

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์
เงินทุนอุดหนุนการวิจัยงบประมาณแผ่นดิน 2544

เรื่อง การคัดแยกและศึกษาลักษณะของแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายสารประกอบ
Polycyclic aromatic hydrocarbons
Screening and characterization of polycyclic aromatic hydrocarbons-
degrading bacteria

โดย

รศ.ดร.กาญจนา จันทองจีน

อ.ดร.กอบชัย กัทธฤดาภิรัชย์

นายณัฐพันธุ์ ศุภกา

รพ
วพ 15
010811

ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์
เงินทุนอุดหนุนการวิจัยงบประมาณแผ่นดิน 2544



เรื่อง

การคัดแยกและศึกษาลักษณะของแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายสารประกอบ
Polycyclic aromatic hydrocarbons

Screening and characterization of polycyclic aromatic hydrocarbons
degrading bacteria

โดย

รศ.ดร.กาญจนา จันทองจีน

อ.ดร.กอบชัย ภัทรกุลวณิชย์

นายณัฐพันธุ์ ศุภกา

สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

17 ก.ย. 2546

I 20720968

กิตติกรรมประกาศ

ผู้ดำเนินงานวิจัยขอขอบคุณ Professor Toshio Omori แห่ง Biotechnology Research Center, University of Tokyo ประเทศญี่ปุ่นที่ให้คำแนะนำเทคนิคต่างๆ ในการแยกและจำแนกแบคทีเรีย ขอขอบคุณ โครงการ TJTTP-OECF ที่ให้การสนับสนุนการดำเนินงานวิจัย งานวิจัยนี้สำเร็จได้ด้วยดีโดยได้รับการสนับสนุนค่าใช้จ่ายจากเงินอุดหนุนการวิจัยงบประมาณแผ่นดิน ปีงบประมาณ 2544

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เลขที่ ^{คพ} ๑๓ 15
เลขทะเบียน 010811
วัน, เดือน, ปี ๗ มค, ๔๕

บทคัดย่อ

เรื่อง การคัดแยกและศึกษาลักษณะของแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายสารประกอบ Polycyclic aromatic hydrocarbons

ผู้วิจัย รศ.ดร.กาญจนา จันทองจีน อ.ดร.กอบชัย ภัทรกุลวณิชช์ นายณัฐพันธ์ ศุภกา

ระยะเวลาวิจัย ตุลาคม 2543 - กันยายน 2544

แบคทีเรียซึ่งสามารถย่อยสลายสารประกอบพอลิไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน (PAHs) 3 สายพันธุ์ ได้แก่ สายพันธุ์ P2 ANT1 และ CU-A1 คัดแยกได้จากแหล่งดินปนเปื้อนผลิตภัณฑ์ปิโตรเลียมในประเทศไทย แบคทีเรียสายพันธุ์ P2 ซึ่งสามารถย่อยสลายพีแนนทรีนคัดแยกได้จากดินปนเปื้อนน้ำมันเครื่องในจังหวัดปราจีนบุรี แบคทีเรียสายพันธุ์ ANT1 ซึ่งสามารถย่อยสลายแอนทราซีนและแบคทีเรียสายพันธุ์ CU-A1 ซึ่งย่อยสลายอะซีแนพทิลีนคัดแยกได้จากดินปนเปื้อนน้ำมันปิโตรเลียมในกรุงเทพมหานคร เมื่อนำมาจำแนกชนิดทางอนุกรมวิธานตามลักษณะฟีโนไทป์ ร่วมกับการวิเคราะห์ลำดับเบสของ 16 เอสโรโบโซมัลดีเอ็นเอ พบว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ P2 และ ANT1 เป็นแบคทีเรียในสกุล *Sphingomonas* ส่วนแบคทีเรียสายพันธุ์ CU-A1 จัดเป็นแบคทีเรียในสกุล *Rhizobium* ซึ่งเป็นการพบครั้งแรกสำหรับเชื้อแบคทีเรีย *Rhizobium* ที่สามารถย่อยสลายอะซีแนพทิลีนซึ่งเป็น PAHs *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ P2 ย่อยสลายพีแนนทรีนในอาหารเหลว CFMM ได้อย่างรวดเร็วจากปริมาณเริ่มต้น 100 มก.ต่อมล. ลดเหลือในปริมาณที่ไม่สามารถตรวจวัดได้ด้วยไฮเพอร์ฟลูออเรสเซนต์โครมาโตกราฟีหลังเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 72 ชั่วโมง นอกจากนี้แบคทีเรียสายพันธุ์ P2 สามารถย่อยสลายแนพทาลีน อะซีแนพทิลีน อะซีแนพทรีน ฟลูออรีน แอนทราซีน และ ไดเบนซิฟูแรน *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ ANT1 ย่อยสลายแอนทราซีนเป็นสารมัธยันต์ที่ไม่สามารถย่อยสลายต่อไปชนิดหนึ่งซึ่งมีค่า Rt 2 นาที เมื่อเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 48 ชั่วโมงซึ่งสารมัธยันต์ชนิดนี้อาจเป็นเหตุให้จำนวนเซลล์ลดลง นอกจากแอนทราซีนแล้วสายพันธุ์ ANT1 ยังสามารถย่อยสลายแนพทาลีน พีแนนทรีน ไดเบนซิฟูแรน และ ฟลูออรีน *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 ย่อยสลายอะซีแนพทิลีนในอาหารเหลว CFMM จากปริมาณเริ่มต้น 600 มก.ต่อมล. จนไม่สามารถวัดได้โดยวิธีไฮเพอร์ฟลูออเรสเซนต์โครมาโตกราฟีหลังการเลี้ยงเชื้อ 3 วัน นอกจากอะซีแนพทิลีนแล้วสายพันธุ์ CU-A1 ยังสามารถย่อยสลายแนพทาลีน ไดเบนซิฟูแรน และ อะซีแนพทรีน

Abstract

Title Screening and characterization of polycyclic aromatic hydrocarbons degrading bacteria

Author Assoc. Prof.Kanchana Juntongjin Dr.Kobchai Pattaragulwanit Mr.Nuttapun Supaka

Three PHAs degrading bacterial strains, P2 ANT1 and CU-A1 were isolated from petroleum-contaminated soils in Thailand. Strain P2, able to degrade phenanthrene was isolated from lubricant-contaminated soil sample in Prajinburi. Strain ANT1 and strain CU-A1, able to degrade anthracene and acenaphthylene respectively, were screened from petroleum-contaminated soil in Bangkok. Phenotypic characterization along with 16S ribosomal DNA sequence analysis indicated that strain P2 and ANT1 belong to genus *Sphingomonas*, while strain CU-A1 belongs to genus *Rhizobium*. This was the first finding that *Rhizobium* sp. can degrade the PAH, acenaphthylene. *Sphingomonas* sp. strain P2 rapidly mineralized phenanthrene in liquid medium from 100 mg.l⁻¹ to undetectable amount by HPLC analysis within 72 h. In addition strain P2 was able to utilize naphthalene acenaphthylene acenaphthene fluorene anthracene and dibenzofuran. Strain ANT1 degraded anthracene to an unidentified dead-end metabolite of retention time 2 minute within 48 h. causing a decline in cell growth. Apart from anthracene, strain ANT1 readily mineralized naphthalene phenanthrene dibenzofuran and fluorene. *Rhizobium* sp. strain CU-A1 used up the supplemented acenaphthylene (600 mg.l⁻¹ of CFMM) on the third day of cultivation as determined by HPLC. Besides acenaphthylene, strain CU-A1 can oxidizes naphthalene dibenzofuran and acenaphthene.

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ.....	๗
บทคัดย่อภาษาไทย.....	๘
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	๙
สารบัญ.....	๑
สารบัญตาราง.....	๑๑
สารบัญรูป.....	๑๒
สัญลักษณ์และคำย่อ.....	๑๓
บทที่	
1. บทนำ.....	1
2. อุปกรณ์และวิธีดำเนินงานวิจัย.....	6
3. ผลการทดลอง.....	17
4. สรุปและอภิปรายผลการทดลอง.....	39
รายการอ้างอิง.....	43
ภาคผนวก	
ภาคผนวก ก.....	48
ภาคผนวก ข.....	50
ภาคผนวก ค.....	51

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
2.1 ส่วนผสมที่ใช้ในการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอโดยวิธี PCR.....	15
2.2 ส่วนผสมที่ใช้ในการติดตามดีเอ็นเอโดยวิธี PCR.....	16
3.1 ลักษณะโคโลนีของแบคทีเรียที่แยกได้จากตัวอย่างดินบนอาหารแข็ง CFMM ที่พ่นทับผิวหน้าด้วย พีแนทรีน แอนทราซีนหรืออะซีแนพริลีน แล้วเกิดบริเวณใสรอบโคโลนี.....	19
3.2 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียสายพันธุ์ P2 ANT1 และ CU-A1.....	23
3.3 ลักษณะทางสรีรวิทยาของแบคทีเรียสายพันธุ์ที่คัดแยกได้.....	24
3.4 แสดงผลการย่อยสลายของแบคทีเรียที่คัดแยกได้ทั้ง 3 สายพันธุ์ต่อ PAHs ทั้ง 9 ชนิด.....	38

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญรูป

รูปที่

หน้า

1.1	โครงสร้างโมเลกุลของ PAHs ทั้ง 16 ชนิดตามรายงานของ U.S. EPA (Wilson and Jones, 1993).....	3
3.1	ลักษณะบริเวณไฮสโอบโคโลนีของแบคทีเรียที่พบในตัวอย่างดินที่ 5 เมื่อเลี้ยงบนอาหารแข็ง CFMM ที่พื้น ทับผิวหน้าด้วยพีแนทรีนเป็นเวลา 4 วัน.....	18
3.2	ลักษณะโคโลนีของแบคทีเรียสายพันธุ์ P2 บนอาหารแข็ง LB.....	20
3.3	ลักษณะโคโลนีของแบคทีเรียสายพันธุ์ ANT1 บนอาหารแข็ง LB.....	20
3.4	ลักษณะโคโลนีของแบคทีเรียสายพันธุ์ CU-A1 บนอาหารแข็ง LB.....	21
3.5	ลักษณะรูปร่างของแบคทีเรียสายพันธุ์ P2 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (1000X).....	21
3.6	ลักษณะรูปร่างของแบคทีเรียสายพันธุ์ ANT1 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (1000X).....	22
3.7	ลักษณะรูปร่างของแบคทีเรียสายพันธุ์ CU-A1 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (1000X).....	22
3.8	ลำดับเบสของ 16 เอส โรโบโซมัลดีเอ็นเอของแบคทีเรียสายพันธุ์ P2.....	26
3.9	ลำดับเบสของ 16 เอส โรโบโซมัลดีเอ็นเอของแบคทีเรียสายพันธุ์ ANT1.....	27
3.10	ลำดับเบสของ 16 เอส โรโบโซมัลดีเอ็นเอของแบคทีเรียสายพันธุ์ CU-A1.....	28
3.11	ลักษณะของอาหารเหลว CFMM ที่มีพีแนทรีนหลังเลี้ยง <i>Sphingomonas</i> sp. สายพันธุ์ P2 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เปรียบเทียบกับชุดควบคุม.....	29
3.12	ลักษณะของอาหารเหลว CFMM ที่มีแอนทราซีนหลังเลี้ยง <i>Sphingomonas</i> sp. สายพันธุ์ ANT1 เป็น เวลา 48 ชั่วโมง เปรียบเทียบกับชุดควบคุม.....	30
3.13	ลักษณะของอาหารเหลว CFMM ที่มีอะซีแนพริลีนหลังเลี้ยง <i>Rhizobium</i> sp. สายพันธุ์ CU-A1 เป็น เวลา 3 วัน เปรียบเทียบกับชุดควบคุม.....	30
3.14	การเจริญของ <i>Sphingomonas</i> sp. สายพันธุ์ P2 ในอาหารเหลว CFMM ที่มีพีแนทรีนเป็นแหล่งพลัง งานและคาร์บอน.....	32
3.15	HPLC โคโรมาโตแกรมจากการวิเคราะห์ปริมาณพีแนทรีนและสารมัธยันต์ที่เกิดขึ้นจากการย่อยสลาย พีแนทรีนโดย <i>Sphingomonas</i> sp. สายพันธุ์ P2 หลังเลี้ยงเชื้อที่เวลาต่างๆ.....	33
3.16	การเจริญของ <i>Sphingomonas</i> sp. สายพันธุ์ ANT1 ในอาหารเหลว CFMM ที่มีแอนทราซีนเป็นแหล่ง พลังงานและคาร์บอน.....	34
3.17	HPLC โคโรมาโตแกรมจากการวิเคราะห์ปริมาณแอนทราซีนและสารมัธยันต์ที่เกิดขึ้นจากการย่อยสลาย แอนทราซีนโดย <i>Sphingomonas</i> sp. สายพันธุ์ ANT1 หลังเลี้ยงเชื้อที่เวลาต่างๆ.....	35

- 3.18 การเจริญของ *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 ในอาหารเหลว CFMM ที่มีอะซีแนพรีลีนเป็นแหล่งพลังงานและคาร์บอน.....36
- 3.19 HPLC โคโรมาโตแกรมจากการวิเคราะห์ปริมาณอะซีแนพรีลีนและสารมัธยันต์ที่เกิดขึ้นจากการย่อยสลายอะซีแนพรีลีนโดย *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 หลังเลี้ยงเชื้อที่เวลาต่างๆ.....37
- ค.1 กราฟมาตรฐานระหว่างปริมาณพีแนนทรินกับพื้นที่ใต้กราฟที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC.....51
- ค.2 กราฟมาตรฐานระหว่างปริมาณแอนทราซินกับพื้นที่ใต้กราฟที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC.....52
- ค.3 กราฟมาตรฐานระหว่างปริมาณอะซีแนพรีลีนกับพื้นที่ใต้กราฟที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC...53



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สัญลักษณ์และคำย่อ

มก.	=	มิลลิกรัม
มล.	=	มิลลิลิตร
มม.	=	มิลลิเมตร
°C	=	องศาเซลเซียส
%	=	เปอร์เซ็นต์



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 1

บทนำ

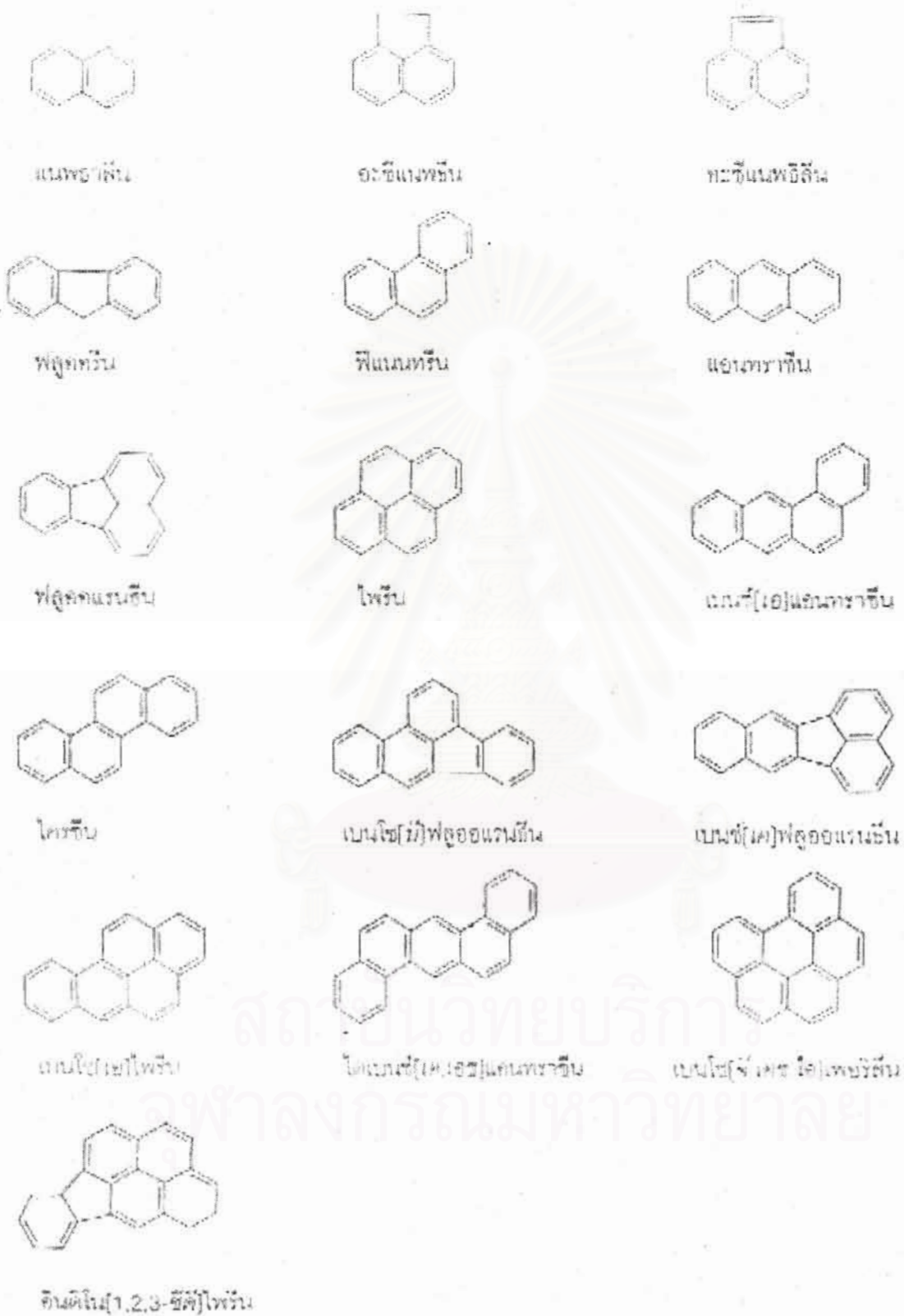


ปัจจุบันผลกระทบจากสิ่งแวดล้อมเป็นพิษได้แพร่ขยายอย่างรวดเร็ว จนเป็นปัญหาที่สำคัญของโลก อันเป็นผลสืบเนื่องมาจากการขยายตัวของการผลิตเพื่อตอบสนองของประชากรโลกที่เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว ประเทศไทยก็ประสบปัญหาดังกล่าวและนับวันจะทวีความซับซ้อนและรุนแรงมากขึ้นตามการพัฒนาของประเทศ การสะสมของกากสารเคมีจากการผลิตที่เป็นของเสียมีพิษ รวมทั้งการขนส่งสินค้าของภาคอุตสาหกรรมเป็นสาเหตุสำคัญอย่างหนึ่งของปัญหาสิ่งแวดล้อม จากการศึกษาปริมาณของเสียที่มีอันตรายต่อสุขภาพและสิ่งแวดล้อมที่เกิดขึ้นทั่วประเทศโดยบริษัท Engineering Science ซึ่งรายงานไว้ใน "The National Hazardous Waste Management" ในปี พ.ศ. 2532 โดยกรมโรงงานอุตสาหกรรมและกระทรวงวิทยาศาสตร์เทคโนโลยีและสิ่งแวดล้อมได้ร่วมกันปรับปรุงให้สมบูรณ์ขึ้นได้ประเมินว่า ในปี พ.ศ. 2535 มีของเสียอันตรายเกิดขึ้นทั่วประเทศจากอุตสาหกรรมและจากทุกกิจกรรมรวมกันประมาณ 1,000,000 ตันและพยากรณ์ว่าในปี พ.ศ. 2544 จะมีของเสียอันตรายเกิดขึ้นประมาณ 2,813,980 ตัน โดยจัดเป็นของเสียอันตรายประเภทน้ำมัน (oil) ปริมาณ 589,508 ตัน (สำนักเทคโนโลยีสิ่งแวดล้อมโรงงาน, 2542)

ของเสียอันตรายประเภทน้ำมันส่วนมากประกอบด้วยสารอินทรีย์หลายกลุ่ม ที่สำคัญคือสารในกลุ่ม Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) เป็นกลุ่มสารประกอบไฮโดรคาร์บอนที่มีวงเบนซินตั้งแต่สอง วงขึ้นไปต่อกัน (O'Neill, 1993) มีแหล่งกำเนิดที่สำคัญคือจากการเผาไหม้ของ fossil fuel ซึ่งได้แก่ยานพาหนะต่างๆ ที่ใช้เชื้อเพลิงปิโตรเลียม อุตสาหกรรมที่ใช้ fossil fuel ในการผลิต อุตสาหกรรมการแปรรูปไม้และการรักษาเนื้อไม้ อุตสาหกรรมเพื่อการเกษตรเช่นการใช้สารเคมีปราบศัตรูพืช เป็นต้น (Giger และ Blumer, 1974; Lijinsky, 1991) สารประกอบ PAHs สามารถเข้าสู่สิ่งแวดล้อมได้หลายวิธี เช่น มาจากการรั่วไหลของน้ำมันในระหว่างการขนส่ง น้ำทิ้งจากโรงกลั่นน้ำมัน น้ำทิ้งจากโรงงานต่าง ๆ ควันท่อไอเสียรถยนต์ การใช้และการกำจัดผลิตภัณฑ์จากปิโตรเลียม นอกจากนี้ PAHs ยังสามารถเกิดขึ้นได้เองโดยธรรมชาติเช่น จากน้ำมันที่ไหลซึมออกจากเนื้อไม้ น้ำที่ชะออกมาจากป่า หรือเกิดจากไฟไหม้ป่า เป็นต้น (Giger และ Blumer, 1974; La Flamme และ Hites, 1978; Cerniglia, 1992) PAHs จัดเป็นสารที่มีอันตรายอย่างสูงต่อสิ่งแวดล้อมและมนุษย์ เนื่องจากสารประกอบ PAHs มีคุณสมบัติที่ก่อให้เกิดมะเร็ง (carcinogenic) ก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของยีน (mutagenic) และก่อให้เกิดทารกในครรภ์รูปร่างผิดปกติ (teratogenic) ซึ่งเป็นอันตรายร้ายแรงต่อชีวิตของประชากรโลก (Keith และ Teilard, 1979) ดังนั้น การสะสมของสาร PAHs ในสิ่งแวดล้อมจึงจัดเป็นปัญหาที่ร้ายแรงที่มีผลกระทบต่อคุณภาพชีวิตของประชากรโลก

รายงานของสำนักงานคุ้มครองสิ่งแวดล้อมของสหรัฐอเมริกา (The U.S. Environmental Protection Agency, EPA) ได้กำหนดให้สาร PAHs รวม 16 ชนิดเป็นสารพิษอันตรายที่ควรให้ความสำคัญในอันดับต้นๆ ในอันที่จะป้องกันการรั่วไหลหรือปนเปื้อนสู่สิ่งแวดล้อม ซึ่งได้แก่ แนพธาซีน (naphthalene) อะซีแนพทีน (acenaphthene) อะซีแนพทิลีน (acenaphthylene) ฟลูออรีน (fluorene) ฟีนแอนทรีน (phenanthrene) แอนทราซีน (anthracene) ฟลูออแรนทีน (fluoranthene) ไพรีน (pyrene) ไครซีน (chrysene) เบนโซ[เอ]แอนทราซีน (benz[a]anthracene) เบนโซ[บี]ฟลูออแรนทีน (benzo[b]fluoranthene) เบนโซ[เอ]ไพรีน (benzo[a]pyrene) เบนโซ[จี,เอช,ไอ]เพอริรีน (benzo[g,h,i]perylene) อินดีโน[1,2,3-ซีดี]ไพรีน (indeno[1,2,3-cd]pyrene) ไดเบนโซ[เอ,เอช]แอนทราซีน (dibenz[a,h]anthracene) ดังแสดงโครงสร้างโมเลกุลในรูปที่ 1.1

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 1.1 โครงสร้างโมเลกุลของ PAHs ทั้ง 16 ชนิดตามรายงานของ U.S. EPA (Wilson and Jones, 1993)

ปัจจุบันนี้ ประเทศไทยได้มีการพัฒนาทางอุตสาหกรรมและทางเกษตรกรรมที่เพิ่มมากขึ้น จึงส่งผลให้เกิดปัญหาการปนเปื้อนของสาร PAHs และตกค้างในสิ่งแวดล้อม มีการกำหนดพระราชบัญญัติวัตถุอันตราย พ.ศ. 2535 โดยจัดประเภทของวัตถุอันตรายในประเทศเป็น 9 ประเภท โดยจัด PAHs เป็นวัตถุอันตรายประเภทที่ 7 คือ วัตถุที่ก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรม (พระราชบัญญัติวัตถุอันตราย, 2535) และมีการออกพระราชบัญญัติส่งเสริมและรักษาคุณภาพสิ่งแวดล้อม พ.ศ. 2535 ในส่วนที่ 6 มาตรา 78 กล่าวถึงการเก็บรวบรวม การขนส่ง และกาจัดการด้วยประการใดๆ เพื่อบำบัดและจัดขยะมูลฝอยและของเสียอื่นที่อยู่ในสภาพเป็นของแข็ง และการป้องกันและควบคุมมลพิษที่เกิดจากหรือมีที่มาจากการทำงานเหมืองแร่ การสำรวจและการขุดเจาะน้ำมัน ก๊าซธรรมชาติ และสารไฮโดรคาร์บอนทุกชนิดทั้งบนบกและในทะเล หรือการป้องกันและควบคุมมลพิษที่เกิดจากหรือมีที่มาจาก การปล่อยทิ้งน้ำมันและการทิ้งของเสียและวัตถุอื่นๆ จากเรือเดินทะเล เรือบรรทุกน้ำมัน และเรือประเภทอื่น ในมาตราที่ 79 กล่าวถึงการกำหนดหลักเกณฑ์ มาตรการและวิธีการเพื่อควบคุมการเก็บ รวบรวม การรักษาความปลอดภัย การขนส่งเคลื่อนย้าย การนำเข้าและส่งออก และการจัดการบำบัดและกำจัดของเสียอันตรายดังกล่าวด้วยวิธีการที่เหมาะสมและถูกต้องตามหลักวิชาการที่เกี่ยวข้อง (พระราชบัญญัติส่งเสริมและรักษาคุณภาพสิ่งแวดล้อมแห่งชาติ, 2535) การแก้ปัญหาเรื่องการปนเปื้อนของ PAHs นั้นนอกจากจะเป็นการรักษาสภาพแวดล้อมแล้ว ยังมีความสำคัญในระบบการผลิตในปัจจุบัน ทั้งนี้เนื่องจากวงการธุรกิจและอุตสาหกรรมหลายประเทศได้ให้ความสำคัญในเรื่องการรักษาสภาพแวดล้อมและเริ่มใช้เงื่อนไขเรื่องสิ่งแวดล้อมในเชิงการตลาดและการยอมรับในตัวสินค้าและบริการ โดยการกำหนดมาตรฐานการจัดการสิ่งแวดล้อม ISO14000 สำหรับอุตสาหกรรมขึ้น งานวิจัยที่จะแก้ปัญหาสารพิษตกค้างในสิ่งแวดล้อมจึงนับว่ามีความสำคัญมากอย่างหนึ่ง

PAHs จัดเป็นสารประกอบ hydrophobic จึงละลายน้ำได้น้อยมาก ด้วยคุณสมบัติดังกล่าวจึงทำให้สาร PAHs ถูก biological uptake ได้น้อย (Aronstein และคณะ, 1991) จึงยากต่อการสลายตัวตามธรรมชาติและโดยทางชีวภาพ จึงตกค้างอยู่ในสิ่งแวดล้อมในปริมาณที่แตกต่างกัน เช่นตั้งแต่ 5 ng/g ของดินในบริเวณที่รกร้าง จนถึง 1.79×10^6 ng/g ของดินบริเวณโรงกลั่นน้ำมัน (Cerniglia, 1992) การสลายตัวของสาร PAHs ที่เกิดขึ้นตามธรรมชาติจะเกิดขึ้นได้โดยการระเหย, Photooxidation, ปฏิกริยาออกซิเดชันทางเคมี และการย่อยสลายโดยจุลินทรีย์เป็นต้น (Cerniglia, 1992) อัตราการสลายสาร PAHs ในสิ่งแวดล้อมขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายชนิด เช่น คุณสมบัติทางกายภาพและคุณสมบัติทางเคมีรวมถึงปริมาณและความเป็นพิษของสาร PAHs ชนิดต่างๆ ความสามารถของเชื้อจุลินทรีย์ในการใช้สาร PAHs เป็นแหล่งคาร์บอน ปัจจัยทางกายภาพของดินและน้ำ เช่น ปริมาณออกซิเจน ความเข้มแสง ความเป็นกรดต่างและอุณหภูมิ เป็นต้น (Cerniglia and Heitkamp, 1989; Cerniglia, 1992) การย่อยสลายทางชีวภาพของสารประกอบ PAHs ที่มีน้ำหนักโมเลกุลน้อย เช่น Naphthalene, Phenanthrene, Anthracene และ Acenaphthylene เป็นต้น จะเกิดขึ้นได้เร็วกว่าสาร PAHs ที่มีน้ำหนักโมเลกุลมากเช่น Chrycene (Cerniglia and Heitkamp, 1989)

การสลายสารประกอบ PAHs ที่มีอยู่ในปัจจุบันก็เหมือนกับการกำจัดสารพิษอันตรายทั่วไปซึ่งจำแนกได้เป็น 5 กลุ่มดังนี้ (Lee และคณะ, 1996)

1. วิธีการเผาที่อุณหภูมิสูง (incineration) โดยการเก็บรวบรวม PAHs ไว้ในภาชนะแล้วนำเข้าเตาเผา (incinerator) ชนิดพิเศษที่อุณหภูมิสูงกว่า 2000°F แล้วนำไปฝังกลบ แต่อย่างไรก็ตามวิธีการนี้อาจก่อให้เกิดสารพิษชนิดใหม่เกิดขึ้นได้ (Cobb และคณะ, 1993)
2. วิธีการทางกายภาพ (physical alteration) เช่น การใช้ความร้อนหรือใช้อากาศเป่าเข้าไปในบริเวณที่มีการปนเปื้อน PAHs หรือการฝังกลบ (landfill) ด้วยกรรมวิธีที่ปลอดภัย
3. วิธีการทางเคมี (chemical alteration) เป็นการเติมสารเคมีลงไปทำปฏิกิริยากับ PAHs เพื่อให้เกิดการสลายอย่างสมบูรณ์ แล้วจึงปล่อยของเสียลงสู่ภาชนะเก็บต่อไป
4. วิธีการทางเคมี-ฟิสิกส์ (physico-chemical technique) เช่นการเติมถ่านกัมมันต์ (activated carbon) ลงไปในบริเวณที่มีการปนเปื้อน PAHs นอกจากนี้ยังมีวิธีการทำลายโดยใช้แสงอัลตราไวโอเล็ต หรือรังสีแกมมา
5. วิธีการบำบัดทางชีวภาพ (bioremediation) เป็นวิธีการกำจัดสารพิษโดยใช้สิ่งมีชีวิตเช่น จุลินทรีย์ต่างๆ ที่สามารถย่อยสลาย PAHs ให้หมดความเป็นพิษโดยใช้ PAHs เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงานในการเจริญของจุลินทรีย์ (Baker and Herson, 1994) ทำให้ PAHs ถูกกำจัดไปอย่างถาวร (mineralization) หรือเปลี่ยนแปลงโครงสร้าง (transformation) ของ PAHs ไปเป็นสารอื่นเพื่อลดความเป็นพิษของ PAHs ให้น้อยลงหรือหมดไป และวิธีการนี้ยังสามารถใช้ร่วมกับวิธีอื่นๆ เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการบำบัด

การบำบัดการปนเปื้อนของ PAHs โดยการใช้อุณหภูมิสูงมีการศึกษากันมานานแล้ว และมีรายงานว่าจุลินทรีย์หลายชนิดสามารถย่อยสลายหรือเปลี่ยนแปลงโครงสร้างโมเลกุลของ PAHs โดยจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลาย PAHs พบทั้ง แบคทีเรีย ราและยีสต์ รวมทั้งสาหร่าย (Cerniglia, 1992) การสลายสารประกอบ PAHs โดยใช้จุลินทรีย์นับเป็นวิธีการสำคัญในการกำจัดสารประกอบ PAHs ออกจากตะกอนและผิวดิน (Sims และคณะ, 1990; Weissenfels และคณะ, 1990) จุลินทรีย์มีคุณสมบัติพิเศษในด้านความสามารถที่จะปรับตัวให้เข้ากับสภาพแวดล้อมเพื่อให้ดำรงอยู่ได้ ความสามารถพิเศษนี้เองที่จะทำให้จุลินทรีย์สามารถใช้สารประกอบต่างๆ ได้อย่างกว้างขวางเพื่อเป็นแหล่งพลังงานและแหล่งคาร์บอนในการเจริญเติบโตและมีชีวิตรอดอยู่ได้ การศึกษาเพื่อที่จะหาจุลินทรีย์ที่มีศักยภาพในการย่อยสลายสารประกอบ PAHs จึงเป็นสิ่งที่น่าสนใจและควรศึกษาให้เข้าใจอย่างลึกซึ้ง เพื่อจะนำมาประยุกต์ใช้ให้เกิดประโยชน์กับประเทศไทย

ดังนั้นการพัฒนาเทคโนโลยีทางชีวภาพเพื่อการกำจัดสาร PAHs ในสิ่งแวดล้อมจึงเป็นสิ่งที่จำเป็นในปัจจุบันที่ต้องศึกษาและเข้าใจให้ลึกซึ้ง ถึงแม้ว่าวิธีการกำจัดสารประกอบ PAHs โดยจุลินทรีย์จะมีการนำไปใช้อย่างกว้างขวางในต่างประเทศ เช่น สหรัฐอเมริกา ยุโรป และญี่ปุ่นเช่นการใช้แบคทีเรียในการย่อยสลาย

คราบน้ำมันดิบซึ่งส่วนมากมี PAHs เป็นองค์ประกอบอยู่ด้วย (Claxton และคณะ, 1991) อย่างไรก็ตามในการที่จะนำเอาวิธีการนี้มาใช้ในประเทศไทยจำเป็นต้องมีการศึกษาความเป็นไปได้ของวิธีการนี้ก่อนเนื่องจากสภาพแวดล้อมเช่น อุณหภูมิ และความชื้น รวมทั้งภูมิอากาศของประเทศไทยมีความแตกต่างกับประเทศในแถบยุโรป และอเมริกา ดังนั้นจึงอาจเป็นไปได้ว่าชนิดและประสิทธิภาพของจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการนำมาใช้ในกระบวนการบำบัดทางชีวภาพน่าจะแตกต่างกันไปด้วย นอกจากนี้ในประเทศไทยยังไม่มีมีการนำจุลินทรีย์มาใช้ในการบำบัดการปนเปื้อนของ PAHs อย่างจริงจังเนื่องจากยังมีองค์ความรู้ทางด้านนี้น้อยมาก งานวิจัยนี้จะสามารถทำให้เกิดการพัฒนาเทคโนโลยีทางชีวภาพเพื่อการเสาะหาเชื้อจุลินทรีย์ที่มีศักยภาพและความเหมาะสมที่จะใช้งานในท้องถิ่นประเทศไทย เพื่อการแก้ไขสภาวะแวดล้อมของประเทศที่เกิดจากอุตสาหกรรมทั้งในปัจจุบันและในอนาคตที่จะเพิ่มมากขึ้น

ในงานวิจัยนี้ได้คัดแยกแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายสาร PAHs จากแหล่งดินในบริเวณต่างๆ และศึกษาความสามารถของเชื้อที่คัดแยกได้ในการย่อยสลายสาร PAHs ชนิดต่างๆ รวมทั้งจำแนกชนิดของแบคทีเรียที่คัดแยกได้นั้นด้วย



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 2

อุปกรณ์ เคมีภัณฑ์และวิธีทดลอง

อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

1. เครื่องนึ่งอบฆ่าเชื้อ (autoclave) ของบริษัท Kakusan, Japan.
2. เครื่องเขย่าชนิดควบคุมอุณหภูมิ รุ่น G-27 ของบริษัท New Brunswick Scientific, USA.
3. เครื่องชั่ง รุ่น L2200P และ A200S ของบริษัท Sartorius, USA.
4. เครื่องปั่นผสม รุ่นG-560E ของบริษัท Scientific Industris, USA.
5. ตู้บ่มเชื้อ ของบริษัท MeCFMMert, Germany.
6. เครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดควบคุมอุณหภูมิ ของบริษัท Kubota, Japan.
7. ตู้เย็นเชื้อ รุ่นBVT-124 ของบริษัท International Scientific Supply, USA.
8. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง รุ่น Spectronic 21 ของบริษัท Bausch & Lomb, USA.
9. เครื่องวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง รุ่น 240 ของบริษัท Corning, USA.
10. กล้องจุลทรรศน์ รุ่นCHK ของบริษัท Olympus, Japan.
11. บีเปต รุ่น P100 P200 P1000 และ P5000 ของบริษัท Gilson, France.
12. หัวกรองชนิด PTFE ขนาดความกว้างรู 0.20 ไมโครเมตร รุ่น DISMIC-13JP ของบริษัท Tokyo Roshi Kaisha, Japan.
13. หลอดแช่แข็ง (cryotube) ของบริษัท Nalgene, USA.
14. เครื่องระเหยแห้งแบบสุญญากาศ (rotary vacuum evaporator) รุ่น N ของบริษัท Tokyo Rikakikai, Japan.
15. ชุดเครื่องมือไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโตกราฟี (high performance liquid chromatography, HPLC)
 - ลิควิดโครมาโตกราฟี (liquid chromatography) รุ่น LC-3A ของบริษัท Shimadzu, Japan.
 - คอลัมน์ (column): Senshu Pak Pegasil ODS ขนาด 6.4x150 มม. ของบริษัท Senshu Scientific, Japan.
 - เครื่องตรวจสอบ (UV-visible detector) รุ่น SPD-2A ของบริษัท Shimadzu, Japan.

- เครื่องบันทึก (recorder) Chromatopac รุ่น C-R1A ของบริษัท Shimadzu, Japan.

16. กระบอกฉีดยาขนาดเล็ก (microsyringe) รุ่น MS-R50 ของบริษัท Exmire, USA.

17. ชุดเครื่องมือที่ใช้ในการบ่งชี้ชนิดทางอนุกรมวิธานของแบคทีเรียที่คัดแยกโดยวิธี 16 เอส ไรบิโอซิมล์ดี เอ็นเอ

- เครื่องพอลิเมอเรสเชนรีแอคชัน (polymerase chain reaction, PCR) รุ่น 2400 ของบริษัท Perkin Elmer Cetus, USA.
- ชุดเครื่องมือทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิส (agarose gel electrophoresis) Mini gel electrophoresis system Mupid-2 ของบริษัท Advance, Japaan.
- เครื่องหาลำดับเบส (sequencer) รุ่น 373 DNA sequencing system ของบริษัท Applied Biosystem, USA. ติดตั้งกับคอมพิวเตอร์รวบรวมและวิเคราะห์ข้อมูล Macintosh R และ printer แบบ Tcktronix phaser TM11

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เคมีภัณฑ์

1. แนพทาลีน (naphthalene), ฟีนแอนทรีน (phenanthrene) และ อะซีแนพทีน (acenaphthene) ของบริษัท Sigma, USA.
2. แอนทราซีน (anthracene), อะซีแนพทิลีน (acenaphthylene), ไดเบนโซฟูแรน (dibenzofuran), ฟลูออรีน (fluorene), ฟลูออแรนทีน (fluoranthene) และ ไพรีน (pyrene) ของบริษัท Kanto Chemical, Japan.
3. ทริปโตน (tryptone) ของบริษัท Difco Laboratories, USA.
4. ผงสกัดจากยีสต์ (yeast extract) ของบริษัท Difco Laboratories, USA.
5. ภู่นม Bacto agar ของบริษัท Difco Laboratories, USA.
6. โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ของบริษัท E Merck, Germany.
7. แอมโมเนียมไนเตรท (NH_4NO_3) ของบริษัท BDH Chemical, AUS.
8. ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$) ของบริษัท Carlo ERBA, France.
9. โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) ของบริษัท AJEX Chemicals, AUS.
10. แมกนีเซียมซัลเฟต ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) ของบริษัท Carlo ERBA, France.
11. เฟอรัสคลอไรด์ ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) ของบริษัท Carlo ERBA, France.
12. แคลเซียมคลอไรด์ ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) ของบริษัท Carlo ERBA, France.
13. โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ของบริษัท E Merck, Germany.
14. กรดไฮโดรคลอริก (HCl) ของบริษัท BDH Chemical, AUS.
15. ไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (CH_3SOCH_3) ของบริษัท Carlo ERBA, France.
16. เอทิลอะซิเตท ($\text{CH}_3\text{COOC}_2\text{H}_5$) ของบริษัท E Merck, Germany.
17. เมทานอล (CH_3OH) ของบริษัท E Merck, Germany.
18. กลีเซอรอล ของบริษัท Carlo ERBA, France.

วิธีการทดลอง

3.1 การเก็บตัวอย่างดิน

เก็บตัวอย่างดินจากแหล่งดินต่างๆ ที่มีการปนเปื้อนจากสารปิโตรเลียม หรือสารเคมีอันตรายเช่นยากำจัดศัตรูพืช มาเป็นเวลานาน โดยเก็บดินที่ความลึกจากผิวดินลงไปถึงระดับ 2-5 ซม. แยกขยะและหินออก เก็บดินไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C จนกว่าจะนำไปแยกเชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลาย PAHs ได้

แหล่งที่เก็บตัวอย่างดินปนเปื้อนมีดังนี้

1. โรงซ่อมยานยนต์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
2. โรงกลั่นน้ำมันบางจาก กรุงเทพฯ
3. โรงกลั่นน้ำมันไทยออยล์ กรุงเทพฯ
4. โรงซ่อมหัวรถจักร สถานีรถไฟบางกอกน้อย กรุงเทพฯ
5. คูซ่อมรถยนต์ จังหวัดปราจีนบุรี
6. สวนผลไม้ จังหวัดปราจีนบุรี
7. สวนผัก จังหวัดราชบุรี
8. นาข้าว จังหวัดสระบุรี

3.2 การแยกเชื้อแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลาย PAHs จากดิน

3.2.1 การเพิ่มจำนวนแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลาย PAHs

ใส่ดินตัวอย่างน้ำหนัก 20 กรัม ใส่ลงในขวดรูปชมพูนขนาด 250 มล. ซึ่งบรรจุอาหารเหลว CFMM (ภาคผนวก ก1) (Omori และคณะ, 1992) ปริมาตร 100 มล. นำไปเขย่าบนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิ 30 °C ด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาดังตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำส่วนน้ำใสซึ่งเป็นหัวเชื้อปริมาตร 5 มล. ปลูกลงในอาหารเหลว CFMM ปริมาตร 45 มล. ที่เติม PAHs ได้แก่ ฟีนานทรีน แอนทราซีนหรืออะซีแนฟลิซีน ความเข้มข้น 0.1 มก.ต่อมล. นำไปบ่มบนเครื่องเขย่าที่สภาวะเดิม สังเกตการเจริญของแบคทีเรีย จากการขุ่นของอาหารเหลวหรือการเปลี่ยนสีของอาหาร ถ้าอาหารเหลวที่พบการเจริญของแบคทีเรียปริมาตร 5 มล. ลงในอาหารใหม่ โดยทำซ้ำทั้งหมด 5 ครั้ง เพื่อเพิ่มจำนวนแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลาย PAHs ให้มากขึ้น

3.2.2 การคัดแยกแบคทีเรียสายพันธุ์ที่สามารถย่อยสลาย PAHs ได้

นำอาหารเหลว CFMM ที่มีการเจริญของแบคทีเรียจากข้อ 3.2.1 มาเจือจางด้วยสารละลาย 0.85% โซเดียมคลอไรด์ ให้ได้ความเข้มข้นที่เหมาะสม แล้วนำไปเกลี่ยบนอาหารแข็ง CFMM จากนั้นพ่นทับผิวหน้าอาหารด้วยสารละลาย 2.0 % PAHs ในไดเอทิลอีเทอร์ (Kiyohara และคณะ, 1982) จากนั้นผึ่งขอบจานอาหารให้สนิทแล้วนำไปป่มที่อุณหภูมิ 30 °C จนเห็นโคโลนีของแบคทีเรีย โดยแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลาย PAHs ได้จะมีบริเวณใสล้อมรอบโคโลนีบนผิวหน้าของอาหารแข็ง นำแบคทีเรียที่คัดแยกได้มาเลี้ยงในอาหารเหลว CFMM ที่เติม PAHs เพื่อยืนยันความสามารถในการย่อยสลาย PAHs

เก็บเชื้อแบคทีเรียที่คัดแยกได้โดยการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียในอาหารเหลว CFMM ที่เติม PAHs จนมีการเจริญเต็มที่ ผสมกับกลีเซอรอลให้ความเข้มข้นสุดท้ายของกลีเซอรอลเป็น 30% (v/v) ของอาหารเลี้ยงเชื้อ จากนั้นบรรจุลงในหลอดแช่แข็ง (cryotube) เก็บที่อุณหภูมิ -70 และ -20 °C หรือเก็บแบคทีเรียบนอาหารแข็ง CFMM ที่มี PAHs วางบนฝาจานอาหารเลี้ยงเชื้อไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C เพื่อใช้ในการทดลองต่างๆ ต่อไป

3.3 การศึกษาการเพิ่มจำนวนและความสามารถของแบคทีเรียที่คัดแยกได้ในการย่อยสลาย PAHs

เตรียมหัวเชื้อของแบคทีเรียโดยนำโคโลนีเดี่ยวบนอาหารแข็ง CFMM ปลูกลงในอาหารเหลว CFMM ที่เติม PAHs 0.1 มก.ต่อมล. นำไปเขย่าบนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิ 30 °C ด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที โดยแบคทีเรียที่เจริญในพีแชนทรีนใช้เวลา 2 วัน ส่วนแบคทีเรียที่เจริญในแอนทราซีนและอะซีแนฟธิลีนใช้เวลา 1 วัน เมื่อครบเวลาปั่นแยกเซลล์แบคทีเรียด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นล้างเซลล์ด้วยสารละลาย 0.85% โซเดียมคลอไรด์ 3 ครั้ง แล้วแขวนลอยเซลล์ให้ได้ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตรเท่ากับ 0.1 นำสารละลายเซลล์ที่ได้มาเขย่าบนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิ 30 °C ด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 12 ชั่วโมงเพื่อให้แบคทีเรียใช้อาหารที่สะสมในเซลล์จนหมดไป จึงนำแบคทีเรียไปใช้ในการทดลอง

การทดลองแบ่งออกเป็น 3 ชุดคือ

1. ชุดทดลอง ให้หลอดทดลองบรรจุอาหารเหลว CFMM ปริมาตร 5 มล. ที่เติม PAHs (ภาคผนวก ข1) และหัวเชื้อแบคทีเรียที่เตรียมได้ปริมาตร 0.1 มล.

2. ชุดควบคุมการเจริญของแบคทีเรียที่ไม่ได้เกิดจากการย่อยสลาย PAHs โดยใช้หลอดทดลองบรรจุอาหารเหลว CFMM ปริมาตร 5 มล. เติมห่วงเชื้อแบคทีเรียที่เตรียมได้ ปริมาตร 0.1 มล.
3. ชุดควบคุมการลดลงของ PAHs เนื่องจากการระเหิด โดยใช้หลอดทดลองบรรจุอาหารเหลว CFMM ปริมาตร 5 มล. ที่เติม PAHs

ปริมาณพีแนทรีนและแอนทราซีนที่เติมในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวในการทดลองนี้ใช้ 0.1 มก.ต่อมล. ส่วนอะซีแนฟลิคีนซึ่งระเหิดง่ายเพิ่มปริมาณเป็น 0.6 มก.ต่อมล. ติดตามการเจริญและการเปลี่ยนแปลงของชุดทดลองเปรียบเทียบกับชุดควบคุมดังนี้

ตรวจการเจริญของเชื้อในชุดทดลองและชุดควบคุมการเจริญของแบคทีเรียที่ไม่ได้เกิดจากการย่อยสลาย PAHs ทุก 12 ชั่วโมง โดยวิธี viable plate count โดยนำอาหารเหลวมาเจือจางด้วยสารละลาย 0.85% โซเดียมคลอไรด์ให้มีความเข้มข้นที่เหมาะสม แล้วเกลี่ยลงบนอาหารแข็ง LB (Luria Bertani) (ภาคผนวก ก3) บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 3 วัน แล้วตรวจนับจำนวนโคโลนี

สกัด PAHs ที่เหลืออยู่ในชุดทดลองและชุดควบคุมการลดลงของ PAHs เนื่องจากการระเหิดตามวิธีการของ Grifoll และคณะ (1992) ดังนี้

นำอาหารเหลวมาปรับค่าความเป็นกรด-ด่างให้เท่ากับ 2.0-3.0 ด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น จากนั้นเติมเอธิลอะซีเตทปริมาตร 1 เท่าของน้ำเลี้ยงเชื้อ ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องปั่นผสม ปั่นด้วยความเร็วสูงเป็นเวลา 2 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้แยกชั้น แยกส่วนเอธิลอะซีเตทเก็บไว้ จากนั้นสกัดซ้ำด้วยเอธิลอะซีเตทปริมาตร 1 เท่าของน้ำเลี้ยงเชื้อตามวิธีเดิมอีก 2 ครั้ง รวมส่วนเอธิลอะซีเตททั้งหมดมาเติมโซเดียมซัลเฟตแอนไฮดรัสเพื่อกำจัดน้ำที่ปนมาด้วย จากนั้นแยกส่วนเอธิลอะซีเตทไประเหยแห้งด้วยเครื่องระเหยแห้งสูญญากาศแบบหมุนจนได้ตะกอนสารมัธยันต์ที่แห้งสนิท เติมเมธานอลปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ลงไปละลายผงสารมัธยันต์ในขวดลดปริมาตร นำมากรองผ่านชุดกรองสำเร็จรูปชนิด PTFE ขนาดรูกว้าง 0.2 ไมโครเมตร ใส่ในหลอดแก้วขนาดเล็ก เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 °C จนกว่าจะนำไปวิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC

การวิเคราะห์ปริมาณ PAHs โดยวิธี HPLC

สร้างกราฟมาตรฐานของ PAHs แต่ละชนิดโดยเติม PAHs ในอาหารเหลว CFMM ให้มีความเข้มข้น 0, 10, 20, 40, 60, 80 และ 100 มก.ต่อมล.ตามลำดับ ทำการสกัดด้วยเอธิลอะซีเตทด้วยวิธีเดียวกับที่กล่าวข้างต้นแล้วนำไปฉีด HPLC เพื่อนำพื้นที่ใต้กราฟจากการวิเคราะห์มาสร้างกราฟมาตรฐาน (ภาคผนวก ค1-3)

ระบบของ HPLC ที่ใช้ประกอบด้วยส่วนต่างๆ ดังนี้ เครื่องลิควิดโครมาโตกราฟี รุ่น LC-3A (Shimadzu, Japan) ที่ใช้คอลัมน์ Senshu Pak Pegasil ODS ขนาด 4.6x150 มิลลิเมตร ตั้งอุณหภูมิคอลัมน์ที่ 40 °C ตรวจสอบการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 275 นาโนเมตร สารละลายตัวทำละลายเป็นสารละลายเมธานอล 80% และใช้อัตราการไหลเท่ากับ 1 มิลลิลิตรต่อนาที ฉีดสารตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์ 20 ไมโครลิตรด้วยกระบอกฉีดขนาดเล็กรุ่น MS-10 นำพื้นที่ได้กราฟที่ได้ในแต่ละตัวอย่างไปเปรียบเทียบหาปริมาณ PAHs ที่ลดลงเทียบกับชุดควบคุม คำนวณหาปริมาณ PAHs ที่ลดลงโดยเทียบกับกราฟมาตรฐาน

3.4 ทดสอบความจำเพาะในการใช้ PAHs ชนิดอื่นในการเจริญของแบคทีเรียที่คัดแยกได้ (substrate specificity)

ทดสอบความสามารถของแบคทีเรียที่คัดแยกได้ในการใช้ PAHs ชนิดอื่นเป็นแหล่งพลังงานและแหล่งคาร์บอนในการเจริญนอกเหนือจาก PAH ที่ใช้ในการจำแนกแบคทีเรียชนิดนั้นๆ ซึ่งได้แก่ แนพธาซีน พีแนนทริน แอนทราซีน อะซีแนพธิน อะซีแนพธิดีน ฟลูออรีน ฟลูออแรนธิน และไพรีน รวมทั้งสารประกอบเฮเตอโรไซคลิกอะโรมาติก (heterocyclic aromatic compound) คือไดเบนโซฟูแรน โดยเติมหัวเชื้อปริมาตร 0.1 มล. ในอาหารเหลว CFMM ปริมาตร 5 มล. ในหลอดทดลองขนาด 22 ซม. ที่เติม PAH ที่ต้องการทดสอบแต่ละชนิดความเข้มข้น 0.1 มก.ต่อมล. ส่วนแนพธาซีนใช้ 0.2 มก.ต่อมล. โดยใช้วิธีเตรียมหัวเชื้อและวิธีการเลี้ยงเช่นเดียวกับที่ใช้ในข้อ 3.3 เก็บตัวอย่างทุก 2 วัน นำมาวัดการเจริญของแบคทีเรียโดยวิธี viable plate count และวิเคราะห์ปริมาณของ PAH ที่เหลืออยู่ด้วยวิธี HPLC

3.5 การจำแนกชนิดทางอนุกรมวิธานของแบคทีเรียที่คัดแยกได้

ทดสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากลักษณะโคโลนีบนอาหารแข็ง LB และลักษณะเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ร่วมกับการทดสอบการเจริญในแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ และผลการทดสอบทางชีวเคมีตามที่รายงานไว้ใน Bergey's manual of systematic bacteriology (Palleroni, 1984)

จำแนกชนิดทางอนุกรมวิธานของแบคทีเรียที่คัดแยกได้โดยการวิเคราะห์หาลำดับเบสของ 16 เอส โรโบโซมัลดีเอ็นเอ ดังแสดงขั้นตอนการวิเคราะห์ดังนี้

1 สกัด DNA จากเซลล์แบคทีเรียตามวิธีของ Ausubel และคณะ (1989) โดยละลายเซลล์แบคทีเรียในบัฟเฟอร์ TE เติมโปรตีนเอส เค เพื่อกำจัดโปรตีน เติม CTAB เพื่อกำจัดตะกอนจากเซลล์และโปรตีนที่เหลืออยู่ ตกตะกอนดีเอ็นเอในส่วนน้ำใสด้วยไอโซโพรพานอล จากนั้นละลายดีเอ็นเออีกครั้งด้วยบัฟเฟอร์ TE เติม RNase วัดปริมาณดีเอ็นเอโดยวิเคราะห์ด้วยค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 620 นาโนเมตร โดยใช้สูตรการคำนวณดังนี้

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

2 ตรวจสอบดีเอ็นเอที่สกัดได้โดยวิธีอีเล็กโตรโฟรีซิส โดยเติมสารละลายดีเอ็นเอลงหลุมบนอะกาโรสเจล 0.9 % นำไปวางใต้อีเล็กโตรโฟรีซิสบัฟเฟอร์ตรวจสอบดีเอ็นเอที่ได้โดยใช้ Marker 6 (λ / Sty I digested) เป็นตัวบ่งชี้ขนาดของดีเอ็นเอ ย้อมแถบดีเอ็นเอด้วยสีย้อมเอธิเดียมโบรไมด์ (0.5 $\mu\text{g/ml}$ ethidium bromide) ตรวจสอบแถบดีเอ็นเอภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต

3 เพิ่มจำนวนดีเอ็นเอโดยวิธี polymerase chain reaction (PCR)

ลำดับเบสของไพรเมอร์ที่ใช้ในการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอคือ

ไพรเมอร์ 1 8F 5'-TCGAATTCGGATCCAGTTTGATCCTGGCTC-3'

ไพรเมอร์ 2 15R 5'-TCGAATTCGGATCCAAGGAGGTGATCCAGCC-3'

นำรีเอเจนต์สำหรับทำปฏิกิริยาตามตารางที่ 2.1 มาผสมกันและนำไปใส่ในเครื่อง PCR ทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ 40 รอบ โดยใช้อุณหภูมิ 96 °C 1 นาที 55 °C 1 นาที 72 °C 12 นาที เมื่อครบ 40 รอบแล้วลดอุณหภูมิเหลือ 4 °C นำผลผลิตที่ได้มาทำให้บริสุทธิ์โดยการผ่านสับันคอลัมน์ (spun column; Perkin-Elmer, New Jersey, USA.) ตกตะกอนดีเอ็นเอคู่ผสม (cDNA) ด้วยเอธานอล วัดปริมาณดีเอ็นเอโดยวิเคราะห์ด้วยค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 620 นาโนเมตร

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 2.1 ส่วนผสมที่ใช้ในการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอโดยวิธี PCR

สารเคมี	ปริมาณ
10 x PCR buffer	10 μ l
d NTP mix	10 μ l
Primer 1 (8F)	1 μ l (Perkin-Elmer, New Jersey, USA.)
Primer 2 (15R)	1 μ l (Perkin-Elmer, New Jersey, USA.)
Template	50 ng
Taq DNA polymerase	0.5 μ l (Ampli Taq Gold™, Perkin-Elmer, New Jersey, USA.)

4 ติดฉลากดีเอ็นเอเพื่อวิเคราะห์และหาลำดับเบสของ 16 เอสโรโบโซมัลดีเอ็นเอ เนื่องจากเครื่องหาลำดับเบส (Sequencer) สามารถหาลำดับเบสได้ครั้งละ 400 เบส ดังนั้นจำเป็นต้องใช้ forward และ reward ไพร์เมอร์ (Perkin-Elmer, New Jersey, USA.) ทั้งหมด 8 คู่ ซึ่งไพร์เมอร์ที่ใช้มีดังนี้

34OR	:5'-ATTCCCCACTGCTGCCTCC-3'
52OR	:5'-CAGGAACCGCGGCTGCTGGC-3'
79OR	:5'-TGGACTACCAGGGTATCTAAT-3'
154OR	:5'-GAAAGGAGGTGATCCAGC-3'
6F	:5'-AGAGTTTGATCCTGGCTC-3'
52OF	:5'-GCTAACTCCGTGCCAGCAG-3'
81OF	:5'-AGGATTAGATACCCTGGTAG-3'
107OF	:5'-TGCATGGCTGTCGTCAGCTC-3'

นำรีเอเจนต์สำหรับทำปฏิกิริยาตามตารางที่ 2.2 มาผสมกันและนำไปใส่ในเครื่อง PCR ทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ 25 รอบ โดยใช้อุณหภูมิ 96 °C 10 วินาที 50 °C 5 วินาที 60 °C 4 นาที เมื่อครบ 25 รอบแล้วลดอุณหภูมิเหลือ 4 °C

ตารางที่ 2.2 ส่วนผสมที่ใช้ในการติดฉลากดีเอ็นเอโดยวิธี PCR

สารเคมี	ปริมาณ
Terminator Ready Reaction MiX	8.0 μ l
Template	
PCR product 30-90 ng	3-6 μ l
Primer	3.2 pmol/ μ l
H ₂ O	เติมให้ได้ปริมาตรสุดท้าย 20 μ l

หลังจากทำ PCR นำผลผลิตดีเอ็นเอที่ได้มาทำให้บริสุทธิ์โดยการตกตะกอนด้วยเอธานอล โดยนำสารละลายดีเอ็นเอมาเติมสารละลายโซเดียมอะซิเตทเข้มข้น 3 โมลาร์ pH 6.4 ผสมด้วย เครื่องปั่นผสม เติมเอธานอลแล้วแยกส่วนน้ำใสทิ้งด้วยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 15,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิ 4°C ล้างตะกอนด้วยเอธานอลเข้มข้น 70% ที่เย็นจัด 1 ครั้ง และระเหยเอธานอลให้แห้ง ละลายดีเอ็นเอด้วยบัฟเฟอร์ loading แล้วแช่ในน้ำร้อน 90 °C เป็นเวลา 2 นาที จากนั้นแช่ในอ่างน้ำแข็งจนกว่าจะนำมาใช้ นำสารละลายดีเอ็นเอที่ได้มาหยอดลงบนแผ่นพอลิอะคริลลาไมด์ (6.0 % polyacrylamide) หากำลังเบสโดยการวิเคราะห์ด้วยเครื่องหา ลำดับเบสที่ติดตั้งกับคอมพิวเตอร์ Macintosh R. ซึ่งรวบรวมและวิเคราะห์ข้อมูล เปรียบเทียบ ลำดับเบสของ 16 เอส โรโบโซมัลดีเอ็นเอของแบคทีเรียที่คัดแยกได้กับลำดับเบสที่มีรายงานไว้ใน EMBL และ Gen Bank. โดยใช้โปรแกรม BLAST (Altschul และคณะ, 1990)

บทที่ 3

ผลการทดลอง

3.1 การเพิ่มจำนวนแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลาย PAHs จากตัวอย่างดิน

จากการนำดินทั้ง 8 ตัวอย่าง มาเพิ่มจำนวนแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลาย PAHs ได้โดยนำมาเลี้ยงในอาหารเหลว CFMM ที่เติม PAHs ชนิดต่างๆ ลงไป ทำการถ่ายเชื้อและสังเกตการเจริญโดยดูจากความขุ่นและการเปลี่ยนสีของอาหารเหลว หลังจากการถ่ายเชื้อ 5 ครั้งเพื่อเพิ่มจำนวนแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลาย PAHs พบว่าดินหมายเลข 5 ที่เติมพีแนทรีนพบการเปลี่ยนสีของอาหารเป็นสีเหลืองและมีความขุ่นเพิ่มมากขึ้น ดินหมายเลข 1 ที่เติมแอนทราซีนมีการเปลี่ยนสีของอาหารเป็นสีน้ำตาลและมีความขุ่นเพิ่มมากขึ้น และดินหมายเลข 1 ที่เติมอะซีแนฟลิ้นมีการเปลี่ยนสีของอาหารเป็นสีเหลืองเข้มและอาหารเลี้ยงเชื้อมีความขุ่นเพิ่มมากขึ้นเช่นกัน มีรายงานว่า การเปลี่ยนสีของอาหารเลี้ยงเชื้อไปเป็นสีเหลืองส้มหรือน้ำตาล อาจเกิดจากการสะสมของสารมัธยันต์ชนิด ring cleavage compounds ที่เกิดจากการย่อยสลาย PAHs โดยจุลินทรีย์ (Mueller และคณะ, 1989) จึงนำดินตัวอย่างดังกล่าวที่ผ่านการเพิ่มจำนวนแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลาย PAHs ได้ไปแยกแบคทีเรียสายพันธุ์ที่ย่อยสลาย PAHs ในขั้นตอนต่อไป

3.2 การคัดแยกแบคทีเรียสายพันธุ์ที่ย่อยสลาย PAHs ให้บริสุทธิ์

จากการนำเชื้อแบคทีเรียในตัวอย่างดินที่ 1 และ 5 ซึ่งผ่านการถ่ายเชื้อมาแล้ว 5 ครั้งมาทำการแยกเชื้อแบคทีเรียที่ย่อยสลาย PAHs ให้บริสุทธิ์ โดยการนำมาเจือจางในสารละลาย 0.85 % โซเดียมคลอไรด์ให้ได้ความเข้มข้นที่เหมาะสม จากนั้นนำมาเกลี่ยบนอาหารแข็ง CFMM แล้วพ่นทับผิวหน้าอาหารแข็งด้วย PAHs ตามชนิดที่ใช้จำแนกในดินแต่ละตัวอย่าง พบว่ามีแบคทีเรียหลายสายพันธุ์ที่สามารถเจริญและสร้างบริเวณใสรอบโคโลนีบนอาหารแข็งที่ถูกพ่นทับผิวหน้าด้วย PAH ดังแสดงลักษณะโคโลนีของแบคทีเรียในรูปที่ 3.1



รูปที่ 3.1 ลักษณะบริเวณไซรอบโคโลนีของแบคทีเรียที่พบในตัวอย่างดินที่ 5 เมื่อเลี้ยงบนอาหารแข็ง CFMM ที่ปนทับผิวน้ำด้วยพีแนนทรินเป็นเวลา 4 วัน

จากการตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาเบื้องต้น โดยพิจารณาจากลักษณะโคโลนีของเชื้อ แบคทีเรียบนอาหารแข็ง CFMM ที่ปนทับผิวน้ำด้วย PAHs พบแบคทีเรียสายพันธุ์ต่างๆ ดังจำแนกไว้ใน ตารางที่ 3.1

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ตารางที่ 3.1 ลักษณะโคโลนีของแบคทีเรียที่แยกได้จากตัวอย่างดินบนอาหารแข็ง CFMM ที่พ้นทับผิวหน้า ด้วยพีแนทรีน แอนทราซีนหรืออะซีแนพรีลิน แล้วเกิดบริเวณใสรอบโคโลนี

PAHs	สายพันธุ์	ลักษณะโคโลนีบน CFMM
พีแนทรีน	P1.1	ขอบไม่เรียบ สีเหลือง แผ่เป็นฝ้าบางๆ รูปร่างไม่แน่นอน
	P1.2	ขอบไม่เรียบ สีเหลือง แผ่เป็นฝ้าบางๆ รูปร่างไม่แน่นอน
	P2	ขอบเรียบ สีเหลือง รูปร่างกลม โปร่งแสง
	P3	ขอบไม่เรียบ สีเหลือง รูปร่างไม่แน่นอน
แอนทราซีน	ANT1	ขอบเรียบ รูปร่างกลม สีเหลือง ทึบแสง
	ANT2	ขอบเรียบ รูปร่างกลม สีขาว ทึบแสง
	ANT3	ขอบไม่เรียบ สีเหลือง แผ่บางๆ รูปร่างไม่แน่นอน
อะซีแนพรีลิน	CU-A1	ขอบเรียบ กลม สีขาวขุ่น
	CU-A2	ขอบเรียบ กลม สีชมพู
	CU-A3	ขอบเรียบ กลม สีเหลือง
	CU-A4	ขอบเรียบ กลม สีขาวขุ่น ขนาดใหญ่กว่า CU-A1
	CU-A5	ขอบเรียบ บาง ตรงกลางขุ่น สีขาวขุ่น
	CU-A6	ขอบเรียบ กลม สีขาวขุ่นเป็นมัน มีขนาดใหญ่กว่า CU-A1

จากนั้นนำแบคทีเรียทั้งหมดที่คัดแยกได้มาทำให้บริสุทธิ์โดยการเชื่อมอาหารแข็ง LB และเปรียบเทียบความสามารถในการย่อยสลาย PAH ตามชนิดที่ใช้ในการคัดแยกในอาหารเหลว CFMM พบว่าแบคทีเรียที่ย่อยสลายพีแนทรีนได้ดีที่สุดเลือกสายพันธุ์ P2 แอนทราซีน เลือกสายพันธุ์ ANT1 และอะซีแนพรีลิน เลือกสายพันธุ์ CU-A1

3.3 ผลการจำแนกชนิดทางอนุกรมวิธานของแบคทีเรียสายพันธุ์ P2 ANT1 และ CU-A1

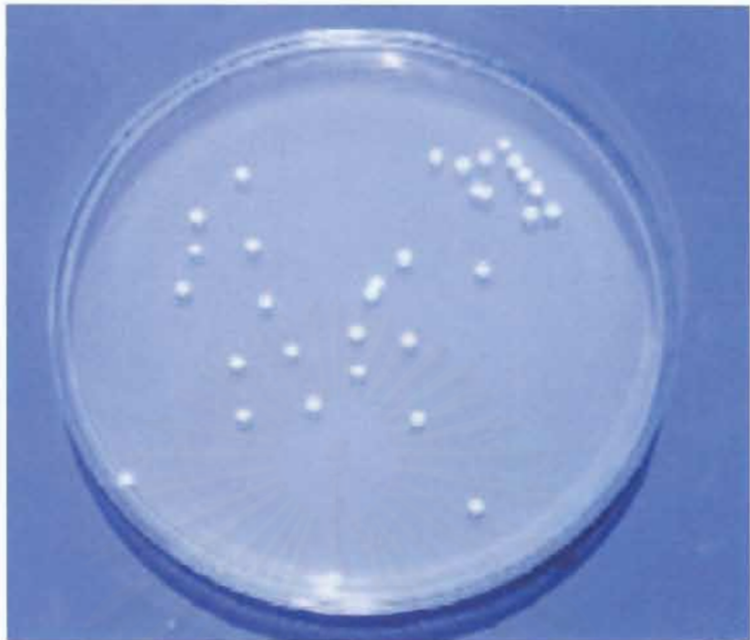
จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียสายพันธุ์ P2 ANT1 และ CU-A1 บนอาหารแข็ง LB พบว่ามีลักษณะโคโลนีดังแสดงในรูปที่ 3.2 3.3 และ 3.4 ตามลำดับ และเมื่อศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์พบลักษณะของเซลล์ดังแสดงในรูปที่ 3.5 3.6 และ 3.7 ตามลำดับ ซึ่งได้สรุปลักษณะทางสัณฐานวิทยาไว้ในตารางที่ 3.2 และลักษณะทางสรีรวิทยาได้แสดงไว้ในตารางที่ 3.3 ตามลำดับ



รูปที่ 3.2 ลักษณะโคโลนีของแบคทีเรียสายพันธุ์ P2 บนอาหารแข็ง LB



รูปที่ 3.3 ลักษณะโคโลนีของแบคทีเรียสายพันธุ์ ANT1 บนอาหารแข็ง LB



รูปที่ 3.4 ลักษณะโคโลนีของแบคทีเรียสายพันธุ์ CU-A1 บนอาหารแข็ง LB



รูปที่ 3.5 ลักษณะรูปร่างของแบคทีเรียสายพันธุ์ P2 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (1000X)



รูปที่ 3.6 ลักษณะรูปร่างของแมคทีเรียสายพันธุ์ ANT1 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (1000X)



รูปที่ 3.7 ลักษณะรูปร่างของแมคทีเรียสายพันธุ์ CU-A1 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (1000X)

ตารางที่ 3.2 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียสายพันธุ์ P2 ANT1 และ CU-A1

ลักษณะที่ศึกษา	ลักษณะที่สังเกตเห็น		
	P2	ANT1	CU-A1
<u>ลักษณะของเซลล์</u>			
การติดสีกรัม	กรัมลบ	กรัมลบ	กรัมลบ
รูปร่างของเซลล์	แท่ง	แท่ง	แท่ง
การติดสีสปอร์	ไม่สร้างสปอร์	ไม่สร้างสปอร์	ไม่สร้างสปอร์
<u>ลักษณะโคโลนีบนอาหารแข็ง LB</u>			
รูปร่าง			
สี	กลม	กลม	กลม
ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง	เหลืองเข้ม	เหลืองเข้ม	ขาวขุ่น
การผ่านของแสง	1-2 มม.	1-2 มม.	1-2 มม.
ลักษณะขอบ	โปร่งแสง	โปร่งแสง	ทึบแสง
	เรียบ	เรียบ	เรียบ

ตารางที่ 3.3 ลักษณะทางสรีรวิทยาของแบคทีเรียสายพันธุ์ที่คัดแยกได้

ลักษณะที่ศึกษา	ลักษณะทางสรีรวิทยา		
	P2	ANT1	CU-A1
1. การสร้างเอนไซม์ออกซีเดส (oxidase test)	+	-	+
2. การสร้างเอนไซม์คาตาเลส (catalase test)	+	+	+
3. การรีดิวซ์ไนเตรต (nitrate reduction)	-	+	+
4. การไฮโดรไลซ์ เอสคูลิน (esculin hydrolysis)	+	-	-
5. การสร้างเอนไซม์ยูรีเอส (urease)	+	+	+
6. การเกิดปฏิกิริยาบนอาหารแข็งปริปเปิลไอรอน (triple sugar iron agar reaction)	K/K	K/-	K/K
7. การเจริญบนอาหารแข็งแมคคองกี (growth of McConkey agar)	-	+	ND
8. การไฮโดรไลซ์เจลาติน (gelatin hydrolysis)	-	-	-
9. การสร้างไฮโดรเจนซัลไฟด์ (H ₂ S production)	-	-	-
10. ปฏิกิริยาออกซิเดทีฟ/เฟอร์เมนเตชัน (oxidative fermentation)	-	-	-
11. การสร้างอินโดล (indole production)	oxidative	-	ND
12. การดีคาร์บอกซิเลชันของไลซีน (lysine decarboxylation)	-	-	ND
13. การเคลื่อนที่ (motility)	+	ND	ND
14. การทดสอบเมธิลเรด (methyl red test)	-	-	+
15. การทดสอบ Vogas-Proskauer (Vogas-Proskauer reaction)	-	-	-
16. ซิมมอนซิเตรต (Simmon citrate)	-	-	-
17. การหมักคาร์โบไฮเดรต (carbohydrate fermentation test)	+	+	-
ดี-กลูโคส (D-glucose)	-	-	-
ดี-กาแลคโตส (D-galactose)	-	-	-
ดี-ฟรุคโตส (D-fructose)	-	-	-
ดี-แมนนิทอล (D-mannitol)	-	-	-

หมายเหตุ + : เชื้อมีเอนไซม์ชนิดที่ทดสอบหรือเจริญได้ในแหล่งคาร์บอนนั้น

- : เชื้อไม่มีเอนไซม์ชนิดที่ทดสอบหรือไม่มีการเจริญในสารตั้งต้นนั้นๆ

K : อาหารแข็งมีสมบัติเป็นต่างหรือกลาง

ND: ไม่ได้ทดสอบ

จากลักษณะทางสัณฐานวิทยาและลักษณะทางสรีรวิทยาที่แสดงไว้ในตารางที่ 3.2 และ 3.3 เมื่อนำมาเปรียบเทียบกับลักษณะที่รายงานไว้ใน Bergey's manual of systematic bacteriology ซึ่งรวบรวมโดย Palleroni (1984) พบว่าลักษณะทั้งสัณฐานวิทยาและสรีรวิทยาของแบคทีเรียสายพันธุ์ P2 ตรงกับแบคทีเรียในสกุล *Sphingomonas* แบคทีเรียสายพันธุ์ ANT1 ตรงกับแบคทีเรียในสกุล *Sphingomonas* และแบคทีเรียสายพันธุ์ CU-A1 ตรงกับแบคทีเรียในสกุล *Rhizobium*

จากผลการวิเคราะห์หาลำดับเบสของ 16 เอส โรโบโซมัลดีเอ็นเอของแบคทีเรียทั้ง 3 สายพันธุ์เปรียบเทียบกับลำดับเบสของ 16 เอส โรโบโซมัลดีเอ็นเอของแบคทีเรียในฐานข้อมูล Gen Bank โดยใช้โปรแกรม BLAST ได้ผลการตรวจสอบดังนี้

แบคทีเรียสายพันธุ์ P2 มีลำดับเบสของ 16 เอส โรโบโซมัลดีเอ็นเอ คล้ายกับลำดับเบสของ 16 เอส โรโบโซมัลดีเอ็นเอของ *Sphingomonas yanoikuyae* สายพันธุ์ B1 (Khan และคณะ, 1996) โดยมีความคล้ายคลึง (% homology) เท่ากับ 99% ดังที่แสดงการเปรียบเทียบลำดับเบสไว้ในรูปที่ 3.8 ดังนั้นจากผลการทดสอบทางสรีรวิทยาและทางสัณฐานวิทยาร่วมกับการวิเคราะห์ลำดับเบสของ 16 เอส โรโบโซมัลดีเอ็นเอ สามารถยืนยันได้ชัดเจนว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ P2 เป็นแบคทีเรียในสกุล *Sphingomonas*

แบคทีเรียสายพันธุ์ ANT1 มีลำดับเบสของ 16 เอส โรโบโซมัลดีเอ็นเอ คล้ายกับลำดับเบสของ 16 เอส โรโบโซมัลดีเอ็นเอของแบคทีเรียสกุล *Sphingomonas* โดยมีความคล้ายคลึง (% homology) เท่ากับ 99% ดังที่แสดงลำดับเบสไว้ในรูปที่ 3.9 ดังนั้นจากผลการทดสอบทางสรีรวิทยาและทางสัณฐานวิทยาร่วมกับการวิเคราะห์ลำดับเบสของ 16 เอส โรโบโซมัลดีเอ็นเอ สามารถยืนยันได้ชัดเจนว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ ANT1 เป็นแบคทีเรียในสกุล *Sphingomonas*

แบคทีเรียสายพันธุ์ CU-A1 มีลำดับเบสของ 16 เอส โรโบโซมัลดีเอ็นเอ คล้ายกับลำดับเบสของ 16 เอส โรโบโซมัลดีเอ็นเอของแบคทีเรียสกุล *Rhizobium* โดยมีความคล้ายคลึง (% homology) เท่ากับ 95% ดังที่แสดงลำดับเบสไว้ในรูปที่ 3.10 ดังนั้นจากผลการทดสอบทางสรีรวิทยาและทางสัณฐานวิทยาร่วมกับการวิเคราะห์ลำดับเบสของ 16 เอส โรโบโซมัลดีเอ็นเอ สามารถยืนยันได้ชัดเจนว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ CU-A1 เป็นแบคทีเรียในสกุล *Rhizobium*

<i>S. sp. P2</i>	: -----GATCCTGGCTCAGAACGAACGCTGGCGGCATGCCTAATACATGCAAGTCGAACGAGATCTTCGGATCTAGTGG :	73
<i>S. yanoikuyae</i>	: AGAGTTTGATCCTGGCTCAGAACGAACGCTGGCGGCATGCCTAATACATGCAAGTCGAACGAGATCTTCGGATCTAGTGG :	80
<i>S. sp. P2</i>	: CGCACGGGTGCGTAACGCGTGGGAATCTGCCCTTGGGTTCGGAATAACTTCTGGAAACGGAAGCTAATACCGGATGATGA :	153
<i>S. yanoikuyae</i>	: CGCACGGGTGCGTAACGCGTGGGAATCTGCCCTTGGGTTCGGAATAACTTCTGGAAACGGAAGCTAATACCGGATGATGA :	160
<i>S. sp. P2</i>	: CGTAAGTCCAAAGATTTATCGCCCAAGGATGAGCCCGCTAGGATTAGCTAGTTGGTGGGTAAAGGCTCACCAAGGCGA :	233
<i>S. yanoikuyae</i>	: CGTAAGTCCAAAGATTTATCGCCCAAGGATGAGCCCGCTAGGATTAGCTAGTTGGTGGGTAAAGGCTCACCAAGGCGA :	240
<i>S. sp. P2</i>	: CGATCCTTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTA :	313
<i>S. yanoikuyae</i>	: CGATCCTTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTA :	320
<i>S. sp. P2</i>	: GGGAAATATGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCAATGCCGCTGAGTGATGAAGGCCTTAGGGTTGTAAGCTCTTT :	393
<i>S. yanoikuyae</i>	: GGGAAATATGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCAATGCCGCTGAGTGATGAAGGCCTTAGGGTTGTAAGCTCTTT :	400
<i>S. sp. P2</i>	: TACCCGGGATGATAATGACAGTACCCGGGAGAATAAGCTCCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCCGGTAATACGGAGGGAG :	473
<i>S. yanoikuyae</i>	: TACCCGGGATGATAATGACAGTACCCGGGAGAATAAGCTCCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCCGGTAATACGGAGGGAG :	480
<i>S. sp. P2</i>	: CTAGCGTTGTTTCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGCTAGGCGGCTATTCAAGTCAGAGGTGAAAGCCCGGGGCTCAACC :	553
<i>S. yanoikuyae</i>	: CTAGCGTTGTTTCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGCTAGGCGGCTATTCAAGTCAGAGGTGAAAGCCCGGGGCTCAACC :	560
<i>S. sp. P2</i>	: CCGGAAGTGCCTTTGAAACTAGATAGCTTGAATCCAGGAGAGGTGAGTGAATCCGAGTGTAGAGGTGAAATTCGTAGA :	633
<i>S. yanoikuyae</i>	: CCGGAAGTGCCTTTGAAACTAGATAGCTTGAATCCAGGAGAGGTGAGTGAATCCGAGTGTAGAGGTGAAATTCGTAGA :	640
<i>S. sp. P2</i>	: TATTCGGAAGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTCACTGGACTGGTATTGACGCTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACA :	713
<i>S. yanoikuyae</i>	: TATTCGGAAGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTCACTGGACTGGTATTGACGCTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACA :	720
<i>S. sp. P2</i>	: GGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCGCTAAACGATGATAACTAGCTGTCAGGGCACATGGTGTTCGTTGGTGGCGCAGCTA :	793
<i>S. yanoikuyae</i>	: GGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCGCTAAACGATGATAACTAGCTGTCAGGGCACATGGTGTTCGTTGGTGGCGCAGCTA :	800
<i>S. sp. P2</i>	: CGCATTAAAGTTATCCGCCTGGGGAGTTACGGTCGCAAGATTAAGAACTCAAAGGAATTGACGGGGCCCTGCACAAGCGGT :	873
<i>S. yanoikuyae</i>	: ACGCATTAAAGTTATCCGCCTGGGGAGT-ACGGTCGCAAGATTAAGAACTCAAAGGAATTGACGGGGCCCTGCACAAGCGGT :	879
<i>S. sp. P2</i>	: GGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGCAAAACCTTACCAACGTTTGACATCCCTATCGCGGATCGTGGAGACACTT :	953
<i>S. yanoikuyae</i>	: GGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGCAGAACCTTACCAACGTTTGACATCCCTATCGCGGATCGTGGAGACACTT :	959
<i>S. sp. P2</i>	: TCCTTCAGTTCGGCTGGATAGGTGACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCG :	1033
<i>S. yanoikuyae</i>	: TCCTTCAGTTCGGCTGGATAGGTGACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCG :	1039
<i>S. sp. P2</i>	: CAACGAGCGCAACCCCTCGCCTTTAGTTGCCAGCATTTAGTTGGTACTCTAAAGGAACCGCCGGTATAAGCCGGAGGAA :	1113
<i>S. yanoikuyae</i>	: CAACGAGCGCAACCCCTCGCCTTTAGTTGCCAGCATTTAGTTGGTACTCTAAAGGAACCGCCGGTATAAGCCGGAGGAA :	1119
<i>S. sp. P2</i>	: GGTGGGGATGACGTCAAGTCTCATGGCCCTTACGCGTTGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGACTACAGTGGGCAGCC :	1193
<i>S. yanoikuyae</i>	: GGTGGGGATGACGTCAAGTCTCATGGCCCTTACGCGTTGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGACTACAGTGGGCAGCC :	1199
<i>S. sp. P2</i>	: ACCTCGCGAGAGGGAGCTAATCTCCAAAAGTCGTCTCAGTTCGGATCGTCTCTGCAACTCGAGAGCGTGAAGCCGGAAT :	1273
<i>S. yanoikuyae</i>	: ACCTCGCGAGAGGGAGCTAATCTCCAAAAGTCGTCTCAGTTCGGATCGTCTCTGCAACTCGAGAGCGTGAAGCCGGAAT :	1279
<i>S. sp. P2</i>	: CGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGTGAATACGTTCCAGGCCTTGACACACCGCCCGTACACCATGGGAGTT :	1353
<i>S. yanoikuyae</i>	: CGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGTGAATACGTTCCAGGCCTTGACACACCGCCCGTACACCATGGGAGTT :	1359
<i>S. sp. P2</i>	: GGATTCACCTCGAAGCGTTGAACTAACCGTAAAGAAGC----- : 1391	
<i>S. yanoikuyae</i>	: GGATTCACCTCGAAGCGTTGAGCTAACCGTAAAGGAGGCAGGCGACCACAGTGGGTTAGCGACTGGGGTGA : 1430	

รูปที่ 3.8 ลำดับเบสของ 16 เกลว โบริโซมัลดีเอ็นเอของแบคทีเรียสายพันธุ์ P2

TCGCCTGCTCCTTACGGTTAGTCAACGCCTTCGAGTGAATCCAACCTCCCATGGTGTGA
 CGGGCGGTGTGTACAAGGCCTGGGAACGTATTCACCGCGGCATGCTGATCCGCGATT
 ACTAGCGATTCCGCCTTCACGCTCTCGAGTTGCAGAGAACGATCCGAACTGAGACGA
 CTTTTGGAGATTAGCTCCCTCTCGCGAGGTGGNTGCCCACTGTAGTCGCCATTGTAGC
 ACGTGTGTAGCCCAACGCGTAAGGGCCATGAGGACTTGACGTCATCCCCACCTTCCT
 CCGGCTTATCACCGGCGGTTCCCTTAGAGTACCCAACTAAATGCTGGCAACTAAAGGC
 GAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAAACATDTCACGACACGAGCTGACGACA
 GCCATGCAGCACCTGTACCTATCCAGCCGAACTGAAGGAAAGTGTNTCCACGATCC
 GCGATAGGGATGTCAAACGTTGGTAAGGTTTTGCGCGTTGCTTCGAATTAACCACATG
 CTCCACCGCTTGTGCAGGCCCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTTAATTTTGGACCGTACT
 CCCAGGCGGATAACTTAATGCGTTAGCTGCGCCACCAAACACCATGTGCCCTGAC
 AGCTAGTTATCATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGCTCCCC
 ACGCTTTCGCACCTCAGCGTCAATACCAGTCCAGTGAGCCGCCCTTCGCCACTGGTGT
 CTTCCGAATATCTACGAATTCACCTCTACACTCGGAATCCACTCACCTCTCCTGGATT
 CAAGCTATCTAGTTTCAAAGGCAGTTCGGGGTTGAGCCCCGGGCTTTCACCTCTGAC
 TTGAATAGCCGCCTACGTGCGCTTACGCCAGTAATCCGAACAACGCTAGCTCCCT
 CCGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGGGAGTTAGCCGGAGCTTATTCTCCCGGTACTGT
 CATTATCATCCCGGGTAAAAGAGCTTACAACCCTAAGGCCTTCATCACTCACGCGGC
 ATTGCTGGATCAGGCTTTCGCCATTGTCCAATATTCCCTACTGCTGCCTCCCGTAGGA
 GTCTGGGCGGTGTCTCAGTCCCAGTGTGGCTGATCATCCTCTCAGACCAGCTAAGGAT
 CGTCGCCTTGGTGAGCCTTACCTCACCAACTAGCTAATCCTACGCGGGCTCATCCTT
 GGGCGATAAATCTTTGGACTTACGTATCATCCGGTATTAGCTTCCGTTTCCAGAAGTTA
 TTCCGAACCCAAGGGCAGATTCCCACGCGTTACGCACCCGTGCGCCACTAGATCCGA
 AGATCTCGTTCGACTTGCATGTATTAAGGCATGCCGCCAGCGTTCGTTCTGAGCCA

รูปที่ 3.9 ลำดับเบสของ 16 เกลวไรโบโซมัลดีเอ็นเอของแบคทีเรียสายพันธุ์ ANT1

GGCGCTCGACTTGCATGTGTTAAGCCTGCCGCCAGCGTTCGTTCTGANCCAGGATCAA
NCTGCTCCTTGCGGTTAGCGCACTACCTTCGGGTAAAACCAACTCCCATGGTGTGACG
GGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTCACCGCGGCGTGCTGATCCGCGATTAC
TAGCGATTCCAACCTTCATGCACTCGAGTTGCAGAGTGCAATCCGAACCTGAGATGGCTTT
TGGAGATTAGCTCGGGATCGCTCNTTCGCTGCCCACTGTCACCACCATTGTAGCACGT
GTGTAGCCCAGCCCGTAAGGGCCATGAGGANTTGACGTCATCCCCACCTTCCTCTCG
GCTTATCACCGGCAGTCCCCTTAGAGTGCCCAACTGAATGCTGGCAACTAAGGGCGA
GGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATNTCACGACACGAGCTGACGACAGC
CATGCAGCACCTGTGTCCCGGCCACCGAAGTGGAAGGTAGATNTNTTTACCGGTCCG
GGCATGTCAAGGGCTGGTAAGGTTTTGCGCGTTGCTTCGAATTAACCACATGCTCCA
CCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTTAATCTTGCGACCGTACTCCCCA
GGCGGAATGTTTAATGCGTTAGCTGCGCCACCGACCAGTAAACTGGCCGACGGCTAA
CATTTCATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGCTCCCCACGCTT
TCGCACCTCAGCGTCAGTTGTGGACCAGTAAGCCGCCTTCGCCACTGGTGTTCCTGC
GAATATCTACGAATTCACCTCTACACTCGCAATCCACTTACCTCTTCCACACTCAAGA
CACCCAGTATCAAAGGCAGTTCGGGGTTGAGCCCCGGGATTTACCCCTGACTTAAA
TGTCGCGCTACGTGCGCTTACGCCAGTAATTCGGAACAACGCTAGCCCCCTTCGTA
TTACCGCGGCTGCTGGCACGAAGTTAGCCGGGGCTTCTTCTCCGGATACCGTCATTAT
CTTCTCCGGTGAAAAAGCTTTACAACCCTAGGGCCTTCATCACTCACGCGGCATGGC
TGGATCAGGCTTGCGCCATTGTCCAATATTCGCCACTGCTGCCTCCCGTAGGAATTN
GGCCCGTGTCTCANTCCCAATGTGGCTGATCATCCTCTCAAACAGCTATGGATCGTCG
CCTTGGTAGGCCATTACCCACCAACTAGCTAATCCAACGCGGGCCAATCCTTTCCCG
ATAAATCTTTCCCCCGTAGGGCTCATACGGTATTAGCACACGTTTCCATGCGTTAATCC
GTANAAAAAGGGTATGTTCCACGCGTACTCACCCGTCTGCCGCTCCCCCTTGGCGG

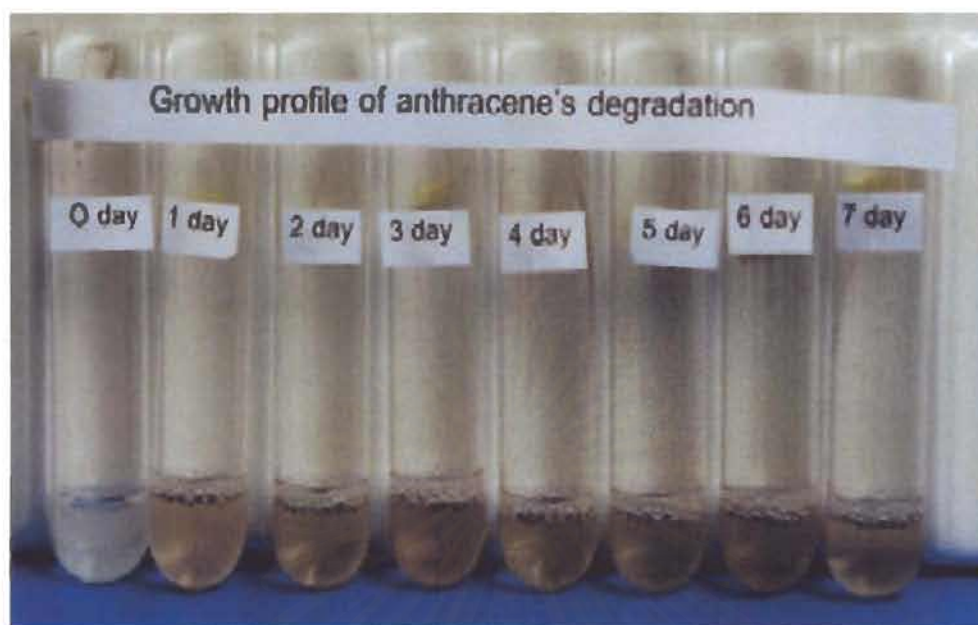
รูปที่ 3.10 ลำดับเบสของ 16 เกล็ด ไรโบโซมัลดีเอ็นเอของแบคทีเรียสายพันธุ์ CU-A1

3.4 การศึกษารูปแบบในการเจริญโดยการใช้ PAHs เป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงานของแบคทีเรีย

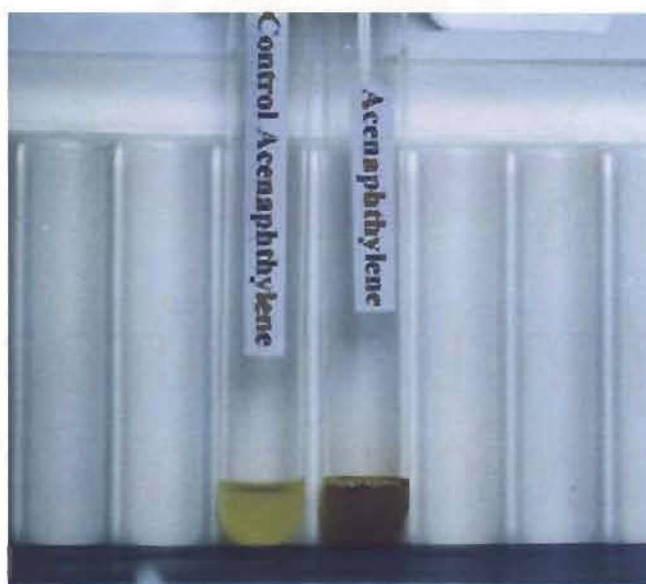
จากการศึกษาเบื้องต้นพบว่าแบคทีเรียทั้ง 3 สายพันธุ์ สามารถเปลี่ยนสีของอาหารเหลว CFMM ที่เติม PAH โดย *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ P2 สามารถเปลี่ยนสีของอาหารเหลว CFMM ที่เติมทีแนทรีน จากไม่มีสีเป็นสีเหลืองเข้มได้หลังจากการเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ดังแสดงในรูปที่ 3.11 *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ ANT1 สามารถเปลี่ยนสีของอาหารเหลว CFMM ที่เติมแอนทราซีน จากไม่มีสีเป็นสีน้ำตาลได้หลังจากการเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 48 ชั่วโมง ดังแสดงในรูปที่ 3.12 ส่วน *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 สามารถเปลี่ยนสีของอาหารเหลว CFMM ที่เติมอะซีแนพธิลีน จากสีเหลืองอ่อนเป็นสีเหลืองเข้มได้หลังจากการเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 3 วัน ดังแสดงในรูปที่ 3.13



รูปที่ 3.11 ลักษณะของอาหารเหลว CFMM ที่มีทีแนทรีนหลังเลี้ยง *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ P2 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เปรียบเทียบกับชุดควบคุม



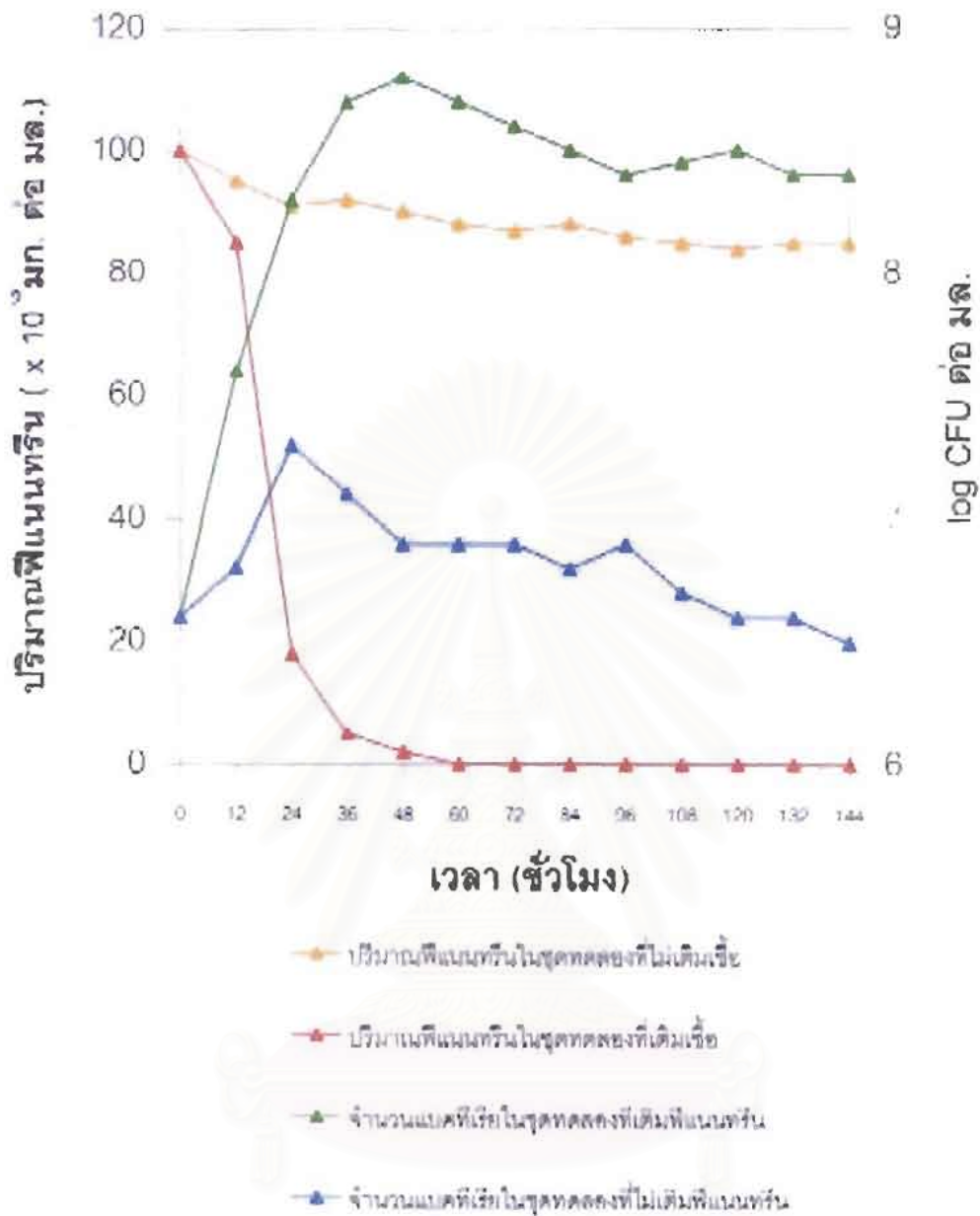
รูปที่ 3.12 ลักษณะของอาหารเหลว CFMM ที่มีแอนทราซีนหลังเลี้ยง *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ ANT1 เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เปรียบเทียบกับชุดควบคุม



รูปที่ 3.13 ลักษณะของอาหารเหลว CFMM ที่มีอะซีแนฟธิลีนหลังเลี้ยง *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 เป็นเวลา 3 วัน เปรียบเทียบกับชุดควบคุม

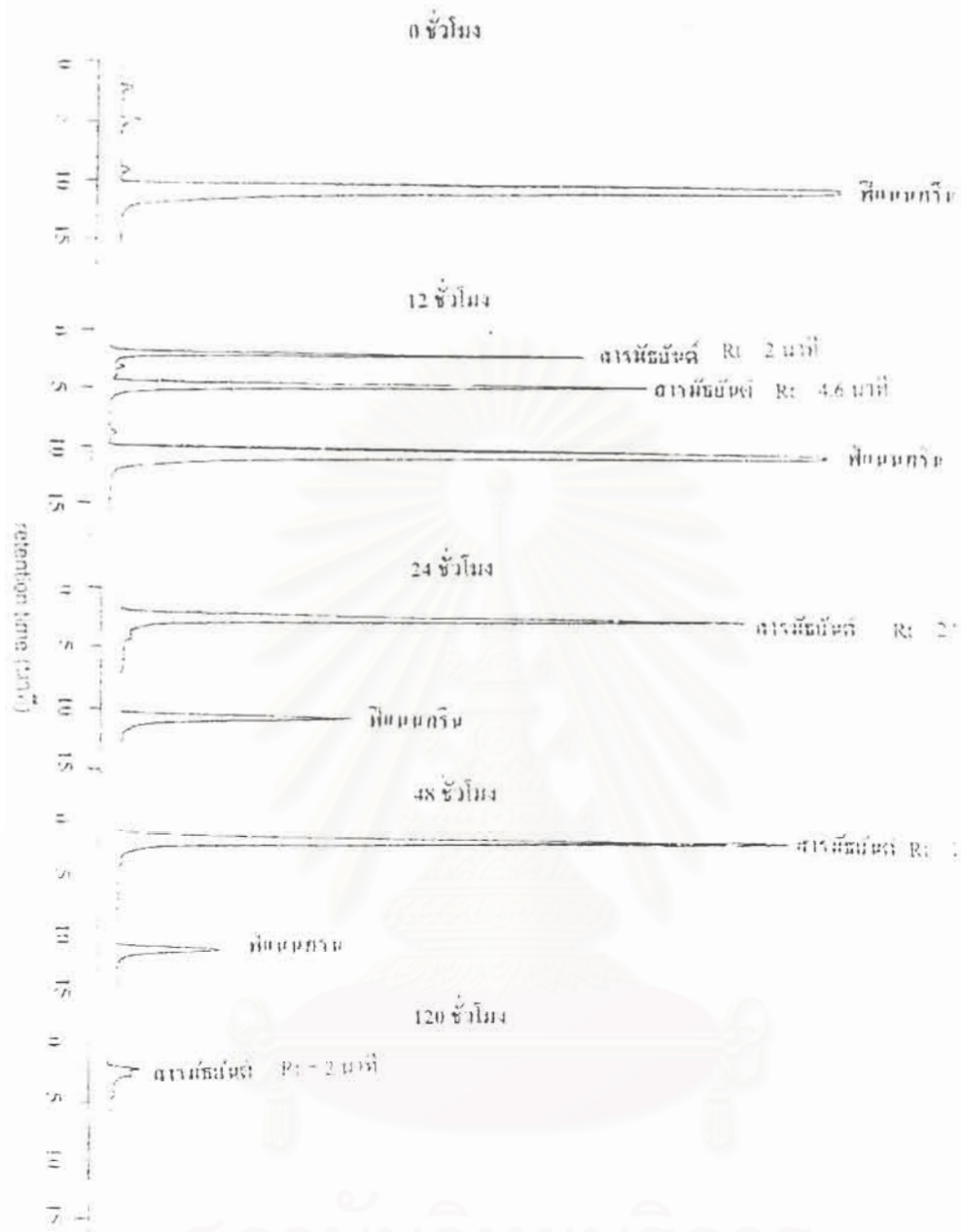
ผลการศึกษารูปแบบในการเจริญโดยใช้ PAH ตามชนิดที่ใช้ในการคัดแยกเป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงานของแบคทีเรียทั้ง 3 สายพันธุ์ โดยการนำหัวเชื้อมาเลี้ยงในอาหารเหลว CFMM ปริมาตร 5 มล. ที่เติมพีแนนทรีนหรือแอนทราซีนเข้มข้น 0.1 มก.ต่อมล. หรืออะซีแนพทิลีนเข้มข้น 0.6 มก.ต่อมล. และทำการติดตามการเจริญของแบคทีเรียทั้ง 3 สายพันธุ์ และวิเคราะห์ปริมาณ PAH ที่เหลือทุก 12 ชั่วโมง พบว่าได้ผลการทดลองดังนี้

Sphingomonas sp. สายพันธุ์ P2 ซึ่งย่อยสลายพีแนนทรีน สามารถใช้พีแนนทรีนได้อย่างสมบูรณ์ โดยสังเกตจากการเพิ่มจำนวนอย่างรวดเร็วของเชื้อควบคู่ไปกับการลดลงอย่างรวดเร็วของพีแนนทรีนที่อยู่ในอาหารเหลว CFMM เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม การเจริญของแบคทีเรียสายพันธุ์ P2 จะหยุดและคงที่เมื่อปริมาณพีแนนทรีนหมดไปหลังการเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 3 วัน ในขณะที่ชุดควบคุมซึ่งได้ใส่เชื้อแบคทีเรียจะมีปริมาณพีแนนทรีนลดลงไปจากเริ่มต้น 5 % เมื่อทำการทดลองไปแล้วเป็นเวลา 7 วัน ทั้งนี้เกิดเนื่องจากการระเหิดของพีแนนทรีน ดังแสดงในรูปที่ 3.14



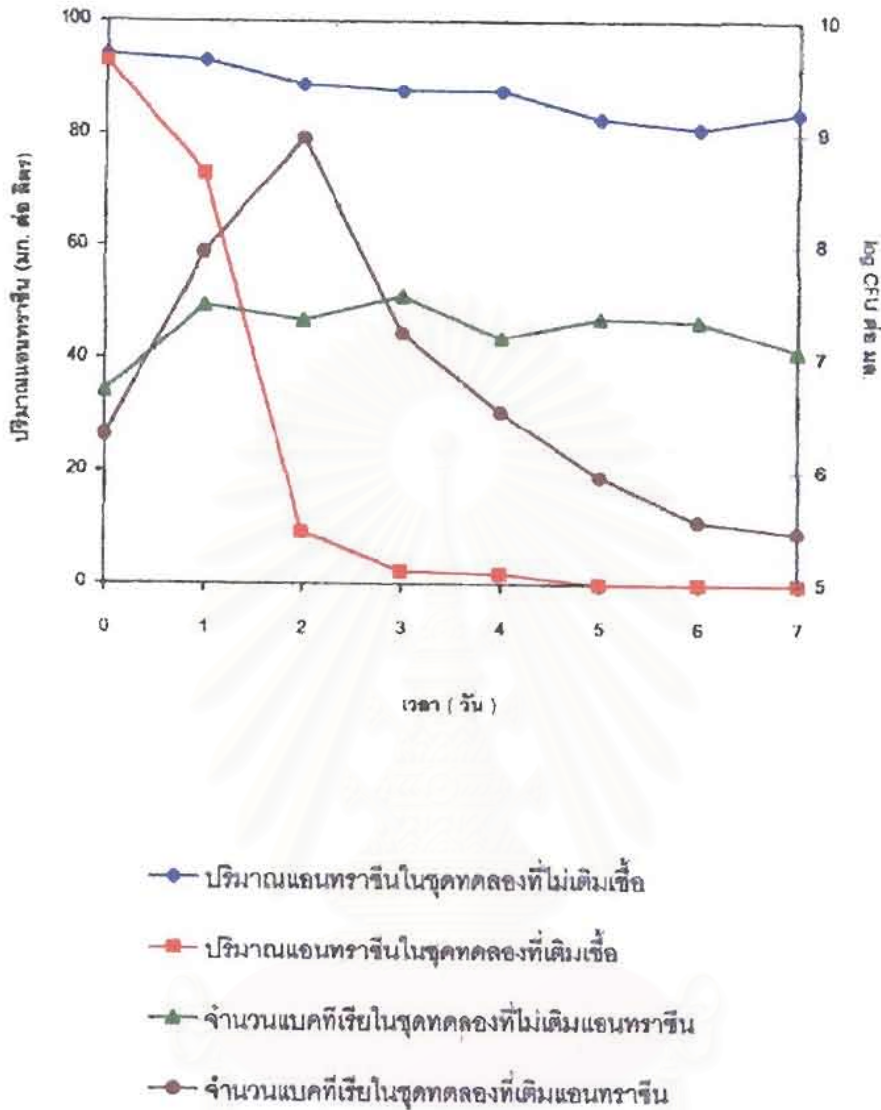
รูปที่ 3.14 การเจริญของ *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ P2 ในอาหารเหลว CFMM ที่มีฟอสฟาติดิลโคลีนเป็นแหล่งพลังงานและคาร์บอน

ผลการทดลองติดตามโครมาโตแกรมการวิเคราะห์ด้วย HPLC เพื่อใช้หาปริมาณฟอสฟาติดิลโคลีนที่เหลือในระบบเวลาต่างๆ พบว่าฟอสฟาติดิลโคลีนถูกย่อยสลายไปเป็นสารมัธยันต์หลายชนิดเช่น สารที่มี retention time (Rt) 2 นาทีและ 4.6 นาที แต่เมื่อเลี้ยงเชื้อสายพันธุ์นี้ต่อไปพบว่าสารมัธยันต์ทั้งสองมีปริมาณลดลงจนในที่สุดสารมัธยันต์ที่มี Rt 4.6 นาทีหายไปหมดและสารมัธยันต์ที่มี Rt 2 นาทีเหลืออยู่จำนวนน้อยมากในเวลา 120 ชั่วโมง และไม่มีฟอสฟาติดิลโคลีนเหลืออยู่เลยดังแสดงผลการวิเคราะห์ไว้ในรูปที่ 3.15



รูปที่ 3.15 HPLC โคโรมาโตแกรมจากการวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลกรีนและสารมีชัยนดีที่เกิดขึ้นจากการย่อยสลายฟีนอลกรีนโดย *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ P2 หลังเลี้ยงเชื้อที่เวลาต่างๆ

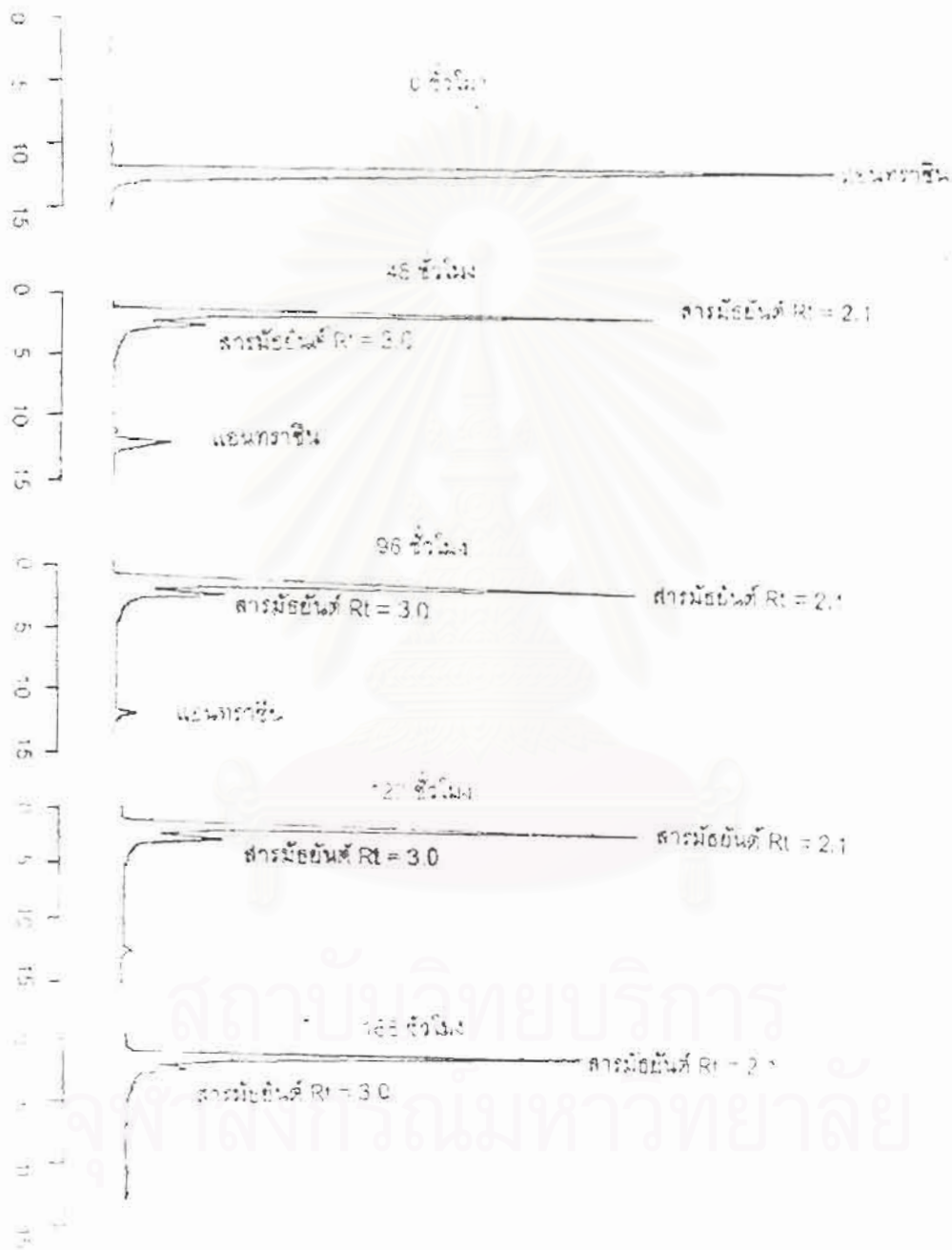
Sphingomonas sp. สายพันธุ์ ANT1 ซึ่งย่อยสลายแอนทราซีน พบว่าสายพันธุ์ ANT1 มีประสิทธิภาพสูงสุดในการย่อยสลายแอนทราซีนใน 48 ชั่วโมงแรกของการเลี้ยงเชื้อ โดยพบการเพิ่มจำนวนอย่างมากของแบคทีเรียควบคู่ไปกับการลดลงของแอนทราซีน แต่หลังจากนั้นการเจริญของสายพันธุ์ ANT1 จะลดลงอย่างรวดเร็วดังแสดงในรูปที่ 3.16



รูปที่ 3.16 การเจริญของ *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ ANT1 ในอาหารเหลว CFMM ที่มีแอนทราซีนเป็นแหล่งพลังงานและคาร์บอน

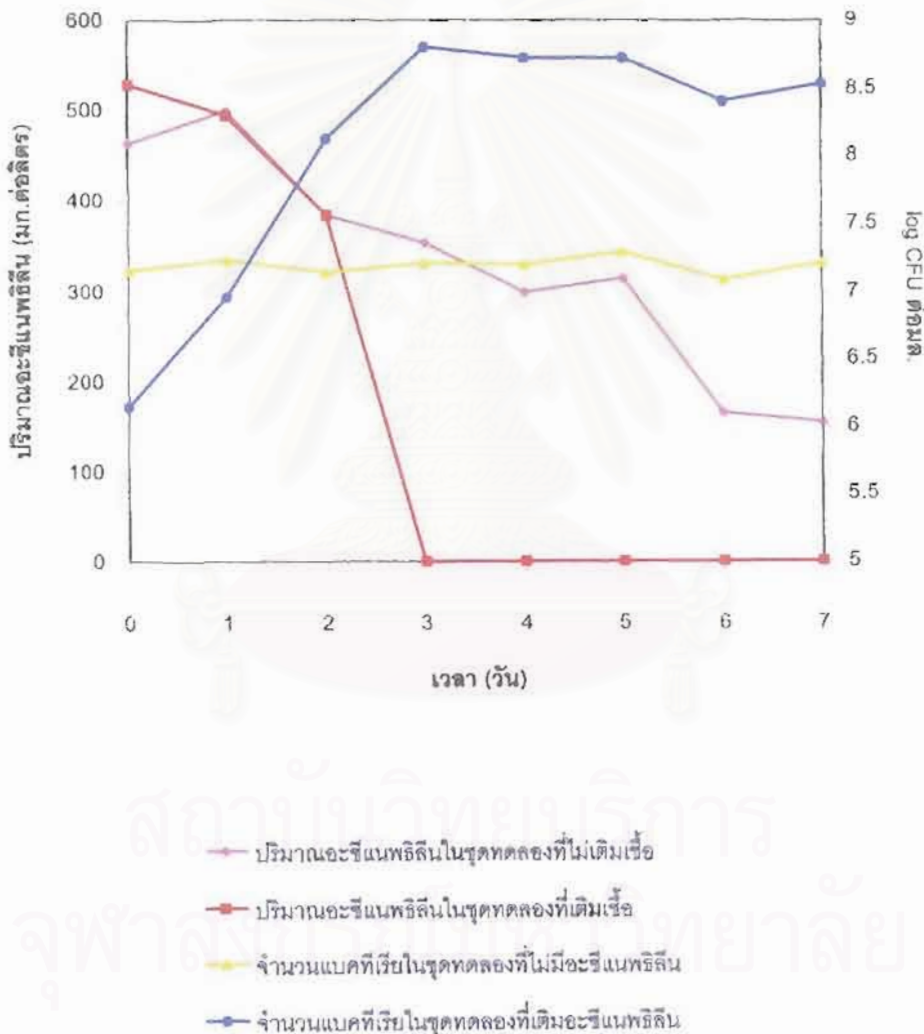
ผลการวิเคราะห์ด้วย HPLC พบว่า ไม่มีแอนทราซีนเหลืออยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อเลยในเวลา 120 ชั่วโมง ดังแสดงในรูปที่ 3.13 นอกจากนี้พบว่าในวันที่ 3 ของการเลี้ยงเชื้อพบว่ามีสารมัธยร์ด 2 ชนิดซึ่งมี Rt 2.1 นาทีและ Rt 3 นาที ตามลำดับ เกิดขึ้นและเมื่อเลี้ยงเชื้อไปจน แอนทราซีนถูกใช้จนหมดพบว่าสาร

มัยยันต์ชนิด Rt 2.1 นาทึ่มีปริมาณค่อนข้างคงที่ตลอดการทดลอง ส่วนสารมัยยันต์ชนิด Rt 3 นาทึ่มีปริมาณน้อยลง หลังจากเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 7 วัน ดังแสดงในรูป 3.17



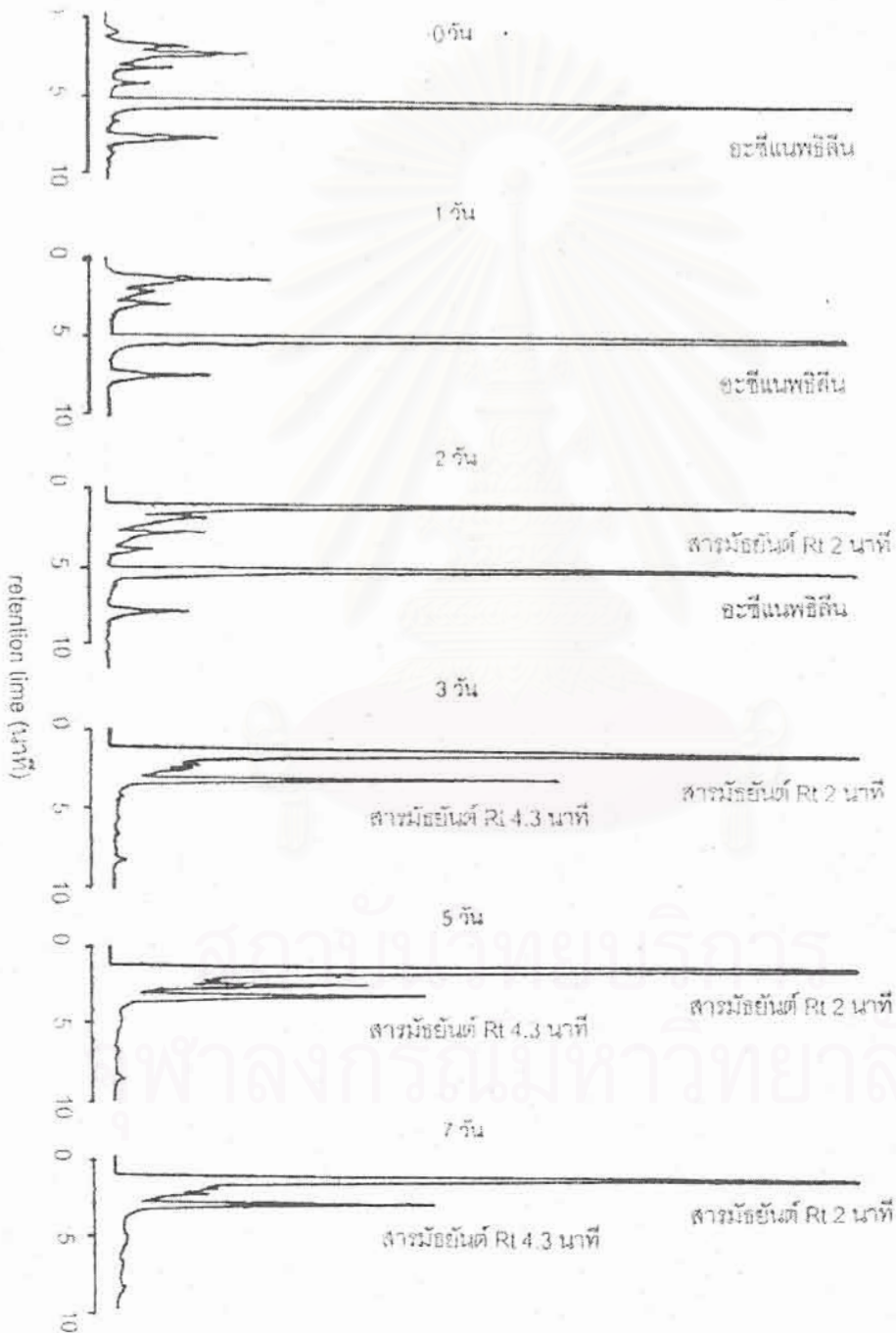
รูปที่ 3.17 HPLC โคโรมาโตแกรมจากการวิเคราะห์ปริมาณแอนทราซีนและสารมัยยันต์ที่เกิดขึ้นจากการย่อยสลายแอนทราซีนโดย *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ ANT1 หลังเลี้ยงเชื้อที่เวลาต่างๆ

Rhizobium sp. สายพันธุ์ CU-A1 ซึ่งย่อยสลายอะซีแนพริลีนจะเปลี่ยนสีอาหารเหลว CFMM จากสีเหลืองอ่อนเป็นสีน้ำตาลหลังจากเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 3 วัน ได้ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 3.18 และจากการวิเคราะห์ปริมาณอะซีแนพริลีนที่เหลือ พบว่าหลังจากเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 3 วันจะไม่มีอะซีแนพริลีนเหลืออยู่เลย ในขณะที่ชุดควบคุมที่ไม่เติมเชื้อจะพบว่าในวันที่ 3 อะซีแนพริลีนลดลงเหลือ 370 มก.ต่อมล. (รูปที่ 3.18)



รูปที่ 3.18 การเจริญของ *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 ในอาหารเหลว CFMM ที่มีอะซีแนพริลีนเป็นแหล่งพลังงานและคาร์บอน

จากโครมาโตแกรมการวิเคราะห์โดย HPLC สายพันธุ์ CU-A1 จะย่อยสลายอะซีแนพธิลีนไปเป็นสารมัธยันต์หลายชนิด โดยพบสารมัธยันต์ที่มี Rt 2 นาที ในวันที่ 2 และพบทั้งชนิดที่มี Rt 2 และ Rt 3 นาทีในวันที่ 3 และปริมาณอะซีแนพธิลีนลดลงจนตรวจไม่พบ ดังแสดงในรูปที่ 3.19



รูปที่ 3.19 HPLC โครมาโตแกรมจากการวิเคราะห์ปริมาณอะซีแนพธิลีนและสารมัธยันต์ที่เกิดขึ้นจากการย่อยสลายอะซีแนพธิลีนโดย *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 หลังเลี้ยงเชื้อที่เวลาต่างๆ

3.5 ผลการทดสอบการย่อยสลาย PAHs ชนิดต่างของแบคทีเรีย

เมื่อนำแบคทีเรียที่คัดแยกได้ทั้ง 3 สายพันธุ์ คือ *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ P2 ที่มีความสามารถในการย่อยสลายพีแนทรีน *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ ANT1 ที่มีความสามารถในการย่อยสลายแอนทราซีน และ *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 ที่มีความสามารถในการย่อยสลายอะซีแนพธิลีน มาทดสอบความสามารถในการย่อยสลาย PAHs ชนิดอื่นๆ พบว่าแบคทีเรียทั้ง 3 สายพันธุ์สามารถย่อยสลาย PAHs ได้หลายชนิดที่ใช้ในการทดสอบนอกเหนือจาก PAHs ที่ใช้คัดแยกแต่ละสายพันธุ์นั้นๆ ดังแสดงในตารางที่ 3.4

ตารางที่ 3.4 แสดงผลการย่อยสลายของแบคทีเรียที่คัดแยกได้ทั้ง 3 สายพันธุ์ต่อ PAHs ทั้ง 9 ชนิด

PAHs	<i>Sphingomonas</i> sp. สายพันธุ์ P2	<i>Sphingomonas</i> sp. สายพันธุ์ ANT1	<i>Rhizobium</i> sp. สายพันธุ์ CU-A1
Naphthalene	+	+	+
Phenanthrene	+	+	-
Dibenzofuran	+	+	+
Acenaphthylene	+	-	+
Acenaphthene	+	-	+
Anthracene	+	+	-
Fluorene	+	+	-
Fluoranthene	-	±	-
Pyrene	-	±	-

หมายเหตุ : + = ย่อยสลายได้; - = ย่อยสลายไม่ได้; ± = ผลการทดลองไม่ชัดเจน



สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

การทดลองนี้สามารถคัดแยกเชื้อแบคทีเรียที่ย่อยสลาย PAHs 3 ชนิด เป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงานคือ phenanthrene, anthracene และ acenaphthylene ได้อย่างมีประสิทธิภาพตามลำดับ ได้แก่ สายพันธุ์ P2, ซึ่งคัดแยกได้จากดินที่มีการปนเปื้อนน้ำมันเครื่อง บริเวณอยู่ชอมรถยนต์ในจังหวัดปราจีนบุรี และสายพันธุ์ ANT1 และ CU-A1 ซึ่งคัดแยกได้จากดินบริเวณโรงชอมยานยนต์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อนำดินที่มีการปนเปื้อน PAHs มาเพิ่มจำนวนจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการย่อยสลาย PAHs จำนวน 5 ครั้งพบว่าระยะเวลาที่สังเกตเห็นการเปลี่ยนสีของอาหารเหลว CFMM ในการถ่ายเชื้อแต่ละครั้งใช้เวลาสั้นลงตามลำดับ แสดงว่าแบคทีเรียมีการปรับตัวโดยสร้างความคุ้นเคย (acclimatisation) ในการย่อยสลาย PAHs เพื่อใช้เป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงานในการเจริญได้เร็วขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Sutherland และคณะ (1995) ที่พบว่า PAHs ในดินหรือในตะกอนที่ปนเปื้อนด้วยสารประกอบอินทรีย์ในกลุ่มนี้จะมีอัตราการย่อยสลาย PAHs เพิ่มมากขึ้นเมื่อจุลินทรีย์ในดินถูกทำให้คุ้นเคยกับสาร PAHs

จากการนำแบคทีเรียทั้ง 3 สายพันธุ์ที่คัดแยกได้มาทำการจำแนกทางอนุกรมวิธานโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและทางสรีรวิทยา ร่วมกับการวิเคราะห์ลำดับเบสของ 16 เอส ไรโบไซม์ดีเอ็นเอสรุปได้ว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ P2 จัดอยู่ในแบคทีเรียสกุล *Sphingomonas* แบคทีเรียสายพันธุ์ ANT1 จัดอยู่ในแบคทีเรียสกุล *Sphingomonas* เช่นกัน ส่วนแบคทีเรียสายพันธุ์ CU-A1 จัดอยู่ในสกุล *Rhizobium*

เมื่อเลี้ยง *Sphingomonas* สายพันธุ์ P2 ในอาหารเหลว CFMM ที่มีฟีนแอนทรีนพบว่าแบคทีเรียนี้สามารถเปลี่ยนสีอาหารเหลวจากไม่มีสีไปเป็นสีเหลืองเข้มได้อย่างรวดเร็วแสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียสายพันธุ์นี้อาจจะใช้กระบวนการย่อยสลายฟีนแอนทรีนโดยอาศัยกิจกรรมของเอนไซม์ไดออกซีจีเนสในการเปลี่ยนฟีนแอนทรีนไปเป็นสารมัธยันต์ที่มีโครงสร้างคล้ายคลึงกับคะทีคอล (catechol like compounds) หรือสารมัธยันต์แบบ meta-ring cleavage ซึ่งการสะสมของสารมัธยันต์ทั้ง 2 แบบนี้มักเป็นสาเหตุที่ทำให้อาหารเลี้ยงเชื้อเปลี่ยนไปเป็นสีเหลือง (Mueller และคณะ, 1989)

เมื่อเลี้ยง *Sphingomonas* สายพันธุ์ ANT1 ในอาหารเหลว CFMM ที่มีแอนทราซินพบว่า แบคทีเรียสายพันธุ์นี้สามารถเปลี่ยนสีอาหารเหลวจากไม่มีสีไปเป็นสีน้ำตาลภายใน 48 ชั่วโมง หลังจากนั้นพบว่าเชื้อมีจำนวนลดลงอย่างรวดเร็ว นอกจากนี้เมื่อตรวจดูด้วย HPLC พบว่ามีการผลิตและสะสมสารมัธยันต์ซึ่งมี $R_t = 2.1$ นาที ดังนั้นจึงสันนิษฐานว่าการสะสมของสารมัธยันต์ที่เกิดขึ้นในระหว่างการย่อยสลาย anthracene มีผลยับยั้งการเจริญของ ANT1 เนื่องจากมีรายงานวิจัยจำนวนมากที่กล่าวถึงการสะสมของสารมัธยันต์ที่คงทนต่อการย่อยสลายไปเป็นสารอื่น (dead end metabolite) และสอดคล้องกับรายงานของ Timmis และ Pieper (1999) ซึ่งกล่าวว่าในวิถีการย่อยสลายของสารพิษอันตรายของจุลินทรีย์บางชนิดอาจไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงโดยสมบูรณ์ กล่าวคือสารตั้งต้นเกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างเพียงบางส่วนเท่านั้น และในบางกรณีสารมัธยันต์ที่เกิดขึ้นอาจมีความเป็นพิษสูงกว่าสารตั้งต้น โดยมีผลยับยั้งการเจริญทั้งต่อจุลินทรีย์ที่ย่อยสลายสารพิษนั้นและจุลินทรีย์อื่นๆ (toxic metabolite) เช่นเชื้อที่ย่อยสลายพอลิคลอริเนทไบฟีนิล (polychlorinated biphenyl, PCB) ทำให้เกิดสารตัวกลางคือ 3-คลอโรเบนโซเอท (3-chlorobenzoate) สะสมอยู่ในอาหารเหลว เนื่องจากสารดังกล่าวมีผลยับยั้งกิจกรรมของ 2,3-ไดไฮดรอกซีไบฟีนิล ไดออกซีจีเนส (2,3-dihydroxybiphenyl dioxygenase) ซึ่งที่หน้าที่ย่อยสลาย 3-คลอโรเบนโซเอทไปเป็น 3-คลอโรแคทีกอล (3-chlorocatechol) (Blasco และคณะ, 1997)

มีงานวิจัยจำนวนมากที่รายงานว่าแบคทีเรียสกุล *Sphingomonas* สามารถย่อยสลายสารพิษอันตรายได้หลายชนิดดังนี้

Khan และคณะ (1996) รายงานว่า *Sphingomonas yanoikuyae* B1 สามารถย่อยสลายไบฟีนิล ไซลีน แอนทราซี พีแนนทรีน และแนพทาลีน เป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงาน

Ye และคณะ (1996) รายงานว่า *Sphingomonas paucimobilis* EPA 505 สามารถย่อยสลาย PAHs ได้หลายชนิดโดยเฉพาะอย่างยิ่งสามารถย่อยสลาย PAHs ที่มีมวลโมเลกุลสูงคือไพรีนและฟลูออแรนธรีน เป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงาน

Bunz และ Cook (1993) รายงานว่า *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ RW 1 สามารถย่อยสลายไดเบนโซฟูแรนและไดเบนโซพาราไดออกซิน (dibenzo-*p*-dioxin) เป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงาน

จากรายงานข้างต้นสามารถกล่าวได้ว่าเชื้อแบคทีเรียสกุล *Sphingomonas* มีบทบาทสำคัญอย่างยิ่งในการย่อยสลายสารพิษอันตรายต่างๆ ในธรรมชาติ ส่วนการที่แบคทีเรียสกุลนี้สามารถย่อยสลายสารพิษอันตรายต่างๆ ได้ดีกว่าแบคทีเรียกลุ่มอื่น อาจมีสาเหตุมาจากแบคทีเรียกลุ่มนี้มีผนังเซลล์ (cell wall) ที่ประกอบด้วยส่วนที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic) ที่หนากว่าแบคทีเรียกลุ่มอื่น และอาจเกี่ยวกับการมีสฟิงโกลิปิด (sphingolipid) อยู่ในชั้นผนังเซลล์ทำให้

แบคทีเรียชนิดนี้สามารถจับและดูดซับสารพิษอันตรายที่ไม่ละลายน้ำให้เข้าสู่เซลล์ได้ดีกว่าแบคทีเรียสกุลอื่นๆ (Harayama, 1997)

เมื่อเลี้ยง *Rhizobium* สายพันธุ์ CU-A1 ในอาหารเหลว CFMM ที่เติมอะซีแนพริลีน *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 ย่อยสลายอะซีแนพริลีนและเปลี่ยนสีอาหารเหลว CFMM จากสีเหลืองอ่อนเป็นสีน้ำตาลหลังจากเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 3 วัน และจากการวิเคราะห์ปริมาณอะซีแนพริลีนที่เหลือ พบว่าหลังจากเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 3 วันจะไม่มีอะซีแนพริลีนเหลืออยู่เลย ซึ่งเป็นการยืนยันว่า *Rhizobium* สายพันธุ์ CU-A1 สามารถย่อยสลายอะซีแนพริลีนเป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงานได้ จากผลการตรวจสอบด้วยการจำแนกทางอนุกรมวิธานโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและทางสรีรวิทยา ร่วมกับการวิเคราะห์ลำดับเบสของ 16 เอส โรโบโซมัลดีเอ็นเอ ซึ่งทำให้สรุปได้ว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ CU-A1 เป็นแบคทีเรียในสกุล *Rhizobium* ทั้งนี้ยังไม่ปรากฏในรายงานใดๆ ในการศึกษาที่ก่อนหน้านี้เกี่ยวกับการย่อยสลาย PAHs โดยแบคทีเรียในสกุล *Rhizobium* งานวิจัยนี้จึงเป็นงานวิจัยแรกที่พบว่าเชื้อสกุล *Rhizobium* สามารถย่อยสลายอะซีแนพริลีนเป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงานได้ แต่มีรายงานว่า *Rhizobium* สายพันธุ์ PATR สามารถย่อยสลายอะตราซีน (atrazine) ซึ่งเป็นยาปราบวัชพืชชนิดหนึ่งได้ (Bouquard และคณะ, 1997)

การศึกษาก่อนหน้านี้ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายอะซีแนพริลีนมีน้อยมาก อย่างไรก็ตามมีรายงานถึงแบคทีเรียที่สามารถโคออกซิไดส์สารชนิดอื่นกับอะซีแนพริลีนได้ โดย Schoken และ Gibson (1984) พบว่ามีการเกิดโคออกซิเดชันของอะซีแนพริลีนได้ เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีไบฟีนีลเป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงาน Komatsu และคณะ (1993) รายงานว่า *Pseudomonas* sp. สายพันธุ์ A4 ที่ใช้อะซีแนพริลีนเป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงานสามารถย่อยสลายอะซีแนพริลีนได้ จนถึงปัจจุบันมีเพียง Sellfonov และคณะ (1996) ที่ได้เสนอวิธีการออกซิไดส์อะซีแนพริลีนโดยแบคทีเรีย *Pseudomonas* sp. สายพันธุ์ PAO1 ได้เป็นกรด 1,8-แนพธาซีนไดคาร์บอกซิลิก แต่เป็นที่น่าสังเกตว่าจากวิธีดังกล่าวยังไม่มีการคาร์บอนในตำแหน่งใดของโมเลกุลอะซีแนพริลีนที่ถูกนำไปเป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงาน จึงน่าจะมีการศึกษาถึงวิธีการย่อยสลายอะซีแนพริลีนโดย *Rhizobium* สายพันธุ์ CU-A1 ต่อไป

จากการทดลองนำแบคทีเรียที่คัดแยกได้ทั้ง 3 สายพันธุ์ไปทดสอบความสามารถในการย่อยสลายสาร PAHs ชนิดอื่นๆ อีก 8 ชนิด โดยไม่รวม PAHs ที่ใช้คัดแยกของเชื้อแต่ละสายพันธุ์เองพบว่า *Sphingomonas* สายพันธุ์ P2 ที่ผ่านการชักนำด้วยพีแนนทรีนแล้ว จะสามารถย่อยสลาย PAHs ชนิดอื่นๆ ได้อีกหลายชนิดซึ่งประกอบด้วย แนพธาซีน อะซีแนพริลีน อะซีแนพริลีน

ฟลูออรีน ไดเบนโซฟูแรน และ แอนทราซีน *Sphingomonas* สายพันธุ์ ANT1 ที่ผ่านการชักนำด้วยแอนทราซีนแล้ว จะสามารถย่อยสลาย PAHs ชนิดอื่นๆ ได้อีกหลายชนิดซึ่งประกอบด้วย แนพธาลีน ฟรีแนทรีน ไดเบนโซฟูแรน และฟลูออรีน ส่วน ฟลูออเรนธินและ ไพรีน สายพันธุ์ ANT1 ให้ผลการทดลองที่ไม่ชัดเจน และ *Rhizobium* สายพันธุ์ CU-A1 สามารถย่อยสลาย แนพธาลีน อะซีแนพทีน และไดเบนโซฟูแรน Stringfellow และ Atiken (1995) รายงานว่าเอนไซม์ที่แบคทีเรียส่วนมากผลิตขึ้นมาเพื่อนำมาใช้ในการย่อยสลาย PAHs จะสามารถย่อยสลาย PAHs ได้หลายชนิด (broad substrate range) ซึ่งลักษณะดังกล่าวเป็นข้อดีอย่างมากในการนำแบคทีเรียชนิดนั้นไปใช้ในการบำบัดและฟื้นฟูบริเวณที่มีการปนเปื้อนจาก PAHs ซึ่งตามปกติจะมีการปนเปื้อนในลักษณะที่มีสารหลายชนิดผสมกันอยู่เป็นจำนวนมาก (Cerniglia, 1992; Wilson และ Jones, 1993)

PAHs ที่ย่อยสลายไม่ได้โดยแบคทีเรียทั้ง 3 คือ pyrene และ fluoranthene ซึ่งเป็น PAHs ที่มีขนาดโมเลกุลใหญ่ ประกอบด้วยวงเบนซีน 4 วง และ 3 วงเบนซีนกับ 1 โหโคลเพนเทน ตามลำดับ อย่างไรก็ตามการย่อยสลาย PAHs ที่มีโมเลกุลขนาดใหญ่นี้มักเกิดขึ้นได้ยากแต่สามารถทำได้ เช่น โดยใช้การย่อยสลายแบบ cometabolism เป็นต้น

การแยกแบคทีเรียทั้ง 3 สายพันธุ์ที่สามารถย่อยสลาย PAHs ได้หลายชนิดจากแหล่งดินในประเทศไทย จะเป็นผลดีอย่างมากในการนำไปบำบัดและฟื้นฟูสภาพแวดล้อมที่ปนเปื้อนจากสารกลุ่ม PAHs หรือสารพิษอันตรายชนิดอื่นต่อไปในอนาคต เนื่องจากจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้ภายในประเทศจะมีความคุ้นเคยต่อลักษณะภูมิอากาศ และลักษณะภูมิประเทศของประเทศไทยเป็นอย่างดีอยู่แล้ว จึงน่าจะนำไปใช้ในการย่อยสลายสารพิษอันตรายได้ดีกว่าแบคทีเรียที่นำเข้ามาจากต่างประเทศ จากการตรวจสอบในเบื้องต้นพบว่าแบคทีเรียทั้ง 3 สายพันธุ์ที่คัดแยกได้จากการทดลองนี้คือ *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ P2 และ ANT1 และ *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 จัดเป็นแบคทีเรียประจำถิ่น (normal flora) ที่อยู่ในดินโดยทั่วไป และมีความสามารถในการย่อยสลาย PAHs ได้ดีโดยการเปลี่ยนสารเหล่านี้ไปเป็นมวลเซลล์ คาร์บอนไดออกไซด์และน้ำ จึงทำให้แบคทีเรียทั้ง 3 สายพันธุ์นี้มีความเหมาะสมที่จะนำไปใช้ในกระบวนการบำบัดสารพิษอันตรายในกลุ่ม PAHs ได้ต่อไปในอนาคต

เอกสารอ้างอิง

ภาษาไทย

กรมควบคุมมลพิษ. 2537. ของเสียนันตราย รายงานสถานการณ์คุณภาพสิ่งแวดล้อม พ.ศ. 2537: 139-141.

พระราชบัญญัติวัตถุอันตราย พ.ศ.2535

พระราชบัญญัติส่งเสริมและรักษาคุณภาพสิ่งแวดล้อมแห่งชาติ พ.ศ.2535

สำนักเทคโนโลยีสิ่งแวดล้อมโรงงาน. 2542. การกำจัดสารพิษอันตรายจากโรงงานอุตสาหกรรม. เอกสารประกอบการศึกษาเผยแพร่โดยสำนักเทคโนโลยีสิ่งแวดล้อมโรงงาน กรมโรงงานอุตสาหกรรม

ภาษาอังกฤษ

Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W. and Lipman, D.J. 1990. Basic local alignment search tool. J. Mol. Biol. 21: 401-410.

Aronstein, B.N., Calvillo, Y.M. and Alexander, M. 1991 Effect of surfactants at low concentrations on the desorption and biodegradation of sorbed aromatic compounds in soil. Environ. Sci. Technol. 25:1728-1731.

Ausubel, F. M., Brent, T., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A. and Struhl, K. 1999. Preparation of genomic DNA from bacteria. In Current protocols in molecular biology (4th ed). New York: John Wiley & Son.

Baker, K.H. and Herson, D.S. 1994. Microbiology and biodegradation in: Baker, K.H. and Herson, D.S. Bioremediation Chapter 2. New York: McGraw-Hill, Inc.

Blasco, R., Mallararapu, M., Wittich, R., Timmis, K.N. and Pieper, D.H. 1997. Evidence that formation of protoanemonin from metabolites of 4-chlorobiphenyl degradation negatively effect the survival of 4-chlwrobiphenyl – cometabolizing microorganisms. Appl. Environ. Microbiol. 63: 427-434.

Blumer, M. 1976. Polynuclear aromatic hydrocarbons in nature. Sci. Am. 234: 34-44.

- Bouquard, C., Ouazzani, J., Prome, J.-C., Michel-Briand, Y. and Plesiat, P. 1997. Dechlorination of atrazine by *Rhizobium* sp. isolate. Appl. Environ. Microbiol. 63: 862-866.
- Bunz, P.V. and Cook, A.M. 1993. Dibenzofuran 4,4a-dioxygenase from *Sphingomonas* sp. strain RW1: angular dioxygenation by three-component enzyme system. J. Bacteriol. 175: 6467-6475.
- Cerniglia, C. E. 1992. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. Biodegradation 3: 351-368.
- Cerniglia, C.E. and Heitkamp, M.A. 1989 Microbialdegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in the aquatic environment. In: Varanasi U (Ed) Metabolism of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in the Aquatic Environment. CRC Press, Boca Raton, FL. Pp 41-68.
- Claxton, L.D., Huck, V.S., Williams, R. and Dremer, P. 1991. Effect of bioremediation on the mutagenicity of oil spill in Prince William Sound, Alaska. Chemosphere 23: 647-650.
- Cobb, G.P., Feng, Z. and Kendall, R.T. 1993. Correlation between polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins and polychlorinated dibenzofurans in soils from western Washington. Toxicol. Environ. Chem. 38: 207-224.
- Giger, W. and Blumer, M. 1974 Polycyclic aromatic hydrocarbons in the environment; Isolation and characterization by chromatography, visible, ultraviolet and mass spectrometry. Anal. Chem. 46:1663-1671.
- Grifoll, M., Casellas, M., Bayona, M.J. and Solanas, A.M. 1992. Isolation and characterization of fluorene-degrading bacteria : identification of ring oxidation and ring fission products. Appl. Environ. Microbiol. 58:29100-2917.
- Harayama, S. 1997. Polycyclic aromatic hydrocarbon bioremediation design. Curr. Opinion. Biotechnol. 8: 268-273.
- Heitkamp, M.A. and Cerniglia, C.E. 1987. The effects of chemical structure and exposure on the microbial degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in freshwater and esturine ecosystems. Environ. Toxicol. Chemistry. 6: 35-46.
- Keith, L.H. and Teiliard, W.A. 1979 Priority pollutants, I A perspective view. Environ. Sci. Technol. 13:416-423.

- Khan, A.A., Wang, R.F., Cao, W.W., Franklin, W. and Cerniglia, C.E. 1996. Reclassification of polycyclic aromatic hydrocarbons-metabolizing bacterial strain, *Beijerinckia* sp. strain B1, as *Sphingomonas yanoikuyae* by fatty acid analysis, Protein pattern analysis and 16S rDNA sequencing. Int. J. Syst. Bacteriol. 46: 341-343.
- Kiyohara, H., Nagao, K. and Yana, K.(1982). Rapid screen for bacteria degrading water insoluble, solid hydrocarbons on agar plates. Appl. Environ. Microbiol. 43:454-457
- Komatsu, T., Omori, T. and Kodama, T. 1993. Microbial degradation of the aromatic hydrocarbons acenaphthene and acenaphthylene by a pure bacterial culture. Biosci. Biotech. Biochem. 57: 864-865.
- La Flamme, R.E. and Hites, R.A. 1978 The global distribution of polycyclic aromatic hydrocarbons in recent sediment. Geochim. Cosmochim. Acta 42:289-303.
- Lee, S. and Cutright, T.J. 1996. Nutrient medium for the bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbon-contaminated soil. US. Patent 5,508,194.
- Lijinsky, W. 1991 The formation and occurrence of polynuclear aromatic hydrocarbons associated with food. Mutat. Res. 259:251-261.
- Mueller, J.G., Chapman, P.J., Blattmann, B.O., and Pritchard, P.H. 1989. Action of a fluoranthene-utilizing bacteria community on polycyclic aromatic hydrocarbons partitioning mechanisms with activated sludge. Water. Res. 23: 93-102.
- Omori, T., Monna, L., Saiki, Y., and Komma, T. 1992. Desulfurization of dibenzothiophene by *Corynebacterium* sp. strain SY1. Appl. Environ. Microbiol. 58: 911-918.
- 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., Grifoll, M., Eaton, R. W. and Chapman, P. J. 1996. Oxidation of naphthenoaromatic and methyl-substituted aromatic compounds by naphthalene 1,2-dioxygenase. Appl. Environ. Microbiol. 62: 507-514.
- Stingfellow, W.T. and Aitden, M.D. 1995. Competitive metabolism of naphthalene, methylnaphthalenes and fluorene by phenanthrene-degrading *Pseudomonas*. Appl. Environ. Microbiol. 61: 357-362.

- Sutherland, J.B., Rafii, F., Khan, A.A. and Cerniglia, C.E. 1995. Mechanisms of PAHs degradation. P. 269-306. In Young, L.Y. and Cerniglia, C.E. (ed.) Microbial transformation and degradation of toxic organic chemicals. Wiley-Liss. New York.
- Timmis, K.N. and Pieper, D.H. 1999. Bacteria designed for bioremediation. Biotech. 17: 201-204.
- Wilson, S.C. and Jones, K.C. 1993. Bioremediation of soil contaminated with polynuclear aromatic hydrocarbon in soil (PAHs) a review. Environ. Pollution. 81: 229-249.
- Ye, D., Siddigi, M.A., Maccubbin, A.E., Kumer, S. and Sikka, H.C. 1996. Degradation of polynuclear aromatic hydrocarbons by *Sphingomonas paucimobilis*. Environ. Sci. Tech. 30: 136-142.
- O'Neill, P. 1993. Polynuclear aromatic hydrocarbons (PAHs). In: Environmental Chemistry. 2nd ed. Great Britain: CHAPMAN&HALL Publisher, pp. 237-239.
- Sims, J.L., Sims R.C. and Matthews, J.E. 1990 Approach to bioremediation of contaminated soil. Haz. Waste Haz. Mater. 7:117-149.
- Weissenfels, W.D., Beyer, M. and Klein, J. 1990 Degradation of phenanthrene, fluorene and fluoranthrene by pure bacterial cultures. Appl. Microbiol. Biotechnol. 32:479-484.



ภาคผนวก

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ก

สูตรและวิธีเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Carbon Free Mineral salt Medium (CFMM)

แอมโมเนียมไนเตรต (NH_4NO_3)	3.0	กรัม
ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟตเดคะไฮเดรต ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)	5.5	กรัม
โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)	0.8	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	0.01	กรัม
เฟอร์ริกคลอไรด์เฮกซะไฮเดรต ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)	0.005	กรัม
แคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรต ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	0.005	กรัม

ละลายสารสามชนิดแรกในน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มล. ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 1 นอร์มัล เป็น 7.5 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 20 นาที ส่วนสารละลายสามชนิดหลังทำให้ปลอดเชื้อโดยการกรองผ่านชุดกรองลำไส้รูปชนิดเซลลูโลสอะซีเตทขนาดรูกว้าง 0.45 ไมโครเมตร แล้วจึงเติมลงไปในการที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว

2. อาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง (CFMM agar)

เตรียมอาหารด้วยวิธีเดียวกับอาหารเหลว CFMM แต่ละลายวุ้นแบคทีโอะกา 15 กรัมต่ออาหาร 1 ลิตร เติมลงไปในการสามอย่างแรกก่อนนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ

3. อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Luria-Bertani (LB broth)

ทริปโตเนน (tryptone)	10.0	กรัม
ผงสกัดจากยีสต์ (yeast extract)	5.0	กรัม

โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)

5.0 กรัม

ละลายสารสามชนิดในน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มล. ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างด้วยสารละลาย โซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 1 นอร์มัล เป็น 7.5 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 °C เป็นเวลา 20 นาที

4. อาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง Luria-Bertani (LB agar)

เตรียมอาหารด้วยวิธีเดียวกับอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB แต่ละลายวุ้น 15 กรัมต่ออาหาร 1 ลิตร เพิ่มลงไป จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 °C เป็นเวลา 20 นาที

ภาคผนวก ข

สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

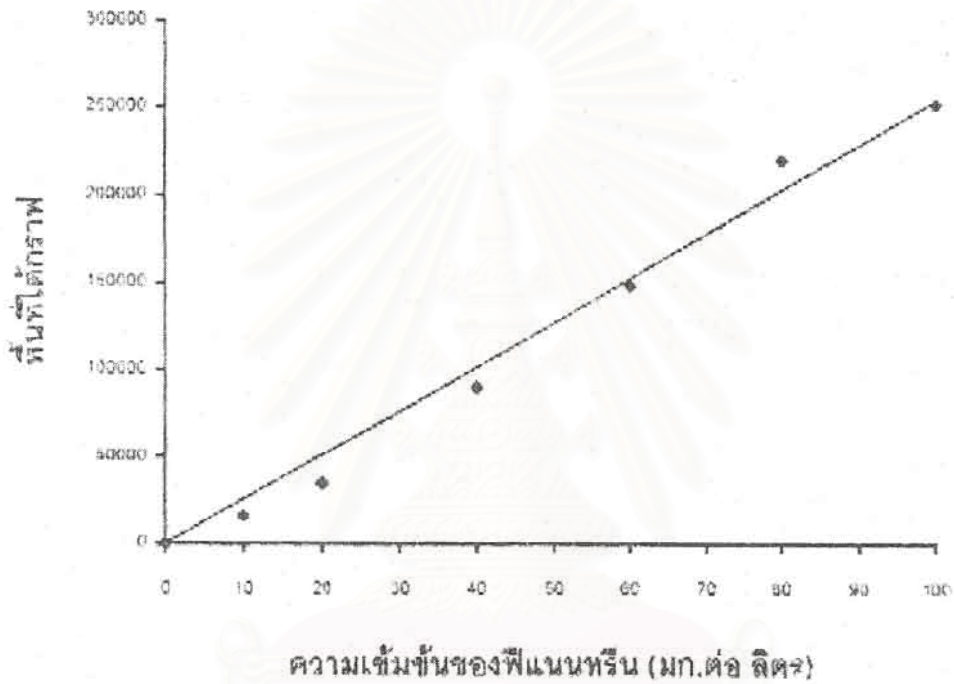
1. สารละลาย PAHs และอนุพันธ์ของสาร PAHs ในไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (DMSO)

อะซีแนพริลีน	0.6	กรัม
พีแนนทริน	0.1	กรัม
แอนทราซีน	0.1	กรัม
แนพทาลีน	0.5	กรัม

ละลายสารแต่ละชนิดในไดเมทิลซัลฟอกไซด์ปริมาตร 18 มิลลิลิตร ผสมด้วยเครื่องปั่นผสมจน
สารละลายหมด ทำให้ปลอดเชื้อโดยการกรองด้วยชุดกรองสำเร็จรูปชนิด PTFE ที่มีขนาดรูกว้าง
0.20 ไมโครเมตร เก็บรักษาในขวดฝาเกลียวสีขาวที่อุณหภูมิ -20°C เดิมในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว
CFMM ที่ผ่านการฆ่าเชื้อและเย็นลงที่อุณหภูมิห้องแล้ว

ภาคผนวก ค

1. กราฟมาตรฐานของฟีแนนทริน



รูปที่ ค.1 กราฟมาตรฐานระหว่างปริมาณฟีแนนทรินกับพื้นที่ใต้กราฟที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC

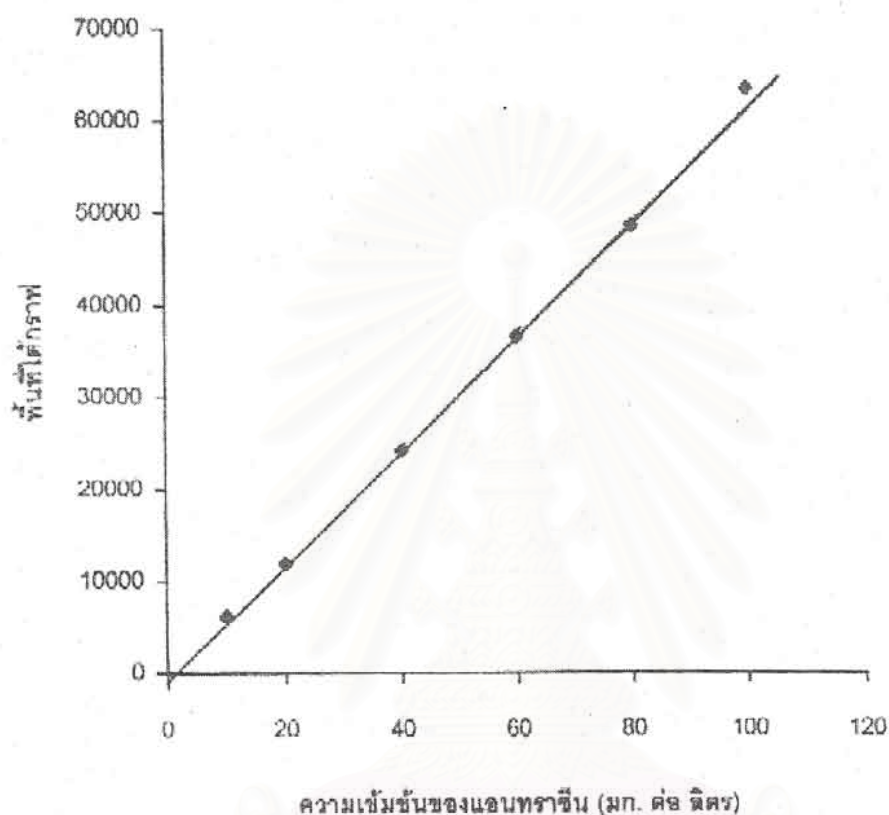
หาความเข้มข้นของฟีแนนทรินได้จากการนำพื้นที่ใต้กราฟที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วย HPLC มาแทนค่าในสมการเส้นตรงดังนี้

$$\text{พื้นที่ใต้กราฟ} = (\text{ความชันของกราฟมาตรฐาน} \times \text{ปริมาณฟีแนนทริน}) + \text{จุดตัดแกน } y$$

โดยที่: ความชันของกราฟมาตรฐาน = 2691.94

จุดตัดแกน y = -10206.6

2. กราฟมาตรฐานของแอนทราซีน



รูปที่ ค.2 กราฟมาตรฐานระหว่างปริมาณแอนทราซีนกับพื้นที่ใต้กราฟที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC

หาความเข้มข้นของแอนทราซีนได้จากการนำพื้นที่ใต้กราฟที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วย HPLC มาแทนค่าในสมการเส้นตรงดังนี้

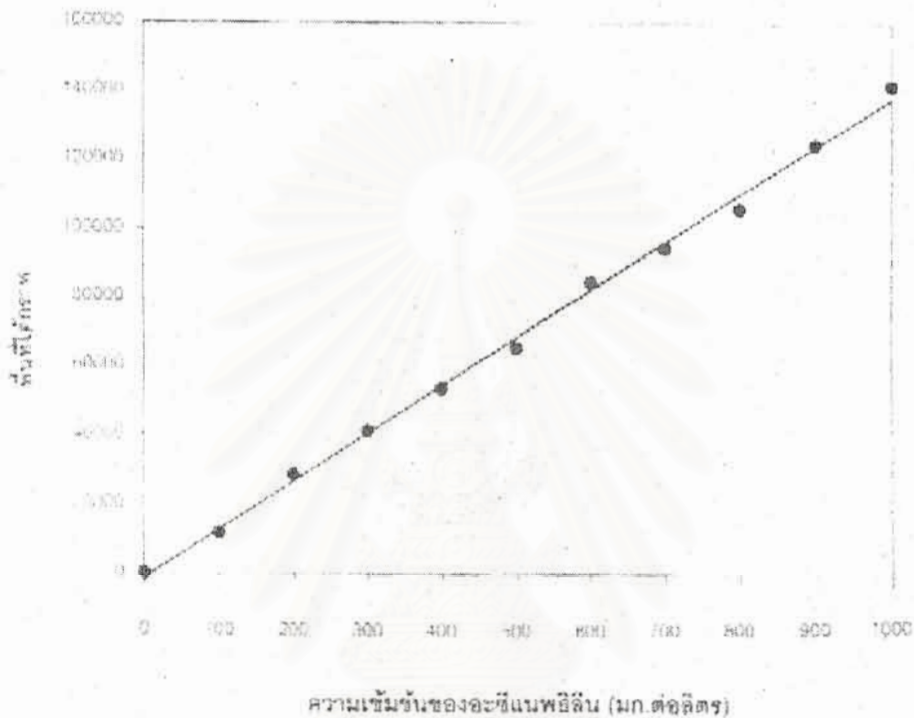
$$\text{พื้นที่ใต้กราฟ} = (\text{ความชันของกราฟมาตรฐาน} \times \text{ปริมาณแอนทราซีน}) + \text{จุดตัดแกน } y$$

โดยที่: ความชันของกราฟมาตรฐาน = 627.355

จุดตัดแกน y = -415.6



3. กราฟมาตรฐานของอะซีแนพริลีน



รูปที่ ค.3 กราฟมาตรฐานระหว่างปริมาณอะซีแนพริลีนกับพื้นที่ใต้กราฟที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC

หาความเข้มข้นของอะซีแนพริลีนได้จากการนำพื้นที่ใต้กราฟที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วย HPLC มาแทนค่าในสมการเส้นตรงดังนี้

$$\text{พื้นที่ใต้กราฟ} = (\text{ความชันของกราฟมาตรฐาน} \times \text{ปริมาณอะซีแนพริลีน}) + \text{จุดตัดแกน } y$$

โดยที่: ความชันของกราฟมาตรฐาน = 13956

จุดตัดแกน y = -15208