การสลายไพรีนและฟีแนนทรีนที่ปนเปื้อนในดินโดยกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่เลี้ยงบนใบจามจุรี

นางสาวเสาวลักษณ์ อ้นเมฆ

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2550

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4 7 7 2 5 4 5 3 2 3

PYRENE AND PHENANTHRENE DEGRADATION IN CONTAMINATED SOIL BY BACTERIAL CONSORTIUM RRM-V3 GROWN ON RAIN TREE LEAVES

Miss Saowaluk Onmek

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Science Program in Industrial Microbiology

Department of Microbiology

Faculty of Science

Chulalongkorn University

Academic Year 2007

Copyright of Chulalongkorn University

502108

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การสลายไพรีนและฟีแนนทรีนที่ปนเปื้อนในดินโดยกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่เลี้ยงบนใบจามจุรี
โดย	นางสาวเสาวลักษณ์ อ้นเมฆ
สาขาวิชา	จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. กอบชัย ภัทรกุลวณิชย์
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	รองศาสตราจารย์ ดร. กาญจณา จันทองจีน

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

..... คณบดีคณะวิทยาศาสตร์
(ศาสตราจารย์ ดร. เปี่ยมศักดิ์ เมนะเศวต)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุเทพ ธนียวัน)

..... อาจารย์ที่ปรึกษา
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. กอบชัย ภัทรกุลวณิชย์)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
(รองศาสตราจารย์ ดร. กาญจณา จันทองจีน)

..... กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. ไพเราะ ปิ่นพานิชการ)

..... กรรมการ
(อาจารย์ ดร. เอกวัล ลือพร้อมชัย)

เสาวลักษณ์ อ้นเมฆ : การสลายไพรีนและฟีแนนทรีนที่ปนเปื้อนในดินโดยกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่เลี้ยงบนใบจามจุรี (PYRENE AND PHENANTHRENE DEGRADATION IN CONTAMINATED SOIL BY BACTERIAL CONSORTIUM RRM-V3 GROWN ON RAIN TREE LEAVES) อ.ที่ปรึกษา : ผศ.ดร. กอบชัย ภัทรกุลวณิชย์, อ.ที่ปรึกษาร่วม : รศ. ดร. กาญจณา จันทองจีน, 93 หน้า.

กลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ซึ่งแยกได้จากใบจามจุรี เป็นกลุ่มแบคทีเรียที่ย่อยสลายไพรีนและฟีแนนทรีนอย่างมีประสิทธิภาพ การปลูกเชื้อ RRM-V3 โดยตรงลงในดินที่ปนเปื้อน PAHs ทำให้จำนวนเซลล์ลดลงและไม่สามารถย่อยสลาย PAHs ได้ ดังนั้นการศึกษานี้จึงมุ่งที่จะพัฒนาการสร้างหัวเชื้อแบคทีเรียในใบจามจุรีก่อนที่จะใส่ลงไปในดิน โดยการปลูกเชื้อ RRM-V3 ที่ 10^8 CFU/กรัม ลงในใบจามจุรีปลอดเชื้อ ซึ่งผ่านการปรับ pH เป็น 7 และความชื้นเป็น 70% ของค่าความจุสูงสุดของการอุ้มน้ำ หลังจากบ่ม 3 วัน ที่ 30°ซ กลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 มีจำนวนเซลล์เพิ่มสูงสุดถึง 9.54 log CFU/กรัม จากนั้นนำไปใช้เป็นหัวเชื้อเพื่อบำบัดดินที่ปนเปื้อนด้วยไพรีนและฟีแนนทรีนที่ความเข้มข้นสุดท้ายชนิดละ 0.05 มก./มล. ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าทั้งไพรีนและฟีแนนทรีนถูกย่อยสลายได้อย่างรวดเร็วและเหลืออยู่เพียง 11.25% และ 7.59% ภายใน 3 วัน ตามลำดับ ในขณะที่จำนวนเซลล์แบคทีเรียในวันที่ 35 มีค่า 9.19 log CFU/กรัม สำหรับ RRM-V3 ที่เตรียมในส่วนดินสกัดปลอดเชื้อ เช่นเดียวกับที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่ไม่มีคาร์บอน มีความสามารถน้อยกว่าในการย่อยสลายไพรีน (22.21% และ 57.31%) และฟีแนนทรีน (12.07% และ 43.71%) ในดินหลังการบ่ม 3 วัน ตามลำดับ การวิเคราะห์ชิ้นส่วนดีเอ็นเอบริเวณ 16s rDNA โดยวิธี DGGE ยืนยันพลวัตรของประชากรกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ซึ่งสามารถพบได้ตลอดการทดลองเป็นเวลา 35 วัน

ภาควิชา จุลชีววิทยา ลายมือชื่อนิสิต เสาวลักษณ์ อ้นเมฆ

สาขาวิชา จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา

ปีการศึกษา 2550 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

4772545323 : MAJOR INDUSTRIAL MICROBIOLOGY

KEYWORD: bacterial consortium/ biodegradation/ pyrene/ phenanthrene/ soil/ DGGE

SAOWALUK ONMEK : PYRENE AND PHENANTHRENE DEGRADATION IN CONTAMINATED SOIL BY BACTERIAL CONSORTIUM RRM-V3 GROWN ON RAIN TREE LEAVES. THESIS ADVISOR: ASST. PROF. KOBCHAI PATTARAGULWANIT, Dr.rer.nat. THESIS COADVISOR: ASSOC. PROF. KANCHANA JUNTONGJIN, Ph. D., 93 pp.

Bacterial consortium RRM-V3 isolated from rain tree leaves is a potential pyrene and phenanthrene degraders. Inoculation of RRM-V3 directly into PAHs contaminated soil resulted in the decrease of cell numbers and inability of PAHs degradation. Thus, this study was aimed to establish a bacterial inoculum in the rain tree leaves prior inoculation into soil. RRM-V3 was inoculated at 10^8 CFU/g into sterile rain tree leaves which had been previously adjusted pH to 7 and moisture content to 70% of maximum water holding capacity of the leaves. After three days of incubation at 30°C, RRM-V3 consortium reached the maximum cell numbers of 9.54 log CFU/g and was used as inoculum for remediation of soil contaminated with pyrene and phenanthrene at the final concentration of 0.05 mg/ml for each. The results revealed that both pyrene and phenanthrene were rapidly degraded and remained only 11.25% and 7.59% within 3 days, respectively, whereas the bacterial cell count was 9.19 log CFU/g on day 35. RRM-V3 inoculum prepared in sterile soil extract as well as in liquid cultured in carbon free mineral medium were less active in degradation of pyrene (22.21% and 57.31%) and phenanthrene (12.07% and 43.71%) in soil after 3 days of incubation, respectively. DGGE analysis of 16S rDNA fragments confirmed the dynamic population of bacterial consortium RRM-V3 which could be found throughout the experimental period of 35 day.

Department Microbiology Student's Signature Saowaluk Onmek

Field of Study Industrial Microbiology Advisor's Signature K. Pattaragulwanit

Academic Year 2007 Coadvisor's signature Kanchana Juntongjin

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จได้ด้วยดีด้วยความช่วยเหลือของผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.กอบชัย ภัทรกุลวณิชย์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ และรองศาสตราจารย์ ดร.กาญจณา จันทองจีน อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่กรุณาให้ความรู้ คำแนะนำและข้อคิดเห็นต่างๆ ทุกขั้นตอน ตลอดจนตรวจแก้ไขต้นฉบับวิทยานิพนธ์ ซึ่งผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้ด้วย

กราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุเทพ ธนียวัน รองศาสตราจารย์ ดร.ไพเราะ ปิ่นพานิชการ และอาจารย์ ดร.เอกวัล ลือพร้อมชัย ที่กรุณารับเป็นประธานกรรมการและกรรมการในการสอบวิทยานิพนธ์ และให้ความรู้ คำแนะนำต่างๆ แก่ผู้วิจัย ตลอดจนช่วยตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้มีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอบคุณพี่ๆ เพื่อนๆ น้องๆ ตลอดจนเจ้าหน้าที่ในภาควิชาจุลชีววิทยาทุกท่าน สำหรับทุกความห่วงใย ความช่วยเหลือ และกำลังใจที่มีให้ตลอดมา

สุดท้ายขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดา และครอบครัว ที่ให้การสนับสนุน ความช่วยเหลือ รวมทั้งให้กำลังใจผู้วิจัยตลอดมา

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย..... ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ..... จ

กิตติกรรมประกาศ..... ฉ

สารบัญ..... ช

สารบัญตาราง..... ญ

สารบัญรูป..... ฎ

สัญลักษณ์และคำย่อ..... ฐ

บทที่ 1 บทนำ..... 1

บทที่ 2 ปริทัศน์วรรณกรรม..... 4

บทที่ 3 อุปกรณ์ เคมีภัณฑ์ และวิธีดำเนินการวิจัย..... 20

3.1 อุปกรณ์ในการทดลอง..... 20

3.2 เคมีภัณฑ์..... 22

3.3 วิธีดำเนินการทดลอง..... 24

3.3.1 กลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3..... 24

3.3.2 โอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพร์เมอร์..... 24

3.3.3 เตรียมใบจามจุรี ดิน และกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3..... 24

3.3.3.1 เตรียมใบจามจุรี..... 24

3.3.3.2 เตรียมดิน..... 25

3.3.3.3 เตรียมหัวเชื้อกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3..... 25

3.3.4 ประเมินการรอดชีวิตของกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่เตรียมบนใบจามจุรี... 26

3.3.5 วัดการเจริญของแบคทีเรียด้วยวิธี viable plate count..... 27

3.3.6 การย่อยสลายไพรีนและฟีแนนทรีนในดินของกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่เตรียมโดยวิธีต่างๆ..... 27

3.3.7 วิเคราะห์ปริมาณไพรีนและฟีแนนทรีน..... 29

3.3.8 ติดตามพลวัตรประชากรกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ในช่วงเวลาของการบำบัด..... 30

3.3.8.1 สกัดจีโนมิกดีเอ็นเอของกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3..... 30

3.3.8.2 สกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างดิน..... 31

บทที่ หน้า

3.3.8.3 กำจัด humid acid และทำให้ดีเอ็นเอบริสุทธิ์..... 32
3.3.8.4 วิเคราะห์ความเข้มข้นของดีเอ็นเอ..... 33
3.3.8.5 เพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (Polymerase Chain Reaction, PCR)..... 33
3.3.8.6 วิเคราะห์ Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE)..... 35
บทที่ 4 ผลการทดลอง..... 36
4.1 ลักษณะทางกายภาพและองค์ประกอบทางเคมีของใบจามจุรีและดินที่ใช้ในการทดลอง..... 36
4.2 การย่อยสลายไพรีนและฟีแนนทรีนโดยกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM..... 38
4.3 การเตรียมกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 บนใบจามจุรีปลอดเชื้อ..... 39
4.4 เปรียบเทียบการย่อยสลายไพรีนและฟีแนนทรีนในดินโดยกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่เตรียมโดยวิธีต่างๆ..... 40
4.4.1 การสลายตัวของไพรีนและฟีแนนทรีนในดินปลอดเชื้อในชุดการทดลองที่ 1 41
4.4.2 การสลายตัวของไพรีนและฟีแนนทรีนในดินไม่ปลอดเชื้อในชุดการทดลองที่ 2..... 42
4.4.3 การสลายตัวของไพรีนและฟีแนนทรีนในดินไม่ปลอดเชื้อที่เติมใบจามจุรีปลอดเชื้อในชุดการทดลองที่ 3..... 44
4.4.4 การสลายตัวของไพรีนและฟีแนนทรีนในดินปลอดเชื้อในชุดการทดลองที่ 4 ที่ผสมกับหัวเชื้อกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่เลี้ยงบนใบจามจุรีปลอดเชื้อ 46
4.4.5 การสลายตัวของไพรีนและฟีแนนทรีนในดินไม่ปลอดเชื้อในชุดการทดลองที่ 5 ที่ผสมกับหัวเชื้อกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่เลี้ยงบนใบจามจุรีปลอดเชื้อ..... 48
4.4.6 การสลายตัวของไพรีนและฟีแนนทรีนในดินไม่ปลอดเชื้อของชุดการทดลองที่ 6 ที่ผสมกับหัวเชื้อกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่เลี้ยงในน้ำดินปลอดเชื้อ..... 50
4.4.7การสลายตัวของไพรีนและฟีแนนทรีนในดินไม่ปลอดเชื้อของชุดการทดลองที่ 7 ที่ผสมกับหัวเชื้อกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM..... 52

บทที่ หน้า

4.5 เปรียบเทียบผลจากการทดลองชุดที่ 1 ถึง 7

4.5.1 เปรียบเทียบปริมาณไพรีนที่เหลืออยู่จากการทดลองชุดที่ 1 ถึง 7..... 54

4.5.2 เปรียบเทียบปริมาณฟีแนนทรีนที่เหลืออยู่จากการทดลองชุดที่ 1 ถึง 7..... 55

4.5.3 เปรียบเทียบจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดจากการทดลองชุดที่ 1 ถึง 7..... 56

4.5.4เปรียบเทียบจำนวนแบคทีเรียที่ย่อยสลายไพรีน/ฟีแนนทรีนจากการทดลองชุดที่ 1 ถึง 7..... 57

4.6 ผลการติดตามพลวัตรประชากรกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ในช่วงเวลาของการบำบัด

4.6.1 พลวัตรประชากรกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่เลี้ยงบนใบจามจุรีปลอดเชื้อ.. 58

4.6.2 พลวัตรประชากรแบคทีเรียของชุดการทดลองที่ 2 การสลายตัวของไพรีนและฟีแนนทรีนในดินไม่ปลอดเชื้อ..... 60

4.6.3 การติดตามพลวัตรประชากรแบคทีเรียของชุดการทดลองที่ 5 การสลายตัวของไพรีนและฟีแนนทรีนในดินไม่ปลอดเชื้อที่ผสมกับหัวเชื้อกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่เลี้ยงบนใบจามจุรีปลอดเชื้อ..... 61

บทที่ 5 สรุปและอภิปรายผลการทดลอง..... 63

บทที่ 6 ข้อเสนอแนะในงานวิจัย..... 72

รายการอ้างอิง..... 73

ภาคผนวก..... 83

ภาคผนวก ก 84

ภาคผนวก ข 86

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์ 93

สารบัญตาราง

ตาราง **หน้า**

4.1 ลักษณะทางกายภาพและองค์ประกอบทางเคมีของใบจามจุรีที่นำมาใช้ในการทดลอง..... 36

4.2 ลักษณะทางกายภาพและองค์ประกอบทางเคมีของดิน..... 37

สารบัญรูป

ภาพประกอบ **หน้า**

2.1 PAHs 16 ชนิด ที่ถูกกำหนดเป็น Priority Pollutants โดย EPA..... 5

3.1 ใบจามจุรีที่ใช้ในการทดลองที่บดและผ่านการคัดกรองแล้ว..... 25

3.2 ลักษณะอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวCFMMที่มีไพรีนเข้มข้น 0.1 มก./มล. เมื่อเลี้ยงกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 เป็นเวลา 3 วัน เปรียบเทียบกับที่เวลา 0 วัน..... 26

4.1 การย่อยสลายไพรีนและฟีแนนทรีนโดยกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM..... 38

4.2 จำนวนกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่เตรียมบนใบจามจุรี..... 39

4.3 ปริมาณไพรีนและฟีแนนทรีนที่เหลืออยู่ในดินปลอดเชื้อของชุดการทดลองที่ 1..... 41

4.4 ปริมาณไพรีนและฟีแนนทรีนที่เหลืออยู่และจำนวนแบคทีเรียในดินไม่ปลอดเชื้อของชุดการทดลองที่ 2..... 43

4.5 ปริมาณไพรีนและฟีแนนทรีนที่เหลืออยู่และจำนวนแบคทีเรียในดินไม่ปลอดเชื้อที่เติมใบจามจุรีปลอดเชื้อของชุดการทดลองที่ 3..... 45

4.6 ปริมาณไพรีนและฟีแนนทรีนที่เหลืออยู่และจำนวนแบคทีเรียในดินปลอดเชื้อที่ผสมกับหัวเชื้อกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่เลี้ยงบนใบจามจุรีปลอดเชื้อ (ชุดการทดลองที่ 4)..... 47

4.7 ปริมาณไพรีนและฟีแนนทรีนที่เหลืออยู่และจำนวนแบคทีเรียในดินไม่ปลอดเชื้อที่ผสมกับหัวเชื้อกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่เลี้ยงบนใบจามจุรีปลอดเชื้อ (ชุดการทดลองที่ 5)..... 49

4.8 ปริมาณไพรีนและฟีแนนทรีนที่เหลืออยู่และจำนวนแบคทีเรียในดินไม่ปลอดเชื้อที่ผสมกับหัวเชื้อกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่เลี้ยงในน้ำดินปลอดเชื้อ (ชุดการทดลองที่ 6)..... 51

4.9 ปริมาณไพรีนและฟีแนนทรีนที่เหลืออยู่และจำนวนแบคทีเรียในดินไม่ปลอดเชื้อที่ผสมกับหัวเชื้อกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM (ชุดการทดลองที่ 7)..... 53

4.10 เปรียบเทียบปริมาณไพรีนที่เหลืออยู่จากการทดลองชุดที่ 1 ถึง 7..... 54

4.11 เปรียบเทียบปริมาณฟีแนนทรีนที่เหลืออยู่จากการทดลองชุดที่ 1 ถึง 7..... 55

4.12 เปรียบเทียบจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดจากการทดลองชุดที่ 1 ถึง 7..... 56

4.13 เปรียบเทียบจำนวนแบคทีเรียที่ย่อยสลายไพรีน/ฟีแนนทรีนจากการทดลองชุดที่ 1 ถึง 7..... 57

4.14 แถบชิ้นส่วนดีเอ็นเอของ 16S rDNA แสดงพลวัตรประชากรกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่เลี้ยงบนใบจามจุรีปลอดเชื้อที่เวลาต่างๆ โดยวิธี DGGE ในพอลิอะคริลาไมด์เจลที่มี 40 – 70% denaturant 59

ภาพประกอบ **หน้า**

4.15 แถบชิ้นส่วนดีเอ็นเอของ 16S rDNA แสดงพลวัตรประชากรแบคทีเรียในชุดการทดลองที่ 2 ได้แก่ ดินไม่ปลอดเชื้อที่ผสมไพรีน/ฟีแนนทรีนที่เวลาต่างๆ โดยวิธี DGGE ในพอลิอะคริลาไมด์เจลที่มี 40-70% denaturant..... 61

4.16 แถบชิ้นส่วนดีเอ็นเอของ 16S rDNA แสดงพลวัตรประชากรแบคทีเรียของชุดการทดลองที่ 5 ได้แก่ การสลายตัวของไพรีนและฟีแนนทรีนในดินไม่ปลอดเชื้อ ที่ผสมกับหัวเชื้อกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่เลี้ยงบนใบจามจุรีปลอดเชื้อที่เวลาต่างๆ โดยวิธี DGGE ในพอลิอะคริลาไมด์เจลที่มี 40-70% denaturant..... 62

สัญลักษณ์และคำย่อ

°ซ = องศาเซลเซียส

% = เปอร์เซ็นต์

มก. = มิลลิกรัม

มล. = มิลลิลิตร

มม. = มิลลิเมตร

ซม. = เซนติเมตร

ชม. = ชั่วโมง