

การย่อยสลายเสริมกันของกลุ่มแบคทีเรียและการประยุกต์ใช้เซลล์ตรึงในการย่อยสลายปิโตรเลียม  
ไฮโดรคาร์บอน



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต  
สาขาวิชาจุลชีววิทยาและเทคโนโลยีจุลินทรีย์ ภาควิชาจุลชีววิทยา  
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
ปีการศึกษา 2564  
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

SYNERGISTIC DEGRADATION OF BACTERIAL CONSORTIA AND APPLICATION  
OF IMMOBILIZED CELLS IN DEGRADATION OF PETROLEUM HYDROCARBONS



A Dissertation Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements  
for the Degree of Doctor of Philosophy in Microbiology and Microbial Technology

Department of Microbiology

FACULTY OF SCIENCE

Chulalongkorn University

Academic Year 2021

Copyright of Chulalongkorn University

|                                 |   |
|---------------------------------|---|
| หัวข้อวิทยานิพนธ์               | การย่อยสลายเสริมกันของกลุ่มแบคทีเรียและการ<br>ประยุกต์ใช้เซลล์ตรึงในการย่อยสลายปิโตรเลียม<br>ไฮโดรคาร์บอน |
| โดย                             | น.ส.ณัฐริกา เหล่าธรรมทีป  |
| สาขาวิชา                        | จุลชีววิทยาและเทคโนโลยีจุลินทรีย์   |
| อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก | รองศาสตราจารย์ ดร.อรุณทัย ภิญญาคง   |

---

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้หัวข้อวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของ  
การศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต

..... คณะบดีคณะวิทยาศาสตร์  
(ศาสตราจารย์ ดร.พลกฤษณ์ แสงวณิช)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ  
(รองศาสตราจารย์ ดร.สุชาดา จันทร์ประทีป นภทร)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก  
(รองศาสตราจารย์ ดร.อรุณทัย ภิญญาคง)

..... กรรมการ  
(รองศาสตราจารย์ ดร.เอกวิทย์ ลือพร้อมชัย)

..... กรรมการ  
(รองศาสตราจารย์ ดร.ปาหนัน เรืองสำราญ)

..... กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย  
(รองศาสตราจารย์ ดร.เบญจภรณ์ ประภักดิ์)

..... กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย  
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.พรินท์พิดา สนธิพันธ์)

ณัฐริกา เหล่าธรรมทีป : การย่อยสลายเสริมกันของกลุ่มแบคทีเรียและการประยุกต์ใช้เซลล์ตรึงในการย่อยสลายปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอน. ( SYNERGISTIC DEGRADATION OF BACTERIAL CONSORTIA AND APPLICATION OF IMMOBILIZED CELLS IN DEGRADATION OF PETROLEUM HYDROCARBONS) อ.ที่ปรึกษาหลัก : รศ. ดร.อรุณทัย ภิญญาคง

การบำบัดน้ำมันรั่วไหลด้วยวิธีทางชีวภาพ เป็นวิธีการรักษาสิ่งแวดล้อมอย่างยั่งยืน งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการทำงานเสริมกันของกลุ่มแบคทีเรียในการย่อยสลายน้ำมันปิโตรเลียม และพอลิไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน (polycyclic aromatic hydrocarbons; PAHs) และพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์รูปแบบกลุ่มแบคทีเรียตรึง โดยพบว่ากลุ่มแบคทีเรีย OPK ซึ่งประกอบด้วย *Mycolicibacterium* spp. PO1 และ PO2 *Novosphingobium pentaromativorans* PY1 และ *Bacillus subtilis* FW1 ทำงานเสริมกันในการย่อยสลายไพรีน PAHs ผสม อัลเคนสายสั้นและสายยาว และน้ำมันดิบ และสามารถคงประสิทธิภาพสูงภายใต้การแปรผันค่า pH (5.0-9.0) อุณหภูมิ (30-40 องศาเซลเซียส) ความเค็ม (20-60‰) ข้อมูลจีโนมจากงานวิจัยก่อนหน้านี้ร่วมกับการทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลาย การทดสอบการสร้างสารลดแรงตึงผิว และ/หรือการวิเคราะห์ทรานสคริปโตมิกส์ บ่งชี้ว่า *Mycolicibacterium* เป็นแบคทีเรียที่มีบทบาทหลักในการย่อยสลาย PAHs และน้ำมันดิบ โดย NidAB เป็นเอนไซม์สำคัญที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายสารผสมไพรีนและฟลูออแรนทีนซึ่งเป็นตัวแทนของ PAHs มวลโมเลกุลสูง นอกจากนี้ ribosomal protein, iron transporter, ABC transporters และ stress response proteins อาจมีบทบาททำให้สายพันธุ์ PO1 และ PO2 อยู่รอดในสภาวะกดดัน *Novosphingobium* มีส่วนช่วยในการย่อยสลายสารตัวกลางในวิถีการย่อยสลาย และ *Bacillus* สร้างสารลดแรงตึงผิว ซึ่งคาดว่าช่วยทำให้แบคทีเรียหลักเข้าถึงสารมลพิษได้ดีขึ้น นอกจากนี้การวิเคราะห์ข้อมูลจีโนมเพิ่มเติม พบยีน *alkB* และ CYP153 ซึ่งเกี่ยวข้องกับการย่อยสลายอัลเคนในแบคทีเรียทุกสายพันธุ์ของกลุ่มแบคทีเรีย การพัฒนาต่อยอดกลุ่มแบคทีเรีย OPK ตรึงบนซีโอไลท์สำหรับบำบัดสิ่งแวดล้อมปนเปื้อนน้ำมันดิบ พบว่ากลุ่มแบคทีเรียตรึงสามารถกำจัดน้ำมันดิบความเข้มข้น 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตรในน้ำทะเลได้ 74 เปอร์เซ็นต์ใน 96 ชั่วโมง และสามารถใช้ซ้ำได้อย่างน้อย 5 รอบ การเติมกลุ่มแบคทีเรียตรึง OPK ในระบบนิเวศจำลองดินทรายช่วยเพิ่มประสิทธิภาพกำจัดน้ำมันดิบ (ความเข้มข้น 10,000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมดิน) จาก 45 เป็น 80.67 เปอร์เซ็นต์ใน 21 วัน และกระตุ้นการเพิ่มจำนวนของ *Alcanivorax* ซึ่งเป็นแบคทีเรียประจำถิ่นที่คาดว่ามีความสามารถในการย่อยไฮโดรคาร์บอน ทำให้อาจเกิดการดำเนินงานเสริมกันและส่งเสริมการกำจัดน้ำมันดิบในระบบนิเวศจำลองดินทราย ผลการวิจัยนี้ทำให้ได้ต้นแบบของผลิตภัณฑ์สำหรับบำบัดสิ่งแวดล้อมปนเปื้อนน้ำมันดิบ

สาขาวิชา จุลชีววิทยาและเทคโนโลยีจุลินทรีย์ ลายมือชื่อนิสิต .....  
 ปีการศึกษา 2564 ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาหลัก .....

# # 5872862623 : MAJOR MICROBIOLOGY AND MICROBIAL TECHNOLOGY

KEYWORD: Microbial consortium, PAHs, transcriptome, crude oil, Immobilization, 16S amplicon sequencing analysis

Natthariga Laothamteep : SYNERGISTIC DEGRADATION OF BACTERIAL CONSORTIA AND APPLICATION OF IMMOBILIZED CELLS IN DEGRADATION OF PETROLEUM HYDROCARBONS. Advisor: Assoc. Prof. Onruthai Pinyakong, Ph.D.

Oil-spill bioremediation is an eco-friendly and sustainable approach towards the environment. This study aims to examine the synergistic interactions of bacterial consortium in crude oil and polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) degradation and to develop an immobilized bacterial consortium as a ready-to-use bioproduct. The consortium OPK containing *Mycolicibacterium* strains PO1 and PO2, *Novosphingobium pentaromativorans* PY1 and *Bacillus subtilis* FW1, exhibited synergistic interaction in the biodegradation of pyrene, a mixture of PAHs, short- and long-chain alkanes, and crude oil. It maintained high degradation capacity over a wide range of pH values (5.0–9.0), temperatures (30–40°C), and salinities (20–60‰). The whole genome sequencing results of our previous study combined with the degradation performance, biosurfactant producing ability and/or transcriptome analysis indicated that *Mycolicibacterium* plays an important role in the PAH and crude oil degradation. NidAB was the major enzyme involved in the degradation of pyrene and fluoranthene mixture which are the representative of high molecular weight (HMW) PAHs. Moreover, ribosomal proteins, an iron transporter, ABC transporters and stress response proteins may play a role in the survival of strains PO1 and PO2 under stress conditions. Furthermore, *Novosphingobium* strain contributed to intermediate degradation and *Bacillus* produced a biosurfactant that facilitates the assimilation of pollutants by the main degraders. In addition, the *alkB* and CYP153 genes involved in alkane degradation were detected in the genome of OPK members. Zeolite-immobilized OPK was developed as a ready-to-use bioproduct for the bioremediation of crude oil-contaminated environment. The results showed that the immobilized OPK removed 74% of 1000 mg L<sup>-1</sup> crude oil within 96 h in sterilized seawater and could be reused for at least 5 cycles. Bioaugmentation using immobilized OPK in sandy soil microcosms significantly increased crude oil (10,000 mg kg<sup>-1</sup> soil) removal from 45% to 80.67% within 21 days and stimulated an increase in the relative abundances of *Alcanivorax*, indigenous hydrocarbon-degrading bacteria, which in turn enhanced crude oil removal from soil. This finding provides ideal bio-based product for bioremediation of crude oil-polluted environments.

|                 |  |                           |
|-----------------|--|---------------------------|
| Field of Study: | Microbiology and Microbial<br>Technology | Student's Signature ..... |
| Academic Year:  | 2021                                     | Advisor's Signature ..... |

## กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จเสร็จสิ้นสมบูรณ์ ด้วยความช่วยเหลืออย่างดียิ่งของรองศาสตราจารย์ ดร. อรุณทัย ภิญญาคง อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่ได้กรุณาถ่ายทอดความรู้ คำปรึกษา คำแนะนำ และข้อคิดเห็นที่เป็นประโยชน์ต่องานวิจัย รวมทั้งช่วยตรวจทานแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้ถูกต้องครบถ้วนสมบูรณ์ นอกจากนี้ ยังกรุณาให้โอกาสสนับสนุนและส่งเสริม ตลอดจนเป็นแรงบันดาลใจให้ข้าพเจ้ามีประสบการณ์ที่ดีตลอดมา ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้

ขอขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร.สุชาติา จันทร์ประทีป นภทร ที่ให้เกียรติเป็นประธานกรรมการสอบป้องกันวิทยานิพนธ์ ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.เอกวิทย์ ลือพร้อมชัย รองศาสตราจารย์ ดร.ปาหนัน เรืองสำราญ รองศาสตราจารย์ ดร.เบญจภรณ์ ประภักดิ์ และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.พรินท์พิดา สนธิพันธ์ ที่กรุณารับเป็นกรรมการในการสอบป้องกันวิทยานิพนธ์ ตลอดจนให้ความรู้ คำแนะนำ และตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้มีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

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

ขอขอบคุณทุนสนับสนุน ได้แก่ ทุนอุดหนุนการวิจัยประเภทโครงการความร่วมมือกับต่างประเทศ (ไทย-ญี่ปุ่น) จากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (NRCT-JSPS) ทุนการศึกษาหลักสูตรดุซุฎบัณฑิต “100 ปี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย” ทุนอุดหนุนการวิจัย “90 ปี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย” ทุนสนับสนุนนิตระดับปริญญาเอก และโทไปทำวิจัยในต่างประเทศ และศูนย์เชี่ยวชาญเฉพาะทางเทคโนโลยีจุลินทรีย์เพื่อการบำบัดมลพิษทางทะเล ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ขอขอบพระคุณศาสตราจารย์ ดร. สุชนา ชวนิชย์ อาจารย์ประจำภาควิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้ความอนุเคราะห์ในส่วนของการเก็บตัวอย่างดิน

ขอขอบพระคุณคณาจารย์ทุกท่านในภาควิชาจุลชีววิทยา ที่กรุณาให้ความรู้ คำแนะนำต่างๆ แก่ผู้วิจัยในการดำเนินงานวิจัย จนสำเร็จลุล่วงด้วยดี

ขอขอบคุณนางสาวชนกภรณ์ เมืองจินดา นายอดิสรณ์ รั้งสีหิรัญรัตน์ ดร. กัลยาณี นาโลกา และสมาชิกห้องปฏิบัติการวิจัย 1704/15 ทุกคนที่ให้คำปรึกษา และความช่วยเหลือตลอดมา

สุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณ นายนภดลและนางมะลิ เหล่าธรรมทีป ผู้เป็นบิดามารดา และนายรัชชัย และเด็กชายปณณธร สกุศลรุ่งโรจน์วุฒิ ผู้เป็นสามีและลูกชาย ที่ให้การสนับสนุนและเป็นกำลังใจ ทำให้งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ณัฐริกา เหล่าธรรมทีป

## สารบัญ

|   | หน้า |
|---|------|
| บทคัดย่อภาษาไทย.....  | ค    |
| บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....   | ง    |
| กิตติกรรมประกาศ.....  | จ    |
| สารบัญ.....   | ฉ    |
| สารบัญตาราง.....  | ฎ    |
| สารบัญรูปภาพ.....   | ฏ    |
| บทที่ 1 บทนำ.....   | 1    |
| บทที่ 2 ทบทวนวรรณกรรม.....  | 5    |
| 2.1 การปนเปื้อนน้ำมันปิโตรเลียม.....  | 5    |
| 2.2 องค์ประกอบของน้ำมันดิบ.....   | 9    |
| 2.3 พอลิไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน (Polycyclic Aromatic Hydrocarbons; PAHs)..... | 11   |
| 2.4 การบำบัดสิ่งแวดล้อมปนเปื้อนน้ำมันดิบและ PAHs โดยทางชีวภาพ.....                | 13   |
| 2.5 การสร้างกลุ่มแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพย่อยสลายน้ำมันดิบและ PAHs.....          | 17   |
| 2.6 ปัจจัยทางกายภาพที่มีผลต่อการย่อยสลายน้ำมันดิบและ PAHs.....                    | 27   |
| 2.6.1 ปัจจัยทางสิ่งแวดล้อม.....   | 27   |
| 2.6.1.1 อุณหภูมิ.....   | 27   |
| 2.6.1.2 ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH).....   | 28   |
| 2.6.1.3 ความเค็ม.....   | 28   |
| 2.6.1.4 ออกซิเจน.....   | 28   |
| 2.6.2 ชนิดและโครงสร้างของสารประกอบไฮโดรคาร์บอน.....                               | 29   |
| 2.7 วิธีการย่อยสลายน้ำมันดิบและ PAHs.....   | 29   |

|         |  |    |
|---------|--|----|
| 2.7.1   | วิธีการย่อยสลายอัลเคน.....   | 29 |
| 2.7.2   | เอนไซม์อัลเคนโมนอกซิจีเนส.....   | 30 |
| 2.7.3   | วิธีการย่อยสลาย PAHs.....  | 32 |
| 2.7.4   | เอนไซม์ไดออกซิจีเนส.....   | 33 |
| 2.8     | แบคทีเรียในงานวิจัยนี้.....  | 34 |
| 2.8.1   | แบคทีเรีย <i>Mycobacterium</i> .....   | 34 |
| 2.8.2   | แบคทีเรีย <i>Novosphingobium</i> .....                                       | 49 |
| 2.8.3   | แบคทีเรีย <i>Brucella intermedia</i> ( <i>Ochrobactrum intermedia</i> )..... | 50 |
| 2.8.4   | แบคทีเรีย <i>Bacillus</i> .....  | 51 |
| 2.9     | การศึกษาบทบาทของแบคทีเรียในกระบวนการย่อยสลาย.....                            | 51 |
| 2.10    | การตรึงแบคทีเรีย.....  | 52 |
| 2.10.1  | วิธีการตรึงแบคทีเรีย.....  | 53 |
| 2.10.2  | ชนิดของวัสดุตรึง.....  | 57 |
| 2.11    | การตรวจติดตามการบำบัดทางชีวภาพโดยใช้เทคนิคชีววิทยาโมเลกุล.....               | 58 |
| บทที่ 3 | วิธีการดำเนินงานวิจัย.....   | 60 |
| 3.1     | การจัดกลุ่มใหม่ของ <i>Mycobacterium</i> .....                                | 65 |
| 3.2     | สร้างกลุ่มแบคทีเรียย่อยสลายไพรีน.....  | 65 |
| 3.2.1   | เตรียมหัวเชื้อแบคทีเรีย.....   | 65 |
| 3.2.2   | ทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายไพรีนและสารมัธยันต์ของแบคทีเรียเดี่ยว.....        | 66 |
| 3.2.3   | ทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายไพรีนของกลุ่มแบคทีเรีย.....                       | 66 |
| 3.2.4   | ทดสอบการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ.....  | 68 |
| 3.2.5   | ทดสอบผลของปัจจัยทางสิ่งแวดล้อมต่อการย่อยสลายไพรีนของกลุ่มแบคทีเรีย.....      | 68 |
| 3.3     | ทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลาย PAHs ในรูปแบบสารค้ำผสมของกลุ่มแบคทีเรีย.....     | 69 |
| 3.3.1   | ทดสอบการย่อยสลาย PAHs ในรูปแบบสารค้ำผสมของกลุ่มแบคทีเรีย.....                | 69 |



|  |    |
|--|----|
| 3.3.2 วิเคราะห์กลไกของกลุ่มแบคทีเรียในการย่อยสลาย PAHs ในรูปแบบสารค้ำผสม .....   | 69 |
| 3.3.2.1 เพาะเลี้ยงกลุ่มแบคทีเรียเพื่อวิเคราะห์กลไกการย่อยสลาย PAHs รูปแบบสารค้ำผสม.....  | 69 |
| 3.3.2.2 สกัด RNA ของแบคทีเรีย.....   | 70 |
| 3.3.2.3 ตรวจสอบการปนเปื้อนดีเอ็นเอ (DNA) ในสารละลาย RNA.....   | 71 |
| 3.3.2.4 การวิเคราะห์ข้อมูล.....  | 72 |
| 3.4 สกัดและวิเคราะห์ PAHs หรือสารมัธยันต์ที่เหลืออยู่ด้วยเทคนิค High Performance Liquid Chromatography (HPLC) .....                  | 73 |
| 3.4.1 สกัด PAHs หรือสารมัธยันต์ .....  | 73 |
| 3.4.2 วิเคราะห์ปริมาณ PAHs หรือสารมัธยันต์ .....   | 73 |
| 3.5 ตรวจสอบหาสิ่งที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายนอร์มัล-อัลเคน .....   | 74 |
| 3.6 ทดสอบการย่อยสลายนอร์มัล-อัลเคนและน้ำมันดิบ .....   | 75 |
| 3.6.1 เตรียมหัวเชื้อแบคทีเรีย.....   | 75 |
| 3.6.2 ทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายนอร์มัล-อัลเคน .....  | 75 |
| 3.6.3 ทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันดิบ .....   | 76 |
| 3.7 สกัดและวิเคราะห์นอร์มัล-อัลเคนที่เหลืออยู่ด้วยเทคนิค Gas Chromatography ที่มีเครื่องตรวจวัด Flame Ionize Detector (GC-FID).....  | 76 |
| 3.7.1 สกัดนอร์มัล-อัลเคน .....   | 76 |
| 3.7.2 วิเคราะห์ปริมาณนอร์มัล-อัลเคน.....   | 77 |
| 3.8 สกัดและวิเคราะห์ปริมาณน้ำมันดิบที่เหลืออยู่ด้วยเทคนิค Gas Chromatography ที่มีเครื่องตรวจวัด Flame Ionize Detector (GC-FID)..... | 77 |
| 3.8.1 สกัดน้ำมันดิบ .....  | 77 |
| 3.8.2 วิเคราะห์ปริมาณน้ำมันดิบ .....   | 78 |
| 3.9 ทดสอบภาวะการตรึงกลุ่มแบคทีเรีย และทดสอบประสิทธิภาพกำจัดน้ำมันดิบของ กลุ่มแบคทีเรียตรึง .....                                     | 78 |

|          |   |    |
|----------|---|----|
| 3.9.1    | แปรผันปริมาณซีไอไลท์ .....  | 78 |
| 3.9.2    | แปรผันความเร็วรอบของการเขย่าในการตรึงแบคทีเรีย .....  | 79 |
| 3.9.3    | แปรผันระยะเวลาการตรึงแบคทีเรีย .....  | 79 |
| 3.9.4    | วิเคราะห์ลักษณะพื้นผิวของวัสดุตรึงก่อนและหลังการตรึงเซลล์ด้วยกล้องจุลทรรศน์<br>อิเล็กตรอนแบบส่องกราด..... | 80 |
| 3.9.5    | ทดสอบประสิทธิภาพกำจัดน้ำมันดิบด้วยกลุ่มแบคทีเรียตรึง .....  | 80 |
| 3.9.6    | ทดสอบผลของปัจจัยทางสิ่งแวดล้อมต่อการกำจัดน้ำมันดิบ .....  | 81 |
| 3.9.7    | ทดสอบประสิทธิภาพการกำจัดน้ำมันดิบแบบกึ่งต่อเนื่องของกลุ่มแบคทีเรียตรึง .....                              | 81 |
| 3.9.8    | ทดสอบประสิทธิภาพการใช้ซ้ำของกลุ่มแบคทีเรียตรึง.....   | 82 |
| 3.10     | ทดสอบประสิทธิภาพการบำบัดทรายเป็นอน้ำมันดิบในระบบนิเวศจำลองระดับ<br>ห้องปฏิบัติการ.....                    | 82 |
| 3.10.1   | วิเคราะห์ตัวอย่างดินทราย .....  | 82 |
| 3.10.2   | วิเคราะห์จำนวนแบคทีเรียทั้งหมดด้วยวิธี Most Probable Number (MPN) .....                                   | 82 |
| 3.10.3   | วิเคราะห์จำนวนแบคทีเรียที่ย่อยสลายน้ำมันดิบด้วยวิธี Most Probable Number<br>(MPN).....                    | 83 |
| 3.10.4   | ทดสอบประสิทธิภาพการบำบัดทรายเป็นอนปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนในระบบนิเวศ<br>จำลองระดับห้องปฏิบัติการ.....      | 83 |
| 3.10.5   | วิเคราะห์ปริมาณน้ำมันดิบที่เหลืออยู่ในดิน .....   | 84 |
| 3.10.5.1 | สกัดน้ำมันดิบ .....   | 84 |
| 3.10.5.2 | วิเคราะห์ปริมาณน้ำมันดิบที่เหลืออยู่ด้วย GC-FID.....  | 85 |
| 3.10.6   | ตรวจติดตามแบคทีเรียและการเปลี่ยนแปลงของประชาคมแบคทีเรียด้วยวิธี 16S<br>amplicon sequencing analysis ..... | 85 |
| 3.10.6.1 | สกัด DNA จากตัวอย่างดินทราย .....   | 85 |
| 3.10.6.2 | ตรวจสอบความสมบูรณ์ของ DNA.....  | 86 |
| 3.10.6.3 | เพิ่มจำนวนและตรวจสอบชิ้นส่วน DNA บริเวณ 16S rDNA.....   | 86 |

|  |     |
|--|-----|
| 3.11 วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ .....   | 87  |
| บทที่ 4 ผลการทดลองและอภิปรายผลการทดลอง.....  | 88  |
| 4.1 การจัดกลุ่มแบคทีเรียในจีโนม <i>Mycobacterium</i> เป็นจีโนมใหม่.....                                      | 88  |
| 4.2 การสร้างกลุ่มแบคทีเรียย่อยสลายไพรีน .....  | 89  |
| 4.2.1 ประสิทธิภาพย่อยสลายไพรีนและสารมัธยันต์ของแบคทีเรียเดี่ยว .....   | 89  |
| 4.2.2 ประสิทธิภาพย่อยสลายไพรีนของกลุ่มแบคทีเรีย.....   | 92  |
| 4.3 การสร้างลดแรงตึงผิวชีวภาพ .....  | 98  |
| 4.4 ปัจจัยที่ส่งผลต่อประสิทธิภาพย่อยสลายไพรีน.....   | 99  |
| 4.4.1 ผลของปัจจัยต่างๆ ทางสิ่งแวดล้อมต่อประสิทธิภาพการย่อยสลายไพรีนของ กลุ่ม<br>แบคทีเรีย OPK.....           | 99  |
| 4.4.2 ประสิทธิภาพย่อยสลาย PAHs ชนิดต่างๆ ของกลุ่มแบคทีเรีย OPK.....  | 104 |
| 4.4.3 ประสิทธิภาพย่อยสลาย PAHs ในรูปแบบสารคู่ผสมของกลุ่มแบคทีเรีย OPK.....                                   | 107 |
| 4.4.4 กลไกการตอบสนองของกลุ่มแบคทีเรีย OPK ระหว่างการย่อยสลายไพรีนและ ฟลูออแรน<br>นทีนในรูปแบบสารคู่ผสม ..... | 110 |
| 4.4.4.1 ประสิทธิภาพย่อยสลายไพรีนและฟลูออแรนทรินในรูปแบบสารคู่ผสมด้วย<br>กลุ่มแบคทีเรีย OPK.....              | 110 |
| 4.4.4.2 กลไกการตอบสนองของกลุ่มแบคทีเรีย OPK ระหว่างการย่อยสลายไพรีนและ<br>ฟลูออแรนทีนในรูปแบบสารคู่ผสม.....  | 111 |
| 4.4.4.2.1 ยีนประมวลรหัสเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลาย PAHs .....   | 113 |
| 4.4.4.2.2 ยีนประมวลรหัสเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการปรับตัวของ<br>แบคทีเรีย .....                         | 118 |
| 4.5 ลักษณะสมบัติเบื้องต้นของแบคทีเรียย่อยสลายน้ำมันดิบ .....   | 120 |
| 4.5.1 ยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายนอร์มัล-อัลเคนของน้ำมันดิบ.....  | 120 |
| 4.5.2 ประสิทธิภาพการย่อยสลายนอร์มัล-อัลเคนด้วยแบคทีเรียเดี่ยวและกลุ่มแบคทีเรีย OPK<br>.....                  | 123 |

|  |     |
|--|-----|
| 4.5.3 ประสิทธิภาพย่อยสลายน้ำมันดิบด้วยแบคทีเรียเดี่ยวและกลุ่มแบคทีเรีย OPK.....              | 123 |
| 4.6 ภาวะการตรึงกลุ่มแบคทีเรีย และประสิทธิภาพการกำจัดน้ำมันดิบของกลุ่มแบคทีเรียตรึง OPK ..... | 125 |
| 4.6.1 ภาวะที่เหมาะสมสำหรับการตรึงกลุ่มแบคทีเรียบนซีโอไลท์.....                               | 126 |
| 4.6.1.1 ปริมาณซีโอไลท์.....  | 126 |
| 4.6.1.2 ความเร็วในการเขย่า.....  | 126 |
| 4.6.1.3 ระยะเวลาในการตรึง .....  | 127 |
| 4.6.2 ประสิทธิภาพการกำจัดน้ำมันดิบของกลุ่มแบคทีเรียตรึง OPK.....                             | 127 |
| 4.6.3 ผลของปัจจัยทางสิ่งแวดล้อมต่อการกำจัดน้ำมันดิบ .....                                    | 129 |
| 4.6.4 ประสิทธิภาพการกำจัดน้ำมันดิบแบบกึ่งต่อเนื่องและการใช้ซ้ำของ กลุ่มแบคทีเรียตรึง .....   | 133 |
| 4.6.5 ประสิทธิภาพการบำบัดทรายน้ำมันดิบในระบบนิเวศจำลองระดับห้องปฏิบัติการ .....              | 136 |
| 4.6.5.1 สมบัติทางกายภาพ เคมี และชีวภาพของตัวอย่างดินทรายนจากอ่าวลวกโยน .                     | 136 |
| 4.6.5.2 ประสิทธิภาพการบำบัดทรายน้ำมันดิบในระบบจำลอง .....                                    | 137 |
| 4.6.5.3 การเปลี่ยนแปลงของประชาคมแบคทีเรียในระบบจำลอง .....                                   | 140 |
| บรรณานุกรม.....  | 143 |
| ภาคผนวก ก สูตรและวิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ .....   | 164 |
| ภาคผนวก ข สูตรและวิธีการเตรียมสารละลาย .....   | 167 |
| ภาคผนวก ค.....   | 173 |
| ภาคผนวก ง .....  | 190 |
| ประวัติผู้เขียน.....   | 216 |

## สารบัญตาราง

|   |     |
|---|-----|
| ตารางที่ 2.1 เหตุการณ์น้ำมันรั่วไหลครั้งยิ่งใหญ่ในประวัติศาสตร์โลก (ITOPE, 2020).....   | 6   |
| ตารางที่ 2.2 เหตุการณ์น้ำมันรั่วไหลปริมาณมาก (20,000 ลิตรขึ้นไป) (MarineDepartment, 2020)<br>.....  | 7   |
| ตารางที่ 2.3 สมบัติทางกายภาพและเคมีของ PAHs จำนวน 16 ชนิด (Pazos และคณะ, 2010;<br>Okere และSemple, 2012; Alegbeleye และคณะ, 2017).....  | 14  |
| ตารางที่ 2.4 ตัวอย่างกลุ่มแบคทีเรียซึ่งสร้างจากแบคทีเรียเดี่ยวที่มีความสามารถย่อยสลายน้ำมันดิบ<br>และ PAHs .....  | 20  |
| ตารางที่ 2.5 <i>Mycobacterium</i> ที่มีความสามารถย่อยสลายน้ำมันดิบ อัลเคน และ PAHs .....  | 37  |
| ตารางที่ 2.6 ยีนและเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายไพรีนและฟลูออแรนทีนของ<br><i>M. vanbaalenii</i> PYR-1 .....  | 48  |
| ตารางที่ 2.7 แบคทีเรียที่เรียงกันจัดน้ำมันปิโตรเลียม .....  | 55  |
| ตารางที่ 3.1 ไพร์เมอร์ที่ใช้ในงานวิจัย .....  | 64  |
| ตารางที่ 3.2 แบคทีเรียที่ใช้ในงานวิจัยนี้ (Wanapaisan และคณะ, 2018).....  | 64  |
| ตารางที่ 3.3 กลุ่มแบคทีเรียในรูปแบบต่างๆ .....  | 67  |
| ตารางที่ 3.4 แบคทีเรียและยีนที่ใช้เป็นฐานข้อมูลสำหรับการค้นหาที่ยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลาย  | 74  |
| ตารางที่ 3.5 ระบบนิเวศจำลองดินสำหรับการบำบัดดินทรายเป็นน้ำมันดิบด้วย<br>กลุ่มแบคทีเรียที่เรียงกัน.....  | 84  |
| ตารางที่ 4.1 ประสิทธิภาพของแบคทีเรียเดี่ยวสายพันธุ์ PO1, PO2, PY1, PW1 และ FW1 ใน<br>การย่อยสลายพทาเลท ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30<br>องศาเซลเซียส ในระยะเวลา 6 ชั่วโมง ปริมาณหัวเชื้อแบคทีเรียเริ่มต้นประมาณ $10^6$ CFU ต่อ<br>มิลลิลิตร (Wanapaisan และคณะ, 2018)..... | 91  |
| ตารางที่ 4.2 ค่าแรงดึงผิวของอาหารเหลว Productive medium ที่มีน้ำมันพืชและไพรีนเป็น<br>แหล่งคาร์บอน (Laothamteep และคณะ, 2021).....  | 98  |
| ตารางที่ 4.3 การจัดกลุ่มของยีนในสายพันธุ์ PO1, PO2, PY1 และ FW1 ด้วยฐานข้อมูล COG<br>(Laothamteep และคณะ, 2021).....  | 112 |
| ตารางที่ 4.4 ผลการวิเคราะห์ยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายนอร์มัล-อัลเคนในน้ำมันดิบจากข้อมูล<br>จีโนม (Laothamteep และคณะ, 2022).....  | 121 |

|   |     |
|---|-----|
| ตารางที่ 4.5 ผลการส่งวิเคราะห์ตัวอย่างดินทรายจากอ่าวลูกโยน จังหวัดระยอง ที่ได้รับการปนเปื้อน<br>ภายหลังเหตุการณ์น้ำมันรั่วไหล 1 เดือน ..... | 137 |
| ตารางที่ 4.6 ประสิทธิภาพของแบคทีเรียตรงในการบำบัดสิ่งแวดล้อมปนเปื้อนน้ำมันดิบ .....   | 139 |



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
CHULALONGKORN UNIVERSITY

## สารบัญรูปภาพ

|   |    |
|---|----|
| รูปที่ 2.1 สาเหตุการเกิดน้ำมันรั่วไหลลงสู่สิ่งแวดล้อม (Sayed และคณะ, 2021).....   | 5  |
| รูปที่ 2.2 พฤติกรรมของน้ำมันเมื่อรั่วไหลลงสู่ทะเล (Wang และคณะ, 2021).....  | 9  |
| รูปที่ 2.3 องค์ประกอบหลักของน้ำมันดิบ (Koshlaf และBall, 2017).....  | 10 |
| รูปที่ 2.4 โครงสร้างของ PAHs 16 ชนิดในรายชื่อสารมลพิษที่สำคัญของ USEPA .....  | 12 |
| รูปที่ 2.5 วิธีการกำจัดน้ำมันออกจากสิ่งแวดล้อม (Sayed และคณะ, 2021).....  | 15 |
| รูปที่ 2.6 โครงสร้างของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ (Mao และคณะ, 2015).....   | 26 |
| รูปที่ 2.7 การผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพช่วยย่อยสลายน้ำมันดิบ (ก) (Hassanshahian และคณะ,<br>2020) และ PAHs (ข) (Chauhan และคณะ, 2008).....                    | 27 |
| รูปที่ 2.8 กระบวนการย่อยสลายไฮโดรคาร์บอนในสถานะที่มีออกซิเจน (Ossai และคณะ, 2020)..   | 29 |
| รูปที่ 2.9 วิธีการย่อยสลายอัลเคน (Varjani, 2017) .....  | 30 |
| รูปที่ 2.10 วิถีและเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายอัลเคนของ <i>Pseudomonas putida</i> GPo1<br>.....  | 31 |
| รูปที่ 2.11 วิธีการย่อยสลาย PAHs ในสถานะที่มีออกซิเจน (Lin และคณะ, 2019) .....  | 33 |
| รูปที่ 2.12 การจัดเรียงระบบการทำงานร่วมกันของระบบเอนไซม์ไดออกซิจีเนส .....  | 34 |
| รูปที่ 2.13 การจัดเรียงตัวของอะโรมาติกริงไฮดรอกซิเลทิงไดออกซิจีเนสบริเวณหน่วยย่อยแอลฟา<br>ประกอบด้วย 2 โดเมนคือ Rieske โดเมน และริงไฮดรอกซิเลทิงโดเมน ..... | 34 |
| รูปที่ 2.14 กระบวนการหลักของการย่อยสลาย PAHs ของ <i>M. vanbaalenii</i> PYR-1 .....  | 41 |
| รูปที่ 2.15 แผนที่ความร้อนแสดงเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลาย PAHs ของ<br><i>M. vanbaalenii</i> PYR-1 (Kweon และคณะ, 2011).....                          | 43 |
| รูปที่ 2.16 ตำแหน่งของการเกิดการแตกวงอะโรมาติกด้วยยีน <i>nidA</i> และยีน <i>nidA3</i> .....   | 44 |
| รูปที่ 2.17 การจัดเรียงตัวของกลุ่มยีนประมวลรหัสเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายไพรีนของ<br><i>M. vanbaalenii</i> PYR-1 (Kim และคณะ, 2007) .....           | 45 |
| รูปที่ 2.18 วิธีการย่อยสลายไพรีนและเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายไพรีนของ<br><i>M. vanbaalenii</i> PYR-1 (Kim และคณะ, 2007) .....                       | 46 |
| รูปที่ 2.19 วิธีการย่อยสลายฟลูออแรนทีนและเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายฟลูออแรนทีน<br>ของ <i>M. vanbaalenii</i> PYR-1 (Kweon และคณะ, 2007).....         | 47 |
| รูปที่ 2.20 รูปแบบการตรึงเซลล์ (Dzionic และคณะ, 2016) .....   | 53 |
| รูปที่ 2.21 ซีไอโอไลท์ (บริษัท เอส.พี. มาร์เก็ตติ้ง, ประเทศไทย).....  | 57 |

|             |   |     |
|-------------|---|-----|
| รูปที่ 2.22 | โครงสร้างซีโอไลท์ (Moghaddam และคณะ, 2018) .....  | 57  |
| รูปที่ 2.23 | เทคนิคชีววิทยาโมเลกุลที่ใช้ในการตรวจติดตามการบำบัดสิ่งแวดล้อม .....   | 59  |
| รูปที่ 4.1  | แผนภูมิต้นไม้แสดงความสัมพันธ์ของแบคทีเรียจากข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ บริเวณยีน 16S rRNA (การวิเคราะห์แบบ Neighbor-joining และ Bootstrap จำนวน 1,000 ครั้ง).....  | 89  |
| รูปที่ 4.2  | ประสิทธิภาพของแบคทีเรียเดียวในการย่อยสลายไพลิน ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 วัน ปริมาณหัวเชื้อแบคทีเรีย เริ่มต้นประมาณ $10^6$ CFU ต่อมิลลิลิตร (Wanapaisan และคณะ, 2018).....  | 90  |
| รูปที่ 4.3  | ประสิทธิภาพของแบคทีเรียเดียวสายพันธุ์ PO1, PO2, PY1 และ PW1 ในการย่อยสลาย พทาเลท ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในระยะเวลา 36 ชั่วโมง ปริมาณหัวเชื้อแบคทีเรียเริ่มต้นประมาณ $10^6$ CFU ต่อมิลลิลิตร (Wanapaisan และคณะ, 2018).....   | 92  |
| รูปที่ 4.4  | ประสิทธิภาพของกลุ่มแบคทีเรีย 4 หรือ 5 สายพันธุ์ในการย่อยสลายไพลิน ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 9 วัน ปริมาณหัวเชื้อแบคทีเรียเริ่มต้นประมาณ $10^6$ CFU ต่อมิลลิลิตร (Wanapaisan และคณะ, 2018).....   | 93  |
| รูปที่ 4.5  | ประสิทธิภาพของแบคทีเรียสายพันธุ์เดี่ยว PO1 และ PO2 และ กลุ่มแบคทีเรีย 2 หรือ 3 สายพันธุ์ในการย่อยสลายไพลิน ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน ปริมาณหัวเชื้อแบคทีเรียเริ่มต้นประมาณ $10^6$ CFU ต่อ มิลลิลิตร (*แบคทีเรียสายพันธุ์เดี่ยว PO1 และ PO2 ไม่ได้ทดสอบย่อยสลายไพลินในวันที่ 1) ..... | 94  |
| รูปที่ 4.6  | แผนภาพการย่อยสลายไพลินด้วยกลุ่มแบคทีเรีย ประกอบด้วยสายพันธุ์ PO1, PO2, PY1, PW1 และ FW1 .....   | 96  |
| รูปที่ 4.7  | ประสิทธิภาพย่อยสลายของกลุ่มแบคทีเรีย OPK ในการย่อยสลายไพลิน ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ในสภาวะแปรผันค่า pH (ก), อุณหภูมิ (ข) และการเติม NaCl (ค) ปริมาณหัวเชื้อแบคทีเรียเริ่มต้นประมาณ $10^6$ CFU ต่อมิลลิลิตร .....  | 101 |
| รูปที่ 4.8  | จำนวนแบคทีเรียในกลุ่มแบคทีเรียภายใต้สภาวะการแปรผันค่า pH เท่ากับ 5.0 (ก), 6.0 (ข), 7.0 (ค), 8.0 (ง) และ 9.0 (จ).....  | 102 |
| รูปที่ 4.9  | จำนวนแบคทีเรียในกลุ่มแบคทีเรีย OPK ภายใต้สภาวะการแปรผัน อุณหภูมิห้อง (24 ถึง 28 องศาเซลเซียส) (ก), 30 (ข) และ 37 องศาเซลเซียส (ค) .....   | 103 |
| รูปที่ 4.10 | จำนวนแบคทีเรียในกลุ่มแบคทีเรีย OPK ภายใต้สภาวะการเติม NaCl 0 (ก), 1 (ข), 3 (ค) และ 5 (ง) เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร).....   | 104 |



|   |     |
|---|-----|
| <b>รูปที่ 4.11</b> ประสิทธิภาพการย่อยสลายของกลุ่มแบคทีเรีย OPK ในการย่อยสลาย PAHs ในรูปแบบสารเดี่ยว ได้แก่ แอนทราซีน, ฟลูออรีน, พีแนนทริน และ ฟลูออแรนทีน ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 วัน .....   | 105 |
| <b>รูปที่ 4.12</b> จำนวนแบคทีเรียในกลุ่มแบคทีเรีย OPK ในการย่อยสลาย PAHs ในรูปแบบสารเดี่ยว ได้แก่ แอนทราซีน (ก) ฟลูออรีน (ข) พีแนนทริน (ค) และฟลูออแรนทีน (ง) ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 วัน .....   | 106 |
| <b>รูปที่ 4.13</b> ประสิทธิภาพการย่อยสลายของกลุ่มแบคทีเรีย OPK ในการย่อยสลาย PAHs ในรูปแบบสารคู่ผสม ได้แก่ ไพรีนและแอนทราซีน (ก) ไพรีนและพีแนนทริน (ข) ไพรีนและฟลูออรีน (ค) และไพรีนและฟลูออแรนทีน (ง) ความเข้มข้นชนิดละ 50 มิลลิกรัมต่อลิตร ความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 วัน .....   | 108 |
| <b>รูปที่ 4.14</b> จำนวนแบคทีเรียในกลุ่มแบคทีเรีย OPK ในการย่อยสลาย PAHs ในรูปแบบสารคู่ผสม ได้แก่ ไพรีนและแอนทราซีน (ก) ไพรีนและพีแนนทริน (ข) ไพรีนและฟลูออรีน (ค) และไพรีนและฟลูออแรนทีน (ง) ความเข้มข้นชนิดละ 50 มิลลิกรัมต่อลิตร ความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 วัน.....   | 109 |
| <b>รูปที่ 4.15</b> ประสิทธิภาพย่อยสลายของกลุ่มแบคทีเรีย OPK ในการย่อยสลายไพรีนและฟลูออแรนทีน ในรูปแบบสารเดี่ยว ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร และในรูปแบบสารคู่ผสม ความเข้มข้นชนิดละ 50 มิลลิกรัมต่อลิตร ความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 144 ชั่วโมง .....   | 110 |
| <b>รูปที่ 4.16</b> แผนภาพความร้อนแสดงระดับการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายไพรีน และฟลูออแรนทีนในรูปแบบสารคู่ผสมของสายพันธุ์ PO1 (ก), PO2 (ข) และ PY1 (ค).....  | 115 |
| <b>รูปที่ 4.17</b> วิธีการย่อยสลายไพรีนและฟลูออแรนทีนของสายพันธุ์ PO1, PO2 และวิถีการย่อยสลายพหุเลทของสายพันธุ์ PY1 (กรอปสี่เหลี่ยมสีเหลือง) ด้วยวิธีการวิเคราะห์จีโนม (Wanapaisan และคณะ, 2018).....   | 117 |
| <b>รูปที่ 4.18</b> ประสิทธิภาพย่อยสลายของสายพันธุ์ PO1, PO2, PY1 และ FW1 และกลุ่มแบคทีเรีย OPK ในการย่อยสลายนอร์มัล-เตตระเดคเคน ความเข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อลิตร (ก) นอร์มัล-เฮกซะเดคเคน ความเข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อลิตร (ข) และนอร์มัล-โดโคเซน ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร (ค) ความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิห้อง (28-30 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 7 วัน..... | 124 |
| <b>รูปที่ 4.19</b> ประสิทธิภาพย่อยสลายของสายพันธุ์เดี่ยว PO1, PO2, PY1 และ FW1 และกลุ่มแบคทีเรีย OPK ในการย่อยสลายน้ำมันดิบ ความเข้มข้น 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร ความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิห้อง (28-30 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 7 วัน.....  | 125 |

|             |   |     |
|-------------|---|-----|
| รูปที่ 4.20 | ภาพถ่ายลักษณะพื้นผิวของซีโอไลท์ กำลังขยาย 10,000 เท่า (ก)<br>และภาพการการยึดเกาะของแบคทีเรียในกลุ่มแบคทีเรียกำลังขยาย 10,000 เท่า (ข) .....   | 126 |
| รูปที่ 4.21 | จำนวนแบคทีเรียที่ตรึงอยู่บนซีโอไลท์ที่มีการแปรผันปริมาณซีโอไลท์ (ก)<br>ความเร็วในการเขย่า (ข) และระยะเวลาในการตรึง (ค) .....  | 128 |
| รูปที่ 4.22 | ประสิทธิภาพของกลุ่มแบคทีเรียตรึง OPK ในการกำจัดน้ำมันดิบ ความเข้มข้น 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร ความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิห้อง (28-30 องศาเซลเซียส) ในอาหารเหลว NSW (ก) และในน้ำทะเลปลอดเชื้อที่ไม่มีการเติมสารอาหาร (ข).....                       | 129 |
| รูปที่ 4.23 | ประสิทธิภาพของกลุ่มแบคทีเรียและกลุ่มแบคทีเรียตรึง OPK ในการกำจัดน้ำมันดิบ ความเข้มข้น 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตรภายใต้การแปรผันค่า pH (ก), อุณหภูมิ (ข)<br>และความเค็ม (ค) เป็นระยะเวลา 5 วัน.....  | 132 |
| รูปที่ 4.24 | ประสิทธิภาพย่อยสลายน้ำมันดิบระหว่างกลุ่มแบคทีเรียเซลล์อิสระ และกลุ่มแบคทีเรียตรึง OPK ในการทดลองแบบกึ่งต่อเนื่อง ที่ความเข้มข้นเริ่มต้นของน้ำมันดิบ 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร และเติมน้ำมันดิบ 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร ทุก 3 วัน ตามตำแหน่งของลูกศร ..... | 133 |
| รูปที่ 4.25 | จำนวนแบคทีเรียของกลุ่มแบคทีเรีย OPK ในรูปแบบเซลล์อิสระ (ก) และรูปแบบเซลล์<br>ตรึง (ข) ในการทดลองแบบกึ่งต่อเนื่อง .....  | 134 |
| รูปที่ 4.26 | ประสิทธิภาพการใช้ออกซิเจนของกลุ่มแบคทีเรียตรึง OPK ในการกำจัดน้ำมันดิบ ความเข้มข้น 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 3 วัน จำนวน 7 รอบ.....   | 135 |
| รูปที่ 4.27 | จำนวนแบคทีเรียของกลุ่มแบคทีเรียในการทดลองการใช้ออกซิเจนของกลุ่มแบคทีเรียตรึง OPK .....  | 136 |
| รูปที่ 4.28 | ประสิทธิภาพของกลุ่มแบคทีเรียตรึง OPK ในการบำบัดดินทรายปนเปื้อนน้ำมันดิบ ความเข้มข้น 10,000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมดินใน 4 ชุดการทดลอง อุณหภูมิห้อง (28-30 องศาเซลเซียส) เป็นระยะเวลา 21 วัน (Laothamteep และคณะ, 2022).....                              | 138 |
| รูปที่ 4.29 | โครงสร้างประชาคมแบคทีเรียระดับคลาส (class) ในชุดการทดลอง BA, BS และ NA (Laothamteep และคณะ, 2022).....  | 140 |
| รูปที่ 4.30 | โครงสร้างประชาคมแบคทีเรียระดับจีนัส (genus) ในชุดการทดลอง BA, BS และ NA (Laothamteep และคณะ, 2022).....   | 142 |

## บทที่ 1

### บทนำ

การปนเปื้อนของน้ำมันปิโตรเลียมในทะเลเป็นปัญหาสำคัญที่เกิดขึ้นทั่วโลก โดยมีสาเหตุจากการขนส่งน้ำมัน การคมนาคมทางน้ำ การเกิดอุบัติเหตุทางทะเล และการรั่วไหลของน้ำมันตามเส้นทางการขนส่งและถ่ายน้ำมันเข้าออกเรือ (Sayed และคณะ, 2021) สำหรับประเทศไทยพบการรั่วไหลของน้ำมันปิโตรเลียมลงสู่ทะเลอย่างต่อเนื่อง โดยเมื่อไม่นานมานี้เกิดเหตุการณ์น้ำมันดิบรั่วไหลในทะเลมาบตาพุด จังหวัดระยอง เมื่อวันที่ 25 มกราคม พ.ศ. 2565 ประมาณ 20,000 ลิตร บริเวณทุ่นผูกเรือน้ำลึกแบบทุ่นเดี่ยวกลางทะเลหรือจุดขนถ่ายน้ำมัน และในวันที่ 10 กุมภาพันธ์ พ.ศ. 2565 พบน้ำมันรั่วไหลกลางทะเลซ้ำที่จุดเดิมประมาณ 5,000 ลิตร (กรมเจ้าท่า, 2565) การรั่วไหลของน้ำมันปิโตรเลียมส่งผลกระทบต่อสิ่งมีชีวิตและสิ่งแวดล้อมเป็นอย่างมาก เนื่องจากน้ำมันปิโตรเลียมมีองค์ประกอบสำคัญที่มีความเป็นพิษต่อสิ่งมีชีวิต ได้แก่ พอลิไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน (Polycyclic Aromatic Hydrocarbons; PAHs) ซึ่งเป็นสารก่อมะเร็ง และสามารถตกค้างในสิ่งแวดล้อมเป็นเวลานาน (Alegbeleye และคณะ, 2017) จากผลกระทบดังกล่าวจึงจำเป็นต้องมีการบำบัดสิ่งแวดล้อมปนเปื้อนน้ำมัน ปัจจุบันการบำบัดทางชีวภาพโดยอาศัยการทำงานของแบคทีเรียมีบทบาทสำคัญในการย่อยสลายน้ำมัน ซึ่งการใช้กลุ่มแบคทีเรียในการบำบัดสิ่งแวดล้อมเป็นทางเลือกที่น่าสนใจอย่างยิ่ง เนื่องจากมีความหลากหลายของชนิดแบคทีเรียและวิถีเมแทบอลิซึม อย่างไรก็ตามจำเป็นต้องคัดเลือกแบคทีเรียในกลุ่มที่เหมาะสม และเข้าใจกลไกการทำงานร่วมกันของแบคทีเรียในกลุ่มแบคทีเรีย โดยแบคทีเรียต่างสายพันธุ์กันอาจช่วยเสริมประสิทธิภาพการย่อยสลายโดยเข้าย่อยสลายโมเลกุลของสารพิษในตำแหน่งที่แตกต่างกัน หรือบางสายพันธุ์อาจช่วยย่อยสลายสารตัวกลางที่ได้จากการย่อยสลายสารพิษตั้งต้นของแบคทีเรียสายพันธุ์อื่น รวมทั้งบางสายพันธุ์อาจผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ ช่วยเพิ่มการละลายของสารพิษ ทำให้แบคทีเรียสามารถเข้าถึงและย่อยสลายได้ดีขึ้น ทำให้ประสิทธิภาพการย่อยสลายเพิ่มมากขึ้น

การศึกษาเชิงลึกถึงการแสดงออกของยีนของแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์ (ทรานสคริปโตม) ในระหว่างการย่อยสลายทางชีวภาพในสภาวะแวดล้อมที่กำหนด ช่วยทำให้เข้าใจบทบาทของแบคทีเรียในการบำบัดทางชีวภาพได้ดียิ่งขึ้น โดยทำให้ทราบบทบาทและการตอบสนองของแบคทีเรียจากยีนที่แสดงออกในสภาวะแวดล้อมที่สนใจ การเข้าใจกลไกการทำงานในการย่อยสลายมลพิษ สามารถใช้เป็นข้อมูลเบื้องต้นสำหรับต่อยอดในการนำกลุ่มแบคทีเรียไปประยุกต์ใช้ในการบำบัดทางชีวภาพ มี

รายงานวิจัยศึกษาบทบาทและการตอบสนองของแบคทีเรียเดี่ยวในสภาวะแวดล้อมที่สนใจ เช่น ในสภาวะที่มี PAHs ในรูปแบบสารเดี่ยว น้ำมันปิโตรเลียม หรือการเติมสารลดแรงตึงผิวระหว่างการย่อยสลาย PAH เป็นต้น (Hong และคณะ, 2016; Liu และคณะ, 2017; Yuan และคณะ, 2018; Li และคณะ, 2020) อย่างไรก็ตามรายงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับกลุ่มแบคทีเรียในการตอบสนองต่อสภาวะแวดล้อมยังคงมีจำกัด ดังนั้นในงานวิจัยนี้สนใจศึกษาบทบาทและการตอบสนองของกลุ่มแบคทีเรียในสภาวะที่มี PAHs ในรูปแบบสารคู่ผสม

การประยุกต์ใช้แบคทีเรียในการบำบัดสิ่งแวดล้อมปนเปื้อนให้มีประสิทธิภาพและประสบความสำเร็จขึ้นอยู่กับการรอดชีวิตของแบคทีเรียที่เติมลงไป และสามารถคงอยู่ได้ในระบบบำบัดหรือพื้นที่ที่ต้องการบำบัดได้นาน โดยไม่ถูกชะล้างออกไปได้ง่าย (Dzionic และคณะ, 2016) สามารถทำได้โดยการตรึงแบคทีเรีย (immobilization) ให้อยู่กับที่ โดยอาศัยการยึดเกาะบนวัสดุตรึง ในงานวิจัยนี้สนใจซีโอไลท์ (zeolite) เป็นวัสดุตรึง เนื่องจากมีรูพรุนและพื้นผิวมาก คาดว่าแบคทีเรียสามารถยึดเกาะได้เป็นจำนวนมาก (Liang และคณะ, 2009; Moghaddam และคณะ, 2018) โดยซีโอไลท์นิยมใช้ในระบบบำบัดน้ำเสีย (Reeve และ Fallowfield, 2018) และใช้เป็นวัสดุดูดซับน้ำมัน (Kalbuadi และคณะ, 2019) ดังนั้นจึงมีความน่าสนใจในการพัฒนาเซลล์ตรึงกลุ่มแบคทีเรียบนซีโอไลท์เพื่อประยุกต์ใช้ในสิ่งแวดล้อมปนเปื้อนน้ำมัน

ห้องปฏิบัติการของหน่วยปฏิบัติการวิจัยเทคโนโลยีจุลินทรีย์เพื่อการจัดการมลพิษทางทะเล ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย สามารถคัดแยกแบคทีเรียเดี่ยวได้แก่ *Mycolicibacterium* spp. PO1 และ PO2, *Novoshingobium pentaromativorans* PY1, *Brucella intermedia* PW1 และ *Bacillus subtilis* FW1 จากกลุ่มแบคทีเรียที่มีความสามารถย่อยสลายไพรีน ซึ่งเพิ่มจำนวนแบคทีเรียจากดินตะกอนป่าชายเลน และจากการวิเคราะห์จีโนมของแบคทีเรียทั้ง 5 สายพันธุ์ พบยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายไพรีนได้อย่างสมบูรณ์ในสายพันธุ์ PO1 และ PO2 พบยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลาย PAHs ในวิถีกลางในสายพันธุ์ PY1 และ PW1 และพบยีนที่ผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดลิโปเปปไทด์ในสายพันธุ์ FW1 (Wanapaisan และคณะ, 2018) จากสมบัติที่หลากหลายและแตกต่างกันของแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์ ทำให้การวิเคราะห์การอยู่ร่วมกันและการทำงานร่วมกันในการย่อยสลาย PAHs ของแบคทีเรียดังกล่าวมีความน่าสนใจเป็นอย่างมาก โดยมีรายงานว่า *Mycolicibacterium* และ Sphingomonads เป็นแบคทีเรีย 2 กลุ่มหลักที่มีบทบาทสำคัญในการย่อยสลาย PAHs ในสิ่งแวดล้อมต่างๆ ทั้งในดิน ป่าชายเลน และในน้ำทะเล (Ghosal และคณะ, 2016)

งานวิจัยนี้มุ่งเน้นศึกษากลไกการทำงานร่วมกันของแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์ ด้วยการสร้างกลุ่มแบคทีเรียที่มีจำนวนและสายพันธุ์แบคทีเรียที่แตกต่างกัน และคัดเลือกรูปแบบของกลุ่มแบคทีเรียที่มีความสามารถย่อยสลายไพรีน ศึกษาผลของปัจจัยทางสิ่งแวดล้อมต่างๆ ได้แก่ ค่า pH อุณหภูมิ และความเค็ม ต่อการเจริญและประสิทธิภาพการย่อยสลายไพรีนของกลุ่มแบคทีเรีย และศึกษาประสิทธิภาพการย่อยสลาย PAHs ในรูปแบบสารเดี่ยวและสารคู่ผสม รวมทั้งศึกษาเชิงลึกถึงการตอบสนองของกลุ่มแบคทีเรียต่อการย่อยสลาย PAHs ในรูปแบบสารคู่ผสมในระดับการแสดงออกของยีน ซึ่งจะทำให้เพิ่มความเข้าใจกลไกการทำงานในการย่อยสลาย PAHs นอกจากนี้ได้ศึกษาความสามารถย่อยสลายน้ำมันดิบและองค์ประกอบหลักในน้ำมันดิบ ได้แก่ นอร์มัล-อัลเคน โดยคาดว่า แบคทีเรียที่มีความสามารถย่อยสลาย PAHs ซึ่งเป็นองค์ประกอบหนึ่งในน้ำมันดิบ น่าจะมีความสามารถย่อยสลายน้ำมันดิบและนอร์มัล-อัลเคนได้เช่นกัน จากนั้นพัฒนากลุ่มแบคทีเรียสำหรับบำบัดสิ่งแวดล้อมปนเปื้อนน้ำมันดิบในรูปแบบเซลล์ตรึงด้วยการหาภาวะการตรึงที่เหมาะสมสำหรับกลุ่มแบคทีเรีย และทดสอบประสิทธิภาพการกำจัดน้ำมันดิบของเซลล์ตรึงในอาหารเหลวและในน้ำทะเลปลอดเชื้อที่ไม่มีการเติมสารอาหาร รวมทั้งศึกษาประสิทธิภาพการกำจัดน้ำมันดิบภายใต้สภาวะการแปรผันปัจจัยทางสิ่งแวดล้อม ได้แก่ ค่า pH อุณหภูมิ และความเค็ม การใช้ซ้ำ และในการทดลองแบบกึ่งต่อเนื่อง จากนั้นทดสอบประสิทธิภาพการบำบัดทรายน้ำมันดิบโดยเซลล์ตรึงในระบบนิเวศจำลองระดับห้องปฏิบัติการ

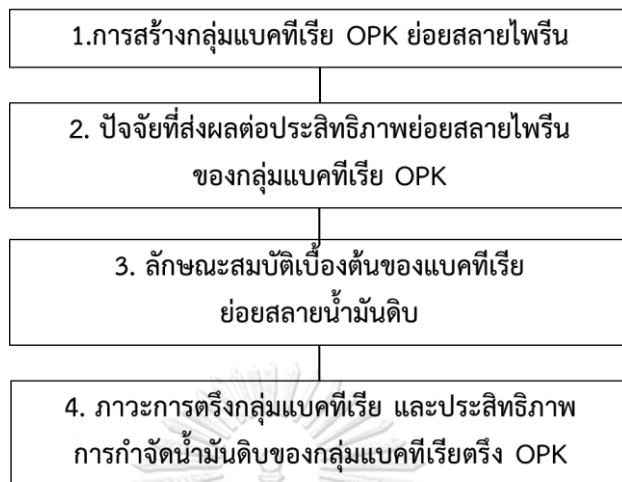
### วัตถุประสงค์

ศึกษากลไกการย่อยสลาย PAHs ในรูปแบบสารคู่ผสมของกลุ่มแบคทีเรียแบบเสริมกัน และพัฒนากลุ่มแบคทีเรียในรูปแบบเซลล์ตรึงสำหรับบำบัดดินทรายน้ำมันดิบ

### ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ทราบกลไกการย่อยสลาย PAHs ในรูปแบบสารคู่ผสมของกลุ่มแบคทีเรียแบบเสริมกัน และได้แบคทีเรียพร้อมใช้ในรูปแบบเซลล์ตรึงสำหรับบำบัดดินทรายน้ำมันปิโตรเลียมน้ำมันดิบ

## ภาพรวมของงานวิจัย



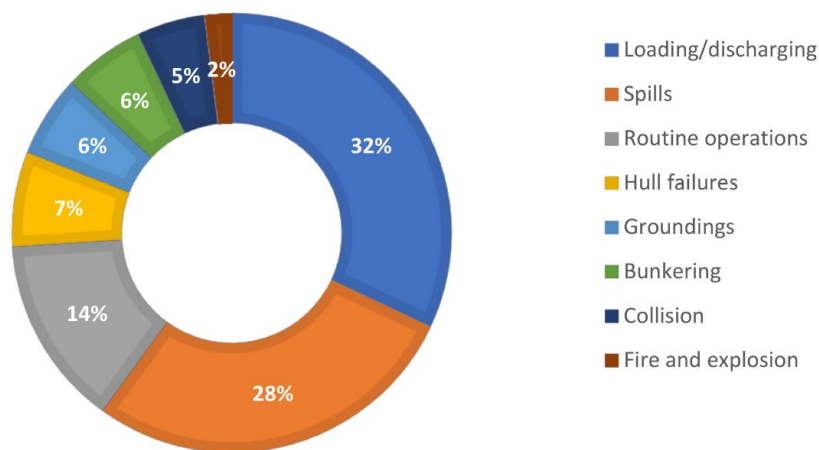
## บทที่ 2 ทบทวนวรรณกรรม

### 2.1 การปนเปื้อนน้ำมันปิโตรเลียม

น้ำมันดิบถือได้ว่าเป็นมีความสำคัญต่อระบบเศรษฐกิจของโลก เนื่องจากการนำไปใช้ประโยชน์อย่างกว้างขวางในทุกภาคส่วน ผลจากการขยายตัวทางด้านเศรษฐกิจ อุตสาหกรรม และการเพิ่มขึ้นของจำนวนประชากร ทำให้ความต้องการใช้พลังงานเพิ่มสูงขึ้น ในปี ค.ศ. 2020 มีความต้องการน้ำมันดิบมากถึง 9.3 ล้านบาร์เรลต่อวัน ใน 187 ประเทศทั่วโลก (IEA, 2020) ส่งผลให้มีโอกาสเกิดการปนเปื้อนของน้ำมันดิบในสิ่งแวดล้อมสูงมากขึ้น

การรั่วไหลของน้ำมันปิโตรเลียมเกิดขึ้นเป็นประจำทุกปี โดยในปี ค.ศ. 2020 มีรายงานเกิดเหตุน้ำมันรั่วไหลลงสู่ธรรมชาติ ประมาณ 1,000 ตัน (ITOPe, 2020) โดยสาเหตุหลักในการรั่วไหลของน้ำมัน แสดงในรูปที่ 2.1 นอกจากนี้ในประวัติศาสตร์โลกมีอุบัติการณ์การรั่วไหลของน้ำมันปิโตรเลียมลงสู่ทะเล โดยเหตุการณ์ครั้งสำคัญเหล่านั้นยังคงส่งผลกระทบต่อระบบนิเวศ และสิ่งมีชีวิตในพื้นที่มาจนถึงปัจจุบันนี้ (ตารางที่ 2.1)

#### MAJOR CAUSES OF ALL CRUDE OIL SPILLS



รูปที่ 2.1 สาเหตุการเกิดน้ำมันรั่วไหลลงสู่สิ่งแวดล้อม (Sayed และคณะ, 2021)

ตารางที่ 2.1 เหตุการณ์น้ำมันรั่วไหลครั้งยิ่งใหญ่ในประวัติศาสตร์โลก (ITOPe, 2020)

| เหตุการณ์น้ำมันรั่วไหล              | วัน/เดือน/ปี            | สถานที่เกิด   | ชนิดของน้ำมัน                                    | ปริมาณน้ำมัน (ล้านแกลลอน) |
|-------------------------------------|-------------------------|---|--|---------------------------|
| Gulf War                            | 23 มกราคม<br>1991       | อ่าวเปอร์เซีย<br>ประเทศคูเวต  | น้ำมันดิบ  | 240-336                   |
| Deepwater<br>Horizon                | 20 เมษายน<br>2010       | อ่าวเม็กซิโก<br>ประเทศเม็กซิโก  | น้ำมันดิบ  | 210                       |
| Ixtoc 1 oil<br>well                 | 3 มิถุนายน<br>1979      | อ่าวเม็กซิโก<br>Bay of Campeche   | น้ำมันดิบ  | 140                       |
| Atlantic<br>Empress oil<br>spill    | 19 กรกฎาคม<br>1979      | ทะเลแคริบเบียน  | น้ำมันดิบ<br>ชนิดเบา                             | 9                         |
| Nowruz oil<br>field                 | 10 กุมภาพันธ์<br>1983   | อ่าวเปอร์เซีย Nowruz<br>Field Platform                                  | น้ำมันดิบ  | 80                        |
| ABT Summer                          | 28 พฤษภาคม<br>1991      | Off coast of Angola<br>ประเทศแอฟริกา                                    | น้ำมันดิบ<br>อิหร่าน                             | 80                        |
| Castillo de<br>Bellver oil<br>spill | 6 สิงหาคม<br>1983       | Table Bay ประเทศ<br>แอฟริกาใต้  | น้ำมันดิบ<br>ชนิดเบา                             | 78.50                     |
| Amoco Cadiz                         | 16 มีนาคม<br>1978       | Brittany coast, up to<br>Channel Islands;<br>Portsall<br>ประเทศฝรั่งเศส | น้ำมันดิบ<br>อิหร่านและ<br>น้ำมันดิบ<br>อาระเบีย | 68.70                     |
| M/T Haven<br>Tanker oil<br>spill    | 11 เมษายน<br>1991       | ทะเลเมดิเตอร์เรเนียน<br>ประเทศอิตาลี                                    | น้ำมันดิบ  | 45                        |
| Odyssey oil<br>spill                | 10<br>พฤศจิกายน<br>1988 | แอตแลนติกเหนือ  | North sea<br>crude oil                           | 43                        |



การปนเปื้อนของน้ำมันดิบในสิ่งแวดล้อมโดยเฉพาะการปนเปื้อนในทะเลเป็นปัญหาใหญ่ที่เกิดขึ้นทั่วโลก รวมถึงในประเทศไทย โดยในประเทศไทยเกิดปัญหาการรั่วไหลของน้ำมันปิโตรเลียมในสิ่งแวดล้อมมากกว่า 200 ครั้งในระหว่างขั้นตอนการผลิต การกลั่น การขนส่ง และการจัดเก็บ รวมถึงกิจกรรมจากอุตสาหกรรมต่างๆ จากสถิติกรมเจ้าท่า พบการรั่วไหลของน้ำมันในปริมาณมาก (20,000 ลิตรขึ้นไป) ซึ่งเกิดในทะเลและชายฝั่งท่าเทียบเรือ ดังสรุปในตารางที่ 2.2

ตารางที่ 2.2 เหตุการณ์น้ำมันรั่วไหลปริมาณมาก (20,000 ลิตรขึ้นไป) (MarineDepartment, 2020)

| วัน/เดือน/ปี         | ชนิดน้ำมัน                  | ปริมาณ<br>(ลิตร) | สาเหตุ   |
|----------------------|-----------------------------|------------------|--|
| 22 พฤษภาคม<br>2544   | น้ำมันดิบ                   | 34,000           | Brakeaway Coupling ขนาด 16 นิ้ว<br>ที่กำลังขนถ่ายจากเรือ Tokachi<br>หลุดออกจากกัน ทำให้น้ำมันรั่วไหล |
| 15 มกราคม 2545       | น้ำมันเตา                   | 270,000          | เรือ Eastern Fortitude<br>สัญชาติปานามาชนหินฉลาม   |
| 17 ธันวาคม 2545      | น้ำมันเตา                   | 243,000          | เรือ Kota Wijaya ชนกับเรือ Sky Ace<br>ทำให้น้ำมันเตารั่วไหลลงทะเล                                    |
| 20 พฤศจิกายน<br>2548 | น้ำมันดิบ                   | 23,000           | ท่อเชื่อมต่อหลุดขณะส่งถ่ายน้ำมัน<br>เนื่องจากคลื่นลมแรง  |
| 4 พฤษภาคม<br>2549    | น้ำมันเตา                   | 23,000           | มีรอยรั่วที่ระวางหมายเลข 2<br>ของเรือบรรทุกน้ำมัน CP 34  |
| 6 ตุลาคม 2550        | Saraline 185V               | 34,000           | รั่วไหลจาก Storage Tank  |
| 9 ธันวาคม 2550       | น้ำมันดีเซลและ<br>น้ำมันเตา | 20,000           | เรือบรรทุกแก๊สของบริษัท<br>เวิร์ลไวด์ทรานสปอร์ต จำกัด อับปาง   |
| 15 มิถุนายน<br>2551  | น้ำมันเตา                   | 40,000           | รั่วไหลจากเรือสินค้า Chol Han Vong<br>Chong Nyon Ho สัญชาติเกาหลีเหนือ                               |
| 4 กันยายน 2554       | น้ำมันดีเซล (B5)            | 40,000           | เรือบรรทุกน้ำมัน ส.โชคดาว 6 จม<br>เนื่องจากสภาพภูมิอากาศเลวร้าย<br>และมีคลื่นลมแรง                   |

ตารางที่ 2.2 เหตุการณ์น้ำมันรั่วไหลปริมาณมาก (20,000 ลิตรขึ้นไป) (ต่อ) (MarineDepartment, 2020, 2022)

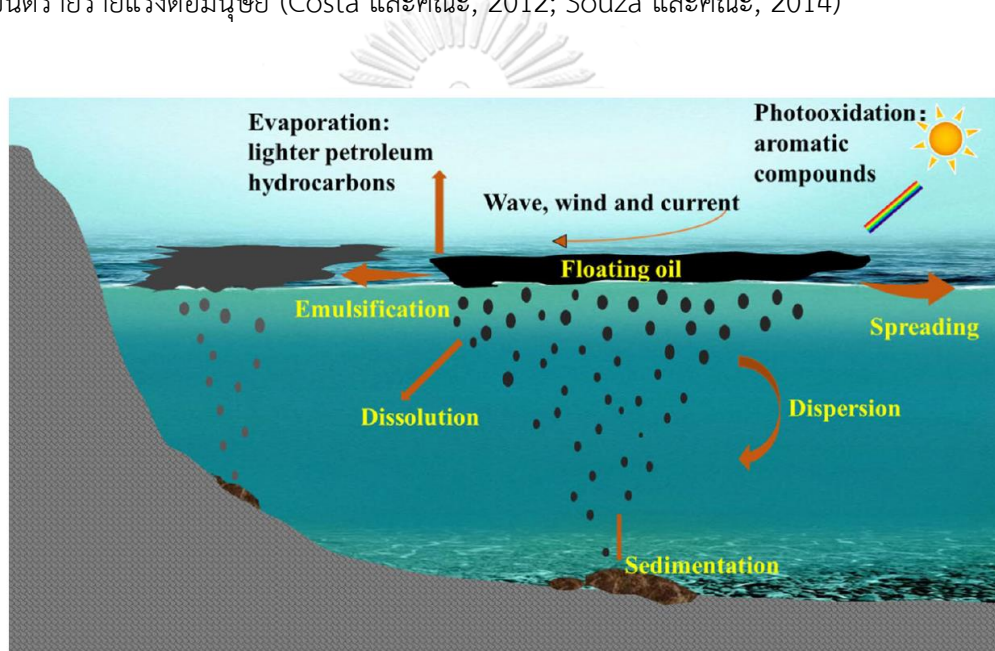
| วัน/เดือน/ปี        | ชนิดน้ำมัน      | ปริมาณ<br>(ลิตร) | สาเหตุ   |
|---------------------|-----------------|------------------|--|
| 27 กรกฎาคม<br>2556  | น้ำมันดิบ       | 50,000           | ท่อรับน้ำมันดิบกลางทะเลของบริษัท<br>พีทีที โกลบอล เคมิคอล มหาชน (จำกัด)<br>แตก   |
| 29 มิถุนายน<br>2562 | น้ำมันเตา (F01) | 100,000          | เรือบรรทุกน้ำมัน “ดราคอน 2” จม   |
| 25 มกราคม 2565      | น้ำมันดิบ       | 20,000           | รั่วไหลจากจุดขนถ่ายน้ำมันในทะเล<br>บริเวณทุ่นผูกเรือน้ำลึกแบบพ่นเดี่ยว<br>กลางทะเล ของบริษัท สตาร์ ปีโตรเลียม<br>รีไฟน์นิง จำกัด (มหาชน) หรือ SPRC |

โดยในวันที่ 27 กรกฎาคม พ.ศ. 2556 เกิดเหตุการณ์น้ำมันดิบรั่วไหลจำนวน 50,000 ลิตรของบริษัทพีทีที โกลบอล เคมิคอล มหาชน (จำกัด) สาเหตุมาจากท่อรับน้ำมันดิบกลางทะเลขนาด 16 นิ้วแตก ทำให้น้ำมันดิบรั่วไหลออกมากกลางทะเล ห่างจากชายฝั่งท่าเรือมาตาพุด จังหวัดระยอง ไปทางทิศตะวันออกเฉียงใต้ประมาณ 20 กิโลเมตรขณะกำลังส่งน้ำมันมายังโรงกลั่น และเมื่อวันที่ 28 กรกฎาคม 2556 คลื่นลมทะเลได้พัดน้ำมันเข้าสู่ชายหาดอ่าวพร้าว ซึ่งอยู่ทางทิศตะวันตกเฉียงเหนือของเกาะเสม็ด เป็นระยะทาง 1 กิโลเมตร คราบน้ำมันหนาประมาณ 20-30 เซนติเมตร และมีคราบน้ำมันปนเปื้อนลงไปในทะเล 200 เมตร (Punwong และคณะ, 2017) และเมื่อไม่นานมานี้เกิดเหตุการณ์น้ำมันดิบรั่วไหลจำนวน 20,000 ลิตรจากท่อใต้ทะเลของทุ่นรับน้ำมันดิบกลางทะเลบริเวณมาตาพุด จังหวัดระยอง เมื่อวันที่ 25 มกราคม พ.ศ. 2565 และเหตุน้ำมันดิบที่ค้างท่อเดิมไหลออกสู่ทะเลเพิ่มเติม จำนวน 5,000 ลิตร เมื่อวันที่ 10 กุมภาพันธ์ พ.ศ. 2565 (MarineDepartment, 2022) ซึ่งเหตุการณ์น้ำมันรั่วไหลในแต่ละครั้งนั้นได้ส่งผลกระทบต่อสิ่งมีชีวิตและสิ่งแวดล้อมเป็นอย่างมาก เนื่องจากน้ำมันดิบประกอบด้วยสารประกอบไฮโดรคาร์บอนที่ซับซ้อนส่งผลให้เป็นสารที่ยากต่อการกำจัด และมักจะตกค้างในสิ่งแวดล้อมเป็นเวลานาน (Xu และคณะ, 2018)

เมื่อน้ำมันดิบปนเปื้อนในน้ำทะเล น้ำมันดิบจะแผ่กระจายไปตามผิวน้ำ ส่วนประกอบที่ระเหยได้จะระเหยไปในอากาศ บางส่วนละลายน้ำ บางส่วนเคลือบอยู่บนผิวน้ำ ทำให้ขัดขวางการละลาย

ของออกซิเจนลงในน้ำ บางส่วนจมลงสู่พื้นท้องทะเล และดูดซับอยู่กับอนุภาคดิน และบางส่วนถูกลม และคลื่นพัดเข้าสู่ชายฝั่ง (Jernelöv, 2010; Bejarano และ Michel, 2016; Wang และคณะ, 2021) ดังแสดงในรูปที่ 2.2

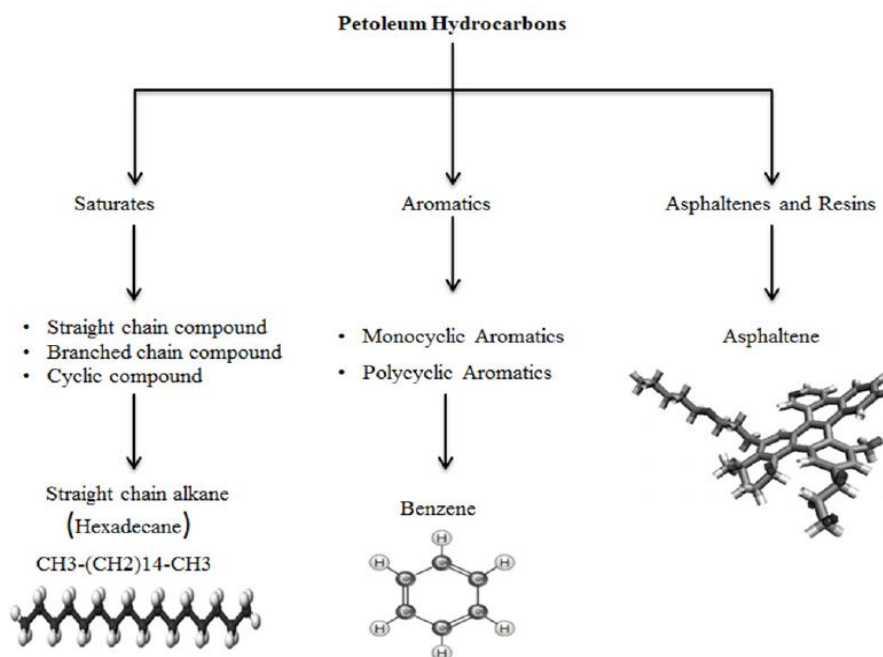
หากมนุษย์ได้รับการสัมผัสน้ำมันดิบทั้งทางตรง และทางอ้อมโดยการสูดดมไอระเหย หรือ การบริโภคอาหารทะเลที่ปนเปื้อน สามารถก่อให้เกิดอันตรายต่อสุขภาพ ทำให้เกิดการระคายเคือง ผิวหนัง เยื่อบุจมูก และตา มีอาการมีนศีรษะ คลื่นไส้ และอาเจียน ถ้าหากได้รับเป็นเวลานานๆ มีอันตรายต่อระบบประสาทส่วนกลาง และเป็นสารก่อมะเร็ง (Xu และคณะ, 2018; Ossai และคณะ, 2020) นอกจากนี้สารอินทรีย์ระเหยง่าย (volatile organic compounds; VOCs) เป็นสารระเหยที่ ก่ออันตรายร้ายแรงต่อมนุษย์ (Costa และคณะ, 2012; Souza และคณะ, 2014)



รูปที่ 2.2 พฤติกรรมของน้ำมันเมื่อรั่วไหลลงสู่ทะเล (Wang และคณะ, 2021)

## 2.2 องค์ประกอบของน้ำมันดิบ

น้ำมันดิบมีองค์ประกอบของคาร์บอน (C) (85 ถึง 90 เปอร์เซ็นต์) และไฮโดรเจน (H) (10 ถึง 14 เปอร์เซ็นต์) เป็นองค์ประกอบหลัก และมีไนโตรเจน (N) (<0.1 ถึง 2 เปอร์เซ็นต์) ออกซิเจน (O) (1 ถึง 1.5 เปอร์เซ็นต์) กำมะถัน (S) (0.2 ถึง 3 เปอร์เซ็นต์) และโลหะหนัก เช่น นิกเกิล สารหนู และ วาเนเดียม เป็นต้น เป็นองค์ประกอบรอง สารไฮโดรคาร์บอนที่ประกอบในน้ำมัน แบ่งออกเป็น 4 ประเภท ได้แก่ ไฮโดรคาร์บอนชนิดอิ่มตัว (saturated hydrocarbon) อะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน (aromatic hydrocarbon) เรซิน (resin) และแอสฟัลทีน (asphaltene) (Waikhom และคณะ, 2020) ดังแสดงในรูปที่ 2.3



รูปที่ 2.3 องค์ประกอบหลักของน้ำมันดิบ (Koshlaf และBall, 2017)

ไฮโดรคาร์บอนชนิดไม่อิ่มตัว หรืออะลิฟาติก (aliphatics) หรืออัลเคน (alkanes) รวมถึงอัลเคนทั้งแบบโซ่ตรง โซ่กิ่ง และไซโคลอัลเคน (Hidalgo และคณะ, 2020) เป็นสารไฮโดรคาร์บอนที่มีพันธะเดี่ยวระหว่างคาร์บอนและคาร์บอน และเป็นองค์ประกอบหลักของน้ำมันและผลิตภัณฑ์จากน้ำมัน (Varjani, 2017) โดยอัลเคนที่มีจำนวนคาร์บอน 20 ถึง 40 อะตอมมักตกค้างอยู่ในดิน เนื่องจากไม่ระเหย และมีความสามารถในการละลายน้ำต่ำ เมื่อมวลโมกุลของอัลเคนเพิ่มมากขึ้น ส่งผลให้การละลายน้ำของอัลเคนลดลง (Stroud และคณะ, 2007; Rojo, 2009)

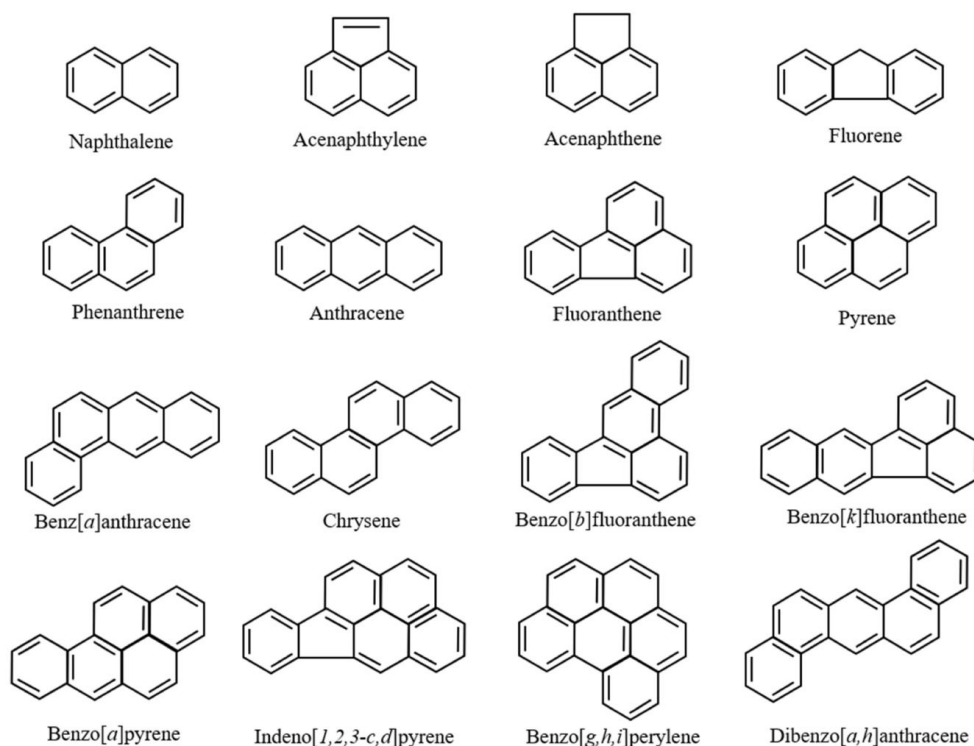
อะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน เป็นไฮโดรคาร์บอนชนิดไม่อิ่มตัว มีโครงสร้างหลักเป็นวงเบนซีน ประกอบด้วยคาร์บอน 6 อะตอมต่อเป็นวงด้วยพันธะคู่สลับพันธะเดี่ยว โดยสามารถแบ่งได้เป็น 2 ประเภท ได้แก่ โมโนไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน (monocyclic aromatic hydrocarbons; MAHs) ตัวอย่างเช่น BTEX ที่ประกอบด้วย เบนซีน (benzene) โทลูอีน (toluene) เอธิลเบนซีน (ethylbenzene) และไซลีน (xylenes) (Farhadian และคณะ, 2008; Costa และคณะ, 2012), และพอลิไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน (polycyclic aromatic hydrocarbons; PAHs) (Chandra และคณะ, 2013)

เรซิน เป็นไฮโดรคาร์บอนชนิดไม่อิ่มตัว ประกอบด้วย กำมะถัน ออกซิเจน ไนโตรเจน และโลหะหนัก ได้แก่ เหล็ก (Fe) นิกเกิล (Ni) และวานาเดียม (V) (Varjani, 2017) มีสีน้ำตาลเข้ม และละลายได้ดีในน้ำมัน (Hidalgo และคณะ, 2020)

แอสฟัลทีน (asphaltenes) เป็นไฮโดรคาร์บอนชนิดมีขี้ว และมีโครงสร้างโมเลกุลที่ซับซ้อนกว่าเรซิน ประกอบด้วย ออกซิเจน ไนโตรเจน กำมะถัน และโลหะหนัก ได้แก่ เหล็ก นิกเกิล และวาเนเดียม (Varjani, 2017) และละลายได้ดีในเบนซีน และโทลูอีน (Parra-Barraza และคณะ, 2003)

### 2.3 พอลิไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน (Polycyclic Aromatic Hydrocarbons; PAHs)

PAHs เป็นองค์ประกอบหนึ่งในน้ำมันดิบที่มีความเป็นพิษสูง ซึ่งเป็นกลุ่มของสารประกอบอินทรีย์ที่มีโครงสร้างวงแหวนอะโรมาติกมากกว่า 2 วงขึ้นไป เชื่อมต่อกันเป็นเส้นตรง (linear) เป็นมุม (angular) หรือเป็นกลุ่ม (cluster) แบ่งออกเป็น 2 ประเภท ได้แก่ PAHs ที่มีมวลโมเลกุลต่ำ (2-3 วง) เช่น แนพธาซีน (naphthalene) อะซีแนพทีน (acenaphthene) อะซีแนพทีลีน (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 (dibenzo[a,h] anthracene) อินดีโน[1,2,3-ซีดี]ไพรีน (indeno[1,2,3-cd]pyrene) เบนโซ[จีเอชไอ]เพอริลีน (benzo[ghi]perylene) โคอโรนีน (coronene) เป็นต้น รายงานของสำนักงานคุ้มครองสิ่งแวดล้อมของสหรัฐอเมริกา (The U.S. Environmental Protection Agency, USEPA) ได้กำหนดให้ PAHs 16 ชนิด (ดังแสดงโครงสร้างในรูปที่ 2.4) เป็นสารพิษอันตรายที่ควรให้ความสำคัญและต้องกำจัดออกจากสิ่งแวดล้อมอย่างเร่งด่วน (Alegbeleye และคณะ, 2017; Idowu และคณะ, 2019; Honda และSuzuki, 2020) โดย PAHs หลายชนิดเป็นสารก่อมะเร็งในมนุษย์ ได้แก่ เบนโซ[เอ]แอนทราซีน เบนโซ[เอ]ไพรีน เบนโซ[บี]ฟลูออแรนทีน เบนโซ[เค]ฟลูออแรนทีน และอินดีโน[1,2,3-ซีดี]ไพรีน



**รูปที่ 2.4** โครงสร้างของ PAHs 16 ชนิดในรายชื่อสารมลพิษที่สำคัญของ USEPA (Honda และ Suzuki, 2020)

สมบัติทางกายภาพและเคมีของ PAHs ขึ้นอยู่กับจำนวนวงอะโรมาติกและน้ำหนักโมเลกุล กล่าวคือ จำนวนวงอะโรมาติกเพิ่มมากขึ้นหรือมวลโมเลกุลเพิ่มมากขึ้น ทำให้ความสามารถการละลายน้ำและการระเหยลดลง ความเป็นพิษเพิ่มมากขึ้น และการย่อยสลายเกิดได้ยากขึ้น ดังแสดงในตารางที่ 2.3 (Achten และ Andersson, 2015; Idowu และคณะ, 2019) ความสามารถละลายน้ำของ PAHs ขึ้นอยู่กับอุณหภูมิ ค่าความเป็นกรด-ด่าง และค่าความแรงไอออน โดยทั่วไป PAHs จัดเป็นสารประกอบอินทรีย์ไม่ชอบน้ำและความสามารถละลายน้ำต่ำ แต่ละลายได้ง่ายในไขมันและน้ำมัน ทำให้เมื่อ PAHs เข้าสู่ร่างกาย จะสะสมอยู่ในชั้นไขมันของสิ่งมีชีวิตได้ดี และสามารถถ่ายทอดผ่านห่วงโซ่อาหารได้ (Idowu และคณะ, 2019) เมื่อ PAHs ปนเปื้อนในดิน จะถูกดูดซับกับอนุภาคต่างๆ ในดินได้อย่างรวดเร็ว ทำให้ PAHs มีความคงตัวมากขึ้น และ PAHs มักปนเปื้อนและตกค้างในสิ่งแวดล้อมส่วนใหญ่เป็นในรูปแบบสารผสม (mixture) ทำให้ยากต่อการกำจัดและสะสมอยู่ในสิ่งแวดล้อมเป็นระยะเวลานาน (Abdel-Shafy และ Mansour, 2016; Alegbeleye และคณะ, 2017) นอกจากนี้ PAHs ยังเป็นสารก่อมลพิษให้เกิดอันตรายร้ายแรงต่อสิ่งมีชีวิต โดยเป็นสารเนื้องอกก่อให้เกิดมะเร็ง และการกลายพันธุ์ได้ (Honda และ Suzuki, 2020) ดังนั้นจึงจำเป็นต้องมีการกำจัดอย่างถูกวิธี

ไพรีนและฟลูออแรนทีน จัดเป็น PAHs มวลโมเลกุลสูง ประกอบด้วยวงแหวนอะโรมาติก 4 วง โดย PAHs ทั้งสองชนิดนี้มักถูกพบปนเปื้อนอย่างในดิน ดินตะกอน แหล่งน้ำจืด และในทะเล (Sinaei และ Mashinchian, 2014) ซึ่งสาเหตุการปนเปื้อนมาจากการกระทำของมนุษย์ เช่น การเผาไหม้ไม่สมบูรณ์ของน้ำมันเชื้อเพลิง และการรั่วไหลของน้ำมันปิโตรเลียม (Honda และ Suzuki, 2020) ดังนั้นจึงได้คัดเลือกไพรีนและฟลูออแรนทีน เป็นตัวแทนในการศึกษาการย่อยสลาย PAHs ในรูปแบบสารคู่ผสม

#### 2.4 การบำบัดสิ่งแวดล้อมปนเปื้อนน้ำมันดิบและ PAHs โดยทางชีวภาพ

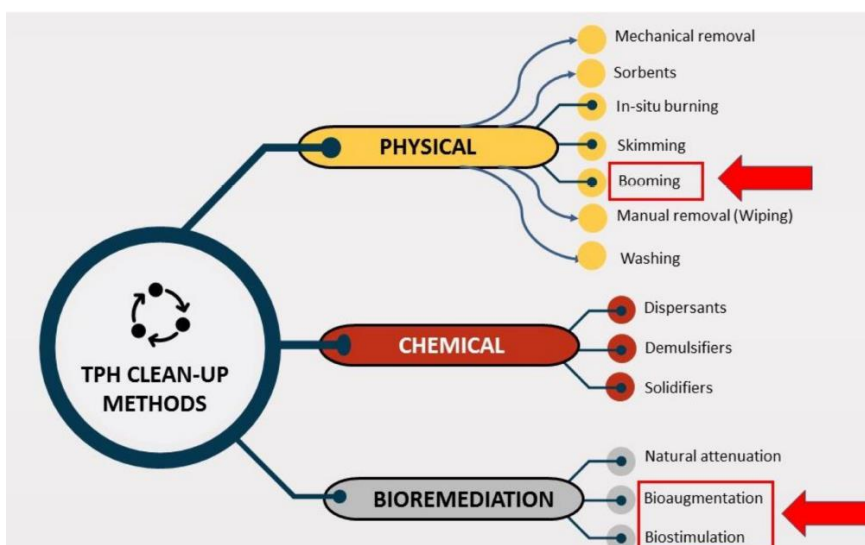
การกำจัดน้ำมันดิบ และ PAHs ออกจากสิ่งแวดล้อม สามารถทำได้หลายวิธี (ดังแสดงในรูปที่ 2.5) เช่น กระบวนการทางกายภาพ (physical method) คือ การเผาทำลายน้ำมันบนผิวน้ำ การใช้วัสดุดูดซับน้ำมันแล้วนำไปทำลาย และการตกแผ่นคราบน้ำมัน ซึ่งมีความเสี่ยงในการเพิ่มการปนเปื้อนให้กับเครื่องมือที่ใช้กำจัด และไม่สามารถกำจัดการปนเปื้อนของน้ำมันได้อย่างถาวร (Al-Sayegh และ คณะ, 2016) ส่วนกระบวนการทางเคมี (chemical method) ทำได้โดยการเติมสารเคมีจำพวก สารลดแรงตึงผิว หรือสารกระจายน้ำมัน (dispersant) เพื่อเพิ่มการกระจายตัวของน้ำมัน ทำให้เกิดการแตกตัวเป็นอนุภาคเล็กๆ ซึ่งวิธีการนี้ทำให้เกิดการตกค้างของสารเคมีในสิ่งแวดล้อม (Zivelyte และ คณะ, 2017) ดังนั้นการใช้วิธีบำบัดโดยทางชีวภาพ (bioremediation method) จึงเป็นวิธีหนึ่งที่ได้รับ ความสนใจและเป็นที่ยอมรับ โดยกระบวนการนี้นิยมใช้แบคทีเรียย่อยสลายน้ำมันดิบและ PAHs ด้วยการใช้เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงานสำหรับการเจริญ ทำให้สารมลพิษถูกเปลี่ยนเป็น สารที่มีความเป็นพิษน้อยลงหรือไม่มีความเป็นพิษ กระบวนการนี้สามารถเกิดขึ้นได้ทั้งในสภาวะที่มี ออกซิเจนและไร้ออกซิเจน ซึ่งวิธีการบำบัดโดยชีวภาพ เป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพสูง เป็นมิตรต่อ สิ่งแวดล้อม และไม่ก่อให้เกิดการตกค้างของสารพิษในสิ่งแวดล้อม (Gupta และ คณะ, 2016; Varjani, 2017)

ตารางที่ 2.3 สมบัติทางกายภาพและเคมีของ PAHs จำนวน 16 ชนิด (Pazos และคณะ, 2010; Okere และ Semple, 2012; Alegbeleye และคณะ, 2017)

| PAHs                | น้ำหนัก<br>โมเลกุล | จุด<br>หลอมเหลว<br>(องศา<br>เซลเซียส) | ความสามารถ<br>ละลายน้ำ<br>(มิลลิกรัม<br>ต่อลิตร) | ความดันไอ<br>(mmHg)    | Log<br>Kow* |
|---------------------|--------------------|---------------------------------------|--|------------------------|-------------|
| แนพทาลีน            | 128.2              | 79-82                                 | 320  | -                      | 3.5         |
| อะซีแนพทาลีน        | 152.2              | 95                                    | 5.3  | $4.47 \times 10^{-3}$  | 3.95        |
| อะซีแนพทริลีน       | 152.2              | 72-82                                 | 3.93   | 0.029                  | 3.94        |
| ฟลูออรีน            | 166.2              | 115-116                               | 1.85   | $5.0 \times 10^{-6}$   | 4.28        |
| ฟีนแอนทรีน          | 178.2              | 99                                    | 1.24   | $6.8 \times 10^{-4}$   | 5.62        |
| แอนทราซีน           | 178.2              | 218                                   | 0.64   | $1.7 \times 10^{-5}$   | 5.33        |
| ฟลูออแรนทีน         | 202.3              | 110                                   | 0.25   | $5.0 \times 10^{-6}$   | 4.62        |
| ไพรีน               | 202.3              | 156                                   | 0.14   | $2.5 \times 10^{-6}$   | 4.47        |
| เบนซ์[เอ]แอนทราซีน  | 228.3              | 158                                   | 0.01   | $2.2 \times 10^{-8}$   | 5.30        |
| โครซีน              | 228.3              | 255                                   | 0.002  | $6.3 \times 10^{-7}$   | 5.30        |
| เบนโซ[บี]           | 252.3              | 168                                   | 0.0015   | $5.0 \times 10^{-7}$   | 5.74        |
| ฟลูออแรนทีน         |                    |                                       |  |                        |             |
| เบนโซ[เค]           | 252.31             | 215                                   | -  | $9.7 \times 10^{-10}$  | 6.06        |
| ฟลูออแรนทีน         |                    |                                       |  |                        |             |
| เบนโซ[เอ]ไพรีน      | 252.3              | 179                                   | 0.0038   | $5.6 \times 10^{-9}$   | 5.74        |
| เบนโซ[จี]เอชไอ      | 276.3              | 273                                   | 0.00026  | $1.3 \times 10^{-10}$  | 6.20        |
| เพอริลีน            |                    |                                       |  |                        |             |
| ไดเบนโซ[เอ,เอช]     | 278.35             | 262                                   | 0.0005   | -                      | 6.84        |
| แอนทราซีน           |                    |                                       |  |                        |             |
| อินดีโน[1,2,3-ซีดี] | 276.3              | 163                                   | ไม่ละลายน้ำ                                      | $10^{-11}$ - $10^{-6}$ | 6.20        |
| ไพรีน               |                    |                                       |  |                        |             |

\* Log Kow สัมประสิทธิ์การกระจายตัวของสารในชั้นออกทานอลและน้ำ





รูปที่ 2.5 วิธีการกำจัดน้ำมันออกจากสิ่งแวดล้อม (Sayed และคณะ, 2021)

วิธีที่นิยมใช้แสดงในกรอบสี่เหลี่ยมสีแดง

กลวิธีในการบำบัดสิ่งแวดล้อมโดยชีวภาพ สามารถแบ่งออกเป็น 3 ประเภท ได้แก่ Natural attenuation เป็นการฟื้นฟูสิ่งแวดล้อมโดยธรรมชาติ Biostimulation เป็นการเติมสารอาหารที่ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการเข้าถึงสารหรือช่วยกระตุ้นการเจริญของแบคทีเรีย เช่น ไนโตรเจน (N) ฟอสฟอรัส (P) และโพแทสเซียม (K) และ Bioaugmentation เป็นการเติมแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลายสารพิษ (Mrozik และ Piotrowska-Seget, 2010; Suja และคณะ, 2014; Wu และคณะ, 2017a) นอกจากนี้การใช้กลุ่มแบคทีเรียมีแนวโน้มช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการย่อยสลายสารพิษในรูปแบบสารผสมหรือที่มีโครงสร้างซับซ้อนได้ดียิ่งขึ้น (Koshlaf และ Ball, 2017) มีงานวิจัยมากมาย พบว่าการบำบัดด้วยวิธีการเติมแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพจะสามารถบำบัดสิ่งแวดล้อมปนเปื้อนได้อย่างรวดเร็ว และมีประสิทธิภาพมากกว่าวิธีการเติมสารอาหาร และวิธีการฟื้นฟูสิ่งแวดล้อมโดยธรรมชาติ ตามลำดับ

ตัวอย่างงานวิจัยของ Abena และคณะ (2019) ศึกษาการย่อยสลายปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอน ความเข้มข้น 79,453 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ในระบบนิเวศจำลองดิน 150 กรัม ซึ่งเก็บตัวอย่างดินจากพื้นที่ที่เคยได้รับการปนเปื้อนปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนจากมลพิษปิโตรเลียม และเติมกลุ่มแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพย่อยสลายน้ำมันดิบ ได้แก่ *Raoultella ornithnolytica* PS, *Serratia marcescens* PL, *Bacillus subtilis* BJ11, *Acinetobacter pittii* BJ6 และ *Acinetobacter lwoffii* BJ10 เป็นเวลา 40 วัน พบว่าสามารถย่อยสลายปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนได้ 37.80 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบกับชุดที่ไม่เติมแบคทีเรีย ซึ่งพบว่าจะสามารถย่อยสลายปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนได้เพียง 20.20 เปอร์เซ็นต์

Varjani และ Upasani (2019) ศึกษาการย่อยสลายน้ำมันดิบ ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ในระบบนิเวศจำลองดิน 1 กิโลกรัม ซึ่งเป็นดินทำเกษตรกรรม และเติมกลุ่มแบคทีเรีย HUBC ที่มีประสิทธิภาพย่อยสลายน้ำมันดิบ ซึ่งประกอบด้วย *Ochrobactrum* sp. VSHUB001, *Stenotrophomonas maltophilia* VSHUB002, *Pseudomonas aeruginosa* VSHUB003, *P. aeruginosa* VSHUB004, *P. aeruginosa* VSHUB005 เป็นเวลา 60 วัน พบว่าสามารถย่อยสลายน้ำมันดิบได้ 82 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบกับชุดทดลองที่ไม่เติมแบคทีเรีย และชุดทดลองที่เติมสารอาหาร ที่ปรับสัดส่วนของคาร์บอน:ไนโตรเจน:ฟอสฟอรัส เท่ากับ 100:10:1 ซึ่งสามารถย่อยสลายน้ำมันดิบได้ 10 และ 30 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

Rabodonirina และคณะ (2019) ศึกษาการบำบัดดินปนเปื้อน PAHs ในรูปแบบผสม ได้แก่ ฟลูออรีน พีแนนทรีน ไพรีน และฟลูออแรนทีน ความเข้มข้นชนิดละ 125 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมดินด้วย *Bacillus simplex* พบว่าสามารถย่อยสลายฟลูออรีนและพีแนนทรีนได้ 86.89 และ 95.13 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ แต่ไม่พบการย่อยสลายของไพรีน และฟลูออแรนทีนในระยะเวลา 72 วัน ทั้งนี้ อาจเป็นเพราะปัจจัยทางสิ่งแวดล้อมและสารอาหารที่ไม่เหมาะสมต่อการเจริญของแบคทีเรีย

งานวิจัยของ Pacwa-Płociniczak และคณะ (2019) ศึกษาการย่อยสลายน้ำมันดิบ ความเข้มข้น 11,980 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมดิน ในระบบนิเวศจำลองดิน 0.3 กิโลกรัม ด้วย *Rhodococcus erythropolis* CD 167 ในระยะเวลา 182 วัน พบว่าสามารถย่อยสลายน้ำมันดิบได้ 38.40 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่ชุดทดลองที่ไม่มีการเติมแบคทีเรีย สามารถย่อยสลายน้ำมันดิบได้เพียง 14.77 เปอร์เซ็นต์

Festa และคณะ (2016) พบว่า *Sphingobium* sp. AM สามารถย่อยสลายพีแนนทรีนจาก ความเข้มข้นเริ่มต้น 2,000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมดิน เหลือเพียง 5.8 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมดิน ในขณะที่ชุดทดลองที่ไม่มีการเติมแบคทีเรีย มีการย่อยสลายพีแนนทรีนไม่เกิน 10 เปอร์เซ็นต์ ในระยะเวลา 63 วัน

Lang และคณะ (2016) ศึกษาการบำบัดดินตะกอนปนเปื้อน PAHs ในรูปแบบผสม ได้แก่ แอนทราซีน พีแนนทรีน ไพรีน และฟลูออแรนทีน ความเข้มข้นชนิดละ 10,000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมดิน โดยเปรียบเทียบวิธีการบำบัดโดยชีววิธี 3 วิธี พบว่าการเติม *Rhodococcus erythropolis* T902.1 สามารถย่อยสลาย PAHs ในรูปแบบสารผสมได้ดีกว่าการเติมสารอาหารที่ปรับสัดส่วนของคาร์บอน:ไนโตรเจน:ฟอสฟอรัส เท่ากับ 100:10:1 และการฟื้นฟูโดยธรรมชาติ

Nopcharoenkul และคณะ (2011) ศึกษาการย่อยสลายไพรีนในดิน ความเข้มข้น 300 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมดินด้วยแบคทีเรียสูตรน้ำของ *Pseudoxanthomonas* sp. RN402 ที่เตรียมใหม่ (bioaugmentation I) และที่ผ่านการเก็บรักษาไว้นาน 30 วัน (bioaugmentation II) พบว่าชุด bioaugmentation I สามารถย่อยสลายไพรีนได้ 76 เปอร์เซ็นต์ และ bioaugmentation II

สามารถย่อยสลายไพรีนได้อย่างสมบูรณ์ ในระยะเวลา 28 วัน ทั้งนี้อาจเป็นเพราะพฤติกรรมอดอาหารเป็นระยะเวลาหนึ่ง ทำให้กระตุ้นความสามารถในการย่อยสลายไพรีนของแบคทีเรีย

## 2.5 การสร้างกลุ่มแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพย่อยสลายน้ำมันดิบและ PAHs

กลุ่มแบคทีเรีย ประกอบด้วยแบคทีเรียจำนวน 2 หรือมากกว่า 2 สายพันธุ์ โดยแบคทีเรียแต่ละชนิดมีวิธีการย่อยสลายที่แตกต่างกัน แบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์ สามารถเข้าย่อยสลายโมเลกุลของสารพิษในตำแหน่งที่ต่างกัน หรือบางสายพันธุ์อาจใช้สารตัวกลางที่ได้จากการย่อยสลายสารพิษของแบคทีเรียสายพันธุ์อื่น และแบคทีเรียแต่ละชนิดมีการทำงานร่วมกันแบบส่งเสริมกัน (Gupta และคณะ, 2016) รวมทั้งบางสายพันธุ์สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ ซึ่งช่วยเพิ่มการละลายน้ำมัน ทำให้แบคทีเรียสามารถย่อยสลายได้เพิ่มมากขึ้น นอกจากนี้การคัดเลือกแบคทีเรียในกลุ่มมีความสำคัญอย่างยิ่ง เพื่อสามารถช่วยเพิ่มประสิทธิภาพย่อยสลายให้ดียิ่งขึ้นด้วยการทำงานร่วมกันแบบส่งเสริมกันได้

การสร้างกลุ่มแบคทีเรีย แบ่งออกเป็น 2 วิธีการได้แก่ การสร้างกลุ่มแบคทีเรียแบบ top-down ซึ่งเริ่มจากประชาคมจุลินทรีย์ที่มีความซับซ้อนจากตัวอย่างสิ่งแวดล้อมตามธรรมชาติ หรือตัวอย่างที่ได้รับการเพิ่มจำนวนจุลินทรีย์โดยสภาวะที่จำเพาะ แล้วผ่านกระบวนการคัดกรองและคัดเลือกจุลินทรีย์สายพันธุ์หลักที่มีลักษณะสมบัติที่ต้องการ และรวมกลุ่มเฉพาะจุลินทรีย์ที่ผ่านการเลือกแล้วทำหน้าที่เสริมกันให้มีประสิทธิภาพการทำงานที่ดี และการสร้างกลุ่มแบคทีเรียแบบ bottom-up ซึ่งเริ่มจากแบคทีเรียเดี่ยวที่มีลักษณะสมบัติตามที่ต้องการหลายสายพันธุ์ นำมาสร้างเป็นกลุ่มจุลินทรีย์ที่ทำหน้าที่เสริมกันทำให้เพิ่มประสิทธิภาพการทำงาน โดยแบคทีเรียที่นำมาสร้างกลุ่มแบคทีเรียไม่จำเป็นต้องมาจากแหล่งที่มาเดียวกัน (Che และ Men, 2019)

การสร้างกลุ่มแบคทีเรียแบบ top-down เป็นการนำแบคทีเรียมาจากสิ่งแวดล้อม ทำให้คาดว่า แบคทีเรียมีโอกาสอยู่ร่วมกันแล้วทำงานร่วมกันแบบส่งเสริมกันได้ดีกว่าแบบ bottom-up ในงานวิจัยนี้จึงได้สร้างกลุ่มแบคทีเรียแบบ top-down โดยคัดแยกแบคทีเรียเดี่ยว จำนวน 5 สายพันธุ์ จากกลุ่มแบคทีเรียที่ถูกเพิ่มจำนวนด้วยไพรีนจากดินตะกอนป่าชายเลน ได้แก่ *Mycolicibacterium* spp. PO1 และ PO2, *Brucella intermedia* PW1 (*Ochrobactrum intermedia* PW1), *Novosphingobium pentaromativorans* PY1 และ *Bacillus subtilis* FW1 และจากการวิเคราะห์จีโนมพบว่า สายพันธุ์ PO1 และ PO2 มียีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายไพรีนได้อย่างสมบูรณ์ สายพันธุ์ PW1 และสายพันธุ์ PY1 พบยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายสารมัธยันต์ได้แก่ โพรโตคาทิกูเอทและพทาเลท และสายพันธุ์ FW1 มียีนที่เกี่ยวข้องกับการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดลิโปเปปไทด์ (Wanapaisan และคณะ, 2018) จึงมีความน่าสนใจในการศึกษาบทบาทและ

การทำงานร่วมกันของแบคทีเรียในการย่อยสลายน้ำมันดิบและ PAHs โดยตัวอย่างกลุ่มแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลายน้ำมันดิบและ PAHs แสดงในตารางที่ 2.4

รายงานวิจัยของ Naloka และคณะ (2021) นำแบคทีเรียเดี่ยว *Rhodococcus ruber* S103 ซึ่งย่อยสลายฟลูออแรนทีน และมีความไม่ชอบน้ำสูง *Mycolicibacterium parafortuitum* J101 และ *Mycolicibacterium austroafricanum* Y502 ซึ่งย่อยสลายฟลูออรีน พีแนนทีน ไพรีน และฟลูออแรนทีน เตตระเดคเคน และโดโคเซน มาเตรียมเป็นกลุ่มแบคทีเรีย สามารถย่อยสลายน้ำมันเตา ความเข้มข้น 3,000 มิลลิกรัมต่อลิตร ได้ 41 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่แบคทีเรียเดี่ยวสายพันธุ์ S103, J101 และ Y502 ย่อยสลายได้ 20, 22 และ 10 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ในระยะเวลา 7 วัน

Xu และคณะ (2021) นำแบคทีเรียเดี่ยว *Comamonas testosterone* CT1 และ KF-1 ซึ่งย่อยสลายโพลูอิน *Acinetobacter calcoaceticus* LM1 และ *Pseudomonas* sp. LY1 ซึ่งย่อยสลายพีนอล *Pseudomonas putida* LN12 ซึ่งย่อยสลายวงอะโรมาติก *Pseudomonas stutzeri* JP1 ซึ่งย่อยสลายพีแนนทีน *Rhodococcus* sp. P14 ซึ่งย่อยสลายพีแนนทีน ไพรีน และเบนโซ[เอ]ไพรีน *Buttiauxella* sp. S19-1 และ *Vibrio* sp. H5 ซึ่งย่อยสลายสเตียรอยด์ มาเตรียมเป็นกลุ่มแบคทีเรีย พบว่าสามารถย่อยสลายเบนโซ[เอ]ไพรีน ความเข้มข้น 0.1 มิลลิโมลาร์ได้ 83.80 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่แบคทีเรียเดี่ยวสายพันธุ์ CT1, KF-1, LM1, LY1, LN12, JP1, P14, S19-1 และ H5 ย่อยสลายได้ 69, 78, 65, 52, 74, 55, 78, 72 และ 71 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ในระยะเวลา 2 วัน

Chen และคณะ (2017) นำแบคทีเรียเดี่ยว *Exiguobacterium* sp. ASW-1, *Pseudomonas aeruginosa* ASW-2, *Alcaligenes* sp. ASW-3, *Alcaligenes* sp. ASS-1 และ *Bacillus* sp. ASS-2 ซึ่งคัดแยกได้จากน้ำทะเลปนเปื้อนน้ำมันดิบมาเตรียมเป็นกลุ่มแบคทีเรีย สามารถย่อยสลายน้ำมันดิบ ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ได้ 75.10 เปอร์เซ็นต์ ในระยะเวลา 7 วัน ซึ่งมีประสิทธิภาพสูงกว่าการใช้แบคทีเรียเดี่ยว

Jasmine และ Mukherji (2015) นำแบคทีเรียเดี่ยวที่มีความสามารถย่อยสลายอัลเคนและ PAHs มาเตรียมเป็นกลุ่มแบคทีเรียที่ประกอบด้วย *Sphingomonas* sp. MSY ซึ่งย่อยสลายนอร์มัล-เฮกซะเดคเคน และไพรีน *Ochobacterium* sp. BSW ซึ่งย่อยสลายนอร์มัล-เฮกซะเดคเคน และ *Burkholderia multivorans* HN1 ซึ่งย่อยสลายแนพธาซีน และไพรีน พบว่าสามารถเพิ่มความสามารถย่อยสลายน้ำมันดิบ ความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ได้ 72 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่แบคทีเรียเดี่ยวสายพันธุ์ MSY, BSW และ HN1 ย่อยสลายได้ 10, 15 และ 18 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ในระยะเวลา 30 วัน

Barin และคณะ (2014) ได้นำกลุ่มแบคทีเรียประกอบด้วย *Bacillus subtilis* ซึ่งสามารถย่อยสลายคีโรซีนและ *P. aeruginosa* ซึ่งผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพและก่ออิมัลชัน มาย่อยสลายน้ำมันดิบ ความเข้มข้น 8 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) พบว่าย่อยสลายได้ 83 เปอร์เซ็นต์ในเวลา 5 วัน ซึ่งจะเห็นได้ว่ากลุ่มแบคทีเรียสามารถย่อยสลายปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนได้ดีกว่าแบคทีเรียเดี่ยว ดังนั้นจึงมีความน่าสนใจที่จะสร้างกลุ่มแบคทีเรียจากแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลายและสามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้ เพื่อช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการย่อยสลายสารประกอบไฮโดรคาร์บอน



ตารางที่ 2.4 ตัวอย่างกลุ่มแบคทีเรียซึ่งสร้างจากแบคทีเรียเดี่ยวที่มีความสามารถย่อยสลายน้ำมันดิบและ PAHs

| กลุ่มแบคทีเรีย   | สารตั้งต้น | ความเข้มข้น                              | เปอร์เซ็นต์<br>ย่อยสลาย | ระยะเวลา<br>(วัน) | รูปแบบ<br>การสร้าง<br>กลุ่มแบคทีเรีย | อ้างอิง                |
|--|------------|--|-------------------------|-------------------|--------------------------------------|------------------------|
| <i>Bacillus</i> sp. DL-13,   | น้ำมันดิบ  | 0.01 กรัม                                | 60.75                   | 8                 | bottom-up                            | Dai และคณะ<br>(2021)   |
| <i>Brevibacillus</i> sp. DL-1 และ<br><i>Acinetobacter</i> DL-34          | ซินดีทหนัก |  |                         |                   |                                      |                        |
| <i>Acinetobacter junii</i> H11S-25,                                      | น้ำมันดิบ  | 1 เปอร์เซ็นต์                            | 57.10                   | 21                | bottom-up                            | Ma และคณะ<br>(2021)    |
| <i>Nitratireductor</i> sp. H11S-31<br>และ <i>Pseudomonas</i> sp. H11S-28 |            |  |                         |                   |                                      |                        |
| <i>Dietzia</i> sp. CN-3<br>และ <i>Acinetobacter</i> sp. HC8-S3           | น้ำมันดิบ  | 1 เปอร์เซ็นต์<br>(น้ำหนัก<br>ต่อปริมาตร) | 95.80                   | 10                | bottom-up                            | Chen และ<br>คณะ (2020) |

ตารางที่ 2.4 ตัวอย่างกลุ่มแบคทีเรียซึ่งสร้างจากแบคทีเรียเดี่ยวที่มีความสามารถย่อยสลายน้ำมันดิบและ PAHs (ต่อ)

| กลุ่มแบคทีเรีย                         | สารตั้งต้น       | ความเข้มข้น      | เปอร์เซ็นต์ย่อยสลาย | ระยะเวลา (วัน) | รูปแบบการสร้าง | อ้างอิง               |
|--|------------------|------------------|---------------------|----------------|----------------|-----------------------|
| <i>Paenibacillus lautus</i> HC_A,      | แนพทาลีน         | 50               | 99.00               | 10             | bottom-up      | lbra และ Zhang (2020) |
| <i>Lysinibacillus fusiformis</i> HC_B, | มิลลิกรัมต่อลิตร |                  |                     |                |                |                       |
| <i>L. fusiformis</i> HC_C,             |                  |                  |                     |                |                |                       |
| <i>Cupriavidus oxalaticus</i> HC_D,    |                  |                  |                     |                |                |                       |
| <i>L. fusiformis</i> HC_4,             |                  |                  |                     |                |                |                       |
| <i>L. fusiformis</i> HC_4L และ         | แอนทราซีน        | 50               | 98.70               |                |                |                       |
| <i>Gordonia jacobaea</i> HC_8A         | มิลลิกรัมต่อลิตร |                  |                     |                |                |                       |
| <i>Pseudomonas</i> sp. PYR-1,          | ไพรีน            | 20               | 60.30               | 20             | bottom-up      | Qiao และคณะ (2020)    |
| <i>Thalassospira</i> sp. PYR-2,        | มิลลิกรัมต่อลิตร |                  |                     |                |                |                       |
| <i>Shewanella</i> sp. PYR-3 และ        |                  |                  |                     |                |                |                       |
| <i>Alcanivorax</i> sp. PYR-4           |                  |                  |                     |                |                |                       |
| <i>Halomonas</i> sp. BAP-1 และ         | เบนโซ[เอ]        | 10               | 33.4                |                | bottom-up      |                       |
| <i>Shewanella</i> sp. BAP-2            | ไพรีน            | มิลลิกรัมต่อลิตร |                     |                |                |                       |

ตารางที่ 2.4 ตัวอย่างกลุ่มแบคทีเรียซึ่งสร้างจากแบคทีเรียเดี่ยวที่มีความสามารถย่อยสลายน้ำมันดิบและ PAHs (ต่อ)

| กลุ่มแบคทีเรีย  | สารตั้งต้น | ความเข้มข้น                              | เปอร์เซ็นต์<br>ย่อยสลาย | ระยะเวลา<br>(วัน) | รูปแบบ<br>การสร้าง<br>กลุ่มแบคทีเรีย | อ้างอิง                 |
|---|------------|--|-------------------------|-------------------|--------------------------------------|-------------------------|
| <i>Rhodococcus erythropolis</i><br>SDS1,  | น้ำมันดิบ  | 1 เปอร์เซ็นต์<br>(ปริมาตร<br>ต่อปริมาตร) | 85.26                   | 15                | bottom-up                            | Xia และคณะ<br>(2019)    |
| <i>Serratia proteamaculans</i><br>S1BD1, <i>Alcaligenes</i> sp. OPKDS2,<br><i>Rhizobium</i> sp. PNS1 และ<br><i>Pseudomonas</i> sp. BSS9BS1            | น้ำมันดิบ  | 1 เปอร์เซ็นต์<br>(ปริมาตร<br>ต่อปริมาตร) | 100                     | 10                | bottom-up                            | Yang และคณะ<br>(2019)   |
| <i>Nocardia soli</i> Y48 และ<br><i>Rhodococcus erythropolis</i><br>YF28-1 (8)   | ที่เนนทรีน | 200<br>มิลลิกรัมต่อลิตร                  | 99                      | 4                 | top-down                             | Festa และ<br>คณะ (2017) |
| <i>Sphingobium</i> sp. AM,<br><i>Enterobacter</i> sp. B,<br><i>Pseudomonas</i> sp. T,<br><i>Pseudomonas</i> sp. Bc และ<br><i>Inquilinus limosus</i> I |            |  |                         |                   |                                      |                         |



ตารางที่ 2.4 ตัวอย่างกลุ่มแบคทีเรียซึ่งสร้างจากแบคทีเรียเดี่ยวที่มีความสามารถย่อยสลายน้ำมันดิบและ PAHs (ต่อ)

| กลุ่มแบคทีเรีย   | สารตั้งต้น                        | ความเข้มข้น      | เปอร์เซ็นต์<br>ย่อยสลาย | ระยะเวลา<br>(วัน) | รูปแบบ<br>การสร้าง<br>กลุ่มแบคทีเรีย | อ้างอิง                       |
|--|-----------------------------------|------------------|-------------------------|-------------------|--------------------------------------|-------------------------------|
| <i>Acinetobacter</i> sp. P3d,<br><i>Bacillus</i> sp. P4a และ<br><i>Pseudomonas</i> sp. P6  | ฟีนนทรีน                          | 330              | 95.64                   | 20                | bottom-up                            | Fazilah และ<br>คณะ (2016)     |
| <i>Acinetobacter calcoaceticus</i><br>PL-2, <i>Brevibacterium</i> sp. PL-44,<br><i>Serratia</i> sp. PL-68 และ<br><i>Streptomyces rochei</i> PAH-13 | ฟลูออรีน<br>แอนทราซีน<br>ฟีนนทรีน | 50<br>50<br>50   | 70<br>55<br>53          | 7                 | bottom-up                            | Chaudhary<br>และคณะ<br>(2015) |
|  | ไพรีน                             | 50               | 40                      |                   |                                      |                               |
|  | มิลลิกรัมต่อลิตร                  | มิลลิกรัมต่อลิตร |                         |                   |                                      |                               |

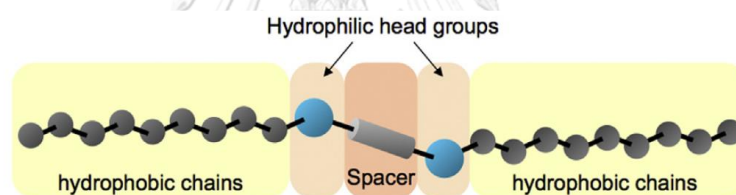
ตารางที่ 2.4 ตัวอย่างกลุ่มแบคทีเรียซึ่งสร้างจากแบคทีเรียเดี่ยวที่มีความสามารถย่อยสลายน้ำมันดิบและ PAHs (ต่อ)

| กลุ่มแบคทีเรีย   | สารตั้งต้น      | ความเข้มข้น                              | เปอร์เซ็นต์<br>ย่อยสลาย | ระยะเวลา<br>(วัน) | รูปแบบ<br>การสร้าง<br>กลุ่มแบคทีเรีย | อ้างอิง                  |
|--|-----------------|--|-------------------------|-------------------|--------------------------------------|--------------------------|
| <i>Pseudomonas</i> sp. PH1,<br><i>Bacillus</i> sp. PH2,<br><i>Ochrobactrum</i> sp. PH3<br>และ <i>Pseudomonas</i> sp. PH4 | น้ำมันดิบ       | 3  | 44                      | 7                 | bottom-up                            | Shen และ<br>คณะ (2015)   |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PSA5<br>และ <i>Rhodococcus</i> sp. NJ2   | ฟลูออ<br>แรนทีน | 200<br>มิลลิกรัมต่อลิตร                  | 97                      | 10                | bottom-up                            | Mishra และ<br>คณะ (2014) |
| <i>Rhodococcus</i> sp. UKMP-5T,<br><i>Rhodococcus</i> sp. UKMP-7T และ<br><i>P. aeruginosa</i> UKMP-8T                    | น้ำมันดิบ       | 1 เปอร์เซ็นต์<br>(ปริมาตรต่อ<br>ปริมาตร) | 99.97                   | 7                 | bottom-up                            | Hamzah และ<br>คณะ (2013) |

ตารางที่ 2.4 ตัวอย่างกลุ่มแบคทีเรียซึ่งสร้างจากแบคทีเรียเดี่ยวที่มีความสามารถย่อยสลายน้ำมันดิบและ PAHs (ต่อ)

| กลุ่มแบคทีเรีย   | สารตั้งต้น  | ความเข้มข้น                       | เปอร์เซ็นต์ย่อยสลาย | ระยะเวลา (วัน) | รูปแบบการสร้างกลุ่มแบคทีเรีย | อ้างอิง              |
|--|-------------|-----------------------------------|---------------------|----------------|------------------------------|----------------------|
| <i>Mycobacterium</i> sp. A1-PYR และ <i>Sphingomonas</i> sp. PheB4  | ฟีนนพรีน    | 10 มิลลิกรัมต่อลิตร               | 100                 | 3              | bottom-up                    | Zhong และคณะ (2011)  |
|  | ฟลูออแรนทีน | 10 มิลลิกรัมต่อลิตร               | 71                  | 7              |                              |                      |
|  | ไพรีน       | 10 มิลลิกรัมต่อลิตร               | 50                  |                |                              |                      |
| <i>Micrococcus</i> sp. GS2-22, <i>Bacillus</i> sp. DS6-86, <i>Corynebacterium</i> sp. GS5-66, <i>Flavobacterium</i> sp. DS5-73 และ <i>Pseudomonas</i> sp. DS10-129 | น้ำมันดิบ   | 1 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) | 70                  | 20             | bottom-up                    | Rahman และคณะ (2002) |

นอกจากความสามารถในการย่อยสลายสารประกอบไฮโดรคาร์บอนของแบคทีเรียที่เป็นปัจจัยสำคัญทำให้การบำบัดทางชีวภาพดำเนินต่อไปได้ ยังมีอีกปัจจัยที่มีความสำคัญทำให้การบำบัดทางชีวภาพมีประสิทธิภาพเพิ่มมากขึ้น ได้แก่ การสร้างสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ (biosurfactant) ซึ่งเป็นสารชีวโมเลกุลที่มีสมบัติลดแรงตึงผิวระหว่างน้ำและน้ำมัน และเพิ่มการละลายน้ำของน้ำมัน ทำให้เพิ่มพื้นที่ผิวสัมผัสของแบคทีเรียกับน้ำมัน ส่งผลให้เพิ่มความสามารถของแบคทีเรียในการนำน้ำมันไปใช้เป็นแหล่งพลังงานและแหล่งคาร์บอนได้ง่ายและมากขึ้น (Das และ Chandran, 2010) โครงสร้างสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ เป็นแอมฟิพาติกโมเลกุลประกอบด้วยส่วนไฮโดรฟิลิกและส่วนไฮโดรโฟบิก ซึ่งเป็นส่วนที่ชอบน้ำและไม่ชอบน้ำตามลำดับ (ดังแสดงในรูปที่ 2.6) ส่วนไฮโดรฟิลิกประกอบด้วยโปรตีนและน้ำตาลที่มีหมู่คาร์บอกซิลิก หมู่ไฮดรอกซิล หมู่อะมิโน หมู่ฟอสเฟต หรือแอลกอฮอล์ เป็นต้น และส่วนไฮโดรโฟบิก เป็นโมเลกุลพวกไฮโดรคาร์บอน เช่น กรดไขมันอิ่มตัวและกรดไขมันไม่อิ่มตัวทั้งโมเลกุลใหญ่และโมเลกุลเล็ก (Mao และคณะ, 2015) สารลดแรงตึงผิวชีวภาพจึงมีหลายชนิดตามโครงสร้างที่แตกต่างกัน เช่น ไกลโคลิพิด ลิโปเปปไทด์ กรดไขมันและฟอสโฟลิพิด และพอลิแซ็กคาไรด์ (Matvyeyeva และคณะ, 2014)

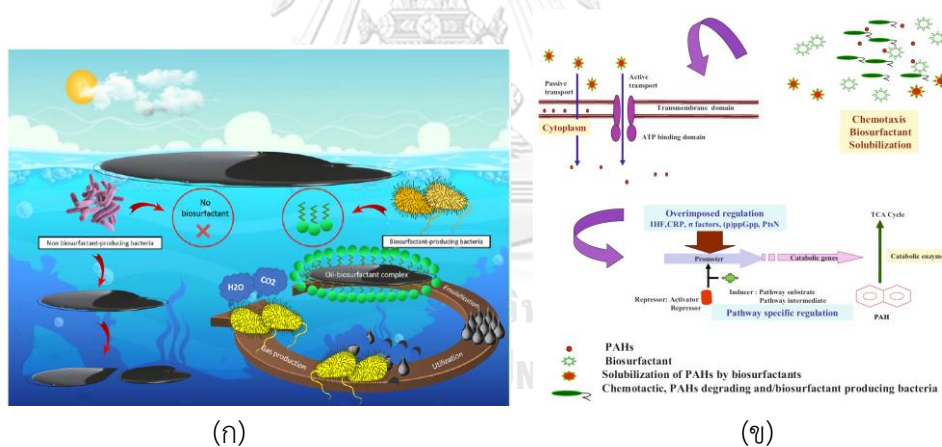


รูปที่ 2.6 โครงสร้างของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ (Mao และคณะ, 2015)

แบคทีเรียสามารถเข้าถึงน้ำมันดิบและองค์ประกอบของน้ำมันดิบได้โดยสร้างสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ และปลดปล่อยออกมานอกเซลล์แบคทีเรีย สารลดแรงตึงผิวจะหันส่วนที่ชอบน้ำหรือส่วนหัวเข้าจับที่บริเวณพื้นผิวของน้ำ และหันส่วนที่ไม่ชอบน้ำหรือส่วนหางเข้าหาสารประกอบไฮโดรคาร์บอน เกิดเป็นโครงสร้างที่เรียกว่า ไมเซลล์ (micelle) จากนั้นแบคทีเรียนำสารประกอบไฮโดรคาร์บอนเข้าสู่เซลล์ด้วยวิธี passive transport หรือ active transport และใช้สารเหล่านั้นในน้ำมันเป็นแหล่งพลังงานและแหล่งคาร์บอนได้ (Chauhan และคณะ, 2008; Hassanshahian และคณะ, 2020) ดังแสดงในรูปที่ 2.7 นอกจากนี้ผนังเซลล์ของแบคทีเรียบางชนิดมีความไม่ชอบน้ำ จะไปจับกับส่วนที่เป็นสารประกอบไฮโดรคาร์บอนที่ไม่มีขั้ว และเป็นสารไฮโดรโฟบิกแทน ทำให้แบคทีเรียสามารถเข้าถึงและยึดเกาะอยู่กับสารประกอบไฮโดรคาร์บอนได้ดี และนำสารประกอบไฮโดรคาร์บอนไปใช้เป็นแหล่งพลังงานและแหล่งคาร์บอนได้ง่ายขึ้น (Thapa และคณะ, 2012) มีงานวิจัยรายงานการส่งเสริมการย่อยสลายปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนด้วยการใช้แบคทีเรียที่มีความสามารถผลิตสารลดแรงตึงผิว

เช่น Mnif และคณะ (2017) เปรียบเทียบประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันดีเซล ความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) ระหว่างชุดการทดลองที่เติม *Bacillus subtilis* SPB1 ที่มีความสามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพลงไปด้วยร่วมกับกลุ่มแบคทีเรียที่ประกอบด้วย *Lysinibacillus bronitolerans* RI18, *Bacillus thuringiensis* RI16 และ *B. weihenstephanensis* RI12 ซึ่งมีความสามารถย่อยสลายไฮโดรคาร์บอน และชุดการทดลองที่มีเพียงกลุ่มแบคทีเรีย พบว่า ชุดการทดลองที่มีกลุ่มแบคทีเรียและสายพันธุ์ SPB1 ช่วยส่งเสริมการย่อยสลายเพิ่มขึ้น 15.35 เปอร์เซ็นต์ในระยะเวลา 21 วัน ดังนั้นการใช้แบคทีเรียผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพร่วมด้วยจึงเป็นอีกแนวทางหนึ่งที่จะช่วยส่งเสริมการบำบัดสิ่งแวดล้อมปนเปื้อนได้

แนวโน้มการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพของแบคทีเรีย สามารถตรวจสอบได้ด้วยการวัดค่าแรงตึงผิวชีวภาพ (surface tension) แรงตึงระหว่างผิวที่ประจัน (interfacial tension) ดัชนีการเกิดอิมัลชันระหว่างน้ำกับสารประกอบไฮโดรคาร์บอน (emulsification index; E24) และความไม่ชอบน้ำ (hydrophobicity) โดยเซลล์ของแบคทีเรียที่มีความไม่ชอบน้ำสูงจะสามารถเข้ากับน้ำมันได้ดี ทำให้มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันได้ดี (Karlpuudi, 2018)



รูปที่ 2.7 การผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพช่วยย่อยสลายน้ำมันดิบ (ก)

(Hassanshahian และคณะ, 2020) และ PAHs (ข) (Chauhan และคณะ, 2008)

## 2.6 ปัจจัยทางกายภาพที่มีผลต่อการย่อยสลายน้ำมันดิบและ PAHs

### 2.6.1 ปัจจัยทางสิ่งแวดล้อม

#### 2.6.1.1 อุณหภูมิ

อุณหภูมิ มีผลต่อลักษณะทางกายภาพและโครงสร้างทางเคมีของไฮโดรคาร์บอน และชนิดของแบคทีเรียย่อยสลาย (Chandra และคณะ, 2013) โดยอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการย่อยสลาย

น้ำมันดิบที่ปนเปื้อนในดินคือ 30 ถึง 40 องศาเซลเซียส สำหรับน้ำทะเลคือ 20 ถึง 30 องศาเซลเซียส และในน้ำจืดคือ 15 ถึง 20 องศาเซลเซียส (Al-Hawash และคณะ, 2018) ที่อุณหภูมิต่ำจะลดความสามารถการละลายน้ำของไฮโดรคาร์บอน ทำให้ความเหนียวหนืดเพิ่มมากขึ้น ทำให้การย่อยสลายเกิดได้ยากขึ้นอย่างไรก็ตามเมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้น การละลายของไฮโดรคาร์บอนเพิ่มมากขึ้น ทำให้ความเหนียวหนืดลดลง ส่งเสริมการส่งผ่านของอัลเคนสายยาวจากดินสู่น้ำได้ง่ายขึ้น (Aislabe และคณะ, 2006; Das และ Chandran, 2010)

#### 2.6.1.2 ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH)

ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ที่เหมาะสมต่อการเจริญและกิจกรรมการย่อยสลายสารประกอบไฮโดรคาร์บอนของแบคทีเรีย ครอบอยู่ในช่วง 6.0-8.0 Thavasi และคณะ (2007) พบว่า *Pseudomonas aeruginosa* ย่อยสลายน้ำมันดิบได้ดีที่สุดในน้ำที่มีค่า pH เท่ากับ 8.0 Pawar (2015) พบว่าดินที่มีค่า pH เท่ากับ 7.5 มีความเหมาะสมต่อการย่อยสลายสารประกอบไฮโดรคาร์บอน และ *Burkholderia cocovenenans* ย่อยสลายพีแนทรีนได้ดีที่สุดในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่มีค่า pH อยู่ในช่วง 6.5 ถึง 7.0 (Hassanshahian และคณะ, 2014) โดยแบคทีเรียแต่ละชนิดมีค่า pH ที่เหมาะสมต่อการเจริญและกิจกรรมการย่อยสลายสารไฮโดรคาร์บอนแตกต่างกัน

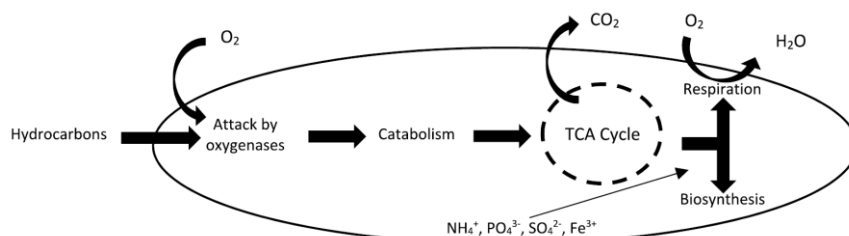
#### 2.6.1.3 ความเค็ม

ความเค็มมีผลต่อกิจกรรมเอนไซม์ในกระบวนการย่อยสลายสารประกอบไฮโดรคาร์บอนของแบคทีเรีย การเจริญของแบคทีเรีย และความหลากหลายของแบคทีเรีย (Qin และคณะ, 2012; Ebadi และคณะ, 2017) โดยทั่วไปความเค็มในน้ำทะเล มีค่าเท่ากับ 25 ถึง 35 กรัมต่อลิตรหรือ 25 ถึง 35 ล้านล้านส่วน (part per trillion, ppt (‰)) (He และคณะ, 2017)

#### 2.6.1.4 ออกซิเจน

ออกซิเจนมีความสำคัญอย่างยิ่งต่อการย่อยสลายสารประกอบไฮโดรคาร์บอนของแบคทีเรียในสิ่งแวดล้อม ซึ่งมีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ที่ผลิตจากแบคทีเรียที่มีความสามารถย่อยสลายไฮโดรคาร์บอนในสถานะที่มีออกซิเจน ทำให้เกิดการย่อยสลายได้อย่างรวดเร็วและสมบูรณ์กว่าในสถานะไร้ออกซิเจน (Waikhom และคณะ, 2020) โดยขั้นแรกของการย่อยสลายไฮโดรคาร์บอนในสถานะที่มีออกซิเจน จำเป็นต้องใช้ ออกซิเจนเป็นตัวออกซิไดซ์ โดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์ออกซิจีเนส (oxygenases) จากนั้นเกิดกระบวนการย่อยสลายตามวิถีที่จำเพาะกับไฮโดรคาร์บอนนั้นๆ เพื่อเปลี่ยนรูปของสาร และเกิดเป็นสารมัธยันต์ของกระบวนการเมแทบอลิซึมหลัก ได้แก่ วัฏจักรกรดไตรคาร์บอกซิลิก (Tricarboxylic acid cycle; TCA cycle) ต่อไป โดยกระบวนการสังเคราะห์ชีวภาพของเซลล์ (biosynthesis) เกิดจากสารตั้งต้นที่มาจากวิถีเมแทบอลิซึมหลัก เช่น

อะซีทิลโคเอ (acetyl-CoA) ซัคซิเนต (succinate) และไพรูเวต (pyruvate) เป็นต้น (Hassanshahian และคณะ, 2020; Ossai และคณะ, 2020) ดังแสดงในรูปที่ 2.8



รูปที่ 2.8 กระบวนการย่อยสลายไฮโดรคาร์บอนในสภาวะที่มีออกซิเจน (Ossai และคณะ, 2020)

## 2.6.2 ชนิดและโครงสร้างของสารประกอบไฮโดรคาร์บอน

โดยทั่วไปชนิดและโครงสร้างของสารประกอบไฮโดรคาร์บอน มักส่งผลต่อประสิทธิภาพการย่อยสลายของแบคทีเรีย ซึ่งสามารถเรียงลำดับความง่ายต่อการย่อยสลายไปยาก ดังนี้ อัลเคนโซ่ตรง > อัลเคนโซ่กิ่ง > อัลคีนโซ่กิ่ง > แอลคิลอะโรมาติกมอลโมเลกุลต่ำ > โมโนอะโรมาติก > อัลเคนวงแหวน > PAHs > แอสฟาทีน (Varjani, 2017; Ossai และคณะ, 2020) โดยองค์ประกอบส่วนใหญ่สามารถย่อยสลายได้ง่ายกว่า PAHs ใดๆก็ตาม อัลเคน เป็นองค์ประกอบหลักในน้ำมันแบ่งได้ 4 ประเภทตามมวลโมเลกุล ได้แก่ อัลเคนที่จำนวนคาร์บอนน้อยกว่า 8 อะตอม จำนวนคาร์บอน 8 ถึง 16 อะตอม จำนวนคาร์บอน 17 ถึง 28 อะตอม และจำนวนคาร์บอนที่มากกว่า 28 อะตอม (Abbasian และคณะ, 2015; Varjani, 2017)

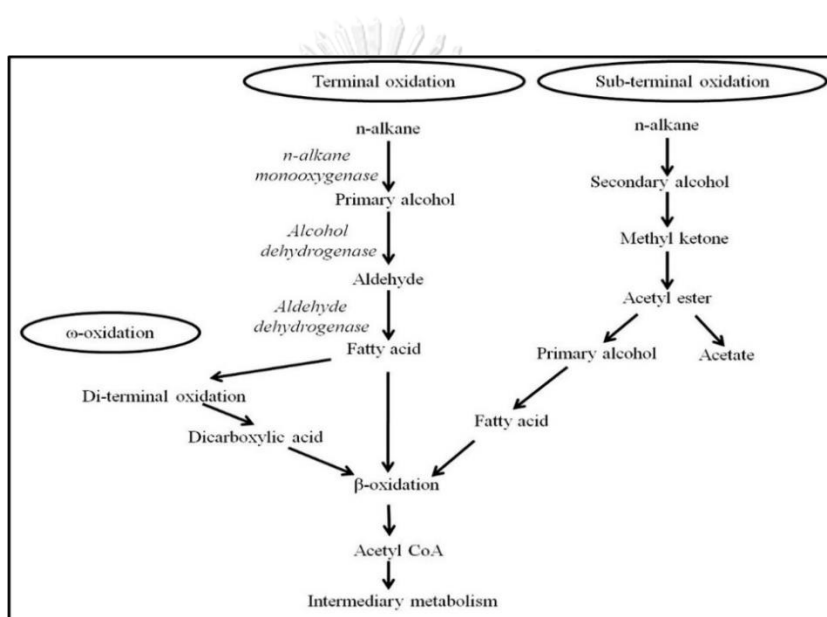
## 2.7 วิธีการย่อยสลายน้ำมันดิบและ PAHs

ในการย่อยสลายน้ำมันดิบ ซึ่งประกอบด้วยสารประกอบไฮโดรคาร์บอนหลากหลายชนิด ดังนั้นจึงจำเป็นต้องอาศัยวิธีการย่อยสลายที่แตกต่างกันซึ่งจำเพาะต่อโครงสร้างของไฮโดรคาร์บอนชนิดนั้นๆ โดยวิธีหลักในการย่อยสลาย ได้แก่ วิธีการย่อยสลายอัลเคน และวิธีการย่อยสลาย PAHs

### 2.7.1 วิธีการย่อยสลายอัลเคน

เนื่องจากองค์ประกอบส่วนใหญ่ในน้ำมันมากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ประกอบด้วยส่วนที่เป็นอัลเคน ซึ่งเป็นสารไฮโดรคาร์บอนชนิดอิ่มตัว ดังนั้นมักเกิดการย่อยสลายที่อัลเคนเป็นหลัก ซึ่งอัลเคนที่มีจำนวนคาร์บอนน้อยกว่า 9 อะตอม สามารถระเหยออกไป ส่วนอัลเคนที่มีจำนวนคาร์บอน 10 ถึง 24 อะตอม เกิดวิธีการย่อยสลายได้ 2 ทาง โดยเริ่มต้นจากการเติมออกซิเจนที่ตำแหน่งปลาย (terminal) ด้วยเอนไซม์อัลเคนโมโนออกซิจีเนส (*n*-alkane monooxygenase) ได้ผลิตภัณฑ์เป็นแอลกอฮอล์ปฐมภูมิ (primary alcohol) จากนั้นถูกเปลี่ยนเป็นแอลดีไฮด์ (aldehyde) ด้วยเอนไซม์

แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนส (alcohol dehydrogenase) และถูกเปลี่ยนเป็นกรดไขมัน (fatty acid) ด้วยเอนไซม์อัลดีไฮด์ดีไฮโดรจีเนส (aldehyde dehydrogenase) แล้วเข้าสู่วัฏจักรเบต้า-ออกซิเดชัน ( $\beta$ -oxidation) และได้ผลิตภัณฑ์สุดท้ายเป็นคาร์บอนไดออกไซด์และน้ำ ส่วนการย่อยสลายที่ตำแหน่งถัดจากปลาย (subterminal) เริ่มจากอัลเคนถูกออกซิไดซ์ได้เป็นแอลกอฮอล์ทุติยภูมิ (secondary alcohol) และถูกออกซิไดซ์ต่อเป็นเมทิลคีโตน (methylketone) และอะซิetylเอสเทอร์ (acetyl ester) ตามลำดับ จากนั้นจะถูกไฮโดรไลซ์ด้วยเอสเทอร์เรสได้แอลกอฮอล์ปฐมภูมิและอะซิเตท (acetate) แล้วเข้าสู่วัฏจักรเบต้า-ออกซิเดชันต่อไป (Abbasian และคณะ, 2016; Varjani, 2017; Brzeszcz และKaszycycki, 2018; Park และPark, 2018) ดังแสดงในรูปที่ 2.9



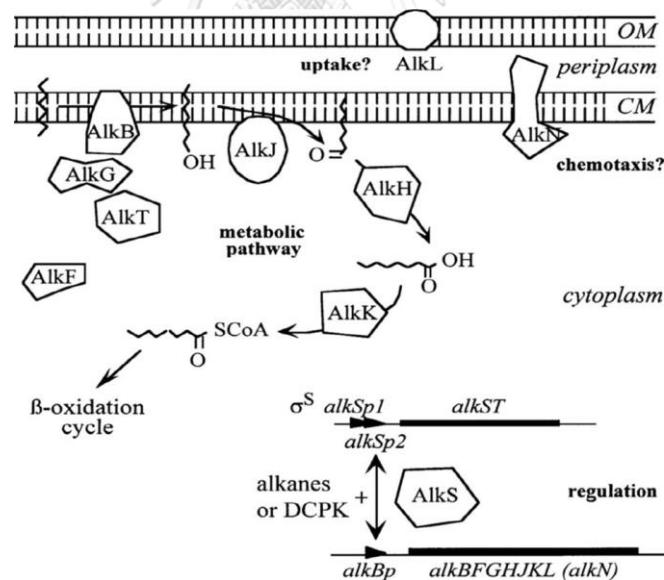
รูปที่ 2.9 วิธีการย่อยสลายอัลเคน (Varjani, 2017)

### 2.7.2 เอนไซม์อัลเคนโมโนออกซิจีเนส

เอนไซม์หลักที่มีบทบาทเกี่ยวกับการย่อยสลายในขั้นตอนแรกของอัลเคน ได้แก่ เอนไซม์อัลเคนโมโนออกซิจีเนส (alkane monooxygenase) โดยยีนประมวลรหัสการสร้างเอนไซม์อัลเคนโมโนออกซิจีเนสแบ่งออกเป็นหลายประเภทตามชนิดของแบคทีเรียและชนิดของอัลเคนที่สามารถย่อยสลายได้ (van Beilen และFunhoff, 2007) ได้แก่ ยีนอัลเคนโมโนออกซิจีเนส (integral-membrane non-heme diiron monooxygenase; *alkB*) เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายอัลเคนที่มีจำนวนคาร์บอน 5 ถึง 16 อะตอม และอัลเคนที่มีจำนวนคาร์บอนมากกว่า 16 อะตอม โดยอาศัยระบบขนส่งอิเล็กตรอนที่ประกอบด้วยรูบรีดอกซิน (rubredoxin; *AlkG*) และรูบรีดอกซินรีดักเทส (rubredoxin reductase; *AlkT*) (ดังแสดงในรูปที่ 2.10) (van Beilen และคณะ, 2001; Abbasian



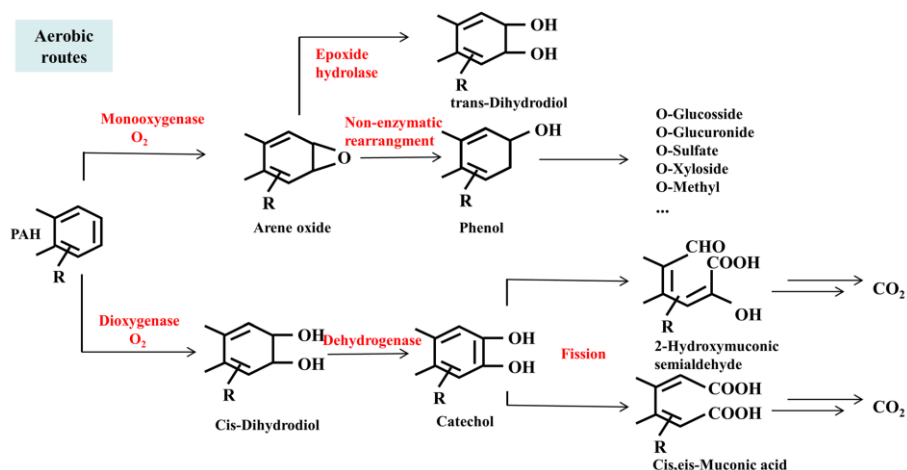
และคณะ, 2016) ยีนอัลเคนโมนอกซิจีเนส (alkane monooxygenase; *alkM*) ของ *Acinetobacter* sp. ADP1 เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายอัลเคนที่มีจำนวนคาร์บอน 6 ถึง 12 อะตอม (Tanase และคณะ, 2013) ยีนฟลาวินอัลเคนไดออกซิจีเนส (flavin-containing alkane-dioxygenase; *almA*) ของ *Acinetobacter* sp. DSM17874 เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายอัลเคนที่มีจำนวนคาร์บอนมากกว่า 32 อะตอม (Wentzel และคณะ, 2007) และ *Acinetobacter* sp. M-1 เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายอัลเคนที่มีจำนวนคาร์บอน 10 ถึง 30 อะตอม (Maeng และคณะ, 1996; Tani และคณะ, 2001) ยีนฟลาวินออกซิจีเนส (flavin-dependent oxygenase; *ladA*) ของ *Geobacillus thermodenitrificans* NG80-2 เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายอัลเคนที่มีจำนวนคาร์บอน 15 ถึง 36 อะตอม (Feng และคณะ, 2007; Li และคณะ, 2008) และยีนไซโตโครม P450 โมโนออกซิจีเนส (cytochrome P450 monooxygenase; CYP153) เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายอัลเคนที่มีจำนวนคาร์บอน 5 ถึง 16 อะตอม ยีน CYP15316 ของ *Mycobacterium marinum* ที่สามารถย่อยสลายอัลเคนที่มีจำนวนคาร์บอน 5 ถึง 12 อะตอม (Scheps และคณะ, 2011) และยีน CYP153C1 ของ *Novosphingobium aromaticivorans* DSM12444 ที่สามารถย่อยสลายอัลเคนที่มีจำนวนคาร์บอน 7 ถึง 9 อะตอม (Zhou และคณะ, 2011)



รูปที่ 2.10 วิธีและเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายอัลเคนของ *Pseudomonas putida* GPo1 (van Beilen และคณะ, 2001)

### 2.7.3 วิธีการย่อยสลาย PAHs

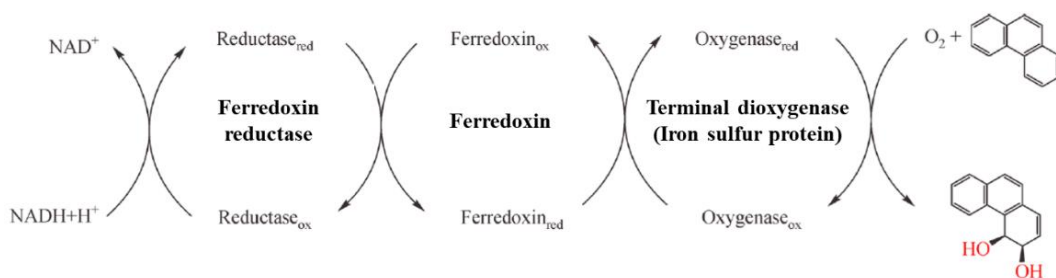
สำหรับการย่อยสลาย PAHs ในสภาวะที่มีออกซิเจน เริ่มจากปฏิกิริยาไฮดรอกซิเลชัน (hydroxylation) โดยอาศัยการเร่งปฏิกิริยาจากระบบเอนไซม์ไดออกซิจีเนส (aromatic ring hydroxylating dioxygenase; ARHD) ด้วยการเติมออกซิเจน 2 อะตอมที่บริเวณพันธะคู่ของวงอะโรมาติก ได้ผลิตภัณฑ์เป็น *ซิส-ไดไฮโดรไดออล* (*cis*-dihydrodiol) แล้วถูกออกซิไดส์ด้วยเอนไซม์ดีไฮโดรจีเนส (dehydrogenase) เกิดผลิตภัณฑ์เป็นสารตัวกลางที่มีหมู่ไฮดรอกซี 2 หมู่ (PAH dihydroxy derivative) เรียกวิธีการย่อยสลายในขั้นตอนนี้ว่า วิธีการย่อยสลายส่วนบน (upper pathway) ซึ่งจะเป็นสารตั้งต้นเพื่อเข้าสู่กระบวนการแตกวงอะโรมาติกโดยการเติมออกซิเจน 2 อะตอมผ่านทางวิถี *ออร์โธ* หรือ *เมตา* ในวิธีการย่อยสลายส่วนล่าง (lower pathway) วิธีการแตกวงแบบ *ออร์โธ* (*ortho* cleavage pathway) จะเกิดการแตกวงระหว่างอะตอมของคาร์บอนที่มีหมู่ไฮดรอกซีด้วยเอนไซม์อินตราไดออล ไดออกซิจีเนส (intradiol dioxygenase) หรือแคทีคอล 1,2 ไดออกซิจีเนส (catechol 1,2-dioxygenase) ได้ผลิตภัณฑ์เป็น *ซิส-ซิส* มูโคเนต (*cis-cis* muconate) ที่มีหมู่คาร์บอกซิลิก 2 หมู่ ซึ่งจะถูกเปลี่ยนรูปเป็นมูโคโนแลคโตน (muconolactone) ด้วยเอนไซม์มูโคเนตไซโคลไอโซเมอเรส (muconate cycloisomerase) แล้วเปลี่ยนพันธะคู่กลายเป็น 3-ออกโซอะดิเพตอินอลแลคโตน (3-oxoadipate-enol-lactone) ด้วยเอนไซม์มูโคโนแลคโตนไอโซเมอเรส (muconate isomerase) แล้วผ่านกระบวนการต่างๆ จนถึงขั้นตอนสุดท้ายจะได้ผลิตภัณฑ์เป็นอะเซทิลโคเอ (acetyl-CoA) และซักซินิลโคเอ (succinyl-CoA) สำหรับการแตกวงโดยวิถี *เมตา* (*meta*-cleavage pathway) จะเกิดการแตกวงระหว่างอะตอมของคาร์บอนด้วยเอนไซม์เอกซ์ตราไดออล ไดออกซิจีเนส (extradiol dioxygenase) หรือเอนไซม์แคทีคอล 2,3-ไดออกซิจีเนส (catechol 2,3-dioxygenase) ได้ผลิตภัณฑ์เป็น 2-ไฮดรอกซีมูโคนิกซีมิแอลดีไฮด์ (2-hydroxy muconicsemialdehyde) จากนั้นผ่านกระบวนการแตกวงอีกหลายขั้นตอน เมื่อผ่านกระบวนการแตกวงจนถึงขั้นตอนสุดท้ายจะได้ผลิตภัณฑ์เป็นไพรูเวท (pyruvate) และอะซีทัลดีไฮด์ (acetaldehyde) จากนั้นผลิตภัณฑ์สุดท้ายของการแตกวงอะโรมาติกทั้งสองแบบจะเข้าสู่ TCA cycle ต่อไป เมื่อกระบวนการย่อยสลาย PAHs เกิดขึ้นอย่างสมบูรณ์ เกิดผลิตภัณฑ์สุดท้ายเป็นคาร์บอนไดออกไซด์และน้ำ (Habe และ Omori, 2003; Peng และคณะ, 2008; Shahsavari และคณะ, 2019) ดังแสดงในรูปที่ 2.11 นอกจากนี้ยังมีรายงานการย่อยสลาย PAHs โดยอาศัยเอนไซม์โมโนออกซิจีเนส (monooxygenase) ในการเติมออกซิเจน 1 อะตอมที่บริเวณพันธะคู่ของวงอะโรมาติก ได้ผลิตภัณฑ์เป็นแอรีนออกไซด์ (arene oxide) จากนั้นอาจเกิดการเรียงตัวใหม่ได้ผลิตภัณฑ์เป็นสารประกอบพินอล หรืออาจเข้าสู่วิถีอีพอกไซด์ไฮโดรเลส (epoxide hydrolase pathway) โดยเกิดการเติมน้ำด้วยเอนไซม์อีพอกไซด์ไฮโดรเลส (epoxide hydrolase) ได้ผลิตภัณฑ์เป็น *ทรานส์-ไดไฮโดรไดออล* (*trans*-dihydrodiol) (Peng และคณะ, 2008) ดังแสดงในรูปที่ 2.11



รูปที่ 2.11 วิธีการย่อยสลาย PAHs ในสภาวะที่มีออกซิเจน (Lin และคณะ, 2019)

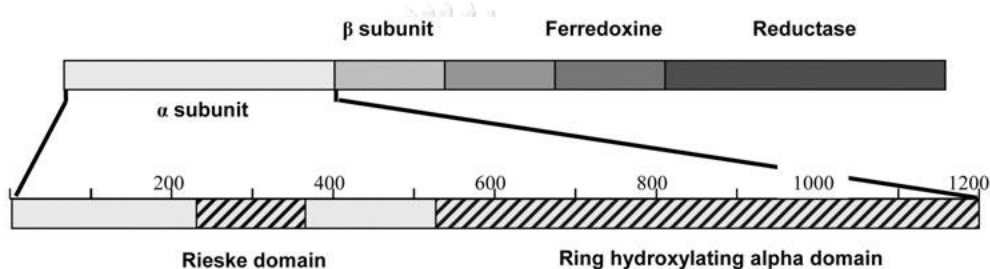
## 2.7.4 เอนไซม์ไดออกซิจีเนส

ระบบเอนไซม์ไดออกซิจีเนส หรืออะโรมาติกริงไฮดรอกซิเลทิงไดออกซิจีเนส เป็นระบบเอนไซม์สำคัญที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลาย PAHs ประกอบด้วย 3 ส่วน ได้แก่ เฟอร์รีดอกซินรีดักเทส (ferredoxin reductase) เฟอร์รีดอกซิน (ferredoxin) และเทอร์มินอลไดออกซิจีเนส (terminal dioxygenase) ที่เป็นไอออนซัลเฟอร์โปรตีน (iron sulfur protein; ISP) ซึ่งส่วนออกซิจีเนสมีความสำคัญคือ เป็นบริเวณอนุรักษ์ของเอนไซม์ และทำหน้าที่เป็นส่วนเร่งปฏิกิริยาอย่างจำเพาะเจาะจงต่อสารตั้งต้น เทอร์มินอลไดออกซิจีเนส ประกอบด้วย 2 หน่วยย่อยคือ หน่วยย่อยแอลฟา ( $\alpha$ -subunit; RHD $\alpha$ ) และหน่วยย่อยเบต้า ( $\beta$ -subunit; RHD $\beta$ ) ดังแสดงในรูปที่ 2.12 โดยเฟอร์รีดอกซินรีดักเทสทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับปฏิกิริยาออกซิเดชันของ NAD(P)H ให้อิเล็กตรอนหลุดออกมา จากนั้นเฟอร์รีดอกซินจะรับอิเล็กตรอน และทำหน้าที่ขนส่งอิเล็กตรอนไปยังเทอร์มินอลไดออกซิจีเนส ซึ่งมีหน้าที่เร่งปฏิกิริยาการเติมออกซิเจนเข้าสู่อะโรมาติก ตรงบริเวณหน่วยย่อยแอลฟา ประกอบด้วยบริเวณอนุรักษ์ 2 ส่วน ได้แก่ Rieske โดเมน มีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เป็นบริเวณอนุรักษ์มากกว่าบริเวณอื่น และริงไฮดรอกซิเลทิงโดเมน ภายหลังเรียกว่า catalytic โดเมน (รูปที่ 2.13) เป็นบริเวณเร่งของเอนไซม์ไดออกซิจีเนสเช่นกัน แต่มีความแตกต่างกันเพียงเล็กน้อยของรูปทรงของบริเวณเร่ง ทำให้เกิดความแตกต่างของความจำเพาะต่อสารตั้งต้นของเอนไซม์แต่ละชนิด (Habe และ Omori, 2003; Kweon และคณะ, 2008; Baboshin และ Golovleva, 2012)



รูปที่ 2.12 การจัดเรียงระบบการทำงานร่วมกันของระบบเอนไซม์ไดออกซิจีเนส

(Wu และคณะ, 2020)



รูปที่ 2.13 การจัดเรียงตัวของอะโรมาติกริงไฮดรอกซิเลทิงไดออกซิจีเนสบริเวณหน่วยย่อยแอลฟา

ประกอบด้วย 2 โดเมนคือ Rieske โดเมน และริงไฮดรอกซิเลทิงโดเมน

(Bordenave และคณะ, 2008)

## 2.8 แบคทีเรียในงานวิจัยนี้

### 2.8.1 แบคทีเรีย *Mycobacterium*

*Mycobacterium* spp. PO1 และ PO2 ถูกคัดแยกจากกลุ่มแบคทีเรียที่มีความสามารถย่อยสลายไพรีน ซึ่งเพิ่มจำนวนแบคทีเรียได้จากดินตะกอนป่าชายเลน และการวิเคราะห์จีโนม ทำให้พบยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายไพรีนได้อย่างสมบูรณ์ (Wanapaisan และคณะ, 2018) ดังนั้นจึงมีความน่าสนใจที่จะศึกษาประสิทธิภาพย่อยสลายไพรีนต่อไป โดย *Mycobacterium* เป็นแบคทีเรียแกรมบวกในไฟลัม Actinobacteria และมีปริมาณ GC-content สูง ซึ่งสามารถพบได้จากสิ่งแวดล้อมที่ปนเปื้อน โดยเฉพาะอย่างยิ่งในดินปนเปื้อน PAHs สามารถแบ่งได้เป็น 2 กลุ่มตามอัตราการเจริญเติบโต ได้แก่ พวกที่เจริญช้า (slow-growing bacteria) ที่ต้องใช้เวลาในการเจริญมากกว่า 7 วัน ซึ่งส่วนใหญ่เป็นเชื้อก่อโรคในมนุษย์และสัตว์ และพวกที่เจริญเร็ว (fast-growing bacteria) ต้องใช้เวลาในการเจริญน้อยกว่า 7 วัน ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลาย PAHs (Pagnout และคณะ, 2006; Dudhagara และ Dave, 2018) นอกจากนี้ ผนังเซลล์ของ

*Mycobacterium* มีกรดไมโคลิก (mycolic acid) ที่มีจำนวนคาร์บอน 60 ถึง 90 อะตอม และมีปริมาณมากถึง 60 เปอร์เซ็นต์ของผนังเซลล์ จึงทำให้ผนังเซลล์ของแบคทีเรียมีความไม่ชอบน้ำสูง ส่งผลให้สามารถยึดเกาะกับ PAHs และนำ PAHs เข้าสู่ภายในเซลล์ได้ดี (Pagnout และคณะ, 2006) Floyed และคณะ (2005) รายงานว่า *Mycobacterium* เป็นจีโนมเด่นในดิน ซึ่งสามารถพบได้ประมาณ 2.6 เปอร์เซ็นต์ของประชาคมแบคทีเรียทั้งหมดในดิน

Gupta และคณะ (2018) ได้จัดกลุ่มแบคทีเรียจีโนม *Mycobacterium* ใหม่ด้วยการใช้ลำดับโปรตีนและลำดับกรดอะมิโนของ *Mycobacterium* 150 สายพันธุ์เป็นข้อมูลในการวิเคราะห์ โดยสามารถแบ่งออกเป็น 5 จีโนม ได้แก่ *Mycobacterium*, *Mycolicibacillus* และ *Mycobacteroides* ซึ่งจัดเป็นเชื้อก่อโรค *Mycolicibacter* และ *Mycolicibacterium* ซึ่งเป็นกลุ่มเชื้อที่ไม่ก่อโรค ทั้งนี้ *Mycobacterium* ที่เคยมีรายงานถึงความสามารถย่อยสลายในการย่อยสลาย PAHs ได้ถูกจัดกลุ่มใหม่ อาทิเช่น *Mycobacterium vanbaalenii* PYR-1 เป็น *Mycolicibacterium vanbaalenii* PYR-1 ย่อยสลาย PAHs ชนิดต่างๆ เช่น แนพธาลีน แอนทราซีน ฟลูออรีน พีแนนทรีน ไพรีน ฟลูออแรนทีน เบนซ์[เอ]แอนทราซีน และเบนโซ[เอ]ไพรีน และผลิตสารมัธยันต์หลักระหว่างการย่อยสลาย และ *Mycobacterium gilvum* PYR-GCK เป็น *Mycolicibacterium gilvum* PYR-GCK ย่อยสลายไพรีนและฟลูออแรนทีน เป็นต้น ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงจัดกลุ่มแบคทีเรีย *Mycobacterium* spp. PO1 และ PO2 ใหม่ โดยการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA กับจีโนมใหม่ดังกล่าว

*Mycobacterium* ได้รับการศึกษาอย่างกว้างขวางเกี่ยวกับความสามารถในการย่อยสลาย PAHs มวลโมเลกุลสูงโดยเฉพาะอย่างยิ่งไพรีนและฟลูออแรนทีน ดังแสดงในตารางที่ 2.5 โดย *Mycobacterium* แบ่งออกเป็น 3 กลุ่มตามความสามารถในการย่อยสลาย PAHs คือ กลุ่มที่ 1 *Mycobacterium* ที่สามารถย่อยสลายพีแนนทรีน ไพรีน และฟลูออแรนทีนได้ กลุ่มที่ 2 *Mycobacterium* ที่ย่อยสลายพีแนนทรีนและไพรีน แต่ไม่ย่อยสลายฟลูออแรนทีน และกลุ่มที่ 3 *Mycobacterium* ที่ย่อยสลายฟลูออแรนทีนเพียงอย่างเดียว (Brzeszcz และKaszycki, 2018) โดย PAHs เป็นหนึ่งในองค์ประกอบของน้ำมันดิบ ทำให้คาดว่า *Mycobacterium* ที่มีความสามารถย่อยสลาย PAHs น่าจะมีความสามารถย่อยสลายน้ำมันดิบและองค์ประกอบของน้ำมันดิบได้

*Mycobacterium vanbaalenii* PYR-1 (หรือ *Mycolicibacterium vanbaalenii* PYR-1) ที่คัดแยกจากดินตะกอนปนเปื้อนน้ำมัน อ่าวเม็กซิโก เป็นสายพันธุ์ที่ศึกษาลักษณะสมบัติอย่างละเอียด ที่สุด ในแง่ของยีนและวิธีการย่อยสลาย PAHs รวมทั้งมีการศึกษาจีโนมของสายพันธุ์นี้ และวิเคราะห์

ยีนที่เกี่ยวข้องในวิถีการย่อยสลาย PAHs รวมทั้งสร้างเครือข่ายวิถีเมแทบอลิซึม PAHs ชนิดต่างๆ รวมทั้งศึกษาหน้าที่ของเอนไซม์ PAHs ไดออกซิจีเนสอย่างละเอียด (Heitkamp และคณะ, 1988; Kim และคณะ, 2007; Kim และคณะ, 2008; Kweon และคณะ, 2011; Kim และคณะ, 2015)



ตารางที่ 2.5 *Mycobacterium* ที่มีความสามารถย่อยสลายน้ำมันดิบ อัลเคน และ PAHs

| สายพันธุ์แบคทีเรีย                      | สารตั้งต้น         | ความเข้มข้น          | เปอร์เซ็นต์<br>ย่อยสลาย | ระยะเวลา<br>(วัน) | อ้างอิง              |
|---|--------------------|----------------------|-------------------------|-------------------|----------------------|
| <i>Mycobacterium parafortuitum</i> J101 | ฟลูออรีน           | 100 มิลลิกรัมต่อลิตร | 99.98                   | 7                 | Naloka และคณะ (2021) |
|   | ฟีนอล              | 100 มิลลิกรัมต่อลิตร | 100.00                  | 3                 |                      |
|   | ฟลูออแรนทรีน       | 100 มิลลิกรัมต่อลิตร | 99.63                   | 7                 |                      |
|   | ไพรีน              | 100 มิลลิกรัมต่อลิตร | 99.25                   | 3                 |                      |
|   | เตตระไฮโดรควิโนลีน | 500 มิลลิกรัมต่อลิตร | 100.00                  | 7                 |                      |
| <i>Mycobacterium</i> sp. Pyr9           | โทโคเฟออล          | 100 มิลลิกรัมต่อลิตร | 100.00                  | 7                 |                      |
|   | ไพรีน              | 50 มิลลิกรัมต่อลิตร  | 98                      | 8                 | Yang และคณะ (2021)   |
|   | ฟลูออแรนทรีน       | 50 มิลลิกรัมต่อลิตร  | 9.9                     | 14                |                      |
|   | เบนโซไพเรน         | 10 มิลลิกรัมต่อลิตร  | 23.2                    | 14                |                      |
|   | ฟีนอล              | 100 มิลลิกรัมต่อลิตร | 100                     | 60 ชั่วโมง        | Sun และคณะ (2019)    |
| <i>Mycobacterium gilvum</i> CP13        | ไพรีน              | 50 มิลลิกรัมต่อลิตร  | 83                      | 3                 |                      |
|   | ไพรีน              | 50 มิลลิกรัมต่อลิตร  | > 95                    | 7                 | Wu และคณะ (2019)     |
| <i>Mycobacterium</i> sp. NS4            | ไพรีน              | 100 มิลลิกรัมต่อลิตร | 84                      | 7                 |                      |
|   | ไพรีน              | 20 มิลลิกรัมต่อลิตร  | 92                      | 15                | Zeng และคณะ (2019)   |

ตารางที่ 2.5 *Mycobacterium* ที่มีความสามารถย่อยสลายน้ำมันดิบ อัลเคน และ PAHs (ต่อ)

| สายพันธุ์แบคทีเรีย              | สารตั้งต้น  | ความเข้มข้น          | เปอร์เซ็นต์<br>ย่อยสลาย | ระยะเวลา<br>(วัน) | อ้างอิง       |
|---------------------------------|-------------|----------------------|-------------------------|-------------------|---------------|
| <i>Mycobacterium</i> sp. PYR10  | ไพรีน       | 100 มิลลิกรัมต่อลิตร | > 95                    | 6                 | Kim และคณะ    |
| <i>Mycobacterium</i> sp. PYR15  | ไพรีน       | 100 มิลลิกรัมต่อลิตร | > 95                    | 6                 | (2018)        |
| <i>Mycobacterium gilvum</i>     | ไพรีน       | 100 มิลลิกรัมต่อลิตร | 56                      | 14                | Hennessee และ |
| czh-101                         | ฟลูออแรนทีน | 100 มิลลิกรัมต่อลิตร | 26                      | 14                | Li (2016)     |
| <i>Mycobacterium crocinum</i>   | ไพรีน       | 100 มิลลิกรัมต่อลิตร | 75                      | 14                |               |
| czh-3                           | ฟลูออแรนทีน | 100 มิลลิกรัมต่อลิตร | 13                      | 14                |               |
| <i>Mycobacterium gilvum</i>     | ไพรีน       | 25 ไมโครโมลาร์       | 100                     | 48 ชั่วโมง        | Badejo และคณะ |
| PYR-GCK                         |             |                      |                         |                   | (2013)        |
| ( <i>Mycobacterium gilvum</i>   |             |                      |                         |                   |               |
| PYR-GCK)                        |             |                      |                         |                   |               |
| <i>Mycobacterium</i> sp. NJS-1  | ไพรีน       | 100 มิลลิกรัมต่อลิตร | 87.90                   | 14                | Zeng และคณะ   |
| <i>Mycobacterium</i> sp. NJS-P  | ไพรีน       | 100 มิลลิกรัมต่อลิตร | 92                      | 14                | (2010)        |
| <i>Mycobacterium</i> sp. A1-PYR | พีแนนพรีน   | 10 มิลลิกรัมต่อลิตร  | 100                     | 3                 | Zhong และคณะ  |
|                                 | ไพรีน       | 10 มิลลิกรัมต่อลิตร  | 33                      | 7                 | (2006)        |
|                                 | ฟลูออแรนทีน | 10 มิลลิกรัมต่อลิตร  | 86.90                   | 7                 |               |



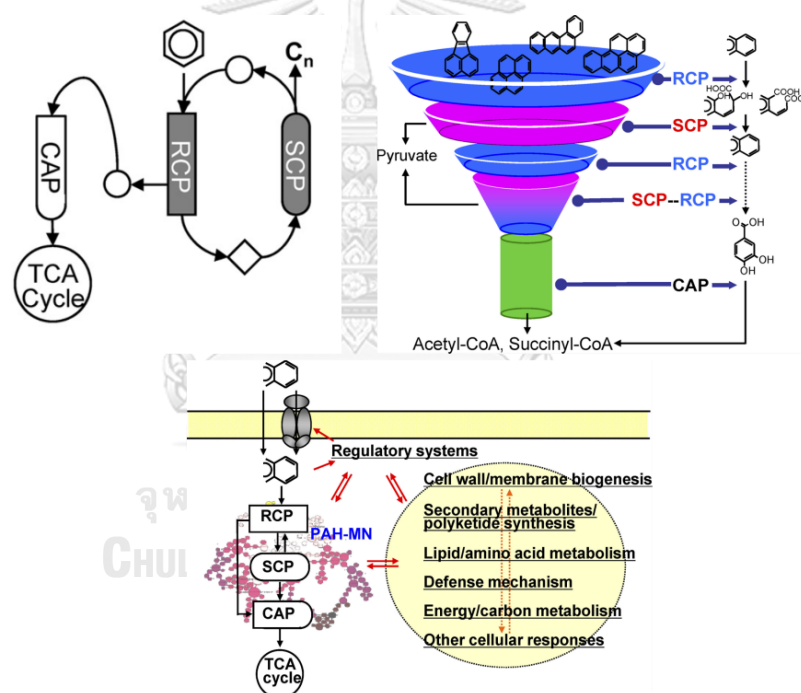
ตารางที่ 2.5 *Mycobacterium* ที่มีความสามารถย่อยสลายน้ำมันดิบ อัลเคน และ PAHs (ต่อ)

| สายพันธุ์แบคทีเรีย                       | สารตั้งต้น                                   | ความเข้มข้น             | เปอร์เซ็นต์ย่อยสลาย | ระยะเวลา (วัน) | อ้างอิง             |
|--|--|-------------------------|---------------------|----------------|---------------------|
| <i>Mycobacterium vanbaalenii</i> PYR-1   | พีแนนทรีน                                    | 0.1 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร | 90                  | 14             | Moody และคณะ (2001) |
| <i>(Mycobacterium vanbaalenii</i> PYR-1) | แอนทราซีน                                    | 0.1 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร | 92                  | 14             | Kim และคณะ (2015)   |
|  | น้ำมันดิบ BP (องค์ประกอบในน้ำมันดิบ) โทเดเคน | 1 เปอร์เซ็นต์           | 62                  | 30             |                     |
| <i>(Mycobacterium vanbaalenii</i> PYR-1) | ไทรตีเคน                                     |                         | 68                  | 30             | Kim และคณะ (2015)   |
|  | พีแนนทรีน                                    |                         | 100                 | 30             |                     |
|  | ไพรีน  |                         | 100                 | 30             |                     |
|  | ฟลูออแรนทีน                                  |                         | 31.20               | 30             |                     |

ตารางที่ 2.5 *Mycobacterium* ที่มีความสามารถย่อยสลายน้ำมันดิบ อัลเคน และ PAHs (ต่อ)

| สายพันธุ์แบคทีเรีย                                | สารตั้งต้น  | ความเข้มข้น                            | เปอร์เซ็นต์<br>ย่อยสลาย | ระยะเวลา<br>(วัน) | อ้างอิง                     |
|---|-------------|--|-------------------------|-------------------|-----------------------------|
| <i>Mycobacterium</i> sp. MHP-1                    | ไพรีน       | 0.1 เปอร์เซ็นต์<br>(น้ำหนักต่อปริมาตร) | 50                      | 7                 | Habe และคณะ<br>(2004)       |
| <i>Mycobacterium</i> sp. 1B                       | ไพรีน       | 250 มิลลิกรัมต่อลิตร                   | 100                     | 6                 | Dandie และคณะ<br>(2004)     |
| <i>Mycobacterium flavescens</i>                   | ฟลูออแรนทีน | 100 มิลลิกรัมต่อลิตร                   | 100                     | 20                | Dean-Ross และ<br>คณะ (2002) |
|   | ไพรีน       | 50 มิลลิกรัมต่อลิตร                    | 100                     | 5                 |                             |
| <i>Mycobacterium</i> sp. AP1                      | ฟลูออแรนทีน | 50 มิลลิกรัมต่อลิตร                    | 50                      | 5                 | Vila และคณะ<br>(2001)       |
|   | ไพรีน       | 180 มิลลิกรัมต่อลิตร                   | 71.40                   | 8                 |                             |
| <i>Mycobacterium</i><br><i>vanbaalenii</i> PYR-1  | ฟลูออแรนทีน | 250 มิลลิตรต่อลิตร                     | 78                      | 5                 | Kelley และคณะ<br>(1993)     |
| <i>Mycobacterium</i><br><i>vanbaalenii</i> PYR-1) | ไพรีน       | 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร                | 63                      | 14                | Heitkamp และ<br>คณะ (1988)  |
|   | แนพธาดีน    | 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร                | 59.50                   | 14                |                             |
|   | ฟิแนนทรีน   | 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร                | 50.90                   | 14                |                             |
|   | ฟลูออแรนทีน | 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร                | 89.70                   | 14                |                             |

Kweon และคณะ (2011) รายงานเกี่ยวกับกระบวนการย่อยสลาย PAHs ของ *M. vanbaalenii* PYR-1 ประกอบด้วย 3 กระบวนการหลัก (รูปที่ 2.14) ได้แก่ Ring cleavage process (RCP) เป็นขั้นตอนการแตกวงอะโรมาติก ทำให้เกิดสารตัวกลางหลายชนิด และเป็นการลดมวลโมเลกุลของ PAHs โดยมีเอนไซม์ที่อาศัยออกซิเจนเป็นสิ่งสำคัญ จากนั้นสารที่ผ่านกระบวนการ RCP เข้าสู่กระบวนการ Side chain process (SCP) ที่เป็นวิธีการย่อยสลายแบบเส้นตรงหรือแบบแตกแขนง เกิดผลิตภัณฑ์ไพรูเวท และสารตัวกลางบางตัวที่จะวนเข้าสู่ขั้นตอน RCP เพื่อแตกวงอะโรมาติกต่อไป และสุดท้ายสารมัธยันต์โปรโตคาทิกูเอท (protocatechuate) เข้าสู่กระบวนการ Central aromatic process (CAP) ที่เป็นวิธีการย่อยสลายแบบเส้นตรง เพื่อผลิตอะเซทิลโคเอ และซัคซินิลโคเอ และเข้าสู่วัฏจักรไทรคาร์บอกซิลิกต่อไป

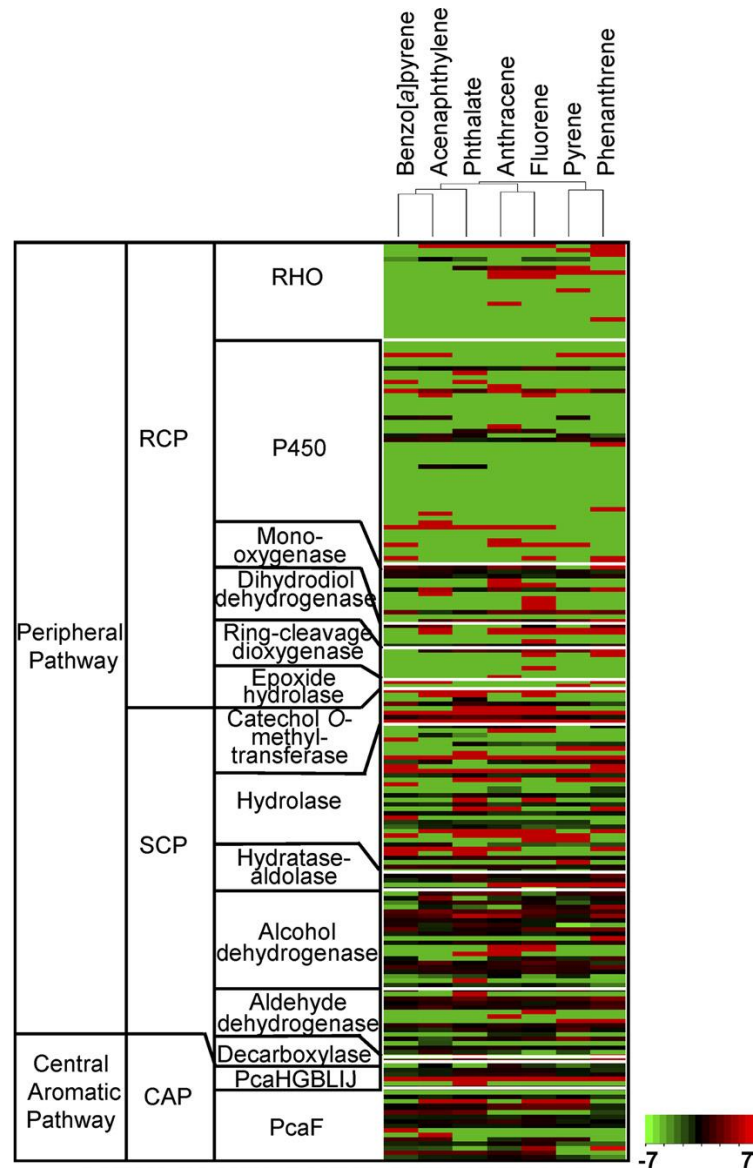


รูปที่ 2.14 กระบวนการหลักของการย่อยสลาย PAHs ของ *M. vanbaalenii* PYR-1 (Kweon และคณะ, 2011)

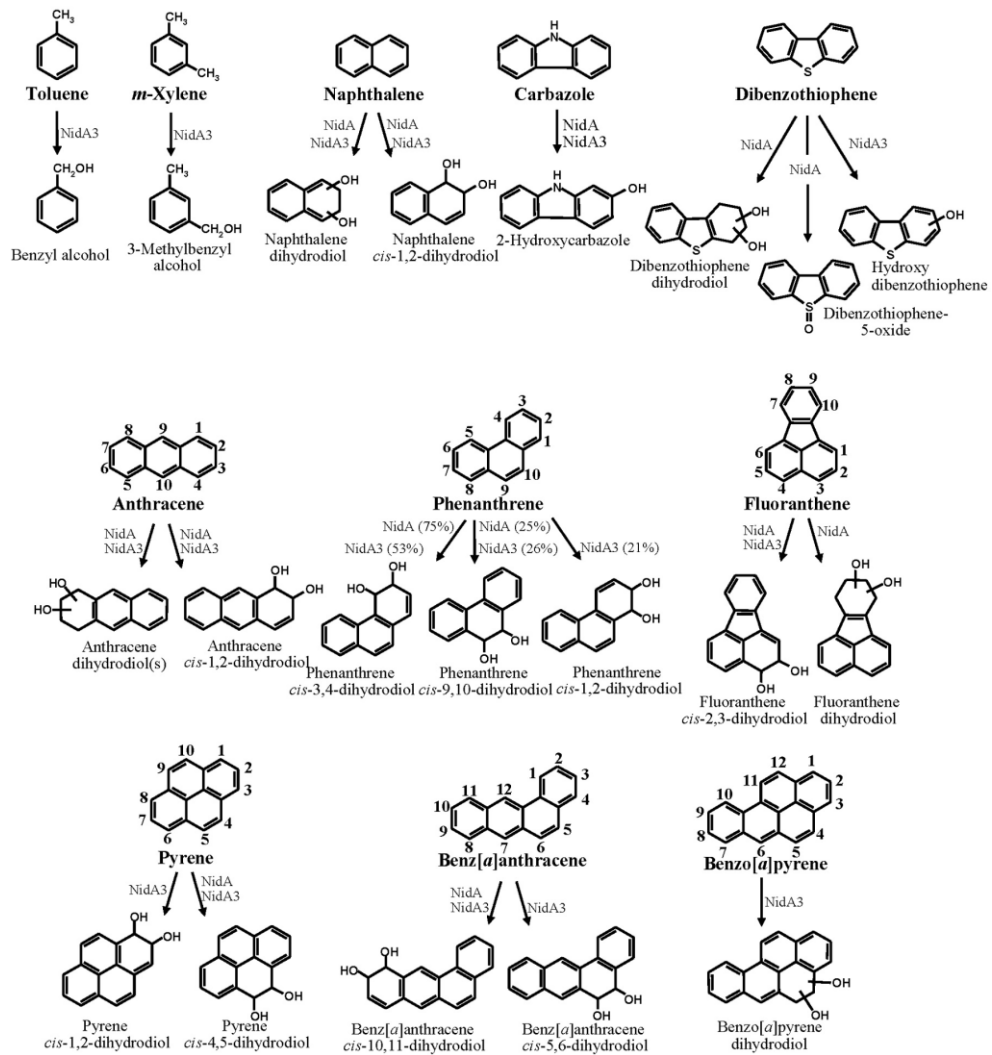
(RCP: Ring cleavage process; SCP: Side chain process; CAP: Central aromatic process)

*Mycobacterium* มีความหลากหลายของยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลาย PAHs โดยการย่อยสลาย PAHs แต่ละชนิดและในแต่ละขั้นตอนย่อยสลายจะมียีนประมวลรหัสเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องแตกต่างกัน ดังแสดงในรูปที่ 2.15 ยีนที่มีความสำคัญต่อกระบวนการแตกวงอะโรมาติกใน

ขั้นตอนแรกคือ ยีน *nidA* และยีน *nidA3* ที่มีความจำเพาะต่อ PAHs แตกต่างกัน (รูปที่ 2.16) กล่าวคือ ยีน *nidA* มีความจำเพาะต่อไพรีน > พีแนนทริน > ฟลูออแรนทีน > แอนทราซีน ในขณะที่ ยีน *nidA3* มีความจำเพาะต่อฟลูออแรนทีน > พีแนนทริน > ไพรีน > แอนทราซีน ยีนทั้งสองนี้มีความเหมือนของลำดับกรดอะมิโนเพียง 53 เปอร์เซ็นต์เท่านั้น (Kweon และคณะ, 2010) ยีน *nidAB* ซึ่งประมวลรหัสหน่วยย่อยแอลฟาและเบต้าของเอนไซม์ไพรีนริงไฮดรอกซิเลทิงไดออกซิจีเนส (pyrene ring-hydroxylating oxygenase) ของสายพันธุ์ PYR-1 จะเกิดการแสดงออกในอาหารที่มีไพรีนเป็นแหล่งคาร์บอน และ *nidA3B3* ซึ่งประมวลรหัสหน่วยย่อยแอลฟาและเบต้าของเอนไซม์ฟลูออแรนทีนริงไฮดรอกซิเลทิงไดออกซิจีเนส (fluoranthene ring-hydroxylating oxygenase) จะเกิดการแสดงออกในอาหารที่มีฟลูออแรนทีนเป็นแหล่งคาร์บอน (Kim และคณะ, 2007; Kweon และคณะ, 2007) ทั้งนี้การย่อยสลาย PAHs ของสายพันธุ์ PYR-1 ต้องอาศัยการทำงานร่วมของยีน *phtAc* และ *phtAd* ทำหน้าที่เป็นเฟอร์ริดอกซินและเฟอร์ริดอกซินรีดักเทสตามลำดับ ให้กับไดออกซิจีเนสและโมนอกซิจีเนสทั้งหมด (Kim และคณะ, 2007; Kim และคณะ, 2008)

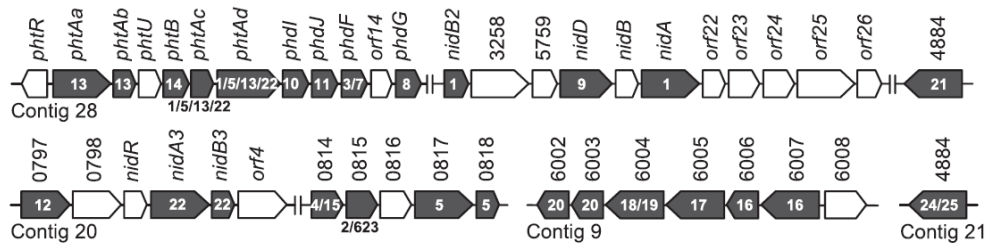


รูปที่ 2.15 แผนที่ความร้อนแสดงเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลาย PAHs ของ *M. vanbaalenii* PYR-1 (Kweon และคณะ, 2011)



รูปที่ 2.16 ตำแหน่งของการเกิดการแตกวงอะโรมาติกด้วยยีน *nidA* และยีน *nidA3*  
(Kweon และคณะ, 2010)

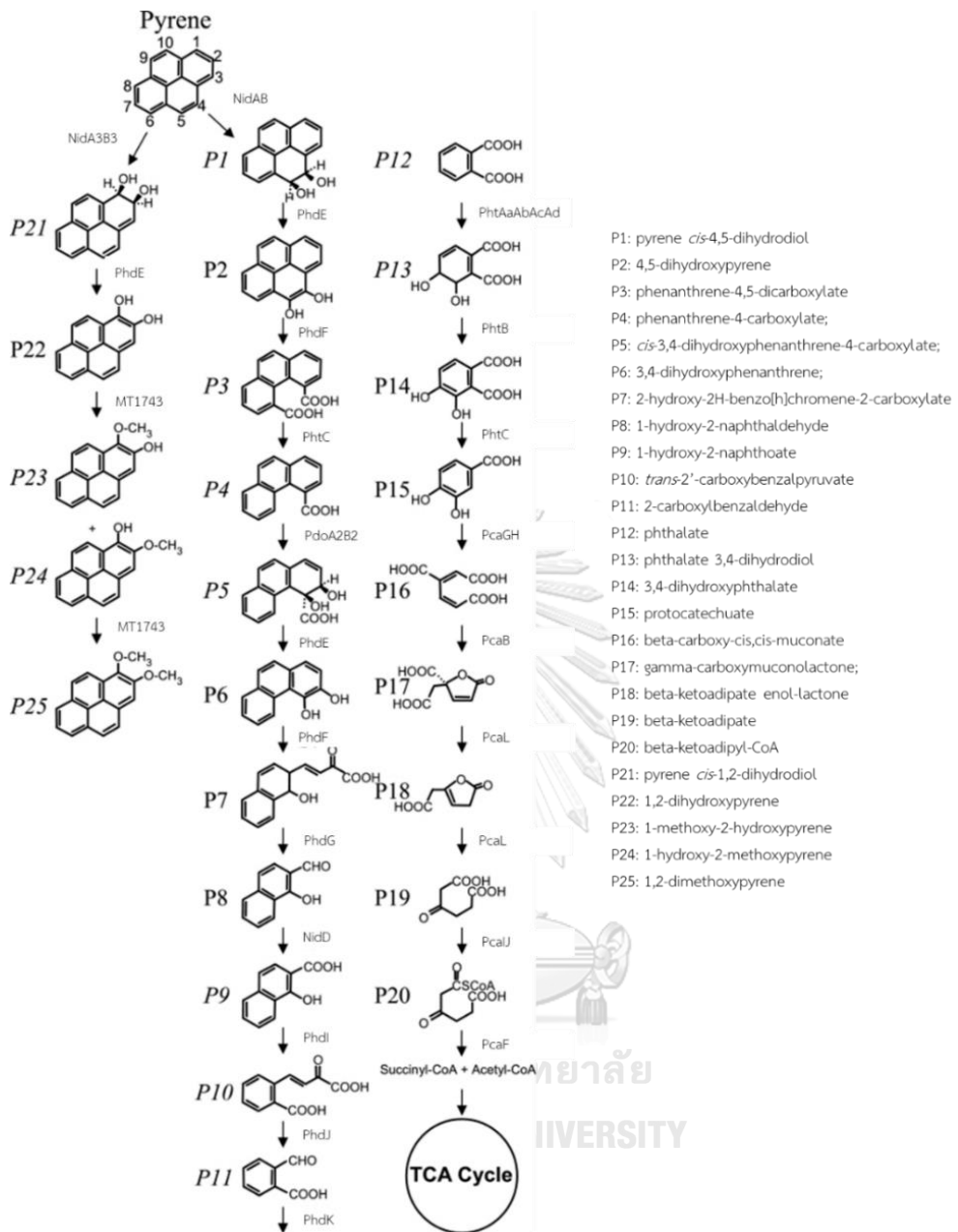
Khan และคณะ (2001) พบยีน *nidAB* ที่ประมวลรหัสของเทอร์มินอลไดออกซิจีเนสในหน่วยย่อยแอลฟาและเบต้า ซึ่งเกี่ยวข้องกับการย่อยสลายไพรีน และยีน *nidD* ที่ประมวลรหัสอัลดีไฮด์ดีไฮโดรจีเนส โดยทั้ง 3 ยีนนี้มีการจัดเรียงตัวเป็น *nidDBA* ดังแสดงในรูปที่ 2.17



รูปที่ 2.17 การจัดเรียงตัวของกลุ่มยีนประมวลรหัสเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายไพรีนของ *M. vanbaalenii* PYR-1 (Kim และคณะ, 2007) โดยตัวเลขที่แสดงอยู่ในลูกศรคือ ขั้นตอนในการย่อยสลายไพรีน

Kim และคณะ (2007) ใช้วิธีการวิเคราะห์เมแทบอลิก (metabolic) จีโนม (genomic) และโปรตีโอม (proteomic) ในการสร้างวิถีการย่อยสลายไพรีนอย่างสมบูรณ์ของสายพันธุ์ PYR-1 (รูปที่ 2.18) พบเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายไพรีน จำนวน 27 เอนไซม์ โดยมีโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายไพรีนถึงพทาเลท 14 โปรตีน การย่อยสลายพทาเลทถึงโปรโตคาทิกูเอท 6 โปรตีน การย่อยสลายโปรโตคาทิกูเอทถึงซัคซินิลโคเอและอะซีทิลโคเอ 7 โปรตีน และการย่อยสลายไพรีนถึง 1,2-ไดเมทอกซีไพรีน (dimethoxypyrene) 3 โปรตีน

วิถีการย่อยสลายไพรีนของสายพันธุ์ PYR-1 เกิดการเติมออกซิเจน 2 อะตอมที่ระหว่างคาร์บอนตำแหน่งที่ 4 และ 5 ด้วยเอนไซม์ไพรีนริงไฮดรอกซิเลทิงไดออกซิจีเนส (NidAB) เกิดผลิตภัณฑ์ไพรีนซิส-4,5-ไดไฮโดรไดออล (pyrene *cis*-4,5-dihydrodiol) จากนั้นผ่านการเปลี่ยนรูปอีกหลายขั้นตอนจนได้ผลิตภัณฑ์ 1-ไฮดรอกซี-2-แนฟโธเอท (1-hydroxy-2-naphthoate) ซึ่งจะถูกลดสลายด้วยอินตราไดออลไดออกซิจีเนส ผ่านทางวิถีการแตกวงอะโรมาติกแบบออโร เกิดผลิตภัณฑ์ออโร-พทาเลท (O-phthalate) และเปลี่ยนรูปต่อไปเป็นโปรโตคาทิกูเอท ซึ่งจะเข้าสู่วัฏจักรไตรคาร์บอกซิลิกผ่านวิถีเบต้า-คีโตอะดิเพท ( $\beta$ -keto adipate) ได้ผลิตภัณฑ์สุดท้ายเป็นคาร์บอนไดออกไซด์ ดังแสดงในรูปที่ 2.18 (Kim และคณะ, 2007) เรียกวิถีการย่อยสลายตั้งแต่พทาเลทจนได้ผลิตภัณฑ์ที่เข้าสู่วัฏจักรไตรคาร์บอกซิลิก วิถีการย่อยสลายส่วนล่าง (lower pathway) และไพรีนจะถูกเติมออกซิเจน 2 อะตอมที่ระหว่างคาร์บอนตำแหน่งที่ 1 และ 2 เกิดผลิตภัณฑ์ไพรีน ซิส-1,2-ไดไฮโดรไดออล (pyrene *cis*-1,2-dihydrodiol) และเกิดการเปลี่ยนรูปร่างหลายขั้นตอนจนได้ผลิตภัณฑ์ 1,2-dimethoxypyrene ซึ่งเป็น dead-end product ในการย่อยสลายไพรีน ดังแสดงในรูปที่ 2.19



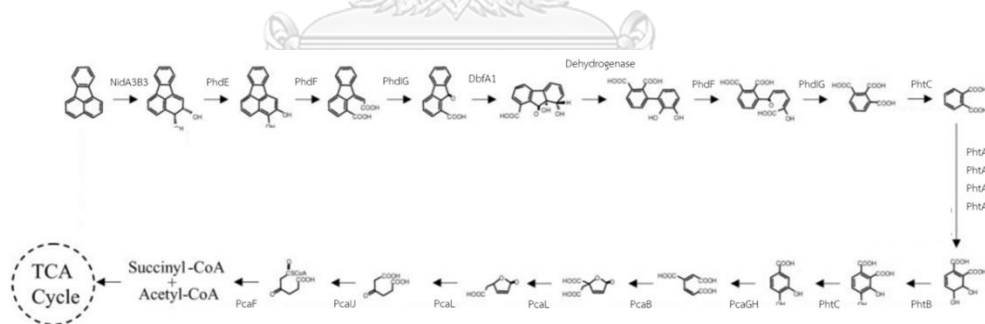
**รูปที่ 2.18** วิธีการย่อยสลายไพรีนและเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายไพรีนของ *M. vanbaalenii* PYR-1 (Kim และคณะ, 2007)

Kweon และคณะ (2007) ใช้วิธีการทางอิมมิกส์ ได้แก่ การวิเคราะห์เมแทบอลิก จีโนม และโปรตีน ในการสร้างวิธีการย่อยสลายฟลูออแรนทีนของสายพันธุ์ PYR-1 พบเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายฟลูออแรนทีน จำนวน 53 เอนไซม์ โดยเอนไซม์ส่วนใหญ่ที่พบมีความเกี่ยวข้องกับการย่อยสลายไพรีน ก็สามารถพบได้ในการย่อยสลายฟลูออแรนทีนเช่นกัน



วิธีการย่อยสลายฟลูออแรนทีนของสายพันธุ์ PYR-1 มีทั้งหมด 18 ขั้นตอน เริ่มต้นจากการเติมออกซิเจน 2 อะตอมที่ระหว่างคาร์บอนตำแหน่งที่ 2 และ 3 ด้วยเอนไซม์ฟลูออแรนทีนริงไฮดรอกซิเลทิงไดออกซิจีเนส (fluoranthene ring-hydroxylating oxygenase; NidA3B3) ได้ผลิตภัณฑ์ฟลูออแรนทีน *ซิส*-2,3-ไดไฮโดรไดออล (fluoranthene *cis*-2,3-dihydrodiol) จากนั้นผ่านการเปลี่ยนรูปหลายขั้นตอนจนได้ผลิตภัณฑ์ 9-ฟลูออรีนโนน-1-คาร์บอกซิลิก แอซิด (9-fluorenine-1-carboxylic acid) ซึ่งจะถูกเติมออกซิเจน 2 อะตอมด้วยเอนไซม์ไดเบนโซฟูแรนไดออกซิจีเนส (dibenzofuran dioxygenase; DbfA1) และเกิดการเปลี่ยนรูปจนได้ผลิตภัณฑ์พทาเลทและโปรโตคาทิกูเอท และเข้าสู่วัฏจักรไทรคาร์บอกซิลิกผ่านวิถี  $\beta$ -ketoadipate ดังแสดงในรูปที่ 2.20 (Kweon และคณะ, 2007)

การย่อยสลายไพรีนและฟลูออแรนทีนในรูปแบบสารเดี่ยวของสายพันธุ์ PYR-1 จะได้สารมัธยันต์หลักที่เหมือนกันคือ พทาเลทและโปรโตคาทิกูเอท (รูปที่ 2.18 และ 2.19) โดยเอนไซม์ที่ใช้ย่อยสลายในวิถีต่างของไพรีนและฟลูออแรนทีน จะเป็นเอนไซม์และขั้นตอนย่อยสลายที่เหมือนกัน (Kim และคณะ, 2007; Kweon และคณะ, 2007) ยีนและเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายไพรีนและฟลูออแรนทีน แสดงในตารางที่ 2.6 นอกจากนี้ยังไม่พบรายงานวิจัยที่ศึกษาการย่อยสลายของไพรีนและฟลูออแรนทีนในรูปแบบสารผสมด้วยสายพันธุ์ PYR-1



รูปที่ 2.19 วิธีการย่อยสลายฟลูออแรนทีนและเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายฟลูออแรนทีนของ *M. vanbaalenii* PYR-1 (Kweon และคณะ, 2007)

**ตารางที่ 2.6** ยีนและเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายไพรีนและฟลูออแรนทีนของ

*M. vanbaalenii* PYR-1

| ยีน          | เอนไซม์   |
|--------------|---|
| <i>nidA</i>  | Pyrene ring-hydroxylating oxygenase, $\alpha$ subunit       |
| <i>nidB</i>  | Pyrene ring-hydroxylating oxygenase, $\beta$ subunit        |
| <i>nidB2</i> | Pyrene hydroxylating dioxygenase $\beta$ subunit            |
| <i>nidA3</i> | Fluoranthene ring-hydroxylating oxygenase, $\alpha$ subunit |
| <i>nidB3</i> | Fluoranthene ring-hydroxylating oxygenase, $\beta$ subunit  |
| <i>dbfA1</i> | Dibenzofuran dioxygenase                                    |
| <i>pdoA2</i> | Phenanthrene ring-hydroxylating oxygenase, $\alpha$ subunit |
| <i>pdoB2</i> | Phenanthrene ring-hydroxylating oxygenase, $\beta$ subunit  |
| <i>phdE</i>  | Dihydrodiol dehydrogenase                                   |
| <i>phdF</i>  | Ring-cleavage dioxygenase                                   |
| <i>phtC</i>  | Decarboxylase   |
| <i>phdG</i>  | Hydratase-aldolase  |
| <i>nidD</i>  | Aldehyde dehydrogenase                                      |
| <i>phdI</i>  | 1-Hydroxy-2-naphthoate dioxygenase                          |
| <i>phdJ</i>  | <i>trans</i> -2'-Carboxybenzalpyruvate hidratase-aldolase   |
| <i>phdK</i>  | 2-Carboxylbenzaldehyde dehydrogenase                        |
| <i>phtAa</i> | Phthalate 3,4-dioxygenase, $\alpha$ subunit                 |
| <i>phtAb</i> | Phthalate 3,4-dioxygenase, $\beta$ subunit                  |
| <i>phtAc</i> | Phtalate dioxygenase ferredoxin subunit                     |
| <i>phtAd</i> | Phtalate dioxygenase reductase subunit                      |
| <i>phtB</i>  | 3,4-Dihydroxy-3,4-dihydrophthalate dehydrogenase            |
| <i>pcaG</i>  | Protocatechuate 3,4-dioxygenase, $\alpha$ subunit           |
| <i>pcaH</i>  | Protocatechuate 3,4-dioxygenase, $\beta$ subunit            |
| <i>pcaB</i>  | $\beta$ -Carboxy-cis,cis-muconate cycloisomerase            |

## ตารางที่ 2.6 ยีนและเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายไพรีนและฟลูออแรนทีนของ

*M. vanbaalenii* PYR-1 (ต่อ)

| ยีน         | เอนไซม์   |
|-------------|---|
| <i>pcaL</i> | $\gamma$ -Carboxymuconolactone decarboxylase/<br>$\beta$ -keto adipate enol-lactone hydrolase |
| <i>pcaI</i> | $\beta$ -Keto adipate succinyl-CoA transferase, $\alpha$ subunit                              |
| <i>pcaJ</i> | $\beta$ -Keto adipate succinyl-CoA transferase, $\beta$ subunit                               |
| <i>pcaF</i> | $\beta$ -Keto adipyl-CoA thiolase   |

### 2.8.2 แบคทีเรีย *Novosphingobium*

*Novosphingobium pentaromativorans* PY1 ที่คัดแยกจากกลุ่มแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายไพรีนได้ และการวิเคราะห์จีโนมทำให้พบยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายพทาเลทซึ่งเป็นสารมัธยันต์หลักที่เกิดขึ้นระหว่างการย่อยสลาย PAHs ได้แก่ ไพรีนและฟลูออแรนทีน (Wanapaisan และคณะ, 2018) จึงมีความน่าสนใจศึกษาความสามารถของสายพันธุ์ PY1 ในการย่อยสลายพทาเลท *Novosphingobium* เป็นแบคทีเรียในกลุ่ม Sphingomonads ถูกจัดอยู่ในกลุ่มแอลฟา-โปรตีโอแบคทีเรีย ( $\alpha$ -proteobacteria) เป็นแบคทีเรียแกรมลบ และมีโคโลนีสีเหลือง มักถูกคัดแยกจากสิ่งแวดล้อมปนเปื้อน อาทิ เช่น น้ำทะเล น้ำจืด น้ำใต้ดิน น้ำเสีย และดินตะกอนแม่น้ำ แบคทีเรียกลุ่มนี้มีไกลโคสฟิงโกลิพิด (glycosphingolipids) ในส่วนเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นนอกแทนที่ลิพอพอลิแซ็กคาไรด์ (lipopolysaccharides) โดยหมู่คาร์โบไฮเดรตของไกลโคสฟิงโกลิพิดที่มีทิศออกนอกเซลล์นั้นมีขนาดสั้นกว่าหมู่คาร์โบไฮเดรตของลิพอพอลิแซ็กคาไรด์ ทำให้ผนังเซลล์มีความไม่ชอบน้ำมากกว่าแบคทีเรียแกรมลบชนิดอื่นๆ อีกทั้งไกลโคสฟิงโกลิพิดมีโครงสร้างคล้ายกับสารลดแรงตึงผิวนอกจากนี้สามารถสร้างสฟิงแกน (sphingans) ซึ่งเป็นเฮทเทอโรพอลิแซ็กคาไรด์ที่มีประจุลบ และปล่อยออกมานอกเซลล์ เกิดการสร้างเป็นฟิล์มชีวภาพ (biofilm) จึงอาจเป็นเหตุผลหลักที่ทำให้แบคทีเรียนี้มีความสามารถย่อยสลายสารพิษได้ (Kaneko และคณะ, 2000; Johnsen และ Karlson, 2004; Stolz, 2009) ในปัจจุบันมีรายงานวิจัยศึกษาเกี่ยวกับประสิทธิภาพย่อยสลายสารพิษของแบคทีเรียกลุ่ม Sphingomonads เช่น น้ำมันดิบ และองค์ประกอบของน้ำมันดิบ PAHs และพทาเลทเอสเทอร์ (phthalate esters; PAEs) เป็นต้น อย่างไรก็ตามยังไม่พบรายงานวิจัยที่ศึกษา

ประสิทธิภาพย่อยสลายพทาเลท โดยรายงานวิจัยส่วนใหญ่ศึกษาประสิทธิภาพย่อยสลาย PAHs และพบพทาเลทเกิดขึ้นระหว่างการย่อยสลาย PAHs

Lyu และคณะ (2014) ได้คัดแยก *Novosphingobium pentaromativorans* US6-1 จากตะกอนโคลน (muddy sediment) อ่าวอูลซาน ประเทศเกาหลีเหนือ และศึกษาวิถีย่อยสลาย PAHs ด้วยการวิเคราะห์โปรตีโอม พบว่าสายพันธุ์ US6-1 เริ่มต้นย่อยสลาย PAHs ด้วยริงไฮดรอกซิเลทิงไดออกซิจีเนส จากนั้นผ่านการเปลี่ยนรูปจนได้ผลิตภัณฑ์ที่จะถูกแตกวงอะโรมาติกแบบออไรด์ เกิดผลิตภัณฑ์ออไรด์-พทาเลท และเข้าสู่วัฏจักร TCA ต่อไป

Chettri และSingh (2019) พบว่า *Novosphingobium panipatense* P5:ABC ที่คัดแยกจากดินตะกอนปนเปื้อนน้ำมันดิบ ประเทศอินเดีย สามารถเจริญได้ในอาหารที่มี PAHs (พีแนทรีน ฟลูออแรนทีน และแอนทราซีน) อัลเคน (เฮกซะเดคเคนและเตตระโคเซน) และน้ำมันดิบเป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงาน และสามารถย่อยสลายน้ำมันดิบ ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) ได้มากกว่า 90 เปอร์เซ็นต์ ในระยะเวลา 10 วัน

### 2.8.3 แบคทีเรีย *Brucella intermedia* (*Ochrobactrum intermedia*)

*Brucella intermedia* PW1 (*Ochrobactrum intermedia* PW1) ถูกคัดแยกจากกลุ่มแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายไพรีนได้ และการวิเคราะห์จีโนมทำให้พบยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายโปรโตคาคิคูเอท ซึ่งเป็นสารมัธยันต์หลักที่เกิดขึ้นระหว่างการย่อยสลาย PAHs ได้แก่ไพรีนและฟลูออแรนทีน (Wanapaisan และคณะ, 2018) จึงมีความน่าสนใจศึกษาความสามารถของสายพันธุ์ PW1 ในการย่อยสลายโปรโตคาคิคูเอท ทั้งนี้รายงานวิจัยส่วนใหญ่ศึกษาประสิทธิภาพย่อยสลาย PAHs และปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอน อย่างไรก็ตามยังไม่พบรายงานวิจัยที่ศึกษาประสิทธิภาพย่อยสลายโปรโตคาคิคูเอท และไม่มีรายงานถึงวิธีการย่อยสลาย PAHs อย่างละเอียดในแบคทีเรียในสกุลนี้

Wu และคณะ (2009) คัดแยก *Ochrobactrum* sp. BAP5 จากดินตะกอนทะเล ประเทศจีน และสามารถย่อยสลายเบนโซ[เอ]ไพรีน ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตรได้ 17 เปอร์เซ็นต์ ในระยะเวลา 30 วัน และย่อยสลายพีแนทรีน ไพรีน และฟลูออแรนทีน ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตรได้ 40, 19 และ 31 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ในระยะเวลา 30 วัน

*Ochrobactrum* sp. C1 ที่คัดแยกจากน้ำมันหล่อลื่นที่ใช้แล้ว มีความสามารถย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นที่ใช้แล้ว ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) ได้ 48.83 เปอร์เซ็นต์ ในระยะเวลา 7 วัน (Bhattacharya และคณะ, 2015)

Oyehan และ Al-Thukair (2017) พบว่า *O. intermedium* BC1 ที่ถูกคัดแยกจากดิน ตะกอนที่ปนเปื้อนน้ำมัน ประเทศซาอุดีอาระเบีย สามารถย่อยสลายพีแนทรีน และไพรีน ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตรได้ 80 และ 60 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ในระยะเวลา 15 วัน

#### 2.8.4 แบคทีเรีย *Bacillus*

แบคทีเรียกลุ่มสำคัญที่มีรายงานความสามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ โดย *Bacillus* sp. ผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดลิโปเปปไทด์ (lipopeptide) โดย *Bacillus subtilis* FW1 ถูกคัดแยกจากกลุ่มแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายไพรีน และพบยื่นประมวลรหัสการสร้างสารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดลิโปเปปไทด์ด้วยการวิเคราะห์จีโนม ซึ่งคาดว่าสารลดแรงตึงผิวชีวภาพนี้อาจช่วยเพิ่มประสิทธิภาพย่อยสลายสารไฮโดรคาร์บอนได้

### 2.9 การศึกษาบทบาทของแบคทีเรียในกระบวนการย่อยสลาย

การศึกษาเชิงลึกถึงการแสดงออกของยีนของแบคทีเรียแต่ละชนิด (ทรานส์คริปโตม) ในระหว่างการย่อยสลายทางชีวภาพในสภาวะแวดล้อมที่กำหนด ช่วยทำให้เข้าใจบทบาทของแบคทีเรียในการบำบัดทางชีวภาพได้ดียิ่งขึ้น โดยทำให้ทราบบทบาทและการตอบสนองของแบคทีเรียจากยีนที่แสดงออกในสภาวะแวดล้อมที่สนใจ ทั้งนี้การเข้าใจกลไกการทำงานในการย่อยสลายองค์ประกอบปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอน สามารถใช้เป็นข้อมูลเบื้องต้นสำหรับต่อยอดในการนำกลุ่มแบคทีเรียไปประยุกต์ใช้ในการบำบัดทางชีวภาพ

ตัวอย่างรายงานวิจัยที่ศึกษาไกล เช่น Auffret และคณะ (2015) ศึกษาบทบาทของแบคทีเรียในกลุ่มแบคทีเรีย Mix 3 ซึ่งเป็นกลุ่มแบคทีเรียดั้งเดิม (enriched consortium) ระหว่างการย่อยสลายไฮโดรคาร์บอนผสม 16 ชนิดในอาหารเหลวด้วยวิธีวิเคราะห์ทรานส์คริปโตม พบว่า *Rhodococcus* เป็นแบคทีเรียที่มีบทบาทหลักในการย่อยสลาย เนื่องจากพบการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายสารผสมไฮโดรคาร์บอนของ *Rhodococcus*

งานวิจัยของ Kim และคณะ (2015) ศึกษาประสิทธิภาพและการตอบสนองของ *M. vanbaalenii* PYR-1 ต่อการย่อยสลายองค์ประกอบของน้ำมันดิบได้แก่ อัลเคนและ PAHs พบว่าสายพันธุ์ PYR-1 สามารถย่อยสลายอัลเคนสายกลาง (จำนวนคาร์บอน 12 และ 13 อะตอม) ได้ดี และย่อยสลายพีแนทรีนและไพรีนได้อย่างสมบูรณ์ แต่ย่อยสลายฟลูออแรนทีนได้เพียงเล็กน้อย จากการวิเคราะห์โปรตีโอมพบว่า ไม่เกิดการแสดงออกของยีน *nidA3B3* ซึ่งเป็นยีนหลักที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายฟลูออแรนทีน

Hong และคณะ (2016) ศึกษาการแสดงออกของยีนและกลไกการปรับตัวของ *Achromobacter* sp. HZ01 ในสภาวะที่มีน้ำมันปิโตรเลียม ด้วยวิธีวิเคราะห์ทรานส์คริปโตม พบ

การแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายอัลเคน ได้แก่ ยีน *alkB* และยีน CYP153 คาดว่า น่าจะเกิดวิถีการย่อยสลายที่ตำแหน่งปลาย (terminal oxidation pathway) และยีนประมวลรหัส ABC transporters และ stress response proteins ที่อาจมีบทบาททำให้สายพันธุ์ HZ01 อยู่รอด ในสภาวะที่มีน้ำมันปิโตรเลียม

Yuan และคณะ (2018) ศึกษาการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลาย ฟีนแอนทรินและไพรีนในรูปแบบสารเดี่ยวและสารคู่ผสมของ *Mycobacterium* sp. A1-PYR การวิเคราะห์ทรานส์คริปโตมิกส์พบว่า ระดับการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลาย ฟีนแอนทรินและไพรีนในรูปแบบสารคู่ผสม จำนวน 23 ยีน มีระดับการแสดงออกที่สูงกว่าในไพรีนในรูปแบบสารเดี่ยว ยีนที่ประมวลรหัสเอนไซม์ NidAB และ PdoA2B2 เป็นยีนที่มีบทบาทในการเริ่มต้น การย่อยสลายฟีนแอนทรินและไพรีนในรูปแบบสารคู่ผสม และการทำงานของยีนที่ประมวลรหัส เอนไซม์ NidAB และ PdoA2B2 จำเป็นต้องอาศัยการทำงานร่วมกับ [4Fe-4S] เพอร์ริดอกซิน นอกจากนี้ยีนประมวลรหัส ABC transporters มีบทบาทสำคัญในการขนส่งฟีนแอนทรินและไพรีนเข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย

ทั้งนี้มียางานวิจัยศึกษาบทบาทและการตอบสนองของแบคทีเรียเดี่ยวในสภาวะแวดล้อมที่ สนใจ อาทิเช่น ในสภาวะที่มี PAHs น้ำมันปิโตรเลียม และการเติมสารลดแรงตึงผิว เป็นต้น (Hong และคณะ, 2016; Liu และคณะ, 2017; Yuan และคณะ, 2018; Li และคณะ, 2020) แต่รายงานวิจัย ที่เกี่ยวข้องกับกลุ่มแบคทีเรียในการตอบสนองต่อสภาวะแวดล้อมยังคงมีจำกัด ดังนั้นในงานวิจัยนี้ สนใจศึกษาบทบาทและการตอบสนองของกลุ่มแบคทีเรียในสภาวะที่มี PAHs มวลโมเลกุลสูง (ไพรีน และฟลูออแรนทีน) ในรูปแบบสารเดี่ยวและสารคู่ผสม

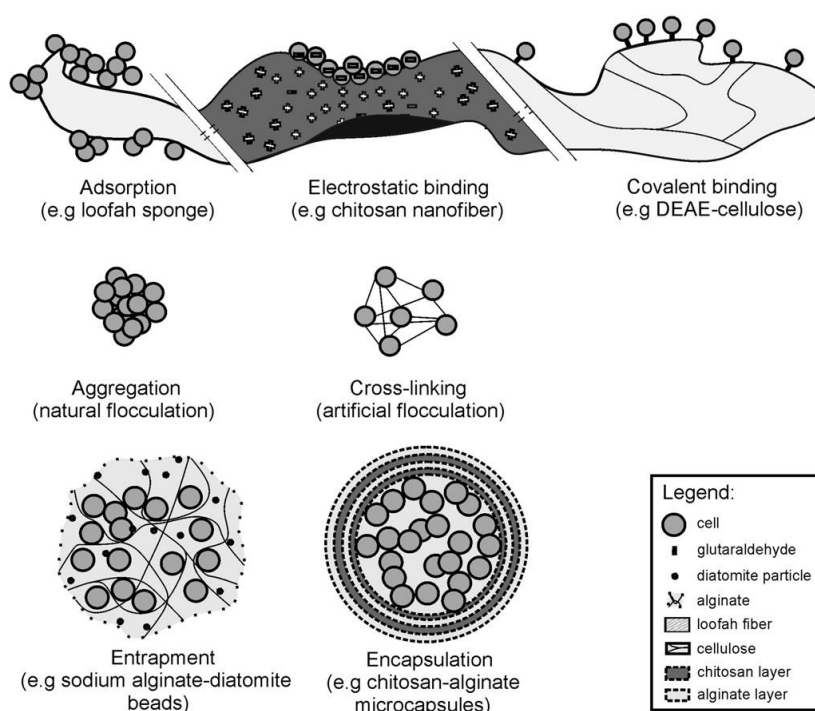
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
CHULALONGKORN UNIVERSITY

## 2.10 การตรึงแบคทีเรีย

การประยุกต์ใช้แบคทีเรียในการบำบัดสิ่งแวดล้อมปนเปื้อนให้มีประสิทธิภาพและประสบ ผลสำเร็จขึ้นอยู่กับอัตราการรอดชีวิตของแบคทีเรียที่เติมลงไป และสามารถคงอยู่ได้ในระบบบำบัด หรือพื้นที่ที่ต้องการบำบัดได้นาน ซึ่งสามารถทำได้โดยการตรึงแบคทีเรีย (immobilization) ให้อยู่กับ ที่โดยอาศัยการยึดเกาะบนวัสดุตรึง ซึ่งแบคทีเรียยังคงมีประสิทธิภาพในการกำจัดสารพิษ การตรึง เซลล์มีข้อดีหลายประการ เช่น ทำให้ชีวมวลสูงขึ้น ประหยัดค่าใช้จ่าย เพราะสามารถนำกลับมาใช้ซ้ำ ได้และไม่ต้องเตรียมหัวเชื้อใหม่ทุกครั้ง และเพิ่มอัตราการรอดของแบคทีเรียจากความเครียดจาก ปัจจัยทางกายภาพต่างๆ ในสิ่งแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมกับการเจริญ เช่น สารเคมี ความเป็นกรด-ด่าง อุณหภูมิ และโลหะหนัก เป็นต้น (Bayat และคณะ, 2015; Dzionek และคณะ, 2016; Partovinia และ Resekh, 2018) ตัวอย่างเซลล์ตรึงที่ใช้ในการกำจัดสารพิษ ดังแสดงในตารางที่ 2.7

### 2.10.1 วิธีการตรึงแบคทีเรีย

การตรึงเซลล์สามารถทำได้หลายรูปแบบ ขึ้นอยู่กับชนิดของแบคทีเรีย ชนิดของวัสดุตรึง และลักษณะการนำไปประยุกต์ใช้ รูปแบบการตรึงเซลล์หลากหลายรูปแบบ เช่น รูปแบบการดูดซับบนพื้นผิววัสดุ การตรึงโดยใช้พันธะโควาเลนต์ การตรึงแบบกักขัง และการตรึงแบบแคปซูล ดังแสดงในรูปที่ 2.20



รูปที่ 2.20 รูปแบบการตรึงเซลล์ (Dzionic และคณะ, 2016)

การดูดซับบนพื้นผิววัสดุ (adsorption) เป็นการยึดเกาะของเซลล์กับพื้นผิวของวัสดุตรึงด้วยแรงแวนเดอร์วาลส์ พันธะไอออนิก พันธะไฮโดรเจน หรือพันธะไฮโดรโฟบิก การตรึงแบบนี้นิยมในกระบวนการบำบัดสิ่งแวดล้อมปนเปื้อน เนื่องจากเป็นวิธีการตรึงเซลล์ที่ง่ายที่สุด รวดเร็ว เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม ราคาถูก และเซลล์ถูกทำลายน้อย (Bayat และคณะ, 2015; Dzionic และคณะ, 2016)

การตรึงโดยใช้พันธะโควาเลนต์ (covalent binding) เป็นวิธีการที่เซลล์เกาะติดกับวัสดุตรึงด้วยพันธะโควาเลนต์ระหว่างหมู่ฟังก์ชันของเซลล์กับหมู่ไฮดรอกซิลของวัสดุตรึง วิธีนี้เป็นที่ยึดเกาะระหว่างเซลล์กับวัสดุโดยตรง ทำให้เซลล์สามารถเกิดปฏิกิริยากับสับสเตรทได้ง่าย และมีความคงตัวสูง การตรึงแบบนี้มักนิยมใช้กับการตรึงเอนไซม์ (Bayat และคณะ, 2015; Dzionic และคณะ, 2016)

การตรึงแบบกักขัง (entrapment) เป็นการที่เซลล์ถูกจำกัดให้อยู่ในโครงสร้างที่มีลักษณะเป็นโครงตาข่าย โดยเซลล์สามารถเคลื่อนที่ได้อย่างอิสระภายในช่องว่างของวัสดุตรึง น้ำและสัปเสตรทสามารถผ่านเข้าออกได้อย่างอิสระ ซึ่งปัจจัยที่สำคัญสำหรับวิธีการตรึงแบบกักขังคือ อัตราส่วนระหว่างขนาดของรูวัสดุตรึงและขนาดของเซลล์แบคทีเรียต้องเหมาะสมกัน เพื่อป้องกันเซลล์หลุดออกจากวัสดุตรึง วัสดุตรึงที่นิยมใช้ในการตรึงคือ ไคโตซาน เซลลูโลส อัลจิเนต คอลลาเจน คาราจีแนน เจลาติน พอลิเอสเทอร์ พอลิไสตีน และพอลิยูรีเทน (Bayat และคณะ, 2015; Partovinia และResekh, 2018)

การตรึงแบบแคปซูล (encapsulation) เป็นการตรึงเซลล์ด้วยการห่อหุ้มเซลล์ภายในเยื่อกึ่งผ่าน (semi-permeable membrane) เซลล์จะเคลื่อนที่ได้อย่างอิสระในพื้นที่จำกัด ซึ่งสัปเสตรทขนาดใหญ่จะไม่สามารถผ่านได้ ยกเว้นแต่สัปเสตรทขนาดเล็กที่สามารถผ่านเยื่อเลือกผ่านได้ (Dzionic และคณะ, 2016)





ตารางที่ 2.7 แบคทีเรียที่เรียงกันจัดตามชนิดของโปรตีน

| แบคทีเรีย   | วัสดุตั้ง                 | สารตั้งต้น          | ความเข้มข้น                              | เปอร์เซ็นต์การกำจัด | ระยะเวลา (วัน) | อ้างอิง                              |
|---|---------------------------|---------------------|--|---------------------|----------------|--------------------------------------|
| <i>Bacillus licheniformis</i>                         | แคลเซียม<br>อัลจิเนต      | น้ำมันดิบ           | 2,500<br>มิลลิกรัมต่อลิตร                | 75.54               | 14             | Khanpour-Alikelayeh<br>และคณะ (2021) |
| <i>Klebsiella variicola</i><br>SKV <sub>2</sub>       | โพลียูรีเทน<br>พอลิเมออร์ | น้ำมันดิบ           | 1 เปอร์เซ็นต์<br>(ปริมาตรต่อ<br>ปริมาตร) | 44.31               | 21             | Kazemzadeh และคณะ<br>(2020)          |
| <i>Rhodococcus</i><br><i>rhodochrous</i><br>ATCC21198 | โพลีโพลี<br>ยูรีเทน       | เตตระไฮโดร<br>คาเบน | 5<br>กรัมต่อลิตร                         | 91.67               | 7              | Matsui และ Nishino<br>(2017)         |
| <i>Pseudomonas</i><br><i>aeruginosa</i> NY3           | โพลีโพลี<br>ยูรีเทน       | น้ำมันดิบ           | 2<br>กรัมต่อลิตร                         | 90.00               | 40             | Nie และคณะ (2016)                    |

ตารางที่ 2.7 แบคทีเรียที่เรียงลำดับตามชนิดของโปรตีน (ต่อ)

| แบคทีเรีย   | วัสดุตั้งต้น  | ความเข้มข้น | เปอร์เซ็นต์การกำจัด                  | ระยะเวลา (วัน)  | อ้างอิง              |
|---|---|-------------|--------------------------------------|-----------------|----------------------|
| กลุ่มแบคทีเรีย  |   |             |                                      |                 |                      |
| <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> ,<br><i>A. baumannii</i> ,<br><i>A. venetianus</i> และ<br><i>Rhodococcus ruber</i> S103,<br><i>Mycobacterium parafortuitum</i> J101 และ <i>M. austroafricanum</i> Y502 | โซเดียม<br>อัลจิเนต<br>พอลิไวนิล<br>แอลกอฮอล์ และ<br>เส้นใยปาน<br>ไบโอบอล | น้ำมันดิบ   | 1 เปอร์เซ็นต์<br>(น้ำหนักต่อปริมาตร) | 75.52<br><br>15 | Zhang และคณะ (2020)  |
|   |   | น้ำมันเตา   | 3,000 มิลลิกรัม<br>ต่อลิตร           | 50<br>1         | Naloka และคณะ (2021) |

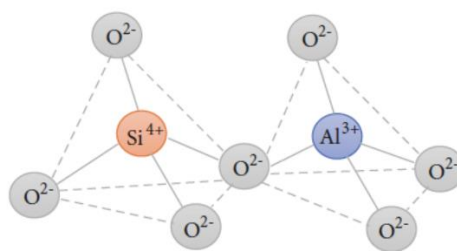
### 2.10.2 ชนิดของวัสดุตรึง

ชนิดของวัสดุตรึง เป็นปัจจัยหลักที่มีความสำคัญต่อกระบวนการตรึงแบคทีเรีย โดยการเลือกใช้วัสดุตรึงจำเป็นต้องพิจารณาถึงความเป็นไปได้ในการเจริญของแบคทีเรียในวัสดุตรึงไม่เป็นพิษต่อแบคทีเรีย มีรูพรุน มีพื้นที่ผิวมาก และต้นทุนต่ำ วัสดุตรึงแบ่งออกเป็น 2 ประเภทคือ สารอินทรีย์ และสารอนินทรีย์ วัสดุตรึงที่เป็นสารอินทรีย์ ได้แก่ ไคโตซาน ไคติน เซลลูโลส อัลจิเนต คาราจีแนน เจลาติน เดกซ์แทรน อะคริลาไมด์ พอลิยูรีเทน พอลิไวนิล และเรซิน เป็นต้น ส่วนวัสดุตรึงที่เป็นสารอนินทรีย์ ได้แก่ ซีโอไลต์ ดินเหนียว ซิลิกา เซรามิก แก้ว และอะลูมินา เป็นต้น (Bayat และคณะ, 2015; Dzionek และคณะ, 2016)

ในงานวิจัยนี้สนใจซีโอไลต์ (zeolite) เป็นวัสดุตรึง (รูปที่ 2.21) โดยซีโอไลต์มีโครงสร้างผลึกที่เกิดจากซิลิเกต ( $[\text{SiO}_4]^{4-}$ ) และอลูมิเนต ( $[\text{AlO}_4]^{4-}$ ) มาเชื่อมต่อกันโดยผ่านมุมของออกซิเจนทั้ง 4 อะตอม ทำให้ภายในโครงสร้างของซีโอไลต์เกิดมีรูพรุนและโพรง (Moghaddam และคณะ, 2018) ดังแสดงในรูปที่ 2.22 ซึ่งการมีรูพรุนและพื้นที่ผิวมาก คาดว่าทำให้เหมาะสมต่อการยึดเกาะของแบคทีเรีย ซีโอไลต์มักนิยมใช้ในระบบบำบัดน้ำเสีย การผลิตเอทานอล การผลิตไบโอแก๊ส และการผลิตกรดแลคติกและกรดซัคซินิก (Misaelides, 2011; Moghaddam และคณะ, 2018)



รูปที่ 2.21 ซีโอไลต์ (บริษัท เอส.พี. มาร์เก็ตติ้ง, ประเทศไทย)

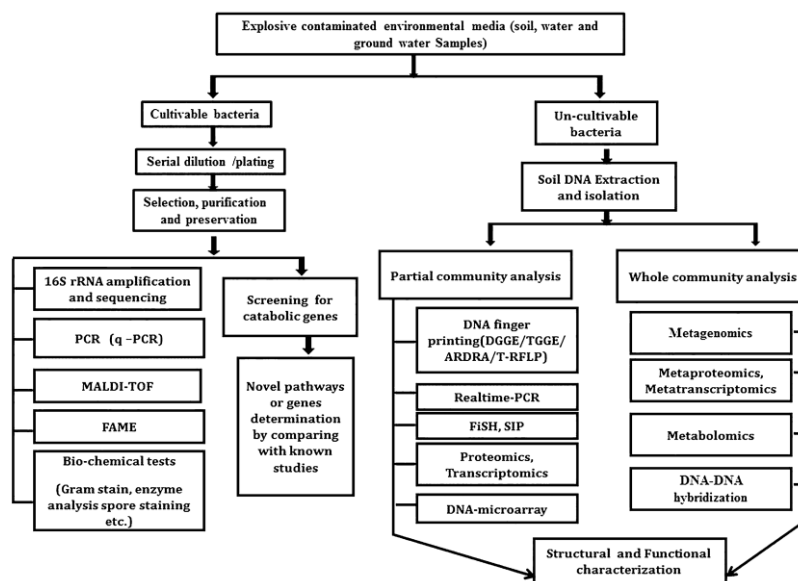


รูปที่ 2.22 โครงสร้างซีโอไลต์ (Moghaddam และคณะ, 2018)

อย่างไรก็ตามยังพบว่ารายงานวิจัยที่ตรึงแบคทีเรียบนซีโอไลท์ และนำมาบำบัดสิ่งแวดล้อมปนเปื้อนน้ำมันยังมีจำนวนน้อย ตัวอย่างรายงานวิจัยของ Dai และคณะ (2020) ศึกษาการย่อยสลายน้ำมันดิบแบบหนัก ความเข้มข้น 9,000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมดินในระดับกึ่งอุตสาหกรรม (pilot scale) ด้วยกลุ่มแบคทีเรียตรึงบนซีโอไลท์ที่ประกอบด้วย *Brevibacillus* sp. DL-1, *Bacillus* sp. DL-13 และ *Acinetobacter* sp. DL-34 และเอนไซม์แลคเคส (laccase) ที่ตรึงบนซีโอไลท์ พบว่าสามารถกำจัดอัลเคนที่มีจำนวนคาร์บอน 15 ถึง 35 อะตอมได้ 79.20 เปอร์เซ็นต์ ในระยะเวลา 100 วัน ดังนั้นจึงมีความน่าสนใจที่จะนำซีโอไลท์มาใช้เป็นวัสดุตรึง เพื่อนำมาบำบัดสิ่งแวดล้อมปนเปื้อนน้ำมันต่อไป

## 2.11 การตรวจติดตามการบำบัดทางชีวภาพโดยใช้เทคนิคชีววิทยาโมเลกุล

ในกระบวนการบำบัดโดยชีววิธีนั้น สิ่งสำคัญอย่างหนึ่งคือการตรวจติดตามโครงสร้างประชากรแบคทีเรีย ปัจจุบันมีการประยุกต์ใช้เทคนิคชีววิทยาโมเลกุลในการตรวจติดตามการบำบัดสิ่งแวดล้อมที่มีความซับซ้อน (รูปที่ 2.23) ซึ่งเป็นวิธีที่ใช้เวลาในการดำเนินงานต่ำ มีความถูกต้องและความแม่นยำสูง (Maphosa และคณะ, 2012) ทำให้เข้าใจบทบาทการทำงานร่วมกันของแบคทีเรียในระหว่างกระบวนการการย่อยสลายสารพิษ รวมถึงการตอบสนองต่อการเปลี่ยนแปลงสภาวะแวดล้อมของแบคทีเรีย โดยความเข้าใจดังกล่าวสามารถช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการบำบัดได้ยิ่งขึ้น



รูปที่ 2.23 เทคนิคชีววิทยาโมเลกุลที่ใช้ในการตรวจติดตามการบำบัดสิ่งแวดล้อม (Celin และคณะ, 2020)

วิธี 16S amplicon sequencing analysis เป็นวิธีที่ใช้ตรวจติดตามการเปลี่ยนแปลงประชาคมแบคทีเรียระหว่างการบำบัดได้ โดยสามารถติดตามการเปลี่ยนแปลงของแบคทีเรียที่เติมลงไป และแบคทีเรียประจำถิ่นที่ตอบสนองต่อสารพิษ โดยอาศัยหลักการสกัดดีเอ็นเอ (DNA) จากตัวอย่างที่ต้องการศึกษา จากนั้นนำมาเพิ่มจำนวนบริเวณยีน 16S rDNA ด้วยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์เรส และวิเคราะห์ลำดับเบส เพื่อใช้ในการจัดจำแนกชนิดของแบคทีเรียที่มีอยู่ในตัวอย่าง (Techtmann และ Hazen, 2016) ตัวอย่างรายงานวิจัยของ Wu และคณะ (2017b) ใช้วิธี 16S amplicon sequencing analysis ในการศึกษาประชาคมแบคทีเรียและตรวจติดตามกลุ่มแบคทีเรีย (ประกอบด้วย *Pseudomonas stutzeri* GQ-4, *Pseudomonas* sp. SZ-2, *Bacillus* sp. SQ-2, และ *Acinetobacter* sp. SZ-1) ที่เติมลงไปในดินปนเปื้อนน้ำมันดิบ เป็นระยะเวลา 112 วัน พบว่าสามารถตรวจพบกลุ่มแบคทีเรียที่เติมลงไปได้ เมื่อวิเคราะห์ข้อมูลในระดับไฟลัม พบว่า Actinobacteria เป็นประชากรหลัก (63 เปอร์เซ็นต์) และ proteobacteria เป็นประชากรรองลงมา (30 เปอร์เซ็นต์) และเมื่อวิเคราะห์ข้อมูลในระดับจีโนส พบว่ามีประมาณ 20 จีโนสเป็นประชากรเด่น อาทิ เช่น *Promicromonospora*, *Pseudomonas*, *Microcella*, *Mycobacterium*, *Alkanibacter* และ *Altererythrobacter* ดังนั้นวิธี 16S amplicon sequencing analysis จึงถือเป็นวิธีหนึ่งซึ่งช่วยให้ข้อมูลในเชิงปริมาณของประชาคมแบคทีเรียได้ด้วยการใช้ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์

### บทที่ 3

#### วิธีการดำเนินงานวิจัย

##### อุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย

1. กระจกฉีดยาพลาสติก (syringe) ขนาด 1 และ 5 มิลลิลิตร บริษัท นิโปร จำกัด, Thailand
2. กระดาษไนลอนเมมเบรน Biodyne<sup>®</sup> B ขนาดรูกรอง 0.45 ไมโครเมตร  
บริษัท Pall Corporation, USA
3. ขวดแก้วฝาเกลียว สำหรับระบบนิเวศจำลองดิน ระดับห้องปฏิบัติการ
4. ขวดรูปชมพู่ (erlenmeyer flask) ขนาด 125, 250 และ 500 มิลลิลิตร บริษัท Pyrex, USA
5. เครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี (Gas chromatography, GC) ประกอบด้วย
  - เครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี รุ่น 6890 บริษัท Agilent Technologies, USA
  - คอลัมน์ (column) ชนิด HP-5 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 320 ไมโครเมตร ความยาว 30 เมตร ภายในเคลือบด้วยเฟนิล เมทิล ซิโลเซน ความเข้มข้น 5% หนา 0.25 ไมครอน บริษัท Agilent Technologies, USA
  - เครื่องตรวจวัด (detector) ชนิด Flame Ionization Detector (FID)  
บริษัท Agilent Technologies, USA
6. เครื่องเขย่าชนิดควบคุมอุณหภูมิ (incubator shaker) รุ่น G-27  
บริษัท New Brunswick Scientific, USA
7. เครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (high performance liquid chromatography; HPLC) ประกอบด้วย
  - เครื่องโครมาโทกราฟีของเหลว (liquid chromatography) รุ่น LC-A3  
บริษัท Shimadzu, Japan
  - เครื่องตรวจสอบ (UV-visible detector) รุ่น SPD-2A บริษัท Shimadzu, Japan
  - เครื่องบันทึกและประมวลผล (chromatopac) รุ่น C-R1A บริษัท Shimadzu, Japan
  - คอลัมน์ (column) ชนิด Senshu Pak Pegasil ODS บริษัท Senshu Scientific, Japan
  - กระจกฉีดยาขนาดเล็ก (microsyringe) รุ่น MS-R50 บริษัท Exmire, USA
8. เครื่องเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส (mini agarose gel electrophoresis system) รุ่น i-mupid  
บริษัท Cosmo Bio, Japan
9. เครื่องชั่งรุ่น P2002-S และ AG285 บริษัท Mettler Toledo, Switzerland

10. เครื่องถ่ายภาพและวิเคราะห์ภาพเจล (Gel documentation system) รุ่น Gel Doc 2909™  
บริษัท Bio-Rad, USA
11. เครื่องปั่นผสม (vortex) รุ่น Gene2 บริษัท Scientific Industries, USA
12. เครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดควบคุมอุณหภูมิ (centrifuge) รุ่น 1920 บริษัท Kubota, Japan
13. เครื่องปั่นเหวี่ยงแบบตั้งโต๊ะชนิดไม่ควบคุมอุณหภูมิ (bench-top microcentrifuge)  
รุ่น Mikro20 บริษัท Hettich zentrifugen, Germany
14. เครื่องปั่นเหวี่ยงแบบตั้งโต๊ะชนิดควบคุมอุณหภูมิ (centrifuge) รุ่น 1920  
บริษัท Kubota, Japan
15. เครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (DNA-Thermal Cycle) รุ่น G-STORM  
บริษัท Thermo Scientific, USA
16. เครื่องไมโครเพลทรีดเดอร์ (microplate reader) บริษัท Bio-Tek Instruments, USA
17. เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) รุ่น UV-160A บริษัท Shimadzu, Japan
18. เครื่องวัดความเข้มข้น DNA (UV-vis spectrophotometer) รุ่น Nanodrop 2000  
บริษัท Thermo Scientific, USA
19. เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH meter) รุ่น 240 บริษัท Corning, USA
20. ชุดกรองสำเร็จรูปชนิดเซลลูโลสอะซิเตท (cellulose acetate; CA) ขนาดรูกรอง 0.2  
ไมโครเมตร บริษัท Chrom Tech, USA
21. ชุดกรองสำเร็จรูปชนิดพอลิเตตระฟลูออโรเอทิลีน (polytetrafluoroethylene; PTFE)  
ขนาดรูกรอง 0.2 ไมโครเมตร บริษัท Chrom Tech, USA
22. ชุด PowerSoil® DNA Isolation Kit บริษัท Qiagen, Germany
23. ชุด RNeasy Mini Kit บริษัท Qiagen, Germany
24. ซีไอไลท์ บริษัท เอส.บี.มาร์เก็ตติ้ง, Thailand
25. ตู้เขี่ยเชื้อ (ISSO laminar flow) รุ่น HT-122.5 บริษัท International Scientific Supply,  
USA
26. ตู้บ่มเชื้ออุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส รุ่น BE800 บริษัท Memmert, Germany
27. ตู้บ่มเชื้ออุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส บริษัท New Brunswick Scientific, USA
28. ตู้อบฆ่าเชื้อ (hot air oven) รุ่น D06063 บริษัท Memmert, Germany
29. ตู้อบแห้ง (oven) บริษัท Contherm Scientific, New Zealand
30. เม็ดปิดแก้ว ขนาด 425-600 ไมโครเมตร บริษัท Sigma, USA
31. ไมโครปิเปตต์ (micropipette) และ ไมโครปิเปตต์ทิว (micropipette tip) ขนาด 2, 10,  
20, 200, 1,000, 5,000 และ 10,000 ไมโครลิตร บริษัท Gilson, France

32. ไมโครเพลท ชนิด 96 หลุม (96-well microplate) บริษัท Corning, USA
33. หม้อนึ่งฆ่าเชื้อความดันไอ (autoclave) บริษัท Kakusan, Japan
34. เครื่อง Mini-BeadBeater บริษัท Biospec products, USA
35. หลอดเซนตริฟิวจ์ (centrifuge tube) ขนาด 50 และ 250 มิลลิลิตร
36. หลอดทดลอง (test tube) ขนาด 20 มิลลิลิตร บริษัท Pyrex, USA
37. หลอดปฏิกิริยาหลอดโพลีเมอเรส (PCR tube) ขนาด 0.2 มิลลิลิตร
38. หลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ (microcentrifuge tube) ขนาด 1.5 และ 2 มิลลิลิตร
39. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath) รุ่น digital water bath SB-1000 บริษัท Eyela, Japan

**เคมีภัณฑ์ที่ใช้ในงานวิจัย** สารเคมีทั้งหมดเป็นสารเคมีเกรดงานวิเคราะห์ (analytic reagent)

1. กรดไฮโดรคลอริก (HCl) บริษัท BDH Chemicals, Australia
2. กลีเซอรอล ( $C_3H_8O_3$ ) บริษัท Research organics, USA
3. กลูโคส ( $C_6H_{12}O_6$ ) บริษัท Merck, Germany
4. แคลเซียมคลอไรด์ ( $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ ) บริษัท Merck, Germany
5. เซทิลไตรเมทิลแอมโมเนียมโบรไมด์ (CTAB) บริษัท Bio Basic, Canada
6. โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) บริษัท Merck, Germany
7. โซเดียมซัลเฟต ( $Na_2SO_4$ ) บริษัท Merck, Germany
8. โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต (SDS) บริษัท NacalaiTesque, Japan
9. โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) บริษัท Merck, Germany
10. น้ำมันดิบ (Arab Extra Light และ Arab light crude oil) บริษัท ไทยออยล์ จำกัด (มหาชน), Thailand
11. ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ( $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ ) บริษัท Merck, Germany
12. ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ( $K_2HPO_4$ ) บริษัท Merck, Germany
13. ไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (dimethyl sulfoxide) บริษัท Merck, Germany
14. ไดเมทิลฟอร์มมาไมด์ (dimethylformamide) บริษัท BioBasic, Japan
15. ไดเอทิลไพโรคาร์บอเนต (diethylpyrocarbonate; DEPC) บริษัท Bio-Rad, USA
16. เตตระเดเคน (tetradecane) บริษัท Sigma, USA
17. ทริปโตเนน (tryptone) บริษัท Difco, USA
18. ผงสกัดจากยีสต์ (yeast extract) บริษัท Difco, USA
19. โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต ( $KH_2PO_4$ ) บริษัท Merck, Germany



20. ไพรีน (pyrene) บริษัท Sigma, USA
21. ฟีนแอนทรีน (phenanthrene) บริษัท Sigma, USA
22. ฟีนอล (phenol) บริษัท Merck, Germany
23. ฟลูออรีน (fluorene) บริษัท Kanto Chemical, Japan
24. ฟลูออแรนทีน (fluoranthene) บริษัท Kanto Chemical, Japan
25. เฟอริกคลอไรด์ ( $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ) บริษัท Merck, Germany
26. เมทานอล (methanol) บริษัท Merck, Germany
27. รูบิเดียมคลอไรด์ ( $\text{RbCl}$ ) บริษัท Sigma, USA
28. สารละลายดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA ladder บริษัท Geneaid, Taiwan
29. สารละลายดีเอ็นเอมาตรฐาน  $\text{Lamda HindIII}$  บริษัท New England Biolabs, UK
30. อะกาโรส (agarose) บริษัท Research organics, USA
31. เอทานอล (ethanol) 99 เปอร์เซ็นต์ บริษัท Merck, Germany
32. เอทิลอะซิเตท (ethylacetate) บริษัท Merck, Germany
33. เอธิเดียมโบรไมด์ (ethidium bromide) บริษัท Promega, USA
34. เอนไซม์โปรตีนเนสเค (proteinase K) บริษัท United States Biological, USA
35. เอนไซม์ไลโซไซม์ (lysozyme) บริษัท Bio Basic, Canada
36. เอนไซม์อาร์เอ็นเอสเอ (RNase A) บริษัท Promega, USA
37. เอนไซม์ *EcoRI* และบัฟเฟอร์ H บริษัท Promega, USA
38. แอนทราซีน (anthracene) บริษัท Kanto Chemical, Japan
39. แอมพิซิลลิน (ampicillin) บริษัท Nacalai Tesque, Japan
40. แอมโมเนียมไนเตรต ( $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ) บริษัท Merck, Germany
41. ไอโซโพรพานอล (isopropanol) บริษัท Merck, Germany
42. ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ (isoamyl alcohol) บริษัท Merck, Germany
43. ไอโอดีนไนโตรเตตระโซเลียมคลอไรด์ (INT) บริษัท Sigma, USA
44. เฮกซะเดกเคน (hexadecane) บริษัท Sigma, USA
45. เฮกเซน (hexane) บริษัท RCI Labscan, Thailand
46. Gel/PCR DNA Fragments Extraction Kit บริษัท Geneaid, Taiwan
47. GoTaq<sup>®</sup> qPCR Master Mix บริษัท Promega, USA
48. High-Speed Plasmid Mini Kit บริษัท Geneaid, Taiwan
49. IPTG (Isopropyl thio-  $\beta$ -D-galactoside) บริษัท BIO BASIC INC, Canada
50. pGEM<sup>®</sup>-T Easy Vector System บริษัท Promega, USA

51. Random Primers บริษัท Invitrogen, Japan
52. RNAprotect™ Bacteria Reagent® บริษัท Qiagen, Germany
53. RNase Away™ Decontamination Reagent บริษัท Thermo Fisher Scientific, USA
54. RNaseOUT™ Ribonuclease Inhibitor บริษัท Invitrogen, Japan
55. RQ1 RNase-Free DNase บริษัท Promega, USA
56. SuperScript™ III Reverse Transcriptase บริษัท Invitrogen, Japan
57. X-gal (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β-D-galactoside) บริษัท BIO BASIC INC, Canada

ตารางที่ 3.1 ไพรเมอร์ที่ใช้ในงานวิจัย

| ไพรเมอร์  | ลำดับนิวคลีโอไทด์ (5'-3') | ขนาดผลิตภัณฑ์ PCR<br>(คู่เบส) | อ้างอิง    |
|---|---------------------------|-------------------------------|------------|
| ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rDNA |                           |                               |            |
| 27F   | AGAGTTTGATCCTGGCTCAG      | 1,465                         | Lane, 1991 |
| 1492R   | TACGGYTACCTTGTACGACTT     |                               |            |

ตารางที่ 3.2 แบคทีเรียที่ใช้ในงานวิจัยนี้ (Wanapaisan และคณะ, 2018)

| แบคทีเรีย                                    | แหล่งที่มา                   | Accession<br>number | MSCU<br>number |
|--|------------------------------|---------------------|----------------|
| <i>Mycolicibacterium</i> sp. PO1             | กลุ่มแบคทีเรีย PCY           | KY511049.1          | MSCU 0808      |
| <i>Mycolicibacterium</i> sp. PO2             | ที่คัดแยกจาก                 | KY511050.1          | MSCU 0809      |
| <i>Brucella intermedia</i> PW1               | ดินตะกอน                     | KY511051.1          | MSCU 0810      |
| ( <i>Ochrobactrum intermedia</i> PW1)        | ป่าชายเลน<br>จังหวัดเพชรบุรี |                     |                |
| <i>Novosphingobium pentaromativorans</i> PY1 | ประเทศไทย                    | KY511052.1          | MSCU 0811      |
| <i>Bacillus subtilis</i> FW1                 |                              | KY511053.1          | MSCU 1084      |

## วิธีการดำเนินงานวิจัย

### 3.1 การจัดกลุ่มใหม่ของ *Mycobacterium*

นำลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีน 16S rRNA ของสายพันธุ์ PO1 (KY511049) และ PO2 (KY511050) เปรียบเทียบกับยีน 16S rRNA ของแบคทีเรียในจีนัส *Mycobacterium*, *Mycolicibacillus*, *Mycobacteroides*, *Mycolicibacter* และ *Mycolicibacterium* จากฐานข้อมูล EzBioCloud (<https://www.ezbiocloud.net/>) โดยสร้างแผนภูมิต้นไม้แสดงความสัมพันธ์ของแบคทีเรียจากข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ แบบวิธี neighbor-joining และใช้ค่า bootstrap เท่ากับ 1,000 ด้วยโปรแกรม Molecular Evolutionary Genetics Analysis; MEGA (เวอร์ชัน 6, <http://www.megasoftware.net/docs>) (Tamura และคณะ, 2013)

### 3.2 สร้างกลุ่มแบคทีเรียย่อยสลายไขมัน

#### 3.2.1 เตรียมหัวเชื้อแบคทีเรีย

เชื้อโคโลนีเดี่ยวของแบคทีเรีย 1 ปลูกลงในอาหารเหลว 0.25X Luria-Bertani (LB) (ภาคผนวก ก) ปริมาตร 150 มิลลิลิตรในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร จากนั้นเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาทีที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วันสำหรับ *Mycolicibacterium* spp. PO1 (KY511049.1) และ PO2 (KY511050.1) และเป็นเวลา 2 วันสำหรับ *Novosphingobium pentaromativorans* PY1 (KY511051.1), *Brucella intermedia* PW1 (KY511052.1) และ *Bacillus subtilis* FW1 (KY511053.1) แล้วนำไปปั่นแยกเซลล์ด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงควบคุมอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ล้างเซลล์ในสารละลาย 0.85 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) โซเดียมคลอไรด์ (ภาคผนวก ข) ทำซ้ำขั้นตอนดังกล่าว 2 รอบ นำเซลล์ที่ได้แขวนลอยใน 0.85 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) โซเดียมคลอไรด์ ปริมาตร 30 มิลลิลิตร หลังจากนั้นนำเซลล์ที่แขวนลอยมาวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ( $OD_{600}$ ) สำหรับทดสอบประสิทธิภาพย่อยสลายไขมันและสารมัธยันต์ ได้แก่ พทาเลทและโปรโตคาทิกูเอทของแบคทีเรียสายพันธุ์เดี่ยว โดยให้มีค่า  $OD_{600}$  เท่ากับ 0.7 สำหรับสายพันธุ์ PO1, PO2 และ PY1 และมีค่าเท่ากับ 1.2 สำหรับสายพันธุ์ PW1 และ FW1 ซึ่งจะมีความเข้มข้นของเชื้อแบคทีเรียเริ่มต้นเท่ากับ  $10^8$  CFU ต่อ มิลลิลิตร ส่วนการทดสอบประสิทธิภาพย่อยสลายไขมันและปัจจัยทางสิ่งแวดล้อมที่มีผลต่อการย่อยสลายไขมันด้วยกลุ่มแบคทีเรีย ปรับให้ได้ค่า  $OD_{600}$  ของสายพันธุ์ PO1, PO2 และ PY1 เท่ากับ 0.5 และค่าเท่ากับ 1.0 สำหรับสายพันธุ์ PW1 และ FW1 ซึ่งจะมีความเข้มข้นของเชื้อแบคทีเรียเริ่มต้นเท่ากับ  $10^7$  CFU ต่อ มิลลิลิตร และสำหรับทดสอบประสิทธิภาพการ

ย่อยสลาย PAHs ชนิดต่างๆ และในรูปแบบสารผสมจำนวน 2 ชนิดด้วยกลุ่มแบคทีเรีย ปรับให้ได้ค่า OD<sub>600</sub> ของสายพันธุ์ PO1, PO2 และ PY1 เท่ากับ 0.7 และค่าเท่ากับ 1.2 สำหรับสายพันธุ์ FW1 ซึ่งจะมีความเข้มข้นของเชื้อแบคทีเรียเริ่มต้นเท่ากับ 10<sup>8</sup> CFU ต่อมิลลิลิตร จากนั้นสร้างกลุ่มแบคทีเรียด้วยการเติมหัวเชื้อแบคทีเรียเดี่ยวแต่ละชนิดในอัตราส่วนที่เท่ากัน

### 3.2.2 ทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายไพรีนและสารมัธยันต์ของแบคทีเรียเดี่ยว

ทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายไพรีนด้วยแบคทีเรียเดี่ยว โดยเติมหัวเชื้อแบคทีเรียเดี่ยวเริ่มต้นเท่ากับ 10<sup>7</sup> CFU ต่อมิลลิลิตร (เตรียมตามวิธีที่ระบุไว้ในข้อ 3.2.1) ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตรในอาหารเหลว Carbon-Free Mineral Medium (CFMM) (ภาคผนวก ก) ปริมาตร 5 มิลลิลิตรที่มีไพรีน ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างทุก 3 วัน เป็นเวลา 9 วัน โดยมีชุดควบคุมคือ ชุดที่เติมไพรีนแต่ไม่เติมแบคทีเรีย ทดลอง 3 ซ้ำ วิเคราะห์ปริมาณไพรีนที่เหลืออยู่ด้วยวิธี High Performance Liquid Chromatography (HPLC) ตามวิธีที่ระบุไว้ในข้อ 3.4

ตรวจสอบความสามารถของแบคทีเรียในการย่อยสลายสารมัธยันต์ โดยเติมหัวเชื้อแบคทีเรียเดี่ยวเริ่มต้นเท่ากับ 10<sup>7</sup> CFU ต่อมิลลิลิตร (เตรียมตามวิธีที่ระบุไว้ในข้อ 3.2.1) ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตรในอาหารเหลว CFMM ปริมาตร 5 มิลลิลิตรที่มีสารมัธยันต์ ได้แก่ กรดพทาสิกหรือกรดโปรโตคาทาคูอิก ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างทุก 6 ชั่วโมง เป็นเวลา 36 ชั่วโมง โดยมีชุดควบคุมคือ ชุดที่เติมสารมัธยันต์แต่ไม่เติมแบคทีเรีย ทดลอง 3 ซ้ำ วิเคราะห์ปริมาณสารมัธยันต์ที่เหลืออยู่ด้วยวิธี HPLC ตามวิธีที่ระบุในข้อ 3.4

### 3.2.3 ทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายไพรีนของกลุ่มแบคทีเรีย

สร้างกลุ่มแบคทีเรียเพื่อศึกษาบทบาทของแบคทีเรียแต่ละชนิดที่อาจช่วยเพิ่มประสิทธิภาพย่อยสลายไพรีนด้วยกลุ่มแบคทีเรีย 4 หรือ 5 สายพันธุ์ (C1 ถึง C6) ดังแสดงในตารางที่ 3.3 โดยเตรียมหัวเชื้อแบคทีเรียตามวิธีที่ระบุไว้ในข้อ 3.2.1 จากนั้นเติมหัวเชื้อแบคทีเรียเดี่ยวแต่ละชนิดในอัตราส่วน 1:1:1:1 หรือ 1:1:1:1:1 (ตารางที่ 3.3) โดยมีความเข้มข้นของเชื้อแบคทีเรียเริ่มต้นเท่ากับ 10<sup>6</sup> CFU ต่อมิลลิลิตรในอาหารเหลว CFMM ปริมาตร 5 มิลลิลิตรที่มีไพรีน ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างทุก 3 วัน เป็นเวลา 12 วัน โดยมีชุดควบคุมคือ ชุดที่เติมไพรีนแต่ไม่เติมแบคทีเรีย ทดลอง 3 ซ้ำ วิเคราะห์ปริมาณไพรีนที่เหลืออยู่ด้วยวิธี HPLC ตามวิธีที่ระบุในข้อ 3.4

ตารางที่ 3.3 กลุ่มแบคทีเรียในรูปแบบต่างๆ

| กลุ่ม<br>แบคทีเรีย | สายพันธุ์แบคทีเรีย |     |     |     |     |
|--------------------|--------------------|-----|-----|-----|-----|
|                    | PO1                | PO2 | PY1 | PW1 | FW1 |
| C1                 | +                  | +   | +   | +   | +   |
| C2                 | -                  | +   | +   | +   | +   |
| C3                 | +                  | -   | +   | +   | +   |
| C4                 | +                  | +   | -   | +   | +   |
| C5                 | +                  | +   | +   | -   | +   |
| C6                 | +                  | +   | +   | +   | -   |
| C7                 | -                  | -   | +   | +   | +   |
| P1                 | +                  | -   | +   | -   | -   |
| P2                 | +                  | -   | -   | +   | -   |
| P3                 | +                  | -   | -   | -   | +   |
| P4                 | +                  | +   | +   | -   | -   |
| P5                 | +                  | +   | -   | +   | -   |
| P6                 | +                  | +   | -   | -   | +   |
| P7                 | +                  | +   | -   | -   | -   |

หมายเหตุ: + มีแบคทีเรีย - ไม่มีแบคทีเรีย

จากการวิเคราะห์จีโนม คาดว่า *Mycolicibacterium* ทั้งสองสายพันธุ์น่าจะเป็นแบคทีเรียที่มีบทบาทหลักในการย่อยสลาย จึงนำ *Mycolicibacterium* มาศึกษาความสำคัญและความสัมพันธ์ระหว่าง *Mycolicibacterium* sp. PO1 หรือ PO2 กับแบคทีเรียสายพันธุ์อื่นได้แก่ สายพันธุ์ PY1, PW1 และ FW1 ในการย่อยสลายไพรีน (กลุ่มแบคทีเรีย C7 และ P1 ถึง P8) ดังแสดงในตารางที่ 3.3 โดยเติมหัวเชื้อแบคทีเรียเดี่ยวแต่ละชนิดในอัตราส่วน 1:1 หรือ 1:1:1 ที่ความเข้มข้นเริ่มต้นเท่ากับ  $10^6$  CFU ต่อมิลลิลิตร (เตรียมตามวิธีที่ระบุไว้ในข้อ 3.2.1) ในอาหารเหลว CFMM ปริมาตร 5 มิลลิลิตรที่มีไพรีน ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร เขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างวันที่ 1 และ 3 โดยมีชุดควบคุมคือ ชุดที่เติมไพรีนแต่ไม่เติมแบคทีเรีย ทดลอง 3 ซ้ำ วิเคราะห์ปริมาณไพรีนที่เหลืออยู่ด้วยวิธี HPLC ตามวิธีที่ระบุในข้อ 3.4

### 3.2.4 ทดสอบการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

ทดสอบการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพของกลุ่มแบคทีเรียที่มีและไม่มีสายพันธุ์ FW1 เติมห้วเชื้อกลุ่มแบคทีเรียประกอบด้วย สายพันธุ์ PO1, PO2 และ PY1 ในอัตราส่วนที่เท่ากัน (1:1:1) และกลุ่มแบคทีเรียประกอบด้วย สายพันธุ์ PO1, PO2, PY1 และ FW1 ในอัตราส่วนที่เท่ากัน (1:1:1:1) ตามวิธีที่ระบุไว้ในข้อ 3.2.1 ให้มีความเข้มข้นเริ่มต้นเท่ากับ  $10^7$  CFU ต่อมิลลิลิตรลงในอาหารเหลว Productive medium (ภาคผนวก ก) ปริมาตร 50 มิลลิลิตรที่มีไพริน ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร หรือน้ำมันถั่วเหลือง ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) เขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน จากนั้นย้ายเชื้อลงไปในหลอดเซนตริฟิวจ์ปราศจากเชื้อ ปั่นแยกเซลล์ด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงควบคุมอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที นำส่วนของเหลวใส (supernatant) ไปวัดค่าแรงตึงผิวด้วยเครื่องวัดแรงตึงผิวด้วยเครื่อง Tensiometer (DCAT21, USA) หน่วยของแรงตึงผิวคือ มิลลินิวตันต่อเมตร (mN/m) ทดลอง 3 ซ้ำ และเปรียบเทียบผลที่ได้กับชุดควบคุมคือ ชุดอาหารเหลว Productive medium

### 3.2.5 ทดสอบผลของปัจจัยทางสิ่งแวดล้อมต่อการย่อยสลายไพรินของกลุ่มแบคทีเรีย

การนำกลุ่มแบคทีเรียไปประยุกต์ใช้ในสิ่งแวดล้อม ปัจจัยทางกายภาพ มักส่งผลต่อความสามารถย่อยสลายของแบคทีเรีย ทดสอบผลของปัจจัยสิ่งแวดล้อมได้แก่ ค่าความเป็นกรด-ด่าง อุณหภูมิ และปริมาณโซเดียมคลอไรด์ เติมห้วเชื้อแบคทีเรียเดี่ยวได้แก่ สายพันธุ์ PO1, PO2, PY1 และ FW1 ในอัตราส่วนที่เท่ากัน (1:1:1:1) ตามวิธีที่ระบุไว้ในข้อ 3.2.1 ให้มีความเข้มข้นเริ่มต้นเท่ากับ  $10^6$  CFU ต่อมิลลิลิตรลงในอาหารเหลว CFMM ปริมาตร 5 มิลลิลิตรที่มีไพริน ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร เขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างทุก 3 วัน เป็นเวลา 15 วัน โดยมีชุดควบคุมคือ ชุดที่เติมไพรินแต่ไม่เติมแบคทีเรีย ทดลอง 3 ซ้ำ วิเคราะห์ปริมาณไพรินที่เหลืออยู่ด้วยวิธี HPLC ตามวิธีที่ระบุในข้อ 3.4 และวิเคราะห์การเจริญของแบคทีเรียโดยวิธี viable plate count บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง LB

ทดสอบการย่อยสลายไพรินภาวะแปรผันความเป็นกรด-ด่าง มีค่าเท่ากับ 5.0, 6.0, 7.0, 8.0 และ 9.0 (ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และไม่มีการเติมโซเดียมคลอไรด์) ในภาวะแปรผันอุณหภูมิ ได้แก่ อุณหภูมิห้อง (24-28 องศาเซลเซียส), 25 และ 37 องศาเซลเซียส (ความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 7.0 และไม่มีการเติมโซเดียมคลอไรด์) และภาวะการเติมโซเดียมคลอไรด์ มีค่าเท่ากับ 0, 1.0, 3.0 และ 5.0 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนัก/ปริมาตร) (ความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 7.0 และอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส)

### 3.3 ทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลาย PAHs ในรูปแบบสารค้ำผสมของกลุ่มแบคทีเรีย

#### 3.3.1 ทดสอบการย่อยสลาย PAHs ในรูปแบบสารค้ำผสมของกลุ่มแบคทีเรีย

เติมหัวเชื้อแบคทีเรียเดี่ยวได้แก่ สายพันธุ์ PO1, PO2, PY1 และ FW1 ในอัตราส่วนที่เท่ากัน (1:1:1:1) ตามวิธีที่ระบุไว้ในข้อ 3.2.1 ให้มีความเข้มข้นเริ่มต้นเท่ากับ  $10^7$  CFU ต่อมิลลิลิตรลงในอาหารเหลว CFMM ปริมาตร 5 มิลลิลิตรที่มีสารค้ำผสมได้แก่ ไพรีนและแอนทราซีน ไพรีนและฟิแนนทรีน ไพรีนและฟลูออรีน และไพรีนและฟลูออแรนทีน ความเข้มข้นอย่างละ 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างทุก 3 วัน เป็นเวลา 12 วัน โดยมีชุดควบคุมคือ ชุดที่เติม PAHs แต่ไม่เติมแบคทีเรีย ทดลอง 3 ซ้ำ วิเคราะห์ปริมาณ PAHs ที่เหลืออยู่ด้วยวิธี HPLC ตามวิธีที่ได้ระบุในข้อ 3.4 และวิเคราะห์การเจริญของแบคทีเรียโดยวิธี viable plate count บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง LB จากนั้นคัดเลือกสารค้ำผสมที่ส่งผลกระทบต่อประสิทธิภาพการย่อยสลายไพรีนและสารค้ำผสมไปศึกษาต่อในข้อที่ 3.3.2 นอกจากนี้นำผลการทดลองที่ได้มาเปรียบเทียบกับประสิทธิภาพย่อยสลาย PAHs ในรูปแบบสารเดี่ยวได้แก่ แอนทราซีน ฟิแนนทรีน ฟลูออรีน และฟลูออแรนทีน ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร

#### 3.3.2 วิเคราะห์กลไกของกลุ่มแบคทีเรียในการย่อยสลาย PAHs ในรูปแบบสารค้ำผสม

##### 3.3.2.1 เพาะเลี้ยงกลุ่มแบคทีเรียเพื่อวิเคราะห์กลไกการย่อยสลาย PAHs รูปแบบสารค้ำผสม

คัดเลือกสารค้ำผสมที่ส่งผลกระทบต่อประสิทธิภาพการย่อยสลายไพรีนและสารค้ำผสมจากข้อที่ 3.3.1 ได้แก่ ไพรีนและฟลูออแรนทีน มาศึกษากลไกการยับยั้งการย่อยสลายไพรีนด้วยวิธีการวิเคราะห์ทรานส์คริปโตมิกส์ โดยแบ่งชุดการทดลองออกเป็น 3 ชุดคือ ชุดทดลองที่มีกลุ่มแบคทีเรียและไพรีนและฟลูออแรนทีนในรูปแบบสารค้ำผสม ความเข้มข้นอย่างละ 50 มิลลิกรัมต่อลิตร ชุดทดลองที่มีกลุ่มแบคทีเรียและไพรีน ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร และชุดทดลองที่มีกลุ่มแบคทีเรียและฟลูออแรนทีน ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร เขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างชั่วโมงที่ 0, 24, 36, 48, 60, 72 และ 144 โดยมีชุดควบคุมคือ ชุดที่เติม PAHs แต่ไม่เติมแบคทีเรีย ทดลอง 3 ซ้ำ วิเคราะห์ปริมาณ PAHs ที่เหลืออยู่ด้วยวิธี HPLC ตามวิธีที่ได้ระบุในข้อ 3.4 เพื่อหาระยะเวลาที่เหมาะสมของการเก็บตัวอย่างในการสกัดอาร์เอ็นเอ (RNA)

เก็บตัวอย่างของชุดการทดลองที่มีไพรีนและฟลูออแรนทีนในรูปแบบสารค้ำผสม จำนวน 2 ซ้ำ และชุดการทดลองที่มีฟลูออแรนทีนเพียงชนิดเดียว จำนวน 2 ซ้ำ ปริมาตรอย่างละ 100 มิลลิลิตร ที่ระยะเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นนำไปปั่นแยกเซลล์ด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงควบคุมอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที จะได้ตะกอนเซลล์แบคทีเรีย และเติม

RNAprotect Bacteria Reagent® (Qiagen, Germany) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องปั่นผสม ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกเซลล์ 12,000 รอบต่อ นาที เป็นเวลา 10 นาที นำเซลล์แบคทีเรียไปสกัด RNA ตามวิธีที่ได้ระบุในข้อ 3.3.2.2

### 3.3.2.2 สกัด RNA ของแบคทีเรีย

ในการสกัด RNA อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ต้องผ่านการฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 40 นาที และบริเวณที่ปฏิบัติงานควรรองด้วยฟรอยด์ และกำจัด RNase ด้วย RNase Away™ Decontamination Reagent (Thermo Fisher Scientific, USA) นำเซลล์แบคทีเรียจากข้อ 3.3.2.1 มากระจายตะกอนเซลล์ในสารละลาย TE ที่มีไลโซไซม์ ความเข้มข้น 60 มิลลิกรัมต่อ มิลลิลิตร (ภาคผนวก ข) 500 ไมโครลิตร ให้เป็นเนื้อเดียวกันด้วยการปิเปตต์ขึ้นลง บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 20 นาที นำมาสกัด RNA ด้วยชุดสกัด RNeasy mini kit (Qiagen, Germany) ตามวิธีที่ ระบุในคู่มือ โดยเติมบัฟเฟอร์ RLT 400 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยการปิเปตต์ขึ้นลง จากนั้นดูด สารละลายผสมทั้งหมดลงในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ขนาด 2 มิลลิลิตรที่มีเม็ดปิดแก้ว ขนาด 425-600 ไมโครเมตร ( $\mu\text{m}$ ) (Sigma, Missouri, USA) ปริมาณ 1 กรัม และบัฟเฟอร์ RLT 300 ไมโครลิตร นำเข้าเครื่อง Bead-Beater เป็นเวลา 45 วินาที หยุด 5 วินาที ทำซ้ำเป็นจำนวน 4 รอบ และนำวาง ในอ่างน้ำแข็งทันที เป็นเวลา 1 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ด้วยความเร็ว 20,000  $\times g$  เป็นเวลา 20 นาที ดูดส่วนน้ำใส 700 ไมโครลิตรลงในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์อันใหม่ แล้วเติมเอทานอล 100 เปอร์เซ็นต์ 500 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยการปิเปตต์ขึ้นลงอย่างช้าๆ แล้วดูด สารละลายผสมทั้งหมดลงในคอลัมน์ RNeasy Mini spin ที่มี collection tube ขนาด 2 มิลลิลิตร ปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ความเร็ว 20,000  $\times g$  เป็นเวลา 2 นาที ย้ายคอลัมน์ลงใน collection tube อันใหม่ เติมน้ำบัฟเฟอร์ RW1 700 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 25 องศา เซลเซียส ความเร็ว 9,000  $\times g$  เป็นเวลา 1 นาที ย้ายคอลัมน์ลงใน collection tube อันใหม่ เติมน้ำบัฟเฟอร์ RPE 500 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงด้วยสภาวะเดิม ย้ายคอลัมน์ลงใน collection tube อันใหม่ เติมน้ำบัฟเฟอร์ RPE 500 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ความเร็ว 9,000  $\times g$  เป็น เวลา 2 นาที ย้ายคอลัมน์ลงใน collection tube อันใหม่ ปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ความเร็ว 20,000  $\times g$  เป็นเวลา 1 นาที เพื่อให้คอลัมน์แห้ง ย้ายคอลัมน์ลงในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติมน้ำ RNase-free water 30 ไมโครลิตร ลงตรงกลางคอลัมน์ ตั้งทิ้งไว้ที่ อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 นาที ปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ความเร็ว 9,000  $\times g$  เป็นเวลา 2 นาที จะได้สารละลาย RNA (วางในอ่างน้ำแข็งทันที) ตรวจสอบความเข้มข้น และความบริสุทธิ์ของ สารละลาย RNA ด้วยเครื่องวัดความเข้มข้น Nanodrop



กำจัด DNA ในสารละลาย RNA ที่สกัดได้ด้วย RQ1 RNase-Free DNase (Promega, USA) โดยเติม RQ1 RNase-Free DNase 5 ไมโครลิตร RNase-Free DNase 10X Reaction buffer 5 ไมโครลิตร (ต่อปริมาตรสารละลาย RNA 30 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 หรือ TE buffer เป็น 100 ไมโครลิตร (เติม 55 ไมโครลิตร) แล้วทำบริสุทธิ์สารละลาย RNA ด้วย RNeasy mini kit ตามวิธีที่ระบุในคู่มือ โดยเติมบัฟเฟอร์ RLT 300 ไมโครลิตร และเอทานอล 100 เปอร์เซ็นต์ 250 ไมโครลิตร ผสมโดยการปิเปตต์ขึ้นลงอย่างช้าๆ แล้วดูดสารละลายผสมทั้งหมดลงในคอลัมน์ที่มี collection tube ขนาด 2 มิลลิลิตร ปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ความเร็ว 20,000 xg เป็นเวลา 2 นาที ย้ายคอลัมน์ลงใน collection tube อันใหม่ เติมบัฟเฟอร์ RW1 700 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ความเร็ว 9,000 xg เป็นเวลา 1 นาที ย้ายคอลัมน์ลงใน collection tube อันใหม่ เติมบัฟเฟอร์ RPE 500 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงด้วยสภาวะเดิม ย้ายคอลัมน์ลงใน collection tube อันใหม่ เติมบัฟเฟอร์ RPE 500 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ความเร็ว 9,000 xg เป็นเวลา 2 นาที ย้ายคอลัมน์ลงใน collection tube อันใหม่ ปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ความเร็ว 20,000 xg เป็นเวลา 1 นาที เพื่อให้คอลัมน์แห้ง ย้ายคอลัมน์ลงในหลอดไมโครเซนติพีพิจ์ ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติม RNase-free water 30 ไมโครลิตร ลงตรงกลางคอลัมน์ ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 นาที ปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ความเร็ว 9,000 xg เป็นเวลา 2 นาที จะได้สารละลาย RNA (วางในอ่างน้ำแข็งทันที) ตรวจสอบความเข้มข้น และความบริสุทธิ์ของสารละลาย RNA ด้วยเครื่องวัดความเข้มข้น Nanodrop (Thermo Scientific, USA) เก็บสารละลาย RNA ไว้ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาใช้

### 3.3.2.3 ตรวจสอบการปนเปื้อนดีเอ็นเอ (DNA) ในสารละลาย RNA

ตรวจสอบการปนเปื้อน DNA ในสารละลาย RNA ด้วยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์เรส (Polymerase chain reaction; PCR) ในหลอดปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์เรส โดยใช้ไพรเมอร์ 27F และ 1492R (ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์แสดงในตารางที่ 3.1) ผลิตภัณฑ์มีความยาวประมาณ 1,456 คู่เบส ส่วนผสมของสารในปฏิกิริยาและความเข้มข้นสุดท้ายของแต่ละสารในปฏิกิริยามีดังนี้ GoTaq<sup>®</sup> Green Master Mix (Promega, USA) ปริมาตร 15 ไมโครลิตร สารละลายไพรเมอร์ ความเข้มข้น 20 พิโคโมลต่อไมโครลิตร (ของแต่ละตัว) ปริมาตรชนิดละ 1 ไมโครลิตร RNA ที่สกัดได้ ปริมาตร 1 ไมโครลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อ รวมส่วนผสมทั้งหมดให้มีปริมาตรสุทธิ 30 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน หลังจากนั้นดำเนินปฏิกิริยา PCR ด้วยเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (DNA Thermo Cycle) โดยให้มีสภาวะเหมาะสมกับไพรเมอร์ดังนี้

1. Initial denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที
2. Denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที
3. Annealing ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที
4. Extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 นาที
5. ทำขั้นตอน 2 ถึง 4 ซ้ำ จำนวน 30 รอบ
6. Final extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 นาที

ผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้คือ 1,456 คู่เบส

ตรวจสอบผลิตภัณฑ์ PCR ที่เกิดขึ้นด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิสในบัฟเฟอร์ TAE (ภาคผนวก ข) ความเข้มข้น 1 เท่า โดยใช้อะกาโรสเจล ความเข้มข้น 2.0 เปอร์เซ็นต์ (ภาคผนวก ข) เพื่อตรวจสอบขนาดของผลิตภัณฑ์ PCR โดยการเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA ladder (ภาคผนวก ข) หากไม่พบผลิตภัณฑ์ PCR แสดงให้เห็นว่า ไม่มีการปนเปื้อน DNA ในสารละลาย RNA จากนั้นส่งวิเคราะห์ทรานสคริปโตมิกส์ที่บริษัท FASMAC ประเทศญี่ปุ่น นำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์การแสดงออกของยีนต่างๆ ของแบคทีเรียแต่ละชนิด และเขียนแผนภาพแสดงการย่อยสลายไฟรีนและฟลูออแรนทีนในรูปแบบสารคู่ผสม

#### 3.3.2.4 การวิเคราะห์ข้อมูล

นำข้อมูล (raw RNA-Seq reads) มาวิเคราะห์ยีนทั้งหมดที่เกิดการแสดงออกโดยเปรียบเทียบกับข้อมูลจีโนมของแบคทีเรียแต่ละชนิด ได้แก่ *Mycolicibacterium* sp. PO1 (KY511049) *Mycolicibacterium* sp. PO2 (KY511050) *N. pentaromativorans* PY1 (KY511052) และ *B. subtilis* FW1 (KY511053) จากนั้นคำนวณระดับการแสดงออกของยีนที่กำหนดในเทอมของค่า RPKM (Reads per kilo base per million mapped reads) ด้วยโปรแกรม CLC Genomics Workbench (version 7.5.2, CLC Bio, Aarhus, Denmark) จากนั้นเปรียบเทียบระดับการแสดงออกของยีนระหว่างชุดทดลองที่มี PAHs ต่างกันด้วยโปรแกรม R (version 3.5.3, <https://www.r-project.org>) โดยกำหนดให้ยีนที่มีการแสดงออกแตกต่างกันระหว่างชุดทดลองมากกว่าหรือน้อยกว่า 2 เท่า (up- และ down-regulated genes) เป็น Differentially Expressed Genes (DEGs) นอกจากนี้ระบุกลุ่มการทำงานของยีนโดยการเปรียบเทียบกับข้อมูลในฐานข้อมูล COG (Clusters of Orthologous Groups of proteins database; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/COG/>)

สำหรับยีนที่ประมวลรหัสออนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายไฟรีนและฟลูออแรนทีนที่แสดงออก ค่า RPKM จะถูกแปลงเป็น  $\log_2$ RPKM และแสดงในรูปแบบของแผนภาพความร้อน (heatmap; Hemi; <http://hemi.biocuckoo.org/down.php>)

### 3.4 สกัดและวิเคราะห์ PAHs หรือสารมลพิษที่เหลื่ออยู่ด้วยเทคนิค High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

#### 3.4.1 สกัด PAHs หรือสารมลพิษ

นำตัวอย่างมาสกัด PAHs หรือสารมลพิษโดยเติมกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 1-2 หยด เติมเอทิลอะซิเตท 5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องปั่นผสม เป็นเวลา 1 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้แยกชั้น จากนั้นดูดสารชั้นบนที่เป็นส่วนของเอทิลอะซิเตทลงในหลอดทดลองอันใหม่ แล้วสกัดอาหารเหลวด้วยเอทิลอะซิเตทซ้ำอีก 1 ครั้ง รวมส่วนเอทิลอะซิเตทที่ได้ เติมโซเดียมซัลเฟตที่ผ่านการอบข้ามคืนที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส ปั่นผสมเพื่อให้โซเดียมซัลเฟตกำจัดน้ำที่เหลื่ออยู่ในส่วนของเอทิลอะซิเตท ย้ายส่วนเอทิลอะซิเตทที่ผ่านการกำจัดน้ำไปยังหลอดทดลองอันใหม่ นำไประเหยแห้งด้วยการต้มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส จากนั้นเติมเมทานอล 1 มิลลิลิตร ปั่นผสมเป็นเวลา 1 นาที กรองสารละลายผ่านชุดกรองสำเร็จรูปชนิด PTFE ที่มีขนาดรูกรอง 0.20 ไมโครเมตร ลงสู่ขวดสำหรับวิเคราะห์ HPLC

#### 3.4.2 วิเคราะห์ปริมาณ PAHs หรือสารมลพิษ

วิเคราะห์ปริมาณ PAHs หรือสารมลพิษที่เหลื่ออยู่ด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC, รุ่นSR-101, บริษัท Shimadzu, Japan) ซึ่งมีสภาวะต่างๆ ในระบบดังนี้

|  |   |
|--|---|
| คอลัมน์ inertsil® ODS                            | ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 4.6 มิลลิเมตร ยาว 150 มิลลิเมตร |
| อุณหภูมิคอลัมน์                                  | 40 องศาเซลเซียส                                       |
| เฟสเคลื่อนที่                                    | เมทานอล 80 เปอร์เซ็นต์                                |
| อัตราไหลของเฟสเคลื่อนที่                         | 1 มิลลิลิตรต่อนาที                                    |
| ความยาวคลื่นแสงอัลตราไวโอเล็ตที่ใช้ตรวจวิเคราะห์ | 275 นาโนเมตร  |
| ปริมาณสารที่ฉีดวิเคราะห์                         | 10 ไมโครลิตร  |

นำพื้นที่ใต้กราฟ (peak area) ที่ได้จากการวิเคราะห์ตัวอย่างไปคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การย่อยสลาย PAHs หรือสารมลพิษ เปรียบเทียบกับชุดควบคุม ดังสมการด้านล่าง

ประสิทธิภาพการย่อยสลาย PAHs หรือสารมลพิษ =

$$\frac{(\text{พื้นที่ใต้กราฟของชุดควบคุม ณ เวลานั้น} - \text{พื้นที่ใต้กราฟของชุดทดลอง ณ เวลานั้น}) \times 100}{\text{พื้นที่ใต้กราฟของชุดควบคุม ณ เวลานั้น}}$$

### 3.5 ตรวจสอบยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายนอร์มัล-อัลเคน

นำข้อมูลจีโนมของสายพันธุ์ PO1, PO2, PY1 และ FW1 มาวิเคราะห์หา ยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายนอร์มัล-อัลเคนด้วยโปรแกรม Unipro UGENE (เวอร์ชัน 1.31.1, Russia, <http://ugene.net/>) โดยนำลำดับกรดอะมิโนของโปรตีนของยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายนอร์มัล-อัลเคนของ *Mycobacterium*, *Novosphingobium* และ *Bacillus* ได้แก่ ยีน *alkB* ประมวลรหัสเอนไซม์อัลเคนโมโนออกซิจีเนส ที่จำเพาะต่อการย่อยสลายอัลเคนที่มีจำนวนคาร์บอน 10-32 อะตอม (Nie และคณะ, 2014) ยีน CYP153 ประมวลรหัสเอนไซม์ไซโตโครม P450 ที่จำเพาะต่อการย่อยสลายอัลเคนสายกลางที่มีจำนวนคาร์บอน 5-16 อะตอม (van Beilen และคณะ, 2006) ยีน *almA* ประมวลรหัสเอนไซม์อัลเคนไดออกซิจีเนส ที่จำเพาะต่อการย่อยสลายอัลเคนสายยาวที่มีจำนวนคาร์บอนมากกว่า 32 อะตอม (Wentzel และคณะ, 2007) ยีน *ladA* ที่ประมวลรหัสเอนไซม์อัลเคนโมโนออกซิจีเนส ที่จำเพาะต่อการย่อยสลายอัลเคนที่มีจำนวนคาร์บอน 15 ถึง 36 อะตอม (Feng และคณะ, 2007; Li และคณะ, 2008) ยีน *alkJ* ที่ประมวลรหัสเอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนส และยีน *alkH* ประมวลรหัสเอนไซม์อัลดีไฮด์ดีไฮโดรจีเนส (Nie และคณะ, 2014) มาสร้างเป็นฐานข้อมูล (ตารางที่ 3.4) เพื่อใช้เป็นข้อมูลสำหรับค้นหา ยีนในจีโนมแบคทีเรีย และใช้โปรแกรม Unipro UGENE ในการวิเคราะห์ข้อมูลเพื่อค้นหา ยีน *alkB*, CYP153, *almA*, *ladA*, *alkJ* และ *alkH* ในจีโนมแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์ จากนั้นนำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนไปเปรียบเทียบกับลำดับกรดอะมิโนของโปรตีนกับข้อมูลที่มีในฐานข้อมูล GenBank โดยใช้โปรแกรม BLASTx (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>)

ตารางที่ 3.4 แบคทีเรียและยีนที่ใช้เป็นฐานข้อมูลสำหรับการค้นหา ยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลาย

| ยีน         | แบคทีเรีย                                       | Accession number |
|-------------|---|------------------|
| <i>alkB</i> | <i>Mycobacterium</i> sp.                        | WP_012393161.1   |
| CYP153      | <i>Mycobacterium smegmatis</i>                  | WP_014877072.1   |
|             | <i>Novosphingobium</i> sp. PP1Y                 | WP_013837101.1   |
|             | <i>Bacillus subtilis</i>                        | WP_014476509.1   |
| <i>alkJ</i> | <i>Mycobacterium chlorophenicum</i><br>DSM43826 | KMO75297.1       |
|             | <i>Novosphingobium pentaromativorans</i> US6-1  | AIT81089.1       |
|             | <i>Bacillus subtilis</i> BS38                   | AOR99390.1       |

**ตารางที่ 3.4** แบคทีเรียและยีนที่ใช้เป็นฐานข้อมูลสำหรับการค้นหาที่ยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลาย (ต่อ)

| ยีน         | แบคทีเรีย                                     | Accession number |
|-------------|---|------------------|
| <i>alkH</i> | <i>Mycolicibacterium obuense</i>              | KMO76300.1       |
|             | <i>Novosphingobium kunmingense</i>            | PKB14481.1       |
|             | <i>Bacillus subtilis</i> 168                  | AIY99612.1       |
| <i>almA</i> | <i>Acinetobacter</i> sp. DSM17874             | ABQ18224.1       |
| <i>ladA</i> | <i>Geobacillus thermodenitrificans</i> NG80-2 | ABO68832.1       |

### 3.6 ทดสอบการย่อยสลายนอร์มัล-อัลเคนและน้ำมันดิบ

#### 3.6.1 เตรียมหัวเชื้อแบคทีเรีย

เชื้อโคโลนีเดี่ยวของแบคทีเรีย 1 ถูปลงในอาหารเหลว 0.25X LB ปริมาตร 150 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร จากนั้นเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วันสำหรับสายพันธุ์ PO1 และ PO2 และเป็นเวลา 2 วันสำหรับสายพันธุ์ PY1 และ FW1 นำไปปั่นแยกเซลล์ด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงควบคุมอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ล้างเซลล์ในสารละลาย 0.85 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) โซเดียมคลอไรด์ ทำซ้ำขั้นตอนดังกล่าว 2 รอบ นำเซลล์ที่ได้แขวนลอยใน 0.85 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) โซเดียมคลอไรด์ ปริมาตร 30 มิลลิลิตร หลังจากนั้นนำเซลล์ที่แขวนลอยมาวัดค่าดูดกลืนแสงที่ OD<sub>600</sub> ให้มีค่าเท่ากับ 0.8 สำหรับสายพันธุ์ PO1, PO2 และ PY1 มีค่าเท่ากับ 1.5 สำหรับสายพันธุ์ FW1 ซึ่งมีความเข้มข้นของเชื้อแบคทีเรียเริ่มต้นแต่ละเชื้อเท่ากับ 10<sup>9</sup> CFU ต่อ มิลลิลิตร จากนั้นสร้างกลุ่มแบคทีเรียด้วยการเติมหัวเชื้อแบคทีเรียเดี่ยวแต่ละชนิดในอัตราส่วนที่เท่ากัน

#### 3.6.2 ทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายนอร์มัล-อัลเคน

ทดสอบความสามารถย่อยสลายนอร์มัล-อัลเคนได้แก่ นอร์มัล-เตตระเดเคน (C14) นอร์มัล-เฮกซะเดเคน (C16) และนอร์มัล-โดโคเซน (C22) สำหรับสายพันธุ์เดี่ยว PO1, PO2, PY1 และ FW1 โดยเติมหัวเชื้อแบคทีเรียเดี่ยวให้มีความเข้มข้นเริ่มต้นเท่ากับ 10<sup>8</sup> CFU ต่อ มิลลิลิตร (ตามวิธีที่ระบุไว้ในข้อ 3.6.1) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร และสำหรับกลุ่มแบคทีเรียจะเติมหัวเชื้อแบคทีเรียเดี่ยวประกอบด้วย สายพันธุ์ PO1, PO2, PY1 และ FW1 ในอัตราส่วน 1:1:1:1 ให้มีความเข้มข้นเริ่มต้นเท่ากับ 10<sup>8</sup> CFU ต่อ มิลลิลิตร (ตามวิธีที่ระบุไว้ในข้อ 3.6.1) ปริมาตร 5 มิลลิลิตรลงในอาหารเหลว Natural Sea Medium (NSM) (ภาคผนวก ก) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250

มิลลิลิตร ที่มีนอร์มัล-เตตระเดคเคนหรือนอร์มัล-เฮกซะเดคเคน ความเข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อลิตร หรือนอร์มัล-โดโคเซน ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร เขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิห้อง (28-30 องศาเซลเซียส) เก็บตัวอย่างวันที่ 0, 3, 5 และ 7 โดยมีชุดควบคุมคือ ชุดที่เติมนอร์มัล-อัลเคนแต่ไม่เติมแบคทีเรีย ทดลอง 3 ซ้ำ วิเคราะห์ปริมาณนอร์มัล-อัลเคนที่เหลื่ออยู่ด้วยเทคนิค Gas Chromatography ที่มีเครื่องตรวจวัด Flame Ionize Detector (GC-FID) ตามวิธีที่ได้ระบุในข้อ 3.7

### 3.6.3 ทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันดิบ

ทดสอบความสามารถย่อยสลายน้ำมันดิบ สำหรับแบคทีเรียสายพันธุ์เดี่ยว PO1, PO2, PY1 และ FW1 โดยเติมหัวเชื้อแบคทีเรียเดี่ยวให้มีความเข้มข้นเริ่มต้นเท่ากับ  $10^8$  CFU ต่อมิลลิลิตร (ตามวิธีที่ระบุไว้ในข้อ 3.6.1) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร สำหรับกลุ่มแบคทีเรียกลุ่มจะเติมหัวเชื้อแบคทีเรียเดี่ยวประกอบด้วย สายพันธุ์ PO1, PO2, PY1 และ FW1 ในอัตราส่วน 1:1:1:1 ให้มีความเข้มข้นเริ่มต้นเท่ากับ  $10^8$  CFU ต่อมิลลิลิตร (ตามวิธีที่ระบุไว้ในข้อ 3.6.1) ปริมาตร 5 มิลลิลิตรลงในอาหารเหลว NSM ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีน้ำมันดิบ ความเข้มข้น 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร เขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิห้อง (28-30 องศาเซลเซียส) เก็บตัวอย่างวันที่ 0, 3, 5 และ 7 โดยมีชุดควบคุมคือ ชุดที่เติมน้ำมันดิบแต่ไม่เติมแบคทีเรีย ทดลอง 3 ซ้ำ วิเคราะห์ปริมาณน้ำมันดิบที่เหลื่ออยู่ด้วยเทคนิค GC-FID ตามวิธีที่ได้ระบุในข้อ 3.8

## 3.7 สกัดและวิเคราะห์นอร์มัล-อัลเคนที่เหลื่ออยู่ด้วยเทคนิค Gas Chromatography ที่มีเครื่องตรวจวัด Flame Ionize Detector (GC-FID)

### 3.7.1 สกัदनอร์มัล-อัลเคน

นำตัวอย่างมาสกัตอัลเคนโดยเติมเฮกเซน ปริมาตร 25 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องปั่นผสม เป็นเวลา 1 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้แยกชั้นจากนั้นดูดสารชั้นบนที่เป็นส่วนของเฮกเซนลงในหลอดทดลองอันใหม่ จากนั้นสกัดด้วยเฮกเซนซ้ำอีก 1 ครั้ง เติมโซเดียมซัลเฟตที่ผ่านการอบข้ามคืนที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส ปั่นผสมเพื่อให้โซเดียมซัลเฟตกำจัดน้ำที่เหลื่ออยู่ในส่วนของเฮกเซน ย้ายส่วนเฮกเซนที่ผ่านการกำจัดน้ำไปหลอดทดลองอันใหม่ นำไประเหยแห้งด้วยการต้มที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส จากนั้นเติมเฮกเซน ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ปั่นผสมด้วยเครื่องผสมสารเป็นเวลา 1 นาที แล้วกรองสารละลายผ่านหัวกรอง PTFE ที่มีขนาดความกว้างรู 0.20 ไมโครเมตร ลงสู่ขวดสำหรับวิเคราะห์ GC-FID

### 3.7.2 วิเคราะห์ปริมาณนอร์มัล-อัลเคน

วิเคราะห์ปริมาณนอร์มัล-อัลเคนที่เหลืออยู่ด้วยเครื่อง Gas Chromatography ที่มีเครื่องตรวจวัด Flame Ionize Detector (GC-FID, รุ่น 6890N บริษัท Agilent Technologies, USA) ซึ่งมีสภาวะต่างๆ ในระบบดังนี้

|  |  |
|--|--|
| คอลัมน์ HP-N5                                      | ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.32 มิลลิเมตร ยาว 30 เมตร<br>ภายในเคลือบด้วยเฟนนิลเมทิลไซโลเซน 5%<br>หนา 0.25 ไมโครเมตร   |
| อุณหภูมิคอลัมน์                                    | เริ่มต้น 80 องศาเซลเซียส เพิ่มด้วยอัตรา 25 องศาเซลเซียสต่อ นาที จนถึง 160 องศาเซลเซียส หยุดเป็นเวลา 3 นาที เพิ่มด้วยอัตรา 3 องศาเซลเซียสต่อ นาที จนถึง 220 องศาเซลเซียส หยุดเป็นเวลา 2 นาที และเพิ่มด้วยอัตรา 40 องศาเซลเซียสต่อ นาที จนถึง 300 องศาเซลเซียส หยุดเป็นเวลา 7 นาที |
| แก๊สตัวพา  | ฮีเลียม  |
| อัตราเร็วของแก๊สตัวพา                              | 2.1 มิลลิลิตรต่อนาที   |
| โหมด   | splitless  |
| คำนวณประสิทธิภาพการย่อยสลายนอร์มัล-อัลเคน ดังสมการ |  |

ประสิทธิภาพการย่อยสลายนอร์มัล-อัลเคน (%) =

$$\frac{\text{พื้นที่ใต้กราฟของชุดควบคุม ณ เวลานั้น} - \text{พื้นที่ใต้กราฟของชุดทดลอง ณ เวลานั้น}}{\text{พื้นที่ใต้กราฟของชุดควบคุม ณ เวลานั้น}} \times 100$$

### 3.8 สกัดและวิเคราะห์ปริมาณน้ำมันดิบที่เหลืออยู่ด้วยเทคนิค Gas Chromatography ที่มีเครื่องตรวจวัด Flame Ionize Detector (GC-FID)

#### 3.8.1 สกัดน้ำมันดิบ

เติมเฮกเซน ปริมาตร 25 มิลลิลิตรลงในตัวอย่าง ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องเขย่า 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้แยกชั้นจากนั้นดูดสารชั้นบนที่เป็นส่วนของเฮกเซนลงในขวดทดลองอันใหม่ จากนั้นสกัดเฮกเซนซ้ำอีก 1 ครั้ง เติมโซเดียมซัลเฟตที่ผ่านการอบข้ามคืนที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียสเพื่อกำจัดน้ำออก นำไปประเหยแห้งด้วยการต้มที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส จากนั้นเติมเฮกเซน ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ปั่นผสมด้วยเครื่องผสมสารเป็นเวลา 1 นาที แล้วกรองสารละลายผ่านหัวกรอง PTFE ที่มีขนาดความกว้างรู 0.20 ไมโครเมตร ลงสู่ขวดสำหรับวิเคราะห์ GC-FID

### 3.8.2 วิเคราะห์ปริมาณน้ำมันดิบ

วิเคราะห์ปริมาณน้ำมันดิบที่เหลืออยู่ด้วยเครื่อง Gas Chromatography ที่มีเครื่องตรวจวัด Flame Ionize Detector (GC-FID, รุ่น 6890N บริษัท Agilent Technologies, USA) ซึ่งมีสภาวะต่างๆ ในระบบดังนี้

|   |   |
|---|---|
| คอลัมน์ HP-N5                                 | ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 320 ไมโครเมตร ยาว 30 เมตร<br>ภายในเคลือบด้วยเฟนนิลเมทิลไซโลเซน 5 เปอร์เซ็นต์<br>หนา 0.25 ไมโครเมตร  |
| อุณหภูมิคอลัมน์                               | เริ่มต้น 80 องศาเซลเซียส เพิ่มด้วยอัตรา 25 องศาเซลเซียสต่อ<br>นาที จนถึง 160 องศาเซลเซียส หยุดเป็นเวลา 3 นาที เพิ่มด้วย<br>อัตรา 3 องศาเซลเซียสต่อนาที จนถึง 240 องศาเซลเซียส หยุด<br>เป็นเวลา 2 นาที และเพิ่มด้วยอัตรา 40 องศาเซลเซียสต่อนาที<br>จนถึง 300 องศาเซลเซียส หยุดเป็นเวลา 10 นาที |
| แก๊สตัวพา                                     | ฮีเลียม   |
| อัตราเร็วของแก๊สตัวพา                         | 1.7 มิลลิลิตรต่อนาที  |
| โหมด  | split   |
| คำนวณประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันดิบตั้งสมการ |   |
| ประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันดิบ (%) =         |   |
|   | $\frac{\text{พื้นที่ใต้กราฟของชุดควบคุม ณ เวลานั้น} - \text{พื้นที่ใต้กราฟของชุดทดลอง ณ เวลานั้น}}{\text{พื้นที่ใต้กราฟของชุดควบคุม ณ เวลานั้น}} \times 100$  |

### 3.9 ทดสอบภาวะการตรึงกลุ่มแบคทีเรีย และทดสอบประสิทธิภาพกำจัดน้ำมันดิบของ กลุ่มแบคทีเรียตรึง

#### 3.9.1 แปรผันปริมาณซีโอล์ท์

เติมหัวเชื้อแบคทีเรียเดี่ยวแต่ละชนิดในอัตราส่วน 1:1:1:1 ให้มีความเข้มข้นเริ่มต้นเท่ากับ  $10^8$  CFU ต่อ มิลลิลิตร ปริมาตร 5 มิลลิลิตรลงในอาหารเหลว 0.25X LB ปริมาตร 50 มิลลิลิตรที่มีการแปรผันซีโอล์ท์ ปริมาณ 5, 10, 15 และ 20 กรัม เขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิห้อง (28-30 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 3 วัน วิเคราะห์ปริมาณแบคทีเรียที่อยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อและแบคทีเรียที่สามารถเกาะติดบนซีโอล์ท์



วิเคราะห์ปริมาณแบคทีเรียที่อยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยดูอาหารเลี้ยงเชื้อในแต่ละขวด ทดลองไปเจือจางที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ และวิเคราะห์การเจริญของแบคทีเรียด้วยวิธี ทรอปเพลทบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง LB

สำหรับการวิเคราะห์ปริมาณแบคทีเรียที่สามารถเกาะติดบนซีโอล์ท โดยการเทสาร แขนวลอยแบคทีเรียออก จากนั้นล้างเซลล์ตรึงด้วยบัฟเฟอร์ฟอสเฟต-ยูเรีย-แมกนีเซียม ซัลเฟต (PUM) (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร นำไปผ่านคลื่นเสียงความถี่สูง (sonicate) เป็นเวลา 2 นาที และไปเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที เพื่อให้เซลล์ที่เกาะอยู่ที่วัสดุตรึง หลุดออกมาอยู่ในสารละลาย ล้างเซลล์ตรึงซ้ำเป็นจำนวนอีก 1 รอบด้วยบัฟเฟอร์ PUM ปริมาตร 100 มิลลิลิตร และนำเซลล์ตรึงไปตรวจนับปริมาณแบคทีเรียที่สามารถเกาะติดบนวัสดุตรึงโดยวิธี viable plate count บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง LB และคัดเลือกปริมาณซีโอล์ทที่แบคทีเรียสามารถเกาะติด บนซีโอล์ทได้มากที่สุดเพื่อนำไปศึกษาต่อในข้อที่ 3.9.2

### 3.9.2 แปรผันความเร็วรอบของการเขย่าในการตรึงแบคทีเรีย

เติมหัวเชื้อแบคทีเรียเดี่ยวแต่ละชนิดในอัตราส่วน 1:1:1:1 ให้มีความเข้มข้นเริ่มต้นเท่ากับ  $10^8$  CFU ต่อ มิลลิลิตร ปริมาตร 5 มิลลิลิตรลงในอาหารเหลว 0.25X LB ปริมาตร 50 มิลลิลิตรที่มี ปริมาณวัสดุตรึงที่เหมาะสมจากข้อ 3.9.1 ที่ผ่านการฆ่าเชื้อโดยการนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศา เซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที นำไปเขย่าที่ความเร็วรอบ 100, 150 หรือ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิห้อง (28-30 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 3 วัน ทดลอง 3 ซ้ำ วิเคราะห์ ปริมาณแบคทีเรียที่สามารถเกาะติดบนซีโอล์ทตามวิธีข้อที่ 3.9.1 และเลือกความเร็วรอบในการเขย่า ที่ทำให้แบคทีเรียเกาะบนซีโอล์ทได้มากที่สุด เพื่อนำไปศึกษาต่อในข้อที่ 3.9.3

### 3.9.3 แปรผันระยะเวลาการตรึงแบคทีเรีย

เติมหัวเชื้อแบคทีเรียเดี่ยวแต่ละชนิดในอัตราส่วน 1:1:1:1 ให้มีความเข้มข้นเริ่มต้นเท่ากับ  $10^8$  CFU ต่อ มิลลิลิตร ปริมาตร 5 มิลลิลิตรลงในอาหารเหลว 0.25X LB ปริมาตร 50 มิลลิลิตรที่มี ปริมาณวัสดุตรึงที่เหมาะสมจากข้อ 3.9.1 ที่ผ่านการฆ่าเชื้อโดยการนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศา เซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที นำไปเขย่าที่ความเร็วรอบที่เหมาะสม จากข้อ 3.9.2 อุณหภูมิห้อง (28-30 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 7 วัน โดยเก็บตัวอย่างทุกวัน ทดลอง 3 ซ้ำ วิเคราะห์ปริมาณแบคทีเรียที่สามารถเกาะติดบนซีโอล์ทตามวิธีข้อที่ 3.9.1 และเลือกระยะเวลาใน การตรึงที่ทำให้แบคทีเรียเกาะบนซีโอล์ทได้มากที่สุด

### 3.9.4 วิเคราะห์ลักษณะพื้นผิวของวัสดุตรึงก่อนและหลังการตรึงเซลล์ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด

#### จุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด

นำวัสดุตรึงก่อนและหลังการตรึงเซลล์วิเคราะห์ลักษณะพื้นผิวของวัสดุตรึงและการเกาะติดของแบคทีเรียบนวัสดุตรึงด้วยการส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (JEOL, model JSM-6610LV, Japan) โดยศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย นำตัวอย่างแช่ในน้ำยากลูตาราลดีไฮด์ ความเข้มข้น 2.5 เปอร์เซ็นต์ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ค่าความเป็นกรด-ด่าง 7.2 เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นล้างด้วยเอทานอล (30, 50, 70 และ 95 เปอร์เซ็นต์) ความเข้มข้นละ 10 นาที และล้างด้วยเอทานอล ความเข้มข้น 100 เปอร์เซ็นต์ จำนวน 3 ครั้ง ครั้งละ 10 นาที ทำตัวอย่างให้แห้งแล้วจึงเคลือบตัวอย่างด้วยทอง ตรวจสอบลักษณะพื้นผิวของวัสดุตรึงโดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดและอุปกรณ์วิเคราะห์ธาตุ

### 3.9.5 ทดสอบประสิทธิภาพกำจัดน้ำมันดิบด้วยกลุ่มแบคทีเรียตรึง

ตรึงกลุ่มแบคทีเรียบนซีโอไลต์ตามภาวะที่เหมาะสมในการตรึงตามวิธีข้อที่ 3.9.1 (ปริมาณซีโอไลต์), 3.9.2 (ความเร็วในการเขย่า) และ 3.9.3 (ระยะเวลาในการตรึง) ตามลำดับ ให้ความเข้มข้นเริ่มต้นเท่ากับ  $10^8$  CFU ต่อกรัมซีโอไลต์ในอาหารเหลว NSM ปริมาตร 50 มิลลิลิตร หรือน้ำทะเลปลอดเชื้อที่ไม่มีการเติมสารอาหาร ปริมาตร 50 มิลลิลิตรที่มีน้ำมันดิบ ความเข้มข้น 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร เขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิห้อง (28-30 องศาเซลเซียส) สำหรับการทดลองในอาหารเหลว NSM จะเก็บตัวอย่างชั่วโมงที่ 0, 72, 120 และ 163 และในการทดลองในน้ำทะเลปลอดเชื้อที่ไม่มีการเติมสารอาหาร เก็บตัวอย่างชั่วโมงที่ 0, 12, 24, 48, 72 และ 96 โดยมีชุดควบคุมคือ ชุดที่เติมน้ำมันดิบแต่ไม่เติมแบคทีเรีย และชุดที่มีวัสดุตรึงแต่ไม่เติมแบคทีเรีย ทดลอง 3 ซ้ำ วิเคราะห์ปริมาณน้ำมันดิบที่เหลืออยู่ด้วยเทคนิค GC-FID ตามวิธีที่ได้ระบุในข้อ 3.8 คำนวณประสิทธิภาพการกำจัดน้ำมันดิบของกลุ่มแบคทีเรียตรึง และปริมาณน้ำมันดิบที่เหลืออยู่ในซีโอไลต์ ตามสมการ ดังนี้

ประสิทธิภาพการกำจัดน้ำมันดิบ (%) =

$$\frac{(\text{พื้นที่ใต้กราฟของชุดควบคุมในวันที่ 0} - \text{พื้นที่ใต้กราฟของชุดทดลอง}) \times 100}{\text{พื้นที่ใต้กราฟของชุดควบคุมในวันที่ 0}}$$

ปริมาณน้ำมันดิบที่เหลืออยู่ในซีโอไลต์ (%) =

$$\frac{\text{พื้นที่ใต้กราฟน้ำมันดิบในซีโอไลต์ของชุดทดลอง} \times 100}{\text{พื้นที่ใต้กราฟของชุดทดลองในวันที่ 0}}$$

### 3.9.6 ทดสอบผลของปัจจัยทางสิ่งแวดล้อมต่อการกำจัดน้ำมันดิบ

ทดสอบความสามารถการกำจัดน้ำมันดิบภายใต้การแปรผันปัจจัยสิ่งแวดล้อมด้วยกลุ่มแบคทีเรียอิสระและกลุ่มแบคทีเรียตรึงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่บรรจุน้ำทะเลปลอดเชื้อที่ไม่มีการเติมสารอาหาร 45 มิลลิลิตรที่มีน้ำมันดิบ ความเข้มข้น 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร เติมห้วเชื้อแบคทีเรียเดี่ยวได้แก่ สายพันธุ์ PO1, PO2, PY1 และ FW1 ในอัตราส่วนที่เท่ากัน (1:1:1:1) ตามวิธีที่ระบุไว้ในข้อ 3.6.1 ปริมาตร 5 มิลลิลิตร และกลุ่มแบคทีเรียตรึง ตามวิธีที่ระบุไว้ในข้อ 3.9.5 ปริมาณ 2 กรัมเซลล์ตรึง ให้มีความเข้มข้นของเซลล์เริ่มต้นเท่ากับ  $10^8$  CFU ต่อชุดทดลอง เขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 วัน โดยมีชุดควบคุมคือ ชุดที่เติมน้ำมันดิบแต่ไม่เติมแบคทีเรีย และชุดที่มีวัสดุตรึงแต่ไม่เติมแบคทีเรีย ทดลอง 3 ซ้ำ วิเคราะห์ปริมาณน้ำมันดิบที่เหลืออยู่ด้วยเทคนิค GC-FID ตามวิธีที่ได้ระบุในข้อ 3.8 และวิเคราะห์การเจริญของแบคทีเรียโดยวิธี viable plate count บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง LB

ทดสอบความสามารถการกำจัดน้ำมันดิบในภาวะแปรผันความเป็นกรด-ด่าง มีค่าเท่ากับ 5.0, 6.0, 7.0, 8.0 และ 9.0 (ที่อุณหภูมิห้อง (28-30 องศาเซลเซียส) และไม่มีการเติมเกลือทะเล (Sea salt)) ในแปรผันอุณหภูมิได้แก่ 30, 37 และ 40 องศาเซลเซียส (ความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 7.0 และไม่มีการเติมเกลือทะเล) และภาวะแปรผันความเค็มด้วยการเติมเกลือทะเล ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 20, 30 40, 50 และ 60‰ (ความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 7.0 และอุณหภูมิห้อง (28-30 องศาเซลเซียส))

### 3.9.7 ทดสอบประสิทธิภาพการกำจัดน้ำมันดิบแบบกึ่งต่อเนื่องของกลุ่มแบคทีเรียตรึง

ทดสอบความสามารถการกำจัดน้ำมันดิบของกลุ่มแบคทีเรียเซลล์อิสระและกลุ่มแบคทีเรียตรึงในการทดลองแบบกึ่งต่อเนื่องที่เติมน้ำมันดิบ ความเข้มข้น 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตรทุก 3 วัน ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่บรรจุน้ำทะเลปลอดเชื้อที่ไม่มีการเติมสารอาหาร 45 มิลลิลิตรที่มีน้ำมันดิบ ความเข้มข้น 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร เติมห้วเชื้อแบคทีเรียเดี่ยวได้แก่ สายพันธุ์ PO1, PO2, PY1 และ FW1 ในอัตราส่วนที่เท่ากัน (1:1:1:1) ตามวิธีที่ระบุไว้ในข้อ 3.6.1 ปริมาตร 5 มิลลิลิตร และกลุ่มแบคทีเรียตรึง ตามวิธีที่ระบุไว้ในข้อ 3.9.5 ปริมาณ 2 กรัมเซลล์ตรึง ให้มีความเข้มข้นของเซลล์เริ่มต้นเท่ากับ  $10^8$  CFU ต่อชุดทดลอง เขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิห้อง (28-30 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 3 วัน จากนั้นเติมน้ำมันดิบ ความเข้มข้น 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร เก็บตัวอย่างทุก 3 วัน เป็นเวลา 15 วัน โดยมีชุดควบคุมคือ ชุดที่เติมน้ำมันดิบแต่ไม่เติมแบคทีเรีย และชุดที่มีวัสดุตรึงแต่ไม่เติมแบคทีเรีย ทดลอง 3 ซ้ำ วิเคราะห์ปริมาณน้ำมันดิบที่เหลืออยู่ด้วยเทคนิค GC-FID ตามวิธีที่ได้ระบุในข้อ 3.8 และวิเคราะห์การเจริญของแบคทีเรียโดยวิธี viable plate count บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง LB

### 3.9.8 ทดสอบประสิทธิภาพการใช้ซ้ำของกลุ่มแบคทีเรียตรึง

เติมกลุ่มแบคทีเรียตรึง (เตรียมตามวิธีที่ระบุไว้ในข้อ 3.9.5) ให้มีความเข้มข้นเริ่มต้นเท่ากับ  $10^8$  CFU ต่อกรัมวัสดุตรึงลงในน้ำทะเลปลอดเชื้อที่ไม่มีการเติมสารอาหาร 50 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตรที่มีน้ำมันดิบ ความเข้มข้น 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร เขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิห้อง (28-30 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 3 วัน หลังจากการย่อยสลายน้ำมันดิบรอบแรก เซลล์ตรึงจะถูกล้างด้วยบัฟเฟอร์ PUM จากนั้นจึงถูกถ่ายไปยังน้ำทะเลปลอดเชื้อที่ไม่มีการเติมสารอาหารที่ปนเปื้อนน้ำมันดิบในขวดใหม่ ใช้ซ้ำทั้งหมด 7 รอบ โดยมีชุดควบคุมคือ ชุดที่เติมน้ำมันดิบแต่ไม่เติมแบคทีเรีย และชุดที่มีวัสดุตรึงแต่ไม่เติมแบคทีเรีย ทดลอง 3 ซ้ำ วิเคราะห์ปริมาณน้ำมันดิบที่เหลืออยู่ในแต่ละรอบด้วยเทคนิค GC-FID ตามวิธีที่ได้ระบุในข้อ 3.8 และวิเคราะห์การเจริญของแบคทีเรียโดยวิธี viable plate count บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง LB

### 3.10 ทดสอบประสิทธิภาพการบำบัดทรายนเปื้อนน้ำมันดิบในระบบนิเวศจำลองระดับห้องปฏิบัติการ

#### 3.10.1 วิเคราะห์ตัวอย่างดินทราย

นำตัวอย่างดินทรายบริเวณชายฝั่งจากอ่าวลูกโยนที่ได้รับการปนเปื้อนน้ำมันดิบภายหลังเหตุการณ์น้ำมันรั่วไหล 1 เดือน จังหวัดระยอง ส่งวิเคราะห์ที่กลุ่มงานพัฒนาระบบตรวจสอบคุณภาพดินและน้ำ กลุ่มวิจัยเกษตรเคมี สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร กรมวิชาการเกษตร (ภายในมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์) เขตจตุจักร กรุงเทพฯ เพื่อวิเคราะห์สมบัติทางกายภาพและเคมีของตัวอย่างดิน โดยวิเคราะห์สมบัติทางกายภาพได้แก่ ลักษณะเนื้อดิน สมบัติทางเคมีได้แก่ ค่าความเป็นกรดต่าง (pH) สารอินทรีย์ ปริมาณความชื้น (%) ไนโตรเจนทั้งหมด (Total N) ฟอสฟอรัสทั้งหมด (Total P) และโพแทสเซียมทั้งหมด (Total K) รวมทั้งวิเคราะห์จำนวนแบคทีเรียทั้งหมด ตามวิธีที่ระบุในข้อ 3.10.2 และจำนวนแบคทีเรียที่ย่อยสลายน้ำมันดิบ ตามวิธีที่ระบุในข้อ 3.10.3

#### 3.10.2 วิเคราะห์จำนวนแบคทีเรียทั้งหมดด้วยวิธี Most Probable Number (MPN)

ตรวจนับจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดในดิน โดยชั่งตัวอย่างดินทราย 1 กรัม ใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB 9 มิลลิลิตร และผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมสาร ตั้งทิ้งไว้ให้ดินทรายนตกตะกอน จากนั้นดูดส่วนใสด้านบนปริมาตร 20 ไมโครลิตร ลงในจานหลุม 96 หลุมที่มีอาหารเหลว LB ปริมาตร 180 ไมโครลิตร โดยทำ 5 หลุม จำนวน 3 ซ้ำ จากนั้นนำไปปั่นที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน นำไปวัดความขุ่นที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร นำผลที่ได้ไปเปรียบเทียบกับตาราง MPN เพื่อคำนวณหาจำนวนแบคทีเรียทั้งหมด (MPN ต่อกรัมดิน)

### 3.10.3 วิเคราะห์จำนวนแบคทีเรียที่ย่อยสลายน้ำมันดิบด้วยวิธี Most Probable

#### Number (MPN)

ตรวจนับจำนวนแบคทีเรียที่ย่อยสลายน้ำมันดิบโดยดัดแปลงวิธีจาก Johnsen และคณะ (2002) โดยนำสารละลายของน้ำมันดิบที่ละลายในนอร์มัล-เฮกเซน (5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ปิเปตต์ลงในจานหลุม 96 หลุม เพื่อให้ได้ความเข้มข้นเริ่มต้นเท่ากับ 0.1 มิลลิกรัมต่อหลุม ระยะเวลาเคมิประมาณ 30 นาที จากนั้นเติมอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว NSM ปริมาตร 180 ไมโครลิตร และตัวอย่างดินทรายปริมาตร 20 ไมโครลิตรลงในจานหลุม (ตัวอย่างดินทราย 1 กรัมในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว NSM 9 มิลลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมสาร) และเจือจางตัวอย่างเป็นลำดับ จำนวน 3 ซ้ำ บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 สัปดาห์ จากนั้นวิเคราะห์ผลการเจริญของแบคทีเรียที่ย่อยสลายน้ำมันดิบโดยเติมสารละลายไอโดโดโนโตรเตตระโซเลียมคลอไรด์ (INT dye) ความเข้มข้น 15 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (ภาคผนวก ข) และไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (DMSO) ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ลงในจานหลุม 96 หลุม สังเกตตะกอนสีชมพูของ fomazan ที่เกิดจากการเปลี่ยนโครงสร้างของ INT dye แล้วนำไปวัดค่าความขุ่นที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร จากนั้นนำผลที่ได้ไปเปรียบเทียบกับตาราง MPN และคำนวณหาจำนวนแบคทีเรียที่ย่อยสลายน้ำมันดิบทั้งหมด เพื่อประเมินการมีอยู่ของแบคทีเรียที่ย่อยสลายน้ำมันดิบในตัวอย่างดินทราย

### 3.10.4 ทดสอบประสิทธิภาพการบำบัดทรายปนเปื้อนปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนในระบบ

#### นิเวศจำลองระดับห้องปฏิบัติการ

ซั่งตัวอย่างดิน 21 กรัมใส่ขวดแก้วฝาเกลียว แบ่งออกเป็น 4 ชุดการทดลอง ชุดละ 3 ซ้ำ ดังแสดงในตารางที่ 3.5 หนึ่งซั่งเชื้อชุดการทดลอง Abiotic control ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที จำนวน 1 ครั้งต่อวัน เป็นเวลา 3 วัน ชุดการทดลอง Natural attenuation เพื่อทดสอบการย่อยสลายน้ำมันดิบโดยจุลินทรีย์ประจำถิ่น ชุดการทดลอง Biostimulation เติมซีโอไลท์ ปริมาณ 2 กรัม เพื่อเพิ่มรูพรุนในดิน ทำให้ปริมาณออกซิเจนเพิ่มขึ้น และอาจสามารถกระตุ้นการย่อยสลายน้ำมันดิบโดยจุลินทรีย์ประจำถิ่น และชุดการทดลอง Bioaugmentation เติมกลุ่มแบคทีเรียตรึงบนซีโอไลท์ ปริมาณ 2 กรัมที่มีจำนวนหัวเชื้อเริ่มต้นที่  $10^8$  CFU ต่อกรัมซีโอไลท์ เพื่อทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันดิบของกลุ่มแบคทีเรียตรึง จากนั้นเติมน้ำมันดิบความเข้มข้นสุดท้าย 10,000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมดิน และปรับความจสูงสุดในการอุ้มน้ำเป็น 60 เปอร์เซ็นต์ด้วยน้ำทะเลปลอดเชื้อ กวนผสมสารทั้งหมดให้เข้ากัน ซึ่งน้ำหนักเริ่มต้นของทุกชุดการทดลอง บ่มที่อุณหภูมิห้อง (28-30 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 21 วัน รักษาความชื้นของแต่ละชุดทดลอง โดยการปรับจากน้ำหนักที่หายไปเมื่อเทียบกับน้ำหนักเริ่มต้นด้วยน้ำทะเลปลอดเชื้อ เก็บตัวอย่างทุก 3 วัน เป็นเวลา 21 วัน วิเคราะห์ปริมาณน้ำมันดิบที่ลดลงด้วย GC-FID ตามวิธีที่ได้ระบุในข้อ 3.10.5 และตรวจ

ติดตามแบคทีเรียและการเปลี่ยนแปลงประชาคมแบคทีเรียด้วยวิธี 16S amplicon sequencing analysis ตามวิธีที่ได้ระบุในข้อ 3.10.6 (ยกเว้นชุดการทดลอง Abiotic control)

**ตารางที่ 3.5** ระบบนิเวศจำลองดินสำหรับการบำบัดดินทรายปนเปื้อนน้ำมันดิบด้วยกลุ่มแบคทีเรียตรึง

| ชุดการทดลอง     | ดิน      | กลุ่มแบคทีเรีย   | ซีโอไลท์ | น้ำมันดิบ        | น้ำ   |
|-----------------|----------|------------------|----------|------------------|-------|
|                 | ทราย     | ตรึง OPK         | 2 กรัม   | ความเข้มข้น      | ทะเล  |
|                 | 21 กรัม  | ( $10^8$ CFU ต่อ |          | 10,000 มิลลิกรัม | ปลอด  |
|                 |          | กรัมซีโอไลท์)    |          | ต่อกิโลกรัมดิน   | เชื้อ |
| Abiotic control | ฆ่าเชื้อ | -                | -        | เต็ม             | เต็ม  |
| Natural         | ไม่ฆ่า   | -                | -        | เต็ม             | เต็ม  |
| attenuation     | เชื้อ    |                  |          |                  |       |
| Biostimulation  | ไม่ฆ่า   | -                | เต็ม     | เต็ม             | เต็ม  |
|                 | เชื้อ    |                  |          |                  |       |
| Bioaugmentation | ไม่ฆ่า   | เต็ม             | เต็ม     | เต็ม             | เต็ม  |
|                 | เชื้อ    |                  |          |                  |       |

### 3.10.5 วิเคราะห์ปริมาณน้ำมันดิบที่เหลืออยู่ในดิน

#### 3.10.5.1 สกัดน้ำมันดิบ

สกัดน้ำมันดิบที่เหลืออยู่ในดิน โดยเติมเฮกเซน ปริมาตร 4 มิลลิลิตร ลงในขวดแก้วฝาเกลียว และผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมสาร เป็นเวลา 2 นาที และนำไปเขย่าบนเครื่องเขย่าด้วยความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นแช่แข็งที่อุณหภูมิ  $-20$  องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อแยกชั้นของเฮกเซน จากนั้นดูดส่วนเฮกเซนใส่ในหลอดทดลองอันใหม่ เติมโซเดียมซัลเฟตที่ผ่านการอบข้ามคืนที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส ปั่นผสมเพื่อให้โซเดียมซัลเฟตกำจัดน้ำที่เหลืออยู่ในส่วนของเฮกเซน นำไปประเหยแห้งด้วยการต้มที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส จากนั้นเติมเฮกเซน 1 มิลลิลิตร ปั่นผสมด้วยเครื่องผสมสาร เป็นเวลา 1 นาที แล้วกรองสารละลายผ่านหัวกรอง PTFE ที่มีขนาดความกว้างรู 0.22 ไมโครเมตร ลงในขวดสำหรับวิเคราะห์ GC-FID และวิเคราะห์ปริมาณน้ำมันดิบที่เหลืออยู่ด้วยเครื่อง GC-FID

### 3.10.5.2 วิเคราะห์ปริมาณน้ำมันดิบที่เหลืออยู่ด้วย GC-FID

วิเคราะห์ปริมาณน้ำมันดิบที่เหลืออยู่ด้วยเครื่อง Gas Chromatography ที่มีเครื่องตรวจจับ Flame Ionize Detector (GC-FID, รุ่น 6890N บริษัท Agilent Technologies, USA) ซึ่งมีสภาวะต่างๆ ในระบบดังนี้

|  |   |
|--|---|
| คอลัมน์ HP-N5                              | ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 320 ไมโครเมตร ยาว 30 เมตร<br>ภายในเคลือบด้วยเฟนนิลเมทิลไซโลเซน 5 เปอร์เซ็นต์<br>หนา 0.25 ไมโครเมตร  |
| อุณหภูมิคอลัมน์                            | เริ่มต้น 80 องศาเซลเซียส เพิ่มด้วยอัตรา 25 องศาเซลเซียสต่อ<br>นาที จนถึง 160 องศาเซลเซียส หยุดเป็นเวลา 3 นาที เพิ่มด้วย<br>อัตรา 3 องศาเซลเซียสต่อนาที จนถึง 240 องศาเซลเซียส หยุด<br>เป็นเวลา 2 นาที และเพิ่มด้วยอัตรา 40 องศาเซลเซียสต่อนาที<br>จนถึง 300 องศาเซลเซียส หยุดเป็นเวลา 10 นาที |
| แก๊สตัวพา                                  | ฮีเลียม   |
| อัตราเร็วของแก๊สตัวพา                      | 1.7 มิลลิเมตรต่อนาที  |
| โหมด                                       | split   |
| คำนวณประสิทธิภาพการกำจัดน้ำมันดิบตั้งสมการ |   |
| ประสิทธิภาพการกำจัดน้ำมันดิบ (%) =         |   |

$$\frac{(\text{พื้นที่ใต้กราฟของชุดควบคุมในวันที่ 0} - \text{พื้นที่ใต้กราฟของชุดทดลอง}) \times 100}{\text{พื้นที่ใต้กราฟของชุดควบคุมในวันที่ 0}}$$

### 3.10.6 ตรวจติดตามแบคทีเรียและการเปลี่ยนแปลงของประชาคมแบคทีเรียด้วยวิธี 16S amplicon sequencing analysis

#### 3.10.6.1 สกัด DNA จากตัวอย่างดินทราย

สกัด DNA จากตัวอย่างดินทรายด้วยชุด PowerSoil DNA Isolation Kit (Qiagen, Germany) ตามวิธีที่ระบุในคู่มือ โดยนำตัวอย่างดินทราย 0.25 กรัมใส่ลงในหลอดของชุด PowerSoil DNA ทำตัวอย่างละ 3 ซ้ำ ผสมสารด้วยเครื่องผสมสาร เป็นเวลา 1 นาที เติมน้ำ C1 ปริมาตร 60 ไมโครลิตร ผสมสารด้วยเครื่องผสมสาร เป็นเวลา 1 นาที นำตัวอย่างใส่ในเครื่อง Mini-BeadBeater เป็นเวลา 3 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 วินาที ดูดส่วนของเหลวใส่ปริมาตร 500 ไมโครลิตรใส่ลงในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ จากนั้นเติมน้ำ C2 ปริมาตร

250 ไมโครลิตร แล้วผสมสารด้วยเครื่องผสมสาร เป็นเวลา 5 นาที บ่มที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นดูดส่วนใส ปริมาตร 750 ไมโครลิตรลงในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์อันใหม่ แล้วเติมสาร C4 ปริมาตร 1,200 ไมโครลิตร ผสมสารด้วยเครื่องผสมสาร เป็นเวลา 5 นาที ดูดส่วนของเหลวใสจากหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ ปริมาตร 675 ไมโครลิตรใส่ลงในหลอด Spin Filter นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เทของเหลวทิ้ง แล้วทำซ้ำอีกครั้งโดยการดูดส่วนของเหลวใสที่เหลืออยู่ในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ใส่ลงในหลอด Spin Filter ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เทของเหลวทิ้ง หลังจากนั้นเติมสาร C5 ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 วินาที นำเฉพาะตัวกรองของ Spin Filter ใส่ลงในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์อันใหม่ แล้วเติมสาร C6 ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 วินาที ดูดส่วนสารละลายส่วนใสของ DNA ออกมาใส่ไว้ในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์อันใหม่ เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

### 3.10.6.2 ตรวจสอบความสมบูรณ์ของ DNA

ตรวจสอบความสมบูรณ์ของสารละลายดีเอ็นเอที่สกัดได้จากข้อ 3.10.6.1 ด้วยวิธีอะกาโรส เจลอิเล็กโทรโฟรีซิสในบัฟเฟอร์ TAE ความเข้มข้น 1 เท่า นำสารละลาย DNA ผสมกับสีย้อม หยอดลงในช่องวิ่งบนแผ่นอะกาโรสเจล ความเข้มข้น 0.9 เปอร์เซ็นต์ (ภาคผนวก ข) โดยช่องวิ่งแรกจะหยอดดีเอ็นเอมาตรฐาน Lambda HindIII ปริมาตร 2 ไมโครลิตร (ภาคผนวก ข) เพื่อใช้เป็นตัวบ่งชี้ขนาดของ DNA จากนั้นทำอิเล็กโทรโฟรีซิส ใช้ความต่างศักย์ 100 โวลต์ จนกระทั่งสีย้อมเคลื่อนที่ได้ใน ระยะทางที่เหมาะสม ย้อมอะกาโรสเจลด้วยสารละลายเอธิเดียมโบรไมด์ (ภาคผนวก ข) เป็นเวลา 10 นาที ตรวจสอบแถบ DNA ภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ตความยาวคลื่น 312 นาโนเมตร

### 3.10.6.3 เพิ่มจำนวนและตรวจสอบชิ้นส่วน DNA บริเวณ 16S rDNA

นำ DNA ที่สกัดได้จากข้อ 3.10.6.1 มาเพิ่มจำนวนบริเวณ 16S rDNA ในหลอดปฏิกิริยา ลูกโซ่พอลิเมอเรส โดยใช้ไพรเมอร์ 27F และ 1492R (ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์แสดงในตารางที่ 3.1) ส่วนผสมของสารในปฏิกิริยาและความเข้มข้นสุดท้ายของแต่ละสารในปฏิกิริยามีดังนี้ GoTaq® Green Master Mix (Promega, USA) ปริมาตร 15 ไมโครลิตร สารละลายไพรเมอร์ ความเข้มข้น 20 พิโคโมลต่อไมโครลิตร (ของแต่ละตัว) ปริมาตร 1 ไมโครลิตร DNA ที่สกัดได้ ปริมาตร 1 ไมโครลิตร น้ำปลอดประจุปลอดเชื้อ ปริมาตร 12 ไมโครลิตร รวมส่วนผสมทั้งหมดให้มี ปริมาตรสุทธิ 30 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน หลังจากนั้นดำเนินปฏิกิริยา PCR ด้วยเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (DNA Thermo Cycle) โดยให้มีสภาวะเหมาะสมกับไพรเมอร์ดังนี้



- |    |                                     |                             |                    |
|----|-------------------------------------|-----------------------------|--------------------|
| 1. | Initial denaturation                | ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส | เป็นเวลา 5 นาที    |
| 2. | Denaturation                        | ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส | เป็นเวลา 30 วินาที |
| 3. | Annealing                           | ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส | เป็นเวลา 30 วินาที |
| 4. | Extension                           | ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส | เป็นเวลา 7 นาที    |
| 5. | ทำขั้นที่ 2 – 4 ซ้ำเป็นจำนวน 40 รอบ |                             |                    |
| 6. | Final extension                     | ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส | เป็นเวลา 7 นาที    |

ผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้คือ 1,456 คู่เบส

ตรวจสอบผลิตภัณฑ์ PCR ด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสในบัฟเฟอร์ TAE ความเข้มข้น 1 เท่า โดยใช้แผ่นอะกาโรสเจลเข้มข้น 2.0 เปอร์เซ็นต์ เพื่อตรวจสอบขนาดของผลิตภัณฑ์ PCR โดยเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA Ladder

นำ DNA จากตัวอย่างละ 3 ซ้ำมารวมตัวอย่าง (Pooling) ให้เป็นตัวอย่างละ 1 ซ้ำ และส่งวิเคราะห์ Metagenomic sequencing ด้วยเครื่อง Miseq (Illumina, USA) โดยใช้ Miseq Reagent kit V2 (บริษัท Illumina, USA) ที่ศูนย์วิทยาศาสตร์โอมิกส์และชีวสารสนเทศ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โดยนำ DNA มาเพิ่มจำนวนบริเวณ 16S rDNA โดยใช้ไพรเมอร์ 515F และ 806R (V4 region) (Caporaso และคณะ, 2011) หลังจากได้ข้อมูลลำดับเบส นำข้อมูลไปคัดกรองคุณภาพลำดับเบสในการระบุชนิดของแบคทีเรียด้วยซอฟต์แวร์ QIIME2 (เวอร์ชัน 2018.8) และนำผลการทดลองที่ได้ไปวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงประชาคมแบคทีเรีย และตรวจติดตามกลุ่มแบคทีเรียที่เติมลงไปด้วยโปรแกรม Base space ด้วยฐานข้อมูล Greengenes

### 3.11 วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

วิเคราะห์ข้อมูลเพื่อหาความแตกต่างทางสถิติ โดยวิเคราะห์ความแปรปรวน (analysis of variance) และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan ที่ความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อ  $p < 0.05$  การวิเคราะห์โดยใช้โปรแกรม SPSS เวอร์ชัน 15

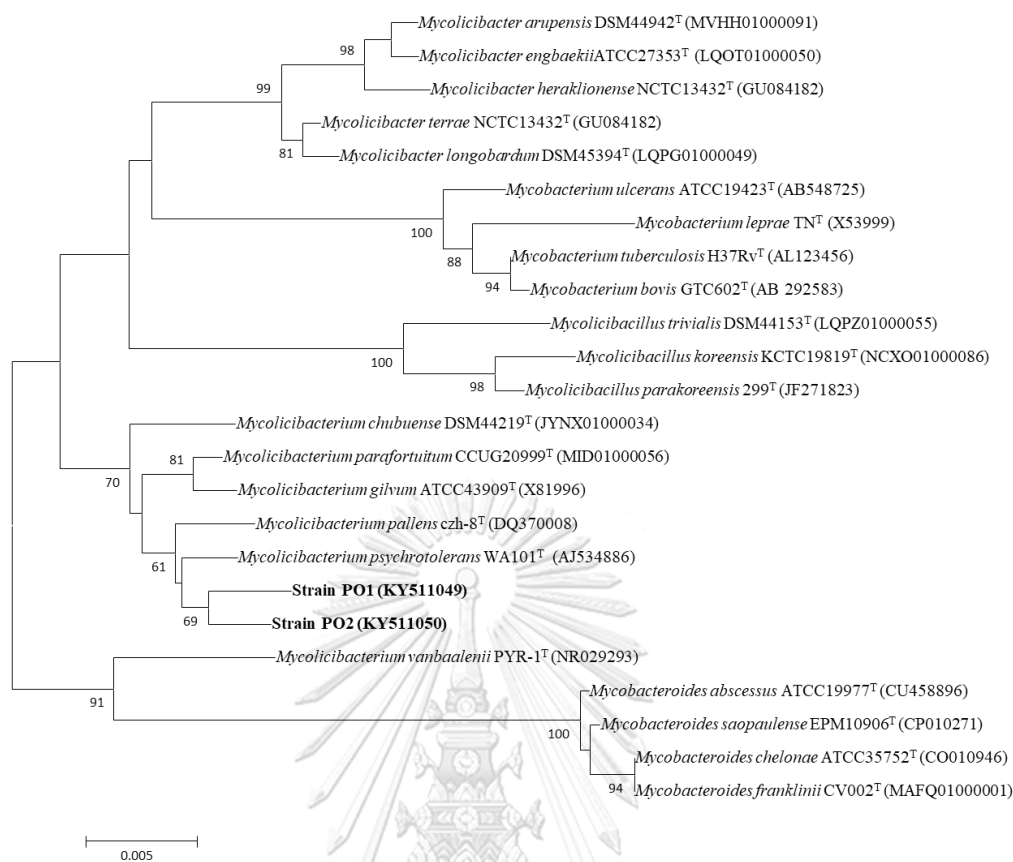
## บทที่ 4

### ผลการทดลองและอภิปรายผลการทดลอง

#### 4.1 การจัดกลุ่มแบคทีเรียในจีโนม *Mycobacterium* เป็นจีโนมใหม่

รายงานวิจัยของ Gupta และคณะ (2018) ได้จัดกลุ่มและวิเคราะห์จีโนม *Mycobacterium* ใหม่ โดยใช้ลำดับโปรตีนและลำดับกรดอะมิโนของ *Mycobacterium* ทั้งหมด 150 สายพันธุ์เป็นข้อมูลในการวิเคราะห์ แบ่งออกเป็น 5 จีโนม ได้แก่ *Mycobacterium*, *Mycolicibacillus* และ *Mycobacteroides* ซึ่งจัดเป็นเชื้อก่อโรค *Mycolicibacter* และ *Mycolicibacterium* ซึ่งเป็นเชื้อที่ไม่ก่อโรค

จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีน 16S rRNA ของสายพันธุ์ PO1 และ PO2 โดยใช้โปรแกรม EZBioCloud พบว่า ลำดับนิวคลีโอไทด์ของสายพันธุ์ PO1 และ PO2 มีความคล้ายกับ *Mycolicibacterium psychrotolerans* WA101<sup>T</sup> (AJ534886) เท่ากับ 99.04 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อเปรียบเทียบความสัมพันธ์ของแบคทีเรียสายพันธุ์ PO1 และ PO2 กับแบคทีเรียในจีโนมที่เกี่ยวข้องโดยการสร้างแผนภูมิต้นไม้จากข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA พบว่าสายพันธุ์ PO1 และ PO2 มีความใกล้เคียงกับแบคทีเรียในจีโนม *Mycolicibacterium* จึงสามารถจัดกลุ่มสายพันธุ์ PO1 และ PO2 อยู่ในจีโนม *Mycolicibacterium* ดังแสดงในรูปที่ 4.1 โดยจีโนม *Mycolicibacterium* ไม่ถูกจัดอยู่ในบัญชีรายการเชื้อโรคที่ประสงค์ควบคุมตามมาตรา 18 แห่งพระราชบัญญัติเชื้อโรคและพิษจากสัตว์ พ.ศ. 2561 (ราชกิจจานุเบกษา, 2561) ที่ก่อโรคทั้งในคนและสัตว์ จากรายงานวิจัยก่อนหน้านี้ซึ่งมีรายงานว่า *Mycolicibacterium vanbaalenii* PYR-1 สามารถย่อยสลาย PAHs ชนิดต่างๆ เช่น ฟิแนนทรีน ไพรีน ฟลูออแรนทีน และเบนโซ[เอ]ไพรีน เป็นต้น (Moody และคณะ, 2001; Kim และคณะ, 2007; Kim และคณะ, 2008) และย่อยสลายอัลเคนสายกลางที่มีจำนวนคาร์บอน 12 และ 13 อะตอม ซึ่งเป็นองค์ประกอบในน้ำมันดิบ BP (Kim และคณะ, 2015) งานวิจัยของ Naloka และคณะ (2021) พบว่า *Mycolicibacterium parafortuitum* J101 และ *M. austroafricanum* Y502 มีความสามารถย่อยสลายฟลูออรีน ฟิแนนทรีน ไพรีน และฟลูออแรนทีน เตตระเดเคน และโดโคเซน ได้ดี และ *Mycolicibacterium* sp. Pyr9 มีประสิทธิภาพย่อยสลายแอนทราซีน ฟิแนนทรีนและไพรีน ได้ดี (Yang และคณะ, 2021)



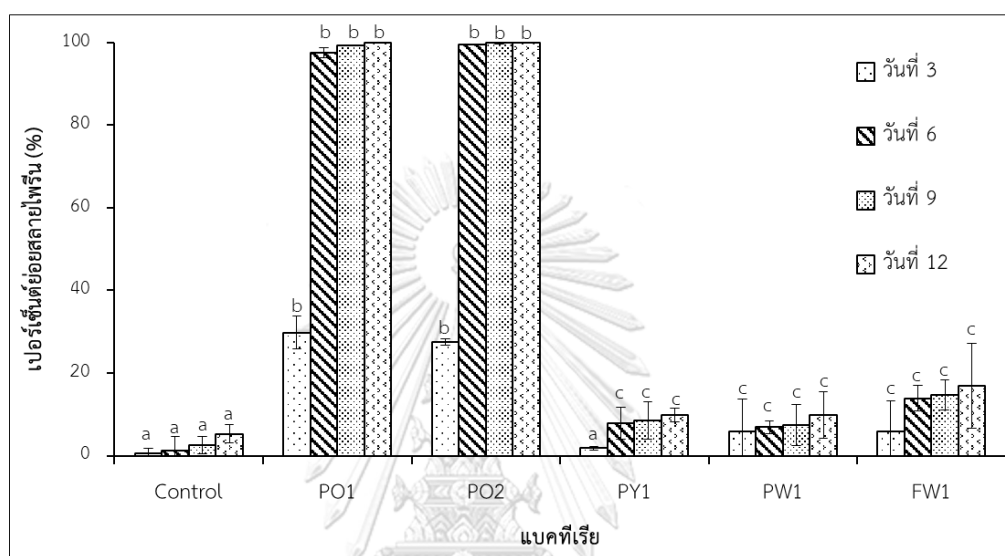
**รูปที่ 4.1** แผนภูมิต้นไม้แสดงความสัมพันธ์ของแบคทีเรียจากข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ บริเวณยีน 16S rRNA (การวิเคราะห์แบบ Neighbor-joining และ Bootstrap จำนวน 1,000 ครั้ง) (Laothamteep และคณะ, 2021)

#### 4.2 การสร้างกลุ่มแบคทีเรียย่อยสลายไฟรีน

##### 4.2.1 ประสิทธิภาพย่อยสลายไฟรีนและสารมัธยันต์ของแบคทีเรียเดี่ยว

การทดสอบประสิทธิภาพย่อยสลายไฟรีน ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรด้วยแบคทีเรียเดี่ยว ได้แก่ *Mycolicibacterium* spp. PO1 และ PO2, *Brucella intermedia* PW1, *Novosphingobium pentaromativorans* PY1 และ *Bacillus subtilis* FW1 พบว่าสายพันธุ์ PO1 และ PO2 สามารถย่อยสลายไฟรีนได้อย่างสมบูรณ์ในระยะเวลา 6 วัน ในขณะที่สายพันธุ์ PY1, PW1 และ FW1 มีความสามารถย่อยสลายไฟรีนได้ค่อนข้างต่ำ ดังแสดงในรูปที่ 4.2 เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพย่อยสลายไฟรีนของสายพันธุ์ PO1 และ PO2 กับงานวิจัยอื่นๆ เช่น งานวิจัยของ Wu และคณะ (2019) ศึกษาประสิทธิภาพย่อยสลายไฟรีน ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตรของ *Mycobacterium gilvum* CP13 พบว่ามีประสิทธิภาพย่อยสลายเท่ากับ 75 เปอร์เซ็นต์ ในระยะเวลา 14 วัน งานวิจัยของ (Zeng และคณะ, 2010) พบว่า *Mycobacterium* sp. NJS-P มี

ประสิทธิภาพย่อยสลายไพรีน ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตรเท่ากับ 92 เปอร์เซ็นต์ ในระยะเวลา 14 วัน และ *M. vanbaalenii* PYR-1 มีประสิทธิภาพย่อยสลายไพรีน ความเข้มข้น 25 ไมโครโมลาร์ ได้สมบูรณ์ ในระยะเวลา 24 ชั่วโมง จะเห็นได้ว่า *Mycolicibacterium* spp. PO1 และ PO2 ในงานวิจัยนี้มีประสิทธิภาพย่อยสลายไพรีนสูงกว่า นอกจากนี้ผลการทดลองได้สอดคล้องกับการวิเคราะห์จีโนมที่พบยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายไพรีนได้สมบูรณ์ในสายพันธุ์ PO1 และ PO2



**รูปที่ 4.2** ประสิทธิภาพของแบคทีเรียเดี่ยวในการย่อยสลายไพรีน ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 วัน ปริมาณหัวเชื้อแบคทีเรียเริ่มต้นประมาณ  $10^6$  CFU ต่อมิลลิลิตร (Wanapaisan และคณะ, 2018)

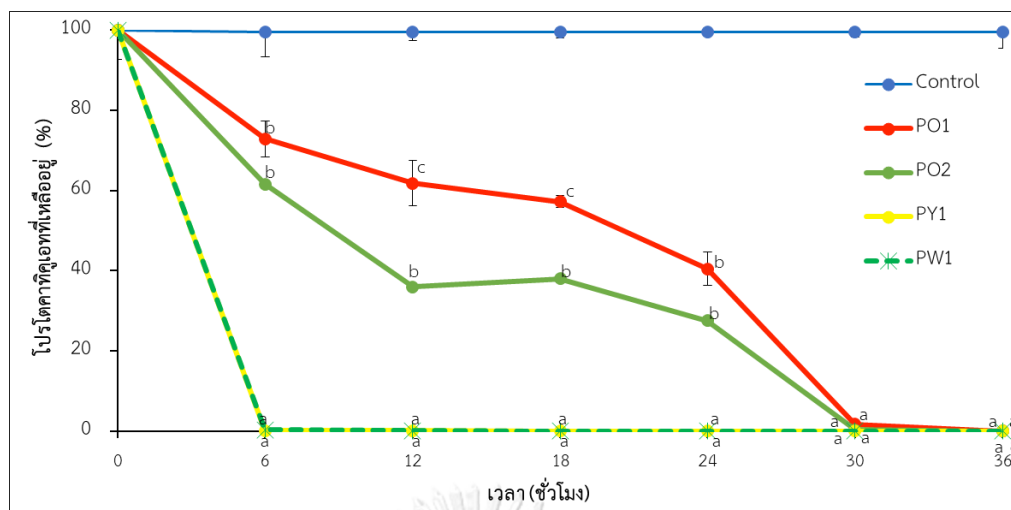
เพื่อพิสูจน์บทบาทของแบคทีเรียชนิดอื่นในการทำงานเสริมกันเพื่อย่อยสลายไพรีน จากข้อมูลการวิเคราะห์จีโนม จึงทดสอบความสามารถการย่อยสลาย PAHs ในวิถील่าง โดยผลการทดสอบการย่อยสลายสารมัยยนต์ได้แก่ พทาเลท และโปรโตคาทิกูเอท ความเข้มข้นชนิดละ 100 มิลลิกรัมต่อลิตรของแบคทีเรียเดี่ยวทั้ง 5 สายพันธุ์ พบว่าแบคทีเรียทุกสายพันธุ์สามารถย่อยสลายพทาเลทได้อย่างสมบูรณ์ในระยะเวลา 6 ชั่วโมง ดังแสดงในตารางที่ 4.1 ในขณะที่มีประสิทธิภาพการย่อยสลายโปรโตคาทิกูเอทแตกต่างกัน โดยสายพันธุ์ PY1 และ PW1 ใช้ระยะเวลา 6 ชั่วโมง และสายพันธุ์ PO1 และ PO2 ใช้ระยะเวลา 30 ชั่วโมงในการย่อยสลายโปรโตคาทิกูเอทได้อย่างสมบูรณ์ โดยไม่พบการย่อยสลายโปรโตคาทิกูเอทโดยสายพันธุ์ FW1 ภายในระยะเวลา 36 ชั่วโมง ดังแสดงในรูปที่ 4.3 ซึ่งผลการทดลองนี้สอดคล้องกับผลการวิเคราะห์จีโนมของสายพันธุ์ PY1 และ PW1 ที่พบยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายพทาเลทและโปรโตคาทิกูเอท ตามลำดับ อย่างไรก็ตามไม่พบยีนที่เกี่ยวข้อง

กับการย่อยสลายพหาลาในสายพันธุ์ PW1 เนื่องจากข้อจำกัดของข้อมูลวิธีการย่อยสลาย PAHs ใน *Brucella* จึงทำให้ยังไม่สามารถพบยีนที่เกี่ยวข้องจากจีโนมโดยวิธีชีวสารสนเทศ (bioinformatics) ได้

จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า แบคทีเรียแต่ละชนิดมีแนวโน้มในการทำงานร่วมกันแบบส่งเสริมกันในการย่อยสลายไพรีน ทำให้มีความน่าสนใจในการศึกษาการทำงานร่วมกันของแบคทีเรียแต่ละชนิดในรูปแบบกลุ่มแบคทีเรียในการย่อยสลายไพรีนต่อไป

**ตารางที่ 4.1** ประสิทธิภาพของแบคทีเรียเดี่ยวสายพันธุ์ PO1, PO2, PY1, PW1 และ FW1 ในการย่อยสลายพหาลา ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในระยะเวลา 6 ชั่วโมง ปริมาณหัวเชื้อแบคทีเรียเริ่มต้นประมาณ  $10^6$  CFU ต่อ มิลลิลิตร (Wanapaisan และคณะ, 2018)

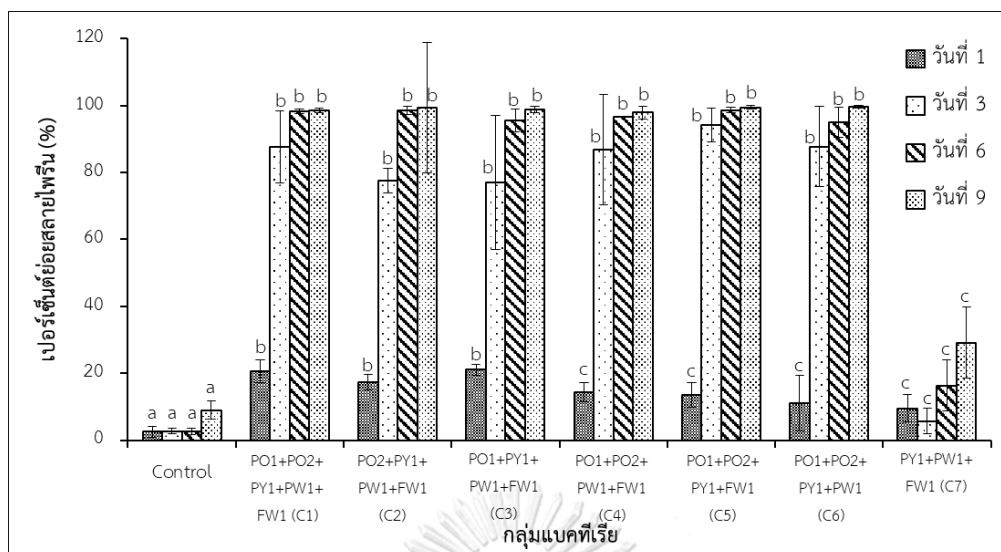
| สายพันธุ์แบคทีเรีย | เปอร์เซ็นต์ย่อยสลายพหาลา (%) |
|--------------------|------------------------------|
| PO1                | 99.25 <sup>a</sup> ± 0.22    |
| PO2                | 99.17 <sup>a</sup> ± 0.43    |
| PY1                | 99.56 <sup>a</sup> ± 0.07    |
| PW1                | 98.85 <sup>a</sup> ± 0.19    |
| FW1                | 98.09 <sup>a</sup> ± 0.67    |



**รูปที่ 4.3** ประสิทธิภาพของแบคทีเรียเดี่ยวสายพันธุ์ PO1, PO2, PY1 และ PW1 ในการย่อยสลาย พทาเลท ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในระยะเวลา 36 ชั่วโมง ปริมาณหัวเชื้อแบคทีเรียเริ่มต้นประมาณ  $10^6$  CFU ต่อมิลลิลิตร (Wanapaisan และคณะ, 2018)

#### 4.2.2 ประสิทธิภาพย่อยสลายไฟรินของกลุ่มแบคทีเรีย

ผลการทดสอบประสิทธิภาพย่อยสลายไฟรินความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตรของกลุ่มแบคทีเรีย C1-C7 ตามตารางที่ 3.3 พบว่ากลุ่มแบคทีเรียที่มี *Mycolicibacterium* sp. PO1 และ/หรือ PO2 (กลุ่มแบคทีเรีย C1-C6) สามารถย่อยสลายไฟรินได้ 76 ถึง 94 เปอร์เซ็นต์ในระยะเวลา 3 วัน และสามารถย่อยสลายไฟรินได้สูงกว่ากลุ่มแบคทีเรีย C7 ที่ไม่มี *Mycolicibacterium* ดังแสดงในรูปที่ 4.4 แสดงให้เห็นว่า *Mycolicibacterium* sp. มีบทบาทหลักในการย่อยสลายไฟริน นอกจากนี้กลุ่มแบคทีเรีย C1-C6 มีประสิทธิภาพย่อยสลายไฟรินได้ดีกว่าแบคทีเรียเดี่ยวสายพันธุ์ PO1 และ PO2 ในวันที่ 3 ของการทดลอง (เปรียบเทียบกับรูปที่ 4.2) แสดงให้เห็นว่า การมีอยู่ของแบคทีเรียสายพันธุ์ PY1, PW1 และ FW1 ช่วยส่งเสริมการย่อยสลายไฟรินให้ดียิ่งขึ้น โดยแบคทีเรียต่างชนิดกันอาจช่วยย่อยสลายสารตัวกลางที่ได้จากการย่อยสลายสารพิษตั้งต้นของแบคทีเรียสายพันธุ์อื่น และอาจสร้างสารลดแรงตึงผิวเพื่อช่วยละลายสารมลพิษ เพิ่มความสามารถในการเข้าถึงสารของแบคทีเรียหลัก (Gupta และคณะ, 2016)

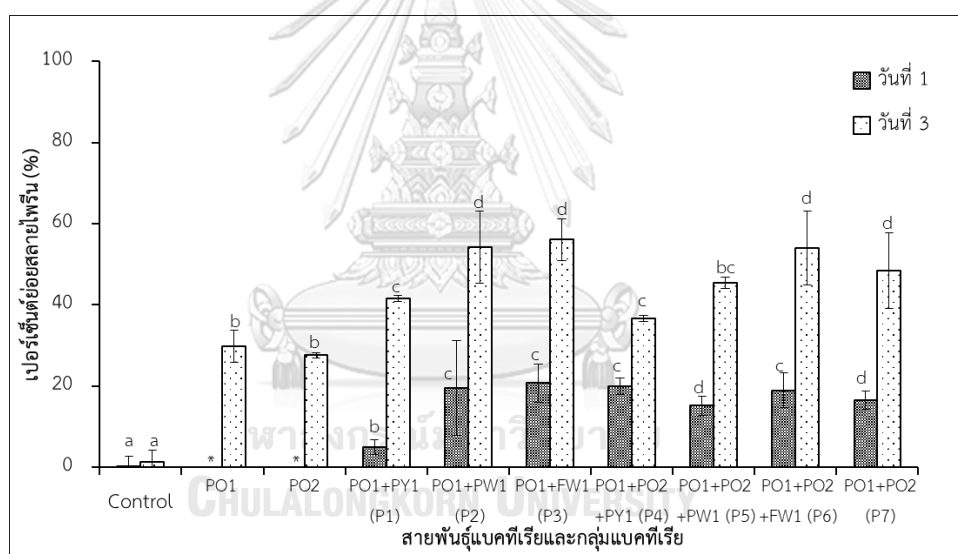


**รูปที่ 4.4** ประสิทธิภาพของกลุ่มแบคทีเรีย 4 หรือ 5 สายพันธุ์ในการย่อยสลายไพรีน ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 9 วัน ปริมาณหัวเชื้อแบคทีเรียเริ่มต้นประมาณ  $10^6$  CFU ต่อ มิลลิลิตร (Wanapaisan และคณะ, 2018)

เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่าง *Mycolicibacterium* spp. PO1 และ/หรือ PO2 กับบทบาทของแบคทีเรียสายพันธุ์อื่นในกลุ่มแบคทีเรีย และศึกษาความสำคัญของแบคทีเรียอื่นๆ ดังกล่าว จึงนำกลุ่มแบคทีเรียที่มี 2 ถึง 3 สายพันธุ์มาทดสอบประสิทธิภาพย่อยสลายไพรีนในระยะเวลา 3 วัน พบว่าทุกกลุ่มแบคทีเรีย (P1-P7) สามารถย่อยสลายไพรีนได้สูงกว่าแบคทีเรียเดี่ยว โดยสายพันธุ์ PO1 และ PO2 สามารถย่อยสลายไพรีนได้ 30 และ 28 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ในระยะเวลา 3 วัน ในขณะที่เมื่อมีแบคทีเรียสายพันธุ์ PY1, PW1 และ FW1 ร่วมกับสายพันธุ์ PO1 และ/หรือ PO2 สามารถช่วยเพิ่มประสิทธิภาพย่อยสลายไพรีนได้ดียิ่งขึ้น ดังแสดงในรูปที่ 4.5 ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับผลการวิเคราะห์จีโนมของสายพันธุ์ PY1 และ PW1 ที่พบยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลาย PAHs ในวิถีล่าง และพบยีนผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดลิโปเปปไทด์ในสายพันธุ์ FW1 ซึ่งคาดว่ามีส่วนช่วยเพิ่มการละลายและเพิ่มประสิทธิภาพย่อยสลายไพรีน

นอกจากนี้การมีอยู่ร่วมกันของสายพันธุ์ PO1 และ PO2 กับสายพันธุ์ PY1, PW1 และ FW1 ของกลุ่มแบคทีเรีย C1, C4, C5 และ C6 (รูปที่ 4.4) มีประสิทธิภาพย่อยสลายไพรีนได้ดีกว่ากลุ่มแบคทีเรียที่มีสายพันธุ์ PO1 หรือ PO2 ร่วมกับแบคทีเรียสายพันธุ์ PY1, PW1 หรือ FW1 (เพียง 1 ชนิด) ของกลุ่มแบคทีเรีย P1-P6 (รูปที่ 4.5) ดังนั้นการรวมกลุ่มของสายพันธุ์ PO1 และ PO2 กับสายพันธุ์อื่น (สายพันธุ์ PY1, PW1 และ FW1) ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพย่อยสลายไพรีนได้สูงที่สุด

จากผลการทดลองทั้งหมด แสดงให้เห็นว่า *Mycolicibacterium* เป็นแบคทีเรียที่ทำหน้าที่หลักในการย่อยสลายไฟรีนในกลุ่มแบคทีเรีย และพบว่าความสัมพันธ์ระหว่าง *Mycolicibacterium* spp. กับ แบคทีเรียอื่น ได้แก่ *Novosphingobium pentaromativorans* PY1 , *Brucella intermedia* PW1 และ *Bacillus subtilis* FW1 ซึ่งคาดว่าทำงานส่งเสริมกัน เนื่องจากประสิทธิภาพย่อยสลายไฟรีนที่เพิ่มมากขึ้น นอกจากนี้ยังพบว่า สารมัธยันต์ที่เกิดจากการย่อยสลายไฟรีนด้วย *Mycolicibacterium* ถูกย่อยสลายด้วยสายพันธุ์ PY1 และ PW1 ทั้งนี้จากผลการทดสอบการย่อยสลายไฟรีน พทาเลท และโปรโตคาทิกูเอท และผลการวิเคราะห์ยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายไฟรีนของแบคทีเรีย (Wanapaisan และคณะ, 2018) สามารถนำมาเขียนแผนภาพทำนายการย่อยสลายไฟรีนด้วยกลุ่มแบคทีเรีย โดยได้มีขั้นตอนการย่อยสลายไฟรีนของ *M. vanbaalenii* PYR-1 เป็นต้นแบบ (Kim และคณะ, 2007) ดังแสดงในรูปที่ 4.6

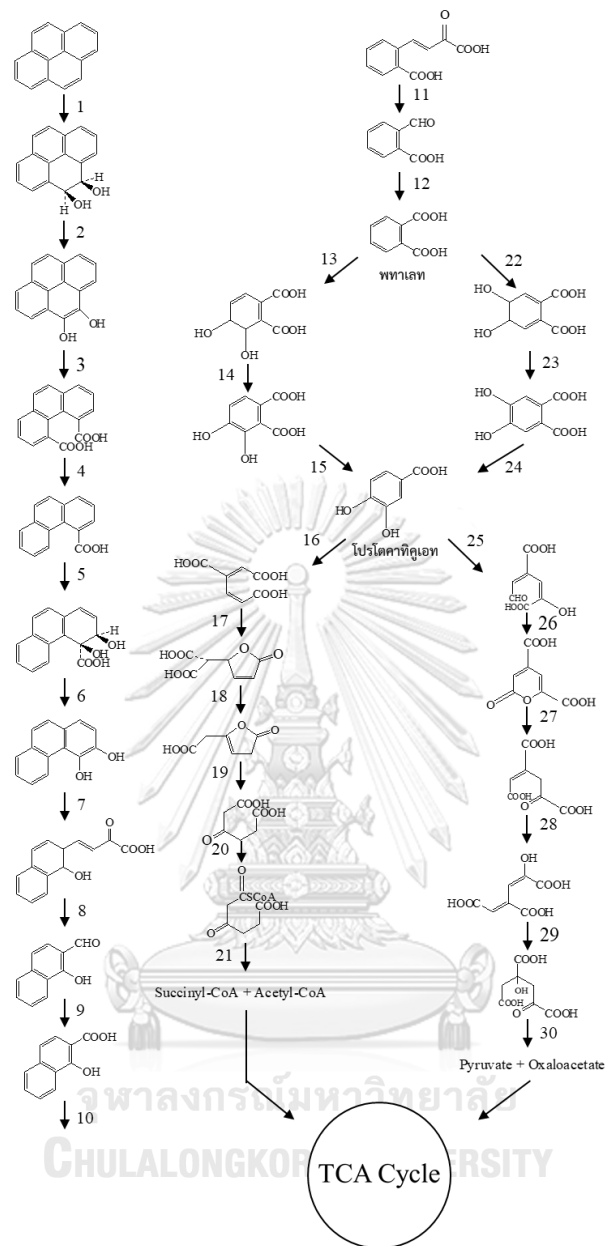


**รูปที่ 4.5** ประสิทธิภาพของแบคทีเรียสายพันธุ์เดี่ยว PO1 และ PO2 และกลุ่มแบคทีเรีย 2 หรือ 3 สายพันธุ์ในการย่อยสลายไฟรีน ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน ปริมาณหัวเชื้อแบคทีเรียเริ่มต้นประมาณ  $10^6$  CFU ต่อมิลลิลิตร (\*แบคทีเรียสายพันธุ์เดี่ยว PO1 และ PO2 ไม่ได้ทดสอบย่อยสลายไฟรีนในวันที่ 1) (Wanapaisan และคณะ, 2018)



โดยรูปที่ 4.6 แสดงขั้นตอนย่อยสลายไพรีนของแบคทีเรียชนิดต่างๆ ในกลุ่มแบคทีเรีย โดย *Mycobacterium* spp. PO1 และ PO2 ย่อยสลายไพรีนจนเข้าสู่ TCA cycle ตามขั้นตอนที่ 1-21 สำหรับ *Novosphingobium pentaromtivorans* PY1 ย่อยสลายพทาเลทผ่านวิถีเมตา (meta pathway) โดยเกิดการแตกวงของคาร์บอนตำแหน่งที่ 4 และ 5 ด้วยเอนไซม์ Phthalate 4,5-dioxygenase แล้วเข้าสู่ TCA cycle ต่อไป ตามขั้นตอนที่ 22-30 และ *Brucella intermedia* PW1 ย่อยสลายโปรโตคาทิกูเอทผ่านวิถีออร์โธ (ortho pathway) โดยเกิดการแตกวงที่ตำแหน่งคาร์บอนที่ 3 และ 4 ด้วยเอนไซม์โปรโตคาทิกูเอท 3,4-ไดออกซิจีเนส (protocatechuate 3,4-dioxygenase) และเข้าสู่ TCA cycle ต่อไป ตามขั้นตอนที่ 16-21 แม้ว่า *Bacillus subtilis* FW1 พบว่ามีประสิทธิภาพย่อยสลายพทาเลทได้ แต่ยังไม่สามารถทำนายวิธีการย่อยสลายได้เนื่องจากข้อจำกัดของข้อมูลวิธีการย่อยสลาย PAHs ใน *Bacillus* จึงทำให้ยังไม่สามารถพบยีนที่เกี่ยวข้องจากจีโนมโดยวิธีชีวสารสนเทศได้





รูปที่ 4.6 แผนภาพการย่อยสลายไพรีนด้วยกลุ่มแบคทีเรียประกอบด้วยสายพันธุ์ PO1, PO2, PY1, PW1 และ FW1 โดยสายพันธุ์ PO1 และ PO2 ย่อยสลายไพรีน ตามขั้นตอนที่ 1-21 สายพันธุ์ PY1 เริ่มต้นย่อยสลายพทาเลท ตามขั้นตอนที่ 22-30 และสายพันธุ์ PW1 เริ่มต้นย่อยสลายโปรโตคาทิกูเอท ตามขั้นตอนที่ 16-21 (Wanapaisan และคณะ, 2018)

ในงานวิจัยนี้ได้ใช้ข้อมูลจีโนมของแบคทีเรียที่คัดแยกได้ร่วมกับการนำแบคทีเรียที่มีบทบาทหลัก (key degrader) ในการย่อยสลาย ซึ่งถูกคัดแยกจากกลุ่มแบคทีเรียเดียวกันมาสร้างเป็นกลุ่มแบคทีเรีย โดยแบคทีเรียในกลุ่มแบคทีเรียจะมีการทำงานร่วมกันแบบส่งเสริมกัน ส่งผลให้ประสิทธิภาพย่อยสลายเพิ่มสูงขึ้น ในงานวิจัยก่อนหน้านี้ส่วนใหญ่เป็นการนำแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลาย และมีคุณสมบัติตามที่ต้องการนำมาสร้างเป็นกลุ่มแบคทีเรีย และนำไปทดสอบประสิทธิภาพย่อยสลายสารพิษ ตัวอย่างรายงานวิจัยของ Jasmine และ Mukherji (2015) นำแบคทีเรียเดี่ยวที่มีความสามารถย่อยสลายอัลเคนและ PAHs มาเตรียมเป็นกลุ่มแบคทีเรียที่ประกอบด้วย *Sphingomonas* sp. MSY ซึ่งย่อยสลายนอร์มัล-เฮกซะเดคเคน และไพรีน *Ochobacterium* sp. BSW ซึ่งย่อยสลายนอร์มัล-เฮกซะเดคเคน และ *Burkholderia multivorans* HN1 ซึ่งย่อยสลายแนพธาลีน และไพรีน พบว่าสามารถเพิ่มประสิทธิภาพย่อยสลายน้ำมันดิบความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ได้ 72 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่แบคทีเรียเดี่ยวสายพันธุ์ MSY, BSW และ HN1 ย่อยสลายได้ 10, 15 และ 18 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ในระยะเวลา 30 วัน และงานวิจัยของ Barin และคณะ (2014) ได้นำกลุ่มแบคทีเรียประกอบด้วย *Bacillus subtilis* TB1 ซึ่งสามารถย่อยสลายคีโรซีน *Pseudomonas aeruginosa* TB3, TB6 และ TB13 ซึ่งผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ และ *P. aeruginosa* TB10 ซึ่งก่ออิมัลชันได้ดี มาย่อยสลายน้ำมันดิบ ความเข้มข้น 8 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) พบว่าย่อยสลายได้ 83 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่แบคทีเรียเดี่ยวสายพันธุ์ TB1, TB3, TB6, TB10 และ TB13 ย่อยสลายได้ 58, 45, 55, 70 และ 50 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ในระยะเวลา 5 วัน

ในงานวิจัยของ Festa และคณะ (2017) ได้คัดแยกแบคทีเรีย *Sphingobium* sp. AM, *Enterobacter* sp. B, *Pseudomonas* sp. T, *Pseudomonas* sp. Bc และ *Inquilinus limosus* I จากกลุ่มแบคทีเรียเดียวกันที่มีประสิทธิภาพย่อยสลายพีแนนทริน จากนั้นนำแบคทีเรียทั้ง 5 สายพันธุ์มาสร้างเป็นกลุ่มแบคทีเรีย เรียกว่า กลุ่มแบคทีเรีย SC และเปรียบเทียบประสิทธิภาพย่อยสลายพีแนนทรินระหว่างกลุ่มแบคทีเรียดั้งเดิม (native consortium) และกลุ่มแบคทีเรีย SC พบว่ากลุ่มแบคทีเรีย SC สามารถย่อยสลายพีแนนทริน ความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตรได้ 99 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่กลุ่มแบคทีเรียดั้งเดิมนย่อยสลายได้ 34 เปอร์เซ็นต์ ในระยะเวลา 4 วัน คาดว่าแบคทีเรียในกลุ่มแบคทีเรียที่สร้างขึ้นจากแบคทีเรียเดี่ยวซึ่งถูกคัดแยกจากกลุ่มแบคทีเรียเดียวกัน น่าจะทำงานร่วมกันในรูปแบบส่งเสริมกัน ส่งผลให้มีประสิทธิภาพย่อยสลายเพิ่มสูงขึ้น

เมื่อพิจารณาการนำกลุ่มแบคทีเรียไปประยุกต์ใช้ในสิ่งแวดล้อม ปัจจัยหนึ่งที่ต้องคำนึงถึงคือแบคทีเรียที่เป็นเชื้อก่อโรค (pathogen) ที่อาจส่งผลกระทบต่อสิ่งมีชีวิตในสิ่งแวดล้อมนั้นๆ จากการนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของแบคทีเรียเดี่ยว 5 สายพันธุ์ไปเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยใช้โปรแกรม EZBioCloud พบว่า สายพันธุ์ PW1 มีความใกล้เคียงกับ *Brucella intermedia*

(ACQA01000003) (ชื่อเดิม *Ochrobactrum intermedium*) เท่ากับ 99.75 เปอร์เซ็นต์ (Teysier และคณะ, 2005) ซึ่งแบคทีเรียสปีชีส์นี้จัดเป็นเชื้อก่อโรคในบัญชีรายการเชื้อโรคที่ประสงค์ควบคุมตาม มาตรา 18 แห่งพระราชบัญญัติเชื้อโรคและพิษจากสัตว์ พ.ศ. 2561 (ราชกิจจานุเบกษา, 2561) ที่ก่อ โรคทั้งในคนและสัตว์ ดังนั้นสายพันธุ์ PW1 มีแนวโน้มเป็นเชื้อก่อโรคได้ จึงไม่ถูกคัดเลือกนำไปใช้ ทดสอบต่อไป

ในการทดลองเพื่อหาแนวทางการประยุกต์ใช้กลุ่มแบคทีเรียจึงจะใช้กลุ่มแบคทีเรียที่ ประกอบ ด้วย *Mycolicibacterium* sp. PO1 และ PO2, *Novosphingobium pentaromativorans* PY1 และ *Bacillus subtilis* FW1 และมีชื่อเรียกว่า กลุ่มแบคทีเรีย OPK

#### 4.3 การสร้างลดแรงดึงผิวชีวภาพ

จากข้อมูลจีโนมของสายพันธุ์ FW1 พบยีนประมวลรหัสการสร้างสารลดแรงดึงผิวชีวภาพ ชนิดลิโปเพปไทด์ (*sfp*, *srfA*, และ *srfA1-A3*) (Wanapaisan และคณะ, 2018) จึงได้ทดสอบ การสร้างสารลดแรงดึงผิวชีวภาพโดยใช้น้ำมันพืช ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) และไพริน ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน ผลการทดลองพบว่า กลุ่ม แบคทีเรียที่ประกอบด้วยสายพันธุ์ PO1, PO2, PY1 และ FW1 สามารถลดค่าแรงดึงผิวจาก 54.00 (ชุดควบคุม) เหลือ 42.91 และ 48.19 มิลลินิวตันต่อเมตรในอาหารเหลวที่มีน้ำมันพืชและไพริน ตามลำดับ (ตารางที่ 4.2) กลุ่มแบคทีเรียที่มีสายพันธุ์ FW1 สามารถลดค่าแรงดึงผิวได้ต่ำกว่ากลุ่ม แบคทีเรียที่ไม่มีสายพันธุ์ FW1 แสดงให้เห็นว่า สายพันธุ์ FW1 สามารถผลิตสารลดแรงดึงผิวชีวภาพ ได้ โดยสารลดแรงดึงผิวช่วยเพิ่มการละลาย PAHs ทำให้แบคทีเรียสามารถย่อยสลายได้เพิ่มมากขึ้น (Singh และคณะ, 2017)

**ตารางที่ 4.2** ค่าแรงดึงผิวของอาหารเหลว Productive medium ที่มีน้ำมันพืชและไพรินเป็น แหล่งคาร์บอน (Laothamteep และคณะ, 2021)

| แบคทีเรีย<br>หรือกลุ่มแบคทีเรีย | ค่าแรงดึงผิว (มิลลินิวตันต่อเมตร)                              |   |
|---------------------------------|--|---|
|                                 | น้ำมันพืช ความเข้มข้น 2<br>เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อ<br>ปริมาตร) | ไพริน ความเข้มข้น<br>100 มิลลิกรัมต่อลิตร |
| FW1                             | 41.15 ± 2.24   | 47.04 ± 0.84                              |
| PO1+PO2+PY1                     | 52.91 ± 0.43   | 57.42 ± 2.06                              |
| PO1+PO2+PY1+FW1                 | 42.91 ± 0.42   | 48.19 ± 1.46                              |

\*ชุดควบคุมคือ Productive medium มีค่าแรงดึงผิวเท่ากับ 54.00 ± 0.45 มิลลินิวตันต่อเมตร

#### 4.4 ปัจจัยที่ส่งผลต่อประสิทธิภาพย่อยสลายไพรีน

##### 4.4.1 ผลของปัจจัยต่างๆ ทางสิ่งแวดล้อมต่อประสิทธิภาพการย่อยสลายไพรีนของกลุ่มแบคทีเรีย OPK

การศึกษาแนวทางการประยุกต์ใช้กลุ่มแบคทีเรียในการบำบัดสิ่งแวดล้อม จำเป็นต้องทราบขอบเขตความสามารถการทำงานของกลุ่มแบคทีเรีย และผลของปัจจัยต่างๆ ทางสิ่งแวดล้อมต่อประสิทธิภาพการย่อยสลาย PAHs อีกด้วย การทดลองนี้จึงทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายไพรีนในสภาวะแปรผันต่างๆ ได้แก่ อุณหภูมิ ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) และการเติมโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) เพื่อใช้เป็นข้อมูลเบื้องต้นสำหรับการประยุกต์ใช้กลุ่มแบคทีเรียต่อไป

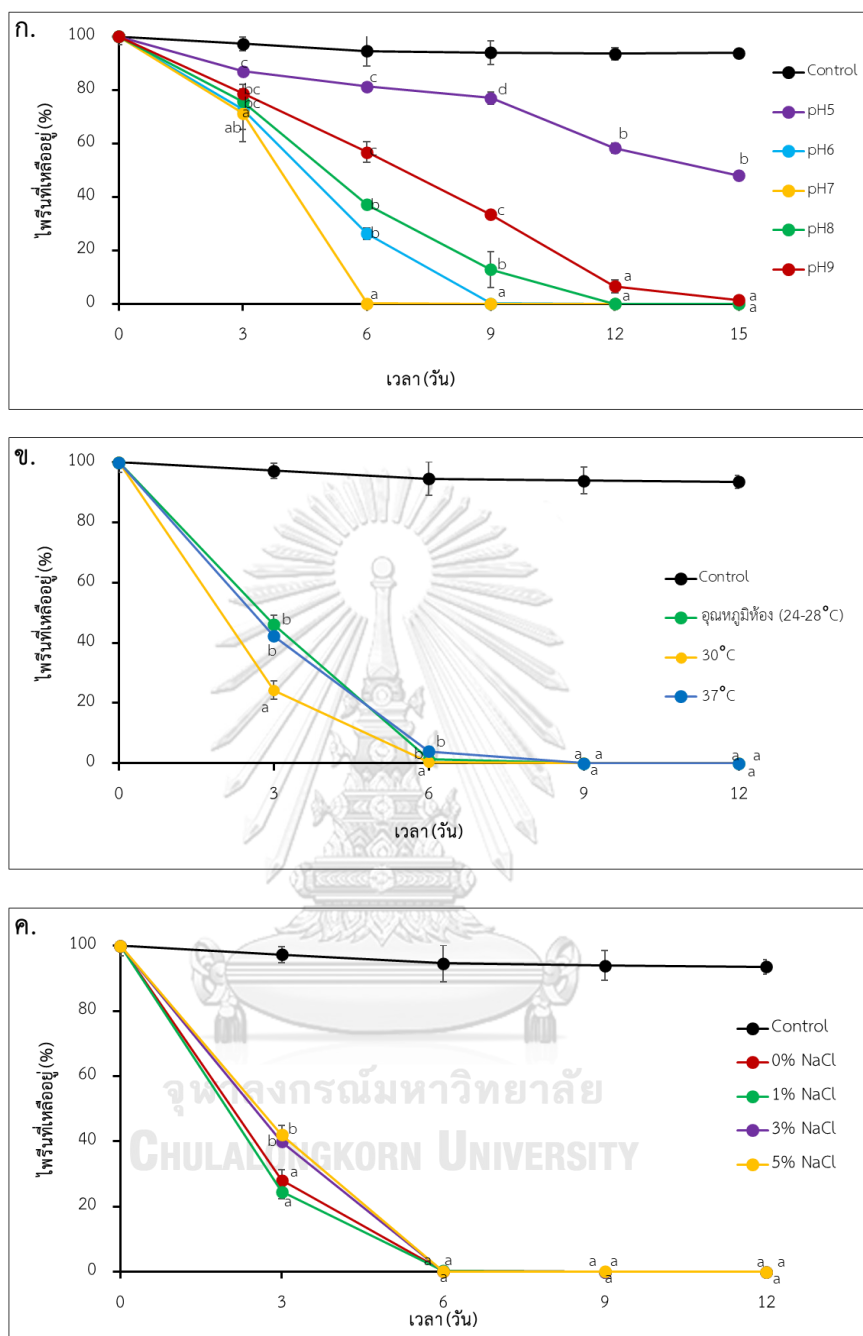
Wong และคณะ (2002) รายงานว่า ค่า pH มีผลต่อกิจกรรมของเอนไซม์และกระบวนการนำ PAHs เข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย ซึ่งส่งผลถึงประสิทธิภาพย่อยสลาย จากผลการทดลองพบว่ากลุ่มแบคทีเรีย OPK สามารถย่อยสลายไพรีนที่ pH 7.0 ได้ดีที่สุดด้วยอัตราการย่อยสลาย 16.65 เปอร์เซ็นต์ต่อวัน โดยสามารถย่อยสลายไพรีนได้อย่างสมบูรณ์ในระยะเวลา 6 วัน (รูปที่ 4.7 (ก)) และย่อยสลายไพรีนได้ช้าลงที่ pH 6.0 (อัตราการย่อยสลายเท่ากับ 11.11 เปอร์เซ็นต์ต่อวัน) ถึง 9.0 (อัตราการย่อยสลายเท่ากับ 6.57 เปอร์เซ็นต์ต่อวัน) ดังแสดงในรูปที่ 4.7 (ก) แบคทีเรียสายพันธุ์ PO1 และ PO2 สามารถเจริญได้ดี และสายพันธุ์ PY1 และ FW1 มีจำนวนแบคทีเรียเท่าเดิม ดังแสดงในรูปที่ 4.8 ในขณะที่ในอาหารเลี้ยงเชื้อมี pH 5.0 กลุ่มแบคทีเรีย OPK ย่อยสลายไพรีนได้เพียง 42.07 เปอร์เซ็นต์ ในระยะเวลา 15 วัน และสายพันธุ์ PY1 ไม่สามารถอยู่รอดได้ในสภาวะนี้ (รูปที่ 4.7 (ก) และ 4.8 (ก)) ทั้งนี้ผลการทดลองในงานวิจัยสอดคล้องกับงานวิจัยอื่นที่รายงานไว้ว่า แบคทีเรียย่อยสลาย PAHs ได้ดีที่มีค่า pH 7.0 (Ghosal และคณะ, 2016; Vaidya และคณะ, 2017)

จากผลของการแปรผันอุณหภูมิ ได้แก่ อุณหภูมิห้อง (24 ถึง 28 องศาเซลเซียส) 30 และ 37 องศาเซลเซียส พบว่ากลุ่มแบคทีเรีย OPK มีประสิทธิภาพย่อยสลายไพรีนได้อย่างสมบูรณ์ ในระยะเวลา 6 วัน กล่าวคือ ในช่วงอุณหภูมิ 24 ถึง 37 องศาเซลเซียสไม่ส่งผลกระทบต่อประสิทธิภาพย่อยสลายไพรีนของกลุ่มแบคทีเรีย ดังแสดงในรูปที่ 4.7 (ข) และแบคทีเรียสายพันธุ์ PO1 และ PO2 สามารถเจริญได้ดี และสายพันธุ์ PY1 และ FW1 มีจำนวนแบคทีเรียเท่าเดิม ดังแสดงในรูปที่ 4.9 โดยทั่วไปอุณหภูมิมีผลต่อการละลายของ PAHs โดยอุณหภูมิที่สูงขึ้น จะช่วยเพิ่มการละลายของ PAHs และเพิ่มการเข้าถึง PAHs ของแบคทีเรีย (Mohan และคณะ, 2006; Singh และคณะ, 2017) หากอุณหภูมิที่สูงมากเกินไป จะทำให้การละลายของออกซิเจนลดลง ส่งผลให้ลดกิจกรรมการย่อยสลายของแบคทีเรีย (Haritash และKaushik, 2009; Varjani และUpasani, 2017) อย่างไรก็ตาม ในช่วงอุณหภูมิ 24 ถึง 37 องศาเซลเซียส ซึ่งเป็นอุณหภูมิบริเวณเขตร้อน (tropical area) กลุ่มแบคทีเรียยังคงประสิทธิภาพการย่อยสลายได้ดี และมีประสิทธิภาพสูงกว่ากลุ่มแบคทีเรียจาก

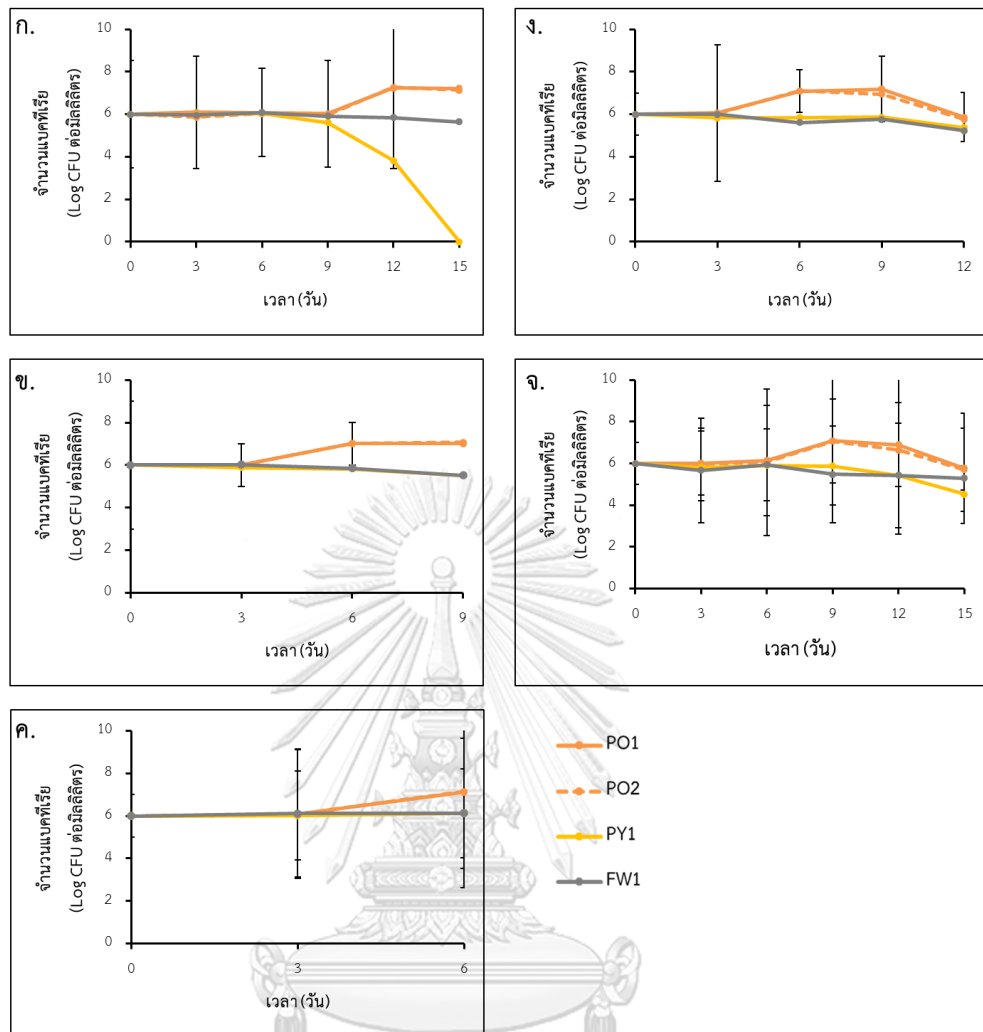
รายงานวิจัยอื่น เช่น กลุ่มแบคทีเรีย PBR ซึ่งประกอบด้วย *Pseudomonas* sp. ASDP1, *Burkholderia* sp. ASDP2 และ *Rhodococcus* sp. ASDP3 ที่สามารถย่อยสลายไพรีน ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่อุณหภูมิ 30 และ 37 องศาเซลเซียสได้ 80 และ 95 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ในระยะเวลา 7 วัน (Vaidya และคณะ, 2017)

จากผลของการแปรผันความเข้มข้น NaCl ตั้งแต่ 0 ถึง 5 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) พบว่า กลุ่มแบคทีเรีย OPK มีประสิทธิภาพย่อยสลายไพรีนได้อย่างสมบูรณ์ ในระยะเวลา 6 วัน (รูปที่ 4.7 (ค)) และแบคทีเรียสายพันธุ์ PO1 และ PO2 สามารถเจริญได้ดี และสายพันธุ์ PY1 และ FW1 มีจำนวนแบคทีเรียเท่าเดิม ดังแสดงในรูปที่ 4.10 ในสภาวะที่มีความเข้มข้น NaCl สูงถึง 5 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) หรือ 50 กรัมต่อลิตร ไม่ส่งผลกระทบต่อประสิทธิภาพย่อยสลายไพรีนของกลุ่มแบคทีเรีย OPK ถึงแม้ว่าแบคทีเรียในกลุ่มแบคทีเรีย OPK ถูกคัดแยกจากอาหารที่ไม่มีการเติม NaCl และมีความสามารถย่อยสลายไพรีนได้ดีกว่าแบคทีเรียที่ทนเค็ม *Ochrobactrum* sp. VA1 ซึ่งย่อยสลายไพรีน ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่มีการเติม NaCl 30 กรัมต่อลิตรได้ 32 เปอร์เซ็นต์ ในระยะเวลา 5 วัน (Arulazhagan และ Vasudevan, 2011)

จากผลการทดลองทั้งหมดแสดงให้เห็นว่า กลุ่มแบคทีเรีย OPK มีประสิทธิภาพย่อยสลายไพรีนได้ดีภายใต้สภาวะแวดล้อมที่แปรผัน ได้แก่ ค่า pH อุณหภูมิ และการเติม NaCl จึงมีความน่าสนใจในการนำกลุ่มแบคทีเรียไปประยุกต์ใช้ในการบำบัดสิ่งแวดล้อมปนเปื้อน PAHs ทั้งในน้ำจืดและน้ำทะเล

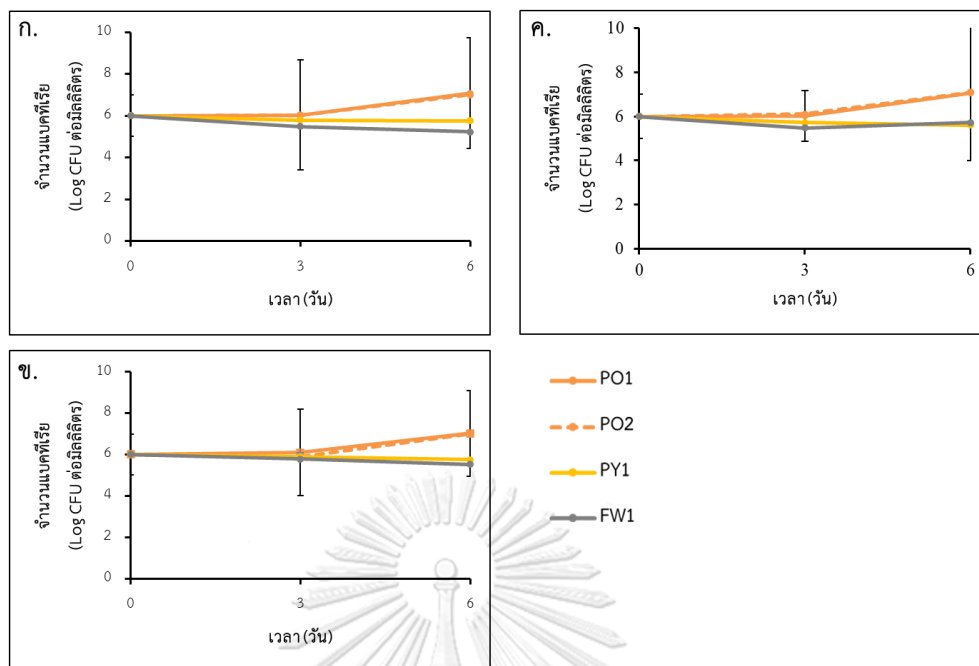


รูปที่ 4.7 ประสิทธิภาพย่อยสลายของกลุ่มแบคทีเรีย OPK ในการย่อยสลายไพริน ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ในสภาวะแปรผันค่า pH (ก), อุณหภูมิ (ข) และการเติม NaCl (ค) ปริมาณหัวเชื้อแบคทีเรียเริ่มต้นประมาณ  $10^6$  CFU ต่อมิลลิลิตร (Laothamteep และคณะ, 2021)

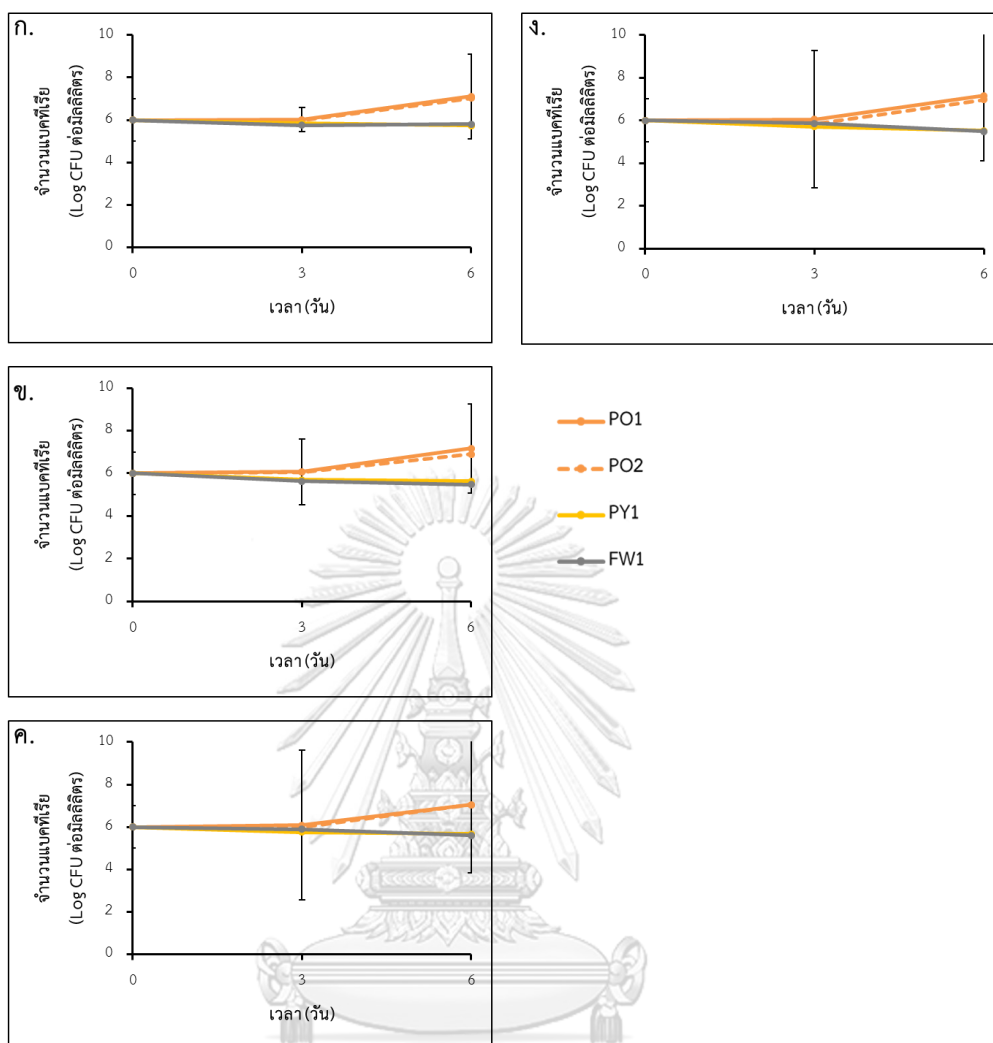


รูปที่ 4.8 จำนวนแบคทีเรียในกลุ่มแบคทีเรียภายใต้สภาวะการแปรผันค่า pH เท่ากับ 5.0 (ก), 6.0 (ข), 7.0 (ค), 8.0 (ง) และ 9.0 (จ) ปริมาณหัวเชื้อแบคทีเรียเริ่มต้นประมาณ  $10^6$  CFU ต่อมิลลิลิตร (Laothamteep และคณะ, 2021)





รูปที่ 4.9 จำนวนแบคทีเรียในกลุ่มแบคทีเรีย OPK ภายใต้สภาวะการแปรผันอุณหภูมิห้อง (24 ถึง 28 องศาเซลเซียส) (ก), 30 (ข) และ 37 องศาเซลเซียส (ค) ปริมาณหัวเชื้อแบคทีเรียเริ่มต้นประมาณ  $10^6$  CFU ต่อ มิลลิตร (Laothamteep และคณะ, 2021)



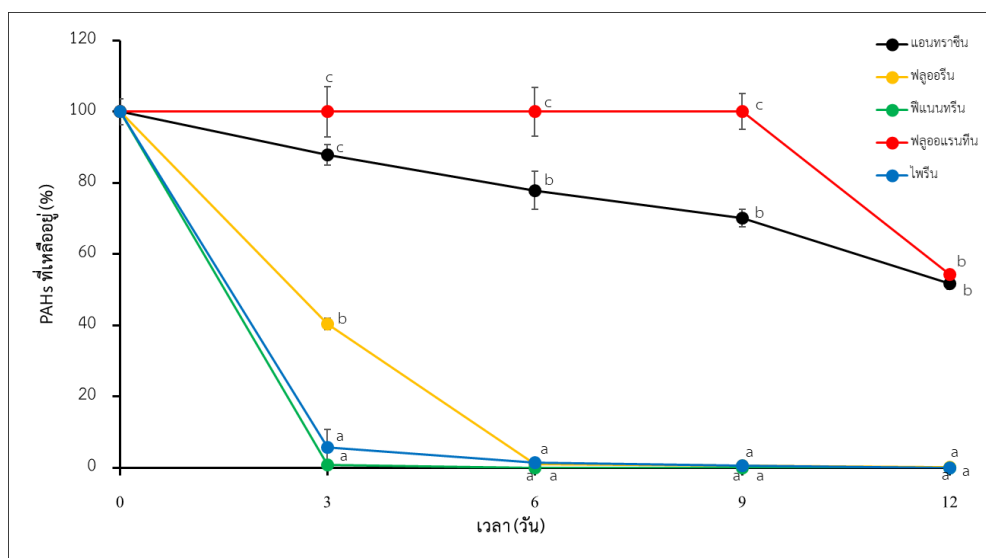
รูปที่ 4.10 จำนวนแบคทีเรียในกลุ่มแบคทีเรีย OPK ภายใต้สภาวะการเติม NaCl 0 (ก), 1 (ข), 3 (ค) และ 5 (ง) เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร)

ปริมาณหัวเชื้อแบคทีเรียเริ่มต้นประมาณ  $10^6$  CFU ต่อ มิลลิเมตร (Laothamteep และคณะ, 2021)

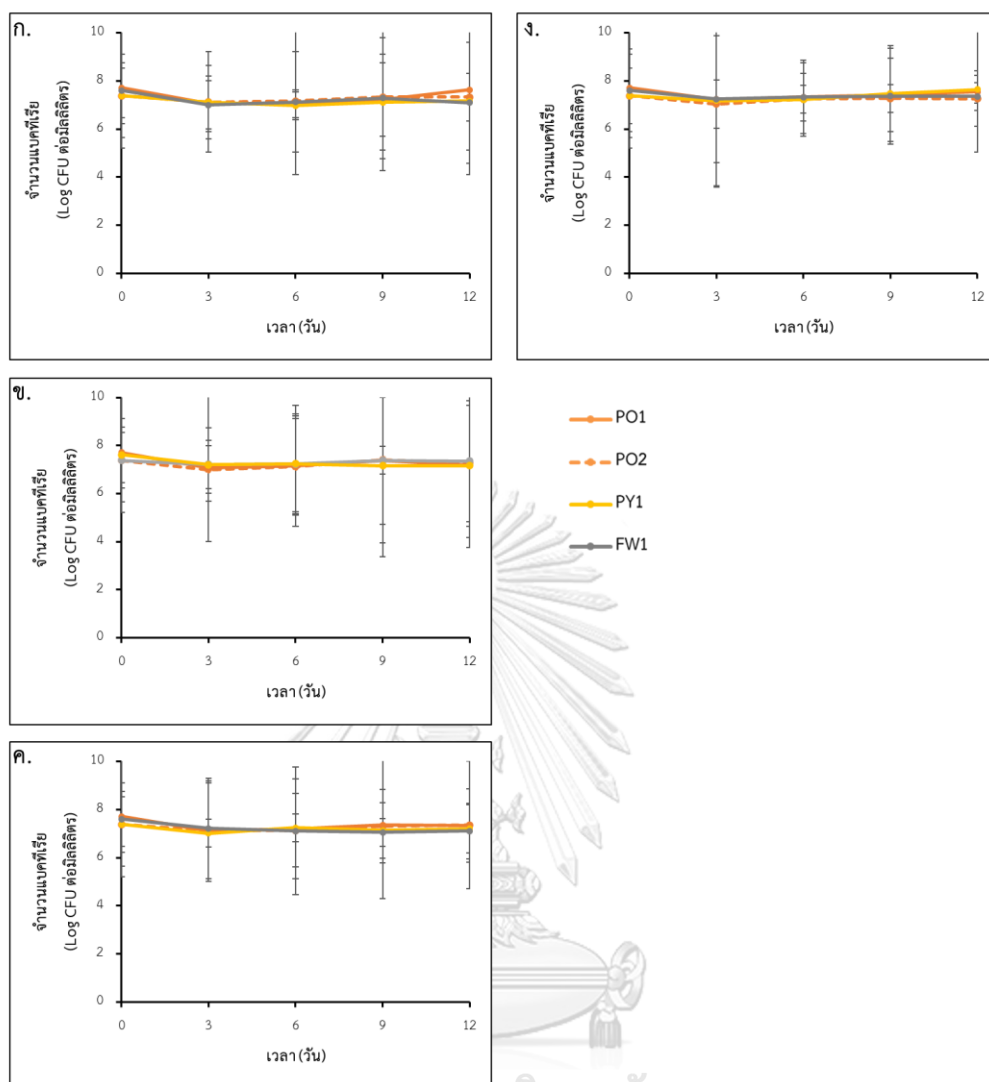
#### 4.4.2 ประสิทธิภาพย่อยสลาย PAHs ชนิดต่างๆ ของกลุ่มแบคทีเรีย OPK

รายงานวิจัยของ Wattayakorn (2012) พบว่าบริเวณปากแม่น้ำมักมีการปนเปื้อนของ แอนทราซีน ฟลูออรีน พีแนนทรีน ไพรีน และฟลูออแรนทีนเป็นหลัก ดังนั้นจึงทดสอบประสิทธิภาพย่อยสลาย PAHs มวลโมเลกุลต่ำได้แก่ แอนทราซีน, ฟลูออรีน และพีแนนทรีน และ PAHs มวลโมเลกุลสูงได้แก่ ฟลูออแรนทีน ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ผลการทดลองพบว่า กลุ่มแบคทีเรีย OPK สามารถย่อยสลายพีแนนทรีนและฟลูออรีนได้อย่างสมบูรณ์ในระยะเวลา 3 และ 6 วันตามลำดับ และย่อยสลายแอนทราซีนและฟลูออแรนทีนได้ 48.2 และ 45.8 เปอร์เซ็นต์

ตามลำดับในระยะเวลา 12 วัน ดังแสดงในรูปที่ 4.11 และแบคทีเรียในกลุ่มแบคทีเรียสามารถอยู่รอดได้ โดยมีจำนวนแบคทีเรียเท่าเดิม ดังแสดงในรูปที่ 4.12 โดยทั่วไป PAHs มวลโมเลกุลสูง เช่น ฟลูออแรนทีน มีความไม่ชอบน้ำสูง ทำให้เกิดการย่อยสลายได้ต่ำกว่า PAHs มวลโมเลกุลต่ำ (แอนทราซีน ฟิแนนทรีน และฟลูออรีน) อย่างไรก็ตาม PAHs มวลโมเลกุลต่ำ เช่น แอนทราซีน มีโครงสร้างเป็นวงอะโรมาติก 3 วงที่ต่อกันเป็นโซ่ตรง (linear structure) ทำให้เกิดการย่อยสลายได้ต่ำกว่าฟิแนนทรีนและฟลูออรีน (Jiang และคณะ, 2018)



รูปที่ 4.11 ประสิทธิภาพการย่อยสลายของกลุ่มแบคทีเรีย OPK ในการย่อยสลาย PAHs ในรูปแบบสารเดี่ยว ได้แก่ แอนทราซีน, ฟลูออรีน, ฟิแนนทรีน และ ฟลูออแรนทีน ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 วัน ปริมาณหัวเชื้อแบคทีเรียเริ่มต้นประมาณ  $10^7$  CFU ต่อมิลลิลิตร (Laothamteep และคณะ, 2021)



รูปที่ 4.12 จำนวนแบคทีเรียในกลุ่มแบคทีเรีย OPK ในการย่อยสลาย PAHs ในรูปแบบสารเดี่ยว ได้แก่ แอนทราซีน (ก) ฟลูออรีน (ข) ฟีนแอนทรีน (ค) และฟลูออแรนทีน (ง) ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 วัน ปริมาณหัวเชื้อแบคทีเรียเริ่มต้นประมาณ  $10^7$  CFU ต่อมิลลิลิตร (Laothamteep และคณะ, 2021)

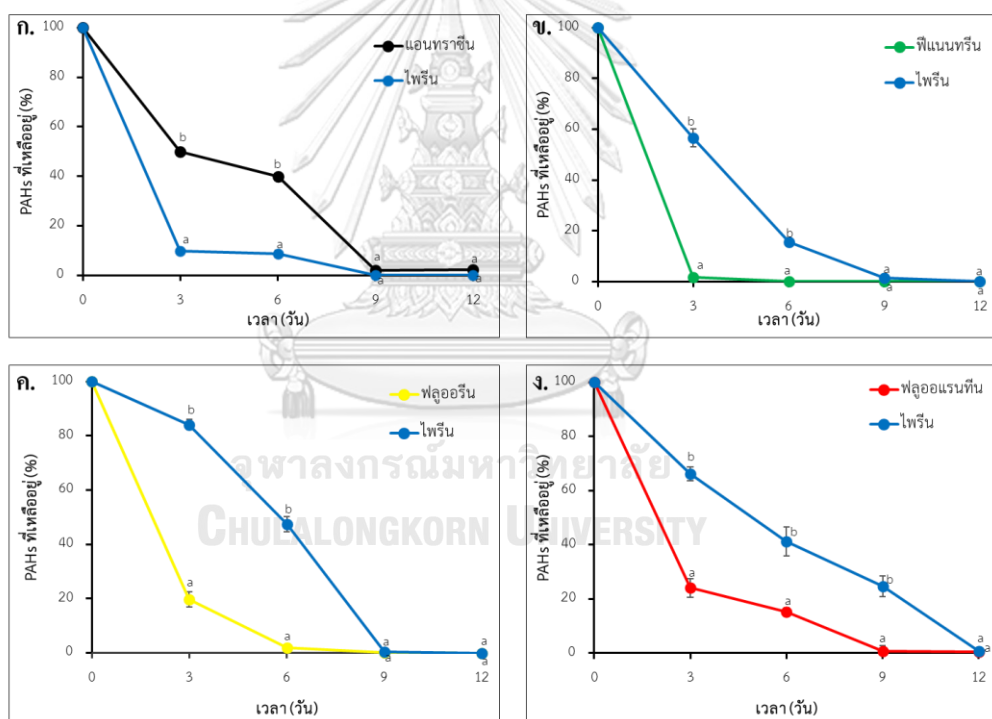
#### 4.4.3 ประสิทธิภาพย่อยสลาย PAHs ในรูปแบบสารค้ำผสมของกลุ่มแบคทีเรีย OPK

ในสิ่งแวดล้อมมักพบการปนเปื้อนของ PAHs ในลักษณะสารผสมหลากหลายชนิด (Alegbeleye และคณะ, 2017) การทดลองนี้จึงทดสอบประสิทธิภาพของกลุ่มแบคทีเรีย OPK ในการย่อยสลาย PAHs ในรูปแบบสารค้ำผสม โดยการผสมไพรีนกับ PAHs ชนิดต่างๆ ได้แก่ แอนทราซีน ฟิแนนทรีน ฟลูออรีน และฟลูออแรนทีน ความเข้มข้นชนิดละ 50 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อเข้าใจกลไกการย่อยสลายของ PAHs ในรูปแบบสารผสม ผลการทดลองพบว่าในสภาวะที่มีสารค้ำผสม PAHs กับไพรีน กลุ่มแบคทีเรีย OPK สามารถย่อยสลายแอนทราซีน ฟิแนนทรีน และฟลูออรีนได้อย่างสมบูรณ์ในระยะเวลา 9, 3 และ 6 วันตามลำดับ และย่อยสลายไพรีนได้อย่างสมบูรณ์ในระยะเวลา 9 วัน ดังแสดงในรูปที่ 4.13 (ก ถึง ค) แสดงให้เห็นว่า การเติม PAHs ชนิดอื่นมีผลกระทบต่อประสิทธิภาพย่อยสลายไพรีน โดยทำให้ไพรีนถูกย่อยสลายได้ช้าลง ในขณะที่ไพรีนในรูปแบบสารเดี่ยวถูกสามารถย่อยสลายได้อย่างสมบูรณ์ในระยะเวลา 6 วัน (รูปที่ 4.11) และแบคทีเรียในกลุ่มแบคทีเรียสามารถอยู่รอด โดยมีจำนวนแบคทีเรียเท่าเดิม ดังแสดงในรูปที่ 4.14

เปรียบเทียบประสิทธิภาพย่อยสลายของแอนทราซีนและฟลูออแรนทีนในรูปแบบสารเดี่ยว (รูปที่ 4.11) และแอนทราซีนหรือฟลูออแรนทีนที่มีไพรีนในรูปแบบสารค้ำผสม พบว่าการมีอยู่ของไพรีน ช่วยส่งเสริมประสิทธิภาพย่อยสลายแอนทราซีนและฟลูออแรนทีน (รูปที่ 4.13 (ก) และ (ง)) โดยผลการทดสอบประสิทธิภาพย่อยสลายของแอนทราซีนและไพรีนในรูปแบบสารค้ำผสมในการทดลองนี้ให้ผลแตกต่างจากงานวิจัยของ Somtrakoon และคณะ (2008) ศึกษาประสิทธิภาพย่อยสลายแอนทราซีนในรูปแบบสารเดี่ยว และในรูปแบบสารผสมร่วมกับไพรีนด้วย *Burkholderia* sp. VUN10013 พบว่าแอนทราซีนในรูปแบบสารเดี่ยวถูกย่อยสลาย 93 เปอร์เซ็นต์ ในระยะเวลา 6 วัน ในขณะที่แอนทราซีนในรูปแบบสารค้ำผสมถูกย่อยสลาย 53 เปอร์เซ็นต์ ในระยะเวลา 21 วัน จะเห็นได้ว่า ประสิทธิภาพย่อยสลายแอนทราซีนลดลง เมื่อมีการเติมไพรีนร่วมด้วย แต่ในงานวิจัยนี้ ประสิทธิภาพย่อยสลายแอนทราซีนเพิ่มขึ้น เมื่อมีการเติมไพรีนร่วมด้วย อย่างไรก็ตามในงานวิจัยนี้ไม่ได้ศึกษาการส่งเสริมการย่อยสลายแอนทราซีนที่มีไพรีนในรูปแบบสารค้ำผสม

ในชุดทดลองสารค้ำผสมฟลูออแรนทีนร่วมกับไพรีน พบว่าไพรีนช่วยส่งเสริมประสิทธิภาพย่อยสลายของฟลูออแรนทีน โดยฟลูออแรนทีนในรูปแบบสารค้ำผสมถูกย่อยสลายได้อย่างสมบูรณ์ในระยะเวลา 9 วัน (รูปที่ 4.13 (ง)) ในขณะที่ฟลูออแรนทีนในรูปแบบสารเดี่ยวถูกย่อยสลาย 45.80 เปอร์เซ็นต์ ในระยะเวลา 12 วัน (รูปที่ 4.11) และไพรีนในรูปแบบสารค้ำผสมถูกการย่อยสลายได้ช้าลง โดยไพรีนถูกย่อยสลายได้หมดในระยะเวลา 12 วัน (รูปที่ 4.13 (ง)) ในขณะที่ไพรีนในรูปแบบสารเดี่ยวถูกสามารถย่อยสลายได้อย่างสมบูรณ์ในระยะเวลา 6 วัน (รูปที่ 4.11) งานวิจัยของ Dean-Ross และคณะ (2002) ศึกษาจลนศาสตร์ (kinetic) และประสิทธิภาพย่อยสลายฟลูออแรนทีนและไพรีนในรูปแบบสารค้ำผสมด้วย *Mycobacterium favesces* พบว่าไพรีนช่วยส่งเสริมประสิทธิภาพ

ย่อยสลายฟลูออแรนทีน และพบ 9-ฟลูออรีโนน-1-คาร์บอกซิลิก แอซิด (9-fluorenone-1-carboxylic acid) ซึ่งเป็นสารมัธยันต์ที่เกิดขึ้นระหว่างการย่อยสลายฟลูออแรนทีน แต่ทั้งนี้ยังไม่ทราบกลไกการทำงานของแบคทีเรียที่เรียต่อ PAHs ในรูปแบบสารค้ำผสม จึงเป็นที่น่าสนใจในการศึกษากลไกการตอบสนองของแบคทีเรียที่เรียต่อ PAHs ในรูปแบบสารค้ำผสม เพื่อนำมาใช้เป็นข้อมูลเบื้องต้นสำหรับต่อยอดในการนำกลุ่มแบคทีเรียไปประยุกต์ใช้ในการบำบัดทางชีวภาพต่อไป ดังนั้นจึงได้คัดเลือกสารค้ำผสมระหว่างไพรีนและฟลูออแรนทีน ซึ่งเป็น PAHs โมลโมเลกุลสูงทั้งคู่ นำไปศึกษากลไกการตอบสนองของกลุ่มแบคทีเรีย OPK ระหว่างการย่อยสลาย PAHs ในรูปแบบสารค้ำผสมด้วยการวิเคราะห์ทรานส์คริปโตมิกส์ โดยไพรีนและฟลูออแรนทีนมักถูกพบปนเปื้อนอย่างแพร่หลายในสิ่งแวดล้อม เช่น ในดิน ดินตะกอน แหล่งน้ำจืด และในทะเล และตกค้างในสิ่งแวดล้อมเป็นเวลานาน (Sinaei และ Mashinchian, 2014)



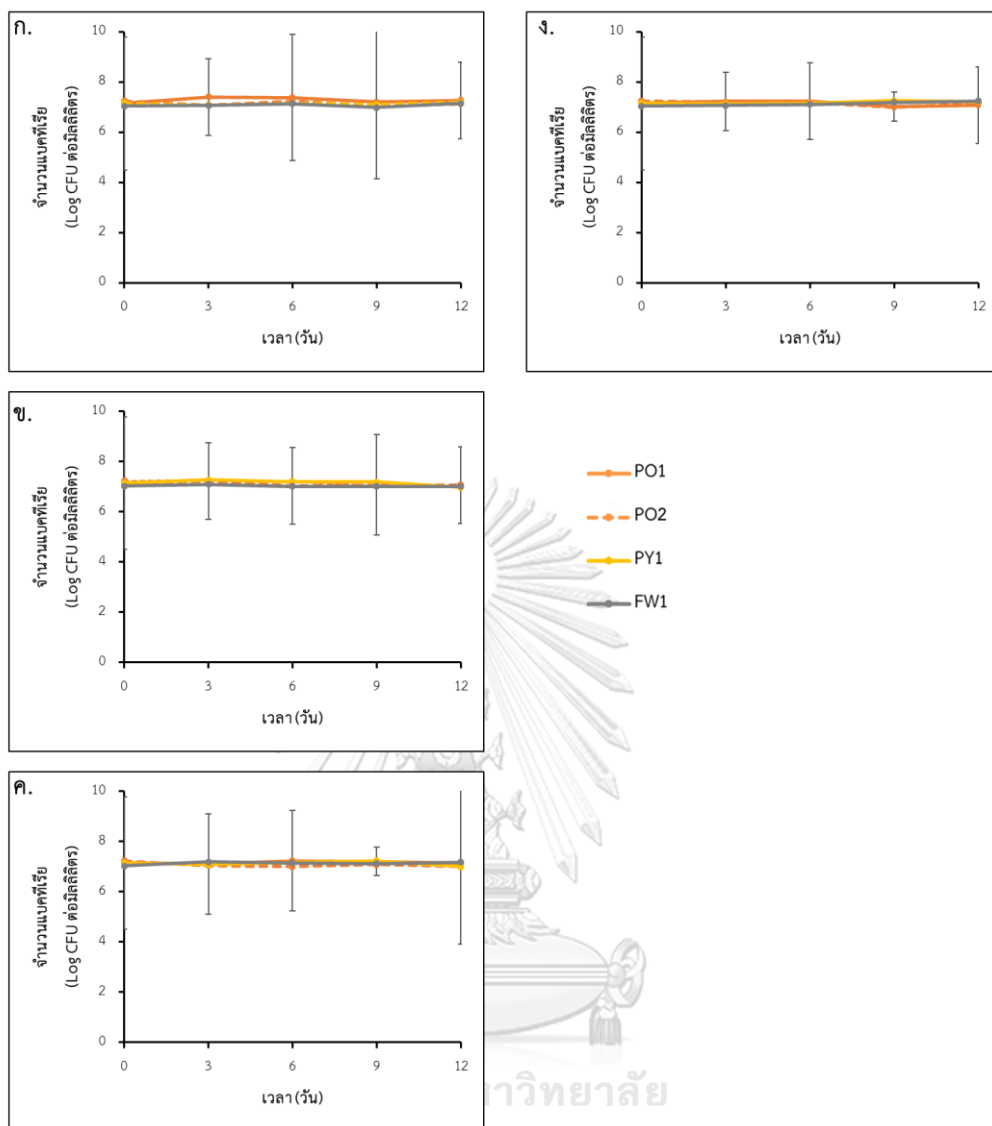
รูปที่ 4.13 ประสิทธิภาพการย่อยสลายของกลุ่มแบคทีเรีย OPK ในการย่อยสลาย PAHs

ในรูปแบบสารค้ำผสม ได้แก่ ไพรีนและแอนทราซิน (ก) ไพรีนและฟิแนนทีน (ข)

ไพรีนและฟลูออรีน (ค) และไพรีนและฟลูออแรนทีน (ง) ความเข้มข้นชนิดละ 50 มิลลิกรัมต่อลิตร

ความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 วัน

ปริมาณหัวเชื้อแบคทีเรียเริ่มต้นประมาณ  $10^7$  CFU ต่อมิลลิลิตร (Laothamteep และคณะ, 2021)

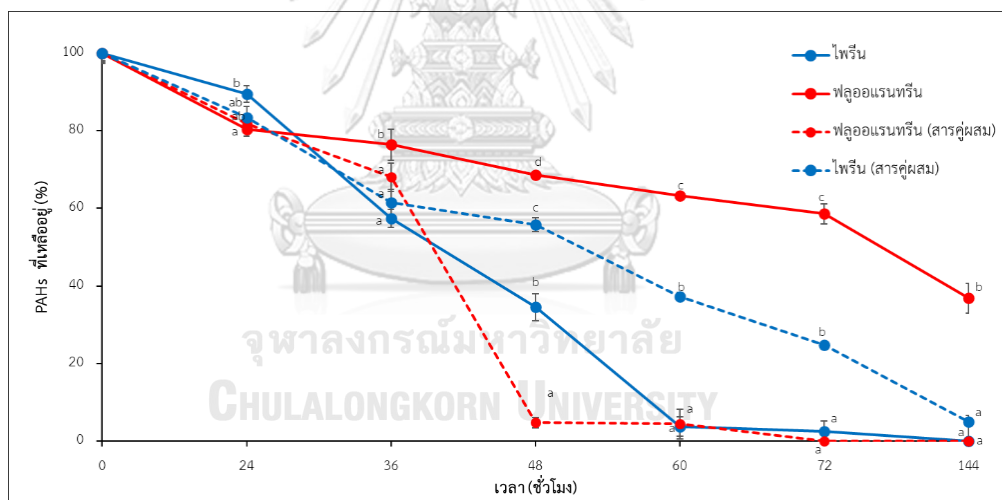


รูปที่ 4.14 จำนวนแบคทีเรียในกลุ่มแบคทีเรีย OPK ในการย่อยสลาย PAHs ในรูปแบบสารคู่ผสม ได้แก่ ไพรีนและแอนทราซีน (ก) ไพรีนและฟิแนนทรีน (ข) ไพรีนและฟลูออรีน (ค) และไพรีนและฟลูออแรนทีน (ง) ความเข้มข้นชนิดละ 50 มิลลิกรัมต่อลิตร ความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 วัน ปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้นประมาณ  $10^7$  CFU ต่อมิลลิลิตร (Laothamteep และคณะ, 2021)

#### 4.4.4 กลไกการตอบสนองของกลุ่มแบคทีเรีย OPK ระหว่างการย่อยสลายไพรีนและฟลูออแรนทีนในรูปแบบสารคู่ผสม

##### 4.4.4.1 ประสิทธิภาพย่อยสลายไพรีนและฟลูออแรนทีนในรูปแบบสารคู่ผสมด้วยกลุ่มแบคทีเรีย OPK

ทดสอบประสิทธิภาพย่อยสลายไพรีนและฟลูออแรนทีนในรูปแบบสารคู่ผสมด้วยกลุ่มแบคทีเรีย OPK เพื่อหาระยะเวลาที่เหมาะสมในการสกัด RNA (รูปที่ 4.15) ผลการทดลองพบว่ากลุ่มแบคทีเรีย OPK ย่อยสลายไพรีนในรูปแบบสารเดี่ยวได้เกือบสมบูรณ์ในระยะเวลา 60 ชั่วโมง ในขณะที่ไพรีนในรูปแบบสารคู่ผสมเกิดความล่าช้าในการย่อยสลาย ดังแสดงในรูปที่ 4.15 นอกจากนี้กลุ่มแบคทีเรียสามารถย่อยสลายฟลูออแรนทีนในรูปแบบสารเดี่ยวได้ 63.17 เปอร์เซ็นต์ ในระยะเวลา 144 ชั่วโมง แต่ย่อยสลายฟลูออแรนทีนในรูปแบบสารคู่ผสมได้อย่างสมบูรณ์ ในระยะเวลา 48 ชั่วโมง (รูปที่ 4.15) แสดงให้เห็นว่า ไพรีนสามารถส่งเสริมการย่อยสลายฟลูออแรนทีนได้ ดังนั้นจึงได้คัดเลือกระยะเวลา 48 ชั่วโมง สำหรับการสกัด RNA เพื่อนำไปวิเคราะห์ทรานสคริปโตมิกส์



**รูปที่ 4.15** ประสิทธิภาพย่อยสลายของกลุ่มแบคทีเรีย OPK ในการย่อยสลายไพรีนและฟลูออแรนทีนในรูปแบบสารเดี่ยว ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร และในรูปแบบสารคู่ผสม ความเข้มข้นชนิดละ 50 มิลลิกรัมต่อลิตร ความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 144 ชั่วโมง ปริมาณหัวเชื้อแบคทีเรียเริ่มต้นประมาณ  $10^7$  CFU ต่อมิลลิลิตร (Laothamteep และคณะ, 2021)



#### 4.4.4.2 กลไกการตอบสนองของกลุ่มแบคทีเรีย OPK ระหว่างการย่อยสลายไพรีนและฟลูออแรนทีนในรูปแบบสารคู่ผสม

ข้อมูลการแสดงออกของยีน (raw RNA-Seq reads) จากชุดการทดลองที่มีไพรีนและฟลูออแรนทีนในรูปแบบสารคู่ผสม จำนวน 2 ซ้ำ และชุดการทดลองที่มีฟลูออแรนทีนเพียงชนิดเดียว จำนวน 2 ซ้ำ มาวิเคราะห์ยีนทั้งหมดที่เกิดการแสดงออกโดยเปรียบเทียบกับข้อมูลจีโนมของแบคทีเรียแต่ละชนิดในกลุ่มแบคทีเรีย OPK (Wanapaisan และคณะ, 2018) และคำนวณระดับการแสดงออกของยีนโดยกำหนดในเทอมของค่า RPKM จากนั้นเปรียบเทียบระดับการแสดงออกของยีนระหว่างชุดทดลองที่มี PAHs ต่างกันด้วยโปรแกรม R โดยกำหนดยีนที่มีการแสดงออกแตกต่างกันระหว่างชุดการทดลองมากกว่าหรือน้อยกว่า 2 เท่า (up- และ down-regulated genes) เป็น Differentially Expressed Genes (DEGs) และระบุกลุ่มการทำงานของยีนโดยการเปรียบเทียบกับข้อมูลในฐานข้อมูล COG (ตารางที่ 4.3) พบว่าสายพันธุ์ PO1 มี DEGs 270 ยีน (175 ยีนเป็น upregulated genes และ 95 ยีนเป็น downregulated genes) สายพันธุ์ PO2 มี DEGs 265 ยีน (169 ยีนเป็น upregulated genes และ 96 ยีนเป็น downregulated genes) สายพันธุ์ PY1 มี DEGs 65 ยีน (8 ยีนเป็น upregulated genes และ 57 ยีนเป็น downregulated genes) และสายพันธุ์ FW1 มี DEGs 234 ยีน (34 ยีนเป็น upregulated genes และ 200 ยีนเป็น downregulated genes) ดังแสดงในตารางที่ 4.3

ตารางที่ 4.3 การจัดกลุ่มของยีนในสายพันธุ์ PO1, PO2, PY1 และ FW1 ด้วยฐานข้อมูล COG (Laothamteep และคณะ, 2021)

|  | จำนวนยีนใน COG <sup>a</sup>        |   |     |     |   |                                  |                |                |     |    |            |     |     |     |     |                 |     |     |                 |                 | ทั้งหมด |     |      |      |
|--|------------------------------------|---|-----|-----|---|----------------------------------|----------------|----------------|-----|----|------------|-----|-----|-----|-----|-----------------|-----|-----|-----------------|-----------------|---------|-----|------|------|
|  | Information storage and processing |   |     |     |   | Cellular processes and signaling |                |                |     |    | Metabolism |     |     |     |     | Uncharacterized |     |     |                 |                 |         |     |      |      |
|  | J                                  | A | K   | L   | B | D                                | V              | T              | M   | N  | U          | O   | C   | G   | E   | F               | H   | I   | P               | Q               |         | R   | S    | -    |
| <i>Mycobacterium</i> sp. PO1                 |                                    |   |     |     |   |                                  |                |                |     |    |            |     |     |     |     |                 |     |     |                 |                 |         |     |      |      |
| Whole  | 159                                | 3 | 384 | 161 | 0 | 33                               | 47             | 175            | 162 | 6  | 22         | 116 | 337 | 207 | 352 | 87              | 159 | 453 | 230             | 238             | 543     | 365 | 1335 | 5574 |
| DEG  | 44 <sup>b</sup>                    | 0 | 10  | 5   | 0 | 1                                | 2              | 2 <sup>c</sup> | 6   | 0  | 2          | 3   | 20  | 5   | 11  | 1               | 7   | 17  | 18 <sup>b</sup> | 22 <sup>b</sup> | 17      | 15  | 62   | 270  |
| <i>Mycobacterium</i> sp. PO2                 |                                    |   |     |     |   |                                  |                |                |     |    |            |     |     |     |     |                 |     |     |                 |                 |         |     |      |      |
| Whole  | 159                                | 3 | 385 | 160 | 0 | 33                               | 47             | 175            | 161 | 6  | 23         | 116 | 338 | 209 | 350 | 88              | 161 | 453 | 231             | 238             | 538     | 368 | 1341 | 5583 |
| DEG  | 43 <sup>b</sup>                    | 0 | 11  | 4   | 0 | 1                                | 2              | 2 <sup>c</sup> | 6   | 0  | 2          | 4   | 20  | 5   | 10  | 1               | 6   | 16  | 18 <sup>b</sup> | 23 <sup>b</sup> | 19      | 15  | 57   | 265  |
| <i>Novosphingobium pentaromathiorans</i> PY1 |                                    |   |     |     |   |                                  |                |                |     |    |            |     |     |     |     |                 |     |     |                 |                 |         |     |      |      |
| Whole  | 157                                | 1 | 250 | 172 | 0 | 34                               | 43             | 152            | 221 | 62 | 103        | 152 | 226 | 188 | 256 | 64              | 133 | 238 | 238             | 61              | 362     | 358 | 1025 | 4496 |
| DEG  | 2                                  | 0 | 1   | 2   | 0 | 0                                | 1              | 4              | 4   | 0  | 0          | 1   | 6   | 1   | 5   | 2               | 0   | 4   | 3               | 0               | 3       | 9   | 17   | 65   |
| <i>Bacillus subtilis</i> FW1                 |                                    |   |     |     |   |                                  |                |                |     |    |            |     |     |     |     |                 |     |     |                 |                 |         |     |      |      |
| Whole  | 164                                | 0 | 261 | 111 | 1 | 39                               | 59             | 126            | 204 | 60 | 27         | 104 | 170 | 283 | 301 | 80              | 115 | 122 | 171             | 51              | 370     | 348 | 803  | 3970 |
| DEG  | 7                                  | 0 | 18  | 5   | 0 | 4                                | 8 <sup>b</sup> | 10             | 15  | 1  | 0          | 4   | 13  | 12  | 21  | 4               | 4   | 7   | 5               | 4               | 23      | 15  | 54   | 234  |

จุดที่สีของ COG ตามในตาราง: J, translation, ribosomal structure, and biogenesis; A, RNA processing and modification; K, transcription; L, replication, recombination, and repair; B, chromatin structure and dynamics; D, cell cycle control, cell division; V, defense mechanisms; T, signal transduction mechanisms; M, cell wall/membrane/envelope biogenesis; N, cell motility; U, intracellular trafficking, secretion, and vesicular transport; O, posttranslational modification, protein turnover, chaperones; C, energy production and conversion; G, carbohydrate transport and metabolism; E, amino acid transport and metabolism; F, nucleotide transport and metabolism; H, coenzyme transport and metabolism, chromosome partitioning; I, lipid transport and metabolism; P, inorganic ion transport and metabolism; Q, biosynthesis of secondary metabolites, transport, and catabolism; R, general function prediction only; S, function unknown; -, uncategorized.

#### 4.4.4.2.1 ยีนประมวลรหัสเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลาย PAHs

เพื่อเข้าใจกลไกการตอบสนองของยีนที่เกี่ยวข้องกับการที่ไฟรีนช่วยส่งเสริมประสิทธิภาพย่อยสลายฟลูออแรนทีน ยีนที่ประมวลรหัสเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายไฟรีนและฟลูออแรนทีนภายใต้สภาวะที่มีฟลูออแรนทีนเพียงชนิดเดียว และสภาวะที่มีไฟรีนและฟลูออแรนทีนในรูปแบบสารคู่ผสมที่แสดงออกในค่า RPKM ได้ถูกแปลงเป็น  $\log_2$ RPKM (ภาคผนวก ง) และนำมาแสดงในรูปของแผนภาพความร้อน (heatmap) ดังแสดงในรูปที่ 4.16

Kim และคณะ (2007) รายงานว่ายีนที่ประมวลรหัสเอนไซม์ NidABD, PdoA2B2 และ PhdJK มีความเกี่ยวข้องกับการย่อยสลายไฟรีน และ Kweon และคณะ (2007) รายงานว่ายีนที่ประมวลรหัสเอนไซม์ NidA3B3 และ DbfA1 มีความเกี่ยวข้องกับการย่อยสลายฟลูออแรนทีน และยีนที่ประมวลรหัสเอนไซม์ PhdEFGI, PhtC และยีนที่ประมวลรหัสเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายพทาเลทและโปรโตคาคิคูเอท ซึ่งเป็นสารมัธยันต์หลักของการย่อยสลายไฟรีนและฟลูออแรนทีน มีความเกี่ยวข้องกับการย่อยสลายทั้งไฟรีนและฟลูออแรนทีน (Kim และคณะ, 2007; Kweon และคณะ, 2007) โดยยีนที่ประมวลรหัสเอนไซม์ที่มีความเกี่ยวข้องกับการย่อยสลาย PAHs ของสายพันธุ์ PO1 และ PO2 มีความเหมือนกับยีนที่ประมวลรหัสเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลาย PAHs ของ *M. vanbaalenii* PYR-1 มากกว่า 69 เปอร์เซ็นต์ที่ระดับกรดอะมิโน (Wanapaisan และคณะ, 2018) และยีนที่ประมวลรหัสเอนไซม์ NidAB และ NidA3B3 ของสายพันธุ์ PO1 และ PO2 มีความเหมือนกับยีนที่ประมวลรหัสเอนไซม์ NidAB และ NidA3B3 ของสายพันธุ์ PYR-1 มากกว่า 97 เปอร์เซ็นต์ที่ระดับกรดอะมิโน

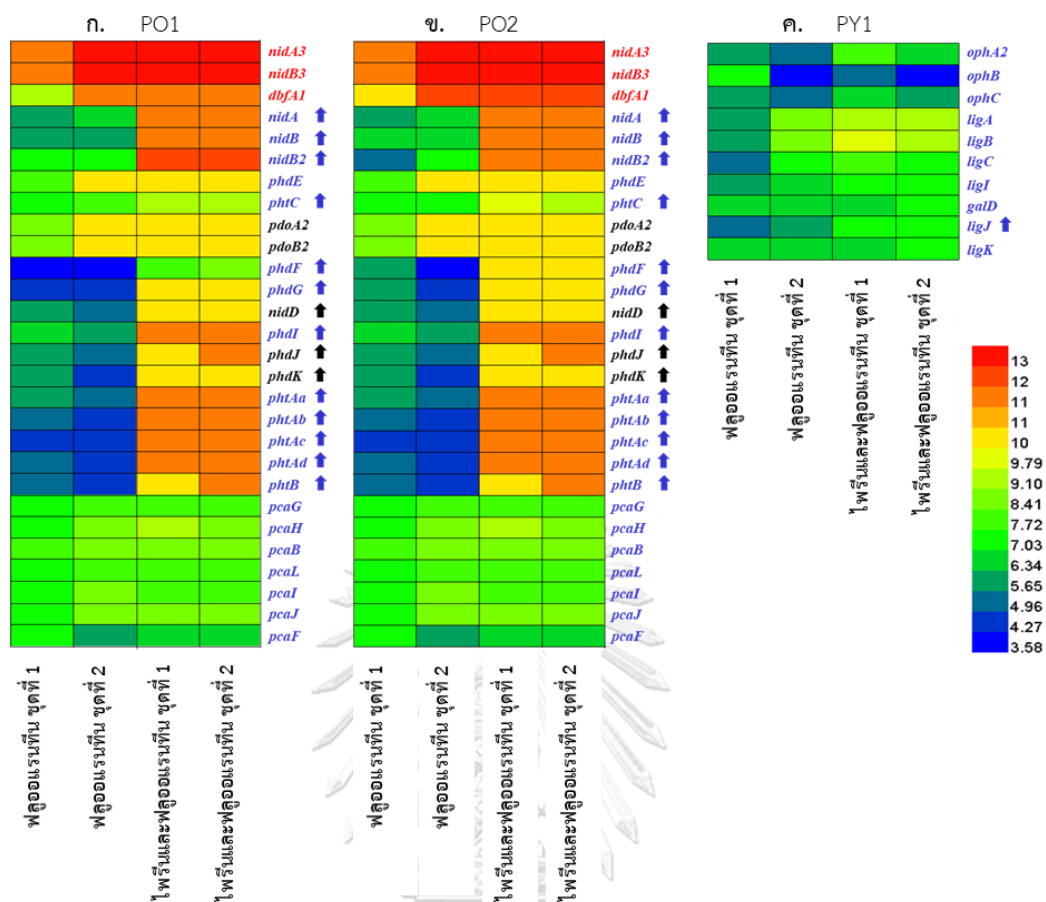
แผนภาพความร้อนแสดงระดับการแสดงออกของยีนประมวลรหัสเอนไซม์ที่คาดว่าเกี่ยวข้องกับการย่อยสลาย PAHs ของสายพันธุ์ PO1, PO2 และ PY1 ภายใต้สภาวะที่มีฟลูออแรนทีนชนิดเดียว และสภาวะที่มีไฟรีนและฟลูออแรนทีนในรูปแบบสารคู่ผสม ดังแสดงในรูปที่ 4.16 พบว่าระดับการแสดงออกของยีนประมวลรหัสเอนไซม์ที่คาดว่าเกี่ยวข้องกับการย่อยสลายทั้งไฟรีนและฟลูออแรนทีนจนถึงโปรโตคาคิคูเอทของสายพันธุ์ PO1 และ PO2 ในสภาวะที่มีไฟรีนและฟลูออแรนทีนในรูปแบบสารคู่ผสม มีระดับการแสดงออกของยีนที่สูงกว่าในสภาวะที่มีฟลูออแรนทีนเพียงชนิดเดียว ดังแสดงในรูปที่ 4.16 (ก) และ (ข) และรูปที่ 4.17 สำหรับระดับการแสดงออกของยีนประมวลรหัสเอนไซม์ที่คาดว่าเกี่ยวข้องกับการย่อยสลายไฟรีนในสภาวะที่มีไฟรีนและฟลูออแรนทีนในรูปแบบสารคู่ผสม มีระดับการแสดงออกของยีนที่สูงกว่าในสภาวะที่มีฟลูออแรนทีนเพียงชนิดเดียว (รูปที่ 4.16 (ก) และ (ข) และ 4.17)

ยีนประมวลรหัสเอนไซม์ Nid และ PhdJK ที่คาดว่าเกี่ยวข้องกับการย่อยสลายไฟรีนและยีนประมวลรหัสเอนไซม์ PhdFGI และ Pht ที่คาดว่าเกี่ยวข้องกับการย่อยสลายทั้งไฟรีนและ

ฟลูออแรนทีนในรูปแบบสารคู่ผสม มีระดับการแสดงออกเพิ่มขึ้น (upregulated) มากกว่า 16 และ 3 เท่าตามลำดับ ในขณะที่ยีนประมวลรหัสเอนไซม์ NidA3B3 และ DbfA1 ที่คาดว่าเกี่ยวข้องกับการย่อยสลายฟลูออแรนทีน ไม่พบระดับการแสดงออกที่เพิ่มขึ้น เมื่อมีไพรีนร่วมด้วย (รูปที่ 4.16 (ก) และ (ข) และ 4.17) Kim และคณะ (2015) รายงานว่า เอนไซม์ NidAB ของสายพันธุ์ PYR-1 สามารถย่อยสลายฟลูออแรนทีนในน้ำมันดิบ BP ได้ ถึงแม้ว่าจะไม่เกิดการแสดงออกของ NidA3B3 ซึ่งคาดว่าเกี่ยวข้องกับการย่อยสลายฟลูออแรนทีน ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองนี้ โดยการวิเคราะห์ทรานส์คริปโตมิกส์แสดงให้เห็นว่า ยีนประมวลรหัสเอนไซม์ NidAB(B2) ของสายพันธุ์ PO1 และ PO2 เป็นยีนหลักที่มีบทบาทในการย่อยสลายทั้งไพรีนและฟลูออแรนทีนในรูปแบบสารคู่ผสมในขั้นตอนแรก ทั้งนี้คาดว่า ไพรีนเป็นตัวชักนำให้เกิดการแสดงออกของยีนประมวลรหัสเอนไซม์ NidAB และเอนไซม์ต่างๆ ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายไพรีน และเอนไซม์เหล่านั้นสามารถย่อยสลายฟลูออแรนทีนได้ด้วย จึงทำให้เกิดการส่งเสริมการย่อยสลายฟลูออแรนทีนในสภาวะที่มีไพรีน

การแสดงออกร่วมกันของ [3Fe-4S] เพอร์ริดอกซิน (พทาเลทไดออกซิจีเนส เพอร์ริดอกซิน; PhtAc) และเพอร์ริดอกซินรีดักเทส (พทาเลทไดออกซิจีเนส เพอร์ริดอกซินรีดักเทส; PhtAd) ช่วยกระตุ้นและส่งเสริมการทำงานของ NidAB และ NidA3B3 (Kim และคณะ, 2007; Kweon และคณะ, 2010) ผลการวิเคราะห์พบว่า ระดับการแสดงออกของยีนประมวลรหัสเอนไซม์ PhtAc และ PhtAd มีระดับการแสดงออกเพิ่มขึ้นในสภาวะที่มีไพรีนและฟลูออแรนทีนในรูปแบบสารคู่ผสม (รูปที่ 4.16 (ก) และ (ข) และ 4.17) ทั้งนี้คาดว่า NidAB และ NidA3B3 เกิดการทำงานร่วมกับ PhtAc และ PhtAd เพื่อเริ่มต้นกระบวนการย่อยสลาย PAHs ซึ่งผลการทดลองนี้สอดคล้องกับรายงานวิจัยของ Yuan และคณะ (2018) ที่พบว่าการแสดงออกร่วมกันของยีนประมวลรหัสเอนไซม์ NidAB และ PhtAcAd ช่วยให้เกิดการทำงานของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายไพรีนและฟีนแอนทรินในรูปแบบสารคู่ผสมในขั้นตอนแรก

จากการทำนายวิถีการย่อยสลายไพรีน สายพันธุ์ PO1 และ PO2 ย่อยสลายพทาเลทและโพรโตคาทิกูเอทผ่านทางวิถีอโอโซ (Wanapaisan และคณะ, 2018) ผลการวิเคราะห์ในการทดลองนี้พบว่ายีนประมวลรหัสเอนไซม์ PhtAB มีระดับการแสดงออกที่เพิ่มขึ้นในสภาวะที่มีไพรีนและฟลูออแรนทีนในรูปแบบสารคู่ผสม (รูปที่ 4.16 (ก) และ (ข) และ 4.17) แต่ไม่พบระดับการแสดงออกที่เพิ่มขึ้นของยีนประมวลรหัสเอนไซม์คาดว่าที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายโพรโตคาทิกูเอทในสภาวะนี้



รูปที่ 4.16 แผนภาพความร้อนแสดงระดับการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายไพรีน และฟลูออแรนทีนในรูปแบบสารคู่ผสมของสายพันธุ์ PO1 (ก), PO2 (ข) และ PY1 (ค)

ยีนที่คาดว่าเกี่ยวข้องกับการย่อยสลายไพรีน แสดงด้วยตัวอักษรสีดำ

ยีนที่คาดว่าเกี่ยวข้องกับการย่อยสลายฟลูออแรนทีน แสดงด้วยตัวอักษรสีแดง

ยีนที่คาดว่าเกี่ยวข้องกับการย่อยสลายทั้งไพรีนและฟลูออแรนทีน แสดงด้วยตัวอักษรสีน้ำเงิน

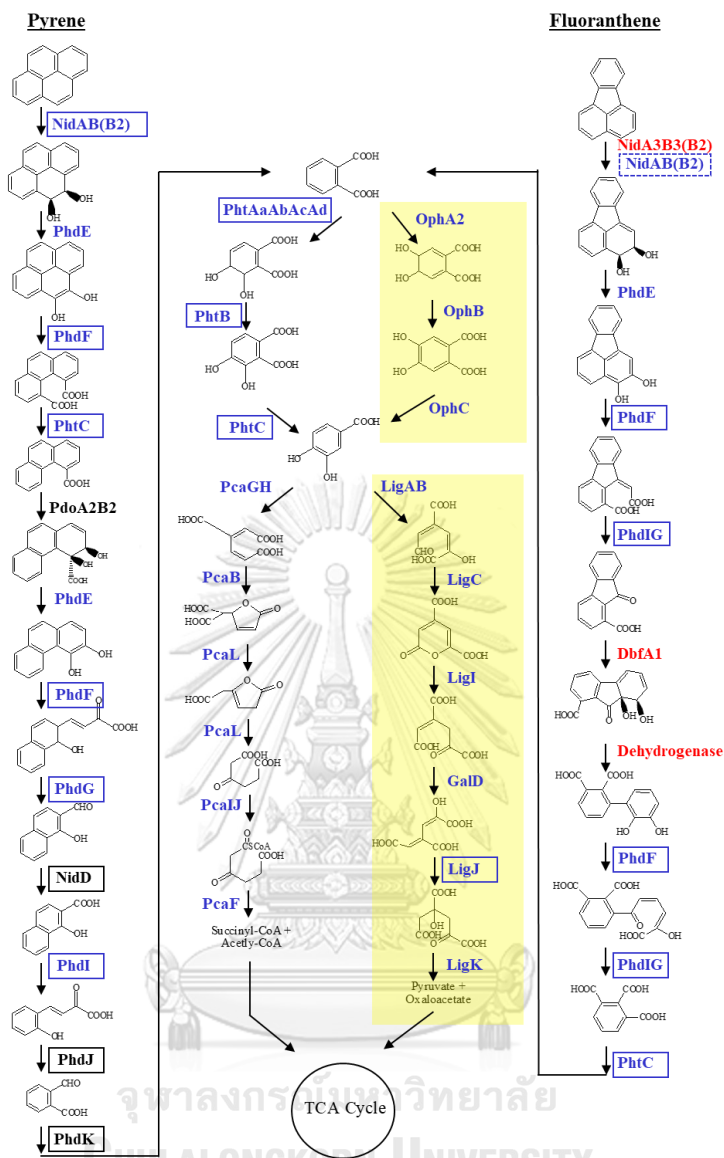
ลูกศรแสดงการเพิ่มขึ้นของระดับการแสดงออกของยีน (up-regulated)

(Laothamteep และคณะ, 2021)

สำหรับสายพันธุ์ PY1 ย่อยสลายพทาเลทและโปรโตคาทิกูเอทผ่านทางวิถีเบต้า (Wanapaisan และคณะ, 2018) ผลการวิเคราะห์พบว่ายีนประมวลรหัสเอนไซม์ LigJ ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายโปรโตคาทิกูเอท มีระดับการแสดงออกที่เพิ่มขึ้นในสภาวะที่มีไพรีนและฟลูออแรนทีนในรูปแบบสารคู่ผสม (รูปที่ 4.16 (ค) และ 4.17) แต่ไม่พบระดับการแสดงออกที่เพิ่มขึ้นของยีนประมวลรหัสเอนไซม์อื่นที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายพทาเลทและโปรโตคาทิกูเอทในสภาวะนี้

ผลการวิเคราะห์ทรานส์คริปโตมิกส์ ให้ข้อมูลสนับสนุนว่า *Mycolicibacterium* เป็นแบคทีเรียที่มีบทบาทหลักในการย่อยสลายไพรีนและฟลูออแรนทีนในรูปแบบสารคู่ผสม และ *Novosphingobium* มีส่วนร่วมในการย่อยสลายโปรโตคาคีคูเอท ซึ่งเป็นสารมัธยันต์ของการย่อยสลายไพรีนและฟลูออแรนทีนที่ถูกย่อยสลายด้วย *Mycolicibacterium* (รูปที่ 4.16 และ 4.17) จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า การอยู่ร่วมกันของแบคทีเรียแต่ละชนิด (PO1, PO2 และ PY1) ในกลุ่มแบคทีเรียมีบทบาทช่วยส่งเสริมการย่อยสลาย PAHs มวลโมเลกุลสูงจำนวน 2 ชนิด





รูปที่ 4.17 วิธีการย่อยสลายไพรีนและฟลูออแรนทีนของสายพันธุ์ PO1, PO2

และวิธีการย่อยสลายพทาเลทของสายพันธุ์ PY1 (กรอบสี่เหลี่ยมสีเหลือง)

ด้วยวิธีการวิเคราะห์จีโนม (Wanapaisan และคณะ, 2018)

เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายไพรีน แสดงเป็นตัวอักษรสีดำ

เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายฟลูออแรนทีน แสดงเป็นตัวอักษรสีแดง

เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายทั้งไพรีนและฟลูออแรนทีน แสดงเป็นตัวอักษรสีน้ำเงิน

เอนไซม์ที่ upregulated แสดงในกรอบสี่เหลี่ยมสีน้ำเงิน

(Laothamteep และคณะ, 2021)

4.4.4.2.2 ยีนประมวลรหัสเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการปรับตัวของแบคทีเรีย การศึกษาทั่วโลกการปรับตัวของแบคทีเรียในกลุ่มแบคทีเรียภายใต้สภาวะที่มีไพรีนและฟลูออแรนทีนในรูปแบบสารคู่ผสม ได้มาระบุกลุ่มการทำงานของยีนทั้งหมด (ORFs) และ DEGs ด้วยการเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล COG พบว่า DEGs ของสายพันธุ์ PO1 และ PO2 ถูกจัดอยู่ในกลุ่ม J (translation, ribosomal structure, และ biogenesis), P (inorganic ion transport และ metabolism) และ Q (biosynthesis of secondary metabolites, transport, และ catabolism) DEGs ของสายพันธุ์ FW1 ถูกจัดอยู่ในกลุ่ม V (defense mechanisms) ทั้งนี้ไม่สามารถระบุกลุ่มของ DEGs ของสายพันธุ์ PY1 ดังแสดงในตารางที่ 4.3 โดยกระบวนการเหล่านี้อาจมีบทบาททำให้สายพันธุ์ PO1, PO2 และ PY1 อยู่รอดได้ดีภายใต้สภาวะที่มีไพรีนและฟลูออแรนทีนในรูปแบบสารคู่ผสม

*กลุ่ม J (translation, ribosomal structure, และ biogenesis)*

พบยีนประมวลรหัสเอนไซม์ ribosomal protein จำนวน 38 และ 39 ยีนในสายพันธุ์ PO1 และ PO2 ตามลำดับ (ภาคผนวก ง) ที่มีระดับการแสดงออกที่เพิ่มขึ้น โดย ribosomal protein อาจมีบทบาททำให้เกิดกระบวนการถอดรหัสและแปลรหัสในเซลล์แบคทีเรีย และส่งเสริมกระบวนการสังเคราะห์โปรตีน (protein biosynthesis) และกระบวนการย่อยสลาย PAHs ภายในเซลล์แบคทีเรีย

*กลุ่ม P (inorganic ion transport และ metabolism)*

ในระหว่างกระบวนการย่อยสลาย PAHs ในสภาวะที่มีออกซิเจน จะเกิดการสะสมอีพอกไซด์ (epoxide) และอนุมูลอิสระออกซิเจน (reactive oxygen species; ROS) ในแบคทีเรีย ซึ่งเป็นพิษต่อแบคทีเรีย (Hong และคณะ, 2016) ยีนประมวลรหัสเอนไซม์ SseA ช่วยส่งเสริมการเจริญของ *Mycobacterium tuberculosis* ในแมคโครฟาจ (macrophage) และมีหน้าที่เป็น oxidative stress resistance (Rengarajan และคณะ, 2005; Nambi และคณะ, 2015) ในงานวิจัยนี้พบว่ายีนประมวลรหัสเอนไซม์ SseA มีระดับการแสดงออกที่เพิ่มขึ้น ทำให้คาดว่า SseA อาจมีส่วนช่วยลดความเป็นพิษที่เกิดขึ้นจากการย่อยสลายไพรีนและฟลูออแรนทีน (ภาคผนวก ง)

นอกจากนี้พบการแสดงออกที่เพิ่มขึ้นของยีน *efeO* ซึ่งประมวลรหัสเอนไซม์ iron transporter ที่เกี่ยวข้องกับการขนส่ง  $Fe^{3+}$  ผ่านเยื่อผนังเซลล์ (membrane permease) (Rajasekaran และคณะ, 2010; Xu และคณะ, 2011) และมีความจำเป็นต่อแบคทีเรียที่ใช้ออกซิเจนในการเจริญ (Miethke และคณะ, 2013) นอกจากนี้ยังช่วยทำให้ออกซิเจนมาจับตรงวงอะโรมาติกทำให้เอนไซม์อินทรีย์ไดออกซิจีเนส เอ็กซ์ตราไดออกซิจีเนส และ Rieske ไดออกซิจีเนส เกิดการทำงาน และเกิดกระบวนการย่อยสลายต่อไป (Kovaleva และ Lipscomb, 2008; Wang และคณะ, 2017) (ภาคผนวก ง)



กลุ่ม Q (biosynthesis of secondary metabolites, transport และ catabolism)

พบยีนประมวลรหัสเอนไซม์ ABC-transporters จำนวน 8 ยีนในสายพันธุ์ PO1 และ PO2 มีระดับการแสดงออกที่เพิ่มขึ้น (ภาคผนวก ง) โดย 6 ยีนเกี่ยวข้องกับการนำเข้าของไขมัน และสารที่ไม่ชอบน้ำ ส่วนอีก 2 ยีนเกี่ยวข้องกับการต้านทาน organic solvent resistance โดย ABC-transporters ทำหน้าที่ขนส่งไอออน น้ำตาล กรดอะมิโน และสารเมแทบอไลต์ต่างๆ ผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ด้วยการใช้พลังงาน ATP และขับสารพิษออกนอกเซลล์ ทำให้ป้องกันการสะสมของสารพิษ ภายในเซลล์แบคทีเรีย (Epel และคณะ, 2008; Locher, 2016) จึงคาดว่า ABC-transporters มีความเกี่ยวข้องกับการขนส่ง PAHs และสารมัธยันต์เข้าและออกจากแบคทีเรีย

#### กลุ่ม V (defense mechanisms)

ยีนประมวลรหัสเอนไซม์ efflux transporter มีระดับการแสดงออกที่เพิ่มขึ้นในสายพันธุ์ FW1 (ภาคผนวก ง) ซึ่ง efflux transporter เกี่ยวข้องกับการขับสารพิษออกจากเซลล์แบคทีเรีย จึงคาดว่าสายพันธุ์ FW1 ใช้กระบวนการนี้ เพื่อการอยู่รอดในภาวะที่มี PAHs

สำหรับระดับการแสดงออกของยีนประมวลรหัสเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการสร้างสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในสายพันธุ์ FW1 ในสภาวะที่มี PAHs ทั้ง 2 สภาวะนี้มีระดับการแสดงออกที่ไม่แตกต่างกัน คาดว่า การที่ไฟรินช่วยส่งเสริมประสิทธิภาพย่อยสลายของฟลูออแรนทีน อาจจะไม่เกี่ยวข้องกับการลดแรงตึงผิวชีวภาพของสายพันธุ์ FW1

การเข้าใจบทบาทของยีนในแบคทีเรียในกลุ่มแบคทีเรียต่อการย่อยสลาย PAHs และกลไกการปรับตัวของแบคทีเรียในการย่อยสลาย PAHs จะทำให้ทราบข้อมูลเพื่อการพัฒนาต่อยอดสำหรับการประยุกต์ใช้แบคทีเรียในการบำบัดสิ่งแวดล้อมปนเปื้อน PAHs โดยวิธีทางชีวภาพอย่างมีประสิทธิภาพสูงสุดต่อไป การวิเคราะห์ทรานสคริปโตมิกส์ในสภาวะที่มีไฟรินและฟลูออแรนทีนในรูปแบบสารคู่ผสมพบว่า *Mycolicibacterium* เป็นแบคทีเรียที่มีบทบาทหลักในการย่อยสลายไฟรินและฟลูออแรนทีนในรูปแบบสารคู่ผสม และยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายไฟรินมีความสำคัญในการช่วยส่งเสริมการย่อยสลายฟลูออแรนทีน และ NidAB เป็นเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายไฟรินและฟลูออแรนทีนในรูปแบบสารคู่ผสม ยีนประมวลรหัส ribosomal protein, iron transporter, ABC transporters และ stress response proteins อาจมีบทบาททำให้สายพันธุ์ PO1 และ PO2 อยู่รอดในสภาวะที่มีทั้งไฟรินและฟลูออแรนทีน นอกจากนี้ *Novosphingobium* มีส่วนร่วมในการย่อยสลายโปรโตคาคิคูเอท ซึ่งเป็นสารมัธยันต์ของการย่อยสลายไฟรินและฟลูออแรนทีนที่ถูกย่อยสลายด้วย *Mycolicibacterium*

กลุ่มแบคทีเรีย OPK มีความสามารถย่อยสลายไพรีนภายใต้สภาวะการแปรผันปัจจัยทางสิ่งแวดล้อมต่างๆ ได้แก่ ค่า pH อุณหภูมิ และการเติม NaCl รวมทั้งสามารถย่อยสลาย PAHs ชนิดต่างๆ ในรูปแบบสารเดี่ยว เช่น แอนทราซีน ฟิแนนทรีน ฟลูออรีน และฟลูออแรนทีน และสามารถย่อยสลาย PAHs ในรูปแบบสารคู่ผสมได้ จึงมีความน่าสนใจนำกลุ่มแบคทีเรีย OPK ไปประยุกต์ใช้ในการย่อยสลายน้ำมันดิบต่อไป เนื่องจาก PAHs เป็นองค์ประกอบหนึ่งในน้ำมันดิบ คาดว่าแบคทีเรียที่มีความสามารถย่อยสลาย PAHs ได้น่าจะมีความสามารถย่อยสลายน้ำมันดิบได้เช่นกัน

#### 4.5 ลักษณะสมบัติเบื้องต้นของแบคทีเรียย่อยสลายน้ำมันดิบ

##### 4.5.1 ยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายนอร์มัล-อัลเคนของน้ำมันดิบ

กลุ่มแบคทีเรีย OPK มีความสามารถย่อยสลาย PAHs ซึ่งเป็นองค์ประกอบที่ถูกย่อยสลายได้ยากในน้ำมันดิบ จึงคาดว่า แบคทีเรียที่สามารถย่อยสลาย PAHs ได้น่าจะมีความสามารถย่อยสลายน้ำมันดิบได้เช่นกัน ในงานวิจัยนี้เริ่มต้นจากการค้นหาที่ยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายนอร์มัล-อัลเคน ซึ่งเป็นองค์ประกอบหลักในน้ำมันดิบในแบคทีเรียแต่ละชนิด การวิเคราะห์ค้นหาที่ยีนที่มีความเกี่ยวข้องกับการย่อยสลายนอร์มัล-อัลเคนของน้ำมันดิบที่อยู่ในจีโนมด้วยโปรแกรม Unipro UGENE (เวอร์ชัน 1.31.1, Russia) จากการวิเคราะห์ข้อมูลจีโนมของสายพันธุ์ PO1, PO2, PY1 และ FW1 พบยีน CYP153 ที่ประมวลรหัสเอนไซม์ไซโตโครม P450 (cytochrome P450) ที่จำเพาะกับการย่อยสลายอัลเคนสายกลางที่มีจำนวนคาร์บอน 8-16 อะตอม (van Beilen และคณะ, 2006) ในทุกสายพันธุ์ และพบยีน *alkB* ที่ประมวลรหัสเอนไซม์อัลเคนโมโนออกซิจีเนสที่มีบทบาทย่อยสลายอัลเคนที่มีจำนวนคาร์บอน 10-32 อะตอม (Nie และคณะ, 2014) ในสายพันธุ์ PO1 และ PO2 ดังแสดงในตารางที่ 4.4 นอกจากนี้พบยีน *alkJ* (alcohol dehydrogenase) ซึ่งเกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแอลกอฮอล์ปฐมภูมิเป็นแอลดีไฮด์ และ *alkH* (aldehyde dehydrogenase) ซึ่งเกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแอลดีไฮด์เป็นกรดไขมันในทุกสายพันธุ์ ดังแสดงในตารางที่ 4.4 แต่ไม่พบยีน *almA* ที่ประมวลรหัสเอนไซม์อัลเคนไดออกซิจีเนสที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายอัลเคนที่มีจำนวนคาร์บอนมากกว่า 32 อะตอม (Wentzel และคณะ, 2007) และยีน *ladA* ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายอัลเคนที่มีจำนวนคาร์บอน 15 ถึง 36 อะตอม (Li และคณะ, 2008) โดยยีน *almA* มักถูกพบใน *Acinetobacter* และยีน *ladA* มักถูกพบใน *Geobacillus thermodenitrificans* (Wentzel และคณะ, 2007; Li และคณะ, 2008) แสดงให้เห็นว่า สายพันธุ์ PO1, PO2, PY1 และ FW1 มียีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายนอร์มัล-อัลเคนในน้ำมันดิบได้อย่างสมบูรณ์

ตารางที่ 4.4 ผลการวิเคราะห์ยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายนอร์มัล-อัลเคนในน้ำมันดิบจากข้อมูลจีโนม (Laothamteep และคณะ, 2022)

| แบคทีเรีย | Contig      | ตำแหน่ง     | ยีน                    | เอนไซม์                | [GenBank accession]                       | % Protein identity | Accession number |
|-----------|-------------|-------------|------------------------|------------------------|---|--------------------|------------------|
| PO1       | 45          | 7616-8836   | <i>alkB</i>            | Alkane                 | <i>Mycobacterium</i> sp.                  | 82.37              | BLTG01000045     |
|           |             |             |                        | monooxygenase          | [WP_012393161.1]                          |                    |                  |
|           | 12          | 42762-43988 | CYP153                 | Alkane hydroxylase     | <i>Mycolicibacterium smegmatis</i>        | 80.68              | BLTG01000012     |
|           |             |             |                        | Alcohol dehydrogenase  | [WP_014877072.1]                          |                    |                  |
|           |             |             |                        | Aldehyde dehydrogenase | <i>Mycolicibacterium chlorophenolicum</i> | 87.12              | BLTG01000044     |
| 89        | 37682-39013 | <i>alkH</i> | Aldehyde dehydrogenase | DSM43826 [KMO75297.1]  | 58.43                                     | BLTG01000089       |                  |
|           |             |             | Aldehyde dehydrogenase | [KMO76300.1]           |   |                    |                  |
| PO2       | 45          | 58879-60099 | <i>alkB</i>            | Alkane                 | <i>Mycobacterium</i> sp.                  | 82.37              | BLTH01000045     |
|           |             |             |                        | monooxygenase          | [WP_012393161.1]                          |                    |                  |
|           | 30          | 26721-27947 | CYP153                 | Alkane hydroxylase     | <i>Mycolicibacterium smegmatis</i>        | 80.68              | BLTH01000030     |
|           |             |             |                        | Alcohol dehydrogenase  | [WP_014877072.1]                          |                    |                  |
|           |             |             |                        | Aldehyde dehydrogenase | <i>Mycolicibacterium chlorophenolicum</i> | 87.12              | BLTH01000010     |
| 111       | 3944-5275   | <i>alkH</i> | Aldehyde dehydrogenase | DSM43826 [KMO75297.1]  | 58.43                                     | BLTH01000111       |                  |
|           |             |             | Aldehyde dehydrogenase | [KMO76300.1]           |   |                    |                  |

ตารางที่ 4.4 ผลการวิเคราะห์ยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายนอร์มัล-อัลเคนในน้ำมันดิบจากข้อมูลจีโนม (ต่อ) (Laothamteep และคณะ, 2022)

| แบคทีเรีย | Contig | ตำแหน่ง       | ยีน           | เอนไซม์               | [GenBank accession]   | % Protein identity                              | Accession number |
|-----------|--------|---------------|---------------|-----------------------|---|---|------------------|
| PY1       | 7      | 221141-222322 | CYP153        | Alkane hydroxylase    | <i>Novosphingobium</i> sp. PP1Y [WP_013837101.1]            | 99.75   | BLTI01000007     |
|           | 8      | 767513-768472 | <i>alkJ</i>   | Alcohol dehydrogenase | <i>Novosphingobium pentaromativorans</i> US6-1 [AIT81089.1] | 85.31   | BLTI01000008     |
|           |        | 4             | 425740-427257 | <i>alkH</i>           | Aldehyde dehydrogenase                                      | <i>Novosphingobium kunmingense</i> [PKB14481.1] | 85.97            |
|           | FW1    | 3             | 334836-336059 | CYP153                | Alkane hydroxylase  | <i>Bacillus subtilis</i> [WP_014476509.1]       | 96.97            |
| 5         |        | 501191-502396 | <i>alkJ</i>   | Alcohol dehydrogenase | <i>Bacillus subtilis</i> BS38 [AOR99390.1]                  | 99.25   | BLTF01000005     |
|           |        | 9             | 29873-31207   | <i>alkH</i>           | Aldehyde dehydrogenase                                      | <i>Bacillus subtilis</i> 168 [AIY99612.1]       | 97.75            |

#### 4.5.2 ประสิทธิภาพการย่อยสลายนอร์มลัล-อัลเคนด้วยแบคทีเรียเดี่ยวและกลุ่มแบคทีเรีย

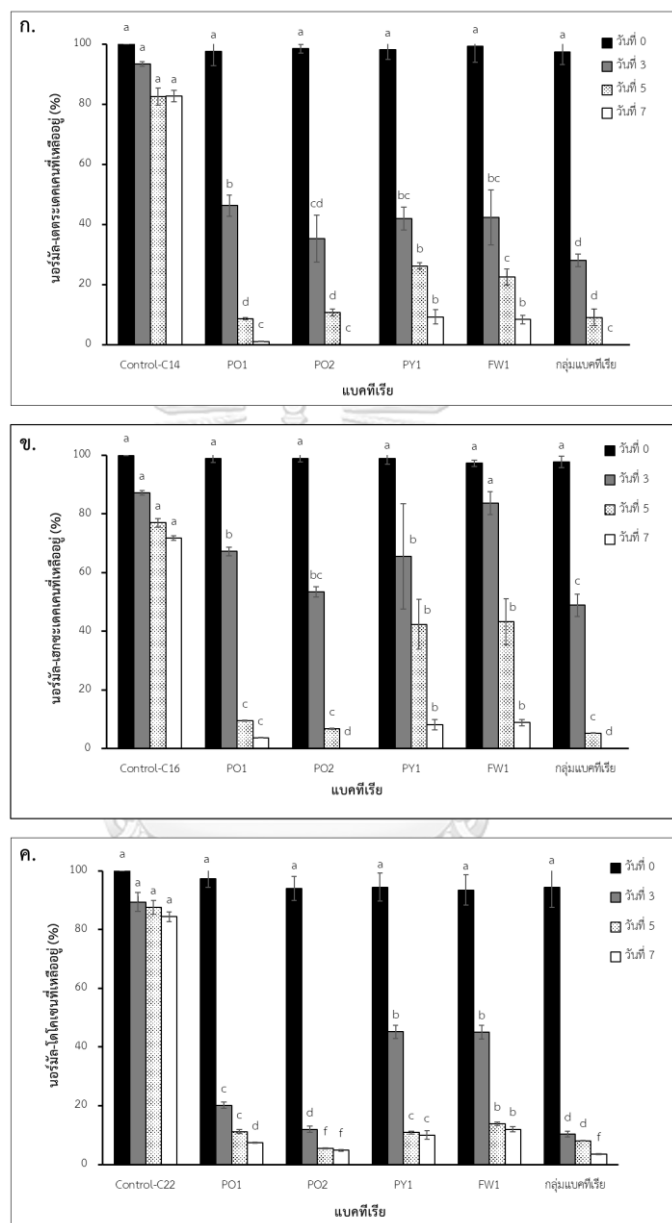
##### OPK

เนื่องจากการปนเปื้อน PAHs ในธรรมชาติ มักมีสาเหตุจากการปนเปื้อนน้ำมันปิโตรเลียมหรือปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอน สารดังกล่าวมีองค์ประกอบหลักได้แก่ นอร์มลัล-อัลเคน (Varjani และ Upasani, 2017) ดังนั้นก่อนการประยุกต์ใช้แบคทีเรียในการบำบัดดินทรายปนเปื้อนน้ำมันดิบ จึงได้ทดสอบความสามารถย่อยสลายนอร์มลัล-อัลเคน โดยนอร์มลัล-อัลเคนที่ใช้ในการทดสอบได้แก่ นอร์มลัล-เตตระเดคเคน (จำนวนคาร์บอน 14 อะตอม) นอร์มลัล-เฮกซะเดคเคน (จำนวนคาร์บอน 16 อะตอม) และนอร์มลัล-โดโคเซน (จำนวนคาร์บอน 22 อะตอม) ผลการทดลองพบว่า แบคทีเรียเดี่ยวสายพันธุ์ PO1 และ PO2 สามารถย่อยสลายนอร์มลัล-เตตระเดคเคน นอร์มลัล-เฮกซะเดคเคน และนอร์มลัล-โดโคเซนได้เกือบสมบูรณ์ และสายพันธุ์ PY1 และ FW1 สามารถย่อยสลายได้ประมาณ 87 ถึง 91 เปอร์เซ็นต์ในระยะเวลา 7 วัน ดังแสดงในรูปที่ 4.18 และกลุ่มแบคทีเรีย OPK สามารถย่อยสลายนอร์มลัล-เตตระเดคเคนและนอร์มลัล-เฮกซะเดคเคนได้อย่างสมบูรณ์ และย่อยสลายนอร์มลัล-โดโคเซนได้ 96 เปอร์เซ็นต์ในระยะเวลา 7 วัน ดังแสดงในรูปที่ 4.18 โดยกลุ่มแบคทีเรีย OPK มีประสิทธิภาพย่อยสลายนอร์มลัล-อัลเคนได้ดีกว่าสายพันธุ์ PY1 และ FW1 และสายพันธุ์ PO1 และ PO2 เป็นแบคทีเรียหลักในกลุ่มแบคทีเรียที่มีบทบาทในการย่อยสลายนอร์มลัล-อัลเคน จากการทดลองแสดงให้เห็นว่า กลุ่มแบคทีเรีย OPK น่าจะมีแนวโน้มนำไปประยุกต์ใช้ในการย่อยสลายน้ำมันดิบ เนื่องจากการทำงานร่วมกันในการย่อยสลายนอร์มลัล-อัลเคน ซึ่งเป็นองค์ประกอบหลักในน้ำมันดิบ

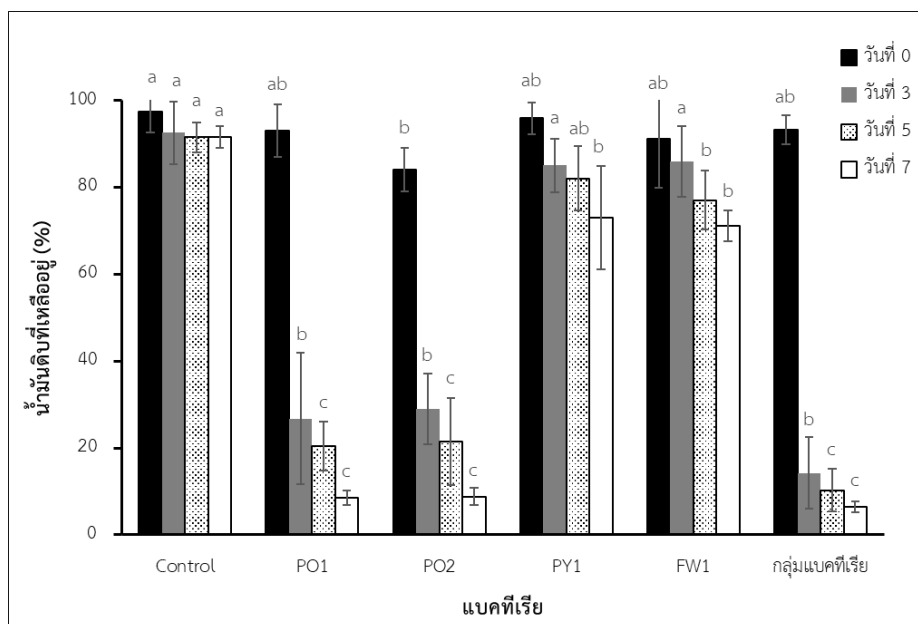
#### 4.5.3 ประสิทธิภาพย่อยสลายน้ำมันดิบด้วยแบคทีเรียเดี่ยวและกลุ่มแบคทีเรีย OPK

น้ำมันดิบมักจะปนเปื้อนอยู่ในสิ่งแวดล้อม เพราะเป็นน้ำมันที่นิยมใช้กันอย่างแพร่หลายในอุตสาหกรรมเดินเรือ การคมนาคมทั้งทางบกและทางน้ำ ดังนั้นจึงทดสอบประสิทธิภาพย่อยสลายน้ำมันดิบด้วยแบคทีเรียเดี่ยวและกลุ่มแบคทีเรีย OPK ผลการทดสอบประสิทธิภาพย่อยสลายน้ำมันดิบ ความเข้มข้น 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าแบคทีเรียเดี่ยวสายพันธุ์ PO1 และ PO2 สามารถย่อยสลายน้ำมันดิบได้มากกว่า 90 เปอร์เซ็นต์ในระยะเวลา 7 วันดังแสดงในรูปที่ 4.19 ในขณะที่สายพันธุ์ PY1 และ FW1 มีความสามารถย่อยสลายได้ประมาณ 20 เปอร์เซ็นต์ (รูปที่ 4.19) คาดว่า อัลเคนสายยาวที่เป็นองค์ประกอบในน้ำมันดิบในงานวิจัยนี้ (ภาคผนวก ค) อาจทำให้เกิดการย่อยสลายได้ช้า งานวิจัยของ Chen และคณะ (2017) รายงานว่า ความไม่ชอบน้ำของอัลเคนเพิ่มขึ้นตามมวลโมเลกุลของอัลเคนที่เพิ่มมากขึ้น ส่งผลให้แบคทีเรียย่อยสลายได้ยากขึ้น นอกจากนี้กลุ่มแบคทีเรีย OPK มีประสิทธิภาพย่อยสลายน้ำมันดิบได้สูงกว่าแบคทีเรียสายพันธุ์เดี่ยวในวันที่ 3 และ 5 ของการทดลอง (รูปที่ 4.19) คาดว่า แบคทีเรียในกลุ่มแบคทีเรียทำงานร่วมกันในรูปแบบ

ส่งเสริมกัน ทำให้ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพย่อยสลายน้ำมันดิบได้ดียิ่งขึ้น ดังนั้น กลุ่มแบคทีเรีย OPK มีแนวโน้มนำไปประยุกต์ใช้ในการบำบัดสิ่งแวดล้อมปนเปื้อนน้ำมันดิบ



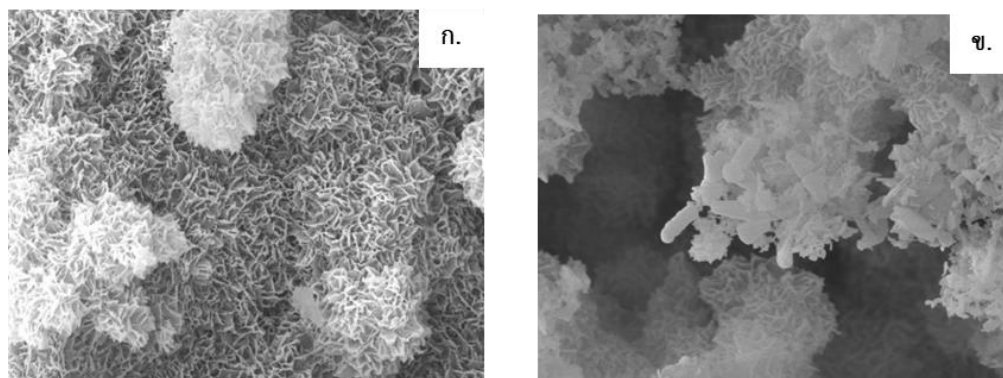
รูปที่ 4.18 ประสิทธิภาพย่อยสลายของสายพันธุ์ PO1, PO2, PY1 และ FW1 และกลุ่มแบคทีเรีย OPK ในการย่อยสลายนอร์มัล-เตตระเดคเคน ความเข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อลิตร (ก) นอร์มัล-เฮกซะเดคเคน ความเข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อลิตร (ข) และนอร์มัล-โดโดเซน ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร (ค) ความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิห้อง (28-30 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 7 วัน ปริมาณหัวเชื้อแบคทีเรียเริ่มต้นประมาณ  $10^8$  CFU ต่อมิลลิลิตร (Laothamteep และคณะ, 2022)



รูปที่ 4.19 ประสิทธิภาพย่อยสลายของสายพันธุ์เดี่ยว PO1, PO2, PY1 และ FW1 และกลุ่มแบคทีเรีย OPK ในการย่อยสลายน้ำมันดิบ ความเข้มข้น 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร ความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิห้อง (28-30 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 7 วัน ปริมาณหัวเชื้อแบคทีเรียเริ่มต้นประมาณ  $10^8$  CFU ต่อมิลลิลิตร (Laothamteep และคณะ, 2022)

#### 4.6 ภาวะการตรึงกลุ่มแบคทีเรีย และประสิทธิภาพการกำจัดน้ำมันดิบของกลุ่มแบคทีเรียตรึง OPK

การใช้แบคทีเรียในรูปแบบการตรึงเซลล์ (immobilization) ซึ่งแบคทีเรียถูกยึดตรึงไว้บนวัสดุที่เหมาะสม มีแนวโน้มช่วยเพิ่มอัตราการรอดชีวิตของแบคทีเรียเมื่ออยู่ในสิ่งแวดล้อม หรือระบบบำบัด และช่วยให้แบคทีเรียคงอยู่ได้ในพื้นที่ที่ต้องการบำบัดได้ โดยไม่ถูกชะล้างออกไปได้ง่าย (Dzionic และคณะ, 2016) ซีโอไลท์ เป็นวัสดุตรึงที่มีรูพรุนและพื้นที่ผิวมาก คาดว่าแบคทีเรียน่าจะยึดเกาะได้เป็นจำนวนมาก (รูปที่ 4.20 (ก)) การทดลองนี้หาภาวะการตรึงที่เหมาะสมสำหรับกลุ่มแบคทีเรียโดยการแปรผันปริมาณซีโอไลท์ ความเร็วรอบในการเขย่า และระยะเวลาการตรึง จากนั้นทดสอบประสิทธิภาพการกำจัดน้ำมันดิบของเซลล์ตรึงในอาหารเหลว น้ำทะเลปลอดเชื้อที่ไม่มีการเติมสารอาหาร และทดสอบประสิทธิภาพบำบัดทรายนบนเปื้อนน้ำมันดิบโดยเซลล์ตรึงในระบบบิวโรว์จาลองระดับห้องปฏิบัติการ



**รูปที่ 4.20** ภาพถ่ายลักษณะพื้นผิวของซีโอไลต์ กำลังขยาย 10,000 เท่า (ก)  
และภาพการการยึดเกาะของแบคทีเรียในกลุ่มแบคทีเรียกำลังขยาย 10,000 เท่า (ข)  
(Laothamteep และคณะ, 2022)

#### 4.6.1 ภาวะที่เหมาะสมสำหรับการตรึงกลุ่มแบคทีเรียบนซีโอไลต์

##### 4.6.1.1 ปริมาณซีโอไลต์

จากการทดสอบการแปรผันปริมาณซีโอไลต์ที่เหมาะสมสำหรับการตรึงกลุ่มแบคทีเรีย โดยแปรผันปริมาณซีโอไลต์ จำนวน 5, 10, 15 และ 20 กรัมในอาหารเหลว 0.25X LB ที่มีปริมาณเชื้อเริ่มต้นเท่ากับ  $10^8$  CFU ต่อมิลลิลิตร ผลการทดลองพบว่าปริมาณวัสดุตรึง 10, 15 และ 20 กรัม มีจำนวนแบคทีเรียเกาะอยู่ไม่แตกต่างกันคือ  $10^8$  CFU ต่อกรัมซีโอไลต์ ดังแสดงในรูปที่ 4.21 (ก) ดังนั้นจึงเลือกปริมาณวัสดุตรึงจำนวน 20 กรัมไปใช้ในการตรึงเซลล์ เนื่องจากได้ปริมาณเซลล์ตรึงที่นำไปใช้ในการทดลองมากกว่า และศึกษาความเร็วรอบที่เหมาะสมที่ทำให้แบคทีเรียเกาะอยู่บนซีโอไลต์ได้มากที่สุด

##### 4.6.1.2 ความเร็วในการเขย่า

เพื่อให้แบคทีเรียเกาะอยู่บนวัสดุตรึงให้มากที่สุด จึงแปรผันความเร็วในการเขย่าในการทดลองนี้แปรผันความเร็วในการเขย่าได้แก่ 100, 150 หรือ 200 รอบต่อนาที โดยมีซีโอไลต์ปริมาณ 20 กรัมในอาหารเหลว 0.25X LB ที่มีปริมาณเชื้อเริ่มต้นเท่ากับ  $10^8$  CFU ต่อมิลลิลิตร ผลการทดลองพบว่าที่ความเร็วรอบ 100 รอบต่อนาที มีจำนวนแบคทีเรียเกาะอยู่บนซีโอไลต์น้อยกว่าที่ความเร็วรอบ 150 และ 200 รอบต่อนาที โดยที่ความเร็วรอบ 150 และ 200 รอบต่อนาทีที่มีจำนวนแบคทีเรียเกาะอยู่บนซีโอไลต์ไม่ต่างกันคือ  $10^8$  CFU ต่อกรัมซีโอไลต์ ดังแสดงในรูปที่ 4.21 (ข) เพื่อป้องกันการหลุดของแบคทีเรียออกจากวัสดุตรึงในการนำไปใช้ในการบำบัดสิ่งแวดล้อมปนเปื้อน และการยึดเกาะที่แข็งแรงของแบคทีเรียบนซีโอไลต์ จึงได้คัดเลือกความเร็วในการเขย่าที่ 200 รอบต่อ



นาที่ ไปศึกษาระยะเวลาการตรึงที่เหมาะสมที่จะทำให้แบคทีเรียยึดเกาะบนซีโอไลท์ได้มากที่สุดเพิ่มเติม

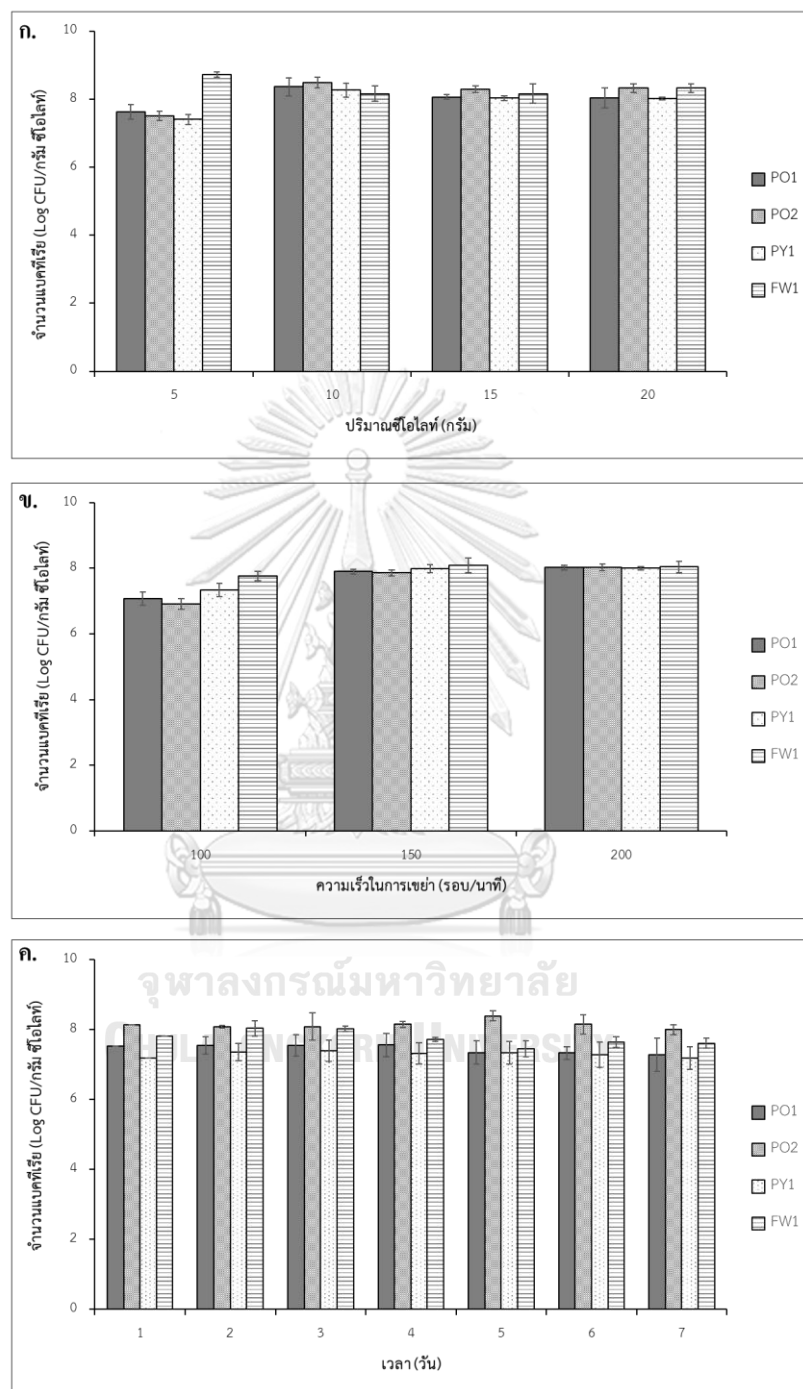
#### 4.6.1.3 ระยะเวลาในการตรึง

ในการทดลองนี้แปรผันระยะเวลาในการตรึงเป็นระยะเวลา 7 วัน พบว่าแบคทีเรียสามารถยึดเกาะบนซีโอไลท์ได้ดีในระยะเวลา 1 วันแรกของการทดลอง โดยมีจำนวนแบคทีเรียเท่ากับ  $10^8$  CFU ต่อกรัมซีโอไลท์ ดังแสดงในรูปที่ 4.21(ค) และงานวิจัยนี้ต้องการระยะเวลาในการตรึงที่สั้นที่สุดที่ให้ปริมาณการเกาะติดของเซลล์แบคทีเรียที่สูง เพื่อลดค่าใช้จ่ายในระหว่างการบำบัดสิ่งแวดล้อมบนเปื้อนน้ำมันดิบขนาดใหญ่ ดังนั้นได้เลือกระยะเวลา 1 วันในการตรึงกลุ่มแบคทีเรียบนซีโอไลท์ โดยการตรึงกลุ่มแบคทีเรียในงานวิจัยนี้ได้ใช้ระยะเวลาการตรึงน้อยกว่าในงานวิจัยของ Liang และคณะ (2009) ที่ตรึงกลุ่มแบคทีเรียบนซีโอไลท์ เป็นระยะเวลา 7 วัน และได้จำนวนแบคทีเรียประมาณ  $10^8$  CFU ต่อกรัมซีโอไลท์

ในงานวิจัยนี้ได้คัดเลือกปริมาณซีโอไลท์ 20 กรัม เขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที และตรึงเป็นระยะเวลา 1 วัน ซึ่งได้จำนวนแบคทีเรียประมาณ  $10^8$  CFU ต่อกรัมซีโอไลท์ นำไปศึกษาประสิทธิภาพการกำจัดน้ำมันดิบของกลุ่มแบคทีเรียตรึง OPK ต่อไป

#### 4.6.2 ประสิทธิภาพการกำจัดน้ำมันดิบของกลุ่มแบคทีเรียตรึง OPK

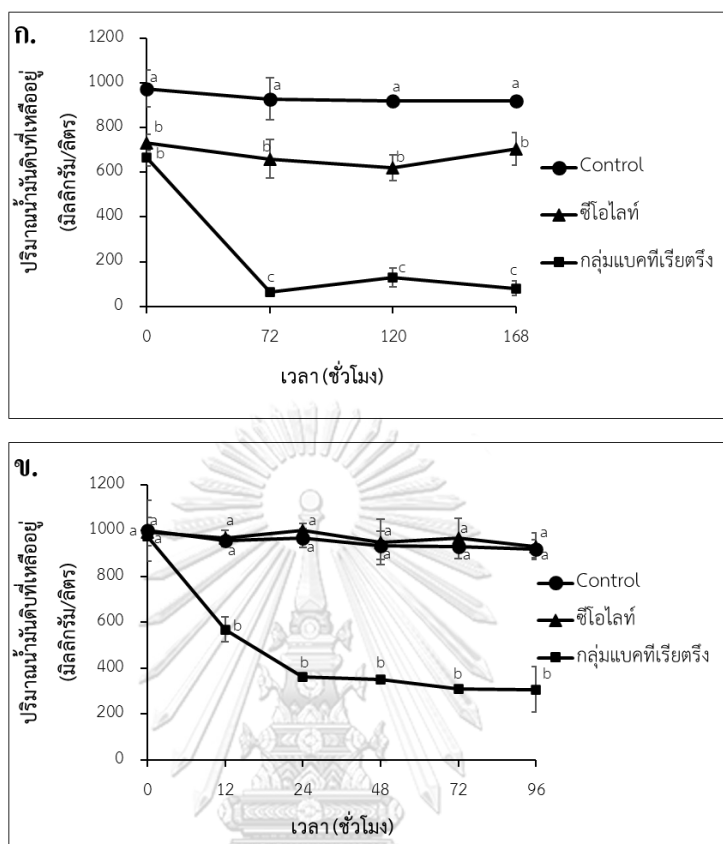
การทดสอบความสามารถการกำจัดน้ำมันดิบด้วยกลุ่มแบคทีเรียตรึง OPK ผลการทดลองพบว่ากลุ่มแบคทีเรียตรึง OPK สามารถกำจัดน้ำมันดิบ ความเข้มข้น 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตรในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว NSM ได้ 90.27 เปอร์เซ็นต์ในระยะเวลา 72 ชั่วโมง (รูปที่ 4.22 (ก)) และในน้ำทะเลปลอดเชื้อที่ไม่มีการเติมสารอาหาร ได้ 74.82 เปอร์เซ็นต์ในระยะเวลา 96 ชั่วโมง (รูปที่ 4.22 (ข)) โดยกลุ่มแบคทีเรียตรึง OPK มีความสามารถย่อยสลายน้ำมันดิบได้ดีกว่ากลุ่มแบคทีเรียประกอบด้วย *Exiguobacterium* sp. ASW-1, *Pseudomonas aeruginosa* ASW-2, *Alcaligenes* sp. ASW-3, *Alcaligenes* sp. ASS-1 และ *Bacillus* sp. ASS-2 ที่ตรึงในแคลเซียมอัลจิเนต ซึ่งสามารถย่อยสลายน้ำมันดิบ ความเข้มข้น 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตรในน้ำทะเลปลอดเชื้อที่มีการเติมสารอาหารได้ 63.90 เปอร์เซ็นต์ ในระยะเวลา 168 ชั่วโมง (Shen และคณะ, 2015) จากผลการทดลอง กลุ่มแบคทีเรียตรึงยังคงมีประสิทธิภาพการกำจัดน้ำมันดิบในสภาวะที่ไม่การเติมสารอาหาร แสดงให้เห็นว่ากลุ่มแบคทีเรียตรึงมีแนวโน้มในการนำไปประยุกต์ใช้ในการบำบัดน้ำทะเลปนเปื้อนน้ำมันดิบได้



รูปที่ 4.21 จำนวนแบคทีเรียที่ตรึงอยู่บนซีอิ๊วที่มีการแปรผันปริมาณซีอิ๊ว (ก)

ความเร็วในการเขย่า (ข) และระยะเวลาในการตรึง (ค)

ปริมาณหัวเชื้อแบคทีเรียเริ่มต้นประมาณ  $10^8$  CFU ต่อมิลลิลิตร (Laothamteep และคณะ, 2022)



รูปที่ 4.22 ประสิทธิภาพของกลุ่มแบคทีเรียตรง OPK ในการกำจัดน้ำมันดิบ ความเข้มข้น 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร ความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิห้อง (28-30 องศาเซลเซียส) ในอาหารเหลว NSW (ก) และในน้ำทะเลปลอดเชื้อที่ไม่มีการเติมสารอาหาร (ข) (Laothamteep และคณะ, 2022)

#### 4.6.3 ผลของปัจจัยทางสิ่งแวดล้อมต่อการกำจัดน้ำมันดิบ

เนื่องจากในสิ่งแวดล้อมจริงมักมีการแปรผันปัจจัยทางสิ่งแวดล้อมต่างๆ อยู่ตลอดเวลา เช่น ค่า pH อุณหภูมิ และความเค็ม เป็นต้น กลุ่มแบคทีเรีย OPK ในรูปแบบเซลล์อิสระมีประสิทธิภาพย่อยสลายไขมันได้ดีภายใต้การแปรผันค่า pH อุณหภูมิ และการเติม NaCl อย่างไรก็ตามยังไม่มีข้อมูลเกี่ยวกับประสิทธิภาพการกำจัดน้ำมันดิบของกลุ่มแบคทีเรียตรงภายใต้การแปรผันปัจจัยทางสิ่งแวดล้อม นอกจากนี้แบคทีเรียตรงมีแนวโน้มจะทนต่อสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมได้ดี การทดลองนี้จึงทดสอบประสิทธิภาพการกำจัดน้ำมันดิบ ความเข้มข้น 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตรของ

กลุ่มแบคทีเรียตรึง OPK เป็นระยะเวลา 5 วัน ภายใต้สภาวะต่างๆ ได้แก่ สภาวะที่มีการแปรผันค่า pH สภาวะที่มีการแปรผันอุณหภูมิ และสภาวะที่มีการแปรผันค่าความเค็ม เพื่อประเมินขอบเขตความสามารถของกลุ่มแบคทีเรียตรึง OPK สำหรับนำไปประยุกต์ใช้ในการบำบัดสิ่งแวดล้อมปนเปื้อนน้ำมันดิบได้อย่างมีประสิทธิภาพสูงสุดต่อไป

ค่า pH มีผลต่ออัตราการย่อยสลายของแบคทีเรีย โดยค่า pH ที่ต่ำ จะทำให้อัตราการย่อยสลายลดลง โดยแบคทีเรียย่อยสลายน้ำมันดิบสามารถอาศัยอยู่ได้ในช่วงค่า pH 4.0 ถึง 9.0 (Boszczyk-Maleszak และคณะ, 2006) และความเป็นกรด-ด่างสูงหรือต่ำเกินไปทำให้แบคทีเรียหยุดการเจริญเติบโตได้ จากการทดสอบประสิทธิภาพการกำจัดน้ำมันดิบ ความเข้มข้น 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตรของกลุ่มแบคทีเรียตรึง OPK ในสภาวะที่มีการแปรผันค่า pH ได้แก่ 5.0, 6.0, 7.0, 8.0 และ 9.0 ผลการทดลองพบว่า กลุ่มแบคทีเรียตรึง OPK สามารถกำจัดน้ำมันดิบได้ดีใกล้เคียงกันที่ค่า pH 6.0, 7.0, 8.0 และ 9.0 โดยสามารถกำจัดน้ำมันดิบได้ 72.88, 75.97, 70.04 และ 67.24 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ และสามารถกำจัดน้ำมันดิบที่ค่า pH 5.0 ได้ 62.91 เปอร์เซ็นต์ ในระยะเวลา 5 วัน (รูปที่ 4.23 ก)

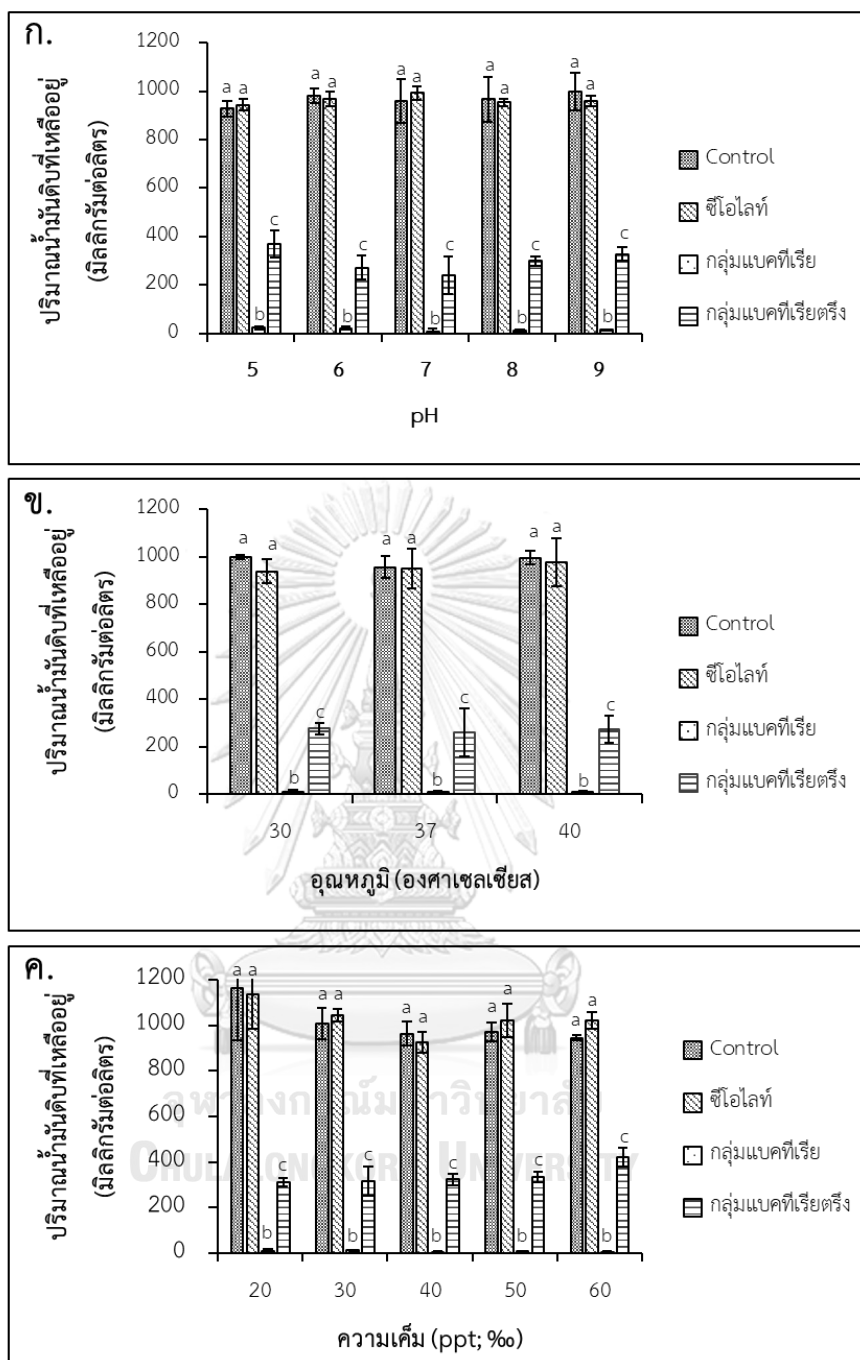
อุณหภูมิ มีผลต่อลักษณะทางกายภาพและทางเคมีของน้ำมันดิบ ในอุณหภูมิที่ต่ำ ความหนืดของน้ำมันดิบจะเพิ่มขึ้น การระเหยของไฮโดรคาร์บอนลดลง ทำให้การแพร่กระจายของน้ำมันดิบเกิดได้น้อยลดพื้นที่การเข้าถึงของแบคทีเรีย ทำให้ความเป็นพิษอยู่ในระยะเวลานาน เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์แบคทีเรีย และลดกิจกรรมต่างๆ ของแบคทีเรีย แต่หากอุณหภูมิสูงเกินไป จะทำให้อัตราการเกิดปฏิกิริยาลดลงเช่นเดียวกัน (So และคณะ, 2003) ทดสอบประสิทธิภาพการกำจัดน้ำมันดิบ ความเข้มข้น 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตรของกลุ่มแบคทีเรียตรึง OPK ในสภาวะที่มีการแปรผันอุณหภูมิ ได้แก่ 30, 37 และ 40 องศาเซลเซียส ผลการทดลองพบว่า กลุ่มแบคทีเรียตรึง OPK สามารถกำจัดน้ำมันดิบได้ดีใกล้เคียงกันในทุกอุณหภูมิ โดยสามารถกำจัดน้ำมันดิบได้ประมาณ 72 ถึง 74 เปอร์เซ็นต์ ในระยะเวลา 5 วัน (รูปที่ 4.23 ข) แสดงให้เห็นว่า กลุ่มแบคทีเรียตรึง OPK มีแนวโน้มนำไปประยุกต์ใช้ในการบำบัดน้ำทะเลปนเปื้อนน้ำมันดิบที่บริเวณเขตร้อนได้

ความเค็ม เป็นปัจจัยที่มีผลต่อกระบวนการบำบัดทางชีวภาพ เนื่องจากความเค็มที่เพิ่มขึ้น จะทำให้แรงดันออสโมติกเพิ่มสูงขึ้น ซึ่งส่งผลต่อการเจริญของแบคทีเรีย และเกิดการยับยั้งการสลายตัวของน้ำมันดิบ (Qin และคณะ, 2012) ทดสอบการกำจัดน้ำมันดิบ ความเข้มข้น 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตรของกลุ่มแบคทีเรียตรึง OPK ในสภาวะที่มีการแปรผันค่าความเค็ม ได้แก่ ที่ระดับความเค็ม 20, 30, 40, 50 และ 60 ppt (%) ผลการทดลองพบว่า กลุ่มแบคทีเรียตรึง OPK สามารถกำจัดน้ำมันดิบได้ดีใกล้เคียงกันที่ความเค็ม 20, 30, 40 และ 50 ppt โดยสามารถกำจัดน้ำมันดิบได้ประมาณ 66 ถึง

68 เปอร์เซ็นต์ และสามารถกำจัดน้ำมันดิบที่ค่าความเค็ม 60 ppt ได้ประมาณ 57 เปอร์เซ็นต์ ในระยะเวลา 5 วัน (รูปที่ 4.23 (ค))

นอกจากนี้ กลุ่มแบคทีเรีย OPK ในรูปแบบเซลล์อิสระมีประสิทธิภาพย่อยสลายน้ำมันดิบ ความเข้มข้น 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตรได้เกือบสมบูรณ์ ภายใต้การแปรผันค่า pH อุณหภูมิ และความเค็ม (รูปที่ 4.23) ทั้งนี้คาดว่า ซีโอไลท์ ซึ่งเป็นวัสดุตั้งที่มีลักษณะเหมือนหิน ทำให้เป็นข้อจำกัด ในการเคลื่อนไหวเมื่อนำไปเขย่า และแยกตัวออกจากของเหลว ส่งผลให้ไม่สามารถสัมผัสกับน้ำมันดิบ ได้โดยตรง ในขณะที่เซลล์อิสระสามารถสัมผัสกับน้ำมันดิบได้โดยตรง จึงเกิดการย่อยสลายได้อย่าง รวดเร็ว

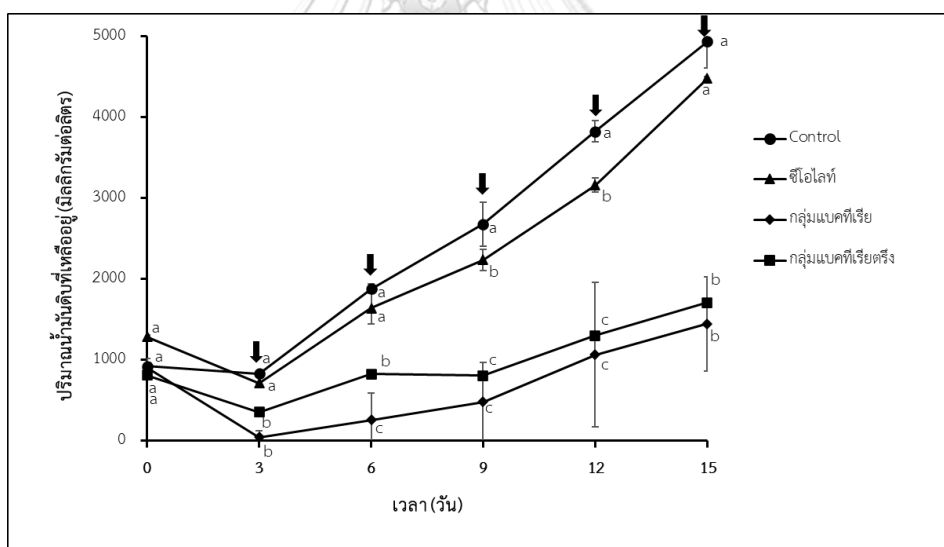
จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า กลุ่มแบคทีเรีย OPK มีประสิทธิภาพการกำจัดน้ำมันดิบได้ ดีภายใต้สภาวะการแปรผันปัจจัยทางสิ่งแวดล้อมต่างๆ จึงมีแนวโน้มจะสามารถนำกลุ่มแบคทีเรียตรง ไปประยุกต์ใช้ในการบำบัดสิ่งแวดล้อมปนเปื้อนน้ำมันดิบต่อไปได้ ถึงแม้ว่ากลุ่มแบคทีเรียในรูปแบบ เซลล์อิสระจะมีประสิทธิภาพการย่อยสลายที่ดีกว่ากลุ่มแบคทีเรียตรงในระบบที่มีการเขย่า ในงานวิจัย นี้มุ่งเน้นศึกษาการประยุกต์ใช้กลุ่มแบคทีเรียในการบำบัดดินทรายปนเปื้อนน้ำมันดิบที่บริเวณชายหาด และแบคทีเรียตรงสามารถคงอยู่ในระบบบำบัดได้ดีกว่าแบคทีเรียในรูปแบบอิสระ (Bayat และคณะ, 2015; Dzionek และคณะ, 2016; Chen และคณะ, 2017)



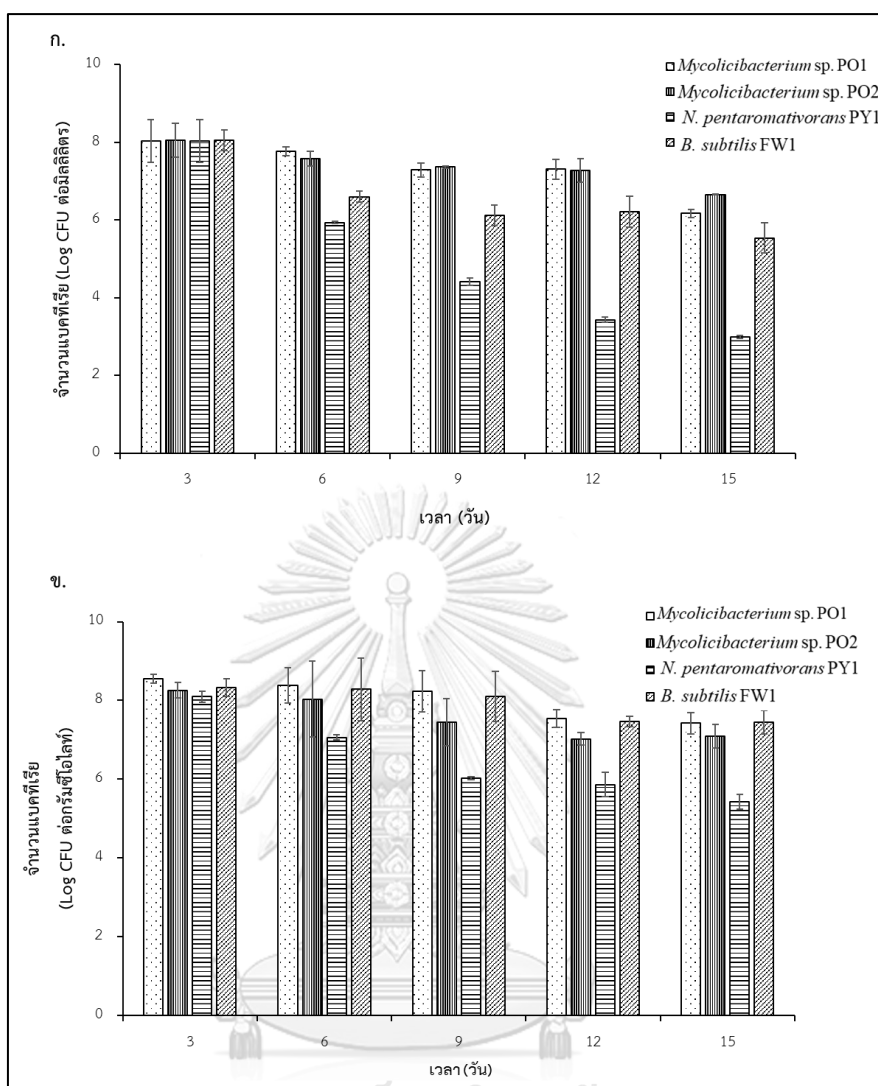
รูปที่ 4.23 ประสิทธิภาพของกลุ่มแบคทีเรียและกลุ่มแบคทีเรียตรง OPK ในการกำจัดน้ำมันดิบ ความเข้มข้น 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตรภายใต้การแปรผันค่า pH (ก), อุณหภูมิ (ข) และความเค็ม (ค) เป็นระยะเวลา 5 วัน ปริมาณหัวเชื้อแบคทีเรียเริ่มต้นประมาณ  $10^8$  CFU ต่อชุดการทดลอง (Laothamteep และคณะ, 2022)

#### 4.6.4 ประสิทธิภาพการกำจัดน้ำมันดิบแบบกึ่งต่อเนื่องและการใช้ซ้ำของกลุ่มแบคทีเรียตรึง

ในการทดสอบผลของความเข้มข้นของน้ำมันดิบต่อประสิทธิภาพย่อยสลายด้วยกลุ่มแบคทีเรียรูปแบบเซลล์อิสระ และกลุ่มแบคทีเรียตรึง OPK โดยใช้ปริมาณแบคทีเรียเริ่มต้น  $10^8$  CFU ต่อชุดทดลองในน้ำทะเลปลอดเชื้อที่ไม่มีการเติมสารอาหาร ปริมาตร 50 มิลลิลิตรในการทดลองแบบกึ่งต่อเนื่อง โดยเติมน้ำมันดิบความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตรทุก 3 วัน เป็นระยะเวลา 15 วัน เพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพย่อยสลายน้ำมันดิบระหว่างกลุ่มแบคทีเรียเซลล์อิสระ และกลุ่มแบคทีเรียตรึง OPK จากผลการทดลองพบว่า กลุ่มแบคทีเรีย OPK มีประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันดิบ 58.61 ถึง 73.15 เปอร์เซ็นต์ และกลุ่มแบคทีเรีย OPK ในรูปแบบเซลล์อิสระย่อยสลายน้ำมันดิบได้ดีกว่าในรูปแบบเซลล์ตรึงเล็กน้อยตลอดการทดลอง (รูปที่ 4.24) ถึงแม้ว่ากลุ่มแบคทีเรียรูปแบบเซลล์อิสระจะมีประสิทธิภาพย่อยสลายน้ำมันดิบได้ดีกว่าในรูปแบบเซลล์ตรึง แต่มีจำนวนแบคทีเรียที่เหลือรอดน้อยกว่าในรูปแบบเซลล์ตรึง ดังแสดงในรูปที่ 4.25



**รูปที่ 4.24** ประสิทธิภาพย่อยสลายน้ำมันดิบระหว่างกลุ่มแบคทีเรียเซลล์อิสระ และกลุ่มแบคทีเรียตรึง OPK ในการทดลองแบบกึ่งต่อเนื่อง ที่ความเข้มข้นเริ่มต้นของน้ำมันดิบ 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร และเติมน้ำมันดิบ 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร ทุก 3 วัน ตามตำแหน่งของลูกศร ปริมาณหัวเชื้อแบคทีเรียเริ่มต้นประมาณ  $10^8$  CFU ต่อชุดการทดลอง (Laothamteep และคณะ, 2022)

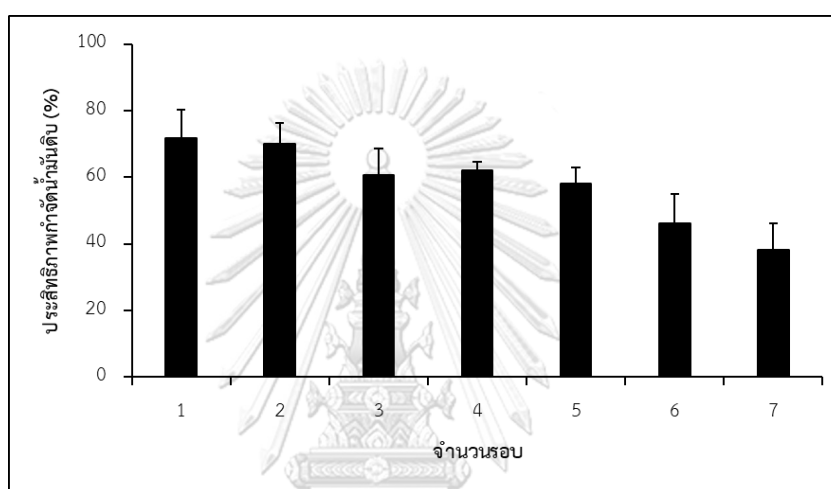


รูปที่ 4.25 จำนวนแบคทีเรียของกลุ่มแบคทีเรีย OPK ในรูปแบบเซลล์อิสระ (ก) และรูปแบบเซลล์ตรึง (ข) ในการทดลองแบบกึ่งต่อเนื่อง (Laothamteep และคณะ, 2022)

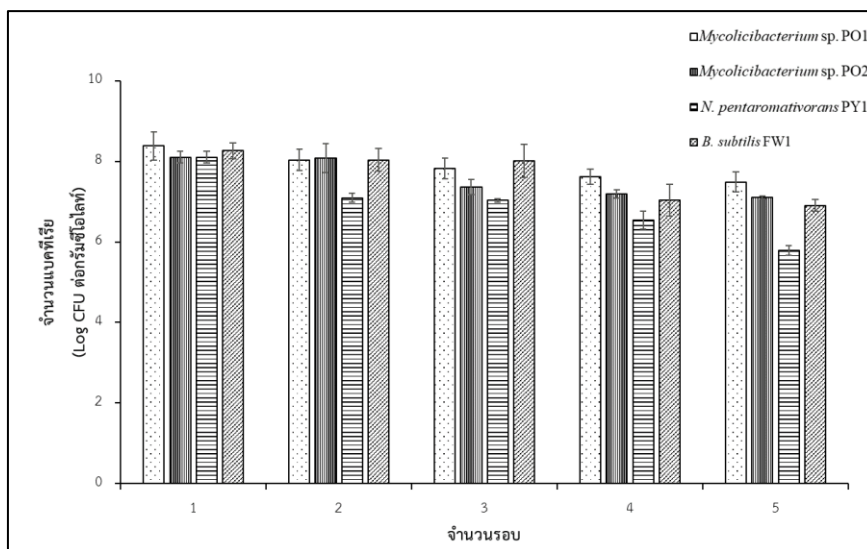
จากการทดสอบประสิทธิภาพการใช้อำนาจของกลุ่มแบคทีเรียตรึงในการย่อยสลายน้ำมันดิบ ความเข้มข้น 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 3 วัน จำนวน 7 รอบ โดยใช้เซลล์ตรึง 2 กรัมซึ่งมี ปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้นเท่ากับ  $10^8$  CFU ต่อชุดทดลอง พบว่ากลุ่มแบคทีเรียตรึงมีประสิทธิภาพกำจัด น้ำมันดิบลดลงจาก 71.63 เหลือ 38.11 เปอร์เซ็นต์ในการใช้ซ้ำรอบที่ 7 (รูปที่ 4.26) และกลุ่ม แบคทีเรียตรึงยังคงมีประสิทธิภาพกำจัดน้ำมันดิบมากกว่า 58 เปอร์เซ็นต์ในการใช้ซ้ำรอบที่ 5 ดังนั้น การใช้อำนาจของกลุ่มแบคทีเรียตรึงในการกำจัดน้ำมันดิบให้มีประสิทธิภาพในงานวิจัยนี้ สามารถใช้ซ้ำได้ สูงถึง 5 รอบ (รูปที่ 4.26) และพบจำนวนแบคทีเรียในกลุ่มแบคทีเรียประมาณ Log 6 ถึง 8 CFU ต่อ



กรัมซีโอไลท์ในวันสุดท้ายของการทดลอง (รูปที่ 4.27) โดยในการใช้ซ้ำรอบที่ 1 กลุ่มแบคทีเรียตรึง ยังคงมีประสิทธิภาพกำจัดน้ำมันดิบได้ 71.63 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งใกล้เคียงกับประสิทธิภาพของกลุ่มแบคทีเรียตรึงก่อนการใช้ซ้ำคือ 73.08 เปอร์เซ็นต์ ในระยะเวลา 3 วัน (รูปที่ 4.22 (ข)) โดยการใช้ซ้ำเป็นคุณสมบัติอย่างหนึ่งที่สำคัญของเซลล์ตรึงในการนำไปบำบัดสิ่งแวดล้อมปนเปื้อนน้ำมันดิบ เนื่องจากประหยัดค่าใช้จ่าย และไม่ต้องเตรียมหัวเชื้อใหม่ทุกครั้ง (Nopcharoenkul และคณะ, 2011; San และคณะ, 2014)



รูปที่ 4.26 ประสิทธิภาพการใช้ซ้ำของกลุ่มแบคทีเรียตรึง OPK ในการกำจัดน้ำมันดิบ ความเข้มข้น 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 3 วัน จำนวน 7 รอบ ปริมาณหัวเชื้อแบคทีเรียเริ่มต้นประมาณ  $10^8$  CFU ต่อกรัมซีโอไลท์ (Laothamteep และคณะ, 2022)



รูปที่ 4.27 จำนวนแบคทีเรียของกลุ่มแบคทีเรียในการทดลองการใช้ซ้ำของกลุ่มแบคทีเรียตรึง OPK (Laothamteep และคณะ, 2022)

#### 4.6.5 ประสิทธิภาพการบำบัดทรายปนเปื้อนน้ำมันดิบในระบบนิเวศจำลองระดับ

##### ห้องปฏิบัติการ

จากผลการทดสอบการกำจัดน้ำมันดิบของกลุ่มแบคทีเรียตรึง OPK พบว่ากลุ่มแบคทีเรียตรึง OPK มีประสิทธิภาพกำจัดน้ำมันดิบในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว NSM และในน้ำทะเลปลอดเชื้อที่ไม่มีการเติมสารอาหาร รวมทั้งแบคทีเรียมีถิ่นที่อยู่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายนอร์มัล-อัลเคนได้อย่างสมบูรณ์ จึงมีแนวโน้มจะนำไปประยุกต์ใช้ในการบำบัดดินทรายปนเปื้อนน้ำมันดิบ ดังนั้นจึงทดสอบประสิทธิภาพการบำบัดดินทรายปนเปื้อนน้ำมันดิบในระบบนิเวศจำลองระดับห้องปฏิบัติการ

##### 4.6.5.1 สมบัติทางกายภาพ เคมี และชีวภาพของตัวอย่างดินทรายจากอ่าวลูกโยน

โดยเลือกใช้ตัวอย่างดินชายฝั่งในบริเวณที่ได้รับการปนเปื้อนภายหลังเหตุการณ์น้ำมันรั่วไหล 1 เดือน จากอ่าวลูกโยน จังหวัดระยอง เพื่อเป็นตัวแทนของบริเวณที่เคยมีประวัติการปนเปื้อนน้ำมันดิบ ผลการวิเคราะห์สมบัติทางกายภาพ เคมี และชีวภาพของตัวอย่างดินทรายจากอ่าวลูกโยน แสดงในตารางที่ 4.5 และเมื่อเติมน้ำมันดิบ ความเข้มข้น 10,000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมดิน ค่า C:N เท่ากับ 9

**ตารางที่ 4.5** ผลการส่งวิเคราะห์ตัวอย่างดินทรายจากอ่าวลูกโยน จังหวัดระยอง ที่ได้รับการปนเปื้อนภายหลังเหตุการณ์น้ำมันรั่วไหล 1 เดือน

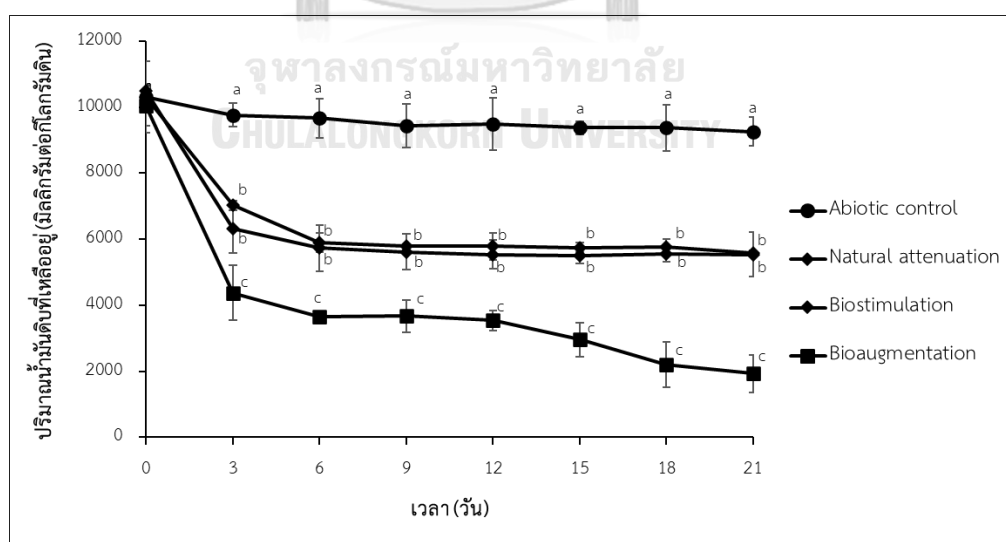
| ค่าพารามิเตอร์                                   | ผลการวิเคราะห์ |
|--|----------------|
| ลักษณะดิน  | ดินทราย        |
| อินทรีย์วัตถุ %                                  | 0.15           |
| Total N %  | 0.01           |
| Total P %  | 3.11           |
| Total K %  | 0.02           |
| ความชื้น %                                       | 8.01           |
| pH   | 8.9            |
| C/N ratio  | 9              |
| จำนวนแบคทีเรียทั้งหมด (MPN ต่อกรัมดิน)           | 6.18           |
| จำนวนแบคทีเรียย่อยสลายน้ำมันดิบ (MPN ต่อกรัมดิน) | 5.07           |

#### 4.6.5.2 ประสิทธิภาพการบำบัดทรายปนเปื้อนน้ำมันดิบในระบบจำลอง

การทดสอบประสิทธิภาพในการบำบัดดินทรายปนเปื้อนน้ำมันดิบ โดยเติมน้ำมันดิบความเข้มข้น 10,000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมดิน และทดสอบโดยใช้ 4 ชุดการทดลองได้แก่ ชุดการทดลอง Abiotic control เป็นชุดควบคุม ชุดการทดลอง Natural attenuation (NA) เพื่อทดสอบการย่อยสลายน้ำมันดิบโดยจุลินทรีย์ประจำถิ่น ชุดการทดลอง Biostimulation (BS) เพื่อทดสอบผลของการเติมซีโอไลท์ต่อประสิทธิภาพการกำจัดน้ำมันของแบคทีเรียประจำถิ่น และชุดการทดลอง Bioaugmentation (BA) เพื่อทดสอบประสิทธิภาพในการกำจัดน้ำมันดิบของกลุ่มแบคทีเรีย OPK บนซีโอไลท์ที่มีจำนวนหัวเชื้อเริ่มต้นที่ประมาณ  $10^8$  CFU ต่อกรัมน้ำหนักดินเปียก

ผลการบำบัดดินทรายปนเปื้อนน้ำมันในระบบนิเวศจำลองด้วยกลุ่มแบคทีเรียตรึง OPK พบว่า ชุดการทดลอง NA และชุด BS มีผลการกำจัดน้ำมันดิบไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ แสดงให้เห็นว่า แบคทีเรียประจำถิ่นสามารถย่อยสลายน้ำมันดิบได้เล็กน้อย และซีโอไลท์ไม่ส่งผลต่อการกำจัดน้ำมันด้วยแบคทีเรียประจำถิ่น โดยในชุดการทดลอง NA และ BS มีน้ำมันดิบเหลืออยู่ในระบบหลังการบ่ม 21 วันเท่ากับ 5,570.01 และ 5,539.57 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมดินตามลำดับ และเมื่อเปรียบเทียบระหว่างชุดการทดลอง BA และ NA พบว่าการเติมกลุ่มแบคทีเรียตรึง OPK ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการกำจัดน้ำมันได้ดียิ่งขึ้น โดยมีน้ำมันดิบเหลืออยู่ในระบบเพียง 1,933.20 มิลลิกรัมต่อ

กิโลกรัมดินหรือกำจัดน้ำมันได้ 80.67 เปอร์เซ็นต์ ดังแสดงในรูปที่ 4.28 แสดงให้เห็นว่า กลุ่มแบคทีเรียที่เจริญที่พัฒนาขึ้นมามีประสิทธิภาพในการกำจัดน้ำมันดิบที่ปนเปื้อนในดินทราย เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพย่อยสลายน้ำมันดิบกับงานวิจัยของ Wang และคณะ (2012) ศึกษาประสิทธิภาพกำจัดน้ำมันดิบ ความเข้มข้น 10,000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมดินของกลุ่มแบคทีเรียเจริญใน โซเดียมอัลจิเนตที่ผสมดินเบาไดอะตอมไมต์ พบว่าสามารถกำจัดน้ำมันดิบได้ 46.30 เปอร์เซ็นต์ ในระยะเวลา 70 วัน และ Dai และคณะ (2020) ศึกษาการย่อยสลายน้ำมันดิบแบบหนัก ความเข้มข้น 9,000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมดินในระดับกึ่งอุตสาหกรรมด้วยกลุ่มแบคทีเรียเจริญบนซีโอไลท์ที่ ประกอบด้วย *Brevibacillus* sp. DL-1, *Bacillus* sp. DL-13 และ *Acinetobacter* sp. DL-34 และ เอนไซม์แลคเคสที่เจริญบนซีโอไลท์ พบว่าสามารถกำจัดอัลเคนที่มีจำนวนคาร์บอน 15 ถึง 35 อะตอม ได้ 79.20 เปอร์เซ็นต์ ในระยะเวลา 100 วัน และมีประสิทธิภาพกำจัดอัลเคนได้สูงกว่าชุดการทดลอง NA (14.30 เปอร์เซ็นต์) และชุดการทดลอง BS (47.60 เปอร์เซ็นต์) แสดงให้เห็นว่า กลุ่มแบคทีเรีย OPK มีประสิทธิภาพกำจัดน้ำมันดิบได้ดีกว่า เนื่องจากการทำงานร่วมกันแบบเสริมกันของ แบคทีเรียในกลุ่มแบคทีเรีย นอกจากนี้มีงานวิจัยที่ใช้กลุ่มแบคทีเรียเจริญบำบัดสิ่งแวดล้อมปนเปื้อน น้ำมันดิบ ดังแสดงในตารางที่ 4.6 ดังนั้นจึงมีความน่าสนใจที่จะนำซีโอไลท์มาใช้เป็นวัสดุเจริญในการนำมาบำบัดสิ่งแวดล้อมปนเปื้อนน้ำมันดิบต่อไป ทั้งนี้ซีโอไลท์เป็นวัสดุเจริญที่ทำมาจากหิน (Drisko, 2018) ทำให้ไม่จำเป็นต้องกำจัดออกจากบริเวณที่ต้องการบำบัดอีกด้วย



รูปที่ 4.28 ประสิทธิภาพของกลุ่มแบคทีเรีย OPK ในการบำบัดดินทรายปนเปื้อนน้ำมันดิบ ความเข้มข้น 10,000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมดินใน 4 ชุดการทดลอง อุณหภูมิห้อง (28-30 องศาเซลเซียส) เป็นระยะเวลา 21 วัน (Laothamteep และคณะ, 2022)

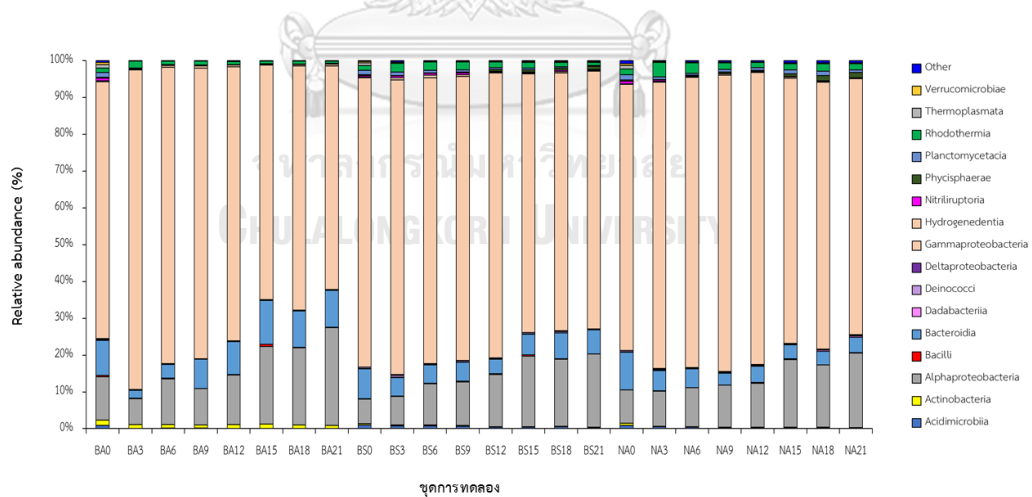
ตารางที่ 4.6 ประสิทธิภาพของแบคทีเรียตรงในการบำบัดสิ่งแวดล้อมบนใบม้วนต้นตบ

| กลุ่มแบคทีเรียตรง   | วัสดุจริง                   | ความเข้มข้น<br>ของน้ำมันดิบ           | การกำจัด<br>น้ำมันดิบ<br>(%) | ระยะเวลา<br>(วัน) | อ้างอิง          |
|---|-----------------------------|---------------------------------------|------------------------------|-------------------|------------------|
| <i>Mycolicibacterium</i> sp. PO1,<br><i>Mycolicibacterium</i> sp. PO2,<br><i>N. pentaromatorans</i> PY1 และ<br><i>B. subtilis</i> FW1 | ซีไอไลท์                    | 10,000<br>มิลลิกรัมต่อ<br>กิโลกรัมดิน | 80.67                        | 21                | ในงานวิจัยนี้    |
| กลุ่มแบคทีเรียที่มีความสามารถย่อยสลาย<br>น้ำมันดิบ  | เปลือกถั่วลิสงปน<br>ซีลีออย | 29,500<br>มิลลิกรัมต่อ<br>กิโลกรัมดิน | 61                           | 84                | Xu และ Lu, 2010  |
| <i>Burkholderia cepacia</i> GS3C,<br><i>Pandoraea pnomenusa</i> GP3B, และ<br><i>Sphingomonas</i> sp. GY2B                             | ซีลีออย                     | 13,755<br>มิลลิกรัมต่อ<br>กิโลกรัมดิน | 60                           | 60                | Li และคณะ (2016) |

#### 4.6.5.3 การเปลี่ยนแปลงของประชาคมแบคทีเรียในระบบจำลอง

วิเคราะห์โครงสร้างประชาคมแบคทีเรียทั้งหมดในชุดการทดลอง NA, ชุดการทดลอง BS และชุดการทดลอง BA โดยวิเคราะห์ 16S amplicon sequencing การวิเคราะห์โครงสร้างประชาคมแบคทีเรียในระดับคลาส (class) พบว่า Gammaproteobacteria เป็นประชากรเด่นในทุกตัวอย่าง ประมาณ 58.28 ถึง 80.19 เปอร์เซ็นต์ รองลงมา ได้แก่ Alphaproteobacteria และ Bacteroidia ประมาณ 2.41 ถึง 25.43 เปอร์เซ็นต์และ 2.35 ถึง 11.49 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 4.29 โดย Gammaproteobacteria และ Alphaproteobacteria เป็นกลุ่มแบคทีเรียที่สำคัญที่มักพบในดินตะกอนที่มีการปนเปื้อนน้ำมันปิโตรเลียม และเป็นกลุ่มสำคัญที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายไฮโดรคาร์บอน (Guarino และคณะ, 2019; Mahjoubia และคณะ, 2021) Mahjoubia และคณะ (2021) พบว่า Gammaproteobacteria เป็นประชากรเด่นในดินตะกอนปนเปื้อนน้ำมันดิบ

การวิเคราะห์โครงสร้างประชาคมแบคทีเรียในระดับจิ้นัส (genus) ในชุดการทดลอง BS และ NA พบว่า *Marinobacter* เป็นประชากรเด่น โดยในชุดการทดลอง BS มีประมาณ 43.86 ถึง 57.73 เปอร์เซ็นต์ และในชุดการทดลอง NA และ 24.64 ถึง 66.11 เปอร์เซ็นต์ (รูปที่ 4.30) จึงคาดว่าน่าจะเป็นแบคทีเรียประจำถิ่นที่มีบทบาทในการย่อยสลายน้ำมันดิบ มีงานวิจัยรายงานว่า *Marinobacter* เป็นแบคทีเรียที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายน้ำมันดิบ (Yakimov และคณะ, 2007; Liu และคณะ, 2017)

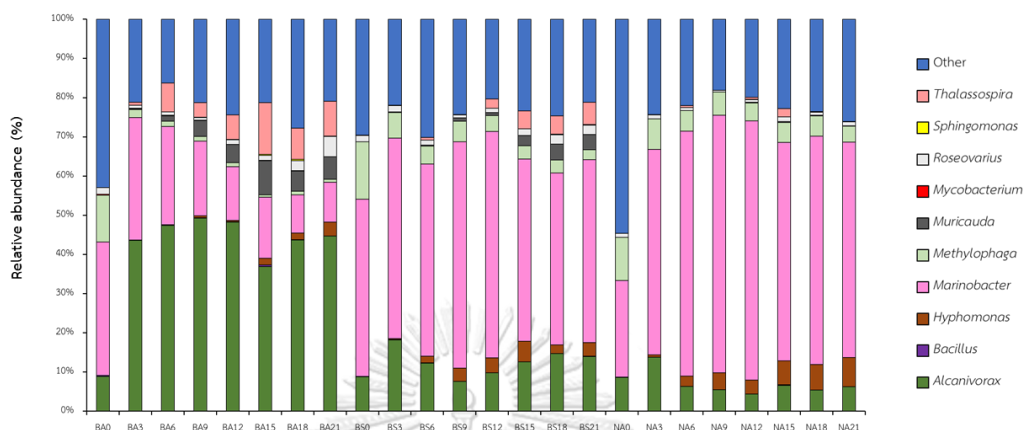


รูปที่ 4.29 โครงสร้างประชาคมแบคทีเรียระดับคลาส (class) ในชุดการทดลอง BA, BS และ NA (Laothamteep และคณะ, 2022)

ในชุดการทดลอง BA ที่เติมกลุ่มแบคทีเรียตรึง OPK ลงไปบำบัดดินทรายปนเปื้อนน้ำมันดิบ พบว่า สามารถตรวจติดตามแบคทีเรียได้ตลอดระยะเวลาของการทดลอง โดยพบ *Mycolicibacterium* ประมาณ 0.03 ถึง 0.32 เปอร์เซ็นต์ *Novosphingobium* ประมาณ 0.07 ถึง 0.13 เปอร์เซ็นต์และ *Bacillus* ประมาณ 0.013 ถึง 0.27 เปอร์เซ็นต์ตลอดระยะเวลาในการทดลอง และจากผลการทดลองประสิทธิภาพการกำจัดน้ำมันดิบในระบบนิเวศจำลองพบว่า ชุดการทดลอง BA มีประสิทธิภาพกำจัดน้ำมันดิบสูงกว่าชุดการทดลอง BS และ NA (รูปที่ 4.28) แสดงให้เห็นว่า การเติมกลุ่มแบคทีเรีย OPK ที่มีความสามารถย่อยสลายน้ำมันดิบช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันดิบในดินทรายได้ดียิ่งขึ้น นอกจากนี้ยังพบว่า *Alcanivorax* เป็นประชากรเด่นในวันที่ 3 ของการทดลองประมาณ 8.9 ถึง 49.28 เปอร์เซ็นต์ ทั้งนี้การเติมกลุ่มแบคทีเรีย OPK อาจไปกระตุ้นการเพิ่มจำนวน และช่วยส่งเสริมการย่อยสลายน้ำมันดิบของ *Alcanivorax* ได้ โดยมีงานวิจัยรายงานว่า *Alcanivorax* เป็นแบคทีเรียที่มีบทบาทในการช่วยบำบัดสิ่งแวดล้อมทางทะเลปนเปื้อนน้ำมันดิบ (Kostka และคณะ, 2011; Valencia-Agami และคณะ, 2019) รายงานวิจัยของ Cappello และคณะ (2007) พบว่า *Alcanivorax* เป็นประชากรเด่นของประชาคมแบคทีเรียในน้ำทะเลที่ปนเปื้อนน้ำมันดิบ และ Mahjoubi และคณะ (2021) รายงานว่า *Alcanivorax* เป็นประชากรเด่นของประชาคมแบคทีเรียในดินตะกอนปนเปื้อนน้ำมันดิบ นอกจากนี้ *Alcanivorax* มีความสามารถย่อยสลายอัลเคนโซ่ตรงและโซ่กิ่ง ((Liu และคณะ, 2010; Gregson และคณะ, 2019; Waikhom และคณะ, 2020) แสดงให้เห็นว่า *Mycolicibacterium*, *Novosphingobium*, *Bacillus* และ *Alcanivorax* ทำงานร่วมกันในรูปแบบส่งเสริมกันในการย่อยสลายน้ำมันดิบ โดย *Mycolicibacterium*, *Novosphingobium* และ *Bacillus* อาจย่อยสลายอัลเคนมีสายสั้นลง จากนั้น *Alcanivorax* อาจเข้ามาช่วยย่อยสลายอัลเคน ซึ่งถูกย่อยสลายจาก *Mycolicibacterium*, *Novosphingobium* และ *Bacillus* และอัลเคนโซ่กิ่งต่อไป

กลุ่มแบคทีเรีย OPK มีความสามารถย่อยสลายนอร์มัล-เตตระเดคเคน นอร์มัล-เฮกซะเดคเคน นอร์มัล-โดโคเซน และน้ำมันดิบได้ และผลการทดลองการย่อยสลายนอร์มัล-อัลเคนได้สอดคล้องกับผลการวิเคราะห์จีโนมของสายพันธุ์ PO1, PO2, PY1 และ FW1 ที่พบยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายอัลเคนได้แก่ ยีน *alkB* และ ยีน CYP153 เมื่อนำกลุ่มแบคทีเรียมาตรึงบนซีไอโอไลท์ พบว่า กลุ่มแบคทีเรียตรึงยังคงมีความสามารถกำจัดน้ำมันดิบภายใต้สภาวะที่ไม่การเติมสารอาหาร การแปรผันปัจจัยทางสิ่งแวดล้อม ได้แก่ ค่า pH อุณหภูมิ และความเค็ม การใช้ซ้ำ และการทดลองแบบกึ่งต่อเนื่อง นอกจากนี้กลุ่มแบคทีเรียตรึงยังคงมีประสิทธิภาพในการกำจัดน้ำมันดิบที่ปนเปื้อนในดินทราย แสดงให้เห็นว่า กลุ่มแบคทีเรียตรึงมีแนวโน้มนำไปประยุกต์ใช้ในการบำบัดสิ่งแวดล้อมทาง

ทะเลปนเปื้อนน้ำมันดิบได้ และพร้อมใช้เป็นต้นแบบของแบคทีเรียพร้อมใช้สำหรับการบำบัด  
สิ่งแวดล้อมปนเปื้อนน้ำมันดิบได้



ชุดการทดลอง

รูปที่ 4.30 โครงสร้างประชาคมแบคทีเรียระดับจีโนส (genus) ในชุดการทดลอง BA, BS และ NA  
(Laothamteep และคณะ, 2022)



## บรรณานุกรม

- Abbasian, F., Lockington, R., Mallavarapu, M., Naidu, R., 2015. A comprehensive review of aliphatic hydrocarbon biodegradation by bacteria. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 176, 670–699.
- Abbasian, F., Lockington, R., Mallavarapu, M., Naidu, R., 2016. A review on the genetics of aliphatic and aromatic hydrocarbon degradation. *Biotechnology and Applied Biochemistry*. 178, 224–250.
- Abdel-Shafy, H.I., Mansour, M.S.M., 2016. A review on polycyclic aromatic hydrocarbons: source, environmental impact, effect on human health and remediation. *Egyptian Journal of Petroleum*. 25, 107-123. .
- Abena, M.T.B., Li, T., Shah, M.N., Zhong, W., 2019. Biodegradation of total petroleum hydrocarbons (TPH) in highly contaminated soils by natural attenuation and bioaugmentation. *Chemosphere* 234, 864-874.
- Achten, C., Andersson, J.T., 2015. Overview of polycyclic aromatic compounds (PAC). *Polycyclic Aromatic Compounds* 35, 177–186.
- Aislabie, J., Saul, D.J., Foght, J.M., 2006. Bioremediation of hydrocarbon-contaminated polar soils. *Extremophiles* 10, 171–179.
- Al-Hawash, A.B., Dragh, M.A., Li, S., Alhujaily, A., Abbood, H.A., Zhang, X., Ma, F., 2018. Principles of microbial degradation of petroleum hydrocarbons in the environment. *Egyptian Journal of Aquatic Research* 44, 71–76.
- Al-Sayegh, A., Al-Wahaibi, Y., Joshi, S., Al-Bahry, S., Elshafie, A., Al-Bemani, A., 2016. Bioremediation of heavy crude oil contamination. *The Open Biotechnology Journal* 10, 301-311.
- Alegbeleye, O.O., Opeolu, B.O., Jackson, V.A., 2017. Polycyclic aromatic hydrocarbons: a critical review of environmental occurrence and bioremediation. *Environmental Management* 60, 758-783.
- Arulazhagan, P., Vasudevan, N., 2011. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by a halotolerant bacterial strain *Ochrobactrum* sp. VA1. *Marine Pollution Bulletin* 62, 388-394.

- Auffret, M.D., Yergeau, E., Labbé, D., Fayolle-Guichard, F., Greer, C.W., 2015. Importance of *Rhodococcus* strains in a bacterial consortium degrading a mixture of hydrocarbons, gasoline, and diesel oil additives revealed by metatranscriptomic analysis. *Applied Microbiology and Biotechnology* 99, 2419–2430.
- Baboshin, M.A., Golovleva, L.A., 2012. Aerobic bacterial degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and its kinetic aspects. *Microbiology* 81, 639-650.
- Badejo, A.C., Badejo, A.O., Shin, K.H., Chai, Y.G., 2013. A gene expression study of the activities of aromatic ring-cleavage dioxygenases in *Mycobacterium gilvum* PYR-GCK to changes in salinity and pH during pyrene degradation PLoS One 8, 1-8.
- Barin, R., Talebi, M., Biria, D., Beheshti, M., 2014. Fast bioremediation of petroleum-contaminated soils by a consortium of biosurfactant/bioemulsifier producing bacteria. *International Journal of Environmental Science and Technology* 11, 1701-1710.
- Bayat, Z., Hassanshahian, M., Cappello, S., 2015. Immobilization of microbes for bioremediation of crude oil polluted environments: a mini review. *The Open Microbiology Journal* 9, 48-54.
- Bejarano, A., Michel, J., 2016. Oil spills and their impacts on sand beach invertebrate communities: a literature review. *Environmental Pollution* 218, 709-722.
- Bhattacharya, M., Biswas, D., Sana, S., Datta, S., 2015. Biodegradation of waste lubricants by a newly isolated *Ochrobactrum* sp. C1. *3 Biotech* 5, 807–817.
- Bordenave, S., Goñi-urriza, M., Vilette, C., Blanchard, S., Caumette, P., Duran, R., 2008. Diversity of ring-hydroxylating dioxygenases in pristine and oil contaminated microbial mats at genomic and transcriptomic levels. *Environmental Microbiology* 10, 3201–3211.
- Brzeszcz, J., Kaszycki, P., 2018. Aerobic bacteria degrading both *n*-alkanes and aromatic hydrocarbons: an undervalued strategy for metabolic diversity and flexibility. *Biodegradation* 29, 359–407.
- Cappello, S., Denaro, R., Genovese, M., Giuliano, L., Yakimov, M.M., 2007. Predominant growth of *Alcanivorax* during experiments on “oil spill bioremediation” in mesocosms. *Microbiological Research* 162, 185-190.
- Celin, S.M., Sahai, S., Kalsi, A., Bhanot, P., 2020. Environmental monitoring approaches

- used during bioremediation of soils contaminated with hazardous explosive chemicals. *Trends in Environmental Analytical Chemistry* 26, e00088.
- Chandra, S., Sharma, R., Singh, K., Sharma, A., 2013. Application of bioremediation technology in the environment contaminated with petroleum hydrocarbon. *Annals of Microbiology* 63, 417-431.
- Chaudhary, P., Sahay, H., Sharma, R., Pandey, A.K., Singh, S.B., Saxena, A.N., Nain, L., 2015. Identification and analysis of polyaromatic hydrocarbons (PAHs)-biodegrading bacterial strains from refinery soil of India. *Environmental Monitoring and Assessment* 187, 1-9.
- Chauhan, A., Fazlurrahman, Oakeshott, J.G., Jain, E.K., 2008. Bacterial metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons: strategies for bioremediation. *Indian Journal of Microbiology* 48, 95-113.
- Che, S., Men, Y., 2019. Synthetic microbial consortia for biosynthesis and biodegradation: promises and challenges. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 46, 1343–1358.
- Chen, Q., Li, J., Liu, M., Sun, H., Bao, M., 2017. Study on the biodegradation of crude oil by free and immobilized bacterial consortium in marine environment. *PLoS One* 12, e0174445.
- Chen, W., Kong, Y., Li, J., Sun, Y., Min, J., Hu, X., 2020. Enhanced biodegradation of crude oil by constructed bacterial consortium comprising salt-tolerant petroleum degraders and biosurfactant producers. *International Biodeterioration & Biodegradation* 154, 105047.
- Chettri, B., Singh, A.K., 2019. Kinetics of hydrocarbon degradation by a newly isolated heavy metal tolerant bacterium *Novosphingobium panipatense* P5:ABC. *Bioresource Technology*. 294, 122190.
- Costa, A.S., Romao, L.P., Araujo, B.R., Lucas, S.C., Maciel, S.T., Wisniewski Jr., A., Alexandre, M.R., 2012. Environmental strategies to remove volatile aromatic fractions (BTEX) from petroleum industry wastewater using biomass. *Bioresource Technology* 105, 31-39.
- Dai, X., Lv, J., Guo, S., Wei, W., 2021. Heavy oil biodegradation by mixed bacterial consortium of biosurfactant-producing and heavy oil-degrading bacteria. *Polish*

- Journal of Environmental Studies 30, 71-80.
- Dai, X., Lv, J., Yan, G., Chen, C., Guo, S., Fu, P., 2020. Bioremediation of intertidal zones polluted by heavy oil spilling using immobilized laccase-bacteria consortium. *Bioresource Technology* 309, 123305.
- Dandie, C.E., Thomas, S.M., Bentham, R.H., McClure, N.C., 2004. Physiological characterization of *Mycobacterium* sp. Strain 1B isolated from a bacterial culture able to degrade high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons. *Journal of Applied Microbiology* 97, 246-255.
- Das, N., Chandran, P., 2010. Microbial degradation of petroleum hydrocarbon contaminants: an overview. *Biotechnology Research International* 2011, 1-14.
- Dean-Ross, D., Moody, J., Cerniglia, C.E., 2002. Utilization of mixtures of polycyclic aromatic hydrocarbons by bacteria isolated from contaminated sediment. *FEMS Microbiology Ecology* 41, 1-7.
- Drisko, J.A., 2018. Chapter 107 - chelation therapy. Elsevier.
- Dudhagara, D.R., Dave, B.P., 2018. *Mycobacterium* as polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHS) degrader, *Mycobacterium- Research and Development* ed. IntechOpen.
- Dzionic, A., Wojcieszynska, D., Guzik, U., 2016. Natural carriers in bioremediation: a review. *Electronic Journal of Biotechnology* 23, 28-36.
- Ebadi, A., Sima, N.A.K., Olamaee, M., Hashemi, M., Nasrabadi, R.G., 2017. Effective bioremediation of a petroleum-polluted saline soil by a surfactant-producing *Pseudomonas aeruginosa* consortium. *Journal of Advanced Research* 8, 627-633.
- Epel, D., Luckenbach, T., Stevenson, C.N., MacManus-Spencer, L.A., Hamdoun, A., Smital, T., 2008. Efflux transporters: newly appreciated roles in protection against pollutants. *Environmental Science & Technology* 42, 3914-3920.
- Farhadian, M., Vachelard, C., Duchez, D., Larroche, C., 2008. In situ bioremediation of monoaromatic pollutants in groundwater: a review. *Bioresource Technology* 9, 5296-5308.
- Fazilah, A., Darah, I., Noraznawatu, I., 2016. Bioremediation of phenanthrene by monocultures and mixed culture bacteria Isolated from contaminated soil.

- International Journal of Biological, Biomolecular, Agricultural, Food and Biotechnological Engineering 10, 512-515.
- Feng, L., Wang, W., Cheng, J., Ren, Y., Zhao, G., Gao, C., Tang, Y., Liu, X., Han, W., Peng, X., Liu, R., Wang, L., 2007. Genome and proteome of long-chain alkane degrading *Geobacillus thermodenitrificans* NG80-2 isolated from a deep-subsurface oil reservoir. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 104, 5602–5607.
- Festa, S., Coppotelli, B.M., Madueño, L., Loviso, C.L., Macchi, M., Neme Tauil, R.M., Valacco, M.P., Morelli, I.S., 2017. Assigning ecological roles to the populations belonging to a phenanthrene-degrading bacterial consortium using omic approaches. PloS one 12, e0184505.
- Festa, S., Coppotelli, B.M., Morelli, I.S., 2016. Comparative bioaugmentation with a consortium and a single strain in a phenanthrene-contaminated soil: Impact on the bacterial community and biodegradation. Applied Soil Ecology 98, 8-19.
- Ghosal, D., Ghosh, S., Dutta, T.K., Ahn, Y., 2016. Current state of knowledge in microbial degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs): a review. Frontiers in Microbiology 7, 1369.
- Gregson, B.H., Metodieva, G., Metodieva, M.V., McKew, B.A., 2019. Differential protein expression during growth on linear versus branched alkanes in the obligate marine hydrocarbon-degrading bacterium *Alcanivorax borkumensis* SK2T. Environmental Microbiology 21, 2347–2359.
- Guarino, C., Zuzolo, D., Marziano, M., Conte, B., Baiamonte, G., Morra, L., Benotti, D., Gresia, D., Stacul, E.R., Cicchella, D., Sciarrillo, R., 2019. Investigation and assessment for an effective approach to the reclamation of polycyclic aromatic hydrocarbon (PAHs) contaminated site: SIN Bagnoli. Italy. Scientific reports 9, 11522.
- Gupta, R.S., Lo, B., Son, J., 2018. Phylogenomics and comparative genomic studies robustly support division of the genus *Mycobacterium* into an emended genus *Mycobacterium* and four novel genera. Frontiers in Microbiology 9, 1-41.
- Gupta, S., Kumar, V., Pal, A.K., 2016. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons

- by microbial consortium: a distinctive approach for decontamination of soil. *Soil and Sediment Contamination: An International Journal* 25, 597-623.
- Habe, H., Kanemitsu, M., Nomura, M., Takemura, T., Iwata, K., Nojiri, H., Yamane, H., 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., Omori, T., 2003. Genetics of polycyclic aromatic hydrocarbon metabolism in diverse aerobic bacteria. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 67, 225-243.
- Hamzah, A., Phan, C.W., Bakar, N.F.A., Wong, K.K., 2013. Biodegradation of crude oil by constructed bacterial consortia and the constituent single bacteria isolated from Malaysia. *Bioremediation Journal* 7, 1-10.
- Haritash, A.K., Kaushik, C.P., 2009. Biodegradation aspects of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs): a review. *Journal of Hazardous Materials* 169, 1-15.
- Hassanshahian, M., Amirinejad, N., Behzadi, M.A., 2020. Crude oil pollution and biodegradation at the Persian Gulf: a comprehensive and review study. *Journal of Environmental Health Science and Engineering* 18, 1415-1435.
- Hassanshahian, M., Zeynalipour, M.S., Musa, F.H., 2014. Isolation and characterization of crude oil degrading bacteria from the Persian Gulf (Khorramshahr provenance). *Marine Pollution Bulletin* 82, 39-44.
- He, H., Chen, Y., Li, X., Chen, Y., Yang, C., Zeng, G., 2017. Influence of salinity on microorganisms in activated sludge processes: a review. *International Biodeterioration & Biodegradation* 119, 520-527.
- Heitkamp, M.A., Freeman, J.P., Miller, D.W., Cerniglia, C.E., 1988. Pyrene degradation by a *Mycobacterium* sp.: identification of ring oxidation and ring fission products. *Applied and Environmental Microbiology* 10, 2556-2565.
- Hennessee, C.T., Li, Q.X., 2016. Effects of polycyclic aromatic hydrocarbon mixtures on degradation, gene expression, and metabolite production in four *Mycobacterium* species. *Applied and Environmental Microbiology* 82, 3357-3369.
- Hidalgo, K., Sierra-Garcia, I.N., Dellagnezze, B.M., de Oliveira, V.M., 2020. Metagenomic

- insights into the mechanisms for biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in the oil supply chain. *Frontiers in Microbiology* 1, 561506.
- Honda, M., Suzuki, N., 2020. Toxicities of polycyclic aromatic hydrocarbons for aquatic animals. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 17, 1363.
- Hong, Y.H., Deng, M.C., Xu, X.M., Wu, C.F., Xiao, X., Zhu, Q., Sun, X.X., Zhou, Q.Z., Peng, J., Yuan, J.P., Wang, J.H., 2016. Characterization of the transcriptome of *Achromobacter* sp. HZ01 with the outstanding hydrocarbon-degrading ability. *Gene* 584, 185–194.
- Ibra, M., Zhang, H., 2020. Construction of a hydrocarbon-degrading consortium and characterization of two new lipopeptides biosurfactants. *Science of the Total Environment* 714, 136400.
- Idowu, O., Semple, K.T., Ramadass, K., O'Connor, W., Hansbro, P., Thavamani, P., 2019. Beyond the obvious: environmental health implications of polar polycyclic aromatic hydrocarbons. *Environment International* 123, 543–557.
- IEA, 2020. The global oil industry is experiencing a shock like no other in its history. <https://www.iea.org/articles/the-global-oil-industry-is-experiencing-shock-like-no-other-in-its-history>.
- ITOPF, 2020. Oil Tanker Spill Statistics. <https://www.itopf.org/knowledge-resources/data-statistics/statistics/>.
- Jasmine, J., Mukherji, S., 2015. Characterization of oily sludge from a refinery and biodegradability assessment using various hydrocarbon degrading strains and reconstituted consortia. *Journal of Environmental Management* 149, 118-125.
- Jernelöv, A., 2010. The threats from oil spills: now, then, and in the future. *AMBIO* 39, 353-366.
- Jiang, Y., Zhang, Z., Zhang, X., 2018. Co-biodegradation of pyrene and other PAHs by the bacterium *Acinetobacter johnsonii*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 163, 465-470.
- Johnsen, A.R., Karlson, U., 2004. Evaluation of bacterial strategies to promote the bioavailability of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Applied Microbiology and Biotechnology* 63, 452–459.

- Kalbuadi, D.N., Goenadi, D.H., Santi, L.P., Nurtjahja, L.R., 2019. The potential use of natural clinoptilolite zeolite for crude oil spill removal from sea water. *Journal of Minerals and Materials Characterization and Engineering* 7, 446–453.
- Kaneko, A., Miyadai, H., Danbara, H., Kawahara, K., 2000. Construction of mutants of *Sphingomonas paucimobilis* defective in terminal mannose in the glycosphingolipid. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 64, 1298–1301.
- Karlapudi, A.P., Venkateswarulu, T.C., Tammineedi, J., Kanumuri, L., Ravuru, B.K., Dirisala, V.R., Kodali, V.P., 2018. Role of biosurfactants in bioremediation of oil pollution—a review. *Petroleum* 4, 241-249.
- Kazemzadeh, S., Naghavi, N.S., Emami-Karvani, Z., Fouladgar, M., Emtiazi, G., 2020. Gas chromatography-mass spectrometry analyses of crude oil bioremediation by the novel *Klebsiella variicola* SKV2 immobilized in polyurethane polymer scaffold and two-layer microcapsulation. *Bioremediation Journal* 24, 129-149.
- Kelley, I., Freeman, J.P., Evans, F.E., Cerniglia, C.E., 1993. Identification of metabolites from the degradation of fluoranthene by *Mycobacterium* sp. strain PYR-1. *Applied and Environmental Microbiology* 59, 800-806.
- Khan, A.A., Wang, R.F., Cao, W.W., Doerge, D.R., Wennerstrom, D., 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.
- Khanpour-Alikelayeh, E., Partovina, A., Talebi, A., Kermanian, H., 2021. Enhanced biodegradation of light crude oil by immobilized *Bacillus licheniformis* in fabricated alginate beads through electrospray technique. *Environmental Monitoring and Assessment* 193, 328.
- Kim, D.W., Lee, K., Lee, D.H., Cha, C.J., 2018. Comparative genomic analysis of pyrene-degrading *Mycobacterium* species: genomic islands and ring-hydroxylating dioxygenases involved in pyrene degradation. *Journal of Microbiology* 56, 798-804.
- Kim, S.J., Kweon, O., Jones, R.C., Edmondson, R.D., 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, P., Edmondson, R.D., 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.
- Kim, S.J., Kweon, O., Sutherland, J.B., Kim, H.L., Jones, R.C., Burbach, B.L., Graves, S.W., Psumny, E., Cerniglia, C.E., 2015. Dynamic response of *Mycobacterium vanbaalenii* PYR-1 to BP deepwater horizon crude oil. *Applied and Environmental Microbiology* 81, 4263-4276.
- Koshlaf, E., Ball, A.S., 2017. Soil bioremediation approaches for petroleum hydrocarbon polluted environments. *AIMS Microbiology* 3, 25-49.
- Kostka, J.E., Prakash, O., Overholt, W.A., Green, S.J., Freyer, G., Canion, A., Delgadio, J., Norton, N., Hazen, T.C., Huettel, M., 2011. Hydrocarbon-degrading bacteria and the bacterial community response in Gulf of Mexico beach sands impacted by the Deepwater Horizon Oil Spill. *Applied and Environmental Microbiology* 77, 7962-7974.
- Kovaleva, E.G., Lipscomb, J.D., 2008. Versatility of biological non-heme Fe(II) centers in oxygen activation reactions. *Nature Chemical Biology* 4, 186-193.
- Kweon, O., Kim, S.J., Baek, S., Chae, J.C., Adeji, M.D., Baek, D.H., Kim, Y.C., Cerniglia, C.E., 2008. A new classification system for bacterial Rieske non-heme iron aromatic ring-hydroxylating oxygenases. *BMC Biochemistry* 9, 1-20.
- Kweon, O., Kim, S.J., Freeman, J.P., Song, J., Baek, S., 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, e00135-00110.
- Kweon, O., Kim, S.J., Holland, R.D., Chen, H., Kim, D.W., Gao, Y., Yu, L.R., Baek, S., Baek, D.H., Ahn, H., Cerniglia, C.E., 2011. Polycyclic aromatic hydrocarbon metabolic network in *Mycobacterium vanbaalenii* PYR-1. *Journal of Bacteriology* 193, 4326-4337.
- Kweon, O., Kim, S.J., Jones, R.C., Freeman, J.P., Adeji, M.D., Edmondson, R.D., Cerniglia, C.E., 2007. A polyomic approach to elucidate the fluoranthene-degradative pathway in *Mycobacterium vanbaalenii* PYR-1. *Journal of Bacteriology* 189,

4635-4647.

- Lang, F.S., Destain, J., Delvigne, F., Druart, P., Ongena, M., Thonart, P., 2016. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in mangrove sediments under different strategies: natural attenuation, biostimulation, and bioaugmentation with *Rhodococcus erythropolis* T902.1. *Water, Air, & Soil Pollution* 227, 297.
- Laothamteep, N., Kawano, H., Vejarano, F., Suzuki-Minakuchi, C., Shintani, M., Nojiri, H., Pinyakong, O., 2021. Effects of environmental factors and coexisting substrates on PAH degradation and transcriptomic responses of the defined bacterial consortium OPK. *Environmental Pollution* 277, 116769.
- Laothamteep, N., Naloka, K., Pinyakong, O., 2022. Bioaugmentation with zeolite-immobilized bacterial consortium OPK results in a bacterial community shift and enhances the bioremediation of crude oil-polluted marine sandy soil microcosms. *Environmental Pollution* 292, 118309.
- Li, J., Guo, C., Lu, G., Yi, X., Dang, Z., 2016. Bioremediation of petroleum-contaminated acid soil by a constructed bacterial consortium immobilized on sawdust: influences of multiple factors. *Water, Air, and Soil Pollution* 227, 444.
- Li, L., Liu, X., Yang, W., Xu, F., Wang, W., Feng, L., Bartlam, M., Wang, L., Rao, Z., 2008. Crystal structure of long-chain alkane monooxygenase (LadA) in complex with coenzyme FMN: unveiling the long-chain alkane hydroxylase. *Journal of Molecular Biology* 376, 453–465.
- Li, S.W., Huang, Y.X., Liu, M.Y., 2020. Transcriptome profiling reveals the molecular processes for survival of *Lysinibacillus fusiformis* strain 15-4 in petroleum environments. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 192, 110250.
- Liang, Y., Zhang, X., Dai, D., Li, G., 2009. Porous biocarrier-enhanced biodegradation of crude oil contaminated soil. *International Biodeterioration and Biodegradation* 63, 80-87.
- Lin, J.H., Zhang, K.C., Tao, W.T., Wang, D., Li, S., 2019. *Geobacillus* strains that have potential value in microbial enhanced oil recovery. *Applied Microbiology and Biotechnology* 103, 8339–8350.
- Liu, S., Guo, C., Lin, W., Wu, F., Lu, G., Lu, J., Dang, Z., 2017. Comparative transcriptomic

- evidence for Tween80-enhanced biodegradation of phenanthrene by *Sphingomonas* sp. GY2B. *Science of the Total Environment* 609, 1161-1171.
- Liu, Y.C., Li, L.Z., Wu, Y., Tian, W., Zhang, L.P., Xu, L., Shen, Q.R., Shen, B., 2010. Isolation of an alkane-degrading *Alcanivorax* sp. strain 2B5 and cloning of the *alkB* gene. *Bioresource Technology* 101, 310-316.
- Locher, K.P., 2016. Mechanistic diversity in ATP-binding cassette (ABC) transporters. *Nature Structural & Molecular Biology* 23, 487-493.
- Lyu, Y., Zheng, W., Zheng, T., Tian, Y., 2014. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by *Novosphingobium pentaromativorans* US6-1. *PloS One* 9, 101438.
- Ma, M., Zheng, L., Yin, X., Gao, W., Han, B., Li, Q., Zhu, A., Chen, H., Yang, H., 2021. Reconstruction and evaluation of oil-degrading consortia isolated from sediments of hydrothermal vents in the South Mid-Atlantic Ridge. *Scientific Reports* 11, 1456.
- Maeng, J.H., Sakai, Y., Tani, Y., Kato, N., 1996. Isolation and characterization of a novel oxygenase that catalyzes the first step of *n*-alkane oxidation in *Acinetobacter* sp strain M-1. *Journal of Bacteriology* 178, 3695-3700.
- Mahjoubia, M., Cappello, S., Santisi, S., Najjari, A., Souissi, Y., Cherif, A., 2021. Investigation of microbial community changes in petroleum polluted sediments during hydrocarbons degradation. *Soil and Sediment Contamination: An International Journal* 31, 200-219.
- Mao, X., Jiang, R., Xiao, W., Yu, J., 2015. Use of surfactants for the remediation of contaminated soils: a review. *Journal of Hazardous Materials* 285, 419-435.
- Maphosa, F., Lieten, S.H., Dinkla, I., Stams, A.J., Smidt, H., Fennell, D.E., 2012. Ecogenomics of microbial communities in bioremediation of chlorinated contaminated sites. *Frontiers in Microbiology* 3, 1-14.
- MarineDepartment, 2020. Oil spill 2020.
- MarineDepartment, 2022. Oil spill 2022.
- Matsui, T., Nishino, T., 2017. Degradation of alkane by bacteria immobilized on polyurethane Foam. *Journal of the Japan Petroleum Institute* 60, 154-157.

- Miethke, M., Monteferrante, C.G., Marahiel, M.A., van Dijl, J.M., 2013. The *Bacillus subtilis* EfeUOB transporter is essential for high-affinity acquisition of ferrous and ferric iron. *Biochimica et Biophysica Acta* 1833, 2267-2278.
- Misaelides, P., 2011. Application of natural zeolites in environmental remediation: a short review. *Microporous and Mesoporous Materials* 144, 15-18.
- Mishra, S., Singh, S.N., Pande, V., 2014. Bacteria induced degradation of fluoranthene in minimal salt medium mediated by catabolic enzymes in vitro condition. *Bioresource Technology* 164, 299–308.
- Mnif, I., Sahnoum, R., Ellouz-Chaabouni, S., Ghribi, D., 2017. Application of bacterial biosurfactants for enhanced removal and biodegradation of diesel oil in soil using a newly isolated consortium. *Process Safety and Environmental Protection* 109, 72-81.
- Moghaddam, S.A.E., Harun, R., Mokhtar, M.N., Zakaria, R., 2018. Potential of zeolite and algae in biomass immobilization. *BioMed Research International* 2018, 1-16.
- Mohan, S.V., Kisa, T., Ohkuma, T., Kanaly, R.A., 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.
- Moody, J.D., Freeman, J.P., Doerge, D.R., Cerniglia, C.E., 2001. Degradation of phenanthrene and anthracene by cell suspensions of *Mycobacterium* sp. strain PYR-1. *Applied and Environmental Microbiology* 67, 1476-1483.
- Mrozik, A., Piotrowska-Seget, Z., 2010. Bioaugmentation as a strategy for cleaning up of soils contaminated with aromatic compounds. *Microbiological Research* 165, 363-375.
- Naloka, K., Polrit, D., Muangchinda, C., Thoetkiattikul, H., Pinyakong, O., 2021. Bioballs carrying a syntrophic *Rhodococcus* and *Mycobacterium* consortium for simultaneous sorption and biodegradation of fuel oil in contaminated freshwater. *Chemosphere* 282, 130973.
- Nambi, S., Long, J.E., Mishra, B.B., Baker, R., Murphy, K.C., Olive, A.J., Nguyen, H.P., Shaffer, S.A., Sasseti, C.M., 2015. The Oxidative stress network of *Mycobacterium tuberculosis* reveals coordination between radical detoxification

- systems. *Cell Host & Microbe* 17, 829–837.
- Nie, M., Nie, H., He, M., Lin, Y., Wang, L., Jin, P., Zhang, S., 2016. Immobilization of biofilms of *Pseudomonas aeruginosa* NY3 and their application in the removal of hydrocarbons from highly concentrated oil-containing wastewater on the laboratory scale. *Journal of Environmental Management* 173, 34-40.
- Nie, Y., Chi, C.Q., Fang, H., Liang, J.L., Lu, S.L., Lai, G.L., Tang, Y.Q., Wu, X.L., 2014. Diverse alkane hydroxylase genes in microorganisms and environments. *Scientific Reports* 4, 4968.
- Nopcharoenkul, W., Pinphanichakarn, P., 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.
- Okere, U.V., Semple, K.T., 2012. Biodegradation of PAHs in 'pristine' soils from different climatic regions. *Journal of Bioremediation and Biodegradation* 1, 1-11.
- Ossai, I.C., Ahmed, A., Hassan, A., Hamid, F.S., 2020. Remediation of soil and water contaminated with petroleum hydrocarbon: a review. *Environmental Technology & Innovation* 17, 100526.
- Oyehan, T.A., Al-Thukair, A.A., 2017. Isolation and characterization of PAH-degrading bacteria from the Eastern Province, Saudi Arabia. *Marine Pollution Bulletin* 115, 39–46.
- Pacwa-Płociniczak, M., Czaplą, J., Płociniczak, T., Piotrowska-Seget, Z., 2019. The effect of bioaugmentation of petroleum-contaminated soil with *Rhodococcus erythropolis* strains on removal of petroleum from soil. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 169, 615-622.
- Pagnout, C., Rast, C., Veber, A.M., Poupin, P., Féraud, J.F., 2006. Ecotoxicological assessment of PAHs and their dead-end metabolites after degradation by *Mycobacterium* sp. strain SNP11. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 65, 151-158.
- Park, C., Park, W., 2018. Survival and energy producing strategies of alkane degraders under extreme conditions and their biotechnological potential. *Frontiers in Microbiology* 9, 1081.

- Parra-Barraza, H., Hernández-Montiel, D., Lizardi, J., Hernández, J., Urbina, R.H., Valdez, M.A., 2003. The zeta potential and surface properties of asphaltenes obtained with different crude oil/n-heptane proportions. *Fuel* 82, 869–874.
- Partovinia, A., Resekh, B., 2018. Review of the immobilized microbial cell systems for bioremediation of petroleum hydrocarbons polluted environments. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology* 48, 1-38.
- Pawar, R., 2015. The effect of soil pH on bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHS). *Journal of Bioremediation and Biodegradation* 6, 1000291.
- Pazos, M., Rosales, E., Alcántara, T., Gómez, J., Sanromán, M.A., 2010. Decontamination of soils containing PAHs by electroremediation: a review. *Journal of Hazardous Materials* 177, 1-11.
- Peng, R.H., Xiong, A.S., Xue, Y., Fu, X.Y., Gao, F., Zhao, W., Tian, Y.S., Yao, Q.H., 2008. Microbial biodegradation of polyaromatic hydrocarbons. *FEMS Microbiology Reviews* 32, 927–955.
- Punwong, P., Juprasong, Y., Traiperm, P., 2017. Effects of an oil spill on the leaf anatomical characteristics of a beach plant (*Terminalia catappa* L.). *Environmental Science and Pollution Research* 24, 21821-21828.
- Qiao, K., Tian, W., Bai, J., Wang, L., Zhao, J., Song, T., Chu, M., 2020. Removal of high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons by a microbial consortium immobilized in magnetic floating biochar gel beads. *Marine Pollution Bulletin* 159, 111489.
- Qin, X., Tang, J., Li, D., Zhang, Q., 2012. Effect of salinity on the bioremediation of petroleum hydrocarbons in a saline alkaline soil. *Letters in Applied Microbiology* 55, 210-217.
- Rabodonirina, S., Rasolomampianina, R., Krier, F., Drider, D., Merhaby, D., Net, S., 2019. Degradation of fluorene and phenanthrene in PAHs-contaminated soil using *Pseudomonas* and *Bacillus* strains isolated from oil spill sites. *Journal of Environmental Management* 232, 1-7.
- Rahman, K.S.M., Thahira-Rahman, J., Lakshmanaperumalsamy, P., Banat, I.M., 2002. Towards efficient crude oil degradation by a mixed bacterial consortium. *Bioresource Technology* 85, 257-261.

- Rajasekaran, M.B., Nilapwar, S., Andrews, S.C., Watson, K.A., 2010. EfeO-cupredoxins: major new members of the cupredoxin superfamily with roles in bacterial iron transport. *BioMetals* 23, 1-7.
- Reeve, P.J., Fallowfield, H.J., 2018. Natural and surfactant modified zeolites: a review of their applications for water remediation with a focus on surfactant desorption and toxicity towards microorganisms. *Journal of Environmental Management* 205, 253–261.
- Rengarajan, J., Bloom, B.R., Rubin, E.J., 2005. Genome-wide requirements for *Mycobacterium tuberculosis* adaptation and survival in macrophages. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, 8327-8332.
- Rajo, F., 2009. Degradation of alkanes by bacteria. *Environmental Microbiology* 11, 2477–2490.
- San, N.O., Celebioglu, A., Tümtas., Y., Uyar, T., Tekinay, T., 2014. Reusable bacteria immobilized electrospun nanofibrous webs for decolorization of methylene blue dye in wastewater treatment. *RSC advances* 4, 32249–32255.
- Sayed, K., Baloo, L., Sharma, N.K., 2021. Bioremediation of total petroleum hydrocarbons (TPH) by bioaugmentation and biostimulation in water with floating oil spill containment booms as bioreactor basin. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 18, 2226.
- Scheps, D., Malca, S.H., Hoffmann, H., Nestl, B.M., 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 & Biomolecular Chemistry* 9, 6727-6733.
- Shahsavari, E., Schwarz, A., Aburto-Medina, A., Ball, A.S., 2019. Biological degradation of polycyclic aromatic compounds (PAHs) in soil: a current perspective. *Current Pollution Reports* 5, 84–92.
- Shen, T., Pi, Y., Bao, M., Xu, N., Li, Y., Lu, J., 2015. Biodegradation of different petroleum hydrocarbons by free and immobilized microbial consortia. *Environmental Science: Processes & Impacts* 17, 2022-2033.

- Sinaei, M., Mashinchian, A., 2014. Polycyclic aromatic hydrocarbons in the coastal sea water, the surface sediment and Mudskipper *Boleophthalmus dussumieri* from coastal areas of the Persian Gulf: source investigation, composition pattern and spatial distribution. *Journal of Environmental Health Science & Engineering* 12, 1-11.
- Singh, P., Jain, R., Srivastava, N., Borthakur, A., Pal, D.B., Singh, R., Madhav, S., Srivastava, P., Tiwary, D., Mishra, P.K., 2017. Current and emerging trends in bioremediation of petrochemical waste: a review. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology* 47, 155-201.
- So, C.M., Phelps, C.D., Young, L., 2003. Anaerobic transformation of alkanes to fatty acids by a sulfate-reducing bacterium, strain Hxd3. *Applied and Environmental Microbiology* 69, 3892–3900.
- Somtrakoon, K., Suanjit, S., Pokethitiyook, P., Kruatrachue, M., Lee, H., Upatham, S., 2008. Phenanthrene stimulates the degradation of pyrene and fluoranthene by *Burkholderia* sp. VUN10013. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 24, 523-531.
- Stolz, A., 2009. Molecular characteristics of xenobiotic-degrading sphingomonads. *Applied Microbiology and Biotechnology* 81, 793–811.
- Stroud, J.L., Paton, G.I., Semple, K.T., 2007. Microbe-aliphatic hydrocarbon interactions in soil: implications for biodegradation and bioremediation. *Journal of Applied Microbiology* 102, 1239–1253.
- Suja, F., Rahim, F., Taha, M.R., Hambali, N., Razali, M.R., Khalid, A., Hamzah, A., 2014. Effects of local microbial bioaugmentation and biostimulation on the bioremediation of total petroleum hydrocarbons (TPH) in crude oil contaminated soil based on laboratory and field observations. *International Biodeterioration and Biodegradation* 90, 155-122.
- Sun, S., Wang, H., Chen, Y., Lou, J., Wu, L., Xu, J., 2019. Salicylate and phthalate pathways contributed differently on phenanthrene and pyrene degradations in *Mycobacterium* sp. WY10. *Journal of Hazardous Materials* 364, 509–518.
- Tani, A., Ishige, T., Sakai, Y., Kato, N., 2001. Gene structures and regulation of the alkane hydroxylase complex in *Acinetobacter* sp. strain M-1. *Journal of Bacteriology*



183, 1819–1823.

- Techtmann, S., Hazen, T.C., 2016. Metagenomic applications in environmental monitoring and bioremediation. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 43, 1345–1354.
- Teyssier, C., Marchandin, H., Jean-Pierre, H., Diego, I., Darbas, H., Jeannot, J.L., Gouby, A., Jumas-Bilak, E., 2005. Molecular and phenotypic features for identification of the opportunistic pathogens *Ochrobactrum* spp. *Journal of Medical Microbiology* 54, 945–953.
- Thapa, B., Kumar, A., Ghimire, A., 2012. A review on bioremediation of petroleum hydrocarbon contamination in soil. *Kathmandu University Journal of Science, Engineering and Technology* 8, 164-170.
- Thavasi, R., Jayalakshmi, S., Balasubramanian, T., Banat, I.M., 2007. Effect of salinity, temperature, pH and crude Oil concentration on biodegradation of crude oil by *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Biodiversity and Environmental Sciences* 1, 51-57.
- Vaidya, S., Jain, K., Madamwar, D., 2017. Metabolism of pyrene through phthalic acid pathway by enriched bacterial consortium composed of *Pseudomonas*, *Burkholderia*, and *Rhodococcus* (PBR). *3 Biotech* 7, 1-29.
- Valencia-Agami, S.S., Cerqueda-García, D., Putzeys, S., Uribe-Flores, M.M., García-Cruz, N.U., Pech, D., Herrera-Silveira, J., Aguirre-Macedo, M.L., García-Maldonado, J.Q., 2019. Changes in the bacterioplankton community structure from Southern Gulf of Mexico during a simulated crude oil spill at mesocosm scale. *Microorganisms* 7, 441.
- van Beilen, J.B., Funhoff, E.G., 2007. Alkane hydroxylases involved in microbial alkane degradation. *Applied Microbiology and Biotechnology* 74, 13-21.
- van Beilen, J.B., Funhoff, E.G., van Loon, A., Just, A., Kaysser, L., Bouza, M., Holtackers, R., Röthlisberger, M., Li, Z., 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.
- van Beilen, J.B., Panke, S., Lucchini, S., Franchini, A.G., Röthlisberger, M., 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.
- Varjani, S., Upasani, V.N., 2017. A new look on factors affecting microbial degradation of petroleum hydrocarbon pollutants. *International Biodeterioration and Biodegradation* 120, 71-83.
- Varjani, S., Upasani, V.N., 2019. Influence of abiotic factors, natural attenuation, bioaugmentation and nutrient supplementation on bioremediation of petroleum crude contaminated agricultural soil. *Journal of Environmental Management* 245, 358–366.
- Varjani, S.J., 2017. Microbial degradation of petroleum hydrocarbons. *Bioresource Technology* 223, 277–286.
- Vila, J., López, Z., Sabaté, J., Minguillón, C., Solanas, A.M., Grifoll, M., 2001. Identification of a novel metabolite in the degradation of pyrene by *Mycobacterium* sp. strain AP1: actions of the isolate on two- and three-ring polycyclic aromatic hydrocarbons. *Applied and Environmental Microbiology* 67, 5497-5505.
- Waikhom, D., Ngasotter, S., Devi, L.S., Devi, M.S., Singh, A.S., 2020. Role of microbes in petroleum hydrocarbon degradation in the aquatic environment: a review. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences* 9, 2990-2903.
- Wanapaisan, P., Laothamteep, N., Vejarano, F., Chakraborty, J., Shintani, M., Muangchinda, C., Morita, T., Suzuki-Minakuchi, C., Inoue, K., Nojiri, H., Pinyakong, O., 2018. Synergistic degradation of pyrene by five culturable bacteria in a mangrove sediment-derived bacterial consortium. *Journal of Hazardous Materials* 342, 561-570.
- Wang, Y., Li, J., Liu, A., 2017. Oxygen activation by mononuclear nonheme iron dioxygenases involved in the degradation of aromatics. *Journal of Biological Inorganic Chemistry* 22, 395–405.
- Wang, Z., An, C., Lee, K., Owens, E., Chen, Z., Boufadel, M., Taylor, E., Feng, Q., 2021. Factors influencing the fate of oil spilled on shorelines: a review. *Environmental Chemistry Letters* 19, 1611–1628.

- Wattayakorn, G., 2012. Petroleum pollution in the gulf of Thailand: a historical review. *Costal Marine Science* 35, 234-245.
- Wentzel, A., Ellingsen, T.E., Kotlar, H.K., Zotchev, S.B., Throne-Holst, M., 2007. Bacterial metabolism of long-chain *n*-alkanes. *Applied Microbiology and Biotechnology* 76, 1209-1221.
- Wong, J.W.C., Lai, K.M., Wan, C.K., Ma, K.K., Fang, M., 2002. Isolation and optimization of PAH-degradative bacteria from contaminated soil for PAHs bioremediation. *Water, Air, & Soil Pollution* 39, 1-13.
- Wu, F., Guo, C., Liu, S., Liang, X., Lu, G., Dang, Z., 2019. Pyrene degradation by *Mycobacterium gilvum*: metabolites and proteins involved. *Water Air and Soil Pollution* 230, 1-13.
- Wu, M., Li, W., Dick, W.A., Ye, X., Chen, K., Kost, D., Chen, L., 2017a. Bioremediation of hydrocarbon degradation in a petroleum-contaminated soil and microbial population and activity determination. *Chemosphere* 169, 124-130.
- Wu, M., Ye, X., Chen, K., Li, W., Yuan, J., Jiang, X., 2017b. Bacterial community shift and hydrocarbon transformation during bioremediation of short-term petroleum-contaminated soil. *Environmental Pollution* 223, 657-664.
- Wu, Y., He, T., Zhong, M., Ahang, Y., Li, E., Huang, T., Hu, Z., 2009. Isolation of marine benzo[a]pyrene-degrading *Ochrobactrum* sp. BAP5 and proteins characterization. *Journal of Environmental Sciences* 21, 1446-1451.
- Wu, Y., Xu, Y., Zhou, N., 2020. A newly defined dioxygenase system from *Mycobacterium vanbaalenii* PYR-1 endowed with an enhanced activity of dihydroxylation of high-molecular-weight polyaromatic hydrocarbons. *Frontiers of Environmental Science & Engineering* 14, 14.
- Xia, M., Fu, D., Chakraborty, R., Singh, R.O., Terry, N., 2019. Enhanced crude oil depletion by constructed bacterial consortium comprising bioemulsifier producer and petroleum hydrocarbon degraders. *Bioresource Technology* 282, 456-463.
- Xu, M., Wu, M., Zhang, Y., Zhang, H., Liu, W., Chen, G., Xiong, G., Guo, L., 2021. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by bacterial mixture. *International Journal of Environmental Science and Technology* 115, 1-12.
- Xu, Q., Rawlings, N.D., Farr, C.L., Chiu, H.J., Grant, J.C., Jaroszewski, L., Klock, H.E., Knuth,

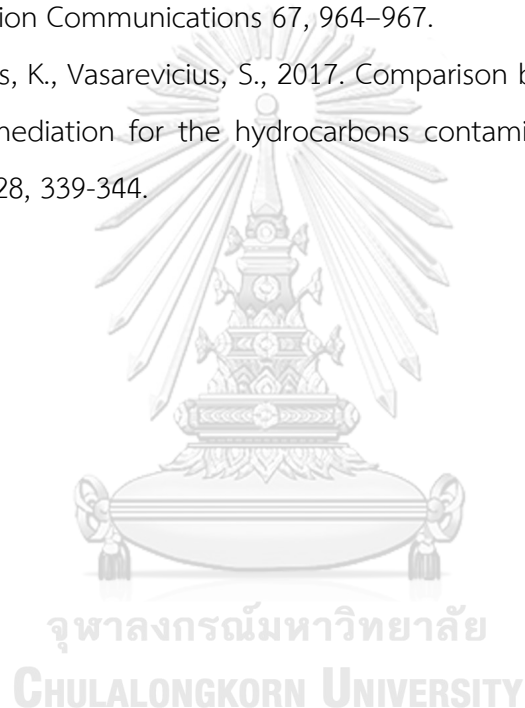
- M.W., Miller, M.D., Weekes, D., Elsliger, M.A., Deacon, A.M., Godzik, A., Lesley, S.A., Wilson, I.A., 2011. Structural and sequence analysis of imelysin-like proteins implicated in bacterial iron uptake. *PLoS One* 6, e21875.
- Xu, X., Liu, W., Tian, S., Wang, W., Qi, Q., Jiang, P., Gao, X., Li, F., Li, H., Yu, H., 2018. Petroleum hydrocarbon-degrading bacteria for the remediation of oil pollution under aerobic conditions: a perspective analysis. *Frontiers in Microbiology* 9, 2885.
- Yakimov, M., Timmis, K.N., Golyshin, P.N., 2007. Obligate oil-degrading marine bacteria. *Current Opinion in Biotechnology* 18, 257–266.
- Yang, J., Gu, Y., Chen, Z., Song, Y., Sun, F., Liu, J., Waigi, G., 2021. Colonization and performance of a pyrene-degrading bacterium *Mycolicibacterium* sp. Pyr9 on root surfaces of white clover. *Chemosphere* 263, 127918.
- Yang, R., Zhang, G., Li, S., Moazeni, F., Li, Y., Wu, Y., Zhang, W., Chen, T., Liu, G., Zhang, B., Wu, X., 2019. Degradation of crude oil by mixed cultures of bacteria isolated from the Qinghai-Tibet plateau and comparative analysis of metabolic mechanisms. *Environmental Science and Pollution Research* 26, 1834–1847.
- Yuan, K., Xie, X., Wang, X., Lin, L., Yang, L., Luan, T., 2018. Transcriptional response of *Mycobacterium* sp. strain A1-PYR to multiple polycyclic aromatic hydrocarbon contaminations. *Environmental Pollution* 243, 824-832.
- Zeng, J., Lin, X., Zhang, J., Li, X., 2010. Isolation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs)-degrading *Mycobacterium* spp. and the degradation in soil. *Journal of Hazardous Materials* 183, 718-723.
- Zeng, J., Zhu, Q., Li, Y., Dai, Y., Wu, Y., Sun, Y., Miu, L., Chen, H., Lim, X., 2019. Isolation of diverse pyrene-degrading bacteria via introducing readily utilized phenanthrene. *Chemosphere* 222, 534-540.
- Zhang, P., Wang, X., Peng, S., Tian, X., Li, Z., Zhou, R., 2020. Degradation of petroleum hydrocarbons by embedding immobilized crude oil degrading bacteria. *Water Science & Technology* 82, 2296–2303.
- Zhong, Y., Luan, T., Lin, L., Liu, H., 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.G., Zhou, H.W., Lan, C.Y., Tam, N.F.Y., 2006. Metabolite production in degradation of pyrene alone or in a mixture with another polycyclic aromatic hydrocarbon by *Mycobacterium* sp. *Environmental Toxicology and Chemistry* 25, 2853–2859.

Zhou, R., Huang, C., Zhang, A., Bell, S.G., Zhou, W., Wong, L.L., 2011. Crystallization and preliminary X-ray analysis of CYP153C1 from *Novosphingobium aromaticivorans* DSM12444. *Acta crystallographica. Section F, Structural Biology and Crystallization Communications* 67, 964–967.

Zivelyte, V., Valters, K., Vasarevicius, S., 2017. Comparison between passive remediation and bioremediation for the hydrocarbons contaminated soil clean up. *Energy Procedia* 128, 339–344.



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 (NaOH) ความเข้มข้น 5 โมลาร์ จน pH เท่ากับ 7 และปรับปริมาตรสุดท้าย 1,000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

เตรียมเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง โดยละลายแบคทีโอะการ์ 20 กรัม ในอาหารเลี้ยงเชื้อ 1,000 มิลลิลิตร ก่อนนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ

สารละลายส่วนที่ 2

|  |      |                  |
|--|------|------------------|
| เฟอร์ริคลอไรด์ ( $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ )   | 0.05 | กรัมต่อมิลลิลิตร |
| แคลเซียมคลอไรด์ ( $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ )   | 0.05 | กรัมต่อมิลลิลิตร |
| แมกนีเซียมซัลเฟต ( $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) | 0.1  | กรัมต่อมิลลิลิตร |

กำจัดเชื้อโดยกรองสารละลายแต่ละชนิดผ่านชุดกรองสำเร็จรูปเซลลูโลสอะซีเตท (CA) ขนาดรูกรองขนาด 0.22 ไมโครเมตร

เติมสารละลายส่วนที่ 2 ชนิดละ 1 มิลลิลิตร ในสารละลายส่วนที่ 1 ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร ก่อนนำไปใช้

### อาหารเลี้ยงเชื้อ Natural Sea Medium (NSM) มีค่าความเค็ม 20‰

|   |       |           |
|---|-------|-----------|
| แอมโมเนียมไนเตรต ( $\text{NH}_4\text{NO}_3$ )           | 1     | กรัม      |
| ไดโทแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ) | 0.02  | กรัม      |
| เฟอร์ริก ซิเตรต (Ferric citrate)                        | 0.02  | กรัม      |
| ผงสกัดจากยีสต์ (Yeast extract)                          | 0.5   | กรัม      |
| น้ำทะเล   | 1,000 | มิลลิลิตร |

นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

### อาหารเลี้ยงเชื้อ Luria-Bertani (LB)

|                                |    |      |
|--------------------------------|----|------|
| ผงสกัดจากยีสต์ (Yeast extract) | 5  | กรัม |
| ทริปโตน (tryptone)             | 10 | กรัม |
| โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)          | 10 | กรัม |

ละลายสารทั้งสามชนิดในน้ำกลั่น ปรับความเป็นกรด-ด่างด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 5 โมลาร์ จน pH เท่ากับ 7 และปรับปริมาตรสุดท้าย 1,000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

อาหารเลี้ยงเชื้อแข็งละลายผงวุ้นหรือแบคโตอะการ์ 15 กรัม ต่ออาหาร 1,000 มิลลิลิตร ก่อนนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
CHULALONGKORN UNIVERSITY

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

นำอาหารเหลว LB ปริมาตร 250 มิลลิลิตร ผสมกับน้ำกลั่น 750 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

อาหารเลี้ยงเชื้อแข็งละลายผงวุ้นหรือแบคโตอะการ์ 15 กรัม ต่ออาหาร 1,000 มิลลิลิตร ก่อนนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ

### อาหารเลี้ยงเชื้อ $\Psi b$

|   |    |      |
|---|----|------|
| ผงสกัดจากยีสต์ (Yeast extract)                  | 5  | กรัม |
| ทริปโตน (tryptone)                              | 20 | กรัม |
| แมกนีเซียมซัลเฟต 7 น้ำ ( $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ) | 5  | กรัม |

ละลายสารทั้งสามชนิดในน้ำกลั่นปรับความเป็นกรด-ด่าง ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 5 โมลาร์ จน pH เท่ากับ 7 และปรับปริมาตรสุดท้าย 1,000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

อาหารเลี้ยงเชื้อแข็งละลายผงวุ้นหรือแบคทีโอะการ์ 15 กรัม ต่ออาหาร 1,000 มิลลิลิตร ก่อนนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ

### อาหารเลี้ยงเชื้อ SOC

#### สารละลายส่วนที่ 1

|   |      |      |
|---|------|------|
| ผงสกัดจากยีสต์ (Yeast extract)                  | 5    | กรัม |
| ทริปโตน (tryptone)                              | 20   | กรัม |
| โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)                           | 0.58 | กรัม |
| แมกนีเซียมคลอไรด์ ( $MgCl$ )                    | 2.0  | กรัม |
| แมกนีเซียมซัลเฟต 7 น้ำ ( $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ) | 2.46 | กรัม |
| โพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl)                         | 0.18 | กรัม |

ละลายสารทั้งหมดในน้ำกลั่นปรับความเป็นปริมาตรสุดท้าย 980 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

#### สารละลายส่วนที่ 2

|              |     |           |
|--------------|-----|-----------|
| กลูโคส       | 3.6 | กรัม      |
| น้ำปลอดประจุ | 20  | มิลลิลิตร |

กำจัดเชื้อด้วยการกรองผ่านกระดาษกรองขนาด 0.22 ไมโครเมตร

ผสมสารละลายทั้ง 2 ส่วน เก็บรักษาที่ -20 องศาเซลเซียส



ภาคผนวก ข  
สูตรและวิธีการเตรียมสารละลาย

สารละลาย Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs)

ความเข้มข้น 10,000 มิลลิกรัมต่อลิตร

|   |     |           |
|---|-----|-----------|
| พอลิไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน (PAHs)                                  | 0.1 | กรัม      |
| ไดเมทิลฟอร์มาไมด์   | 10  | มิลลิลิตร |
| ก้ำจัดซื้อด้วยการกรองผ่านชุดกรองสำเร็จรูป PTFE ขนาดรูกรอง 0.2 ไมโครเมตร |     |           |

สารละลายโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 0.85 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร)

|                       |      |           |
|-----------------------|------|-----------|
| โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) | 0.85 | กรัม      |
| น้ำกลั่น              | 100  | มิลลิลิตร |

นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

เอทานอล 70 เปอร์เซ็นต์

|                        |     |           |
|------------------------|-----|-----------|
| เอทานอล 99 เปอร์เซ็นต์ | 700 | มิลลิลิตร |
| น้ำกลั่นปลอดประจุ      | 300 | มิลลิลิตร |

CHULALONGKORN UNIVERSITY

10 เปอร์เซ็นต์ โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต (Sodium Dodecyl Sulfate; SDS)

|  |      |      |
|--|------|------|
| โซเดียมลอริลซัลเฟต (Sodium lauryl sulfate) | 10.0 | กรัม |
|--|------|------|

ค่อยๆ ละลายในน้ำปลอดประจุอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ปริมาตร 80 มิลลิลิตร เมื่อละลายหมดเติมน้ำปลอดประจุจนเป็นปริมาตร 100 มิลลิลิตร นึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

**สารละลายโปรตีนเนสเค (proteinase K)**

|                            |    |           |
|----------------------------|----|-----------|
| โปรตีนเนสเค (proteinase K) | 10 | มิลลิกรัม |
| น้ำปลอดประจุและเชื้อ       | 1  | มิลลิลิตร |

**บัฟเฟอร์ TE**

|                                      |     |           |
|--------------------------------------|-----|-----------|
| Tris-HCl pH 8 เข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ | 10  | มิลลิลิตร |
| EDTA pH 8.0 เข้มข้น 0.1 มิลลิโมลาร์  | 0.2 | มิลลิลิตร |

เติมน้ำปลอดประจุให้เป็นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร นิ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

**สารละลายไลโซไซม์ (Lysozyme) ความเข้มข้น 60 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร**

|                     |    |           |
|---------------------|----|-----------|
| ไลโซไซม์ (Lysozyme) | 60 | มิลลิกรัม |
| บัฟเฟอร์ TE         | 1  | มิลลิลิตร |

**สารละลายโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 5 โมลาร์**

|                       |      |      |
|-----------------------|------|------|
| โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) | 29.2 | กรัม |
|-----------------------|------|------|

ละลายในน้ำปลอดประจุจนปริมาตรสุดท้ายเป็น 100 มิลลิลิตร นิ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

**สารละลาย CTAB/NaCl (Hexadecyl trimethyl ammoniumbromide/sodium chloride)**

|                       |     |      |
|-----------------------|-----|------|
| โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) | 4.1 | กรัม |
| CTAB                  | 10  | กรัม |

ละลาย CTAB ในน้ำปลอดประจุอุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส ปริมาตร 80 มิลลิลิตร จากนั้นเติมโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.7 โมลาร์ เมื่อละลายหมดเติมน้ำปลอดประจุจนเป็นปริมาตร 100 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

### สารละลายคลอโรฟอร์ม/ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์

ผสมคลอโรฟอร์มกับไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ ในอัตราส่วน 24:1 (ปริมาตรต่อปริมาตร) เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

### สารละลายฟีนอล/คลอโรฟอร์ม

ผสมสารละลายฟีนอลกับคลอโรฟอร์ม ในอัตราส่วน 1:1 (ปริมาตรต่อปริมาตร) เติมสารละลาย Tris-HCl pH 8.0 เข้มข้นเป็น 0.5 โมลาร์ ปริมาตร 1 เท่า คนด้วยแท่งแม่เหล็กเป็นเวลา 30 นาที ทิ้งให้แยกชั้น เก็บในขวดสีชาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

### บัฟเฟอร์ TAE เข้มข้น 50 เท่า

|                                |      |           |
|--------------------------------|------|-----------|
| Tris-HCl                       | 242  | กรัม      |
| EDTA pH 8.0 เข้มข้น 0.5 โมลาร์ | 100  | มิลลิลิตร |
| กรดอะซิติกเข้มข้น              | 57.1 | มิลลิลิตร |

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำปลอดประจุปริมาตร 800 มิลลิลิตร แล้วเติมน้ำปลอดประจุให้เป็นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร นิ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

### อะกาโรสเข้มข้น 0.9% จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

|                             |     |           |
|-----------------------------|-----|-----------|
| อะกาโรส                     | 0.9 | กรัม      |
| บัฟเฟอร์ TAE เข้มข้น 1 เท่า | 100 | มิลลิลิตร |

หลอมให้เข้ากันด้วยไมโครเวฟ

### อะกาโรสเข้มข้น 2.0%

|                             |     |           |
|-----------------------------|-----|-----------|
| อะกาโรส                     | 2.0 | กรัม      |
| บัฟเฟอร์ TAE เข้มข้น 1 เท่า | 100 | มิลลิลิตร |

หลอมให้เข้ากันด้วยไมโครเวฟ

### สารละลายเอธิเดียมโบรไมด์เข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

|                  |     |           |
|------------------|-----|-----------|
| เอธิเดียมโบรไมด์ | 0.1 | มิลลิกรัม |
| น้ำกลั่น         | 10  | มิลลิลิตร |

ละลายให้เข้ากันเก็บในภาชนะปิดสนิทในที่มืด โดยขณะเตรียมควรสวมถุงมือป้องกัน เนื่องจากเอธิเดียมโบรไมด์เป็นสารก่อมะเร็ง

### สารปฏิชีวนะแอมพิซิลลิน (Ampicillin, Amp)

|              |     |           |
|--------------|-----|-----------|
| แอมพิซิลลิน  | 100 | มิลลิกรัม |
| น้ำปลอดประจุ | 1   | มิลลิลิตร |

กำจัดเชื้อด้วยการกรองผ่านหัวกรองสำเร็จรูปขนาด 0.22 ไมโครเมตร

### 2% 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galactoside (X-gal)

|                          |    |           |
|--------------------------|----|-----------|
| X-gal                    | 20 | มิลลิกรัม |
| ไดเมทิลฟอร์มมาไมด์ (DMF) | 1  | มิลลิลิตร |

กำจัดเชื้อด้วยการกรองผ่านชุดกรองสำเร็จรูปชนิด PTFE ขนาด 0.2 ไมโครเมตร

### isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranoside (IPTG) เข้มข้น 1 โมลาร์

|              |     |           |
|--------------|-----|-----------|
| IPTG         | 238 | มิลลิกรัม |
| น้ำปลอดประจุ | 1   | มิลลิลิตร |

กำจัดเชื้อด้วยการกรองผ่านหัวกรองสำเร็จรูปขนาด 0.22 ไมโครเมตร

**สารละลาย TfbI**

|   |       |           |
|---|-------|-----------|
| โพแทสเซียมอะซิเตต ( $\text{CH}_3\text{COOK}$ )                      | 0.295 | กรัม      |
| รูบิเดียมคลอไรด์ ( $\text{RbCl}$ )                                  | 1.21  | กรัม      |
| แคลเซียมคลอไรด์ 2 น้ำ ( $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) | 0.148 | กรัม      |
| แมงกานีสคลอไรด์ ( $\text{MnCl}_2$ )                                 | 0.99  | กรัม      |
| กลีเซอรอล   | 15    | มิลลิลิตร |

ละลายสารทั้งหมดในน้ำกลั่น 70 มิลลิลิตร ปรับความเป็นกรด-ด่าง ด้วยกรดอะซิติกเข้มข้น 0.2 โมลาร์ จน pH เท่ากับ 5.8 ด้วย และปรับปริมาตรสุดท้าย 100 มิลลิลิตร กำจัดเชื้อด้วยการกรองผ่านกระดาษกรอง CA ขนาด 0.22 ไมโครเมตร

**สารละลาย TfbII**

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

ปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 100 มิลลิลิตร กำจัดเชื้อด้วยการกรองผ่านกระดาษกรอง CA ขนาด 0.22 ไมโครเมตร

**การเตรียมไพรมอร์จากสต็อก**

|         |    |           |
|---------|----|-----------|
| ไพรมอร์ | 4  | ไมโครลิตร |
| TE      | 16 | ไมโครลิตร |

**100 bp DNA ladder**

|                         |    |           |
|-------------------------|----|-----------|
| 100 bp ladder           | 20 | ไมโครลิตร |
| สีย้อม (6X loading dye) | 10 | ไมโครลิตร |
| น้ำกลั่น                | 30 | ไมโครลิตร |

**Lamda HindIII**

|                         |    |           |
|-------------------------|----|-----------|
| Lamda HindIII DNA       | 20 | ไมโครลิตร |
| สีย้อม (6X loading dye) | 10 | ไมโครลิตร |
| น้ำกลั่น                | 30 | ไมโครลิตร |

**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 |

ละลายสารทั้งหมดในน้ำกลั่น นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว  
อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

**สารละลาย TritonX-100 เข้มข้น 15 เปอร์เซ็นต์**

|             |    |           |
|-------------|----|-----------|
| TritonX-100 | 15 | มิลลิลิตร |
| น้ำกลั่น    | 85 | มิลลิลิตร |

**สารละลายไอโอดีนไนโตรเตตราโซเลียมคลอไรด์ (INT) เข้มข้น 15 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร**

|  |     |           |
|--|-----|-----------|
| INT (iodonitrotetrazolium chloride)          | 150 | มิลลิกรัม |
| ไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (dimethyl sulfoxide; DMSO) | 10  | มิลลิลิตร |

ละลายสารในไดเมทิลซัลฟอกไซด์จนสมบูรณ์ กำจัดเชื้อโดยการกรองสารละลายผ่านชุดกรอง  
สำเร็จรูป PTFE ขนาดรูกรอง 0.22 ไมโครเมตร เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

ภาคผนวก ค

ตารางที่ ค-1 ประสิทธิภาพย่อยสลายไพลิน ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตรของแบคทีเรียเดี่ยว

| แบคทีเรีย                                    | การย่อยสลายไพลิน (%) |              |              |              |
|--|----------------------|--------------|--------------|--------------|
|  | วันที่ 3             | วันที่ 6     | วันที่ 9     | วันที่ 12    |
| <i>Mycolicibacterium</i> sp. PO1             | 33.67 ± 4.03         | 88.34 ± 4.03 | 91.51 ± 1.12 | 94.21 ± 2.08 |
| <i>Mycolicibacterium</i> sp. PO2             | 31.13 ± 1.45         | 88.50 ± 1.45 | 93.22 ± 2.16 | 94.46 ± 2.35 |
| <i>Novosphingobium pentaromativorans</i> PY1 | 0.90 ± 2.51          | 5.64 ± 2.51  | 2.93 ± 6.79  | 4.71 ± 9.47  |
| <i>Brucella intermedia</i> PW1               | 10.19 ± 3.40         | 16.27 ± 3.40 | 18.53 ± 1.73 | 28.95 ± 2.85 |
| <i>Bacillus subtilis</i> FW1                 | 4.13 ± 1.84          | 2.67 ± 1.84  | 5.41 ± 0.74  | 5.87 ± 1.36  |

ตารางที่ ค-2 ประสิทธิภาพย่อยสลายโปรโตคาคีคูเอท ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตรของแบคทีเรียเดี่ยว

| แบคทีเรีย                                    | การย่อยสลายโปรโตคาคีคูเอท (%) |               |               |               |               |               |
|--|-------------------------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
|  | ชั่วโมงที่ 6                  | ชั่วโมงที่ 12 | ชั่วโมงที่ 18 | ชั่วโมงที่ 24 | ชั่วโมงที่ 30 | ชั่วโมงที่ 36 |
| <i>Mycolicibacterium</i> sp. PO1             | 27.12 ± 2.89                  | 38.20 ± 5.74  | 42.80 ± 0.96  | 59.58 ± 1.40  | 98.27 ± 0.46  | 100 ± 0.00    |
| <i>Mycolicibacterium</i> sp. PO2             | 38.48 ± 4.50                  | 64.04 ± 5.69  | 62.07 ± 1.55  | 72.44 ± 4.12  | 99.67 ± 0.01  | 100 ± 0.00    |
| <i>Novosphingobium pentaromativorans</i> PY1 | 99.92 ± 0.02                  | 99.93 ± 0.01  | 100 ± 0.00    | 100 ± 0.00    | 100 ± 0.00    | 100 ± 0.00    |
| <i>Brucella intermedia</i> PW1               | 99.76 ± 0.12                  | 99.95 ± 0.00  | 100 ± 0.00    | 100 ± 0.00    | 100 ± 0.00    | 100 ± 0.00    |
| <i>Bacillus subtilis</i> FW1                 | 0.55 ± 0.11                   | 0.55 ± 0.20   | 0.55 ± 0.50   | 0.55 ± 0.80   | 0.55 ± 0.20   | 0.55 ± 0.40   |

ตารางที่ ค-3 ประสิทธิภาพย่อยสลายไพลีน ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตรของกลุ่มแบคทีเรีย

| กลุ่มแบคทีเรีย           | การย่อยสลายไพลีน (%) |               |              |               |
|--------------------------|----------------------|---------------|--------------|---------------|
|                          | วันที่ 1             | วันที่ 3      | วันที่ 6     | วันที่ 9      |
| C1 (PO1+PO2+PY1+PW1+FW1) | 20.62 ± 3.28         | 87.60 ± 10.75 | 98.26 ± 0.64 | 98.50 ± 0.67  |
| C2 (PO2+PY1+PW1+FW1)     | 17.40 ± 2.37         | 77.59 ± 3.66  | 98.59 ± 1.28 | 99.30 ± 18.66 |
| C3 (PO1+PY1+PW1+FW1)     | 21.05 ± 1.73         | 76.94 ± 20.03 | 95.50 ± 3.39 | 98.79 ± 1.06  |
| C4 (PO1+PO2+PW1+FW1)     | 14.30 ± 2.79         | 86.77 ± 16.52 | 96.67 ± 0.22 | 97.91 ± 1.95  |
| C5 (PO1+PO2+PY1+FW1)     | 13.46 ± 3.64         | 94.21 ± 5.03  | 98.59 ± 0.80 | 99.44 ± 0.55  |
| C6 (PO1+PO2+PY1+PW1)     | 11.17 ± 8.29         | 87.72 ± 11.99 | 94.92 ± 4.45 | 99.52 ± 0.41  |
| C7 (PY1+PW1+FW1)         | 9.56 ± 4.00          | 5.72 ± 3.61   | 16.33 ± 7.65 | 29.20 ± 10.63 |
| P1 (PO1+PY1)             | 4.96 ± 1.82          | 41.61 ± 0.80  | -            | -             |
| P2 (PO1+PW1)             | 19.56 ± 11.63        | 54.23 ± 8.93  | -            | -             |
| P3 (PO1+FW1)             | 20.70 ± 4.64         | 56.11 ± 5.16  | -            | -             |
| P4 (PO1+PO2+PY1)         | 19.95 ± 1.98         | 36.68 ± 0.81  | -            | -             |
| P5 (PO1+PO2+PW1)         | 15.20 ± 2.33         | 45.36 ± 1.40  | -            | -             |
| P6 (PO1+PO2+FW1)         | 18.94 ± 4.25         | 54.03 ± 9.14  | -            | -             |
| P7 (PO1+PO2)             | 16.50 ± 2.19         | 48.43 ± 9.32  | -            | -             |

ตารางที่ ค-4 ประสิทธิภาพย่อยสลายไพลีน ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตรของกลุ่มแบคทีเรีย

OPK ในสภาวะการแปรผันค่า pH

| pH     | ไพลีนที่เหลืออยู่ (%) |              |              |              |              |
|--------|-----------------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
|        | วันที่ 3              | วันที่ 6     | วันที่ 9     | วันที่ 12    | วันที่ 15    |
| pH 5.0 | 86.95 ± 0.17          | 81.26 ± 1.28 | 76.91 ± 2.31 | 58.25 ± 1.77 | 47.93 ± 0.52 |
| pH 6.0 | 72.76 ± 7.49          | 26.24 ± 2.10 | 0.04 ± 0.23  | 0.00 ± 0.00  | 0.00 ± 0.00  |
| pH 7.0 | 71.29 ± 10.71         | 0.08 ± 0.50  | 0.00 ± 0.00  | 0.00 ± 0.00  | 0.00 ± 0.00  |
| pH 8.0 | 75.63 ± 0.68          | 37.15 ± 1.09 | 12.80 ± 6.77 | 0.01 ± 0.02  | 0.00 ± 0.00  |
| pH 9.0 | 78.75 ± 0.18          | 56.74 ± 3.92 | 33.38 ± 0.61 | 6.56 ± 2.38  | 1.39 ± 0.46  |



ตารางที่ ค-5 จำนวนแบคทีเรียในกลุ่มแบคทีเรียในสภาวะการแปรผันค่า pH

| pH        | เวลา<br>(วัน) | จำนวนแบคทีเรีย (Log CFU ต่อมิลลิลิตร) |                                     |   |  |
|-----------|---------------|---------------------------------------|-------------------------------------|---|--|
|           |               | <i>Mycolicibacterium</i><br>sp. PO1   | <i>Mycolicibacterium</i><br>sp. PO2 | <i>Novosphingobium</i><br><i>pentaromativorans</i><br>PY1 | <i>Bacillus</i><br><i>subtilis</i> FW1 |
| pH<br>5.0 | 3             | 6.09 ± 2.52                           | 5.87 ± 2.08                         | 5.97 ± 0.58   | 5.95 ± 1.00                            |
|           | 6             | 6.08 ± 2.65                           | 6.03 ± 2.08                         | 6.04 ± 2.65   | 6.08 ± 3.00                            |
|           | 9             | 6.03 ± 2.08                           | 5.95 ± 3.46                         | 5.60 ± 3.61   | 5.90 ± 1.73                            |
|           | 12            | 7.24 ± 2.52                           | 7.27 ± 3.06                         | 3.82 ± 1.15   | 5.85 ± 2.65                            |
|           | 15            | 7.21 ± 3.79                           | 7.14 ± 3.21                         | 0.00 ± 0.00   | 5.85 ± 1.73                            |
| pH<br>6.0 | 3             | 6.00 ± 3.00                           | 6.00 ± 1.00                         | 5.88 ± 2.31   | 6.01 ± 2.52                            |
|           | 6             | 7.00 ± 1.00                           | 7.03 ± 2.08                         | 5.82 ± 1.53   | 5.85 ± 2.65                            |
|           | 9             | 7.00 ± 1.00                           | 7.08 ± 2.65                         | 5.52 ± 1.15   | 5.73 ± 1.15                            |
| pH<br>7.0 | 3             | 6.10 ± 2.52                           | 6.10 ± 3.06                         | 6.03 ± 2.08   | 6.11 ± 3.00                            |
|           | 6             | 7.12 ± 3.79                           | 7.15 ± 3.61                         | 6.12 ± 2.08   | 6.14 ± 3.51                            |
| pH<br>8.0 | 3             | 6.05 ± 3.21                           | 6.04 ± 1.73                         | 5.97 ± 1.15   | 6.00 ± 2.65                            |
|           | 6             | 7.08 ± 1.00                           | 7.09 ± 2.52                         | 5.85 ± 2.00   | 5.60 ± 3.61                            |
|           | 9             | 7.19 ± 1.53                           | 6.95 ± 2.00                         | 5.87 ± 2.89   | 5.75 ± 2.08                            |
|           | 12            | 5.87 ± 1.15                           | 5.75 ± 2.08                         | 5.37 ± 2.08   | 5.22 ± 1.53                            |
| pH<br>9.0 | 3             | 6.01 ± 1.53                           | 5.95 ± 1.73                         | 5.80 ± 2.52   | 5.88 ± 1.53                            |
|           | 6             | 6.15 ± 2.65                           | 6.16 ± 2.08                         | 5.90 ± 1.73   | 5.94 ± 1.53                            |
|           | 9             | 7.08 ± 2.00                           | 7.07 ± 3.06                         | 5.88 ± 2.31   | 5.48 ± 2.65                            |
|           | 12            | 6.90 ± 2.00                           | 6.85 ± 2.52                         | 5.43 ± 2.52   | 5.43 ± 1.15                            |
|           | 15            | 5.78 ± 2.65                           | 5.70 ± 2.00                         | 4.52 ± 0.58   | 5.30 ± 2.00                            |

ตารางที่ ค-6 ประสิทธิภาพย่อยสลายไพลีน ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตรของกลุ่มแบคทีเรีย OPK ในสภาวะการแปรผันอุณหภูมิ

| อุณหภูมิ               | ไพลีนที่เหลืออยู่ (%) |             |             |             |
|------------------------|-----------------------|-------------|-------------|-------------|
|                        | วันที่ 3              | วันที่ 6    | วันที่ 9    | วันที่ 12   |
| 30°C                   | 24.22 ± 3.02          | 0.29 ± 0.01 | 0.00 ± 0.00 | 0.00 ± 0.00 |
| อุณหภูมิห้อง (24-28°C) | 46.06 ± 3.04          | 1.30 ± 0.13 | 0.02 ± 0.00 | 0.00 ± 0.00 |
| 37°C                   | 42.25 ± 0.09          | 3.88 ± 0.02 | 0.00 ± 0.00 | 0.00 ± 0.00 |

ตารางที่ ค-7 จำนวนแบคทีเรียในกลุ่มแบคทีเรียในสภาวะการแปรผันอุณหภูมิ

| อุณหภูมิ               | เวลา (วัน) | จำนวนแบคทีเรีย (Log CFU ต่อมิลลิลิตร) |                                  |  |                              |
|------------------------|------------|---------------------------------------|----------------------------------|--|------------------------------|
|                        |            | <i>Mycolicibacterium</i> sp. PO1      | <i>Mycolicibacterium</i> sp. PO2 | <i>Novosphingobium pentaromativorans</i> PY1 | <i>Bacillus subtilis</i> FW1 |
| 30°C                   | 3          | 6.04 ± 2.65                           | 6.01 ± 2.31                      | 5.80 ± 1.53                                  | 6.00 ± 1.73                  |
|                        | 6          | 7.08 ± 2.65                           | 7.00 ± 1.00                      | 5.75 ± 2.08                                  | 5.22 ± 1.53                  |
| อุณหภูมิห้อง (24-28°C) | 3          | 6.10 ± 2.08                           | 5.90 ± 2.00                      | 5.88 ± 1.53                                  | 5.78 ± 2.00                  |
|                        | 6          | 7.03 ± 2.08                           | 6.99 ± 2.89                      | 5.75 ± 2.08                                  | 5.52 ± 0.58                  |
| 37°C                   | 3          | 6.03 ± 1.15                           | 6.10 ± 2.52                      | 5.73 ± 2.52                                  | 5.48 ± 2.65                  |
|                        | 6          | 7.07 ± 3.06                           | 7.09 ± 2.08                      | 5.75 ± 1.15                                  | 5.73 ± 2.52                  |

ตารางที่ ค-8 ประสิทธิภาพย่อยสลายไพลิน ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตรของกลุ่มแบคทีเรีย OPK ในสภาวะการแปรผันความเค็ม

| %NaCl<br>(น้ำหนักต่อ<br>ปริมาตร) | ไพลินที่เหลืออยู่ (%) |             |             |             |
|----------------------------------|-----------------------|-------------|-------------|-------------|
|                                  | วันที่ 3              | วันที่ 6    | วันที่ 9    | วันที่ 12   |
| 0%                               | 28.08 ± 3.20          | 0.20 ± 0.04 | 0.00 ± 0.00 | 0.00 ± 0.00 |
| 1%                               | 24.50 ± 2.05          | 0.35 ± 0.07 | 0.00 ± 0.00 | 0.00 ± 0.00 |
| 3%                               | 39.86 ± 1.25          | 0.02 ± 0.00 | 0.00 ± 0.00 | 0.00 ± 0.00 |
| 5%                               | 41.95 ± 2.85          | 0.04 ± 0.01 | 0.01 ± 0.00 | 0.00 ± 0.00 |

ตารางที่ ค-9 จำนวนแบคทีเรียในกลุ่มแบคทีเรียในสภาวะการแปรผันความเค็ม

| %NaCl<br>(น้ำหนัก<br>ต่อ<br>ปริมาตร) | เวลา<br>(วัน) | จำนวนแบคทีเรีย (Log CFU ต่อมิลลิตร)         |  |   |   |
|--------------------------------------|---------------|---|--|---|---|
|                                      |               | <i>Mycolicibacteriu</i><br><i>m sp. PO1</i> | <i>Mycolicibacterium</i><br><i>sp. PO2</i> | <i>Novosphingobium</i><br><i>pentaromativorans</i><br>PY1 | <i>Bacillus</i><br><i>subtilis</i><br>FW1 |
| 0%                                   | 3             | 6.01 ± 0.58                                 | 5.99 ± 1.15                                | 5.85 ± 1.73   | 5.75 ±<br>2.08                            |
|                                      | 6             | 7.11 ± 2.00                                 | 7.03 ± 1.53                                | 5.73 ± 1.53   | 5.80 ±<br>2.08                            |
| 1%                                   | 3             | 6.07 ± 1.53                                 | 6.05 ± 3.21                                | 5.70 ± 1.00   | 5.85 ±<br>1.73                            |
|                                      | 6             | 7.17 ± 2.08                                 | 6.90 ± 3.61                                | 5.85 ± 2.65   | 5.48 ±<br>2.65                            |
| 3%                                   | 3             | 6.09 ± 3.51                                 | 6.00 ± 1.00                                | 5.75 ± 3.06   | 5.90 ±<br>3.61                            |
|                                      | 6             | 7.05 ± 3.21                                 | 7.08 ± 1.00                                | 5.82 ± 0.58   | 5.60 ±<br>2.65                            |
| 5%                                   | 3             | 6.05 ± 3.21                                 | 5.85 ± 2.00                                | 5.90 ± 1.73   | 5.87 ±<br>2.08                            |
|                                      | 6             | 7.16 ± 3.06                                 | 7.14 ± 1.15                                | 5.52 ± 3.06   | 5.48 ±<br>2.65                            |

ตารางที่ ค-10 ประสิทธิภาพย่อยสลายแอนทราซีน ฟลูออรีน พีแนนทรีน และฟลูออแรนทีนในรูปแบบสารเดี่ยว ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตรของกลุ่มแบคทีเรีย OPK

| PAHs<br>ในรูปแบบสารเดี่ยว | PAHs ที่เหลืออยู่ (%) |               |               |              |
|---------------------------|-----------------------|---------------|---------------|--------------|
|                           | วันที่ 3              | วันที่ 6      | วันที่ 9      | วันที่ 12    |
| แอนทราซีน                 | 87.91 ± 2.86          | 77.92 ± 5.37  | 70.12 ± 2.39  | 51.80 ± 1.78 |
| พีแนนทรีน                 | 40.41 ± 0.23          | 1.00 ± 0.00   | 0.62 ± 0.04   | 0.07 ± 0.00  |
| ฟลูออรีน                  | 0.75 ± 1.53           | 0.02 ± 0.12   | 0.00 ± 0.00   | 0.00 ± 0.00  |
| ฟลูออแรนทีน               | 100.00 ± 7.08         | 100.00 ± 6.89 | 100.00 ± 5.02 | 54.22 ± 0.30 |

ตารางที่ ค-11 จำนวนแบคทีเรียในกลุ่มแบคทีเรียในการย่อยสลายแอนทราซีน ฟลูออรีน พีแนนทรีน และฟลูออแรนทีนในรูปแบบสารเดี่ยว ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร

| PAHs                | เวลา<br>(วัน) | จำนวนแบคทีเรีย (Log CFU ต่อมิลลิลิตร) |                                     |   |   |
|---------------------|---------------|---------------------------------------|-------------------------------------|---|---|
|                     |               | <i>Mycolicibacterium</i><br>sp. PO1   | <i>Mycolicibacterium</i><br>sp. PO2 | <i>Novosphingobium</i><br><i>pentaromativorans</i><br>PY1 | <i>Bacillus</i><br><i>subtilis</i><br>FW1 |
| แอน<br>ทรา<br>ซีน   | 3             | 7.05 ± 1.15                           | 7.12 ± 1.53                         | 7.12 ± 2.08   | 7.00 ± 1.00                               |
|                     | 6             | 7.05 ± 0.58                           | 7.16 ± 3.06                         | 6.97 ± 0.58   | 7.12 ± 2.08                               |
|                     | 9             | 7.21 ± 1.53                           | 7.33 ± 3.06                         | 7.11 ± 2.00   | 7.29 ± 2.52                               |
|                     | 12            | 7.64 ± 2.52                           | 7.32 ± 1.00                         | 7.16 ± 3.06   | 7.09 ± 2.52                               |
| พีแนน<br>ทรีน       | 3             | 7.10 ± 2.08                           | 7.11 ± 2.00                         | 7.01 ± 0.58   | 7.21 ± 2.08                               |
|                     | 6             | 7.19 ± 2.08                           | 7.14 ± 1.53                         | 7.24 ± 0.58   | 7.11 ± 0.65                               |
|                     | 9             | 7.36 ± 3.06                           | 7.31 ± 1.53                         | 7.14 ± 1.15   | 7.05 ± 0.58                               |
|                     | 12            | 7.33 ± 1.53                           | 7.36 ± 2.65                         | 7.20 ± 1.00   | 7.10 ± 1.15                               |
| ฟลูออ<br>รีน        | 3             | 7.07 ± 3.06                           | 7.00 ± 1.00                         | 7.21 ± 1.53   | 7.20 ± 1.00                               |
|                     | 6             | 7.17 ± 2.52                           | 7.11 ± 2.00                         | 7.23 ± 2.00   | 7.24 ± 2.08                               |
|                     | 9             | 7.36 ± 2.65                           | 7.41 ± 4.04                         | 7.39 ± 0.58   | 7.17 ± 3.21                               |
|                     | 12            | 7.18 ± 3.00                           | 7.27 ± 3.51                         | 7.35 ± 2.52   | 7.17 ± 2.52                               |
| ฟลูออ<br>แรน<br>ทีน | 3             | 7.23 ± 2.65                           | 7.04 ± 1.00                         | 7.18 ± 3.61   | 7.24 ± 3.61                               |
|                     | 6             | 7.32 ± 1.00                           | 7.24 ± 0.58                         | 7.21 ± 1.53   | 7.33 ± 1.53                               |
|                     | 9             | 7.41 ± 1.53                           | 7.27 ± 0.58                         | 7.48 ± 2.00   | 7.37 ± 2.00                               |
|                     | 12            | 7.55 ± 2.52                           | 7.26 ± 1.15                         | 7.65 ± 0.58   | 7.35 ± 0.58                               |

ตารางที่ ค-12 ประสิทธิภาพย่อยสลาย PAHs ในรูปแบบสารคู่ผสม ความเข้มข้นชนิดละ 50 มิลลิกรัมต่อลิตรของกลุ่มแบคทีเรีย OPK

| PAHs<br>ในรูปแบบสารคู่ผสม  | PAHs ที่เหลืออยู่ (%) |              |              |             |
|----------------------------|-----------------------|--------------|--------------|-------------|
|                            | วันที่ 3              | วันที่ 6     | วันที่ 9     | วันที่ 12   |
| <u>ไพรีนและแอนทราซีน</u>   |                       |              |              |             |
| ไพรีน                      | 9.85 ± 0.40           | 8.83 ± 1.22  | 0.08 ± 0.02  | 0.05 ± 0.02 |
| แอนทราซีน                  | 49.94 ± 0.46          | 40.01 ± 1.34 | 2.01 ± 0.34  | 2.26 ± 0.16 |
| <u>ไพรีนและฟิแนนทรีน</u>   |                       |              |              |             |
| ไพรีน                      | 56.70 ± 3.55          | 15.48 ± 0.93 | 1.36 ± 0.29  | 0.00 ± 0.00 |
| ฟิแนนทรีน                  | 1.60 ± 0.05           | 0.06 ± 0.02  | 0.00 ± 0.00  | 0.00 ± 0.00 |
| <u>ไพรีนและฟลูออรีน</u>    |                       |              |              |             |
| ไพรีน                      | 84.12 ± 1.91          | 47.39 ± 2.83 | 0.51 ± 0.72  | 0.00 ± 0.00 |
| ฟลูออรีน                   | 19.83 ± 2.80          | 1.83 ± 0.19  | 0.01 ± 0.02  | 0.00 ± 0.00 |
| <u>ไพรีนและฟลูออแรนทีน</u> |                       |              |              |             |
| ไพรีน                      | 66.31 ± 2.55          | 41.37 ± 5.35 | 27.47 ± 3.91 | 0.79 ± 0.17 |
| ฟลูออแรนทีน                | 24.14 ± 3.47          | 15.24 ± 1.59 | 0.86 ± 1.82  | 0.56 ± 0.30 |

ตารางที่ ค-13 จำนวนแบคทีเรียในกลุ่มแบคทีเรียในการย่อยสลาย PAHs ในรูปแบบสารคู่ผสม

| PAHs   | เวลา<br>(วัน) | จำนวนแบคทีเรีย (Log CFU ต่อมิลลิลิตร) |                                     |   |   |
|--------|---------------|---------------------------------------|-------------------------------------|---|---|
|        |               | <i>Mycolicibacterium</i><br>sp. PO1   | <i>Mycolicibacterium</i><br>sp. PO2 | <i>Novosphingobium</i><br><i>pentaromativorans</i><br>PY1 | <i>Bacillus</i><br><i>subtilis</i><br>FW1 |
| ไพรีน  | 3             | 7.40 ± 1.53                           | 7.08 ± 1.00                         | 7.08 ± 4.36   | 7.07 ± 0.58                               |
| และ    | 6             | 7.37 ± 2.52                           | 7.23 ± 2.00                         | 7.15 ± 1.00   | 7.14 ± 1.53                               |
| แอน    | 9             | 7.19 ± 3.06                           | 7.04 ± 1.00                         | 7.10 ± 0.58   | 6.99 ± 1.53                               |
| ทราซีน | 12            | 7.26 ± 1.53                           | 7.12 ± 3.21                         | 7.19 ± 0.58   | 7.15 ± 2.65                               |
| ไพรีน  | 3             | 7.24 ± 1.53                           | 7.28 ± 1.00                         | 7.27 ± 1.53   | 7.10 ± 3.06                               |
| และ    | 6             | 7.03 ± 1.53                           | 7.20 ± 1.00                         | 7.21 ± 2.31   | 7.01 ± 0.58                               |
| พีแนน  | 9             | 7.08 ± 2.00                           | 7.03 ± 1.15                         | 7.19 ± 1.15   | 7.01 ± 0.58                               |
| ทรีน   | 12            | 7.07 ± 1.53                           | 7.04 ± 2.65                         | 6.99 ± 1.15   | 7.01 ± 2.08                               |
| ไพรีน  | 3             | 7.15 ± 2.00                           | 7.24 ± 1.00                         | 7.16 ± 1.00   | 7.03 ± 3.06                               |
| และ    | 6             | 7.11 ± 2.00                           | 7.04 ± 1.00                         | 7.08 ± 0.58   | 7.19 ± 2.00                               |
| ฟลูออ  | 9             | 7.23 ± 0.58                           | 7.00 ± 2.52                         | 7.17 ± 1.00   | 7.15 ± 2.31                               |
| รีน    | 12            | 7.21 ± 3.21                           | 7.09 ± 0.00                         | 7.23 ± 2.00   | 7.12 ± 3.00                               |
| ไพรีน  | 3             | 7.22 ± 1.15                           | 7.19 ± 2.08                         | 7.14 ± 2.31   | 7.07 ± 0.58                               |
| และ    | 6             | 7.22 ± 1.53                           | 7.18 ± 4.36                         | 7.15 ± 2.65   | 7.10 ± 2.08                               |
| ฟลูออ  | 9             | 7.01 ± 0.58                           | 7.00 ± 2.00                         | 7.25 ± 1.53   | 7.19 ± 0.58                               |
| แรนทีน | 12            | 7.07 ± 1.53                           | 7.16 ± 1.53                         | 7.20 ± 2.00   | 7.24 ± 1.53                               |

ตารางที่ ค-14 ประสิทธิภาพย่อยสลายไพรีนในรูปสารเดี่ยว ฟลูออแรนทีนในรูปแบบสารเดี่ยว และไพรีนและฟลูออแรนทีนในรูปแบบสารคู่ผสม ความเข้มข้นชนิดละ 50 มิลลิกรัมต่อลิตรของกลุ่มแบคทีเรีย OPK

| PAHs                   | PAHs ที่เหลืออยู่ (%) |                 |                 |                 |                 |                 |
|------------------------|-----------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
|                        | ชั่วโมงที่ 24         | ชั่วโมงที่ 36   | ชั่วโมงที่ 48   | ชั่วโมงที่ 60   | ชั่วโมงที่ 72   | ชั่วโมงที่ 144  |
| <u>รูปแบบสารเดี่ยว</u> |                       |                 |                 |                 |                 |                 |
| ไพรีน                  | 89.52 ±<br>7.12       | 57.39 ±<br>7.35 | 34.52 ±<br>9.43 | 3.78 ±<br>6.56  | 2.59 ± 0.46     | 0.00 ±<br>0.00  |
| ฟลูออแรนทีน            | 80.41 ±<br>1.84       | 76.42 ±<br>4.04 | 68.66 ±<br>0.77 | 63.23 ±<br>0.17 | 58.59 ±<br>5.61 | 36.83 ±<br>6.82 |
| <u>รูปแบบสารคู่ผสม</u> |                       |                 |                 |                 |                 |                 |
| ไพรีน                  | 83.33 ±<br>1.39       | 61.50 ±<br>3.60 | 55.84 ±<br>1.33 | 24.82 ±<br>3.84 | 24.82 ±<br>5.17 | 5.01 ±<br>6.68  |
| ฟลูออแรนทีน            | 81.85 ±<br>2.87       | 68.02 ±<br>3.40 | 4.82 ±<br>1.83  | 4.43 ±<br>1.06  | 0.00 ±<br>0.00  | 0.00 ±<br>0.00  |

ตารางที่ ค-15 ประสิทธิภาพย่อยสลายนอร์มัล-อัลเคนของแบคทีเรียเดี่ยวและกลุ่มแบคทีเรีย OPK

| แบคทีเรีย<br>หรือกลุ่มแบคทีเรีย OPK                    | นอร์มัล-อัลเคนที่เหลืออยู่ (%) |              |              |
|--|--------------------------------|--------------|--------------|
|  | วันที่ 3                       | วันที่ 5     | วันที่ 7     |
| นอร์มัล-เตตระเดคเคน ความเข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อลิตร   |                                |              |              |
| <i>Mycolicibacterium</i> sp. PO1                       | 46.28 ± 3.49                   | 8.57 ± 0.42  | 1.07 ± 0.07  |
| <i>Mycolicibacterium</i> sp. PO2                       | 35.28 ± 7.76                   | 10.73 ± 1.08 | 0.00 ± 0.00  |
| <i>Novosphingobium</i><br><i>pentaromativorans</i> PY1 | 41.93 ± 3.76                   | 26.21 ± 1.02 | 9.28 ± 2.44  |
| <i>Bacillus subtilis</i> FW1                           | 42.38 ± 9.15                   | 22.51 ± 2.58 | 8.38 ± 1.45  |
| กลุ่มแบคทีเรีย OPK                                     | 28.01 ± 2.10                   | 9.05 ± 2.77  | 0.00 ± 0.00  |
| นอร์มัล-เฮกซะเดคเคน ความเข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อลิตร   |                                |              |              |
| <i>Mycolicibacterium</i> sp. PO1                       | 67.22 ± 1.48                   | 9.53 ± 0.12  | 3.67 ± 0.12  |
| <i>Mycolicibacterium</i> sp. PO2                       | 53.44 ± 1.84                   | 6.77 ± 0.23  | 0.00 ± 0.00  |
| <i>Novosphingobium</i><br><i>pentaromativorans</i> PY1 | 65.48 ± 17.94                  | 42.34 ± 8.50 | 8.20 ± 1.78  |
| <i>Bacillus subtilis</i> FW1                           | 83.72 ± 3.97                   | 43.25 ± 7.87 | 8.83 ± 1.05  |
| กลุ่มแบคทีเรีย OPK                                     | 48.89 ± 3.85                   | 5.26 ± 0.10  | 0.00 ± 0.00  |
| นอร์มัล-โดโคเซน ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร       |                                |              |              |
| <i>Mycolicibacterium</i> sp. PO1                       | 20.18 ± 1.09                   | 11.99 ± 0.70 | 7.45 ± 0.12  |
| <i>Mycolicibacterium</i> sp. PO2                       | 11.98 ± 1.05                   | 5.48 ± 0.19  | 4.88 ± 0.29  |
| <i>Novosphingobium</i><br><i>pentaromativorans</i> PY1 | 45.22 ± 2.23                   | 10.86 ± 0.53 | 10.05 ± 1.42 |
| <i>Bacillus subtilis</i> FW1                           | 46.08 ± 2.29                   | 13.88 ± 0.59 | 12.01 ± 0.81 |
| กลุ่มแบคทีเรีย OPK                                     | 10.37 ± 0.90                   | 8.10 ± 0.12  | 3.55 ± 0.15  |



ตารางที่ ค-16 ประสิทธิภาพย่อยสลายน้ำมันดิบ ความเข้มข้น 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตรของแบคทีเรียเดี่ยวและกลุ่มแบคทีเรีย OPK

| แบคทีเรีย<br>หรือกลุ่มแบคทีเรีย OPK                    | ปริมาณน้ำมันดิบที่เหลืออยู่ (มิลลิกรัมต่อลิตร) |                |                |
|--|--|----------------|----------------|
|  | วันที่ 3                                       | วันที่ 5       | วันที่ 7       |
| <i>Mycolicibacterium</i> sp. PO1                       | 267.52 ± 123.70                                | 203.83 ± 45.80 | 86.17 ± 13.61  |
| <i>Mycolicibacterium</i> sp. PO2                       | 290.26 ± 66.34                                 | 214.85 ± 81.36 | 88.15 ± 15.94  |
| <i>Novosphingobium</i><br><i>pentaromativorans</i> PY1 | 850.89 ± 50.19                                 | 820.93 ± 60.07 | 730.58 ± 97.23 |
| <i>Bacillus subtilis</i> FW1                           | 859.32 ± 66.46                                 | 770.49 ± 50.05 | 711.26 ± 28.57 |
| กลุ่มแบคทีเรีย OPK                                     | 142.75 ± 66.96                                 | 103.24 ± 39.59 | 64.10 ± 9.99   |

ตารางที่ ค-17 จำนวนแบคทีเรียที่ตรึงอยู่ในซีโอไลท์ปริมาณ 5, 10, 15 และ 20 กรัม เป็นระยะเวลา 3 วัน

| แบคทีเรีย  | ปริมาณซีโอไลท์ (กรัม) |             |             |             |
|--|-----------------------|-------------|-------------|-------------|
|  | 5                     | 10          | 15          | 20          |
| จำนวนแบคทีเรียที่ตรึงอยู่ในซีโอไลท์ (Log CFU ต่อกรัมซีโอไลท์)    |                       |             |             |             |
| <i>Mycolicibacterium</i> sp. PO1                                 | 7.62 ± 0.22           | 8.36 ± 0.26 | 8.06 ± 0.07 | 8.03 ± 0.29 |
| <i>Mycolicibacterium</i> sp. PO2                                 | 7.50 ± 0.14           | 8.49 ± 0.16 | 8.29 ± 0.09 | 8.32 ± 0.13 |
| <i>Novosphingobium</i><br><i>pentaromativorans</i> PY1           | 7.40 ± 0.14           | 8.26 ± 0.20 | 8.03 ± 0.07 | 8.02 ± 0.04 |
| <i>Bacillus subtilis</i> FW1                                     | 8.72 ± 0.08           | 8.16 ± 0.22 | 8.16 ± 0.29 | 8.32 ± 0.12 |
| จำนวนแบคทีเรียที่อยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ (Log CFU ต่อกรัมมิลลิตร) |                       |             |             |             |
| <i>Mycolicibacterium</i> sp. PO1                                 | 8.04 ± 0.11           | 8.17 ± 0.06 | 8.35 ± 0.11 | 8.45 ± 0.03 |
| <i>Mycolicibacterium</i> sp. PO2                                 | 8.17 ± 0.10           | 8.60 ± 0.07 | 8.62 ± 0.10 | 8.60 ± 0.10 |
| <i>Novosphingobium</i><br><i>pentaromativorans</i> PY1           | 8.16 ± 0.06           | 8.43 ± 0.09 | 8.64 ± 0.05 | 8.77 ± 0.07 |
| <i>Bacillus subtilis</i> FW1                                     | 7.72 ± 0.10           | 8.13 ± 0.10 | 8.74 ± 0.02 | 8.97 ± 0.01 |

ตารางที่ ค-18 จำนวนแบคทีเรียที่ตรึงอยู่บนซีโอไลท์ปริมาณ 20 กรัมที่มีการแปรผันความเร็วในการเขย่า เป็นระยะเวลา 3 วัน

| แบคทีเรีย   | ความเร็วในการเขย่า (รอบต่อนาที) |             |             |
|---|---------------------------------|-------------|-------------|
|   | 100                             | 150         | 200         |
| <b>จำนวนแบคทีเรียที่ตรึงอยู่ในซีโอไลท์ (Log CFU ต่อกรัมซีโอไลท์)</b>    |                                 |             |             |
| <i>Mycolicibacterium</i> sp. PO1  | 7.07 ± 0.20                     | 7.90 ± 0.07 | 8.02 ± 0.07 |
| <i>Mycolicibacterium</i> sp. PO2  | 6.92 ± 0.16                     | 7.86 ± 0.09 | 8.03 ± 0.10 |
| <i>Novosphingobium</i>  |                                 |             |             |
| <i>pentaromativorans</i> PY1  | 7.34 ± 0.20                     | 7.99 ± 0.13 | 8.00 ± 0.05 |
| <i>Bacillus subtilis</i> FW1  | 7.77 ± 0.14                     | 8.09 ± 0.23 | 8.04 ± 0.18 |
| <b>จำนวนแบคทีเรียที่อยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ (Log CFU ต่อกรัมมิลลิตร)</b> |                                 |             |             |
| <i>Mycolicibacterium</i> sp. PO1  | 8.20 ± 0.15                     | 8.32 ± 0.22 | 9.01 ± 0.05 |
| <i>Mycolicibacterium</i> sp. PO2  | 8.15 ± 0.24                     | 8.20 ± 0.05 | 8.99 ± 0.07 |
| <i>Novosphingobium</i>  | 8.35 ± 0.23                     | 8.49 ± 0.16 | 9.11 ± 0.08 |
| <i>pentaromativorans</i> PY1  |                                 |             |             |
| <i>Bacillus subtilis</i> FW1  | 8.43 ± 0.50                     | 8.10 ± 0.14 | 9.24 ± 0.05 |

**ตารางที่ ค-19** จำนวนแบคทีเรียที่ตรึงอยู่บนซีโอไลท์ปริมาณ 20 กรัม ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที่ที่มีการแปรผันระยะเวลาในการตรึง เป็นระยะเวลา 7 วัน

| แบคทีเรีย   | ระยะเวลา (วัน) |             |             |             |             |             |             |
|---|----------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
|   | 1              | 2           | 3           | 4           | 5           | 6           | 7           |
| <b>จำนวนแบคทีเรียที่ตรึงอยู่ในซีโอไลท์ (Log CFU ต่อกรัมซีโอไลท์)</b>    |                |             |             |             |             |             |             |
| <i>Mycolicibacterium</i> sp. PO1  | 7.52 ± 0.25    | 7.54 ± 0.30 | 7.54 ± 0.34 | 7.55 ± 0.33 | 7.34 ± 0.18 | 7.33 ± 0.47 | 7.27 ± 0.20 |
| <i>Mycolicibacterium</i> sp. PO2  | 8.13 ± 0.04    | 8.08 ± 0.39 | 8.08 ± 0.08 | 8.14 ± 0.14 | 8.38 ± 0.28 | 8.14 ± 0.14 | 7.99 ± 0.16 |
| <i>Novosphingobium pentaromativorans</i> PY1                            | 7.18 ± 0.24    | 7.35 ± 0.30 | 7.39 ± 0.30 | 7.31 ± 0.32 | 7.33 ± 0.36 | 7.28 ± 0.33 | 7.18 ± 0.48 |
| <i>Bacillus subtilis</i> FW1  | 7.81 ± 0.22    | 8.03 ± 0.08 | 8.02 ± 0.06 | 7.71 ± 0.23 | 7.44 ± 0.15 | 7.64 ± 0.14 | 7.60 ± 0.23 |
| <b>จำนวนแบคทีเรียที่อยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ (Log CFU ต่อกรัมมิลลิตร)</b> |                |             |             |             |             |             |             |
| <i>Mycolicibacterium</i> sp. PO1  | 7.66 ± 0.15    | 7.81 ± 0.17 | 7.64 ± 0.21 | 7.63 ± 0.22 | 7.28 ± 0.54 | 7.33 ± 0.28 | 7.21 ± 0.20 |
| <i>Mycolicibacterium</i> sp. PO2  | 8.40 ± 0.07    | 8.31 ± 0.20 | 8.38 ± 0.09 | 8.41 ± 0.10 | 8.39 ± 0.60 | 8.13 ± 0.13 | 7.91 ± 0.18 |
| <i>Novosphingobium pentaromativorans</i> PY1                            | 7.05 ± 0.18    | 7.08 ± 0.10 | 7.27 ± 0.29 | 7.13 ± 0.35 | 7.20 ± 0.19 | 7.11 ± 0.26 | 7.10 ± 0.29 |
| <i>Bacillus subtilis</i> FW1  | 8.34 ± 0.09    | 8.30 ± 0.18 | 8.13 ± 0.06 | 7.75 ± 0.22 | 7.41 ± 0.10 | 7.74 ± 0.34 | 7.21 ± 0.13 |

**ตารางที่ ค-20** ประสิทธิภาพการกำจัดน้ำมันดิบ ความเข้มข้น 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตรในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว NSW ของกลุ่มแบคทีเรียตรึง OPK

|                        | ปริมาณน้ำมันดิบที่เหลืออยู่ (มิลลิกรัมต่อลิตร) |                |                |
|------------------------|--|----------------|----------------|
|                        | ชั่วโมงที่ 72                                  | ชั่วโมงที่ 120 | ชั่วโมงที่ 168 |
| กลุ่มแบคทีเรียตรึง OPK | 65.67 ± 2.23                                   | 128.26 ± 3.21  | 81.10 ± 1.54   |
| ซีโอไลท์               | 660.33 ± 3.6                                   | 618.88 ± 2.56  | 704.20 ± 2.11  |

**ตารางที่ ค-21** ประสิทธิภาพการกำจัดน้ำมันดิบ ความเข้มข้น 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตรในน้ำทะเล  
ปราศจากการเติมสารอาหารของกลุ่มแบคทีเรียตรึง OPK

|                    | ปริมาณน้ำมันดิบที่เหลืออยู่ (มิลลิกรัมต่อลิตร) |               |               |               |               |
|--------------------|--|---------------|---------------|---------------|---------------|
|                    | ชั่วโมงที่ 12                                  | ชั่วโมงที่ 24 | ชั่วโมงที่ 48 | ชั่วโมงที่ 72 | ชั่วโมงที่ 96 |
| กลุ่มแบคทีเรียตรึง | 386.74 ±                                       | 356.25 ±      | 345.86 ± 8.73 | 339.13 ±      | 251.83 ±      |
| OPK                | 53.96  | 12.49         |               | 12.41         | 98.30         |
| ซีโอล์ไท์          | 987.69 ±                                       | 1,000.00 ±    | 954.75 ±      | 971.18 ±      | 890.67 ±      |
|                    | 36.47  | 29.80         | 99.29         | 88.40         | 58.02         |

**ตารางที่ ค-22** ประสิทธิภาพการกำจัดน้ำมันดิบ ความเข้มข้น 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตรของ  
กลุ่มแบคทีเรีย OPK ในรูปแบบเซลล์อิสระและรูปแบบเซลล์ตรึง ในสภาวะการแปรผันค่า pH

| pH     | ปริมาณน้ำมันดิบที่เหลืออยู่ (มิลลิกรัมต่อลิตร) |                        |                |
|--------|--|------------------------|----------------|
|        | กลุ่มแบคทีเรีย OPK                             | กลุ่มแบคทีเรียตรึง OPK | ซีโอล์ไท์      |
| pH 5.0 | 23.66 ± 6.61                                   | 370.89 ± 56.24         | 943.98 ± 23.21 |
| pH 6.0 | 22.56 ± 5.88                                   | 271.17 ± 49.13         | 967.40 ± 31.67 |
| pH 7.0 | 8.34 ± 11.03                                   | 240.27 ± 78.92         | 992.56 ± 28.93 |
| pH 8.0 | 12.37 ± 2.69                                   | 299.52 ± 20.13         | 952.81 ± 13.14 |
| pH 9.0 | 16.63 ± 1.72                                   | 327.56 ± 28.34         | 960.35 ± 21.91 |

**ตารางที่ ค-23** ประสิทธิภาพการกำจัดน้ำมันดิบ ความเข้มข้น 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตรของ  
กลุ่มแบคทีเรีย OPK ในรูปแบบเซลล์อิสระและรูปแบบเซลล์ตรึง ในสภาวะการแปรผันอุณหภูมิ

| อุณหภูมิ<br>(องศาเซลเซียส) | ปริมาณน้ำมันดิบที่เหลืออยู่ (มิลลิกรัมต่อลิตร) |                        |                 |
|----------------------------|--|------------------------|-----------------|
|                            | กลุ่มแบคทีเรีย OPK                             | กลุ่มแบคทีเรียตรึง OPK | ซีโอล์ไท์       |
| 30                         | 11.87 ± 8.48                                   | 277.33 ± 23.54         | 939.34 ± 49.12  |
| 37                         | 11.40 ± 3.91                                   | 260.46 ± 101.14        | 949.72 ± 82.26  |
| 40                         | 12.41 ± 1.92                                   | 275.11 ± 56.15         | 977.33 ± 100.18 |

ตารางที่ ค-24 ประสิทธิภาพการกำจัดน้ำมันดิบ ความเข้มข้น 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตรของ  
กลุ่มแบคทีเรีย OPK ในรูปแบบเซลล์อิสระและรูปแบบเซลล์ตรึง ในสภาวะการแปรผันความเค็ม

| ความเค็ม (%) | ปริมาณน้ำมันดิบที่เหลืออยู่ (มิลลิกรัมต่อลิตร) |                        |                  |
|--------------|--|------------------------|------------------|
|              | กลุ่มแบคทีเรีย OPK                             | กลุ่มแบคทีเรียตรึง OPK | ซีโอล์ไท์        |
| 20           | 11.64 ± 7.44                                   | 312.33 ± 17.59         | 1136.11 ± 151.03 |
| 30           | 12.64 ± 2.63                                   | 316.33 ± 64.70         | 1043.44 ± 28.19  |
| 40           | 6.82 ± 4.26                                    | 323.56 ± 26.49         | 926.12 ± 46.97   |
| 50           | 9.43 ± 1.39                                    | 334.54 ± 23.68         | 1023.69 ± 73.21  |
| 60           | 6.92 ± 1.35                                    | 421.85 ± 39.70         | 1021.55 ± 38.09  |

ตารางที่ ค-25 ประสิทธิภาพการกำจัดน้ำมันดิบ ความเข้มข้น 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตรด้วย  
กลุ่มแบคทีเรียตรึง OPK โดยมีการเติมน้ำมันดิบ ความเข้มข้น 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตรทุก 3 วัน เป็น  
ระยะเวลา 15 วัน

| กลุ่มแบคทีเรีย/<br>ซีโอล์ไท์ | ปริมาณน้ำมันดิบที่เหลืออยู่ (มิลลิกรัมต่อลิตร) |                      |                      |                      |                      |
|------------------------------|--|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|
|                              | วันที่ 3                                       | วันที่ 6             | วันที่ 9             | วันที่ 12            | วันที่ 15            |
| กลุ่มแบคทีเรีย<br>OPK        | 43.77 ± 84.91                                  | 258.32 ±<br>336.58   | 481.82 ±<br>485.00   | 1,066.35 ±<br>895.31 | 1,444.60 ±<br>582.88 |
| กลุ่มแบคทีเรีย<br>ตรึง OPK   | 356.83 ±<br>93.11                              | 827.62 ±<br>145.20   | 805.44 ±<br>260.82   | 1,302.22 ±<br>265.22 | 1,711.65 ±<br>332.13 |
| ซีโอล์ไท์                    | 716.03 ± 3.02                                  | 1,642.48 ±<br>192.54 | 2,239.62 ±<br>131.99 | 3,161.25 ±<br>89.03  | 4,482.98 ±<br>15.73  |

ตารางที่ ค-26 จำนวนแบคทีเรียในกลุ่มแบคทีเรียในระบบที่มีการเติมน้ำมันดิบ

ความเข้มข้น 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตรทุก 3 วัน เป็นระยะเวลา 15 วัน

| กลุ่มแบคทีเรีย | จำนวนแบคทีเรีย (Log CFU ต่อมิลลิลิตร)    |                                     |   |  |
|----------------|--|-------------------------------------|---|--|
|                | <i>Mycolicibacterium</i><br>sp. PO1      | <i>Mycolicibacterium</i><br>sp. PO2 | <i>Novosphingobium</i><br><i>pentaromativorans</i><br>PY1 | <i>Bacillus</i><br><i>subtilis</i> FW1 |
| OPK            |  |                                     |   |  |
| 3              | 7.60 ± 0.54                              | 7.56 ± 0.43                         | 7.33 ± 0.55   | 7.75 ± 0.27                            |
| 6              | 7.77 ± 0.12                              | 7.57 ± 0.19                         | 5.94 ± 0.02   | 6.10 ± 0.14                            |
| 9              | 7.28 ± 0.17                              | 7.36 ± 0.03                         | 4.72 ± 0.10   | 6.62 ± 0.27                            |
| 12             | 7.31 ± 0.26                              | 7.27 ± 0.30                         | 4.43 ± 0.07   | 6.21 ± 0.39                            |
| 15             | 6.17 ± 0.11                              | 6.66 ± 0.02                         | 4.00 ± 0.04   | 4.53 ± 0.39                            |
| กลุ่มแบคทีเรีย | จำนวนแบคทีเรีย (Log CFU ต่อกรัมซีไอไลท์) |                                     |   |  |
|                | <i>Mycolicibacterium</i><br>sp. PO1      | <i>Mycolicibacterium</i><br>sp. PO2 | <i>Novosphingobium</i><br><i>pentaromativorans</i><br>PY1 | <i>Bacillus</i><br><i>subtilis</i> FW1 |
| ตรึง OPK       |  |                                     |   |  |
| 3              | 8.55 ± 0.10                              | 8.26 ± 0.20                         | 8.10 ± 0.14   | 8.32 ± 0.22                            |
| 6              | 8.38 ± 0.44                              | 8.03 ± 0.97                         | 7.56 ± 0.06   | 8.28 ± 0.80                            |
| 9              | 8.24 ± 0.53                              | 7.45 ± 0.60                         | 7.03 ± 0.04   | 8.10 ± 0.64                            |
| 12             | 7.54 ± 0.23                              | 7.02 ± 0.16                         | 6.86 ± 0.31   | 7.47 ± 0.13                            |
| 15             | 7.42 ± 0.27                              | 7.09 ± 0.30                         | 5.43 ± 0.19   | 7.45 ± 0.30                            |

ตารางที่ ค-27 ปริมาณน้ำมันดิบที่เหลือ (มิลลิกรัมต่อลิตร) ในการทดลองการใช้ซ้ำของ

กลุ่มแบคทีเรียตรึง OPK

| จำนวนรอบ | ปริมาณน้ำมันดิบที่เหลืออยู่ (มิลลิกรัมต่อลิตร) |
|----------|--|
| 1        | 283.74 ± 86.36                                 |
| 2        | 299.97 ± 63.83                                 |
| 3        | 394.58 ± 81.03                                 |
| 4        | 380.17 ± 27.02                                 |
| 5        | 417.73 ± 48.44                                 |

ตารางที่ ค-28 จำนวนแบคทีเรียของกลุ่มแบคทีเรียในการทดลองการใช้ซ้ำของ  
กลุ่มแบคทีเรียตรึง OPK

| จำนวนรอบ | จำนวนแบคทีเรีย (Log CFU ต่อกรัมซีโอไลท์) |                                     |   |  |
|----------|--|-------------------------------------|---|--|
|          | <i>Mycolicibacterium</i><br>sp. PO1      | <i>Mycolicibacterium</i><br>sp. PO2 | <i>Novosphingobium</i><br><i>pentaromativorans</i><br>PY1 | <i>Bacillus</i><br><i>subtilis</i> FW1 |
| 1        | 8.38 ± 0.35                              | 8.10 ± 0.14                         | 8.10 ± 0.14   | 8.26 ± 0.20                            |
| 2        | 8.03 ± 0.26                              | 8.08 ± 0.36                         | 7.09 ± 0.11   | 8.03 ± 0.29                            |
| 3        | 7.82 ± 0.26                              | 7.36 ± 0.19                         | 7.03 ± 0.04   | 8.01 ± 0.41                            |
| 4        | 7.62 ± 0.18                              | 7.19 ± 0.11                         | 6.54 ± 0.23   | 7.03 ± 0.39                            |
| 5        | 7.48 ± 0.25                              | 7.10 ± 0.03                         | 5.78 ± 0.12   | 6.90 ± 0.15                            |

ตารางที่ ค-29 ปริมาณน้ำมันดิบที่เหลืออยู่ (มิลลิกรัมต่อลิตร) ในระบบนิเวศจำลองดิน

| ชุดการทดลอง            | ปริมาณน้ำมันดิบที่เหลืออยู่ (มิลลิกรัมต่อลิตร) |                      |                       |                      |                      |                      |                      |
|------------------------|--|----------------------|-----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|
|                        | วันที่ 3                                       | วันที่ 6             | วันที่ 9              | วันที่ 12            | วันที่ 15            | วันที่ 18            | วันที่ 21            |
| Abiotic control        | 97,66.66<br>± 351.02                           | 9,663.27<br>± 595.72 | 9,446.87<br>± 656.79  | 9,484.09<br>± 788.93 | 9,372.26<br>± 187.98 | 9,376.45<br>± 702.84 | 9,263.45<br>± 438.75 |
| Natural<br>attenuation | 7,024.67<br>± 146.71                           | 5,902.80<br>± 291.5  | 5,803.36<br>± 32.46   | 5,783.52<br>± 402.61 | 5,744.12<br>± 144.36 | 5,766.74<br>± 240.31 | 5,570.01<br>± 88.90  |
| Biostimulation         | 6,323.23<br>± 728.72                           | 5,728.09<br>± 691.35 | 5,621.99<br>± 538.46  | 5,531.49<br>± 434.79 | 5,515.02<br>± 240.31 | 5,565.35<br>± 259.82 | 5,539.57<br>± 682.24 |
| Bioaugmentation        | 4,373.31<br>± 836.76                           | 3,666.81<br>± 136.47 | 3,668.64<br>± 4280.20 | 3,537.52<br>± 292.00 | 2,955.88<br>± 516.40 | 2,204.52<br>± 694.07 | 1,933.2<br>± 595.75  |

ภาคผนวก ง

ตารางที่ ง-1 ค่า Log<sub>2</sub>RPKM ของยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายไพรีนและฟลูออแรนที่ของชุดการทดลองที่มีฟลูออแรนที่เพิ่มขึ้นเพียงชนิดเดียว (F1 และ F2) และไพรีนและฟลูออแรนที่ในรูปแบบสารคู่ผสม (PF1 และ PF2)

| แบบที่เรีย   | ยีน   | Gene description  | Log <sub>2</sub> RPKM values |       |       |       |        |        |        |           | Fold change |   |   | Regulation |
|--------------|---|---|------------------------------|-------|-------|-------|--------|--------|--------|-----------|-------------|---|---|------------|
|              |   |   | F1                           | F2    | PF1   | PF2   | PF1/F1 | PF1/F2 | PF2/F1 | PF2/F2    |             |   |   |            |
| PO1          | <i>nidA3</i>                                      | Fluoranthene hydroxylating dioxygenase $\alpha$ subunit                       | 11.61                        | 13.78 | 13.17 | 13.59 | -      | -      | -      | -         | -           | - | - | Unchanged  |
|              | <i>nidB3</i>                                      | Fluoranthene hydroxylating dioxygenase $\beta$ subunit                        | 11.53                        | 13.92 | 13.54 | 13.76 | -      | -      | -      | -         | -           | - | - | Unchanged  |
|              | <i>dbfA1</i>                                      | Dibenzofuran dioxygenase/ putative 9-fluorenone-1-carboxylic acid dioxygenase | 9.41                         | 11.11 | 11.64 | 11.46 | -      | -      | -      | -         | -           | - | - | Unchanged  |
| <i>nidA</i>  | Pyrene hydroxylating dioxygenase $\alpha$ subunit | 6.06  | 6.47                         | 11.52 | 11.48 | 43.85 | 33.05  | 42.56  | 32.08  | Up        |             |   |   |            |
| <i>nidB</i>  | Pyrene hydroxylating dioxygenase $\beta$ subunit  | 5.92  | 5.69                         | 11.15 | 11.32 | 37.30 | 43.78  | 42.19  | 49.52  | Up        |             |   |   |            |
| <i>nidB2</i> | Pyrene hydroxylating dioxygenase $\beta$ subunit  | 7.06  | 7.24                         | 12.42 | 12.36 | 41.18 | 36.37  | 39.36  | 34.76  | Up        |             |   |   |            |
| <i>phdE</i>  | Dihydrodiol dehydrogenase                         | 8.19  | 10.19                        | 10.47 | 10.22 | -     | -      | -      | -      | Unchanged |             |   |   |            |



**ตารางที่ ง-1** ค่า Log<sub>2</sub>RPKM ของยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายไพรีนและฟลูออแรนทีนของชุดการทดลองที่มีฟลูออแรนทีนเพียงชนิดเดียว (F1 และ F2) และไพรีนและฟลูออแรนทีนในรูปแบบสารคู่ผสม (PF1 และ PF2) (ต่อ)

| แบคทีเรีย | ยีน          | Gene description   | Log <sub>2</sub> RPKM values |       |       |       |        |         | Fold change |         |           | Regulation |
|-----------|--------------|--|------------------------------|-------|-------|-------|--------|---------|-------------|---------|-----------|------------|
|           |              |  | F1                           | F2    | PF1   | PF2   | PF1/F1 | PF1/F2  | PF2/F1      | PF2/F2  |           |            |
| PO1       | <i>phtC</i>  | 3,4-Dihydroxyphthalate 2-decarboxylase                                     | 7.07                         | 7.75  | 9.75  | 9.55  | 6.42   | 3.99    | 5.60        | 3.48    | Up        |            |
|           | <i>pdoA2</i> | Phenanthrene-4-carboxylate ring-hydroxylating dioxygenase $\alpha$ subunit | 8.87                         | 10.71 | 10.39 | 10.40 | -      | -       | -           | -       | Unchanged |            |
|           | <i>pdoB2</i> | Phenanthrene-4-carboxylate ring-hydroxylating dioxygenase $\beta$ subunit  | 9.00                         | 10.67 | 10.46 | 10.48 | -      | -       | -           | -       | Unchanged |            |
|           | <i>phdF</i>  | Ring-cleavage dioxygenase  | 4.14                         | 0.00  | 8.31  | 8.66  | 4.73   | 1522.40 | 3.49        | 1123.98 | Up        |            |
|           | <i>phdF</i>  | Ring-cleavage dioxygenase  | 4.53                         | 3.58  | 6.39  | 5.95  | 13.77  | 26.40   | 17.45       | 33.45   | Up        |            |
|           | <i>phdG</i>  | Hydratase-aldolase   | 4.74                         | 4.43  | 10.29 | 10.13 | 46.60  | 57.74   | 41.61       | 51.55   | Up        |            |
|           | <i>nidD</i>  | aldehyde dehydrogenase   | 6.02                         | 5.18  | 10.58 | 10.33 | 23.65  | 42.37   | 19.83       | 35.51   | Up        |            |
|           | <i>phdI</i>  | 1-Hydroxy-2-naphthoate dioxygenase   | 4.44                         | 3.50  | 9.68  | 9.87  | 37.73  | 72.16   | 42.97       | 82.18   | Up        |            |
|           | <i>phdI</i>  | 1-Hydroxy-2-naphthoate dioxygenase   | 6.39                         | 6.28  | 11.50 | 11.68 | 34.33  | 37.11   | 39.01       | 42.16   | Up        |            |

**ตารางที่ ง-1** ค่า Log<sub>2</sub>RPKM ของยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายไพรินและฟลูออแรนทีนของชุดการทดลองที่มีฟลูออแรนทีนเพียงชนิดเดียว (F1 และ F2) และไพรินและฟลูออแรนทีนในรูปแบบสารคู่ผสม (PF1 และ PF2) (ต่อ)

| แบคทีเรีย | ยีน          | Gene description  | Log <sub>2</sub> RPKM values |      |       |       |        |        | Fold change |        |    | Regulation |
|-----------|--------------|---|------------------------------|------|-------|-------|--------|--------|-------------|--------|----|------------|
|           |              |   | F1                           | F2   | PF1   | PF2   | PF1/F1 | PF1/F2 | PF2/F1      | PF2/F2 |    |            |
| PO1       | <i>phdJ</i>  | <i>trans</i> -2'-Carboxybenzalpyruvate hydratase-aldolase | 4.40                         | 2.39 | 8.48  | 8.68  | 16.91  | 67.42  | 19.42       | 77.41  | Up |            |
|           | <i>phdJ</i>  | <i>trans</i> -2'-Carboxybenzalpyruvate hydratase-aldolase | 5.78                         | 5.45 | 10.79 | 11.08 | 32.27  | 40.44  | 39.43       | 49.42  | Up |            |
|           | <i>phdK</i>  | 2-Carboxybenzaldehyde dehydrogenase                       | 6.10                         | 4.84 | 10.69 | 10.45 | 24.05  | 57.57  | 20.32       | 48.64  | Up |            |
|           | <i>phtAa</i> | Phthalate 3,4-dioxygenase $\alpha$ subunit                | 3.64                         | 3.11 | 9.86  | 10.13 | 74.27  | 106.84 | 89.51       | 128.76 | Up |            |
|           | <i>phtAb</i> | Phthalate 3,4-dioxygenase $\beta$ subunit                 | 3.94                         | 1.64 | 9.55  | 9.90  | 48.54  | 235.82 | 61.94       | 300.94 | Up |            |
|           | <i>phtAc</i> | Phthalate dioxygenase ferredoxin subunit                  | 3.05                         | 4.13 | 10.17 | 10.09 | 138.67 | 65.64  | 130.72      | 61.88  | Up |            |
|           | <i>phtAd</i> | Phthalate dioxygenase reductase subunit                   | 4.20                         | 3.35 | 9.89  | 10.06 | 51.25  | 92.29  | 57.67       | 103.87 | Up |            |
|           | <i>phtAa</i> | Phthalate 3,4-dioxygenase $\alpha$ subunit                | 5.97                         | 5.33 | 11.64 | 11.91 | 50.93  | 78.93  | 61.70       | 95.62  | Up |            |

**ตารางที่ ง-1** ค่า Log<sub>2</sub>RPKM ของยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายไพรินและฟลูออแรนทีนของชุดการทดลองที่มีฟลูออแรนทีนเพียงชนิดเดียว (F1 และ F2) และไพรินและฟลูออแรนทีนในรูปแบบสารคู่ผสม (PF1 และ PF2) (ต่อ)

| แบคทีเรีย | ยีน          | Gene description                                       | Log2RPKM values |      |       |       |        |        | Fold change |           |    |  | Regulation |
|-----------|--------------|--|-----------------|------|-------|-------|--------|--------|-------------|-----------|----|--|------------|
|           |              |  | F1              | F2   | PF1   | PF2   | PF1/F1 | PF1/F2 | PF2/F1      | PF2/F2    |    |  |            |
| PO1       | <i>phtAb</i> | Phthalate 3,4-dioxygenase<br>β subunit                 | 5.41            | 4.84 | 11.05 | 11.36 | 49.80  | 73.46  | 62.09       | 91.59     | Up |  |            |
|           | <i>phtAc</i> | Phthalate dioxygenase ferredoxin<br>subunit            | 4.63            | 4.27 | 11.24 | 11.52 | 97.16  | 124.91 | 118.54      | 152.40    | Up |  |            |
|           | <i>phtAd</i> | Phthalate dioxygenase reductase<br>subunit             | 5.31            | 4.62 | 11.07 | 11.21 | 53.83  | 86.83  | 59.38       | 95.79     | Up |  |            |
|           | <i>phtB</i>  | 3,4-Dihydroxy-3,4-dihydrophthalate<br>dehydrogenase    | 4.45            | 3.27 | 9.68  | 9.85  | 37.45  | 84.49  | 42.12       | 95.04     | Up |  |            |
|           | <i>phtB</i>  | 3,4-Dihydroxy-3,4-dihydrophthalate<br>dehydrogenase    | 5.45            | 4.79 | 10.92 | 11.21 | 44.26  | 70.27  | 53.95       | 85.66     | Up |  |            |
|           | <i>pcaG</i>  | Protocatechuate 3,4-dioxygenase                        | 7.59            | 7.97 | 7.99  | 8.22  | -      | -      | -           | Unchanged |    |  |            |
|           |              | <b>α</b> subunit                                       |                 |      |       |       |        |        |             |           |    |  |            |
|           | <i>pcaH</i>  | Protocatechuate 3,4-dioxygenase<br>β subunit           | 7.42            | 8.66 | 9.12  | 8.85  | -      | -      | -           | Unchanged |    |  |            |
|           | <i>pcaB</i>  | β -Carboxy- <i>cis,cis</i> -muconate<br>cycloisomerase | 8.08            | 8.57 | 8.89  | 8.71  | -      | -      | -           | Unchanged |    |  |            |

**ตารางที่ ง-1** ค่า Log<sub>2</sub>RPKM ของยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายเพอรินและฟลูออแรนทีนของชุดการทดลองที่มีฟลูออแรนทีนเพียงชนิดเดียว (F1 และ F2) และเพอรินและฟลูออแรนทีนในรูปแบบสารคู่ผสม (PF1 และ PF2) (ต่อ)

| แบบที่เรีย | ยีน          | Gene description   | Log <sub>2</sub> RPKM values |       |       |       |        |        | Fold change |        |   | Regulation |
|------------|--------------|--|------------------------------|-------|-------|-------|--------|--------|-------------|--------|---|------------|
|            |              |  | F1                           | F2    | PF1   | PF2   | PF1/F1 | PF1/F2 | PF2/F1      | PF2/F2 |   |            |
| PO1        | <i>pcaL</i>  | $\gamma$ -Carboxymuconolactone decarboxylase                                 | 7.61                         | 8.33  | 8.32  | 8.18  | -      | -      | -           | -      | - | Unchanged  |
|            | <i>pcaI</i>  | $\beta$ -Ketoadipate CoA-transferase   | 7.03                         | 8.56  | 8.32  | 8.31  | -      | -      | -           | -      | - | Unchanged  |
|            | <i>pcaJ</i>  | $\alpha$ subunit   |                              |       |       |       |        |        |             |        |   |            |
|            | <i>pcaJ</i>  | $\beta$ -Ketoadipate CoA-transferase $\beta$ subunit                         | 7.12                         | 8.81  | 8.71  | 8.64  | -      | -      | -           | -      | - | Unchanged  |
| PO2        | <i>pcaF</i>  | $\beta$ -Ketoadipyl-CoA thiolase   | 7.08                         | 6.26  | 6.56  | 6.42  | -      | -      | -           | -      | - | Unchanged  |
|            | <i>nidA3</i> | Fluoranthene hydroxylating dioxygenase $\alpha$ subunit                      | 11.62                        | 13.79 | 13.17 | 13.59 | -      | -      | -           | -      | - | Unchanged  |
|            | <i>nidB3</i> | Fluoranthene hydroxylating dioxygenase $\beta$ subunit                       | 11.53                        | 13.92 | 13.54 | 13.76 | -      | -      | -           | -      | - | Unchanged  |
|            | <i>dbfA1</i> | Dibenzofuran dioxygenase/putative 9-fluorenone-1-carboxylic acid dioxygenase | 10.66                        | 12.28 | 12.61 | 12.53 | -      | -      | -           | -      | - | Unchanged  |
|            | <i>nidA</i>  | Pyrene hydroxylating dioxygenase $\alpha$ subunit                            | 6.06                         | 6.47  | 11.52 | 11.48 | 43.97  | 33.13  | 42.66       | 32.14  |   | Up         |

**ตารางที่ ง-1** ค่า Log<sub>2</sub>RPKM ของยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายไพรีนและฟลูออแรนที่ของชุดการทดลองที่มีฟลูออแรนที่นเพียงชนิดเดียว (F1 และ F2) และไพรีนและฟลูออแรนที่ในรูปแบบสารคู่ผสม (PF1 และ PF2) (ต่อ)

| แบบที่เรีย | ยีน          | Gene description   | Log <sub>2</sub> RPKM values |       |       |       |        |        | Fold change |        |           |  | Regulation |
|------------|--------------|--|------------------------------|-------|-------|-------|--------|--------|-------------|--------|-----------|--|------------|
|            |              |  | F1                           | F2    | PF1   | PF2   | PF1/F1 | PF1/F2 | PF2/F1      | PF2/F2 |           |  |            |
| PO2        | <i>nidB</i>  | Pyrene hydroxylating dioxygenase<br>β subunit                              | 6.65                         | 6.91  | 11.84 | 11.64 | 36.49  | 30.49  | 31.59       | 26.39  | Up        |  |            |
|            | <i>nidB2</i> | Pyrene hydroxylating dioxygenase<br>β subunit                              | 5.20                         | 7.13  | 11.79 | 11.90 | 96.17  | 25.26  | 104.31      | 27.40  | Up        |  |            |
|            | <i>nidB2</i> | Pyrene hydroxylating dioxygenase<br>β subunit                              | 6.70                         | 5.35  | 11.80 | 11.70 | 34.26  | 87.30  | 32.05       | 81.67  | Up        |  |            |
|            | <i>phdE</i>  | Dihydrodiol dehydrogenase  | 8.18                         | 10.20 | 10.47 | 10.22 | -      | -      | -           | -      | Unchanged |  |            |
|            | <i>phnC</i>  | 3,4-Dihydroxyphthalate 2-<br>decarboxylase                                 | 7.61                         | 7.58  | 9.94  | 9.48  | 5.02   | 5.12   | 3.66        | 3.74   | Up        |  |            |
|            | <i>pdoA2</i> | Phenanthrene-4-carboxylate ring-<br>hydroxylating dioxygenase              | 8.87                         | 10.72 | 10.39 | 10.40 | -      | -      | -           | -      | Unchanged |  |            |
|            | <i>pdoB2</i> | Phenanthrene-4-carboxylate ring-<br>hydroxylating dioxygenase<br>β subunit | 9.00                         | 10.67 | 10.47 | 10.48 | -      | -      | -           | -      | Unchanged |  |            |
|            | <i>phdF</i>  | Ring-cleavage dioxygenase  | 5.71                         | 4.08  | 10.40 | 10.48 | 25.77  | 79.53  | 27.29       | 84.23  | Up        |  |            |



**ตารางที่ ง-1** ค่า Log<sub>2</sub>RPKM ของยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายไพรินและฟลูออแรนทีนของชุดการทดลองที่มีฟลูออแรนทีนเพียงชนิดเดียว (F1 และ F2) และไพรินและฟลูออแรนทีนในรูปแบบสารคู่ผสม (PF1 และ PF2) (ต่อ)

| แบคทีเรีย | ยีน          | Gene description                                    | Log <sub>2</sub> RPKM values |      |       |       |        |        | Fold change |        |    | Regulation |
|-----------|--------------|---|------------------------------|------|-------|-------|--------|--------|-------------|--------|----|------------|
|           |              |   | F1                           | F2   | PF1   | PF2   | PF1/F1 | PF1/F2 | PF2/F1      | PF2/F2 |    |            |
| PO2       | <i>phtAb</i> | Phthalate 3,4-dioxygenase<br>β subunit              | 5.41                         | 4.80 | 11.05 | 11.37 | 49.84  | 75.93  | 62.11       | 94.63  | Up |            |
|           | <i>phtAc</i> | Phthalate dioxygenase ferredoxin<br>subunit         | 4.46                         | 4.54 | 11.21 | 11.52 | 107.21 | 101.54 | 132.59      | 125.56 | Up |            |
|           | <i>phtAd</i> | Phthalate dioxygenase reductase<br>subunit          | 5.31                         | 4.68 | 11.07 | 11.21 | 54.03  | 83.81  | 59.74       | 92.67  | Up |            |
|           | <i>phtAa</i> | Phthalate 3,4-dioxygenase<br><b>α</b> subunit       | 3.65                         | 3.11 | 9.86  | 10.13 | 73.49  | 106.60 | 88.69       | 128.65 | Up |            |
|           | <i>phtAb</i> | Phthalate 3,4-dioxygenase<br>β subunit              | 3.94                         | 1.57 | 9.55  | 9.90  | 48.57  | 248.32 | 61.95       | 316.69 | Up |            |
|           | <i>phtAc</i> | Phthalate dioxygenase ferredoxin<br>subunit         | 3.46                         | 3.90 | 10.23 | 10.11 | 108.52 | 80.04  | 99.72       | 73.54  | Up |            |
|           | <i>phtAd</i> | Phthalate dioxygenase reductase<br>subunit          | 4.22                         | 3.24 | 9.89  | 10.05 | 50.97  | 100.24 | 56.95       | 112.02 | Up |            |
|           | <i>phtB</i>  | 3,4-Dihydroxy-3,4-dihydrophthalate<br>dehydrogenase | 5.46                         | 4.88 | 10.92 | 11.21 | 44.00  | 65.68  | 53.81       | 80.33  | Up |            |

**ตารางที่ ง-1** ค่า Log<sub>2</sub>RPKM ของยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายไพรินและฟลูออแรนทีนของชุดการทดลองที่มีฟลูออแรนทีนเพียงชนิดเดียว (F1 และ F2) และไพรินและฟลูออแรนทีนในรูปแบบสารคู่ผสม (PF1 และ PF2) (ต่อ)

| แบบที่เรีย | ยีน         | Gene description  | Log <sub>2</sub> RPKM values |      |      |      |        |        | Fold change |        |           |  | Regulation |
|------------|-------------|---|------------------------------|------|------|------|--------|--------|-------------|--------|-----------|--|------------|
|            |             |   | F1                           | F2   | PF1  | PF2  | PF1/F1 | PF1/F2 | PF2/F1      | PF2/F2 |           |  |            |
| PO2        | <i>phtB</i> | 3,4-Dihydroxy-3,4-dihydrophthalate dehydrogenase                    | 4.43                         | 3.32 | 9.68 | 9.84 | 38.04  | 82.04  | 42.31       | 91.24  | Up        |  |            |
|            | <i>pcaG</i> | Protocatechuate 3,4-dioxygenase                                     | 7.59                         | 7.96 | 7.99 | 8.22 | -      | -      | -           | -      | Unchanged |  |            |
|            |             | <b>α</b> subunit  |                              |      |      |      |        |        |             |        |           |  |            |
|            | <i>pcaH</i> | Protocatechuate 3,4-dioxygenase <b>β</b> subunit                    | 7.42                         | 8.67 | 9.13 | 8.85 | -      | -      | -           | -      | Unchanged |  |            |
|            | <i>pcaB</i> | <b>β</b> -Carboxy- <i>cis</i> - <i>cis</i> -muconate cyclisomerase. | 8.09                         | 8.58 | 8.89 | 8.71 | -      | -      | -           | -      | Unchanged |  |            |
|            | <i>pcaL</i> | <b>γ</b> -Carboxymuconolactone decarboxylase                        | 7.61                         | 8.32 | 8.32 | 8.19 | -      | -      | -           | -      | Unchanged |  |            |
|            | <i>pcaI</i> | <b>β</b> -Ketoadipate CoA-transferase <b>α</b> subunit              | 7.03                         | 8.57 | 8.33 | 8.31 | -      | -      | -           | -      | Unchanged |  |            |
|            | <i>pcaJ</i> | <b>β</b> -Ketoadipate CoA-transferase <b>β</b> subunit              | 7.12                         | 8.81 | 8.71 | 8.65 | -      | -      | -           | -      | Unchanged |  |            |
|            | <i>pcaF</i> | <b>β</b> -Ketoadipyl-CoA thiolase                                   | 7.08                         | 6.27 | 6.56 | 6.42 | -      | -      | -           | -      | Unchanged |  |            |



**ตารางที่ ง-1** ค่า Log<sub>2</sub>RPKM ของยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายไพรินและฟลูออแรนที่ของชุดการทดลองที่มีฟลูออแรนที่เพียงชนิดเดียว (F1 และ F2) และไพรินและฟลูออแรนที่ในรูปแบบสารคู่ผสม (PF1 และ PF2) (ต่อ)

| แบคทีเรีย | ยีน          | Gene description                                    | Log <sub>2</sub> RPKM values |     |      |     |        |        | Fold change |        |   | Regulation |
|-----------|--------------|---|------------------------------|-----|------|-----|--------|--------|-------------|--------|---|------------|
|           |              |   | F1                           | F2  | PF1  | PF2 | PF1/F1 | PF1/F2 | PF2/F1      | PF2/F2 |   |            |
| PY1       | <i>ophA2</i> | Phthalate 4,5-dioxygenase                           | 68                           | 45  | 266  | 103 | -      | -      | -           | -      | - | Unchanged  |
|           | <i>ophB</i>  | <i>cis</i> -Phthalate dihydrodiol dehydrogenase     | 163                          | 12  | 36   | 14  | -      | -      | -           | -      | - | Unchanged  |
|           | <i>ophC</i>  | 4,5-Dihydroxyphthalate decarboxylase                | 58                           | 36  | 98   | 53  | -      | -      | -           | -      | - | Unchanged  |
|           | <i>ligA</i>  | Protocatechuate 4,5-dioxygenase<br><b>α</b> subunit | 48                           | 138 | 220  | 213 | -      | -      | -           | -      | - | Unchanged  |
|           | <i>ligB</i>  | Protocatechuate 4,5-dioxygenase<br><b>β</b> subunit | 82                           | 100 | 172  | 150 | -      | -      | -           | -      | - | Unchanged  |
|           | <i>ligA</i>  | Protocatechuate 4,5-dioxygenase<br><b>α</b> subunit | 50                           | 371 | 726  | 783 | -      | -      | -           | -      | - | Unchanged  |
|           | <i>ligB</i>  | Protocatechuate 4,5-dioxygenase<br><b>β</b> subunit | 270                          | 471 | 1003 | 869 | -      | -      | -           | -      | - | Unchanged  |
|           | <i>ligA</i>  | Protocatechuate 4,5-dioxygenase<br><b>α</b> subunit | 16                           | 6   | 9    | 8   | -      | -      | -           | -      | - | Unchanged  |

**ตารางที่ ง-1** ค่า Log<sub>2</sub>RPKM ของยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายเพรีนและฟลูออแรนทีนของชุดการทดลองที่มีฟลูออแรนทีนเพียงชนิดเดียว (F1 และ F2) และเพรีนและฟลูออแรนทีนในรูปแบบสารคู่ผสม (PF1 และ PF2) (ต่อ)

| PY1 | ยีน         | Gene description  | Log2RPKM values |     |     |     |        |        | Fold change |        |      | Regulation |
|-----|-------------|---|-----------------|-----|-----|-----|--------|--------|-------------|--------|------|------------|
|     |             |   | F1              | F2  | PF1 | PF2 | PF1/F1 | PF1/F2 | PF2/F1      | PF2/F2 |      |            |
|     | <i>ligB</i> | Protocatechuate 4,5-dioxygenase<br>β subunit                            | 30              | 18  | 13  | 15  | -      | -      | -           | -      | -    | Unchanged  |
|     | <i>ligC</i> | 2-Hydroxy-4-carboxymuconate<br>semialdehyde hemiacetal<br>dehydrogenase | 47              | 179 | 221 | 170 | -      | -      | -           | -      | -    | Unchanged  |
|     | <i>ligI</i> | 2-Pyruvate-4,6-dicarbonylate<br>hydrolase                               | 61              | 83  | 147 | 131 | -      | -      | -           | -      | -    | Unchanged  |
|     | <i>galD</i> | 4-Oxalomesaconate tautomerase   | 101             | 91  | 118 | 135 | -      | -      | -           | -      | -    | Unchanged  |
|     | <i>ligJ</i> | 4-Oxalomesaconate hydratase   | 37              | 58  | 150 | 134 | 4.02   | 2.59   | 3.59        | 2.31   | 2.31 | Up         |
|     | <i>ligK</i> | 4-Hydroxy-4-methyl-2-oxoglutarate<br>aldolase                           | 90              | 93  | 102 | 155 | -      | -      | -           | -      | -    | Unchanged  |

**ตารางที่ ง-2** ยีนที่ up- และ downregulated ของ *Mycolicibacterium* sp. PO1 และ PO2 ที่ถูกจัดอยู่ในกลุ่ม J ของชุดการทดลองที่มีไพรินและฟลูออแรนทีนในรูปแบบสารคู่ผสม

| แบคทีเรีย | ORF tag           | ชื่อยีน     | Annotation                    | Regulation |
|-----------|-------------------|-------------|-------------------------------|------------|
| PO1       | PO1_contig-004-25 | <i>rplT</i> | 50S ribosomal protein L20     | Up         |
|           | PO1_contig-004-26 | <i>rpmI</i> | 50S ribosomal protein L35     | Up         |
|           | PO1_contig-005-12 | <i>rplL</i> | 50S ribosomal protein L7/L12  | Up         |
|           | PO1_contig-005-13 | <i>rplU</i> | 50S ribosomal protein L10     | Up         |
|           | PO1_contig-005-28 | <i>rplA</i> | 50S ribosomal protein L1      | Up         |
|           | PO1_contig-005-29 | <i>rplK</i> | 50S ribosomal protein L11     | Up         |
|           | PO1_contig-005-35 | <i>rpmG</i> | 50S ribosomal protein L33     | Up         |
|           | PO1_contig-012-4  | <i>rplO</i> | 50S ribosomal protein L15     | Up         |
|           | PO1_contig-012-5  | <i>rpmD</i> | 50S ribosomal protein L30/L7E | Up         |
|           | PO1_contig-012-8  | <i>rplF</i> | 50S ribosomal protein L6P/L9E | Up         |
|           | PO1_contig-012-9  | <i>rpsH</i> | 30S ribosomal protein S8      | Up         |
|           | PO1_contig-012-10 | <i>rpsZ</i> | 30S ribosomal protein S14     | Up         |
|           | PO1_contig-012-11 | <i>rplE</i> | 50S ribosomal protein L5      | Up         |
|           | PO1_contig-012-12 | <i>rplX</i> | 50S ribosomal protein L24     | Up         |
|           | PO1_contig-012-13 | <i>rplN</i> | 50S ribosomal protein L14     | Up         |

**ตารางที่ ง-2** ยีนที่ up- และ downregulated ของ *Mycolicibacterium* sp. PO1 และ PO2 ที่ถูกจัดอยู่ในกลุ่ม J ของชุดการทดลองที่มีไพรินและฟลูออแรนทีนในรูปแบบสารคู่ผสม (ต่อ)

| แบคทีเรีย | ORF tag           | ชื่อยีน     | Annotation                          | Regulation |
|-----------|-------------------|-------------|-------------------------------------|------------|
| PO1       | PO1_contig-012-38 | <i>rpmC</i> | 50S ribosomal protein L29           | Up         |
|           | PO1_contig-012-39 | <i>rplP</i> | 50S ribosomal protein L16/L10AE     | Up         |
|           | PO1_contig-012-42 | <i>rpsS</i> | 30S ribosomal protein S19           | Up         |
|           | PO1_contig-012-43 | <i>rplB</i> | 50S ribosomal protein L2            | Up         |
|           | PO1_contig-012-44 | <i>rplW</i> | 50S ribosomal protein L23           | Up         |
|           | PO1_contig-012-45 | <i>rplD</i> | 50S ribosomal protein L4            | Up         |
|           | PO1_contig-012-46 | <i>rplC</i> | 50S ribosomal protein L3            | Up         |
|           | PO1_contig-012-47 | <i>rpsJ</i> | 30S ribosomal protein S10           | Up         |
|           | PO1_contig-012-69 | <i>tufB</i> | Translation elongation factor EF-Tu | Up         |
|           | PO1_contig-012-70 | <i>fusA</i> | Translation elongation factor EF-G  | Up         |
|           | PO1_contig-012-72 | <i>rpsL</i> | 30S ribosomal protein S12           | Up         |
|           | PO1_contig-014-22 | <i>rpsI</i> | 30S ribosomal protein S9            | Up         |
|           | PO1_contig-014-23 | <i>rplM</i> | 50S ribosomal protein L13           | Up         |
|           | PO1_contig-014-60 | <i>rplQ</i> | 50S ribosomal protein L17           | Up         |

ตารางที่ ง-2 ยีนที่ up- และ downregulated ของ *Mycolicibacterium* sp. PO1 และ PO2 ที่ถูกจัดอยู่ในกลุ่ม J ของชุดการทดลองที่มีไพรินและฟลูออแรนทีนในรูปแบบสารคู่ผสม (ต่อ)

| แบคทีเรีย | ORF tag            | ชื่อยีน     | Annotation                          | Regulation |
|-----------|--------------------|-------------|-------------------------------------|------------|
| PO1       | PO1_contig-014-62  | <i>rpsD</i> | 30S ribosomal protein S4            | Up         |
|           | PO1_contig-014-63  | <i>rpsK</i> | 30S ribosomal protein S11           | Up         |
|           | PO1_contig-014-64  | <i>rpsM</i> | 30S ribosomal protein S13           | Up         |
|           | PO1_contig-046-40  | <i>rpmB</i> | 50S ribosomal protein L28           | Up         |
|           | PO1_contig-046-75  | <i>rpsP</i> | 30S ribosomal protein S16           | Up         |
|           | PO1_contig-046-80  | <i>rplS</i> | 50S ribosomal protein L19           | Up         |
|           | PO1_contig-046-99  | <i>rpsB</i> | 30S ribosomal protein S2            | Up         |
|           | PO1_contig-046-100 | <i>tsf</i>  | Translation elongation factor EF-Ts | Up         |
|           | PO1_contig-050-17  | <i>rpmA</i> | 50S ribosomal protein L27           | Up         |
|           | PO1_contig-050-18  | <i>rplU</i> | 50S ribosomal protein L21           | Up         |
|           | PO1_contig-059-23  | <i>rnpA</i> | Ribonuclease P                      | Up         |
|           | PO1_contig-061-29  | <i>rpsO</i> | 30S ribosomal protein S15P/S13E     | Up         |
|           | PO1_contig-135-5   | <i>rpsR</i> | 30S ribosomal protein S18           | Up         |
|           | PO1_contig-135-6   | <i>rplI</i> | 50S ribosomal protein L9            | Up         |
|           | PO1_contig-044-34  | <i>prmA</i> | Ribosomal protein L11 methylase     | Down       |

**ตารางที่ ง-2** ยีนที่ up- และ downregulated ของ *Mycolicibacterium* sp. PO1 และ PO2 ที่ถูกจัดอยู่ในกลุ่ม J ของชุดการทดลองที่มีไพรินและฟลูออแรนทีนในรูปแบบสารคู่ผสม (ต่อ)

| แบคทีเรีย | ORF tag           | ชื่อยีน     | Annotation                          | Regulation |
|-----------|-------------------|-------------|-------------------------------------|------------|
| PO2       | PO2_contig-025-23 | <i>rpsI</i> | 30S ribosomal protein S9            | Up         |
|           | PO2_contig-025-24 | <i>rplM</i> | 50S ribosomal protein L13           | Up         |
|           | PO2_contig-025-61 | <i>rplQ</i> | 50S ribosomal protein L17           | Up         |
|           | PO2_contig-025-63 | <i>rpsD</i> | 30S ribosomal protein S4            | Up         |
|           | PO2_contig-025-64 | <i>rpsK</i> | 30S ribosomal protein S11           | Up         |
|           | PO2_contig-025-65 | <i>rpsM</i> | 30S ribosomal protein S13           | Up         |
|           | PO2_contig-026-25 | <i>rplT</i> | 50S ribosomal protein L20           | Up         |
|           | PO2_contig-030-6  | <i>rpsL</i> | 30S ribosomal protein S12           | Up         |
|           | PO2_contig-030-8  | <i>fusA</i> | Translation elongation factor EF-G  | Up         |
|           | PO2_contig-030-9  | <i>tufB</i> | Translation elongation factor EF-Tu | Up         |
|           | PO2_contig-030-31 | <i>rpsJ</i> | 30S ribosomal protein S10           | Up         |
|           | PO2_contig-030-32 | <i>rplC</i> | 50S ribosomal protein L3            | Up         |
|           | PO2_contig-030-33 | <i>rplD</i> | 50S ribosomal protein L4            | Up         |
|           | PO2_contig-030-34 | <i>rplW</i> | 50S ribosomal protein L23           | Up         |
|           | PO2_contig-030-35 | <i>rplB</i> | 50S ribosomal protein L2            | Up         |

ตารางที่ ง-2 ยีนที่ up- และ downregulated ของ *Mycolicibacterium* sp. PO1 และ PO2 ที่ถูกจัดอยู่ในกลุ่ม J ของชุดการทดลองที่มีไพรินและฟลูออแรนทีนในรูปแบบสารคู่ผสม (ต่อ)

| แบคทีเรีย | ORF tag           | ชื่อยีน     | Annotation                          | Regulation |
|-----------|-------------------|-------------|-------------------------------------|------------|
| PO2       | PO2_contig-030-36 | <i>rpsS</i> | 30S ribosomal protein S19           | Up         |
|           | PO2_contig-030-39 | <i>rplP</i> | 50S ribosomal protein L16/L10AE     | Up         |
|           | PO2_contig-030-40 | <i>rpmC</i> | 50S ribosomal protein L29           | Up         |
|           | PO2_contig-030-65 | <i>rplN</i> | 50S ribosomal protein L14           | Up         |
|           | PO2_contig-030-66 | <i>rplX</i> | 50S ribosomal protein L24           | Up         |
|           | PO2_contig-030-67 | <i>rplE</i> | 50S ribosomal protein L5            | Up         |
|           | PO2_contig-030-68 | <i>rpsZ</i> | 30S ribosomal protein S14           | Up         |
|           | PO2_contig-030-69 | <i>rpsH</i> | 30S ribosomal protein S8            | Up         |
|           | PO2_contig-030-70 | <i>rplF</i> | 50S ribosomal protein L6P/L9E       | Up         |
|           | PO2_contig-030-73 | <i>rpmD</i> | 50S ribosomal protein L30/L7E       | Up         |
|           | PO2_contig-030-74 | <i>rplO</i> | 50S ribosomal protein L15           | Up         |
|           | PO2_contig-036-5  | <i>rpsR</i> | 30S ribosomal protein S18           | Up         |
|           | PO2_contig-036-6  | <i>rplI</i> | 50S ribosomal protein L9            | Up         |
|           | PO2_contig-065-75 | <i>tsf</i>  | Translation elongation factor EF-Ts | Up         |
|           | PO2_contig-065-76 | <i>rpsB</i> | 30S ribosomal protein S2            | Up         |

ตารางที่ ง-2 ยีนที่ up- และ downregulated ของ *Mycolicibacterium* sp. PO1 และ PO2 ที่ถูกจัดอยู่ในกลุ่ม J ของชุดการทดลองที่มีไพรินและฟลูออแรนทีนในรูปแบบสารคู่ผสม (ต่อ)

| แบคทีเรีย | ORF tag            | ชื่อยีน     | Annotation                      | Regulation |
|-----------|--------------------|-------------|---------------------------------|------------|
| PO2       | PO2_contig-065-95  | <i>rplS</i> | 50S ribosomal protein L19       | Up         |
|           | PO2_contig-065-100 | <i>rpsP</i> | 30S ribosomal protein S16       | Up         |
|           | PO2_contig-065-135 | <i>rpmB</i> | 50S ribosomal protein L28       | Up         |
|           | PO2_contig-071-23  | <i>rnpA</i> | Ribonuclease P                  | Up         |
|           | PO2_contig-076-82  | <i>rpmG</i> | 50S ribosomal protein L33       | Up         |
|           | PO2_contig-076-88  | <i>rplK</i> | 50S ribosomal protein L11       | Up         |
|           | PO2_contig-076-89  | <i>rplA</i> | 50S ribosomal protein L1        | Up         |
|           | PO2_contig-076-104 | <i>rplU</i> | 50S ribosomal protein L10       | Up         |
|           | PO2_contig-076-105 | <i>rplL</i> | 50S ribosomal protein L7/L12    | Up         |
|           | PO2_contig-097-39  | <i>rpsO</i> | 30S ribosomal protein S15P/S13E | Up         |
|           | PO2_contig-152-1   | <i>rpmA</i> | 50S ribosomal protein L27       | Up         |
|           | PO2_contig-152-2   | <i>rplU</i> | 50S ribosomal protein L21       | Up         |
|           | PO2_contig-010-34  | <i>prmA</i> | Ribosomal protein L11 methylase | Down       |



ตารางที่ ง-3 ยีนที่ up- และ downregulated ของ *Mycolicibacterium* sp. PO1 และ PO2 ที่ถูกจัดอยู่ในกลุ่ม P ของชุดการทดลองที่มีเพรีนและฟลูออแรนทีนในรูปแบบสารคู่ผสม

| แบคทีเรีย | ORF tag            | ชื่อยีน      | Annotation  | Regulation |
|-----------|--------------------|--------------|---|------------|
| PO1       | PO1_contig-001-19  | <i>sseA</i>  | Thiosulfate sulfurtransferase                     | Up         |
|           | PO1_contig-031-1   | <i>nidA</i>  | Pyrene hydroxylating dioxygenase $\alpha$ subunit | Up         |
|           | PO1_contig-031-5   | <i>hcaE</i>  | Rieske [2Fe-2S] domain-containing protein         | Up         |
|           | PO1_contig-036-54  | <i>efeO</i>  | Iron uptake system                                | Up         |
|           | PO1_contig-057-3   | <i>phtAa</i> | Phthalate 3,4-dioxygenase $\alpha$ subunit        | Up         |
|           | PO1_contig-058-2   | <i>phtAa</i> | Phthalate 3,4-dioxygenase $\alpha$ subunit        | Up         |
|           | PO1_contig-007-51  | <i>zntA</i>  | Heavy metal translocating P-type atpase           | Down       |
|           | PO1_contig-009-73  | <i>tauB</i>  | ABC transporter ATP-binding protein               | Down       |
|           | PO1_contig-009-86  | <i>cynT</i>  | Carbonic anhydrase                                | Down       |
|           | PO1_contig-009-157 | <i>hcaE</i>  | Rieske [2Fe-2S]                                   | Down       |
|           | PO1_contig-017-66  | <i>kdpA</i>  | K+-transporting ATPase, subunit A                 | Down       |
|           | PO1_contig-017-67  | <i>kdpB</i>  | K+-transporting ATPase, subunit B                 | Down       |
|           | PO1_contig-017-68  | <i>kdpC</i>  | K+-transporting ATPase, subunit C                 | Down       |
|           | PO1_contig-030-81  | <i>copZ</i>  | Copper chaperone CopZ                             | Down       |
|           | PO1_contig-030-82  | <i>zntA</i>  | Heavy metal translocating P-type atpase           | Down       |

**ตารางที่ 3-3** ยีนที่ up- และ downregulated ของ *Mycolicibacterium* sp. PO1 และ PO2 ที่ถูกจัดอยู่ในกลุ่ม P ของชุดการทดลองที่มีเพรีนและฟลูออแรนทีนในรูปแบบสารคู่ผสม (ต่อ)

| แบคทีเรีย         | ORF tag           | ชื่อยีน                           | Annotation  | Regulation |
|-------------------|-------------------|-----------------------------------|---|------------|
| PO1               | PO1_contig-078-10 | <i>tauB</i>                       | ABC transporter ATP-binding protein               | Down       |
|                   | PO1_contig-119-37 | <i>cynS</i>                       | Cyanate lyase                                     | Down       |
|                   | PO1_contig-119-38 | <i>focA</i>                       | Formate/nitrite transporter                       | Down       |
| PO2               | PO2_contig-006-35 | <i>hcaE</i>                       | Rieske [2Fe-2S] domain-containing protein         | Up         |
|                   | PO2_contig-006-39 | <i>nidA</i>                       | Pyrene hydroxylating dioxygenase $\alpha$ subunit | Up         |
|                   | PO2_contig-038-16 | <i>sseA</i>                       | Thiosulfate sulfurtransferase                     | Up         |
|                   | PO2_contig-047-54 | <i>efeO</i>                       | Iron uptake system                                | Up         |
|                   | PO2_contig-053-14 | <i>phtAa</i>                      | Phthalate 3,4-dioxygenase $\alpha$ subunit        | Up         |
|                   | PO2_contig-108-3  | <i>phtAa</i>                      | Phthalate 3,4-dioxygenase $\alpha$ subunit        | Up         |
|                   | PO2_contig-001-80 | <i>cynT</i>                       | Carbonic anhydrase                                | Down       |
|                   | PO2_contig-001-93 | <i>tauB</i>                       | ABC transporter ATP-binding protein               | Down       |
|                   | PO2_contig-013-10 | <i>tauB</i>                       | ABC transporter ATP-binding protein               | Down       |
|                   | PO2_contig-022-63 | <i>kdpA</i>                       | K+-transporting ATPase, subunit A                 | Down       |
| PO2_contig-022-64 | <i>kdpA</i>       | K+-transporting ATPase, subunit B | Down  |            |
| PO2_contig-022-65 | <i>kdpC</i>       | K+-transporting ATPase, subunit C | Down  |            |

ตารางที่ ง-3 ยีนที่ up- และ downregulated ของ *Mycolicibacterium* sp. PO1 และ PO2 ที่ถูกจัดอยู่ในกลุ่ม P ของชุดการทดลองที่มีเพปรีนและฟลูออแรนทีนในรูปแบบสารคู่ผสม (ต่อ)

| แบคทีเรีย | ORF tag           | ชื่อยีน     | Annotation                              | Regulation |
|-----------|-------------------|-------------|---|------------|
| PO2       | PO2_contig-023-51 | <i>zntA</i> | Heavy metal translocating P-type atpase | Down       |
|           | PO2_contig-057-97 | <i>cynS</i> | Cyanate lyase                           | Down       |
|           | PO2_contig-057-98 | <i>focA</i> | Formate/nitrite transporter             | Down       |
|           | PO2_contig-098-2  | <i>zntA</i> | Heavy metal translocating P-type atpase | Down       |
|           | PO2_contig-098-3  | <i>copZ</i> | Copper chaperone CopZ                   | Down       |
|           | PO2_contig-154-1  | <i>czcO</i> | Oxidoreductase                          | Down       |

**ตารางที่ ง-4** ยีนที่ up- และ downregulated ของ *Mycolicibacterium* sp. PO1 และ PO2 ที่ถูกจัดอยู่ในกลุ่ม Q ของชุดการทดลองที่มีเพรีนและฟลูออแรนทีนในรูปแบบสารคู่ผสม

| แบคทีเรีย | ORF tag           | ชื่อยีน      | Annotation                                      | Regulation |
|-----------|-------------------|--------------|---|------------|
| PO1       | PO1_contig-031-6  | <i>hcaF</i>  | Dioxygenase $\beta$ subunit                     | Up         |
|           | PO1_contig-031-8  | <i>pcaH</i>  | Protocatechuate 3,4-dioxygenase $\beta$ subunit | Up         |
|           | PO1_contig-031-9  | <i>mlaE</i>  | ABC-type transporter                            | Up         |
|           | PO1_contig-031-10 | <i>mlaE</i>  | ABC-type transporter                            | Up         |
|           | PO1_contig-031-11 | <i>mlaD</i>  | ABC-type transporter                            | Up         |
|           | PO1_contig-031-12 | <i>mlaD</i>  | ABC-type transporter                            | Up         |
|           | PO1_contig-031-13 | <i>mlaD</i>  | ABC-type transporter                            | Up         |
|           | PO1_contig-031-14 | <i>mlaD</i>  | ABC-type transporter                            | Up         |
|           | PO1_contig-031-15 | <i>mlaD</i>  | ABC-type transporter                            | Up         |
|           | PO1_contig-031-16 | <i>mlaD</i>  | ABC-type transporter                            | Up         |
|           | PO1_contig-053-2  | <i>cypX</i>  | Cytochrome P450                                 | Up         |
|           | PO1_contig-057-4  | <i>phaAb</i> | Phthalate 3,4-dioxygenase $\beta$ subunit       | Up         |
|           | PO1_contig-057-11 | <i>phdI</i>  | 1-Hydroxy-2-naphthoate dioxygenase              | Up         |
|           | PO1_contig-058-3  | <i>phaAb</i> | Phthalate 3,4-dioxygenase $\beta$ subunit       | Up         |
|           | PO1_contig-058-8  | <i>phdI</i>  | 1-Hydroxy-2-naphthoate dioxygenase              | Up         |

**ตารางที่ ง-4** ยีนที่ up- และ downregulated ของ *Mycolicibacterium* sp. PO1 และ PO2 ที่ถูกจัดอยู่ในกลุ่ม Q ของชุดการทดลองที่มีเพรีนและฟลูออแรนทีนในรูปแบบสารคู่ผสม (ต่อ)

| แบคทีเรีย | ORF tag           | ชื่อยีน      | Annotation  | Regulation |
|-----------|-------------------|--------------|---|------------|
| PO1       | PO1_contig-073-1  | <i>nidB</i>  | Pyrene hydroxylating dioxygenase $\beta$ subunit                    | Up         |
|           | PO1_contig-088-4  | <i>nidB2</i> | Pyrene hydroxylating dioxygenase $\beta$ subunit                    | Up         |
|           | PO1_contig-096-9  | <i>hmgA</i>  | Homogentisate 1,2-dioxygenase                                       | Up         |
|           | PO1_contig-128-7  | <i>phdI</i>  | 1-Hydroxy-2-naphthoate dioxygenase                                  | Up         |
|           | PO1_contig-016-62 | <i>cypX</i>  | Cytochrome p450   | Down       |
|           | PO1_contig-045-34 | <i>fcbT2</i> | Tripartite ATP-independent periplasmic transporters, DctQ component | Down       |
|           | PO1_contig-094-14 |              | N-Acyl-D-aspartate D-glutamate deacylase                            | Down       |

**ตารางที่ ง-4** ยีนที่ up- และ downregulated ของ *Mycolicibacterium* sp. PO1 และ PO2 ที่ถูกจัดอยู่ในกลุ่ม Q ของชุดการทดลองที่มีเพรีนและฟลูออแรนทีนในรูปแบบสารคู่ผสม (ต่อ)

| แบคทีเรีย | ORF tag            | ชื่อยีน      | Annotation                                       | Regulation |
|-----------|--------------------|--------------|--|------------|
| PO2       | PO2_contig-005-111 | <i>hmgA</i>  | Homogentisate 1,2-dioxygenase                    | Up         |
|           | PO2_contig-006-24  | <i>mlaD</i>  | ABC-type transporter                             | Up         |
|           | PO2_contig-006-25  | <i>mlaD</i>  | ABC-type transporter                             | Up         |
|           | PO2_contig-006-26  | <i>mlaD</i>  | ABC-type transporter                             | Up         |
|           | PO2_contig-006-27  | <i>mlaD</i>  | ABC-type transporter                             | Up         |
|           | PO2_contig-006-28  | <i>mlaD</i>  | ABC-type transporter                             | Up         |
|           | PO2_contig-006-29  | <i>mlaD</i>  | ABC-type transporter                             | Up         |
|           | PO2_contig-006-30  | <i>mlaE</i>  | ABC-type transporter                             | Up         |
|           | PO2_contig-006-31  | <i>mlaE</i>  | ABC-type transporter                             | Up         |
|           | PO2_contig-006-32  | <i>pcaH</i>  | Protocatechuate 3,4-dioxygenase $\beta$ subunit  | Up         |
|           | PO2_contig-006-34  | <i>hcaF</i>  | Dioxygenase $\beta$ subunit                      | Up         |
|           | PO2_contig-006-40  | <i>nidB</i>  | Pyrene hydroxylating dioxygenase $\beta$ subunit | Up         |
|           | PO2_contig-053-1   | <i>nidB2</i> | Pyrene hydroxylating dioxygenase $\beta$ subunit | Up         |
|           | PO2_contig-053-8   | <i>phdI</i>  | 1-Hydroxy-2-naphthoate dioxygenase               | Up         |

**ตารางที่ ง-4** ยีนที่ up- และ downregulated ของ *Mycolicibacterium* sp. PO1 และ PO2 ที่ถูกจัดอยู่ในกลุ่ม Q ของชุดการทดลองที่มีเพรีนและฟลูออแรนทีนในรูปแบบสารคู่ผสม (ต่อ)

| แบคทีเรีย | ORF tag           | ชื่อยีน      | Annotation  | Regulation |
|-----------|-------------------|--------------|---|------------|
| PO2       | PO2_contig-053-13 | <i>phaAb</i> | Phthalate 3,4-dioxygenase $\beta$ subunit                           | Up         |
|           | PO2_contig-077-4  | <i>nidB2</i> | Pyrene hydroxylating dioxygenase $\beta$ subunit                    | Up         |
|           | PO2_contig-078-6  | <i>hcaF</i>  | Dioxygenase $\beta$ subunit   | Up         |
|           | PO2_contig-084-2  | <i>cypX</i>  | Cytochrome P450   | Up         |
|           | PO2_contig-099-6  | <i>phdI</i>  | 1-Hydroxy-2-naphthoate dioxygenase                                  | Up         |
|           | PO2_contig-108-4  | <i>phaAb</i> | Phthalate 3,4-dioxygenase $\beta$ subunit                           | Up         |
|           | PO2_contig-108-11 | <i>phdI</i>  | 1-Hydroxy-2-naphthoate dioxygenase                                  | Up         |
|           | PO2_contig-007-29 | <i>cypX</i>  | Cytochrome P450   | Down       |
|           | PO2_contig-045-29 | <i>fcbT2</i> | Tripartite ATP-independent periplasmic transporters, DctO component | Down       |

ตารางที่ ง-5 ยีนที่ up- และ downregulated ของ *Bacillus subtilis* FW1 ที่ถูกจัดอยู่ในกลุ่ม V ของชุดการทดลองที่มีเพรีนและฟลูออแรนทีนในรูปแบบสารคู่ผสม

| แบคทีเรีย | ORF tag           | ชื่อยีน     | Annotation                                      | Regulation |
|-----------|-------------------|-------------|---|------------|
| FW1       | FW1_contig-02-67  | <i>ccmA</i> | ABC transporter                                 | Up         |
|           | FW1_contig-01-12  | <i>ccmA</i> | ABC transporter ATP-binding protein             | Down       |
|           | FW1_contig-01-77  | <i>ampC</i> | beta-lactamase                                  | Down       |
|           | FW1_contig-02-107 | <i>ccmA</i> | Antibiotic transport system ATP-binding protein | Down       |
|           | FW1_contig-05-330 | <i>yadh</i> | ABC transporter                                 | Down       |
|           | FW1_contig-07-336 | <i>ccmA</i> | ABC transporter ATP-binding protein             | Down       |
|           | FW1_contig-07-383 | <i>ampC</i> | beta-lactamase                                  | Down       |
|           | FW1_contig-07-418 | <i>ampC</i> | beta-lactamase                                  | Down       |





จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
**CHULALONGKORN UNIVERSITY**

## ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-สกุล

ณัฐริกา เหล่าธรรมทีป

วัน เดือน ปี เกิด

19 มกราคม 2532

ที่อยู่ปัจจุบัน

412 ถนนหน้าเมือง ตำบลหน้าเมือง อำเภอเมือง จังหวัดปราจีนบุรี 25000

ผลงานตีพิมพ์

1. Laothamteep, N., Naloka, K., Pinyakong, O., 2022. Bioaugmentation with zeolite-immobilized bacterial consortium OPK results in a bacterial community shift and enhances the bioremediation of crude oil-polluted marine sandy soil microcosms. Environmental Pollution. 118309.
2. Laothamteep, N., Kawano, H., Vejarano, F., Suzuki-Minakuchi, C., Shintani, M., Nojiri, H., Pinyakong, O., 2021. Effects of environmental factors and coexisting substrates on PAH degradation and transcriptomic responses of the defined bacterial consortium OPK. Environmental Pollution. 116769.
3. Wanapaisan, P., Laothamteep, N., Vejarano, F., Chakraborty, J., Shintani, M., Muangchinda, C., Morita, T., Suzuki-Minakuchi, C., Inoue, K., Nojiri, H., Pinyakong, O., 2018. Synergistic degradation of pyrene by five culturable bacteria in a mangrove sediment-derived bacterial consortium. Journal of Hazardous Materials. 342: 561-570.

รางวัลที่ได้รับ

ในปี พ.ศ. 2559 ได้รับทุนการศึกษาหลักสูตรดุขฎฐิบัณฑิต “100 ปี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย” ปี พ.ศ. 2561 ได้รับทุนสนับสนุนนิตระดับปริญญาเอกและโทไปทำวิจัยในต่างประเทศ ที่มหาวิทยาลัยโตเกียว ประเทศญี่ปุ่น และปี พ.ศ. 2562 ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัย “90 ปี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย” ปี พ.ศ. 2563 ได้รับรางวัลรองชนะเลิศอันดับ 1 แห่งประเทศไทย (Silver Champion) ในการแข่งขันนำเสนอวิทยานิพนธ์ (3MT@ Three Minute Thesis, Thailand, 2020) และปี พ.ศ. 2564 ได้รับรางวัลนิตดีเด่น คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย