

## บทที่ 4

### ผลการทดลอง

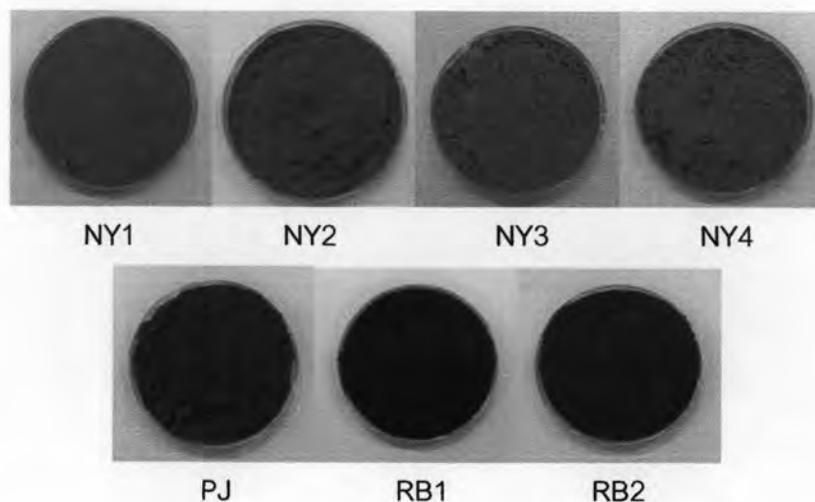
#### 4.1 การเก็บตัวอย่างดิน การวิเคราะห์สมบัติทางฟิสิกส์และเคมีของดินและการปนเปื้อนของพีแนนทริน

##### 4.1.1 การเก็บตัวอย่างดิน

เก็บตัวอย่างดินทั้งหมด 7 แห่ง จาก 3 จังหวัด ได้แก่ NY1 NY2 NY3 และ NY4 จากจังหวัดนครนายกซึ่งเป็นจังหวัดหนึ่งในประเทศไทยที่มีแหล่งดินเปรี้ยวอยู่มาก โดยเลือกเก็บดินในอำเภอบ้านนาบริเวณตำบลอาษา บ้านพริก ทองหลางหมู่ที่ 2 และทองหลางหมู่ที่ 4 ตามลำดับ โดยให้เป็นดินชุดที่ 1 ซึ่งเป็นดินเปรี้ยวโดยธรรมชาติ

ตัวอย่างดินถัดมาคือ PJ เป็นตัวอย่างดินจากสวนผลไม้ที่เคยมีประวัติปนเปื้อนยาฆ่าแมลงมาก่อนในจังหวัดปราจีนบุรี และ RB1 RB2 เป็นตัวอย่างดินจากอุทยานธรรมชาติวิทยาอำเภอสวนผึ้ง จังหวัดราชบุรี ซึ่งดินบริเวณที่เก็บตัวอย่างมีความชุ่มชื้นและมีความอุดมสมบูรณ์สูง โดยให้เป็นดินชุดที่ 2

ลักษณะเนื้อดินจากทั้ง 7 แห่ง หลังจากแยกเศษหินออก และร่อนผ่านตะแกรงขนาดรู 1.18 มม. แล้วพบว่าดินชุดที่ 1 เนื้อดินมีสีน้ำตาลอ่อน และดินชุดที่ 2 เนื้อดินมีสีน้ำตาลเข้มซึ่งแสดงถึงปริมาณฮิวมัสที่สูงกว่าดินชุดแรก ดังแสดงในรูปที่ 4.1



รูปที่ 4.1 ลักษณะเนื้อดินทั้ง 7 ตัวอย่าง ที่ใช้ในการทดลอง

#### 4.1.2 การวิเคราะห์สมบัติทางฟิสิกส์และเคมีของดิน และการปนเปื้อนของพีแนนทริน

##### 4.1.2.1 การวิเคราะห์สมบัติทางฟิสิกส์และเคมีของดิน

จากการนำตัวอย่างดินทั้ง 7 แหล่ง ส่งตรวจที่กลุ่มงานพัฒนาระบบตรวจสอบคุณภาพดินและน้ำ กลุ่มวิจัยเกษตรเคมี สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการเกษตร กรมวิชาการเกษตร โดยใช้วิธีการวิเคราะห์สมบัติดังกล่าวตามวิธีที่แสดงในตารางที่ 3.2 นั้น ได้ผลการวิเคราะห์สมบัติทางฟิสิกส์และเคมีของดิน ดังแสดงไว้ในตารางที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 ผลการวิเคราะห์สมบัติทางฟิสิกส์และเคมีของดิน

พารามิเตอร์	ผลการวิเคราะห์สมบัติทางฟิสิกส์และเคมีของดิน						
	NY1	NY2	NY3	NY4	PJ	RB1	RB2
ความเป็นกรดต่าง	4.3	5.0	4.3	4.5	5.4	6.4	5.5
สภาพการนำไฟฟ้า (dS/m)	0.079	0.065	0.265	0.143	0.077	0.122	0.101
สารอินทรีย์ (%)	1.14	1.68	2.42	2.48	2.25	5.44	5.24
ปริมาณความชื้น (%)	1.11	0.81	1.94	3.52	1.01	2.04	2.25
ความสามารถในการแลกเปลี่ยนประจุหรือไอออน (Cmol kg <sup>-1</sup> )	4.8	4.3	9.0	14.0	5.3	11.8	8.4
ความจุสูงสุดในการอุ้มน้ำ (%)	41.41	32.04	53.66	59.54	34.87	43.94	41.60
อินทรีย์คาร์บอน (%)	0.661	0.974	1.404	1.438	1.305	3.155	3.039
ไนโตรเจน (%)	0.057	0.084	0.121	0.124	0.112	0.272	0.262
ฟอสฟอรัส (ppm)	6	35	56	24	78	27	30
โพแทสเซียม (ppm)	20	37	54	195	63	148	99
แคลเซียม (ppm)	391	405	1295	1519	597	1,515	1,147
แมกนีเซียม (ppm)	26	27	54	96	62	116	137
ลักษณะเนื้อดิน	Loam	Sandy Loam	Silty Clay Loam	Clay	Sandy Loam	Sandy Loam	Loamy Sand

#### 4.1.2.2 การวิเคราะห์การปนเปื้อนของพีแนทรีน

ตรวจสอบการปนเปื้อนของพีแนทรีนซึ่งเป็น PAH ที่ใช้ในการทดลองนี้ ในตัวอย่างดินทั้ง 7 แห่ง โดยใช้ *n*-hexane ในการสกัดด้วยตัวทำละลาย และวิเคราะห์สารที่สกัดได้โดยวิธีแก๊สโครมาโตกราฟีเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของพีแนทรีน (ภาคผนวก ค) พบว่า ตัวอย่างดินทั้งหมดไม่มีการปนเปื้อนพีแนทรีนมาก่อน โดยแสดงโครมาโตแกรมไว้ในภาคผนวก ค

#### 4.2 การตรวจนับจำนวนจุลินทรีย์เริ่มต้น

ตรวจนับจำนวนจุลินทรีย์เริ่มต้นในดินตัวอย่างโดยใช้วิธี Most Probable Number ทำการทดลองใน 96-well plate ที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB ภาวะเป็นกลาง (pH 7.0) และภาวะเป็นกรด (pH 4.0) โดยจำนวนจุลินทรีย์ที่ได้มีค่าดังแสดงในตารางที่ 4.2

ตารางที่ 4.2 จำนวนจุลินทรีย์เริ่มต้นในตัวอย่างดินที่ใช้ในการทดลอง

ตัวอย่างดิน	จำนวนจุลินทรีย์ (เซลล์/กรัมดิน)	
	LB ที่มี pH 7.0	LB ที่มี pH 4.0
<u>ดินชุดที่ 1</u>		
NY1	$4.90 \times 10^5$	$7.80 \times 10^1$
NY2	$1.30 \times 10^6$	$7.90 \times 10^2$
NY3	$4.60 \times 10^5$	$3.50 \times 10^3$
NY4	$7.90 \times 10^5$	$1.30 \times 10^3$
<u>ดินชุดที่ 2</u>		
PJ	$5.40 \times 10^6$	$2.40 \times 10^3$
RB1	$2.80 \times 10^6$	$3.30 \times 10^2$
RB2	$2.80 \times 10^6$	$7.90 \times 10^2$

จากตารางที่ 4.2 เมื่อพิจารณาจำนวนจุลินทรีย์ที่เจริญได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB ที่มี pH 7.0 พบว่าตัวอย่างดินชุดที่ 1 (pH 4.3 – 5.0) และตัวอย่างดินชุดที่ 2 (pH 5.4 – 6.4) มีจำนวนจุลินทรีย์ใกล้เคียงกัน ซึ่งอยู่ในช่วงประมาณ  $10^5 - 10^6$  เซลล์/กรัมดิน และเมื่อพิจารณาจำนวน

จุลินทรีย์ที่เจริญได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB ที่มี pH 4.0 พบว่าตัวอย่างดิน NY1 มีจำนวนจุลินทรีย์น้อยที่สุด คือ  $7.80 \times 10^1$  เซลล์/กรัมดิน ในขณะที่ตัวอย่างดินอื่นๆ ในดินชุดที่ 1 และดินชุดที่ 2 มีจำนวนจุลินทรีย์อยู่ในช่วง  $10^2 - 10^3$  เซลล์/กรัมดิน

เมื่อเปรียบเทียบจำนวนจุลินทรีย์ที่เจริญได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB ที่มี pH 4.0 กับจำนวนจุลินทรีย์ที่เจริญได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB ที่มี pH 7.0 ในตัวอย่างดินชนิดเดียวกัน พบว่าจำนวนจุลินทรีย์ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB ที่มี pH 4.0 อยู่ในช่วงประมาณ  $10^2 - 10^3$  เซลล์/กรัมดิน ซึ่งน้อยกว่าจำนวนจุลินทรีย์ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB ที่มี pH 7.0 ซึ่งอยู่ในช่วงประมาณ  $10^5 - 10^6$  เซลล์/กรัมดิน ถึง 1000 เท่า ในทุกตัวอย่างดินที่ใช้ในการทดลอง

#### 4.3 การสร้างระบบนิเวศจำลองดินที่มีภาวะเป็นกรดที่ทำให้ปนเปื้อนด้วยพีแนนทริน

สร้างระบบนิเวศจำลองดิน 2 ชุด คือ ระบบนิเวศจำลองดินชุดที่ 1 และระบบนิเวศจำลองดินชุดที่ 2 โดย

ระบบนิเวศจำลองดินชุดที่ 1 ประกอบด้วย ระบบนิเวศจำลองที่เติมพีแนนทรินเป็นแหล่งคาร์บอน และระบบนิเวศจำลองที่เติมพีแนนทรินร่วมกับสารอาหารอื่น

ระบบนิเวศจำลองดินชุดที่ 2 ประกอบด้วย ระบบนิเวศจำลองที่เติมพีแนนทรินเป็นแหล่งคาร์บอน และระบบนิเวศจำลองที่เติมพีแนนทรินร่วมกับสารอาหารอื่น

##### 4.3.1 การสร้างระบบนิเวศจำลองดินชุดที่ 1

###### 4.3.1.1 การสร้างระบบนิเวศจำลองดินชุดที่ 1 ที่เติมพีแนนทรินเป็นแหล่งคาร์บอน

จากการสร้างระบบนิเวศจำลองดิน โดยใช้ดิน NY1 NY2 NY3 และ NY4 ปริมาณ 250 กรัม เติมสารละลายพีแนนทรินในอะซิโตนให้มีความเข้มข้นสุดท้ายในดินเป็น 300 ppm และเติมอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM ได้ระบบนิเวศจำลองมีลักษณะดังรูปที่ 4.2



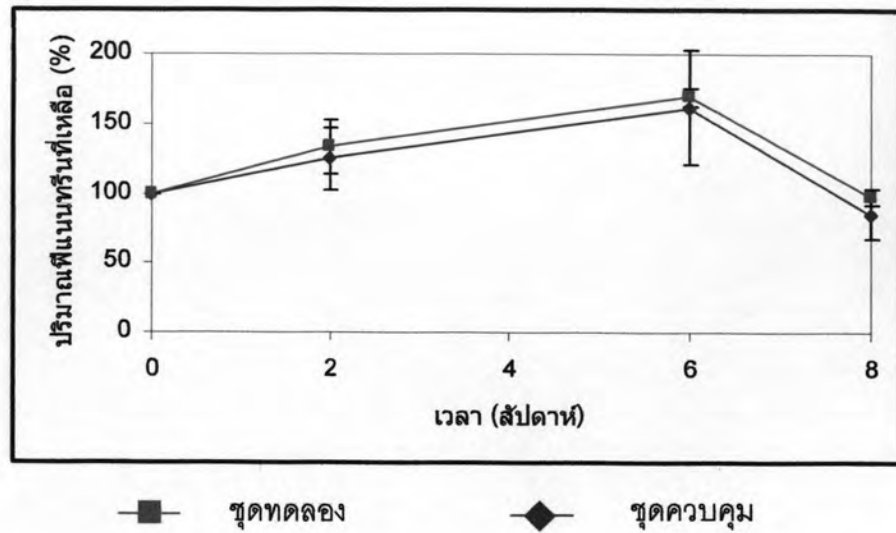
รูปที่ 4.2 ลักษณะระบบนิเวศจำลองดินชุดที่ 1 ที่เติมพีแนทรีนเป็นแหล่งคาร์บอน

หลังจากสร้างระบบนิเวศจำลองแล้ว วิเคราะห์ปริมาณพีแนทรีนที่เหลืออยู่ในระบบนิเวศจำลอง ติดตามการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างประชาคมแบคทีเรียโดยวิธี DGGE และแยกและจำแนกชนิดแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายพีแนทรีนได้ในภาวะกรด

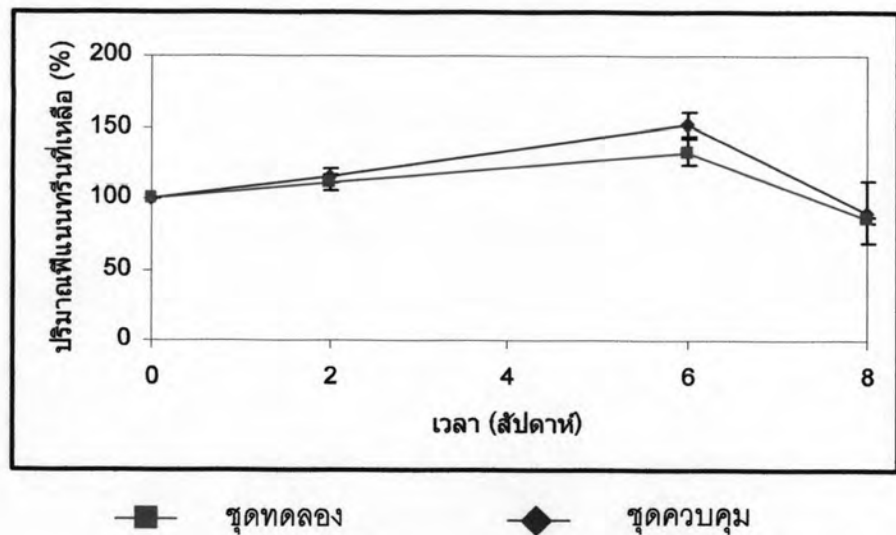
นอกจากนี้ยังตรวจสอบส่วนของยีนไดออกซิจีเนส บริเวณ Rieske ในตัวอย่างดินก่อนการสร้างระบบนิเวศจำลองดิน

#### 4.3.1.1.1 การวิเคราะห์ปริมาณพีแนทรีนที่เหลืออยู่ในระบบนิเวศจำลองดินชุดที่ 1 ที่เติมพีแนทรีนเป็นแหล่งคาร์บอน

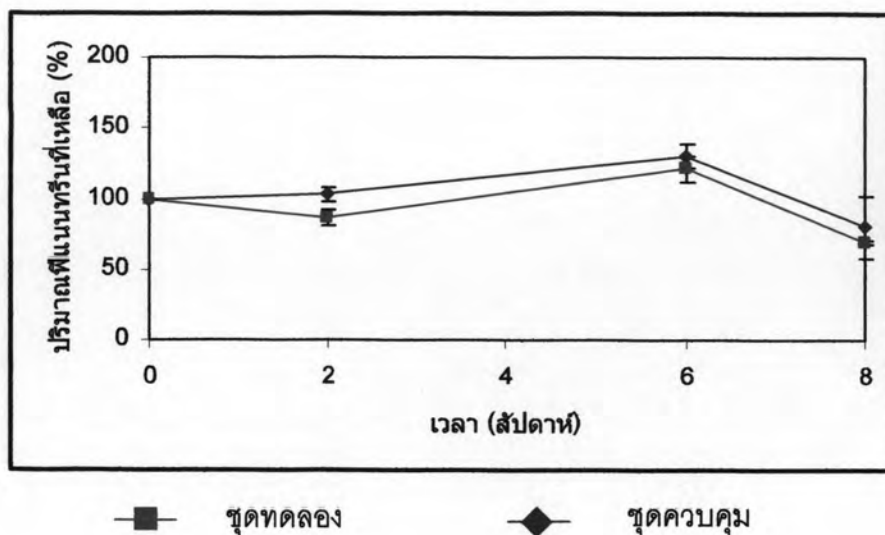
หลังจากทดลองเป็นเวลา 8 สัปดาห์ พบว่าปริมาณพีแนทรีนในชุดทดลองของดินทั้ง 4 ตัวอย่าง ไม่ลดลงเมื่อเทียบกับชุดควบคุม ซึ่งแสดงว่าจุลินทรีย์ไม่สามารถย่อยสลายพีแนทรีนภายใต้ภาวะและระยะเวลาในการทดลองนี้ ปริมาณพีแนทรีนที่เหลือในทั้ง 4 การทดลองได้แสดงไว้ในรูปที่ 4.3.1 – 4.3.4



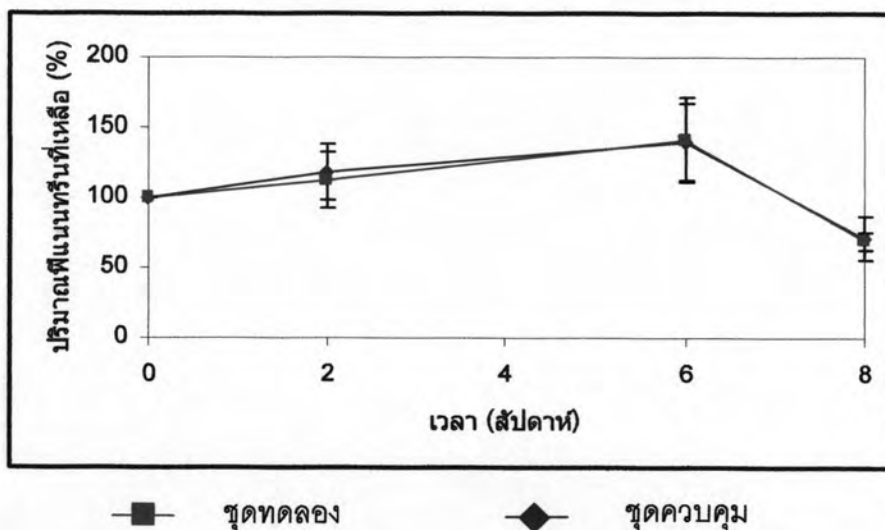
รูปที่ 4.3.1 การย่อยสลายพีแนทรีน 300 ppm ในระบบนิเวศจำลองดิน NY1 ขนาด 250 กรัม ที่เติมพีแนทรีนเป็นแหล่งคาร์บอน เป็นเวลา 8 สัปดาห์



รูปที่ 4.3.2 การย่อยสลายพีแนทรีน 300 ppm ในระบบนิเวศจำลองดิน NY2 ขนาด 250 กรัม ที่เติมพีแนทรีนเป็นแหล่งคาร์บอน เป็นเวลา 8 สัปดาห์



รูปที่ 4.3.3 การย่อยสลายพีแนทรีน 300 ppm ในระบบนิเวศจำลองดิน NY3 ขนาด 250 กรัม ที่เติมพีแนทรีนเป็นแหล่งคาร์บอน เป็นเวลา 8 สัปดาห์



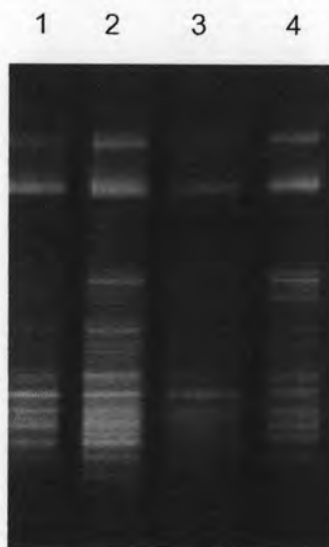
รูปที่ 4.3.4 การย่อยสลายพีแนทรีน 300 ppm ในระบบนิเวศจำลองดิน NY4 ขนาด 250 กรัม ที่เติมพีแนทรีนเป็นแหล่งคาร์บอน เป็นเวลา 8 สัปดาห์



#### 4.3.1.1.2 การติดตามการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างประชาคมแบคทีเรียโดยวิธี DGGE ในระบบนิเวศจำลองดินชุดที่ 1 ที่เติมพีแนทรีนเป็นแหล่งคาร์บอน

จากผลการสกัดดีเอ็นเอพบว่าไม่สามารถสกัดดีเอ็นเอจากระบบนิเวศจำลองได้ แต่สามารถสกัดดีเอ็นเอได้จากดินก่อนสร้างระบบนิเวศจำลอง โดยหลังจากสกัดดีเอ็นเอแล้ว นำไปเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอบริเวณ V-3 region ของ 16S rDNA ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส ได้ผลิตภัณฑ์ขนาดประมาณ 200 bp

หลังจากนั้นวิเคราะห์โครงสร้างประชาคมแบคทีเรียจากตัวอย่างดินทั้ง 4 แหล่ง ด้วยเทคนิค DGGE โดยใช้เกรเดียนท์ของความเข้มข้น denaturant 20 – 70% พบว่าในดินทั้ง 4 แหล่ง มีความแตกต่างของโครงสร้างประชาคมแบคทีเรีย ซึ่งตัวอย่างดิน NY2 มีความเข้มข้นของแถบดีเอ็นเอมากที่สุด รองลงมาคือ NY1 NY4 และ NY3 ตามลำดับ โดยโครงสร้างประชาคมแบคทีเรียแสดงไว้ในรูปที่ 4.4

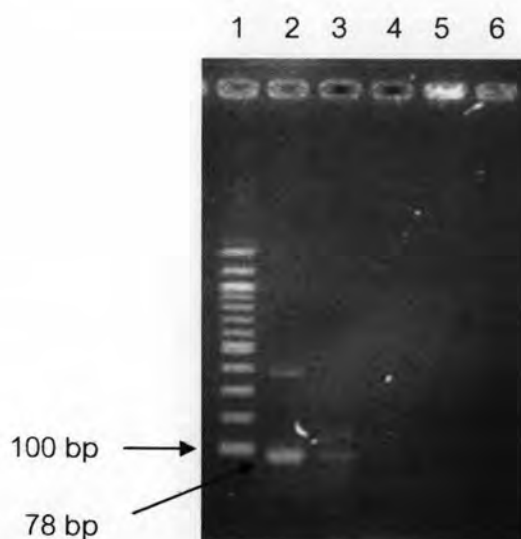


รูปที่ 4.4 โครงสร้างประชาคมแบคทีเรียบริเวณ V-3 region ของ 16S rDNA โดยวิธี DGGE ของตัวอย่างดินชุดที่ 1 ช่องวิ่งที่1: จากตัวอย่างดิน NY1 ช่องวิ่งที่2: จากตัวอย่างดิน NY2 ช่องวิ่งที่3: จากตัวอย่างดิน NY3 ช่องวิ่งที่4: จากตัวอย่างดิน NY4



#### 4.3.1.1.3 การตรวจหาส่วนของยีนไดออกซิจีเนสในระบบนิเวศจำลอง ดินชุดที่ 1 ที่เติมพีแนนทรินเป็นแหล่งคาร์บอน

จากการเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอบริเวณ Rieseke ของยีนไดออกซิจีเนสซึ่งเป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลาย PAHs ด้วยปฏิกิริยาออกซิเดชัน โดยการปรากฏของส่วนของยีนนี้แสดงถึงแนวโน้มที่จุลินทรีย์สามารถย่อยสลาย PAHs ได้ และตรวจสอบผลิตภัณฑ์ที่ได้โดยการหยอดดีเอ็นเอกับสีติดตามลงในช่องวุ้นของ 2% อะกาโรสเจล เปรียบเทียบกับผลิตภัณฑ์ PCR ที่ใช้ดีเอ็นเอของ *Alteromonas macleodii* BP-PH (Fuse และคณะ, 2003) เป็นดีเอ็นเอแม่แบบ และทำอีเลคโตรโฟรีซิสโดยมี 100 bp DNA ladder เป็นดีเอ็นเอมาตรฐานนั้น พบผลิตภัณฑ์ PCR ขนาด 78 bp ซึ่งคาดว่าเป็นส่วน Rieseke ของยีนไดออกซิจีเนสจากตัวอย่างดิน NY4 เป็นแถบจางกว่า positive control ในขณะที่ตัวอย่างดิน NY1 NY2 และ NY3 ไม่พบผลิตภัณฑ์ PCR ดังกล่าว โดยแสดงไว้ในรูปที่ 4.5



รูปที่ 4.5 ขนาดชิ้นผลิตภัณฑ์ PCR บริเวณ Rieseke ของยีนไดออกซิจีเนส ช่องวุ้นที่1: 100 bp DNA ladder ช่องวุ้นที่2: positive control (ใช้ดีเอ็นเอจาก *Alteromonas macleodii* BP-PH (Fuse และคณะ, 2003) เป็นดีเอ็นเอแม่แบบ) ช่องวุ้นที่3: จากตัวอย่างดิน NY4 ช่องวุ้นที่4: จากตัวอย่างดิน NY3 ช่องวุ้นที่5: จากตัวอย่างดิน NY2 ช่องวุ้นที่6: จากตัวอย่างดิน NY1

#### 4.3.1.1.4 การแยกและจำแนกชนิดแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลาย พีแนนทรินได้ในภาวะกรดในระบบนิเวศจำลองดินชุดที่ 1 ที่เติมพีแนนทรินเป็นแหล่งคาร์บอน

จากการแยกชนิดแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายพีแนนทรินได้ในภาวะกรด โดยเลี้ยงบนอาหารแข็ง CFMM ที่มี pH 4.0 แล้วพ่นทับด้วย 2% สารละลายพีแนนทรินใน ไดเอทิลอีเทอร์ และนำไปปรมที่ 30°C ผลปรากฏว่าไม่พบแบคทีเรียที่สามารถเจริญและสร้าง บริเวณใสรอบโคโลนี

#### 4.3.1.2 การสร้างระบบนิเวศจำลองดินชุดที่ 1 ที่เติมพีแนนทรินร่วมกับ สารอาหารอื่น

สร้างระบบนิเวศจำลองดิน โดยเลือกดิน NY1 ซึ่งมีปริมาณอินทรีย์คาร์บอน และไนโตรเจนต่ำที่สุดในชุดดินนี้และต่ำที่สุดในงานวิจัยนี้มาใช้ในการทดลอง โดยใช้ดินปริมาณ 6 กรัม สร้างระบบนิเวศจำลอง เติมพีแนนทรินในอะซิโตนให้มีความเข้มข้นสุดท้ายในดินเป็น 300 ppm และเติมอาหารเหลว basal salt (ภาคผนวก ก) หลังจากนั้นแบ่งการทดลองออกเป็น 3 การทดลองย่อย โดยเติมสารอาหารอื่น ดังนี้ คือ

1. เติมสารสกัดจากยีสต์ความเข้มข้นสุดท้ายในดิน 200 ppm
2. เติมเปลือกถั่วปริมาณ 0.36 กรัม (6% ของน้ำหนักดินที่ใช้เตรียมระบบนิเวศจำลอง) โดยเปลือกถั่วที่นำมาใช้ผ่านการปั่นด้วยเครื่องปั่นน้ำผลไม้ ร่อนผ่านตะแกรงขนาดรู 0.84 มม. และนึ่งฆ่าเชื้อที่ 121°C 30 นาที 3 ครั้ง โดยระหว่างฆ่าเชื้อแต่ละครั้ง ตั้งทิ้งไว้ 1 วัน จึงฆ่าเชื้อครั้งต่อไป ลักษณะของเปลือกถั่วที่เติมลงในระบบนิเวศจำลองมีลักษณะดังรูปที่ 4.6



รูปที่ 4.6 ลักษณะเปลือกถั่วที่เติมลงในระบบนิเวศจำลอง

3. เติมสารสกัดจากยีสต์ร่วมกับเปลือกถั่วความเข้มข้นและปริมาณเช่นเดียวกับใน ข้อ 1 และ 2

โดยลักษณะระบบนิเวศจำลองมีลักษณะดังรูปที่ 4.7

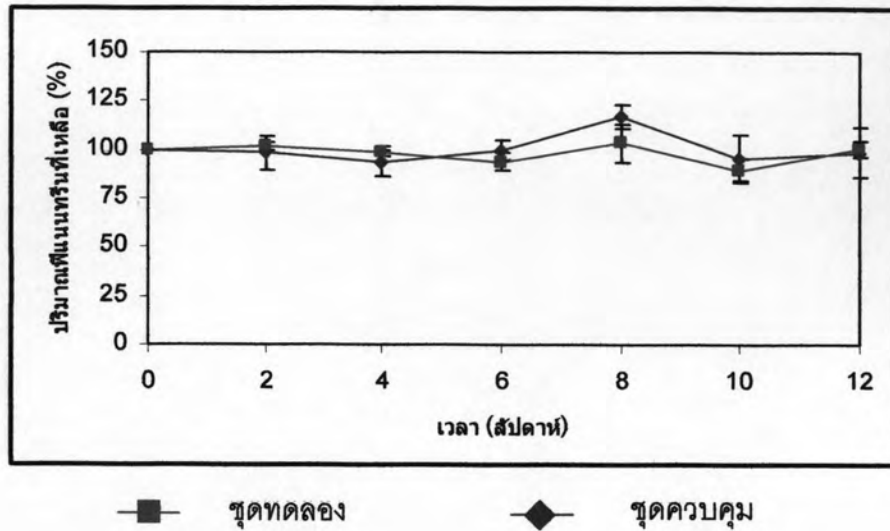


รูปที่ 4.7 ลักษณะระบบนิเวศจำลองดิน NY1 ที่เติมพีแนนทรีนร่วมกับสารอาหารอื่น

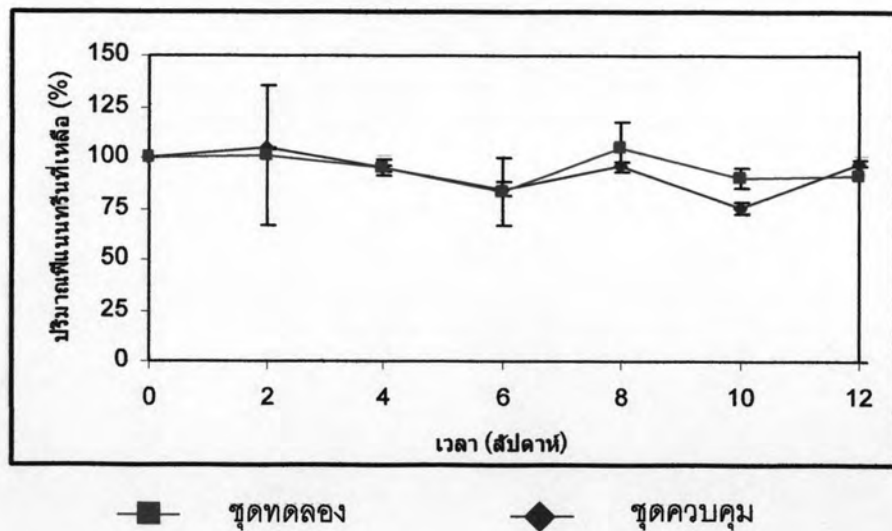
หลังจากสร้างระบบนิเวศจำลองแล้ว วิเคราะห์ปริมาณพีแนนทรีนที่เหลืออยู่ในระบบนิเวศจำลอง ตรวจนับจำนวนจุลินทรีย์ที่เจริญได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB ที่มี pH 4.0 และตรวจนับจำนวนจุลินทรีย์ที่เจริญได้ในภาวะกรดโดยใช้พีแนนทรีนเป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงาน ทุกๆ 2 สัปดาห์ เป็นเวลา 12 สัปดาห์

#### 4.3.1.2.1 การวิเคราะห์ปริมาณพีแนนทรีนที่เหลืออยู่ในระบบนิเวศจำลองดินชุดที่ 1 ที่เติมพีแนนทรีนร่วมกับสารอาหารอื่น

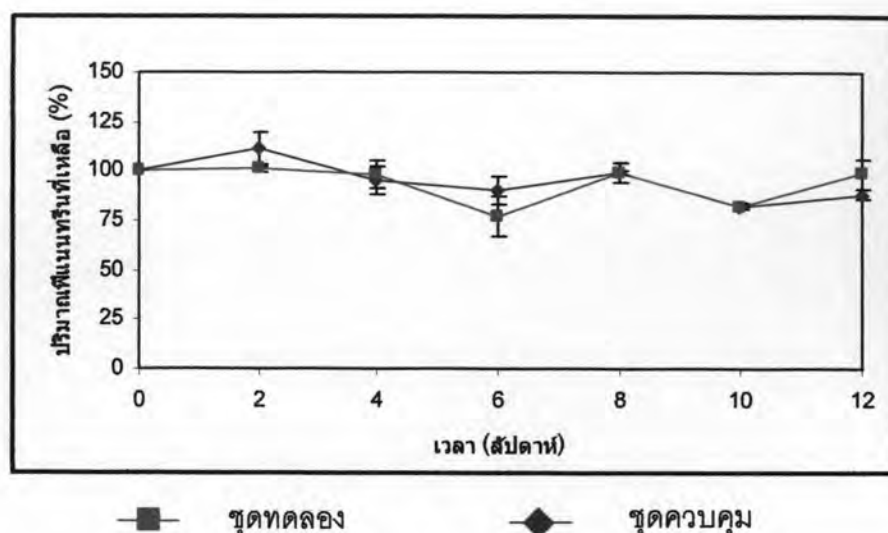
หลังจากทดลองเป็นเวลา 12 สัปดาห์ พบว่าปริมาณพีแนนทรีนในชุดทดลองของดิน NY1 ทั้ง 3 การทดลอง ไม่ลดลงเมื่อเทียบกับชุดควบคุม ซึ่งแสดงว่าจุลินทรีย์ไม่สามารถย่อยสลายพีแนนทรีนภายใต้ภาวะและระยะเวลาในการทำการทดลองนี้ โดยปริมาณพีแนนทรีนที่เหลือในทั้ง 3 การทดลอง ได้แสดงไว้ในรูปที่ 4.8.1 – 4.8.3



รูปที่ 4.8.1 การย่อยสลายพีแนทรีน 300 ppm ในระบบนิเวศจำลองดิน NY1 ขนาด 6 กรัม ที่เติมพีแนทรีนร่วมกับสารสกัดจากยีสต์ความเข้มข้นสุดท้ายในดิน 200 ppm เป็นเวลา 12 สัปดาห์



รูปที่ 4.8.2 การย่อยสลายพีแนทรีน 300 ppm ในระบบนิเวศจำลองดิน NY1 ขนาด 6 กรัม ที่เติมพีแนทรีนร่วมกับเปลือกถั่วปริมาณ 0.36 กรัม เป็นเวลา 12 สัปดาห์



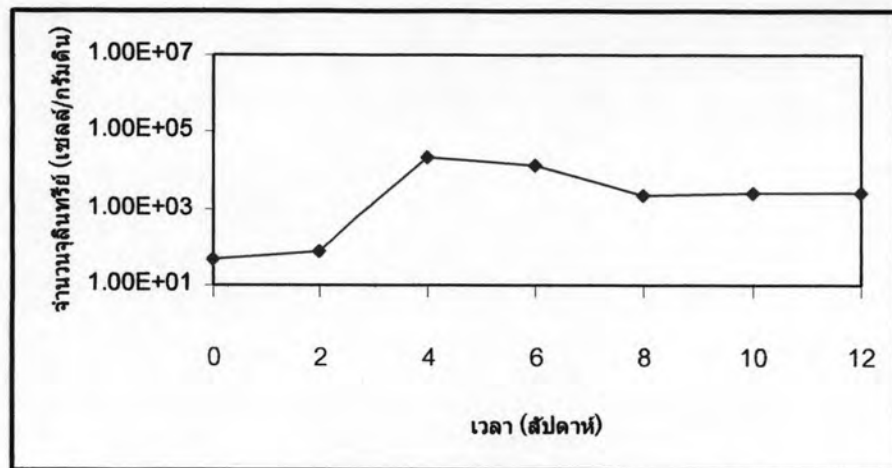
รูปที่ 4.8.3 การย่อยสลายพีแนทรีน 300 ppm ในระบบนิเวศจำลองดิน NY1 ขนาด 6 กรัม ที่เติมพีแนทรีนร่วมกับสารสกัดจากยีสต์ความเข้มข้นสุดท้ายในดิน 200 ppm และเปลือกถั่วปริมาณ 0.36 กรัม เป็นเวลา 12 สัปดาห์

#### 4.3.1.2.2 การตรวจนับจำนวนจุลินทรีย์โดยวิธี Most Probable Number (MPN) ในระบบนิเวศจำลองดินชุดที่ 1 ที่เติมพีแนทรีนร่วมกับสารอาหารอื่น

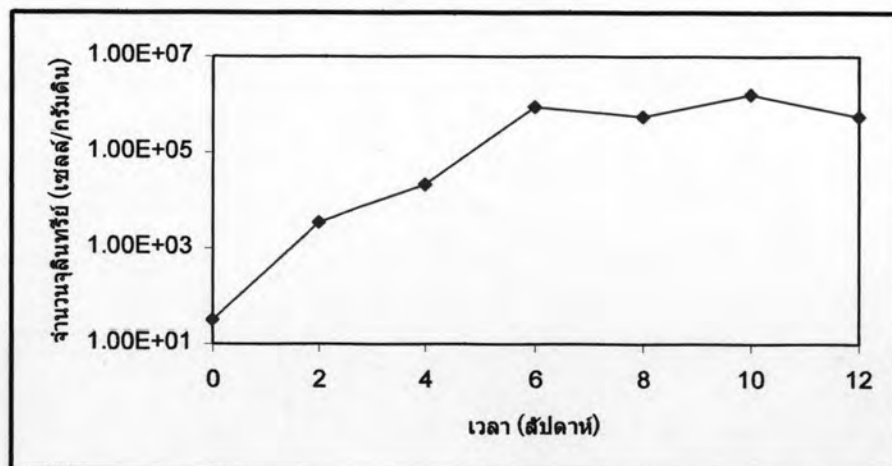
##### 4.3.1.2.2.1 การตรวจนับจำนวนจุลินทรีย์ที่เจริญได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB ที่มี pH 4.0 ในระบบนิเวศจำลองดินชุดที่ 1 ที่เติมพีแนทรีนร่วมกับสารอาหารอื่น

จากการตรวจนับจำนวนจุลินทรีย์ด้วยวิธี MPN โดยทดลองใน 96-well plate ซึ่งมีอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB ที่มี pH 4.0 นั้น พบว่าจุลินทรีย์ในการทดลองที่เติมเปลือกถั่วมีการเจริญมากที่สุด โดยจุลินทรีย์เพิ่มขึ้นตั้งแต่เริ่มต้นการทดลอง และเพิ่มปริมาณมากที่สุดในสัปดาห์ที่ 6 หลังจากนั้นปริมาณจุลินทรีย์คงที่ ส่วนในการทดลองที่เติมสารสกัดจากยีสต์ จุลินทรีย์เพิ่มปริมาณสูงที่สุดในสัปดาห์ที่ 4 ลดลงเล็กน้อยจนถึงสัปดาห์ที่ 8 และคงที่จนสิ้นสุดการทดลอง และการทดลองที่เติมสารสกัดจากยีสต์ร่วมกับเปลือกถั่ว พบว่าจุลินทรีย์เพิ่มปริมาณตั้งแต่เริ่มต้นการทดลองเช่นเดียวกับที่เติมเปลือกถั่วเพียงอย่างเดียว จนถึงสัปดาห์ที่ 4 ปริมาณจุลินทรีย์ลดลงจนใกล้เคียงเมื่อเริ่มต้นทำการทดลอง และเพิ่มขึ้นอีกครั้งจนถึงสัปดาห์ที่ 10 จึงลดปริมาณลง

เล็กน้อย นอกจากนี้พบว่าเมื่อสิ้นสุดการทดลอง ปริมาณจุลินทรีย์ในการทดลองที่เติมสารสกัดจากยีสต์มีปริมาณน้อยที่สุด ( $2.4 \times 10^3$  เซลล์/กรัมดิน) ในการทดลองที่เติมสารสกัดจากยีสต์ร่วมกับเปลือกถั่วมีปริมาณจุลินทรีย์เป็นอันดับสอง ( $5.4 \times 10^4$  เซลล์/กรัมดิน) และในการทดลองที่เติมเปลือกถั่วเพียงอย่างเดียวมีปริมาณจุลินทรีย์สูงที่สุด ( $5.4 \times 10^5$  เซลล์/กรัมดิน) โดยผลการทดลองแสดงไว้ในรูปที่ 4.9.1 – 4.9.3

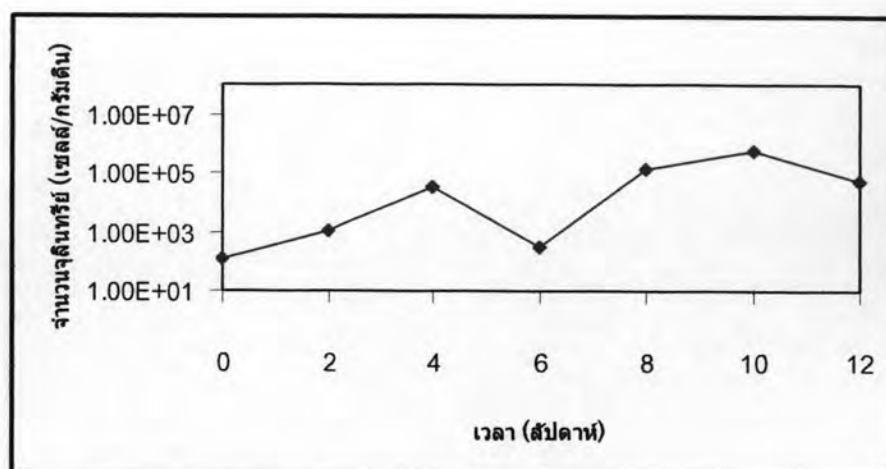


รูปที่ 4.9.1 จำนวนจุลินทรีย์ในระบบนิเวศจำลองดิน NY1 ขนาด 6 กรัม ที่เติมพีแนนทรีน 300 ppm ร่วมกับสารสกัดจากยีสต์ความเข้มข้นสุดท้ายในดิน 200 ppm



รูปที่ 4.9.2 จำนวนจุลินทรีย์ในระบบนิเวศจำลองดิน NY1 ขนาด 6 กรัม ที่เติมพีแนนทรีน 300 ppm ร่วมกับเปลือกถั่วปริมาณ 0.36 กรัม เป็นเวลา 12 สัปดาห์





รูปที่ 4.9.3 จำนวนจุลินทรีย์ในระบบนิเวศจำลองดิน NY1 ขนาด 6 กรัม ที่เติมพีแนนทริน 300 ppm ร่วมกับสารสกัดจากยีสต์ความเข้มข้นสุดท้ายในดิน 200 ppm และเปลือกถั่ว ปริมาณ 0.36 กรัม เป็นเวลา 12 สัปดาห์

#### 4.3.1.2.2.2 การตรวจนับจำนวนจุลินทรีย์ที่เจริญได้โดยใช้พีแนนทริน เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงานในระบบนิเวศจำลอง ดินชุดที่ 1 ที่เติมพีแนนทรินร่วมกับสารอาหารอื่น

จากการตรวจนับจำนวนจุลินทรีย์โดยวิธี MPN ซึ่งทำการทดลองใน 96-well plate ที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว basal salt ความเป็นกรดต่าง 4.0 และพีแนนทรินความเข้มข้นสุดท้าย 200 ppm นั้น พบว่าไม่มีจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายพีแนนทรินในทั้ง 3 การทดลอง

#### 4.3.2 การสร้างระบบนิเวศจำลองดินชุดที่ 2

จากผลการทดลองของระบบนิเวศจำลองดินชุดที่ 1 ซึ่งไม่พบการย่อยสลายพีแนนทรินทั้งการทดลองที่เติมพีแนนทรินเป็นแหล่งคาร์บอน และที่เติมพีแนนทรินร่วมกับสารอาหารอื่น ชนิดของดินชุดที่ 1 จึงอาจไม่เหมาะสมในการสร้างระบบนิเวศจำลอง รวมถึงปริมาณสารอาหารที่เติมอาจยังไม่เหมาะสมที่จะช่วยปรับปรุงดินให้มีคุณภาพดีเพียงพอที่จุลินทรีย์จะดำรงชีวิตและย่อยสลายพีแนนทรินได้ นอกจากนี้จุลินทรีย์ประจำถิ่นในดินชุดที่ 1 ถึงแม้จะมีปริมาณเพิ่มขึ้นเมื่อมีการเติมสารอาหารอื่นร่วมกับพีแนนทริน แต่อาจไม่สามารถย่อยสลายหรือพัฒนาให้สามารถย่อยสลายพีแนนทรินในภาวะกรดได้ จึงทดลองใช้ดินชุดที่ 2 ซึ่งได้แก่ PJ RB1 และ RB2 มาสร้างระบบนิเวศจำลองดิน



#### 4.3.2.1 การสร้างระบบนิเวศจำลองดินชุดที่ 2 ที่เติมพีแนนทรินร่วมกับ สารสกัดจากยีสต์ความเข้มข้นสุดท้ายในดิน 200 ppm

สร้างระบบนิเวศจำลองดินโดยใช้ดิน PJ RB1 และ RB2 ปริมาณ 6 กรัม เติม พีแนนทรินในอะซิโตนให้มีความเข้มข้นสุดท้ายในดินเป็น 300 ppm เติมอาหารเหลว basal salt และเลือกเติมสารสกัดจากยีสต์ความเข้มข้นสุดท้ายในดินเป็น 200 ppm เนื่องจากเป็นแหล่ง สารอาหารที่จุลินทรีย์นำไปใช้ในการเจริญได้โดยง่าย โดยลักษณะระบบนิเวศจำลองมีลักษณะ ดังรูปที่ 4.10



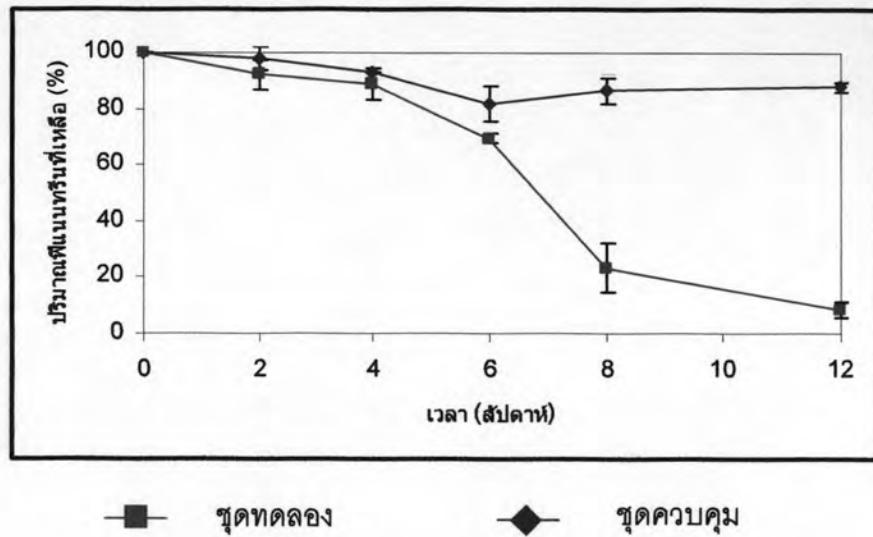
รูปที่ 4.10 ลักษณะระบบนิเวศจำลองดินชุดที่ 2 ที่เติมพีแนนทรินร่วมกับสารสกัดจากยีสต์

หลังจากสร้างระบบนิเวศจำลองแล้ว วิเคราะห์ปริมาณพีแนนทรินที่เหลืออยู่ใน ระบบนิเวศจำลอง ติดตามการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างประชาคมจุลินทรีย์โดยวิธี DGGE และแยก และจำแนกชนิดแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายพีแนนทรินได้ในภาวะกรด

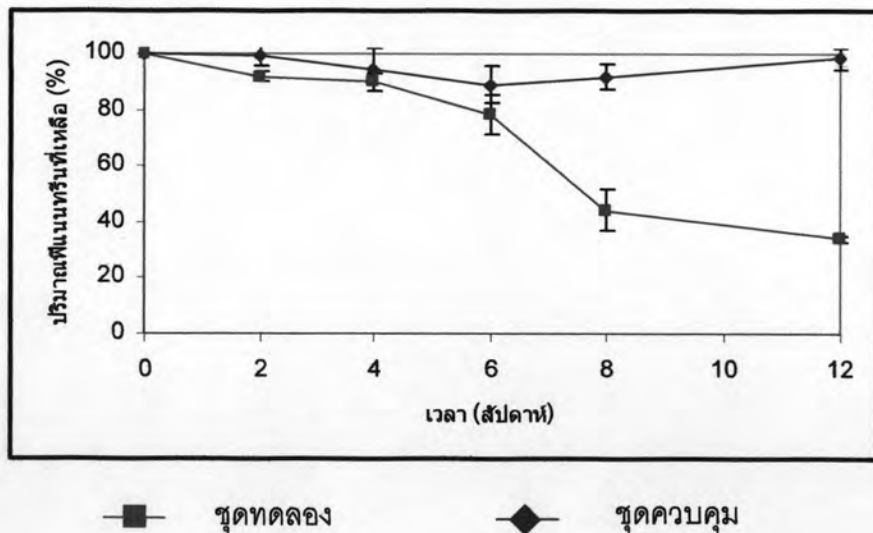
##### 4.3.2.1.1 การวิเคราะห์ปริมาณพีแนนทรินที่เหลืออยู่ในระบบนิเวศ จำลองดินชุดที่ 2 ที่เติมพีแนนทรินร่วมกับสารสกัดจากยีสต์ ความเข้มข้นสุดท้ายในดิน 200 ppm

ผลการทดลองพบว่าปริมาณพีแนนทรินในชุดทดลองของระบบนิเวศจำลอง ดิน PJ RB1 และ RB2 เริ่มลดลงตั้งแต่สัปดาห์ที่ 6 และลดลงอย่างรวดเร็วจนถึงสัปดาห์ที่ 8 หลังจากนั้นพีแนนทรินลดลงอีกเพียงเล็กน้อยจนถึงสัปดาห์ที่ 12 ที่ทำการทดลอง ในขณะที่ในชุด ควบคุม พีแนนทรินลดลงเพียงเล็กน้อยเท่านั้น โดยเมื่อสิ้นสุดการทดลอง ระบบนิเวศจำลองดิน PJ

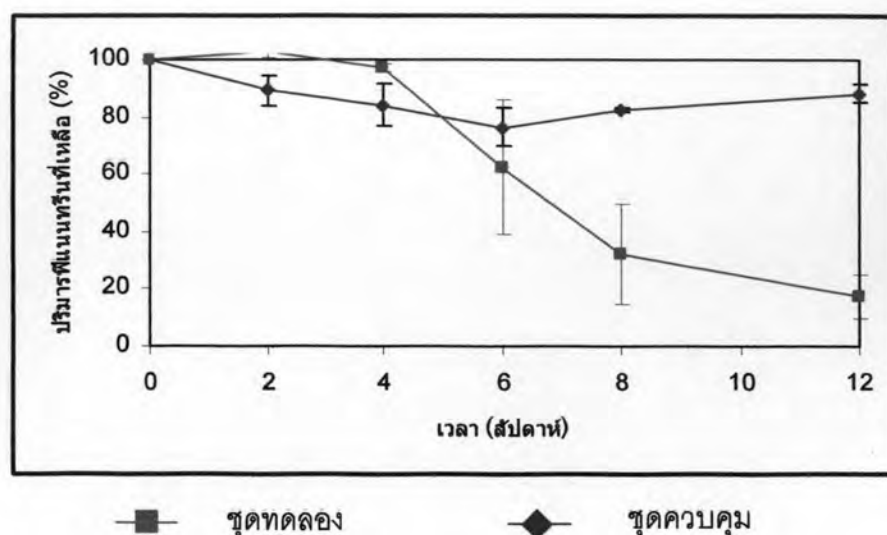
มีการลดลงของพีแนทรีนมากที่สุด (ปริมาณพีแนทรีนที่เหลือ = 8.39%) รองลงมาคือ RB2 (ปริมาณพีแนทรีนที่เหลือ = 17.55%) และ RB1 (ปริมาณพีแนทรีนที่เหลือ = 34.09%) ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 4.11.1 – 4.11.3



รูปที่ 4.11.1 การย่อยสลายพีแนทรีน 300 ppm ในระบบนิเวศจำลองดิน PJ ขนาด 6 กรัม ที่เติมพีแนทรีนร่วมกับสารสกัดจากยีสต์ความเข้มข้นสุดท้ายในดิน 200 ppm เป็นเวลา 12 สัปดาห์



รูปที่ 4.11.2 การย่อยสลายพีแนทรีน 300 ppm ในระบบนิเวศจำลองดิน RB1 ขนาด 6 กรัม ที่เติมพีแนทรีนร่วมกับสารสกัดจากยีสต์ความเข้มข้นสุดท้ายในดิน 200 ppm เป็นเวลา 12 สัปดาห์



รูปที่ 4.11.3 การย่อยสลายพีแนทรีน 300 ppm ในระบบนิเวศจำลองดิน RB2 ขนาด 6 กรัม ที่เติมพีแนทรีนร่วมกับสารสกัดจากยีสต์ความเข้มข้นสุดท้ายในดิน 200 ppm เป็นเวลา 12 สัปดาห์

#### 4.3.2.1.2 การติดตามการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างประชาคมจุลินทรีย์โดยวิธี DGGE ในระบบนิเวศจำลองดินชุดที่ 2 ที่เติมพีแนทรีนร่วมกับสารสกัดจากยีสต์ความเข้มข้นสุดท้ายในดิน 200 ppm

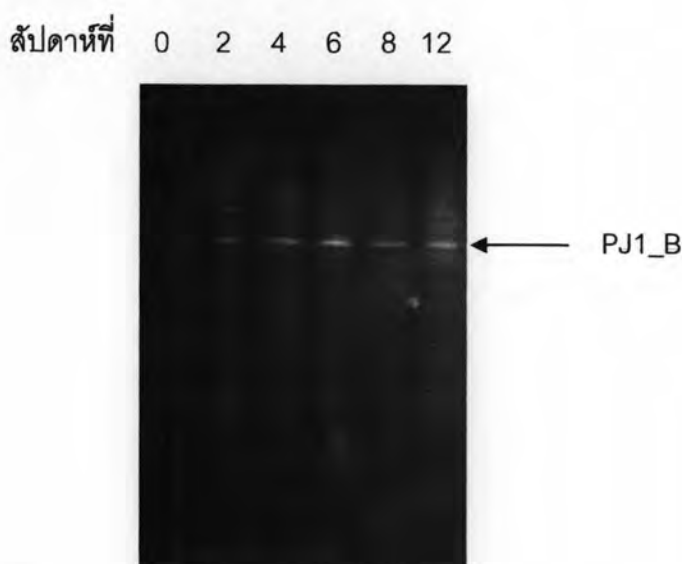
การติดตามการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างประชาคมจุลินทรีย์ในระบบนิเวศจำลองดิน เริ่มจากการสกัดดีเอ็นเอจากดินปริมาณเท่ากัน และเพิ่มขึ้นส่วนดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยา ลูกโซ่พอลิเมอเรส แล้วนำไปวิเคราะห์ DGGE ซึ่งได้ผลการทดลองดังนี้

##### 4.3.2.1.2.1 การติดตามการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างประชาคมแบคทีเรียในระบบนิเวศจำลองดินชุดที่ 2 ที่เติมพีแนทรีนร่วมกับสารสกัดจากยีสต์ความเข้มข้นสุดท้ายในดิน 200 ppm

ผลการเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอบริเวณ V-3 region ของ 16S rDNA ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสและนำผลิตภัณฑ์ที่ได้มาทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส พบว่าความเข้มของผลิตภัณฑ์ PCR ในแต่ละช่วงเวลาของการทดลองมีความใกล้เคียงกัน และเมื่อนำมาวิเคราะห์โดยเทคนิค DGGE ในพอลิอะคริลาไมด์เจลที่มี 20 – 70% denaturant พบว่าในดินทั้ง 3 ชนิด มีโครงสร้างประชาคมแบคทีเรียแตกต่างกัน โดยมีความหลากหลายของแถบดีเอ็นเอใน

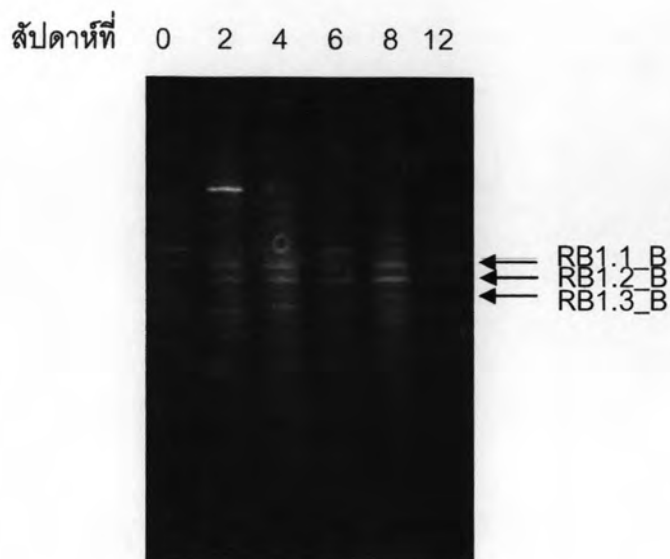
โปรไฟล์ของ DGGE น้อย และไม่มีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างประชาคมแบคทีเรียมากนัก แถบดีเอ็นเอเมื่อเริ่มต้นการทดลองจางมาก แต่ตั้งแต่สัปดาห์ที่ 2 เป็นต้นไป พบว่ามีแถบดีเอ็นเอเด่นเกิดขึ้นและคงอยู่จนถึงสิ้นสุดการทดลอง ดังรูปที่ 4.12.1 – 4.12.3

ในระบบนิเวศจำลองดิน PJ เมื่อเริ่มต้นการทดลองพบว่าแถบดีเอ็นเอจางมาก แต่ยังสามารถพบแถบดีเอ็นเอ PJ1\_B เป็นแถบดีเอ็นเอหลัก ในสัปดาห์ที่ 2 มีแถบดีเอ็นเอเด่นเพิ่มขึ้นอีก 4 แถบ แต่ยังคงจางกว่าแถบดีเอ็นเอ PJ1\_B โดยในสัปดาห์ถัดมาแถบดีเอ็นเอดังกล่าวเริ่มจางลงและหายไป ในขณะที่แถบดีเอ็นเอ PJ1\_B มีความเข้มมากที่สุด ในสัปดาห์ที่ 6 และคงอยู่จนถึงสิ้นสุดการทดลอง ดังแสดงในรูปที่ 4.12.1



รูปที่ 4.12.1 การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างประชาคมแบคทีเรียบริเวณ V-3 region ของ 16S rDNA โดยวิธี DGGE ในพอลิอะคริลาไมด์เจลที่มี 20 – 70% denaturant ของระบบนิเวศจำลองดิน PJ; PJ1\_B คือ แถบดีเอ็นเอเด่นแถบที่ 1

ในระบบนิเวศจำลองดิน RB1 เมื่อเริ่มต้นการทดลองพบว่ามีแถบดีเอ็นเอหลัก 2 แถบ สัปดาห์ที่ 2 มีการเปลี่ยนแปลงประชาคมแบคทีเรียอย่างชัดเจน โดยมีความหลากหลายของแถบดีเอ็นเอมากขึ้น พบแถบดีเอ็นเอเด่นประมาณ 5 แถบ มีแถบดีเอ็นเอที่เข้มที่สุดอยู่ด้านบนของเจล แต่หลังจากสัปดาห์ที่ 4 แถบดีเอ็นเอดังกล่าวหายไป และพบว่ามีแถบดีเอ็นเอ 3 แถบ ที่ยังคงอยู่จนถึงสัปดาห์ที่ 8 ได้แก่แถบดีเอ็นเอ RB1.1\_B RB1.2\_B และ RB1.3\_B และในสัปดาห์ที่ 12 พบเพียงแถบดีเอ็นเอ RB1.1\_B และ RB1.2\_B ซึ่งเป็นแถบจางมาก ดังแสดงในรูปที่ 4.12.2



รูปที่ 4.12.2 การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างประชาคมแบคทีเรียบริเวณ V-3 region ของ 16S rDNA โดยวิธี DGGE ในพอลิอะคริลาไมด์เจลที่มี 20 – 70% denaturant ของระบบนิเวศจำลองดิน RB1; RB1.1\_B คือ แถบดีเอ็นเอเด่นแถบที่ 1; RB1.2\_B คือ แถบดีเอ็นเอเด่นแถบที่ 2; RB1.3\_B คือ แถบดีเอ็นเอเด่นแถบที่ 3

ในระบบนิเวศจำลองดิน RB2 เมื่อเริ่มต้นการทดลองมีแถบดีเอ็นเอหลัก 1 แถบเท่านั้น หลังจากสัปดาห์ที่ 2 พบว่ามีการเปลี่ยนแปลงประชาคมแบคทีเรีย โดยมีความหลากหลายของแถบดีเอ็นเอมากขึ้น พบแถบดีเอ็นเอเด่นประมาณ 3 แถบ ซึ่งคงอยู่จนถึงสัปดาห์ที่ 8 ได้แก่แถบดีเอ็นเอ RB2.1\_B RB2.2\_B และ RB2.3\_B และในสัปดาห์ที่ 12 พบว่าแถบดีเอ็นเอเด่นได้หายไป ดังแสดงในรูปที่ 4.12.3

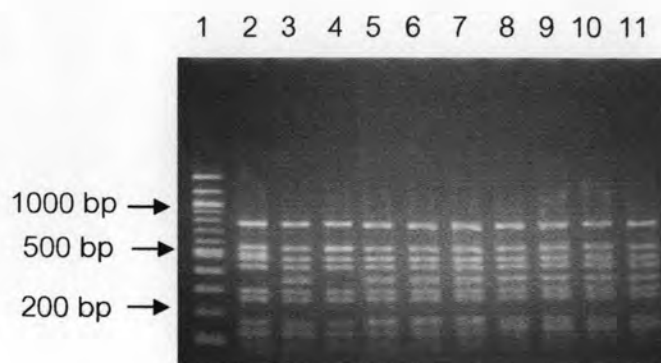
สัปดาห์ที่ 0 2 4 6 8 12



รูปที่ 4.12.3 การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างประชาคมแบคทีเรียบริเวณ V-3 region ของ 16S rDNA โดยวิธี DGGE ในพอลิอะครีลาไมด์เจลที่มี 20 – 70% denaturant ของระบบนิเวศจำลองดิน RB2 ; RB2.1\_B คือ แถบดีเอ็นเอเด่นแถบที่ 1; RB2.2\_B คือ แถบดีเอ็นเอเด่นแถบที่ 2; RB2.3\_B คือ แถบดีเอ็นเอเด่นแถบที่ 3

หลังจากนั้นตัดชิ้นดีเอ็นเอเด่น PJ1\_B RB1.1\_B - RB1.3\_B และ RB2.1\_B - RB2.3\_B ออกจากเจล ละลายดีเอ็นเอจากชิ้นเจลด้วยน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อและนำสารละลายดีเอ็นเอที่ได้ไปเพิ่มจำนวนด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส นำไปไลเกตกับพลาสมิดเวกเตอร์ pGEM-T Easy และทรานสฟอร์มเข้า *E. coli* JM109 แล้วคัดเลือกทรานสฟอร์มแมนท์ที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่ต้องการ ตรวจสอบชิ้นดีเอ็นเอสอดแทรกภายในรีคอมบิแนนท์พลาสมิดแล้วนำไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

ทั้งนี้ตัวอย่างรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่ได้จากชิ้นดีเอ็นเอเด่น RB1.1\_B - RB1.3\_B ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bsu*RI และ *Hin*FI ตามวิธีที่ระบุในข้อ 3.6.4 ได้ผลดังแสดงในรูปที่ 4.13.1 - 4.13.2 เพื่อเลือกรูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกันไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์



รูปที่ 4.13.1 รูปแบบของรีคอมบิแนนท์พลาสมิดหลังจากถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bsu*RI  
 ช่องวิ่งที่ 1: 100 bp DNA ladder ช่องวิ่งที่ 2: RB1.1.1\_B ช่องวิ่งที่ 3: RB1.1.2\_B  
 ช่องวิ่งที่ 4: RB1.1.3\_B ช่องวิ่งที่ 5: RB1.2.1\_B ช่องวิ่งที่ 6: RB1.2.2\_B ช่องวิ่งที่  
 7: RB1.2.3\_B ช่องวิ่งที่ 8: RB1.2.4\_B ช่องวิ่งที่ 9: RB1.3.1\_B ช่องวิ่งที่ 10:  
 RB1.3.2\_B ช่องวิ่งที่ 11: RB1.3.3\_B (เทคนิคตำแหน่งสุดท้ายหมายถึงโคลนที่)

จากรูปที่ 4.13.1 พบว่าสามารถแบ่งรูปแบบของรีคอมบิแนนท์พลาสมิด  
 หลังจากถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bsu*RI ได้เป็น 2 กลุ่ม คือ

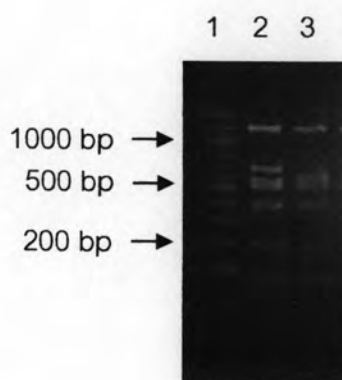
กลุ่มที่ 1: RB1.1.1\_B RB1.1.3\_B

กลุ่มที่ 2: RB1.1.2\_B RB1.2.1\_B RB1.2.2\_B RB1.2.3\_B

RB1.2.4\_B RB1.3.1\_B RB1.3.2\_B RB1.3.3\_B

และเมื่อตัดรีคอมบิแนนท์พลาสมิด RB1.1.1\_B และ RB1.1.3\_B จาก  
 กลุ่มที่ 1 ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hinf*I พบว่า RB1.1.1\_B และ RB1.1.3\_B มีรูปแบบที่ต่างกัน ดัง  
 แสดงในรูปที่ 4.13.2





รูปที่ 4.13.2 รูปแบบของรีคอมบิแนนท์พลาสมิดหลังจากถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *HinfI* ช่อง  
 ริงที่1: 100 bp DNA ladder ช่องริงที่ 2: RB1.1.1\_B ช่องริงที่ 3: RB1.1.3\_B  
 (ทัศนียมตำแหน่งที่ 3 หมายถึงโคลนที่)

จากรูปแบบที่ได้จึงเลือกรีคอมบิแนนท์พลาสมิด RB1.1.1\_B  
 RB1.1.2\_B และ RB1.1.3\_B ในการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

เมื่อนำโคลนที่คัดเลือก ได้แก่ PJ1 โคลนที่ 1-4 RB1.1 โคลนที่ 1-3  
 RB2.1 โคลนที่ 1-4 RB2.2 โคลนที่ 1-4 และ RB2.3 โคลนที่ 1-4 ไปวิเคราะห์ลำดับ  
 นิวคลีโอไทด์ พบว่ามีความคล้ายคลึงกับสายพันธุ์แบคทีเรีย ได้แก่ *Sphingomonas* sp. *Bacillus*  
 sp. *Halomonas* sp. *Staphylococcus caprae* *Mycobacterium* sp. รวมถึง uncultured  
 bacteria โดยลำดับนิวคลีโอไทด์แสดงไว้ในภาคผนวก ๑ และรายละเอียดผลการวิเคราะห์ลำดับ  
 นิวคลีโอไทด์แสดงไว้ในตารางที่ 4.3

ตารางที่ 4.3 ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ชั้นดีเอ็นเอเด่นจากโครงสร้างประชาคมแบคทีเรีย  
ในระบบนิเวศจำลองดิน

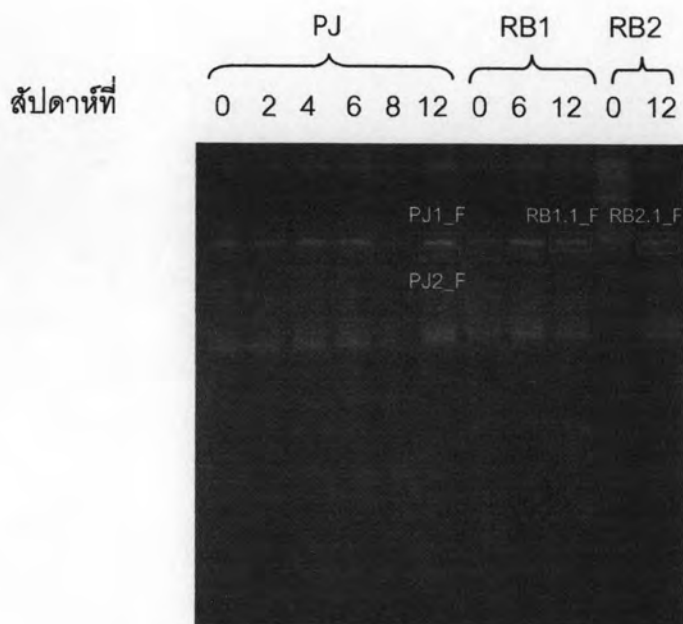
แถบดีเอ็นเอ	โคลนที่	สายพันธุ์แบคทีเรีย	Accession no.	Sequence identity (%)	เอกสารอ้างอิง
PJ1	1	uncultured Bacteroidetes	AF452599	167/191 (87%)	Humayoun และคณะ, ไม่ ตีพิมพ์
	2	<i>Sphingomonas</i> sp. HS372	AY116886	171/171 (100%)	Han และคณะ, 2003
	3	<i>Bacillus</i> sp. SFB	AY669375	177/182 (97%)	Achenbach และ Coates, ไม่ตีพิมพ์
	4	uncultured alpha proteobacterium	AY395387	164/171 (95%)	Schoenborn และคณะ, ไม่ตีพิมพ์
RB1.1	1	uncultured bacterium	DQ499306	163/167 (97%)	Macalady และคณะ, ไม่ ตีพิมพ์
	2	<i>Sphingomonas</i> sp. A4	AB104886	170/171 (99%)	Pinyakong และคณะ, 2004
RB1.1	3	uncultured bacterium	DQ478942	159/170 (93%)	Ahn และคณะ, ไม่ตีพิมพ์
RB2.1	1	<i>Sphingomonas</i> <i>phyllosphaerae</i>	AY563441	171/171 (100%)	Rivas และคณะ, 2004
	2	uncultured <i>Halomonas</i> sp.	DQ646796	189/194 (97%)	Wang และคณะ, ไม่ ตีพิมพ์
	3	<i>Staphylococcus</i> <i>caprae</i>	AM231272	195/196 (99%)	Opelt และ Berg, ไม่ ตีพิมพ์
	4	uncultured bacterium	DQ137896	185/193 (95%)	Lee และคณะ, ไม่ตีพิมพ์
RB2.2	1	uncultured bacterium	DQ453120	165/167 (98%)	Hao และ Zhang, ไม่ ตีพิมพ์
	2	uncultured alpha proteobacterium	EF061946	170/171 (99%)	Zhang และ Xu, ไม่ตีพิมพ์
	3	<i>Mycobacterium</i> sp. N12	DQ512892	174/177 (98%)	Su และคณะ, ไม่ตีพิมพ์
	4	<i>Sphingomonas</i> <i>cloacae</i>	AY151393	169/169 (100%)	Bastiaens และคณะ, 2000

ตารางที่ 4.3 (ต่อ) ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ชิ้นดีเอ็นเอเด่นจากโครงสร้างประชาคม  
แบคทีเรียในระบบนิเวศจำลองดิน

แถบดีเอ็นเอ	โคลนที่	สายพันธุ์แบคทีเรีย	Accession no.	Sequence identity (%)	เอกสารอ้างอิง
RB2.3	1	<i>Mycobacterium austroafricanum</i>	AF544627	151/158 (95%)	Leys และคณะ, ไม่ตีพิมพ์
	2	uncultured bacterium	AY271780	81/86 (94%)	Bhattacharya และ Lal, ไม่ตีพิมพ์
	3	<i>Mycobacterium aurum</i>	AY438068	176/176 (100%)	Devulder และคณะ, ไม่ ตีพิมพ์
	4	<i>Mycobacterium austroafricanum</i>	AF544627	151/158 (95%)	Leys และคณะ, ไม่ตีพิมพ์

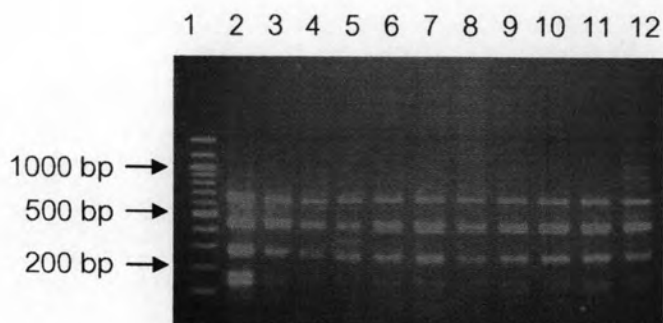
#### 4.3.2.1.2.2 การติดตามการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างประชาคมราใน ระบบนิเวศจำลองดินชุดที่ 2 ที่เติมพีแนนทรินร่วมกับ สารสกัดจากยีสต์ความเข้มข้นสุดท้ายในดิน 200 ppm

จากการติดตามการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างประชาคมราบริเวณ  
internal transcribed spacer ในระบบนิเวศจำลองดินทั้ง 3 ชุด ตั้งแต่เริ่มการทดลองจนถึง  
การทดลองโดยเทคนิค DGGE ในพอลิอะคริลาไมด์เจลที่มี 20 – 70% denaturant พบว่าดินทั้ง 3  
ชุด มีโครงสร้างประชาคมใกล้เคียงกันโดยพบแถบดีเอ็นเอเด่นประมาณ 3 แถบ ดังรูปที่ 4.14



รูปที่ 4.14 การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างประชาคมราในระบบนิเวศจำลองดิน PJ RB1 และ RB2 ในพอลิอะคริลาไมด์เจลที่มี 20 – 70% denaturant

หลังจากนั้นตัดชิ้นดีเอ็นเอเด่น PJ1\_F (แถบดีเอ็นเอที่ 1 จากสัปดาห์ที่ 12) PJ2\_F (แถบดีเอ็นเอที่ 2 จากสัปดาห์ที่ 12) RB1.1\_F (แถบดีเอ็นเอที่ 1 จากสัปดาห์ที่ 12) RB2.1\_F (แถบดีเอ็นเอที่ 1 จากสัปดาห์ที่ 12) ดังแสดงในรูปที่ 4.14 ออกจากเจล ละลายดีเอ็นเอจากชิ้นเจลด้วยน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อ และนำสารละลายดีเอ็นเอที่ได้ไปเพิ่มจำนวนด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชัน นำไปไลเกตกับพลาสมิดเวกเตอร์ pGEM-T Easy และทรานสฟอร์มเข้า *E. coli* JM109 แล้วคัดเลือกทรานสฟอร์มแมนท์ที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่ต้องการ ตรวจสอบชิ้นดีเอ็นเอสอดแทรกภายในรีคอมบิแนนท์พลาสมิดแล้วตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bsu*RI และ *Rsa*I ตามวิธีที่ระบุในข้อ 3.6.4 ได้ผลดังแสดงในรูป 4.15.1 – 4.15.2



รูปที่ 4.15.1 รูปแบบของรีคอมบิแนนท์พลาสมิดหลังจากถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *BsuRI*  
 ช่องวิ่งที่ 1: 100 bp DNA ladder ช่องวิ่งที่ 2: PJ1.1\_F ช่องวิ่งที่ 3: PJ1.2\_F ช่องวิ่ง  
 ที่ 4: PJ2.1\_F ช่องวิ่งที่ 5: PJ2.2\_F ช่องวิ่งที่ 6: PJ2.3\_F ช่องวิ่งที่ 7: RB1.1.1\_F  
 ช่องวิ่งที่ 8: RB1.1.2\_F ช่องวิ่งที่ 9: RB2.1.1\_F ช่องวิ่งที่ 10: RB2.1.2\_F ช่องวิ่งที่  
 11: RB2.1.3\_F ช่องวิ่งที่ 12: RB2.1.4\_F (เทคนิคตำแหน่งสุดท้ายหมายถึงโคลนที่)

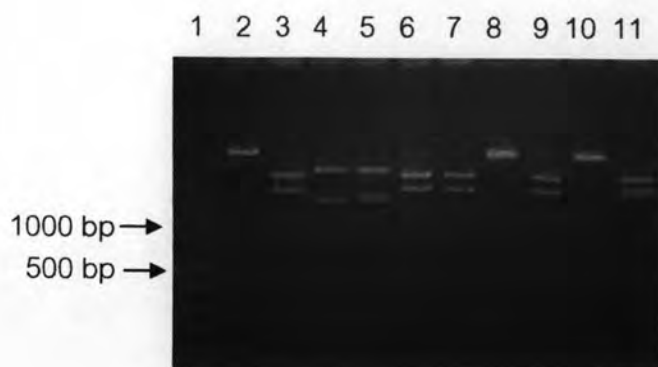
จากรูปที่ 4.15.1 ได้เลือกรีคอมบิแนนท์พลาสมิด PJ1.1\_F ไปวิเคราะห์  
 ลำดับนิวคลีโอไทด์ และนำรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่เหลือมาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *RsaI*  
 พบว่าสามารถแบ่งรูปแบบของรีคอมบิแนนท์พลาสมิดหลังจากถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *RsaI*  
 ได้เป็น 3 กลุ่ม คือ

กลุ่มที่ 1: PJ1.2\_F RB2.1.1\_F RB2.1.3\_F

กลุ่มที่ 2: PJ2.1\_F RB1.1.1\_F RB1.1.2\_F RB2.1.2\_F RB2.1.4\_F

กลุ่มที่ 3: PJ2.2\_F PJ2.3\_F

ดังแสดงในรูปที่ 4.15.2



รูปที่ 4.15.2 รูปแบบของรีคอมบิแนนท์พลาสมิดหลังจากถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *RsaI* ช่อง  
 ริงที่ 1: 100 bp DNA ladder ช่องริงที่ 2: PJ1.2\_F ช่องริงที่ 3: PJ2.1\_F ช่องริงที่ 4:  
 PJ2.2\_F ช่องริงที่ 5: PJ2.3\_F ช่องริงที่ 6: RB1.1.1\_F ช่องริงที่ 7: RB1.1.2\_F  
 ช่องริงที่ 8: RB2.1.1\_F ช่องริงที่ 9: RB2.1.2\_F ช่องริงที่ 10: RB2.1.3\_F ช่องริงที่  
 11: RB2.1.4\_F (เทคนิคตำแหน่งสุดท้ายหมายถึงโคลนที่)

เมื่อนำโคลนที่คัดเลือก ได้แก่ PJ1 โคลนที่ 1 และ 2 PJ2 โคลนที่ 2 และ  
 RB1.1 โคลนที่ 2 มาวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ พบว่ามีความคล้ายคลึงกับสายพันธุ์จุลินทรีย์  
 ได้แก่ *Halteria grandinella* Uncultured soil fungus *Epistylis plicatilis* และ *Penicillium*  
*pinophilum* ตามลำดับ โดยลำดับนิวคลีโอไทด์แสดงไว้ในภาคผนวก ๑ และรายละเอียดผลการ  
 วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์แสดงไว้ในตารางที่ 4.4

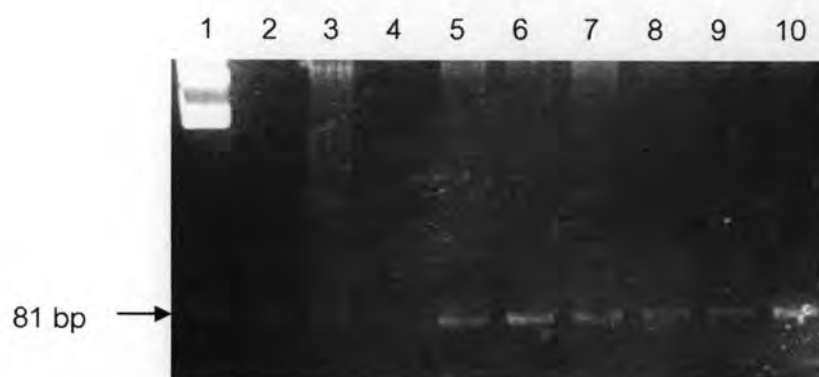
ตารางที่ 4.4 ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ขึ้นดีเอ็นเอเด่นจากการเปลี่ยนแปลงโครงสร้าง  
 ประชาคมราในระบบนิเวศจำลองดิน

แถบดีเอ็นเอ	โคลนที่	สายพันธุ์จุลินทรีย์	Accession no.	Sequence identity (%)	เอกสารอ้างอิง
PJ1	1	<i>Halteria grandinella</i>	DQ241753	363/380 (95%)	Katz และคณะ, 2005
PJ1	2	Uncultured soil fungus	AM229065	100/100 (100%)	Verma และ Shanmugam, ไม่ตีพิมพ์
PJ2	2	<i>Epistylis plicatilis</i>	AF429890	181/193 (93%)	Miao และคณะ, ไม่ตีพิมพ์
RB1.1	2	<i>Penicillium</i> <i>pinophilum</i>	AB194281	406/408 (99%)	Hideno, ไม่ตีพิมพ์



#### 4.3.2.1.3 การตรวจหาส่วนของยีนไดออกซิจีเนสในระบบนิเวศจำลองดิน ชุดที่ 2 ที่เติมพีแนนทรินร่วมกับสารสกัดจากยีสต์ความเข้มข้นสุดท้ายในดิน 200 ppm

จากการเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอบริเวณ Rieske ของยีนไดออกซิจีเนสด้วยปฏิกิริยาถูกลูกโซ่พอลิเมอเรส และตรวจสอบผลิตภัณฑ์ที่ได้โดยการหยอดดีเอ็นเอกับสีติดตามลงในช่องวิ่งของ 10.5% พอลิอะคริลาไมด์เจล (ภาคผนวก ข) และทำอีเลคโตรโฟเรซิส โดยมีพลาสมิด pPC1 (กรองกาญจน์ สายพิณ, 2549) ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bgl*II และ *Sac*I ซึ่งมีชิ้นส่วนขนาด 81 bp ในการเปรียบเทียบขนาดนั้น พบผลิตภัณฑ์ PCR ขนาด 78 bp ซึ่งคาดว่าเป็นส่วนของ Rieske ในระบบนิเวศจำลองดินทั้ง PJ RB1 และ RB2 โดยในระบบนิเวศจำลองดิน PJ มีความเข้มของแถบดีเอ็นเอจางที่สุด และพบว่าในสัปดาห์ที่ 12 ไม่สามารถสังเกตเห็นแถบดีเอ็นเอได้ ในระบบนิเวศจำลองดิน RB1 และ RB2 มีแถบดีเอ็นเอเข้มกว่า PJ อย่างชัดเจน โดยเมื่อพิจารณาในแต่ละช่วงเวลาของการทดลอง พบว่าในระบบนิเวศจำลองดิน RB1 มีความเข้มของแถบดีเอ็นเอมากที่สุดในสัปดาห์ที่ 6 และในระบบนิเวศจำลองดิน RB2 มีความเข้มของแถบดีเอ็นเอมากที่สุดในสัปดาห์ที่ 12 โดยแสดงไว้ในรูปที่ 4.16



รูปที่ 4.16 ขนาดชิ้นผลิตภัณฑ์ PCR บริเวณ Rieske ของยีนไดออกซิจีเนสช่องวิ่งที่ 1: pPC1 (กรองกาญจน์ สายพิณ, 2549) ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bgl*II และ *Sac*I ช่องวิ่งที่ 2: PJ สัปดาห์ที่ 0 ช่องวิ่งที่ 3: PJ สัปดาห์ที่ 6 ช่องวิ่งที่ 4: PJ สัปดาห์ที่ 12 ช่องวิ่งที่ 5: RB1 สัปดาห์ที่ 0 ช่องวิ่งที่ 6: RB1 สัปดาห์ที่ 6 ช่องวิ่งที่ 7: RB1 สัปดาห์ที่ 12 ช่องวิ่งที่ 8: RB2 สัปดาห์ที่ 0 ช่องวิ่งที่ 9: RB2 สัปดาห์ที่ 6 ช่องวิ่งที่ 10: RB2 สัปดาห์ที่ 12



หลังจากนั้นตัดชิ้นดีเอ็นเอขนาด 78 bp ในลำดับที่ 6 ของแต่ละระบบนิเวศจำลองออกจากเจล ละลายดีเอ็นเอจากชิ้นเจลด้วยน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อ และนำสารละลายดีเอ็นเอที่ได้ไปเพิ่มจำนวนด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส นำไปไลเกตกับพลาสมิดเวกเตอร์ pGEM-T Easy และทรานสฟอร์มเข้า *E. coli* JM109 แล้วคัดเลือกทรานสฟอร์มแมนท์ที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่ต้องการ ตรวจสอบชิ้นดีเอ็นเอสอดแทรกภายในรีคอมบิแนนท์พลาสมิดแล้วนำไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ พบว่าโคลน RB1 มีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ประมวลรหัสกรดอะมิโนคล้ายคลึงกับ Rieske (2Fe-2S) region ของ *Mycobacterium* sp. ซึ่งเป็นส่วนของยีนไดออกซิจีเนสที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลาย PAHs โคลน PJ และ RB2 มีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ประมวลรหัสกรดอะมิโนคล้ายคลึงกับ protocatechuate 3,4-dioxygenase beta subunit ของ uncultured bacterium ซึ่งไม่ใช่ส่วนของ Rieske แต่มีความเกี่ยวข้องกับยีนไดออกซิจีเนส ในขณะที่ positive control มีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ประมวลรหัสกรดอะมิโนคล้ายคลึงกับ putative terminal aromatic dioxygenase alpha subunit ของ uncultured bacterium โดยลำดับนิวคลีโอไทด์แสดงไว้ในภาคผนวก จ และรายละเอียดผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์แสดงไว้ในตารางที่ 4.5

ตารางที่ 4.5 ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ขึ้นผลิตภัณฑ์ PCR บริเวณ Rieske ของยีนไดออกซิจีเนส

ตัวอย่าง	คำจำกัดความ	สายพันธุ์แบคทีเรีย	Accession no.	Sequence identity (%)	เอกสารอ้างอิง
Positive control	putative terminal aromatic dioxygenase alpha subunit	uncultured bacterium	AAL14941	24/26 (92%)	Taylor และ Janssen, 2005
PJ	protocatechuate 3,4-dioxygenase beta subunit	uncultured bacterium	ABC50006	16/16 (100%)	El Azhari และคณะ, ไม่ตีพิมพ์
RB1	Rieske (2Fe-2S) region	<i>Mycobacterium</i> sp. MCS	YP_642597	24/25 (96%)	Copeland และคณะ, ไม่ตีพิมพ์
RB2	protocatechuate 3,4-dioxygenase beta subunit	uncultured bacterium	ABC50006	16/16 (100%)	El Azhari และคณะ, ไม่ตีพิมพ์

#### 4.3.2.1.4 การแยกและจำแนกชนิดแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลาย ฟิแนนทรินได้ในภาวะกรดในระบบนิเวศจำลองดินชุดที่ 2 ที่เติมฟิแนนทรินร่วมกับสารสกัดจากยีสต์ความเข้มข้น สุดท้ายในดิน 200 ppm

จากการแยกชนิดแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายฟิแนนทรินได้ในภาวะกรด โดยเลี้ยงบนอาหารแข็ง CFMM ที่มี pH 4.0 แล้วพ่นทับด้วย 2% สารละลายฟิแนนทรินใน ไดเอทิลอีเทอร์ นำไปบ่มที่ 30°ซ ผลปรากฏว่าไม่พบแบคทีเรียที่สามารถเจริญและสร้างบริเวณใส รอบโคโลนี

#### 4.3.2.2 การสร้างระบบนิเวศจำลองดินชุดที่ 2 ที่เติมฟิแนนทรินเป็นแหล่ง คาร์บอน

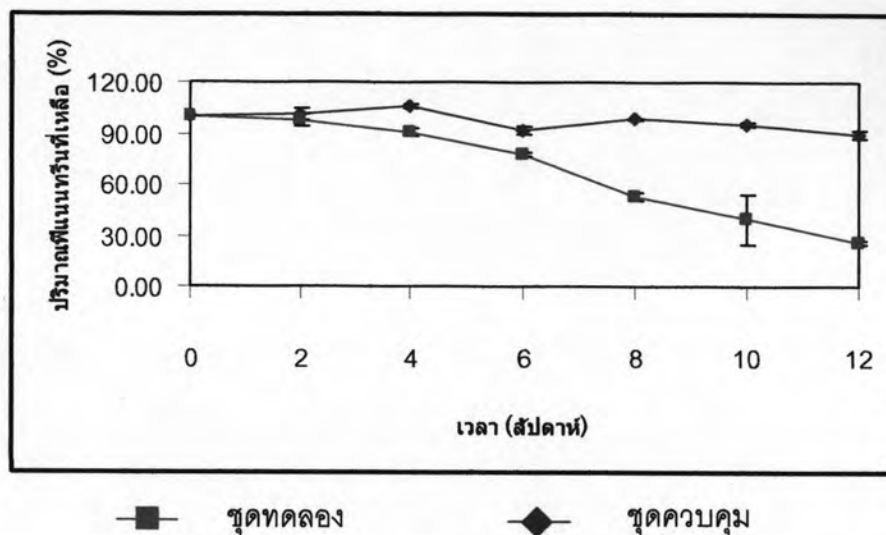
เตรียมระบบนิเวศจำลองดิน โดยใช้ดิน PJ RB1 และ RB2 ปริมาณ 6 กรัม เติม ฟิแนนทรินในอะซิโตนให้มีความเข้มข้นสุดท้ายในดินเป็น 300 ppm และเติมอาหารเหลว basal salt โดยลักษณะระบบนิเวศจำลองมีลักษณะดังรูปที่ 4.9

หลังจากสร้างระบบนิเวศจำลองแล้ว ได้วิเคราะห์ปริมาณฟิแนนทรินที่เหลืออยู่ ในระบบนิเวศจำลอง ติดตามการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างประชาคมจุลินทรีย์โดยวิธี DGGE ตรวจ จนับจำนวนจุลินทรีย์ที่เจริญได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB ที่มี pH 4.0 และตรวจนับจำนวนจุลินทรีย์ที่ เจริญได้ในภาวะกรดโดยใช้ฟิแนนทรินเป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงาน ทุกๆ 2 สัปดาห์ เป็น เวลา 12 สัปดาห์

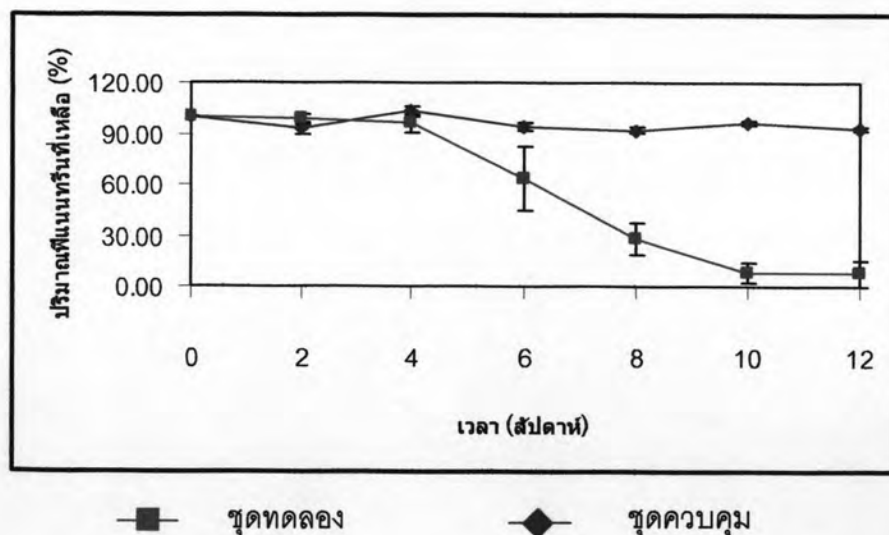
##### 4.3.2.2.1 การวิเคราะห์ปริมาณฟิแนนทรินที่เหลืออยู่ในระบบนิเวศจำลอง ดินชุดที่ 2 ที่เติมฟิแนนทรินเป็นแหล่งคาร์บอน

ผลการทดลองพบว่าปริมาณฟิแนนทรินในชุดทดลองของระบบนิเวศจำลอง ดิน PJ เริ่มลดลงในสัปดาห์ที่ 6 และค่อยๆ ลดลงอย่างต่อเนื่องจนสิ้นสุดการทดลองในสัปดาห์ที่ 12 (ปริมาณฟิแนนทรินที่เหลือ = 26.01%) ระบบนิเวศจำลองดิน RB1 ปริมาณฟิแนนทรินในชุด ทดลองลดลงอย่างรวดเร็วตั้งแต่สัปดาห์ที่ 6 จนถึงสัปดาห์ที่ 10 แล้วคงที่จนถึงสัปดาห์ที่ 12 (ปริมาณฟิแนนทรินที่เหลือ = 7.74%) ระบบนิเวศจำลองดิน RB2 ปริมาณฟิแนนทรินลดลงเพียง เล็กน้อยเมื่อเปรียบเทียบกับใน PJ และ RB1 คือเริ่มลดลงในสัปดาห์ที่ 8 และคงที่จนถึงสัปดาห์

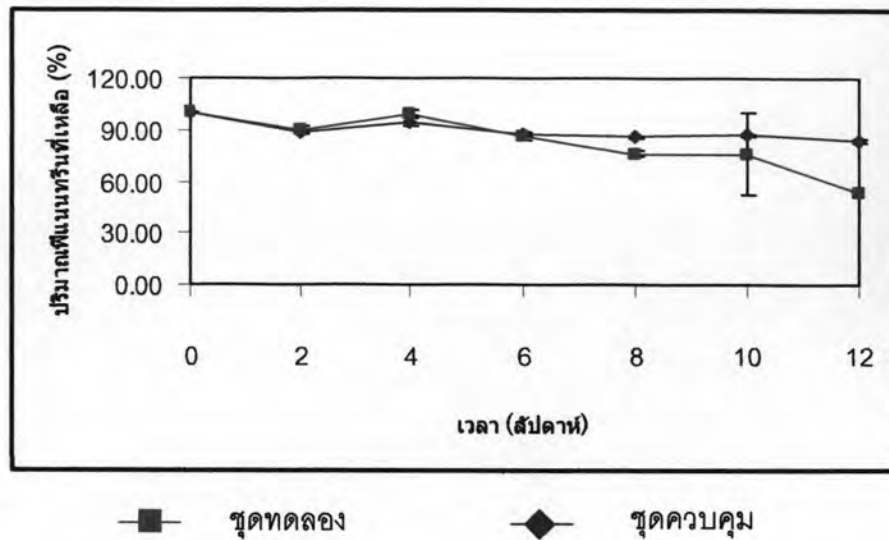
ที่ 10 แล้วลดลงอีกเล็กน้อยจนถึงสิ้นสุดการทดลอง (ปริมาณฟิแทนทรินที่เหลือ = 53.31%) ดังแสดงในรูปที่ 4.17.1 – 4.17.3



รูปที่ 4.17.1 การย่อยสลายฟิแทนทริน 300 ppm ในระบบนิเวศจำลองดิน PJ ขนาด 6 กรัม ที่เติมฟิแทนทรินเป็นแหล่งคาร์บอน เป็นเวลา 12 สัปดาห์



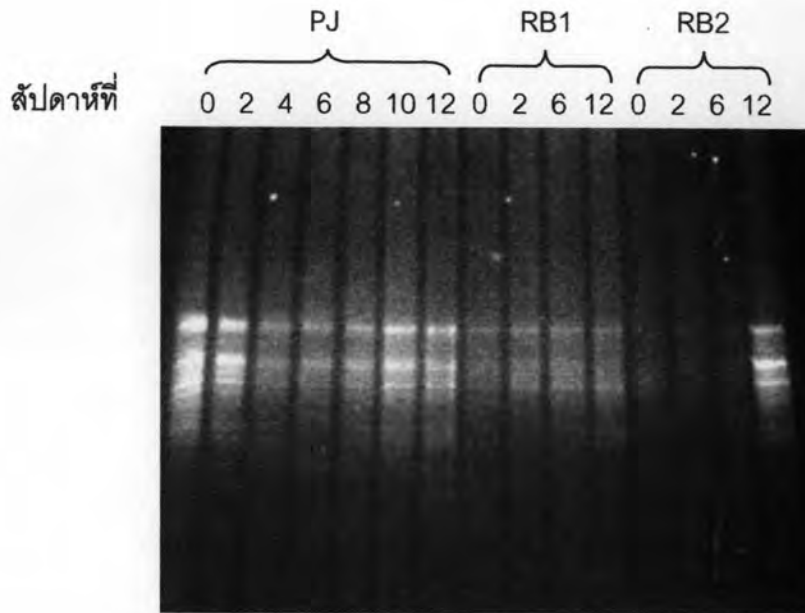
รูปที่ 4.17.2 การย่อยสลายฟิแทนทริน 300 ppm ในระบบนิเวศจำลองดิน RB1 ขนาด 6 กรัม ที่เติมฟิแทนทรินเป็นแหล่งคาร์บอน เป็นเวลา 12 สัปดาห์



รูปที่ 4.17.3 การย่อยสลายฟลูออโรส 300 ppm ในระบบนิเวศจำลองดิน RB2 ขนาด 6 กรัม ที่เติมฟลูออโรสเป็นแหล่งคาร์บอน เป็นเวลา 12 สัปดาห์

#### 4.3.2.2.2 การติดตามการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างประชาคมแบคทีเรียโดยวิธี DGGE ในระบบนิเวศจำลองดินชุดที่ 2 ที่เติมฟลูออโรสเป็นแหล่งคาร์บอน

ผลการเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอบริเวณ V-3 region ของ 16S rDNA พบว่าในระบบนิเวศจำลอง PJ ผลิตภัณฑ์ PCR ในแต่ละช่วงเวลากการเก็บตัวอย่างมีความเข้มใกล้เคียงกัน ซึ่งในระบบนิเวศจำลองดิน RB1 ก็มีลักษณะเช่นเดียวกัน ในขณะที่ระบบนิเวศจำลองดิน RB2 นั้นผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้ในสัปดาห์ที่ 2 และ 6 จางมากเมื่อเปรียบเทียบกับสัปดาห์ที่ 12 การติดตามการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างประชาคมแบคทีเรียในระบบนิเวศจำลองดินทั้ง 3 ชนิด ตั้งแต่เริ่มการทดลองจนถึงสิ้นสุดการทดลอง โดยเทคนิค DGGE พบว่าดินทั้ง 3 ชนิด มีโครงสร้างประชาคมแบคทีเรียคล้ายคลึงกัน โดยพบแถบดีเอ็นเอเด่นอย่างน้อยประมาณ 3 แถบ และแถบดีเอ็นเอของระบบนิเวศจำลอง PJ มีความเข้มมากที่สุด รองลงมาคือ RB1 และ RB2 ตามลำดับ ดังรูปที่ 4.18



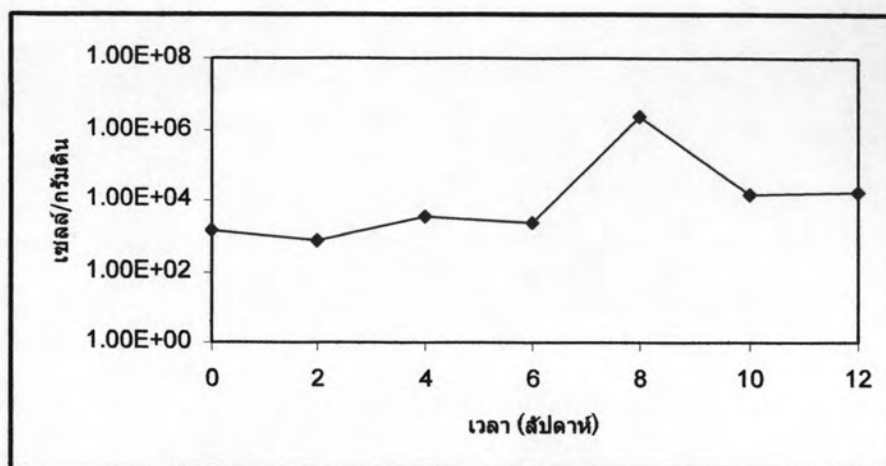
รูปที่ 4.18 การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างประชาคมแบคทีเรียในระบบนิเวศจำลองดิน PJ RB1 และ RB2 ในพอลิอะคริลาไมด์เจลที่มี 20 – 70% denaturant

#### 4.3.2.2.3 การตรวจนับจำนวนจุลินทรีย์โดยวิธี Most Probable Number (MPN) ในระบบนิเวศจำลองดินชุดที่ 2 ที่เติมพีแนนทรินเป็นแหล่งคาร์บอน

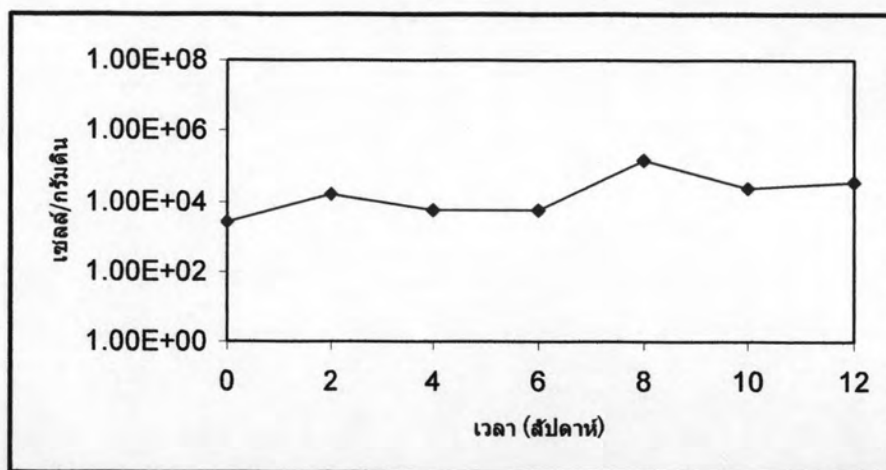
##### 4.3.2.2.3.1 การตรวจนับจำนวนจุลินทรีย์ที่เจริญได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB ที่มี pH 4.0 ในระบบนิเวศจำลองดินชุดที่ 2 ที่เติมพีแนนทรินเป็นแหล่งคาร์บอน

จากการตรวจนับจำนวนจุลินทรีย์โดยวิธี MPN ซึ่งทำการทดลองใน 96-well plate ที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB ที่มี pH 4.0 นั้น พบว่าจำนวนจุลินทรีย์ในระบบนิเวศจำลองดิน PJ ในช่วง 6 สัปดาห์แรก ไม่แตกต่างจากเมื่อเริ่มต้นการทดลอง คือประมาณ  $10^3$  เซลล์/กรัมดิน หลังจากนั้นจุลินทรีย์มีจำนวนเพิ่มขึ้นจนมีประมาณ  $10^6$  เซลล์/กรัมดิน ในสัปดาห์ที่ 8 และลดลงจนเมื่อสิ้นสุดการทดลองมีประมาณ  $10^4$  เซลล์/กรัมดิน ในระบบนิเวศจำลองดิน RB1 จำนวนจุลินทรีย์ค่อนข้างคงที่ และพบการเพิ่มจำนวนขึ้นเพียงเล็กน้อยเช่นเดียวกับในระบบนิเวศจำลอง PJ เมื่อสิ้นสุดการทดลองมีจำนวนจุลินทรีย์ประมาณ  $10^4$  เซลล์/กรัมดิน ในระบบนิเวศจำลอง RB2 พบว่าในช่วง 8 สัปดาห์แรกของการทดลอง จำนวนจุลินทรีย์เฉลี่ยอยู่ในช่วง  $10^4 - 10^5$  เซลล์/กรัม

ดิน ในสัปดาห์ที่ 10 จุลินทรีย์มีจำนวนสูงสุดคือประมาณ  $10^7$  เซลล์/กรัมดิน และเมื่อสิ้นสุดการทดลองเหลือประมาณ  $10^6$  เซลล์/กรัมดิน โดยผลการทดลองเป็นดังรูปที่ 4.19.1 – 4.19.3

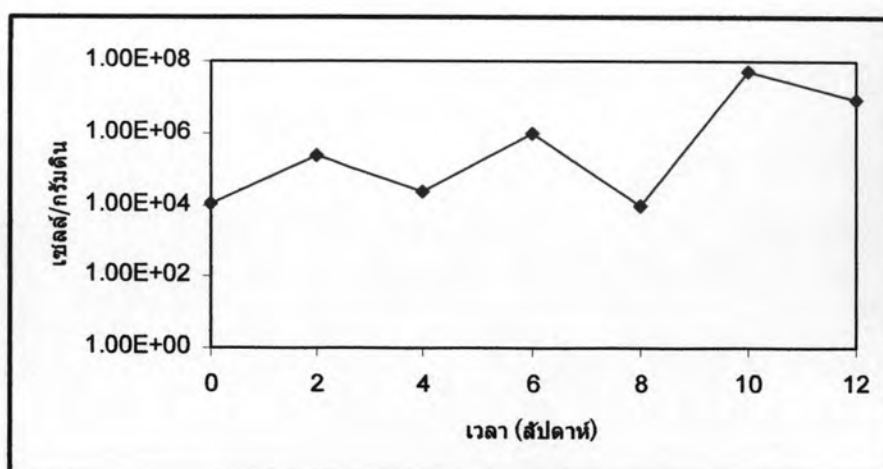


รูปที่ 4.19.1 จำนวนจุลินทรีย์ในระบบนิเวศจำลองดิน PJ ขนาด 6 กรัม ที่เติมพีแนนทรีน 300 ppm เป็นเวลา 12 สัปดาห์



รูปที่ 4.19.2 จำนวนจุลินทรีย์ในระบบนิเวศจำลองดิน RB1 ขนาด 6 กรัม ที่เติมพีแนนทรีน 300 ppm เป็นเวลา 12 สัปดาห์





รูปที่ 4.19.3 จำนวนจุลินทรีย์ในระบบนิเวศจำลองดิน RB2 ขนาด 6 กรัม ที่เติมพีแนทรีน 300 ppm เป็นเวลา 12 สัปดาห์

#### 4.3.2.2.3.2 การตรวจนับจำนวนจุลินทรีย์ที่เจริญได้โดยใช้พีแนทรีน เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงานในระบบนิเวศจำลอง ดินชุดที่ 2 ที่เติมพีแนทรีนเป็นแหล่งคาร์บอน

จากการตรวจนับจำนวนจุลินทรีย์โดยวิธี MPN ซึ่งทำการทดลองใน 96-well plate ที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว basal salt ความเป็นกรดต่าง 4.0 และพีแนทรีน ความเข้มข้นสุดท้าย 200 ppm นั้น พบว่าไม่มีจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายพีแนทรีนในทั้ง 3 การทดลอง