

การคัดแยกยีนไดออกซิจีเนสจากเมตาจีโนมของดินที่ปนเปื้อนด้วยพีแนนทริน  
และอะซีแนพทิน



นางสาวกังสดาล ทองดองน้ำว

ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา


คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2552

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ISOLATION OF DIOXYGENASE FROM METAGENOME OF SOIL CONTAMINATED  
WITH PHENANTHRENE AND ACENAPHTHENE

Miss Kungsadarn Thongdonngao



ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements  
for the Degree of Master of Science Program in Industrial Microbiology

Department of Microbiology

Faculty of Science

Chulalongkorn University

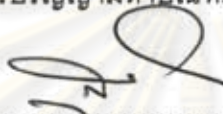
Academic Year 2009

Copyright of Chulalongkorn University

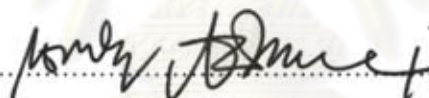
หัวข้อวิทยานิพนธ์	การคัดแยกยีนไดออกซิจีเนสจากเมตาจีโนมของดินที่ปนเปื้อนด้วยพีแนทรีนและอะซีแนพรีน
โดย	นางสาวกังสตาล ทองดอนง้าว
สาขาวิชา	จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อรุณทัย ภิญญาคง
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	ดร. ปิยะนันท์ นาญพิชาญชัย

---

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยอนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

  
..... คณบดีคณะวิทยาศาสตร์  
(ศาสตราจารย์ ดร. สุพจน์ นารหนองบัว)

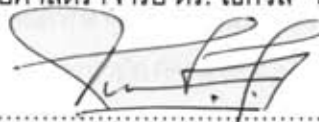
คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

  
..... ประธานกรรมการ  
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. กอบชัย ภัทรกุลวณิชย์)

..... 01/กษ. ภิญญาคง ..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก  
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อรุณทัย ภิญญาคง)

..... ปิยะนันท์ นาญพิชาญชัย ..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม  
(ดร. ปิยะนันท์ นาญพิชาญชัย)

  
..... กรรมการ  
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. เอกวัล ลีพร้อมชัย)

  
..... กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย  
(รองศาสตราจารย์ ดร. อรินทิพย์ ธรรมชัยพิเนต)

กังสดาล ทองดอนง้าว: การคัดแยกยีนไดออกซิเจเนสจากเมตาจีโนมของดินที่ปนเปื้อนด้วยพีแนนทรีน และอะซีแนพทีน (ISOLATION OF DIOXYGENASE FROM METAGENOME OF SOIL CONTAMINATED WITH PHENANTHRENE AND ACENAPHTHENE) อ. ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: ผศ. ดร. อรรถชัย ภิณฑูมาศ; อ. ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม: ดร. ปิยะนันท์ หาญพิชาญชัย, 146 หน้า

วิทยานิพนธ์นี้มีจุดประสงค์เพื่อคัดแยกยีนไดออกซิเจเนสที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายสารประกอบพอลิไซคลิกแอโรมาติกไฮโดรคาร์บอน (Polycyclic Aromatic Hydrocarbon, PAHs) จากเมตาจีโนมดิน โดยสร้างระบบนิเวศจำลองดินที่เติมพีแนนทรีนและ/หรืออะซีแนพทีนให้มีความเข้มข้นสุดท้ายในดินเป็น 300 ppm เพื่อชักนำให้แบคทีเรียดั้งเดิมในดินสามารถปรับตัวและมีความสามารถในการย่อยสลาย PAHs บ่มเป็นเวลา 6 สัปดาห์ และเก็บตัวอย่างทุก 2 สัปดาห์เพื่อวิเคราะห์การลดลงของปริมาณ PAHs โดยวิธีแก๊สโครมาโตกราฟี และสกัดดีเอ็นเอสำหรับตรวจติดตามการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างประชาคมแบคทีเรียด้วยเทคนิค PCR-DGGE และคัดแยกยีนไดออกซิเจเนสโดยวิธี PCR และสร้างห้องสมุดเมตาจีโนมดิน ผลการทดลองพบว่าพีแนนทรีนถูกย่อยสลายจนหมดใน 4 สัปดาห์ ส่วนอะซีแนพทีนถูกย่อยสลายจนเหลือ 24.52 เปอร์เซ็นต์ ของความเข้มข้นเริ่มต้นในสัปดาห์ที่ 6 และเมื่อเติมพีแนนทรีนและ/หรืออะซีแนพทีนเป็นแหล่งคาร์บอนพบการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างประชาคมแบคทีเรียอย่างเห็นได้ชัดเมื่อเปรียบเทียบกับแบคทีเรียดั้งเดิมในดิน ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์สามารถระบุชนิดของแบคทีเรียบางชนิดที่มีบทบาทต่อการย่อยสลายอะซีแนพทีนและ/หรือพีแนนทรีน ได้แก่ *Bacillus* sp. และ *Delftia* sp นอกจากนี้ยังพบแบคทีเรียเด่นที่คาดว่าในกลุ่มที่ไม่สามารถเพาะเลี้ยงหรือเพาะเลี้ยงได้ยากในห้องปฏิบัติการ สำหรับการคัดกรองยีนประมวลรหัสไดออกซิเจเนสที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายสารประกอบ PAHs โดยวิธี PCR โดยใช้ไพรเมอร์ 10 คู่ ที่จำเพาะต่อยีนดังนี้ *ndo phn arh bph nah ado* และ PAH-RHD $\alpha$  ซึ่งจำเพาะต่อยีนจากแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ และใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีนประมวลรหัสเอกซ์ตราไดออกไซด์ออกซิเจเนสบางกลุ่ม 2 คู่ ที่จำเพาะต่อยีน *bph* พบผลิตภัณฑ์ PCR เมื่อใช้ไพรเมอร์คู่ GPF และ GPR และคู่ไพรเมอร์ NMR331f และ NMR1134r ซึ่งจำเพาะต่อแอลฟาโรกซิเลทิงไดออกซิเจเนสของแบคทีเรียแกรมบวก เมื่อสร้างห้องสมุดยีนพบรีคอมบิแนนท์จากผลิตภัณฑ์ PCR และวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์พบ 12 โคลนที่น่าสนใจ โดยมีผลิตภัณฑ์จากโคลนที่มีเปอร์เซ็นต์ความเหมือนต่ำกว่า 97 เปอร์เซ็นต์ จำนวน 9 โคลน และพบ 2 โคลนที่มีแนวโน้มเป็นยีนไดออกซิเจเนสชนิดใหม่ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายอะซีแนพทีนและพีแนนทรีน โดยผลิตภัณฑ์จากยีนมีเปอร์เซ็นต์ความเหมือนเพียง 66 และ 41 เปอร์เซ็นต์กับโปรตีนส่วน Rieseke (2Fe-2S) ของหน่วยย่อยแอลฟาโรกซิเลทิงไดออกซิเจเนสของ *Comamonas testosteroni* สายพันธุ์ KF-1 [ZP\_03542810.1] และ *Mycobacterium vanbaalenii* สายพันธุ์ PYR-1 [YP\_951396.1] ที่เกี่ยวข้องต่อการย่อยสลาย PAHs โดยไม่ต้องผ่านการคัดแยกเชื้อในห้องปฏิบัติการได้ จากผลการทดลองที่ได้แสดงให้เห็นว่าการใช้เมตาจีโนมดินและเทคนิคทางชีวโมเลกุลทำให้สามารถคัดแยกยีนไดออกซิเจเนสที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลาย PAHs ที่น่าสนใจและทราบข้อมูลยีนดังกล่าวในสิ่งแวดล้อมเพิ่มขึ้น ข้อมูลยีนที่ศึกษาได้นี้มีประโยชน์ในการออกแบบใช้เทคนิคทางชีวโมเลกุลสำหรับการบำบัด PAHs ต่อไป

ภาควิชา.....จุลชีววิทยา..... ลายมือชื่อนิสิต..... *พิศ ภาณ*  
สาขาวิชา..จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม.. ลายมือชื่อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก... *อภิญญา ภิญโญ*  
ปีการศึกษา.....2552..... ลายมือชื่อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม... *ปิยะนันท์ หาญพิชาญชัย*



# # 5072210723 : MAJOR INDUSTRIAL MICROBIOLOGY

KEYWORDS: *phenanthrene*; *acenaphthene*; *microcosm*; *biodegradation*; *dioxygenase gene*.

KUNGSADARN THONGDONNGAO : ISOLATION OF DIOXYGENASE FROM METAGENOME OF SOIL CONTAMINATED WITH PHENANTHRENE AND ACENAPHTHENE. THESIS ADVISOR : ASST. PROF. ONRUTHAI PINYAKONG, Ph.D., THESIS COADVISOR : PIYANUN HARNPICHANCHAI, Ph.D., 146 pp.

The work in this thesis is focused on isolation of dioxygenase genes involved in degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) from soil metagenome. Soil microcosms were constructed by adding phenanthrene and/or acenaphthene to the final concentration of 300 ppm in order to let bacteria in the soil adjust to the PAH conditions and allow them to degrade PAHs. The soil microcosms were incubated for 6 weeks and samples were taken every 2 weeks to monitor for the remaining PAHs by gas chromatography. In addition, genomic DNA from microorganisms in the soil was extracted and soil bacterial population dynamics were examined by PCR-DGGE technique. Dioxygenase genes were isolated by PCR and by soil metagenomic library construction. The results showed that phenanthrene was completely degraded within 4 weeks and 24.52% of initial concentration of acenaphthene was left at week 6. Addition of phenanthrene and/or acenaphthene as carbon source causes significant change in composition of bacterial population, compared to the original soil sample. Nucleotide analysis of bacterial DNA revealed that bacteria that might be important for the degradation of phenanthrene and/or acenaphthene most likely include *Bacillus* sp. and *Delftia* sp. Moreover, dominant bacteria that are likely to be unculturable or difficult to be cultured could also be observed. For the isolation of dioxygenase gene, PCR amplification by using each of ten pairs of primers that are specific for *ndo*, *phn*, *arh*, *bph*, *nah*, *ado*, and PAH-RHD $\alpha$  genes from gram-positive and gram-negative bacteria, as well as two pairs of primers that are specific for *bph* gene encoding for extradiol dioxygenase, were performed. PCR products could be detected with primers GPF plus GPR or NMR331f plus NMR1134r which are specific for alpha ring-hydroxylating dioxygenase from gram-positive bacteria. Nucleotide analysis of the PCR gene library revealed 12 clones containing part of dioxygenase genes of interest. The product of nine of these clones showed percent identity lower than 97% to those of known dioxygenase genes. Two of the identified clones are most likely to encode for novel dioxygenases involved in the degradation of phenanthrene or acenaphthene because they contain only 66% and 41% identity to Rieske (2Fe-2S) part of alpha ring-hydroxylating deoxygenase from *Comamonas testosteroni* KF-1 [ZP\_03542810.1] and *Mycobacterium vanbaalenii* PYR-1 [YP\_951396.1]. The results showed that soil metagenome combined with molecular techniques can be utilized to isolate genes encoding for PAH-degrading dioxygenases and to gain knowledge about the presence of those genes in that particular environment. This knowledge can be beneficial in using molecular technique for remediation of PAH-contaminated soil.

Department.....Microbiology..... Student's Signature..... *Kungsadarn Thongdonngao*  
 Field of Study.....Industrial Microbiology..... Advisor's Signature..... *Onruthai Pinyakong*  
 Academic Year:.....2009..... Co-Advisor's Signature..... *Piyanun Harnpichanchai*

## กิตติกรรมประกาศ

ขอกราบขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อรรถชัย ภิัญญาคง อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลักและ ดร. ปิยะนันท์ หาญพิชาญชัย อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วมที่กรุณาให้ความรู้ คำปรึกษา คำแนะนำ และข้อคิดต่างๆ ในการทำวิจัยจนสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี ตลอดจนได้กรุณาปรับปรุงวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์มากขึ้น รวมถึงกำลังใจที่มีให้ตลอดมา

ขอกราบขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. กอบชัย ภัทรกุลวณิชย์ ที่กรุณารับเป็นประธาน ขอกราบขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. เอกวัล ลือพร้อมชัย และรองศาสตราจารย์ ดร. อรินทิพย์ ธรรมชัยพิเนต ที่กรุณารับเป็นคณะกรรมการในการสอบวิทยานิพนธ์ รวมทั้งให้คำปรึกษา-คำแนะนำ และกำลังใจ ตลอดจนปรับปรุงวิทยานิพนธ์ฉบับนี้จนสมบูรณ์

ขอกราบขอบพระคุณคณาจารย์ในภาควิชาจุลชีววิทยาทุกท่าน และขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ทุกท่านในภาควิชาจุลชีววิทยาที่กรุณาอำนวยความสะดวกและเป็นกำลังใจในการทำงานวิจัยนี้

ขอขอบคุณสมาชิกห้อง 406 ที่คอยให้คำปรึกษาและความช่วยเหลือ

ขอขอบคุณพี่ๆ เพื่อนๆ น้องๆ และเจ้าหน้าที่ทุกคนบนภาควิชาจุลชีววิทยาแห่งนี้ที่คอยช่วยเหลือและให้กำลังใจตลอดการทำงานวิจัย

ขอขอบคุณนางสาวรุ่งตระกูล จันทนพันธ์ สำหรับกำลังใจและความช่วยเหลือในการทำงานวิจัยตลอดมาจนงานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอขอบคุณหน่วยปฏิบัติการวิจัย Bioremediation ที่สนับสนุนเครื่องมือ และอุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัยครั้งนี้

ขอขอบคุณหน่วยงาน National Center of Excellence for Environmental and Hazardous Waste Management ที่สนับสนุนเครื่องมือ และอุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัยครั้งนี้

ขอขอบคุณทุน 90 ปี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช

ขอขอบคุณห้องปฏิบัติการเกี่ยวกับเอนไซม์ ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ (BIOTECH)

สุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณบิดามารดาที่ให้โอกาส และรวมถึงสมาชิกทุกคนในครอบครัวสำหรับกำลังใจในการทำงานวิจัยตลอดมาจนงานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

## สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ญ
สารบัญรูป.....	ฎ
บทที่.....	
1. บทนำ.....	1
2. ทัศนวิสัย.....	4
2.1 สารประกอบพอลิไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน.....	4
2.2 การบำบัดการปนเปื้อนสารประกอบ PAHs ในสิ่งแวดล้อมโดยวิธีทาง ชีวภาพ.....	7
2.3 กระบวนการย่อยสลายสารประกอบ PAHs ด้วยวิธีทางชีวภาพโดย แบคทีเรีย.....	8
2.4 ยีนและเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายสารประกอบ PAHs .....	9
2.4.1 ยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายสารประกอบ PAHs ในแบคทีเรีย แกรมลบ.....	10
2.4.2 ยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายสารประกอบ PAHs ในแบคทีเรีย แกรมบวก.....	14
2.5 โครงสร้างของริงไฮดรอกซีเลททิงไดออกซีจีเนส.....	16
2.5.1 การจัดจำแนกกลุ่มไดออกซีจีเนส.....	19
2.5.2 เอกซ์ตราไดออกซีไดออกซีจีเนส.....	22
2.6 วิธีการย่อยสลายสารประกอบ PAHs โดยแบคทีเรีย.....	22
2.6.1 วิธีการย่อยสลายเนพธาซีน.....	22
2.6.2 วิธีการย่อยสลายอะซีแนพทีน.....	24
2.6.3 วิธีการย่อยสลายพีแนนทีน.....	25
2.7 ดีเอ็นเอเมตาจีโนมจากสิ่งแวดล้อม.....	30

2.8 การตรวจติดตามจุลินทรีย์ที่ไม่ผ่านการเพาะเลี้ยงเชื้อในห้องปฏิบัติการ (Culture-independent method).....	30
2.8.1 การติดตามการเปลี่ยนแปลงประชาคมจุลินทรีย์.....	30
2.9 การโคลน (Cloning).....	32
2.9.1 การสร้างห้องสมุดดีเอ็นเอและห้องสมุดยีน (PCR) จากดีเอ็นเอจาก เมตาจีโนม (Metagenomic library).....	32
3. อุปกรณ์ เคมีภัณฑ์ และวิธีดำเนินงานวิจัย.....	40
อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง.....	40
เคมีภัณฑ์.....	41
โปรแกรมที่ใช้ในการวิจัย.....	43
วิธีการดำเนินงานวิจัย.....	45
3.1 เก็บตัวอย่างดิน .....	46
3.1.1 วิเคราะห์สมบัติทางฟิสิกส์และเคมีของดินและการปนเปื้อนของ ฟิเนนทรีนและอะซีแนฟทีน.....	46
3.1.2 สร้างระบบนิเวศจำลองดิน.....	48
3.2 ติดตามการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างประชาคมจุลินทรีย์โดยวิธี Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE).....	48
3.2.1 สกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างดิน.....	48
3.2.2 ติดตามการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างประชาคมจุลินทรีย์โดยวิธี Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE).....	50
3.2.3 วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์จากแถบดีเอ็นเอเด่น.....	52
3.3 ตรวจสอบยีนไดออกซิจีเนสเบื้องต้นจากดีเอ็นเอที่สกัดจากระบบนิเวศ จำลองดินและสร้างห้องสมุดยีนจากผลิตภัณฑ์ปฏิกิริยาถูกใช้พอลิเมอเรส..	56
3.3.1 ตรวจสอบเบื้องต้นเพื่อหายีนไดออกซิจีเนสและยีนเอกซ์ตราไดออก ไดออกซิจีเนสด้วยวิธีปฏิกิริยาถูกใช้พอลิเมอเรส.....	56
3.3.2 สร้างห้องสมุดยีนจากผลิตภัณฑ์ปฏิกิริยาถูกใช้พอลิเมอเรส.....	59
3.4. สร้างห้องสมุดดีเอ็นเอ.....	61
3.4.1 ตัดดีเอ็นเอแบบไม่สมบูรณ์ (partial digest) ด้วยเอนไซม์ <i>Sau3AI</i>	61
..	61



3.4.2 โคโลนิรีคอมบิแนนท์พลาสมิด (recombinant DNA).....	61
3.4.3 คัดกรองยีนไดออกซีจีเนสหรือเอกซ์ตราไดออกซีจีเนสจาก ห้องสมุดดีเอ็นเอ.....	62
3.4.4 สกัดรีคอมบิแนนท์พลาสมิดจากโคลนที่ให้ผลบวก.....	63
4. ผลการทดลอง.....	
4.1 การวิเคราะห์สมบัติของตัวอย่างดิน.....	63
4.2 ประสิทธิภาพการย่อยสลายอะซีแนพรีนและพีแนพรีนในระบบนิเวศ จำลองดิน.....	64
4.3 การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างประชาคมแบคทีเรียในระบบนิเวศจำลองดิน ...	68
4.4 การตัดแยกยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายสารประกอบพอลิไซ คลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนโดยการสร้างห้องสมุดดีเอ็นเอจาก เมตาจีโนมดิน.....	74
4.5 การตรวจสอบและการตัดแยกยีนประมวลรหัสไดออกซีจีเนสที่เกี่ยวข้องกับ การย่อยสลายสารประกอบพอลิไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนโดยวิธี PCR...	77
4.5.1 การตรวจสอบยีนประมวลรหัสไดออกซีจีเนสที่เกี่ยวข้องกับ การย่อยสลายสารประกอบพอลิไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนโดยวิธี PCR.....	77
4.5.2 การตัดแยกยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายสารประกอบพอลิไซ คลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนโดยสร้างห้องสมุดยีนจากผลิตภัณฑ์ ลูกโซ่พอลิเมอร์.....	81
5. สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง.....	103
รายการอ้างอิง.....	115
ภาคผนวก.....	129
ภาคผนวก ก.....	130
ภาคผนวก ข.....	133
ภาคผนวก ค.....	139
ภาคผนวก ง.....	143
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....	146

## สารบัญตาราง

ตาราง	หน้า
2.1 สมบัติทางเคมีและกายภาพของของอะซีแนพทิน.....	6
2.2 สมบัติทางเคมีและกายภาพของของฟีแนนทรีน.....	7
2.3 เอนไซม์ไดออกซีจีเนสที่เร่งปฏิกิริยาไฮดรอกซิเลชัน (Kweon และคณะ, 2008).....	20
2.4 แบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายอะซีแนพทิน.....	25
2.5 แบคทีเรียที่สามารถย่อยฟีแนนทรีนได้.....	28
2.6 ข้อดีและข้อเสียของการคัดกรองด้วยวิธีการคัดกรองโดยการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ (Sequence-based screening) และ การคัดกรองโดยใช้การแสดงออกทางฟีโนไทป์ของยีนสอดแทรก (Activity-based screening).....	33
2.7 ไพโรเมอรรวบรวมยีนไดออกซีจีเนสและเอกซ์ตราไดออกซีจีเนสเบื้องต้น...	36
3.1 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพโรเมอรรู้ใช้ในการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์.....	43
3.2 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพโรเมอรรู้ใช้ในการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอบริเวณยีนที่ประมวลรหัสหน่วยย่อยแอลฟาของเทอร์มินัลไดออกซีจีเนส.....	44
3.3 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพโรเมอรรู้ใช้ในการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอบริเวณยีนที่ประมวลรหัสเอกซ์ตราไดออกซีจีเนส.....	44
3.4 วิธีการวิเคราะห์สมบัติทางฟิสิกส์และเคมีของดิน.....	46
4.1 ผลการวิเคราะห์สมบัติทางฟิสิกส์และเคมีของดิน.....	64
4.2 ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์จากแถบดีเอ็นเอในการวิเคราะห์โครงสร้างประชาคมแบคทีเรียจากระบบนิเวศจำลองดินต่างๆ .....	71
4.3 ผลปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชันโดยใช้ไพโรเมอรรู้ต่างๆ ที่จำเพาะต่อยีนที่ประมวลรหัสเอนไซม์อะโรมาติกริงไฮดรอกซิเลทิงไดออกซีจีเนส.....	80
4.4 ผลปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชันโดยใช้ไพโรเมอรรู้ต่างๆ ที่จำเพาะต่อยีนที่ประมวลรหัสเอกซ์ตราไดออกซีจีเนส .....	80
4.5 ผลการสร้างห้องสมุด PCR ซึ่งจำเพาะต่อยีนที่ประมวลรหัสหน่วยย่อยแอลฟาอะโรมาติกริงไฮดรอกซิเลทิงไดออกซีจีเนส.....	81
4.6 กลุ่มของรูปแบบบริดคอมบิแนนท์พลาสมิดหลังจากถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะจากตัวอย่าง AP4GP4.....	82

4.7	กลุ่มของรูปแบบรีคอมบิแนนท์พลาสมิดหลังจากถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ จากตัวอย่าง AP2NMR AP4NMR (โคลนครั้งที่1) AP4iNMR (โคลนครั้งที่2) และ AP6NMR.....	86
4.8	ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ประมวลรหัสกรดอะมิโนของยีนต่างๆ ที่เกี่ยวข้องกับกร่อยสลาย PAHs จากระบบนิเวศจำลองดิน.....	89
5.1	การเปรียบเทียบปริมาณการลดลงของอะซีแนพธินและ/หรือพีแนนทรินในระบบนิเวศจำลองดินต่างๆ.....	104
5.2	ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอสกัดแทรกพบโคลนที่มีเปอร์เซ็นต์ความเหมือนต่ำกว่าร้อยละ 97 จำนวน 9 โคลน.....	110
ค.1	ปริมาณอะซีแนพธินที่เหลืออยู่ในระบบนิเวศจำลองดินที่เติมอะซีแนพธินเป็นแหล่งคาร์บอน (ACE) สัปดาห์ที่ 0 2 4 และ 6.....	139
ค.2	ปริมาณพีแนนทรินที่เหลืออยู่ในระบบนิเวศจำลองดินที่เติมพีแนนทรินเป็นแหล่งคาร์บอน (PHE) สัปดาห์ที่ 0 2 4 และ 6.....	140
ค.3	ปริมาณอะซีแนพธินที่เหลืออยู่ในระบบนิเวศจำลองดินที่เติมอะซีแนพธินและพีแนนทรินเป็นแหล่งคาร์บอน (AP) สัปดาห์ที่ 0 2 4 และ 6.....	141
ค.4	ปริมาณพีแนนทรินที่เหลืออยู่ในระบบนิเวศจำลองดินที่เติมอะซีแนพธินและพีแนนทรินเป็นแหล่งคาร์บอน (AP) สัปดาห์ที่ 0 2 4 และ 6.....	142

## สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
2.1	5
2.2	6
2.3	6
2.4	9
2.5	10
2.6	11
2.7	11
2.8	15
2.9	15
2.10	16
2.11	17
2.12	18
2.13	18



รูปที่		
2.14	phylogenetic tree ของหน่วยย่อยแอลฟาของเทอร์มินัลออกซิจีเนสของริงไฮดรอกซีเลทิงไดออกซิจีเนส CarAa ของ <i>P. resinovorans</i> สายพันธุ์ CA10 เป็น outgroup และตัวเลขที่สาขาทิ้งการนับที่ให้ผลซ้ำทั้งหมด 1,000 ครั้ง ด้วย bootstrap (Kweon และคณะ, 2008).....	21
2.15	วิธีบ้นของการย่อยสลายเนพธาลินโดยแบคทีเรีย <i>Pseudomonads</i> sp. (Davies และ Evans, 1964; Yen และ Gunsalus, 1982, Habe และ Omori, 2003).....	23
2.16	วิธีการย่อยสลายอะซีแนพธิน (Selifonov และคณะ, 1998).....	24
2.17	วิธีการย่อยสลายพีแนนทรินโดยแบคทีเรีย (Evan และคณะ, 1965; Kiyohara และ คณะ, 1976, Habe และ Omori, 2003).....	26
2.18	วิธีการย่อยสลายพีแนนทรินโดยแบคทีเรีย (Kiyohara และคณะ, 1976, Habe และ Omori, 2003).....	27
2.19	วิธีล่างของการย่อยสลายเนพธาลินโดยจุลินทรีย์ต่างๆ <i>Pseudomonas</i> sp. (Davies และ Evans, 1964; Yen และ Gunsalus, 1982), <i>Ralstonia</i> sp. สายพันธุ์ U2 (Zhou และคณะ, 2001).....	28
3.1	แผนภาพแสดงขั้นตอนการดำเนินงานวิจัย.....	45
4.1	ลักษณะเนื้อดินที่ใช้ในการทดลอง.....	63
4.2	ลักษณะระบบนิเวศจำลองดิน.....	65
4.3	การย่อยสลายพีแนนทริน 300 ppm ในระบบนิเวศจำลองดิน PHE ขนาด 6 กรัม ที่เติมพีแนนทริน เป็นเวลา 6 สัปดาห์.....	66
4.4	การย่อยสลายอะซีแนพธิน 300 ppm ในระบบนิเวศจำลองดิน ACE ขนาด 6 กรัม ที่เติมอะซีแนพธินเป็นเวลา 6 สัปดาห์.....	66
4.5	การย่อยสลายพีแนนทรินและอะซีแนพธินชนิดละ 300 ppm ในระบบนิเวศจำลองดิน AP ขนาด 6 กรัม ที่เติมพีแนนทรินและอะซีแนพธินเป็นเวลา 6 สัปดาห์.....	67
4.6	โครงสร้างประชาคมแบคทีเรียโดยวิธี DGGE จากบริเวณ V-3 region ของ 16S rDNA จากระบบนิเวศจำลองดินต่างๆ.....	69
4.7	ตัดดีเอ็นเอ AP4 แบบไม่สมบูรณ์ (partial digest) ด้วยเอนไซม์ <i>Sau3AI</i> .....	74
4.8	แยกตามขนาดซึ้นดีเอ็นเอ (size fractionation).....	75

รูปที่		หน้า
4.9	ตรวจสอบขนาดชิ้นดีเอ็นเอสอดแทรกจากรีคอมบิแนนท์พลาสมิดโดยการสุ่มโคลน ต่างๆ จากการสร้างห้องสมุดดีเอ็นเอ (AP4) หลังจากถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>EcoRI</i> .....	76
4.10	ขนาดชิ้นผลิตภัณฑ์ลูกโซ่พอลิเมอไรสจากไพรเมอร์คู่ GPF และ GPR.....	78
4.11	ขนาดชิ้นผลิตภัณฑ์ลูกโซ่พอลิเมอไรสจากไพรเมอร์คู่ NMR331f และ NMR1134r ..	79
4.12	รูปแบบของรีคอมบิแนนท์พลาสมิดตัวอย่าง AP4GP4 หลังจากถูกตัดด้วยเอนไซม์ ตัดจำเพาะ <i>Hinfl</i> .....	82
4.13	รูปแบบของรีคอมบิแนนท์พลาสมิดตัวอย่าง AP2NMR หลังจากถูกตัดด้วยเอนไซม์ ตัดจำเพาะ <i>Hinfl</i> .....	83
4.14	รูปแบบของรีคอมบิแนนท์พลาสมิดตัวอย่าง AP4NMR หลังจากถูกตัดด้วยเอนไซม์ ตัดจำเพาะ <i>Hinfl</i> .....	84
4.15	รูปแบบของรีคอมบิแนนท์พลาสมิดตัวอย่าง AP4iNMR หลังจากถูกตัดด้วยเอนไซม์ ตัดจำเพาะ <i>Hinfl</i> .....	84
4.16	รูปแบบของรีคอมบิแนนท์พลาสมิดตัวอย่าง AP6NMR หลังจากถูกตัดด้วยเอนไซม์ ตัดจำเพาะ <i>Hinfl</i> .....	85
4.17	phylogenetic tree ของผลิตภัณฑ์ยีนส่วนหน่วยย่อยแอลฟาริงไฮดรอกซีเลทิงได ออกซีจีเนสที่ได้กับ dioxygenase กลุ่มที่เกี่ยวข้อง scale bar: 0.1; percent divergence และตัวเลขที่สาขาบอกถึงการนับที่ให้ผลซ้ำจากทั้งหมด 100 ครั้งด้วย bootstrap.....	101
5.1	การเปรียบเทียบรูปแบบแถบดีเอ็นเอจากการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างประชาคม แบคทีเรียในช่วงระยะเวลาต่างๆ.....	105

## บทที่ 1

### บทนำ

ปัจจุบันน้ำมันปิโตรเลียมมีส่วนสำคัญต่อการดำรงชีวิต เช่น ใช้ในทางการเกษตร อุตสาหกรรม การขนส่งและคมนาคม ซึ่งทำให้มีโอกาสเกิดการปนเปื้อนของน้ำมันปิโตรเลียมที่มีส่วนประกอบสารอินทรีย์หลายชนิดที่มีอันตรายต่อสิ่งมีชีวิตสูงในสิ่งแวดล้อม สารอันตรายที่สำคัญคือสารในกลุ่มพอลิไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน (Polycyclic Aromatic Hydrocarbon, PAHs) ซึ่งเป็นสารประกอบอินทรีย์ที่มีโครงสร้างของอะตอมคาร์บอนและไฮโดรเจนประกอบกันเป็นวงแหวนอะโรมาติกตั้งแต่ 2 วงขึ้นไป ถูกพบปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อม เช่น ในดิน น้ำ อากาศ และตะกอน ป่าชายเลน เป็นต้น และก่อให้เกิดอันตรายร้ายแรงต่อสิ่งมีชีวิตโดยอาจชักนำให้เกิดมะเร็งและก่อให้เกิดการกลายพันธุ์ในสิ่งมีชีวิต (Talley, 2006) ซึ่ง The United State Environment Protection Agency (U.S. EPA) จัดให้สารเหล่านี้อยู่ในกลุ่มของสารก่อมลพิษที่ต้องกำจัดออกจากสิ่งแวดล้อมอย่างเร่งด่วน

การบำบัดการปนเปื้อนสารพิษในสิ่งแวดล้อมด้วยวิธีทางชีวภาพ (Bioremediation) ซึ่งเป็นการอาศัยกิจกรรมของจุลินทรีย์เพื่อย่อยสลายหรือลดปริมาณสารพิษในสิ่งแวดล้อมเป็นวิธีที่ได้รับความสนใจเนื่องจากมีต้นทุนต่ำและไม่ส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม (Talley, 2006, Haritash และ kaushik, 2009)

กระบวนการย่อยสลาย PAHs ด้วยวิธีทางชีวภาพโดยแบคทีเรียในสภาวะที่มีอากาศ เริ่มต้นจากการเติมหมู่ออกซิเจนแกว่งอะโรมาติกซึ่งเร่งปฏิกิริยาด้วยเอนไซม์ไดออกซิจีเนส (dioxygenase) จากนั้นผ่านการเปลี่ยนรูปอีกหลายขั้นตอนจนได้สารตั้งต้นที่คล้ายแคทีคอล ซึ่งจะถูกลดสลายด้วยเอ็กซ์ตราไดออกซิเดอออกซิจีเนส (extradiol dioxygenase) ผ่านทางวิถีการแตกวงอะโรมาติกแบบ เมตา เป็นส่วนใหญ่ หรือย่อยสลายด้วยอินตราไดออกซิเดอออกซิจีเนส (intradiol dioxygenase) ผ่านทางวิถีการแตกวงอะโรมาติกแบบ ออโร เพื่อเข้าสู่วัฏจักรกรดไตรคาร์บอกซิลิกต่อไป (Habe และ Omori, 2003)

การศึกษาแบคทีเรียย่อยสลาย PAHs ในอดีตใช้วิธีการคัดเลือกเชื้อจากธรรมชาติ เช่น จากแหล่งที่มีการปนเปื้อนของ PAHs โดยการเพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ ซึ่งทำให้การศึกษายีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลาย PAHs ถูกจำกัดเนื่องจากสามารถศึกษาในแบคทีเรียที่เพาะเลี้ยงได้ในห้องปฏิบัติการเท่านั้น มีรายงานสรุปการศึกษายีนประมวลรหัสไดออกซิจีเนสที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลาย PAHs ในแบคทีเรีย เช่น Peng และคณะ (2008) รายงานสรุปการศึกษายีนประมวลรหัสเอนไซม์ไดออกซิจีเนสในแบคทีเรียหลายชนิด เช่น ยีน *nah* ของ *P. putida* สายพันธุ์ G7 ยีน *ndo*

ของ *P. putida* สายพันธุ์ NCIB9816 ยีน *dox* ของ *Pseudomonas* สายพันธุ์ C18 ยีน *pah* ของ *P. aeruginosa* สายพันธุ์ PaK1 ยีน *phn* ของ *Burkholderia* sp. สายพันธุ์ RP007 ยีน *arh* ของ *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ A4 และยีน *nid* ของ *Mycobacterium vanbaalenii* สายพันธุ์ PYR-1 เป็นต้น และมีรายงานการศึกษายีนประมวลรหัสเอนไซม์เอกซ์ตราไดออกไซด์ออกซิจีเนสที่สำคัญหลายชนิด ซึ่งพบว่าแบงก์กลุ่มเอนไซม์เอกซ์ตราไดออกไซด์ออกซิจีเนสได้เป็นสองกลุ่ม กลุ่มแรกสามารถใช้แคทีคอล และ 2,3 ไดไฮดรอกซีไบฟีนิลเป็นสับสเตรท เช่น XylE ใน *Pseudomonas putida* สายพันธุ์ mt2 BphC1 จาก *Sphingomonas xenophaga* สายพันธุ์ BN6 และในกลุ่มที่สองสามารถใช้โปรโทแคทีชูเอทเป็นสับสเตรท เช่น LigAB จาก *Pseudomonas paucimobilis* สายพันธุ์ SYK6 และ PCD 4,5 จาก *Pseudomonas* sp. สายพันธุ์ K82 เป็นต้น อย่างไรก็ตามในปัจจุบันพบว่าจุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่ในดินกว่าร้อยละ 99 ตามธรรมชาติไม่สามารถถูกเพาะเลี้ยงได้ในสภาวะที่ใช้ในห้องปฏิบัติการหรือเพาะเลี้ยงได้ยาก จึงเป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้ยังขาดข้อมูลยีนและเอนไซม์ที่สำคัญอีกมาก ดังนั้นจึงมีเทคนิคใหม่ทางชีวโมเลกุลในการศึกษายีนจากแบคทีเรียในสิ่งแวดล้อมโดยตรงหลายวิธี เช่น การคัดแยกยีนจากเมตาจีโนมจากสิ่งแวดล้อมโดยตรงโดยใช้เทคนิคปฏิกิริยาถูกโซ่พอลิเมอเรส หรือการสร้างห้องสมุดดีเอ็นเอจากเมตาจีโนมจากสิ่งแวดล้อม ซึ่งวิธีการเหล่านี้ทำให้สามารถค้นพบยีนและเอนไซม์ที่มีประโยชน์จากสิ่งแวดล้อมโดยไม่ต้องคัดแยกเชื้อก่อน (Daniel และคณะ, 2004)

การสร้างห้องสมุดดีเอ็นเอด้วยดีเอ็นเอจากเมตาจีโนม (Metagenomic library) เป็นการใช้ดีเอ็นเอจากจุลินทรีย์ในสิ่งแวดล้อมโดยไม่ผ่านการเพาะเลี้ยงมาศึกษาโดยตรง เริ่มจากการสกัดดีเอ็นเอจากสิ่งแวดล้อมโดยตรงเช่น สกัดดีเอ็นเอจากดิน หรือดินตะกอนป่าชายเลน ที่พบการย่อยสลาย PAHs เป็นต้น จากนั้นทำได้หลายวิธีเช่น การใช้เทคนิคปฏิกิริยาถูกโซ่พอลิเมอเรสในการคัดกรองเบื้องต้น โดยใช้ไพรเมอร์ที่ออกแบบจากข้อมูลที่ได้จากการศึกษาที่ผ่านมา เช่นที่จำเพาะกับยีนไดออกซิจีเนส และเมื่อพบผลิตภัณฑ์ยีนไดออกซิจีเนสจากปฏิกิริยาถูกโซ่พอลิเมอเรสที่ใช้ดีเอ็นเอแม่แบบจากเมตาจีโนมดินแล้วจึงนำมาสร้างห้องสมุดยีนไดออกซิจีเนส และวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์เปรียบเทียบกับฐานข้อมูล หรือการสร้างห้องสมุดดีเอ็นเอโดยการตัดเมตาจีโนมดีเอ็นเอที่สกัดได้ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะที่เหมาะสมแล้วนำชิ้นดีเอ็นเอทั้งหมดโคลนเข้ายังดีเอ็นเอพาหะที่เหมาะสมที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิดเดียวกันกับจีโนมดีเอ็นเอ จากนั้น ทรานสฟอร์มรีคอมบิแนนท์ดีเอ็นเอทั้งหมดที่ได้เข้ายังเซลล์เจ้าบ้าน แล้วคัดกรองโคลนที่ต้องการจากห้องสมุดดีเอ็นเอ และวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์เปรียบเทียบกับฐานข้อมูล (Handelsman และคณะ, 2004)

นอกจากนี้เทคนิค PCR-DGGE เป็นอีกเทคนิคหนึ่งทางชีวโมเลกุลที่ถูกนำมาใช้วิเคราะห์โครงสร้างประชาคมแบคทีเรียในสิ่งแวดล้อม (Rosado และคณะ, 1997) ในการตรวจหาแบคทีเรียมเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอบริเวณ 16S rDNA นำผลิตภัณฑ์ที่ได้มาวิเคราะห์ความหลากหลายของ



จุลินทรีย์ด้วยวิธี DGGE (Torsvik และคณะ, 2002) และเพื่อตรวจติดตามการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างประชาคมจุลินทรีย์ ซึ่งเทคนิคเหล่านี้สามารถใช้ในการตรวจติดตามจุลินทรีย์ที่ไม่สามารถเพาะเลี้ยงหรือเพาะเลี้ยงได้ยากในห้องปฏิบัติการได้

จากรายงานที่คาดว่าจุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่ในดินกว่าร้อยละ 99 ตามธรรมชาติไม่สามารถถูกเพาะเลี้ยงได้ในสถานะที่ใช้ในห้องปฏิบัติการหรือเพาะเลี้ยงได้ยาก วิธีทางชีวโมเลกุลเหล่านี้ช่วยลดข้อจำกัดของการศึกษาแบคทีเรียในสิ่งแวดล้อมได้ ดังนั้นด้วยเทคนิคทางชีวโมเลกุลจะทำให้สามารถค้นพบยีนและเอนไซม์ชนิดใหม่ที่มีประโยชน์จากสิ่งแวดล้อมโดยไม่ต้องคัดแยกเชื้อก่อน และสามารถใช้เป็นข้อมูลที่สำคัญในการแก้ปัญหาการปนเปื้อน PAHs ในสิ่งแวดล้อมได้ เช่น การได้ข้อมูลยีนใหม่สามารถช่วยในการออกแบบไพรเมอร์เพื่อตรวจติดตามจุลินทรีย์เพื่อใช้ในการแก้ปัญหาการปนเปื้อน PAHs ในสิ่งแวดล้อมและการได้ข้อมูลเกี่ยวกับยีนใหม่ทำให้ทราบถึงความหลากหลายของยีนต่อชนิดของ PAHs มากขึ้น

### วัตถุประสงค์

เพื่อคัดแยกยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายพอลิไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนจากเมตาจีโนมดิน

### ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

สามารถคัดแยกยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายพอลิไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนจากเมตาจีโนมดินได้

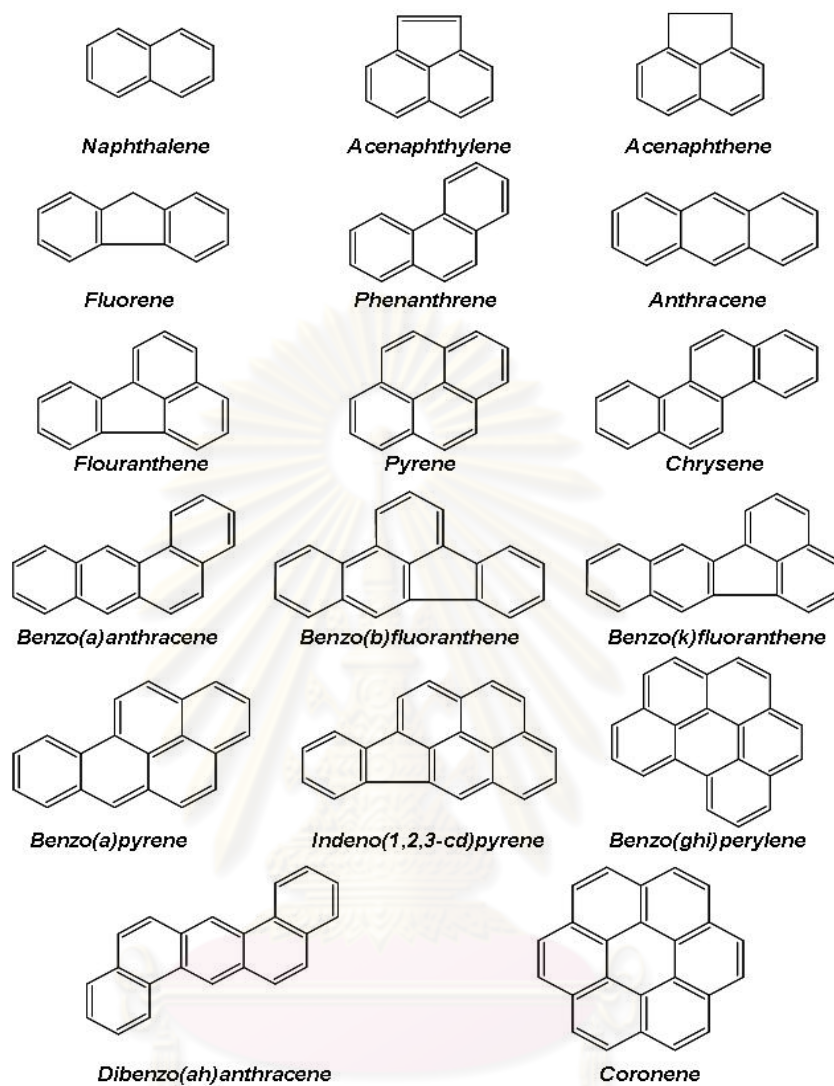
ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## ปรีทัศน์วรรณกรรม

### 2.1 สารประกอบ พอลิไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน

ปัจจุบันมนุษย์ใช้สารเคมี น้ำมันและปิโตรเลียมเข้ามามีส่วนสำคัญในการดำรงชีวิต เช่น ใช้ในทาง การเกษตร อุตสาหกรรม การขนส่งและคมนาคมต่างๆ ซึ่งการใช้สารเคมีเหล่านี้ส่งผลให้มีการปนเปื้อนเกิดขึ้นในสิ่งแวดล้อม โดยของเสียประเภทนี้มีส่วนประกอบสารอินทรีย์ในกลุ่มพอลิไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน (Polycyclic Aromatic Hydrocarbon, PAHs) ซึ่งสามารถพบได้ทุกแหล่งในสิ่งแวดล้อม เช่น ในดิน น้ำ อากาศ ตะกอนป่าชายเลน เป็นต้น (Soclo และคณะ, 2001) สารประกอบ PAHs เป็นสารประกอบอินทรีย์ที่มีโครงสร้างของอะตอมคาร์บอนและไฮโดรเจนประกอบกันเป็นวงแหวนอะโรมาติก เรียงตัวเชื่อมต่อกันเป็นเส้นตรง มุมงอ หรือเป็นกลุ่มตั้งแต่สองวงขึ้นไป เช่น แนพทาลีน อะซีแนพทรีน ฟิแนนทรีน ฟลูออแรนทรีนและไพรีน ได้แสดงโครงสร้างโมเลกุลและสมบัติของสารประกอบ PAHs ทั้ง 16 ชนิด ในรูปที่ 2.1 สามารถแบ่งสารประกอบ PAHs ออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ คือ สารประกอบ PAHs ที่มีมวลโมเลกุลต่ำ (Low molecular weight PAHs, LMW PAHs) ซึ่งประกอบไปด้วยวงอะโรมาติก 2 ถึง 3 วง และสารประกอบ PAHs ที่มีมวลโมเลกุลสูง (High molecular weight PAHs, HMW PAHs) ซึ่งประกอบด้วยวงเบนซีนตั้งแต่ 4 วงขึ้นไป

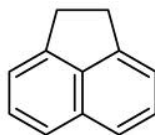
สารในกลุ่ม PAHs พบได้ในสิ่งแวดล้อมจากกระบวนการผลิตในภาคอุตสาหกรรม น้ำมัน ถ่านหิน กระบวนการเผาไหม้ที่ไม่สมบูรณ์ของเชื้อเพลิงฟอสซิล กากตะกอนปิโตรเลียม ยางลาดถนน น้ำยาซักผ้าไม่ น้ำยาป้องกันเชื้อราในไม้และสามารถดูดซับกับอนุภาคของของแข็งได้ทำให้มีความทนทานต่อการย่อยสลายมากขึ้น (Samanta และคณะ, 2002) เป็นสารก่อมลพิษที่สำคัญเนื่องจากก่อให้เกิดอันตรายร้ายแรงต่อสิ่งมีชีวิตอาจชักนำให้เกิดมะเร็งและก่อให้เกิดการกลายพันธุ์ในสิ่งมีชีวิต (Talley, 2006) ซึ่ง The United State Environment Protection Agency (U.S. EPA) จัดให้สารเหล่านี้อยู่ในกลุ่มของสารก่อมลพิษที่ต้องกำจัดออกจากสิ่งแวดล้อมอย่างเร่งด่วน ATSDR (1996) รายงานตัวอย่างความเป็นพิษของสารประกอบ PAHs จากการศึกษามนุษย์ที่หายใจเอาสารประกอบ PAHs เข้าไปเป็นเวลานานสามารถก่อให้เกิดการเป็นมะเร็งได้ Samanta และคณะ (2002) รายงานว่าแนพทาลีนสามารถจับกับโมเลกุลของเนื้อเยื่อไต ตับและปอด ซึ่งก่อให้เกิดความเป็นพิษและยับยั้งการทำงานของไมโทคอนเดรียและรายงานถึงฟิแนนทรีนเป็นสารที่ก่อให้เกิดภูมิแพ้ที่ไม่รุนแรงและสามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการกลายพันธุ์ในแบคทีเรียและเป็นสารที่ชักนำให้ sister chromatid เกิดการเปลี่ยนแปลงอย่างอ่อนได้



ศูนย์วิทยทรัพยากร  
 รูปที่ 2.1 โครงสร้างสารประกอบ PAHs 16 ชนิด (U.S. EPA, 1990)  
 จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

### อะซีแนฟทีน (Acenaphthene)

เป็นสารประกอบอินทรีย์ในกลุ่มสารประกอบ PAHs โครงสร้างโมเลกุลประกอบด้วยวงอะโรมาติกสองวงเชื่อมต่อกับวงไซโคลเพนเทนหนึ่งวง ดังแสดงในรูปที่ 2.2 และมีสมบัติดังแสดงในตารางที่ 2.1



รูปที่ 2.2 โครงสร้างโมเลกุลของอะซีแนฟทีน

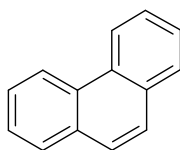
ตารางที่ 2.1 สมบัติทางเคมีและกายภาพของของอะซีแนฟทีน

สมบัติ	ลักษณะ
สูตรโมเลกุล	$C_{12}H_{10}$
น้ำหนักโมเลกุล	154.22
ชื่อสามัญ	อะซีแนฟีน (acenafeno)
ความถ่วงจำเพาะ	1.189
อุณหภูมิหลอมเหลว	95 °ซ
อุณหภูมิกลายเป็นไอ	279 °ซ
ความหนาแน่น	1.024 กรัมต่อลูกบาศก์เมตร (ที่ 25°ซ)
ความดันไอ	3 มิลลิเมตรปรอท (ที่ 25°ซ)
การละลายน้ำ	ไม่ละลาย

ที่มา : กรมควบคุมมลพิษ, 2546

### ฟีนแอนทรีน (Phenanthrene)

เป็นสารประกอบอินทรีย์ในกลุ่ม PAHs โครงสร้างโมเลกุลประกอบด้วยวงเบนซีนสามวงเชื่อมต่อกันเป็นมุมอ ดังแสดงในรูปที่ 2.3 และมีสมบัติดังแสดงในตารางที่ 2.2



รูปที่ 2.3 โครงสร้างโมเลกุลของฟีนแอนทรีน



ตารางที่ 2.2 สมบัติทางเคมีและกายภาพของของฟีนแอนทริน

สมบัติ	ลักษณะ
สูตรโมเลกุล	C <sub>14</sub> H <sub>10</sub>
น้ำหนักโมเลกุล	178.23
ชื่อสามัญ	ฟีนแอนเทรน (Phenanthren) ฟีนแอนทริน (Phenantrin)
ความถ่วงจำเพาะ	1.025
อุณหภูมิหลอมเหลว	100 °ซ
อุณหภูมิกลายเป็นไอ	339 °ซ
ความหนาแน่น	1.179 กรัมต่อลูกบาศก์เมตร (ที่ 25 °ซ)
ความดันไอ	1 มิลลิเมตรปรอท (ที่ 118.3 °ซ)
การละลายน้ำ	ละลายได้น้อย (น้อยกว่า 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่ 26 °ซ)

ที่มา : กรมควบคุมมลพิษ, 2546

## 2.2 การบำบัดการปนเปื้อนสารประกอบ PAHs ในสิ่งแวดล้อมโดยวิธีทางชีวภาพ

การบำบัดการปนเปื้อนสารพิษในสิ่งแวดล้อมด้วยวิธีทางชีวภาพ (Bioremediation) เป็นการอาศัยกิจกรรมของจุลินทรีย์เพื่อย่อยสลายหรือลดปริมาณสารพิษในสิ่งแวดล้อม ซึ่งสารพิษจะถูกจุลินทรีย์ย่อยสลายโดยนำไปสร้างพลังงานเพื่อใช้ในการเจริญ ซึ่งกระบวนการที่เกิดขึ้นนี้อาจเกิดโดยจุลินทรีย์เพียงชนิดเดียวหรือโดยกลุ่มจุลินทรีย์ วิธีนี้เป็นวิธีที่ได้รับความสนใจเนื่องจากมีต้นทุนต่ำและไม่ส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม (Talley, 2006) วิธีทางชีวภาพ ประกอบด้วยสองวิธีหลัก (Suthersan, 1999)

2.2.1 วิธีแรกคือ Biostimulation เป็นการเติมสารอาหาร เช่น ฟอสฟอรัสไนโตรเจน การให้ออกซิเจน การเติมสารลดแรงตึงผิว เพื่อช่วยเพิ่มการละลายสารไฮโดรคาร์บอนลงในบริเวณที่ปนเปื้อนสารพิษช่วยให้แบคทีเรียสามารถย่อยสลายได้ง่ายขึ้น (Haigh, 1996) โดยวิธีนี้ช่วยกระตุ้นให้จุลินทรีย์ประจำถิ่นเจริญเพื่อเพิ่มความสามารถและประสิทธิภาพในการย่อยสลาย

Yu และคณะ (2005) เปรียบเทียบการย่อยสลายสารประกอบ PAHs (ฟลูออรีน ฟีนแอนทรินและไพรีน) ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร ในตัวอย่างตะกอนดินป่าชายเลนโดยดำเนินการทดลองต่างกันคือการทดลองชุดแรกเป็นการบำบัดโดยธรรมชาติ ชุดที่สองเติมสารอาหารลงไป ส่วนชุดการทดลองที่สามเติมกลุ่มจุลินทรีย์ที่แยกมาจากตะกอนดินป่าชายเลนลงไป จากการทดลองพบว่า การบำบัดโดยธรรมชาติ (natural attenuation) ภายในสัปดาห์ที่ 4 ฟลูออรีนและฟีนแอนทรินถูกย่อยสลายไปมากกว่า 99 เปอร์เซ็นต์ ส่วนไพรีนถูกย่อยไปเพียง 30 เปอร์เซ็นต์ ของความเข้มข้นเริ่มต้นเท่านั้น ในขณะที่การทดลองที่เติมสารอาหารลงไป พบว่าสารประกอบ PAHs

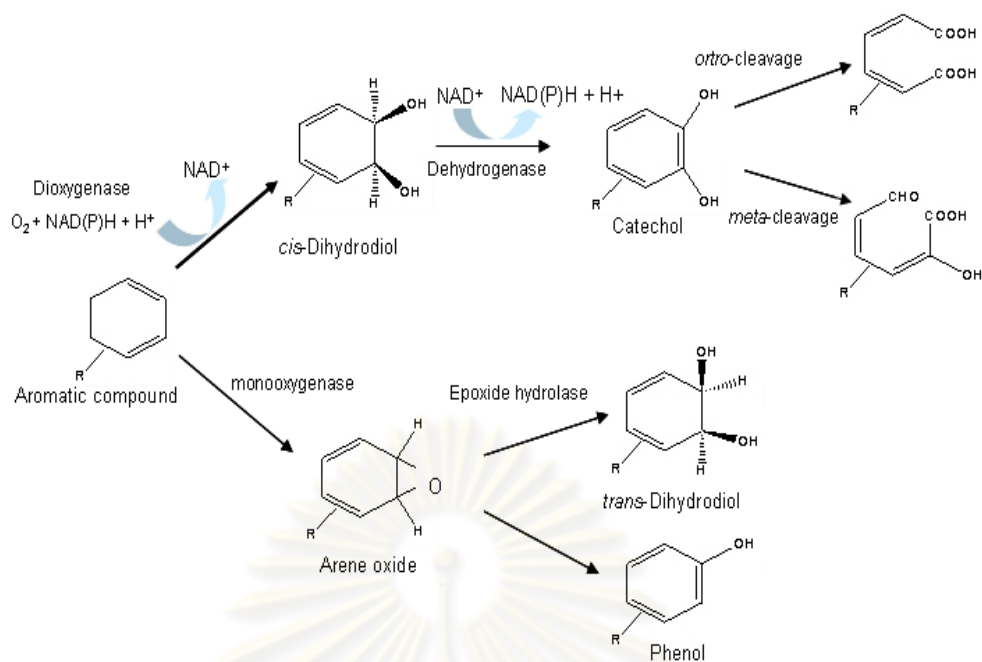
ทั้ง 3 ชนิดถูกย่อยสลายไปมากกว่า 99 เปอร์เซ็นต์ แสดงให้เห็นว่าการเติมสารอาหารช่วยส่งเสริมการย่อยสลายไพรีนในขณะที่การเติมกลุ่มจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายประกอบ PAHs ที่แยกมาจากตะกอนดินป่าชายเลนนั้นพบว่าผลที่ได้ไม่แตกต่างจากการบำบัดโดยจุลินทรีย์ที่มีอยู่ตามธรรมชาติ (natural attenuation)

2.2.2 วิธีที่สองคือ Bioaugmentation เป็นการเติมจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการเปลี่ยนแปลงโครงสร้าง (biotransformation) หรือสามารถย่อยสลายสารพิษ (biodegradation) หรือเติมจุลินทรีย์ที่ได้รับการปรับปรุงสายพันธุ์โดยใช้เทคโนโลยีทางพันธุวิศวกรรมลงในบริเวณที่มีการปนเปื้อนของสารพิษเพื่อส่งเสริมให้เกิดการย่อยสลายสารปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อมเพื่อกระตุ้นให้เกิดกระบวนการย่อยสลาย (Watanabe, 2001)

Coppotelli และคณะ (2006) ศึกษาผลของการเติมเชื้อ *Sphingomonas paucimobilis* สายพันธุ์ 20006FA ในดินที่ปนเปื้อนพีแนทรีน ความเข้มข้นสุดท้าย 200 ppm พบว่าในดินที่เติมเชื้อมีการลดลงของพีแนทรีนมากกว่าดินที่ไม่เติมเชื้อ โดยที่เติมเชื้อ *Sphingomonas paucimobilis* สายพันธุ์ 20006FA สามารถย่อยสลายพีแนทรีนได้ถึง 98 เปอร์เซ็นต์ ของความเข้มข้นเริ่มต้น ภายในระยะเวลา 60 วัน

### 2.3 กระบวนการย่อยสลายสารประกอบ PAHs ด้วยวิธีทางชีวภาพโดยแบคทีเรีย

กระบวนการย่อยสลาย PAHs ด้วยวิธีทางชีวภาพโดยแบคทีเรีย เริ่มต้นจากการเร่งปฏิกิริยาด้วยระบบเอนไซม์ไดออกซิจีเนส (multicomponent dioxygenase) โดยการเติมหมู่ออกซิเจนแกว่งอะโรมาติก เอนไซม์ไดออกซิจีเนสประกอบด้วยสามส่วนประกอบคือเฟอร์รีดอกซิน (ferredoxin) เฟอร์รีดอกซินรีดักเทส (ferredoxin reductase) และเทอร์มินัลไดออกซิจีเนส (terminal dioxygenase) ซึ่งประกอบด้วยสองหน่วยย่อยคือหน่วยย่อยแอลฟาและหน่วยย่อยบีตา โดยเฟอร์รีดอกซินรีดักเทสและเฟอร์รีดอกซินทำหน้าที่ส่งผ่านอิเล็กตรอนจาก NADH ส่งไปยังเทอร์มินัลไดออกซิจีเนสซึ่งเป็นส่วนที่จับกับสับสเตรทและเกิดการเร่งปฏิกิริยาการเปลี่ยนรูปได้เป็นซิส-ไดไฮโดรไดออล (cis-dihydrodiol) จากนั้นเร่งปฏิกิริยาการเปลี่ยนรูปต่อโดยซิส-ไดไฮโดรไดออลดีไฮโดรจีเนส (cis-dihydrodiol dehydrogenase) และผ่านการเปลี่ยนรูปอีกหลายขั้นตอนจนได้สารตั้งต้นที่คล้ายแคทีคอล (catechol) ซึ่งจะถูกรับย่อยสลายด้วยเอ็กซ์ตราไดออลไดออกซิจีเนส (extradiol dioxygenase) ผ่านวิถีการแตกวงอะโรมาติกแบบ เมตา ในแบคทีเรียส่วนใหญ่หรือย่อยสลายด้วยอินตราไดออลไดออกซิจีเนส (intradiol dioxygenase) ผ่านวิถีการแตกวงอะโรมาติกแบบ ออโธ เข้าสู่วัฏจักรกรดไตรคาร์บอกซิลิกต่อไป (Habe และ Omori, 2003) ดังแสดงในรูป 2.4

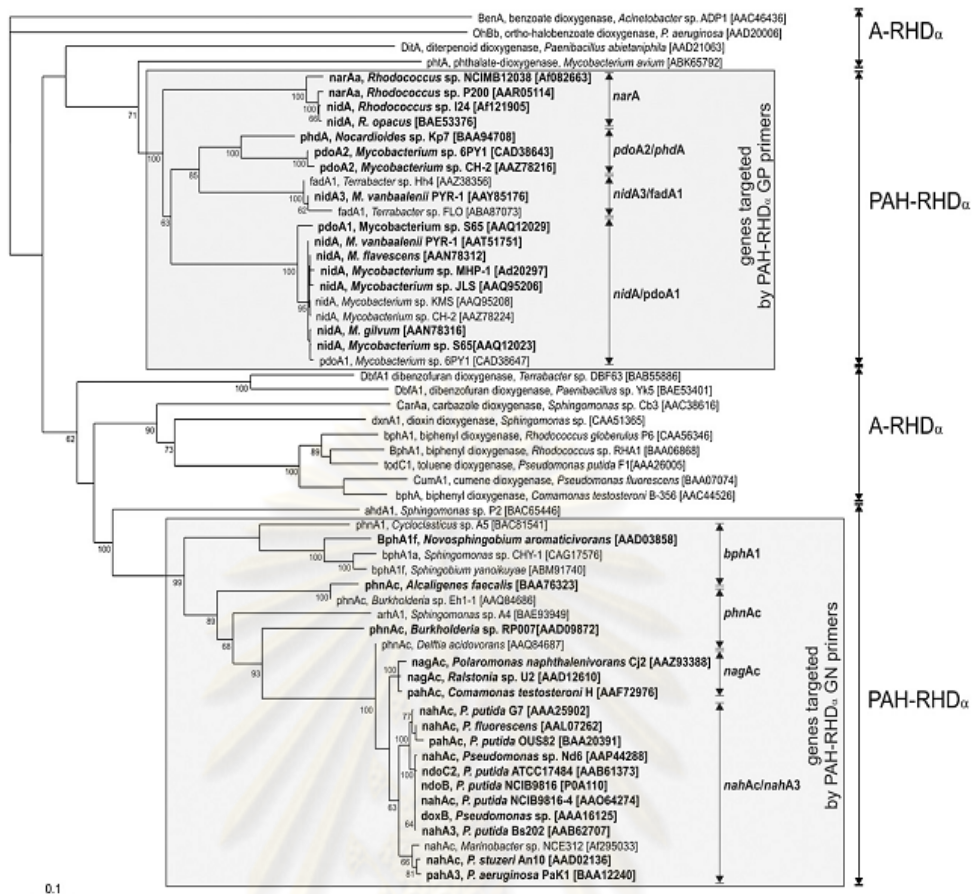


รูปที่ 2.4 วิธีการย่อยสลายสารประกอบ PAHs ทั่วไปโดยจุลินทรีย์แบบใช้ออกซิเจน (Cerniglia, 1992, Haritash และ Kaushik, 2009)

## 2.4 ยีนและเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายสารประกอบ PAHs

ยีนไดออกซิจีเนสสามารถแบ่งออกเป็นสองกลุ่มคือกลุ่มแรกยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายสารประกอบ PAHs ในแบคทีเรียแกรมลบ กลุ่มที่สองยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายสารประกอบ PAHs ในแบคทีเรียแกรมบวก (Cebren และคณะ, 2008) ซึ่งทั้งสองกลุ่มมีความแตกต่างในการเรียงตัวของยีนทำให้สามารถแบ่งออกเป็นสองกลุ่มได้ดังแสดงในรูปที่ 2.5

ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

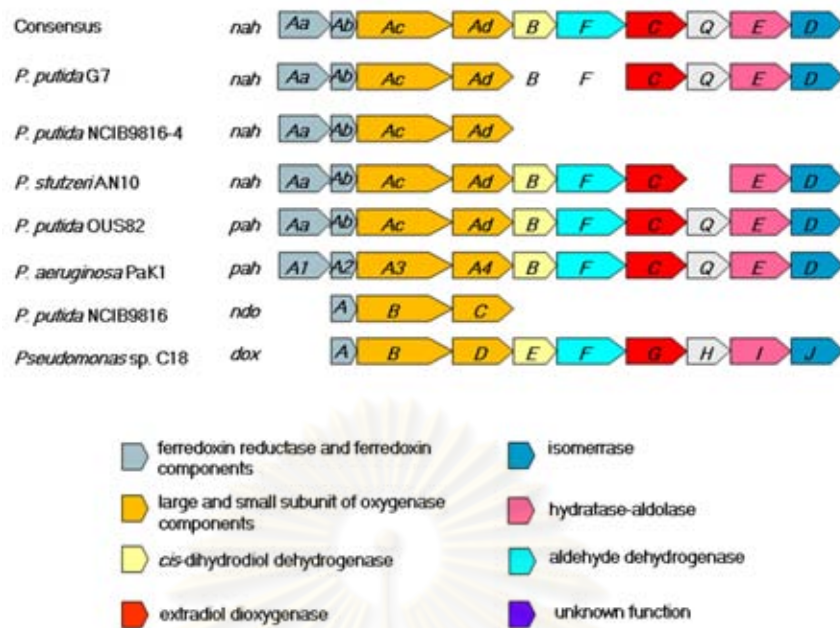


รูปที่ 2.5 phylogenetic tree ของหน่วยย่อยแอลฟาของเอนไซม์ออกซิจีเนสของริงไฮดรอกซีเลททิงไดออกซิจีเนส ในแบคทีเรียแกรมลบและแบคทีเรียแกรมบวก (Cebron และคณะ, 2008)

### 2.4.1 ยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายสารประกอบ PAHs ในแบคทีเรียแกรมลบ

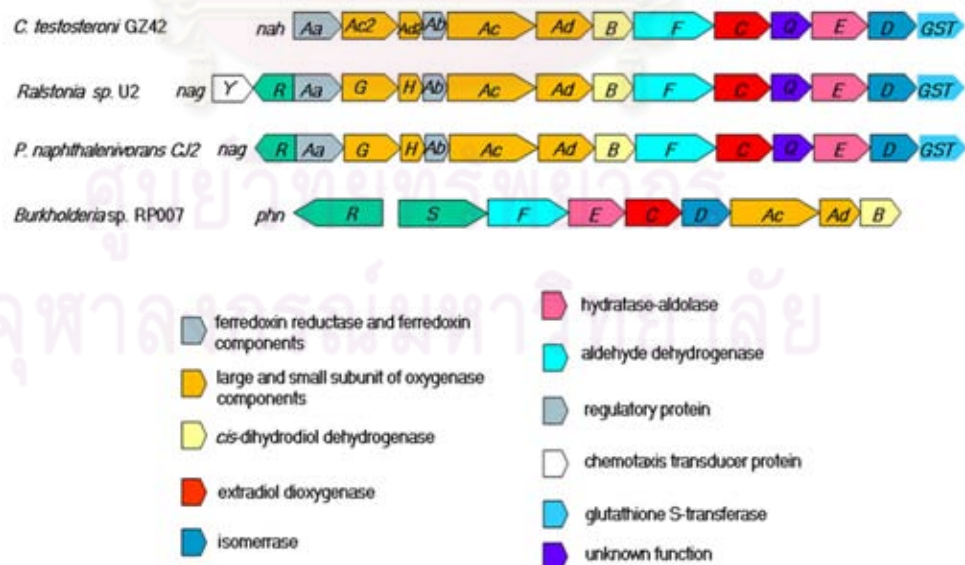
รายงานการศึกษา *Pseudomonas* sp. สายพันธุ์อื่นที่มีความสามารถในการย่อยสลายสารประกอบ PAHs ที่มีมวลโมเลกุลต่ำ เช่น แนพทาลินและพีแนนทรีน พบยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายสารประกอบ PAHs ที่มีการเรียงตัวคล้ายกับยีน *nah* ของ *P. putida* สายพันธุ์ G7 มากกว่า 90เปอร์เซ็นต์ (Simon และคณะ, 1993) จึงเรียกยีนกลุ่มนี้ว่ายีนกลุ่มคล้าย *nah* (*nah*-like) ตัวอย่างยีนในกลุ่มนี้ได้แก่ ยีน *ndo* ของ *P. putida* สายพันธุ์ NCIB9816 (Kurkela และคณะ, 1988) ยีน *dox* ของ *Pseudomonas* สายพันธุ์ C18 (Denome และคณะ, 1993) ยีน *pah* ของ *P. aeruginosa* สายพันธุ์ PaK1 (Takizawa และคณะ, 1999) ยีน *pah* ของ *P. putida* สายพันธุ์ OUS82 (Kiyohara และคณะ, 1994) ยีน *nah* ของ *P. putida* สายพันธุ์ NCIB9816-4 (Simon และคณะ, 1993) ยีน *nah* ของ *P. stutzeri* สายพันธุ์ AN10 (Bosch และคณะ, 1999) และยีน *phn* ของ *Burkholderia* sp.สายพันธุ์ RP007 (Laurie และคณะ, 1999) เป็นต้น ตัวอย่างการเรียงตัวของยีนกลุ่มคล้าย *nah* ในวิถีนของการย่อยสลายแนพทาลิน ดังแสดงในรูปที่ 2.6





รูปที่ 2.6 การเรียงของยีนในกลุ่มคลัสเตอร์ *nah* ในวิถีบนของการย่อยสลายเนฟธาซีนของ *Pseudomonas* สายพันธุ์ต่างๆ (Peng และคณะ, 2008)

นอกจากแบคทีเรียในสกุล *Pseudomonas* แล้ว ยังพบว่ามีแบคทีเรียในสกุลอื่นที่สามารถย่อยสลายสารประกอบ PAHs แต่พบว่า การเรียงตัวและลำดับเบสของยีนมีความแตกต่างไปจากยีนในกลุ่มคลัสเตอร์ *nah* ดังแสดงในรูป 2.7



รูปที่ 2.7 กลุ่มยีนที่มีการเรียงตัวแตกต่างจากกลุ่มคลัสเตอร์ *nah* (Peng และคณะ, 2008)



Goyal และ Zylstra (1996) รายงานเกี่ยวกับยีน *nah* ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายพีแนนนทรีนและแนพธาดีนใน *Comamonas testosteroni* พบว่ายีน *nah* จากสายพันธุ์ GZ42 มีความแตกต่างจากยีน *nah* ของ *P. putida* สายพันธุ์ G7 ดังแสดงในรูป 2.7

Laurie และ Lloyd (1999) ศึกษาเกี่ยวกับยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายพีแนนนทรีนและแนพธาดีนใน *Burkholderia* sp. สายพันธุ์ RP007 พบยีน *phnR* และ *phnS* ซึ่งประมวลรหัสโปรตีนควบคุม และพบยีนประมวลรหัสแอลดีไฮด์ดีไฮโดรจีเนส (*phnF*) ไฮดรอกซี-แอลโดเลส (*phnE*) ไดออกซีจีเนส (*phnC*) ไอโซเมอเรส (*phnD*) ISP หน่วยย่อยแอลฟา และบีตา (*phnAcAd*) และไดไฮโดรไดออกซีดีไฮโดรจีเนส (*phnB*) ซึ่งมีการเรียงตัวเป็น *phnFECDACAdB* ต่างจาก *nahAaAbAcAdBFCQED* ของสายพันธุ์ G7 ดังแสดงในรูป 2.7

Zhou และคณะ (2001) รายงานว่า *Ralstonia* sp. สายพันธุ์ U2 ซึ่งสามารถย่อยสลายแนพธาดีนได้ มียีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายแนพธาดีนผ่านไประจุนทรีน โดยพบยีนประมวลรหัสเพอร์ริดอกซินรีดักเทส (*nagAa*) เพอร์ริดอกซิน (*nagAb*) ISP หน่วยย่อยแอลฟา และหน่วยย่อยบีตา (*nagAcAd*) ซิส-ไดไฮโดรไดออกซีดีไฮโดรจีเนส (*nagB*) และ แอลดีไฮด์ดีไฮโดรจีเนส (*nagF*) ซึ่งมีการจัดเรียงตัวเหมือนกับยีน *nah* ในพลาสมิด NAH7 แต่ระหว่างยีน *nagAa* และ *nagAb* มียีน *nagGH* ซึ่งประมวลรหัสหน่วยย่อยของซาลิไซเลต 5-ไฮดรอกซีเลสแทรกอยู่ โดยมีการเรียงตัวของยีนนี้ *nagAaGHAbAcAdBFCQED* และพบ *nagJKLMN* ซึ่งประมวลรหัสยีนที่ย่อยสลายกรดเจนนทรีนที่ตำแหน่ง downstream ของยีน *nagD* ดังแสดงในรูป 2.7

Singleton และคณะ (2009) ศึกษาลักษณะการย่อยสลายพีแนนนทรีนจาก *Acidovorax* sp. สายพันธุ์ NA3 โดยสามารถใช้พีแนนนทรีนเป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงาน ทำ southern hybridization โดยใช้ยีน *nahAc* ของ *Pseudomonas putida* สายพันธุ์ G7 เป็นตัวติดตาม พบว่าดีเอ็นเอขนาดประมาณ 800 bp มีความใกล้เคียงกับยีน *phnC* ของ *Alcaligenes faecalis* สายพันธุ์ AFK2 นอกจากนี้ยังมียีน *phnAcd* ที่ประมวลรหัสรีดักทีฟไฮดรอกซีเลทิงไดออกซีจีเนส ขนาดใหญ่และขนาดเล็ก ยีน *phnB* ประมวลรหัสไดไฮโดรไดออกซีดีไฮโดรจีเนส (dihydrodiol dehydrogenase) และยีน *phnC* ประมวลรหัส 3,4-ไดไฮดรอกซีพีแนนนทรีนไดออกซีจีเนส (3,4-dihydroxyphenanthrene dioxygenase)

Klankeo และคณะ (2009) ศึกษาจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการย่อยสลายไพรีนจากตัวอย่างดินโดยสร้างระบบนิเวศจำลองดินที่มีการเติมไพรีนลงไปในระบบ แบคทีเรียใหม่ 2 สายพันธุ์ถูกแยกได้จากระบบนิเวศจำลองดิน คือ สายพันธุ์ KOTLB และ RN402 พบว่ามีความสามารถในการใช้ไพรีนเป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงาน KOTLB และ RN402 สามารถย่อยไพรีน 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ได้ 99 เปอร์เซ็นต์ ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวภายในเวลา 16 วัน นอกจากนี้ไพรีนยังพบว่าทั้ง 2 สายพันธุ์สามารถย่อยพีแนนนทรีน 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ได้ 99

เปอร์เซ็นต์ ภายในเวลา 8 วัน ย่อยฟลูออแรนทริน 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ได้ 55 เปอร์เซ็นต์ ภายในเวลา 24 วัน เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rDNA ไปวิเคราะห์แบบแผนภูมิพบว่าสายพันธุ์ KOTLB และ RN402 คือ *Diaphorobacter* sp. และ *Pseudoxanthomonas* sp. ตามลำดับ จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าทั้ง 2 กลุ่มนี้ไม่มีความเกี่ยวข้องกับการย่อยสลายไพรีน จากการเพิ่มจำนวนขึ้นดีเอ็นเอแบบปฏิกิริยาถูกโซ่พอลิเมอเรสโดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับ *nidA* พบการแสดงออกของยีนไดออกซีจีเนสทั้ง 2 สายพันธุ์ พบผลิตภัณฑ์ยีน *nidA* มีความเหมือนกับโปรตีน NidA 99-100 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเป็นยีนที่ประมวลรหัสหน่วยย่อยของเทอร์มินัลไดออกซีจีเนส สำหรับการย่อยสลายไพรีนของ *Mycobacterium* spp. นอกจากนี้ผลของปฏิกิริยาถูกโซ่พอลิเมอเรสแสดงให้เห็นว่ายีน *nidA* มีตำแหน่งอยู่บน megaplasmid ซึ่งในรายงานนี้จึงเป็นรายงานแรกที่แสดงการย่อยสลายไพรีนจากแบคทีเรียแกรมลบที่พบยีน *nidA*

นอกจากนี้แบคทีเรียหลายสายพันธุ์ในสกุล *Sphingomonas* พบการเรียงตัวและลำดับเบสของยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายมีความแตกต่างไปจากแบคทีเรียในสกุลที่กล่าวในข้างต้น และพบว่ามีความสามารถในการย่อยสลายสารประกอบ PAHs ได้เช่นกัน

Romine และคณะ (1999) รายงานเกี่ยวกับ *Sphingomonas aromaticivorans* สายพันธุ์ F199 (หลังจากนั้นได้ถูกเปลี่ยนเป็น *Novosphingobium aromaticivorans* สายพันธุ์ F199 (Takeuchi และคณะ, 2001)) โดยพบว่ามียีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายสารประกอบ PAHs ได้แก่ แนพธาซีน และพีแนนทริน รวมถึงไบฟีนิล บนพลาสมิดขนาด 184 กิโลเบส มียีนที่ประมวลรหัสเทอร์มินัลไดออกซีจีเนสทั้ง 6 ชุด ได้แก่ ยีน *bphA1[a-e]* *bphA2[a-e]* และ *bphA1fA2f* เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายสารประกอบอะโรมาติกหลายชนิด ได้แก่ ไบฟีนิล แนพธาซีน เมตา-ไซลีน และพารา-ครีซอล ซึ่งยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายแนพธาซีน ได้แก่ ยีน *nahE nahD* และ *nahF* โดยมีการกระจายตัวอยู่ห่างกันและถูกค้นด้วยยีนในวิธีการย่อยสลายสารอื่น แต่เมื่อเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของยีนทั้งสามกับลำดับกรดอะมิโนของยีนกลุ่มคล้าย *nah* พบว่ายีนดังกล่าวมีเปอร์เซ็นต์ความเหมือนค่อนข้างต่ำ และยังพบยีนและการเรียงตัวของยีนลักษณะดังกล่าวใน *Sphingobium yanoikuyae* สายพันธุ์ B1 (ยีน *bphA1[a-e]* และ *bphA2[a-e]*) และ *Sphingobium* sp. สายพันธุ์ P2 (ยีน *ahdA1[a-e]* และ *ahdA2[a-e]*) (Pinyakong และคณะ, 2003)

Pinyakong และคณะ (2004) ได้ศึกษา *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ A4 เป็นสายพันธุ์ที่ย่อยสลายอะซีแนพทีนและอะซีแนพทีลินได้แต่ไม่สามารถย่อยสลายสารประกอบ PAHs ชนิดอื่นได้ พบว่าแบคทีเรียสายพันธุ์นี้มียีน *arhA1* และ *arhA2* ที่ประมวลรหัสหน่วยย่อยแอลฟาและบีตาของเทอร์มินัลไดออกซีจีเนส ตามลำดับ โดยมีลำดับของกรดอะมิโนเหมือนกับโปรตีน PhnAc และ PhnAd ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายพีแนนทริน ใน *Burkholderia* sp. สายพันธุ์ RP007 56

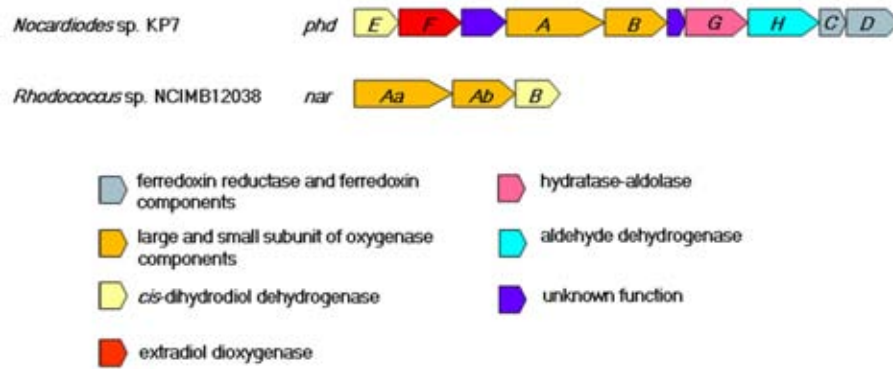
เปอร์เซ็นต์ และ 45เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ต่อมาในงานวิจัยของ Kouzuma และคณะ (2006) รายงานว่า พบยีนเพอร์รีดอกซิน (*arhA3*) เพอร์รีดอกซิน รีดักเทส(*arhA4*) และยีนควบคุม (*arhR*) ของวิถีการย่อยสลายอะซีแนพรีน ซึ่งอยู่ห่างออกไปทาง upstream ของยีนที่ประมวลรหัสอะซีแนพรีนไดออกซิจีเนส

#### 2.4.2 ยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายสารประกอบ PAHs ในแบคทีเรียแกรมบวก

การศึกษาในแบคทีเรียแกรมบวกซึ่งพบว่าการเรียงตัวและลำดับเบสของยีนมีความแตกต่างไปจากแบคทีเรียในกลุ่มแกรมลบที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายสารประกอบ PAHs

Larkin และคณะ (1999) และ Kulakov และคณะ (2005) รายงานถึงยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายแนพธาดีนของแบคทีเรียแกรมบวกพบว่า *Rhodococcus* sp. สายพันธุ์ NCIMB12038 มียีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายแนพธาดีนทางด้าน เมตา กระจายอยู่บน พลาสมิด p2SL1 โดยพบยีน *narAa narAb* และ *narB* ประมวลรหัสหน่วยย่อยแอลฟาและบีตาของแนพธาดีนไดออกซิจีเนส และ ซิล-แนพธาดีนไดไฮโดรไดออกซิไดไฮโดรจีเนส ตามลำดับ พบว่ายีนทั้งสามมีการถอดรหัสร่วมกันเพื่อตอบสนองต่อแนพธาดีนเท่านั้น เมื่อเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของยีน *narAa* และ *narAb* กับฐานข้อมูล EMBL และ GenBank พบว่ายีน *narAa* และ *narAb* มีความเหมือนกับยีนประมวลรหัสหน่วยย่อยแอลฟาและบีตาของริงไฮดรอกซิเลทิงไดออกซิจีเนส (ring-hydroxylating dioxygenase) ของ *Pseudomonas* sp. เพียง 31 เปอร์เซ็นต์ และ 39 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และไม่พบยีนประมวลรหัสเพอร์รีดอกซินและเพอร์รีดอกซินรีดักเทส นอกจากนี้ยังพบยีน *narR1* และ *narR2* ประมวลรหัสโปรตีนที่ควบคุมการทำงานของยีนกลุ่มนี้ ด้วยการจัดตัวของยีนดังแสดงในรูป 2.8

Saito และคณะ (2000) รายงานว่า *Nocardioides* sp. สายพันธุ์ KP7 มียีน *phd* ซึ่งประมวลรหัสเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายฟีนานทรินผ่านทางพธาลेट (phthalate) โดย *phd* ประกอบด้วยยีนสองกลุ่มกลุ่มแรกประกอบด้วย *phdEFABGHCD* ประมวลรหัสเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ในการย่อยสลายฟีนานทรินไปเป็น 1-ไฮดรอกซี-2-แนพธาโนเอต (1-hydroxy-2-naphthoate) และ *phdIJK* ประมวลรหัสยีนที่ทำหน้าที่ในการย่อยสลาย 1-ไฮดรอกซี-2-แนพธาโนเอต ไปเป็นพธาลेट การเรียงตัวของยีนดังแสดงในรูป 2.8



รูปที่ 2.8 การเรียงตัวของกลุ่มยีนในแบคทีเรียแกรมบวก (Saito และคณะ, 2000; Larkin และคณะ, 1999; Kulakov และคณะ, 2000)

Khan และคณะ (2001) ศึกษา *Mycobacterium vanbaalenii* สายพันธุ์ PYR-1 โดยใช้เทคนิคทางโปรตีโอม (Proteomic) ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่สามารถย่อยสลายไพรีน ฟลูออแรนทรีน ฟีนแอนทรีน แอนทราซีน เบนโซ[เอ]ไพรีน โดยเลี้ยง *Mycobacterium vanbaalenii* สายพันธุ์ PYR-1 ในอาหารที่มีไพรีน หรือฟีนแอนทรีนหรือไดเบนโซไทโอพีน พบว่า *Mycobacterium vanbaalenii* สายพันธุ์ PYR-1 มียีน *nidA* ประมวลรหัสหน่วยย่อยแอลฟาของไดออกซีจีเนสในส่วนของ ISP ยีน *nidB* ประมวลรหัสหน่วยย่อยบีตาของไดออกซีจีเนสในส่วนของ ISP และยีน *nidD* ประมวลรหัสอัลดีไฮด์ไฮโดรจีเนส และพบอีกว่าลำดับนิวคลีโอไทด์และการจัดเรียงตัวของยีนแตกต่างจากยีนในกลุ่มคล้าย *nah* โดยมีการเรียงตัวเป็น *nidDBA* และลำดับนิวคลีโอไทด์มีความแตกต่างจาก *nah*-like มากกว่า 60 เปอร์เซ็นต์ ดังแสดงในรูป 2.9



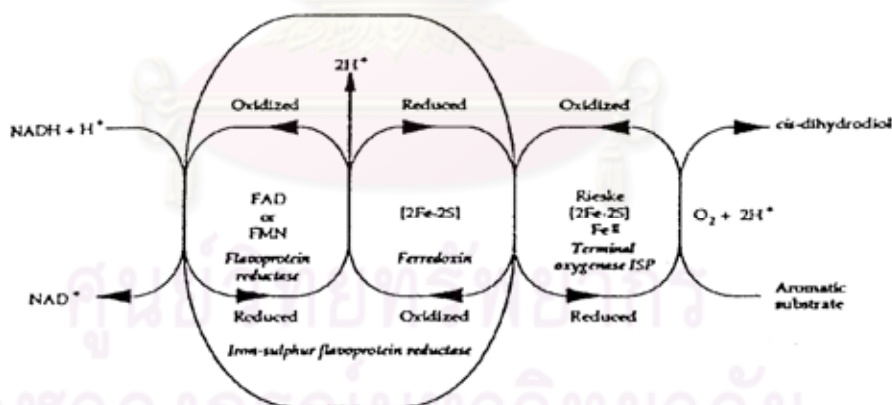
รูปที่ 2.9 การเรียงตัวของยีนที่เกี่ยวข้องในการย่อยสลายไพรีนของ *Mycobacterium vanbaalenii* สายพันธุ์ PYR-1 (Kim และคณะ, 2007)



## 2.5 โครงสร้างของริงไฮดรอกซีเลททิงไดออกซิจีเนส

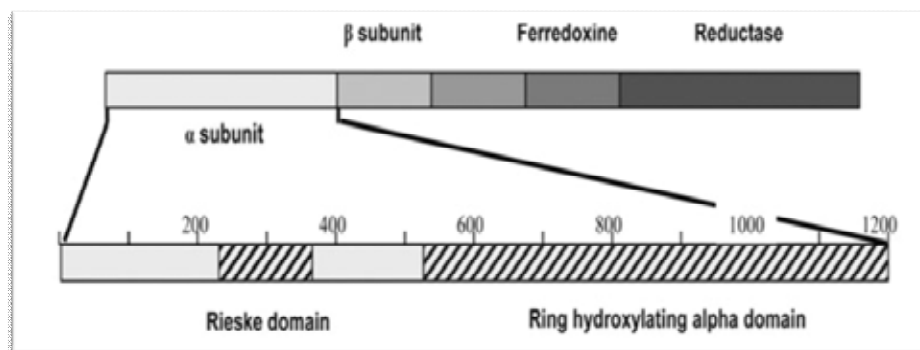
รายงานแรกในการศึกษาระบบการทำงานของริงไฮดรอกซีเลททิงไดออกซิจีเนสกล่าวถึงไดออกซิจีเนสของ *Pseudomonas putida* ที่สามารถเร่งปฏิกิริยาออกซิไดส์เบนซีนไปเป็น ซิส-1,2-ไดไฮดรอกซีไซโคลเฮกซะ-3,5-ไดอีน (cis-1,2-dihydroxy-cyclohexa-3,5-diene) จึงเริ่มมีการศึกษาไดออกซิจีเนสจากจุลินทรีย์ชนิดอื่น ซึ่งไดออกซิจีเนสจัดเป็น non-heme iron dioxygenase ซึ่งสามารถออกซิไดส์สารประกอบอะโรมาติกได้เป็น ซิส-ไดไฮโดรไดออล (cis-dihydrodiol)

อะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนไดออกซิจีเนส เป็นไดออกซิจีเนสที่สำคัญในการย่อยสลายสารประกอบ PAHs ซึ่งถูกจัดอยู่ในกลุ่มอะโรมาติกริงไฮดรอกซีเลททิงไดออกซิจีเนส (aromatic ring-hydroxylating dioxygenase) (Butler และ Mason, 1997) โดยที่สมาชิกในกลุ่มนี้มีหนึ่งหรือสองโปรตีนที่ทำหน้าที่ขนส่งอิเล็กตรอนคือ iron-sulfur flavoprotein หรือ flavoprotein และ iron-sulfur ferredoxin ซึ่งจะส่งผ่านอิเล็กตรอนไปยังเทอร์มินัลออกซิจีเนสก่อนหน้าออกซิจีเนส ดังแสดงในรูปที่ 2.10 และส่วนที่มีความสำคัญในกลุ่มอะโรมาติกริงไฮดรอกซีเลททิงไดออกซิจีเนสคือส่วนของหน่วยย่อยแอลฟาซึ่งเป็นบริเวณอนุรักษ์ประกอบไปด้วย 2 โดเมน ได้แก่ Rieske โดเมนและริงไฮดรอกซีเลททิงไดออกซิจีเนสโดเมน ดังแสดงในรูปที่ 2.11



รูปที่ 2.10 การจัดเรียงของระบบการทำงานร่วมกันของริงไฮดรอกซีเลททิงไดออกซิจีเนส (Butler และ Mason, 1997)





รูปที่ 2.11 การจัดเรียงของกลุ่มอะโรมาติกริงไฮดรอกซีเลททิงไดออกซิจีเนสคือส่วนของหน่วยย่อยแอลฟาซึ่งเป็นบริเวณอนุรักษ์ประกอบไปด้วย 2 โดเมน ได้แก่ Rieske โดเมนและริงไฮดรอกซีเลททิงไดออกซิจีเนสโดเมน (Bordenave และคณะ, 2008 )

Kauppi และคณะ (1998) รายงานถึงโครงสร้างของแนพธาซีน 1,2-ไดออกซิจีเนส (NDO) ต่อมาใช้เป็นต้นแบบในการศึกษาระบบเอนไซม์ที่อยู่ในกลุ่มนี้ โครงสร้างของ NDO มีลักษณะเป็น  $\alpha_3\beta_3$  hexamer โดยการทำงานของหน่วยย่อยแอลฟาจะควบคุมความจำเพาะของเอนไซม์ต่อสับสเตรท ซึ่งในแต่ละหน่วยย่อยแอลฟาประกอบไปด้วย 2 โดเมน ได้แก่ Rieske โดเมน และ catalytic โดเมน ในส่วนของ Rieske โดเมน มี [2Fe-2S] โดย  $Fe^{3+}$  อะตอมแรกจะเกิดพันธะซัลไฟด์กับกรดอะมิโน Cys-81 และ Cys-101 ในขณะที่  $Fe^{3+}$  อีกอะตอมจะเกิดพันธะซัลไฟด์กับกรดอะมิโน His-83 และ His-104 ดังแสดงในรูปที่ 2.12 และในส่วนของ catalytic โดเมน มี  $Fe^{3+}$  ที่บริเวณเร่งปฏิกิริยาจะเกิดพันธะไฮโดรเจนกับกรดอะมิโน His-208 His-213 Asp-326 และโมเลกุลของน้ำ ดังแสดงในรูปที่ 2.13 สำหรับการดำเนินงานของหน่วยย่อยบีตาไม่เกี่ยวข้องกับการเร่งปฏิกิริยาหรือความจำเพาะต่อสับสเตรท และเมื่อทำให้หน่วยย่อยแอลฟาบริสุทธิ์ไม่พบแอกติวิตี และสามารถพบแอกติวิตีได้เมื่อรวมหน่วยย่อยแอลฟาเข้าหน่วยย่อยบีตา (Jiang และคณะ, 1999) ซึ่งหน้าที่หลักของหน่วยย่อยบีตาที่มีรายงานคือเป็นโครงสร้างของโปรตีน

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

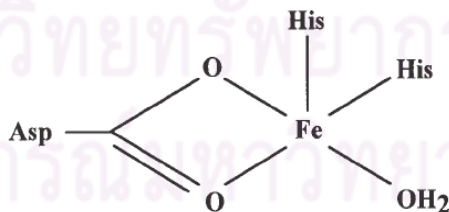
		81	83		101	104			
<b>9816-4 NahAc</b>	<b>FLNV</b>	<b>C</b>	<b>R</b>	<b>H</b>	<b>RGKTLVSVEAGNAKGFV</b>	<b>C</b>	<b>SY</b>	<b>H</b>	<b>GWGFGSNGELQS</b>
DNT DntAc	FLNV	C	R	H	RGKTIIVDAEAGNAKGFV	C	GY	H	GWGYGSNGELQS
JS42 NtdAc	FLNV	C	R	H	RGKTLVHTEAGNAKGFV	C	GY	H	GWGYGSNGELQS
LB400 BphA	FLNQ	C	R	H	RGMRICRSDAGNAKAFT	C	SY	H	GWAYDIAGKLVN
KF707 BphA1	FLNQ	C	R	H	RGMRICRSDAGNAKAFT	C	SY	H	GWAYDIAGKLVN
KKS102 BphA1	FLNQ	C	R	H	RGMRICRSDAGNAKAFT	C	TY	H	GWAYDIAGNLVN
PpF1 TodC1	FLNQ	C	R	H	RGMRICRADAGNAKAFT	C	SY	H	GWAYDTAGNLVN
P51 TcbAa	FLNQ	C	R	H	RGMRICRSDAGNAKAFT	C	SY	H	GWAYDTAGNLVN

**Consensus sequence CxH-x15-17-CxxH**



รูปที่ 2.12 Rieske iron-sulfur center ซึ่งเชื่อมต่อกับบริเวณอนุวัฏจักร Cysteines และ Histidines (Parales, 2003)

		208	213		362			
<b>9816-4 NahAc</b>	<b>ENFVGDAY</b>	<b>H</b>	<b>VGWT.</b>	<b>H</b>	<b>ASSLRSG</b>	<b>RTFGPAGFWESD</b>	<b>D</b>	<b>NDNMETAS</b>
DNT DntAc	ENFVGDIY	H	IGWT.	H	ASILRAG	RSTGPAGYWESD	D	NDNM.VLS
JS42 NtdAc	ENFVGDIY	H	VGWT.	H	AAALRAG	RSIGPAGFWESD	D	NDNMETLS
KKS102 BphA1	EQFCSDMY	H	AGTMS	H	LSGVLSS	FTFNQGGTYEQD	D	GENWVEVQ
KF707 BphA1	EQFCSDMY	H	AGTMS	H	LSGILAG	RTFSAGGVFEQD	D	GENWVEIQ
LB400 BphA	EQFCSDMY	H	AGTTT	H	LSGILAG	RNFSAGGVFEQD	D	GENWVEIQ
F1 TodC1	EQFCSDMY	H	AGTTS	H	LSGILAG	RSFSAGGVFEQD	D	GENWVEIQ
P51 TcbAa	EQFCSDAY	H	AGTTS	H	LSGILAG	RNFSAGGVFEQD	D	GENWVEIQ



รูปที่ 2.13 การเชื่อมต่อระหว่างอะตอมเหล็กกับ His-208 His-213 Asp-326 และโมเลกุลน้ำ (Parales, 2003)

### 2.5.1 การจัดจำแนกกลุ่มไดออกซิจีเนส

ในปี 2008 Kweon และคณะ ได้จัดจำแนกกลุ่มไดออกซิจีเนสโดยใช้ข้อมูลของลำดับกรดอะมิโนที่บริเวณเร่งปฏิกิริยาของหน่วยย่อยแอลฟาและชนิดของสารตั้งต้นโดยจำแนกได้ 5 กลุ่ม ดังแสดงในตารางที่ 2.3 และรูปที่ 2.12

Group I แสดงส่วนประกอบของริงไฮดรอกซีเลทิงไดออกซิจีเนสซึ่งประกอบด้วย 2 ส่วน คือ FNR<sub>C</sub>-type รีดักเทส และ ออกซิจีเนสซึ่งอาจจะเป็นเฮเทอโรโอลิโกเมอร์ (ชนิด  $\alpha\beta$ ) หรือโฮโมโอลิโกเมอร์ (ชนิด  $\alpha$ ) ซึ่งเอนไซม์กลุ่มนี้จะสามารถเร่งปฏิกิริยาได้ทั้งโมโนออกซิจีเนสและไดออกซิจีเนส

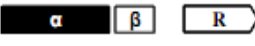


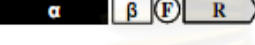

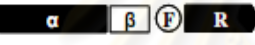

Group II แสดงส่วนประกอบของริงไฮดรอกซีเลทิงไดออกซิจีเนสซึ่งประกอบด้วย 2 ส่วน คือ FNR<sub>N</sub>-type รีดักเทส และ ออกซิจีเนส ซึ่งแสดงเป็นเอนไซม์เบนโซเอต 1,2 ไดออกซิจีเนส เป็นเอนไซม์ที่ใช้ออกซิไดส์อะโรมาติกแอซิด (oxidize aromatic acids) เป็นสารตั้งต้น

Group III แสดงส่วนประกอบของริงไฮดรอกซีเลทิงไดออกซิจีเนสซึ่งประกอบด้วย 3 ส่วน คือ FNR<sub>N</sub>-type รีดักเทส, ออกซิจีเนสและ [2Fe-2S]-type เพอร์รีดอกซิน เป็นเอนไซม์แนพทาลีนคาร์บาไซล 1,9a ไดออกซิจีเนส เป็นไดออกซิจีเนสในแบคทีเรียแกรมลบที่ใช้ในการย่อยสลายแนพทาลีน ฟีนานทรีน ไนโตรเบนซีน และไนโตรโทลูอีน รวมถึง PAH dioxygenase ด้วย

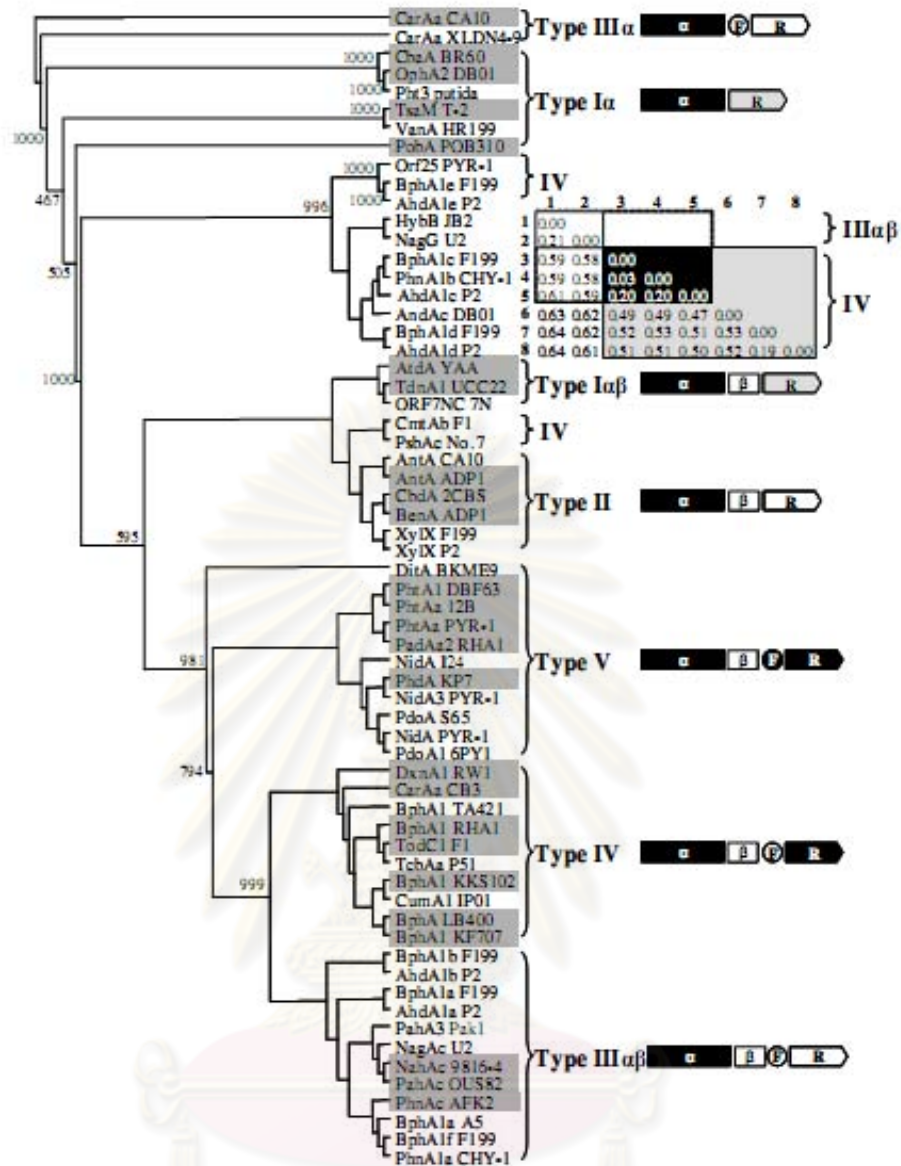
Group IV แสดงส่วนประกอบของริงไฮดรอกซีเลทิงไดออกซิจีเนสซึ่งประกอบด้วย 3 ส่วน คือ GP-type รีดักเทส, ออกซิจีเนสและ [2Fe-2S]-type เพอร์รีดอกซิน เป็นเอนไซม์โทลูอีนและไบฟีนิลไดออกซิจีเนส เป็นไดออกซิจีเนสจากแบคทีเรียแกรมลบและแกรมบวกที่ใช้ในการย่อยสลายโทลูอีน เบนซีน ไอโซโพรพิลเบนซีน คลอโรเบนซีน และไบฟีนิล

Group V แสดงส่วนประกอบของริงไฮดรอกซีเลทิงไดออกซิจีเนสซึ่งประกอบด้วย 3 ส่วน คือ GP-type รีดักเทส, ออกซิจีเนสและ [3Fe-4S]-type เพอร์รีดอกซิน เป็นเอนไซม์ฟีนานทรีนและพธาลไดออกซิจีเนส เป็นไดออกซิจีเนสจากแบคทีเรียแกรมบวกส่วนมากอยู่ในกลุ่มของ *Actinobacteria* ใช้ในการย่อยสลายฟีนานทรีน แนพทาลีน แอนทราซีน ไพรีน และพธาล

ตารางที่ 2.3 เอนไซม์ไดออกซิจีเนสที่เร่งปฏิกิริยาไฮดรอกซิเลชัน (Kweon และคณะ, 2008)

Classification	Structure	Enzyme system
Type Ia $\beta$		Aniline dioxygenase ( <i>Acinetobacter</i> sp. YAA) Aniline oxygenase ( <i>P. putida</i> UCC22)
<b>Type I</b>		Phenoxybenzoate dioxygenase ( <i>Alcaligenes</i> sp. BR60)
Type Ia $\alpha$		Phenoxybenzoate dioxygenase ( <i>P. pseudoalcaligenes</i> POB310) Phthalate dioxygenase ( <i>P. cepacia</i> DB01) Toluenesulfonate monooxygenase ( <i>C. testosterone</i> T-2)
<b>Type II</b>		2-Halobenzoate 1,2-dioxygenase ( <i>P. cepacia</i> 2CBS) Anthranilate dioxygenase ( <i>Acinetobacter</i> sp. ADP1) Benzoate 1,2-dioxygenase ( <i>Acinetobacter</i> sp. ADP1)
Type IIIa $\beta$		3,4-Dihydroxyphenanthrene dioxygenase ( <i>A. faecalis</i> AFK2) Naphthalene dioxygenase ( <i>Pseudomonas</i> sp. 9816-4) PAH dioxygenase ( <i>P. putida</i> OUS82)
<b>Type III</b>		
Type IIIa $\alpha$		Carbazole 1,9a-dioxygenase ( <i>P. resinovorans</i> CA10)
<b>Type IV</b>		Carbazole dioxygenase ( <i>Sphingomonas</i> sp. CB3) Dioxin dioxygenase ( <i>Sphingomonas</i> sp. RW1) Biphenyl dioxygenase ( <i>Rhodococcus</i> sp. RHA1) Toluene dioxygenase ( <i>P. putida</i> F1) Biphenyl dioxygenase ( <i>Pseudomonas</i> sp. KKS102) Biphenyl 2,3-dioxygenase ( <i>B. xenovorans</i> LB400) Biphenyl dioxygenase ( <i>P. pseudoalcaligenes</i> KF707)
<b>Type V</b>		Phenanthrene dioxygenase ( <i>Nocardioides</i> sp. KP7) Phthalate dioxygenase ( <i>Terrabacter</i> sp. DBF63) Phthalate dioxygenase ( <i>A. Keyseri</i> 12B) Phthalate dioxygenase ( <i>M. vanbaaleni</i> PYR-1) Phthalate dioxygenase ( <i>Rhodococcus</i> sp. RHA1)

ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 2.14 phylogenetic tree ของหน่วยย่อยแอลฟาชาอลเทออร์มินัลออกซิจีเนสของริงไฮดรอกซีเลทิงไดออกซิจีเนส CarAa ของ *P. resinovorans* สายพันธุ์ CA10 เป็น outgroup และตัวเลขที่สาขาบอกถึงการนับที่ให้ผลซ้ำจากทั้งหมด 1,000 ครั้ง ด้วย bootstrap (Kweon และคณะ, 2008)



## 2.5.2 เอ็กซ์ตราไดออกไซด์ออกซิจีเนส

เมื่อได้สารมัธยันตร์เป็นแคทีคอล โดยแคทีคอลจะย่อยสลายผ่านวิถีการแตกวงเบนซีนแบบเมตา โดยการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์เอ็กซ์ตราไดออกไซด์ออกซิจีเนส ซึ่งเอนไซม์เอ็กซ์ตราไดออกไซด์ออกซิจีเนสสามารถแบ่งออกเป็นสองกลุ่ม กลุ่มแรกสามารถใช้แคทีคอลและ 2,3 ไดไฮดรอกซีไบฟีนิลเป็นสับสเตรท ตัวอย่างแบคทีเรียที่พบยีนที่ประมวลรหัสเอ็กซ์ตราไดออกไซด์ออกซิจีเนสจากการศึกษาจากของ Nakai และคณะ (1983) พบยีน *xyIE* ใน *Pseudomonas putida* สายพันธุ์ mt2 ประมวลรหัสเอ็กซ์ตราไดออกไซด์ออกซิจีเนสสำหรับแคทีคอล Kabisch และ Fortnagel (1990) พบยีน *mpcl* จาก *Alcaligenes eutrophus* สายพันธุ์ JMP222 ประมวลรหัสเอ็กซ์ตราไดออกไซด์ออกซิจีเนสสำหรับแคทีคอล Keck และคณะ (2002) พบยีน *bphC1* จาก *Sphingomonas xenophaga* สายพันธุ์ BN6 ที่ประมวลรหัสเอ็กซ์ตราไดออกไซด์ออกซิจีเนสสำหรับ 2,3 ไดไฮดรอกซีไบฟีนิล Mukerjeedhar และคณะ (2005) พบยีน *bphA1A2* จาก *Bacillus sp.* สายพันธุ์ JF8 ที่ประมวลรหัสเอ็กซ์ตราไดออกไซด์ออกซิจีเนสสำหรับ 2,3 ไดไฮดรอกซีไบฟีนิล ในกลุ่มที่สองสามารถใช้โปรโทแคทีชูเอทเป็นสับสเตรท จากการศึกษาของ Noda และคณะ (1990) พบยีน *ligA* และ *ligB* จาก *Pseudomonas paucimobilis* สายพันธุ์ SYK6 ประมวลรหัสเอ็กซ์ตราไดออกไซด์ออกซิจีเนสสำหรับโปรโทแคทีชูเอท Yun และคณะ (2004) พบยีน *PCD 4,5* จาก *Pseudomonas sp.* สายพันธุ์ K82 ที่ประมวลรหัสเอ็กซ์ตราไดออกไซด์ออกซิจีเนสสำหรับโปรโทแคทีชูเอท Habe และคณะ (2005) พบยีน *pcaD* จาก *Terrabacter sp.* สายพันธุ์ DBF63 ที่ประมวลรหัสเอ็กซ์ตราไดออกไซด์ออกซิจีเนสสำหรับโปรโทแคทีชูเอท

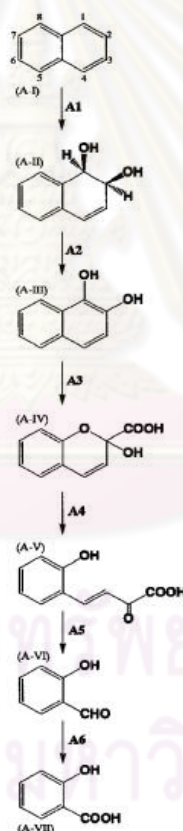
## 2.6 วิถีการย่อยสลายสารประกอบ PAHs โดยแบคทีเรีย

### 2.6.1 วิถีการย่อยสลายแนพธาไลน์

แนพธาไลน์เป็นสารประกอบ PAHs มีโครงสร้างประกอบด้วยวงเบนซีนสองวงเชื่อมกันซึ่งเป็นโครงสร้างที่ง่ายที่สุดในกลุ่มของสารประกอบ PAHs ด้วยเหตุนี้จึงใช้แนพธาไลน์เป็นต้นแบบในการศึกษาวิถีการย่อยสลายและคาดว่ายีนที่เกี่ยวข้องในวิถีการย่อยสลายสารประกอบ PAHs จากแนพธาไลน์จะช่วยอธิบายการย่อยสลายสารประกอบ PAHs ที่มีโครงสร้างซับซ้อนอื่นได้ (Habe และ Omori, 2003)

วิถีการย่อยสลายแนพธาไลน์ประกอบด้วย การเร่งปฏิกิริยาด้วยการเติมออกซิเจนสองอะตอมยังวงเบนซีนของแนพธาไลน์ (A-I) เปลี่ยนรูปเป็น ซิส-1,2-แนพธาไลน์ไดไฮโดรไดออกไซด์ (A-II) ด้วยกิจกรรมของแนพธาไลน์ไดออกซิจีเนส (A1) จากนั้นเปลี่ยนรูปเป็น 1,2-ไดไฮดรอกซีแนพธาไลน์ (1,2-dihydroxynaphthalene) (A-III) ด้วยกิจกรรมของซิส-แนพธาไลน์ไดไฮโดรไดออกไซด์ไฮโดรจีเนส (*cis-naphthalene dihydrodiol dehydrogenase*) (A2) จากนั้น 1,2-ไดไฮดรอกซีแนพธาไลน์

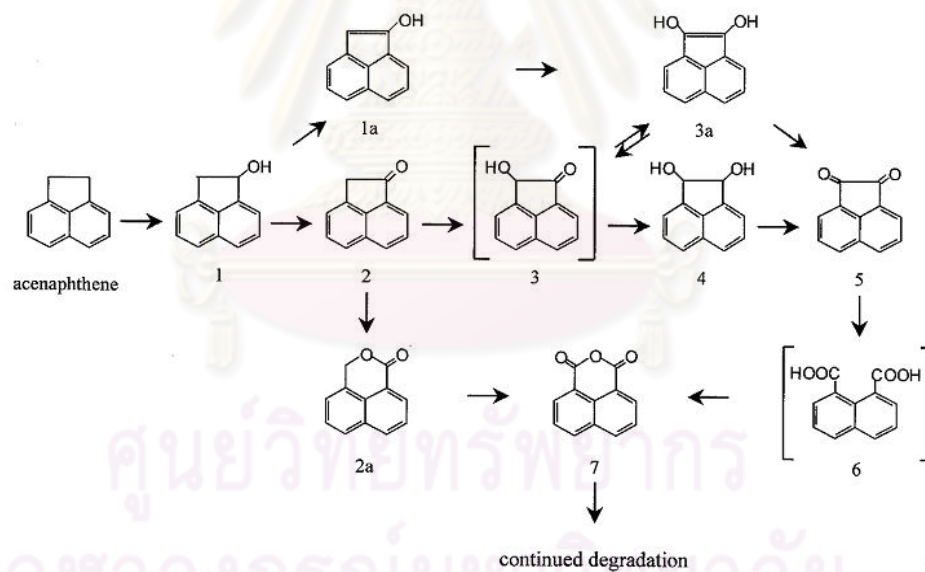
เปลี่ยนรูปเป็นกรด 2-ไฮดรอกซีโครมีน-2-คาร์บอกซิลิก (2-hydroxychromene-2-carboxylic acid) (A-IV) ด้วยกิจกรรมของ 1,2-ไดไฮดรอกซีแนพธาลีนไดออกซิจีเนส (1,2-dihydroxynaphthalene dioxygenase) (A3) จากกรด 2-ไฮดรอกซีโครมีน-2-คาร์บอกซิลิกถูกออกซิไดส์เป็น *ทรานส-ออโร-ไฮดรอกซีเบนซิลิดีนไพรูวิก* (*trans-o*-hydroxybenzylidenepyruvic acid) (A-V) โดย 2-ไฮดรอกซี-2*H*-โครมีน-2-คาร์บอกซิลิเตอไซโซเมอเรส (2-hydroxy-2*H*-chromene-2-carboxylate isomerase) (A4) แล้วเปลี่ยนเป็นซาลิไซแอลดีไฮด์ (salicylaldehyde) (A-VI) และเป็นกรดซาลิไซลิก (A-VII) โดยการเร่งปฏิกิริยาของ *ทรานส-ออโร-ไฮดรอกซีเบนซิลิดีนไพรูเวตไฮเดรตาส-แอลโดเลส* (*trans-o*-hydroxybenzylidenepyruvate hydratase-aldolase) (A5) และซาลิไซลัลดีไฮด์ดีไฮโดรจีเนส (salicylaldehyde dehydrogenase) (A6) ตามลำดับ ซึ่งเรียกว่าวิถีการย่อยสลายส่วนบน (upper pathway) ดังแสดงในรูปที่ 2.13



รูปที่ 2.15 วิถีบนของการย่อยสลายแนพธาลีนโดยแบคทีเรีย *Pseudomonads* sp. (Davies และ Evans, 1964; Yen และ Gunsalus, 1982, Habe และ Omori, 2003)

## 2.6.2 วิธีการย่อยสลายอะซีแนฟทีน

อะซีแนฟทีนเป็นสารประกอบ PAHs ที่มีโครงสร้างซับซ้อนกว่าแนพทาลีนโดยประกอบด้วยวงอะโรมาติกสองวงเชื่อมต่อกับวงไซโคลเพนเทนหนึ่งวง แบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายอะซีแนฟทีน เช่น สกุล *A. eutrophus* และ *A. paradoxus* พบว่ามีการเติมออกซิเจนหนึ่งอะตอมลงบนวงไซโคลเพนเทนของอะซีแนฟทีนได้ผลิตภัณฑ์เป็นอะซีแนฟทีนอล (1-acenaphthenol) (1) จากการทำงานของโมโนออกซิจีเนส และเกิดกระบวนการไฮดรอกซีเลชันได้ผลิตภัณฑ์เป็นอะซีแนฟทีโนน (1-acenaphthenone) (2) จากนั้นถูกออกซิไดส์ด้วยไดออกซิไฮโดรจีเนสไปเป็น 1-ไฮดรอกซี-2-คีโตอะซีแนฟทีน (1-hydroxy-2-ketoacenaphthene) (3) และอะซีแนฟทีนไดออล ซึ่งเป็นเทโทเมอร์และถูกออกซิไดซ์หรือรีดิวส์และแตกตัวได้เอง จนทำให้วงไซโคลเพนเทนแตกออกจนเป็น กรด 1,8-แนพทาลไดคาร์บอกซิลิก (1,8-naphthalene dicarboxylic acid) (6) และกรด 3-ไฮดรอกซีเบนซีน-1,2-ไดคาร์บอกซิลิก (1,2-naphthalic anhydride) (7) และเปลี่ยนต่อไปเป็นกรดซาลิไซลิก ดังแสดงในรูปที่ 2.14



รูปที่ 2.16 วิธีการย่อยสลายอะซีแนฟทีน (Selifonov และคณะ, 1998)

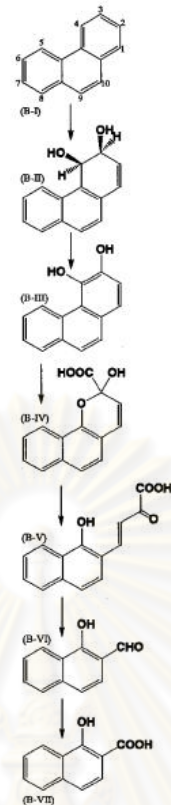
ตารางที่ 2.4 แบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายอะซีแนฟทีน

แบคทีเรีย	เอกสารอ้างอิง
<i>Beijerinckia</i> sp. ( <i>Sphingobium yanoikuyae</i> strain B1)	Schocken และ Gibson 1984 (Khan และคณะ 1996)
<i>Beijerinckia</i> sp. B8/36 (mutant strain of <i>Beijerinckia</i> sp.)	Schocken และ Gibson 1984
<i>Alcaligenes eutrophus</i>	Selifonov และคณะ 1993
<i>Alcaligenes paradoxus</i>	Selifonov และคณะ 1993
<i>Pseudomonas</i> sp. สายพันธุ์ A4	Komatsu และคณะ 1993
<i>Pseudomonas</i> sp. สายพันธุ์ A2279	Selifonov และคณะ 1998
<i>Sphingomonas</i> sp.	Hormisch และคณะ 2000
<i>Sphingomonas aromaticivorans</i> สายพันธุ์ B0695	Shi และคณะ 2001
<i>Sphingomonas</i> sp. สายพันธุ์ A4	Pinyakong และคณะ 2004
<i>Sphingomonas</i> sp. สายพันธุ์ CHY-1	Demaneche และคณะ 2004
<i>Sphingomonas</i> sp. สายพันธุ์ SP2	Saipheth และคณะ 2006
Uncultured microorganism	Lozada และคณะ 2008

### 2.6.3 วิธีการย่อยสลายพีแนฟทีน

พีแนฟทีนเป็นสารประกอบ PAHs อีกชนิดหนึ่งที่ถูกใช้เป็นตัวแบบในการศึกษาวิธีการย่อยสลายสารประกอบ PAHs และคาดว่ายีนที่เกี่ยวข้องในวิธีการย่อยสลายสารประกอบ PAHs จากพีแนฟทีนจะช่วยอธิบายการย่อยสลายสารประกอบ PAHs ที่มีโครงสร้างซับซ้อนอื่นได้ (Habe และ Omori, 2003)

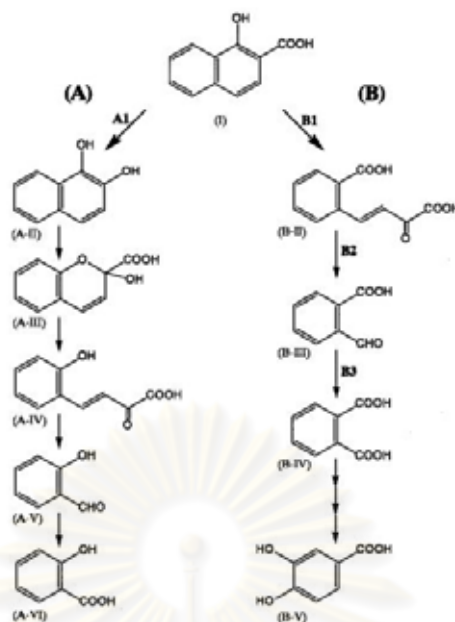
แบคทีเรียสกุล *Pseudomonas* พบว่าเริ่มการแตกโมเลกุลของพีแนฟทีน (B-I) บริเวณระหว่างคาร์บอนตำแหน่งที่ 3 และ 4 โดยอาศัยกิจกรรมของไดออกซิจีเนสได้สารมัธยันตร์ ซีส-3,4-พีแนฟทีนไดไฮโดรไดออกอล (*cis*-3,4-dihydroxy-3,4-dihydrophenanthrene) (B-II) และหลังจากนั้นก็จะถูกย่อยสลายต่อไปจนได้สารมัธยันตร์เป็น กรด 1-ไฮดรอกซี-2-แนฟโทอิก (1-hydroxy-2-naphthoic acid) (B-VII) ดังแสดงในรูปที่ 2.15



รูปที่ 2.17 วิธีการย่อยสลายพีแนทรีนโดยแบคทีเรีย (Evan และคณะ, 1965; Kiyohara และคณะ, 1976, Habe และ Omori, 2003)

สารมัธยันตร์ กรด 1-ไฮดรอกซี-2-แนพโทอิก (1-hydroxy-2-naphthoic acid) (I) สามารถถูกย่อยสลายโดยผ่านวิธีการย่อยสลายที่แตกต่างกันสองวิธี วิธีแรก (A) คือการย่อยสลายโดยใช้กระบวนการย่อยสลายเดียวกับการย่อยสลายแนพทาลีน โดยได้ผลิตภัณฑ์เป็นกรดซาลิไซลิก (A-VI) (Evan และคณะ, 1965) วิธีที่สอง (B) คือวิธีการย่อยสลายที่ถูกย่อยสลายไปเป็นกรดออกโทพธาลิก (O-phthalic acid) (B-IV) และเปลี่ยนต่อไปเป็นกรดโปรโตคาซุอิก (protocatechuic acid) (B-V) (Kiyohara และคณะ, 1976) ดังแสดงในรูปที่ 2.16





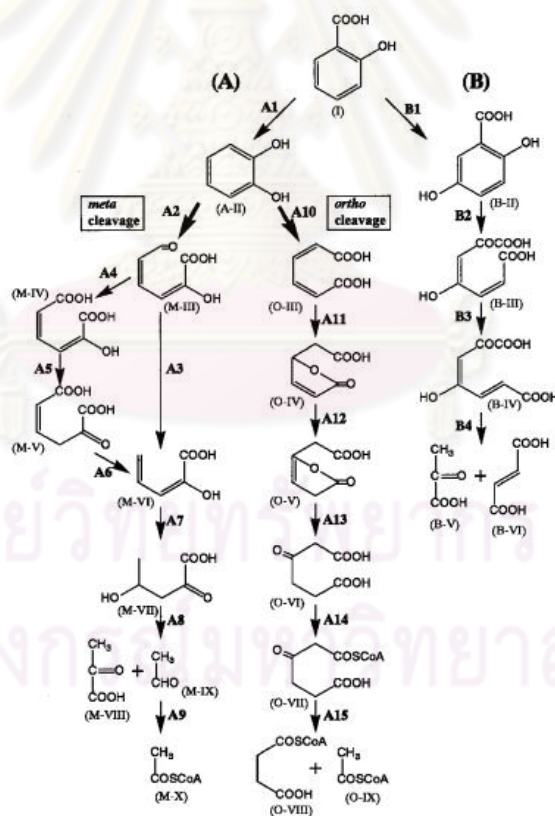
รูปที่ 2.18 วิธีการย่อยสลายพีแนนทรีนโดยแบคทีเรีย (Kiyohara และคณะ, 1976, Habe และ Omori, 2003)

นอกจากนี้ Jerina และคณะ (1976) ได้รายงานว่าการย่อยสลายพีแนนทรีนโดย *Bejerinkia* sp. สายพันธุ์ B-836 (หลังจากนั้นได้ถูกเปลี่ยนเป็น *Sphingobium yanoikuyae* (Takeuchi และคณะ, 2001)) แยกโมเลกุลพีแนนทรีนระหว่างคาร์บอนตำแหน่งที่ 1 และ 2 ได้ผลิตภัณฑ์เป็น ซิส-1,2-ไดไฮดรอกซี-1,2-ไดไฮโดรพีแนนทรีน (*cis*-1,2-dihydroxy-1,2-dihdropyrene) รวมทั้งในงานวิจัยของ Moody และคณะ (2001) ได้รายงานว่าการย่อยสลายพีแนนทรีนตรงคาร์บอนตำแหน่งที่ 3 และ 4 และพบว่ายังสามารถแยกโมเลกุลคาร์บอนตำแหน่งที่ 9 และ 10 ได้อีกด้วย โดยพบผลิตภัณฑ์คือ ซิส-9,10-พีแนนทรีนไดไฮโดรไดออล (*cis*-9,10-phenanthrene dihydrodiol) และ ทรานส-9,10-พีแนนทรีนไดไฮโดรไดออล (*trans*-9,10-phenanthrene dihydrodiol)

ตารางที่ 2.5 แบคทีเรียที่สามารถย่อยพีแนทรีนได้

สายพันธุ์แบคทีเรีย	เอกสารอ้างอิง
<i>Pseudomonas putida</i>	Evans และคณะ, 1965
<i>Aeromonas</i> sp.	Kiyohara และคณะ, 1976
<i>Streptomyces griseus</i>	Trower และ Gilbert, 1988
<i>Alcaligenes denitrificans</i>	Weissenfels และคณะ, 1992
<i>Pseudomonas fluorescens</i> สายพันธุ์ 5R	Menn และคณะ, 1993
<i>Burkholderia capacia</i> สายพันธุ์ F297	Grifoll และคณะ, 1995
<i>Acidiphilium</i> sp.	Stapleton และคณะ, 1998
<i>Cycloclasticus</i> sp.	Geiselbrecht และคณะ, 1998
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Romero และคณะ, 1998
<i>Rhodomonas</i> sp.	Foght และ Westlake, 1988
<i>Sphingomonas</i> sp. สายพันธุ์ P2	Supaka และคณะ, 2001
<i>Mycobacterium</i> sp.	Stingley และคณะ, 2004
<i>Rhodococcus opacus</i>	Guo และคณะ, 2005
<i>Rhodococcus ruber</i>	Guo และคณะ, 2005
<i>Mycobacterium gilvum</i>	Zhou และคณะ, 2006
<i>Mycobacterium psychrotolerans</i>	Zhou และคณะ, 2006
<i>Mycobacterium vanbaalenii</i> สายพันธุ์ PYR 1	Zhou และคณะ, 2006
<i>Mycobacterium fortuitum</i>	Zhou และคณะ, 2006
<i>Mycobacterium farcinogenes</i>	Zhou และคณะ, 2006
<i>Rhodococcus ruber</i> สายพันธุ์ OUCZ91B	Zhou และคณะ, 2006
<i>Terrabacter</i> sp. สายพันธุ์ YK10	Zhou และคณะ, 2006
<i>Terrabacter</i> sp.	Zhou และคณะ, 2006
Uncultured microorganism	Chadhain และคณะ, 2006
<i>Acidovorax</i> sp. สายพันธุ์ NA3	Singleton และคณะ, 2009
<i>Pseudomonas stutzeri</i> สายพันธุ์ ZP2	Zhao และคณะ, 2009
<i>Sphingomonas</i> sp. สายพันธุ์ LH128	Schuler และคณะ, 2009

เมื่อได้สารมัธยันตร์เป็นกรดซาลิไซลิกหรือกรดโปรโตคาซุอิก จากนั้นจุลินทรีย์จะเปลี่ยนกรดซาลิไซลิก (I) ไปเป็นแคทีคอล (A-II) โดยซาลิไซเลตไฮดรอกซิเลส (salicylate hydroxylase) (A1) โดยแคทีคอลจะย่อยสลายผ่านวิธีการแตกวงเบนซีนแบบ เมตา (A2) หรือ ออโธ (A10) จนกระทั่งได้ผลิตภัณฑ์เป็น ซัคซินิลโคเอ (succinyl Co A) (O-VIII) หรืออะซิติลโคเอ (acetyl Co A) (M-X) (Yen และ Gunsalus, 1982) นอกจากนี้จุลินทรีย์บางชนิดสามารถย่อยสลายกรดซาลิไซลิกโดยไม่ผ่านแคทีคอล เริ่มจากเปลี่ยนกรดซาลิไซลิกไปเป็นกรดเจนทิสิก (gentisic acid) (B2) เช่น *Rhodococcus* sp. สายพันธุ์ NCIMB12038 (Allen และคณะ, 1997) และ *Ralstonia* sp. สายพันธุ์ U2 (Zhou และคณะ, 2001) โดยกรดเจนทิสิกจะถูกออกซิไดส์ไปเป็นมาเรอิลไพรูเวต (maleylpyruvate) (B-III) ด้วยกิจกรรมของเจนทิเสต-1,2-ไดออกซิจีเนส (gentisate-1,2-dioxygenase) (B2) และได้ผลิตภัณฑ์สุดท้ายเพื่อเข้าสู่วัฏจักรกรดไตรคาร์บอกซิลิก ได้แก่ ไพรูเวต (pyruvate) (B-V) และ ฟูมาเรต (fumarate) (B-VI) เรียกวิธีการย่อยสลายตั้งแต่กรดซาลิไซลิกจนได้ผลิตภัณฑ์ที่เข้าสู่วัฏจักรกรดไตรคาร์บอกซิลิกว่าวิธีการย่อยสลายส่วนล่าง (lower pathway) ดังแสดงในรูปที่ 2.17



รูปที่ 2.19 วิถีล่างของการย่อยสลายเนฟธาลินโดยจุลินทรีย์ต่างๆ *Pseudomonas* sp. (Davies และ Evans, 1964; Yen และ Gunsalus, 1982), *Ralstonia* sp. สายพันธุ์ U2 (Zhou และคณะ, 2001)

## 2.7 ดีเอ็นเอเมตาจีโนมจากสิ่งแวดล้อม

การศึกษาแบคทีเรียย่อยสลายพอลิไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนในอดีตใช้วิธีการคัดแยกเชื้อจากธรรมชาติหรือจากแหล่งที่มีการปนเปื้อนของพอลิไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน โดยการเพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ (Culture-dependent method) ทำให้การศึกษายีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายพอลิไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนถูกจำกัดเนื่องจากสามารถศึกษาในแบคทีเรียที่เพาะเลี้ยงได้เท่านั้น ในปัจจุบันพบว่าจุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่ในดินกว่าร้อยละ 99 ตามธรรมชาติไม่สามารถถูกเพาะเลี้ยงได้ในสภาวะที่ใช้ในห้องปฏิบัติการจึงเป็นสาเหตุทำให้ยังขาดข้อมูลยีนและเอนไซม์ที่สำคัญอีกมาก ดังนั้นจึงมีการศึกษายีนจากแบคทีเรียในสิ่งแวดล้อมโดยนำดีเอ็นเอเมตาจีโนมจากสิ่งแวดล้อม (Culture-independent method) ซึ่งดีเอ็นเอเมตาจีโนมจากสิ่งแวดล้อม คือการนำดีเอ็นเอจากจุลินทรีย์ในสิ่งแวดล้อมโดยไม่ผ่านการเพาะเลี้ยงมาศึกษาโดยตรง ซึ่งช่วยให้สามารถค้นพบยีนและเอนไซม์ที่มีประโยชน์จากสิ่งแวดล้อมโดยไม่ต้องคัดแยกเชื้อก่อนโดย (Daniel และคณะ, 2004)

## 2.8 การตรวจติดตามจุลินทรีย์ที่ไม่ผ่านการเพาะเลี้ยงเชื้อในห้องปฏิบัติการ (Culture-independent method)

### 2.8.1 การติดตามการเปลี่ยนแปลงประชาคมจุลินทรีย์

เทคนิคการเพาะเลี้ยงเชื้อในห้องปฏิบัติการไม่สามารถตรวจหาจุลินทรีย์ที่มีอยู่ในดินได้ครอบคลุมทุกชนิด ในปัจจุบันจึงมีการนำเทคนิคทางชีวโมเลกุลมาตรวจหาจุลินทรีย์ที่ไม่สามารถเพาะเลี้ยงได้ในห้องปฏิบัติการ วิธี PCR-Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) เป็นหนึ่งในเทคนิคทางชีวโมเลกุลที่ถูกนำมาใช้ในการวิเคราะห์ประชาคมจุลินทรีย์ในสิ่งแวดล้อม (Rosado และคณะ, 1997) โดยในการตรวจหาแบคทีเรียมการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอบริเวณ 16S rDNA และนำผลิตภัณฑ์ที่ได้มาวิเคราะห์ความหลากหลายของจุลินทรีย์ด้วยวิธี DGGE (Torsvik และคณะ, 2002) ซึ่งเป็นเทคนิคที่ใช้แยกดีเอ็นเอสายคู่ที่มีความยาวเท่ากันแต่มีลำดับเบสต่างกัน โดยใช้เกรเดียนท์ของความเข้มข้นของสารเคมี เช่น ยูเรียและฟอร์มาไมด์ทำลายพันธะไฮโดรเจนระหว่างดีเอ็นเอสายคู่ (Felske และ Akkermans, 1998; Muyzer และคณะ, 1993) ความแตกต่างของลำดับเบสส่งผลให้การสลายพันธะไฮโดรเจนเกิดขึ้นไม่พร้อมกันในขณะที่ดีเอ็นเอเคลื่อนที่อยู่ภายในเจล ทำให้สามารถแยกแถบดีเอ็นเอที่มีขนาดเท่ากันแต่มีลำดับเบสต่างกันออกจากกันได้ โดยเมื่อดีเอ็นเอสายคู่ถูกทำลายพันธะไปบางส่วนจะหยุดการเคลื่อนที่เนื่องจาก GC clamp ซึ่งเป็นส่วนที่มีเบส GC อยู่มาก เมื่อสายดีเอ็นเอหยุดเคลื่อนที่จึงเห็นเป็นแถบดีเอ็นเออยู่ในเจล โดยความหลากหลายของจุลินทรีย์สามารถสังเกตได้จากจำนวนแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้น (Myer และคณะ, 1985)

Agnelli และคณะ (2004) ติดตามการเปลี่ยนแปลงประชาคมแบคทีเรียและราประจำถิ่นในดินที่ปนเปื้อน PAHs โดยในแบคทีเรียเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอบริเวณ 16S rDNA และราเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอบริเวณ 18S rDNA และนำมาวิเคราะห์โดยเทคนิค DGGE จากรูปแบบ DGGE พบว่าความหลากหลายของประชาคมแบคทีเรียมีมากกว่ารา

Michale Cunliffe และคณะ (2006) ติดตามประชาคมของกลุ่มแบคทีเรียในดินปนเปื้อนพีแนทรีนที่เติมเชื้อ *Sphingobium yanoikuyae* สายพันธุ์ B1 ในอาหาร 4 แบบ โดยใช้เทคนิค RT-PCR DGGE ติดตามการเปลี่ยนแปลงของ 16S rDNA และนำมาวิเคราะห์โดยเทคนิค RNA DGGE พบว่าลักษณะรูปแบบของ DGGE ของ *Sphingobium yanoikuyae* สายพันธุ์ B1 เหมือนกันในอาหาร 4 แบบ และยังพบความเปลี่ยนแปลงประชาคมของแบคทีเรียประจำถิ่นโดยพบรูปแบบแถบดีเอ็นเอเพิ่มขึ้น 3 แถบเมื่อเปรียบเทียบกับดินที่ไม่เติมเชื้อ *Sphingobium yanoikuyae* สายพันธุ์ B1

Lafortune และคณะ (2009) ศึกษาความหลากหลายของแบคทีเรียในกลุ่มของจุลินทรีย์ที่ย่อยสลายสารประกอบไฮโดรคาร์บอนที่มีมวลโมเลกุลสูงในระบบชีวภาพโดยใช้ของเหลว 2 ชนิดรวมกัน คือ น้ำมันซิลิโคนและน้ำ เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อ ในรายงานนี้ศึกษาลักษณะความหลากหลายของแบคทีเรียจากกลุ่มจุลินทรีย์โดยวิธีการเพาะเลี้ยงและไม่เพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ร่วมกัน การตรวจติดตามการเปลี่ยนแปลงของประชากรจุลินทรีย์เมื่อมีการย่อยสลายสารประกอบพอลิไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนคือ ไพรีนที่ความเข้มข้น 141 มิลลิกรัมต่อลิตรสามารถย่อยได้ 0.26 มิลลิกรัมต่อลิตรต่อวันโดยในเวลา 17 วันการย่อยสลายคิดเป็น 23 เปอร์เซ็นต์ ไครซีนที่ความเข้มข้น 44 มิลลิกรัมต่อลิตรสามารถย่อยได้หมดภายใน 25 วัน โดยเฉลี่ย 0.47 มิลลิกรัมต่อลิตรต่อวัน จากนั้นใช้ปฏิกิริยาถูกใช้พอลิเมอเรสจากส่วนของ 16S rDNA ร่วมกับ DGGE โดยใช้ไพรเมอร์ 314f และ 534r พบว่าไม่มีการเปลี่ยนแปลงรูปแบบประชากรในระหว่างการย่อยสลายไพรีนและไครซีนแบคทีเรีย 11 สายพันธุ์ถูกแยกออกมาจากกลุ่มของจุลินทรีย์ ซึ่งสนใจเพียงกลุ่มของ IAFILS9 เนื่องจากมีความสัมพันธ์กับกลุ่มของ *Novosphingobium pentaromativorans* ที่มีความสามารถในการใช้ไพรีนและไครซีนเป็นแหล่งคาร์บอน จากการทำ 16s rDNA จากห้องสมุดดีเอ็นเอพบว่าสามารถจำแนกแบคทีเรียที่ไม่สามารถเพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการได้ 86 โคลน เมื่อคัดกรองพบว่า 20 โคลนมีความแตกต่างกัน มีเพียง 3 สายพันธุ์ที่มีการแสดงออก พบว่า 85 เปอร์เซ็นต์ ของโคลนมีความเกี่ยวข้องกับแอลฟาและเบตาโพรทีโอแบคทีเรีย ดังนั้น 3 ยีนที่ตรวจพบจากกลุ่มของจุลินทรีย์ทั้ง 2 สายพันธุ์ในกลุ่มของ IAFILS9 มีความเกี่ยวข้องกับการย่อยสลายอะโรมาติกที่มีมวลโมเลกุลสูง



## 2.9 การโคลน (Cloning)

เป็นอีกหนึ่งเทคนิคทางชีวโมเลกุลคือการตัดจีโนมดีเอ็นเอที่ต้องการด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะที่เหมาะสมแล้วนำชิ้นดีเอ็นเอทั้งหมดโคลนเข้ายังดีเอ็นเอพาหะที่ตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ชนิดเดียวกันกับจีโนมดีเอ็นเอจากนั้นทรานสฟอร์มรีคอมบีแนนท์พลาสมิดทั้งหมดที่ได้เข้ายังเซลล์เจ้าบ้านจากนั้นคัดกรองโคลนที่ต้องการออกจากห้องสมุดยีน (genomic library) โดยการแสดงลักษณะฟีโนไทป์ของเซลล์เจ้าบ้านตามที่ต้องการ เช่น การติดตามโคลนที่มียีนไดออกซิจีเนสซึ่งเป็นยีนสำคัญในการบ่งบอกความสามารถในการย่อยสลายประกอบอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน โดยติดตามการเปลี่ยนสีของสารอินโดล (Ensley และคณะ, 1983) เป็นต้น จากวิธีนี้จะได้ข้อมูลทางพันธุกรรมที่ต้องการเก็บอยู่ในรูป รีคอมบีแนนท์พลาสมิดหรือคอสมิด (cosmid) ซึ่งขึ้นอยู่กับขนาดของชิ้นส่วนดีเอ็นเอ หรือเก็บไว้ในเซลล์เจ้าบ้านได้ ดังนั้นจึงสามารถนำข้อมูลทางพันธุกรรมนี้มาทำการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์หรือนำยีนไปทำการแสดงออก (expression) หรือตัดต่อ ดัดแปลงยีนให้มีสมบัติตามต้องการ มีข้อเสียคือ การโคลนยีนบางยีนไม่มีระบบการคัดกรองโคลนที่เหมาะสม จึงไม่สามารถทำการคัดเลือกโคลนที่ต้องการออกจากโคลนทั้งหมดได้

### 2.9.1 การสร้างห้องสมุดดีเอ็นเอและห้องสมุดยีน (PCR) จากดีเอ็นเอจากเมตาจีโนม (Metagenomic library)

#### 2.9.1.1 การสร้างห้องสมุดดีเอ็นเอ

ดีเอ็นเอเมตาจีโนมจากสิ่งแวดล้อม คือการนำดีเอ็นเอจากจุลินทรีย์ในสิ่งแวดล้อมโดยไม่ผ่านการเพาะเลี้ยงมาศึกษาโดยตรง เริ่มจากการสกัดดีเอ็นเอจากสิ่งแวดล้อมโดยตรงเช่น สกัดดีเอ็นเอจากดิน (ดีเอ็นเอเมตาจีโนมดิน) เป็นต้น ตัดจีโนมดีเอ็นเอที่สกัดได้ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะที่เหมาะสมแล้วนำชิ้นดีเอ็นเอทั้งหมดโคลนเข้ายังดีเอ็นเอพาหะที่เหมาะสมที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิดเดียวกันกับจีโนมดีเอ็นเอ ทรานสฟอร์มรีคอมบีแนนท์ดีเอ็นเอทั้งหมดที่ได้เข้ายังเซลล์เจ้าบ้าน จากนั้นคัดกรองโคลนที่ต้องการจากห้องสมุดดีเอ็นเอ วิธีนี้จะได้ข้อมูลทางพันธุกรรมที่ต้องการเก็บอยู่ในรูปรีคอมบีแนนท์ ดีเอ็นเอ ซึ่งขึ้นอยู่กับขนาดของชิ้นส่วนดีเอ็นเอหรือเก็บไว้ในเซลล์เจ้าบ้านได้ ดังนั้นจึงสามารถนำข้อมูลทางพันธุกรรมนี้มาหาลำดับนิวคลีโอไทด์หรือนำยีนไปแสดงออกหรือตัดต่อดัดแปลงยีนให้มีสมบัติตามต้องการ (Handelsman และคณะ, 2004)

#### 2.9.1.1.1 การคัดกรอง (Screening)

การสร้างห้องสมุดดีเอ็นเอขั้นตอนสำคัญในการค้นหาชิ้นส่วนหนึ่งคือขั้นตอนการคัดกรองโคลน การคัดกรองห้องสมุดดีเอ็นเอมีวิธีการคัดกรองหลักสองวิธี วิธีแรกคือการคัดกรองโดยการศึกษาหาลำดับนิวคลีโอไทด์ (Sequence-based screening) เพื่อเปรียบเทียบร้อยละความเหมือนกับฐานข้อมูล วิธีที่สองคือการคัดกรองโดยใช้การแสดงออกทางฟีโนไทป์ของยีน

สอดแทรก (Activity-based screening) ซึ่งการคัดกรองทั้งสองวิธีมีข้อดีและข้อเสียดังแสดงในตารางที่ 2.6

ตารางที่ 2.6 ข้อดีและข้อเสียของการคัดกรองด้วยวิธีการคัดกรองโดยการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ (Sequence-based screening) และ การคัดกรองโดยใช้การแสดงออกทางฟีโนไทป์ของยีนสอดแทรก (Activity-based screening)

ข้อดี/ข้อเสีย	คัดกรองโดยการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ (Sequence-based screening)	คัดกรองโดยใช้การแสดงออกทางฟีโนไทป์ (Activity-based screening)
ข้อดี	<ul style="list-style-type: none"> <li>- มีวิธีในการคัดกรองที่หลากหลายกว่าการคัดกรองโดยใช้การแสดงออกทางฟีโนไทป์</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- ยีนที่ได้มีความสามารถในการแสดงออกและมีความสามารถในการทำงานได้</li> <li>- สามารถตรวจสอบแอคติวิตีของเอนไซม์ได้</li> </ul>
ข้อเสีย	<ul style="list-style-type: none"> <li>- ยีนที่ได้อาจไม่มีความสามารถในการแสดงออกและมีความสามารถในการทำงานได้</li> <li>- ไม่สามารถตรวจสอบแอคติวิตีของเอนไซม์ได้</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- วิธีคัดกรองมีความจำเพาะต่อการแสดงออกของยีนซึ่งทำให้เกิดข้อจำกัดในการคัดกรองโดยใช้การแสดงออกทางฟีโนไทป์</li> </ul>

#### 2.9.1.1.1 การคัดกรองโดยการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ (Sequence-based screening)

Jiang และ Wu (2007) รายงานการค้นพบเอนไซม์ดีคาร์บอกซิเลสชนิดใหม่โดยใช้วิธีสร้างห้องสมุดดีเอ็นเอจากดินและคัดกรองโคลนที่ต้องการโดยการสุ่มโคลนของดีเอ็นเอสอดแทรกไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์เพื่อเปรียบเทียบร้อยละความเหมือนกับฐานข้อมูล ซึ่งทำให้พบยีนหรือเอนไซม์ชนิดใหม่ โดยตั้งชื่อยีนที่ผลิตเอนไซม์ดีคาร์บอกซิเลสชนิดใหม่นี้ว่า (undec1A)

Chengjian และ Bo (2007) รายงานการค้นพบเอนไซม์ดีคาร์บอกซิเลสชนิดใหม่ (novel decarboxylase) โดยใช้วิธีสร้างห้องสมุดดีเอ็นเอจากดินและทำการคัดกรองโคลนที่ต้องการ โดยการสุ่มโคลนที่เจริญโดยนำชิ้นส่วนดีเอ็นเอสอดแทรกไปศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์เพื่อเปรียบเทียบร้อยละความเหมือนกับฐานข้อมูลยีน ซึ่งทำให้พบยีนหรือเอนไซม์ชนิดใหม่ โดยตั้งชื่อ

ยีนที่ผลิตเอนไซม์ดีคาร์บอกซิเลสชนิดใหม่นี้ว่า undec1A เป็นเอนไซม์ดีคาร์บอกซิเลสชนิดใหม่ที่จัดอยู่ในกลุ่ม homooligomeric flavin-containing cysteine decarboxylase (HFCD) family และเป็นโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุล 38 กิโลดาลตัน ซึ่งเอนไซม์ดีคาร์บอกซิเลสชนิดใหม่นี้สามารถเปลี่ยน L-cysteine ไปเป็น cysteamine ได้

#### 2.9.1.1.1.2 การคัดกรองโดยใช้การแสดงออกทางฟีโนไทป์ของยีนสอดแทรก (Activity-based screening)

Ensley และคณะ (1983) ได้ใช้การโคลนยีนในส่วน upper pathway จากพลาสมิด NAH7 ของ *P. Putida* สายพันธุ์ G7 และทำการแสดงออกของยีนใน *E.coli* สายพันธุ์ HB101 จากการทดลองพบว่าเมื่อเลี้ยงเชื้อ *E.coli* สายพันธุ์ถูกผสมในอาหารเลี้ยงเชื้อแล้วพบการสะสมของสารอินดิโกสีฟ้าน้ำเงินโดยบังเอิญ เมื่อหาสาเหตุของการปรากฏขึ้นของอินดิโกในอาหารเลี้ยงเชื้อพบว่าอินดิโกเกิดขึ้นจากการทำงานร่วมกันระหว่างทริปโตเฟนเนสที่พบใน *E.coli* ทั่วไปและไดออกซิจีเนสจากส่วนของพลาสมิด NAH7 ในการเปลี่ยนทริปโตเฟนให้เป็นอินโดลและอินดิโกตามลำดับ จากการทดลองยังได้ทำการยืนยันการทำงานของไดออกซิจีเนสในการเปลี่ยนอินโดลเป็นอินดิโกในเชื้อสายพันธุ์ดั้งเดิมต่างๆ ที่มีความสามารถในการย่อยสลายสารประกอบ PAHs และสายพันธุ์กลายที่เกิดการบกพร่องของยีนที่ประมวลรหัสเอนไซม์ไดออกซิจีเนส มีส่วนสัมพันธ์กับการปรากฏขึ้นของอินดิโก จากข้อสรุปดังกล่าวจึงเป็นประโยชน์อย่างยิ่งในการชักนำปฏิกิริยาดังกล่าวมาประยุกต์ใช้ในการทดลองเพื่อหาเชื้อที่ย่อยสลายสารประกอบ PAHs รวมทั้งใช้ในการทดสอบโคลนซึ่งมียีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายสารประกอบ PAHs จากการทดลองหาเอ็นที่ประมวลรหัสไดออกซิจีเนส ด้วยการติดตามความสามารถของเชื้อในการเปลี่ยนแปลงอินโดลไปเป็นอินดิโก

Jung และคณะ (2004) รายงานการค้นพบเอนไซม์เอสเทอไฮโดรไลซิงชนิดใหม่ (novel ester-hydrolyzing Enzyme) โดยใช้วิธีสร้างห้องสมุดดีเอ็นเอจากดินและคัดกรองโคลนที่ต้องการโดยใช้การคัดกรองการแสดงออกของยีนสอดแทรกโดยการสังเกตการเปลี่ยนสีรอบโคโลนี โดยตั้งชื่อยีนที่ผลิตเอนไซม์เอสเทอไฮโดรไลซิงชนิดใหม่นี้ว่า (Est25) ถอดรหัสโปรตีน 363 กรดอะมิโน และเป็นโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุล 38.3 กิโลดาลตัน

Lee และคณะ (2004) รายงานการค้นพบเอนไซม์ลิพอลิติกชนิดใหม่ (novel lipolytic enzymes) โดยใช้วิธีสร้างห้องสมุดดีเอ็นเอจากดินและทำการคัดกรองโคลนที่ต้องการ โดยการใช้ tributyrinhydrolysis ซึ่งเป็นการคัดกรองโคลนโดยใช้วิธีการคัดกรองการแสดงออกของยีนสอดแทรก จากนั้นนำดีเอ็นเอสอดแทรกจากโคลนที่ผ่านการคัดกรองว่ามีกิจกรรมของเอนไซม์ลิพอลิติกไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์เพื่อเปรียบเทียบร้อยละความเหมือนกับฐานข้อมูลยีน ซึ่งมีร้อยละ

ละความเหมือน 34-48 จากเอนไซม์บนฐานข้อมูลอื่น ทำให้พบยีนหรือเอนไซม์ชนิดใหม่ ซึ่งมีส่วนอนุรักษ์อยู่ในกลุ่มของ (hormone sensitive lipase family)

Tirawongsaroj และคณะ (2007) รายงานการค้นพบเอนไซม์ลิพอลิติกในสภาวะอุณหภูมิสูงชนิดใหม่ (novel thermophilic and thermostable lipolytic enzymes) ที่มีช่วงอุณหภูมิในการทำงาน 50-75 องศาเซลเซียส โดยใช้วิธีสร้างห้องสมุดดีเอ็นเอจากตะกอนดินบริเวณบ่อน้ำพุร้อน (sediments) และคัดกรองโคลนที่ต้องการ โดยการใช้ trioleoylglycerol หรือ tributyrinhydrolysis เป็นสับสเตรทในการคัดเลือกโคลนที่มียีนสอดแทรกเอนไซม์ไลเปส (lipase) และเอสเทอเรส (esterase) ตามลำดับซึ่งเป็นการคัดกรองโคลนโดยใช้วิธีการคัดเลือกการแสดงออกของยีนสอดแทรก จากนั้นนำดีเอ็นเอสอดแทรกจากโคลนที่ผ่านการคัดกรองที่มีกิจกรรมของเอนไซม์เอนไซม์ไลเปส (lipase) และเอสเทอเรส (esterase) ไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์เพื่อเปรียบเทียบร้อยละความเหมือนกับฐานข้อมูลอื่น ทำให้พบยีนหรือเอนไซม์ชนิดใหม่ และนำยีนไปทำการแสดงออก (expression) และทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์ ตรวจสอบการทำงานของเอนไซม์ (enzyme assays) ตรวจสอบความจำเพาะของสับสเตรทและ (enzyme characterizations) จากการทดลองเอนไซม์ชนิดใหม่ที่พบคือ novel patatin-like phospholipase (PLP) และ esterase (Est1)

Suenaga และคณะ (2007) สร้างเมตาจีโนมจากตะกอนบำบัดน้ำเสียเพื่อหายีนประมวลรหัสเอกซ์ตราโดอกซิลิเนสที่สามารถย่อยสลายสารประกอบอะโรมาติก และคัดกรองโคลนที่ต้องการโดยใช้การแสดงออกทางพีโนไทป์ของยีนสอดแทรกโดยมีสารแคทีคอลเป็นสับสเตรทเมื่อถูกเร่งปฏิกิริยาด้วยเอนไซม์เอกซ์ตราโดอกซิลิเนส สามารถย่อยแคทีคอลเป็นสับสเตรทเป็นสี่เหลี่ยมเข็มได้แก่สาร 2-ไฮดรอกซีมิวโคเนท เซมิแอลดีไฮด์

### 2.9.1.2 การสร้างห้องสมุดยีน (PCR)

โดยการใช้ปฏิกิริยาถูกโซฟอลิเมอเรสโดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีนเป้าหมายที่เกี่ยวข้องกับยีนที่สนใจ ซึ่งอาจมีการออกแบบไพรเมอร์ให้มีความจำเพาะกับยีนเป้าหมายมาเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอบริเวณยีนที่ประมวลรหัสโดยใช้ดีเอ็นเอเมตาจีโนมจากสิ่งแวดล้อมเป็นดีเอ็นเอแม่แบบจากนั้นนำผลิตภัณฑ์ที่ถูกโซฟอลิเมอเรสมาโคลนเพื่อหาลำดับนิวคลีโอไทด์ต่อไป (Marcos และคณะ, 2009) ดังนั้นขั้นตอนสำคัญในการสร้างห้องสมุดยีน (PCR) คือขั้นตอนการออกแบบไพรเมอร์ให้มีความจำเพาะกับยีนเป้าหมายเพื่อให้มีโอกาสในการค้นพบยีนชนิดใหม่ได้ดังแสดงตัวอย่างในตารางที่ 2.7

ตารางที่ 2.7 โพรเมอร์ตรวจสอบยีนไดออกซิจีเนสและเอกซ์ตราไดออกซิจีเนสเบื้องต้น

ชื่อโพรเมอร์	เป้าหมาย	อุณหภูมิ (°C) Annealing	ขนาดที่ คาดหวัง (bp)	เอกสารอ้างอิง
GPF GPR	Alpha subunit Gram-positive RHD gene	54	292	Cebzon และคณะ 2008
GNF GNR	Alpha subunit Gram-negative RHD gene	57	306	Cebzon และคณะ 2008
adoF1 adoB1	RHD gene	56	384	Taylor และคณะ 2009
NMR331 f NMR1134r	alpha subunit Gram-positive bacteria	53	803	Marcos และคณะ 2009
NahAc1F NahAc3F NahAc2R	<i>nahAc</i> Alpha subunit	53	950 และ 730	Lafortune และคณะ 2008
ndoBF ndoBR	<i>ndoB nah</i> และ <i>nagAc</i>	54	642	Kurkela และคณะ 1988
phnAcF phnAcR	<i>phnAc</i>	57	462	Klankeo และคณะ 2009
arhA1F arhA1R	<i>arhA1</i>	56	518	Klankeo และคณะ 2009
bphA1F bphA1R	<i>bphA1</i>	53	424	Laurie และคณะ 1999
BphCS1F BphCS2R	<i>bphC</i>	56	840	Lafortune และคณะ 2008
BP-f BP-r	<i>nahC bphC</i> และ <i>nagC</i>	55	467	Sipila และคณะ 2006



Taylor และคณะ (2002) ศึกษาการตรวจติดตามยีนที่เคยมีรายงานแล้วและยีนใหม่ที่ ประมวลรหัสอะโรมาติกริงไฮดรอกซีเลทิงไดออกซิจีเนส ในดินและแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลาย วงอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนได้ โดยออกแบบไพรเมอร์คือ adoF1 และ adoF2 ซึ่งประมวลรหัสใน กลุ่มที่ 2 และ 3 ของอะโรมาติกริงไฮดรอกซีเลทิงไดออกซิจีเนส พบว่าสามารถใช้ไพรเมอร์ในการ คัดกรองแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลายวงอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนได้ จากนั้นสร้าง ห้องสมุดดีเอ็นเอจากดิน สกัดดีเอ็นเอและทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสพบว่า 16 โคลน จาก 20 โคลนมีความคล้ายกับยีนที่ประมวลรหัสอะโรมาติกริงไฮดรอกซีเลทิงไดออกซิจีเนส จากการ เปรียบเทียบแบบแผนภูมิพบสามารถจัดกลุ่มยีนได้ 2 กลุ่มใหม่โดยให้ชื่อว่ากลุ่ม S และ T ยีนใน กลุ่ม S มีความเหมือนของลำดับอะมิโนอยู่ระหว่าง 56.2-77.5 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบกับตัว อื่น ส่วนในกลุ่มที่ 2 ของอะโรมาติกริงไฮดรอกซีเลทิงไดออกซิจีเนสพบว่ามีความใกล้เคียงกับยีน ประมวลรหัส biphenyl dioxygenase *bhpA* และ *bhpA1* จาก *Pseudomonas* sp. สายพันธุ์ KKS102 และ *Comamonas testosteroni* สายพันธุ์ B-356 ตามลำดับ พบยีนในกลุ่ม T มีความ หลากหลายมากกว่าในกลุ่ม S และมีความเหมือนภายในกลุ่มอยู่ระหว่าง 74-100 เปอร์เซ็นต์

Zhou และคณะ (2006) ศึกษาความหลากหลายของยีนไดออกซิจีเนส ในแบคทีเรียที่ สามารถย่อยสลายประกอบ PAHs ได้ ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่แยกได้จากดินตะกอนป่าชายเลน แบคทีเรียทั้งหมด 32 สายพันธุ์ที่แยกได้อยู่ในกลุ่มของ *Mycobacterium*, *Sphingomonas*, *Terrabacter*, *Sphingopyxis*, *Sphingobium* และ *Rhodococcus* ไพรเมอร์ถูกออกแบบมาเพื่อ เพิ่มจำนวนยีน *nidA*-like และ *nahAc*-like สำหรับ *nidA*-like ใช้ไพรเมอร์ Nid-for และ Nid-rev1 Nid-rev2 เพื่อเพิ่มความจำเพาะและประสิทธิภาพในการเพิ่มจำนวน ส่วน *nahAc*-like ยีนใช้ไพร เมอร์ Nah-for และ Nah-rev2 เมื่อใช้ไพรเมอร์ *nidA*-like พบว่ามี 3 กลุ่มที่พบว่ามี ความสำคัญ คือ *fadA1* ซึ่งเป็นกลุ่มของ *nidA3* จาก *M. vanbaalenii* PYR-1, *nidA* เป็นกลุ่มของ *nidA* จาก PYR-1 และ *fadA2* เป็นกลุ่มของ dioxygenase จาก *Arthrobacter* sp. FB24 สำหรับ *nahAc*-like ไพร เมอร์ มีความคล้ายกับ *phnA1a* จาก *Sphingomonas* sp. CHY-1 ไพรเมอร์ ที่ถูกออกแบบมานั้น มีความคล้ายกับ *phnA1a* 32-36 เปอร์เซ็นต์ และมีความเหมือนกับ p-cumate dioxygenase 53- 93 เปอร์เซ็นต์ จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่ายีน *nidA*-like และ *nahAc*-like สามารถพบใน แบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลายสารประกอบ PAHs

Lui และคณะ (2007) ศึกษาการตรวจติดตามปริมาณของยีน *phnE* จากตัวอย่างดิน บริเวณที่มีการปนเปื้อนน้ำมันโดยวิธี competitive quantitative PCR โดยใช้ยีน *phnE* จาก *Burkholderia cepacia* สายพันธุ์ L68 ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลายฟีนอล และแยกได้จากดินบริเวณที่มีการปนเปื้อนน้ำมัน ซึ่งยีน *phnE* เป็นยีนที่ประมวลรหัส catechol 2,3 dioxigenase (C23O) ถูกนำมาใช้เป็นยีนเป้าหมายในการตรวจติดตามและศึกษาปริมาณ *phnE*

จากดิน วิธี competitive quantitative PCR เพิ่มจำนวนยีน *phnE* โดยใช้ไพรเมอร์ BC01 และ BC02 และใช้ไพรเมอร์ DC01 และ DC02 จากการทดลองในตัวอย่างดิน 3 ตัวอย่าง คือ S1 S2 และ S3 พบว่าในตัวอย่างดิน S1 และ S3 มีการตรวจพบยีน *phnE* และมีความเข้มข้นของพินอลเท่ากับ 1.522 และ 2.078 มิลลิกรัมต่อกรัม ตามลำดับ ในขณะที่ตัวอย่างดิน S2 ไม่พบยีน *phnE* เนื่องจากพินอลมีความเข้มข้นค่อนข้างสูงคือ 3.181 มิลลิกรัมต่อกรัม และจากการทดลองแสดงให้เห็นว่ายีน *phnE* จะตอบสนองต่อสารตั้งต้นที่ความเข้มข้นต่ำ

Lozada และคณะ (2008) ศึกษา ยีนที่มีเป้าหมายประมวลรหัสหน่วยย่อยแอลฟาของเทอร์มินัลอะโรมาติกริงไฮดรอกซีเลทิงไดออกซิจีเนส จากตะกอนดิน Subantactic marine บริเวณ Patagonia โดยเพิ่มจำนวนโดยใช้ไพรเมอร์ 2 ชุดที่แตกต่างกัน ซึ่งไพรเมอร์ถูกออกแบบมาเพื่อให้จำเพาะต่อยีน *phnA1-like* โดยมีขนาดคาดหวังของผลิตภัณฑ์ถูกใช้พอลิเมอร์เรสคือ 500 bp จากนั้นนำผลิตภัณฑ์ถูกใช้พอลิเมอร์เรสที่ได้นำไปโคลนและคัดกรองโดยใช้วิธี RFLP คัดเลือกโคลนแต่ละรูปแบบมาศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ พบ 8 ยีนที่มีความแตกต่างกันและเมื่อนำลำดับอะมิโนของ 5 ยีนจากทั้งหมด 8 ยีนไปเปรียบเทียบกับลำดับอะมิโนพบว่ามีความเหมือนน้อยกว่า 70 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งยีนเหล่านี้จะมีส่วนของ Rieske type [2Fe-2S] แสดงให้เห็นว่ายีนที่ได้มีส่วนของยีนประมวลรหัสอะโรมาติกริงไฮดรอกซีเลทิงไดออกซิจีเนส และสำหรับ 3 ยีนที่เหลือพบว่ามีความใกล้เคียงกับ *nahAc-like* gene, *phnAc-like* gene ซึ่งพบใน *Alcaligenes faecalis* สายพันธุ์ AFK2 และ *phnA1-like* gene จากกลุ่มของ *Cycloclasticus* ซึ่งพบว่าเป็นผู้ย่อยสลายสารประกอบพอลิไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนในทะเล

Kumar และ Khanna (2009) ศึกษาความหลากหลายของ 16s rRNA และยีน dioxygenase ซึ่งตรวจพบในดินบริเวณที่มีการปนเปื้อนน้ำมันจากถ่านหินภายใต้การบำบัดด้วยวิธีทางชีวภาพ ในการทดลองนี้เก็บตัวอย่างดินมาจากบริเวณที่มีการปนเปื้อนพบว่ามีสารประกอบ PAHs ปนเปื้อนอยู่ 122.5 มิลลิกรัมต่อดิน 10 กรัม จากการวิเคราะห์ด้วย Liquid-chromatography พบว่ามีสารประกอบ PAHs อยู่ 7 กลุ่มคือ เบนโซ[*จี้,เอช,ไอ*]ไพรีน ไดเบนโซ[*เอ,เอช*]แอนทราซีน อินดีโน[1,2,3-*ซี,ดี*]ไพรีน ไพรีน อะซีแนพทีลีน เบนโซ[*เค*]ฟลูออแรนธิน และ เบนโซ[*บี*]ฟลูออแรนธิน สร้างห้องสมุดยีนโดยใช้เทคนิค PCR และใช้ไพรเมอร์ 8F และ 1406R ในการเพิ่มจำนวน 16s rRNA และใช้ไพรเมอร์ Rf1 และ Rr1 สำหรับเพิ่มจำนวน  $\alpha$ -subunit และ Rf2-F และ Rf2-R เพิ่มจำนวน  $\beta$ -subunit จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากโคลนของ 16s rRNA พบว่ามีความใกล้เคียงกับ *Proteobacteria*, *Actinobacteria*, *Anaerolineae*, *Fimicutes* และ *Acidobacteria* และพบว่า  $\beta$ -subunit ของ dioxygenase มีบทบาทสำคัญในการทำงานร่วมกันกับ  $\alpha$ -subunit ซึ่งโครงสร้างของ subunit ทั้งสองนี้อาจมีผลต่อขนาดและรูปร่างของบริเวณที่เร่งปฏิกิริยาการเติมออกซิเจนในโมเลกุลของสารประกอบ PAHs นอกจากนี้ยังพบความ

หลากหลายของยีนไดออกซิจีเนส ในบริเวณที่มีการปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อม การทำงานร่วมกันของ Rieske โปรเมออร์ และสังคมของแบคทีเรียช่วยเพิ่มศักยภาพในการย่อยสลายทางชีวภาพและยังพบยีนไดออกซิจีเนสใหม่ๆ ในสิ่งแวดล้อมที่มีการปนเปื้อนได้

Marcos และคณะ (2009) ศึกษาชนิดที่ได้จากการสร้างห้องสมุดดีเอ็นเอจากตะกอนดิน Subantactic marine ที่สามารถย่อยสลายสารประกอบอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน โดยใช้โปรเมออร์ที่จำเพาะกับ หน่วยย่อยแอลฟาของอะโรมาติกไดออกซิจีเนสจากแบคทีเรียแกรมบวก โปรเมออร์ที่ใช้คือ NMR331f และ NMR1134r พบว่าสามารถจัดกลุ่มยีนที่มีความเกี่ยวข้องกับไดออกซิจีเนสได้ 14 กลุ่ม ซึ่งมีความสัมพันธ์กับแบคทีเรียแกรมบวก 5 กลุ่ม คือ *Rhodococcus*, *Mycobacterium*, *Nocardiodes*, *Terrabacteria* และ *Bacillus* และพบว่ายีนมากกว่า 12 ชนิดอยู่ในกลุ่มของ *Rhodococcus* และ *Mycobacterium*

Sipila และคณะ (2006) ศึกษาความหลากหลายของกลุ่มแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลายทางชีวภาพในดินที่มีการปนเปื้อน 3 แหล่งและออกแบบโปรเมออร์ให้มีความจำเพาะกับส่วนบนของวิถีการย่อยโดยยีนเอกซ์ตราไดออกซิจีเนสซึ่งโปรเมออร์ที่สร้างขึ้นถูกนำมาใช้ในปฏิกิริยาถูกใช้พอลิเมอเรสเพื่อเพิ่มจำนวนยีนที่อยู่บริเวณส่วนบนของวิถี จากนั้นนำผลิตภัณฑ์ที่ได้จากปฏิกิริยาถูกใช้พอลิเมอเรสไปโคลนและวิเคราะห์รูปแบบโดยวิธี RFLP ซึ่งจำแนกได้โดยการตัดผลิตภัณฑ์ที่ได้ด้วย *HhaI* ได้ 26 หน่วยที่แตกต่างกัน พบว่ามีความใกล้เคียงกับยีนของหน่วยย่อยแอลฟา เบตา และแกมมาโพรทีโอแบคทีเรีย เมื่อวิเคราะห์แบบแผนภูมิสามารถจัดกลุ่มได้ 7 กลุ่ม พบว่า 2 กลุ่มไม่มีความใกล้เคียงกับฐานข้อมูลเลย คือกลุ่มที่ 6 และ 7 ซึ่งสามารถจำแนกได้ 2 subfamilies กลุ่มที่ 6 จัดอยู่ในกลุ่มของแอลฟาโพรทีโอแบคทีเรีย และกลุ่มที่ 7 อยู่ในกลุ่มของแกมมาโพรทีโอแบคทีเรีย ดังนั้นจึงแสดงให้เห็นว่าพบยีนใหม่ที่มีความสามารถในการย่อยสลายทางชีวภาพ

ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

### บทที่ 3

## อุปกรณ์ เคมีภัณฑ์ และวิธีดำเนินงานวิจัย

### อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

1. กระบอกฉีดยาพลาสติก ขนาด 1 และ 5 มิลลิลิตร บริษัท Nipro, Thailand
2. เครื่องกำเนิดเสียงความถี่สูง (ultrasonicator) รุ่น FS4000 บริษัท Decan Ultrasonics, England
3. เครื่องเขย่าชนิดควบคุมอุณหภูมิ (controlled environment incubator shaker) รุ่น G-27 บริษัท New Brunswick Scientific, USA
4. เครื่องชั่ง รุ่น P2002-S และ AG285 บริษัท Mettler Toledo, Switzerland
5. เครื่องปั่นผสม (vortex mixer) รุ่น Gene 2 บริษัท Scientific Industries, USA
6. เครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดควบคุมอุณหภูมิ (refrigerated centrifuge) รุ่น 1920 บริษัท Kubota, Japan
7. เครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดตั้งโต๊ะ (bench-top centrifuge) รุ่น MIKRO20 บริษัท Hettich, Germany
8. เครื่องตรวจสอบเจล (Gel documentation system) รุ่น Gel DOC 2000<sup>TM</sup> บริษัท Bio-Rad, USA
9. เครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (DNA Thermal Cycler) รุ่น 2400 บริษัท Perkin Elmer, USA และ รุ่น MJ Mini<sup>TM</sup> Personal Thermal Cycler บริษัท Bio-Rad, USA
10. เครื่องนึ่งอบฆ่าเชื้อ (autoclave) บริษัท Kakusan, Japan
11. เครื่องวัดค่าความเป็นกรด - ด่าง (pH meter) รุ่น 240 บริษัท Corning, USA
12. ชุดกรองสำเร็จรูปชนิด PTFE ขนาดความกว้างรู 0.2 ไมโครเมตร บริษัท Tokyo Roshi Kaisha, Japan
13. ชุดเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟี (Gas Chromatography, GC)
  - เครื่องแก๊สโครมาโตกราฟี รุ่น 6890N บริษัท Agilent Technologies, USA
  - คอลัมน์ (column) ชนิด HP-5 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 320 ไมโครเมตร ยาว 30 เมตร ภายในเคลือบด้วย เฟนนิล เมทิล ซาโลเซน ความเข้มข้น 5% หนา 0.25 ไมโครเมตร
  - เครื่องตรวจวัด (detector) ชนิด Flame Ionization Detector (FID)
  - เข็มฉีดยาขนาดเล็ก (microsyringe) ขนาด 10 ไมโครลิตร

14. ชุดเครื่องมือ Minigel migration trough รุ่น i-mupid บริษัท COSMO BIO, Japan
15. ตู้แช่แข็งจุดเยือกแข็งต่ำ (deep freezer) อุณหภูมิ  $-70^{\circ}\text{C}$  รุ่น ULT1786 บริษัท Forma Scientific, USA
16. ตู้แช่แข็งจุดเยือกแข็งต่ำ (deep freezer) อุณหภูมิ  $-20^{\circ}\text{C}$  รุ่น MDF-U332 บริษัท Sanyo Electric, Japan
17. ตู้บ่มเชื้ออุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส รุ่น BE800 บริษัท Memmert, Germany
18. ตู้อบฆ่าเชื้อ (hot air oven) รุ่น D06063 บริษัท Memmert, Germany
19. ตู้อบแห้ง (oven) บริษัท Contherm Scientific, New Zealand
20. ไมโครปิเปต (micropipette) ขนาด 2, 10, 20, 200, 1000 และ 5000 ไมโครลิตร บริษัท Gilson, France
21. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath) รุ่น digital water bath SB-1000 บริษัท Eyla, Japan

#### เคมีภัณฑ์

1. ชุดเอนไซม์ T4 DNA Ligase บริษัท Bio-Rad, USA
2. Trizma base (tris [hydroxymethyl] aminomethane), ( $\text{C}_4\text{H}_{11}\text{NO}_3$ ) บริษัท Sigma, USA
3. กรดไฮโดรคลอริก (HCl) บริษัท BDH Chemicals, Australia
4. กลีเซอรอล (glycerol) บริษัท Research Organics, Inc., USA
5. ทริปโตเน (tryptone) บริษัท Difco Laboratories, USA
6. ชุดสกัดพลาสมิดปริมาณน้อย QIAprep Spin Miniprep Kit บริษัท Qiagen, Germany
7. แบคทีโอะการ์ (bacto agar) บริษัท Difco, USA.
8. ชุดเอนไซม์ตัดจำเพาะ EcoRI บริษัท Promega, USA
9. ชุดเอนไซม์ Taq DNA polymerase บริษัท New England Biolabs, USA
10. ฟีนแอนทรีน (phenanthrene) บริษัท Sigma, USA
11. นอร์มัลเฮกเซน ( $\text{C}_6\text{H}_{14}$ ) บริษัท Merck, Germany
12. ผงสกัดจากยีสต์ (yeast extract) บริษัท Difco Laboratories, USA
13. อะซิโตน (acetone) บริษัท Merck, Germany
14. Triton X-100 บริษัท Sigma, USA
15. ฟีนอล (phenol) บริษัท Merck, Germany
16. 100 base pair DNA ladder บริษัท Bio-Rad, USA
17. รูบิเดียมคลอไรด์ (RbCl) บริษัท Sigma, USA



- 18 สารปฏิชีวนะกานามัยซิน (kanamycin, Km)
- 19 ชุดเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI บริษัท Fermentas, Canada
- 20 อะกาโรสเจล (agarose gel) บริษัท IUI, Japan
- 21 อะซีแนฟทีน (acenaphthene) บริษัท Wako, Japan
- 22 ชุดเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Sau*3AI บริษัท Fermentas, Canada
- 23 ชุด Glass Powder for Recovery of DNA EASYTRAP™ Ver.2 บริษัท TAKARA, Japan
- 24 สีบรอมฟีนอลบลู (bromphenolblue) บริษัท Fluka, Switzerland
- 25 เมทานอล (CH<sub>3</sub>OH) บริษัท Merck, Germany
- 26 กลูโคส (glucose) บริษัท Merck, Germany
- 27 เอทิลีนไดเอมีนเตตระอะซีติกแอซิด (ethylenediaminetetraacetic acid, EDTA),  
(C<sub>10</sub>H<sub>14</sub>N<sub>2</sub>O<sub>8</sub>Na<sub>2</sub>•2H<sub>2</sub>O) บริษัท Sigma, USA
- 28 แคลเซียมคลอไรด์ 2 น้ำ (CaCl<sub>2</sub>•2H<sub>2</sub>O) บริษัท Merck, Germany
- 29 แนฟทาลีน (naphthalene) บริษัท Kanto Chemical Co., INC, Japan
- 30 100 base pair DNA ladder บริษัท Bio-Rad, UK
- 31 แมงกานีสคลอไรด์ (MnCl<sub>2</sub>) บริษัท Merck, Germany
- 32 แมกนีเซียมคลอไรด์ (MgCl<sub>2</sub>) บริษัท Merck, Germany
- 33 แมกนีเซียมซัลเฟต 7 น้ำ (MgSO<sub>4</sub>•7H<sub>2</sub>O) บริษัท Carlo ERBA, France
- 34 กรดอะซีติกเข้มข้น 7 น้ำ (glacial CH<sub>3</sub>COOH) บริษัท Merck, Germany
- 35 แอมโมเนียมไนเตรต (NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>) บริษัท Merck, Germany
- 36 โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) บริษัท Merck, Germany
- 37 โซเดียมซัลเฟตแอนไฮดรัส (anhydrous Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) บริษัท Merck, Germany
- 38 ไดเมทิลฟอร์มมาไมด์ (dimethyl formamide, DMF) บริษัท BIOBASIS, INC. Japan
- 39 โซเดียมอะซิเตต 3 น้ำ (CH<sub>3</sub>COONa•3H<sub>2</sub>O) บริษัท Merck, Germany
- 40 โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต (sodium dodecyl sulfate, SDS), (C<sub>12</sub>H<sub>25</sub>OSO<sub>3</sub>) บริษัท Nacalai  
Tesque, Japan
- 41 โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) บริษัท Merck, Germany
- 42 โพแทสเซียมอะซิเตต (CH<sub>3</sub>COOK) บริษัท Merck, Germany
- 43 ไพรีน (pyrene) บริษัท Sigma, USA
- 44 ไอโซโพรพานอล (isopropanol) บริษัท Merck, Germany
- 45 IPTG (Isopropyl thio- β-D-galactoside) บริษัท BIO BASIC INC, Canada
- 46 Lambda *Hind*III บริษัท Bio-Rad, USA

47 โปรตีนเนสเค Proteinase K บริษัท US.Biological, USA

48 ไรโบนิวคลีเอสเอ Rnase A บริษัท Promega, USA

49 1 kilobase DNA ladder บริษัท Bio-Rad, USA

50 สารเคมีที่ใช้ในเทคนิค DGGE บริษัท Bio-Rad, USA

Formamide (Deionized)

40% Acrylamide/Bis solution, 37.5:1 (2.6% C)

Urea

Ammonium persulfate

TEMED (N,N,N',N'-Tetra-methyl-ethylenediamine)

50xTAE

Dye solution

Ethidium bromide solution เข้มข้น 10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร

### ไพรเมอร์ที่ใช้ในการวิจัย

ตารางที่ 3.1 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ที่ใช้ในการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

ชื่อไพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์ (5' ถึง 3')	เอกสารอ้างอิง
M13F (-20)	GTAAAACGACGGCCAGT	Muyzer และคณะ 1993
341F	CCTACGGGAGGCAGCAG	Muyzer และคณะ 1993
350F	TACGGGAGGCAGCAG	Muyzer และคณะ 1993
520R	ACC GCGGCTGCTGGC	Muyzer และคณะ 1993

ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 3.2 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ที่ใช้ในการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอบริเวณยีนที่ประมวลรหัสหน่วยย่อยแอลฟาของเทอร์มินัลไดออกซิจีเนส

ชื่อไพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์ (5' ถึง 3') *	ขนาดคาดหวัง (bp)	เอกสารอ้างอิง
ndoBF ndoBR	CACTCATGATAGCCTGATTCCTGCCCCCGGCG CCGTCCCACAACACACCCATGCCGCTGCCG	642	Kurkela และ คณะ 1988
phnAcF phnAcR	CCATTACGGTGATTCGTGACC ACAAAATTCTCTGACGGCGC	462	Laurie และ คณะ 1999
arhA1F arhA1R	CGCCGACTGAAAATTTTGT GTCGTCAGCTTCCCAGTAGC	518	Klankeo และ คณะ 2009
bphA1F bphA1R	TATTTGGGGGACTTCTGCTG TTGGGAGGATCGACGTATTC	424	Klankeo และ คณะ 2009
GNF GNR	GAG ATGCATACCACGTKGGTTGGA AGCTGTTGTTCCGGGA AGAYWGTGCMGTT	306	Cebon และ คณะ 2008
GPF GPR	CGGCGCCGACAAYTTYGTNGG GGGGAACACGGTGCCRTGDATRAA	292	Cebon และ คณะ 2008
NahAc1F NahAc3F NahAc2	TTCATGGCGAYGAAGAACT GAAGCMGGHAATGCBAAA RGACMATGGCGTAGGTCCA	950 (1F-2R) 730 (3F-2R)	Lafortune และ คณะ 2008
NMR331f NMR1134r	TGCCCKTACCACGGYTGG CTCGGCGTCGTCCCTGYTC	803	Marcos และ คณะ 2009
adoF1 adoB1	GTGTTCTGAACCAGTGCCGSCACCG TGGTACATGTCRCTGCARAACCTGCTC	394	Taylor และ คณะ 2009

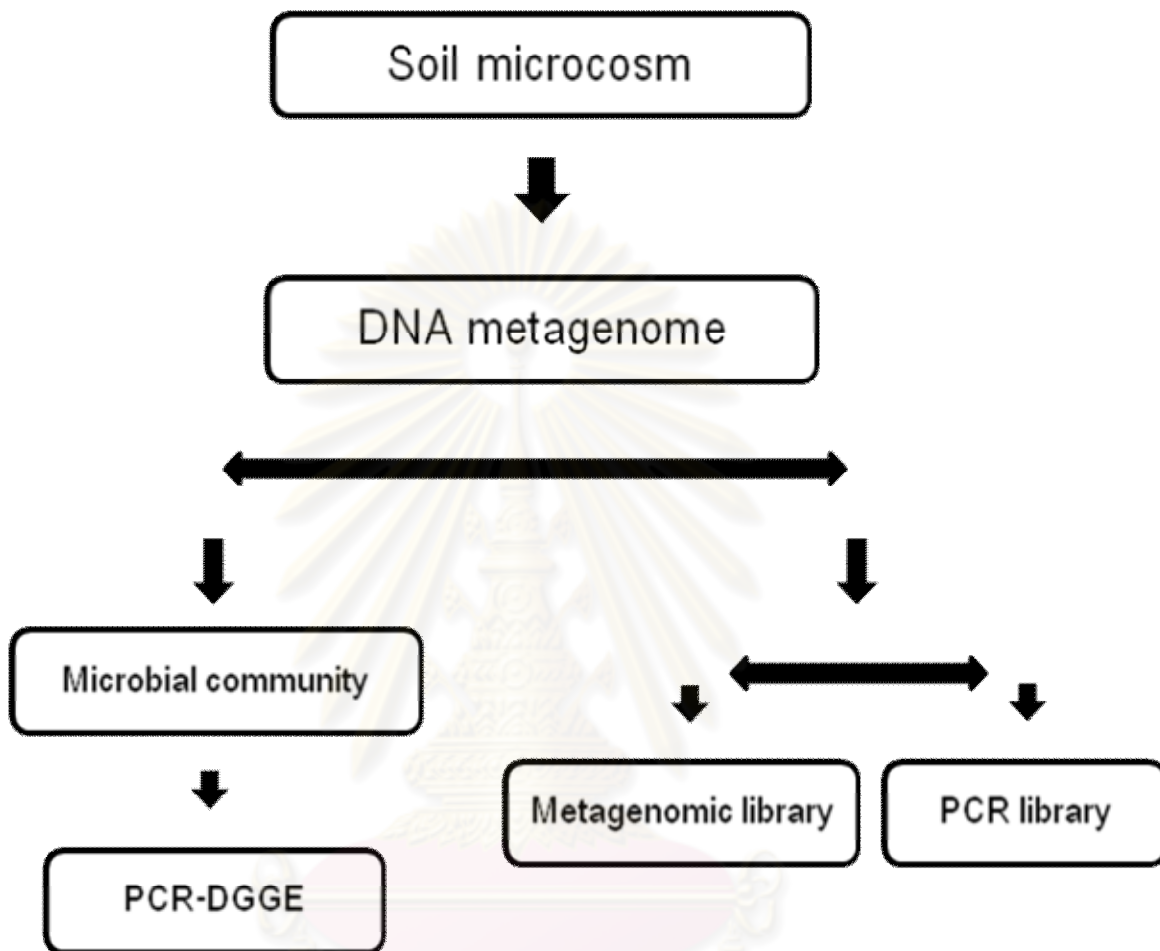
หมายเหตุ \* เป็นโอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์

ตารางที่ 3.3 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ที่ใช้ในการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอบริเวณยีนที่ประมวลรหัสเอกซัตราไดออกซิลไดออกซิจีเนส

ชื่อไพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์ (5' ถึง 3') *	ขนาดคาดหวัง (bp)	เอกสารอ้างอิง
BphCS1F BphCS2R	GTCACSGAACTCGGYTAY TCGCGGGTGTAGTATTCC	840	Lafortune และ คณะ 2008
BP-f BP-r	TCTAYCTVCGNATGGAYHDBTGGCA TGVTSNCGNBCRRTGCARTGCATGAA	469	Sipila และ คณะ 2006

หมายเหตุ \* เป็นโอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์

## วิธีดำเนินงานวิจัย



รูปที่ 3.1 แผนภาพแสดงขั้นตอนการดำเนินงานวิจัย

### 3.1 เก็บตัวอย่างดิน

เลือกเก็บตัวอย่างดินจากแหล่งดินอุดมสมบูรณ์ในธรรมชาติโดยเก็บจากผิวดินลึกลงไปประมาณ 1.5 เซนติเมตร 10 เซนติเมตร ผึ่งลมไว้ข้ามคืน แยกเศษหินออก แล้วนำมาร่อนผ่านตะแกรงขนาดรู 1.18 มิลลิเมตร (เบอร์16) เก็บตัวอย่างดินไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส จนกว่าจะทำการทดลอง

3.1.1 วิเคราะห์สมบัติทางฟิสิกส์และเคมีของดินและการปนเปื้อนของพีแนทรีนและอะซีแนทรีน

#### 3.1.1.1 วิเคราะห์สมบัติทางฟิสิกส์และเคมีของดิน

นำตัวอย่างดินส่งตรวจที่กลุ่มงานพัฒนาระบบตรวจสอบคุณภาพดินและน้ำ กลุ่มวิจัยเกษตรเคมี สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิต กรมวิชาการเกษตร โดยวิเคราะห์ค่าความเป็นกรดต่าง (pH) สภาพการนำไฟฟ้า (Electrical Conductivity) สารอินทรีย์ (Organic Matter) ปริมาณความชื้น (Moisture Content) ความสามารถในการแลกเปลี่ยนประจุหรือไอออน (Cation Exchange Capacity) ความจุสูงสุดในการอุ้มน้ำ (Water Holding Capacity) อินทรีย์คาร์บอน (Organic carbon) ไนโตรเจน (Nitrogen) ฟอสฟอรัส (Phosphorus) โพแทสเซียม (Potassium) แคลเซียม (Calcium) แมกนีเซียม (Magnesium) และลักษณะเนื้อดิน (Texture) ตามวิธีที่แสดงไว้ในตารางที่ 3.4

ตารางที่ 3.4 วิธีการวิเคราะห์สมบัติทางฟิสิกส์และเคมีของดิน

สมบัติของดิน	วิธีการวิเคราะห์
ความเป็นกรดต่าง	ดิน : น้ำ = 1 : 1 และวัดโดยอิเล็กโทรด
สภาพการนำไฟฟ้า	ดิน : น้ำ = 1 : 5 และวัดโดยอิเล็กโทรด
สารอินทรีย์	Walkley-Black Method
ปริมาณความชื้น	Physical method
ความสามารถในการแลกเปลี่ยนประจุหรือไอออน	$\text{NH}_4^+$ saturation and distillation
ความจุสูงสุดในการอุ้มน้ำ (%)	Comparison between wet weight and dried weight
อินทรีย์คาร์บอน (%)	Wet oxidation method
ไนโตรเจน (%)	% OM X 0.05



ตารางที่ 3.4 วิธีการวิเคราะห์สมบัติทางฟิสิกส์และเคมีของดิน (ต่อ)

สมบัติของดิน	วิธีการวิเคราะห์
ฟอสฟอรัส	Bray II
โพแทสเซียม	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> acetate 1 N pH 7.0 extraction
แคลเซียม	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> acetate 1 N pH 7.0 extraction
แมกนีเซียม	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> acetate 1 N pH 7.0 extraction
ลักษณะเนื้อดิน	Hydrometer method

### 3.1.1.2 วิเคราะห์ปริมาณสารประกอบพอลิไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน

ตรวจสอบการปนเปื้อนของพีแนทรีนและอะซีแนทรีนในตัวอย่างดินโดยวิธีแก๊สโครมาโตกราฟี (Gas chromatography, GC) โดยใช้ *n*-hexane ในการสกัดด้วยตัวทำละลายโดยเติม *n*-hexane ปริมาตร 4 มิลลิลิตร และ 15% TritonX-100 ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร ในตัวอย่างดิน 2 กรัม ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมสารและนำไปเขย่าบนเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที นาน 24 ชั่วโมง จากนั้นนำไปแช่เยือกแข็งที่ -20 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง เติม anhydrous Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ที่ผ่านการอบข้ามคืนและทิ้งไว้ให้เย็นเพื่อกำจัดน้ำออกจากส่วนของชั้น *n*-hexane แล้วนำส่วนของ *n*-hexane กรองผ่านชุดกรองสำเร็จรูปชนิด PTFE ที่มีขนาดรูกรอง 0.20 ไมโครเมตร ตรวจสอบการปนเปื้อนสารประกอบพอลิไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนในตัวอย่างดินโดยวิธีแก๊สโครมาโตกราฟี (Gas chromatography, GC) รุ่น 6890N (บริษัท Agilent Technologies, USA) คอลัมน์ชนิด HP-5 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 320 ไมโครเมตร ยาว 30 เมตร ภายในเคลือบด้วยเฟนิล เมทิล ซิโลเซน ความเข้มข้น 5% หนา 0.25 ไมโครเมตร เครื่องตรวจวัดชนิด Flame Ionization Detector (FID)

วิเคราะห์ภายใต้สภาวะดังนี้

อุณหภูมิเริ่มต้น 80°ซ

อุณหภูมิขั้นที่ 1 25°ซ ต่อเวลาที่ จนอุณหภูมิ 160°ซ hold 3 นาที

อุณหภูมิขั้นที่ 2 3°ซ ต่อเวลาที่ จนอุณหภูมิ 220°ซ hold 2 นาที

อุณหภูมิขั้นที่ 3 40°ซ ต่อเวลาที่ จนอุณหภูมิ 300°ซ hold 7 นาที

โดยใช้ฮีเลียมเป็นแก๊สตัวพาไหลด้วยอัตราเร็ว 1.7 มิลลิลิตรต่อนาที

เปรียบเทียบความเข้มข้นกับกราฟมาตรฐานของพีแนทรีน

### 3.1.2 สร้างระบบนิเวศจำลองดิน

บรรจุดินจำนวน 6 กรัม ในขวดแก้วฝาเกลียวแบ่งเป็นชุดควบคุมและชุดทดลอง หนึ่งฆ่าเชื้อชุดควบคุมที่ 121 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที 3 ครั้ง โดยระหว่างการฆ่าเชื้อแต่ละครั้ง ตั้งทิ้งไว้ 1 วัน จึงฆ่าเชื้อครั้งต่อไป ชุดการทดลองมาเติมพีแนนทรินหรือ/และอะซีแนพรีนในอะซิโตน (ภาคผนวก ข) ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายในดินเป็น 300 ppm ตั้งทิ้งไว้ 1 คืนให้อะซิโตนระเหย ปรับความชื้นให้เป็น 60% ของความจุสูงสุดในการอุ้มน้ำด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ เติมน้ำกลั่นปลอดเชื้อทุก 7 วัน เพื่อรักษาความชื้นโดยพิจารณาจากน้ำหนักที่หายไปเมื่อเทียบกับน้ำหนักเริ่มต้น เก็บตัวอย่างดินทุก 2 สัปดาห์ นาน 6-8 สัปดาห์ โดยเก็บตัวอย่างดินชุดละ 3 ขวด ในแต่ละขวดซึ่งตัวอย่างดินเพื่อนำมาวิเคราะห์ดังนี้

ก. 2 กรัม สำหรับวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบพอลิไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนที่เหลือโดยวิธีแก๊สโครมาโตกราฟี ตามวิธีที่ระบุในข้อ 3.1.1.2

ข. 4 กรัม สำหรับสกัดดีเอ็นเอเพื่อสร้างห้องสมุดดีเอ็นเอ ตามวิธีที่ระบุในข้อ 3.2.1

## 3.2 ติดตามการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างประชาคมจุลินทรีย์โดยวิธี Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE)

### 3.2.1 สกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างดิน

วิธีสกัดดีเอ็นเอดัดแปลงมาจาก Zhou และคณะ (1996) โดยชั่งดิน 4 กรัม ใส่ในหลอดเซนต์ปีฟิวจ์ 15 มิลลิลิตร เติม lysis buffer 7 มิลลิลิตร (ภาคผนวก ข) ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมสารเติมโปรตีนเนสเค (proteinase K) 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 50 ไมโครลิตร นำไปเขย่าด้วยเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมินำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที ทำการเยือกแข็ง-ละลาย (freeze-thaw) 3 ครั้ง โดยเยือกแข็งที่ -80 องศาเซลเซียส นาน 5-10 นาที และละลายที่ 65 องศาเซลเซียส นาน 3-5 นาที เติม 20% SDS (ภาคผนวก ข) 1.5 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่ 65 องศาเซลเซียส นาน 120 นาที โดยผสมให้เข้ากันทุก 20 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 7,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที เก็บส่วนน้ำใสลงในหลอดเซนต์ปีฟิวจ์ 15 มิลลิลิตร สกัดด้วยคลอโรฟอร์ม-ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ (24:1) (ภาคผนวก ข) เท่ากับปริมาตรของส่วนน้ำใส ผสมให้เข้ากันอย่างช้าๆ นาน 2-3 นาที ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 7,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที เก็บส่วนน้ำใสที่มีดีเอ็นเอลงในหลอดเซนต์ปีฟิวจ์ 30 มิลลิลิตร เติมไอโซโพรพานอลปริมาตร 0.6 เท่าของปริมาตรส่วนน้ำใส ผสมให้เข้ากันอย่างช้าๆ นาน 1 ชั่วโมง ปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิห้องด้วยความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที นาน 20 นาที เทส่วนน้ำใสทิ้งล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วย 70% เอทานอล (ภาคผนวก ข) ระเหยเอทานอลออกจากตะกอนดีเอ็นเอให้แห้งละลายตะกอนดีเอ็นเอใน

บัฟเฟอร์ TE (ภาคผนวก ข) 150 ไมโครลิตร เก็บสารละลายดีเอ็นเอที่ -20 องศาเซลเซียส (Harnpichanchai และคณะ, 2007)

### 3.2.1.1 แยกดีเอ็นเอด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิส

นำดีเอ็นเอที่สกัดได้มาแยกด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิส โดยเตรียมอะกาโรสเจลเข้มข้น 0.9% (ภาคผนวก ข) ที่หลอมในบัฟเฟอร์ TAE ความเข้มข้น 1 เท่า (ภาคผนวก ข) เทลงในแม่พิมพ์ที่มีหัวเสียบอยู่ เมื่ออะกาโรสแข็งตัว วางขึ้นอะกาโรสเจลที่ได้ลงในแชมเบอร์ เทปไฟเฟอร์ ให้ท่วมอะกาโรสเจล ผสมผลิตภัณฑ์ปฏิกิริยาถูกใช้กับสัติดตามจากนั้นหยอดลงในช่องวิ่งโดยช่องวิ่งที่ 1 จะหยอดด้วยดีเอ็นเอมาตรฐาน Lambda HindIII (ภาคผนวก ข) ที่ผสมกับสัติดตามแล้ว ปริมาตร 2 ไมโครลิตร จากนั้นทำอิเล็กโทรโฟเรซิส ใช้ความต่างศักย์ 100 โวลต์ จนกระทั่งสัติดตามเคลื่อนที่ได้ในระยะเวลาที่เหมาะสม ย้อมอะกาโรสเจลด้วยสารละลายเอธิเดียมโบรไมด์ เป็นเวลา 5 นาที ตรวจดูแถบดีเอ็นเอด้วยแสงอัลตราไวโอเล็ต

### 3.2.1.2 กำจัดกรดฮิวมิกโดยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิส

กำจัดกรดฮิวมิกด้วยวิธี DNA troughing method ตามวิธีของ Harnpichanchai และคณะ (2007) เตรียมอะกาโรสเจลเข้มข้น 0.9% ที่หลอมในบัฟเฟอร์ TAE ความเข้มข้น 1 เท่าซึ่งมีเอธิเดียมโบรไมด์เข้มข้น 1-5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ผสมอยู่ในเจลเทลงในแบบพิมพ์ซึ่งมีหัวเสียบอยู่ระวางอย่าให้มีฟองอากาศ ปล่อยให้อะกาโรสแข็งตัวประมาณ 20 นาที วางขึ้นอะกาโรสเจลที่ได้ลงในแชมเบอร์เทปไฟเฟอร์ TAE ความเข้มข้น 1 เท่าให้พอดีกับขอบอะกาโรสเจล ผสมสารละลายดีเอ็นเอกับสัติดตามหยอดลงในช่องวิ่ง โดยช่องวิ่งแรกหยอดด้วยดีเอ็นเอมาตรฐาน Lambda HindIII ที่ผสมกับสัติดตามแล้วปริมาตร 2 ไมโครลิตร จากนั้นทำอิเล็กโทรโฟเรซิสโดยใช้ความต่างศักย์ 100 โวลต์ นาน 45 นาที ตรวจดูแถบดีเอ็นเอด้วยการส่องด้วยแสงอัลตราไวโอเล็ต จากนั้นตัดช่องบริเวณใต้แถบดีเอ็นเอแล้วเติม 30% PEG8000 (ภาคผนวก ข) ในบัฟเฟอร์ TAE ความเข้มข้น 1 เท่า จากนั้นนำไปทำอิเล็กโทรโฟเรซิสนาน 30 นาที จนกระทั่งดีเอ็นเอตกลงมาในช่องที่ตัดและเก็บดีเอ็นเอที่อยู่ในช่องโดยทำ 2 ครั้ง จากนั้นนำดีเอ็นเอแต่ละครั้งที่เก็บมาตกตะกอนดีเอ็นเอด้วยเอทานอลปริมาตร 2 เท่าของปริมาตรส่วนน้ำใส เติมไกลโคเจน 1 ไมโครลิตร และเติม 3 โมลาร์ โซเดียมอะซิเตท 1 ส่วนใน 10 ส่วนของทั้งหมด จากนั้นละลายตะกอนดีเอ็นเอที่ได้ด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อหรือ บัฟเฟอร์ TE แล้วเก็บสารละลายดีเอ็นเอที่ -20 องศาเซลเซียส

### 3.2.1.3 วิเคราะห์ความบริสุทธิ์และปริมาณความเข้มข้นของดีเอ็นเอ

#### 3.2.1.3.1 นำสารละลายดีเอ็นเอไปวัดหาปริมาณและคุณภาพของดีเอ็นเอ

นำสารละลายดีเอ็นเอไปวัดหาปริมาณด้วยเครื่อง spectrophotometer ด้วยค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร ( $A_{260}$ ) และ 280 นาโนเมตร ( $A_{280}$ ) สำหรับดีเอ็นเอและโปรตีนตามลำดับ (Ray และคณะ., 2006) คำนวณค่า  $A_{260}$  ต่อ  $A_{280}$  โดยหากอัตราส่วนที่ได้มี

ค่านี้น้อยกว่า 1.8 แสดงว่ามีโปรตีนปนเปื้อนสูง แต่ถ้าค่าสูงกว่า 2.0 แสดงว่ามีอาร์เอ็นเอปนเปื้อนสูงและคำนวณหาความเข้มข้นของดีเอ็นเอจากสมการ

$$\text{ดีเอ็นเอสายคู่ (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)} = A_{260} \times 50 \times \text{dilution factor}$$

3.2.1.3.2 วิเคราะห์ความบริสุทธิ์ดีเอ็นเอโดยเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอบริเวณ 16S rDNA ของแบคทีเรียด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส

โดยใช้ไพรเมอร์ 341F และ 520R (ตารางที่ 3.1) (Muyzer และคณะ, 1993) เพิ่มจำนวนดีเอ็นเอบริเวณ V-3 region ซึ่งผลิตภัณฑ์ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสมีความยาวประมาณ 200 bp ความเข้มข้นสุดท้ายของแต่ละสารในปฏิกิริยามีดังนี้ สารละลายแมกนีเซียมคลอไรด์ ( $MgCl_2$ ) ความเข้มข้น 2 มิลลิโมลาร์ สารละลาย dNTP ความเข้มข้น 0.2 มิลลิโมลาร์  $1 \times Taq$  DNA polymerase ปริมาณ 2.5 หน่วย สารละลายไพรเมอร์ความเข้มข้น 20 พิโคโมลต่อไมโครลิตร (ของแต่ละตัว) ดีเอ็นเอที่สกัดจากวิธี 3.2.1.2 ปริมาณ 1 พิโคกรัม ถึง 1 ไมโครกรัม ปรับปริมาตรด้วยน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อ รวมส่วนผสมทั้งหมดให้มีปริมาตรสุทธิ 30 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน หลังจากนั้นดำเนินปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสด้วยเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (DNA Thermo Cycle) โดยให้มีสภาวะดังนี้

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

ตรวจสอบผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นโดยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสในบัฟเฟอร์ TAE ความเข้มข้น 1 เท่า โดยใช้อะกาโรสเจลเข้มข้น 2% เพื่อตรวจสอบขนาดของผลิตภัณฑ์ PCR โดยการเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA ladder ตามวิธีที่ระบุในข้อ 3.2.1.1 ต่อไป

3.2.2 ติดตามการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างประชาคมจุลินทรีย์โดยวิธี Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE)

3.2.2.1 นำดีเอ็นเอที่สกัดได้จากข้อ 2.1.3.2 มาเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอบริเวณ 16S rDNA ของแบคทีเรียโดยใช้ไพรเมอร์ 341F (5'-CCTACGGGAGGCAGCAG-3') ซึ่งมี GC clamp (5'-CGCCCGCCGCGCCCGCGCCCGTCCCGCCGCCCCGCCCCG-3') เชื่อมต่อบริเวณ 5' และ 520R (5'-ACCGCGGCTGCTGGC-3') (Muyzer และคณะ, 1993) เพิ่มจำนวนดีเอ็นเอบริเวณ V-3 region ซึ่งผลิตภัณฑ์ PCR มีความยาวประมาณ 200 bp โดยที่ความเข้มข้นสุดท้ายของสารแต่ละชนิดในปฏิกิริยาความเข้มข้นสุดท้ายของแต่ละสารในปฏิกิริยามีดังนี้ สารละลาย

แมกนีเซียมคลอไรด์ (MgCl<sub>2</sub>) ความเข้มข้น 2 มิลลิโมลาร์ สารละลาย dNTP ความเข้มข้น 0.2 มิลลิโมลาร์ 1× Taq DNA polymerase ปริมาณ 2.5 หน่วย สารละลายไพรเมอร์ความเข้มข้น 20 พิโคโมลต่อไมโครลิตร (ของแต่ละตัว) ดีเอ็นเอที่สกัดจากวิธี 3.2.1.3.2 ปริมาณ 1 พิโคกรัม ถึง 1 ไมโครกรัม ปรับปริมาตรด้วยน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อ รวมส่วนผสมทั้งหมดให้มีปริมาตรสุทธิ 30 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน หลังจากนั้นดำเนินการปฏิกิริยาถูกโซ่พอลิเมอไรส์ด้วยเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (DNA Thermo Cycle) โดยให้มีสภาวะดังนี้

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

ตรวจสอบผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นโดยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิสในบัฟเฟอร์ TAE ความเข้มข้น 1 เท่า โดยใช้อะกาโรสเจลเข้มข้น 2% เพื่อตรวจสอบขนาดของผลิตภัณฑ์ PCR โดยการเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA ladder ตามวิธีที่ระบุในข้อ 3.2.1.1 ต่อไป

3.2.2.2 วิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ถูกโซ่พอลิเมอไรส์ โดยวิธี Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE)

โดยใช้อุปกรณ์ของ DCode™ system (Bio-Rad Laboratories Inc., USA) ในการวิเคราะห์ DGGE โดยเตรียมพอลิอะคริลาไมด์เจลเข้มข้น 8% ที่มีเกรเดียนท์ของสารละลาย denaturant 30–70% (ภาคผนวก ข) (100% denaturant ประกอบด้วย 7 M urea และ 40% formamide) ซึ่งทำเกรเดียนท์ของสารละลาย denaturant โดยใช้ระบบจ่ายเกรเดียนท์ตามวิธีที่ระบุในคู่มือ เมื่อทำเกรเดียนท์ของสารละลาย denaturant ลงในชุดแซนวิชเตรียมเจลแล้ว เสียบหัวลงไประหว่างกระจกแซนวิชระวางอย่าให้มีฟองอากาศปล่อยให้พอลิอะคริลาไมด์แข็งตัวนำชุดแซนวิชใส่ลงในแทมเบอร์ที่มีบัฟเฟอร์ TAE ความเข้มข้น 1 เท่า ปริมาตร 7 ลิตร ที่ผ่านการให้ความร้อนจนอุณหภูมิประมาณ 60 องศาเซลเซียส ผสมผลิตภัณฑ์ปฏิกิริยาถูกโซ่พอลิเมอไรส์กับสีติดตามหยอดลงในช่องวิ่ง จากนั้นทำอิเล็กโทรโฟเรซิสโดยใช้ความต่างศักย์ 130 โวลต์ ที่ 60 องศาเซลเซียส นาน 5 ชั่วโมง ย้อมพอลิอะคริลาไมด์เจลด้วยสารละลายเอซีดีเอ็มโบรไมด์เข้มข้น 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นาน 20 นาที นำไปดูภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต (UV)



### 3.2.3 วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์จากแถบดีเอ็นเอเด่น

#### 3.2.3.1 เพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอและทำให้บริสุทธิ์เพื่อการโคลน

ตัดชิ้นเจลบริเวณแถบดีเอ็นเอเด่นในน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อปริมาณ 30 ไมโครลิตร แชนด์เอ็นเอไว้ที่ 4°C ประมาณ 2-3 วัน เพื่อให้ดีเอ็นเอละลายออกมาในน้ำให้มากที่สุด เพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาถูกโซ่พอลิเมอเรส โดยที่ชนิดและความเข้มข้นสุดท้ายของสารแต่ละชนิดในปฏิกิริยาเหมือนกับที่ใช้ในการเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอสำหรับทำ DGGE แต่ฟอร์เวิร์ดไพรเมอร์ที่ไม่ต้องเชื่อมต่อกับ GC clamp บริเวณ 5' หลังจากนั้นดำเนินปฏิกิริยาถูกโซ่พอลิเมอเรสด้วยเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (Perkin Elmer, USA) โดยตั้งโปรแกรมดังนี้

เพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอบริเวณ 16S rDNA ตั้งโปรแกรมดังนี้

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

ทำให้บริสุทธิ์ด้วย QIAquick PCR purification kit (Qiagen, Germany) ตามวิธีที่ระบุในคู่มือ โดยเติมบัฟเฟอร์ PB ปริมาตร 5 เท่าของผลิตภัณฑ์ถูกโซ่พอลิเมอเรส ผสมให้เข้ากันแล้วดูดลงใน QIAprep spin column นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาทีที่อุณหภูมิห้อง เทส่วนน้ำใส่ทิ้ง เติมน้ำบัฟเฟอร์ PE ปริมาตร 750 ไมโครลิตร ลงในคอลัมน์ นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที ที่อุณหภูมิห้อง เทส่วนน้ำใส่ทิ้งก่อนปั่นเหวี่ยงซ้ำอีกครั้งเพื่อกำจัดส่วนน้ำใส่ที่เหลือติดคอลัมน์ ย้ายคอลัมน์มายังหลอดไมโครฟิวจีใหม่ เติมน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อหรือบัฟเฟอร์ EB ปริมาตร 30-50 ไมโครลิตร ให้ลงตรงแผ่นกรองตั้งทิ้งไว้ 1 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที ที่อุณหภูมิห้อง จะได้ผลิตภัณฑ์ถูกโซ่พอลิเมอเรส ที่บริสุทธิ์ เก็บไว้ที่ -20°C จนกว่าจะนำมาใช้

#### 3.2.3.2 โคลนชิ้นผลิตภัณฑ์ปฏิกิริยาถูกโซ่พอลิเมอเรส

3.2.3.2.1 ไลเกทชิ้นผลิตภัณฑ์ปฏิกิริยาถูกโซ่พอลิเมอเรสที่ได้จากข้อ 3.2.3.1 เข้ากับ พลาสมิดเวกเตอร์ pGEM-T Easy ด้วยไลเกส (ligase) (Promega, USA) ตามวิธีที่ระบุในคู่มือ โดยทำส่วนผสมปฏิกิริยา (ปริมาตร 10 ไมโครลิตร) ดังนี้

2x ไลเกชันบัฟเฟอร์	5	ไมโครลิตร
พลาสมิดเวกเตอร์ pGEM-T Easy (50 นาโนกรัม)	1	ไมโครลิตร
ผลิตภัณฑ์ปฏิกิริยาถูกโซ่พอลิเมอเรส	3	ไมโครลิตร(ประมาณ 150 นาโนกรัม)

T4 DNA ligase (3 หน่วยต่อไมโครลิตร) 1 ไมโครลิตร

ทำไลเกชันที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 16-18 ชั่วโมง

3.2.3.2.2 ทรานส์ฟอร์มรีคอมบิแนนท์พลาสมิดเข้าสู่คอมพีเทนต์เซลล์ *E. coli* JM109 และคัดเลือกทรานส์ฟอร์มแมนท์ที่มีชั้นยีนที่ต้องการอยู่ภายในชั้นดีเอ็นเอสอดแทรก

3.2.3.2.2.1 เตรียมคอมพีเทนต์เซลล์โดยวิธี Calcium chloride (Sambrook และ Russell, 2001) ลงเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ JM109 บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง  $\Psi_b$  (ภาคผนวก ก) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 16-18 ชั่วโมง เชื้อโคลนนี้เดี่ยวของ *E. coli* สายพันธุ์ JM109 ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว  $\Psi_b$  ปริมาตร 5 มิลลิลิตร นำไปเขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 4 ชั่วโมง จนกระทั่ง OD<sub>600</sub> มีค่าเท่ากับ 0.3-0.5 เพื่อใช้เป็นหัวเชื้อ จากนั้นถ่ายหัวเชื้อปริมาตร 5 มิลลิลิตร ไปยังอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว  $\Psi_b$  ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ที่บรรจุใน arm flask นำไปเขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จนกระทั่ง OD<sub>600</sub> มีค่าเท่ากับ 0.5 เมื่อเซลล์เจริญจนถึงค่า OD<sub>600</sub> ที่ต้องการ ถ่ายเชื้อลงในหลอดเซนตริฟิวจ์ปลอดเชื้อแช่ในน้ำแข็งนาน 5 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อตกตะกอนเซลล์ด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดควบคุมอุณหภูมิที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ความเร็วในการปั่นเหวี่ยง 3,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที (ตั้งแต่ขั้นตอนนี้ต้องทำที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ตลอด) เทอาหารเลี้ยงเชื้อทิ้ง เติมสารละลาย TfbI (ภาคผนวก ข) ที่เย็นปริมาตร 40 มิลลิลิตร ลงในตะกอนเซลล์ กระจายตะกอนให้เข้ากับสารละลาย TfbI (ห้ามใช้เครื่องปั่นผสม) แช่หลอดเซนตริฟิวจ์ที่มีตะกอนเซลล์และสารละลาย TfbI ในอ่างน้ำแข็งนาน 5 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ความเร็วในการปั่นเหวี่ยง 3,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที เทส่วนน้ำใสทิ้ง จากนั้นเติมสารละลาย TfbII (ภาคผนวก ข) ที่เย็นปริมาตร 4 มิลลิลิตร ลงในตะกอนเซลล์อีกครั้ง กระจายตะกอนให้เข้ากับสารละลาย TfbII แช่ในน้ำแข็งนาน 15 นาที หรือมากกว่านั้น แบ่งใส่หลอดไมโครฟิวจ์ปลอดเชื้อที่เย็น ปริมาตรหลอดละ 100 ไมโครลิตร เก็บคอมพีเทนต์เซลล์ไว้ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส

3.2.3.2.2.2 ทรานส์ฟอร์มรีคอมบิแนนท์พลาสมิดเข้าสู่คอมพีเทนต์เซลล์ *E. coli* JM109 ด้วยวิธี heat shock (Sambrook และ Russell, 2001) โดยนำคอมพีเทนต์เซลล์ *E. coli* JM109 ที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส มาแช่ในอ่างน้ำแข็งเพื่อให้ละลายช้าๆ ใส่รีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่ไลเกทไว้ปริมาตร 2 ไมโครลิตร ลงในคอมพีเทนต์เซลล์ *E. coli* JM109 ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วบ่มในอ่างน้ำแข็งนาน 20 นาที heat shock ที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส นาน 45-50 วินาที เมื่อครบเวลาให้แช่ลงในน้ำแข็งทันทีนาน 2 นาที แล้วจึงเติมอาหารเหลว SOC (ภาคผนวก ก) ปริมาตร 950 ไมโครลิตร ลงในหลอดบรรจุเชื้อและนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส อย่างน้อย 1 ชั่วโมง

3.2.3.2.2.3 คัดเลือกทรานสฟอร์มแมนท์ (transformant) ที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่ต้องการด้วยวิธี Blue/White selection (Sambrook และ Russell, 2001) นำสารละลายแขวนลอยของ *E. coli* JM109 ที่ทรานสฟอร์มรีคอมบิแนนท์พลาสมิดแล้วปริมาตร 100 ไมโครลิตร เกลี่ยลงบนอาหารแข็ง LB ที่มีสารปฏิชีวนะแอมพิซิลลิน (ภาคผนวก ข) ความเข้มข้นสุดท้าย 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิเมตร ซึ่งผ่านการเกลี่ยด้วย X-gal (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galactoside) เข้มข้น 2% (ภาคผนวก ข) ความเข้มข้นสุดท้าย 2 ไมโครกรัมต่อมิลลิเมตร และ IPTG (Isopropyl thio- $\beta$ -D-galactoside) เข้มข้น 1 มิลลาร์ (ภาคผนวก ข) ความเข้มข้นสุดท้าย 100 ไมโครโมลาร์ หลังจากเกลี่ยเพื่อนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 16–24 ชั่วโมง

#### 3.2.3.2.3 สกัดรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pGEM-T Easy

ด้วยชุดสกัดพลาสมิดปริมาณน้อย QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen, Germany) ตามวิธีที่ระบุในคู่มือ โดยเลี้ยง *E. coli* JM109 ที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pGEM-T Easy ในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB ที่มีสารปฏิชีวนะแอมพิซิลลิน ปริมาตร 5 มิลลิตร บ่มบนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที นาน 16-18 ชั่วโมง ปั่นเก็บเซลล์ในหลอดไมโครพิวล์ด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิห้องด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที นาน 2 นาที แขนงลอยเซลล์ด้วยบัฟเฟอร์ P1 ปริมาตร 250 ไมโครลิตร จากนั้นเติมบัฟเฟอร์ P2 ปริมาตร 250 ไมโครลิตร ผสมโดยการกลับหลอดจนกระทั่งสารแขวนลอยเริ่มเหนียวและใสขึ้นภายในระยะเวลาไม่เกิน 5 นาที เติมน้ำละลาย N3 ปริมาตร 350 ไมโครลิตร ผสมโดยกลับหลอดไปมาจนเกิดตะกอนขาว นำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อให้ตกตะกอนที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ที่อุณหภูมิห้อง แยกส่วนน้ำใสลงใน QIAprep spin column นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที ที่อุณหภูมิห้อง เทส่วนน้ำใสทิ้ง เติมน้ำบัฟเฟอร์ PB ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ลงในคอลัมน์ นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที ที่อุณหภูมิห้อง เทส่วนน้ำใสทิ้ง เติมน้ำบัฟเฟอร์ PE ปริมาตร 750 ไมโครลิตร ลงในคอลัมน์ นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที ที่อุณหภูมิห้อง เทส่วนน้ำใสทิ้งก่อนปั่นเหวี่ยงซ้ำอีกครั้งเพื่อกำจัดส่วนน้ำใสที่เหลือติดคอลัมน์ ย้ายคอลัมน์มายังหลอดไมโครพิวล์ใหม่ เติมน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อหรือบัฟเฟอร์ EB ปริมาตร 50-100 ไมโครลิตร ลงตรงแผ่นกรอง ตั้งทิ้งไว้ 1 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที ที่อุณหภูมิห้อง จะได้สารละลายพลาสมิดอยู่ในส่วนน้ำใส เก็บสารละลาย พลาสมิดที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

#### 3.2.3.2.4 ตัดรีคอมบิแนนท์พลาสมิดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

เพื่อตรวจสอบชิ้นดีเอ็นเอสอดแทรกภายในรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pGEM-T Easy ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI* *BsuRI* และ *HinfI* ตามลำดับโดยทำส่วนผสมของปฏิกิริยา (ปริมาตร 10 ไมโครลิตร) ดังนี้

รีคอมบิแนนท์พลาสมิด pGEM-T Easy	1	ไม่โคโรลิตร
10x บัฟเฟอร์	1	ไม่โคโรลิตร
เอนไซม์ตัดจำเพาะ	1	ไม่โคโรลิตร
น้ำปลอดประจุปลอดเชื้อ	7	ไม่โคโรลิตร

ผสมให้เข้ากันบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 2-4 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำส่วนผสมของปฏิกิริยาที่ได้ปริมาตร 5 ไมโครลิตร ตรวจสอบผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นโดยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสในบัฟเฟอร์ TAE ความเข้มข้น 1 เท่า โดยใช้อะกาโรสเจลเข้มข้น 2% เพื่อตรวจสอบขนาดของผลิตภัณฑ์ PCR โดยการเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA ladder ตามวิธีที่ระบุในข้อ 3.2.1.1 ต่อไป

#### 3.2.3.2.5 วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

ละลายรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่ได้ด้วยน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อ วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นดีเอ็นเอแทรกสอดในรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pGEM-T Easy โดยส่งวิเคราะห์ที่ First BASE Laboratories Sdn Bhd ประเทศมาเลเซีย ผ่านทางบริษัท Ward Medic Ltd., Part โดยบริษัทนี้ใช้ระบบ LI-COR® NEN 4200 Global IR2 DNA Sequencing และเครื่อง ABI® PRISM DNA Sequencers ในการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์โดยใช้ไพรเมอร์ M13F (-20) (5'-GTAAAACGACGGCCAGT-3') ซึ่งจำเพาะกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของพลาสมิดเวกเตอร์ เมื่อได้ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นดีเอ็นเอแทรกสอดจากนั้นนำไปเชื่อมลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยโปรแกรม DNASIS-Mac software version 2.05 (Hitachi Software Engineering Co.Ltd) และ Bioedit versions 7.0.4.1 และจำแนกชนิดของจุลินทรีย์โดยเปรียบเทียบกับข้อมูลที่มีในฐานข้อมูล GenBank โดยใช้โปรแกรม BLASTn (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)

#### 3.2.3.2.6 สร้างแผนภูมิต้นไม้แสดงความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ

นำลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rDNA ที่ผ่านการวิเคราะห์แล้ว และลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rDNA ของแบคทีเรียที่คัดเลือกไว้ ทำการปรับแนวของลำดับนิวคลีโอไทด์ (multiple alignment) โดยใช้โปรแกรม Clustal X จากนั้นนำข้อมูลที่ผ่านการปรับแนว มาคำนวณ distance matrix สร้าง phylogenetic tree ด้วยการวิเคราะห์แบบ Neighbor-joining และ Bootstrap ด้วยโปรแกรม PHYLIP software package version 3.572c ซึ่งประกอบไปด้วย DNADIST.EXE NEIGHBOR.EXE และ SEQBOOT.EXE ตามลำดับ phylogenetic tree ที่ถูกสร้างขึ้นนำเสนอโดยใช้โปรแกรม TREEVIEW (Felsenstein, 1985)



### 3.3 ตรวจสอบยีนไดออกซิจีเนสเบื้องต้นจากดีเอ็นเอที่สกัดจากระบบนิเวศจำลองดิน และสร้างห้องสมุดยีนจากผลิตภัณฑ์ปฏิกิริยาแลงก์มูสใช้พอลิเมอเรส

3.3.1 นำดีเอ็นเอที่สกัดได้จากข้อ 3.2.1.2 ตรวจสอบเบื้องต้นเพื่อหายีนไดออกซิจีเนส และยีนเอกซ์ตราไดออกไซด์ไดออกซิจีเนสด้วยวิธีปฏิกิริยาแลงก์มูสใช้พอลิเมอเรสโดยใช้คู่อินทริโพรไมด์ ไอโพรเมอร์ที่มียื่นเป้าหมายประมาณครึ่งหน่วยย่อยแอลฟาของเทอร์มินัลไดออกซิจีเนสของแบคทีเรีย กลุ่มต่างๆ ที่สามารถย่อยสลายสารประกอบพอลิไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนได้ ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไอโพรเมอร์และขนาดคาดหวังของผลิตภัณฑ์แลงก์มูสใช้พอลิเมอเรส ดังแสดงในตารางที่ 3.2 และ 3.3 โดยใช้ส่วนผสมของสารในปฏิกิริยาดังนี้

ความเข้มข้นสุดท้ายของแต่ละสารในปฏิกิริยาดังนี้ สารละลายแมกนีเซียมคลอไรด์ ( $MgCl_2$ ) ความเข้มข้น 2 มิลลิโมลาร์ สารละลาย dNTP ความเข้มข้น 0.2 มิลลิโมลาร์  $1 \times Taq$  DNA polymerase ปริมาณ 2.5 หน่วย สารละลายไอโพรเมอร์ความเข้มข้น 25 พิโคโมลต่อไมโครลิตร (ของแต่ละตัว) ดีเอ็นเอที่สกัดจากวิธีในข้อ 2.1.3.2 ปริมาณ 1 พิโคกรัม ถึง 1 ไมโครกรัม ปรับปริมาตรด้วยน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อ รวมส่วนผสมทั้งหมดให้มีปริมาตรสุทธิ 30 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน จากนั้นดำเนินปฏิกิริยาแลงก์มูสใช้พอลิเมอเรสด้วยเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (DNA Thermo Cycle) โดยให้มีสภาวะที่เหมาะสมกับไอโพรเมอร์ดังนี้

ไอโพรเมอร์ ndoBF และ ndoBR ใช้สภาวะ

1. Initial denaturation	ที่อุณหภูมิ 94°C	เป็นเวลา 5 นาที
2. Denaturation	ที่อุณหภูมิ 94°C	เป็นเวลา 1 นาที
3. Annealing	ที่อุณหภูมิ 62°C	เป็นเวลา 1 นาที
4. Extension	ที่อุณหภูมิ 72°C	เป็นเวลา 1 นาที
5. ทำขั้นตอน 2 ถึง 4 จำนวน 30 รอบ		
6. Final extension	ที่อุณหภูมิ 72°C	เป็นเวลา 7 นาที

ไอโพรเมอร์ phnAcF และ phnAcR ใช้สภาวะ

1. Initial denaturation	ที่อุณหภูมิ 94°C	เป็นเวลา 5 นาที
2. Denaturation	ที่อุณหภูมิ 94°C	เป็นเวลา 1 นาที
3. Annealing	ที่อุณหภูมิ 57.5°C	เป็นเวลา 1 นาที
4. Extension	ที่อุณหภูมิ 72°C	เป็นเวลา 1 นาที
5. ทำขั้นตอน 2 ถึง 4 จำนวน 30 รอบ		
6. Final extension	ที่อุณหภูมิ 72°C	เป็นเวลา 7 นาที



ไพรเมอร์ arhA1F และ arhA1R ใช้สภาวะ

- |                                      |                  |                 |
|--------------------------------------|------------------|-----------------|
| 1. Initial denaturation              | ที่อุณหภูมิ 94°C | เป็นเวลา 5 นาที |
| 2. Denaturation                      | ที่อุณหภูมิ 94°C | เป็นเวลา 1 นาที |
| 3. Annealing                         | ที่อุณหภูมิ 55°C | เป็นเวลา 1 นาที |
| 4. Extension                         | ที่อุณหภูมิ 72°C | เป็นเวลา 1 นาที |
| 5. ทำซ้ำขั้นตอน 2 ถึง 4 จำนวน 30 รอบ |                  |                 |
| 6. Final extension                   | ที่อุณหภูมิ 72°C | เป็นเวลา 7 นาที |

ไพรเมอร์ bphA1F และ bphA1R ใช้สภาวะ

- |                                      |                  |                    |
|--------------------------------------|------------------|--------------------|
| 1. Initial denaturation              | ที่อุณหภูมิ 94°C | เป็นเวลา 5 นาที    |
| 2. Denaturation                      | ที่อุณหภูมิ 94°C | เป็นเวลา 1 นาที    |
| 3. Annealing                         | ที่อุณหภูมิ 55°C | เป็นเวลา 30 วินาที |
| 4. Extension                         | ที่อุณหภูมิ 72°C | เป็นเวลา 30 วินาที |
| 5. ทำซ้ำขั้นตอน 2 ถึง 4 จำนวน 30 รอบ |                  |                    |
| 6. Final extension                   | ที่อุณหภูมิ 72°C | เป็นเวลา 5 นาที    |

ไพรเมอร์ GNF และ GNR ใช้สภาวะ

- |                                      |                  |                 |
|--------------------------------------|------------------|-----------------|
| 1. Initial denaturation              | ที่อุณหภูมิ 94°C | เป็นเวลา 5 นาที |
| 2. Denaturation                      | ที่อุณหภูมิ 94°C | เป็นเวลา 1 นาที |
| 3. Annealing                         | ที่อุณหภูมิ 57°C | เป็นเวลา 1 นาที |
| 4. Extension                         | ที่อุณหภูมิ 72°C | เป็นเวลา 1 นาที |
| 5. ทำซ้ำขั้นตอน 2 ถึง 4 จำนวน 30 รอบ |                  |                 |
| 6. Final extension                   | ที่อุณหภูมิ 72°C | เป็นเวลา 7 นาที |

ไพรเมอร์ GPF และ GPR ใช้สภาวะ

- |                                      |                  |                 |
|--------------------------------------|------------------|-----------------|
| 1. Initial denaturation              | ที่อุณหภูมิ 94°C | เป็นเวลา 5 นาที |
| 2. Denaturation                      | ที่อุณหภูมิ 94°C | เป็นเวลา 1 นาที |
| 3. Annealing                         | ที่อุณหภูมิ 54°C | เป็นเวลา 1 นาที |
| 4. Extension                         | ที่อุณหภูมิ 72°C | เป็นเวลา 1 นาที |
| 5. ทำซ้ำขั้นตอน 2 ถึง 4 จำนวน 30 รอบ |                  |                 |
| 6. Final extension                   | ที่อุณหภูมิ 72°C | เป็นเวลา 7 นาที |

ไพรเมอร์ NahAc1F, NahAc3F และ NahAc2R ใช้สภาวะ

1. Initial denaturation ที่อุณหภูมิ 94°C เป็นเวลา 5 นาที
2. Denaturation ที่อุณหภูมิ 94°C เป็นเวลา 1 นาที
3. Annealing ที่อุณหภูมิ 53°C เป็นเวลา 1 นาที
4. Extension ที่อุณหภูมิ 72°C เป็นเวลา 1 นาที
5. ทำซ้ำขั้นตอน 2 ถึง 4 จำนวน 30 รอบ
6. Final extension ที่อุณหภูมิ 72°C เป็นเวลา 7 นาที

ไพรเมอร์ NMR331f และ NMR1134r ใช้สภาวะ

1. Initial denaturation ที่อุณหภูมิ 94°C เป็นเวลา 5 นาที
2. Denaturation ที่อุณหภูมิ 94°C เป็นเวลา 30 วินาที
3. Annealing ที่อุณหภูมิ 53°C เป็นเวลา 30 วินาที
4. Extension ที่อุณหภูมิ 72°C เป็นเวลา 1 นาที
5. ทำซ้ำขั้นตอน 2 ถึง 4 จำนวน 40 รอบ
6. Final extension ที่อุณหภูมิ 72°C เป็นเวลา 30 นาที

ไพรเมอร์ adoF1 และ adoB1 ใช้สภาวะ

1. Initial denaturation ที่อุณหภูมิ 94°C เป็นเวลา 5 นาที
2. Denaturation ที่อุณหภูมิ 94°C เป็นเวลา 1 นาที
3. Annealing ที่อุณหภูมิ 56°C เป็นเวลา 1 นาที
4. Extension ที่อุณหภูมิ 72°C เป็นเวลา 1 นาที
5. ทำซ้ำขั้นตอน 2 ถึง 4 จำนวน 30 รอบ
6. Final extension ที่อุณหภูมิ 72°C เป็นเวลา 7 นาที

ไพรเมอร์ BphCS1F และ BphCS2R ใช้สภาวะ

1. Initial denaturation ที่อุณหภูมิ 94°C เป็นเวลา 5 นาที
2. Denaturation ที่อุณหภูมิ 94°C เป็นเวลา 1 นาที
3. Annealing ที่อุณหภูมิ 56°C เป็นเวลา 1 นาที
4. Extension ที่อุณหภูมิ 72°C เป็นเวลา 1 นาที
5. ทำซ้ำขั้นตอน 2 ถึง 4 จำนวน 30 รอบ
6. Final extension ที่อุณหภูมิ 72°C เป็นเวลา 7 นาที

ไพรเมอร์ BP-f และ BP-r ใช้สภาวะ

1. Initial denaturation ที่อุณหภูมิ 94°C เป็นเวลา 5 นาที
2. Denaturation ที่อุณหภูมิ 94°C เป็นเวลา 1 นาที

- |                                      |                  |                 |
|--------------------------------------|------------------|-----------------|
| 3. Annealing                         | ที่อุณหภูมิ 55°C | เป็นเวลา 1 นาที |
| 4. Extension                         | ที่อุณหภูมิ 72°C | เป็นเวลา 1 นาที |
| 5. ทำขั้นตอนนี้ 2 ถึง 4 จำนวน 30 รอบ |                  |                 |
| 6. Final extension                   | ที่อุณหภูมิ 72°C | เป็นเวลา 7 นาที |

ตรวจสอบผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นโดยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิสในบัฟเฟอร์ TAE ความเข้มข้น 1 เท่า โดยใช้อะกาโรสเจลเข้มข้น 2% เพื่อตรวจสอบขนาดของผลิตภัณฑ์ PCR โดยการเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA ladder ตามวิธีที่ระบุในข้อ 3.2.1.1 ต่อไป

3.3.2 สร้างห้องสมุดยีนจากผลิตภัณฑ์ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส  
เพื่อวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์จากผลิตภัณฑ์ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส

3.3.2.1 ทำบริสุทธิ์ผลิตภัณฑ์ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสเพื่อการโคลน

ทำบริสุทธิ์ผลิตภัณฑ์ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสที่ได้จากข้อ 3.1 ด้วย QIAquick PCR purification kit (Qiagen, Germany) ตามวิธีที่ระบุในคู่มือ โดยเติมบัฟเฟอร์ PB ปริมาตร 5 เท่าของผลิตภัณฑ์ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสผสมให้เข้ากันดูดลงใน QIAprep spin column ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที ที่อุณหภูมิห้องเทส่วนน้ำใสทิ้งเติมบัฟเฟอร์ PE ปริมาตร 750 ไมโครลิตรลงในคอลัมน์นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที ที่อุณหภูมิห้อง เทส่วนน้ำใสทิ้งปั่นเหวี่ยงอีกครั้งเพื่อกำจัดส่วนน้ำใสที่เหลือติดคอลัมน์ จากนั้นย้ายคอลัมน์มายังหลอดไมโครพิวจีใหม่ เติมน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อหรือบัฟเฟอร์ EB ปริมาตร 30-50 ไมโครลิตร ลงบนแผ่นกรองตั้งทิ้งไว้ 1 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที ที่อุณหภูมิห้อง จะได้ผลิตภัณฑ์ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสที่บริสุทธิ์เก็บไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส

3.3.2.2 โคลนขึ้นผลิตภัณฑ์ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส

3.3.2.2.1 ไลเกตขึ้นผลิตภัณฑ์ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสที่ได้จากข้อ 3.3.2.1 เข้ากับ พลาสมิดเวกเตอร์ pGEM-T Easy ด้วยไลเกส (ligase) (Promega, USA) ตามวิธีที่ระบุในคู่มือ โดยทำส่วนผสมปฏิกิริยา (ปริมาตร 10 ไมโครลิตร) ดังนี้

2x ไลเกชันบัฟเฟอร์	5	ไมโครลิตร
พลาสมิดเวกเตอร์ pGEM-T Easy (50 นาโนกรัม)	1	ไมโครลิตร
ผลิตภัณฑ์ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส	3	ไมโครลิตร(ประมาณ 150 นาโนกรัม)
T4 DNA ligase (3 หน่วยต่อไมโครลิตร)	1	ไมโครลิตร

ทำไลเกชันที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 16-18 ชั่วโมง

3.3.2.2.2 ทรานสฟอร์มรีคอมบิแนนท์พลาสมิดเข้าสู่คอมพีเทนต์เซลล์ *E. coli* JM109 ตามวิธีที่ระบุในข้อ 3.2.3.2.2 และคัดเลือกทรานสฟอร์มแมนท์ที่มีขึ้นยีนที่ต้องการอยู่ภายในซันดีเอ็นเอสอดแทรก ตามวิธีที่ระบุในข้อ 3.2.3.2.3 สกัดรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pGEM-T Easy ตามวิธีที่ระบุในข้อ 3.2.3.2.4

3.3.2.2.3 ตัดรีคอมบิแนนท์พลาสมิดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

เพื่อตรวจสอบซันดีเอ็นเอสอดแทรกภายในรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pGEM-T Easy ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI* *BsuRI* และ *HinfI* ตามลำดับโดยทำส่วนผสมของปฏิกิริยา (ปริมาตร 10 ไมโครลิตร) ดังนี้

รีคอมบิแนนท์พลาสมิด pGEM-T Easy	1	ไมโครลิตร
10x บัฟเฟอร์	1	ไมโครลิตร
เอนไซม์ตัดจำเพาะ	1	ไมโครลิตร
น้ำปลอดประจุปลอดเชื้อ	7	ไมโครลิตร

ผสมให้เข้ากันบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 2-4 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำส่วนผสมของปฏิกิริยาที่ได้ปริมาตร 5 ไมโครลิตร ตรวจสอบผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นโดยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสในบัฟเฟอร์ TAE ความเข้มข้น 1 เท่า โดยใช้อะกาโรสเจลเข้มข้น 2% เพื่อตรวจสอบขนาดของผลิตภัณฑ์ PCR โดยการเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA ladder ตามวิธีที่ระบุในข้อ 3.2.1.1 ต่อไป

3.3.2.2.4 วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

ส่งวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ 9 ตามวิธีที่ระบุในข้อ 3.2.3.2.5 จากนั้นวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์เปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนและกรดอะมิโนของเอนไซม์ที่ย่อยสลายพอลิไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนกับฐานข้อมูล โดยใช้ด้วยโปรแกรม DNASIS-Mac software version 2.05 (Hitachi Software Engineering Co.Ltd) และ Bioedit versions 7.0.4.1

3.3.2.2.5 สร้างแผนภูมิต้นไม้แสดงความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ

สร้างต้นไม้แสดงความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของผลิตภัณฑ์ยีนที่ได้กับโปรตีนที่เกี่ยวข้อง (phylogenetic tree) ตามวิธีที่ระบุในข้อ 3.2.3.2.6

### 3.4. สร้างห้องสมุดดีเอ็นเอ

#### 3.4.1 ตัดดีเอ็นเอแบบไม่สมบูรณ์ (partial digest) ด้วยเอนไซม์ *Sau3A*I

ตัดดีเอ็นเอแบบไม่สมบูรณ์จากดีเอ็นเอที่ได้จากข้อ 3.2.1.2 ด้วยเอนไซม์ *Sau3A*I ต่อมา นำดีเอ็นเอที่ตัดแบบไม่สมบูรณ์มาแยกตามขนาดชิ้นดีเอ็นเอ (size fractionation) ด้วยวิธี DNA troughing method ตามวิธีของ Harnpichanchai และคณะ (2007) เตรียมอะกาโรสเจลเข้มข้น 0.9% ที่หลอมในบัฟเฟอร์ TAE ความเข้มข้น 1 เท่า ซึ่งมีเอธิเดียมโบรไมด์เข้มข้น 1-1.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ผสมอยู่ในเจล เทลงในแบบพิมพ์ซึ่งมีหัวเสียบอยู่ระวางอย่าให้มีฟองอากาศปล่อยอะกาโรสแข็งตัวประมาณ 20 นาที วางชิ้นอะกาโรสเจลที่ได้ลงในแชมเบอร์แทปเฟอร์ TAE ความเข้มข้น 1 เท่า ให้พอดีกับขอบอะกาโรสเจล ผสมสารละลายดีเอ็นเอกับสปีดิตตามหยอดลงในช่องว่าง โดยช่องว่างแรกหยอดด้วยดีเอ็นเอมาตรฐาน *Lambda HindIII* ที่ผสมกับสปีดิตตามแล้วปริมาตร 2 ไมโครลิตร จากนั้นทำอิเล็กโทรโฟเรซิส โดยใช้ความต่างศักย์ 100 โวลต์ นาน 45 นาที ตรวจดูแถบดีเอ็นเอด้วยการส่องด้วยแสงอัลตราไวโอเล็ต จากนั้นตัดช่องบริเวณใต้แถบดีเอ็นเอแล้วเติม 30% PEG8000 ในบัฟเฟอร์ TAE ความเข้มข้น 1 เท่า จากนั้นนำไปทำอิเล็กโทรโฟเรซิสจนกระทั่งดีเอ็นเอตกลงมาในช่องที่ตัด เก็บดีเอ็นเอที่อยู่ในช่อง 4 ครั้ง จะได้ดีเอ็นเอที่มีขนาดในช่วงต่างๆ กัน ตามเวลาดังนี้ 15 30 45 60 นาที ในระหว่างการแยกขนาดนั้นควรเปลี่ยนบัฟเฟอร์ TAE ความเข้มข้น 1 เท่า เนื่องจากบัฟเฟอร์เก่าจะมีความร้อนสูงอาจทำให้เจลหลอมละลายได้ จากนั้นนำดีเอ็นเอแต่ละครั้งที่เก็บมาตกตะกอนดีเอ็นเอด้วยเอทานอล เติมไกลโคเจน 1 ไมโครลิตร และเติม 3 โมลาร์ โซเดียมอะซิเตท 1 ส่วนใน 10 ส่วนของทั้งหมด จากนั้นละลายตะกอนดีเอ็นเอที่ได้ด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว และวิเคราะห์ด้วยเครื่อง gel documentation และเปรียบเทียบชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากการสังเคราะห์กับแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb marker ขนาดดีเอ็นเอที่จะนำไปใช้ต่อควรมีขนาด 5-10 กิโลเบส

#### 3.4.2 โคลนรีคอมบิแนนท์พลาสมิด (recombinant DNA)

โคลนดีเอ็นเอที่ตัดด้วยเอนไซม์ *Sau3A*I ที่มีขนาด 5-10 กิโลเบส ลงในพลาสมิดเวกเตอร์ pZErO-2 (Invitrogen, USA) ที่ตัดด้วยเอนไซม์ *Bam*HI บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ที่กำจัดโปรตีนด้วย Wizard DNA clean up Kit เชื่อมชิ้นส่วนดีเอ็นเอเป้าหมายเข้ากับพลาสมิดเวกเตอร์ ด้วย T4 DNA Ligase บ่มที่อุณหภูมิ 16 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที แล้วถ่ายทอดรีคอมบิแนนท์พลาสมิดเข้าสู่เชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ TOP10 ด้วยวิธี heat shock ตามวิธีที่ระบุในข้อ 2.3.2.2.2 จากนั้นแบ่งสารละลายไปเกลี่ยบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง LB ที่มีสารปฏิชีวนะกานามัยซิน (kanamycin, Km) ความเข้มข้นสุดท้าย 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และสารละลาย isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactoside (IPTG) ที่มีความเข้มข้นสุดท้าย 100 ไมโครโมลาร์ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง



#### 3.4.2.1 ตรวจสอบขนาดชิ้นดีเอ็นเอสอดแทรกจากรีคอมบิแนนท์พลาสมิด

เป็นการตรวจสอบขนาดชิ้นดีเอ็นเอสอดแทรกจากรีคอมบิแนนท์พลาสมิดโดยสกัดรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่ได้จากข้อ 3.4.2 ตามวิธีที่ระบุในข้อ 3.2.3.2.2.4 จากนั้นตัดรีคอมบิแนนท์พลาสมิดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI* ตามวิธีที่ระบุในข้อ 3.3.2.2.3 ตรวจสอบผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นโดยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสในบัฟเฟอร์ TAE ความเข้มข้น 1 เท่า โดยใช้อะกาโรสเจลเข้มข้น 1% เพื่อตรวจสอบขนาดของผลิตภัณฑ์ลูกโซ่พอลิเมอร์ โดยการเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kb DNA ladder ตามวิธีที่ระบุในข้อ 3.2.1.1 ต่อไป

#### 3.4.3 คัดกรองยีนไดออกซีจีเนสหรือเอกซ์ตราไดออกไซด์ออกซีจีเนสจากห้องสมุดดีเอ็นเอ

3.4.3.1 การย่อยแคทีคอลเป็นผลิตภัณฑ์สี่เหลี่ยมเข็ม (2-ไฮดรอกซีมีวโคเนท เซมิแอลดีไฮด์) เพื่อคัดกรองโคลนที่มียีนเอกซ์ตราไดออกไซด์ออกซีจีเนส เชื้อเซลล์รีคอมบิแนนท์ที่มียีนสอดแทรกลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ LB ชนิดแข็ง ที่มีสารปฏิชีวนะกานามัยซิน และ IPTG นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมงตรวจสอบเอนไซม์แอกติวิตีของแบคทีเรียด้วยวิธี ENZhance Overlay (BIOTECH Thailand) ตามวิธีที่ระบุโดยผู้ผลิต โดยเลือกโคลนที่สามารถผลิตเอนไซม์เร่งปฏิกิริยาการย่อยแคทีคอลเป็นผลิตภัณฑ์สี่เหลี่ยมเข็ม (2-ไฮดรอกซีมีวโคเนท เซมิแอลดีไฮด์)

3.4.3.2 การเปลี่ยนอินโดลเป็นอินดิโกเพื่อคัดกรองโคลนที่มียีนไดออกซีจีเนส เชื้อเซลล์รีคอมบิแนนท์ที่มียีนสอดแทรกลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ LB ชนิดแข็ง ที่มีสารปฏิชีวนะกานามัยซิน และ IPTG นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง แล้ววางอินโดลบนฝาจานเลี้ยงเชื้อบ่มต่อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง คัดเลือกโคลนที่มีส่วนของยีนที่สามารถผลิตออกซีจีเนสโดยเลือกโคลนที่สามารถผลิตเอนไซม์เร่งปฏิกิริยาการเปลี่ยนอินโดลเป็นอินดิโกที่ให้สีอินดิโก (Ensley และคณะ, 1983)

#### 3.4.4 สกัดรีคอมบิแนนท์พลาสมิดจากโคลนที่ให้ผลบวก

นำโคลนที่ให้ผลบวกจากข้อ 3.4.3 มาสกัดรีคอมบิแนนท์พลาสมิดตามวิธีที่ระบุในข้อ 3.2.3.2.2.4 จากนั้นตรวจสอบขนาดชิ้นดีเอ็นเอสอดแทรกจากรีคอมบิแนนท์พลาสมิดตามวิธีที่ระบุในข้อ 3.4.2.1 เพื่อส่งวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ ตามวิธีที่ระบุในข้อ 3.3.2.2.4 และสร้างแผนภูมิต้นไม้แสดงความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ ตามวิธีที่ระบุในข้อ 3.3.2.2.5

## บทที่ 4

### ผลการทดลอง

#### 4.1 การวิเคราะห์สมบัติของตัวอย่างดิน

ดินที่ใช้ในการทดลองนี้เป็นดินจากแหล่งดินอุดมสมบูรณ์ในธรรมชาติจากจังหวัดพิษณุโลก ลักษณะเนื้อดินหลังจากแยกเศษหินออกและร่อนผ่านตะแกรงขนาดรู 1.18 มม. พบว่าเนื้อดินมีสีน้ำตาลเข้ม ดังแสดงในรูปที่ 4.1



รูปที่ 4.1 ลักษณะเนื้อดินที่ใช้ในการทดลอง

ผลการวิเคราะห์สมบัติทางฟิสิกส์และเคมีของดิน ซึ่งส่งตรวจที่กลุ่มงานพัฒนาระบบตรวจสอบคุณภาพดินและน้ำ กลุ่มวิจัยเกษตรเคมี สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการเกษตร กรมวิชาการเกษตร ตามวิธีที่แสดงไว้ในตารางที่ 3.4 พบว่าดินมีลักษณะเป็นดินร่วนปนทราย (loamy sand) ประกอบด้วย ดินเหนียว 21.60% ดินร่วน 30.40% และ ทราย 48% ค่าความเป็นกรด-ด่าง ของดิน มีค่า 6.8 ซึ่งเป็นกรดเล็กน้อย ปริมาณความจุสูงสุดในการอุ้มน้ำสูง 44.79% ปริมาณความชื้นสูง 5.26 % ปริมาณอินทรีย์คาร์บอน ไนโตรเจนและฟอสฟอรัส อยู่ในเกณฑ์ที่มีความอุดมสมบูรณ์เนื่องจากมีอัตราส่วนระหว่าง คาร์บอน : ไนโตรเจน : ฟอสฟอรัส (C:N:P) ใกล้เคียง 100 : 8 : 2 นอกจากนี้ได้แสดงรายละเอียดไว้ในตารางที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 ผลการวิเคราะห์สมบัติทางฟิสิกส์และเคมีของดิน

พารามิเตอร์	ผลการวิเคราะห์สมบัติทางฟิสิกส์และเคมีของดิน
ตัวอย่างดิน	ดินจากแหล่งดินอุดมสมบูรณ์ในธรรมชาติจากจังหวัดพิษณุโลก
ความเป็นกรดต่าง	6.8
สภาพการนำไฟฟ้า (dS/m)	0.031
สารอินทรีย์ (%)	2.22
ปริมาณความชื้น (%)	5.26
ความสามารถในการแลกเปลี่ยนประจุหรือไอออน (Cmol kg <sup>-1</sup> )	10.5
ความจุสูงสุดในการอุ้มน้ำ (%)	44.79
อินทรีย์คาร์บอน (%)	1.288
ไนโตรเจน (%)	0.111
ฟอสฟอรัส (ppm)	171
โพแทสเซียม (ppm)	284
แคลเซียม (ppm)	1714
แมกนีเซียม (ppm)	212
ลักษณะเนื้อดิน	ดินร่วนปนทราย

นอกจากนี้ผลการวิเคราะห์การปนเปื้อนพีแนทรีนและอะซีแนพทีนในดินตัวอย่างซึ่งวิเคราะห์โดยวิธีแก๊สโครมาโตกราฟี (Gas chromatography, GC) พบว่าตัวอย่างดินไม่มีการปนเปื้อน PAHs ดังกล่าวมาก่อน

#### 4.2 ประสิทธิภาพการย่อยสลายอะซีแนพทีนและพีแนทรีนในระบบนิเวศจำลองดิน

การศึกษาประสิทธิภาพการย่อยสลายอะซีแนพทีนและพีแนทรีนในดินโดยแบคทีเรียที่มีอยู่ดั้งเดิมในดิน ทำโดยสร้างระบบนิเวศจำลองดิน 3 ชุด คือ ระบบนิเวศจำลองดิน PHE ระบบนิเวศจำลองดิน ACE และระบบนิเวศจำลองดิน AP ตามวิธีที่ระบุในข้อ 3.1.2 ดังแสดงในรูป 4.2 โดยที่ระบบนิเวศจำลองดิน PHE คือระบบนิเวศจำลองที่เติมพีแนทรีนเป็นแหล่งคาร์บอน ระบบนิเวศจำลองดิน ACE คือระบบนิเวศจำลองที่เติมอะซีแนพทีนเป็นแหล่งคาร์บอนและระบบนิเวศจำลองดิน AP คือระบบนิเวศจำลองที่เติมอะซีแนพทีนและพีแนทรีนเป็นแหล่งคาร์บอน และสร้าง

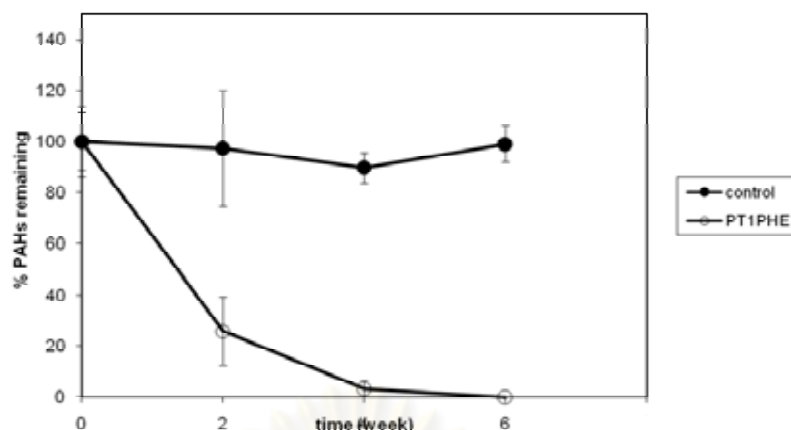
ระบบนิเวศจำลองดินชุดควบคุมที่หนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียสนาน 30 นาที 3 ครั้งเพื่อเป็นการเปรียบเทียบในทุกการทดลองด้วย



รูปที่ 4.2 ลักษณะระบบนิเวศจำลองดิน

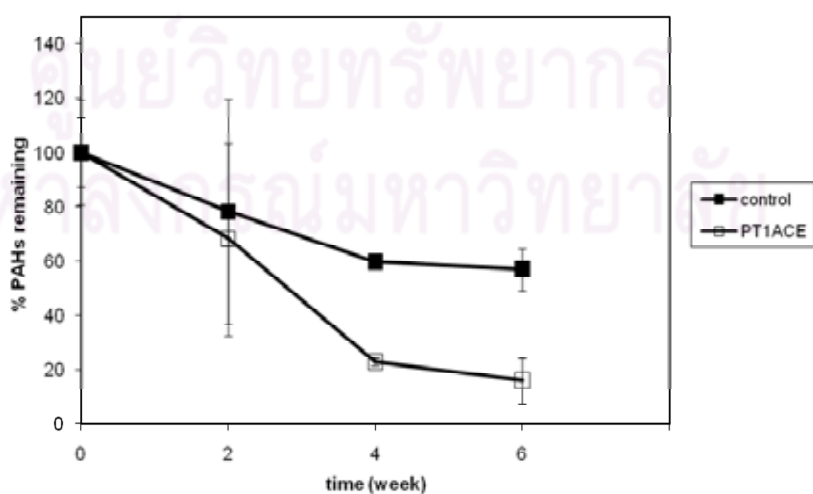
เก็บตัวอย่างดินทุก 2 สัปดาห์ นาน 6 สัปดาห์ เพื่อวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบพอลิไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนที่เหลือในระบบนิเวศจำลองดินและตรวจสอบการปรากฏของยีนไดออกซิจีเนสเบื้องต้นจากดีเอ็นเอที่สกัดจากระบบนิเวศจำลองดินและติดตามการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างประชาคมแบคทีเรียโดยวิธี PCR-DGGE

ผลการวิเคราะห์ปริมาณพีแนนทรินจากระบบนิเวศจำลองดิน PHE ที่เติมพีแนนทรินเป็นแหล่งคาร์บอน หลังจากการทดลองเป็นเวลา 6 สัปดาห์ พบว่าปริมาณพีแนนทรินในชุดทดลองลดลง เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่มีความเข้มข้นเริ่มต้น 300 ppm ซึ่งคิดเป็น 100 % โดยเริ่มลดลงตั้งแต่สัปดาห์ที่ 2 และลดลงเกือบหมดในสัปดาห์ที่ 4 และหมดไปในสัปดาห์ที่ 6 โดยในสัปดาห์ที่ 2 มีปริมาณพีแนนทรินเหลืออยู่ 25.83% ของความเข้มข้นเริ่มต้น ในสัปดาห์ที่ 4 มีปริมาณพีแนนทรินเหลืออยู่เพียง 3.4% ของความเข้มข้นเริ่มต้น และในสัปดาห์ที่ 6 ปริมาณพีแนนทรินลดลงจนหมด เมื่อเทียบกับความเข้มข้นเริ่มต้นของพีแนนทริน ในขณะที่ปริมาณพีแนนทรินในชุดควบคุมไม่ลดลงตลอดการทดลอง ดังแสดงในรูปที่ 4.3 แสดงให้เห็นว่าการลดลงของพีแนนทรินในชุดทดลองเกิดจากการย่อยสลายโดยแบคทีเรียในดิน



รูปที่ 4.3 การย่อยสลายพีแนทรีน 300 ppm ในระบบนิเวศจำลองดิน PHE ขนาด 6 กรัม ที่เติมพีแนทรีน เป็นเวลา 6 สัปดาห์

ผลการวิเคราะห์ปริมาณอะซีแนพทีนจากระบบนิเวศจำลองดิน ACE ที่เติมอะซีแนพทีนเป็นแหล่งคาร์บอนหลังจากการทดลองเป็นเวลา 6 สัปดาห์ พบว่าปริมาณอะซีแนพทีนในชุดทดลองลดลง เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่มีความเข้มข้นเริ่มต้น 300 ppm ซึ่งคิดเป็น 100 % โดยเริ่มลดลงตั้งแต่สัปดาห์ที่ 2 ลดลงอย่างรวดเร็วสัปดาห์ที่ 4 และลดลงจนเกือบหมดในสัปดาห์ที่ 6 โดยสัปดาห์ที่ 2 มีปริมาณอะซีแนพทีนเหลืออยู่ 68.17% ของความเข้มข้นเริ่มต้น และสัปดาห์ที่ 6 มีปริมาณอะซีแนพทีนเหลือเพียง 15.95% ของความเข้มข้นเริ่มต้น ในขณะที่ปริมาณอะซีแนพทีนในชุดควบคุมมีการลดลงเช่นกันแต่เมื่อเปรียบเทียบกับการลดลงในชุดทดลองเห็นได้ว่าในชุดทดลองมีการลดลงจนเกือบหมด ดังแสดงในรูปที่ 4.4 แสดงให้เห็นว่าการลดลงของอะซีแนพทีนในชุดทดลองเกิดจากการย่อยสลายโดยแบคทีเรียในดิน

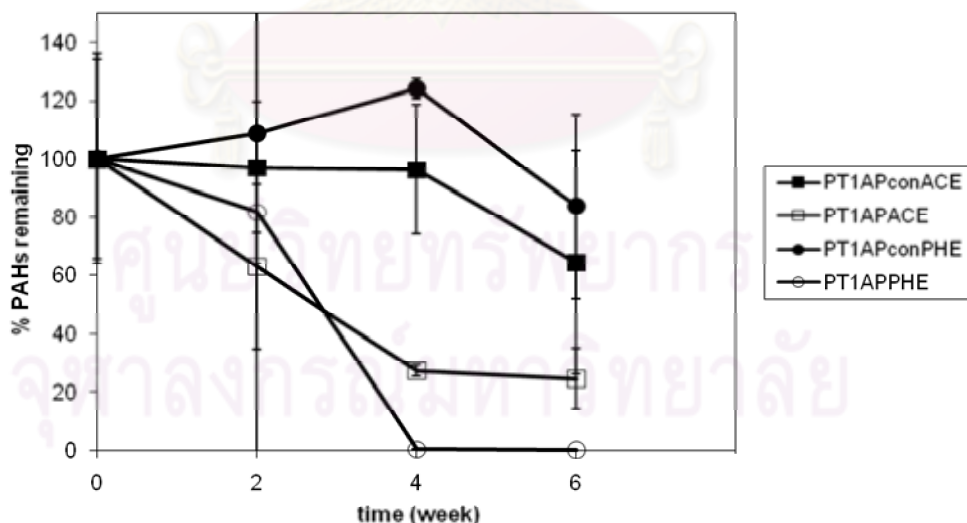


รูปที่ 4.4 การย่อยสลายอะซีแนพทีน 300 ppm ในระบบนิเวศจำลองดิน ACE ขนาด 6 กรัม ที่เติมอะซีแนพทีนเป็นเวลา 6 สัปดาห์



ผลการวิเคราะห์ปริมาณพีแนทรีนและอะซีแนพทีนจากระบบนิเวศจำลองดิน AP ที่เติมพีแนทรีนและอะซีแนพทีนเป็นแหล่งคาร์บอน จากการทดลองเป็นเวลา 6 สัปดาห์ พบว่าปริมาณพีแนทรีนในชุดทดลองลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่มีความเข้มข้นเริ่มต้น 300 ppm ซึ่งคิดเป็น 100 % เริ่มลดลงตั้งแต่สัปดาห์ที่ 2 ลดลงเกือบหมดในสัปดาห์ที่ 4 และลดลงจนหมดในสัปดาห์ที่ 6 โดยสัปดาห์ที่ 2 มีปริมาณพีแนทรีนเหลืออยู่ 81.64% ของความเข้มข้นเริ่มต้น ในสัปดาห์ที่ 4 มีปริมาณพีแนทรีนเหลือเพียง 0.41% ของความเข้มข้นเริ่มต้น ในขณะที่ปริมาณพีแนทรีนในชุดควบคุมไม่ลดลงตลอดการทดลอง ดังแสดงในรูปที่ 4.5 แสดงให้เห็นว่าการลดลงของพีแนทรีนในชุดทดลองเกิดจากการย่อยสลายโดยแบคทีเรียในดิน

ส่วนปริมาณอะซีแนพทีนลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่มีความเข้มข้นเริ่มต้น 300 ppm โดยคิดเป็น 100 % โดยเริ่มลดลงตั้งแต่สัปดาห์ที่ 2 ลดลงอย่างรวดเร็วในสัปดาห์ที่ 4 และลดลงจนเกือบหมดในสัปดาห์ที่ 6 โดยสัปดาห์ที่ 2 มีปริมาณอะซีแนพทีนเหลืออยู่ 63.06% ของความเข้มข้นเริ่มต้น และสัปดาห์ที่ 6 มีปริมาณอะซีแนพทีนที่เหลือเพียง 24.52% ของความเข้มข้นเริ่มต้น ในขณะที่ปริมาณอะซีแนพทีนในชุดควบคุมลดลงเพียงเล็กน้อยเมื่อเทียบกับชุดทดลอง ดังแสดงในรูปที่ 4.5 แสดงให้เห็นว่าการลดลงของอะซีแนพทีนในชุดทดลองเกิดจากการย่อยสลายโดยแบคทีเรียในดิน



รูปที่ 4.5 การย่อยสลายพีแนทรีนและอะซีแนพทีนชนิดละ 300 ppm ในระบบนิเวศจำลองดิน AP ขนาด 6 กรัม ที่เติมพีแนทรีนและอะซีแนพทีนเป็นเวลา 6 สัปดาห์

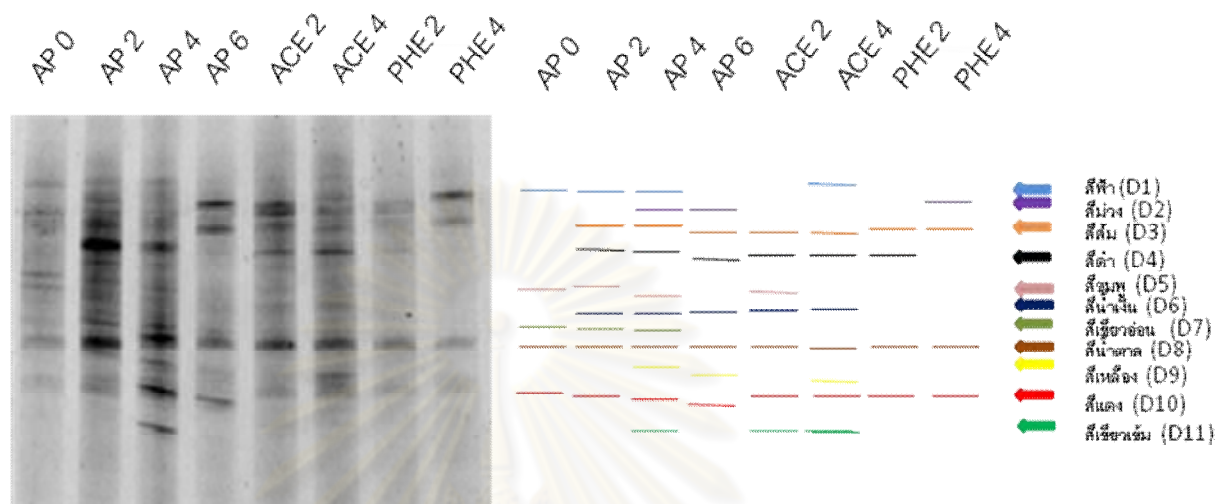
#### 4.3 การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างประชาคมแบคทีเรียในระบบนิเวศจำลองดิน

จากผลการศึกษาประสิทธิภาพการย่อยสลายอะซีแนพทินและพีแนทรีนในดินข้างต้นพบว่าแบคทีเรียที่มีอยู่ในดินมีประสิทธิภาพการย่อยสลาย PAHs ทั้งสองชนิด การทดลองนี้จึงตรวจติดตามการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างประชาคมแบคทีเรียในระบบนิเวศจำลองดินดังกล่าว เพื่อวิเคราะห์กลุ่มประชากรแบคทีเรียที่มีบทบาทในการย่อยสลาย PAHs ในดิน

ซึ่งการศึกษากการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างประชาคมแบคทีเรียทำโดยวิธี PCR-DGGE โดยมีเป้าหมายที่บริเวณ 16S rDNA โดยใช้ดีเอ็นเอที่สกัดจากระบบนิเวศจำลองดินเป็นแม่แบบในการเพิ่มจำนวน ทั้งนี้สกัดดีเอ็นเอจากระบบนิเวศจำลองดิน PHE ในสัปดาห์ที่ 0 2 4 ดินในระบบนิเวศจำลองดิน ACE ในสัปดาห์ที่ 0 2 4 และดินจากระบบนิเวศจำลองดิน AP ในสัปดาห์ที่ 0 2 4 และ 6 และนำมาเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอบริเวณ 16S rDNA ของแบคทีเรียโดยใช้ไพรเมอร์ 341F ซึ่งมี GC clamp และ 520R (Muyzer และคณะ, 1993) โดยเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอบริเวณ V-3 region ซึ่งจะได้ผลิตภัณฑ์ลูกโซ่พอลิเมอเรสที่มีความยาวประมาณ 200 bp

หลังจากนั้นวิเคราะห์โครงสร้างประชาคมแบคทีเรียจากระบบนิเวศจำลองดิน PHE ในสัปดาห์ที่ 0 2 4 จากระบบนิเวศจำลองดิน ACE ในสัปดาห์ที่ 0 2 4 จากระบบนิเวศจำลองดิน AP ในสัปดาห์ที่ 0 2 4 และ 6 ด้วยเทคนิค DGGE โดยใช้เกรเดียนท์ของความเข้มข้น denaturant 30% – 70% เมื่อมีการเติมพีแนทรีนและ/หรืออะซีแนพทินเป็นแหล่งคาร์บอนแบคทีเรียดั้งเดิมในดินสามารถปรับตัวและมีความสามารถย่อยสลาย PAHs ซึ่งสอดคล้องกับการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างประชาคมแบคทีเรียในระบบนิเวศจำลองดินทั้งหมดอย่างเห็นได้ชัดเมื่อเปรียบเทียบกับแบคทีเรียดั้งเดิม การเปรียบเทียบโครงสร้างประชาคมแบคทีเรียที่เกิดขึ้นจากระบบนิเวศจำลองดิน AP กับโครงสร้างประชาคมแบคทีเรียจากระบบนิเวศจำลองดิน ACE จะเห็นได้ว่าโครงสร้างประชาคมแบคทีเรียใน AP2 มีความคล้ายคลึงกับ ACE2 และ AP4 มีความคล้ายคลึงกับ ACE4 โดยพบแถบดีเอ็นเอเด่นที่เกิดขึ้นตรงกันหลายแถบดีเอ็นเอ เริ่มจากแถบดีเอ็นเอเด่น D1 (สีฟ้า) ในระบบนิเวศจำลองดิน AP0 AP2 AP4 และ ACE4 แถบดีเอ็นเอเด่น D5 (สีชมพู) ในระบบนิเวศจำลองดิน AP0 AP2 AP4 และ ACE2 แถบดีเอ็นเอเด่น D6 (สีน้ำเงิน) ในระบบนิเวศจำลองดิน AP0 AP2 AP4 AP6 ACE2 และ ACE4 แถบดีเอ็นเอเด่น D7 (สีเขียวอ่อน) ในระบบนิเวศจำลองดินแถบดีเอ็นเอเด่น AP0 AP2 และ AP4 แถบดีเอ็นเอเด่น D9 (สีเหลือง) ในระบบนิเวศจำลองดิน AP4 AP6 และ ACE4 และแถบดีเอ็นเอเด่น D11 (สีเขียวเข้ม) ในระบบนิเวศจำลองดิน AP4 ACE2 และ ACE4 ซึ่งแถบดีเอ็นเอที่พบนี้มาจากระบบนิเวศจำลองดินที่เติมอะซีแนพทินเป็นแหล่งคาร์บอน และเมื่อเปรียบเทียบโครงสร้างประชาคมแบคทีเรียที่เกิดขึ้นจากระบบนิเวศจำลองดิน AP กับโครงสร้างประชาคมแบคทีเรียจากระบบนิเวศจำลองดิน PHE พบว่ามีความคล้ายคลึงกันโดยพบแถบดีเอ็นเอเด่นที่เกิดขึ้นตรงกันคือแถบดีเอ็นเอเด่น D2 (สีม่วง) ในระบบนิเวศจำลองดิน

AP6 และ PHE4 ซึ่งเป็นแถบดีเอ็นเอเด่นที่พบในระบบนิเวศจำลองดินที่เติมพีแนทรีนเป็นแหล่งคาร์บอน นอกจากนี้ยังพบแถบดีเอ็นเอเด่นที่พบในทุกระบบนิเวศจำลองดินคือ D5 (สีชมพู) D3 (สีส้ม) D4 (สีดำ) D6 (สีน้ำเงิน) D8 (สีน้ำตาล) D10 (สีแดง) ดังแสดงในรูปที่ 4.6



รูปที่ 4.6 โครงสร้างประชาคมแบคทีเรียโดยวิธี DGGE จากบริเวณ V-3 region ของ 16S rDNA จากระบบนิเวศจำลองดินต่างๆ ช่องวิ่งที่ 1 : AP0 (ระบบนิเวศจำลองดินที่เติมอะซีแนพรีนและพีแนทรีนจะเป็นแหล่งคาร์บอน, 0 ย่อมาจากระยะเวลาในสัปดาห์ที่0) ช่องวิ่งที่ 2 : AP2 (ระบบนิเวศจำลองดินที่เติมอะซีแนพรีนและพีแนทรีนเป็นแหล่งคาร์บอน, 2 ย่อมาจากระยะเวลาในสัปดาห์ที่ 2) ช่องวิ่งที่ 3 : AP4 ช่องวิ่งที่ 4 : AP6 ช่องวิ่งที่ 5 : ACE2 (ระบบนิเวศจำลองดินที่เติมอะซีแนพรีนเป็นแหล่งคาร์บอน, 2 ย่อมาจากระยะเวลาในสัปดาห์ที่ 2) ช่องวิ่งที่ 6 : ACE4 ช่องวิ่งที่ 7 : PHE2 (ระบบนิเวศจำลองดินที่เติมพีแนทรีนเป็นแหล่งคาร์บอน, 2 ย่อมาจากระยะเวลาในสัปดาห์ที่ 2) ช่องวิ่งที่ 8 PHE4

จากรูปแสดงให้เห็นว่าแถบดีเอ็นเอ D1 (สีฟ้า) D5 (สีชมพู) D7 (เขียวอ่อน) D9 (สีเหลือง) D11 (สีเขียวเข้ม) อาจเป็นกลุ่มแบคทีเรียที่มีบทบาทต่อการย่อยสลายอะซีแนพรีนได้ เนื่องจากสามารถพบแถบดีเอ็นเอเหล่านี้ได้จากระบบนิเวศจำลองดินที่เติมอะซีแนพรีนเป็นแหล่งคาร์บอน ส่วนแถบดีเอ็นเอ D2 (สีม่วง) อาจเป็นกลุ่มแบคทีเรียที่มีบทบาทต่อการย่อยสลายพีแนทรีนได้เนื่องจากสามารถพบแถบดีเอ็นเอนี้ได้จากระบบนิเวศจำลองดินที่เติมพีแนทรีนเป็นแหล่งคาร์บอน นอกจากนี้ยังพบแถบดีเอ็นเอที่อาจใช้ PAHs ทั้งสองชนิดเป็นแหล่งคาร์บอนได้คือ แถบดีเอ็นเอ D5 (สีชมพู) D3 (สีส้ม) D4 (สีดำ) D6 (สีน้ำเงิน) D8 (สีน้ำตาล) D10 (สีแดง) เพราะสามารถพบได้ทั้งในระบบนิเวศจำลองดินที่เติมอะซีแนพรีนและ/หรือพีแนทรีน

จากนั้นเลือกแถบดีเอ็นเอบางส่วนไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์เพื่อระบุชนิดแบคทีเรียที่มีบทบาทต่อการย่อยสลายอะซีแนพรีนและ/หรือพีแนพรีนโดยเลือกตัวแทนจากแถบดีเอ็นเอที่มีปริมาณความเข้มข้นของแถบดีเอ็นเอสูงไปวิเคราะห์ก็คือแถบดีเอ็นเอ D4 (สีดำ) D8 (สีน้ำตาล) D11 (สีเขียวเข้ม) เมื่อวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของแถบดีเอ็นเอบางแถบคือ D4 (สีดำ) D8 (สีน้ำตาล) D11 (สีเขียวเข้ม) พบว่า D4 (สีดำ) น่าจะเป็น *Bacillus* sp. และ D8 (สีน้ำตาล) น่าจะเป็น *Delftia* sp. ส่วน D11 (สีเขียวเข้ม) ยังไม่สามารถระบุชนิดได้ ทั้งนี้แบคทีเรียเด่นดังกล่าวเป็นกลุ่มที่ไม่สามารถเพาะเลี้ยงหรือเพาะเลี้ยงได้ยากในห้องปฏิบัติการ ดังแสดงรายละเอียดในตารางที่ 4.2

หลังจากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์พบว่าควรส่งวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์แถบดีเอ็นเอ D1 (สีฟ้า) D5 (สีชมพู) D7 (สีเขียวอ่อน) D9 (สีเหลือง) D10 (สีแดง) เพิ่มเนื่องจากคาดว่าน่าจะเป็นแบคทีเรียกลุ่มที่มีบทบาทต่อการย่อยสลายอะซีแนพรีนและจากการศึกษาในอดีตพบรายงานถึงแบคทีเรียที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายอะซีแนพรีนมีจำนวนน้อยและมีแนวโน้มที่จะพบแบคทีเรียกลุ่มที่ไม่สามารถเพาะเลี้ยงหรือเพาะเลี้ยงได้ยากในห้องปฏิบัติการ และควรส่งแถบดีเอ็นเอ D2 (สีม่วง) D3 (สีส้ม) วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์เพิ่มซึ่งคาดว่ากลุ่มแบคทีเรียนี้มีบทบาทและความสำคัญต่อการย่อยสลายพีแนพรีนดังแสดงในรูปที่ 4.6

ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4.2 แสดงผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์จากแถบดีเอ็นเอในการวิเคราะห์โครงสร้างประชาคมแบคทีเรียจากระบบนิเวศจำลองดินต่างๆ

ตัวอย่าง	สายพันธุ์แบคทีเรีย	Accession no.	Sequencing identity (%)	เอกสารอ้างอิง
D4 (สีดำ)	Uncultured marine bacterium	GU368020.1	196/197 (99%)	Hossain และ Ohnishi 2010 ไม่ตีพิมพ์
	Uncultured bacterium	GU291682.1	196/197 (99%)	Aw และคณะ 2010 ไม่ตีพิมพ์
	<i>Bacillaceae</i> bacterium สายพันธุ์G12-14A	GQ900683.1	196/197 (99%)	Divya และ Nair 2009
	<i>Bacillus</i> sp. สายพันธุ์ WPCB165	EU939690.2	196/197 (99%)	Baik และ Seong 2009 ไม่ตีพิมพ์
	<i>Bacillus</i> sp. สายพันธุ์ 76-7	GQ478402.1	196/197 (99%)	King และคณะ 2009 ไม่ตีพิมพ์
	<i>Bacillus</i> sp. สายพันธุ์ LS29	FJ937891.1	196/197 (99%)	Li และ Zhu 2009 ไม่ตีพิมพ์
	<i>Bacillus</i> sp. สายพันธุ์ UST050418-086	FJ596396.1	196/197 (99%)	Lee และคณะ 2009
	<i>Bacillus</i> sp. สายพันธุ์ JSM 081037	FJ527422.1	196/197 (99%)	Chen และคณะ 2009 ไม่ตีพิมพ์
	Uncultured <i>Bacillaceae</i> bacterium	FJ463649.1	196/197 (99%)	Wu 2008 ไม่ตีพิมพ์
	<i>Bacillus</i> sp. สายพันธุ์ B131	FJ441057.1	196/197 (99%)	Orbera และคณะ 2010 ไม่ตีพิมพ์
	<i>Bacillus</i> sp. สายพันธุ์ 10	FJ197849.1	196/197 (99%)	Che และคณะ 2008 ไม่ตีพิมพ์
	<i>Bacillus rigui</i> สายพันธุ์ WPCB074	EU939689.1	196/197 (99%)	Baik และคณะ 2010
	<i>Bacillus</i> sp. สายพันธุ์ MOLA 657	AM990770.1	196/197 (99%)	Bourrain และคณะ 2008 ไม่ตีพิมพ์
	<i>Bacillaceae</i> bacterium สายพันธุ์JAM-FM0701	AB362272.1	196/197 (99%)	Kobayashi และคณะ 2008
	<i>Bacillus</i> sp. สายพันธุ์ HS-R1	DQ988161.1	196/197 (99%)	Bonadei และคณะ 2007



ตารางที่ 4.2 แสดงผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์จากแถบดีเอ็นเอในการวิเคราะห์โครงสร้างประชาคมแบคทีเรียจากระบบนิเวศจำลองดินต่างๆ

ตัวอย่าง	สายพันธุ์แบคทีเรีย	Accession no.	Sequencing identity (%)	เอกสารอ้างอิง
D8 (สื่อน้ำตาล)	Uncultured <i>Delftia</i> sp.	GU472861.1	193/193 (100%)	Inceoglu และคณะ 2010
	<i>Delftia tsuruhatensis</i> สายพันธุ์ IMM1	GU591410.1	193/193 (100%)	Preiswerk และคณะ 2010 ไม่ตีพิมพ์
	<i>Delftia</i> sp. สายพันธุ์ AL3	GU566337.1	193/193 (100%)	Pavan และคณะ 2010 ไม่ตีพิมพ์
	Uncultured <i>Delftia</i> sp.	GU563748.1	193/193 (100%)	Tian และคณะ 2010 ไม่ตีพิมพ์
	Uncultured <i>Delftia</i> sp.	GU472582.1	193/193 (100%)	Biderre และคณะ 2010 ไม่ตีพิมพ์
	<i>Delftia</i> sp. สายพันธุ์ AN-P1	FJ595716.1	193/193 (100%)	Wu 2010
	Uncultured bacterium	GU272276.1	193/193 (100%)	Ning และคณะ 2010 ไม่ตีพิมพ์
	Uncultured beta proteobacterium	GU202941.1	193/193 (100%)	Zhang 2009 ไม่ตีพิมพ์
	Uncultured Burkholderiales bacterium	EU572429.1	193/193 (100%)	Frank และคณะ 2009
	Uncultured bacterium	FJ981666.1	193/193 (100%)	Erickson และคณะ 2009 ไม่ตีพิมพ์
	Uncultured bacterium	AM930326.1	193/193 (100%)	Guo และคณะ 2008 ไม่ตีพิมพ์
	Uncultured <i>Delftia</i> sp.	FJ268930.1	193/193 (100%)	Dicksved, และคณะ 2009
	Uncultured bacterium	GU212470.1	193/193 (100%)	Wang และคณะ 2009 ไม่ตีพิมพ์
	Uncultured Burkholderiales bacterium	EU572382.1	193/193 (100%)	Frank และคณะ 2009

ศูนย์วิจัยทรัพยากรน้ำ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4.2 แสดงผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์จากแถบดีเอ็นเอในการวิเคราะห์โครงสร้างประชาคมแบคทีเรียจากระบบนิเวศจำลองดินต่างๆ

ตัวอย่าง	สายพันธุ์แบคทีเรีย	Accession no.	Sequencing identity (%)	เอกสารอ้างอิง
D11 (สีเขียวเข้ม)	Uncultured actinobacterium	GQ249482.1	172/175 (98%)	Koechling และคณะ 2009 ไม่ตีพิมพ์
	Uncultured bacterium	EU007626.1	172/175 (98%)	Zhang 2007 ไม่ตีพิมพ์
	Uncultured bacterium	AY860750.1	172/175 (98%)	Zhang และคณะ 2005 ไม่ตีพิมพ์
	Uncultured actinobacterium	GU194284.1	174/178 (97%)	Cermak และคณะ 2010 ไม่ตีพิมพ์
	Uncultured bacterium	EU335288.1	174/178 (97%)	Hansel และคณะ 2008
	Uncultured bacterium	EU133131.1	174/178 (97%)	Elshahed และคณะ 2008
	Uncultured bacterium	EU132698.1	174/178 (97%)	Elshahed และคณะ 2008
	Uncultured actinobacterium	DQ828770.1	172/176 (97%)	Hartmann และ Widmer 2006
	Uncultured bacterium	FJ479494.1	173/178 (97%)	Yousse และคณะ 2009
	Uncultured bacterium	FJ479347.1	173/178 (97%)	Yousse และคณะ 2009
	Uncultured bacterium	EU440447.1	173/178 (97%)	Pellerin และคณะ 2008 ไม่ตีพิมพ์
	Uncultured bacterium	EU132889.1	173/178 (97%)	Elshahed และคณะ 2008
	Uncultured <i>Blastococcus</i> sp.	GQ366427.1	172/177 (97%)	Shivaji และคณะ 2009 ไม่ตีพิมพ์
	Uncultured soil bacterium	EU861863.1	173/178 (97%)	Nemergut และคณะ 2008
	Uncultured actinobacterium	DQ828303.1	172/176 (97%)	Hartmann และ Widmer 2006
	Uncultured actinobacterium	DQ828088.1	172/176 (97%)	Hartmann และ Widmer 2006

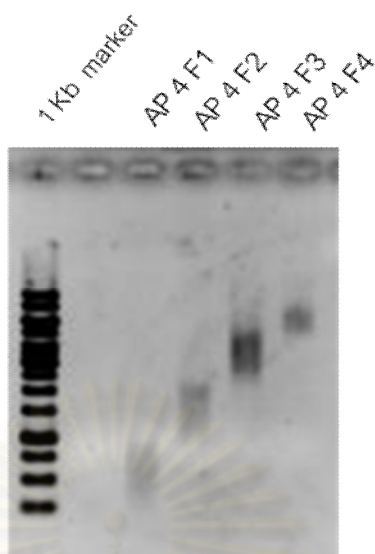
#### 4.4 การคัดแยกยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายสารประกอบพอลิไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนโดยการสร้างห้องสมุดดีเอ็นเอจากเมตาจีโนมดิน

เมื่อพบการย่อยสลายของ PAHs โดยจุลินทรีย์ในดินแล้ว ในการทดลองนี้ได้พยายามคัดแยกยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายสารประกอบพอลิไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนโดยวิธีการสร้างห้องสมุดดีเอ็นเอจากเมตาจีโนมดิน ซึ่งทำการทดลองโดยนำดีเอ็นเอเมตาจีโนม AP2 และ AP4 จากข้อ 3.2.1 มาตัดแบบไม่สมบูรณ์ด้วยเอนไซม์ *Sau3AI* ดังแสดงในรูปที่ 4.7 และนำมาแยกตามขนาดชิ้นดีเอ็นเอ (size fractionation) ด้วยวิธี DNA troughing method ตามวิธีของ Harpichanchai และคณะ (2007) ตามวิธีที่ระบุในข้อ 3.4.1 ซึ่งแยกขนาดดีเอ็นเอได้ 4 ขนาด ดังนี้ ขนาด <1 Kb ขนาด 1-3 Kb ขนาด 3-5 Kb และ ขนาด 5-10 Kb ดังแสดงในรูปที่ 4.8



รูปที่ 4.7 ตัดดีเอ็นเอ AP4 แบบไม่สมบูรณ์ (partial digest) ด้วยเอนไซม์ *Sau3AI* ช่องวิ่งที่ 1: Marker 1 Kb ช่องวิ่งที่ 2 : ดีเอ็นเอ AP4 ตัดด้วยเอนไซม์ *Sau3AI* ช่องวิ่งที่ 3 : ดีเอ็นเอ AP4 ตัดด้วยเอนไซม์ *Sau3AI*

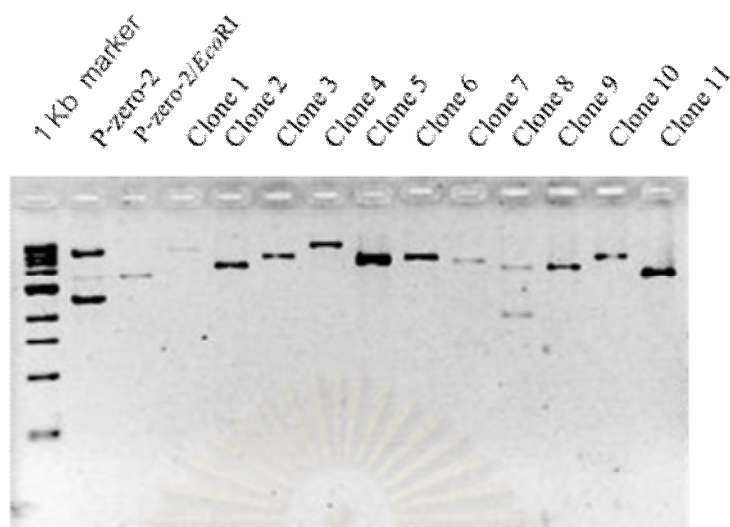
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 4.8 แยกตามขนาดชิ้นดีเอ็นเอ (size fractionation) ช่องวิ่งที่ 1: Marker 1 Kb ช่องวิ่งที่ 3 : ดีเอ็นเอ AP4 ตัดด้วยเอนไซม์ *Sau3AI* แยกขนาดชิ้นดีเอ็นเอ (size fractionation) ขนาด < 1 Kb ช่องวิ่งที่ 4 : ดีเอ็นเอ AP4 ตัดด้วยเอนไซม์ *Sau3AI* แยกขนาดชิ้นดีเอ็นเอ (size fractionation) ขนาด 1-3 Kb ช่องวิ่งที่ 5 : ดีเอ็นเอ AP4 ตัดด้วยเอนไซม์ *Sau3AI* แยกขนาดชิ้นดีเอ็นเอ (size fractionation) ขนาด 3-5 Kb ช่องวิ่งที่ 6 : ดีเอ็นเอ AP4 ตัดด้วยเอนไซม์ *Sau3AI* แยกขนาดชิ้นดีเอ็นเอ (size fractionation) ขนาด 5-10 Kb

จากนั้นนำดีเอ็นเอดีเอ็นเอ AP2 และ AP4 ตัดด้วยเอนไซม์ *Sau3AI* แยกขนาดชิ้นดีเอ็นเอ (size fractionation) ขนาด 3-5 Kb และ ขนาด 5-10 Kb เชื่อมเข้ากับพลาสมิดเวกเตอร์ pZErO-2 (Invitrogen, USA) ที่ตัดด้วยเอนไซม์ *BamHI* ตามวิธีที่ระบุในข้อ 4.2 พบรีคอมบิแนนท์พลาสมิดจำนวนประมาณ 10,000 โคลน ซึ่งเป็นตัวอย่าง AP2 จำนวนประมาณ 5,000 โคลน และตัวอย่าง AP4 จำนวนประมาณ 5,000 โคลน

ตรวจสอบขนาดชิ้นดีเอ็นเอสอดแทรกจากรีคอมบิแนนท์พลาสมิดโดยการสุ่มรีคอมบิแนนท์พลาสมิดจากห้องสมุดดีเอ็นเอจากนั้นตัดรีคอมบิแนนท์พลาสมิดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI* และตรวจสอบผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นโดยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส ได้ผลแสดงในรูปที่ 4.9 ซึ่งพบชิ้นดีเอ็นเอสอดแทรกขนาดเฉลี่ยประมาณ 3-8 Kb



รูปที่ 4.9 ตรวจสอบขนาดชิ้นดีเอ็นเอสอดแทรกจากรีคอมบิแนนท์พลาสมิดโดยการสุ่มโคลนต่างๆ จากการสร้างห้องสมุดดีเอ็นเอ (AP4) หลังจากถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI* ช่องวิ่งที่ 1 : Marker 1 Kb ช่องวิ่งที่ 2 : พลาสมิดเวกเตอร์ pZER0-2 ช่องวิ่งที่ 3 : พลาสมิดเวกเตอร์ pZER0-2 ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI* ช่องวิ่งที่ 4 – ช่องวิ่งที่ 14 : โคลนต่างๆ จากห้องสมุดดีเอ็นเอ (AP4) หลังจากถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI*

จากนั้นการคัดกรองยีนเอกซ์ตราไดออกซีจีเนสหรือไดออกซีจีเนสจากห้องสมุดดีเอ็นเอ ซึ่งคัดกรองยีนเอกซ์ตราไดออกซีจีเนสโดยนำโคลนที่ได้จากการสร้างห้องสมุดดีเอ็นเอมาคัดกรองโดยสังเกตการย่อยแคทีคอลเป็นผลิตภัณฑ์สีเหลืองเข้ม (2-ไฮดรอกซีมีวโคเนทเซมิแอลดีไฮด์) ผลจากการทดลองไม่พบการย่อยแคทีคอลเป็นผลิตภัณฑ์สีเหลืองเข้ม (2-ไฮดรอกซีมีวโคเนท เซมิแอลดีไฮด์) และการคัดกรองยีนไดออกซีจีเนสโดยนำโคลนที่ได้จากการสร้างห้องสมุดดีเอ็นเอมาคัดกรองโดยสังเกตการแสดงออกของยีนไดออกซีจีเนสจากการเปลี่ยนอินโดลเป็นอินดิโก ผลจากการทดลองไม่พบโคลนที่สามารถเปลี่ยนอินโดลเป็นอินดิโก



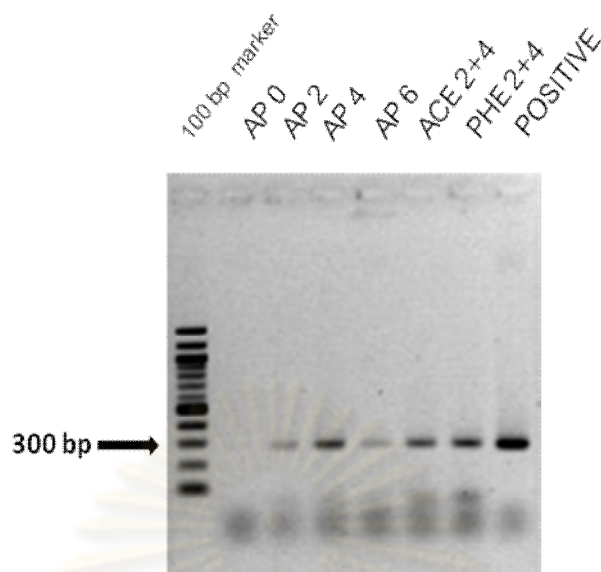
#### 4.5 การตรวจสอบและการคัดแยกยีนประมวลรหัสไดออกซีจีเนสที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสารประกอบพอลิไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนโดยวิธี PCR

จากผลการทดลองข้างต้นพบว่าการย่อยสลายพีแนทรีนและอะซีแนทรีนในระบบนิเวศจำลองดินเกิดจากบทบาทของแบคทีเรียในดิน และผลการวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงประชาคมแบคทีเรียในระบบนิเวศจำลองดินพบกลุ่มแบคทีเรียเด่นเป็นเป็นกลุ่มที่ไม่สามารถเพาะเลี้ยงหรือเพาะเลี้ยงได้ยากในห้องปฏิบัติการ คาดว่าระบบนิเวศจำลองดินดังกล่าวน่าจะเป็นแหล่งที่สามารถพบยีนประมวลรหัสไดออกซีจีเนสที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสารประกอบพอลิไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนที่แตกต่างจากที่เคยมีรายงานมาแล้ว การทดลองนี้จึงคัดแยกยีนดังกล่าวจากระบบนิเวศจำลองดินโดยเทคนิคลูกโซ่พอลิเมอเรส

##### 4.5.1 การตรวจสอบยีนประมวลรหัสไดออกซีจีเนสที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสารประกอบพอลิไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนโดยวิธี PCR

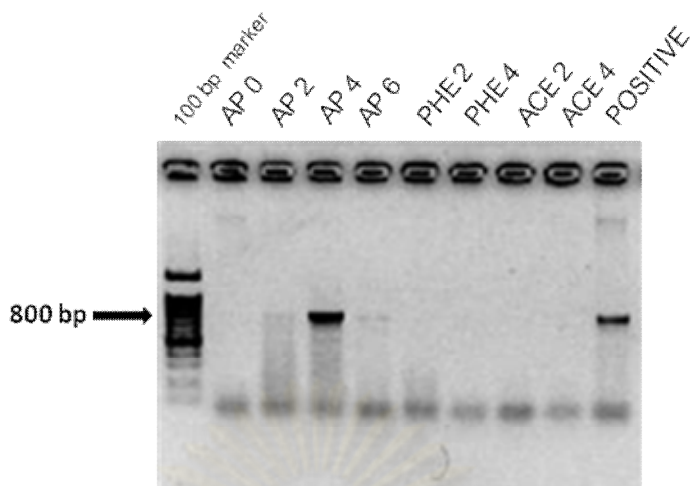
การทดลองทำโดยเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอบริเวณที่จำเพาะต่อยีนที่ประมวลรหัสเกี่ยวกับอะโรมาติกริงไฮดรอกซีเลทิงไดออกซีจีเนสและเอนไซม์เอกซ์ตราไดออกไซด์ออกซีจีเนสของแบคทีเรียบางกลุ่มที่สามารถย่อยสลายสารประกอบอะโรมาติก โดยการใช้เทคนิคลูกโซ่พอลิเมอเรส โดยใช้ดีเอ็นเอจากระบบนิเวศจำลองดินที่เติมพีแนทรีนและ/หรืออะซีแนทรีนเป็นแหล่งคาร์บอนมาเป็นดีเอ็นเอแม่แบบ

ผลการตรวจสอบยีนที่ประมวลรหัสไดออกซีจีเนสที่คาดว่าเกี่ยวข้องกับการย่อยสารประกอบพอลิไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนโดยวิธีลูกโซ่พอลิเมอเรสพบผลิตภัณฑ์ลูกโซ่พอลิเมอเรสตามขนาดที่คาดหวัง 297 bp เมื่อใช้ไพรเมอร์ GPF และ GPR (Cebon และคณะ, 2008) ซึ่งจำเพาะต่อยีนที่ประมวลรหัสหน่วยย่อยแอลฟาอะโรมาติกริงไฮดรอกซีเลทิงไดออกซีจีเนสที่จำเพาะต่อแบคทีเรียแกรมบวก แสดงดังรูปที่ 4.10 และพบผลิตภัณฑ์ลูกโซ่พอลิเมอเรสขนาดตามที่คาดหวัง 803 bp เมื่อใช้ไพรเมอร์ NMR331f และ NMR1134r (Marcos และคณะ, 2009) ซึ่งจำเพาะต่อยีนที่ประมวลรหัสหน่วยย่อยแอลฟาอะโรมาติกริงไฮดรอกซีเลทิงไดออกซีจีเนสที่จำเพาะต่อแบคทีเรียแกรมบวก แสดงดังรูปที่ 4.11 ในขณะที่เมื่อใช้ไพรเมอร์คู่อื่นๆ จำเพาะต่อยีนที่ประมวลรหัสหน่วยย่อยแอลฟาอะโรมาติกริงไฮดรอกซีเลทิงไดออกซีจีเนส และเอกซ์ตราไดออกไซด์ออกซีจีเนสไม่พบผลิตภัณฑ์ลูกโซ่พอลิเมอเรส ดังแสดงรายละเอียดในตารางที่ 4.3 และ 4.4 ตามลำดับ



รูปที่ 4.10 ขนาดชิ้นผลิตภัณฑ์ลูกโซ่พอลิเมอไรสจากไพรเมอร์คู่ GPF และ GPR ช่องวิ่งที่ 1: Marker 100 bp ช่องวิ่งที่ 2 : AP0 ช่องวิ่งที่ 3 : AP2 ช่องวิ่งที่ 4 : AP4 ช่องวิ่งที่ 5 : AP6 ช่องวิ่งที่ 6 : ACE2+4 ช่องวิ่งที่ 7 : PHE2+4 ช่องวิ่งที่ 8 : positive control (ดีเอ็นเอจาก *Pseudoxanthomonas* sp. สายพันธุ์ RN402) (Klankeo และคณะ, 2009)

จากรูปที่ 4.10 ผลจากการใช้ไพรเมอร์คู่ GPF และ GPR ไม่พบผลิตภัณฑ์ลูกโซ่พอลิเมอไรสในสัปดาห์ที่ 0 (AP0) ของการทดลอง และพบผลิตภัณฑ์ลูกโซ่พอลิเมอไรส ในสัปดาห์ที่ 4 (AP4) ซึ่งมีความเข้มของแถบดีเอ็นเอมากกว่าผลิตภัณฑ์ลูกโซ่พอลิเมอไรสจากสัปดาห์ที่ 2 (AP2) และ 6 (AP6) ในขณะที่ ACE2+4 และ PHE2+4 พบว่าผลิตภัณฑ์ลูกโซ่พอลิเมอไรสมีความเข้มของแถบดีเอ็นเอไม่ต่างจาก AP4 จากผลแสดงให้เห็นว่าเมื่อเติมอะซีแนพทีนและพีแนนทรีนลงไป ในดินสามารถชักนำให้แบคทีเรียในดินผลิตเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายอะซีแนพทีนและพีแนนทรีนได้ และจากการพบผลิตภัณฑ์ลูกโซ่พอลิเมอไรสในสัปดาห์ที่ 4 (AP4) มีความเข้มของแถบดีเอ็นเอมากที่สุดนั้นอาจอนุมานได้ว่าแบคทีเรียในดินสามารถผลิตเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายอะซีแนพทีนและพีแนนทรีนได้มากที่สุดที่สุดในสัปดาห์ที่ 4 ของการทดลอง ดังนั้นจึงเลือกผลิตภัณฑ์ลูกโซ่พอลิเมอไรสจากสัปดาห์ที่ 4 (AP4) มาทำการทดลองต่อในการสร้างห้องสมุดยีน เพื่อคัดแยกยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายสารประกอบ PAHs



รูปที่ 4.11 ขนาดชิ้นผลิตภัณฑ์ลูกโซ่พอลิเมอไรสจากไพรเมอร์คู่ NMR331f และ NMR1134r ช่องวุ้นที่ 1: Marker 100 bp ช่องวุ้นที่ 2 : AP0 ช่องวุ้นที่ 3 : AP2 ช่องวุ้นที่ 4 : AP4 ช่องวุ้นที่ 5 : AP6 ช่องวุ้นที่ 6 : PHE2 ช่องวุ้นที่ 7 : PHE4 ช่องวุ้นที่ 8 : ACE2 ช่องวุ้นที่ 9 : ACE4 ช่องวุ้นที่ 10 : positive control (ดีเอ็นเอจาก *Pseudoxanthomonas* sp. สายพันธุ์ RN402) (Klankeo และคณะ , 2009)

จากรูปที่ 4.11 ผลจากการใช้ไพรเมอร์คู่ NMR331f และ NMR1134r ไม่พบผลิตภัณฑ์ลูกโซ่พอลิเมอไรสในสัปดาห์ที่ 0 (AP0) ของการทดลอง และพบผลิตภัณฑ์ลูกโซ่พอลิเมอไรสในสัปดาห์ที่ 4 (AP4) ซึ่งมีความเข้มของแถบดีเอ็นเอมากกว่าผลิตภัณฑ์ลูกโซ่พอลิเมอไรสจากสัปดาห์ที่ 2 (AP2) และ 6 (AP6) ในขณะที่ไม่พบผลิตภัณฑ์ลูกโซ่พอลิเมอไรสในตัวอย่าง ACE2 ACE4 และ PHE2 PHE4 จากผลแสดงให้เห็นว่าเมื่อเติมอะซีแนพรีนและพีแนนทรีนลงไปในดินสามารถชักนำให้แบคทีเรียในดินผลิตเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายอะซีแนพรีนและพีแนนทรีนได้และจากการพบผลิตภัณฑ์ลูกโซ่พอลิเมอไรสในสัปดาห์ที่ 4 (AP4) มีความเข้มของแถบดีเอ็นเอมากที่สุดนั้นอาจอนุมานได้ว่าแบคทีเรียในดินสามารถผลิตเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายอะซีแนพรีนและพีแนนทรีนได้มากที่สุดในการทดลอง ซึ่งสอดคล้องกับผลในการนำผลิตภัณฑ์ลูกโซ่พอลิเมอไรสมาสร้างห้องสมุดยีนเพื่อคัดแยกยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายสารประกอบ PAHs ที่พบจำนวนรีคอมบิแนนท์พลาสมิดมากที่สุดจากตัวอย่างในสัปดาห์ที่ 4 (AP4) ดังแสดงในตารางที่ 4.5

ตารางที่ 4.3 ผลปฏิกิริยาถูกใช้พอลิเมอร์โดยใช้ไพรเมอร์คู่ต่างๆ ที่จำเพาะต่อยีนที่ประมวลรหัส  
เอนไซม์อะโรมาติกริงไฮดรอกซิเลทิงไดออกซีจีเนส

ไพรเมอร์	ดีเอ็นเอจากระบบนิเวศจำลองดิน							
	AP0	AP2	AP4	AP6	PHE2	PHE4	ACE2	ACE4
ndoBF/ndoBR	-	-	-	-	-	-	-	-
phnAcF/phnAcR	-	-	-	-	-	-	-	-
arhA1F/arhA1R	-	-	-	-	-	-	-	-
bphA1F/bphA1R	-	-	-	-	-	-	-	-
GNF/GNR	-	-	-	-	-	-	-	-
GPF/GPR	-	+	+	+	+	+	+	+
NahAc1F/NahAc3F, NahAc2	-	-	-	-	-	-	-	-
NMR331f/NMR1134r	-	+	+	+	-	-	-	-
adoF1/adoB1	-	-	-	-	-	-	-	-

+ หมายถึง ได้ผลิตผลิตภัณฑ์ถูกใช้พอลิเมอร์ตามที่คาดหวัง

- หมายถึง ไม่พบผลิตภัณฑ์ถูกใช้พอลิเมอร์ตามที่คาดหวัง

ตารางที่ 4.4 ผลปฏิกิริยาถูกใช้พอลิเมอร์โดยใช้ไพรเมอร์คู่ต่างๆ ที่จำเพาะต่อยีนที่ประมวลรหัส  
เอกซ์ตราไดออกไซด์ออกซีจีเนส

ไพรเมอร์	ดีเอ็นเอจากระบบนิเวศจำลองดิน							
	AP0	AP2	AP4	AP6	PHE2	PHE4	ACE2	ACE4
BphCS1F/BphCS2R	-	-	-	-	-	-	-	-
BP-f/BP-r	-	-	-	-	-	-	-	-

+ หมายถึง ได้ผลิตผลิตภัณฑ์ถูกใช้พอลิเมอร์ตามที่คาดหวัง

- หมายถึง ไม่พบผลิตภัณฑ์ถูกใช้พอลิเมอร์ตามที่คาดหวัง

4.5.2 การคัดแยกยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายสารประกอบพอลิไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนโดยสร้างห้องสมุดยีนจากผลิตภัณฑ์ลูกโซ่พอลิเมอเวส

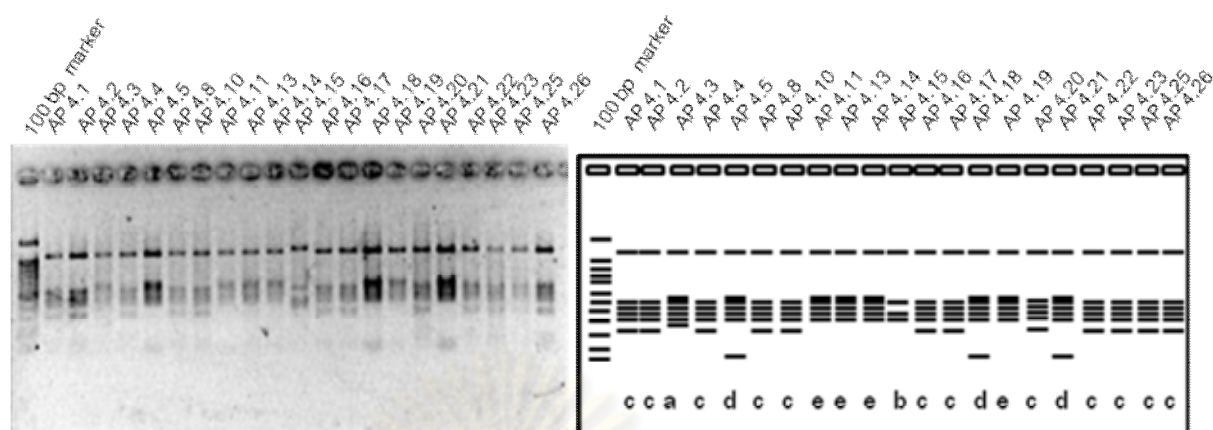
เมื่อพบผลิตภัณฑ์ลูกโซ่พอลิเมอเวสซึ่งจำเพาะต่อยีนที่ประมวลรหัสหน่วยย่อยแอลฟาอะโรมาติกริงไฮดรอกซีเลทิงไดออกซีจีเนส จึงนำมาโคลนเข้ากับพลาสมิดเวกเตอร์ pGEM-T Easy เพื่อศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลิตภัณฑ์ลูกโซ่พอลิเมอเวสที่ได้โดยเรียกว่าการสร้างห้องสมุดยีน โดยมีตัวอย่างผลิตภัณฑ์ลูกโซ่พอลิเมอเวสที่นำมาโคลนและจำนวนโคลนที่นำไปศึกษาต่อ ดังแสดงผลตารางที่ 4.5

ตารางที่ 4.5 ผลการสร้างห้องสมุด PCR ซึ่งจำเพาะต่อยีนที่ประมวลรหัสหน่วยย่อยแอลฟาอะโรมาติกริงไฮดรอกซีเลทิงไดออกซีจีเนส

ตัวอย่างผลิตภัณฑ์ลูกโซ่พอลิเมอเวส	จำนวนรีคอมบิแนนท์พลาสมิด (โคลน)
AP4GP4	21
AP2NMR	11
AP4NMR4 (โคลนครั้งที่1) + AP4iNMR (โคลนครั้งที่2)	33
AP6NMR	10

การสร้างห้องสมุดยีน (PCR) ที่สร้างโดยการนำผลิตภัณฑ์ลูกโซ่พอลิเมอเวสที่ใช้คู่ไพรเมอร์ GPF และ GPR ซึ่งพบรีคอมบิแนนท์พลาสมิดจากการใช้ดีเอ็นเอแม่แบบในระบบนิเวศจำลองดินที่เติมอะซีแนพทินและพีแนนทรินเป็นแหล่งคาร์บอนในสปีด้าท์ที่ 4 (AP4GP4) จำนวน 21 โคลน จากนั้นนำรีคอมบิแนนท์พลาสมิดจำนวน 21 โคลน *Hinf*I เพื่อเลือกรูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกันไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ ได้ผลดังแสดงในรูปที่ 4.12





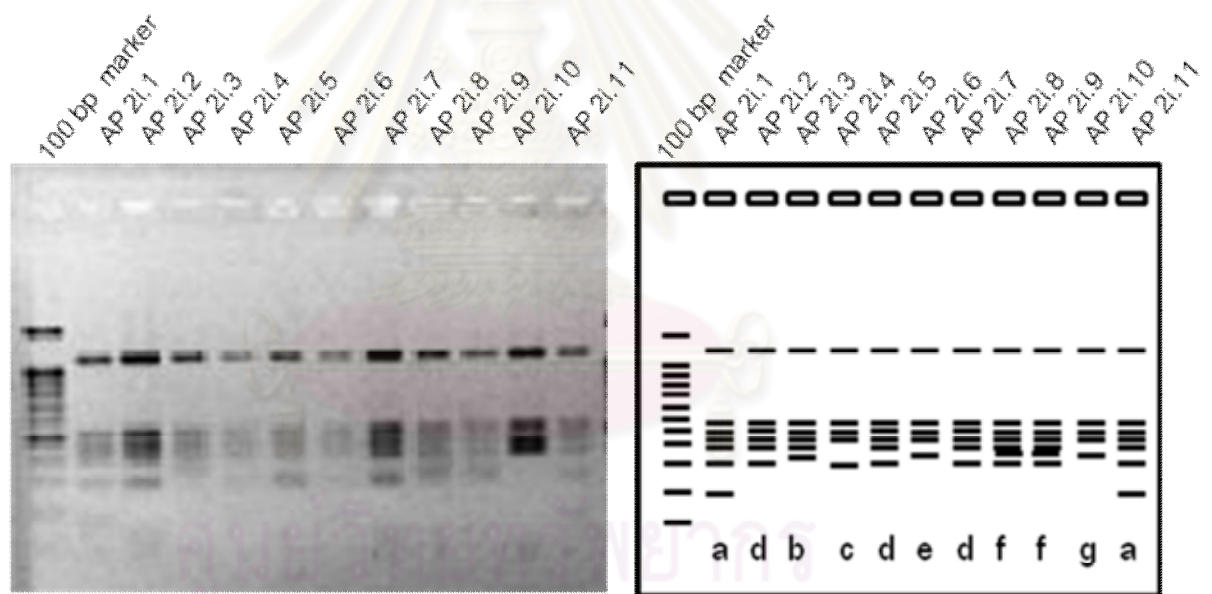
รูปที่ 4.12 แสดงรูปแบบของรีคอมบิแนนท์พลาสมิดตัวอย่าง AP4GP4 หลังจากถูกตัดด้วย เอนไซม์ตัดจำเพาะ *HinfI* ช่องวิ่งที่ 1: Marker 100 bp ช่องวิ่งที่ 2 - ช่องวิ่งที่ 22 : คือตัวอย่าง AP4GP หลังจากถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *HinfI*

จากรูปที่ 4.12 ที่แสดงรูปแบบของรีคอมบิแนนท์พลาสมิดตัวอย่าง AP4GP4 พบว่า สามารถแบ่งรูปแบบของรีคอมบิแนนท์พลาสมิดหลังจากถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *BsuRI* และ *HinfI* ได้เป็น 5 กลุ่ม จากนั้นเลือกตัวแทนของแต่ละกลุ่มดังนี้ AP4GP4.3 AP4GP4.15 AP4GP4.23 AP4GP4.5 และ AP4GP4.11 เพื่อนำไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ ดังแสดงใน ตารางที่ 4.6

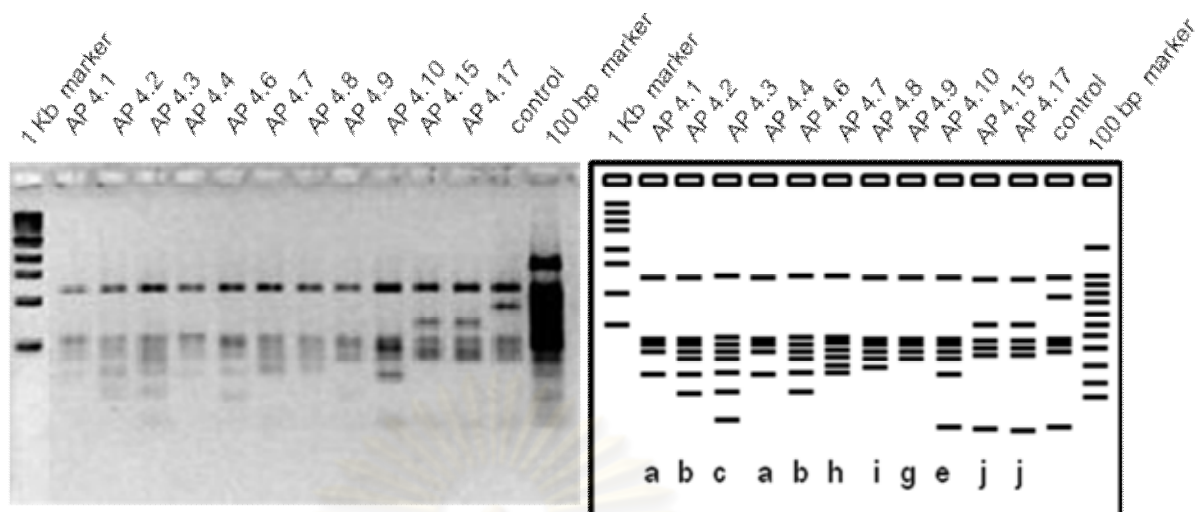
ตารางที่ 4.6 กลุ่มของรูปแบบรีคอมบิแนนท์พลาสมิดหลังจากถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะจาก ตัวอย่าง AP4GP4

กลุ่ม (รูปแบบ)	สมาชิกในกลุ่มที่มีรูปแบบของแถบดีเอ็นเอ เหมือนกัน	รีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่นำไป วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์
1 (a)	4.3	AP4GP4.3
2 (b)	4.15	AP4GP4.15
3 (c)	4.1, 4.2, 4.4, 4.8, 4.10, 4.16, 4.17, 4.20, 4.22, 4.23, 4.25, 4.26	AP4GP4.23
4 (d)	4.5, 4.18, .4.21	AP4GP4.5
5 (e)	4.11, 4.13, 4.14, 4.19	AP4GP4.11

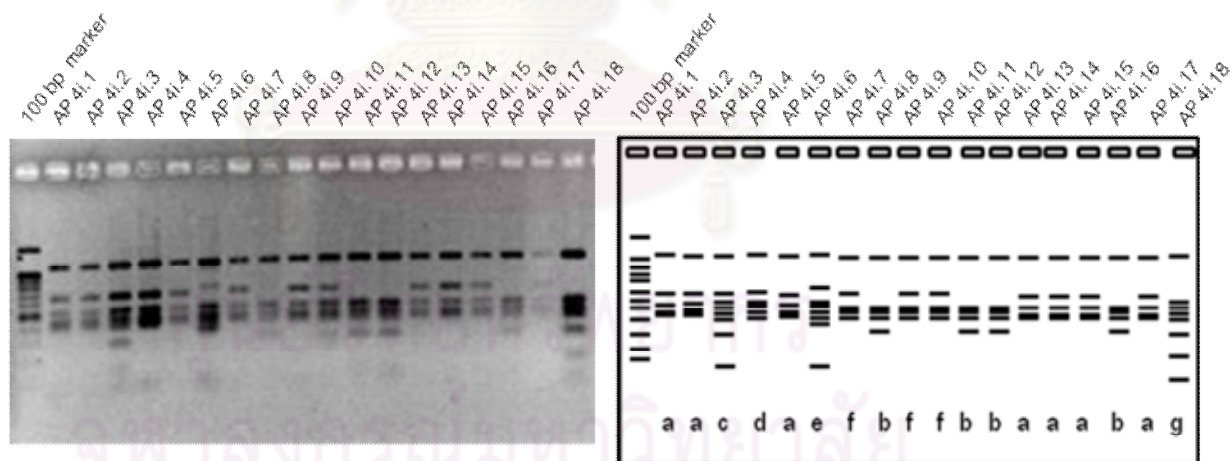
จากตารางที่ 4.5 สร้างห้องสมุดยีนจากการนำผลิตภัณฑ์ลูกโซ่พอลิเมอเรสที่ใช้คู่ไพรเมอร์ NMR331f และ NMR1134r โดยใช้ดีเอ็นเอแม่แบบจากระบบนิเวศจำลองดินที่เดิมอะซีแนพรีน และพีแนนทรีนเป็นแหล่งคาร์บอนในสัปดาห์ที่2 (AP2NMR) พบรีคอมบิแนนท์พลาสมิดจำนวน 11 โคลน นำมาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hin*I นอกจากนี้ยังมีตัวอย่าง AP4NMR (โคลนครั้งที่1) AP4iNMR (โคลนครั้งที่2) (ย่อมาจากผลิตภัณฑ์ลูกโซ่พอลิเมอเรสที่ใช้ไพรเมอร์คู่ NMR331f และ NMR1134r โดยใช้ดีเอ็นเอแม่แบบจากระบบนิเวศจำลองดินที่เดิมอะซีแนพรีนและพีแนนทรีนเป็นแหล่งคาร์บอนในสัปดาห์ที่4) พบรีคอมบิแนนท์พลาสมิดจำนวน 31 โคลน นำมาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hin*I และจากตัวอย่าง AP6NMR (ย่อมาจากผลิตภัณฑ์ลูกโซ่พอลิเมอเรสที่ใช้ไพรเมอร์คู่ NMR331f และ NMR1134r โดยใช้ดีเอ็นเอแม่แบบจากระบบนิเวศจำลองดินที่เดิมอะซีแนพรีนและพีแนนทรีนเป็นแหล่งคาร์บอนในสัปดาห์ที่6) พบรีคอมบิแนนท์พลาสมิดจำนวน 10 โคลน นำมาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hin*I เพื่อเลือกรูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกันไป วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ ได้ผลดังแสดงในรูปที่ 4.13-4.16



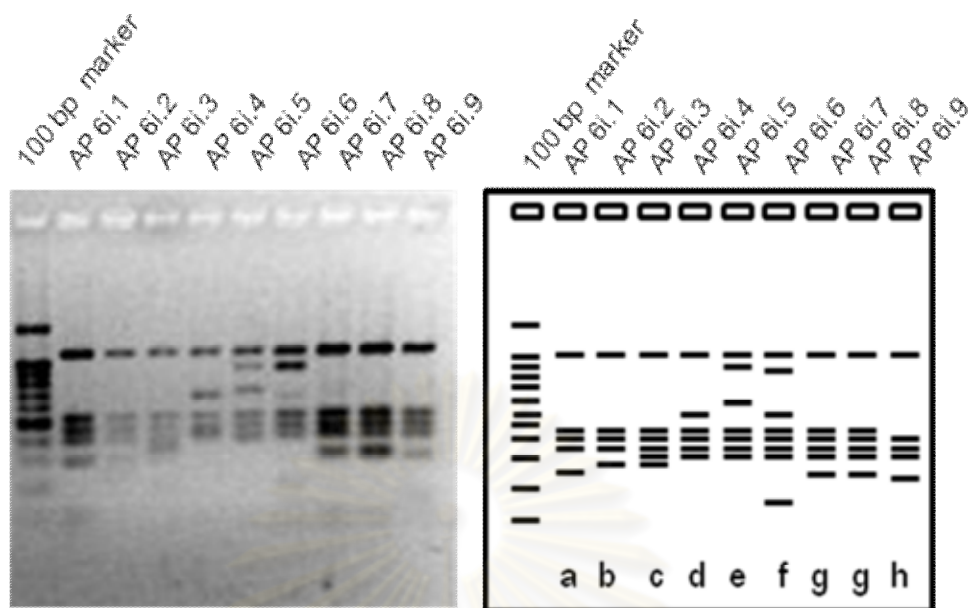
รูปที่ 4.13 แสดงรูปแบบของรีคอมบิแนนท์พลาสมิดตัวอย่าง AP2NMR หลังจากถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hin*I ช่องวิ่งที่ 1: Marker 100 bp ช่องวิ่งที่ 2 - ช่องวิ่งที่ 12 : คือตัวอย่าง AP2NMR หลังจากถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hin*I



รูปที่ 4.14 แสดงรูปแบบของรีคอมบิแนนท์พลาสมิดตัวอย่าง AP4NMR หลังจากถูกตัดด้วย เอนไซม์ตัดจำเพาะ *HinfI* ช่องวิ่งที่ 1: Marker 100 bp ช่องวิ่งที่ 2 - ช่องวิ่งที่ 22 : คือตัวอย่าง AP4NMR หลังจากถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *HinfI*



รูปที่ 4.15 แสดงรูปแบบของรีคอมบิแนนท์พลาสมิดตัวอย่าง AP4iNMR หลังจากถูกตัดด้วย เอนไซม์ตัดจำเพาะ *HinfI* ช่องวิ่งที่ 1: Marker 100 bp ช่องวิ่งที่ 2 - ช่องวิ่งที่ 19 : คือตัวอย่าง AP4iNMR หลังจากถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *HinfI*



รูปที่ 4.16 แสดงรูปแบบของรีคอมบิแนนท์พลาสมิดตัวอย่าง AP6NMR หลังจากถูกตัดด้วย เอนไซม์ตัดจำเพาะ *HinfI* ช่องวิ่งที่ 1: Marker 100 bp ช่องวิ่งที่ 2 - ช่องวิ่งที่ 10 : คือตัวอย่าง AP6NMR หลังจากถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *HinfI*

จากรูปที่ 4.13 - 4.16 ที่แสดงรูปแบบของรีคอมบิแนนท์พลาสมิดตัวอย่าง AP2NMR หลังจากถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *HinfI* ได้เป็น 7 กลุ่ม จากนั้นเลือกตัวแทนของแต่ละกลุ่ม ดังนี้ AP2NMR2i1 AP2NMR2i3 AP2NMR2i4 AP2NMR2i2 AP2NMR2i6 AP2NMR2i8 AP2NMR2i10 ส่วนรูปแบบของรีคอมบิแนนท์พลาสมิดตัวอย่าง AP4NMR (โคลนครั้งที่1) AP4iNMR (โคลนครั้งที่2) หลังจากถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *HinfI* ได้เป็น 17 กลุ่ม จากนั้นเลือกตัวแทนของแต่ละกลุ่ม ดังนี้ AP4NMR4.1 AP4NMR4.2 AP4NMR4.3 AP4NMR4.5 AP4NMR4.10 AP4NMR4.16 AP4NMR4.9 AP4NMR4.7 AP4NMR4.8 AP4NMR4.15 AP4iNMR4i1 AP4iNMR4i8 AP4iNMR4i3 AP4iNMR4i4 AP4iNMR4i6 AP4iNMR4i7 AP4iNMR4i18 และรูปแบบของรีคอมบิแนนท์พลาสมิดตัวอย่าง AP6NMR พบว่าสามารถแบ่งรูปแบบของรีคอมบิแนนท์พลาสมิดหลังจากถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *HinfI* ได้เป็น 9 กลุ่ม จากนั้นเลือกตัวแทนของแต่ละกลุ่ม ดังนี้ AP6NMR6i1 AP6NMR6i2 AP6NMR6i3 AP6NMR6i4 AP6NMR6i5 AP6NMR6i6 AP6NMR6i7 AP6NMR6i9 AP6NMR6i10 ดังแสดงในตารางที่ 4.7

ตารางที่ 4.7 แสดงกลุ่มของรูปแบบรีคอมบิแนนท์พลาสมิดหลังจากถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ จากตัวอย่าง AP2NMR AP4NMR (โคลนครั้งที่1) AP4iNMR (โคลนครั้งที่2) และ AP6NMR

ตัวอย่าง	กลุ่ม (รูปแบบ)	สมาชิกในกลุ่มที่มีรูปแบบของแถบดีเอ็นเอเหมือนกัน	รีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่นำไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์
AP2NMR	1 (a)	2i1, 2i11	AP2NMR2i1
	2 (b)	2i3	AP2NMR2i3
	3 (c)	2i4	AP2NMR2i4
	4 (d)	2i2, 2i5, 2i7	AP2NMR2i2
	5 (e)	2i6	AP2NMR2i6
	6 (f)	2i8, 2i9	AP2NMR2i8
	7 (g)	2i10	AP2NMR2i10
AP4NMR	1 (a)	4.1, 4.4	AP4NMR4.1
	2 (b)	4.2, 4.6	AP4NMR4.2
	3 (c)	4.3	AP4NMR4.3
	4 (d)	4.5	AP4NMR4.5
	5 (e)	4.10	AP4NMR4.10
	6 (f)	4.16	AP4NMR4.16
	7 (g)	4.9	AP4NMR4.9
	8 (h)	4.7	AP4NMR4.7
	9 (i)	4.8	AP4NMR4.8
	10 (j)	4.15, 4.17	AP4NMR4.15
AP4iNMR	1 (a)	4i1, 4i2, 4i5, 4i13, 4i14, 4i15, 4i17	AP4iNMR4i1
	2 (b)	4i8, 4i11, 4i12, 4i16	AP4iNMR4i8
	3 (c)	4i3	AP4iNMR4i3
	4 (d)	4i4	AP4iNMR4i4
	5 (e)	4i6	AP4iNMR4i6
	6 (f)	4i7, 4i9, 4i10	AP4iNMR4i7
	7 (g)	4i18	AP4iNMR4i18



ตารางที่ 4.7 แสดงกลุ่มของรูปแบบรีคอมบิแนนท์พลาสมิดหลังจากถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ จากตัวอย่าง AP2NMR AP4NMR (โคลนครั้งที่1) AP4iNMR (โคลนครั้งที่2) และ AP6NMR (ต่อ)

ตัวอย่าง	กลุ่ม (รูปแบบ)	สมาชิกในกลุ่มที่มีรูปแบบของแถบดีเอ็นเอเหมือนกัน	รีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่นำไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์
AP6NMR	1 (a)	6i1	AP6NMR6i1
	2 (b)	6i2	AP6NMR6i2
	3 (c)	6i3	AP6NMR6i3
	4 (d)	6i4	AP6NMR6i4
	5 (e)	6i5	AP6NMR6i5
	6 (f)	6i6	AP6NMR6i6
	7 (g)	6i7, 6i8	AP6NMR6i7
	8 (h)	6i9	AP6NMR6i9
	9 (i)	6i10	AP6NMR6i10

ผลจากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์จากรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่เป็นตัวแทนในแต่ละกลุ่มทั้งหมด 38 โคลน พบรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่มีความน่าสนใจจำนวน 12 โคลนดังนี้ โคลนที่ 1 AP2NMR2i8 ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอสอดแทรกมีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ประมวลรหัสกรดอะมิโนคล้ายคลึงกับส่วน Rieske (2Fe-2S) ของหน่วยย่อยแอลฟาริงไฮดรอกซีเลททิงไดออกซิจีเนสของ *Comamonas testosteroni* สายพันธุ์ KF-1 [ZP\_03542810.1] โดยมีเปอร์เซ็นต์ความเหมือนเพียง 66 เปอร์เซ็นต์ โคลนที่ 2 AP4NMR4.2 ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอสอดแทรกมีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ประมวลรหัสกรดอะมิโนคล้ายคลึงกับโปรตีน ring hydroxylating dioxygenase alpha subunit ของ *Mycobacterium gilvum* สายพันธุ์ PYR-GCK. [YP\_001131817] โดยมีเปอร์เซ็นต์ความเหมือนถึง 100 เปอร์เซ็นต์ โคลนที่ 3 AP4NMR4.5 ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอสอดแทรกมีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ประมวลรหัสกรดอะมิโนคล้ายคลึงกับ NidA ของ *Mycobacterium tuberculosis* [ACL13524.1] โดยมีเปอร์เซ็นต์ความเหมือนถึง 100 เปอร์เซ็นต์ โคลนที่ 4 AP4NMR4.15 โคลนที่ 5 AP4NMR4i1 โคลนที่ 6 AP4NMR4i4 โคลนที่ 7 AP4NMR4i7 โคลนที่ 8 AP6NMR6i4 และโคลนที่ 9 AP6NMR6i10 ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอสอดแทรกมีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ประมวลรหัสกรดอะมิโนคล้ายคลึงกับ PhdA ของ *Nocardioides* sp. สายพันธุ์ KP7 [BAA84712.1] โดยมีเปอร์เซ็นต์ความเหมือน 90 96 94 91 90 และ 96 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

โคลนที่ 10 AP6NMR6i3 ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอสอดแทรกมีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ประมวลรหัสกรดอะมิโนคล้ายคลึงกับโปรตีน ring hydroxylating dioxygenase, alpha subunit ของ *Mycobacterium vanbaalenii* สายพันธุ์ PYR-1 [YP\_951396.1] โดยมีเปอร์เซ็นต์ความเหมือนเพียง 41 เปอร์เซ็นต์ โคลนที่ 11 AP4GP4.3 ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอสอดแทรกมีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ประมวลรหัสกรดอะมิโนคล้ายคลึงกับโปรตีน PAH-ring hydroxylating dioxygenase alpha subunit ของ uncultured bacterium [ACD14261.1] โดยมีเปอร์เซ็นต์ความเหมือน 93 เปอร์เซ็นต์ โคลนที่ 12 AP4GP4.5 ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอสอดแทรกมีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ประมวลรหัสกรดอะมิโนคล้ายคลึงกับโปรตีน PAH-ring hydroxylating dioxygenase alpha subunit ของ uncultured bacterium [ACD14261.1] โดยมีเปอร์เซ็นต์ความเหมือน 98 เปอร์เซ็นต์ รายละเอียดผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์แสดงไว้ในตารางที่ 4.8 จากนั้นสร้างแผนภูมิต้นไม้แสดงความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของผลิตภัณฑ์ยีนที่ได้กับโปรตีนที่เกี่ยวข้อง (phylogenetic tree) ได้ผลดังแสดงในรูปที่ 4.17



ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4.8 ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ประมวลรหัสกรดอะมิโนของยีนต่างๆ ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลาย PAHs จากระบบนิเวศจำลองดิน

ตัวอย่าง	โปรตีน	ยีน	สายพันธุ์แบคทีเรีย	Substrate	% amino acid identity	Accession no.	เอกสารอ้างอิง
AP4 GP4.3	PAH-ring hydroxylating dioxygenase alpha subunit	PAH-RHD $\alpha$	uncultured bacterium	-	93%	ACD14261.1	Cebron และคณะ 2008
	PAH-ring hydroxylating dioxygenase alpha subunit	PAH-RHD $\alpha$	uncultured bacterium	-	93%	ACD14260.1	Cebron และคณะ 2008
	PAH-ring hydroxylating dioxygenase alpha subunit	PAH-RHD $\alpha$	uncultured bacterium	-	93%	ACD14259.1	Cebron และคณะ 2008
	PAH-ring hydroxylating dioxygenase alpha subunit	PAH-RHD $\alpha$	uncultured bacterium	-	93%	ACD14254.1	Cebron และคณะ 2008

ตารางที่ 4.8 ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ประมวลรหัสกรดอะมิโนของยีนต่างๆ ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลาย PAHs จากระบบนิเวศจำลองดิน

ตัวอย่าง	โปรตีน	ยีน	สายพันธุ์แบคทีเรีย	Substrate	% amino acid identity	Accession no.	เอกสารอ้างอิง
AP4 GP4.5	PAH-ring hydroxylating dioxygenase alpha subunit	PAH-RHD $\alpha$	uncultured bacterium	-	98%	ACD14261.1	Cebron และคณะ 2008
	PAH-ring hydroxylating dioxygenase alpha subunit	PAH-RHD $\alpha$	uncultured bacterium	-	98%	ACD14250.1	Cebron และคณะ 2008
	PAH-ring hydroxylating dioxygenase alpha subunit	PAH-RHD $\alpha$	uncultured bacterium	-	98%	ACD14248.1	Cebron และคณะ 2008
	PAH-ring hydroxylating dioxygenase alpha subunit	PAH-RHD $\alpha$	uncultured bacterium	-	98%	ACD14244.1	Cebron และคณะ 2008

ตารางที่ 4.8 ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ประมวลรหัสกรดอะมิโนของยีนต่างๆ ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลาย PAHs จากระบบนิเวศจำลองดิน

ตัวอย่าง	โปรตีน	ยีน	สายพันธุ์แบคทีเรีย	Substrate	% amino acid identity	Accession no.	เอกสารอ้างอิง
AP2 NMR2i8	Rieske (2Fe-2S)	PAH-RHD $\alpha$	<i>Comamonas testosteroni</i> สายพันธุ์ KF-1	3-(4-sulfophenyl) butyrate (3-C4-SPC)	66%	ZP_03542810.1	ไม่ตีพิมพ์, 2009
	Rieske (2Fe-2S)	PAH-RHD $\alpha$	<i>Marinobacter algicola</i> สายพันธุ์ DG893	n-hexadecane และ n-tetradecane	60%	ZP_01894046	Green และคณะ 2007
	putative dioxygenase	PAH-RHD $\alpha$	<i>Streptomyces</i> sp. สายพันธุ์ SPB78	-	57%	ZP_05485171.1	Fischbach และคณะ 2009 ไม่ตีพิมพ์
	Rieske (2Fe-2S)	PAH-RHD $\alpha$	<i>Burkholderia</i> sp. สายพันธุ์ H160	4,5-Dihydroxyphthalate	55%	ZP_03268943	Lucas และคณะ 2008 ไม่ตีพิมพ์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ตารางที่ 4.8 ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ประมวลรหัสกรดอะมิโนของยีนต่างๆ ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลาย PAHs จากระบบนิเวศจำลองดิน

ตัวอย่าง	โปรตีน	ยีน	สายพันธุ์แบคทีเรีย	Substrate	% amino acid identity	Accession no.	เอกสารอ้างอิง
AP4 NMR4.2	ring hydroxylating dioxygenase alpha subunit	PAH-RHD $\alpha$	<i>Mycobacterium gilvum</i> สายพันธุ์ PYR-GCK	ไพรีน	100%	YP_001131817	Copeland และคณะ 2007 ไมตีพิมพ์
	ring hydroxylating dioxygenase alpha subunit	PAH-RHD $\alpha$	<i>Mycobacterium vanbaalenii</i> สายพันธุ์ PYR-1	ไพรีน ฟลูออแรนทรีน พีแนนทรีน	99%	YP_951396	Copeland และคณะ 2006 ไมตีพิมพ์
	putative PAH ring-hydroxylating dioxygenase large subunit 2	<i>pdoA2</i>	<i>Mycobacterium</i> sp. สายพันธุ์ CH-1	Putative 3,4-dihydroxy phthalate decarboxylase	98%	ABD97978	Morgan และ Churchill 2006
	putative ring-hydroxylating dioxygenase large subunit	<i>phdA</i>	<i>Mycobacterium</i> sp. สายพันธุ์ SNP11	ไพรีน ฟลูออแรนทรีน พีแนนทรีน	98%	ABK27720	Pagnout และคณะ 2006

ตารางที่ 4.8 ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ประมวลรหัสกรดอะมิโนของยีนต่างๆ ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลาย PAHs จากระบบนิเวศจำลองดิน

ตัวอย่าง	โปรตีน	ยีน	สายพันธุ์แบคทีเรีย	Substrate	% amino acid identity	Accession no.	เอกสารอ้างอิง
AP4 NMR4.5	PAH ring-hydroxylating dioxygenase alpha subunit	<i>nidA</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	ไพรีน	100%	ACL13524.1	Zhang และ Ran 2010 ไม่ตีพิมพ์
	naphtalene-inducible dioxygenase large subunit	<i>nidA</i>	<i>Pseudoxanthomonas</i> sp. สายพันธุ์ RN402	ไพรีน ฟลูออแรนทรีน ฟีนแอนทรีน	100%	ACM63044	Klankeo และคณะ 2009
	PAH-ring hydroxylating dioxygenase alpha subunit	<i>nidA</i>	<i>Diaphorobacter</i> sp. สายพันธุ์ KOTLB	ไพรีน ฟลูออแรนทรีน ฟีนแอนทรีน	100%	ACL13523.1	Klankeo และคณะ 2009
	ring-hydroxylating dioxygenase	<i>nidA</i>	<i>Mycobacterium gilvum</i>	ไพรีน ฟลูออแรนทรีน ฟีนแอนทรีน	100%	ABG02224.1	Hennessee และคณะ 2006 ไม่ตีพิมพ์

ตารางที่ 4.8 ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ประมวลรหัสกรดอะมิโนของยีนต่างๆ ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลาย PAHs จากระบบนิเวศจำลองดิน

ตัวอย่าง	โปรตีน	ยีน	สายพันธุ์แบคทีเรีย	Substrate	% amino acid identity	Accession no.	เอกสารอ้างอิง
AP4 NMR4.15	ISP large subunit	<i>phdA</i>	<i>Nocardioides</i> sp. สายพันธุ์ KP7	พีแนทรีน	90%	BAA84712.1	Saito และคณะ 2000
	putative PAH ring-hydroxylating dioxygenase large subunit 2	<i>pdoA2</i>	<i>Mycobacterium</i> sp. สายพันธุ์ CH-1	Putative 3,4-dihydroxyphthalate decarboxylase	75%	ABD97978.1	Morgan และ Churchill 2006 ไมตีพิมพ์
	putative ring-hydroxylating dioxygenase large subunit	<i>phdA</i>	<i>Mycobacterium</i> sp. สายพันธุ์ SNP11	ไพรีน ฟลูออแรนไพรีน พีแนทรีน ฟลูออรีน	75%	ABK27720.1	Pagnout และคณะ 2007
	ring hydroxylating dioxygenase alpha subunit	PAH-RHD $\alpha$	<i>Mycobacterium vanbaalenii</i> สายพันธุ์ PYR-1	ไพรีน ฟลูออแรนไพรีน	75%	YP_951396.1	Copeland และคณะ 2006 ไมตีพิมพ์

ตารางที่ 4.8 ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ประมวลรหัสกรดอะมิโนของยีนต่างๆ ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลาย PAHs จากระบบนิเวศจำลองดิน

ตัวอย่าง	โปรตีน	ยีน	สายพันธุ์แบคทีเรีย	Substrate	% amino acid identity	Accession no.	เอกสารอ้างอิง
AP4 NMR4i1	ISP large subunit	<i>phdA</i>	<i>Nocardioides</i> sp. สายพันธุ์ KP7	พีแนทรีน	96%	BAA84712.1	Saito และคณะ 2000
	putative PAH ring-hydroxylating dioxygenase large subunit 2	<i>pdoA2</i>	<i>Mycobacterium</i> sp. สายพันธุ์ CH-1	Putative 3,4-dihydroxy phthalate decarboxylase	77%	ABD97978.1	Morgan และ Churchill 2007
	putative ring-hydroxylating dioxygenase large subunit	<i>phdA</i>	<i>Mycobacterium</i> sp. สายพันธุ์ SNP11	ไพรีน ฟลูออแรนทรีน พีแนทรีน ฟลูออรีน	77%	ABK27720.1	Pagnout และคณะ 2007
	ring hydroxylating dioxygenase alpha subunit	PAH-RHD $\alpha$	<i>Mycobacterium</i> sp. สายพันธุ์ MCS	-	77%	YP_638855.1	Copeland และคณะ 2010 ไมตีพิมพ์

ตารางที่ 4.8 ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ประมวลรหัสกรดอะมิโนของยีนต่างๆ ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลาย PAHs จากระบบนิเวศจำลองดิน

ตัวอย่าง	โปรตีน	ยีน	สายพันธุ์แบคทีเรีย	Substrate	% amino acid identity	Accession no.	เอกสารอ้างอิง
AP4 NMR4i4	ISP large subunit	<i>phdA</i>	<i>Nocardioides</i> sp. สายพันธุ์ KP7	พีแนนทรีน	94%	BAA84712.1	Saito และคณะ 2000
	putative PAH ring-hydroxylating dioxygenase large subunit 2	<i>pdoA2</i>	<i>Mycobacterium</i> sp. สายพันธุ์ CH-1	Putative 3,4-dihydroxy phthalate decarboxylase	76%	ABD97978.1	Morgan, และ Churchill 2007
	putative ring-hydroxylating dioxygenase large subunit	<i>phdA</i>	<i>Mycobacterium</i> sp. สายพันธุ์ SNP11	ไพรีน ฟลูออแรนทรีน พีแนนทรีน ฟลูออรีน	76%	ABK27720.1	Pagnout และคณะ 2007
	ring hydroxylating dioxygenase alpha subunit	PAH-RHD $\alpha$	<i>Mycobacterium</i> sp. สายพันธุ์ MCS	-	72%	YP_638855.1	Copeland และคณะ 2010 ไม่ตีพิมพ์



ตารางที่ 4.8 ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ประมวลรหัสกรดอะมิโนของยีนต่างๆ ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลาย PAHs จากระบบนิเวศจำลองดิน

ตัวอย่าง	โปรตีน	ยีน	สายพันธุ์แบคทีเรีย	Substrate	% amino acid identity	Accession no.	เอกสารอ้างอิง
AP4 NMR4i7	ISP large subunit	<i>phdA</i>	<i>Nocardioides</i> sp. สายพันธุ์ KP7	พีแนทรีน	91%	BAA84712.1	Saito และคณะ 2000
	putative PAH ring-hydroxylating dioxygenase large subunit 2	<i>pdoA2</i>	<i>Mycobacterium</i> sp. สายพันธุ์ CH-1	Putative 3,4-dihydroxy phthalate decarboxylase	73%	ABD97978.1	Morgan และ Churchill 2007
	putative ring-hydroxylating dioxygenase large subunit	<i>phdA</i>	<i>Mycobacterium</i> sp. สายพันธุ์ SNP11	ไพรีน ฟลูออแรนทรีน พีแนทรีน ฟลูออรีน	73%	ABK27720.1	Pagnout และคณะ 2007
	ring hydroxylating dioxygenase alpha subunit	PAH-RHD $\alpha$	<i>Mycobacterium</i> sp. สายพันธุ์ MCS	-	62%	YP_638855.1	Copeland และคณะ 2010 ไม่ตีพิมพ์

ตารางที่ 4.8 ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ประมวลรหัสกรดอะมิโนของยีนต่างๆ ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลาย PAHs จากระบบนิเวศจำลองดิน

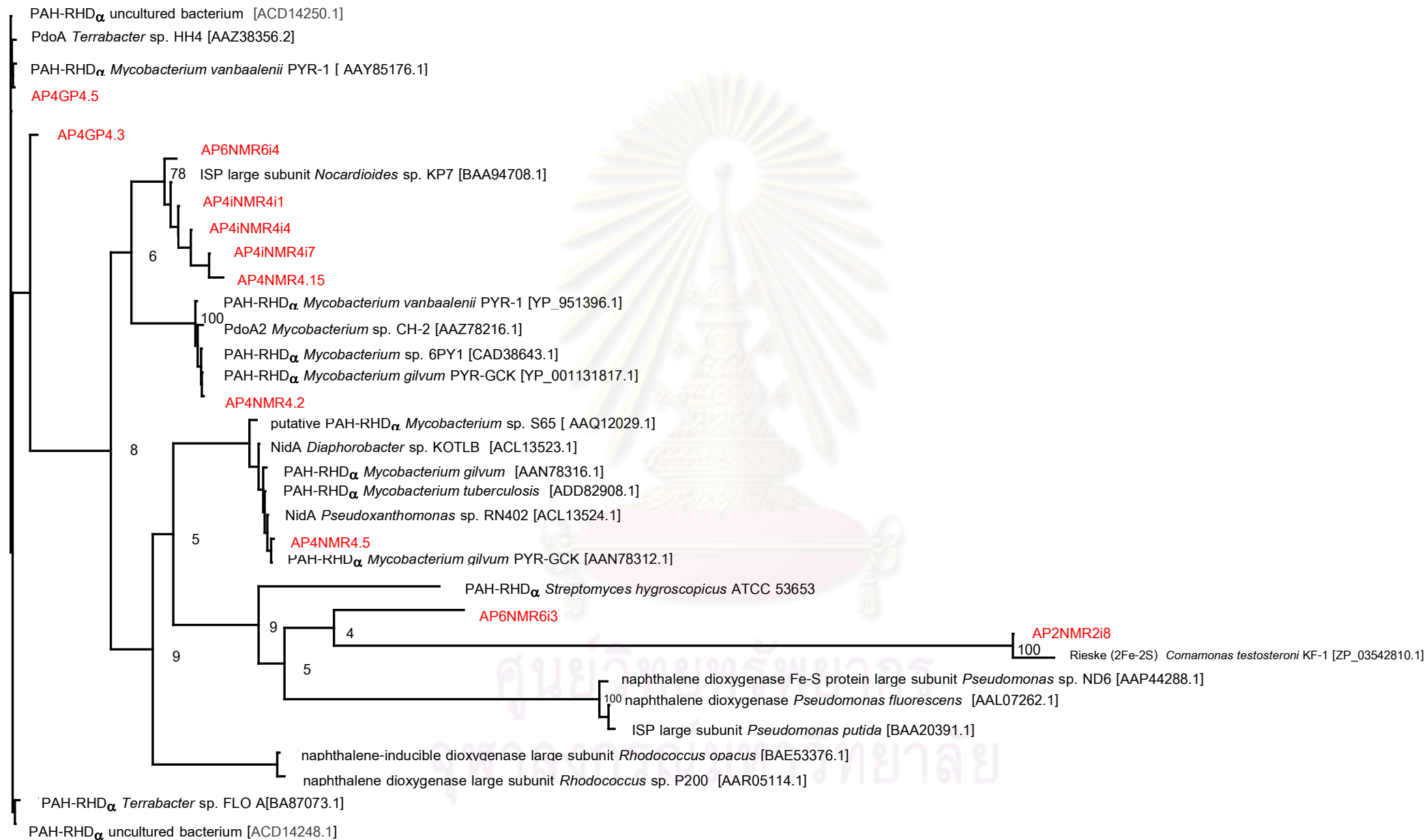
ตัวอย่าง	โปรตีน	ยีน	สายพันธุ์แบคทีเรีย	Substrate	% amino acid identity	Accession no.	เอกสารอ้างอิง
AP6 NMR6i3	ring hydroxylating dioxygenase alpha subunit	PAH-RHD $\alpha$	<i>Mycobacterium vanbaalenii</i> สายพันธุ์ PYR-1	ไพรีน ฟลูออแรนทรีน พีแนนทรีน	41%	YP_951396.1	Copeland และคณะ 2010 ไม่ตีพิมพ์
	ring hydroxylating dioxygenase alpha subunit	PAH-RHD $\alpha$	<i>Streptomyces hygroscopicus</i>	-	46%	ZP_05512708.1	Fischbach และคณะ 2009 ไม่ตีพิมพ์
	PhtAa	PAH-RHD $\alpha$	<i>Rhodococcus</i> sp. สายพันธุ์ TFB	แนพธาลีน,	50%	AAY57926.1	Tomas และคณะ 2008
	ISP large subunit	<i>phdA</i>	<i>Nocardioides</i> sp. สายพันธุ์ KP7	พีแนนทรีน	43%	BAA84712.1	Saito และคณะ 2000

ตารางที่ 4.8 ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ประมวลรหัสกรดอะมิโนของยีนต่างๆ ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลาย PAHs จากระบบนิเวศจำลองดิน

ตัวอย่าง	โปรตีน	ยีน	สายพันธุ์แบคทีเรีย	Substrate	% amino acid identity	Accession no.	เอกสารอ้างอิง
AP6 NMR6i4	ISP large subunit	<i>phdA</i>	<i>Nocardioides</i> sp. สายพันธุ์ KP7	พีแนทรีน	90%	BAA84712.1	Saito และคณะ 2000
	putative PAH ring-hydroxylating dioxygenase large subunit 2	<i>pdoA2</i>	<i>Mycobacterium</i> sp. สายพันธุ์ CH-1	Putative 3,4-dihydroxy phthalate decarboxylase	80%	ABD97978.1	Morgan และ Churchill 2007
	putative ring-hydroxylating dioxygenase large subunit	<i>phdA</i>	<i>Mycobacterium</i> sp. สายพันธุ์ SNP11	ไพรีน ฟลูออแรนไพรีน พีแนทรีน ฟลูออรีน	80%	ABK27720.1	Pagnout และคณะ 2007
	ring hydroxylating dioxygenase	PAH-RHD $\alpha$	<i>Mycobacterium</i> sp. สายพันธุ์ MCS	-	76%	YP_638855.1	Copeland และคณะ 2010 ไม่ตีพิมพ์

ตารางที่ 4.8 ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ประมวลรหัสกรดอะมิโนของยีนต่างๆ ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลาย PAHs จากระบบนิเวศจำลองดิน

ตัวอย่าง	โปรตีน	ยีน	สายพันธุ์แบคทีเรีย	Substrate	% amino acid identity	Accession no.	เอกสารอ้างอิง
AP6 NMR6i10	ISP large subunit	<i>phdA</i>	<i>Nocardioides</i> sp. สายพันธุ์ KP7	พีแนทรีน	96%	BAA84712.1	Saito และคณะ 2000
	putative PAH ring-hydroxylating dioxygenase large subunit 2	<i>pdoA2</i>	<i>Mycobacterium</i> sp. สายพันธุ์ CH-1	Putative 3,4-dihydroxy phthalate decarboxylase	77%	ABD97978.1	Morgan, และ Churchill 2007
	putative ring-hydroxylating dioxygenase large subunit	<i>phdA</i>	<i>Mycobacterium</i> sp. สายพันธุ์ SNP11	ไพรีน ฟลูออแรนทรีน พีแนทรีน ฟลูออรีน	77%	ABK27720.1	Pagnout และคณะ 2007
	ring hydroxylating dioxygenase alpha subunit	PAH-RHD $\alpha$	<i>Mycobacterium</i> sp. สายพันธุ์ MCS	-	77%	YP_638855.1	Copeland และคณะ 2010 ไม่ตีพิมพ์



0.1

รูปที่ 4.17 phylogenetic tree ของผลิตภัณฑ์ที่ยีนส่วนหน่วยย่อยแอลฟาริงไฮดรอกซีเลทิงไดออกซิจีเนสที่ได้กับ dioxygenase กลุ่มที่เกี่ยวข้อง scale bar: 0.1; percent divergence และตัวเลขที่สาขาบอกถึงการนับที่ให้ผลซ้ำจากทั้งหมด 100 ครั้งด้วย bootstrap



ผลจากการสร้างแผนภูมิต้นไม้แสดงความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการพบความหลากหลายของผลิตภัณฑ์ยีนประมวลรหัสหน่วยย่อยแอลฟาอะโรมาติกริงไฮดรอกซีเลทิงไดออกซีจีเนส หลายกลุ่ม (รูปที่ 4.17) เริ่มผลิตภัณฑ์จากโคลน AP2NMR2i8 จัดอยู่ในกลุ่มเอนไซม์ PAH-RHD $\alpha$  ของ *Comamonas testosteroni* สายพันธุ์ KF-1 [ZP\_03542810.1] และมีความสัมพันธ์กับเอนไซม์ของแบคทีเรียกลุ่มแกรมลบ ผลิตภัณฑ์จากโคลน AP4NMR4.2 จัดอยู่ในกลุ่มเอนไซม์ PAH-RHD $\alpha$  ของ *Mycobacterium gilvum* สายพันธุ์ PYR-GCK [YP\_001131817.1] และมีความสัมพันธ์กับเอนไซม์ในกลุ่มของแบคทีเรีย *Mycobacterium* sp. ผลิตภัณฑ์จากโคลน AP4NMR4.5 จัดอยู่ในกลุ่มเอนไซม์ NidA ของ *Mycobacterium gilvum* สายพันธุ์ PYR-GCK [AAN78312.1] และมีความสัมพันธ์กับเอนไซม์ในกลุ่มของแบคทีเรียที่มี NidA ส่วนผลิตภัณฑ์จากโคลน AP4NMR4.15 AP4NMR4i1 AP4NMR4i4 AP4NMR4i7 และ AP6NMR6i4 จัดอยู่ในกลุ่ม PhdA phdA ของ *Nocardioides* sp. สายพันธุ์ KP7 [BAA84712.1] ผลิตภัณฑ์จากโคลน AP6NMR6i3 จัดอยู่ระหว่างกลุ่ม NidA nidA และในกลุ่มเอนไซม์ของแบคทีเรียกลุ่มแกรมลบซึ่งโปรตีนโคลนนี้มีเปอร์เซ็นต์ความเหมือนต่ำกว่าร้อยละ 50 เปอร์เซ็นต์ ผลิตภัณฑ์จากโคลน AP4GP4.3 จัดอยู่ในกลุ่มของเอนไซม์ PAH-RHD $\alpha$  ของ uncultured bacterium [ACD14261.1] ผลิตภัณฑ์จากโคลน AP4GP4.5 จัดอยู่ในกลุ่มเอนไซม์ PAH-RHD $\alpha$  ของ *Mycobacterium vanbaalenii* PYR-1 [ AAY85176.1] PdoA ของ *Terrabacter* sp. สายพันธุ์ HH4 [AAZ38356.2] และ PAH-RHD $\alpha$  ของ uncultured bacterium [ACD14250.1] ซึ่งผลการสร้างแผนภูมิต้นไม้แสดงความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการนี้ให้ผลสอดคล้องกับการเปรียบเทียบข้อมูลจากฐานข้อมูล ดังที่แสดงในตาราง 4.8

ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

วิทยานิพนธ์นี้เกี่ยวข้องกับการคัดแยกอินทรีย์ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายพอลิไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน (Polycyclic Aromatic Hydrocarbon, PAHs) จากเมตาจีโนมดิน ทั้งนี้ PAHs จัดเป็นสารพิษอันตรายต่อสิ่งมีชีวิตและพบปนเปื้อนอยู่ในสิ่งแวดล้อมและสามารถบำบัดได้ด้วยวิธีทางชีวภาพโดยอาศัยกิจกรรมของแบคทีเรียย่อยสลายสารดังกล่าว (Talley, 2006, Haritash และ Kaushik, 2009) พบว่าแบคทีเรียสามารถสร้างเอนไซม์ที่สำคัญหลายชนิดที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลาย PAHs เช่น ไดออกซิจีเนส หรือ เอกซ์ตราไดออกซิไดออกซิจีเนส (Habe และ Omori, 2003) ที่ผ่านมาการศึกษาชิ้นประมวลรหัสเอนไซม์เหล่านี้ศึกษาจากแบคทีเรียที่เพาะเลี้ยงได้ในห้องปฏิบัติการเป็นหลัก ขณะที่ในปัจจุบันพบว่ายังมีแบคทีเรียในสิ่งแวดล้อมกว่าร้อยละ 99 ที่ยังไม่สามารถเพาะเลี้ยงหรือเพาะเลี้ยงได้ยากในห้องปฏิบัติการ (Handelsman และคณะ, 2004) ทำให้ข้อมูลอินทรีย์ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลาย PAHs ที่มีในปัจจุบันมีจำกัด ส่งผลให้ความเข้าใจกระบวนการย่อยสลาย PAHs โดยวิธีทางชีวภาพในสิ่งแวดล้อมถูกจำกัดด้วย ดังนั้นในวิทยานิพนธ์นี้จึงเลือกใช้เทคนิคทางชีวโมเลกุลค้นหาอินทรีย์ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลาย PAHs ในสิ่งแวดล้อมโดยไม่อาศัยการเพาะเลี้ยงเชื้อ

การทดลองทำโดยเก็บตัวอย่างดินจากแหล่งดินอุดมสมบูรณ์ในธรรมชาติที่ไม่ปนเปื้อน PAHs จากจังหวัดพิษณุโลกมาสร้างระบบนิเวศจำลองดินที่เติมพีแนทรีนและ/หรืออะซีแนพรีนเป็นแหล่งคาร์บอน โดยสร้างระบบนิเวศจำลองดิน 3 ชุด คือ ระบบนิเวศจำลองดิน PHE ระบบนิเวศจำลองดิน ACE และระบบนิเวศจำลองดิน AP ซึ่งระบบนิเวศจำลองดิน PHE คือระบบนิเวศจำลองที่เติมพีแนทรีนเป็นแหล่งคาร์บอน ระบบนิเวศจำลองดิน ACE คือระบบนิเวศจำลองที่เติมอะซีแนพรีนเป็นแหล่งคาร์บอนและระบบนิเวศจำลองดิน AP คือระบบนิเวศจำลองที่เติมอะซีแนพรีนและพีแนทรีนเป็นแหล่งคาร์บอน เพื่อเป็นการชักนำให้แบคทีเรียดั้งเดิมในดินสามารถปรับตัวและมีความสามารถในการย่อยสลาย PAHs โดยแบคทีเรียสามารถนำพีแนทรีนและ/หรืออะซีแนพรีนไปใช้เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงานในการเจริญ (enrichment) (Zhou และคณะ, 2009) ซึ่งเป็นวิธีที่เหนี่ยวนำให้สามารถตรวจพบอินทรีย์ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายพีแนทรีนและ/หรืออะซีแนพรีนได้ ทั้งนี้ในการทดลองนี้สร้างระบบนิเวศจำลองดินชุดควบคุมที่หนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียสนาน 30 นาที 3 ครั้งเพื่อเป็นการเปรียบเทียบในทุกการทดลอง หลังวิเคราะห์การลดลงของปริมาณ PAHs โดยวิธีแก๊สโครมาโตกราฟี (Gas chromatography, GC) สรุปได้ว่าเกิดการย่อยสลาย PAHs ในระบบนิเวศจำลองดินชุดทดลอง

ทุกชุดและเกิดจากบทบาทของแบคทีเรียในดิน โดยเปรียบเทียบผลการย่อยสลายในแต่ละระบบนิเวศจำลองดินได้ดังแสดงในตารางที่ 5.1

ตารางที่ 5.1 แสดงการเปรียบเทียบปริมาณการลดลงของอะซีแนพธินและ/หรือพีแนนทรินในระบบนิเวศจำลองดินต่างๆ

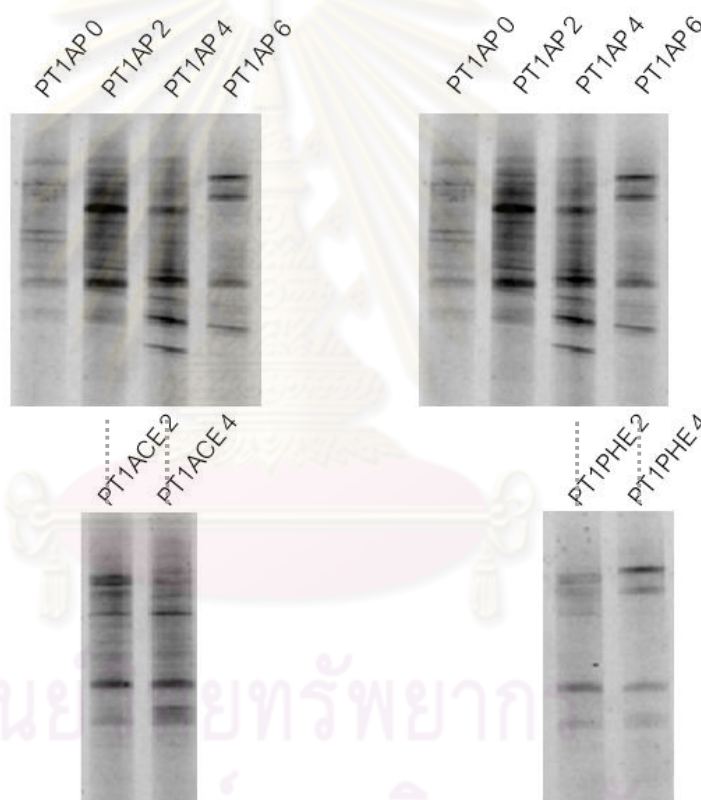
ระบบนิเวศจำลองดิน	ปริมาณอะซีแนพธินและ/หรือพีแนนทรินที่เหลือในแต่ละสัปดาห์ของการสร้างระบบนิเวศจำลองดินเทียบกับความเข้มข้นเริ่มต้น 300 ppm ซึ่งคิดเป็น 100 %							
	ACE0*	ACE2*	ACE4*	ACE6*	PHE0*	PHE2*	PHE4*	PHE6*
ACE	100 %	68.17%	22.98%	15.95%	ND	ND	ND	ND
PHE	ND	ND	ND	ND	100 %	25.83%	3.4%	0
AP	100 %	63.06%	27.32%	24.52%	100 %	81.64%	0.41%	0

หมายเหตุ\* ACE ย่อมาจาก ปริมาณอะซีแนพธิน ตัวเลข 0 2 4 6 หมายถึงจำนวนสัปดาห์  
PHE ย่อมาจาก ปริมาณพีแนนทริน ตัวเลข 0 2 4 6 หมายถึงจำนวนสัปดาห์

จากตารางผลการเปรียบเทียบระหว่างระบบนิเวศจำลองดิน ACE และ AP แสดงให้เห็นว่าการลดลงของปริมาณอะซีแนพธินมีความคล้ายคลึงกัน ซึ่งแตกต่างจากผลระหว่างระบบนิเวศจำลองดิน PHE และ AP แสดงให้เห็นว่าการลดลงของปริมาณพีแนนทรินในสัปดาห์ที่ 2 (PHE2\*) มีความแตกต่างกัน โดยที่ระบบนิเวศจำลองดิน PHE ในช่วงสัปดาห์ที่ 2 ปริมาณพีแนนทรินลดลงอย่างรวดเร็วส่วนระบบนิเวศจำลองดิน AP ในช่วงสัปดาห์ที่ 2 ยังคงเหลือปริมาณพีแนนทรินค่อนข้างสูง ถึงแม้ว่าทั้งสองระบบนิเวศจำลองดินจะสามารถย่อยสลายพีแนนทรินได้จนเกือบหมดในช่วงสัปดาห์ที่ 4 ก็ตาม และเมื่อเปรียบเทียบผลระหว่างชุดทดลองและชุดควบคุมแสดงให้เห็นว่าการลดลงของอะซีแนพธินและ/หรือพีแนนทรินในชุดทดลองเกิดจากการย่อยสลายโดยแบคทีเรียในดิน ดังแสดงในรูปที่ 4.3 4.4 และ 4.5 จากนั้นจึงสกัดดีเอ็นเอจากดินในระบบนิเวศจำลองดินต่างๆ ไปทำการทดลองโดยใช้เทคนิคทางชีวโมเลกุลต่อไป

สำหรับการศึกษากการตรวจติดตามจุลินทรีย์ที่ไม่ผ่านการเพาะเลี้ยงเชื้อในห้องปฏิบัติการ (Culture-independent method) ในปัจจุบันเทคนิคการนำดีเอ็นเอเมตาจีโนมจากสิ่งแวดล้อมมาศึกษาโดยตรงมีหลายเทคนิคด้วยกัน (Daniel และคณะ, 2004) ในการทดลองนี้ได้ใช้เทคนิค PCR-DGGE เป็นหนึ่งในเทคนิคทางชีวโมเลกุลที่ถูกนำมาใช้วิเคราะห์โครงสร้างประชาคมแบคทีเรียในสิ่งแวดล้อม (Rosado และคณะ, 1997) ในการตรวจหาแบคทีเรียนิยมเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอบริเวณ 16S rDNA และนำผลิตภัณฑ์ที่ได้มาวิเคราะห์ความหลากหลายของจุลินทรีย์ด้วยวิธี DGGE (Torsvik และคณะ, 2002) นำดีเอ็นเอที่สกัดจากดินในระบบนิเวศจำลองดินต่างๆ เป็นแม่แบบใน

การเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอบริเวณ 16S rDNA ผลการตรวจติดตามการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างประชาคมแบคทีเรีย แสดงในรูปที่ 4.6 พบว่าเมื่อมีการเติมพีแนนทรีนและ/หรืออะซีแนพทีนเป็นแหล่งคาร์บอนเพื่อชักนำให้แบคทีเรียดั้งเดิมในดินสามารถปรับตัวและมีความสามารถในการย่อยสลาย PAHs ซึ่งสอดคล้องกับการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างประชาคมแบคทีเรียอย่างเห็นได้ชัดเมื่อเปรียบเทียบกับแบคทีเรียดั้งเดิม จากการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างประชาคมแบคทีเรียที่เกิดขึ้นเห็นได้ว่ารูปแบบแถบดีเอ็นเอจาก AP กับรูปแบบแถบดีเอ็นเอ ACE มีความคล้ายคลึงและมีช่วงระยะเวลาในการย่อยสลายที่สอดคล้องกัน ส่วนรูปแบบแถบดีเอ็นเอจาก AP กับรูปแบบแถบดีเอ็นเอ PHE มีความคล้ายคลึงกันแต่มีความแตกต่างกันในช่วงระยะเวลาของการพบรูปแบบแถบดีเอ็นเอดังแสดงในรูปที่ 5.2



รูปที่ 5.1 แสดงการเปรียบเทียบรูปแบบแถบดีเอ็นเอจากการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างประชาคมแบคทีเรียในช่วงระยะเวลาต่างๆ

ผลจากตารางที่ 5.1 แสดงการลดลงของปริมาณพีแนนทรีนในสัปดาห์ที่ 2 (PHE2\*) ที่มีความแตกต่างกันและผลจากรูปที่ 5.1 แสดงการเปรียบเทียบรูปแบบแถบดีเอ็นเอจากการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างประชาคมแบคทีเรียในช่วงระยะเวลาต่างๆ แสดงให้เห็นถึงรูปแบบของการเติมพีแนนทรีนและอะซีแนพทีนลงในดินมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างประชาคมแบคทีเรียและ

ความสามารถในการย่อยสลาย PAHs โดยพบว่าการเติม PAHs พร้อมกันทั้ง 2 ชนิดนี้มีรูปแบบที่แตกต่างจากการเติมพีแนทรีนหรืออะซีแนพทีนเพียงชนิดเดียว

เมื่อวิเคราะห์ผลการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างประชาคมแบคทีเรีย สามารถสังเกตรูปแบบแถบดีเอ็นเอที่มีความหลากหลายของชนิดแบคทีเรียที่อาจมีบทบาทสำคัญต่อการย่อยสลายพีแนทรีนและ/หรืออะซีแนพทีนในระบบนิเวศจำลองดินต่างๆ ดังแสดงดังรูปที่ 4.6 แสดงให้เห็นว่าแถบดีเอ็นเอ D1 (สีฟ้า) D5 (สีชมพู) D7 (สีเขียวอ่อน) D9 (สีเหลือง) D11 (สีเขียวเข้ม) อาจเป็นกลุ่มแบคทีเรียที่มีบทบาทต่อการย่อยสลายอะซีแนพทีนได้เนื่องจากสามารถพบแถบดีเอ็นเอเหล่านี้ได้จากระบบนิเวศจำลองดินที่เติมอะซีแนพทีนเป็นแหล่งคาร์บอน ส่วนแถบดีเอ็นเอ D2 (สีม่วง) อาจเป็นกลุ่มแบคทีเรียที่มีบทบาทสำคัญต่อการย่อยสลายพีแนทรีนได้เนื่องจากสามารถพบแถบดีเอ็นเอนี้ได้จากระบบนิเวศจำลองดินที่เติมพีแนทรีนเป็นแหล่งคาร์บอน นอกจากนี้ยังพบแถบดีเอ็นเอที่อาจใช้ PAHs ทั้งสองชนิดเป็นแหล่งคาร์บอนได้คือแถบดีเอ็นเอ D5 (สีชมพู) D3 (สีส้ม) D4 (สีดำ) D6 (สีน้ำเงิน) D8 (สีน้ำตาล) D10 (สีแดง) เพราะสามารถพบได้ทั้งในระบบนิเวศจำลองดินที่เติมอะซีแนพทีนและ/หรือพีแนทรีน

จากการเลือกแถบดีเอ็นเอบางส่วนของไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์เพื่อระบุชนิดแบคทีเรียที่มีบทบาทต่อการย่อยสลายอะซีแนพทีนและ/หรือพีแนทรีนโดยเลือกตัวแทนจากแถบดีเอ็นเอที่มีปริมาณความเข้มของแถบดีเอ็นเอสูงไปวิเคราะห์ก็คือแถบดีเอ็นเอ D4 (สีดำ) D8 (สีน้ำตาล) D11 (สีเขียวเข้ม) เมื่อวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของแถบดีเอ็นเอบางแถบคือ D4 (สีดำ) D8 (สีน้ำตาล) D11 (สีเขียวเข้ม) พบว่า D4 (สีดำ) น่าจะเป็น *Bacillus* sp. และ D8 (สีน้ำตาล) น่าจะเป็น *Delftia* sp. ส่วน D11 (สีเขียวเข้ม) ยังไม่สามารถระบุชนิดได้ ทั้งนี้แบคทีเรียเด่นดังกล่าวคาดว่าเป็นกลุ่มที่ไม่สามารถเพาะเลี้ยงหรือเพาะเลี้ยงได้ยากในห้องปฏิบัติการ มีรายงานถึงความสามารถในการย่อยสลาย PAHs ของ *Bacillus* sp. โดย Bayoumi และคณะ (2009) ศึกษาแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลาย PAHs ในดินที่มีการปนเปื้อนน้ำมัน แบคทีเรีย 26 สายพันธุ์ถูกแยกได้จากดินบริเวณโรงกลั่นน้ำมัน พบแบคทีเรียสายพันธุ์มีความสามารถในการย่อยสลายน้ำมันได้จากนั้นจัดจำแนกแบคทีเรียพบอยู่ในกลุ่มของ *Burkholderia cepacia* DAFS11, *Bacillus firmus* APIS272, *Pseudomonas alcaligenes* DAFS331, *Bacillus licheniformis* APIS473, *Bacillus subtilis* SBS26 และ *Micrococcus lylae* SBS661 จากทั้งหมด 6 สายพันธุ์ พบ 3 สายพันธุ์เป็นแบคทีเรียในกลุ่มของ *Bacillus* ซึ่ง *Bacillus firmus* APIS272 สามารถย่อยสลายอะซีแนพทีน, แอนทราซีน และเบนโซ[*ปิ*]ฟลูออแรนทีน ได้อย่างสมบูรณ์ที่ความเข้มข้น 0.381, 13.148 และ 0.229 ppm ตามลำดับ *Bacillus licheniformis* APIS473 สามารถย่อยแอนทราซีนได้อย่างสมบูรณ์ที่ความเข้มข้น 13.148 ppm และ *Bacillus subtilis* SBS26 สามารถย่อยอะซีแนพทีน, แอนทราซีน และเบนโซ[*ปิ*]ฟลูออแรนทีน ได้อย่างสมบูรณ์ที่ความเข้มข้น 0.177, 13.148 และ 0.229 ppm



ตามลำดับ การย่อยสลายโดย *Bacillus* นั้นจะสมบูรณ์ใน 15 วัน และการศึกษาเกี่ยวกับการย่อย PAHs โดย *Delftia* sp. ได้แก่ Vacca และคณะ (2005) ศึกษาการแยกแบคทีเรียในดินที่มีความสามารถในการย่อยพีแนทรีนซึ่งจับอยู่บนตัวดูดซับ คือ กรดฮิวมิก โดยทำการเก็บตัวอย่างดินบริเวณที่มีการปนเปื้อน PAHs จากโรงงานถ่านหิน จากนั้นแยกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลายพีแนทรีนโดยเปรียบเทียบระหว่างการเติมตัวดูดซับที่ไม่มีพีแนทรีนหรืออยู่บนตัวดูดซับและมีพีแนทรีนอยู่บนตัวดูดซับซึ่งใช้พีแนทรีน 10 มิลลิกรัม เติมนลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ 50 มิลลิลิตร และสามารถแยกแบคทีเรีย 25 สายพันธุ์ได้จากดินที่มีการเติมตัวดูดซับที่ไม่มีพีแนทรีนอยู่บนตัวดูดซับในขณะที่อาหารที่มีการเติมตัวดูดซับที่มีพีแนทรีนอยู่บนตัวดูดซับแยกแบคทีเรียได้ 3 สายพันธุ์ คือ *Burkholderia* spp. *Delftia* sp. และ *Sphingomonas* sp. แสดงว่าแบคทีเรียทั้ง 3 สายพันธุ์ที่คัดแยกได้มีความสามารถในการย่อยสลายพีแนทรีนได้

จากการทดลองที่การเติมพีแนทรีนและ/หรืออะซีแนทรีนเป็นแหล่งคาร์บอนเพื่อชักนำให้แบคทีเรียดั้งเดิมในดินสามารถปรับตัวให้มีความสามารถในการย่อยสลาย PAHs ซึ่งสอดคล้องกับการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างประชาคมแบคทีเรียอย่างเห็นได้ชัดเมื่อเปรียบเทียบกับแบคทีเรียดั้งเดิม การทดลองนี้ได้พยายามคัดแยกยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลาย PAHs โดยวิธีการสร้างห้องสมุดดีเอ็นเอจากเมตาจีโนมดิน โดยใช้ดีเอ็นเอเมตาจีโนม จากการสร้างระบบนิเวศจำลองดิน AP ในสัปดาห์ที่ 2 และ 4 มาสร้างห้องสมุดดีเอ็นเอโดยใช้พลาสมิดเวกเตอร์ pZErO-2 (Invitrogen, USA) พบรีคอมบิแนนท์พลาสมิดจำนวนประมาณ 10,000 โคลน ซึ่งมีชิ้นดีเอ็นเอสอดแทรกเฉลี่ยขนาด 3-8 Kb เพื่อคัดกรองยีนเอกซ์ตราไดออกไซด์ออกซิจีเนสหรือยีนไดออกไซด์จีเนส จากห้องสมุดดีเอ็นเอโดยสังเกตการแสดงออกของพีโนไทป์ ทั้งนี้จากรายงาน Suenaga และคณะ (2007) สร้างห้องสมุดดีเอ็นเอเมตาจีโนมจากตะกอนบำบัดน้ำเสียเพื่อหายีนประมวลรหัสเอกซ์ตราไดออกไซด์ออกซิจีเนสที่สามารถย่อยสลายสารประกอบอะโรมาติกโดยโคลนชิ้นดีเอ็นเอลงในพอสมิดเวกเตอร์ (pCC1FOS) ซึ่งมีชิ้นดีเอ็นเอสอดแทรกเฉลี่ยขนาด 33 Kb และคัดกรองโคลนที่ต้องการโดยใช้การแสดงออกทางพีโนไทป์ของยีนสอดแทรกโดยมีสารแคทีคอลเป็นสับสเตรทเมื่อถูกเร่งปฏิกิริยาด้วยเอนไซม์เอกซ์ตราไดออกไซด์ออกซิจีเนส สามารถย่อยแคทีคอลเป็นสับสเตรทเป็นสี่เหลี่ยมเข้มได้แก่สาร 2-ไฮดรอกซีมิวโคเนทเซมิแอลดีไฮด์ พบโคลนที่ให้ผลบวกจำนวน 91 โคลน และพบ ยีนประมวลรหัสเอกซ์ตราไดออกไซด์ออกซิจีเนสชนิดใหม่จำนวน 25 โคลน นอกจากนี้ Brennerova และคณะ (2009) ได้สร้างห้องสมุดดีเอ็นเอเมตาจีโนมจากดินที่ปนเปื้อนอะโรมาติกริงไฮโดรคาร์บอนที่ได้รับการบำบัดโดยการเติมอากาศ (air-sparging) เพื่อหายีนประมวลรหัสเอกซ์ตราไดออกไซด์ออกซิจีเนสที่สามารถย่อยสลายอะโรมาติก โดยโคลนชิ้นดีเอ็นเอลงในพอสมิดเวกเตอร์ (pCC1FOS) ซึ่งมีชิ้นดีเอ็นเอสอดแทรกเฉลี่ยขนาด 33 Kb และคัดกรองโคลนที่ต้องการโดยใช้การแสดงออกทางพีโนไทป์ของยีนสอดแทรกโดยมีสารแคทีคอลเป็นสับสเตรทเมื่อถูกเร่ง

ปฏิกิริยาดำยเอ็นไซม์เอกซ์ตราไดออกไซด์ออกซิจีเนส สามารถย่อยแคทีคอลเป็นสับสเตรทเป็นสี่เหลี่ยมขนมเปียกปูนได้แก่สาร 2-ไฮดรอกซีมิวโคเนทเซมิแอลดีไฮด์ พบโคลนที่ให้ผลบวกจำนวน 235 โคลน และพบยีนประมวลรหัสเอกซ์ตราไดออกไซด์ออกซิจีเนสชนิดใหม่จำนวน 128 โคลน จากรายงานข้างต้นการสร้างห้องสมุดดีเอ็นเอเป็นวิธีที่ทำให้มีโอกาสพบยีนชนิดใหม่ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายอะโรมาติกได้ และจากการพยายามสร้างห้องสมุดดีเอ็นเอจากเมตาจีโนมดินเพื่อเพิ่มโอกาสในการพบยีนชนิดใหม่ได้ อย่างไรก็ตามในการทดลองนี้ผลที่ได้หลังการคัดกรองรีคอมบิแนนท์พลาสมิดจำนวนประมาณ 10,000 โคลน ไม่พบโคลนที่ให้ผลบวก ทั้งนี้จะเห็นได้จากการศึกษาที่ผ่านมาที่ประสบความสำเร็จในการคัดแยกยีนชนิดใหม่ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายอะโรมาติกนั้นเลือกใช้พอสมิตเวกเตอร์ที่สามารถโคลนขึ้นดีเอ็นเอสอดแทรกเฉลี่ยขนาด 33 Kb ซึ่งมีขนาดใหญ่กว่าที่ใช้ในการทดลองนี้ที่ใช้พลาสมิดเวกเตอร์ที่สามารถโคลนขึ้นดีเอ็นเอสอดแทรกเฉลี่ยขนาด 3-8 Kb เท่านั้น ดังนั้นในการศึกษาในอนาคตควรเลือกใช้เวกเตอร์ที่สามารถโคลนขึ้นดีเอ็นเอขนาดใหญ่เพื่อเป็นการเพิ่มโอกาสในการพบยีนชนิดใหม่ได้

นอกจากนั้นในการทดลองนี้ได้ตรวจสอบยีนประมวลรหัสไดออกซิจีเนสที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายประกอบ PAHs โดยวิธี PCR เพื่อเป็นการคัดกรองเบื้องต้น โดยใช้ไพรเมอร์ที่ออกแบบจากข้อมูลที่ได้จากการศึกษาที่ผ่านมาและมีความสามารถในการคัดแยกยีนชนิดใหม่ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายประกอบอะโรมาติกได้ ซึ่งในการทดลองนี้ใช้โอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์ที่ครอบคลุมทุกกลุ่มของยีนประมวลรหัสไดออกซิจีเนสโดยใช้ไพรเมอร์ทั้งหมด 10 คู่ ดังแสดงในตารางที่ 3.2 และใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีนประมวลรหัสเอกซ์ตราไดออกไซด์ออกซิจีเนสบางกลุ่ม จำนวน 2 คู่ ดังแสดงในตารางที่ 3.3 ผลการคัดกรองยีนเบื้องต้นพบผลิตภัณฑ์ลูกโซ่พอลิเมอร์ เมื่อใช้ไพรเมอร์คู่ GPF และ GPR (Cebon และคณะ, 2008) ดังแสดงในรูปที่ 4.7 และใช้ไพรเมอร์คู่ NMR331f และ NMR1134r (Marcos และคณะ, 2009) ดังแสดงในรูปที่ 4.8 ซึ่งทั้ง 2 คู่ไพรเมอร์มีความจำเพาะต่อยีนที่ประมวลรหัสหน่วยย่อยแอลฟาอะโรมาติกริงไฮดรอกซีเลทิงไดออกซิจีเนสที่จำเพาะต่อแบคทีเรียแกรมบวก

เมื่อนำผลิตภัณฑ์ลูกโซ่พอลิเมอร์ที่ได้มาสร้างห้องสมุดยีนเพื่อคัดแยกยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายประกอบ PAHs นำผลิตภัณฑ์ลูกโซ่พอลิเมอร์ที่ใช้คู่ไพรเมอร์ GPF และ GPR มาสร้างห้องสมุดยีน ได้รีคอมบิแนนท์พลาสมิดจำนวน 21 โคลน ส่วนการสร้างห้องสมุดยีนจากผลิตภัณฑ์ลูกโซ่พอลิเมอร์ที่ใช้คู่ไพรเมอร์ NMR331f และ NMR1134r ได้รีคอมบิแนนท์พลาสมิดจำนวน 54 โคลน จากนั้นนำรีคอมบิแนนท์พลาสมิดมาตัดด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะชนิดต่างๆ เพื่อเลือกรูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกันไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์และพบรูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกันทั้งหมด 38 โคลน ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์พบรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่

มีความน่าสนใจจำนวน 12 โคลน ดังแสดงในตารางที่ 4.8 และพบโคลนที่มีเปอร์เซ็นต์ความเหมือนต่ำกว่าร้อยละ 97 จำนวน 9 โคลน ดังแสดงในตารางที่ 5.2 ส่วนรีคอมบิแนนท์พลาสมิดจำนวน 3 โคลน ที่มีเปอร์เซ็นต์ความเหมือนสูงกว่าร้อยละ 97 ได้ผลดังนี้

โคลนที่ 1 AP4NMR4.2 ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอสอดแทรกมีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ประมวลรหัสกรดอะมิโนคล้ายคลึงกับโปรตีน ring hydroxylating dioxygenase alpha subunit ของ *Mycobacterium gilvum* สายพันธุ์ PYR-GCK. [YP\_001131817] โดยมีเปอร์เซ็นต์ความเหมือนถึง 100 เปอร์เซ็นต์ โคลนที่ 2 AP4NMR4.5 ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอสอดแทรกมีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ประมวลรหัสกรดอะมิโนคล้ายคลึงกับ NidA ของ *Mycobacterium tuberculosis* [ACL13524.1] โดยมีเปอร์เซ็นต์ความเหมือนถึง 100 เปอร์เซ็นต์ โคลนที่ 3 AP4GP4.5 ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอสอดแทรกมีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ประมวลรหัสกรดอะมิโนคล้ายคลึงกับโปรตีน PAH-ring hydroxylating dioxygenase alpha subunit ของ uncultured bacterium [ACD14261.1] โดยมีเปอร์เซ็นต์ความเหมือน 98 เปอร์เซ็นต์

การรายงานถึงแบคทีเรียที่มียีนประมวลรหัสกรดอะมิโนคล้ายคลึงกับ NidA ล่าสุดที่มีการตีพิมพ์ พบรายงานของ Klankeo และคณะ (2009) ศึกษาจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการย่อยสลายไพรีนจากตัวอย่างดินโดยสร้างระบบนิเวศจำลองดินที่มีการเติมไพรีนลงไปในระบบแบคทีเรียใหม่ 2 สายพันธุ์ถูกแยกได้จากระบบนิเวศจำลองดิน คือ สายพันธุ์ KOTLB และ RN402 พบว่ามีความสามารถในการใช้ไพรีนเป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงาน นอกจากนี้ไพรีนยังพบว่าทั้ง 2 สายพันธุ์สามารถย่อยพีแนนทริน ฟลูออแรนทริน จากการเพิ่มจำนวนขึ้นดีเอ็นเอแบบปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสโดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับ *nidA* พบการแสดงออกของยีนไดออกซิจีเนสทั้ง 2 สายพันธุ์ พบผลิตภัณฑ์ยีน *nidA* มีความเหมือนกับโปรตีน NidA 99-100 % ซึ่งเป็นยีนที่ประมวลรหัสหน่วยย่อยของเทอร์มินัลออกซิจีเนส สำหรับการย่อยสลายไพรีนของ *Mycobacterium* spp. นอกจากนี้ผลของปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสแสดงให้เห็นว่ายีน *nidA* มีตำแหน่งอยู่บน megaplasmid ซึ่งรายงานนี้เป็นรายงานแรก que แสดงการย่อยสลายไพรีนจากแบคทีเรียแกรมลบที่มียีน *nidA* จากรายงานดังกล่าวเป็นรายงานยีนประมวลรหัสกรดอะมิโนคล้ายคลึงกับ NidA ซึ่งเป็นยีนชนิดเดียวกันกับโคลนที่พบทั้ง 3 โคลน และแสดงให้เห็นถึงความสามารถในการใช้พีแนนทรินเป็นสับสเตรทได้ ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองที่เติมพีแนนทรินและ/หรืออะซีแนพทินเป็นแหล่งคาร์บอน

ตารางที่ 5.2 ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอของดีเอ็นเอสกัดแทรกพบโคลนที่มีเปอร์เซ็นต์ความเหมือนต่ำกว่าร้อยละ 97 จำนวน 9 โคลน

ตัวอย่าง	โปรตีน	ยีน	สายพันธุ์แบคทีเรีย	Substrate	% amino acid identity	Accession no.	เอกสารอ้างอิง
AP2NMR2i8	Rieske (2Fe-2S)	PAH-RHD $\alpha$	<i>Comamonas testosteroni</i> สายพันธุ์ KF-1	3-(4-sulfophenyl) butyrate (3-C4-SPC)	66%	ZP_0354281 0.1	ไมตี้พิมพ์, 2009
AP6NMR6i3	ring hydroxylating dioxygenase, alpha subunit	PAH-RHD $\alpha$	<i>Mycobacterium vanbaalenii</i> สายพันธุ์ PYR-1	ไพรีน ฟลูออแรนทีรีน พีแนนทีรีน	41%	YP_951396.1	Copeland และคณะ 2010 ไมตี้พิมพ์
AP4NMR4.15	ISP large subunit	<i>phdA</i>	<i>Nocardioides</i> sp. สายพันธุ์ KP7	พีแนนทีรีน	90 %	BAA84712.1	Saito และคณะ 2000
AP4NMR4i1					96 %		
AP4NMR4i4					94 %		
AP4NMR4i7					91 %		
AP6NMR6i4					90 %		
AP6NMR6i10					96 %		
AP4GP4.3	ring hydroxylating dioxygenase alpha subunit	PAH-RHD $\alpha$	uncultured bacterium	-	93%	ACD14261.1	Cebren และคณะ 2008



โดย ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอสอดแทรกของโคลน AP2NMR2i8 พบว่ามีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ประมวลรหัสกรดอะมิโนคล้ายคลึงกับส่วน Rieske (2Fe-2S) ของหน่วยย่อยแอลฟาริงไฮดรอกซีเลทิงไดออกซิจีเนสของ *Comamonas testosteroni* สายพันธุ์ KF-1 [ZP\_03542810.1] โดยมีเปอร์เซ็นต์ความเหมือนเพียง 66 เปอร์เซ็นต์พิจารณาจากเปอร์เซ็นต์ความเหมือนที่ได้พบว่าการทดลองนี้มีแนวโน้มในการพบยีนใหม่ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายอะซีแนพทรินและพีแนนทริน รายงานที่ผ่านมาของ Goyal และ Zylstra (1996) ซึ่งรายงานเกี่ยวกับยีน *nah* ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายพีแนนทรินและเนพธาลินใน *Comamonas testosteroni* พบยีน *nah* จากสายพันธุ์ GZ42 และพบยีนประมวลรหัสเพอร์ริดอกซินรีดักเทส (*nahAa*) เพอร์ริดอกซิน (*nahAb*) ISP หน่วยย่อยแอลฟา และหน่วยย่อยบีตา (*nahAcAd*) ซิส-ไดไฮโดรไดออกซีไดไฮโดรจีเนส (*nahB*) และ แอลดีไฮด์ดีไฮโดรจีเนส (*nahF*) แต่ระหว่างยีน *nahAa* และ *nahAb* มียีน *nahAc2* และ *nahAd2* ที่ประมวลรหัส ISP หน่วยย่อยแอลฟาและหน่วยย่อยบีตาแทรกอยู่ จากรายงานดังกล่าวที่เป็นรายงานเชื้อกลุ่มเดียวกันกับโคลนที่พบแสดงให้เห็นถึงความสามารถในการใช้พีแนนทรินเป็นสับสเตรทซึ่งสอดคล้องกับการทดลองที่เติมพีแนนทรินและ/หรืออะซีแนพทรินเป็นแหล่งคาร์บอน

โคลน AP6NMR6i3 เป็นอีกโคลนหนึ่งที่มีความน่าสนใจ ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอสอดแทรกพบว่ามีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ประมวลรหัสกรดอะมิโนคล้ายคลึงกับโปรตีน ring hydroxylating dioxygenase, alpha subunit ของ *Mycobacterium vanbaalenii* สายพันธุ์ PYR-1 [YP\_951396.1] โดยมีเปอร์เซ็นต์ความเหมือนเพียง 41 เปอร์เซ็นต์ พิจารณาจากเปอร์เซ็นต์ความเหมือนที่ได้พบว่าการทดลองนี้มีแนวโน้มในการพบยีนใหม่ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายอะซีแนพทรินและพีแนนทริน ในอดีตมีรายงานถึงความสามารถในการย่อยสลาย PAHs ในแบคทีเรียแกรมบวก โดยมี *Mycobacterium vanbaalenii* สายพันธุ์ PYR-1 เป็นตัวแทนของการศึกษาในแบคทีเรียแกรมบวกดังนี้ Khan และคณะ (2001) ศึกษา *Mycobacterium vanbaalenii* สายพันธุ์ PYR-1 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่สามารถย่อยสลายไพรีน ฟลูออแรนทริน พีแนนทริน แอนทราซีน เบนโซ[เอ]ไพรีนโดยใช้เทคนิคทางโปรตีโอม (Proteomic) ทำโดยเลี้ยง *Mycobacterium vanbaalenii* สายพันธุ์ PYR-1 ในอาหารที่มีไพรีน หรือพีแนนทรินหรือไดเบนโซไทโอพีน และทราบว่า *Mycobacterium vanbaalenii* สายพันธุ์ PYR-1 มียีน *nidA* ประมวลรหัสหน่วยย่อยแอลฟาของไดออกซิจีเนส ยีน *nidB* ประมวลรหัสหน่วยย่อยบีตาของไดออกซิจีเนส และยีน *nidD* ประมวลรหัสอัลดีไฮด์ดีไฮโดรจีเนส และพบอีกว่าลำดับนิวคลีโอไทด์และการจัดเรียงตัวของยีนแตกต่างจากยีนในกลุ่มคล้าย *nah* โดยมีการเรียงตัวเป็น *nidDBA* และลำดับนิวคลีโอไทด์มีความแตกต่างจาก *nah*-like มากกว่า 60% จากรายงานดังกล่าวที่เป็นรายงานเชื้อกลุ่มเดียวกันกับ



โคลนที่พบแสดงให้เห็นถึงความสามารถในการใช้พีแนทรีนเป็นสับสเตรทซึ่งสอดคล้องกับการทดลองที่เติมพีแนทรีนและ/หรืออะซีแนพทีนเป็นแหล่งคาร์บอน

โคลน AP4NMR4.15 AP4NMR4i1 AP4NMR4i4 AP4NMR4i7 AP6NMR6i4 และ AP6NMR6i10 ซึ่งเป็นโคลนชนิดที่พบมากที่สุดในการทดลองนี้ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอสอดแทรกมีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ประมวลรหัสกรดอะมิโนคล้ายคลึงกับ *PhdA* ของ *Nocardioides* sp. สายพันธุ์ KP7 [BAA84712.1] โดยมีเปอร์เซ็นต์ความเหมือน 90 96 94 91 90 และ 96 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ Saito และคณะ (2000) รายงานว่า *Nocardioides* sp. สายพันธุ์ KP7 มียีน *phd* ซึ่งประมวลรหัสเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายพีแนทรีนผ่านทางพธาลเท (phthalate) โดย *phd* ประกอบด้วยยีนสองกลุ่มกลุ่มแรกประกอบด้วย *phdEFABGHCD* ประมวลรหัสเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ในการย่อยสลายพีแนทรีนไปเป็น 1-ไฮดรอกซี-2-แนพธานอเอต (1-hydroxy-2-naphthoate) และ *phdIJK* ประมวลรหัสยีนที่ทำหน้าที่ในการย่อยสลาย 1-ไฮดรอกซี-2-แนพธานอเอต ไปเป็นพธาลเท จากรายงานดังกล่าวเป็นรายงานเชื้อชนิดเดียวกันกับโคลนที่พบแสดงให้เห็นถึงความสามารถในการใช้พีแนทรีนเป็นสับสเตรทซึ่งสอดคล้องกับการทดลองที่เติมพีแนทรีนและ/หรืออะซีแนพทีนเป็นแหล่งคาร์บอน และโคลน AP4GP4.3 ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอสอดแทรกมีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ประมวลรหัสกรดอะมิโนคล้ายคลึงกับโปรตีน PAH-ring hydroxylating dioxygenase alpha subunit ของ uncultured bacterium [ACD14261.1] โดยมีเปอร์เซ็นต์ความเหมือน 93 เปอร์เซ็นต์ (Cebren และคณะ, 2008) ผลที่ได้จากโคลนนี้คาดว่ามาจากกลุ่มเชื้อที่ไม่สามารถเพาะเลี้ยงหรือเพาะเลี้ยงได้ยากในห้องปฏิบัติการ แสดงให้เห็นว่าการใช้ดีเอ็นเอเมตาจีโนมดิโนและ การใช้เทคนิคทางชีวโมเลกุลนั้นช่วยลดข้อจำกัดของการศึกษาที่ยีนที่เกี่ยวข้องต่อการย่อยสลาย PAHs โดยไม่ต้องผ่านการคัดแยกเชื้อในห้องปฏิบัติการ (Handelsman และคณะ, 2004)

จากการพบโคลนที่มีแนวโน้มในการพบยีนชนิดใหม่ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายอะซีแนพทีนและพีแนทรีนของ 9 โคลนนี้ เป็นการเพิ่มข้อมูลยีนสำหรับใช้ในการแก้ปัญหาการปนเปื้อน PAHs ในสิ่งแวดล้อมได้ เช่น ใช้เป็นข้อมูลในการออกแบบไพรเมอร์เพื่อตรวจติดตามแบคทีเรียที่มีความครอบคลุมกับแบคทีเรียที่มีบทบาทในการย่อยสลายได้มากขึ้น (Marcos และคณะ, 2009)

เมื่อพิจารณาผลการคัดแยกยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายสารประกอบ PAHs จากการสร้างห้องสมุดยีนจากผลิตภัณฑ์ลูกโซ่พอลิเมอเรสไม่พบโคลนที่รายงานถึงความสามารถในการใช้อะซีแนพทีนเป็นแหล่งคาร์บอน อาจเนื่องมาจากการศึกษาที่ผ่านมาเกี่ยวข้องกับแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายอะซีแนพทีนมีจำนวนน้อย Pinyakong และคณะ (2004) ได้ศึกษา *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ A4 เป็นสายพันธุ์ที่ย่อยสลายอะซีแนพทีนและอะซีแนพทีนได้แต่ไม่สามารถย่อยสลายสารประกอบพอลิไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนชนิดอื่นได้ พบว่าแบคทีเรียสาย

พันธุ์นี้มียีน *arhA1* และ *arhA2* ที่ประมวลรหัสหน่วยย่อยแอลฟาและบีตาของเทอร์มินัลออกซิจีเนส ตามลำดับ จากรายงานดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าการศึกษาที่ผ่านมาพบแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายอะซีแนฟทีนได้ ส่วนใหญ่เป็นแบคทีเรียแกรมลบในกลุ่มของ *Sphingomonas* sp. ซึ่งในการทดลองนี้ได้ใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายอะซีแนฟทีนคือใช้ไพรเมอร์คู่ *arhA1F* และ *arhA1R* ที่จำเพาะต่อยีน *arh* ซึ่งไม่พบผลิตภัณฑ์ถูกใช้พอลิเมอร์เรสในการทดลองนี้ จึงเป็นที่สังเกตได้ว่าการไม่พบยีนที่เกี่ยวข้องต่อการย่อยสลายอะซีแนฟทีนจากการสร้างห้องสมุดยีน อาจเนื่องมาจากการทดลองนี้พบผลิตภัณฑ์ถูกใช้พอลิเมอร์เรสจากการใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีนที่ประมวลรหัสหน่วยย่อยแอลฟาอะโรมาติกริงไฮดรอกซีเลทิงไดออกซิจีเนสที่จำเพาะต่อกลุ่มแบคทีเรียแกรมบวกเท่านั้น และพบว่าผลจากการเปลี่ยนแปลงของโครงสร้างประชาคมแบคทีเรีย คาดว่าแถบดีเอ็นเอหลายแถบคือ D1 (สีฟ้า) D5 (สีชมพู) D7 (สีเขียวอ่อน) D9 (สีเหลือง) D11 (สีเขียวเข้ม) D3 (สีส้ม) D4 (สีดำ) D6 (สีน้ำเงิน) D8 (สีน้ำตาล) D10 (สีแดง) มีบทบาทต่อการย่อยสลายอะซีแนฟทีน เนื่องจากพบแถบดีเอ็นเอเหล่านี้ได้ในระบบนิเวศจำลองดินที่เติมอะซีแนฟทีนเป็นแหล่งคาร์บอน และเมื่อนำแถบดีเอ็นเอบางส่วนคือ D4 (สีดำ) D8 (สีน้ำตาล) D11 (สีเขียวเข้ม) ไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ เมื่อวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์พบว่าแบคทีเรียเด่นดังกล่าวเป็นกลุ่มที่ไม่สามารถเพาะเลี้ยงหรือเพาะเลี้ยงได้ยากในห้องปฏิบัติการ พบว่าแถบดีเอ็นเอ D4 (สีดำ) คือ *Bacillus* sp. จากรายงานถึงความสามารถในการย่อยสลาย PAHs ของ *Bacillus* sp. Bayoumi และคณะ (2009) รายงานถึง *Bacillus subtilis* SBS26 สามารถย่อยอะซีแนฟทีน แอนทราซีนและเบนโซ[*ปิ*]ฟลูออแรนทีน ได้อย่างสมบูรณ์ที่ความเข้มข้น 0.177, 13.148 และ 0.229 ppm ตามลำดับ โดยสามารถย่อยสลายอย่างสมบูรณ์ใน 15 วัน จากผลข้างต้นเชื่อได้ว่าแบคทีเรียเหล่านี้ อาจเป็นกลุ่มที่มีบทบาทต่อการย่อยสลายอะซีแนฟทีนในระบบนิเวศจำลองดินได้

เมื่อพิจารณาผลการวิเคราะห์แถบดีเอ็นเอจากการตรวจติดตามการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างประชาคมแบคทีเรียด้วยวิธี DGGE ที่พบว่าแถบดีเอ็นเอ D4 (สีดำ) น่าจะเป็น *Bacillus* sp. และ D8 (สีน้ำตาล) น่าจะเป็น *Delftia* sp. ส่วน D11 (สีเขียวเข้ม) ยังไม่สามารถระบุชนิดได้นั้น เมื่อนำมาเปรียบเทียบกับผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอสกัดแทรกจากการสร้างห้องสมุดยีน (PCR) ดังแสดงในตารางที่ 5.2 แสดงให้เห็นว่าผลที่ได้ไม่สอดคล้องกัน อาจเนื่องมาจากการศึกษาในอดีตยังไม่พบการรายงานถึงยีนไดออกซิจีเนสของ *Delftia* sp. มาก่อน ส่วน *Bacillus* sp. พบเพียงรายงานของ Mukerjee-dhar และคณะ (2005) รายงานถึง *Bacillus* sp. สายพันธุ์ JF8 พบยีน *bph* สามารถใช้ไบฟิโนลและแนฟธาลินเป็นแหล่งคาร์บอนได้เท่านั้น ดังนั้นในการทดลองนี้ที่เติมอะซีแนฟทีนและพีแนนทรินอาจเป็นสาเหตุที่ทำให้ผลที่ได้ไม่สอดคล้องกับการรายงานในฐานข้อมูลจึงเป็นสาเหตุที่ทำให้ผลที่ได้ไม่สอดคล้องกันและจากการใช้ดีเอ็นเอเมตาจีโนมดินมาศึกษานั้นอาจทำให้ได้ *Bacillus* sp. และ *Delftia* sp. ที่มาจากกลุ่มเชื้อที่ไม่

สามารถเพาะเลี้ยงหรือเพาะเลี้ยงได้ยากในห้องปฏิบัติการจึงทำให้ผลที่ได้อาจไม่สอดคล้องกับการรายงานที่มีในฐานข้อมูลมาก่อน

จากนั้นนำผลรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่มีความน่าสนใจจำนวน 12 โคลนไปสร้างแผนภูมิต้นไม้แสดงความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ ดังแสดงในรูปที่ 4.17 พบความหลากหลายของยีนประมวลรหัสหน่วยย่อยแอลฟาอะโรมาติกริงไฮดรอกซีเลทิงไดออกซิจีเนสหลายกลุ่ม ซึ่งผลการสร้างแผนภูมิต้นไม้แสดงความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการนี้ให้ผลสอดคล้องกับการเปรียบเทียบข้อมูลจากฐานข้อมูล ดังที่แสดงในตาราง 4.8

จากการศึกษาทั้งหมดแสดงให้เห็นว่าการใช้ดีเอ็นเอจากเมตาจีโนมที่สกัดจากสิ่งแวดล้อมโดยตรงมีแนวโน้มในการค้นพบยีนใหม่ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลาย PAHs ได้และทำให้ได้ข้อมูลยีนสำคัญที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลาย PAHs และสามารถใช้เป็นข้อมูลที่สำคัญในการแก้ปัญหการปนเปื้อน PAHs ในสิ่งแวดล้อมได้ เช่น การได้ข้อมูลยีนใหม่จะช่วยในการออกแบบไพรเมอร์เพื่อตรวจติดตามแบคทีเรียเพื่อใช้ในการแก้ปัญหการปนเปื้อน PAHs ในสิ่งแวดล้อม และการได้ข้อมูลเกี่ยวกับยีนใหม่ทำให้ทราบถึงความหลากหลายของยีนต่อชนิดของ PAHs มากขึ้น

#### ข้อเสนอแนะในงานวิจัยนี้

1. ควรวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์จากแถบดีเอ็นเอที่พบจากการติดตามการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างประชาคมแบคทีเรียด้วยวิธี DGGE เพิ่มเติม และนำผลวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ไปเปรียบเทียบกับข้อมูลในฐานข้อมูล เพื่อนำผลที่ได้มาเปรียบเทียบกับผลวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่พบว่ามีผลสอดคล้องกันหรือไม่

#### 2. ข้อเสนอแนะวิธีการสร้างห้องสมุด PCR

- ควรสร้างห้องสมุด PCR ให้ได้จำนวนโคลนเพิ่มเพื่อให้มีความหลากหลายของยีนมากขึ้น
- ควรออกแบบไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะและมีความหลากหลายต่อยีนเพื่อให้มีโอกาสในการค้นพบยีนใหม่เพิ่มขึ้นได้

#### 3. ข้อเสนอแนะวิธีการสร้างห้องสมุดดีเอ็นเอจากเมตาจีโนมดิน

- ควรเพิ่มขนาดของชิ้นดีเอ็นเอสอดแทรกให้มีขนาดใหญ่ขึ้น
- ควรเพิ่มจำนวนโคลนในการสร้างห้องสมุดดีเอ็นเอจากเมตาจีโนมดิน
- ควรเปลี่ยนชนิดเวกเตอร์ให้มีความเหมาะสมต่อการแสดงออกของยีนและขนาดของชิ้นดีเอ็นเอสอดแทรก
- ควรเปลี่ยนเซลล์เจ้าบ้าน (host) ให้มีความเหมาะสมต่อการแสดงออกของยีนและชนิดเวกเตอร์
- ควรหาวิธีการคัดกรองที่มีความเหมาะสมต่อยีน

## รายการอ้างอิง

### ภาษาไทย

กรมควบคุมมลพิษ. 2546. ของเสี้ยอันตราย. สรุปสถานการณ์มลพิษของประเทศไทย พ.ศ.2546.  
กรุงเทพมหานคร : ที.พริ้นติ้ง.กรุ๊ป.

### ภาษาอังกฤษ

- Agnelli, A., Ascher, J., Corti, G., Ceccherini, M. T., and Pietramellara, G. 2004. Distribution of microbial communities in a forest soil profile investigated by microbial biomass, soil respiration and DGGE of total and extracellular DNA. Soil Biol. Biochem. 36: 859-868.
- Allen, C.C., Boyd, C., Larkin, M.J., Reid, K.A., and Wilson, K. 1997. Metabolism of naphthalene, 1-naphthol, indene, and indole by *Rhodococcus* sp. strain NCIMB 12038. Appl. Environ. Microbiol. 63: 151-155.
- ATSDR. 1996. Toxicological profile for polycyclic aromatic hydrocarbon. Atlanta, GA: U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service.
- Bastiaens, L. Springael, D., Wattiau, P., Harms, H., and Diels, L. 2000. Isolation of adherent polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH)- degrading bacteria using PAH-sorbing carries. Appl. Environ. Microbiol. 66: 1834-1843.
- Bouchez, M., Blanchet, D., and Vandecasteele, J.P. 1995. Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by pure strains and by defined strain associations: inhibition phenomena and cometabolism. Appl. Microbiol. Biotechnol. 43: 156-164.
- Bosch, R., Garcia-Valdes, E., and Moore, E.R. 1999. Genetic characterization and evolutionary implications of a chromosomally encoded naphthalene-degradation upper pathway from *Pseudomonas stutzeri* AN10. Gene 236: 149-157.
- Brennerova, M.V., Josefiova, J., Brenner, V., Pieper, D.H., and Junca, H. 2009. Metagenomics reveals diversity and abundance of meta-cleavage pathways in microbial communities from soil highly contaminated with jet fuel under air-sparging bioremediation. Environ. Microbiol. 11: 2216-2227.

- Butler, C.S., and Mason J.R. 1997. Structure-function analysis of the bacterial aromatic ring-hydroxylating dioxygenases. Adv. Microb. Physiol. 38: 47-84.
- Cebron, A., Norini, M.P., Beguiristain, T., and Leyval, C. 2008. Real-Time PCR quantification of PAH-ring hydroxylating dioxygenase (PAH-RHD $\alpha$ ) genes from gram positive and gram negative bacteria in soil and sediment samples. J. Microbiol. Methods. 73: 148-159.
- Cerniglia, C.E. 1992. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. Biodegradation. 3: 351-368.
- Chadhain, S.M.N., Norman, R.S., and Pesce, K.V. 2006. Microbial dioxygenase gene population shifts during polycyclic aromatic hydrocarbon biodegradation. Appl. Environ. Microbiol. 72: 4078-4087.
- Chen, S.H., and Aitken, M.D. 1999. Salicylate stimulates the degradation of high-molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons by *Pseudomonas saccharophila* P15. Environ. Sci. Technol. 33: 435-439.
- Daniel, R. 2004. The soil metagenome a rich resource for the discovery of novel nature products. Curr. Opin. Biotechnol. 15: 199-204.
- Davies, J.I., and Evans, W.C. 1964. Oxidative metabolism of naphthalene by soil pseudomonads the ring-fission mechanism. J. Biochem. 91: 251-261.
- Demaneche, S., Meyer, C., Micoud, J., Louwagie, M., and Jouanneau, Y. 2004. Identification and functional analysis of two aromatic-ring-hydroxylating dioxygenases from a *Sphingomonas* strain that degrades various polycyclic aromatic hydrocarbons. Appl. Environ. Microbiol. 70: 6714-6725.
- Denome, S.A., Stanley, D.C., Olson, E.S., and Young, K.D. 1993. Metabolism of dibenzothiophene and naphthalene in *Pseudomonas* strains: complete DNA sequence of an upper naphthalene catabolic pathway. J. Bacteriol. 175: 6890-6901.
- Derz, K., Klinner, U., Schuphan, I., Stackebrandt, E., and Kroppenstedt, R. M. 2004. *Mycobacterium pyrenivorans* sp. nov., a novel polycyclic-aromatic-hydrocarbon-degrading species. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 54: 2313-2317.
- Ensley, B.D., and Gibson, D.T. 1983. Naphthalene dioxygenase: purification and properties of a terminal oxygenase component. J. Bacteriol. 155: 505-511.



- Evans, W.C., Fernley, H.N., and Griffiths, E. 1965. Oxidative metabolism of phenanthrene and anthracene by soil pseudomonads: the ring fission mechanism. Biochem. J. 95: 819-831.
- Felsenstein, J. 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. Evolution 39: 783-791.
- Felske, A., and Akkermans, A.D.L. 1998. Spatial homogeneity of abundant bacterial 16S rRNA molecules in Grassland soils. Microbial Ecol. 36: 31-36.
- Foght, J.M., and Westlake, D.W.S. 1988. Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons and aromatic heterocycles by a *Pseudomonas* species. Can. J. Microbiol. 34: 1135-1141.
- Geiselbrecht, A.D., Hedlund, B.P., Tichi, M.A., and Staley, J.T. 1998. Isolation of marine polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) degrading *Cycloclasticus* strain from the Gulf of Mexico and comparison of their PAH degrading ability with that of Puget Sound *Cycloclasticus* strain. Appl. Environ. Microbiol. 64: 4703-4710.
- Gibson, D.T., and Parales, R.E. 2000. Aromatic hydrocarbon dioxygenases in environmental biotechnology. Curr. Opin. Biotechnol. 11: 236-243.
- Goyal, A.K., and Zylstra, G.J. 1996. Molecular cloning of novel genes for polycyclic aromatic hydrocarbon degradation from *Comamonas testosteroni* GZ39. Appl. Environ. Microbiol. 62: 230-236.
- Grifoll, M., Selifonov, S.A., Gatlin, C.V., and Chapman, P.J. 1995. Action of versatile fluorene degrading bacterial isolated on polycyclic aromatic compounds. Appl. Environ. Microbiol. 61: 3711-3723.
- Guo, C.L., Zhou, H.W., Wong, Y.S., and Tam, N.F. 2005. Isolation of PAH-degrading bacteria from mangrove sediments and their biodegradation potential. Mar. Pollut. Bull. 51: 1054-1061.
- Habe, H., and Omori, T. 2003. Genetics of polycyclic aromatic hydrocarbon metabolism in diverse aerobic bacteria. Biosci. Biotechnol. Biochem. 67: 225-243.
- Habe, H., Kanemitsu, M., Nomura, M., Yamane, H., and Omori, T. 2004. Isolation and characterization of an alkaliphilic bacterium utilizing pyrene as a carbon source. J. Biosci. Bioeng. 98: 306-308.

- Habe, H., Chung, J., Shida, A., Yamane, H., and Omori, T. 2005. The fluorene catabolic linear plasmid in *Terrabacter* sp. strain DBF63 carries the  $\beta$ -ketoacid pathway genes, *pcaRHGBDCFIJ*, also found in proteobacteria. Microbiology 151: 3713-3722.
- Haigh, S.D. 1996. A review of the interaction of surfactants with organic contaminants in soil. Sci. Total Environ. 185: 161-170.
- Handelsman, J. 2004. Metagenomics application of genomics to uncultured microorganisms. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 68: 669-685.
- Harnpicharnchai, P., Thongaram, T., Sriprang, R., Champreda, V., and Eurwilaichitr, L. 2007. An efficient purification and fractionation of genomic DNA from soil by modified troughing method. Lett. Appl. Microbiol. 45: 387-391.
- Heitkamp, M.A., Franklin, W., and Cerniglia, C.E. 1988a. Microbial metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons: isolation and characterization of a pyrene-degrading bacterium. Appl. Environ. Microbiol. 54: 2549-2555.
- Heitkamp, M.A., Freeman, J.P., Miller, D.W., and Cerniglia, C.E. 1988b. Pyrene degradation by a *Mycobacterium* sp.: identification of ring oxidation and ring fission products. Appl. Environ. Microbiol. 54: 2556-2565.
- Hormisch, D., Brost, I., Kohring, G.W., and Giffhorn, F. 2000. Degradation of acenaphthene and acenaphthylene by isolated bacteria and influence of fertilizers on the PAH degrading populations in soils. Proc. Forum. Appl. Biotech. 11: 157-160.
- Hu, Y.T., Zhou, P.J., Zhou, Y.G., Liu, Z.H., and Liu, S.J. 2004. *Saccharothrix xinjiangensis* sp. nov., a pyrene-degrading actinomycete isolated from Tianchi Lake, Xinjiang, China. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 54: 2091-2094.
- Iwabuchi, T., and Harayama, S. 1997. Biochemical and genetic characterization of 2-carboxybenzaldehyde dehydrogenase, an enzyme involved in phenanthrene degradation by *Nocardioides* sp. strain KP7. J. Bacteriol. 179: 6488-6494.
- Jeon, C.O., Park, M., Ro, H.S., Park, W., and Madsen, E.L. 2006. The naphthalene catabolic (*nag*) genes of *Polaromonas naphthalenivorans* CJ2: evolutionary implications for two gene clusters and novel regulatory control. Appl. Environ. Microbiol. 72: 1086-1095.

- Jerina, D.M., Selander, H., Yagi, H., Wells, M.C., and Gibson, D.T. 1976. Dihydrindiol from anthracene and phenanthrene. J. AM. Chem. Soc. 98: 5988-5996.
- Jiang, H., Parales, R.E., and Gibson, D.T. 1999. The  $\alpha$  subunit of toluene dioxygenase from *Pseudomonas putida* F1 can accept electrons from reduced ferredoxinTOL but is catalytically inactive in the absence of the  $\beta$  subunit. Appl. Environ. Microbiol. 65: 315-318.
- Jiang, C., and Wu, B. 2007. Molecular cloning and functional characterization of a novel decarboxylase from uncultured microorganism. Biochem. Biophys. Res. Commun. 357: 421-426.
- Juhasz, A.L., Britz, M.L., and Stanley, G.A. 1997. Degradation of fluoranthene, pyrene, benz[a]anthracene and bibenz[a,h]anthracene by *Burkholderia cepacia*. J. Appl. Microbiol. 83: 189-198.
- Juhasz, A.L., Stanley, G.A., and Britz, M.L. 2000. Microbial degradation and detoxification of high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons by *Stenotrophomonas maltophilia* strain VUN 10,003. Lett. Appl. Microbiol. 30: 396-401.
- Kauppi, B., Lee, K., Carredano, E., Parales, R.E., and Ramaswamy, S. 1998. Structure of an aromatic-ring-hydroxylating dioxygenase-naphthalene 1,2-dioxygenase. Structure. 6: 571-586.
- Khan, A.A., Wang, R.F., Cao, W.W., Franklin, W., and Cerniglia, C.E. 1996. Reclassification of a polycyclic aromatic hydrocarbon-metabolizing bacterium, *Beijerinckia* sp. strain B1, as *Sphingomonas yanoikuyae* by fatty acid analysis, protein pattern analysis, DNA-DNA hybridization, and 16S ribosomal DNA sequencing. Int. J. Syst. Bacteriol. 46: 466-469.
- Khan, A.A., Wang, R.F., Cao, W.W., Doerge, D.R., and Cerniglia, C.E. 2001. Molecular cloning, nucleotide sequence, and expression of genes encoding a polycyclic aromatic ring dioxygenase from *Mycobacterium* sp. strain PYR-1. Appl. Environ. Microbiol. 67: 3577-3585.
- Khan, A.A., Kim, S.J., Paine, D.D., and Cerniglia, C.E. 2002. Classification of a polycyclic aromatic hydrocarbon-metabolizing bacterium, *Mycobacterium* sp.

- strain PYR-1, as *Mycobacterium vanbaalenii* sp. nov. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 52: 1997-2002.
- Khan, S.T., and Hiraishi, A. 2002. *Diaphorobacter nitroreducens* gen nov, sp nov, a poly(3-hydroxybutyrate)-degrading denitrifying bacterium isolated from activated sludge. J Gen. Appl. Microbiol. 48: 299-308.
- Keck, A., Rau, J., Reemtsma, T., Mattes, R., and Klein, J. 2002. Identification of quinoid redox mediators that are formed during the degradation of naphthalene-2-sulfonate by *Sphingomonas xenophaga* BN6. Appl. Environ. Microbiol. 68: 4341-4349.
- Kim, S.I., Kuor, J.J., Oh, K.H., and Kahng, H.Y. 2006a. Evaluating the genetic diversity of dioxygenases for initial catabolism of aromatic hydrocarbons in *Pseudomonas rhodesiae* KK1. Enzyme. Microb. Technol. 40: 71-78.
- Kim, S.J., Edmondson, R.D., and Cerniglia, C.E. 2006b. Molecular cloning and expression of genes encoding a novel dioxygenase involved in low- and high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbon degradation in *Mycobacterium vanbaalenii* PYR-1. Appl. Environ. Microbiol. 72: 1045-1054.
- Kim, S.J., Kweon, O., Jones, R.C., Freeman, J.P., and Cerniglia, C.E. 2007. Complete and integrated pyrene degradation pathway in *Mycobacterium vanbaalenii* PYR-1 based on systems biology. J. Bacteriol. 189: 464-472.
- Kim, T.J., Lee, E.Y., Kim, Y.J., Cho, K.S., and Ryu, H.W. 2003. Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by *Burkholderia cepacia* 2A-12. World J. Microbiol. & Biotechnol. 19: 411-417.
- Kiyohara, H., Nagao, K., and Nomi, R. 1976. Degradation of phenanthrene through o-phthalate by an *Aeromonas* sp. Agric. Biol. Chem. Soc. 99: 8121-8123.
- Kiyohara, H., Torigoe, S., Kaida, N., Asaki, T., and Takizawa, N. 1994. Cloning and characterization of a chromosomal gene cluster, *pah*, that encodes the upper pathway for phenanthrene and naphthalene utilization by *Pseudomonas putida* OUS82. J. Bacteriol. 176: 2439-2443.
- Klankeo, P., Nopcharoenkul, W., and Pinyakong, O. 2009. Two novel pyrene-degrading *Diaphorobacter* sp. and *Pseudomonas* sp. Isolated from soil. J. Biosci. Bioeng. 108: 488-495.

- Komatsu, T., Omori, T., and Kodama, T. 1993. Microbial degradation of the polycyclic aromatic hydrocarbons acenaphthene and acenaphthylene by a pure bacterial culture. Biosci. Biotechnol. Biochem. 57: 864-865.
- Kouzuma, A., Pinyakong, O., Nojiri, H., Omori, T., and Habe, H. 2006. Functional and transcriptional analyses of the initial oxygenase genes for acenaphthene degradation from *Sphingomonas* sp. strain A4. Microbiology. 152: 2455-2467.
- Krivobok, S., Kuony, S., Meyer, C., Louwagie, M., and Jouanneau, Y. 2003. Identification of pyrene-induced proteins in *Mycobacterium* sp. strain 6PY1: evidence for two ring-hydroxylating dioxygenases. J. Bacteriol. 185: 3828-3841.
- Kulakov, L.A., Chen, S., Allen, C.C., and Larkin, M.J. 2005. Web-type evolution of *Rhodococcus* gene clusters associated with utilization of naphthalene. Appl. Environ. Microbiol. 71: 1754-1764.
- Kurkela, S., Lehvaslaiho, H., Palva, E.T., and Teeri, T.H. 1988. Cloning, nucleotide sequence and characterization of genes encoding naphthalene dioxygenase of *Pseudomonas putida* strain NCIB9816. Gene. 73: 355-362.
- Lafortune, I., Juteau, P., Deziel, E., Lepine, F., and Villemur, R. 2009. Bacterial Diversity of a Consortium Degrading High-Molecular-Weight Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in a Two-Liquid Phase Biosystem. Microb. Ecol. 57: 455-468.
- Larkin, M.J., Allen, C.C., Kulakov, L.A., and Lipscomb, D.A. 1999. Purification and characterization of a novel naphthalene dioxygenase from *Rhodococcus* sp. strain NCIMB12038. J. Bacteriol. 181: 6200-6204.
- Laurie, A. D., and Lloyd-Jones, G. 1999. The *phn* genes of *Burkholderia* sp. strain RP007 constitute a divergent gene cluster for polycyclic aromatic hydrocarbon catabolism. J. Bacteriol. 181: 531-540.
- Lee, S.W., Won, K., Lim, H.K., Kim, J.C., and Cho, K.Y. 2004. Screening for novel lipolytic enzymes from uncultured soil microorganisms. Appl. Microbiol. Biotechnol. 65: 720-726.
- Leys, N.M., Ryngaert, A., Bastiaens, L., Verstraete, W., and Springael, D. 2004. Occurrence and phylogenetic diversity of *Sphingomonas* strains in soils contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons. Appl. Environ. Microbiol. 70: 1944-1955.



- Liu, Y., Zhang, J., and Zhang, Z. 2004. Isolation and characterization of polycyclic aromatic hydrocarbons-degrading *Sphingomonas* sp. strain ZL5. Biodegradation. 15: 205-212.
- Lozada, M., Mercadal, J.P.R., Guerrero, L.D., Marzio, W.D.D., and Dionisi, H.M. 2008. Novel aromatic ring-hydroxylating dioxygenase genes from coastal marine sediments of Patagonia. BMC. Microbiol. Doi:10.1186/1471-2180-8-50.
- Marcos, M.S., Lozada, M., and Dionisi, H.M. 2009. Aromatic hydrocarbon degradation genes from chronically polluted Subantarctic marine sediments. Appl. Microbiol. Lett. Doi: 10.1111/j. 1472-765x.2009.02711.x.
- Mason, J.R., and Cammack, R. 1992. The electron-transport proteins of hydroxylating bacterial dioxygenases. Annu. Rev. Microbiol. 46: 277-305.
- Menn, F. M., Applegate, B. M., and Saylor, G. S. 1993. NAH plasmid-mediated catabolism of anthracene and phenanthrene to naphthoic acids. Appl. Environ. Microbiol. 59: 1938-1942.
- Morimoto, S., Togami, K., Ogawa, N., Hasebe, A., and Fujii, T. 2005. Analysis of a bacterial community in 3-chlorobenzoate-contaminated soil by PCR-DGGE targeting the 16S rRNA gene and benzoate 1,2-dioxygenase gene (*benA*). Microbes Environ. 20: 151-159.
- Moody, J. D., Freeman, J. P., Doerge, D. R., and Cerniglia, C. E. 2001. Degradation of phenanthrene and anthracene by cell suspensions of *Mycobacterium* sp. strain PYR-1. Appl. Environ. Microbiol. 67: 1476-1483.
- Mukerjee-Dhar G, Shimura M, Miyazawa D, Kimbara K and Hatta T. 2005. *bph* genes of the thermophilic PCB degrader, *Bacillus* sp. JF8: characterization of the divergent ring-hydroxylating dioxygenase and hydrolase genes upstream of the Mn-dependent BphC. Microbiol. 151: 4139-4151.
- Muyzer, G., De Waal, E. C., and Uitterlinden, A. G. 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. Appl. Environ. Microbiol. 59: 695-700.

- Myer, R.M., Fischer, S.G., Lerman, L.S., and Maniatis, T. 1985. Nearly all single base substitutions in DNA fragments joined to a GC-clamp can be detected by denaturing gradient gel electrophoresis. Nucleic Acids Res. 13: 3131-3145.
- Nakai, C., Kagamiyam, H. and Nozaki, M. 1983. Complete nucleotide sequence of the metapyrocatechase gene on the TOL Plasmid of *Pseudomonas putida* mt-2. J. Biol. Chem. 258: 2923-2928.
- Ni Chadhain, S.M., Norman, R.S., Pesce, K.V., Kukor, J.J., and Zylstra, G.J. 2006. Microbial dioxygenase gene population shifts during polycyclic aromatic hydrocarbon biodegradation. Appl. Environ. Microbiol. 72: 4078-4087.
- Noda, Y., Katayama, Y., Morohoshi, N., Haraguchi, T., and Yamasaki, M. 1990. Molecular cloning of the protocatechuate 4,5-dioxygenase genes of *Pseudomonas paucimobilis*. J. Bacteriol. 172: 2704-2709.
- Parales, R.E. 2003. The role of active-site residues in naphthalene dioxygenase. J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 30: 271-278.
- Peng, R.H., Xiong, A.S., Xue, Y. and Yao, Q.H. 2008. Microbial biodegradation of polyaromatic hydrocarbons. FEMS Microbiol. Rev. 32: 927-955.
- Pinyakong, O., Habe, H., and Omori, T. 2003. The unique aromatic catabolic genes in sphingomonads degrading polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). J. Gen. Appl. Microbiol. 49: 1-19.
- Pinyakong, O., Habe, H., Kouzuma, A., Nojiri, H., and Omori, T. 2004. Isolation and characterization of genes encoding polycyclic aromatic hydrocarbon dioxygenase from acenaphthene and acenaphthylene degrading *Sphingomonas* sp. strain A4. FEMS Microbiol. Lett. 238: 297-305.
- Romero, M. C., Cazau, M. G., Giorgieri, S., and Arambari, A. M. 1998. Phenanthrene degradation by microorganisms isolated from a contaminated stream. Environ. Pollut. 101: 355-359.
- Romine, M.F., Gaasterland, T., Fredrickson, J.K., and Saffer, J.D. 1999. Complete sequence of a 184-kilobase catabolic plasmid from *Sphingomonas aromaticivorans* F199. J. Bacteriol. 181: 1585-1602.
- Rosado, A., Seldin, L., Wolters, A., and Elsas, J. V. 1997. Molecular Microbial Ecology: a minireview. Braz. J. Microbiol. 28: 135-147.

- Saipheth, A., Juntongjin, K., Pattaragulwanit, K., Pinpanichakarn, P., and Thaniyavarn, S. 2006. Novel acenaphthene degrading bacterium *Sphingomonas* sp. Strain SP2. J. Sci. Res. Chula. Univ. 31: 83-94.
- Saito, A., Iwabuchi, T., and Harayama, S. 2000. A novel phenanthrene dioxygenase from *Nocardioides* sp. Strain KP7: expression in *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 182: 2134-2141.
- Samanta, S.K., Chakraborti, A.K., and Jain, R.K. 1999. Degradation of phenanthrene by different bacteria: evidence for novel transformation sequences involving the formation of 1-naphthol. Appl. Microbiol. Biotechnol. 53: 98-107.
- Samanta, S.K., Singh, O.V., and Jain, R.K. 2002. Polycyclic aromatic hydrocarbons: environmental pollution and bioremediation. Trends Biotechnol. 20: 243-247.
- Sambrook J, and Russell D.W. 2001. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 3<sup>rd</sup> ed. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sarma, P.M., Bhattacharya, D., Krishnan, S., and Lal, B. 2004. Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by a newly discovered enteric bacterium, *Leclercia adecarboxylata*. Appl. Environ. Microbiol. 70: 3163-3166.
- Schuler, L., Chadhain, S.M.N., Jouanneau, Y., and Agathos, S.N. 2008. Characterization of a Novel Angular Dioxygenase from Fluorene-Degrading *Sphingomonas* sp. Strain LB126. Appl. Environ. Microbiol. 74: 1050-1057.
- Schocken, M.J., and Gibson, D.T. 1984. Bacterial oxidation of the polycyclic aromatic hydrocarbons acenaphthene and acenaphthylene. Appl. Environ. Microbiol. 48: 10-16.
- Selifonov, S.A., Chapman, P.J., Nanny, M.A., and Hatcher, P.G. 1998. Use of <sup>13</sup>C nuclear magnetic resonance to assess fossil fuel bioremediation: fate of [1-<sup>13</sup>C]acenaphthene in creosote polycyclic aromatic compound mixtures degraded by bacteria. Appt. Environ. Microbiol. 64: 1447-1453.
- Selifonov, S.A., Slemen, K.A.V., Adamin, V.M., Grechkina, G.M., and Starovoitov, I.I. 1993. Acenaphthene catabolism by strains of *Alcaligenase eutrophus* and *Alcaligenase paradoxus*. Microbiology. 62: 85-91.

- Shi, T., Fredrickson, J.K., and Balkwill, D.L. 2001. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by *Sphingomonas* strains isolated from the terrestrial subsurface. J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 26: 283-289.
- Sho, M., Hamel, C., and Greer, C.W. 2004. Two distinct gene clusters encode pyrene degradation in *Mycobacterium* sp. strain S65. FEMS Microbiol. Ecol. 48: 209-220.
- Simon, M.J., Harcourt, A., Suen, W.C., Cruden, D.L., and Zylstra, G.J. 1993. Sequences of genes encoding naphthalene dioxygenase in *Pseudomonas putida* strains G7 and NCIB 9816-4. Gene. 127: 31-37.
- Singleton, D.R., Ramirez, L.G., and Aitken, M.D. 2009. Characterization of a Polycyclic Aromatic Hydrocarbon degradation Gene Cluster in a Phenanthrene-Degrading *Acidovorax* Strain. Appl. Environ. Microbiol. 75: 2613-2620.
- Sipila, T.P., Riisio, H., and Yrjala, K. 2006. Novel upper *meta*-pathway extradiol dioxygenase gene diversity in polluted soil. FEMS. Microbiol. Ecol. 58: 134-144.
- Soclo, H.H., Garriges, P., and Ewald, M. 2001. Origin of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in coastal marine sediments: case studies in Cotonou (Benin) and Aquitaine (France) areas. Mar Pollut Bull. 40: 387-396.
- Stapleton, R.D., Savage, D.C., Saylor, G.S., and Stacey, G. 1998. Biodegradation of aromatic hydrocarbons in an extremely acidic environment. Appl. Environ. Microbiol. 64: 4180-4184.
- Stingley, R.L., Khan, A.A., and Cerniglia, C.E. 2004. Molecular characterization of phenanthrene degradation pathway in *Mycobacterium vanbaalenii* PYR-1. Biochem. Biophys. Res. Commun. 322: 133-146.
- Suenaga, H., Ohnuki, T., and Miyazaki, K. 2007. Functional screening of a metagenomic library for genes involved in microbial degradation of aromatic compounds. Environ. Microbiol. 9: 2289-2297.
- Supaka, N., Pinphanichakarn, P., Pattaragulwanit, K., Thaniyavarn, S., Omori, T., and Juntongjin, K. 2001. Isolation and characterization of a phenanthrene-degrading *Sphingomonas* sp. Strain P2 and its ability to degrade fluoranthene and pyrene via cometabolism. Sci. Asia. 27: 21-28.
- Suthersan, S.S. 1999. In situ Bioremediation. Remediation engineering: design

concepts. Boca Raton: CRC Press LLC.

- Takeuchi, M., Hamana, K., and Hiraishi, A. 2001. Proposal of the genus *Sphingomonas* sensu stricto and three new genera, *Sphingobium*, *Novosphingobium* and *Sphingopyxis*, on the basis of phylogenetic and chemotaxonomic analyses. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 51: 1405-1417.
- Takizawa, N., Iida, T., Sawada, T., Yamauchi, K., and Kiyohara, H. 1999. Nucleotide sequences and characterization of genes encoding naphthalene upper pathway of *Pseudomonas aeruginosa* PaK1 and *Pseudomonas putida* OUS82. J. Biosci. Bioeng. 87: 721-731.
- Talley, W.J. 2006. Bioremediation of recalcitrant compounds. CRC Press, New York.
- Taylor, P.M., Medd, J.M., Schoenborn, L., Hodgson, B., and Janssen, P.H. 2002. Detection of known and novel genes encoding aromatic ring-hydroxylating dioxygenases in soils and in aromatic hydrocarbon-degrading bacteria. FEMS. Microbiol. Lett. 216: 61-66.
- Tirawongsaroj, P., Champreda, V., Tanapongpipat, S., Pootanakit, K., and Eurwilaichitr, L. 2008. Novel thermophilic and thermostable lipolytic enzymes from a Thailand hot spring metagenomic library. J. Biotechnol. 113: 42-49.
- Torsvik, V., Ovreas, L., and Thingstad, T.F. 2002. Prokaryotic diversity-magnitude, dynamics and controlling factors. Science 296: 1064-1066.
- Trower, P. and Gilbert, P. 1988. Xenobiotic oxidation by cytochrome P-450-enriched extracts of *Streptomyces griseus*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 157: 1417-1422.
- U.S. EPA. 1987. Health and environmental effects profile for phenanthrene: The environmental criteria and assessment office, office of health and environmental assessment, U.S. environmental protection agency, Cincinnati, OH, for the office of solid waste and emergency response ECAO-CIN-P226.
- U.S. EPA. 1988. Drinking water criteria document for polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs): The environmental criteria and assessment office, office of health and environmental assessment, U.S. environmental protection agency, Cincinnati, OH, for the office of drinking water. ECAO-CIN-D010.



- Vila, J., Lopez, Z., Sabate, J., Minguillon, C., Solanas, A. M., and 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. Appl. Environ. Microbiol. 67: 5497-5505.
- Walter, U., Beyer, M., Klein, J., and Rehm, H.-J. (1991). Degradation of pyrene by *Rhodococcus* sp. UW1. Appl. Microbiol. Biotechnol. 34: 671-676.
- Watanabe, K. 2001. Microorganisms relevant to bioremediation. Curr. Opin. Biotechnol. 12: 237-241.
- Weissenfels, W.D., Klewer, H.J., and Langhoff, J. 1992. Adsorption of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by soil particles: influence on biodegradability and biotoxicity. Appl. Microbiol. Biotechnol. 36: 689-696.
- Yen, K.M., and Gunsalus, I.C. 1982. Plasmid gene organization: naphthalene/salicylate oxidation. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 79: 874-878.
- Yen, K.M., and Serdar, C.M. 1988. Genetics of naphthalene catabolism in pseudomonads. Crit. Rev. Microbiol. 15: 247-268.
- Yu, K.S.H., Wong, A.H.Y., Yau, K.W.Y., Wong, Y.S., and Tam, N.F.Y. 2005. Natural attenuation, biostimulation and bioaugmentation on biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in mangrove sediments. Mar. Pollu. Bull. 51: 1071-1077.
- Yun, H.S., Yun, Y.C., and Kim, I.S. 2004. Characterization of protocatechuate 4,5-dioxygenase induced from *p*-hydroxybenzoate-cultured *Pseudomonas* sp.K82. J. Microbiol. 42: 152-155.
- Yun, J., Kang, S., Park, S., Yoon, H., Kim, M.J., and Ryu, S. 2004. Characterization of a novel amylolytic enzyme encoded by a gene from a soil-derived metagenomic library. Appl. Environ. Microbiol. 70: 7229-7235.
- Zhang, H., Kallimanis, A., Koukkou, A. I., and Drainas, C. 2004. Isolation and characterization of novel bacteria degrading polycyclic aromatic hydrocarbons from polluted Greek soils. Appl. Microbiol. Biotechnol. 65: 124-131.
- Zhou, H.W., Guo, C.L., Wong, Y.S., and Tam, N.F.Y. 2006. Genetic diversity of dioxygenase genes in polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacteria isolated from mangrove sediments. FEMS. Microbiol. Lett. 262: 148-157.

Zhou, N.Y., Fuenmayor, S.L., and Williams, P.A. 2001. *nag* genes of *Ralstonia* (formerly *Pseudomonas*) sp. strain U2 encoding enzymes for gentisate catabolism. J. Bacteriol. 183: 700-708.



ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาคผนวก

ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## ภาคผนวก ก

## สูตรและวิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

## อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Luria-Bertani (LB)

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

ละลายส่วนผสมทั้งหมดด้วยน้ำกลั่น ปริมาตรสุดท้าย 1,000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 °ซ เป็นเวลา 15 นาที

## อาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง Luria Bertani (LB)

เติมวุ้นผง 15 กรัม ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 °ซ เป็นเวลา 15 นาที

อาหารเลี้ยงเชื้อ  $\Psi$ b

ผงสกัดจากยีสต์ (Yeast extract)	5	กรัม
ทริปโตน (tryptone)	20	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟต 7 น้ำ (MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O)	5	กรัม

ละลายสารทั้งสามชนิดในน้ำกลั่นปรับความเป็นกรด-ด่าง ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 5 โมลาร์ จน pH เท่ากับ 7 และปรับปริมาตรสุดท้าย 1,000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 °ซ เป็นเวลา 15 นาที

อาหารเลี้ยงเชื้อแข็งละลายผงวุ้นหรือแบคทีโอะคาร์ 15 กรัม ต่ออาหาร 1,000 มิลลิลิตร ก่อนนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ

## อาหารเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากแหล่งคาร์บอน (Carbon Free Mineral Medium, CFMM)

## สารละลายส่วนที่ 1

แอมโมเนียมไนเตรด (NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> )	3	กรัม
โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	2.2	กรัม
ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 12 น้ำ (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·12H <sub>2</sub> O)	0.8	กรัม

ปรับปริมาตรสุดท้าย 1,000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 °ซ เป็นเวลา 15 นาที

อาหารเลี้ยงเชื้อแข็งละลายผงวุ้นหรือแบคทีโอะการ์ 15 กรัม ต่ออาหาร 1,000 มิลลิลิตร  
ก่อนนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ

### สารละลายส่วนที่ 2

เฟอร์ริสคลอไรด์ 6 น้ำ (FeCl <sub>3</sub> .6H <sub>2</sub> O)	0.05	กรัม/มิลลิลิตร
แคลเซียมคลอไรด์ 2 น้ำ (CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O)	0.05	กรัม/มิลลิลิตร
แมกนีเซียมซัลเฟต 7 น้ำ (MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O)	0.1	กรัม/มิลลิลิตร

กำจัดเชื้อด้วยการกรองผ่านกระดาษกรองขนาด 0.22 ไมโครเมตร

สารละลายส่วนที่ 2 ชนิดละ 1 มิลลิลิตรต่อสารละลายส่วนที่ 1 1,000 มิลลิลิตร

### อาหารเลี้ยงเชื้อ SOC

#### สารละลายส่วนที่ 1

ผงสกัดจากยีสต์ (Yeast extract)	5	กรัม
ทริปโตเนน (tryptone)	20	กรัม
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	0.58	กรัม
แมกนีเซียมคลอไรด์ (MgCl)	2	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟต 7 น้ำ (MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O)	2.46	กรัม
โพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl)	0.18	กรัม

ละลายสารทั้งหมดในน้ำกลั่นปรับความเป็นปริมาตรสุดท้าย 980 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่า  
เชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 °ซ เป็นเวลา 15 นาที

#### สารละลายส่วนที่ 2

กลูโคส	3.6	กรัม
น้ำปลอดประจุ	20	มิลลิลิตร

กำจัดเชื้อด้วยการกรองผ่านกระดาษกรองขนาด 0.22 ไมโครเมตร

ผสมสารละลายทั้ง 2 ส่วน เก็บรักษาที่ -20 °ซ



### อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว basal salt ความเป็นกรดต่าง 4.0

#### สารละลาย A

แมกนีเซียมซัลเฟต 7 น้ำ ( $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ )	5	กรัม
ไดแอมโมเนียมซัลเฟต ( $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ )	1.5	กรัม
โพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl)	1.0	กรัม
แคลเซียมไนเตรต ( $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ )	0.1	กรัม

ละลายส่วนผสมทั้งหมดด้วยน้ำกลั่น ปรับความเป็นกรดต่างเป็น 4.0. และปรับปริมาตรสุดท้าย 1,000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 °ซ เป็นเวลา 15 นาที

#### สารละลาย B

เฟอร์รัสซัลเฟต ( $\text{FeSO}_4$ ) ความเข้มข้น 500 มิลลิโมลาร์

เตรียมโดยละลาย  $\text{FeSO}_4$  13.9 กรัม ในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร ทำให้ปราศจากเชื้อด้วยการกรองผ่านกระดาษกรองขนาดรูกรอง 0.22 ไมโครเมตร แล้วเติมสารละลาย B 5 มิลลิลิตรลงในสารละลาย A ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร

## ภาคผนวก ข

## สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

## สารละลายฟีนอล์ฟทาเลอินในอะซิโตน ความเข้มข้น 12,000 ppm

ฟีนอล์ฟทาเลอิน	0.12	กรัม
อะซิโตน	10	มิลลิลิตร

ทำให้ปราศจากเชื้อด้วยการกรองผ่านชุดกรองสำเร็จรูปชนิด PTFE ขนาดรูกรอง 0.2 ไมโครเมตร

## สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 1 นอร์มัล

โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH)	4	กรัม
เติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตรสุทธิ	100	มิลลิลิตร

## สารละลายไฮโดรคลอริกเข้มข้น 1 นอร์มัล

กรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 12 นอร์มัล	8.33	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	91.67	มิลลิลิตร

## 70% เอทานอล

99% เอทานอล	700	มิลลิลิตร
น้ำกลั่นปลอดประจุ	300	มิลลิลิตร

## 20% สารละลายโปรตีนเนสเค (proteinase K)

โปรตีนเนสเค (proteinase K)	20	มิลลิกรัม
น้ำปลอดประจุปลอดเชื้อ	1	มิลลิลิตร

## สารละลาย Tris-HCl pH 8 เข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์

Trizma base ( $C_4H_{11}NO_3$ )	1.2	กรัม
---------------------------------	-----	------

ละลายในน้ำปลอดประจุปริมาตร 800 มิลลิลิตร จากนั้นปรับค่าความเป็นกรดต่างเป็น 8.0 ด้วย กรดไฮโดรคลอริก เติมน้ำปลอดประจุจนได้ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร หนึ่งชั่วโมงด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 °ซ เป็นเวลา 15 นาที

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 หนึ่งชั่วโมงด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 °ซ เป็นเวลา 15 นาที

#### สารละลาย CTAB/NaCl

โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	4.1	กรัม
-----------------------	-----	------

CTAB	10	กรัม
------	----	------

ละลาย CTAB ในน้ำปลอดประจุอุณหภูมิ 65 °ซ ปริมาตร 80 มิลลิลิตร จากนั้นเติมโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.7 โมลาร์ เมื่อละลายหมดเติมน้ำปลอดประจุให้ได้ปริมาตร 100 มิลลิลิตร นำไปหนึ่งชั่วโมงด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 °ซ เป็นเวลา 15 นาที

#### สารละลายคลอโรฟอร์ม/ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์

ผสมคลอโรฟอร์มกับไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ในอัตราส่วน 24 :1 (ปริมาตร ต่อปริมาตร) เก็บที่อุณหภูมิ 4 °ซ

#### 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 หนึ่งชั่วโมงด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 °ซ เป็นเวลา 15 นาที

#### อะกาโรสเจลเข้มข้น 0.9%

อะกาโรสเจล	0.9	กรัม
------------	-----	------

บัฟเฟอร์ TAE เข้มข้น 1 เท่า	100	มิลลิลิตร
-----------------------------	-----	-----------

หลอมให้เข้ากันด้วยไมโครเวฟหรือการต้มให้ความร้อน

#### อะกาโรสเจลเข้มข้น 2%

อะกาโรสเจล	2	กรัม
บัฟเฟอร์ TAE เข้มข้น 1 เท่า	100	มิลลิลิตร

หลอมให้เข้ากันด้วยไมโครเวฟหรือการต้มให้ความร้อน

### ไลซิส บัฟเฟอร์ ( DNA extraction buffer )

Tris-HCl, pH 8.0	1	โมลาร์
สารละลายโซเดียมฟอสเฟต, pH 8.0	1	โมลาร์
สารละลาย EDTA, pH 8.0	0.5	โมลาร์
สารละลายโซเดียมคลอไรด์	5	โมลาร์
CTAB	5%	(w/v)
H <sub>2</sub> O		

### สารละลาย Tris-HCl pH 8 เข้มข้น 1 โมลาร์

Trizma base (C <sub>4</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>3</sub> )	121.1	กรัม
---	-------	------

ละลายในน้ำปลอดประจุปริมาตร 800 มิลลิลิตร จากนั้นปรับค่าความเป็นกรดต่างเป็น 8.0 ด้วย กรดไฮโดรคลอริก เติมน้ำปลอดประจุจนได้ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร นึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 °ซ เป็นเวลา 15 นาที

### 20% โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต (sodium dodecyl sulfate, SDS)

Sodium dodecyl sulfate	20	กรัม
------------------------	----	------

ค่อยๆ ละลายในน้ำปลอดประจุปลอดเชื้ออุณหภูมิ 60°ซ ปริมาตร 80 มิลลิลิตร เมื่อละลายหมดเติมน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อจนได้ปริมาตร 100 มิลลิลิตร นึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 °ซ เป็นเวลา 15 นาที

### สารละลาย EDTA pH 8 เข้มข้น 0.5 โมลาร์

EDTA (C <sub>10</sub> H <sub>14</sub> O <sub>8</sub> Na <sub>2</sub> •2H <sub>2</sub> O)	186.1	กรัม
โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH)	20	กรัม

ละลาย EDTA ในน้ำปลอดประจุปริมาตร 800 มิลลิลิตร จากนั้นเติมเกล็ดโซเดียมไฮดรอกไซด์ คนให้เข้ากัน รอให้เย็นลงแล้วจึงปรับค่าความเป็นกรดต่างเป็น 8.0 เติมน้ำปลอดประจุให้เป็นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร นึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 °ซ เป็นเวลา 15 นาที

### สารละลายโซเดียมคลอไรด์ เข้มข้น 5 โมลาร์

โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) 292 กรัม

ละลายโซเดียมคลอไรด์ ในน้ำปลอดประจุปริมาตร 800 มิลลิลิตร คนให้ละลาย จากนั้นเติมน้ำปลอดประจุให้เป็นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร หนึ่งชั่วโมงด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 °ซ เป็นเวลา 15 นาที

### สารละลายเอธิเดียมโบรไมด์เข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

เอธิเดียมโบรไมด์ 0.1 มิลลิกรัม

น้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร

ละลายให้เข้ากันเก็บในภาชนะปิดสนิทในที่มืด (ขณะเตรียมควรสวมถุงมือป้องกัน เนื่องจากเอธิเดียมโบรไมด์เป็นสารก่อมะเร็ง)

### สารละลายฟีนอล/คลอโรฟอร์ม

เตรียมสารละลายฟีนอลอิมิตัวในบัฟเฟอร์ Tris-HCl โดยละลายฟีนอลในอ่างน้ำอุณหภูมิ 68 °ซ จากนั้นเติมผง hydroxyquinoline ให้ได้ความเข้มข้น 0.1% (น้ำหนัก/น้ำหนัก) เติมสารละลาย Tris-HCl pH 8.0 เข้มข้นเป็น 0.5 โมลาร์ ปริมาตร 1 เท่าคนด้วยแท่งแม่เหล็กเป็นเวลา 15 นาที ทิ้งให้แยกชั้น ดูดชั้นน้ำส่วนบนออก เติมสารละลาย Tris-HCl pH 8.0 เข้มข้นเป็น 0.1 โมลาร์ ปริมาตร 1 เท่าคนด้วยแท่งแม่เหล็กเป็นเวลา 15 นาที ทิ้งให้แยกชั้น ดูดชั้นน้ำส่วนบนออก ทำขั้นนี้หลายครั้งด้วย Tris-HCl pH 8.0 เข้มข้นเป็น 0.1 โมลาร์ จนค่าความเป็นกรดต่างของฟีนอลมากกว่า 7.8 สุดท้ายเติมสารละลาย Tris-HCl pH 8.0 เข้มข้นเป็น 0.1 โมลาร์ ที่ผสม  $\beta$ -mercaptoethanol เข้มข้น 0.2% ปริมาตร 0.1 เท่าของฟีนอลที่เตรียมได้ เก็บในขวดสีชาที่อุณหภูมิ 4 °ซ ผสมฟีนอลที่เตรียมได้กับคลอโรฟอร์ม ในอัตราส่วน 25:25 (ปริมาตรต่อ ปริมาตร) เก็บในขวดสีชาที่อุณหภูมิ 4 °ซ

### สารปฏิชีวนะแอมพิซิลิน (Ampicilin, Ap)

แอมพิซิลิน 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

ไดเมทิลฟอร์มาไมด์ (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

ละลายสารในน้ำกลั่น 70 มิลลิลิตร ปรับความเป็นกรด-ด่าง ด้วยกรดอะซิติกเข้มข้น 0.2 โมลาร์ จน pH เท่ากับ 5.8 ด้วย และปรับปริมาตรสุดท้าย 100 มิลลิลิตร กำจัดเชื้อด้วยการกรองผ่านกระดาษกรองขนาด 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 กำจัดเชื้อด้วยการกรองผ่านกระดาษกรองขนาด 0.22 ไมโครเมตร

#### สารละลายไซเตียมอะซิเตทเข้มข้น 3 โมลาร์

ละลายไซเตียมอะซิเตทน้ำหนัก 204 กรัม ในน้ำปลอดประจุให้ได้ปริมาตร 400 มิลลิลิตร นำไปปรับค่าความเป็นกรด-ด่างให้เป็น 5.2 ด้วยกรดอะซิติกปริมาตรประมาณ 57 มิลลิลิตร เติมน้ำปลอดประจุให้ได้ปริมาตรครบ 500 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ  $121^\circ\text{C}$  เป็นเวลา 15 นาที

#### สารละลายไลโซไซม์ (Lysozyme)

ไลโซไซม์ (Lysozyme)	60	มิลลิกรัม
บัฟเฟอร์ TE	1	มิลลิลิตร

#### สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์ DGGE

##### 0% denaturing solution ใน 8% อะคริลาไมด์เจล

40% อะคริลาไมด์/บิส	20	มิลลิลิตร
บัฟเฟอร์ TAE เข้มข้น 50 เท่า	2	มิลลิลิตร
น้ำปลอดประจุ	78	มิลลิลิตร

##### 100% denaturing solution ใน 8% อะคริลาไมด์เจล

40% อะคริลาไมด์/บิส	20	มิลลิลิตร
บัฟเฟอร์ TAE เข้มข้น 50 เท่า	2	มิลลิลิตร
ฟอร์มามาไมด์	40	มิลลิลิตร
ยูเรีย	42	กรัม
เติมน้ำปลอดประจุจนได้ปริมาตรสุทธิ	100	มิลลิลิตร

##### แอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟตเข้มข้น 10%

แอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต	0.1	กรัม
น้ำปลอดประจุ	1	มิลลิลิตร

##### สารละลายเอธิเดียมโบรไมด์เข้มข้น 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

เอธิเดียมโบรไมด์เข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร	10	ไมโครลิตร
น้ำกลั่น	200	มิลลิลิตร

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## ภาคผนวก ค

## ข้อมูลดิบ

**ตารางที่ ค.1** ปริมาณอะซีแนพธินที่เหลืออยู่ในระบบนิเวศจำลองดินที่เติมอะซีแนพธินเป็นแหล่งคาร์บอน (ACE) สัปดาห์ที่ 0 2 4 และ 6

สัปดาห์	ปริมาณอะซีแนพธินที่เหลือ (พื้นที่ได้กราฟ)		อะซีแนพธินที่เหลืออยู่ (เฉลี่ย)		ส่วนเบี่ยงเบน มาตรฐาน (SD) ในชุดควบคุม	ส่วนเบี่ยงเบน มาตรฐาน (SD) ในชุดทดลอง
	ชุด ควบคุม	ชุด ทดลอง	ชุด ควบคุม	ชุดทดลอง		
0	246.2	156.7	100	100	12.66	19.26
	234.6	195.2				
	220.9	175				
2	152	158.7	78.14	68.17	41.51	35.40
	230	89.6				
	166.4	110.8				
4	139.8	39.7	59.83	22.98	1.05	1.514
	138.9	42.1				
	137.7	39.3				
6	138.1	37.7	56.94	15.95	7.75	8.47
	137.3	22.1				
	124.3	24.2				

**ตารางที่ ค.2** ปริมาณฟิแนนทรินที่เหลืออยู่ในระบบนิเวศจำลองดินที่เติมฟิแนนทรินเป็นแหล่งคาร์บอน (PHE) สัปดาห์ที่ 0 2 4 และ 6

สัปดาห์	ปริมาณฟิแนนทรินที่เหลือ (พื้นที่ได้กราฟ)		ฟิแนนทรินที่เหลืออยู่ (เฉลี่ย)		ส่วนเบี่ยงเบน มาตรฐาน (SD) ในชุดควบคุม	ส่วนเบี่ยงเบน มาตรฐาน (SD) ในชุดทดลอง
	ชุด ควบคุม	ชุด ทดลอง	ชุด ควบคุม	ชุดทดลอง		
0	246.1	224.5	100	100	13.80	11.41
	232	245.4				
	259.6	227				
2	262.2	45	97.23	25.83	22.62	13.45
	217	71				
	238.1	64				
4	217.85	11	89.73	3.4	5.87	3.205
	227.4	4.6				
	216.7	8.1				
6	242.69	0	99.08	0	6.95	0
	251	0				
	237.2	0				

**ตารางที่ ค.3** ปริมาณอะซีแนพธินที่เหลืออยู่ในระบบนิเวศจำลองดินที่เติมอะซีแนพธินและ  
พีแนนทรินเป็นแหล่งคาร์บอน(AP) สัปดาห์ที่ 0 2 4 และ 6

สัปดาห์	ปริมาณอะซีแนพธินที่เหลือ (พื้นที่ได้กราฟ)		อะซีแนพธินที่เหลืออยู่ (เฉลี่ย)		ส่วนเบี่ยงเบน มาตรฐาน (SD) ในชุดควบคุม	ส่วนเบี่ยงเบน มาตรฐาน (SD) ในชุดทดลอง
	ชุด ควบคุม	ชุด ทดลอง	ชุด ควบคุม	ชุดทดลอง		
0	286.5	286.5	100	100	36.14	36.14
	280.7	280.7				
	346	346				
2	277.1	223.8	97.10	63.06	22.55	28.34
	288.9	182.6				
	320.7	169.5				
4	318	82.9	96.38	27.32	22.09	1.91
	275.3	81.4				
	286.8	85.2				
6	189.3	63.4	64.44	24.52	38.36	10.46
	237.5	84.1				
	161.7	76.4				



**ตารางที่ ค.4** ปริมาณฟิแนนทรินที่เหลืออยู่ในระบบนิเวศจำลองดินที่เติมอะซีแนฟรินและฟิแนนทรินเป็นแหล่งคาร์บอน (AP) สัปดาห์ที่ 0 2 4 และ 6

สัปดาห์	ปริมาณฟิแนนทรินที่เหลือ (พื้นที่ได้กราฟ)		ฟิแนนทรินที่เหลืออยู่ (เฉลี่ย)		ส่วนเบี่ยงเบน มาตรฐาน (SD) ในชุดควบคุม	ส่วนเบี่ยงเบน มาตรฐาน (SD) ในชุดทดลอง
	ชุด ควบคุม	ชุด ทดลอง	ชุด ควบคุม	ชุดทดลอง		
0	234.6	234.6	100	100	34.31	34.31
	244.6	244.6				
	180.8	180.8				
2	195.1	107.4	108.5	81.64	44.53	83.94
	236.9	271.7				
	284.1	159.7				
4	276.5	0.68	123.94	0.42	3.37	0.33
	270.2	1.3				
	271.3	0.79				
6	149.3	0.51	83.68	0.24	31.60	0.07
	211	0.47				
	192	0.61				

**ภาคผนวก ง**  
**ลำดับนิวคลีโอไทด์ของตัวอย่าง**

**AP2NMR2i8**

```

1   TGCCCTTACC ACGGTTGGAA ATATGATGTC ACCGGCCAAT GTGTGATCT
51  GCCCTCGGAG CCTGAGGAGA GCGGCTTCCG CAAGAACGTC AACTGAAGT
101 CTTACCCCTG CATCGAGAAG GCCGGGATCA TTTGGGCCCTA CATGGGGCCG
151 CCCGCGCTGC AACCGCCGCC ACCGGCGCTG GAATGGACAG ACGTTGAACC
201 GCCGAGCGC TTCGTTTCCA AGCGTCTCCA GGAATGCAAT TACCTTCAGG
251 CCATGGAAGG CGGCATTGAT TCCAGCCACG TATCGTGGCT GCACGGAAGC
301 GAGCTCAACA AGGACCCGCT GTTTAAAGGC TCGAAGGGCA ACGTCTACA

```

**AP4NMR4.2**

```

1   AACGAGTGGA GTCTTACCCA GGTTCGCGC CTCGAGAACT ACCGCGGAAT
51  GATATTCGGT TGCCTGGACG AGAAGGCAGA ACCTCTCGTT GATTATTTGG
101 GCGATATGGC GTGGTATCTG GACCTGATCA CCCAGAAGTC CAAGGGTGGAA
151 CTGGAGGTGC GGGGTGAGCC CCAGCGTTGG ATCATCGACT CCAACTGGAA
201 GCTCGGCGCG GACAACCTTG TCGGGGACGC CTACCACACG TTGATGACGC
251 ACCGATCGGC GGTGAGCTC GGTCTGGCTC CGCCCGATCC GAAATTCGCA
301 TCGGAGCCGG CGCATATCAG TCTCTCCAAC GGTACGCGCC TCGGCGTCCT
351 CGGGGTAACG CCCGGGCAAC CGATGCCGCC CTTTATGAAC TATCCACCCG
401 AGGTCGTCTGA TGGACTCGCA GCGGCTTACG GCGATCAGGA CCGCGCAGAC
451 ATGCTTCA

```

**AP4NMR4.5**

```

1   ACCCTCTTTG CTCACCGCTC GATGGTTCGAG CTAGGCATGG CGCCCGGTGA
51  CCCAAACTTC GCGAGCGCAC CAGCGGAAAT CTCGCTGCAG AACGGCCACG
101 GCGTCGGCGT ACTCGGCTTT CCGCCACGC TCGCCGATTT TCCCGAGTAC
151 GAGGGATAACC CCGACGAAGT CGTCGACCAG ATGGCGACGT CCTACCCGTC
201 GCCGGTACAC AAGGACCTGA TCGGACGCTC ATCCTTTATT CACGGCACCG
251 TGTTCCCGAA TTTGTCTGTT ATCAACGTGA CCCTCGCGCA GGACCACATG
301 TCGCCCCCTA CCCCCTTCAT CACGTTCCGG GTATGGCATC CGCTCTCCCA
351 TGATCGGATG GAGATCCTCT CCTGGTTCCT GGTGAAACGC GATGCTCCGG
401 AA

```

**AP4NMR4.15**

```

1   CCCGAAGTTC GCCTCCGGCC GGCCACATC AGCCTGTTCGG GCGGGCACGG
51  CCTGGGCGTC CTCGGTGTAC CGCCCGGCTA CGAGATGCCG CCGTTCATGA
101 ACTACCCGGA GGAGATGATC GAGGGTCTCG CCGCCGGCTA CGGGAACCAG
151 AAGCACGCCG ACGTCCTGGA GCGGACGATC TTCATTCACG GGACGGTGT
201 CCCGAACCTG TCCTTTCTCA ACGTCATGAT CAGCAAGGAC CACATGTCCG
251 TTCCCGTGCC GATGTTGACC ATGCGTCTGT GGCGCCCGCT CAGCCACGAC
301 ACGATGGAGG TCTGGTCGTG GTTCTCATC GAGCGGGACG CGCCGGAGGA
351 GTTCAAGGAC CTCTCCTACG ACGTACGTC CCGCACCTTC GGGGTGTCCG
401 GGGTGTTCGA ACAGGACGAC GCCGAGAATC GAATTCCCGC GGCCGCATG
451 GCGGCCG

```

## AP4NMR4i1

1 ACCGGTGACC TGACCGGCGT GCCCGCGCAG GAGGAGGTCT ACGGCGCCTC  
 51 GATGGACAAG GCGCAGTGGA ACCTGACACC GGTACCGCGG CTCGAGTCCT  
 101 ACAACGGCCT GGTCTTCGGT TGTCTGGACG ACGCGGCGCC GACGCTGGTC  
 151 GAGTACCTGG GCGACATGGC CTGGTACCTC GACCTGTTC AAGCGCAG  
 201 CGCCGGTGGC CTCGAGGTCC GCGGCGAGCC GCAGCGCTGG GTGATCGATG  
 251 CGAACTGGAA GCTTGGCGCC GACAACTTCG TCGGCGACGC TTACCACACG  
 301 CTGATGACGC ACCGCTCGAT GCGGAGCTC GGTCTCGTGC CGCCGACCC  
 351 GAAGTTCGCC TCCGCGCCGG CCCACATCAG CCTGTCTGGG GGGCAGGCC  
 401 TGGGCGTCCT CGGTGTACCG CCCGGCTACG AGATGCCGCC GTTCATGAAC  
 451 TACCCGGAGG AGATGATCGA GGTCTCGCC GCCGGCTACG GGAACCAGAC  
 501 GCACGCCGAC GTCCTGGAGC GGACGATCTT CATTCACGGG ACGGTGTTCC  
 551 CGAACTGTC CTTTCTCAAC GTCATGATCA GCAAGGACCA CATGTCGGTT  
 601 CCCGCGCCGA TGTTGACCAT GCGTCTGTGG CGCCCGCTCA GCCACGACAC  
 651 GATGGAGGTC TGGTCGTGGT TCCTCATCGA GCGGGACGCG CCGGAGGAGT  
 701 TCAAGGACCT CTCCTACGAG ACTTACGTCC GCACCTTCGG GGTGTCCGGG  
 751 GTGTTCGAAC AGGACGACGC CGAGAATCG

## AP4NMR4i4

1 AACACCGGTG ACCTGACCGG CGTGCCCGCG CAGGAGGAGG CCTACGGCGC  
 51 CTCGATGAAC AAGGCGCAGT GGAACCTGAC ACCGGTACCG CGGCTCGAGT  
 101 CCTACAACGG CCTGGTCTTC GGTGTCTGG ACAGCGCGGC GCCGACGCTG  
 151 GTCGAGTACC TGGGCGACAT GGCTGGTAC CTCGACCTGT TCACCAAGCG  
 201 CAGCGCCGGT GGCTCGAGG TCCGCGGCGA GCCGACGCGC TGGGTGATCG  
 251 ATGCGAACCG GAAGCTTGGC GCCGACAAC TCGTCGGCGA CGCTTACCAC  
 301 ACGCTGATGA TGCACCGCTC GATGGCGGAG CTCGGTCTCG TGCCGCCGGA  
 351 CCCGAAGTTC GCCTCCGCGC CGGCCACAT CAGCTGTCTG GCGGGCAGC  
 401 GCCTGGCGGT CCTCGGTGTA CGCCCGGCT ACGAGATGCC GCCGTTATG  
 451 AACTACCCGG AGGAGATGAT CGAGGTCTC GCCCGCGCT ACGGAAACCA  
 501 GACGCACGCC GACGTCCTGG AGCGGACGAT CTCATTTCAC GGGACGGTGT  
 551 TCCCGAACCT GTCCTTTCTC AACGTCATGA TCAGCAAGGA CCACATGTCTG  
 601 GTTCCCGTGC CGATGTTGAC CATGCGTCTG TGGCGCCCGC TCAGCCACGA  
 651 CACGATGGAG GTCTGGTCTG GGTTCCTCAT CGAGCGGGAC GCGCCGAGG  
 701 AGTTCAAGGA CCTCTCCTAC GAGACTTACG TCCGCACCTT CGGGGTGTCC  
 751 GGGGTGTTTC AACAGGACGA CGCCGAGAA

## AP4NMR4i7

1 CCGGCCACA TCAGCCTGTG GGGCGGGCAC GGCCTGGGCG TCCTCGGTGT  
 51 CCCGCCGGG TAGGAGAGGC CCCGTTTCAT GACCTCCCCG GAGGAGATGA  
 101 TCGAGGGTCT CGCCGCCGGC TACGGGAACC AGACGCACGC CGACGTCTGT  
 151 GAGCGGACGA TCTTCATTCA CGGGACGGTG TTCCCGAAC TGTCCTTTCT  
 201 CAACGTCATG ATCAGCAAGG ACCACATGTC GGTTCGCGTG CCGATGTTGA  
 251 CCATGCGTCT GTGGCGCCCG CTCAGCCACG ACACGATGGA GGTCTGGTCTG  
 301 TGGTTCCTCA TC

## AP6NMR6i3

1 TGCCCTTACC ACGGTTGGAC CTACAAGAAT GACGGCGAGC TTCTCGGCGT  
 51 CCCCGCGAAA ACCCAGGGCT ACCGCAACCT GGATACGTCC AAATGGGGAC  
 101 TGCTGTCTGG ACCTCAGGTG ACCAACTACG CGGGACTGGT TTTCGCCAAC  
 151 CTGGATCCGG ACGCGCTCC TTTTGAAGAA TATCTCGGAC AGTATAAATG  
 201 GACTTTCGAT ATCCAGTTCA AGCTGTCCCA GGGCGGCATG GAAGTGATCG  
 251 GCGAGCCGCA AAGGTGGCAG GTGGATTTCA ACTGGAAGCA GGGCGCGGAA  
 301 AACTTCTGCG GCGACAGCTC GCACACGCAG ATGACGCACC GCTCCGTATT  
 351 GGAAGTCGGC ATTGCGGGCG AAGCGGCCCG AGGGGCACCC GGCAAAAAC  
 401 ACGGGCTCCA CGTGCACGAG TCGACGGCC ATTCCGTCAG CATCCGTCGT

451 CTGCCGAAGG GAGAATCCAT CTTCTGGTAT TACCCGGAAG AAGTGACCTC  
 501 CAAATTCACT CCCGGCGAGC TGAACGGGGA CCAATTCGAC CTCGCGAGAC  
 551 GGTTCGATGGT CCACAACGGA ACGATTTTTTC CGAATTTTTTC GTACCTGCAC  
 601 TTCGGGTTGA CGGACAGCCT GGAGAAAGC

## AP6NMR6i4

1 GTCGAGTACC TGGGCGACAT GGCCTGGTAC CTCGACCTGT TCACCAAGCG  
 51 CAGCGCCGGT GGCCTCGAGG TCCGCGGCGA GCCGCAGCGC TGGGTGATCG  
 101 ATGCGAACTG GAAGCTTGGC GCCGACAACT TCGTCGGCGA CGCTTACCAC  
 151 ACGCTGATGA CGCACCCTC GATGGCGGAG CTCGGTCTCG TGCCGCCGGA  
 201 CCCGAAGTTC GCCTCCGCGC CGGCCACAT CAGCCTGTCTG GCGGGCAGC  
 251 GCCTGGGCGT CCTCGGTGTA CCGCCCGGCT ACGAGATGCC GCCGTTTCATG  
 301 AACTACCCGG AGGAGATGAT CGAGGGTCTC GCCGCCGGCT ACGGGAACCA  
 351 GACGCACGCC GACGTCCTGG AGCGGACGAT CTTCAATTCAC GGGACGGTGT  
 401 TCCCGAACCT GTCCTTTCTC AACGTCATGA TCAGCAAGGA CCACATGTCTG  
 451 GTTCCCGTGC CGATGTTGAC CATGCGTCTG TGGCGCCCGC TCAGCCACGA  
 501 CACGATGGAG GTCTGGTCTG GGTTCCTCAT CGAGCGGGAC GCGCCGGAGG  
 551 AGTTCAAGGA CCTCTCCTAC GAGACTTACG TCCGCACCTT CGGGGTGTCC  
 601 GGGGTGTTTCG AACAGGACGA CGCCGAGAA

## AP6NMR6i10

1 GGTGACCTGA CCGGCGTGCC CGCGCAGGAG GAGGTCTACG GCGCCTCGAT  
 51 GGACAAGGCG CAGTGGAAACC TGACACCGGT ACCGCGGCTC GAGTCCTACA  
 101 ACGGCCTGGT CTTTCGGTTGT CTGGACGACG CGGCGCCGAC GCTGGTTCGAG  
 151 TACCTGGGCG ACATGGCCTG GTACCTCGAC CTGTTCACCA AGCGCAGCGC  
 201 CGGTGGCCTC GAGGTCCGCG GCGAGCCGCA GCGCTGGGTG ATCGATGCGA  
 251 ACTGGAAGCT TGGCGCCGAC AACTTCGTCG GCGACGCTTA CCACACGCTG  
 301 ATGACGCACC GCTCGATGGC GGAGCTCGGT CTCGTGCCGC CGGACCCGAA  
 351 GTTCGCCTCC GCGCCGGCCC ACATCAGCCT GTCGGGCGGG CACGGCCTGG  
 401 GCGTCTCGG TGTACCGCCC GGCTACGAGA TGCCGCCGTT CATGAACCTAC  
 451 CCGGAGGAGA TGATCGAGGG TCTCGCCGCC GGCTACGGGA ACCAGACGCA  
 501 CGCCGACGTC CTGGAGCGGA CGATCTTCAT TCACGGGACG GTGTTCCCGA  
 551 ACCTGTCTTT TCTCAACGTC ATGATCAGCA AGGACCACAT GTCGGTTCCTC  
 601 GTCCGATGT TGACCATGCG TCTGTGGCGC CCGCTCAGCC ACGACACGAT  
 651 GGAGGTCTGG TCGTGGTTCC TCATCGAGCG GGACGCGCCG GAGGAGTTCA  
 701 AGGGCCTCTC CTACGAGACT TACGTCCGCA CCTTCGGGGT GTCCGGGGTG  
 751 TTCGAACAGG ACGACGCCGA GAATCGAATT

## AP4GP4.3

1 TTTTGTGGG ACGGCTATCA CACGGTCATG ACGCACCGTT CGATGTGTGA  
 51 GCTGGGGTTG TTACCGCCCG ATAATGTGGC CGTTTCGCCG

## AP4GP4.5

1 GCGCCGACA ATTTTGTGG GGACGGCTAT CGCACGGTCA TGACGCACCG  
 51 TTCGATGTGT GAGCTGGGGT TGTTACCGCC CGATAATGTG GCCGTTTCGC  
 101 CGGCCACGTC CAGCCTATCG GCGGGCAGC GGGCGGGCGT TCTAGGCGCA  
 151 CCACCCGGCA TACCCGACCC GCCGTACATG GGCTATCCGG AGGAAGTCGT  
 201 CTCCGGTCTC AGCGAGGGTT ACGGCGATGA C

### ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวกังสดาล ทองดองง้าว เกิดเมื่อวันที่ 21 มกราคม พ.ศ. 2528 ที่ จังหวัดพิษณุโลก ได้รับปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาจุลชีววิทยา จากคณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร ในปีการศึกษา 2549 และได้เข้าศึกษาต่อในระดับปริญญาโท สาขาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2550 ปัจจุบันอาศัยอยู่บ้านเลขที่ 134/2 หมู่ 2 ตำบล บ้านคลอง อำเภอ เมือง จังหวัดพิษณุโลก 65000

### ผลงานตีพิมพ์เผยแพร่

\_\_\_\_\_1. Kungsadarn Thongdonggao, Piyapun Harnpichanchai and Onruthai Pinyakong. MONITORING OF PAH DIOXYGENASE GENES AND BIODEGRADATION OF PHENANTHRENE AND ACENAPHTHENE IN SOIL MICROCOSMS. Proceedings in the 21<sup>th</sup> Annual Meeting and International Conference of the Thai Society for Biotechnology (TSB). September 24-25, 2009, Queen Sirikit National Convention Center, Bangkok, Thailand. (poster presentation) (Full text in CD-ROM)

ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย