

ลักษณะสมบัติของ *Novosphingobium* sp. PCY ที่คัดแยกใหม่เพื่อพัฒนาเป็นแบคทีเรียอัดเม็ด  
สำหรับบำบัดดินปนเปื้อนไพรีน

นางสาววัลย์วสันต์ ว่องวงศ์ศรี

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
CHULALONGKORN UNIVERSITY

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต

สาขาวิชาจุลชีววิทยา ภาควิชาจุลชีววิทยา

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)  
ปีการศึกษา 2556

เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตที่ส่งมาขึ้นทะเบียนที่สำนักงานบัณฑิตวิทยาลัย  
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

The abstract and full text of theses from the academic year 2011 in Chulalongkorn University Intellectual Repository (CUIR)  
are the thesis authors' files submitted through the University Graduate School.

CHARACTERIZATION OF A NEWLY ISOLATED *Novosphingobium* sp. PCY FOR  
DEVELOPING AS GRANULAR BACTERIA FOR PYRENE-CONTAMINATED SOIL  
TREATMENT

Miss Wanwasan Wongwongsee



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
CHULALONGKORN UNIVERSITY

A Dissertation Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements  
for the Degree of Doctor of Philosophy Program in Microbiology  
Department of Microbiology  
Faculty of Science  
Chulalongkorn University  
Academic Year 2013  
Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์

ลักษณะสมบัติของ *Novosphingobium* sp. PCY ที่คัด  
แยกใหม่เพื่อพัฒนาเป็นแบคทีเรียอัดเม็ดสำหรับบำบัดดิน  
ปนเปื้อนไพรีน

โดย

นางสาววัลย์วสันต์ ว่องวงศ์ศรี

สาขาวิชา

จุลชีววิทยา

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อรุณทัย ภิญญาคง

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้หัวข้อวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่ง  
ของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาตรีบัณฑิต

.....คณบดีคณะวิทยาศาสตร์

(ศาสตราจารย์ ดร. สุพจน์ หารหนองบัว)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร. สุเทพ ธานีวัน)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อรุณทัย ภิญญาคง)

.....กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. กอบชัย ภัทรกุลวณิช)

.....กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. เอกวิทย์ ลือพร้อมชัย)

.....กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย

(รองศาสตราจารย์ ดร. กาญจนา จันทองจีน)

.....กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย

(รองศาสตราจารย์ ดร. เบญจภรณ์ ประภักดิ์)

วัลย์วสันต์ ว่องวงศ์ศรี : ลักษณะสมบัติของ *Novosphingobium* sp. PCY ที่คัดแยกใหม่เพื่อพัฒนาเป็นแบคทีเรียอัดเม็ดสำหรับบำบัดดินปนเปื้อนไพรีน. (CHARACTERIZATION OF A NEWLY ISOLATED *Novosphingobium* sp. PCY FOR DEVELOPING AS GRANULAR BACTERIA FOR PYRENE-CONTAMINATED SOIL TREATMENT) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อรุณทัย ภิญญาคง , 231 หน้า.

การพัฒนาแบคทีเรียพร้อมใช้ที่มีประสิทธิภาพ เก็บรักษาได้นาน ขนส่งสะดวก มีความสำคัญต่อการบำบัดสิ่งแวดล้อมโดยวิธีทางชีวภาพ โดยแบคทีเรียพร้อมใช้รูปแบบอัดเม็ดมีสมบัติที่ดีข้างต้น และเหมาะสมสำหรับการบำบัดดินปนเปื้อน เนื่องจากมีวัสดุยึดเกาะที่มีสมบัติดูดซับสารปนเปื้อนต่างๆทำให้แบคทีเรียสามารถสัมผัสกับสารปนเปื้อนได้ดียิ่งขึ้น และมีสมบัติเพิ่มรุกรานในดินทำให้อากาศสามารถถ่ายเทลงไปในดิน ส่งผลดีต่อกิจกรรมการย่อยสลายสารมลพิษโดยใช้ออกซิเจนของแบคทีเรีย งานวิจัยนี้จุดประสงค์เพื่อพัฒนาแบคทีเรียอัดเม็ดสำหรับบำบัดดินปนเปื้อนพอลิไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน (PAHs) โดยเริ่มจากการค้นหาแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพจากสิ่งแวดล้อมและศึกษาลักษณะสมบัติที่เกี่ยวข้องกับประสิทธิภาพการย่อยสลาย PAHs และสมบัติที่จะนำไปสู่การพัฒนาเป็นแบคทีเรียอัดเม็ด โดยสามารถคัดแยกแบคทีเรียย่อยสลาย PAHs กลุ่ม Proteobacteria และ Actinobacteria จากดินตะกอนป่าชายเลน ซึ่งเป็นแหล่งสิ่งแวดล้อมที่มีความหลากหลายและความแปลกใหม่ของแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพทั้งการย่อยสลาย PAHs และการผลิตสารลดแรงตึงผิว ในบรรดาแบคทีเรียที่คัดแยกได้นั้น *Novosphingobium* sp. PCY เป็นสายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพสูงในการย่อยสลาย PAHs ขนาด 3-4 วงอะโรมาติก โดยเฉพาะอย่างยิ่งไพรีนและพีแนนทริน และยังย่อยสลายอัลเคนขนาดกลางได้ และมีแนวโน้มการผลิตสารลดแรงตึงผิว อีกทั้งยังมียีนประมวลรหัสบนเมกะพลาสมิดที่ตอบสนองต่อการย่อยสลายไพรีนของสายพันธุ์ PCY คือ ยีนไพรีนไดออกซิจีเนส (*nidA*) ซึ่งเป็นที่ทราบอย่างกว้างขวางว่ามักพบในแบคทีเรียจีนัส *Mycobacterium* ที่ย่อยสลายไพรีน แต่ยังไม่มียีนการพบในแบคทีเรียย่อยสลาย PAHs กลุ่ม Sphingomonads มาก่อน นอกจากนี้ยังพบยีนอัลเคนโมโนออกซิจีเนส (*alkB*) ที่มีความจำเพาะต่ออัลเคนขนาดกลางของแบคทีเรียจีนัส *Mycobacterium* ในสายพันธุ์ PCY เช่นกัน ซึ่งบ่งชี้ถึงแนวโน้มการปรับตัวของสายพันธุ์ PCY ในสิ่งแวดล้อมให้สามารถย่อยสลายสารพิษได้อย่างมีประสิทธิภาพ จากลักษณะสมบัติข้างต้นและการไม่เป็นเชื้อก่อโรคของสายพันธุ์ PCY ทำให้สายพันธุ์ดังกล่าวมีความน่าสนใจในการพัฒนาต่อเป็นหัวเชื้อพร้อมใช้ แบคทีเรียอัดเม็ดของสายพันธุ์ PCY ด้วยซังข้าวโพดเป็นวัสดุยึดเกาะและซูโครสเป็นสารปกป้องเซลล์ มีอายุเก็บรักษานาน นอกจากนี้ยังช่วยส่งเสริมการกำจัดไพรีนในดินโดยอาศัยการย่อยสลายไพรีนของสายพันธุ์ PCY ร่วมกับคุณสมบัติต่างๆของซังข้าวโพด ได้แก่ การดูดซับ การเพิ่มรุกรานของดิน รวมถึงการกระตุ้นจุลินทรีย์ท้องถิ่นที่มีความสามารถในการย่อยสลายไพรีนให้เพิ่มจำนวนขึ้นด้วย

ภาควิชา จุลชีววิทยา

ลายมือชื่อนิสิต .....

สาขาวิชา จุลชีววิทยา

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก .....

ปีการศึกษา 2556

# # 5273849123 : MAJOR MICROBIOLOGY

KEYWORDS: POLYCYCLIC AROMATIC HYDROCARBONS / GRANULAR BACTERIA /  
BIOREMEDIATION / MANGROVE

WANWASAN WONGWONGSEE: CHARACTERIZATION OF A NEWLY ISOLATED *Novosphingobium* sp. PCY FOR DEVELOPING AS GRANULAR BACTERIA FOR PYRENE-CONTAMINATED SOIL TREATMENT. ADVISOR: ASST. PROF. ONRUTHAI PINYAKONG, 231 pp.

Development of ready-to-use inoculum, which is high potential, long-term storage, and expedient transportation, is important for bioremediation. Granular bacteria has above possession and is suitable for applying in contaminated soil treatment owing to the carrier material's properties such as adsorption of contaminants, increasing the contaminants bioavailability, and increment of soil porosity, increasing the air in soil and enhancing the contaminant degradation activity by aerobic bacteria. This study aimed to develop granular bacteria for PAHs-contaminated soil treatment, which was started with the finding of effective bacterium from the environment and then the characterization of its toxic degradation performances and other properties leading to the granular bacterial development. PAHs-degrading bacteria belonging to Proteobacteria and Actinobacteria were isolated from mangrove sediment, an environmental source of the diversity and novelty of bacteria capable of both degrading PAHs and producing biosurfactants. Among them, *Novosphingobium* sp. PCY has high versatility to degrade 3-4 rings PAHs, especially pyrene and phenanthrene, and medium-chain alkane and also has feasible ability to produce biosurfactants. Furthermore, megaplasmid-encoded gene responsible for pyrene degradation in strain PCY was pyrene dioxygenase gene (*nidA*), which is well-known exist in pyrene-degrading *Mycobacterium* in contrast to its absence in PAHs-degrading Sphingomonads. In addition, alkane monooxygenase (*alkB*) of *Mycobacterium*, which has substrate specificity to medium-chain alkanes, was also found in strain PCY, indicating the adaptation tendency of strain PCY to effectively degrade contaminants in the environment. Due to its characteristics and non-pathogenicity, strain PCY could moreover be the candidate for the development of ready-to-use inoculum. Granular bacteria of strain PCY using corncob as carrier material and sucrose as protective agent makes this inoculum suitable for prolonged storage. Furthermore, this inoculum could enhance the pyrene removal from soil by the pyrene degradation ability of strain PCY and the properties, including PAHs adsorption, soil porosity increment, and PAHs-degrading indigenous microorganisms activation, of corncob.

Department: Microbiology

Student's Signature .....

Field of Study: Microbiology

Advisor's Signature .....

Academic Year: 2013

## กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อรุณทัย ภิญญาคง อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่กรุณาถ่ายทอดความรู้ ให้คำปรึกษา คำแนะนำ และข้อคิดเห็นที่เป็นประโยชน์ จนทำให้งานวิจัยนี้สำเร็จได้ด้วยดี รวมทั้งช่วยตรวจทาน แก้ไขวิทยานิพนธ์ให้ถูกต้องครบถ้วนสมบูรณ์ นอกจากนี้ ยังกรุณาให้โอกาส สนับสนุนและส่งเสริม ตลอดจนเป็นแรงบันดาลใจให้ข้าพเจ้ามีประสบการณ์ที่ดีตลอดมา ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้

ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. สุเทพ ธานีวัน ที่กรุณารับเป็นประธานขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.ไพเราะ ปิ่นพานิชการ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.กอบชัย ภัทรกุลวณิช ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เอกวิทย์ ลือพร้อมชัย รองศาสตราจารย์ ดร.กาญจนา จันทองจัน รองศาสตราจารย์ ดร.เบญจภรณ์ ประภักดี ในความกรุณารับเป็นคณะกรรมการในการสอบวิทยานิพนธ์ รวมทั้งให้คำปรึกษาและคำแนะนำ ตลอดจนปรับปรุงวิทยานิพนธ์ฉบับนี้จนสมบูรณ์

ขอขอบคุณศาสตราจารย์ Hideaki Nojiri ที่กรุณาถ่ายทอดความรู้ ให้คำปรึกษา คำแนะนำ และข้อคิดเห็นที่เป็นประโยชน์ รวมถึงกรุณามอบโอกาสให้ข้าพเจ้าไปทำวิจัย ณ Biotechnology Research Center, The University of Tokyo ประเทศญี่ปุ่น เพื่อทำให้งานวิจัยนี้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณคณาจารย์และเจ้าหน้าที่ในภาควิชาจุลชีววิทยาทุกท่าน ในความกรุณาอำนวยความสะดวกและเป็นกำลังใจในการทำงานวิจัยนี้

ขอขอบคุณผู้สนับสนุนและส่งเสริมการทำวิจัยครั้งนี้ ได้แก่ หน่วยปฏิบัติการวิจัยการบำบัดมลพิษทางสิ่งแวดล้อมโดยชีววิธี ภาควิชาจุลชีววิทยา ทุนจากคณะวิทยาศาสตร์ และทุนอุดหนุนวิทยานิพนธ์สำหรับนิสิต ครั้งที่ 1 ภาคการศึกษาต้น ปีการศึกษา 2555 ปีงบประมาณ 2556 สำหรับอุปกรณ์และเครื่องมือวิจัย ทุนสนับสนุนการไปเสนอผลงานวิชาการในต่างประเทศ และ ทุนสนับสนุนนิสิตระดับปริญญาเอกและโทไปทำวิจัยในต่างประเทศ (G-RSAB) สำหรับโอกาสในการเสนอผลงานและการทำวิจัยระยะสั้นในต่างประเทศ

ขอขอบคุณพี่ๆ เพื่อนๆ น้องๆ ภาควิชาจุลชีววิทยา โดยเฉพาะอย่างยิ่งห้อง 1704/15 (ห้อง 406) 1704/14 และ 1704/13 สำหรับคำปรึกษา ความช่วยเหลือ และกำลังใจตลอดการทำงานวิจัย รวมถึงพี่ๆ เพื่อนๆ น้องๆ ที่ Biotechnology Research Center โดยเฉพาะอย่างยิ่ง ดร. Yurika Takahashi, ดร. Yee Lii Mien, ดร. Chiho Suzuki, Suguru Noto, Ryusuke Hirotsu, Kosuke Yanagida, Kohei Kawazuma, Aya Kubo, Daisuke Sugiyama, Haruka Tachi และ Kaoru Fujiwara และดร. Yamazoe Atsushi จาก National Institute of Technology and Evaluation (NITE) สำหรับคำปรึกษาและความช่วยเหลือในด้านการทำวิจัยและการดำรงชีวิตในประเทศญี่ปุ่น

สุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณ นายโสภณและนางสมใจ ว่องวงศ์ศรี ผู้เป็นบิดามารดา ครอบครัวว่องวงศ์ศรี ครอบครัวเอกปัญญากุล และนายภูธร สิทธิเดชพร ที่ให้การสนับสนุน ความช่วยเหลือ และเป็นกำลังใจสำคัญแก่ผู้วิจัย ทำให้งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

## สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ญ
สารบัญรูป.....	ฐ
บทที่ 1 .....	1
บทนำ.....	1
บทที่ 2 .....	3
พิธีศน์วาระกรรม.....	3
2.1 พอลิไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน.....	3
2.1.1 ชนิดและโครงสร้างของ PAHs .....	3
2.1.2 ลักษณะและสมบัติของ PAHs .....	5
2.1.3 แหล่งที่มาของ PAHs.....	7
2.1.4 การแพร่กระจายของ PAHs สู่สิ่งแวดล้อม .....	8
2.2 การบำบัดดินปนเปื้อนพอลิไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนโดยชีววิธี .....	10
2.2.1 การบำบัดดินโดยชีววิธี .....	10
2.2.2 ปัจจัยที่มีผลต่อการบำบัดดินโดยชีววิธี.....	15
2.2.3 เทคนิคชีววิทยาโมเลกุลในการตรวจติดตามการบำบัด .....	24
2.3 แบคทีเรียย่อยสลายพอลิไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน .....	28
2.3.1 แบคทีเรียแกรมลบ <i>Pseudomonas</i> .....	35
2.3.2 แบคทีเรียแกรมลบกลุ่ม Sphingomonads.....	39
2.3.3 แบคทีเรียแกรมบวก <i>Mycobacterium</i> .....	46
2.4 หัวเชื้อพร้อมใช้รูปแบบแบคทีเรียอัดเม็ด.....	54
2.5 ป้ายขายเลน .....	58
บทที่ 3 .....	63
วิธีดำเนินงานวิจัย .....	63

3.1	คัดแยกและจำแนกแบคทีเรียย่อยสลาย PAHs .....	70
3.2	ศึกษาสภาวะการเจริญของแบคทีเรียที่คัดแยกได้.....	76
3.3	ศึกษาประสิทธิภาพการย่อยสลาย PAHs และยีนไดออกซิจีเนสของแบคทีเรียที่คัดแยกได้... 77	
3.4	ศึกษาแนวโน้มการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพของแบคทีเรียที่คัดแยกได้ .....	79
3.5	ศึกษาคุณสมบัติเบื้องต้นของ <i>Novosphingobium</i> sp. PCY.....	80
3.6	พัฒนาแบคทีเรียพร้อมใช้รูปแบบอัดเม็ดจาก <i>Novosphingobium</i> sp. PCY .....	93
3.7	ประยุกต์ใช้แบคทีเรียอัดเม็ดในการบำบัดดินปนเปื้อนไพรีน.....	96
บทที่ 4	.....	102
	ความสามารถและยีนที่เกี่ยวข้องในการย่อยสลาย PAHs และการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพของ แบคทีเรียจากดินตะกอนป่าชายเลน .....	102
4.1	แบคทีเรียย่อยสลาย PAHs ที่คัดแยกจากดินตะกอนป่าชายเลน .....	102
4.2	สภาวะการเจริญของแบคทีเรียที่คัดแยกได้.....	107
4.3	ประสิทธิภาพการย่อยสลาย PAHs ของแบคทีเรียที่คัดแยกได้ .....	108
4.4	ยีนประมวลรหัสหน่วยย่อยแอลฟาของไดออกซิจีเนสของแบคทีเรียที่คัดแยกได้.....	111
4.5	แนวโน้มการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพของแบคทีเรียที่คัดแยกได้ .....	114
4.6	ยีนที่เกี่ยวข้องกับการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพของแบคทีเรียที่คัดแยกได้ .....	117
บทที่ 5	.....	120
	ลักษณะสมบัติเบื้องต้นสำหรับการพัฒนาเป็นหัวเชื้อพร้อมใช้ของ <i>Novosphingobium</i> sp. สายพันธุ์ PCY.....	120
5.1	รูปแบบการเจริญและการย่อยสลายพีแนมทรีนและไพรีน .....	120
5.2	ยีนประมวลรหัสไดออกซิจีเนสอื่นๆ .....	123
5.3	ตำแหน่งของยีน <i>nidA</i> และขนาดของพลาสมิด.....	126
5.4	การหายไปของเมกะพลาสมิดต่อประสิทธิภาพการย่อยสลายไพรีน.....	129
5.5	บทบาทของยีน <i>nidA</i> ในการย่อยสลายไพรีน.....	133
5.6	ประสิทธิภาพการย่อยสลายสารผสมของไพรีนและอะลิฟาติก .....	134
5.7	ยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายอะลิฟาติก.....	136
5.8	การไม่เป็นเชื้อก่อโรค.....	139
บทที่ 6	.....	142



แบคทีเรียพร้อมใช้รูปแบบอัดเม็ดของ <i>Novosphingobium</i> sp. สายพันธุ์ PCY และการประยุกต์ใช้ บำบัดดินปนเปื้อนไพรีน.....	142
6.1 วัสดุที่ใช้เป็นองค์ประกอบในการผลิตแบคทีเรียอัดเม็ด .....	142
6.2 ประสิทธิภาพการกำจัดไพรีนในอาหารเหลวของแบคทีเรียอัดเม็ด.....	143
6.3 สารปกป้องเซลล์ที่ใช้ในการผลิตแบคทีเรียอัดเม็ด.....	146
6.4 การเก็บรักษาแบคทีเรียอัดเม็ดในระยะยาว .....	148
6.5 การบำบัดดินปนเปื้อนไพรีนของแบคทีเรียอัดเม็ด.....	151
6.6 ต้นทุนการผลิตแบคทีเรียอัดเม็ด .....	159
บทที่ 7 .....	161
บทสรุปและข้อเสนอแนะ.....	161
รายการอ้างอิง .....	165
ภาคผนวก.....	198
ภาคผนวก ก สูตรและวิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ.....	199
ภาคผนวก ข สูตรและวิธีการเตรียมสารเคมี.....	201
ภาคผนวก ค ข้อมูลดิบต่างๆในการทดลองของแบคทีเรียที่คัดแยกได้.....	210
ภาคผนวก ง ข้อมูลดิบต่างๆในการทดลองของแบคทีเรียอัดเม็ด.....	216
ภาคผนวก จ รูปภาพเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส.....	225
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์ .....	231

## สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 2.1 สมบัติต่างๆของ PAHs.....	6
ตารางที่ 2.2 ดัชนีที่ใช้ในการวิเคราะห์แหล่งที่มาของ PAHs.....	7
ตารางที่ 2.3 การประเมินค่าใช้จ่ายของการบำบัดดินแต่ละวิธี.....	11
ตารางที่ 2.4 ปัจจัยสำคัญที่ส่งผลกระทบต่อประสิทธิภาพการบำบัดดินปนเปื้อน PAHs โดยชีววิธี..	16
ตารางที่ 2.5 ตัวอย่างสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากจุลินทรีย์สำหรับการบำบัดสิ่งแวดล้อมโดยชีววิธี	20
ตารางที่ 2.6 ค่าที่เหมาะสมของปัจจัยต่างๆต่อการย่อยสลาย PAHs ในดิน .....	24
ตารางที่ 2.7 ตัวอย่างแบคทีเรียย่อยสลาย PAHs ชนิดต่างๆในรายงานวิจัยก่อนหน้า .....	28
ตารางที่ 2.8 โครงสร้างองค์ประกอบของระบบเอนไซม์ไดออกซิจีเนส .....	34
ตารางที่ 2.9 เอนไซม์ที่ประมวลรหัสโดยยีน <i>nah</i> .....	36
ตารางที่ 2.10 ความสามารถและยีนที่เกี่ยวข้องในการย่อยสลาย PAHs ของ <i>Pseudomonas</i> spp. .....	38
ตารางที่ 2.11 ยีนและเอนไซม์ไดออกซิจีเนสที่พบใน Sphingomonads.....	41
ตารางที่ 2.12 ความสามารถและยีนที่เกี่ยวข้องในการย่อยสลาย PAHs ของ Sphingomonads...	42
ตารางที่ 2.13 เอนไซม์ประมวลรหัสไดออกซิจีเนสโดยยีนที่พบใน <i>M. vanbaalenii</i> PYR-1 .....	48
ตารางที่ 2.14 ความสามารถและยีนที่เกี่ยวข้องในการย่อยสลาย PAHs ของ <i>Mycobacterium</i> spp. .....	53
ตารางที่ 2.15 การกำจัดสารพิษอื่นๆในสิ่งแวดล้อมด้วยแบคทีเรียรูปแบบยัดเกาะกับวัสดุ.....	57
ตารางที่ 2.16 ตัวอย่างแบคทีเรียย่อยสลาย PAHs ที่คัดแยกจากดินตะกอนป่าชายเลน.....	61
ตารางที่ 3.1 ไพร์เมอร์ที่ใช้ในงานวิจัย.....	68
ตารางที่ 3.2 องค์ประกอบของสารในปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (ปริมาตรสุดท้าย 30 ไมโครลิตร)	73
ตารางที่ 3.3 ระบบนิเวศจำลองดินสำหรับการบำบัดดินปนเปื้อนไพรีนด้วยแบคทีเรียอัดเม็ด.....	97
ตารางที่ 3.4 องค์ประกอบของพอลิอะคริลาไมด์เจลที่มี denaturant 50-80 เปอร์เซ็นต์.....	99
ตารางที่ 4.1 การเปลี่ยนแปลงสีของอาหารเหลว CFMM ที่มี PAH ชนิดต่างๆ ในการเพิ่มจำนวน แบคทีเรียย่อยสลาย PAHs จากดินตะกอนป่าชายเลน.....	104
ตารางที่ 4.2 แบคทีเรียย่อยสลาย PAHs ที่คัดแยกได้จากดินตะกอนป่าชายเลนที่ใช้ในงานวิจัยนี้.	105
ตารางที่ 4.3 การเจริญของแบคทีเรียที่คัดแยกได้ในสภาวะแปรผันอุณหภูมิ ความเป็นกรด-ด่าง และ ปริมาณโซเดียมคลอไรด์.....	107
ตารางที่ 4.4 ยีนประมวลรหัสหน่วยย่อยแอลฟาของไดออกซิจีเนสของแบคทีเรียที่คัดแยกได้ .....	112

ตารางที่ 4.5 ความเหมือนของผลิตภัณฑ์ PCR ด้วยไพรเมอร์ RHD $\alpha$ -GP ของแบคทีเรียที่คัดแยกได้ กับฐานข้อมูล.....	113
ตารางที่ 4.6 ค่าแรงดึงผิวและความไม่ชอบน้ำของแบคทีเรียที่คัดแยกได้ .....	114
ตารางที่ 4.7 ยีนผลิตสารลดแรงตึงผิวกลุ่มลิพอเปปไทด์ของแบคทีเรียที่คัดแยกได้ .....	117
ตารางที่ 4.8 ความเหมือนของผลิตภัณฑ์ PCR ด้วยไพรเมอร์ Ap1-F, Tp1-R ของ <i>Novosphingobium</i> sp. PCY (แถบ A-C).....	118
ตารางที่ 5.1 ประสิทธิภาพการย่อยสลายพีแนนทรินและไพรีนของแบคทีเรีย Sphingomonads	121
ตารางที่ 5.2 การเปรียบเทียบรูปแบบการเจริญระหว่างการย่อยสลายพีแนนทรินของแบคทีเรีย Sphingomonads.....	122
ตารางที่ 5.3 ยีนประมวลรหัสระบบเอนไซม์ไดออกซิจีเนสของ <i>Novosphingobium</i> sp. PCY เปรียบเทียบกับแบคทีเรียอื่นๆในกลุ่ม Sphingomonads .....	124
ตารางที่ 5.4 ขนาดจีโนมของแบคทีเรียจีโนส <i>Novosphingobium</i> ที่มีความสามารถในการย่อยสลาย PAHs.....	129
ตารางที่ 5.5 เปอร์เซ็นต์พลาสติกที่หายไปของ <i>Novosphingobium</i> sp. สายพันธุ์ต่างๆ .....	131
ตารางที่ 5.6 ประสิทธิภาพการย่อยสลายอะลิฟาติกและไพรีนของ <i>Novosphingobium</i> sp. PCY .....	135
ตารางที่ 5.7 ประสิทธิภาพการย่อยสลายเตตระเดคเคนและเฮกซะเดคเคนของแบคทีเรียในรายงาน วิจัยก่อนหน้า.....	137
ตารางที่ 5.8 ยีนประมวลรหัสเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายอัลเคนของ <i>Novosphingobium</i> sp. PCY .....	138
ตารางที่ 5.9 ความเหมือนของผลิตภัณฑ์ PCR ด้วยไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน <i>alkB1</i> ของ <i>Novosphingobium</i> sp. PCY กับฐานข้อมูล.....	141
ตารางที่ 6.1 การเปรียบเทียบระยะเวลาการเก็บรักษาของหัวเชื้อแบคทีเรียรูปแบบยัดเกาะบนซึ่ง ข้าวโพดต่างๆ .....	151
ตารางที่ 6.2 ความเหมือนของผลิตภัณฑ์ PCR จากภาพ DGGE เมื่อใช้ RNA เป็นแม่แบบและไพร เมอร์ที่จำเพาะต่อยีน 16S rDNA ของแบคทีเรียกับฐานข้อมูล.....	156
ตารางที่ 6.3 ต้นทุนการผลิตแบคทีเรียอัดเม็ดในระดับห้องปฏิบัติการ .....	159
ตารางที่ 6.4 ราคาจำหน่ายของผลิตภัณฑ์หัวเชื้อพร้อมใช้ต่างๆสำหรับการบำบัดสารปนเปื้อน.....	160
ตารางที่ ค-1 ข้อมูลดิบของประสิทธิภาพการย่อยสลาย PAHs ชนิดต่างๆของแบคทีเรียที่คัดแยกได้ วิเคราะห์โดย HPLC .....	210

ตารางที่ ค-2 ข้อมูลดิบของรูปแบบการเจริญและการย่อยสลายพีแนนนทรีนของสายพันธุ์ PCY วิเคราะห์โดย HPLC .....	210
ตารางที่ ค-3 ข้อมูลดิบของรูปแบบการเจริญและการย่อยสลายไพรีนของสายพันธุ์ PCY วิเคราะห์ โดย HPLC.....	211
ตารางที่ ค-4 การคำนวณการนำกลับของสารจากอาหารเหลว วิเคราะห์โดย GC-FID.....	212
ตารางที่ ง-1 ข้อมูลดิบของจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดในแบคทีเรียอัดเม็ดสายพันธุ์ PCY.....	216
ตารางที่ ง-2 ข้อมูลดิบปริมาณไพรีนที่เหลืออยู่ในการกำจัดไพรีนของแบคทีเรียอัดเม็ดสายพันธุ์ PCY วิเคราะห์โดย GC-FID.....	216
ตารางที่ ง-3 ข้อมูลดิบของจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดและจำนวนแบคทีเรียย่อยสลายไพรีนใน แบคทีเรียอัดเม็ดสายพันธุ์ PCY ที่ผลิตโดยแปรผันชนิดของสารปกป้องเซลล์.....	216
ตารางที่ ง-4 ข้อมูลดิบของจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดและการกำจัดไพรีนของแบคทีเรียอัดเม็ดสาย พันธุ์ PCY ระหว่างการเก็บรักษาระยะสั้น (ไม่เติมสารปกป้องเซลล์).....	218
ตารางที่ ง-5 ข้อมูลดิบของจำนวนแบคทีเรียและการกำจัดไพรีนของแบคทีเรียอัดเม็ดสายพันธุ์ PCY ระหว่างการเก็บรักษาระยะยาว (เติมสารปกป้องเซลล์).....	218
ตารางที่ ง-6 การคำนวณการนำกลับของไพรีนจากดิน วิเคราะห์โดย GC-FID .....	220
ตารางที่ ง-7 ข้อมูลดิบปริมาณไพรีนที่เหลืออยู่ในการบำบัดดินปนเปื้อนไพรีนด้วยแบคทีเรียอัดเม็ด สายพันธุ์ PCY วิเคราะห์โดย GC-FID.....	222
ตารางที่ ง-8 ข้อมูลดิบของจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดและแบคทีเรียย่อยสลายไพรีนในการบำบัดดิน ปนเปื้อนไพรีนด้วยแบคทีเรียอัดเม็ดสายพันธุ์ PCY วิเคราะห์โดย MPN.....	223
ตารางที่ ง-9 ข้อมูลดิบของจำนวนยีน 16S rDNA และ <i>nidA</i> ในการบำบัดดินปนเปื้อนไพรีนด้วย แบคทีเรียอัดเม็ดสายพันธุ์ PCY วิเคราะห์โดย real-time PCR.....	223

## สารบัญรูป

	หน้า
รูปที่ 2.1 โครงสร้างของ PAHs 16 ชนิดในรายชื่อสารมลพิษที่สำคัญของ USEPA.....	4
รูปที่ 2.2 โครงสร้างของเบนโซ[เอ]ไพรีน เบนโซ[เจ]ฟลูออแรนทีน และโคโรนีน .....	4
รูปที่ 2.3 ภาพรวมของปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการบำบัดดินปนเปื้อน PAHs โดยชีววิธี .....	16
รูปที่ 2.4 คุณสมบัติทางกายภาพของสารลดแรงตึงผิวที่ส่งเสริมการละลายของ PAHs .....	18
รูปที่ 2.5 กลไกการส่งเสริมการย่อยสลาย PAHs ของสารลดแรงตึงผิว .....	18
รูปที่ 2.6 การกระจายเชิงพื้นที่ของปริมาณ PAHs (a) ความหลากหลายและการกระจายตัวของ จุลินทรีย์ (b และ c) และยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลาย PAHs (d-f) ของดินปนเปื้อนครีโอลิต.....	22
รูปที่ 2.7 เทคนิคชีววิทยาโมเลกุลที่ใช้ในการตรวจติดตามการบำบัดสิ่งแวดล้อม.....	25
รูปที่ 2.8 การแสดงออกของยีน 16S rRNA และ <i>nidA3B3</i> ของ <i>Mycobacterium vanbaalenii</i> Pyr-1 เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ .....	26
รูปที่ 2.9 วิธีการย่อยสลาย PAHs แบบใช้ (A) และไม่ใช้อากาศ (B) ของแบคทีเรีย .....	30
รูปที่ 2.10 ระบบเอนไซม์ไดออกซิจีเนส.....	32
รูปที่ 2.11 ความสัมพันธ์ของลำดับกรดอะมิโนบริเวณหน่วยย่อยแอลฟาของยีนประมวลรหัสเอนไซม์ ไดออกซิจีเนสในแบคทีเรียย่อยสลาย PAHs ชนิดต่างๆ.....	33
รูปที่ 2.12 ความสัมพันธ์ของโครงสร้างองค์ประกอบทั้งหมดของระบบเอนไซม์ไดออกซิจีเนส .....	34
รูปที่ 2.13 ยีน <i>nah</i> บนพลาสมิด NAH7 ของ <i>P. putida</i> G7 .....	37
รูปที่ 2.14 การจัดเรียงตัวของยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลาย PAHs บนพลาสมิด pNL1 ของ <i>N.</i> <i>aromaticivorans</i> F199 .....	40
รูปที่ 2.15 ความสัมพันธ์ระหว่างลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน Rep บนพลาสมิดขนาดต่างๆที่พบใน Sphingomonads.....	45
รูปที่ 2.16 ความสัมพันธ์ระหว่างลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน RepA ParA และ ParB บนพลาสมิด ขนาดต่างๆที่พบใน Sphingomonads.....	45
รูปที่ 2.17 การจัดลำดับของยีน <i>repA parA</i> และ <i>parB</i> บนพลาสมิดขนาดต่างๆที่พบใน Sphingomonads.....	45
รูปที่ 2.18 กระบวนการหลักของการย่อยสลาย PAHs ของ <i>M. vanbaalenii</i> Pyr-1 .....	47
รูปที่ 2.19 แผนที่ความร้อนแสดง A.) โปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลาย PAHs และ B.) โปรตีน ทั้งหมดที่แสดงออกในการย่อยสลาย PAHs ชนิดต่างๆของ <i>M. vanbaalenii</i> Pyr-1 .....	49
รูปที่ 2.20 ตำแหน่งการแตกวงของสารประกอบอะโรมาติกด้วยยีน <i>nidA</i> และ <i>nidA3</i> .....	50

รูปที่ 2.21 การจัดเรียงตัวของยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลาย PAHs ของ <i>M. vanbaalenii</i> PYR-1 .....	51
รูปที่ 2.22 การเปรียบเทียบยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลาย PAHs ที่ประมวลรหัสมาจากโครโมโซม และพลาสมิดของ <i>Mycobacterium</i> spp. 5 สายพันธุ์ .....	52
รูปที่ 2.23 การตรึงแบคทีเรียแบบต่างๆ .....	54
รูปที่ 2.24 แบคทีเรียอัดเม็ด <i>Bacillus</i> sp. Mk-8 .....	56
รูปที่ 2.25 การแพร่กระจายของป่าชายเลน .....	59
รูปที่ 2.26 ชนิดของแบคทีเรียที่พบในดินตะกอนป่าชายเลนในพื้นที่เขตสงวน .....	60
รูปที่ 3.1 เครื่องอัดเม็ด .....	93
รูปที่ 3.2 วัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรที่นำมาทดสอบการผลิตแบคทีเรียอัดเม็ด .....	94
รูปที่ 4.1 แผนที่บริเวณเก็บตัวอย่างดินตะกอนป่าชายเลน อ่าวไทย ประเทศไทย .....	102
รูปที่ 4.2 การแบ่งชนิดของแบคทีเรียที่คัดแยกได้ตามฟิล์มและชั้น อันดัม วงศ์ และจีโนม .....	106
รูปที่ 4.3 ประสิทธิภาพการย่อยสลาย PAHs ของแบคทีเรียที่คัดแยกได้ .....	109
รูปที่ 4.4 ไกลโคสฟิงโกลิพิดที่พบในแบคทีเรียกลุ่ม Sphingomonads .....	116
รูปที่ 4.5 ผลิตภัณฑ์ PCR ด้วยไพรเมอร์ Ap1-F, Tp1-R ของแบคทีเรียที่คัดแยกได้ทั้ง 5 สายพันธุ์ พร้อมแสดงชั้นผลิตภัณฑ์ที่วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ .....	117
รูปที่ 5.1 รูปแบบการเจริญระหว่าง การย่อยสลายพีแนนทรีน (a) และไพรีน (b) ของ <i>Novosphingobium</i> sp. PCY .....	120
รูปที่ 5.2 รูปแบบการเจริญระหว่าง การย่อยสลายพีแนนทรีนของแบคทีเรีย Sphingomonads สายพันธุ์อื่นๆ .....	122
รูปที่ 5.3 แผนภูมิความสัมพันธ์ของ NidA (a), NidB (b), BphA3 (c), BphA4 (d) และ BphC (e) ของ <i>Novosphingobium</i> sp. PCY และโปรตีนที่เกี่ยวข้อง .....	124
รูปที่ 5.4 อิเล็กโทรโฟรีซิสของ DNA ของ <i>Novosphingobium</i> sp. PCY เปรียบเทียบกับของ <i>Pseudoxanthomonas</i> sp. RN402 .....	126
รูปที่ 5.5 การตรวจสอบตำแหน่งของยีน <i>nidA</i> ที่พบใน <i>Novosphingobium</i> sp. PCY ด้วยวิธี PCR .....	126
รูปที่ 5.6 การตรวจสอบขนาดของพลาสมิดที่พบใน <i>Novosphingobium</i> sp. PCY ด้วยวิธี PFGE .....	127
รูปที่ 5.7 การตรวจสอบตำแหน่งของยีน <i>nidA</i> ที่พบใน <i>Novosphingobium</i> sp. PCY ด้วยวิธีเซาท์เทิร์นไฮบริไดเซชัน .....	128
รูปที่ 5.8 การตรวจสอบพลาสมิดของ <i>Novosphingobium</i> sp. PCY และ cPCY10 .....	130

รูปที่ 5.9 การตรวจสอบยีนไดออกซิจีเนสของ <i>Novosphingobium</i> sp. PCY และ cPCY10.....	130
รูปที่ 5.10 ประสิทธิภาพการย่อยสลายไพรีนของ <i>Novosphingobium</i> sp. PCY และ cPCY1 ถึง cPCY10 .....	131
รูปที่ 5.11 การตรวจสอบการแสดงออกของยีน <i>nidA</i> ของ <i>Novosphingobium</i> sp. PCY ด้วยวิธี RT-PCR (a) เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีไพรีนและซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอนเพียงแหล่งเดียว (b).....	133
รูปที่ 5.12 วิธีและยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายอัลเคนของ <i>P. putida</i> GPo1.....	139
รูปที่ 6.1 วัสดุอัดเม็ดที่แปรผันชนิดและปริมาณของวัสดุที่ใช้เป็นองค์ประกอบ .....	143
รูปที่ 6.2 จำนวนแบคทีเรียทั้งหมดในแบคทีเรียอัดเม็ดที่ผลิตได้ .....	144
รูปที่ 6.3 โครงสร้างของซังข้าวโพด .....	144
รูปที่ 6.4 ประสิทธิภาพการกำจัดไพรีนของแบคทีเรียอัดเม็ดที่ผลิตจากซังข้าวโพดอัตราส่วนต่างๆ	145
รูปที่ 6.5 จำนวนแบคทีเรียทั้งหมด (a) และแบคทีเรียย่อยสลายไพรีน (b) ในแบคทีเรียอัดเม็ดที่เติม สารปกป้องเซลล์ชนิดต่างๆ.....	146
รูปที่ 6.6 จำนวนแบคทีเรียทั้งหมดในวัสดุอัดเม็ด (a) และแบคทีเรียอัดเม็ด (b) ระหว่างการเก็บรักษา ระยะยาว .....	149
รูปที่ 6.7 จำนวนแบคทีเรียย่อยสลายไพรีนในวัสดุอัดเม็ด (a) และแบคทีเรียอัดเม็ด (b) ระหว่างการ เก็บรักษา ระยะยาว .....	149
รูปที่ 6.8 ประสิทธิภาพการกำจัดไพรีนในอาหารเหลวของวัสดุอัดเม็ด (a) และแบคทีเรียอัดเม็ด (b) ระหว่างการเก็บรักษา ระยะยาว .....	150
รูปที่ 6.9 ปริมาณไพรีนที่เหลืออยู่ระหว่างการบำบัดดินปนเปื้อนไพรีนด้วยแบคทีเรียอัดเม็ด .....	152
รูปที่ 6.10 จำนวนแบคทีเรียทั้งหมด (a) และจำนวนแบคทีเรียย่อยสลายไพรีน (b) ระหว่างการบำบัด ดินปนเปื้อนไพรีนด้วยแบคทีเรียอัดเม็ด .....	153
รูปที่ 6.11 จำนวนยีน 16S rDNA (a) และ <i>nidA</i> (b) ระหว่างการบำบัดดินปนเปื้อนไพรีนด้วย แบคทีเรียอัดเม็ด.....	154
รูปที่ 6.12 ประชาคมแบคทีเรียระหว่างการบำบัดดินปนเปื้อนไพรีนด้วยแบคทีเรียอัดเม็ด เมื่อใช้ DNA (a) และ RNA (b) ที่สกัดจากดินเป็นแม่แบบ.....	155
รูปที่ 6.13 การส่งเสริมการกำจัดสารพิษในดินของจุลินทรีย์ยึดเกาะบนวัสดุดูดซับ .....	158
รูปที่ ค-1 กราฟมาตรฐานของสารละลายไพรีน (a) เตตระเดเคน (b) และเฮกซะเดเคน (c) วิเคราะห์โดย GC-FID (OIL method).....	211
รูปที่ ค-2 โครมาโทแกรมของการย่อยสลายเตตระเดเคนของสายพันธุ์ PCY วิเคราะห์โดย GC-FID (OIL method) .....	212

รูปที่ ค-3 โครมาโทแกรมของการย่อยสลายเฮกซะเดคเคนของสายพันธุ์ PCY วิเคราะห์โดย GC-FID (OIL method) .....	213
รูปที่ ค-4 โครมาโทแกรมของการย่อยสลายไพรีนของสายพันธุ์ PCY วิเคราะห์โดย GC-FID (OIL method).....	213
รูปที่ ค-5 โครมาโทแกรมของการย่อยสลายสารผสมของไพรีนและเตตระเดคเคนของสายพันธุ์ PCY วิเคราะห์โดย GC-FID (OIL method).....	214
รูปที่ ค-6 โครมาโทแกรมของการย่อยสลายสารผสมของไพรีนและเฮกซะเดคเคนของสายพันธุ์ PCY วิเคราะห์โดย GC-FID (OIL method).....	215
รูปที่ ง-1 กราฟมาตรฐานของสารละลายไพรีนวิเคราะห์โดย GC-FID (PAH method) .....	220
รูปที่ ง-2 โครมาโทแกรมของ PAHs วิเคราะห์โดย GC-FID (PAH method) .....	221
รูปที่ ง-3 โครมาโทแกรมของการบำบัดดินปนเปื้อนไพรีนด้วยแบคทีเรียอัดเม็ดสายพันธุ์ PCY วิเคราะห์โดย GC-FID (PAH method) .....	222
รูปที่ ง-4 กราฟมาตรฐานของยีน 16S rDNA (a) และ <i>nidA</i> (b) วิเคราะห์โดย real-time PCR... 223	
รูปที่ จ-1 ผลิตภัณฑ์ PCR ด้วยไพรเมอร์ RHD $\alpha$ -GN ของแบคทีเรียที่คัดแยกได้ 5 สายพันธุ์.....	225
รูปที่ จ-2 ผลิตภัณฑ์ PCR ด้วยไพรเมอร์ RHD $\alpha$ -GP ของแบคทีเรียที่คัดแยกได้ 5 สายพันธุ์.....	225
รูปที่ จ-3 ผลิตภัณฑ์ PCR ด้วยไพรเมอร์ As1-F, Ts2-R ของแบคทีเรียที่คัดแยกได้ 5 สายพันธุ์....	225
รูปที่ จ-4 ผลิตภัณฑ์ PCR ด้วยไพรเมอร์ Am1-F, Tm1-R ของแบคทีเรียที่คัดแยกได้ 5 สายพันธุ์	226
รูปที่ จ-5 ผลิตภัณฑ์ PCR ด้วยไพรเมอร์ Af2-F, Tf1-R ของแบคทีเรียที่คัดแยกได้ 5 สายพันธุ์.....	226
รูปที่ จ-6 ผลิตภัณฑ์ PCR ด้วยไพรเมอร์ Ap1-F, Tp1-R ของแบคทีเรียที่คัดแยกได้ 5 สายพันธุ์..	226
รูปที่ จ-7 ผลิตภัณฑ์ PCR ด้วยไพรเมอร์ bphA1f-F, bphA1f-R ของ <i>Novosphingobium</i> sp. PCY .....	227
รูปที่ จ-8 ผลิตภัณฑ์ PCR ด้วยไพรเมอร์ bphA3-F, bphA3-R ของ <i>Novosphingobium</i> sp. PCY .....	227
รูปที่ จ-9 ผลิตภัณฑ์ PCR ด้วยไพรเมอร์ bphA4-F, bphA4-R ของ <i>Novosphingobium</i> sp. PCY .....	227
รูปที่ จ-10 ผลิตภัณฑ์ PCR ด้วยไพรเมอร์ bphC-F, bphC-R ของ <i>Novosphingobium</i> sp. PCY .....	227
รูปที่ จ-11 ผลิตภัณฑ์ PCR ด้วยไพรเมอร์ <i>nidA</i> -F, <i>nidA</i> -R ของ <i>Novosphingobium</i> sp. PCY.	228
รูปที่ จ-12 ผลิตภัณฑ์ PCR ด้วยไพรเมอร์ <i>nidB</i> -F, <i>nidB</i> -R ของ <i>Novosphingobium</i> sp. PCY.	228
รูปที่ จ-13 ผลิตภัณฑ์ PCR ด้วยไพรเมอร์ <i>phtAc</i> -F, <i>phtAc</i> -R และ <i>phtAd</i> -F, <i>phtAd</i> -R ของ <i>Novosphingobium</i> sp. PCY .....	228



รูปที่ จ-14 การทดลองแปรผันสภาวะของ PFGE เปรียบเทียบกับขนาด DNA มาตรฐาน .....	229
รูปที่ จ-15 ภาพเซาท์เทิร์นไฮบริดเซชันด้วย 16S rDNA probe ของอิลีคโทรโฟรีซิสแบบธรรมดา .....	229
รูปที่ จ-16 อิลีคโทรโฟรีซิสของ RNA ที่สกัดได้จาก <i>Novosphingobium</i> sp. PCY เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีไพรีนหรือซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอนเพียงแหล่งเดียว .....	229
รูปที่ จ-17 การตรวจสอบการแสดงออกของยีน 16S rRNA (a) และ <i>nidA</i> (b) ของ <i>Novosphingobium</i> sp. PCY ด้วยวิธี RT-PCR เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีไพรีนและซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอนเพียงแหล่งเดียว .....	230
รูปที่ จ-18 ผลิตภัณฑ์ PCR ด้วยไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีนย่อยสลายอัลเคนของ <i>Novosphingobium</i> sp. PCY .....	230



# บทที่ 1

## บทนำ

### ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอน เป็นแหล่งของพลังงานที่สำคัญ เนื่องจากถูกนำมาใช้ใน ชีวิตประจำวันของมนุษย์ในด้านอุปโภคบริโภค คมนาคม เกษตรกรรม และอุตสาหกรรม โดยมี ปริมาณการใช้ปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนเพิ่มขึ้นตามจำนวนประชากรมนุษย์ที่เพิ่มขึ้น อย่างไรก็ตาม การใช้งานปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนนั้น มักปลดปล่อยสารปนเปื้อนสู่สิ่งแวดล้อม อีกทั้งอุบัติเหตุจาก การขนส่งปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนยังเป็นสาเหตุสำคัญที่ก่อให้เกิดการแพร่กระจายของปิโตรเลียม ไฮโดรคาร์บอนสู่สิ่งแวดล้อม (Zhang และคณะ, 2011b) ปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนประกอบด้วย สารอินทรีย์และไฮโดรคาร์บอนที่มีมวลโมเลกุลต่างๆที่มีโครงสร้างเป็นอะลิฟาติกและอะโรมาติก เช่น อัลเคน (Alkanes) และพอลิไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน (Polycyclic aromatic hydrocarbons; PAHs) (Khodadadi และคณะ, 2012) อย่างไรก็ตาม PAHs เป็นองค์ประกอบใน ปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนที่มีความเป็นพิษสูงต่อสิ่งมีชีวิต และมักพบการตกค้างในสิ่งแวดล้อม โดยเฉพาะอย่างยิ่งในดิน เนื่องจากสมบัติการละลายน้ำได้ต่ำ การดูดซับกับอนุภาคสูง และการย่อย สลายได้ยากของ PAHs (Liu และคณะ, 2011b; Zhou และคณะ, 2013b) ทำให้การปนเปื้อน PAHs เป็นสิ่งที่ควรตระหนักและต้องกำจัดออกจากสิ่งแวดล้อมอย่างสมบูรณ์ โดยเฉพาะอย่างยิ่ง PAHs ที่มี มวลโมเลกุลสูง เช่น ฟลูออแรนทีน ไพรีน เบนโซ[เอ]แอนทราซีน ไครซิน เบนโซ[เอ]ไพรีน เป็นต้น

จากความสำคัญที่กล่าวมาข้างต้นในแง่ของการตกค้างในสิ่งแวดล้อมและความเป็นพิษของ PAHs การบำบัดด้วยชีววิธี (Bioremediation) จึงเป็นวิธีที่นิยม เนื่องจากสามารถกำจัด PAHs ออกจากสิ่งแวดล้อมได้อย่างสมบูรณ์ โดยอาศัยจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการใช้ PAHs เป็นแหล่ง คาร์บอนและพลังงานในการเจริญเติบโต อย่างไรก็ตามจุลินทรีย์แต่ละชนิดจะมีวิธีการย่อยสลาย ประสิทธิภาพการย่อยสลาย และปัจจัยที่มีผลกระทบต่อการอยู่รอดและการย่อยสลาย PAHs ที่ แตกต่างกัน (Das และ Chandran, 2011) แม้ว่าในท้องตลาดจะมีการจำหน่ายผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์ บำบัดสิ่งแวดล้อมรูปแบบต่างๆทั้งที่ผลิตจากในและต่างประเทศ ผลิตภัณฑ์ส่วนใหญ่มุ่งเน้นการบำบัด สิ่งแวดล้อมที่เป็นบ่อบำบัดน้ำเสียและแหล่งน้ำ อีกทั้งส่วนใหญ่ยังเป็นผลิตภัณฑ์ที่ต้องนำเข้าจาก ต่างประเทศ จึงมีราคาค่อนข้างสูงและอาจมีลักษณะสมบัติบางประการที่ไม่เหมาะสมต่อสภาวะใน ประเทศไทย ทำให้ประสิทธิภาพการบำบัดไม่ดีเท่าที่ควร ดังนั้นแบคทีเรียท้องถิ่นที่มีประสิทธิภาพสูง ในการย่อยสลาย PAHs และการประยุกต์ใช้แบคทีเรียดังกล่าวในรูปแบบที่เหมาะสมจึงเป็นปัจจัย สำคัญในการบำบัดสิ่งแวดล้อมด้วยวิธีทางชีวภาพให้มีประสิทธิภาพและประสบผลสำเร็จ

งานวิจัยนี้จึงมีจุดมุ่งหมายเพื่อพัฒนาหัวเชื้อพร้อมใช้จากแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการ ย่อยสลาย PAHs สำหรับการบำบัดดินปนเปื้อนไพรีน โดยจะคัดแยกแบคทีเรียจากดินตะกอนป่าชาย เลนแหล่งที่อุดมสมบูรณ์บริเวณศูนย์อนุรักษ์และแหล่งที่ปนเปื้อนด้วยปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนอัน เนื่องมาจากการท่องเที่ยว ศึกษาลักษณะสมบัติของแบคทีเรียที่คัดแยกได้ เพื่อคัดเลือกสายพันธุ์ที่มี

ประสิทธิภาพในการย่อยสลาย PAHs มาพัฒนาเป็นหัวเชื้อพร้อมใช้รูปแบบแคทรีเรียอัดเม็ด เพื่อให้ใช้งานง่าย มีประสิทธิภาพในการย่อยสลาย ต้นทุนต่ำ ขนส่งได้สะดวก และเก็บรักษาได้ง่ายโดยยังคงประสิทธิภาพในการย่อยสลายสารตลอดอายุการเก็บรักษา จากนั้นจะพัฒนาวิธีการใช้แคทรีเรียอัดเม็ดในการบำบัดดินปนเปื้อนไฟรีน และใช้เทคนิคทางชีววิทยาโมเลกุลในการตรวจติดตามการเปลี่ยนแปลงประชาคมจุลินทรีย์และยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลาย

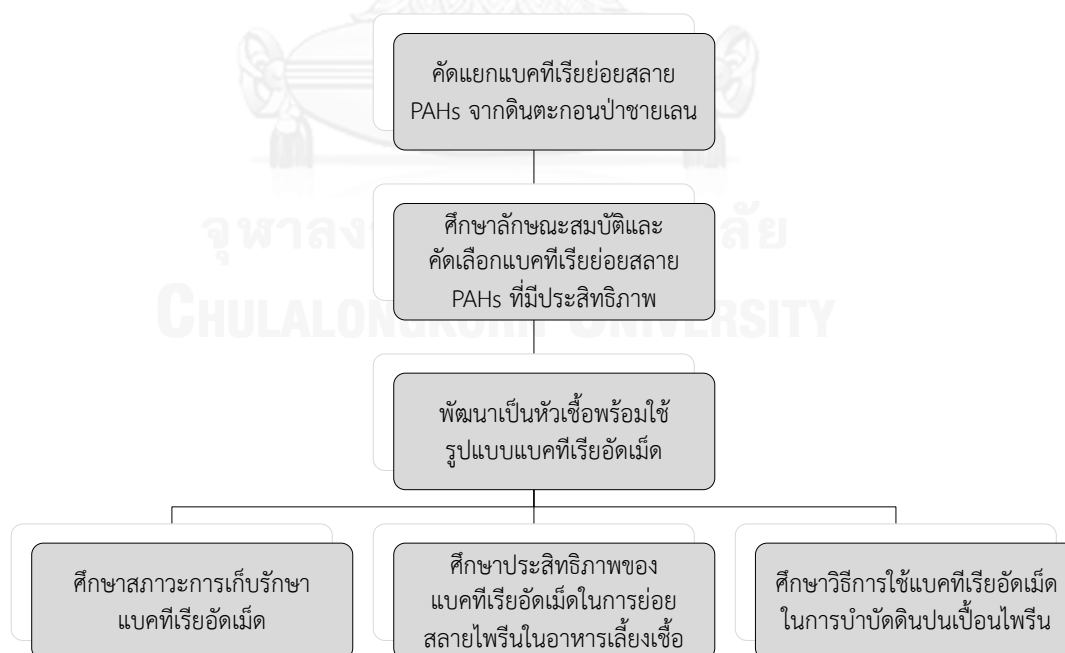
### วัตถุประสงค์

1. เพื่อคัดแยกแคทรีเรียย่อยสลาย PAHs จากดินตะกอนป่าชายเลน
2. เพื่อศึกษาลักษณะสมบัติและคัดเลือกแคทรีเรียที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลาย PAHs
3. เพื่อพัฒนาหัวเชื้อพร้อมใช้รูปแบบแคทรีเรียอัดเม็ดสำหรับการบำบัดดินปนเปื้อนไฟรีนจากแคทรีเรียที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลาย PAHs

### ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ได้แคทรีเรียที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลาย PAHs และทราบลักษณะสมบัติที่สำคัญของแคทรีเรียที่คัดแยกได้ รวมทั้งได้ผลิตภัณฑ์หัวเชื้อพร้อมใช้รูปแบบแคทรีเรียอัดเม็ดสำหรับบำบัดสิ่งแวดล้อม

### ภาพรวมของงานวิจัย



## บทที่ 2

### ปรีทัศน์วรรณกรรม

#### 2.1 พอลิไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน

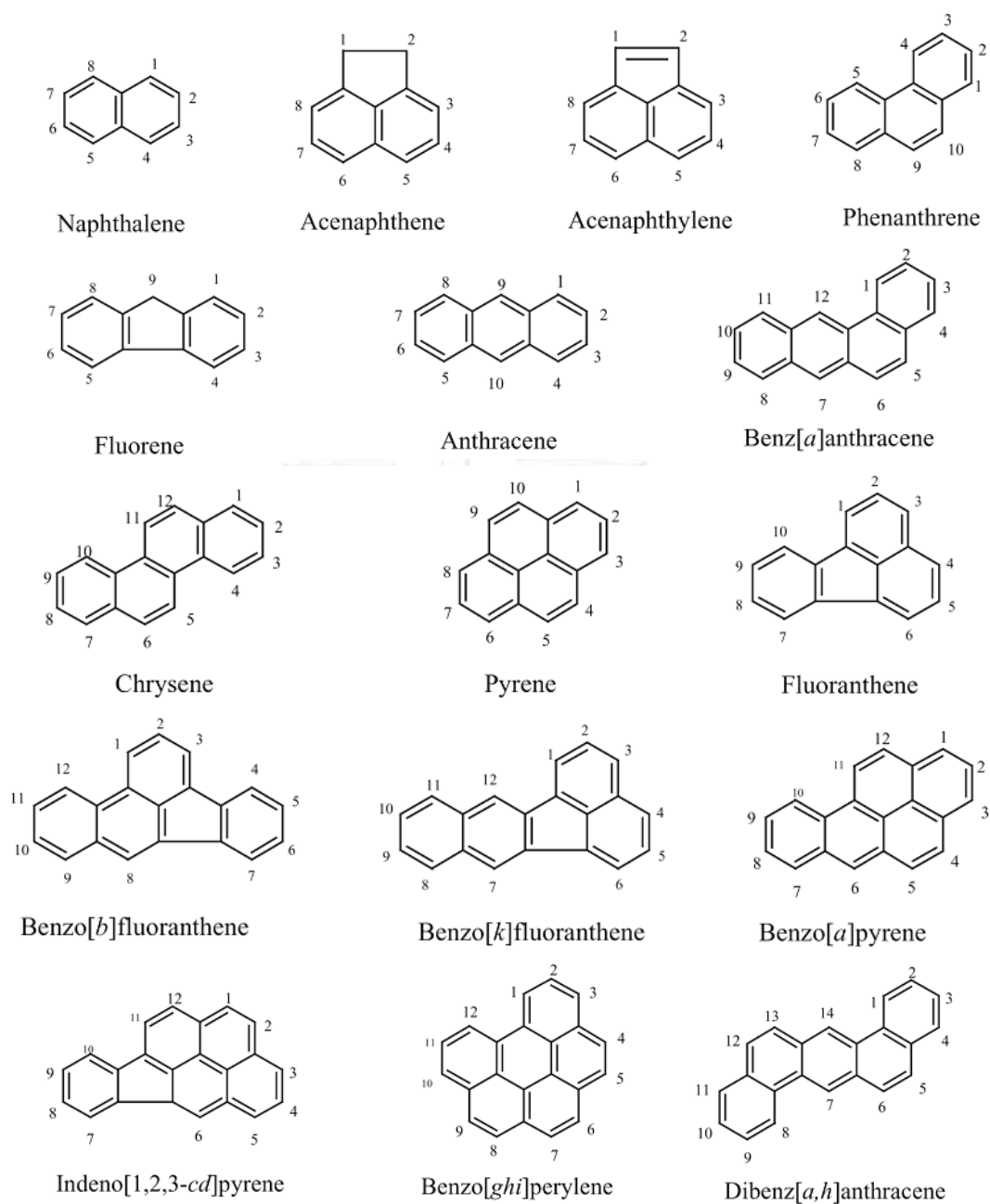
##### 2.1.1 ชนิดและโครงสร้างของ PAHs

พอลิไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน (Polycyclic aromatic hydrocarbons; PAHs) เป็นกลุ่มของสารประกอบอินทรีย์ที่มีโครงสร้างวงแหวนอะโรมาติกมากกว่า 2 วงขึ้นไป เชื่อมต่อกันเป็นเส้นตรง (linear) เป็นมุม (angular) หรือเป็นกลุ่ม (cluster) แบ่งออกเป็น PAHs ที่มีมวลโมเลกุลต่ำ (2-3 วง) เช่น แนพธาซีน (naphthalene) อะซีแนพทีน (acenaphthene) อะซีแนพทิลีน (acenaphthylene) ฟลูออรีน (fluorene) แอนทราซีน (anthracene) ฟีนแอนทรีน (phenanthrene) และ PAHs ที่มีมวลโมเลกุลสูง (4 วงขึ้นไป) เช่น เบนโซ[เอ]แอนทราซีน (benzo[a]anthracene) ฟลูออแรนทีน (fluoranthene) ไพรีน (pyrene) ไครซีน (chrysene) เบนโซ[เอ]ไพรีน (benzo[a]pyrene) เบนโซ[อี]ไพรีน (benzo[e]pyrene) เบนโซ[เค]ฟลูออแรนทีน (benzo[k]fluoranthene) เบนโซ[บี]ฟลูออแรนทีน (benzo[b]fluoranthene) เบนโซ[เจ]ฟลูออแรนทีน (benzo[j]fluoranthene) ไดเบนโซ[เอ,เอช]แอนทราซีน (dibenz[a,h]anthracene) อินดีโน[1,2,3-ซีดี]ไพรีน (indeno[1,2,3-cd]pyrene) เบนโซ[จีเอชไอ]เพอริลีน (benzo[ghi]perylene) โคโรนีน (coronene) เป็นต้น

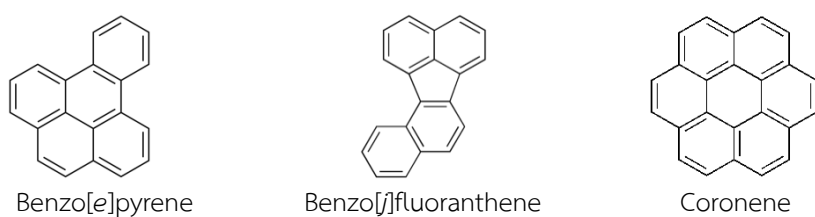
รายงานของสำนักงานคุ้มครองสิ่งแวดล้อมของสหรัฐอเมริกา (The U.S. Environmental Protection Agency, EPA) ได้กำหนดให้ PAHs 16 ชนิด (ดังแสดงโครงสร้างในรูปที่ 2.1) เป็นสารพิษอันตรายที่ควรเฝ้าระวังและต้องกำจัดออกจากสิ่งแวดล้อมอย่างเร่งด่วน (Yan และคณะ, 2004) นอกจากนี้ องค์การขึ้นทะเบียนสารพิษและโรค (Agency for Toxic Substances and Disease Registry, ATSDR) ยังรายงาน PAHs ที่ควรให้ความสำคัญและเป็นสารก่อมลพิษนอกเหนือจากประกาศของ EPA ได้แก่ เบนโซ[อี]ไพรีน (benzo[e]pyrene) เบนโซ[เจ]ฟลูออแรนทีน (benzo[j]fluoranthene) และโคโรนีน (coronene) (ATSDR, 1995) ซึ่งมีโครงสร้างแสดงดังรูปที่ 2.2 อย่างไรก็ตาม ในการศึกษาและวิจัยเกี่ยวกับ PAHs ส่วนใหญ่ นิยมใช้ฟีนแอนทรีนและไพรีนเป็นตัวแทนของ PAHs มวลโมเลกุลต่ำและมวลโมเลกุลสูงตามลำดับ

ฟีนแอนทรีน มีสูตรทางเคมีคือ  $C_{14}H_{10}$  ประกอบด้วยวงแหวนอะโรมาติก 3 วง เชื่อมต่อกันเป็นมุม นิยมใช้เป็นแบบจำลองในการศึกษาและวิจัยเกี่ยวกับการย่อยสลายทางชีวภาพ (Huang และคณะ, 2013) และการศึกษาพฤติกรรมโดยทั่วไปของ PAHs (Sara และ Everett, 2001)

ไพรีน หรือชื่อเรียกทางเคมีว่า เบนโซ[ดี,อี,เอฟ]ฟีนแอนทรีน (benzo[d,e,f]phenanthrene) มีสูตรทางเคมีคือ  $C_{16}H_{10}$  ประกอบด้วยวงแหวนอะโรมาติก 4 วง เชื่อมต่อกันเป็นกลุ่ม ไพรีนถูกใช้เป็นแบบจำลองในการศึกษาการย่อยสลายทางกายภาพและทางชีวภาพมากมาย และยังใช้เป็นดัชนีสำหรับการตรวจติดตามการปนเปื้อน PAHs ในสิ่งแวดล้อมได้อีกด้วย (Ceyhan, 2012)



รูปที่ 2.1 โครงสร้างของ PAHs 16 ชนิดในรายชื่อสารมลพิษที่สำคัญของ USEPA  
(Yan และคณะ, 2004)



รูปที่ 2.2 โครงสร้างของเบนโซ[อี]ไพรีน เบนโซ[เจ]ฟลูออแรนทีน และโคโรนีน

### 2.1.2 ลักษณะและสมบัติของ PAHs

ลักษณะปรากฏของ PAHs อยู่ในรูปผลึกของแข็ง ไม่มีสี หรือสีขาวซีด หรือสีเหลือง (USEPA, 2008) ตารางที่ 2.1 แสดงสมบัติของ PAHs แต่ละชนิด ซึ่งมีจุดหลอมเหลว (melting point temperature,  $T_m$ ) และจุดเดือด (boiling point temperature,  $T_b$ ) สูง ความสามารถในการละลายน้ำ (water solubility,  $S_w$ ) ต่ำ แต่ละลายได้ดีในไขมัน (lipophilic หรือ hydrophobic) โดยพิจารณาจากค่าสัมประสิทธิ์การกระจายตัวของสารในชั้นออกทานอลและน้ำ (*n*-octanol/water partition coefficient,  $\log K_{ow}$ ) หากมีค่า  $\log K_{ow}$  สูง หมายความว่าสารนั้นสามารถละลายได้ในออกทานอลมากกว่าน้ำ มีความดันไอ (vapor pressure,  $V_p$ ) ต่ำ จึงมีความสามารถในการระเหยได้ต่ำ หรืออาจพิจารณาจากค่าสัมประสิทธิ์การกระจายตัวของสารในชั้นออกทานอลและอากาศ (*n*-octanol/air partition coefficient,  $\log K_{oa}$ ) ซึ่งจะมีค่าผกผันกับค่าความดันไอ หากมีค่า  $\log K_{oa}$  สูง หมายความว่าสารนั้นสามารถละลายได้ดีในออกทานอลมากกว่าการระเหยไปสู่อากาศ นอกจากนี้ยังสามารถพิจารณาได้จากค่าสัมประสิทธิ์การกระจายตัวของสารในชั้นอากาศและน้ำ (air/water partition coefficient,  $K_{aw}$ ) หรือค่าคงที่ของเฮนรี (Henry's law constant,  $H$ ) ซึ่งจะมีค่าต่ำลงตามมวลโมเลกุลของสารที่เพิ่มขึ้น อย่างไรก็ตาม PAHs สามารถดูดซับกับอนุภาคต่างๆ ในดินได้ดี โดยมีค่าสัมประสิทธิ์การดูดซับกับอินทรีย์คาร์บอนในดิน (organic carbon soil sorption coefficient,  $K_{oc}$ ) สูงขึ้นตามมวลโมเลกุลของสารที่เพิ่มขึ้น และยังมีค่าครึ่งชีวิตในดิน (half-life in soil,  $t_{1/2}$ ) สูงขึ้นตามมวลโมเลกุลของสารที่เพิ่มขึ้น ทำให้สามารถคงทนอยู่ในสิ่งแวดล้อมได้เป็นระยะเวลาานาน (Ferreira, 2001; Haritash และ Kaushik, 2009; Paraiba และคณะ, 2011; Liu และคณะ, 2011b; Zhou และคณะ, 2013b) อย่างไรก็ตาม PAHs ยังเป็นสารก่อมลพิษให้เกิดอันตรายร้ายแรงต่อสิ่งมีชีวิต โดยอาจชักนำให้เกิดมะเร็ง การกลายพันธุ์ หรือการตายได้ (Samanta และคณะ, 2002) PAHs แต่ละชนิดจะมีความเป็นพิษแตกต่างกัน โดยมีค่าความเป็นพิษ (toxicity) แสดงในตารางที่ 2.1 ซึ่งเป็นค่าที่บ่งบอกความเป็นพิษจากแสง (phototoxicity) ของ PAHs แต่ละชนิด สาเหตุของความเป็นพิษนี้เกิดจากการสร้างสารอนุมูลอิสระ (free radicals) หลังถูกกระตุ้นด้วยแสงอัลตราไวโอเล็ต (ultraviolet, UV) เพื่อไปทำลายโมเลกุลใหญ่ๆ (macromolecules) เช่น กรดนิวคลีอิก และโปรตีนของสิ่งมีชีวิต จากตารางที่ 2.1 พบว่า แนพธาซีนและฟิแรนทรีนมีความเป็นพิษต่ำ ในขณะที่แอนทราซีน ไพรีน ไดเบนซี[เอ,เอช]แอนทราซีน เบนโซ[เอ]ไพรีน เบนโซ[อี]ไพรีน เบนโซ[จีเอชไอ]เพอร์ลิซีน และโคโรนีน มีความเป็นพิษสูง (Paraiba และคณะ, 2011) แม้ว่ามวลโมเลกุลของแอนทราซีนและไพรีนจะต่ำกว่า PAHs อื่นๆ ในกลุ่มสารที่มีความเป็นพิษสูง แต่หากพิจารณาช่วงความยาวคลื่นของรังสี UV ที่ก่อให้เกิดความเป็นพิษนั้นพบว่าแอนทราซีนและไพรีนจะสร้างพันธะโควาเลนต์กับ DNA หลังจากได้รับรังสี UV ที่ความยาวคลื่น 366 และ 335 นาโนเมตร ตามลำดับ ความยาวคลื่นดังกล่าวจัดอยู่ในช่วงความยาวคลื่นของรังสี UV-A (320-400 นาโนเมตร) ซึ่งเป็นช่วงความยาวคลื่นที่ผ่านเข้ามายังโลกได้ แต่สำหรับ PAHs อื่นๆ จะก่อความเป็นพิษเมื่อได้รับรังสี UV ช่วงความยาวคลื่นของรังสี UV-B (290-320 นาโนเมตร) และ UV-C (200-290 นาโนเมตร) ซึ่งสามารถผ่านเข้ามายังโลกได้น้อยมากหรือไม่ผ่านเลย (Pasternak และคณะ, 2011; Hu และคณะ, 2012)

ตารางที่ 2.1 สมบัติต่างๆของ PAHs

PAHs	T <sub>m</sub> (°C)	T <sub>b</sub> (°C)	S <sub>w</sub> (mg/L)	log K <sub>OW</sub>	V <sub>p</sub> (Pa)	log K <sub>OA</sub>	K <sub>OC</sub> (L/kg)	t <sub>1/2</sub> (days)	Toxicity (A <sub>nm</sub> )
naphthalene	80	218	31.0000	3.3	1.13 × 10 <sup>-1</sup>	5.13	278	48	< -3.3 (275)
acenaphthylene	92	280	16.1000	3.9	8.91 × 10 <sup>-1</sup>		1054	60	
acenaphthene	93	279	3.9000	3.9	2.87 × 10 <sup>-1</sup>		1011	102	
fluorene	116	295	1.6900	4.2	8.00 × 10 <sup>-2</sup>		1737	60	
phenanthrene	101	338	1.1500	4.5	1.61 × 10 <sup>-2</sup>	7.45	3111	200	-3.20 (292)
anthracene	218	340	0.0434	4.4	8.71 × 10 <sup>-4</sup>	7.34	3046	460	-2.46 (366)
fluoranthene	111	375	0.2600	5.1	1.23 × 10 <sup>-3</sup>		11787	440	
pyrene	145	393	0.1350	4.9	6.00 × 10 <sup>-4</sup>	8.43	7456	1870	-2.31 (335)
benz[a]anthracene	158	435	0.0094	5.8	2.80 × 10 <sup>-5</sup>	10.80	46563	670	-2.52 (288)
chrysene	254	431	0.0020	5.8	8.31 × 10 <sup>-7</sup>	10.44	51670	990	-2.54 (282)
benzo[b]fluoranthene	168	481	0.0015	5.8	6.67 × 10 <sup>-5</sup>		48542	610	
benzo[k]fluoranthene	217	480	0.0008	6.1	1.29 × 10 <sup>-7</sup>		96481	2140	
benzo[a]pyrene	179	496	0.0016	6.1	7.32 × 10 <sup>-7</sup>	10.71	100582	530	-2.43 (297)
benzo[e]pyrene	178	493	0.0026	6.3		11.48			-2.39 (290)
indeno[1,2,3-cd]pyrene	161	536	0.0002	6.7	1.67 × 10 <sup>-8</sup>		329458	730	
dibenz[a,h]anthracene	262	535	0.0025	6.7	1.27 × 10 <sup>-7</sup>	13.91	365595	940	-2.44 (297)
benzo[ghi]perylene	278	542	0.0003	6.6	1.33 × 10 <sup>-8</sup>	13.07	284787	650	-2.36 (-)
coronene	438	590	0.0001	7.5					-2.39 (-)

จุดหลอมเหลว (T<sub>m</sub>); จุดเดือด (T<sub>b</sub>); ค่าการละลายน้ำ (S<sub>w</sub>); สัมประสิทธิ์การกระจายตัวของสารในชั้นออกทานอลและน้ำ (log K<sub>OW</sub>); ความดันไอ (V<sub>p</sub>); สัมประสิทธิ์การกระจายตัวของสารในชั้นออกทานอลและอากาศ (log K<sub>OA</sub>); สัมประสิทธิ์การดูดซับกับอินทรีย์คาร์บอนในดิน (K<sub>OC</sub>); ค่าครึ่งชีวิตในดิน (t<sub>1/2</sub>) (Ferreira, 2001; Paraiba และคณะ, 2011)

### 2.1.3 แหล่งที่มาของ PAHs

PAHs เป็นองค์ประกอบสำคัญของปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอน เช่น ก๊าซธรรมชาติ (natural gas) น้ำมันดิบ (crude oil) น้ำมันถ่านหิน (coal tar) ยางมะตอย (asphalt) และครีโอสท (creosote) (Khodadadi และคณะ, 2012) การสลายตัวด้วยความร้อน (thermal decomposition) ของปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนหรือสารอินทรีย์อื่นๆ ก่อให้เกิด PAHs ขึ้น โดยเฉพาะอย่างยิ่งการเผาไหม้อย่างไม่สมบูรณ์ที่อุณหภูมิต่ำประมาณ 100-300 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน หรือที่อุณหภูมิสูงประมาณ 500-800 องศาเซลเซียส (Haritash และ Kaushik, 2009) แหล่งที่มาของ PAHs เกิดจากกระบวนการในธรรมชาติ เช่น ไฟไหม้ป่า ภูเขาไฟระเบิด การรั่วไหลของน้ำมันโดยธรรมชาติ และสารคัดหลั่งจากต้นไม้ หรือเกิดจากการกระทำของมนุษย์ เช่น การเผาไหม้เชื้อเพลิงและถ่านหิน การเผาไหม้ของเครื่องยนต์และเครื่องจักร การเผาขยะ การประกอบอาหาร การสูบบุหรี่ และการปลดปล่อยของเสียจากโรงงานอุตสาหกรรมปิโตรเคมี รวมถึงอุบัติเหตุการรั่วไหลของปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนต่างๆ (Haritash และ Kaushik, 2009; Arias และคณะ, 2010)

ในรายงานวิจัยก่อนหน้าได้นำดัชนีอัตราส่วนของปริมาณ PAHs (ตารางที่ 2.2) มาใช้ในการวิเคราะห์แหล่งที่มาของ PAHs ที่ปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อม โดยอาศัยความแตกต่างของความเสถียรต่อการเปลี่ยนแปลงความร้อนระหว่างไอโซเมอร์ของ PAHs ที่มีมวลโมเลกุลเท่ากัน แหล่งที่มาของ PAHs สามารถแบ่งออกเป็น 2 ประเภท คือ มาจากการเผาไหม้เชื้อเพลิง (Pyrolytic origin) และมาจากการปลดปล่อยผลิตภัณฑ์ที่ทำมาจากปิโตรเลียม (Petrogenic origin) (Yunker และคณะ, 2002; Luo และคณะ, 2006; Wang และคณะ, 2007; Zhang และคณะ, 2011a; Li และคณะ, 2012) อย่างไรก็ตาม การปนเปื้อน PAHs ในธรรมชาตินั้นมีสาเหตุมาจากหลายแหล่ง อีกทั้งดัชนีเหล่านี้ไม่สามารถแสดงถึงแหล่งที่มาเชิงปริมาณได้ จึงมีการพัฒนาโดยอาศัยการวิเคราะห์องค์ประกอบหลัก (Principal component analysis) และการถดถอยพหุคูณเชิงเส้นตรง (Multiple linear regression) หรือเรียกโดยย่อว่า PCA/MLR มาใช้ในการระบุแหล่งที่มาของ PAHs เชิงปริมาณ โดยวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนทั้งหมดของข้อมูล PAHs ด้วยวิธี PCA แล้วนำค่าที่ได้ไปคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ของแหล่งที่มาต่างๆของ PAHs ด้วยวิธี MLR (Li และคณะ, 2012)

ตารางที่ 2.2 ดัชนีที่ใช้ในการวิเคราะห์แหล่งที่มาของ PAHs

อัตราส่วน	แหล่งที่มา	
	Pyrolytic	Petrogenic
PAHs มวลโมเลกุลต่ำ/PAHs มวลโมเลกุลสูง	ต่ำ	สูง
พีแนทรีน/แอนทราซีน	< 10	> 10
ไครซีน/เบนซ์[เอ]แอนทราซีน	< 1	> 1
ฟลูออแรนทีน/ไพรีน	> 1	< 1
ฟลูออแรนทีน/(ฟลูออแรนทีน+ไพรีน)	> 0.5	< 0.5
อินดีโน[1,2,3-ซีดี]ไพรีน/(อินดีโน[1,2,3-ซีดี]ไพรีน+เบนโซ[จีเอชไอ]เพอร์ลิซีน)	> 0.5	< 0.5

(Zhang และคณะ, 2011a; Li และคณะ, 2012)



### 2.1.4 การแพร่กระจายของ PAHs สู่สิ่งแวดล้อม

PAHs สามารถแพร่กระจายไปในสิ่งแวดล้อมทั้งในอากาศ น้ำจืด น้ำทะเล ดินตะกอน และดิน จุดเริ่มต้นของการปนเปื้อนมักเกิดจากการปนเปื้อนของ PAHs ในอากาศ โดย PAHs มวลโมเลกุลต่ำจะอยู่ในรูปของไอ ในขณะที่ PAHs มวลโมเลกุลสูงจะยึดเกาะกับอนุภาคในอากาศ ซึ่งส่วนใหญ่ปริมาณ PAHs ในอนุภาคละเอียด ( $< 0.7$  ไมโครเมตร) จะมีความเข้มข้นสูงกว่าในอนุภาคหยาบ ( $> 10.9$  ไมโครเมตร) อีกทั้งการยึดเกาะกับอนุภาคในอากาศที่อุณหภูมิต่ำจะเกิดขึ้นได้ดีกว่าที่อุณหภูมิสูง (Gupta และคณะ, 2011) นอกจากนี้ PAHs ยังสามารถตกตะกอนกับไอออนที่ละลายน้ำได้บางชนิด เช่น ไพริน เบนซ์[เอ]แอนทราซีน เบนโซ[บี]ฟลูออแรนทีน เบนโซ[เค]ฟลูออแรนทีน และเบนโซ[เอ]ไพรีน สามารถตกตะกอนกับโซเดียมไอออน ( $\text{Na}^+$ ) และคลอไรด์ไอออน ( $\text{Cl}^-$ ) ได้ ทำให้สารดังกล่าวสามารถแพร่กระจายไปในที่อื่นได้ด้วยลมทะเล จากนั้น PAHs ในอากาศจะแพร่กระจายสู่แหล่งน้ำและดินด้วยการชะล้างของน้ำฝน โดยปริมาณน้ำฝนจะแปรผกผันกับปริมาณ PAHs ในอากาศ หมายความว่าปริมาณน้ำฝนที่เพิ่มขึ้นจะทำให้ปริมาณ PAHs ในอากาศลดลง นอกจากนี้ยังพบว่าหิมะสามารถกักจับ PAHs ในอากาศได้ดีกว่าน้ำฝน เนื่องจากหิมะมีพื้นผิวที่มีความจำเพาะสูง (Wang และคณะ, 2010b) นอกจากการแพร่กระจายของ PAHs ลงสู่แหล่งน้ำจะมาจากอากาศแล้ว ยังเกิดจากการปล่อยของเสียจากแหล่งชุมชนและโรงงานอุตสาหกรรม และการรั่วไหลของน้ำมันด้วย (Zhang และคณะ, 2013a) อย่างไรก็ตามเนื่องจากสมบัติละลายน้ำได้ต่ำและดูดซับกับอนุภาคได้สูง ทำให้ PAHs ส่วนใหญ่ที่ปนเปื้อนในแหล่งน้ำโดยเฉพาะอย่างยิ่ง PAHs มวลโมเลกุลสูง จะเกิดการตกตะกอนและถูกดูดซับกับอนุภาคดินตะกอนของแหล่งน้ำนั้นๆ (Zhang และคณะ, 2011a; Fukushima และคณะ, 2012) สำหรับการแพร่กระจายในดิน PAHs บางส่วนสามารถนำไปใช้ได้โดยจุลินทรีย์ท้องถิ่น ในขณะที่ PAHs ส่วนใหญ่ไม่สามารถนำไปใช้ได้และไม่สามารถย่อยสลายได้ เนื่องจากการยึดเกาะกับอนุภาคในดินอย่างแข็งแรงหรือจากการแพร่กระจายเข้าไปในช่องขนาดเล็กของอนุภาคในดิน ส่งผลให้ดินเป็นแหล่งสะสมและตกค้างของ PAHs เป็นระยะเวลานาน (Yang และคณะ, 2010; Liu และคณะ, 2011b; Zhou และคณะ, 2013b) งานวิจัยมากมายศึกษาการแพร่กระจายและปริมาณของ PAHs ในสิ่งแวดล้อมต่างๆ ดังจะยกตัวอย่างต่อไปนี้

Wang และคณะ (2010b) วิเคราะห์ปริมาณ PAHs ในอากาศบริเวณแหล่งท่องเที่ยว Mount Taishan ประเทศจีน พบว่าปริมาณ PAHs ทั้งหมดในอากาศมีค่าแปรผันอย่างมากตลอดทั้งปี โดยมีปริมาณสูงสุดเฉลี่ย 94.24 นาโนกรัม/ลิตร ในฤดูหนาว (ธันวาคม-กุมภาพันธ์) และมีปริมาณต่ำสุดเฉลี่ย 72.90 นาโนกรัม/ลิตร ในฤดูร้อน (มิถุนายน-สิงหาคม) โดยสารปนเปื้อนหลักส่วนใหญ่จะเป็น PAHs มวลโมเลกุลต่ำที่ประกอบด้วยฟิแนนทรีน (เฉลี่ย 33.31 นาโนกรัม/ลิตร) และฟลูออรีน (เฉลี่ย 16.61 นาโนกรัม/ลิตร) และ PAHs อื่นๆชนิดละไม่เกิน 10 นาโนกรัม/ลิตร แหล่งที่มาของ PAHs จึงน่าจะมาจากการเผาไหม้ถ่านหิน เนื่องจากในฤดูหนาวมีการเผาไหม้เชื้อเพลิงและถ่านหินเพื่อให้ความร้อน รวมถึงการใช้เครื่องทำความร้อนซึ่งถือเป็นแหล่งกำเนิด PAHs ในบรรยากาศอีกด้วย

Zhang และคณะ (2013a) วิเคราะห์ปริมาณ PAHs บริเวณผิวน้ำของแม่น้ำ Hun ประเทศจีน พบปริมาณ PAHs 16 ชนิดตามรายงานของ USEPA เฉลี่ยประมาณ 286.75 นาโนกรัม/ลิตร ในช่วงหน้าแล้ง 3,066.79 นาโนกรัม/ลิตร ในช่วงหน้าน้ำ และ 4,346.71 นาโนกรัม/ลิตร ในช่วงระดับน้ำคงที่ การพบ PAHs ปริมาณมากในช่วงหน้าน้ำและช่วงระดับน้ำคงที่ อาจเกิดจากการกัก

กร่อนของดินเนื่องจากน้ำ ทำให้ PAHs ที่สะสมอยู่ในดินเกิดการหลุดออกจากอนุภาคดินแล้วมาอยู่ในชั้นน้ำ องค์ประกอบหลักของ PAHs ที่ปนเปื้อนในช่วงหน้าแล้งและหน้าน้ำคือ PAHs ขนาด 3 วงอะโรมาติก แต่ในช่วงหน้าน้ำนั้นจะมีปริมาณ PAHs ขนาด 2 วงอะโรมาติกเพิ่มขึ้นจากช่วงหน้าแล้ง และในช่วงระดับน้ำคงที่จะมีปริมาณ PAHs ขนาด 2 วงอะโรมาติกเป็นองค์ประกอบหลัก

Wu และคณะ (2011) วิเคราะห์ปริมาณ PAHs ที่ละลายในน้ำทะเล และ PAHs ที่ยึดเกาะกับอนุภาคในน้ำทะเล บริเวณช่องแคบระหว่างประเทศไต้หวันและจีน พบปริมาณ PAHs 15 ชนิดตามรายงานของ USEPA (ยกเว้นแนพธาลีน) ที่ละลายในน้ำทะเลเฉลี่ยประมาณ 19.8 นาโนกรัม/ลิตร โดยมีองค์ประกอบหลักคือ PAHs ขนาด 3 วงอะโรมาติก ซึ่งพบปริมาณพีแนนทรินและฟลูออรีนประมาณ 34.9 และ 26.5 เพอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และปริมาณ PAHs ที่ยึดเกาะกับอนุภาคในน้ำทะเลเฉลี่ยประมาณ 15.0 นาโนกรัม/ลิตร โดยมีองค์ประกอบหลักคือ PAHs ขนาด 3 และ 4 วงอะโรมาติก ซึ่งพบปริมาณพีแนนทรินและไพรีนประมาณ 21.9 และ 28.7 เพอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

Zhang และคณะ (2011a) เปรียบเทียบปริมาณ PAHs ที่ปนเปื้อนในชั้นน้ำและดินตะกอนในทะเลสาบ Taihu ประเทศจีน พบว่าปริมาณ PAHs ทั้งหมดที่พบในชั้นน้ำเฉลี่ยประมาณ 1,592 นาโนกรัม/ลิตร ประกอบด้วย PAHs ขนาด 2-3 วงอะโรมาติก 94.3 เพอร์เซ็นต์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งแนพธาลีน (72.5 เพอร์เซ็นต์) และ PAHs ขนาด 4 วงอะโรมาติก 5.7 เพอร์เซ็นต์ ในขณะที่ปริมาณ PAHs ทั้งหมดที่พบในดินตะกอนเฉลี่ยประมาณ 584 นาโนกรัม/กรัม ประกอบด้วย PAHs ขนาด 2-3 วงอะโรมาติก 33.6 เพอร์เซ็นต์ PAHs ขนาด 4 วงอะโรมาติก 34.4 เพอร์เซ็นต์ และ PAHs ขนาด 5-6 วงอะโรมาติก 32.0 เพอร์เซ็นต์

Fan และคณะ (2010) วิเคราะห์ปริมาณ PAHs ในดินตะกอนของอ่างเก็บน้ำ Feitsui ประเทศไต้หวัน พบปริมาณ PAHs ทั้งหมด 400 นาโนกรัม/กรัม ซึ่งมีปริมาณ PAHs 16 ชนิดตามรายงานของ USEPA ประมาณ 236 นาโนกรัม/กรัม ชนิดของ PAHs ที่พบมากที่สุดคือเพอริลีนประมาณ 41 เพอร์เซ็นต์ รองลงมาคือพีแนนทรินประมาณ 17 เพอร์เซ็นต์ การพบเพอริลีนในปริมาณมากนั้นแสดงที่มาของ PAHs จากการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพและเคมีของธรรมชาติบริเวณนั้น ในขณะที่พีแนนทรินแสดงถึงการปนเปื้อนจากการกระทำของมนุษย์ เช่น การเผาไหม้เชื้อเพลิง

Liu และคณะ (2011c) เปรียบเทียบปริมาณ PAHs ที่ปนเปื้อนในดินจากย่านชุมชน ย่านชนบท และบริเวณภูเขาของเมืองปักกิ่ง ประเทศจีน พบว่าปริมาณ PAHs ทั้งหมดในดินย่านชุมชน ย่านชนบท และบริเวณภูเขามีค่า 502, 148 และ 146 นาโนกรัม/กรัม ตามลำดับ โดยมีองค์ประกอบหลักคือ PAHs มวลโมเลกุลสูง (ขนาด 4-6 วงอะโรมาติก) ประมาณ 92.8, 77.3 และ 73.4 เพอร์เซ็นต์ของ PAHs ทั้งหมดในดินจากย่านชุมชน ย่านชนบท และบริเวณภูเขา การปนเปื้อน PAHs มวลโมเลกุลสูงนี้บ่งบอกถึงแหล่งที่มาของ PAHs จากการเผาไหม้เชื้อเพลิงของเครื่องจักรและเครื่องยนต์ ซึ่งตรงกับกิจกรรมในย่านชุมชนของเมืองปักกิ่ง ทำให้ PAHs ปนเปื้อนไปในอากาศก่อนที่จะถูกดูดซับไว้ในดิน อย่างไรก็ตามในย่านชนบทและบริเวณภูเขานั้น อาจได้รับผลกระทบจากการแพร่กระจายของอากาศที่ปนเปื้อน PAHs จากย่านชุมชน ทำให้ดินในย่านชนบทและบริเวณภูเขาได้รับการปนเปื้อน PAHs มวลโมเลกุลสูงด้วย

จากตัวอย่างงานวิจัยจะเห็นได้ว่า PAHs ที่แพร่กระจายในสิ่งแวดล้อม มีสาเหตุหลักมาจากการกระทำของมนุษย์ (Fan และคณะ, 2010) ทั้งโดยเจตนาและไม่เจตนา เนื่องจากปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนเป็นแหล่งของพลังงานที่สำคัญสำหรับชีวิตประจำวันของมนุษย์ในด้านอุปโภคบริโภคคมนาคม เกษตรกรรม และอุตสาหกรรม ทำให้ปริมาณการใช้ปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนเพิ่มขึ้นตามจำนวนประชากรมนุษย์ที่เพิ่มขึ้น ก่อให้เกิดการผลิตและการแพร่กระจายของสารมลพิษโดยเฉพาะอย่างยิ่ง PAHs จึงมีความกังวลเกี่ยวกับผลกระทบที่จะเกิดจากการปนเปื้อนและการตกค้างของ PAHs ในสิ่งแวดล้อม ดังนั้น PAHs จึงเป็นเป้าหมายสำคัญในการบำบัดสิ่งแวดล้อมที่ปนเปื้อนปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอน โดยเฉพาะอย่างยิ่งการปนเปื้อนในดิน

## 2.2 การบำบัดดินปนเปื้อนพอลิไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนโดยชีววิธี

การบำบัดสิ่งแวดล้อมโดยชีววิธี (bioremediation) เป็นการกำจัดสารมลพิษออกจากสิ่งแวดล้อมโดยอาศัยความสามารถของจุลินทรีย์ ได้แก่ แบคทีเรีย ยีสต์ รา และสาหร่าย ในการใช้สารมลพิษเป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงานในการเจริญเติบโต ทำให้สารมลพิษถูกเปลี่ยนเป็นสารที่มีความเป็นพิษน้อยลงหรือไม่มีความเป็นพิษเลย ถือเป็นวิธีการกำจัดสารมลพิษอย่างสมบูรณ์และถาวรปลอดภัยและเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม ทั้งยังสามารถกำจัดสารมลพิษที่ความเข้มข้นต่ำๆ ได้ ซึ่งการบำบัดด้วยวิธีทางกายภาพและทางเคมีไม่สามารถทำได้ แต่อาจใช้ระยะเวลาในการบำบัดนานและไม่สามารถคาดการณ์ได้ (Perelo, 2010; Sonal และ Reeta, 2013) กลวิธีในการบำบัดสิ่งแวดล้อมโดยชีววิธีสามารถแบ่งออกเป็น 4 ประเภท คือ การฟื้นฟูสิ่งแวดล้อมโดยธรรมชาติ (natural attenuation หรือ monitored natural recovery) การกระตุ้นจุลินทรีย์ท้องถิ่นด้วยการส่งเสริมปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการเจริญของจุลินทรีย์ เช่น สารอาหาร อากาศ เป็นต้น (biostimulation) การเติมจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพสำหรับการย่อยสลายสารมลพิษที่จำเพาะ (bioaugmentation) และ การใช้พืชหรือสาหร่ายในการกำจัดสารมลพิษออกจากสิ่งแวดล้อม (phytoremediation) (Perelo, 2010)

### 2.2.1 การบำบัดดินโดยชีววิธี

การบำบัดดินปนเปื้อนปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนสามารถทำได้หลายวิธี ได้แก่ กระบวนการทางกายภาพ เช่น การขุดและย้ายดินที่ปนเปื้อนไปยังหลุมฝังกลบหรือไปไว้ในบริเวณที่จำกัดให้เป็นสถานที่ที่ทิ้งของเสีย ซึ่งมีความเสี่ยงในการเพิ่มการปนเปื้อนให้กับเครื่องมือที่ใช้ระหว่างขนย้าย มีค่าใช้จ่ายสูง ไม่เป็นที่ยอมรับของประชาชนในบริเวณนั้น และไม่ได้เป็นการทำให้สารปนเปื้อนนั้นลดลงหรือหมดไป (Perelo, 2010) สำหรับกระบวนการทางเคมี ทำได้โดยการฉีดพ่นสารเคมีจำพวก oxidants ซึ่งก็เป็นการเพิ่มปริมาณสารเคมีในสิ่งแวดล้อมด้วย (Sarkar และคณะ, 2005) การบำบัดดินโดยชีววิธีจึงได้รับความสนใจเนื่องจากสามารถจัดข้อบ่งชี้ของวิธีการทางกายภาพและทางเคมีได้ อีกทั้งยังเป็นวิธีที่ง่าย ไม่อาศัยแรงงานมาก มีค่าใช้จ่ายต่ำเมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการอื่นๆ (ตารางที่ 2.3) เป็นที่ยอมรับของประชาชน และเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม อย่างไรก็ตาม การไม่มีข้อมูลเกี่ยวกับจุลินทรีย์ท้องถิ่นในธรรมชาติรวมถึงปัจจัยอื่นๆ ในสิ่งแวดล้อมอาจส่งผลให้การบำบัดโดยชีววิธีไม่ประสบความสำเร็จ (Perelo, 2010; Thapa และคณะ, 2012)

### ตารางที่ 2.3 การประเมินค่าใช้จ่ายของการบำบัดดินแต่ละวิธี

Treatment	Approximate remediation cost (£/tonne)
Removal to landfill	Up to 100
<u>Solidification</u>	
Cement and Pozzolan based	25-175
Lime based	25-50
Vitrification	50-525
<i>Physical processes</i>	
Soil washing	25-150
Physio-chemical washing	50-175
Vapour extraction	75
<u>Chemical processes</u>	
Solvent extraction	50-600
Chemical dehalogenation	175-450
In situ flushing	25-80
Surface amendments	10-25
<i>Thermal treatment</i>	
Thermal desorption	25-225
Incineration	50-1200
<u>Biological treatments</u>	
Windrow turning	10-50
Land farming	10-90
Bioventing	15-75
Bioslurry	50-85
Biopiles	15-35
In situ bioremediation	175

(Semple และคณะ, 2001)

งานวิจัยก่อนหน้ารายงานการบำบัดดินปนเปื้อนไนโตรเจนไฮโดรคาร์บอนโดยชีววิธี ทั้งด้วยวิธีการฟื้นฟูสิ่งแวดล้อมโดยธรรมชาติ ซึ่งใช้เวลานานในการบำบัด อาจไม่จำเพาะต่อสารบางชนิดที่ต้องการบำบัด และผลิตภัณฑ์จากการย่อยสลายอาจมีความเป็นพิษมากกว่าสารเดิม (Mulligan และ Yong, 2004) จึงใช้วิธีการกระตุ้นจุลินทรีย์ท้องถิ่นด้วยการส่งเสริมปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการเจริญของจุลินทรีย์ เช่น การเติมอากาศ การเติมสารอาหาร โดยสารอาหารที่นำมาเติมเป็นสารอินทรีย์หรือสารอนินทรีย์จำพวกไนโตรเจนและฟอสฟอรัสเพื่อปรับค่าอัตราส่วนคาร์บอน:ไนโตรเจน:ฟอสฟอรัส (C:N:P) ให้เหมาะสม มักไม่เติมสารจำพวกคาร์บอนเนื่องจากคาร์บอนเป็นองค์ประกอบหลักในไนโตรเจนไฮโดรคาร์บอนอยู่แล้ว นอกจากนี้ยังมีการเติมสารอาหารอื่นๆ เช่น ปุ๋ยอินทรีย์

(inorganic fertilizer) ปุ๋ยหมัก (compost) ปุ๋ยคอก (manure) ขี้เลื่อย (sawdust) และวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร (agricultural waste) เพื่อเป็นสารอาหารและเป็นการเพิ่มอากาศโดยทำให้ดินมีช่องว่างเพิ่มขึ้น (Sarkar และคณะ, 2005) หรือใช้วิธีการเติมจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพสำหรับการย่อยสลายสารมลพิษที่จำเพาะลงไปดินที่ต้องการบำบัด งานวิจัยมากมายพบว่า การบำบัดด้วยวิธีการเติมจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพจะสามารถบำบัดดินปนเปื้อนได้เร็วและมีประสิทธิภาพมากกว่าวิธีการส่งเสริมปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการเจริญของจุลินทรีย์และวิธีการฟื้นฟูสิ่งแวดล้อมโดยธรรมชาติตามลำดับ ดังตัวอย่างงานวิจัยของ Bento และคณะ (2005) ศึกษาการบำบัดดินปนเปื้อนน้ำมันดีเซลเปรียบเทียบวิธีการบำบัดทางชีวภาพทั้ง 3 วิธี พบว่าการเติมจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพสามารถย่อยสลายปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนขนาดเล็กและใหญ่ได้ดีกว่าการเติมสารอาหารและการฟื้นฟูโดยธรรมชาติในดิน Long Beach ประเทศสหรัฐอเมริกา อย่างไรก็ตาม ในดิน Hong Kong ประเทศจีน มีประสิทธิภาพการย่อยสลายปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนขนาดเล็กของการเติมจุลินทรีย์และการฟื้นฟูโดยธรรมชาติไม่ต่างกัน และมีค่ามากกว่าการเติมสารอาหาร ในขณะที่ประสิทธิภาพการย่อยสลายปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนขนาดใหญ่ของการเติมจุลินทรีย์มีค่าสูงกว่าการเติมสารอาหารและการฟื้นฟูโดยธรรมชาติตามลำดับ แสดงให้เห็นถึงความแปรผันของผลการบำบัดโดยชีววิธีอันเนื่องมาจากความซับซ้อนของแต่ละสิ่งแวดล้อม ซึ่งไม่สามารถคาดการณ์ได้

อย่างไรก็ตาม การส่งเสริมปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการเจริญของจุลินทรีย์และการเติมจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพสำหรับการย่อยสลายสารมลพิษที่จำเพาะ เป็นที่นิยมใช้กันอย่างแพร่หลาย และถูกนำมาใช้ร่วมกันเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการบำบัดโดยเฉพาะอย่างยิ่งการบำบัดในแหล่งปนเปื้อนจริง โดยต้องคำนึงถึงการมีอยู่ของจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการย่อยสลายสารมลพิษ ความต้องการสารอาหารของจุลินทรีย์ เช่น คาร์บอน ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส ออกซิเจน และตัวรับอิเล็กตรอน ตลอดจนสถานะที่เหมาะสมต่อการเจริญและการย่อยสลายสารมลพิษของจุลินทรีย์ เช่น อุณหภูมิ ความเค็ม ความเป็นกรด-ด่าง ความสามารถในการเกิดปฏิกริยารีดอกซ์ เป็นต้น ซึ่งควรมีการศึกษาปัจจัยเหล่านี้ในระดับห้องปฏิบัติการและระดับภาคสนามก่อนการบำบัดในพื้นที่จริง ข้อมูลที่ได้จากการศึกษาจะช่วยจัดการกับปัจจัยทางสิ่งแวดล้อมที่จะมีผลยับยั้งการย่อยสลายสารมลพิษในพื้นที่จริง นอกจากนี้ การเลือกใช้จุลินทรีย์และรูปแบบของจุลินทรีย์ที่เหมาะสมสำหรับแต่ละพื้นที่ปนเปื้อนจัดเป็นสิ่งสำคัญที่จะส่งเสริมให้การบำบัดโดยชีววิธีประสบผลสำเร็จ และยังเป็นวิธีการแก้ปัญหาทางสิ่งแวดล้อมที่ดีที่สุดขณะนี้ (Tyagi และคณะ, 2011)

การบำบัดดินปนเปื้อน PAHs ในระดับห้องปฏิบัติการและระดับภาคสนาม นิยมใช้หัวเชื้อจุลินทรีย์รูปแบบต่างๆ เช่น รูปแบบน้ำ รูปแบบตรึง และรูปแบบยัดเกาะบนวัสดุทางการเกษตร ดังจะยกตัวอย่างต่อไปนี้

งานวิจัยของ Cunliffe และ Kertesz (2006b) ศึกษาการบำบัดดินปนเปื้อน PAHs เป็นเวลานาน ความเข้มข้น 5.981 มิลลิกรัม/กรัม ด้วยแบคทีเรีย *Sphingobium yanoikuyae* B1 จำนวนเซลล์เริ่มต้น  $10^9$  CFU/กรัม พบว่าสามารถกำจัด PAHs ในดินได้ 27 เปอร์เซ็นต์ ในระยะเวลา 30 วัน (ความเข้มข้นของ PAHs ณ วันที่ 30 เท่ากับ 4.384 มิลลิกรัม/กรัม) โดยสายพันธุ์ B1 จะมีบทบาทสำคัญในการย่อยสลาย PAHs มวลโมเลกุลต่ำโดยเฉพาะอย่างยิ่งพีแนนทรินเมื่อเปรียบเทียบกับชุดดินที่ไม่ได้เติมสายพันธุ์ B1 งานวิจัยของ Coppotelli และคณะ (2008) ศึกษาการบำบัดดิน

ปนเปื้อนพีแนทรินความเข้มข้นเริ่มต้น 2000 มิลลิกรัม/กิโลกรัม ด้วยแบคทีเรีย *Sphingomonas paucimobilis* 20006FA จำนวนเซลล์เริ่มต้น  $1.4 \times 10^8$  CFU/กรัม พบว่าสามารถกำจัดพีแนทรินได้ 98 เปอร์เซ็นต์ ในระยะเวลา 100 วัน และมีปริมาณพีแนทรินเหลืออยู่ในดินต่ำกว่าระดับมาตรฐานงานวิจัยของ Nopcharoenkul และคณะ (2011) ศึกษาการย่อยสลายไพรีนในดินที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 300 มิลลิกรัม/กิโลกรัม เป็นระยะเวลา 28 วัน โดยใช้สูตรน้ำของแบคทีเรีย *Pseudoxanthomonas* sp. RN402 ที่เตรียมใหม่ (bioaugmentation I) และที่เก็บรักษาไว้นาน 30 วัน (bioaugmentation II) จำนวนเซลล์เริ่มต้นประมาณ  $10^8$  CFU/กรัม พบว่าเมื่อเวลาผ่านไป 14 วัน ปริมาณไพรีนลดลงอย่างเห็นได้ชัดในชุด bioaugmentation ทั้ง 2 ชุด และเมื่อเวลาผ่านไป 28 วัน พบปริมาณไพรีนเหลืออยู่เพียง 24 เปอร์เซ็นต์ใน bioaugmentation I แต่ไม่พบปริมาณไพรีนใน bioaugmentation II ทั้งนี้อาจเป็นเพราะพฤติกรรมการอดอาหารเป็นระยะเวลาหนึ่งของแบคทีเรีย RN402 สูตรน้ำ ทำให้กระตุ้นความสามารถในการย่อยสลายไพรีนของแบคทีเรียเอง งานวิจัยของ Sun และคณะ (2012) ศึกษาการบำบัดดินปนเปื้อน PAHs ความเข้มข้นเริ่มต้น 364.276 มิลลิกรัม/กิโลกรัม ประกอบด้วย PAHs ขนาด 2-3 วงอะโรมาติก 313.133 มิลลิกรัม/กิโลกรัม และขนาด 4-6 วงอะโรมาติก 51.143 มิลลิกรัม/กิโลกรัม โดยใช้วิธีการเติมสารอาหาร การเติมแบคทีเรีย *Rhodococcus ruber* Em1 ที่สามารถย่อยสลายอัลเคนและ PAHs และสามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้ และการเติมสารอาหารร่วมกับแบคทีเรีย เป็นระยะเวลา 175 วัน พบว่าวิธีการบำบัดทั้ง 3 วิธี สามารถทำให้ปริมาณ PAHs ทั้งหมดลดลง อย่างไรก็ตามการเติมสารอาหารเพียงอย่างเดียวสามารถลดปริมาณ PAHs ขนาด 4-6 วงอะโรมาติก ได้เพียงเล็กน้อย ในขณะที่ชุดการทดลองที่มีการเติมแบคทีเรีย Em1 สามารถลดปริมาณ PAHs ขนาด 4-6 วงอะโรมาติก ได้ดี ดังนั้นแบคทีเรีย Em1 จึงมีบทบาทสำคัญในการย่อยสลาย PAHs มวลโมเลกุลสูงในดินที่ทดสอบ

งานวิจัยของ Li และคณะ (2005) ศึกษาการย่อยสลายพีแนทรินและไพรีนในดิน เป็นระยะเวลา 7 วัน โดยใช้แบคทีเรีย *Zoogloea* sp. ตรึงใน biocarrier ซึ่งประกอบด้วยพอลิไวนิลแอลกอฮอล์ 10 เปอร์เซ็นต์ โซเดียมอัลจิเนต 0.5 เปอร์เซ็นต์ และผงถ่านกัมมันต์ 5 เปอร์เซ็นต์ ประสิทธิภาพการย่อยสลายพีแนทรินและไพรีน คือ 85.0 และ 67.1 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ งานวิจัยของ Chen และคณะ (2012) ศึกษาการบำบัดดินปนเปื้อน PAHs ด้วยแบคทีเรียสายพันธุ์ B2 ที่คัดแยกได้จากพื้นที่ปนเปื้อน โดยนำแบคทีเรียมาผสมกับถ่าน biochar ที่เกิดจากการเผาไหม้วัสดุทางการเกษตรชนิดต่างๆ ได้แก่ เศษไม้ เปลือกส้ม ใบไม้ และไม้จากต้นไพน แล้วตรึงในโซเดียมอัลจิเนต 2 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนัก/ปริมาตร) พบว่าชุดการทดลองที่เติมแบคทีเรียตรึงที่มีถ่าน biochar สามารถเพิ่มประสิทธิภาพการกำจัด PAHs ได้ดียิ่งกว่าชุดการทดลองที่เติมแบคทีเรียตรึงที่ไม่มีถ่าน biochar ทั้งนี้เนื่องจากถ่าน biochar ทำหน้าที่เป็นวัสดุดูดซับ PAHs ส่งผลให้แบคทีเรีย B2 สามารถเข้าถึง PAHs ได้เพิ่มขึ้น

งานวิจัยของ Liang และคณะ (2009) ศึกษาการบำบัดดินปนเปื้อนน้ำมันดิบด้วยการเพิ่มจำนวนจุลินทรีย์ท้องถิ่นในอาหารเหลวที่มีพาราฟินเป็นแหล่งคาร์บอนเพียงแหล่งเดียว แล้วนำไปผสมกับวัสดุตรึง ได้แก่ ถ่านคาร์บอนกัมมันต์ หรือซีโอไลต์ ก่อนนำกลับมาใส่ในดินปนเปื้อน พบว่าสามารถกำจัดน้ำมันดิบได้ 48.9 เปอร์เซ็นต์ในระยะเวลา 33 วัน ซึ่งมากกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับชุดดินที่เติมแบคทีเรียเซลล์อิสระ (37.4 เปอร์เซ็นต์) ชุดดินที่เติมสารอาหาร (26.3 เปอร์เซ็นต์) และชุดดินฟื้นฟู

โดยธรรมชาติ (13.0 เปอร์เซ็นต์) โดยชุดดินที่เติมจุลินทรีย์ท้องถิ่นผสมกับวัสดุตั้งสามารถกำจัดสารประกอบอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน 59.8 เปอร์เซ็นต์ และสารประกอบอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน 26.6 เปอร์เซ็นต์ อีกทั้งวัสดุตั้งยังมีหน้าที่ส่งเสริมการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ด้วย งานวิจัยของ Xu และ Lu (2010) ศึกษาการบำบัดดินปนเปื้อนน้ำมันดิบด้วยการเพิ่มจำนวนแบคทีเรียท้องถิ่นในอาหารเหลวที่มีน้ำมันดิบเป็นแหล่งคาร์บอนเพียงแหล่งเดียว แล้วนำไปผสมกับวัสดุตั้งคือผงของเปลือกถั่วลิสงก่อนนำกลับมาใส่ในดินปนเปื้อน พบว่าประสิทธิภาพการกำจัดปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนทั้งหมดในน้ำมันดิบของชุดดินพื้นฟูโดยธรรมชาติ 26 เปอร์เซ็นต์ ชุดดินที่เติมแบคทีเรียท้องถิ่นรูปแบบเซลล์อิสระ 27 เปอร์เซ็นต์ ชุดดินที่เติมผงของเปลือกถั่วลิสง 38 เปอร์เซ็นต์ และชุดดินที่เติมแบคทีเรียท้องถิ่นผสมกับผงของเปลือกถั่วลิสง 61 เปอร์เซ็นต์ ในระยะเวลา 12 สัปดาห์ แสดงให้เห็นว่าผงของเปลือกถั่วลิสงมีประสิทธิภาพในการช่วยบำบัดดินปนเปื้อน เนื่องจากมีโครงสร้างที่เป็นรูและพื้นที่ผิวมาก ทั้งยังมีความสามารถในการดูดซับสูง

นอกจากนี้ การบำบัดดินปนเปื้อน PAHs ในระดับพื้นที่จริง สามารถทำได้โดยการบำบัดในพื้นที่ปนเปื้อนจริง (*in situ*) เช่น landfarming หรือโดยการเคลื่อนย้ายดินปนเปื้อนไปบำบัดในสถานที่อื่น (*ex situ*) เช่น composting biopiling และ bioreactors (Bamforth และ Singleton, 2005)

Landfarming เป็นวิธีการบำบัดดินปนเปื้อนโดยเน้นการกระตุ้นจุลินทรีย์ท้องถิ่นด้วยการเติมสารอาหาร น้ำ และอากาศ งานวิจัยของ Straube และคณะ (2003) รายงานการบำบัดดินปนเปื้อน PAHs มวลโมเลกุลสูง ความเข้มข้นเริ่มต้น 13,000 มิลลิกรัม/กิโลกรัมของดิน ด้วยวิธี landfarming โดยการเติมอากาศและสารประกอบไนโตรเจน ร่วมกับการเติมแบคทีเรียผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ *Pseudomonas aeruginosa* 64 พบว่าประสิทธิภาพการกำจัด PAHs ทั้งหมด 87 เปอร์เซ็นต์ รวมถึงสามารถกำจัดเบนซ์[เอ]แอนทราซีนและเบนโซ[เอ]ไพรีนได้ 79.5 และ 11.3 เปอร์เซ็นต์ ในระยะเวลา 11 เดือน งานวิจัยของ Sun และคณะ (2012) รายงานการบำบัดดินปนเปื้อน PAHs ความเข้มข้นเริ่มต้น 364.276 มิลลิกรัม/กิโลกรัมของดินแห้ง ด้วยวิธี landfarming มีประสิทธิภาพการย่อยสลาย PAHs ทั้งหมด 23.42 เปอร์เซ็นต์ และประสิทธิภาพการย่อยสลาย PAHs ขนาด 4-6 วงอะโรมาติก 10.10 เปอร์เซ็นต์ ในระยะเวลา 175 วัน

Composting เป็นวิธีการบำบัดดินปนเปื้อนโดยเน้นการเติมอากาศด้วยการผสมดินปนเปื้อนเข้ากับปุ๋ยหมักหรือวัสดุทางการเกษตร จุลินทรีย์จะย่อยสลายสารปนเปื้อนแล้วผลิตความร้อนและสารประกอบอินทรีย์และอนินทรีย์ขึ้น แบ่งออกเป็น 4 ช่วงตามอุณหภูมิของระบบ ได้แก่ mesophilic thermophilic cooling และ maturation ซึ่งแต่ละช่วงจะมีกลุ่มจุลินทรีย์ในระบบที่แตกต่างกัน งานวิจัยของ Sayara และคณะ (2011) ศึกษาการบำบัดดินปนเปื้อนสารผสมของ PAHs (ฟลูออรีน ฟีนานทริน แอนทราซีน ฟลูออแรนทีน ไพรีน เบนซ์[เอ]แอนทราซีน ไครซีน) ความเข้มข้นเริ่มต้น 1,000 มิลลิกรัม/กิโลกรัมของดินแห้ง ด้วยวิธี composting โดยการเติมขยะมูลฝอยจากชุมชนและอาหารกระต่าย ร่วมกับการเติมเชื้อรา *Trametes versicolor* ATCC 42530 พบว่าประสิทธิภาพการย่อยสลาย PAHs ทั้งหมด 89.0 เปอร์เซ็นต์ ในระยะเวลา 30 วัน เปรียบเทียบกับประสิทธิภาพของชุดควบคุมดินที่ไม่เติมขยะมูลฝอยจากชุมชนและอาหารกระต่ายซึ่งมีค่าเท่ากับ 29.5 เปอร์เซ็นต์

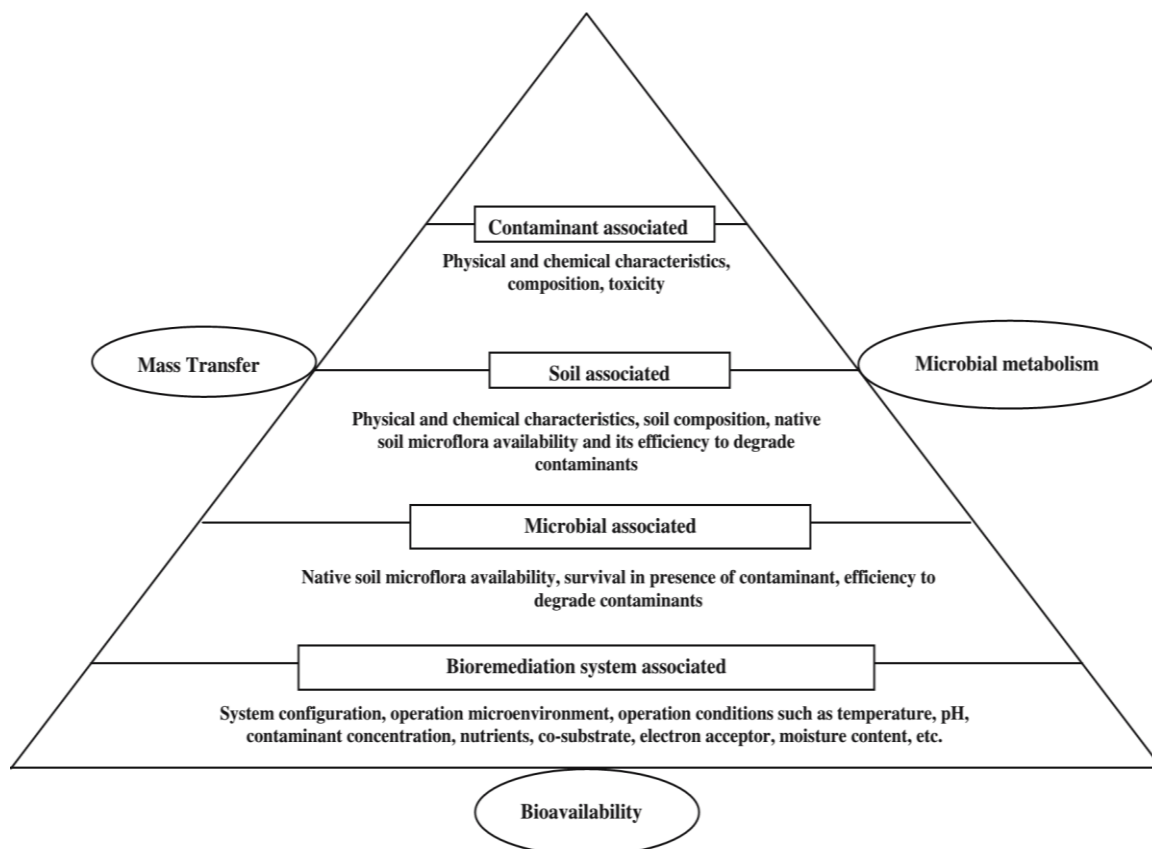
Biopiling เป็นวิธีการบำบัดดินปนเปื้อนโดยการถมดินปนเปื้อนให้มีลักษณะเป็นกองๆ แล้วมีการให้อากาศ สารอาหาร แร่ธาตุ หรือความชื้น คล้ายกับวิธี landfarming แต่แตกต่างกันตรงที่การให้อากาศของวิธี biopiling จะเป็นการให้อากาศผ่านท่อที่วางอยู่ตลอดกองของดินปนเปื้อน งานวิจัยของ Iturbe และคณะ (2004) รายงานการบำบัดดินปนเปื้อนปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนความเข้มข้นเริ่มต้น 4,666 มิลลิกรัม/กิโลกรัมของดิน ด้วยวิธี biopiling ความจุ 100 ลูกบาศก์เมตร ว่ามีประสิทธิภาพการย่อยสลายปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนทั้งหมด 85.2 เปอร์เซ็นต์ ในระยะเวลา 66 วัน

Bioreactors เป็นวิธีการบำบัดดินปนเปื้อนในถังปฏิกรณ์ อาจมีการเติมออกซิเจน สารอาหาร จุลินทรีย์ หรืออาจมีการปรับสภาวะต่างๆให้เหมาะสม เช่น อุณหภูมิ ความเป็นกรด-ด่าง เพื่อให้กระบวนการย่อยสลายในถังปฏิกรณ์เกิดขึ้นอย่างมีประสิทธิภาพ งานวิจัยของ Rehmann และคณะ (2008) ศึกษาการบำบัดดินปนเปื้อนพีแนทริน ฟลูออแรนทีน และไพรีน ความเข้มข้นเริ่มต้นชนิดละ 400 มิลลิกรัม/กิโลกรัมของดิน โดยอาศัย solid-liquid two-phase partitioning bioreactor ซึ่งแบ่งออกเป็น 2 ชั้นตอน ชั้นแรกเป็นการสกัดหรือชะล้าง PAHs ออกจากดินด้วยตัวทำละลายชนิดต่างๆ ได้แก่ น้ำ สารลดแรงตึงผิว และไอโซโพรพานอล เพื่อให้ PAHs ถูกดูดซับบนพอลิยูรีเทนโฟม ผลการสกัดพบว่าไอโซโพรพานอลสามารถชะล้าง PAHs ออกจากดินได้ดีที่สุดในเวลา 2 วัน โดยพบปริมาณ PAHs บนพอลิยูรีเทนโฟมประมาณ 80 เปอร์เซ็นต์ของความเข้มข้น PAHs ที่ปนเปื้อนในดิน ชั้นต่อไปเป็นการย่อยสลาย PAHs ที่ดูดซับบนพอลิยูรีเทนโฟมในถังปฏิกรณ์ขนาด 5 ลิตร ที่มีการเติมกลุ่มจุลินทรีย์ตรึงบนพอลิยูรีเทนโฟมและเติมอากาศในอัตรา 0.3 ลิตร/นาที่ สภาวะมีการเขย่า 200 รอบ/นาที่ อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ผลการบำบัดดินพบว่าประสิทธิภาพการย่อยสลายพีแนทริน ฟลูออแรนทีน และไพรีนมีค่า 78, 36 และ 62 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ในระยะเวลา 14 วัน

## 2.2.2 ปัจจัยที่มีผลต่อการบำบัดดินโดยชีววิธี

การบำบัดดินโดยชีววิธีเป็นกระบวนการที่มีประสิทธิภาพในการฟื้นฟูสิ่งแวดล้อมและมีต้นทุนต่ำ แต่การบำบัดในพื้นที่จริงอาจไม่ประสบความสำเร็จและไม่เป็นไปตามผลการทดลองในห้องปฏิบัติการ รวมทั้งกระบวนการบำบัดพื้นที่จริงแต่ละที่อาจใช้ไม่ได้ผลกับพื้นที่อื่นๆ เนื่องจากขาดข้อมูลเกี่ยวกับปัจจัยที่ควบคุมการเจริญและกระบวนการย่อยสลายสารพิษของจุลินทรีย์ รวมถึงโครงสร้างและลักษณะของดินที่ซับซ้อนและแตกต่างกันตามแต่ละสถานที่ (Lovley และคณะ, 2003) การไม่ประสบผลสำเร็จในการบำบัดดินโดยชีววิธีจึงมีสาเหตุเกี่ยวข้องกับสารปนเปื้อน (contaminant associated) ลักษณะของดิน (soil associated) จุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายสารปนเปื้อน (microbial associated) และวิธีการบำบัด (bioremediation system associated) ซึ่งแต่ละสาเหตุจะมีปัจจัยที่เกี่ยวข้องที่จะส่งผลกระทบต่อความสามารถในการนำสารพิษไปใช้ของจุลินทรีย์ (bioavailability) การถ่ายเทมวลสาร (mass transfer) และวิถีการย่อยสลายสารพิษของจุลินทรีย์ (microbial metabolism) ดังรูปที่ 2.3 อย่างไรก็ตาม ปัจจัยสำคัญที่ส่งผลกระทบต่อประสิทธิภาพการย่อยสลาย PAHs ในดินแสดงดังตารางที่ 2.4 (Mohan และคณะ, 2006)





รูปที่ 2.3 ภาพรวมของปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการบำบัดดินปนเปื้อน PAHs โดยชีววิธี  
(Mohan และคณะ, 2006)

ตารางที่ 2.4 ปัจจัยสำคัญที่ส่งผลกระทบต่อประสิทธิภาพการบำบัดดินปนเปื้อน PAHs โดยชีววิธี

Factors	Influence
pH	Bioavailability, Mass transfer, Microbial metabolism
Temperature	Bioavailability, Mass transfer, Microbial metabolism
Microflora	Bioavailability, Microbial metabolism
Electron acceptor	Bioavailability, Microbial metabolism
Microenvironment	Microbial metabolism
Nutrients	Microbial metabolism
Co-substrate	Microbial metabolism
Soil properties	Bioavailability, Mass transfer
Contaminant characteristics	Bioavailability, Mass transfer, Microbial metabolism

(Mohan และคณะ, 2006)

### 2.2.2.1 ปัจจัยเกี่ยวข้องกับสารปนเปื้อน

การบำบัดดินปนเปื้อน PAHs โดยชีววิธี ควรคำนึงถึงชนิดและความเข้มข้นของ PAHs เนื่องจาก PAHs แต่ละชนิดมีลักษณะทางกายภาพและเคมีต่างกัน ทำให้ความสามารถในการเกิดการย่อยสลายต่างกัน อีกทั้งความแปรผันของระดับความเข้มข้นที่ปนเปื้อนจะก่อให้เกิดความเป็นพิษต่อจุลินทรีย์และสิ่งมีชีวิตต่างกันด้วย

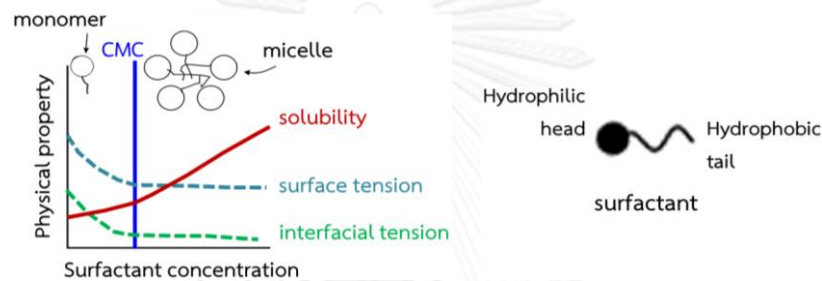
ลักษณะทางกายภาพและเคมีของ PAHs ล้วนแต่ส่งเสริมให้ PAHs เป็นสารที่ยากต่อการย่อยสลาย เนื่องจากโครงสร้างวงอะโรมาติกของ PAHs ประกอบด้วยพายอิเล็กตรอน ( $\pi$  electron; Pi electron) จำนวนมาก จึงยากต่อการเกิดปฏิกิริยาทางเคมีแบบชอบนิวเคลียส (nucleophilic) อีกทั้งยังมีความเสถียรของการจัดเรียงตัวของวงอะโรมาติก เรียงตามลำดับจากความเสถียรมากไปน้อย คือจัดเรียงตัวเป็นมุม เป็นกลุ่ม และเป็นเส้นตรง ความเสถียรของการจัดเรียงตัวนี้สามารถประเมินได้จากค่า bond localization energy (BLE) ซึ่งจะบ่งชี้ตำแหน่งของการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันและศักยภาพในการเกิดไอออนในเซชันที่เกี่ยวข้องกับการแตกวงอะโรมาติก PAHs ยังมีสมบัติละลายน้ำต่ำ จึงเป็นการยากต่อจุลินทรีย์ในการนำ PAHs ไปใช้ โดย PAHs โมเลกุลสูงชัน จะมีสมบัติการละลายน้ำต่ำลงแบบลอการิทึม (Mohan และคณะ, 2006) รวมถึง PAHs มีความสามารถในการดูดซับกับอนุภาคดินสูง จึงเกิดการตกค้างและสะสมในดิน หากเกิดการยึดเกาะกันเป็นเวลานานด้วยกระบวนการอันได้แก่ การแยกชั้น (partitioning) การดูดซับทางกายภาพ (adsorption) การดูดซับทางเคมี (chemisorption) การแพร่กระจาย (diffusion) การละลาย (dissolution) และการจับกันด้วยพันธะโควาเลนต์ (covalent binding) โอกาสในการย่อยสลาย PAHs ในดินจะยิ่งเกิดยากขึ้น (Cunliffe และ Kertesz, 2006b) นอกจากนี้ยังก่อให้เกิดความเป็นพิษต่อจุลินทรีย์และสิ่งมีชีวิตต่างกัน ขึ้นอยู่กับชนิดและความเข้มข้นของ PAHs ซึ่งมีผลกระทบโดยตรงต่อการเจริญและการอยู่รอดของจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการย่อยสลาย PAHs ระดับความเข้มข้นของ PAHs ที่ต่ำเกินไปอาจไม่มีผลกระทบต่อกิจกรรมการย่อยสลายของจุลินทรีย์ และระดับความเข้มข้นที่สูงเกินไปอาจมีผลยับยั้งกิจกรรมการย่อยสลายของจุลินทรีย์เอง (Bamforth และ Singleton, 2005)

### 2.2.2.2 ปัจจัยเกี่ยวข้องกับลักษณะของดิน

ลักษณะทางกายภาพ เคมี และชีวภาพของดิน มีความสำคัญอย่างยิ่งต่อประสิทธิภาพการย่อยสลาย PAHs ในดิน เช่น ชนิดของดิน สารปนเปื้อนอื่นๆ เป็นต้น

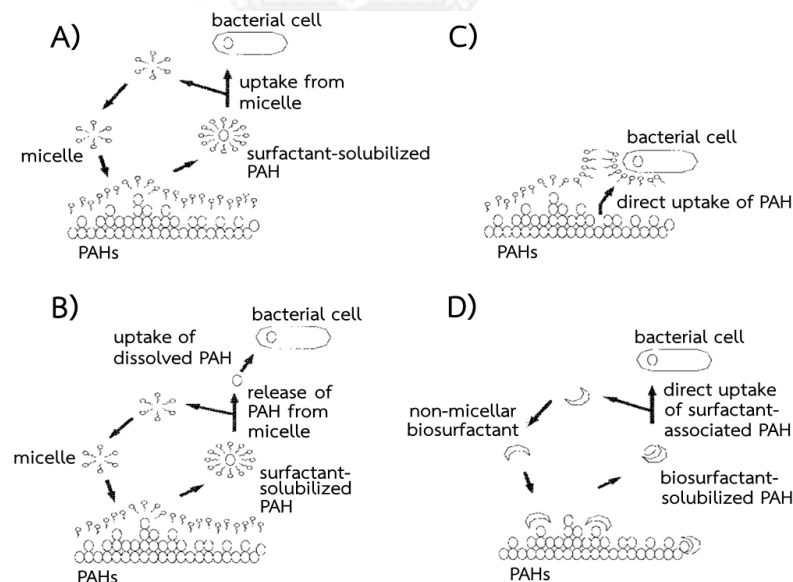
ชนิดและองค์ประกอบของดิน เป็นปัจจัยสำคัญที่กำหนดตำแหน่งของ PAHs เนื่องจากความสามารถของ PAHs ในการดูดซับกับอนุภาคดินแต่ละชนิดนั้นไม่เท่ากัน ทำให้ PAHs สามารถละลายน้ำได้ในปริมาณไม่เท่ากัน โดยดินเหนียวและดินตะกอนจะสามารถดูดซับ PAHs ได้มากกว่าดินร่วนและดินทรายตามลำดับ ดังนั้นหากมีสัดส่วนของดินเหนียวและดินตะกอนต่ำ จะทำให้ PAHs ละลายน้ำได้ในปริมาณมาก ส่งผลให้จุลินทรีย์สามารถนำ PAHs ไปใช้ได้ดียิ่งขึ้น ประสิทธิภาพการย่อยสลายก็ดีขึ้นไปด้วย แต่หากมีสัดส่วนของดินเหนียวและดินตะกอนสูง ปริมาณ PAHs ที่ละลายในน้ำจะน้อย ทำให้จุลินทรีย์ย่อยสลาย PAHs แต่เพียงปริมาณน้อย ส่งผลให้ประสิทธิภาพการย่อยสลายไม่ดีเท่าที่ควร (Mohan และคณะ, 2006) แนวทางการแก้ไขคือเพิ่มการละลายของ PAHs ออกมาจากดินด้วยการใช้สารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์ (synthetic surfactants) หรือสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ (biosurfactants) โดยอาศัยคุณสมบัติในการลดแรงตึงระหว่างผิวที่ประจันของน้ำและ PAHs

(interfacial tension) (รูปที่ 2.4) อย่างไรก็ตาม งานวิจัยของ Makkar และ Rockne (2003) เปรียบเทียบการส่งเสริมการย่อยสลาย PAHs ของสารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์และสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ พบว่าสารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์สามารถยับยั้งกิจกรรมการย่อยสลาย PAHs ของจุลินทรีย์ โดยก่อให้เกิดความเป็นพิษ กระตุ้นการเจริญของจุลินทรีย์ย่อยสลายสารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์ หรือ กัก PAHs ให้อยู่โครงสร้างไมเซลล์ของสารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์ ทำให้จุลินทรีย์ย่อยสลาย PAHs ไม่สามารถเข้าถึงและนำ PAHs ไปใช้ได้ นอกจากนี้ยังอาจเกิดการตกค้างของสารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์ ในสิ่งแวดล้อมอีกด้วย ขณะที่สารลดแรงตึงผิวชีวภาพนั้นสามารถย่อยสลายได้เอง ไม่มีความเป็นพิษ หรือมีความเป็นพิษต่ำ และส่วนใหญ่ไม่ได้มีโครงสร้างไมเซลล์ที่แท้จริง จึงง่ายต่อการถ่ายโอน PAHs ให้จุลินทรีย์ ดังกลไกการส่งเสริมการย่อยสลาย PAHs ของสารลดแรงตึงผิวแสดงในรูปที่ 2.5



รูปที่ 2.4 คุณสมบัติทางกายภาพของสารลดแรงตึงผิวที่ส่งเสริมการละลายของ PAHs

\* CMC: ความเข้มข้นวิกฤตของการเกิดไมเซลล์ (Critical micelle concentration) (Mulligan และคณะ, 2001)



รูปที่ 2.5 กลไกการส่งเสริมการย่อยสลาย PAHs ของสารลดแรงตึงผิว

\* A: การได้รับ PAHs โดยตรงจากไมเซลล์; B: การได้รับ PAHs จากชั้นของเหลวหลังจากถูกปล่อยออกจากไมเซลล์; C: การได้รับ PAHs โดยตรงผ่านการสัมผัสระหว่างเซลล์-สารลดแรงตึงผิว-PAHs; D: การได้รับ PAHs จากไมเซลล์ไม่แท้จริงของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ (Makkar และ Rockne, 2003)

สารลดแรงตึงผิวชีวภาพ ผลิตโดยจุลินทรีย์จำพวกแบคทีเรียและยีสต์จากสารตั้งต้นต่างๆ เช่น สารประกอบไฮโดรคาร์บอน คาร์โบไฮเดรต และน้ำมันพืช เป็นต้น แล้วปล่อยออกมาออกเซลล์ แบ่งเป็น 5 ชนิดตามองค์ประกอบทางเคมีและชนิดของจุลินทรีย์ที่ผลิต (Gautam และ Tyagi, 2006) ดังแสดงตัวอย่างในตารางที่ 2.5

- ไกลโคลิพิด (glycolipids) เช่น แรมโนลิพิด (rhamnolipids) ทรีฮาโลลิพิด (trehalolipids) โซฟอโรลิพิด (sophorolipids)
- ลิพอเปปไทด์ (lipopeptides) และลิพอโปรตีน (lipoproteins) เช่น เซอร์แฟคติน (surfactin) ไลเคนไนซิน (lichenysin) ไมโคซบติลิน (mycosubtilin) อีทูริน (iturin) เฟนจิสิน (fengycin) พลิวาสตาติน (plipastatin)
- กรดไขมัน (fatty acids) ฟอสโฟลิพิด (phospholipids) และนิวทรัลลิพิด (neutral lipids) เช่น ฟอสฟาติดีลเอทานอลามีน (phosphatidylethanolamine)
- polymeric biosurfactants เช่น อิมัลชัน (emulsan) ลิพอแซน (liposan) แมนโนโปรตีน (mannoprotein) สารประกอบพอลิแซ็กคาไรด์โปรตีน (polysaccharide-protein complex)
- particulate biosurfactants เช่น extracellular membrane vesicle

แนวโน้มการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพของจุลินทรีย์สามารถตรวจสอบได้ด้วยการวัดค่าแรงตึงผิว (surface tension) และแรงตึงระหว่างผิวที่ประจัน (interfacial tension) การวัดดัชนีก่อเกิดอิมัลชัน (emulsification index;  $E_{24}$ ) ระหว่างน้ำกับสารประกอบไฮโดรคาร์บอน การวัดคุณสมบัติไม่ชอบน้ำ (hydrophobicity) การวัดการละลายของสารประกอบไฮโดรคาร์บอนในน้ำ (Costa และคณะ, 2010) และการตรวจสอบยีนที่เกี่ยวข้องกับการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ (Tapi และคณะ, 2010; Schmidberger และคณะ, 2013)

งานวิจัยมากมายรายงานการส่งเสริมการย่อยสลาย PAHs ของจุลินทรีย์ด้วยการใช้สารลดแรงตึงผิวชีวภาพ (Cameotra และ Makkar, 2010) งานวิจัยของ Zhao และคณะ (2011b) รายงานการส่งเสริมการละลายพีแนทรีนจากดินในระบบ bioslurry ด้วยสารลดแรงตึงผิวชีวภาพความเข้มข้น 1.5 กรัม/ลิตร ที่ผลิตจากแบคทีเรีย *Acinetobacter calcoaceticus* BU03 ต่อมางานวิจัยของ Zhao และคณะ (2011a) พบว่าแรมโนลิพิดที่ผลิตจากแบคทีเรีย *Pseudomonas aeruginosa* ATCC9027 สามารถเพิ่มความไม่ชอบน้ำของผิวเซลล์แบคทีเรีย *Pseudomonas aeruginosa* P-CG3 และส่งเสริมการย่อยสลายพีแนทรีนของสายพันธุ์ P-CG3 อย่างไรก็ตาม แรมโนลิพิดดังกล่าวมีผลให้ความไม่ชอบน้ำของผิวเซลล์แบคทีเรีย *Bacillus subtilis* BUM ลดลง จึงยับยั้งการย่อยสลายพีแนทรีนของสายพันธุ์ BUM นอกจากนี้ ยังพบว่าจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการย่อยสลาย PAHs จะสามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพด้วย (Nie และคณะ, 2010; Reddy และคณะ, 2010; Ferradji และคณะ, 2014) งานวิจัยของ Yuan และคณะ (2013) คัดแยกแบคทีเรีย *Acinetobacter* sp. USTB-X ที่มีความสามารถในการย่อยสลายไพรีนและผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพเมื่อมีไพรีนเป็นแหล่งคาร์บอน และงานวิจัยของ Ferradji และคณะ (2014) คัดแยกแบคทีเรีย *Streptomyces* spp. AB1, AH4 และ AM2 ที่มีความสามารถในการย่อยสลายเนฟธาลินและน้ำมันดิบและยังสามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้อีกด้วย

ตารางที่ 2.5 ตัวอย่างสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากจุลินทรีย์สำหรับการบำบัดสิ่งแวดล้อมโดยชีววิธี

สารลดแรงตึงผิวชีวภาพ	จุลินทรีย์	สารตั้งต้น	สารพิษในสิ่งแวดล้อม	อ้างอิง
แรมโนลิพิด	<i>Pseudomonas alcaligenes</i> PCL	น้ำมันปาล์ม (3%)	-	Oliveira และคณะ, 2009
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> UFPEDA614	กลีเซอรอล	-	Neto และคณะ, 2009
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> L1-2	น้ำมันจากการปรุงอาหาร	น้ำมันปิโตรเลียม	Costa และคณะ, 2010
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> MTCC 2297	น้ำมันรำข้าวที่ผ่านการใช้งาน (3.48%)	คอปเปอร์	Venkatesh และ Vedaraman, 2012
	<i>Pseudoxanthomonas</i> sp. PNK-04	แมนนิทอล (2%)	สารประกอบอะโรมาติก	Nayak และคณะ, 2009
ทรีฮาโลลิพิด	<i>Alcaligenes faecalis</i>	น้ำมันดีเซล (2%)	น้ำมันปิโตรเลียม	Bharali และคณะ, 2011
	<i>Rhodococcus</i> sp. PML026	น้ำมันดอกทานตะวัน (2%)	-	White และคณะ, 2013
โซฟอโรลิพิด	<i>Candida bombicola</i> NRRL Y-17069	หางนม (9%) กลูโคส (1%) และกรดไขมันโอเลอิก (10%)	-	Daverey และ Pakshirajan, 2010
แมนโนซิลอิรี	<i>Calyptogena soyoae</i> SY62	น้ำมันมะกอก (5%)	-	Konishi และคณะ, 2010
ทริทอลลิพิด	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 21332	กลูโคส (4%)	น้ำมันดีเซล	Whang และคณะ, 2008
เซอร์แฟคติน		กลูโคส	น้ำมันดิบ	Ismail และคณะ, 2013
ลิพอเปปไทด์		<i>Bacillus subtilis</i> DSVP23	น้ำมันจากสลัดจ์	น้ำมันปิโตรเลียม
อิมัลแซน	<i>Acinetobacter venetianus</i> RAG-1		ปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอน	Dams-Kozłowska และคณะ, 2008

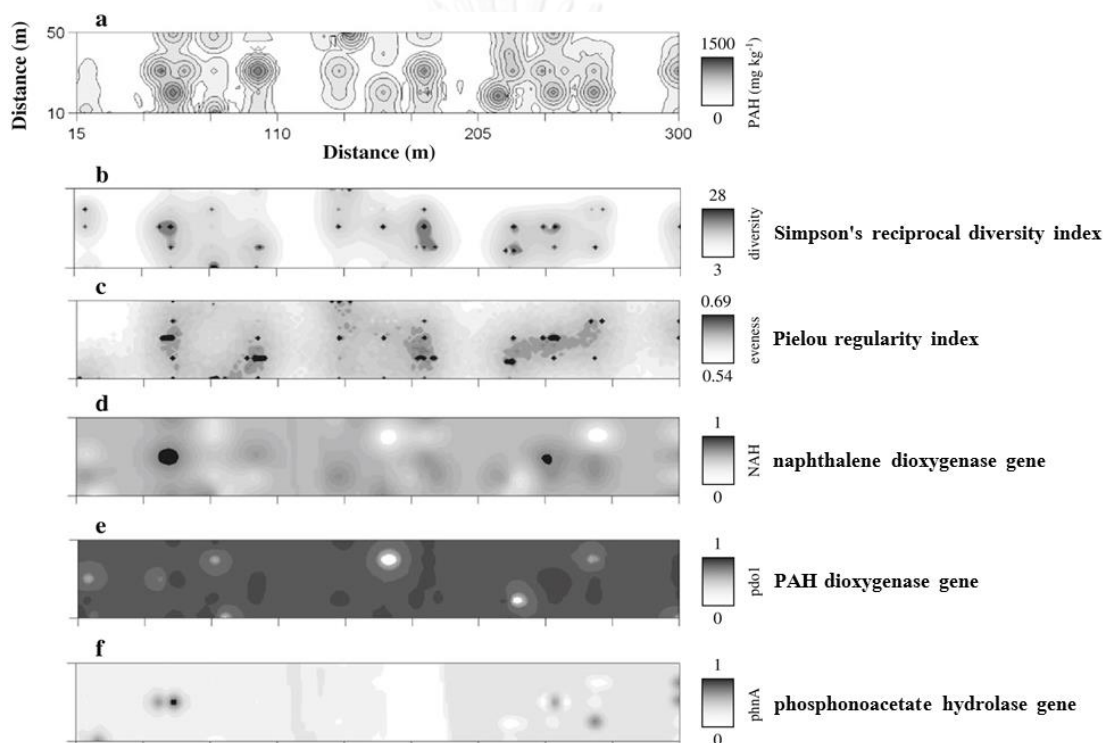
- หมายถึง ไม่ได้ทดสอบการบำบัดสิ่งแวดล้อมปนเปื้อนสารพิษ แต่มีสมบัติที่ดีในการนำไปใช้ในการบำบัดสิ่งแวดล้อมโดยชีววิธี

นอกจากนี้ การมีอยู่ของสารปนเปื้อนอื่นๆอาจมีผลยับยั้งหรือส่งเสริมการย่อยสลาย PAHs ในดินได้ เนื่องจาก PAHs ที่ปนเปื้อนมักมาจากการปนเปื้อนปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนหรือน้ำมัน ซึ่งประกอบด้วยสารอินทรีย์และสารประกอบไฮโดรคาร์บอนที่มีมวลโมเลกุลต่างๆทั้งที่มีโครงสร้างเป็นอะลิฟาติกและอะโรมาติก (Khodadadi และคณะ, 2012) ลำดับการย่อยสลายทางชีวภาพขององค์ประกอบในน้ำมัน เรียงจากง่ายไปยากได้ดังนี้  $n$ -alkanes > branched-chain alkanes > branched alkenes > low molecular weight  $n$ -alkyl aromatics > monoaromatics > cyclic alkanes > PAHs >> asphaltenes (Tyagi และคณะ, 2011) ซึ่งองค์ประกอบส่วนใหญ่สามารถย่อยสลายทางชีวภาพได้ง่ายกว่า PAHs อย่างไรก็ตาม อัลเคน ( $n$ -alkanes) เป็นองค์ประกอบในน้ำมันปิโตรเลียมที่มีปริมาณมาก แบ่งได้เป็น 4 ประเภทตามจำนวนอะตอมคาร์บอน ได้แก่ อัลเคนที่มีจำนวนคาร์บอน 1-11 อะตอม (short-chain liquid  $n$ -alkanes; SLA) จำนวนคาร์บอน 12-16 อะตอม (long-chain liquid  $n$ -alkanes; LLA) จำนวนคาร์บอน 17-28 อะตอม (short-chain solid  $n$ -alkanes; SSA) และจำนวนคาร์บอนมากกว่า 28 อะตอม (long-chain solid  $n$ -alkanes; LSA) ส่วนใหญ่สามารถย่อยสลายได้ทางชีวภาพโดยเฉพาะอย่างยิ่ง LLA และ SSA เนื่องจากมีสมบัติละลายน้ำได้น้อย จึงมีความเป็นพิษต่อเซลล์จุลินทรีย์ต่ำ ทำให้เกิดการย่อยสลายได้โดยจุลินทรีย์ภายในระยะเวลาไม่นาน ในขณะที่ LSA สามารถละลายน้ำได้น้อยมาก จึงเกิดการย่อยสลายทางชีวภาพช้ากว่า แต่สำหรับ SLA จะมีความเป็นพิษต่อจุลินทรีย์มากเนื่องจากสามารถละลายน้ำได้มาก จึงเข้าไปทำลายไขมันบริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ของจุลินทรีย์และยับยั้งการทำงานของจุลินทรีย์ย่อยสลายสารพิษ (Plohl และ Leskovšek, 2002) งานวิจัยของ Feitkenhauer และคณะ (2003) ศึกษาผลของเฮกซะเดคเคนต่อการย่อยสลายไพรีนของแบคทีเรีย *Thermus brockii* sp. Hamburg ที่สามารถทนอุณหภูมิสูง พบว่าแบคทีเรียดังกล่าวสามารถย่อยสลายไพรีนได้ในสภาวะที่มีเฮกซะเดคเคนที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 36 ชั่วโมง อีกทั้งยังสามารถย่อยสลายเฮกซะเดคเคนได้อีกด้วย ดังนั้นเฮกซะเดคเคนจึงไม่มีผลยับยั้งการย่อยสลายไพรีนของสายพันธุ์ Hamburg ในสภาวะที่ทดลอง ยิ่งไปกว่านั้นเฮกซะเดคเคนยังส่งเสริมการย่อยสลายไพรีน เนื่องจากเฮกซะเดคเคนหรืออัลเคนสายยาวชนิดที่สามารถย่อยสลายได้ทางชีวภาพจะช่วยเพิ่มการละลายของไพรีน ทำให้เพิ่มโอกาสของแบคทีเรียในการสัมผัสไพรีนด้วย

### 2.2.2.3 ปัจจัยเกี่ยวข้องกับจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายสารปนเปื้อน

ความหลากหลายและความอุดมสมบูรณ์ของจุลินทรีย์ท้องถิ่นก็เป็นปัจจัยสำคัญในการบำบัดดิน โดยเฉพาะอย่างยิ่งจุลินทรีย์ท้องถิ่นที่มีความสามารถในการย่อยสลาย PAHs งานวิจัยมากมายตรวจสอบจุลินทรีย์ย่อยสลาย PAHs และ/หรือตรวจหายีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลาย PAHs ในตัวอย่างดินชนิดต่างๆ เพื่อใช้เป็นข้อมูลเบื้องต้นในการประเมินการบำบัดโดยชีววิธี การตรวจสอบการมีอยู่ของแบคทีเรียย่อยสลาย PAHs สามารถทำได้หลายวิธี ได้แก่ การคัดแยกแบคทีเรียย่อยสลาย PAHs (Liu และคณะ, 2010) การนับจำนวนแบคทีเรียย่อยสลาย PAHs ด้วยวิธี Most probable number (MPN) (Uyttebroek และคณะ, 2006) การตรวจประชาคมจุลินทรีย์ด้วยวิธี PCR-DGGE (Cui และคณะ, 2008) สำหรับการตรวจสอบปริมาณของยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลาย PAHs ในตัวอย่างสิ่งแวดล้อมสามารถทำได้ด้วยวิธี quantitative PCR (Marcos และคณะ, 2012)

งานวิจัยของ Bengtsson และคณะ (2013) ศึกษาประชาคมจุลินทรีย์ด้วยวิธี PCR-DGGE ของยีนบริเวณ 16S rDNA และยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลาย PAHs ด้วยวิธี PCR ในดินปนเปื้อนครีโอลไฮท ประเทศสวีเดน แล้วนำมาวิเคราะห์เชิงพื้นที่ (spatial analysis) โดยใช้เทคนิคสถิติทางภูมิศาสตร์ (Geostatistical technique) ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 2.6 แสดงให้เห็นว่าความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณการปนเปื้อน PAHs และประชาคมจุลินทรีย์เป็นไปในเชิงบวก รวมถึงการมีอยู่ของยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลาย PAHs แสดงให้เห็นถึงศักยภาพในการย่อยสลาย PAHs ในดินชนิดนี้ การบำบัดทางชีววิธีจึงอาจทำได้โดยการกระตุ้นจุลินทรีย์ท้องถิ่นให้ทำงาน



รูปที่ 2.6 การกระจายเชิงพื้นที่ของปริมาณ PAHs (a) ความหลากหลายและการกระจายตัวของจุลินทรีย์ (b และ c) และยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลาย PAHs (d-f) ของดินปนเปื้อนครีโอลไฮท (Bengtsson และคณะ, 2013)

#### 2.2.2.4 ปัจจัยเกี่ยวข้องกับวิธีการบำบัด

ระบบการบำบัดที่ใช้และสถานะการบำบัด เช่น ปริมาณสารอาหาร ปริมาณออกซิเจน ตัวรับอิเล็กตรอน อุณหภูมิ ความเป็นกรด-ด่าง ความชื้น ความเค็ม ฯลฯ ล้วนแต่ส่งผลต่อประสิทธิภาพการบำบัด ดังนั้นจึงต้องควบคุมสถานะการบำบัดให้เหมาะสม อย่างไรก็ตามสิ่งแวดล้อมในธรรมชาติมักมีปัจจัยทางกายภาพแปรผันไปตามฤดูกาล ยากต่อการควบคุมสถานะให้เหมาะสมต่อการบำบัดในพื้นที่ปนเปื้อน ทั้งนี้การบำบัดด้วยถังปฏิกรณ์จึงเป็นทางเลือกที่ดีในการกำจัดสารพิษในดิน เนื่องจากสามารถถ่ายเทมวลได้ดีในสถานะการบำบัดที่เหมาะสม ทำให้ความสามารถในการนำสารพิษไปใช้ของจุลินทรีย์สูง แต่อาจมีต้นทุนสูงกว่าเมื่อเทียบกับวิธีทางชีวภาพอื่นๆ (Mohan และคณะ, 2006)

- สารอาหาร

แม้ว่าในธรรมชาติจะมีความหลากหลายของจุลินทรีย์สูง แต่บางครั้งอาจมีจำนวนจุลินทรีย์ย่อยสลาย PAHs ไม่เพียงพอ จึงต้องกระตุ้นให้มีการเพิ่มจำนวนจุลินทรีย์โดยการเติมสารอาหาร เมื่อกระบวนการย่อยสลายเกิดขึ้น PAHs มวลโมเลกุลต่ำจะถูกย่อยสลายก่อน จากนั้นปริมาณสารอาหารจะลดลง ทำให้มีปริมาณสารอาหารไม่เพียงพอต่อการย่อยสลาย PAHs มวลโมเลกุลสูงต่อไป (Thapa และคณะ, 2012)

- ออกซิเจน/ตัวรับอิเล็กตรอน

ในธรรมชาติการย่อยสลาย PAHs สามารถเกิดได้ทั้งแบบใช้และไม่ใช้ออกซิเจน แต่กระบวนการย่อยสลายแบบไม่ใช้ออกซิเจนนั้นอาจก่อให้เกิดผลิตภัณฑ์ที่มีความเป็นพิษ (Bamforth และ Singleton, 2005) จึงนิยมใช้กระบวนการย่อยสลายแบบใช้ออกซิเจนเป็นส่วนใหญ่ ซึ่งออกซิเจนจะมีความสำคัญต่อการแตกวงอะโรมาติก หากมีการปนเปื้อน PAHs ในปริมาณมาก ออกซิเจนจะถูกนำไปใช้ในปริมาณมากเช่นกัน ก่อให้เกิดเป็นสภาวะไร้ออกซิเจนในดิน จากนั้นแบคทีเรียย่อยสลาย PAHs ที่ไม่ใช้ออกซิเจนจะมีบทบาทในการย่อยสลายขึ้นมาแทน โดยใช้ตัวรับอิเล็กตรอน เช่น ไนเตรต ไอรอน(III) หรือซัลเฟต แต่ตัวรับอิเล็กตรอนดังกล่าวจะทำให้ได้พลังงานต่ำ ทำให้กิจกรรมการย่อยสลาย PAHs ของจุลินทรีย์ต่ำและใช้เวลานาน (Thapa และคณะ, 2012)

- อุณหภูมิ

อุณหภูมิในสิ่งแวดล้อมตามธรรมชาติมีการแปรผันตามฤดูกาลตลอดทั้งปี อย่างไรก็ตามกระบวนการย่อยสลาย PAHs ทางชีวภาพสามารถเกิดขึ้นได้ที่อุณหภูมิช่วงกว้าง ขึ้นอยู่กับชนิดของจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการย่อยสลาย แต่การศึกษาวิจัยส่วนใหญ่เน้นช่วงอุณหภูมิปานกลาง (mesophilic) ทำให้อุณหภูมิที่เหมาะสมในการย่อยสลาย PAHs ส่วนใหญ่อยู่ในช่วงอุณหภูมิปานกลาง (Bamforth และ Singleton, 2005) นอกจากอุณหภูมิจะมีผลต่อการเจริญและการย่อยสลายของจุลินทรีย์แล้ว ยังมีผลต่อองค์ประกอบทางกายภาพและเคมีของดินซึ่งจะมีผลกระทบต่อความสามารถในการนำ PAHs ไปใช้ของจุลินทรีย์อีกด้วย (Tyagi และคณะ, 2011)

- ปัจจัยอื่นๆ

ปัจจัยอื่นๆ เช่น ความเป็นกรด-ด่าง ความชื้น ความเค็ม ชนิดและปริมาณของหัวเชื้อจุลินทรีย์ที่เติมลงไป ก็มีผลต่อการย่อยสลาย PAHs ในดิน โดยจุลินทรีย์แต่ละชนิดจะมีปัจจัยเหล่านี้ที่เหมาะสมต่อการเจริญและกิจกรรมการย่อยสลาย PAHs แตกต่างกันไป

งานวิจัยของ Chen และคณะ (2008) ศึกษาปัจจัยที่เหมาะสมต่อการย่อยสลายฟิแนนทรินของแบคทีเรีย *Sphingomonas* sp. ในดินตะกอนป่าชายเลนด้วยการออกแบบการทดลองมุมฉาก (orthogonal experimental design) พบว่าสภาวะที่เหมาะสมต่อการย่อยสลายฟิแนนทรินในดินของแบคทีเรียดังกล่าว คือ อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเค็ม 15 ล้านล้านส่วน (parts per trillion; ppt) อัตราส่วนของคาร์บอน:ไนโตรเจน 100:1 และปริมาณหัวเชื้อแบคทีเรียที่เติมลงไป  $10^6$  MPN/กรัม โดยปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการย่อยสลายฟิแนนทรินมากที่สุด คือ ความเค็มและปริมาณหัวเชื้อแบคทีเรีย แม้ว่าสภาวะการบำบัดที่เหมาะสมในแต่ละพื้นที่จะแตกต่างกันขึ้นอยู่กับชนิดของจุลินทรีย์ย่อยสลายสารพิษ อย่างไรก็ตามสามารถประมาณค่าที่เหมาะสมของปัจจัยต่างๆต่อการย่อยสลาย PAHs ในดินได้ตามตารางที่ 2.6



**ตารางที่ 2.6** ค่าที่เหมาะสมของปัจจัยต่างๆต่อการย่อยสลาย PAHs ในดิน

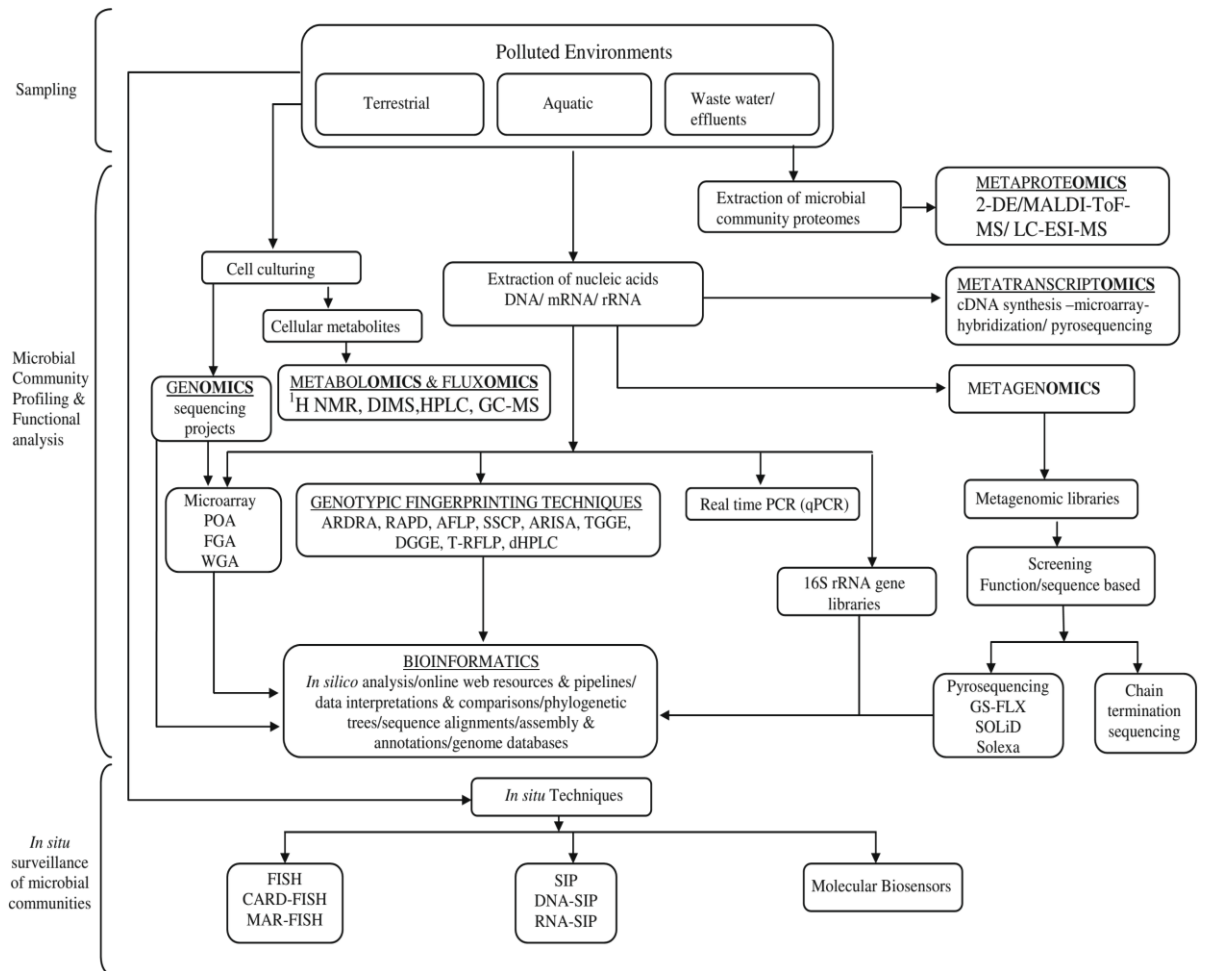
ปัจจัย	ค่าที่เหมาะสม	หมายเหตุ	อ้างอิง
สารอาหาร	100:10:1	อัตราส่วนคาร์บอน:ไนโตรเจน:ฟอสฟอรัส	Leys และคณะ, 2005a; Thapa และคณะ, 2012
ออกซิเจน	10-40 %	วิเคราะห์ในรูปพรุนของดิน	Thapa และคณะ, 2012
อุณหภูมิ	20-30 องศาเซลเซียส	อุณหภูมิต่ำ-ลดกิจกรรมการย่อยสลายของจุลินทรีย์ อุณหภูมิสูง-การละลายน้ำของ PAHs เพิ่มขึ้น ปริมาณออกซิเจนละลายน้ำต่ำลง จึงลดกิจกรรมการย่อยสลายของจุลินทรีย์ใช้อากาศ	Bamforth และ Singleton, 2005; Thapa และคณะ, 2012
ความเป็นกรด-ต่าง	6.5-8.0	สภาวะกรดหรือด่างรุนแรง-ลดกิจกรรมการย่อยสลายของจุลินทรีย์	Tyagi และคณะ, 2011; Thapa และคณะ, 2012
ความชื้น	30-90 %	ความชื้นต่ำ-ยับยั้งการเจริญและการย่อยสลายของจุลินทรีย์ ความชื้นสูง-ลดปริมาณอากาศในดิน จึงลดกิจกรรมการย่อยสลายของจุลินทรีย์ใช้อากาศ	Tyagi และคณะ, 2011; Thapa และคณะ, 2012
ความเค็ม	มีการศึกษา น้อยมาก	ความเค็มสูง-ยับยั้งกิจกรรมการย่อยสลายของจุลินทรีย์	Chen และคณะ, 2008

### 2.2.3 เทคนิคชีววิทยาโมเลกุลในการตรวจติดตามการบำบัด

กระบวนการบำบัดโดยชีววิธีจะเกี่ยวข้องกับองค์ประกอบหลักๆ คือ จุลินทรีย์ท้องถิ่นหรือจุลินทรีย์ที่ถูกเติมลงไปในพื้นที่สิ่งแวดล้อม ความสามารถในการย่อยสลายสารพิษของจุลินทรีย์ และการตอบสนองต่อการเปลี่ยนแปลงสภาวะแวดล้อมของจุลินทรีย์ องค์ประกอบเหล่านี้สามารถใช้ประเมินประสิทธิภาพการบำบัดที่เกิดขึ้นในสิ่งแวดล้อม จึงมีการประยุกต์ใช้เทคนิคชีววิทยาโมเลกุลในการตรวจติดตามการบำบัดสิ่งแวดล้อมที่มีความซับซ้อน (รูปที่ 2.7) (Lovley และคณะ, 2003; Maphosa และคณะ, 2012) ซึ่งเป็นวิธีที่ใช้เวลาดำเนินงานต่ำ มีความถูกต้องและความแม่นยำสูง สามารถศึกษาได้ทั้งจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้และยังไม่สามารถคัดแยกได้ในห้องปฏิบัติการ จึงเป็นการปรับปรุงความเข้าใจเกี่ยวกับกิจกรรมของจุลินทรีย์และวิธีการย่อยสลายสารพิษ เพื่อที่จะทำให้กระบวนการบำบัดโดยชีววิธีประสบผลสำเร็จ (Widada และคณะ, 2002b; Malik และคณะ, 2008)

#### 2.2.3.1 Polymerase Chain Reaction (PCR)

PCR เป็นเทคนิคการสังเคราะห์ชิ้นส่วนของ DNA ในหลอดทดลอง โดยอาศัยไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีนบริเวณที่ต้องการเพิ่มจำนวน จึงสามารถใช้ในการตรวจหาจุลินทรีย์หรือยีนที่จำเพาะ



รูปที่ 2.7 เทคนิคชีววิทยาโมเลกุลที่ใช้ในการตรวจติดตามการบำบัดสิ่งแวดล้อม

(Desai และคณะ, 2010)

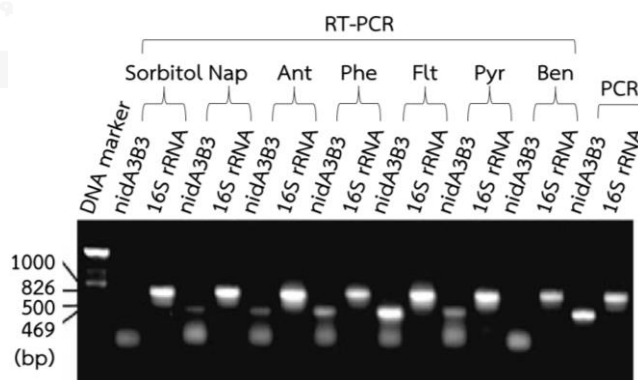
งานวิจัยของ Leys และคณะ (2004) ออกแบบไพรเมอร์ Spingo108f และ Spingo420r ที่จำเพาะต่อยีนบริเวณ 16S rDNA ของแบคทีเรียแกรมลบ *Spingomonas* ในแฟมิลี *Sphingomonadaceae* กลุ่ม Alpha-proteobacteria เพื่อใช้ตรวจหาแบคทีเรียดังกล่าวในดินปนเปื้อน PAHs ด้วยเทคนิค PCR พบว่าไพรเมอร์ดังกล่าวมีความจำเพาะต่อแบคทีเรีย *Spingomonas* สูง โดยสามารถจับกับ *Spingomonas* ได้หลายสายพันธุ์ เกิดผลิตภัณฑ์ PCR ขนาด 352 bp และยังสามารถจับกับแบคทีเรียอื่น ๆ ในแฟมิลีเดียวกัน ได้แก่ *Porphyrobacter*, *Erythrobacter*, *Erythromicrobium* และ *Zymomonas* แต่ไม่สามารถจับกับแบคทีเรียอื่นในกลุ่ม Alpha-proteobacteria ได้ ต่อมา Leys และคณะ (2005b) ออกแบบไพรเมอร์ MYCO66f และ MYCO600r ที่จำเพาะต่อยีนบริเวณ 16S rDNA ของแบคทีเรียแกรมบวก *Mycobacterium* ซึ่งจัดอยู่ในกลุ่ม fast-growing mycobacteria เพื่อใช้ตรวจหาแบคทีเรียดังกล่าวในดินปนเปื้อน PAHs ด้วยเทคนิค PCR พบว่าไพรเมอร์ดังกล่าวมีความจำเพาะต่อแบคทีเรีย *Mycobacterium* สูง โดยเฉพาะอย่างยิ่ง *M. frederiksbergense* และ *M. austroafricanum* เกิดผลิตภัณฑ์ PCR ขนาด 578 bp งานวิจัยของ Chadhain และคณะ (2006) ออกแบบไพรเมอร์ Rieske\_f และ Rieske\_r จากลำดับ

กรดอะมิโนบริเวณหน่วยย่อยแอลฟาของยีนไดออกซิจีเนสเพื่อใช้ตรวจหายีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนด้วยเทคนิค PCR พบว่าไพรเมอร์ดังกล่าวสามารถจับกับยีนไดออกซิจีเนสที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายเบนซีน โทลูอีน แนพธาซีน ฟีนแอนทริน และไบฟีนิลได้ เกิดผลิตภัณฑ์ PCR ขนาด 78 bp โดยทดสอบกับแบคทีเรียหลายชนิด ได้แก่ *Burkholderia xenovorans* LB400, *Comamonas testosteroni* GZ39, *Pseudomonas putida* F1 และ *Pseudomonas putida* NCIB 9816-4 และงานวิจัยของ Ding และคณะ (2010) ออกแบบไพรเมอร์ PAH-RHD $\alpha$ -396F และ PAH-RHD $\alpha$ -696R จากลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณหน่วยย่อยแอลฟาของยีนไดออกซิจีเนส ได้แก่ ยีน *phdAc*, *narAa*, *nidA* ของแบคทีเรียแกรมบวก และยีน *nahAc*, *phnAc*, *nagAc*, *bphA1*, *ndo-3*, *ndo-5* ของแบคทีเรียแกรมลบ เพื่อใช้ตรวจหายีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนในดินปนเปื้อนฟีนแอนทรินด้วยเทคนิค PCR พบว่าไพรเมอร์มีความจำเพาะต่อยีนไดออกซิจีเนสที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลาย PAHs ประมาณ 90 เปอร์เซ็นต์ เกิดผลิตภัณฑ์ PCR ขนาด 320 bp

### 2.2.3.2 Reverse transcription PCR (RT-PCR)

RT-PCR เป็นเทคนิคการสังเคราะห์ชิ้นส่วนของ RNA ในหลอดทดลอง ซึ่ง RNA จะถูกคัดลอกแบบย้อนกลับเป็น cDNA (complementary DNA) ด้วยเอนไซม์รีเวิร์สทรานสคริปเทส (reverse transcriptase) จากนั้น cDNA จะเป็นแม่แบบในการสังเคราะห์ชิ้นส่วนของ DNA ในปฏิกิริยา PCR ต่อไป กระบวนการ RT-PCR สามารถนำมาใช้ในการวิเคราะห์การแสดงออกของยีนในจุลินทรีย์ที่มีบทบาทในกระบวนการบำบัดสิ่งแวดล้อม

งานวิจัยของ Kim และคณะ (2006b) ตรวจสอบการแสดงออกของยีน *nidA3B3* ของแบคทีเรีย *Mycobacterium vanbaalenii* PYR-1 เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีซอพิทอลหรือ PAHs ชนิดต่างๆ ได้แก่ แนพธาซีน แอนทราซีน ฟีนแอนทริน ฟลูออแรนทีน ไพรีน เบนซ์[เอ]แอนทราซีน เป็นแหล่งคาร์บอน ด้วยวิธี RT-PCR พบว่ายีน *nidA3B3* จะแสดงออกเมื่อเลี้ยงในอาหารที่มี PAHs ทุกชนิด ยกเว้นเบนซ์[เอ]แอนทราซีน แต่ไม่แสดงออกเมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีซอพิทอล (รูปที่ 2.8) ดังนั้น ยีน *nidA3B3* จึงเกี่ยวข้องกับการย่อยสลายแนพธาซีน แอนทราซีน ฟีนแอนทริน ฟลูออแรนทีน และไพรีน



รูปที่ 2.8 การแสดงออกของยีน 16S rRNA และ *nidA3B3* ของ *Mycobacterium vanbaalenii*

PYR-1 เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ

(Kim และคณะ, 2006b)

### 2.2.3.3 Real time PCR / Quantitative PCR (qPCR)

Real time PCR เป็นเทคนิคที่พัฒนามาจากเทคนิค PCR ให้สามารถวัดปริมาณผลิตภัณฑ์ PCR ที่ถูกสังเคราะห์ขึ้นมาได้ทันที อาศัยพื้นฐานของการตรวจวัดสัญญาณการเรืองแสงในระหว่างขั้นตอนการเพิ่มจำนวน การเรืองแสงของผลิตภัณฑ์ PCR เกิดจากการจับกันระหว่าง DNA สายคู่ และสารเรืองแสงประเภทฟลูออโรโครม (fluorochrome) เช่น SYBR green แล้วถูกกระตุ้นด้วยแสง UV จึงมีการคายพลังงานออกมาเป็นแสงของฟลูออเรสเซนต์ จากนั้นสารเรืองแสงจะหลุดออกจากสาย DNA เมื่อ DNA กลายเป็นสายเดี่ยวในช่วง denaturation ทำให้การเรืองแสงลดลง ซึ่งระดับความเข้มของแสงฟลูออเรสเซนต์ที่ถูกปล่อยออกมาจะสอดคล้องกับปริมาณผลิตภัณฑ์ PCR ที่เกิดขึ้น โดยจำนวนรอบของ PCR ที่เพิ่มขึ้นทำให้ระดับความเข้มของแสงเพิ่มขึ้นเช่นกัน จึงสามารถนำมาใช้วิเคราะห์ปริมาณของยีนที่มีบทบาทในกระบวนการบำบัดในขณะนั้นได้

งานวิจัยของ Cébron และคณะ (2008) ตรวจสอบปริมาณของยีน 16S rDNA และยีนไดออกซิจีเนสของแบคทีเรียแกรมบวก (PAH-RHD<sub>α</sub> GP) และแบคทีเรียแกรมลบ (PAH-RHD<sub>α</sub> GN) ในตัวอย่างดินและดินตะกอน 8 ชนิด ได้แก่ F, F<sub>GWUS</sub>, B, H, NM, T5R, Z5 และ Z12 พบว่าปริมาณยีน 16S rDNA อยู่ในช่วง  $4.9 \pm 2.5 \times 10^8$  ถึง  $4.2 \pm 1.2 \times 10^9$  copies/กรัม และปริมาณยีนไดออกซิจีเนสของแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบพบอยู่ในช่วง  $4.4 \pm 2.4 \times 10^4$  ถึง  $4.7 \pm 2.4 \times 10^7$  copies/กรัม โดยเฉพาะอย่างยิ่งในตัวอย่างดินและดินตะกอนที่พบการปนเปื้อนของ PAHs ปริมาณมาก (H, NM, T5R และ Z12)

### 2.2.3.4 Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE)

DGGE เป็นเทคนิคอิเล็กโทรโฟรีซิสที่ใช้ในการแยกชิ้น DNA สายคู่ ที่มีขนาดเท่ากันประมาณ 100-500 bp แต่ลำดับนิวคลีโอไทด์ต่างกัน โดยอาศัยความเข้มข้นที่เพิ่มขึ้นเป็นเกรเดียนต์ของ denaturant ได้แก่ ยูเรีย (urea) และฟอร์มามิด (formamide) เพื่อทำลายพันธะไฮโดรเจนระหว่าง DNA สายคู่ในระหว่างการเคลื่อนที่ไปในตัวกลางเจลพอลิอะคริลาไมด์ (polyacrylamide) ความเข้มข้น 8 เปอร์เซ็นต์ รวมถึงการใช้อุณหภูมิสูงในการทำลายพันธะระหว่างคู่เบส G-C ด้วย เมื่อ DNA เคลื่อนที่ถึงความเข้มข้น denaturant ที่เหมาะสม จะเกิดการทำลายสายคู่ของ DNA ส่งผลให้ DNA เคลื่อนที่ช้าลงและหยุดการเคลื่อนที่ โดยความเข้มข้นของ denaturant ที่แตกต่างกัน จะสามารถแยกลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ต่างกันในจุลินทรีย์แต่ละชนิด ส่งผลให้ DNA ของจุลินทรีย์แต่ละชนิดหยุดการเคลื่อนที่ ณ ตำแหน่งที่ต่างกัน นิยมใช้ในการประเมินประชาคมของจุลินทรีย์ในสิ่งแวดล้อมทั้งอากาศ น้ำ ดินตะกอน ดิน และสลัดจ์ (Teixeira และคณะ, 2010; Kourtev และคณะ, 2011; Pires และคณะ, 2012; Sun และคณะ, 2013; Evans และคณะ, 2014)

งานวิจัยของ Viñas และคณะ (2005) ศึกษาการเปลี่ยนแปลงประชาคมแบคทีเรียระหว่างการย่อยสลาย PAHs ในดินปนเปื้อนครีโอลิท ณ วันที่ 0, 21, 45, 90, 135 และ 200 ด้วยวิธี PCR-DGGE บริเวณ V3-V5 ของยีน 16S rDNA (ไพรเมอร์ 16F341-GC และ 16R907) และใช้ความเข้มข้นของ denaturant 35-70 เปอร์เซ็นต์ โดยแบ่งชุดการทดลองออกเป็นชุดดินที่ผ่านการทำแห้ง ชุดดินที่ไม่เติมสารอาหาร และชุดดินที่เติมสารอาหาร พบว่าแบคทีเรียในชุดดินที่ไม่เติมสารอาหารและชุดดินที่เติมสารอาหาร มีความหลากหลายและปริมาณของแบคทีเรียมากเมื่อเปรียบเทียบกับชุดดินที่ผ่านการทำแห้งซึ่งไม่มีการเปลี่ยนแปลงความหลากหลายของแบคทีเรียจนสิ้นสุดการทดลอง ซึ่งประชาคม

แบคทีเรียในชุดดินที่ไม่เติมสารอาหารและชุดดินที่เติมสารอาหาร มีการเปลี่ยนแปลงความหลากหลายและปริมาณเพิ่มขึ้นในระยะแรกของการทดลอง (วันที่ 0-45) และเริ่มคงที่ในระยะต่อมา (วันที่ 45-200) อย่างไรก็ตาม เมื่อวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของแถบ DNA จาก DGGE พบว่าชุดดินที่ไม่เติมสารอาหารมีจำนวน Gamma-proteobacteria และ *Cytophaga-Flavobacterium-Bacteroides* เพิ่มขึ้น ในขณะที่ชุดดินที่เติมสารอาหาร มีจำนวน Beta-proteobacteria, Gamma-proteobacteria และแบคทีเรียแกรมบวกที่มีปริมาณ G+C สูง เพิ่มขึ้น ดังนั้นวิธีการเติมสารอาหารลงไปดินส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงชนิดของแบคทีเรียท้องถิ่นที่มีบทบาทสำคัญระหว่างการบำบัด

งานวิจัยของ Nopcharoenkul และคณะ (2011) ตรวจสอบติดตามการมีอยู่ของแบคทีเรีย *Pseudoxanthomonas* sp. RN402 ระหว่างการกำจัดไพรีนในดิน ด้วยวิธี PCR-DGGE บริเวณ V3 ของยีน 16S rDNA (ไพรเมอร์ 341F-GC และ 543R) และใช้ความเข้มข้นของ denaturant 30-70 เปอร์เซ็นต์ พบว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ RN402 มีปริมาณเพิ่มขึ้น และยังคงมีอยู่ในชุดที่มีการเติมแบคทีเรียสายพันธุ์ดังกล่าวตลอดการทดลอง

### 2.2.3.5 เทคนิคทางชีววิทยาโมเลกุลอื่นๆ

นอกจากนี้ ยังมีเทคนิคทางชีววิทยาโมเลกุลอื่นๆที่นำมาประยุกต์ใช้ในการตรวจสอบติดตามการบำบัดสิ่งแวดล้อมปนเปื้อนสารประกอบไฮโดรคาร์บอน เช่น Random amplified polymorphic DNA (RAPD) Temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) Terminal-restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) Ribosomal intergenic spacer analysis (RISA) Amplified ribosomal DNA restriction analysis (ARDRA) Fluorescent *in situ* hybridization (FISH) Stable isotope probing (SIP) และ Pyrosequencing (Malik และคณะ, 2008; Chikere, 2013; Singleton และคณะ, 2013)

## 2.3 แบคทีเรียย่อยสลายพอลิไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน

แบคทีเรียหลายชนิดถูกคัดแยกโดยอาศัยความสามารถในการย่อยสลาย PAHs จากตัวอย่างสิ่งแวดล้อมที่ปนเปื้อนและไม่ปนเปื้อน ดังตัวอย่างในตารางที่ 2.7

ตารางที่ 2.7 ตัวอย่างแบคทีเรียย่อยสลาย PAHs ชนิดต่างๆในรายงานวิจัยก่อนหน้า

PAHs	แบคทีเรีย (แหล่งที่มา)	อ้างอิง
แนพธาซีน	<i>Streptomyces</i> sp. AB1, AH4, AM2 (d)	Ferradji และคณะ, 2014
	<i>Streptomyces</i> sp. ERI-CPDA-1 (a)	Balachandran และคณะ, 2012
	<i>Pseudomonas plecoglossicida</i> J26 (h)	Parellada และคณะ, 2012
	<i>Micrococcus varians</i> AFS-2 (a)	John และคณะ, 2012
	<i>Micrococcus diversus</i> N1 (g)	Othman และคณะ, 2010
	<i>Novosphingobium naphthalenivorans</i> TUT562 (b)	Suzuki และ Hiraishi, 2007
อะซีแนพธีน	<i>Corynebacterium agropyri</i> A1 (g)	Othman และคณะ, 2010

ตารางที่ 2.7 ตัวอย่างแบคทีเรียย่อยสลาย PAHs ชนิดต่างๆในรายงานวิจัยก่อนหน้า (ต่อ)

PAHs	แบคทีเรีย (แหล่งที่มา)	อ้างอิง
อะซีแนพธิลิน	<i>Rhodococcus rhodochrous</i> AC1 (g)	Othman และคณะ, 2010
ฟลูออรีน	<i>Micrococcus diversus</i> F1 (g)	Othman และคณะ, 2010
แอนทราซีน	<i>Bacillus</i> sp. SBER3 (i)	Bisht และคณะ, 2014
	<i>Microbacterium</i> sp. SL10 (b)	Salam และคณะ, 2014
	<i>Pediococcus pentosaceus</i> AN1 (g)	Othman และคณะ, 2010
	<i>Pseudomonas</i> sp. (b)	Jacques และคณะ, 2009
พีแนนทริน	<i>Pseudomonas mendocina</i> NR802 (f)	Mangwani และคณะ, 2014
	<i>Pseudomonas xanthomarina</i> (c)	Sopeña และคณะ, 2013
	<i>Sphingobium</i> sp. PHE3 (c)	Wang และคณะ, 2013
	<i>Marinobacter nanhaiticus</i> D15-8W (e)	Gao และคณะ, 2013
	<i>Pseudomonas putida</i> AFS-3 (a)	John และคณะ, 2012
	<i>Ochrobactrum</i> sp. VA1 (f)	Arulazhagan และ Vasudevan, 2011
	<i>Corynebacterium uroalyticum</i> P1 (g)	Othman และคณะ, 2010
	<i>Brevibacillus</i> sp. PDM-3 (g)	Reddy และคณะ, 2010
	<i>Janibacter anophelis</i> JY11 (a)	Zhang และคณะ, 2009
	<i>Novosphingobium taihuense</i> T3-B9 (e)	Liu และคณะ, 2005
ฟลูออแรนทีน	<i>Rhodococcus</i> sp. BAP-1 (c)	Li และคณะ, 2014
	<i>Herbaspirillum chlorophenolicum</i> FA1 (g)	Xu และคณะ, 2011
ไพรีน	<i>Klebsiella pneumonia</i> PL1 (a)	Ping และคณะ, 2014
	<i>Acinetobacter</i> sp. USTB-X (c)	Yuan และคณะ, 2013
	<i>Pseudomonas</i> sp. Jpyr-1 (g)	Ma และคณะ, 2013
	<i>Pseudomonas putida</i> PL2 (a)	Ping และคณะ, 2011
	<i>Bacillus vallismortis</i> JY3A (a)	Ling และคณะ, 2011
	<i>Mycobacterium</i> sp. NJS-1, NJS-P (c)	Zeng และคณะ, 2010
	<i>Mycobacterium aromativorans</i> JS19b1 (c)	Seo และคณะ, 2010
	<i>Diaphorobacter</i> sp. KOTLB,	Klankeo และคณะ, 2009
	<i>Pseudoxanthomonas</i> sp. RN402 (b)	
โครซีน	<i>Alcaligenes faecalis</i> AFS-5 (a)	John และคณะ, 2012
	<i>Achromobacter xylosoxidans</i> CG542 (a)	Ghevariya และคณะ, 2011
เบนโซ[เอ]ไพรีน	<i>Paracoccus aminovorans</i> strain HPD-2 (c)	Teng และคณะ, 2010
	<i>Bacillus subtilis</i> BMT4i (a)	Lily และคณะ, 2009
PAHs ผสม	<i>Sphingobium</i> sp. FB3 (a)	Fu และคณะ, 2014

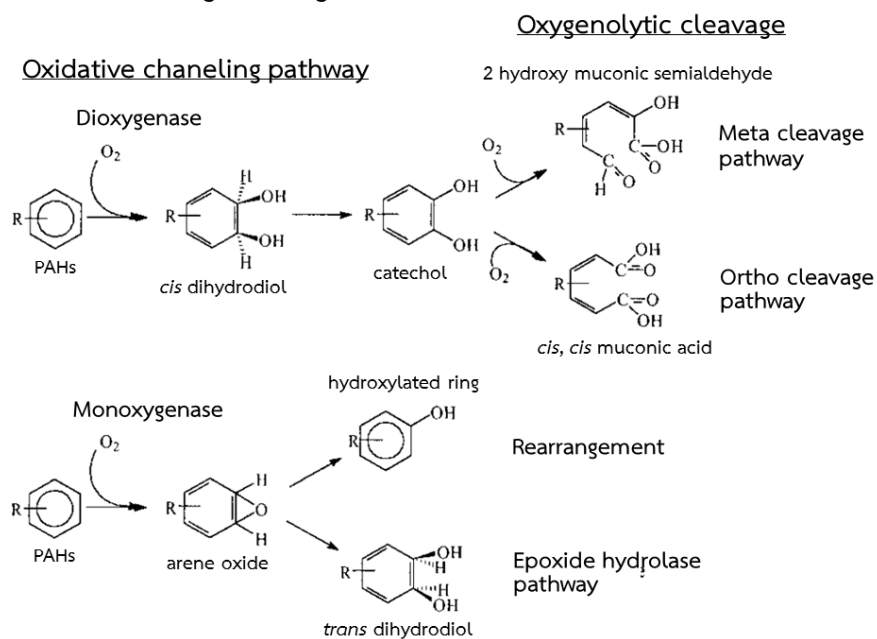
ตารางที่ 2.7 ตัวอย่างแบคทีเรียย่อยสลาย PAHs ชนิดต่างๆในรายงานวิจัยก่อนหน้า (ต่อ)

PAHs	แบคทีเรีย (แหล่งที่มา)	อ้างอิง
PAHs ผสม	<i>Pseudomonas putida</i> GS-24, <i>Arthrobacter oxydans</i> GS-15, <i>Sphingomonas</i> sp. GS-51 (c) <i>Pseudomonas</i> sp. TKB1, <i>Labrys</i> <i>portucalensis</i> TKB2, <i>Ralstonia eutropha</i> TKB3, <i>Rhodococcus globerulus</i> TKB4 (d) <i>Novosphingobium pentaromativorans</i> US6-1 (e)	Pušárová และคณะ, 2013 Wang และคณะ, 2012b Sohn และคณะ, 2004

แหล่งที่มาของแบคทีเรีย (a) ดินปนเขื่อนน้ำมัน; (b) ดินปนเขื่อนสารประกอบไฮโดรคาร์บอน; (c) ดินปนเขื่อน PAHs; (d) ดินไม่ปนเขื่อน; (e) ดินตะกอนจากน้ำทะเล; (f) น้ำทะเล; (g) สลัดจ์; (h) ดินตะกอนป่าชายเลน; (i) รากของต้นบ๊อบปลาร์, poplar tree

แบคทีเรียสามารถย่อยสลาย PAHs ได้ทั้งแบบใช้และไม่ใช้อากาศด้วยวิธีการย่อยสลายที่แตกต่างกัน (รูปที่ 2.9) อย่างไรก็ตาม วิธีการย่อยสลายแบบไม่ใช้อากาศของแบคทีเรียยังคงเป็นสมมติฐาน อีกทั้งกระบวนการย่อยสลายแบบใช้อากาศมีข้อดีเหนือกว่าแบบไม่ใช้อากาศ กล่าวคือ การย่อยสลายแบบใช้อากาศจะเกิดอย่างสมบูรณ์และรวดเร็วกว่า (Baboshin และ Golovleva, 2012)

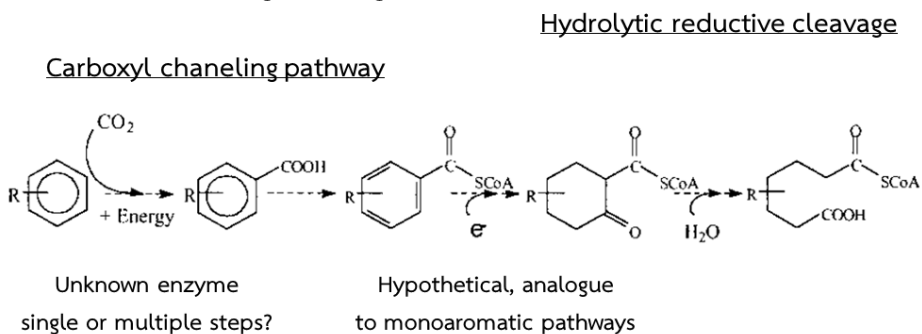
### A) Aerobic ring cleavage



รูปที่ 2.9 วิธีการย่อยสลาย PAHs แบบใช้ (A) และไม่ใช้อากาศ (B) ของแบคทีเรีย

(Makkar และ Rockne, 2003)

## B) Anaerobic ring cleavage



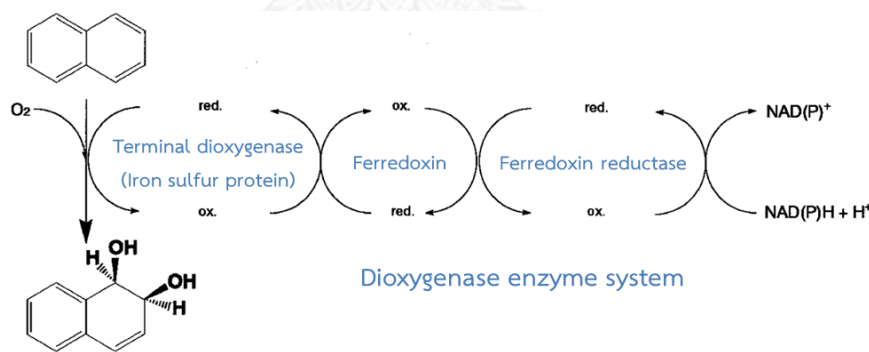
รูปที่ 2.9 วิธีการย่อยสลาย PAHs แบบใช้ (A) และไม่ใช่อากาศ (B) ของแบคทีเรีย (ต่อ)  
(Makkar และ Rockne, 2003)

กลไกการย่อยสลาย PAHs ของแบคทีเรียแบบใช้อากาศ เริ่มจากปฏิกิริยาไฮดรอกซิเลชัน (hydroxylation) โดยอาศัยระบบเอนไซม์ไดออกซิจีเนส (aromatic ring hydroxylating dioxygenase; ARHD or RHD) เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาการเติมออกซิเจน 2 อะตอม ให้กับโมเลกุลคาร์บอนที่เป็นพันธะคู่ในวงอะโรมาติก ได้ผลิตภัณฑ์เป็นซิส-ไดไฮโดรไดออล (cis-dihydrodiol) แล้วถูกออกซิไดซ์ด้วยเอนไซม์ดีไฮโดรจีเนส (dehydrogenase) ในปฏิกิริยารีดักชัน (reduction) เกิดผลิตภัณฑ์เป็นสารตัวกลางที่มีหมู่ไฮดรอกซิล 2 หมู่ (PAHs dihydroxy derivatives) ที่คล้ายแคทีคอล (catechol) ซึ่งจะเป็นสารตั้งต้นเพื่อเข้าสู่กระบวนการแตกวงอะโรมาติกโดยการเติมออกซิเจน 2 โมเลกุลผ่านทางวิธีการแตกวงแบบ*ออร์โธ*หรือ*เมตา* วิธีการแตกวงแบบ*ออร์โธ* (ortho cleavage pathway) จะเกิดการแตกวงระหว่างคาร์บอน 2 อะตอมที่มีหมู่ไฮดรอกซิลด้วยเอนไซม์อินตราไดออลไดออกซิจีเนส (intradiol dioxygenase) หรือเอนไซม์แคทีคอล-1,2-ไดออกซิจีเนส (catechol-1,2-dioxygenase) ได้ผลิตภัณฑ์เป็นซิส,ซิส มูโคนิกแอซิด (cis, cis muconic acid) ที่มีหมู่คาร์บอกซิลิก 2 หมู่ ซึ่งจะถูกลีขียนรูปเป็นมูโคนแลคโตน (muconolactone) ด้วยเอนไซม์มูโคนเตไซโคลไอโซเมอเรส (muconate cycloisomerase) แล้วเปลี่ยนพันธะคู่กลายเป็นออกโซอะดิเพตอินอลแลคโตน (3-oxoadipate-enol-lactone) ด้วยเอนไซม์มูโคนแลคโตนไอโซเมอเรส (muconolactone isomerase) แล้วผ่านกระบวนการต่างๆจนถึงขั้นสุดท้ายจะได้ผลิตภัณฑ์เป็นอะเซทิลโคเอ (acetyl-CoA) และซักซินิลโคเอ (succinyl-CoA) ในขณะที่วิธีการแตกวงแบบ*เมตา* (meta cleavage pathway) จะเกิดการแตกวงระหว่างคาร์บอน 2 อะตอมที่ตำแหน่งอื่นด้วยเอนไซม์เอกซ์ตราไดออลไดออกซิจีเนส (extradiol dioxygenase) หรือเอนไซม์แคทีคอล-2,3-ไดออกซิจีเนส (catechol-2,3-dioxygenase) ได้ผลิตภัณฑ์เป็นไฮดรอกซีมูโคนิกเซมิแอลดีไฮด์ (2-hydroxy muconic semialdehyde) ที่มีหมู่คาร์บอกซิลิกเพียง 1 หมู่ ซึ่งจะสามารถผ่านกระบวนการแตกวงโดยอาศัยเอนไซม์แอลโดเลส (aldolase) เกิดเป็นไพรูเวท (pyruvate) และสารตัวกลางของ PAHs ที่มีจำนวนวงอะโรมาติกลดลง 1 วง เมื่อผ่านกระบวนการแตกวงจนถึงขั้นสุดท้ายจะได้ผลิตภัณฑ์เป็นไพรูเวทและอะซีทัลดีไฮด์ (acetaldehyde) จากนั้นผลิตภัณฑ์สุดท้ายของการแตกวงอะโรมาติกทั้งสองแบบจะเข้าสู่วัฏจักรกรดไตรคาร์บอกซิลิกต่อไป เมื่อกระบวนการย่อยสลาย PAHs เกิดขึ้นอย่างสมบูรณ์ จะเกิดผลิตภัณฑ์สุดท้ายเป็นคาร์บอนไดออกไซด์ น้ำ และชีวมวลของเซลล์แบคทีเรีย (Habe และ



Omori, 2003; Peng และคณะ, 2008; Baboshin และ Golovleva, 2012) นอกจากนี้ ยังมีรายงานการย่อยสลาย PAHs ของแบคทีเรียแบบใช้อากาศโดยอาศัยเอนไซม์โมโนออกซิจีเนส (monooxygenase) ในการเติมออกซิเจน 1 อะตอม ให้กับโมเลกุลคาร์บอนที่เป็นพันธะคู่ในวงอะโรมาติกได้ผลิตภัณฑ์เป็นแอรีนออกไซด์ (arene oxide) ซึ่งเป็นสารเหนี่ยวนำให้เกิดมะเร็ง (active carcinogens) อย่างไรก็ตาม แอรีนออกไซด์อาจเกิดการจัดเรียงตัวใหม่ได้ผลิตภัณฑ์เป็นสารประกอบฟีนอลิกหรืออาจเข้าสู่วิถีอีพอกไซด์ไฮโดรเลส (epoxide hydrolase pathway) โดยเกิดปฏิกิริยาการเติมน้ำ (hydration) ด้วยเอนไซม์อีพอกไซด์ไฮโดรเลส (epoxide hydrolase) ได้ผลิตภัณฑ์เป็นทรานส์-ไดไฮโดรไดออล (*trans*-dihydrodiol) ซึ่งสามารถเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันได้ ผลิตภัณฑ์เป็นไดออลอีพอกไซด์ (diol-epoxide) ซึ่งก็เป็นสารตัวกลางที่สามารถชักนำให้เกิดมะเร็งได้เช่นกัน (Nolan และ O'Connor, 2008; Chang และคณะ, 2013)

ระบบเอนไซม์ไดออกซิจีเนสเป็นสิ่งสำคัญสำหรับกลไกการย่อยสลาย PAHs ประกอบด้วย 3 องค์ประกอบที่มีความเกี่ยวข้องกับกลไกแรกในการย่อยสลาย (รูปที่ 2.10) คือ เฟอร์รีดอกซินรีดักเทส (ferredoxin reductase; flavoprotein reductase) เฟอร์รีดอกซิน (ferredoxin) และเทอร์มินอลไดออกซิจีเนส (terminal dioxygenase; iron sulfur protein) ซึ่งประกอบด้วยหน่วยย่อยเบตา ( $\beta$ -subunit; small subunit; RHD $\beta$ ) และหน่วยย่อยแอลฟา ( $\alpha$ -subunit; large subunit; RHD $\alpha$ ) โดยแต่ละองค์ประกอบของระบบเอนไซม์ไดออกซิจีเนสมีหน้าที่ต่างกัน กล่าวคือ เฟอร์รีดอกซินรีดักเทสมีหน้าที่เกี่ยวข้องกับการรีดิวซ์ของ NAD(P)H ให้อิเล็กตรอนหลุดออกมา จากนั้นเฟอร์รีดอกซินจะรับอิเล็กตรอนและขนส่งไปยังเทอร์มินอลไดออกซิจีเนส ซึ่งมีหน้าที่เร่งปฏิกิริยาการเติมออกซิเจนเข้าสู่วงอะโรมาติก (Habe และ Omori, 2003; Baboshin และ Golovleva, 2012)



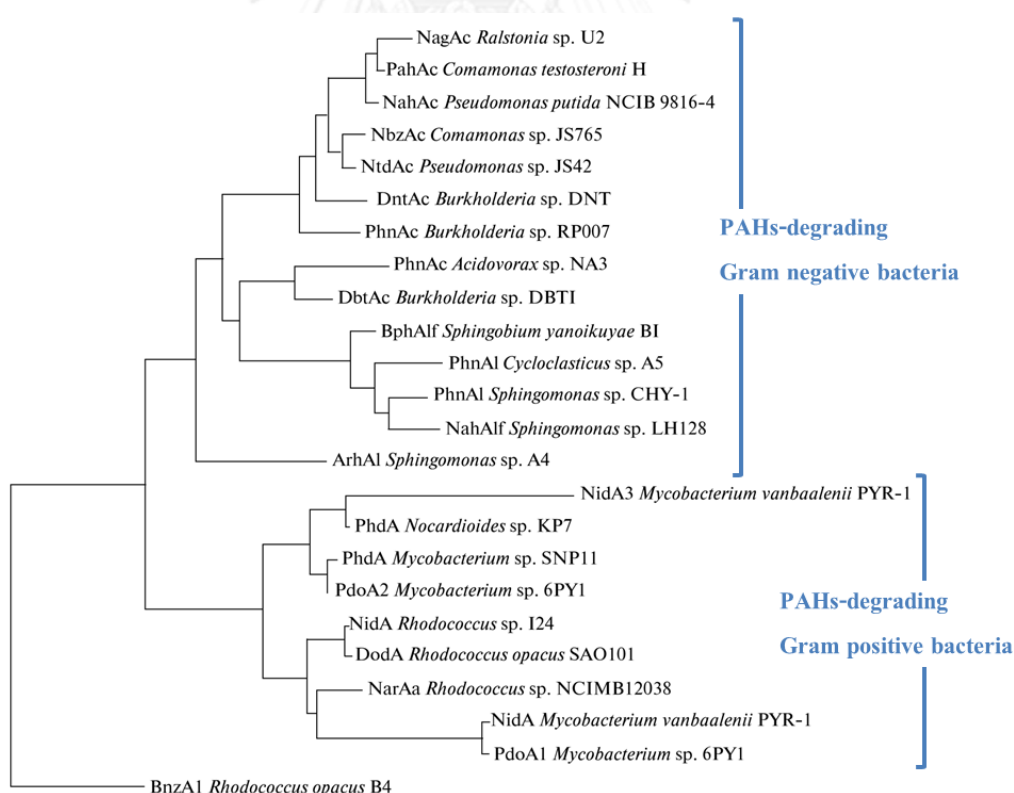
รูปที่ 2.10 ระบบเอนไซม์ไดออกซิจีเนส

(ดัดแปลงมาจาก Habe และ Omori, 2003)

เอนไซม์เทอร์มินอลไดออกซิจีเนสมีโครงสร้างโมเลกุลเป็นสายพอลิเปปไทด์หลายสายมารวมกัน (oligomer) มีทั้งชนิด  $\alpha_3$  (homo-oligomers) และ  $\alpha_3\beta_3$  (hetero-oligomers) ซึ่งหน่วยย่อยแอลฟานี้ประกอบด้วย 2 ส่วนหลักๆ คือ Rieske domain ที่มีหน้าที่ขนส่งอิเล็กตรอนไปยังบริเวณเร่ง (active site) โดยพบว่า Rieske domain มีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เป็นบริเวณอนุรักษ์ (conservative sequences) มากกว่าบริเวณอื่น จึงนิยมนำมาใช้ในการออกแบบไพรเมอร์เพื่อ

ตรวจสอบการมีอยู่ของยีนประมวลรหัสเอนไซม์ไดออกซิจีเนสในแบคทีเรียและสิ่งแวดล้อม และ catalytic domain ที่เป็นบริเวณเร่งของเอนไซม์ไดออกซิจีเนส ซึ่งความแตกต่างกันเพียงเล็กน้อยของรูปทรงของบริเวณเร่งจะทำให้เกิดความแตกต่างของความจำเพาะเจาะจงต่อสารตั้งต้นของเอนไซม์แต่ละชนิด (Baboshin และ Golovleva, 2012)

ยีนประมวลรหัสเอนไซม์ไดออกซิจีเนสสามารถจัดจำแนกตามความเหมือนของลำดับกรดอะมิโนบริเวณหน่วยย่อยแอลฟาของเอนไซม์ไดออกซิจีเนส (รูปที่ 2.11) ได้เป็น 2 กลุ่มหลักๆ คือ ยีนที่พบในแบคทีเรียแกรมลบ เช่น ยีน *nah* เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายแนพธาซีนของ *Pseudomonas* (Lalucat และคณะ, 2006) ยีน *phn* เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายพีแนนทรินของ *Burkholderia* (Tittabutr และคณะ, 2011) ยีน *bph* (*ahd*) เกี่ยวข้องกับการย่อยสลาย PAHs ของแบคทีเรียกลุ่ม Sphingomonads (Stolz, 2009) นอกจากนี้ยังพบยีน *arh* ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายอะซีแนพธินและอะซีแนพธิลีนของ *Sphingomonas* sp. A4 (Pinyakong และคณะ, 2004; Kouzuma และคณะ, 2006) และยีนกลุ่มคล้าย *nah* ได้แก่ *ndo*, *dox*, *pah* เป็นต้น และยีนที่พบในแบคทีเรียแกรมบวก เช่น ยีน *nid* และ *pdo* เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายไพรีนและ PAHs มวลโมเลกุลสูงของ *Mycobacterium* (DeBruyn และคณะ, 2012) ยีน *phd* เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายพีแนนทรินของ *Nocardioidea* (Doyle และคณะ, 2008) ยีน *nar* เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายแนพธาซีนของ *Rhodococcus* (Anan'ina และคณะ, 2011)



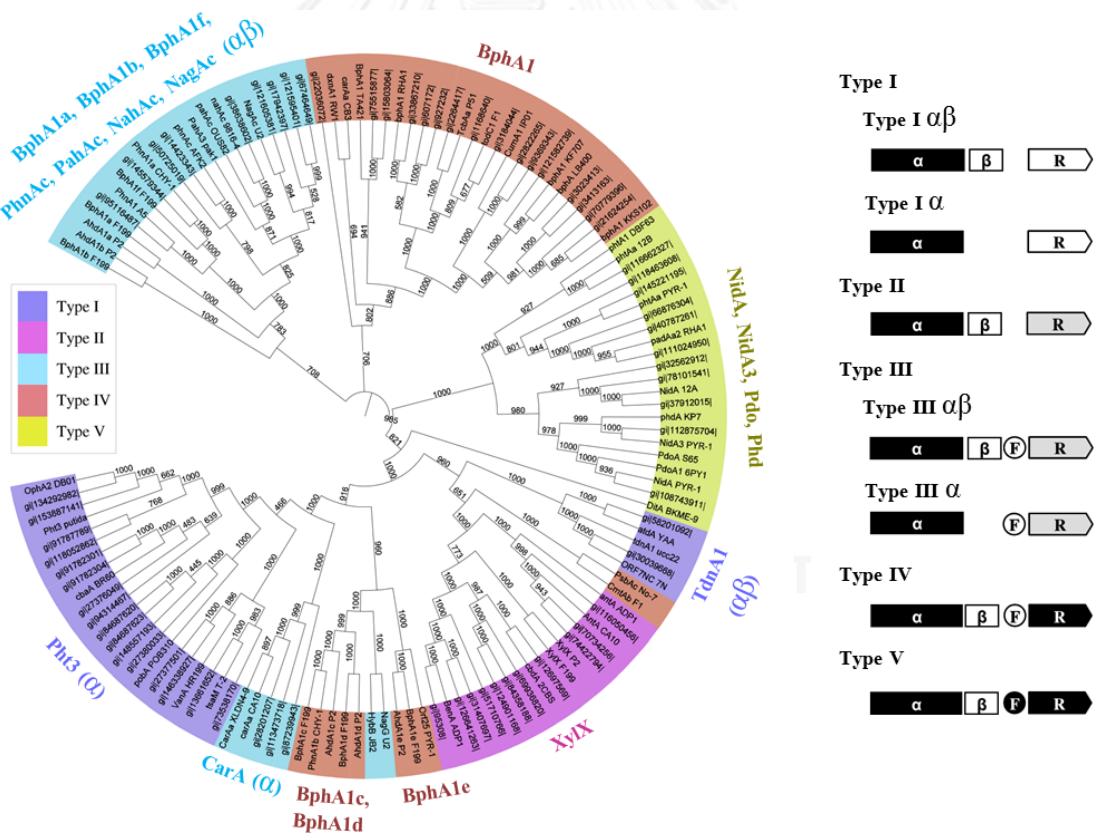
รูปที่ 2.11 ความสัมพันธ์ของลำดับกรดอะมิโนบริเวณหน่วยย่อยแอลฟาของยีนประมวลรหัสเอนไซม์ไดออกซิจีเนสในแบคทีเรียย่อยสลาย PAHs ชนิดต่างๆ (Baboshin และ Golovleva, 2012)

นอกจากนี้ ยังสามารถจำแนกยีนประมวลรหัสเอนไซม์ไดออกซิจีเนสตามโครงสร้างองค์ประกอบทั้งหมดของระบบเอนไซม์ได้ 5 ประเภท ดังตารางที่ 2.8 ซึ่งสามารถสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ได้ดังรูปที่ 2.12 (Kweon และคณะ, 2008)

ตารางที่ 2.8 โครงสร้างองค์ประกอบของระบบเอนไซม์ไดออกซิจีเนส

Type	Terminal dioxygenase ( $\alpha$ or $\alpha\beta$ )	Ferredoxin (F)	Ferredoxin reductase (R)	
			Prosthetic group	Structure
I	$[2Fe-2S]/Fe^{2+}$	-	FMN/[2Fe-2S]	FNR <sub>C</sub> -type
II	$[2Fe-2S]/Fe^{2+}$	-	FAD/[2Fe-2S]	FNR <sub>N</sub> -type
III	$[2Fe-2S]/Fe^{2+}$	2Fe-2S	FAD/[2Fe-2S]	FNR <sub>N</sub> -type
IV	$[2Fe-2S]/Fe^{2+}$	2Fe-2S	FAD	GR-type
V	$[2Fe-2S]/Fe^{2+}$	3Fe-4S	FAD	GR-type

(Kweon และคณะ, 2008)



รูปที่ 2.12 ความสัมพันธ์ของโครงสร้างองค์ประกอบทั้งหมดของระบบเอนไซม์ไดออกซิจีเนส (ดัดแปลงมาจาก Kweon และคณะ, 2008)

ตำแหน่งของยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลาย PAHs ถูกพบทั้งบนโครโมโซมและพลาสมิดของแบคทีเรีย โดยอาศัยเทคนิคต่างๆ เช่น เทคนิคเซาท์เทิร์นไฮบริไดเซชัน (southern hybridization) ตรวจพบยีน *nidA* บนโครโมโซมของ *Mycobacterium* sp. SNP11 (Pagnout และคณะ, 2007) และพบบนเมกะพลาสมิดในแบคทีเรียย่อยสลายไพรีน *Pseudoxanthomonas* sp. RN402 และ *Diaphorobacter* sp. KOTLB (Klankeo และคณะ, 2009) เทคนิคพลาสมิดคิวริง (plasmid curing) ทำให้ทราบว่าเมกะพลาสมิด pKS14 มีบทบาทในการย่อยสลายแนพธาซีนและพีแนนทรินของ *Sphingomonas* sp. KS14 (Cho และ Kim, 2001) และพลาสมิดของ *Pseudomonas* sp. E มีบทบาทในการย่อยสลายแอนทราซีน (Kumar และคณะ, 2010) เทคนิคพลาสมิดทรานส์ฟอร์มเมชัน (plasmid transformation) แสดงให้เห็นว่าพลาสมิดของ *Paracoccus aminovorans* CT เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายไครซีน (Tang และคณะ, 2011) เทคนิควิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของจีโนมทั้งหมด (whole genome sequencing) สามารถระบุได้ว่ายีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลาย PAHs อยู่บนพลาสมิดของ *Novosphingobium* sp. PP1Y (D'Argenio และคณะ, 2011) และ *Novosphingobium pentaromativorans* US6-1 (Luo และคณะ, 2012a) อย่างไรก็ตาม ตำแหน่งของยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลาย PAHs ส่วนใหญ่ตั้งอยู่บนพลาสมิด จึงมีประโยชน์ในการถ่ายยีนให้แบคทีเรียอื่นที่ไม่มีความสามารถในการย่อยสลาย PAHs ทำให้แบคทีเรียที่ได้รับพลาสมิดนั้นสามารถย่อยสลาย PAHs ได้ (Obayori และ Salam, 2010)

ความสามารถและยีนที่เกี่ยวข้องในการย่อยสลาย PAHs ของแบคทีเรียแกรมลบและแกรมบวก ได้รับการศึกษาอย่างกว้างขวาง โดยเฉพาะอย่างยิ่งความสามารถในการย่อยสลาย PAHs มวลโมเลกุลต่ำ (แนพธาซีนและพีแนนทริน) ของแบคทีเรียแกรมลบจิ้นัส *Pseudomonas* (Niepceron และคณะ, 2013) ความสามารถในการย่อยสลาย PAHs หลากหลายชนิดของแบคทีเรียแกรมลบกลุ่ม Sphingomonads (Stolz และคณะ, 2014) และความสามารถในการย่อยสลายไพรีนและ PAHs มวลโมเลกุลสูง (3-5 วงอะโรมาติก) ของแบคทีเรียแกรมบวกจิ้นัส *Mycobacterium* (DeBruyn และคณะ, 2012) ดังจะกล่าวรายละเอียดต่อไป

### 2.3.1 แบคทีเรียแกรมลบ *Pseudomonas*

#### 2.3.1.1 ความสามารถในการย่อยสลาย PAHs ของ *Pseudomonas*

*Pseudomonas* spp. เป็นแบคทีเรียในชั้น Gamma-proteobacteria ที่มีความสามารถในการย่อยสลาย PAHs มวลโมเลกุลต่ำหลายชนิด โดยเฉพาะอย่างยิ่งแนพธาซีน เช่น *Pseudomonas* sp. C18 (Denome และคณะ, 1993), *Pseudomonas* sp. NGK1 (Manohar และคณะ, 2001), *P. putida* PCL1444 (Kuiper และคณะ, 2002), *P. fluorescens* NK33, *P. fluorescens* A96, *P. fluorescens* I-1 (Izmalkova และคณะ, 2005), *P. putida* G7 (Sota และคณะ, 2006), *P. stutzeri* AN10 (Brunet-Galmés และคณะ, 2012), *P. plecoglossicida* J26 (Parellada และคณะ, 2012), *P. xanthomarina* N12, *P. monteilii* P26 (Isaac และคณะ, 2013), *P. putida* OUS82 (Tay และคณะ, 2014) และสายพันธุ์ที่สามารถย่อยสลายพีแนนทริน เช่น *Pseudomonas* sp. PP2 (Prabhu และ Phale, 2003), *P. putida* AFS-3 (John และคณะ, 2012), *P. xanthomarina* (Sopeña และคณะ, 2013), *P. mendocina* NR802 (Mangwani และคณะ,

2014), *P. stutzeri* CECT 930 (Ferreira และคณะ, 2014) บางสายพันธุ์สามารถย่อยสลายแอนทราซีนได้ เช่น *P. rhodesiae* KK1 (Kim และคณะ, 2006a), *P. citronellolis*, *P. aerigonosa* (Jacques และคณะ, 2009), *Pseudomonas* sp. E (Kumar และคณะ, 2010) นอกจากนี้ ยังพบว่าบางสายพันธุ์สามารถย่อยสลาย PAHs มวลโมเลกุลสูงจำพวกไพรีน เช่น *P. putida* PL2 (Ping และคณะ, 2011), *Pseudomonas* sp. Jpyr-1 (Ma และคณะ, 2013) และเบนโซ[เอ]ไพรีน เช่น *P. oleovorans* 1C (Sowada และคณะ, 2014)

### 2.3.1.2 ยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลาย PAHs ของ *Pseudomonas*

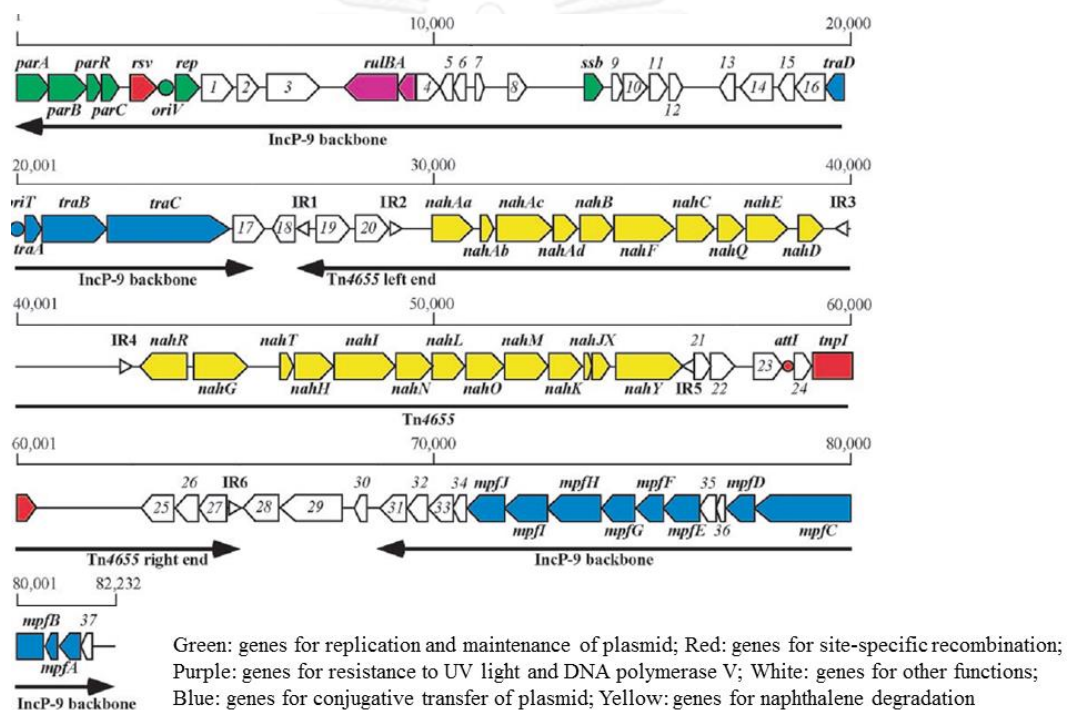
ยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายแนพทาลีนของ *Pseudomonas* spp. คือยีน *nah* และยีนกลุ่มคล้าย *nah* ได้แก่ *ndo*, *dox* และ *pah* ซึ่งยีน *nah* ประกอบด้วย 2 โอเปอรอน คือ โอเปอรอน *nah* ส่วนบน (*nahABFCQED*) ทำหน้าที่เปลี่ยนแนพทาลีนเป็นกรดซาลิไซเลท (salicylate) และโอเปอรอน *nah* ส่วนล่าง (*nahGTHINLOMKJXY*) หรือโอเปอรอน *sal* ทำหน้าที่เปลี่ยนซาลิไซเลทเป็นไพรูเวทและอะซีทัลดีไฮด์ กระบวนการดังกล่าวเกิดขึ้นภายใต้การควบคุมของยีน *nahR* ซึ่งแต่ละยีนจะประมวลรหัสเป็นเอนไซม์ดังตารางที่ 2.9

ตารางที่ 2.9 เอนไซม์ที่ประมวลรหัสโดยยีน *nah*

โอเปอรอน	ยีน	เอนไซม์	
<i>nah</i>	<i>nahAa</i>	Reductase	
	<i>nahAb</i>	Ferredoxin	
	<i>nahAc</i>	Iron sulfur protein large subunit	
	<i>nahAd</i>	Iron sulfur protein small subunit	
	<i>nahB</i>	<i>cis</i> -Naphthalene dihydrodiol dehydrogenase	
	<i>nahF</i>	Salicylaldehyde dehydrogenase	
	<i>nahC</i>	1,2-Dihydroxynaphthalene oxygenase	
	<i>nahE</i>	2-Hydroxybenzalpyruvate aldolase	
	<i>nahD</i>	2-Hydroxychromene-2-carboxylate isomerase	
	<i>sal</i>	<i>nahG</i>	Salicylate hydroxylase
		<i>nahT</i>	Chloroplast-type ferredoxin
		<i>nahH</i>	Catechol oxygenase
		<i>nahI</i>	2-Hydroxymuconic semialdehyde dehydrogenase
		<i>nahN</i>	2-Hydroxymuconic semialdehyde hydrolase
<i>nahL</i>		2-Oxo-4-pentenoate hydratase	
	<i>nahO</i>	4-Hydroxy-2-oxovalerate aldolase	
	<i>nahM</i>	Acetaldehyde dehydrogenase	
	<i>nahK</i>	4-Oxalocrotonate decarboxylase	
	<i>nahJ</i>	2-Hydroxymuconate tautomerase	
	regulator	<i>nahR</i>	regulatory protein (induced by salicylate)

(Obayori และ Salam, 2010)

ยีนย่อยสลาย PAHs ของ *Pseudomonas* spp. ส่วนใหญ่มักพบอยู่บนพลาสมิดขนาดใหญ่กว่า 50 kb ตัวอย่างพลาสมิด NAH7 ของ *Pseudomonas putida* G7 (รูปที่ 2.13) ที่ได้รับการศึกษาอย่างกว้างขวาง มีขนาด 82,232 bp ประกอบด้วย incompatibility group P-9 (IncP-9) เป็นแกนหลัก และมีโอเปอรอนของยีน *nah* อยู่ระหว่างยีนที่เกี่ยวข้องกับการเคลื่อนที่ ทำให้โอเปอรอนของยีน *nah* สามารถแพร่กระจายด้วยการถ่ายโอนไปสู่แบคทีเรียอื่นๆ โดยอาจเข้าสู่โครโมโซมหรือพลาสมิด (Sota และคณะ, 2006) อย่างไรก็ตาม บางสายพันธุ์ก็พบยีนดังกล่าวอยู่บนโครโมโซม เช่น ตัวอย่างยีน *nah* ที่พบบนโครโมโซมของ *Pseudomonas stutzeri* AN10 ซึ่งมีการจัดเรียงตัวของยีน *nah* เหมือนกับยีนที่พบบนพลาสมิด NAH7 (Bosch และคณะ, 1999; Bosch และคณะ 2000)



รูปที่ 2.13 ยีน *nah* บนพลาสมิด NAH7 ของ *P. putida* G7

(Sota และคณะ, 2006)

ตัวอย่างแบคทีเรียจีโนส *Pseudomonas* ที่มีความสามารถในการย่อยสลาย PAHs และยีนที่เกี่ยวข้องแสดงในตารางที่ 2.1

ตารางที่ 2.10 ความสามารถและยีนที่เกี่ยวข้องในการย่อยสลาย PAHs ของ *Pseudomonas* spp.

<i>Pseudomonas</i>	การย่อยสลาย PAHs	ยีนไดออกซิจีเนส / ตำแหน่งของยีน	อ้างอิง
<i>P. aeruginosa</i> PaK1	แนพทาลีน	<i>pah</i> / โครโมโซม	Takizawa และคณะ, 1999
<i>P. putida</i> OUS82	แนพทาลีน	<i>pah</i>	
<i>Pseudomonas</i> sp. ND6	แนพทาลีน	<i>nah</i> / พลาสมิด pND6-1	Jiang และคณะ, 2004
<i>P. putida</i> NCIB 9816-4	แนพทาลีน	<i>nah</i> / พลาสมิด pDTG1	Dennis และ Zylstra, 2004
<i>P. fluorescens</i> NK33	แนพทาลีน	<i>nah</i> / พลาสมิด pNK33	Izmalkova และคณะ, 2005
<i>P. fluorescens</i> A96	แนพทาลีน	<i>nah</i> / พลาสมิด pA96	
<i>P. fluorescens</i> I-1	แนพทาลีน	<i>nah</i> / พลาสมิด pl-1	
<i>P. putida</i> G7	แนพทาลีน	<i>nah</i> / พลาสมิด NAH7	Sota และคณะ, 2006
<i>Pseudomonas</i> sp. 30-2	แนพทาลีน	<i>ndo</i>	Panicker และคณะ, 2010
<i>Pseudomonas</i> sp. 5K-VPa	แนพทาลีน	<i>ndo</i>	Ferrera-Rodríguez และคณะ, 2012
<i>P. stutzeri</i> AN10	แนพทาลีน	<i>nah</i> / โครโมโซม	Brunet-Galmés และคณะ, 2012
<i>P. xanthomarina</i> N12	แนพทาลีน	<i>nah</i>	Isaac และคณะ, 2013
<i>P. monteilii</i> P26	แนพทาลีน	<i>nah</i>	
<i>Pseudomonas</i> sp. C18	แนพทาลีน, พีแนนทริน	<i>dox</i> / พลาสมิด	Denome และคณะ, 1993
<i>P. putida</i> OUS82	แนพทาลีน, พีแนนทริน	<i>pah</i> / โครโมโซม	Tay และคณะ, 2014
<i>P. fluorescens</i> LP6a	แนพทาลีน, พีแนนทริน, แอนทราซีน	<i>nah</i> / พลาสมิด pLP6a	Foght และ Westlake, 1996
<i>P. rhodesiae</i> KK1	แนพทาลีน, พีแนนทริน, แอนทราซีน	<i>ndoC2, phnAc, bphA1b</i>	Kim และคณะ, 2006a
<i>Pseudomonas</i> sp. E	แอนทราซีน	anthracene responsible gene / พลาสมิด	Kumar และคณะ, 2010
<i>P. putida</i> PL2	ไพรีน		Ping และคณะ, 2011

## 2.3.2 แบคทีเรียแกรมลบกลุ่ม Sphingomonads

### 2.3.2.1 ความสามารถในการย่อยสลาย PAHs ของ Sphingomonads

Sphingomonads เป็นกลุ่มแบคทีเรียในชั้น Alpha-proteobacteria ที่มีไกลโคสฟิงโกลิพิด (glycosphingolipids) แทนนีพอลิแซ็กคาไรด์ (lipopolysaccharide) บริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นนอก มีรูปแบบของพอลิเอมีน (polyamines) ที่จำเพาะ และมีโคโลนีสีเหลือง ประกอบด้วยจีโนส *Novosphingobium*, *Sphingobium*, *Sphingomonas*, *Sphingopyxis*, *Sphingosinicella*, *Sphingomicrobium*, *Sphingorhabdus* และ *Parasphingopyxis* (Stolz, 2014) มักถูกคัดแยกจากสิ่งแวดล้อมเนื่องจากสมบัติในการใช้ PAHs หรือสารที่ไม่ชอบน้ำเป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงาน โดยเฉพาะจีโนส *Novosphingobium*, *Sphingobium*, *Sphingomonas* และ *Sphingopyxis* แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียกลุ่มนี้มีการปรับตัวที่ดีเมื่อสิ่งแวดล้อมเกิดการปนเปื้อนสารพิษชนิดใหม่ๆ ซึ่งอาจมีสาเหตุจากหมู่คาร์โบไฮเดรตของไกลโคสฟิงโกลิพิดที่มีทิศออกนอกเซลล์นั้นมีขนาดสั้นกว่าหมู่คาร์โบไฮเดรตของลิพอพอลิแซ็กคาไรด์ในแบคทีเรียแกรมลบทั่วไป ทำให้ผิวเซลล์ของ Sphingomonads มีความไม่ชอบน้ำมากกว่าแบคทีเรียแกรมลบอื่นๆ อีกทั้งไกลโคสฟิงโกลิพิดยังมีโครงสร้างคล้ายกับสารลดแรงตึงผิวด้วย นอกจากนี้ Sphingomonads ส่วนใหญ่ยังสามารถสร้างสฟิงแกน (sphingans) ซึ่งเป็นเฮทเทอโรพอลิแซ็กคาไรด์ที่มีประจุลบ และปล่อยออกมานอกเซลล์ เกิดการสร้างโคโลนีเป็นไบโอฟิล์ม (biofilm) จึงอาจเป็นสาเหตุหลักที่ทำให้แบคทีเรียกลุ่มนี้สามารถย่อยสลาย PAHs มวลโมเลกุลสูงได้ (Cunliffe และ Kertesz, 2006a; Stolz, 2009) จากความน่าสนใจดังกล่าว ทำให้มีงานวิจัยเกี่ยวกับการออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะกับแบคทีเรียกลุ่มนี้เพื่อใช้ตรวจสอบและติดตามแบคทีเรียกลุ่ม Sphingomonads ในสิ่งแวดล้อม (Leys และคณะ, 2004; Zhou และคณะ, 2013a) อย่างไรก็ตามงานวิจัยของ Zhou และคณะ (2013a) ออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะกับแบคทีเรียจีโนส *Sphingomonas* คือ SA429f และ SA933r ที่มีความจำเพาะถึง 90 เปอร์เซ็นต์ และสามารถตรวจสอบจีโนสดังกล่าวได้เป็นจำนวนมากในตัวอย่างดิน

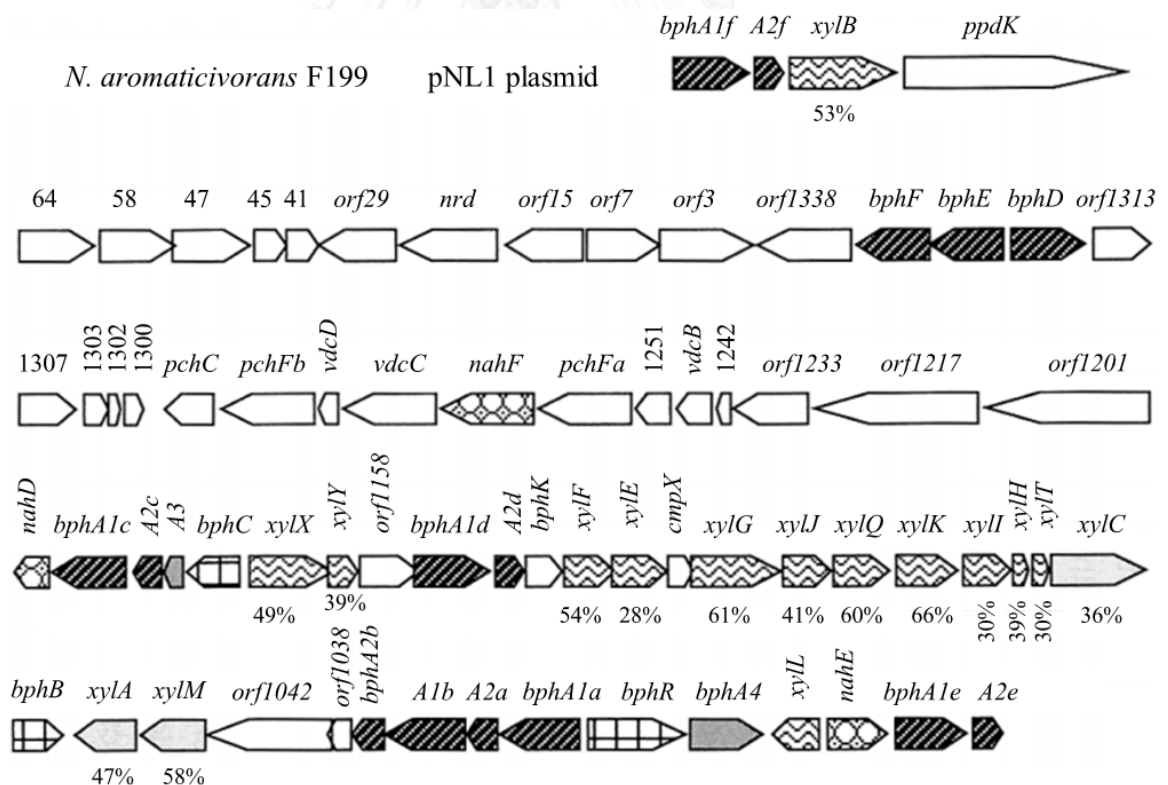
Sphingomonads ได้รับการศึกษาอย่างกว้างขวางเกี่ยวกับความสามารถในการย่อยสลาย PAHs มวลโมเลกุลต่ำและสูง ตัวอย่างเช่น *Novosphingobium aromaticivorans* F199 (Romine และคณะ, 1999), *Novosphingobium pentaromaticivorans* US6-1 (Sohn และคณะ, 2004), *Novosphingobium naphthalenivorans* TUT5 6 2 (Suzuki และ Hiraishi, 2007), *Novosphingobium* sp. PP1 Y (Notomista และคณะ, 2011), *Sphingobium* sp. P2 (Pinyakong และคณะ, 2003b), *Sphingobium* sp. HV3 (Sipila และคณะ, 2010), *Sphingobium scionense* WP01 (Liang และ Lloyd-Jones, 2010), *Sphingobium chungbukense* DJ77 (Yeon และ Kim, 2011), *Sphingobium* sp. KK22 (Maeda และคณะ, 2013), *Sphingomonas yanoikuyae* B1, *Sphingomonas paucimobilis* TNE12 (Shuttleworth และคณะ, 2000), *Sphingomonas aromaticivorans* B0695 (Shi และคณะ, 2001), *Sphingomonas paucimobilis* EPA505 (Story และคณะ, 2004), *Sphingomonas* sp. A4 (Pinyakong และคณะ, 2004), *Sphingomonas* sp. CHY-1 (Willison, 2004), *Sphingomonas* sp. LH128 (Schuler และคณะ, 2009) *Sphingomonas polyaromaticivorans* B2-7 (Luo และคณะ, 2012b) เป็นต้น



### 2.3.2.2 ยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลาย PAHs ของ Sphingomonads

ยีนที่มีบทบาทเกี่ยวกับการย่อยสลาย PAHs ของแบคทีเรียที่เรียกลกลุ่ม Sphingomonads ส่วนใหญ่คือยีน *bph* (*ahd*) (Pinyakong และคณะ, 2003a) นอกจากนี้ยังพบยีน *phn* ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลาย PAHs หลายชนิดของ *Sphingomonas* sp. CHY-1 (Demanèche และคณะ, 2004) ยีน *arh* ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายอะซีแนพธีนและอะซีแนพธิลีนของ *Sphingomonas* sp. A4 (Pinyakong และคณะ, 2004) และยีน *fln* ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายฟลูออรีนของ *Sphingomonas* sp. LB126 (Schuler และคณะ, 2008) ตารางที่ 2.11 แสดงรายละเอียดของยีนประมวลรหัสที่เกี่ยวข้องและเอนไซม์ไดออกซิจีเนสของแบคทีเรียที่เรียกลกลุ่ม Sphingomonads

ยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลาย PAHs หรือสารพิษอื่นๆของ Sphingomonads มักอยู่กระจ่ายไปในหลายๆคลัสเตอร์ (cluster) ดังตัวอย่างการจัดเรียงตัวของยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลาย PAHs บนพลาสมิด pNL1 ของ *Novosphingobium aromaticivorans* F199 ในรูปที่ 2.14 ซึ่งเป็นการจัดเรียงตัวที่มีเอกลักษณ์ มีความซับซ้อน และมีความแตกต่างจากยีนที่พบในแบคทีเรียที่เรียกลกลุ่ม Pseudomonads แต่มีความเหมือนระหว่างยีนที่พบในแบคทีเรียที่เรียกลกลุ่ม Sphingomonads ด้วยกัน (Pinyakong และคณะ, 2003a) ตัวอย่างแบคทีเรียที่เรียกลกลุ่ม Sphingomonads ที่มีความสามารถในการย่อยสลาย PAHs และยีนที่เกี่ยวข้องแสดงในตารางที่ 2.12



รูปที่ 2.14 การจัดเรียงตัวของยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลาย PAHs บนพลาสมิด pNL1 ของ *N. aromaticivorans* F199 (Pinyakong และคณะ, 2003a)

ตารางที่ 2.11 ยีนและเอนไซม์ไดออกซิจีเนสที่พบใน Sphingomonads

โอเปอรอน	ยีน	เอนไซม์
<i>bph</i>	<i>bphA1(a-f)</i>	aromatic dioxygenase $\alpha$ subunit
	<i>bphA2(a-f)</i>	aromatic dioxygenase $\beta$ subunit
	<i>bphA3</i>	Ferredoxin
	<i>bphA4</i>	ferredoxin reductase
	<i>bphB</i>	<i>cis</i> -dihydrodiol dehydrogenase
	<i>bphC</i>	extradiol dioxygenase
	<i>bphD</i>	2-hydroxy-6-oxo-6-phenylhexa-2,4-dienoate hydrolase
	<i>bphE</i>	2-oxopent-4-enoate hydratase
	<i>bphF</i>	4-hydroxy-2-oxo-valerate aldolase
	<i>bphR</i>	regulatory protein
<i>phn</i>	<i>phnA1</i>	dioxygenase $\alpha$ subunit
	<i>phnA2</i>	dioxygenase $\beta$ subunit
	<i>phnA3</i>	Ferredoxin
	<i>phnA4</i>	ferredoxin reductase
	<i>phnB</i>	dehydrogenase
	<i>phnC</i>	extradiol dioxygenase
	<i>phnD</i>	Isomerase
<i>arh</i>	<i>arhA1</i>	dioxygenase $\alpha$ subunit
	<i>arhA2</i>	dioxygenase $\beta$ subunit
	<i>arhA3</i>	Ferredoxin
	<i>arhA4</i>	ferredoxin reductase
	<i>arhR</i>	regulatory protein (induced by acenaphthene)
<i>fln</i>	<i>flnA1</i>	angular dioxygenase $\alpha$ subunit
	<i>flnA2</i>	angular dioxygenase $\beta$ subunit
	<i>flnB</i>	dehydrogenase
	<i>flnD</i>	extradiol dioxygenase
	<i>flnE</i>	hydrolase

ตารางที่ 2.12 ความสามารถและยีนที่เกี่ยวข้องในการย่อยสลาย PAHs ของ Sphingomonads

Sphingomonads	การย่อยสลาย PAHs	ยีนไดออกซิจีเนส / ตำแหน่งของยีน	อ้างอิง
<b>Novosphingobium</b>			
<i>N. aromaticivorans</i> F199	แนพทาลีน, ฟลูออรีน, ฟีนานทริน	<i>bph</i> / พลาสมิด pNL1 (184 kb)	Romine และคณะ, 1999
<i>N. pentaromativorans</i> US6-1	ไพรีน, เบนซ์[เอ]แอนทราซีน, ไครซีน, เบนโซ[ซี]ฟลูออแรนทีน, เบนโซ[เอ]ไพรีน	ARHD / พลาสมิด pLA1 (188 kb)	Sohn และคณะ, 2004; Luo และคณะ, 2012a
<i>N. naphthalenivorans</i> TUT562	แนพทาลีน	-	Suzuki และ Hiraishi, 2007
<i>Novosphingobium</i> sp. PP1Y	แนพทาลีน, อะซีแนพทีน, ฟลูออรีน, ฟีนานทริน, แอนทราซีน, เบนซ์[เอ]แอนทราซีน, ฟลูออแรนทีน, ไพรีน, ไครซีน	ARHD / พลาสมิด Mpl (1160 kb)	Notomista และคณะ, 2011; D'Argenio และคณะ, 2011
<b>Sphingobium</b>			
<i>Sphingobium</i> sp. P2	ฟีนานทริน	<i>ahd</i>	Pinyakong และคณะ, 2003b
<i>Sphingobium</i> sp. HV3	แนพทาลีน, ฟลูออรีน, ฟีนานทริน	<i>bph</i> / พลาสมิด pSKY4 (15.7 kb)	Sipila และคณะ, 2010
<i>S. chlorophenicum</i> C3R	ฟีนานทริน	-	Colombo และคณะ, 2011
<i>Sphingobium</i> sp. PNB	ฟีนานทริน	-	Roy และคณะ, 2012
<i>Sphingobium</i> sp. KK22	ฟีนานทริน, เบนซ์[เอ]แอนทราซีน	<i>bph</i> / โครโมโซม	Maeda และคณะ, 2013
<b>Sphingomonas</b>			
<i>S. yanoikuyae</i> B1	แนพทาลีน, ฟีนานทริน	<i>bph</i> / โครโมโซม	Shuttleworth และคณะ, 2000
<i>S. paucimobilis</i> TNE12	ฟีนานทริน, ฟลูออแรนทีน	ARHD / พลาสมิด (240 kb)	
<i>Sphingomonas</i> sp. Ant 17	แนพทาลีน, ฟลูออรีน, ฟีนานทริน, แอนทราซีน, ฟลูออแรนทีน, ไพรีน, ไครซีน	ARHD / โครโมโซม	Baraniecki และคณะ, 2002

ตารางที่ 2.12 ความสามารถและยีนที่เกี่ยวข้องในการย่อยสลาย PAHs ของ Sphingomonads (ต่อ)

Sphingomonads	การย่อยสลาย PAHs	ยีนไดออกซิจีเนส / ตำแหน่งของยีน	อ้างอิง
<i>S. paucimobilis</i> EPA505	แนพธาลีน, พีแนนทรีน, ฟลูออแรนทีน	<i>bph, phn, nah</i>	Story และคณะ, 2004
<i>Sphingomonas</i> sp. A4	อะซีแนพทีน, อะซีแนพทีลีน	<i>arh</i>	Pinyakong และคณะ, 2004
<i>Sphingomonas</i> sp. CHY-1	แนพธาลีน, พีแนนทรีน, ไครซีน, เบนซ์[เอ]แอนทราซีน, เบนโซ[เอ]ไพรีน	<i>ph / n</i> โครโมโซม	Willison, 2004; Demanèche และคณะ, 2004; Jakoncic และคณะ, 2007
<i>S. paucimobilis</i> ZX4	พีแนนทรีน	-	Xia และคณะ, 2005
<i>Sphingomonas</i> sp. GY2B	พีแนนทรีน	-	Tao และคณะ, 2007
<i>Sphingomonas</i> sp. PheB4	พีแนนทรีน	-	Zhong และคณะ, 2007
<i>Sphingomonas</i> sp. VKM B-2434	แนพธาลีน, อะซีแนพทีน, พีแนนทรีน, แอนทราซีน, ฟลูออแรนทีน	-	Baboshin และคณะ, 2008
<i>Sphingomonas</i> sp. LB126	ฟลูออรีน	<i>fIn</i>	Schuler และคณะ, 2008
<i>Sphingomonas</i> sp. ZP1	แนพธาลีน, พีแนนทรีน	-	Zhao และคณะ, 2008
<i>Sphingomonas</i> sp. LH128	พีแนนทรีน, เบนซ์[เอ]แอนทราซีน	<i>phn</i>	Schuler และคณะ, 2009
<b><i>Sphingopyxis</i></b>			
<i>Sphingopyxis</i> sp. M2R2	แนพธาลีน, พีแนนทรีน, ฟลูออรีน*	-	LaRoe และคณะ, 2010
<i>Sphingopyxis</i> sp. PHPY	พีแนนทรีน	-	Pinyakong และคณะ, 2012

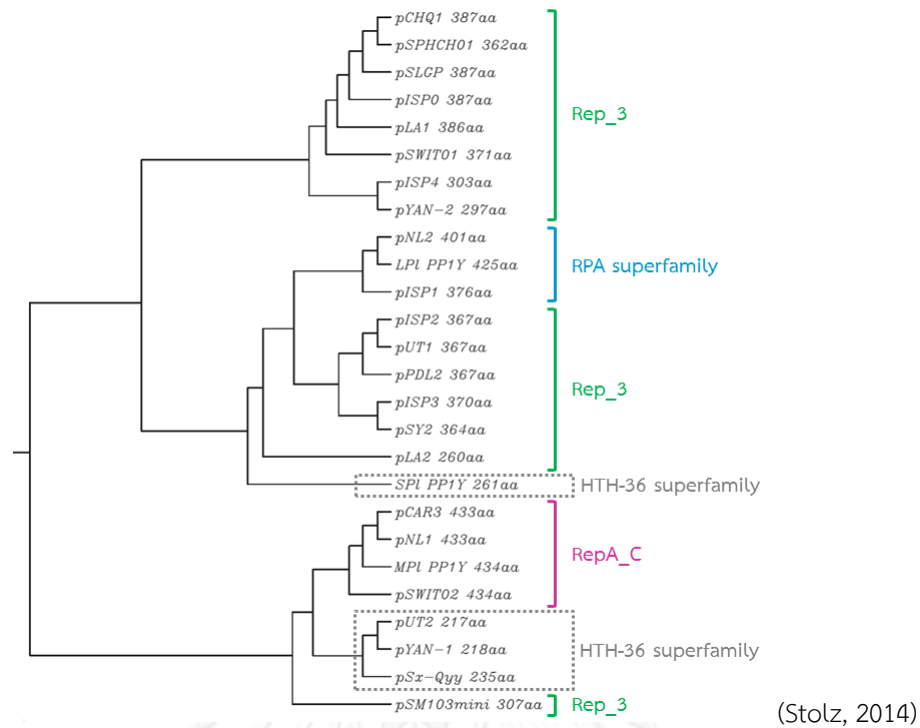
- หมายถึง ไม่มีรายงาน; \* สามารถย่อยสลายได้เมื่อมีพีแนนทรีนเป็นโคซับสเตรท (co-substrate)

ยีนประมวลรหัสเอนไซม์ไดออกซีจีเนสของ Sphingomonads สามารถพบได้ทั้งในโครโมโซมหรือพลาสมิดที่มีขนาดใหญ่กว่า 100 kb จึงมักเรียกกันว่าเมกะพลาสมิด (megaplasmid) ซึ่งสามารถถ่ายโอนระหว่างแบคทีเรียในกลุ่ม Sphingomonads แล้วเกิดการจัดเรียงตัวใหม่ได้ ดังนั้นการมีอยู่ การถ่ายโอน และการเกิดรีคอมบิแนนท์ของพลาสมิดเหล่านี้ จึงมีความสำคัญต่อความสามารถในการย่อยสลาย PAHs ของแบคทีเรียในกลุ่ม Sphingomonads (Basta และคณะ, 2005; Stolz, 2014) ปัจจุบันมีรายงานวิจัยการวิเคราะห์ลำดับเบสของจีโนมทั้งหมด (genome sequencing) ของ Sphingomonads มากขึ้น จึงทำให้ทราบว่าแบคทีเรียในกลุ่ม Sphingomonads ที่มีความสามารถในการย่อยสลาย PAHs และสารพิษอื่น ๆ นั้นประกอบด้วยหลายพลาสมิดภายในเซลล์แบคทีเรีย ความสามารถในการมีอยู่ของหลายพลาสมิดในเซลล์นั้นเกิดจากความเข้ากันได้ (compatibility) ของพลาสมิด อีกนัยหนึ่งคือเกิดจากความแตกต่างกันของ incompatibility groups ของพลาสมิด ซึ่งมีความสัมพันธ์กับลำดับกรดอะมิโนของโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการจำลองพลาสมิด (replication initiator, Rep) และโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการแบ่งส่วนพลาสมิด (plasmid partition, Par) (Stolz, 2014)

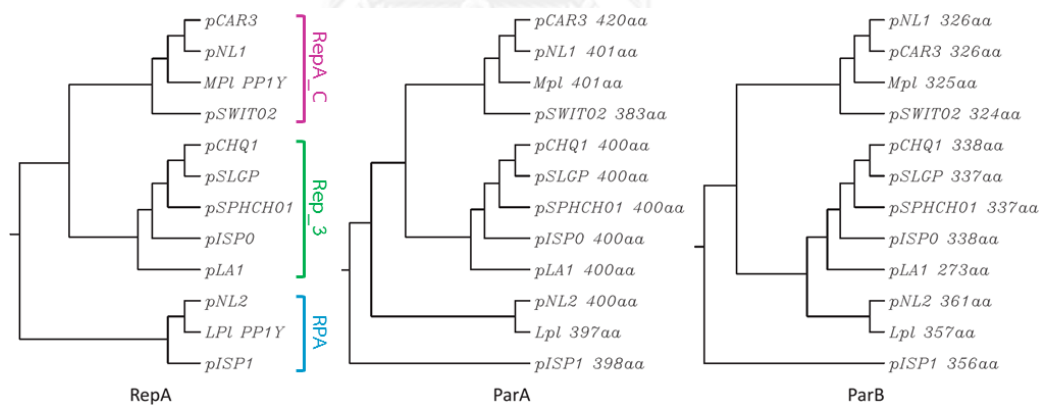
โปรตีน Rep มีความสำคัญต่อกระบวนการเริ่มต้นของการจำลองพลาสมิด โดยจะตอบสนองต่อการจับกับ DNA ที่ตำแหน่งจำเพาะแล้วเริ่มเกิดการตัดสาย DNA ขึ้น โปรตีนดังกล่าวประมวลรหัสมาจากยีน *repA* หรือ *repB* บนพลาสมิดที่พบในแบคทีเรียกลุ่ม Sphingomonads ผลการวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนในตารางที่ 2.13 พบว่าโปรตีน Rep บนพลาสมิดที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายสารพิษของแบคทีเรียกลุ่มนี้ สามารถแบ่งออกเป็น 3 กลุ่ม คือ RepA\_C superfamily (Pfam 04796, incompatibility groups IncW) Rep\_3 (Pfam 01051, incompatibility groups IncN) และ RPA superfamily (Pfam 10134) อย่างไรก็ตาม พลาสมิดขนาดเล็กที่ไม่พบยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายสารพิษ ได้แก่ pUT2, pYAN-1, pSx-Qyy และ Spl มีชนิดของโปรตีน Rep ที่แตกต่างออกไป กล่าวคือเป็นโปรตีนชนิด HTH-36 superfamily (Pfam 13730) ดังแผนภูมิความสัมพันธ์ของลำดับกรดอะมิโนในรูปที่ 2.15 (Stolz, 2014)

โปรตีน Par มีความสำคัญต่อกระบวนการบางส่วนพลาสมิดไปยังเซลล์ลูก (bacterial daughter cells) ประกอบด้วยโปรตีน ParA ที่ทำหน้าที่คล้ายเอนไซม์เอทีพีเอส (ATPase) ในการแบ่งส่วนพลาสมิด และโปรตีน ParB ที่มีหน้าที่จับกับบริเวณจำเพาะของพลาสมิด การสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ของลำดับกรดอะมิโนเปรียบเทียบกับโปรตีนทั้งสามชนิดนี้ (รูปที่ 2.16) สามารถใช้ในการยืนยันการจำแนกชนิดของพลาสมิดขนาดใหญ่ที่พบในแบคทีเรียกลุ่ม Sphingomonads (Stolz, 2014)

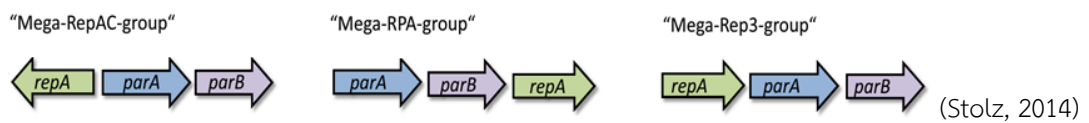
นอกจากนี้ งานวิจัยของ Stolz (2014) รายงานว่าตำแหน่งของยีน *repA* อยู่ใกล้กับยีน *parA* และ *parB* บนพลาสมิดขนาดใหญ่ของแบคทีเรียกลุ่ม Sphingomonads ซึ่งยีนดังกล่าวมีการจัดลำดับแตกต่างกันในพลาสมิดขนาดใหญ่ทั้ง 3 กลุ่ม (รูปที่ 2.17) โดยพลาสมิดกลุ่ม Mega-RepAC-group ได้แก่ pNL1, pCAR3, pSWIT02 และ Mpl พลาสมิดกลุ่ม Mega-RPA-group ได้แก่ pNL2, pISP1 และ Lpl พลาสมิดกลุ่ม Mega-Rep3-group ได้แก่ pCHQ1, pISP0, pLA1, pSLGP และ pSPHCH01



รูปที่ 2.15 ความสัมพันธ์ระหว่างลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน Rep บนพลาสมิดขนาดต่างๆที่พบใน Sphingomonads



รูปที่ 2.16 ความสัมพันธ์ระหว่างลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน RepA ParA และ ParB บนพลาสมิดขนาดต่างๆที่พบใน Sphingomonads (Stolz, 2014)



รูปที่ 2.17 การจัดลำดับของยีน repA parA และ parB บนพลาสมิดขนาดต่างๆที่พบใน Sphingomonads

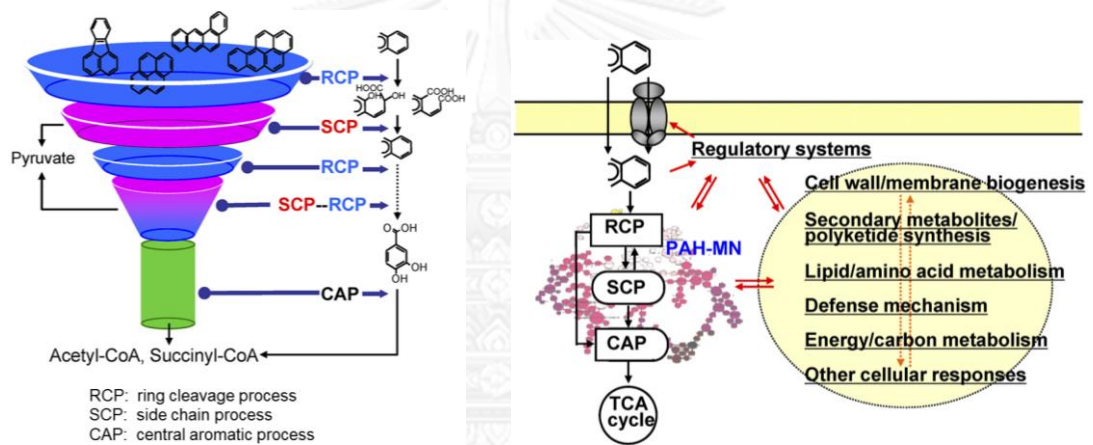
### 2.3.3 แบคทีเรียแกรมบวก *Mycobacterium*

#### 2.3.3.1 ความสามารถในการย่อยสลาย PAHs ของ *Mycobacterium*

*Mycobacterium* เป็นแบคทีเรียในไฟลัม Actinobacteria ที่ชอบอาศัยอยู่ตามสิ่งแวดล้อมปนเปื้อน แบ่งออกเป็น 2 กลุ่มตามอัตราการเจริญเติบโต คือ พวกเจริญช้า (slow growing mycobacteria) ที่ใช้เวลาในการเจริญตั้งแต่ 7 วันขึ้นไป ส่วนใหญ่เป็นเชื้อก่อโรคในมนุษย์และสัตว์ ขณะที่ *Mycobacterium* ที่สามารถย่อยสลาย PAHs ได้นั้นเป็นพวกเจริญเร็ว (fast growing mycobacteria) ที่ใช้เวลาในการเจริญน้อยกว่า 7 วัน มักถูกคัดแยกได้ด้วยสมบัติการใช้ PAHs มวลโมเลกุลสูง (มากกว่า 4 วงอะโรมาติก) เป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงาน แสดงให้เห็นว่า *Mycobacterium* มีสรีรวิทยา โครงสร้างเซลล์ การดำรงชีวิตในสิ่งแวดล้อม และความหลากหลายของเอนไซม์ ที่ทำให้สามารถอยู่รอด เพิ่มจำนวน แข่งขันกับจุลินทรีย์ท้องถิ่น และย่อยสลาย PAHs ในสภาวะแปรผันของสิ่งแวดล้อมได้ โดยพบว่าเกี่ยวข้องกับการย่อยสลาย PAHs ที่ดูดซับกับอนุภาคดินเนื่องจากผนังเซลล์มีกรดไมโคลิก (mycolic acid) ที่มีจำนวนคาร์บอน 60-90 อะตอม และมีปริมาณมากถึง 60 เปอร์เซ็นต์ของผนังเซลล์ ในขณะที่แบคทีเรียอื่นในไฟลัม Actinobacteria มีกรดไมโคลิกที่มีจำนวนคาร์บอนเพียง 30-60 อะตอม จึงทำให้ผนังเซลล์ของ *Mycobacterium* มีความไม่ชอบน้ำสูงและยอมให้เซลล์เกาะกับอนุภาคดินได้ดี (Doyle และคณะ, 2008; Kim และคณะ, 2010) งานวิจัยของ Leys และคณะ (2005b) ออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะกับ *Mycobacterium* จำพวกเจริญเร็วคือ MYCO66f และ MYCO600r เพื่อใช้ตรวจสอบความหลากหลายของแบคทีเรียกลุ่มนี้ในตัวอย่างดินปนเปื้อน โดยมีข้อจำกัดของการตรวจสอบ (detection limit) ประมาณ  $10^6$  CFU/กรัม เมื่อทดสอบความจำเพาะของไพรเมอร์กับแบคทีเรีย *Mycobacterium* สายพันธุ์บริสุทธิ์ที่มีความสามารถในการย่อยสลาย PAHs ด้วยวิธี PCR-DGGE พบว่าเกิดผลิตภัณฑ์ PCR เพียงแถบเดียวในสายพันธุ์บริสุทธิ์ส่วนใหญ่ นอกจากนี้หากใช้ไพรเมอร์ดังกล่าวร่วมกับไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อ eubacteria (eubacterial primers, 27fc and 1492rc) ในกระบวนการ nested PCR จะทำให้ข้อจำกัดของการตรวจสอบลดลงเหลือประมาณ  $10^2$  CFU/กรัม

*Mycobacterium* ได้รับการศึกษาอย่างกว้างขวางเกี่ยวกับความสามารถในการย่อยสลาย PAHs มวลโมเลกุลสูงโดยเฉพาะอย่างยิ่งไพรีน สายพันธุ์ที่เป็นที่รู้จักกันเป็นอย่างดีและได้รับการศึกษาอย่างละเอียดคือ *M. vanbaalenii* PYR-1 (Heitkamp และคณะ, 1988; Khan และคณะ, 2001; Kim และคณะ, 2006b; Kim และคณะ, 2007; Kim และคณะ, 2008) นอกจากนี้ ตัวอย่างสายพันธุ์อื่น ๆ เช่น *M. gilvum* PYR-GCK (Dean-Ross และ Cerniglia, 1996), *M. hodleri* EM12 (Kleespies และคณะ, 1996), *M. frederiksbergense* FAn9T (Willumsen และคณะ, 2001), *Mycobacterium* sp. 6PY1 (Krivobok และคณะ, 2003), *M. austroafricanum* GTI-23 (Bogan และคณะ, 2003), *Mycobacterium* sp. MCS, *Mycobacterium* sp. JLS (Miller และคณะ, 2004), *M. aromatorans* JS19b1 (Seo และคณะ, 2007), *Mycobacterium* sp. N12 (Hu และคณะ, 2011), *M. gilvum* Spyr1 (Kallimanis และคณะ, 2011), *Mycobacterium* sp. A1-PYR (Zhong และคณะ, 2011), *Mycobacterium* sp. KA5, *Mycobacterium* sp. BS5, *Mycobacterium* sp. KF4 (Lease และคณะ, 2011), *Mycobacterium* sp. KMS (Zhang และ Anderson, 2012)

กระบวนการที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลาย PAHs ของ *M. vanbaalenii* PYR-1 ประกอบด้วย 3 กระบวนการหลัก (รูปที่ 2.18) คือ ring cleavage process (RCP) เป็นขั้นตอนการแตกวงอะโรมาติกที่มีวิธีการย่อยสลายแบบแตกแขนงออกไปมากมาย ทำให้เกิดสารตัวกลางหลายชนิดและยังเป็นการลดมวลโมเลกุลของ PAHs โดยมีเอนไซม์ที่อาศัยออกซิเจนเป็นสิ่งสำคัญ จากนั้นสารที่ผ่านกระบวนการ RCP จะเข้าสู่กระบวนการ side chain process (SCP) ที่เป็นวิธีการย่อยสลายแบบเส้นตรงหรือแบบแตกแขนงเล็กน้อย เกิดผลิตภัณฑ์ไพรูเวตและสารตัวกลางที่จะวนเข้าสู่ขั้นตอน RCP เพื่อแตกวงอะโรมาติกต่อไป ทำให้ยังคงมีการลดลงของมวลโมเลกุลของ PAHs ด้วยสุดท้ายสารตัวกลางโปรโตคาเทชูเอต (protocatechuate) จะเข้าสู่กระบวนการ central aromatic process (CAP) ที่เป็นวิธีการย่อยสลายแบบเส้นตรง เพื่อผลิตสารตัวกลางอะเซทิลโคเอและซัคซินิลโคเอที่จะเข้าสู่วัฏจักรเครปต่อไป (Kweon และคณะ, 2011)



รูปที่ 2.18 กระบวนการหลักของการย่อยสลาย PAHs ของ *M. vanbaalenii* PYR-1

(Kweon และคณะ, 2011)

### 2.3.3.2 ยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลาย PAHs ของ *Mycobacterium*

*Mycobacterium* มีความหลากหลายของยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลาย PAHs สูง ดังตัวอย่างยีนของ *M. vanbaalenii* PYR-1 ในตารางที่ 2.13 โดยพบว่าในการย่อยสลาย PAHs แต่ละชนิดจะมียีนประมวลรหัสโปรตีนที่เกี่ยวข้องแตกต่างกัน (รูปที่ 2.19 A) สามารถจัดกลุ่มการแสดงออกของยีนทั้งหมดได้ตามมวลโมเลกุลของ PAHs อีกทั้งการแสดงออกของยีนทั้งหมดในการย่อยสลายพทาเลท (phthalate) ยังครอบคลุมการแสดงออกของยีนในการย่อยสลาย PAHs อื่นๆ ด้วย เนื่องจากพทาเลทเป็นสารตัวกลางในระหว่างการย่อยสลาย PAHs โดยสายพันธุ์ดังกล่าว (รูปที่ 2.19 B) (Kweon และคณะ, 2011) อย่างไรก็ตาม ยีนที่มีความสำคัญต่อกระบวนการแตกวงอะโรมาติกขั้นแรกคือยีน *nidA* และยีน *nidA3* ที่มีความจำเพาะต่อ PAHs ต่างชนิดกัน กล่าวคือยีน *nidA* จะมีความจำเพาะต่อไพรีน > ฟิแนนทรีน > ฟลูออแรนทีน > แอนทราซีน ในขณะที่ยีน *nidA3* มีความจำเพาะต่อฟลูออแรนทีน > ฟิแนนทรีน > ไพรีน > แอนทราซีน และมีความเหมือนกันของลำดับกรดอะมิโนของทั้ง 2 ยีนเพียง 53 เปอร์เซ็นต์ ตำแหน่งของการเกิดการแตกวงอะโรมาติกโดยอาศัยยีน *nidA* และ *nidA3* แสดงดังรูปที่ 2.20 (Kweon และคณะ, 2010) นอกจากนี้ การย่อยสลาย



PAHs ของสายพันธุ์ PYR-1 ยังอาศัยยีน *phtAc* และ *phtAd* ทำหน้าที่เป็นเฟอร์รีดอกซินและเฟอร์รีดอกซินรีดักเทสตามลำดับ ให้กับไดออกซิจีเนสและโมนอกซิจีเนสทั้งหมด (Kweon และคณะ, 2011)

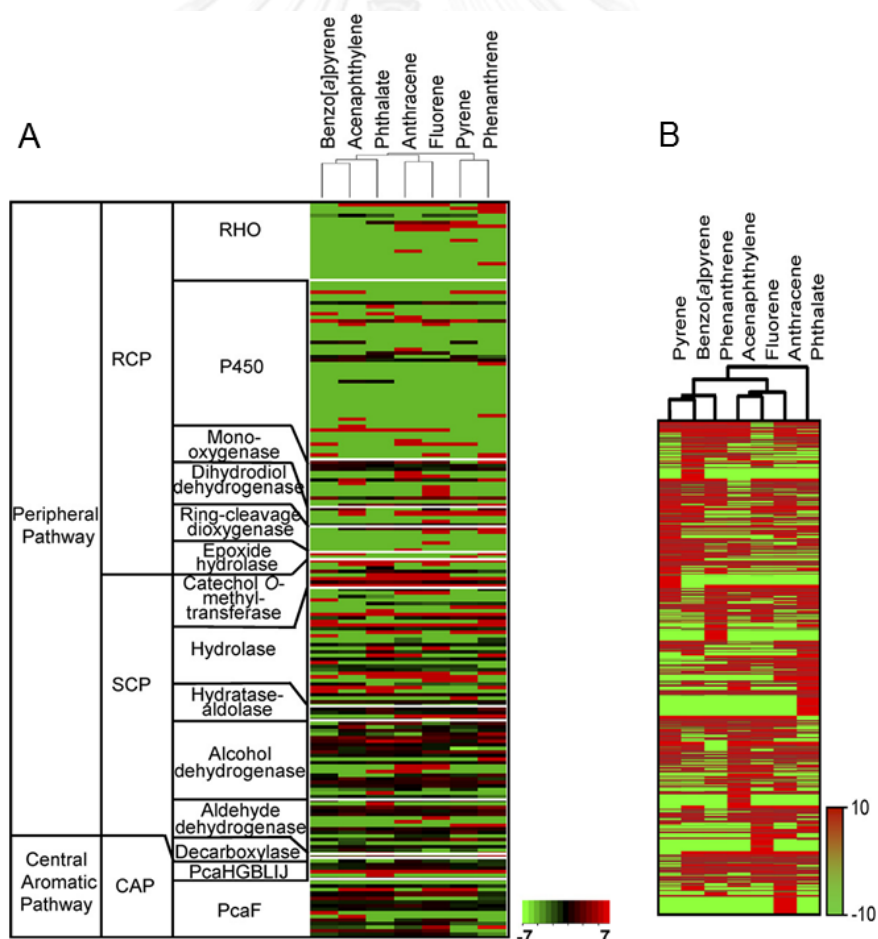
**ตารางที่ 2.13** เอนไซม์ประมวลรหัสไดออกซิจีเนสโดยยีนที่พบใน *M. vanbaalenii* PYR-1

ยีน	เอนไซม์
<i>nidA, pdoA1</i>	pyrene/phenanthrene dioxygenase $\alpha$ subunit
<i>nidB2, pdoB1</i>	pyrene/phenanthrene dioxygenase $\beta$ subunit
<i>nidA3</i>	fluoranthene/pyrene dioxygenase $\alpha$ subunit
<i>nidB3</i>	fluoranthene/pyrene dioxygenase $\beta$ subunit
<i>pdoA2</i>	phenanthrene dioxygenase $\alpha$ subunit
<i>pdoB2</i>	phenanthrene dioxygenase $\beta$ subunit
<i>nidC, nidH, pdoH</i>	alcohol dehydrogenase
<i>nidD, phdH</i>	aldehyde dehydrogenase
<i>phdE</i>	dihydrodiol dehydrogenase
<i>phdF</i>	ring cleavage dioxygenase
<i>phdG, narC</i>	hydratase-aldolase
<i>phdI</i>	1-hydroxy-2-naphthoate dioxygenase
<i>phdJ</i>	trans-2'-carboxybenzalpyruvate hydratase-aldolase
<i>phdK</i>	2-carboxylbenzaldehyde dehydrogenase
<i>phtAa, phtA1</i>	phthalate 3,4-dioxygenase $\alpha$ subunit
<i>phtAb, phtA2</i>	phthalate 3,4-dioxygenase $\beta$ subunit
<i>phtAc</i>	ferredoxin
<i>phtAd</i>	ferredoxin reductase
<i>phtB, ophB</i>	phthalate 3,4-dihydrodiol dehydrogenase
<i>phtC</i>	decarboxylase
<i>phtR</i>	regulatory protein
<i>pcaG</i>	protocatechuate 3,4-dioxygenase $\alpha$ subunit
<i>pcaH</i>	protocatechuate 3,4-dioxygenase $\beta$ subunit
<i>pcaB</i>	$\beta$ -carboxy- <i>cis,cis</i> -muconate cycloisomerase
<i>pcaL</i>	$\gamma$ -carboxymuconolactone decarboxylase/ $\beta$ -ketoadipate enol-lactone hydrolase
<i>pcaI</i>	$\beta$ -ketoadipate succinyl-CoA transferase $\alpha$ subunit
<i>pcaJ</i>	$\beta$ -ketoadipate succinyl-CoA transferase $\beta$ subunit
<i>pcaF</i>	$\beta$ -ketoadipyl-CoA thiolase

ตารางที่ 2.13 เอนไซม์ประมวลผลสลายไดออกซิเจนโดยยีนที่พบใน *Mycobacterium vanbaalenii* PYR-1 (ต่อ)

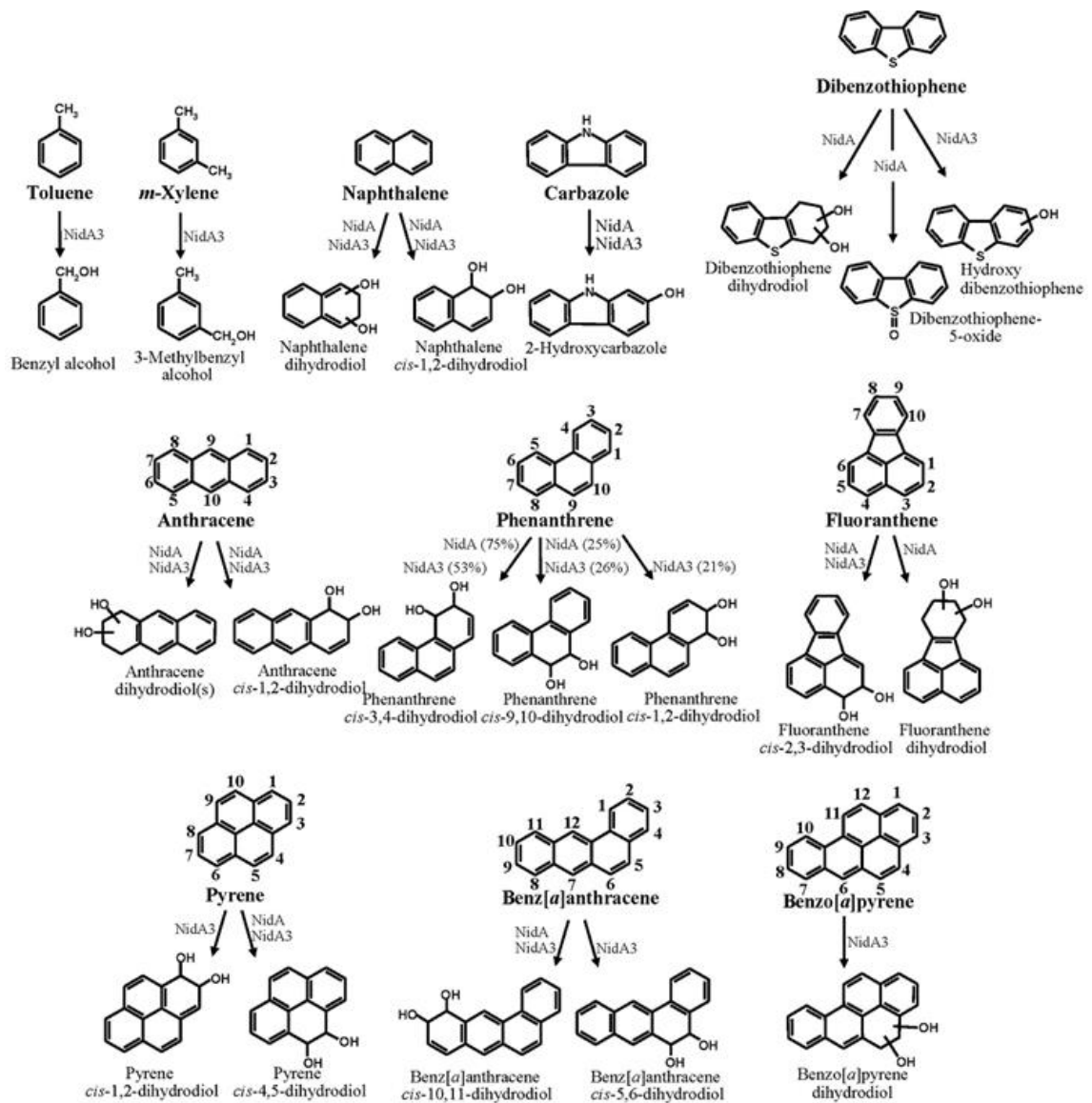
ยีน	เอนไซม์
<i>sdhA</i>	Succinate dehydrogenase/fumarate reductase
<i>ephX1</i>	Epoxide hydrolase I
<i>dfdA1, dbfA1</i>	ring hydroxylating oxygenase $\alpha$ subunit
<i>bnzA2, dbfA2</i>	ring hydroxylating oxygenase $\beta$ subunit
<i>mmsB</i>	3-hydroxyisobutyrate dehydrogenase
<i>flnE</i>	<i>meta</i> -cleavage product hydrolase
<i>carBb</i>	catalytic subunit of <i>meta</i> -cleavage enzyme
<i>ema7</i>	cytochrome P450 monooxygenase

(Kim และคณะ, 2007)



รูปที่ 2.19 แผนที่ความร้อนแสดง A.) โปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลาย PAHs และ B.) โปรตีนทั้งหมดที่แสดงออกในการย่อยสลาย PAHs ชนิดต่างๆของ *M. vanbaalenii* PYR-1

(Kweon และคณะ, 2011)

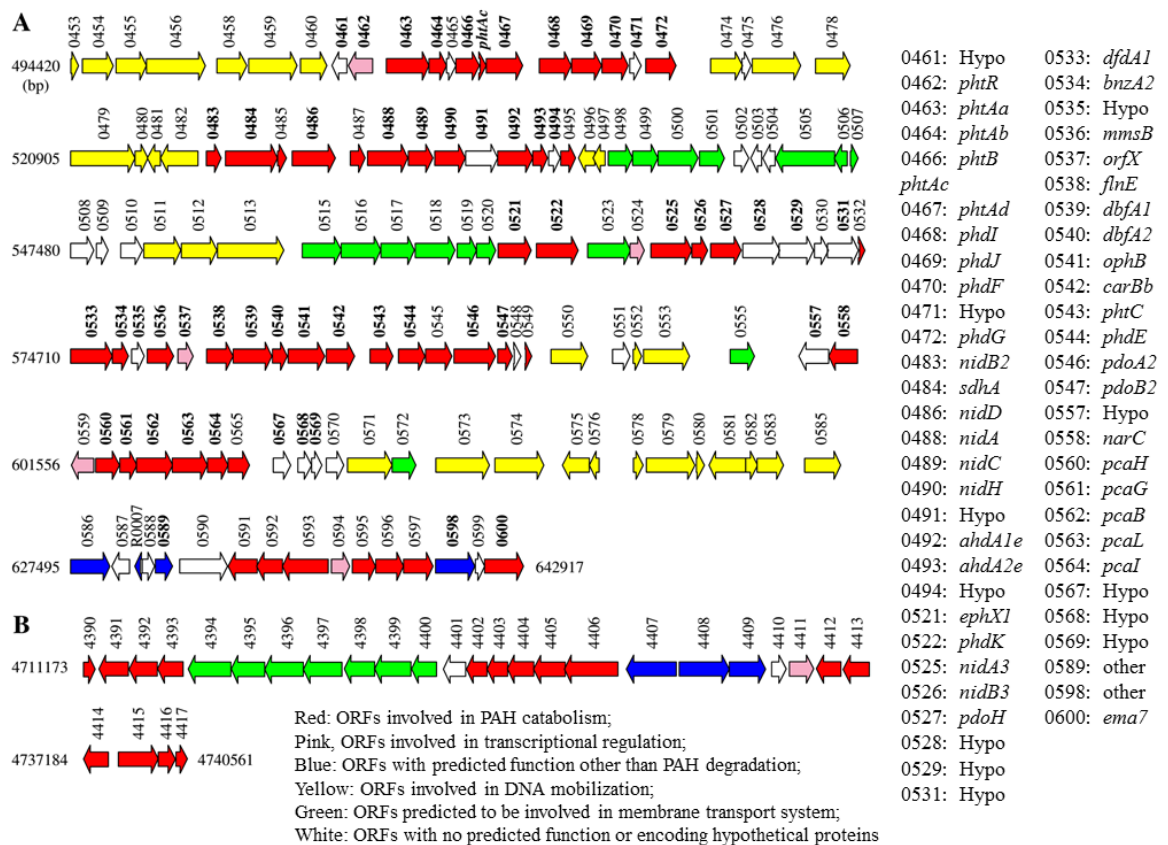


รูปที่ 2.20 ตำแหน่งการแตกวงของสารประกอบอะโรมาติกด้วยยีน *nidA* และ *nidA3*

(Kweon และคณะ, 2010)

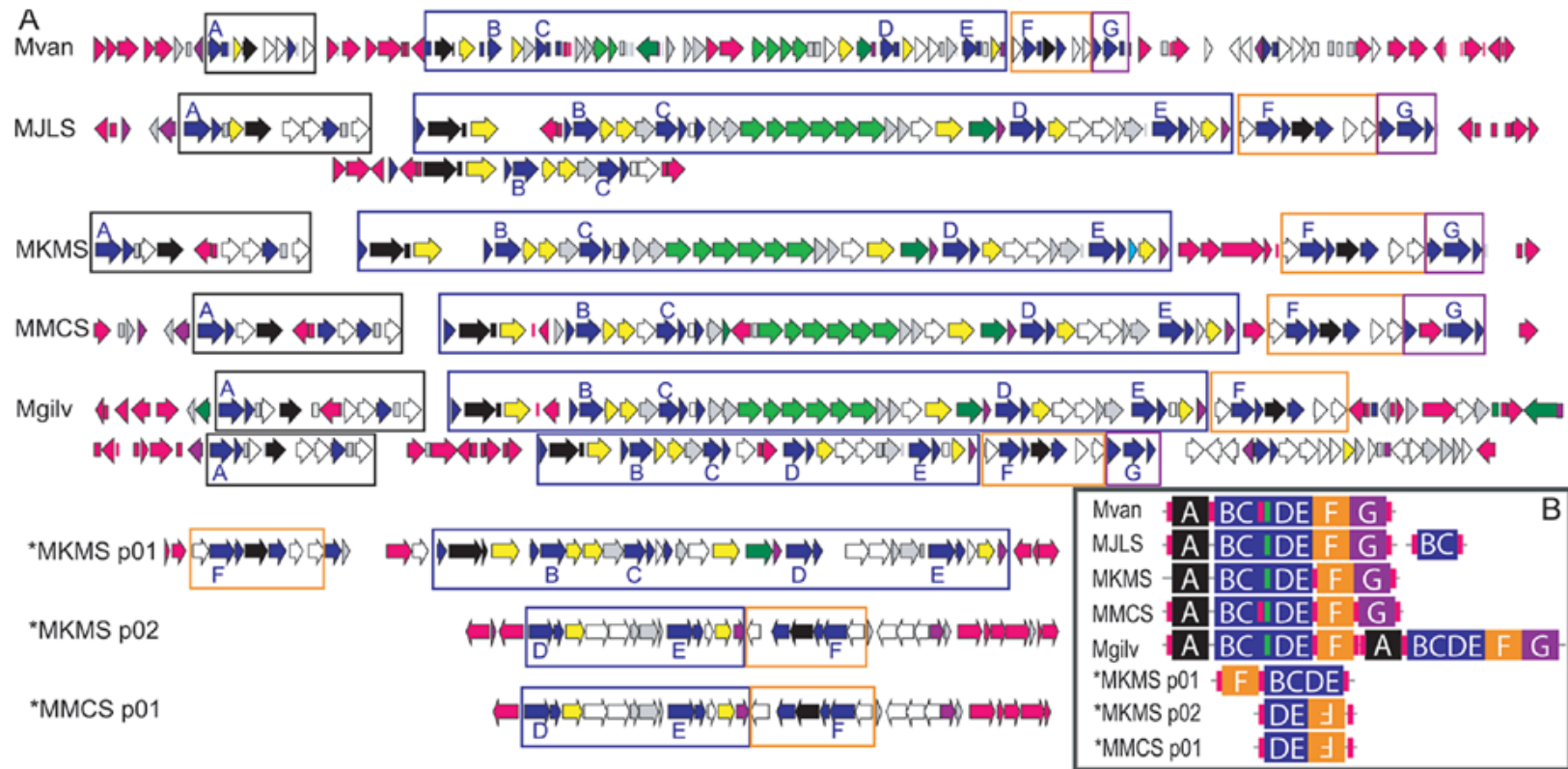
รูปที่ 2.21 แสดงการจัดเรียงตัวของยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลาย PAHs (ลูกศรสีแดงของรูปที่ 2.21) บนโครโมโซม 2 บริเวณของ *M. vanbaalenii* PYR-1 โดยพบว่ายีนที่แสดงออก (ตัวอักษรเข้มของรูปที่ 2.21) ทั้งหมดอยู่ในบริเวณ A ของรูปที่ 2.21 ระหว่างยีนที่เกี่ยวข้องกับการเคลื่อนที่ (mobile genetic elements) (ลูกศรสีเหลืองของรูปที่ 2.21) (Kim และคณะ, 2008) เมื่อพิจารณาแบคทีเรีย *Mycobacterium* ที่มีความสามารถในการย่อยสลาย PAHs ในตารางที่ 2.14 พบว่ายีนที่เกี่ยวข้องในการย่อยสลาย PAHs จะตั้งอยู่บนโครโมโซม และในบางสายพันธุ์ เช่น *Mycobacterium* sp. MCS และ *Mycobacterium* sp. KMS มีจำนวนยีน *nidA* มากกว่าหนึ่งกระจายอยู่ในโครโมโซมและพลาสมิด เมื่อเปรียบเทียบการจัดเรียงตัวของยีนใน *Mycobacterium* 5 สายพันธุ์ (รูปที่ 2.22) ได้แก่ *M. vanbaalenii* PYR-1, *Mycobacterium* sp. JLS,

*Mycobacterium* sp. KMS, *Mycobacterium* sp. MCS และ *M. gilvum* PYR-GCK พบว่าเป็น ARHDO ทั้ง 7 กลุ่ม มีความอนุรักษ์บนโครโมโซมของทั้ง 5 สายพันธุ์ และอยู่ระหว่างยีนที่เกี่ยวข้องกับการเคลื่อนที่ (ลูกศรสีชมพูของรูปที่ 2.22) เช่น ยีนประมวลรหัส integrase และยีนประมวลรหัส transposase นอกจากนี้ ยังพบว่าบนพลาสมิดของสายพันธุ์ KMS และ MCS มียีน ARHDO บางกลุ่มอยู่ระหว่างยีนที่เกี่ยวข้องกับการเคลื่อนที่เช่นกัน แสดงให้เห็นถึงการถ่ายโอน (horizontal gene transfer) และการสับเปลี่ยน (shuffling) ของยีนดังกล่าวที่เกิดขึ้น (DeBruyn และคณะ, 2012)



รูปที่ 2.21 การจัดเรียงตัวของยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลาย PAHs ของ *M. vanbaalenii* PYR-1

(Kim และคณะ, 2008)



Blue: seven ARHDO types (A-G); Yellow: dehydrogenases, Black: ferredoxin/oxidoreductase, Pink: mobile elements (integrases and transposases), Light green: mammalian cell entry (*mce*) elements, Dark green: transporters, Purple: transcriptional regulators, White: other genes/unknown functions, Gray: hypothetical proteins

รูปที่ 2.22 การเปรียบเทียบยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลาย PAHs ที่ประมวลผลได้จากโครโมโซมและพลาสมิดของ *Mycobacterium* spp. 5 สายพันธุ์

(DeBruyn และคณะ, 2012)

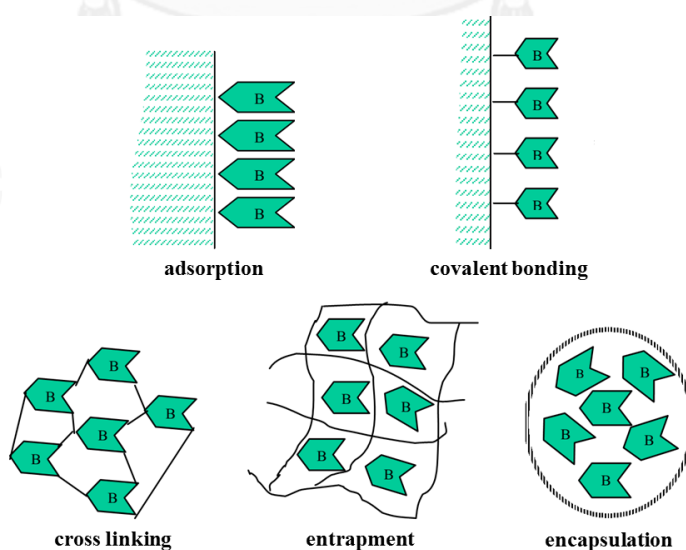
ตารางที่ 2.14 ความสามารถและยีนที่เกี่ยวข้องในการย่อยสลาย PAHs ของ *Mycobacterium* spp.

<i>Mycobacterium</i>	การย่อยสลาย PAHs	ยีนไดออกซิจีเนส / ตำแหน่งของยีน	อ้างอิง
<i>M. vanbaalenii</i> PYR-1	พีแนนทริน, ไพรีน, เบนโซ[เอ]ไพรีน	<i>nid</i> / โครโมโซม	Heitkamp และคณะ, 1988
<i>M. gilvum</i> PYR-GCK	พีแนนทริน, ไพรีน	<i>nid</i> / โครโมโซม	Dean-Ross และ Cerniglia, 1996
<i>M. hodleri</i> EM12	ฟลูออแรนทีน		Kleespies และคณะ, 1996
<i>M. frederiksbergense</i> FAn9T	ฟลูออรีน, พีแนนทริน, แอนทราซีน, ฟลูออแรนทีน, ไพรีน, เบนโซ[เอ]ไพรีน	<i>nid</i>	Willumsen และคณะ, 2001
<i>Mycobacterium</i> sp. 6PY1	ไพรีน	<i>pdo</i>	Krivobok และคณะ, 2003
<i>Mycobacterium</i> sp. MCS	พีแนนทริน, ไพรีน, เบนโซ[เอ]ไพรีน	<i>nid</i> / โครโมโซมและพลาสมิด	Miller และคณะ, 2004
<i>Mycobacterium</i> sp. JLS	พีแนนทริน, ไพรีน	<i>nid</i> / โครโมโซม	
<i>M. aromativorans</i> JS19b1	ฟลูออรีน, พีแนนทริน, ฟลูออแรนทีน, ไพรีน		Seo และคณะ, 2007
<i>Mycobacterium</i> sp. N12	อะซีแนพทีน, ฟลูออรีน, พีแนนทริน, ไพรีน, เบนโซ[เอ]ไพรีน*		Hu และคณะ, 2011
<i>M. gilvum</i> Spyr1	อะซีแนพทีน, ฟลูออรีน, แอนทราซีน, ฟลูออแรนทีน, ไพรีน	RHD / โครโมโซม	Kallimanis และคณะ, 2011
<i>Mycobacterium</i> sp. A1-PYR	พีแนนทริน, ฟลูออแรนทีน, ไพรีน		Zhong และคณะ, 2011
<i>Mycobacterium</i> sp. KA5	พีแนนทริน, แอนทราซีน <sup>BS5, KF4</sup> , ฟลูออแรนทีน, ไพรีน, เบนโซ[เอ]แอนทราซีน, ไครซีน		Lease และคณะ, 2011
<i>Mycobacterium</i> sp. BS5	ทีน, ไพรีน, เบนโซ[เอ]แอนทราซีน, ไครซีน		
<i>Mycobacterium</i> sp. KF4	<sup>KA5, KF4</sup> , ไคเบนซ์[เอ, เอช]แอนทราซีน		
<i>Mycobacterium</i> sp. KMS	ไพรีน, เบนโซ[เอ]ไพรีน	<i>nid</i> / โครโมโซมและพลาสมิด	Zhang และ Anderson, 2012

\* สามารถย่อยสลายได้เมื่อมีพีแนนทรินและไพรีนเป็นโคซับสเตรท (co-substrate)

## 2.4 หัวเชื้อพร้อมใช้รูปแบบแบคทีเรียอัดเม็ด

การประยุกต์ใช้แบคทีเรียสายพันธุ์บริสุทธิ์ในการบำบัดดินปนเปื้อนให้มีประสิทธิภาพและประสบความสำเร็จ ขึ้นอยู่กับอัตราการรอดชีวิตของแบคทีเรียที่เติมลงไป ซึ่งสามารถส่งเสริมได้โดยการตรึงแบคทีเรีย (immobilization) ให้อยู่กับที่โดยอาศัยการยึดเกาะ (attachment) หรือการกักขัง (entrapment) ในวัสดุตรึง (รูปที่ 2.23) (Rahman และคณะ, 2006) การยึดเกาะเป็นวิธีตรึงที่อาศัยแรงยึดเหนี่ยวระหว่างแบคทีเรียและพื้นผิวของวัสดุตรึง แรงยึดเหนี่ยวดังกล่าวแบ่งออกเป็น 2 ประเภท คือ แรงยึดเกาะที่สามารถผันกลับได้ (reversible forces) เช่น แรงแรงแวนเดอร์วาลส์ แรงดึงดูดระหว่างไอออนและโมเลกุลที่ไม่ชอบน้ำ พันธะไฮโดรเจน และแรงยึดเกาะที่ไม่สามารถผันกลับได้ (irreversible forces) เช่น พันธะโควาเลนต์ วิธีการยึดเกาะอย่างง่ายคือการดูดซับ (adsorption) ส่วนใหญ่มักใช้งานเพียงระยะเวลาสั้นๆ เนื่องจากความไม่เสถียรของการยึดเกาะ สำหรับการกักขังนั้นเป็นวิธีตรึงโดยการกักเซลล์ไว้ภายในวัสดุตรึง ซึ่งส่วนใหญ่เป็นเจลาพอลิเมอร์ เช่น อัลจิเนต (alginate) คาราจีแนน (carrageenan) คอลลาเจน (collagen) พอลิอะคริลาไมด์ (polyacrylamide) เจลาติน (gelatin) ยางซิลิโคน (silicon rubber) พอลิยูรีเทน (polyurethane) พอลิไวนิลแอลกอฮอล์ (polyvinyl alcohol) การตรึงแบบห่อหุ้มเซลล์ (encapsulation) เป็นวิธีการกักขังเซลล์ไว้ภายในผนังของเยื่อกึ่งผ่าน (semi-permeable membrane) ที่ยอมให้เซลล์เคลื่อนที่ได้ภายในช่องว่างของแคปซูล แต่ยอมให้สารอาหารต่างๆ ผ่านเข้าออกแคปซูลได้ อย่างไรก็ตาม ยังมีการตรึงแบบไม่ใช้วัสดุตรึงคือการเชื่อมไขว้ (cross linking) ที่อาศัยการเชื่อมกันระหว่างเซลล์ด้วยสารเคมี โดยทั่วไปนิยมใช้กลูตาออลดีไฮด์ (glutaraldehyde) ซึ่งทำปฏิกิริยากับหมู่อะมิโนของผิวโปรตีน นอกจากนี้ยังสามารถใช้ไอโซไซยาเนต (*bis-isocyanate*) ไดอะโซเบนซิดีน (*bis-diazobenzidine*) เกลือไดอะโซเนียม (diazonium salts) หรือโปรตีนเฉื่อย เช่น โบวีนซีรัมอัลบูมิน (bovine serum albumin) โอวัลบูมิน (ovoalbumin) ในการเชื่อมไขว้กันได้ (Górecka และ Jastrzębsk, 2011)



รูปที่ 2.23 การตรึงแบคทีเรียแบบต่างๆ

(Górecka และ Jastrzębsk, 2011)

ชนิดของวัสดุคั่วเป็นปัจจัยหลักที่มีความสำคัญต่อกระบวนการคั่วแบบที่เรีย โดยการใช้วัสดุคั่วจำเป็นต้องพิจารณาถึงความเป็นไปได้ในการเจริญของแบคทีเรียในวัสดุคั่ว และลักษณะทางกายภาพอื่นๆของวัสดุคั่ว เช่น การย่อยสลาย การละลายน้ำ และความเป็นรูพรุน เป็นต้น (Górecka และ Jastrzębsk, 2011) วัสดุทางการเกษตรจึงเป็นตัวเลือกที่ดีในการนำมาใช้เป็นวัสดุคั่วแบบที่เรียเพื่อการบำบัดดินปนเปื้อน เนื่องจากเป็นวัสดุเหลือใช้ที่มีปริมาณมาก ต้นทุนต่ำ ไม่เป็นพิษต่อสิ่งแวดล้อม สามารถย่อยสลายได้เองจึงไม่พบการตกค้าง และยังสามารถส่งเสริมการย่อยสลาย PAHs ในดินได้ ตัวอย่างวัสดุทางการเกษตรที่นำมาศึกษาการบำบัดสิ่งแวดล้อมปนเปื้อนสารพิษต่างๆ เช่น รำ (rice bran) แกลบ (rice husk) รำข้าวสาลี (wheat bran) แกลบข้าวสาลี (wheat husk) ฟางข้าวสาลี (wheat straw) ฝุ่นเลื่อย (saw dust) เปลือกไม้ (bark) เปลือกถั่วลิสง (groundnut shells) เปลือกมะพร้าว (coconut shells) เปลือกเฮเซลนัท (hazelnut shells) เปลือกวอลนัท (walnut shells) เปลือกเมล็ดฝ้าย (cottonseed hulls) ใบชาใช้แล้ว (waste tea leaves) ใบต้นราชพฤกษ์ (*Cassia fistula* leaves) ชังข้าวโพด (maize corn cob) ชานอ้อย (sugarcane bagasse) เปลือกแอปเปิ้ล (apple peels) เปลือกกล้วย (banana peels) เปลือกส้ม (orange peels) เปลือกถั่วเหลือง (soybean hulls) ก้านองุ่น (grapes stalks) ผักตบชวา (water hyacinth) จาวชูการ์บีท (sugar beet pulp) ก้านดอกทานตะวัน (sunflower stalks) เมล็ดกาแฟ (coffee beans) ถั่วอาร์จัน (arjun nuts) ก้านฝ้าย (cotton stalks) (Sud และคณะ, 2008) ปัจจุบันมีการนำวัสดุทางการเกษตรมาเผาที่อุณหภูมิสูงไม่เกิน 700 องศาเซลเซียส ภายใต้สภาวะที่มีปริมาณออกซิเจนจำกัด ได้เป็นถ่านที่เรียกว่า biochar ซึ่งมีลักษณะเป็นเม็ดคาร์บอนเนื้อละเอียดที่มีรูพรุน มีความเสถียรต่อการเปลี่ยนแปลงของสภาวะในดิน มีโครงสร้างที่จำเพาะต่อการกักเก็บน้ำและสารอาหารในดิน มีพื้นที่ผิวที่สามารถดูดซับสารปนเปื้อนในดินได้ดี ทำให้ลดการเคลื่อนที่และแพร่กระจายของสารปนเปื้อนได้ จึงนิยมนำมาใช้เป็นสารปรับปรุงดินหรือวัสดุคั่วแบบที่เรียในการบำบัดดินปนเปื้อน (Beesley และคณะ, 2011; Tang และคณะ, 2013) งานวิจัยของ Chen และ Yuan (2011) ศึกษาการดูดซับแนพทาลีนและพีแนทรีนของถ่าน biochar ที่ผลิตจากการเผาไม้จากต้นไพนที่อุณหภูมิ 300 และ 400 องศาเซลเซียส พบว่าถ่าน biochar ที่เผาใหม่ที่อุณหภูมิสูงสามารถดูดซับ PAHs ในดินได้ดีและเร็วกว่า อย่างไรก็ตาม การประยุกต์ใช้งานถ่าน biochar ยังคงเป็นประเด็นถกเถียงเนื่องจากกระบวนการผลิต biochar มีการปลดปล่อยก๊าซเรือนกระจก อีกทั้งยังปลดปล่อยสารพิษคือไดออกซิน (dioxin) และ PAHs ด้วย โดยพบว่าไดออกซินที่เกิดขึ้นและสะสมใน biochar มีปริมาณน้อยมากประมาณ 92 พิโกกรัม/กรัม สำหรับปริมาณ PAHs ที่เกิดขึ้นและสะสมใน biochar พบว่าขึ้นอยู่กับชนิดของวัตถุดิบ อุณหภูมิและเวลาในการเผาไหม้ ซึ่ง biochar ที่เผาไหม้เป็นระยะเวลาสั้นมีปริมาณ PAHs 0.3-45.0 ไมโครกรัม/กรัม และที่เผาไหม้เป็นเวลานานมีปริมาณ PAHs 0.07-3.27 ไมโครกรัม/กรัม กล่าวคือการเพิ่มอุณหภูมิและเวลาในการเผาวัตถุดิบนั้น จะทำให้ลดปริมาณ PAHs ที่เกิดขึ้นใน biochar ได้ (Hale และคณะ, 2012)

งานวิจัยนี้มุ่งเน้นการผลิตหัวเชื้อพร้อมใช้ที่ใช้งานง่าย มีประสิทธิภาพในการบำบัดสิ่งแวดล้อมปนเปื้อน PAHs ต้นทุนต่ำ น้ำหนักเบาขนส่งสะดวก กระบวนการผลิตไม่ซับซ้อน เก็บรักษาได้ง่ายโดยคงประสิทธิภาพการบำบัด ใช้งานง่ายและเหมาะสมกับประเทศไทย โดยรูปแบบหัวเชื้อพร้อมใช้ที่น่าสนใจ คือ แบคทีเรียอัดเม็ด



การผลิตแบคทีเรียอัดเม็ดเริ่มจากการคัดเลือกวัสดุที่เป็นองค์ประกอบในการอัดเม็ดที่มีต้นทุนต่ำ มีปริมาณมาก และสามารถหาได้ง่าย นำวัสดุที่คัดเลือกได้มาบดให้ละเอียด ความละเอียดของวัสดุจะช่วยให้เม็ดมีความคงตัวดี จากนั้นผสมวัสดุแต่ละชนิดกับเชื้อแบคทีเรียให้เข้ากัน แล้วนำส่วนผสมนี้เข้าสู่กระบวนการอัดเม็ด ทำให้แห้งด้วยการผึ่งลมในสถานที่ที่ไม่มีแสงแดดเพื่อให้ความชื้นระเหยออกไป (ดัดแปลงมาจาก Cheunbarn และคณะ, 2008) อย่างไรก็ตาม ปัจจัยภายในที่มีผลต่อประสิทธิภาพการกำจัดสารพิษของแบคทีเรียอัดเม็ด ได้แก่ ชนิดและอัตราส่วนของวัสดุที่เป็นองค์ประกอบในการอัดเม็ด และปริมาณของแบคทีเรียในแบคทีเรียอัดเม็ด จึงต้องมีการศึกษาและแปรผันปัจจัยดังกล่าว เพื่อให้ได้แบคทีเรียอัดเม็ดที่มีประสิทธิภาพดี

งานวิจัยของ Cheunbarn และคณะ (2008) ศึกษาการบำบัดน้ำเสียปนเปื้อนสี้อมด้วยแบคทีเรียอัดเม็ด *Bacillus* sp. Mk-8 (รูปที่ 2.24) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร และความยาว 1 เซนติเมตร โดยมีองค์ประกอบของวัสดุอัดเม็ด ได้แก่ ทรายละเอียด รำข้าวถั่วเหลือง และแป้งข้าวเจ้า พบว่าแบคทีเรียอัดเม็ดสามารถกำจัดสี้อมของน้ำเสียได้ 96.9 เปอร์เซ็นต์ ในสภาวะไม่มีอากาศที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 14 วัน แต่ทำให้ค่าซีไอดีของน้ำเสียสูงขึ้นอันเนื่องมาจากวัสดุที่เป็นองค์ประกอบของแบคทีเรียอัดเม็ด แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียอัดเม็ดไม่เหมาะในการนำไปใช้ในการบำบัดน้ำเสีย



รูปที่ 2.24 แบคทีเรียอัดเม็ด *Bacillus* sp. Mk-8

(Cheunbarn และคณะ, 2008)

ในทางตรงกันข้าม การประยุกต์ใช้แบคทีเรียอัดเม็ดในการบำบัดดินปนเปื้อนนั้น มีข้อดีหลายประการ กล่าวคือเป็นที่ยืดเกาะให้แบคทีเรียสามารถเพิ่มจำนวนและอยู่รอดได้ในสิ่งแวดล้อม ช่วยเพิ่มจุลินทรีย์ในดินทำให้เพิ่มปริมาณออกซิเจนและความชื้นในดินด้วย รวมถึงสามารถดูดซับสารพิษในดินทำให้แบคทีเรียเข้าถึงสารพิษได้มากขึ้น (Mishra และคณะ, 2001; Mohan และคณะ, 2006) อย่างไรก็ตาม ยังไม่มีรายงานวิจัยที่ศึกษาการบำบัดดินปนเปื้อน PAHs ด้วยแบคทีเรียรูปแบบอัดเม็ด มีเพียงงานวิจัยที่ศึกษาการบำบัดดินปนเปื้อน PAHs ด้วยจุลินทรีย์รูปแบบยัดเกาะบนวัสดุทางการเกษตรต่างๆ

งานวิจัยของ Wang และคณะ (2012a) ศึกษาการกำจัดไพรีนความเข้มข้นเริ่มต้น 100 มิลลิกรัม/กิโลกรัม ในดินเค็มด้วยแบคทีเรีย *Mycobacterium* sp. B2 รูปแบบเซลล์อิสระและ

รูปแบบยีสต์เกาะบนซังข้าวโพด พบว่ามีประสิทธิภาพการย่อยสลายไพลีนเท่ากับ 82.2 และ 83.2 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ในระยะเวลา 30 วัน นอกจากนี้ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราด (scanning electron microscope; SEM) แสดงให้เห็นว่าวัสดุตั้ง (ซังข้าวโพด) มีช่องว่างระหว่างกันมาก จึงมีพื้นที่มากพอสำหรับการเจริญของเซลล์แบคทีเรีย อีกทั้งแบคทีเรียสายพันธุ์ B2 รูปแบบเซลล์อิสระและรูปแบบยีสต์เกาะบนซังข้าวโพด ยังสามารถเจริญได้ดีในดินเค็มปนเปื้อนไพลีน

งานวิจัยของ Wu และคณะ (2008) ศึกษาการบำบัดดินปนเปื้อน PAHs ความเข้มข้นเริ่มต้น  $10.83 \pm 0.22$  มิลลิกรัม/กิโลกรัม ด้วยเชื้อรา *Monilinia* sp. W5-2 ยีสต์เกาะบนซังข้าวโพดบด เป็นเวลา 30 วัน เปรียบเทียบกับชุดควบคุมพื้นฟูโดยธรรมชาติและชุดที่เติมซังข้าวโพดบด พบว่าการย่อยสลาย PAHs ในชุดที่เติมเชื้อราสายพันธุ์ W5-2 มากกว่าในชุดที่เติมซังข้าวโพดบดและชุดควบคุม โดยมีประสิทธิภาพการย่อยสลายเท่ากับ 35, 16 และ 9 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ งานวิจัยของ Wang และคณะ (2014) ศึกษาการบำบัดดินปนเปื้อน PAHs ความเข้มข้นเริ่มต้น  $6.35 \pm 0.045$  มิลลิกรัม/กิโลกรัม ด้วยเชื้อรา *Phanerochaete chrysosporium* รูปแบบเซลล์อิสระและรูปแบบผสมกับหินทัวร์มาลีน พบว่าการกำจัด PAHs ในดินของเชื้อรา *P. chrysosporium* รูปแบบผสมหินทัวร์มาลีนมีประสิทธิภาพสูงกว่าของรูปแบบเซลล์อิสระ และการเติมเพียงหินทัวร์มาลีนก็สามารถช่วยกำจัด PAHs ได้โดยการกระตุ้นจุลินทรีย์ในดิน อย่างไรก็ตามพบว่า การเติมเชื้อราร่วมกับวัสดุธรรมชาติจะส่งเสริมการย่อยสลาย PAHs โดยเฉพาะอย่างยิ่งมวลโมเลกุลสูง (ขนาด 5-6 วงอะโรมาติกขึ้นไป)

นอกจากนี้ ยังมีงานวิจัยการกำจัดสารปนเปื้อนอื่น ๆ ในดินด้วยแบคทีเรียยีสต์เกาะบนวัสดุต่างๆ ดังตัวอย่างในตารางที่ 2.15

**ตารางที่ 2.15** การกำจัดสารพิษอื่นๆในสิ่งแวดล้อมด้วยแบคทีเรียรูปแบบยีสต์เกาะกับวัสดุ

สารพิษ	แบคทีเรีย	วัสดุตั้ง	ประสิทธิภาพการกำจัดสาร	อ้างอิง
น้ำมันดิบ 800 มก./ล.	<i>Arthrobacter</i> sp.	เซลล์อิสระ	22.5%, 7 วัน	Obuekwe และ Al-Muttawa, 2001
		ซีลี้อย	45.0%, 7 วัน	
		รำข้าว	27.5%, 7 วัน	
ไนโตรฟีนอล 70 มก./กก.	<i>Arthrobacter protophormiae</i> RKJ 100	เซลล์อิสระ	75%, 5 วัน	Labana และคณะ, 2005
		ซังข้าวโพด	99%, 5 วัน	
น้ำมันดิบ 6,500 มก./ล.	<i>Rhodococcus corynebacterioides</i> QBT0	เซลล์อิสระ	35.4%, 15 วัน	Gentili และคณะ, 2006
		ไคติน	61.5%, 15 วัน	
		เกล็ดไคโตซาน	64.6%, 15 วัน	
เฮกซะเดคเคน 30,000 มก./ล.	<i>Rhodococcus ruber</i> IEGM 231	ซีลี้อย	71 มก./ล./ชม.	Podorozhko และคณะ, 2008
เฮกซะคลอโรไซโคลเฮกเซน 60.7 มก./กก.	<i>Sphingobium indicum</i> B90A	ซังข้าวโพด	76%, 8 วัน	Raina และคณะ, 2008

**ตารางที่ 2.15** การกำจัดสารพิษอื่นๆในสิ่งแวดล้อมด้วยแบคทีเรียรูปแบบยัดเกาะกับวัสดุ (ต่อ)

สารพิษ	แบคทีเรีย	วัสดุจริง	ประสิทธิภาพ การกำจัดสาร	อ้างอิง
คาร์โบฟูแรน 5 มก./กก.	<i>Burkholderia cepacia</i> PCL3	เซลลูลีอัสระ	95%, 60 วัน	Plangklang และ Reungsang, 2009
		ซังข้าวโพด	90%, 60 วัน	
		ชานอ้อย	90%, 60 วัน	
อะลิฟาติก ไฮโดรคาร์บอน (6 ชนิด) 6,000 มก./กก.	<i>Pseudomonas</i> sp.  <i>Rhodococcus</i> sp.	เซลลูลีอัสระ	19-48%, 15 วัน	Rivelli และคณะ, 2013
		ซังข้าวโพด	45-55%, 15 วัน	
		เซลลูลีอัสระ	21-44%, 15 วัน	
		ซังข้าวโพด	12-42%, 15 วัน	
น้ำมันดีเซล 10,000 มก./ล.	<i>Acinetobacter</i> sp. F9	เซลลูลีอัสระ	90%, 2 วัน	Hou และคณะ, 2013
		โซเดียมอัลจิ เนตและโคโต	90%, 7 วัน	
		ชานเคลือบบน ข้าวฟ่าง		
ปิโตรเลียม ไฮโดรคาร์บอน 10,000 มก./ล.	แบคทีเรีย 6 สายพันธุ์	เซลลูลีอัสระ	26%, 30 วัน	Simons และคณะ, 2012
		เปลือกหอย	55%, 30 วัน	
		กากมะพร้าว	36%, 30 วัน	

## 2.5 ป่าชายเลน

ป่าชายเลน (mangrove forest หรือ intertidal forest) หมายถึง ระบบนิเวศที่มีน้ำขึ้นสูงสุดและน้ำลงต่ำสุด บริเวณชายฝั่งทะเล ปากแม่น้ำ อ่าว และเกาะ ในแถบภูมิภาคเขตร้อนและกึ่งร้อน มีโครงสร้างและหน้าที่ที่เป็นเอกลักษณ์ มีความสำคัญทางชีวภาพเนื่องจากเป็นที่อยู่อาศัยของพืชและสัตว์น้ำตามธรรมชาติ เป็นแหล่งพลังงานและอาหารของจุลินทรีย์ เป็นแหล่งดูดซับคาร์บอน เป็นแหล่งวัตถุดิบประเภทไม้และถ่านหิน และเป็นแนวกำบังป้องกันการกัดเซาะชายฝั่งและลดความรุนแรงของภัยธรรมชาติอีกด้วย (Alongi, 2002) ข้อมูลภาพถ่ายดาวเทียม (รูปที่ 2.25) แสดงให้เห็นการแพร่กระจายของป่าชายเลนในทวีปเอเชีย 42 เปอร์เซ็นต์ ทวีปแอฟริกา 20 เปอร์เซ็นต์ ทวีปอเมริกาเหนือและกลาง 15 เปอร์เซ็นต์ หมู่เกาะต่างๆในมหาสมุทรแปซิฟิก 12 เปอร์เซ็นต์ และทวีปอเมริกาใต้ 11 เปอร์เซ็นต์ โดยในแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้จะมีความหลากหลายของพรรณไม้ในพื้นที่ป่าชายเลนสูง (Giri และคณะ, 2011) ในประเทศไทยมีพื้นที่ป่าชายเลนประมาณ 1,435,116 ไร่ ครอบคลุมพื้นที่ 4 บริเวณ ได้แก่ บริเวณชายฝั่งทะเลอ่าวไทย (ภาคกลาง) ในพื้นที่จังหวัดกรุงเทพมหานคร สมุทรปราการ สมุทรสาคร สมุทรสงคราม เพชรบุรี และประจวบคีรีขันธ์ บริเวณชายฝั่งทะเลภาคตะวันออกในพื้นที่จังหวัดตราด จันทบุรี ระยอง ชลบุรี และฉะเชิงเทรา บริเวณชายฝั่งทะเลอ่าวไทย (ภาคใต้) ในพื้นที่จังหวัดชุมพร สุราษฎร์ธานี นครศรีธรรมราช พัทลุง สงขลา ปัตตานี และนราธิวาส และบริเวณชายฝั่งทะเลอันดามัน (ภาคใต้) ในพื้นที่จังหวัดพังงา ระนอง ตรัง

กระบี่ สตูล และภูเก็ต โดยพบว่าพื้นที่ป่าชายเลนบริเวณชายฝั่งทะเลอ่าวไทยของภาคกลางมีปริมาณการปนเปื้อนสารพิษมากกว่าบริเวณอื่น ซึ่งมีสาเหตุหลักมาจากการปลดปล่อยของเสียจากกิจกรรมของมนุษย์ลงสู่น้ำสายต่างๆที่ไหลมาสู่อ่าวไทย (Pumijumnong, 2014)

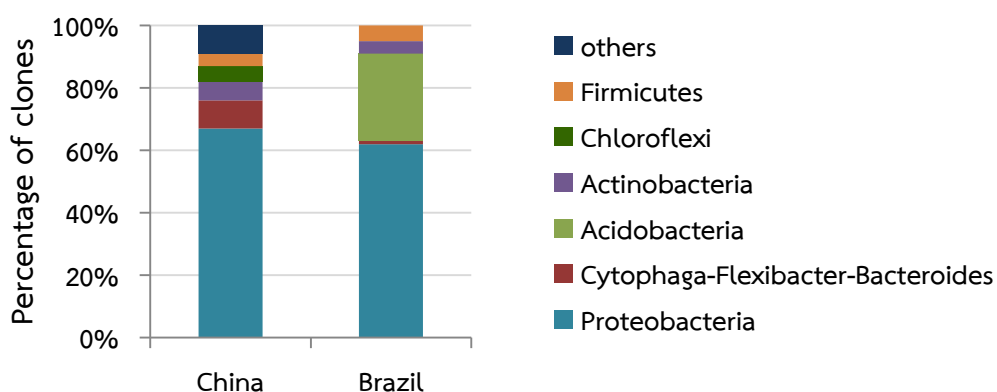


รูปที่ 2.25 การแพร่กระจายของป่าชายเลน  
(Giri และคณะ, 2011)

ในปัจจุบันป่าชายเลนถูกทำลายลงอย่างมากโดยมีสาเหตุหลักมาจากการได้รับอิทธิพลจากการกระทำของมนุษย์ ได้แก่ การใช้ประโยชน์พื้นที่ป่าชายเลนเพื่อการประมงชายฝั่ง เช่น การทำนากุ้ง 38 เปอร์เซ็นต์ และการจับปลาลิ้นปลา 14 เปอร์เซ็นต์ การตัดไม้ทำลายป่าเพื่อนำไปใช้ในการเกษตรอุตสาหกรรม และการพัฒนาชุมชน 26 เปอร์เซ็นต์ การตั้งโรงงานผลิตน้ำจืดจากน้ำทะเล 11 เปอร์เซ็นต์ การรुकกล้าที่ดินเพื่อการขยายตัวของชุมชนเมือง 5 เปอร์เซ็นต์ การใช้สารกำจัดศัตรูพืช 3 เปอร์เซ็นต์ การเกษตรกรรม 1 เปอร์เซ็นต์ และกิจกรรมอื่นๆ เช่น การทำนาเกลือ การทำเหมืองแร่ การสร้างท่าเรือ เป็นต้น (Valiela และคณะ, 2001) อีกทั้งยังมีสาเหตุมาจากการเปลี่ยนแปลงทางธรรมชาติ เช่น การเพิ่มขึ้นของระดับน้ำทะเลอย่างรวดเร็ว การกัดเซาะชายฝั่ง เป็นต้น (Giri และคณะ, 2011) นอกจากนี้ยังเกิดจากอุบัติเหตุการรั่วไหลของน้ำมันและสารเคมีจากเรือ ซึ่งน้ำมันจะถูกคลื่นพัดพาเข้าหาชายฝั่ง ทำให้ป่าชายเลนเป็นพื้นที่ที่มีความเสี่ยงสูงที่จะได้รับผลกระทบอย่างมากจากอุบัติเหตุดังกล่าว ผลกระทบที่เกิดขึ้นจะมีความหลากหลายขึ้นอยู่กับชนิดและองค์ประกอบของน้ำมัน โดยพบว่าอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนมวลโมเลกุลต่ำจะทำให้เกิดการทำลายเยื่อหุ้มเซลล์ของรากส่วนอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนมวลโมเลกุลสูงจะก่อให้เกิดการกลายพันธุ์ (NOAA, 2010; Santos และคณะ, 2011)

อย่างไรก็ตาม ยังพบว่าจุลินทรีย์เป็นตัวแปรสำคัญในการดำรงรักษาผลผลิต การอนุรักษ์และการฟื้นฟูสภาพของป่าชายเลน ซึ่งมีความเกี่ยวข้องโดยตรงกับการเปลี่ยนรูปของสารอาหาร การสังเคราะห์แสง การตรึงไนโตรเจน การผลิตก๊าซมีเทน การละลายของฟอสเฟต การลดลงของซิลิเกต และการผลิตสารเมตาบอไลต์ เช่น สารปฏิชีวนะ และเอนไซม์ (Holguin และคณะ, 2001) จุลินทรีย์ในป่าชายเลนประกอบด้วยโปรโตซัว 2 เปอร์เซ็นต์ สาหร่ายขนาดเล็ก 7 เปอร์เซ็นต์ และแบคทีเรีย

และเชื้อรา 91 เปอร์เซ็นต์ (Santos และคณะ, 2011) ซึ่งแบคทีเรียที่พบในดินตะกอนป่าชายเลนนั้น จะมีความเหมือนกับฐานข้อมูลต่ำ หมายความว่าส่วนใหญ่เป็นแบคทีเรียชนิดใหม่ที่ยังไม่มีรายงานใน ฐานข้อมูล (Dias และคณะ; 2010) โดยพบว่าชนิดแบคทีเรียส่วนใหญ่ในดินตะกอนป่าชายเลนบริเวณ พื้นที่เขตสงวนคือ Proteobacteria และแบคทีเรียชนิดอื่นๆ เช่น Actinobacteria, Firmicutes และ Cytophaga-Flexibacter-Bacteroides (รูปที่ 2.26) (Liang และคณะ, 2007; Dias และคณะ; 2010)



รูปที่ 2.26 ชนิดของแบคทีเรียที่พบในดินตะกอนป่าชายเลนในพื้นที่เขตสงวน

\* วิเคราะห์โดยทำห้องสมุดของยีน 16S rDNA (Liang และคณะ, 2007; Dias และคณะ; 2010)

ป่าชายเลนจึงเปรียบเสมือนแหล่งรองรับสิ่งปฏิกูลและสารพิษจากแผ่นดินและผิวน้ำ ทำให้มีการสะสมของสารพิษในดินตะกอนป่าชายเลน (Domínguez และคณะ, 2010) และมีอิทธิพลต่อการเปลี่ยนแปลงประชาคมของจุลินทรีย์ รายงานวิจัยของ Taketani และคณะ (2010) ศึกษาการเปลี่ยนแปลงประชาคมแบคทีเรียในดินตะกอนป่าชายเลนดั้งเดิม และดินตะกอนป่าชายเลนที่ปนเปื้อนสารมลพิษ โดยแบ่งดินตะกอนทั้ง 2 ชนิดออกเป็นอย่างละ 2 ส่วน คือ ส่วนที่เติมน้ำมันดิบ 2 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร และส่วนที่ไม่เติมน้ำมันดิบ พบว่าประชาคมแบคทีเรียในดินตะกอนที่มีการเติมน้ำมันดิบมีการเปลี่ยนแปลงไปจากดินตะกอนที่ไม่เติมน้ำมันดิบ โดยแบคทีเรียในดินตะกอนดั้งเดิมที่เติมน้ำมันดิบจะมีจำนวนลดลง ในขณะที่แบคทีเรียในดินตะกอนที่ปนเปื้อนสารมลพิษและเติมน้ำมันดิบจะมีจำนวนเพิ่มขึ้น และมีแบคทีเรียใหม่บางชนิดเพิ่มขึ้นมา ซึ่งคาดว่าจะจะเป็นแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายน้ำมันดิบและสารที่เป็นองค์ประกอบในน้ำมันดิบได้ และยังพบการเปลี่ยนแปลงของชนิดแบคทีเรียในดินตะกอนที่มีการเติมน้ำมันดิบทั้งดินตะกอนดั้งเดิมและที่ปนเปื้อนสารมลพิษ ซึ่งพบว่า Proteobacteria มีจำนวนเพิ่มขึ้นและยังคงเป็นแบคทีเรียกลุ่มหลักอีกด้วย

รายงานวิจัยของ Zhou และคณะ (2009) ศึกษาการเปลี่ยนแปลงประชาคมแบคทีเรียในดินตะกอนป่าชายเลนที่ถูกทำให้ปนเปื้อนด้วยสารพิษของ PAHs 3 ชนิด ได้แก่ ฟิแนนทรีน ไพรีน และเบนโซ[เอ]ไพรีน โดยแบ่งดินตะกอนออกเป็น 3 ชุด ชุดละ 3 ซ้ำ ชุดแรก (C1-C3) เป็นชุดควบคุมที่ไม่มีการเติม PAHs ชุดที่ 2 (L1-L3) เป็นชุดที่มีการเติม PAHs ความเข้มข้นชนิดละ 20 มิลลิกรัม/กิโลกรัม และชุดที่ 3 (H1-H3) เป็นชุดที่มีการเติม PAHs ความเข้มข้นชนิดละ 400 มิลลิกรัม/กิโลกรัม พบว่าประชาคมแบคทีเรียลดจำนวนลงอย่างชัดเจนตามความเข้มข้นของ PAHs ที่สูงขึ้น และคงเหลือ

แต่แบคทีเรียบางชนิดในวันที่ 28 ของการทดลอง ซึ่งคาดว่าน่าจะเป็นแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายสารผสมของ PAHs ได้

จากที่กล่าวมาข้างต้น ดินตะกอนป่าชายเลนถือเป็นตัวอย่างสิ่งแวดล้อมที่น่าสนใจที่จะนำมาคัดแยกแบคทีเรียย่อยสลายสารพิษ (Sahoo และ Dhal, 2009) โดยเฉพาะอย่างยิ่ง PAHs เนื่องจากป่าชายเลนมีความหลากหลายและเอกลักษณ์ของจุลินทรีย์สูง อีกทั้งยังเป็นแหล่งสะสมของสารมลพิษที่เกิดจากกิจกรรมในชีวิตประจำวันของมนุษย์ งานวิจัยมากมายรายงานถึงแบคทีเรียที่ถูกคัดแยกจากดินตะกอนป่าชายเลนโดยอาศัยความสามารถในการย่อยสลาย PAHs ดังแสดงในตารางที่ 2.16 อย่างไรก็ตาม งานวิจัยที่คัดแยกแบคทีเรียย่อยสลาย PAHs จากดินตะกอนป่าชายเลนของประเทศไทยยังมีจำนวนน้อยอยู่ จึงคาดว่าน่าจะมีแบคทีเรียชนิดใหม่ที่มีความสามารถในการย่อยสลาย PAHs จากดินตะกอนป่าชายเลนของประเทศไทย

**ตารางที่ 2.16** ตัวอย่างแบคทีเรียย่อยสลาย PAHs ที่คัดแยกจากดินตะกอนป่าชายเลน

ดินตะกอนป่าชายเลน	PAHs	แบคทีเรียที่คัดแยกได้	อ้างอิง
จีน	พีแนทรีน 10 มก./ล.	<i>Sphingomonas</i> sp. PheB4	Zhong และคณะ, 2007
จีน	พีแนทรีน 50 มก./ล.	<i>Novosphingobium</i> sp. F2, <i>Stappia</i> sp. F4, <i>Roseobacter</i> sp. F16, <i>Marinobacterium</i> sp. F19	Tian และคณะ, 2008
	ฟลูออแรนทีน 50 มก./ล.	<i>Novosphingobium</i> sp. Y2, <i>Kordiimonas</i> sp. Y3, <i>Stappia</i> sp. Y4, <i>Marinobacterium</i> sp. Y24	
	ไพรีน 50 มก./ล.	<i>Kordiimonas</i> sp. B1, <i>Roseobacter</i> sp. B2, <i>Stappia</i> sp. B5, <i>Pseudoalteromonas</i> sp. B16, <i>Marinobacter</i> sp. B17	
	เบนโซ[เอ]ไพรีน 50 มก./ล.	<i>Vibrio</i> sp. P1, <i>Roseobacter</i> sp. P3, <i>Marinobacterium</i> sp. P7, <i>Thalassospira</i> sp. P9, <i>Pseudomonas</i> sp. P12	
ฮ่องกง	สารผสมของฟลูออรีนและพีแนทรีนชนิดละ 10 มก./ล.	<i>Sphingomonas</i> sp. HL1, HL2, HL3, HL4, HL5	Zhou และคณะ, 2008
	สารผสมของไพรีนและฟลูออแรนทีนชนิดละ 10 มก./ล.	<i>Mycobacterium</i> sp. HH1, HH2, HH3, <i>Terrabacter</i> sp. HH4, HH5, <i>Rhodococcus</i> sp. HH6	

ตารางที่ 2.16 ตัวอย่างแบคทีเรียย่อยสลาย PAHs ที่คัดแยกจากดินตะกอนป่าชายเลน (ต่อ)

ดินตะกอน ป่าชายเลน	PAHs	แบคทีเรียที่คัดแยกได้	อ้างอิง
ฮ่องกง	สารผสมของ PAHs ได้แก่ พี แนน ทรีน ไพรีน และฟลูออแรน ที่น ชนิดละ 10 มก./ล.	<i>Sphingomonas</i> sp. MWFG, SCSO, SKET, <i>Sphingopyxis</i> sp. KLHS, SKNG, SASS, <i>Sphingobium</i> sp. MPFG, MPSS, SAFY, SCFL, <i>Novosphingobium</i> sp. HCCW, SPNY, <i>Mycobacterium</i> sp. YOWG, SBSW, SKEW, SCSH, SKEY, <i>Rhodococcus</i> sp. SKOO, HCCS, <i>Paracoccus</i> sp. SPNT, <i>Pseudomonas</i> sp. SKDOP	Guo และคณะ, 2010

### บทที่ 3

#### วิธีดำเนินงานวิจัย

##### อุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย

1. กระจกฉีดยาพลาสติก (syringe) ขนาด 5 มิลลิลิตร บริษัท นิโปร จำกัด, Thailand
2. กระจกนาลอนเมมเบรน Biodyne<sup>®</sup> B ขนาดรูกรอง 0.45 ไมโครเมตร บริษัท Pall Corporation, USA
3. ขวดแก้วฝาเกลียว ขนาด 300 มิลลิลิตร สำหรับ microcosm
4. ขวดรูปชมพู่ (erlenmeyer flask) ขนาด 125, 250 และ 500 มิลลิลิตร บริษัท Pyrex, USA
5. เครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี (gas chromatography, GC) ประกอบด้วย
  - 5.1 เครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี รุ่น 6890N บริษัท Agilent Technologies, USA
  - 5.2 เครื่องตรวจวัด (detector) ชนิด flame ionization detector (FID) บริษัท Agilent Technologies, USA
  - 5.3 คอลัมน์ (column) ชนิด HP-5 บริษัท Agilent Technologies, USA
6. เครื่องเขย่าชนิดควบคุมอุณหภูมิ (incubator shaker) รุ่น G-27 บริษัท New Brunswick Scientific, USA
7. เครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (high performance liquid chromatography; HPLC) ประกอบด้วย
  - 7.1 เครื่องโครมาโทกราฟีของเหลว (liquid chromatography) รุ่น LC-A3 บริษัท Shimadzu, Japan
  - 7.2 เครื่องตรวจสอบ (UV-visible detector) รุ่น SPD-2A บริษัท Shimadzu, Japan
  - 7.3 เครื่องบันทึกและประมวลผล (chromatopac) รุ่น C-R1A บริษัท Shimadzu, Japan
  - 7.4 คอลัมน์ (column) ชนิด Senshu Pak Pegasil ODS บริษัท Senshu Scientific, Japan
  - 7.5 กระจกฉีดยาขนาดเล็ก (microsyringe) รุ่น MS-R50 บริษัท Exmire, USA
8. เครื่องเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส (mini agarose gel electrophoresis system) รุ่น i-mupid บริษัท Cosmo Bio, Japan
9. เครื่องชั่ง (weighing apparatus) รุ่น P2002-S และ AG285 บริษัท Mettler Toledo, Switzerland
10. เครื่องถ่ายเท DNA ชนิดสุญญากาศ รุ่น VacuGene XL Vacuum Blotting System บริษัท GE Healthcare, Sweden
11. เครื่องถ่ายและวิเคราะห์ภาพเจล (Gel documentation system) รุ่น Gel DOC 2909<sup>™</sup> บริษัท Bio-Rad, USA
12. เครื่องปั่นผสม (vortex mixer) รุ่น Gene 2 บริษัท Scientific Industries, USA
13. เครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดควบคุมอุณหภูมิ (centrifuge) รุ่น 1920 บริษัท Kubota, Japan



14. เครื่องปั่นเหวี่ยงแบบตั้งโต๊ะชนิดไมควบคุมอุณหภูมิ (bench-top microcentrifuge) รุ่น Mikro20 บริษัท Hettich zentrifugen, Germany
15. เครื่องปั่นเหวี่ยงแบบตั้งโต๊ะชนิดควบคุมอุณหภูมิ (bench-top microcentrifuge) บริษัท Hettich Lab Technology, Germany
16. เครื่องเพิ่มปริมาณ DNA (DNA-Thermal Cycle) รุ่น G-storm GS482 บริษัท Gene Technologies, England
17. เครื่อง MiniOpticon Real-Time PCR detector บริษัท Bio-Rad, USA
18. เครื่องไมโครเพลทรีดเดอร์ (microplate reader) บริษัท Bio-Tek Instruments, USA
19. เครื่องระเหยแห้งชนิดควบคุมอุณหภูมิ (digital dry bath) รุ่น D1100 บริษัท Labnet International, USA
20. เครื่องระเหยแห้งสูญญากาศแบบหมุน (rotary vacuum evaporator) ยี่ห้อ EYELA บริษัท Tokyo Rikakikai, Japan
21. เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) รุ่น UV-160A บริษัท Shimadzu, Japan
22. เครื่องวัดความเข้มข้น DNA (UV-vis spectrophotometer) รุ่น NanoDrop 2000 บริษัท Thermo Scientific, USA
23. เครื่องวัดความเข้มข้นและคุณภาพ RNA รุ่น 2100 Bioanalyzer บริษัท Agilent Technologies, USA
24. เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH meter) รุ่น 240 บริษัท Corning, USA
25. เครื่องวัดแรงตึงผิว (dynamic contact angle meter and tensiometer) รุ่น DCAT21 บริษัท Future Digital Scientific Corp, USA
26. เครื่องอัดเม็ด
27. จานเพาะเชื้อ (petri dish)
28. ชุดกรองสำเร็จรูปชนิดเซลลูโลสอะซิเตท (cellulose acetate; CA) ขนาดรูกรอง 0.2 ไมโครเมตร บริษัท Chrom Tech, USA
29. ชุดกรองสำเร็จรูปชนิดพอลิเตตระฟลูออโรเอทิลีน (polytetrafluoroethylene; PTFE) ขนาดรูกรอง 0.2 ไมโครเมตร บริษัท Chrom Tech, USA
30. ชุด CHEF-DR<sup>®</sup> III Variable Angle System บริษัท Bio-Rad, USA
31. ชุด DCode<sup>™</sup> System บริษัท Bio-Rad, USA
32. ตู้เขี่ยเชื้อ (ISSCO laminar flow) รุ่น HT-122.5 บริษัท International Scientific supplies, USA
33. ตู้แช่แข็งจุดเยือกแข็งต่ำ (deep freezer) รุ่น ULT1786 บริษัท Forma Scientific, USA (อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส) และ รุ่น MDF-U332 บริษัท Sanyo Electric, Japan (อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส)
34. ตู้บ่มเชื้อ (incubator) รุ่น BE800 บริษัท Memmert, Germany (อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส) และบริษัท New Brunswick Scientific, USA (อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส)
35. ตู้อบฆ่าเชื้อ (hot air oven) รุ่น D06063 บริษัท Memmert, Germany

36. ตู้อบแห้ง (oven) บริษัท Contherm Scientific, New Zealand
37. ไมโครปิเปตต์ (micropipette) และ ไมโครปิเปตต์ทิป (micropipette tip) ขนาด 2, 10, 20, 200, 1000 และ 5000 ไมโครลิตร บริษัท Gilson, France
38. ไมโครเพลท ชนิด 96 หลุม (96-well microplate) บริษัท Corning, USA
39. หม้อนึ่งความดันไอ (autoclave) บริษัท Kakusan, Japan
40. หลอดเก็บเชื้อแช่แข็ง (cryotube) ขนาด 1.5 มิลลิลิตร บริษัท Nalgene, USA
41. หลอดเซนตริฟิวจ์ (centrifuge tube) ขนาด 50 และ 250 มิลลิลิตร
42. หลอดทดลอง (test tube) ขนาด 20 มิลลิลิตร บริษัท Pyrex, USA
43. หลอดปฏิกิริยาลูโกโซพอลิเมอเรส (PCR tube) ขนาด 0.2 มิลลิลิตร
44. หลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ (microcentrifuge tube) ขนาด 1.5 และ 2 มิลลิลิตร

#### เคมีภัณฑ์ที่ใช้ในงานวิจัย

1. กรดบอริก ( $H_3BO_3$ ) บริษัท Kanto Chemical, Japan
2. กรดมาลิก (maleic acid) บริษัท Kanto Chemical, Japan
3. กรดมอร์ฟอลิโนพรเพนซัลโฟนิก (3-[N-morpholino] propanesulfonic acid; MOPS) บริษัท Kanto Chemical, Japan
4. กรดมอร์ฟอลิโนอีเทนซัลโฟนิก (2-[N-morpholino] ethanesulfonic acid; MES) บริษัท Sigma, USA
5. กรดอะซิติก ( $C_2H_4O_2$ ) บริษัท Merck, Germany
6. กรดไฮโดรคลอริก (HCl) บริษัท BDH Chemicals, Australia
7. กลีเซอรอล ( $C_3H_8O_3$ ) บริษัท Research organics, USA
8. กลูโคส ( $C_6H_{12}O_6$ ) บริษัท Merck, Germany
9. แคลเซียมคลอไรด์ ( $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ ) บริษัท Merck, Germany
10. คลอโรฟอร์ม (chloroform) บริษัท RCI Labscan, Thailand
11. ซูโครส ( $C_{12}H_{22}O_{11}$ ) บริษัท Merck, Germany
12. เซทิลไตรเมทิลแอมโมเนียมโบรไมด์ (CTAB) บริษัท Bio Basic, Canada
13. โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) บริษัท Merck, Germany
14. โซเดียมซัลเฟต ( $Na_2SO_4$ ) บริษัท Merck, Germany
15. โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต (SDS) บริษัท Nacalai Tesque, Japan
16. โซเดียมอะซิเตท ( $CH_3COONa \cdot 3H_2O$ ) บริษัท Kanto Chemical, Japan
17. โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) บริษัท Merck, Germany
18. ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ( $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ ) บริษัท Merck, Germany
19. ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ( $K_2HPO_4$ ) บริษัท Merck, Germany
20. ไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (dimethyl sulfoxide) บริษัท Merck, Germany
21. ไดเมทิลฟอร์มามาไมด์ (dimethylformamide) บริษัท BioBasic, Japan
22. ไดเอทิลไพโรคาร์บอเนต (diethylpyrocarbonate; DEPC) บริษัท Bio-Rad, USA

23. ไดเอทิลอีเธอร์ (diethylether) บริษัท Merck, Germany
24. เตตระเดเคน (tetradecane) บริษัท Fluka, Germany
25. เตตระเมทิลีนไดอะมีน (*N,N,N,N'*-tetramethylenediamine; TEMED) บริษัท Bio-Rad, USA
26. ไตรโซเดียมซีเตรท ( $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ ) บริษัท Kanto Chemical, Japan
27. ทริปโตเน (tryptone) บริษัท Difco, USA
28. ทริส[ไฮดรอกซีเมทิล]อะมิโนมีเทน (Tris) บริษัท Sigma, USA
29. ทรีฮาโลส ( $\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$ ) บริษัท Fluka, Germany
30. ทวิน 20 (tween20) บริษัท Kanto Chemical, Japan
31. แนฟทาลีน (naphthalene) บริษัท Kanto Chemical, Japan
32. นมผงขาดมันเนย (skim milk) บริษัท Merck, Germany
33. เบนโซ[เอ]ไพรีน (benzo[*a*]pyrene) บริษัท Kanto Chemical, Japan
34. แบคโตอะการ์ (bacto agar) บริษัท Difco, USA
35. ผงสกัดจากยีสต์ (yeast extract) บริษัท Difco, USA
36. โพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl) บริษัท Merck, Germany
37. โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) บริษัท Merck, Germany
38. โพแทสเซียมอะซิเตท ( $\text{CH}_3\text{COOK}$ ) บริษัท Merck, Germany
39. พอลิเปปโทน (polypeptone) บริษัท Difco, USA
40. ไพรีน (pyrene) บริษัท Sigma, USA
41. ฟีนแอนทรีน (phenanthrene) บริษัท Sigma, USA
42. ฟีนอล (phenol) บริษัท Merck, Germany
43. ฟลูออรีน (fluorene) บริษัท Kanto Chemical, Japan
44. ฟลูออแรนทีน (fluoranthene) บริษัท Kanto Chemical, Japan
45. เฟอริกคลอไรด์ ( $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ) บริษัท Merck, Germany
46. ฟอว์มาไมด์ (formamide) 40 เปอร์เซ็นต์ บริษัท Bio-Rad, USA
47. ฟอว์มัลดีไฮด์ (formaldehyde) บริษัท Kanto Chemical, Japan
48. เมทานอล (methanol) บริษัท Merck, Germany
49. เมอร์แคปโตเอทานอล (2-mercaptoethanol) บริษัท Nacalai Tesque, Japan
50. แมกนีเซียมคลอไรด์ ( $\text{MgCl}_2$ ) บริษัท Merck, Germany
51. แมกนีเซียมซัลเฟต ( $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) บริษัท Carlo Erba, France
52. แมงกานีสคลอไรด์ ( $\text{MnCl}_2$ ) บริษัท Merck, Germany
53. ยูเรีย ( $\text{CH}_4\text{N}_2\text{O}$ ) บริษัท Bio-Rad, USA
54. รูบิเดียมคลอไรด์ (RbCl) บริษัท Sigma, USA
55. ลอโรอิลซาโคซีน (*N*-lauroylsarcosine) บริษัท Nacalai Tesque, Japan
56. สารละลาย DNA มาตรฐาน 100 bp DNA ladder บริษัท Bio-Rad, USA
57. สารละลาย DNA มาตรฐาน Lambda HindIII บริษัท Bio-Rad, USA

58. อะกาโรส (agarose) บริษัท IUI, Japan
59. อะคริลามได์:บิส (acrylamide:bis) (37:1) 40 เปอร์เซนต์ บริษัท Bio-Rad, USA
60. อะซิโตน (acetone) บริษัท Merck, Germany
61. อะซีแนฟทีน (acenaphthene) บริษัท Wako, Japan
62. เอทานอล (ethanol) 99 เปอร์เซนต์ บริษัท Merck, Germany
63. เอทิลอะซิเตท (ethylacetate) บริษัท Merck, Germany
64. เอทิลีนไดเอมีนเตตระอะซิติกแอซิด (EDTA) บริษัท Sigma, USA
65. เอธิเดียมโบรไมด์ (ethidium bromide) บริษัท Promega, USA
66. เอนไซม์โปรตีนเนสเค (proteinase K) บริษัท United States Biological, USA
67. เอนไซม์ไลโซไซม์ (lysozyme) บริษัท Bio Basic, Canada
68. เอนไซม์อาร์เอ็นเอสเอ (RNase A) บริษัท Promega, USA
69. เอนไซม์ DNA พอลิเมอเรส (taq DNA polymerase) บริษัท New England Biolabs, USA
70. เอนไซม์ EcoRI และบัฟเฟอร์ H บริษัท Promega, USA
71. แอนทราซีน (anthracene) บริษัท Kanto Chemical, Japan
72. แอมพิซิลลิน (ampicillin) บริษัท Nacalai Tesque, Japan
73. แอมโมเนียมไนเตรต ( $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ) บริษัท Merck, Germany
74. แอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต (APS) บริษัท Bio-Rad, USA
75. ไอโซโพรพานอล (isopropanol) บริษัท Merck, Germany
76. ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ (isoamyl alcohol) บริษัท Merck, Germany
77. ไอโอดีนไดไนโตรเตตระโซเลียมคลอไรด์ (INT) บริษัท Sigma, USA
78. เฮกซะเดคาเคน (hexadecane) บริษัท Sigma, USA
79. เฮกเซน (hexane) บริษัท RCI Labscan, Thailand
80. Anti-Digoxigenin AP, Fab fragments บริษัท Roche, Germany
81. Blocking Reagent บริษัท Roche, Germany
82. Certified Low-Melt Agarose บริษัท Bio-Rad, USA
83. CHEF Bacterial Genomic DNA Plug Kit บริษัท Bio-Rad, USA
84. CHEF DNA Size Marker, *H. wingei* บริษัท Bio-Rad, USA
85. CHEF DNA Size Standard, Lambda Ladder บริษัท Bio-Rad, USA
86. CHEF DNA Size Standard, *S. cerevisiae* บริษัท Bio-Rad, USA
87. dNTP PCR Grade, Na-Salt (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) บริษัท Roche, Germany
88. DIG High Prime บริษัท Roche, Germany
89. DNA EASYTRAP™ Version 2 บริษัท Takara Bio, Japan
90. FastDNA® Spin Kit for Soil บริษัท MP Biomedicals, USA
91. FastRNA® Pro Soil-Direct Kit บริษัท MP Biomedicals, USA
92. Gel/PCR DNA Fragments Extraction Kit บริษัท Geneaid, Taiwan
93. GoTaq® qPCR Master Mix บริษัท Promega, USA

94. High-Speed Plasmid Mini Kit บริษัท Geneaid, Taiwan
95. IPTG (isopropyl thio- $\beta$ -D-galactoside) บริษัท Bio Basic, Canada
96. Luminaris Color HiGreen High ROX qPCR Master Mix บริษัท Thermo Scientific, USA
97. NBT/BCIP Stock Solution บริษัท Roche, Germany
98. NucleoSpin<sup>®</sup> RNA บริษัท Macherey-Nagel, Germany
99. NucleoSpin<sup>®</sup> RNA Clean-up บริษัท Macherey-Nagel, Germany
100. OneStep RT-PCR Kit บริษัท Qiagen, Germany
101. pGEM<sup>®</sup>-T Easy Vector System บริษัท Promega, USA
102. Pulsed Field Certified Agarose บริษัท Bio-Rad, USA
103. Random Primers บริษัท Invitrogen, Japan
104. RNA 6000 Nano Kit บริษัท Agilent Technologies, USA
105. RNAprotect<sup>™</sup> Bacteria Reagent บริษัท Qiagen, Germany
106. RNase Away บริษัท Thermo Fisher Scientific, USA
107. RNaseOUT<sup>™</sup> Ribonuclease Inhibitor บริษัท Invitrogen, Japan
108. RQ1 RNase-Free DNase บริษัท Promega, USA
109. SOA-OIL Kit บริษัท Kyoritsu Chemical-Check Lab Corp, Japan
110. SuperScript<sup>™</sup> II Reverse Transcriptase บริษัท Invitrogen, Japan
111. X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galactoside) บริษัท Bio Basic, Canada

### ตารางที่ 3.1 ไพรเมอร์ที่ใช้ในงานวิจัย

ไพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์ (5'-3')	ขนาด ผลิตภัณฑ์ PCR (bp)	อ้างอิง
ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rDNA			
27F	AGAGTTTGATCACTGGCTCAG		Lane, 1991
1492R	CGGCTTACCTTGTTACGACTT		
341F-GC clamp	CCTACGGGAGGCAGCAG-GC clamp		Muyzer และ คณะ, 1993
350F	TACGGGAGGCAGCAG		
520R	ACCGCGGCTGCTGGC		
800R	GAGTACCAGGGTATCTAATCC		
ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อเวกเตอร์			
M13F (-20)	GTAAACGACGCCAGT		Kim และคณะ, 2009
M13R (-20)	GCGGATAACAATTTACACAGG		

ตารางที่ 3.1 ไพรเมอร์ที่ใช้ในงานวิจัย (ต่อ)

ไพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์ (5'-3')	ขนาด ผลิตภัณฑ์ PCR (bp)	อ้างอิง
ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีนย่อยสลาย PAHs			
RHD <sub>α</sub> -GN-610F	GAGATGCATACCACGKGGTTGGA	306	Cébron และ คณะ, 2008
RHD <sub>α</sub> -GN-916R	AGCTGTTGTTCCGGGAAGAYWGTGCMGTT		
RHD <sub>α</sub> -GP-641F	CGGCGCCGACAAYTTYGTNGG	292	
RHD <sub>α</sub> -GP-933R	GGGGAACACGGTGCCRTGDATRAA		
pah-rhd <sub>α</sub> -396F	ATTGCGCTTAYCAYGGBTGG	320	Ding และคณะ, 2010
pah-rhd <sub>α</sub> -696R	ATAGGTGTCTCCAACRAARTT		
nidA-F	ATCTTCGGGCGCGCTGGGTGTTTCTCGG	508	Sho และคณะ, 2004
nidA-R	AATTGTGCGGCGCTGTCTCCAGTTCCG		
nidA-RTF	ATTGGAAGTGC GCGGTGT	175	งานวิจัยนี้
nidA-RTR	GGACACGAGTCGGAGTTGG		
nidB-F	TGGTCGAGGAGTTCGGTGTGATG	530	Brezna และ คณะ, 2003
nidB-R	GGTGGTGAACGGAGCTGGCCCTA		
phtAc-F	GAGGTATGTCAGGGCTACGC	201	งานวิจัยนี้
phtAc-R	GAAGGAACCTCCGTCTTGC		
phtAd-F	TCATCGTCGGCAGTTCTGTCTG	870	
phtAd-R	CGTTTGTCCAGTGTTCGATG		
bphA1f-F	TATTTGGGGACTTCTGCTG	424	Klankeo และ คณะ, 2009
bphA1f-R	TTGGGAGGATCGACGTATTC		
bphA3-F	GGTACCACCTAGATTGGAATTGCCAG	370	งานวิจัยนี้
bphA3-R	GGATCCGAGCATTAGGCGCTCTCTT		
bphA4-F	GCCAGCATCGTATTGTCCG	407	งานวิจัยนี้
bphA4-R	CCTGGTCCGCCGTTTTGGTAGG		
bphC-F	CACGAACCTTCCGTACATGG	250	Ratanasuwana ri และคณะ, 2009
bphC-R	CTCCGACGATCTTGCTATC		
ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีนผลิตสารลดแรงตึงผิวกลุ่มลิพอเปปไทด์			
As-1F	CGCGGMTACCGVATYGAGC	419, 422,	Tapi และคณะ, 2010
Ts-2R	ATBCCTTTBTWDGAATGTCCGCC	425, 431	
Am-1F	CAKCARGTSAAAATYCGMGG	416, 419	
Tm-1R	CCDASATCAAARAADTTATC		
Af-2F	GAATAYMTCGGMCGTMTKGA	443, 452	
Tf-1R	GCTTTWADKGAATSBCCGCC		

ตารางที่ 3.1 ไพรเมอร์ที่ใช้ในงานวิจัย (ต่อ)

ไพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์ (5'-3')	ขนาด ผลิตภัณฑ์ PCR (bp)	อ้างอิง
ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีนผลิตสารลดแรงตึงผิวกลุ่มลิพอเปปไทด์ (ต่อ)			
Ap-1F	AGMCAGCKSGCMASATCMCC	893, 959,	Tapi และคณะ,
Tp-1R	GCKATWWTGAARRCCGGCGG	929	2010
ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีนย่อยสลายอะลิฟาติก			
Alk-1F	CATAATAAAGGGCATCACCGT	185	Kohno และ
Alk-1R	GATTTCAATCTCGAACTCCAAAC	( <i>alkB</i> )	คณะ, 2002
Alk-2F	GAGACAAATCGTCTAAAACGTAA	271	
Alk-2R	TTGTTATTATTCCAACATGCTC	( <i>alkM</i> )	
Alk-3F	TCGAGCACATCCGCGGCCACCA	330	
Alk-3R	CCGTAGTGCTCGACGTAGTT	( <i>alkB1</i> )	
AlkB-1f	AAYACNGCNCAYGARCTNGGNCAYAA	550	Kloos และ
AlkB-1r	GCRTGRTGRTCNGARTGNCGYTG	( <i>alkB</i> )	คณะ, 2006
AlkB1-F	ATCTGGGCGCGTTGGGATTTGAGCG	629	Whyte และ
AlkB1-R	CGCATGGTGATCGCTGTGCCGCTGC	( <i>alkB1</i> )	คณะ, 2002
AlkB2-F	ACTCTGGCGCAGTCGTTTTACGGCC	552	
AlkB2-R	CCCCTGGGCGAGTTGGGCGCACCG	( <i>alkB2</i> )	
AlmAwf	GGNGGNACNTGGGAYCTNTT	1,131	Liu และคณะ,
AlmAwr	ATRTCNGCYTTNAGNGTCC	( <i>almA</i> )	2011b
CYP153-F1	ATGTTYATYGCNATGGAYCCN	820	Wang และ
CYP153-R2	GCGRTTVCCATRCARCGR TG	(CYP153)	คณะ, 2011
P450F	TGTCGGTTGAAATGTTTCATYGCNMTGGAYCC	800	Wang และ
P450R	TGCAGTTCGGCAAGGCGTTDCCSRYCAVCKRTG	(CYP153)	คณะ, 2010a
P450fw1	GTSGGCGGCAACGACACSAC	multiple	Beilen และ
P450rv3	GCASC GG TGGATGCCGAAGCCRAA	(CYP153)	คณะ, 2006

## วิธีการดำเนินงานวิจัย

### 3.1 คัดแยกและจำแนกแบคทีเรียย่อยสลาย PAHs

#### 3.1.1 เก็บตัวอย่างดินตะกอนป่าชายเลน

เก็บตัวอย่างดินตะกอนป่าชายเลนจากแหล่งที่อุดมสมบูรณ์บริเวณศูนย์อนุรักษ์และศึกษาระบบนิเวศป่าชายเลน จังหวัดเพชรบุรี และแหล่งที่ปนเปื้อนด้วยปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนอันเนื่องมาจากการขนส่ง การท่องเที่ยว และการประมง จังหวัดกรุงเทพมหานครและสมุทรสงคราม โดย

เก็บบริเวณผิวดินลึกลงไปประมาณ 1-5 เซนติเมตร บรรจุในภาชนะที่สะอาด ปิดฝาให้มิดชิด และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จนกว่าจะทำการทดลอง

### 3.1.2 เพิ่มจำนวนและคัดแยกแบคทีเรียย่อยสลาย PAHs

เพิ่มจำนวนแบคทีเรียย่อยสลาย PAHs (ดัดแปลงจาก Guo และคณะ, 2005) โดยนำตัวอย่างดินตะกอนป่าชายเลน 5 กรัม แขนวลอยในอาหารเหลวปราศจากแหล่งคาร์บอน (carbon-free mineral medium; CFMM) (ภาคผนวก ก) ปริมาตร 45 มิลลิลิตร เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบ/นาที่ อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นดูดส่วนน้ำใส 5 มิลลิลิตร ใส่ในขวดรูปชมพู่ที่บรรจุอาหารเหลว CFMM ปริมาตร 45 มิลลิลิตร และเติม PAH ในรูปสารละลายในไตรเมทิลฟออร์มาไมด์ (ภาคผนวก ข) ได้แก่ อะซีแนพทีน พีแนนทริน ฟลูออแรนทีน หรือไพรีน ให้มีความเข้มข้นสุดท้าย 100 มิลลิกรัม/ลิตร บ่มในเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบ/นาที่ ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เมื่อครบเวลา 7 วัน จึงถ่ายอาหารเหลวที่มีความขุ่นหรือมีการเปลี่ยนสีของอาหารเหลวเมื่อเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่ได้เติมส่วนน้ำใส 5 มิลลิลิตร ลงในอาหารเหลว CFMM ขวดใหม่ ที่มี PAH ชนิดเดียวกันกับขวดเดิม ทำซ้ำเป็นจำนวน 3-4 ครั้ง จากนั้นคัดแยกแบคทีเรียย่อยสลาย PAH โดยถ่ายเชื้อจากขวดอาหารเหลว CFMM ที่เปลี่ยนสี 0.1 มิลลิลิตร เกลี่ยลงบนอาหารแข็ง CFMM แล้วพันทับด้วย 2 เปอร์เซ็นต์ PAH ที่ละลายในไดเอทิลอีเทอร์ (ภาคผนวก ข) ชนิดเดียวกันกับที่ใช้ในการเพิ่มจำนวน บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส จนกว่าจะพบการเจริญของโคโลนีที่มีโซนใสล้อมรอบ

ตรวจสอบความบริสุทธิ์ของแบคทีเรียโดยการเขี่ยโคโลนีที่สร้างโซนใสมาเลี้ยงบนอาหารแข็ง Luria-Bertani (LB) (ภาคผนวก ก) จนกระทั่งได้แบคทีเรียสายพันธุ์บริสุทธิ์ โดยศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของโคโลนีที่เจริญบนอาหารแข็ง LB การติดสีแกรม และรูปร่างของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ จากนั้นยืนยันการย่อยสลาย PAHs เบื้องต้นของแบคทีเรียสายพันธุ์บริสุทธิ์ที่คัดแยกได้ในอาหารเหลว CFMM ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ที่มี PAH ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัม/ลิตร เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบ/นาที่ อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส สังเกตการเปลี่ยนแปลงจากความขุ่นที่เพิ่มขึ้นหรือสีที่เปลี่ยนไปของอาหารเหลวเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่ได้เติมแบคทีเรีย

นอกจากนี้ การคัดแยกแบคทีเรียย่อยสลาย PAHs จากระบบนิเวศจำลองดินปนเปื้อนสารผสมของอะซีแนพทีน พีแนนทริน และไพรีน ความเข้มข้นชนิดละ 30 มิลลิกรัม/กิโลกรัม จะคัดแยกจากตัวอย่างดินของสัปดาห์ที่ 0, 2, 4, 6 และ 8 โดยเพิ่มจำนวนแบคทีเรียย่อยสลาย PAHs ในอาหารเหลว CFMM ที่มีอะซีแนพทีน พีแนนทริน หรือไพรีน ความเข้มข้นสุดท้าย 100 มิลลิกรัม/ลิตร แล้วคัดแยกตามวิธีที่ระบุไว้ข้างต้นในข้อ 3.1.2

### 3.1.3 จำแนกชนิดของแบคทีเรียย่อยสลาย PAH สายพันธุ์บริสุทธิ์

#### 3.1.3.1 สกัด DNA ของแบคทีเรีย

สกัด DNA ของแบคทีเรียตามวิธีของ Ausubel และคณะ (1999) โดยนำเซลล์แบคทีเรีย 1.5 มิลลิลิตร ลงในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ ปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกเซลล์ด้วยความเร็ว 10,000 รอบ/นาที่ ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที เทอาหารเลี้ยงเชื้อทิ้ง กระจายตะกอนเซลล์ในสารละลาย Tris-EDTA (TE) (ภาคผนวก ข) 517 ไมโครลิตร ให้เป็นเนื้อเดียวกัน เติมสารละลายไลโซโซมเข้มข้น 60 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร (ภาคผนวก ข) 50 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยการกลับลดไปมา บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เติมสารละลายโซเดียมโดเดซิลซัลเฟตเข้มข้น 10



เปอร์เซ็นต์ (ภาคผนวก ข) 30 ไมโครลิตร และสารละลายโปรตีนเนสเคเข้มข้น 10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร (ภาคผนวก ข) 10 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยการกับลดไปมา บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เติมสารละลายโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 5 โมลาร์ (ภาคผนวก ข) 120 ไมโครลิตร และสารละลายเซทิลไตรเมทิลแอมโมเนียมโบรไมด์ในโซเดียมคลอไรด์ (CTAB/NaCl) (ภาคผนวก ข) ที่มีอุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส 220 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยการกับลดไปมา บ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เติมคลอโรฟอร์ม/ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ (ภาคผนวก ข) 550 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยการกับลดไปมาประมาณ 5 นาที ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 นาที ย้ายสารละลายชั้นบนลงในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์อันใหม่ แล้วเติมฟีนอล/คลอโรฟอร์ม (ภาคผนวก ข) ในปริมาณที่เท่ากับปริมาณของสารละลายสุดท้าย ผสมให้เข้ากันโดยการกับลดไปมาประมาณ 5 นาที ปั่นเหวี่ยงด้วยสถานะเดิมแล้วย้ายสารละลายชั้นบนลงในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์อันใหม่ เติมไอโซโพรพานอล 0.6 เท่าของปริมาตรสุดท้าย กับลดไปมาให้สารละลายเข้ากันจนปรากฏสาย DNA สีขาว ปั่นเหวี่ยงด้วยสถานะเดิมและเทส่วนใสทิ้ง ล้างตะกอนด้วยเอทานอล 70 เปอร์เซ็นต์ (ภาคผนวก ข) 450 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงด้วยสถานะเดิมและเทส่วนใสทิ้ง ระบายเอทานอลจนแห้ง แล้วละลายตะกอน DNA ด้วยสารละลาย TE 100 ไมโครลิตร เติมอาร์เอ็นเอสเอเข้มข้น 10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร 0.2 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

### 3.1.3.2 ตรวจสอบคุณภาพและความเข้มข้นของสารละลาย DNA

ตรวจสอบคุณภาพของสารละลาย DNA ด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส (agarose gel electrophoresis) โดยเตรียมอะกาโรสเจลเข้มข้น 0.9 เปอร์เซ็นต์ ที่หลอมในบัฟเฟอร์ Tris-acetate-EDTA ความเข้มข้น 1 เท่า (1X TAE) (ภาคผนวก ข) เทลงในแม่พิมพ์ที่มีหัวเสียอยู่ ทิ้งให้อะกาโรสแข็งตัวที่อุณหภูมิห้องประมาณ 30-40 นาที วางชิ้นอะกาโรสเจลที่ได้ลงในแชมเบอร์ที่มีบัฟเฟอร์ 1X TAE หยอดสารละลาย DNA 3 ไมโครลิตร ที่ผสมกับสตีดีตาม 1 ไมโครลิตร ลงในช่องวิ่ง โดยให้ช่องวิ่งที่ 1 เป็นสารละลาย DNA มาตรฐาน Lambda HindIII ที่ผสมกับสตีดีตามแล้ว 3 ไมโครลิตร ทำอิเล็กโทรโฟรีซิสที่ความต่างศักย์ 100 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที แล้วนำอะกาโรสเจลมาย้อมด้วยสารละลายเอธิเดียมโบรไมด์ (ภาคผนวก ข) เป็นเวลา 5 นาที ล้างอะกาโรสเจลด้วยน้ำกลั่นเป็นเวลา 5 นาที ตรวจสอบและถ่ายภาพแถบ DNA ด้วยเครื่องถ่ายภาพและวิเคราะห์ภาพเจล ภายใต้แสงอัลตราไวโอเลตความยาวคลื่น 312 นาโนเมตร

ตรวจสอบความเข้มข้นและความบริสุทธิ์ของสารละลาย DNA ด้วยเครื่องวัดความเข้มข้น Nanodrop ตามวิธีที่ระบุในคู่มือ (factor 50) โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร ( $A_{260}$  และ  $A_{280}$ )

### 3.1.3.3 เพิ่มจำนวน DNA บริเวณ 16S rDNA

เพิ่มจำนวน DNA บริเวณ 16S rDNA ด้วยวิธี PCR ในหลอดปฏิกิริยาถูกโซฟอลิเมอร์เรส โดยใช้ไพรเมอร์ 27F และ 1492R (ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์แสดงในตารางที่ 3.1) เกิดผลิตภัณฑ์ PCR ขนาด 1,456 bp องค์ประกอบของสารต่างๆในปฏิกิริยาแสดงในตารางที่ 3.2 ดำเนินปฏิกิริยาด้วยเครื่องเพิ่มปริมาณ DNA ตามสภาวะดังนี้

1. initial denaturation อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส 5 นาที

2. denaturation อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส 1 นาที
3. annealing อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส 1.30 นาที
4. extension อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส 2 นาที
5. ทำขั้นตอนที่ 2-4 จำนวน 30 รอบ
6. final extension อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส 7 นาที

ตรวจสอบผลิตภัณฑ์ PCR ที่เกิดขึ้นด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสในบัฟเฟอร์ 1X TAE โดยใช้อะกาโรสเจล เข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ และผลิตภัณฑ์ PCR 5 ไมโครลิตร ที่ผสมกับสตีดีตาม 1 ไมโครลิตร เปรียบเทียบกับสารละลาย DNA มาตรฐาน 100 bp DNA ladder ตามวิธีที่ระบุไว้ในข้อ 3.1.3.2

**ตารางที่ 3.2** องค์ประกอบของสารในปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (ปริมาตรสุดท้าย 30 ไมโครลิตร)

สาร	ปริมาตร (ไมโครลิตร)	ความเข้มข้นสุดท้ายของสาร
น้ำปลอดประจุปราศจากเชื้อ	24.8	
10 เท่า บัฟเฟอร์ (thermo buffer)	3	1 เท่า
10 มิลลิโมลาร์ dNTP	0.6	0.2 มิลลิโมลาร์
20 ไมโครโมลาร์ ไพร์เมอร์	0.15 (ชนิดละ)	0.1 ไมโครโมลาร์ (ชนิดละ)
DNA แม่แบบ	1	100 นาโนกรัม
เอนไซม์ taq DNA polymerase	0.3	2.5 หน่วย

#### 3.1.3.4 ทำบริสุทธิ์ผลิตภัณฑ์ PCR

ตัดแถบผลิตภัณฑ์ PCR ตามขนาดที่ต้องการจากอะกาโรสเจลมาใส่ในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ ซึ่งน้ำหนักขึ้นอะกาโรสเจล แล้วทำบริสุทธิ์ผลิตภัณฑ์ PCR ด้วย Gel/PCR DNA Fragments Extraction Kit ตามวิธีที่ระบุในคู่มือ โดยเติม DF buffer 500 ไมโครลิตร ลงในชิ้นอะกาโรสเจลขนาด 300 มิลลิกรัม ปั่นผสมเล็กน้อย ละลายชิ้นอะกาโรสเจลอย่างสมบูรณ์ที่อุณหภูมิ 55-60 องศาเซลเซียส ประมาณ 10-15 นาที พร้อมทั้งกลับหลอดไปมาทุกๆ 2-3 นาที จากนั้นตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องจนสารละลายผสมเย็น ดูดสารละลายผสม 800 ไมโครลิตร ลงในคอลัมน์ DF ที่มี collection tube ขนาด 2 มิลลิลิตร ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 30 วินาที เทส่วนน้ำใส่ทิ้ง เติม W1 buffer 400 ไมโครลิตร ลงในคอลัมน์ ปั่นเหวี่ยงด้วยสภาวะเดิมและเทส่วนใส่ทิ้ง เติม wash buffer (ที่เติมเอทานอลแล้ว) 600 ไมโครลิตร ลงในคอลัมน์ ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 นาที ปั่นเหวี่ยงด้วยสภาวะเดิมและเทส่วนใส่ทิ้ง ล้างด้วย wash buffer ซ้ำอีกครั้ง ระบายเอทานอลออกจากคอลัมน์โดยปั่นเหวี่ยงอีกครั้งด้วยความเร็ว 13,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 3 นาที ย้ายคอลัมน์ไปยังหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์อันใหม่ หยด elution buffer 30 ไมโครลิตร ลงตรงกลางคอลัมน์ ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลาอย่างน้อย 2 นาที ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 2 นาที จะได้สารละลายบริสุทธิ์ของผลิตภัณฑ์ PCR เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

### 3.1.3.5 โคลนผลิตภัณฑ์ PCR

ไลเกตผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้จากข้อ 3.1.3.4 เข้ากับพลาสมิดเวกเตอร์ pGEM®-T Easy ด้วย pGEM®-T Easy Vector Systems ตามวิธีที่ระบุในคู่มือ โดยผสมสารต่างๆดังนี้ บัฟเฟอร์ 2X rapid ligation 5 ไมโครลิตร พลาสมิดเวกเตอร์ pGEM®-T easy (50 นาโนกรัม) 1 ไมโครลิตร เอนไซม์ T4 DNA ligase (3 หน่วย/ไมโครลิตร) 1 ไมโครลิตร ผลิตภัณฑ์ PCR ปริมาณ 150 นาโนกรัม และปรับปริมาตรเป็น 10 ไมโครลิตร ด้วยน้ำปลอดประจุปราศจากเชื้อ ผสมให้เข้ากันด้วยการปิเปตต์ บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หรืออุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง จะได้รีคอมบิแนนท์พลาสมิด (recombinant plasmid) ที่มีผลิตภัณฑ์ PCR สอดแทรกอยู่

เตรียมเซลล์คอมพีเทนต์ (competent) ของ *Escherichia coli* JM109 ตามวิธีของ Sambrook และ Russell (2001) โดยเลี้ยง *E. coli* JM109 บนอาหารแข็ง  $\Psi$ b (ภาคผนวก ก) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง เชื้อโคโลนีเดี่ยวลงในอาหารเหลว  $\Psi$ b ปริมาตร 5 มิลลิลิตร เขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง หรือจนกระทั่งมีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ( $OD_{600}$ ) เท่ากับ 0.3-0.5 เพื่อใช้เป็นหัวเชื้อ จากนั้นถ่ายหัวเชื้อ 5 มิลลิลิตร ไปยังอาหารเหลว  $\Psi$ b ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ที่บรรจุในขวดรูปชมพู่ชนิด arm flask เขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จนกระทั่งมีค่า  $OD_{600}$  เท่ากับ 0.5 แล้วย้ายเชื้อลงไปในหลอดเซนตริฟิวจ์ปราศจากเชื้อ แช่ในน้ำแข็งเป็นเวลา 5 นาที (ทำที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ตั้งแต่ขั้นตอนนี้) ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 3,000 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที เทอาหารเลี้ยงเชื้อทิ้ง เติมสารละลาย TfbI (ภาคผนวก ข) ที่เย็น 40 มิลลิลิตร กระจายตะกอนเซลล์ให้เข้ากัน (ห้ามใช้เครื่องปั่นผสม) แช่ในน้ำแข็งเป็นเวลา 5 นาที ปั่นเหวี่ยงด้วยสภาวะเดิมและเติมสารละลาย TfbI ที่เติมสารละลาย TfbII (ภาคผนวก ข) ที่เย็น 4 มิลลิลิตร กระจายตะกอนเซลล์ให้เข้ากัน (ห้ามใช้เครื่องปั่นผสม) แช่ในน้ำแข็งเป็นเวลาอย่างน้อย 15 นาที แบ่งใส่หลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ปราศจากเชื้อหลอดละ 100 ไมโครลิตร แช่แข็งในไนโตรเจนเหลวทันที เก็บเซลล์คอมพีเทนต์ไว้ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส

ทรานสฟอร์มรีคอมบิแนนท์พลาสมิดเข้าสู่เซลล์คอมพีเทนต์ *E. coli* JM109 ด้วยวิธี heat shock (Sambrook และ Russell, 2001) โดยละลายเซลล์คอมพีเทนต์อย่างช้าๆในอ่างน้ำแข็ง จากนั้นเติมรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่ไลเกตไว้ 3 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน แช่ในน้ำแข็งเป็นเวลา 20 นาที บ่มที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45-50 วินาที แล้วแช่ในน้ำแข็งทันทีเป็นเวลา 2 นาที เติมน้ำอาหารเหลว SOC (ภาคผนวก ก) 1,000 ไมโครลิตร เขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลาอย่างน้อย 90 นาที จะได้สารแขวนลอยของเซลล์คอมพีเทนต์ที่ทรานสฟอร์มรีคอมบิแนนท์พลาสมิด

คัดเลือกทรานสฟอร์มแมนท์ (transformant) ที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่ต้องการด้วยวิธี Blue/White selection (Sambrook และ Russell, 2001) โดยปั่นเหวี่ยงสารแขวนลอยของเซลล์คอมพีเทนต์ที่ทรานสฟอร์มรีคอมบิแนนท์พลาสมิดแล้วด้วยความเร็ว 4,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 4 นาที ดูดอาหารเลี้ยงเชื้อทิ้งให้เหลือปริมาตรสุดท้ายในหลอดประมาณ 100 ไมโครลิตร กระจายตะกอนเซลล์ในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ แล้วนำมาเกลี่ยลงบนอาหารแข็ง LB ที่ผสม 0.1 มิลลิลิตร ของสารละลายแอมพิซิลิน (ภาคผนวก ข) ความเข้มข้นสุดท้าย 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร 0.1 มิลลิลิตร ของสารละลาย X-gal (ภาคผนวก ข) ความเข้มข้นสุดท้าย 80 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และ

0.1 มิลลิลิตร ของสารละลาย IPTG (ภาคผนวก ข) ความเข้มข้นสุดท้าย 0.5 มิลลิโมลาร์ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-24 ชั่วโมง คัดเลือกโคโลนีสีขาวซึ่งเป็นโคโลนีที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิด

### 3.1.3.6 สกัดรีคอมบิแนนท์พลาสมิด

เลี้ยงเซลล์คอมพีเทนต์ที่ได้จากการโคลนผลิตภัณฑ์ PCR ในข้อ 3.1.3.5 ในอาหารเหลว LB ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ที่ผสมสารละลายแอมพิซิลิน ความเข้มข้นสุดท้าย 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12-14 ชั่วโมง จากนั้นนำมาสกัดรีคอมบิแนนท์พลาสมิดด้วย High-Speed Plasmid Mini Kit ตามวิธีที่ระบุในคู่มือ โดยนำเซลล์แบคทีเรีย 1.5 มิลลิลิตร ลงในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ ปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกเซลล์ด้วยความเร็ว 13,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 1 นาที เเทอาหารเลี้ยงเชื้อทิ้ง เติม PD1 buffer (ที่เติมอาร์เอ็นเอสเอแล้ว) 200 ไมโครลิตร ปั่นผสมเพื่อกระจายตะกอนเซลล์ เติม PD2 buffer 200 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยการกลับหลอดไปมา บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลาอย่างน้อย 2 นาที (ห้ามเกิน 5 นาที) เติม PD3 buffer 300 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยการกลับหลอดไปมา ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 3 นาที ดูดสารละลายส่วนใส ลงในคอลัมน์ PD ที่มี collection tube ขนาด 2 มิลลิลิตร ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 30 วินาที เทส่วนน้ำใสทิ้ง เติม W1 buffer 400 ไมโครลิตรลงในคอลัมน์ ปั่นเหวี่ยงด้วยสภาวะเดิมและเทส่วนน้ำใสทิ้ง เติม wash buffer (ที่เติมเอทานอลแล้ว) 600 ไมโครลิตรลงในคอลัมน์ ปั่นเหวี่ยงด้วยสภาวะเดิมและเทส่วนน้ำใสทิ้ง ล้างด้วย wash buffer ซ้ำอีกครั้ง ระบายเอทานอลออกจากคอลัมน์โดยปั่นเหวี่ยงอีกครั้งด้วยความเร็ว 13,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 3 นาที ย้ายคอลัมน์ไปยังหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์อันใหม่ หยด elution buffer 50 ไมโครลิตร ลงตรงกลางคอลัมน์ ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลาอย่างน้อย 2 นาที ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 2 นาที จะได้สารละลายบริสุทธิ์ของรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่คาดว่าผลิตภัณฑ์ PCR อยู่ เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

### 3.1.3.7 ตรวจสอบผลิตภัณฑ์ PCR ในรีคอมบิแนนท์พลาสมิด

ชิ้น DNA สอดแทรกภายในรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pGEM<sup>®</sup>-T Easy สามารถตรวจสอบด้วยการตัดรีคอมบิแนนท์พลาสมิดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 1 ชนิด (single-enzyme digestion) ได้แก่ EcoRI, BstZI และ NotI ในงานวิจัยนี้เลือกใช้เอนไซม์ EcoRI โดยมีองค์ประกอบของปฏิกิริยา ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ (ผสมสารทั้งหมดให้เข้ากันก่อนเติมเอนไซม์) ดังนี้

น้ำปลอดประจุปราศจากเชื้อ	7.5 ไมโครลิตร
10 เท่า บัฟเฟอร์ (restriction enzyme buffer)	1.0 ไมโครลิตร
รีคอมบิแนนท์พลาสมิด pGEM <sup>®</sup> -T Easy (1 ไมโครกรัม/ไมโครลิตร)	1.0 ไมโครลิตร
เอนไซม์ EcoRI (10 หน่วย/ไมโครลิตร)	0.5 ไมโครลิตร

ผสมเบาๆให้เข้ากันอีกครั้ง ปั่นเหวี่ยงเพื่อให้สารผสมมารวมกันที่ก้นหลอด บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1-4 ชั่วโมง (ข้อควรระวัง การบ่มข้ามคืนอาจทำให้เกิดการย่อยสลายของ DNA) จากนั้นนำสารผสมหลังเกิดปฏิกิริยามาตรวจสอบชิ้น DNA สอดแทรกด้วยวิธีอะกาโรส เจลอิเล็กโทรโฟรีซิสในบัฟเฟอร์ 1X TAE โดยใช้อะกาโรสเจลเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ และสารผสมหลังเกิดปฏิกิริยากับสีติดตามอัตราส่วน 5:1 เปรียบเทียบกับสารละลาย DNA มาตรฐาน 100 bp DNA

ladder ตามวิธีที่ระบุไว้ในข้อ 3.1.3.2 รีคอมบิแนนท์พลาสมิด pGEM<sup>®</sup>-T Easy ที่มีชั้น DNA สอดแทรกขนาดเท่ากับผลิตภัณฑ์ PCR จะถูกส่งไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

### 3.1.3.8 วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rDNA

ส่งวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของชั้น DNA สอดแทรกในรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pGEM<sup>®</sup>-T Easy ที่ First BASE Laboratories Sdn Bhd ประเทศมาเลเซีย ผ่านทางบริษัท Ward Medic Ltd., Part ด้วยระบบ Li-Cor<sup>®</sup> NEN 4200 Global IR2 และเครื่อง ABI<sup>®</sup> Prism DNA Sequencers ในการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยใช้ไพรเมอร์ M13F และ M13R ซึ่งจำเพาะกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของพลาสมิดเวกเตอร์ และไพรเมอร์ 350F และ 800R ซึ่งจำเพาะกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rDNA ของแบคทีเรีย (ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์แสดงในตารางที่ 3.1)

เมื่อได้ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของชั้น DNA สอดแทรก นำไปเชื่อมลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยโปรแกรม DNASIS-Mac software เวอร์ชัน 2.05 (Hitachi Software Engineering Co., Ltd) แล้วเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์กับข้อมูลที่มีในฐานข้อมูล GenBank โดยใช้โปรแกรม BLASTn (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) เพื่อระบุชนิดของแบคทีเรีย

### 3.1.4 เก็บเชื้อแบคทีเรียย่อยสลาย PAH สายพันธุ์บริสุทธิ์

เลี้ยงแบคทีเรียสายพันธุ์บริสุทธิ์ในอาหารเหลว 0.25 เท่า Luria-Bertani (0.25X LB) (ภาคผนวก ก) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และในอาหารเหลว CFMM ที่มี PAH เป็นแหล่งคาร์บอนเพียงแหล่งเดียว จนกว่าจะเริ่มเห็นการเปลี่ยนแปลงสีของอาหารเหลว ในสภาวะอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบ/นาที ถ่ายเชื้อที่เจริญแล้วลงในหลอดเก็บเชื้อแช่แข็ง ผสมกับกลีเซอรอลในอัตราส่วน 1:1 ทำอย่างน้อย 3-5 ซ้ำ เก็บรักษาที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส

## 3.2 ศึกษาสถานะการเจริญของแบคทีเรียที่คัดแยกได้

### 3.2.1 เตรียมหัวเชื้อแบคทีเรีย

เลี้ยงแบคทีเรียสายพันธุ์บริสุทธิ์ในขวดรูปชมพู่ที่บรรจุอาหารเหลว 0.1 เท่า Luria-Bertani (0.1X LB) (ภาคผนวก ก) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง ย้ายเชื้อลงไปในหลอดเซนตริฟิวจ์ปราศจากเชื้อ ปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกเซลล์ด้วยความเร็ว 8,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 5 นาที เทอาหารเลี้ยงเชื้อทิ้ง ล้างตะกอนเซลล์ด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.85 เปอร์เซ็นต์ จำนวน 2 ครั้ง แขนวลอยเซลล์ในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.85 เปอร์เซ็นต์ ให้มีค่า OD<sub>600</sub> ประมาณ 0.4-0.5 เพื่อใช้เป็นหัวเชื้อแบคทีเรีย

### 3.2.2 ตรวจนับจำนวนแบคทีเรียด้วยวิธี MPN

ตรวจสอบการเจริญของแบคทีเรียด้วยวิธี MPN (ดัดแปลงจาก Alonso-Gutiérrez และคณะ, 2009) ในไมโครเพลทชนิด 96 หลุม โดยเติมอาหารเหลว LB ลงในไมโครเพลทหลุมละ 180 ไมโครลิตร เติมตัวอย่างที่ต้องการตรวจสอบ (ในกรณีนี้คือหัวเชื้อแบคทีเรียที่ได้จากข้อ 3.2.1) หลุมละ 20 ไมโครลิตร แล้วเจือจางตัวอย่างที่ต้องการตรวจสอบอย่างเป็นลำดับ ทำการทดลอง 3 ซ้ำ บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน วัดค่า OD<sub>540</sub> ด้วยเครื่องไมโครเพลทรีดเดอร์ คำนวณจำนวนแบคทีเรียเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่ได้เติมตัวอย่างที่ต้องการตรวจสอบจากตาราง MPN ชนิด 3 หลอด (Sutton, 2010)

### 3.2.3 ทดสอบการเจริญของแบคทีเรียในสภาวะต่างๆด้วยวิธี MPN

ทดสอบการเจริญของแบคทีเรียทุกสายพันธุ์ที่คัดแยกได้ในสภาวะแปรผันอุณหภูมิ โดยทำการทดลองตามวิธีที่ระบุไว้ในข้อ 3.2.2 แต่แยกบ่มที่อุณหภูมิ 25, 30 และ 37 องศาเซลเซียส

ทดสอบการเจริญของแบคทีเรียทุกสายพันธุ์ที่คัดแยกได้ในสภาวะแปรผันความเป็นกรด-ด่าง โดยทำการทดลองตามวิธีที่ระบุไว้ในข้อ 3.2.2 แต่แปรผันความเป็นกรด-ด่างของอาหารเหลว LB ให้มีค่าเท่ากับ 4.0, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0 และ 9.0

ทดสอบการเจริญของแบคทีเรียทุกสายพันธุ์ที่คัดแยกได้ในสภาวะแปรผันปริมาณโซเดียมคลอไรด์ โดยทำการทดลองตามวิธีที่ระบุไว้ในข้อ 3.2.2 แต่แปรผันปริมาณโซเดียมคลอไรด์ของอาหารเหลว LB ให้มีค่าเท่ากับ 0, 0.5, 1.5, 2.5, 3.5, 4.5, 5.0, 10, 20 และ 30 เปอร์เซ็นต์

## 3.3 ศึกษาประสิทธิภาพการย่อยสลาย PAHs และยีนไดออกซิจีเนสของแบคทีเรียที่คัดแยกได้

### 3.3.1 ทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลาย PAHs

#### 3.3.1.1 ทดสอบการย่อยสลาย PAHs ชนิดต่างๆ

ทดสอบความสามารถในการย่อยสลาย PAHs ชนิดต่างๆของแบคทีเรียทุกสายพันธุ์ที่คัดแยกได้ในหลอดทดลองที่บรรจุอาหารเหลว CFMM 4.5 มิลลิลิตร ที่มี PAH ชนิดต่างๆ ได้แก่ แนพทาซีน อะซีแนพธิน ความเข้มข้น 1,000 มิลลิกรัม/ลิตร ฟลูออรีน แอนทราซีน พีแนนทรีน ฟลูออแรนทีน ไพรีน ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัม/ลิตร และเบนโซ[เอ]ไพรีน ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัม/ลิตร เติมห้วเชื้อแบคทีเรีย (เตรียมตามวิธีที่ระบุไว้ในข้อ 3.2.1) 0.5 มิลลิลิตร ที่ผ่านการเขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบ/นาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำการทดลอง 3 ซ้ำ ควบคู่กับชุดควบคุมอาหารเหลว CFMM ที่เติม PAH แต่ไม่เติมห้วเชื้อแบคทีเรีย บ่มในเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน

#### 3.3.1.2 สกัด PAHs ที่เหลืออยู่ในอาหารเหลวด้วยเอทิลอะซิเตท

สกัด PAHs ที่เหลืออยู่ในอาหารเหลวเมื่อครบกำหนดเวลาบ่ม ตามวิธีของ Klankeo และคณะ (2009) โดยเติมกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น เพื่อปรับความเป็นกรด-ด่างของอาหารเหลวให้มีค่าประมาณ 2.0-3.0 เติมหิวเอทิลอะซิเตท 5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องปั่นผสมเป็นเวลา 1 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้แยกชั้น แยกส่วนเอทิลอะซิเตท (สารชั้นบน) เก็บไว้ในหลอดทดลองอันใหม่ แล้วสกัดอาหารเหลวด้วยเอทิลอะซิเตทซ้ำอีก 1 ครั้ง รวมส่วนเอทิลอะซิเตทที่ได้ เติมหิวเอทิลอะซิเตทที่ผ่านการอบฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส ปั่นผสมเพื่อให้โซเดียมซัลเฟตกำจัดน้ำที่เหลืออยู่ในส่วนเอทิลอะซิเตท ย้ายส่วนเอทิลอะซิเตทที่ผ่านการกำจัดน้ำไปยังหลอดทดลองอันใหม่ ระเหยแห้งด้วยเครื่องระเหยแห้งสูญญากาศแบบหมุน จากนั้นเติมหิวเอทิลอะซิเตท 1 มิลลิลิตร ปั่นผสมเป็นเวลา 1 นาที กรองสารละลายที่ได้ผ่านชุดกรองสำเร็จรูปชนิด PTFE ที่มีขนาดรูกรอง 0.20 ไมโครเมตร ลงในขวดสำหรับวิเคราะห์ HPLC เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะวิเคราะห์

#### 3.3.1.3 วิเคราะห์ปริมาณ PAHs ที่เหลืออยู่ในอาหารเหลวด้วย HPLC

วิเคราะห์ปริมาณ PAHs ที่เหลืออยู่ในอาหารเหลวด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC) ตามวิธีของ Klankeo และคณะ (2009) ซึ่งมีสภาวะต่างๆในระบบดังนี้

คอลัมน์ inertisill® ODS	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 4.6 มิลลิเมตร ยาว 150 มิลลิเมตร
อุณหภูมิคอลัมน์	40 องศาเซลเซียส
เฟสเคลื่อนที่	เมทานอล 80 เปอร์เซ็นต์
อัตราไหลของเฟสเคลื่อนที่	1 มิลลิเมตร/นาที
ความยาวคลื่นแสงอัลตราไวโอเล็ตที่ใช้ตรวจวิเคราะห์	275 นาโนเมตร
ปริมาณสารที่ฉีดวิเคราะห์	10 ไมโครลิตร
นำพื้นที่ใต้กราฟ (peak area) ที่ได้จากการวิเคราะห์ตัวอย่างไปคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การย่อยสลาย PAHs เปรียบเทียบกับชุดควบคุม ดังสมการด้านล่าง	
$\text{เปอร์เซ็นต์การย่อยสลาย PAHs} = \frac{(\text{พื้นที่ใต้กราฟของชุดควบคุม} - \text{พื้นที่ใต้กราฟของตัวอย่าง}) \times 100}{\text{พื้นที่ใต้กราฟของชุดควบคุม}}$	

### 3.3.2 ตรวจหายีนประมวลรหัสหน่วยย่อยแอลฟาของไดออกซิจีเนสด้วยวิธี PCR

ตรวจหายีนประมวลรหัสหน่วยย่อยแอลฟาของเอนไซม์ไดออกซิจีเนสในแบคทีเรียทุกสายพันธุ์ที่คัดแยกได้ด้วยวิธี PCR โดยใช้คู่ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีนหน่วยย่อยแอลฟาของไดออกซิจีเนสจากแบคทีเรียแกรมลบ (RHD<sub>α</sub>-GN) จากแบคทีเรียแกรมบวก (RHD<sub>α</sub>-GP) และจากแบคทีเรียทั้งแกรมลบและแกรมบวก (pah-rhd<sub>α</sub>) ขนาดของผลิตภัณฑ์ PCR และลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์แสดงในตารางที่ 3.1 องค์ประกอบของสารต่างๆในปฏิกิริยาแสดงในตารางที่ 3.2 และดำเนินปฏิกิริยาตามสภาวะดังนี้

คู่ไพรเมอร์ RHD <sub>α</sub> -GN (RHD <sub>α</sub> -GN-610F และ RHD <sub>α</sub> -GN-916R)		
1. initial denaturation	อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส	5 นาที
2. denaturation	อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส	30 วินาที
3. annealing	อุณหภูมิ 57 องศาเซลเซียส	30 วินาที
4. extension	อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส	30 วินาที
5. ทำขั้นตอนที่ 2-4 จำนวน 30 รอบ		
6. final extension	อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส	7 นาที
คู่ไพรเมอร์ RHD <sub>α</sub> -GP (RHD <sub>α</sub> -GP-641F และ RHD <sub>α</sub> -GP-933R)		
1. initial denaturation	อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส	5 นาที
2. denaturation	อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส	30 วินาที
3. annealing	อุณหภูมิ 54 องศาเซลเซียส	30 วินาที
4. extension	อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส	30 วินาที
5. ทำขั้นตอนที่ 2-4 จำนวน 30 รอบ		
6. final extension	อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส	7 นาที
คู่ไพรเมอร์ pah-rhd <sub>α</sub> (pah-rhd <sub>α</sub> -396F และ pah-rhd <sub>α</sub> -696R)		
1. initial denaturation	อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส	5 นาที
2. denaturation	อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส	1 นาที

3. annealing	อุณหภูมิ 46 องศาเซลเซียส	2 นาที
4. extension	อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส	1 นาที
5. ทำขั้นตอนที่ 2-4 จำนวน 5 รอบ		
6. denaturation	อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส	1 นาที
7. annealing	อุณหภูมิ 58.5 องศาเซลเซียส	1 นาที
8. extension	อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส	1 นาที
9. ทำขั้นตอนที่ 6-8 จำนวน 30 รอบ		
10. final extension	อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส	10 นาที

จากนั้นตรวจสอบผลิตภัณฑ์ PCR ที่เกิดขึ้นตามวิธีที่ระบุไว้ในข้อ 3.1.3.3 และวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลิตภัณฑ์ PCR ตามวิธีที่ระบุไว้ในข้อ 3.1.3.4-3.1.3.8 ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลิตภัณฑ์ PCR จะนำไปเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์กับข้อมูลที่มีในฐานข้อมูล GenBank โดยใช้โปรแกรม BLASTx (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)

### 3.4 ศึกษาแนวโน้มการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพของแบคทีเรียที่คัดแยกได้

#### 3.4.1 ทดสอบการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

ทดสอบการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพของแบคทีเรียที่คัดแยกได้ทุกสายพันธุ์ในขวดรูปชมพู่ที่บรรจุอาหารเหลว CFMM 45 มิลลิลิตร และมีฟิแนทรีนความเข้มข้น 100 มิลลิกรัม/ลิตร หรือน้ำมันหล่อลื่นความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งคาร์บอนเพียงแหล่งเดียว เติมหิวเชื้อแบคทีเรีย (เตรียมตามวิธีที่ระบุไว้ในข้อ 3.2.1) 5 มิลลิลิตร ทำการทดลอง 3 ซ้ำ ควบคู่กับชุดควบคุมอาหารเหลว CFMM ที่เติมแหล่งคาร์บอนแต่ไม่เติมหิวเชื้อแบคทีเรีย บ่มในเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน สำหรับชุดที่มีฟิแนทรีนเป็นแหล่งคาร์บอน และ 7 วัน สำหรับชุดที่มีน้ำมันหล่อลื่นเป็นแหล่งคาร์บอน จากนั้นย้ายเชื้อลงไปในหลอดเซนตริฟิวจ์ปราศจากเชื้อปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 8,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 30 นาที นำอาหารเลี้ยงเชื้อไปวัดค่าแรงตึงผิวด้วยเครื่องวัดแรงตึงผิว ตามวิธีที่ระบุในคู่มือ และนำตะกอนเซลล์ไปทดสอบความไม่ชอบน้ำ (hydrophobicity) ตามวิธีของ Costa และคณะ (2010) โดยล้างตะกอนเซลล์ด้วยบัฟเฟอร์ PUM (ภาคผนวก ข) จำนวน 1 ครั้ง แขนวลอยเซลล์ในบัฟเฟอร์ PUM ให้มีค่า OD<sub>400</sub> ประมาณ 1.0 (OD<sub>400</sub> เริ่มต้น) แล้วนำสารแขวนลอยของแบคทีเรีย 4 มิลลิลิตร มาผสมกับเฮกซะเดคเคน 1 มิลลิลิตร ผสมด้วยเครื่องปั่นผสมเป็นเวลา 1 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้แยกชั้นที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที แล้วดูสารแขวนลอยของแบคทีเรีย (สารชั้นล่าง) มาวัดค่า OD<sub>400</sub> (OD<sub>400</sub> สุดท้าย) คำนวณหาเปอร์เซ็นต์ความไม่ชอบน้ำ ดังสมการด้านล่าง

$$\text{เปอร์เซ็นต์ความไม่ชอบน้ำ} = \left( 1 - \frac{\text{OD}_{400} \text{ สุดท้าย}}{\text{OD}_{400} \text{ เริ่มต้น}} \right) \times 100$$

#### 3.4.2 ตรวจสอบที่เกี่ยวข้องกับการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพด้วยวิธี PCR

ตรวจหายีนที่เกี่ยวข้องกับการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพกลุ่มลิพอเปปไทด์ในแบคทีเรียทุกสายพันธุ์ที่คัดแยกได้ด้วยวิธี PCR โดยใช้คู่ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีนผลิตสารลดแรงตึงผิวกลุ่มลิพอเปปไทด์ ได้แก่ เซอร์แฟคติน ไมโคซบิทีลิน เพนไซซิน และฟลิพาสตาติน ขนาดของผลิตภัณฑ์ PCR และ



ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์แสดงในตารางที่ 3.1 องค์ประกอบของสารต่างๆในปฏิกิริยาแสดงในตารางที่ 3.2 และดำเนินปฏิกิริยาตามสภาวะดังนี้

คู่ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีนผลิตภัณฑ์แอสตาติน (As-1F และ Ts-2R)

1. initial denaturation	อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส	3 นาที
2. denaturation	อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส	1 นาที
3. annealing	อุณหภูมิ 43 องศาเซลเซียส	30 วินาที
4. extension	อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส	45 วินาที
5. ทำขั้นตอนที่ 2-4 จำนวน 30 รอบ		
6. final extension	อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส	10 นาที

คู่ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีนผลิตภัณฑ์ไมโคซัคทีลิน (Am-1F และ Tm-1R) และยีนผลิตภัณฑ์ไซน (Af-2F และ Tf-1R)

1. initial denaturation	อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส	3 นาที
2. denaturation	อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส	1 นาที
3. annealing	อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส	30 วินาที
4. extension	อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส	45 วินาที
5. ทำขั้นตอนที่ 2-4 จำนวน 30 รอบ		
6. final extension	อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส	10 นาที

คู่ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีนผลิตภัณฑ์ฟอสฟาตาติน (Ap-1F และ Tp-1R)

1. initial denaturation	อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส	3 นาที
2. denaturation	อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส	1 นาที
3. annealing	อุณหภูมิ 58 องศาเซลเซียส	30 วินาที
4. extension	อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส	1.30 นาที
5. ทำขั้นตอนที่ 2-4 จำนวน 30 รอบ		
6. final extension	อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส	10 นาที

จากนั้นตรวจสอบผลิตภัณฑ์ PCR ที่เกิดขึ้นตามวิธีที่ระบุไว้ในข้อ 3.1.3.3 และวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลิตภัณฑ์ PCR ตามวิธีที่ระบุไว้ในข้อ 3.1.3.4-3.1.3.8 ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลิตภัณฑ์ PCR จะนำไปเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์กับข้อมูลที่มีในฐานข้อมูล GenBank โดยใช้โปรแกรม BLASTx (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)

### 3.5 ศึกษาคุณสมบัติเบื้องต้นของ *Novosphingobium* sp. PCY

#### 3.5.1 ทดสอบรูปแบบการเจริญและการย่อยสลายฟิแนนทรินและไพรีน

ทดสอบรูปแบบการเจริญและการย่อยสลายฟิแนนทรินและไพรีนของ *Novosphingobium* sp. PCY ตามวิธีที่ระบุไว้ในข้อ 3.3.1 โดยเพิ่มชุดควบคุมอาหารเหลว CFMM ที่ไม่เติม PAH แต่เติมหัวเชื้อแบคทีเรีย เก็บตัวอย่างทุก 3 วัน เป็นเวลา 21 วัน มาวิเคราะห์ปริมาณ PAHs ที่เหลืออยู่เปรียบเทียบกับชุดควบคุมอาหารเหลว CFMM ที่เติม PAH แต่ไม่เติมหัวเชื้อแบคทีเรีย และตรวจนับ

จำนวนแบคทีเรียด้วยวิธีทรอปเพลทบนอาหารแข็ง LB เปรียบเทียบกับชุดควบคุมอาหารเหลว CFMM ที่ไม่เติม PAH แต่เติมหัวเชื้อแบคทีเรีย

### 3.5.2 ตรวจสอบชนิดของยีนประมวลรหัสไดออกซีจีเนสอื่น ๆ ด้วยวิธี PCR

ตรวจหายีนประมวลรหัสไดออกซีจีเนสอื่น ๆ ของ *Novosphingobium* sp. PCY ด้วยวิธี PCR โดยใช้คู่ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *nidA*, *nidB*, *phtAc*, *phtAd*, *bphA1f*, *bphA3*, *bphA4* และ *bphC* ขนาดของผลิตภัณฑ์ PCR และลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์แสดงในตารางที่ 3.1 องค์ประกอบของสารต่างๆในปฏิกิริยาแสดงในตารางที่ 3.2 และดำเนินปฏิกิริยาตามสภาวะดังนี้

คู่ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *nidA* (*nidA-F* และ *nidA-R*)

1. initial denaturation	อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส	5 นาที
2. denaturation	อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส	1 นาที
3. annealing	อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส	1 นาที
4. extension	อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส	1 นาที
5. ทำขั้นตอนที่ 2-4 จำนวน 30 รอบ		
6. final extension	อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส	10 นาที

คู่ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *nidB* (*nidB-F* และ *nidB-R*)

1. initial denaturation	อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส	3 นาที
2. denaturation	อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส	30 วินาที
3. annealing	อุณหภูมิ 58 องศาเซลเซียส	1 นาที
4. extension	อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส	1 นาที
5. ทำขั้นตอนที่ 2-4 จำนวน 30 รอบ		
6. final extension	อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส	7 นาที

คู่ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *phtAc* (*phtAc-F* และ *phtAc-R*) และยีน *phtAd* (*phtAd-F* และ *phtAd-R*)

1. initial denaturation	อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส	5 นาที
2. denaturation	อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส	1 นาที
3. annealing	อุณหภูมิ 58 องศาเซลเซียส	1 นาที
4. extension	อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส	1 นาที
5. ทำขั้นตอนที่ 2-4 จำนวน 30 รอบ		
6. final extension	อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส	10 นาที

คู่ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *bphA1f* (*bphA1f-F* และ *bphA1f-R*)

1. initial denaturation	อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส	5 นาที
2. denaturation	อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส	1 นาที
3. annealing	อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส	1 นาที
4. extension	อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส	1 นาที
5. ทำขั้นตอนที่ 2-4 จำนวน 30 รอบ		
6. final extension	อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส	10 นาที

คู่ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *bphA3* (*bphA3-F* และ *bphA3-R*) และยีน *bphC* (*bphC-F* และ *bphC-R*)

- |                                  |                          |           |
|----------------------------------|--------------------------|-----------|
| 1. initial denaturation          | อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส | 2 นาที    |
| 2. denaturation                  | อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส | 30 วินาที |
| 3. annealing                     | อุณหภูมิ 54 องศาเซลเซียส | 30 วินาที |
| 4. extension                     | อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส | 45 วินาที |
| 5. ทำขั้นตอนที่ 2-4 จำนวน 30 รอบ |                          |           |
| 6. final extension               | อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส | 6 นาที    |

คู่ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *bphA4* (*bphA4-F* และ *bphA4-R*)

- |                                  |                          |           |
|----------------------------------|--------------------------|-----------|
| 1. initial denaturation          | อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส | 2 นาที    |
| 2. denaturation                  | อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส | 30 วินาที |
| 3. annealing                     | อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส | 30 วินาที |
| 4. extension                     | อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส | 45 วินาที |
| 5. ทำขั้นตอนที่ 2-4 จำนวน 30 รอบ |                          |           |
| 6. final extension               | อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส | 6 นาที    |

จากนั้นตรวจสอบผลิตภัณฑ์ PCR ที่เกิดขึ้นตามวิธีที่ระบุไว้ในข้อ 3.1.3.3 และวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลิตภัณฑ์ PCR ตามวิธีที่ระบุไว้ในข้อ 3.1.3.4-3.1.3.8 ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลิตภัณฑ์ PCR จะนำไปเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์กับข้อมูลที่มีในฐานข้อมูล GenBank โดยใช้โปรแกรม BLASTx (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) พร้อมทั้งสร้างแผนผังความสัมพันธ์ของลำดับกรดอะมิโนของผลิตภัณฑ์ PCR ที่เกิดขึ้นและลำดับกรดอะมิโนในฐานข้อมูลด้วยโปรแกรม Mega5.1 ด้วยวิธี neighbor-joining โดยกำหนดค่า Bootstrap เท่ากับ 1000

### 3.5.3 ตรวจสอบตำแหน่งของยีน *nidA*

#### 3.5.3.1 ตรวจสอบตำแหน่งของยีน *nidA* ด้วยวิธี PCR

แยก DNA ด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส ตามวิธีที่ระบุไว้ในข้อ 3.1.3.2 จากนั้นตัดแถบ DNA และพลาสติกที่พบออกจากเจลมาใส่ในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ ซึ่งน้ำหนักชิ้นอะกาโรสเจลแล้วทำบริสุทธิ์ด้วย DNA EASYTRAP™ Version 2 ตามวิธีที่ระบุในคู่มือ โดยเติม NaI buffer ปริมาตร 3 เท่า (ไมโครลิตร) ของน้ำหนักชิ้นอะกาโรสเจล (กรัม) ปั่นผสมเล็กน้อย ละลายชิ้นอะกาโรสเจลอย่างสมบูรณ์ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส พร้อมทั้งกลับหลอดไปมาทุกๆ 2-3 นาที เติม glass powder ปริมาตร 5 ไมโครลิตร/ความเข้มข้น DNA 1 ไมโครกรัม ผสมโดยการกลับหลอดไปมา ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 5-10 นาที เพื่อให้ glass powder ดูดซับ DNA ในสารละลาย ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 1 นาที เทส่วนน้ำใส่ทิ้ง เติม wash buffer (ที่เติมเอทานอลแล้ว) 250 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงด้วยสภาวะเดิมและเทส่วนน้ำทิ้ง ระบายแห้งที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เติมสารละลาย TE ปริมาตร 3 เท่าของปริมาตร glass powder บ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที เพื่อละลาย DNA ออกจาก glass powder ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องจนสารละลายเย็น ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 วินาที ดูดสารละลายส่วนใส

ออกมาใส่ในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์อันใหม่ จะได้สารละลายบริสุทธิ์ของ DNA และพลาสมิด เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

นำสารละลายบริสุทธิ์ของ DNA และพลาสมิดที่ได้มาตรวจหาตำแหน่งของยีน *nidA* ด้วยวิธี PCR โดยใช้ไพรเมอร์ *nidA-F* และ *nidA-R* ตามวิธีที่ระบุไว้ในข้อ 3.5.2 ตรวจสอบผลิตภัณฑ์ PCR ที่เกิดขึ้นตามวิธีที่ระบุไว้ในข้อ 3.1.3.3

### 3.5.3.2 ตรวจหาตำแหน่งของยีน *nidA* ด้วยวิธีเซาท์เทิร์นไฮบริไดเซชัน

เตรียม DNA ตรวจติดตาม หรือโพรบ (probe) จากผลิตภัณฑ์ PCR บริสุทธิ์ของยีนบริเวณ 16S rDNA และยีน *nidA* ด้วย DIG High Prime ตามวิธีที่ระบุในคู่มือ โดยนำผลิตภัณฑ์ PCR บริสุทธิ์ ความเข้มข้น 300 นาโนกรัม มาปรับปริมาตรด้วยน้ำปลอดประจุปราศจากเชื้อเป็น 16 ไมโครลิตร ให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที แช่ในน้ำแข็งทันทีเป็นเวลา 3 นาที เติมน้ำ DIG-High Prime 4 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน ระวังอย่าให้เกิดฟองอากาศ บ่มอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลาอย่างน้อย 20 ชั่วโมง จากนั้นหยุดปฏิกิริยาด้วยการเติมสารละลาย EDTA เข้มข้น 0.2 โมลาร์ pH 8.0 (ภาคผนวก ข) 2 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

แยก DNA ด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส ตามวิธีที่ระบุไว้ในข้อ 3.1.3.2 จากนั้นตรวจหาตำแหน่งของยีน *nidA* ด้วยวิธีเซาท์เทิร์นไฮบริไดเซชัน ตามวิธีของ Nojiri และคณะ (2001) โดยวางอะกาโรสเจล (ขนาด 5x6 เซนติเมตร) หายบนกระดาษไนลอนเมมเบรน Biodyne® B ขนาด 6x7 เซนติเมตร บนเครื่องถ่ายเท DNA ชนิดสูญญากาศ ปิดที่บรอยเตอร์อบเจลและหลุมหยอด DNA ด้วยอะกาโรสเจลที่มีความเข้มข้นเท่ากัน ปิดสวิทช์ปั๊ม ดูดสารละลายกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 0.2 โมลาร์ (ภาคผนวก ข) 5 มิลลิลิตร ลงบนเจล ทิ้งไว้ 15 นาที ซับผิวหน้าเมมเบรนด้วยกระดาษทิชชู ดูดบัฟเฟอร์ denaturation (ภาคผนวก ข) 5 มิลลิลิตร ลงบนเจล ทิ้งไว้ 15 นาที ซับผิวหน้าเมมเบรนด้วยกระดาษทิชชู ดูดบัฟเฟอร์ neutralization (ภาคผนวก ข) 5 มิลลิลิตร ลงบนเจล ทิ้งไว้ 15 นาที ซับผิวหน้าเมมเบรนด้วยกระดาษทิชชู เติมน้ำเกลือ 2 เท่า SSC (20X SSC) (ภาคผนวก ข) ให้สูงประมาณ 2 เท่าของความสูงเจล ทิ้งไว้ 45-60 นาที เพื่อถ่ายเท DNA ลงบนเมมเบรน ปิดสวิทช์ปั๊ม เติมน้ำเกลือ 20X SSC ออก (ใช้ซ้ำได้) แล้วนำเมมเบรนมาทำให้แห้งด้วยการซับบนกระดาษทิชชู ตีตรง DNA บนเมมเบรนด้วยการฉายแสงอัลตราไวโอเล็ตเป็นเวลา 3-5 นาที นำเมมเบรนวางบนกระดาษทิชชูแล้วห่อฟอยด์ เก็บไว้ในตู้เย็นจนกว่าจะทำการทดลอง

นำเมมเบรนที่เก็บไว้มาแช่ในสารละลาย NaOH/SDS (ภาคผนวก ข) 100 มิลลิลิตร เขย่าด้วยความเร็วต่ำ (30-40 รอบ/นาที) เป็นเวลา 15 นาที เติมน้ำเกลือที่แห้งแล้วล้างด้วยน้ำปลอดประจุ (ถ้าไม่ได้แช่เมมเบรนไว้ในตู้เย็น ก็ข้ามขั้นตอนการแช่ในสารละลาย NaOH/SDS) นำเมมเบรนมาใส่ในถุงพลาสติก เติมน้ำบัฟเฟอร์ hybridization (ภาคผนวก ข) ที่ผ่านการให้ความร้อนอุณหภูมิ 68 องศาเซลเซียส 15 มิลลิลิตร ใส่ฟองอากาศภายในแล้วซีลถุง เขย่าด้วยความเร็วต่ำที่อุณหภูมิ 68 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ย้ายเมมเบรนมาใส่ในถุงพลาสติก เติมน้ำบัฟเฟอร์ hybridization ที่ผสมโพรบแล้ว (นำโพรบมาบ่มที่อุณหภูมิ 98 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5-15 นาที ดูดบัฟเฟอร์ hybridization 1 มิลลิลิตรที่ผ่านการแช่ในน้ำแข็ง มาผสมกับโพรบในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์โดยการปิเปตตั้งขึ้นลง แล้วย้ายสารผสมดังกล่าวลงในน้ำบัฟเฟอร์ hybridization 24 มิลลิลิตร ที่แช่ในน้ำแข็ง

กรณีใช้บัฟเฟอร์ hybridization ที่ผสมโพรบซ้ำ ต้องบ่มที่อุณหภูมิ 98 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5-15 นาที แช่น้ำแข็ง แล้วจึงนำไปใช้งาน) 25 มิลลิลิตร ใส่ฟองอากาศภายในแล้วซีลถุง เขย่าด้วยความเร็วต่ำที่อุณหภูมิ 68 องศาเซลเซียส เป็นเวลาอย่างน้อย 8 ชั่วโมง จากนั้นนำเมมเบรนมาแช่ในสารละลาย 1X SSC/SDS (ภาคผนวก ข) 50 มิลลิลิตร เขย่าด้วยความเร็วสูง (160-170 รอบ/นาที) เป็นเวลา 5 นาที เทสารละลายทิ้งแล้วล้างด้วยน้ำปลอดประจุ ทำซ้ำ 2 รอบ แช่ในสารละลาย 0.1X SSC/SDS (ภาคผนวก ข) 50 มิลลิลิตร เขย่าด้วยความเร็วต่ำที่อุณหภูมิ 68 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที เทสารละลายทิ้งแล้วล้างด้วยน้ำปลอดประจุ ทำซ้ำ 2 รอบ ย้ายเมมเบรนไปภาชนะอันใหม่ ล้างด้วยบัฟเฟอร์ SHB1 (ภาคผนวก ข) หลายๆ ครั้ง แช่ในบัฟเฟอร์ SHB2 (ภาคผนวก ข) 50 มิลลิลิตร เขย่าด้วยความเร็วต่ำเป็นเวลาอย่างน้อย 30 นาที เทสารละลายทิ้ง แช่ในสารละลาย antibody solution (ภาคผนวก ข) 50 มิลลิลิตร เขย่าด้วยความเร็วต่ำเป็นเวลา 30 นาที เทสารละลายทิ้ง แช่ในสารละลาย antibody wash solution (ภาคผนวก ข) 100 มิลลิลิตร เขย่าด้วยความเร็วสูงเป็นเวลา 15 นาที เทสารละลายทิ้งแล้วล้างด้วยน้ำปลอดประจุ ทำซ้ำ 3 รอบ (ครั้งที่ 3 เขย่านาน 10 นาที) ย้ายเมมเบรนไปภาชนะขนาดใหญ่อันใหม่ แช่ในบัฟเฟอร์ SHB3 (ภาคผนวก ข) เขย่าด้วยความเร็วต่ำเป็นเวลา 5 นาที เทสารละลายทิ้งแล้วล้างด้วยน้ำปลอดประจุ ทำซ้ำ 2 รอบ ย้ายเมมเบรนไปในถุงพลาสติก เติมสารละลาย color substrate solution (ภาคผนวก ข) 20 มิลลิลิตร ใส่ฟองอากาศภายใน ซีลถุงแล้วหุ้มด้วยฟอยด์ ตั้งทิ้งไว้ในที่มืดเป็นเวลา 5-30 นาที หรือจนกว่าจะเกิดแถบสีม่วง เมื่อเกิดแถบสีม่วงแล้วให้นำเมมเบรนมาแช่ในน้ำปลอดประจุ ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลาอย่างน้อย 1 ชั่วโมง ทำให้แห้ง เก็บไว้ในถุงซีลที่อุณหภูมิห้อง

หากต้องการทำไฮบริดเซชันใหม่ด้วยเมมเบรนเดิม ต้องดีไฮบริดเซชัน (dehybridization) โดยการแช่เมมเบรนในไดเมทิลฟอร์มาไมด์ ที่อุณหภูมิประมาณ 60 องศาเซลเซียส จนเมมเบรนเป็นสีขาว ประมาณ 1-2 ชั่วโมง (สามารถใช้ไดเมทิลฟอร์มาไมด์ จนกว่าจะเป็นสีม่วงเข้ม) ล้างในน้ำปลอดประจุ แล้วเริ่มไฮบริดเซชันใหม่ตั้งแต่ขั้นตอนการแช่ในสารละลาย NaOH/SDS

### 3.5.4 ตรวจสอบขนาดของพลาสติก

#### 3.5.4.1 สกัด DNA และพลาสติกของแบคทีเรีย

สกัด DNA และพลาสติกของ *Novosphingobium* sp. PCY ตามวิธีของ Ausubel และคณะ (1999) โดยนำเซลล์แบคทีเรีย 1.5 มิลลิลิตร ลงในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ขนาด 2 มิลลิลิตร ปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกเซลล์ด้วยความเร็ว 10,000 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที เทอาหารเลี้ยงเชื้อทิ้ง กระจายตะกอนเซลล์ในสารละลาย TE 567 ไมโครลิตร ให้เป็นเนื้อเดียวกัน เติมสารละลายโปรตีนเนสเคเข้มข้น 10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร 3 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยการกลับหลอดไปมา เติมสารละลายโซเดียมโดเดซิลซัลเฟตเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ 30 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยการกลับหลอดไปมาเป็นเวลา 15 นาที บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลาอย่างน้อย 1 ชั่วโมง เติมสารละลายโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 5 โมลาร์ 100 ไมโครลิตร และสารละลาย CTAB/NaCl ที่มีอุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส 80 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยการกลับหลอดไปมา เป็นเวลา 3 นาที บ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เติมคลอโรฟอร์ม/ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ 800 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยการกลับหลอดไปมาเป็นเวลา 3 นาที ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 14,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 15 นาที ย้ายสารละลายชั้นบนลงในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์

อันใหม่ แล้วเติมฟีนอล/คลอโรฟอร์มในปริมาตรที่เท่ากับปริมาตรของสารละลายสุดท้าย ผสมให้เข้ากันโดยการกลับหลอดไปมาประมาณ 5 นาที ปั่นเหวี่ยงด้วยสภาวะเดิมแล้วย้ายสารละลายชั้นบนลงในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์อันใหม่ เติมไอโซโพรพานอลในปริมาตรที่เท่ากับปริมาตรของสารละลายสุดท้าย กลับหลอดไปมาอย่างน้อย 5 นาที ให้สารละลายเข้ากันจนปรากฏสาย DNA สีขาว ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 15,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 นาที เทส่วนใสทิ้ง ล้างตะกอนด้วยเอทานอล 70 เปอร์เซ็นต์ 400 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 15,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 5 นาที เทส่วนใสทิ้ง ระบายเอทานอลจนแห้งในโถดูดความชื้นสภาวะสุญญากาศ (desiccator) ประมาณ 5 นาที แล้วละลายตะกอน DNA ด้วยสารละลาย TE 50 ไมโครลิตร เติมอาร์เอ็นเอสเอเข้มข้น 10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร 0.1 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลาอย่างน้อย 30 นาที เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

### 3.5.4.2 เตรียมเจลแบคทีเรีย (strain gel) หรือปลั๊ก (plug)

เตรียมปลั๊กของ *Novosphingobium* sp. PCY ด้วย CHEF Bacterial Genomic DNA Plug Kit ตามวิธีที่ระบุในคู่มือ โดยเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว LB ให้มีค่า OD<sub>600</sub> เท่ากับ 0.8-1.0 หรือประมาณ  $5 \times 10^8$  CFU/มิลลิลิตร คูดเชื้อมา 100 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที เทอาหารเลี้ยงเชื้อทิ้ง เติมน้ำเกลือ TE 500 ไมโครลิตร ปั่นผสมเพื่อกระจายตะกอนเซลล์ ปั่นเหวี่ยงด้วยสภาวะเดิม เทส่วนใสทิ้ง ทำซ้ำ 2 รอบ เติมน้ำ Cell suspension buffer ที่ผ่านการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส 55 ไมโครลิตร แช่ในเครื่องระเหยแห้งชนิดควบคุมอุณหภูมิที่ตั้งค่าอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เติมน้ำ 1.8 เปอร์เซ็นต์ CleanCut Agarose ที่ผ่านการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 50-70 องศาเซลเซียส 55 ไมโครลิตร ผสมโดยการปิเปตต์ขึ้นลง ระวังกายให้เกิดฟอง เทสารผสมลงในแม่พิมพ์ (mold) ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที นำปลั๊กที่ได้ออกจากแม่พิมพ์มาใส่ในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ขนาด 2 มิลลิลิตร เติมน้ำ Lysozyme solution (25X Lysozyme 40 ไมโครลิตร ผสมกับ Lysozyme buffer 960 ไมโครลิตร) 520 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง เทสารละลายทิ้งและล้างด้วยน้ำปลอดประจุปราศจากเชื้อ เติมน้ำ Wash buffer (10X Wash buffer 200 ไมโครลิตร ผสมกับน้ำปลอดประจุปราศจากเชื้อ 1,800 ไมโครลิตร) 1,875 ไมโครลิตร กลับหลอดไปมา เทสารละลายทิ้ง เติมน้ำ Proteinase K buffer (25X Proteinase K buffer 40 ไมโครลิตร ผสมกับ Proteinase K buffer 960 ไมโครลิตร) 520 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1-4 วัน เทสารละลายทิ้ง เติมน้ำ Wash buffer (10X Wash buffer 400 ไมโครลิตร ผสมกับน้ำปลอดประจุปราศจากเชื้อ 3,600 ไมโครลิตร) 500 ไมโครลิตร กลับหลอดไปมาที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง เทสารละลายทิ้ง ทำซ้ำเป็นจำนวน 6 ครั้ง เติมน้ำ Wash buffer 400 ไมโครลิตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ได้นาน 3 เดือน

### 3.5.4.3 พัลซ์ฟิลด์เจลอิเล็กโทรโฟรีซิส (PFGE)

เตรียม CHEF DNA Size Standard, Lambda Ladder, CHEF DNA Size Standard, *S. cerevisiae* และ CHEF DNA Size Marker, *H. wingei* โดยใส่บัฟเฟอร์ 0.5X TBE 500 ไมโครลิตร ลงในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ บ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลาอย่างน้อย 30 นาที นำเจล marker มาใส่ในหลอดดังกล่าว บ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที แล้วแช่ในน้ำแข็ง

ตรวจสอบขนาดของพลาสมิดด้วยวิธี PFGE (Nojiri และคณะ, 2002) ด้วยชุด CHEF-DR® III Variable Angle System โดยเตรียม Pulsed Field Certified Agarose เข้มข้น 0.9 เปอร์เซ็นต์ ที่หลอมในบัฟเฟอร์ Tris-borate-EDTA ความเข้มข้น 0.5 เท่า (0.5X TBE) (ภาคผนวก ข) เทลงในแม่พิมพ์ที่มีหัวเสียบอยู่ ทิ้งให้อะกาโรสแข็งตัวที่อุณหภูมิห้องประมาณ 30-40 นาที ใส่เจล marker และปลั๊ก (ที่เตรียมได้จากข้อ 3.5.5.2) ลงในช่องวิ่งให้ชิดด้านหน้า ระวังอย่าให้เกิดฟองอากาศ ปิดช่องวิ่งด้วย Certified Low-Melt Agarose เข้มข้น 0.9 เปอร์เซ็นต์ ที่หลอมในบัฟเฟอร์ 0.5X TBE ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 นาที วางชิ้นอะกาโรสเจลที่ได้ลงในแชมเบอร์ที่มีบัฟเฟอร์ 0.5X TBE ปริมาตร 2 ลิตร หยอดสารละลาย DNA (ที่เตรียมได้จากข้อ 3.5.4.1) 10 ไมโครลิตร ที่ผสมกับสตีตตาม 5 ไมโครลิตร ลงในช่องวิ่งที่เหลือ ทำอิเล็กโทรโฟรีซิสด้วยชุด CHEF-DR® III Variable Angle System ที่ความต่างศักย์ 100 โวลต์ (3 โวลต์/เซนติเมตร) มุม (angle) 106 องศา เวลาสลับ (switch time) 60-120 วินาที เป็นเวลา 38 ชั่วโมง โดยควบคุมอุณหภูมิ 14 องศาเซลเซียสด้วย Cooling module จากนั้นนำอะกาโรสเจลมาย้อมด้วยสารละลายเอธิเดียมโบรไมด์ เป็นเวลา 20 นาที ล้างอะกาโรสเจลด้วยน้ำกลั่นเป็นเวลาอย่างน้อย 3 ชั่วโมง ตรวจสอบและถ่ายภาพแถบ DNA ด้วยเครื่องถ่ายและวิเคราะห์ภาพเจล ภายใต้แสงอัลตราไวโอเลตความยาวคลื่น 312 นาโนเมตร แล้วยืนยันตำแหน่งของยีน *nidA* ด้วยวิธีเซาท์เทิร์นไฮบริดเซชันตามวิธีที่ระบุไว้ในข้อ 3.5.3.2

### 3.5.5 ประเมินการหายไปของเมกะพลาสมิดต่อประสิทธิภาพการย่อยสลายไพรีน

#### 3.5.5.1 ทำพลาสมิดคิวริง

ทำพลาสมิดคิวริง (plasmid curing) ของ *Novosphingobium* sp. PCY ด้วยการต่อเชื้อในอาหารแข็ง LB จำนวน 10 ครั้ง แต่แต่ละครั้งจะบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน โดยกำหนดรหัสของสายพันธุ์ที่ถูกต้องไปแต่ละครั้งคือ cPCY1 จนถึง cPCY10

#### 3.5.5.2 ตรวจสอบการมีอยู่ของพลาสมิดของสายพันธุ์ cPCY

ตรวจสอบการมีอยู่ของเมกะพลาสมิดในสายพันธุ์ cPCY10 เปรียบเทียบกับสายพันธุ์ดั้งเดิมไม่ได้ผ่านการต่อเชื้อบนอาหารแข็ง LB (สายพันธุ์ PCY) โดยการสกัด DNA ตามวิธีที่ระบุไว้ในข้อ 3.1.3.1 แล้วทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสตามวิธีที่ระบุไว้ในข้อ 3.1.3.2

#### 3.5.5.3 ตรวจสอบการมีอยู่ของยีนไดออกซิจีเนสของสายพันธุ์ cPCY

ตรวจสอบการมีอยู่ของยีนไดออกซิจีเนสในสายพันธุ์ cPCY10 เปรียบเทียบกับสายพันธุ์ดั้งเดิมไม่ได้ผ่านการต่อเชื้อบนอาหารแข็ง LB (สายพันธุ์ PCY) โดยนำ DNA สกัดได้จากข้อ 3.5.5.2 มาเป็นแม่แบบในการทำ PCR ตามวิธีที่ระบุไว้ในข้อ 3.5.2

#### 3.5.5.4 ตรวจสอบเปอร์เซ็นต์พลาสมิดที่หายไปของสายพันธุ์ cPCY

ตรวจสอบเปอร์เซ็นต์พลาสมิดที่หายไปในทุกสายพันธุ์ cPCY (cPCY1 ถึง cPCY10) เปรียบเทียบกับสายพันธุ์ดั้งเดิมไม่ได้ผ่านการต่อเชื้อบนอาหารแข็ง LB (สายพันธุ์ PCY) โดยเกลี่ยหัวเชื้อแบคทีเรีย (เตรียมตามวิธีที่ระบุไว้ในข้อ 3.2.1) 0.1 มิลลิลิตร ลงบนอาหารแข็ง CFMM แล้วพันทับด้วย 2 เปอร์เซ็นต์ ไพรีนที่ละลายในไดเอทิลอีเทอร์ บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส จนกว่าจะพบการเจริญของแบคทีเรียที่สร้างโซนใสล้อมรอบโคโลนี นับจำนวนโคโลนีที่สร้างโซนใสของแต่ละสายพันธุ์ แล้วคำนวณเปอร์เซ็นต์พลาสมิดที่หายไป ดังสมการด้านล่าง

$$\text{เปอร์เซ็นต์พลาสติกที่หายไป} = \frac{(\text{จำนวนโคลนีสรางโซนใสของ PCY} - \text{จำนวนโคลนีสรางโซนใสของ cPCY}) \times 100}{\text{จำนวนโคลนีสรางโซนใสของ PCY}}$$

### 3.5.5.5 ทดสอบความสามารถในการย่อยสลายไฟรินของสายพันธุ์ cPCY

ทดสอบความสามารถในการย่อยสลายไฟรินความเข้มข้น 100 มิลลิกรัม/ลิตร ของทุกสายพันธุ์ cPCY (cPCY1 ถึง cPCY10) ในหลอดทดลองที่บรรจุอาหารเหลว CFMM ปริมาตร 4.5 มิลลิลิตร และเติมหัวเชื้อแบคทีเรีย (เตรียมตามวิธีที่ระบุไว้ในข้อ 3.2.1) 0.5 มิลลิลิตร ทำการทดลอง 3 ซ้ำ บ่มในเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน สังเกตความขุ่นและสีของอาหารเหลวที่เปลี่ยนไปเทียบกับชุดควบคุมอาหารเหลว CFMM ที่เติม PAH และหัวเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ PCY (ชุดควบคุมเชิงบวก) และชุดควบคุมอาหารเหลว CFMM ที่เติม PAH แต่ไม่เติมหัวเชื้อแบคทีเรีย (ชุดควบคุมเชิงลบ)

### 3.5.6 ตรวจสอบการแสดงออกของยีน *nidA*

#### 3.5.6.1 ทดสอบการเจริญในอาหารที่มีแหล่งคาร์บอนต่างกัน

เลี้ยงสายพันธุ์ PCY ในขวดรูปชมพู่ที่บรรจุอาหารเหลว CFMM 45 มิลลิลิตร และมีแหล่งคาร์บอนคือ ไฟรินความเข้มข้น 100 มิลลิกรัม/ลิตร หรือซูโครสความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ เติมหัวเชื้อแบคทีเรีย (เตรียมตามวิธีที่ระบุไว้ในข้อ 3.2.1) 5 มิลลิลิตร ที่ผ่านการเขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบ/นาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง บ่มในเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 วัน เก็บตัวอย่างวันที่ 0, 2 และ 4 มาตรวจนับจำนวนแบคทีเรียด้วยวิธีทรอปเพลทบนอาหารแข็ง LB และเพื่อตรวจสอบการแสดงออกของยีน

#### 3.5.6.2 สกัด RNA ของแบคทีเรีย

ในการสกัด RNA อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ต้องผ่านการฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 40 นาที และบริเวณที่ปฏิบัติงาน ควรรองด้วยฟอยด์และกำจัด RNase ด้วย RNase Away เตรียมเซลล์สำหรับสกัด RNA โดยเติมอาหารเลี้ยงเชื้อ 5 มิลลิลิตร ลงในหลอดเซนตริฟิวจ์ ขนาด 50 มิลลิลิตร ที่บรรจุ RNAProtect™ Bacteria Reagent 5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องปั่นผสม ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที ปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกเซลล์ด้วยความเร็ว 9,000 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที เทอาหารเลี้ยงเชื้อทิ้ง กระจายตะกอนเซลล์ในสารละลาย TE ที่มีไลโซไซม์เข้มข้น 10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร 100 ไมโครลิตร ให้เป็นเนื้อเดียวกัน (ผสมด้วยเครื่องปั่นผสมหรือปิเปตต์ขึ้นลง) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที นำมาสกัด RNA ของแบคทีเรียด้วย NucleoSpin® RNA ตามวิธีที่ระบุในคู่มือ โดยเติม RA1 buffer 350 ไมโครลิตร และเมอร์แคปโตเอทานอล 3.5 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องปั่นผสม ดูดสารละลายผสมทั้งหมดลงในคอลัมน์ Nucleospin® filter (วงแหวนสีม่วง) ที่มี collection tube ขนาด 2 มิลลิลิตร ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 5,000 xg เป็นเวลา 5 นาที นำส่วนน้ำใสมาเติมเอทานอล 100 เปอร์เซ็นต์ 250 ไมโครลิตร ผสมโดยการปิเปตต์ขึ้นลง แล้วดูดสารละลายผสมทั้งหมดลงในคอลัมน์ Nucleospin® RNA (วงแหวนสีฟ้า) ที่มี collection tube ขนาด 2 มิลลิลิตร ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 11,000 xg เป็นเวลา 30 วินาที ย้ายคอลัมน์ลงใน collection tube อันใหม่ เติม RA3 buffer 600 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงด้วยสภาวะเดิม ย้ายคอลัมน์ลงใน collection tube อันใหม่ เติม RA3 buffer 250 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 11,000 xg เป็นเวลา 2 นาที ย้ายคอลัมน์ลงใน collection tube



อันใหม่ ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 11,000 xg เป็นเวลา 1 นาที เพื่อให้คอลัมน์แห้ง ย้ายคอลัมน์ลงในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ เติม RNase-free water 40 ไมโครลิตร ลงตรงกลางคอลัมน์ ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 นาที ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 11,000 xg เป็นเวลา 2 นาที จะได้สารละลาย RNA (วางในอ่างน้ำแข็งทันที) ตรวจสอบความเข้มข้นและความบริสุทธิ์ของสารละลาย RNA ด้วยเครื่องวัดความเข้มข้น Nanodrop ตามวิธีที่ระบุในคู่มือ (factor 40)

กำจัด DNA ในสารละลาย RNA ที่สกัดได้ด้วย RQ1 RNase-Free DNase โดยการเติม RQ1 DNase 5 ไมโครลิตร และ RQ1 DNase buffer 5 ไมโครลิตร (ต่อปริมาตรสารละลาย RNA 40 ไมโครลิตร) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เติม RQ1 DNase stop solution 5 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ปรับปริมาตรสารละลาย RNA ด้วย RNase-free water เป็น 100 ไมโครลิตร (เติม 45 ไมโครลิตร) แล้วทำบริสุทธิ์สารละลาย RNA ด้วย NucleoSpin® RNA Clean-up ตามวิธีที่ระบุในคู่มือ โดยเติมสารละลายผสมของ RA1 buffer 300 ไมโครลิตร และเอทานอล 100 เปอร์เซ็นต์ 300 ไมโครลิตร ผสมโดยการปิเปตตั้งขึ้นลง แล้วดูดสารละลายผสมทั้งหมดลงในคอลัมน์ Nucleospin® RNA (วงแหวนสีฟ้า) ที่มี collection tube ขนาด 2 มิลลิลิตร ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 11,000 xg เป็นเวลา 30 วินาที ย้ายคอลัมน์ลงใน collection tube อันใหม่ เติม RA3 buffer 600 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงด้วยสภาวะเดิม ย้ายคอลัมน์ลงใน collection tube อันใหม่ เติม RA3 buffer 250 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 11,000 xg เป็นเวลา 2 นาที ย้ายคอลัมน์ลงใน collection tube อันใหม่ ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 11,000 xg เป็นเวลา 1 นาที เพื่อให้คอลัมน์แห้ง ย้ายคอลัมน์ลงในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ เติม RNase-free water 40 ไมโครลิตร ลงตรงกลางคอลัมน์ ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 นาที ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 11,000 xg เป็นเวลา 2 นาที จะได้สารละลาย RNA (วางในอ่างน้ำแข็งทันที) เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส

### 3.5.6.3 ตรวจสอบคุณภาพและความเข้มข้นของสารละลาย RNA

ตรวจสอบคุณภาพของสารละลาย RNA ด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส (agarose gel electrophoresis) โดยเตรียมอะกาโรสเจลเข้มข้น 1.2 เปอร์เซ็นต์ ที่หลอมในน้ำปลอดประจุปราศจาก RNase (DEPC-treated water) (ภาคผนวก ข) 45 มิลลิลิตร ที่มีบัฟเฟอร์ MOPS ความเข้มข้น 10 เท่า (10X MOPS) (ภาคผนวก ข) 5 มิลลิลิตร และเมื่อสารละลายเจลมีอุณหภูมิประมาณ 65 องศาเซลเซียส เติมฟอร์มัลดีไฮด์ 0.9 มิลลิลิตร และสารละลายเอธิเดียมโบรไมด์ 0.5 ไมโครลิตร ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกันโดยใช้แท่งกวนแม่เหล็ก เทลงในแม่พิมพ์ที่มีหวีเสียบอยู่ ตั้งให้อะกาโรสแข็งตัวที่อุณหภูมิห้องประมาณ 30-40 นาที วางชิ้นอะกาโรสเจลที่ได้ลงในแชมเบอร์ที่มีบัฟเฟอร์ 1X MOPS (ภาคผนวก ข) ผสมสารละลาย RNA 4 ไมโครลิตร (ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัม) ที่ผ่านการให้ความร้อนอุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที กับบัฟเฟอร์ running MOPS (ภาคผนวก ข) 1 ไมโครลิตร แล้วหยอดลงในช่องวิ่ง ทำอิเล็กโทรโฟรีซิสที่ความต่างศักย์ 100 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที นำอะกาโรสเจลมาตรวจดูและถ่ายภาพแถบ RNA ด้วยเครื่องถ่ายและวิเคราะห์ภาพเจล ภายใต้แสงอัลตราไวโอเลตความยาวคลื่น 312 นาโนเมตร

ตรวจสอบความเข้มข้นและความบริสุทธิ์ของสารละลาย RNA ด้วยเครื่องวัดความเข้มข้น Nanodrop ตามวิธีที่ระบุในคู่มือ (factor 40) โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร ( $A_{260}$  และ  $A_{280}$ )

นอกจากนี้ ตรวจสอบความเข้มข้นและคุณภาพของสารละลาย RNA ด้วยเครื่อง 2100 Bioanalyzer โดยใช้ RNA 6000 Nano Kit ในการเตรียมตัวอย่าง ตามวิธีที่ระบุในคู่มือ

#### 3.5.6.4 ตรวจสอบการแสดงออกของยีน *nidA* ด้วยวิธี RT-PCR

สังเคราะห์ cDNA จาก RNA (ที่สกัดได้จากข้อ 3.5.6.2) ด้วย SuperScript™ II Reverse Transcriptase โดยผสม RNase-free water (เพื่อปรับปริมาตรเป็น 11 ไมโครลิตร) random primer เข้มข้น 75 นาโนกรัม/ไมโครลิตร (เตรียมโดยผสม random primer เข้มข้น 3 ไมโครกรัม/ไมโครลิตร) 1 ไมโครลิตร และ RNase-free water 39 ไมโครลิตร 3.33 ไมโครลิตร และสารละลาย RNA ที่สกัดได้จากข้อ 3.5.6.2 เข้มข้น 1 ไมโครกรัม ลงในหลอดปฏิกิริยาลูกลูโซโฟลิมเมอร์ส ดำเนินปฏิกิริยารอบที่ 1 ตามสถานะดังนี้ อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส 10 นาที อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส 10 นาที และอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จนกว่าจะใช้งานต่อ

เตรียมสารต่างๆในปฏิกิริยาการสังเคราะห์ cDNA ซึ่งประกอบด้วย 5 เท่า First-strand buffer 4 ไมโครลิตร, 0.1 โมลาร์ DTT 2 ไมโครลิตร, dNTP เข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ (เตรียมโดยเติม dATP, dCTP, dGTP, dTTP ชนิดละ 1 ไมโครลิตร ใน RNase-free water 6 ไมโครลิตร) 1 ไมโครลิตร, RNaseOUT™ Ribonuclease Inhibitor (40 หน่วย/ไมโครลิตร) 1 ไมโครลิตร และ SuperScript™ II Reverse Transcriptase (200 หน่วย/ไมโครลิตร) 1 ไมโครลิตร แล้วเติมลงในหลอดปฏิกิริยาลูกลูโซโฟลิมเมอร์สที่ผ่านการดำเนินปฏิกิริยารอบที่ 1 ดำเนินปฏิกิริยารอบที่ 2 ตามสถานะดังนี้ อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส 10 นาที อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 60 นาที อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส 60 นาที อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส 10 นาที และอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จนกว่าจะใช้งานต่อ จากนั้นกำจัด RNA โดยการเติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (HPLC grade) เข้มข้น 1 นอร์มัล 6.67 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เติมสารละลายกรดไฮโดรคลอริก (HPLC grade) เข้มข้น 1 นอร์มัล 6.67 ไมโครลิตร จะได้สารละลาย cDNA เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

เพิ่มจำนวนยีน 16S rDNA ด้วยไพรเมอร์ 341F, 520R และยีน *nidA* ด้วยไพรเมอร์ *nidA*-RTF, *nidA*-RTR (ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์แสดงในตารางที่ 3.1) จาก cDNA ที่สังเคราะห์ได้ด้วยวิธี PCR เกิดผลิตภัณฑ์ขนาด 179 และ 175 bp ตามลำดับ องค์ประกอบของสารต่างๆในปฏิกิริยาแสดงในตารางที่ 3.2 ดำเนินปฏิกิริยาด้วยเครื่องเพิ่มปริมาณ DNA ตามสถานะดังนี้

คู่ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน 16S rDNA (341F และ 520R)

- |                                  |                          |        |
|----------------------------------|--------------------------|--------|
| 1. initial denaturation          | อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส | 5 นาที |
| 2. denaturation                  | อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส | 1 นาที |
| 3. annealing                     | อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส | 1 นาที |
| 4. extension                     | อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส | 1 นาที |
| 5. ทำขั้นตอนที่ 2-4 จำนวน 30 รอบ |                          |        |
| 6. final extension               | อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส | 7 นาที |

คู่ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *nidA* (*nidA*-RTF และ *nidA*-RTR)

- |                                  |                            |           |
|----------------------------------|----------------------------|-----------|
| 1. initial denaturation          | อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส   | 2 นาที    |
| 2. denaturation                  | อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส   | 30 วินาที |
| 3. annealing                     | อุณหภูมิ 67.4 องศาเซลเซียส | 30 วินาที |
| 4. extension                     | อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส   | 30 วินาที |
| 5. ทำขั้นตอนที่ 2-4 จำนวน 30 รอบ |                            |           |
| 6. final extension               | อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส   | 7 นาที    |

จากนั้นตรวจสอบผลิตภัณฑ์ PCR ที่เกิดขึ้นตามวิธีที่ระบุไว้ในข้อ 3.1.3.3

### 3.5.7 ทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายสารผสมของไพรีนและอะลิฟาติก

#### 3.5.7.1 ทดสอบการย่อยสลายสารผสมของไพรีนและอะลิฟาติก

ทดสอบความสามารถในการย่อยสลายอะลิฟาติกและสารผสมของไพรีนและอะลิฟาติกของ *Novosphingobium* sp. PCY ในหลอดทดลองที่บรรจุอาหารเหลว CFMM 4.5 มิลลิลิตร และหัวเชื้อแบคทีเรีย (เตรียมตามวิธีที่ระบุไว้ในข้อ 3.2.1) 0.5 มิลลิลิตร ที่ผ่านการเขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบ/นาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยแบ่งออกเป็น 5 ชุดการทดลองตามชนิดของแหล่งคาร์บอนที่เติมลงไป ได้แก่ 1) ไพรีน ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัม/ลิตร 2) เตตระเดเคน ความเข้มข้น 1,000 มิลลิกรัม/ลิตร 3) เฮกซะเดเคน ความเข้มข้น 1,000 มิลลิกรัม/ลิตร 4) ไพรีนและเตตระเดเคน ความเข้มข้น 100 และ 1,000 มิลลิกรัม/ลิตร ตามลำดับ 5) ไพรีนและเฮกซะเดเคน ความเข้มข้น 100 และ 1,000 มิลลิกรัม/ลิตร ตามลำดับ ทำการทดลอง 3 ซ้ำ บ่มในเครื่องเขย่า ความเร็ว 200 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 และ 20 วัน

#### 3.5.7.2 สกัดไพรีนและอะลิฟาติกที่เหลืออยู่ในอาหารเหลวด้วยเฮกเซน

สกัดไพรีนและอะลิฟาติกที่เหลืออยู่ในอาหารเหลวเมื่อครบกำหนดเวลาบ่ม ตามวิธีของ Nopcharoenkul และคณะ (2013) โดยเติมเฮกเซน 5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องปั่นผสม เป็นเวลา 2 นาที แช่เย็นที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3-4 ชั่วโมง แยกส่วนเฮกเซน (สารชั้นบน) เก็บไว้ในหลอดทดลองอันใหม่ แล้วสกัดอาหารเหลวด้วยเฮกเซนซ้ำอีก 1 ครั้ง รวมส่วนเฮกเซนที่ได้ เติมโซเดียมซัลเฟตที่ผ่านการอบข้ามคืนที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส ปั่นผสมเพื่อให้โซเดียมซัลเฟตกำจัดน้ำที่เหลืออยู่ในส่วนเฮกเซน ย้ายส่วนเฮกเซนที่ผ่านการกำจัดน้ำไปยังหลอดทดลองอันใหม่ ระเหยแห้งด้วยเครื่องระเหยแห้งสุญญากาศแบบหมุน จากนั้นเติมเฮกเซน 1 มิลลิลิตร ปั่นผสม เป็นเวลา 1 นาที กรองสารละลายที่ได้ผ่านชุดกรองสำเร็จรูปชนิด PTFE ที่มีขนาดรูกรอง 0.20 ไมโครเมตร ลงในขวดสำหรับวิเคราะห์ GC-FID เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะวิเคราะห์

#### 3.5.7.3 วิเคราะห์ปริมาณไพรีนและอะลิฟาติกที่เหลืออยู่ในอาหารเหลวด้วย GC-FID

วิเคราะห์ปริมาณไพรีนและอะลิฟาติกที่เหลืออยู่ในอาหารเหลวด้วยเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี (GC-FID) ตามวิธีของ Nopcharoenkul และคณะ (2013) ซึ่งมีสถานะต่างๆในระบบดังนี้

คอลัมน์ HP-5	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.32 มิลลิเมตร ยาว 30 เมตร ภายในเคลือบด้วยเฟนนิลเมทิลไซโลเซน 5 เปอร์เซ็นต์ หนา 0.25 ไมโครเมตร
อุณหภูมิคอลัมน์	เริ่มต้น 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที จนถึง 320 องศาเซลเซียส ด้วยอัตรา 10 องศาเซลเซียส/นาที
แก๊สตัวพา	ฮีเลียม
อัตราเร็วของแก๊สตัวพา	1.7 มิลลิลิตร/นาที
อุณหภูมิเครื่องตรวจจับ FID	320 องศาเซลเซียส
โหมด	splitless
ปริมาณสารที่ฉีดวิเคราะห์	0.5 ไมโครลิตร

นำพื้นที่ใต้กราฟ (peak area) ที่ได้จากการวิเคราะห์ตัวอย่างไปคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การ  
ย่อยสลายไฟรินหรืออะลิฟาติกเปรียบเทียบกับชุดควบคุม ดังสมการด้านล่าง

$$\text{เปอร์เซ็นต์การย่อยสลายสาร} = \frac{\text{พื้นที่ใต้กราฟของชุดควบคุม} - \text{พื้นที่ใต้กราฟของตัวอย่าง}}{\text{พื้นที่ใต้กราฟของชุดควบคุม}} \times 100$$

### 3.5.8 ตรวจหาอินทรีย์ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายอะลิฟาติกด้วยวิธี PCR

เลี้ยง *Novosphingobium* sp. PCY ในขวดรูปชมพู่ที่บรรจุอาหารเหลว CFMM ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ที่มีสารผสมของเตตระเดเคนและเฮกซะเดเคน ความเข้มข้นชนิดละ 1,000 มิลลิกรัม/ลิตร เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 วัน จากนั้นสกัด DNA ตามวิธีที่ระบุไว้ในข้อ 3.1.3.1 แล้วตรวจหาอินทรีย์ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายอะลิฟาติกของ *Novosphingobium* sp. PCY ด้วยวิธี PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีนอัลเคนโมนอกซิจีเนส (alkane monooxygenase; *alkB*) ยีนอัลเคนไฮดรอกซิเลส (alkane hydroxylase; *alkM*) ยีนโมนอกซิจีเนส (flavin-binding monooxygenase; *almA*) ยีน P450 ไซโตโครมโมนอกซิจีเนส (P450 cytochrome monooxygenase; CYP153) ขนาดของผลิตภัณฑ์ PCR และลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์แสดงในตารางที่ 3.1 องค์ประกอบของสารต่างๆในปฏิกิริยาแสดงในตารางที่ 3.2 และดำเนินปฏิกิริยาตามสภาวะดังนี้

ไพรเมอร์ Alk-1F, Alk-1R และ Alk2F, Alk-2R และ Alk3F, Alk-3R

1. initial denaturation	อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส	5 นาที
2. denaturation	อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส	1 นาที
3. annealing	อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส	30 วินาที
4. extension	อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส	30 วินาที
5. ทำขั้นตอนที่ 2-4 จำนวน 30 รอบ		
6. final extension	อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส	5 นาที

ไพรเมอร์ AlkB-1F, AlkB-1R

1. initial denaturation	อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส	5 นาที
2. denaturation	อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส	30 วินาที

3. annealing	อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส	30 วินาที
4. extension	อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส	1 นาที
5. ทำขั้นตอนที่ 2-4 จำนวน 35 รอบ		
6. final extension	อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส	5 นาที
คู่มือ AlkB-1F, AlkB-1R และ AlkB-2F, AlkB-2R		
1. initial denaturation	อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส	5 นาที
2. denaturation	อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส	1 นาที
3. annealing	อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส	1 นาที
4. extension	อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส	1 นาที
5. ทำขั้นตอนที่ 2-4 จำนวน 30 รอบ		
6. final extension	อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส	3 นาที
คู่มือ AlmAwf, AlmAwr		
1. initial denaturation	อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส	5 นาที
2. denaturation	อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส	30 วินาที
3. annealing	อุณหภูมิ 52 องศาเซลเซียส	30 วินาที
4. extension	อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส	1 นาที
5. ทำขั้นตอนที่ 2-4 จำนวน 30 รอบ		
6. final extension	อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส	7 นาที
คู่มือ CYP153F1, CYP153R2		
1. initial denaturation	อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส	5 นาที
2. denaturation	อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส	45 วินาที
3. annealing	อุณหภูมิ 54 องศาเซลเซียส	30 วินาที
4. extension	อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส	1 นาที
5. ทำขั้นตอนที่ 2-4 จำนวน 35 รอบ		
6. final extension	อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส	10 นาที
คู่มือ P450F, P450R		
1. initial denaturation	อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส	4 นาที
2. denaturation	อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส	30 วินาที
3. annealing	อุณหภูมิ 52 องศาเซลเซียส	30 วินาที
4. extension	อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส	1 นาที
5. ทำขั้นตอนที่ 2-4 จำนวน 32 รอบ		
6. final extension	อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส	10 นาที
คู่มือ P450fw, P450rv		
1. initial denaturation	อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส	4 นาที
2. denaturation	อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส	45 วินาที
3. annealing	อุณหภูมิ 58 องศาเซลเซียส	1 นาที

4. extension อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส 1 นาที  
 5. ทำขั้นตอนที่ 2-4 จำนวน 25 รอบ  
 6. final extension อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส 5 นาที

จากนั้นตรวจสอบผลิตภัณฑ์ PCR ที่เกิดขึ้นตามวิธีที่ระบุไว้ในข้อ 3.1.3.3 และวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลิตภัณฑ์ PCR ตามวิธีที่ระบุไว้ในข้อ 3.1.3.4-3.1.3.8 ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลิตภัณฑ์ PCR จะนำไปเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์กับข้อมูลที่มีในฐานข้อมูล GenBank โดยใช้โปรแกรม BLASTx (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)

### 3.6 พัฒนาแบคทีเรียพร้อมใช้รูปแบบอัดเม็ดจาก *Novosphingobium* sp. PCY

#### 3.6.1 ผลิตแบคทีเรียอัดเม็ด

ผลิตแบคทีเรียอัดเม็ด (ดัดแปลงจาก Cheunbarn และคณะ, 2008) โดยบดวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรที่ใช้เป็นองค์ประกอบในการอัดเม็ดและร่อนผ่านตะแกรงให้มีความละเอียดเท่าๆกัน ผสมกับแป้งข้าวเหนียวในอัตราส่วนที่เหมาะสม เติมนโซเดียมเบนโซเอต 0.1 เปอร์เซ็นต์ และเติมหัวเชื้อแบคทีเรีย (เตรียมตามวิธีที่ระบุไว้ในข้อ 3.2.1) ที่มีค่า OD<sub>600</sub> ประมาณ 10 ในสัดส่วนที่เท่ากับวัสดุที่เป็นองค์ประกอบทั้งหมด (วัสดุอัดเม็ด 100 กรัม จะเติมหัวเชื้อแบคทีเรีย 100 มิลลิลิตร) ผสมให้เข้ากันดี อัดส่วนผสมทั้งหมดลงในเครื่องอัดเม็ด (รูปที่ 3.1) โดยกำหนดให้มีเส้นผ่านศูนย์กลางของเม็ดประมาณ 1 ซม. และความยาวของเม็ดประมาณ 1 ซม. ทำให้แห้งสนิทที่อุณหภูมิห้องประมาณ 2-3 วัน



รูปที่ 3.1 เครื่องอัดเม็ด

#### 3.6.2 คัดเลือกวัสดุที่ใช้เป็นองค์ประกอบในการผลิตแบคทีเรียอัดเม็ด

วัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร (รูปที่ 3.2) ได้แก่ กากถั่วเหลือง (soybean meal; SM) ชั่งข้าวโพด (corn cob; CC) และแกลบ (rice husk; RH) ถูกเลือกมาทดสอบการผลิตแบคทีเรียอัดเม็ดตามวิธีที่ระบุไว้ในข้อ 3.6.1 (แต่ไม่เติมแบคทีเรีย) โดยแปรผันชนิดและปริมาณของวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรต่อปริมาณแป้งข้าวเหนียวในอัตราส่วน 1:3, 1:1 และ 3:1 สังเกตความแข็งแรงของวัสดุ

อัดเม็ดที่ผลิตได้ แล้วเลือกชนิดและอัตราส่วนของวัสดุทางการเกษตรมา 4 สูตร ที่ทำให้วัสดุอัดเม็ดมีความแข็งแรง สำหรับใช้ในการศึกษาข้อ 3.6.3 ต่อไป



SM: soybean meal  
CC: corncob  
RH: rice husk  
SF: sticky rice flour

รูปที่ 3.2 วัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรที่นำมาทดสอบการผลิตแบคทีเรียอัดเม็ด

### 3.6.3 ทดสอบประสิทธิภาพการกำจัดไฟรีนในอาหารเหลวของแบคทีเรียอัดเม็ด

#### 3.6.3.1 ทดสอบการกำจัดไฟรีนในอาหารเหลวของแบคทีเรียอัดเม็ด

ทดสอบความสามารถในการกำจัดไฟรีนความเข้มข้น 100 มิลลิกรัม/ลิตร ของแบคทีเรียอัดเม็ดในขูดรูปขมพูที่บรรจุอาหารเหลว CFMM 50 มิลลิลิตร เติมแบคทีเรียอัดเม็ด (ตามวิธีที่ระบุไว้ในข้อ 3.6.1 โดยใช้วัสดุทางการเกษตรที่คัดเลือกจากข้อ 3.6.2) 5 กรัม ทำการทดลอง 3 ซ้ำ ควบคู่กับชุดควบคุมอาหารเหลว CFMM ที่เติมไฟรีน ชุดควบคุมอาหารเหลว CFMM ที่เติมไฟรีนและวัสดุอัดเม็ด และชุดควบคุมอาหารเหลว CFMM ที่เติมไฟรีนและวัสดุอัดเม็ดปราศจากเชื้อ บ่มในเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน แล้วเลือกแบคทีเรียอัดเม็ดมา 1 สูตร ที่มีประสิทธิภาพในการกำจัดไฟรีนสูงสุด สำหรับใช้ในการศึกษาข้อ 3.6.4 ต่อไป

#### 3.6.3.2 สกัดไฟรีนที่เหลืออยู่ในอาหารเหลวด้วยเอทิลอะซิเตท

สกัดไฟรีนที่เหลืออยู่ในอาหารเหลวเมื่อครบกำหนดเวลาบ่ม (ดัดแปลงจาก Klankeo และคณะ, 2009) โดยเติมกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น เพื่อปรับความเป็นกรด-ด่างของอาหารเหลวให้มีค่าประมาณ 2.0-3.0 เติมเอทิลอะซิเตท 30 มิลลิลิตร เขย่าด้วยความเร็วรอบ 200 รอบ/นาที เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ตั้งทิ้งไว้ให้แยกชั้น แยกส่วนเอทิลอะซิเตท (สารชั้นบน) มาเก็บไว้ในหลอดทดลอง เติมโซเดียมซัลเฟตที่ผ่านการอบข้ามคืนที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส ปั่นผสมเพื่อให้โซเดียมซัลเฟตกำจัดน้ำที่เหลืออยู่ในส่วนเอทิลอะซิเตท ย้ายส่วนเอทิลอะซิเตทที่ผ่านการกำจัดน้ำไปยังหลอดทดลองอันใหม่ ระเหยแห้งด้วยเครื่องระเหยแห้งสุญญากาศแบบหมุน จากนั้นเติมเฮกเซน 1 มิลลิลิตร ปั่นผสมเป็นเวลา 1 นาที กรองสารละลายที่ได้ผ่านชุดกรองสำเร็จรูปชนิด PTFE ที่มีขนาดรูกรอง 0.20 ไมโครเมตร ลงในขวดสำหรับวิเคราะห์ GC-FID เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะวิเคราะห์

### 3.6.3.3 วิเคราะห์ปริมาณไพรีนที่เหลืออยู่ในอาหารเหลวด้วย GC-FID

วิเคราะห์ปริมาณไพรีนที่เหลืออยู่ในอาหารเหลวด้วยเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี (GC-FID) ตามวิธีของ Nopcharoenkul และคณะ (2011) ซึ่งมีสภาวะต่างๆในระบบดังนี้

คอลัมน์ HP-5	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.32 มิลลิเมตร ยาว 30 เมตร ภายในเคลือบด้วยเฟนิลเมทิลไซโลเซน 5 เปอร์เซ็นต์ หนา 0.25 ไมโครเมตร
อุณหภูมิคอลัมน์	เริ่มต้น 80 องศาเซลเซียส เพิ่มด้วยอัตรา 25 องศา เซลเซียส/นาที จนถึง 160 องศาเซลเซียส หยุดเป็นเวลา 3 นาที เพิ่มด้วยอัตรา 3 องศาเซลเซียส/นาที จนถึง 220 องศาเซลเซียส หยุดเป็นเวลา 2 นาที และเพิ่มด้วยอัตรา 40 องศาเซลเซียส/นาที จนถึง 300 องศาเซลเซียส หยุด เป็นเวลา 7 นาที
แก๊สตัวพา	ฮีเลียม
อัตราเร็วของแก๊สตัวพา	1.7 มิลลิลิตร/นาที
อุณหภูมิเครื่องตรวจจับ FID	320 องศาเซลเซียส
โหมด	splitless
ปริมาณสารที่ฉีดวิเคราะห์	0.5 ไมโครลิตร
นำพื้นที่ใต้กราฟ (peak area) ที่ได้จากการวิเคราะห์ตัวอย่างไปคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การ	

กำจัดไพรีน ดังสมการด้านล่าง

$$\text{เปอร์เซ็นต์การกำจัดไพรีน} = 100 - \frac{(\text{พื้นที่ใต้กราฟของชุดทดลอง ณ วันที่ใดๆ} \times 100)}{\text{พื้นที่ใต้กราฟของชุดทดลอง ณ วันที่ 0}}$$

### 3.6.4 คัดเลือกสารปกป้องเซลล์ที่ใช้ในการผลิตแบคทีเรียอัดเม็ด

#### 3.6.4.1 แปรผันชนิดและความเข้มข้นของสารปกป้องเซลล์ในการผลิตแบคทีเรียอัดเม็ด

สารปกป้องเซลล์ ได้แก่ กลูโคส ซูโครส ทรีฮาโลส กลีเซอรอล และนมผงขาดมันเนย ที่ความเข้มข้น 5 และ 10 เปอร์เซ็นต์ ถูกเลือกมาทดสอบเพื่อส่งเสริมการอยู่รอดของ *Novosphingobium* sp. PCY ในการผลิตแบคทีเรียอัดเม็ด (ตามวิธีที่ระบุไว้ในข้อ 3.6.1 โดยใช้วัสดุทางการเกษตรที่คัดเลือกจากข้อ 3.6.3) เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 สัปดาห์ เก็บตัวอย่างทุกๆ สัปดาห์มาตรวจนับจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดและแบคทีเรียย่อยสลายไพรีนด้วยวิธี MPN แล้วคัดเลือกสารปกป้องเซลล์ชนิดที่ทำให้แบคทีเรียอัดเม็ดมีจำนวนแบคทีเรียรอดชีวิตสูง สำหรับใช้ในการศึกษาข้อ 3.6.5 ต่อไป

#### 3.6.4.2 ตรวจนับจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดด้วยวิธี MPN

ชั่งแบคทีเรียอัดเม็ด 1 กรัม ใส่ในหลอดทดลองที่บรรจุอาหารเหลว LB 9 มิลลิลิตร ผสมให้แบคทีเรียอัดเม็ดแตกตัวและแขวนลอยอย่างทั่วถึงด้วยเครื่องปั่นผสม ตั้งทิ้งไว้ให้วัสดุทางการเกษตรตกตะกอน คูดสารแขวนลอยส่วนบนไปตรวจนับจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดด้วยวิธี MPN ตามวิธีที่ระบุ



ไว้ในข้อ 3.2.2 จำนวนจำนวนแบคทีเรียเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่ได้เติมตัวอย่างที่ต้องการตรวจสอบจากตาราง MPN ชนิด 3 หลอด (Sutton, 2010)

### 3.6.4.3 ตรวจนับจำนวนแบคทีเรียย่อยสลายไขมันด้วยวิธี MPN

ซึ่งแบคทีเรียอัดเม็ด 1 กรัม ใส่ในหลอดทดลองที่บรรจุอาหารเหลว CFMM 9 มิลลิลิตร ผสมให้แบคทีเรียอัดเม็ดแตกตัวและแขวนลอยอย่างทั่วถึงด้วยเครื่องปั่นผสม ตั้งทิ้งไว้ให้วัสดุทางการเกษตรตกตะกอน ดูดสารแขวนลอยส่วนบนไปตรวจนับจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดด้วยวิธี MPN

ตรวจสอบการเจริญของแบคทีเรียด้วยวิธี MPN (ดัดแปลงจาก Johnsen และ Henriksen, 2009) ในไมโครเพลทชนิด 96 หลุม โดยเติมสารละลายไขมันในเฮกเซน ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร (ภาคผนวก ข) หลุมละ 10 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ให้เฮกเซนระเหยจนหมด เติมหาอาหารเหลว CFMM ลงในไมโครเพลทหลุมละ 180 ไมโครลิตร เติมตัวอย่างที่ต้องการตรวจสอบหลุมละ 20 ไมโครลิตร แล้วเจือจางตัวอย่างที่ต้องการตรวจสอบอย่างเป็นลำดับ ทำการทดลอง 3 ซ้ำ บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 วัน เติมหาสารละลายไอโอดีนไนโตรเตตระโซเลียมคลอไรด์ (INT) (ภาคผนวก ข) หลุมละ 10 ไมโครลิตร วัดค่า OD<sub>450</sub> เริ่มต้นของไมโครเพลทด้วยเครื่องไมโครเพลทรีดเดอร์ บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 วัน วัดค่า OD<sub>450</sub> สุดท้ายของไมโครเพลท จำนวนจำนวนแบคทีเรียจากความต่างของค่า OD<sub>450</sub> เทียบจากตาราง MPN ชนิด 3 หลอด (Sutton, 2010)

### 3.6.5 ทดสอบสถานะการเก็บรักษาแบคทีเรียอัดเม็ดในระยะยาว

ผลิตแบคทีเรียอัดเม็ด (ตามวิธีที่ระบุไว้ในข้อ 3.6.1 โดยใช้วัสดุทางการเกษตรที่คัดเลือกจากข้อ 3.6.3 และสารปกป้องเซลล์ที่คัดเลือกจากข้อ 3.6.4) แบ่งเก็บรักษาในถุงพลาสติกสภาพะมีและไม่มียาอากาศ ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสและอุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 12 สัปดาห์ เก็บตัวอย่างสัปดาห์ที่ 0, 1, 2, 4, 6, 8, 10 และ 12 มาตรวจนับจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดด้วยวิธี MPN (ตามวิธีที่ระบุไว้ในข้อ 3.6.4.2) จำนวนแบคทีเรียย่อยสลายไขมันด้วยวิธี MPN (ตามวิธีที่ระบุไว้ในข้อ 3.6.4.3) และทดสอบประสิทธิภาพการกำจัดไขมันในอาหารเหลว (ตามวิธีที่ระบุไว้ในข้อ 3.6.3) ทำการทดลอง 3 ซ้ำ เปรียบเทียบกับชุดควบคุมอาหารเหลว CFMM ที่เติมไขมันและวัสดุอัดเม็ด

## 3.7 ประยุกต์ใช้แบคทีเรียอัดเม็ดในการบำบัดดินปนเปื้อนไขมัน

### 3.7.1 บำบัดดินปนเปื้อนไขมันในระบบนิเวศจำลองดิน

#### 3.7.1.1 เก็บตัวอย่างดินไม่ปนเปื้อนน้ำมัน

เก็บตัวอย่างดินไม่ปนเปื้อนน้ำมัน ตามวิธีที่ระบุไว้ในข้อ 3.1.1 โดยตรวจสอบการปนเปื้อนน้ำมัน ณ สถานที่เก็บตัวอย่างด้วย SOA-OIL Kit ตามวิธีที่ระบุในคู่มือ (อุปกรณ์และสารเคมีทั้งหมดให้มาในชุด Kit) โดยร่อนและชั่งตัวอย่างดิน 0.95-1.04 กรัม ลงในชุดกรองกระบอกฉีดยา F1 ดูดสารละลาย R1 (เติมเอทานอลแล้ว) 12 มิลลิลิตร ด้วยกระบอกฉีดยาอีกอันหนึ่ง แล้วค่อยๆหยดสารละลาย R1 ลงในชุดกรอง F1 ทีละหยด รองรับสารละลาย R1 ที่ไหลผ่านตัวอย่างดินด้วยขวดพลาสติก เติมหาสารละลาย R2 (สารละลายพอลิเมอร์ที่จะจับกับน้ำมัน) 25 มิลลิลิตร ลงไปในขวดพลาสติก เขย่าแรงๆเป็นเวลาอย่างน้อย 20 วินาที ตั้งทิ้งไว้จนสารละลายในขวดใส น้ำมันจะจับกับพอลิเมอร์และเกาะอยู่ข้างขวด เทส่วนใสทิ้ง แล้วเติมหาสารละลาย R3 8 มิลลิลิตร เขย่าเพื่อล้างคราบน้ำมัน

ที่เกาะอยู่ข้างขวด ตั้งทิ้งไว้ให้ฟองอากาศหายไป จากนั้นวัดค่าการดูดกลืนแสงโดยใช้สารละลาย R3 เป็น blank ค่าที่ออกมาคือปริมาณน้ำมันในตัวอย่างดิน มีหน่วยเป็นมิลลิกรัม/กิโลกรัมของดินเปียก ซึ่ง SOA-OIL Kit สามารถวัดปริมาณน้ำมันที่ปนเปื้อนในดินได้ระหว่าง 400-5,000 มิลลิกรัม/กิโลกรัมของดินเปียก

### 3.7.1.2 วิเคราะห์สมบัติทางกายภาพและเคมีของตัวอย่างดิน

ส่งวิเคราะห์สมบัติทางกายภาพและเคมีของตัวอย่างดินที่กลุ่มงานพัฒนาระบบตรวจสอบคุณภาพดินและน้ำ กลุ่มวิจัยเกษตรเคมี สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร กรมวิชาการเกษตร (ภายในมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์) เขตจตุจักร กรุงเทพฯ โดยวิเคราะห์สมบัติทางกายภาพ ได้แก่ ลักษณะเนื้อดิน และสมบัติทางเคมี ได้แก่ ค่าความเป็นกรดด่าง (pH) สภาพการนำไฟฟ้า (electrical conductivity; EC) สารอินทรีย์ (organic matter; OM) ปริมาณความชื้น ความสามารถในการแลกเปลี่ยนประจุหรือไอออน (cation exchange capacity; CEC) ความจุสูงสุดในการอุ้มน้ำ (water holding capacity) อินทรีย์คาร์บอน ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส โพแทสเซียม แคลเซียม และแมกนีเซียม

### 3.7.1.3 สร้างระบบนิเวศจำลองดิน (microcosm)

ชั่งตัวอย่างดิน 50 กรัม ใส่ขวดแก้วฝาเกลียว จำนวน 18 ขวด แบ่งออกเป็น 6 ชุดการทดลอง ชุดละ 3 ขวด ดังตารางที่ 3.3 ینگฆ่าเชื้อชุดการทดลอง A ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส 30 นาที จำนวน 1 ครั้ง/วัน เป็นเวลา 3 วัน จากนั้นเติมไพรินที่ละลายในอะซิโตนความเข้มข้นสุดท้าย 300 มิลลิกรัม/กิโลกรัมของดิน ตั้งทิ้งไว้ให้อะซิโตนระเหยเป็นเวลา 1 วัน ปรับปริมาณสารอาหารให้มีอัตราส่วนคาร์บอน:ไนโตรเจน:ฟอสฟอรัสเท่ากับ 100:10:1 โดยเติมแอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจนและเติมไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟตเป็นแหล่งฟอสฟอรัส และปรับความจุสูงสุดในการอุ้มน้ำเป็น 60 เปอร์เซ็นต์ กวนผสมสารทั้งหมดให้เข้ากัน ชั่งน้ำหนักเริ่มต้นของทุกชุดการทดลองไว้ บ่มในที่มืด ณ อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 20 วัน รักษาความชื้นของแต่ละชุดทดลองทุก 10 วัน โดยการปรับจากน้ำหนักที่หายไปเมื่อเทียบกับน้ำหนักเริ่มต้นด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ เก็บตัวอย่างวันที่ 0, 10 และ 20 มาวิเคราะห์ปริมาณไพรินที่ลดลงด้วย GC-FID ตรวจนับจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดและแบคทีเรียย่อยสลายไพรินด้วยวิธี MPN (ยกเว้นชุดการทดลอง A) ตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงประชาคมแบคทีเรียด้วยวิธี DGGE (ยกเว้นชุดการทดลอง A) และตรวจติดตามยีน 16S rDNA และยีน *nidA* ด้วยเทคนิค real-time PCR (ยกเว้นชุดการทดลอง A)

ตารางที่ 3.3 ระบบนิเวศจำลองดินสำหรับการบำบัดดินปนเปื้อนไพรินด้วยแบคทีเรียอัดเม็ด

ชุดการทดลอง	ดิน	ไพริน	วัสดุอัดเม็ด (GM)	แบคทีเรียอัดเม็ด (GB)
A Abiotic	ฆ่าเชื้อ	เต็ม	-	-
B Natural attenuation	ไม่ฆ่าเชื้อ	เต็ม	-	-
C 10% GM addition	ไม่ฆ่าเชื้อ	เต็ม	เต็ม 10%	-
D 5% GB addition	ไม่ฆ่าเชื้อ	เต็ม	-	เต็ม 5%
E 10% GB addition	ไม่ฆ่าเชื้อ	เต็ม	-	เต็ม 10%
F 15% GB addition	ไม่ฆ่าเชื้อ	เต็ม	-	เต็ม 15%

### 3.7.2 ตรวจสอบปริมาณไฟรินที่เหลืออยู่ในดิน

#### 3.7.2.1 สกัดไฟรินที่เหลืออยู่ในดินด้วยเฮกเซน

สกัดไฟรินที่เหลืออยู่ในดินตามวิธีของ Nopcharoenkul และคณะ (2011) โดยชั่งตัวอย่างดิน 2 กรัม เติมเฮกเซน 4 มิลลิลิตร และ TritonX-100 ความเข้มข้น 15 เปอร์เซ็นต์ (ภาคผนวก ข) 1.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องปั่นผสมเป็นเวลา 2 นาที เขย่าด้วยความเร็วรอบ 200 รอบ/นาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แช่แข็งที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ดูดส่วนเฮกเซนใส่ในหลอดทดลองอันใหม่ เติมโซเดียมซัลเฟตที่ผ่านการอบข้ามคืนที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส ปั่นผสมเพื่อให้โซเดียมซัลเฟตกำจัดน้ำที่เหลืออยู่ในส่วนเฮกเซน ย้ายส่วนเฮกเซนที่ผ่านการกำจัดน้ำไปยังหลอดทดลองอันใหม่ ระเหยแห้งด้วยเครื่องระเหยแห้งสุญญากาศแบบหมุน จากนั้นเติมเฮกเซน 1 มิลลิลิตร ปั่นผสมเป็นเวลา 1 นาที กรองสารละลายที่ได้ผ่านชุดกรองสำเร็จรูปชนิด PTFE ที่มีขนาดรูกรอง 0.20 ไมโครเมตร ลงในขวดสำหรับวิเคราะห์ GC-FID เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะวิเคราะห์

#### 3.7.2.2 วิเคราะห์ปริมาณไฟรินที่เหลืออยู่ในดินด้วย GC-FID

วิเคราะห์ปริมาณไฟรินที่เหลืออยู่ในดินด้วยเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี (GC-FID) ตามวิธีที่ระบุไว้ในข้อ 3.6.3.3 (Nopcharoenkul และคณะ, 2011)

#### 3.7.3 ตรวจสอบจำนวนแบคทีเรียในดินด้วยวิธี MPN

ตรวจสอบจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดและจำนวนแบคทีเรียย่อยสลายไฟรินในระบบนิเวศจำลองดิน ตามวิธีที่ระบุไว้ในข้อ 3.6.4.2 และข้อ 3.6.4.3 ตามลำดับ

#### 3.7.4 ตรวจสอบติดตามการเปลี่ยนแปลงประชาคมแบคทีเรียในดินด้วยวิธี DGGE

##### 3.7.4.1 สกัด DNA ทั้งหมดของดิน

สกัด DNA ทั้งหมดของดินด้วย FastDNA<sup>®</sup> Spin Kit for Soil ตามวิธีที่ระบุในคู่มือ โดยชั่งตัวอย่างดิน 0.5 กรัม ใส่ใน lysing matrix E tube เติม sodium phosphate buffer 978 ไมโครลิตร และ MT buffer 122 ไมโครลิตร ปั่นผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน นำไป freeze-thaw เป็นจำนวน 3 รอบ โดยแช่แข็งที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3-5 นาที จากนั้นปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 15 นาที ย้ายส่วนน้ำใสไปยังหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ เติม protein precipitation solution (PPS) 250 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยการกลับหลอดไปมาประมาณ 10 ครั้ง ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 5 นาที ย้ายส่วนน้ำใสไปยังหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์อันใหม่ เติม binding matrix suspension ในปริมาตรที่เท่ากับปริมาตรของสารละลายสุดท้าย ผสมให้เข้ากันโดยการกลับหลอดไปมาประมาณ 2 นาที ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 นาที ดูดส่วนใสทิ้งไป 500 ไมโครลิตร แล้วผสมส่วนใสกับ binding matrix ที่เหลือในหลอดอีกครั้งก่อนย้ายสารผสมดังกล่าว 600 ไมโครลิตร ไปยัง Spin<sup>™</sup> Filter ที่อยู่ใน catch tube ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 1 นาที เติม SEWS-M (เติมเอทานอลแล้ว) 500 ไมโครลิตร ผสมโดยการปิเปตต์ขึ้นลงช้าๆ ปั่นเหวี่ยงด้วยสถานะเดิม เทส่วนใสทิ้ง ปั่นเหวี่ยงอีกครั้งด้วยความเร็ว 13,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 2 นาที เพื่อกำจัดเอทานอล ย้าย Spin<sup>™</sup> Filter ไปไว้ใน catch tube อันใหม่ ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที เติม DNase/pyrogen-free water (DES) 100 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส

เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 1 นาที ย้ายสารละลาย DNA ที่ได้ไปยังหลอดไมโครเซนตริฟิวจันใหม่ เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

### 3.7.4.2 ตรวจสอบความบริสุทธิ์ในดินด้วยวิธี PCR-DGGE

เพิ่มจำนวน DNA (ที่สกัดได้จากข้อ 3.7.4.1) บริเวณ 16S rDNA ด้วยวิธี PCR โดยใช้ไพรเมอร์ 341F-GC และ 520R (ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์แสดงในตารางที่ 3.1) เกิดผลิตภัณฑ์ PCR ขนาด 179 bp องค์ประกอบของสารต่างๆในปฏิกิริยามาจาก GoTaq® qPCR Master Mix (ตามวิธีที่ระบุในคู่มือ) ประกอบด้วย nuclease-free water 12 ไมโครลิตร GoTaq® qPCR master mix (ความเข้มข้น 2 เท่า) 15 ไมโครลิตร ไพรเมอร์ (ความเข้มข้น 20 ไมโครโมลาร์) ชนิดละ 1 ไมโครลิตร และ DNA แม่แบบ (ความเข้มข้นประมาณ 100 นาโนกรัม/ไมโครลิตร) 1 ไมโครลิตร ดำเนินปฏิกิริยาตามสภาวะข้อ 3.5.6.4

**ตารางที่ 3.4** องค์ประกอบของพอลิอะครีลาไมด์เจลที่มี denaturant 50-80 เปอร์เซ็นต์

สาร	ปริมาตรของสาร (มิลลิลิตร)		ความเข้มข้น สุดท้าย
	denaturant 50%	denaturant 80%	
น้ำกลั่นปราศจากเชื้อ	6.5	3.5	-
40% อะครีลาไมด์:บิส (37:1)	3.0	3.0	8%
50 เท่า TAE*	0.3	0.3	1 เท่า
7 โมลาร์ ยูเรีย*	3.1	4.9	แปรผัน
40% ฟอว์มาไมด์*	3.0	4.8	แปรผัน
กลีเซอรอล	0.3	0.3	2%
10% แอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต (APS)*	81 ไมโครลิตร	81 ไมโครลิตร	0.5 กรัม/ลิตร
เตตระเมทิลีนไดอะมีน (TEMED)	5 ไมโครลิตร	5 ไมโครลิตร	-

\* วิธีเตรียมสารตามที่ระบุไว้ในภาคผนวก ข

ตรวจสอบความบริสุทธิ์ด้วยวิธี DGGE (Muangchinda และคณะ, 2013) โดยใช้ชุด DCode™ System เริ่มจากเตรียมพอลิอะครีลาไมด์เจลเข้มข้น 8 เปอร์เซ็นต์ ที่มีความเข้มข้นของ denaturant ได้แก่ ยูเรียและฟอว์มาไมด์ เป็นเกรเดียนท์เท่ากับ 50-80 เปอร์เซ็นต์ (องค์ประกอบของสารที่ใช้ในการเตรียมพอลิอะครีลาไมด์เจล ปริมาตร 32 มิลลิลิตร แสดงในตารางที่ 3.4) ทำพอลิอะครีลาไมด์เจลในชุดแซนวิชเตรียมเจล เสียบหัวลงในระหว่างกระจกแซนวิช ระวังอย่าให้เกิดฟองอากาศ ทิ้งให้พอลิอะครีลาไมด์เจลแข็งตัวที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลาข้ามคืน (หรืออย่างน้อย 2 ชั่วโมง) วางชุดเจลแซนวิชที่ได้ลงในแชมเบอร์ที่มีบัฟเฟอร์ 1X TAE ปริมาตร 7 ลิตร ที่ผ่านการให้ความร้อนจนมีอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส หยอดผลิตภัณฑ์ PCR 25 ไมโครลิตร ที่ผสมกับสีติดตาม 5 ไมโครลิตร ลงในช่องวิ่ง ทำอิเล็กโทรโฟรีซิสที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ความต่างศักย์ 130 โวลต์ เป็นเวลา 270 นาที แล้วนำพอลิอะครีลาไมด์เจลมาขย้อมด้วยสารละลายเอธิเดียมโบรไมด์ เป็นเวลา 20 นาที ตรวจสอบและถ่ายภาพแถบ DNA ด้วยเครื่องถ่ายและวิเคราะห์ภาพเจล ภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ตความยาวคลื่น 312 นาโนเมตร

### 3.7.4.3 สกัด RNA ทั้งหมดของดิน

สกัด RNA ทั้งหมดของดินด้วย FastRNA® Pro Soil-Direct Kit ตามวิธีที่ระบุในคู่มือ โดยชั่งตัวอย่างดิน 0.5-1.0 กรัม ใส่ใน lysing matrix E tube เติม RNApro™ soil lysis solution 1 มิลลิลิตร ปั่นผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 5 นาที ย้ายส่วนน้ำใสไปยังหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ เติมฟีนอล:คลอโรฟอร์ม 750 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องปั่นผสมเป็นเวลา 10 วินาที ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,000 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ย้ายส่วนน้ำใสไปยังหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์อันใหม่ เติม inhibitor removal solution 200 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยการกลับหลอดไปมาประมาณ 5 ครั้ง ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 5 นาที ย้ายส่วนน้ำใสไปยังหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์อันใหม่ (ไม่ต้องเอาฟองอากาศมา) เติมไอโซโพรพานอลที่เย็น 660 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยการกลับหลอดไปมาประมาณ 5 ครั้ง แช่แข็งที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 วัน ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,000 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที เทส่วนใสทิ้ง ล้างตะกอนด้วยเอทานอล 70 เปอร์เซ็นต์ 500 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงด้วยสภาวะเดิมและเทส่วนใสทิ้ง ระบายเอทานอลจนแห้งที่อุณหภูมิห้องประมาณ 5 นาที เติม DEPC-H<sub>2</sub>O 200 ไมโครลิตร เติม RNAMATRIX® binding solution 600 ไมโครลิตร และ RNAMATRIX® slurry 10 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยการกลับหลอดไปมาประมาณ 10 ครั้ง ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 วินาที เทส่วนใสทิ้ง เติม RNAMATRIX® wash solution 500 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงด้วยสภาวะเดิม เทส่วนใสทิ้ง ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที กระจายตะกอน RNA ด้วย DEPC-H<sub>2</sub>O 50 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 นาที ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 วินาที ดูดสารละลายส่วนใสของ RNA ออกมาใส่ไว้ในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์อันใหม่ เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส

ตรวจสอบการปนเปื้อน DNA ของ RNA ที่สกัดได้ด้วยวิธี PCR โดยใช้ไพรเมอร์ 350F และ 520R ตามวิธีที่ระบุไว้ในข้อ 3.7.4.2 แล้วตรวจสอบผลิตภัณฑ์ PCR ตามวิธีที่ระบุไว้ในข้อ 3.1.3.3 หากพบผลิตภัณฑ์ PCR เกิดขึ้น แสดงว่ามีการปนเปื้อน DNA ใน RNA ที่สกัดได้ ซึ่งจะต้องกำจัด DNA ที่ปนเปื้อนโดยใช้เอนไซม์ DNase ต่อไป

### 3.7.4.4 ตรวจสอบประชาคมแบคทีเรียที่มีชีวิตในดินด้วยวิธี RT-PCR-DGGE

เพิ่มจำนวน DNA บริเวณ 16S rDNA จาก RNA (ที่สกัดได้จากข้อ 3.7.4.3) ด้วยวิธี RT-PCR โดยใช้ไพรเมอร์ 341F-GC และ 520R (ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์แสดงในตารางที่ 3.1) เกิดผลิตภัณฑ์ PCR ขนาด 179 bp องค์ประกอบของสารต่างๆในปฏิกิริยามาจาก OneStep RT-PCR Kit (ตามวิธีที่ระบุในคู่มือ) ประกอบด้วย RNase-free water 32 ไมโครลิตร RT-PCR buffer (ความเข้มข้น 5 เท่า) 10 ไมโครลิตร dNTP mix (ความเข้มข้น dNTP ชนิดละ 10 มิลลิโมลาร์) 2 ไมโครลิตร ไพรเมอร์ (ความเข้มข้น 20 ไมโครโมลาร์) ชนิดละ 1.5 ไมโครลิตร RT-PCR enzyme mix 2 ไมโครลิตร และ RNA แม่แบบ (ความเข้มข้นระหว่าง 0.001-2,000 นาโนกรัม/ไมโครลิตร) 1 ไมโครลิตร ดำเนินปฏิกิริยาตามสภาวะดังนี้

- |                          |                          |         |
|--------------------------|--------------------------|---------|
| 1. reverse transcription | อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส | 30 นาที |
| 2. initial denaturation  | อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส | 15 นาที |

- |                                  |                          |         |
|----------------------------------|--------------------------|---------|
| 3. denaturation                  | อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส | 1 นาที  |
| 4. annealing                     | อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส | 1 นาที  |
| 5. extension                     | อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส | 1 นาที  |
| 6. ทำขั้นตอนที่ 3-5 จำนวน 30 รอบ |                          |         |
| 7. final extension               | อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส | 10 นาที |

ตรวจประชาคมแบคทีเรียด้วยวิธี DGGE ตามวิธีที่ระบุไว้ในข้อ 3.7.4.2 แล้วตัดแถบ DNA ที่สนใจไปทำบริสุทธิ์ตามวิธีที่ระบุไว้ในข้อ 3.1.3.4 และส่งวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ตามวิธีที่ระบุไว้ในข้อ 3.1.3.5 ถึง 3.1.3.8

### 3.7.5 ตรวจนับจำนวนยีน 16S rDNA และ *nidA* ในดินด้วยวิธี Real time-PCR

เตรียมกราฟมาตรฐานสำหรับแต่ละยีน โดยใช้รีคอมบิแนนท์พลาสมิดเวกเตอร์ที่มีผลิตภัณฑ์ PCR ของแต่ละยีน (ตามวิธีที่ระบุไว้ในข้อ 3.1.3.4-3.1.3.7) คำนวณความเข้มข้นของรีคอมบิแนนท์พลาสมิดตั้งสมการด้านล่าง แล้วเจือจางด้วยน้ำปลอดประจุปราศจากเชื้อให้มีระดับความเข้มข้น  $10^2$ - $10^{10}$  gene copies number/มิลลิลิตร ใช้รีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่ระดับความเจือจาง  $10^2$ ,  $10^4$ ,  $10^6$ ,  $10^8$  และ  $10^{10}$  มาเป็น DNA แม่แบบในการทำ Real time PCR เพื่อสร้างกราฟมาตรฐานระหว่างค่า cycle threshold (Ct) และ gene copies number/มิลลิลิตร

$$\text{Gene copies number} = \frac{\text{ความเข้มข้นของผลิตภัณฑ์ PCR (g/}\mu\text{l)} \times 6.02 \times 10^{23} \times 10^3}{(\text{copies/มิลลิลิตร}) \times 660 \times \text{ขนาดของรีคอมบิแนนท์พลาสมิด (bp)}}$$

หมายเหตุ 1 bp = 660 กรัม/โมล =  $6.02 \times 10^{23}$  copies/โมล, ขนาดพลาสมิด pGEM<sup>®</sup>-T 3,015 bp

ตรวจนับจำนวนยีนบริเวณ 16S rDNA และยีน *nidA* ด้วยวิธี real time PCR โดยใช้ Luminaris Color HiGreen High ROX qPCR Master Mix ตามวิธีที่ระบุในคู่มือ องค์ประกอบของสารต่างๆในปฏิกิริยาประกอบด้วย nuclease-free water 9.2 ไมโครลิตร Luminaris color higreen high ROX qPCR master mix (ความเข้มข้น 2 เท่า) 12.5 ไมโครลิตร ไพร์เมอร์ (ความเข้มข้น 20 ไมโครโมลาร์) ชนิดละ 0.4 ไมโครลิตร และสารละลาย DNA (DNA แม่แบบ 2 ไมโครลิตร ผสมกับ Yellow sample buffer เข้มข้น 40 เท่า 0.5 ไมโครลิตร) 2.5 ไมโครลิตร โดย DNA แม่แบบคือ DNA ที่สกัดได้จากดินในข้อ 3.7.4.1 ทำควบคู่กับรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่ระดับความเจือจางต่างๆ ดำเนินปฏิกิริยาตามสภาวะดังนี้

- |                                  |  |         |
|----------------------------------|--|---------|
| 1. initial denaturation          | อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส   | 10 นาที |
| 2. denaturation                  | อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส   | 1 นาที  |
| 3. annealing                     | อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส (16S DNA)<br>อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส ( <i>nidA</i> ) | 1 นาที  |
| 4. extension                     | อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส   | 1 นาที  |
| 5. ทำขั้นตอนที่ 2-4 จำนวน 40 รอบ |  |         |
| 6. final extension               | อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส   | 10 นาที |
- คำนวณประสิทธิภาพ (efficiency) ของ real time PCR ดังสมการด้านล่าง

$$\text{ประสิทธิภาพ real time PCR (\%)} = (10^{-1/\text{slope}} - 1) \times 100$$

หมายเหตุ slope ที่อยู่ในช่วง -3.3 ถึง -3.8 โดยค่าที่ดีที่สุดคือ -3.322 (ประสิทธิภาพ 100%)

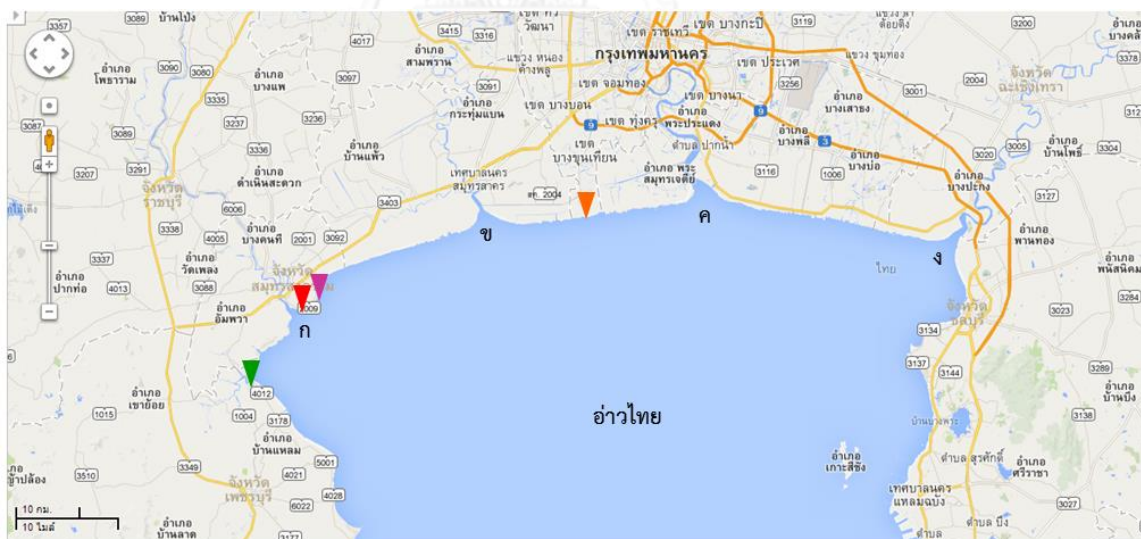
## บทที่ 4

### ความสามารถและยีนที่เกี่ยวข้องในการย่อยสลาย PAHs และการผลิตสารลดแรงตึงผิว ชีวภาพของแบคทีเรียจากดินตะกอนป่าชายเลน

#### 4.1 แบคทีเรียย่อยสลาย PAHs ที่คัดแยกจากดินตะกอนป่าชายเลน

ดินตะกอนป่าชายเลนที่ใช้ในการคัดแยกแบคทีเรียย่อยสลาย PAHs มาจาก 4 แหล่ง (ดังแสดงในรูปที่ 4.1) คือ

- 1) ศูนย์อนุรักษ์และศึกษาระบบนิเวศป่าชายเลน จังหวัดเพชรบุรี เป็นบริเวณที่มีความอุดมสมบูรณ์และไม่มีกิจกรรมที่ทำให้เกิดการปนเปื้อนของปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอน
- 2) แหล่งท่องเที่ยวบางขุนเทียน จังหวัดกรุงเทพมหานคร เป็นแหล่งที่มีกิจกรรมการคมนาคมทางน้ำ การท่องเที่ยวและร้านอาหาร
- 3) แนวป่าชายเลน จังหวัดสมุทรสงคราม เป็นบริเวณที่มีการคมนาคมทางน้ำ
- 4) แหล่งท่องเที่ยวดอนหอยหลอด จังหวัดสมุทรสงคราม เป็นแหล่งที่มีกิจกรรมการคมนาคมทางน้ำ การประมง การท่องเที่ยวและร้านอาหาร อีกทั้งบริเวณที่เก็บตัวอย่างยังพบคราบน้ำมันปริมาณมาก



▼ ศูนย์อนุรักษ์และศึกษาระบบนิเวศป่าชายเลน เพชรบุรี ▼ ดอนหอยหลอด และ ▼ แนวป่าชายเลน สมุทรสงคราม ▼ บางขุนเทียน กทม.  
ก: ปากแม่น้ำแม่กลอง; ข: ปากแม่น้ำท่าจีน; ค: ปากแม่น้ำเจ้าพระยา; ง: ปากแม่น้ำบางปะกง

#### รูปที่ 4.1 แผนที่บริเวณเก็บตัวอย่างดินตะกอนป่าชายเลน อ่าวไทย ประเทศไทย

จากแผนที่พบว่าแหล่งที่เก็บตัวอย่างทั้งหมดอยู่ในบริเวณอ่าวไทยตอนบน ซึ่งเป็นแหล่งรองรับน้ำจืดจากแม่น้ำสายหลักทั้ง 4 สาย ได้แก่ แม่กลอง ท่าจีน เจ้าพระยา และบางปะกง ที่มีความสำคัญต่อการดำรงชีวิต เศรษฐกิจ และการคมนาคมของประเทศไทย นอกจากนี้รายงานการ

ปนเปื้อนปิโตรเลียมบริเวณอ่าวไทยของ Wattayakorn (2012) พบว่าตั้งแต่ปี 1986 จนถึงปัจจุบัน เกิดอุบัติเหตุน้ำมันรั่วเพิ่มมากขึ้นในบริเวณอ่าวไทย ส่วนใหญ่เป็นน้ำมันเชื้อเพลิง น้ำมันดีเซล และน้ำมันดิบ ทำให้มีแนวโน้มการปนเปื้อนปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนสูงขึ้น โดยมีปริมาณ PAHs ทั้งหมดที่พบบริเวณปากแม่น้ำเจ้าพระยาและท่าจีนประมาณ 192-1,710 (693±447) นาโนกรัม/ลิตรของน้ำ และ 260-4,710 (1,530±1,730) นาโนกรัม/กรัมของดินตะกอน ปริมาณ PAHs ที่พบในประเทศไทย นั้นอยู่ในช่วงต่ำถึงปานกลางเมื่อเปรียบเทียบกับประเทศอื่นๆแถบเอเชียและทั่วโลก อีกทั้งยังพบว่า บริเวณผิวดินตะกอนจะมีปริมาณ PAHs ทั้งหมดปนเปื้อนสูงกว่าบริเวณที่ลึกลงไป ดังนั้นในการเก็บตัวอย่างดินตะกอนป่าชายเลนเพื่อการคัดแยกแบคทีเรียย่อยสลาย PAHs จึงเก็บตัวอย่างจากดินตะกอนบริเวณดังกล่าวที่ความลึกไม่เกิน 5 เซนติเมตร ซึ่งคาดว่าจะมีแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลาย PAHs อยู่

ในการคัดแยกแบคทีเรียย่อยสลาย PAHs จากดินตะกอนป่าชายเลนของงานวิจัยนี้ เลือกใช้ตัวแทนของ PAHs มวลโมเลกุลต่ำ คือ อะซีแนพทีนและพีแนพทีน และตัวแทนของ PAHs มวลโมเลกุลสูง คือ ฟลูออแรนทีนและไพรีน เนื่องจากเป็นชนิดที่พบมากในแหล่งกำเนิดต่างๆ ได้แก่ น้ำมันปิโตรเลียม ไอเสียจากรถยนต์ ควันทหารรถยนต์ และควันทหารเรือ อีกทั้งยังมีค่าครึ่งชีวิตในดินสูงด้วย นอกจากนี้ยังเป็นสารที่มีความสำคัญทางอุตสาหกรรมในการผลิตสารเคมีอื่นๆ (กรมควบคุมมลพิษ, 2547) จึงต้องการคัดแยกแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายสารดังกล่าว เพื่อประยุกต์ใช้ในการบำบัดสิ่งแวดล้อมต่อไป อย่างไรก็ตาม เนื่องจาก PAHs มีสมบัติละลายน้ำต่ำ การใช้งาน PAHs จึงต้องใช้ตัวทำละลายในการละลาย PAHs งานวิจัยส่วนใหญ่ใช้ตัวทำละลายจำพวกไดเมทิลฟอร์มาไมด์และไดเมทิลซัลฟอกไซด์ แต่ตัวทำละลายทั้งสองชนิดนี้ก็ยังมีผลกระทบต่อแบคทีเรีย กล่าวคือไดเมทิลฟอร์มาไมด์มีผลลดกิจกรรมของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลาย PAHs (Chang และคณะ, 2006) ในขณะที่ไดเมทิลซัลฟอกไซด์มีผลเปลี่ยนแปลงพันธุกรรมของแบคทีเรีย (Hakura และคณะ, 1993) ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงเลือกใช้ไดเมทิลฟอร์มาไมด์เป็นตัวทำละลาย ซึ่งจะเตรียมเป็นสารละลาย PAHs ความเข้มข้นสูง แล้วเติมลงในอาหารเหลวปริมาณน้อยๆ เพื่อลดผลกระทบของไดเมทิลฟอร์มาไมด์ต่อการย่อยสลาย PAHs ของแบคทีเรีย

การคัดแยกแบคทีเรียย่อยสลาย PAHs จากดินตะกอนป่าชายเลน พบการเปลี่ยนแปลงสีของอาหารเหลว CFMM เมื่อมีพีแนพทีนเป็นแหล่งคาร์บอนในทุกตัวอย่างดินตะกอน และพบการเปลี่ยนแปลงสีของอาหารเหลว CFMM เมื่อมีไพรีนเป็นแหล่งคาร์บอนยกเว้นดินตะกอนจากแนวป่าชายเลน จังหวัดสมุทรสงคราม ในขณะที่พบการเปลี่ยนแปลงสีของอาหารเหลว CFMM เมื่อมีอะซีแนพทีนเป็นแหล่งคาร์บอนเพียงตัวอย่างดินตะกอนจากดอนหอยหลอด อย่างไรก็ตาม ไม่พบการเปลี่ยนแปลงสีของอาหารเหลว CFMM เมื่อมีฟลูออแรนทีนเป็นแหล่งคาร์บอน (ตารางที่ 4.1) เมื่อเปรียบเทียบตัวอย่างดินตะกอนทั้ง 4 แหล่ง พบว่าดินตะกอนดอนหอยหลอดที่ผ่านการเพิ่มจำนวนแบคทีเรียย่อยสลาย PAHs ในระบบนิเวศจำลองดินปนเปื้อนสารผสมของอะซีแนพทีน พีแนพทีน และไพรีน ความเข้มข้นชนิดละ 30 มิลลิกรัม/กิโลกรัม ก่อนการนำมาใช้คัดแยกในอาหารเหลวที่มีความเข้มข้นของ PAH ชนิดละ 100 มิลลิกรัม/ลิตร เป็นตัวอย่างที่พบการเปลี่ยนแปลงสีของอาหารเหลว CFMM มากที่สุด เปรียบเทียบกับชุดควบคุมปราศจากเชื้อ ทั้งนี้เนื่องจากตัวอย่างดินตะกอนดังกล่าวมาจากบริเวณที่พบคราบปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนปนเปื้อนบนผิวน้ำดิน (แต่ตรวจไม่พบ



การปนเปื้อนของอะซีแนพธิน พีแนนทรีน และไพรีน) และยังมีการนำดินตะกอนมาทำให้คุ้นเคย (acclimatization) กับ PAHs ที่ระดับความเข้มข้นต่ำๆ ก่อนเพิ่มความเข้มข้นของ PAHs ให้สูงขึ้น ซึ่งเป็นการกระตุ้นและส่งเสริมกิจกรรมการย่อยสลาย PAHs ของแบคทีเรียท้องถิ่น (Guo และคณะ, 2005) จึงมีโอกาสดูแลที่จะสามารถคัดแยกแบคทีเรียย่อยสลาย PAHs ได้หลายชนิด

**ตารางที่ 4.1** การเปลี่ยนแปลงสีของอาหารเหลว CFMM ที่มี PAH ชนิดต่างๆ ในการเพิ่มจำนวนแบคทีเรียย่อยสลาย PAHs จากดินตะกอนป่าชายเลน

ดินตะกอนป่าชายเลน	อะซีแนพธิน	พีแนนทรีน	ฟลูออแรนทีน	ไพรีน
ศูนย์อนุรักษ์และศึกษาระบบนิเวศป่าชายเลน เพชรบุรี	-	+	-	+
บางขุนเทียน กรุงเทพมหานคร	-	+	-	+
แนวป่าชายเลน สมุทรสงคราม	-	+	-	-
ดอนหอยหลอด สมุทรสงคราม*	+	+	-	+

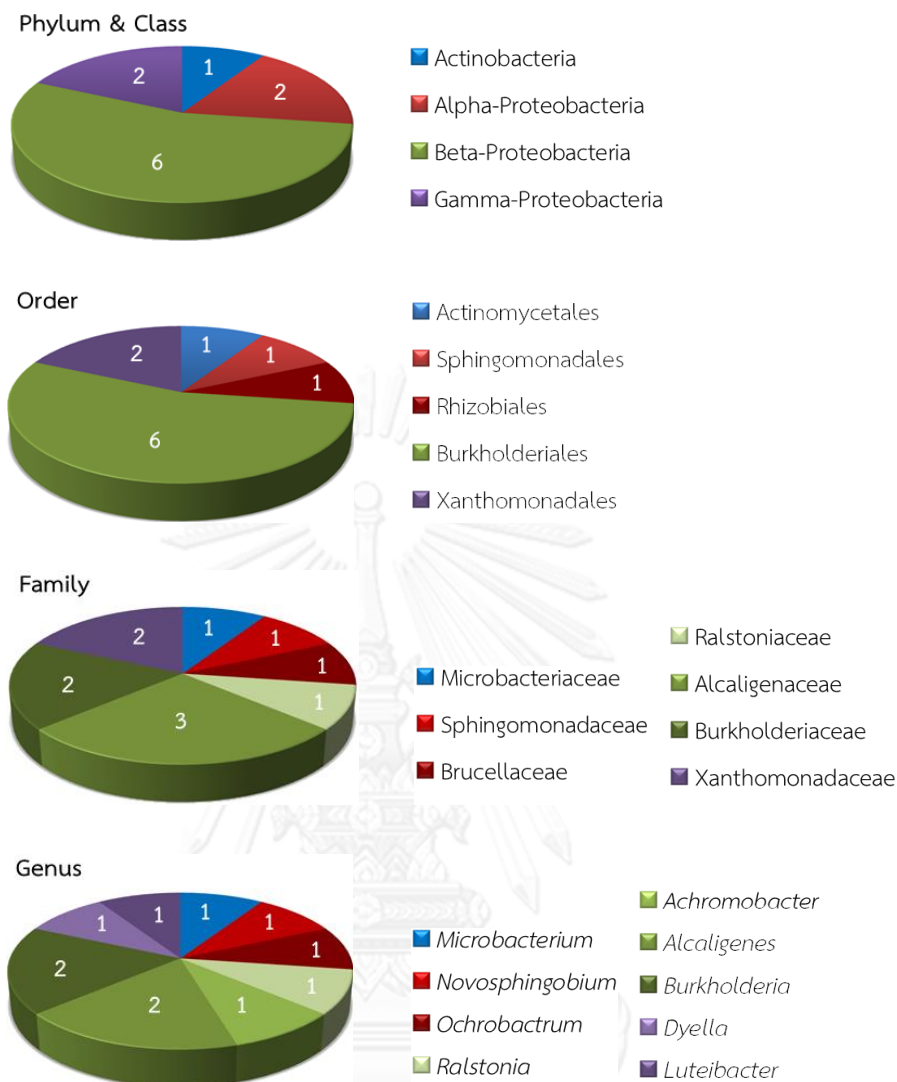
\* ตัวอย่างดินตะกอนป่าชายเลนผ่านการเพิ่มจำนวนแบคทีเรียย่อยสลาย PAHs ในระบบนิเวศจำลองดินที่ทำให้ปนเปื้อนอะซีแนพธิน พีแนนทรีน และไพรีน ความเข้มข้นชนิดละ 30 มิลลิกรัม/กิโลกรัม

แบคทีเรียย่อยสลาย PAHs จำนวน 11 สายพันธุ์ ถูกคัดแยกในงานวิจัยนี้ ประกอบด้วยแบคทีเรียย่อยสลายอะซีแนพธิน 1 สายพันธุ์ (FA4) แบคทีเรียย่อยสลายพีแนนทรีน 7 สายพันธุ์ (BPH, SSK1B, SSK4, FP0, FP2-1, FP2-2, FP8) และแบคทีเรียย่อยสลายไพรีน 3 สายพันธุ์ (PCY, BPW, FPY8) ผลการคัดแยกแบคทีเรียย่อยสลาย PAHs นั้น มีความสอดคล้องกับผลการเปลี่ยนแปลงสีของอาหารเหลวในตารางที่ 4.1 จากการศึกษาลักษณะโคโลนีที่เจริญบนอาหารแข็ง LB พบว่าแบคทีเรียที่คัดแยกได้มีลักษณะโคโลนีกลม เรียบ และมันวาว มีสีแตกต่างกันไปตั้งแต่สีขาว เหลือง หรือสีเหลือง การศึกษารูปร่างและการติดสีแกรมภายใต้กล้องจุลทรรศน์แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียที่คัดแยกได้ส่วนใหญ่มีรูปร่างท่อนและติดสีแกรมลบ มีเพียง 1 สายพันธุ์ เป็นแบคทีเรียแกรมบวกซึ่งคัดแยกจากความสามารถในการใช้ไพรีนเป็นแหล่งคาร์บอน ผลการจำแนกชนิดของแบคทีเรียที่คัดแยกได้ด้วยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rDNA แสดงในตารางที่ 4.2 ประกอบด้วยแบคทีเรียในไฟลัม Actinobacteria จีโนส *Microbacterium* ชั้น Alpha-proteobacteria จีโนส *Novosphingobium* และ *Ochrobactrum* ชั้น Beta-proteobacteria จีโนส *Ralstonia*, *Alcaligenes* (2 สายพันธุ์), *Achromobacter* และ *Burkholderia* (2 สายพันธุ์) และชั้น Gamma-proteobacteria จีโนส *Dyella* และ *Luteibacter* ซึ่งแสดงรายละเอียดการจำแนกชนิดของแบคทีเรียที่คัดแยกได้ตามไฟลัมและชั้น (Phylum & Class) อันดับ (Order) วงศ์ (Family) และจีโนส (Genus) ดังรูปที่ 4.2

ตารางที่ 4.2 แบคทีเรียย่อยสลาย PAHs ที่คัดแยกได้จากดินตะกอนป่าชายเลนที่ใช้ในงานวิจัยนี้

สายพันธุ์	PAH ที่ใช้	ลักษณะของแบคทีเรีย		การจำแนกชนิดแบคทีเรีย	
	คัดแยก	บนอาหารแข็ง LB	ภายใต้กล้องจุลทรรศน์	จีโนม	accession number*
<u>ศูนย์อนุรักษ์และศึกษาระบบนิเวศป่าชายเลน, เพชรบุรี</u>					
PCY	ไพรีน	สีเหลืองเข้ม	แกรมลบ รูปท่อน	<i>Novosphingobium</i> (100%, 731 bp)	JQ965256
<u>แหล่งท่องเที่ยวบางขุนเทียน, กรุงเทพมหานคร</u>					
BPH	พีแนน ทรีน	สีขาวใส	แกรมลบ รูปท่อน	<i>Ralstonia</i> (99%, 1224 bp)	JQ965257
BPW	ไพรีน	สีขาวขุ่นเหลือง	แกรมบวก รูปกลม	<i>Microbacterium</i> (99%, 1134 bp)	JQ965258
<u>แนวป่าชายเลน, สมุทรสงคราม</u>					
SSK1B	พีแนน ทรีน	สีขาวใส	แกรมลบ รูปท่อน	<i>Alcaligenes</i> (99%, 1490 bp)	JQ965259
SSK4	พีแนน ทรีน	สีขาวใส	แกรมลบ รูปท่อน	<i>Achromobacter</i> (99%, 1483 bp)	JQ965260
<u>แหล่งท่องเที่ยวดอนหอยหลอด, สมุทรสงคราม (คัดแยกจากระบบนิเวศจำลองดิน)</u>					
FA4	อะซีแนพ ซิน	สีเหลือง	แกรมลบ รูปท่อน	<i>Alcaligenes</i> (100%, 965 bp)	JX910139
FP0	พีแนน ทรีน	สีเหลือง	แกรมลบ รูปท่อน	<i>Dyella</i> (100%, 1383 bp)	JX910135
FP2-1	พีแนน ทรีน	สีขาว	แกรมลบ รูปท่อน	<i>Burkholderia</i> (99%, 998 bp)	JX910136
FP2-2	พีแนน ทรีน	สีขาวเหลือง	แกรมลบ รูปท่อน	<i>Luteibacter</i> (99%, 1362 bp)	JX910137
FP8	พีแนน ทรีน	สีขาว	แกรมลบ รูปท่อน	<i>Burkholderia</i> (99%, 1323 bp)	JX910138
FPY8	ไพรีน	สีขาวเหลือง	แกรมลบ รูปท่อน	<i>Ochrobactrum</i> (99%, 1298 bp)	JX910140

\* accession number ของแบคทีเรียที่คัดแยกได้ในงานวิจัยนี้



รูปที่ 4.2 การแบ่งชนิดของแบคทีเรียที่คัดแยกได้ตามไฟลัมและชั้น อันดับ วงศ์ และจีแนส

แบคทีเรียที่คัดแยกได้ทั้งหมดจัดอยู่ในไฟลัม Actinobacteria และ Proteobacteria (alpha-, beta-, gamma-) ซึ่งเป็นไฟลัมที่พบมากในดินตะกอนป่าชายเลน (Gomes และคณะ, 2008) และเมื่อมีการปนเปื้อน PAHs ในดินตะกอนป่าชายเลน จำนวนและความหลากหลายของแบคทีเรียสองกลุ่มนี้จะเพิ่มขึ้นด้วย (Peixoto และคณะ, 2011) จีแนสของแบคทีเรียที่คัดแยกได้นี้ มีรายงานการคัดแยกโดยอาศัยความสามารถในการย่อยสลาย PAHs ก่อนหน้า (ความสามารถในการย่อยสลาย PAHs ของแต่ละจีแนสจะกล่าวอย่างละเอียดในข้อ 4.3) ยกเว้นจีแนส *Dyella* และ *Luteibacter* งานวิจัยนี้จึงเป็นรายงานแรกที่พบสายพันธุ์ของจีแนส *Dyella* และ *Luteibacter* ที่มีความสามารถในการย่อยสลายพีแนนทรีน นอกจากนี้ งานวิจัยก่อนหน้าพบว่าแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลายไพรีนส่วนใหญ่เป็นแบคทีเรียแกรมบวก (Zhou และคณะ, 2008) อย่างไรก็ตาม ในงานวิจัยนี้สามารถคัดแยกแบคทีเรียทั้งแกรมบวก (*Microbacterium*) และแกรมลบ (*Novosphingobium*) จากความสามารถในการย่อยสลายไพรีนด้วย

อย่างไรก็ตาม แบคทีเรีย 6 สายพันธุ์ ที่คัดแยกได้จากระบบนิเวศจำลองดินตะกอนป่าชายเลนของแหล่งท่องเที่ยวดอนหอยหลอด จังหวัดสมุทรสงคราม ไม่ได้นำมาใช้งานต่อในงานวิจัยนี้ เนื่องจากได้นำไปศึกษาในงานวิจัยของ Muangchinda และคณะ (2013) จึงไม่ขอกล่าวถึงตั้งแต่ข้อ 4.2 เป็นต้นไป

#### 4.2 สภาวะการเจริญของแบคทีเรียที่คัดแยกได้

ตารางที่ 4.3 การเจริญของแบคทีเรียที่คัดแยกได้ในสภาวะแปรผันอุณหภูมิ ความเป็นกรด-ด่าง และ ปริมาณโซเดียมคลอไรด์

สภาวะแปรผัน	จำนวนแบคทีเรีย (log MPN/มิลลิลิตร)					
	BPH	BPW	SSK1B	SSK4	PCY	
จำนวนเซลล์เริ่มต้น	5.21±0.85	5.48±0.21	5.39±0.60	5.47±0.31	5.35±0.18	
อุณหภูมิ *	25	5.93±0.94	5.36±0.24	5.50±0.19	5.20±1.39	5.63±1.30
	30****	5.95±0.53	6.69±0.46	5.73±0.67	6.01±0.36	5.85±1.07
	37	5.10±0.57	5.46±0.19	4.95±0.20	5.62±1.80	6.03±0.83
ความเป็นกรด- ด่าง **	4.0	3.01±1.36	2.71±0.64	3.18±0.26	4.84±0.32	4.48±0.43
	6.0	5.78±0.97	5.93±0.21	4.04±0.18	4.73±0.84	5.97±0.88
	6.5	5.85±0.48	6.93±0.72	5.38±0.45	5.73±0.48	5.66±0.21
	7.0****	5.95±0.53	6.69±0.46	5.73±0.67	6.01±0.36	5.85±1.07
	7.5	4.90±0.39	6.76±0.30	5.04±0.75	5.04±0.38	4.32±1.10
	8.0	4.98±0.95	3.91±1.18	4.66±0.97	4.83±0.73	4.04±0.56
	9.0	3.24±1.00	3.77±0.81	3.99±0.43	3.02±0.55	3.22±0.10
ปริมาณโซเดียม คลอไรด์ ***	0	5.85±0.37	5.93±0.69	4.99±0.93	5.84±0.44	5.11±0.12
	0.5****	5.95±0.53	6.69±0.46	5.73±0.67	6.01±0.36	5.85±1.07
	1.5	5.26±0.72	5.04±0.80	5.03±0.84	5.42±0.47	5.88±0.64
	2.5	4.90±0.09	4.76±0.67	4.59±0.75	5.59±1.03	5.69±0.34
	3.5	3.98±0.29	4.77±0.53	4.49±0.74	4.38±0.38	4.43±0.40
	4.5	3.24±0.23	4.61±1.04	3.38±0.33	3.50±0.55	3.30±0.12
	5.0	-	-	-	-	3.73±0.26
	10	-	-	-	-	3.20±0.40
	20	-	-	-	-	1.77±0.35
	30	-	-	-	-	1.36±0.00

\* ควบคุมความเป็นกรด-ด่าง 7.0 ปริมาณโซเดียมคลอไรด์ 0.5 เปอร์เซ็นต์; \*\* ควบคุมอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ปริมาณโซเดียมคลอไรด์ 0.5 เปอร์เซ็นต์; \*\*\* ควบคุมอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเป็นกรด-ด่าง 7.0; \*\*\*\* สภาวะการทดลองเดียวกัน; - ไม่ได้ทดสอบ

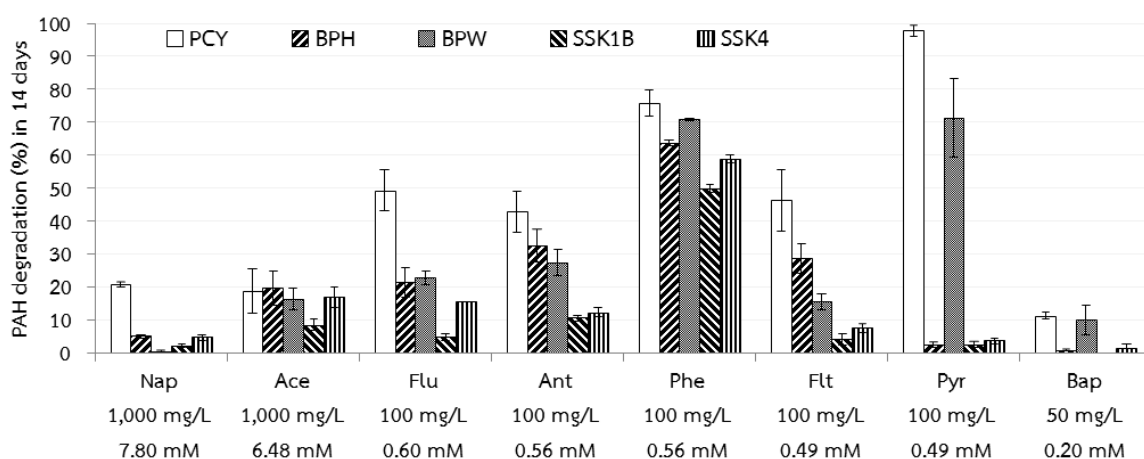
แบคทีเรียที่คัดแยกได้ 5 สายพันธุ์ ประกอบด้วย แบคทีเรียย่อยสลายฟีนแอนทริน *Ralstonia* sp. BPH, *Microbacterium* sp. BPW, *Alcaligenes* sp. SSK1B, *Achromobacter* sp. SSK4 และแบคทีเรียย่อยสลายไพรีน *Novosphingobium* sp. PCY ถูกนำมาทดสอบการเจริญในอาหาร LB สภาวะที่แปรผันอุณหภูมิ (25, 30, 37 องศาเซลเซียส) ความเป็นกรด-ด่าง (4.0, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0, 9.0) และปริมาณโซเดียมคลอไรด์ (0, 0.5, 1.5, 2.5, 3.5, 4.5, 5.0, 10, 20, 30 เปอร์เซ็นต์) ด้วยวิธี MPN ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 4.3 พบว่าแบคทีเรียสามารถอยู่รอดและเจริญได้ที่สภาวะอุณหภูมิ 25-30 องศาเซลเซียส ความเป็นกรด-ด่าง 6.5-7.0 และปริมาณโซเดียมคลอไรด์ 0-3.5 เปอร์เซ็นต์

งานวิจัยของ Yanagi และคณะ (2001) พบว่าบริเวณอ่าวไทยตอนบนมีการปลดปล่อยน้ำจืดจากแม่น้ำต่างๆลงสู่อ่าวไทยในปริมาณมาก อีกทั้งชายฝั่งอ่าวไทยมีความลึกเฉลี่ยประมาณ 45 เมตร (จุดลึกที่สุด 80 เมตร) การแลกเปลี่ยนระหว่างน้ำจืดและน้ำทะเลจึงเป็นไปได้ค่อนข้างช้า ส่งผลให้น้ำทะเลบริเวณดังกล่าวมีความเค็มในระดับต่ำประมาณ 3.05-3.25 เปอร์เซ็นต์ หรือต่ำกว่า งานวิจัยของ Buranapratheprat และคณะ (2008) พบว่าอุณหภูมิของน้ำทะเลบริเวณอ่าวไทยตอนบนอยู่ระหว่าง 26-31 องศาเซลเซียส ซึ่งมีการเปลี่ยนแปลงตามฤดูกาลเพียงเล็กน้อย โดยส่วนใหญ่มีอุณหภูมิเฉลี่ยประมาณ 30 องศาเซลเซียส นอกจากนี้ กรมควบคุมมลพิษ กระทรวงทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม ประเทศไทย มีการควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่างของชายฝั่งทะเลให้อยู่ระหว่าง 7.0-8.5 จากข้อมูลดังกล่าวแสดงให้เห็นว่า สภาวะการเจริญของแบคทีเรียที่คัดแยกได้มีความสอดคล้องกับสภาวะของอ่าวไทยตอนบน โดยมีสภาวะการเจริญที่ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเป็นกรด-ด่าง 7.0 และปริมาณโซเดียมคลอไรด์ 0.5 เปอร์เซ็นต์ เมื่อพิจารณาผลของปริมาณโซเดียมคลอไรด์ต่อการเจริญของแบคทีเรียที่คัดแยกได้พบว่า แบคทีเรียสามารถเจริญได้เมื่อมีปริมาณโซเดียมคลอไรด์อยู่ในช่วง 0.5-2.5 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งการเจริญของแบคทีเรียจะลดลงเมื่อมีปริมาณโซเดียมคลอไรด์เพิ่มขึ้น และยังสามารถอยู่รอดได้ในสภาวะไม่มีโซเดียมคลอไรด์หรือมีปริมาณโซเดียมคลอไรด์ไม่เกิน 3.5 เปอร์เซ็นต์

#### 4.3 ประสิทธิภาพการย่อยสลาย PAHs ของแบคทีเรียที่คัดแยกได้

แบคทีเรียที่คัดแยกได้ 5 สายพันธุ์ ประกอบด้วย แบคทีเรียย่อยสลายฟีนแอนทริน *Ralstonia* sp. BPH, *Microbacterium* sp. BPW, *Alcaligenes* sp. SSK1B, *Achromobacter* sp. SSK4 และแบคทีเรียย่อยสลายไพรีน *Novosphingobium* sp. PCY ถูกนำมาทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลาย PAH ในอาหารเหลว CFMM ชนิดของ PAH ที่ทดสอบถูกเลือกเนื่องจากเป็นสารที่พบมากในแหล่งกำเนิดต่างๆและมีค่าครึ่งชีวิตในดินสูง นอกจากนี้ ยังมีความสำคัญทางอุตสาหกรรมในการผลิตสารเคมีอื่นๆ เช่น แนพธาไลน์ใช้ในการผลิตสารกำจัดแมลง (ลูกเหม็น) อะซีแนพทีนใช้ในการผลิตแนพธาอิกแอนไฮไดรด์ (naphthalic anhydride) สีอะซีแนพทีลีน (acenaphthylene dye) และเรซิน (resin) ฟลูออรีนใช้ในการผลิตฟลูออรีน (fluorenone) ฟีนแอนทรินใช้ในการผลิตฟีนแอนทรินควิโนน (phenanthrenequinone) และกรดไดฟีนิก (diphenic acid) แอนทราซีนใช้เป็นสารตรวจวัดสารกัมมันตรังสีและใช้ในการผลิตแอนทราควิโนน (anthraquinone) ฟลูออแรนทีนใช้ในการผลิตสีเรืองแสง ไพรีนใช้ในการผลิตสีเพอรินอน (perinon pigment) (กรมควบคุมมลพิษ, 2547) ซึ่งกิจกรรม

ดังกล่าวจะเพิ่มความเสี่ยงของการปนเปื้อน PAHs เหล่านี้ลงสู่สิ่งแวดล้อม แบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลาย PAHs เหล่านี้ ถือเป็นตัวเลือกที่ดีในการนำไปประยุกต์ใช้ในการบำบัดสิ่งแวดล้อมต่อไป ประสิทธิภาพการย่อยสลาย PAHs ทั้ง 8 ชนิดของแบคทีเรียที่คัดแยกได้ แสดงในรูปที่ 4.3 พบว่าแบคทีเรียทุกสายพันธุ์สามารถย่อยสลายพีแนทรีนได้ 49.7-75.7 เปอร์เซ็นต์ อีกทั้งสายพันธุ์ PCY และ BPW ที่คัดแยกจากการเพิ่มจำนวนด้วยไพรีน สามารถย่อยสลายไพรีนได้ 97.7 และ 71.1 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ในระยะเวลา 14 วัน



รูปที่ 4.3 ประสิทธิภาพการย่อยสลาย PAHs ของแบคทีเรียที่คัดแยกได้

\* Nap: แนพธาซีน; Ace: อะซีแนพทีน; Flu: ฟลูออรีน; Ant: แอนทราซีน; Phe: พีแนทรีน; Flt: ฟลูออแรนทีน; Pyr: ไพรีน; Bap: เบนโซ[เอ]ไพรีน

ความสามารถในการย่อยสลาย PAHs มวลโมเลกุลต่ำของแบคทีเรียจีนัส *Ralstonia* ที่เป็นที่ยอมรับโดยทั่วไปคือ *Ralstonia* sp. U2 ซึ่งคัดแยกจากดินปนเปื้อนน้ำมัน ประเทศเวเนซุเอลา จากการเพิ่มจำนวนในอาหารที่มีแนพธาซีนความเข้มข้น 5,000 มิลลิกรัม/ลิตร เป็นแหล่งคาร์บอนเพียงแหล่งเดียว และมีความสามารถในการย่อยสลายแนพธาซีนและพีแนทรีนได้ (Fuenmayor และ Rodriguez, 1992) สำหรับแบคทีเรีย *Ralstonia* sp. BPH ที่คัดแยกได้ในงานวิจัยนี้พบว่ามีประสิทธิภาพในการย่อยสลายพีแนทรีน  $63.8 \pm 0.8$  เปอร์เซ็นต์ แอนทราซีน  $32.4 \pm 5.0$  เปอร์เซ็นต์ ฟลูออแรนทีน  $28.6 \pm 4.3$  เปอร์เซ็นต์ และฟลูออรีน  $21.5 \pm 4.5$  เปอร์เซ็นต์ แต่มีความสามารถในการย่อยสลายแนพธาซีนต่ำประมาณ  $5.0 \pm 0.6$  เปอร์เซ็นต์ (แม้ทดสอบด้วยความเข้มข้นเริ่มต้นของแนพธาซีนที่ต่ำกว่า) งานวิจัยของ Jalilnejada และ Vahabzadeha (2013) ศึกษาการย่อยสลายแนพธาซีนของ *Ralstonia eutropha* PTCC 1615 ที่ความเข้มข้นต่ำ พบว่าสายพันธุ์ PTCC 1615 สามารถย่อยสลายแนพธาซีนความเข้มข้นเริ่มต้น 10-150 มิลลิกรัม/ลิตร ได้ โดยมีประสิทธิภาพการย่อยสลายแนพธาซีนประมาณ 33 เปอร์เซ็นต์ในระยะเวลา 3 วัน

แบคทีเรีย *Alcaligenes* sp. SSK1B และ *Achromobacter* sp. SSK4 ที่คัดแยกได้ในงานวิจัยนี้มีความสามารถในการย่อยสลายพีแนทรีน  $49.7 \pm 1.0$  และ  $58.7 \pm 1.1$  เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ แบคทีเรียทั้งสองจีนัสนี้มีรายงานเกี่ยวกับการย่อยสลายพีแนทรีนมากมาย เช่น *Alcaligenes* sp. EF105546 สามารถย่อยสลายพีแนทรีนความเข้มข้น 1 มิลลิกรัม/ลิตร ได้ 34.4

เปอร์เซ็นต์ ในเวลา 1 วัน (Abd-Elsalam และคณะ, 2009) *Alcaligenes* sp. J08 สามารถย่อยสลายพีแนทรีนความเข้มข้น 50 มิลลิกรัม/ลิตร ได้ 92.1 เปอร์เซ็นต์ ในเวลา 3 วัน (Jiajun และคณะ, 2010) *Achromobacter* sp. AY189752 สามารถย่อยสลายพีแนทรีนความเข้มข้น 200 มิลลิกรัม/ลิตร ได้ 73.2 เปอร์เซ็นต์ ในเวลา 21 วัน (Tiwari และคณะ, 2010) นอกจากนี้ยังมีรายงานเกี่ยวกับการย่อยสลาย PAHs มวลโมเลกุลต่ำของแบคทีเรีย *Achromobacter* sp. FBHYA2 ที่สามารถย่อยสลายแนพธาซีนความเข้มข้น 500 มิลลิกรัม/ลิตร ได้ 96.0 เปอร์เซ็นต์ ในเวลา 2 วัน (Farjadfard และคณะ, 2012) และการย่อยสลาย PAHs มวลโมเลกุลสูงของแบคทีเรียทั้งสองจี้นี้ เช่น *Achromobacter* sp. AY189752 สามารถย่อยสลายไพรีนความเข้มข้น 200 มิลลิกรัม/ลิตร ได้ 82.5 เปอร์เซ็นต์ ในเวลา 21 วัน (Tiwari และคณะ, 2010) *Alcaligenes faecalis* สามารถย่อยสลายโครซีนความเข้มข้น 30, 50, 100 มิลลิกรัม/ลิตร ได้ 82.6, 72.8, 71.3 เปอร์เซ็นต์ ในเวลา 7 วัน (Igwo-Ezike และคณะ, 2009) *Achromobacter xylosoxidans* สามารถย่อยสลายโครซีนความเข้มข้น 50 มิลลิกรัม/ลิตร ได้ 40.8 เปอร์เซ็นต์ ในเวลา 4 วัน (Ghevariya และคณะ, 2011) *Alcaligenes* sp. และ *Achromobacter* sp. สามารถย่อยสลายเบนโซ[เอ]ไพรีนความเข้มข้น 0.25-0.90 มิลลิกรัม/ลิตร ได้อย่างสมบูรณ์ในเวลา 14 วัน โดยมีประสิทธิภาพการย่อยสลายเบนโซ[เอ]ไพรีนได้ดีที่สุด ณ ความเข้มข้น 0.40 มิลลิกรัม/ลิตร (Cao และคณะ, 2011)

แบคทีเรีย *Microbacterium* sp. BPW ที่คัดแยกได้ในงานวิจัยนี้มีความสามารถในการย่อยสลายไพรีน  $71.1 \pm 11.7$  เปอร์เซ็นต์ พีแนทรีน  $70.8 \pm 0.4$  เปอร์เซ็นต์ แอนทราซีน  $27.3 \pm 4.0$  เปอร์เซ็นต์ และฟลูออรีน  $22.6 \pm 1.9$  เปอร์เซ็นต์ รายงานวิจัยก่อนหน้านี้เกี่ยวกับการย่อยสลาย PAHs ของแบคทีเรียจี้นี้ *Microbacterium* ยังมีจำนวนน้อย เช่น *Microbacterium* sp. F10a สามารถย่อยสลายพีแนทรีนและไพรีนความเข้มข้น 50 และ 20 มิลลิกรัม/ลิตร ได้ 98.0 และ 65.0 เปอร์เซ็นต์ ในเวลา 7 วัน (Sheng และคณะ, 2009) และ *Microbacterium* sp. SL10 สามารถย่อยสลายแอนทราซีนความเข้มข้น 50 มิลลิกรัม/ลิตร ได้ 90.1 เปอร์เซ็นต์ ในเวลา 21 วัน (Salam และคณะ, 2014)

ความสามารถในการย่อยสลาย PAHs ของแบคทีเรียจี้นี้ *Novosphingobium* ได้รับการศึกษาอย่างกว้างขวางโดยเฉพาะอย่างยิ่ง *Novosphingobium aromaticivorans* F199 (DSM 12444) ซึ่งคัดแยกจากดินตะกอนที่ความลึก 410 เมตร ประเทศสหรัฐอเมริกา (Balkwill, 1989) มีความสามารถในการย่อยสลายแนพธาซีน ฟลูออรีน พีแนทรีน (Romine และคณะ, 1999) นอกจากนี้ ยังมีสายพันธุ์อื่นๆ ได้แก่ *Novosphingobium pentaromativorans* US6-1 ซึ่งคัดแยกจากดินโคลน ประเทศเกาหลี มีความสามารถในการย่อยสลายสารผสมของไพรีน เบนโซ[เอ]แอนทราซีน โครซีน เบนโซ[บี]ฟลูออแรนทีน และเบนโซ[เอ]ไพรีน ความเข้มข้นชนิดละ 10 มิลลิกรัม/ลิตร ได้อย่างสมบูรณ์ในเวลา 8 วัน ยกเว้นเบนโซ[บี]ฟลูออแรนทีนที่ย่อยสลายไปประมาณ 85 เปอร์เซ็นต์ (Sohn และคณะ, 2004) *Novosphingobium naphthalenivorans* TUT562 ซึ่งคัดแยกจากดินปนเปื้อนพอลิคลอรีเนตไดออกซิน ประเทศญี่ปุ่น มีความสามารถในการย่อยสลายแนพธาซีนความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัม/ลิตร ได้อย่างสมบูรณ์ในเวลา 1 วัน (Suzuki และ Hiraiishi, 2007) *Novosphingobium indicum* H25 ซึ่งคัดแยกจากน้ำทะเลลึก ประเทศอินเดีย มีความสามารถในการย่อยสลายพีแนทรีนและฟลูออแรนทีน (Yuan และคณะ, 2009) *Novosphingobium* sp.

PP1Y ซึ่งคัดแยกจากผิวน้ำทะเล ประเทศอิตาลี มีความสามารถในการเจริญได้บนอาหารที่มีเนพธาลีน อะซีแนพธิน พีแนนทริน ฟลูออแรนทีน และไพรีน (Notomista และคณะ, 2011) ในงานวิจัยนี้ได้คัดแยกแบคทีเรีย *Novosphingobium* sp. PCY ที่มีความสามารถในการย่อยสลายไพรีน  $97.7 \pm 1.7$  เปอร์เซ็นต์ พีแนนทริน  $75.7 \pm 3.7$  เปอร์เซ็นต์ ฟลูออรีน  $49.2 \pm 6.1$  เปอร์เซ็นต์ ฟลูออแรนทีน  $46.2 \pm 9.3$  เปอร์เซ็นต์ แอนทราซีน  $42.7 \pm 6.3$  เปอร์เซ็นต์ และเนพธาลีน  $20.5 \pm 0.5$  เปอร์เซ็นต์

เมื่อเปรียบเทียบแบคทีเรียที่คัดแยกได้กับแบคทีเรียจีสเดียวกันในรายงานวิจัยก่อนหน้าพบว่าแบคทีเรียที่คัดแยกได้ในงานวิจัยนี้มีประสิทธิภาพค่อนข้างดีกว่าในด้านความเข้มข้นเริ่มต้นในการย่อยสลายของ PAHs ที่สูงกว่าและ/หรือระยะเวลาที่ใช้ในการย่อยสลายที่สั้นกว่า โดยเฉพาะอย่างยิ่งแบคทีเรีย *Novosphingobium* sp. PCY ที่มีความสามารถในการย่อยสลาย PAHs หลากหลายชนิด อีกทั้งยังมีประสิทธิภาพการย่อยสลายไพรีน (PAHs มวลโมเลกุลสูง) ได้ดีกว่าพีแนนทริน (PAHs มวลโมเลกุลต่ำ) ซึ่งตรงข้ามกับประสิทธิภาพของ *Novosphingobium* สายพันธุ์อื่นๆ แต่มีประสิทธิภาพใกล้เคียงกับแบคทีเรียจีส *Mycobacterium* ที่สามารถย่อยสลายไพรีนได้ 50-90 เปอร์เซ็นต์ ในเวลา 14 วัน (Li และคณะ, 2008; Vila และ Grifoll, 2009) เนื่องจากแบคทีเรียทั้ง 5 สายพันธุ์ที่คัดแยกได้ในงานวิจัยนี้มีประสิทธิภาพการย่อยสลาย PAHs ดี ดังนั้นจึงมีความน่าสนใจที่จะศึกษาชนิดของยีนประมวลรหัสเอนไซม์ไดออกซิจีเนสต่อไป

#### 4.4 ยีนประมวลรหัสหน่วยย่อยแอลฟาของไดออกซิจีเนสของแบคทีเรียที่คัดแยกได้

แบคทีเรียที่คัดแยกได้ 5 สายพันธุ์ ประกอบด้วย แบคทีเรียย่อยสลายพีแนนทริน *Ralstonia* sp. BPH, *Microbacterium* sp. BPW, *Alcaligenes* sp. SSK1B, *Achromobacter* sp. SSK4 และแบคทีเรียย่อยสลายไพรีน *Novosphingobium* sp. PCY ถูกนำมาตรวจหายีนประมวลรหัสเอนไซม์ไดออกซิจีเนสเบื้องต้นโดยอาศัยไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อหน่วยย่อยแอลฟาของไดออกซิจีเนสจำนวน 3 ไพรเมอร์ ได้แก่ RHD $\alpha$ -GN ที่จำเพาะต่อหน่วยย่อยแอลฟาของไดออกซิจีเนสของแบคทีเรียแกรมลบ RHD $\alpha$ -GP ที่จำเพาะต่อหน่วยย่อยแอลฟาของไดออกซิจีเนสของแบคทีเรียแกรมบวก และ pah-rhd $\alpha$  ที่จำเพาะต่อหน่วยย่อยแอลฟาของไดออกซิจีเนสของแบคทีเรียทั้งแกรมลบและแกรมบวก ผลการเกิดผลิตภัณฑ์ PCR แสดงในตารางที่ 4.4 ซึ่งไม่พบผลิตภัณฑ์ PCR จากไพรเมอร์ RHD $\alpha$ -GN (รูปที่ จ-1) และ pah-rhd $\alpha$  แต่พบผลิตภัณฑ์ PCR จากไพรเมอร์ RHD $\alpha$ -GP ในสายพันธุ์ PCY และ BPW (รูปที่ จ-2)

การไม่พบผลิตภัณฑ์ PCR ของแบคทีเรียแกรมลบ *Ralstonia* sp. BPH *Alcaligenes* sp. SSK1B และ *Achromobacter* sp. SSK4 โดยใช้ไพรเมอร์ RHD $\alpha$ -GN ที่จำเพาะต่อหน่วยย่อยแอลฟาของไดออกซิจีเนสในแบคทีเรียแกรมลบ อาจเนื่องจากความไม่จำเพาะของไพรเมอร์ต่อยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายพีแนนทรินของแบคทีเรียดังกล่าว อย่างไรก็ตาม งานวิจัยก่อนหน้ารายงานชนิดยีนประมวลรหัสหน่วยย่อยแอลฟาของไดออกซิจีเนสที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลาย PAHs ในแบคทีเรียจีสเหล่านี้ ได้แก่ ยีน *nagAc* ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายเนพธาลีนของ *Ralstonia* spp. U2 และ NI1 (Zhou และคณะ, 2001; Widada และคณะ, 2002a) ยีน *phnAc* ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายเนพธาลีนและพีแนนทรินของ *Ralstonia* sp. PJ531 (Widada และคณะ, 2002a) และ *Alcaligenes faecalis* AFK2 (Lozada และคณะ, 2008) ยีน *bphA* ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลาย



สารประกอบอะโรมาติกของ *Achromobacter xylosoxidans* A8 (Jencova และคณะ, 2008) และไบฟีนิลของ *Achromobacter* sp. BP3 (Hong และคณะ, 2009)

**ตารางที่ 4.4** ยีนประมวลรหัสหน่วยย่อยแอลฟาของไดออกซีจีเนสของแบคทีเรียที่คัดแยกได้

แบคทีเรียที่คัดแยกได้	PAH ที่ใช้ คัดแยก	ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีนประมวลรหัสหน่วย ย่อยแอลฟาของเอนไซม์ไดออกซีจีเนส		
		RHD <sub>α</sub> -GN	RHD <sub>α</sub> -GP	pah-rhd <sub>α</sub>
<i>Novosphingobium</i> sp. PCY	ไพรีน	-	+	-
<i>Ralstonia</i> sp. BPH	ฟิแนนทรีน	-	-	-
<i>Microbacterium</i> sp. BPW	ไพรีน	-	+	-
<i>Alcaligenes</i> sp. SSK1B	ฟิแนนทรีน	-	-	-
<i>Achromobacter</i> sp. SSK4	ฟิแนนทรีน	-	-	-

+ พบผลิตภัณฑ์ PCR ตามขนาดที่คาดหวัง; - ไม่พบผลิตภัณฑ์ PCR ตามขนาดที่คาดหวัง

ผลิตภัณฑ์ PCR จากไพรเมอร์ RHD<sub>α</sub>-GP ที่พบในแบคทีเรีย *Microbacterium* sp. BPW มีความเหมือนกับลำดับกรดอะมิโนของ NidA3 ที่พบในแบคทีเรีย *Mycobacterium* spp. (ตารางที่ 4.5) งานวิจัยก่อนหน้ารายงานการพบยีน RHD<sub>α</sub> ใน *Microbacterium laevaniformans* OR221 ที่มีความสามารถในการทนต่อโลหะหนัก แต่ไม่มีรายงานการย่อยสลาย PAHs (Brown และคณะ, 2012)

ผลิตภัณฑ์ PCR จากไพรเมอร์ RHD<sub>α</sub>-GP ที่พบในแบคทีเรีย *Novosphingobium* sp. PCY มีความเหมือนกับลำดับกรดอะมิโนของ NidA ที่พบในแบคทีเรีย *Mycobacterium* spp. (ตารางที่ 4.5) ซึ่งมีบทบาทสำคัญในการย่อยสลายไพรีนและ PAHs มวลโมเลกุลสูง (Kim และคณะ, 2007) ในขณะที่ *Novosphingobium* สายพันธุ์อื่นๆในงานวิจัยก่อนหน้า พบว่ามียีน *bphA1f* ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลาย PAHs (Stolz, 2009; Pinyakong และคณะ, 2003a) จึงมีความน่าสนใจเนื่องจากเป็นแบคทีเรียแกรมลบที่มียีนเกี่ยวข้องกับการย่อยสลาย PAHs ของแบคทีเรียแกรมบวก และเป็นงานวิจัยแรกที่พบยีน *nidA* ในแบคทีเรียจีโนส *Novosphingobium* นอกจากนี้การตรวจพบยีน *nidA* ในสายพันธุ์ PCY ยังมีความสอดคล้องกับประสิทธิภาพการย่อยสลายไพรีน ฟิแนนทรีน และฟลูออแรนทีนด้วย กล่าวคือความสามารถในการย่อยสลาย PAHs ของสายพันธุ์ PCY เรียงลำดับจากมากไปน้อยได้ดังนี้ ไพรีนมากกว่าฟิแนนทรีนมากกว่าฟลูออแรนทีน เมื่อมีความเข้มข้นเริ่มต้นของ PAHs และระยะเวลาการย่อยสลายเท่ากัน สอดคล้องกับความจำเพาะต่อ PAHs ของยีน *nidA* ที่มีความจำเพาะต่อไพรีนมากกว่าฟิแนนทรีนมากกว่าฟลูออแรนทีน ในขณะที่ยีน *nidA3* มีความจำเพาะต่อฟลูออแรนทีนมากกว่าฟิแนนทรีนมากกว่าไพรีน (Kweon และคณะ, 2010)

ตารางที่ 4.5 ความเหมือนของผลิตภัณฑ์ PCR ด้วยไพรเมอร์ RHD $\alpha$ -GP ของแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากฐานข้อมูล

ผลิตภัณฑ์ PCR ด้วย ไพรเมอร์ RHD $\alpha$ -GP ของแบคทีเรีย	ความเหมือนกับฐานข้อมูลของกรดอะมิโน				อ้างอิง
	ความเหมือน	กรดอะมิโน	แบคทีเรีย	accession number	
<i>Microbacterium</i> sp. BPW	98% (79/81 aa)	NidA3	<i>Mycobacterium</i> sp. 16F	AFS30998	Direct Submission
(ขนาด 243 bp, KJ650248)	98% (79/81 aa)	NidA3	<i>Mycobacterium vanbaalenii</i> PYR-1	AAY85176	Kim และคณะ, 2006b
	98% (79/81 aa)	NidA3	<i>Mycobacterium gilvum</i> Spyr1	YP_004074745	Kallimanis และคณะ, 2011
	98% (79/81 aa)	RHD $\alpha$	<i>Mycobacterium</i> sp. KMS	YP_935636	Direct Submission
	98% (79/81 aa)	RHD $\alpha$	<i>Mycobacterium gilvum</i> PYR-GCK	YP_001131838	Direct Submission
	98% (79/81 aa)	RHD $\alpha$	<i>Mycobacterium</i> sp. MCS	YP_638832	Direct Submission
<i>Novosphingobium</i> sp. PCY	99% (154/155 aa)	NidA	<i>Pseudoxanthomonas</i> sp. RN402	ACL13524	Klankeo และคณะ, 2009
(ขนาด 465 bp, JX105351)	99% (154/155 aa)	RHD $\alpha$	<i>Mycobacterium gilvum</i> PYR-GCK	YP_001131939	Direct Submission
	99% (154/155 aa)	RHD $\alpha$	<i>Mycobacterium</i> sp. JLS	YP_001070514	Direct Submission
	99% (154/155 aa)	NidA	<i>Mycobacterium</i> sp. MHP-1	BAD20297	Habe และคณะ, 2004
	99% (153/155 aa)	NidA	<i>Mycobacterium gilvum</i> BB1	AAN78316	Unpublished
	99% (153/155 aa)	NidA	<i>Mycobacterium</i> sp. KMS	AAQ95208	Miller และคณะ, 2004
	99% (153/155 aa)	RHD $\alpha$	<i>Mycobacterium vanbaalenii</i> PYR-1	YP_951339	Direct Submission
	99% (153/155 aa)	NidA	<i>Mycobacterium frederiksbergense</i> FAn9T	AAN78314	Unpublished
	99% (153/155 aa)	NidA	<i>Mycobacterium gilvum</i> czh-101	ABG02224	Unpublished
	99% (153/155 aa)	RHD $\alpha$	[ <i>Mycobacterium gilvum</i> Spyr1	YP_004074723	Kallimanis และคณะ, 2011

#### 4.5 แนวโน้มการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพของแบคทีเรียที่คัดแยกได้

นอกจากการตรวจสอบประสิทธิภาพและยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลาย PAHs ของแบคทีเรียที่คัดแยกได้แล้ว การผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพก็เป็นปัจจัยสำคัญอีกประการหนึ่งซึ่งส่งเสริมการย่อยสลาย PAHs ของแบคทีเรีย ดังนั้นแบคทีเรียที่คัดแยกได้ 5 สายพันธุ์ ประกอบด้วยแบคทีเรียย่อยสลายฟิแนทรีน *Ralstonia* sp. BPH, *Microbacterium* sp. BPW, *Alcaligenes* sp. SSK1B, *Achromobacter* sp. SSK4 และแบคทีเรียย่อยสลายไพรีน *Novosphingobium* sp. PCY ถูกนำมาประเมินการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพด้วยการวัดค่าแรงตึงผิวและความไม่ชอบน้ำของแบคทีเรียหลังผ่านการเลี้ยงในอาหารเหลว CFMM ที่มีแหล่งคาร์บอนที่ไม่ชอบน้ำ ได้แก่ ฟิแนทรีนความเข้มข้น 100 มิลลิกรัม/ลิตร หรือน้ำมันหล่อลื่นความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 4.6

ตารางที่ 4.6 ค่าแรงตึงผิวและความไม่ชอบน้ำของแบคทีเรียที่คัดแยกได้

แบคทีเรียที่คัดแยกได้	ค่าแรงตึงผิว (มิลลินิวตัน/เมตร)		เปอร์เซ็นต์ความไม่ชอบน้ำ
	ฟิแนทรีน	น้ำมันหล่อลื่น	
ชุดควบคุมปราศจากเชื้อ	65.7	62.0	-
<i>Novosphingobium</i> sp. PCY	48	29	25.8
<i>Ralstonia</i> sp. BPH	51	34	19.3
<i>Microbacterium</i> sp. BPW	50	30	38.0
<i>Alcaligenes</i> sp. SSK1B	54	29	14.9
<i>Achromobacter</i> sp. SSK4	53	33	4.0

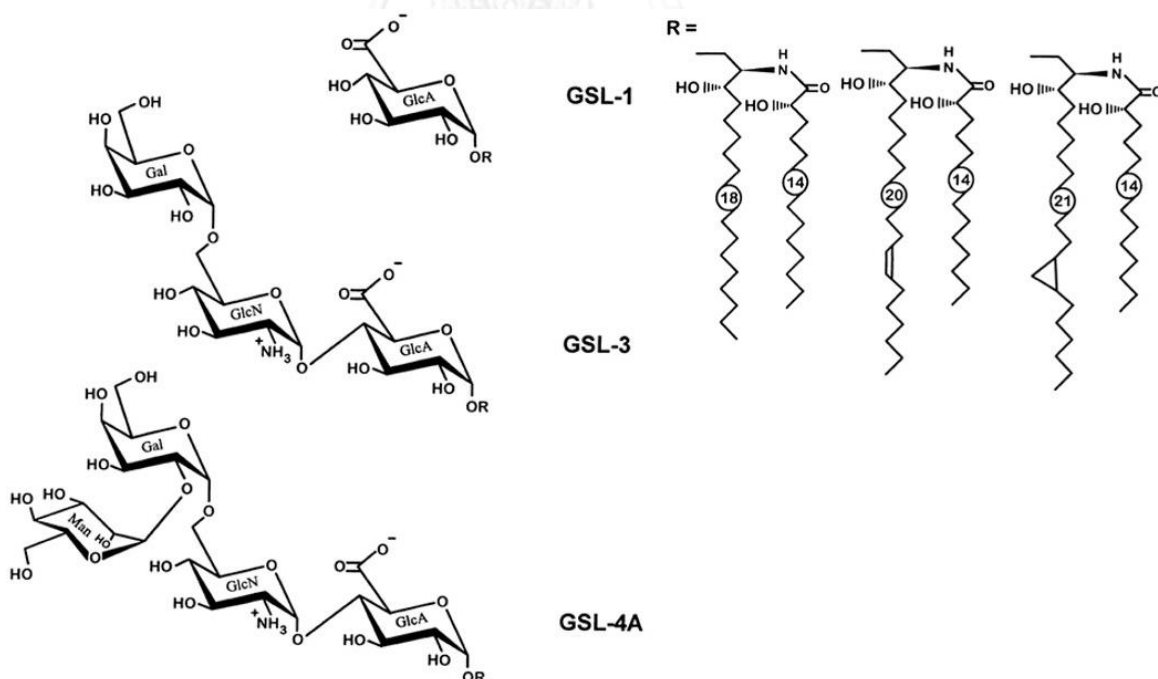
จากตารางที่ 4.6 ค่าแรงตึงผิวของแบคทีเรียทุกสายพันธุ์ลดลงจาก 65.7 มิลลินิวตัน/เมตร เหลือ 48-54 มิลลินิวตัน/เมตร เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีฟิแนทรีนเป็นแหล่งคาร์บอน และลดลงจาก 62.0 มิลลินิวตัน/เมตร เหลือ 29-34 มิลลินิวตัน/เมตร เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีน้ำมันหล่อลื่นเป็นแหล่งคาร์บอน แสดงให้เห็นแนวโน้มการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในแบคทีเรียย่อยสลาย PAHs ทุกสายพันธุ์ที่คัดแยกได้ ซึ่งอาจมีความเกี่ยวข้องกันระหว่างความสามารถในการย่อยสลาย PAHs หรือสารประกอบไฮโดรคาร์บอนอื่นๆ และการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ ดังงานวิจัยของ Reddy และคณะ (2010) ที่พบการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพระหว่างการย่อยสลายฟิแนทรีนของแบคทีเรีย *Brevibacillus* sp. PDM-3 โดยมีค่าแรงตึงผิวลดลงจาก 70 เหลือ 47 มิลลินิวตัน/เมตร ณ วันที่ 6 ในการย่อยสลายฟิแนทรีน 94 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้งานวิจัยของ Kumara และคณะ (2006) ยังแสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียผลิตสารลดแรงตึงผิว *Pseudomonas* sp. IR1 ก็ยังสามารถย่อยสลายเนฟธาลินฟิแนทรีน และไพรีนได้อีกด้วย โดยพบการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดไกลโคลิพิดที่มีค่าแรงตึงผิวลดลงจาก 72 เหลือ 35 มิลลินิวตัน/เมตร ในระหว่างการย่อยสลายไพรีน สำหรับผลความไม่ชอบ

น้ำของแบคทีเรียที่คัดแยกได้ พบว่าแบคทีเรียแกรมบวกสายพันธุ์ BPW มีความไม่ชอบน้ำสูงสุด (38.0 เปอร์เซ็นต์) ในขณะที่แบคทีเรียแกรมลบที่คัดแยกได้มีความไม่ชอบน้ำ 4.0-25.8 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Bogan และคณะ (2003) ที่พบว่าแบคทีเรียแกรมบวก *Mycobacterium* (แบคทีเรียในอันดับเดียวกันกับ *Microbacterium*) มีความไม่ชอบน้ำ 48-52 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีค่าสูงกว่าแบคทีเรียแกรมลบ *Pseudomonas* (4 เปอร์เซ็นต์) และ *Sphingomonas* spp. (0-26 เปอร์เซ็นต์) อย่างมีนัยสำคัญ

การผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพของแบคทีเรียแต่ละจีเนส ขึ้นกับปัจจัยที่สำคัญ 3 ประการ คือ ชนิดของแบคทีเรีย ชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อ และสภาวะการเลี้ยงเชื้อ (Souza และคณะ, 2014) ความสามารถในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพของแบคทีเรีย *Alcaligenes* มีรายงานมากมาย ได้แก่ สายพันธุ์ย่อยสลายน้ำมันดิบ (1 เปอร์เซ็นต์) *Alcaligenes piechaudii* CZOR L-1B ผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดไกลโคลิพิด สามารถลดแรงตึงผิวจาก  $72.1 \pm 0.4$  เหลือ  $55.2 \pm 0.2$  มิลลินิวตัน/เมตร และมีความไม่ชอบน้ำ 15-46 เปอร์เซ็นต์ (Ptaza และคณะ, 2005) สายพันธุ์ย่อยสลายไฮโดรคาร์บอน *Alcaligenes faecalis* 212 ผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดเอ็กโซพอลิเมอร์ (exopolymers) ที่ประกอบด้วยคาร์โบไฮเดรต 30-51 เปอร์เซ็นต์ และโปรตีน 10-22 เปอร์เซ็นต์ มีค่า CMC 2 กรัม/ลิตร สามารถลดแรงตึงผิวจาก 70 เหลือ 50 มิลลินิวตัน/เมตร (Toledo และคณะ, 2008) สายพันธุ์ *Alcaligenes* sp. S-XJ-1 ผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดลิพอเปปไทด์ สามารถลดแรงตึงผิวจาก  $68.9 \pm 0.3$  เหลือ  $30.8 \pm 0.5$  มิลลินิวตัน/เมตร และมีความไม่ชอบน้ำ 12-72 เปอร์เซ็นต์ (Huang และคณะ, 2009) สายพันธุ์ย่อยสลายน้ำมันดีเซล (2 เปอร์เซ็นต์) *Alcaligenes faecalis* ผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดไกลโคลิพิดที่มีค่า CMC 0.038 กรัม/ลิตร สามารถลดแรงตึงผิวจาก 71.6 เหลือ 32.2 มิลลินิวตัน/เมตร และมีความไม่ชอบน้ำประมาณ 80 เปอร์เซ็นต์ (Bharali และคณะ, 2011) รายงานการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพของแบคทีเรีย *Ralstonia Achromobacter* และ *Microbacterium* ยังมีจำนวนน้อย ได้แก่ สายพันธุ์ย่อยสลายน้ำมันดิบ (1 เปอร์เซ็นต์) *Ralstonia picketti* BP20 ผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดไกลโคลิพิด สามารถลดแรงตึงผิวจาก  $72.1 \pm 0.4$  เหลือ  $61.1 \pm 0.3$  มิลลินิวตัน/เมตร และมีความไม่ชอบน้ำ 18-42 เปอร์เซ็นต์ (Ptaza และคณะ, 2005) สายพันธุ์ทนต่อโลหะหนักแคดเมียมและสังกะสี *Ralstonia* sp. HM-1 ที่ผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพเพื่อส่งเสริมการกำจัดโลหะหนักในดินตะกอน (Park และคณะ, 2008) สายพันธุ์ย่อยสลายน้ำมันถั่วเหลือง (2 เปอร์เซ็นต์) *Achromobacter xylosoxidans* BW1 ผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่สามารถลดแรงตึงผิวจาก 64.65 เหลือ 51.60 มิลลินิวตัน/เมตร (Tambekar และคณะ, 2012) อย่างไรก็ตาม ยังพบว่าไม่มีการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในระหว่างการย่อยสลายเนพธาลีนของสายพันธุ์ *Achromobacter* sp. FBHYA2 (Farjadfard และคณะ, 2012) สำหรับแบคทีเรียจีเนส *Microbacterium* สายพันธุ์ที่พบการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพคือ *Microbacterium* sp. 47 แต่ยังไม่ได้รับการศึกษาสมบัติของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้ (Domingues และคณะ, 2013) ในขณะที่มีรายงานการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพมากมายในแบคทีเรียอันดับ Actinomycetales (อันดับเดียวกันกับ *Microbacterium*) ตัวอย่างเช่นจีเนส *Mycobacterium Micrococcus Nocardia Nocardopsis Rhodococcus Streptomyces Arthrobacter* (Souza และคณะ, 2014) นอกจากนี้ ยังไม่พบรายงานการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพของแบคทีเรีย

*Novosphingobium* แต่มีรายงานในแบคทีเรียที่เรียกรวม Sphingomonads (กลุ่มเดียวกันกับ *Novosphingobium*) เช่น สายพันธุ์ย่อยสายพันธุ์ *Sphingomonas paucimobilis* 20006FA ผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่สามารถลดแรงตึงผิวเหลือ  $19.7 \pm 1.1$  มิลลินิวตัน/เมตร ซึ่งมีประสิทธิภาพดีกว่าสารลดแรงตึงผิวทางเคมี SDS (0.25 เปอร์เซ็นต์) ที่สามารถลดแรงตึงผิวเหลือ  $40.5 \pm 1.2$  มิลลินิวตัน/เมตร แต่มีความไม่ชอบน้ำน้อยมากประมาณ 0.13 เปอร์เซ็นต์ (Coppotelli และคณะ, 2010) ในขณะที่สายพันธุ์ย่อยสายพันธุ์น้ำมันดีเซล (1 เปอร์เซ็นต์) *Sphingomonas* sp. VA1 มีความไม่ชอบน้ำสูงถึง 94 เปอร์เซ็นต์ (Zhang และคณะ, 2014) อย่างไรก็ตาม ไม่พบการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในสายพันธุ์ย่อยสายพันธุ์ไฮโดรคาร์บอน *Novosphingobium* sp. PP1Y แต่มีการสร้างไบโอฟิล์ม (biofilm) ทั้งบนอาหารแข็งและอาหารเหลวที่มีไฮโดรคาร์บอน เช่น น้ำมันดีเซล แก๊สโซลีน และ PAHs เป็นแหล่งคาร์บอน ส่งผลให้สายพันธุ์ PP1Y สามารถยึดเกาะกับอนุภาคดินได้ดี จึงมีประโยชน์ในการบำบัดดินปนเปื้อน (Notomista และคณะ, 2011)

เมื่อเปรียบเทียบแบคทีเรียที่คัดแยกได้ทั้ง 5 สายพันธุ์ พบว่า *Novosphingobium* sp. PCY มีความสามารถในการลดแรงตึงผิวได้ดีที่สุดและมีความไม่ชอบน้ำสูงสุดในบรรดาแบคทีเรียแกรมลบที่คัดแยกได้ ทั้งนี้เนื่องจากแบคทีเรียในกลุ่ม Sphingomonads มีไกลโคสฟิงโกลิพิดแทนที่ลิพอพอลิแซ็กคาไรด์บริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นนอก โครงสร้างของไกลโคสฟิงโกลิพิดที่พบในแบคทีเรีย *Sphingomonas paucimobilis* แสดงในรูปที่ 4.4 (Kawahara และคณะ, 2000) ซึ่งมีลักษณะเป็นสารที่มีขั้วและไม่ขั้วในโมเลกุลเดียวกัน (amphiphilic) จึงมีคุณสมบัติคล้ายสารลดแรงตึงผิว



รูปที่ 4.4 ไกลโคสฟิงโกลิพิดที่พบในแบคทีเรียกลุ่ม Sphingomonads

(Kawahara และคณะ, 2000)

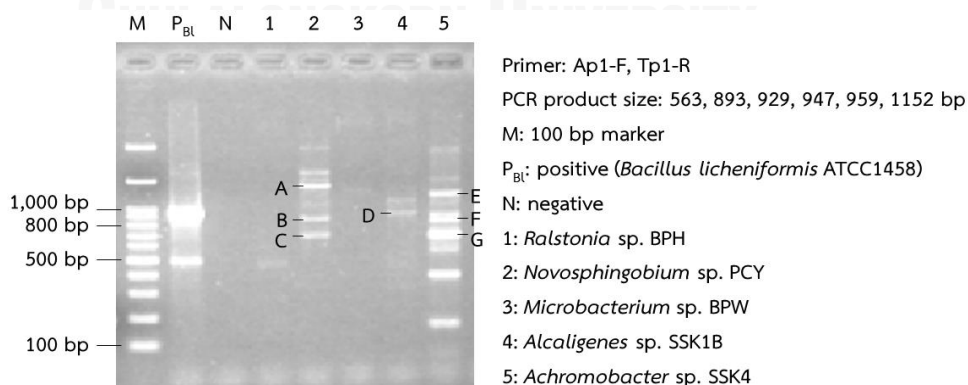
#### 4.6 ยีนที่เกี่ยวข้องกับการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพของแบคทีเรียที่คัดแยกได้

แบคทีเรียที่คัดแยกได้ 5 สายพันธุ์ ประกอบด้วย แบคทีเรียย่อยสลายฟีนแอนทริน *Ralstonia* sp. BPH, *Microbacterium* sp. BPW, *Alcaligenes* sp. SSK1B, *Achromobacter* sp. SSK4 และแบคทีเรียย่อยสลายไพรีน *Novosphingobium* sp. PCY ยังถูกนำมาตรวจสอบยีนที่เกี่ยวข้องกับการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพเบื้องต้น โดยอาศัยไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีนผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพกลุ่มลิพอเปปไทด์ จำนวน 4 ไพรเมอร์ ได้แก่ As1-F/Ts2-R ที่จำเพาะต่อยีนผลิตเซอร์แฟคติน และไลเคนโนซิน Am1-F/Tm1-R ที่จำเพาะต่อยีนผลิตไมโคซบิทีลินและอิทูริน Af2-F/Tf1-R ที่จำเพาะต่อยีนผลิตเพนโจซิน และ Ap1-F/Tp1-R ที่จำเพาะต่อยีนผลิตฟลิพาสตาติน ผลการเกิดผลิตภัณฑ์ PCR แสดงในตารางที่ 4.7 ซึ่งไม่พบผลิตภัณฑ์ PCR จากไพรเมอร์ As1-F/Ts2-R (รูปที่ จ-3) Am1-F/Tm1-R (รูปที่ จ-4) และ Af2-F/Tf1-R (รูปที่ จ-5) แต่พบผลิตภัณฑ์ PCR จากไพรเมอร์ Ap1-F/Tp1-R ในสายพันธุ์ PCY, SSK1B และ SSK4 (รูปที่ 4.5 และ จ-6)

#### ตารางที่ 4.7 ยีนผลิตสารลดแรงตึงผิวกลุ่มลิพอเปปไทด์ของแบคทีเรียที่คัดแยกได้

แบคทีเรีย <i>Bacillus</i> (positive) และแบคทีเรียที่คัดแยกได้	ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีนผลิตลิพอเปปไทด์			
	As/Ts	Am/Tm	Af/Tf	Ap/Tp
<i>B. amyloliquefaciens</i> ATCC23350	-	-	+	-
<i>B. licheniformis</i> ATCC1458	+	-	+	+
<i>B. subtilis</i> ATCC6633	+	+	+	-
<i>Novosphingobium</i> sp. PCY	-	-	-	+
<i>Ralstonia</i> sp. BPH	-	-	-	-
<i>Microbacterium</i> sp. BPW	-	-	-	-
<i>Alcaligenes</i> sp. SSK1B	-	-	-	+
<i>Achromobacter</i> sp. SSK4	-	-	-	+

+ พบผลิตภัณฑ์ PCR ตามขนาดที่คาดหวัง; - ไม่พบผลิตภัณฑ์ PCR ตามขนาดที่คาดหวัง



รูปที่ 4.5 ผลิตภัณฑ์ PCR ด้วยไพรเมอร์ Ap1-F, Tp1-R ของแบคทีเรียที่คัดแยกได้ทั้ง 5 สายพันธุ์ พร้อมแสดงขึ้นผลิตภัณฑ์ที่วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

ชิ้นผลิตภัณฑ์ PCR ด้วยไพรเมอร์ Ap1-F, Tp1-R ที่สังเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ (A-G) แสดงในรูปที่ 4.5 ผลการวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลพบว่า ชิ้นผลิตภัณฑ์ PCR ของ *Novosphingobium* sp. PCY (แถบ A และ C) *Alcaligenes* sp. SSK1B (แถบ D) และ *Achromobacter* sp. SSK4 (แถบ E-G) ไม่มีความเกี่ยวข้องกับยีนผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ ในขณะที่ชิ้นผลิตภัณฑ์ PCR ของ *Novosphingobium* sp. PCY (แถบ B) มีความเหมือนกับโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างพอลิแซ็กคาไรด์ที่ปล่อยออกมานอกเซลล์ (exopolysaccharide) (ตารางที่ 4.8)

**ตารางที่ 4.8** ความเหมือนของผลิตภัณฑ์ PCR ด้วยไพรเมอร์ Ap1-F, Tp1-R ของ *Novosphingobium* sp. PCY (แถบ A-C)

ผลิตภัณฑ์ PCR ด้วย ไพรเมอร์ Ap/Tp	ความเหมือนกับฐานข้อมูลของกรดอะมิโน			
	ความเหมือน	โปรตีนของแบคทีเรีย	accession number	อ้างอิง
แถบ A (ขนาด 285 bp, JX105352)	100% (95/95 aa)	hypothetical protein [ <i>Novosphingobium</i> sp. PP1Y]	YP_004538551	D'Argenio และคณะ, 2011
แถบ B (ขนาด 423 bp, JX105353)	99% (140/141 aa)	exopolysaccharide biosynthesis protein [ <i>Novosphingobium</i> sp. PP1Y]	YP_004534845	D'Argenio และคณะ, 2011
	99% (140/141 aa)	capsular polysaccharide biosynthesis protein [ <i>Novosphingobium pentaromativorans</i> US6-1]	WP_007011119	Luo และคณะ, 2012a
	91% (128/141 aa)	capsular polysaccharide biosynthesis protein [ <i>Sphingomonas</i> sp. LH128]	WP_008829433	Unpublished
แถบ C (ขนาด 489 bp, JX105354)	70% (99/141 aa)	exopolysaccharide biosynthesis protein [ <i>Novosphingobium aromaticivorans</i> DSM 12444]	YP_497605	Unpublished
	100% (163/163 aa)	glycoside hydrolase 15-like protein [ <i>Novosphingobium</i> sp. PP1Y]	YP_004533563	D'Argenio และคณะ, 2011
	100% (163/163 aa)	glucoamylase [ <i>Novosphingobium pentaromativorans</i> US6-1]	WP_007011994	Luo และคณะ, 2012a

## บทสรุป

แบคทีเรียที่คัดแยกได้จากดินตะกอนป่าชายเลนมีความสามารถหลากหลายในการย่อยสลาย PAHs และการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ อีกทั้งยังสามารถเจริญได้ในสภาวะที่มีปริมาณโซเดียมคลอไรด์ 0-3.5 เปอร์เซ็นต์ สายพันธุ์ที่น่าสนใจคือแบคทีเรียแกรมลบ *Novosphingobium* sp. PCY ซึ่งมีความสามารถในการย่อยสลาย PAHs ได้หลายชนิด โดยเฉพาะอย่างยิ่งไพรีนและฟิแนนทรีน อีกทั้งยังมียีนประมวลรหัสหน่วยย่อยแอลฟาของเอนไซม์ไดออกซิจีเนสของแบคทีเรียแกรมบวก (*nidA*) ซึ่งยังไม่เคยมีรายงานมาก่อน จึงมีความน่าสนใจที่จะศึกษาลักษณะเบื้องต้นของสายพันธุ์ดังกล่าวเพื่อการพัฒนาเป็นหัวเชื้อสำหรับการบำบัดดินปนเปื้อนต่อไป



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
CHULALONGKORN UNIVERSITY



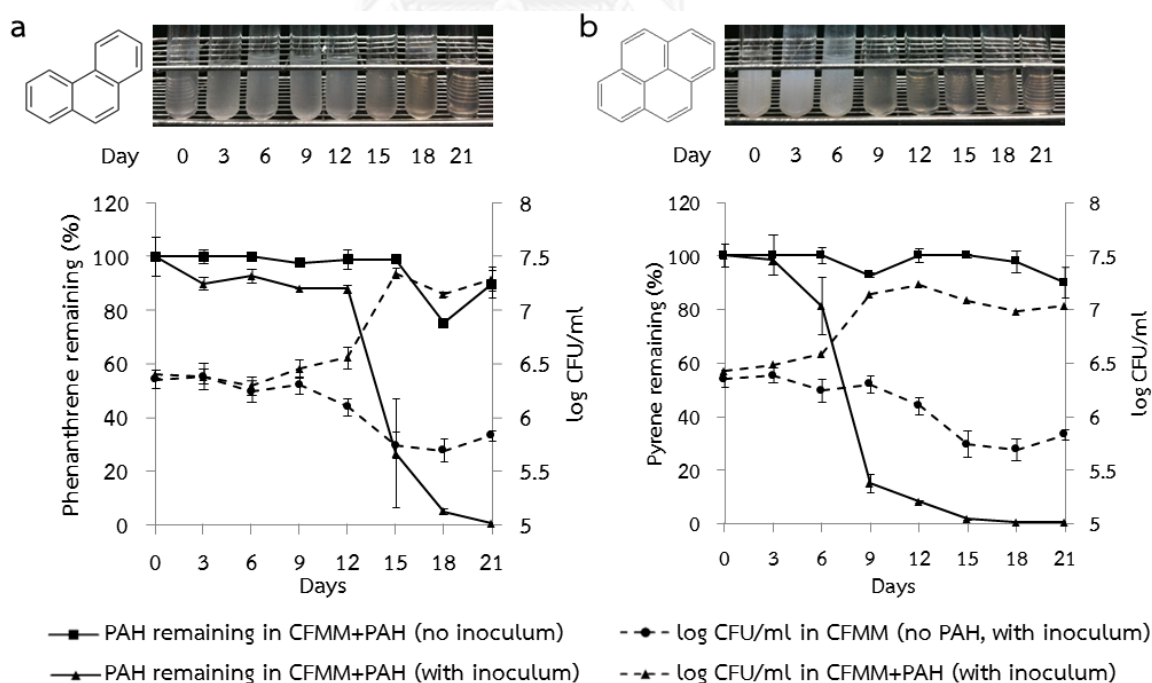
## บทที่ 5

ลักษณะสมบัติเบื้องต้นสำหรับการพัฒนาเป็นหัวเชื้อพร้อมใช้ของ  
*Novosphingobium* sp. สายพันธุ์ PCY

แบคทีเรีย *Novosphingobium* sp. PCY ที่คัดแยกได้จากดินตะกอนป่าชายเลน เป็นสายพันธุ์ที่มีความสามารถในการย่อยสลาย PAHs ได้หลากหลายชนิด มีแนวโน้มการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ อีกทั้งยังมีโครงสร้างเซลล์เอื้อต่อการดูดซับกับดินหรือสารประกอบที่ไม่ชอบน้ำ ทำให้มีประโยชน์ต่อการนำไปประยุกต์ใช้ในการบำบัดดินปนเปื้อน ดังนั้นแบคทีเรีย *Novosphingobium* sp. PCY จึงถูกเลือกมาศึกษาลักษณะสมบัติเบื้องต้นสำหรับการพัฒนาเป็นหัวเชื้อพร้อมใช้ต่อไป

### 5.1 รูปแบบการเจริญและการย่อยสลายพีแนนทรีนและไพรีน

แบคทีเรีย *Novosphingobium* sp. PCY ถูกนำมาตรวจสอบรูปแบบการเจริญและการย่อยสลายพีแนนทรีนและไพรีน เนื่องจากเป็น PAHs ชนิดที่สายพันธุ์ PCY สามารถย่อยสลายได้อย่างรวดเร็วและมีประสิทธิภาพดี อีกทั้งยังเป็น PAHs ที่พบมากในสิ่งแวดล้อม การทดสอบทำในอาหารเหลว CFMM ที่มีพีแนนทรีนหรือไพรีนความเข้มข้นเริ่มต้น 100 มิลลิกรัม/ลิตร ผลการทดลองแสดงในรูปที่ 5.1



รูปที่ 5.1 รูปแบบการเจริญระหว่างการย่อยสลายพีแนนทรีน (a) และไพรีน (b) ของ

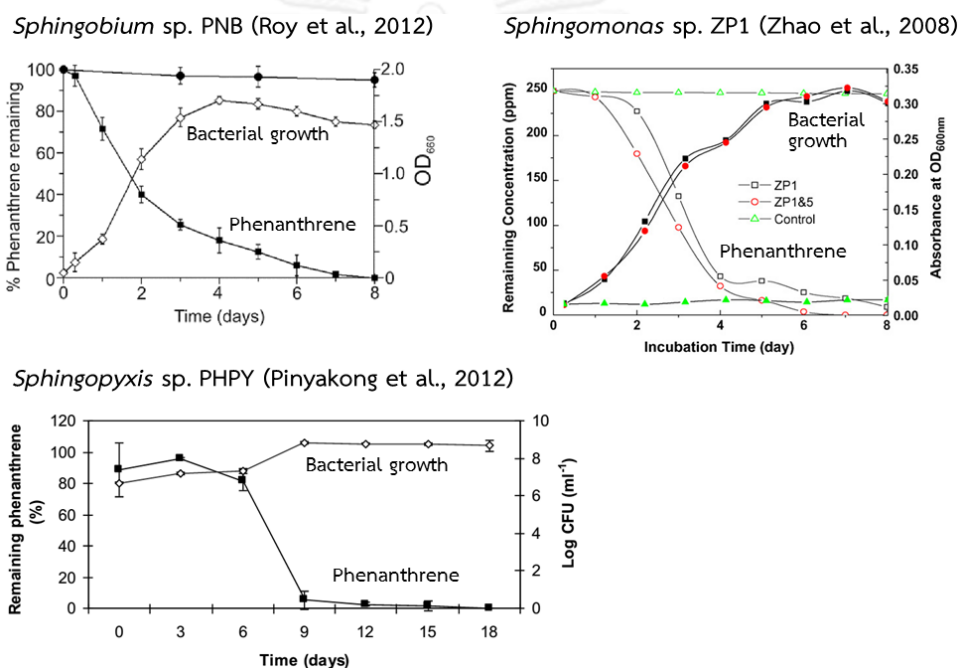
*Novosphingobium* sp. PCY

รูปแบบการเจริญระหว่างการย่อยสลายพีแนนทรีนและไพรีนของสายพันธุ์ PCY มีลักษณะเหมือนกัน กล่าวคือช่วงแรกที่ยังไม่มีการลดลงของ PAH หรือมีการลดลงน้อยมาก จะมีการเจริญแบบ lag phase จากนั้นการลดลงของ PAH จะเกิดขึ้นอย่างรวดเร็วในขณะเดียวกันกับการเพิ่มจำนวนของแบคทีเรียอย่างรวดเร็ว (log phase) และเมื่อ PAH เหลือน้อยลงหรือหมดไป การเจริญจะเข้าสู่ช่วงคงที่ (stationary phase) เมื่อเปรียบเทียบระหว่างชนิดของ PAH พบว่าประสิทธิภาพในการย่อยสลายไพรีนดีกว่าพีแนนทรีน โดยมีระยะเวลาช่วง lag phase ในการย่อยสลายไพรีนเพียง 3 วัน และสามารถย่อยสลายอย่างสมบูรณ์ในเวลา 18 วัน (รูปที่ 5.1 a) ในขณะที่การย่อยสลายพีแนนทรีนมีระยะเวลาช่วง lag phase นาน 6 วัน และสามารถย่อยสลายอย่างสมบูรณ์ในเวลา 21 วัน (รูปที่ 5.1 b) ผลของรูปแบบการเจริญดังกล่าวสอดคล้องกับประสิทธิภาพการย่อยสลาย PAHs (ข้อ 4.3) และชนิดของยีนประมวลรหัสหน่วยย่อยแอลฟาของเอนไซม์ไดออกซิจีเนสที่พบ (ข้อ 4.4) เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพการย่อยสลายไพรีนและพีแนนทรีนของกับแบคทีเรียกลุ่ม Sphingomonads ในรายงานวิจัยอื่นๆ พบว่าสายพันธุ์ PCY มีประสิทธิภาพการย่อยสลายไพรีนสูงกว่าสายพันธุ์อื่นๆ และมีประสิทธิภาพการย่อยสลายพีแนนทรีนในระดับปานกลาง (ตารางที่ 5.1)

**ตารางที่ 5.1** ประสิทธิภาพการย่อยสลายพีแนนทรีนและไพรีนของแบคทีเรีย Sphingomonads

Sphingomonads	PAH (มก./ล.)	ประสิทธิภาพการย่อยสลาย	อ้างอิง
<b>Novosphingobium</b>			
<i>Novosphingobium</i> sp. PCY	พีแนนทรีน (100)	95.1%, 18 วัน	งานวิจัยนี้
	ไพรีน (100)	98.2%, 15 วัน	
<i>N. pentaromativorans</i> US1-6	ไพรีน (10)	100%, 4 วัน	Sohn และคณะ, 2004
<b>Sphingobium</b>			
<i>S. chlorophenolicum</i> C3R	พีแนนทรีน (300)	99%, 12 วัน	Colombo และคณะ, 2011
<i>Sphingobium</i> sp. PNB	พีแนนทรีน (1000)	100%, 8 วัน	Roy และคณะ, 2012
<b>Sphingomonas</b>			
<i>S. paucimobilis</i> ZX4	พีแนนทรีน (1000)	98.7%, 14 วัน	Xia และคณะ, 2005
<i>Sphingomonas</i> sp. GY2B	พีแนนทรีน (100)	99.1%, 2 วัน	Tao และคณะ, 2007
<i>Sphingomonas</i> sp. PheB4	พีแนนทรีน (10)	100%, 1 วัน	Zhong และคณะ, 2007
<i>Sphingomonas</i> sp. ZP1	พีแนนทรีน (250)	100%, 8 วัน	Zhao และคณะ, 2008
<i>Sphingomonas</i> sp. GF2B	พีแนนทรีน (40)	83.6%, 10 วัน	Pei และคณะ, 2010
<b>Sphingopyxis</b>			
<i>Sphingopyxis</i> sp. PHPY	พีแนนทรีน (500)	95%, 9 วัน	Pinyakong และคณะ, 2012

อย่างไรก็ตาม แม้ว่าจะมีประสิทธิภาพในการย่อยสลายไพรีนและฟิแนนทรีนต่างกันในแต่ละสายพันธุ์ แต่มีรูปแบบการเจริญระหว่างการย่อยสลาย PAHs ของแบคทีเรียที่เหมือนกัน ดังตัวอย่างรูปแบบการเจริญระหว่างการย่อยสลายฟิแนนทรีน (ความเข้มข้นเริ่มต้นของฟิแนนทรีน 1000, 250 และ 500 มิลลิกรัม/ลิตร ตามลำดับ) ของ *Sphingobium* sp. PNB (Roy และคณะ, 2012) *Sphingomonas* sp. ZP1 (Zhao และคณะ, 2008) และ *Sphingopyxis* sp. PHPY (Pinyakong และคณะ, 2012) ในรูปที่ 5.2 กล่าวคือแบคทีเรียมีการปรับตัวต่อสภาวะที่มีฟิแนนทรีนในช่วงการเจริญระยะ lag จากนั้นจะเริ่มย่อยสลายฟิแนนทรีนแล้วเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วในระยะ log และเข้าสู่ระยะ stationary ที่มีการเจริญของแบคทีเรียคงที่ เมื่อฟิแนนทรีนเหลือน้อยหรือเริ่มหมดลง โดยแต่ละสายพันธุ์จะมีระยะเวลาของแต่ละช่วงการเจริญต่างกันดังตารางที่ 5.2



รูปที่ 5.2 รูปแบบการเจริญระหว่างการย่อยสลายฟิแนนทรีนของแบคทีเรีย Sphingomonads สายพันธุ์อื่นๆ

ตารางที่ 5.2 การเปรียบเทียบรูปแบบการเจริญระหว่างการย่อยสลายฟิแนนทรีนของแบคทีเรีย Sphingomonads

Sphingomonads	วันที่ของระยะการเจริญ			อ้างอิง
	Lag	Log	Stationary	
<i>Novosphingobium</i> sp. PCY	0-6	6-15	15-21	งานวิจัยนี้
<i>Sphingomonas</i> sp. ZP1	0-0.25	0.25-5	5-8	Zhao และคณะ, 2008
<i>Sphingopyxis</i> sp. PHPY	0-3	3-9	9-18	Pinyakong และคณะ, 2012
<i>Sphingobium</i> sp. PNB	-	0-4	4-8	Roy และคณะ, 2012

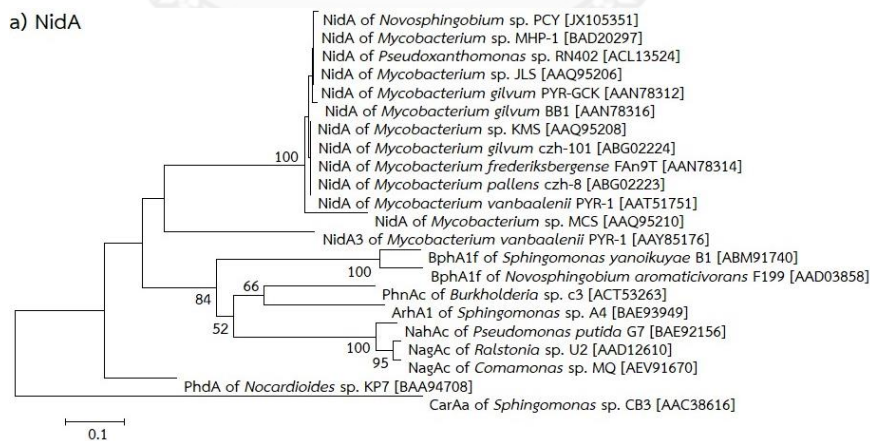
## 5.2 ยีนประมวลรหัสไดออกซิจีนอื่นๆ

เนื่องจากการตรวจหายีนประมวลรหัสหน่วยย่อยแอลฟาของเอนไซม์ไดออกซิจีเนสของแบคทีเรีย *Novosphingobium* sp. PCY พบว่าเป็นยีนประมวลรหัสเอนไซม์ไดออกซิจีเนสจากแบคทีเรียแกรมบวก *Mycobacterium* (ข้อ 4.4) ซึ่งยังไม่พบรายงานยีนดังกล่าวในแบคทีเรีย *Novosphingobium* จึงมีความน่าสนใจที่จะตรวจหายีนประมวลรหัสเอนไซม์ไดออกซิจีเนสอื่นๆในสายพันธุ์ PCY โดยอาศัยไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อเอนไซม์ไดออกซิจีเนสที่พบในแบคทีเรียย่อยสลาย PAHs กลุ่ม Sphingomonads (*bphA1f*, *bphA3*, *bphA4*, *bphC*) และจีโนม *Mycobacterium* (*nidA*, *nidB*, *phtAc*, *phtAd*) ผลการเกิดผลิตภัณฑ์ PCR แสดงในตารางที่ 5.3 ซึ่งไม่พบผลิตภัณฑ์ PCR จากไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *bphA1f* (รูปที่ จ-7) *phtAc* และ *phtAd* (รูปที่ จ-13) แต่พบผลิตภัณฑ์ PCR จากไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *bphA3* (รูปที่ จ-8) *bphA4* (รูปที่ จ-9) *bphC* (รูปที่ จ-10) *nidA* (รูปที่ จ-11) และ *nidB* (รูปที่ จ-12) การเปรียบเทียบยีนประมวลรหัสระบบเอนไซม์ไดออกซิจีเนสกับแบคทีเรียในกลุ่ม Sphingomonads (ตารางที่ 5.3) แสดงให้เห็นว่าสายพันธุ์ PCY ไม่มียีนประมวลรหัสหน่วยย่อยแอลฟาของเอนไซม์ไดออกซิจีเนส *bphA1f* ซึ่งเกี่ยวข้องกับที่ย่อยสลาย PAHs ในแบคทีเรียกลุ่ม Sphingomonads เช่น *Sphingomonas yanoikuyae* B1 และ *Novosphingobium aromaticivorans* F199 (Pinyakong และคณะ, 2003a) แต่พบยีนประมวลรหัสหน่วยย่อยแอลฟาของเอนไซม์ไพรีนไดออกซิจีเนส *nidA* ซึ่งไม่เคยมีรายงานว่าพบในแบคทีเรียกลุ่ม Sphingomonads มาก่อน แต่มีรายงานว่าเกี่ยวข้องกับที่ย่อยสลายไพรีนและ PAHs มวลโมเลกุลสูงในแบคทีเรียจีโนม *Mycobacterium* spp. (Kim และคณะ, 2007) อย่างไรก็ตาม ยีนประมวลรหัสเพอร์ริดอกซิน เพอร์ริดอกซินรีดักเทส และเอกซ์ตราไดออกซิจีเนสที่พบในสายพันธุ์ PCY คือ *bphA3*, *bphA4* และ *bphC* ตามลำดับ ซึ่งเป็นยีนที่พบทั่วไปในแบคทีเรียกลุ่ม Sphingomonads ดังนั้น แม้ว่าสายพันธุ์ PCY จะมีความเหมือนกันของลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rDNA กับแบคทีเรียกลุ่ม Sphingomonads แต่ก็มียีนประมวลรหัสระบบเอนไซม์ไดออกซิจีเนสบางชนิดที่แตกต่างออกไป เมื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของโปรตีนที่ถอดรหัสมาจากยีนไดออกซิจีเนสที่พบในสายพันธุ์ PCY พบว่าหน่วยย่อยแอลฟาและเบตาของเทอร์มินอลไดออกซิจีเนส (*NidA* และ *NidB*) ที่พบในสายพันธุ์ PCY จัดอยู่ในกลุ่มเดียวกันกับ *NidA* ที่พบในแบคทีเรียจีโนม *Mycobacterium* spp. ซึ่งแยกออกมาจากหน่วยย่อยแอลฟาและเบตาของเทอร์มินอลไดออกซิจีเนส (*BphA1f* และ *BphA2f*) ที่พบในแบคทีเรียกลุ่ม Sphingomonads (รูปที่ 5.3 a-b) ในทางตรงกันข้ามเพอร์ริดอกซิน (*BphA3*) และเอกซ์ตราไดออกซิจีเนส (*BphC*) ที่พบในสายพันธุ์ PCY จัดอยู่ในกลุ่มเดียวกันกับ *BphA3* และ *BphC* ที่พบในแบคทีเรียกลุ่ม Sphingomonads (รูปที่ 5.3 c และ e) ซึ่งแยกออกมาจากเพอร์ริดอกซิน (*PhtAc*) และเอกซ์ตราไดออกซิจีเนส (*PhdF*) ที่พบในแบคทีเรียจีโนม *Mycobacterium* อย่างไรก็ตาม เพอร์ริดอกซินรีดักเทส (*BphA4*) ที่พบในสายพันธุ์ PCY จัดอยู่ในกลุ่มเดียวกันกับออกซิโดรีดักเทส (FAD dependent oxidoreductase) ของแบคทีเรียจีโนม *Novosphingobium* spp. เช่น *Novosphingobium* sp. PP1Y และ *Novosphingobium pentaromativorans* US6-1 ซึ่งแยกออกมาจากเพอร์ริดอกซินรีดักเทสที่พบในแบคทีเรียกลุ่ม Sphingomonads (*BphA4*) และจีโนม *Mycobacterium* (*PhtAd*) (รูปที่ 5.3 d)

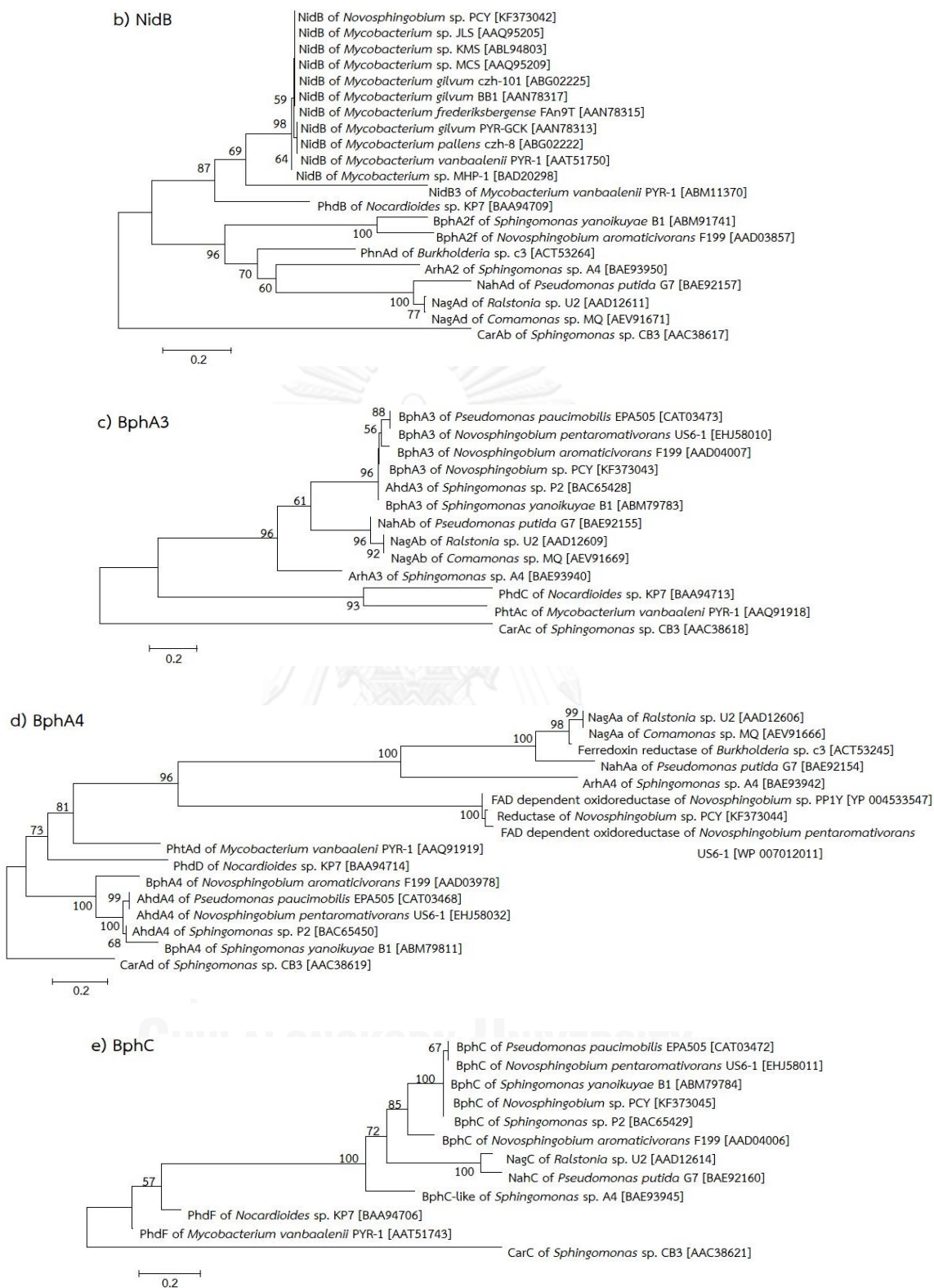
ตารางที่ 5.3 ยีนประมวลรหัสระบบเอนไซม์ไดออกซิจีเนสของ *Novosphingobium* sp. PCY เปรียบเทียบกับแบคทีเรียอื่นๆในกลุ่ม Sphingomonads

ยีนประมวลรหัสเอนไซม์ไดออกซิจีเนส	Sphingomonads	PCY	B1	F199	P2	US6-1	PP1Y
ยีนไดออกซิจีเนสที่พบใน Sphingomonads							
<i>bphA1f</i>	RHD $\alpha$	-	+	+	*	-	**
<i>bphA2f</i>	RHD $\beta$	NE	+	+	NR	-	**
<i>bphA3</i>	Ferredoxin	+	+	+	+	+	-
<i>bphA4</i>	Reductase	+	+	+	+	+	-
<i>bphC</i>	Extradiol dioxygenase	+	+	+	+	+	+
ยีนไดออกซิจีเนสที่พบใน <i>Mycobacterium</i>							
<i>nidA</i>	RHD $\alpha$	+	NR	*	*	**	**
<i>nidB</i>	RHD $\beta$	+	NR	*	*	**	**
<i>phtAc</i>	Ferredoxin	-	NR	NE	*	**	**
<i>phtAd</i>	Reductase	-	NR	NE	*	**	**

PCY: *Novosphingobium* sp. PCY; B1: *S. yanoikuyae* B1 (Cunliffe และคณะ, 2006b); F199: *N. aromaticivorans* F199 (Romine และคณะ, 1999); P2: *Sphingobium* sp. P2 (Pinyakong และคณะ, 2003b); US6-1: *N. pentaromativorans* US6-1 (Luo และคณะ, 2012a); PP1Y: *Novosphingobium* sp. PP1Y (D'Argenio และคณะ, 2011); + พบผลิตภัณฑ์ PCR ตามขนาดที่คาดหวัง; - ไม่พบผลิตภัณฑ์ PCR ตามขนาดที่คาดหวัง; NE ไม่ได้ตรวจสอบ; NR ไม่มีรายงาน; \* ตรวจสอบในงานวิจัยนี้โดยวิธี PCR; \*\* ตรวจสอบในงานวิจัยนี้โดยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์



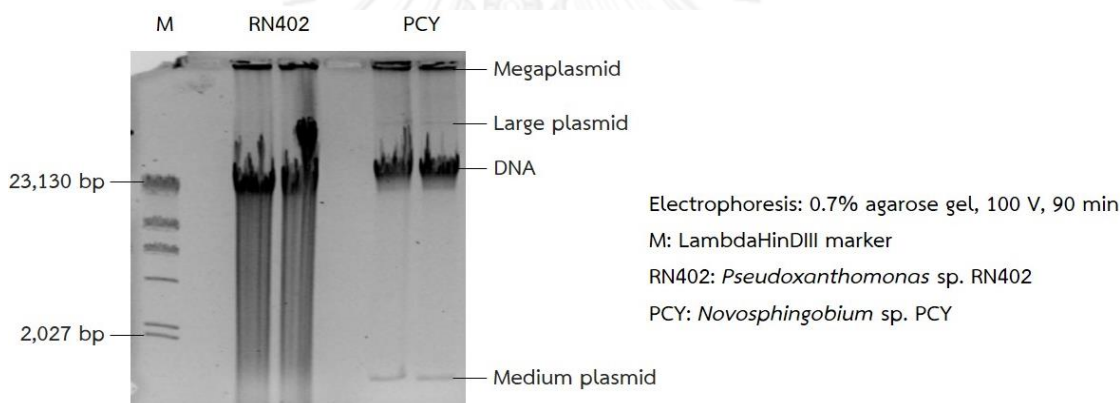
รูปที่ 5.3 แผนภูมิความสัมพันธ์ของ NidA (a), NidB (b), BphA3 (c), BphA4 (d) และ BphC (e) ของ *Novosphingobium* sp. PCY และโปรตีนที่เกี่ยวข้อง



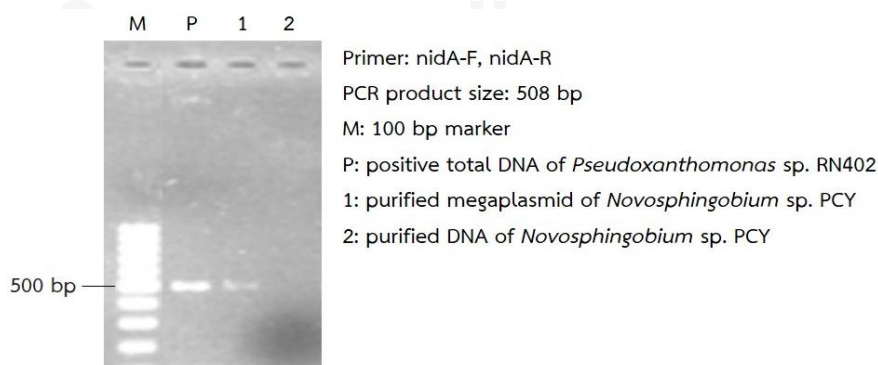
รูปที่ 5.3 แผนภูมิตามความสัมพันธ์ของ NidA (a), NidB (b), BphA3 (c), BphA4 (d) และ BphC (e) ของ *Novosphingobium* sp. PCY และโปรตีนที่เกี่ยวข้อง (ต่อ)  
 (ค่า Bootstrap มากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์)

### 5.3 ตำแหน่งของยีน *nidA* และขนาดของพลาสมิด

จากการพบยีนประมวลรหัสหน่วยย่อยแอลฟาของเอนไซม์ไพรีนไดออกซิจีเนสของแบคทีเรียแกรมบวก *Mycobacterium* spp. (*nidA*) ในแบคทีเรีย *Novosphingobium* sp. PCY ซึ่งยังไม่เคยมีรายงานมาก่อน จึงมีความน่าสนใจในการตรวจสอบตำแหน่งของยีนดังกล่าว การตรวจสอบเบื้องต้นทำโดยอิเล็กโทรโฟรีซิสของ DNA ของสายพันธุ์ PCY เปรียบเทียบกับของ *Pseudoxanthomonas* sp. RN402 (ชุดควบคุมเชิงบวก) ที่มีรายงานการพบยีน *nidA* บนเมกะพลาสมิด (Klankeo และคณะ, 2009) รูปที่ 5.4 และรูปที่ 5.5 แสดงให้เห็นว่าสายพันธุ์ PCY มีพลาสมิดอย่างน้อย 4 ชั้น ประกอบด้วย เมกะพลาสมิด (megaplasmid) พลาสมิดขนาดใหญ่ (large plasmid) พลาสมิดขนาดกลาง (medium plasmid) และพลาสมิดขนาดเล็ก (small plasmid) จากนั้นตัดแถบของ DNA และเมกะพลาสมิดที่พบในสายพันธุ์ PCY มาทำบริสุทธิ์ เพื่อใช้เป็นแม่แบบในการตรวจสอบตำแหน่งของยีน *nidA* ด้วยวิธี PCR โดยใช้ไพรเมอร์ *nidA*-F, *nidA*-R ผลการทดลองแสดงในรูปที่ 5.5 ซึ่งพบการเกิดผลิตภัณฑ์ PCR เมื่อใช้เมกะพลาสมิดบริสุทธิ์เป็นแม่แบบ

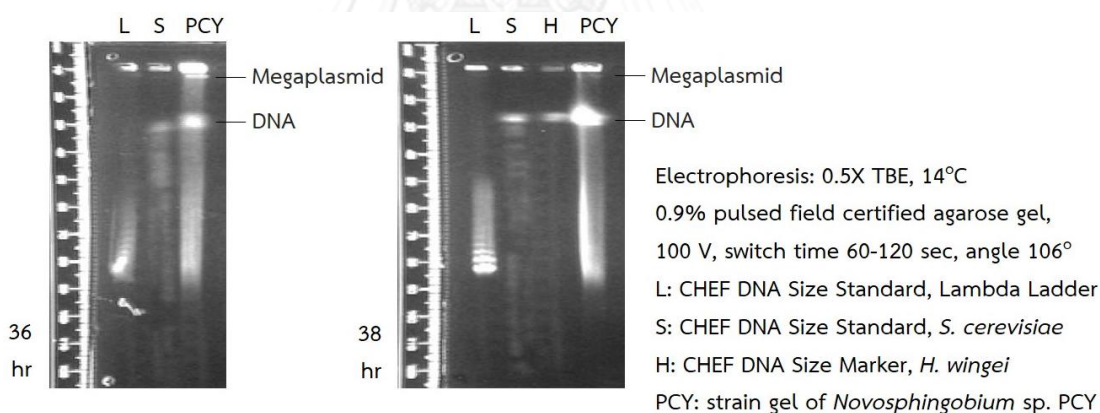


รูปที่ 5.4 อิเล็กโทรโฟรีซิสของ DNA ของ *Novosphingobium* sp. PCY เปรียบเทียบกับของ *Pseudoxanthomonas* sp. RN402



รูปที่ 5.5 การตรวจสอบตำแหน่งของยีน *nidA* ที่พบใน *Novosphingobium* sp. PCY ด้วยวิธี PCR

นอกจากนี้ ยังตรวจสอบขนาดของพลาสมิดที่พบในสายพันธุ์ PCY ด้วยวิธี PFGE เปรียบเทียบกับขนาด DNA มาตรฐาน 3 ชนิด ได้แก่ ขนาด DNA มาตรฐาน lambda ladder (0.0485-1.2125 เมกะเบส) ขนาด DNA ของ *Saccharomyces cerevisiae* (0.225-2.200 เมกะเบส) และขนาด DNA ของ *Hansenula wingei* (1.05-3.13 เมกะเบส) โดยแปรผันสภาวะของ PFGE ให้เหมาะสมกับ DNA มาตรฐานทั้ง 3 ชนิด (รูปที่ จ-14) ได้สภาวะที่เหมาะสมดังนี้ ความเข้มข้นของเจล 0.9 เปอร์เซ็นต์ ความต่างศักย์ 100 โวลต์ (3 โวลต์/เซนติเมตร) มุม 106 องศา เวลาสลับ 60-120 วินาที เป็นเวลา 36-38 ชั่วโมง ในบัฟเฟอร์ 0.5 เท่า TBE ที่ควบคุมอุณหภูมิ 14 องศาเซลเซียส ตลอดการทดลอง ผลการตรวจสอบขนาดของพลาสมิดในสายพันธุ์ PCY แสดงดังรูปที่ 5.6 ซึ่งพบว่าสามารถแยกเมกะพลาสมิดได้อย่างชัดเจนเมื่อเปรียบเทียบกับวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิสธรรมดา (รูปที่ 5.4) อย่างไรก็ตาม ยังไม่สามารถระบุขนาดของเมกะพลาสมิดของสายพันธุ์ PCY ได้ เนื่องจากเมกะพลาสมิดที่พบมีขนาดใหญ่กว่าขนาด DNA มาตรฐานทั้ง 3 ชนิด ขณะที่ DNA ของสายพันธุ์ PCY มีขนาดประมาณ 3 เมกะเบส หรือมากกว่า จากนั้นยืนยันตำแหน่งของยีน *nidA* ด้วยวิธีเซาท์เทิร์นไฮบริไดเซชันโดยอาศัยโพรบที่สร้างขึ้นจากผลิตภัณฑ์ PCR ของไพรเมอร์ *nidA-F* และ *nidA-R* ผลไฮบริไดเซชันแสดงในรูปที่ 5.7 พบว่าสัญญาณของการไฮบริไดเซชันด้วยโพรบ *nidA* อยู่บริเวณตำแหน่งของเมกะพลาสมิดที่พบในสายพันธุ์ PCY ซึ่งสอดคล้องกับผลการตรวจสอบตำแหน่งของยีน *nidA* ด้วยวิธี PCR (การไฮบริไดเซชันด้วยโพรบ 16S rDNA แสดงในรูปที่ จ-15)

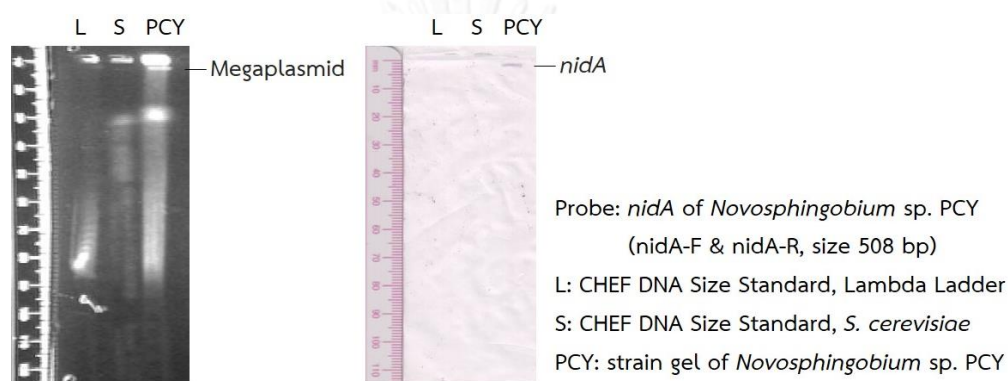


รูปที่ 5.6 การตรวจสอบขนาดของพลาสมิดที่พบใน *Novosphingobium* sp. PCY ด้วยวิธี PFGE

งานวิจัยของ Basta และคณะ (2004) ตรวจสอบพลาสมิดด้วยวิธี PFGE ในแบคทีเรียจีส *Sphingomonas* spp. ที่มีความสามารถในการย่อยสลายสารพิษทั้งหมด 17 สายพันธุ์ พบว่าเกือบทุกสายพันธุ์มีพลาสมิดขนาด 50-500 กิโลเบส จำนวน 2-5 พลาสมิด ส่วนใหญ่เป็นรูปวงกลม (circular plasmids) และยังพบว่าพลาสมิดเหล่านี้สามารถถ่ายเทไปยังแบคทีเรียภายในแฟมิลี Sphingomonadaceae แต่ไม่สามารถถ่ายเทไปยังแบคทีเรียกลุ่มอื่นนอกเหนือแฟมิลี Sphingomonadaceae ได้ นอกจากนี้เทคนิคเซาท์เทิร์นไฮบริไดเซชันยังแสดงให้เห็นตำแหน่งของยีน ไดออกซิจีเนสบนพลาสมิดของ *Sphingomonas* บางสายพันธุ์อีกด้วย เช่นเดียวกับงานวิจัยอื่นๆ ที่พบยีนไดออกซิจีเนสบนพลาสมิดของแบคทีเรียกลุ่ม Sphingomonads เช่น ยีนที่เกี่ยวข้องกับการ



ย่อยสลาย PAHs บนพลาสติก pNL1 ของ *N. aromaticivorans* F199 (Romine และคณะ, 1999) ยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายแนพธาซีน/พีแนนทรินบนพลาสติก pKS14 ของ *Sphingomonas* sp. KS14 (Cho และ Kim, 2001) ยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายพีแนนทรินบนพลาสติก pZL ของ *Sphingomonas* sp. ZL5 (Liu และคณะ, 2004) ยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายสารประกอบอะโรมาติกบนพลาสติก pSKY4 ของ *Sphingobium* sp. HV3 (Sipilä และคณะ, 2010) ยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลาย PAHs มวลโมเลกุลสูงบนพลาสติก pLA1 ของ *N. pentaromaticivorans* US6-1 (Luo และคณะ, 2012a)



รูปที่ 5.7 การตรวจสอบตำแหน่งของยีน *nidA* ที่พบใน *Novosphingobium* sp. PCY ด้วยวิธีเซาท์เทิร์นไฮบริไดเซชัน

ในงานวิจัยนี้ยังไม่สามารถระบุขนาดของเมกะพลาสมิด พลาสมิดขนาดใหญ่และ DNA ของสายพันธุ์ PCY ได้อย่างแน่ชัด เนื่องจากช่วงของขนาด DNA มาตรฐานไม่ครอบคลุม การเปรียบเทียบขนาดของจีโนมของแบคทีเรียจีส *Novosphingobium* ที่มีความสามารถในการย่อยสลาย PAHs ในตารางที่ 5.4 พบว่าจีโนมของแบคทีเรียจีสนี้มีขนาดประมาณ 3.5-5.0 เมกะเบส และมีปริมาณ G+C สูงประมาณ 61-65 เปอร์เซ็นต์ จึงอาจใช้ DNA มาตรฐานที่มีขนาดครอบคลุม เช่น DNA มาตรฐานของ *Schizosaccharomyces pombe* (1.6-5.7 เมกะเบส) ในการตรวจสอบด้วยวิธี PFGE ครั้งต่อไป อย่างไรก็ตาม สามารถประเมินขนาดของพลาสมิดขนาดกลางและพลาสมิดขนาดเล็กที่พบในสายพันธุ์ PCY ได้จากรูปที่ จ-15 ซึ่งมีขนาดประมาณ 1,880 และ 1,300 เบส ตามลำดับ นอกจากนี้เทคนิค PCR และเซาท์เทิร์นไฮบริไดเซชัน ยังยืนยันตำแหน่งของยีน *nidA* บนเมกะพลาสมิดที่พบในสายพันธุ์ PCY ซึ่งจะช่วยให้ทราบถึงวิวัฒนาการทางจีโนมของแบคทีเรียกลุ่ม Sphingomonads ต่อไป

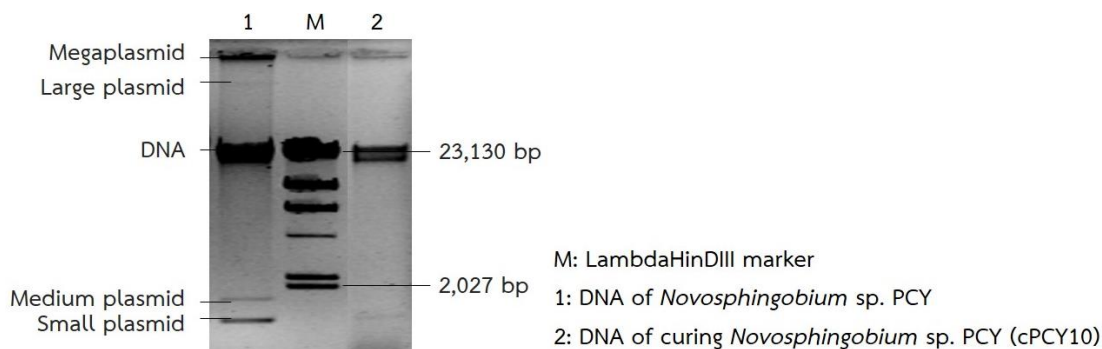
**ตารางที่ 5.4** ขนาดจีโนมของแบคทีเรียจิ้นัส *Novosphingobium* ที่มีความสามารถในการย่อยสลาย PAHs

<i>Novosphingobium</i>	ขนาดจีโนม (bp)	G+C (%)	พลาสมิด	อ้างอิง
<i>N. pentaromativorans</i> US6-1	5,096,413	61.10	2 plasmids - 188,476 bp* - 60,085 bp	Luo และคณะ, 2012a
<i>Novosphingobium</i> sp. PP1Y	3,911,486	61.70	3 plasmids - 1,161,602 bp - 192,103 bp - 48,714 bp	D'Argenio และ คณะ, 2011
<i>N. aromaticivorans</i> DSM 12444 (F199)	3,561,584	65.15	2 plasmids - 487,268 bp - 184,462 bp*	Unpublished
<i>N. indicum</i> H25		62.00		Yuan และคณะ, 2009
<i>N. naphthalenivorans</i> DSM 18518		64.60		Suzuki และ Hiraishi, 2007
<i>N. taihuense</i> T3-B9		63.30		Liu และคณะ, 2005

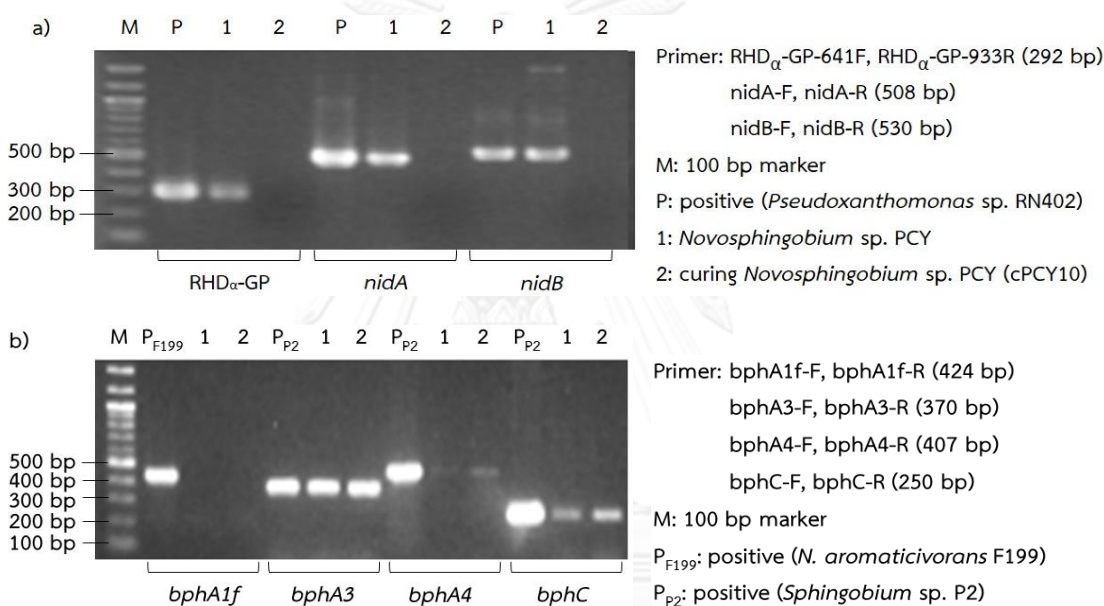
\* ยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายสารพิษส่วนใหญ่ตั้งอยู่บนพลาสมิดนี้

#### 5.4 การหายไปของเมกะพลาสมิดต่อประสิทธิภาพการย่อยสลายไพรีน

การมีอยู่ของยีน *nidA* บนเมกะพลาสมิดในแบคทีเรีย *Novosphingobium* sp. PCY ซึ่งไม่ใช่ยีนที่พบโดยทั่วไปในแบคทีเรียกลุ่ม Sphingomonads จึงอาจทำให้มีความเสถียรของการดำรงอยู่ของยีนต่ำในสายพันธุ์ PCY ดังนั้นจึงประเมินการหายไปของเมกะพลาสมิดต่อประสิทธิภาพการย่อยสลายไพรีนของสายพันธุ์ PCY ด้วยการกำจัดเมกะพลาสมิดในสายพันธุ์ PCY โดยการเลี้ยงเชื้อบนอาหารที่มีสารอาหารอุดมสมบูรณ์อย่างต่อเนื่องเป็นเวลา 10 ครั้ง สายพันธุ์ที่ผ่านการเลี้ยงเชื้อแต่ละครั้งถูกกำหนดรหัสเป็นสายพันธุ์ cPCY1 ถึง cPCY10 จากนั้นสายพันธุ์ cPCY10 ถูกนำมาตรวจสอบการคงอยู่ของเมกะพลาสมิดและยีนไดออกซิจีเนสต่างๆเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ PCY ผลการทดลองแสดงให้เห็นการหายไปของพลาสมิด 3 ชั้น ได้แก่ พลาสมิดขนาดกลาง พลาสมิดขนาดใหญ่ และเมกะพลาสมิด และพบการลดลงของพลาสมิดขนาดเล็กในสายพันธุ์ cPCY10 (รูปที่ 5.8) นอกจากนี้ ยังพบการหายไปของยีนหน่วยย่อยแอลฟาและหน่วยย่อยเบตาของเอนไซม์ไดออกซิจีเนส (*nidA* และ *nidB*) ในสายพันธุ์ cPCY10 ด้วย (รูปที่ 5.9 a) ในขณะที่ยีนไดออกซิจีเนสอื่นๆที่เดิมพบในสายพันธุ์ PCY และเป็นยีนที่พบทั่วไปในแบคทีเรียย่อยสลาย PAHs กลุ่ม Sphingomonads ได้แก่ *bphA3*, *bphA4* และ *bphC* ยังคงพบในสายพันธุ์ cPCY10 (รูปที่ 5.9 b)



รูปที่ 5.8 การตรวจสอบพลาสมิดของ *Novosphingobium* sp. PCY และ cPCY10



รูปที่ 5.9 การตรวจสอบยีนไดออกซิจีเนสของ *Novosphingobium* sp. PCY และ cPCY10

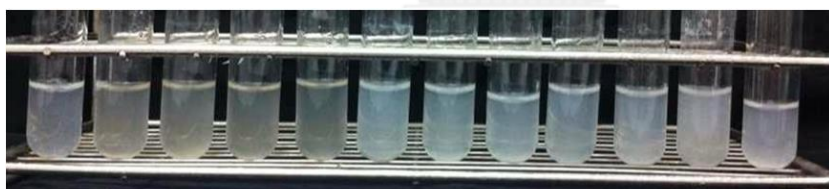
นอกจากนี้ สายพันธุ์ cPCY1 ถึง cPCY10 ถูกนำมาตรวจสอบเปอร์เซ็นต์การหายไปของเมกะพลาสมิดเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ PCY โดยประเมินจากจำนวนโคโลนีสร้างโชนในสไลบนอาหารแข็ง CFMM ที่พ่นทับด้วยไพริน ผลการตรวจสอบแสดงในตารางที่ 5.5 พบว่าการเลี้ยงสายพันธุ์ PCY บนอาหารที่มีสารอาหารอุดมสมบูรณ์แม้เพียงครั้งเดียว ทำให้มีจำนวนเซลล์ที่มีการหายไปของพลาสมิดประมาณ 36 เปอร์เซ็นต์ หากเลี้ยงเชื้ออย่างต่อเนื่องบนอาหารดังกล่าวจะทำให้จำนวนเซลล์ที่มีการหายไปของพลาสมิดสูงขึ้นเรื่อยๆ จนกระทั่งเมื่อเลี้ยงเชื้อเป็นจำนวนมากกว่า 4 ครั้ง จำนวนเซลล์ที่มีการหายไปของพลาสมิดจะสูงถึง 100 เปอร์เซ็นต์ ผลของเปอร์เซ็นต์พลาสมิดที่หายไปนี้มีความสอดคล้องกับการประเมินความสามารถในการย่อยสลายไพรินของแต่ละสายพันธุ์ cPCY เปรียบเทียบกับสายพันธุ์ PCY ดังรูปที่ 5.10 โดยสายพันธุ์ cPCY1, cPCY2 และ cPCY3 ยังคงมีประสิทธิภาพการย่อยสลายไพรินเมื่อเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ PCY ในขณะที่สายพันธุ์ cPCY4 ถึง cPCY10 นั้น ไม่พบ

การย่อยสลายไพรีน ซึ่งสังเกตจากอนุภาคไพรีนที่ยังเหลืออยู่ในหลอดทดลองเปรียบเทียบกับชุดควบคุมปราศจากเชื้อ (abiotic)

ตารางที่ 5.5 เปอร์เซ็นต์พลาสติกที่หายไปของ *Novosphingobium* sp. สายพันธุ์ต่างๆ

<i>Novosphingobium</i> sp.	จำนวนโคโลนีสร้างโซนใส	เปอร์เซ็นต์พลาสติกที่หายไป
PCY	39.0 ± 4.0	0.0 ± 0.0 (a)
cPCY1	25.0 ± 2.0	35.9 ± 5.1 (b)
cPCY2	21.7 ± 6.1	44.4 ± 15.7 (b)
cPCY3	16.7 ± 5.5	57.2 ± 14.1 (b)
cPCY4	14.0 ± 1.0	64.1 ± 2.6 (b)
cPCY5	1.3 ± 1.5	96.7 ± 3.9 (c)
cPCY6	1.0 ± 0.0	97.4 ± 0.0 (c)
cPCY7	0.0 ± 0.0	100.0 ± 0.0 (c)
cPCY8	0.0 ± 0.0	100.0 ± 0.0 (c)
cPCY9	0.0 ± 0.0	100.0 ± 0.0 (c)
cPCY10	0.0 ± 0.0	100.0 ± 0.0 (c)

a-c แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ( $p$  value = 0.05) วิเคราะห์โดยโปรแกรม ANOVA



CFMM + pyrene 100 mg/L  
30°C, 200 rpm, 14 days

Abiotic PCY cPCY1 cPCY2 cPCY3 cPCY4 cPCY5 cPCY6 cPCY7 cPCY8 cPCY9 cPCY10

รูปที่ 5.10 ประสิทธิภาพการย่อยสลายไพรีนของ *Novosphingobium* sp. PCY และ cPCY1 ถึง cPCY10

งานวิจัยก่อนหน้ารายงานการศึกษาความเกี่ยวข้องของพลาสติกต่อความสามารถในการย่อยสลาย PAHs ของแบคทีเรียด้วยวิธีพลาสติกคิง ซึ่งสามารถทำได้หลายวิธี ตัวอย่างงานวิจัยของ Cho และ Kim (2001) แสดงให้เห็นว่าพลาสติก pKS14 ขนาด 500,000 เบส เกี่ยวข้องกับการย่อยสลาย PAHs ของแบคทีเรีย *Sphingomonas* sp. KS14 ด้วยการทำให้พลาสติกคิงโดยใช้ไมโทมายซินซี (mitomycin C) เข้มข้น 5 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร งานวิจัยของ Coral และ Karagoz (2005) พบว่าพลาสติก pARP1 ขนาด 26,000 เบส เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายพีแนนทรีนของแบคทีเรีย *Pseudomonas* spp. ARP26 และ ARP28 ด้วยการทำให้พลาสติกคิงโดยใช้เอธิเดียมโบรไมด์เข้มข้น 500 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร งานวิจัยของ Igwo-Ezike และคณะ (2008) รายงานความสามารถในการ

ย่อยสลายฟลูออแรนทีนและไพรีนของแบคทีเรีย 5 สายพันธุ์ ว่ามีความเกี่ยวข้องกับพลาสมิดขนาดใหญ่ด้วยการทำพลาสมิดคิวง์โดยใช้ SDS งานวิจัยของ Kumar และคณะ (2010) พบว่าความสามารถในการย่อยสลายแอนทราซีนเกี่ยวข้องกับพลาสมิดที่พบในแบคทีเรีย *Pseudomonas* sp. E ด้วยการทำพลาสมิดคิวง์โดยใช้อะคริดีนออเรนจ์ (acridine orange) เข้มข้น 50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส อย่างไรก็ตามงานวิจัยนี้ ทำพลาสมิดคิวง์ด้วยการเลี้ยงเชื้อต่อเนื่องในอาหารที่มีสารอาหารอุดมสมบูรณ์แทนการใช้สารเคมีหรือยาปฏิชีวนะ ซึ่งอาจมีผลกระทบต่อการอยู่รอดของแบคทีเรียได้

นอกจากนี้ งานวิจัยของ Ma และคณะ (2006) แสดงให้เห็นว่ายีน *ndo* ที่ตั้งอยู่บนพลาสมิดเกี่ยวข้องกับกระบวนการย่อยสลายแนพธาซีนของแบคทีเรีย *Pseudomonas* ด้วยพลาสมิดคิวง์โดยใช้ SDS เข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ แล้วตรวจสอบยีน *ndo* ในสายพันธุ์ที่ผ่านพลาสมิดคิวง์ด้วยวิธี PCR และงานวิจัยของ Lin และคณะ (2012) ทำพลาสมิดคิวง์ของแบคทีเรียย่อยสลายแนพธาซีน *Gordonia* sp. CC-NAPH129-6 ด้วยเอธิเดียมโบรไมด์เข้มข้น 0.25 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร แล้วตรวจสอบการมีอยู่ของพลาสมิดโดย PFGE พบว่าสายพันธุ์ CC-NAPH129-6 มีพลาสมิด 2 ชั้น ได้แก่ พลาสมิดขนาดเล็ก (ขนาดประมาณ 97,000 เบส) และพลาสมิดขนาดใหญ่ (อยู่ระหว่าง 145,500 และ 194,000 เบส) อย่างไรก็ตาม พบการหายไปของพลาสมิดขนาดเล็กในสายพันธุ์ที่ผ่านการทำพลาสมิดคิวง์เช่นเดียวกันกับความสามารถในการย่อยสลายแนพธาซีนที่หายไป และเมื่อทำซาท์เทิร์นไฮบริดเซชันด้วยโพรบที่จำเพาะต่อยีนย่อยสลายแนพธาซีน (*ndo*) พบว่าเกิดสัญญาณของการไฮบริดเซชันบริเวณพลาสมิดขนาดเล็ก

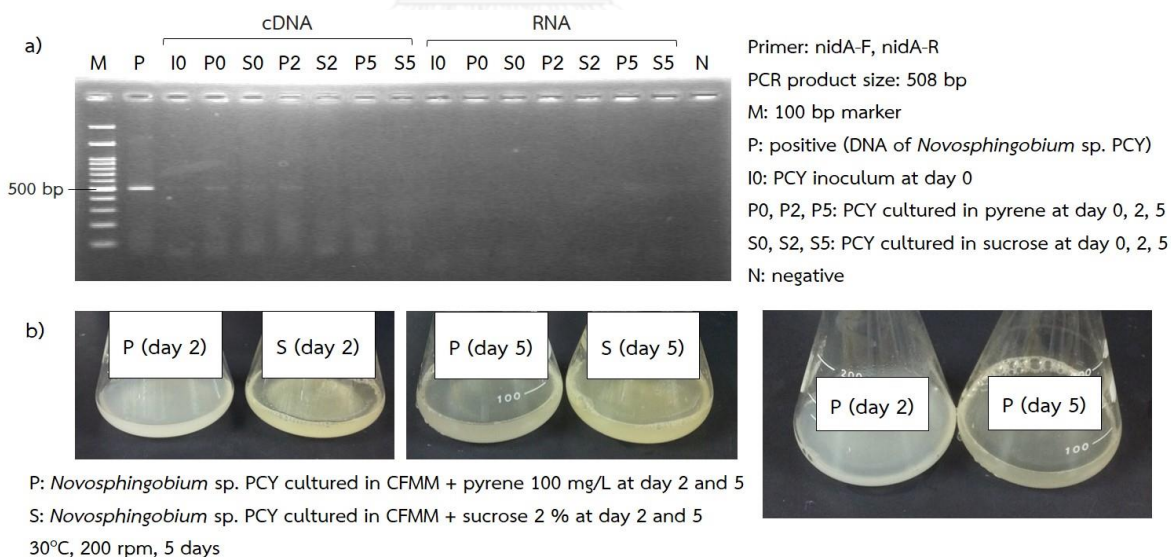
งานวิจัยของ Mallick และคณะ (2007) ศึกษาพื้นที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายพีแนนทรินของแบคทีเรีย *Staphylococcus* sp. PN/Y ซึ่งถูกคัดแยกมาจากดินปนเปื้อนปิโตรเลียม และไม่เคยมีรายงานเกี่ยวกับการย่อยสลายพีแนนทรินในแบคทีเรียจิ้นัส *Staphylococcus* มาก่อน ผลการทดลองของ PFGE แสดงให้เห็นว่าสายพันธุ์ PN/Y มีพลาสมิด pPHN ขนาดประมาณ 112,000 เบส และหลังจากการทำพลาสมิดคิวง์ด้วยอะคริดีนออเรนจ์เข้มข้น 300 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร พบการหายไปของพลาสมิด pPHN เช่นเดียวกันกับการหายไปของความสามารถในการย่อยสลายพีแนนทริน จึงสันนิษฐานว่า ยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายพีแนนทรินของสายพันธุ์ PN/Y ตั้งอยู่บนพลาสมิด pPHN อีกทั้งความสามารถในการย่อยสลายพีแนนทรินของสายพันธุ์ PN/Y อาจเกิดจากการได้รับยีนย่อยสลายพีแนนทรินจากแบคทีเรียชนิดอื่น เพื่อปรับตัวให้เหมาะสมกับสภาพแวดล้อมที่อาศัยอยู่

ในทำนองเดียวกัน การหายไปของทั้งเมกะพลาสมิดที่มียีน *nidA* และความสามารถในการย่อยสลายไพรีนของสายพันธุ์ PCY ทำให้สมมติฐานได้ว่ายีนดังกล่าวน่าจะมีบทบาทเกี่ยวข้องกับการย่อยสลายไพรีนในสายพันธุ์ PCY นอกจากนี้ ยีน *nidA* ยังถูกพบว่าตั้งอยู่ระหว่างยีนที่สามารถเคลื่อนที่ได้ (mobile genetic elements) เช่น อินทีเกรส (integrases) และทรานโปเซส (transposases) เป็นต้น จึงทำให้ยีนดังกล่าวสามารถเคลื่อนที่หรือถ่ายโอนไปยังแบคทีเรียชนิดเดียวกันหรือต่างชนิดได้ (Debruyne และคณะ, 2012) อีกทั้งยังไม่เคยมีรายงานการพบยีน *nidA* ในแบคทีเรียจิ้นัส *Novosphingobium* หรือแม้แต่แบคทีเรียกลุ่ม Sphingomonads มาก่อน จึงมีความเป็นไปได้ว่าความสามารถในการย่อยสลายไพรีนของสายพันธุ์ PCY อาจเกิดจากการได้รับยีน *nidA* จากแบคทีเรียชนิดอื่นหรือจากสิ่งแวดล้อมที่อาศัยอยู่

## 5.5 บทบาทของยีน *nidA* ในการย่อยสลายไพรีน

จากสมมติฐานว่ายีน *nidA* น่าจะมีบทบาทเกี่ยวข้องกับการย่อยสลายไพรีนของแบคทีเรีย *Novosphingobium* sp. PCY จึงตรวจสอบการแสดงออกของยีนดังกล่าวด้วยวิธี RT-PCR จากสถานะเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวที่มีแหล่งคาร์บอนต่างกันคือไพรีนและซูโครส ผลของผลิตภัณฑ์ PCR แสดงในรูปที่ 5.11 a พบว่าเกิดผลิตภัณฑ์ PCR เมื่อใช้แม่แบบ cDNA ของสายพันธุ์ PCY ทุกชุดการทดลองในวันที่ 0 และเมื่อใช้แม่แบบ cDNA ของสายพันธุ์ PCY เลี้ยงในอาหารเหลวที่มีไพรีนเป็นแหล่งคาร์บอนในวันที่ 2 และ 5 โดยมีความเข้มข้นของแถบผลิตภัณฑ์ลดลง ในขณะที่ไม่พบผลิตภัณฑ์ PCR ของสายพันธุ์ PCY เลี้ยงในอาหารเหลวที่มีซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอนในวันที่ 2 และ 5 และเมื่อใช้แม่แบบ RNA ของทุกชุดการทดลอง ซึ่งแสดงให้เห็นถึงการไม่ปนเปื้อน DNA ใน RNA ที่สกัดได้ (รูปที่ จ-16 แสดงอิเล็กโทรโฟรีซิสของ RNA ที่สกัดได้)

ผลการเกิดผลิตภัณฑ์ PCR แสดงให้เห็นว่าเมื่อกำหนดความเข้มข้นของ RNA ให้เท่ากันจนได้ความเข้มข้นของผลิตภัณฑ์ 16S rRNA เท่ากันแล้ว (รูปที่ จ-17) ยีน *nidA* ของสายพันธุ์ PCY จะแสดงออกเมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีไพรีนเป็นแหล่งคาร์บอน โดยการแสดงออกของยีนลดลงเมื่อปริมาณไพรีนเหลือน้อยลง ดังรูปที่ 5.11 b จะเห็นได้ว่า ณ วันที่ 5 มีปริมาณไพรีนในขวดทดลองน้อยกว่าวันที่ 2 อีกทั้งยังไม่พบการแสดงออกของยีน *nidA* เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอน ดังนั้นจึงสรุปได้ว่ายีน *nidA* มีบทบาทสำคัญต่อการย่อยสลายไพรีนในสายพันธุ์ PCY อย่างไรก็ตามพบการแสดงออกของยีน *nidA* ในทุกชุดการทดลอง ณ วันที่ 0 ซึ่งมีความเป็นไปได้ว่ายีนดังกล่าวยังคงแสดงออกจากการเลี้ยงเชื้อในอาหารที่มีไพรีนเป็นแหล่งคาร์บอนก่อนการเตรียมหัวเชื้อ



รูปที่ 5.11 การตรวจสอบการแสดงออกของยีน *nidA* ของ *Novosphingobium* sp. PCY ด้วยวิธี RT-PCR (a) เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีไพรีนและซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอนเพียงแหล่งเดียว (b)

งานวิจัยของ Alemayehu และคณะ (2004) ศึกษาบทบาทของยีนอินโดลไดออกซิจีเนส (indole dioxygenase; *idoA*) ที่พบบนโครโมโซมของแบคทีเรียย่อยสลายฟลูออแรนทีน *Pseudomonas alcaligenes* PA-10 ด้วยวิธียีนดิสรัปชัน (gene disruption) และตรวจหาสายพันธุ์กลาย (mutants) จากการสูญเสียความสามารถในการเปลี่ยนอินโดลเป็นอินดิโก (indigo) พบว่าสายพันธุ์กลายไม่มีความสามารถในการย่อยสลายฟลูออแรนทีน ดังนั้นยีน *idoA* จึงมีความสำคัญต่อการย่อยสลายฟลูออแรนทีนของสายพันธุ์ PA-10 นอกจากนี้ ผลการวิเคราะห์ด้วยวิธี RT-PCR พบว่ายีน *idoA* มีการแสดงออกตลอดเวลา (constitutive expression) แม้ว่าจะกระตุ้นด้วยสารใดๆก็ตาม งานวิจัยของ Pagnout และคณะ (2007) ศึกษาบทบาทของยีน *phdAB* ของแบคทีเรีย *Mycobacterium* sp. SNP11 ที่มีความสามารถในการย่อยสลายไพรีน ฟลูออแรนทีน พีแนนทริน และฟลูออรีน โดยการไลเกทียีนดังกล่าวเข้าสู่เวกเตอร์และทรานสฟอร์ม์ริคอมบีแนนท์ พลาสมิดที่ได้เข้าสู่แบคทีเรีย *Mycobacterium smegmatis* mc<sup>2</sup>155 พบว่าสายพันธุ์ทรานสฟอร์ม์ริคอมบีแนนท์พลาสมิด มีความสามารถในการย่อยสลาย PAHs ขึ้นมา งานวิจัยของ Singleton และคณะ (2009) ตรวจสอบบทบาทของยีน *phnAcBC* ในแบคทีเรีย *Acidovorax* sp. NA3 ด้วยวิธี RT-PCR เมื่อแปรผันชนิดของแหล่งคาร์บอนต่างๆ ได้แก่ เมทานอล แนนพธาซีน พีแนนทริน ไพรีน ไครซีน ฟลูออแรนทีน เบนซ์[เอ]แอนทราซีน เบนโซ[เอ]ไพรีน ซาลิไซเลท และพทาเลท ซึ่งพบการแสดงออกของยีนเมื่อเลี้ยงเชื้อด้วยพีแนนทรินและแนนพธาซีนเท่านั้น โดยการแสดงออกของยีน *phnAcBC* ในอาหารที่มีพีแนนทรินสูงกว่าในอาหารที่มีแนนพธาซีนประมาณ 2 เท่า และงานวิจัยของ Lin และคณะ (2012) ตรวจสอบบทบาทของยีน *narAaBC* ในแบคทีเรีย *Gordonia* sp. CC-NAPH129-6 ด้วยวิธี RT-PCR เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวที่มีแนนพธาซีนเข้มข้น 30 มิลลิกรัม/ลิตร หรือกลูโคสเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งคาร์บอน ผลการแสดงออกของยีนพบว่าเมื่อปรับความเข้มข้นของ RNA ให้เท่ากันจนได้ความเข้มข้นของผลิตภัณฑ์ 16S rRNA เท่ากันแล้ว การแสดงออกของยีน *narAaBC* จะถูกกระตุ้นเมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีแนนพธาซีน อย่างไรก็ตาม ยังพบการแสดงออกของยีน *narAa* เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน แต่ปริมาณการแสดงออกน้อยกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับเลี้ยงในอาหารที่มีแนนพธาซีนเป็นแหล่งคาร์บอน สังเกตจากความเข้มของแถบผลิตภัณฑ์ที่ได้

## 5.6 ประสิทธิภาพการย่อยสลายสารผสมของไพรีนและอะลิฟาติก

เนื่องจากสภาวะการปนเปื้อน PAHs ในธรรมชาติ มักมีสาเหตุจากการปนเปื้อนน้ำมันหรือปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอน สารดังกล่าวล้วนมีองค์ประกอบอื่นที่สามารถย่อยสลายทางชีวภาพได้ง่ายกว่า PAHs เช่น อัลเคน โดยเฉพาะอย่างยิ่งอัลเคนขนาดกลางที่มีจำนวนคาร์บอนประมาณ 10-22 อะตอม (USEPA, 2003; Liu และคณะ, 2012b) ดังนั้น การประยุกต์ใช้แบคทีเรีย *Novosphingobium* sp. PCY เป็นหัวเชื้อในการบำบัดดินปนเปื้อน จึงควรทดสอบความสามารถในการย่อยสลายอะลิฟาติกของสายพันธุ์ PCY เพื่อเป็นข้อมูลในการประเมินผลของอะลิฟาติกต่อการย่อยสลายไพรีนของสายพันธุ์ดังกล่าวได้ อะลิฟาติกที่ใช้ทดสอบในงานวิจัยนี้คือเตตระเดเคน (จำนวนคาร์บอน 14 อะตอม) และเฮกซะเดเคน (จำนวนคาร์บอน 16 อะตอม) ซึ่งถูกจัดเป็นตัวแทนของอะลิฟาติกในน้ำมันดีเซลและก๊าซโซลีน เนื่องจากเป็นชนิดที่พบมากในน้ำมันดีเซลที่นิยมใช้เป็นเชื้อเพลิงในกิจกรรมประจำวันของมนุษย์ (Prince และ Douglas, 2010; Villa และคณะ, 2010) ความสามารถ

ในการย่อยสลายอะลิฟาติกและสารผสมของอะลิฟาติกกับไพรีนของสายพันธุ์ PCY แสดงในตารางที่ 5.6 พบว่าสายพันธุ์ PCY สามารถย่อยสลายเตตระเดคเคนและเฮกซะเดคเคนความเข้มข้นเริ่มต้นชนิดละ 1,000 มิลลิกรัม/ลิตร ได้ 67 และ 30 เปอร์เซ็นต์ ในเวลา 10 วัน ตามลำดับ และสามารถย่อยสลายไพรีนความเข้มข้นเริ่มต้น 100 มิลลิกรัม/ลิตร ได้ 86 เปอร์เซ็นต์ ในเวลา 10 วัน นอกจากนี้ ในชุดการทดลองที่มีสารผสมของไพรีนและเตตระเดคเคนหรือเฮกซะเดคเคน ประสิทธิภาพการย่อยสลายของสารทั้งสองเพิ่มขึ้นเล็กน้อย กล่าวคือชุดสารผสมของไพรีนและเตตระเดคเคน สายพันธุ์ PCY สามารถย่อยสลายไพรีนและเตตระเดคเคนได้ 92 และ 74 เปอร์เซ็นต์ และชุดสารผสมของไพรีนและเฮกซะเดคเคน สายพันธุ์ PCY สามารถย่อยสลายไพรีนและเฮกซะเดคเคนได้ 89 และ 34 เปอร์เซ็นต์ ในเวลา 10 วัน

ตารางที่ 5.6 ประสิทธิภาพการย่อยสลายอะลิฟาติกและไพรีนของ *Novosphingobium* sp. PCY

สาร	จำนวนแบคทีเรีย (CFU/มล.) <sup>*</sup>		การย่อยสลายสาร (%)	
	วันที่ 10	วันที่ 20	วันที่ 10	วันที่ 20
เตตระเดคเคน	$1.80 \times 10^6$ ± 0.62	$1.83 \times 10^6$ ± 0.38	$67.2 \pm 12.4$	$94.8 \pm 8.2$
เฮกซะเดคเคน	$1.53 \times 10^6$ ± 0.55	$8.33 \times 10^5$ ± 1.53	$30.5 \pm 5.1$	$31.0 \pm 1.8$
ไพรีน	$2.27 \times 10^6$ ± 1.36	$4.00 \times 10^5$ ± 1.73	$85.9 \pm 9.6$	$99.0 \pm 0.3$
เตตระเดคเคน + ไพรีน	เตตระเดคเคน ไพรีน $1.40 \times 10^6$ ± 0.96	เตตระเดคเคน ไพรีน $1.10 \times 10^6$ ± 0.46	$74.1 \pm 11.5$ $91.9 \pm 2.4$	$100.0 \pm 0.01$ $99.8 \pm 0.03$
เฮกซะเดคเคน + ไพรีน	เฮกซะเดคเคน ไพรีน $4.33 \times 10^5$ ± 4.16	เฮกซะเดคเคน ไพรีน $6.67 \times 10^5$ ± 1.53	$34.1 \pm 10.9$ $89.4 \pm 0.5$	$39.1 \pm 6.0$ $99.9 \pm 0.02$

<sup>\*</sup> จำนวนแบคทีเรียเริ่มต้น  $2.22 \times 10^6$  CFU/มิลลิลิตร และจำนวนแบคทีเรียในชุดควบคุมการเจริญ (ไม่เติมสาร) ณ วันที่ 10 และ 20 เท่ากับ  $6.00 \pm 2.64 \times 10^5$  และ  $2.73 \pm 0.31 \times 10^5$  CFU/มิลลิลิตร

แบคทีเรียแกรมบวกจีส *Acinetobacter* และ *Rhodococcus* และแบคทีเรียแกรมลบจีส *Pseudomonas* เป็นแบคทีเรียจีสหลักๆที่มีรายงานการย่อยสลายอัลเคนโดยเฉพาะอย่างยิ่งเฮกซะเดคเคน (ตารางที่ 5.7) ในขณะที่ความสามารถในการย่อยสลายอัลเคนของแบคทีเรียกลุ่ม Sphingomonads ยังคงมีรายงานไม่มากนัก เช่น *Sphingomonas paucimobilis* DSM 1098 ที่สามารถย่อยสลายเฮกซะเดคเคน (Vomberg และ Klinner, 2000) อย่างไรก็ตาม งานวิจัยของ Notomista และคณะ (2011) แสดงให้เห็นว่า *Novosphingobium* sp. PP1Y ไม่สามารถเจริญโดยใช้อัลเคนเป็นแหล่งคาร์บอนได้ แต่สามารถย่อยสลายน้ำมันดีเซลและน้ำมันเชื้อเพลิงได้

งานวิจัยของ Feitkenhauer และคณะ (2003) ศึกษาผลของเฮกซะเดคต่อการย่อยสลาย PAHs 4 ชนิด ของแบคทีเรีย *Thermus brockii* sp. Hamburg พบว่าเมื่อเวลาผ่านไป 3 วัน แบคทีเรียดังกล่าวสามารถย่อยสลายอะซีแนพธินและฟลูออแรนที่ความเข้มข้นเริ่มต้นชนิดละ 60



มิลลิกรัม/ลิตร ได้อย่างสมบูรณ์ และสามารถย่อยสลายไพรีนและเบนโซ[อ]ไพรีนความเข้มข้นเริ่มต้น ชนิดละ 30 มิลลิกรัม/ลิตร ได้ 57 และ 40 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ จากนั้นทดสอบการย่อยสลายสารผสมระหว่างเฮกซะเดคเคนและไพรีน พบว่าเมื่อเวลาผ่านไป 36 ชั่วโมง สามารถย่อยสลายเฮกซะเดคเคนความเข้มข้นเริ่มต้น 800 มิลลิกรัม/ลิตร ได้ 16.5 กรัม และไพรีนความเข้มข้นเริ่มต้น 40 มิลลิกรัม/ลิตร ได้ 0.7 กรัม จึงสรุปว่าเฮกซะเดคเคนไม่มีผลยับยั้งการย่อยสลาย PAHs ของสายพันธุ์นี้ อีกทั้งยังช่วยส่งเสริมการย่อยสลายไพรีนโดยการละลายของไพรีนในเฮกซะเดคเคนด้วย ในทำนองเดียวกัน สายพันธุ์ PCY สามารถย่อยสลายอะลิฟาติกชนิดที่ทดสอบได้ อีกทั้งการมีอยู่ร่วมกันของอะลิฟาติกและไพรีน ยังช่วยส่งเสริมการย่อยสลายของสารทั้งสองชนิดอีกด้วย

### 5.7 ยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายอะลิฟาติก

จากความสามารถของแบคทีเรีย *Novosphingobium* sp. PCY ในการย่อยสลายอะลิฟาติก ขนาดกลางชนิดที่พบมากในน้ำมันดีเซล จึงมีความน่าสนใจในการตรวจหายีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายอะลิฟาติกในสายพันธุ์ PCY ด้วยวิธี PCR โดยใช้ไพรเมอร์จำเพาะต่อยีนที่เกี่ยวข้องกับขั้นแรกของการย่อยสลายอัลเคน ผลการเกิดผลิตภัณฑ์ PCR ของสายพันธุ์ PCY แสดงในตารางที่ 5.8 (รูปที่ จ-18) ซึ่งพบเพียงผลิตภัณฑ์ PCR จากไพรเมอร์ Alk-3F, Alk-3R ที่จำเพาะต่อยีน *alkB1*

ยีนที่มีบทบาทสำคัญในขั้นตอนแรกของการย่อยสลายอัลเคน คือ ยีนอัลเคนโมโนออกซิจีเนส (alkane monooxygenase) แบ่งออกเป็นหลายประเภทตามชนิดของแบคทีเรียที่พบและชนิดของอัลเคนที่สามารถย่อยสลายได้ (Rojo, 2009) ได้แก่ ยีนไซโตโครม P450 โมโนออกซิจีเนส (cytochrome P450 monooxygenase; CYP153) เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายอัลเคนขนาดเล็ก ซึ่งอาศัยระบบขนส่งอิเล็กตรอนที่ประกอบด้วยเฟอร์รีดอกซิน (ferredoxin) และเฟอร์รีดอกซินรีดักเทส (ferredoxin reductase) เช่น CYP153 ของแบคทีเรีย *Acinetobacter* sp. EB104 ที่สามารถย่อยสลายอัลเคนที่มีจำนวนคาร์บอน 6-11 อะตอม (Maier และคณะ, 2001) CYP153A16 ของแบคทีเรีย *Mycobacterium marinum* ที่สามารถย่อยสลายอัลเคนที่มีจำนวนคาร์บอน 5-12 อะตอม (Scheps และคณะ, 2011) CYP153C1 ของแบคทีเรีย *Novosphingobium aromaticivorans* DSM 12444 ที่สามารถย่อยสลายอัลเคนที่มีจำนวนคาร์บอน 7-9 อะตอม (Zhou และคณะ, 2011) ยีนอัลเคนโมโนออกซิจีเนส (integral-membrane non-heme diiron monooxygenase; *alkB*) เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายอัลเคนขนาดเล็กถึงกลาง ซึ่งอาศัยระบบขนส่งอิเล็กตรอนที่ประกอบด้วยรูบริดอกซิน (rubredoxin; AlkG) และรูบริดอกซินรีดักเทส (rubredoxin reductase; AlkT) (รูปที่ 5.12) ทั้งยังได้รับการศึกษายีนดังกล่าวอย่างกว้างขวางในแบคทีเรีย *Pseudomonas putida* GPo1 ที่สามารถย่อยสลายอัลเคนที่มีจำนวนคาร์บอน 5-13 อะตอม (Beilen และคณะ, 2001) และยีน *alkB* ของแบคทีเรียอื่นๆ เช่น *Sphingomonas paucimobilis* DSM 1098 ที่สามารถย่อยสลายเฮกซะเดคเคน (Vomberg และ Klinner, 2000) *Mycobacterium austroafricanum* IFP 2012 ที่สามารถย่อยสลายอัลเคนที่มีจำนวนคาร์บอน 2-16 อะตอม (Ferreira และคณะ, 2007) ยีนอัลเคนไฮดรอกซิเลส (alkane hydroxylase; *alkM*) ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายอัลเคนขนาดกลางถึงใหญ่ (จำนวนคาร์บอน 10-20 อะตอม) ของแบคทีเรีย *Acinetobacter* spp. (Mara และคณะ, 2012) ยีนฟลาวิน-

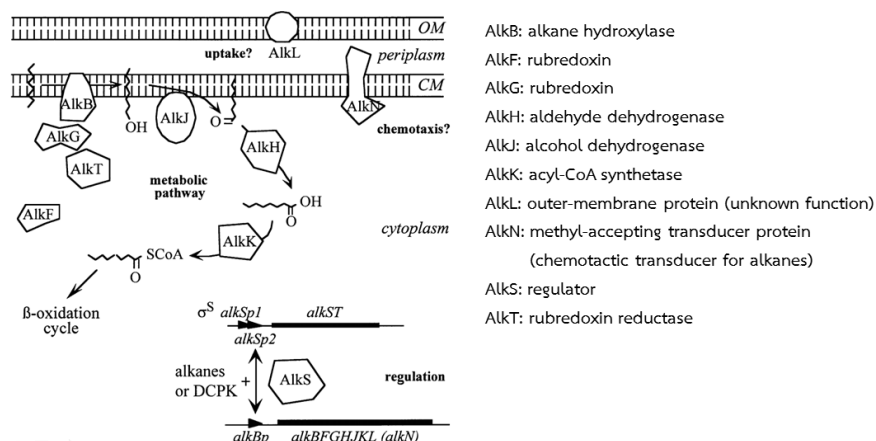
ตารางที่ 5.7 ประสิทธิภาพการย่อยสลายเตตระเดกเคนและเฮกซะเดกเคนของแบคทีเรียในรายงานวิจัยก่อนหน้า

แบคทีเรีย	เตตระเดกเคน		เฮกซะเดกเคน		เวลา (วัน)	อ้างอิง
	ความเข้มข้น (มก./ล.)	การย่อย สลาย (%)	ความเข้มข้น (มก./ล.)	การย่อย สลาย (%)		
<i>Acinetobacter</i> sp. B <sub>2.2</sub>	-	-	3,850 (0.5%)	90	2	Espeche และคณะ, 1994
<i>Acinetobacter</i> sp. A3	3,780 (0.5%)	65	-	-	3	Hanson และ Desai, 1996
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	-	3,850 (0.5%)	76	13	Chayabutra และ Ju, 2000
<i>Mycobacterium austroafricanum</i> GTI-23	-	-	25,000	26	24	Bogan และคณะ, 2003
<i>Rhodococcus</i> sp. OI-NR-LI	-	-	40	99	5	McGowan และคณะ, 2004
<i>Corynebacterium</i> sp. T2W	-	-	32	99	3	
<i>Pseudomonas putida</i>	-	-	120	100	12	Abdel-Megeed และคณะ, 2010
<i>Rhodococcus erythropolis</i>	-	-	-	100	11	
<i>Bacillus thermoleovorans</i>	-	-	-	100	12	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> B1	-	-	5,000	96	7	Liu และคณะ, 2012a
<i>Acinetobacter junii</i> B2	-	-	-	78		
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PSA5	-	-	7,700 (1%)	99	10	Mishra และ Singh, 2012
<i>Rhodococcus</i> sp. NJ2	-	-	-	95		
<i>Ochrobactrum intermedium</i> P2	-	-	-	92		
<i>Acinetobacter radioresistens</i> ASI $\alpha$	-	-	10,000	55.27	31	Samaei และคณะ, 2012
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ASID $\alpha$	-	-	-	82.67		
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ASIID $\alpha$	-	-	-	73.51		
<i>Pseudoxanthomonas</i> sp. RN402	450	92	450	65	9	Nopcharoenkul และคณะ, 2013

โมโนออกซิจีเนส (flavin-binding monooxygenase; *almA*) ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายอัลเคนขนาดใหญ่ของแบคทีเรีย *Acinetobacter* sp. DSM 17874 ที่สามารถย่อยสลายอัลเคนที่มีจำนวนคาร์บอน 20-40 อะตอม และ *Acinetobacter* sp. RAG-1 และ M-1 ที่สามารถย่อยสลายอัลเคนที่มีจำนวนคาร์บอน 36 อะตอม (Throne-Holst และคณะ, 2007) และยีนอัลเคนโมโนออกซิจีเนส (*ladA*) เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายอัลเคนขนาดใหญ่ (จำนวนคาร์บอนมากกว่า 36 อะตอม) ของแบคทีเรีย *Geobacillus thermodenitrificans* NG80-2 (Li และคณะ, 2008)

**ตารางที่ 5.8** ยีนประมวลรหัสเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายอัลเคนของ *Novosphingobium* sp. PCY

ยีน	ไพรเมอร์	ไพรเมอร์ออกแบบจากแบคทีเรีย	PCY
<i>alkB</i>	Alk-1F, Alk-1R	alkane hydroxylase ของแบคทีเรียแกรมลบ <i>Pseudomonas</i> , <i>Stenotrophomonas</i>	-
	AlkB-1f, AlkB-1r	rubredoxin dependent alkane monooxygenase	-
<i>alkB1</i>	Alk-3F, Alk-3R	alkane hydroxylase ของแบคทีเรียแกรมบวก <i>Rhodococcus</i> และแกรมลบ <i>Pseudomonas</i>	+
	AlkB1-F, AlkB1-R	alkane monooxygenase ของแบคทีเรียแกรมบวก <i>Rhodococcus</i> sp. Q15 (AF388181)	-
<i>alkB2</i>	AlkB2-F, AlkB2-R	alkane monooxygenase ของแบคทีเรียแกรมบวก <i>Rhodococcus</i> sp. Q15 (AF388182)	-
<i>alkM</i>	Alk-2F, Alk-2R	alkane hydroxylase ของแบคทีเรียแกรมบวก <i>Acinetobacter</i>	-
<i>almA</i>	AlmAwf, AlmAwr	alkane monooxygenase ของแบคทีเรียแกรมบวก <i>Alcanivorax dieselolei</i> B-5 (FJ263134) ที่ย่อย สลายอัลเคนขนาด C <sub>12</sub> -C <sub>26</sub>	-
CYP153	CYP153-F1, CYP153-R2	cytochrome P450 enzymes บริเวณ MFIAMDP (F) และ HRCMGNR (R) ของแบคทีเรียที่ย่อยสลายอัลเคน ขนาด C <sub>5</sub> -C <sub>16</sub>	-
	P450F, P450R	CYP153A subfamily บริเวณ N-terminal (MFIAMDPP) และ C-terminal (HTCMGNRL)	-
	P450fw1, P450rv3	CYP153 บริเวณ substrate-binding GGNDTTRN และ heme-binding cysteine (HLSFGFGIHRC)	-



รูปที่ 5.12 วิธีและยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายอัลเคนของ *P. putida* GPo1

(Beilen และคณะ, 2001)

ผลการตรวจหายีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายอัลเคนของสายพันธุ์ PCY ในงานวิจัยนี้ ไม่พบยีน CYP153 ที่มีบทบาทในการย่อยสลายอัลเคนขนาดเล็ก และยีน *almA* และ *alkM* ที่มีบทบาทในการย่อยสลายอัลเคนขนาดกลางถึงใหญ่ แต่พบยีน *alkB* ที่มีบทบาทในการย่อยสลายอัลเคนขนาดเล็กถึงกลาง ซึ่งสอดคล้องกับความสามารถของสายพันธุ์ PCY ในการย่อยสลายอัลเคนที่มีจำนวนคาร์บอน 14 และ 16 อะตอม อย่างไรก็ตาม ไพร์เมอร์จำเพาะกับยีน *alkB* ที่ใช้ในงานวิจัยนี้มีหลายคู่ แต่สามารถตรวจพบด้วยไพร์เมอร์ที่จำเพาะกับยีนดังกล่าวในแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ (Alk-3F, Alk-3R) และไม่สามารถตรวจพบด้วยไพร์เมอร์ที่จำเพาะยีนดังกล่าวในแบคทีเรียแกรมลบ (Alk-1F, Alk-1R) เมื่อวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลพบว่า ยีน *alkB* ของสายพันธุ์ PCY มีความเหมือนกับลำดับกรดอะมิโนของ AlkB ที่พบในแบคทีเรีย *Mycobacterium* (ตารางที่ 5.9) จึงเป็นความน่าสนใจอีกประการหนึ่งของสายพันธุ์ PCY ที่มียีนคล้ายกับยีนที่พบในแบคทีเรียแกรมบวกยีน *Mycobacterium*

## 5.8 การไม่เป็นเชื้อก่อโรค

จากการค้นคว้ารายงานวิจัยก่อนหน้านี้เกี่ยวกับการเป็นเชื้อก่อโรคของแบคทีเรียกลุ่ม Sphingomonads พบว่าไม่มีรายงานการก่อโรคของแบคทีเรียยีน *Novosphingobium* มาก่อน มีเพียงรายงานการก่อโรคของแบคทีเรียยีน *Sphingomonas* 2 สายพันธุ์ ได้แก่ *Sphingomonas melonis* DAPP-PG 224 ที่ก่อโรคจุดสีน้ำตาล (brown spot) ในเมลอน (yellow Spanish melon fruits) (Buonaurio และคณะ, 2002) และ *Sphingomonas paucimobilis* ซึ่งเป็นเชื้อก่อโรคในมนุษย์ (opportunistic pathogen) (Kilic และคณะ, 2007; Maragakis และคณะ, 2009; Toh และคณะ, 2011) นอกจากนี้ เมื่อเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rDNA ของแบคทีเรีย *Novosphingobium* sp. PCY กับลำดับนิวคลีโอไทด์ของสายพันธุ์ก่อโรค *S. melonis* DAPP-PG 224 (NR\_028626) และ *S. paucimobilis* (D16144) แสดงความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์เพียง 93 เปอร์เซ็นต์ (670/719) และ 92 เปอร์เซ็นต์ (662/721) ตามลำดับ จึงสรุปได้เบื้องต้นว่าสาย

พันธุ์ PCY ไม่เป็นเชื้อก่อโรค เนื่องจากมีความห่างทางวิวัฒนาการจากเชื้อก่อโรคทั้ง 2 สายพันธุ์ดังกล่าว

### บทสรุป

แบคทีเรียย่อยสลาย PAHs และอัลเคน *Novosphingobium* sp. PCY มียีนประมวลรหัสหน่วยย่อยแอลฟาของเอนไซม์ไพรีนไดออกซิจีเนส (*nidA*) บนเมกะพลาสมิด ซึ่งมีบทบาทในการย่อยสลายไพรีนของสายพันธุ์ PCY และมียีนอัลเคนโมโนออกซิจีเนส (*alkB*) ที่น่าจะเกี่ยวข้องกับความสามารถในการย่อยสลายอัลเคนของสายพันธุ์ PCY อีกด้วย นอกจากนี้ สายพันธุ์ดังกล่าวไม่ถูกจัดเป็นเชื้อก่อโรค จึงสามารถนำไปพัฒนาต่อเป็นหัวเชื้อพร้อมใช้เพื่อการบำบัดดินปนเปื้อนได้



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ตารางที่ 5.9 ความเหมือนของผลิตภัณฑ์ PCR ด้วยไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *alkB1* ของ *Novosphingobium* sp. PCY กับฐานข้อมูล

ผลิตภัณฑ์ PCR ด้วย ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อ ยีน <i>alkB1</i> ของ	ความเหมือนกับฐานข้อมูลของกรดอะมิโน				
	ความเหมือน	กรดอะมิโน	แบคทีเรีย	accession number	อ้างอิง
<i>Novosphingobium</i> sp. PCY (ขนาด 300 bp , KJ650249)	93% (93/100 aa)	alkane 1- monooxygenase	<i>Mycobacterium vanbaalenii</i> PYR-1	YP_952571	Unpublished
	93% (93/100 aa)	AlkB	<i>Mycobacterium austroafricanum</i> IFP 2012	ABB13506	Ferreira และคณะ, 2007
	93% (92/99 aa)	alkane hydroxylase	<i>Mycobacterium austroafricanum</i> IFP 2173	AAQ88276	Solano-Serena และคณะ , 2004
	91% (91/100 aa)	alkane 1- monooxygenase	<i>Mycobacterium phlei</i>	WP_003886333	Direct submission
	91% (91/100 aa)	alkane 1- monooxygenase	<i>Mycobacterium vaccae</i>	WP_003929436	Direct submission
	90% (90/100 aa)	AlkB	<i>Mycobacterium smegmatis</i> MC2 155	ABB13509	Ferreira และคณะ, 2007
	90% (90/100 aa)	alkane 1- monooxygenase	<i>Mycobacterium</i> sp. JLS	YP_001069662	Unpublished
	90% (90/100 aa)	AlkB	Uncultured soil bacterium	AGQ20997	Jurelevicius และคณะ, 2013
	88% (88/100 aa)	AlkB	Uncultured soil bacterium	AGQ20888	
86% (86/100 aa)	alkane hydroxylase	<i>Mycobacterium</i> sp. CH-2	AAY85982	Direct submission	

## บทที่ 6

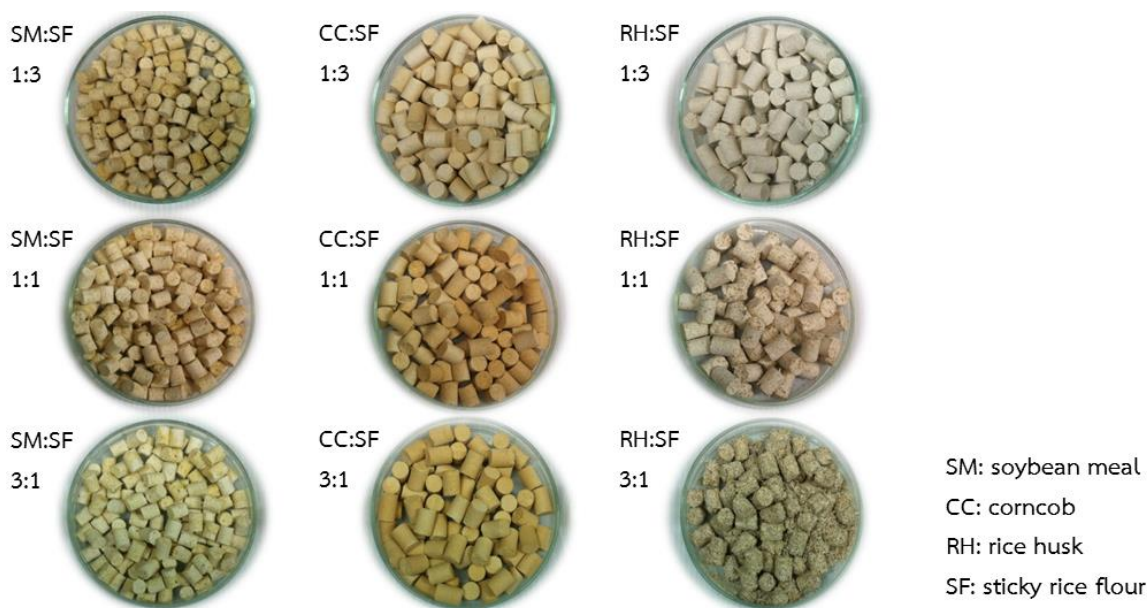
### แบคทีเรียพร้อมใช้รูปแบบอัดเม็ดของ *Novosphingobium* sp. สายพันธุ์ PCY และ การประยุกต์ใช้บำบัดดินปนเปื้อนไพรีน

แบคทีเรียแกรมลบ *Novosphingobium* sp. PCY มีความสามารถในการย่อยสลาย PAHs และอะลิฟาติกได้ดี มียีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลาย PAHs (*nidA*) และอะลิฟาติก (*alkB*) เหมือนกับ ยีนที่พบในแบคทีเรียแกรมบวกจีแนส *Mycobacterium* ซึ่งยังไม่เคยมีรายงานมาก่อน และมีความสามารถในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพเมื่อใช้สารประกอบไฮโดรคาร์บอนเป็นสารตั้งต้น อีกทั้งยังไม่เคยมีรายงานว่าแบคทีเรียก่อโรค จึงมีความน่าสนใจในการพัฒนาเป็นหัวเชื้อพร้อมใช้ สำหรับการบำบัดดินปนเปื้อน โดยรูปแบบหัวเชื้อที่น่าสนใจคือแบคทีเรียอัดเม็ด เนื่องจากมีน้ำหนักเบา ขนส่งสะดวก เก็บรักษาและใช้งานง่าย การพัฒนาหัวเชื้อพร้อมใช้รูปแบบแบคทีเรียอัดเม็ดนั้น จำต้องศึกษาปัจจัยต่างๆ ได้แก่ ชนิดและปริมาณของวัสดุที่ใช้เป็นองค์ประกอบ ปริมาณของแบคทีเรีย และชนิดของสารปกป้องเซลล์ เพื่อให้แบคทีเรียอัดเม็ดมีอัตราการอยู่รอดและประสิทธิภาพการ กำจัดสารพิษสูงสุด

#### 6.1 วัสดุที่ใช้เป็นองค์ประกอบในการผลิตแบคทีเรียอัดเม็ด

วัสดุที่ใช้เป็นองค์ประกอบในการผลิตแบคทีเรียอัดเม็ดที่เลือกมาทดสอบเป็นวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรที่มีปริมาณมาก หาได้ง่าย และต้นทุนต่ำ ได้แก่ กากถั่วเหลือง (SM) ชั่งข้าวโพด (CC) และ แกลบ (RH) โดยนำมาบดและผสมกับแป้งข้าวเหนียว (SF) ซึ่งทำหน้าที่เป็นสารเหนียวเพื่อให้วัสดุ สามารถจับตัวเป็นเม็ดได้ ปริมาณของวัสดุจะถูกแปรผันในอัตราส่วนของวัสดุต่อแป้งข้าวเหนียว เท่ากับ 1:3, 1:1 และ 3:1 แล้วผ่านการอัดเม็ดโดยยังไม่เติมแบคทีเรีย ลักษณะของวัสดุอัดเม็ดแสดง ในรูปที่ 6.1

เมื่อตรวจสอบความแข็งแรงและลักษณะของวัสดุอัดเม็ดที่ผลิตได้พบว่า อัตราส่วนของวัสดุต่อ แป้งข้าวเหนียว 1:3 ทำให้วัสดุอัดเม็ดมีความร่วนซุยมาก เนื่องจากปริมาณแป้งข้าวเหนียวมากเกินไป อีกทั้งการใช้แป้งข้าวเหนียวในปริมาณมากเป็นการเพิ่มต้นทุนการผลิต เพราะแป้งข้าวเหนียวไม่ใช่วัสดุ เหลือใช้ทางการเกษตร และยังเป็น การเพิ่มการปลดปล่อยสารอินทรีย์สู่สิ่งแวดล้อมได้ นอกจากนี้ วัสดุ อัดเม็ดที่ผลิตจากแกลบทุกอัตราส่วนนั้น มีความหยาบและความไม่เป็นเนื้อเดียวกันสูง ซึ่งมีสาเหตุจาก ความไม่ละเอียดของแกลบที่บดได้ ทำให้วัสดุอัดเม็ดมีความเปราะบางและแตกตัวง่าย อย่างไรก็ตาม แกลบเป็นวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรที่มีปริมาณมาก หาได้ง่าย มีโครงสร้างเป็นซิลิกา-เซลลูโลส จึง แข็งแรงทนทานและสามารถดูดซับสารได้ดี เช่น ตัวทำละลาย สี ย้อม โลหะหนัก น้ำมันและไขมัน PAHs เป็นต้น จึงมีประโยชน์สำหรับการประยุกต์ใช้ในกระบวนการบำบัดสิ่งแวดล้อม (Foo และ Hameed, 2009; Lattuada และคณะ, 2013) ดังนั้นหากสามารถบดแกลบให้ละเอียดยิ่งขึ้น ก็ อาจจะเป็นตัวเลือกที่ดีที่นำมาใช้เป็นวัสดุในกระบวนการผลิตแบคทีเรียอัดเม็ด



รูปที่ 6.1 วัสดุอัดเม็ดที่แปรผันชนิดและปริมาณของวัสดุที่ใช้เป็นองค์ประกอบ

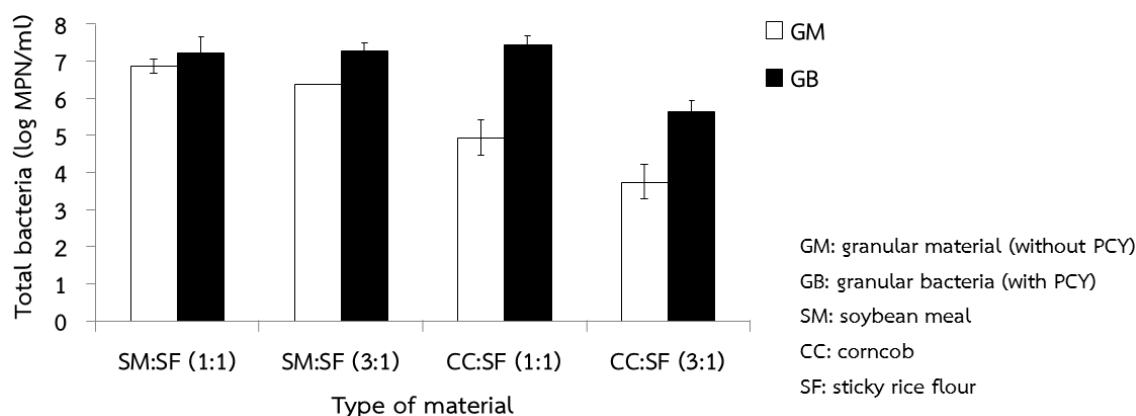
จากความไม่แข็งแรงของวัสดุอัดเม็ดที่ผลิตจากอัตราส่วนของแป้งข้าวเหนียวที่มากเกินไปและความหยาบของแกลบนั้น จึงเลือกวัสดุอัดเม็ดที่ผลิตจากกากถั่วเหลืองและซังข้าวโพด ในอัตราส่วนกากถั่วเหลืองหรือซังข้าวโพดต่อแป้งข้าวเหนียว 1:1 และ 3:1 จำนวนทั้งหมด 4 สูตร ไปศึกษาประสิทธิภาพการกำจัดไฟรินในอาหารเหลว

## 6.2 ประสิทธิภาพการกำจัดไฟรินในอาหารเหลวของแบคทีเรียอัดเม็ด

อัตราส่วนของกากถั่วเหลืองหรือซังข้าวโพดต่อแป้งข้าวเหนียว 1:1 และ 3:1 ถูกเลือกมาผลิตแบคทีเรียอัดเม็ดที่มีแบคทีเรีย *Novosphingobium* sp. PCY เป็นสายพันธุ์หลัก เพื่อใช้ทดสอบความสามารถกำจัดไฟรินในอาหารเหลว โดยเบื้องต้นได้ตรวจนับจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดของแบคทีเรียอัดเม็ดที่ผลิตได้ด้วยวิธี MPN เปรียบเทียบกับวัสดุอัดเม็ดชนิดเดียวกันที่ผลิตโดยไม่เติมสายพันธุ์ PCY ความแตกต่างของจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดในแบคทีเรียอัดเม็ดและวัสดุอัดเม็ดนั้นจะถูกประเมินเป็นจำนวนแบคทีเรียของสายพันธุ์ PCY ผลของจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดแสดงในรูปที่ 6.2 พบว่าจำนวนแบคทีเรียของสายพันธุ์ PCY ในแบคทีเรียอัดเม็ดที่ผลิตจากกากถั่วเหลืองมีปริมาณน้อยกว่าที่ผลิตจากซังข้าวโพด ซึ่งอาจมีสาเหตุจากความเป็นรูปพรุนต่ำของกากถั่วเหลือง จึงมีพื้นที่ให้แบคทีเรียยึดเกาะน้อย อีกทั้งภายในกากถั่วเหลืองอัดเม็ดยังไม่มีอากาศหรือมีอากาศน้อย จึงอาจไม่เหมาะสมต่อสายพันธุ์ PCY ซึ่งเป็นจีโนสที่ต้องการอากาศในการเจริญอย่างแท้จริง นอกจากนี้ กากถั่วเหลืองยังเป็นแหล่งของไนโตรเจน โดยมีโปรตีนทั้งหมดประมาณ 36.4-49.5 เปอร์เซ็นต์ ขึ้นกับสายพันธุ์ของถั่วเหลือง (Sari และคณะ, 2013; Zhang และคณะ, 2013b) ซึ่งเมื่อประยุกต์ใช้แบคทีเรียอัดเม็ดที่ผลิตจากกากถั่วเหลืองในการบำบัดดินปนเปื้อนนั่น จะส่งผลต่อปริมาณสารอาหารในดินที่เปลี่ยนแปลงไป (อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนต่อฟอสฟอรัสเปลี่ยนแปลงไป) รวมถึงความยากต่อการปรับปริมาณสารอาหาร เนื่องจากไม่ทราบปริมาณไนโตรเจนของกากถั่วเหลืองที่แน่นอน ทำให้

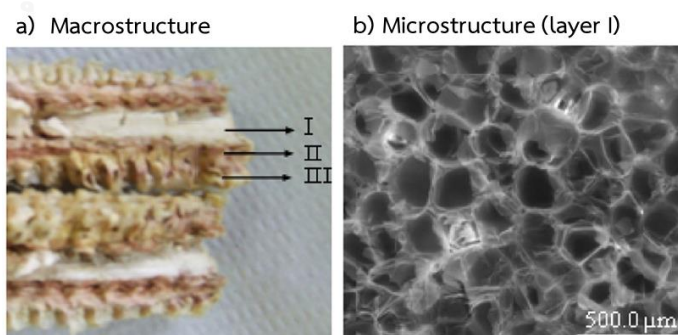


การบำบัดเกิดขึ้นอย่างไม่เต็มประสิทธิภาพ อีกทั้งแบคทีเรียอัดเม็ดที่ผลิตจากกากถั่วเหลืองยังแตกตัวในน้ำได้ช้ามากเมื่อเปรียบเทียบกับแบคทีเรียอัดเม็ดที่ผลิตจากซังข้าวโพด ดังนั้นแบคทีเรียอัดเม็ดที่ผลิตจากซังข้าวโพดทั้ง 2 สูตร (อัตราส่วนซังข้าวโพดต่อแป้งข้าวเหนียว 1:1 และ 3:1) จึงถูกเลือกนำไปทดสอบประสิทธิภาพการกำจัดไฟรีนในอาหารเหลวต่อไป



รูปที่ 6.2 จำนวนแบคทีเรียทั้งหมดในแบคทีเรียอัดเม็ดที่ผลิตได้

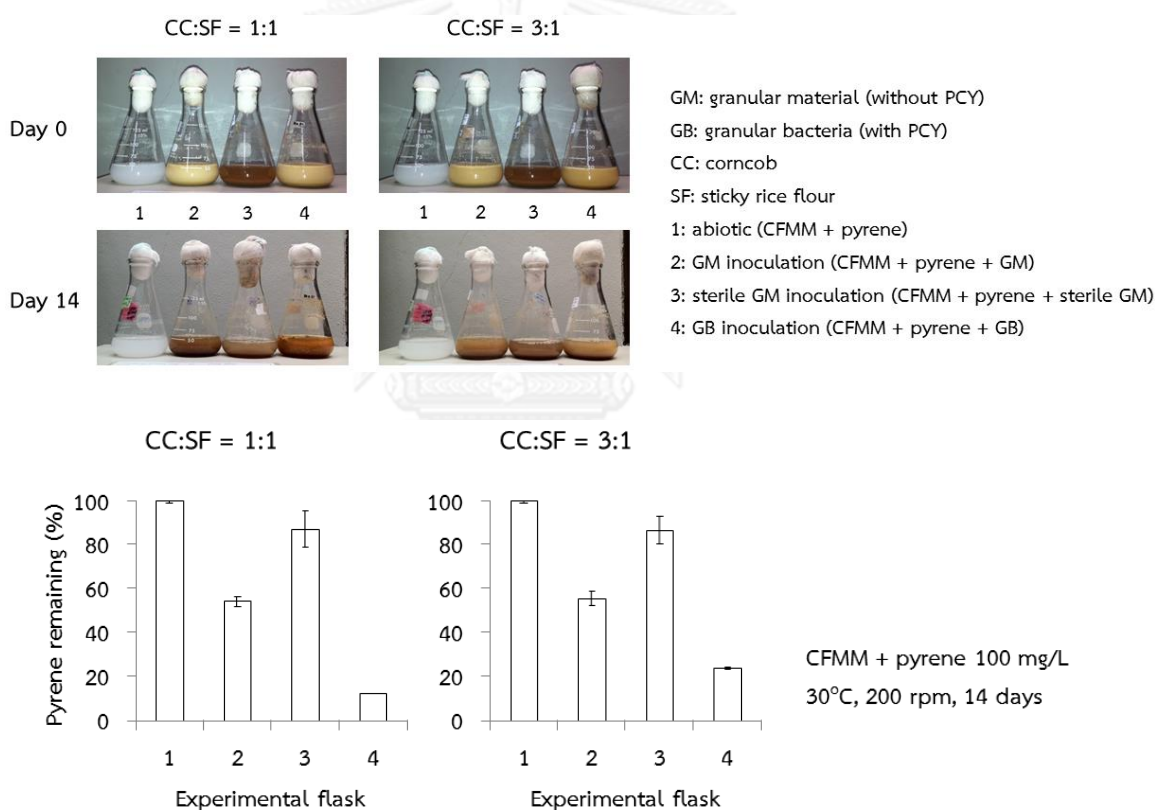
นอกจากนี้ ซังข้าวโพดเป็นวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรที่มีปริมาณมาก หาได้ง่าย ย่อยสลายได้เอง และน้ำหนักเบา โครงสร้างของซังข้าวโพดแบ่งออกเป็น 3 ชั้น ดังรูปที่ 6.3 a ชั้นแรก (layer I) เป็นส่วนแกนกลางสีขาวของซังข้าวโพด ซึ่งมีลักษณะเป็นถุงรูปทรงเรขาคณิต (alveolar) ผนังบางและบรรจุอากาศอยู่ภายในแต่ละถุง (ดังรูปที่ 6.3 b) มีรูพรุนสูง จึงสามารถดูดซับสารต่างๆ ได้ดี มีพื้นที่ผิวมาก ทำให้แบคทีเรียสามารถยึดเกาะได้ในปริมาณมาก เมื่อนำไปประยุกต์ใช้ในการบำบัดดินปนเปื้อน ซังข้าวโพดจะเพิ่มความเป็นรูพรุนของดิน ทำให้อากาศสามารถถ่ายเทลงไปในดินได้ดียิ่งขึ้น ปริมาณออกซิเจนในดินก็จะเพิ่มตามด้วย ส่งผลดีต่อกระบวนการย่อยสลาย PAHs ของแบคทีเรีย (Pinto และคณะ, 2012)



รูปที่ 6.3 โครงสร้างของซังข้าวโพด

(Pinto และคณะ, 2012)

การทดสอบความสามารถในการกำจัดไพรีนของแบคทีเรียอัดเม็ดนั้น ประกอบด้วยชุดควบคุมปราศจากเชื้อ (CFMM + pyrene) ชุดกำจัดไพรีนโดยวัสดุอัดเม็ดปราศจากเชื้อ (CFMM + pyrene + sterile GM) ชุดการกำจัดไพรีนโดยวัสดุอัดเม็ด (CFMM + pyrene + GM) และชุดการกำจัดไพรีนโดยแบคทีเรียอัดเม็ด (CFMM + pyrene + GB) ผลการทดลองแสดงในรูปที่ 6.4 พบว่าประสิทธิภาพการกำจัดไพรีนเรียงลำดับจากน้อยไปมากได้ดังนี้ ชุดควบคุมปราศจากเชื้อ < ชุดควบคุมการดูดซับของวัสดุอัดเม็ด < ชุดการกำจัดไพรีนโดยวัสดุอัดเม็ด < ชุดการกำจัดไพรีนโดยแบคทีเรียอัดเม็ด โดยพบว่าแบคทีเรียอัดเม็ดในอัตราส่วนซึ่งข้าวโพดต่อแป้งข้าวเหนียว 1:1 มีประสิทธิภาพการกำจัดไพรีนดีกว่าแบคทีเรียอัดเม็ดในอัตราส่วนซึ่งข้าวโพดต่อแป้งข้าวเหนียว 3:1 โดยสามารถกำจัดไพรีนความเข้มข้นเริ่มต้น 100 มิลลิกรัม/ลิตร ได้  $87.5 \pm 0.1$  และ  $76.0 \pm 0.4$  เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ในเวลา 14 วัน



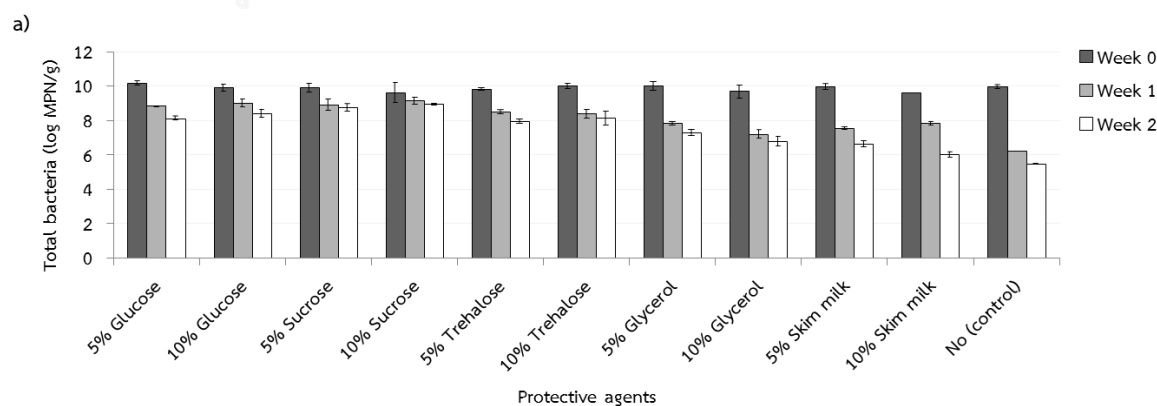
รูปที่ 6.4 ประสิทธิภาพการกำจัดไพรีนของแบคทีเรียอัดเม็ดที่ผลิตจากซึ่งข้าวโพดอัตราส่วนต่างๆ

เนื่องจากชุดควบคุมปราศจากเชื้อมีเปอร์เซ็นต์การกำจัดไพรีนต่ำมาก การกำจัดไพรีนของชุดที่เติมวัสดุอัดเม็ดปราศจากเชื้อจึงเกิดจากการดูดซับไพรีนของซึ่งข้าวโพดเป็นส่วนใหญ่ ซึ่งมีค่าประมาณ 13 เปอร์เซ็นต์ และการกำจัดไพรีนของชุดที่เติมวัสดุอัดเม็ดเกิดจากการดูดซับของซึ่งข้าวโพดร่วมกับการย่อยสลายของจุลินทรีย์ในเม็ดวัสดุ ซึ่งมีค่าประมาณ 45 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้นการย่อยสลายไพรีนของจุลินทรีย์ในเม็ดวัสดุจึงมีค่าประมาณ 32 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่แบคทีเรียอัดเม็ดสูตร 1:1 และ 3:1 สามารถกำจัดไพรีนได้ประมาณ 87.5 และ 76.0 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งเกิดจากการ

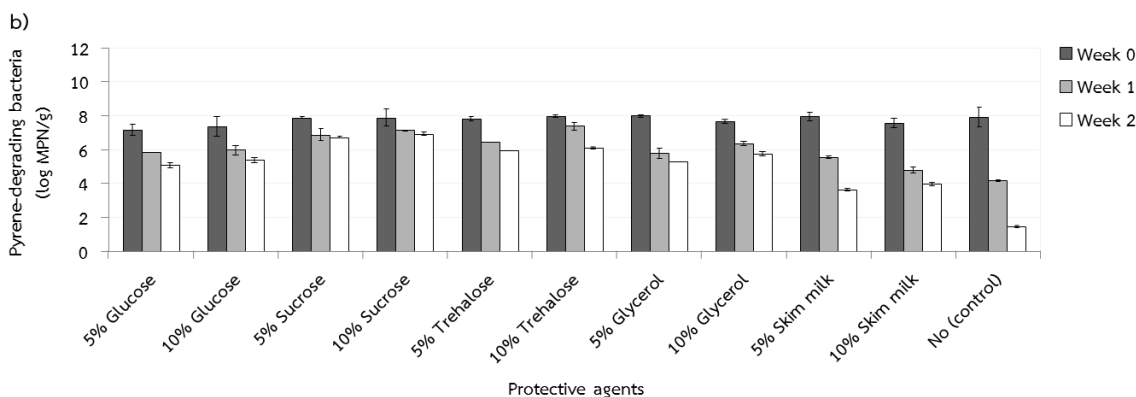
ดูดซับของซังข้าวโพดและการย่อยสลายของจุลินทรีย์ในเม็ดวัสดุร่วมกับสายพันธุ์ PCY แสดงให้เห็นว่าความสามารถในการย่อยสลายไฟรีนของสายพันธุ์ PCY รูปแบบแบคทีเรียอัดเม็ดสูตร 1:1 และ 3:1 มีค่าประมาณ 42.5 และ 31.0 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ อย่างไรก็ตาม เมื่อพิจารณาจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดในรูปที่ 6.2 พบว่าแบคทีเรียอัดเม็ดสูตร 1:1 มีจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดมากกว่าแบคทีเรียอัดเม็ดสูตร 3:1 จึงอาจส่งผลต่อประสิทธิภาพการกำจัดไฟรีนที่ต่างกัน ดังนั้นเมื่อพิจารณาผลจำนวนแบคทีเรียประกอบกับประสิทธิภาพการกำจัดไฟรีน พบว่าแบคทีเรียอัดเม็ดที่ผลิตจากซังข้าวโพดสูตร 1:1 มีจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดมากกว่าและมีประสิทธิภาพการกำจัดไฟรีนดีกว่า จึงเลือกใช้สูตรดังกล่าวในการทดลองขั้นต่อไป

### 6.3 สารปกป้องเซลล์ที่ใช้ในการผลิตแบคทีเรียอัดเม็ด

เนื่องจากการศึกษาสภาวะการเก็บรักษาแบคทีเรียอัดเม็ดเบื้องต้นเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ พบว่าสายพันธุ์ PCY ไม่สามารถอยู่รอดได้ในแบคทีเรียอัดเม็ด (ตารางที่ ง-4) จึงต้องปรับปรุงอัตราการรอดชีวิตของสายพันธุ์ PCY โดยงานวิจัยนี้ศึกษาการเติมสารปกป้องเซลล์ลงในหัวเชื้อสายพันธุ์ PCY ก่อนกระบวนการอัดเม็ด สารปกป้องเซลล์ที่ทดสอบในงานวิจัยนี้ได้แก่ กลูโคส ซูโครส ทรีฮาโลส กลีเซอรอล และนมผงขาดมันเนย ที่ความเข้มข้น 5 และ 10 เปอร์เซ็นต์ ผลจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดและแบคทีเรียย่อยสลายไฟรีนในแบคทีเรียอัดเม็ดสายพันธุ์ PCY แสดงดังรูปที่ 6.5 พบว่าจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดในแบคทีเรียอัดเม็ดที่เติมสารปกป้องเซลล์มีปริมาณมากกว่าในแบคทีเรียอัดเม็ดที่ไม่เติมสารปกป้องเซลล์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งสารปกป้องเซลล์ชนิดแซ็กคาไรด์ (รูปที่ 6.5 a) เมื่อพิจารณาพร้อมกับจำนวนแบคทีเรียย่อยสลายไฟรีน (รูปที่ 6.5 b) พบว่าความสามารถของสารปกป้องเซลล์เรียงลำดับจากน้อยไปมากได้ดังนี้ นมผงขาดมันเนย < กลูโคส < กลีเซอรอล < ทรีฮาโลส < ซูโครส อย่างไรก็ตาม ความเข้มข้นของสารปกป้องเซลล์ที่สูงขึ้นไม่ได้มีผลส่งเสริมการอยู่รอดของแบคทีเรียให้สูงขึ้นตาม โดยความเข้มข้นที่สูงขึ้น (10 เปอร์เซ็นต์) มีผลเพิ่มอัตราการรอดชีวิตเพียงเล็กน้อยเมื่อใช้สารปกป้องเซลล์ชนิดแซ็กคาไรด์ แต่มีผลลดอัตราการรอดชีวิตเมื่อใช้สารปกป้องเซลล์ชนิดกลีเซอรอลและนมผงขาดมันเนย



รูปที่ 6.5 จำนวนแบคทีเรียทั้งหมด (a) และแบคทีเรียย่อยสลายไฟรีน (b) ในแบคทีเรียอัดเม็ดที่เติมสารปกป้องเซลล์ชนิดต่างๆ



รูปที่ 6.5 จำนวนแบคทีเรียทั้งหมด (a) และแบคทีเรียย่อยสลายไพรีน (b) ในแบคทีเรียอัดเม็ดที่เติมสารปกป้องเซลล์ชนิดต่างๆ (ต่อ)

การประยุกต์ใช้สารปกป้องเซลล์ในการเพิ่มการอยู่รอดของแบคทีเรียดังกล่าว สามารถเติมสารปกป้องเซลล์ลงไประหว่างการเจริญของแบคทีเรียหรือก่อนนำแบคทีเรียสู่กระบวนการทำให้แห้ง ชนิดและความเข้มข้นของสารปกป้องเซลล์ที่เหมาะสมจะขึ้นอยู่กับชนิดของแบคทีเรีย อย่างไรก็ตาม สารปกป้องเซลล์บางชนิดมีความเหมาะสมต่อการเพิ่มการอยู่รอดของแบคทีเรียหลายชนิด เช่น นมผงขาดมันเนย (non-fat milk solids) เซรัม (serum) ทรีฮาโลส (trehalose) กลีเซอรอล (glycerol) บีเทน (betaine) อะโดนิทอล (adonitol) ซูโครส (sucrose) กลูโคส (glucose) แลคโทส (lactose) เดกแทรน (dextran) พอลิเอทิลีนไกลคอล (polyethylene glycol) (Hubalek, 2003) งานวิจัยมากมายรายงานความสามารถของทรีฮาโลสและซูโครสในการปกป้องเซลล์จากความแห้ง พบว่าสารปกป้องเซลล์ดังกล่าวจะไปแทนที่น้ำรอบๆ ส่วนมีขั้วของโปรตีน แล้วสร้างพันธะไฮโดรเจนเพื่อเพิ่มความเสถียรของโปรตีน จึงสามารถป้องกันการถูกทำลายจากความร้อน ทำให้สามารถรักษาโครงสร้างและหน้าที่ของโปรตีนในระหว่างกระบวนการทำให้แห้งได้ (Morgan และคณะ, 2006)

งานวิจัยของ Palmfeldt และคณะ (2003) แปรผันชนิดของสารปกป้องเซลล์ ได้แก่ แลคโทส ซูโครส ทรีฮาโลส กลูตาเมท ซูโครสผสมกับกลูตาเมท นมผงขาดมันเนย และนมผงขาดมันเนยผสมกับทรีฮาโลส ในการทำให้แห้งแบบแช่เยือกแข็ง (freeze drying) ของแบคทีเรีย *Pseudomonas chlororap* MA 100 พบว่าซูโครสความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ สามารถเพิ่มอัตราการอยู่รอดของสายพันธุ์ MA 100 ได้สูงสุด ต่อมาพบว่าความเข้มข้นของซูโครสที่เพิ่มขึ้น มีผลลดอัตราการรอดชีวิตของสายพันธุ์ MA 100 หลังผ่านการทำให้แห้งแบบแช่เยือกแข็งได้ จึงควรใช้ความเข้มข้นของซูโครสที่เหมาะสมในการส่งเสริมอัตราการรอดชีวิตของแบคทีเรีย งานวิจัยของ Ming และคณะ (2009) พบว่าสารปกป้องเซลล์ชนิดนมผงขาดมันเนยและซูโครส ความเข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์ สามารถเพิ่มอัตราการรอดชีวิตของ *Lactobacillus salivarius* I 24 หลังผ่านการทำให้แห้งแบบแช่เยือกแข็ง 91.1 และ 89.2 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ อย่างไรก็ตาม อัตราการรอดชีวิตสามารถเพิ่มขึ้นอีกเมื่อใช้สารผสมของซูโครสและนมผงขาดมันเนยความเข้มข้นชนิดละ 9.85 และ 10.65 เปอร์เซ็นต์ เป็นสารปกป้องเซลล์ งานวิจัยของ Zhan และคณะ (2011) พบว่าซูโครสความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ ส่งเสริมอัตราการอยู่รอดของแบคทีเรีย *Bacillus cereus* AR156 หลังผ่านการทำให้แห้งแบบแช่เยือกแข็งได้ 100

เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่เซลล์ไปไอสและกาแลคโทสความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ สามารถเพิ่มอัตราการอยู่รอดของ *Burkholderia vietnamiensis* B418 และ *Pantoea agglomerans* 2Re40 ได้ 98 และ 54 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

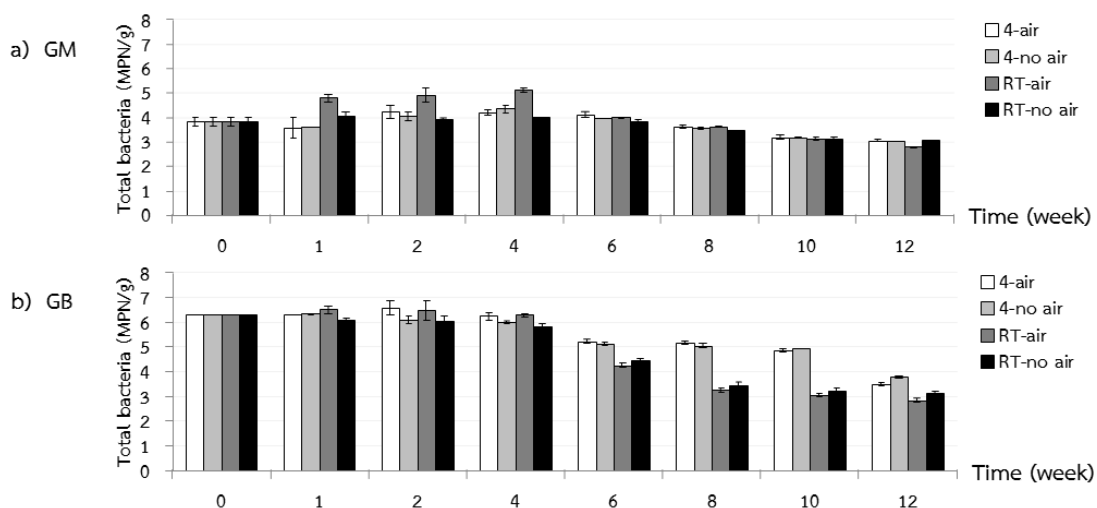
จากงานวิจัยก่อนหน้านี้แสดงให้เห็นว่า ซูโครสเป็นสารปกป้องเซลล์ที่สามารถประยุกต์ใช้ได้กับทั้งแบคทีเรียแกรมลบและแกรมบวก นอกจากนี้ งานวิจัยของ Raina และคณะ (2008) ศึกษาการผลิตแบคทีเรีย *Sphingobium indicum* B90A ยึดเกาะบนซังข้าวโพด โดยใช้กากน้ำตาล (ซึ่งประกอบด้วยซูโครส น้ำตาลอินเวิร์ท และสารเคมีอื่นๆ) ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ เป็นสารปกป้องเซลล์ พบว่าหัวเชื้อรูปแบบดังกล่าวมีจำนวนแบคทีเรียรอดชีวิตสูงและยังคงมีความสามารถย่อยสลายเฮกซะคลอโรไซโคลเฮกเซน (hexachlorocyclohexane) ได้ดี

งานวิจัยนี้พบว่าสารปกป้องเซลล์ชนิดซูโครสความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ สามารถเพิ่มอัตราการอยู่รอดของสายพันธุ์ PCY ในรูปแบบแบคทีเรียอัดเม็ดได้ดีที่สุด ดังนั้นจึงเลือกใช้ซูโครสความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นสารปกป้องเซลล์ในการผลิตแบคทีเรียอัดเม็ดสายพันธุ์ PCY สำหรับการศึกษาระยะยาวและการประยุกต์ใช้ในการบำบัดดินเปื้อนไพรินต่อไป

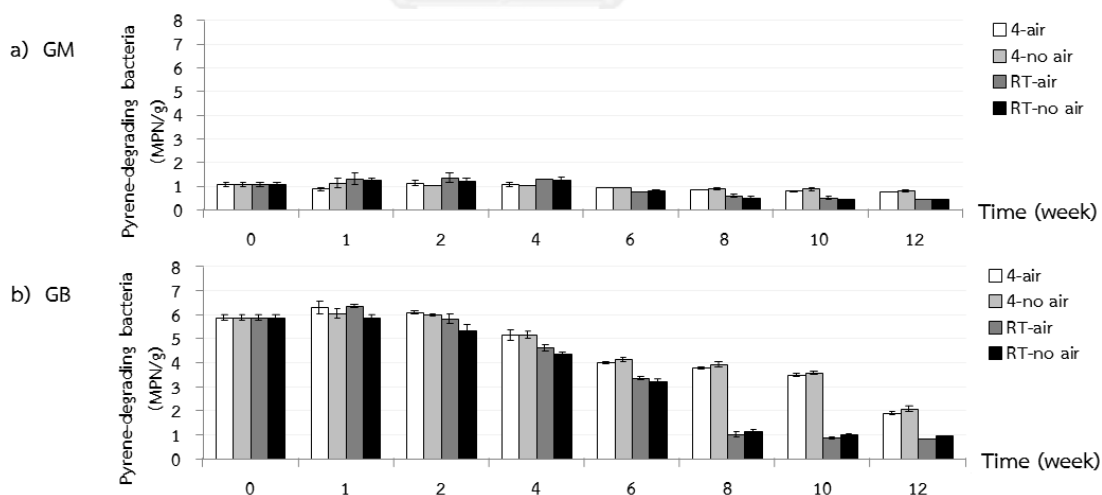
#### 6.4 การเก็บรักษาแบคทีเรียอัดเม็ดในระยะยาว

แบคทีเรียอัดเม็ดของ *Novosphingobium* sp. PCY ที่ผลิตจากอัตราส่วนของซังข้าวโพดต่อแป้งข้าวเหนียวเท่ากับ 1:1 เติมซูโครสความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นสารปกป้องเซลล์ และโซเดียมเบนโซเอตความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ เป็นสารป้องกันรา ถูกทดสอบการเก็บรักษาระยะยาวในสภาวะแปรผันอุณหภูมิของการเก็บรักษา คือ อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิห้อง (room temperature; RT) พร้อมกับแปรผันสภาวะมีและไม่มีอากาศ จากนั้นประเมินประสิทธิภาพของแบคทีเรียอัดเม็ดภายหลังการเก็บรักษาโดยตรวจนับจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดและแบคทีเรียย่อยสลายไพรินด้วยวิธี MPN และตรวจสอบประสิทธิภาพการกำจัดไพริน ผลการทดลองในรูปที่ 6.6 พบว่าการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ทั้งในสภาวะมีและไม่มีอากาศ แบคทีเรียทั้งหมดจะมีจำนวนคงที่จากจำนวนเริ่มต้น  $6.4 \log$  MPN/กรัมของแบคทีเรียอัดเม็ด แล้วค่อยๆลดลงหลังเวลาผ่านไป 4 สัปดาห์ จนมีจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดประมาณ  $5 \log$  MPN/กรัมของแบคทีเรียอัดเม็ด ณ สัปดาห์ที่ 10 จากนั้นจะลดลงต่ำกว่า  $4 \log$  MPN/กรัมของแบคทีเรียอัดเม็ด ซึ่งมากกว่าจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดในวัสดุอัดเม็ดเพียงเล็กน้อย ในขณะที่การเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง (ประมาณ 30 องศาเซลเซียส) จำนวนแบคทีเรียทั้งหมดจะเพิ่มขึ้นเล็กน้อยในสภาวะเก็บรักษาแบบมีอากาศและจะคงที่ในสภาวะเก็บรักษาแบบไม่มีอากาศในระยะเวลา 4 สัปดาห์ จากนั้นจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดจะลดลงในอัตราที่สูงกว่าการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส โดยมีจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดเทียบเท่ากับวัสดุอัดเม็ด ณ สัปดาห์ที่ 8 ในทำนองเดียวกัน จำนวนแบคทีเรียย่อยสลายไพริน (รูปที่ 6.7) มีแนวโน้มการลดลงคล้ายกับจำนวนแบคทีเรียทั้งหมด กล่าวคือการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ทั้งในสภาวะมีและไม่มีอากาศ แบคทีเรียย่อยสลายไพรินจะมีจำนวนคงที่จากจำนวนเริ่มต้น  $5.9 \log$  MPN/กรัมของแบคทีเรียอัดเม็ด แล้วค่อยๆลดลงหลังเวลาผ่านไป 4 สัปดาห์ จนมีจำนวนแบคทีเรียย่อยสลายไพรินประมาณ  $3.55 \log$  MPN/กรัมของแบคทีเรียอัดเม็ด ณ สัปดาห์ที่ 10 จากนั้นจะลดลงเหลือ  $2 \log$  MPN/กรัมของแบคทีเรียอัดเม็ด ซึ่งมากกว่าจำนวนแบคทีเรียย่อยสลายไพรินในวัสดุ

อัดเม็ดเพียงเล็กน้อย ในขณะที่การเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้องทั้งในสภาวะมีและไม่มีอากาศ จำนวนแบคทีเรียย่อยสลายไฟรีนจะเริ่มลดลงตั้งแต่สัปดาห์ที่ 2 จนมีจำนวนแบคทีเรียย่อยสลายไฟรีนประมาณ 4 log MPN/กรัมของแบคทีเรียอัดเม็ด ณ สัปดาห์ที่ 6 จากนั้นแบคทีเรียย่อยสลายไฟรีนจะลดลงจนมีจำนวนเทียบเท่ากับวัสดุอัดเม็ดตั้งแต่สัปดาห์ที่ 8 เป็นต้นไป



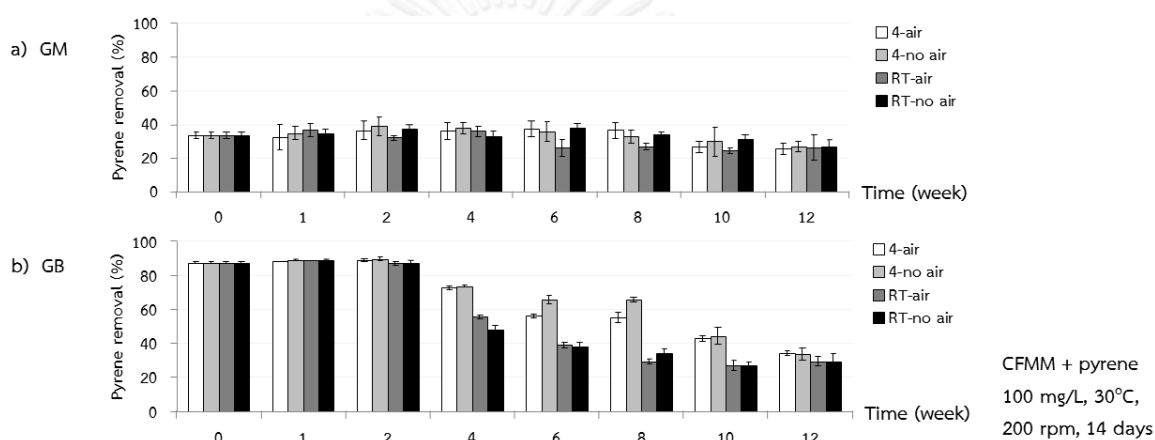
รูปที่ 6.6 จำนวนแบคทีเรียทั้งหมดในวัสดุอัดเม็ด (a) และแบคทีเรียอัดเม็ด (b) ระหว่างการเก็บรักษาระยะยาว



รูปที่ 6.7 จำนวนแบคทีเรียย่อยสลายไฟรีนในวัสดุอัดเม็ด (a) และแบคทีเรียอัดเม็ด (b) ระหว่างการเก็บรักษาระยะยาว

จากผลจำนวนแบคทีเรียพบว่าสามารถเก็บรักษาแบคทีเรียอัดเม็ดได้นาน 10 สัปดาห์ ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และนาน 6 สัปดาห์ที่อุณหภูมิห้อง ในสภาวะมีและไม่มีอากาศ อย่างไรก็ตาม เมื่อพิจารณาประสิทธิภาพการกำจัดไฟรีนในอาหารเหลวของแบคทีเรียอัดเม็ดที่เก็บรักษาใน

สภาวะต่างๆ (รูปที่ 6.8) พบว่าแบคทีเรียอัดเม็ดมีประสิทธิภาพการกำจัดไพรีน 88-90 เปอร์เซ็นต์ ตลอดระยะเวลา 2 สัปดาห์ของการเก็บรักษาในทุกสภาวะ ซึ่งมากกว่าวัสดุอัดเม็ดที่มีประสิทธิภาพการกำจัดไพรีนเพียง 30-40 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นประสิทธิภาพการกำจัดไพรีนของแบคทีเรียอัดเม็ดที่ผ่านการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ในสภาวะมีและไม่มีอากาศ จะลดลงเหลือ 56 และ 66 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ณ สัปดาห์ที่ 8 ในขณะที่ประสิทธิภาพการกำจัดไพรีนของแบคทีเรียอัดเม็ดที่ผ่านการเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้องในสภาวะมีและไม่มีอากาศ จะลดลงเหลือ 56 และ 48 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ณ สัปดาห์ที่ 4 ดังนั้นสภาวะการเก็บรักษาแบคทีเรียอัดเม็ดให้ยังคงมีประสิทธิภาพการกำจัดไพรีนได้ดี คือ อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 8 สัปดาห์ และอุณหภูมิห้อง นาน 4 สัปดาห์



รูปที่ 6.8 ประสิทธิภาพการกำจัดไพรีนในอาหารเหลวของวัสดุอัดเม็ด (a) และแบคทีเรียอัดเม็ด (b) ระหว่างการเก็บรักษาระยะยาว

การเปรียบเทียบระยะเวลาการเก็บรักษาหัวเชื้อแบคทีเรียยีสต์เกาะบนซังข้าวโพดกับงานวิจัยก่อนหน้า (ตารางที่ 6.1) พบว่าการเก็บรักษาแบคทีเรียอัดเม็ดสายพันธุ์ PCY มีระยะเวลาใกล้เคียงกับหัวเชื้ออื่นๆ เช่น หัวเชื้อย่อยสลายน้ำมันจากแบคทีเรียกลุ่ม *Acinetobacter baumannii*, *Burkholderia cepacia* และ *Pseudomonas* sp. (Mishra และคณะ, 2001) และหัวเชื้อย่อยสลายเฮกซะคลอโรไซโคลเฮกเซนจากแบคทีเรีย *Sphingobium indicum* B90A (Raina และคณะ, 2008) ในขณะที่หัวเชื้อย่อยสลายพารา-ไนโตรฟีนอล (*p*-nitrophenol) จากแบคทีเรีย *Arthrobacter protophormiae* RKJ100 มีระยะเวลาเก็บรักษาที่นานกว่าเมื่อเทียบกับหัวเชื้ออื่นๆ (Labana และคณะ, 2005) ทั้งนี้อาจมีสาเหตุจากแบคทีเรียจีสต์ *Arthrobacter* มีสมบัติทนทานต่อสภาวะรุนแรง ได้แก่ การขาดแคลนอาหาร ความแห้ง และความเข้มข้นของเกลือสูงๆ เนื่องจากมีไกลโคเจนและทรีฮาโลสเป็นองค์ประกอบในเซลล์ปริมาณมาก (Zevenhuizen, 1992)

**ตารางที่ 6.1** การเปรียบเทียบระยะเวลาการเก็บรักษาของหัวเชื้อแบคทีเรียรูปแบบยัดเกาะบนขังข้าวโพดต่างๆ

แบคทีเรีย	อุณหภูมิการเก็บรักษา (°ซ)	เวลาการเก็บรักษา (สัปดาห์)	ความสามารถกำจัดสาร	อ้างอิง
แบคทีเรียกลุ่ม* ( <i>Acinetobacter baumannii</i> , <i>Burkholderia cepacia</i> , <i>Pseudomonas</i> sp.)	4°ซ	12	น้ำมัน	Mishra และคณะ, 2001
<i>Arthrobacter protophormiae</i> RKJ100	4°ซ	> 24	พารา-ไนโตรฟีนอล	Labana และคณะ, 2005
<i>Sphingobium indicum</i> B90A *	30°ซ	4	เฮกซะคลอโรไซโคลเฮกเซน	Raina และคณะ, 2008
<i>Novosphingobium</i> sp. PCY **	4°ซ	8	ไพรีน	งานวิจัยนี้
	อุณหภูมิห้อง	4		

สารปกป้องเซลล์ : \* กากน้ำตาลเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์, \*\* ซูโครสเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์

### 6.5 การบำบัดดินปนเปื้อนไพรีนของแบคทีเรียอัดเม็ด

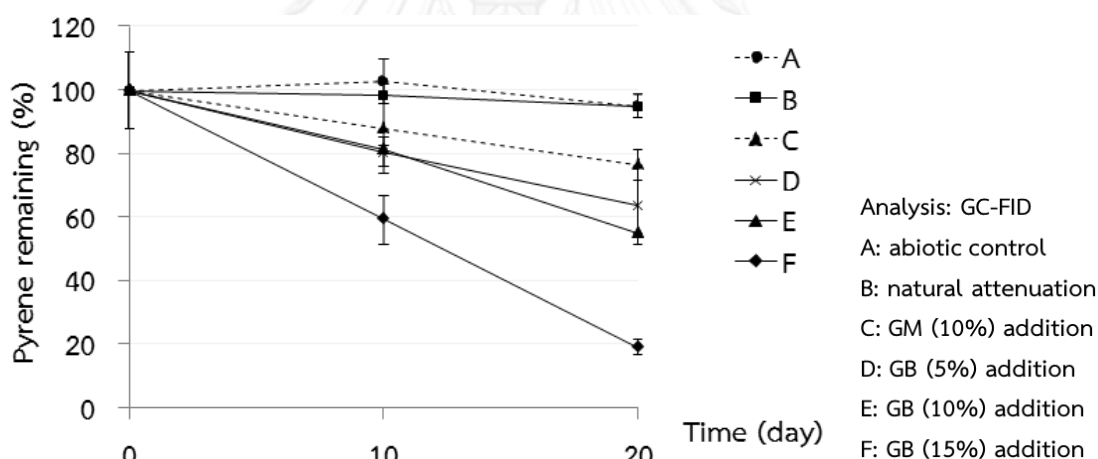
แบคทีเรียอัดเม็ดของ *Novosphingobium* sp. PCY ที่ผลิตจากอัตราส่วนของขังข้าวโพดต่อขังข้าวเหนียวเท่ากับ 1:1 เติมซูโครสความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นสารปกป้องเซลล์ และโซเดียมเบนโซเอตความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ เป็นสารป้องกันรา ถูกนำมาประยุกต์ใช้ในการบำบัดดินปนเปื้อนไพรีนความเข้มข้นเริ่มต้น 300 มิลลิกรัม/กิโลกรัมของดิน ซึ่งแบ่งออกเป็น 6 ชุดการทดลอง ได้แก่ ชุดดินปราศจากเชื้อ (abiotic set, A) ชุดดินฟื้นฟูโดยธรรมชาติ (natural attenuation set, B) ชุดดินเติมวัสดุอัดเม็ด 10 เปอร์เซ็นต์ (10% GM addition, C) ชุดดินเติมแบคทีเรียอัดเม็ด 5 เปอร์เซ็นต์ (5% GB addition, D) ชุดดินเติมแบคทีเรียอัดเม็ด 10 เปอร์เซ็นต์ (10% GB addition, E) และชุดดินเติมแบคทีเรียอัดเม็ด 15 เปอร์เซ็นต์ (15% GB addition, F) จากนั้นตรวจติดตามการบำบัดดินปนเปื้อนไพรีนของแบคทีเรียอัดเม็ด โดยการวิเคราะห์ไพรีนที่เหลืออยู่ด้วย GC-FID การตรวจนับจำนวนแบคทีเรียและยีนที่เกี่ยวข้องด้วย MPN และ real-time PCR ตามลำดับ และการตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงประชาคมแบคทีเรียและตรวจติดตามสายพันธุ์ PCY ด้วย DGGE

ตัวอย่างดินที่นำมาสร้างระบบนิเวศจำลองดิน มีลักษณะเนื้อดินร่วนปนดินเหนียวและดินทราย (sandy clay loam) ที่มีองค์ประกอบของดินทราย 57.2 เปอร์เซ็นต์ ดินตะกอน 18.0 เปอร์เซ็นต์ และดินเหนียว 24.8 เปอร์เซ็นต์ และมีสมบัติทางเคมี ได้แก่ ความเป็นกรดต่าง 7.8 สภาพการนำไฟฟ้า 0.112 เดซิซีเมน/เมตร สารอินทรีย์ 6.44 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณความชื้น 26.2 เปอร์เซ็นต์ ความสามารถในการแลกเปลี่ยนประจุหรือไอออน 9.2 เซนติโมล/กิโลกรัม ความจุสูงสุดในการอุ้มน้ำ 68.2 เปอร์เซ็นต์ อินทรีย์คาร์บอน 3.735 เปอร์เซ็นต์ ไนโตรเจน 0.322 เปอร์เซ็นต์ ฟอสฟอรัส 475



มิลลิกรัม/กิโลกรัม โปแทสเซียม 616 มิลลิกรัม/กิโลกรัม แคลเซียม 5,023 มิลลิกรัม/กิโลกรัม และ แมกนีเซียม 216 มิลลิกรัม/กิโลกรัม

ปริมาณไพรีนที่เหลืออยู่ในการบำบัดดินของแบคทีเรียอัดเม็ด (รูปที่ 6.9) แสดงให้เห็นว่า ณ วันสุดท้ายของการทดลอง (วันที่ 20) ชุด A มีการลดลงของไพรีนจากการระเหยประมาณ 5 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับการลดลงของไพรีนในชุด B ที่เกิดจากการระเหยและการย่อยสลายไพรีนของจุลินทรีย์ท้องถิ่น ในขณะที่พบการลดลงของไพรีนในชุด C ประมาณ 24 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเกิดจากการดูดซับของวัสดุอัดเม็ดและการย่อยสลายไพรีนของจุลินทรีย์ในวัสดุอัดเม็ด อย่างไรก็ตาม การส่งเสริมการกำจัดไพรีนในดินพบในชุด D-F ที่เติมแบคทีเรียอัดเม็ดสายพันธุ์ PCY โดยปริมาณแบคทีเรียอัดเม็ดที่เพิ่มขึ้น ทำให้ประสิทธิภาพการกำจัดไพรีนในดินเพิ่มขึ้นตาม กล่าวคือปริมาณแบคทีเรียอัดเม็ด 5, 10 และ 15 เปอร์เซ็นต์ สามารถส่งเสริมการกำจัดไพรีนได้ 36, 45 และ 81 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบชุด C และ E ที่มีปริมาณวัสดุอัดเม็ดและแบคทีเรียอัดเม็ดเท่ากัน พบว่าการลดลงของไพรีนในชุด E เกิดขึ้นอย่างรวดเร็วกว่าชุด C เนื่องจากการมีอยู่ของสายพันธุ์ PCY ซึ่งเป็นแบคทีเรียย่อยสลายไพรีน แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียอัดเม็ดจากสายพันธุ์ PCY มีประสิทธิภาพในการส่งเสริมการกำจัดไพรีนในดินได้ดี

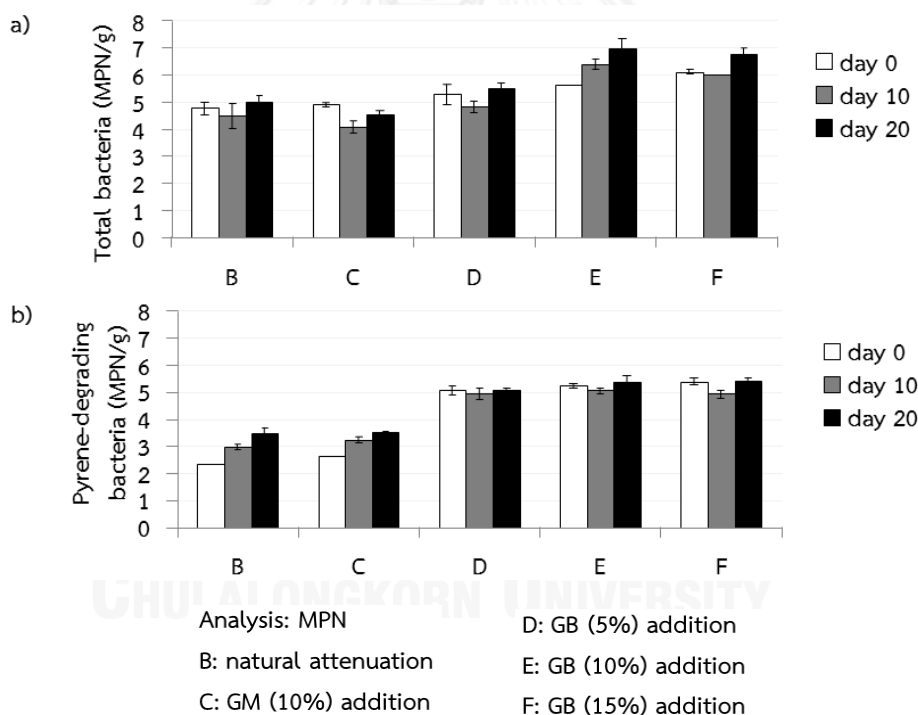


รูปที่ 6.9 ปริมาณไพรีนที่เหลืออยู่ระหว่างการบำบัดดินปนเปื้อนไพรีนด้วยแบคทีเรียอัดเม็ด

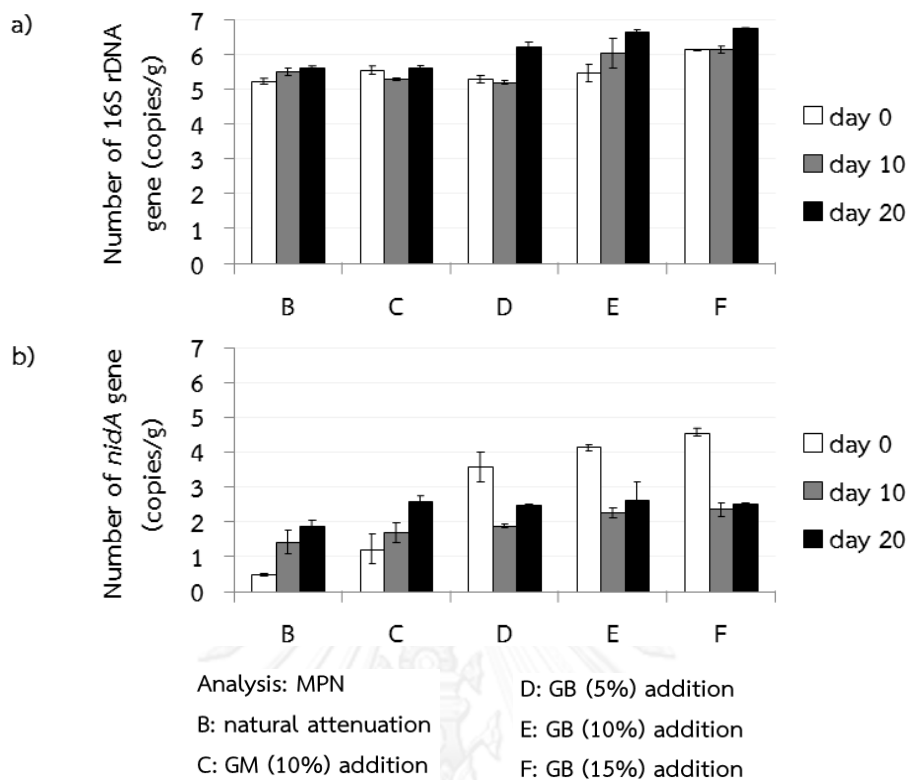
การตรวจนับจำนวนแบคทีเรียทั้งหมด (รูปที่ 6.10 a) และจำนวนแบคทีเรียย่อยสลายไพรีน (รูปที่ 6.10 b) พบว่าจำนวนแบคทีเรียในชุด B และ C มีจำนวนใกล้เคียงกันและมีแนวโน้มการเพิ่มขึ้นของแบคทีเรียย่อยสลายไพรีนเช่นเดียวกัน อย่างไรก็ตาม ชุด B และ C มีประสิทธิภาพการกำจัดไพรีนแตกต่างกันประมาณ 20 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งอาจเกิดจากการมีอยู่ของวัสดุอัดเม็ดประกอบกับการมีอยู่ของแบคทีเรียต่างชนิดกัน เมื่อพิจารณาจำนวนแบคทีเรียในชุดที่เติมแบคทีเรียอัดเม็ด (ชุด D-F) พบว่าจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดจะเพิ่มขึ้นจากวันที่ 0 ในทุกชุดที่เติมแบคทีเรียอัดเม็ดโดยเฉพาะอย่างยิ่งชุด E แต่มีจำนวนแบคทีเรียย่อยสลายไพรีนใกล้เคียงกันตลอดการทดลอง ซึ่งมีค่ามากกว่าชุด B และ C ส่งผลให้ประสิทธิภาพการกำจัดไพรีนของชุด D-F สูงกว่า นอกจากนี้ เมื่อเปรียบเทียบชุด C และ E ที่มีปริมาณวัสดุอัดเม็ดและแบคทีเรียอัดเม็ดเท่ากัน แต่มีประสิทธิภาพการกำจัดไพรีนต่างกัน พบว่า

จำนวนแบคทีเรียทั้งหมดและจำนวนแบคทีเรียย่อยสลายไพรีนในชุด E มีค่าสูงกว่าในชุด C ประมาณ  $2 \log$  MPN/กรัมของดิน ซึ่งอาจเป็นผลมาจากการมีอยู่ของสายพันธุ์ PCY ในชุด E

ในการทำงานเดียวกันกับการตรวจนับจำนวนแบคทีเรียทั้งหมด การตรวจนับจำนวนยีน 16S rDNA (รูปที่ 6.11 a) พบว่าจำนวนยีน 16S rDNA ในชุด B และ C มีค่าใกล้เคียงกันตลอดการทดลอง และมีค่าเพิ่มขึ้นจากวันที่ 0 ในชุด D-F ที่มีการเติมแบคทีเรียอัดเม็ด อย่างไรก็ตาม การตรวจนับจำนวนยีน *nidA* (รูปที่ 6.11 b) แสดงให้เห็นว่าจำนวนยีน *nidA* ในชุด D-F มีค่าลดลงอย่างมากเมื่อเทียบกับวันที่ 0 จึงเป็นไปได้ว่าเกิดการลดลงของจำนวนสายพันธุ์ PCY ในขณะเดียวกัน พบการเพิ่มขึ้นของยีน *nidA* ในชุด B และ C ทั้งนี้เนื่องจากแบคทีเรียท้องถิ่นในดินที่มียีน *nidA* ถูกกระตุ้นให้เพิ่มจำนวนเพื่อย่อยสลายไพรีนที่ปนเปื้อนในดิน ซึ่งยีน *nidA* ที่พบในชุด B มีจำนวนน้อยกว่าชุด C ทำให้การย่อยสลายไพรีนในดินของแบคทีเรียกลุ่มดังกล่าวเกิดขึ้นในอัตราต่ำกว่า นอกจากนี้แม้ว่ายีน *nidA* ในชุด C จะมีจำนวนใกล้เคียงกับชุด D-F ณ วันสุดท้ายของการทดลอง แต่ยังคงมีประสิทธิภาพการกำจัดไพรีนในดินต่างกันประมาณ 20 เปอร์เซ็นต์ (เปรียบเทียบระหว่างชุด C และ E) ซึ่งเป็นผลมาจากการย่อยสลายไพรีนในดินของสายพันธุ์ PCY



รูปที่ 6.10 จำนวนแบคทีเรียทั้งหมด (a) และจำนวนแบคทีเรียย่อยสลายไพรีน (b) ระหว่างการบำบัดดินปนเปื้อนไพรีนด้วยแบคทีเรียอัดเม็ด



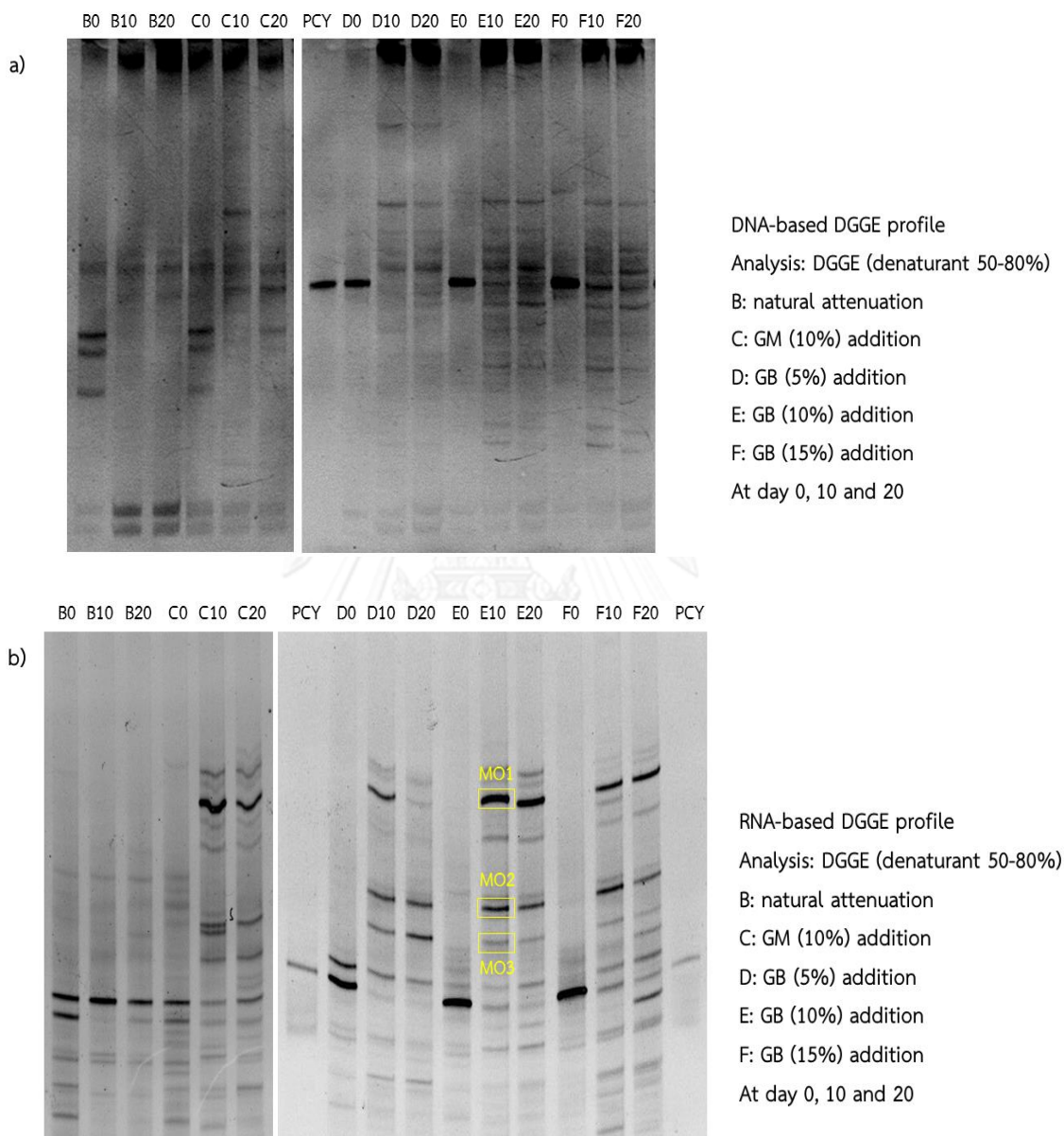
รูปที่ 6.11 จำนวนยีน 16S rDNA (a) และ *nidA* (b) ระหว่างการบำบัดดินปนเปื้อนไฟรีนด้วยแบคทีเรียอัดเม็ด

เมื่อเปรียบเทียบจำนวนแบคทีเรียย่อยสลายไฟรีน (รูปที่ 6.10 b) และจำนวนยีน *nidA* (รูปที่ 6.11 b) ของชุด D-F ณ วันเดียวกัน พบว่าจำนวนแบคทีเรียย่อยสลายไฟรีนมีค่าเพิ่มขึ้น แต่จำนวนยีน *nidA* มีค่าลดลง แสดงให้เห็นว่าการกำจัดไฟรีนในดินที่เกิดขึ้นไม่ได้มีผลมาจากแบคทีเรียย่อยสลายไฟรีนที่มียีน *nidA* (แบคทีเรียสายพันธุ์ PCY และแบคทีเรียท้องถิ่นที่มียีน *nidA*) เท่านั้น แต่ยังเป็นผลมาจากแบคทีเรียท้องถิ่นที่มียีนอื่นๆที่สามารถย่อยสลายไฟรีนได้อีกด้วย

การตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงประชาคมแบคทีเรียและตรวจติดตามสายพันธุ์ PCY ด้วยวิธี DGGE โดยใช้ DNA และ RNA ที่สกัดได้จากดินเป็นแม่แบบ แสดงในรูปที่ 6.12 a และ 6.12 b ตามลำดับ พบว่ารูปแบบของประชาคมแบคทีเรียมีลักษณะคล้ายกัน จึงจะขอกกล่าวเพียงประชาคมแบคทีเรียที่มีชีวิตระหว่างการทำบำบัดดินปนเปื้อนไฟรีน (RNA-based DGGE profile) เท่านั้น

จากการตรวจสอบประชาคมแบคทีเรียที่มีชีวิตระหว่างการทำบำบัดดินปนเปื้อนไฟรีน ในรูปที่ 6.12 b พบว่าสายพันธุ์ PCY มีความเข้มข้นของแถบผลิตภัณฑ์ลดลงจากวันที่ 0 แต่ยังคงพบแถบผลิตภัณฑ์ตลอดระยะเวลาการทดลอง แสดงให้เห็นว่าสายพันธุ์ PCY ยังคงมีบทบาทในการกำจัดไฟรีนในดินอยู่นอกจากนี้ ยังพบว่าประชาคมแบคทีเรียในชุด B มีรูปแบบเปลี่ยนไปเล็กน้อย ในขณะที่การเติมวัสดุอัดเม็ด (ชุด C) และแบคทีเรียอัดเม็ด (ชุด D-F) ส่งผลให้ประชาคมแบคทีเรียเปลี่ยนแปลงไปทั้งจากวันที่ 0 และจากชุด B ซึ่งมีลักษณะการเปลี่ยนแปลงประชาคมในรูปแบบที่คล้ายกัน โดยแต่ละแถบผลิตภัณฑ์แสดงถึงแบคทีเรียอย่างน้อย 1 ชนิดในประชาคม และความเข้มที่เพิ่มขึ้นของแถบผลิตภัณฑ์

แสดงถึงการเพิ่มขึ้นของแบคทีเรียที่เรี่ยรหว่างการบำบัดดิน ซึ่งสันนิษฐานได้ว่าแถบผลิตภัณฑ์ที่มีความเข้มสูงเป็นแบคทีเรียที่มีบทบาทในการกำจัดไพรินในดิน ดังนั้นจึงตัดแถบผลิตภัณฑ์ที่มีความเข้มสูง (แถบเด่น) มาวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ ได้แก่ MO1, MO2 และ MO3



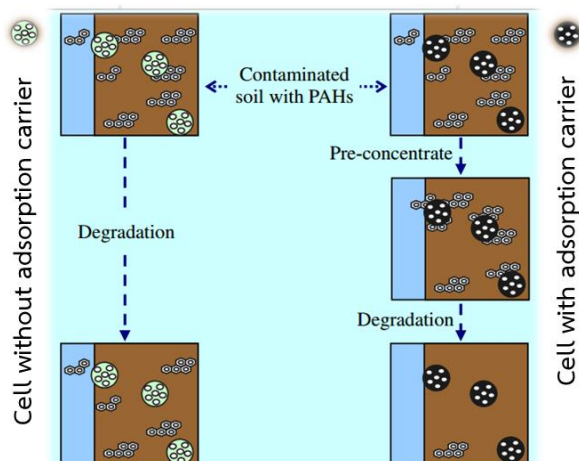
รูปที่ 6.12 ประชาคมแบคทีเรียระหว่างการบำบัดดินปนเปื้อนไพรินด้วยแบคทีเรียอัดเม็ด เมื่อใช้ DNA (a) และ RNA (b) ที่สกัดจากดินเป็นแม่แบบ

**ตารางที่ 6.2** ความเหมือนของผลิตภัณฑ์ PCR จากภาพ DGGE เมื่อใช้ RNA เป็นแม่แบบและไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน 16S rDNA ของแบคทีเรียกับฐานข้อมูล

ผลิตภัณฑ์ PCR จาก RNA-based DGGE profile ของ	ความเหมือนกับฐานข้อมูล		accession number	อ้างอิง
	ความเหมือน	แบคทีเรีย		
Clone MO1 (ขนาด 167 bp)	99% (166/167)	Uncultured actinobacterium clone H196	JF916606	Unpublished
	99% (166/167)	Uncultured actinobacterium clone H84	JF916601	
	99% (166/167)	Uncultured actinobacterium clone H668	JF916587	
	99% (166/167)	Uncultured actinobacterium clone AlertF10	JF508336	Unpublished
	99% (166/167)	Uncultured actinobacterium clone O_2C02	HM480662	Sagova-Mareckova และคณะ, 2011
Clone MO2 (ขนาด 191 bp)	100% (191/191)	<i>Pseudomonas taiwanensis</i> NIOT-PL28	KJ371084	Unpublished
	100% (191/191)	<i>Pseudomonas</i> sp. FSGRN7	KJ200412	Unpublished
	100% (191/191)	<i>Pseudomonas</i> sp. FSBRY15	KJ185008	Unpublished
	100% (191/191)	<i>Pseudomonas putida</i> XY5	KJ174593	Unpublished
	100% (191/191)	<i>Pseudomonas</i> sp. JD30	KJ191414	Unpublished
Clone MO3 (ขนาด 177 bp)	99% (175/177)	<i>Pseudomonas putida</i> LUA15.1	KF601300	Unpublished
	99% (175/177)	<i>Pseudomonas plecoglossicida</i> 2G	KF591119	Unpublished
	99% (175/177)	<i>Pseudomonas</i> sp. VLB120	CP003961	Unpublished
	99% (175/177)	<i>Pseudomonas</i> sp. SR50-1	KF279361	Unpublished
	99% (175/177)	<i>Pseudomonas monteilii</i> KKU-06	KF554300	Unpublished

ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ในตารางที่ 6.2 แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียท้องถิ่นที่เพิ่มจำนวนขึ้นและคาดว่าจะมีบทบาทในการย่อยสลายไพรีนในดิน คือ แบคทีเรียกลุ่ม Actinobacteria และแบคทีเรียจีโนส *Pseudomonas* ซึ่งแบคทีเรียทั้งสองกลุ่มนั้นถูกรายงานว่ามีประสิทธิภาพสูงในการย่อยสลาย PAHs หลากหลายชนิด กล่าวคือแบคทีเรียกลุ่ม Actinobacteria ถูกรายงานมากมายว่ามีความสามารถในการย่อยสลายไพรีนและ PAHs มวลโมเลกุลสูง โดยเฉพาะอย่างยิ่งจีโนส *Mycobacterium* และ *Rhodococcus* ซึ่งยีนที่เกี่ยวข้องในการย่อยสลายไพรีนของแบคทีเรียกลุ่มนี้คือยีน *nidA*, *nidA3* และ *pdoA1* (DeBruyn และคณะ, 2012) ในขณะที่มีรายงานมากมายถึงความสามารถในการย่อยสลาย PAHs หลากหลายชนิดทั้งมวลโมเลกุลต่ำและสูงของแบคทีเรียจีโนส *Pseudomonas* และยังพบว่ามีความหลากหลายของยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลาย PAHs (Obayori และคณะ, 2008) โดยงานวิจัยของ Ma และคณะ (2013) รายงานการพบยีน *pydA* และ *pydB* ประมวลรหัสหน่วยย่อยแอลฟาและเบตาของเอนไซม์ไดออกซิเจเนสที่เกี่ยวกับการย่อยสลายไพรีนของแบคทีเรีย *Pseudomonas* sp. Jpyr-1 นอกจากนี้ การพบแบคทีเรียทั้งสองกลุ่มนี้สนับสนุนข้อสันนิษฐานเกี่ยวกับการมีแบคทีเรียท้องถิ่นที่มียีนอื่นๆที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายไพรีนในการบำบัดดินปนเปื้อนไพรีนของการทดลองนี้อีกด้วย

งานวิจัยของ Mishra และคณะ (2001) ประเมินประสิทธิภาพการบำบัดดินปนเปื้อนปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนเมื่อมีการเติมกลุ่มแบคทีเรียในรูปหัวเชื้อยัดเกาะกับซังข้าวโพดบดละเอียด โดยมีปริมาณแบคทีเรีย  $10^{10}$  CFU/กรัมของวัสดุตั้ง พบว่าในระยะเวลา 1 ปี ปริมาณปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนลดลงและกลุ่มแบคทีเรียที่เติมลงไปยังคงมีอัตราการอยู่รอดสูง แสดงให้เห็นว่ากลุ่มแบคทีเรียที่เติมลงไปในรูปแบบหัวเชื้อยัดเกาะกับวัสดุตั้ง สามารถปรับตัวได้ดีต่อสิ่งแวดล้อม และมีบทบาทสำคัญในการบำบัดสารในบริเวณที่ทดลอง นอกจากนี้ งานวิจัยมากมายแสดงให้เห็นประสิทธิภาพของแบคทีเรียยัดเกาะบนซังข้าวโพดในการส่งเสริมการบำบัดดินปนเปื้อนสารพิษ โดยความสามารถในการดูดซับสารพิษและจุลินทรีย์ของซังข้าวโพด ทำให้จุลินทรีย์สามารถเข้าถึงสารพิษได้ดียิ่งขึ้นดังรูปที่ 6.13 และยังเป็นกลไกการแพร่กระจายของสารพิษในสิ่งแวดล้อม (Chen และคณะ, 2012) เช่น งานวิจัยของ Labana และคณะ (2005) ศึกษาการบำบัดดินปนเปื้อนพารา-ไนโตรฟีนอลความเข้มข้น 70 มิลลิกรัม/กิโลกรัม ด้วยแบคทีเรีย *Arthrobacter protophormiae* RKJ100 ยัดเกาะบนซังข้าวโพด โดยมีจำนวนเซลล์เริ่มต้น  $2 \times 10^6$  เซลล์/กรัมของดิน พบว่าสายพันธุ์ RKJ100 รูปแบบยัดเกาะบนซังข้าวโพดและเซลล์อิสระ สามารถกำจัดไนโตรฟีนอลได้อย่างสมบูรณ์ในเวลา 10 และ 30 วัน ตามลำดับ ในขณะที่ชุดดินฟื้นฟูโดยธรรมชาติมีการกำจัดไนโตรฟีนอล 30 เปอร์เซ็นต์ ในเวลา 30 วัน และงานวิจัยของ Raina และคณะ (2008) ประเมินการบำบัดดินปนเปื้อนเฮกซะคลอโรไซโคลเฮกเซนความเข้มข้น  $66.5 \pm 3.2$  มิลลิกรัม/กิโลกรัมของดิน โดยใช้แบคทีเรีย *Sphingobium indicum* B90A ยัดเกาะบนซังข้าวโพดปริมาณ  $10^8$  เซลล์/กรัมของดิน พบว่าชุดดินเติมสายพันธุ์ B90A ยัดเกาะบนซังข้าวโพดสามารถกำจัดเฮกซะคลอโรไซโคลเฮกเซนได้ 76 เปอร์เซ็นต์ ในเวลา 8 วัน ขณะที่เฮกซะคลอโรไซโคลเฮกเซนในชุดดินเติมซังข้าวโพดลดลงเพียง 7 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ การตรวจติดตามสายพันธุ์ B90A โดยวิธี PCR ด้วยไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีนประมวลรหัสเอนไซม์เฮกซะคลอโรไซโคลเฮกเซนดีไฮโดรคลอรีเนส (*lin*) พบว่าสายพันธุ์ B90A มีชีวิตอยู่ตลอดการทดลอง (8 วัน)



รูปที่ 6.13 การส่งเสริมการกำจัดสารพิษในดินของจุลินทรีย์ยึดเกาะบนวัสดุดูดซับ

(Chen และคณะ, 2012)

นอกจากสมบัติการดูดซับของซังข้าวโพดที่ช่วยส่งเสริมการย่อยสลายสารพิษของจุลินทรีย์ ซังข้าวโพดยังช่วยเพิ่มรطوبةของดินและเพิ่มจำนวนจุลินทรีย์ย่อยสลาย PAHs ในดิน ทำให้ประชาคมจุลินทรีย์ในดินเปลี่ยนแปลงไป ดังงานวิจัยของ Wu และคณะ (2008) ที่ศึกษาการบำบัดดินปนเปื้อน PAHs ด้วยเชื้อรา *Monilinia* sp. ยึดเกาะบนซังข้าวโพด และพบว่าประชาคมจุลินทรีย์ของชุดดินเต็มซังข้าวโพด และชุดดินเต็มเชื้อรา *Monilinia* sp. ยึดเกาะบนซังข้าวโพด มีจำนวนจุลินทรีย์ท้องถิ่นในดินเพิ่มขึ้นเปรียบเทียบกับในชุดดินพื้นฟูโดยธรรมชาติ ซึ่งคาดว่าจำนวนจุลินทรีย์ท้องถิ่นที่เพิ่มขึ้นนี้น่าจะมีบทบาทในการกำจัดอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนโดยเฉพาะอย่างยิ่ง PAHs มวลโมเลกุลสูง เนื่องจากการกำจัด PAHs ในดินของชุดดินเต็มเชื้อรา *Monilinia* sp. ยึดเกาะบนซังข้าวโพด (30-40 เปอร์เซ็นต์) และชุดดินเต็มซังข้าวโพด (15-30 เปอร์เซ็นต์) มีประสิทธิภาพสูงกว่าชุดดินพื้นฟูโดยธรรมชาติที่มีประสิทธิภาพการกำจัด PAHs มวลโมเลกุลต่ำเพียง 0-20 เปอร์เซ็นต์ และไม่สามารถกำจัด PAHs มวลโมเลกุลสูงได้

การตรวจนับจำนวนแบคทีเรียในระหว่างกระบวนการบำบัดดินปนเปื้อนสารพิษโดยอาศัยการเพาะเลี้ยงเชื้อด้วยวิธี MPN สามารถตรวจนับจำนวนแบคทีเรียในดินเบื้องต้นด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีสารพิษเป็นแหล่งคาร์บอน ซึ่งยอมให้แต่แบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลายสารพิษนั้นๆ เจริญได้ แม้ว่าในตัวอย่างดินจะมีจำนวนและความหลากหลายของแบคทีเรียอื่นๆ อยู่มากก็ตาม ดังนั้นเทคนิค MPN จึงนิยมใช้ในการตรวจนับจำนวนแบคทีเรียจากตัวอย่างสิ่งแวดล้อมต่างๆ (Wrenn และ Venosa, 1996) อย่างไรก็ตาม ความเข้มข้นของสารพิษที่ใช้ในวิธี MPN ยังเป็นปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อจำนวนแบคทีเรียย่อยสลายสารพิษที่ตรวจนับได้ หากใช้ความเข้มข้นของสารพิษต่ำเกินไป จำนวนแบคทีเรียที่นับได้อาจมีค่ามากเกินไป เนื่องจากความเข้มข้นของสารพิษไม่สูงพอที่จะคัดเลือกแต่เฉพาะแบคทีเรียย่อยสลายสารพิษนั้นๆ ทำให้แบคทีเรียอื่นๆ สามารถเจริญได้ ในทางกลับกันหากใช้สารพิษความเข้มข้นสูงเกินไป จำนวนแบคทีเรียที่นับได้อาจมีค่าน้อยเกินไป เนื่องจากความเข้มข้นของสารพิษสูงจนทำให้เป็นพิษต่อแบคทีเรีย ส่งผลให้ทั้งแบคทีเรียที่มีและไม่มีความสามารถในการย่อยสลายสารพิษนั้นๆ ตายลงได้ จึงควรเลือกใช้ความเข้มข้นของสารพิษที่เหมาะสมในกระบวนการ MPN นอกจากนี้

จำนวนแบคทีเรียที่ได้จากวิธี MPN เป็นเพียงค่าประมาณ ใช้เวลานานในการเลี้ยงเชื้อ และไม่สามารถตรวจนับจำนวนแบคทีเรียสายพันธุ์ที่เฉพาะเจาะจงได้ ดังนั้นการตรวจนับจำนวนแบคทีเรียในระหว่างกระบวนการบำบัดดินปนเปื้อนสารพิษโดยไม่อาศัยการเพาะเลี้ยงเชื้อด้วยวิธี real time PCR จึงช่วยปรับปรุงข้อจำกัดของวิธี MPN ให้มีความถูกต้อง แม่นยำ และรวดเร็วขึ้น อีกทั้งยังสามารถตรวจติดตามแบคทีเรียสายพันธุ์ที่เฉพาะเจาะจงได้โดยอาศัยไพรเมอร์ที่จำเพาะกับสายพันธุ์นั้นๆ และยังสามารถตรวจสอบการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องในกระบวนการบำบัดสารพิษได้อีกด้วย ซึ่งจะช่วยปรับปรุงความเข้าใจเกี่ยวกับแบคทีเรียในกระบวนการบำบัดสิ่งแวดล้อมตามธรรมชาติ (Smith และ Osborn, 2009)

## 6.6 ต้นทุนการผลิตแบคทีเรียอัดเม็ด

แบคทีเรียอัดเม็ดของ *Novosphingobium* sp. PCY ที่ผลิตจากอัตราส่วนของซังข้าวโพดต่อแป้งข้าวเหนียวเท่ากับ 1:1 เติมซูโครสความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นสารปกป้องเซลล์ และโซเดียมเบนโซเอตความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ เป็นสารป้องกันรา ถูกประเมินต้นทุนการผลิตในระดับห้องปฏิบัติการ แสดงดังตารางที่ 6.3 พบว่าแบคทีเรียอัดเม็ดปริมาณ 1,000 กรัม มีต้นทุนการผลิตเพียง 282.62 บาท ซึ่งต้นทุนดังกล่าวจะสามารถลดลงได้หากมีการผลิตในปริมาณมากขึ้นต่อครั้ง นอกจากนี้ การเปรียบเทียบราคาผลิตภัณฑ์หัวเชื้อพร้อมใช้รูปแบบต่างๆ ที่มีจำหน่ายในท้องตลาด (ตารางที่ 6.4) แสดงให้เห็นว่าราคาของแต่ละผลิตภัณฑ์แปรผันค่อนข้างมากขึ้นอยู่กับรูปแบบของผลิตภัณฑ์และแหล่งผลิต โดยส่วนใหญ่ผลิตภัณฑ์รูปแบบน้ำจะมีราคาต่ำกว่ารูปแบบเม็ดและผงตามลำดับ และผลิตภัณฑ์ที่ผลิตในประเทศจะมีราคาต่ำกว่าที่ผลิตจากต่างประเทศ

ตารางที่ 6.3 ต้นทุนการผลิตแบคทีเรียอัดเม็ดในระดับห้องปฏิบัติการ

รายการ	จำนวน (หน่วย)	ราคา (บาท/หน่วย)	ต้นทุน (บาท)
<u>การเตรียมหัวเชื้อสายพันธุ์ PCY</u>			
โซเดียมคลอไรด์	4.2 กรัม	0.22	0.92
ผงสกัดจากยีสต์	2.5 กรัม	2	5.00
ทริปโตน	5.0 กรัม	5.2	26
ค่าไฟฟ้า (เครื่องเขย่า)	0.76 หน่วย	0.38	1.90
<u>การผลิตแบคทีเรียอัดเม็ด</u>			
ซังข้าวโพด	100 กรัม	-	-
ค่าบดซังข้าวโพด	100 กรัม	0.18	18
แป้งข้าวเหนียว	100 กรัม	0.033	3.30
ซูโครส	10 กรัม	0.1	1.00
<u>การบรรจุ</u>			
ค่าถุงบรรจุ	10 ใบ	0.04	0.40
	รวม	ต้นทุนการผลิตแบคทีเรียอัดเม็ด 200 กรัม	56.52
		ต้นทุนการผลิตแบคทีเรียอัดเม็ด 1000 กรัม	282.62



**ตารางที่ 6.4** ราคาจำหน่ายของผลิตภัณฑ์หัวเชื้อพร้อมใช้ต่างๆสำหรับการบำบัดสารปนเปื้อน

ชื่อผลิตภัณฑ์	แหล่งผลิต	ความสามารถการบำบัด	ราคา
<u>ผลิตภัณฑ์รูปแบบเม็ด</u>			
Green magic	ประเทศไทย	แหล่งน้ำและน้ำเสียปนเปื้อนสารอินทรีย์และอินทรีย์วัตถุ	104 บาท/กิโลกรัม
Bionic G-002	ประเทศไทย	แหล่งน้ำและน้ำเสียปนเปื้อนไขมัน	490 บาท/กิโลกรัม
<u>ผลิตภัณฑ์รูปแบบผง</u>			
Bactocel 3001	ประเทศไทย	แหล่งน้ำและน้ำเสียปนเปื้อนไขมัน	350 บาท/กิโลกรัม
Biodigez	ประเทศไทย	แหล่งน้ำและน้ำเสียปนเปื้อนสารอินทรีย์และไขมัน	450 บาท/กิโลกรัม
Petro-Clear F10	ประเทศแคนาดา	ดินและแหล่งน้ำปนเปื้อนน้ำมันเบนซิน ดีเซล น้ำมันหล่อลื่น BTEX	1,877 บาท/กิโลกรัม
Ana-e plus	ประเทศไทย	แหล่งน้ำและน้ำเสียปนเปื้อนไขมัน	2,000 บาท/กิโลกรัม
<u>ผลิตภัณฑ์รูปแบบน้ำ</u>			
Keen oil spill control	ประเทศไทย	ดินและแหล่งน้ำปนเปื้อนน้ำมัน	74 บาท/ลิตร
Spill Remed	ประเทศสหรัฐอเมริกา	แหล่งน้ำและน้ำเสียปนเปื้อนน้ำมันปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอน	143 บาท/ลิตร
Liquid Remediate <sup>MT</sup>	ประเทศสหรัฐอเมริกา	ดินและน้ำเสียปนเปื้อนน้ำมันปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอน	1,311บาท/ลิตร

### บทสรุป

แบคทีเรียอัดเม็ด *Novosphingobium* sp. PCY ที่ผลิตจากซังข้าวโพดต่อแป้งข้าวเหนียวในอัตราส่วน 1:1 และมีซูโครสเป็นสารปกป้องเซลล์ มีต้นทุนการผลิตต่ำ สามารถเก็บรักษาได้นาน 8 สัปดาห์ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส หรือนาน 4 สัปดาห์ที่อุณหภูมิห้อง โดยยังคงมีประสิทธิภาพดีในการกำจัดไฟริน นอกจากนี้ ยังสามารถส่งเสริมการกำจัดไฟริน (ความเข้มข้นเริ่มต้น 300 มิลลิกรัม/กิโลกรัมของดิน) ในดินได้ประมาณ 80 เปอร์เซ็นต์ ในเวลา 20 วัน เมื่อใช้แบคทีเรียอัดเม็ดสายพันธุ์ PCY ปริมาณ 15 เปอร์เซ็นต์ (โดยน้ำหนัก)

## บทที่ 7

### บทสรุปและข้อเสนอแนะ

#### บทสรุป

แบคทีเรียอัดเม็ดเป็นหัวเชื้อพร้อมใช้ที่มีข้อดีหลายประการสำหรับการประยุกต์ใช้ในการบำบัดดินปนเปื้อน เนื่องจากการมีอยู่ของวัสดุทางการเกษตรให้แบคทีเรียสามารถยึดเกาะ เพิ่มจำนวน และอยู่รอดได้ในสิ่งแวดล้อม อีกทั้งวัสดุทางการเกษตรยังสามารถดูดซับสารปนเปื้อนต่างๆในดินทำให้แบคทีเรียเข้าถึงสารปนเปื้อนได้ดียิ่งขึ้น และช่วยเพิ่มรطوبةในดินทำให้อากาศสามารถถ่ายเทลงไปในดิน ส่งผลดีต่อกิจกรรมการย่อยสลายสารปนเปื้อนแบบใช้ออกซิเจนของแบคทีเรีย การพัฒนาหัวเชื้อพร้อมใช้รูปแบบแบคทีเรียอัดเม็ดจึงเริ่มจากการค้นหาแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายสารพิษจากสิ่งแวดล้อม แล้วศึกษาสมบัติที่เกี่ยวข้องกับประสิทธิภาพการย่อยสลายสารพิษและสมบัติที่จะนำไปสู่การพัฒนาเป็นแบคทีเรียอัดเม็ด โดยงานวิจัยนี้สนใจแบคทีเรียอัดเม็ดสำหรับการบำบัดดินปนเปื้อน PAHs จึงคัดแยกแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลาย PAHs จากดินตะกอนป่าชายเลน ศึกษาลักษณะสมบัติของแบคทีเรียที่คัดแยกได้ แล้วคัดเลือกสายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพสูงมาพัฒนาต่อเป็นแบคทีเรียอัดเม็ด จากนั้นศึกษาการเพิ่มอัตราการอยู่รอดของแบคทีเรียในรูปแบบอัดเม็ด สภาวะการเก็บรักษาแบคทีเรียอัดเม็ด และประสิทธิภาพการกำจัด PAHs ของแบคทีเรียอัดเม็ดในอาหารเหลวและในดิน

ดินตะกอนป่าชายเลนเป็นสิ่งแวดล้อมตามธรรมชาติที่สามารถพบแบคทีเรียย่อยสลาย PAHs และยีนประมวลรหัสเอนไซม์ไดออกซิจีเนสที่มีความหลากหลายสูง ตัวอย่างดินตะกอนป่าชายเลนที่ใช้ในงานวิจัยนี้มาจากบริเวณอ่าวไทยตอนบน ซึ่งเป็นแหล่งรองรับมลพิษจากน้ำจืดของแม่น้ำสายหลักที่มีความสำคัญต่อการดำรงชีวิต เศรษฐกิจ และการคมนาคมของประเทศไทยทั้ง 4 สาย ได้แก่ แม่น้ำเจ้าพระยา และบางปะกง ชนิดของแบคทีเรียย่อยสลาย PAHs ที่คัดแยกได้จากดินตะกอนป่าชายเลนบริเวณดังกล่าวจัดอยู่ในสองไฟลัมที่มีบทบาทในการย่อยสลาย PAHs เมื่อมีการปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อม คือ แบคทีเรียแกรมลบไฟลัม Proteobacteria (alpha-, beta-, gamma-) 10 สายพันธุ์ และแบคทีเรียแกรมบวกไฟลัม Actinobacteria 1 สายพันธุ์ ซึ่งประกอบด้วยแบคทีเรียย่อยสลายอะซิแนพธิน *Alcaligenes* sp. FA4 แบคทีเรียย่อยสลายพีแนนทรีน *Ralstonia* sp. BPH, *Alcaligenes* sp. SSK1B, *Achromobacter* sp. SSK4, *Dyella* sp. FP0, *Burkholderia* sp. F2-1, *Luteibacter* sp. F2-2, *Burkholderia* sp. FP8 และแบคทีเรียย่อยสลายไพรีน *Novosphingobium* sp. PCY, *Microbacterium* sp. BPW, *Ochrobactrum* sp. FPY8

นอกจากนี้ แบคทีเรียที่คัดแยกได้ 5 สายพันธุ์ ได้แก่ *Ralstonia* sp. BPH, *Alcaligenes* sp. SSK1B, *Achromobacter* sp. SSK4, *Novosphingobium* sp. PCY และ *Microbacterium* sp. BPW ถูกนำมาศึกษาประสิทธิภาพและยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลาย PAHs และแนวโน้มการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ เมื่อเปรียบเทียบความสามารถในการย่อยสลาย PAHs กับแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากงานวิจัยก่อนหน้าพบว่า แบคทีเรียที่คัดแยกได้ในงานวิจัยนี้มีความสามารถค่อนข้างสูงในการ

ย่อยสลาย PAHs ขนาด 3-4 วงอะโรมาติก โดยเฉพาะอย่างยิ่งพีแนนทรินและไพรีน ความเข้มข้นเริ่มต้น 100 มิลลิกรัม/ลิตร ในอาหารเหลว โดยสามารถย่อยสลาย PAHs ความเข้มข้นเริ่มต้นที่สูงกว่า และ/หรือใช้เวลาในการย่อยสลายที่สั้นกว่า และมีความสามารถในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ เมื่อมีสารที่ไม่ชอบน้ำเป็นสารตั้งต้น เช่น PAHs และน้ำมันหล่อลื่น เป็นต้น ซึ่งเป็นคุณสมบัติที่ดีในการส่งเสริมการย่อยสลาย PAHs ของแบคทีเรียเอง อีกทั้งยังพบว่าสามารถเจริญได้ดีในสภาวะที่สอดคล้องกับสภาพแวดล้อมของแหล่งที่มา ได้แก่ อุณหภูมิ 25-30 องศาเซลเซียส ความเป็นกรด-ด่าง 6.5-7.0 และปริมาณโซเดียมคลอไรด์ 0-3.5 เปอร์เซ็นต์ อย่างไรก็ตาม ยังไม่สามารถตรวจพบยีนประมวลรหัสหน่วยย่อยแอลฟาของเอนไซม์ไดออกซิจีเนสในแบคทีเรียย่อยสลายพีแนนทริน *Ralstonia* sp. BPH, *Alcaligenes* sp. SSK1B และ *Achromobacter* sp. SSK4 ซึ่งอาจเกิดจากข้อจำกัดของไพรเมอร์ที่ยังไม่จำเพาะต่อยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลาย PAHs ของแบคทีเรียทั้งสามชนิดนี้ ในขณะที่ยีนประมวลรหัสหน่วยย่อยแอลฟาของเอนไซม์ไดออกซิจีเนสที่พบในแบคทีเรียย่อยสลายไพรีน *Novosphingobium* sp. PCY และ *Microbacterium* sp. BPW คือยีนไพรีนไดออกซิจีเนส (*nidA*) ที่ถูกรายงานว่ามีบทบาทสำคัญในการย่อยสลายไพรีนและ PAHs โมลโมเลกุลสูงของแบคทีเรียแกรมบวกจีโนส *Mycobacterium*

จากข้อมูลเบื้องต้น แบคทีเรีย *Novosphingobium* sp. PCY เป็นสายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพดีในการย่อยสลาย PAHs ได้แก่ ไพรีน พีแนนทริน ฟลูออรีน ฟลูออแรนทีน และแอนทราซีน และมีแนวโน้มการผลิตสารลดแรงตึงผิวได้ดีเปรียบเทียบกับแบคทีเรียที่คัดแยกได้ทั้ง 5 สายพันธุ์และแบคทีเรียในจีโนสเดียวกัน อีกทั้งยังมียีน *nidA* ซึ่งไม่เคยมีรายงานการพบยีนดังกล่าวในแบคทีเรียจีโนส *Novosphingobium* มาก่อน ความน่าสนใจดังกล่าวและการไม่มีรายงานการเป็นเชื้อก่อโรคของแบคทีเรียจีโนส *Novosphingobium* ทำให้สายพันธุ์ PCY เป็นตัวเลือกที่ดีที่จะนำไปพัฒนาต่อเป็นหัวเชื้อพร้อมใช้ จึงเลือกมาศึกษาลักษณะสมบัติเบื้องต้น โดยพบว่าสายพันธุ์ PCY มีรูปแบบการเจริญและการย่อยสลายไพรีนในระยะเวลาสั้นกว่าพีแนนทริน ซึ่งสอดคล้องกับความจำเพาะต่อ PAHs ของยีน *nidA* ที่พบ นอกจากนี้ยังพบยีนประมวลรหัสหน่วยย่อยเบตาของเอนไซม์ไดออกซิจีเนสของแบคทีเรียแกรมบวกจีโนส *Mycobacterium* (*nidB*) และยีนประมวลรหัสเอนไซม์ไดออกซิจีเนสอื่นๆ ที่พบในแบคทีเรียย่อยสลาย PAHs กลุ่ม Sphingomonads ได้แก่ เพอร์รีดอกซิน (*bphA3*) เพอร์รีดอกซินรีดักเทส (*bphA4*) และเอกซ์ตราไดออกไซด์ออกซิจีเนส (*bphC*) ในขณะที่ไม่พบยีนประมวลรหัสหน่วยย่อยแอลฟาของเอนไซม์ไดออกซิจีเนสของแบคทีเรียย่อยสลาย PAHs กลุ่ม Sphingomonads (*bphA1f*) ซึ่งเกี่ยวข้องกับการย่อยสลาย PAHs ของแบคทีเรียกลุ่มดังกล่าว การที่สายพันธุ์ PCY มียีนประมวลรหัสระบบเอนไซม์ไดออกซิจีเนสที่แตกต่างออกไปจากแบคทีเรียอื่นๆ ในกลุ่ม Sphingomonads นั้น สันนิษฐานว่ามีความเป็นไปได้ที่เกิดจากการได้รับยีนดังกล่าวจากสิ่งแวดล้อมในธรรมชาติ (horizontal gene transfer) สู่สายพันธุ์ PCY ทำให้เกิดวิวัฒนาการทางพันธุกรรมของแบคทีเรีย จึงตรวจสอบตำแหน่งของยีน *nidA* ด้วยวิธี PCR และ PFGE-เซาท์เทิร์นไฮบริโดเซชัน พบว่ายีน *nidA* อยู่บนเมกะพลาสมิดที่มีขนาดใหญ่กว่า DNA (DNA ของสายพันธุ์ PCY มีขนาดประมาณ 3 เมกะเบสหรือมากกว่า) นอกจากนี้เมกะพลาสมิดของสายพันธุ์ PCY มีเปอร์เซ็นต์การหายไปมากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ ภายหลังจากการเลี้ยงเชื้อต่อเนื่องบนอาหารที่มีสารอาหารอุดมสมบูรณ์เป็นเวลามากกว่า 3 ครั้ง ในขณะที่เดียวกันกับความสามารถในการย่อยสลายไพรีนและยีน

*nidA* ที่หายไปเช่นกัน ซึ่งผลของ RT-PCR ยังยืนยันบทบาทของยีน *nidA* ในการย่อยสลายไพรีนของสายพันธุ์ PCY อีกด้วย จากความเสถียรต่ำของเมกะพลาสมิดและยีน *nidA* ประกอบกับยังไม่เคยมีรายงานการพบยีน *nidA* ในแบคทีเรียจีโนส *Novosphingobium* หรือแม้แต่แบคทีเรียกลุ่ม Sphingomonads มาก่อน จึงมีความเป็นไปได้ว่าความสามารถในการย่อยสลายไพรีน ของสายพันธุ์ PCY อาจเกิดจากการได้รับยีน *nidA* จากแบคทีเรียชนิดอื่นหรือจากสิ่งแวดล้อมที่อาศัยอยู่ เพื่อปรับตัวให้อยู่รอดจากสภาวะปนเปื้อน PAHs

นอกจากความสามารถในการย่อยสลาย PAHs หลายชนิด สายพันธุ์ PCY สามารถย่อยสลายอัลเคนขนาดกลางที่เป็นองค์ประกอบหลักในน้ำมันเชื้อเพลิงที่ใช้ในชีวิตประจำวันของมนุษย์ ได้แก่ เตตระเดเคน และเฮกซะเดเคน ความเข้มข้นเริ่มต้น 1,000 มิลลิกรัม/ลิตร ในอาหารเหลว และยังสามารถย่อยสลายสารผสมของไพรีนและอัลเคนขนาดกลางได้โดยไม่มีผลยับยั้งการย่อยสลายซึ่งกันและกัน จึงเป็นสมบัติที่ดีในการพัฒนาต่อเป็นหัวเชื้อพร้อมใช้สำหรับการบำบัดสิ่งแวดล้อมปนเปื้อน เนื่องจากสภาวะการปนเปื้อน PAHs ในธรรมชาติ มักมีสาเหตุจากการปนเปื้อนน้ำมันหรือปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอน ซึ่งมีองค์ประกอบอื่นๆอีกโดยเฉพาะอย่างยิ่งอัลเคน ยิ่งกว่านั้นยังพบยีนอัลเคนโมโนออกซิจีเนส (*alkB*) ที่มีความจำเพาะต่ออัลเคนขนาดเล็กถึงกลาง (จำนวนคาร์บอน 5-16 อะตอม) ซึ่งน่าจะเกี่ยวข้องกับความสามารถในการย่อยสลายอัลเคนของสายพันธุ์ PCY อีกด้วย

ในการพัฒนาสายพันธุ์ PCY เป็นหัวเชื้อพร้อมใช้เพื่อการบำบัดดินปนเปื้อน รูปแบบของหัวเชื้อพร้อมใช้ที่น่าสนใจคือแบคทีเรียอัดเม็ด เนื่องจากมีน้ำหนักเบา ขนส่งสะดวก เก็บรักษาและใช้งานง่าย การผลิตแบคทีเรียอัดเม็ดในงานวิจัยนี้ เลือกใช้ซังข้าวโพดบดเป็นวัสดุให้แบคทีเรียยึดเกาะ ผสมกับแ่งข้าวเหนียวในอัตราส่วน 1:1 และมีซูโครสความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นสารปกป้องเซลล์แบคทีเรียอัดเม็ดของสายพันธุ์ PCY ที่ได้มีความแข็งแรงและไม่ร่วนซุย มีต้นทุนการผลิตประมาณ 283 บาท/กิโลกรัม ซึ่งถือว่ามีต้นทุนต่ำเมื่อเทียบกับราคาคาผลิตภัณฑ์หัวเชื้อบำบัดสิ่งแวดล้อมที่มีจำหน่ายในท้องตลาด สามารถเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ได้นาน 8 สัปดาห์ หรือที่อุณหภูมิห้องได้นาน 4 สัปดาห์ โดยยังคงมีประสิทธิภาพการกำจัดไพรีนในอาหารเหลวมากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ เมื่อนำไปประยุกต์ใช้ในระบบจำลองดินปนเปื้อนไพรีน ความเข้มข้นเริ่มต้น 300 มิลลิกรัม/กิโลกรัมของดิน พบว่าแบคทีเรียอัดเม็ดสายพันธุ์ PCY ปริมาณ 15 เปอร์เซ็นต์ (โดยน้ำหนัก) สามารถกำจัดไพรีนในดินได้ 80 เปอร์เซ็นต์ ในเวลา 20 วัน ซึ่งสูงกว่าการฟื้นฟูตามธรรมชาติและการเติมวัสดุอัดเม็ด ดังนั้นการส่งเสริมการบำบัดดินปนเปื้อนไพรีนของแบคทีเรียอัดเม็ดในงานวิจัยนี้ เป็นผลมาจากการย่อยสลายไพรีนของสายพันธุ์ PCY ที่เติมลงไป ร่วมกับการมีอยู่ของซังข้าวโพด ซึ่งมีคุณสมบัติดูดซับสารต่างๆ ทำให้แบคทีเรียสามารถสัมผัสกับสารได้ดียิ่งขึ้น คุณสมบัติเพิ่มรูพรุนในดินของซังข้าวโพดยังทำให้อากาศสามารถถ่ายเทลงไปในดินได้ดียิ่งขึ้น ปริมาณออกซิเจนในดินก็จะเพิ่มตามด้วย ส่งผลต่อกิจกรรมการย่อยสลาย PAHs ของแบคทีเรีย รวมถึงการกระตุ้นจำนวนจุลินทรีย์ท้องถิ่นที่มีความสามารถในการย่อยสลายไพรีนให้เพิ่มจำนวนขึ้นด้วย แม้ว่าแบคทีเรียอัดเม็ดของสายพันธุ์ PCY จะยังคงสามารถกำจัดไพรีนในดินได้ดี แต่สายพันธุ์ PCY ยังคงมีการปรับตัวต่อสภาวะในดินต่ำ จึงพบการลดลงของจำนวนสายพันธุ์ PCY จากผลการทดลองการนับจำนวนยีน *nidA* ด้วยวิธี real time PCR และการตรวจประชาคมแบคทีเรียด้วยวิธี DGGE ซึ่งเป็นสิ่งที่ควรพัฒนาต่อไป นอกจากนี้ การประยุกต์ใช้งานในแหล่งดินปนเปื้อนจริงนั้น อาจทำได้โดยการเติมแบคทีเรียอัดเม็ดลงไปในดินแล้วเฝ้า

กลบหรือพรวนดิน เพื่อให้เกิดความสม่ำเสมอของหัวเชื้อที่เติมลงไปและยังเป็นการเพิ่มปริมาณอากาศในดินอีกด้วย

โดยสรุปงานวิจัยนี้สามารถพัฒนาผลิตภัณฑ์หัวเชื้อพร้อมใช้รูปแบบแคปซูลที่เรีย้อัดเม็ดจากแบคทีเรียย่อยสลาย PAHs และอัลเคน *Novosphingobium* sp. PCY ที่มีประสิทธิภาพในการกำจัดไพรีนในอาหารเหลวและในดิน ทราบวิธีการใช้งาน รวมถึงวิธีและระยะเวลาการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์แคปซูลที่เรีย้อัดเม็ดที่พัฒนาขึ้นอีกด้วย นอกจากนี้ ยังทราบลักษณะสมบัติของสายพันธุ์ PCY เกี่ยวกับความสามารถในการย่อยสลายสารพิษเพื่อใช้ประเมินความเป็นไปได้ในการนำไปบำบัดสิ่งแวดล้อมและยืนยันที่ตอบสนองการย่อยสลายสารพิษเพื่อใช้ตรวจติดตามสายพันธุ์ PCY ระหว่างการบำบัดสิ่งแวดล้อม

### ข้อเสนอแนะ

เนื่องจากแบคทีเรีย *Novosphingobium* sp. PCY เป็นสายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพดีในการย่อยสลาย PAHs และอัลเคน รวมถึงการมีเอนไซม์ออกซิเจเนสและอัลเคนโมโนออกซิเจเนสที่แตกต่างไปจากแบคทีเรียในกลุ่ม Sphingomonads จึงมีความน่าสนใจในการศึกษาเชิงลึกเกี่ยวกับการย่อยสลาย PAHs ของสายพันธุ์นี้ โดยอาศัยการวิเคราะห์ลำดับเบสทั้งหมด (whole genome sequencing) ร่วมกับองค์ความรู้ของการศึกษาทางด้านจีโนมทั้งหมด (genomics) ด้าน RNA ทั้งหมด (transcriptomics) ด้านโปรตีนทั้งหมด (proteomics) และด้านวิถีเมตาบอลิซึมทั้งหมด (metabolomics) เพื่อความเข้าใจกลไกการปรับตัวของแบคทีเรียในการย่อยสลายสารพิษและการอยู่รอดในสิ่งแวดล้อม และใช้เป็นข้อมูลในการพัฒนาสำหรับการประยุกต์ใช้ได้อย่างมีประสิทธิภาพสูงสุด เช่น การตรวจสอบบทบาทและความเกี่ยวข้องของยีนต่างๆในการย่อยสลาย PAHs การวิเคราะห์วิธีการย่อยสลาย PAHs กลไกการตอบสนองต่อปัจจัยทางสิ่งแวดล้อม รวมถึงการตรวจสอบการมีอยู่ของยีนที่สามารถเคลื่อนที่ได้บริเวณรอบยีน *nidA* เช่น อินทีเกรส ทรานสโพซีส เป็นต้น และการตรวจสอบการถ่ายเทของเมกะพลาสมิดหรือยีน *nidA* ไปสู่แบคทีเรียอื่น เพื่อพิสูจน์ข้อสันนิษฐานของสายพันธุ์ PCY ว่าได้รับยีนดังกล่าวจากสิ่งแวดล้อมและสามารถถ่ายเทไปสู่แบคทีเรียอื่นเพื่อส่งเสริมการย่อยสลายสารพิษในสิ่งแวดล้อมได้ นอกจากนี้การวิเคราะห์ขนาดของเมกะพลาสมิดในงานวิจัยนี้ยังไม่ประสบผลสำเร็จ เนื่องจากพลาสมิดมีขนาดใหญ่จนไม่สามารถประเมินได้จาก DNA มาตรฐานที่ใช้เปรียบเทียบขนาด วิธีการแก้ไขอาจทำได้โดยใช้ DNA มาตรฐานขนาดใหญ่ขึ้น หรือการตัดเมกะพลาสมิดด้วยเอนไซม์ S1 nuclease ก่อนการทำ PFGE (Mallick และคณะ, 2007) ต่อไป

ในการประยุกต์ใช้แบคทีเรียอัดเม็ดสำหรับการบำบัดสิ่งแวดล้อมปนเปื้อน ยังพบว่าสายพันธุ์ PCY มีอัตราการอยู่รอดในดินต่ำ ดังนั้นจึงควรพัฒนาการผลิตแบคทีเรียอัดเม็ดต่อ เพื่อปรับปรุงการรอดชีวิตของสายพันธุ์ PCY ซึ่งอาจทำได้โดยกระตุ้นการสร้างไบโอฟิล์มของสายพันธุ์ PCY (Singh และคณะ, 2006) แล้วพัฒนาต่อยอดจากความรู้ความเข้าใจเรื่องกลไกการอยู่รอดของสายพันธุ์ PCY และการตอบสนองต่อปัจจัยต่างๆของสิ่งแวดล้อมต่อไป เป็นต้น

รายการอ้างอิง



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
**CHULALONGKORN UNIVERSITY**

## รายการอ้างอิง

- กรมควบคุมมลพิษ. พีเอเอช (โพลีไซคลิก อะโรมาติก ไฮโดรคาร์บอน). พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพมหานคร: สำนักจัดการกากของเสียและสารอันตราย กรมควบคุมมลพิษ กระทรวงทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม, 2547.
- Abd-Elsalam, H.E., Hafez, E.E., Hussain, A.A., Ali, A.G., and El-Hanafy, A.A. 2009. Isolation and identification of three-rings polyaromatic hydrocarbons (anthracene and phenanthrene) degrading bacteria. American-Eurasian Journal of Agricultural and Environmental Sciences. 5: 31-38.
- Abdel-Megeed, A., Al-Harbi, N., and Al-Deyab, S. 2010. Hexadecane degradation by bacterial strains isolated from contaminated soils. African Journal of Biotechnology. 9: 7487-7494.
- Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR), Public Health Statement, Toxicological profile for polycyclic aromatic hydrocarbons, August 1995. U.S. Public Health Service, U.S. Department of Health and Human Services, Atlanta, GA, August 1995.
- Alemayehu, D., Gordon, L.M., O'Mahony, M.M., O'Leary, N.D., and Dobson, A.D.W. 2004. Cloning and functional analysis by gene disruption of a novel gene involved in indigo production and fluoranthene metabolism in *Pseudomonas alcaligenes* PA-10. FEMS Microbiology Letters. 239: 285-293.
- Alongi, D.M. 2002. Present state and future of the world's mangrove forests. Environmental Conservation. 29: 331-349.
- Alonso-Gutiérrez, J., Figueras, A., Albaigés, J., Jiménez, N., Viñas, M., Solanas, A.M., and Novoa, B. 2009. Bacterial communities from shoreline environments (Costa da Morte, Northwestern Spain) affected by the Prestige oil spill. Applied and Environmental Microbiology. 75: 3407-3418.
- Anan'ina, L.N., Yastrebova, O.V., Demakov, V.A., and Plotnikova, E.G. 2011. Naphthalene-degrading bacteria of the genus *Rhodococcus* from the Verkhnekamsk salt mining region of Russia. Antonie van Leeuwenhoek. 100: 309-316.
- Andreoni, V., and Gianfreda, L. 2007. Bioremediation and monitoring of aromatic-polluted habitats. Applied Microbiology and Biotechnology. 76: 287-308.
- Arias, A.H., Vazquez-Botello, A., Tombesi, N., Ponce-Vélez, G., Freije, H., and Marcovecchio, J. 2010. Presence, distribution, and origins of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in sediments from Bahía Blanca estuary, Argentina. Environmental Monitoring and Assessment. 160: 301-314.
- Arulazhagan, P., and Vasudevan, N. 2011. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by a halotolerant bacterial strain *Ochrobactrum* sp. VA1. Marine Pollution Bulletin. 62: 388-394.

- Ausubel, F.M, Brent, R.E., Kington, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A., and Struhl, K. 1999. Current Protocol in Molecular Biology. New York, John Wiley and Sons.
- Baboshin, M., Akimov, V., Baskunov, B., Born, T.L., Khan, S.U., and Golovleva, L. 2008. Conversion of polycyclic aromatic hydrocarbons by *Sphingomonas* sp. VKM B-2434. Biodegradation. 19: 567-576.
- Baboshin, M., and Golovleva, L.A. 2012. Aerobic bacterial degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and its kinetic aspects. Microbiology. 81: 695-706.
- Balachandran, C., Duraipandiyar, V., Balakrishna, K., and Ignacimuthu, S. 2012. Petroleum and polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) degradation and naphthalene metabolism in *Streptomyces* sp. (ERI-CPDA-1) isolated from oil contaminated soil. Bioresource Technology. 112: 83-90.
- Balkwill, D.L. 1989. Numbers, diversity, and morphological characteristics of aerobic, chemoheterotrophic bacteria in deep subsurface sediments from a site in South Carolina. Geomicrobiology Journal. 7: 33-52.
- Bamforth, S.M., and Singleton, I. 2005. Bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons: current knowledge and future directions. Journal of Chemical Technology and Biotechnology. 80: 723-736.
- Baraniecki, C.A., Aislabie, J., and Foght, J.M. 2002. Characterization of *Sphingomonas* sp. Ant 17, an aromatic hydrocarbon-degrading bacterium isolated from Antarctic soil. Microbial Ecology. 43: 44-54.
- Basta, T., Buerger, S., and Stolz, A. 2005. Structural and replicative diversity of large plasmids from sphingomonads that degrade polycyclic aromatic compounds and xenobiotics. Microbiology. 151: 2025-2037.
- Basta, T., Keck, A., Klein, J., and Stolz, A. 2004. Detection and characterization of conjugative degradative plasmids in xenobiotic-degrading *Sphingomonas* strains. Journal of Bacteriology. 186: 3862-3872.
- Beesley, L., Moreno-Jiménez, E., Gomez-Eyles, J.L., Harris, E., Robinson, B., and Sizmur, T. 2011. A review of biochars' potential role in the remediation, revegetation and restoration of contaminated soils. Environmental Pollution. 159: 3269-3282.
- Beilen, J.B., Funhoff, E.G., Loon, A., Just, A., Kaysser, L., Bouza, M., Holtackers, R., Röthlisberger, M., Li, Z., and Witholt, B. 2006. Cytochrome P450 alkane hydroxylases of the CYP153 family are common in alkane-degrading eubacteria lacking integral membrane alkane hydroxylases. Applied and Environmental Microbiology. 72: 59-65.
- Beilen, J.B., Panke, S., Lucchini, S., Franchini, A.G., Röthlisberger, M., and Witholt, B. 2001. Analysis of *Pseudomonas putida* alkane degradation gene clusters and flanking insertion sequences: evolution and regulation of the *alk* genes. Microbiology. 147: 1621-1630.



- Bengtsson, G., Törneman, N., Lipthay, J.R., and Sørensen, S.J. 2013. Microbial diversity and PAH catabolic genes tracking spatial heterogeneity of PAH concentrations. Environmental Microbiology. 65: 91-100.
- Bento, F.M., Camargo, F.A.O., Okeke, B.C., and Frankenberger, W.T. 2005. Comparative bioremediation of soils contaminated with diesel oil by natural attenuation, biostimulation and bioaugmentation. Bioresource Technology. 96: 1049-1055.
- Bharalia, P., Das, S., Konwar, B.K., and Thakur, A.J. 2011. Crude biosurfactant from thermophilic *Alcaligenes faecalis*: Feasibility in petro-spill bioremediation. International Biodeterioration and Biodegradation. 65: 682-690.
- Bisht, S., Pandey, P., Kaur, G., Aggarwal, H., Sood, A., Sharma, S., Kumar, V., and Bisht, N.S. 2014. Utilization of endophytic strain *Bacillus* sp. SBER3 for biodegradation of polyaromatic hydrocarbons (PAH) in soil model system. European Journal of Soil Biology. 60: 67-76.
- Bogan, B.W., Lahner, L.M., Sullivan, W.R., and Paterek, J.R. 2003. Degradation of straight-chain aliphatic and high-molecularweight polycyclic aromatic hydrocarbons by a strain of *Mycobacterium austroafricanum*. Journal of Applied Microbiology. 94: 230-239.
- Bosch, R., García-Valdés, E., and Moore, E.R.B. 1999. Genetic characterization and evolutionary implications of a chromosomally encoded naphthalene-degradation upper pathway from *Pseudomonas stutzeri* AN10. Gene. 236: 149-157.
- Bosch, R., García-Valdés, E., and Moore, E.R.B. 2000. Complete nucleotide sequence and evolutionary significance of a chromosomally encoded naphthalene-degradation lower pathway from *Pseudomonas stutzeri* AN10. Gene. 245: 65-74.
- Brezna, B., Khan, A.A., and Cerniglia, C.E. 2003. Molecular characterization of dioxygenases from polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading *Mycobacterium* spp. FEMS Microbiology Letters. 223: 177-183.
- Brown, S.D., Palumbo, A.V., Panikov, N., Ariyawansa, T., Klingeman, D.M., Johnson, C.M., Land, M.L., Utturkar, S.M., and Epstein, S.S. 2012. Draft genome sequence for *Microbacterium laevaniformans* strain OR221, a bacterium tolerant to metals, nitrate, and low pH. Journal of Bacteriology. 194: 3279-3280.
- Brunet-Galmés, I., Busquets, A., Peña, A., Gomila, M., Nogales, B., García-Valdés, E., Lalucat, J., Bennasar, A., and Bosch, R. 2012. Complete genome sequence of the naphthalene-degrading bacterium *Pseudomonas stutzeri* AN10 (CCUG 29243). Journal of Bacteriology. 194: 6642-6643.
- Buonaurio, R., Stravato, V.M., Kosako, Y., Fujiwara, N., Naka, T., Kobayashi, K., Cappelli, C., and Yabuuchi, E. 2002. *Sphingomonas melonis* sp. nov., a novel pathogen that causes brown spots on yellow Spanish melon fruits. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 52: 2081-2087.

- Buranapratheprat, A., Yanagi, T., and Matsumura, S. 2008. Seasonal variation in water column conditions in the upper gulf of Thailand. Continental Shelf Research. 28: 2509-2522.
- Cameotra, S.S., and Makkar, R.S. 2010. Biosurfactant-enhanced bioremediation of hydrophobic pollutants. Pure and Applied Chemistry. 82: 97-116.
- Cao, Z., Sun, L., Cao, X., and He, Y. 2011. Isolation and performance for two strains of benzo[*a*]pyrene degradation. Advanced Materials Research. 233-235: 1920-1923.
- Cébron, A., Norini, M.P., Beguiristain, T., and Leyval, C. 2008. Real-Time PCR quantification of PAH-ring hydroxylating dioxygenase (PAH-RHD $\alpha$ ) genes from Gram positive and Gram negative bacteria in soil and sediment samples. Journal of Microbiological Methods. 73: 148-159.
- Ceyhan, N. 2012. Biodegradation of pyrene by a newly isolated *Proteus vulgaris*. Scientific Research and Essays. 7: 66-77.
- Chadhain, S.M.N., Norman, R.S., Pesce, K.V., Kukor, J.J., and Zylstra, G.J. 2006. Microbial dioxygenase gene population shifts during polycyclic aromatic hydrocarbon biodegradation. Applied and Environmental Microbiology. 72: 4078-4087.
- Chang, R.L., Wood, A.W., Huang, M.T., Xie, J.G., Cui, X.X., Reuhl, K.R., Boyd, D.R., Lin, Y., Shih, W.J., Balani, S.K., Yagi, H., Jerina, D.M., and Conney, A.H. 2013. Mutagenicity and tumorigenicity of the four enantiopure bay-region 3,4-diol-1,2-epoxide isomers of dibenz[*a,h*]anthracene. Carcinogenesis. 34: 2184-2191.
- Chang, Y.T., Lee, J.F., Chao, H.P., and Liao, W.L. 2006. Bacterial community changes with N'-N' dimethylformamide (DMF) additives during polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) biodegradation. Environmental Technology. 27: 1-14.
- Chayabutra, C., and Ju, L.K. 2000. Degradation of *n*-hexadecane and its metabolites by *Pseudomonas aeruginosa* under microaerobic and anaerobic denitrifying conditions. Applied and Environmental Microbiology. 66: 493-498.
- Chen, B., and Yuan, M. 2011. Enhanced sorption of polycyclic aromatic hydrocarbons by soil amended with biochar. Journal of Soils and Sediments. 11: 62-71.
- Chen, B., Yuan, M., and Qian, L. 2012. Enhanced bioremediation of PAH-contaminated soil by immobilized bacteria with plant residue and biochar as carriers. Journal of Soils and Sediments. 12: 1350-1359.
- Chen, J., Wong, M.H., Wong, Y.S., and Tam, N.F.Y. 2008. Multi-factors on biodegradation kinetics of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by *Sphingomonas* sp. a bacterial strain isolated from mangrove sediment. Marine Pollution Bulletin. 57: 695-702.
- Cheunbarn, T., Cheunbarn, S., and Khumjai, T. 2008. Prospects of bacterial granule for treatment of real textile industrial wastewater. International Journal of Agriculture and Biology. 10: 689-692.

- Chikere, C.B. 2013. Application of molecular microbiology techniques in bioremediation of hydrocarbons and other pollutants. British Biotechnology Journal. 3: 90-115.
- Cho, J.C., and Kim, S.J. 2001. Detection of mega plasmid from polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading *Sphingomonas* sp. strain KS14. Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology. 3: 503-506.
- Colombo, M., Cavalca, L., Bernasconi, L., and Andreoni, V. 2011. Bioremediation of polyaromatic hydrocarbon contaminated soils by native microflora and bioaugmentation with *Sphingobium chlorophenicum* strain C3R: A feasibility study in solid- and slurry-phase microcosms. International Biodeterioration and Biodegradation. 65: 191-197.
- Coppotelli, B.M., Ibarrolaza, A., Dias, R.L., Panno, M.T.D., Berthe-Corti, L., and Morelli, I.S. 2010. Study of the degradation activity and the strategies to promote the bioavailability of phenanthrene by *Sphingomonas paucimobilis* strain 20006FA. Microbial Ecology. 59: 266-276.
- Coppotelli, B.M., Ibarrolaza, A., Panno, M.T.D., and Morelli, I.S. 2008. Effects of the inoculant strain *Sphingomonas paucimobilis* 20006FA on soil bacterial community and biodegradation in phenanthrene-contaminated soil. Microbial Ecology. 55: 173-183.
- Coral, G., and Karagoz, S. 2005. Isolation and characterization of phenanthrene-degrading bacteria from a petroleum refinery soil. Annals of Microbiology. 55: 255-259.
- Costa, S.G.V.A.O., Nitschke, M., Lépine, F., Déziel, E., and Contiero, J. 2010. Structure, properties and applications of rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* L2-1 from cassava wastewater. Process Biochemistry. 45: 1511-1516.
- Cui, Z., Lai, Q., Dong, C., and Shao, Z. 2008. Biodiversity of polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacteria from deep sea sediments of the Middle Atlantic Ridge. Environmental Microbiology. 10: 2138-2149.
- Cunliffe, M., and Kertesz, M.A. 2006a. Autecological properties of soil sphingomonads involved in the degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. Applied Microbiology and Biotechnology. 72: 1083-1089.
- Cunliffe, M., and Kertesz, M.A. 2006b. Effect of *Sphingobium yanoikuyae* B1 inoculation on bacterial community dynamics and polycyclic aromatic hydrocarbon degradation in aged and freshly PAH-contaminated soils. Environmental Pollution. 144: 228-237.
- D'Argenio, V., Petrillo, M., Cantiello, P., Naso, B., Cozzuto, L., Notomista, E., Paoletta, G., Donato, A.D., and Salvatore, F. 2011. *De novo* sequencing and assembly of the whole genome of *Novosphingobium* sp. strain PP1Y. Journal of Bacteriology. 193: 4296.
- Dams-Kozłowska, H., Mercaldi, M.P., Panilaitis, B.J., and Kaplan, D.L. 2008. Modifications and applications of the *Acinetobacter venetianus* RAG-1 exopolysaccharide, the emulsan complex and its components. Applied Microbiology and Biotechnology. 81: 201-210.

- Das, N., and Chandran, P. 2011. Microbial degradation of petroleum hydrocarbon contaminants: An overview. *Biotechnology Research International*. 2011: 1-13. Article ID 941810. doi:10.4061/2011/941810.
- Daverey, A., and Pakshirajan, K. 2010. Sophorolipids from *Candida bombicola* using mixed hydrophilic substrates: Production, purification and characterization. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 79: 246-253.
- Dean-Ross, D., and Cerniglia, C.E. 1996. Degradation of pyrene by *Mycobacterium flavescens*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 46: 307-312.
- DeBruyn, J.M., Mead, T.J., and Sayler, G.S. 2012. Horizontal transfer of PAH catabolism genes in *Mycobacterium*: Evidence from comparative genomics and isolated pyrene-degrading bacteria. *Environmental Science and Technology*. 46: 99-106.
- Demanèche, S., Meyer, C., Micoud, J., Louwagie, M., Willison, J.C., and Jouanneau, Y. 2004. Identification and functional analysis of two aromatic-ring-hydroxylating dioxygenases from a *Shingomonas* strain that degrades various polycyclic aromatic hydrocarbons. *Applied and Environmental Microbiology*. 70: 6714-6725.
- Dennis, J.J., and Zylstra, G.J. 2004. Complete sequence and genetic organization of pDTG1, the 83 kilobase naphthalene degradation plasmid from *Pseudomonas putida* strain NCIB 9816-4. *Journal of Molecular Biology*. 341: 753-768.
- Denome, S.A., Stanley, D.C., Olson, E.S., and Young, K.D. 1993. Metabolism of dibenzothiophene and naphthalene in *Pseudomonas* strains: Complete DNA sequence of an upper naphthalene catabolic pathway. *Journal of Bacteriology*. 175: 6890-6901.
- Desai, C., Pathak, H., and Madamwar, D. 2010. Advances in molecular and “-omics” technologies to gauge microbial communities and bioremediation at xenobiotic/anthropogen contaminated sites. *Bioresource Technology*. 101: 1558-1569.
- Ding, G.C., Heuer, H., Zühlke, S., Spitteller, M., Pronk, G.J., Heister, K., Kögel-Knabner, I., and Smalla, K. 2010. Soil type-dependent responses to phenanthrene as revealed by determining the diversity and abundance of polycyclic aromatic hydrocarbon ring-hydroxylating dioxygenase genes by using a novel PCR detection system. *Applied and Environmental Microbiology*. 76: 4765-4771.
- Domingues, P.M., Louvado, A., Oliveira, V., Coelho, F.J., Almeida, A., Gomes, N.C., and Cunha, A. 2013. Selective cultures for the isolation of biosurfactant producing bacteria: comparison of different combinations of environmental inocula and hydrophobic carbon sources. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*. 43: 237-255.
- Domínguez, C., Sarkar, S.K., Bhattacharya, A., Chatterjee, M., Bhattacharya, B.D., Jover, E., Albaigés, J., Bayona, J.M., Alam, Md. A., and Satpathy, K.K. 2010. Quantification and source identification of polycyclic aromatic hydrocarbons in core sediments from Sundarban

- mangrove wetland, India. Archives of Environmental Contamination and Toxicology. 59: 49-61.
- Doyle, E., Muckian, L., Hickey, A.M., and Clipson, N. 2008. Microbial PAH degradation. Advances in Applied Microbiology. 65: 27-66.
- Espeche, M.E., MacCormack, W.P., and Fraile, E.R. 1994. Factors affecting growth of an *n*-hexadecane degrader *Acinetobacter* species isolated from a highly polluted urban river. International Biodeterioration and Biodegradation. 33: 187-196.
- Evans, T.N., Watson, G., Rees, G.N., and Seviour, R.J. 2014. Comparing activated sludge fungal community population diversity using denaturing gradient gel electrophoresis and terminal restriction fragment length polymorphism. Antonie van Leeuwenhoek. DOI 10.1007/s10482-013-0108-x.
- Fan, C.W., Yang, T.N., and Kao, S.J. 2010. Characteristics of sedimentary polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in the subtropical Feitsui Reservoir, Taiwan. Journal of Hydrology. 391: 217-222.
- Farjadfard, S., Borghei, S.M., Hassani, A.H., Yakhchali, B., Ardjmand, M., and Zeinali, M. 2012. Efficient biodegradation of naphthalene by a newly characterized indigenous *Achromobacter* sp. FBHYA2 isolated from Tehran Oil Refinery Complex. Water Science and Technology. 66: 594-602.
- Feitkenhauer, H., Müller, R., and Märkl, H. 2003. Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons and long chain alkanes at 60-70°C by *Thermus* and *Bacillus* spp. Biodegradation. 14: 367-372.
- Ferradji, F.Z., Mnif, S., Badis, A., Rebbani, S., Fodil, D., Eddouaouda, K., and Sayadi, S. 2014. Naphthalene and crude oil degradation by biosurfactant producing *Streptomyces* spp. isolated from Mitidja plain soil (North of Algeria). International Biodeterioration and Biodegradation. 86: 300-308.
- Ferreira, L., Rosales, E., Sanromán, M.A., and Pazos, M. 2014. Preliminary testing and design of permeable bioreactive barrier for phenanthrene degradation by *Pseudomonas stutzeri* CECT 930 immobilized in hydrogel matrices. Journal of Chemical Technology and Biotechnology. DOI: 10.1002/jctb.4338.
- Ferreira, M.M.C. 2001. Polycyclic aromatic hydrocarbons: a QSPR study. Chemosphere. 44: 125-146.
- Ferreira, N.L., Mathis, H., Labbe, D., Monot, F., Greer, C.W., and Fayolle-Guichard, F. 2007. *n*-Alkane assimilation and *tert*-butyl alcohol (TBA) oxidation capacity in *Mycobacterium austroafricanum* strains. Applied Microbiology and Biotechnology. 75: 909-919.

- Ferrera-Rodríguez, O., Greer, C.W., Juck, D., Consaul, L.L., Martínez-Romero, E., and Whyte, L.G. 2012. Hydrocarbon-degrading potential of microbial communities from Arctic plants. Journal of Applied Microbiology. 114: 71-83.
- Foght, J.M., and Westlake, D.W. 1996. Transposon and spontaneous deletion mutants of plasmid-borne genes encoding polycyclic aromatic degradation by a strain of *Pseudomonas fluorescens*. Biodegradation. 7: 353-366.
- Foo, K.Y., and Hameed, B.H. 2009. Utilization of rice husk ash as novel adsorbent: A judicious recycling of the colloidal agricultural waste. Advances in Colloid and Interface Science. 152: 39-47.
- Fu, B., Li, Q.X., Xu, T., Cui, Z.L., Sun, Y., and Li, J. 2014. *Sphingobium* sp. FB3 degrades a mixture of polycyclic aromatic hydrocarbons. International Biodeterioration and Biodegradation. 87: 44-51.
- Fuenmayor, S.L., and Rodríguez, L.V. 1992. Characterization of polycyclic aromatic hydrocarbons degradative soil *Pseudomonas*. Acta Científica Venezolana. 43: 349-354.
- Fukushima, T., Watanabe, S., Kamiya, K., and Ozaki, N. 2012. Vertical distributions of PAHs in the sediments of four lakes in Japan. Journal of Soils and Sediments. 12: 1530-1540.
- Gao, W., Cui, Z., Li, Q., Xu, G., Jia, X., and Zheng, L. 2013. *Marinobacter nanhaiticus* sp. nov., polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacterium isolated from the sediment of the South China sea. Antonie van Leeuwenhoek. 103: 485-491.
- Gautam, K.K., and Tyagi, V.K. 2006. Microbial surfactants: A review. Journal of Oleo Science. 55: 155-166.
- Gentili, A.R., Cubitto, M.A., Ferrero, M., and Rodríguez, M.S. 2006. Bioremediation of crude oil polluted seawater by a hydrocarbon degrading bacterial strain immobilized on chitin and chitosan flakes. International Biodeterioration and Biodegradation. 57: 222-228.
- Ghevariya, C.M., Bhatt, J.K., and Dave, B.P. 2011. Enhanced chrysene degradation by halotolerant *Achromobacter xylosoxidans* using response surface methodology. Bioresour. Technology. 102: 9668-9674.
- Giri, C., Ochieng, E., Tieszen, L.L., Zhu, Z., Singh, A., Loveland, T., Masek, J., and Duke, N. 2011. Status and distribution of mangrove forests of the world using earth observation satellite data. Global Ecology and Biogeography. 20: 154-159.
- Gomes, N.C.M., Borges, L.R., Paranhos, R., Pinto, F.N., Mendonça-Hagler, L.C.S., and Smalla, K., 2008. Exploring the diversity of bacterial communities in sediments of urban mangrove forests. FEMS Microbiology Ecology. 66: 96-109.
- Górecka, E., and Jastrzębski, M. 2011. Immobilization techniques and biopolymer carriers. Biotechnology and Food Science. 75: 65-86.

- Guo, C.L., Dang, Z., Wong, Y.S., and Tam, N.F.Y. 2010. Biodegradation ability and dioxygenase genes of PAH-degrading *Sphingomonas* and *Mycobacterium* strains isolated from mangrove sediments. International Biodeterioration and Biodegradation. 64: 419-426.
- Guo, C.L., Zhou, H.W., Wong, Y.S., and Tam, N.F.Y. 2005. Isolation of PAH-degrading bacteria from mangrove sediments and their biodegradation potential. Marine Pollution Bulletin. 51: 1054-1061.
- Gupta, S., Kumar, K., Srivastava, A., Srivastava, A., and Jain, V.K. 2011. Size distribution and source apportionment of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in aerosol particle samples from the atmospheric environment of Delhi, India. Science of the Total Environment. 409: 4674-4680.
- Habe, H., Kanemitsu, M., Nomura, M., Takemura, T., Iwata, K., Nojiri, H., Yamane, H., and Omori, T. 2004. Isolation and characterization of an alkaliphilic bacterium utilizing pyrene as a carbon source. Journal of Bioscience and Bioengineering. 98: 306-308.
- Habe, H., and Omori, T. 2003. Genetics of polycyclic aromatic hydrocarbon metabolism in diverse aerobic bacteria. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry. 67: 225-243.
- Hakura, A., Mochida, H., and Yamatsu, K. 1993. Dimethyl sulfoxide (DMSO) is mutagenic for bacterial mutagenicity tester strains. Mutation Research. 303: 127-133.
- Hale, S.E., Lehmann, J., Rutherford, D., Zimmerman, A.R., Bachmann, R.T., Shitumbanuma, V., O'Toole, A., Sundqvist, K.L., Arp, H.P.H., and Cornelissen, G. 2012. Quantifying the total and bioavailable polycyclic aromatic hydrocarbons and dioxins in biochars. Environmental Science and Technology. 46: 2830-2838.
- Hanson, K.G., and Desai, A.J. 1996. Intergeneric protoplast fusion between *Acinetobacter* sp. A3 and *Pseudomonas putida* DP99 for enhanced hydrocarbon degradation. Biotechnology Letters. 18: 1369-1374.
- Haritash, A.K., and Kaushik, C.P. 2009. Biodegradation aspects of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs): A review. Journal of Hazardous Materials. 169: 1-15.
- Heitkamp, M.A., Franklin, W., and Cerniglia, C.E. 1988. Microbial metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons: isolation and characterization of a pyrene degrading bacterium. Applied and Environmental Microbiology. 54: 2549-2555.
- Holguin, G., Vazquez, P., and Bashan, Y. 2001. The role of sediment microorganisms in the productivity, conservation, and rehabilitation of mangrove ecosystems: an overview. Biology and Fertility of Soils. 33: 265-278.
- Hong, Q., Dong, X., He, L., Jiang, X., and Li, S. 2009. Isolation of a biphenyl-degrading bacterium, *Achromobacter* sp. BP3, and cloning of the *bph* gene cluster. International Biodeterioration and Biodegradation. 63: 365-370.

- Hou, D., Shen, X., Luo, Q., He, Y., Wang, Q., and Liu, Q. 2013. Enhancement of the diesel oil degradation ability of a marine bacterial strain by immobilization on a novel compound carrier material. Marine Pollution Bulletin. 67: 146-151.
- Hu, F.C., Su, Z.C., Sun, J., Li, X., Zhang, H.W., and Sun, J.D. 2011. Isolation and identification of a highly efficient pyrene-degrading *Mycobacterium* sp. strain N12. Ying Yong Sheng Tai Xue Bao. 22: 1566-1572.
- Hu, L., Yan, J., Liao, M., Xiang, H., Gong, X., Zhang, L., and Fang, X. 2012. An optimized ultraviolet-A light photodetector with wide range photoresponse based on ZnS/ZnO biaxial nanobelt. Advanced Materials. 24: 2305-2309.
- Huang, X.F., Liu, J., Lu, L.J., Wen, Y., Xu, J.C., Yang, D.H., and Zhou, Q. 2009. Evaluation of screening methods for demulsifying bacteria and characterization of lipopeptide bio-demulsifier produced by *Alcaligenes* sp. Bioresource Technology. 100: 1358-1365.
- Huang, Y., Zhang, J., and Zhu, L. 2013. Evaluation of the application potential of bentonites in phenanthrene bioremediation by characterizing the biofilm community. Bioresource Technology. 134: 17-23.
- Hubalek, Z. 2003. Protectants used in the cryopreservation of microorganisms. Cryobiology. 46: 205-229.
- Igwo-Ezikpe, M.N., Gbenle, O.G., Ilori, M.O., Okpuzor, J., and Osuntoki, A.A. 2009. Evaluation of *Alcaligenes faecalis* degradation of chrysene and diesel oil with concomitant production of biosurfactant. Research Journal of Environmental Toxicology. 3: 159-169.
- Igwo-Ezikpe, M.N., Gbenle, O.G., Okpuzor, J., Ilori, J.M., Idoko, J.E., Amosa, J.A., and Soyoye, D.O. 2008. Plasmid involvement in biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by bacteria isolated from Nigeria. The FASEB Journal. 22: 597.1.
- Isaac, P., Sánchez, L.A., Bourguignon, N., Cabral, M.E., and Ferrero, M.A. 2013. Indigenous PAH-degrading bacteria from oil-polluted sediments in Caleta Cordova, Patagonia Argentina. International Biodeterioration and Biodegradation. 82: 207-214.
- Ismail, W., Al-Rowaihi, I.S., Al-Humam, A.A., Hamza, R.Y., Nayal, A.M.E., and Bououdina, M. 2013. Characterization of a lipopeptide biosurfactant produced by a crude-oil-emulsifying *Bacillus* sp. I-15. International Biodeterioration and Biodegradation. 84: 168-178.
- Iturbe, R., Flores, C., Chavez, C., Bautista, G., and Tortes, L.G. 2004. Remediation of contaminated soil using soil washing and biopile methodologies at a field level. Journal of Soils and Sediments. 4: 115-122.
- Izmalkova, T.Y., Sazonova, O.I., Sokolov, S.L., Kosheleva, I.A., and Boronin, A.M. 2005. Diversity of genetic systems responsible for naphthalene biodegradation in *Pseudomonas fluorescens* strains. Microbiology. 74: 60-68.



- Jacques, R.J.S., Okeke, B.C., Bento, F.M., Peralba, M.C.R., and Camargo, F.A.O. 2009. Improved enrichment and isolation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH)-degrading microorganisms in soil using anthracene as a model PAH. Current Microbiology. 58: 628-634.
- Jakoncic, J., Jouanneau, Y., Meyer, C., and Stojanoff, V. 2007. The crystal structure of the ring-hydroxylating dioxygenase from *Sphingomonas* CHY-1. FEBS Journal. 274: 2470-2481.
- Jalilnejada, E., and Vahabzadeha, F. 2013. Models for the biodegradation kinetics of naphthalene by *Ralstonia eutropha*. Polycyclic Aromatic Compounds. 33: 451-466.
- Jencova, V., Strnad, H., Chodora, Z., Ulbrich, P., Vlcek, C., Hickey, W.J., and Paces, V. 2008. Nucleotide sequence, organization and characterization of the (halo)aromatic acid catabolic plasmid pA81 from *Achromobacter xylosoxidans* A8. Research in Microbiology. 159: 118-127.
- Jiajun, X., Linjun, G., Shipeng, W., and Yitong, L. 2010. Comparative impact of cadmium on two phenanthrene-degrading bacteria isolated from cadmium and phenanthrene co-contaminated soil in China. Journal of Hazardous Materials. 174: 818-823.
- Jiang, Y., Yang, X., Liu, B., Zhao, H., Cheng, Q., and Cai, B. 2004. Catechol 2,3-dioxygenase from *Pseudomonas* sp. strain ND6: gene sequence and enzyme characterization. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry. 68: 1798-1800.
- John, R.C., Essien, J.P., Akpan, S.B., and Okpokwasili, G.C. 2012. Polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacteria from aviation fuel spill site at Ibeno, Nigeria. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology. 88: 1014-1019.
- Johnsen, A.R., and Henriksen, S. 2009. Microplate MPN-enumeration of monocyclic- and dicyclic-aromatic hydrocarbon degraders via substrate phase-partitioning. Biodegradation. 20: 581-589.
- Jurelevicius, D., Alvarez, V.M., Peixoto, R., Rosado, A.S., and Seldin, L. 2013. The use of a combination of *alkB* primers to better characterize the distribution of alkane-degrading bacteria. PLoS ONE. 8: E66565.
- Kallimanis, A., Karabika, E., Mavromatis, K., Lapidus, A., LaButti, K.M., Liolios, K., Ivanova, N., Goodwin, L., Woyke, T., Velentzas, A.D., Perisynakis, A., Ouzounis, C.C., Kyrpides, N.C., Koukkou, A.I., and Drinas, C. 2011. Complete genome sequence of *Mycobacterium* sp. strain (Spyr1) and reclassification to *Mycobacterium gilvum* Spyr1. Standards in Genomic Sciences. 5: 144-153.
- Kawahara, K., Moll, H., Knirel, Y.A., Seydel, U., and Zähringer, U. 2000. Structural analysis of two glycosphingolipids from the lipopolysaccharide-lacking bacterium *Sphingomonas capsulata*. European Journal of Biochemistry. 267: 1837-1846.

- Khan, A.A., Wang, R.F., Cao, W.W., Doerge, D.R., Wennerstrom, D., and Cerniglia, C.E. 2001. Molecular cloning, nucleotide sequence, and expression of genes encoding a polycyclic aromatic ring dioxygenase from *Mycobacterium* sp. strain PYR-1. Applied and Environmental Microbiology. 67: 3577-3585.
- Khodadadi, Z., Mousavi-Khoshdel, S.M., Gharibi, H., Hashemianzadeh, S.M., and Javadian, S. 2012. Monte Carlo simulation of binary surfactant/contaminant/ water systems. Journal of Molecular Graphics and Modelling. 36: 20-29.
- Kilic, A., Senses, Z., Kurekci, A.E., Aydogan, H., Sener, K., Kismet, E., and Basustaoglu, A.C. 2007. Nosocomial outbreak of *Sphingomonas paucimobilis* bacteremia in a hemato/oncology unit. Japanese journal of infectious diseases. 60: 394-396.
- Kim, H.K., Luo, Y., Moon, H.J., Park, S.J., Keum, H.O., Rho, S., and Park, B.K. 2009. Phylogenetic and recombination analysis of genomic sequences of PCV2 isolated in Korea. Virus Genes. 39: 352-358.
- Kim, S.I., Kukor, J.J., Oh, K.H., and Kahng, H.Y. 2006a. Evaluating the genetic diversity of dioxygenases for initial catabolism of aromatic hydrocarbons in *Pseudomonas rhodesiae* KK1. Enzyme and Microbial Technology. 40: 71-78.
- Kim, S.J., Kweon, O., and Cerniglia, C.E. 2010. Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by *Mycobacterium* strains. Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology. 19: 1865-1879.
- Kim, S.J., Kweon, O., Freeman, J.P., Jones, R.C., Adjei, M.D., Jhoo, J.W., Edmondson, R.D., and Cerniglia, C.E. 2006b. Molecular cloning and expression of genes encoding a novel dioxygenase involved in low- and high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbon degradation in *Mycobacterium vanbaalenii* PYR-1. Applied and Environmental Microbiology. 72: 1045-1054.
- Kim, S.J., Kweon, O., Jones, R.C., Edmondson, R.D., and Cerniglia, C.E. 2008. Genomic analysis of polycyclic aromatic hydrocarbon degradation in *Mycobacterium vanbaalenii* PYR-1. Biodegradation. 19: 859-881.
- Kim, S.J., Kweon, O., Jones, R.C., Freeman, J.P., Edmondson, R.D., and Cerniglia, C.E. 2007. Complete and integrated pyrene degradation pathway in *Mycobacterium vanbaalenii* PYR-1 based on systems biology. Journal of Bacteriology. 189: 464-472.
- Klankeo, P., Nopcharoenkul, W., and Pinyakong, O. 2009. Two novel pyrene-degrading *Diaphorobacter* sp. and *Pseudoxanthomonas* sp. isolated from soil. Journal of Bioscience and Bioengineering. 108: 488-495.
- Kleespies, M., Kroppenstedt, R.M., Rainey, F.A., Webb, L.E., and Stackebrandt, E. 1996. *Mycobacterium hodleri* sp. nov., a new member of the fast-growing mycobacteria capable of degrading polycyclic aromatic hydrocarbons. International Journal of Systematic Bacteriology. 46: 683-687.

- Kloos, K., Munch, J.C., and Schloter, M. 2006. A new method for the detection of alkane-monoxygenase homologous genes (*alkB*) in soils based on PCR-hybridization. Journal of Microbiological Methods. 66: 486-496.
- Kohno, T., Sugimoto, Y., Sei, K., and Mori, K. 2002. Design for PCR primers and gene probes for general detection of alkane-degrading bacteria. Microbes and Environments. 17: 114-121.
- Konishi, M., Fukuoka, T., Nagahama, T., Morita, T., Imura, T., Kitamoto, D., and Hatada, Y. 2010. Biosurfactant-producing yeast isolated from *Calyptogena soyoe* (deep-sea cold-seep clam) in the deep sea. Journal of Bioscience and Bioengineering. 110: 169-175.
- Kourtev, P.S., Hill, K.A., Shepson, P.B., and Konopka, A. 2011. Atmospheric cloud water contains a diverse bacterial community. Atmospheric Environment. 45: 5399-5405.
- Kouzuma, A., Pinyakong, O., Nojiri, H., Omori, T., Yamane, H., and Habe, H. 2006. Functional and transcriptional analyses of the initial oxygenase genes for acenaphthene degradation from *Sphingomonas* sp. strain A4. Microbiology. 152: 2455-2467.
- Kuiper, I., Kravchenko, L.V., Bloemberg, G.V., and Lugtenberg, B.J.J. 2002. *Pseudomonas putida* strain PCL1444, selected for efficient root colonization and naphthalene degradation, effectively utilizes root exudate components. Molecular Plant-Microbe Interactions. 15: 734-741.
- Kumar, G., Singla, R., and Kumar, R. 2010. Plasmid associated anthracene degradation by *Pseudomonas* sp. isolated from filling station site. Nature and Science. 8: 89-94.
- Kumara, M., Leon, V., Materano, A.S., Ilzins, O.A., Galindo-Castro, I., and Fuenmayor, S.L. 2006. Polycyclic aromatic hydrocarbon degradation by biosurfactant-producing *Pseudomonas* sp. IR1. Zeitschrift für Naturforschung C. 61: 203-212.
- Kweon, O., Kim, S.J., Baek, S., Chae, J.C., Adjei, M.D., Baek, D.H., Kim, Y.C., and Cerniglia, C.E. 2008. A new classification system for bacterial rieske non-heme iron aromatic ring-hydroxylating oxygenases. BMC Biochemistry. 9: 11-30.
- Kweon, O., Kim, S.J., Freeman, J.P., Song, J., Baek, S., and Cerniglia, C.E. 2010. Substrate specificity and structural characteristics of the novel rieske nonheme iron aromatic ring-hydroxylating oxygenases NidAB and NidA3B3 from *Mycobacterium vanbaalenii* PYR-1. mBio. 1: 1-11.
- Kweon, O., Kim, S.J., Holland, R.D., Chen, H., Kim, D.W., Gao, Y., Yu, L.R., Baek, S., Baek, D.H., Ahn, B., and Cerniglia, C.E. 2011. Polycyclic aromatic hydrocarbon metabolic network in *Mycobacterium vanbaalenii* PYR-1. Journal of Bacteriology. 193: 4326-4337.
- Labana, S., Pandey, G., Paul, D., Sharma, N.K., Basu, A., and Jain, R.K. 2005. Pot and field studies on bioremediation of *p*-nitrophenol contaminated soil using *Arthrobacter protophormiae* RKJ100. Environmental Science and Technology. 39: 3330-3337.

- Lalucat, J., Bennasar, A., Bosch, R., García-Valdés, E., and Palleroni, N.J. 2006. Biology of *Pseudomonas stutzeri*. Microbiology and Molecular Biology Reviews. 70: 510-547.
- Lane, D.J. 1991. 16S/23S rRNA sequencing. In: Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics ed. Stackebrandt, E. and Goodfellow, M., pp. 115-175. Chichester, UK: Wiley.
- LaRoe, S.L., Wang, B., and Han, J.I. 2010. Isolation and characterization of a novel polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacterium, *Sphingopyxis* sp. strain M2R2, capable of passive spreading motility through soil. Environmental Engineering Science. 27: 505-512.
- Lattuada, R.M., Radtke, C., Peralba, M.C.R., Santos, J.H.Z.D. 2013. Rice husk: raw material in the catalyst preparation for advanced oxidative processes applied in the industrial effluent treatment and from acid drainage of a mine. Water Air and Soil Pollution. 224: 1396. DOI 10.1007/s11270-012-1396-x.
- Lease, C.W.M., Bentham, R.H., Gaskin, S.E., and Juhasz, A.L. 2011. Isolation and identification of pyrene mineralizing *Mycobacterium* spp. From contaminated and uncontaminated sources. Applied and Environmental Soil Science. 2011: 1-11.
- Leys, N.M., Bastiaens, L., Verstraete, W., and Springael, D. 2005a. Influence of the carbon/nitrogen/phosphorus ratio on polycyclic aromatic hydrocarbon degradation by *Mycobacterium* and *Sphingomonas* in soil. Applied Microbiology and Biotechnology. 66: 726-736.
- Leys, N.M., Ryngaert, A., Bastiaens, L., Verstraete, W., Top, E.M., and Springael, D. 2004. Occurrence and phylogenetic diversity of *Sphingomonas* strains in soils contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons. Applied and Environmental Microbiology. 70: 1944-1955.
- Leys, N.M., Ryngaert, A., Bastiaens, L., Wattiau, P., Top, E.M., Verstraete, W., and Springael, D. 2005b. Occurrence and community composition of fast-growing *Mycobacterium* in soils contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons. FEMS Microbiology Ecology. 51: 375-388.
- Li, B., Feng, C., Li, X., Chen, Y., Niu, J., and Shen, Z. 2012. Spatial distribution and source apportionment of PAHs in surficial sediments of the Yangtze Estuary, China. Marine Pollution Bulletin. 64: 636-643.
- Li, P., Wang, X., Stagnitti, F., Li, L., Gong, Z., Zhang, H., Xiong, X., and Austin, C. 2005. Degradation of phenanthrene and pyrene in soil slurry reactors with immobilized bacteria *Zoogloea* sp. Environmental Engineering Science. 22: 390-399.
- Li, Q.X., Fan, B.Q., Gong, M.B., and Yang, H. 2008. Isolation, identification of a pyrene degrading strain *Mycobacterium* sp. M11 and its degrading characteristics. Huan Jing Ke Xue. 29: 763-768.

- Li, Y., Wang, H., Hua, F., Su, M., and Zhao, Y. 2014. Trans-membrane transport of fluoranthene by *Rhodococcus* sp. BAP-1 and optimization of uptake process. Bioresource Technology. 155: 213-219.
- Liang, J.B., Chen, Y.Q., Lan, C.Y., Tam, N.F.Y., Zan, Q.J., and Huang, L.N. 2007. Recovery of novel bacterial diversity from mangrove sediment. Marine Biology. 150: 739-747.
- Liang, Q., and Lloyd-Jones, G. 2010. *Sphingobium scionense* sp. nov., an aromatic hydrocarbon-degrading bacterium isolated from contaminated sawmill soil. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 60: 413-416.
- Liang, Y., Zhang, X., Dai, D., and Li, G. 2009. Porous biocarrier-enhanced biodegradation of crude oil contaminated soil. International Biodeterioration and Biodegradation. 63: 80-87.
- Lily, M.K., Bahuguna, A., Dangwal, K., and Garg, V. 2009. Degradation of benzo[a]pyrene by a novel strain *Bacillus subtilis* BMT4i (MTCC 9447). Brazilian Journal of Microbiology. 40: 884-892.
- Lin, C.L., Shen, F.T., Tan, C.C., Huang, C.C., Chen, B.Y., Arun, A.B., and Young, C.C. 2012. Characterization of *Gordonia* sp. strain CC-NAPH129-6 capable of naphthalene degradation. Microbiological Research. 167: 395-404.
- Ling, J., Zhang, G., Sun, H., Fan, Y., Ju, J., and Zhang, C. 2011. Isolation and characterization of a novel pyrene-degrading *Bacillus vallismortis* strain JY3A. Science of the Total Environment. 409: 1994-2000.
- Liu, C., Wang, W., Wu, Y., Zhou, Z., Lai, Q., and Shao, Z. 2011a. Multiple alkane hydroxylase systems in a marine alkane degrader, *Alcanivorax dieselolei* B-5. Environmental Microbiology. 13: 1168-1178.
- Liu, H., Yang, C.Y., Tian, Y., Lin, G.H., and Zheng, T.L. 2010. Screening of PAH-degrading bacteria in a mangrove swamp using PCR-RFLP. Marine Pollution Bulletin. 60: 2056-2061.
- Liu, P.W.G., Chang, T.C., Whang, L.M., Kao, C.H., Pan, P.T., and Cheng, S.S. 2011b. Bioremediation of petroleum hydrocarbon contaminated soil: Effects of strategies and microbial community shift. International Biodeterioration and Biodegradation. 65: 1119-1127.
- Liu, S., Xia, X., Zhai, Y., Wang, R., Liu, T., and Zhang, S. 2011c. Black carbon (BC) in urban and surrounding rural soils of Beijing, China: Spatial distribution and relationship with polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). Chemosphere. 82: 223-228.
- Liu, T., Wang, F.H., Guo, L.P., Li, X.L., Yang, X.J., and Lin, A.J. 2012a. Biodegradation of *n*-hexadecane by bacterial strains B1 and B2 isolated from petroleum-contaminated soil. Science China Chemistry. 55: 1968-1975.
- Liu, Y.S., Zhang, J., and Zhang, Z.Z. 2004. Isolation and characterization of polycyclic aromatic hydrocarbons-degrading *Sphingomonas* sp. strain ZL5. Biodegradation. 15: 205-212.

- Liu, Z., Liu, J., Zhu, Q., and Wu, W. 2012b. The weathering of oil after the Deepwater Horizon oil spill: insights from the chemical composition of the oil from the sea surface, salt marshes and sediments. Environmental Research Letters. 7: 1-14.
- Liu, Z.P., Wang, B.J., Liu, Y.H., and Liu, S.J. 2005. *Novosphingobium taihuense* sp. nov., a novel aromatic-compound-degrading bacterium isolated from Taihu Lake, China. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 55: 1229-1232.
- Lovley, D.R. 2003. Cleaning up with genomics: Applying molecular biology to bioremediation. Nature Reviews Microbiology. 1: 35-44.
- Lozada, M., Mercadal, J.P.R., Guerrero, L.D., Marzio, W.D.D., Ferrero, M.A., and Dionisi, H.M. 2008. Novel aromatic ring-hydroxylating dioxygenase genes from coastal marine sediments of Patagonia. BMC Microbiology. 8: 1-13.
- Luo, X.J., Chen, S.J., Mai, B.X., Yang, Q.S., Sheng, G.Y., and Fu, J.M. 2006. Polycyclic aromatic hydrocarbons in suspended particulate matter and sediments from the Pearl River Estuary and adjacent coastal areas, China. Environmental Pollution. 139: 9-20.
- Luo, Y.R., Kang, S.G., Kim, S.J., Kim, M.R., Li, N., Lee, J.H., and Kwon, K.K. 2012a. Genome sequence of benzo(a)pyrene-degrading bacterium *Novosphingobium pentaromativorans* US6-1. Journal of Bacteriology. 194: 907.
- Luo, Y.R., Tian, Y., Huang, X., Kwon, K., Yang, S.H., Seo, H.S., Kim, S.J., and Zheng, T.L. 2012b. *Sphingomonas polyaromaticivorans* sp. nov., a polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacterium from an oil port water sample. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 62: 1223-1227.
- Ma, J., Xu, L., and Jia, L. 2013. Characterization of pyrene degradation by *Pseudomonas* sp. strain Jpyr-1 isolated from active sewage sludge. Bioresource Technology. 140: 15-21.
- Ma, Y., Wang, L., and Shao, Z. 2006. *Pseudomonas*, the dominant polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacteria isolated from Antarctic soils and the role of large plasmids in horizontal gene transfer. Environmental Microbiology. 8: 455-465.
- Maeda, A.H., Nishi, S., Ozeki, Y., Ohta, Y., Hatada, Y., and Kanaly, R.A. 2013. Draft genome sequence of *Sphingobium* sp. strain KK22, a high molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacterium isolated from Cattle Pasture soil. Genome Announcements. 1: 1-2.
- Maier, T., Förster, H.H., Asperger, O., and Hahn, U. 2001. Molecular Characterization of the 56-kDa CYP153 from *Acinetobacter* sp. EB104. Biochemical and Biophysical Research Communications. 286: 652-658.
- Makkar, R.S., and Rockne, K.J. 2003. Comparison of synthetic surfactants and biosurfactants in enhancing biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. Environmental Toxicology and Chemistry. 22: 2280-2292.

- Malik, S., Beer, M., Megharaj, M., and Naidu, R. 2008. The use of molecular techniques to characterize the microbial communities in contaminated soil and water. Environment International. 34: 265-276.
- Mallick, S., Chatterjee, S., and Dutta, T.K. 2007. A novel degradation pathway in the assimilation of phenanthrene by *Staphylococcus* sp. strain PN/Y via *meta*-cleavage of 2-hydroxy-1-naphthoic acid: formation of *trans*-2,3-dioxo-5-(29-hydroxyphenyl)-pent-4-enoic acid. Microbiology. 153: 2104-2115.
- Mangwani, N., Shukla, S.K., Rao, T.S., and Das, S. 2014. Calcium-mediated modulation of *Pseudomonas mendocina* NR802 biofilm influences the phenanthrene degradation. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces. 114: 301-309.
- Manohar, S., Kim, C., and Karegoudar, T. 2001. Enhanced degradation of naphthalene by immobilization of *Pseudomonas* sp. strain NGK1 in polyurethane foam. Applied Microbiology and Biotechnology. 55: 311-316.
- Maphosa, F., Lieten, S.H., Dinkla, I., Stams, A.J., Smidt, H., and Fennell, D.E. 2012. Ecogenomics of microbial communities in bioremediation of chlorinated contaminated sites. Frontiers in Microbiology. 3: 1-14.
- Mara, K., Decorosi, F., Viti, C., Giovannetti, L., Papaleo, M.C., Maida, I., Perrin, E., Fondi, M., Vaneechoutte, M., Nemeč, A., Barselaar, M., Dijkshoorn, L., and Fani, R. 2012. Molecular and phenotypic characterization of *Acinetobacter* strains able to degrade diesel fuel. Research in Microbiology. 163: 161-172.
- Maragakis, L.L., Chaiwarith, R., Srinivasan, A., Torriani, F.J., Avdic, E., Lee, A., Ross, T.R., Carroll, K.C., and Perl, T.M. 2009. *Sphingomonas paucimobilis* bloodstream infections associated with contaminated intravenous fentanyl. Emerging Infectious Diseases. 15: 12-19.
- Marcos, M.S., Lozada, M., Marzio, W.D.D., and Dionisi, H.M. 2012. Abundance, dynamics, and biogeographic distribution of seven polycyclic aromatic hydrocarbon dioxygenase gene variants in coastal sediments of Patagonia. Applied and Environmental Microbiology. 78: 1589-1592.
- McGowan, L., Herbert, R., and Muyzer, G. 2004. A comparative study of hydrocarbon degradation by *Marinobacter* sp., *Rhodococcus* sp. and *Corynebacterium* sp. isolated from different mat systems. Ophelia. 58: 271-281.
- Miller, C.D., Hall, K., Liang, Y.N., Nieman, K., Sorensen, D., Issa, B., Anderson, A.J., and Sims, R.C. 2004. Isolation and characterization of polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading *Mycobacterium* isolates from soil. Microbial Ecology. 48: 230-238.
- Ming, L.C., Rahim, R.A., Wan, H.Y., and Ariff, A.B. 2009. Formulation of protective agents for improvement of *Lactobacillus salivarius* I 24 survival rate subjected to freeze drying for

- production of live cells in powderized form. Food and Bioprocess Technology. 2: 431-436.
- Mishra, S., Jyot, J., Kuhad, R.C., and Lal, B. 2001. Evaluation of inoculum addition to stimulate in situ bioremediation of oily-sludge-contaminated soil. Applied and Environmental Microbiology. 67: 1675-1681.
- Mishra, S., and Singh, S.N. 2012. Microbial degradation of *n*-hexadecane in mineral salt medium as mediated by degradative enzymes. Bioresource Technology. 111: 148-154.
- Mohan, S.V., Kisa, T., Ohkuma, T., Kanaly, R.A., and Shimizu, Y. 2006. Bioremediation technologies for treatment of PAH-contaminated soil and strategies to enhance process efficiency. Reviews in Environmental Science and Biotechnology. 5: 347-374.
- Morgan, C.A., Herman, N., White, P.A., and Vesey, G. 2006. Preservation of microorganisms by drying: A review. Journal of Microbiological Methods. 66: 183-193.
- Muangchinda, C., Pansri, R., Wongwongsee, W., and Pinyakong, O. 2013. Assessment of polycyclic aromatic hydrocarbon biodegradation potential in mangrove sediment from Don Hoi Lot, Samut Songkram Province, Thailand. Journal of Applied Microbiology. 114: 1311-1324.
- Mulligan, C.N., and Yong, R.N. 2004. Natural attenuation of contaminated soils. Environment International. 30: 587-601.
- Mulligan, C.N., Yong, R.N., and Gibbs, B.F. 2001. Surfactant-enhanced remediation of contaminated soil: A review. Engineering Geology. 60: 371-380.
- Muyzer, G., De Waal, E.C., and Uitterlinden, A.G. 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. Applied and Environmental Microbiology. 59: 695-700.
- National Oceanic and Atmospheric Administration (NOAA), Planning and Response Considerations, Oil spills in mangroves, July 2010. Office of Response and Restoration, National Ocean Service, U.S. Department of Commerce, Silver Spring, MD, July 2010.
- Nayak, A.S., Vijaykumar, M.H., and Karegoudar, T.B. 2009. Characterization of biosurfactant produced by *Pseudoxanthomonas* sp. PNK-04 and its application in bioremediation. International Biodeterioration and Biodegradation. 63: 73-79.
- Neto, D.C., Meira, J.A., Tiburtius, E., Zamora, P.P., Bugay, C., Mitchell, D.A., and Krieger, N. 2009. Production of rhamnolipids in solid-state cultivation: Characterization, downstream processing and application in the cleaning of contaminated soils. Biotechnology Journal. 4: 748-755.
- Nie, M., Yin, X., Ren, C., Wang, Y., Xu, F., and Shen, Q. 2010. Novel rhamnolipid biosurfactants produced by a polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacterium *Pseudomonas aeruginosa* strain NY3. Biotechnology Advances. 28: 635-643.



- Niepceron, M., Martin-Laurent, F., Crampon, M., Portet-Koltalo, F., Akpa-Vinceslas, M., Legras, M., Bru, D., Bureau, F., and Bodilis, J. 2013. Gammaproteobacteria as a potential bioindicator of a multiple contamination by polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in agricultural soils. Environmental Pollution. 180: 199-205.
- Nojiri, H., Kamakura, M., Urata, M., Tanaka, T., Chung, J.S., Takemura, T., Yoshida, T., Habe, H., and Omori, T. 2002. Dioxin catabolic genes are dispersed on the *Terrabacter* sp. DBF63 genome. Biochemical and Biophysical Research Communications. 296: 233-240.
- Nojiri, H., Sekiguchi, H., Maeda, K., Urata, M., Nakai, S.I., Yoshida, T., Habe, H., and Omori, T. 2001. Genetic characterization and evolutionary implications of a *car* gene cluster in the carbazole degrader *Pseudomonas* sp. strain CA10. Journal of Bacteriology. 183: 3663-3679.
- Nolan, L.C., and O'Connor, K.E. 2013. Dioxygenase- and monooxygenase-catalysed synthesis of *cis*-dihydrodiols, catechols, epoxides and other oxygenated products. Biotechnology Letters. 30: 1879-1891.
- Nopcharoenkul, W., Netsakulnee, P., and Pinyakong, O. 2013. Diesel oil removal by immobilized *Pseudoxanthomonas* sp. RN402. Biodegradation. 24: 387-397.
- Nopcharoenkul, W., Pinphanichakarn, P., and Pinyakong, O. 2011. The development of a liquid formulation of *Pseudoxanthomonas* sp. RN402 and its application in the treatment of pyrene-contaminated soil. Journal of Applied Microbiology. 111: 36-47.
- Notomista, E., Pennacchio, F., Cafaro, V., Smaldone, G., Izzo, V., Troncone, L., Varcamonti, M., and Donato, A.D. 2011. The marine isolate *Novosphingobium* sp. PP1Y shows specific adaptation to use the aromatic fraction of fuels as the sole carbon and energy source. Environmental Microbiology. 61: 582-594.
- Obayori, O.S., Ilori, M.O., Adebuseye, S.A., Oyetibo, G.O., and Amund, O.O. 2008. Pyrene-degradation potentials of *Pseudomonas* species isolated from polluted tropical soils. World Journal of Microbiology and Biotechnology. 24: 2639-2646.
- Obayori, O.S., and Salam, L.B. 2010. Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons: Role of plasmids. Scientific Research and Essays. 5: 4093-4106.
- Obuekwe, C.O., and Al-Muttawa, E.M. 2001. Self-immobilized bacterial cultures with potential for application as ready-to-use seeds for petroleum bioremediation. Biotechnology Letters. 23: 1025-1032.
- Oliveira, F.J.S., Vazquez, L., Campos, N.P., and França, F.P. 2009. Production of rhamnolipids by a *Pseudomonas alcaligenes* strain. Process Biochemistry. 44: 383-389.
- Othman, N., Hussain, N., and Abdul-Talib, S. 2010. Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbon by pure strain isolated from municipal sludge: Synergistic and

- cometabolism phenomena. International Conference on Environment 2010 (ICENV 2010), December 13-15, 2010, Malaysia.
- Pagnout, C., Frache, G., Poupin, P., Maunit, B., Muller, J.F., and Férard, J.F. 2007. Isolation and characterization of a gene cluster involved in PAH degradation in *Mycobacterium* sp. strain SNP11: Expression in *Mycobacterium smegmatis* mc2155. Research in Microbiology. 158: 175-186.
- Palmfeldt, J., Radstrom, P., and Hahn-Hagerdal, B. 2003. Optimisation of initial cell concentration enhances freeze-drying tolerance of *Pseudomonas chlororaphis*. Cryobiology. 47: 21-29.
- Panicker, G., Mojib, N., Aislabie, J., and Bej, A.K. 2010. Detection, expression and quantitation of the biodegradative genes in Antarctic microorganisms using PCR. Antonie van Leeuwenhoek. 97: 275-287.
- Paraíba, L.C., Queiroz, S.C.N., Souza, D.R.C., and Saito, M.L. 2011. Risk simulation of soil contamination by polycyclic aromatic hydrocarbons from sewage sludge used as fertilizers. Journal of the Brazilian Chemical Society. 22: 1156-1163.
- Parellada, E.A., Ramos, A.N., Ferrero, M., Cartagena, E., Bardón, A., and Neske, A. 2012. Effect of the annonaceous acetogenins, squamocin and laherradurin, on the degradation of naphthalene mediated by *Pseudomonas plecoglossicida* J26. International Biodeterioration and Biodegradation. 72: 82-87.
- Park, Y.J., Ko, J.J., Yun, S.L., Lee, E.Y., Kim, S.J., Kang, S.W., Lee, B.C., and Kim, S.K. 2008. Enhancement of bioremediation by *Ralstonia* sp. HM-1 in sediment polluted by Cd and Zn. Bioresource Technology. 99: 7458-7463.
- Pasternak, K., Pasternak, A., Gupta, P., Veedu, R.N., and Wengel, J. 2011. Photoligation of self-assembled DNA constructs containing anthracene-functionalized 2'-amino-LNA monomers. Bioorganic and Medicinal Chemistry. 19: 7407-7415.
- Pei, X.H., Zhan, X.H., Wang, S.M., Lin, Y.S., and Zhou, L.X. 2010. Effects of a biosurfactant and a synthetic surfactant on phenanthrene degradation by a *Sphingomonas* strain. Pedosphere. 20: 771-779.
- Peixoto, R., Chaer, G.M., Carmo, F.L., Araújo, F.V., Paes, J.E., Volpon, A., Santiago, G.A., and Rosado, A.S., 2011. Bacterial communities reflect the spatial variation in pollutant levels in Brazilian mangrove sediment. Antonie van Leeuwenhoek. 99: 341-354.
- Pemmaraju, S.C., Sharma, D., Singh, N., Panwar, R., Cameotra, S.S., and Pruthi, V. 2012. Production of microbial surfactants from oily sludge-contaminated soil by *Bacillus subtilis* DSVP23. Applied Biochemistry and Biotechnology. 167: 1119-1131.
- Peng, R.H., Xiong, A.S., Xue, Y., Fu, X.Y., Gao, F., Zhao, W., Tian, Y.S., and Yao, Q.H. 2008. Microbial biodegradation of polyaromatic hydrocarbons. FEMS Microbiology Reviews. 32: 927-955.

- Perelo, L.W. 2010. Review: In situ and bioremediation of organic pollutants in aquatic sediments. Journal of Hazardous Materials. 177: 81-89.
- Ping, L., Zhang, C., Zhang, C., Zhu, Y., He, H., Wu, M., Tang, T., Li, Z., and Zhao, H. 2014. Isolation and characterization of pyrene and benzo[a]pyrene-degrading *Klebsiella pneumonia* PL1 and its potential use in bioremediation. Applied Microbiology and Biotechnology. DOI 10.1007/s00253-013-5469-6.
- Ping, L., Zhang, C., Zhu, Y., Wu, M., Hu, X., Li, Z., and Zhao, H. 2011. Biodegrading of pyrene by a newly isolated *Pseudomonas putida* PL2. Biotechnology and Bioprocess Engineering. 16: 1000-1008.
- Pinto, J., Cruz, D., Paiva, A., Pereira, S., Tavares, P., Fernandes, L., and Varum, H. 2012. Characterization of corn cob as a possible raw building material. Construction and Building Materials. 34: 28-33.
- Pinyakong, O., Habe, H., Kouzuma, A., Nojiri, H., Yamane, H., and Omori, T. 2004. Isolation and characterization of genes encoding polycyclic aromatic hydrocarbon dioxygenase from acenaphthene and acenaphthylene degrading *Sphingomonas* sp. strain A4. FEMS Microbiology Letters. 238: 297-305.
- Pinyakong, O., Habe, H., and Omori, T. 2003a. The unique aromatic catabolic genes in sphingomonads degrading polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). Journal of General and Applied Microbiology. 49: 1-19.
- Pinyakong, O., Habe, H., Yoshida, T., Nojiri, H., and Omori, T. 2003b. Identification of three novel salicylate 1-hydroxylases involved in the phenanthrene degradation of *Sphingobium* sp. strain P2. Biochemical and Biophysical Research Communications. 301: 350-357.
- Pinyakong, O., Tiangda, K., Iwata, K., and Omori, T. 2012. Isolation of novel phenanthrene-degrading bacteria from seawater and the influence of its physical factors on the degradation of phenanthrene. ScienceAsia. 38: 36-43.
- Pires, A.C.C., Cleary, D.F.R., Almeida, A., Cunha, A., Dealtry, S., Mendonça-Hagler, L.C.S., Smalla, K., and Gomes, N.C.M. 2012. Denaturing gradient gel electrophoresis and barcoded pyrosequencing reveal unprecedented archaeal diversity in mangrove sediment and rhizosphere samples. Applied and Environmental Microbiology. 78: 5520-5528.
- Plangklang, P., and Reungsang, A. 2009. Bioaugmentation of carbofuran residues in soil using *Burkholderia cepacia* PCL3 adsorbed on agricultural residues. International Biodeterioration and Biodegradation. 63: 515-522.
- Plaza, G.A., Ulfing, K., and Brigmon, R.L. 2005. Surface active properties of bacterial strains isolated from petroleum hydrocarbon-bioremediated soil. Polish Journal of Microbiology. 54: 161-167.

- Plohl, K., and Leskovšek, H. 2002. Biological degradation of motor oil in water. Acta Chimica Slovenica. 49: 279-289.
- Podorozhko, E.A., Lozinsky, V.I., Ivshina, I.B., Kuyukina, M.S., Krivorutchko, A.B., Philp, J.C., and Cunningham, C.J. 2008. Hydrophobised sawdust as a carrier for immobilisation of the hydrocarbon-oxidizing bacterium *Rhodococcus ruber*. Bioresource Technology. 99: 2001-2008.
- Prabhu, Y., and Phale, P.S. 2003. Biodegradation of phenanthrene by *Pseudomonas* sp. strain PP2: novel metabolic pathway, role of biosurfactant and cell surface hydrophobicity in hydrocarbon assimilation. Applied Microbiology and Biotechnology. 61: 342-351.
- Prince, R.C., and Douglas, G.S. 2010. Remediation of petrol and diesel in subsurface from petrol station leaks. Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology. 2597-2608.
- Pumijumng, N. 2014. Mangrove forests in Thailand. Mangrove Ecosystems of Asia. 61-79.
- Pušárová, A., Bučková, M., Chovanová, K., Harichová, J., Karellová, E., Godočíková, J., Polek, B., Ferienc, P., and Pangallo, D. 2013. Diversity and PAH growth abilities of bacterial strains isolated from a contaminated soil in Slovakia. Biologia. 68: 587-591.
- Rahman, R.N.Z.A., Ghazali, F.M., Salleh, A.B., and Basri, M. 2006. Biodegradation of hydrocarbon contamination by immobilized bacterial cells. The Journal of Microbiology. 44: 354-359.
- Raina, V., Suar, M., Singh, A., Prakash, O., Dadhwal, M., Gupta, S.K., Dogra, C., Lawlor, K., Lal, S., Meer, J.R., Holliger, C., and Lal, R. 2008. Enhanced biodegradation of hexachlorocyclohexane (HCH) in contaminated soils via inoculation with *Sphingobium indicum* B90A. Biodegradation. 19: 27-40.
- Ratanasuwanasri, W., Chanthamalee, J., Luepromchai, E. and Pinyakong, O. 2009. Biodegradation of lubricant oil by *Sphingobium* sp. P2 and its quantitative analysis in oil-in-water emulsion. Proceedings from the International Conference on Green and Sustainable Innovation, December 2-4, 2009, Chiang Rai.
- Reddy, M.S., Naresh, B., Leela, T., Prashanthi, M., Madhusudhan, N.C., Dhanasri, G., and Devi, P. 2010. Biodegradation of phenanthrene with biosurfactant production by a new strain of *Brevibacillus* sp. Bioresource Technology. 101: 7980-7983.
- Rehmann, R., Prpich, G.P., and Daugulis, A.J. 2008. Remediation of PAH contaminated soils: Application of a solid-liquid two-phase partitioning bioreactor. Chemosphere. 73: 798-804.
- Rivelli, V., Franzetti, A., Gandolfi, I., Cordoni, S., and Bestetti, G. 2013. Persistence and degrading activity of free and immobilized allochthonous bacteria during bioremediation of hydrocarbon-contaminated soils. Biodegradation. 24: 1-11.
- Rojo, F. 2009. Degradation of alkanes by bacteria. Environmental Microbiology. 11: 2477-2490.

- Romine, M.F., Stillwell, L.C., Wong, K.K., Thurston, S.J., Sisk, E.C., Sensen, C., Gaasterland, T., Fredrickson, J.K., and Saffer, J.D. 1999. Complete sequence of a 184-kilobase catabolic plasmid from *Sphingomonas aromaticivorans* F199. Journal of Bacteriology. 181: 1585-1602.
- Roy, M., Khara, P., and Dutta, T.K. 2012. *meta*-cleavage of hydroxynaphthoic acids in the degradation of phenanthrene by *Sphingobium* sp. strain PNB. Microbiology. 158: 685-695.
- Sagova-Mareckova, M., Omelka, M., Cermak, L., Kamenik, Z., Olsovska, J., Hackl, E., Kopecky, J., and Hadacek, F. 2011. Microbial communities show parallels at sites with distinct litter and soil characteristics. Applied and Environmental Microbiology. 77: 7560-7567.
- Sahoo, K., and Dhal, N.K. 2009. Potential microbial diversity in mangrove ecosystems: A review. Indian Journal of Marine Sciences. 38: 249-256.
- Salam, L.B., Obayori, O.S., and Olatoye, N.O. 2014. Biodegradation of anthracene by a novel actinomycete, *Microbacterium* sp. isolated from tropical hydrocarbon contaminated soil. World Journal of Microbiology and Biotechnology. 30: 335-341.
- Samaei, M.R., Mortazavi, S.B., Bakhshi, B., and Jafari, A.J. 2012. Isolation and characterization of bacteria degrading *n*-hexadecane from soil. International Conference on Biological and Life Sciences (IPCBE 2012), July 23-24, 2012, Singapore. 40: 132-135.
- Samanta, S.K., Singh, O.V., and Jain, R.K. 2002. Polycyclic aromatic hydrocarbons: environmental pollution and bioremediation. TRENDS in Biotechnology. 20: 243-248.
- Sambrook, J., and Russell, D.W. 2001. Molecular cloning: A laboratory manual. 3<sup>rd</sup> ed. cold spring harbor, New York: Cold Spring Laboratory Press.
- Santos, H.F., Carmo, F.L., Paes, J.E.S., Rosado, A.S., and Peixoto, R.S. 2011. Bioremediation of mangroves impacted by petroleum. Water, Air, and Soil Pollution. 216: 329-350.
- Sara, M.N., and Everett, L.G. 2001. Evaluation and remediation of low permeability and dual porosity environments. Reno, Nev, 2001.
- Sari, Y.W., Bruins, M.E., and Sanders, J.P.M. 2013. Enzyme assisted protein extraction from rapeseed, soybean, and microalgae meals. Industrial Crops and Products. 43: 78-83.
- Sarkar, D., Ferguson, M., Datta, R., and Birnbaum, S. 2005. Bioremediation of petroleum hydrocarbons in contaminated soils: Comparison of biosolids addition, carbon supplementation, and monitored natural attenuation. Environmental Pollution. 136: 187-195.
- Sayara, T., Borràs, E., Caminal, G., Sarrà, M., and Sánchez, A. 2011. Bioremediation of PAHs-contaminated soil through composting: Influence of bioaugmentation and biostimulation on contaminant biodegradation. International Biodeterioration and Biodegradation. 65: 859-865.

- Scheps, D., Malca, S.H., Hoffmann, H., Nestl, B.M., and Hauer, B. 2011. Regioselective  $\omega$ -hydroxylation of medium-chain *n*-alkanes and primary alcohols by CYP153 enzymes from *Mycobacterium marinum* and *Polaromonas* sp. strain JS666. Organic and Biomolecular Chemistry. 9: 6727-6733.
- Schmidberger, A., Henkel, M., Hausmann, R., and Schwartz, T. 2013. Expression of genes involved in rhamnolipid synthesis in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 in a bioreactor cultivation. Applied Microbiology and Biotechnology. 97: 5779-5791.
- Schuler, L., Chadhain, S.M.N., Jouanneau, Y., Meyer, C., Zylstra, G.J., Hols, P., and Agathos, S.N. 2008. Characterization of a novel angular dioxygenase from fluorene-degrading *Sphingomonas* sp. strain LB126. Applied and Environmental Microbiology. 74: 1050-1057.
- Schuler, L., Jouanneau, Y., Chadhain, S.M.I., Meyer, C., Pouli, M., Zylstra, G.J., Hols, P., and Agathos, S.N. 2009. Characterization of a ring-hydroxylating dioxygenase from phenanthrene-degrading *Sphingomonas* sp. strain LH128 able to oxidize benz[*a*]anthracene. Applied Microbiology and Biotechnology. 83: 465-475.
- Simple, K.T., Reid, B.J., and Fermor, T.R. 2001. Impact of composting strategies on the treatment of soils contaminated with organic pollutants. Environmental Pollution. 112: 269-283.
- Seo, J.S., Keum, Y.S., Harada, R.M., and Li, Q.X. 2007. Isolation and characterization of bacteria capable of degrading polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and organophosphorus pesticides from PAH contaminated soil in Hilo, Hawaii. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 55: 5383-5389.
- Seo, J.S., Keum, Y.S., Kim, K., and Li, Q.X. 2010. Degradation of pyrene by *Mycobacterium aromativorans* strain JS19b1. Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry. 53: 323-329.
- Sheng, X.F., He, L.Y., Zhou, L., and Shen, Y.Y. 2009. Characterization of *Microbacterium* sp. F10a and its role in polycyclic aromatic hydrocarbon removal in low temperature soil. Canadian Journal of Microbiology. 55: 529-535.
- Shi, T., Fredrickson, J.K., and Balkwill, D.L. 2001. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by *Sphingomonas* strains isolated from the terrestrial subsurface. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology. 26: 283-289.
- Sho, M., Hamel, C., and Greer, C.W. 2004. Two distinct gene clusters encode pyrene degradation in *Mycobacterium* sp. strain S65. FEMS Microbiology Ecology. 48: 209-220.
- Shuttleworth, K.L., Sung, J., Kim, E., and Cerniglia, C.E. 2000. Physiological and genetic comparison of two aromatic hydrocarbon-degrading *Sphingomonas* strains. Molecules and Cells. 10: 199-205.

- Simons, K.L., Ansar, A., Kadali, K., Bueti, A., Adetutu, E.M., and Ball, A.S. 2012. Investigating the effectiveness of economically sustainable carrier material complexes for marine oil remediation. Bioresource Technology. 126: 202-207.
- Singh, R., Paul, D., and Jain, R.K. 2006. Biofilms: implications in bioremediation. TRENDS in Microbiology. 14: 389-397.
- Singleton, D.R., Jones, M.D., Richardson, S.D., and Aitken, M.D. 2013. Pyrosequence analyses of bacterial communities during simulated in situ bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbon-contaminated soil. Applied Microbiology and Biotechnology. 97: 8381-8391.
- Singleton, D.R., Ramirez, L.G., and Aitken, M.D. 2009. Characterization of a polycyclic aromatic hydrocarbon degradation gene cluster in a phenanthrene-degrading *Acidovorax* strain. Applied and Environmental Microbiology. 75: 2613-2620.
- Sipilä, T.P., Väisänen, P., Paulin, L., and Yrjölä, K. 2010. *Sphingobium* sp. HV3 degrades both herbicides and polyaromatic hydrocarbons using *ortho*- and *meta*-pathways with differential expression shown by RT-PCR. Biodegradation. 21: 771-784.
- Smith, C.J., and Osborn, A.M. 2009. Advantages and limitations of quantitative PCR (Q-PCR)-based approaches in microbial ecology. FEMS Microbiology Ecology. 67: 6-20.
- Sohn, J.H., Kwon, K.K., Kang, J.H., Jung, H.B., and Kim, S.J. 2004. *Novosphingobium pentaromativorans* sp. nov., a high-molecular-mass polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacterium isolated from estuarine sediment. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 54: 1483-1487.
- Solano-Serena, F., Marchal, R., Heiss, S., and Vandecasteele, J.P. 2004. Degradation of isooctane by *Mycobacterium austroafricanum* IFP 2173: growth and catabolic pathway. Journal of Applied Microbiology. 97: 629-639.
- Sonal, B., and Reeta, K. 2013. Bioremediation: A sustainable tool for environmental management - A review. Annual Review and Research in Biology. 3: 974-993.
- Sopeña, F., Laiz, L., Morillo, E., Sanchez-Trujillo, M.A., Villaverde, J., Jurado, V., and Saiz-Jimenez, C. 2013. Phenanthrene biodegradation by *Pseudomonas xanthomarina* isolated from an aged contaminated soil. CLEAN-Soil, Air, Water. 41: 1-6.
- Sota, M., Yano, H., Ono, A., Miyazaki, R., Ishii, H., Genka, H., Top, E.M., and Tsuda, M. 2006. Genomic and functional analysis of the IncP-9 naphthalene-catabolic plasmid NAH7 and its transposon Tn4655 suggests catabolic gene spread by a tyrosine recombinase. Journal of Bacteriology. 188: 4057-4067.
- Souza, E.C., Vessoni-Penna, T.C., and Oliveira, R.P.S. 2014. Biosurfactant-enhanced hydrocarbon bioremediation: An overview. International Biodeterioration and Biodegradation. 89: 88-94.

- Sowada, J., Schmalenberger, A., Ebner, I., Luch, A., and Tralau, T. 2014. Degradation of benzo[*a*]pyrene by bacterial isolates from human skin. FEMs Microbiology Ecology. 88: 129-139.
- Stolz, A. 2009. Molecular characteristics of xenobiotic-degrading sphingomonads. Applied Microbiology and Biotechnology. 81: 793-811.
- Stolz, A. 2014. Degradative plasmids from sphingomonads. FEMs Microbiology Letters. 350: 9-19.
- Story, S.P., Kline, E.L., Hughes, T.A., Riley, M.B., and Hayasaka, S.S. 2004. Degradation of aromatic hydrocarbons by *Sphingomonas paucimobilis* strain EPA505. Archives of Environmental Contamination and Toxicology. 47: 168-176.
- Straube, W.L., Nestler, C.C., Hansen, L.D., Ringleberg, D., Pritchard, P.H., and Jones-Meehan, J. 2003. Remediation of polyaromatic hydrocarbons (PAHs) through landfarming with biostimulation and bioaugmentation. Acta Biotechnologica. 23: 179-196.
- Sud, D., Mahajan, G., and Kaur, M.P. 2008. Agricultural waste material as potential adsorbent for sequestering heavy metal ions from aqueous solutions - A review. Bioresource Technology. 99: 6017-6027.
- Sun, G.D., Xu, Y., Jin, J.H., Zhong, Z.P., Liu, Y., Luo, M., and Liu, Z.P. 2012. Pilot scale ex-situ bioremediation of heavily PAHs-contaminated soil by indigenous microorganisms and bioaugmentation by a PAHs-degrading and bioemulsifier-producing strain. Journal of Hazardous Materials. 233-234: 72-78.
- Sun, S., Guo, Z., Yang, R., Sheng, Z., and Cao, P. 2013. Analysis of microbial diversity in tomato paste wastewater through PCR-DGGE. Biotechnology and Bioprocess Engineering. 18: 111-118.
- Sutton, S. 2010. The most probable number method and its uses in enumeration, qualification, and validation. Journal of Validation Technology. 16: 35-38.
- Suzuki, S., and Hiraishi, A. 2007. *Novosphingobium naphthalenivorans* sp. nov., a naphthalene-degrading bacterium isolated from polychlorinated-dioxin-contaminated environments. Journal of General and Applied Microbiology. 53: 221-228.
- Taketani, R.G., Franco, N.O., Rosado, A.S., and Elsas, J.D. 2010. Microbial community response to a simulated hydrocarbon spill in mangrove sediments. The Journal of Microbiology. 48: 7-15.
- Takizawa, N., Iida, T., Sawada, T., Tamauchi, K., Wang, Y.W., Fukuda, M., and Kiyohara, H. 1999. Nucleotide sequences and characterization of genes encoding naphthalene upper pathway of *Pseudomonas aeruginosa* PaK1 and *Pseudomonas putida* OUS82. Journal of Bioscience and Bioengineering. 87: 721-731.



- Tambekar, D.H., Dose, P.N., Gunjekar, S.R., and Gadakh, P.V. 2012. Studies on biosurfactant production from Lonar lake's *Achromobacter xylosoxidans* bacterium. International Journal of Advances in Pharmacy, Biology and Chemistry. 1: 415-419.
- Tang, J., Zhu, W., Kookana, R., and Katayama, A. 2013. Characteristics of biochar and its application in remediation of contaminated soil. Journal of Bioscience and Bioengineering. 116: 653-659.
- Tang, Y.B., Yang, X., Chen, F.Y., Jiang, R.L., and Wang, X.G. 2011. Screening, identification and degrading gene assignment of a chrysene-degrading strain. African Journal of Biotechnology. 10: 6549-6557.
- Tao, X.Q., Lu, G.N., Dang, Z., Yang, C., and Yi, X.Y. 2007. A phenanthrene-degrading strain *Sphingomonas* sp. GY2B isolated from contaminated soils. Process Biochemistry. 42: 401-408.
- Tapi, A., Chollet-Imbert, M., Scherens, B. and Jacques, P. 2010. New approach for the detection of non-ribosomal peptide synthetase genes in *Bacillus* strains by polymerase chain reaction. Applied Microbiology and Biotechnology. 85: 1521-1531.
- Tay, M., Roizman, D., Cohen, Y., Tolker-Nielsen, T., Givskov, M., and Yang, L. 2014. Draft genome sequence of the model naphthalene-utilizing organism *Pseudomonas putida* OUS82. Genome Announcements. 2: 1.
- Teixeira, L.C.R.S., Peixoto, R.S., Cury, J.C., Sul, W.J., Pellizari, V.H., Tiedje, J., and Rosado, A.S. 2010. Bacterial diversity in rhizosphere soil from Antarctic vascular plants of Admiralty Bay, maritime Antarctica. The ISME Journal. 4: 989-1001.
- Teng, Y., Luo, Y., Sun, M., Liu, Z., Li, Z., and Christie, P. 2010. Effect of bioaugmentation by *Paracoccus* sp. strain HPD-2 on the soil microbial community and removal of polycyclic aromatic hydrocarbons from an aged contaminated soil. Bioresource Technology. 101: 3437-3443.
- Thapa, B., Kumar, A., and Ghimire, A. 2012. A review on bioremediation of petroleum hydrocarbon contaminants in soil. Kathmandu University Journal of Science, Engineering and Technology. 8: 164-170.
- Throne-Holst, M., Wentzel, A., Ellingsen, T.E., Kotlar, H.K., and Zotchev, S.B. 2007. Identification of novel genes involved in long-chain *n*-alkane degradation by *Acinetobacter* sp. strain DSM 17874. Applied and Environmental Microbiology. 73: 3327-3332.
- Tian, Y., Liu, H.J., Zheng, T.L., Kwon, K.K., Kim, S.J., and Yan, C.L. 2008. PAHs contamination and bacterial communities in mangrove surface sediments of the Jiulong River Estuary, China. Marine Pollution Bulletin. 57: 707-715.
- Tittabutr, P., Cho, I.K., and Li, Q.X. 2011. Phn and Nag-like dioxygenases metabolize polycyclic aromatic hydrocarbons in *Burkholderia* sp. C3. Biodegradation. 22: 1119-1133.

- Tiwari, J.N., Reddy, M.M.K., Patel, D.K., Jain, S.K., Murthy, R.C., and Manickam, N. 2010. Isolation of pyrene degrading *Achromobacter xylooxidans* and characterization of metabolic product. World Journal of Microbiology and Biotechnology. 26: 1727-1733.
- Toh, H.S., Tay, H.T., Kuar, W.K., Weng, T.C., Tang, H.J., and Tan, C.K. 2011. Risk factors associated with *Sphingomonas paucimobilis* infection. Journal of Microbiology, Immunology and Infection. 44: 289-295.
- Toledo, F.L., Gonzalez-Lopez, J., and Calvo, C. 2008. Production of bioemulsifier by *Bacillus subtilis*, *Alcaligenes faecalis* and *Enterobacter* species in liquid culture. Bioresource Technology. 99: 8470-8475.
- Tyagi, M., Fonseca, M.M.R., and Carvalho, C.C.C.R. 2011. Bioaugmentation and biostimulation strategies to improve the effectiveness of bioremediation processes. Biodegradation. 22: 231-241.
- United States Environmental Protection Agency (USEPA). Characteristics of spilled oils, fuels, and petroleum products: 1. Composition and properties of selected oils. July 2003. Office of Research and Development, North Carolina, July 2003.
- United States Environmental Protection Agency (USEPA). Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), January 2008. Office of Solid Waste, Washington, DC, January 2008.
- Uytendaele, M., Breugelmans, P., Janssen, M., Wattiau, P., Joffe, B., Karlson, U., Ortega-Calvo, J.J., Bastiaens, L., Ryngaert, A., Hausner, M., and Springael, D. 2006. Distribution of the *Mycobacterium* community and polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) among different size fractions of a long-term PAH-contaminated soil. Environmental Microbiology. 8: 836-847.
- Valiela, I., Bowen, J.L., and York, J.K. 2001. Mangrove forests: One of the world's threatened major tropical environments. BioScience. 51: 807-815.
- Venkatesh, N.M., and Vedaraman, N. 2012. Remediation of soil contaminated with copper using rhamnolipids produced from *Pseudomonas aeruginosa* MTCC 2297 using waste frying rice bran oil. Annals of Microbiology. 62: 85-91.
- Vila, J., and Grifoll, M. 2009. Actions of *Mycobacterium* sp. strain AP1 on the saturated and aromatic-hydrocarbon fractions of fuel oil in a marine medium. Applied and Environmental Microbiology. 75: 6232-6239.
- Villa, R.D., Trovó, A.G., and Nogueira, R.F.P. 2010. Diesel degradation in soil by fenton process. Journal of the Brazilian Chemical Society. 21: 1088-1095.
- Viñas, M., Sabaté, J., Espuny, M.J., and Solanas, A.M. 2005. Bacterial community dynamics and polycyclic aromatic hydrocarbon degradation during bioremediation of heavily creosote-contaminated soil. Applied and Environmental Microbiology. 71: 7008-7018.

- Vomberg, A., and Klinner, U. 2000. Distribution of *alkB* genes within *n*-alkane-degrading bacteria. Journal of Applied Microbiology. 89: 339-348.
- Wang, C., Wang, F., Hong, Q., Zhang, Y., Kengara, F.O., Li, Z., and Jiang, X. 2013. Isolation and characterization of a toxic metal-tolerant phenanthrene-degrader *Sphingobium* sp. in a two-liquid-phase partitioning bioreactor (TPPB). Environmental Earth Sciences. 70: 1765-1773.
- Wang, C., Yu, L., Zhang, Z., Wang, B., and Sun, H. 2014. Tourmaline combined with *Phanerochaete chrysosporium* to remediate agricultural soil contaminated with PAHs and OCPs. Journal of Hazardous Materials. 264: 439-448.
- Wang, L., Wang, W., Lai, Q., and Shao, Z. 2010a. Gene diversity of CYP153A and AlkB alkane hydroxylases in oil-degrading bacteria isolated from the Atlantic Ocean. Environmental Microbiology. 12: 1230-1242.
- Wang, S., Li, X., Liu, W., Li, P., Kong, L., Ren, W., Wu, H., and Tu, Y. 2012a. Degradation of pyrene by immobilized microorganisms in saline-alkaline soil. Journal of Environmental Sciences. 24: 1662-1669.
- Wang, S., Nomura, N., Nakajima, T., and Uchiyama, H. 2012b. Case study of the relationship between fungi and bacteria associated with high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbon degradation. Journal of Bioscience and Bioengineering. 113: 624-630.
- Wang, X.B., Chi, C.Q., Nie, Y., Tang, Y.Q., Tan, Y., Wu, G., and Wu, X.L. 2011. Degradation of petroleum hydrocarbons (C6–C40) and crude oil by a novel *Dietzia* strain. Bioresource Technology. 102: 7755-7761.
- Wang, Y., Li, P.H., Li, H.I., Liu, X.H., and Wang, W.X. 2010b. PAHs distribution in precipitation at Mount Taishan China. Identification of sources and meteorological influences. Atmospheric Research. 95: 1-7.
- Wang, Z., Chen, J., Yang, P., Qiao, X., and Tian, F. 2007. Polycyclic aromatic hydrocarbons in Dalian soils: distribution and toxicity assessment. Journal of Environmental Monitoring. 9: 199-204.
- Wattayakorn, G. 2012. Petroleum pollution in the Gulf of Thailand: A historical review. Coastal Marine Science. 35: 234-245.
- Whang, L.M., Liu, P.W., Ma, C.C., and Cheng, S.S. 2008. Application of biosurfactants, rhamnolipid, and surfactin, for enhanced biodegradation of diesel-contaminated water and soil. Journal of Hazardous Materials. 151: 155-163.
- White, D.A., Hird, L.C., and Ali, S.T. 2013. Production and characterization of a trehalolipid biosurfactant produced by the novel marine bacterium *Rhodococcus* sp., strain PML026. Journal of Applied Microbiology. 115: 744-755.

- Whyte, L.G., Schultz, A., Beilen, J.B., Luz, A.P., Pellizari, V., Labbe, D., and Greer, C.W. 2002. Prevalence of alkane monooxygenase genes in Arctic and Antarctic hydrocarbon-contaminated and pristine soils. FEMS Microbiology Ecology. 41: 141-150.
- Widada, J., Nojiri, H., Kasuga, K., Yoshida, T., Habe, H., and Omori, T. 2002a. Molecular detection and diversity of polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacteria isolated from geographically diverse sites. Applied Microbiology and Biotechnology. 58: 202-209.
- Widada, J., Nojiri, H., and Omori, T. 2002b. Recent developments in molecular techniques for identification and monitoring of xenobiotic-degrading bacteria and their catabolic genes in bioremediation. Applied Microbiology and Biotechnology. 60: 45-59.
- Willison, J.C. 2004. Isolation and characterization of a novel sphingomonad capable of growth with chrysene as sole carbon and energy source. FEMS Microbiology Letters. 241: 143-150.
- Willumsen, P., Karlson, U., Stackebrandt, E., and Kroppenstedt, R.M. 2001. *Mycobacterium frederiksbergense* sp. nov., a novel polycyclic aromatic hydrocarbon degrading *Mycobacterium* species. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 51: 1715-1722.
- Wrenn, B.A., and Venosa, A.D. 1996. Selective enumeration of aromatic and aliphatic hydrocarbon degrading bacteria by a most-probable-number procedure. Canadian Journal of Microbiology. 42: 252-258.
- Wu, Y., Luo, Y., Zou, D., Ni, J., Liu, W., Teng, Y., and Li, Z. 2008. Bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons contaminated soil with *Monilinia* sp.: degradation and microbial community analysis. Biodegradation. 19: 247-257.
- Wu, Y.L., Wang, X.H., Li, Y.Y., and Hong, H.S. 2011. Occurrence of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in seawater from the Western Taiwan Strait, China. Marine Pollution Bulletin. 63: 459-463.
- Xia, Y., Min, H., Rao, G., Lv, Z.M., Liu, J., Ye, Y.F., and Duan, X.J. 2005. Isolation and characterization of phenanthrene-degrading *Sphingomonas paucimobilis* strain ZX4. Biodegradation. 16: 393-402.
- Xu, H.X., Wu, H.Y., Qiu, Y.P., Shi, X.Q., He, G.H., Zhang, J.F., and Wu, J.C. 2011. Degradation of fluoranthene by a newly isolated strain of *Herbaspirillum chlorophenicum* from activated sludge. Biodegradation. 22: 335-345.
- Xu, Y., and Lu, M. 2010. Bioremediation of crude oil-contaminated soil: Comparison of different biostimulation and bioaugmentation treatments. Journal of Hazardous Materials. 183: 395-401.
- Yan, J., Wang, L., Fu, P.P., and Yu, H. 2004. Photomutagenicity of 16 polycyclic aromatic hydrocarbons from the US EPA priority pollutant list. Mutation Research. 557: 99-108.

- Yanagi, T., Sachoemar, S.I., Takao, T., and Fujiwara, S. 2001. Seasonal variation of stratification in the gulf of Thailand. Journal of Oceanography. 57: 461-470.
- Yang, Y., Zhang, N., Xue, M., and Tao, S. 2010. Impact of soil organic matter on the distribution of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in soils. Environmental Pollution. 158: 2170-2174.
- Yeon, S.M., and Kim, Y.C. 2011. Complete sequence and organization of the *Sphingobium chungbukense* DJ77 pSY2 plasmid. The Journal of Microbiology. 49: 684-688.
- Yuan, H., Yao, J., Masakorala, K., Wang, F., Cai, M., and Yu, C. 2013. Isolation and characterization of a newly isolated pyrene-degrading *Acinetobacter* strain USTB-X. Environmental Science and Pollution Research. 21: 2724-2732.
- Yuan, J., Lai, Q., Zheng, T., and Shao, Z. 2009. *Novosphingobium indicum* sp. nov., a polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacterium isolated from a deep-sea environment. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 59: 2084-2088.
- Yunker, M.B., Macdonald, R.W., Vingarzan, R., Mitchell, R.H., Goyette, D., and Sylvestre, S. 2002. PAHs in the Fraser River basin: a critical appraisal of PAH ratios as indicators of PAH source and composition. Organic Geochemistry. 33: 489-515.
- Zeng, J., Lin, X., Zhang, J., and Li, X. 2010. Isolation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs)-degrading *Mycobacterium* spp. and the degradation in soil. Journal of Hazardous Materials. 183: 718-723.
- Zevenhuizen, L.P. 1992. Levels of trehalose and glycogen in *Arthrobacter globiformis* under conditions of nutrient starvation and osmotic stress. Antonie Van Leeuwenhoek. 61: 61-68.
- Zhan, Y., Xu, Q., Yang, M.M., Yang, H.T., Liu, H.X., Wang, Y.P., and Guo, J.H. 2011. Screening of freeze-dried protective agents for the formulation of biocontrol strains, *Bacillus cereus* AR156, *Burkholderia vietnamiensis* B418 and *Pantoea agglomerans* 2Re40. Letters in Applied Microbiology. 54: 10-17.
- Zhang, C., and Anderson, A.J. 2012. Multiplicity of genes for aromatic ring-hydroxylating dioxygenases in *Mycobacterium* isolate KMS and their regulation. Biodegradation. 23: 585-596.
- Zhang, G.Y., Ling, J.Y., Sun, H.B., Luo, J., Fan, Y.Y., and Cui, Z.J. 2009. Isolation and characterization of a newly isolated polycyclic aromatic hydrocarbons-degrading *Janibacter anophelis* strain JY11. Journal of Hazardous Materials. 172: 580-586.
- Zhang, H., Sun, L., Sun, T., Li, H., and Luo, Q. 2013a. Spatial distribution and seasonal variation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) contaminations in surface water from the Hun River, Northeast China. Environmental Monitoring and Assessment. 185: 1451-1462.

- Zhang, Q., Wang, D., Li, M., Xiang, W.N., and Achal, V. 2014. Isolation and characterization of diesel degrading bacteria, *Sphingomonas* sp. and *Acinetobacter junii* from petroleum contaminated soil. Frontiers of Earth Science. 8: 58-63.
- Zhang, Y., Lu, Y., Xu, J., Yu, T., and Zhao, W. 2011a. Spatial distribution of polycyclic aromatic hydrocarbons from Lake Taihu, China. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology. 87: 80-85.
- Zhang, Y., Yang, R., Zhao, W., Hua, X., and Zhang, W. 2013b. Application of high density steam flash-explosion in protein extraction of soybean meal. Journal of Food Engineering. 116: 430-435.
- Zhang, Z., Hou, Z., Yang, C., Ma, C., Tao, F., and Xu, P. 2011b. Degradation of *n*-alkanes and polycyclic aromatic hydrocarbons in petroleum by a newly isolated *Pseudomonas aeruginosa* DQ8. Bioresource Technology. 102: 4111-4116.
- Zhao, H.P., Wang, L., Ren, J.R., Li, Z., Li, M., and Gao, H.W. 2008. Isolation and characterization of phenanthrene-degrading strains *Sphingomonas* sp. ZP1 and *Tistrella* sp. ZP5. Journal of Hazardous Materials. 152: 1293-1300.
- Zhao, Z., Selvam, A., and Wong, J.W.C. 2011a. Effects of rhamnolipids on cell surface hydrophobicity of PAH degrading bacteria and the biodegradation of phenanthrene. Bioresource Technology. 102: 3999-4007.
- Zhao, Z., Selvam, A., and Wong, J.W.C. 2011b. Synergistic effect of thermophilic temperature and biosurfactant produced by *Acinetobacter calcoaceticus* BU03 on the biodegradation of phenanthrene in bioslurry system. Journal of Hazardous Materials. 190: 345-350.
- Zhong, Y., Luan, T., Lin, L., Liu, H., and Tam, N.F.Y. 2011. Production of metabolites in the biodegradation of phenanthrene, fluoranthene and pyrene by the mixed culture of *Mycobacterium* sp. and *Sphingomonas* sp. Bioresource Technology. 102: 2965-2972.
- Zhong, Y., Luan, T., Wang, X., Lan, C., and Tam, N.F.Y. 2007. Influence of growth medium on cometabolic degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by *Sphingomonas* sp. strain PheB4. Applied Microbiology and Biotechnology. 75: 175-186.
- Zhou, H.W., Luan, T.G., Zou, F., and Tam, N.F.Y. 2008. Different bacterial groups for biodegradation of three- and four-ring PAHs isolated from a Hong Kong mangrove sediment. Journal of Hazardous Materials. 152: 1179-1185.
- Zhou, H.W., Wong, A.H.Y., Yu, R.M.K., Park, Y.D., Wong, Y.S., and Tam, N.F.Y. 2009. Polycyclic aromatic hydrocarbon-induced structural shift of bacterial communities in mangrove sediment. Microbial Ecology. 58: 153-160.
- Zhou, L., Li, H., Zhang, Y., Han, S., and Xu, H. 2013a. Development of genus-specific primers for better understanding the diversity and population structure of *Sphingomonas* in soils. Journal of Basic Microbiology. DOI 10.1002/jobm.201200679.

- Zhou, N.Y., Fuenmayor, S.L., and Williams, P.A. 2001. *nag* genes of *Ralstonia* (formerly *Pseudomonas*) sp. strain U2 encoding enzymes for gentisate catabolism. Journal of Bacteriology. 183: 700-708.
- Zhou, R., Huang, C., Zhang, A., Bell, S.G., Zhou, W., and Wong, L.L. 2011. Crystallization and preliminary X-ray analysis of CYP153C1 from *Novosphingobium aromaticivorans* DSM12444. Acta Crystallographica Section F. 67: 964-967.
- Zhou, Z., Liu, Z., and Guo, L. 2013b. Chemical evolution of Macondo crude oil during laboratory degradation as characterized by fluorescence EEMs and hydrocarbon composition. Marine Pollution Bulletin. 66: 164-175.



ภาคผนวก

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
CHULALONGKORN UNIVERSITY



### ภาคผนวก ก สูตรและวิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

#### อาหารเลี้ยงเชื้อปราศจากแหล่งคาร์บอน (Carbon Free Mineral Medium; CFMM)

##### สารละลายส่วนที่ 1

แอมโมเนียมไนเตรต ( $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ) 3 กรัม

โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) 2.2 กรัม

ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ ) 0.8 กรัม

ละลายสารทั้งหมดในน้ำกลั่น ปรับความเป็นกรด-ด่างด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ เข้มข้น 5 โมลาร์ จนมีค่าเท่ากับ 7 และปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 1,000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

อาหารเลี้ยงเชื้อแห้ง เตรียมโดยละลายแบคโตอะการ์ 15 กรัม ในอาหารเหลว 1,000 มิลลิลิตร ก่อนนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ

##### สารละลายส่วนที่ 2

แมกนีเซียมซัลเฟต ( $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) 0.1 กรัม/มิลลิลิตร

เฟอร์ริกคลอไรด์ ( $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ) 0.05 กรัม/มิลลิลิตร

แคลเซียมคลอไรด์ ( $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) 0.05 กรัม/มิลลิลิตร

กำจัดเชื้อโดยการกรองสารละลายแต่ละชนิดผ่านชุดกรองสำเร็จรูปเซลลูโลสอะซีเตท (CA) ขนาดรูกรอง 0.22 ไมโครเมตร แล้วเติมสารละลายส่วนที่ 2 ชนิดละ 1 มิลลิลิตร ลงในสารละลายส่วนที่ 1 ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร

#### อาหารเลี้ยงเชื้อ Luria-Bertani (LB)

ทริปโตเน (Tryptone) 10 กรัม

ผงสกัดจากยีสต์ (Yeast extract) 5 กรัม

โซเดียมคลอไรด์ ( $\text{NaCl}$ ) 5 กรัม

ละลายสารทั้งหมดในน้ำกลั่น ปรับความเป็นกรด-ด่างด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ เข้มข้น 5 โมลาร์ จนมีค่าเท่ากับ 7 และปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 1,000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

อาหารเลี้ยงเชื้อแห้ง เตรียมโดยละลายผงวุ้น 15 กรัม ในอาหารเหลว 1,000 มิลลิลิตร ก่อนนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ

#### อาหารเลี้ยงเชื้อ Luria-Bertani เจือจาง 4 เท่า (0.25X LB)

ผสมอาหารเหลว LB ปริมาตร 250 มิลลิลิตร และน้ำกลั่น ปริมาตร 750 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

### อาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับแบคทีเรียผลิตสารลดแรงตึงผิว

พอลิเปปไทด์ (Polypeptone)	10 กรัม
ผงสกัดจากยีสต์ (Yeast extract)	2 กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟต ( $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ )	1 กรัม

ละลายสารทั้งหมดในน้ำกลั่น ปรับความเป็นกรด-ด่างด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ เข้มข้น 5 โมลาร์ จนมีค่าเท่ากับ 7 และปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 1,000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

อาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง เตรียมโดยละลายผงวุ้น 15 กรัม ในอาหารเหลว 1,000 มิลลิลิตร ก่อนนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ

### อาหารเลี้ยงเชื้อ $\Psi$ b

ทริปโตเนอ (Tryptone)	20 กรัม
ผงสกัดจากยีสต์ (Yeast extract)	5 กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟต ( $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ )	5 กรัม

ละลายสารทั้งหมดในน้ำกลั่น ปรับความเป็นกรด-ด่างด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ เข้มข้น 5 โมลาร์ จนมีค่าเท่ากับ 7 และปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 1,000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

อาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง เตรียมโดยละลายแบคโตอะการ์ 15 กรัม ในอาหารเหลว 1,000 มิลลิลิตร ก่อนนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ

### อาหารเลี้ยงเชื้อ SOC

#### สารละลายส่วนที่ 1

ทริปโตเนอ (Tryptone)	20 กรัม
ผงสกัดจากยีสต์ (Yeast extract)	5 กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟต ( $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ )	2.46 กรัม
แมกนีเซียมคลอไรด์ ( $MgCl_2$ )	2 กรัม
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	0.58 กรัม
โพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl)	0.18 กรัม

ละลายสารทั้งหมดในน้ำกลั่น ปริมาตร 980 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

#### สารละลายส่วนที่ 2

กลูโคส ( $C_6H_{12}O_6$ )	3.6 กรัม
---------------------------	----------

ละลายสารในน้ำกลั่น ปริมาตร 20 มิลลิลิตร กำจัดเชื้อโดยกรองสารละลายแต่ละชนิดผ่านชุดกรองสำเร็จรูปเซลลูโลสอะซีเตท (CA) ขนาดรูกรอง 0.22 ไมโครเมตร แล้วผสมสารละลายส่วนที่ 2 ลงในสารละลายส่วนที่ 1 เก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

### ภาคผนวก ข สูตรและวิธีการเตรียมสารเคมี

#### สารละลาย PAH เข้มข้น 10,000 มิลลิกรัม/ลิตร (สำหรับเติมในอาหารเหลว CFMM)

PAH	500 มิลลิกรัม
ไดเมทิลฟอร์มมาไมด์ (Dimethylformamide)	50 มิลลิลิตร

ละลายสารในไดเมทิลฟอร์มมาไมด์จนสมบูรณ์ กำจัดเชื้อโดยกรองสารละลายผ่านชุดกรองสำเร็จรูปพอลิเตตระฟลูออโรเอทิลีน (PTFE) ขนาดรูกรอง 0.22 ไมโครเมตร เก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

#### สารละลาย PAH เข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ (สำหรับสำหรับพันทาบจานอาหารแข็ง CFMM)

PAH	200 มิลลิกรัม
ไดเอทิลอีเธอร์ (Diethylether)	10 มิลลิลิตร

#### สารละลายไพรีนเข้มข้น 5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร (สำหรับวิธี MPN)

ไพรีน	100 มิลลิกรัม
เฮกเซน (Hexane)	20 มิลลิลิตร

ละลายสารในเฮกเซนจนสมบูรณ์ กำจัดเชื้อโดยกรองสารละลายผ่านชุดกรองสำเร็จรูปพอลิเตตระฟลูออโรเอทิลีน (PTFE) ขนาดรูกรอง 0.22 ไมโครเมตร เก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

#### สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ เข้มข้น 5 โมลาร์

โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH)	20 กรัม
น้ำปลอดประจุ	100 มิลลิลิตร

ละลายสารในน้ำปลอดประจุ 70 มิลลิลิตร ในบีกเกอร์ที่มีแท่งกวนแม่เหล็ก จนสารเกิดการละลายสมบูรณ์ รอให้เย็นลง แล้วปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 100 มิลลิลิตร

#### สารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.85 เปอร์เซ็นต์

โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	8.5 กรัม
น้ำกลั่น	1,000 มิลลิลิตร

ละลายสารในน้ำกลั่น นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

#### สารละลายโซเดียมโดเดซิลซัลเฟต เข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์

โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต (SDS)	10 กรัม
น้ำปลอดประจุปราศจากเชื้อ	100 มิลลิลิตร

**สารละลาย Tris เข้มข้น 1 โมลาร์ pH 8.0**

Tris (tris[hydroxymethyl]aminomethane)	12.11 กรัม
น้ำปลอดประจุ	100 มิลลิลิตร

ละลายสารในน้ำปลอดประจุ 70 มิลลิลิตร ในบีกเกอร์ที่มีแท่งกวนแม่เหล็ก จนสารเกิดการละลายสมบูรณ์ ปรับความเป็นกรด-ด่างด้วยกรดไฮโดรคลอริกจนมีค่าเท่ากับ 8 และปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 100 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

**สารละลาย EDTA เข้มข้น 0.5 โมลาร์ pH 8.0**

EDTA (ethylenediamine tetraacetic acid disodium salt)	16.81 กรัม
น้ำปลอดประจุ	100 มิลลิลิตร

ละลายสารในน้ำปลอดประจุ 50 มิลลิลิตร ในบีกเกอร์ที่มีแท่งกวนแม่เหล็ก ปรับความเป็นกรด-ด่างด้วยเกลือโซเดียมไฮดรอกไซด์ จนมีค่าเท่ากับ 8 กวนจนสารเกิดการละลายสมบูรณ์ และปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 100 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

**สารละลาย Tris-EDTA (Tris-ethylenediaminetetraacetic acid; TE)**

สารละลาย Tris เข้มข้น 1 โมลาร์ pH 8.0	1.0 มิลลิลิตร
สารละลาย EDTA เข้มข้น 0.5 โมลาร์ pH 8.0	0.2 มิลลิลิตร
น้ำปลอดประจุ	98.8 มิลลิลิตร

ผสมสารทั้งหมดเข้าด้วยกัน นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

**สารละลายไลโซไซม์ เข้มข้น 60 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร**

ไลโซไซม์ (lysozyme)	60 มิลลิกรัม
สารละลาย TE	1 มิลลิลิตร

**สารละลายโปรตีนเนสเค เข้มข้น 10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร**

โปรตีนเนสเค (proteinase K)	10 มิลลิกรัม
น้ำปลอดประจุปราศจากเชื้อ	1 มิลลิลิตร

**สารละลายโซเดียมคลอไรด์ เข้มข้น 5 โมลาร์**

โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	29.22 กรัม
น้ำปลอดประจุ	100 มิลลิลิตร

ละลายสารในน้ำปลอดประจุ นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

### สารละลายเซทิลไตรเมทิลแอมโมเนียมโบรไมด์ในโซเดียมคลอไรด์ (CTAB/NaCl)

เซทิลไตรเมทิลแอมโมเนียมโบรไมด์ (CTAB)	10 กรัม
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	4.1 กรัม
น้ำปลอดประจุ	100 มิลลิลิตร

ละลายโซเดียมคลอไรด์ในน้ำปลอดประจุ 70 มิลลิลิตร ในบีกเกอร์ที่มีแท่งกวนแม่เหล็ก ให้ความร้อนพออุ่น แล้วค่อยๆละลาย CTAB ปริมาณสุดท้ายเป็น 100 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

### คลอโรฟอร์ม:ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ อัตราส่วน 24:1

คลอโรฟอร์ม	96 มิลลิลิตร
ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์	4 มิลลิลิตร

### ฟีนอล:คลอโรฟอร์ม อัตราส่วน 1:1

ฟีนอล	50 มิลลิลิตร
คลอโรฟอร์ม	50 มิลลิลิตร

### เอทานอล 70 เปอร์เซ็นต์

เอทานอล 99 เปอร์เซ็นต์	70 มิลลิลิตร
น้ำปลอดประจุ	30 มิลลิลิตร

### บัฟเฟอร์ Tris-acetate-EDTA เข้มข้น 50 เท่า (50X TAE)

Tris (tris[hydroxymethyl]aminomethane)	242 กรัม
กรดอะซิติก (glacial acetic acid)	57.1 มิลลิลิตร
สารละลาย EDTA เข้มข้น 0.5 โมลาร์ pH 8.0	100 มิลลิลิตร
น้ำปลอดประจุ	1,000 มิลลิลิตร

ละลาย Tris ในน้ำปลอดประจุ 600 มิลลิลิตร ในบีกเกอร์ที่มีแท่งกวนแม่เหล็ก จนสารเกิดการละลายสมบูรณ์ เติมกรดอะซิติกและสารละลาย EDTA ปริมาณสุดท้ายเป็น 1,000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

### บัฟเฟอร์ Tris-acetate-EDTA เข้มข้น 1 เท่า (1X TAE)

บัฟเฟอร์ 50X TAE	20 มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	980 มิลลิลิตร

### สารละลายเอธิเดียมโบรไมด์ (ethidium bromide) เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัม/ลิตร

เอธิเดียมโบรไมด์ เข้มข้น 10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร	10 ไมโครลิตร
น้ำกลั่น	200 มิลลิลิตร

**สารละลาย TfbI**

โพแทสเซียมอะซิเตท ( $\text{CH}_3\text{COOK}$ )	0.296 กรัม
รูบิเดียมคลอไรด์ (RbCl)	1.21 กรัม
แคลเซียมคลอไรด์ ( $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ )	0.148 กรัม
แมงกานีสคลอไรด์ ( $\text{MnCl}_2$ )	0.99 กรัม
กลีเซอรอล	15 มิลลิลิตร
น้ำปลอดประจุ	100 มิลลิลิตร

ละลายสารในน้ำปลอดประจุ 50 มิลลิลิตร ในบีกเกอร์ที่มีแท่งกวนแม่เหล็ก จนสารเกิดการละลายสมบูรณ์ ปรับความเป็นกรด-ด่างด้วยกรดอะซิติกจนมีค่าเท่ากับ 5.8 และปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 100 มิลลิลิตร กำจัดเชื้อโดยกรองผ่านชุดกรองสำเร็จรูปเซลลูโลสอะซิเตท (CA) ขนาดรูกรอง 0.22 ไมโครเมตร เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

**สารละลาย TfbII**

MES (2-[N-morpholino]ethanesulfonic acid)	0.29 กรัม
รูบิเดียมคลอไรด์ (RbCl)	0.121 กรัม
แคลเซียมคลอไรด์ ( $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ )	1.103 กรัม
กลีเซอรอล	15 มิลลิลิตร
น้ำปลอดประจุ	100 มิลลิลิตร

ละลายสารในน้ำปลอดประจุ 50 มิลลิลิตร ในบีกเกอร์ที่มีแท่งกวนแม่เหล็ก จนสารเกิดการละลายสมบูรณ์ ปรับความเป็นกรด-ด่างด้วยโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์จนมีค่าเท่ากับ 6.5 และปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 100 มิลลิลิตร กำจัดเชื้อโดยกรองผ่านชุดกรองสำเร็จรูปเซลลูโลสอะซิเตท (CA) ขนาดรูกรอง 0.22 ไมโครเมตร เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

**สารละลายแอมพิซิลลิน เข้มข้น 100 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร**

แอมพิซิลลิน (ampicillin)	100 มิลลิกรัม
น้ำปลอดประจุ	1 มิลลิลิตร

ละลายสารในน้ำปลอดประจุ กำจัดเชื้อโดยกรองสารละลายผ่านชุดกรองสำเร็จรูปเซลลูโลสอะซิเตท (CA) ขนาดรูกรอง 0.22 ไมโครเมตร เก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

**สารละลาย X-gal เข้มข้น 80 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร**

X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galactoside)	80 มิลลิกรัม
ไดเมทิลฟอร์มมาไมด์ (dimethylformamide)	1 มิลลิลิตร

ละลายสารในไดเมทิลฟอร์มมาไมด์ กำจัดเชื้อโดยกรองสารละลายผ่านชุดกรองสำเร็จรูปพอลิเตตระฟลูออโรเอทิลีน (PTFE) ขนาดรูกรอง 0.22 ไมโครเมตร เก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

**สารละลาย IPTG เข้มข้น 0.5 โมลาร์**

IPTG (isopropyl thio- $\beta$ -D-galactoside)	119 มิลลิกรัม
น้ำปลอดประจุ	1 มิลลิลิตร

ละลายสารในน้ำปลอดประจุ กำจัดเชื้อโดยกรองสารละลายผ่านชุดกรองสำเร็จรูป เซลลูโลสอะซีเตท (CA) ขนาดรูกรอง 0.22 ไมโครเมตร เก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

**บัฟเฟอร์ PUM (phosphate-urea-magnesium sulfate)**

ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ( $K_2HPO_4$ )	16.9 กรัม
โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต ( $KH_2PO_4$ )	7.3 กรัม
ยูเรีย ( $CH_4N_2O$ )	1.8 กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟต ( $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ )	0.2 กรัม
น้ำกลั่น	1,000 มิลลิลิตร

ละลายสารในน้ำกลั่น นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

**สารละลาย TritonX-100 เข้มข้น 15 เปอร์เซ็นต์**

TritonX-100	15 มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	85 มิลลิลิตร

**สารละลาย EDTA เข้มข้น 0.2 โมลาร์ pH 8.0**

สารละลาย EDTA เข้มข้น 0.5 โมลาร์ pH 8.0	400 ไมโครลิตร
น้ำปลอดประจุปราศจากเชื้อ	600 ไมโครลิตร

**สารละลายกรดไฮโดรคลอริก (HCl) เข้มข้น 0.2 โมลาร์**

กรดไฮโดรคลอริก เข้มข้น 1 โมลาร์	20 มิลลิลิตร
น้ำปลอดประจุ	80 มิลลิลิตร

**สารละลาย 20 เท่า SSC (20X SSC) pH 7.0**

ไตรโซเดียมซิเตรท ( $Na_3C_6H_5O_7$ )	77.418 กรัม
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	175.32 กรัม
น้ำปลอดประจุ	1,000 มิลลิลิตร

ละลายสารในน้ำปลอดประจุ 600 มิลลิลิตร จนสารเกิดการละลายสมบูรณ์ ปรับความเป็นกรด-ด่างด้วยกรดไฮโดรคลอริกจนมีค่าเท่ากับ 7 และปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 1,000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

**บัฟเฟอร์ denaturation pH 13.0**

โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH)	20 กรัม
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	87.66 กรัม
น้ำปลอดประจุ	1,000 มิลลิลิตร

ละลายสารในน้ำปลอดประจุ 600 มิลลิลิตร จนสารเกิดการละลายสมบูรณ์ ปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 1,000 มิลลิลิตร เก็บรักษาที่อุณหภูมิห้องได้นาน 3 เดือน

**บัฟเฟอร์ neutralization pH 7.0**

Tris (tris[hydroxymethyl]aminomethane)	60.57 กรัม
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	175.32 กรัม
น้ำปลอดประจุ	1,000 มิลลิลิตร

ละลายสารในน้ำปลอดประจุ 600 มิลลิลิตร จนสารเกิดการละลายสมบูรณ์ ปรับความเป็นกรด-ด่างด้วยกรดไฮโดรคลอริกจนมีค่าเท่ากับ 7 และปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 100 มิลลิลิตร เก็บรักษาที่อุณหภูมิห้องได้นาน 3 เดือน

**บัฟเฟอร์ hybridization (5X SSC/SDS)**

สารละลาย 20X SSC	250 มิลลิลิตร
สารละลาย SDS เข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์	2 มิลลิลิตร
สารละลาย Blocking solution	100 มิลลิลิตร
ลอโรอิลซาโคซิน (N-lauroylsarcosine)	1 กรัม
น้ำปลอดประจุ	1,000 มิลลิลิตร

ละลายลอโรอิลซาโคซินในน้ำปลอดประจุ 600 มิลลิลิตร จนสารเกิดการละลายสมบูรณ์ เติมสารละลายอีก 3 ชนิด ปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 1,000 มิลลิลิตร เก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

**สารละลาย 1X SSC/SDS**

สารละลาย 20X SSC	5 มิลลิลิตร
สารละลาย SDS เข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์	1 มิลลิลิตร
น้ำปลอดประจุ	94 มิลลิลิตร

**สารละลาย 0.1X SSC/SDS**

สารละลาย 20X SSC	0.5 มิลลิลิตร
สารละลาย SDS เข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์	1 มิลลิลิตร
น้ำปลอดประจุ	98.5 มิลลิลิตร



**สารละลาย NaOH/SDS**

สารละลาย NaOH เข้มข้น 5 โมลาร์	1 มิลลิลิตร
สารละลาย SDS เข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์	1 มิลลิลิตร
น้ำปลอดประจุ	98 มิลลิลิตร

**บัฟเฟอร์ SHB1 (maleic acid buffer) pH 7.5**

กรดมาเลอิก (C <sub>4</sub> H <sub>4</sub> O <sub>4</sub> )	11.607 กรัม
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	8.766 กรัม
น้ำปลอดประจุ	1,000 มิลลิลิตร

ละลายสารในน้ำปลอดประจุ 800 มิลลิลิตร จนสารเกิดการละลายสมบูรณ์ ปรับความเป็นกรด-ด่างด้วยเกลือโซเดียมไฮดรอกไซด์จนมีค่าเท่ากับ 7.5 และปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 1,000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

**บัฟเฟอร์ SHB2 (blocking solution)**

บัฟเฟอร์ SHB1	45 มิลลิลิตร
สารละลาย blocking solution	5 มิลลิลิตร

**บัฟเฟอร์ SHB3 (detection buffer) pH 9.5**

Tris (tris[hydroxymethyl]aminomethane)	12.114 กรัม
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	5.844 กรัม
น้ำปลอดประจุ	1,000 มิลลิลิตร

ละลายสารในน้ำปลอดประจุ 800 มิลลิลิตร จนสารเกิดการละลายสมบูรณ์ ปรับความเป็นกรด-ด่างด้วยกรดไฮโดรคลอริก เข้มข้น 1 โมลาร์ จนมีค่าเท่ากับ 9.5 และปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 1,000 มิลลิลิตร กำจัดเชื้อด้วยการกรอง เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

**สารละลาย blocking solution**

Blocking reagent	100 กรัม
บัฟเฟอร์ SHB1	1,000 มิลลิลิตร

**สารละลาย antibody solution**

บัฟเฟอร์ SHB1	45 มิลลิลิตร
สารละลาย blocking solution	5 มิลลิลิตร
Anti-Digoxigenin AP, Fab fragments	10 ไมโครลิตร

**สารละลาย antibody wash solution**

บัฟเฟอร์ SHB1	300	มิลลิลิตร
ทวิน 20 (tween20)	900	ไมโครลิตร

**สารละลาย color substrate solution**

บัฟเฟอร์ SHB3	20	มิลลิลิตร
NBT/BCIP stock solution	200	ไมโครลิตร

**บัฟเฟอร์ Tris-Borate-EDTA เข้มข้น 10 เท่า (10X TBE)**

Tris (tris[hydroxymethyl]aminomethane)	60.55	กรัม
กรดบอริก ( $H_3BO_3$ )	30	กรัม
สารละลาย EDTA เข้มข้น 0.5 โมลาร์ pH 8.0	40	มิลลิลิตร
น้ำปลอดประจุ	1,000	มิลลิลิตร

ละลายสารในน้ำปลอดประจุ 600 มิลลิลิตร ในบีกเกอร์ที่มีแท่งกวนแม่เหล็ก จนสารเกิดการละลายสมบูรณ์ เติมสารละลาย EDTA ปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 1,000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

**บัฟเฟอร์ Tris-Borate-EDTA เข้มข้น 0.5 เท่า (0.5X TBE)**

บัฟเฟอร์ 10X TBE	50	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	950	มิลลิลิตร

**น้ำปลอดประจุปราศจาก RNase (DEPC-treated water)**

สารละลายไดเอทิลไพโรคาร์บอเนต (DEPC)	1	มิลลิลิตร
น้ำปลอดประจุ	1000	มิลลิลิตร

ผสมสารละลายไดเอทิลไพโรคาร์บอเนตในน้ำปลอดประจุ ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลาข้ามคืน นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

**สารละลายยูเรีย (urea) เข้มข้น 7 โมลาร์**

ยูเรีย ( $CH_4N_2O$ )	42.042	กรัม
น้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร

**สารละลายแอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต (APS) เข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์**

แอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต ( $(NH_4)_2S_2O_8$ )	0.1	กรัม
น้ำปลอดประจุ	1	มิลลิลิตร

### สารละลายไอโอดีนไนโตรเตตระโซลียมคลอไรด์ (INT) เข้มข้น 15 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร

INT (iodonitrotetrazolium chloride) 150 มิลลิกรัม

ไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (dimethyl sulfoxide; DMSO) 10 มิลลิลิตร

ละลายสารในไดเมทิลซัลฟอกไซด์จนสมบูรณ์ กำจัดเชื้อโดยกรองสารละลายผ่านชุดกรองสำเร็จรูปพอลิเตตระฟลูออโรเอทิลีน (PTFE) ขนาดรูกรอง 0.22 ไมโครเมตร เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

### บัฟเฟอร์ MOPS เข้มข้น 10 เท่า (10X MOPS)

กรดเมอร์ฟอลีนโพรเพนซัลโฟนิค 41.85 กรัม

โซเดียมอะซิเตท ( $\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ) 5 กรัม

EDTA 2.92 กรัม

น้ำปลอดประจุ 1000 มิลลิลิตร

ละลายสารในน้ำปลอดประจุ 600 มิลลิลิตร ในขวดสีชาที่มีแท่งกวนแม่เหล็ก จนสารเกิดการละลายสมบูรณ์ ปรับความเป็นกรด-ด่างด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ เข้มข้น 5 โมลาร์ จนมีค่าเท่ากับ 7 และปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 1,000 มิลลิลิตร นำไปนิ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

### บัฟเฟอร์ MOPS เข้มข้น 1 เท่า (1X MOPS)

บัฟเฟอร์ 10X MOPS 100 มิลลิลิตร

น้ำกลั่น 900 มิลลิลิตร

### บัฟเฟอร์ running MOPS

สารละลายโบรมีนฟีนอลบลูเข้มข้น 16 ไมโครลิตร

สารละลาย EDTA เข้มข้น 0.5 โมลาร์ pH 8.0 80 ไมโครลิตร

ฟอร์มัลดีไฮด์ 720 ไมโครลิตร

กลีเซอรอล 100 เปอร์เซ็นต์ 2 มิลลิลิตร

ฟอร์มาไมด์ 3.084 มิลลิลิตร

บัฟเฟอร์ 10X MOPS 4 มิลลิลิตร

น้ำปลอดประจุปราศจาก RNase 100 ไมโครลิตร

ภาคผนวก ค ข้อมูลดิบต่างๆในการทดลองของแบคทีเรียที่คัดแยกได้

ค-1 ประสิทธิภาพการย่อยสลาย PAHs ชนิดต่างๆของแบคทีเรียที่คัดแยกได้

ตารางที่ ค-1 ข้อมูลดิบของประสิทธิภาพการย่อยสลาย PAHs ชนิดต่างๆของแบคทีเรียที่คัดแยกได้ วิเคราะห์โดย HPLC

PAHs	ประสิทธิภาพการย่อยสลาย PAHs ของแบคทีเรียที่คัดแยกได้ (%)				
	PCY	BPH	BPW	SSK1B	SSK4
แนฟทาลีน <sup>a</sup>	20.56±0.46	5.04±0.59	0.30±0.42	2.09±0.56	4.67±0.88
อะซีแนพทีน <sup>a</sup>	18.79±6.87	19.57±5.12	16.32±3.07	8.31±1.52	16.79±2.98
ฟลูออรีน <sup>b</sup>	49.22±6.08	21.51±4.53	22.61±1.86	4.68±1.00	15.38±0.01
แอนทราซีน <sup>b</sup>	42.73±6.29	32.44±4.96	27.29±3.97	10.49±0.78	12.17±1.09
พีแนนทรีน <sup>b</sup>	75.68±3.75	63.76±0.85	70.77±0.39	49.70±0.96	58.69±1.12
ฟลูออแรนทีน <sup>b</sup>	46.22±9.33	28.60±4.34	15.38±2.18	4.16±1.74	7.39±1.27
ไพรีน <sup>b</sup>	97.70±1.68	2.39±0.76	71.13±11.74	2.41±0.60	3.65±0.91
เบนโซ[เอ]ไพรีน <sup>c</sup>	11.08±0.91	0.60±0.42	10.03±4.49	0	1.21±1.01

a, b, c: ความเข้มข้นเริ่มต้น 1000, 100, 50 มิลลิกรัม/ลิตร ตามลำดับ; PCY: *Novosphingobium* sp. PCY; BPH: *Ralstonia* sp. BPH; BPW: *Microbacterium* sp. BPW; SSK1B: *Alcaligenes* sp. SSK1B; SSK4: *Achromobacter* sp. SSK4

ค-2 รูปแบบการเจริญและการย่อยสลายพีแนนทรีนและไพรีนของสายพันธุ์ PCY

ตารางที่ ค-2 ข้อมูลดิบของรูปแบบการเจริญและการย่อยสลายพีแนนทรีนของสายพันธุ์ PCY วิเคราะห์โดย HPLC

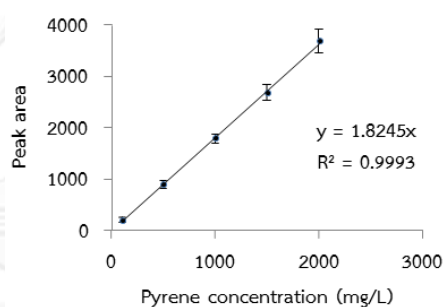
วันที่	จำนวนแบคทีเรีย (log CFU/มล.)		ปริมาณพีแนนทรีนที่เหลืออยู่ (%)	
	CFMM+PCY	CFMM+pyrene+PCY	CFMM+pyrene	CFMM+pyrene+PCY
0	6.35±0.09	6.40±0.03	99.97±7.12	99.97±7.12
3	6.38±0.06	6.38±0.12	100.00±2.26	89.90±2.40
6	6.24±0.10	6.29±0.08	100.00±1.70	92.75±2.47
9	6.30±0.08	6.45±0.08	97.70±0.99	88.00±0.00
12	6.10±0.07	6.56±0.10	98.90±3.39	88.00±1.41
15	5.74±0.12	7.34±0.04	99.00±0.42	26.55±20.01
18	5.69±0.10	7.15±0.02	75.10±0.00	4.90±1.05
21	5.83±0.05	7.29±0.10	89.70±4.81	0.47±0.32

ตารางที่ ค-3 ข้อมูลดิบของรูปแบบการเจริญและการย่อยสลายไพรีนของสายพันธุ์ PCY วิเคราะห์โดย HPLC

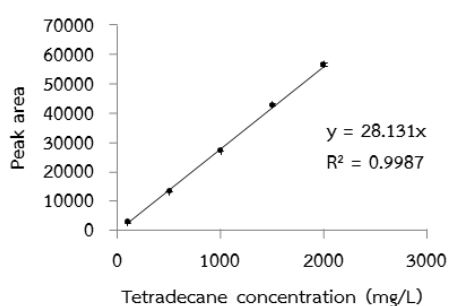
วันที่	จำนวนแบคทีเรีย (log CFU/มล.)		ปริมาณไพรีนที่เหลืออยู่ (%)	
	CFMM+PCY	CFMM+pyrene+PCY	CFMM+pyrene	CFMM+pyrene+PCY
0	6.35±0.08	6.42±0.03	100.00±3.97	100.00±3.97
3	6.38±0.06	6.48±0.12	100.03±7.20	98.40±1.84
6	6.24±0.10	6.58±0.08	99.97±2.74	81.07±10.57
9	6.30±0.07	7.14±0.08	92.65±0.78	14.83±3.01
12	6.10±0.05	7.23±0.10	99.97±2.29	8.20±0.46
15	5.74±0.12	7.08±0.04	99.95±0.78	1.83±0.49
18	5.69±0.10	6.98±0.02	97.70±4.10	0.41±0.01
21	5.83±0.05	7.03±0.10	89.85±5.73	0.28±0.17

ค-3 ประสิทธิภาพการย่อยสลายสารผสมของไพรีนและอะลิฟาติกของสายพันธุ์ PCY

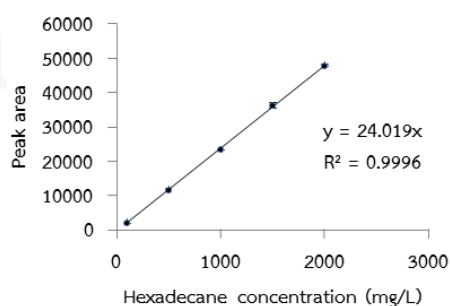
a) Pyrene standard



b) Tetradecane standard



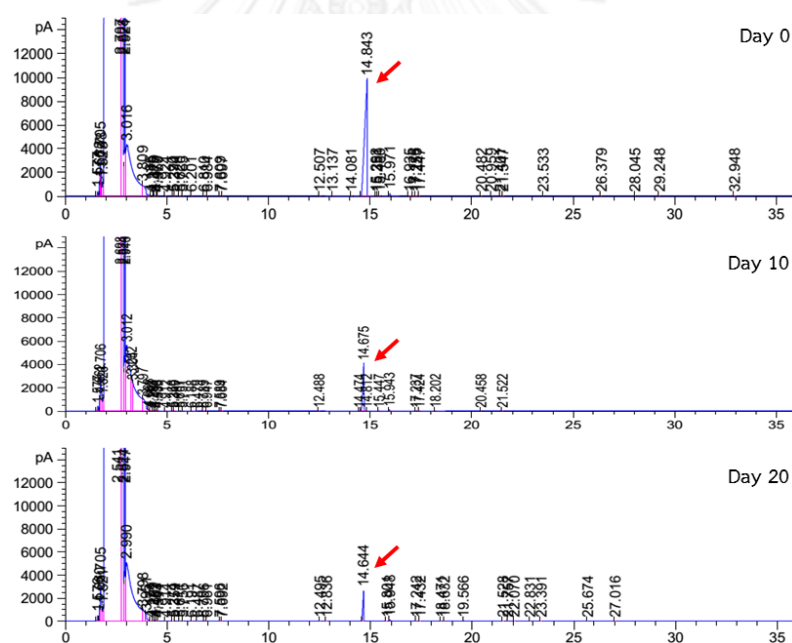
c) Hexadecane standard



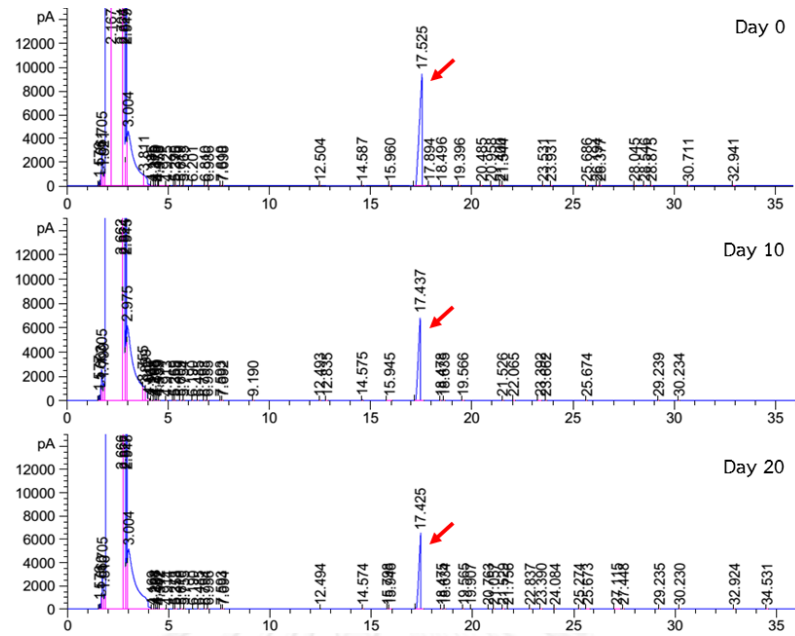
รูปที่ ค-1 กราฟมาตรฐานของสารละลายไพรีน (a) เตตระเดเคน (b) และเฮกซะเดเคน (c) วิเคราะห์โดย GC-FID (OIL method)

ตารางที่ ค-4 การคำนวณการนำกลับของสารจากอาหารเหลว วิเคราะห์โดย GC-FID

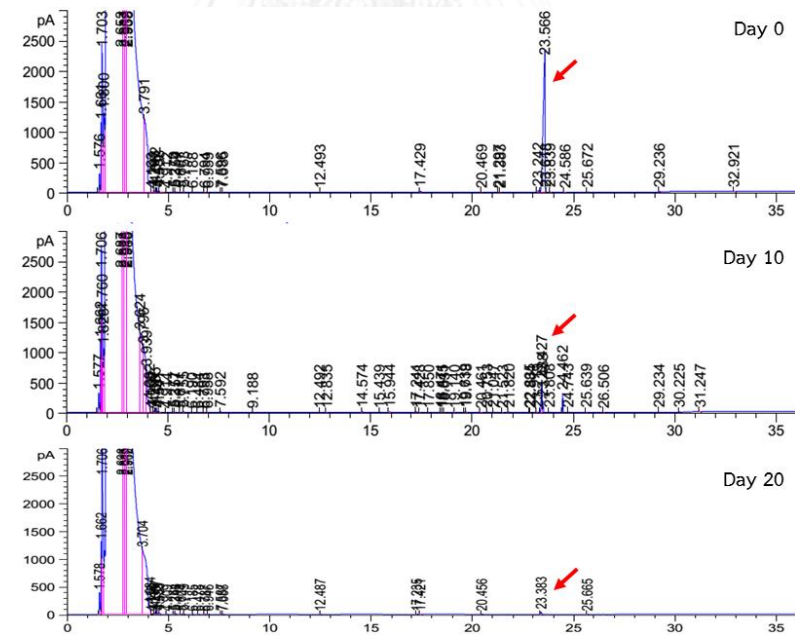
สาร	ความเข้มข้นเริ่มต้น (มก./ล.)	พื้นที่ใต้กราฟ	ความเข้มข้นที่ นำกลับ (มก./ล.)	การนำกลับของ สาร (%)
ไพรีน	100	175.498655	96.19	92.6 ± 7.9
		152.436975	83.55	
		178.728020	97.96	
เตตระเดเคน	1,000	26287.85688	934.48	84.3 ± 8.0
		22772.32581	809.51	
		22113.21648	786.08	
เฮกซะเดเคน	1,000	22623.01572	941.88	89.5 ± 5.4
		21789.31622	907.17	
		20093.57483	836.57	



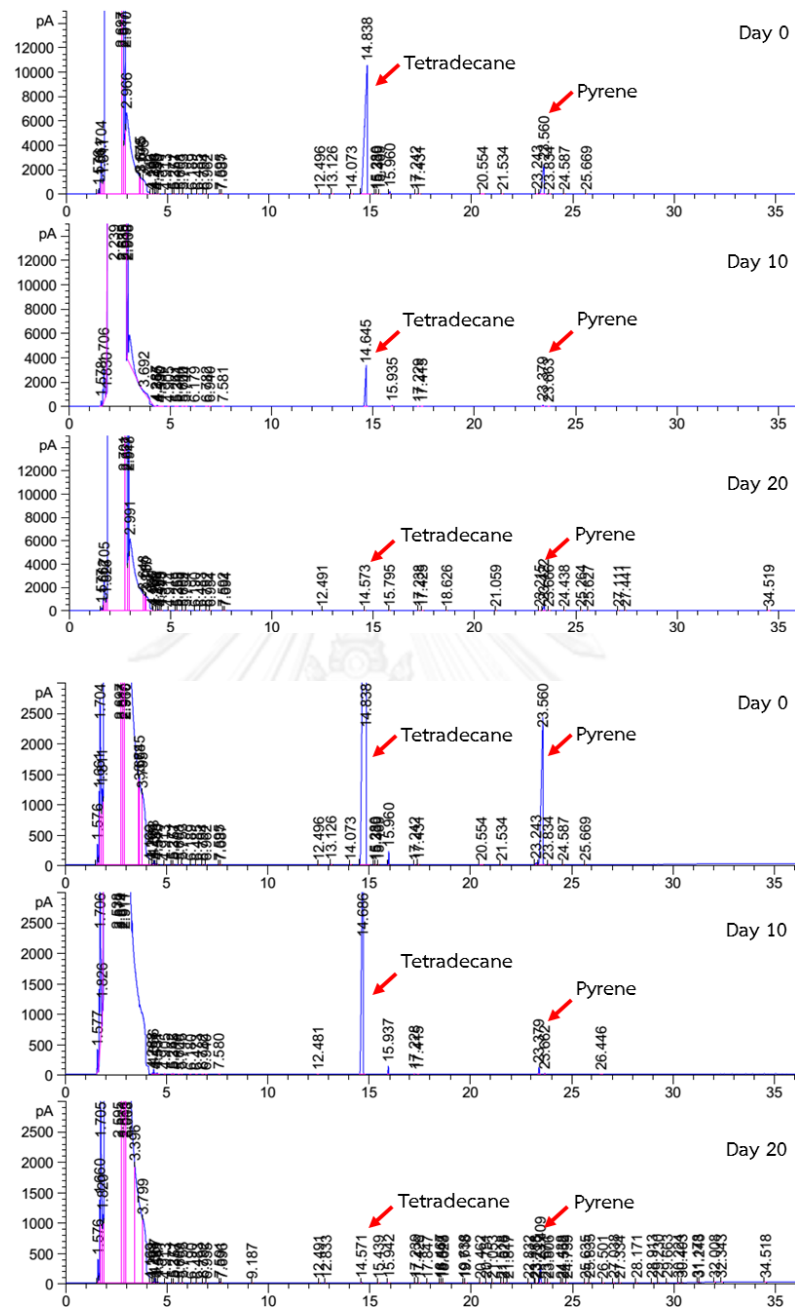
รูปที่ ค-2 โครมาโทแกรมของการย่อยสลายเตตระเดเคนของสายพันธุ์ PCY วิเคราะห์โดย GC-FID (OIL method)



รูปที่ ค-3 โครมาโทแกรมของการย่อยสลายเฮกซะเดคเคนของสายพันธุ์ PCY วิเคราะห์โดย GC-FID (OIL method)

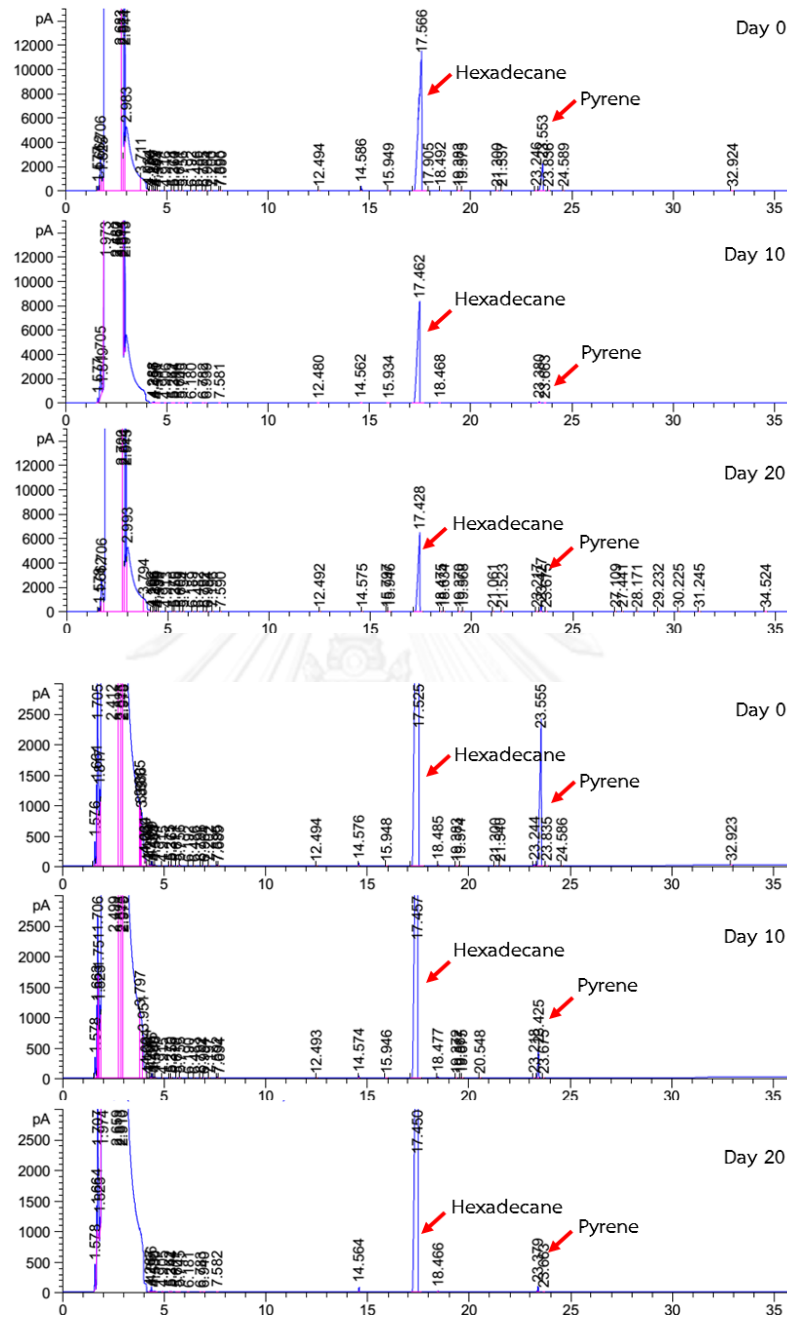


รูปที่ ค-4 โครมาโทแกรมของการย่อยสลายไฟรีนของสายพันธุ์ PCY วิเคราะห์โดย GC-FID (OIL method)



รูปที่ ค-5 โครมาโทแกรมของการย่อยสลายสารผสมของไพรีนและเตตระเดเคนของสายพันธุ์ PCY วิเคราะห์โดย GC-FID (OIL method)





รูปที่ ค-6 โครมาโทแกรมของการย่อยสลายสารผสมของไพรีนและเฮกซะเดเคนของสายพันธุ์ PCY วิเคราะห์โดย GC-FID (OIL method)

ภาคผนวก ง ข้อมูลดิบต่างๆในการทดลองของแบคทีเรียอัดเม็ด

ง-1 ประสิทธิภาพการกำจัดไพรินของแบคทีเรียอัดเม็ดสายพันธุ์ PCY

ตารางที่ ง-1 ข้อมูลดิบของจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดในแบคทีเรียอัดเม็ดสายพันธุ์ PCY

สูตรอัดเม็ด	จำนวนแบคทีเรียทั้งหมด (log MPN/ก.)	
	GM	GB
กากถั่วเหลือง:แป้งข้าวเหนียว		
1:1	6.88±0.20	7.24±0.44
3:1	6.38±0.00	7.28±0.24
ซังข้าวโพด:แป้งข้าวเหนียว		
1:1	4.95±0.46	7.45±0.24
3:1	3.75±0.45	5.66±0.26

GM: วัสดุอัดเม็ด (ไม่เติมสายพันธุ์ PCY); GB: แบคทีเรียอัดเม็ด (เติมสายพันธุ์ PCY)

ตารางที่ ง-2 ข้อมูลดิบปริมาณไพรินที่เหลืออยู่ในการกำจัดไพรินของแบคทีเรียอัดเม็ดสายพันธุ์ PCY วิเคราะห์โดย GC-FID

สูตรอัดเม็ด	ปริมาณไพรินที่เหลืออยู่ในอาหารเหลว (%)			
	abiotic	sterile GM	GM	GB
ซังข้าวโพด:แป้งข้าวเหนียว				
1:1	100.0±0.8	86.9±8.1	54.4±2.2	12.5±0.0
3:1	100.0±0.8	86.7±6.0	55.6±3.1	24.0±0.4

ง-2 สารปกป้องเซลล์สำหรับแบคทีเรียอัดเม็ดสายพันธุ์ PCY

ตารางที่ ง-3 ข้อมูลดิบของจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดและจำนวนแบคทีเรียย่อยสลายไพรินในแบคทีเรียอัดเม็ดสายพันธุ์ PCY ที่ผลิตโดยแปรผันชนิดของสารปกป้องเซลล์

สารปกป้องเซลล์	เวลา (สัปดาห์)	จำนวนแบคทีเรียทั้งหมดใน GB (log MPN/ก.)	จำนวนแบคทีเรียย่อยสลายไพรินใน GB (log MPN/ก.)
กลูโคส 5%	0	10.18±0.12	7.18±0.30
	1	8.86±0.07	5.86±0.02
	2	8.10±0.07	5.10±0.15
กลูโคส 10%	0	9.89±0.19	7.39±0.59
	1	8.99±0.20	5.99±0.28
	2	8.39±0.20	5.39±0.15

ตารางที่ ง-3 (ต่อ)

สารปกป้องเซลล์	เวลา (สัปดาห์)	จำนวนแบคทีเรียทั้งหมดใน GB (log MPN/ก.)	จำนวนแบคทีเรียย่อยสลายไพลิน ใน GB (log MPN/ก.)
ซูโครส 5%	0	9.89±0.23	7.89±0.03
	1	8.89±0.30	6.89±0.34
	2	8.73±0.21	6.73±0.02
ซูโครส 10%	0	9.59±0.56	7.89±0.48
	1	9.15±0.20	7.15±0.02
	2	8.94±0.07	6.94±0.06
ทรีฮาโลส 5%	0	9.82±0.05	7.82±0.10
	1	8.48±0.11	6.48±0.03
	2	7.95±0.14	5.95±0.02
ทรีฮาโลส 10%	0	9.99±0.13	7.99±0.07
	1	8.40±0.25	7.40±0.21
	2	8.12±0.37	6.12±0.06
กลีเซอรอล 5%	0	10.01±0.25	8.01±0.06
	1	7.82±0.11	5.82±0.31
	2	7.29±0.16	5.29±0.02
กลีเซอรอล 10%	0	9.68±0.36	7.68±0.11
	1	7.19±0.24	6.39±0.12
	2	6.75±0.25	5.75±0.10
นมผงขาดมันเนย 5%	0	9.96±0.17	7.96±0.25
	1	7.55±0.07	5.55±0.06
	2	6.62±0.13	3.62±0.05
นมผงขาดมันเนย 10%	0	9.58±0.00	7.58±0.25
	1	7.82±0.07	4.82±0.17
	2	5.99±0.11	3.99±0.10
ไม่เติมสารปกป้อง เซลล์	0	9.93±0.07	7.93±0.56
	1	6.20±0.00	4.20±0.07
	2	5.48±0.04	1.48±0.08

### ง-3 การเก็บรักษาแบคทีเรียอัดเม็ดสายพันธุ์ PCY

ตารางที่ ง-4 ข้อมูลดิบของจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดและการกำจัดไพรินของแบคทีเรียอัดเม็ดสายพันธุ์ PCY ระหว่างการเก็บรักษาระยะสั้น (ไม่เติมสารปกป้องเซลล์)

เวลา (สัปดาห์)	ชนิดของเม็ด	จำนวนแบคทีเรียทั้งหมด (MPN/ก.)	การกำจัดไพริน (%)
0	GM	$1.74 \times 10^7$	25.61±3.23
	GB	$3.00 \times 10^7$	97.41±8.13
4	GM-4-air	$4.20 \times 10^3$	23.39±3.11
	GB-4-air	$1.32 \times 10^4$	37.88±6.01
	GM-RT-air	$3.45 \times 10^3$	21.53±2.86
	GB-RT-air	$2.15 \times 10^3$	46.28±4.17

ตารางที่ ง-5 ข้อมูลดิบของจำนวนแบคทีเรียและการกำจัดไพรินของแบคทีเรียอัดเม็ดสายพันธุ์ PCY ระหว่างการเก็บรักษาระยะยาว (เติมสารปกป้องเซลล์)

เวลา (สัปดาห์)	ชนิดของเม็ด	จำนวนแบคทีเรียทั้งหมด (MPN/ก.)	จำนวนแบคทีเรียย่อยสลายไพริน (MPN/ก.)	การกำจัดไพริน (%)
0	GM	3.86±0.19	1.08±0.06	33.59±1.99
	GB	6.36±0.00	5.88±0.08	87.77±0.27
1	GM-4-air	3.59±0.40	0.90±0.06	32.39±7.22
	GB-4-air	6.36±0.00	6.33±0.23	88.86±0.35
	GM-4-no air	3.63±0.00	1.15±0.17	34.71±3.72
	GB-4-no air	6.37±0.03	6.08±0.17	89.35±0.40
	GM-RT-air	4.81±0.16	1.33±0.23	36.56±3.92
	GB-RT-air	6.54±0.17	6.39±0.07	89.18±0.22
	GM-RT-no air	4.07±0.17	1.25±0.13	34.54±2.88
	GB-RT-no air	6.10±0.12	5.88±0.08	89.29±0.35
2	GM-4-air	4.24±0.24	1.13±0.08	36.42±5.50
	GB-4-air	6.61±0.26	6.13±0.08	89.39±0.50
	GM-4-no air	4.07±0.17	1.04±0.00	39.01±5.49
	GB-4-no air	6.13±0.16	6.03±0.02	89.57±0.45
	GM-RT-air	4.93±0.27	1.37±0.16	32.02±1.61
	GB-RT-air	6.51±0.38	5.87±0.18	87.49±0.85
	GM-RT-no air	3.94±0.05	1.22±0.08	37.39±2.41
	GB-RT-no air	6.09±0.22	5.38±0.19	87.50±0.96

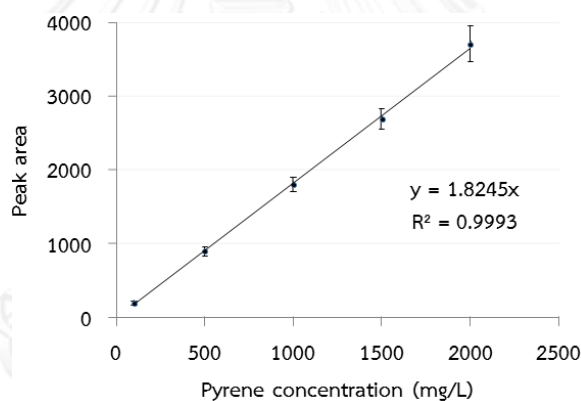
ตารางที่ ง-5 (ต่อ)

เวลา (สัปดาห์)	ชนิดของเม็ด	จำนวนแบคทีเรีย ทั้งหมด (MPN/ก.)	จำนวนแบคทีเรียย่อย สลายไฟรีน (MPN/ก.)	การกำจัดไฟรีน (%)
4	GM-4-air	4.22±0.08	1.08±0.06	36.41±5.09
	GB-4-air	6.28±0.16	5.17±0.20	73.16±0.89
	GM-4-no air	4.37±0.16	1.05±0.02	38.08±3.39
	GB-4-no air	6.03±0.06	5.18±0.14	73.96±0.39
	GM-RT-air	5.13±0.08	1.33±0.03	35.98±3.08
	GB-RT-air	6.32±0.08	4.65±0.14	56.23±1.19
	GM-RT-no air	4.04±0.00	1.27±0.06	33.06±3.39
	GB-RT-no air	5.86±0.09	4.38±0.06	48.12±2.63
6	GM-4-air	4.12±0.07	0.97±0.01	37.38±4.65
	GB-4-air	5.24±0.07	4.04±0.06	56.39±1.07
	GM-4-no air	3.97±0.01	0.97±0.00	35.46±5.64
	GB-4-no air	5.15±0.06	4.15±0.07	66.18±2.43
	GM-RT-air	4.02±0.04	0.79±0.00	26.09±5.20
	GB-RT-air	4.28±0.06	3.40±0.07	39.24±1.45
	GM-RT-no air	3.85±0.04	0.81±0.04	38.10±2.01
	GB-RT-no air	4.48±0.05	3.27±0.08	38.60±2.69
8	GM-4-air	3.62±0.04	0.87±0.01	36.51±4.99
	GB-4-air	5.21±0.08	3.83±0.04	55.64±2.64
	GM-4-no air	3.56±0.02	0.90±0.05	32.77±3.74
	GB-4-no air	5.08±0.06	3.96±0.08	66.01±1.16
	GM-RT-air	3.64±0.02	0.59±0.06	26.68±1.61
	GB-RT-air	3.28±0.06	1.05±0.09	29.40±0.99
	GM-RT-no air	3.48±0.00	0.53±0.04	34.14±1.42
	GB-RT-no air	3.48±0.05	1.17±0.03	34.54±2.62
10	GM-4-air	3.17±0.03	0.84±0.04	26.51±3.39
	GB-4-air	4.90±0.06	3.52±0.05	43.33±1.59
	GM-4-no air	3.18±0.02	0.89±0.06	30.01±8.68
	GB-4-no air	4.97±0.00	3.61±0.06	44.63±4.75
	GM-RT-air	3.15±0.07	0.53±0.04	24.39±1.78
	GB-RT-air	3.09±0.08	0.90±0.05	27.29±2.93
	GM-RT-no air	3.15±0.06	0.48±0.00	31.42±1.83
	GB-RT-no air	3.25±0.09	1.01±0.04	27.05±2.00

ตารางที่ ง-5 (ต่อ)

เวลา (สัปดาห์)	ชนิดของเม็ด	จำนวนแบคทีเรีย ทั้งหมด (MPN/ก.)	จำนวนแบคทีเรียย่อย สลายไพรีน (MPN/ก.)	การกำจัดไพรีน (%)
12	GM-4-air	3.05±0.02	0.79±0.00	25.66±3.26
	GB-4-air	3.50±0.04	1.93±0.06	34.61±0.95
	GM-4-no air	3.04±0.00	0.82±0.04	26.81±2.94
	GB-4-no air	3.84±0.04	2.10±0.07	33.79±3.25
	GM-RT-air	2.81±0.04	0.48±0.00	26.06±7.11
	GB-RT-air	2.87±0.08	0.86±0.01	29.69±2.40
	GM-RT-no air	3.07±0.02	0.48±0.00	26.44±4.41
	GB-RT-no air	3.14±0.09	0.97±0.01	29.27±5.16

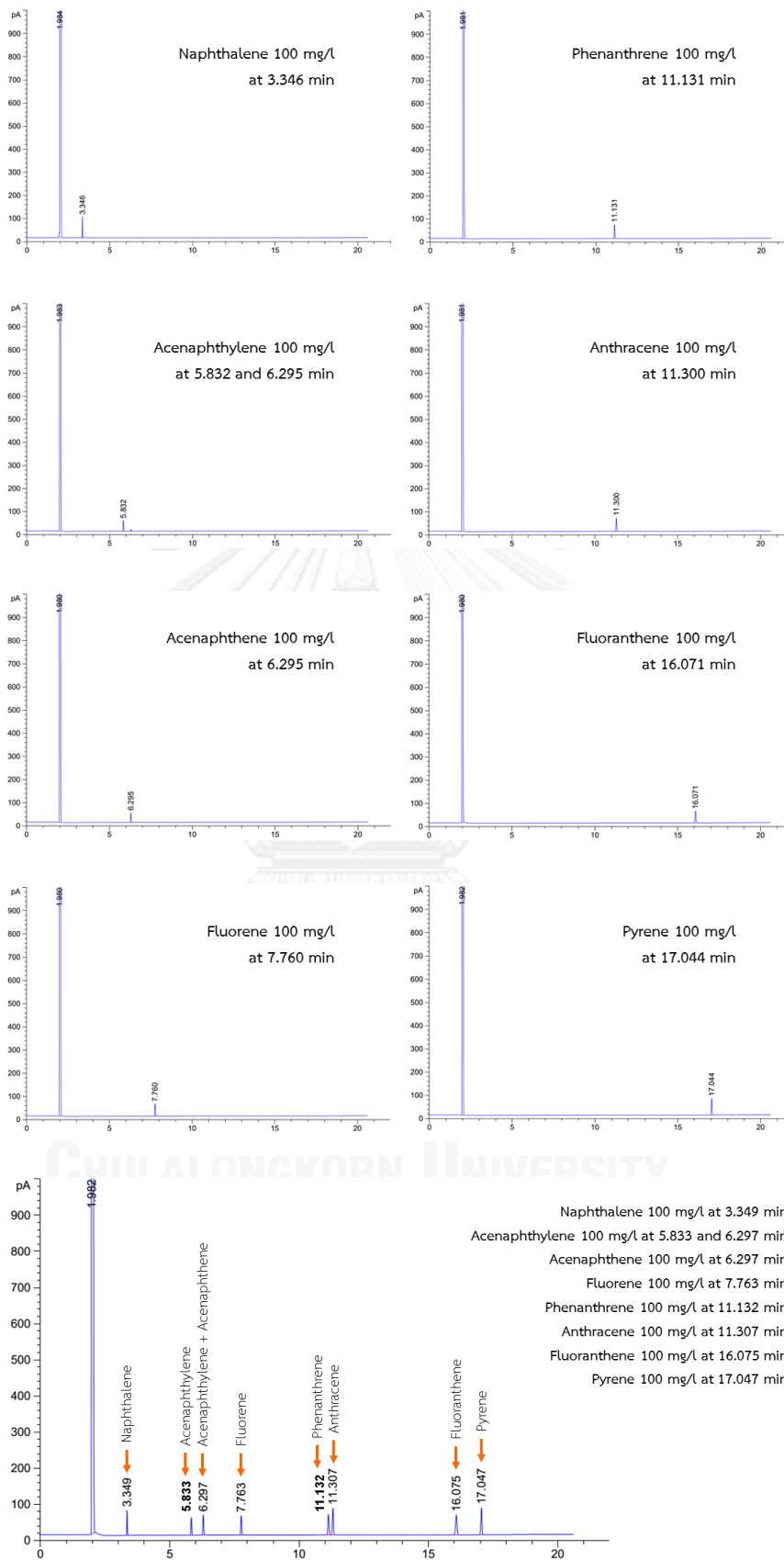
ง-4 การประยุกต์ใช้แบคทีเรียอัดเม็ดสลายพันธุ์ PCY ในการบำบัดดินปนเปื้อนไพรีน



รูปที่ ง-1 กราฟมาตรฐานของสารละลายไพรีนวิเคราะห์โดย GC-FID (PAH method)

ตารางที่ ง-6 การคำนวณการนำกลับของไพรีนจากดิน วิเคราะห์โดย GC-FID

ชนิดดิน	ความเข้มข้นเริ่มต้น (มก./ล.)	พื้นที่ใต้กราฟ	ความเข้มข้นที่ นำกลับ (มก./ล.)	การนำกลับของ สาร (%)
ดินไม่ปนเปื้อน	1,000	1635.7	896.52	77.9±11.8
		1427.1	782.19	
		1203.3	659.52	
ดินปนเปื้อน	1,000	1981.6	1,086.11	97.0±10.3
		1700.3	931.93	
		1625.1	890.71	

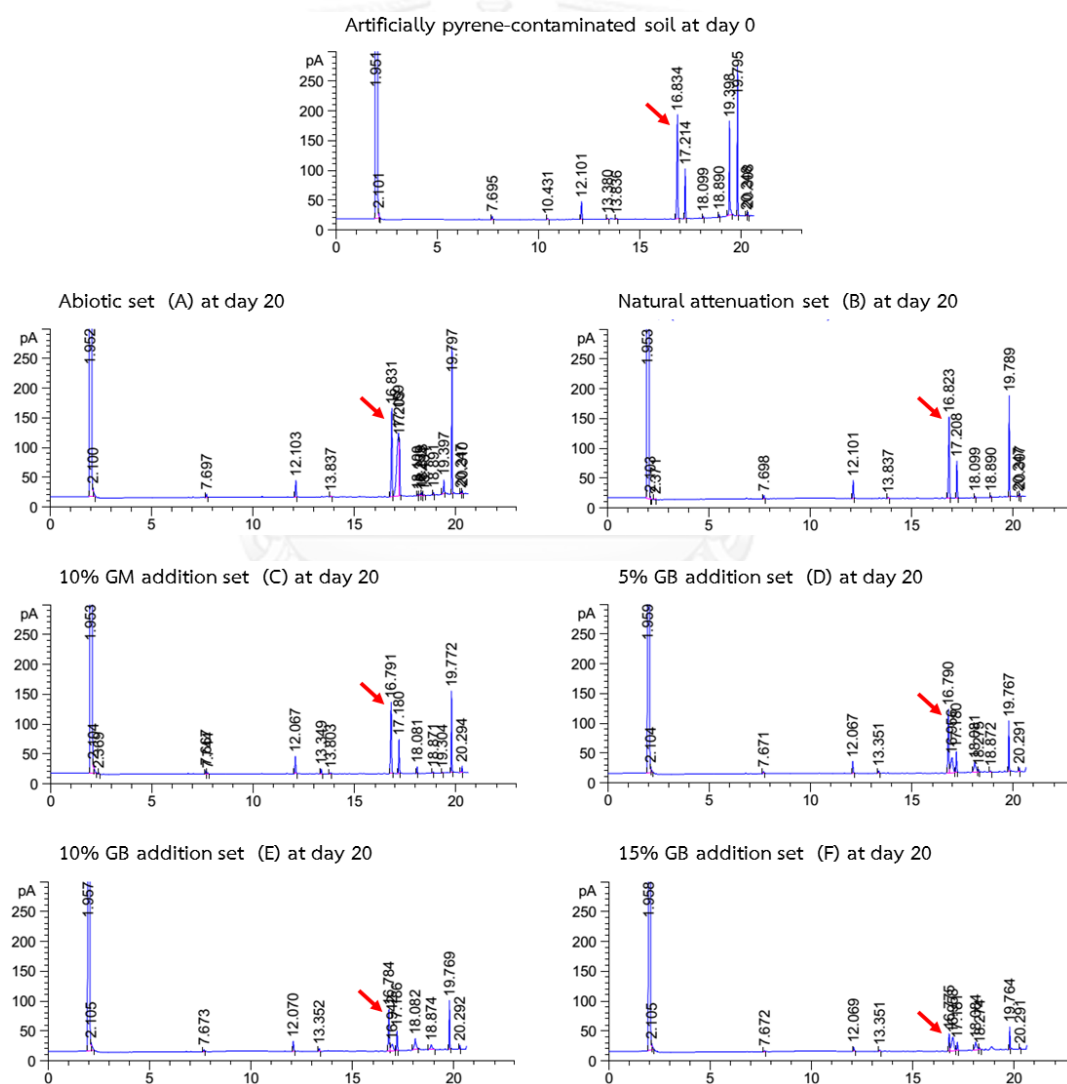


รูปที่ ง-2 โครมาโทแกรมของ PAHs วิเคราะห์โดย GC-FID (PAH method)

ตารางที่ ง-7 ข้อมูลปริมาณไพรีนที่เหลืออยู่ในการบำบัดดินปนเปื้อนไพรีนด้วยแบคทีเรียอัดเม็ดสายพันธุ์ PCY วิเคราะห์โดย GC-FID

เวลา (วัน)	ปริมาณไพรีนที่เหลืออยู่ในดิน (%)					
	A	B	C	D	E	F
0	100.0±12.2	100.0±12.2	100.0±12.2	100.0±12.2	100.0±12.2	100.0±12.2
10	103.0±6.9	98.5±0.0	87.8±13.7	80.6±4.7	81.4±1.3	59.2±7.8
20	95.0±3.7	94.9±3.3	76.4±4.8	63.6±12.1	54.9±0.1	19.2±2.6

A: abiotic; B: natural attenuation; C: 10% GM addition; D: 5% GB addition; E: 10% GB addition; F: 15% GB addition

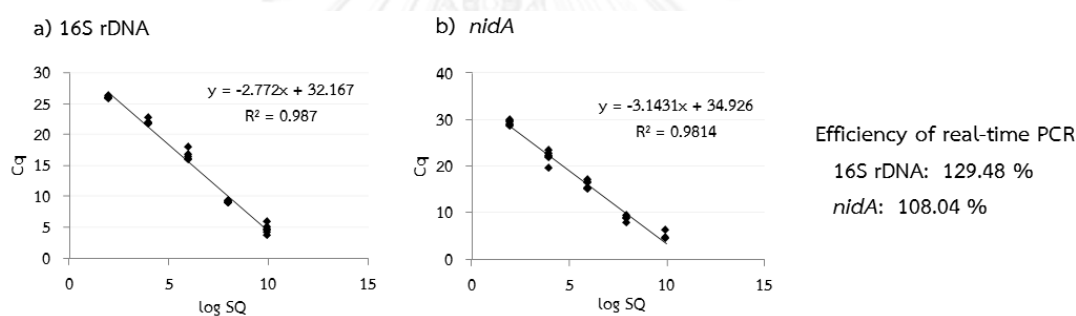


รูปที่ ง-3 โครมาโทแกรมของการบำบัดดินปนเปื้อนไพรีนด้วยแบคทีเรียอัดเม็ดสายพันธุ์ PCY วิเคราะห์โดย GC-FID (PAH method)



ตารางที่ ง-8 ข้อมูลดิบของจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดและแบคทีเรียย่อยสลายไฟรีนในการบำบัดดินปนเปื้อนไฟรีนด้วยแบคทีเรียอัดเม็ดสายพันธุ์ PCY วิเคราะห์โดย MPN

เวลา (วัน)	จำนวนแบคทีเรียทั้งหมด (log MPN/ก.)				
	B	C	D	E	F
0	4.80±0.24	4.92±0.07	5.30±0.36	5.66±0.00	6.13±0.07
10	4.51±0.46	4.10±0.23	4.86±0.19	6.41±0.19	6.04±0.00
20	5.03±0.20	4.54±0.16	5.54±0.16	6.99±0.37	6.79±0.22
เวลา (วัน)	จำนวนแบคทีเรียย่อยสลายไฟรีน (log MPN/ก.)				
	B	C	D	E	F
0	2.36±0.00	2.63±0.00	5.07±0.15	5.25±0.10	5.39±0.10
10	2.97±0.10	3.23±0.06	4.95±0.20	5.06±0.11	4.93±0.13
20	3.50±0.14	3.50±0.04	5.06±0.11	5.39±0.19	5.43±0.11



รูปที่ ง-4 กราฟมาตรฐานของยีน 16S rDNA (a) และ *nidA* (b) วิเคราะห์โดย real-time PCR

ตารางที่ ง-9 ข้อมูลดิบของจำนวนยีน 16S rDNA และ *nidA* ในการบำบัดดินปนเปื้อนไฟรีนด้วยแบคทีเรียอัดเม็ดสายพันธุ์ PCY วิเคราะห์โดย real-time PCR

เวลา (วัน)	จำนวนยีน 16S rDNA (log copies/ก.)				
	B	C	D	E	F
0	5.24±0.07	5.56±0.11	5.31±0.10	5.47±0.22	6.17±0.03
10	5.51±0.11	5.31±0.05	5.21±0.03	6.05±0.41	6.15±0.09
20	5.61±0.06	5.64±0.03	6.22±0.15	6.65±0.05	6.75±0.02
เวลา (วัน)	จำนวนยีน <i>nidA</i> (log copies/ก.)				
	B	C	D	E	F
0	0.48±0.05	1.21±0.39	3.58±0.44	4.14±0.09	4.55±0.08
10	1.42±0.33	1.70±0.29	1.86±0.04	2.26±0.13	2.35±0.20
20	1.86±0.15	2.57±0.16	2.46±0.02	2.61±0.49	2.50±0.04

**ลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลิตภัณฑ์ RT-PCR-DGGE****Clone MO1**

>ACCGCGGCTGCTGGCACGTAGTTGGCCGCACCTTCTTCTACAGGTACCGTCATTTTCTTCCCT  
GCTGAAAGCGGTTTACAACCCTAGGGCCTTCTCCCGCACGCGGCGTTGCTGCATCAGGCTTGC  
GCCATTGTGCAAGATTCCCCACTGCTGCCTCCCGTAGGA

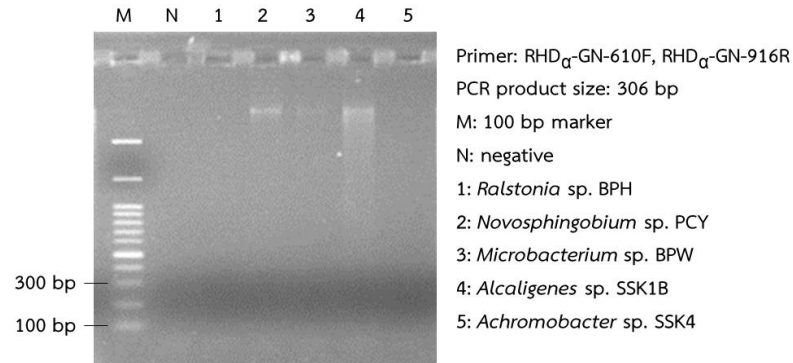
**Clone MO2**

>ATTACCGCGGCTGCTGGCACAGAGTTAGCCGGTGCTTATTCTGTGCGGTAACGTCAAACAGCA  
AGGTATTAACCTTACTGCCCTTCCTCCCAACTTAAAGTGCTTTACAATCCGAAGACCTTCTTCACA  
CACGCGGCATGGCTGGATCAGGCTTTCGCCCCATTGTCCAATATCCCCACTGCTGCCTCCCGT

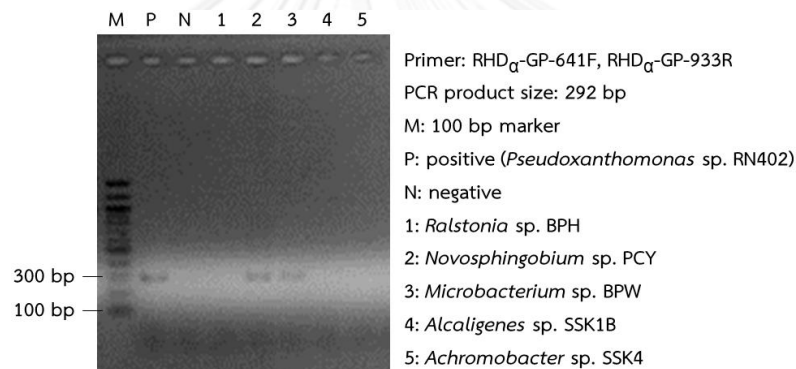
**Clone MO3**

>ATTACCGCGACTGCTGGCACAGAGTTAGCCGGTGCTTATTCTGTGCGGTAACGTCAAACAGCA  
AGGTATTAACCTTACTGCCCTTCCTCCCAACTTAAAGTGCTTTACAATCCGAAGACCTTCTTCACA  
CACGCGGCATGGCTGGGTCAGGCTTTCGCCCCATTGTCCAATATCCCCA

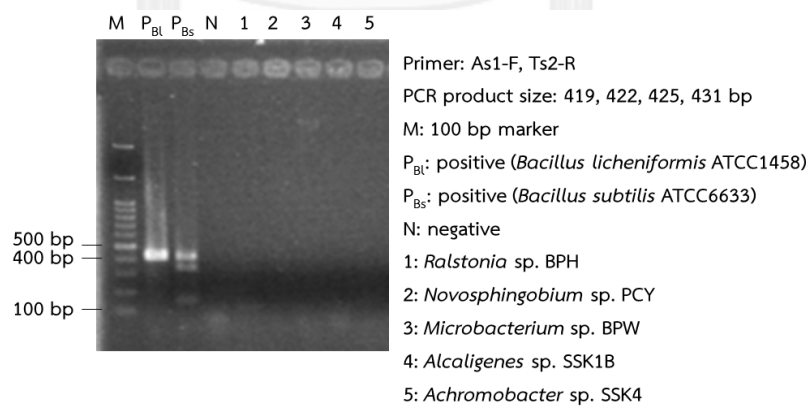
### ภาคผนวก จ รูปภาพเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส



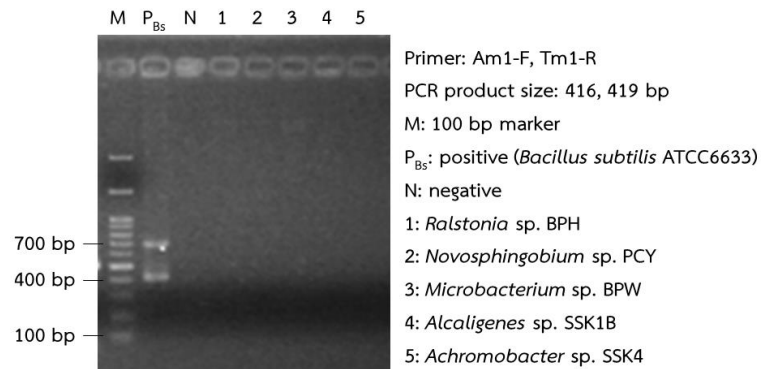
รูปที่ จ-1 ผลิตรหัส PCR ด้วยไพรเมอร์ RHD $\alpha$ -GN ของแบคทีเรียที่คัดแยกได้ 5 สายพันธุ์



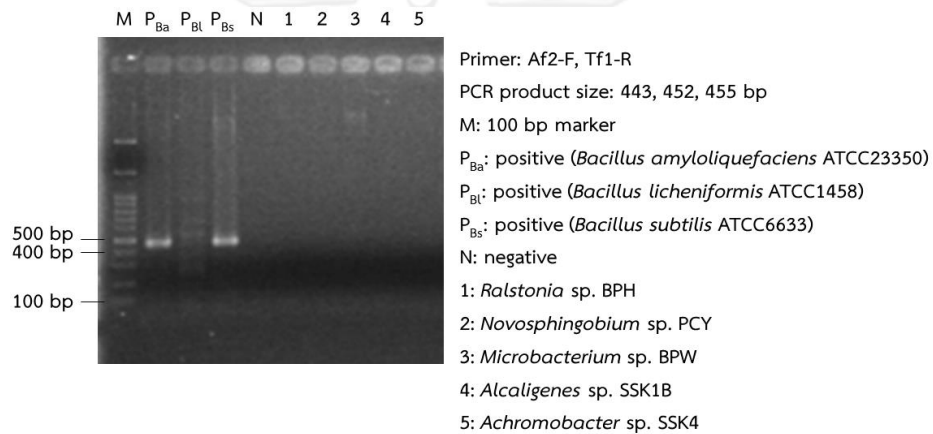
รูปที่ จ-2 ผลิตรหัส PCR ด้วยไพรเมอร์ RHD $\alpha$ -GP ของแบคทีเรียที่คัดแยกได้ 5 สายพันธุ์



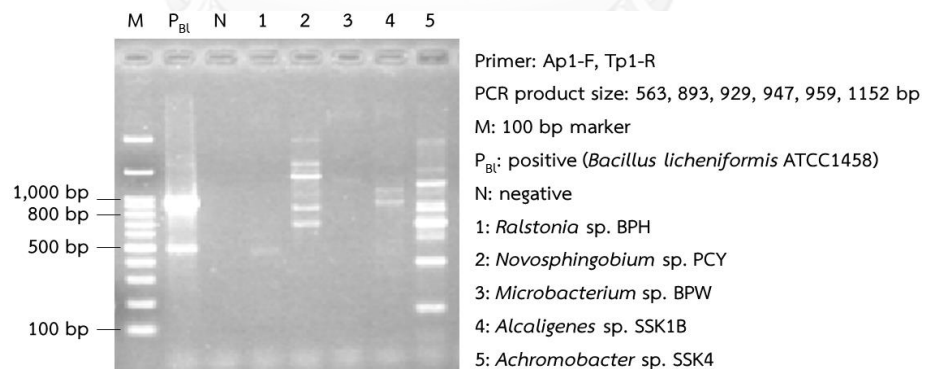
รูปที่ จ-3 ผลิตรหัส PCR ด้วยไพรเมอร์ As1-F, Ts2-R ของแบคทีเรียที่คัดแยกได้ 5 สายพันธุ์



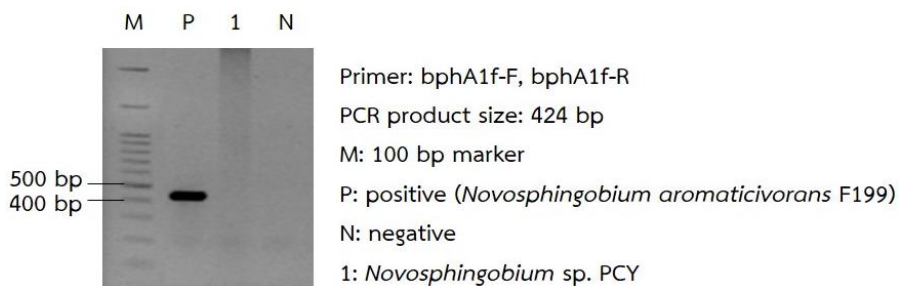
รูปที่ จ-4 ผลิตรหัส PCR ด้วยไพรเมอร์ Am1-F, Tm1-R ของแบคทีเรียที่คัดแยกได้ 5 สายพันธุ์



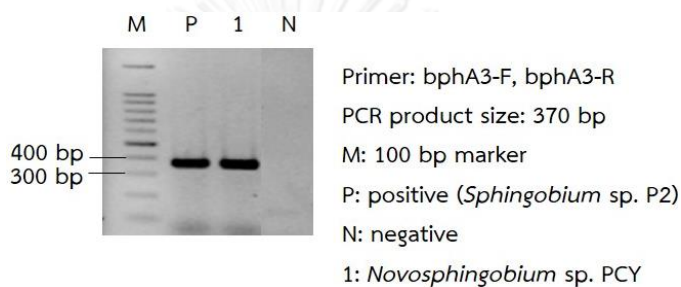
รูปที่ จ-5 ผลิตรหัส PCR ด้วยไพรเมอร์ Af2-F, Tf1-R ของแบคทีเรียที่คัดแยกได้ 5 สายพันธุ์



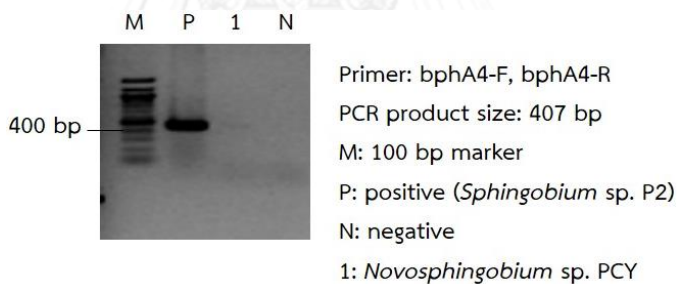
รูปที่ จ-6 ผลิตรหัส PCR ด้วยไพรเมอร์ Ap1-F, Tp1-R ของแบคทีเรียที่คัดแยกได้ 5 สายพันธุ์



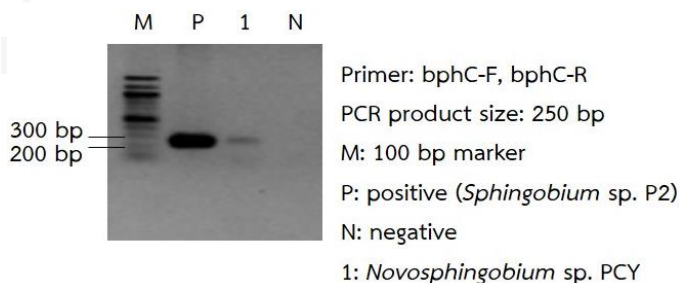
รูปที่ จ-7 ผลิตรหัส PCR ด้วยไพรเมอร์ bphA1f-F, bphA1f-R ของ *Novosphingobium* sp. PCY



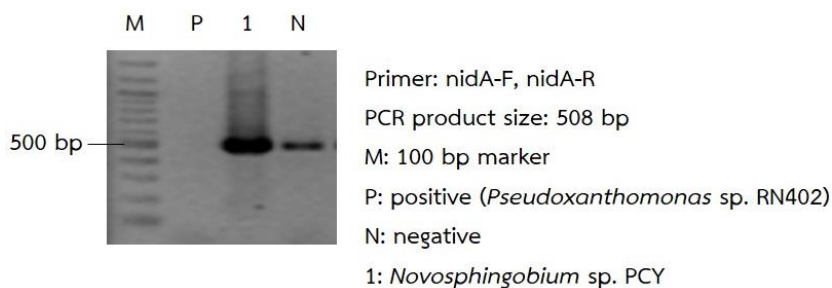
รูปที่ จ-8 ผลิตรหัส PCR ด้วยไพรเมอร์ bphA3-F, bphA3-R ของ *Novosphingobium* sp. PCY



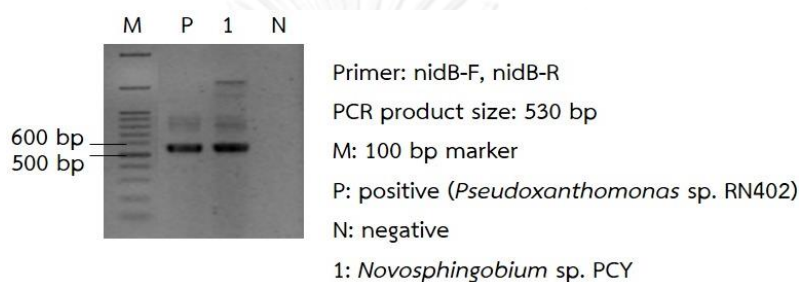
รูปที่ จ-9 ผลิตรหัส PCR ด้วยไพรเมอร์ bphA4-F, bphA4-R ของ *Novosphingobium* sp. PCY



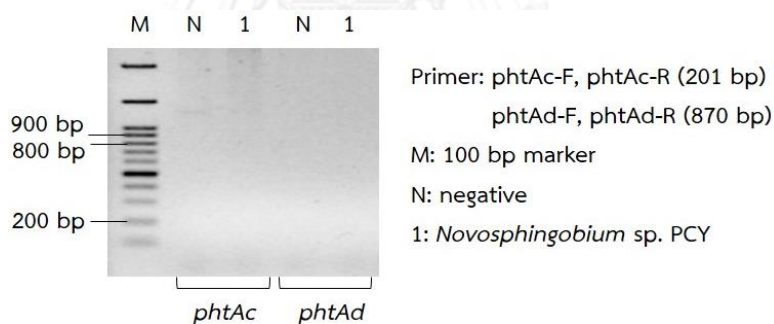
รูปที่ จ-10 ผลิตรหัส PCR ด้วยไพรเมอร์ bphC-F, bphC-R ของ *Novosphingobium* sp. PCY



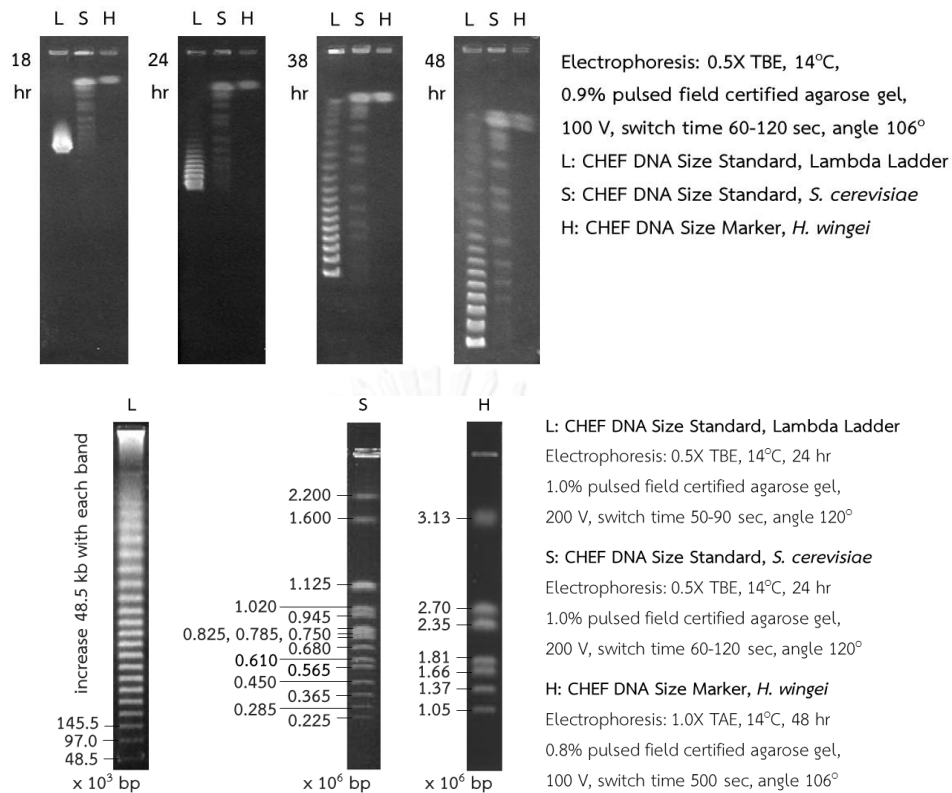
รูปที่ จ-11 ผลิตภัณฑ์ PCR ด้วยไพรเมอร์ nidA-F, nidA-R ของ *Novosphingobium* sp. PCY



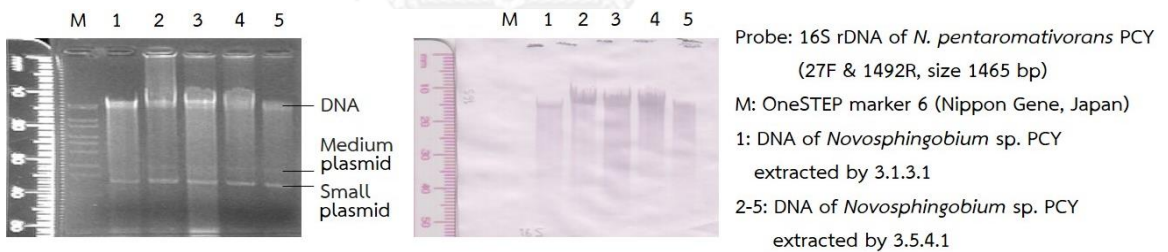
รูปที่ จ-12 ผลิตภัณฑ์ PCR ด้วยไพรเมอร์ nidB-F, nidB-R ของ *Novosphingobium* sp. PCY



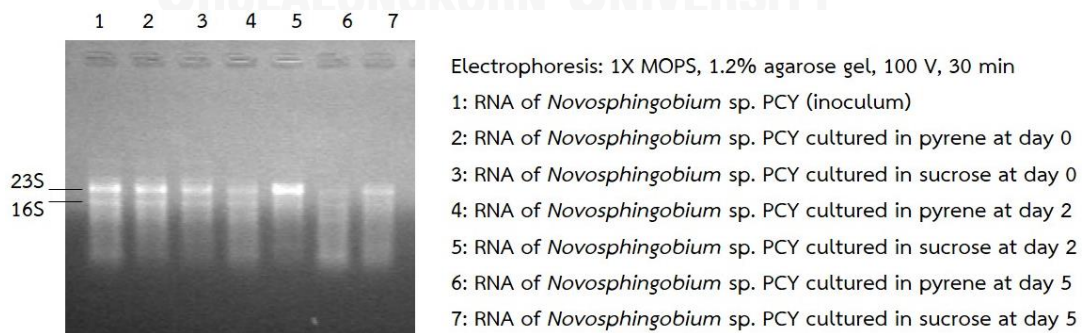
รูปที่ จ-13 ผลิตภัณฑ์ PCR ด้วยไพรเมอร์ phtAc-F, phtAc-R และ phtAd-F, phtAd-R ของ *Novosphingobium* sp. PCY



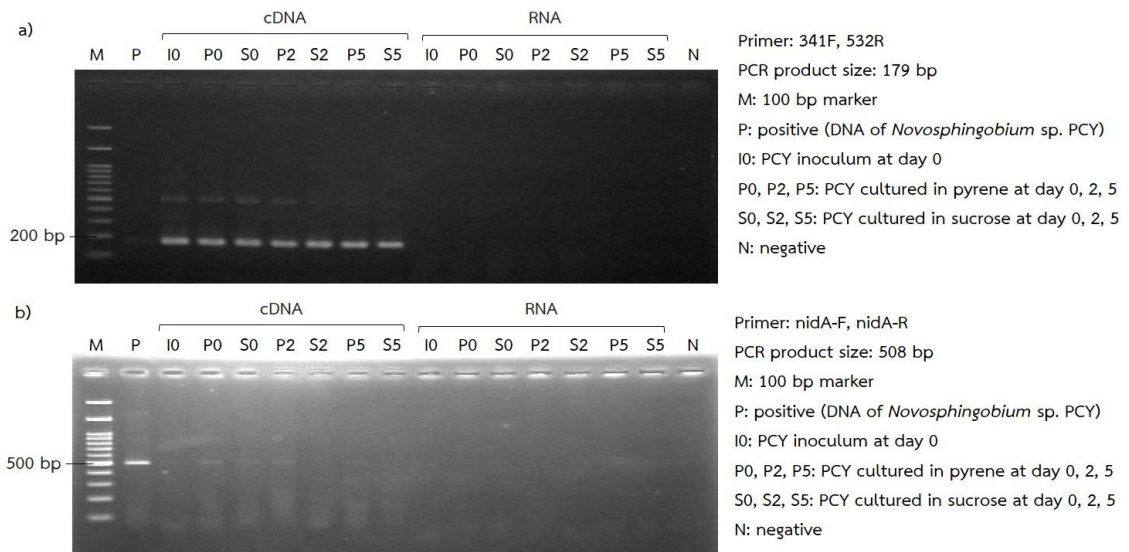
รูปที่ จ-14 การทดลองแปรผันสภาวะของ PFGE เปรียบเทียบกับขนาด DNA มาตรฐาน



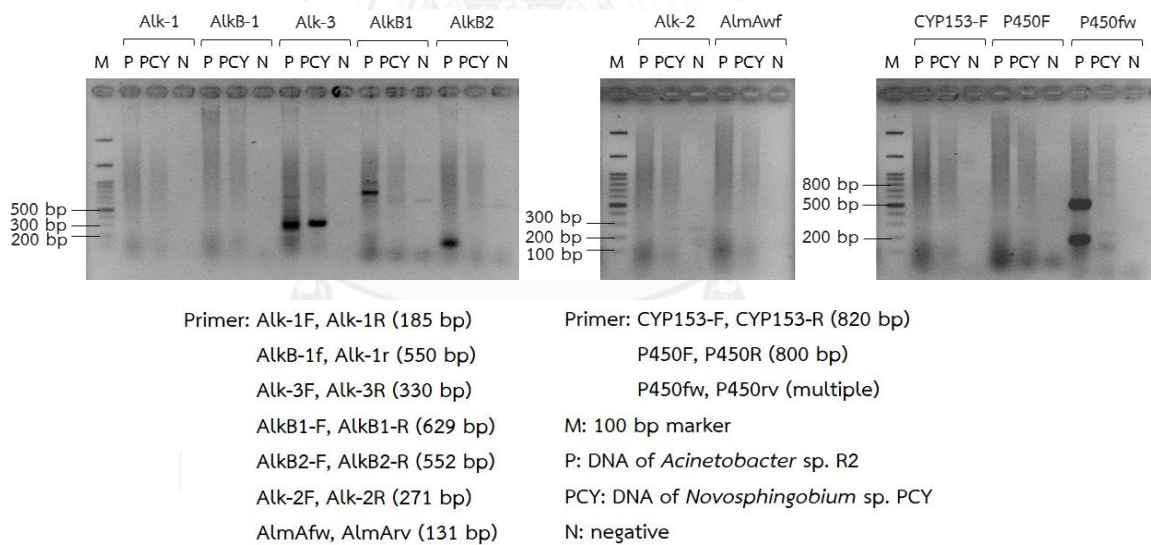
รูปที่ จ-15 ภาพเซาท์เทิร์นไฮบริโดเซชันด้วย 16S rDNA probe ของอิเล็กโทรโฟรีซิสแบบธรรมดา



รูปที่ จ-16 อิเล็กโทรโฟรีซิสของ RNA ที่สกัดได้จาก *Novosphingobium* sp. PCY เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีไพรีนหรือซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอนเพียงแหล่งเดียว



รูปที่ จ-17 การตรวจสอบการแสดงออกของยีน 16S rRNA (a) และ *nidA* (b) ของ *Novosphingobium* sp. PCY ด้วยวิธี RT-PCR เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีไพรีนและซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอนเพียงแหล่งเดียว



รูปที่ จ-18 ผลิตภัณฑ์ PCR ด้วยไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีนย่อยสลายอัลเคนของ *Novosphingobium* sp. PCY



## ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาววัลย์สันต์ ว่องวงศ์ศรี เกิดเมื่อวันที่ 8 ตุลาคม พ.ศ.2530 ณ โรงพยาบาลสุโขทัย จังหวัดนครราชสีมา สำเร็จ การศึกษาระดับปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาจุลชีววิทยาอุตสาหกรรม สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบังใน ปี พ.ศ.2551 และได้เข้าศึกษาต่อในระดับปริญญาวิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต สาขาจุลชีววิทยา จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยในปี พ.ศ.2552

ทุนและรางวัลที่ได้รับ ในปี พ.ศ.2552 ได้รับรางวัลผลการเรียนยอดเยี่ยมระดับปริญญาตรี จากมูลนิธิแอมฯ และทุนคณะ วิทยาศาสตร์ ปี พ.ศ.2554 ได้รับรางวัล Best poster prize จาก The 1st Environment Asia International Conference ปี พ.ศ. 2555 ได้รับทุนสนับสนุนการไปเสนอผลงานวิชาการในต่างประเทศ ที่ประเทศสหรัฐอเมริกา ปี พ.ศ.2556 ได้รับทุนอุดหนุนวิทยานิพนธ์ สำหรับนิสิต ครั้งที่ 1 ภาคการศึกษาต้น ปีการศึกษา 2555 ปีงบประมาณ 2556 และปี พ.ศ.2556 ได้รับทุนสนับสนุนนิสิตระดับ ปริญญาตรีไปทำวิจัยในต่างประเทศ (G-RSAB) ทีมมหาวิทยาลัยโตเกียว ประเทศญี่ปุ่น

### ผลงานตีพิมพ์

1. Muangchinda, C., Pansri, R., Wongwongsee, W., and Pinyakong O. 2013. Assessment of polycyclic aromatic hydrocarbon biodegradation potential in mangrove sediment from Don Hoi Lot, Samutsongkram Province, Thailand. *Journal of Applied Microbiology*. 114: 1311-1324.
2. Wongwongsee, W., Chareanpat, P., and Pinyakong, O. 2013. Abilities and genes for PAH biodegradation of bacteria isolated from mangrove sediments from the central of Thailand. *Marine Pollution Bulletin*. 74: 95-104.
3. Wongwongsee, W., Nojiri, H., and Pinyakong O. 2013. Enhancing the pyrene removal from soil by granular bacteria from *Novosphingobium* sp. PCY. (in preparation)

### การเผยแพร่ผลงานวิชาการระดับนานาชาติ

1. Wongwongsee, W., Chareanpat, P., and Pinyakong, O. 2011. Five bacteria from mangrove sediments capable of degrading PAH and producing biosurfactant. Abstract. The 1st Environment Asia International Conference. Bangkok, Thailand. 22-25 Mar.
2. Wongwongsee, W., and Pinyakong, O. 2012. Megaplasmid possessed *nidA* in pyrene/phenanthrene-degrading *Novosphingobium* sp. PCY. Abstract. The 112th General Meeting ASM. San Francisco, USA. 16-19 Jun.
3. Muangchinda, C., Pansri, R., Wongwongsee, W., and Pinyakong, O. 2012. Studying bacterial population in PAHs biodegradation of mangrove sediment through culture-dependent and independent methods. Abstract. The 17th Biological Sciences Graduate Congress. Bangkok, Thailand, 8-10 Dec.
4. Wongwongsee, W., and Pinyakong, O. 2013. Development of granular bacteria from *Novosphingobium* sp. PCY for use in bioremediation of PAHs-contaminated soil. Abstract. The 1st Annual PSU Phuket International Conference 2012 "Multidisciplinary Studies on Sustainable Development". Prince of Songkla University, Phuket Campus. 10-12 Jan.
5. Wongwongsee, W., and Pinyakong, O. 2013. *Novosphingobium pentaromativorans* PCY: the newly PAH-degrading inoculum for bioremediation of contaminated site. Extended Abstract. International Conference on Environmental and Hazardous Substance Management. Bangkok, Thailand, 21-23 May.



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
**CHULALONGKORN UNIVERSITY**