ความหลากหลายและความอุดมสมบูรณ์ของแบคทีเรียและยีนไดออกซิจีเนสที่เกี่ยวข้องในการย่อยสลายพอลิไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนจากบริเวณเกาะสีชัง

นางสาวทิพอัปสร รุ่งทวีมนัสชัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2555
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของวิทยานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางบัณฑิตวิทยาลัย
The abstract and full text of theses from the academic year 2011 in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the thesis authors' files submitted through the Graduate School.

DIVERSITY AND ABUNDANCE OF BACTERIA AND DIOXYGENASE GENES INVOLVED IN POLYCYCLIC AROMATIC HYDROCARBON DEGRADATION FROM SICHANG ISLAND

Miss Thipupsorn Rungthaweemanuschai

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Industrial Microbiology
Department of Microbiology
Faculty of Science
Chulalongkorn University
Academic Year 2012

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	ความหลากหลายและความอุดมสมบูรณ์ของแบคทีเรียและยีนไดออกซิจีเนสที่เกี่ยวข้องในการย่อยสลายพอลิไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนจากบริเวณเกาะสีชัง
โดย	นางสาวทิพอัปสร รุ่งทวีมนัสชัย
สาขาวิชา	จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อรฤทัย ภิญญาคง

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

…….. คณบดีคณะวิทยาศาสตร์
(ศาสตราจารย์ ดร. สุพจน์ หารหนองบัว)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

……ประธานกรรมการ
(อาจารย์ ดร. นราพร สมบูรณ์นะ)

…….. อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อรฤทัย ภิญญาคง)

……กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. กอบชัย ภัทรกุลวณิชย์)

……กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. เอกวัล ลือพร้อมชัย)

……กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(ดร. ปิยนันท์ หาญพิชาญชัย)

ทิพอัปสร รุ่งทวีมนัสชัย: ความหลากหลายและความอุดมสมบูรณ์ของแบคทีเรียและยีนไดออกซิจีเนสที่เกี่ยวข้องในการย่อยสลายพอลิไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนจากบริเวณเกาะสีชัง. (DIVERSITY AND ABUNDANCE OF BACTERIA AND DIOXYGENASE GENES INVOLVED IN POLYCYCLIC AROMATIC HYDROCARBON DEGRADATION FROM SICHANG ISLAND) อ. ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: ผศ. ดร.อรฤทัย ภิญญาคง, 256 หน้า.

เกาะสีชังมีหลากหลายทางชีวภาพสูง แต่ขณะเดียวกันก็เสี่ยงต่อการปนเปื้อนของสารประกอบ PAHs จากการรั่วไหลของน้ำมันในพื้นที่ วิทยานิพนธ์นี้จึงมีจุดประสงค์เพื่อศึกษาความหลากหลายและความอุดมสมบูรณ์ของแบคทีเรียและยีนไดออกซิจีเนสที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลาย PAHs ในพื้นที่เกาะสีชัง โดยวิธีเพาะเลี้ยงเชื้อร่วมกับวิธีที่ไม่อาศัยการเพาะเลี้ยงเชื้อ จาก 34 ตัวอย่าง ที่เก็บจากบริเวณอู่จอดเรือ ท่าเทียบเรือ และเขตชุมชนที่อยู่อาศัย ซึ่งแบ่งประเภทของตัวอย่างได้เป็น 10 ตัวอย่างดิน 4 ตัวอย่างน้ำทะเล และ 20 ตัวอย่างดินตะกอน พบว่าสามารถคัดแยกแบคทีเรียย่อยสลาย PAHs ได้ 21 สายพันธุ์ ที่น่าสนใจได้แก่ *Pseudomonas* 7 สายพันธุ์ และ *Sphingomonas* 2 สายพันธุ์ ซึ่งตรวจพบยีนไดออกซิจีเนสในกลุ่มแบคทีเรียแกรมลบ (dox_{GN}) และ *Marinobacter* 2 สายพันธุ์ และ *Gordonia* 1 สายพันธุ์ ซึ่งตรวจพบยีนไดออกซิจีเนสในกลุ่มแบคทีเรียแกรมบวก (dox_{GP}) การวิเคราะห์ความอุดมสมบูรณ์ของแบคทีเรียทั้งหมด ด้วยการเพาะเลี้ยงด้วยวิธี MPN พบว่ามีค่าสูงสุดในตัวอย่างดินตะกอน รองมาคือดิน และน้ำทะเล ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับผลที่ได้เมื่อวิเคราะห์ด้วยวิธีที่ไม่อาศัยการเพาะเลี้ยงเชื้อทั้งวิธี PCR-DGGE และ real-time PCR ในขณะที่เปอร์เซ็นต์ความอุดมสมบูรณ์สัมพัทธ์ระหว่างแบคทีเรียย่อยสลาย PAHs และแบคทีเรียทั้งหมด พบว่าผลที่ได้จากวิธีการเพาะเลี้ยงและไม่อาศัยการเพาะเลี้ยงมีความแตกต่างกัน เนื่องจากความแตกต่างของวิธีการ นอกจากนี้การวิเคราะห์โครงสร้างประชาคมแบคทีเรียด้วยวิธี PCR-DGGE และวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของแถบดีเอ็นเอเด่นได้แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียในกลุ่ม *Gammaproteobacteria* และกลุ่มที่ยังไม่สามารถระบุชนิดได้เป็นแบคทีเรียกลุ่มหลัก และเป็นน่าสนใจว่า *Halomonas* เป็นแบคทีเรียกลุ่มหลักที่ได้จากวิธี PCR-DGGE ซึ่งมีรายงานการย่อยสลาย PAHs และยังถูกคัดแยกได้โดยการเพาะเลี้ยงด้วย ผลการตรวจสอบยีนไดออกซิจีเนสในตัวอย่างสิ่งแวดล้อมโดยวิธี PCR พบ dox_{GN} ถึง 75% (26 ตัวอย่างจาก 34 ตัวอย่าง) และ dox_{GP} เพียง 19% (6 ตัวอย่าง จาก 34 ตัวอย่าง) อย่างไรก็ตามค่าความหลากหลายของรูปแบบ RFLP ของโคลน dox_{GP} (1.47) สูงกว่าโคลน dox_{GN} (1.37) และที่น่าสนใจ คือ ลำดับกรดอะมิโนของโคลน dox_{GN} มีความเหมือนกับข้อมูลในฐานข้อมูลในระดับปานกลาง ในขณะที่ลำดับกรดอะมิโนของโคลน dox_{GP} มีความเหมือนในระดับสูง จากผลการทดลองทั้งหมดจึงสรุปได้ว่าการใช้วิธีการเพาะเลี้ยงเชื้อ ร่วมกับการวิเคราะห์ดีเอ็นเอเมตาจีโนมจากสิ่งแวดล้อมโดยตรงแสดงให้เห็นว่าพื้นที่บริเวณเกาะสีชังมีหลากหลายของแบคทีเรียและยีนไดออกซิจีเนสที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลาย PAHs สูง ตลอดจนพบความอุดมสมบูรณ์ของแบคทีเรียย่อยสลาย PAHs และยีนไดออกซิจีเนสในพื้นที่มาก จากการศึกษานี้จึงทำให้ได้คลังแบคทีเรีย และข้อมูลยีนไดออกซิจีเนสที่สำคัญในการย่อยสลาย PAHs และชี้ให้เห็นว่ามีความเป็นไปได้ในการเกิดการย่อยสลายทางชีวภาพในพื้นที่ ซึ่งจะนำมาซึ่งประโยชน์ในแง่การจัดการระบบสิ่งแวดล้อม และการบำบัดการปนเปื้อนสารมลพิษทั้งในบริเวณเกาะสีชัง และเป็นแนวทางสำหรับบริเวณอื่นต่อไป

ภาควิชา จุลชีววิทยา ลายมือชื่อ .....

สาขาวิชา จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ลายมือชื่ออ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก .....

ปีการศึกษา 2555

5372254623 : MAJOR INDUSTRIAL MICROBIOLOGY
KEYWORDS: DIVERSITY/ ABUNDANCE/ DIOXYGENASE GENES/ POLYCYCLIC AROMATIC HYDROCARBON/ SICHANG ISLAND

THIPUPSORN RUNGTHAWEEMANUSCHAI: DIVERSITY AND ABUNDANCE OF BACTERIA AND DIOXYGENASE GENES INVOLVED IN POLYCYCLIC AROMATIC HYDROCARBON DEGRADATION FROM SICHANG ISLAND. ADVISOR: ASST. PROF. ONRUTHAI PINYAKONG, Ph.D. 256 pp.

Sichang Island is the high biodiversity area and risky from contamination of PAHs due to oil spill. Aim of this study is to investigate diversity and abundance of bacteria and dioxygenase genes involved in PAH degradation in Sichang Island by culture-dependent and culture-independent approaches. Total of 34 samples were collected from port and urban areas and classified into 10 soil, 4 seawater and 20 sediment samples. Twenty one PAH-degrading bacterial strains were isolated. Interestingly, dioxygenase of Gram negative group (dox_{GN}) was detected in 7 strains of *Pseudomonas* and 2 strains of *Sphingomonas* while dioxygenase of Gram positive group (dox_{GP}) was found in 2 strains of *Marinobacter* and a strain of *Gordonia*. The MPN values or abundance of total bacteria were highest in sediment sample, followed by soil and seawater samples, respectively. This is consistent with diversity and abundance of total bacteria examined by PCR-DGGE and real-time PCR. On the other hand, Percentage of relative abundance of dox_{GN} to total bacteria (assessed by 16S rDNA gene) was not harmonious with of that of PAH degraders to total bacteria by MPN because of distinct methods. From PCR-DGGE, *gammaproteobacteria* and uncultured bacteria were the most prominent in the bacterial community. Interestingly, the PAHs degrader, *Halomonas,* was isolated and also found in the environment confirmed by PCR-DGGE. The dox_{GN} genes were detected as much as 75% of the samples (26 from 34 samples) while dox_{GP} genes was detected at 19% of the samples (6 from 34 samples). However, Shannon's indices of RFLP patterns of dox_{GP} (1.47) were higher than those of dox_{GN} (1.37). The amino acid sequences of dox_{GN} were somewhat similar with the GenBank database while those of dox_{GP} were highly similar. In conclusion, there was high level of diversity of bacteria and genes involved in PAH degradation in Sichang Island by culture and metagenomic methods. The abundance of bacteria and dioxygenase genes found were also high. This study provided the libraries of PAH-degrading bacteria and dioxygenase genes. This information also suggested that bioremediation is possible in this area, and be useful in environmental management as well as PAHs remediation in Sichang Island and other areas.

Department : Microbiology Student's Signature .....

Field of Study : Industrial Microbiology Advisor's Signature .....

Academic Year : 2012

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอขอบคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อรฤทัย ภิญญาคง อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ผู้ให้ความรู้ คำปรึกษา คำแนะนำ ตลอดจนข้อคิดเห็นต่างๆ ที่ดีแก่ผู้วิจัยตลอดมาจนทำให้งานวิจัยครั้งนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี

ขอขอบพระคุณอาจารย์ ดร. นราพร สมบูรณ์นะ ประธานในการสอบวิทยานิพนธ์ ขอขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. กอบชัย ภัทรกุลวณิชย์ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. เอกวัล ลือพร้อมชัย และดร. ปิยนันท์ หาญพิชาญชัย กรรมการในการสอบวิทยานิพนธ์ ที่ให้ความรู้ คำแนะนำต่างๆ และตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์เล่มนี้ให้มีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร. กัลยา วัฒยากร ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้ความอนุเคราะห์ตัวอย่างดินตะกอนในงานวิจัย

ขอกราบขอบพระคุณศาสตราจารย์ ดร. ไพเราะ ปิ่นพานิชการ รองศาสตราจารย์ ดร. ศิริรัตน์ เร่งพิพัฒน์ รองศาสตราจารย์ ดร. กาญจนา ชาญสง่าเวช ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ชาญวิทย์ โฆษิตานนท์ และอาจารย์ ดร. ชีวานันท์ เดชอุปการ ที่กรุณาให้ความรู้ และคำแนะนำ ตลอดจนให้ความรักใคร่ เอ็นดู และห่วงใย ผู้วิจัยในการดำเนินงานวิจัยเสมอมา

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ทุกท่านที่อำนวยความสะดวกตลอดการทำวิจัย

ขอขอบคุณทุนอุดหนุนวิทยานิพนธ์สนับสนุนแหล่งเงินทุนสำหรับดำเนินงานวิจัยนี้ ได้แก่ “ทุนอุดหนุนวิทยานิพนธ์ระดับปริญญาโท-เอก” ประจำปีการศึกษา 2556 “ทุน CU-LMU” คณะวิทยาศาสตร์ และ "ทุนวิทยบัณฑิต" ประจำปีการศึกษา 2553 จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ขอขอบคุณหน่วยปฏิบัติการวิจัย Bioremediation และหน่วยงาน National Center of Excellence for Environmental and Hazardous Waste Management ที่สนับสนุนเครื่องมือและอุปกรณ์สำหรับงานวิจัย

ขอขอบคุณเพื่อนๆ ร่วมรุ่น และสมาชิกทุกคนในห้อง 406 462 403 และ 448 ที่ให้ความช่วยเหลือ และกำลังใจ ทำให้วิทยานิพนธ์เล่มนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอกราบขอบพระคุณบิดามารดาที่ให้โอกาส และการสนับสนุน ตลอดจนให้ความช่วยเหลือในทุก ๆ ด้าน โดยเฉพาะอย่างยิ่งในการเก็บตัวอย่างดินทรายที่ใช้ในงานวิจัยนี้ สุดท้ายนี้ขอขอบคุณนายอภินันท์ เอี่ยมสุวรรณสุข เป็นอย่างมากสำหรับกำลังใจ ความช่วยเหลือห่วงใยและคอยอยู่เคียงข้างผู้วิจัยเสมอมา

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย…….. ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ..... จ

กิตติกรรมประกาศ..... ฉ

สารบัญ..... ช

สารบัญตาราง…….. ฏ

สารบัญรูป…….. ฒ

คำอธิบายสัญลักษณะและคำย่อ…….. ท

บทที่ 1 บทนำ…….. 1

บทที่ 2 ปริทัศน์วรรณกรรม…… 4

2.1 สารประกอบพอลิไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน…… 4

2.2 ความเป็นพิษของสารประกอบ PAHs……..... 8

2.3 การปนเปื้อนสารประกอบ PAHs ในสิ่งแวดล้อม…….. 9

2.4 เกาะสีชัง……... 10

2.5 การปนเปื้อนปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนบริเวณรอบเกาะสีชัง……... 11

2.6 การบำบัดสารประกอบ PAHs ในสิ่งแวดล้อมด้วยวิธีทางชีวภาพ …….. 13

2.7 การย่อยสลายสารประกอบ PAHs ด้วยวิธีทางชีวภาพโดยแบคทีเรีย…….. 13

2.7.1 แบคทีเรียย่อยสลายสารประกอบ PAHs มวลโมเลกุลต่ำ…….. 14

2.7.2 แบคทีเรียย่อยสลายสารประกอบ PAHs มวลโมเลกุลสูง……... 14

2.8 กระบวนการย่อยสลายสารประกอบ PAHs โดยแบคทีเรีย…….. 17

2.9 ระบบเอนไซม์ไดออกซิจีเนส…….. 18

2.9.1 การจัดเรียงตัวระบบเอนไซม์ไดออกซิจีเนส……..... 19

2.9.2 การจัดจำแนกกลุ่มไดออกซิจีเนส……..... 20

2.10 วิถีการย่อยสารประกอบ PAHs…….. 22

2.10.1 วิถีการย่อยสลายฟีแนนทรีน……... 22

หน้า

2.10.2 วิถีการย่อยสลายไพรีน..... 25
2.11 ยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายสารประกอบ..... 28
2.11.1 ยีนไดออกซิจีเนสในกลุ่ม dox_{GN}..... 29
2.11.2 ยีนไดออกซิจีเนสในกลุ่ม dox_{GP} 34
2.12 การศึกษาจุลินทรีย์โดยใช้วิธีการเพาะเลี้ยงเชื้อในห้องปฏิบัติการ..... 36
2.13 การศึกษาจุลินทรีย์โดยใช้วิธีการที่ไม่อาศัยการเพาะเลี้ยงเชื้อ..... 36
2.14 ความหลากหลายของโครงสร้างประชาคมแบคทีเรียในสิ่งแวดล้อม..... 38
2.14.1 ดัชนีความหลากหลายและการกระจายตัวของ Shannon..... 39
2.14.2 ดัชนีความหลากหลายของ Simpson..... 39
บทที่ 3 อุปกรณ์ เคมีภัณฑ์ และวิธีดำเนินงานวิจัย..... 43
อุปกรณ์..... 43
เคมีภัณฑ์..... 45
แบคทีเรีย พลาสมิด และไพร์เมอร์ที่ใช้ในงานวิจัย..... 49
วิธีการดำเนินงานวิจัย..... 51
3.1 เก็บตัวอย่างดิน ดินตะกอน และน้ำทะเล 52
3.2 สกัด และวิเคราะห์ปริมาณฟีแนนทรีนหรือไพรีนในตัวอย่าง..... 56
3.2.1 สกัดฟีแนนทรีน หรือไพรีนจากแหล่งตัวอย่าง..... 56
3.2.2 วิธีการเตรียมกราฟมาตรฐานฟีแนนทรีนหรือไพรีน..... 56
3.2.3 วิเคราะห์ปริมาณฟีแนนทรีน หรือไพรีนจากตัวอย่าง..... 56
3.3 วิเคราะห์ความอุดมสมบูรณ์ของแบคทีเรียทั้งหมด และแบคทีเรียย่อยสลาย PAHs โดยวิธีการเพาะเลี้ยง..... 57
3.3.1 วิเคราะห์ความอุดมสมบูรณ์ของแบคทีเรียทั้งหมด..... 57
3.3.2 วิเคราะห์ความอุดมสมบูรณ์ของแบคทีเรียย่อยสลายฟีแนนทรีน/ไพรีน 57
3.4 คัดแยกและจำแนกชนิดของแบคทีเรียย่อยสลายฟีแนนทรีน หรือไพรีน..... 58
3.4.1 เพิ่มจำนวนแบคทีเรียย่อยสลายฟีแนนทรีน หรือไพรีน..... 58
3.4.2 คัดแยกแบคทีเรียย่อยสลายฟีแนนทรีน หรือไพรีนสายพันธุ์บริสุทธิ์..... 59
3.4.3 จำแนกชนิดแบคทีเรียย่อยสลายฟีแนนทรีน หรือไพรีน..... 59

หน้า

3.4.4 การเก็บเชื้อแบคทีเรีย..... 63
3.4.5 ตรวจสอบยีนประมวลรหัสเอนไซม์ไดออกซิจีเนสในแบคทีเรียสายพันธุ์บริสุทธิ์ที่คัดแยกได้..... 63
3.5 วิเคราะห์ความหลากหลายของโครงสร้างประชาคมแบคทีเรียเกาะสีชัง..... 64
3.5.1 สกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างสิ่งแวดล้อม..... 64
3.5.2 ตรวจสอบดีเอ็นเอโดยวิธีอะกาโรสเจลอีเลคโทรโฟเรซิส..... 66
3.5.3 วิเคราะห์ความเข้มข้นและความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอ..... 66
3.5.4 กำจัดกรดฮิวมิกออกจากดีเอ็นเอตัวอย่างโดยวิธีอะกาโรสเจลอีเลคโทรโฟเรซิส และทำบริสุทธิ์ดีเอ็นเอ..... 66
3.5.5 เพิ่มจำนวนดีเอ็นเอบริเวณยีน 16S rDNA ของแบคทีเรียโดยใช้ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (Polymerase Chain reaction, PCR)..... 67
3.5.6 วิเคราะห์โครงสร้างประชาคมแบคทีเรียโดยวิธี PCR-DGGE..... 68
3.5.7 วิเคราะห์ค่าความหลากหลายของโครงสร้างประชาคมแบคทีเรียโดยวิธี PCR-DGGE..... 74
3.6 สร้างห้องสมุดของยีน และวิเคราะห์ความหลากหลายของยีนไดออกซิจีเนสโดยตรงจากสิ่งแวดล้อม..... 74
3.6.1 ตรวจสอบยีนไดออกซิจีเนสเบื้องต้นจากสิ่งแวดล้อม..... 74
3.6.2 สร้างห้องสมุดของยีนไดออกซิจีเนสจากสิ่งแวดล้อม..... 75
3.6.3 วิเคราะห์ค่าความหลากหลายของยีนไดออกซิจีเนส..... 76
3.7 วิเคราะห์ความอุดมสมบูรณ์ของแบคทีเรียและยีนไดออกซิจีเนสจากสิ่งแวดล้อมด้วยวิธี Quantitaive real-time PCR..... 76
3.7.1 สร้างรีคอมบิแนนท์โคลนยีน 16S rDNA..... 76
3.7.2 สร้างกราฟมาตรฐานของพลาสมิดโดยวิธี real time PCR..... 77
3.7.3 วิเคราะห์ปริมาณแบคทีเรียและยีนไดออกซิจีเนสทั้งหมดในสิ่งแวดล้อมโดยวิธี Real time PCR 78

หน้า

3.8 นำฝากลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล..... 79
บทที่ 4 ผลการทดลอง..... 80
4.1 ลักษณะทางกายภาพของตัวอย่างดิน..... 80
4.2 การวิเคราะห์ปริมาณฟีแนนทรีนหรือไพรีนในตัวอย่าง..... 81
4.3 ความอุดมสมบูรณ์ของแบคทีเรียทั้งหมด และแบคทีเรียย่อยสลาย PAHs โดยวิธีการเพาะเลี้ยง..... 81
4.4 คัดแยกและจำแนกชนิดของแบคทีเรียย่อยสลายฟีแนนทรีน หรือไพรีน..... 84
4.5 ความหลากหลายของโครงสร้างประชาคมแบคทีเรียบริเวณเกาะสีชัง..... 105
4.6 สร้างห้องสมุดของยีนและวิเคราะห์ความหลากหลายของยีนไดออกซิจีเนสโดยตรงจากสิ่งแวดล้อม..... 124
4.7 วิเคราะห์ความอุดมสมบูรณ์ของแบคทีเรียและยีนไดออกซิจีเนสจากตัวอย่างสิ่งแวดล้อมด้วยวิธี Quantitaive real-time PCR..... 153
บทที่ 5 วิจารณ์ผลการทดลอง..... 156
5.1 วิเคราะห์ปริมาณฟีแนนทรีนหรือไพรีนในตัวอย่าง..... 156
5.2 วิเคราะห์ความอุดมสมบูรณ์ของแบคทีเรียทั้งหมด และแบคทีเรียย่อยสลาย PAHs โดยวิธีการเพาะเลี้ยง..... 156
5.3 คัดแยกและจำแนกชนิดของแบคทีเรียย่อยสลายฟีแนนทรีน หรือไพรีน..... 158
5.4 วิเคราะห์ความหลากหลายโครงสร้างประชาคมแบคทีเรียบริเวณเกาะสีชัง.... 162
5.5 สร้างห้องสมุดของยีนและวิเคราะห์ความหลากหลายของยีนไดออกซิจีเนสโดยตรงจากสิ่งแวดล้อม..... 172
5.6 วิเคราะห์ความอุดมสมบูรณ์สัมพัทธ์ (relative abundance)..... 180
5.6.1 วิเคราะห์ความอุดมสมบูรณ์ของยีนไดออกซิจีเนสต่อแบคทีเรียทั้งหมดในสิ่งแวดล้อมโดยวิธี Quantitaive real-time PCR..... 180
5.6.2 ความอุดมสมบูรณ์สัมพัทธ์ของแบคทีเรียย่อยสลายสารประกอบ PAHs ต่อแบคทีเรียทั้งหมดจากการเพาะเลี้ยงเชื้อโดยวิธี MPN..... 182

หน้า

5.7 สรุปความความสัมพันธ์ของข้อมูล..... 183
บทที่ 6 สรุปผลการทดลอง..... 191
รายการอ้างอิง..... 192
ภาคผนวก..... 213
ภาคผนวก ก..... 214
ภาคผนวก ข..... 217
ภาคผนวก ค..... 224
ภาคผนวก ง..... 226
ภาคผนวก จ..... 228
ภาคผนวก ฉ..... 251
ภาคผนวก ช..... 253
ภาคผนวก ซ..... 255
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์..... 256

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
2.1	สมบัติทางเคมีและกายภาพของฟีแนนทรีน.....	6
2.2	สมบัติทางเคมีและกายภาพของไพรีน.....	7
2.3	สถิติน้ำมันรั่วไหลบริเวณอ่าวไทยตอนบนของประเทศไทย.....	11
2.4	ชนิดแบคทีเรียย่อยสลายฟีแนนทรีนและแหล่งคัดแยก.....	15
2.5	ชนิดแบคทีเรียย่อยสลายไพรีนและแหล่งคัดแยก.....	16
2.6	การจัดระบบกลุ่มเอนไซม์ไดออกซิจีเนส.....	21
2.7	ตัวอย่างแบคทีเรียย่อยสลายฟีแนนทรีนที่ถูกคัดแยกได้.....	24
2.8	ตัวอย่างแบคทีเรียย่อยสลายไพรีนที่ถูกคัดแยกได้.....	27
3.1	แบคทีเรียและพลาสมิดที่ใช้ในการวิจัย.....	49
3.2	ไพร์เมอร์ที่ใช้วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA จากดีเอ็นเอเมตาจีโนม.....	49
3.3	ไพร์เมอร์ที่ใช้วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA จากเชื้อสายพันธุ์บริสุทธิ์.....	49
3.4	คู่ไพร์เมอร์ที่ใช้เพิ่มจำนวนดีเอ็นเอบริเวณยีน dox_{GN} และ dox_{GP}	50
3.5	คู่ไพร์เมอร์ที่ใช้เพิ่มจำนวนดีเอ็นเอบริเวณยีน 16S rDNA ของแบคทีเรียและใช้เพิ่มจำนวนดีเอ็นเอบริเวณยีน dox_{GN} ในการทำ Quantitative Real-time PCR.....	50
3.6	วันที่เก็บตัวอย่าง และบริเวณที่เก็บตัวอย่างดิน ดินตะกอน และน้ำทะเล.....	52
4.1	ลักษณะดิน และเนื้อดินของตัวอย่างดิน และดินตะกอนเกาะสีชัง.....	80
4.2	การเพิ่มจำนวนแบคทีเรียย่อยสลายฟีแนนทรีน หรือไพรีนจากตัวอย่างเกาะสีชัง	84
4.3	แบคทีเรียสายพันธุ์บริสุทธิ์ที่คัดแยกได้จากตัวอย่างที่พ่นทับด้วยฟีแนนทรีน.....	89
4.4	แบคทีเรียสายพันธุ์บริสุทธิ์ที่คัดแยกได้จากตัวอย่างที่พ่นทับด้วยไพรีน.....	90
4.5	ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายฟีแนนทรีน.....	93
4.6	ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายไพรีน.....	97

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
4.7	ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีน 16S rDNA ของแบคทีเรียสายพันธุ์บริสุทธิ์ที่ถูกคัดแยกจากแหล่งตัวอย่างเกาะสีชังที่สามารถย่อยสลายฟีแนนทรีนได้……..	98
4.8	การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีน 16S rDNA ของแบคทีเรียสายพันธุ์บริสุทธิ์ที่ถูกคัดแยกจากแหล่งตัวอย่างเกาะสีชังที่สามารถย่อยสลายไพรีนได้…..	99
4.9	ผลของผลิตภัณฑ์ PCR เมื่อใช้ไพร์เมอร์คู่ต่าง ๆ……....	103
4.10	ความเข้มข้นดีเอ็นเอที่สกัดได้โดยตรงจากตัวอย่างดิน น้ำทะเล และดินตะกอนเกาะสีชังด้วยชุดสกัด Fast-DNA spin kit (Bio 101 Kit, Qbiogene, USA)….....	106
4.11	ค่าความหลากหลายที่ได้จากวิธี PCR-DGGE จากตัวอย่างดิน…….....	108
4.12	ค่าความหลากหลายที่ได้จากวิธี PCR-DGGE จากตัวอย่างน้ำทะเล…….....	109
4.13	ค่าความหลากหลายที่ได้จากวิธี PCR-DGGE จากตัวอย่างดินตะกอน…….....	110
4.14	ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีน 16S rDNA ของโคลนดีเอ็นเอจากตัวอย่างเกาะสีชัง……	116
4.15	ผลของปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสโดยใช้ไพร์เมอร์คู่ GNF และ GNR ที่จำเพาะต่อยีน dox_{GN} ……	125
4.16	ผลของปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสโดยใช้ไพร์เมอร์คู่ GPF และ GPR ที่จำเพาะต่อยีน dox_{GP} ……..	127
4.17	ผลการสร้างห้องสมุดยีน dox_{GN} และยีน dox_{GP} จากผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอหลังเพิ่มจำนวนด้วยปฏิกิริยา PCR……..	133
4.18	กลุ่มของรูปแบบรีคอมบิแนนท์พลาสมิดในกลุ่ม dox_{GN} หลังถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิด *HinfI* และ *BsuRI (HaeIII)* ……..	135
4.19	กลุ่มของรูปแบบรีคอมบิแนนท์พลาสมิดในกลุ่ม dox_{GP} หลังถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิด *HinfI* และ *Rsa*I…….....	137
4.20	ค่าความหลากหลายของยีนไดออกซิจีเนสที่พบในบริเวณเกาะสีชัง……..	139

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
4.21	ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ประมวลรหัสอะมิโนของยีนต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลาย PAHs ในแบคทีเรียแกรมลบ……..	141
4.22	ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ประมวลรหัสอะมิโนของยีนต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลาย PAHs ในแบคทีเรียแกรมบวก……	147
5.1	จำนวนแบคทีเรียทั้งหมดที่พบสูงสุดในตัวอย่างแต่ละประเภท……..……	157
5.2	จำนวนแบคทีเรียย่อยสลายฟีแนนทรีนหรือไพรีนที่พบสูงสุดในตัวอย่างแต่ละประเภท……...	157
5.3	กลุ่มแบคทีเรียความสามารถในการย่อยสลายสารพิษ และแหล่งคัดแยก……	159
5.4	แบคทีเรียในสกุลที่พบรายงานการย่อยสลายสารพิษจากตัวอย่างดิน……..	165
5.5	แบคทีเรียในสกุลที่พบรายงานการย่อยสลายสารพิษจากตัวอย่างน้ำทะเล……..	166
5.6	แบคทีเรียในสกุลที่พบรายงานการย่อยสลายสารพิษจากตัวอย่างดินตะกอน…..	167
5.7	ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของรีคอมบิแนนท์โคลนยีน dox_{GN} ที่มีเปอร์เซ็นต์ความเหมือนระดับปานกลาง (49-56%) จำนวน 6 โคลน……..	177
5.8	ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของรีคอมบิแนนท์โคลนยีน dox_{GP} ที่มีเปอร์เซ็นต์ความเหมือนสูง (95-99%) จำนวน 5 โคลน……..	178
5.9	ผลความสัมพันธ์ของข้อมูลทั้งหมดจากตัวอย่างสิ่งแวดล้อมบริเวณเกาะสีชังโดยวิธีการเพาะเลี้ยง และจากการวิเคราะห์ดีเอ็นเอเมตาจีโนม……..	184

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
2.1	โครงสร้างสารประกอบ PAHs 16 ชนิด…….....	5
2.2	โครงสร้างโมเลกุลของฟีแนนทรีน…….....	6
2.3	โครงสร้างโมเลกุลของไพรีน…….....	7
2.4	เกาะสีชัง จังหวัดชลบุรี ประเทศไทย…….....	10
2.5	วิถีการย่อยสลายสารประกอบ PAHs โดยทั่วไปของจุลินทรีย์……..	17
2.6	การจัดเรียงตัวและการทำงานร่วมกันของระบบเอนไซม์ไดออกซิจีเนส……	18
2.7	การจัดเรียงตัวของอะโรมาติกริงไฮดรอกซิเลททิงไดออกซิจีเนสบริเวณหน่วยย่อยแอลฟา ประกอบไปด้วย 2 โดเมน คือ Rieske โดเมน และ ริงไฮดรอกซิเลททิงโดเมน…….....	19
2.8	โครงสร้าง 3 มิติของแนพธาลีน 1, 2-ไดออกซิจีเนส คือ Rieske โดเมน ที่มีหมู่พรอสทีติก แบบ [2Fe-2S] และ catatyic โดเมน ในหน่วยย่อยแอลฟา และอะมิโนที่สำคัญ คือ Aspartate-205 (Asp-205) ซึ่งเกี่ยวข้องกับการขนส่งอิเล็กตรอนระหว่าง Rieske โดเมน และ catalytic โดเมน……..	20
2.9	วิถีการย่อยฟีแนนทรีนโดยทั่วไปแบคทีเรีย…….....	23
2.10	วิถีการย่อยไพรีนโดยทั่วไปแบคทีเรีย…….....	26
2.11	แผนภูมิแสดงความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการบริเวณหน่วยแอลฟาของเอนไซม์ไดออกซิจีเนสในกลุ่ม dox_{GN} และ dox_{GP} …….....	28
2.12	การจัดเรียงตัวของกลุ่มยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายแนพธาลีนและระบบควบคุมการทำงานของยีน…….....	29
2.13	การเรียงตัวของกลุ่มยีน *nah* ใน *Pseudomonas putida* สายพันธุ์ G7 และกลุ่มยีนคล้ายยีน *nah* (*nah-like*) เช่น *P. putida* สายพันธุ์ NCIB9816-4, *P. stutzeri* สายพันธุ์ AN10, *P. putida* สายพันธุ์ OUS82, *P. aeruginosa* สายพันธุ์ Pak1, *P. putida* สายพันธุ์ NCIB 9816 และ *P.* sp. สายพันธุ์ C18……..	30

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
2.14	การเรียงตัวของกลุ่มยีนที่แตกต่างจากกลุ่มยีน *nah* และกลุ่มยีนคล้ายยีน *nah* (*nah-like*) ได้แก่ ยีน *nag* จาก *Ralstonia* sp. สายพันธุ์ U2, ยีน *nag* จาก *Comamonas testeroni* สายพันธุ์ GZ42, ยีน *nag* จาก *Polaromonas naphthalenivorans* สายพันธุ์ CJ2 และยีน *phn* จาก *Burkholderia* sp. สายพันธุ์ RP007…….....	31
2.15	การเรียงตัวของยีนคล้าย *nag* ร่วมกับยีน *phn* ใน *Burkholderia* sp. สายพันธุ์ C3…….....	33
2.16	การเรียงตัวของกลุ่มยีนประมวลรหัสเอนไซม์ไดออกซิจีเนสในกลุ่ม dox_{GP} ได้แก่ *Nocardioides* sp. สายพันธุ์ KP7 และ *Rhodococcus* sp. สายพันธุ์ NCIMB12038…….....	35
2.17	การเรียงตัวของกลุ่มยีนประมวลรหัสเอนไซม์ไดออกซิจีเนสในกลุ่ม dox_{GP} ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายไพรีนของ *Mycobacterium vanbaalenii* สายพันธุ์ PYR-1…….....	35
3.1	แผนภาพแสดงขั้นตอนการดำเนินงานวิจัย…….....	51
3.2	แสดงจุดเก็บตัวอย่างดิน และตัวอย่างน้ำทะเลจำนวน 14 จุดรอบเกาะสีชัง……	55
3.3	แสดงจุดเก็บตัวอย่างดินตะกอนจำนวน 20 จุดรอบเกาะสีชัง……..	55
4.1	จำนวนแบคทีเรียทั้งหมด และแบคทีเรียย่อยสลายฟีแนนทรีน หรือไพรีน ในตัวอย่างดิน (ก) ตัวอย่างน้ำทะเล (ข) และตัวอย่างดินตะกอน (ค) ……..	82
4.2	การเปลี่ยนแปลงสีของอาหารเหลว NSW ที่เติมฟีแนนทรีน เมื่อมีการเจริญของแบคทีเรียจากตัวอย่างดินเป็นเวลา 2 วัน หลังจากถ่ายเชื้อ 3 ครั้ง……...	86
4.3	(ก) การเปลี่ยนแปลงสีของอาหารเหลว NSW ที่เติมฟีแนนทรีน เมื่อมีการเจริญของแบคทีเรียจากตัวอย่างดินตะกอนเป็นเวลา 2 วัน หลังจากถ่ายเชื้อ 3 ครั้ง (ข) การเปลี่ยนแปลงสีของอาหารเหลว NSW ที่เติมฟีแนนทรีน เมื่อมีการเจริญของแบคทีเรียจากดินตะกอนเป็นเวลา 2 วัน หลังจากถ่ายเชื้อ 3 ครั้ง……..	86

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
4.4	การเปลี่ยนแปลงสีอาหารเหลว NSW ที่เติมฟีแนนทรีน เมื่อมีการเจริญของแบคทีเรียจากตัวอย่างน้ำทะเลเป็นเวลา 3 วัน หลังจากถ่ายเชื้อ 3 ครั้ง……	87
4.5	การเปลี่ยนแปลงสีอาหารเหลว NSW ที่เติมไพรีน เมื่อมีการเจริญของแบคทีเรียจากตัวอย่างดินและดินตะกอนเป็นเวลา 3 วัน หลังจากถ่ายเชื้อ 3 ครั้ง……..	87
4.6	ลักษณะโคโลนีของแบคทีเรียและโซนใสเมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง NSW ที่พ่นทับด้วยฟีแนนทรีน……..	88
4.7	ลักษณะโคโลนีของแบคทีเรียและโซนใสเมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง NSW ที่พ่นทับด้วยไพรีน……..	89
4.8	ลักษณะการเปลี่ยนแปลงสีของอาหารเหลว NSW ที่เติมฟีแนนทรีน หลังเพาะเลี้ยงแบคทีเรียบริสุทธิ์สายพันธุ์ต่าง ๆ ที่คัดแยกได้ เป็นเวลา 5 วัน……..	91
4.9	ลักษณะการเปลี่ยนแปลงสีของอาหารเหลว NSW ที่เติมฟีแนนทรีน หลังเพาะเลี้ยงแบคทีเรียบริสุทธิ์สายพันธุ์ต่าง ๆ ที่คัดแยกได้ เป็นเวลา 4 วัน……..	91
4.10	ลักษณะการเปลี่ยนแปลงสีของอาหารเหลว NSW ที่เติมไพรีน หลังเพาะเลี้ยงแบคทีเรียบริสุทธิ์สายพันธุ์ต่าง ๆ ที่คัดแยกได้ เป็นเวลา 5 วัน……..	92
4.11	แผนภูมิต้นไม้แสดงความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของยีนบริเวณ 16S rDNA ของแบคทีเรียสายพันธุ์บริสุทธิ์ที่คัดแยกได้ (ตัวอักษรสีแดง) กับยีน 16S rDNA ของแบคทีเรียสายพันธุ์ที่เกี่ยวข้อง และแบคทีเรียที่มีรายงานย่อยสลายสารพิษ (ตัวอักษรสีดำ) โดยตัวเลขที่กิ่งสาขาบอกถึงการนับผลที่ให้ผลซ้ำจากทั้งหมด 1000 ครั้ง ด้วย bootstrap……..	101
4.12	ขนาดชิ้นผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอบริเวณยีนไดออกซิจีเนสในกลุ่ม dox_{GN}……	104
4.13	ขนาดชิ้นผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอบริเวณยีนไดออกซิจีเนสในกลุ่ม dox_{GP}……	105
4.14	โครงสร้างประชาคมแบคทีเรียโดยวิธี DGGE จากบริเวณ V-3 region ของตัวอย่างดินเกาะสีชังจำนวน 10 ตัวอย่าง……..	111
4.15	โครงสร้างประชาคมแบคทีเรียโดยวิธี DGGE จากบริเวณ V-3 region ของตัวอย่างน้ำทะเลเกาะสีชังจำนวน 4 ตัวอย่าง ……..	109

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
4.16	โครงสร้างประชาคมแบคทีเรียโดยวิธี DGGE จากบริเวณ V-3 region ของตัวอย่างดินตะกอนเกาะสีชังจำนวน 20 ตัวอย่าง	110
4.17	แถบดีเอ็นเอเด่นของโครงสร้างประชาคมแบคทีเรียในตัวอย่างดินเกาะสีชังจำนวน 10 ตัวอย่าง.....	112
4.18	แถบดีเอ็นเอเด่นของโครงสร้างประชาคมแบคทีเรียในตัวอย่างน้ำทะเลเกาะสีชังจำนวน 4 ตัวอย่าง.....	113
4.19	(ก) แถบดีเอ็นเอเด่นของโครงสร้างประชาคมแบคทีเรียในตัวอย่างดินตะกอนเกาะสีชังจำนวน 9 ตัวอย่าง และ (ข) แถบดีเอ็นเอเด่นของโครงสร้างประชาคมแบคทีเรียในตัวอย่างดินตะกอนเกาะสีชังจำนวน 10 ตัวอย่าง.....	114
4.20	แผนภูมิต้นไม้แสดงความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของยีนบริเวณ 16S rDNA ของโคลนที่ได้จากเกาะสีชัง กับยีน 16S rDNA ของแบคทีเรียสายพันธุ์เกี่ยวข้องที่ไม่พบรายงานย่อยสลายสารพิษ และพบรายงานการย่อยสลายสารพิษ และแบคทีเรียที่มีรายงานย่อยสลายสารพิษเพิ่มเติม.....	122
4.21	ผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอบริเวณยีน dox_{GN} จากไพร์เมอร์คู่ GNF และ GNR จากตัวอย่างสิ่งแวดล้อมเกาะสีชัง.....	130
4.22	ผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอบริเวณยีน dox_{GP} จากไพร์เมอร์คู่ GPF และ GPR จากตัวอย่างสิ่งแวดล้อมเกาะสีชัง.....	131
4.23	แสดงรูปแบบตัวแทนรีคอมบิแนนท์พลาสมิดของกลุ่ม dox_{GN} หลังถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิด *Hinf*I.....	136
4.24	แสดงรูปแบบตัวแทนรีคอมบิแนนท์พลาสมิดของกลุ่ม dox_{GN} หลังถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิด *BsuRI (HaeIII)*	136
4.25	แสดงรูปแบบตัวแทนรีคอมบิแนนท์พลาสมิดในกลุ่ม dox_{GP} หลังถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิด *Hinf*I.....	138
4.26	แสดงรูปแบบตัวแทนรีคอมบิแนนท์พลาสมิดในกลุ่ม dox_{GP} หลังถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิด *Rsa*I.....	138

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
4.27	แผนภูมิต้นไม้แสดงความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของยีนไดออกซิจีเนสในหน่วยย่อยแอลฟาของ dox_{GN} และ dox_{GP} ที่สร้างจากลำดับกรดอะมิโน และตัวเลขบนกิ่งบอกถึงการนับจำนวนซ้ำจากทั้งหมด 1,000 ครั้งด้วย bootstrap……	152
4.28	จำนวนชุดของยีน 16S rDNA และยีน dox_{GN} ในตัวอย่างดินจำนวน 10 ตัวอย่าง	154
4.29	จำนวนชุดของยีน 16S rDNA และยีน dox_{GN} ในตัวอย่างดิน J บริเวณท่าบน ตัวอย่างน้ำทะเล W2 บริเวณท่าบน และตัวอย่างดินตะกอน 6 บริเวณท่าบน…..	155
5.1	ค่าเฉลี่ยของดัชนีความหลากหลายของ Shannon ที่คำนวณได้จากโครงสร้างประชาคมแบคทีเรียจากวิธี DGGE ในตัวอย่างดิน น้ำทะเล และดินตะกอน …..	163
5.2	แสดงสัดส่วนประชาคมจุลินทรีย์บริเวณเกาะสีชังใน ตัวอย่างดินจำนวน 10 โคลน (ก) ตัวอย่างน้ำทะเลจำนวน 13 โคลน (ข) และตัวอย่างดินตะกอนจำนวน 23 โคลน (ค) ……..…….....	164
5.3	สัดส่วนของกลุ่มแบคทีเรียบริเวณเกาะสีชัง……....	168
5.4	แผนภูมิต้นไม้แสดงความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของแบคทีเรียที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเลี้ยง และการวิเคราะห์เมตาจีโนม กับยีน 16S rDNA ของแบคทีเรียสายพันธุ์ที่เกี่ยวข้อง และแบคทีเรียที่มีรายงานย่อยสลายสารพิษ โดยตัวเลขที่กิ่งสาขาบอกถึงการนับผลที่ให้ผลซ้ำจากทั้งหมด 1,000 ครั้ง ด้วย bootstrap……..	170
5.5	เปอร์เซ็นต์ของยีนไดออกซิจีเนสจาก 34 ตัวอย่างรอบเกาะสีชัง……	172
5.6	จำนวนโคลนของตัวแทนในแต่ละรูปแบบที่พบในกลุ่มยีน dox_{GN} จำนวน 130 โคลน และ dox_{GP} จำนวน 30 โคลน เมื่อเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล……	175
5.7	เปอร์เซ็นต์ความอุดมสมบูรณ์สัมพัทธ์ของ dox_{GN} ต่อ 16S rDNA โดยตัวยกแทนการจัดกลุ่มของค่าเฉลี่ยที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99% ($p > 0.01$)……..……...	181
5.8	เปอร์เซ็นต์ความอุดมสมบูรณ์สัมพัทธ์ของผลบวกจำนวนแบคทีเรียย่อยสลาย PAHs ต่อจำนวนแบคทีเรียทั้งหมด โดยตัวยกแทนการจัดกลุ่มของค่าเฉลี่ยที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($p > 0.05$)…..	182

คำอธิบายลักษณะและคำย่อ

%	=	เปอร์เซ็นต์
bp	=	base pair
kp	=	kilobase
°ซ	=	องศาเซลเซียส

บทที่ 1

บทนำ

ปัจจุบันประเทศไทยมีการเจริญเติบโตทางอุตสาหกรรมอย่างต่อเนื่อง ทำให้ปริมาณการใช้และนำเข้าน้ำมันปิโตรเลียมเพื่อใช้ในการผลิตระดับอุตสาหกรรมเพิ่มสูงขึ้น อีกทั้งการประกอบกิจกรรมต่าง ๆ ของมนุษย์ เช่น การเกษตร การคมนาคมและการขนส่ง ล้วนมีความเสี่ยงต่อการรั่วไหลของน้ำมันปิโตรเลียม (Reynoso-Cuevas และคณะ, 2008) ที่ประกอบด้วยสารอินทรีย์หลายชนิด หนึ่งในสารอันตรายที่สำคัญ คือสารประกอบในกลุ่มพอลิไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน (Polycyclic Aromatic Hydrocarbon, PAHs) ที่มีโครงสร้างเป็นคาร์บอนอะตอมและไฮโดรเจนอะตอมจับกันเป็นวงแหวนอะโรมาติกตั้งแต่ 2 วงขึ้นไป สารประกอบ PAHs เหล่านี้มีอันตรายต่อสิ่งมีชีวิต โดยอาจเหนี่ยวนำให้เกิดการกลายพันธุ์ (mutagenic) มะเร็ง (carcinogenic) (Talley, 2006) และทำให้ทารกในครรภ์มีรูปร่างผิดปกติได้ (teratogenic) (Singh และ Ward, 2004)

การบำบัดสารประกอบ PAHs ที่ปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อมด้วยวิธีทางชีวภาพ (Bioremediation) เป็นวิธีหนึ่งที่มีประสิทธิภาพสูง ในการกำจัดหรือลดความเป็นพิษของสารประกอบ PAHs ให้น้อยลงหรือหมดไปโดยอาศัยกิจกรรมของแบคทีเรีย เนื่องจากแบคทีเรียสามารถใช้สารประกอบ PAHs เป็นแหล่งอาหารและพลังงานในการเจริญเติบโต (Thavasi และคณะ, 2006) โดยจะย่อยสารสารพิษดังกล่าวให้เป็นก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์และน้ำ ซึ่งไม่ส่งผลกระทบภายหลังการบำบัด (Haritash และ Kaushik, 2009)

กระบวนการย่อยสลาย PAHs โดยแบคทีเรีย เกิดขึ้นในสภาวะที่มีอากาศ (Habe และ Omori, 2003) โดยการเติมออกซิเจน 2 อะตอมเข้าสู่วงอะโรมาติกที่ตำแหน่งพันธะคู่โดยเอนไซม์ไดออกซิจีเนส (dioxygenase) จากนั้นผ่านการเปลี่ยนรูปแบบหลายขั้นตอนจนได้สารตั้งต้นที่คล้ายแคทีคอล และถูกย่อยสลายต่อด้วยเอกซ์ตราไดออลไดออกซิจีเนส (extradiol dioxygenase) ผ่านทางวิถีการแตกวงอะโรมาติกแบบ *ออโธ* หรือ *เมตา* เพื่อเข้าสู่วัฏจักรกรดไทรคาร์บอกซิลิกต่อไป (Peng และคณะ, 2008)

เมื่อมีการปนเปื้อนของสารพิษในพื้นที่แบคทีเรียท้องถิ่นจะมีการปรับตัว และมีเปลี่ยนแปลงโครงสร้างประชาคมแบคทีเรียกลายเป็นโครงสร้างประชาคมแบคทีเรียใหม่ (Roling และคณะ, 2002) จากรายงานของ Andreoni และ Gianfreda (2007) ที่ศึกษาโครงสร้างประชาคมแบคทีเรียหลังจากเกิดการปนเปื้อนด้วยอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน พบว่าแบคทีเรีย

มากกว่าครึ่งหนึ่งที่พบเป็นแบคทีเรียย่อยสลายสารพิษดังกล่าวได้ จากการศึกษาดังกล่าวนี้เองนำมาสู่ที่มาของการคัดแยกแบคทีเรียย่อยสลายสารพิษจากแหล่งที่พบปนเปื้อน ซึ่งแบคทีเรียกลุ่มหลักในดินปนเปื้อนสารประกอบ PAHs คือ แบคทีเรียในสกุล *Pseudomonas Sphingomonas Mycobacterium* และ *Rhodococcus* (Johnsen และคณะ, 2005) อย่างไรก็ตามการคัดแยกเชื้อจากแหล่งธรรมชาติใหม่ ๆ ที่มีความอุดมสมบูรณ์ทางชีวภาพ เช่น ดินชายหาดหรือดินตะกอนทะเลลึก และน้ำทะเล ทำให้มีโอกาสพบกลุ่มแบคทีเรียใหม่ที่ย่อยสลายสารประกอบ PAHs ได้ เช่น *Exiguobacterium* sp. *Methylomonas* sp. และ *Schewanella* sp. (Edlund และ Jansson, 2008) ที่สามารถย่อยสลายฟีแนนทรีนได้ และ *Achromobacter* spp. *Flavobacterium* spp. *Halomonas* sp. *Roseovarius* spp. (Wang และคณะ, 2008) *Janibacter anophelis* สายพันธุ์ JY11 (Zhang และคณะ, 2009) และ *Bacillus vallismortis* สายพันธุ์ JY3A (Ling และคณะ, 2011) ที่สามารถย่อยสลายไพรีนได้

เริ่มแรกของการศึกษาพันธุศาสตร์ของยีนประมวลรหัสเอนไซม์ไดออกซิจีเนสในแบคทีเรียที่คัดแยกได้ พบมีจัดเรียงตัวของยีนที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์แตกต่างกัน ทำให้สามารถแบ่งกลุ่มยีนออกเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มยีนประมวลรหัสเอนไซม์ไดออกซิจีเนสในแบคทีเรียแกรมลบ (dox_{GN}) ซึ่งส่วนใหญ่เกี่ยวข้องกับสามารถย่อยสลายสารประกอบ PAHs มวลโมเลกุลต่ำ เช่น ยีน *nah* จาก *Pseudomonas putida* สายพันธุ์ G7 และยีนคล้าย *nah* (*nah-like*) จาก *Pseudomonas* สายพันธุ์ต่างๆ ที่ย่อยสลายแนพธาลีน ยีน *phn* จาก *Burkholderia* sp. สายพันธุ์ RP007 และ *Burkholderia* sp. สายพันธุ์ C3 ที่สลายแนพธาลีน ฟีแนนทรีน และไดเบนโซไธโอฟีน (Tittabutr และคณะ, 2011) ยีน *arh* จาก *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ A4 ที่ย่อยสลายอะซีแนพธีน และอะซีแนพธิลีน (Pinyakong และคณะ, 2004) และกลุ่มยีนประมวลรหัสเอนไซม์ไดออกซิจีเนสในแบคทีเรียแกรมบวก (dox_{GP}) ซึ่งเกี่ยวข้องกับการย่อยสลายสารประกอบ PAHs มวลโมเลกุลต่ำและสูง เช่น ยีน *nar* จาก *Rhodococcus* sp. สายพันธุ์ NCIMB12038 ที่ย่อยสลายแนพธาลีน ยีน *phd* จาก *Nocardioides* sp. สายพันธุ์ KP7 ที่ย่อยสลายฟีแนนทรีน (Saito และคณะ, 2000) และยีน *nid* ที่พบส่วนใหญ่ใน *Mycobacterium* สายพันธุ์ต่าง ๆ ที่ย่อยสลายไพรีน เช่น สายพันธุ์ MHP-1 (Habe และคณะ, 2004) และสายพันธุ์ 17A3T (Derz และคณะ, 2004)

ข้อจำกัดของการคัดแยกเชื้อจากธรรมชาติ พบว่าสามารถคัดแยกเชื้อที่เพาะเลี้ยงได้เพียง 0.1 % (Andreoni และ Gianfreda, 2007; Kennedy และคณะ, 2010) ทำให้ข้อมูลด้านพันธุศาสตร์ของยีนถูกจำกัด แต่ปัจจุบันการใช้วิธีทางชีวโมเลกุล เช่น การสกัดดีเอ็นเอเมตาจีโนมจากสิ่งแวดล้อมโดยตรง การวิเคราะห์ความหลากหลายของโครงสร้างประชาคมแบคทีเรียโดยเพิ่ม

จำนวนดีเอ็นเอส่วน 16S rDNA และแยกชิ้นดีเอ็นเอที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์แตกต่างกันโดยวิธี PCR-DGGE (Torsvik และคณะ, 2002) การตรวจหายีนไดออกซิจีเนส และการวิเคราะห์ความหลากหลายของรูปแบบยีนไดออกซิจีเนสจากห้องสมุดเมตาจีโนม (Handelsman และคณะ, 2004) ตลอดจนวิเคราะห์หาความอุดมสมบูรณ์ของยีนย่อยสลายสารประกอบ PAHs ด้วยวิธี real-time PCR เพื่อ เป็นต้น วิธีการเหล่านี้สามารถทำให้ค้นพบแบคทีเรีย ตลอดจนยีนและเอนไซม์ที่มีประโยชน์โดยตรงจากสิ่งแวดล้อมโดยไม่ต้องแยกเชื้อก่อน และสามารถใช้เป็นข้อมูลเปรียบเทียบกับโครงสร้างประชาคมแบคทีเรียที่แท้จริงในสิ่งแวดล้อม และความอุดมสมบูรณ์ของยีนย่อยสลายพิษที่เปลี่ยนแปลงไปเมื่อมีการปนเปื้อนด้วยสารพิษได้

ปัจจุบันประเทศไทยมีการขยายเขตอุตสาหกรรมเข้าสู่อ่าวไทยตอนบน โดยเฉพาะบริเวณเกาะสีชัง จังหวัดชลบุรี ซึ่งเป็นที่ตั้งของท่าเรือน้ำลึกขนาดใหญ่ และโรงกลั่นน้ำมันและเปลี่ยนถ่ายน้ำมันเป็นจำนวนมาก (Department of Pollution Control, 2003) ทำให้มีการใช้เส้นทางคมนาคมขนส่งทางน้ำที่หนาแน่น เป็นเหตุให้เกิดอุบัติเหตุทางเรืออยู่บ่อยครั้ง จึงมีโอกาสเสี่ยงต่อการปนเปื้อนสารประกอบ PAHs โดยเฉพาะฟีแนนทรีน หรือไพรีน ซึ่งเป็น PAHs มวลโมเลกุลต่ำ และสูงที่พบปนเปื้อนอย่างแพร่หลายในสิ่งแวดล้อม ทั้งยังไม่พบรายงานการศึกษาการย่อยสลาย PAHs โดยแบคทีเรียในพื้นที่ดังกล่าว ดังนั้นวิทยานิพนธ์นี้จึงมุ่งเน้นศึกษาความหลากหลายแบคทีเรียและยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายสารประกอบ PAHs โดยใช้วิธีการเพาะเลี้ยงเชื้อร่วมกับการวิเคราะห์เมตาจีโนมสิ่งแวดล้อม ผลสรุปของการศึกษาทั้งหมดสรุปของงานทั้งหมดจะทำให้ทราบความหลากหลายของโครงสร้างประชาคมแบคทีเรีย ชนิดและปริมาณแบคทีเรียย่อยสลายสารพิษ รวมทั้งยีนและความอุดมสมบูรณ์ของยีนย่อยสลายสายพิษในพื้นที่ เพื่อใช้เป็นข้อมูลเบื้องต้นในการประเมินความเป็นไปได้ในการเกิดการย่อยสลายทางชีวภาพในพื้นที่ปนเปื้อนได้

วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

เพื่อศึกษาความหลากหลายและความอุดมสมบูรณ์ของแบคทีเรียและยีนไดออกซิจีเนสที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายฟีแนนทรีนหรือไพรีนในดิน ดินตะกอน และน้ำทะเลบริเวณเกาะสีชัง โดยวิธีการเพาะเลี้ยงเชื้อในห้องปฏิบัติการร่วมกับการวิเคราะห์เมตาจีโนม

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

สามารถคัดแยกแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายฟีแนนทรีน หรือไพรีน และทราบข้อมูลเบื้องต้นของยีนประมวลรหัสเอนไซม์ไดออกซิจิเนสในแบคทีเรียสายพันธุ์บริสุทธิ์ที่ถูกคัดแยกได้ และสามารถคัดแยกยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายสารพิษจากวิธีเมตาจีโนมได้

บทที่ 2

ปริทัศน์วรรณกรรม

2.1 สารประกอบพอลิไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน

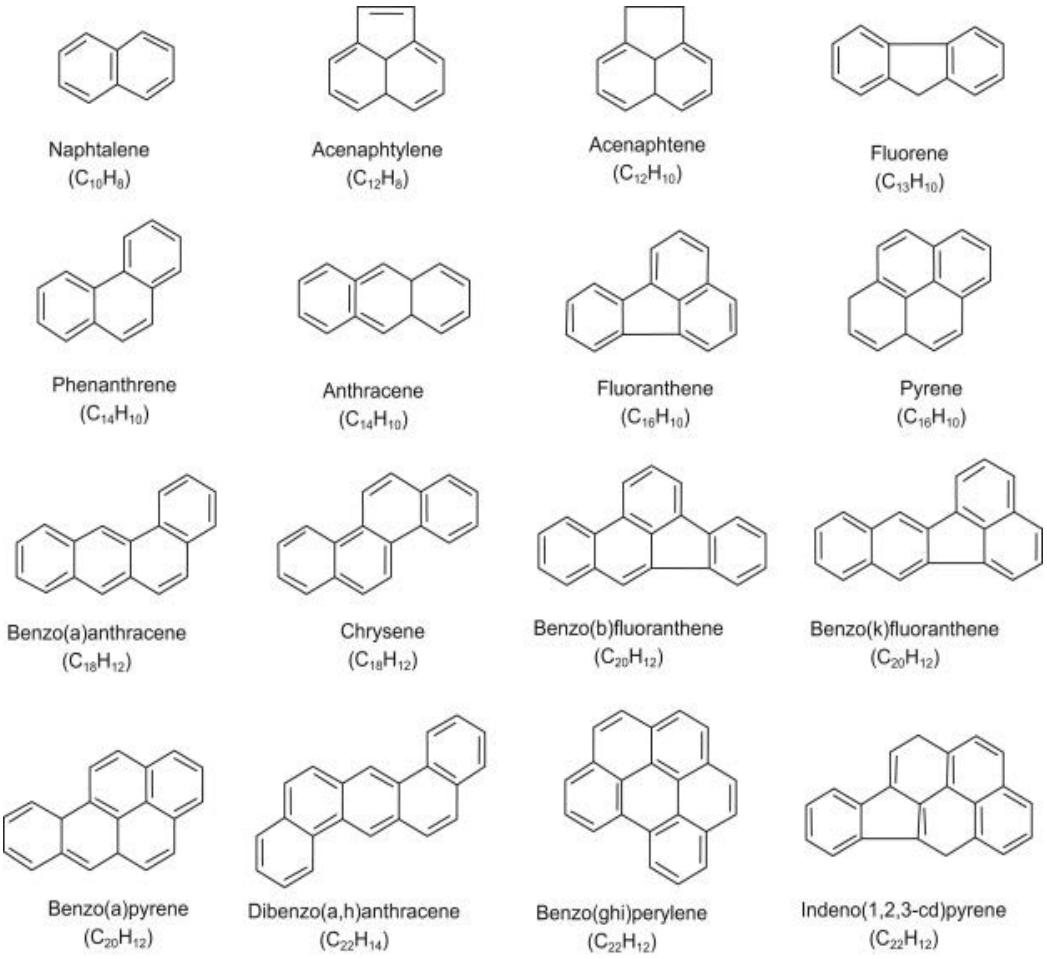
ปัจจุบันอุตสาหกรรมในประเทศไทยมีการเจริญเติบโตอย่างต่อเนื่อง ส่งผลให้ปริมาณการใช้และนำเข้าน้ำมันปิโตรเลียมเพื่อใช้ในการผลิตระดับอุตสาหกรรมเพิ่มมากขึ้น อีกทั้งมนุษย์เองก็มีใช้น้ำมันปิโตรเลียมในการคมนาคมและขนส่งปริมาณมาก ส่งผลให้เกิดของเสียมลพิษจำพวกน้ำมันปิโตรเลียมซึ่งยากต่อการควบคุม จัดการ และย่อยสลายให้หมดไป เพราะองค์ประกอบในน้ำมันปิโตรเลียมมีสารอินทรีย์หลายชนิด หนึ่งในสารอันตรายที่สำคัญ คือสารประกอบในกลุ่มพอลิไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน (Polycyclic Aromatic Hydrocarbon, PAHs)

สารประกอบในกลุ่ม PAHs มีโครงสร้างเป็นคาร์บอนอะตอมและไฮโดรเจนอะตอมจับกันเป็นวงอะโรมาติกตั้งแต่ 2 วงขึ้นไป PAHs มีโครงสร้างหลักทั้งหมด 35 ชนิด แต่ละโครงสร้างหลักประกอบด้วยซึ่งอนุพันธุ์ (derivative) ต่าง ๆ มีการจัดเรียงตัวของวงอะโรมาติกเชื่อมต่อกันเป็นเส้นตรง มุมงอ หรือจับเป็นกลุ่ม โดยการจัดเรียงกันเป็นเส้นตรงจะมีความคงตัวน้อยที่สุด ส่วนการจัดเรียงตัวเป็นมุมงอจะมีความคงตัวมากที่สุด สามารถตกค้างและสะสมอยู่ในสิ่งแวดล้อมเป็นเวลานาน (Hafez และคณะ, 2008; Johnsen และคณะ, 2005) พบปนเปื้อนอย่างแพร่หลายในสิ่งแวดล้อม ก่อให้เกิดอันตรายต่อสิ่งมีชีวิต (Sverdrup และคณะ, 2007) โดยเหนี่ยวนำให้เกิดการกลายพันธุ์ (mutagenic) มะเร็ง (carcinogenic) (Talley, 2006) และทำให้ทารกในครรภ์มีรูปร่างผิดปกติได้ (teratogenic) (Singh และ Ward, 2004) โดยสาเหตุการปนเปื้อนส่วนใหญ่เกิดจากกิจกรรมของมนุษย์ เช่น การประกอบอาหาร ควันบุหรี่ การเผาไหม้ที่ไม่สมบูรณ์ของน้ำมันเชื้อเพลิงและเครื่องยนต์ การปล่อยของเสียจากอุตสาหกรรมปิโตรเคมี และอุตสาหกรรมไม้ที่ใช้สารรักษาเนื้อไม้ น้ำยาชักเงาไหม้ รวมถึงน้ำยาป้องกันเชื้อรา

จากรายงานของสำนักงานคุ้มครองสิ่งแวดล้อมของสหรัฐอเมริกา The United State Environment Protection Agency (U.S. EPA) กำหนดให้สารประกอบ PAHs 16 ชนิดเป็นสารอันตรายและต้องกำจัดออกจากสิ่งแวดล้อมอย่างเร่งด่วน ซึ่งโครงสร้างของสารประกอบ PAHs ทั้ง 16 ชนิด แสดงในรูปที่ 2.1 โดยสามารถแบ่งกลุ่มของสารประกอบ PAHs ออกได้ 2 กลุ่ม คือ สารประกอบ PAHs มวลโมเลกุลต่ำ (Low molecular weight PAHs, LMW PAHs) ประกอบด้วย

วงอะโรมาติก 2-3 วง และสารประกอบ PAHs มวลโมเลกุลสูง (High molecular weight PAHs, HMW PAHs) ประกอบด้วยวงอะโรมาติกตั้งแต่ 4 วงขึ้นไป

ฟีแนนทรีน (Phenanthrene) และไพรีน (Pyrene) ซึ่งมีโครงสร้างเป็นวงอะโรมาติก 3 และ 4 วง ตามลำดับ ถูกใช้เป็นตัวแทนในการศึกษาการย่อยสลาย PAHs โมเลกุลต่ำ และสูง ตามลำดับ (Joanna และคณะ, 2001) เนื่องจากพบปนเปื้อนอย่างแพร่หลายในสิ่งแวดล้อมทั้งในดิน ดินตะกอน และแหล่งน้ำจืด หรือแม้กระทั่งในทะเล (Chen และคณะ, 2007) ซึ่งสาเหตุการปนเปื้อนหลักมาจากรั่วไหลของน้ำมันปิโตรเลียม (Labana และคณะ, 2007; Reynoso-Cuevas และคณะ, 2008)



รูปที่ 2.1 โครงสร้างสารประกอบ PAHs 16 ชนิด

(US EPA, 1997; Harmens และคณะ, 2013)

ฟีแนนทรีน

เป็นสารประกอบ PAHs มวลโมเลกุลต่ำมีโครงสร้างเป็นวงอะโรมาติก 3 วงเชื่อมต่อกันเป็นมุมงอ ดังแสดงในรูปที่ 2.2 มีสมบัติทางเคมีและกายภาพของฟีแนนทรีนดังแสดงในตารางที่ 2.1

รูปที่ 2.2 โครงสร้างโมเลกุลของฟีแนนทรีน

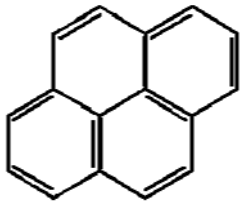
ตารางที่ 2.1 สมบัติทางเคมีและกายภาพของฟีแนนทรีน

สมบัติ	ลักษณะ
สูตรโมเลกุล	$C_{14}H_{10}$
น้ำหนักโมเลกุล	178.23
ลักษณะปรากฏ	ผลึกของแข็งใสสีขาว
อุณหภูมิหลอมเหลว	100 °ซ
อุณหภูมิการกลายเป็นไอ	340 °ซ
ความดันไอ	1 มิลลิเมตรปรอท ที่ 118.3 °ซ
ความถ่วงจำเพาะ	1.179
ความหนาแน่น	1.179 กรัมต่อลูกบาศก์เมตร (ที่ 25 °ซ)
การละลายน้ำ	ละลายน้ำได้น้อยกว่า 1 มิลลิกรัมต่อลิตร (ที่ 25 °ซ)
การละลายตัวทำละลาย	คาร์บอนเตตระคลอไรด์ โทลูอีน อีเทอร์ กรดแอซีติก เบนซีนและคลอโรฟอร์ม
สัมประสิทธิ์แบ่งการละลาย $LogK_{ow}$	4.57
สัมประสิทธิ์แบ่งการละลาย $LogK_{oc}$	4.45

ที่มา: กรมควบคุมมลพิษ, 2547

ไพรีน (Pyrene)

เป็นสารประกอบ PAHs มวลโมเลกุลสูงมีโครงสร้างเป็นวงอะโรมาติก 4 วงเชื่อมต่อกันเป็นกลุ่ม ดังแสดงในรูปที่ 2.3 มีสมบัติทางเคมีและกายภาพของไพรีนแสดงในตารางที่ 2.2



รูปที่ 2.3 โครงสร้างโมเลกุลของไพรีน

ตารางที่ 2.2 สมบัติทางเคมีและกายภาพของไพรีน

สมบัติ	ลักษณะ
สูตรโมเลกุล	$C_{16}H_{10}$
น้ำหนักโมเลกุล	202.3
ลักษณะปรากฏ	ผลึกของแข็งสีขาวหรือเหลืองอ่อน
อุณหภูมิหลอมเหลว	156 °ซ
อุณหภูมิการกลายเป็นไอ	339-404 °ซ
อุณหภูมิการกลายเป็นไอ	339-404 °ซ
ความถ่วงจำเพาะ	0.077 ที่ 25 °ซ
ความหนาแน่น	1.271 กรัมต่อตารางเซนติเมตร ที่ 14 °ซ
การละลายน้ำ	ไม่ละลาย
การละลายตัวทำละลาย	เบนซีนไดเอทิลอีเทอร์ อีเทอร์ โทลีน เอธานอล และคาร์บอนซัลไฟด์
สัมประสิทธิ์แบ่งการละลาย $LogK_{ow}$	4.88
สัมประสิทธิ์แบ่งการละลาย $LogK_{oc}$	4.58

ที่มา: กรมควบคุมมลพิษ, 2547

2.2 ความเป็นพิษของสารประกอบ PAHs

สารประกอบ PAHs หลายชนิดก่อให้เกิดอันตรายต่อมนุษย์ และสัตว์มีเลี้ยงลูกด้วยนม โดยทำให้การระคายเคืองเบื้องต้นซึ่งพบว่าแอนทราซีนมีฤทธิ์ในการกระตุ้นร่างกายมนุษย์ให้ไวต่อแสงมากขึ้นทำให้ผิวหนังมีอาการแสบ ร้อน และคัน และยังส่งผลต่อการระคายเคืองที่เยื่อบุตา และหลอดลม (International Labour Office, 1983) ส่วนไพรีนทำให้ผิวหนังของหนูตะเภามีอาการแพ้แสงอย่างรุนแรง (Kochevar และคณะ, 1982) เช่นเดียวกับฟีแนนทรีนทำให้เกิดภูมิแพ้ชนิดที่ไม่รุนแรง (Samanta และคณะ, 2002) ส่วนเบนโซ(*เอ*)ไพรีน ทำให้เกิดการระคายเคืองที่ผิวหนัง ผิวหนัง มีหูด และมีตุ่มหนองขึ้น และการะคายเคืองบริเวณเยื่อบุทางเดินหายใจ (Cottini และ Mazzone, 1939) และเบนโซ (*เอ*) แอนทราซีน ส่งผลต่อเยื่อบุทางเดินหายใจทำให้เกิดพังพืดที่เยื่อบุทางเดินหายใจ หายใจได้ไม่สะดวก (Topping และคณะ,1978)

ผลต่อปฏิกิริยาทางชีวเคมี (Biochemical interactions): พบว่า เบนโซ (*เอ*) ไพรีน เบนโซ (*เอ*) แอนทราซีน ฟีแนนทรีน และแอนทราซีน มีผลต่อการยังยั้งการทำงานของเอนไซม์คาร์บอกซิลเอสเทอเรสในเซลล์ตับ ไต และในเยื่อบุลำไส้หนู ส่วนเบนโซ (*เอ*) ไพรีน และเบนโซ (*เอ*) แอนทราซีน มีผลต่อการกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์อัลดีไฮด์ดีไฮโดรจีเนสในเซลล์ตับหนู (Torronen และคณะ, 1981)

สารก่อมะเร็ง: สารประกอบ PAHs สามารถแบ่งได้ 2 กลุ่ม คือสารที่ก่อมะเร็ง และสารที่อาจก่อมะเร็ง (IARC, 1999) ดังนี้คือ

<u>กลุ่ม A</u> สารก่อมะเร็งในมนุษย์มี 3 ชนิด คือ เบนโซ (*เอ*) ไพรีน, แอนทราซีน และไดเบนโซ (*เอ, เอช*) แอนทราซีน โดยสารเหล่านี้จัดเป็นสารก่อกลายพันธุ์ด้วย

<u>กลุ่ม B</u> สารที่อาจจะก่อมะเร็งในมนุษย์มี 11 ชนิด ได้แก่ แนพธาลีน, เบนโซ (*บี*) ฟลูออแรนธีน, เบนโซ (*เค*) ฟลูออแรนธีน, เบนโซ (*เจ*) ฟลูออแรนธีน, ไดเบนโซ (*เอ, เอช*) ไพรีน, ไดเบนโซ (*เอ, แอล*) ไพรีน, ไดเบนโซ (*เอ, อี*) ไพรีน, ไดเบนโซ (*เอ, เอช*) อะคริดีน, ไดเบนโซ (*เอ, ไอ*) ไพรีน ,ไดเบนโซ (*เอ, เจ*) อะคริดีน และอินดิโน (*1, 2, 3- ซี ดี*) ไพรีน

ความผิดปกติของทารกในครรภ์: พบว่าหนูที่ได้รับเบนโซ (*เอ*) ไพรีน ระหว่างตั้งท้องทำให้ตัวอ่อนมีพัฒนาการผิดปกติไป คือ มีอัตราการรอดชีวิตของลูกหนูหลังผ่านการคลอดน้อยลง หรือตัวอ่อนมีการพัฒนาระบบสืบพันธุ์ผิดปกติ ทำให้ลูกหนูภายหลังการมีความสมบูรณ์ทางเพศลดลง บางตัวเป็นหมัน (MacKenzie และ Angevine, 1981)

2.3 การปนเปื้อนสารประกอบ PAHs ในสิ่งแวดล้อม

สารประกอบ PAHs พบปนเปื้อนอย่างแพร่หลายทั้งในดิน ดินตะกอน แหล่งน้ำจืด และในทะเล ดังรายงานต่อไปนี้ Chen และคณะ, 2006 พบการปนเปื้อน PAHs ในดินตะกอน และแหล่งน้ำ บริเวณลี่เจียง ประเทศจีน ซึ่งมีปริมาณ PAHs เท่ากับ 70.3-1,844.4 นาโนกรัมต่อลิตรในแหล่งน้ำ พบเป็น PAHs ชนิดที่มีวงอะโรมาติก 2-3 วง ส่วนในดินตะกอนมีปริมาณ PAHs เท่ากับ 91.3-614.4 นาโนกรัมต่อกรัมดินแห้ง โดยพบเป็น PAHs ชนิดที่มีวงอะโรมาติก 3-4 วง

Yim และคณะ (2007) พบการปนเปื้อน PAHs ในดินตะกอนชายฝั่งทะเล ประเทศเกาหลี มีความเข้มข้นของ PAHs ทั้ง 16 ชนิดสูงถึง 8.80-18,500 นาโนกรัมต่อกรัมดินแห้ง

Tian และคณะ (2008) พบการปนเปื้อน PAHs ในดินปากแม่น้ำจูหลง ในประเทศจีน มีความเข้มข้นของ PAHs อยู่ในช่วง 280-1,074 นาโนกรัมต่อกรัมดินแห้ง โดยพบ PAHs ชนิดที่มีวงอะโรมาติก 4-6 วงเป็นส่วนใหญ่

Sojinu และคณะ (2010) พบการปนเปื้อน PAHs ในดิน และดินตะกอนบริเวณสามเหลี่ยมปากแม่น้ำไนเจอร์ ประเทศไนจีเรีย พบมีความเข้มข้นของ PAHs เท่ากับ 65-331 และ 24-120 นาโนกรัมต่อกรัมดิน และดินตะกอนแห้งตามลำดับ ซึ่งพบเป็น PAHs ชนิดที่มีวงอะโรมาติก 3 วงเป็นส่วนใหญ่ ซึ่งคิดเป็น 45% ของปริมาณ PAH ที่พบทั้งหมด

Barakat และคณะ (2011) พบการปนเปื้อน PAHs ในดินตะกอนชายฝั่งทะเลเมดิเตอร์เรเนียน ประเทศอียิปต์ มีความเข้มข้นของ PAHs อยู่ในช่วง 13.5-22,600 นาโนกรัมต่อกรัมดินแห้ง โดยพบการปนเปื้อนของ PAHs ชนิดที่มีวงอะโรมาติก 2–6 วง เป็นส่วนใหญ่

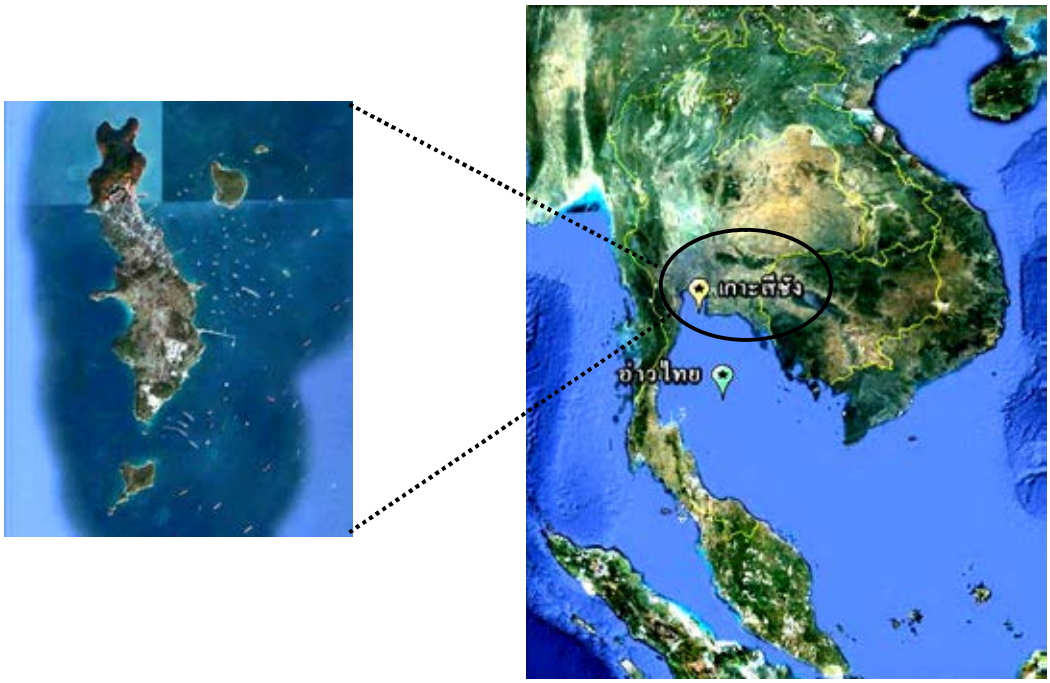
Perra และคณะ (2011) พบการปนเปื้อน PAHs ในดินตะกอนทะเล ประเทศอิตาลี มีความเข้มข้นของ PAHs อยู่ในช่วง 0.71-1,550 นาโนกรัมต่อกรัมดินแห้ง โดยพบการปนเปื้อนของ PAHs ชนิดที่มีวงอะโรมาติก 3-4 วง เช่น ฟีแนนทรีน ฟลูออแรธีน ไพรีน เบนโซ (*เอ*) แอนทราซีน เบนโซ (*เอ*) แอนทราซีน และไครซีน คิดเป็น 60-70% ของความเข้มข้น PAHs ทั้งหมด

Su และคณะ (2012) พบการปนเปื้อน PAHs 16 ชนิดในดินตะกอน ที่อ่าวซานเจียง และเหลยโจว ตอนใต้ของประเทศจีน มีค่าเฉลี่ยความเข้มข้นของ PAHs สูงถึง 315.98 นาโนกรัมต่อกรัมดินแห้ง โดยที่บริเวณอ่าวเหลยโจวพบการปนเปื้อนของ PAHs ชนิดที่มีวงอะโรมาติก 3 วง ขณะที่บริเวณอ่าวซานเจียงพบการปนเปื้อนของ PAHs ชนิดที่มีวงอะโรมาติก 4 วง เป็นส่วนใหญ่

2.4 เกาะสีชัง

เกาะสีชังเป็นอำเภอหนึ่งในจังหวัดชลบุรี ตั้งอยู่บริเวณอ่าวไทยตอนบนของประเทศไทย ดังแสดงในรูปที่ 2.4 ทิศเหนือจดทะเลเขตอำเภอเมือง จังหวัดสมุทรปราการ ทิศใต้จดทะเลเขตอำเภอบางละมุง จังหวัดชลบุรี และทิศตะวันออกจดทะเลเขตอำเภอศรีราชา จังหวัดชลบุรี และทิศตะวันตกจดทะเลเขตอำเภอบ้านแหลม จังหวัดเพชรบุรี มีเนื้อที่ประมาณ 25 กิโลเมตร ได้รับอิทธิพลลมมรสุมตะวันออกเฉียงเหนือ และตะวันตกเฉียงใต้ และนี้ได้รับอิทธิพลจากกระแสน้ำจืดเพราะตั้งอยู่ใกล้บริเวณปากแม่น้ำสำคัญ 2 สาย คือ แม่น้ำบางปะกง และแม่น้ำเจ้าพระยา

สภาพภูมิประเทศของเกาะสีชังเป็นเกาะกลางทะเล พื้นที่ส่วนใหญ่ร้อยละ 80 เป็นโขดหินและภูเขา ซึ่งไม่เหมาะแก่การเพาะปลูก แหล่งชุมชนส่วนใหญ่ของเกาะสีชังตั้งอยู่ทางทิศตะวันออกของเกาะ ซึ่งเป็นที่ตั้งของท่าเรือ เพื่อใช้ในการสัญจรไปมา เศรษฐกิจที่สำคัญของเกาะสีชังจึงขึ้นอยู่กับการประมง และขนส่งสินค้าทางทะเล ทำให้บริเวณเกาะสีชังมีอู่เรือ ท่าเทียบเรือน้ำลึก สำหรับรองรับเรือขนส่งสินค้าทางทะเล และยังเป็นที่ตั้งของโรงกลั่นน้ำมันและเปลี่ยนถ่ายน้ำมันจำนวนมาก (Department of Pollution Control, 2003)



รูปที่ 2.4 เกาะสีชัง จังหวัดชลบุรี ประเทศไทย

ที่มา: Google Earth program

2.5 การปนเปื้อนปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนบริเวณรอบเกาะสีชัง

ระบบนิเวศเกาะสีชังมีความหลากหลายทั้ง ดินทราย และน้ำทะเล และดินตะกอนทะเล ซึ่งภายในระบบนิเวศดังกล่าวจะมีสิ่งมีชีวิตอาศัยอยู่มากมาย ทำให้เกิดความหลากหลายทางชีวภาพขึ้น (Somboona และคณะ, 2012) ดินตะกอนนอกจากเป็นแหล่งที่อยู่อาศัยของสิ่งมีชีวิตยังเป็นแหล่งกำเนิดและสะสมธาตุอาหารต่างๆ เนื่องจากการย่อยสลายของจุลินทรีย์ ทำให้ธาตุอาหารต่าง ๆ หมุนเวียนกลับขึ้นสู่แหล่งน้ำ และดินได้

แต่ปัจจุบันมีการใช้เส้นทางคมนาคมขนส่งทางน้ำบริเวณรอบเกาะสีชังเพิ่มมากขึ้น ทำให้เสี่ยงต่อการรั่วไหลของปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอน ได้แก่ น้ำมัน และ PAHs ซึ่งจากสถิติการรั่วไหลของน้ำมันปริมาณมาก (20,000 ลิตรขึ้นไป) บริเวณอ่าวไทยตอนบนเหนือเกาะสีชัง ระหว่างปี พ.ศ. 2540 – 2553 พบว่าการรั่วไหลจำนวนมากถึง 6 ครั้ง ดังแสดงในตารางที่ 2.3

ตารางที่ 2.3 สถิติน้ำมันรั่วไหลบริเวณอ่าวไทยตอนบนของประเทศไทย

ลำดับ	วัน เดือน ปี	ชนิดน้ำมัน	สถานที่เกิด	สาเหตุ
1	22 พฤษภาคม 2544	น้ำมันดิบ	ท่าเรือมาบตาพุด ระยอง	สายตู้จ่ายน้ำมันหลุดทำให้น้ำมันรั่วไหล
2	15 มกราคม 2545	น้ำมันเตา	อ. สัตหีบ ชลบุรี	อุบัติเหตุของเรือชนหินฉลามเนื่องจากคลื่นลมแรง
3	17 ธันวาคม 2545	น้ำมันเตา	ท่าเรือแหลมฉบังใต้เกาะสีชัง ชลบุรี	อุบัติเหตุของเรือชนกันทำให้น้ำมันรั่วไหล
4	2 พฤศจิกายน 2548	น้ำมันดิบ	อ.ศรีราชา ชลบุรี	ท่อเชื่อมต่อหลุดขณะส่งถ่ายน้ำมัน เนื่องจากคลื่นลมแรง
5	4 พฤษภาคม 2549	น้ำมันเตา	อ.มาบตาพุด ระยอง	รั่วไหลจากรอยรั่วของเรือบรรทุกน้ำมัน
6	15 มิถุนายน 2551	น้ำมันเตา	อ. พระสมุทรเจดีย์ สมุทรปราการ	รั่วไหลจากเรือสินค้าสัญชาติเกาหลีเหนือ

ที่มา: รวบรวมจากกรมเจ้าท่า. สถิติน้ำมันรั่วไหล สืบค้นจาก http://www.md.go.th/safety_environment/04_4.php วันที่เข้าถึง 21 กุมภาพันธ์ 2556

นอกจากนี้ยังพบรายงานการปนเปื้อนปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนบริเวณเกาะสีชัง จากรายงานของสมภพ รุ่งสุภา และกัลยา วัฒยากร (2550) ที่ศึกษาการปนเปื้อนปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนในน้ำทะเลรอบเกาะสีชัง และศรีราชา พบปริมาณปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนอยู่ในมาตรฐานน้ำทะเลและชายฝั่ง 5-6 คือ 5 ไมโครกรัมต่อลิตรของไครซีน แต่บริเวณหาดทรายแก้ว มีค่า 5.433 ไมโครกรัมต่อลิตรของไครซีน ซึ่งมีค่าสูงเกินมาตรฐาน ส่วนบริเวณศรีราชา (เกาะลอย) มีค่าสูงเกินมาตรฐานตลอดปี คือ 50.249 ไมโครกรัมต่อลิตรของไครซีน ต่อมาในปี 2553 สมภพ รุ่งสุภา ศึกษาการปนเปื้อนปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนในน้ำทะเลบริเวณเกาะสีชัง ในปี 2551-2553 พบปริมาณปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนอยู่ในมาตราฐานน้ำทะเลและชายฝั่ง แต่บริเวณท่าบน และท่าล่างซึ่งเป็นเขตชุมชนที่อยู่อาศัย ทางทิศตะวันออกของเกาะสีชังมีปริมาณปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนสูงกว่าบริเวณอื่นในทั้ง 3 ปี อย่างไรก็ตามพบรายงานการปนเปื้อนปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอน และ PAHs จากบริเวณอื่น ๆ ในประเทศไทย อาทิ เช่น

สุทธาทิพย์ มาฟู (2548) พบการปนเปื้อนปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอน บริเวณปากแม่น้ำแขมหนู และปากน้ำระยอง มีปริมาณปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนอยู่ในช่วง 1.75-6.42 และ 5.24-46.49 ไมโครกรัมต่อลิตรตามลำดับ

จุมพล สงวนสิน และคณะ (2548) พบการปนเปื้อนปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอน บริเวณอ่าวเพ จังหวัดระยอง มีปริมาณปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนอยู่ในช่วง 0.60 ± 0.26 ไมโครกรัมต่อลิตร

Boonyatumanond และคณะ (2006) พบปนเปื้อนของ PAHs ในบริเวณลำคลอง และบริเวณแม่น้ำ ดินตะกอนปากแม่น้ำเจ้าพระยา และอ่าวไทยตอนบนใกล้เกาะสีชัง มีค่าอยู่ในช่วง 6-8,399 นาโนกรัมต่อกรัมดินแห้ง โดยพบปนเปื้อนฟีแนนทรีนและไพรีนเป็นหลัก อีกทั้งยังพบว่าระดับการปนเปื้อน PAHs ในบริเวณดังกล่าวก็เพิ่มสูงขึ้นอีกด้วย (Boonyatumanond และคณะ, 2007)

2.6 การบำบัดสารประกอบ PAHs ในสิ่งแวดล้อมด้วยวิธีทางชีวภาพ

เมื่อมีการปนเปื้อนของสารพิษในสิ่งแวดล้อม สารพิษบางส่วนจะถูกเปลี่ยนแปลงด้วยวิธีทางกายภาพ เช่น แสงแดด (photooxidation) และการกลายเป็นไอ (volatilization) แต่สารพิษส่วนใหญ่จะยึดเกาะติดกับอนุภาคของดินทราย ดินตะกอน น้ำทะเล (adsorption) จากนั้นจะถูกย่อยสลายและเปลี่ยนแปลงด้วยจุลินทรีย์ เรียกกระบวนการบำบัดสารพิษที่ปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อมโดยใช้จุลินทรีย์ แต่มนุษย์ทำให้เกิดว่า การบำบัดทางชีวภาพ (Bioremediation) การบำบัดวิธีนี้เป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพสูง ในการกำจัดหรือลดความเป็นพิษของสารประกอบ PAHs ให้น้อยลงหรือหมดไปโดยอาศัยกิจกรรมของจุลินทรีย์ เนื่องจากจุลินทรีย์สามารถใช้สารประกอบ PAHs เป็นแหล่งอาหารและพลังงานในการเจริญเติบโต โดยจะย่อยสารสารพิษดังกล่าวให้เป็นก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์และน้ำ ซึ่งไม่ส่งผลกระทบภายหลังการบำบัด (Haritash และ Kaushik, 2009; Lee และคณะ, 2011) แบ่งออกได้หลายวิธี ดังต่อไปนี้

Natural attenuation เป็นการบำบัดด้วยธรรมชาติ โดยใช้กิจกรรมของจุลินทรีย์ประจำถิ่นในการย่อยสลายสารพิษในพื้นที่ปนเปื้อน (Bento และคณะ, 2005)

Biostimulation เป็นการเติมสารอาหาร เช่น ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส การเติมอากาศลงไปในแหล่งปนเปื้อน เพื่อช่วยในเจริญเติบโตและกระตุ้นให้จุลินทรีย์ประจำถิ่นในธรรมชาติให้มีความสามารถในการย่อยสลายสารพิษ หรือการเติมสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ เพื่อช่วยเพิ่มค่าการละลายของสารพิษ ทำให้จุลินทรีย์ย่อยสลายสารพิษในแหล่งปนเปื้อนได้ง่ายขึ้น (Sarkar และคณะ, 2005)

Bioaugmentation เป็นการเติมจุลินทรีย์จากภายนอกแหล่งปนเปื้อนที่มีความสามารถในการย่อยสลายสารพิษลงสู่พื้นที่ปนเปื้อน มักใช้ในกรณีที่จุลินทรีย์ประจำถิ่นไม่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายสารพิษ จึงจำเป็นต้องอาศัยกิจกรรมของจุลินทรีย์ต่างถิ่นมาช่วยเพิ่มความสามารถในกำจัดสารพิษ (Mrozik และ Piotrowska-Seget, 2010)

2.7 การย่อยสลายสารประกอบ PAHs ด้วยวิธีทางชีวภาพโดยแบคทีเรีย

เมื่อมีการปนเปื้อนของสารพิษในพื้นที่แบคทีเรียท้องถิ่นจะมีการปรับตัว และมีเปลี่ยนแปลงความหลากหลายของโครงสร้างประชาคมแบคทีเรียที่แตกต่างไปจากเดิม กลายเป็นโครงสร้างประชาคมแบคทีเรียใหม่ (Roling และคณะ, 2002) จากรายงานของ Andreoni และ Gianfreda (2007) ที่ศึกษาโครงสร้างประชาคมแบคทีเรียหลังจากเกิดการปนเปื้อนด้วยอะโรมาติก

ไฮโดรคาร์บอน พบว่าแบคทีเรียมากกว่าครึ่งหนึ่งที่พบเป็นแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายสารพิษดังกล่าวได้ จากการศึกษาดังกล่าวนี้เองนำมาสู่การคัดแยกแบคทีเรียย่อยสลายสารพิษจากแหล่งปนเปื้อน โดยเฉพาะการคัดแยกแบคทีเรียย่อยสลายสารพิษจากแหล่งปนเปื้อนสารประกอบ PAHs โดยวิธีเพิ่มจำนวนแบคทีเรียย่อยสลายสารประกอบ PAHs ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อเฉพาะในห้องปฏิบัติการ (enrichment) ผลสรุปของการศึกษาทำให้เราทราบว่าแบคทีเรียส่วนใหญ่ที่ย่อยสลายสารพิษในดินปนเปื้อนสารประกอบ PAHs พบเป็นแบคทีเรียในสกุล *Pseudomonas* สกุล *Sphingomonas* สกุล *Mycobacterium* และสกุล *Rhodococcus* (Johnsen และคณะ, 2005) ดังแสดงในหัวข้อที่ 2.7.1 และ 2.7.2 อย่างไรก็ตามพบว่าการคัดแยกเชื้อจากแหล่งธรรมชาติใหม่ ๆ ที่มีความอุดมสมบูรณ์ทางชีวภาพ เช่น บริเวณดิน ดินตะกอน ตะกอนทะเล และน้ำทะเล ทำให้มีโอกาสพบกลุ่มแบคทีเรียใหม่ ที่น่าสนใจในย่อยสลายสารพิษชนิดฟีแนนทรีน และไพรีน ดังตารางที่ 2.4 และ 2.5

2.7.1 แบคทีเรียย่อยสลายสารประกอบ PAHs มวลโมเลกุลต่ำ

พบรายงานการคัดแยกแบคทีเรียแกรมลบที่สามารถย่อยสลายสารประกอบ PAHs มวลโมเลกุลต่ำได้ เช่น แบคทีเรียในสกุล *Pseudomonas* สกุล *Sphingomonas* สกุล *Alcaligenes* และสกุล *Acinetobacter* และแบคทีเรียแกรมบวกที่สามารถย่อยสลายสารประกอบ PAHs มวลโมเลกุลต่ำได้ เช่น แบคทีเรียในสกุล *Bacillus* สกุล *Corynebacterium* สกุล *Mycobacterium* สกุล *Nocardioides* และสกุล *Rhodococcus* (Kanaly และ Harayama, 2000; Sun และคณะ, 2010)

2.7.2 แบคทีเรียย่อยสลายสารประกอบ PAHs มวลโมเลกุลสูง

พบรายงานการคัดแยกแบคทีเรียลบที่สามารถสลายสารประกอบ PAHs มวลโมเลกุลสูงได้ เช่น แบคทีเรียในสกุล *Pseudomonas* สกุล *Sphingomonas* สกุล *Burholderia* สกุล *Cycloclasticus* และสกุล *Flavobacterium* (Robert และคณะ, 2000; Samanta และคณะ, 2002; Dasai และคณะ, 2008; Janbandhu และ Fulekar, 2011) และแบคทีเรียแกรมบวกสกุลที่สามารถย่อยสลายสารประกอบ PAHs มวลโมเลกุลสูงได้ เช่น แบคทีเรียในสกุล *Bacillus* สกุล *Mycobacterium* และสกุล *Rhodococcus* (Miller และคณะ, 2004; Hennessee และคณะ, 2009)

ตารางที่ 2.4 ชนิดแบคทีเรียย่อยสลายฟีแนนทรีนและแหล่งคัดแยก

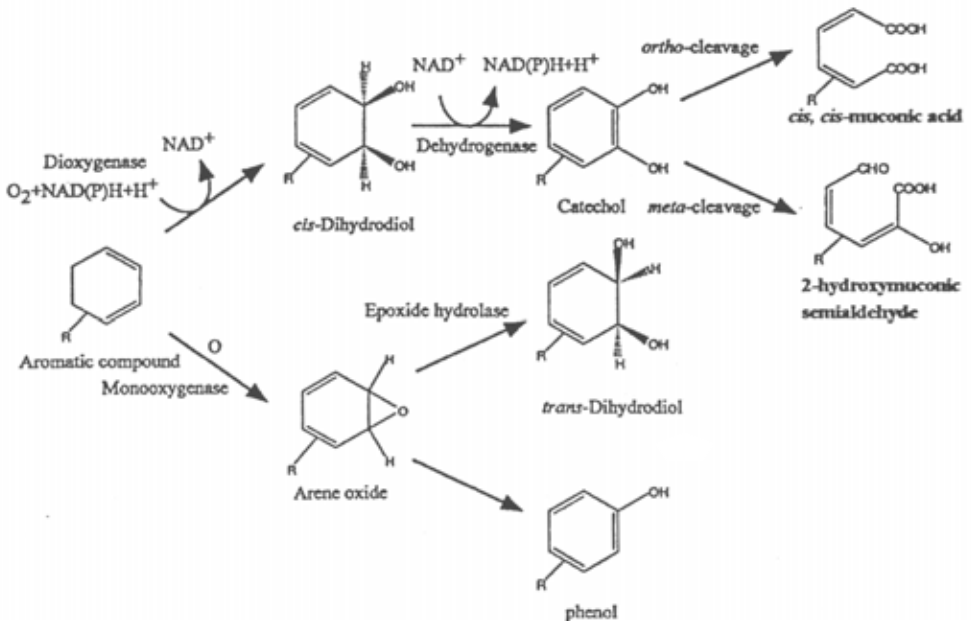
ชนิดแบคทีเรีย	แหล่งคัดแยก	เอกสารอ้างอิง
Bacillus sp.	ดินตะกอนทะเลลึก	Aono และ Inoue 1998
Exiguobacterium sp.	ดินตะกอนทะเล	Edlund และ Jansson 2008
Methylomonas sp.	ดินตะกอนทะเล	Edlund และ Jansson 2008
Schewanella sp.	ดินตะกอนทะเล	Edlund และ Jansson 2008
Vibrio cyclotrophicus	ตะกอนทะเล	Hedlund และ Staley 2001
Cycloclasticus sp. สายพันธุ์ A5	ตะกอนทะเล	Kasai และคณะ 2003
Pseudoalteromonas sp.	น้ำทะเล	Huang และคณะ 2008
Burkholderia xenovorans สายพันธุ์ LB400		
Sphingomonas sp.		
Marinobacter sp.		
Neptumonas sp.		
Halomonas sp.		

ตารางที่ 2.5 ชนิดแบคทีเรียย่อยสลายไพรีนและแหล่งคัดแยก

ชนิดแบคทีเรีย	แหล่งคัดแยก	เอกสารอ้างอิง
Ralstonia sp.	ดินตะกอนทะเล	Wang และคณะ 2008
Achromobacter spp.	ดินตะกอนทะเล	
Alcanivorax spp.	ดินตะกอนทะเล	
Flavobacterium spp	ดินตะกอนทะเลลึก	
Halomonas sp.	ดินตะกอนทะเลลึก	
Novosphingobium spp.	ดินตะกอนทะเลลึก	
Roseovarius spp.	ดินตะกอนทะเลลึก	
Novosphingomonas aromaticivorans สายพันธุ์ F199	ดินตะกอนทะเลลึก	
Cycloclasticus sp. สายพันธุ์ P1	ดินตะกอนทะเลลึก	
Cycloclasticus sp. A5	ตะกอนทะเล	Kasai และคณะ 2003
Janibacter anophelis สายพันธุ์ JY11	ดินตะกอน	Zhang และคณะ 2009
Bacillus vallismortis สายพันธุ์ JY3A	ดินตะกอน	Ling และคณะ 2011

2.8 กระบวนการย่อยสลายสารประกอบ PAHs โดยแบคทีเรีย

กระบวนการย่อยสลายสารประกอบ PAHs โดยแบคทีเรีย ดังแสดงในรูป 2.5 เกิดขึ้นในสภาวะที่มีอากาศ (Habe และ Omori, 2003) โดยการเติมออกซิเจน 2 อะตอมเข้าสู่วงอะโรมาติกที่ตำแหน่งพันธะคู่ด้วยการเร่งปฏิกิริยาของระบบเอนไซม์ไดออกซิจีเนส (multicomponent dioxygenase) กลายเป็น *ซิส*-ไดไฮโดรไดออล (*cis*-dihydrodiol) จากนั้นเร่งปฏิกิริยาต่อไปโดย *ซิส*-ไดไฮโดรไดออลดีไฮโดรจีเนส (*cis*-dihydrodiol dehydrogenase) ได้เป็นสารอนุพันธ์ประเภทไดไฮดรอกซิล และผ่านการเปลี่ยนรูปอีกหลายขั้นตอนจนได้สารตั้งต้นที่คล้ายแคทีคอล (catechol) เรียกวิถีการย่อยสลายในขั้นต้นนี้ว่า วิถีการย่อยสลายส่วนบน (upper pathway) ซึ่งสารตัวกลางที่คล้ายแคทีคอลจะถูกย่อยสลายต่อด้วยเอกซ์ตราไดออลไดออกซิจีเนส (extradiol dioxygenase) ในวิถีการย่อยสลายส่วนล่าง (lower pathway) ผ่านวิถีการแตกวงอะโรมาติกแบบ *เมตา* (Elsas และคณะ, 2007; Chikere และคณะ, 2011) ซึ่งจะพบแบคทีเรียส่วนใหญ่ หรืออาจถูกย่อยสลายต่อด้วยอินตราไดออลไดออกซิจีเนส (intradiol dioxygenase) ผ่านวิถีการแตกอะโรมาติกแบบ *ออโธ* และเข้าสู่วัฏจักรกรดไทรคาร์บอกซิลิกต่อไป ภายหลังสิ้นสุดกระบวนการย่อยสลายจะได้คาร์บอนไดออกไซด์, น้ำ และพลังงานที่ใช้ในการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย ทั้งนี้กระบวนการดังกล่าวจะเกิดขึ้นอย่างสมบูรณ์ จำเป็นต้องอาศัยกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์มากมายหลายชนิดร่วมกัน



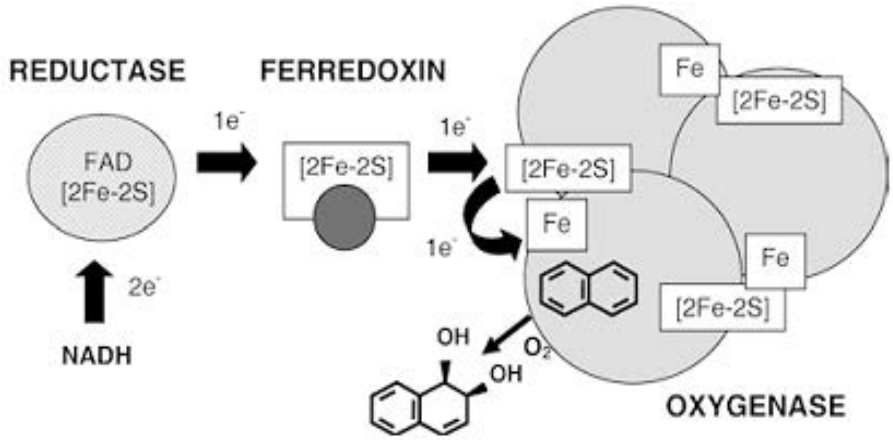
รูปที่ 2.5 วิถีการย่อยสลายสารประกอบ PAHs โดยทั่วไปของจุลินทรีย์

(Cernigia, 1992; Haritash และ Kaushik, 2009)

2.9 **ระบบเอนไซม์ไดออกซิจีเนส** (Multicomponent dioxygenase)

ระบบเอนไซม์ไดออกซิจีเนส หรือ อะโรมาติกริงไฮดรอกซิเลททิงไดออกซิจีเนส เป็นระบบเอนไซม์ที่มีความสำคัญในกระบวนการย่อยสลายสารประกอบ PAHs ประกอบด้วย 3 ส่วนประกอบที่สำคัญ คือ ได้แก่ เฟอร์รีดอกซินรีดักเทส (ferredoxin reductase) เฟอร์รีดอกซิน (ferredoxin) และออกซิจีเนส หรือเทอร์มินัลไดออกซิจีเนส (terminal dioxygenase) ที่เป็นไอออนซัลเฟอร์โปรตีน (iron-sulfur protein; ISP) (Harayama และคณะ, 1992) ซึ่งส่วนออกซิจีเนสมีความสำคัญ คือเป็นบริเวณอนุรักษ์ของเอนไซม์ และทำหน้าที่เป็นส่วนเร่งปฏิกิริยาอย่างจำเพาะเจาะจงต่อสารตั้งต้น ภายในส่วนนี้ประกอบด้วย 2 หน่วยย่อย คือ หน่วยย่อยเบตา และ หน่วยย่อยแอลฟา

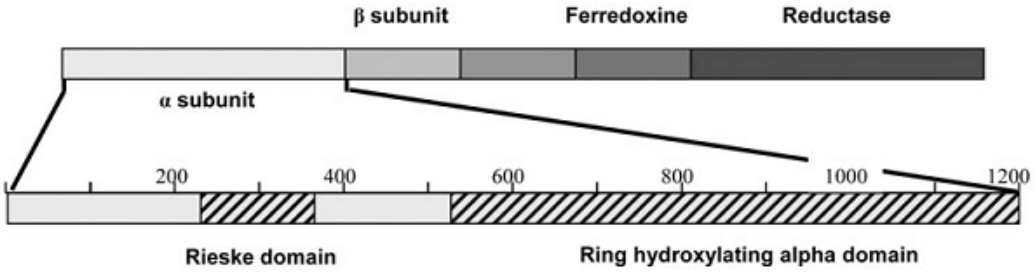
โดยปฏิกิริยาการย่อยสลายสารประกอบ PAHs ในขั้นแรกโดยระบบเอนไซม์ไดออกซิจีเนส (intitial dioxygenase) จะเริ่มจาก NAD(P)H ขนส่งอิเล็กตรอนให้เฟอร์รีดอกซินรีดักเทส แล้วส่งต่อให้เฟอร์รีดอกซิน และออกซิจีเนสตามลำดับ ดังแสดงในรูป 2.6 จากนั้นได้ผลิตภัณฑ์เป็น *ซีส*-ไดไฮโดรไดออล ซึ่งถูกเร่งปฏิกิริยาต่อไปโดย *ซีส*-ไดไฮโดรไดออล ดีไฮโดรจีเนส ผ่านการเปลี่ยนรูปแบบอีกหลายขั้นตอนจนได้สารตั้งต้นที่คล้ายแคทีคอล และถูกย่อยสลายผ่านทางวิถีการแตกวงแอโรมาติกแบบ *เมตา* หรือ *ออโธ* เพื่อเข้าสู่วัฏจักรกรดไทรคาร์บอกซิลิกต่อไป (Peng และคณะ, 2008)



รูปที่ 2.6 การจัดเรียงตัวและการทำงานร่วมกันของระบบเอนไซม์ไดออกซิจีเนส (Parales และคณะ, 1999; Parales และคณะ, 2000)

2.9.1 การจัดเรียงตัวระบบเอนไซม์ไดออกซิจีเนส

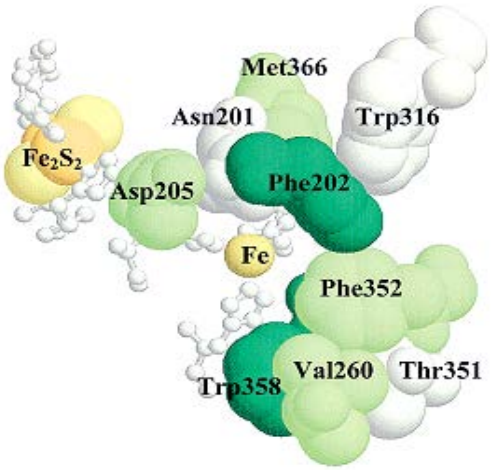
ต้นแบบของการศึกษาระบบเอนไซม์ไดออกซิจีเนสใช้แนพธาลีน 1, 2-ไดออกซิจีเนส ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายแนพธาลีนในแบคทีเรีย โดย Kauppi และคณะ, 1998 พบว่าไดออกซิจีเนสดังกล่าวมีส่วนประกอบ 2 ส่วน คือ ส่วน small subunit หรือส่วนย่อยเบตา และส่วน large subunit หรือส่วนย่อยแอลฟา และมีโครงสร้างแบบ $\alpha_3\beta_3$hexamer (Parales และคณะ, 1999) ภายในแต่ละหน่วยย่อยแอลฟามีโดเมนย่อย 2 โดเมน คือ Rieske โดเมน และ ริงไฮดรอกซิเลททิงโดเมน ภายหลังเรียกว่า catalytic โดเมน (Parales และคณะ, 2000) ดังแสดงในรูปที่ 2.7



รูปที่ 2.7 การจัดเรียงตัวของอะโรมาติกริงไฮดรอกซิเลททิงไดออกซิจีเนสบริเวณหน่วยย่อยแอลฟาประกอบไปด้วย 2 โดเมน คือ Rieske โดเมน และ ริงไฮดรอกซิเลททิงโดเมน (Bordenave และคณะ, 2008)

Rieske โดเมน มีหมู่พรอสทีติก (Prosthetic group) แบบ [2Fe-2S] โดย Fe^{3+} อะตอมแรกเกิดพันธะซัลไฟต์กับกรดอะมิโน Cys-81, Cys-101 และ Fe^{3+} อีกอะตอมเกิดพันธะซัลไฟต์กับกรดอะมิโน His-83 and His-104 ส่วน Fe^{3+} ใน catalytic โดเมนจะเกิดพันธะไฮโดรเจนกับกรดอะมิโน His-208, His-213 และ Asp-362 ภายหลังพบว่า Asp-205 มีบทบาทสำคัญในการขนส่งอิเล็กตรอนระหว่างโดเมน Rieske และ catalytic โดเมน โดยเกิดพันธะไฮโดรเจนกับ His-208 และ His-104 และพบว่ากรดอะมิโนใกล้บริเวณเร่งของ catalytic โดเมนคือ Asn-201, Phe-202, Val-260, Trp-316, Phe-352, Trp-358 และ Met-366, ตามลำดับ (Parales และคณะ, 2000) ดังแสดงในรูปที่ 2.8

จะเห็นได้ว่าหน่วยย่อยแอลฟาทำหน้าที่สำคัญในการเร่งปฏิกิริยา และจำเพาะเจาะจงต่อสารตั้งต้น ตรงข้ามกับหน่วยย่อยเบตาที่มีหน้าที่สำคัญในการเกิดเป็นโครงสร้างโปรตีน ซึ่งมีผลต่อแอคทีวิตี้ของเอนไซม์ โดยจากรายงานของ Jiang และคณะ (1999) พบว่าแอคทีวิตี้ของเอนไซม์ไดออกซิจีเนสจะเกิดขึ้นได้ก็ต่อเมื่อมีการรวมกันของหน่วยย่อยแอลฟาและหน่วยย่อยเบตา



รูปที่ 2.8 โครงสร้าง 3 มิติของแนพธาลีน 1, 2-ไดออกซิจีเนส คือ Rieske โดเมน ที่มีหมู่พรอสทีติกแบบ [2Fe-2S] และ catatyic โดเมน ในหน่วยย่อยแอลฟา และอะมิโนที่สำคัญ คือ Aspartate-205 (Asp-205) ซึ่งเกี่ยวข้องกับการขนส่งอิเล็กตรอนระหว่าง Rieske โดเมนและ catalytic โดเมน (Parales และคณะ, 2000)

2.9.2 การจัดจำแนกกลุ่มไดออกซิจีเนส

ไดออกซิจีเนสถูกจัดจำแนกกลุ่มตามข้อมูลของหมู่พรอสทีติก (Prosthetic group) และลำดับอะมิโนบริเวณเร่งปฏิกิริยาของหน่วยย่อยแอลฟา รวมถึงชนิดของสารตั้งต้นที่ย่อยสลาย โดยสามารถจัดจำแนกได้ 5 กลุ่ม (Kweon, 2008) ดังแสดงในตารางที่ 2.6

<u>กลุ่ม 1</u> (Type I) ประกอบด้วยอะโรมาติกริงไฮดรอกซิเลททิงไดออกซิจีเนส 2 ส่วน คือ FNR_C-type รีดักเทส และออกซิจีเนส ซึ่งเป็นได้ทั้งเฮเทอโรโอลิโกเมอร์ (type I$\alpha\beta$) หรือโฮโมโอลิกโกเมอร์ (type I$\alpha\beta$) เอนไซม์ในกลุ่มนี้ ได้แก่ โมโนออกซีจีเนสและไดออกซิจีเนสที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลาย อนิลีน โทลูอีน ฟีนอกซีเบนโซเอต และพธาเลท

<u>กลุ่ม 2</u> (Type II) ประกอบด้วยอะโรมาติกริงไฮดรอกซิเลททิงไดออกซิจีเนส 2 ส่วน คือ FNR_C-type รีดักเทส และออกซิจีเนส เอนไซม์ในกลุ่มนี้ ได้แก่ ไดออกซิจีเนสที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลาย ย่อยสลายเบนโซเอต และแอนทรานิเลต เป็นต้น

<u>กลุ่ม 3</u> (Type III) ประกอบด้วยอะโรมาติกริงไฮดรอกซิเลททิงไดออกซิจีเนส 2 ส่วน คือ FNR_C-type รีดักเทส มีหมู่พรอสทีติกแบบ [2Fe-2S]-type เฟอร์รีดอกซินและออกซิจีเนส เอนไซม์ในกลุ่มนี้ ได้แก่ ไดออกซิจีเนสที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายแนพธาลีน ฟีแนนทรีน หรือสารประกอบ PAHs ในแบคทีเรียแกรมลบ

กลุ่ม 4 (Type IV) ประกอบด้วยส่วนอะโรมาติกริงไฮดรอกซิเลททิงไดออกซิจีเนส 2 ส่วนคือ GR-type รีดักเทส มีหมู่พรอสทีติกแบบ [2Fe-2S]-type เฟอร์รีดอกซิน และ ออกซิจีเนสเอนไซม์ในกลุ่มนี้ ได้แก่ ไดออกซิจีเนสที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายไบฟีนิลและโทลูอีนในแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ

กลุ่ม 5 (Type V) ประกอบด้วยอะโรมาติกริงไฮดรอกซิเลททิงไดออกซิจีเนสส่วนคือ GR-type รีดักเทส หมู่พรอสทีติกแบบ [3Fe-4S]-type เฟอร์รีดอกซิน และออกซิจีเนส เอนไซม์ในกลุ่มนี้ ได้แก่ ไดออกซิจีเนสที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายฟีแนนทรีน แนพธาลีน แอนทราซีน และพธาเลทในแบคทีเรียแกรมบวก

ตารางที่ 2.6 การจัดระบบกลุ่มเอนไซม์ไดออกซิจีเนส (Kweon, 2008)

Classification	Structure	Enzyme system
Type Iαβ	α β R	Aniline dioxygenase (*Acinetobacter* sp. YAA) Aniline oxygenase (*P. putida* UCC22)
Type I		
Type Iα	α R	Phenoxybenzoate dioxygenase (*Alcaligenes* sp. BR60) Phenoxybenzoate dioxygenase (*P. pseudoalcaligenes* POB310) Phthalate dioxygenase (*P. cepacoa* DB01) Toluenenesulfonate monooxygenase (*C. testosterone* T-2)
Type II	α β R	2-Halobenzoate 1,2-dioxygenase (*P. cepacia* 2CBS) Anthranilate dioxygenase (*Acinetobacter* sp. ADP1) Benzoate 1,2-dioxygenase (*Acinetobacter* sp. ADP1)
Type IIIαβ	α β Ⓕ R	3,4-Dihydroxyphenanthrene dioxygenase (*A. faecalis* AFK2) Naphthalene dioxygenase (*Pseudomonas* sp. 9816-4)
Type III		PAH dioxygenase (*P. putida* OUS82)
Type IIIα	α Ⓕ R	Carbazole 1,9a-dioxygenase (*P. resinovorans* CA10)
Type IV	α β Ⓕ R	Carbazole dioxygenase (*Sphingomonas* sp. CB3) Dioxin dioxygenase (*Sphingomonas* sp. RW1) Biphenyl dioxygenase (*Rhodococcus* sp. RHA1) Toluene dioxygenase (*P. putida* F1) Biphenyl dioxygenase (*Pseudomonas* sp. KKS102) Biphenyl 2,3-dioxygenase (*B. xenovorans* LB400) Biphenyl dioxygenase (*P. pseudoalcaligenes* KF707)
Type V	α β Ⓕ R	Phenanthrene dioxygenase (*Nocardioides* sp. KP7) Phthalate dioxygenase (*Terrabacter* sp. DBF63) Phthalate dioxygenase (*A. Keyseri* 12B) Phthalate dioxygenase (*M. vanbaaleni* PYR-1) Phthalate dioxygenase (*Rhodococcus* sp. RHA1)

2.10 วิถีการย่อยสลายสารประกอบ PAHs

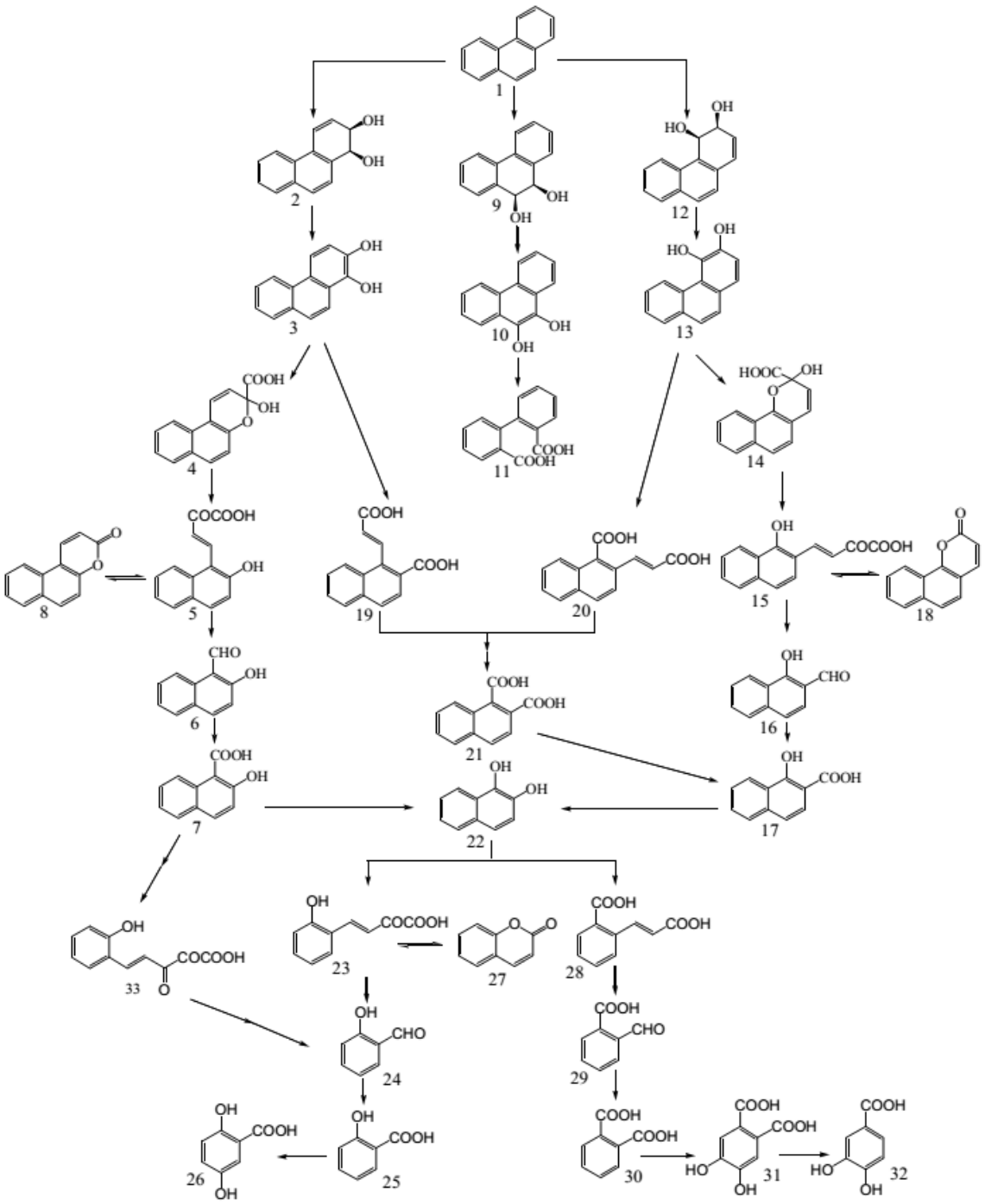
2.10.1 วิถีการย่อยสลายฟีแนนทรีน

ฟีแนนทรีนเป็นต้นแบบในศึกษาวิถีการย่อยสลายสารประกอบ PAHs มวลโมเลกุลต่ำ เนื่องจากโครงสร้างที่ไม่ซับซ้อนเพราะประกอบด้วยวงอะโรมาติก 3 วง และพบปนเปื้อนอย่างแพร่หลายในสิ่งแวดล้อม ตัวอย่างแบคทีเรียย่อยสลายฟีแนนทรีนที่ถูกคัดแยกได้ดังแสดงในตารางที่ 2.7

วิถีการย่อยสลายฟีแนนทรีนมี 3 วิถี วิถีแรกพบในแบคทีเรีย *Sphingobium yanoikuyae* (Takeuchi และคณะ, 2001) เริ่มต้นจากการแตกวงอะโรมาติกของฟีแนนทรีนระหว่างคาร์บอนตำแหน่งที่ 1 และ 2 เกิดเป็น ซิส-1, 2-ไดไฮดรอกซี-1, 2-ไดไฮโดรฟีแนนทรีน (*cis*-1, 2-dihydroxy-1, 2-dihydrophenanthrene) ต่อมาจะถูกย่อยสลายต่อไปตามวิถีจนได้กรดซาลิไซลิก (salicylatic acid) และกรดเจนทิสิก (gentisic acid) จากนั้นจะเข้าสู่การย่อยสลายเช่นเดียวกับแนพธาลีนต่อไป

วิถีที่สองพบในแบคทีเรียในสกุล *Pseudomonas* เริ่มต้นจากการแตกวงอะโรมาติกของฟีแนนทรีนระหว่างคาร์บอนตำแหน่งที่ 3 และ 4 เกิดเป็น ซิส-3, 4-ฟีแนนทรีนไดไฮโดรไดออล (*cis*-3, 4-phenanthrene dihydrodiol) และถูกย่อยสลายต่อไปเป็นกรด 1-ไฮดรอกซี-2-แนพโธอิก (1-hydroxy-2-naphthoic acid) จากนั้นจะถูกย่อยสลายต่อเป็นแคทีคอล (Evan และคณะ, 1965) ซึ่งคล้ายกับวิถีการย่อยสลายแนพธาลีน หรือถูกย่อยสลายไปเป็นกรดออโธพธาลิก (*o*-phthalic acid) และเปลี่ยนต่อไปเป็นกรดโปรโตคาชูอิก (protocatechuate) เพื่อเข้าสู่วัฏจักรกรดไทรคาร์บอกซิลิกต่อไป (Habe และ Omori, 2003)

วิถีแรกที่สามพบในแบคทีเรีย *Staphylococcus* sp. สายพันธุ์ PN/Y เริ่มต้นจากการแตกวงอะโรมาติกของฟีแนนทรีนระหว่างคาร์บอนตำแหน่งที่ 9 และ 10 เกิดเป็น ซิส-9, 10-ฟีแนนทรีนไดไฮโดรไดออล (*cis*-9, 10-phenanthrene dihydrodiol) และถูกย่อยสลายต่อไปเป็น 9, 10-ไดไฮดรอกซีฟีแนนทรีน (9, 10-dihydroxyphenanthrene) และ 2, 2'-ไดเฟนิกแอซิด (Mallick และคณะ, 2007) (2, 2'-diphenic acid) สรุปวิถีการย่อยสลายฟีแนนทรีนทั้งสามวิถีในดังแสดงในรูปที่ 2.9



รูปที่ 2.9 วิถีการย่อยฟีแนนทรีนโดยทั่วไปแบคทีเรีย (Seo และคณะ, 2009)

โดยหมายเลข 1 คือ ฟีแนนทรีน; 2 คือ ซิส-1, 2-ไดไฮดรอกซี-1, 2-ไดไฮโดรฟีแนนทรีน; 9 คือ ซิส-9, 10-ฟีแนนทรีนไดไฮโดรไดออล; 10 คือ 9, 10-ไดไฮดรอกซีฟีแนนทรีน; 11 คือ 2, 2'-ไดเฟนิกแอซิด 12; คือ ซิส-3, 4-ฟีแนนทรีนไดไฮโดรไดออล; 17 คือ กรด 1-ไฮดรอกซี-2-แนพโธอิก; 25 คือ กรดซาลิไซลิก; 26 คือ กรดเจนทิสิก; 30 คือ กรดออโธพธาลิก; 32 คือ กรดโปรโตคาชูอิก

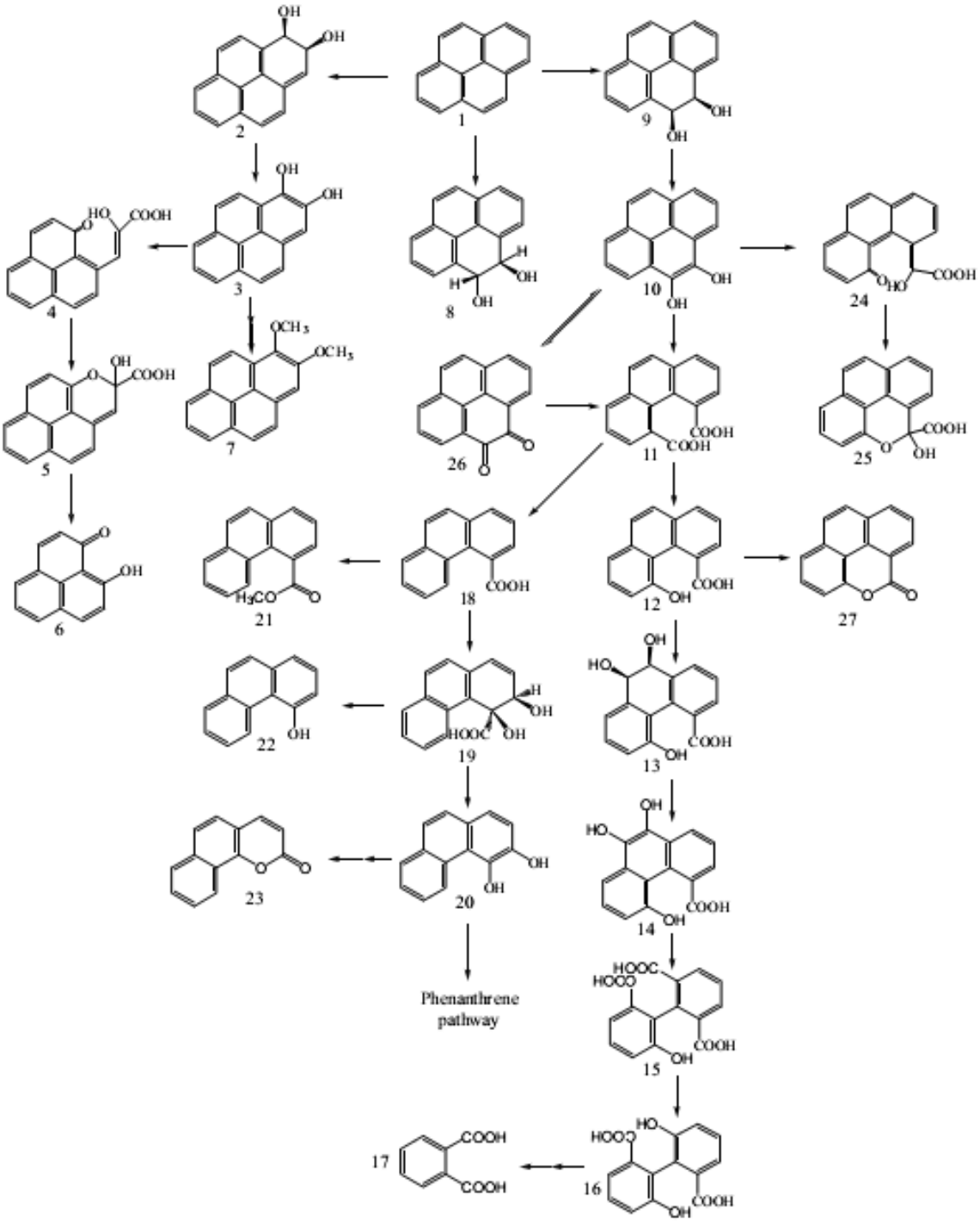
ตารางที่ 2.7 ตัวอย่างแบคทีเรียย่อยสลายฟีแนนทรีนที่ถูกคัดแยกได้

สายพันธุ์แบคทีเรีย	เอกสารอ้างอิง
Aeromonas sp.	Kiyohara และคณะ 1976
Streptomyces griseus	Trower และคณะ 1988
Alcaligenes denitrificans	Waissenfels และคณะ 1992
Acidiphilium sp.	Stapleton และคณะ 1998
Cycloclasticus sp.	Geiselbrecht และคณะ 1998
Burkholderia sp.	Kang และคณะ 2003
Sphingomonas sp. สายพันธุ์ P2	Pinyakong และคณะ 2003
Rhodococcus opacus	Guo และคณะ 2005
Rhodococcus ruber	Guo และคณะ 2005
Arthrobacter sp. สายพันธุ์ P1-1	Seo และคณะ 2006
Mycobacterium gilvum	Zhou และคณะ 2006
Mycobacterium fortutum	Zhou และคณะ 2006
Mycobacterium farcinogenes	Zhou และคณะ 2006
Rhodococcus ruber สายพันธุ์ OUCZ91B	Zhou และคณะ 2006
Mycobacterium vanbaalenii สายพันธุ์ PYR-1	Zhou และคณะ 2006
Terrabacter sp. สายพันธุ์ YK10	Zhou และคณะ 2006
Burkholderia sp. สายพันธุ์ C3	Seo และคณะ 2007
Sphingomonas sp. สายพันธุ์ VKM B-2434	Baboshin และคณะ 2008
Sphingomonas sp. สายพันธุ์ LH128	Schuler และคณะ 2008
Pseudomonas sp. สายพันธุ์ ZP2	Zhao และคณะ 2009
Acidovorax sp. สายพันธุ์ NA3	Singleton และคณะ 2009
Brevibacillus sp. สายพันธุ์ PDM-3	Reddy และคณะ 2010
Mycobacterium spp.	Zeng และคณะ 2010
Ochrobactrum sp.	Arulazhagan และคณะ 2011
Enterobacter cloacae	Arulazhagan และคณะ 2011
Stenotrophomonas maltophilia	Arulazhagan และคณะ 2011
Bacillus vallismortis	Ling และคณะ 2011

2.10.2 วิถีการย่อยสลายไพรีน

ไพรีนเป็นต้นแบบในศึกษาวิถีการย่อยสลายสารประกอบ PAHs มวลโมเลกุลสูง เนื่องจากมีโครงสร้างที่ซับซ้อน เพราะประกอบด้วยวงอะโรมาติก 4 วง และพบปนเปื้อนอย่างแพร่หลายจากกระบวนการผลิตแก๊สและกระบวนการเผาไหม้แบบไม่สมบูรณ์ ตัวอย่างแบคทีเรียย่อยสลายไพรีนที่ถูกคัดแยกได้ดังแสดงในตารางที่ 2.8 พบส่วนใหญ่เป็นแบคทีเรียในสกุล *Mycobacterium* ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมบวก เนื่องจากส่วนผิวเซลล์ของแบคทีเรียสกุลนี้มีส่วนไม่ชอบน้ำสูงโดยจะยึดติดกับหยดของตัวทำละลายที่อิมัลซิไฟด์แล้ว เช่น สารลดแรงตึงผิวชีวภาพ (biosurfactant) (Jimenez และคณะ, 1996)

วิถีการย่อยสลายไพรีนในแบคทีเรีย *Mycobacterium vanbaalenii* สายพันธุ์ PYR-1 (Kim และคณะ, 2007) โดยอาศัยการทำงานของไดออกซิจีเนส และ/หรือ โมโนออกซิจีเนส (Heitkamp และคณะ, 1998) เริ่มต้นโดยการแตกวงอะโรมาติกของไพรีนระหว่างคาร์บอนตำแหน่งที่ 1 และ 2 เกิดเป็น *ซิส*-1, 2-ไพรีนไดไฮโดรไดออล (*cis*-1, 2-pyrene dihydrodiol) หรือแตกวงอะโรมาติกของไพรีนระหว่างคาร์บอนตำแหน่งที่ 4 และ 5 เกิดเป็น *ซิส*-4, 5-ไพรีนไดไฮโดรไดออล (*cis*-3, 4-pyrene dihydrodiol) จากนั้นเข้าสู่วิถีการย่อยสลายเดียวกับฟีแนนทรีน และเข้าสู่วัฏจักรกรดไทรคาร์บอกซิลิกต่อไป พบรายงานการย่อยสลายไพรีนจากแบคทีเรียอื่น ๆ ในสกุล *Mycobacterium* ซึ่งได้สารตัวกลางที่แตกต่างกันออกไปในแต่ละสายพันธุ์ เช่น *Mycobacterium* sp. สายพันธุ์ AP1 สามารถย่อยสลายไพรีนให้เป็น กรด 6, 6'-ไดไฮดรอกซี-2'2-ไบฟีนิล ไดคาร์บอกซิลิก (6, 6'-dihydroxy-2'2-biphenyl dicarboxylic acid) (Vila และคณะ, 2001) หรือ *Mycobacterium* sp. สายพันธุ์ KMS สามารถย่อยสลายไพรีนให้เป็น ไพรีน-4,5-dione (pyrene-4, 5-dione) (Liang และคณะ, 2006) นอกจากแบคทีเรียในสกุล *Mycobacterium* แล้วยังพบว่าแบคทีเรียในสกุล *Pseudomonas saccharophila* สายพันธุ์ P15 และ *Sphingomonas yanoikuyae* สายพันธุ์ R1 สามารถย่อยสลายไพรีนให้เป็น ไพรีน-4, 5-ไดโอน (pyrene-4, 5-dione) และ*ซีส*-4, 5-ไพรีนไดไฮโดรไดออลได้ (*cis*-4, 5-pyrene dihydrodiol) ตามลำดับ ส่วน *Pseudomonas stutzeri* สายพันธุ์ P16 และ *Bacillus cereus* สายพันธุ์ P21 สามารถย่อยสลายไพรีนให้เป็นสารที่ไม่สามารถใช้ในกระบวนการเมตาบอลิซึมต่อไปได้ คือ 4, 5-ไพรีนไดไฮโดรไดออล (4, 5-pyrene dihydrodiol) และ *Rhodococcus* sp. สายพันธุ์ UW1 สามารถย่อยสลายไพรีนให้เป็นสารตัวกลางที่ละลายน้ำได้ 2 ชนิด ซึ่งมีสูตรโมเลกุลคือ $C_{16}H_{10}O_4$ (Walter และคณะ, 1991) สรุปวิถีการย่อยสลายไพรีนโดยทั่วไปในแบคทีเรียดังแสดงในรูปที่ 2.10



รูปที่ 2.10 วิถีการย่อยไพรีนโดยทั่วไปแบคทีเรีย (Seo และคณะ, 2009)

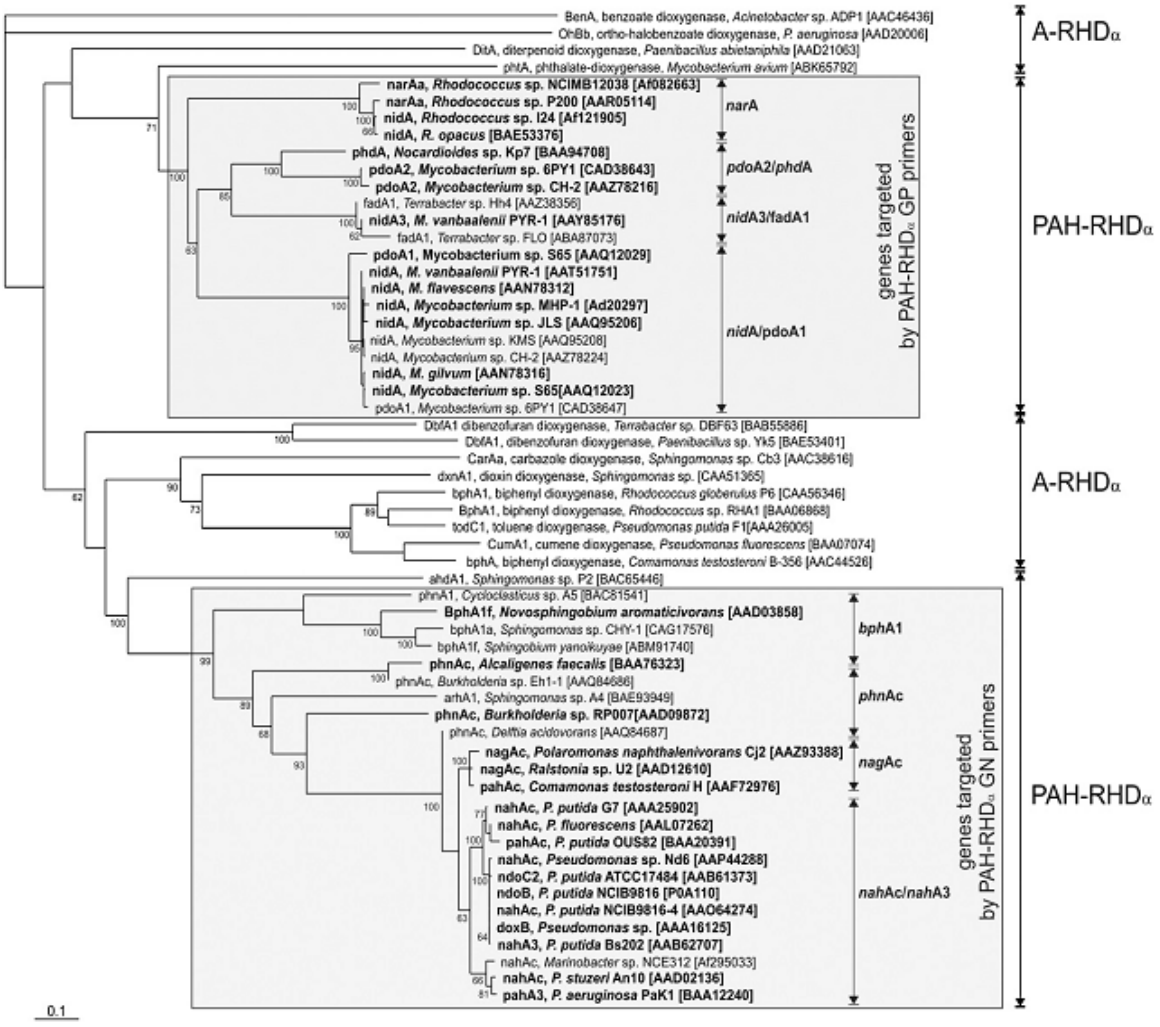
โดยหมายเลข 1 คือ ไพรีน; 2 คือ ซิส-1, 2-ไพรีนไดไฮโดรไดออล; 9 คือ ซิส-4, 5-ไพรีนไดไฮโดรไดออล; 15 คือ กรด 6, 6'-ไดไฮดรอกซี-2'2-ไบฟีนิล ไดคาร์บอกซิลิก; 26 คือ ไพรีน-4, 5-ไดโอน

ตารางที่ 2.8 ตัวอย่างแบคทีเรียย่อยสลายไพรีนที่ถูกคัดแยกได้

สายพันธุ์แบคทีเรีย	เอกสารอ้างอิง
Rhodococcus sp. สายพันธุ์ UW1	Walter และคณะ 1991
Burkholderia cepacia	Juhasz และคณะ 1997
Stenotrophomonas maltophilia	Boonchan และคณะ 1998
Stenotrophomonas maltophilia สายพันธุ์ VUN 10,003	Juhasz และคณะ 2000
Pseudomonas stutzeri	Kazunga และ Aitken 2000
Bacullus sp.	Kazunga และคณะ 2000
Mycobacterium sp.	Cheung และคณะ 2001
Mycobacterium sp. สายพันธุ์ Ap1	Vila และคณะ 2001
Mycobacterium sp. สายพันธุ์ JS14	Rehmann และคณะ 2001
Mycobacterium sp.	Miller และคณะ 2004
Mycobacterium vanbaalenii สายพันธุ์ PYR-1	Kim และคณะ 2005
Mycobacterium sp.	Seo และคณะ 2006
Mycobacterium sp.	Seo และคณะ 2007
Cycloclasticus sp. สายพันธุ์ P1	Wang และคณะ 2008
Sphingomonas sp. สายพันธุ์ VKM B-2434	Baboshin และคณะ 2008
Schewanella sp.	Edlund และ Jansson 2008
Achromobacter spp.	Wang และคณะ 2008
Flavobacterium spp.	Wang และคณะ 2008
Alcanivorax spp.	Wang และคณะ 2008
Achromobacter xylooxidans	Tiwari และคณะ 2010
Mycobacterium spp.	Zeng และคณะ 2010
Pseudomonas putida สายพันธุ์ PL2	Ping และคณะ 2011
Bacillus vallismortis	Ling และคณะ 2011

2.11 **ยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายสารประกอบ** PAHs

ในอดีตการศึกษาพันธุศาสตร์ของยีนประมวลรหัสเอนไซม์ไดออกซิจีเนสศึกษาแค่ในแบคทีเรียที่คัดแยกได้เท่านั้น พบมีจัดเรียงตัวของยีนที่แตกต่างในบริเวณหน่วยย่อยแอลฟาของเทอร์มินัลไดออกซิจิเนส ทำให้สามารถแบ่งกลุ่มของยีนออกเป็น 2 กลุ่ม ดังแสดงในรูปที่ 2.11 คือ ยีนประมวลรหัสเอนไซม์ไดออกซิจีเนสในแบคทีเรียแกรมลบ (dox_{GN}) และ ยีนประมวลรหัสเอนไซม์ไดออกซิจีเนสในแบคทีเรียแกรมบวก (dox_{GP}) (Cebron และคณะ, 2008)

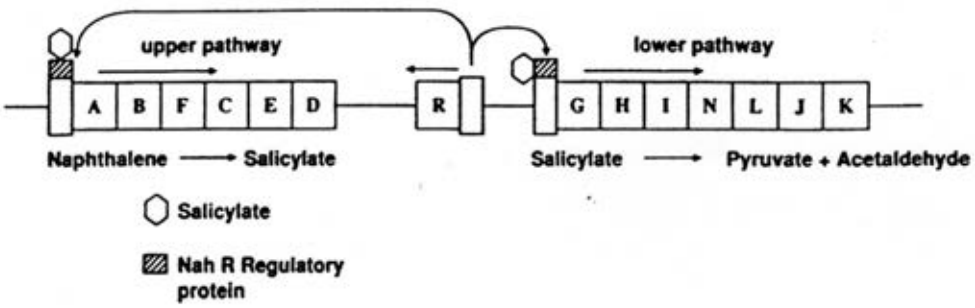


รูปที่ 2.11 แผนภูมิแสดงความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการบริเวณหน่วยแอลฟาของเอนไซม์ไดออกซิจีเนสในกลุ่ม dox_{GN} และ dox_{GP} (Cebron และคณะ, 2008)

2.11.1 **ยีนไดออกซิจีเนสในกลุ่ม** dox_{GN}

ยีนไดออกซิจีเนสในกลุ่ม dox_{GN} แบ่งออกได้ 2 กลุ่มย่อย ตามการเรียงตัวของยีน กลุ่มแรก คือ กลุ่มยีน *nah* และกลุ่มยีนคล้ายยีน *nah* (*nah-like*) กลุ่มที่สอง คือ กลุ่มยีนที่มีการเรียงตัวแตกต่างจากกลุ่มยีน *nah* และกลุ่มยีนคล้ายยีน *nah* (*nah-like*)

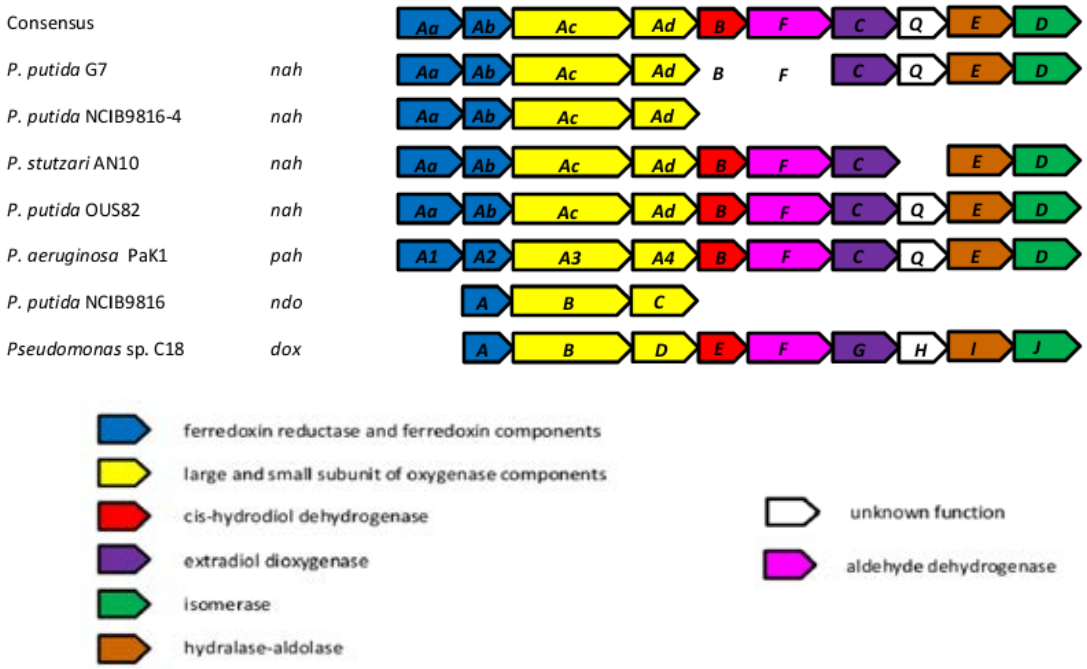
กลุ่มยีน *nah* ใน *Pseudomonas putida* สายพันธุ์ G7 (Simon และคณะ, 1993) เป็นกลุ่มยีนแรก ๆ ที่ศึกษาการย่อยสลายสารประกอบ PAHs มวลโมเลกุลต่ำ คือ แนพธาลีนโดยระบบเอนไซม์ที่อยู่บนพลาสมิด NAH7 (Parales และคณะ, 1999) ที่มีการเรียงตัวของยีนเป็นโอเปอรอน 2 ชุด โอเปอรอนชุดแรก คือ โอเปอรอน *nah* ประกอบด้วย *nahABFCED* ประมวลรหัสเอนไซม์ในวิถีการย่อยสลายส่วนบน โดยจะเปลี่ยนแนพธาลีนไปเป็นกรดซาลิไซลิก ส่วน โอเปอรอนชุดที่สอง คือ โอเปอรอน *sal* ประกอบด้วย *nahGHINLJK* ประมวลรหัสเอนไซม์ในวิถีการย่อยส่วนล่าง โดยจะย่อยสลายกรดซาลิไซลิกผ่านทางแคทีคอลจนได้ไพรูเวต และอะซีทัลดีไฮด์ โดยมีระบบยีน *nahR* ทำหน้าที่ควบคุมโอเปอรอนทั้ง 2 ชุด ซึ่งมีตำแหน่งอยู่ระหว่างโอเปอรอน *nah* และ *sal* แต่เรียงตัวในทิศตรงข้าม โดยควบคุมจากการเหนี่ยวนำของกรดซาลิไซลิก หรือโปรตีนที่ผลิตจากยีน *nahR* ดังแสดงในรูปที่ 2.12



รูปที่ 2.12 การจัดเรียงตัวของกลุ่มยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายแนพธาลีน และระบบควบคุมการทำงานของยีน (Yen และ Gunsalus, 1982)

ส่วนกลุ่มยีนคล้ายยีน *nah* พบเป็นกลุ่มยีนที่มีการเรียงตัวคล้ายยีน *nah* (*nah-like*) จาก *Pseudomonas* สายพันธุ์ต่างๆ ที่มีการเรียงตัวคล้ายกับยีน *nah* ของ *P. putida* สายพันธุ์ G7 มากกว่า 90% (Simon และคณะ, 1993) พบรายงานในแบคทีเรียสกุล *Pseudomonas* สายพันธุ์ต่าง ๆ ซึ่งเกี่ยวข้องกับการย่อยสลายสารประกอบ PAHs มวลโมเลกุลต่ำ เช่น แนพธาลีนและฟีแนนทรีน ดังรายงานต่อไปนี้ คือ เช่น ยีน *ndo* จาก *Pseudomonas putida* สายพันธุ์ NCIB 9816 (Yang และคณะ, 1994) ยีน *nah* จาก *Pseudomonas putida* สายพันธุ์ NCIB9816-4 (Simon และคณะ,1993) สายพันธุ์ ND6 (Li และคณะ, 2004) และสายพันธุ์ BS202 (Kosheleva

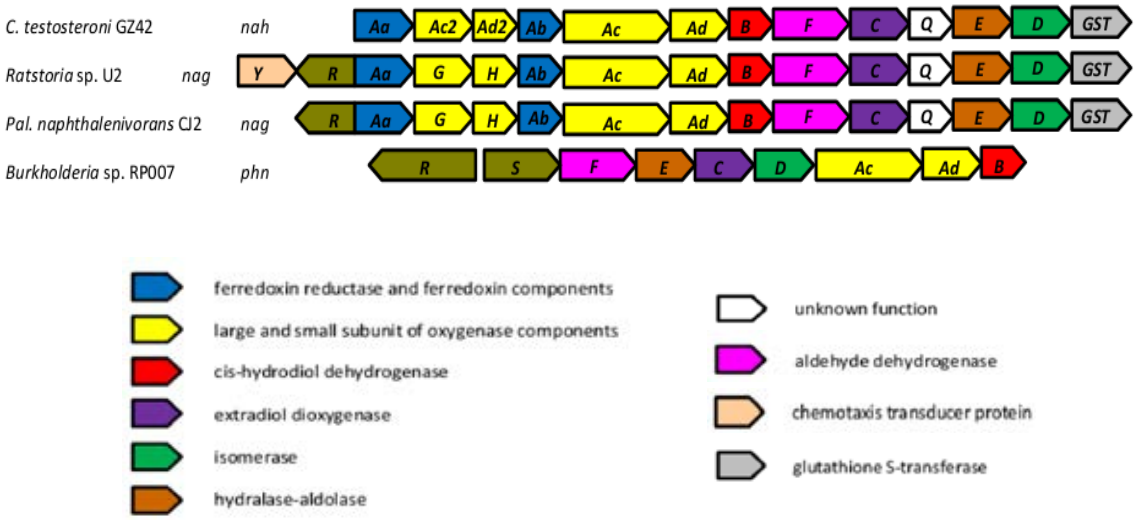
และคณะ,1986 และ Balashova และคณะ, 2001) และสายพันธุ์ putidasp (Ono และคณะ, 2007) ยีน *dox* จาก *Pseudomonas* sp. สายพันธุ์ C18 (Denome และคณะ, 1993) ยีน *pah* จาก *Pseudomonas putida* สายพันธุ์ OUS82 (Kiyohara และคณะ, 1994; Takizawa และคณะ , 1994) สายพันธุ์ *aeruginosa* และ สายพันธุ์ Pak1 (Takizawa และคณะ, 1999) และยีน *nah* จาก *Pseudomonas stutzeri* สายพันธุ์ AN10 (Bosch และคณะ, 1999; Bosch และคณะ, 2000) รูปแสดงการเรียงตัวของกลุ่มยีน *nah* และกลุ่มยีนคล้ายยีน *nah* (*nah-like*) ในแบคทีเรียแกรมลบดังแสดงในรูปที่ 2.13



รูปที่ 2.13 การเรียงตัวของกลุ่มยีน *nah* ใน *Pseudomonas putida* สายพันธุ์ G7 และกลุ่มยีนคล้ายยีน *nah* (*nah-like*) เช่น *P. putida* สายพันธุ์ NCIB9816-4, *P. stutzeri* สายพันธุ์ AN10, *P. putida* สายพันธุ์ OUS82, *P. aeruginosa* สายพันธุ์ Pak1, *P. putida* สายพันธุ์ NCIB 9816 และ *P.* sp. สายพันธุ์ C18 (Peng และคณะ, 2008)

ส่วนรายงานของยีนที่มีการเรียงตัวแตกต่างไปจากกลุ่มยีน *nah* และกลุ่มยีนคล้ายยีน *nah* (*nah-like*) เช่น ยีน *nag* จาก *Ralstonia* sp. สายพันธุ์ U2 (Zhou และคณะ, 2001) ยีน *nag* จาก *Comamonas testeronistrain* สายพันธุ์ GZ42 (Singleton และคณะ, 2009) ยีน *nag* จาก *Polaromonas naphthalenivorans* สายพันธุ์ CJ2 (Pumphrey และ Madsen, 2007) ยีน *phn* จาก *Burkholderia* sp. สายพันธุ์ RP007 (Laurie และคณะ, 1999) และ สายพันธุ์ C3

(Tittabutr และคณะ, 2011) รูปแสดงการเรียงตัวของกลุ่มยีนที่แตกต่างจากกลุ่มยีน *nah* และกลุ่มยีนคล้ายยีน *nah* (*nah-like*) ในแบคทีเรียแกรมลบดังแสดงในรูปที่ 2.14



รูปที่ 2.14 การเรียงตัวของกลุ่มยีนที่แตกต่างจากกลุ่มยีน *nah* และกลุ่มยีนคล้ายยีน *nah* (*nah-like*) ได้แก่ ยีน *nag* จาก *Ralstonia* sp. สายพันธุ์ U2, ยีน *nag* จาก *Comamonas testeroni* สายพันธุ์ GZ42, ยีน *nag* จาก *Polaromonas naphthalenivorans* สายพันธุ์ CJ2 และยีน *phn* จาก *Burkholderia* sp. สายพันธุ์ RP007 (Peng และคณะ, 2008)

Goyal และ Zylstra (1996) พบยีน *nah* ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายฟีแนนทรีนและแนพธาลีนของ *Comamonas testeronistrain* สายพันธุ์ GZ42 มีการเรียงตัวต่างจากกลุ่มยีน *nah* ในพลาสมิด NAH7

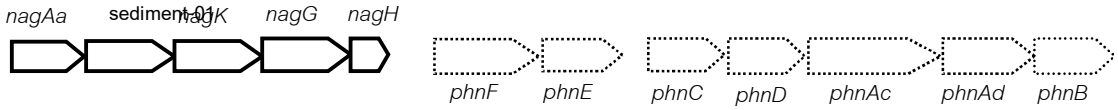
Laurie และ Lloyd-Jones (1999) พบยีน *phn* ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายแนพธาลีน และฟีแนนทรีน ของ *Burkholderia* sp. สายพันธุ์ RP007 มีการเรียงตัวเป็น *phnFECDAcAdB* ซึ่งต่างไปจากการเรียงตัวของกลุ่มยีน *nah* ในพลาสมิด NAH7 ที่เรียงตัวแบบ *nahAaAbAcAdBFCQED* โดยยีน *phnF* เป็นยีนประมวลรหัสแอลดีไฮด์ดีไฮโดรจีเนส ยีน *phnE* เป็นยีนประมวลรหัสไฮดราเทส-แอลโดเลส ยีน *phnC* เป็นยีนประมวลไดออกซิจีเนสยีน *phnD* เป็นยีนประมวลรหัสไอโซเมอเรส ยีน *phnAcAd* เป็นยีนประมวลรหัส ISP ของเทอร์มินัลไดออกซิจีเนสในหน่วยย่อยแอลฟา และเบตาตามลำดับ และยีน *phnB* ประมวลไดไฮโดรไดออลดีไฮโดรจีเนส นอกจากนี้ยังพบยีนที่ประมวลรหัสโปรตีนควบคุม คือ ยีน *phnR* และ *phnS* อีกด้วย

Zhou และคณะ (2001) พบยีน *nag* ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายแนพธาลีนผ่านทางกรดเจนทิสิกของ *Ralstonia* sp. สายพันธุ์ U2 มีการเรียงตัวของยีนดังนี้ คือ *nagAaGHAbAcAdBFCQED* ซึ่งยีน *nagAa* เป็นยีนประมวลรหัสเฟอร์รีดอกซินรีดักเทส ยีน *nagAb* เป็นยีนประมวลรหัสเฟอร์รีดอกซิน ยีน *nagAcAd* เป็นยีนประมวลรหัส ISP ของเทอร์มินัลไดออกซิจีเนสในหน่วยย่อยแอลฟา และเบตา ยีน *nagB* เป็นยีนประมวลรหัส ซีส-ไดไฮโดรไดออลดีไฮโดรจีเนส และยีน *nagF* เป็นยีนประมวลรหัสแอลดีไฮด์ดีไฮโดรจีเนส มีเรียงตัวที่เหมือนและต่างจากยีน *nah* ในพลาสมิด NAH7 ส่วนที่ต่างกับคือมียีน *nagGH* ที่อยู่บริเวณยีน *nagAa* และ *nagAb* ซึ่งประมวลรหัสหน่วยย่อยของซาลิไซเลต 5-ไฮดรอกซิเลสแทรกอยู่ด้วย และพบ *nagJIKLMN* ซึ่งประมวลรหัสเอนไซม์ย่อยสลายกรดเจนทิสิกที่ตำแหน่ง downstream ของยีน *nagD* ดังแสดงในรูป

Jeon และคณะ (2006) พบยีน *nah* ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายแนพธาลีน ผ่านทางกรดเจนทิสิกของ *Polaromonas naphthalenivorans* สายพันธุ์ CJ2 มีการเรียงตัวของยีนกลุ่มเล็ก และกลุ่มใหญ่ ซึ่งมีการรียงตัวของยีนคล้ายกับยีนประมวลรหัสการย่อยสลายแนพธาลีนผ่านทางกรดเจนทิสิกของ *Ralstonia* sp. สายพันธุ์ U2

Tittabutr และคณะ (2011) ศึกษายีน *nag* และยีน *phn* ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายแนพธาลีน ฟีแนนทรีน และแอนทราซีนจาก *Burkholderia* sp. สายพันธุ์ C3 ที่คัดแยกจากดินปนเปื้อนสารประกอบ PAHs ซึ่งรายงานนี้พบการของยีนคล้าย *nag* และร่วมกับยีน *phn* ใน *Burkholderia* sp. สายพันธุ์ C3 โดยพบมีการเรียงตัวของยีน *nag* คล้ายกับกลุ่มยีน *nag* ใน *Ralstonia* sp. สายพันธุ์ U2 โดยมีการเรียงตัวดังนี้ *nagAaIKGH* ซึ่งยีน *nagAa* เป็นยีนประมวลรหัสรหัสเฟอร์รีดอกซินรีดักเทส ซึ่งยีน *nagI* เป็นยีนประมวลรหัสการย่อยสลายเอนไซม์เจนทิเสท 1, 2-ไดออกซิจีเนส ยีน *nagK* เป็นยีนประมวลรหัสฟูมาริลไพรูเวตไฮโดรเลส และยีน *nagGH* เป็นยีนประมวลรหัส ISP ของเทอร์มินัลไดออกซิจีเนสในหน่วยย่อยแอลฟา และเบตาตามลำดับ ส่วนมีการเรียงตัวของยีน *phn* มีความต่างกับกลุ่มยีน *nah* และกลุ่มยีนคล้าย *nag* (*nag-like*) ในแบคทีเรียสกุล *Pseudomonas* และ *Ralstonia* โดยมีการเรียงตัวดังนี้ *phnFECDAcAdB* ซึ่งยีน *phnF* เป็นยีนประมวลรหัสดีไฮโดรจีเนส ยีน *phnE* เป็นยีนประมวลรหัสไฮโดรเลส/แอลโดเลส ยีน *phnC* เป็นยีนประมวลรหัสเอกตราไดออลไดออกซิจีเนส ยีน *phnAcAd* เป็นยีนประมวลรหัส ISP ของเทอร์มินัลไดออกซิจีเนสในหน่วยย่อยแอลฟาและเบตา และยีน *phnB* เป็นยีนประมวลรหัสได

ไฮโดรไดออลดีไฮโดรจีเนส ซึ่งรายงานนี้เป็นรายงานที่พบการของยีนคล้าย *nag* และร่วมกับยีน *phn* ใน *Burkholderia* sp. สายพันธุ์ C3 ดังแสดงในรูปที่ 2.15



รูปที่ 2.15 การเรียงตัวของยีนคล้าย *nag* ร่วมกับยีน *phn* ใน *Burkholderia* sp. สายพันธุ์ C3 (Tittabutr และคณะ, 2011)

พบรายงานแบคทีเรียในสกุลอื่นที่สามารถย่อยสลายสารประกอบ PAHs ได้ และมีการเรียงตัวของยีนแตกต่างจากกลุ่มยีน *nah* และกลุ่มยีนคล้ายยีน *nah* ดังรายงานต่อไปนี้

Romine และคณะ (1999) พบว่า *Novosphingobium aromaticivorans* สายพันธุ์ F199 มียีนประมวลรหัสเทอร์มินัลไดออกซิจีเนสทั้งหมด 6 ชุดอยู่บนพลาสมิด คือ ยีน *bphA1[a-e]* ยีน *bphA2[a-e]* และยีน *bphA1fA2f* ซึ่งเกี่ยวข้องกับการย่อยสลายแนพธาลีนและไบฟีนิล *เมตา*-ไซคลีน และ *พารา*-คลีซอล และยีน *nahE* ยีน *nahD* และยีน *nahF* ซึ่งที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายแนพธาลีนมีการเรียงตัวของยีนห่างกัน และถูกคั่นด้วยยีนในวิถีการย่อยสลายอื่น และพบมีเปอร์เซ็นต์ความเหมือนค่อนข้างต่ำเมื่อเปรียบเทียบข้อมูลของกรดอะมิโนของยีนทั้งสามกับยีนกลุ่มคล้าย *nah* นอกจากนี้ยังพบยีน *bphA1[a-e]* ยีน *bphA2[a-e]* และการเรียงตัวของยีนลักษณะดังกล่าวในแบคทีเรีย *Sphingobium yanoikuyae* สายพันธุ์ B1 และ *Sphingobium* sp. สายพันธุ์ P2 (Pinyakong และคณะ, 2003)

Pinyakong และคณะ (2004) พบว่ายีน *arhA1* ที่ประมวลรหัสหน่วยย่อยแอลฟาและ ยีน *arhA2* ที่ประมวลรหัสหน่วยย่อยเบตาของเทอร์มินัลไดออกซิจีเนส ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายอะซีแนพธีน และอะซีแนพธีลีนของ *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ A4 มีลำดับกรดอะมิโนเหมือนกับโปรตีน PhnAc และ PhnAd ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายฟีแนนทรีนของเชื้อ *Burkholderia* sp. สายพันธุ์ RP007 56% และ 45% ตามลำดับ ซึ่งภายหลัง Kouzuma และคณะ (2006) พบว่ายีน *arhA3* ที่ประมวลรหัสเฟอร์รีดอกซิน ยีน *arhA4* ที่ประมวลรหัสเฟอร์รีดอกซิน รีดักเทส และยีน *arhR* ที่ควบคุมวิถีการย่อยสลายอะซีแนฟธีน อยู่ห่างออกไปจาก upstream ของยีนประมวลรหัสอะซีแนพธีนไดออกซิจีเนส

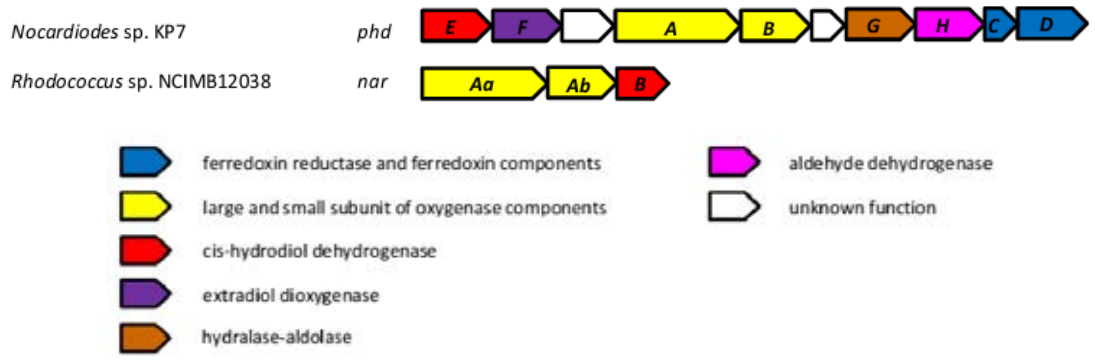
Klankeo และคณะ (2009) คัดแยกจุลินทรีย์ย่อยสลายไพรีนในระบบนิเวศจำลองดินที่เติมไพรีนลงไป โดยคัดแยกเชื้อได้ 2 สายพันธุ์ คือ *Pseudoxanthomonas* sp. สายพันธุ์ KOTLB และสายพันธุ์ RN 402 และจากการเพิ่มจำนวนชิ้นดีเอ็นเอโดยใช้ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสด้วยไพร์เมอร์ที่จำเพาะต่อยีนย่อยสลายไพรีนคือ *nidA* พบการแสดงออกของยีนในแบคทีเรียทั้ง 2 สายพันธุ์ และพบว่าผลิตภัณฑ์ยีน *nidA* มีความเหมือนกับโปรตีน NidA ซึ่งประมวลรหัสส่วนย่อยแอลฟาบริเวณเทอร์มินัลไดออกซิจีเนสเท่ากับ 99 ถึง 100% และพบว่ายีนดังกล่าวมีตำแหน่งอยู่บนเมกะพลาสมิด (megaplasmid) ซึ่งถือเป็นรายงานแรกที่พบว่ามียีนย่อยสลายไพรีนในแบคทีเรียแกรมลบและเป็นรายงานแรกที่พบว่าแบคทีเรียทั้ง 2 สายพันธุ์มีความสามารถในการย่อยสลายไพรีน นอกจากนี้ยังสามารถย่อยสลายฟีแนนทรีน และฟลูออแรนธีนที่ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตรได้ 99% 99% และ 55% ตามลำดับ เมื่อเลี้ยงแบคทีเรียในอาหารเหลวเป็นเวลา 16 วัน 8 วัน และ 24 วัน

2.11.2 **ยีนไดออกซิจีเนสในกลุ่ม** dox_{GP}

ยีนไดออกซิจีเนสในกลุ่ม dox_{GP} พบมีการเรียงตัวของยีนแตกต่างจากกลุ่ม dox_{GN} ดังรายงานต่อไปนี้

Larkin และคณะ (1999) พบยีน *nar* ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายแนพธาลีนของ *Rhodococcus* sp. สายพันธุ์ NCIMB12038 โดยพบการเรียงตัวของยีนเป็น *narAaAbB* ซึ่งยีน *narAaAb* ประมวลรหัส ISP ของเทอร์มินัลไดออกซิจีเนสในหน่วยย่อยแอลฟาและเบตา และยีน *narB* ประมวลรหัสซิส-แนพธาลีนไดไฮโดรไดออลดีไฮโดรจีเนส แต่ไม่พบยีนประมวลรหัสเฟอร์รีดอกซินและเฟอร์รีดอกซินรีดักเทส และพบยีนประมวลรหัสโปรตีนควบคุมการทำงานของกลุ่มยีนนี้ คือ ยีน *narR1* และ *narR2*

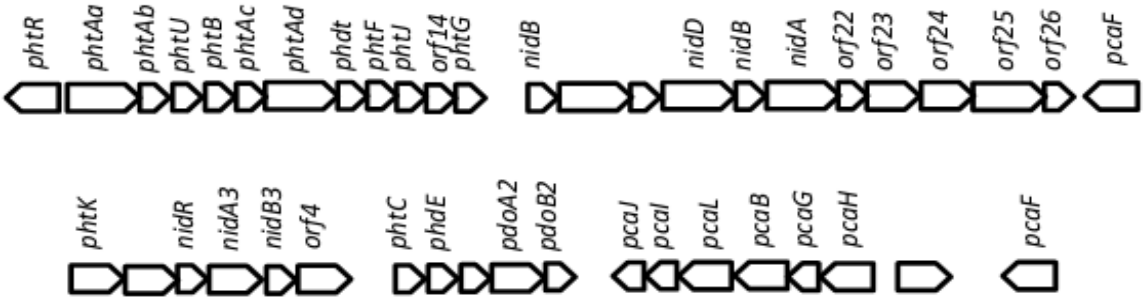
Saito และคณะ (2000) พบยีน *phd* ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายฟีแนนทรีนผ่านทางพธาเลท ของ *Nocardioides* sp. สายพันธุ์ KP7 โดยพบการเรียงตัวของยีน 2 กลุ่ม กลุ่มแรกมีการเรียงตัวเป็น *phdEFABGHCD* ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายฟีแนนทรีนเป็น 1-ไฮดอรกซี-2-แนพธาโนเอต (1-hydroxy-2-naphthoate) ส่วนกลุ่มที่สองมีการเรียงตัวเป็น *phdIJK* ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลาย-ไฮดอรกซี-2-แนพธาโนเอต ไปเป็นพธาเลท ดังแสดงในรูป 2.16



รูปที่ 2.16 การเรียงตัวของกลุ่มยีนประมวลรหัสเอนไซม์ไดออกซิจีเนสในกลุ่ม dox_{GP} ได้แก่ *Nocardioides* sp. สายพันธุ์ KP7 (Saito และคณะ, 2000) และ *Rhodococcus* sp. สายพันธุ์ NCIMB12038 (Kulakov และคณะ, 2000)

นอกจากนี้ยังพบยีน dox_{GP} ในแบคทีเรียสกุล *Mycobacterium* สายพันธุ์ต่าง ๆ ที่ย่อยสลายไพรีนได้ เช่น สายพันธุ์ PYR-1 สายพันธุ์ MHP-1 (Habe และคณะ, 2004) และสายพันธุ์ 17A3T (Derz และคณะ, 2004)

Khan และคณะ (2001) พบยีน *nidA* ที่ประมวลรหัส ISP ของเทอร์มินัลไดออกซิจีเนสในหน่วยย่อยแอลฟา และเบตาซึ่งเกี่ยวข้องกับการย่อยสลายไพรีน และยีน *nidD* ซึ่งประมวลรหัสอัลดีไฮด์ดีไฮโดรจีเนสของ *Mycobacterium vanbaalenii* สายพันธุ์ PYR-1 โดยพบการเรียงตัวของเป็น *nidDBA* ซึ่งมีลำดับนิวคลีโอไทด์แตกต่างจากยีนคล้าย *nah* (*nah-like*) มากกว่า 60% ดังแสดงในรูป 2.17



รูปที่ 2.17 การเรียงตัวของกลุ่มยีนประมวลรหัสเอนไซม์ไดออกซิจีเนสในกลุ่ม dox_{GP} ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายไพรีนของ *Mycobacterium vanbaalenii* สายพันธุ์ PYR-1 (Kim และคณะ, 2007)

2.12 การศึกษาจุลินทรีย์โดยใช้วิธีการเพาะเลี้ยงเชื้อในห้องปฏิบัติการ

ในอดีตการศึกษาและตรวจติดตามจุลินทรีย์ส่วนใหญ่นิยมใช้วิธีการเพาะเลี้ยงเชื้อในห้องปฏิบัติการ (culture-dependent method) โดยการเพิ่มจำนวนแบคทีเรียย่อยสลายสารประกอบ PAHs ในอาหารเลี้ยงเชื้อเฉพาะ (enrichment) หรือตรวจหาปริมาณแบคทีเรียที่ย่อยสลายสารพิษด้วยวิธี MPN (Most Probable Number) ซึ่งมีวิธีการเหล่านี้มีข้อดีคือง่าย สะดวก และไม่ยุ่งยาก แต่อย่างไรก็ตามการคัดแยกเชื้อในธรรมชาติสามารถคัดแยกเชื้อที่เพาะเลี้ยงได้เพียง 0.1% เท่านั้น (Andreoni และ Gianfreda, 2007; Kennedy และคณะ, 2010) จึงทำให้ขาดข้อมูลของจุลินทรีย์ อีกทั้งพันธุศาสตร์ของยีน และเอนไซม์ที่สำคัญต่าง ๆ อีกมากมาย (Daniel และคณะ, 2004)

2.13 การศึกษาจุลินทรีย์โดยใช้วิธีการที่ไม่อาศัยการเพาะเลี้ยงเชื้อ

เนื่องจากการเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ในห้องปฏิบัติการไม่สามารถคัดแยกเชื้อในธรรมชาติได้อย่างครอบคลุม ดังนั้นการพัฒนาเทคนิคใหม่ทางชีวโมเลกุลเพื่อใช้ในศึกษาแบคทีเรียและตรวจติดตามยีนในสิ่งแวดล้อมโดยตรง โดยไม่ต้องผ่านเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ในห้องปฏิบัติการ (culture-independent method) ซึ่งเริ่มจากการสกัดดีเอ็นเอเมตาจีโนมจากสิ่งแวดล้อมโดยตรง และนำดีเอ็นเอที่ได้มาสร้างห้องสมุดยีน 16S rDNA หรือวิเคราะห์ความหลากหลายของโครงสร้างประชาคมแบคทีเรีย PCR-DGGE โดยเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอในส่วน 16S rDNA และนำผลิตภัณฑ์ที่ได้มาวิเคราะห์ความหลากหลายของแบคทีเรียด้วยวิธี PCR-Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) (Torsvik และคณะ, 2002) ซึ่งมีหลักการใช้ในแยกดีเอ็นเอสายคู่ที่มีความยาวเท่ากัน แต่มีนิวคลีโอไทด์แตกต่างกัน โดยใช้ความแตกต่างความเข้มข้น (เกรเดียนท์) ของสารเคมีสองชนิด คือยูเรีย และฟอร์มาไมด์ (denaturant) ในการทำลายพันธะไฮโดรเจนของดีเอ็นเอสายคู่ เนื่องจากแบคทีเรียแต่ละชนิดมีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่แตกต่างกัน ส่งผลให้การทำลายพันธะไฮโดรเจนเกิดขึ้นไม่พร้อมกัน ซึ่งแบคทีเรียที่มีลำดับเบส GC มากต้องใช้ความแตกต่างความเข้มข้นของสารเคมีสูงในการทำลายพันธะไฮโดรเจน เพื่อการแยกดีเอ็นเอสายคู่ให้เป็นสายเดี่ยว เมื่อดีเอ็นเอสายคู่ถูกทำลายพันธะไปจะหยุดการเคลื่อนที่ในเจลเนื่องจากมี GC clamp ที่มีลำดับเบส GC อยู่มาก ซึ่งสามารถเห็นแถบแบนด์ดีเอ็นเอได้โดยการย้อมด้วยสารเรืองแสง วิธีการดังกล่าวทั้งหมดนี้ช่วยในการวิเคราะห์โครงสร้างประชาคมแบคทีเรียโดยทั่วไปในสิ่งแวดล้อม ทั้งยังสามารถใช้เป็นข้อมูลเปรียบเทียบกับการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างประชาคมแบคทีเรียในสิ่งแวดล้อม

ที่แตกต่างกัน หรือในสิ่งแวดล้อมที่ถูกปนเปื้อนด้วยสารพิษ เนื่องจากแบคทีเรียแต่ละชนิดมีการปรับตัวที่ต่างกัน ส่งผลต่อการอยู่รอดของแบคทีเรียในสิ่งแวดล้อมได้ต่างกัน พบรายงานดังต่อไปนี้

Long และคณะ (2009) ศึกษาโครงสร้างประชาคมแบคทีเรียโดยวิธี PCR-DGGE และร่วมกับการสร้างห้องสมุดยีน 16S rDNA พบแบคทีเรียในกลุ่ม *Proteobacteria* และ *Actinobacteria* มีบทบาทในการย่อยสลายฟีแนนทรีนในดินตะกอนปากแม่น้ำบริสตอล ประเทศอังกฤษ

Lors และคณะ (2010) ศึกษาโครงสร้างประชาคมแบคทีเรียในระหว่างการบำบัดทางชีวภาพของดินปนเปื้อนถ่านหินโดยใช้วิธี PCR-DGGE ผลปรากฏว่าโครงสร้างแบคทีเรียหลักที่พบคือแบคทีเรียในกลุ่ม *Gammaproteobacteria* โดยเฉพาะ *Enterobacter* และ *Pseudomonas* ซึ่งแบคทีเรียเหล่านี้สามารถใช้บ่งชี้ประสิทธิภาพของการบำบัดสารพิษได้ ส่วน *Betaproteobacteria* เป็นประชาคมแบคทีเรียที่เกิดขึ้นหลังการบำบัดนาน 3 เดือน โดยมีบทบาทสำคัญในการย่อยสลายสารประกอบ PAHs ชนิดแนพธาลีน ฟีแนนทรีน และไพรีน

Jung และคณะ (2010) ศึกษาโครงสร้างประชาคมแบคทีเรียจากระบบนิเวศจำลองน้ำทะเลปนเปื้อนด้วยน้ำมัน ที่ระดับความเข้มข้น 10 ถึง 10,000 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยใช้วิธี PCR-DGGE ผลปรากฏว่ากลุ่มแบคทีเรียหลักที่พบคือ *Jannaschia* sp. และ *Sulfitobacter brevis* ซึ่งเป็นแบคทีเรียในกลุ่ม *Alphaproteobacteria* ทั้งสิ้น

Niepceron และคณะ (2010) ศึกษาโครงสร้างประชาคมแบคทีเรียจากระบบนิเวศจำลองน้ำทะเลปนเปื้อนด้วยสารประกอบ PAHs โดยใช้วิธี PCR-DGGE ผลปรากฏว่าโครงสร้างแบคทีเรียหลักที่พบคือ *Cycloclasticus* และ *Pseudomonas* ซึ่งมีบทบาทสำคัญในการย่อยสลายฟีแนนทรีนในน้ำทะเลซึ่งเป็นแบคทีเรียในกลุ่ม *Gammaproteobacteria* ทั้งสิ้น

Dias และคณะ (2010) ศึกษาโครงสร้างประชาคมแบคทีเรียจากดินตะกอนป่าชายเลน ที่มีความอุดมสมบูรณ์ทางชีวภาพ และไม่พบการปนเปื้อนของสารพิษ ในประเทศบราซิล โดยใช้วิธี PCR-DGGE ผลปรากฏว่าประชาคมแบคทีเรียหลักในพื้นที่คือ *Bacteroidetes* และ *Alphaproteobacteria* ส่วนกลุ่มแบคทีเรียที่มีอยู่น้อยในพื้นที่พบเป็นแบคทีเรียในกลุ่ม *Betaproteobacteria* และ *Actinoteobacteria*

Andrade คณะ (2012) ศึกษาโครงสร้างประชาคมแบคทีเรียที่เปลี่ยนแปลงหลังจากการปนเปื้อนด้วยน้ำมัน จากดินตะกอนป่าชายเลน ประเทศบราซิล โดยใช้วิธี PCR-DGGE ผลปรากฏ

ว่า โครงสร้างประชาคมแบคทีเรียหลัก *Gammaproteobacteria* โดยเฉพาะ *Pseudomonas* และพบว่าระดับการปนเปื้อนของปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างประชาคมแบคทีเรียในกลุ่ม *Bacteroidetes* และ *Betaproteobacteria* ส่วนระดับการปนเปื้อนของแอนทราซีนต่อการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างประชาคมแบคทีเรียในกลุ่ม *Actinoteobacteria*

Somboona และคณะ (2012) ศึกษาโครงสร้างประชาคมแบคทีเรีย โดยสกัดดีเอ็นเอเมตาจีโนมจากน้ำทะเลบริเวณท่าวัง และหาดถ้ำพังของเกาะสีชัง โดยทำ PCR เพิ่มจำนวนดีเอ็นเอบริเวณยีน16SrDNA ของแบคทีเรีย และทำ pyrosequencing ผลปรากฏว่ากลุ่มประชาคมแบคทีเรียบริเวณท่าวังมีมากกว่าหาดถ้ำพังพบเป็นแบคทีเรียในกลุ่ม *Bacteroidetes Firmicutes Verrucomicrobia Gammatimonadetes Spirochaetes Tenericutes Acidobacteria* และ *Chlamydiae* เป็นต้น โดยแบคทีเรียที่พบบริเวณท่าวังคือ *Euryarchaeota Planctomycetes Nitrospirae Chlorobi Thermotogae* และ *Aquificae* ส่วนแบคทีเรียที่พบบริเวณหาดถ้ำพังในสัดส่วนที่มากกว่าท่าวังคือ *Actinobacteria Deinococcus* และ *Thermus* นอกจากนี้พบว่า *Proteobacteria* เป็นแบคทีเรียที่พบได้ในทั้ง 2 บริเวณ

2.14 ความหลากหลายของโครงสร้างประชาคมแบคทีเรียในสิ่งแวดล้อม

การศึกษาโครงสร้างประชาคมแบคทีเรียในสิ่งแวดล้อมโดยวิธี PCR-DGGE นอกจากสามารถช่วยในการอธิบายองค์ประกอบของแบคทีเรียในสิ่งแวดล้อมต่าง ๆ ได้แล้ว ยังสามารถใช้หาความหลากหลายของแบคทีเรียในพื้นที่ได้ เนื่องจากหนึ่งแบนด์ดีเอ็นเอที่ปรากฏบนเจลจากการทำ PCR-DGGE คือ แบคทีเรียหนึ่งชนิด ซึ่งนิยมทำ PCR-DGGE มากกว่า 3 ครั้งเพื่อแน่ใจว่ามีหนึ่งแบนด์ดีเอ็นเอที่ปรากฏจริง การหาความหลากหลายของแบคทีเรียพิจารณาถึง 2 ปัจจัยหลัก ปัจจัยแรกคือชนิดสายพันธุ์ของแบคทีเรีย (species richness) หรือจำนวนแบนด์ดีเอ็นเอที่พบในการทำ PCR-DGGE และปัจจัยที่สองคือความสม่ำเสมอหรือการกระจายตัวของชนิดพันธุ์ (eveness) คือความเข้มของแบนด์ดีเอ็นเอที่ปรากฏในการทำ PCR-DGGE โดยพื้นที่ที่มีความหลากหลายของแบคทีเรียสูงจะประกอบด้วยชนิดแบคทีเรียมาก และมีความสม่ำเสมอของชนิดพันธุ์สูง ถ้ามีปัจจัยในปัจจัยหนึ่งเปลี่ยนแปลงไปจะส่งผลต่อความหลากหลายของแบคทีเรียซึ่งสะท้อนถึงเปลี่ยนแปลงไปของสภาพแวดล้อม ตลอดจนความอุดมสมบูรณ์ของธาตุอาหารต่าง ๆ ในพื้นที่ ซึ่งค่าความหลากหลายของแบคทีเรียสามารถคำนวณได้จากดัชนีความหลากหลายและการกระจายตัวของ Shannon (Shannon diversity index; *H'*) (Pielou, 1975 และ Macgurran,

2004) และดัชนีความหลากหลายของ Simpson (Simpson diversity index; *D*) (Simpson, 1949 และ Magurran, 2004)

2.14.1 ดัชนีความหลากหลายและการกระจายตัวของ Shannon

เป็นดัชนีความหลากหลายที่นิยมใช้ในการหาความหลากหลายทางชีวภาพ (Wilsey และ Stirling, 2007) เนื่องจากไม่มีความแปรปรวนของข้อมูล เหมาะกับจำนวนตัวอย่าง การวิเคราะห์ข้อมูลขนาดเล็กและใหญ่ (Pielou, 1975 และ Magurran, 2004) ถ้าค่าดัชนีความหลากหลายและการจายตัวของ Shannon ถ้ามีค่ามากแสดงว่าพื้นที่นั้นมีความหลากหลายของแบคทีเรียสูง

ดัชนีความหลากหลายของ Shannon (*H'*)

$$H' = -\sum p_i \ln p_i \qquad \text{โดยที่} \quad p_i = n_i / N$$

เมื่อ p_i คืออัตราส่วนความเข้มของแบนด์ดีเอ็นเอที่สนใจต่อความเข้มของแบนด์ทั้งหมด

n_i = ความเข้มของแบนด์ดีเอ็นเอในแต่ละ lane

N = ความเข้มของแบนด์ดีเอ็นเอทั้งหมด

ค่าความสม่ำเสมอ หรือการกระจายตัวของ Shannon (E_H) คำนวณได้จาก

$$E_H = H'/H_{\max} = H'/\ln S$$

เมื่อ *S* คือจำนวนแบนด์ดีเอ็นเอที่ปรากฏ (Magurran, 2004; Wilsey และ Stirling, 2007)

2.14.2 ดัชนีความหลากหลายของ Simpson

เป็นดัชนีความหลากหลายที่ง่าย สะดวกในการคิดวิเคราะห์ แต่มักให้ผลผิดพลาดไปในเชิงบวก เมื่อตัวอย่างมีจำนวนน้อย (Simpson, 1949 และ Magurran, 2004)

ดัชนีความหลากหลายของ Simpson (*D*)

$$D = \sum p_i^2 \qquad \text{โดยที่} \quad p_i = n_i / N$$

เมื่อ p_i คืออัตราส่วนความเข้มของแบนด์ดีเอ็นเอที่สนใจต่อความเข้มของแบนด์ทั้งหมด

n_i = ความเข้มของแบนด์ดีเอ็นเอในแต่ละ lane

N = ความเข้มของแบนด์ดีเอ็นเอทั้งหมด

เมื่อค่า *D* ลดลง แสดงว่าความหลากหลายย่อมเพิ่มขึ้น ดังนั้นมักแสดงดัชนีความหลากหลายของซิมสันในรูป *1-D* ซึ่งดัชนีนี้จะแปรผกผันไปตามค่าความหลากหลายคือถ้ามีค่าน้อยพบความหลากหลายมาก

พบรายงานการศึกษาความหลากหลายของโครงสร้างประชาคมจุลินทรีย์ดังต่อไปนี้ คือ

Baek และ Kim (2009) ศึกษาโครงสร้างประชาคมแบคทีเรียในดินปนเปื้อนน้ำมัน และในดินปนเปื้อนน้ำมันที่เติมเฮกซะเดกเคน หรือแนพธาลีนที่ความเข้นข้น 200 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม โดยวิธี PCR-DGGE พร้อมทั้งคำนวณหาค่าความหลากหลายโดยใช้ดัชนีความหลากหลายของ Shannon และ Simpson ผลปรากฏว่าดินปนเปื้อนน้ำมันที่เติมเฮกซะเดกเคนมีความหลากหลายของแบคทีเรียมากกว่าดินปนเปื้อนน้ำมันที่เติมแนพธาลีน ซึ่งแสดงให้เห็นว่าประชาคมจุลินทรีย์มีการปรับตัวให้ใช้เฮกซะเดกเคนเป็นแหล่งคาร์บอนได้ดีกว่า โดยผลการวิเคราะห์โครงสร้างประชาคมแบคทีเรียในดินปนเปื้อนน้ำมันพบแบคทีเรียในกลุ่ม *Alphaproteobacteria* และ *Gammaproteobacteria* ประชาคมแบคทีเรียที่เพิ่มขึ้นในดินปนเปื้อนน้ำมันที่เติมเฮกซะเดกเคน คือ *Bacteroidetes* ส่วนแบคทีเรีย *Betaproteobacteria* เป็นโครงสร้างประชาคมแบคทีเรียที่เพิ่มขึ้นในดินปนเปื้อนที่เติมแนพธาลีน

Guo และคณะ (2011) ศึกษาโครงสร้างประชาคมแบคทีเรีย *Sphingomonas* และ *Mycobacterium* ในระบบนิเวศจำลองดินตะกอนป่าชายเลนที่เติมสารประกอบ PAHs ชนิดไพรีนในอัตราส่วนที่มากกว่าฟลูออแรนธีน และฟีแนนทรีน โดยบ่มเป็นระยะเวลานาน 30 วัน โดยวิธี PCR-DGGE ร่วมกับการคำนวณค่าความหลากหลายโดยใช้ดัชนีความหลากหลายของ Shannon ผลปรากฏว่าไม่มีพบการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างประชาคมแบคทีเรีย *Sphingomonas* ตามระยะเวลาการบ่ม ตรงข้ามกับโครงสร้างประชาคมแบคทีเรีย *Mycobacterium* มีการเปลี่ยนแปลงตามตามระยะเวลาที่บ่ม โดยวันที่ 30 มีค่าความหลากหลายของโครงสร้างประชาคมแบคทีเรียมากกว่าวันที่ 15 และวันที่ 0 ตามลำดับ เป็นไปได้ว่า *Mycobacterium* มีการใช้ไพรีนเป็นแหล่งคาร์บอนได้ดีกว่า *Sphingomonas* ที่มักใช้ฟีแนนทรีนเป็นแหล่งคาร์บอน

นอกจากการวิเคราะห์เมตาจีโนมด้วยวิธีดังกล่าวข้างต้นแล้ว การตรวจติดตามยีนไดออกซิจีเนสโดยตรงจากสิ่งแวดล้อม และวิเคราะห์ความหลากหลายของรูปแบบยีนไดออกซิจีเนสจากห้องสมุดเมตาจีโนม (Handelsman และคณะ, 2004) รวมถึงการศึกษาวิเคราะห์หาความอุดมสมบูรณ์ของยีนที่เกี่ยวข้องกับย่อยสลายสารประกอบ PAHs ด้วยวิธี real-time PCR จะทำให้ทราบข้อมูลเบื้องต้นของยีนย่อยสลายสิ่งแวดล้อม และทราบความอุดมสมบูรณ์ของยีนย่อยสลายพิษที่แท้จริง เพื่อใช้เป็นข้อมูลประกอบการประเมินความเป็นไปได้ในการเกิดการย่อยสลาย PAHs ด้วยวิธีทางชีวภาพโดยแบคทีเรียในพื้นที่ปนเปื้อน และนำไปสู่การจัดการสิ่งแวดล้อมได้อย่างถูกต้อง และรวดเร็วยิ่งขึ้น เนื่องจากเข้าใจถึงบทบาทหน้าที่ของแบคทีเรียและยีนทั้งหมดในสิ่งแวดล้อม (Santos และคณะ, 2009) ได้ซึ่งพบรายงานศึกษาดังต่อไปนี้

Marcos และคณะ (2009) ศึกษายีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนโดยได้ออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีน dox_{GP} เพื่อใช้ในการตรวจหายีนในระบบนิเวศจำลองดินตะกอนทะเลปนเปื้อน บริเวณซับ-แอนตาร์คติก ประเทศอาร์เจนตินา ผลปรากฏว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มีความคล้ายคลึงกับยีนไดออกซิเนสที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายสารประกอบ PAHs ในกลุ่มแบคทีเรียแกรมบวกจำพวก *Rhodococcus Mycobacterium Norcardioides Terrabacter* และ *Bacillus* แต่มีเปอร์เซ็นต์ความเหมือนของกรดอะมิโนเมื่อเทียบกับในฐานข้อมูลปานกลางถึงต่ำคือ 62-33%

Yergeau และคณะ (2009) ศึกษาความความอุดมสมบูรณ์ของยีนย่อยสลายสารพิษโดยวิธี real-time RT-PCR (Reverse transcription polymerase chain reaction) มีการแสดงออกของยีนอัลเคนไฮดรอกซีเลส (*alkB*) ซึ่งเกี่ยวข้องกับการย่อยสลายน้ำมัน ยีน dox_{GP} และ dox_{GN} และเมื่อหาปริมาณของแบคทีเรียย่อยสลายน้ำมันโดยวิธี MPN พบมีปริมาณแบคทีเรียย่อยสลายน้ำมันเพิ่มมากขึ้นซึ่งสอดคล้องกับปริมาณไฮโดรคาร์บอนที่ลดน้อยลง

Peng และคณะ (2010) ศึกษาความความอุดมสมบูรณ์ของยีนย่อยสลายสารพิษคือ *nidA* โดยใช้วิธี real-time PCR ในระบบนิเวศจำลองดินที่เติมไพรีนลงไป พบว่าจำนวนชุด (copy number) ของยีน *nidA* มีปริมาณมากอยู่ในช่วง 7.33×10^3 ถึง 3.05×10^6 จำนวนชุดของยีนต่อกรัมดิน แต่ไม่พบการเปลี่ยนแปลงของจำนวนชุดยีน *nidA* ในชุดควบคุมที่เติมไพรีน

Zhou และคณะ (2012) ศึกษาความหลากหลายและความอุดมสมบูรณ์ของแบคทีเรียในดินปนเปื้อนปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอน บริเวณระบบชลประทานเฉิงตู ประเทศจีน โดยออกแบบไพร

เมอร์ที่จำเพาะกับกลุ่ม *Sphingomonas* ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่พบมากในดินปนเปื้อนน้ำมัน โดยใช้วิธี PCR-DGGE ร่วมกับคำนวณหาค่าความหลากหลาย และวิธี real-time PCR ผลปรากฏว่าพบความหลากหลาย *Sphingomonas* มากในดินที่เก็บจากส่วนต้นน้ำ โดยมีค่าความหลากหลายเท่ากับ 2.171 และ 0.873 ตามลำดับเมื่อใช้ดัชนีความหลากหลายของ Shannon ส่วนความความอุดมสมบูรณ์ของ *Sphingomonas* พบโดยพิจารณาจากจำนวนชุด (copy number) ของยีน 16S rDNA พบว่าดินที่เก็บจากบริเวณต้นน้ำมีค่าสูงสุดคือ 5.08×10^{7} อีกทั้งพบความสัมพันธ์ระหว่างความอุดมสมบูรณ์ของ *Sphingomonas* ในพื้นที่กับอัตราส่วนสารประกอบ PAHs ต่อปริมาณปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนรวมทั้งหมด

จากรายงานทั้งหมดจะเห็นการศึกษาความหลากหลายและความอุดมสมบูรณ์ของแบคทีเรียและยีนย่อยสลายสารพิษมีความสำคัญอย่างยิ่ง เนื่องจากแบคทีเรียเป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพ เมื่อสภาพแวดล้อมมีการเปลี่ยนแปลงไป ซึ่งการศึกษาดังกล่าวยังไม่เคยปรากฏในประเทศไทย โดยเฉพาะบริเวณพื้นที่เกาะสีชัง ซึ่งเป็นบริเวณที่มีความอุดมสมบูรณ์ และมีความหลากหลายทางชีวภาพสูง แต่ในขณะเดียวกันก็เป็นบริเวณที่เสี่ยงต่อการได้รับการปนเปื้อนจากสารประกอบ PAH ดังนั้นวิทยานิพนธ์นี้จึงมุ่งเน้นศึกษาความหลากหลายแบคทีเรียและยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลาย PAHs ชนิดฟีแนนทรีน หรือไพรีนในดิน ดินตะกอน และน้ำทะเล บริเวณเกาะสีชังโดยวิเคราะห์เมตาจีโนม ได้แก่ การใช้สกัดดีเอ็นเอเมตาจีโนมจากสิ่งแวดล้อมโดยตรง และวิเคราะห์โครงสร้างความหลากหลายของประชาคมจุลินทรีย์ด้วยวิธี PCR-DGGE การตรวจหายีนไดออกซิจีเนสโดยตรงจากสิ่งแวดล้อม สร้างห้องสมุดยีนจากดีเอ็นเอเมตาจีโนม รวมถึงการศึกษาความอุดมสมบูรณ์ของยีนย่อยสลายสารพิษโดยใช้วิธี real-time PCR ร่วมกับการคัดแยกเชื้อแบคทีเรียย่อยสลาย PAHs โดยวิธี enrichment ในอาหารเลี้ยงเชื้อจำเพาะ ผลสรุปของการศึกษาทั้งหมดจะทำให้ทราบความหลากหลายของโครงสร้างประชาคมแบคทีเรีย ชนิดและปริมาณแบคทีเรียย่อยสลายสารพิษ รวมทั้งยีนและความอุดมสมบูรณ์ของยีนย่อยสลายสายพิษในพื้นที่ เพื่อใช้เป็นข้อมูลเบื้องต้นในการประเมินความเป็นไปได้ในการเกิดการย่อยสลายทางชีวภาพในพื้นที่ปนเปื้อนได้

บทที่ 3

อุปกรณ์ เคมีภัณฑ์ และวิธีดำเนินงานวิจัย

อุปกรณ์

1. เข็มฉีดยาพลาสติกขนาด 1 มิลลิลิตร บริษัท Nissho Nipro, Japan
2. หลอดเก็บเชื้อแช่แข็ง (Cryotube) บริษัท Nalgene, USA
3. ชุดกรองสำเร็จรูปชนิดเซลลูโลสอะซีเทต (CA) ขนาดช่อง 0.22 ไมโครเมตร บริษัท Sartorius Biolab Product, Germany
4. ชุดกรองสำเร็จรูปชนิด PTFE (Polytetrafluoroethylene) ขนาดช่อง 0.22 ไมโครเมตร รุ่น DISMIC-13JP บริษัท Tokyo Roshi Kaisha, Japan
5. ชุดเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟ รุ่น 6890 N บริษัท Agilent Technologies, USA
   คอลัมน์ (Column) ชนิด HP-5 ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 320 ไมโครเมตร ยาว 30 เมตร ภายในเคลือบด้วยเฟนิลเมธิลไซโลเซน ความเข้มข้น 5% หนา 0.25 ไมโครเมตร เครื่องตรวจวัด (Detector) ชนิด Frame Ionization Detector (FID) เข็มฉีดยาขนาดเล็ก (Microsyrings) ขนาด 10 ไมโครลิตร
6. ชุดเครื่องเจล Minigel migration trough รุ่น i-mupid บริษัท COSMO BIO, Japan
7. ชุดเครื่องระเหยแห้งสูญญากาศ (Rotary vacuum evaporation) บริษัท EYELA, Japan
8. เครื่องแก้วพื้นฐานในห้องปฏิบัติการ คีมคีบ (forcep) และที่เขี่ยเชื้อ (loop)
9. เครื่องกำเนิดเสียงความถี่สูง (Ultrasonicator) ชนิดอ่าง รุ่น FS4000 บริษัท Decan Ultrasonics, England
10. เครื่องเขย่าไม่ควบคุมอุณหภูมิรุ่น Innova 2300 บริษัท New Brunswick Scientific, USA
11. เครื่องชั่ง รุ่น AG285 PG2002-S และ PB3002 บริษัท Mettler Toledo, Switzerland
12. เครื่องนึ่งอบฆ่าเชื้อ (Autoclave) บริษัท Kakusan, Japan
13. เครื่องปั่นผสม (Vortex mixer) รุ่น Gene 2 ของบริษัท Scientific Industries, USA
14. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) รุ่นUV-160A บริษัท Shimadzu, Japan

15. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสงสำหรับไมโครเพลท (Microplate reader รุ่นELx800 บริษัท BioTek-Instuments, Inc., USA)
16. เครื่องวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH meter) รุ่น 240 บริษัท Corning, USA
17. เครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดควบคุมอุณหภูมิ (Refrigerated centrifuge) รุ่น J2-21 บริษัท Beckman Instrument Inc, USA และ รุ่น 1920 บริษัท Kubota, USA
18. เครื่องหมุนเหวี่ยงชนิดตั้งโต๊ะ (Bench-top centrifuge) รุ่น Mikro20 บริษัท Hettich, Germany
19. เครื่องฉายแสงอัลตราไวโอเลต บริษัท Fotodyne, USA
20. เครื่องตรวจสอบเจล (Gel documentation system) รุ่น Gel DOC 2000™ บริษัท Bio-Rad Laboratories Inc., USA
21. เครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (DNA Thermal Cycler) รุ่น 2400 บริษัท Perkin Elmer, USA รุ่น MJ Mini™ Personal Thermal Cycler บริษัท Bio-Rad Laboratories Inc., USA
22. เครื่องวิเคราะห์ชนิดและปริมาณสารพันธุกรรมแบบ Real-Time PCR รุ่น Mini Opticon Real-Time PCR บริษัท Bio-Rad Laboratories Inc., USA
23. เครื่องวัดปริมาณสารพันธุกรรมใช้จำนวนสารปริมาณน้อย (นาโนดร็อป 2000) บริษัท Thermo Scientific, USA
24. เครื่องหมุนผสมกลับไปมา (Inverter) บริษัท Bio-Active Co., Ltd., USA
25. เครื่องโฮโมจิไนซ์ (Homogenizer) บริษัท Biospec Products, Inc., USA
26. เครื่องกรองสูญญากาศ บริษัท Biospec Products, Inc., USA
27. ตู้เขี่ยเชื้อแบบ ISSCO laminar flow รุ่น HT-122.5 บริษัท International Scientific Supply, USA
28. ตู้แช่แข็งจุดเยือกแข็งต่ำ (Deep freezer) อุณหภูมิ –20 ซº รุ่น MDF-U332 บริษัท Sanyo Electric, Japan
29. ตู้แช่แข็งจุดเยือกแข็งต่ำ (Deep freezer) อุณหภูมิ -80 ซº รุ่น ULT1786 บริษัท Forma Scientific, USA
30. ตู้บ่มเชื้ออุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส (Incubator) รุ่น BE800 ยี่ห้อ Memmert, Germany

31. ตู้บ่มเชื้ออุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส (Incubator) ยี่ห้อ New Brunswick Scientific บริษัท Edison NJ, Germany
32. ตู้อบฆ่าเชื้อ (Hot air oven) รุ่น UE 600 บริษัท Memmert, Germany
33. ตู้อบแห้ง (Oven) บริษัท Contherm Scientific, New Zealand
34. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath) รุ่น digital water bath SB-1000 บริษัท Eyela, Japan
35. อุปกรณ์ DCode™ system สำหรับทำ DGGE บริษัท Bio-Rad Laboratories Inc., USA
36. ไมโครปิเปต (Micropipette) ขนาด 2, 10, 20, 100, 200, 1000, 5000 และ 10000 ไมโครลิตร และ Multi Pipette รุ่น BioPette™ Plus Multichannel Pipettes บริษัท Gilson, France
35. กระดาษกรอง Millipore Microfil® V เส้นผ่าศูนย์กลาง 47 มิลลิเมตร บริษัท Merck, Germany และกระดาษกรอง Whatman® เส้นผ่าศูนย์กลาง 110 มิลลิเมตร บริษัท Sigma, USA
36. 96 Well Cell Culture Cortar® บริษัท Corning incorporated, USA

เคมีภัณฑ์

1. ไดเมธิลซัลฟอกไซด์ (C_2H_6OS; DMSO) บริษัท Carlo ERBA, Italy
2. ไดเมธิลฟอร์มาไมด์ (*N'N*-Dimethylformamide; DMF), $(CH_3)_2$ NC (O) H) บริษัท BIOBASIC, Japan
2. ไดเอทธิลอีเทอร์ (Diethyl ether), $(C_2H_5)_2O$) บริษัท Merch, Germany
3. นอร์มัลเฮกเซน (C_6H_{14}) บริษัท Merch, Germany
4. Triton-X 100 และ Tween 20 บริษัท Sigma, USA
5. เมธานอล (CH_3OH) บริษัท Merck, Germany
6. เอทานอล (C_2H_5OH) ความเข้มข้น 99% บริษัท Merck, Germany (Lab grade)
7. ไอโซโพรพานอล (Isopropanol) บริษัท Merch, Germany
8. กลีเซอรอล (Glycerol) บริษัท Research Organic Inc., USA
9. นิสเตติน (Nystatin) บริษัท Sigma, USA
10. ผงวุ้น (Agar) ของบริษัท Difco Laboratories, USA
11. แบคโตอะการ์ (Bacto agar) บริษัท Difco, USA

12. อาหารสำเร็จรูป MB (Marine broth) บริษัท Difco, USA
13. อะกาโรสเจล (Agarose gel) บริษัท IUAI, Japan (molecular biology grade)
14. ผงสกัดจากยีสต์ (Yeast extract) บริษัท Difco Laboratories, USA
15. โซเดียมคลอไรด์(NaCl) บริษัท Merck, Germany
16. ทริปโตน (Tryptone) บริษัท Difco Laboratories, USA
17. โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) บริษัท Merck, Germany
18. กรดไฮโดรคลอริก (HCl) บริษัท BDH Chemicals, Australia
19. กรดอะซิติกเข้มข้น (Glacial CH_3COOH) บริษัท Merck, Germany
20. ฟีนอล (Phenol) บริษัท Merck, Germany
21. คลอโรฟอร์ม (chloroform) บริษัท Merck, Germany
22. โซเดียมซัลเฟตแอนไฮดรัส (Anhydrous Na_2SO_4) บริษัท Merck, Germany
23. โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) บริษัท Sigma, USA
24. โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต (Sodium dodecyl sulfate; SDS), ($C_{12}H_{25}OSO_3$) บริษัท Nacalai Tesque, Japan
25. รูบิเดียมคลอไรด์ (RbCl) บริษัท Sigma, USA
26. แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$) บริษัท Carlo ERBA, France
27. แมกนีเซียมคลอไรด์ ($MgCl_2$) บริษัท Merch, Germany
28. โพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl) บริษัท Merch, Germany
29. แคลเซียมคลอไรด์ ($CaCl_2 \cdot 2H_2O$) บริษัท Merch, Germany
30. กลูโคส (Glucose) บริษัท Merch, Germany
31. เอทิลีนไดเอมีนเททราอะซิติกแอซิด (Ethylenediaminetetraacetic acid; EDTA), $C_{10}H_{14}N_2O_8Na_2 \cdot 2H_2O$ บริษัท Sigma, USA
32. ไพรีน (Pyrene) บริษัท Sigma, USA
33. ฟีแนนทรีน (Phenanthrene) บริษัท Sigma, USA
34. แอมโมเนียมไนเตรต (NH_4NO_3) บริษัท Sigma, USA
35. ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4) บริษัท Sigma, USA
36. เฟอริกซิเตรต ($FeC_6H_8O7 \cdot 6H_2O$) บริษัท Sigma, USA
37. น้ำทะเลเข้มข้นจากภาควิทยาศาสตร์ทางทะเล จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
38. ชุดเอนไซม์ *Taq* DNA polymerase บริษัท New England Biolabs, USA

39. ชุด PCR master mix (Go-Tag® Green Master Mix) บริษัท Promega, USA
40. ชุด Maxima™ SYBR Green qPCR master mix บริษัท Fermentas Life Sciences, USA
41. ชุดเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI บริษัท Promega, USA
42. ชุดเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hin*fI บริษัท Promega, USA
43. ชุดเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Rsa*I บริษัท Promega, USA
44. ชุดเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bsu*RI บริษัท Promega, USA
45. ชุดเอนไซม์ T4 DNA Ligase บริษัท Promega, USA
46. ชุดทำบริสุทธิ์ดีเอ็นเอ DNA Gel/PCR Fragments Extraction Kit บริษัท Geneaid, Taiwan
47. ชุดสกัดพลาสมิด High speed Plasmid Mini Kit บริษัท Geneaid, Taiwan
48. ชุดสกัดดีเอ็นเอจากน้ำทะเล Meta-G-Nome™ DNA Isolation Kit บริษัท Epicenter, USA
49. ชุดสกัดดีเอ็นเอจากดิน Fast DNA® spin kit for soil บริษัท Qbiogene, USA
50. พลาสมิดเวกเตอร์ pGEM-T Easy Vector System II บริษัท Promega, USA
51. Lambda HindIII บริษัท Geneaid, Taiwan
52. 100 bp DNA ladder บริษัท Geneaid, Taiwan
53. 1 kilobase DNA ladder บริษัท Geneaid, Taiwan
54. Tris [hydroxymethyl] aminomethane; Trizma base, ($C_4H_{11}NO_3$) บริษัท Sigma, USA
55. Isopropyl thio-ß-D-galactoside; IPTG บริษัท Promega, USA
56. 5-Bromo-4-Chloro-3-indolyl-ß-D-galactoside; X-gal บริษัท Promega, USA
57. โปรตีนเนสเค (Proteinase K) บริษัท US. Biological, USA
58. ไรโบนิวคลีเอสเอ (RNase A) บริษัท Promega, USA
59. ไลโซไซม์ (lysozyme) บริษัท Promega, USA
60. สารปฏิชีวนะแอมพิซิลลิน (Ampicillin) บริษัท Nacalal tesque, Japan
61. สารละลาย dNTP ได้แก่ dATP dCTP dGTP และ dTTP บริษัท Fermentus, Canada
62. สีบรอมฟีนอลบลู (Bromphenolblue) บริษัท Fluka, Switzerland

63. Cetyltrimethylammonium bromide; CTAB, $((C_{16}H_{33})N(CH_3)_3Br)$ บริษัท Sigma, USA
64. 2-[*N*-morpholino] ethanesulfonic acid (MES) บริษัท Sigma, USA
65. Iodonitrotetrazolium violet (INT dye) บริษัท Amresco Inc, USA
66. สารเคมีที่ใช้ในเทคนิค DGGE (molecular biology grade)

    ฟอร์มาไมด์ (Formamide) บริษัท Amresco Inc, USA

    40 % Acrylamide/Bis solution บริษัท Amresco Inc, USA

    ยูเรีย (Urea), (CH_4N_2O) บริษัท Sigma, USA

    แอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต (Ammonium persulfate; APS), $(NH_4)_2SO_4$ บริษัท Sigma, USA

    N, N, N', N'-Tetra-methyl-ethylenediamine (TEMED) บริษัท Pacific Sci, UK

    50xTAE

    เอธิเดียมโบรไมด์ (Ethidium bromide) บริษัท Bio-Rad Laboratories Inc., USA

แบคทีเรีย พลาสมิด และไพร์เมอร์ที่ใช้ในงานวิจัย

ตารางที่ 3.1 แบคทีเรียและพลาสมิดที่ใช้ในการวิจัย

ชื่อ	จีโนไทป์	เอกสารอ้างอิง
Escherichia coli สายพันธุ์ JM109	*hsdR17* ($r_K^- m_K^-$) *endA1 thi-1 relA1 gyrA96 supE44 recA1* e14$^-$ (*mceA*) Δ(*lac-proAB*) (F' *traD36 proAB lac*^{rq} ZΔM15)	Sambrook และคณะ 1989

หมายเหตุ Ap^r คือ มียีนต้านยาปฏิชีวนะแอมพิซิลิน

ตารางที่ 3.2 ไพร์เมอร์ที่ใช้วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA จากดีเอ็นเอเมตาจีโนม

ไพร์เมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์ (5'-3')	เอกสารอ้างอิง
341F	CCT ACG GGA GGC AGC AG	Muyzer และคณะ 1993
520R	ACC GCG GCT GCT GGC	Muyzer และคณะ 1993
341F-GC	CGC CCG CCG CGC CCC GCG CCC GTC CCG CCG CCC CCG CCC GCC TAC GGG AGG CAG CAG	Muyzer และคณะ 1993
520R	ACC GCG GCT GCT GGC	Muyzer และคณะ 1993
M13F (-20)*	GTA AAA CGA CGG CCA GT	Muyzer และคณะ 1993

หมายเหตุ

* เป็นไพร์เมอร์ที่ใช้ในการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากโคลน DGGE

ตารางที่ 3.3 ไพร์เมอร์ที่ใช้วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA จากเชื้อสายพันธุ์บริสุทธิ์

ไพร์เมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์ (5'-3')	เอกสารอ้างอิง
27F	AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG	Gurtler และ Stanisich, 1996
1492R	TAC GGT TAC CTT GTT ACG ACT T	Gurtler และ Stanisich, 1996
350F	TAC GGG AGG CAG CAG	ดัดแปลงจาก Muyzer และคณะ 1993
1100R	AGG GTT GCG CTC GTT G	Vishnivetskaya และ Kathariou 2005

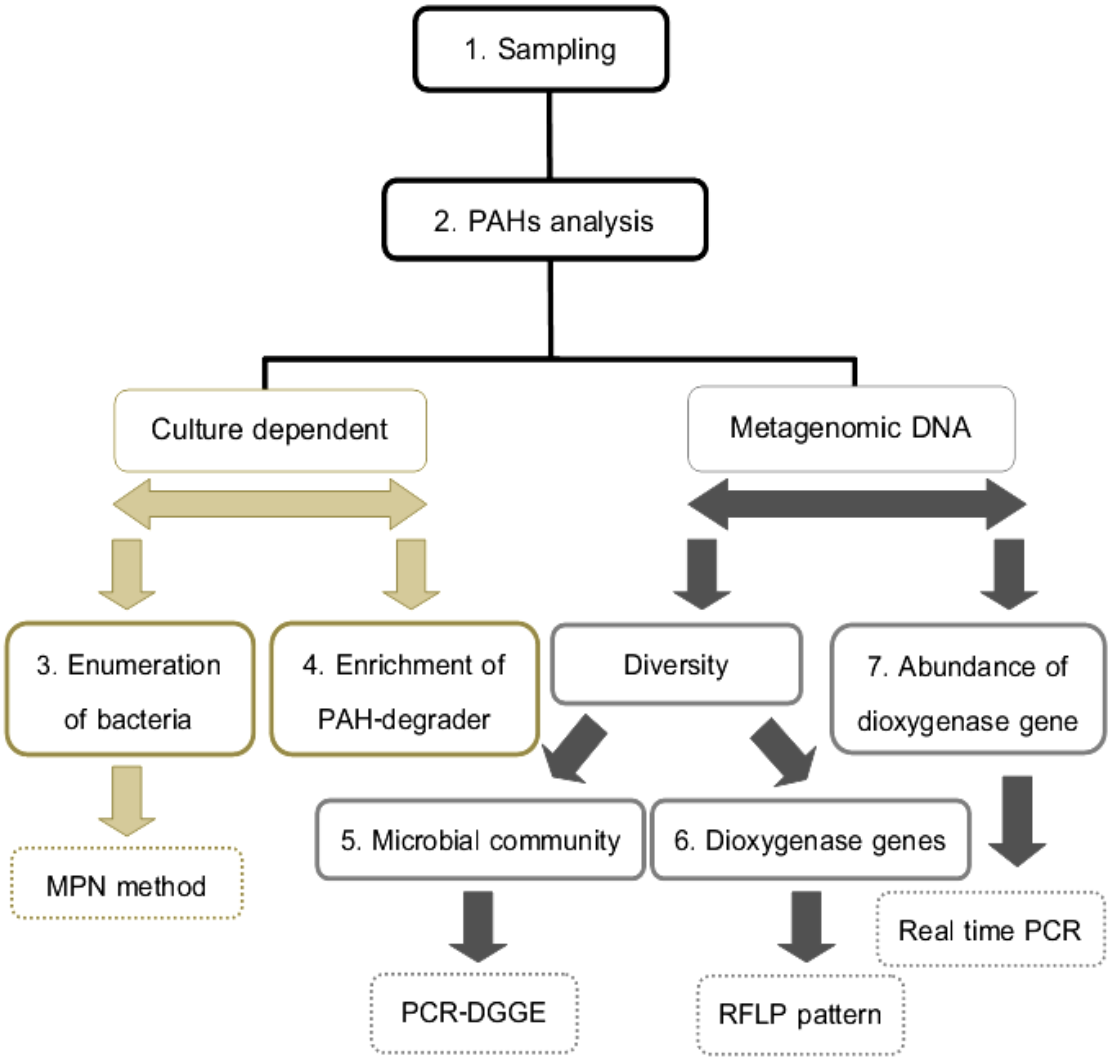
ตารางที่ 3.4 คู่ไพร์เมอร์ที่ใช้เพิ่มจำนวนดีเอ็นเอบริเวณยีน dox_{GN} และ dox_{GP}

ไพร์เมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์ (5'-3')	ดีเอ็นเอเป้าหมาย	ขนาดที่คาดหวัง (bp)	เอกสารอ้างอิง
GNF 610	GAG ATG CAT ACC ACG TKG GTT GGA	dox_{GN}	306	Cebron และคณะ 2008
GNR 916	AGC TGT TGT TCG GGA AGA YWG TGC MGT T			
GPF 641	CGG CGC CGA CAA YTT YGT NGG	dox_{GP}	292	Cebron และคณะ 2008
GPR 933	GGG GAA CAC GGT GCC RTG DAT RAA			

ตารางที่ 3.5 คู่ไพร์เมอร์ที่ใช้เพิ่มจำนวนดีเอ็นเอบริเวณยีน 16S rDNA ของแบคทีเรียและใช้เพิ่มจำนวนดีเอ็นเอบริเวณยีน dox_{GN} ในการทำ Quantitative Real-time PCR

ไพร์เมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์ (5'-3')*	ดีเอ็นเอเป้าหมาย	ขนาดที่คาดหวัง (bp)	เอกสารอ้างอิง
1401F	CGG TGT GTA CAA GAC CC	16S rDNA	433	Felske และคณะ 1998
968R	AAC GCG AAG AAC CTT AC			
GNF 610	GAG ATG CAT ACC ACG TKG GTT GGA	dox_{GN}	306	Cebron และคณะ 2008
GNR 916	AGC TGT TGT TCG GGA AGA YWG TGC MGT T			

วิธีดำเนินงานวิจัย



รูปที่ 3.1 แผนภาพแสดงขั้นตอนการดำเนินงานวิจัย

3.1 เก็บตัวอย่างดิน ดินตะกอน และน้ำทะเล

เก็บตัวอย่างดิน ดินตะกอน และน้ำทะเลจากบริเวณที่คาดว่ามีการปนเปื้อนของสารประกอบ PAHs เช่น บริเวณท่าเรือ อู่จอดเรือ และบริเวณชายฝั่งรอบเขตชุมชน จำนวน 34 ตัวอย่าง ประกอบด้วยตัวอย่างดินจำนวน 10 ตัวอย่าง ตัวอย่างน้ำทะเลจำนวน 4 ตัวอย่าง และตัวอย่างดินตะกอนจำนวน 20 ตัวอย่าง โดยการเก็บตัวอย่างดินเก็บลึกจากบริเวณผิวดิน ประมาณ 1-5 เซนติเมตร ตัวอย่างดินตะกอนเก็บจากบริเวณผิวดินใต้ทะเล และตัวอย่างน้ำทะเลเก็บลึกจากบริเวณผิวน้ำประมาณ 10-30 เซนติเมตร บันทึกวันที่เก็บ บริเวณที่เก็บ และจุดเก็บตัวอย่าง ดังแสดงในตารางที่ 3.6 และรูปที่ 3.2 และ 3.3 จากนั้นนำตัวอย่างทั้งหมดเก็บในภาชนะที่สะอาด ปิดให้มิดชิด และเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสจนกว่าจะนำมาทำการทดลอง

ตารางที่ 3.6 วันที่เก็บตัวอย่าง และบริเวณที่เก็บตัวอย่างดิน ดินตะกอน และน้ำทะเล

ตัวอย่างดิน	วันที่เก็บตัวอย่าง	บริเวณที่เก็บตัวอย่าง
A	12/11/2010	ท่าวังแถบพระจุฑาธุชราชฐาน
B		
C		
D		ที่จอดเรือท่าล่าง (ท่าเทววงษ์)
E		สถานีตำรวจใกล้ท่าล่าง
F	13/02/2011	หน้าหาดถ้ำพัง
G		หาดทรายแก้วใกล้สถานีขนถ่ายน้ำมันและสินค้า
H		ท่าวังแถบเรือนผ่องศรี
I		หน้าสถานีตำรวจน้ำ
J		ท่าเรือท่าบน (ท่าภาณุรังสี) และรอบชายฝั่งเขตชุมชนที่อยู่อาศัย
ตัวอย่างน้ำทะเล	วันที่เก็บตัวอย่าง	บริเวณที่เก็บตัวอย่าง
W1	19/06/2011	ท่าวังแถบสะพานอัษฎางค์
W2		ที่จอดเรือท่าบน
W3		ที่จอดเรือท่าล่าง
W4		หน้าหาดถ้ำพัง

ตัวอย่างดินตะกอน*	วันที่เก็บตัวอย่าง	บริเวณที่เก็บตัวอย่าง ละติจูด (Lat N) และ ลองจิจูด (Long E)
B1	07/04/2011	ทิศเหนือของเกาะสีชัง (13.191 Lat N และ 100.790 Long E)
B2		ทิศเหนือของเกาะสีชัง (13.191 Lat N และ 100.836 Long E)
B3		ทิศตะวันออกเฉียงเหนือของเกาะสีชัง บริเวณกลางร่องน้ำ (13.190 Lat N และ 100.860 Long E)
B5		ทิศตะวันตกของเกาะสีชัง บริเวณหน้าถ้ำพัง (13.146 Lat N และ 100.789 Long E)
B6		ทิศตะวันออกของเกาะสีชัง บริเวณหน้าท่าเรือสีชังทอง (13.146 Lat N และ 100.835 Long E)
B7		ทิศตะวันออกของเกาะสีชัง บริเวณกลางร่องน้ำ (13.145 Lat N และ 100.881 Long E)
B9		ทิศตะวันตกเฉียงใต้ของเกาะสีชัง บริเวณใต้เกาะค้างคาว (13.100 Lat N และ 100.789 Long E)
B10		ทิศตะวันตกเฉียงใต้ของเกาะสีชัง บริเวณใต้เกาะค้างคาว (13.099 Lat N และ 100.835 Long E)
B11		เขาบ่อยา บริเวณท่าเรือปตท. (13.100 Lat N และ 100.881 Long E)

ตัวอย่างดินตะกอน*	วันที่เก็บตัวอย่าง	บริเวณที่เก็บตัวอย่าง ละติจูด (Lat N) และลองจิจูด (Long E)
1	11/08/2011	หน้าบางพระ (13°11'26.05''N และ 100°54'53.68''E)
2		ทิศตะวันออกเฉียงเหนือของเกาะสีชัง บริเวณกลางร่องน้ำ (13°11'27.59''N และ 100°52'56.44''E)
3		กลางร่องน้ำท่าเรือศรีราชา (13°11'24.54''N และ 100°51'32.75''E)
4		ทิศเหนือของเกาะสีชัง (13°11'27.59''N และ 100°50'10.41''E)
5		ทิศเหนือฝั่งตะวันตกของเกาะสีชัง (13°11'20.03''N และ 100°48'42.87''E)
6		ท่าบน (13°10'1.07''N และ 100°48'44.40''E)
7		ทิศตะวันออกของเกาะสีชัง บริเวณหน้าท่าเรือสีชังทอง (13°9'20.10''N และ 100°50'10.42''E)
8		ทิศตะวันออกของเกาะสีชัง บริเวณกลางร่องน้ำ (13°10'4.26''N และ 100°50'10.42''E)
9		กลางร่องน้ำหน้าเกาะสีชัง-ศรีราชา (13°10'4.26''N และ 100°51'36.32''E)
10		กลางร่องน้ำหน้าเกาะสีชัง-ศรีราชา (13°10'4.26''N และ 100°52'56.44''E)
11		ท่าเรือสวนสาธารณะศรีราชา (13°10'12.50''N และ 100°54'53.41''E)

หมายเหตุ

* คือได้รับความอนุเคราะห์ตัวอย่างจาก รศ.ดร.กัลยา วัฒยากร ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โดยชื่อของตัวอย่างแทนชื่อสถานีที่เก็บตัวอย่าง

รูปที่ 3.2 จุดเก็บตัวอย่างดิน และตัวอย่างน้ำทะเลจำนวน 14 จุดรอบเกาะสีชัง

ที่มา: Google Earth program

รูปที่ 3.3 จุดเก็บตัวอย่างดินตะกอนจำนวน 20 จุดรอบเกาะสีชัง

ที่มา: Google Earth program

3.2 สกัด และวิเคราะห์ปริมาณฟีแนนทรีนหรือไพรีนในตัวอย่าง

3.2.1 สกัดฟีแนนทรีน หรือไพรีนจากแหล่งตัวอย่าง

สกัดฟีแนนทรีน หรือไพรีนจากแหล่งตัวอย่างโดยใช้ดิน 4 กรัม หรือน้ำทะเล ปริมาตร 10 มิลลิลิตร สกัดด้วยตัวทำละลาย *n*-hexane ปริมาตร 8 มิลลิลิตร และ 10 มิลลิลิตร ตามลำดับ (ดัดแปลงจาก Luepromchai และคณะ, 2007) ทำซ้ำตัวอย่างละ 3 ซ้ำ จากนั้นเติม 15% Triton X-100 ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ลงในตัวอย่างดินเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการสกัดสารประกอบ PAHs ที่ถูกดูดซับในอนุภาคดิน ผสมสารทั้งหมดให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมสาร และเขย่าด้วยความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที นาน 24 ชั่วโมง จากนั้นนำไปแช่เยือกแข็งที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง นำออกมาตั้งทิ้งไว้ให้สารละลายแยกชั้นและเติม Anhydrous Na_2SO_4 ที่ผ่านการอบข้ามคืน และทิ้งไว้ให้เย็น เพื่อกำจัดชั้นน้ำออกจากส่วน *n*-hexane นำชั้น *n*-hexane ที่ได้กรองผ่านหัวกรอง PTFE ขนาด 0.20 ไมโครเมตร และวิเคราะห์หาปริมาณการปนเปื้อนของฟีแนนทรีนหรือไพรีนในแหล่งตัวอย่างโดยใช้เครื่องแก๊สโครมาโตกราฟี (Gas chromatography, GC) และเปรียบเทียบความเข้มข้นกับกราฟมาตรฐานฟีแนนทรีนหรือไพรีน

3.2.2 วิธีการเตรียมกราฟมาตรฐานฟีแนนทรีนหรือไพรีน

เตรียมกราฟมาตรฐานฟีแนนทรีนหรือไพรีน โดยนำฟีแนนทรีนหรือไพรีนละลายในตัวทำละลาย *n*-hexane ความเข้มข้นต่าง ๆ คือ 50 100 150 200 250 และ 300 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยทำซ้ำตัวอย่างละ 3 ซ้ำ จากนั้นนำไปวิเคราะห์หาปริมาณฟีแนนทรีน หรือไพรีนโดยใช้เครื่องแก๊สโครมาโตกราฟี และนำค่าพื้นที่ใต้กราฟ (Peak area) ที่ได้ไปสร้างกราฟมาตรฐาน (ภาคผนวก ค. 1 และ ค. 2)

3.2.3 วิเคราะห์ปริมาณฟีแนนทรีน หรือไพรีนจากตัวอย่าง

วิเคราะห์ปริมาณฟีแนนทรีนหรือไพรีนจากตัวอย่างด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟี รุ่น 6890 N (บริษัท Agilent Technologies, USA) คอลัมน์ชนิด HP-5 ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 320 ไมโครเมตร ยาว 30 เมตร ในคอลัมน์เคลือบด้วยเฟนนิลเมธิลไซโลเซน ความเข้มข้น 5% หนา 0.25 ไมโครเมตร มีเครื่องตรวจจับสัญญาณชนิด Flame Ionization Detector (FID) การวิเคราะห์ใช้ปริมาณสารละลายตัวอย่างครั้งละ 1 ไมโครลิตร

วิเคราะห์ภายใต้สภาวะดังนี้ คือ

อุณหภูมิเริ่มต้น 80 °ซ

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

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

อุณหภูมิขั้นที่ 2 40 °ซ ต่อนาที จนอุณหภูมิ 300 °ซ hold 7 นาที

โดยใช้แก๊สฮีเลียมเป็นแก๊สตัวพาไหลด้วยอัตราเร็ว 1.7 มิลลิลิตรต่อนาที

3.3 วิเคราะห์ความอุดมสมบูรณ์ของแบคทีเรียทั้งหมด และแบคทีเรียย่อยสลาย PAHs โดยวิธีการเพาะเลี้ยง

3.3.1 วิเคราะห์ความอุดมสมบูรณ์ของแบคทีเรียทั้งหมด

วิเคราะห์หาจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดในแหล่งตัวอย่างด้วยวิธี MPN โดยชั่งตัวอย่างดิน 1 กรัม หรือน้ำทะเลปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลองที่บรรจุอาหารเหลว MB (Marine broth) ปริมาตร 9 มิลลิลิตร (เจือจาง 10 เท่า) ที่เติม nystatin เพื่อยับยั้งการเจริญของเชื้อรา (ภาคผนวก ข) จากนั้นเจือจางเชื้อใน 96-well plate โดยใส่อาหารเหลว MB ปริมาตร 180 ไมโครลิตร ลงทุกหลุมก่อน และนำสารแขวนลอยเซลล์ที่ผ่านการเจือจาง 10 เท่า ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันกับอาหารเหลว MB ในแถวแรก (เจือจาง 100 เท่า) เจือจางตัวอย่างด้วยวิธีเดิมไปยังแต่ละหลุมของ 96-well plate ได้ค่าการเจือจางทั้งหมด 7 ค่า ทำซ้ำตัวอย่างละ 3 ซ้ำ ซึ่งแถวที่แปดใช้เป็นชุดควบคุม บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง วัดความขุ่นที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตรด้วยเครื่องวัดความขุ่นสำหรับไมโครเพลท นำผลการทดลองที่ได้เปรียบเทียบกับตาราง MPN (3-tube MPN Table) เพื่อคำนวณหาจำนวนแบคทีเรีย และวิเคราะห์ความแปรปรวนและเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยจำนวนแบคทีเรียที่ได้ ด้วยวิธี ANOVA และ Tukey HSD ตามลำดับที่ระดับความเชื่อมั่น 99% ($p < 0.01$) ด้วยโปรแกรม SPSS Statistics version 17.0

3.3.2 วิเคราะห์ความอุดมสมบูรณ์ของแบคทีเรียย่อยสลายฟีแนนทรีน หรือไพรีน

วิเคราะห์หาจำนวนแบคทีเรียย่อยสลายฟีแนนทรีน หรือไพรีนในแหล่งตัวอย่างด้วยวิธี MPN โดยชั่งตัวอย่างดิน 1 กรัม หรือน้ำทะเลปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลองที่บรรจุอาหารเหลว NSW (Nutrient Sea Water) ซึ่งดัดแปลงจากวิธีของ Johnsen และคณะ (2002) ปริมาตร 9 มิลลิลิตร (เจือจาง 10 เท่า) ที่เติม nystatin เพื่อยับยั้งการเจริญของเชื้อรา (ภาคผนวก ข) โดยเติมสารละลายฟีแนนทรีน หรือไพรีนที่ละลายใน *n*-hexane ให้มีความเข้มข้น

สุดท้ายเท่ากับ 100 มิลลิกรัมต่อลิตรลงทุกหลุมก่อน จากนั้นรอให้ *n*-hexane ระเหย จึงเติมอาหารเหลว NSW ปริมาตร 180 ไมโครลิตร ลงทุกหลุม จากนั้นนำสารแขวนลอยเซลล์ที่ผ่านการเจือจาง 10 เท่า ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันกับอาหารเหลว NSW ในแถวแรก (เจือจาง 100 เท่า) เจือจางตัวอย่างด้วยวิธีเดิมไปยังแต่ละหลุมของ 96-well plate ได้ค่าการเจือจางทั้งหมด 7 ค่า ทำซ้ำตัวอย่างละ 3 ซ้ำ ซึ่งแถวที่แปดใช้เป็นชุดควบคุม บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในที่มืด นาน 7 วัน วิเคราะห์ผลโดยเติมสารละลาย Iodonitrotetrazolium chloride (INT dye) ปลอดเชื้อความเข้มข้น 3 กรัมต่อลิตรน้ำกลั่น (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ลงในไมโครเพลทแต่ละหลุม ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที นาน 5 ชั่วโมง สังเกตตะกอนสีส้มหรือสีชมพูของสารฟอร์มาซาน (formazan) ที่ได้จากการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของ INT ซึ่งแสดงผลทดสอบเป็นบวก นำผลการทดลองที่ได้เปรียบเทียบกับตาราง MPN (3-tube MPN Table) เพื่อคำนวณหาจำนวนแบคทีเรีย และวิเคราะห์ความแปรปรวนและเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยจำนวนแบคทีเรียที่ได้ ด้วยวิธี ANOVA และ Tukey HSD ตามลำดับ ที่ระดับความเชื่อมั่น 99% ($p < 0.01$) ด้วยโปรแกรม SPSS Statistics version 17.0

3.4 คัดแยกและจำแนกชนิดของแบคทีเรียย่อยสลายฟีแนนทรีน หรือไพรีน

3.4.1 เพิ่มจำนวนแบคทีเรียย่อยสลายฟีแนนทรีน หรือไพรีน

เพิ่มจำนวนแบคทีเรียย่อยสลายฟีแนนทรีนหรือไพรีน (enrichment) ในแหล่งตัวอย่าง โดยชั่งดิน 5 กรัม หรือน้ำทะเลปริมาตร 5 มิลลิลิตร ใส่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่บรรจุอาหารเหลว NSW ปริมาตร 45 มิลลิลิตร ซึ่งดัดแปลงจากวิธีของ Higashihara และคณะ (1978) (ภาคผนวก ก) โดยใส่สารสกัดจากยีสต์ (yeast extract) ลงไปในอาหารในปริมาณน้อยคือ 0.5% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร เพื่อช่วยเพิ่มการเจริญเติบโตของเชื้อโดยที่เชื้อยังคงความสามารถในการใช้สารพิษเป็นแหล่งอาหารและพลังงานได้ (Higashihara และคณะ, 1978) และใช้น้ำทะเลเข้มข้นที่มีค่าความเค็ม 17% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร โดยใช้ปริมาตร 200 มิลลิลิตร และเติมน้ำกลั่นปริมาตร 800 มิลลิลิตรจะได้ค่าความเค็มเท่ากับค่าความเค็มในน้ำทะเลประเทศไทยคือ 3.4 % โดยน้ำหนักต่อปริมาตร นำไปเขย่าบนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง เมื่อครบเวลาตั้งทิ้งให้ตกตะกอน ดูดส่วนน้ำใสปริมาตร 5 มิลลิลิตร เติมลงในขวดรูปชมพู่ที่บรรจุอาหาร NSW และเติมฟีแนนทรีน หรือไพรีนที่ละลายในไดเมธิลฟอร์มาไมด์ ความเข้มข้นสุดท้ายในอาหารเท่ากับ 100 มิลลิกรัมต่อลิตร (ภาคผนวก ข) นำไปเขย่าบนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง และสังเกตการเจริญเติบโตของเชื้อ โดยดูจากการ

เปลี่ยนแปลงความขุ่นและสีของอาหาร เมื่อเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่ได้เติมส่วนน้ำใส เมื่อพบการเปลี่ยนแปลงดังกล่าวจึงถ่ายเชื้อลงสู่อาหารเหลวขวดใหม่ และทำเช่นนี้อีก 3-5 ครั้ง เพื่อเพิ่มจำนวนแบคทีเรียย่อยสลาย PAHs

3.4.2 **คัดแยกแบคทีเรียย่อยสลายฟีแนนทรีน หรือไพรีนสายพันธุ์บริสุทธิ์**

ถ่ายอาหารเหลวที่พบการเปลี่ยนแปลงสีจากข้อ 3.4.1 ปริมาตร 100 ไมโครลิตร เกลี่ยลงบนผิวหน้าอาหารแข็ง NSW และพ่นทับด้วยฟีแนนทรีนหรือไพรีนเข้มข้น 2% โดยน้ำหนักต่อปริมาตรที่สารละลายในไดเอทิลอีเทอร์ และบ่มเชื้อที่ตู้บ่มอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส จนกว่าจะสังเกตเห็นโคโลนีของเชื้อและบริเวณใสโดยรอบโคโลนี จากนั้นนำโคโลนีของเชื้อที่สร้างบริเวณใสขีดบนอาหารแข็ง MA เจือจาง 4 เท่า (ภาคผนวก ก) ที่ผสมฟีแนนทรีนหรือไพรีนความเข้มข้นสุดท้ายในอาหารเท่ากับ 100 มิลลิกรัมต่อลิตร บ่มเชื้อที่ตู้บ่มอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 2 ถึง 3 วันทำเช่นนี้จนกระทั่งได้เชื้อสายพันธุ์บริสุทธิ์ และยืนยันการย่อยสลายสารประกอบ PAHs เบื้องต้น โดยนำเชื้อสายพันธุ์บริสุทธิ์เลี้ยงในอาหารเหลว NSW ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ที่เติมไพรีนหรือฟีแนนทรีน ที่ละลายในไดเมธิลฟอร์มาไมด์ความเข้มข้นสุดท้ายในอาหารเท่ากับ 100 มิลลิกรัมต่อลิตร นำไปเขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง สังเกตการเจริญเติบโตของเชื้อโดยดูจากการเปลี่ยนแปลงความขุ่นและสีของอาหารเมื่อเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่มีเชื้อ

3.4.3 **จำแนกชนิดแบคทีเรียย่อยสลายฟีแนนทรีน หรือไพรีน**

3.4.3.1 **ลักษณะสัณฐานวิทยา**

นำแบคทีเรียสายพันธุ์บริสุทธิ์ที่คัดแยกได้ศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาจากโคโลนีที่เจริญบนอาหารแข็ง MA และลักษณะการย้อมติดสีแกรมของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์

3.4.3.2 **วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีน** 16S rDNA

3.4.3.2.1 **สกัดดีเอ็นเอจากแบคทีเรียสายพันธุ์บริสุทธิ์**

สกัดดีเอ็นเอจากแบคทีเรียสายพันธุ์บริสุทธิ์ดัดแปลงตามวิธีการของ Ausalbel และคณะ (1999) โดยเขี่ยโคโลนีเดี่ยวของเชื้อลงในอาหารเหลว NSW ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ที่เติมฟีแนนทรีน หรือไพรีนที่ละลายในไดเมธิลฟอร์มาไมด์ความเข้มข้นสุดท้ายในอาหารเท่ากับ 100 มิลลิกรัมต่อลิตร จนกระทั่งมีการเปลี่ยนแปลงสีอาหาร จากนั้นถ่ายเชื้อปริมาตร 3 มิลลิลิตรลงหลอดทดลองไมโครฟิวส์ โดยถ่ายครั้งละ 1.5 มิลลิลิตรจำนวน 2 ครั้งแต่ละครั้งจะนำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกเซลล์แบคทีเรียด้วยความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที

กระจายตะกอนเซลล์ในบัฟเฟอร์ TE (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 517 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องปั่นผสม เติมสารละลายไลโซไซม์ความเข้มข้น 60 มิลลิกรัมต่อลิตร (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยการกลับหลอดไปมาเบา ๆ และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง จากนั้นเติมสารละลายโซเดียมโดเดซิลซัลเฟต (Sodium dodecyl sulfate, SDS), ความเข้มข้น 10% (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 30 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยการกลับหลอดไปมาเบา ๆ และเติมโปรตีนเนสเค (Proteinase K) ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยการกลับหลอดไปมาเบา ๆ และบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง เติมสารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 5 โมลาร์ (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 120 ไมโครลิตร ผสมด้วยการกลับหลอดไปมาเบา ๆ และเติมสารละลาย CTAB/NaCl (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 220 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที จากนั้นเติมคลอโรฟอร์มในปริมาตรที่เท่ากับปริมาตรของสารละลายสุดท้าย และปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที สารละลายดังกล่าวจะถูกแยกเป็นสองส่วน แบ่งสารละลายใสส่วนบนใส่หลอดไมโครเซนตริฟิวจ์หลอดใหม่และเติมฟีนอล/คลอโรฟอร์ม (ภาคผนวก ข) ในปริมาตรที่เท่ากับปริมาตรของสารละลายสุดท้าย ปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที และแบ่งสารละลายใสส่วนบนใส่หลอดไมโครเซนตริฟิวจ์หลอดใหม่และเติมไอโซโพรพานอล ปริมาตร 0.6 เท่าของปริมาตรของสารละลายสุดท้าย ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องหมุนผสมกลับไปมาอย่างช้า ๆ จนปรากฏสายดีเอ็นเอ นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที เทส่วนใสทิ้ง และล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วยเอทานอล 70 % (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 450 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที จากนั้นเทส่วนน้ำใสทิ้ง ระเหยเอทานอลออกจากตะกอนดีเอ็นเอจนแห้ง และแขวนลอยตะกอนดีเอ็นเอด้วยบัฟเฟอร์ TE ปริมาตร 50 ไมโครลิตร และเติมสารละลายไรโบนิวคลีเอสเอ (RNase A) ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 0.2 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง เก็บสารแขวนลอยดีเอ็นเอที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาใช้ในการทดลอง

3.4.3.2.2 **ตรวจสอบดีเอ็นเอโดยวิธีอะกาโรสเจลอีเลคโทรโฟเรซิส**

ตรวจสอบดีเอ็นเอที่สกัดได้จากข้อ 3.4.4.2.1 โดยวิธีอะกาโรสเจลอีเลคโทรโฟเรซิส เริ่มต้นจากการเตรียมอะกาโรสเจลความเข้มข้น 0.9% ที่หลอมในบัฟเฟอร์ TAE ความเข้มข้น 1 เท่า (ภาคผนวก ข) จากนั้นเทลงในแม่พิมพ์ซึ่งมีซี่หวีเสียบอยู่ ปล่อยให้อะกาโรสแข็งตัวประมาณ 30 นาที จึงวางแผ่นเจลและแม่พิมพ์ลงในแชมเบอร์ จากนั้นนำบัฟเฟอร์ TAE ความเข้มข้นเท่ากับที่ใช้หลอมเจล เทจนท่วมเจล ผสมสารละลายดีเอ็นเอกับสีติดตาม (loading dye) หยอดลงในหลุม

ในอัตราส่วน 5:1 โดยหลุมแรกหยอดดีเอ็นเอมาตรฐานชนิด Lambda HindIII ปริมาตร 2 ไมโครลิตร เพื่อใช้เป็นตัวบ่งชี้ขนาดดีเอ็นเอ จากนั้นทำเจลอีเลคโทรโฟเรซิส โดยใช้ความต่างศักย์ 100 โวลต์ จนกระทั่งสีติดตามเคลื่อนที่บนแผ่นเจลเป็นระยะทาง ที่เหมาะสมซึ่งใช้เวลาประมาณ 30 นาที จึงนำแผ่นเจลย้อมสารละลายเอธิเดียมโบรไมด์ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ภาคผนวก ข) เป็นเวลานาน 5 นาที และตรวจสอบแถบดีเอ็นเอด้วยเครื่องตรวจสอบเจล Gel documentation system รุ่น Gel DOC 2000^{TM} บริษัท Bio-Rad Laboratories Inc., USA

3.4.3.2.3 วิเคราะห์ความเข้มข้นและความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอ

นำดีเอ็นเอที่สกัดได้จากข้อ 3.4.4.2.1 วัดค่าการดูดกลืนความยาวคลื่นแสงที่ความยาวคลื่น 260 ต่อ 280 นาโนเมตร (A_{260} ต่อ A_{280}) ด้วยเครื่องวัดปริมาณสารพันธุกรรมใช้จำนวนสารปริมาณน้อย (นาโนดร็อป) ค่าอัตราส่วนความยาวคลื่นแสงของดีเอ็นเอมีค่าเท่ากับที่ 1.8 หากมีอัตราส่วนสูงกว่า 2.0 แสดงว่ามีอาร์เอ็นเอปนเปื้อน และหากมีอัตราส่วนต่ำกว่า 1.8 แสดงว่ามีโปรตีนปนเปื้อน

3.4.3.2.4 เพิ่มจำนวนดีเอ็นเอบริเวณยีน 16S rDNA ของแบคทีเรียสายพันธุ์บริสุทธิ์ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (Polymerase Chain reaction, PCR)

นำดีเอ็นเอที่สกัดได้และผ่านการตรวจวิเคราะห์ดีเอ็นเอในหัวข้อ 3.4.4.2.2 และ 3.4.4.2.3 แล้วมาเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอบริเวณยีน 16S rDNA ของแบคทีเรียด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส โดยใช้โอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพร์เมอร์คู่ 27F และ 1492R (Gurtler และ Stanisich, 1996) ซึ่งมีลำดับนิวคลีโอไทด์ดังแสดงในตารางที่ 3.3 และมีขนาดผลิตภัณฑ์พีซีอาร์เท่ากับ 1,465 bp โดยในปฏิกิริยามีความเข้มข้นสุดท้ายของสารแต่ละตัวดังต่อไปนี้ สารละลายแมกนีเซียมคลอไรด์ ($MgCl_2$) ความเข้มข้น 2 มิลลิโมลาร์ สารละลาย dNTP ความเข้มข้น 0.2 มิลลิโมลาร์ 1x *Taq* DNA polymerase ปริมาณ 2.5 หน่วย สารละลายไพร์เมอร์ ความเข้มข้น 20 พิโคโมลต่อไมโครลิตร (ไพร์เมอร์แต่ละตัว) ดีเอ็นเอที่สกัดได้จากข้อ 3.4.4.2.1 ที่ปรับความเข้มข้นของดีเอ็นเอสุดท้ายให้เท่ากับ 100 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ปรับปริมาตรน้ำด้วยน้ำปลอดประจุและปลอดเชื้อรวมส่วนผสมทั้งหมดให้มีปริมาตรสุทธิเท่ากับ 30 ไมโครลิตร ผสมสารให้เข้ากัน และดำเนินปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสด้วยเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (DNA Themo Cycle) ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมดังนี้

1) Initial denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที
2) Denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที
3) Annealing ที่อุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที
4) Extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที
5) ทำขั้นตอนที่ 2 ถึง 4 จำนวน 30 รอบ
6) Final extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 นาที

จากนั้นตรวจสอบผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นหลังเพิ่มจำนวนด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส โดยวิธีอะกาโรสเจลอีเลคโทรโฟเรซิสในอะกาโรสเจลความเข้มข้น 2% ในบัฟเฟอร์ TAE ความเข้มข้น 1 เท่า และตรวจสอบขนาดผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอด้วยดีเอ็นเอมาตรฐานชนิด 1 kilobase DNA ladder ตามวิธีที่ระบุไว้ในหัวข้อ 3.4.3.2.2 ต่อไป

3.4.3.2.5 ทำบริสุทธิ์ผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอจากการทำ PCR

ทำบริสุทธิ์ผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอที่ได้จากการทำ PCR ในหัวข้อ 3.4.4.2.4 ด้วยชุด DNA Gel/PCR Fragments Extraction Kit บริษัท Geneaid, Taiwan ตามวิธีที่ระบุไว้ในคู่มือ โดยเติมบัฟเฟอร์ DF ปริมาตร 5 เท่าของปริมาตรผลิตภัณฑ์ PCR ผสมให้เข้ากันเบา ๆ จากนั้นปิเปตสารละลายทั้งหมดลงใน DF คอลัมน์ที่ประกอบกับหลอด collection tube นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที เทส่วนน้ำใสทิ้ง จากนั้นเติมบัฟเฟอร์สำหรับล้างดีเอ็นเอ (wash buffer) ปริมาตร 600 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ 1 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที เทส่วนน้ำใสทิ้ง นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที นาน 4 นาทีเพื่อกำจัดบัฟเฟอร์สำหรับล้างดีเอ็นเอออกจนหมด นำ DF คอลัมน์ที่มีดีเอ็นเอใส่ในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์หลอดใหม่ จากนั้นเติมบัฟเฟอร์สำหรับชะดีเอ็นเอ (Elution buffer) ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 2 นาที และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที นาน 2 นาที เก็บแขวนลอยดีเอ็นเอที่ได้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการทดลองในหัวข้อต่อไป

3.4.3.2.6 วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

นำดีเอ็นเอจากหัวข้อ 3.4.4.2.5 ส่งวิเคราะห์ที่ First BASE Laboratories Sdn Bhn ประเทศมาเลเซีย ผ่านทางบริษัท Ward Medic Ltd., Part โดยบริษัทนี้ใช้ระบบ LI-COR® NEN 4200 Global IR2 DNA Sequencing และเครื่อง ABI® PRISM DNA Sequencer ในการ

อ่านลำดับนิวคลีโอไทด์ จากผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอที่บริสุทธิ์ โดยใช้ไพร์เมอร์ 27F 1492R 350F และ 1100R ซึ่งมีลำดับนิวคลีโอไทด์ดังแสดงในตารางที่ 3.3 เมื่อได้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอแล้ว เชื่อมลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้โดยใช้โปรแกรม DNA-SIS software version 2.05 (Hitachi Software Engineering Co., Ltd) และจัดจำแนกชนิดของจุลินทรีย์โดยการเปรียบเทียบกับข้อมูลในฐานข้อมูล GenBank โดยใช้โปรแกรม BLASTn (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/)

3.4.3.2.7 สร้างแผนภูมิต้นไม้แสดงความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ

สร้างแผนภูมิต้นไม้แสดงความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ โดยการนำลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีน 16S rDNA ของแบคทีเรียสายพันธุ์บริสุทธิ์ที่ผ่านการวิเคราะห์แล้ว และลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีน 16S rDNA ของแบคทีเรียในฐานข้อมูลที่ถูกคัดเลือกไว้ มาจัดเรียง (Multiple alignment) โดยใช้โปรแกรม MUSCLE (Edgar และ Robert, 2004) ในโปรแกรม MEGA5 version 5.05 (Tamura และคณะ 2011) จากนั้นนำข้อมูลที่ได้มาคำนวณระยะห่างทางพันธุกรรม (distance matrix) และสร้างแผนภูมิต้นไม้แสดงความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการโดยการวิเคราะห์ด้วยวิธี Neighbor-joining (Saitou และ Nei, 1987) และวิเคราะห์ความเชื่อมั่นของกิ่งด้วยวิธี Bootstrap (Efron, 1979) ที่ 1,000 ซ้ำ

3.4.4 การเก็บเชื้อแบคทีเรีย

เพาะเลี้ยงแบคทีเรียสายพันธุ์บริสุทธิ์ในอาหารเหลว NSW ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ที่เติมฟีแนนทรีน หรือไพรีนที่ละลายในไดเมธิลฟอร์มาไมด์ความเข้มข้นสุดท้ายในอาหารเท่ากับ 100 มิลลิกรัมต่อลิตร จนกระทั่งมีการเปลี่ยนแปลงสีอาหาร จากนั้นถ่ายเชื้อลงสู่หลอดเก็บเชื้อแช่แข็ง (Cryotube) โดยผสมเชื้อกับกลีเซอรอลในอัตราส่วน 1:1 ทำซ้ำ 5 ซ้ำต่อจำนวนเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์บริสุทธิ์ที่คัดแยกได้ และเก็บรักษาเชื้อที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส

3.4.5 ตรวจสอบยีนประมวลรหัสเอนไซม์ไดออกซิจีเนสในแบคทีเรียสายพันธุ์บริสุทธิ์ที่คัดแยกได้

นำดีเอ็นเอที่สกัดได้และผ่านการตรวจวิเคราะห์ดีเอ็นเอในหัวข้อ 3.4.4.2.2 และ 3.4.4.2.3 มาเพิ่มจำนวนยีนในกลุ่ม dox_{GN} โดยไพร์เมอร์คู่ GNF และ GNR (Cebron และคณะ, 2008) มีขนาดผลิตภัณฑ์พีซีอาร์เท่ากับ 306 bp และ dox_{GP} โดยใช้ไพร์เมอร์คู่ GPF และ GPR (Cebron และคณะ, 2008) มีขนาดผลิตภัณฑ์พีซีอาร์เท่ากับ 292 bp ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส ซึ่งมีลำดับนิวคลีโอไทด์ดังแสดงในตารางที่ 3.4 โดยในปฏิกิริยามีความเข้มข้นสุดท้ายของสารแต่ละตัวดังต่อไปนี้ สารละลายแมกนีเซียมคลอไรด์ ($MgCl_2$) ความเข้มข้น 2 มิลลิโมลาร์

สารละลาย dNTP ความเข้มข้น 0.2 มิลลิโมลาร์ 1x *Taq* DNA polymerase ปริมาณ 2.5 หน่วย สารละลายไพร์เมอร์ความเข้มข้น 20 พิโคโมลต่อไมโครลิตร (ไพร์เมอร์แต่ละตัว) ดีเอ็นเอที่สกัดได้จากข้อ 3.4.3.2.1 ที่ปรับความเข้มข้นของดีเอ็นเอสุดท้ายให้เท่ากับ 100 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำปลอดประจุและปลอดเชื้อ รวมส่วนผสมทั้งหมดให้มีปริมาตรสุทธิเท่ากับ 30 ไมโครลิตร ผสมสารให้เข้ากัน และดำเนินปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสด้วยเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (DNA Themo Cycle) โดยมีสภาวะที่เหมาะสมดังนี้

1) Initial denaturation	ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที
2) Denaturation	ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที
3) Annealing	ที่อุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที
4) Extension	ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที
5) ทำขั้นตอนที่ 2 ถึง 4	จำนวน 30 รอบ
6) Final extension	ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 นาที

จากนั้นตรวจสอบผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นหลังเพิ่มจำนวนด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส โดยวิธีอะกาโรสเจลอีเลคโทรโฟเรซิสในอะกาโรสเจลความเข้มข้น 2% ในบัฟเฟอร์ TAE ความเข้มข้น 1 เท่า และตรวจสอบขนาดผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอด้วยดีเอ็นเอมาตรฐานชนิด 100 bp DNA Ladder ตามวิธีที่ระบุไว้ในหัวข้อ 3.4.3.2.2 ต่อไป

3.5 วิเคราะห์ความหลากหลายของโครงสร้างประชาคมแบคทีเรียบริเวณเกาะสีชัง

3.5.1 สกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างสิ่งแวดล้อม

3.5.1.1 สกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างดินและดินตะกอน

สกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างดิน และดินตะกอนหนัก 1 กรัม และทำซ้ำตัวอย่างละ 3 ซ้ำต่อตัวอย่าง ด้วยชุดสกัด Fast DNA® spin kit for soil บริษัท Qbiogene, USA ตามวิธีที่ระบุไว้ในคู่มือ โดยชั่งดิน 1 กรัมใส่ในหลอด Lysing Matrix E ภายในบรรจุเม็ดบีทส์ 3 ขนาด ได้แก่เม็ดบีทส์เซรามิคขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 1.4 มิลลิเมตร เม็ดบีทส์ซิลิกาขนาด 0.1 มิลลิเมตร และเม็ดบีทส์แก้วขนาด 4 มิลลิเมตร จากนั้นเติมสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ปริมาตร 978 ไมโครลิตร และบัฟเฟอร์ MT ปริมาตร 122 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องปั่นผสมนาน 2 นาที เพิ่มเติมวิธีการจากที่ระบุไว้คู่มือเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่าง โดยการทำโฮโมจี

ไนส์ด้วยเครื่องโฮโมจิไนซ์ นาน 5 ครั้ง ครั้งละ 2 นาที ตามด้วยการเยือกแข็ง-ละลาย (freeze thaw) นาน 5 ครั้ง โดยแต่ละครั้งเยือกแข็งที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที และละลายที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที จากนั้นปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที นาน 15 นาที ปิเปตสารละลายใสส่วนบนลงหลอด catch tube และเติมสารละลาย PPS ปริมาตร 250 ไมโครลิตร ผสมโดยเครื่องหมุนผสมกลับไปมาจำนวน 10 รอบ จากนั้นปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที นาน 5 ถึง 6 นาที แบ่งส่วนน้ำใสที่ได้ใส่หลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ใหม่จากนั้นเติม Binding Matrix Suspension ในอัตราส่วน 2:1 ผสมโดยเครื่องหมุนผสมกลับไปมา นาน 2 นาที และตั้งหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 3 นาทีเพื่อให้ Binding Matrix เกาะติดอยู่กับดีเอ็นเอ จากนั้นปิเปตสารละลายใสส่วนบนปริมาตร 250 ไมโครลิตรทิ้ง และปิเปตสารละลายส่วนที่เหลือใส่ใน SPIN™ คอลัมน์ ที่มี filter นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที นาน 2 นาที ทิ้งส่วนน้ำใส และเติมสารละลาย SEWS-M ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที นาน 2 นาที และปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที นาน 4 นาทีเพื่อกำจัดสารละลายออกจนหมด นำ SPIN™ คอลัมน์ที่มีดีเอ็นเอเกาะอยู่กับ Binding Matrix ใส่หลอดไมโครเซนตริฟิวจ์หลอดใหม่ทิ้งไว้ให้แห้งที่อุณหภูมิห้องนาน 5 นาที และเติมสารละลาย DES ปริมาตร 20 ไมโครลิตร เพื่อชะดีเอ็นเอ โดยใช้ปลายทิปผสมสารละลาย DES ให้เข้ากับ Binding Matrix เบา ๆ (ระวังอย่าให้ filter แตก) จากนั้นให้ปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที นาน 2 นาที และนำดีเอ็นเอของตัวอย่างในแต่ละซ้ำมารวมกัน จากนั้นเก็บสารแขวนลอยดีเอ็นเอที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาใช้ในการทดลอง

3.5.1.2 **สกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างน้ำทะเล**

สกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างน้ำทะเล โดยใช้ปริมาตร 3 ลิตรต่อตัวอย่าง ด้วยชุดสกัด Meta-G-Nome™ DNA Isolation Kit บริษัท Epicenter, USA โดยกรองน้ำทะเลผ่าน Whatman® เส้นผ่าศูนย์กลาง 110 มิลลิเมตร ในขั้นแรกเพื่อกำจัดกากตะกอนที่ไม่ต้องการออกจากน้ำทะเล จากนั้นนำน้ำทะเลที่ผ่านการกรองขั้นต้นมากรองผ่านกระดาษกรอง Millipore Microfil® V ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.45 ไมโครเมตรเพื่อแยกเซลล์แบคทีเรียออกจากน้ำทะเลโดยแบคทีเรียดังกล่าวจะเกาะบนกระดาษกรอง จากนั้นคีมกระดาษกรองด้วยคีมคีบ ปราศจากเชื้อและตัดกระดาษกรองด้วยกรรไกรที่แช่อยู่ในเอทานอลความเข้มข้น 70% โดยตัดกระดาษกรองออกเป็นชิ้นเล็ก ๆ ใส่กระดาษกรองในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์โดยนำด้านตาข่ายที่มีแบคทีเรียเกาะติดอยู่ออกมาด้านนอก และเติมบัฟเฟอร์สำหรับล้างกระดาษกรอง Filter Wash Buffer ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ที่มี tween 20 ความเข้มข้น 2 % ปั่นผสมให้เข้าด้วยเครื่องปั่นผสม นาน 5 นาที ระหว่างการปั่นผสมพยายามให้กระดาษกรองแช่อยู่ในบัฟเฟอร์ตลอดเวลา จากนั้นปิเปตสารละลายดังกล่าวใส่หลอด

ไมโครเซนตริฟิวจ์หลอดใหม่ ปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที นาน 2 นาที ทิ้งสารละลายใส นำตะกอนที่ได้เติมบัฟเฟอร์ TE ปริมาตร 300 ไมโครลิตร สารละลาย Ready-Lyse Lysozyme Solution ปริมาตร 2 ไมโครลิตร และสารละลายไรโบนิวคลีเอสเอ (RNase A) ปริมาตร 1 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องปั่นผสม และบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที จากนั้นเติมสารละลาย Meta-Lysis Solution (2X) ปริมาตร 300 ไมโครลิตร และโปรตีเนสเค (Proteinase K) ปริมาตร 1 ไมโครลิตร ผสมให้เข้าด้วยเครื่องปั่นผสม และบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที ปล่อยให้เย็นที่อุณหภูมิห้องนาน 10 นาที และย้ายลงน้ำแข็ง 3-5 นาที จากนั้นเติมสารละลาย MPC protein precipitation reagent เพื่อตกตะกอนโปรตีน ปริมาตร 350 ไมโครลิตร ผสมให้เข้าเบา ๆ นาน 10 วินาที ปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และปิเปตสารละลายใส่หลอดไมโครเซนตริฟิวจ์หลอดใหม่ เติมไอโซโพรพานอล ปริมาตร 570 ไมโครลิตร ผสมโดยเครื่องหมุนผสมกลับไปมาเบา ๆ จนปรากฏสายดีเอ็นเอ และปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เทส่วนน้ำใสทิ้ง ล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วยเอทานอล 70% ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นเทส่วนน้ำใสทิ้ง ระเหยสารละลายออกจากจากตะกอนดีเอ็นเอจนแห้ง และแขวนลอยดีเอ็นเอด้วยบัฟเฟอร์ TE ปริมาตร 20 ไมโครลิตร เก็บดีเอ็นเอที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาใช้ในการทดลอง

3.5.2 ตรวจสอบดีเอ็นเอโดยวิธีอะกาโรสเจลอีเลคโทรโฟเรซิส

ตรวจสอบดีเอ็นเอที่สกัดได้จากข้อ 3.5.1 โดยวิธีอะกาโรสเจลอีเลคโทรโฟเรซิส ตามวิธีที่ระบุในหัวข้อ 3.4.4.2.2

3.5.3 วิเคราะห์ความเข้มข้นและความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอ

นำสารละลายดีเอ็นเอที่สกัดได้จากข้อ 3.5.1 วิเคราะห์ความเข้มข้นและความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอตามวิธีที่ระบุในหัวข้อ 3.4.4.2.3

3.5.4 กำจัดกรดฮิวมิกออกจากดีเอ็นเอตัวอย่างโดยวิธีอะกาโรสเจลอีเลคโทรโฟเรซิส และทำบริสุทธิ์ดีเอ็นเอ

กำจัดกรดฮิวมิกออกจากดีเอ็นเอตัวอย่างที่สกัดได้จากข้อ 3.5.1 ด้วยวิธีอะกาโรสเจลอีเลคโทรโฟเรซิส ตามวิธีที่ระบุในหัวข้อ 3.4.4.2.2 จากนั้นตัดเจลบนเครื่องฉายแสงอัลตราไวโอเลต บริษัท Fotodyne, USA จากบริเวณที่พบชิ้นดีเอ็นเอตามขนาดที่คาดหวังใส่หลอดไมโครเซนตริฟิวจ์เพื่อทำบริสุทธิ์ดีเอ็นอต่อไป

ทำบริสุทธิ์ดีเอ็นเอด้วยชุด DNA Gel/PCR Fragments Extraction Kit บริษัท Geneaid, Taiwan ตามวิธีที่ระบุไว้ในคู่มือ โดยเติมบัฟเฟอร์ DF ปริมาตร 500 ไมโครลิตรในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ที่มีดีเอ็นเอบนอะกาโรสเจล ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องปั่นผสม บ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส นาน 10-15 นาทีจนกว่าเจลละลาย จากนั้นตั้งทิ้งไว้ให้เย็นภายใต้อุณหภูมิห้อง และปิเปตสารละลายทั้งหมดลงใน DF คอลัมน์ที่ประกอบกับหลอด collection tube นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที เทส่วนน้ำใสทิ้ง ดีเอ็นเอที่ต้องการจะอยู่บน DF คอลัมน์ จากนั้นเติมบัฟเฟอร์ W1 (W1 buffer) ปริมาตร 400 ไมโครลิตร บน DF คอลัมน์ นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที ทิ้งส่วนน้ำใส และเติมบัฟเฟอร์สำหรับล้างดีเอ็นเอ (Wash buffer) ปริมาตร 600 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ 1 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที เทส่วนน้ำใสทิ้ง นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที นาน 4 นาทีเพื่อกำจัดบัฟเฟอร์สำหรับล้างดีเอ็นเอออกจนหมด นำ DF คอลัมน์ที่มีดีเอ็นเอใส่ในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์หลอดใหม่ จากนั้นเติมบัฟเฟอร์สำหรับชะดีเอ็นเอ (Elution buffer) ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 2 นาที และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที นาน 2 นาที นำสารแขวนลอยดีเอ็นเอที่ได้เก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาใช้ในการทดลอง

3.5.5 เพิ่มจำนวนดีเอ็นเอบริเวณยีน 16S rDNA ของแบคทีเรียโดยใช้ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (Polymerase Chain reaction, PCR)

นำดีเอ็นเอที่สกัดได้หลังผ่านการตรวจวิเคราะห์ดีเอ็นเอและกำจัดกรดฮิวมิกออกจากสารแขวนลอยดีเอ็นเอในหัวข้อ 3.5.2 ถึง 3.5.4 มาเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอบริเวณ V-3 region ของยีน 16S rDNA ของแบคทีเรียด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส โดยใช้โอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพร์เมอร์คู่ 341F และ 520R (Muyzer และคณะ, 1993) ซึ่งมีลำดับนิวคลีโอไทด์ดังแสดงในตารางที่ 3.2 และมีขนาดผลิตภัณฑ์พีซีอาร์เท่ากับ 179 bp โดยใช้ดีเอ็นเอจากข้อ 3.5.1 ที่ปรับความเข้มข้นของดีเอ็นเอสุดท้ายให้เท่ากับ 20 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร และใช้ความเข้มข้นสุดท้ายของสารแต่ละตัวรวมถึงสภาวะที่เหมาะสมดังวิธีที่ระบุไว้ในหัวข้อ 3.4.3.2.4

จากนั้นตรวจสอบผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นหลังเพิ่มจำนวนด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส ตามวิธีที่ระบุในหัวข้อ 3.4.5 และตรวจสอบขนาดผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอด้วยดีเอ็นเอมาตรฐานชนิด 100 bp DNA Ladder ตามวิธีที่ระบุไว้ในหัวข้อ 3.4.3.2.2 ต่อไป

3.5.6 วิเคราะห์โครงสร้างประชาคมแบคทีเรียโดยวิธี PCR-DGGE

3.5.6.1 เพิ่มจำนวนดีเอ็นเอบริเวณยีน 16S rDNA ของแบคทีเรียโดยใช้ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส

นำดีเอ็นเอที่สกัดได้และผ่านการตรวจวิเคราะห์ดีเอ็นเอและกำจัดกรดฮิวมิกออกจากสารแขวนลอยดีเอ็นเอในหัวข้อ 3.5.2 ถึง 3.5.4 มาเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอบริเวณ V-3 region ของยีน 16S rDNA ของแบคทีเรียด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส โดยใช้โอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพร์เมอร์คู่ 341F ที่มี GC clamp เชื่อมต่อบริเวณปลาย 5' ของไพร์เมอร์ และ 520R (Muyzer และคณะ, 1993) ซึ่งมีลำดับนิวคลีโอไทด์ดังแสดงในตารางที่ 3.2 และมีขนาดผลิตภัณฑ์พีซีอาร์เท่ากับ 179 bp โดยใช้ชุด PCR master mix (Go-Tag® Green Master Mix) บริษัท Promega, USA ในการทำปฏิกิริยามีความเข้มข้นสุดท้ายของสารแต่ละตัวดังต่อไปนี้ สารละลายไพร์เมอร์ความเข้มข้น 20 พิโคโมลต่อไมโครลิตรของไพร์เมอร์ (ไพร์เมอร์แต่ละตัว) ปริมาตร 1 ไมโครลิตร ดีเอ็นเอที่ได้จากข้อ 3.5.1 ที่ปรับความเข้มข้นของดีเอ็นเอสุดท้ายให้เท่ากับ 20 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร Go-Tag® Green Master Mix (2X) ปริมาตร 15 ไมโครลิตร จากนั้นปรับปริมาตรน้ำด้วยน้ำปราศจากนิวคลีเอส (Nuclease-Free Water) ปริมาตร 12 ไมโครลิตร ส่วนผสมทั้งหมดมีปริมาตรสุทธิเท่ากับ 30 ไมโครลิตร ผสมสารให้เข้ากัน และดำเนินปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสด้วยเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (DNA Themo Cycle) ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมดังนี้

1) Initial denaturation	ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที
2) Denaturation	ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที
3) Annealing	ที่อุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที
4) Extension	ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที
5) ทำขั้นตอนที่ 2 ถึง 4	จำนวน 30 รอบ
6) Final extension	ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

จากนั้นตรวจสอบผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นหลังเพิ่มจำนวนด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส โดยวิธีอะกาโรสเจลอีเลคโทรโฟเรซิสในอะกาโรสเจลความเข้มข้น 2% ในบัฟเฟอร์ TAE ความเข้มข้น 1 เท่า และตรวจสอบขนาดผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอด้วยดีเอ็นเอมาตรฐานชนิด 100 bp DNA Ladder ตามวิธีที่ระบุไว้ในหัวข้อ 3.4.3.2.2 ต่อไป

3.5.6.2 วิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอด้วยวิธี DGGE

วิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ดีเอ็นด้วยวิธี DGGE โดยใช้อุปกรณ์ DCode™ system บริษัท Bio-Rad Laboratories Inc., USA ในการเตรียมพอลิอะคลิราไมด์เจลเข้มข้น 8% ที่มีเกรเดียนท์ของสารละลาย denaturant 40 ถึง 80% (100% ของสารละลาย denaturant ประกอบด้วยยูเรียความเข้มข้น 7 โมลาร์ และฟอร์มาไมด์ 40%) ทำเกรเดียนท์โดยใช้ระบบจ่ายเกรเดียนท์ตามวิธีที่ระบุไว้ในคู่มือ เมื่อทำเกรเดียนท์ของสารละลาย denaturant ลงในชุดแซนวิชเตรียมเจลเรียบร้อยแล้วจึงเสียบหวีลงไประหว่างกระจกแซนวิชระวังอย่าให้มีฟองอากาศปล่อย จากนั้นปล่อยให้พอลิอะคลิราไมด์เจลแข็งตัวประมาณ 5 ชั่วโมง จึงนำชุดแซนวิชใส่ลงในแชมเบอร์ที่มีบัฟเฟอร์ TAE ความเข้นข้น 1 เท่า ปริมาตร 7 ลิตร ที่ผ่านการให้ความร้อนจนอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ผสมผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้กับสีติดตามหยอดลงในช่องวิ่ง ในปริมาตร 5:1 จากนั้นทำอีเลคโทรโฟเรซิสโดยใช้ความต่างศักย์ 130 โวลต์ ที่ 60 องศาเซลเซียส นาน 4 ชั่วโมง 15 นาที เมื่อครบเวลาตั้งกระจกแซนวิชทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง ย้อมพอลิอะคลิราไมด์เจลด้วยสารละลายเอธิเดียมโบรไมด์ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ภาคผนวก ข) เป็นเวลานาน 30 นาที ตรวจสอบแถบดีเอ็นเอด้วยเครื่องตรวจสอบเจล Gel documentation system รุ่น Gel DOC 2000™ บริษัท Bio-Rad Laboratories Inc., USA และตัดเจลบนเครื่องฉายแสงอัลตราไวโอเลต บริษัท Fotodyne, USA ใส่หลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ จากนั้นเติมน้ำกลั่นปลอดประจุและปลอดเชื้อ ปริมาตร 50 ไมโครลิตร โดยเติมให้ท่วมเจลเพื่อละลายดีเอ็นเอจากเจลให้มากที่สุด และเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 3 วัน เพื่อใช้ในการทดลองหัวข้อถัดไป

3.5.6.3 วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของแถบดีเอ็นเอเด่น

3.5.6.3.1 เพิ่มจำนวนดีเอ็นเอบริเวณยีน 16S rDNA ของแบคทีเรียโดยใช้ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส

นำดีเอ็นเอที่ได้จากหัวข้อ 3.5.6.2 มาเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอบริเวณ V-3 region ของยีน 16S rDNA ของแบคทีเรียด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส โดยใช้ไพร์เมอร์คู่ 341F ที่ไม่มี GC clamp เชื่อมต่อบริเวณปลาย 5’ ของไพร์เมอร์ และ 520R (Muyzer และคณะ, 1993) ซึ่งมีลำดับนิวคลีโอไทด์ดังแสดงในตารางที่ 3.2 โดยใช้ความเข้มข้นสุดท้ายของสารแต่ละชนิดในปฏิกิริยา ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมที่ระบุไว้ในหัวข้อ 3.4.3.2.4

จากนั้นตรวจสอบผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นหลังเพิ่มจำนวนด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส โดยวิธีอะกาโรสเจลอีเลคโทรโฟเรซิสในอะกาโรสเจลความเข้มข้น 2% ในบัฟเฟอร์

TAE ความเข้มข้น 1 เท่า และตรวจสอบขนาดผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอด้วยดีเอ็นเอมาตรฐานชนิด 100 bp DNA Ladder ตามวิธีที่ระบุไว้ในหัวข้อ 3.4.3.2.2 ต่อไป

3.5.6.3.2 ทำบริสุทธิ์ผลิตภัณฑ์ PCR เพื่อการโคลน

ทำบริสุทธิ์ผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอที่ได้จากการทำ PCR ในหัวข้อ 3.5.6.3.1 ด้วยชุด DNA Gel/PCR Fragments Extraction Kit บริษัท Geneaid, Taiwan ตามวิธีที่ระบุไว้ในหัวข้อ 3.4.4.2.5

3.5.6.3.3 โคลนชิ้นผลิตภัณฑ์ PCR

3.5.6.3.3.1 ไลเกทชิ้นผลิตภัณฑ์ PCR

ไลเกทชิ้นผลิตภัณฑ์ PCR หลังทำบริสุทธิ์ในหัวข้อ 3.5.6.3.2 เข้ากับพลาสมิดเวกเตอร์ชนิด pGEM-T Easy โดยเอนไซม์ T4 DNA ligase บริษัท Promega, USA ตามวิธีที่ระบุไว้ในคู่มือ โดยทำส่วนผสมของปฏิกิริยา (ปริมาตรสุทธิ 10 ไมโครลิตร) ดังนี้

ไลเกชันบัฟเฟอร์ (2X)	ปริมาตร 5 ไมโครลิตร
พลาสมิดเวกเตอร์ pGEM-T Easy (50 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร)	ปริมาตร 1 ไมโครลิตร
ผลิตภัณฑ์ PCR (100 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร)	ปริมาตร 3 ไมโครลิตร
เอนไซม์ T4 DNA ligase (3 หน่วยต่อไมโครลิตร)	ปริมาตร 1 ไมโครลิตร

ไลเกชันทำที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 16 ถึง 18 ชั่วโมง

3.5.6.3.3.2 เตรียมคอมพีเทนต์เซลล์ *E. coli* สายพันธุ์ JM 109 และทรานฟอร์มรีคอมบิแนนท์พลาสมิดเข้าสู่คอมพีเทนต์เซลล์

เตรียมคอมพีเทนต์เซลล์ *E. coli* สายพันธุ์ JM 109 โดยวิธีแคลเซียมคลอไรด์ (Calcium chloride) (Sambrook และ Russell, 2001) โดยเพาะเลี้ยงเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ JM 109 บนอาหารแข็ง Ψb (ภาคผนวก ก) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 16 ถึง 18 ชั่วโมง จากนั้นเขี่ยโคโลนีเดี่ยวลงเลี้ยงในอาหารเหลว Ψb (ภาคผนวก ก) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร นำไปเขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จนกระทั่งวัดค่าการดูดกลืนคลื่นแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร (OD_{600}) ที่เหมาะสมมีค่าระหว่าง 0.3 ถึง 0.5 จึงใช้ในการเตรียมหัวเชื้อ ถ่ายหัวเชื้อปริมาตร 5 มิลลิลิตรไปสู่อาหารเหลว Ψb ปริมาตร 100 มิลลิลิตรใน arm flask นำไปเขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จนกระทั่งวัดค่า OD_{600} ได้ค่าเท่ากับ 0.5 จึงถ่ายเชื้อสู่หลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ขนาดใหญ่ที่ปลอดเชื้อและแช่ในอ่างน้ำแข็งนาน 5 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 3,000 รอบต่อ

นาที นาน 5 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเพื่อตกตะกอนเซลล์ ตั้งแต่ขั้นนี้เป็นต้นไปทำที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสตลอดการทดลอง หลังได้ตะกอนเซลล์ให้นำตะกอนเซลล์เติมสารละลาย TfbI (ภาคผนวก ข) ที่เย็นปริมาตร 40 มิลลิลิตร กระจายตะกอนเซลล์ให้แขวนลอยทั่วสารละลาย (ห้ามใช้เครื่องปั่นผสม) จากนั้นแช่ทิ้งไว้ในอ่างน้ำแข็งนาน 5 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เทส่วนน้ำใสทิ้ง และนำตะกอนเซลล์ที่ได้มาแขวนลอยในสารละลาย TfbII (ภาคผนวก ข) ที่เย็นปริมาตร 40 มิลลิลิตร กระจายตะกอนเซลล์แขวนลอยให้ทั่วสารละลาย จากนั้นแช่ทิ้งไว้ในอ่างน้ำแข็งนาน 15 นาที หรือมากกว่านั้น แบ่งสารละลายแขวนลอยเซลล์ใส่หลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ปลอดเชื้อปริมาตรหลอดละ 100 ไมโครลิตร นำหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ดังกล่าวปิดฝาให้แน่น บันทึกวันที่เก็บ ผู้ที่เก็บ และชื่อเชื้อที่เก็บ จากนั้นทำเยือกแข็งเซลล์อย่างรวดเร็วด้วยไนโตรเจนเหลว เพื่อรักษาประสิทธิภาพของคอมพีเทนต์เซลล์ไว้มากที่สุด เก็บรักษาเชื้อที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาใช้งาน

ทรานฟอร์มรีคอมบิแนนท์พลาสมิดเข้าสู่คอมพีเทนต์เซลล์ *E. coli* สายพันธุ์ JM 109 โดยวิธี heat shock (Sambrook และ Russell, 2001) ทำโดยนำคอมพีเทนต์เซลล์ ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียสมาละลายอย่างช้า ๆ ในอ่างน้ำแข็ง เมื่อคอมพีเทนต์เซลล์ละลายจนหมดจึงใส่รีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่ไลเกทไว้แล้วจากหัวข้อ 3.5.6.3.3.1 ลงไปปริมาตร 3 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันเบา ๆ (ห้ามใช้เครื่องปั่นผสม) จากนั้นบ่มในอ่างน้ำแข็งนาน 20 นาที และ heat shock ที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส นาน 45 ถึง 50 วินาที เมื่อครบเวลานำไปแช่ในน้ำแข็งทันทีเป็นเวลา 2 นาที จากนั้นจึงเติมอาหารเหลว SOC (ภาคผนวก ก) ปริมาตร 950 ไมโครลิตรลงไปในหลอดบรรจุเชื้อ และบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลาอย่างน้อย 1 ชั่วโมง

3.5.6.3.3.3 **คัดเลือกทรานฟอร์มแมนท์** (transformant)

คัดเลือกทรานฟอร์มแมนท์ที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่ต้องการโดยวิธี Blue/White colony (Sambrook และ Russell, 2001) โดยปิเปตสารละลายแขวนลอยเซลล์ที่มีการเพิ่มจำนวนเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ JM 109 ที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิดจากหัวข้อ 3.5.6.3.3.2 ปริมาตร 100 ไมโครลิตร เกลี่ยเชื้อลงบนผิวหน้าอาหารแข็ง LB ที่ผสมสารปฏิชีวนะแอมพิซิลลิน X-gal (5-Bromo-4-Chloro-3-indolyl-ß-D-galactoside) และ IPTG (Isopropyl thio-ß-D-galactoside) (ภาคผนวก ข) ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร 2 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ 100 ไมโครโมล่าร์ตามลำดับ เก็บรักษาอาหารไว้ในที่มืด และปราศจากแสง หลังเกลี่ยเชื้อแล้วจึงบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ถึง 18 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาจึงเก็บเชื้อไว้ในที่มืดในตู้เย็นนาน 1 คืน เพื่อให้เกิดความแน่ใจในการคัดเลือกทรานฟอร์มแมนท์ที่มี

รีคอมบิแนนท์พลาสมิดตามที่ต้องการ (โคโลนีสีขาว) หรือไม่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิดตามที่ต้องการ (โคโลนีสีฟ้า)

3.5.6.3.3.4 สกัดรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pGEM-T Easy

สกัดรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่คัดเลือกจากหัวข้อ 3.5.6.3.3.3 ด้วยชุดสกัดพลาสมิด High speed Plasmid Mini Kit บริษัท Geneaid, Taiwan โดยนำเพาะเลี้ยงรีคอมบิแนนท์พลาสมิดในอาหารเหลว LB ที่ผสมสารปฏิชีวนะแอมพิซิลลิน (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร บ่มเชื้อบนเครื่องเขย่าอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 16 ถึง 18 ชั่วโมง ปั่นเก็บตะกอนเซลล์จากอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาตร 3 มิลลิลิตรในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ปลอดเชื้อด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นเติมบัฟเฟอร์ PD1 (PD1 buffer) ที่เติมสารละลายไรโบนิวคลีเอสเอ (RNase A) เรียบร้อยแล้ว ปริมาตร 200 ไมโครลิตร กระจายตะกอนเซลล์ให้ทั่วสารละลายด้วยเครื่องปั่นผสม จากนั้นเติมบัฟเฟอร์ PD2 (PD2 buffer) ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยการกลับหลอดไปมา 10 ครั้ง (ไม่ควรผสมด้วยเครื่องเขย่าผสมเพราะอาจทำให้เกิดการแตกของดีเอ็นเอ) และเติมบัฟเฟอร์ PD3 (PD3 buffer) ปริมาตร 300 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยการกลับหลอดไปมา 10 ครั้ง จากนั้นปั่นเหวี่ยงความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที นาน 3 นาที ที่อุณหภูมิห้อง ปิเปตสารละลายทั้งหมดใส่ PD คอลัมน์ที่ประกอบกับหลอด collection tube และปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที ที่อุณหภูมิห้อง เทส่วนน้ำใสทิ้ง พลาสมิดดีเอ็นเอที่ต้องการจะอยู่บนแผ่นกรองของ PD คอลัมน์ จากนั้นเติมบัฟเฟอร์ W1 (W1 buffer) ปริมาตร 400 ไมโครลิตร บน DF คอลัมน์ นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที ทิ้งส่วนน้ำใส และเติมบัฟเฟอร์สำหรับล้างดีเอ็นเอ (Wash buffer) ปริมาตร 600 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ 1 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที เทส่วนน้ำใสทิ้ง นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที นาน 4 นาทีเพื่อกำจัดบัฟเฟอร์สำหรับล้างดีเอ็นเอออกจนหมด นำ PD คอลัมน์ที่มีพลาสมิดดีเอ็นเอใส่ในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์หลอดใหม่ จากนั้นเติมบัฟเฟอร์สำหรับชะดีเอ็นเอ (Elution buffer) ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 2 นาที และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที นาน 2 นาที เก็บสารแขวนลอยดีเอ็นเอที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการทดลองในหัวข้อต่อไป

3.5.6.3.3.5 ตัดรีคอมบิแนนท์พลาสมิดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

ตรวจสอบชิ้นดีเอ็นเอแทรกสอดภายในรีคอมบิแนนท์พลาสมิด โดยตัดรีคอมบิแนนท์พลาสมิดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI บริษัท Difco, USA ตามวิธีที่ระบุไว้ในคู่มือ โดยทำส่วนผสมของปฏิกิริยา (ปริมาตรสุทธิ 10 ไมโครลิตร) ดังนี้

น้ำปลอดประจุปลอดเชื้อ	ปริมาตร 7 ไมโครลิตร
รีคอมบิแนนท์พลาสมิด pGEM-T Easy	ปริมาตร 1 ไมโครลิตร
บัฟเฟอร์ (10X)	ปริมาตร 1 ไมโครลิตร
เอนไซม์ตัดจำเพาะ (12 หน่วยต่อไมโครลิตร)	ปริมาตร 1 ไมโครลิตร

ผสมสารชนิดต่าง ๆ ให้เข้ากัน และบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลานำส่วนผสมที่ได้จากปฏิกิริยาผสมกับสีติดตามในอัตราส่วน 5:1 และตรวจสอบชิ้นดีเอ็นเอแทรกสอดภายในรีคอมบิแนนท์พลาสมิดโดยวิธีอะกาโรสเจลอีเลคโทรโฟเรซิสในอะกาโรสเจลความเข้มข้น 2 %ในบัฟเฟอร์ TAE ความเข้มข้น 1 เท่า และตรวจสอบขนาดผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอด้วยดีเอ็นเอมาตรฐานชนิด 1 kilobase DNA ladder ดังวิธีที่ระบุไว้ในหัวข้อ 3.4.4.2.2 ต่อไป

3.5.6.3.3.6 วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่มีชิ้นดีเอ็นเอแทรกสอดจากหัวข้อ 3.5.6.3.3.5 โดยละลายในน้ำกลั่นปลอดประจุปลอดเชื้อ และส่งวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ First BASE Laboratories Sdn Bhn ประเทศมาเลเซีย ผ่านทางบริษัท Ward Medic Ltd., Part โดยบริษัทนี้ใช้ระบบ LI-COR® NEN 4200 Global IR2 DNA Sequencing และเครื่อง ABI® PRISM DNA Sequencer ในการอ่านลำดับนิวคลีโอไทด์ และใช้ไพร์เมอร์ M13F (-20) ซึ่งมีลำดับนิวคลีโอไทด์ดังแสดงในตารางที่ 3.2 ที่จำเพาะต่อลำดับนิวคลีโอไทด์ภายในพลาสมิดเวกเตอร์ เมื่อได้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอแล้ว จัดจำแนกชนิดของจุลินทรีย์โดยเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลใน GenBank โดยใช้โปรแกรม BLASTn (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/)

3.5.6.3.3.7 สร้างแผนภูมิต้นไม้แสดงความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ

นำลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีน 16S rDNA ของรีคอมบิแนนท์โคลนที่ได้จากหัวข้อ 3.5.6.3.3.6 กับแบคทีเรียในฐานข้อมูลที่คัดเลือกไว้ และแบคทีเรียที่พบรายงานการย่อยสลายสารพิษมาจัดเรียง และสร้างแผนภูมิต้นไม้แสดงความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการโดยวิธีที่ระบุไว้ในข้อ 3.4.3.2.7

3.5.7 วิเคราะห์ค่าความหลากหลายของโครงสร้างประชาคมแบคทีเรียโดยวิธี PCR-DGGE

วิเคราะห์ค่าความหลากหลายของโครงสร้างประชาคมแบคทีเรียจากวิธี PCR-DGGE ด้วยดัชนีความหลากหลายและการกระจายตัวของ Shannon-Wiener index (H', E_H) (Shannon และ Wiener, 1949) และดัชนีความหลากหลายและการกระจายตัวของ Simpson index (D', $E_{1/D}$) (Simpson, 1949) โดยใช้โปรแกรม Image J ในการคำนวณค่าความเข้มของแถบแบนด์ดีเอ็นเอที่ปรากฏบนแผ่นเจล และใช้โปรแกรมคำนวณ Shannon-Wiener Calculation ในการหาค่าดัชนีความหลากหลาย (http://www.changbioscience.com/genetics/shannon.html)

3.6 สร้างห้องสมุดของยีน และวิเคราะห์ความหลากหลายของยีนไดออกซิจีเนสโดยตรงจากสิ่งแวดล้อม

3.6.1 ตรวจสอบยีนไดออกซิจีเนสเบื้องต้นจากสิ่งแวดล้อม

ตรวจสอบยีนไดออกซิจีเนสเบื้องต้นโดยตรงจากสิ่งแวดล้อม โดยนำดีเอ็นเอที่สกัดได้และผ่านการตรวจวิเคราะห์ดีเอ็นเอและกำจัดกรดฮิวมิกออกจากสารแขวนลอยดีเอ็นเอในหัวข้อ 3.5.2 ถึง 3.5.4 มาเพิ่มจำนวนยีนในกลุ่ม dox_{GN} และ dox_{GP} ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส โดยใช้ไพร์เมอร์คู่ GNF และ GNR (Cebron และคณะ, 2008) และไพร์เมอร์คู่ GPF และ GPR (Cebron และคณะ, 2008) ดังแสดงในตารางที่ 3.4 โดยใช้เริ่มต้นดีเอ็นเอที่ได้จากข้อ 3.5.1 และใช้ความเข้มข้นสุดท้ายของสารแต่ละชนิดในปฏิกิริยา และภายใต้สภาวะที่เหมาะสมในการทำเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอในหัวข้อ 3.4.5

จากนั้นตรวจสอบผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นหลังเพิ่มจำนวนด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส โดยวิธีอะกาโรสเจลอีเลคโทรโฟเรซิสในอะกาโรสเจลความเข้มข้น 2% ในบัฟเฟอร์ TAE ความเข้มข้น 1 เท่า และตรวจสอบขนาดผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอด้วยดีเอ็นเอมาตรฐานชนิด 100 bp DNA Ladder ตามวิธีที่ระบุไว้ในหัวข้อ 3.4.3.2.2 ต่อไป

3.6.2 สร้างห้องสมุดของยีนไดออกซิจีเนสจากสิ่งแวดล้อม

3.6.2.1 ทำบริสุทธิ์ผลิตภัณฑ์ PCR เพื่อการโคลน

ทำบริสุทธิ์ผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอที่ได้จากการทำ PCR ในหัวข้อ 3.6.1 ด้วยชุด DNA Gel/PCR Fragments Extraction Kit บริษัท Geneaid, Taiwan ตามวิธีที่ระบุไว้ในหัวข้อ 3.4.4.2.5

3.6.2.2 โคลนชิ้นผลิตภัณฑ์ PCR

3.6.2.2.1 ไลเกทชิ้นผลิตภัณฑ์ PCR

ไลเกทชิ้นผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้จากการทำบริสุทธิ์ดังวิธีที่ระบุไว้ในข้อ 3.5.6.3.3.1

3.6.2.2.2 เตรียมคอมพีเทนต์เซลล์ *E. coli* สายพันธุ์ JM 109 และทรานฟอร์มรีคอมบิแนนท์พลาสมิดเข้าสู่คอมพีเทนต์เซลล์

เตรียมคอมพีเทนต์เซลล์ *E. coli* สายพันธุ์ JM 109 โดยวิธีแคลเซียมคลอไรด์ (Calcium chloride) (Sambrook และ Russell, 2001) และทรานฟอร์มรีคอมบิแนนท์พลาสมิดเข้าสู่คอมพีเทนต์เซลล์ *E. coli* สายพันธุ์ JM 109 ตามวิธีที่ระบุในหัวข้อ 3.5.6.3.3.2 คัดเลือกทรานฟอร์มแมนท์ที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่ต้องการ ตามวิธีที่ระบุในหัวข้อ 3.5.6.3.3.3 และสกัดรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pGEM-T Easy ตามวิธีที่ระบุในหัวข้อ 3.5.6.3.3.4

3.6.2.2.3 ตัดรีคอมบิแนนท์พลาสมิดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

ตรวจสอบชิ้นดีเอ็นเอแทรกสอดภายในรีคอมบิแนนท์พลาสมิดโดยการตัดรีคอมบิแนนท์พลาสมิดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิดต่าง ๆ คือ *Eco*RI *Hin*fI *Rsa*I และ *Bsu*RI บริษัท Difco, USA ตามวิธีที่ระบุไว้ในคู่มือ และในหัวข้อ 3.5.6.3.3.5

3.6.2.2.4 วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของรีคอมบิแนนท์พลาสมิดตามวิธีที่ระบุในหัวข้อ 3.5.6.3.3.6 เมื่อได้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอแล้ววิเคราะห์เปรียบเทียบกับลำดับกรดอะมิโนของเอนไซม์ย่อยสลายสารประกอบ PAHs ในฐานข้อมูล GenBank โดยใช้โปรแกรม BLASTx (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/)

3.6.2.2.5 สร้างแผนภูมิต้นไม้แสดงความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ

นำลำดับกรดอะมิโนของยีนในกลุ่ม dox_{GN} และ dox_{GP} และลำดับกรดอะมิโนของยีนในกลุ่ม dox_{GN} และ dox_{GP} ในฐานข้อมูลที่ถูกคัดเลือกไว้มาจัดเรียง และสร้างแผนภูมิต้นไม้แสดงความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการโดยวิธีที่ระบุไว้ในข้อ 3.4.3.2.7

3.6.3 วิเคราะห์ค่าความหลากหลายของยีนไดออกซิจีเนส

วิเคราะห์ความหลากหลายของยีนไดออกซิจีเนสจากห้องสมุดยีนในกลุ่ม dox_{GN} จำนวน 130 โคลน และ dox_{GP} จำนวน 30 โคลน โดยคำนวณจากดัชนีความหลากหลายและการกระจายตัวของ Shannon-Wiener index (H', E_H) (Shannon และ Wiener, 1949) และดัชนีความหลากหลายและการกระจายตัวของ Simpson index (D', $E_{1/D}$) (Simpson, 1949)

3.7 วิเคราะห์ความอุดมสมบูรณ์ของแบคทีเรียและยีนไดออกซิจีเนสจากสิ่งแวดล้อมด้วยวิธี Quantitaive real-time PCR

3.7.1. สร้างรีคอมบิแนนท์โคลนยีน 16S rDNA

3.7.1.1 เพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอบริเวณยีน 16S rDNA ของเชื้อ *Pseudomonas* sp. สายพันธุ์ T6-102 โดยใช้ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส

นำดีเอ็นเอของเชื้อที่สกัดได้ในหัวข้อ 3.4.3.2.1 มาเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอบริเวณยีน 16S rDNA ของแบคทีเรียด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส ด้วยไพร์เมอร์คู่ 1401F และ 968R (Felske และคณะ, 1998) ซึ่งมีลำดับนิวคลีโอไทด์ดังแสดงในตารางที่ 3.5 โดยใช้ความเข้มข้นสุดท้ายของสารแต่ละชนิดในปฏิกิริยาเหมือนกันกับที่ใช้ในการเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอในหัวข้อ 3.4.3.2.4 และดำเนินปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสด้วยเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (DNA Themo Cycle) ภายใต้สภาวะดังนี้

1) Initial denaturation	ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที
2) Denaturation	ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที
3) Annealing	ที่อุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที
4) Extension	ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที
5) ทำขั้นตอนที่ 2 ถึง 4	จำนวน 30 รอบ
6) Final extension	ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 นาที

จากนั้นตรวจสอบผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นหลังเพิ่มจำนวนด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส โดยวิธีอะกาโรสเจลอีเลคโทรโฟเรซิสในอะกาโรสเจลความเข้มข้น 2% ในบัฟเฟอร์ TAE ความเข้มข้น 1 เท่า และตรวจสอบขนาดผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอด้วยดีเอ็นเอมาตรฐานชนิด 100 bp DNA Ladder ตามวิธีที่ระบุไว้ในหัวข้อ 3.4.3.2.2 ต่อไป

3.7.1.2 **สร้างรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่มียีน** 16S rDNA **ของเชื้อ** *Pseudomonas* sp. **สายพันธุ์** T6-102

ทำบริสุทธิ์ผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอที่ได้จากการทำ PCR ในหัวข้อ 3.7.1.1 ด้วยชุด DNA Gel/PCR Fragments Extraction Kit บริษัท Geneaid, Taiwan ตามวิธีที่ระบุในหัวข้อ 3.4.4.2.5 และโคลนชิ้นผลิตภัณฑ์ PCR โดยการไลเกทชิ้นผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้จากการทำบริสุทธิ์ในหัวข้อ 3.7.1.1 เข้ากับพลาสมิดเวกเตอร์ชนิด pGEM-T Easy ด้วยเอนไซม์ T4 DNA ligase บริษัท Promega, USA ตามวิธีที่ระบุในหัวข้อ 3.6.2.2.1 และทรานฟอร์มรีคอมบิแนนท์พลาสมิดเข้าสู่คอมพีเทนต์เซลล์ *E. coli* สายพันธุ์ JM 109 โดยวิธีแคลเซียมคลอไรด์ (Calcium chloride) (Sambrook และ Russell, 2001) ตามวิธีที่ระบุในหัวข้อ 3.5.6.3.3.2 และคัดเลือกทรานฟอร์มแมนท์ที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่ต้องการตามวิธีที่ระบุในหัวข้อ 3.5.6.3.3.3 และสกัดรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pGEM-T Easy ตามวิธีที่ระบุในหัวข้อ 3.5.6.3.3.4 จากนั้นตัดรีคอมบิแนนท์พลาสมิดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI เพื่อตรวจสอบชิ้นดีเอ็นเอแทรกสอดภายในรีคอมบิแนนท์พลาสมิดตามวิธีที่ระบุในหัวข้อ 3.6.2.2.3 และวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของรีคอมบิแนนท์พลาสมิดตามวิธีที่ระบุในหัวข้อ 3.5.6.3.3.6 เพื่อตรวจสอบความถูกต้องของชิ้นดีเอ็นเอแทรกสอดโดยใช้โปรแกรม BLASTn (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/)

3.7.2 **สร้างกราฟมาตรฐานของพลาสมิดโดยวิธี** real time PCR

นำรีคอมบิแนนท์พลาสมิดโคลนจากเชื้อ *Pseudomonas* sp. สายพันธุ์ T6-102 ที่มียีน 16S rDNA จากหัวข้อ 3.7.1 และโคลน GNB6.2 ที่มียีน dox_{GN} จากหัวข้อ 3.6.2.5 มาสร้างกราฟมาตรฐานของยีน 16S rDNA และยีน dox_{GN} โดยวัดความเข้มข้นของพลาสมิดที่สกัดได้ด้วยเครื่องวัดปริมาณสารพันธุกรรมใช้จำนวนสารปริมาณน้อย (นาโนดร็อป) และหาจำนวนชุดของยีน (copy number) โดยคำนวณจากผลบวกความยาวของพลาสมิด pGEM-T Easy (3,015 bp) และความยาวของชิ้นดีเอ็นเอแทรกสอด (433 bp) หนึ่งเบสของดีเอ็นเอหนักประมาณ 660 ดาลตัน นำไปคูณกับความยาวของรีคอมบิแนนท์พลาสมิดจะได้น้ำหนักโมเลกุลของพลาสมิด 1 วง จากนั้นนำค่านี้ไปหารออกจากความเข้มข้นของพลาสมิดที่วัดได้ จะได้จำนวนโมลของพลาสมิดทั้งหมด ดี

เอ็นเอหนึ่งโมลมีค่าเท่ากับพลาสมิดจำนวน 6.02 x 10^{23} ชุด ให้นำจำนวนโมลของพลาสมิดที่คำนวณได้มาคูณกับ 6.02 x 10^{23} จะได้จำนวนชุดของยีน และเตรียมสารละลายมาตรฐานพลาสมิดดีเอ็นเอที่มีจำนวนชุดของยีนเท่ากับ 10^9 copies ต่อไมโครลิตร หลังจากเตรียมสารละลายมาตรฐานพลาสมิดดีเอ็นเอที่มีจำนวนชุดของยีนเท่ากับ 10^9 copies ต่อไมโครลิตร แล้วเจือจางความเข้มข้นของพลาสมิดดีเอ็นเอดังกล่าวจาก 10^8 ถึง 10^1 copies ต่อไมโครลิตร

3.7.3 วิเคราะห์ปริมาณแบคทีเรียและยีนไดออกซิจีเนสทั้งหมดในสิ่งแวดล้อมโดยวิธี Real time PCR

วิเคราะห์ปริมาณแบคทีเรีย และยีนในกลุ่ม dox_{GN} ในสิ่งแวดล้อมโดยวิธี Real time PCR โดยเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอบริเวณยีน 16S rDNA ของแบคทีเรีย และยีน dox_{GN} ในตัวอย่างสิ่งแวดล้อม และสารละลายพลาสมิดดีเอ็นเอที่ความเข้มข้นต่าง ๆ คือ 10^8 10^6 10^5 10^4 และ 10^2 copies number ต่อไมโครลิตร ตามลำดับ ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส ทำซ้ำ 3 ซ้ำในแต่ละตัวอย่าง โดยใช้โอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพร์เมอร์คู่ 1401F และ 968R (Felske และคณะ, 1998) สำหรับเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอบริเวณยีน 16S rDNA ของแบคทีเรียในตัวอย่างสิ่งแวดล้อม และโอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพร์เมอร์คู่ GNF และ GNR (Cebron และคณะ 2008) สำหรับเพิ่มจำนวนชิ้นดีเอ็นเอบริเวณยีนไดออกซิจีเนส ซึ่งมีลำดับนิวคลีโอไทด์ดังแสดงในตารางที่ 3.5 โดยใช้ชุด Maxima™ SYBR Green qPCR master mix บริษัท Promega, USA ซึ่งเป็นชุดทำ real time PCR สำเร็จรูป ในการทำปฏิกิริยามีความเข้มข้นสุดท้ายของสารแต่ละตัวดังต่อไปนี้ สารละลายไพร์เมอร์ความเข้มข้น 20 พิโคโมลต่อไมโครลิตร (ไพร์เมอร์แต่ละตัว) ปริมาตร 0.4 ไมโครลิตร ดีเอ็นเอและพลาสมิดดีเอ็นเอเข้มข้นน้อยกว่า 500 นาโนกรัม ปริมาตร 2 ไมโครลิตร และ Maxima™ SYBR Green qPCR master mix (2X) ปริมาตร 12.5 ไมโครลิตร ปรับปริมาตรน้ำด้วยน้ำปราศจากนิวคลีเอส (Nuclease-Free Water) ปริมาตร 9.7 ไมโครลิตร ส่วนผสมทั้งหมดมีปริมาตรสุทธิเท่ากับ 25 ไมโครลิตร ผสมสารให้เข้ากัน และดำเนินปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสด้วยเครื่องวิเคราะห์ชนิดและปริมาณสารพันธุกรรมแบบ Real-Time PCR ภายใต้สภาวะดังนี้

1) Initial denaturation ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที
2) Denaturation ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที
3) Annealing ที่อุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที
4) Extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที
5) ทำขั้นตอนที่ 2 ถึง 4 จำนวน 40 รอบ
6) Final extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

จากนั้นสิ้นสุดปฏิกิริยาตรวจสอบผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นหลังเพิ่มจำนวนด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส โดยเครื่องสัญญาณในช่วง exponential phase ของแต่ละ cycle มาสร้างกราฟมาตรฐานของพลาสมิดที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ซึ่งค่า slope ของกราฟมาตรฐานจะสามารถคำนวณประสิทธิภาพของการทำ real time PCR ได้โดยมีค่าเท่ากับ $10^{(-1/slope)}$ ค่า Ct แสดงจำนวนรอบของปฏิกิริยาที่มีการเรืองแสงของฟลูออเรสเซนต์ (fluorescence) ซึ่งสามารถคำนวณจำนวนชุดของยีนที่ได้โดยใช้ค่า Ct นำไปแทนค่าในสมการกราฟมาตรฐาน

3.8 นำฝากลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล

หลังการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ในหัวข้อต่าง ๆ แล้วจึงนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ฝากในฐานข้อมูล Genbank เพื่อออก accession number

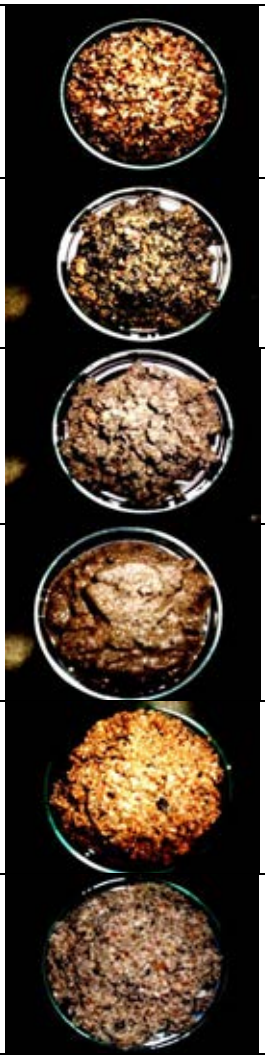
บทที่ 4

ผลการทดลอง

4.1 ลักษณะทางกายภาพของตัวอย่างดิน

ตัวอย่างดิน และดินตะกอน ที่ใช้ในการทดลองถูกเก็บจากบริเวณที่คาดว่ามีการปนเปื้อนของสารประกอบ PAHs เช่น บริเวณท่าเรือ อู่จอดเรือ และเขตชุมชนที่อยู่อาศัย โดยเน้นเก็บทางด้านตะวันออกของเกาะสีชังใกล้ชายฝั่งอำเภอศรีราชา (เกาะลอย) จังหวัดชลบุรี ซึ่งมีลักษณะดิน และเนื้อดิน ดังแสดงในตารางที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 ลักษณะดิน และเนื้อดินของตัวอย่างดิน และดินตะกอนที่ใช้ในการทดลอง

10 ตัวอย่างดิน	ลักษณะดิน	รูปแสดงลักษณะเนื้อดิน
A	ดินทรายปนเศษหินและเปลือกหอย เนื้อดินหยาบ สีน้ำตาลเข้ม	
B	ดินทรายปนเศษหิน เนื้อดินหยาบ สีน้ำตาลปนดำ	
C	ดินทราย เนื้อดินละเอียดปานกลาง สีเทา	
D	ดินทราย เนื้อดินละเอียด สีเทา	
E	ดินทรายปนเศษหิน เนื้อดินหยาบ สีน้ำตาล	
F	ดินทรายปนเศษหิน เนื้อดินหยาบ สีน้ำตาลอ่อน	

ตารางที่ 4.1 ลักษณะดิน และเนื้อดินของตัวอย่างดิน และดินตะกอนที่ใช้ในการทดลอง (ต่อ)

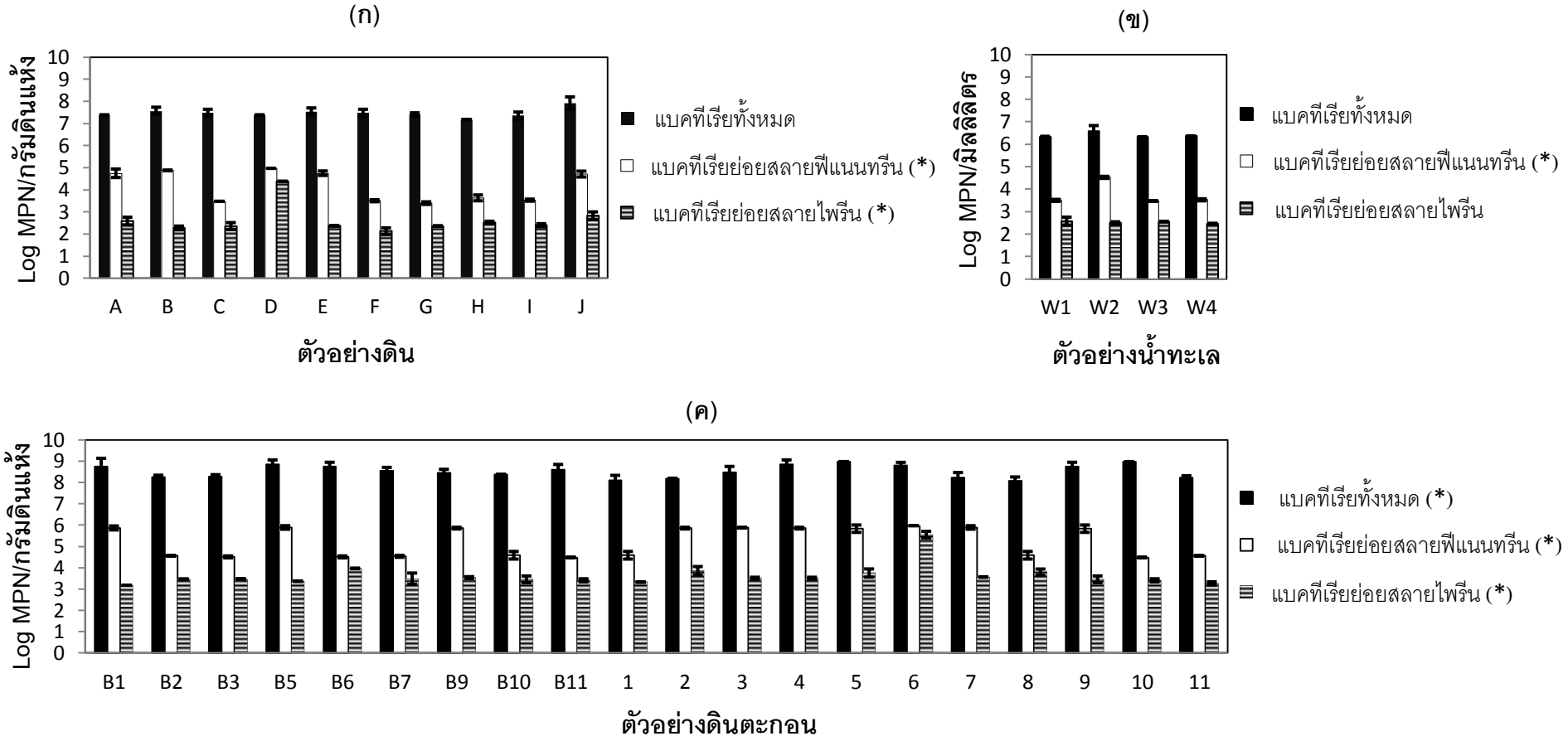
10 ตัวอย่างดิน	ลักษณะดิน	รูปแสดงลักษณะเนื้อดิน
G	ดินทรายปนเศษหิน เนื้อดินหยาบ สีน้ำตาล	
H	ดินทรายปนเศษหินขนาดเล็ก เนื้อดินหยาบปานกลาง สีขาว	
I	ดินทรายปนเศษหิน เนื้อดินหยาบ สีน้ำตาลอ่อน	
J	ดินทรายปนเศษหิน เนื้อดินหยาบ สีน้ำตาลอ่อน	
20 ตัวอย่างดินตะกอน	**ลักษณะดิน**	**รูปแสดงลักษณะเนื้อดิน**
B1-B3, B5 , B6-B11 และ ดินตะกอนหมายเลข 1-11	ดินโคลนเนื้อละเอียด ชุ่มน้ำ สีดำอมเขียว	

4.2 การวิเคราะห์ปริมาณฟีแนนทรีนหรือไพรีนในตัวอย่าง

ผลการวิเคราะห์ปริมาณฟีแนนทรีนหรือไพรีนในตัวอย่างดิน ดินตะกอน และน้ำทะเล โดยเครื่องเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟี (Gas chromatography, GC) ปรากฏว่าไม่พบการปนเปื้อนของฟีแนนทรีนหรือไพรีนในทุกตัวอย่าง โดยมี % recovery ของฟีแนนทรีน หรือไพรีนเท่ากับ 98% และ 97% ตามลำดับ (ภาคผนวก ค)

4.3 ความอุดมสมบูรณ์ของแบคทีเรียทั้งหมด และแบคทีเรียย่อยสลาย PAHs โดยวิธีการเพาะเลี้ยง

ผลการวิเคราะห์จำนวนแบคทีเรียทั้งหมด และแบคทีเรียย่อยสลายฟีแนนทรีน หรือไพรีน โดยวิธี MPN พบว่าในตัวอย่างดินตะกอนมีจำนวนแบคทีเรียทั้งหมด และแบคทีเรียย่อยสลายสารพิษทั้ง 2 ชนิดสูงสุดเมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างดิน และน้ำทะเล ดังแสดงในรูปที่ 4.1 (ก-ค) และภาคผนวก ง



รูปที่ 4.1 จำนวนแบคทีเรียทั้งหมด และแบคทีเรียย่อยสลายฟีแนนทรีน หรือไพรีน ในตัวอย่างดิน (ก) ตัวอย่างน้ำทะเล (ข) และตัวอย่างดินตะกอน (ค) โดย (*) แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99 % ($p < 0.01$) ด้วยวิธี ANOVA และ Tukey HSD

จากรูป 4.1 (ก-ค) แสดงผลของจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดพบมีค่าสูงสุดในตัวอย่างดินตะกอน (10^8 MPN/กรัมดินแห้ง) เมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างดิน และน้ำทะเล โดยตัวอย่างดินตะกอน 5 บริเวณทิศเหนือฝั่งตะวันตกของเกาะสีชัง และดินตะกอน 10 บริเวณกลางร่องน้ำเกาะสีชัง-ศรีราชามีจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดสูงสุด คือ $9.30 \pm 0.00 \times 10^8$ MPN/กรัมดินแห้ง ในขณะที่จำนวนแบคทีเรียทั้งหมดในตัวอย่างดินมีค่าประมาณ 10^7 MPN/กรัมดินแห้ง โดยตัวอย่างดิน J บริเวณท่าบนมีจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดสูงสุดคือ $5.03 \pm 3.95 \times 10^7$ MPN/กรัมดินแห้ง และจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดในตัวอย่างน้ำทะเลมีค่าประมาณ 10^6 MPN/มิลลิลิตรน้ำทะเลซึ่งต่ำสุดโดยตัวอย่างน้ำทะเล W2 บริเวณท่าบน พบจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดสูงสุด $4.37 \pm 2.71 \times 10^6$ MPN/มิลลิลิตรน้ำทะเล และเมื่อพิจารณาค่าเฉลี่ยของจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดภายในตัวอย่างดินและน้ำทะเลพบมีค่าไม่แตกต่างกัน แต่ในตัวอย่างดินตะกอนพบมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99%

ผลของจำนวนแบคทีเรียย่อยสลายฟีแนนทรีนพบมีค่าสูงสุดในตัวอย่างดินตะกอน (10^5 MPN/กรัมดินแห้ง) เมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างประเภทอื่น โดยตัวอย่างดินตะกอนหมายเลข 6 บริเวณท่าบนมีจำนวนแบคทีเรียสลายฟีแนนทรีนสูงสุด คือ $9.30 \pm 0.00 \times 10^5$ MPN/กรัมดินแห้ง ในขณะที่จำนวนแบคทีเรียสลายฟีแนนทรีนในตัวอย่างดินมีค่าประมาณ 10^4 MPN/กรัมดินแห้ง โดยตัวอย่างดิน D บริเวณท่าล่างมีจำนวนแบคทีเรียสลายฟีแนนทรีนสูงสุด คือ 9.30×10^4 MPN/กรัมดินแห้ง และจำนวนแบคทีเรียสลายฟีแนนทรีนในตัวอย่างน้ำทะเลมีค่าประมาณ 10^3-10^4 MPN/มิลลิลิตรน้ำทะเลซึ่งต่ำที่สุด โดยตัวอย่างน้ำทะเล W2 บริเวณท่าบนพบจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดสูงสุด คือ $3.40 \pm 0.00 \times 10^4$ MPN/มิลลิลิตรน้ำทะเล และเมื่อพิจารณาค่าเฉลี่ยของจำนวนแบคทีเรียสลายฟีแนนทรีนในตัวอย่างทุกประเภทพบมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99%

ผลของจำนวนแบคทีเรียย่อยสลายไพรีนพบมีค่าสูงสุดในตัวอย่างดินตะกอน (10^5 MPN/กรัมดินแห้ง) เมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างประเภทอื่น โดยตัวอย่างดินตะกอนหมายเลข 6 บริเวณท่าบนมีจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดสูงสุด คือ $3.63 \pm 1.15 \times 10^5$ MPN/กรัมดินแห้ง ในขณะที่จำนวนแบคทีเรียย่อยสลายไพรีนในตัวอย่างดินมีค่าประมาณ 10^2-10^4 MPN/กรัมดินแห้ง โดยตัวอย่างดิน D บริเวณท่าล่างมีจำนวนแบคทีเรียสลายไพรีนสูงสุด คือ $2.40 \pm 0.00 \times 10^4$ log MPN/กรัมดินแห้ง และจำนวนแบคทีเรียย่อยสลายไพรีนในตัวอย่างน้ำทะเลมีค่าประมาณ 10^2 MPN/มิลลิลิตรน้ำทะเลซึ่งต่ำที่สุด โดยตัวอย่างน้ำทะเล W2 บริเวณท่าบนมีจำนวนแบคทีเรียย่อยสลายไพรีนสูงสุด คือ $3.20 \pm 0.35 \times 10^2$ MPN/มิลลิลิตร และเมื่อพิจารณาค่าเฉลี่ยของจำนวนแบคทีเรียย่อยสลาย

ไพรีนในตัวอย่างน้ำทะเลพบมีค่าไม่แตกต่างกัน แต่ในตัวอย่างดินและดินตะกอนพบมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99%

4.4 คัดแยกและจำแนกชนิดของแบคทีเรียย่อยสลายฟีแนนทรีน หรือไพรีน

จากการนำตัวอย่างดิน ดินตะกอน และน้ำทะเลบริเวณเกาะสีชังมาเพิ่มจำนวนแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลายฟีแนนทรีน และไพรีน โดยเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว NSW ที่เติมฟีแนนทรีน หรือไพรีนความเข้มข้นสุดท้ายในอาหารเท่ากับ 100 มิลลิกรัมต่อลิตร สังเกตการเจริญเติบโตของแบคทีเรียจากสีส้มของเมทาบอไลต์หลังเชื้อย่อย PAHs โดยดูการเปลี่ยนแปลงสีของอาหารเหลว เมื่อเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่ได้เติมตัวอย่างดินหรือน้ำทะเล แต่เนื่องจากสีของดินอาจทำให้สังเกตเห็นการเปลี่ยนแปลงสีของอาหารเหลวได้ยาก จึงถ่ายเชื้อจากส่วนน้ำใสด้านบนเท่านั้น และบันทึกผลการเปลี่ยนแปลงสีในการถ่ายเชื้อครั้งที่ 3 ผลปรากฏว่าพบการเปลี่ยนแปลงสีของอาหารในตัวอย่างที่เติมฟีแนนทรีนจำนวน 16 ตัวอย่าง ซึ่งเป็นตัวอย่างดินจำนวน 5 ตัวอย่าง ตัวอย่างน้ำทะเลจำนวน 1 ตัวอย่าง และตัวอย่างดินตะกอนจำนวน 10 ตัวอย่าง และพบการเปลี่ยนแปลงสีของอาหารในตัวอย่างที่เติมไพรีนจำนวน 3 ตัวอย่าง ซึ่งเป็นตัวอย่างดินจำนวน 1 ตัวอย่าง และตัวอย่างดินตะกอนจำนวน 2 ตัวอย่าง ดังตารางที่ 4.2 และรูปที่ 4.2 4.3 (ก-ข) 4.4 และ 4.5

ตารางที่ 4.2 การเพิ่มจำนวนแบคทีเรียย่อยสลายฟีแนนทรีน หรือไพรีนจากตัวอย่างเกาะสีชัง

ตัวอย่างดิน	บริเวณ	ความสามารถในการย่อยสลาย*	
		ฟีแนนทรีน	ไพรีน
A	ท่าวังแถบพระจุฑาธุชราชฐาน	+	-
B	ท่าวังแถบพระจุฑาธุชราชฐาน	+	-
D	ที่จอดเรือท่าล่าง(ท่าเทววงษ์)	+	+
E	สถานีตำรวจใกล้ท่าล่าง	+	-
J	ท่าเรือท่าบน (ท่าภาณุรังสี) รอบชายฝั่งเขตชุมชนที่อยู่อาศัย	+	-
ตัวอย่างน้ำทะเล	บริเวณ	ความสามารถในการย่อยสลาย*	
		ฟีแนนทรีน	ไพรีน
W2	ที่จอดเรือท่าบน	+	-

ตารางที่ 4.2 การเพิ่มจำนวนแบคทีเรียย่อยสลายฟีแนนทรีน หรือไพรีนจากตัวอย่างเกาะสีชัง (ต่อ)

ตัวอย่างดินตะกอน	บริเวณ	ความสามารถในการย่อยสลาย*	
		ฟีแนนทรีน	ไพรีน
B1	ทิศเหนือของเกาะสีชัง	+	+
B5	ทิศตะวันตกของเกาะสีชัง บริเวณหน้าถ้ำพัง	+	-
B9	ทิศตะวันตกเฉียงใต้ของเกาะสีชัง บริเวณใต้เกาะค้างคาว	+	-
2	ทิศตะวันออกเฉียงเหนือของเกาะสีชัง บริเวณกลางร่องน้ำ	+	-
3	กลางร่องน้ำท่าเรือศรีราชา	+	-
4	ทิศเหนือของเกาะสีชัง	+	-
5	ทิศเหนือฝั่งตะวันตกของเกาะสีชัง	+	-
6	ใกล้ท่าบน	+	+
7	ทิศตะวันออกของเกาะสีชัง บริเวณหน้าท่าเรือสีชังทอง	+	-
9	กลางร่องน้ำหน้าเกาะสีชัง-ศรีราชา	+	-

* หมายเหตุ

(+) แสดงถึงการเปลี่ยนแปลงสีอาหาร (-) แสดงถึงไม่มีการเปลี่ยนแปลงสีอาหาร

ชุดควบคุม A B D E J

รูปที่ 4.2 การเปลี่ยนแปลงสีของอาหารเหลว NSW ที่เติมฟีแนนทรีนเมื่อมีการเจริญของแบคทีเรียจากตัวอย่างดินบริเวณท่าวังแถบพระจุฑาธุชราชฐาน (A และ B) ตัวอย่างดินบริเวณที่จอดเรือท่าล่าง (ท่าเทววงษ์) (D) ตัวอย่างดินบริเวณสถานีตำรวจใกล้ท่าล่าง (E) และตัวอย่างดินบริเวณท่าเรือท่าบน (ท่าภาณุรังสี) รอบชายฝั่งเขตชุมชนที่อยู่อาศัย (J) หลังจากถ่ายเชื้อครั้งที่ 3 เป็นเวลา 2 วัน

ชุดควบคุม B1 B5 B9 2 3

รูปที่ 4.3 (ก) การเปลี่ยนแปลงสีของอาหารเหลว NSW ที่เติมฟีแนนทรีน เมื่อมีการเจริญของแบคทีเรียจากตัวอย่างดินตะกอนบริเวณทิศเหนือของเกาะสีชัง (B1) ดินตะกอนทางทิศตะวันตกของเกาะสีชัง บริเวณหน้าถ้ำพัง (B5) ดินตะกอนทางทิศตะวันตกเฉียงใต้ของเกาะสีชัง บริเวณใต้เกาะค้างคาว (B9) ดินตะกอนทางทิศตะวันออกเฉียงเหนือของเกาะสีชัง บริเวณกลางร่องน้ำ (2) ดินตะกอนบริเวณกลางร่องน้ำท่าเรือศรีราชา (3) หลังจากถ่ายเชื้อครั้งที่ 3 เป็นเวลา 2 วัน

ชุดควบคุม 4 5 6 7 9

รูปที่ 4.3 (ข) การเปลี่ยนแปลงสีของอาหารเหลว NSW ที่เติมฟีแนนทรีน เมื่อมีการเจริญของแบคทีเรียจากดินตะกอนทางทิศเหนือของเกาะสีชัง (4) ดินตะกอนทางทิศเหนือฝั่งตะวันตกของเกาะสีชัง (5) ดินตะกอนบริเวณท่าบน (6) ดินตะกอนทางทิศตะวันออกของเกาะสีชัง บริเวณหน้าท่าเรือสีชังทอง (7) ดินตะกอนบริเวณกลางร่องน้ำหน้าเกาะสีชัง-ศรีราชา (9) หลังจากถ่ายเชื้อครั้งที่ 3 เป็นเวลา 2 วัน

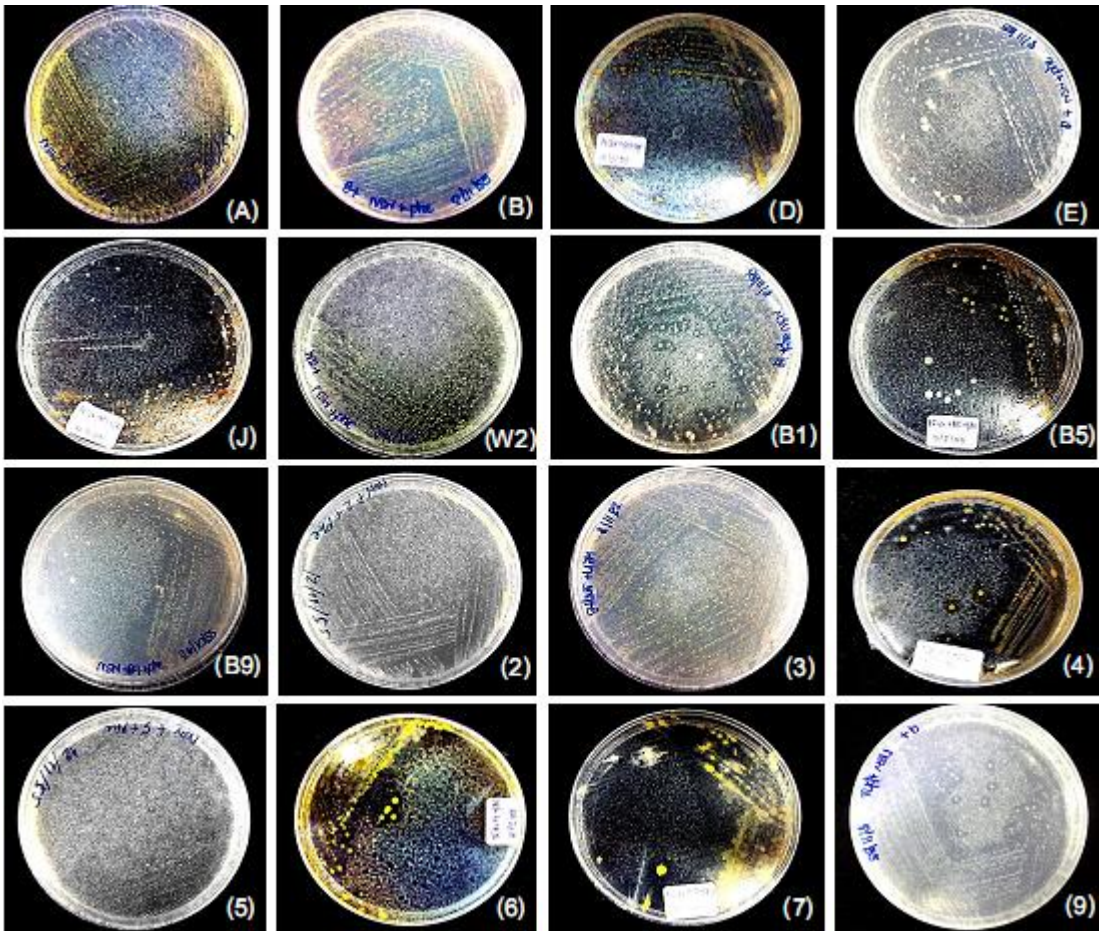
ชุดควบคุม W2

รูปที่ 4.4 การเปลี่ยนแปลงสีของอาหารเหลว NSW ที่เติมฟีแนนทรีน เมื่อมีการเจริญของแบคทีเรียจากตัวอย่างน้ำทะเลบริเวณที่จอดเรือท่าบน (W2) หลังจากถ่ายเชื้อครั้งที่ 3 เป็นเวลา 3 วัน

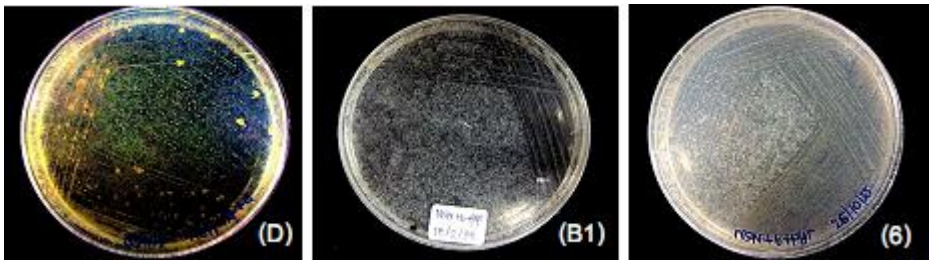
ชุดควบคุม D B1 6

รูปที่ 4.5 การเปลี่ยนแปลงสีของอาหารเหลว NSW ที่เติมไพรีน เมื่อมีการเจริญของแบคทีเรียจากตัวอย่างดินบริเวณที่จอดเรือท่าล่าง (ท่าเทววงษ์) (D) ดินตะกอนทางทิศเหนือของเกาะสีชัง (B1) และดินตะกอนบริเวณท่าบน (6) หลังจากถ่ายเชื้อครั้งที่ 3 เป็นเวลา 3 วัน

หลังจากอาหารเหลว NSW ที่พบการเปลี่ยนแปลงสีมาคัดแยกแบคทีเรียโดยขีดลงบนอาหารแข็ง NSW และพ่นทับด้วยฟีแนนทรีนหรือไพรีน จากนั้นบ่มเชื้อที่ตู้บ่มอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พบโคโลนีและบริเวณใสโดยรอบโคโลนีของแบคทีเรียในตัวอย่างที่พ่นทับด้วยฟีแนนทรีนหรือไพรีนดังแสดงในรูปที่ 4.6 และ 4.7



รูปที่ 4.6 ลักษณะโคโลนีของแบคทีเรียและโซนใสเมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งNSW ที่พ่นทับด้วยฟีแนนทรีน เป็นเวลา 2 วันโดยตัวอย่างดิน (A, B, D, E และ J) คือ ตัวอย่างดิน ตัวอย่าง (W2) คือตัวอย่างน้ำทะเล และตัวอย่าง (B1, B5, B9, 2, 3, 4, 5, 6, 7 และ 9) คือ ตัวอย่างดินตะกอน



รูปที่ 4.7 ลักษณะโคโลนีของแบคทีเรียและโซนใสเมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง NSW ที่พ่นทับด้วยไพรีน เป็นเวลา 3 วันโดย (D) คือ ตัวอย่างดิน (B1 และ 6) คือ ตัวอย่างดินตะกอน

เมื่อนำโคโลนีของแบคทีเรียที่สร้างโซนมาคัดแยกให้บริสุทธิ์ในอาหาร MA เจือจาง 4 เท่า ที่ผสมฟีแนนทรีนหรือไพรีนในอาหารโดยตั้งชื่อแบคทีเรียที่คัดแยกได้ตามชื่อตัวอย่างที่เก็บ และชนิดของสารประกอบ PAHs ที่สร้างโซนใส ซึ่งตัวอย่างที่สร้างโซนใสหลังพ่นทับด้วยฟีแนนทรีนแทนด้วยตัวเลข 1 และตัวอย่างที่สร้างโซนใสหลังพ่นทับด้วยไพรีนแทนด้วยหมายเลข 2 ผลการคัดแยกเชื้อปรากฏว่าสามารถคัดแยกเชื้อได้ทั้งหมด 21 สายพันธุ์ โดยเชื้อที่คัดแยกได้ 17 สายพันธุ์มาจากตัวอย่างที่สร้างโซนใสหลังพ่นทับด้วยฟีแนนทรีน จำนวน 16 ตัวอย่าง ซึ่งตัวอย่างดินตะกอนหมายเลข 6 บริเวณท่าบนเป็นตัวอย่างที่สามารถคัดแยกเชื้อได้จำนวน 2 สายพันธุ์ และเชื้อที่คัดแยกได้ 4 สายพันธุ์มาจากตัวอย่างที่สร้างโซนใสหลังพ่นทับด้วยไพรีนจำนวน 3 ตัวอย่าง ซึ่งตัวอย่างดินตะกอนหมายเลข 6 บริเวณท่าบนเป็นตัวอย่างที่สามารถคัดแยกเชื้อได้จำนวน 2 สายพันธุ์ ดังแสดงในตารางที่ 4.3 และ 4.4

ตารางที่ 4.3 แบคทีเรียสายพันธุ์บริสุทธิ์ที่คัดแยกได้จากตัวอย่างที่พ่นทับด้วยฟีแนนทรีน

ตัวอย่างดิน	บริเวณ	ชื่อสายพันธุ์
A	บริเวณท่าวังแถบพระจุฑาธุชราชฐาน	TA-101
B	บริเวณท่าวังแถบพระจุฑาธุชราชฐาน	TB-101
D	บริเวณสถานีตำรวจใกล้ท่าล่าง	TD-101
E	สถานีตำรวจใกล้ท่าล่าง	TE-101
J	ท่าเรือท่าบน (ท่าภาณุรังสี) รอบชายฝั่งเขตชุมชนที่อยู่อาศัย	TJ-101
ตัวอย่างน้ำทะเล	บริเวณ	ชื่อสายพันธุ์
W2	ที่จอดเรือท่าบน	TW2-101

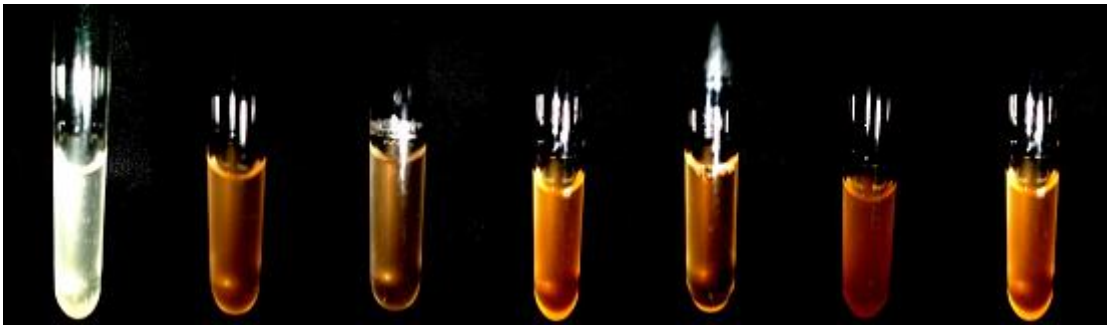
ตารางที่ 4.3 แบคทีเรียสายพันธุ์บริสุทธิ์ที่คัดแยกได้จากตัวอย่างที่พ่นทับด้วยฟีแนนทรีน (ต่อ)

ตัวอย่างดินตะกอน	บริเวณ	ชื่อสายพันธุ์
B1	ทิศเหนือของเกาะสีชัง	TB1-104
B5	ทิศตะวันตกของเกาะสีชัง บริเวณหน้าถ้ำพัง	TB5-102
B9	ทิศตะวันตกเฉียงใต้ของเกาะสีชัง บริเวณใต้เกาะค้างคาว	TB9-105
2	ทิศตะวันออกเฉียงเหนือของเกาะสีชัง บริเวณกลางร่องน้ำ	T2-109
3	กลางร่องน้ำท่าเรือศรีราชา	T3-102
4	ทิศเหนือของเกาะสีชัง	T4-101
5	ทิศเหนือฝั่งตะวันตกของเกาะสีชัง	T5-101
6	ใกล้ท่าบน	T6-101
		T6-102
7	ทิศตะวันออกของเกาะสีชัง บริเวณหน้าท่าเรือสีชังทอง	T7-101
9	กลางร่องน้ำหน้าเกาะสีชัง-ศรีราชา	T9-101

ตารางที่ 4.4 แบคทีเรียสายพันธุ์บริสุทธิ์ที่คัดแยกได้จากตัวอย่างที่พ่นทับด้วยไพรีน

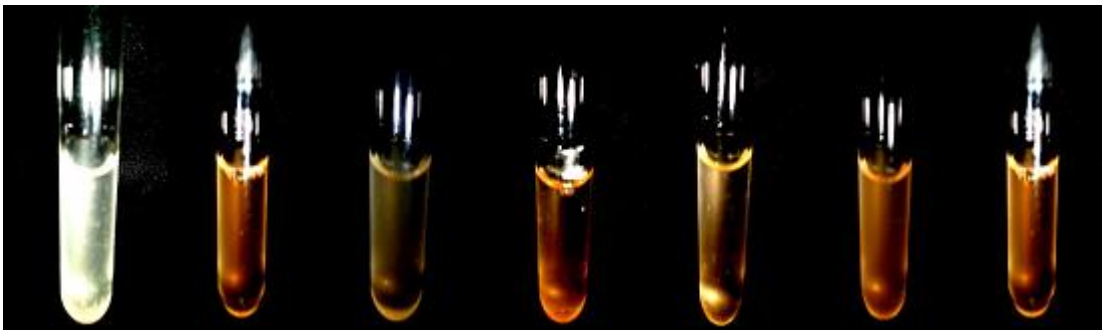
ตัวอย่างดิน	บริเวณ	ชื่อสายพันธุ์
D	บริเวณสถานีตำรวจใกล้ท่าล่าง	TD-204
ตัวอย่างดินตะกอน	บริเวณ	ชื่อสายพันธุ์
B1	ทิศเหนือของเกาะสีชัง	TB1-218
6	ใกล้ท่าบน	T6-212
		T6-223

หลังจากการยืนยันความสามารถในการย่อยสลายสารประกอบ PAHs เบื้องต้นของแบคทีเรียสายพันธุ์บริสุทธิ์โดยการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียในอาหารเหลว NSW ที่เติมฟีแนนทรีนหรือไพรีนความเข้มข้นสุดท้ายในอาหารเท่ากับ 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ผลปรากฏว่าแบคทีเรียสายพันธุ์บริสุทธิ์ต่าง ๆ ที่คัดแยกได้สามารถย่อยสลายฟีแนนทรีน และไพรีนได้ โดยสังเกตเห็นการเปลี่ยนแปลงสีเมื่อเทียบกับตัวควบคุมที่ได้เติมเชื้อดังแสดงในรูปที่ 4.8-4.10

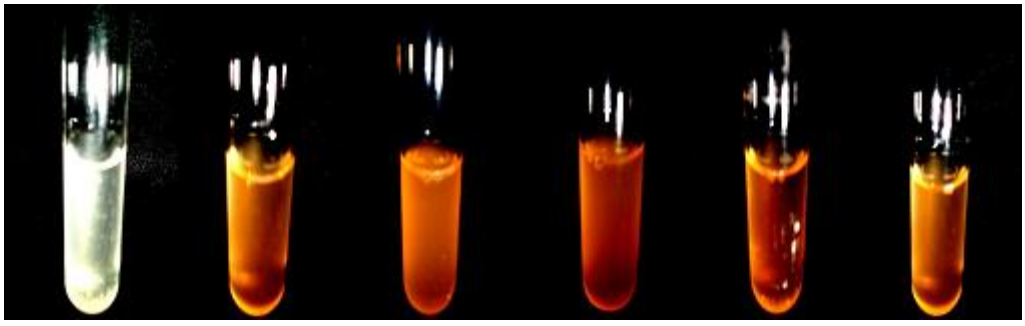


ชุดควบคุม TA-101 TB-101 TD-101 TE-101 TJ-101 TW2-101

รูปที่ 4.8 ลักษณะการเปลี่ยนแปลงสีของอาหารเหลว NSW ที่เติมฟีแนนทรีนหลังเพาะเลี้ยงแบคทีเรียบริสุทธิ์สายพันธุ์ต่าง ๆ เป็นเวลา 5 วัน

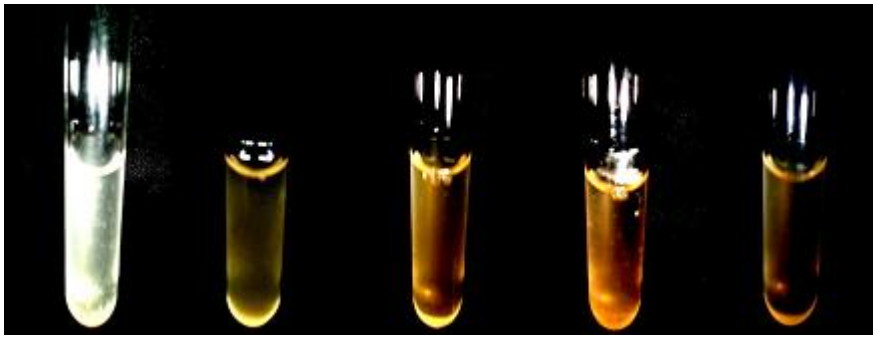


ชุดควบคุม TB1-104 TB5-102 TB9-105 T2-109 T3-101 T4-101



ชุดควบคุม T5-101 T6-101 T6-102 T7-101 T9-101

รูปที่ 4.9 ลักษณะการเปลี่ยนแปลงสีของอาหารเหลว NSW ที่เติมฟีแนนทรีนหลังเพาะเลี้ยงแบคทีเรียบริสุทธิ์สายพันธุ์ต่าง ๆ เป็นเวลา 4 วัน

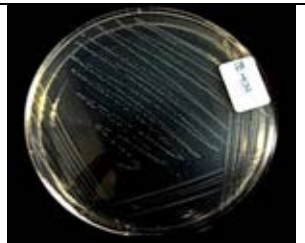
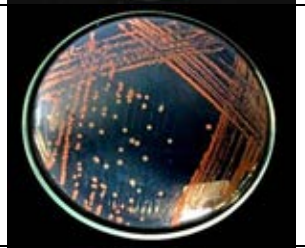
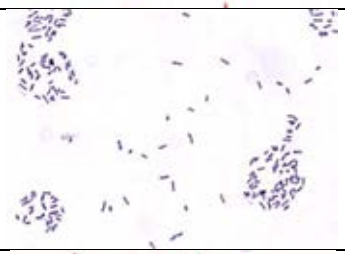
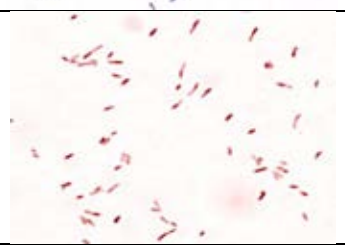


ชุดควบคุม TD-204 TB1-218 T6-212 T6-223

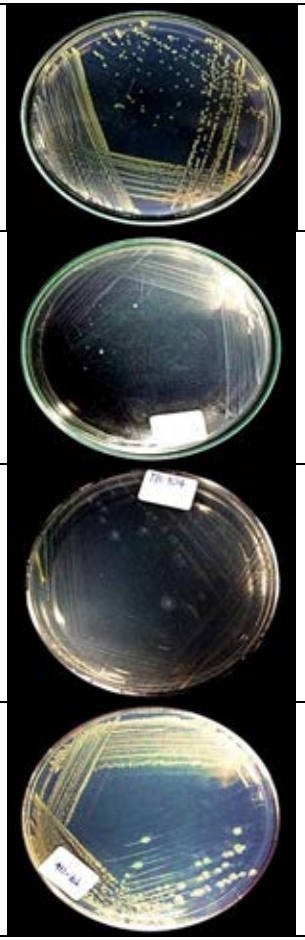
รูปที่ 4.10 ลักษณะการเปลี่ยนแปลงสีของอาหารเหลว NSW ที่เติมไพรีน หลังเพาะเลี้ยงแบคทีเรียบริสุทธิ์สายพันธุ์ต่าง ๆ เป็นเวลา 5 วัน

ผลจำแนกชนิดของแบคทีเรียสายพันธุ์บริสุทธิ์โดยการสังเกตลักษณะสังเกตลักษณะโคโลนีของแบคทีเรียสายพันธุ์บริสุทธิ์ที่เจริญบนอาหารแข็ง MA และลักษณะการย้อมติดสีแกรมของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ดังแสดงในตารางที่ 4.5 และ 4.6

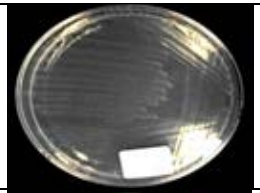
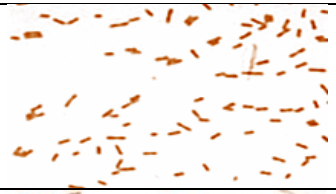
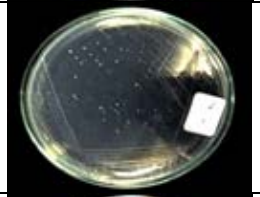
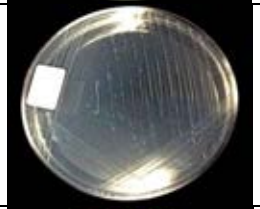
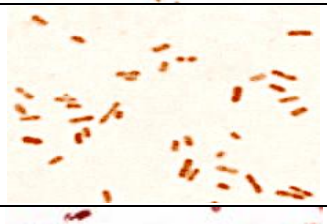
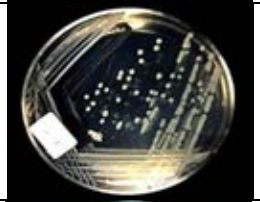
ตารางที่ 4.5 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายฟีแนนทรีน

ชื่อสายพันธุ์	รูปโคโลนี	รูปภายใต้กล้องจุลทรรศน์	ลักษณะโคโลนี	ลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์
TA-101			โคโลนีสีเหลือง รูปร่างกลม ขอบเรียบ ด้าน และทึบแสง	ติดสีแกรมลบ มีลักษณะเป็นแท่ง
TB-101			โคโลนีสีขาว รูปร่างกลม ขอบเรียบ ด้าน และทึบแสง	ติดสีแกรมลบมีลักษณะเป็นแท่ง
TD-101			โคโลนีสีส้ม รูปร่างกลม ขอบเรียบด้าน และทึบแสง	ติดสีแกรมบวกมีลักษณะเป็นแท่ง
TE-101			โคโลนีสีขาว รูปร่างกลม ขอบเรียบ มันวาว และทึบแสง	ติดสีแกรมลบ มีลักษณะเป็นแท่ง

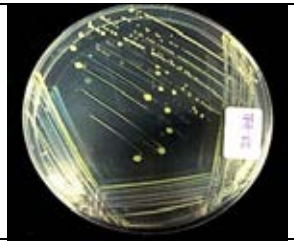
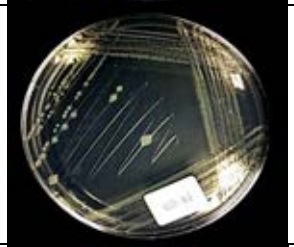
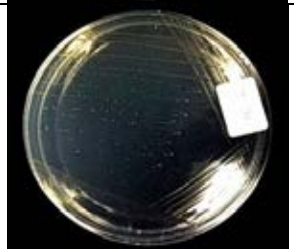
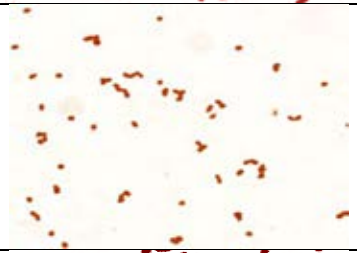
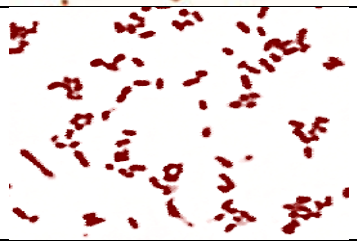
ตารางที่ 4.5 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายฟีแนนทรีน (ต่อ)

ชื่อสายพันธุ์	รูปโคโลนี	รูปภายใต้กล้องจุลทรรศน์	ลักษณะโคโลนี	ลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์
TJ-101			โคโลนีขาวเหลือง รูปร่างกลม ขอบเรียบ ด้าน และทึบแสง	ติดสีแกรมบวก มีลักษณะเป็นแท่ง
TW2-101			โคโลนีสีขาว รูปร่างกลม ขอบเรียบ ด้าน และทึบแสง	ติดสีแกรมลบ มีลักษณะเป็นแท่ง
TB1-104			โคโลนีสีขาวใสด้านนอกส่วนด้านในทึบแสง รูปร่างกลมขอบเรียบด้าน และโปร่งแสง	ติดสีแกรมลบมีลักษณะเป็นแท่ง
TB5-102			โคโลนีสีเหลืองอ่อน รูปร่างรี ขอบหยัก ด้าน และทึบแสง	ติดสีแกรมลบ มีลักษณะเป็นแท่ง

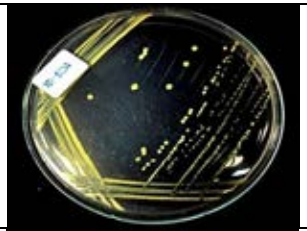
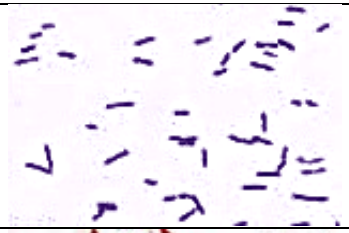
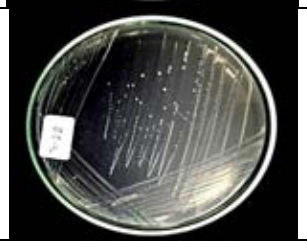
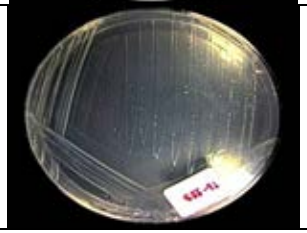
ตารางที่ 4.5 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายฟีแนนทรีน (ต่อ)

ชื่อสายพันธุ์	รูปโคโลนี	รูปภายใต้กล้องจุลทรรศน์	ลักษณะโคโลนี	ลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์
TB9-105			โคโลนีสีขาว รูปร่างกลม ขอบเรียบ ด้าน และทึบแสง	ติดสีแกรมลบ มีลักษณะเป็นแท่ง
T2-109			โคโลนีสีขาว รูปร่างกลม ขอบเรียบ ด้าน และทึบแสง	ติดสีแกรมลบมีลักษณะเป็นแท่ง
T3-102			โคโลนีสีขาว รูปร่างกลม ขอบเรียบ ด้าน และทึบแสง	ติดสีแกรมลบ มีลักษณะเป็นแท่ง
T4-101			โคโลนีสีขาว รูปร่างกลม ขอบเรียบ เยิ้ม และทึบแสง	ติดสีแกรมลบมีลักษณะเป็นแท่ง
T5-101			โคโลนีสีขาว รูปร่างกลม ขอบเรียบ ด้าน และทึบแสง	ติดสีแกรมลบมีลักษณะเป็นแท่ง

ตารางที่ 4.5 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายฟีแนนทรีน (ต่อ)

ชื่อสายพันธุ์	รูปโคโลนี	รูปภายใต้กล้องจุลทรรศน์	ลักษณะโคโลนี	ลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์
T6-101			โคโลนีสีเหลือง รูปร่างกลม ขอบเรียบ ด้าน และทึบแสง	ติดสีแกรมลบ มีลักษณะเป็นแท่ง
T6-102			โคโลนีสีเหลืองอ่อน รูปร่างรี ขอบหยัก ด้าน และทึบแสง	ติดสีแกรมลบ มีลักษณะเป็นแท่ง
T7-101			โคโลนีสีเหลืองอ่อน รูปร่างกลม ขอบเรียบ ด้าน และทึบแสง	ติดสีแกรมลบ มีลักษณะเป็นแท่ง
T9-101			โคโลนีสีขาว รูปร่างกลม ขอบเรียบ ด้าน และทึบแสง	ติดสีแกรมลบ มีลักษณะเป็นแท่ง

ตารางที่ 4.6 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายไพรีน

ชื่อสายพันธุ์	รูปโคโลนี	รูปภายใต้กล้องจุลทรรศน์	ลักษณะโคโลนี	ลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์
TD-204			โคโลนีสีเหลือง รูปร่างกลม ขอบเรียบ ด้าน และทึบแสง	ติดสีแกรมบวก มีลักษณะเป็นแท่ง
TB1-218			โคโลนีสีขาวเหลือง รูปร่างกลม ขอบเรียบ ด้าน และทึบแสง	ติดสีแกรมลบ มีลักษณะเป็นแท่ง
T6-212			โคโลนีสีขาว รูปร่างกลม ขอบเรียบด้าน และทึบแสง	ติดสีแกรมลบ มีลักษณะเป็นแท่ง
T6-223			โคโลนีขาวเหลือง รูปร่างกลม ขอบเรียบ ด้าน และทึบแสง	ติดสีแกรมบวก มีลักษณะเป็นแท่ง

จากตารางที่ 4.5 และ 4.6 ผลปรากฏว่าจากแบคทีเรียสายพันธุ์บริสุทธิ์จำนวน 21 สายพันธุ์ พบติดสีแกรมลบจำนวน 17 สายพันธุ์และติดสีแกรมบวกจำนวน 4 สายพันธุ์ โดยแบคทีเรียสายพันธุ์บริสุทธิ์ที่ติดสีแกรมลบจำนวน 17 สายพันธุ์จัดเป็นแบคทีเรียย่อยสลายฟีแนนทรีนจำนวน 15 สายพันธุ์ ได้แก่ สายพันธุ์ TA-101, TB-101,TE-101, TW2-101, TB1-104, TB5-102, TB9-105, T2-109, T3-102, T4-101, T5-101, T6-101, T6-102, T7-101 และ T9-101 พบแบคทีเรียย่อยสลายไพรีนจำนวน 2 สายพันธุ์ ได้แก่ สายพันธุ์ TB1-218 และ T6-212 ส่วนแบคทีเรียสายพันธุ์บริสุทธิ์ที่ติดสีแกรมบวกจำนวน 4 สายพันธุ์จัดป็นแบคทีเรียย่อยสลายฟีแนนทรีนจำนวน 2 สายพันธุ์ ได้แก่ สายพันธุ์ TJ-101 และ TD-101 และแบคทีเรียย่อยสลายไพรีนจำนวน 2 สายพันธุ์ ได้แก่สายพันธุ์ TD-204 และ T6-223

เมื่อวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีน 16S rDNA ของแบคทีเรียสายพันธุ์บริสุทธิ์เปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีน 16S rDNA ของแบคทีเรียสายพันธุ์ต่าง ๆ ที่มีรายงานในฐานข้อมูล GenBank โดยใช้โปรแกรม BLASTn พบว่ามีความคล้ายคลึงกับแบคทีเรียในสกุลต่าง ๆ อีกมากมาย ดังแสดงในตารางที่ 4.7 และตารางที่ 4.8 และภาคผนวก จ

ตารางที่ 4.7 ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีน 16S rDNA ของแบคทีเรียสายพันธุ์บริสุทธิ์ที่ถูกคัดแยกจากแหล่งตัวอย่างเกาะสีชังที่สามารถย่อยสลายฟีแนนทรีนได้

ตัวอย่างดิน	สายพันธุ์	คล้ายกับแบคทีเรียในสกุล (ช่วง % ความเหมือน)	กลุ่มแบคทีเรีย
A	TA-101	*Oceanimonas* (99-98%)	*Gammaproteobacteria*
B	TB-101	*Brucella* (99%)	*Alphaproteobacteria*
D	TD-101	*Gordonia* (99%)	*Actinobacteria*
E	TE-101	*Ochrobactrum* (99%)	*Alphaproteobacteria*
J	TJ-101	*Microbacterium* (99%)	*Actinobacteria*
ตัวอย่างน้ำทะเล	สายพันธุ์	คล้ายกับแบคทีเรียในสกุล (ช่วง % ความเหมือน)	กลุ่มแบคทีเรีย
W2	TW2-101	*Pseudomonas* (99%)	*Gammaproteobacteria*

ตารางที่ 4.7 ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีน 16S rDNA ของแบคทีเรียสายพันธุ์บริสุทธิ์ที่ถูกคัดแยกจากแหล่งตัวอย่างเกาะสีชังที่สามารถย่อยสลายฟีแนนทรีนได้ (ต่อ)

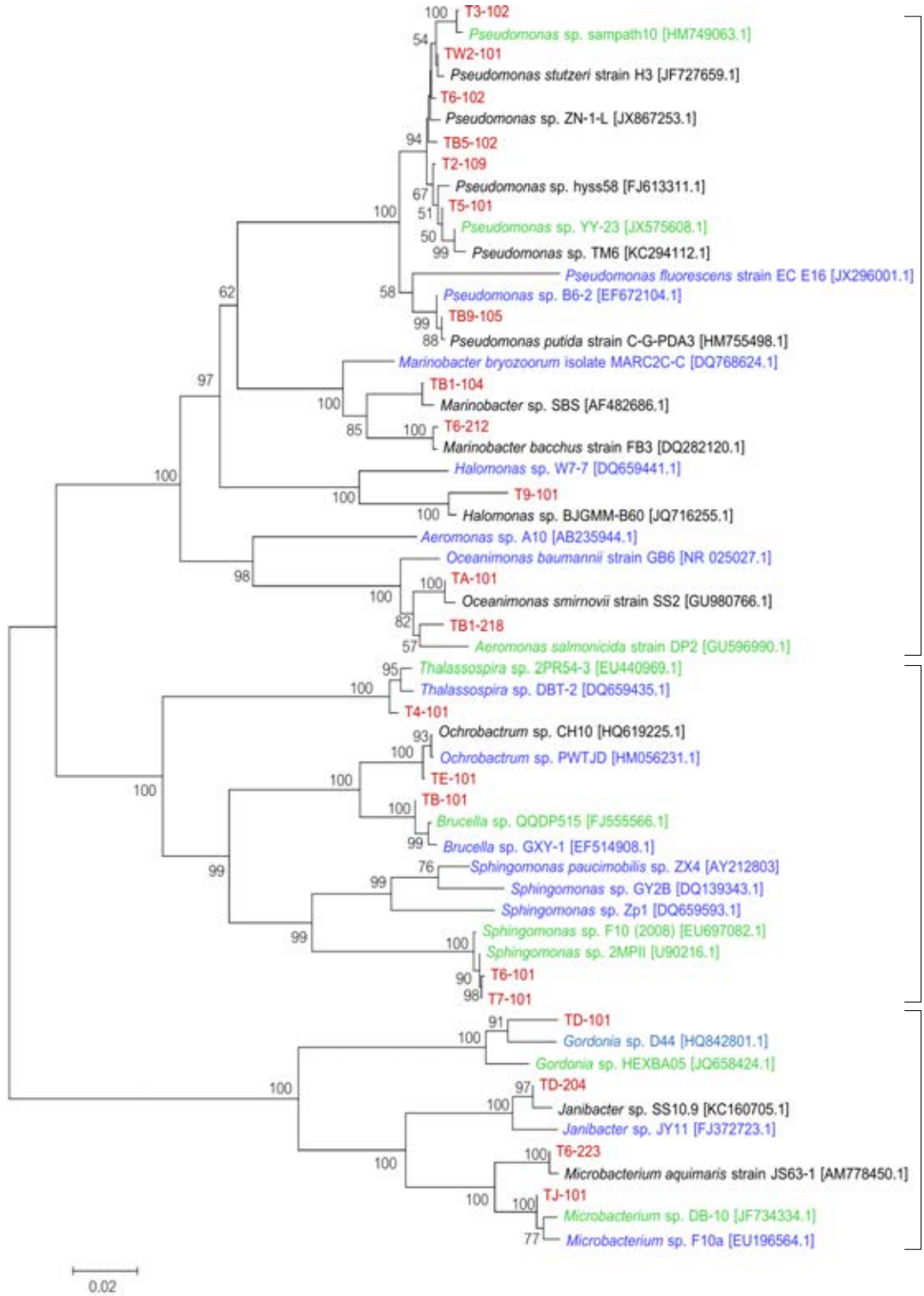
ตัวอย่างดินตะกอน	สายพันธุ์	คล้ายกับแบคทีเรียในสกุล (ช่วง % ความเหมือน)	กลุ่มแบคทีเรีย
B1	TB1-104	*Marinobacter* (98-99%)	*Gammaproteobacteria*
B5	TB5-102	*Pseudomonas* (99%)	*Gammaproteobacteria*
B9	TB9-105	*Pseudomonas* (99%)	*Gammaproteobacteria*
2	T2-109	*Pseudomonas* (99%)	*Gammaproteobacteria*
3	T3-102	*Pseudomonas* (99%)	*Gammaproteobacteria*
4	T4-101	*Thalassospira* (99%)	*Alphaproteobacteria*
5	T5-101	*Pseudomonas* (99%)	*Gammaproteobacteria*
6	T6-101	*Sphingomonas* (97-99%)	*Alphaproteobacteria*
	T6-102	*Pseudomonas* (99%)	*Gammaproteobacteria*
7	T7-101	*Sphingomonas* (97-99%)	*Alphaproteobacteria*
9	T9-101	*Halomonas* (98%)	*Gammaproteobacteria*

ตารางที่ 4.8 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีน 16S rDNA ของแบคทีเรียสายพันธุ์บริสุทธิ์ที่ถูกคัดแยกจากแหล่งตัวอย่างเกาะสีชังที่สามารถย่อยสลายไพรีนได้

ตัวอย่างดิน	สายพันธุ์	คล้ายกับแบคทีเรียในสกุล (ช่วง % ความเหมือน)	กลุ่มแบคทีเรีย
D	TD-204	*Janibacter* (99%)	*Actinobacteria*
ตัวอย่างดินตะกอน	สายพันธุ์	คล้ายกับแบคทีเรียในสกุล (ช่วง % ความเหมือน)	กลุ่มแบคทีเรีย
B1	TB1-218	*Aeromonas* (98%)	*Gammaproteobacteria*
6	T6-212	*Marinobacter* (99-100%)	*Gammaproteobacteria*
	T6-223	*Microbacterium* (99%)	*Actinobacteria*

จากตารางที่ 4.7 และ 4.8 ผลปรากฏว่าแบคทีเรีย 7 สายพันธุ์คือ TW2-101 ที่ย่อยสลายฟีแนนทรีนจากตัวอย่างน้ำทะเล และ TB5-102, TB9-105, T2-109, T3-102, T5-101 และ T6-102 ที่ย่อยสลายฟีแนนทรีนจากตัวอย่างดินตะกอน มีความคล้ายคลึงกับแบคทีเรียในสกุล *Pseudomonas* ถึง 99% พบแบคทีเรีย 2 สายพันธุ์ คือ TJ-101 ที่ย่อยสลายฟีแนนทรีนจากตัวอย่างดิน และ T6-223 ที่ย่อยสลายไพรีนจากตัวอย่างดินตะกอน มีความคล้ายคลึงกับแบคทีเรียในสกุล *Microbacterium* ถึง 99% พบแบคทีเรีย 2 สายพันธุ์ คือ T6-101 และ T7-101 ที่ย่อยสลายฟีแนนทรีนจากตัวอย่างดินตะกอน มีความคล้ายคลึงกับแบคทีเรียในสกุล *Sphingomonas* ถึง 99% และพบแบคทีเรีย 2 สายพันธุ์ คือ TB1-104 ที่ย่อยสลายฟีแนนทรีนจากตัวอย่างดินตะกอน และ T6-212 ย่อยสลายไพรีนจากตัวอย่างดินตะกอน มีความคล้ายคลึงกับแบคทีเรียในสกุล *Marinobacter* ถึง 99% แบคทีเรียสายพันธุ์ TA-101, TB-101, TD-101และ TE-101 ที่ย่อยสลายฟีแนนทรีนจากตัวอย่างดินมีความคล้ายคลึงกับแบคทีเรียในสกุล *Oceanimonas Brucella Gordonia* และ *Ochrobactrum* ตามลำดับ ถึง 99% แบคทีเรียสายพันธุ์ T4-101 และ T9-101 ที่ย่อยสลายฟีแนนทรีนจากตัวอย่างดินตะกอน มีความคล้ายคลึงกับแบคทีเรียในสกุล *Thalassospira* ถึง 99% และ *Halomonas* ถึง 98% นอกจากนี้แบคทีเรียสายพันธุ์ TD-204 ที่ย่อยสลายไพรีนจากตัวอย่างดิน และแบคทีเรียสายพันธุ์ TB1-218 ที่ย่อยสลายไพรีนจากตัวอย่างดินตะกอน มีความคล้ายคลึงกับแบคทีเรียในสกุล *Janibacter* ถึง 99% และ *Aeromonas* ถึง 98% นอกจากนี้ยังพบว่าแบคทีเรียสายพันธุ์บริสุทธิ์ 12 จาก 21 สายพันธุ์ จัดอยู่ในกลุ่ม *Gammaproteobacteria* มี 5 สายพันธุ์จัดอยู่ในกลุ่ม *Alphaproteobacteria* และ 4 สายพันธุ์จัดอยู่ในกลุ่ม *Actinobacteria*

เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีน 16S rDNA ของแบคทีเรียสายพันธุ์บริสุทธิ์คัดแยกได้และลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีน 16S rDNA ของแบคทีเรียสายพันธุ์อ้างอิงและแบคทีเรียที่มีรายงานย่อยสลายสารพิษมาจัดเรียง (Multiple alignment) โดยใช้โปรแกรม MUSCLE ในโปรแกรม MEGA5 version 5.05 จากนั้นนำข้อมูลที่ได้มาคำนวณระยะห่างทางพันธุกรรม (distance matrix) และสร้างแผนภูมิต้นไม้แสดงความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการโดยการวิเคราะห์ด้วยวิธี Neighbor-joining และวิเคราะห์ความเชื่อมั่นของกิ่งด้วยวิธี Bootstrap ที่ 1,000 ซ้ำ ดังแสดงในรูปที่ 4.11



รูปที่ 4.11 แผนภูมิต้นไม้แสดงความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของยีนบริเวณ 16S rDNA จากแบคทีเรียสายพันธุ์บริสุทธิ์ที่คัดแยกได้ (ตัวอักษรสีแดง) กับยีน 16S rDNA ของแบคทีเรียสายพันธุ์เกี่ยวข้องที่ไม่พบรายงานย่อยสลายสารพิษ (ตัวอักษรสีดำ) และพบรายงานการย่อยสลายสารพิษ (ตัวอักษรสีฟ้า) และแบคทีเรียที่มีรายงานย่อยสลายสารพิษเพิ่มเติม (ตัวอักษรสีน้ำเงิน) ตัวเลขที่กิ่งสาขาบอกถึงการนับผลที่ให้ผลซ้ำจากทั้งหมด 1,000 ครั้ง ด้วย bootstrap

จากรูปที่ 4.11 แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียสายพันธุ์บริสุทธิ์ TA-101 มีความใกล้เคียงกับแบคทีเรียในสกุล *Oceanimonas* แบคทีเรียสายพันธุ์ TB-101 มีความใกล้เคียงกับแบคทีเรียในสกุล *Brucella* แบคทีเรียสายพันธุ์ TD-101 มีความใกล้เคียงกับมีความใกล้เคียงกับแบคทีเรียในสกุล *Gordonia* แบคทีเรียสายพันธุ์ TE-101 มีความใกล้เคียงกับมีความใกล้เคียงกับแบคทีเรียในสกุล *Ochrobactrum* แบคทีเรีย 2 สายพันธุ์ คือ TJ-101 และ T6-223 มีความใกล้เคียงกับแบคทีเรียในสกุล *Microbacterium* แบคทีเรีย 7 สายพันธุ์ คือ TW2-101, TB5-102, TB9-105, T2-109, T3-102, T5-101 และ T6-102 มีความใกล้เคียงกับกับแบคทีเรียในสกุล *Pseudomonas* แบคทีเรีย 2 สายพันธุ์ คือ TB1-104 และ T6-212 มีความใกล้เคียงกับแบคทีเรียในสกุล *Marinobacter* แบคทีเรียสายพันธุ์ T4-101 มีความใกล้เคียงกับแบคทีเรียในสกุล*Thalassospira* แบคทีเรีย 2 สายพันธุ์ คือ T6-101 และ T7-101 มีความใกล้เคียงกับแบคทีเรียในสกุล *Sphingomonas* แบคทีเรียสายพันธุ์ T9-101 มีความใกล้เคียงกับแบคทีเรียในสกุล *Halomonas* แบคทีเรียสายพันธุ์ TD-204 มีความใกล้เคียงกับแบคทีเรียในสกุล *Janibacter* และแบคทีเรียสายพันธุ์ TB1-218 มีความใกล้เคียงกับแบคทีเรียในสกุล *Aeromonas*

การตรวจสอบยีนประมวลรหัสเอนไซม์ไดออกซิจีเนสที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายสารประกอบ PAHs ในแบคทีเรียสายพันธุ์บริสุทธิ์ที่คัดแยกได้โดยเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอบริเวณยีนประมวลรหัสเอนไซม์ไดออกซิจีเนสในหน่วยย่อยแอลฟา ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสโดยใช้ดีเอ็นเอแม่แบบจากแบคทีเรียสายพันธุ์บริสุทธิ์ต่าง ๆ และใช้คู่ไพร์เมอร์ที่จำเพาะต่อยีนประมวลรหัสเอนไซม์ไดออกซิจีเนสในกลุ่ม dox_{GN} และ dox_{GP} ผลแสดงดังตารางที่ 4.9

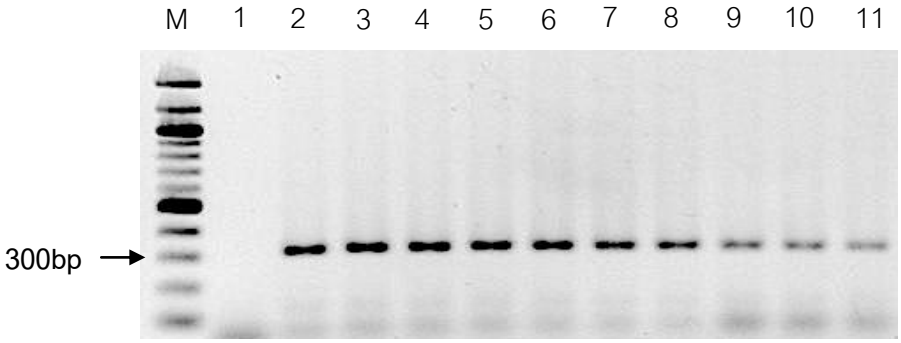
ตารางที่ 4.9 ผลของผลิตภัณฑ์ PCR เมื่อใช้ไพร์เมอร์คู่ต่าง ๆ

ดีเอ็นเอจากเชื้อ	คู่ไพร์เมอร์*	
	GNF/GNR	GPF/GPR
Oceanimonas sp. สายพันธุ์ TA-101	-	-
Brucella sp. สายพันธุ์ TB-101	-	-
Gordonia sp. สายพันธุ์ TD-101	-	+
Ochrobactrum sp. สายพันธุ์ TE-101	-	-
Microbacterium sp. สายพันธุ์ TJ-101	-	-
Pseudomonas sp. สายพันธุ์ TW2-101	+	-
Marinobacter sp. สายพันธุ์ TB1-104	-	+
Pseudomonas sp.สายพันธุ์ TB5-102	+	-
Pseudomonas sp.สายพันธุ์ TB9-105	+	-
Pseudomonas sp.สายพันธุ์ T2-109	+	-
Pseudomonas sp. สายพันธุ์ T3-102	+	-
Thalassospira sp. สายพันธุ์ T4-101	-	-
Pseudomonas sp. สายพันธุ์ T5-101	+	-
Sphingomonas sp. สายพันธุ์ T6-101	+	-
Pseudomonas sp. สายพันธุ์ T6-102	+	-
Sphingomonas sp. สายพันธุ์ T7-101	+	-
Halomonas sp. สายพันธุ์ T9-101	-	-
Janibacter sp. สายพันธุ์ TD-204	-	-
Aeromonas sp. สายพันธุ์ TB1-218	-	-
Marinobacter sp. สายพันธุ์ T6-212	-	+
Microbacterium sp. สายพันธุ์ T6-223	-	-

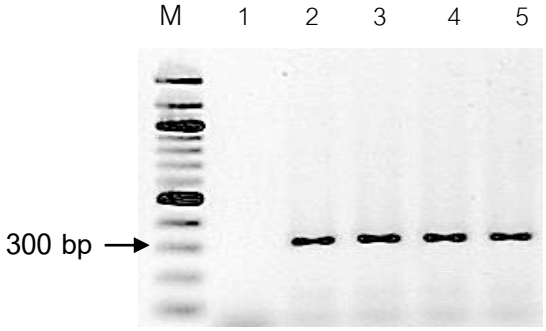
* หมายเหตุ

(+) คือได้ผลิตภัณฑ์ PCR ตามที่คาดหวัง (-) คือไม่ได้ผลิตภัณฑ์ PCR ตามที่คาดหวัง

จากตารางที่ 4.9 ได้ผลิตภัณฑ์ PCR ขนาดที่คาดหวังคือ 306 bp เมื่อใช้คู่ไพร์เมอร์ GNF/GNR และใช้ดีเอ็นเอแม่แบบของแบคทีเรียในสกุล *Pseudomonas* sp. ทุกสายพันธุ์คือ TW2-101, TB5-102, TB9-105, T2-109, T3-102, T5-101และ T6-102 และดีเอ็นเอแม่แบบของแบคทีเรียในสกุล *Sphingomonas* ทุกสายพันธุ์ คือ T6-101 และ T7-101 ดังแสดงในรูปที่ 4.12 และได้ผลิตภัณฑ์ PCR ขนาดที่คาดหวังคือ 292 bp เมื่อใช้คู่ไพร์เมอร์ GPF/GPR และใช้ดีเอ็นเอแม่แบบของแบคทีเรียในสกุล *Gordonia* สายพันธุ์ TD-101 และ *Marinobacter* สายพันธุ์ T6-212 และ TB1-104 ดังแสดงในรูปที่ 4.13



รูปที่ 4.12 ขนาดชิ้นผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอบริเวณยีนไดออกซิจีเนสในกลุ่ม dox_{GN} **ช่องวิ่ง** M: ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp **ช่องวิ่ง** 1: ไม่มีดีเอ็นเอแม่แบบ (ตัวแปรควบคุมผลลบ) **ช่องวิ่ง** 2: ดีเอ็นเอจาก *Burholderia* sp. สายพันธุ์ RP007 (ตัวแปรควบคุมผลบวก) **ช่องวิ่ง** 3: ดีเอ็นเอจาก *Pseudomonas* sp. สายพันธุ์ TW2-101 **ช่องวิ่ง** 4: ดีเอ็นเอจาก *Pseudomonas* sp. สายพันธุ์ TB5-102 **ช่องวิ่ง** 5: ดีเอ็นเอจาก *Pseudomonas* sp. สายพันธุ์ TB9-105 **ช่องวิ่ง** 6: ดีเอ็นเอจาก *Pseudomonas* sp. สายพันธุ์ T2-109 **ช่องวิ่ง** 7: ดีเอ็นเอจาก *Pseudomonas* sp. สายพันธุ์ T3-102 **ช่องวิ่ง** 8: ดีเอ็นเอจาก *Pseudomonas* sp. สายพันธุ์ T5-101 **ช่องวิ่ง** 9: ดีเอ็นเอจาก *Pseudomonas* sp. สายพันธุ์ T6-102 **ช่องวิ่ง** 10: ดีเอ็นเอจาก *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ T6-101 **และช่องวิ่ง** 11: ดีเอ็นเอจาก *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ T7-101



รูปที่ 4.13 ขนาดชิ้นผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอบริเวณยีนไดออกซิจีเนสในกลุ่ม dox_{GP} **ช่องวิ่ง** M: ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp **ช่องวิ่ง** 1: ไม่มีดีเอ็นเอแม่แบบ (ตัวแปรควบคุมผลลบ) **ช่องวิ่ง** 2: ดีเอ็นเอจาก *Pseudoxanthomonas* sp. สายพันธุ์ RN402 (ตัวแปรควบคุมผลบวก) **ช่องวิ่ง** 3: ดีเอ็นเอจาก *Gordonia* sp. สายพันธุ์ TD-101 คือ **ช่องวิ่ง** 4: ดีเอ็นเอจาก *Marinobacter* sp. สายพันธุ์ TB1-104 **และช่องวิ่ง** 5: ดีเอ็นเอจาก *Marinobacter* sp. สายพันธุ์ T6-212

4.5 ความหลากหลายของโครงสร้างประชาคมแบคทีเรียบริเวณเกาะสีชัง

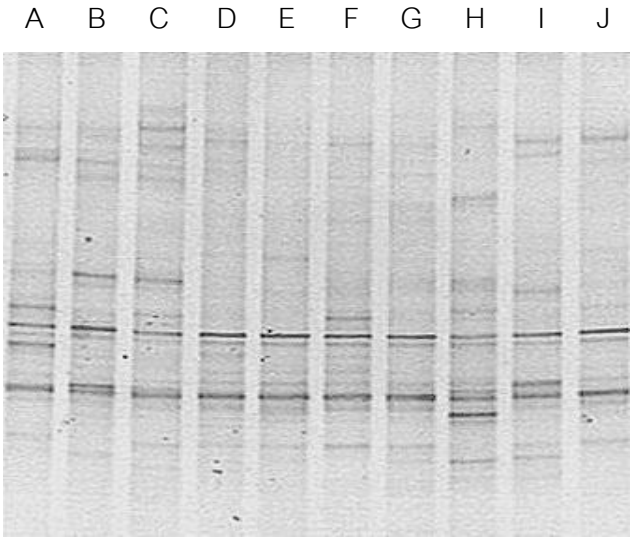
จากผลการทดลองการคัดแยกเชื้อย่อยสลายฟีแนนทรีน และไพรีนในแหล่งตัวอย่างเกาะสีชังพบว่าสามารถคัดแยกแบคทีเรียได้หลากหลายสายพันธุ์ที่ประสิทธิภาพในการย่อยสลายสารพิษทั้งสองชนิดนี้ได้ แต่เนื่องจากเพาะเลี้ยงแบคทีเรียโดยทั่วไปในธรรมชาติถูกจำกัด ซึ่งมีเพียงร้อยละ 1% เท่านั้นสามารถเพาะเลี้ยงได้ในห้องปฏิบัติการ ดังนั้นการศึกษาความหลากหลายของโครงสร้างประชาคมแบคทีเรียจะช่วยทำให้ทราบข้อมูลของชนิดแบคทีเรียและความหลากหลายของแบคทีเรียที่เป็นองค์ประกอบในพื้นที่เกาะสีชังได้อย่างแท้จริง ซึ่งทำได้โดยวิธี PCR-DGGE โดยมีเป้าหมายบริเวณยีน 16S rDNA ของแบคทีเรีย และใช้เมตาจีโนมิกดีเอ็นเอที่สกัดจากสิ่งแวดล้อมโดยตรงเป็นดีเอ็นเอแม่แบบโดยมีความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่สกัดได้ดังแสดงในตารางที่ 4.10 และใช้ไพร์เมอร์คู่ 341F ที่มี GC clamp และ 520 R (Muyzer และคณะ, 1993) โดยเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอบริเวณ V-3 region ซึ่งจะได้ผลิตภัณฑ์ PCR ความยาวประมาณ 200 bp หลังจากนั้นใช้เทคนิค DGGE ในการแยกชิ้นส่วนดีเอ็นเอของแบคทีเรียแต่ละชนิดออกจากกัน โดยใช้ความแตกต่างของความเข้มข้นของ denaturant (เกรเดียนท์) เท่ากับ 40-80% ทั้งในตัวอย่างทุกประเภท ดังแสดงในรูปที่ 4.14 4.15 และ 4.16 ตามลำดับ จากนั้นนำผลที่ได้มาคำนวณหาค่าความหลากหลายของแบคทีเรีย ดังแสดงในตารางที่ 4.11 4.12 และ 4.13 และภาคผนวก ฉ

ตารางที่ 4.10 ความเข้มข้นดีเอ็นเอที่สกัดได้โดยตรงจากตัวอย่างดิน น้ำทะเล และดินตะกอนบริเวณเกาะสีชังด้วยชุดสกัด Fast-DNA spin kit (Bio 101 Kit, Qbiogene, USA)

ตัวอย่างดิน	บริเวณ	ความเข้มข้นดีเอ็นเอ (นาโนกรัมต่อกรัมดิน)
A	ท่าวังแถบพระจุฑาธุชราชฐาน	1,127.9
B		1,100.8
C		1,450.7
D	ที่จอดเรือท่าล่าง(ท่าเทววงษ์)	1,129.4
E	สถานีตำรวจใกล้ท่าล่าง	733.8
F	หน้าหาดถ้ำพัง	1,440.7
G	หาดทรายแก้ว ใกล้สถานีขนถ่ายน้ำมันและสินค้า	584.6
H	ท่าวังแถบเรือนผ่องศรี	1,125.5
I	หน้าสถานีตำรวจน้ำ	1,410.1
J	ท่าเรือท่าบน (ท่าภาณุรังสี) และรอบชายฝั่งเขตชุมชนที่อยู่อาศัย	773.1
ตัวอย่างน้ำทะเล	บริเวณ	ความเข้มข้นดีเอ็นเอ (นาโนกรัมต่อมิลลิลิตรน้ำทะเล)
W1	ท่าวังแถบสะพานอัษฎางค์	2.20
W2	ที่จอดเรือท่าบน	0.99
W3	ที่จอดเรือท่าล่าง	1.89
W4	หน้าหาดถ้ำพัง	1.87
ตัวอย่างดินตะกอน	บริเวณ	ความเข้มข้นดีเอ็นเอต่อกรัมดิน (นาโนกรัมต่อกรัมดิน)
B1	ทิศเหนือของเกาะสีชัง	998.8
B2	ทิศเหนือของเกาะสีชัง	1,993.9
B3	ทิศตะวันออกเฉียงเหนือของเกาะสีชัง บริเวณกลางร่องน้ำ	3,363.8

ตารางที่ 4.10 ความเข้มข้นดีเอ็นเอที่สกัดได้โดยตรงจากตัวอย่างดิน น้ำทะเล และดินตะกอนบริเวณเกาะสีชังด้วยชุดสกัด Fast-DNA spin kit (Bio 101 Kit, Qbiogene, USA) (ต่อ)

ตัวอย่างดินตะกอน	บริเวณ	ความเข้มข้นดีเอ็นเอต่อกรัมดิน (นาโนกรัมต่อกรัมดิน)
B5	ทิศตะวันตกของเกาะสีชัง บริเวณหน้าถ้ำพัง	2,978.3
B6	ทิศตะวันออกของเกาะสีชัง บริเวณหน้าท่าเรือสีชังทอง	2,659.9
B7	ทิศตะวันออกของเกาะสีชัง บริเวณกลางร่องน้ำ	2,674.3
B9	ทิศตะวันตกเฉียงใต้ของเกาะสีชัง บริเวณใต้เกาะค้างคาว	2,154.8
B10	ทิศตะวันตกเฉียงใต้ของเกาะสีชัง บริเวณใต้เกาะค้างคาว	800.8
B11	เขาบ่อยา บริเวณท่าเรือปตท.	957.8
1	หน้าบางพระ	800.9
2	ทิศตะวันออกเฉียงเหนือของเกาะสีชัง บริเวณกลางร่องน้ำ	3,391.5
3	กลางร่องน้ำท่าเรือศรีราชา	3,615.7
4	ทิศเหนือของเกาะสีชัง	959.1
5	ทิศเหนือฝั่งตะวันตกของเกาะสีชัง	807.8
6	ท่าบน	4,950.3
7	ทิศตะวันออกของเกาะสีชัง บริเวณหน้าท่าเรือสีชังทอง	2,666.2
8	ทิศตะวันออกของเกาะสีชัง บริเวณกลางร่องน้ำ	2,686.3
9	กลางร่องน้ำหน้าเกาะสีชัง-ศรีราชา	2,158.8
10	กลางร่องน้ำหน้าเกาะสีชัง-ศรีราชา	4,570.9
11	ท่าเรือสวนสาธารณะศรีราชา	956.9



รูปที่ 4.14 โครงสร้างประชาคมแบคทีเรียโดยวิธี DGGE จากบริเวณ V-3 region ของตัวอย่างดินเกาะสีชังจำนวน 10 ตัวอย่าง โดยแต่ละช่องวิ่งแทนตัวอย่างดินที่เก็บจากบริเวณต่าง ๆ

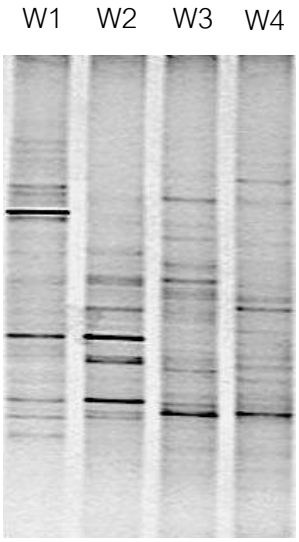
ตารางที่ 4.11 ค่าความหลากหลายที่ได้จากวิธี PCR-DGGE จากตัวอย่างดิน

ตัวอย่างดิน	บริเวณ	ค่าความหลากหลาย *H'**
A	**ท่าวังแถบพระจุฑาธุชราชฐาน**	2.08 ± 0.01
B		2.02 ± 0.00
C		**2.20 ± 0.01**
D	ที่จอดเรือท่าล่าง(ท่าเทววงษ์)	2.09 ± 0.05
E	สถานีตำรวจใกล้ท่าล่าง	1.77 ± 0.01
F	หน้าหาดถ้ำพัง	2.19 ± 0.02
G	หาดทรายแก้ว ใกล้สถานีขนถ่ายน้ำมันและสินค้า	1.57 ± 0.00
H	ท่าวังแถบเรือนผ่องศรี	2.07 ± 0.01
I	หน้าสถานีตำรวจน้ำ	2.13 ± 0.00
J	ท่าเรือท่าบน (ท่าภาณุรังสี) และรอบชายฝั่งเขตชุมชนที่อยู่อาศัย	1.85 ± 0.00

* หมายเหตุ

H' คำนวณโดยใช้แสดงดัชนีความหลากหลายของ Shannon

ตัวอักษรสีดำเข้ม แสดงตัวอย่างที่ให้ค่าดัชนีความหลากหลายของ Shannon สูงที่สุด



รูปที่ 4.15 โครงสร้างประชาคมแบคทีเรียโดยวิธี DGGE จากบริเวณ V-3 region ของตัวอย่างน้ำทะเลเกาะสีชังจำนวน 4 ตัวอย่าง โดยแต่ละช่องวิ่งแทนตัวอย่างน้ำทะเลที่เก็บจากบริเวณต่าง ๆ

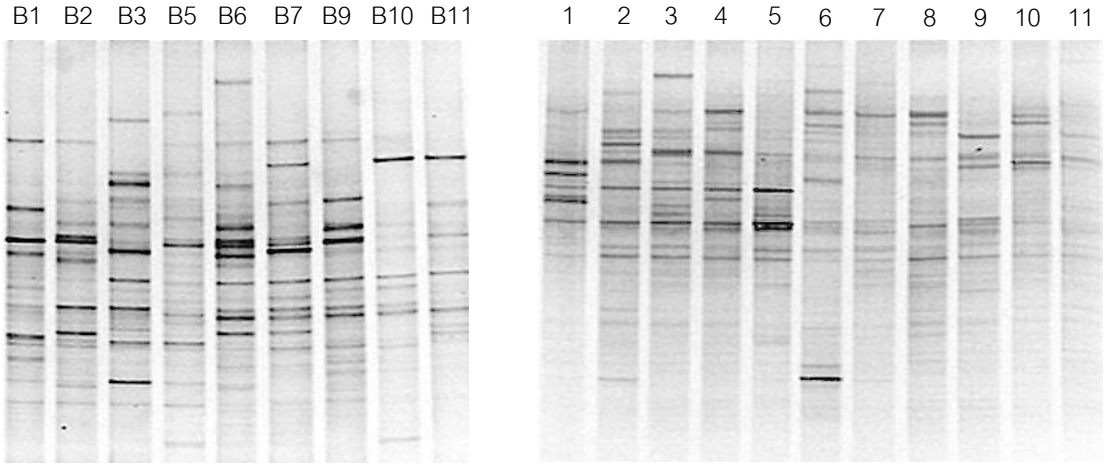
ตารางที่ 4.12 ค่าความหลากหลายที่ได้จากวิธี PCR-DGGE จากตัวอย่างน้ำทะเล

ตัวอย่างน้ำทะเล	บริเวณ	ค่าความหลากหลาย *H'**
W1	**ท่าวังแถบสะพานอัษฎางค์**	**2.16 ± 0.00**
W2	ที่จอดเรือท่าบน	1.77 ± 0.01
W3	ที่จอดเรือท่าล่าง	1.96 ± 0.01
W4	หน้าหาดถ้ำพัง	1.90 ± 0.02

* หมายเหตุ

H' คำนวณโดยใช้แสดงดัชนีความหลากหลายของ Shannon

ตัวอักษรสีดำเข้ม แสดงตัวอย่างที่ให้ค่าดัชนีความหลากหลายของ Shannon สูงที่สุด



รูปที่ 4.16 โครงสร้างประชาคมแบคทีเรียโดยวิธี DGGE จากบริเวณ V-3 region ของตัวอย่างดินตะกอนเกาะสีชังจำนวน 20 ตัวอย่าง โดยแต่ละช่องวิ่งแทนตัวอย่างดินตะกอนที่เก็บจากบริเวณต่าง ๆ

ตารางที่ 4.13 ค่าความหลากหลายที่ได้จากวิธี PCR-DGGE จากตัวอย่างดินตะกอน

ตัวอย่างดินตะกอน	บริเวณ	ค่าความหลากหลาย *H'**
B1	ทิศเหนือของเกาะสีชัง	1.99 ± 0.00
B2	ทิศเหนือของเกาะสีชัง	2.10 ± 0.01
B3	ทิศตะวันออกเฉียงเหนือของเกาะสีชัง บริเวณกลางร่องน้ำ	2.38 ± 0.01
B5	ทิศตะวันตกของเกาะสีชัง บริเวณหน้าถ้ำพัง	2.34 ± 0.00
B6	ทิศตะวันออกของเกาะสีชัง บริเวณหน้าท่าเรือสีชังทอง	2.32 ± 0.04
B7	ทิศตะวันออกของเกาะสีชัง บริเวณกลางร่องน้ำ	2.31 ± 0.08
B9	ทิศตะวันตกเฉียงใต้ของเกาะสีชัง บริเวณใต้เกาะค้างคาว	2.25 ± 0.01
B10	ทิศตะวันตกเฉียงใต้ของเกาะสีชัง บริเวณใต้เกาะค้างคาว	1.85 ± 0.00
B11	เขาบ่อยา บริเวณท่าเรือปตท.	1.97 ± 0.00

ตารางที่ 4.13 ค่าความหลากหลายที่ได้จากวิธี PCR-DGGE จากตัวอย่างดินตะกอน (ต่อ)

ตัวอย่างดินตะกอน	บริเวณ	ค่าความหลากหลาย *H'**
1	หน้าบางพระ	1.82 ± 0.01
2	ทิศตะวันออกเฉียงเหนือของเกาะสีชัง บริเวณกลางร่องน้ำ	2.39 ± 0.05
3	กลางร่องน้ำท่าเรือศรีราชา	2.37 ± 0.01
4	ทิศเหนือของเกาะสีชัง	1.98 ± 0.00
5	ทิศเหนือฝั่งตะวันตกของเกาะสีชัง	1.87 ± 0.07
6	**ท่าบน**	**2.40 ± 0.01**
7	ทิศตะวันออกของเกาะสีชัง บริเวณหน้าท่าเรือสีชังทอง	2.32 ± 0.01
8	ทิศตะวันออกของเกาะสีชัง บริเวณกลางร่องน้ำ	2.33 ± 0.01
9	กลางร่องน้ำหน้าเกาะสีชัง-ศรีราชา	2.25 ± 0.01
10	กลางร่องน้ำหน้าเกาะสีชัง-ศรีราชา	2.39 ± 0.00
11	ท่าเรือสวนสาธารณะศรีราชา	1.97 ± 0.01

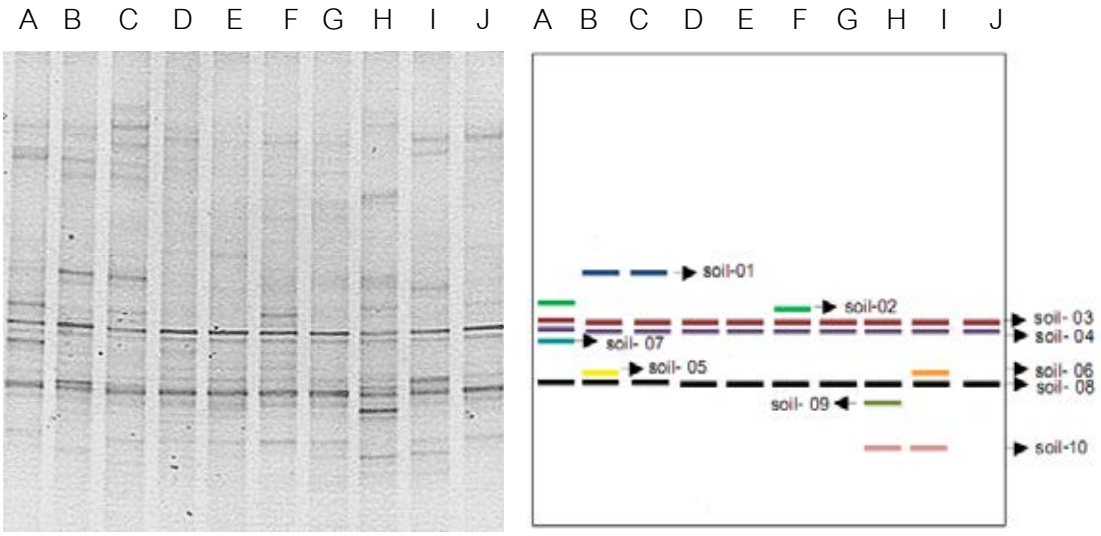
* หมายเหตุ

H' คำนวณโดยใช้แสดงดัชนีความหลากหลายของ Shannon

ตัวอักษรสีดำเข้ม แสดงตัวอย่างที่ให้ค่าดัชนีความหลากหลายของ Shannon สูงที่สุด

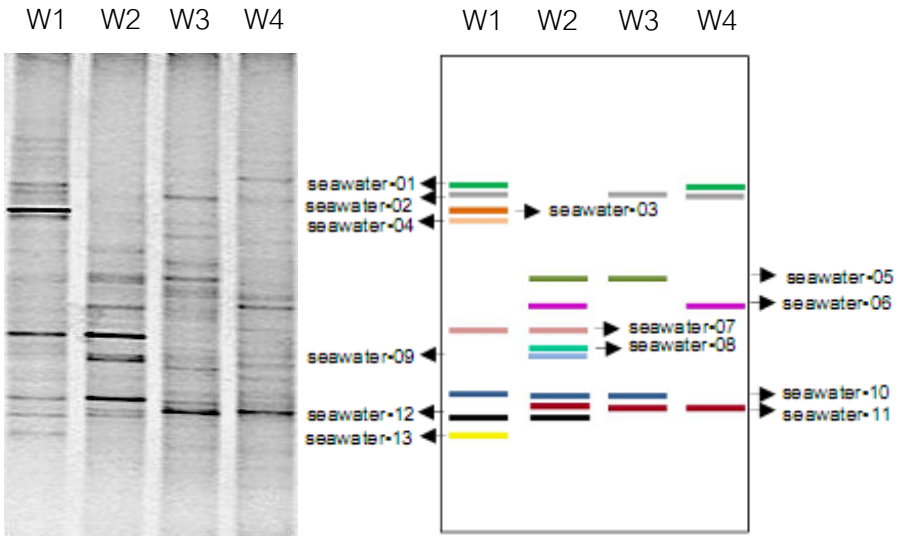
จากผลการคำนวณค่าความหลากหลายของโครงสร้างประชาคมแบคทีเรีย โดยวิธี DGGE ในตัวอย่างเกาะสีชังแสดงให้เห็นว่าความหลากหลายของโครงสร้างประชาคมแบคทีเรียในตัวอย่างดินตะกอนมีค่ามากกว่าในตัวอย่างดิน และน้ำทะเล ซึ่งตัวอย่างดินตะกอนหมายเลข 6 บริเวณท่าบน มีค่าความหลากหลายมากที่สุด โดยที่ค่าดัชนีความหลากหลายของ Shannon และในตัวอย่างดินตะกอนมีค่าอยู่ในช่วง 1.82 ± 0.01 (บริเวณท่าพระ) ถึง 2.40 ± 0.01 (บริเวณท่าบน) ค่าดัชนีความหลากหลายของ Shannon ในตัวอย่างดินมีค่าอยู่ในช่วง 1.57 ± 0.00 (บริเวณหาดทรายแก้วใกล้สถานีขนถ่ายน้ำมันและสินค้า) ถึง 2.20 ± 0.01 (บริเวณท่าวังแถบสะพานอัษฎางค์) และในตัวอย่างน้ำทะเลมีค่าอยู่ในช่วง 1.77 ± 0.01 (บริเวณที่จอดเรือท่าบน) ถึง 2.16 ± 0.00 (บริเวณท่า

วังแถบสะพานอัษฎางค์) นอกจากนี้ยังพบแถบดีเอ็นเอเด่นมากมายในตัวอย่างทุกประเภทดังแสดงในรูปที่ 4.17 4.18 และ 4.19 (ก และ ข)



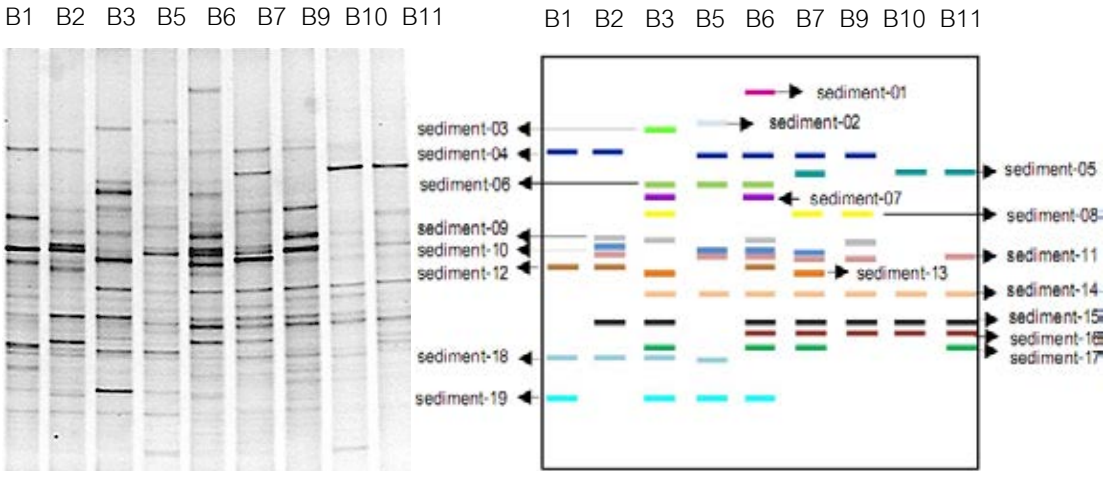
รูปที่ 4.17 แถบดีเอ็นเอเด่นของโครงสร้างประชาคมแบคทีเรียในตัวอย่างดินจำนวน 10 ตัวอย่าง **ช่องวิ่ง** A: ตัวอย่างดิน A (ท่าวังแถบพระจุฬาธุชราชฐาน) **ช่องวิ่ง** B: ตัวอย่างดิน B (ท่าวังแถบพระจุฬาธุชราชฐาน) **ช่องวิ่ง** C: ตัวอย่างดิน C (ท่าวังแถบพระจุฬาธุชราชฐาน) **ช่องวิ่ง** D: ตัวอย่างดิน D (ที่จอดเรือท่าล่าง) **ช่องวิ่ง** E: ตัวอย่างดิน E (สถานีตำรวจใกล้ท่าล่าง) **ช่องวิ่ง** F: ตัวอย่างดิน F (หน้าหาดถ้ำพัง) **ช่องวิ่ง** G: ตัวอย่างดิน G (หาดทรายแก้ว) **ช่องวิ่ง** H: ตัวอย่างดิน H (ท่าวังแถบเรือนผ่องศรี) **ช่องวิ่ง** I: ตัวอย่างดิน I (หน้าสถานีตำรวจน้ำ) **และช่องวิ่ง** J: ตัวอย่างดิน J (ท่าเรือท่าบน)

จากรูป 4.17 แสดงให้เห็นว่าแถบดีเอ็นเอเด่นในตัวอย่างดินมีทั้งหมด 10 แถบ โดยแถบดีเอ็นเอเด่น soil 03, soil 04 และ soil 08 เป็นกลุ่มแบคทีเรียหลักที่พบในตัวอย่างดินทุกตัวอย่าง แถบดีเอ็นเอเด่น soil 01 พบในตัวอย่างดิน B และ C บริเวณท่าวังแถบพระจุฬาธุชราชฐาน แถบดีเอ็นเอเด่น soil 02 พบในตัวอย่างดิน A บริเวณท่าวังแถบพระจุฬาธุชราชฐาน และตัวอย่าง F บริเวณหน้าหาดถ้ำพังและแถบดีเอ็นเอเด่น soil 10 พบในตัวอย่างดิน H ท่าวังแถบเรือนผ่องศรี และตัวอย่างดิน I บริเวณหน้าสถานีตำรวจน้ำในขณะที่แถบดีเอ็นเอเด่น soil 05 ที่พบในตัวอย่างดิน B เท่านั้น แถบดีเอ็นเอเด่น soil 07 ที่พบในตัวอย่างดิน A บริเวณท่าวังแถบพระจุฬาธุชราชฐานเท่านั้น แถบดีเอ็นเอเด่น soil 6 ที่พบในตัวอย่างดิน I บริเวณหน้าสถานีตำรวจน้ำเท่านั้น และแถบดีเอ็นเอเด่น soil 9 ที่พบในตัวอย่างดิน H ท่าวังแถบเรือนผ่องศรีเท่านั้น

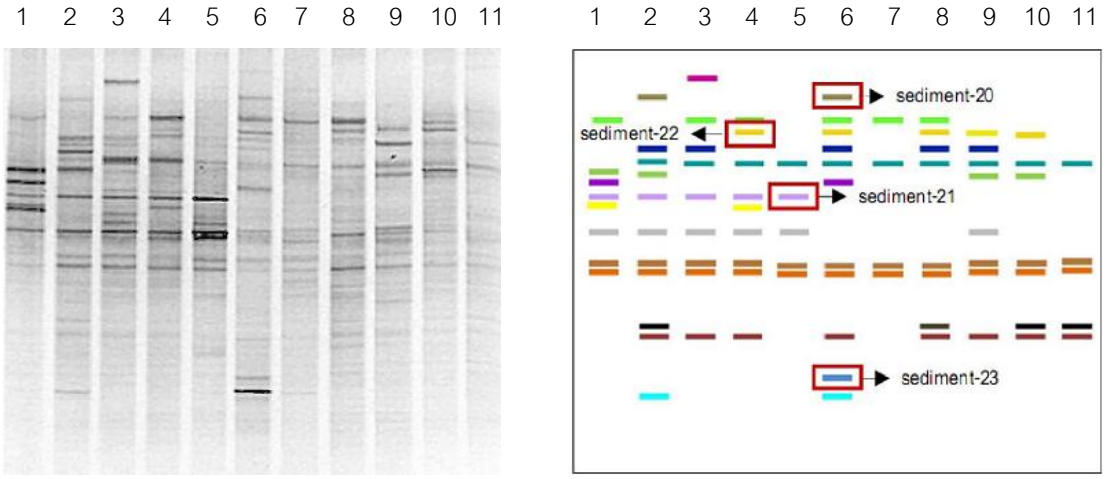


รูปที่ 4.18 แถบดีเอ็นเอเด่นของโครงสร้างประชาคมแบคทีเรียในตัวอย่างน้ำทะเลจำนวน 4 ตัวอย่าง **ช่องวิ่ง W1**: ตัวอย่างน้ำทะเล W1 (ท่าวังแถบสะพานอัษฎางค์) **ช่องวิ่ง W2**: ตัวอย่างน้ำทะเล W2 (ที่จอดเรือท่าบน) **ช่องวิ่ง W3**: ตัวอย่างน้ำทะเล (ที่จอดเรือท่าล่าง) **ช่องวิ่ง W4**: ตัวอย่างน้ำทะเล W4 (หน้าหาดถ้ำพัง)

จากรูป 4.18 แสดงให้เห็นว่าแถบดีเอ็นเอเด่นในตัวอย่างน้ำทะเลมีทั้งหมด 13 แถบ โดยแถบดีเอ็นเอเด่น seawater 02 เป็นกลุ่มแบคทีเรียหลักที่พบในตัวอย่างน้ำทะเล W1 W3 และ W4 บริเวณท่าวังแถบสะพานอัษฎางค์ที่จอดเรือท่าล่าง และหน้าหาดถ้ำพังตามลำดับ แถบดีเอ็นเอเด่น seawater 10 เป็นกลุ่มแบคทีเรียหลักที่พบในตัวอย่างน้ำทะเล W1 W2 และ W3 บริเวณท่าวังแถบพระจุฑาธุชราชฐานที่จอดเรือท่าบน และท่าล่างตามลำดับ ส่วนแถบดีเอ็นเอเด่น seawater 11 เป็นกลุ่มแบคทีเรียหลักที่พบในตัวอย่างน้ำทะเล W2 W3 และ W4 บริเวณที่จอดเรือท่าบนท่าล่าง และหน้าหาดถ้ำพังตามลำดับ แถบดีเอ็นเอเด่น seawater 01 พบในตัวอย่างน้ำทะเล W1 และ W4 บริเวณท่าวังแถบพระจุฑาธุชราชฐานและหน้าหาดถ้ำพัง แถบดีเอ็นเอเด่น seawater 05 พบในตัวอย่างน้ำทะเล W2 และ W3 บริเวณที่จอดเรือท่าบน และท่าล่าง แถบดีเอ็นเอเด่น seawater 06 พบในตัวอย่างน้ำทะเล W2 และ W4 บริเวณที่จอดเรือท่าบน และหาดถ้ำพัง แถบดีเอ็นเอเด่น seawater 07 และ seawater 12 พบในตัวอย่างน้ำทะเล W1 และ W2 บริเวณท่าวังแถบพระจุฑาธุชราชฐานและที่จอดเรือท่าบน ในขณะที่แถบดีเอ็นเอเด่น seawater 03 seawater 04 และ seawater 13 เป็นกลุ่มแบคทีเรียหลักที่พบในตัวอย่างน้ำทะเล W1 บริเวณท่าวังแถบพระจุฑาธุชราชฐานเท่านั้น และแถบดีเอ็นเอเด่น seawater 08 และ seawater 09 เป็นกลุ่มแบคทีเรียหลักที่พบในตัวอย่างน้ำทะเล W2 บริเวณท่าบนเท่านั้น



รูปที่ 4.19 (ก) แถบดีเอ็นเอเด่นของโครงสร้างประชาคมแบคทีเรียในตัวอย่างดินตะกอนเกาะสีชัง จำนวน 9 ตัวอย่าง **ช่องวิ่ง** B1: ตัวอย่างดินตะกอน B1 (ทิศเหนือของเกาะสีชัง) **ช่องวิ่ง** B2: ตัวอย่างดินตะกอน B2 (ทิศเหนือของเกาะสีชัง) **ช่องวิ่ง** B3: ตัวอย่างดินตะกอน B3 (ทิศตะวันออกเฉียงเหนือของเกาะสีชัง บริเวณกลางร่องน้ำ) **ช่องวิ่ง** B5: ตัวอย่างดินตะกอน B5 (ทิศตะวันตกของเกาะสีชัง บริเวณหน้าถ้ำพัง) **ช่องวิ่ง** B6: ตัวอย่างดินตะกอน B6 (ทิศตะวันออกของเกาะสีชัง บริเวณหน้าท่าเรือสีชังทอง) **ช่องวิ่ง** B7: ตัวอย่างดินตะกอน B7 (ทิศตะวันออกของเกาะสีชัง บริเวณกลางร่องน้ำ) **ช่องวิ่ง** B9: ตัวอย่างดินตะกอน B9 (ทิศตะวันตกเฉียงใต้ของเกาะสีชัง บริเวณใต้เกาะค้างคาว) **ช่องวิ่ง** B10: ตัวอย่างดินตะกอน B10 (ทิศตะวันตกเฉียงใต้ของเกาะสีชัง บริเวณใต้เกาะค้างคาว) **ช่องวิ่ง** B11: ตัวอย่างดินตะกอน B11 (เขาบ่อยา บริเวณท่าเรือปตท.)



รูปที่ 4.19 (ข) โครงสร้างประชาคมแบคทีเรียในตัวอย่างดินตะกอนเกาะสีชังจำนวน 11 ตัวอย่าง **ช่องวิ่ง** 1: ตัวอย่างดินตะกอน 1 (หน้าบางพระ) **ช่องวิ่ง** 2: ตัวอย่างดินตะกอน 2 (ทิศ

ตะวันออกเฉียงเหนือบริเวณกลางร่องน้ำ) **ช่องวิ่ง 3**: ตัวอย่างดินตะกอน 3 (กลางร่องน้ำท่าเรือศรีราชา) **ช่องวิ่ง 4**: ตัวอย่างดินตะกอน 4 (ทิศเหนือของเกาะสีชัง) **ช่องวิ่ง 5**: ตัวอย่างดินตะกอน 5 (ทิศเหนือฝั่งตะวันตกของเกาะสีชัง) **ช่องวิ่ง 6**: ตัวอย่างดินตะกอนหมายเลข 6 (ท่าบน) **ช่องวิ่ง 7**: ตัวอย่างดินตะกอน 7 (ทิศตะวันออกของเกาะสีชัง บริเวณหน้าท่าเรือสีชังทอง) **ช่องวิ่ง 8**: ตัวอย่างดินตะกอน 8 (ทิศตะวันออกของเกาะสีชัง บริเวณกลางร่องน้ำ) **ช่องวิ่ง 9**: ตัวอย่างดินตะกอน 9 (กลางร่องน้ำหน้าเกาะสีชัง-ศรีราชา) **ช่องวิ่ง 10**: ตัวอย่างดินตะกอน 10 (กลางร่องน้ำหน้าเกาะสีชัง-ศรีราชา) และ**ช่องวิ่ง 11**: ตัวอย่างดินตะกอน 11 (ท่าเรือสวนสาธารณะศรีราชา)

จากรูป 4.19 (ก) และ 4.19 (ข) แสดงให้เห็นว่าแถบดีเอ็นเอเด่นในตัวอย่างดินตะกอนทั้งสองชุดมีจำนวน 23 แถบ โดยแถบดีเอ็นเอเด่นที่ปรากฏในตัวอย่างดินตะกอนทั้งสองชุด มีลักษณะคล้ายกันยกเว้นแถบดีเอ็นเอเด่น sediment 20 sediment 21 sediment 22 และsediment 23 ที่ไม่พบในตัวอย่างดินตะกอนชุดแรก (B1-B11รูป 4.19 (ก)) พบเฉพาะในตัวอย่างดินตะกอนชุดที่สองเท่านั้น โดยที่แถบดีเอ็นเอเด่น sediment 20 และ sediment 23 เป็นกลุ่มแบคทีเรียหลักที่พบในตัวอย่างดินตะกอนหมายเลข 6 บริเวณท่าบนเท่านั้นแถบดีเอ็นเอเด่น sediment 21 เป็นกลุ่มแบคทีเรียหลักที่พบในตัวอย่างดินตะกอน 1 บริเวณหน้าบางพระตัวอย่างดินตะกอน 2 ทางทิศตะวันออกเฉียงเหนือของเกาะสีชังบริเวณกลางร่องน้ำตัวอย่างดินตะกอน 3 บริเวณกลางร่องน้ำท่าเรือศรีราชาตัวอย่างดินตะกอน 4 บริเวณทิศเหนือของเกาะสีชัง และตัวอย่างดินตะกอน 5 บริเวณทิศเหนือฝั่งตะวันตกของเกาะสีชังและแถบดีเอ็นเอเด่น sediment 22 เป็นกลุ่มแบคทีเรียหลักที่พบในตัวอย่างดินตะกอน 4 บริเวณทิศเหนือของเกาะสีชัง ตัวอย่างดินตะกอนหมายเลข 6 บริเวณท่าบนตัวอย่างดินตะกอน 8 ทางทิศตะวันออกของเกาะสีชังบริเวณกลางร่องน้ำและตัวอย่างดินตะกอน 10 บริเวณกลางร่องน้ำหน้าเกาะสีชัง-ศรีราชานอกจากนี้ยังพบว่าแถบดีเอ็นเอเด่นsediment 13 ที่พบในตัวอย่างดินตะกอนชุดแรกเพียง 2 ตัวอย่างคือ ตัวอย่างดินตะกอน B3 บริเวณทิศตะวันออกเฉียงเหนือของเกาะสีชังบริเวณกลางร่องน้ำและตัวอย่างดินตะกอน B7 บริเวณทิศตะวันออกของเกาะสีชัง หน้าท่าเรือสีชังทองแต่พบปรากฏในทุกตัวอย่างของดินตะกอนชุดที่ 2 ในรูป 4.19 (ข) เช่นเดียวกับแถบดีเอ็นเอเด่น sediment 12 ที่พบในตัวอย่างดินตะกอนชุดแรกเพียง 3 ตัวอย่าง คือ ดินตะกอน B1 บริเวณทิศเหนือของเกาะสีชังตัวอย่างดินตะกอน B2 บริเวณทิศเหนือของเกาะสีชังและตัวอย่างดินตะกอน B6 บริเวณทิศตะวันตกของเกาะสีชัง หน้าหาดถ้ำพังพบปรากฏในทุกตัวอย่างของดินตะกอนชุดที่ 2 เช่นเดียวกัน

ภายหลังการโคลนแถบดีเอ็นเอเด่นจำนวนทั้งหมด 46 แถบที่ได้จากแถบดีเอ็นเอเด่นในที่พบในตัวอย่างดินจำนวน 10 แถบ ในตัวอย่างน้ำทะเลจำนวน 13 แถบ และในตัวอย่างดินตะกอนจำนวน 23 แถบโดยตั้งชื่อโคลนดีเอ็นเอตามประเภทของตัวอย่างและลำดับของการโคลน หลังจากนั้นนำรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่มีชิ้นดีเอ็นเอที่ต้องการส่งวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีน 16S rDNA ของแบคทีเรีย และนำข้อมูลที่ได้มาเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีน 16S rDNA ของแบคทีเรียสายพันธุ์ต่าง ๆ ที่มีรายงานในฐานข้อมูล GenBank โดยใช้โปรแกรม BLASTn ดังแสดงในตารางที่ 4.14 และภาคผนวก จ

ตารางที่ 4.14 ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีน 16S rDNA ของโคลนดีเอ็นเอจากตัวอย่างเกาะสีชัง

โคลนจากตัวอย่างดิน	คล้ายกับแบคทีเรียในสกุล (ช่วง % ความเหมือน)	กลุ่มแบคทีเรีย
DGGE soil-clone 01	Uncultured bacterium clone D12P4MbH (97-99%)	-
DGGE soil-clone 02	Uncultured bacterium clone EW-22 (94-97%)	-
DGGE soil-clone 03	*Caulobacter* sp. สายพันธุ์ ZSGR14 (100%)	*Alphaproteobacteria*
DGGE soil-clone 04	Uncultured bacterium clone NF027 (100%)	-
DGGE soil-clone 05	*Rheinheimera aquimaris* สายพันธุ์ ML-2 (99-100%)	*Gammaproteobacteria*
DGGE soil-clone 06	Uncultured bacterium clone NS013 (99%)	-
DGGE soil-clone 07	*Paramoritella alkaliphila* สายพันธุ์ ssthio04PA7-c (96%)	*Gammaproteobacteria*
DGGE soil-clone 08	Uncultured bacterium clone RS-G05 (100%)	-

ตารางที่ 4.14 ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีน 16S rDNA ของโคลนดีเอ็นเอจากตัวอย่างเกาะสีชัง (ต่อ)

โคลนจากตัวอย่างดิน	คล้ายกับแบคทีเรียในสกุล (ช่วง % ความเหมือน)	กลุ่มแบคทีเรีย
DGGE soil-clone 09	*Brevundimonas diminuta* สายพันธุ์ R057 (100%)	*Alphaproteobacteria*
DGGE soil-clone 10	Uncultured Bacteroidetes bacterium clone ZU-11-n-2 (100%)	*Bacteroidetes*
โคลนจากตัวอย่างน้ำทะเล	คล้ายกับแบคทีเรียในสกุล (ช่วง % ความเหมือน)	กลุ่มแบคทีเรีย
DGGE seawater-clone 01	Uncultured bacterium clone CLA23 (99%)	-
DGGE seawater-clone 02	Uncultured gamma proteo-bacterium clone 1_117 (100%)	*Gammaproteobacteria*
DGGE seawater-clone 03	Uncultured bacterium isolate 1112864242305b (98-99%)	-
DGGE seawater-clone 04	Uncultured bacterium clone pIR3BF04 (99-100%)	-
DGGE seawater-clone 05	*Fusibacter* sp. enrichment culture clone 22-7A (99%)	*Firmicutes*
DGGE seawater-clone 06	*Thalassobius* sp. สายพันธุ์ KU27E3 (99%)	*Alphaproteobacteria*
DGGE seawater-clone 07	*Formosa* sp. สายพันธุ์ AK20 (100%)	*Bacteroidetes*
DGGE seawater-clone 08	*Bizionia* sp. สายพันธุ์ SN-3-9-2 (100%)	*Bacteroidetes*
DGGE seawater-clone 09	*Idiomarina* sp. สายพันธุ์ D3 (100%)	*Gammaproteobacteria*
DGGE seawater-clone 10	*Reinekea* sp. สายพันธุ์ KLE1125 (99-100%)	*Gammaproteobacteria*

ตารางที่ 4.14 ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีน 16S rDNA ของโคลนดีเอ็นเอจากตัวอย่างเกาะสีชัง (ต่อ)

โคลนจากตัวอย่างน้ำทะเล	คล้ายกับแบคทีเรียในสกุล (ช่วง % ความเหมือน)	กลุ่มแบคทีเรีย
DGGE seawater-clone 11	*Pseudoalteromonas elyakovii* สายพันธุ์ J34 (100%)	*Gammaproteobacteria*
DGGE seawater-clone 12	Bacteroidetes bacterium สายพันธุ์ GM71 (98%)	*Bacteroidetes*
DGGE seawater-clone 13	*Gillisia* sp. สายพันธุ์ NP10 (96-97%)	*Bacteroidetes*
โคลนจากตัวอย่างดินตะกอน	คล้ายกับแบคทีเรียในสกุล (ช่วง % ความเหมือน)	กลุ่มแบคทีเรีย
DGGE sediment-clone 01	Uncultured bacterium clone bore 9 (99%)	-
DGGE sediment-clone 02	Uncultured Acidobacteria bacterium clone ANOX-115 (95-99%)	*Acidobacteria*
DGGE sediment-clone 03	Uncultured bacterium clone 1FTfc10_E11 (100%)	-
DGGE sediment-clone 04	*Photobacterium* sp. สายพันธุ์ SL62 (99-100%)	*Gammaproteobacteria*
DGGE sediment-clone 05	*Maricaulis virginensis* สายพันธุ์ PR54-12 (100%)	*Alphaproteobacteria*
DGGE sediment-clone 06	*Arenibacter* sp. สายพันธุ์ TBL_45 (100%)	*Bacteroidetes*
DGGE sediment-clone 07	Uncultured gamma proteobacterium clone APC_2_A10 (100%)	*Gammaproteobacteria*
DGGE sediment-clone 08	Uncultured bacterium cloneCypR_68 (100%)	-

ตารางที่ 4.14 ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีน 16S rDNA ของโคลนดีเอ็นเอจากตัวอย่างเกาะสีชัง (ต่อ)

โคลนจากตัวอย่างดินตะกอน	คล้ายกับแบคทีเรียในสกุล (ช่วง % ความเหมือน)	กลุ่มแบคทีเรีย
DGGE sediment-clone 09	Uncultured bacterium clone EW_72 (100%)	-
DGGE sediment-clone 10	*Flexibacter* sp. สายพันธุ์ 2216.15.5 (99-100%)	*Bacteroidetes*
DGGE sediment-clone 11	Uncultured *Gaetbulibacter* sp. clone DP25 (97%)	*Bacteroidetes*
DGGE sediment-clone 12	Uncultured Flavobacteriaceae bacterium clone E0C103 (100%)	*Bacteroidetes*
DGGE sediment-clone 13	Flavobacteriaceae bacterium enrichment culture clone MT-1698 (100%)	*Bacteroidetes*
DGGE sediment-clone 14	*Alteromonas macleodii* สายพันธุ์ p1a1 (97%)	*Gammaproteobacteria*
DGGE sediment-clone 15	Uncultured bacterium clone B8 (100%)	-
DGGE sediment-clone 16	Uncultured bacterium clone NS087 (100%)	-
DGGE sediment-clone 17	Uncultured bacterium clone SG23 (99-100%)	-
DGGE sediment-clone 18	Uncultured *Brevundimonas* sp. clone OTU160 (100%)	*Alphaproteobacteria*
DGGE sediment-clone 19	*Pseudoalteromonas* sp. สายพันธุ์ V4. ME.31 (99%)	*Gammaproteobacteria*
DGGE sediment-clone 20	*Glaciecola* sp. สายพันธุ์ SW1-13 (98%)	*Gammaproteobacteria*

ตารางที่ 4.14 ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีน 16S rDNA ของโคลนดีเอ็นเอจากตัวอย่างเกาะสีชัง (ต่อ)

โคลนจากตัวอย่างดินตะกอน	คล้ายกับแบคทีเรียในสกุล (ช่วง % ความเหมือน)	กลุ่มแบคทีเรีย
DGGE sediment-clone 21	*Alishewanella* sp. สายพันธุ์ IARI-L-23 (99%)	*Gammaproteobacteria*
DGGE sediment-clone 22	*Halomonas meridian* สายพันธุ์ C538 (99%)	*Gammaproteobacteria*
DGGE sediment-clone 23	Uncultured bacterium clone AND GV0309 IH8.2 8S0 (99%)	-

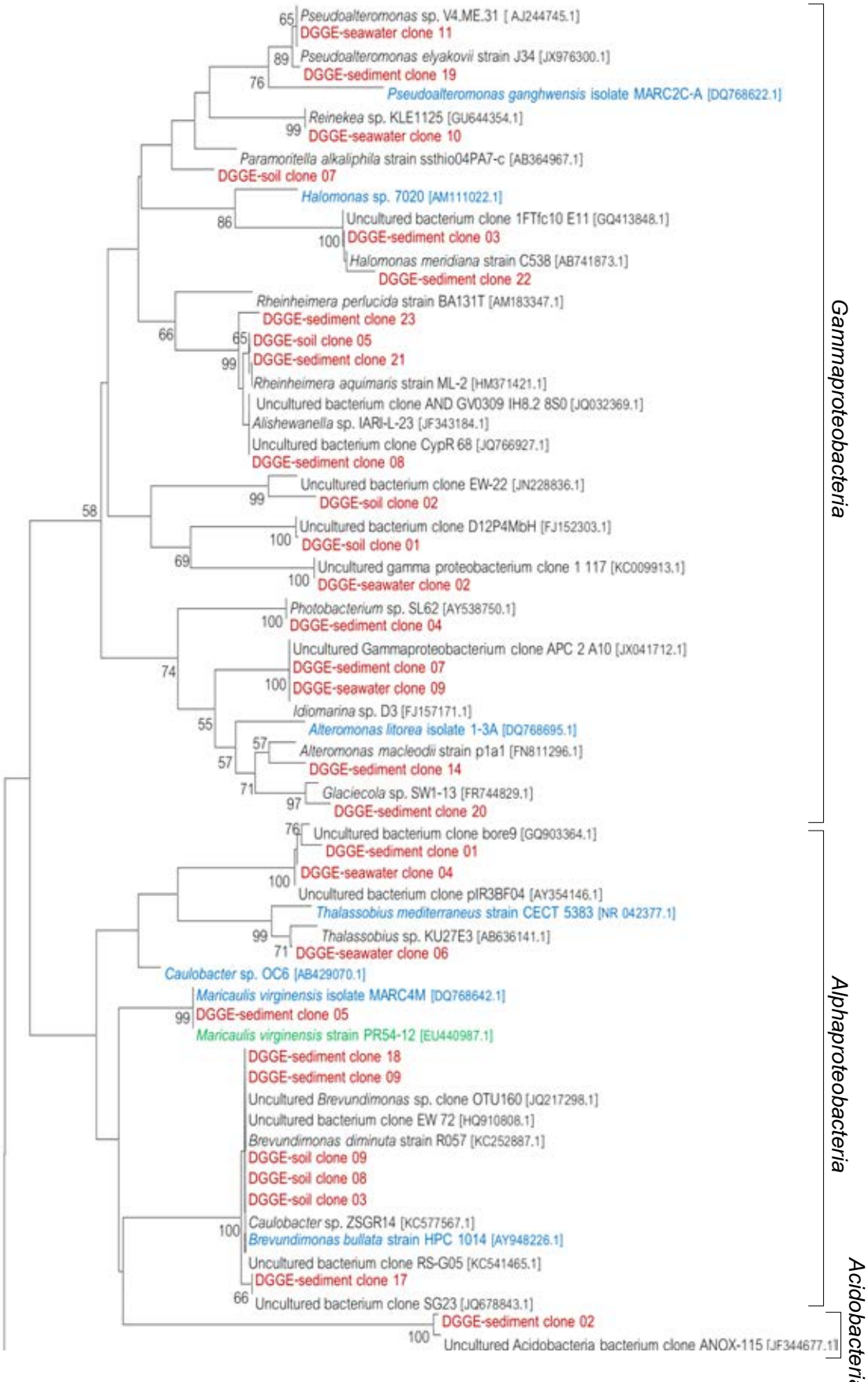
จากตารางที่ 4.14 ผลปรากฏว่าโคลนที่ได้จากตัวอย่างดินพบเป็นแบคทีเรียกลุ่ม *Bacteroidetes* คือ clone 10 และแบคทีเรียกลุ่มอื่น ๆ เช่น แบคทีเรียกลุ่ม *Alphaproteobacteria* พบใน clone 03 ซึ่งเป็นโคลนที่ได้จากแถบดีเอ็นเอเด่นที่พบในทุกตัวอย่างดิน และ clone 09 โดยมีความคล้ายคลึงกับแบคทีเรียในสกุล *Caulobacter* และ *Brevundimonas* ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบแบคทีเรียกลุ่ม *Gammaproteobacteria* จาก clone 05 และ clone 07 โดยมีความคล้ายคลึงกับแบคทีเรียในสกุล *Rheinheimera* และ *Paramoritella*

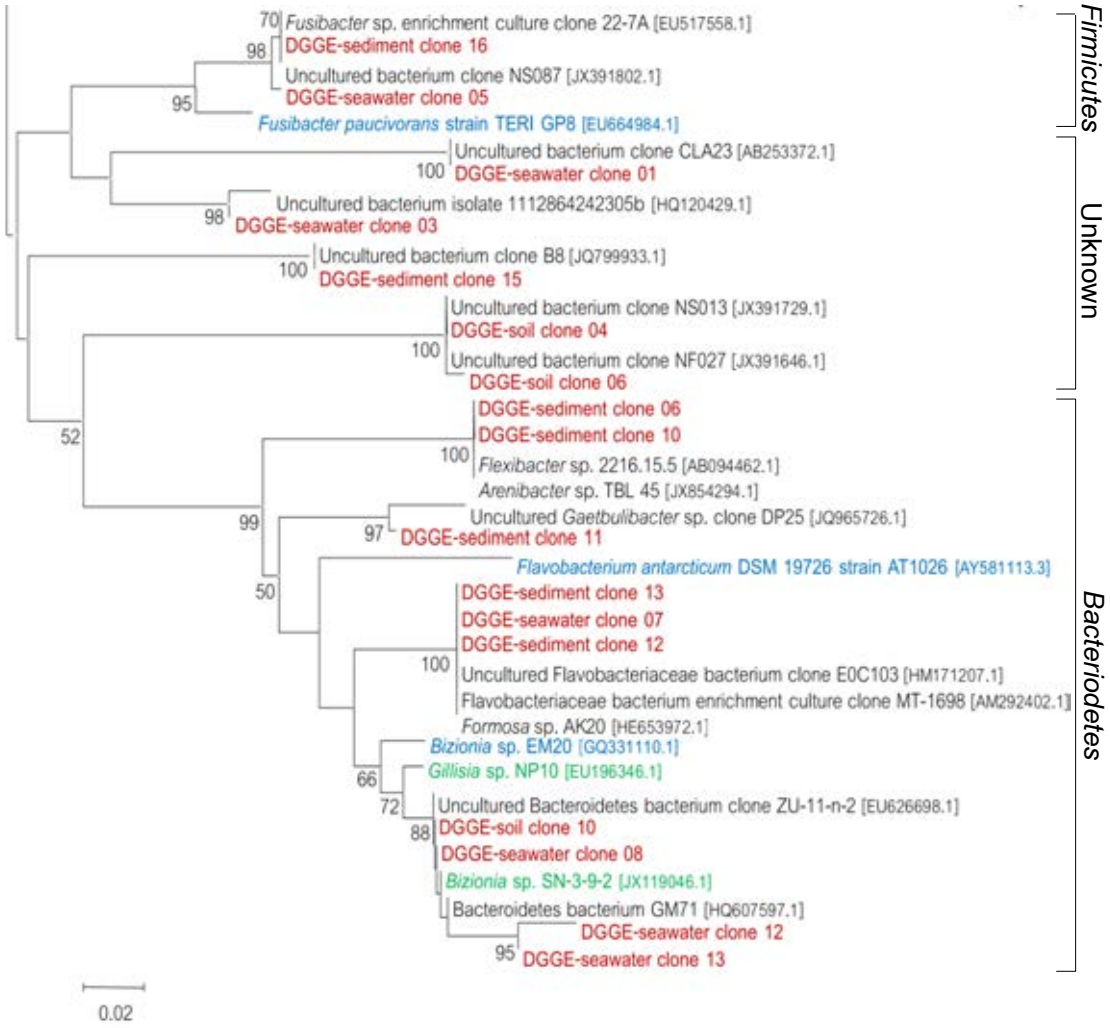
โคลนที่ได้จากตัวอย่างน้ำทะเลพบแบคทีเรียกลุ่ม *Firmicutes* ซึ่งเป็นกลุ่มแบคทีเรียที่ไม่ปรากฏในตัวอย่างดิน คือ clone 05 โดยมีความคล้ายคลึงกับแบคทีเรียในสกุล *Fusibacter* นอกจากนี้ยังพบแบคทีเรียกลุ่มต่าง ๆ เช่น แบคทีเรียกลุ่ม *Gammaproteobacteria* พบใน clone 10 clone 11 ซึ่งเป็นโคลนที่ได้จากแถบดีเอ็นเอเด่นในตัวอย่างน้ำทะเล 3 ตัวอย่างจาก 4 ตัวอย่าง คือ ตัวอย่าง W2 (บริเวณท่าบน) W3 (บริเวณท่าล่าง) และ W4 (บริเวณหาดถ้ำพัง) และ clone 09 โดยมีความคล้ายคลึงกับแบคทีเรียในสกุล *Reinekea* *Pseudoalteromonas* และ *Idiomarina* ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบแบคทีเรียกลุ่ม *Alphaproteobacteria* ใน clone 06 มีความคล้ายคลึงกับแบคทีเรียในสกุล *Thalassobius* และพบแบคทีเรียกลุ่ม *Bacteroidetes* จาก clone 07 clone 08 และ clone 13 โดยมีความคล้ายคลึงกับแบคทีเรียในสกุล *Formosa* *Bizionia* และ*Gillisia* ตามลำดับ

โคลนที่ได้จากตัวอย่างดินตะกอนพบแบคทีเรียกลุ่ม *Acidobacteria* ซึ่งเป็นกลุ่มแบคทีเรียที่ไม่ปรากฏในตัวอย่างดิน และน้ำทะเลและพบแบคทีเรียกลุ่มต่าง ๆ เช่น แบคทีเรียกลุ่ม *Gammaproteobacteria* จาก clone 04 clone 14 และ clone 19 โดยมีความคล้ายคลึงกับ

แบคทีเรียในสกุล *Photobacterium* *Alteromonas* และ *Pseudoalteromonas* นอกจากนี้จาก clone 20 ซึ่งเป็นโคลนที่ได้จากแถบดีเอ็นเอเด่นในตัวอย่างดินตะกอนหมายเลข 6 บริเวณท่าบนเท่านั้นclone 21 ซึ่งเป็นโคลนที่ได้จากแถบดีเอ็นเอเด่นในตัวอย่างดินตะกอน 1 (หน้าบางพระ) ตัวอย่างดินตะกอน 2 (ทิศตะวันออกเฉียงเหนือของเกาะสีชังบริเวณกลางร่องน้ำ) ตัวอย่างดินตะกอน 3 (กลางร่องน้ำท่าเรือศรีราชา) ตัวอย่างดินตะกอน 4 (ทิศเหนือของเกาะสีชัง)และตัวอย่างดินตะกอน 5 (ทิศเหนือฝั่งตะวันตกของเกาะสีชัง) และ clone 22 ซึ่งเป็นโคลนที่ได้จากแถบดีเอ็นเอเด่นในตัวอย่างดินตะกอน 4 (ทิศเหนือของเกาะสีชัง) ดินตะกอนหมายเลข 6 (ใกล้ท่าบน)ดินตะกอน 8 (ทิศตะวันออกของเกาะสีชังบริเวณกลางร่อง) ดินตะกอน 9 และดินตะกอน 10 (บริเวณกลางร่องน้ำหน้าเกาะสีชัง-ศรีราชา)มีความคล้ายคลึงกับแบคทีเรียในสกุล *Glaciecola* *Alishewanella* และ*Halomonas* ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับผลการคัดแยกแบคทีเรียย่อยสลายฟีแนนทรีนที่พบเป็นแบคทีเรียในสกุล *Halomonas* เช่นกัน นอกจากนี้ยังพบแบคทีเรียกลุ่ม *Bacteroidetes* จาก clone 06 clone 10 และ clone 13 ซึ่งเป็นโคลนที่ได้จากแถบดีเอ็นเอเด่นในทุกตัวอย่างดินตะกอนชุดที่สอง (ตัวอย่าง 1-11) โดยมีความคล้ายคลึงกับแบคทีเรียในสกุล *Arenibacter* *Flexibacter* และแบคทีเรียวงศ์ Flavobacteriaceae และพบแบคทีเรียกลุ่ม *Alphaproteobacteria* จาก clone 05 โดยมีความคล้ายคลึงกับแบคทีเรียในสกุล *Maricaulis*

การสร้างแผนภูมิต้นไม้แสดงความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีน 16S rDNA ที่ได้จากโคลนดีเอ็นเอจากตัวอย่างเกาะสีชัง กับแบคทีเรียสายพันธุ์อ้างอิง และแบคทีเรียที่มีรายงานการย่อยสลายสารพิษมาจัดเรียง ผลปรากฏว่ามีจัดกลุ่มของโคลนที่ได้ในจำนวน 5 กลุ่มคือ *Gammaproteobacteria* *Alphaproteobacteria* *Acidobacteria* *Firmicutes* และ *Bacteriodetes* ดังแสดงในรูปที่ 4.20


Pseudoalteromonas sp. V4.ME.31 [AJ244745.1]
DGGE-seawater clone 11
Pseudoalteromonas elyakovii strain J34 [JX976300.1]
DGGE-sediment clone 19
Pseudoalteromonas ganghwensis isolate MARC2C-A [DQ768622.1]
Reinekea sp. KLE1125 [GU644354.1]
DGGE-seawater clone 10
Paramoritella alkaliphila strain ssthio04PA7-c [AB364967.1]
DGGE-soil clone 07
Halomonas sp. 7020 [AM111022.1]
Uncultured bacterium clone 1FTfc10 E11 [GQ413848.1]
DGGE-sediment clone 03
Halomonas meridiana strain C538 [AB741873.1]
DGGE-sediment clone 22
Rheinheimera perlucida strain BA131T [AM183347.1]
DGGE-sediment clone 23
DGGE-soil clone 05
DGGE-sediment clone 21
Rheinheimera aquimaris strain ML-2 [HM371421.1]
Uncultured bacterium clone AND GV0309 IH8.2 8S0 [JQ032369.1]
Alishewanella sp. IAR8-L-23 [JF343184.1]
Uncultured bacterium clone CypR 68 [JQ766927.1]
DGGE-sediment clone 08
Uncultured bacterium clone EW-22 [JN228836.1]
DGGE-soil clone 02
Uncultured bacterium clone D12P4MbH [FJ152303.1]
DGGE-soil clone 01
Uncultured gamma proteobacterium clone 1 117 [KC009913.1]
DGGE-seawater clone 02
Photobacterium sp. SL62 [AY538750.1]
DGGE-sediment clone 04
Uncultured Gammaproteobacterium clone APC 2 A10 [JX041712.1]
DGGE-sediment clone 07
DGGE-seawater clone 09
Idiomarina sp. D3 [FJ157171.1]
Alteromonas litorea isolate 1-3A [DQ768695.1]
Alteromonas macleodii strain p1a1 [FN811296.1]
DGGE-sediment clone 14
Glaciecola sp. SW1-13 [FR744829.1]
DGGE-sediment clone 20
Uncultured bacterium clone bore9 [GQ903364.1]
DGGE-sediment clone 01
DGGE-seawater clone 04
Uncultured bacterium clone pIR3BF04 [AY354146.1]
Thalassobius mediterraneus strain CECT 5383 [NR 042377.1]
Thalassobius sp. KU27E3 [AB636141.1]
DGGE-seawater clone 06
Caulobacter sp. OC6 [AB429070.1]
Maricaulis virginensis isolate MARC4M [DQ768642.1]
DGGE-sediment clone 05
Maricaulis virginensis strain PR54-12 [EU440987.1]
DGGE-sediment clone 18
DGGE-sediment clone 09
Uncultured Brevundimonas sp. clone OTU160 [JQ217298.1]
Uncultured bacterium clone EW 72 [HQ910808.1]
Brevundimonas diminuta strain R057 [KC252887.1]
DGGE-soil clone 09
DGGE-soil clone 08
DGGE-soil clone 03
Caulobacter sp. ZSGR14 [KC577567.1]
Brevundimonas bullata strain HPC 1014 [AY948226.1]
Uncultured bacterium clone RS-G05 [KC541465.1]
DGGE-sediment clone 17
Uncultured bacterium clone SG23 [JQ678843.1]
DGGE-sediment clone 02
Uncultured Acidobacteria bacterium clone ANOX-115 [JF344677.1]
Gammaproteobacteria
Alphaproteobacteria
Acidobacteria



รูปที่ 4.20 แผนภูมิต้นไม้แสดงความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของยีนบริเวณ 16S rDNA ของโคลนที่ได้จากเกาะสีชัง (ตัวอักษรสีแดง) กับยีน 16S rDNA ของแบคทีเรียสายพันธุ์เกี่ยวข้องที่ไม่พบรายงานย่อยสลายสารพิษ (ตัวอักษรสีดำ) และพบรายงานการย่อยสลายสารพิษ (ตัวอักษรสีเขียว) และแบคทีเรียที่มีรายงานย่อยสลายสารพิษเพิ่มเติม (ตัวอักษรสีน้ำเงิน) ตัวเลขที่กิ่งสาขาบอกถึงการนับผลที่ให้ผลซ้ำจากทั้งหมด 1,000 ครั้ง ด้วย bootstrap

จากรูปที่ 4.20 พบว่าโคลนดีเอ็นเอที่ได้จากตัวอย่างเกาะสีชังประกอบด้วยกลุ่มแบคทีเรียชนิด *Gammaproteobacteria* มากที่สุดโดยพบจำนวน 18 โคลน ซึ่งเป็นโคลนจากตัวอย่างดินจำนวน 4 โคลน ตัวอย่างน้ำทะเลจำนวน 4 โคลน และดินตะกอนจำนวน 10 โคลน รองมาคือแบคทีเรียในกลุ่ม *Alphaproteobacteria* พบจำนวน 10 โคลน ซึ่งเป็นโคลนจากตัวอย่างดินจำนวน 3 โคลน ตัวอย่างน้ำทะเลจำนวน 2 โคลน และดินตะกอนจำนวน 5 โคลน และแบคทีเรียในกลุ่ม *Bacteriodetes* พบจำนวน 10 โคลน ซึ่งเป็นโคลนจากตัวอย่างดินจำนวน 1 โคลน ตัวอย่างน้ำทะเลจำนวน 4 โคลน และดินตะกอนจำนวน 5 โคลนแบคทีเรียในกลุ่ม *Firmicutes* พบจำนวน 2 โคลน จากตัวอย่างน้ำจำนวน 1 โคลนและตัวอย่างดินตะกอนจำนวน 1 โคลน แต่ไม่พบในตัวอย่างดิน และกลุ่มแบคทีเรียพบน้อยสุดคือ *Acidobacteria* ซึ่งเป็นโคลนจากตัวอย่างดินตะกอนจำนวน 1 โคลนนอกนั้นเป็น Unknown ที่ไม่สามารถระบุชนิดได้จำนวน 5 โคลน ซึ่งพบในตัวอย่างดินจำนวน 2 ตัวอย่าง ดินตะกอนจำนวน 1 ตัวอย่าง และน้ำทะเลจำนวน 2 ตัวอย่าง

4.6 สร้างห้องสมุดของยีนและวิเคราะห์ความหลากหลายของยีนไดออกซิจีเนสโดยตรงจากสิ่งแวดล้อม

จากการศึกษาความหลากหลายแบคทีเรียในตัวอย่างเกาะสีชังด้วยวิธี PCR-DGGE ทำให้ทราบว่ามีความหลากหลายของแบคทีเรียในพื้นที่สูง จึงมีโอกาสที่จะตรวจพบยีนไดออกซิจีเนสที่หลากหลายสูงได้เช่นกัน ดังนั้นการศึกษานี้จะช่วยทำให้ทราบข้อมูลความหลากหลายของยีนไดออกซิจีเนสที่เป็นองค์ประกอบในสิ่งแวดล้อมโดยตรงโดยนำดีเอ็นเอเมตาจีโนมที่สกัดได้มาเพิ่มจำนวนยีนประมวลรหัสเอนไซม์ไดออกซิจีเนสในกลุ่ม dox_{GN} และ dox_{GP} ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสโดยใช้ไพร์เมอร์คู่ GNF และ GNR (Cebron และคณะ 2008) มีขนาดผลิตภัณฑ์พีซีอาร์เท่ากับ 306 bp และใช้ไพร์เมอร์คู่ GPF และ GPR (Cebron และคณะ 2008) มีขนาดผลิตภัณฑ์พีซีอาร์เท่ากับ 292 bp ตามลำดับ

จากการตรวจสอบพบยีนไดออกซิจีเนสของแบคทีเรียในพื้นที่เกาะสีชังพบเป็นยีน dox_{GN} มากกว่า dox_{GP} ดังแสดงในรายระเอียดดังตารางที่ 4.15 และ 4.16 และรูปที่ 4.21 และ 4.22

ตารางที่ 4.15 ผลของปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสโดยใช้ไพร์เมอร์คู่ GNF และ GNR ที่จำเพาะต่อยีน dox_{GN}

ดีเอ็นเอจากจาก ตัวอย่างดิน	บริเวณที่เก็บ	การเพิ่มจำนวนด้วยคู่ GNF และ GNR*
A	ท่าวังแถบพระจุฑาธุชราชฐาน	+
B		+
C		+
D	ที่จอดเรือท่าล่าง (ท่าเทววงษ์)	+
E	สถานีตำรวจใกล้ท่าล่าง	+
F	หน้าหาดถ้ำพัง	+
G	หาดทรายแก้ว ใกล้สถานีขนถ่ายน้ำมันและสินค้า	+
H	ท่าวังแถบเรือนผ่องศรี	+
I	หน้าสถานีตำรวจน้ำ	+
J	ท่าเรือท่าบน (ท่าภาณุรังสี) และรอบชายฝั่งเขตชุมชนที่อยู่อาศัย	+
ดีเอ็นเอจาก ตัวอย่างน้ำทะเล	บริเวณที่เก็บ	การเพิ่มจำนวนด้วยคู่ GNF และ GNR*
W1	ท่าวังแถบสะพานอัษฎางค์	+
W2	ที่จอดเรือท่าบน	+
W3	ที่จอดเรือท่าล่าง	+
W4	หน้าหาดถ้ำพัง	+
ดีเอ็นเอจาก ตัวอย่างดินตะกอน	บริเวณที่เก็บ	การเพิ่มจำนวนด้วยคู่ GNF และ GNR*
B1	ทิศเหนือของเกาะสีชัง	+
B2	ทิศเหนือของเกาะสีชัง	+
B3	ทิศตะวันออกเฉียงเหนือของเกาะสีชัง บริเวณกลางร่องน้ำ	-
B5	ทิศตะวันตกของเกาะสีชัง หน้าถ้ำพัง	-

ตารางที่ 4.15 ผลของปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสโดยใช้ไพร์เมอร์คู่ GNF และ GNR ที่จำเพาะต่อยีน dox_{GN} (ต่อ)

ดีเอ็นเอจากตัวอย่างดินตะกอน	บริเวณที่เก็บ	การเพิ่มจำนวนด้วยคู่ GNF และ GNR*
B6	ทิศตะวันออกของเกาะสีชัง บริเวณหน้าท่าเรือสีชังทอง	+
B7	ทิศตะวันออกของเกาะสีชัง บริเวณกลางร่องน้ำ	+
B9	ทิศตะวันตกเฉียงใต้ของเกาะสีชัง บริเวณใต้เกาะค้างคาว	+
B10	ทิศตะวันตกเฉียงใต้ของเกาะสีชัง บริเวณใต้เกาะค้างคาว	+
B11	เขาบ่อยา บริเวณท่าเรือปตท.	+
1	หน้าบางพระ	-
2	ทิศตะวันออกเฉียงเหนือของเกาะสีชัง บริเวณกลางร่องน้ำ	-
3	กลางร่องน้ำท่าเรือศรีราชา	+
4	ทิศเหนือของเกาะสีชัง	+
5	ทิศเหนือฝั่งตะวันตกของเกาะสีชัง	+
6	ใกล้ท่าบน	+
7	ทิศตะวันออกของเกาะสีชัง บริเวณหน้าท่าเรือสีชังทอง	+
8	ทิศตะวันออกของเกาะสีชัง บริเวณกลางร่องน้ำ	-
9	กลางร่องน้ำหน้าเกาะสีชัง-ศรีราชา	-
10	กลางร่องน้ำหน้าเกาะสีชัง-ศรีราชา	-
11	ท่าเรือสวนสาธารณะศรีราชา	-

* หมายเหตุ

(+) คือได้ผลิตภัณฑ์ PCR ตามที่คาดหวัง (-) คือไม่ได้ผลิตภัณฑ์ PCR ตามที่คาดหวัง

จากตารางที่ 4.15 พบว่าสามารถตรวจพบยีน dox_{GN} ในตัวอย่าง 26 จาก 34 ตัวอย่างที่ใช้ในการทดลอง ในขณะที่ตัวอย่างอื่นไม่พบผลิตภัณฑ์ PCR โดยพบในทุกตัวอย่างดิน และน้ำทะเล และในตัวอย่างดินตะกอนตรวจพบ 12 จาก 20 ตัวอย่าง ซึ่งพบว่าบริเวณท่าบนของตัวอย่างทุกประเภทตรวจพบยีน dox_{GN} ได้

ตารางที่ 4.16 ผลของปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสโดยใช้ไพร์เมอร์คู่ GPF และ GPR ที่จำเพาะต่อยีน dox_{GP}

ดีเอ็นเอจากจาก ตัวอย่างดิน	บริเวณที่เก็บ	การเพิ่มจำนวนด้วยคู่ GPF และ GPR*
A	ท่าวังแถบพระจุฬาธุชราชฐาน	-
B		-
C		-
D	ที่จอดเรือท่าล่าง (ท่าเทววงษ์)	-
E	สถานีตำรวจใกล้ท่าล่าง	+
F	หน้าหาดถ้ำพัง	-
G	หาดทรายแก้ว ใกล้สถานีขนถ่ายน้ำมันและสินค้า	-
H	ท่าวังแถบเรือนผ่องศรี	+
I	หน้าสถานีตำรวจน้ำ	+
J	ท่าเรือท่าบน (ท่าภาณุรังสี) และรอบชายฝั่งเขตชุมชนที่อยู่อาศัย	+
ดีเอ็นเอจาก ตัวอย่างน้ำทะเล	บริเวณที่เก็บ	การเพิ่มจำนวนด้วยคู่ GPF และ GPR*
W1	ท่าวังแถบสะพานอัษฎางค์	-
W2	ที่จอดเรือท่าบน	-
W3	ที่จอดเรือท่าล่าง	-
W4	หน้าหาดถ้ำพัง	-

ตารางที่ 4.16 ผลของปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสโดยใช้ไพร์เมอร์คู่ GPF และ GPR ที่จำเพาะต่อยีน dox_{GP} (ต่อ)

ดีเอ็นเอจากตัวอย่างดินตะกอน	บริเวณที่เก็บ	การเพิ่มจำนวนด้วยคู่ GPF และ GPR*
B1	ทิศเหนือของเกาะสีชัง	-
B2	ทิศเหนือของเกาะสีชัง	-
B3	ทิศตะวันออกเฉียงเหนือของเกาะสีชัง บริเวณกลางร่องน้ำ	-
B5	ทิศตะวันตกของเกาะสีชัง หน้าถ้ำพัง	-
B6	ทิศตะวันออกของเกาะสีชัง บริเวณหน้าท่าเรือสีชังทอง	-
B7	ทิศตะวันออกของเกาะสีชัง บริเวณกลางร่องน้ำ	-
B9	ทิศตะวันตกเฉียงใต้ของเกาะสีชัง บริเวณใต้เกาะค้างคาว	-
B10	ทิศตะวันตกเฉียงใต้ของเกาะสีชัง บริเวณใต้เกาะค้างคาว	-
B11	เขาบ่อยา บริเวณท่าเรือปตท.	-
1	หน้าบางพระ	-
2	ทิศตะวันออกเฉียงเหนือของเกาะสีชัง บริเวณกลางร่องน้ำ	-
3	กลางร่องน้ำท่าเรือศรีราชา	+
4	ทิศเหนือของเกาะสีชัง	-
5	ทิศเหนือฝั่งตะวันตกของเกาะสีชัง	-
6	ใกล้ท่าบน	-
7	ทิศตะวันออกของเกาะสีชัง บริเวณหน้าท่าเรือสีชังทอง	+
8	ทิศตะวันออกของเกาะสีชัง บริเวณกลางร่องน้ำ	-

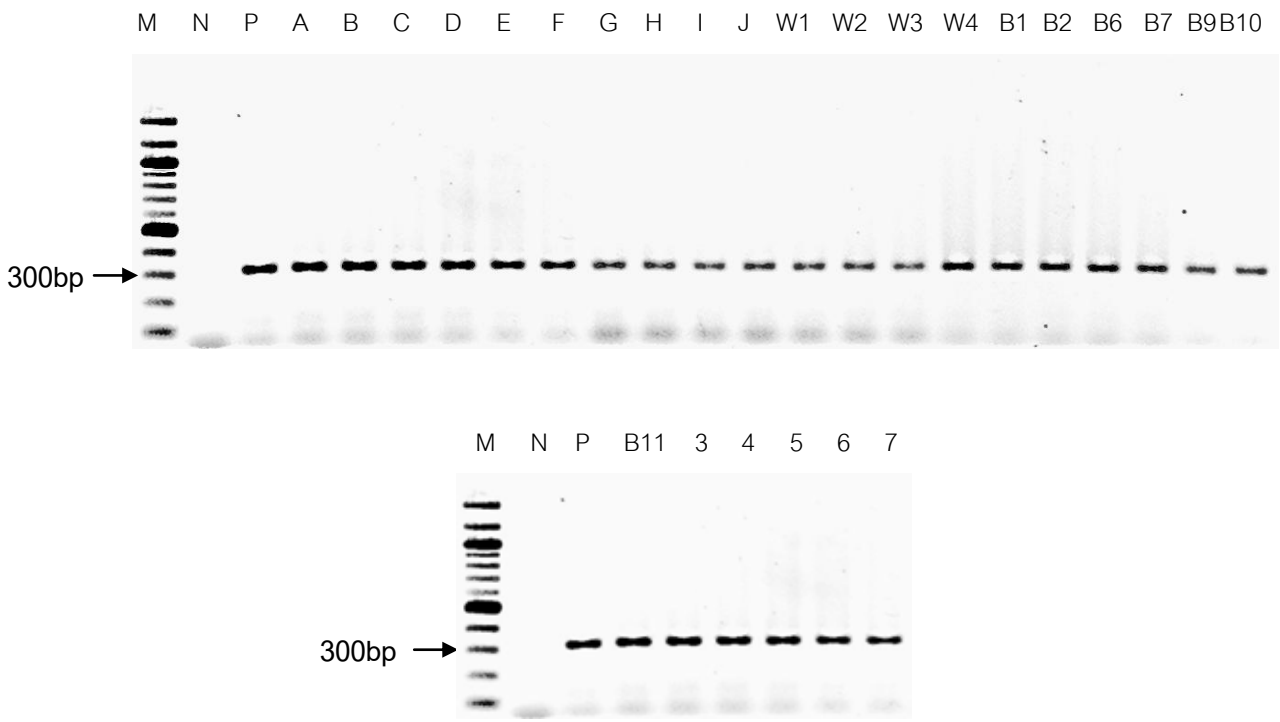
ตารางที่ 4.16 ผลของปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสโดยใช้ไพร์เมอร์คู่ GPF และ GPR ที่จำเพาะต่อยีน dox_{GP} (ต่อ)

ดีเอ็นเอจาก ตัวอย่างดินตะกอน	บริเวณที่เก็บ	การเพิ่มจำนวนด้วยคู่ GPF และ GPR*
9	กลางร่องน้ำหน้าเกาะสีชัง-ศรีราชา	-
10	กลางร่องน้ำหน้าเกาะสีชัง-ศรีราชา	-
11	ท่าเรือสวนสาธารณะศรีราชา	-

* หมายเหตุ

(+) คือได้ผลิตภัณฑ์ PCR ตามที่คาดหวัง (-) คือไม่ได้ผลิตภัณฑ์ PCR ตามที่คาดหวัง

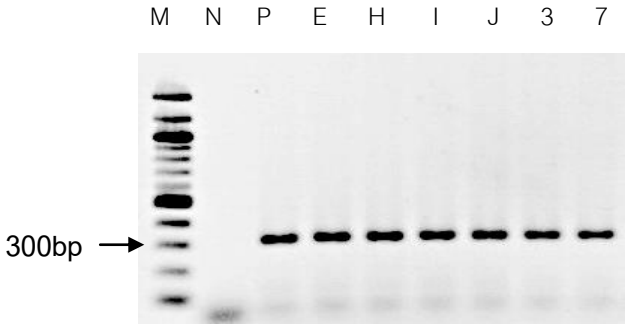
จากตารางที่ 4.16 พบว่าสามารถตรวจพบยีน dox_{GP} ได้จากตัวอย่างจำนวน 6 ตัวอย่าง จาก 34 ตัวอย่างที่ใช้ในการทดลอง ในขณะที่ตัวอย่างอื่นไม่พบผลิตภัณฑ์ PCR โดยเป็นตัวอย่างดินจำนวน 4 ตัวอย่าง จาก 10 ตัวอย่าง และดินตะกอน จำนวน 2 ตัวอย่างจาก 20 ตัวอย่าง แต่ไม่พบในตัวอย่างน้ำทะเล ซึ่งตัวอย่างดินและดินตะกอนที่พบยีน dox_{GN} สามารถตรวจพบยีน dox_{GP} ได้เช่นเดียวกัน



รูปที่ 4.21 ผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอบริเวณยีน dox_{GN} จากไพร์เมอร์คู่ GNF และ GNR จากตัวอย่างสิ่งแวดล้อมเกาะสีชัง **ช่องวิ่ง** M: ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp **ช่องวิ่ง** N: ไม่มีดีเอ็นเอแม่แบบ (ตัวแปรควบคุมผลลบ) **ช่องวิ่ง** P: ดีเอ็นเอจาก *Burholderia* sp. สายพันธุ์ RP007 (ตัวแปรควบคุมผลบวก) **ช่องวิ่ง** A-J: ดีเอ็นเอเมตาจีโนมจากตัวอย่างดิน **ช่องวิ่ง** W1-W4: ดีเอ็นเอเมตาจีโนมจากตัวอย่างน้ำทะเล **และช่องวิ่ง** B1-B11 **และ** 3-7: ดีเอ็นเอเมตาจีโนมตัวอย่างดินตะกอน

จากรูปที่ 4.21 ผลการใช้ไพร์เมอร์คู่ GNF และ GNR ไม่พบผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอในตัวอย่างดินตะกอน B3 จากทิศตะวันออกเฉียงเหนือของเกาะสีชังบริเวณกลางร่องน้ำดินตะกอน B5 จากทิศตะวันตกของเกาะสีชัง บริเวณหน้าถ้ำพังดินตะกอน 1 จากบริเวณหน้าบางพระดินตะกอน 2 จากทิศตะวันออกเฉียงเหนือของเกาะสีชังบริเวณกลางร่องน้ำดินตะกอน 8 จากทิศตะวันออกของเกาะสีชัง บริเวณกลางร่องน้ำดินตะกอน 9 และ 10 จากบริเวณกลางร่องน้ำหน้าเกาะสีชัง-ศรีราชา และดินตะกอน 11 จากบริเวณท่าเรือสวนสาธารณะศรีราชาแต่พบตรวจพบผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอในตัวอย่างดินทุกอย่าง คือ ตัวอย่างดิน A B และ C บริเวณท่าวังแถบพระจุฑาธุชราชฐาน ตัวอย่างดิน D บริเวณที่จอดเรือท่าล่างตัวอย่างดิน E บริเวณสถานีตำรวจใกล้ท่าล่าง ตัวอย่างดิน F บริเวณหน้าหาดถ้ำพังคือ ตัวอย่างดิน G บริเวณหาดทรายแก้วใกล้สถานีขนถ่ายน้ำมันและสินค้าตัวอย่างดิน H บริเวณท่าวังแถบเรือนผ่องศรี ตัวอย่างดิน I บริเวณหน้าสถานีตำรวจน้ำ และตัวอย่างดิน J บริเวณท่าเรือท่าบน ตรวจพบในตัวอย่างน้ำทะเลทุกตัวอย่าง คือ ตัวอย่างน้ำทะเล W1 บริเวณท่า

วังแถบสะพานอัษฎางค์ตัวอย่างน้ำทะเล W2 บริเวณที่จอดเรือท่าบน ตัวอย่างน้ำทะเล W3 บริเวณที่จอดเรือท่าล่างและตัวอย่างน้ำทะเล W4 บริเวณหน้าหาดถ้ำพัง และตรวจพบในตัวอย่างดินตะกอนจำนวน 12 ตัวอย่าง จากดินตะกอนทั้งหมด 20 อย่าง คือตัวอย่างดินตะกอน B1 และ B2 บริเวณทิศเหนือของเกาะสีชัง ตัวอย่างดินตะกอน B6 จากทิศตะวันออกของเกาะสีชัง บริเวณหน้าท่าเรือสีชังทอง ตัวอย่างดินตะกอน B7 จากทิศตะวันออกของเกาะสีชังบริเวณกลางร่องน้ำตัวอย่างดินตะกอน B9 จากทิศตะวันตกเฉียงใต้ของเกาะสีชังใต้เกาะค้างคาว ตัวอย่างดินตะกอน B10 จากทิศตะวันตกเฉียงใต้ของเกาะสีชังใต้เกาะค้างคาวและตัวอย่างดินตะกอน B11 บริเวณเขาบ่อยาท่าเรือปตท.ตัวอย่างดินตะกอน 3 บริเวณกลางร่องน้ำท่าเรือศรีราชา ตัวอย่างดินตะกอน 4 บริเวณทิศเหนือของเกาะสีชังตัวอย่างดินตะกอน 5 บริเวณทิศเหนือฝั่งตะวันตกของเกาะสีชัง ตัวอย่างดินตะกอนหมายเลข 6 บริเวณท่าบน และตัวอย่างดินตะกอน 7 ทางทิศตะวันออกของเกาะสีชังบริเวณกลางร่องน้ำ ดังนั้นจึงเลือกผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอในตัวอย่างที่พบยีนดังกล่าวมาสร้างห้องสมุดยีน dox_{GN} เพื่อคัดแยกยีนย่อยสลายสารประกอบ PAHs ในกลุ่มแบคทีเรียแกรมลบต่อไป



รูปที่ 4.22 ผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอบริเวณยีน dox_{GP} จากไพร์เมอร์คู่ GPF และ GPR จากตัวอย่างสิ่งแวดล้อมเกาะสีชัง **ช่องวิ่ง M**: ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp **ช่องวิ่ง N**: ไม่มีดีเอ็นเอแม่แบบ (ตัวแปรควบคุมผลลบ) **ช่องวิ่ง P**: ดีเอ็นเอจาก *Pseudoxanthomonas* sp. สายพันธุ์ RN 402 (ตัวแปรควบคุมผลบวก) **ช่องวิ่ง E H I และ J**: ดีเอ็นเอเมตาจีโนมจากตัวอย่างดิน **ช่องวิ่ง 3 และ 7**: ดีเอ็นเอเมตาจีโนมจากตัวอย่างดินตะกอน

จากรูปที่ 4.22 ผลการใช้ไพร์เมอร์คู่ GPF และ GPR ไม่พบผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอในตัวอย่างน้ำทะเลทุกประเภท และในตัวอย่างดิน A B และ C จากบริเวณท่าวังแถบพระจุฑาธุชราชฐาน ตัวอย่างดิน D บริเวณที่จอดเรือท่าล่างตัวอย่างดิน F บริเวณหน้าหาดถ้ำพังตัวอย่างดิน G บริเวณหาดทรายแก้ว แต่ตรวจพบในตัวอย่างดิน 4 ตัวอย่าง คือ ตัวอย่างดิน E บริเวณสถานีตำรวจใกล้

ท่าล่าง ตัวอย่างดิน H บริเวณท่าวังแถบเรือนผ่องศรี ตัวอย่างดิน I บริเวณหน้าสถานีตำรวจน้ำ และตัวอย่างดิน J บริเวณท่าเรือท่าบนในตัวอย่างดินตะกอนไม่พบผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอจากดินตะกอน B1 และ B2 จากบริเวณทิศเหนือของเกาะสีชัง ตัวอย่างดินตะกอน B3 จากทิศตะวันออกเฉียงเหนือของเกาะสีชัง บริเวณกลางร่องน้ำ ตัวอย่างดินตะกอน B5 จากทิศตะวันตกของเกาะสีชัง บริเวณหน้าถ้ำพังตัวอย่างดินตะกอน B6 จากทิศตะวันออกของเกาะสีชัง บริเวณหน้าท่าเรือสีชังทองตัวอย่างดินตะกอน B7 จากทิศตะวันออกของเกาะสีชังบริเวณกลางร่องน้ำ ตัวอย่างดินตะกอน B9 และ B10 จากทิศตะวันตกเฉียงใต้ของเกาะสีชังบริเวณใต้เกาะค้างคาว ตัวอย่างดินตะกอน B11 จากเขาบ่อยา บรีเวณท่าเรือ ปตท. ตัวอย่างดินตะกอน 1 จากหน้าบางพระตัวอย่างดินตะกอน 2 จากทิศตะวันออกเฉียงเหนือของเกาะสีชังบริเวณกลางร่องน้ำ ตัวอย่างดินตะกอน 4 จากทิศเหนือของเกาะสีชังตัวอย่างดินตะกอน 5 จากทิศเหนือฝั่งตะวันตกของเกาะสีชังตัวอย่างดินตะกอนหมายเลข 6 จากใกล้ท่าบน ตัวอย่างดินตะกอน 8 จากทิศตะวันออกของเกาะสีชัง บริเวณกลางร่องน้ำ ตัวอย่างดินตะกอน 9 และ 10 จากกลางร่องน้ำหน้าเกาะสีชัง-ศรีราชา และตัวอย่างดินตะกอน 11 จากท่าเรือสวนสาธารณะศรีราชาแต่ตรวจพบในตัวอย่างดินตะกอนจำนวน 2 ตัวอย่าง คือ ตัวอย่างดินตะกอน 3 บริเวณกลางร่องน้ำท่าเรือศรีราชา และตัวอย่างดินตะกอน 7 บริเวณทิศตะวันออกของเกาะสีชังบริเวณหน้าท่าเรือสีชังทองดังนั้นจึงเลือกผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอในตัวอย่างที่พบยีนดังกล่าวมาสร้างห้องสมุดยีน dox_{GP} เพื่อคัดแยกยีนย่อยสลายสารประกอบ PAHs ในกลุ่มแบคทีเรียแกรมบวกต่อไป

หลังตรวจพบผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอ โดยการเพิ่มจำนวนด้วยคู่ไพร์เมอร์ที่จำเพาะต่อยีน dox_{GN} และยีน dox_{GP} จากนั้นจึงสร้างห้องสมุดยีนไดออกซิจีเนสโดยนำผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอที่ได้มาโคลนเข้ากับพลาสมิดเวกเตอร์ pGEM-T Easy เพื่อใช้ในหาลำดับนิวคลีโอไทด์และความหลากหลายของยีนต่อไป โดยจำนวนรีคอมบิแนนท์พลาสมิดโคลนที่ได้ทั้งหมดมีจำนวน 160 โคลน ซึ่งจัดเป็นรีคอมบิแนนท์พลาสมิดในกลุ่มยีน dox_{GN} จำนวน 130 โคลน และกลุ่มยีน dox_{GP} จำนวน 30 โคลน โดยมีแหล่งที่มาดังแสดงในตารางที่ 4.17

ตารางที่ 4.17 ผลการสร้างห้องสมุดยีน dox_{GN} และยีน dox_{GP} จากผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอหลังเพิ่มจำนวนด้วยปฏิกิริยา PCR

รีคอมบิแนนท์พลาสมิดในกลุ่มยีน dox_{GN}	ดีเอ็นเอจากตัวอย่างดิน	จำนวนรีคอมบิแนนท์พลาสมิด (โคลน)*
GNA	A	50
GNB	B	
GNC	C	
GND	D	
GNE	E	
GNF	F	
GNG	G	
GNH	H	
GNI	I	
GNJ	J	
รีคอมบิแนนท์พลาสมิดในกลุ่มยีน dox_{GN}	ดีเอ็นเอจากตัวอย่างน้ำทะเล	จำนวนรีคอมบิแนนท์พลาสมิด (โคลน)*
GNW1	W1	20
GNW2	W2	
GNW3	W3	
GNW4	W4	
รีคอมบิแนนท์พลาสมิดในกลุ่มยีน dox_{GN}	ดีเอ็นเอจากตัวอย่างดินตะกอน	จำนวนรีคอมบิแนนท์พลาสมิด (โคลน)*
GNB1	B1	35
GNB2	B2	
GNB6	B6	
GNB7	B7	
GNB9	B9	
GNB10	B10	
GNB11	B11	

ตารางที่ 4.17 ผลการสร้างห้องสมุดยีน dox_{GN} และยีน dox_{GP} จากผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอหลังเพิ่มจำนวนด้วยปฏิกิริยา PCR (ต่อ)

รีคอมบิแนนท์พลาสมิดในกลุ่มยีน dox_{GN}	ดีเอ็นเอจากตัวอย่างดินตะกอน	จำนวนรีคอมบิแนนท์พลาสมิด (โคลน)*
GN3	3	25
GN4	4	
GN5	5	
GN6	6	
GN7	7	
ผลรวมของรีคอมบิแนนท์พลาสมิด dox_{GN}		130
รีคอมบิแนนท์พลาสมิดในกลุ่มยีน dox_{GP}	ดีเอ็นเอจากตัวอย่างดิน	จำนวนรีคอมบิแนนท์พลาสมิด (โคลน)*
GPE	E	20
GPH	H	
GPI	I	
GPJ	J	
รีคอมบิแนนท์พลาสมิดในกลุ่มยีน dox_{GP}	ดีเอ็นเอจากตัวอย่างดินตะกอน	จำนวนรีคอมบิแนนท์พลาสมิด (โคลน)*
GP3	3	10
GP7	7	
ผลรวมของรีคอมบิแนนท์พลาสมิด dox_{GP}		30

* หมายเหตุ

จำนวนรีคอมบิแนนท์พลาสมิด (โคลน) ที่ได้ในแต่ละตัวอย่าง มาจากรีคอมบิแนนท์โคลนจำนวน 5 โคลน

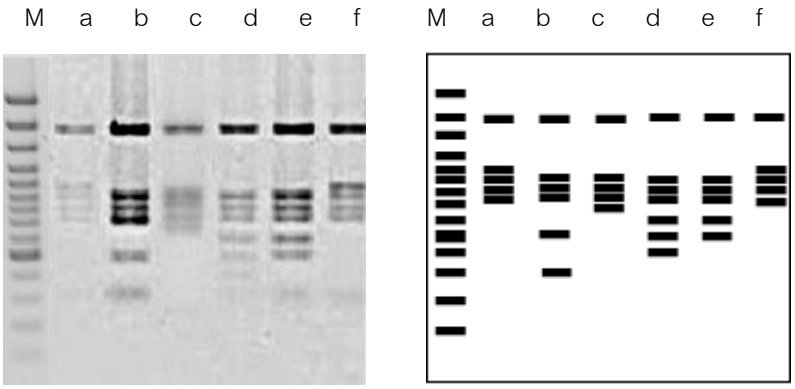
จากตารางที่ 4.17 ผลการสร้างห้องสมุดยีน dox_{GN} โดยใช้คู่ไพร์เมอร์ GNF และ GNR พบรีคอมบิแนนท์พลาสมิดจำนวน 130 โคลนโดยเป็นโคลนที่มาจากตัวอย่างดินและตัวอย่างน้ำทะเลทุกตัวอย่าง และตัวอย่างดินตะกอนตัวอย่าง 12 จาก 20 ตัวอย่าง คือ ตัวอย่างดินตะกอน B1, B2, B6, B7, B9, B10, B11 และตัวอย่างดินตะกอน 3-7 จากนั้นนำรีคอมบิแนนท์พลาสมิดโคลนที่ได้

ทั้งหมดมาคัดเลือกรูปแบบของยีนที่แตกต่างกันโดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 2 ชนิด คือ *HinfI* และ *BsuRI (HaeIII)* ได้กลุ่มรูปแบบรีคอมบิแนนท์พลาสมิดหลังถูกตัดด้วยเอนไซม์ทั้งสองชนิด ดังแสดงในตารางที่ 4.18

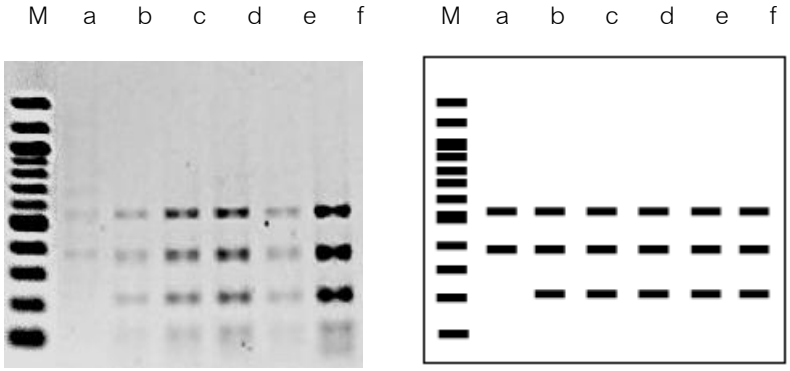
ตารางที่ 4.18 กลุ่มของรูปแบบรีคอมบิแนนท์พลาสมิดในกลุ่ม dox_{GN} หลังถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิด *HinfI* และ *BsuRI (HaeIII)*

กลุ่ม (รูปแบบ)	จำนวนสมาชิกในกลุ่มที่มีรูปแบบของแถบดีเอ็นเอเหมือนกัน	เปอร์เซ็นต์สมาชิกในกลุ่มที่มีรูปแบบของแถบดีเอ็นเอเหมือนกัน	ตัวแทนรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่นำไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์
1 (a)	13	10%	GNB6.2
2 (b)	13	10%	GNB2.1
3 (c)	12	9.23%	GNB7.2
4 (d)	10	7.69%	GNB6.3
5 (e)	17	13.08%	GND.1
6 (f)	65	50%	GNA.2

จากตาราง 4.18 พบว่ารูปแบบของรีคอมบิแนนท์พลาสมิดในกลุ่ม dox_{GN} หลังถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิด *HinfI* และ *BsuRI (HaeIII)* มีจำนวน 6 รูปแบบ ดังแสดงรูปที่ 4.23 และ 4.24 และภาคผนวก ช โดยพบว่ารูปแบบที่ 1 (a) ประกอบด้วยโคลนจำนวน 13 โคลน รูปแบบที่ 2 (b) ประกอบด้วยโคลนจำนวน 13 รูปแบบที่ 3 (c) ประกอบด้วยโคลนจำนวน 12 โคลนรูปแบบที่ 4 (d) ประกอบด้วยโคลนจำนวน 10 โคลนรูปแบบที่ 5 (e) ประกอบด้วยโคลนจำนวน 17 โคลนและรูปแบบที่ 6 (f) ประกอบด้วยโคลนจำนวนมากที่สุดคือ 65 โคลน และคิดเป็น 50% ของรีคอมบิแนนท์ทั้งหมด



รูปที่ 4.23 แสดงรูปแบบตัวแทนรีคอมบิแนนท์พลาสมิดของกลุ่ม dox_{GN} หลังถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิด *HinfI* **ช่องวิ่ง M**: ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp **ช่องวิ่ง a**: รูปแบบ a จากรีคอมบิแนนท์โคลนตัวอย่าง GNB6.2 **ช่องวิ่ง b**: รูปแบบ b จากรีคอมบิแนนท์โคลนตัวอย่าง GNB2.1 **ช่องวิ่ง c**: รูปแบบ c จากรีคอมบิแนนท์โคลนตัวอย่าง GNB7.2 **ช่องวิ่ง d**: รูปแบบ d จากรีคอมบิแนนท์โคลนตัวอย่าง GNB6.3 **ช่องวิ่ง e**: รูปแบบ e จากรีคอมบิแนนท์โคลนตัวอย่าง GND.1 **ช่องวิ่ง f**: รูปแบบ f จากรีคอมบิแนนท์โคลนตัวอย่าง GNA.2



รูปที่ 4.24 แสดงรูปแบบตัวแทนรีคอมบิแนนท์พลาสมิดของกลุ่ม dox_{GN} หลังถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิด *BsuRI (HaeIII)* **ช่องวิ่ง M**: ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp **ช่องวิ่ง a**: รูปแบบ a จากรีคอมบิแนนท์โคลนตัวอย่าง GNB6.2 **ช่องวิ่ง b**: รูปแบบ b จากรีคอมบิแนนท์โคลนตัวอย่าง GNB2.1 **ช่องวิ่ง c**: รูปแบบ c จากรีคอมบิแนนท์โคลนตัวอย่าง GNB7.2 **ช่องวิ่ง d**: รูปแบบ d จากรีคอมบิแนนท์โคลนตัวอย่าง GNB6.3 **ช่องวิ่ง e**: รูปแบบ e จากรีคอมบิแนนท์โคลนตัวอย่าง GND.1 **ช่องวิ่ง f**: รูปแบบ f จากรีคอมบิแนนท์โคลนตัวอย่าง GNA.2

จากรูปที่ 4.23 และ 4.24 แสดงรูปแบบตัวแทนรีคอมบิแนนท์พลาสมิดของกลุ่ม dox_{GN} ในตัวอย่างเกาะสีชังจำนวน 6 รูปแบบ คือรูปแบบ a จากโคลน GNB6.2 รูปแบบ b จากโคลน GNB2.1 รูปแบบ C จากโคลน GNB7.2 รูปแบบ d จากโคลน GNB6.3 รูปแบบ e จากโคลน GND.1 และรูปแบบ f จากโคลน GNA.2 ซึ่งมาจากการคัดเลือกตัวแทนจากโคลนทั้งหมดที่แตกต่างกัน เพื่อจากนั้นนำไปวิเคราะห์ค่าความหลากหลายและลำดับนิวคลีโอไทด์ต่อไป

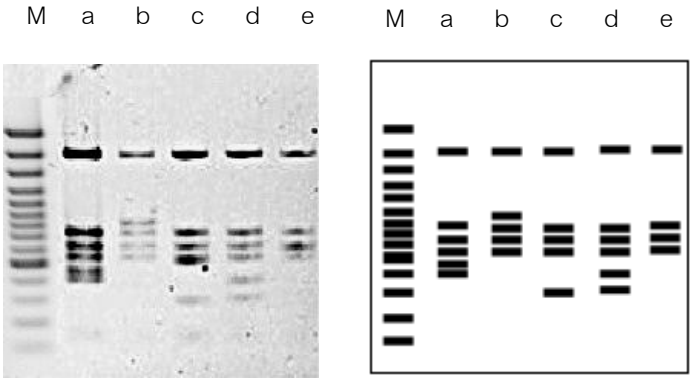
จากตารางที่ 4.17 การสร้างห้องสมุดยีนไดออกซิจีเนสในกลุ่ม dox_{GP} โดยใช้คู่ไพร์เมอร์ GPF และ GPR พบรีคอมบิแนนท์พลาสมิดจำนวน 30 โคลนโดยเป็นโคลนที่มาจากตัวอย่างดิน 4 ตัวอย่างจาก 10 ตัวอย่าง คือ ตัวอย่างดิน E, H, I และ J และตัวอย่างดินตะกอน 2 ตัวอย่างจาก 20 ตัวอย่าง คือตัวอย่างดินตะกอน 3 และ 7 และนำรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่ได้ทั้งหมดมาคัดเลือกรูปแบบของยีนที่แตกต่างกันโดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิด 2 ชนิด คือ *Hinf*I และ *Rsa*I ได้กลุ่มรูปแบบรีคอมบิแนนท์พลาสมิดหลังถูกตัดด้วยเอนไซม์ทั้งสองชนิด ดังแสดงในตารางที่ 4.19

ตารางที่ 4.19 กลุ่มของรูปแบบรีคอมบิแนนท์พลาสมิดในกลุ่ม dox_{GP} หลังถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิด *Hinf*I และ *Rsa*I

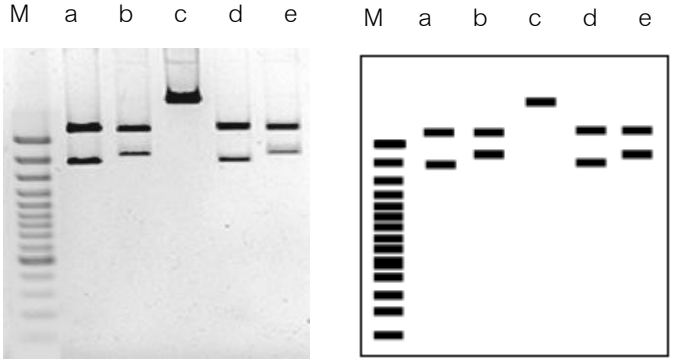
กลุ่ม (รูปแบบ)	จำนวนสมาชิกในกลุ่มที่มีรูปแบบของแถบดีเอ็นเอเหมือนกัน	เปอร์เซ็นต์สมาชิกในกลุ่มที่มีรูปแบบของแถบดีเอ็นเอเหมือนกัน	ตัวแทนรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่นำไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์
1 (a)	12	40%	GP7.5
2 (b)	6	20%	GP7.1
3 (c)	6	20%	GPE.1
4 (d)	3	10%	GPI.1
5 (e)	3	10%	GPI.3

จากตาราง 4.19 พบว่ารูปแบบของรีคอมบิแนนท์พลาสมิดในกลุ่ม dox_{GP} หลังถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิด *Hinf*I และ *Rsa*I มีจำนวน 5 รูปแบบ ดังแสดงรูปที่ 4.25 และ 4.26 และภาคผนวก ช โดยพบว่ารูปแบบที่ 1 (a) ประกอบด้วยโคลนจำนวนมากที่สุด คือ 12 โคลน คิดเป็น 40% ของรีคอมบิแนนท์ทั้งหมดรูปแบบที่ 2 (b) ประกอบด้วยโคลนจำนวน 6 โคลนรูปแบบที่ 3 (c)

ประกอบด้วยโคลนจำนวน 6 โคลนรูปแบบที่ 4 (d) ประกอบด้วยโคลนจำนวน 3 โคลนรูปแบบที่ 5 (e) ประกอบด้วยโคลนจำนวน 3 โคลน



รูปที่ 4.25 แสดงรูปแบบตัวแทนรีคอมบิแนนท์พลาสมิดในกลุ่ม dox_{GP} หลังถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิด *HinfI* **ช่องวิ่ง M**: ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp **ช่องวิ่ง a**: รูปแบบ a จากรีคอมบิแนนท์โคลนตัวอย่าง GP7.5 **ช่องวิ่ง b**: รูปแบบ b จากรีคอมบิแนนท์โคลนตัวอย่างGP7.1 **ช่องวิ่ง c**: รูปแบบ c จากรีคอมบิแนนท์โคลนตัวอย่าง GPE.1 **ช่องวิ่ง d**: รูปแบบ d จากรีคอมบิแนนท์โคลนตัวอย่าง GPI.1 **ช่องวิ่ง e**: รูปแบบ e จากรีคอมบิแนนท์โคลนตัวอย่าง GPI.3



รูปที่ 4.26 แสดงรูปแบบตัวแทนรีคอมบิแนนท์พลาสมิดในกลุ่ม dox_{GP} หลังถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิด *Rsa*I **ช่องวิ่ง M**: ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp **ช่องวิ่ง a**: รูปแบบ a จากรีคอมบิแนนท์โคลนตัวอย่าง GP7.5 **ช่องวิ่ง b**: รูปแบบ b จากรีคอมบิแนนท์โคลนตัวอย่าง GP7.1 **ช่องวิ่ง c**: รูปแบบ c จากรีคอมบิแนนท์โคลนตัวอย่าง GPE.1 **ช่องวิ่ง d**: รูปแบบ d จากรีคอมบิแนนท์โคลนตัวอย่าง GPI.1 **ช่องวิ่ง e**: รูปแบบ e จากรีคอมบิแนนท์โคลนตัวอย่าง GPI.3

จากรูปที่ 4.25 และ 4.26 แสดงรูปแบบตัวแทนรีคอมบิแนนท์พลาสมิดในกลุ่ม dox_{GP} จากตัวอย่างเกาะสีชังจำนวน 5 รูปแบบ คือ รูปแบบ a จากโคลน GP7.5 รูปแบบ b จากโคลน GP7.1

รูปแบบ c จากโคลน GPE.1 รูปแบบ d จากโคลน GPI.1 และรูปแบบ e จากโคลน GPI.3 ซึ่งมาจากการคัดเลือกตัวแทนจากโคลนทั้งหมดที่แตกต่างกัน จากนั้นนำไปวิเคราะห์ลำดับค่าความหลากหลายและลำดับนิวคลีโอไทด์ต่อไป

ผลวิเคราะห์ค่าความหลากหลายของห้องสมุดยีนไดออกซิจีเนสในกลุ่ม dox_{GN} และ dox_{GP} โดยคำนวณจากดัชนีความหลากหลายและการกระจายตัวของ Shannon-Wiener index (H', E_H) (Shannon และ Wiener, 1949) และดัชนีความหลากหลายและการกระจายตัวของ Simpson index (D') (Simpson, 1949) ดังแสดงในตารางที่ 4.20 ผลปรากฏว่าความหลากหลายของยีนไดออกซิจีเนสในกลุ่ม dox_{GP} มีมากกว่า dox_{GN}

ตารางที่ 4.20 ค่าความหลากหลายของยีนไดออกซิจีเนสที่พบในบริเวณเกาะสีชัง

	ยีนในกลุ่ม dox_{GN}	ยีนในกลุ่ม dox_{GP}
H'^{*}	1.37	1.47
D'^{**}	0.36	0.26
E_H^{***}	0.77	0.91
รูปแบบที่พบในการทำ RFLP	6	5
จำนวนโคลนทั้งหมด	130	30

หมายเหตุ

H'^{*} แสดงค่าความความหลากหลายที่คำนวณจากดัชนีของ Shannon

D^{**} แสดงค่าความความหลากหลายที่คำนวณจากดัชนีของ Simpson

E_H^{***} แสดงความค่าความสม่ำเสมอ หรือการกระจายตัวของ Shannon (E_H)

จากตารางที่ 4.20 ผลปรากฏว่าภายหลังการคำนวณค่าดัชนีความหลากหลายของ Shannon พบว่าความหลากหลายของยีน dox_{GP} มีค่ามากกว่า dox_{GN} ซึ่งมีค่าเท่ากับ 1.47 ซึ่งสอดคล้องกับค่าดัชนีความหลากหลายของ Simpson ซึ่งมีค่า 0.26 ขณะที่ค่าความสม่ำเสมอ หรือการกระจายตัวของใน dox_{GP} มีค่าเข้าใกล้ 1 ซึ่งแสดงถึงความสม่ำเสมอของการกระจายตัวของแบคทีเรียแกรมบวกในพื้นที่มีมากกว่า

ผลการวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์จากรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่เป็นตัวแทนในแต่ละกลุ่ม จำนวน 11 โคลน โดยพบเป็นตัวแทนของยีน dox_{GN} จำนวน 6 โคลน คือ GNB6.2, GNB2.1, GNB7.2, GNB6.3, GND.1 และ GNA.2 ผลปรากฏว่าโคลน GNB6.2 โคลน GNB2.1 โคลน

GNB7.2 โคลน GNB6.3 และ GND.1 มีลำดับนิวคลีโอไทด์ประมวลรหัสกรดอะมิโนที่คล้ายคลึงกับโปรตีน PAH-ring hydroxylating dioxygenase alpha subunit ของ *Hydrocarboniphaga effusa* สายพันธุ์ AP103 (ZP_10317397.1) ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมลบ โดยมีเปอร์เซ็นต์ความเหมือนปานกลางเพียงคือ 49%, 50%, 49%, 50% และ 50% ตามลำดับ ส่วนโคลน GNA.2 มีลำดับนิวคลีโอไทด์ประมวลรหัสกรดอะมิโนที่คล้ายคลึงกับโปรตีนโปรตีน PAH-ring hydroxylating dioxygenase alpha subunit ของ Uncultured bacterium (CCG47700.1) ที่เปอร์เซ็นต์ความเหมือนปานกลางเช่นกัน คือ 50% และโคลนที่เป็นตัวแทนของยีนไดออกซิจีเนสในกลุ่มแบคทีเรียแกรมบวก จำนวน 5 โคลน คือ GP7.5, GP7.1, GPE.1, GPI.1 และ GPI.3 ผลปรากฏว่าโคลน GP7.5 มีลำดับนิวคลีโอไทด์ประมวลรหัสอะมิโนที่คล้ายคลึงกับโปรตีน PAH-ring hydroxylating dioxygenase alpha subunit ของ Uncultured bacterium (ADO01375.1) ที่เปอร์เซ็นต์ความเหมือน 98% โคลน GP7.1 มีลำดับนิวคลีโอไทด์ประมวลรหัสอะมิโนที่คล้ายคลึงกับโปรตีน PAH-ring hydroxylating dioxygenase alpha subunit ของUncultured bacterium (ACD14245.1) ที่เปอร์เซ็นต์ความเหมือน 95% โคลน GPE.1 มีลำดับนิวคลีโอไทด์ประมวลรหัสอะมิโนที่คล้ายคลึงกับโปรตีน PAH-ring hydroxylating dioxygenase alpha subunit ของ *Mycobacterium* sp. สายพันธุ์ HH2 (ABA87072.1) ที่เปอร์เซ็นต์ความเหมือน 99% โคลน GPI.1 และโคลน GPI.3 มีลำดับนิวคลีโอไทด์ประมวลรหัสอะมิโนที่คล้ายคลึงกับโปรตีน PAH-ring hydroxylating dioxygenase alpha subunit ของ *Mycobacterium gilvum* สายพันธุ์ PYR-GCK (YP_001131817.1) ที่เปอร์เซ็นต์ความเหมือน 97% และ 96% ตามลำดับรายละเอียดของผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ในกลุ่ม dox_{GN} ดังแสดงในตารางที่ 4.21 และผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ในกลุ่ม dox_{GP} แสดงในตารางที่ 4.22 หลังจากนั้นนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของตัวแทนที่ได้และลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนไดออกซิจีเนสในหน่วยย่อยแอลฟาของแบคทีเรียที่พบรายงาน มาสร้างแผนภูมิต้นไม้แสดงความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของยีนไดออกซิจีเนสได้ผลดังแสดงในรูปที่ 4.27

ตารางที่ 4.21 ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ประมวลรหัสอะมิโนของยีนต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลาย PAHs ในแบคทีเรียแกรมลบ

ตัวอย่าง	โปรตีน	ยีน	สายพันธุ์แบคทีเรีย	% amino acid identity	Accession no.	เอกสารอ้างอิง
GNB6.2	PAH-ring hydroxylating dioxygenase alpha subunit protein	PAH-RHD$_{\alpha}$	*Hydrocarboniphaga effusa* สายพันธุ์ AP103	49%	ZP_10317397.1	Chang และคณะ 2012
	PAH-ring hydroxylating dioxygenase iron sulfur protein	PAH-RHD$_{\alpha}$	*Ralstonia* sp. สายพันธุ์ PJ531	47%	BAB84024.1	Widada และคณะ 2002
	Iron sulfur protein	PAH-RHD$_{\alpha}$	Uncultured soil bacterium	47%	AAT01800.1	Gomes และคณะ 2004
	Iron sulfur protein	PAH-RHD$_{\alpha}$	Uncultured soil bacterium	47%	AAT01797.1	Gomes และคณะ 2004

ตารางที่ 4.21 ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ประมวลรหัสอะมิโนของยีนต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลาย PAHs ในแบคทีเรียแกรมลบ (ต่อ)

ตัวอย่าง	โปรตีน	ยีน	สายพันธุ์แบคทีเรีย	% amino acid identity	Accession no.	เอกสารอ้างอิง
GNB2.1	PAH-ring hydroxylating dioxygenase alpha subunit	PAH-RHD$_{\alpha}$	*Hydrocarboniphaga effusa* สายพันธุ์ AP103	50%	ZP_10317397.1	Chang และคณะ 2012
	PAH-ring hydroxylating dioxygenase	PAH-RHD$_{\alpha}$	*Martelella* sp. สายพันธุ์ AD-3	42%	AEP26316	Cui และคณะ 2011
	PAH-ring hydroxylating dioxygenase large subunit	*pahAc3*	bacterium enrichment culture clone	47%	AFH77961.1	Singleton และคณะ 2012
	PAH-ring hydroxylating dioxygenase alpha subunit	PAH-RHD$_{\alpha}$	Uncultured bacterium	46%	CCG47668.1	Martin และคณะ 2012 ไม่ตีพิมพ์

\

ตารางที่ 4.21 ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ประมวลรหัสอะมิโนของยีนต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลาย PAHs ในแบคทีเรียแกรมลบ (ต่อ)

ตัวอย่าง	โปรตีน	ยีน	สายพันธุ์แบคทีเรีย	% amino acid identity	Accession no.	เอกสารอ้างอิง
GNB7.2	PAH-ring hydroxylating dioxygenase alpha subunit	PAH-RHD$_{\alpha}$	*Hydrocarboniphaga effusa* สายพันธุ์ AP103	49%	ZP_10317397.1	Chang และคณะ 2012
	PAH-ring hydroxylating dioxygenase large subunit	*pahAc3*	bacterium enrichment culture clone	46%	AFH77961.1	Singleton และคณะ 2012
	PAH-ring hydroxylating dioxygenase alpha subunit	PAH-RHD$_{\alpha}$	Uncultured bacterium	45%	CCG47668.1	Martin และคณะ 2012 ไม่ตีพิมพ์
	PAH-ring hydroxylating dioxygenase alpha subunit	PAH-RHD$_{\alpha}$	Uncultured bacterium	45%	CCG47696.1	Martin และคณะ 2012 ไม่ตีพิมพ์

ตารางที่ 4.21 ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ประมวลรหัสอะมิโนของยีนต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลาย PAHs ในแบคทีเรียแกรมลบ (ต่อ)

ตัวอย่าง	โปรตีน	ยีน	สายพันธุ์แบคทีเรีย	% amino acid identity	Accession no.	เอกสารอ้างอิง
GNB6.3	PAH-ring hydroxylating dioxygenase alpha subunit	PAH-RHD$_{\alpha}$	*Hydrocarboniphaga effusa* สายพันธุ์ AP103	50%	ZP_10317397.1	Chang และคณะ 2012
	PAH-ring hydroxylating dioxygenase alpha subunit	PAH-RHD$_{\alpha}$	*Ralstonia* sp. สายพันธุ์ PJ531	46%	BAB84024.1	Widada และคณะ 2002
	Iron sulfur protein	PAH-RHD$_{\alpha}$	Uncultured soil bacterium	46%	AAT01800.1	Gomes และคณะ 2004
	Iron sulfur protein	PAH-RHD$_{\alpha}$	Uncultured soil bacterium	46%	AAT01797.1	Gomes และคณะ 2004

ตารางที่ 4.21 ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ประมวลรหัสอะมิโนของยีนต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลาย PAHs ในแบคทีเรียแกรมลบ (ต่อ)

ตัวอย่าง	โปรตีน	ยีน	สายพันธุ์แบคทีเรีย	% amino acid identity	Accession no.	เอกสารอ้างอิง
GND.1	PAH-ring hydroxylating dioxygenase alpha subunit	PAH-RHD$_{\alpha}$	*Hydrocarboniphaga effusa* สายพันธุ์ AP103	50%	ZP_10317397.1	Chang และคณะ 2012
	PAH-ring hydroxylating dioxygenase large subunit	*pahAc3*	bacterium enrichment culture clone	47%	AFH77961.1	Singleton และคณะ 2012
	PAH-ring hydroxylating dioxygenase alpha subunit	PAH-RHD$_{\alpha}$	Uncultured soil bacterium	46%	CCG47668.1	Martin และคณะ 2012 ไม่ตีพิมพ์
	PAH-ring hydroxylating dioxygenase alpha subunit	PAH-RHD$_{\alpha}$	Uncultured soil bacterium	46%	CCG47700.1	Martin และคณะ 2012 ไม่ตีพิมพ์

ตารางที่ 4.21 ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ประมวลรหัสอะมิโนของยีนต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลาย PAHs ในแบคทีเรียแกรมลบ (ต่อ)

ตัวอย่าง	โปรตีน	ยีน	สายพันธุ์แบคทีเรีย	% amino acid identity	Accession no.	เอกสารอ้างอิง
GNA.2	PAH-ring hydroxylating dioxygenase alpha subunit	PAH-RHD$_{\alpha}$	Uncultured bacterium	56%	CCG47700.1	Martin และคณะ 2012 ไม่มีการตีพิมพ์
	PAH-ring hydroxylating dioxygenase alpha subunit	PAH-RHD$_{\alpha}$	Uncultured bacterium	56%	CCG47690.1	Martin และคณะ 2012 ไม่มีการตีพิมพ์
	PAH-ring hydroxylating dioxygenase alpha subunit	PAH-RHD$_{\alpha}$	Uncultured bacterium	56%	CCG47668.1	Martin และคณะ 2012 ไม่มีการตีพิมพ์
	PAH-ring hydroxylating dioxygenase alpha subunit	PAH-RHD$_{\alpha}$	Uncultured bacterium	56%	CCG47665.1	Martin และคณะ 2012 ไม่มีการตีพิมพ์

ตารางที่ 4.22 ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ประมวลรหัสอะมิโนของยีนต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลาย PAHs ในแบคทีเรียแกรมบวก

ตัวอย่าง	โปรตีน	ยีน	สายพันธุ์แบคทีเรีย	% amino acid identity	Accession no.	เอกสารอ้างอิง
GP7.5	PAH-ring hydroxylating dioxygenase alpha subunit	PAH-RHD$_{\alpha}$	Uncultured bacterium	98%	ADO01375.1	Cebron และคณะ 2011
	PAH-ring hydroxylating dioxygenase alpha subunit	PAH-RHD$_{\alpha}$	Uncultured bacterium	97%	AEW70612.1	Jurelevicius และคณะ 2012
	PAH-ring hydroxylating dioxygenase alpha subunit	PAH-RHD$_{\alpha}$	Uncultured bacterium	97%	ACD14248.1	Cebron และคณะ 2008
	PAH-ring hydroxylating dioxygenase alpha subunit	PAH-RHD$_{\alpha}$	Uncultured bacterium	97%	ACD14260.1	Cebron และคณะ 2008

ตารางที่ 4.22 ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ประมวลรหัสอะมิโนของยีนต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลาย PAHs ในแบคทีเรียแกรมบวก (ต่อ)

ตัวอย่าง	โปรตีน	ยีน	สายพันธุ์แบคทีเรีย	% amino acid identity	Accession no.	เอกสารอ้างอิง
GP7.1	PAH ring-hydroxylating dioxygenase alpha subunit	PAH-RHD$_{\alpha}$	uncultured bacterium	95%	ACD14245.1	Cebron และ Leyval 2007
	PAH ring-hydroxylating dioxygenase alpha subunit	PAH-RHD$_{\alpha}$	uncultured bacterium	94%	AEW70635.1	Jurelevicius และคณะ 2012
	PAH-ring hydroxylating dioxygenase alpha subunit	PAH-RHD$_{\alpha}$	*Mycobacterium gilvum* สายพันธุ์ PYR-GCK	93%	YP_001131838.1	Copeland และคณะ 2007
	PAH-ring hydroxylating dioxygenase alpha subunit	PAH-RHD$_{\alpha}$	*Mycobacterium vanbaalenii* สายพันธุ์ PYR-1	93%	YP_951375.1	Copeland และคณะ 2006

ตารางที่ 4.22 ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ประมวลรหัสอะมิโนของยีนต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลาย PAHs ในแบคทีเรียแกรมบวก (ต่อ)

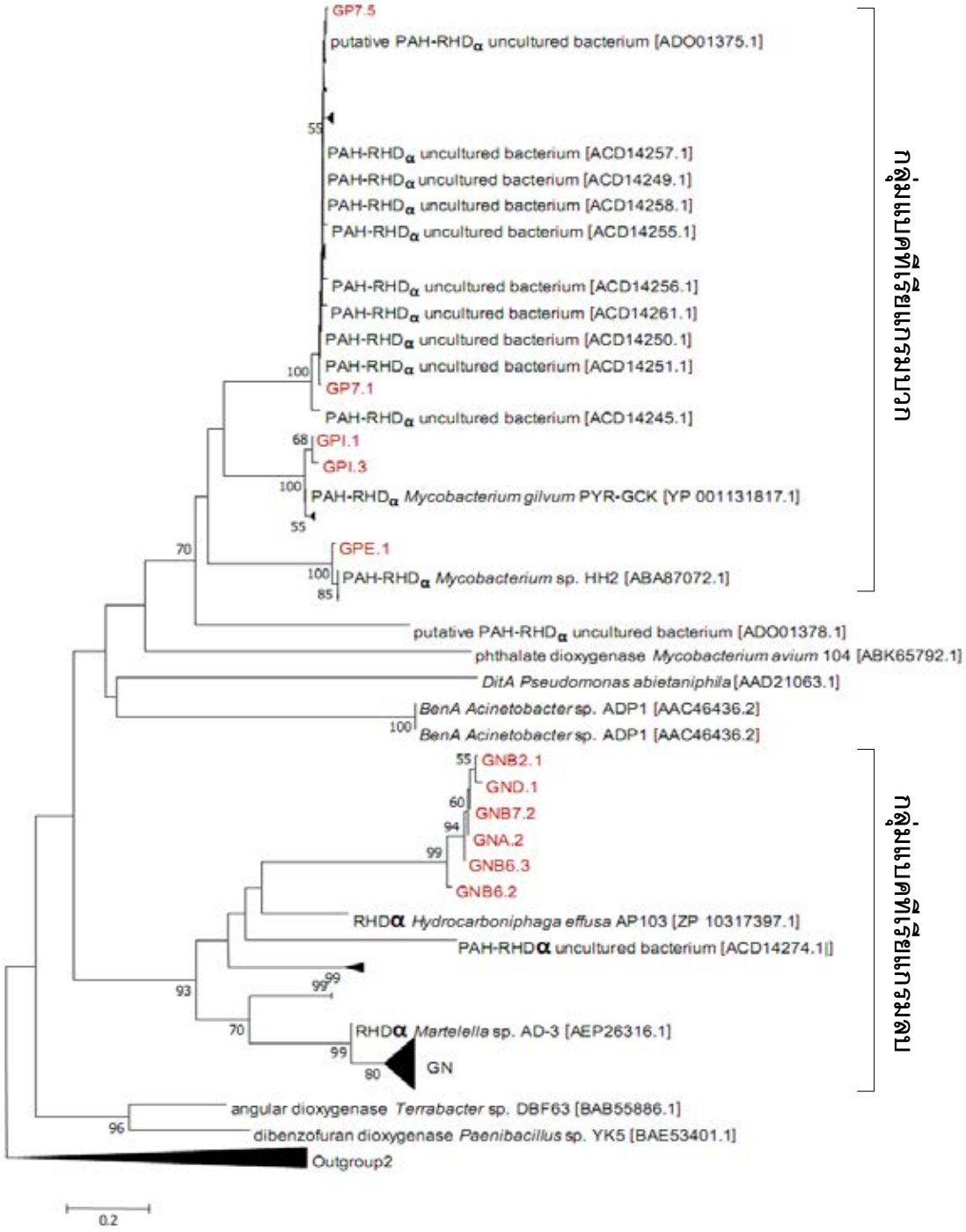
ตัวอย่าง	โปรตีน	ยีน	สายพันธุ์แบคทีเรีย	% amino acid identity	Accession no.	เอกสารอ้างอิง
GPE.1	PAH ring-hydroxylating dioxygenase alpha subunit	PAH-RHD$_{\alpha}$	*Mycobacterium* sp. สายพันธุ์ HH2	99%	ABA87072.1	Zhou และคณะ 2006
	NidA	*nidA*	*Pseudoxanthomonas* sp. สายพันธุ์ RN402	98%	ACL13524.1	Klankeo และคณะ 2009
	NidA	*nidA*	*Mycobacterium* sp. สายพันธุ์ py139	98%	ADH94658.1	DeBruyn และคณะ 2010
	NidA	*nidA*	*Mycobacterium* sp. สายพันธุ์ py138	98%	ADH94657.1	DeBruyn และคณะ 2010

ตารางที่ 4.22 ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ประมวลรหัสอะมิโนของยีนต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลาย PAHs ในแบคทีเรียแกรมบวก (ต่อ)

ตัวอย่าง	โปรตีน	ยีน	สายพันธุ์แบคทีเรีย	% amino acid identity	Accession no.	เอกสารอ้างอิง
GPI.1	PAH ring-hydroxylating dioxygenase alpha subunit	PAH-RHD$_{\alpha}$	*Mycobacterium gilvum* สายพันธุ์ PYR-GCK	97%	YP_001131817.1	Copeland และคณะ 2007
	putative ring hydroxylating dioxygenase large subunit	PAH-RHD$_{\alpha}$	*Mycobacterium* sp. สายพันธุ์ SNP11	96%	ABK27720.1	Pagnout และคณะ 2007
	PAH-ring hydroxylating dioxygenase, large terminal subunit	PAH-RHD$_{\alpha}$	*Mycobacterium* sp. สายพันธุ์ MCS	96%	YP_638855.1	Morgan และ Churchill 2005
	PAH-ring hydroxylating dioxygenase, large terminal subunit	PAH-RHD$_{\alpha}$	*Mycobacterium* sp. สายพันธุ์ CH-1	96%	ABD97978.1	Pagnout และคณะ 2007

ตารางที่ 4.22 ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ประมวลรหัสอะมิโนของยีนต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลาย PAHs ในแบคทีเรียแกรมบวก (ต่อ)

ตัวอย่าง	โปรตีน	ยีน	สายพันธุ์แบคทีเรีย	% amino acid identity	Accession no.	เอกสารอ้างอิง
GPI.3	PAH-ring hydroxylating dioxygenase alpha subunit	PAH-RHD$_{\alpha}$	*Mycobacterium gilvum* สายพันธุ์ PYR-GCK	96%	YP_001131817.1	Copeland และคณะ 2007
	PAH-ring hydroxylating dioxygenase alpha subunit	PAH-RHD$_{\alpha}$	*Mycobacterium vanbaalenii* สายพันธุ์ PYR-1	96%	YP_951396.1	Copeland และคณะ 2006
	PAH-ring hydroxylating dioxygenase alpha subunit	PAH-RHD$_{\alpha}$	*Mycobacterium* sp. สายพันธุ์ MCS	96%	YP_638855.1	Copeland และคณะ 2006
	PdoA2	*pdoA2*	*Mycobacterium* sp. สายพันธุ์ CH-2	96%	AAZ78216.1	Morgan และ Churchill 2005



รูปที่ 4.27 แผนภูมิต้นไม้แสดงความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของยีนไดออกซิจีเนสในหน่วยย่อยแอลฟาของ dox_{GN} และ dox_{GP} ที่สร้างจากลำดับกรดอะมิโน และตัวเลขบนกิ่งบอกถึงการนับจำนวนซ้ำจากทั้งหมด 1,000 ครั้งด้วย bootstrap

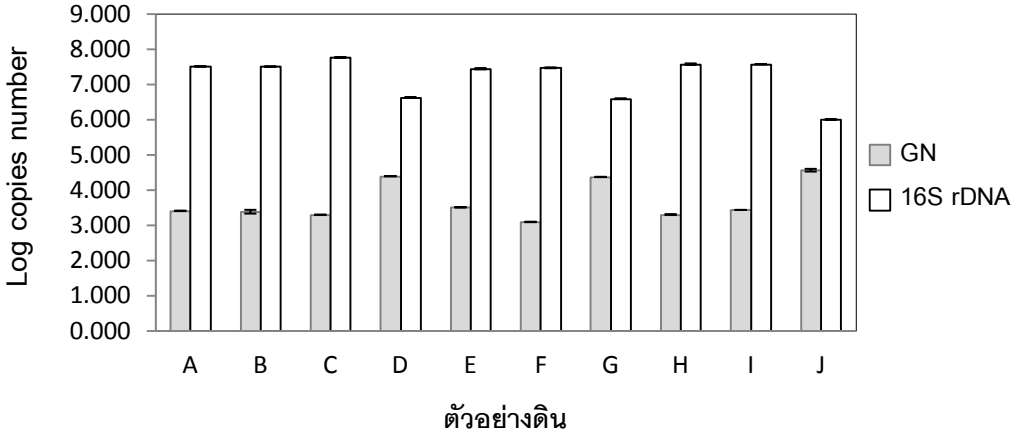
จากรูปที่ 4.27 พบว่าผลิตภัณฑ์ของโคลนยีนไดออกซิจีเนสที่พบในกลุ่ม dox_{GN} ทั้งหมดแยกจากกลุ่มยีน dox_{GN} ที่เคยมีรายงานมาก่อนอย่างชัดเจน โดยที่โคลน GNB6.2 โคลน GNB2.1 โคลน GNB7.2 โคลน GNB6.3 และ GND.1 จัดอยู่ในกลุ่ม PAH-RHDα ของ *Hydrocarboniphaga effuse* สายพันธุ์ AP103 (ZP_10317397.1) และโคลน GNA.2 จัดอยู่ในกลุ่ม PAH-RHDα ของ Uncultured bacterium (CCG47700.1) ส่วนผลิตภัณฑ์ของโคลนที่พบในกลุ่ม dox_{GP} คือ โคลน GP7.5 จัดอยู่ในกลุ่ม PAH-RHDα ของ Uncultured bacterium (ADO01375.1)โคลน GP7.1 จัดอยู่ในกลุ่ม PAH-RHDα ของ Uncultured bacterium (ACD14245.1) โคลน GPE.1 จัดอยู่ในกลุ่ม PAH-RHDα ของ *Mycobacterium* sp. สายพันธุ์ HH2 (ABA87072.1) โคลน GPI.1 และโคลน GPI.3 จัดอยู่ในกลุ่ม PAH-RHDα ของ *Mycobacterium gilvum* สายพันธุ์ PYR-GCK (YP_001131817.1) ซึ่งแสดงให้เห็นว่าผลการสร้างแผนภูมิต้นไม้แสดงความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของยีนไดออกซิจีเนสในกลุ่ม dox_{GN} และ dox_{GP} สอดคล้องข้อมูลการเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลดังแสดงในตารางที่ 4.21 และ 4.22

4.7 วิเคราะห์ความอุดมสมบูรณ์ของแบคทีเรียและยีนไดออกซิจีเนสจากตัวอย่างสิ่งแวดล้อมด้วยวิธี Quantitaive real-time PCR

จากการศึกษาความหลากหลายของยีนไดออกซิจีเนสในหัวข้อ 4.6 พบยีนไดออกซิจีเนสกลุ่ม dox_{GN} และ dox_{GP} มากมายหลายชนิด โดยเฉพาะยีนไดออกซิจีเนสในกลุ่ม dox_{GN} ที่พบได้ในตัวอย่างทุกประเภททั้งในตัวอย่างดิน น้ำทะเล และดินตะกอนโดยเฉพาะบริเวณท่าบนที่สามารถตรวจพบยีน dox_{GN} ได้ในตัวอย่างทุกประเภท คือ ตัวอย่างดิน J ตัวอย่างน้ำทะเล W2 และตัวอย่างดินตะกอนหมายเลข 6 ดังนั้นเพื่อที่จะหาปริมาณของยีนไดออกซิจีเนสที่แท้จริงในสิ่งแวดล้อมโดยเปรียบเทียบสัดส่วนของปริมาณของยีน dox_{GN} กับปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดถือเป็นสิ่งสำคัญเพราะจะทำให้ทราบข้อมูลความอุดมสมบูรณ์ของยีนไดออกซิจีเนสที่แท้จริงในสิ่งแวดล้อมโดยตรงจาก ซึ่งทำได้โดยการใช้วิธี real-time PCR ในการเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอบริเวณยีน 16S rDNA ด้วยไพร์เมอร์คู่ 1401F และ 968R (Felske และคณะ, 1998) และเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนยีนไดออกซิจีเนสในกลุ่ม dox_{GN} ด้วยไพร์เมอร์คู่ GNF และ GNR (Cebron และคณะ, 2008) โดยใช้ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส

ภายหลังการสร้างกราฟมาตรฐานของรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่มียีน 16S rDNA (% efficiency = 98.02%) และยีนไดออกซิจีเนสในกลุ่ม dox_{GN} (% efficiency = 84.18%) ดังแสดงในภาคผนวก ซ เพื่อใช้เปรียบเทียบปริมาณแบคทีเรียทั้งหมด และปริมาณยีนไดออกซิจีเนสใน

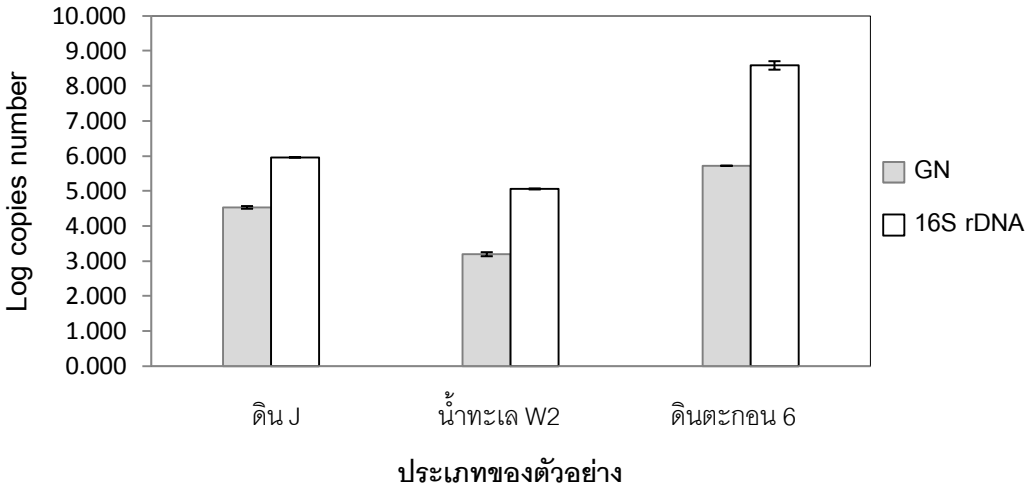
ตัวอย่าง โดยมีปริมาณแบคทีเรียทั้งหมด และปริมาณยีนไดออกซิจีเนสในตัวอย่างดินจำนวน 10 ตัวอย่าง ดังแสดงในรูปที่ 4.28



รูปที่ 4.28 จำนวนชุดของยีน 16S rDNA และยีน dox_{GN} ในตัวอย่างดินจำนวน 10 ตัวอย่าง

จากรูป 4.28 พบว่าจำนวนชุดของยีน 16S rDNA ในตัวอย่างดินมีอยู่ในช่วง 5.99 ± 0.00 ถึง 7.76 ± 0.01 log copy number/กรัมดินโดยมีค่าสูงสุดในตัวอย่างดิน C บริเวณท่าวังแถบพระจุฑาธุชราชฐาน และต่ำสุดในตัวอย่างดิน J บริเวณท่าบน ทั้งนี้ยังพบว่าตัวอย่างดิน D บริเวณท่าเรือท่าล่าง และตัวอย่างดิน G บริเวณหาดทรายแก้วใกล้สถานีขนถ่ายน้ำมันและสินค้า เป็นตัวอย่างดินที่พบจำนวนชุดของยีน 16S rDNA ต่ำ มีค่า 6.62 ± 0.01 และ 6.59 ± 0.01 log copy number/กรัมดิน ตามลำดับ ในขณะที่จำนวนชุดของยีนไดออกซิจีเนสในกลุ่ม dox_{GN} ที่พบในตัวอย่างดินมีอยู่ในช่วง 3.09 ± 0.00 ถึง 4.55 ± 0.04 log copy number/กรัมดิน โดยค่าสูงสุดในตัวอย่างดิน J บริเวณท่าบน และต่ำสุดในตัวอย่างดิน F บริเวณหน้าหาดถ้ำพัง

เมื่อพิจารณาประเภทตัวอย่างที่เก็บจากบริเวณท่าบน พบมีจำนวนชุดของยีน 16S rDNA และจำนวนชุดของยีนไดออกซิจีเนสในกลุ่ม dox_{GN} สูงสุดในตัวอย่างดินตะกอนหมายเลข 6 รองมาคือ ตัวอย่างดิน J และตัวอย่างน้ำทะเล W2 ดังแสดงในรูปที่ 4.29



รูปที่ 4.29 จำนวนชุดของยีน 16S rDNA และยีน dox_{GN} บริเวณท่าบนในตัวอย่างดิน J ตัวอย่างน้ำทะเล W2 และตัวอย่างดินตะกอน 6

จากรูปที่ 4.29 พบว่าจำนวนชุดของยีน 16S rDNA มีสูงสุดในตัวอย่างดินตะกอนหมายเลข 6 ซึ่งมีค่าเท่ากับ 7.58 ± 0.12 log copy number/กรัมดิน รองมาคือ ตัวอย่างดิน J มีค่าเท่ากับ 5.95 ± 0.00 log copy number/กรัมดิน และตัวอย่างน้ำทะเล W2 มีค่าเท่ากับ 5.05 ± 0.01 log copy number/มิลลิลิตรน้ำทะเล ซึ่งสอดคล้องกับจำนวนชุดของยีนไดออกซิจีเนสในกลุ่ม (dox_{GN}) ที่พบสูงสุดในตัวอย่างดินตะกอนหมายเลข 6 มีค่าเท่ากับ 5.71 ± 0.00 log copy number/กรัมดิน รองมาคือ ตัวอย่างดิน J มีค่าเท่ากับ 4.53 ± 0.04 log copy number/กรัมดิน และตัวอย่างน้ำทะเล W2 มีค่าเท่ากับ 3.19 ± 0.06 log copy number/มิลลิลิตรน้ำทะเล

4.8 ลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล

หลังนำฝากลำดับนิวคลีโอไทด์ต่าง ๆ ในฐานข้อมูล Genebank ซึ่งปรากฏภายใต้ accession number ต่าง ๆ ดังนี้ คือ KC998926-KC998946 (แบคทีเรียสายพันธุ์บริสุทธิ์) KC998916-KC998925 (โคลน DGGE ในตัวอย่างดิน) KC998880-KC998892 (โคลน DGGE ในตัวอย่างน้ำทะเล) KC998893-KC998915 (โคลน DGGE ในตัวอย่างดินตะกอน) และ KC978719-KC978727 (รีคอมบิแนนท์โคลนตัวแทนในกลุ่ม dox_{GN} และ dox_{GP})

บทที่ 5

วิจารณ์ผลการทดลอง

5.1 วิเคราะห์ปริมาณฟีแนนทรีนหรือไพรีนในตัวอย่าง

ผลการวิเคราะห์ปริมาณฟีแนนทรีนหรือไพรีนในตัวอย่าง โดยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟี (Gas chromatography, GC) ปรากฏว่าไม่พบการปนเปื้อนของสารประกอบ PAHs ทั้งสองชนิดในทุกตัวอย่าง ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากในพื้นที่เกาะสีชังอาจมีระดับการปนเปื้อนของ PAHs ต่ำเกินกว่าที่จะสามารถตรวจพบโดยวิธีการสกัดแบบปกติด้วยตัวทำละลายสกัด *n*-hexane ได้ ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการสกัดโดยเครื่องมือสกัดที่เรียกกันว่า ซอกห์เลต (soxhlet) ที่มีการสกัดอย่างต่อเนื่องซ้ำ ๆ กันหลายครั้ง และเป็นเวลานานทำให้มีโอกาสพบการปนเปื้อนของ PAHs ได้มากกว่า ประกอบกับปริมาณตัวอย่างที่ใช้สกัดเพื่อวิเคราะห์ระดับการปนเปื้อนมีปริมาณน้อยเกินไป อีกทั้งกราฟมาตรฐานที่ใช้ในการเปรียบเทียบปริมาณการปนเปื้อนของ PAHs ในพื้นที่สูงเกินระดับการปนเปื้อนจริงในธรรมชาติ หรืออาจเนื่องมาจากมีระดับการปนเปื้อนต่ำเกินกว่าขีดจำกัดของเครื่อง GC ที่สามารถตรวจวัดความเข้มข้นของสารได้ (1.8 พิโคกรัมต่อคาร์บอนของไตรเดกเคน) โดยมีมวลโมเลกุลเท่ากับ 184.36 ซึ่งใกล้เคียงกับฟีแนนทรีน และไพรีน (www.agilent.com/chem)

5.2 วิเคราะห์ความอุดมสมบูรณ์ของแบคทีเรียทั้งหมด และแบคทีเรียย่อยสลาย PAHs โดยวิธีการเพาะเลี้ยง

ผลวิเคราะห์ความอุดมสมบูรณ์ของแบคทีเรียทั้งหมด และแบคทีเรียย่อยสลาย PAHs โดยวิธีการเพาะเลี้ยงเชื้อ ด้วยวิธี MPN พบว่าตัวอย่างที่มีจำนวนแบคทีเรียทั้งหมด และแบคทีเรียย่อยสลายฟีแนนทรีน หรือไพรีนสูงสุด คือ ตัวอย่างดินตะกอน เมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างดิน และตัวอย่างน้ำทะเล ซึ่งค่าสูงสุดของจำนวนแบคทีเรียทั้งหมด และแบคทีเรียย่อยสลายฟีแนนทรีนหรือไพรีนของตัวอย่างทุกประเภทดังแสดงในตารางที่ 5.1 และตารางที่ 5.2

ตารางที่ 5.1 จำนวนแบคทีเรียทั้งหมดที่พบสูงสุดในตัวอย่างแต่ละประเภท

ประเภทตัวอย่าง	บริเวณ	จำนวนแบคทีเรียทั้งหมด
ดิน J	ท่าบน	7.93 ± 0.27 log MPN/กรัมดินแห้ง
น้ำทะเล W2	ท่าบน	6.59 ± 0.25 log MPN/มิลลิลิตรน้ำทะเล
ดินตะกอน 5	ทิศเหนือฝั่งตะวันตกของเกาะสีชัง	8.97 ± 0.00 log MPN/กรัมดินแห้ง
ดินตะกอน 10	กลางร่องน้ำเกาะสีชัง-ศรีราชา	

ตารางที่ 5.2 จำนวนแบคทีเรียย่อยสลายฟีแนนทรีนหรือไพรีนที่พบสูงสุดในตัวอย่างแต่ละประเภท

ตัวอย่าง	บริเวณ	จำนวนแบคทีเรียย่อยสลายฟีแนนทรีน	จำนวนแบคทีเรียย่อยสลายไพรีน
ดิน D	ท่าล่าง	4.97 ± 0.00 log MPN/กรัมดินแห้ง	4.38 ± 0.00 log MPN/กรัมดินแห้ง
น้ำทะเล W2	ท่าบน	4.30 ± 0.00 log MPN/มิลลิลิตรน้ำทะเล	3.50 ± 0.05 log MPN/มิลลิลิตรน้ำทะเล
ดินตะกอนหมายเลข 6	ท่าบน	5.97 ± 0.00 log MPN/กรัมดินแห้ง	5.54 ± 0.16 log MPN/กรัมดินแห้ง

จากตารางที่ 5.1 ตัวอย่างดินตะกอนพบจำนวนแบคทีเรียสูงสุดเมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างดิน และน้ำทะเล ทั้งนี้เนื่องมาจากความแตกต่างของทางกายภาพของตัวอย่างดินตะกอนซึ่งมีลักษณะเนื้อดินที่ละเอียดทำให้จุลินทรีย์สามารถยึดติดกับอนุภาคดินตะกอนได้ดีกว่าในตัวอย่างดินทรายที่มีเนื้อดินหยาบเป็นเปลือกหอยและจากตารางที่ 5.2 พบว่าตัวอย่างจากท่าเรือบริเวณต่าง ๆ พบจำนวนแบคทีเรียย่อยสลายฟีแนนทรีน หรือไพรีนมีค่าสูงสุด โดยพบค่าสูงสุดในตัวอย่างตะกอนบริเวณท่าบนตามด้วยตัวอย่างดินบริเวณท่าล่าง และตัวอย่างน้ำทะเลบริเวณท่าบนทั้งนี้เนื่องมาจากบริเวณดังกล่าวเสี่ยงต่อการปนเปื้อนของสารพิษโดยเฉพาะ PAHs จึงทำให้แบคทีเรียท้องถิ่นสามารถปรับตัวในการใช้สารพิษได้ดีกว่าพื้นที่อื่น ๆ ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของสมภพ รุ่งสุภา (2553) ที่พบการปนเปื้อนของปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนจากน้ำทะเลบริเวณเกาะสีชังช่วงปี 2551-2553 โดยมีค่าเฉลี่ยอยู่ที่ 0.510 ไมโครกรัมต่อลิตร และพบว่าบริเวณท่าบน หรือท่าล่างมีปริมาณปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนสูงและเมื่อพิจารณาจำนวนแบคทีเรียย่อยสลายฟีแนนทรีน

หรือไพรีน พบว่าไม่สอดคล้องกับจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดในพื้นที่แต่สอดคล้องกับพื้นที่ที่เสี่ยงต่อการปนเปื้อนของสารพิษ

5.3 คัดแยกและจำแนกชนิดของแบคทีเรียย่อยสลายฟีแนนทรีน หรือไพรีน

สำหรับผลการคัดแยกแบคทีเรียย่อยสลายฟีแนนทรีน หรือไพรีนในตัวอย่าง เริ่มต้นจากการเพิ่มจำนวนแบคทีเรียย่อยสลายสารพิษโดยวิธี enrichment ซึ่งพบการเปลี่ยนแปลงสีของอาหารเหลว NSW ในตัวอย่างที่เติมฟีแนนทรีนมากกว่าการเปลี่ยนแปลงสีของอาหาร NSW ในตัวอย่างที่เติมไพรีนถึงประมาณ 5 เท่า และจะสังเกตได้ว่าพบการเปลี่ยนแปลงสีของฟีแนนทรีนมากกว่าไพรีนอาจเนื่องมาจากฟีแนนทรีนเป็นสารพิษที่มีโครงสร้างเป็นวงแหวนอะโรมาติก 3 วง ขณะที่ไพรีนประกอบวงแหวนอะโรมาติก 4 วง ทำให้แบคทีเรียในธรรมชาติสามารถย่อยสลายฟีแนนทรีนได้ง่ายกว่า ทั้งนี้พบการเปลี่ยนสีของไพรีนและฟีแนนทรีนร่วมกันในตัวอย่างเดียวกัน แต่ไม่พบตัวอย่างที่เปลี่ยนสีไพรีนเพียงอย่างเดียว เนื่องจากจะเกิดการย่อยสลายไพรีนผ่านวิถีการย่อยสลายไพรีน หลังจากนั้นจะผ่านการย่อยโดยวิถีการย่อยสลายฟีแนนทรีนตามลำดับ โดยตัวอย่างที่พบการเปลี่ยนแปลงสีของอาหารเมื่อเติมฟีแนนทรีน และไพรีน คือ ตัวอย่างดิน D บริเวณท่าล่าง ตัวอย่างดินตะกอน B1 บริเวณทิศเหนือของเกาะสีชัง และตัวอย่างดินตะกอนหมายเลข 6 บริเวณท่าบนซึ่งเป็นตัวอย่างที่พบจำนวนแบคทีเรียย่อยสลายฟีแนนทรีน หรือไพรีนโดยวิธี MPN สูงสุดด้วยซึ่งภายหลังการคัดแยกแบคทีเรียย่อยสลายฟีแนนทรีน หรือไพรีนได้มากที่สุด (4 สายพันธุ์) โดยพบเป็นแบคทีเรียแกรมลบย่อยสลายฟีแนนทรีน 2 กลุ่ม ได้แก่ *Alphaproteobacteria* (1 สายพันธุ์ คือ สกุล *Sphingomonas*) และ *Gammaproteobacteria* (1 สายพันธุ์ คือ สกุล *Pseudomonas*)และพบแบคทีเรียแกรมบวกย่อยสลายไพรีนในกลุ่ม *Actinobacteria* (1 สายพันธุ์ คือ สกุล *Microbacterium*) และแบคทีเรียแกรมลบย่อยสลายไพรีนในกลุ่ม *Gammaproteobacteria* (1 สายพันธุ์ คือ สกุล *Marinobacter*) นอกจากนี้ยังสามารถคัดแยกแบคทีเรียในสกุลต่าง ๆ ได้ตัวอย่างละ 1 สายพันธุ์จากดิน น้ำทะเลและดินตะกอน ตัวอย่างอื่น ๆ โดยพบเป็นแบคทีเรียแกรมลบย่อยสลายฟีแนนทรีน 2 กลุ่ม ได้แก่ *Alphaproteobacteria* เช่น สกุล *Brucella* สกุล *Ochrobactrum* และสกุล *Thalassospira* และกลุ่ม *Gammaproteobacteria* เช่น สกุล *Oceanimonas* สกุล *Halomonas* สกุล *Marinobacter* และแบคทีเรียแกรมบวกย่อยสลายฟีแนนทรีนในกลุ่ม *Actinobacteria* เช่น สกุล *Gordonia* และสกุล *Microbacterium* และพบแบคทีเรียแกรมลบย่อยสลายไพรีนในกลุ่ม *Gammaproteobacteria* คือ สกุล *Aeromonas* แบคทีเรียแกรมบวกย่อยสลายไพรีนในกลุ่ม *Actinobacteria* คือ สกุล *Janibacter* โดยพบว่าแบคทีเรียในสกุล *Marinobacter* และสกุล *Microbacterium* สามารถย่อยสลายสารพิษทั้งฟีแนนท

รีน และไพรีนได้ นอกจากนี้พบว่าแบคทีเรียในสกุล *Pseudomonas* สามารถคัดแยกได้มากที่สุดถึง 7 สายพันธุ์จากตัวอย่างดินตะกอน และน้ำทะเล ซึ่งพบรายงานการคัดแยกแบคทีเรียในสกุลต่าง ๆ ข้างต้น และความสามารถในการย่อยสลายสารประกอบ PAHs ดังตารางที่ 5.3

ตารางที่ 5.3 กลุ่มแบคทีเรียความสามารถในการย่อยสลายสารพิษ และแหล่งคัดแยก

แบคทีเรีย	แหล่งคัดแยก	ความสามารถในการย่อยสลายสารพิษ	เอกสารอ้างอิง
Pseudomonas sp. สายพันธุ์ B6-2	ดิน	ไดเบนโซฟูแรน	LI และคณะ 2008
Pseudomonas sp. สายพันธุ์ YY-23	ดิน	บิวทานอล	Yu และ Yang 2012
Pseudomonas sp. สายพันธุ์ sampath10	ดินชายฝั่งทะเล	สารประกอบไฮโดรคาร์บอน	Kamalakannan และคณะ 2010
Pseudomonas fluorescens สายพันธุ์ EC E16	ดินปนเปื้อนน้ำมัน	เฮกซะเดกเคน ไพรีน ฟีแนนทรีน และฟลูออรีน	Pangallo และคณะ 2012
Marinobacter bryozoorum สายพันธุ์ MARC2C-C	ดินตะกอนทะเลลึก	น้ำมันดิบ สารผสมของ PAHs จำพวกฟีแนนทรีน แนพธาลีน และไพรีน	Zhisong และคณะ 2008
Thalassospira sp. สายพันธุ์ 2PR54-3	น้ำทะเลลึก	ไพรีน	Yuan และคณะ 2008
Thalassospira sp. สายพันธุ์ DBT-2	น้ำทะเลลึก	ไพรีน	Baojiang และคณะ 2008
Sphingomonas sp. สายพันธุ์ 2MPII	ดินจากโรงกลั่นน้ำมัน	ฟีแนนทรีน	Ying และคณะ 2005
Sphingomonas sp. สายพันธุ์ F10 (2008)	ดินตะกอนป่าชายเลน	ฟีแนนทรีน	Liu และคณะ 2008
Sphingomonas paucimobilis สายพันธุ์ ZX4	ดินจากโรงกลั่นน้ำมัน	ฟีแนนทรีน แนพธาลีน ฟลูออรีน	Ying และคณะ 2005

ตารางที่ 5.3 กลุ่มแบคทีเรีย ความสามารถในการย่อยสลายสารพิษ และแหล่งคัดแยก (ต่อ)

แบคทีเรีย	แหล่งคัดแยก	ความสามารถในการย่อยสลายสารพิษ	เอกสารอ้างอิง
Sphingomonas sp. สายพันธุ์ GY2B	ดินปนเปื้อนน้ำมัน	ฟีแนนทรีน แนพธาลีน ฟีนอล กรดซาลิไซลิก กรด 1-ไฮดรอกซี-2-แนพโทอิก แคทีคอล และ 2-แนพธอล	Xue-Qin และคณะ 2007
Sphingomonas sp. สายพันธุ์ Zp1	ดินจากโรงกลั่นน้ำมันที่ปนเปื้อน PAHs	ฟีแนนทรีน แนพธาลีน โทลูอีน เมทานอล เอทานอล กรดซาลิไซลิกและ Tween 80	He-Ping และคณะ 2008
Gordonia sp. สายพันธุ์ D44	ดินปนเปื้อนปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอน	ฟีแนนทรีน และไพรีน	Su และคณะ 2011
Gordonia sp. สายพันธุ์ HEXBA05	ดินตะกอนป่าชายเลน	ปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอน	Angelim และ Melo 2012
Ochrobactrum sp. สายพันธุ์ PWTJD	ดินปนเปื้อนขยะมูลฝอยจากชุมชน	ฟีแนนทรีน	Ghosal และคณะ 2010
Halomonas sp. สายพันธุ์ W7-7	ดินตะกอนทะเลลึก	ไพรีน	Wang และคณะ 2008
Brucella sp. สายพันธุ์ QQDP515	กากของเสียจากน้ำเสียในโรงงานปราบศัตรูพืช	เรซอซิน	Qiu และ Li 2008
Brucella sp. สายพันธุ์ GXY-1	ดินปนเปื้อนน้ำมัน	อะโรมาติกและน้ำมันดิบ	Guan และคณะ 2007
Microbacterium sp. สายพันธุ์ F10a	ดินใกล้โรงงานผลิตปิโตรเคมี	ฟีแนนทรีน	Zhou และคณะ 2005

ตารางที่ 5.3 กลุ่มแบคทีเรีย ความสามารถในการย่อยสลายสารพิษ และแหล่งคัดแยก (ต่อ)

แบคทีเรีย	แหล่งคัดแยก	ความสามารถในการย่อยสลายสารพิษ	เอกสารอ้างอิง
Microbacterium sp. สายพันธุ์ F10a	ดินใกล้โรงงานผลิตปิโตรเคมี	ฟีแนนทรีน	Zhou และคณะ 2005
Microbacterium sp. สายพันธุ์ DB-10	ดินที่ไม่พบการปนเปื้อนของน้ำมัน	ปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอน	Ivanova และคณะ 2012
Janibacter sp. สายพันธุ์ JY11	ดินจากโรงกลั่นน้ำมัน	ฟีแนนทรีน แนพธาลีน ไพรีน แอนทราซีน ไซลีน เมทานอล เอทานอล และกรดซาลิไซลิก	Guo-Ying และคณะ 2009
Aeromonas salmonicida สายพันธุ์ DP2	น้ำทะเล	ไตรบิวทิลทินคลอไรด์	Dubey และ Pandey 2010
Aeromonas sp. สายพันธุ์ A10	น้ำทะเล	ปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอน	Han และคณะ 2007
Oceanimonas baumannii สายพันธุ์ GB6	โคลนจากปากแม่น้ำ	ฟีนอล	Geoffrey และคณะ 2001

ผลจากการสร้างแผนภูมิต้นไม้แสดงความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการบริเวณยีน 16S rDNA ของแบคทีเรียสายพันธุ์บริสุทธิ์ที่ถูกคัดแยกได้ร่วมกับแบคทีเรียสายพันธุ์อ้างอิง เปรียบเทียบกับแบคทีเรียที่มีรายงานย่อยสลายสารพิษจากตารางที่ 5.3 และรูป 4.11 พบว่าแบคทีเรียที่ถูกคัดแยกได้ล้วนจัดอยู่ในแบคทีเรียสกุลที่เคยพบรายงานการย่อยสลาย PAHs ทั้งสิ้น เช่น สายพันธุ์ T7-101 และสายพันธุ์ T6-101 คล้ายกับแบคทีเรียในสกุล *Sphingomonas* ที่ย่อยสลายฟีแนนทรีนได้ และพบว่าแบคทีเรียในสกุล *Oceanimonas* ที่คัดแยกได้ที่ไม่เคยปรากฏรายงานการย่อยสลายสารประกอบ PAHs พบเพียงรายงานการย่อยสลายฟีนอลเท่านั้น และจากรายงานในปี 2012 ที่ศึกษาเกี่ยวกับ complete genome ของแบคทีเรียในสกุล *Oceanimonas* ที่คัดแยกได้จากดินในพื้นที่ชุ่มน้ำ พบมียีนที่เกี่ยวข้องกับวิถีการย่อยสลายอะโรมาติก เช่น โทลูอีน หรือไซลีน และแนพธาลีน (Yeganeh และคณะ, 2012) และเมื่อพิจารณากลุ่มแบคทีเรียสายพันธุ์บริสุทธิ์ที่คัดแยกได้พบเป็นแบคทีเรียแกรมลบในกลุ่มแบคทีเรียกลุ่ม *Gammaproteobacteria* มากถึง 57% รองมาคือ

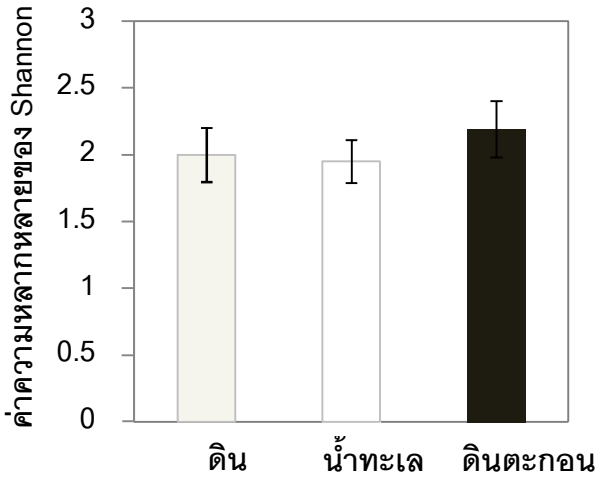
แบคทีเรียกลุ่ม *Alphaproteobacteria* 24% และพบกลุ่มแบคทีเรียแกรมบวกจำพวก *Actinobacteria* เพียง 19%

ภายหลังการตรวจหายีนไดออกซิจีเนสในกลุ่ม dox_{GN} โดยใช้คู่ไพร์เมอร์ GNF/GNR และกลุ่ม dox_{GP} โดยใช้คู่ไพร์เมอร์ GPF/GPR จากแบคทีเรียสายพันธุ์บริสุทธิ์ที่คัดแยกได้พบเป็นยีนในกลุ่ม dox_{GN} ถึง 43% ในแบคทีเรียสกุล *Pseudomonas* ทุกสายพันธุ์ (7 สายพันธุ์) และแบคทีเรีย *Sphingomonas* ทุกสายพันธุ์ (2 สายพันธุ์) ซึ่งมากกว่ายีนในกลุ่ม dox_{GP} ที่พบเพียง 14% ในแบคทีเรียในสกุล *Marinobacter* (2 สายพันธุ์) และแบคทีเรียในสกุล *Gordonia* (1 สายพันธุ์) ส่วนแบคทีเรียสายพันธุ์อื่น อีก 43% ไม่สามารถตรวจพบยีนไดออกซิจีเนสทั้งสองกลุ่มได้ อาจเนื่องมาจากข้อจำกัดของไพร์เมอร์ที่ใช้ในการทดลองไม่เหมาะสม เพราะไพร์เมอร์ในกลุ่ม dox_{GN} ถูกออกแบบมาจากยีนประมวลรหัสเอนไซม์ไดออกซิจีเนสในกลุ่มยีน *nahAc, nahA3, nagAc*, *ndoB, ndoC2, pahAc, pahA3, phnA, phnA1*, *bphAc, bphA1*, *dntAc* และยีน *arhA1* ของแบคทีเรียในสกุล *Pseudomonas* สกุล *Ralstonia* สกุล *Commamonas* สกุล *Burkholderia* สกุล *Sphingomonas* สกุล *Alcaligenes* และสกุล *Polaromonas* เท่านั้น ส่วนไพร์เมอร์ในกลุ่ม dox_{GP} ถูกออกแบบมาจากยีนประมวลรหัสเอนไซม์ไดออกซิจีเนสในกลุ่ม *narAa* ของแบคทีเรียในสกุล *Rhodococcus* ยีน *phdA/pdoA2* ของแบคทีเรียสกุล *Mycobacterium* ยีน *nidA/pdoA1* ของแบคทีเรียสกุล *Nocardioides* และยีน *nidA3/fadA1* ของแบคทีเรียสกุล *Terrabacter* เท่านั้น หรือเป็นไปได้ว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ต่าง ๆ เหล่านั้น อาจมียีนไดออกซิจีเนสในกลุ่มอื่นที่แตกต่างไปออกไปจากกลุ่มยีนไดออกซิจีเนสเดิมที่พบ

5.4 วิเคราะห์ความหลากหลายของโครงสร้างประชาคมแบคทีเรียบริเวณเกาะสีชัง

สำหรับการศึกษาดีเอ็นเอเมตาจีโนมของแบคทีเรียจากสิ่งแวดล้อมโดยตรงซึ่งไม่ผ่านวิธีการเพาะเลี้ยงเชื้อ หลังจากการสกัดดีเอ็นเอจากสิ่งแวดล้อม และเพิ่มจำนวนยีนบริเวณ 16S rDNA ของแบคทีเรีย จากนั้นวิเคราะห์หาค่าความหลากหลายของโครงสร้างประชาคมแบคทีเรียในพื้นที่ ด้วยวิธี PCR-DGGE โดยคำนวณจากค่าดัชนีความหลากหลายของ Shannon พบว่าค่าเฉลี่ยความหลากหลายของแบคทีเรียที่ได้มีค่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99% ($p < 0.01$) และเมื่อนำค่าเฉลี่ยดังกล่าวมาเรียงลำดับจากมากไปน้อย พบว่าตัวอย่างดินตะกอนมีค่า 2.19 ± 0.21 ซึ่งมากกว่าตัวอย่างดิน (2.00 ± 0.20) และน้ำทะเล (1.95 ± 0.16) ดังแสดงในรูปที่ 5.1 ซึ่งสอดคล้องกับจำนวนแบคทีเรียที่เพาะเลี้ยงได้โดยวิธี MPN และผลการคัดแยกเชื้อย่อยสลายสารประกอบ PAHs ที่พบมากสุดในตัวอย่างดินตะกอน เป็นไปได้ว่า

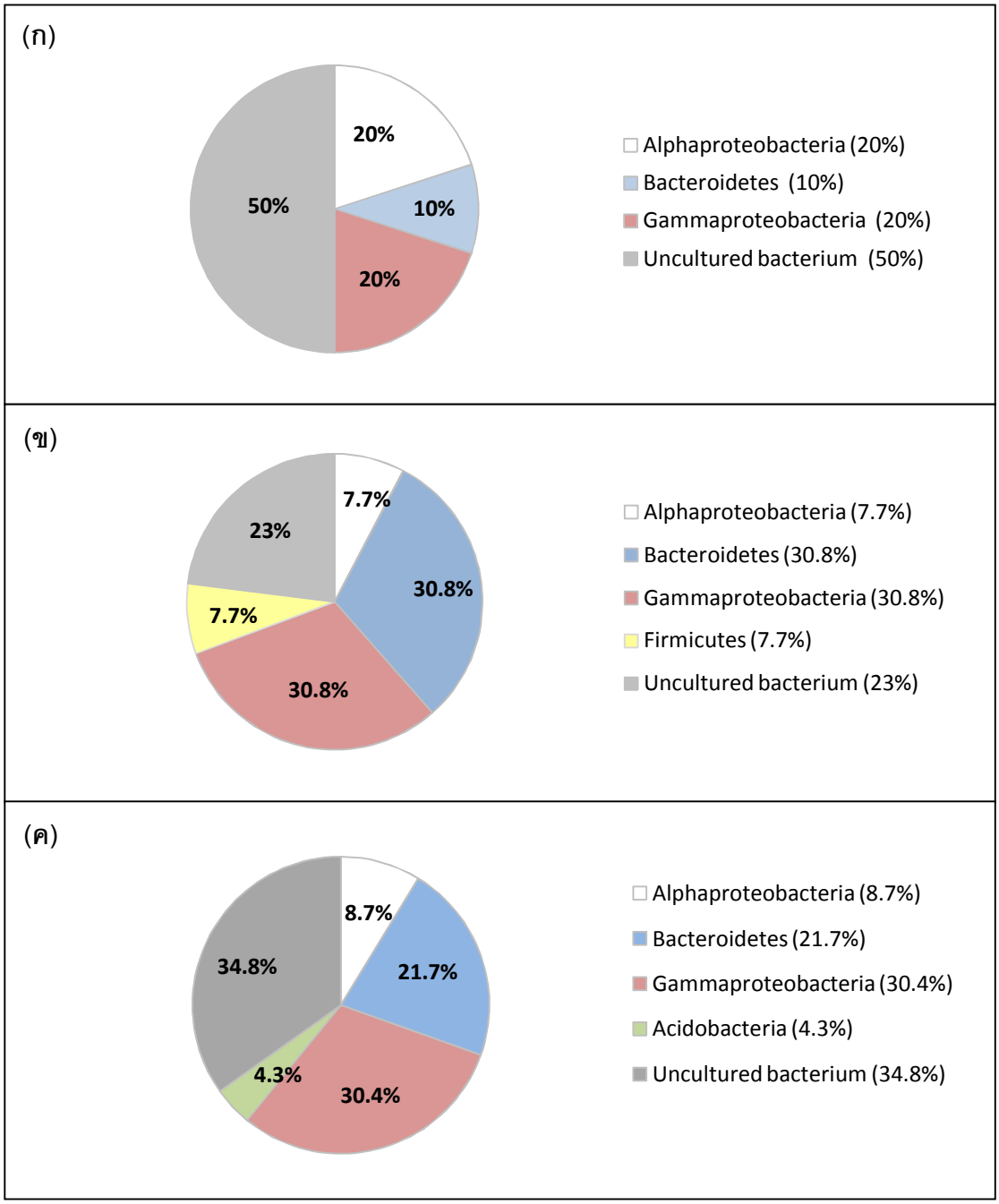
ปริมาณสารอาหารภายในดินตะกอนที่มีมากกว่าดินทรายและน้ำทะเลโดยตัวอย่างดินตะกอนหมายเลข 6 บริเวณท่าบน พบความหลากหลายของแบคทีเรียมากที่สุด มีค่า 2.40 ± 0.01 โดยมีจำนวนแบนด์ดีเอ็นเอที่ปรากฏ (richness) ในเจล DGGE มากที่สุดมีค่า 19.0 ± 0.0 ในขณะที่ความหลากหลายของแบคทีเรียในตัวอย่างดิน และน้ำทะเล พบมีความหลากหลายมากสุดในตัวอย่างดิน C และน้ำทะเล W1 บริเวณท่าวังแถบพระจุฑาธุชราชฐานมีค่า 2.20 ± 0.01 และ 2.16 ± 0.00 ตามลำดับอาจเป็นไปได้ว่าพื้นที่ที่พบค่าดัชนีความหลากหลายของแบคทีเรียสูงเนื่องจากบริเวณพบการปนเปื้อนของสารพิษน้อย เมื่อเปรียบเทียบกับค่าความหลากหลายของแบคทีเรียด้วยวิธีเดียวกัน แต่ในพื้นที่ที่แตกต่างออกกัน เช่น บริเวณป่าชายเลน ประเทศฮ่องกง พบมีค่าความหลากหลายของ Shannon เท่ากับ 1.38 ซึ่งต่ำกว่าบริเวณเกาะสีชัง นั่นแสดงว่าพื้นที่เกาะสีชังมีความหลากหลายทางชีวภาพสูงกว่าบริเวณอื่น ๆ



รูปที่ 5.1 ค่าเฉลี่ยของดัชนีความหลากหลายของ Shannon ที่คำนวณได้จากโครงสร้างประชาคมแบคทีเรียจากวิธี DGGE ในตัวอย่างดิน น้ำทะเลและดินตะกอน บริเวณเกาะสีชัง

ภายหลังการโคลนแถบดีเอ็นเอเด่นทั้งหมดจำนวน 46 โคลน ซึ่งได้จากตัวอย่างดิน 10 โคลน น้ำทะเล 13 โคลน และดินตะกอน 23 โคลน และวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์พบเป็น Uncultured bacterium มากที่สุด และพบแบคทีเรียทั้งหมด 5 กลุ่ม คือ *Gammaproteobacteria Alphaproteobacteria Bacteroidetes Firmicutes* และ *Acidobacteria* ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Somboona และคณะ (2012) ที่ศึกษาโครงสร้างประชาคมแบคทีเรีย โดยสกัดดีเอ็นเอจากน้ำทะเลบริเวณท่าวัง และหาดถ้ำพังของเกาะสีชัง และสร้างห้องสมุดยีน 16S rDNA พบเป็น

แบคทีเรียในกลุ่ม *Proteobacteria Bacteroidetes Firmicutes* และ *Acidobacteria* เช่นเดียวกัน โดยที่แบคทีเรียกลุ่ม *Gammaproteobacteria Alphaproteobacteria* และ *Bacteroidetes* ในตัวอย่างทุกประเภทและพบว่าตัวอย่างต่างประเภทกันมีโครงสร้างประชาคมของกลุ่มแบคทีเรียแตกต่างกันดังแสดงในรูปที่ 5.2 (ก-ค)



รูปที่ 5.2 (ก-ค) แสดงสัดส่วนประชาคมจุลินทรีย์บริเวณเกาะสีชังใน ตัวอย่างดินจำนวน 10 โคลน (ก) ตัวอย่างน้ำทะเลจำนวน 13 โคลน (ข) และตัวอย่างดินตะกอนจำนวน 23 โคลน (ค)

จากรูป 5.2 (ก) ตัวอย่างดินประกอบด้วยแบคทีเรีย 3 กลุ่ม คือ *Gammaproteobacteria* 20% (2 โคลน)กลุ่ม *Alphaproteobacteria* 20% (2 โคลน) และกลุ่ม *Bacteroidetes* 10% (1โคลน) นอกนั้นเป็น Uncultured bacterium 50% (5 โคลน) ทั้งนี้ 2 โคลน จาก 10 โคลน ได้แก่ โคลน 03 จากตัวอย่างดินทุกชนิดคล้ายคลึงกับแบคทีเรียสกุล *Caulobacter* และ โคลน 09 จากตัวอย่างดิน H บริเวณท่าวังแถบเรือนผ่องศรีคล้ายคลึงกับแบคทีเรียสกุล *Brevundimonas* ซึ่งแบคทีเรียเหล่านั้นพบรายงานการย่อยสลายพิษ ดังตารางที่ 5.4

ตารางที่ 5.4 แบคทีเรียในสกุลที่พบรายงานการย่อยสลายสารพิษจากตัวอย่างดิน

แบคทีเรีย	แกรมลบในกลุ่ม	ความสามารถในการย่อยสลายสารพิษ	เอกสารอ้างอิง
Caulobacter sp. สายพันธุ์ OC6	*Alphaproteobacteria*	คาร์บาโซล	Maeda และคณะ 2008
Caulobacter sp. สายพันธุ์ 3-3		เบนโซ(เอ)ไพรีน ฟีแนนทรีน และไพรีน	Maและคณะ 2010
Brevundimonas bullata สายพันธุ์ HPC 1014		ไนโตร- และคลอโร–อะโรมาติก แนพธาลีน และฟีแนนทรีน	Lori และคณะ 2008

จากรูป 5.2 (ข) ตัวอย่างน้ำทะเลประกอบด้วยแบคทีเรีย 4 กลุ่ม คือ *Gammaproteobacteria* 30.8% (4 โคลน) กลุ่ม *Bacteroidetes* 30.8% (4 โคลน) กลุ่ม *Alphaproteobacteria* 7.7% (1 โคลน) และกลุ่ม *Firmicutes* 7.7% (1 โคลน) ซึ่งเป็นกลุ่มแบคทีเรียที่ไม่พบในตัวอย่างดิน นอกนั้นเป็น Uncultured bacterium 23% (3 โคลน) และพบว่าโคลนจำนวน 6 โคลน จาก 13 โคลน พบรายงานการย่อยสลายพิษดังตารางที่ 5.5 โดยพบว่าโคลนจากน้ำทะเล W2 บริเวณท่าบนพบกลุ่มแบคทีเรียย่อยสลายสารพิษมากที่สุด (5 โคลน) คือ โคลน 05 ที่คล้ายคลึงกับแบคทีเรีย *Fusibacter* โคลน 06 ที่คล้ายคลึงกับแบคทีเรีย *Thalassobius* โคลน 08 ที่คล้ายคลึงกับแบคทีเรีย *Bizionia* โคลน 09 ที่คล้ายคลึงกับแบคทีเรีย *Idiomarina* และโคลน 11 ที่คล้ายคลึงกับแบคทีเรีย *Pseudoalteromonas* ซึ่งเป็นโคลนจากแถบดีเอ็นเอเด่นที่พบในน้ำทะเล W3 และ W4 บริเวณที่จอดเรือท่าล่าง และหน้าหาดถ้ำพังด้วย และอีก 1 โคลนคือ โคลน 13 ที่คล้ายคลึงกับแบคทีเรียสกุล *Gillisia* พบในน้ำทะเล W1 บริเวณท่าวังแถบพระจุฑาธุชราชฐาน

ตารางที่ 5.5 แบคทีเรียในสกุลที่พบรายงานการย่อยสลายสารพิษจากตัวอย่างน้ำทะเล

แบคทีเรีย	แกรมลบในกลุ่ม	ความสามารถในการย่อยสลายสารพิษ	เอกสารอ้างอิง
Pseudoalteromonas ganghwensis สายพันธุ์ MARC2C-A	*Gammaproteobacteria*	น้ำมันดิบ แนพธาลีน ไพรีน และฟีแนนทรีน	Cui และคณะ 2008
Idiomarina xiamenensis สายพันธุ์ 10-D-4(T)		น้ำมัน	Lai และคณะ 2012
Thalassobius mediterraneus สายพันธุ์ CECT 5383	*Alphaproteobacteria*	พทาเลท และไดเมธิลพทาเลท	Iwaki และคณะ 2012
Bizionia sp. สายพันธุ์ EM20	*Bacteroidetes*	น้ำมัน และอัลเคน	Lee และ Kahng2008
Bizionia sp. สายพันธุ์ SN-3-9-2		น้ำมันและอัลเคน	Xin และคณะ 2012
Gillisia sp. สายพันธุ์ NP10		น้ำมัน และอัลเคน	Perreault และคณะ 2007
แบคทีเรีย	แกรมบวกในกลุ่ม	ความสามารถในการย่อยสลายสารพิษ	เอกสารอ้างอิง
Fusibacter paucivorans สายพันธุ์ TERI GP8	*Firmicutes*	น้ำมัน	Agrawal และคณะ 2010

จากรูป 5.2 (ค) ตัวอย่างดินตะกอนประกอบด้วยแบคทีเรีย 4 กลุ่ม คือ *Gammaproteobacteria* 30.4% (7 โคลน) กลุ่ม *Alphaproteobacteria* 8.7% (2 โคลน) กลุ่ม *Bacteroidetes* 21.7% (5 โคลน) และกลุ่ม *Acidobacteria* 4.3% (1 โคลน) ซึ่งเป็นกลุ่มแบคทีเรียที่ไม่พบในตัวอย่างดิน และน้ำทะเล นอกนั้นเป็น Uncultured bacterium 34.8% (8 โคลน) ซึ่งโคลนจำนวน 8 โคลน จาก 23 โคลน พบรายงานการย่อยสลายพิษดังตารางที่ 5.6 โดยพบว่าโคลนจากดินตะกอนหมายเลข 6 บริเวณท่าบน พบกลุ่มแบคทีเรียย่อยสลายสารพิษมาก

ที่สุด (4 โคลน) ได้แก่ โคลน 05 ที่คล้ายคลึงกับแบคทีเรียสกุล *Maricaulis* โคลน 20 ที่คล้ายคลึงกับแบคทีเรียสกุล *Glaciecola* โคลน 13 ที่คล้ายคลึงกับแบคทีเรียวงศ์ Flavobacteriaceae โคลน 22 ที่คล้ายคลึงกับแบคทีเรียสกุล *Halomonas* ซึ่งพบสอดคล้องกับผลการคัดแยกเชื้อที่สามารถคัดแยกเชื้อได้จากตัวอย่าง 9 บริเวณเดียวกัน รองมาคือดินตะกอน B5 ทิศตะวันตกของเกาะสีชังบริเวณหน้าถ้ำพังพบ 3 โคลน คือ โคลน14 ที่คล้ายคลึงกับแบคทีเรียสกุล *Alteromonas* โคลน19 ที่คล้ายคลึงกับแบคทีเรียสกุล *Pseudoalteromonas* และโคลน 18 ที่คล้ายคลึงกับแบคทีเรียสกุล *Brevundimonas* ซึ่ง 2 จาก 3โคลนจากแถบดีเอ็นเอเด่นในดินตะกอน B5 (ยกเว้น โคลน 18) พบในดินตะกอน B6 จากทิศตะวันออก บริเวณหน้าท่าเรือศรีชังทองด้วยและอีก 1 โคลน คือ โคลน 21 ที่คล้ายคลึงกับแบคทีเรียสกุล *Alishewanella* ในดินตะกอน 1 (หน้าบางพระ) ดินตะกอน 2 (ทิศตะวันออกเฉียงเหนือของเกาะสีชังบริเวณกลางร่องน้ำ) ดินตะกอน 3 (กลางร่องน้ำท่าเรือศรีราชา) ดินตะกอน 4 (ทิศเหนือของเกาะสีชัง)และดินตะกอน 5 (ทิศเหนือฝั่งตะวันตกของเกาะสีชัง)

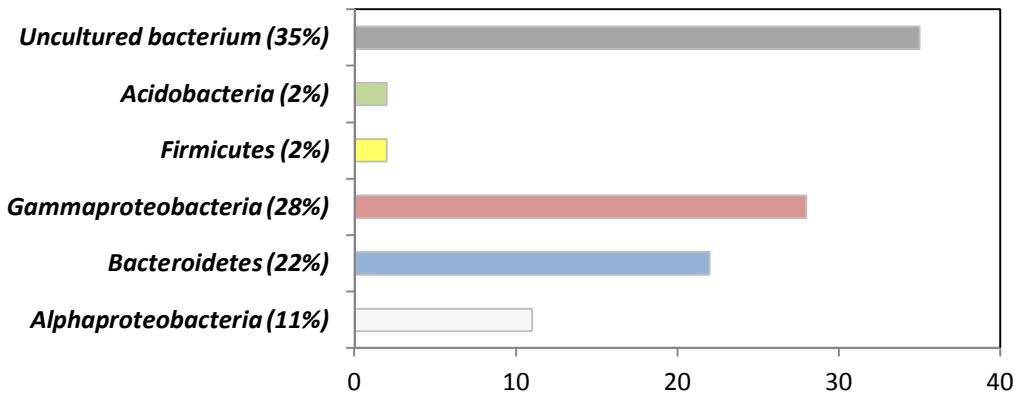
ตารางที่ 5.6 แบคทีเรียในสกุลที่พบรายงานการย่อยสลายสารพิษจากตัวอย่างดินตะกอน

แบคทีเรีย	แกรมลบในกลุ่ม	ความสามารถในการย่อยสลายสารพิษ	เอกสารอ้างอิง
Alteromonas litorea สายพันธุ์ 1-3A	*Gammaproteobacteria*	น้ำมันดิบ แนพธาลีน ไพรีน และฟีแนนทรีน	Cui และคณะ 2008
Pseudoalteromonas ganghwensis สายพันธุ์ MARC2C-A		น้ำมันดิบ แนพธาลีน ไพรีน และฟีแนนทรีน	Cui และคณะ 2008
Glaciecola polaris		ไพรีน	Wang และคณะ2008
Halomonas sp. สายพันธุ์ 7020		ไพรีนและฟีแนนทรีน	Wang และคณะ 2008
Alishewanella sp. สายพันธุ์ KMK6		สีย้อมอะโซ (azo dyes) จากอุตสาหกรรมสิ่งทอ	Yogesh และ Kisan 2012

ตารางที่ 5.6 แบคทีเรียในสกุลที่พบรายงานการย่อยสลายสารพิษจากตัวอย่างดินตะกอน (ต่อ)

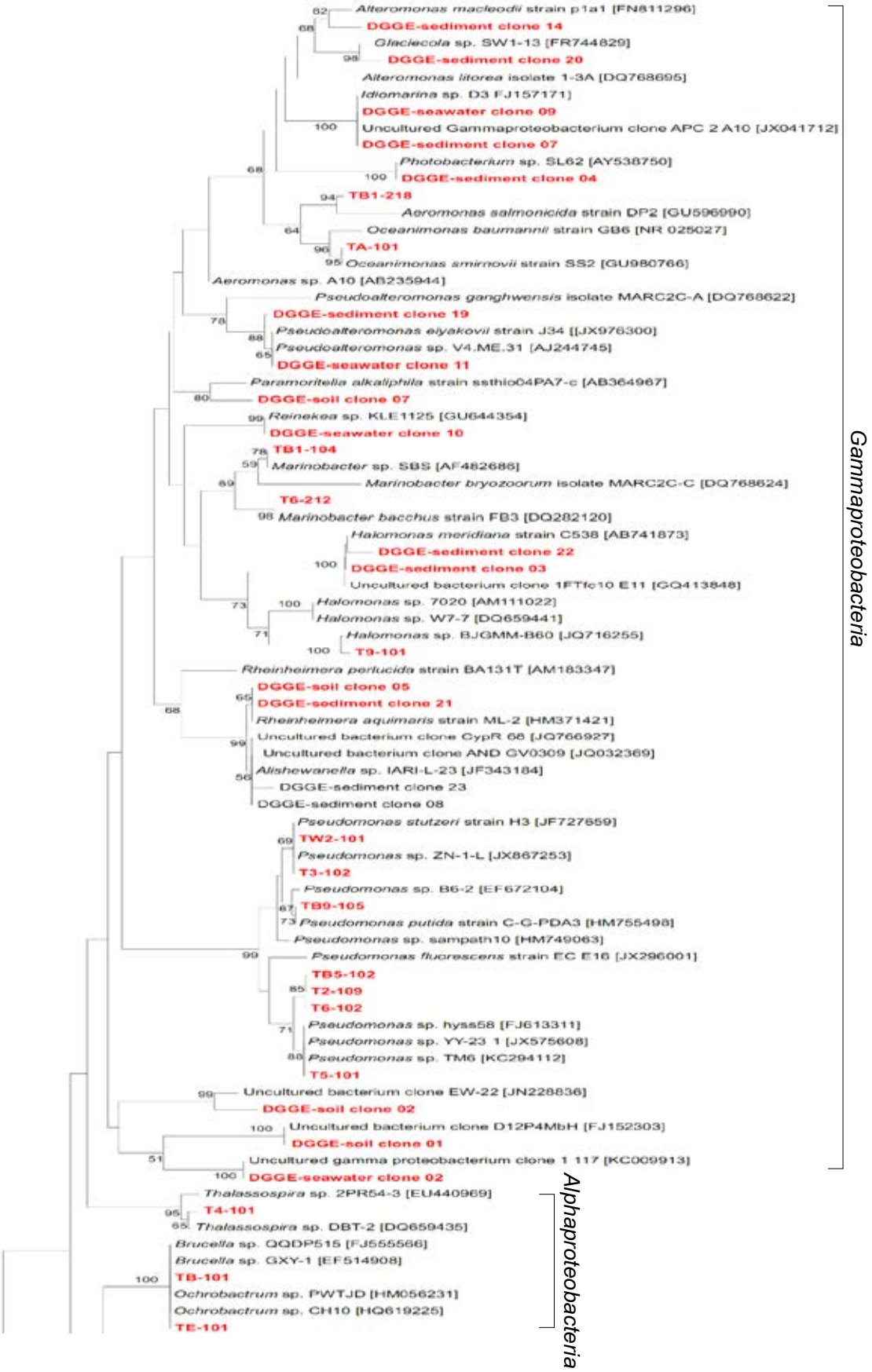
แบคทีเรีย	แกรมลบในกลุ่ม	ความสามารถในการย่อยสลายสารพิษ	เอกสารอ้างอิง
Maricaulis virginensis สายพันธุ์ PR54-12	*Alphaproteobacteria*	แนพธาลีน ไพรีน และฟีแนนทรีน	Shao และคณะ 2010
Maricaulis virginensis สายพันธุ์ MARC4M		แนพธาลีน ไพรีน และฟีแนนทรีน	Shao และคณะ 2010
Brevundimonas bullata สายพันธุ์ HPC 1014		ไนโตร- และคลอโร–อะโรมาติก แนพธาลีน และฟีแนนทรีน	Lori และคณะ 2008
Flavobacterium antarcticum DSM สายพันธุ์ AT1026	*Bacteroidetes*	ไพรีน	Wang และคณะ 2008

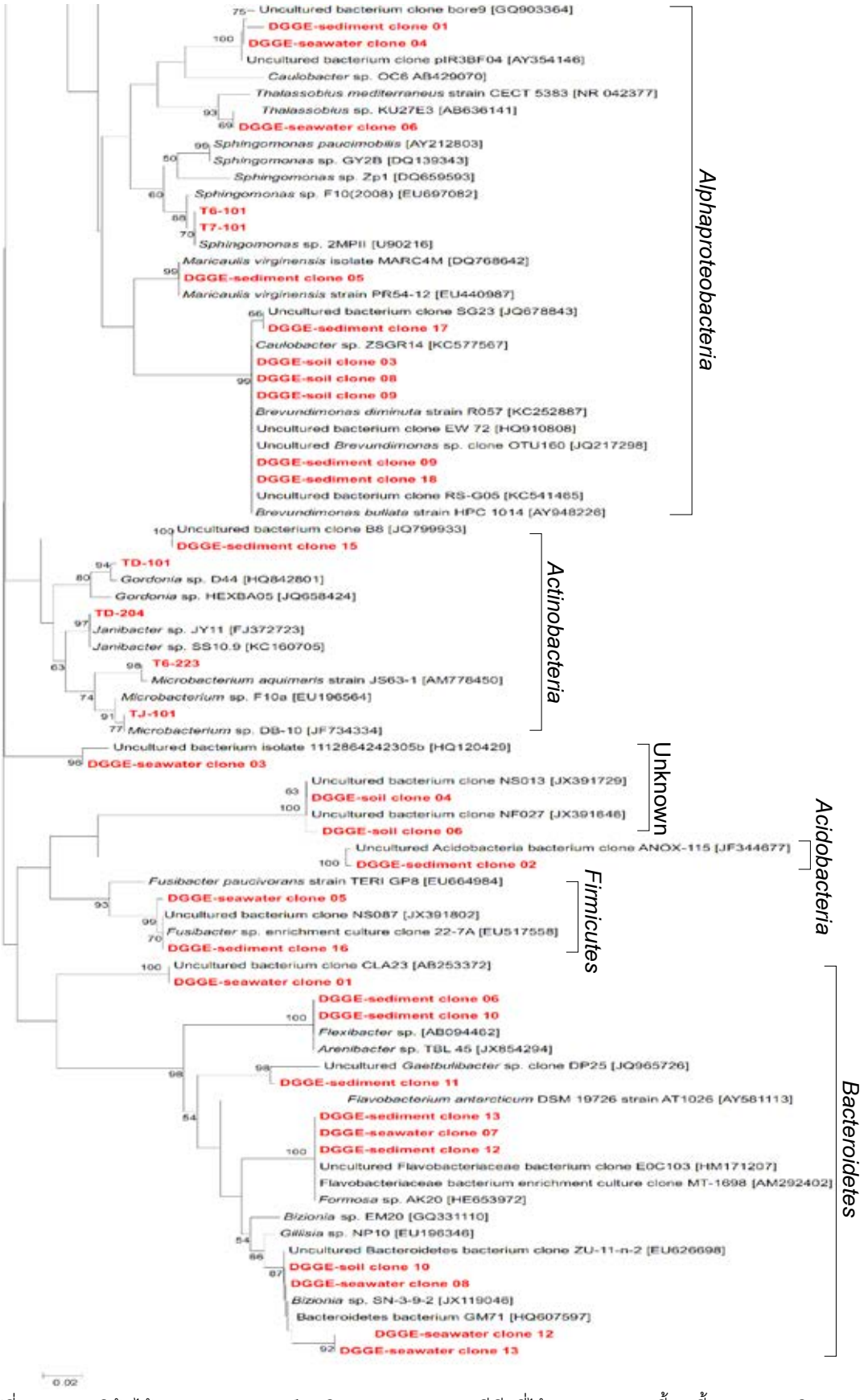
จากการสร้างแผนภูมิต้นไม้แสดงความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการบริเวณยีน 16S rDNA ของโคลนจากแถบดีเอ็นเอเด่นร่วมกับแบคทีเรียสายพันธุ์อ้างอิง และเปรียบเทียบกับแบคทีเรียที่มีรายงานย่อยสลายสารพิษจากตารางที่ 5.4-5.6 และรูป 4.20 พบว่าโคลนที่ได้จัดอยู่ในแบคทีเรียในสกุลที่พบรายงานการย่อยสลาย PAHs เช่น โคลน 05 จากตัวอย่างดินตะกอน ที่คล้ายกับแบคทีเรียในสกุล *Maricaulis* ที่ย่อยสลายแนพธาลีน ไพรีน และฟีแนนทรีนได้ และเมื่อพิจารณาโครงสร้างประชาคมแบคทีเรียบริเวณเกาะสีชังจากตัวอย่างทุกประเภทพบเป็นแบคทีเรียในกลุ่ม *Gammaproteobacteria* มากที่สุด พบว่าดังแสดงในรูปที่ 5.3



รูปที่ 5.3 สัดส่วนของกลุ่มแบคทีเรียบริเวณเกาะสีชัง

จากรูปที่ 5.3 แสดงสัดส่วนของกลุ่มแบคทีเรียบริเวณเกาะสีชังพบว่าจากจำนวนโคลนทั้งหมด 46 โคลน พบเป็นแบคทีเรียแกรมลบ ถึง 61% ซึ่งมากกว่าแบคทีเรียแกรมบวกที่พบ 4% ถึง 15 เท่าโดยพบเป็นแบคทีเรียในกลุ่ม *Gammaproteobacteria* มากที่สุด ถึง 28% (13 โคลน) รองมาคือ แบคทีเรียในกลุ่ม *Bacteroidetes* 22% (10 โคลน) และ *Alphaproteobacteria* 11% (5 โคลน) และพบแบคทีเรียแกรมบวกอยู่ในกลุ่ม *Acidobacteria* 2% (1โคลน) และกลุ่ม *Firmicutes* 2% (1 โคลน) นอกนั้นเป็น Uncultured bacterium ถึง 35% (6 โคลน) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Peixoto และคณะ (2012) ที่ศึกษาโครงสร้างประชาคมแบคทีเรียโดยวิธี PCR-DGGE พบว่า *Gammaproteobacteria* เป็นแบคทีเรียกลุ่มหลักที่พบในดินตะกอนปนเปื้อนด้วยน้ำมัน จากป่าชายเลน ประเทศบราซิล และงานวิจัยของ Lors และคณะ (2010) ที่ศึกษาโครงสร้างประชาคมด้วยวิธีเดียวกัน ซึ่งพบว่า *Gammaproteobacteria* เป็นแบคทีเรียกลุ่มหลักที่พบในหลังการบำบัดดินปนเปื้อนถ่านหิน นอกจากนี้ยังสอดคล้องกับผลการคัดแยกเชื้อย่อยสลายฟีแนนทรีน หรือไพรีน โดยพบว่าเป็นแบคทีเรียในแกรมลบกลุ่ม *Gammaproteobacteria* มากที่สุดเช่นเดียวกันซึ่งภายหลังสร้างแผนภูมิต้นไม้แสดงความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของแบคทีเรียทั้งหมดที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเลี้ยงและจากการวิเคราะห์เมตาจีโนม พบว่าแบคทีเรียในกลุ่ม *Gammaproteobacteria* พบเป็นกลุ่มแบคทีเรียหลักที่พบมากที่สุดในพื้นที่เกาะสีชัง ดังแสดงในรูปที่ 5.4


Alteromonas macleodii strain p1a1 [FN811296]
DGGE-sediment clone 14
Glaciecola sp. SW1-13 [FR744829]
DGGE-sediment clone 20
Alteromonas litorea isolate 1-3A [DQ768695]
Idiomarina sp. D3 FJ157171]
DGGE-seawater clone 09
Uncultured Gammaproteobacterium clone APC 2 A10 [JX041712]
DGGE-sediment clone 07
Photobacterium sp. SL62 [AY538750]
DGGE-sediment clone 04
TB1-218
Aeromonas salmonicida strain DP2 [GU596990]
Oceanimonas baumannii strain GB6 [NR 025027]
TA-101
Oceanimonas smirnovii strain SS2 [GU980766]
Aeromonas sp. A10 [AB235944]
Pseudoalteromonas ganghwensis isolate MARC2C-A [DQ768622]
DGGE-sediment clone 19
Pseudoalteromonas elyakovii strain J34 [[JX976300]
Pseudoalteromonas sp. V4.ME.31 [AJ244745]
DGGE-seawater clone 11
Paramoritella alkaliphila strain ssthio04PA7-c [AB364967]
DGGE-soil clone 07
Reinekea sp. KLE1125 [GU644354]
DGGE-seawater clone 10
TB1-104
Marinobacter sp. SBS [AF482686]
Marinobacter bryozoorum isolate MARC2C-C [DQ768624]
T6-212
Marinobacter bacchus strain FB3 [DQ282120]
Halomonas meridiana strain C538 [AB741873]
DGGE-sediment clone 22
DGGE-sediment clone 03
Uncultured bacterium clone 1FTfc10 E11 [GQ413848]
Halomonas sp. 7020 [AM111022]
Halomonas sp. W7-7 [DQ659441]
Halomonas sp. BJGMM-B60 [JQ716255]
T9-101
Rheinheimera perlucida strain BA131T [AM183347]
DGGE-soil clone 05
DGGE-sediment clone 21
Rheinheimera aquimaris strain ML-2 [HM371421]
Uncultured bacterium clone CypR 68 [JQ766927]
Uncultured bacterium clone AND CV0309 [JQ032369]
Alishewanella sp. IARI-L-23 [JF343184]
DGGE-sediment clone 23
DGGE-sediment clone 08
Pseudomonas stutzeri strain H3 [JF727659]
TW2-101
Pseudomonas sp. ZN-1-L [JX867253]
T3-102
Pseudomonas sp. B6-2 [EF672104]
TB9-105
Pseudomonas putida strain C-G-PDA3 [HM755498]
Pseudomonas sp. sampath10 [HM749063]
Pseudomonas fluorescens strain EC E16 [JX296001]
TB5-102
T2-109
T6-102
Pseudomonas sp. hyss58 [FJ613311]
Pseudomonas sp. YY-23 1 [JX575608]
Pseudomonas sp. TM6 [KC294112]
T5-101
Uncultured bacterium clone EW-22 [JN228836]
DGGE-soil clone 02
Uncultured bacterium clone D12P4MbH [FJ152303]
DGGE-soil clone 01
Uncultured gamma proteobacterium clone 1 117 [KC009913]
DGGE-seawater clone 02
Thalassospira sp. 2PR54-3 [EU440969]
T4-101
Thalassospira sp. DBT-2 [DQ659435]
Brucella sp. QQDP515 [FJ555566]
Brucella sp. GXY-1 [EF514908]
TB-101
Ochrobactrum sp. PWTJD [HM056231]
Ochrobactrum sp. CH10 [HQ619225]
TE-101
Gammaproteobacteria
Alphaproteobacteria

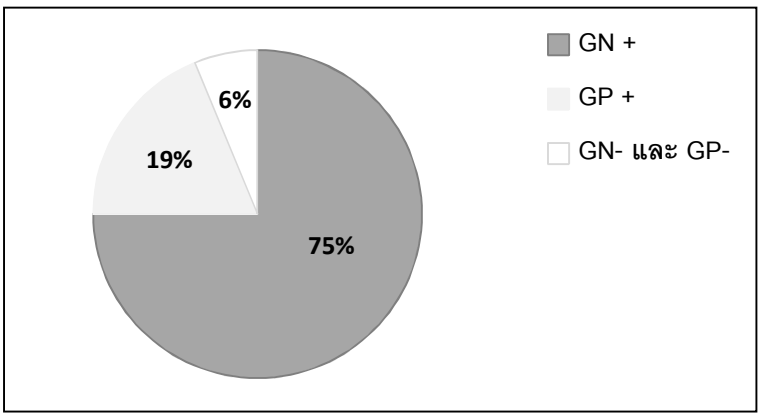


รูปที่ 5.4 แผนภูมิต้นไม้แสดงความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของแบคทีเรียที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเลี้ยง และการวิเคราะห์เมตาจีโนม (ตัวอักษรสีแดง) กับยีน 16S rDNA ของแบคทีเรียสายพันธุ์ที่เกี่ยวข้อง และแบคทีเรียที่มีรายงานย่อยสลายสารพิษ (ตัวอักษรสีดำ) โดยตัวเลขที่กิ่งสาขาบอกถึงการนับผลที่ให้ผลซ้ำจากทั้งหมด 1,000 ครั้ง ด้วย bootstrap

จากรูปที่ 5.4 แผนภูมิต้นไม้แสดงความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของแบคทีเรียที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเชื้อและจากการวิเคราะห์เมตาจีโนมจากสิ่งแวดล้อมโดยตรง พบว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ T9-106 ที่ถูกคัดแยกได้พบเป็นสกุลเดียวกันกับ DGGE-sediment clone 22 คือ *Halomonas* ที่ได้จากแถบดีเอ็นเอเด่นโดยวิธี DGGE ทั้งนี้พบรายงานว่าแบคทีเรียในสกุลดังกล่าวเป็นแบคทีเรียกลุ่มหลักในดินตะกอนทะเล (Wang และคณะ 2008) และน้ำทะเล (Pinyakong และคณะ, 2012) ซึ่งสามารถถูกคัดแยกและสามารถย่อยสลายสารประกอบ PAHs ชนิดฟีแนนทรีนและไพรีนได้ (Wang และคณะ, 2008)

5.5 สร้างห้องสมุดของยีนและวิเคราะห์ความหลากหลายของยีนไดออกซิจีเนสโดยตรงจากสิ่งแวดล้อม

จากผลการตรวจสอบยีนในกลุ่ม dox_{GN} และ dox_{GP} โดยการเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอโดยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสด้วยคู่ไพร์เมอร์ GNF และ GNR (Cebron และคณะ, 2008) และคู่ไพร์เมอร์ GPF และ GPR (Cebron และคณะ, 2008) ตามลำดับ สามารถพบในกลุ่ม dox_{GN} มากกว่า dox_{GP} ถึง 4 เท่า ดังแสดงในรูปที่ 5.5



รูปที่ 5.5 เปอร์เซ็นต์ของยีนไดออกซิจีเนสที่พบบริเวณเกาะสีชังจากตัวอย่างเกาะสีชัง จำนวน 34 ตัวอย่าง

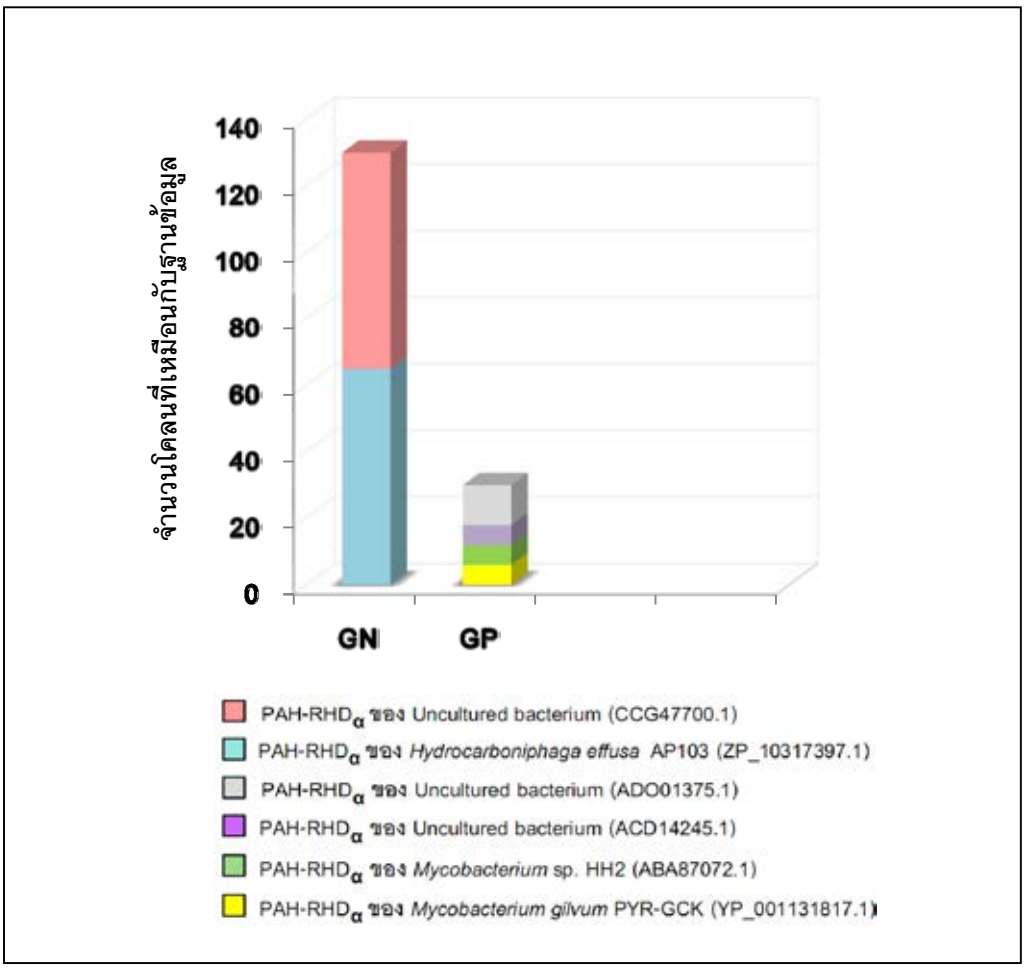
จากรูปที่ 5.5 ภายหลังการตรวจหายีนในกลุ่ม dox_{GN} และ dox_{GP} จากตัวอย่างจำนวน 34 ตัวอย่างบริเวณเกาะสีชัง พบว่า 26 ตัวอย่าง ได้แก่ ตัวอย่างดิน 10 ตัวอย่าง ตัวอย่างน้ำทะเล 4 ตัวอย่าง และตัวอย่างดินตะกอน 12 จาก 20 ตัวอย่างพบยีนในกลุ่มยีนในกลุ่ม dox_{GN} (75%) ในขณะที่ 6 ตัวอย่าง ได้แก่ตัวอย่างดิน 4 จาก 10 ตัวอย่าง ได้แก่ ดิน E บริเวณสถานีตำรวจใกล้ท่าล่างดิน H บริเวณท่าวังแถบเรือนผ่องศรีดิน I บริเวณหน้าสถานีตำรวจน้ำ ดิน J บริเวณท่าบน และ

ตัวอย่างดินตะกอน 2 จาก 20 ตัวอย่าง ได้แก่ ดินตะกอน 3 บริเวณกลางร่องน้ำท่าเรือศรีราชา และดินตะกอน 7 ทางทิศตะวันออกของเกาะสีชัง บริเวณหน้าท่าเรือสีชังทอง ตรวจพบยีนในกลุ่ม dox_{GP} (19%) และอีก 6% ไม่สามารถตรวจพบยีนในกลุ่ม dox_{GN} และ dox_{GP} ได้ โดยพบว่าบริเวณท่าบนจากตัวอย่างทุกประเภท คือ ตัวอย่างดิน J ตัวอย่างน้ำทะเล W2 และตัวอย่างดินตะกอนหมายเลข 6 สามารถตรวจพบยีนในกลุ่ม dox_{GN} ได้ซึ่งตัวอย่างดิน J เป็นตัวอย่างเดียวที่สามารถตรวจพบยีนในกลุ่ม dox_{GP} และ dox_{GN} สาเหตุที่ในพื้นที่เกาะสีชังตรวจพบยีนในกลุ่ม dox_{GN} มากกว่า dox_{GP} อาจเนื่องมาจากการปรับตัวตามธรรมชาติของกลุ่มแบคทีเรียย่อยสลายสารพิษในพื้นที่เนื่องในธรรมชาติพบแบคทีเรียทั้งแกรมลบ และแกรมบวกแต่เนื่องจากกลุ่มแบคทีเรียแกรมลบมีการเจริญแบบ *r-strategists* ทำให้มีการเจริญเติบโตเร็วและสามารถปรับตัวได้ดีในอาหารหรือสารพิษใหม่ ๆ ได้ดีกว่า ทำให้มีบทบาทในการย่อยสลายสารพิษในระยะเริ่มแรกแต่เนื่องจากอัตราการแข่งขันของกลุ่มแบคทีเรียแกรมบวกที่มีการเจริญแบบ *k-strategists* มีมากกว่าจึงทำให้แบคทีเรียแกรมบวกอยู่รอดในพื้นที่ปนเปื้อนได้นานกว่า และมีบทบาทต่อย่อยสลายสารพิษที่ปนเปื้อนระยะนาน ๆ และมีความเข้มข้นสูงและความแตกต่างด้านพื้นที่ปนเปื้อนโดยจากรายงานของ Uyttebroek และคณะ (2006) ที่ศึกษาแบคทีเรีย และยีนไดออกซิจีเนสในดินปนเปื้อนสารประกอบ PAHs พบมีการเพิ่มขึ้นของยีนในกลุ่ม dox_{GP} เมื่อมีการปนเปื้อนของ PAHs เป็นระยะเวลานาน (มากกว่า 10 ปี) และพบในปริมาณสูง (92-416 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัมดินแห้ง) ซึ่งอาจเป็นไปได้พื้นที่ส่วนใหญ่ของเกาะสีชังน่าจะมีการปนเปื้อนของ PAHs ในปริมาณต่ำ และพบปนเปื้อนระยะเวลาสั้นเนื่องจากไม่สามารถตรวจพบได้โดยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟี และไม่ปรากฏรายงานการปนเปื้อนของสารประกอบ PAHs บริเวณเกาะสีชังเลย พบเพียงรายงานการปนเปื้อนปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนบริเวณเกาะสีชัง-ศรีราชา (Wattayakorn และ Rungsupa, 2012) และรายงานการปนเปื้อนของฟีแนนทรีน และไพรีนในดินตะกอนปากแม่น้ำเจ้าพระยา และบริเวณอ่าวไทยตอนบนเท่านั้น (Boonyatumanond และคณะ, 2006-2007) และตัวอย่างที่พบยีนในกลุ่ม dox_{GP} น่าจะมีการปนเปื้อนของ PAHs ในระดับที่สูง หรือพบการปนเปื้อนยาวที่นานกว่าตัวอย่างอื่น ๆ เนื่องจากเป็นตัวอย่างจากบริเวณท่าเรือทั้งสิ้น (ท่าบน, ท่าล่าง, ท่าวัง, ศรีราชา และศรีชังทอง)

จากการนำผลิตภัณฑ์ของยีนในกลุ่ม dox_{GN} จำนวน 130 โคลน และ dox_{GP} จำนวน 30 โคลน มาสร้างห้องสมุดยีน และคัดเลือกรีคอมบิแนนท์โคลนที่ให้รูปแบบการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (RFLP) ที่แตกต่างกัน เพื่อใช้เป็นตัวแทนในการวิเคราะห์หาลำดับ

นิวคลีโอไทด์ พบว่าโคลน dox_{GN} มีรูปแบบที่ต่างกัน 6 รูปแบบ และโคลน dox_{GP} มีรูปแบบที่ต่างกัน 5 รูปแบบ จากนั้นนำผลที่ได้ไปคำนวณค่าความหลากหลาย และวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ของโคลนตัวแทนแต่ละรูปแบบต่อไป ดังแสดงในรูปที่ 5.6

ผลการคำนวณความหลากหลายของรูปแบบการตัดของยีนไดออกซิจีเนสในพื้นที่เกาะสีชัง โดยใช้ดัชนีของ Shannon พบว่าค่าความหลากหลายยีนในกลุ่ม dox_{GP} (1.47) พบมากกว่า dox_{GN} (1.37) ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบค่าความหลากหลายของยีนไดออกซิจีเนสที่พบบริเวณเกาะสีชังกับพื้นที่อื่น ๆ พบว่า ดินตะกอนทะเลบริเวณซับ-แอนตาร์คติก ประเทศอาร์เจนตินา มีค่าความหลากหลายของยีนในกลุ่ม dox_{GP} สูงกว่าบริเวณเกาะสีชัง โดยมีค่าอยู่ในช่วง 1.79-1.94 พบเป็นยีนจากแบคทีเรียสกุล *Rhodococcus* สกุล *Mycobacterium* สกุล *Nocardiodes* สกุล *Terrabacter* และสกุล *Bacillus* ในขณะที่ดินตะกอนชายฝั่งทะเล บริเวณปาตาโกเนีย ประเทศอาร์เจนตินา มีค่าความหลากหลายของยีนในกลุ่ม dox_{GN} ต่ำกว่าบริเวณเกาะสีชัง โดยมีค่าอยู่ในช่วง 0.00-1.45 พบเป็นยีนจากแบคทีเรีย *Alcaligenes faecalis* สายพันธุ์ AFK2 และ *Cycloclasticus* ซึ่งจากรายงานดังกล่าวพบว่าในพื้นที่ที่แตกต่างกัน องค์ประกอบของแบคทีเรียที่พบก็จะแตกต่างกันด้วย จึงส่งผลต่อค่าความหลากหลายของยีนต่างกันตามมา และในขณะเดียวกันไพร์เมอร์ที่ใช้ในการตรวจหายีนถือเป็นปัจจัยสำคัญในการจำกัดค่าความหลากหลายที่ได้



รูปที่ 5.6 จำนวนโคลนของตัวแทนในแต่ละรูปแบบที่พบในกลุ่มยีน dox_{GN} จำนวน 130 โคลน และ dox_{GP} จำนวน 30 โคลน เมื่อเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล

จากรูปที่ 5.6 ผลของการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์จากโคลนตัวแทนในกลุ่มยีน dox_{GN} คือ GNA.2 ที่พบจำนวนครึ่งหนึ่งของโคลนทั้งหมด (65 โคลน) พบมีความคล้ายคลึงกับยีนประมวลรหัสเอนไซม์ไดออกซิจีเนสในหน่วยย่อยแอลฟาของเชื้อ Unculture bacteria (สีชมพู) ส่วนโคลนตัวแทนในกลุ่มอื่น ๆ คือ GNB6.2 GNB2.1 GNB7.2 GNB6.3 และ GND.1(รวมกันทั้งหมด 65 โคลน) พบมีคล้ายคลึงกับยีนประมวลรหัสเอนไซม์ไดออกซิจีเนสในหน่วยย่อยแอลฟาของเชื้อ *Hydrocarboniphaga effuse* สายพันธุ์ AP103 โดยโคลนที่ได้ทั้งหมดในกลุ่มนี้มีเปอร์เซ็นต์ความเหมือนปานกลางอยู่ในช่วง 49-56% (สีฟ้า) ในขณะที่ลำดับนิวคลีโอไทด์ของโคลนตัวแทนในกลุ่ม dox_{GP} ที่พบจำนวนโคลนมากสุด (12 โคลน) คือ GP7.5 มีคล้ายคลึงกับยีนประมวลรหัสเอนไซม์ไดออกซิจีเนสในหน่วยย่อยแอลฟาของ Unculture bacteria ที่เปอร์เซ็นต์ความเหมือน 98% ส่วนโคลนตัวแทนในกลุ่มอื่น ๆ คือ GP7.1 (6 โคลน) GPE.1 (6 โคลน) GPI.1

(3 โคลน) และ GPI.3 (3 โคลน) มีคล้ายคลึงกับยีนประมวลรหัสเอนไซม์ไดออกซิจีเนสในหน่วยย่อยแอลฟาของแบคทีเรียในสกุล *Mycobacterium* โดยมีเปอร์เซ็นต์ความเหมือนอยู่ในช่วง 95-99% และเมื่อพิจารณาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากโคลนตัวแทนในกลุ่ม GN และ GP

เป็นที่น่าสนใจว่าพบรีคอมบิแนนท์โคลนที่มีเปอร์เซ็นต์ความเหมือนในระดับปานกลาง (49-56%) จำนวน 6 โคลน ซึ่งเป็นโคลนจาก dox_{GN} ทั้งหมด และโคลนที่มีความเหมือนเปอร์เซ็นต์ความเหมือนสูง (95-99%) จำนวน 5 โคลน ซึ่งเป็นโคลนในกลุ่ม dox_{GP} ดังแสดงในตารางที่ 5.7 และ 5.8

ตารางที่ 5.7 ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของรีคอมบิแนนท์โคลน dox_{GN} ที่มีเปอร์เซ็นต์ความเหมือนในระดับปานกลาง (49-56%) จำนวน 6 โคลน

ตัวอย่าง	โปรตีน	ยีน	สายพันธุ์แบคทีเรีย	% amino acid identity	accession number	เอกสารอ้างอิง
GNB6.2	PAH-ring hydroxylating dioxygenase alpha subunit protein	PAH-RHD$_{\alpha}$	*Hydrocarboniphaga effusa* สายพันธุ์ AP103	49%	ZP_10317397.1	Chang และคณะ 2012
GNB2.1	PAH-ring hydroxylating dioxygenase alpha subunit	PAH-RHD$_{\alpha}$		50%	ZP_10317397.1	
GNB7.2	PAH-ring hydroxylating dioxygenase alpha subunit	PAH-RHD$_{\alpha}$		49%	ZP_10317397.1	
GNB6.3	PAH-ring hydroxylating dioxygenase alpha subunit	PAH-RHD$_{\alpha}$		50%	ZP_10317397.1	
GND.1	PAH-ring hydroxylating dioxygenase alpha subunit	PAH-RHD$_{\alpha}$		50%	ZP_10317397.1	
GNA.2	PAH-ring hydroxylating dioxygenase alpha subunit	PAH-RHD$_{\alpha}$	Uncultured bacterium	56%	CCG47700.1	Martin และคณะ 2012

ตารางที่ 5.8 ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของรีคอมบิแนนท์โคลน dox_{GP} ที่มีเปอร์เซ็นต์ความเหมือนสูง (95-99%) จำนวน 5 โคลน (ต่อ)

ตัวอย่าง	โปรตีน	ยีน	สายพันธุ์แบคทีเรีย	% amino acid identity	accession number	เอกสารอ้างอิง
GP7.1	PAH ring-hydroxylating dioxygenase alpha subunit	PAH-RHD$_{\alpha}$	uncultured bacterium	95%	ACD14245.1	Cebron และ Leyval 2007
GPI.3	PAH ring-hydroxylating dioxygenase alpha subunit	PAH-RHD$_{\alpha}$	*Mycobacterium gilvum* สายพันธุ์ PYR-GCK	96%	YP_001131817.1	Copeland และคณะ 2007
GPI.1	PAH ring-hydroxylating dioxygenase alpha subunit	PAH-RHD$_{\alpha}$		97%	YP_001131817.1	
GP7.5	PAH-ring hydroxylating dioxygenase alpha subunit	PAH-RHD$_{\alpha}$	Uncultured bacterium	98%	ADO01375.1	Cebron และคณะ 2011
GPE.1	PAH ring-hydroxylating dioxygenase alpha subunit	PAH-RHD$_{\alpha}$	*Mycobacterium* sp. สายพันธุ์ HH2	99%	ABA87072.1	Zhou และคณะ 2006

จากตารางที่ 5.7 ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของรีคอมบิแนนท์โคลนจำนวน 5 โคลนในกลุ่ม dox_{GN} คือ GNB6.2 GNB2.1 GNB7.2 GNB6.3 และ GND.1 มีความคล้ายคลึงกับลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน PAH-ring hydroxylating dioxygenase alpha subunit จากเชื้อ *Hydrocarboniphaga effusa* สายพันธุ์ AP103 (ZP_10317397.1) โดยมีเปอร์เซ็นต์ความเหมือนปานกลางเพียง 49% 50% 49% 50% และ 50% ตามลำดับทั้งนี้จากรายงานของ Palleroni และคณะ (2004) ที่ศึกษาเชื้อ *Hydrocarboniphaga effusa* สายพันธุ์ AP103 ที่ถูกคัดแยกจากดินปนเปื้อนน้ำมันภายหลังพบว่าสามารถใช้อัลเคน และอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนจำพวก ฟีนอล และโทลูอีนเป็นซับสเตรทได้ และรายงานของ Chang และคณะ (2012) ที่วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์จากจีโนมของเชื้อดังกล่าวโดยพบว่ามียีนประมวลเอนไซม์อัลเคนโมโนออกซิจีเนส (*alk*) ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายอัลเคน และอะโรมาติกริงไฮดรอกซิเลททิงไดออกซิจีเนส จำพวกไบฟีนิลไดออกซิจีเนสที่เกี่ยวข้องกับวิถีการย่อยสลายไบฟีนิล และแนพธาลีน 1, 2 ไดออกซิจีเนสที่เกี่ยวข้องกับวิถีการย่อยสลายแนพธาลีน ฟีแนนทรีน และไพรีน ทำให้สรุปได้ว่าโคลน dox_{GN} ที่พบมีแนวโน้มที่จะเป็นยีนไดออกซิจีเนสกลุ่มใหม่ที่สามารถย่อยสลายสารพิษได้หลายประเภทที่สำคัญ คือฟีแนนทรีนและไพรีนได้

จากตารางที่ 5.8 โคลน GPI.3 และ GPI.1 ซึ่งเป็นรีคอมบิแนนท์โคลนในกลุ่ม dox_{GP} มีความคล้ายคลึงกับลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน PAH-ring hydroxylating dioxygenase alpha subunit จากเชื้อ *Mycobacterium gilvum* สายพันธุ์ PYR-GCK (YP_001131817.1) และ โดยมีเปอร์เซ็นต์ความเหมือน 96% และ 97% และโคลน GPE.1 มีความคล้ายคลึงกับลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน PAH-ring hydroxylating dioxygenase alpha subunit จากเชื้อ *Mycobacterium* sp. สายพันธุ์ HH2 (ABA87072.1) โดยมีเปอร์เซ็นต์ความเหมือน 99% ทั้งนี้จากรายงานของ Miller และคณะ (2006) ที่ศึกษาเชื้อ *Mycobacterium gilvum* สายพันธุ์ PYR-GCK ที่ถูกคัดจากดินปนเปื้อนน้ำมัน ภายหลังพบว่าสามารถย่อยสลายสารประกอบ PAHs ชนิดไพรีน ฟีแนนทรีน และเบนโซ (*เอ*) ไพรีนได้ และตรวจพบยีนประมวลรหัสเอนไซม์ไดออกซิจีเนสในกลุ่ม *nidA* จากเชื้อดังกล่าวด้วย ซึ่งในปีต่อมา Copeland และคณะ (2007) ได้ศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์จากจีโนมจากเชื้อดังกล่าวผลปรากฏว่าพบยีนประมวลเอนไซม์อะโรมาติกริงไฮดรอกซิเลททิงไดออกซิจีเนสเช่นกัน ทำให้สรุปได้ว่าโคลนในกลุ่มแบคทีเรียแกรมบวกมีความสามารถย่อยสลายสารพิษได้หลายประเภทที่สำคัญ คือ ฟีแนนทรีน และไพรีนได้

และเมื่อพิจารณาลำดับนิวคลีโอไทด์ของรีคอมบิแนนท์โคลนในกลุ่ม dox_{GN} คือ GNA.2 ที่พบจำนวนครึ่งหนึ่งของโคลนทั้งหมด และรีคอมบิแนนท์โคลนในกลุ่ม dox_{GP} คือ GP7.1 ซึ่งเป็น

โคลนที่พบจำนวนมากที่สุด และ GP7.5 พบมีความคล้ายคลึงกับลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน PAH-ring hydroxylating dioxygenase alpha subunit จาก Uncultured bacterium ทั้งสิ้นโดยมีเปอร์เซ็นต์ความเหมือนเท่ากับ 56% และ 95% ตามลำดับ ทำให้สรุปได้ว่ามาจากโคลนส่วนใหญ่ในพื้นที่เกาะสีชังเป็นโคลนจาก Uncultured bacterium ในกลุ่มที่ยังไม่สามารถเพาะเลี้ยงได้ หรือเพาะเลี้ยงได้ยากซึ่งแสดงว่าการใช้ดีเอ็นเอเมตาจีโนมจากสิ่งแวดล้อมโดยตรงช่วยลดข้อจำกัดด้านการศึกษายีนย่อยสลายสารพิษ เพราะไม่จำเป็นต้องคัดแยกเชื้อในห้องปฏิบัติการก่อนซึ่งโคลน dox_{GN} ที่มีแนวโน้มในการพบยีนชนิดใหม่ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายสารพิษทั้ง 6 โคลนนี้สามารถใช้เป็นข้อมูลเพิ่มเติมเป็นข้อมูลในการออกแบบไพร์เมอร์เพื่อตรวจติดตามแบคทีเรียย่อยสลายสารพิษในพื้นที่ที่ครอบคลุมมากกว่าเดิมได้

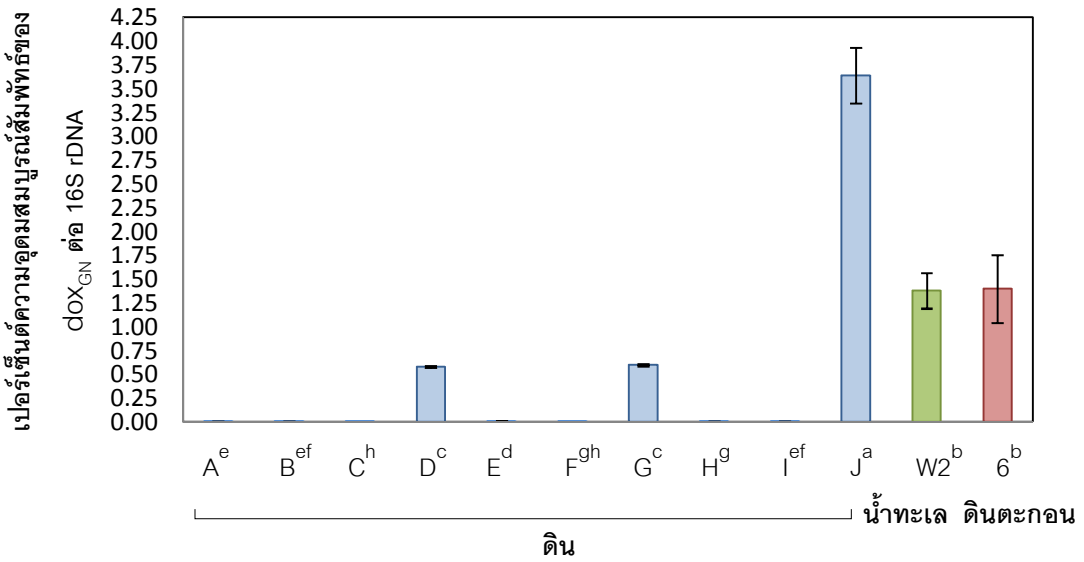
จากการนำรีคอมบิแนนท์ตัวแทนทั้งหมดจำนวน 11 โคลน มาสร้างแผนภูมิแสดงความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ ดังแสดงในรูป 4.26 พบว่าให้ผลสอดคล้องกับการเปรียบเทียบข้อมูลในฐานข้อมูล โดยที่โคลน dox_{GN} ที่เป็นทั้งหมดจัดอยู่ในกลุ่มใหม่ เนื่องจากมีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่แตกต่างจากที่พบรายงานมาก่อนอย่างชัดเจน ส่วนโคลนยีน dox_{GP} อยู่ในกลุ่มของ Unculture bacterium และ *Mycobacterium* ตามลำดับ

5.6 **วิเคราะห์ความอุดมสมบูรณ์สัมพัทธ์** (relative abundance)

5.6.1 **ความอุดมสมบูรณ์สัมพัทธ์ของยีนไดออกซิจีเนสต่อแบคทีเรียทั้งหมดในสิ่งแวดล้อมโดยวิธี** Quantitaive real-time PCR

จากการศึกษาความหลากหลายของยีนไดออกซิจีเนสโดยตรงจากสิ่งแวดล้อมพบมีความหลากหลายสูงเช่นเดียวกับความหลากหลายของแบคทีเรียที่พบในบริเวณเกาะสีชัง นอกจากนั้นยังพบยีนในกลุ่ม dox_{GN} ซึ่งเป็นกลุ่มยีนใหม่จากตัวอย่างบริเวณท่าบนในทุกประเภทที่ศึกษา คือ ตัวอย่างดิน J น้ำทะเล W2 และดินตะกอนหมายเลข 6 และเมื่อพิจารณาประเภทของแหล่งตัวอย่างที่พบยีนในกลุ่ม dox_{GN} ทำให้ทราบว่าตัวอย่างดินเป็นตัวอย่างที่น่าสนใจเนื่องจากพบยีนไดออกซิจีเนสในทุกตัวอย่าง และพบมากที่สุด (พบในตัวอย่างดินทั้งหมด คือ 10 ตัวอย่าง ในตัวอย่างน้ำทะเลทั้งหมด คือ 4 ตัวอย่าง และในตัวอย่างดินตัวอย่างดินตะกอน 12 จาก 20 ตัวอย่าง) ดังนั้นเพื่อที่จะหาปริมาณของยีนไดออกซิจีเนสที่แท้จริงในตัวอย่างดิน เปรียบเทียบกับแหล่งตัวอย่างประเภทอื่น ๆ และภายในตัวอย่างดินด้วยกันเองในสิ่งแวดล้อม ทำโดยเปรียบเทียบสัดส่วนของปริมาณของยีนในกลุ่ม dox_{GN} กับปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดโดยการใช้วิธี real-time PCR ด้วยไพร์เมอร์คู่ 1401F และ 968R (Felske และคณะ, 1998) ในการเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็น

เอบริเวณยีน 16S rDNA และไพร์เมอร์คู่ GNF และ GNR (Cebron และคณะ 2008) ในเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนยีนไดออกซิจีเนสในกลุ่มแบคทีเรียแกรมลบด้วยซึ่งจากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าตัวอย่าง J มีสัดส่วนความอุดมสมบูรณ์สัมพัทธ์ของยีน dox_{GN} ต่อ 16S rDNA มากที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างประเภทอื่น ๆ ดังแสดงในรูปที่ 5.7

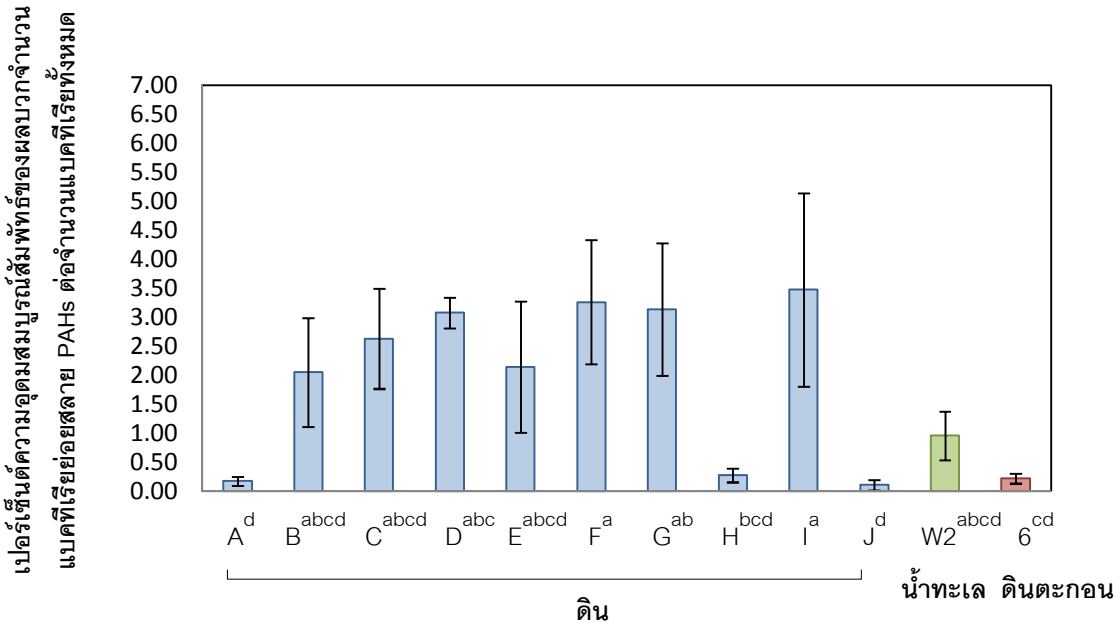


รูปที่ 5.7 เปอร์เซ็นต์ความอุดมสมบูรณ์สัมพัทธ์ของ dox_{GN} ต่อ 16S rDNA โดยตัวยกแทนการจัดกลุ่มของค่าเฉลี่ยที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99% ($p > 0.01$)

จากรูปที่ 5.7 จะเห็นได้ว่าตัวอย่างดิน J บริเวณท่าบนพบความอุดมสมบูรณ์สัมพัทธ์ของ dox_{GN} ต่อ 16S rDNA สูงสุด และมีค่าต่างจากตัวอย่าง C บริเวณท่าวังแถบพระจุฬาธุชราชฐานที่พบค่าต่ำสุด ถึง 1,000 เท่าซึ่งสอดคล้องกับรายงานการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียย่อยสลายสารประกอบ PAHs ด้วยวิธี MPN ที่ค่าสูงสุดบริเวณท่าบน และต่ำบริเวณท่าวังแถบพระจุฬาธุชราชฐานเช่นกัน นอกจากนี้ตัวอย่างดินที่เก็บจากบริเวณที่มีการจราจรขนส่งทางน้ำที่หนาแน่นคือตัวอย่าง D บริเวณที่จอดเรือท่าล่าง และ G บริเวณหาดทรายแก้วใกล้สถานีขนส่งน้ำมันพบค่าความอุดมสมบูรณ์สัมพัทธ์สูงกว่าบริเวณอื่น ๆ และเมื่อเปรียบเทียบความอุดมสมบูรณ์สัมพัทธ์จากตัวอย่างน้ำทะเล W2 และดินตะกอนหมายเลข 6 บริเวณท่าบน พบว่ามีค่าใกล้เคียงกัน แต่ก็ต่ำกว่าตัวอย่างดิน J จากท่าบนถึง 3 เท่า จากผลทั้งหมดทำให้คาดได้ว่าพบการปนเปื้อนของสารประกอบ PAHs ในพื้นที่เกาะสีชัง โดยพบมากในแหล่งตัวอย่างดินโดยเฉพาะบริเวณท่าบน ซึ่งอยู่ใกล้ชายฝั่งเขตชุมชนที่อยู่อาศัย และท่าเรืออันเป็นแหล่งกำเนิดสารประกอบ PAHs ที่สำคัญ

5.6.2 ความอุดมสมบูรณ์สัมพัทธ์ของแบคทีเรียย่อยสลายสารประกอบ PAHs ต่อแบคทีเรียทั้งหมดจากการเพาะเลี้ยงเชื้อโดยวิธี MPN

จากการเปรียบเทียบความอุดมสมบูรณ์สัมพัทธ์จากสัดส่วนจำนวนแบคทีเรียย่อยสลายฟีแนนทรีน และไพรีน ต่อจำนวนแบคทีเรียทั้งหมด โดยวิธี MPN ซึ่งผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าตัวอย่างน้ำทะเล W2 มีความอุดมสมบูรณ์สัมพัทธ์ของจำนวนแบคทีเรียย่อยสลายฟีแนนทรีน และไพรีน ต่อจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดมากที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างประเภทอื่น ๆ ดังแสดงในรูปที่ 5.8



รูปที่ 5.8 เปอร์เซ็นต์ความอุดมสมบูรณ์สัมพัทธ์ของผลบวกจำนวนแบคทีเรียย่อยสลาย PAHs ต่อจำนวนแบคทีเรียทั้งหมด โดยตัวยกแทนการจัดกลุ่มของค่าเฉลี่ยที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($p > 0.05$)

จากรูปที่ 5.8 จะเห็นได้ว่าตัวอย่างดิน I บริเวณท่าบนพบค่าความอุดมสมบูรณ์สัมพัทธ์สูงสุด และต่างจากค่าต่ำสุดจากตัวอย่างดิน J บริเวณท่าบนถึง 1,000 เท่า ทั้งนี้เนื่องจากตัวอย่างดิน I มีจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดน้อยกว่าตัวอย่าง J ถึง 2 เท่าและยังมีจำนวนแบคทีเรียย่อยสลาย PAHs มากกว่าตัวอย่าง J ถึง 10 เท่า จึงทำให้มีค่าความอุดมสมบูรณ์สัมพัทธ์สูงสุดในตัวอย่างดิน และพบว่าค่าความอุดมสมบูรณ์สัมพัทธ์จากการเพาะเลี้ยงมีค่าน้อยกว่าความอุดมสมบูรณ์สัมพัทธ์จากวิธีไม่อาศัยการเพาะเลี้ยงทั้งนี้เนื่องจากเป็นความอุดมสมบูรณ์ของแบคทีเรียย่อย

สลาย PAHs จากเชื้อที่สามารถเพาะเลี้ยงได้เท่านั้น ไม่ได้สะท้อนถึงความอุดมสมบูรณ์ของแบคทีเรียย่อยสลาย PAHs ทั้งหมดในสิ่งแวดล้อม

5.7 **สรุปความความสัมพันธ์ของข้อมูล**

จากวิเคราะห์ผลความสัมพันธ์ของข้อมูลทั้งหมดจากแหล่งตัวอย่างดินน้ำทะเล และดินตะกอนบริเวณเกาะสีชังที่ได้จากวิธีการเพาะเลี้ยง และจากการวิเคราะห์ดีเอ็นเอเมตาจีโนมจากสิ่งแวดล้อมโดยตรง ได้แก่ ผลวิเคราะห์ความหลายหลายของแบคทีเรียและยีนไดออกซิจีเนสโดยเมตาจีโนม ความอุดมสมบูรณ์ของแบคทีเรียทั้งหมด และแบคทีเรียย่อยสลายฟีแนนทรีนและไพรีนโดยวิธีการเพาะเลี้ยง ความอุดมสมบูรณ์ของยีนไดออกซิจีเนสโดยวิธีเมตาจีโนม รวมถึงผลการคัดแยกเลี้ยงแบคทีเรีย และปริมาณฟีแนนทรีนหรือไพรีนที่พบในตัวอย่างดังแสดงในตารางที่ 5.9

ตารางที่ 5.9 ผลความสัมพันธ์ของข้อมูลทั้งหมดในตัวอย่างดินบริเวณเกาะสีชังโดยวิธีการเพาะเลี้ยง และการวิเคราะห์ดีเอ็นเอเมตาจีโนมจากสิ่งแวดล้อม

ตัวอย่างดิน (บริเวณ)	การวิเคราะห์ดีเอ็นเอเมตาจีโนมจากสิ่งแวดล้อม						การเพาะเลี้ยงเชื้อ				
	ความหลากหลายของ			ความอุดมสมบูรณ์ของแบคทีเรียและยีนไดออกซิจีเนส [3] (Log copy number/g soil)			ความอุดมสมบูรณ์ของแบคทีเรีย [4] (log MPN/g dry soil)			% Relative abundance	การคัดแยกเชื้อ [5] (สายพันธุ์)
	แบคทีเรีย [1]	ยีนไดออกซิจีเนส [2]									
	H'	dox_{GN}	dox_{GP}	16S rDNA	dox_{GN}	% Relative abundance	แบคทีเรียทั้งหมด	แบคทีเรียย่อยสลายฟีแนนทรีน*	แบคทีเรียย่อยสลายไพรีน*		
A (ท่าวัง)	2.08 ± 0.01	+	-	7.502 ± 0.006	3.401 ± 0.001	0.007 ± 0.00	7.38 ± 0.00	4.75 ± 0.19^{a}	2.58 ± 0.18^{bc}	0.17 ± 0.08	1
B (ท่าวัง)	2.02 ± 0.00	+	-	7.498 ± 0.002	3.375 ± 0.053	0.007 ± 0.00	7.57 ± 0.16	4.88 ± 0.00^{a}	2.27 ± 0.08^{cd}	2.05 ± 0.94	1
C (ท่าวัง)	2.20 ± 0.01	+	-	7.756 ± 0.014	3.289 ± 0.003	0.003 ± 0.00	7.47 ± 0.16	3.48 ± 0.00^{b}	2.36 ± 0.16^{cd}	2.63 ± 0.86	-
D (ที่จอดเรือท่าล่าง)	2.09 ± 0.05	+	-	6.620 ± 0.008	4.385 ± 0.002	0.582 ± 0.01	7.38 ± 0.00	4.97 ± 0.00^{a}	4.38 ± 0.00^{a}	3.07 ± 0.27	2
E (สถานีตำรวจท่าล่าง)	1.77 ± 0.01	+	+	7.437 ± 0.018	3.500 ± 0.004	0.012 ± 0.00	7.54 ± 0.16	4.75 ± 0.10^{a}	2.37 ± 0.01^{cd}	2.14 ± 1.13	1
F (หน้าหาดถ้ำพัง)	2.19 ± 0.02	+	-	7.463 ± 0.012	3.085 ± 0.005	0.004 ± 0.00	7.47 ± 0.16	3.50 ± 0.05^{b}	2.13 ± 0.15^{d}	3.26 ± 1.07	-
G (หาดทรายแก้ว)	1.57 ± 0.00	+	-	6.587 ± 0.007	4.364 ± 0.003	0.599 ± 0.01	7.41 ± 0.07	3.40 ± 0.06^{b}	2.36 ± 0.00^{cd}	3.13 ± 1.14	-
H (ท่าวัง แถบเรือนผ่องศรี)	2.07 ± 0.01	+	+	7.566 ± 0.022	3.294± 0.006	0.005 ± 0.00	7.18 ± 0.00	3.63 ± 0.13^{b}	2.53 ± 0.05^{bc}	0.27 ± 0.11	-
I (สถานีตำรวจน้ำ)	2.13 ± 0.00	+	+	7.564 ± 0.005	3.426 ± 0.001	0.007 ± 0.00	7.36 ± 0.16	3.53 ± 0.05^{b}	2.40 ± 0.07^{cd}	3.47 ± 1.67	-
J (ท่าเรือท่าบน)	1.85 ± 0.00	+	+	5.994 ± 0.004	4.554± 0.038	3.639 ± 0.29	7.93 ± 0.27	4.40 ± 0.06^{a}	2.83 ± 0.17^{b}	0.10 ± 0.09	1

ตารางที่ 5.9 ผลความสัมพันธ์ของข้อมูลทั้งหมดในตัวอย่างน้ำทะเลบริเวณเกาะสีชังโดยวิธีการเพาะเลี้ยง และการวิเคราะห์ดีเอ็นเอเมตาจีโนมจากสิ่งแวดล้อม (ต่อ)

ตัวอย่าง น้ำทะเล (บริเวณ)	การวิเคราะห์ดีเอ็นเอเมตาจีโนมจากสิ่งแวดล้อม						การเพาะเลี้ยงเชื้อ				
	ความหลากหลาย			ความอุดมสมบูรณ์ของแบคทีเรียและยีนไดออกซิจีเนส[3] (Log copy number/ml seawater)			ความอุดมสมบูรณ์ของแบคทีเรีย[4] (log MPN/ml seawater)			% Relative abundance	การคัดแยกเชื้อ[5] (สายพันธุ์)
	แบคทีเรีย[1]	ยีนไดออกซิจีเนส[2]									
	H'	dox_{GN}	dox_{GP}	16S rDNA	dox_{GN}	% Relative abundance	แบคทีเรียทั้งหมด	แบคทีเรียย่อยสลายฟีแนนทรีน*	แบคทีเรียย่อยสลายไพรีน*		
W1 (ท่าวังแถบสะพานอัษฎางค์)	2.16 ± 0.00	+	-	NA	NA	NA	6.13 ± 0.15	3.50 ± 0.05^{b}	2.58 ± 0.18	NA	-
W2 (ที่จอดเรือท่าบน)	1.77 ± 0.01	+	-	5.052 ± 0.014	3.189 ± 0.058	1.379 ± 0.19	6.59 ± 0.25	4.30 ± 0.00^{a}	3.50 ± 0.05	0.96 ± 0.42	1
W3 (ที่จอดเรือท่าล่าง)	1.96 ± 0.01	+	-	NA	NA	NA	6.32 ± 0.00	3.48 ± 0.00^{b}	2.56 ± 0.00	NA	-
W4 (หน้าหาดถ้ำพัง)	1.90 ± 0.02	+	-	NA	NA	NA	6.36± 0.00	3.53 ± 0.05^{b}	2.47 ± 0.02	NA	-

ตารางที่ 5.9 ผลความสัมพันธ์ของข้อมูลทั้งหมดในตัวอย่างดินตะกอนบริเวณเกาะสีชังโดยวิธีการเพาะเลี้ยง และการวิเคราะห์ดีเอ็นเอเมตาจีโนมจากสิ่งแวดล้อม (ต่อ)

ตัวอย่าง ดินตะกอน (บริเวณ)	การวิเคราะห์ดีเอ็นเอเมตาจีโนมจากสิ่งแวดล้อม						การเพาะเลี้ยงเชื้อ				
	ความหลากหลายของ			ความอุดมสมบูรณ์ของแบคทีเรียและยีนไดออกซิจีเนส [3] (Log copy number/g soil)			ความอุดมสมบูรณ์ของแบคทีเรีย [4] (log MPN/g dry soil)				การคัดแยกเชื้อ [5] (สายพันธุ์)
	แบคทีเรีย [1]	ยีนไดออกซิจีเนส [2]									
	H'	dox_{GN}	dox_{GP}	16S rDNA	dox_{GN}	% Relative abundance	แบคทีเรียทั้งหมด*	แบคทีเรียย่อยสลายฟีแนนทรีน*	แบคทีเรียย่อยสลายไพรีน*	% Relative abundance	
B1 (ทิศเหนือของเกาะสีชัง)	1.99 ±0.00	+	-	NA	NA	NA	8.75 ± 0.37^{bcd}	5.86 ± 0.09^{a}	3.18 ± 0.00^{de}	NA	2
B2 (ทิศเหนือของเกาะสีชัง)	2.10 ±0.01	+	-				8.26 ± 0.07^{abc}	4.56 ± 0.00^{b}	3.46 ± 0.02^{ef}		-
B3 (ทิศตะวันออกเฉียงเหนือของเกาะสีชัง บริเวณกลางร่องน้ำ)	2.38 ±0.01	-	-				8.27 ± 0.08^{abc}	4.50 ± 0.04^{b}	3.47 ± 0.02^{ef}		-
B5 (ทิศตะวันตกของเกาะสีชัง หน้าถ้ำพัง)	2.34 ±0.00	-	-				8.86 ± 0.19^{cd}	5.88 ± 0.08^{a}	4.38 ± 0.00^{c}		1
B6 (ทิศตะวันออกของเกาะสีชัง บริเวณหน้าท่าเรือสีชังทอง)	2.32 ±0.04	+	-				8.75 ± 0.19^{bcd}	4.50 ± 0.05^{a}	3.36 ± 0.00^{ef}		-
B7 (ทิศตะวันออกของเกาะสีชัง บริเวณกลางร่องน้ำ)	2.31 ±0.08	+	-				8.54 ± 0.16^{bc}	4.52 ± 0.05^{b}	3.97 ± 0.26^{bc}		-
B9 (ทิศตะวันตกเฉียงใต้ของเกาะสีชังบริเวณใต้เกาะค้างคาว)	2.25 ±0.01	+	-				8.45 ± 0.16^{abcd}	5.85 ± 0.04^{b}	3.48 ± 0.04^{ef}		1
B10 (ทิศตะวันตกเฉียงใต้ของเกาะสีชังบริเวณใต้เกาะค้างคาว)	1.85 ±0.00	+	-				8.36 ± 0.00^{abcd}	4.58 ± 0.18^{b}	3.53 ± 0.16^{de}		-
B11 (เขาบ่อยา บริเวณท่าเรือปตท.)	1.97 ±0.00	+	-				8.59 ± 0.25^{abcd}	4.48 ± 0.00^{b}	3.41 ± 0.07^{ef}		-

ตารางที่ 5.9 ผลความสัมพันธ์ของข้อมูลทั้งหมดในตัวอย่างดินตะกอนบริเวณเกาะสีชังโดยวิธีการเพาะเลี้ยง และการวิเคราะห์ดีเอ็นเอเมตาจีโนมจากสิ่งแวดล้อม (ต่อ)

ตัวอย่าง ดินตะกอน (บริเวณ)	การวิเคราะห์ดีเอ็นเอเมตาจีโนมจากสิ่งแวดล้อม						การเพาะเลี้ยงเชื้อ				
	ความหลากหลาย			ความอุดมสมบูรณ์ของแบคทีเรียและยีนไดออกซิจีเนส [3] (Log copy number/gsoil)			ความอุดมสมบูรณ์ของแบคทีเรีย [4] (log MPN/g dry soil)			% Relative abundance	การคัดแยกเชื้อ [5] (สายพันธุ์)
	แบคทีเรีย [1]	ยีนไดออกซิจีเนส [2]									
	H'	dox_{GN}	dox_{GP}	16S rDNA	dox_{GN}	% Relative abundance	แบคทีเรียทั้งหมด*	แบคทีเรียย่อยสลายฟีแนนทรีน*	แบคทีเรียย่อยสลายไพรีน *		
1 (หน้าบางพระ)	1.82 ± 0.01	-	-	NA	NA	NA	8.10 ± 0.23^{abcd}	4.58 ± 0.18^{b}	3.32 ± 0.00^{f}	NA	-
2 (ทิศตะวันออกเฉียงเหนือของเกาะสีชัง บริเวณกลางร่องน้ำ)	2.39 ± 0.05	-	-				8.18 ± 0.00^{cd}	5.85 ± 0.04^{a}	3.86 ± 0.19^{bc}		1
3 (กลางร่องน้ำท่าเรือศรีราชา)	2.37 ± 0.01	+	+				8.48 ± 0.26^{d}	5.86 ± 0.00^{a}	3.50 ± 0.05^{cdef}		1
4 (ทิศเหนือของเกาะสีชัง)	1.98 ± 0.00	+	-				8.86 ± 0.19^{bcd}	5.85 ± 0.04^{a}	3.50 ± 0.05^{cdef}		1
5 (ทิศเหนือฝั่งตะวันตกของเกาะสีชัง)	1.87 ± 0.07	+	-				8.97 ± 0.00^{abc}	5.83 ± 0.17^{a}	3.75 ± 0.19^{bcde}		1
6 (ใกล้ท่าบน)	2.40 ± 0.01	+	-	7.578 ± 0.121	5.713 ± 0.001	1.400 ± 0.36	8.79 ± 0.14^{a}	5.97 ± 0.00^{a}	5.54 ± 0.16^{a}	0.22 ± 0.09	4
7 (ทิศตะวันออกของเกาะสีชัง บริเวณหน้าท่าเรือสีชังทอง)	2.32 ± 0.01	+	+	NA	NA	NA	8.23 ± 0.23^{bcd}	5.88 ± 0.08^{a}	3.56 ±0.00^{cdef}	NA	1

ตารางที่ 5.9 ผลความสัมพันธ์ของข้อมูลทั้งหมดในตัวอย่างดินตะกอนบริเวณเกาะสีชังโดยวิธีการเพาะเลี้ยง และการวิเคราะห์ดีเอ็นเอเมตาจีโนมจากสิ่งแวดล้อม (ต่อ)

ตัวอย่าง ดินตะกอน (บริเวณ)	การวิเคราะห์ดีเอ็นเอเมตาจีโนมจากสิ่งแวดล้อม						การเพาะเลี้ยงเชื้อ				
	ความหลากหลายของ			ความอุดมสมบูรณ์ของแบคทีเรียและยีนไดออกซิจีเนส [3] (Log copy number/g soil)			ความอุดมสมบูรณ์ของแบคทีเรีย [4] (log MPN/g dry soil)				การคัดแยกเชื้อ [5] (สายพันธุ์)
	แบคทีเรีย [1]	ยีนไดออกซิจีเนส [2]					แบคทีเรียทั้งหมด*	แบคทีเรียย่อยสลายฟีแนนทรีน*	แบคทีเรียย่อยสลายไพรีน*	% Relative abundance	
	H'	dox_{GN}	dox_{GP}	16S rDNA	dox_{GN}	% Relative abundance					
8 (ทิศตะวันออกของเกาะสีชัง บริเวณกลางร่องน้ำ)	2.33 ± 0.01	-	-	NA	NA	NA	8.07 ± 0.18^{d}	4.58 ± 0.18^{b}	3.79 ± 0.14^{bcd}	NA	-
9 (กลางร่องน้ำหน้าเกาะสีชัง-ศรีราชา)	2.25 ± 0.01	-	-				8.75 ± 0.19^{abc}	5.83 ± 0.17^{a}	3.45 ± 0.16^{cdef}		1
10 (กลางร่องน้ำหน้าเกาะสีชัง-ศรีราชา)	2.39 ± 0.00	-	-				8.97 ± 0.00^{a}	4.48 ± 0.00^{b}	3.41 ± 0.07^{def}		-
11 (ท่าเรือสวนสาธารณะศรีราชา)	1.97 ± 0.01	-	-				8.22 ± 0.08^{ab}	4.56 ± 0.00^{b}	3.26 ± 0.07^{f}		-

หมายเหตุ

[1] คือความหลากหลายของแบคทีเรียโดยคำนวณจากดัชนีของ Shannon (*H'*) ที่คำนวณจากวิธี PCR-DGGE

[2] คือแสดงการพบผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอหลังเพิ่มจำนวนโดยวิธี PCR ด้วยคู่ไพร์เมอร์ที่จำเพาะต่อยีนไดออกซินีเนสในกลุ่มแบคทีเรียแกรมลบ (+dox_{GN}) หรือแกรมบวก (+dox_{GP})

[3] คือความอุดมสมบูรณ์ของแบคทีเรียและยีนไดออกซิจีเนสโดยวิธี Real-time PCR โดยที่ NA คือ ไม่ได้มีการตรวจวิเคราะห์ความอุดมสมบูรณ์ในตัวอย่างนั้น ๆ

[4, 5] คือความอุดมสมบูรณ์ของแบคทีเรียทั้งหมด และแบคทีเรียย่อยสลายฟีแนนทรีนหรือไพรีนโดยวิธี MPN

* คือข้อมูลนั้นแสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.01$)

[a,b,c,d,e,f] คือแสดง subset ของกลุ่มตัวอย่างเมื่อใช้วิธี Tukey HSD test ($p < 0.01$)

ตัวหนาสีแดง แทนค่าสูงสุดของผลการวิเคราะห์ในแหล่งตัวอย่างต่าง ๆ

จากตารางที่ 5.9 ความหลากหลายของแบคทีเรียจากวิธีไม่อาศัยการเพาะเลี้ยงเชื้อมีค่าสูงสุดในตัวอย่างดินตะกอน ซึ่งมากกว่าตัวอย่างดิน และน้อยสุดในตัวอย่างน้ำทะเล โดยดินตะกอนหมายเลข 6 บริเวณท่าบนพบค่าความหลากหลายของแบคทีเรียมากสุด และจากผลการตรวจหายีนไดออกซิจีเนสจากตัวอย่างสิ่งแวดล้อมโดยตรง พบยีนในกลุ่ม dox_{GN} มากกว่า dox_{GP} โดยพบในตัวอย่างดินและน้ำทะเลทุกตัวอย่าง และตัวอย่างดินตะกอน 12 จาก 20 ตัวอย่าง ซึ่งบริเวณท่าบนจากตัวอย่างทุกประเภทพบผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอของยีนในกลุ่ม dox_{GN} ทั้งสิ้น ซึ่งภายหลังมีการสร้างห้องสมุดยีนจากตัวอย่างสิ่งแวดล้อมพบมีความหลากหลายของยีนสูง และพบเป็นกลุ่มยีนใหม่อีกด้วยจึงเป็นตัวอย่างที่มีความน่าสนใจในการศึกษาความอุดมสมบูรณ์ของแบคทีเรีย และยีนไดออกซิจีเนสจากตัวอย่างทุกประเภทบริเวณท่าบน รวมทั้งในตัวอย่างดินทุกตัวอย่าง โดยพบว่าความอุดมสมบูรณ์ของแบคทีเรียจากวิธีไม่อาศัยการเพาะเลี้ยงเชื้อจากสอดคล้องกับความอุดมสมบูรณ์ของแบคทีเรียทั้งหมดที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเชื้อด้วยวิธี MPN โดยมีค่าสูงสุดในตัวอย่างดินตะกอน รองมาคือตัวอย่างดิน และต่ำสุดในตัวอย่างน้ำทะเล และเมื่อพิจารณาความอุดมสมบูรณ์ของแบคทีเรียภายในแหล่งตัวอย่างดินทั้ง 10 ประเภท พบว่าตัวอย่างดิน C บริเวณท่าวังมีความอุดมสมบูรณ์ของแบคทีเรียมากสุด และต่ำสุดสุดในตัวอย่างดิน J บริเวณท่าบน ในขณะที่เปอร์เซ็นต์ความอุดมสมบูรณ์สัมพัทธ์ของยีนกลุ่ม dox_{GN} ต่อ 16S rDNA จากวิธีไม่อาศัยการเพาะเลี้ยง พบว่าในตัวอย่างดิน J มีค่ามากกว่าดินตะกอนหมายเลข 6 และต่ำสุดในน้ำทะเล W2 ซึ่งไม่สอดคล้องกับเปอร์เซ็นต์ความอุดมสมบูรณ์สัมพัทธ์ของแบคทีเรียย่อยสลาย PAHs ต่อแบคทีเรียทั้งหมดจากการเพาะเลี้ยง โดยวิธี MPN ซึ่งมีค่าสูงสุดในตัวอย่างน้ำทะเล W2 รองมาคือดินตะกอนหมายเลข 6 และดิน J ตามลำดับ นอกจากนี้ความอุดมสมบูรณ์ของยีนไดออกซิจีเนสจากวิธีไม่อาศัยการเพาะเลี้ยงเชื้อ เป็นความอุดมสมบูรณ์ของยีนในกลุ่ม dox_{GN} เพียงอย่างเดียวเท่านั้น ในขณะที่ความอุดมสมบูรณ์ของยีนไดออกซิจีเนสที่ได้จากการเพาะเลี้ยง เป็นทั้งยีนในกลุ่ม dox_{GN} และกลุ่ม dox_{GP} เมื่อพิจารณาผลการคัดแยกเชื้อพบว่าตัวอย่างดินตะกอนหมายเลข 6 สามารถคัดแยกเชื้อย่อยสลายฟีแนนทรีน หรือไพรีนได้มากที่สุดถึง 4 สายพันธุ์ โดยพบว่าโครงสร้างประชาคมจุลินทรีย์ที่ได้จากตัวอย่างสิ่งแวดล้อมโดยตรงสอดคล้องกับกลุ่มแบคทีเรียย่อยสลายฟีแนนทรีน และไพรีนที่คัดแยกได้ซึ่งพบเป็นแบคทีเรียกลุ่ม *Gammaproteobacteria* มากที่สุด แต่ชนิดของแบคทีเรียจากสองวิธีพบมีความแตกต่างกันทั้งนี้เนื่องมาจากการคัดแยกเชื้อย่อยสลายสารประกอบ PAHs เป็นการกระตุ้นให้แบคทีเรียในท้องถิ่นที่สามารถย่อยสลายสารพิษให้เพิ่มจำนวน และเจริญได้เท่านั้น ซึ่งเป็นที่น่าสนใจว่าสามารถคัดแยกแบคทีเรียในสกุล *Halomonas* ซึ่งเป็นแบคทีเรียกลุ่มหลักที่พบในตัวอย่างดินตะกอนได้ ผลจาก

ความสัมพันธ์ทั้งหมดทำให้ทราบว่าในพื้นที่ส่วนใหญ่ของเกาะสีชังพบมีการปนเปื้อนของสารประกอบ PAHs น้อย แต่บริเวณท่าบนซึ่งบริเวณที่มีเส้นทางคมนาคมขนส่งทางน้ำที่หนาแน่น ทั้งยังเป็นทั้งเขตชุมชนที่อยู่อาศัย มีความเสี่ยงต่อการได้รับปนเปื้อนของสารประกอบ PAHs ในพื้นที่มากที่สุด โดยเฉพาะในแหล่งตัวอย่างดิน เนื่องจากเป็นตัวอย่างเดียวที่พบตรวจพบยีนไดออกซิจีเนสในกลุ่ม dox_{GN} และ dox_{GP} อีกทั้งมีความอุดมสมบูรณ์ของยีนไดออกซิจีเนสสูงกว่าพื้นที่อื่น แต่ในขณะเดียวกันก็เป็นแหล่งตัวอย่างที่สามารถคัดแยกเชื้อย่อยสลายฟีแนนทรีน หรือไพรีนได้มากเช่นกัน

บทที่ 6

สรุปผลการทดลอง

วิทยานิพนธ์เล่มนี้ศึกษาเกี่ยวกับความหลากหลายและความอุดมสมบูรณ์ของแบคทีเรียและยีนไดออกซิจีเนสที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายสารประกอบ PAHs บริเวณเกาะสีชัง ซึ่งเป็นบริเวณที่มีความอุดมสมบูรณ์ และความหลากหลายทางชีวภาพสูง โดยใช้วิธีเพาะเลี้ยงเชื้อควบคู่ (Culture dependent method) ร่วมกับการวิเคราะห์ดีเอ็นเอเมตาจีโนมจากสิ่งแวดล้อมโดยตรง (Culture-independent method) ผลจากการศึกษาแสดงให้เห็นว่าพื้นที่บริเวณเกาะสีชังมีหลากหลายของแบคทีเรียและยีนไดออกซิจีเนสสูงตลอดจนพบความอุดมสมบูรณ์ของแบคทีเรียและยีนไดออกซิจีเนสในพื้นที่มาก ซึ่งผลจากการศึกษาทำให้ได้คลังแบคทีเรียและยีนที่สำคัญในการย่อยสลายสารพิษ รวมถึงทราบว่าเกาะสีชังสามารถเกิดการย่อยสลายทางชีวภาพในพื้นที่ได้เนื่องจากพบแบคทีเรียท้องถิ่น ตลอดทั้งยีน ที่เกี่ยวข้องในการย่อยสลายสารพิษ ซึ่งจะมีประโยชน์ต่อการจัดการ และบำบัดการปนเปื้อน PAHs ในพื้นที่เกาะสีชัง และเป็นแนวทางสำหรับบริเวณอื่นได้ต่อไป

ข้อเสนอแนะในงานวิจัยนี้

1. ควรออกแบบไพร์เมอร์ให้มีความหลากหลาย และจำเพาะต่อการตรวจหายีนไดออกซิจีเนสของแบคทีเรียสายพันธุ์บริสุทธิ์ที่ถูกคัดแยกและเพื่อใช้ในการตรวจหายีนไดออกซิจีเนสในสิ่งแวดล้อมโดยตรง
2. ควรมีการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอที่ได้จากยีนไดออกซิจีเนสในกลุ่มแบคทีเรียแกรมลบ และแกรมบวก จากแบคทีเรียสายพันธุ์บริสุทธิ์ที่ถูกคัดแยก
3. ควรมีการศึกษา และคัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายสารประกอบ PAHs จากแบคทีเรียสายพันธุ์บริสุทธิ์คัดแยกได้ เพื่อใช้ในการบำบัดสารพิษในระบบนิเวศจำลองดิน หรือน้ำทะเลต่อไป
4. ควรมีการวิเคราะห์ความอุดมสมบูรณ์ของยีนไดออกซิจีเนสในกลุ่มอื่น เช่น dox_{GP} เพื่อให้ได้ความอุดมสมบูรณ์ของยีนย่อยสลาย PAHs ที่แท้จริงในตัวอย่างสิ่งแวดล้อม

รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

กรมควบคุมมลพิษ. ของเสียอันตราย. สรุปสถานการณ์มลพิษของประเทศไทย พ.ศ. 2547. กรุงเทพมหานคร : ที. พริ้นติ้ง. กรุ๊ป 2547.

จุมพล สงวนสิน, สุธิดา กาญจน์อติเรกลาภ, ศุภวัตร กาญจนอติเรกลาภ และสมพงศ์ บันติวิวัฒน์กุล. วารสารการประมง 58, 3 (พฤษภาคม-มิถุนายน 2543): 263.

สุทธาทิพย์ มาฟู. การเปรียบเทียบปริมาณการปนเปื้อนของปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนบริเวณปากแม่น้ำแขมหนูและปากแม่น้ำระยอง. ใน เทคโนโลยีทางทะเล. หน้า 1-69. 2548.

สมภพ รุ่งสุภา. โครงการ “คุณภาพน้ำและแพลงก์ตอนรอบเกาะสีชัง” [ออนไลน์]. 2553. แหล่งที่มา: http://www.arri.chula.ac.th [11 มีนาคม 2554]

สมภพ รุ่งสุภา และกัลยา วัฒยากร. โครงการ “การปนเปื้อนปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนในน้ำทะเลรอบเกาะสีชัง และศรีราชา” [ออนไลน์]. 2550. แหล่งที่มา: http://www.arri.chula.ac.th [11 มีนาคม 2554]

ภาษาอังกฤษ

Allen, C. C. R., Boyd, D. R., Larkin, M. J., Reid, K. A., Sharma N. D. and Wilson, K. 1997. Metabolism of naphthalene, 1-naphthol, indene, and indole by *Rhodococcus* sp. strain NCIMB 12038. Appl. Environ. Microbiol. 63: 151–155.

Altschul S.F., Gish W., Miller W., Myers E.W. and Lipman D.J. (1990) Basic local alignment search tool. J. Mol. Biol. 215: 403-410.

Andrade, L. L., Leite, D. C., Ferreira, E. M., Ferreira, L. Q., Paula, G. R., Maguire, M. J., Hubert, C. R., Peixoto, R. S., Domingues, R. M. and Rosado, A. S. 2012. Microbial diversity and anaerobic hydrocarbon degradation potential in an oil-contaminated mangrove sediment. BMC microbiology. DOI: 10.1186/1471-2180-12-186.

Andreoni, V. and Gianfreda, L. 2007. Bioremediation and monitoring of aromatic-polluted habitats. Appl. Environ. Microbiol. 76: 287-308.

Aono, R. and Inoue, A. 1998. Organic solvent tolerance in microorganisms. In: Horikoshi, K. and Grant, W. D. (eds) Extremophiles: microbial life in extreme environments. 287–310 pp. Wiley-Liss, New York.

Arulazhagan, P. and Vasudevan, N. 2011. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by a halotolerant bacterial strain *Ochrobactrum* sp. VA1. Mar. Pollut. Bull. 62: 388-94.

Ausubel, F., Brent, R., Kingston, R., Moore, D., Smith, J. and Struhl K. 1999. Short Protocols in Molecular Biology: A Compendium of Methods from Current Protocols in Mol. Microbiol.

Baboshin, M., Akimov, V., Baskunov, B., Born, T. L., Khan, S. U. and Golovleva, L. 2008. Conversion of polycyclic aromatic hydrocarbons by *Sphingomonas* sp. VKM B-2434. Biodegradation 19: 567–576.

Baek, K. and Kim, H. S. 2009. Microbial community structure in hexadecane- and naphthalene-enriched gas station soil. J. Microbiol. Biotechnol.19 (7): 651-7.

Balashova, N. V., Stolz, A., Knackmuss, H. J., Kosheleva, I. A., Naumov, A. V. and Boronin, A. M. 2001. Purification and characterization of a salicylate hydroxylase involved in 1-hydroxy-2-naphthoic acid hydroxylation from the naphthalene and phenanthrene-degrading bacterial strain *Pseudomonas putida* BS202-P1. Biodegradation. 12: 179–188.

Barakat, A. O., Mostafa, A., Wade, T. L., Sweet, S. T. and El Sayed, N. B. 2011. Distribution and characteristics of PAHs in sediments from the Mediterranean coastal environment of Egypt. Mar. Pollut. Bull. 62: 1969–1978.

Bento, F. M., Camargo, F. A. O., Okeke, B. C. and Frankenberger, W. T. 2005. Comparative bioremediation of soils contaminated with diesel oil by natural attenuation, biostimulation and bioaugmentation. Bioresource Technol. 96: 1049–1055.

Boonchan, S., Britz, M. L. and Stanley, G. A. 1998. Surfactant-enhanced biodegradation of high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons by *Stenotrophomonas maltophilia*. Biotechnol. Bioeng. 59: 482-494.

Boonyatumanond, R., Wattayakorn, G., Togo, A. and Takada, H. 2006. Distribution and origins of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in riverine, estuarine, and marine sediments in Thailand. Mar. Pollut. Bull. 5: 942–956.

Boonyatumanond, R., Wattayakorn, G., Amano, A., Inouchi, Y. and Takada, H. 2007. Reconstruction of pollution history of organic contaminants in the upper Gulf of Thailand by using sediment cores: first report from Tropical Asia Core (TACO) project. Mar. Pollut. Bull. 5: 554-565.

Bordenave, S., Goni-Urriza, M., Vilette, C., Blanchard, S., Caumette, P. and Duran, R. 2008. Diversity of ring-hydroxylating dioxygenases in pristine and oil contaminated microbial mats at genomic and transcriptomic levels. Environ. Microbiol. 10: 3201-3211.

Bosch, R., Moore, E. R., Garcia-Valdes, E. and Pieper, D. H. 1999. NahW, a novel, inducible salicylate hydroxylase involved in mineralization of naphthalene by *Pseudomonas stutzeri* AN10. J. Bacteriol. 181: 2315–2322.

Bosch, R., Garcia-Valdes, E. and Moore, E. R. B. 2000. Complete nucleotide sequence and evolutionary significance of a chromosomally encoded naphthalene-degradation lower pathway from *Pseudomonas stutzeri* AN10. Gene. 245: 67–74.

Cebron, A., Norini, M. P., Beguiristain, T. and Leyval, C. 2008. Real-time PCR quantification of PAH-ring hydroxylating dioxygenase (PAHs-RHD$_\alpha$) genes from gram positive and gram negative bacteria in soil and sediment samples. J. Microbiol. 73: 148-159.

Cerniglia, C. E. 1992. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. Biodegradation. 3 (2-3): 351-368.

Chen, Y. C., Lee, W. J., Uang, S. N., Lee, S. H. and Tsai, P. J. 2006. Characteristics of polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) emissions from a UH-1H helicopter engine and its impact on the ambient environment. Atmos. Environ. 40: 7589–7597.

Chen, Y., Zhu, L. and Zhou, R. 2007. Characterization and distribution of polycyclic aromatic hydrocarbon in surface water and sediment from Qiantang River, China. J. Hazard. Mater. 141: 148-155.

Cheung, P. Y. and Kinkle, B. K. 2001. *Mycobacterium* diversity and pyrene mineralization in petroleum-contaminated soils. Appl. Environ. Microbiol. 67: 2222–2229.

Cottini, G. B. and Mazzone, G. B. 1939. The effects of 3, 4- benzo (*a*) pyrene on human skin. Am. J. Cancer. 37: 186-195.

Daniel, R. 2004. The soil metagenome a rich resource for the discovery of novel nature products. Curr. Opin. Biotechnol. 15: 199-204.

Denome, S. A., Oldfiel, C. L., Nash, J. and Young, K. D. 1994. Characterization of the desulfurization genes from *Rhodococcus* sp. strain IGTS8. J. Bacteriol.176: 6707-6717.

Demaneche, S., Meyer, C., Micoud, J., Louwagie, M., Willison, J. C. and Jouanneau, Y. 2004. Identification and functionalanalysisof two aromatic-ring-hydroxylating dioxygenases from a *Sphingomonas* strain that degrades various polycyclic aromatic hydrocarbons. Appl. Environ. Microbiol. 70: 6714-25.

Department of Pollution Control: State of the Thai marine environments. 2003. Ministry of Natural Resources and Environment. Bangkok. Thailand.

Derz, K., Klinner, U., Schuphan, I., Stackebrandt, E. and Kroppenstedt, R. M. 2004. *Mycobacterium pyrenivorans* sp. nov., a novel polycyclic-aromatic-hydrocarbon-degrading species. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 54(6): 2313-7.

Desai, A., Autenrieth, R., Dimitriou-Christidis, P. and McDonald, T. 2008. Biodegradation kinetics of select polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) mixtures by *Sphingomonas paucimobilis* EPA 505. Biodegradation. 19: 223-233.

Dias, A. C. F., Andreote, F. D., Rigonato, J., Fiore, M. F., Melo, I. S. and Araujo, W. L . 2010. The bacterial diversity in a Brazilian non-disturbed mangrove sediment. Anton. Leeuw. Int. J. G. 98 (4): 541-551.

Dutta, T. K., Selifonov, S. A. and Gunsalus, I. C. 1998. Oxidation of methyl-substituted naphthalenes: pathways in a versatile *Sphingomonas paucimobilis* strain. Appl Environ. Microbiol. 64: 1884-1889.

Edgar, R. C. 2004. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. Nucleic Acids Res. 32(5):1792-1797.

Edlund, A. and Jansson, J. K. 2008. Use of bromodeoxyuridine immunocapture to identify psychrotolerant phenanthrene-degrading bacteria in phenanthrene-enriched polluted Baltic Sea sediments. FEMS Microbiol. Ecol. 65: 513-525.

Elsasvan, J. D., Jansson, J. K. and Trevors, J. K. 2007. Modern soil Microbiology. 2nd ed. CRC Press. New York.

Evans, W. C., Fernley, H. N. and Griffiths, E. 1965. Oxidative metabolism of phenanthrene and anthracene by soil *Pseudomonads.* The ring-fission mechanism. Biochem. J. 95(3): 819–831.

Felske, A., Akkermans, A. D. L. and De, V. W. M. 1998. Quantification of 16S rRNAs in complex bacterial communities by multiple competitive reverses transcription-PCR in temperature gradient gel electrophoresis fingerprints. Appl. Environ. Microbiol. 64: 4581–4587.

Free Google Earth Program (Google Inc.)

Free Shannon-Wiener Calculation Program (Chang Bioscience, Inc.)

Fuenmayor, S. L., Wild, M., Boyes, A. L. and Williams, P. A. 1998. A gene cluster encoding steps in conversion of naphthalene to gentisate in *Pseudomonas* sp. strain U2. J. Bacteriol. 180: 2522–2530.

Geiselbrecht, A., Hedlund, B. P., Tichi, M. A., Staley, J. T. 1998. Isolation of marine polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH)-degrading *Cycloclasticus* strains from the Gulf of Mexico and comparison of their PAH degradation ability with that of Puget Sound *Cycloclasticus* strains. Appl. Environ. Microbiol. 64: 4703–4710.

Gibson, T. D and Parales, E. R. 2000. Aromatic hydrocarbon dioxygenases in environmental biotechnology. Curr. Opin. Biotechnol. 11: 236–243.

Goyal, A. K. and Zylstra, G. J. 1996. Molecular cloning of novel genes for polycyclic aromatic hydrocarbon degradation from *Comamonas testosteroni* GE39. Appl. Environ. Microbiol. 62: 230–236.

Goyal, A. K. and Zylstra, G. J. 1997. Genetics of naphthalene and phenanthrene degradation by *Comamonas testosteroni*. J. Indl. Microbiol. Biotechnol. 19: 401–407.

Guo, C. L., Zhou, H. W., Wong, Y. S. and Tam, N. F. 2005. Isolation of PAH-degrading bacteria from mangrove sediments and their biodegradation potential. Mar. Pollut. Bull. 51: 1054-1061.

Guo, C. L., Ke, L ., Dang, Z. and Tam, N. F . 2011. Temporal changes in *Sphingomonas* and *Mycobacterium* populations in mangrove sediments contaminated with different concentrations of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). Mar. Pollut. Bull. 62 (1): 133-139.

Gurtler, V., Stanisich, V. A. 1996. New approaches to typing and identification of bacteria using the 16S–23S rDNA spacer region. Microbiology 142: 3–16.

Habe, H. and Omori, T. 2003. Genetics of polycyclic aromatic hydrocarbon metabolism in diverse aerobicbacteria. Biosci. Biotechnol. Biochem. 67: 225-243.

Habe, H., Kanemitsu, M., Nomura, M., Takemura, T., Iwata, K., Nojiri, H., Yamane, H. and Omori, T. 2004. Isolation and characterization of an alkaliphilic bacterium utilizing pyrene as a carbon source. J. Biosci. Bioeng. 98(4): 306-8.

Hafez, E. E., Rashad, M., Abd-Elsalam, H. E. and EL-Hanafy, A. A. 2008. The Polyaromatic hydrocarbons as a serious environmental pollutants and the role of bioremediation to overcome this problem. Accepted for publication in Environment, Health and Nutrition-Global Issues. S. K. Basu and S. DattaBanik (eds). APH Publishing Corporation. New Delhi. India.

Haines, J. R., Wrenn, B. A., Holder, E. L., Strohmeier, K. L., Herrington, R. T. and Venosa, A. D. 1996. Measurement of hydrocarbon-degrading microbial populations by a 96-well plate most-probable-number procedure. J. Ind. Microbiol. Biot. 16: 36-41.

Handelsman, J. 2004. Metagenomic application of genomics to uncultured microorganism. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 68: 669-685.

Harayama, S., Kok, M. and Neidle, E. L. 1992. Functional and evolutionary relationships among diverse oxygenases. Annu. Rev. Microbiol. 46: 565-601.

Haritash, A. K. and Kaushik, C. P. 2009. Biodegradation aspects of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs): A review. J. Hazard. Mater. 169: 1-15.

Hedlund, B. P. and Staley, J. T. 2001. *Vibrio cyclotrophicus* sp. nov., a polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH)-degrading marine bacterium. IJSEM. 51(1): 61-66.

Heitkamp, M. A. and Cerniglia, C. E. 1989. Polycyclic aromatic hydrocarbon degradation by a *Mycobacterium* sp. in microcosm containing sediment and water from a pristine ecosystem. Appl. Environ. Microbiol. 55: 1968-1973.

Hennessee, C. T., Seo, J. S., Alvarez, A. M. and Li, Q. X. 2009. Polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading species isolated from Hawaiian soils: *Mycobacterium crocinum* sp. nov., *Mycobacterium pallens* sp. nov., *Mycobacterium rutilum* sp. nov., *Mycobacterium rufum* sp. nov. and *Mycobacterium aromaticivorans* sp. nov. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 59 (2): 378-387.

Higashihara, T., Sato, A. and Simidu, U. 1978. An MPN method for the enumeration of marine hydrocarbon degrading bacteria. Bull. Jap. Soc. Sci. Fish. 44: 1127-1134.

Huang, X., Tian, Y., Luo, Y. R., Liu, H. J., Zheng, W. and Zheng, T. L. 2008. Modified sublimation to isolate phenanthrene-degrading bacteria of the genera *Sphingomonas* and *Burkholderia* from Xiamen oil port. Mar. Pollut. Bull. 57: 538-543.

IARC. 1999. Overall Evaluations of Carcinogenicity of Humans. [Online] International Agency for Research on Cancer. Available from http://193.51.164.11/monoeval/erthall.html. [20 January 1999]

International Labour Office. 1983. Encyclopedia of Occupational Health and Safety. Volume I & II. Geneva. Switzerland.

Janbandhu, A. and Fulekar, M. H. 2011. Biodegradation of phenanthrene using adapted microbial consortium isolated from petrochemical contaminated environment, J. Hazard. M. 333-340.

Jeon, C. O., Park, M., Ro, H. S., Park, W. and Madsen, E. L. 2006. The naphthalene catabolic (*nag*) genes of *Polaromonas naphthalenivorans* CJ2: Evolutionary implications for two gene clusters and novel regulatory control. Appl. Environ. Microbiol. 72: 1086–1095.

Jiang, H., Parales, R. E. and Gibson, D. T. 1999. The α Subunit of toluene dioxygenase from *Pseudomonas putida* F1 can accept electrons from reduced Ferredoxin$_{TOL}$ but is catalytically inactive in the absence of the β Subunit. Appl. Environ. Microbiol. 65: 315–318.

Jimenez, I. Y. and Bartha, R. 1996. Solvent-augmented mineralization of pyrene by a *Mycobacterium* sp. Appl. Environ. Microbiol. 62: 2311-2316.

Joanna, D. M., James, P. F., Daniel, R. D. and Carl, E. C. 2001. Degradation of phenanthrene and anthracene by cell suspensions of *Mycobacterium* sp. strain PYR-1. Appl. Environ. Microbiol. 67(4): 1476-1483.

Johnsen, A. R., Bendixen, K. and Karlson, U. 2002. Detection of microbial growth on polycyclic aromatic hydrocarbons in microtiter plates by using the respiration indicator WST-1. Appl. Environ. Microbiol. 68: 2683-2689.

Johnsen, A. R., Wick, L. Y. and Harms, H. 2005. Principles of microbial PAH-degradation in soil. Env. Pollut. 133: 71-84.

Juhasz, A. L. and Naidu, R. 2000. Bioremediation of high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons: A review of the microbial degradation of benzo (*a*) pyrene. Int. Biodeter. Biodegrad. 45: 57–88.

Jung, S. W., Park, J. S., YounKown, O., Kang, J. H., Shim, W. J. and Kim, Y. O. 2010. Effects of crude oil on marine microbial communities in short term outdoor microcosms. Microbiology. 48 (5): 594-600.

Kanaly, R. A. and Harayama, Shigeaki. 2000. Biodegradation of high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons by bacteria J. Bacteriol. 182 (8): 2059-2067.

Kang, H., Hwang, S. Y., Kim, Y. M., Kim, E., Kim, Y. S., Kim, S. K., Kim, S. W., Cerniglia C. E., Shuttleworth, K. L. and Zylstra, G. J. 2003. Degradation of phenanthrene and naphthalene by a *Burkholderia* species strain. Can. J. Microbiol. 49(2): 139-44.

Kasai, Y., Shindo, K., Harayama, S. and Misawa, N. 2003. Molecular characterization and substrate preference of a polycyclic aromatic hydrocarbon dioxygenase from *Cycloclasticus* sp. strain A5. Appl. Environ. Microbiol. 69: 6688–6697.

Kauppi, B., Lee, K., Carredano, E., Parales, R. E., Gibson, D. T., Eklund, H. and Ramaswamy, S. 1998. Structure of an aromatic-ring-hydroxylating dioxygenase-naphthalene 1, 2-dioxygenase. Structure 6: 571-586.

Kazunga, C. and Aitken M. D. 2000. Products from the incomplete metabolism of pyrene by polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacteria. Appl. Environ. Microbiol. 66: 1917-1922.

Kennedy, J., Flemer, B., Jackson, S. A., Lejon, D. P. H., Morrissey, J. P., Gara, F. O and Alan, D. D. W. 2010. Marine Metagenomics: New Tools for the Study and Exploitation of Marine Microbial Metabolism. Mar. Drugs. 8(3): 608–628.

Khan, A. A., Wang, R. F., Cao, W. W., Doerge, D. R., Wennerstrom, D. and Cerniglia, C. E. 2001. Molecular cloning, nucleotide sequence and expression of genes encoding a polycyclic aromatic ringdioxygenase from *Mycobacterium* sp. strain PYR-1. Appl. Environ. Microbiol. 67: 3577–3585.

Kim, T. J., Lee, E. Y., Kim, Y. J., Cho, K. S. and Ryu, H. 2003. Degradation of polyaromatic hydrocarbons by *Burkholderia cepacia* 2A-12. World J. Microb. Biot. 19 (4): 411-417.

Kim, Y. H., Engesser, K. H. and Cerniglia, C. E. 2005. Numerical and genetic analysis of polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading mycobacteria. Microb. Ecol. 50: 110–119.

Kim, S. J., Kweon, O., Jones, R. C., Freeman, J. P., Edmondson, R. D. and Cerniglia, C. E. 2007. Complete and integrated pyrene degradation pathway in *Mycobacterium vanbaalenii* PYR-1 based on systems biology. J. Bacteriol. 189: 464–472.

Kiyohara, H., Nagao, K. and Nomi, R. 1976. Degradation of phenanthrene through *o*-phthalate by an *Aeromonas* sp. Agric. Biol. Chem. 40: 1075–1082.

Kiyohara, H., Torigoe, S., Kaida, N., Asaki, T., Iida, T., Hayashi, H. and Takizawa, N. 1994. Cloning and characterization of a chromosomal gene cluster "*pah"* that encodes the upper pathway for phenanthrene and naphthalene utilization by *Pseudomonas putida* OUS82. J. Bacteriol. 176: 2439–2443.

Klankeo, P., Nopcharoenkul, W. and Pinyakong, O. 2009. Two novel pyrene-degrading *Diaphorobacter* sp. and *Pseudoxanthomonas* sp. isolated from soil. J. Biosci. Bioeng. 108: 488-495.

Kochevar, I. E., Armstrong, R. B., Einbinder, J., Walther, R. R. and Harber, L. C. 1982. Coaltar phototoxicity: Active compounds and action spectra. Photochem. Photobiol. 36: 65-69.

Komatsu, T., Omori, T. and Kodama, T. 1993. Microbial degradation of the polycyclic aromatic hydrocarbons acenaphthene and acenaphthylene by a pure bacterialculture. Biosci. Biotechnol. Biochem. 57: 864-5.

Kosheleva, I. A., Tsoi, T. V., Kulakova, A. N. and Boronin, A. M. 1986. Srtuctiral analysis of plasmid NPL-1 controlling napthhlane oxidation in *Pseudomonas putida* and its derivatives. Gene. 22: 2389–2397.

Kouzuma, A., Pinyakong, O., Nojiri, H., Omori, T., Yamane, H. and Habe, H. 2006. Functional and transcriptional analyses of the initial oxygenase genes for acenaphthene degradation from *Sphingomonas* sp. strain A4. Microbiology 152: 2455-2467.

Kulakov, L. A., Allen, C. C. R., Lipscomb, D. A. and Larkin, M. J. 2000. Cloning and characterization of a novel *cis*-naphthalene dihydrodiol dehydrogenase gene

(*narB*) from *Rhodococcus* sp. NCIMB 12038. FEMS Microbiol. Lett. 182: 327–331.

Kweon, O., Kim, S. J., Baek, S., Chae, J. C., Adjei, M. D., Baek, D. H., Kim, Y. C., Cerniglia, C. E. 2008. New classification system for bacterial Rieske non-heme iron aromatic ring-hydroxylatingoxygenases. BMC Biochemistry. v9. Doi: 10.1186/1471-2091-9-11.

Labana, S., Kapur, M., Malik, D. K., Prakash, D. and Jain, R. K. 2007. Diversity, biodegradation and bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons. In Environmental bioremediation technologies. Shree, N., Singh, R. and Tripathi, D., editors. Springer, New York.

Larkin, M. J., Allen, C. C. R., Kulakov, L. A. and Lipscomb, D. A. 1999. Purification and characterization of a novel naphthalene dioxygenase from *Rhodococcus* sp. strain NCIMB 12038. J. Bacteriol. 181: 6200–6204.

Laurie, A. D. and Lloyd-Jones, G. 1999. The *phn* genes of *Burkholderia* sp. strain RP007 constitute a divergent gene cluster for polycyclic aromatic hydrocarbon catabolism. J. Bacteriol. 181: 531–540.

Lee, E. H., Kang, Y. S. and Cho, K. S. 2011. Biostimulation and bioaugmentation employing *Rhodococcus* sp. EH831. J. Microbiol. Biotechnol. 39 (1): 86–92.

Li, W., Shi, J., Wang, X., Han, Y., Tong., Ma, L., BaoliCai, B. L. 2004. Complete nucleotide sequence and organization of the naphthalene catabolic plasmid pND6-1 from *Pseudomonas* sp. strain ND6. Gene. 336 (2): 231-240.

Liang, Y., Gardner, D. R., Miller, C. D., Chen, D., Anderson, A. J., Weimer, B. C. and Sims, R. C. 2006. Study of biochemical pathways and enzymes involved in pyrene degradation by *Micobacterium* sp. strain KMS. Appl. Environ. Microbiol. 72: 7821-7828.

Ling, J., Zhang, G., Sun, H., Fan, Y., Ju, J. and Zhang, C. 2011. Isolation and characterization of a novel pyrene-degrading *Bacillus vallismortis* strain JY3A. Sci. Total. Environ. 409: 1994-2000.

Long, R. M., Lappin-Scott, H. M. and Stevens, J. R. 2009. Enrichment and identification of polycyclic aromatic compound-degrading bacteria enriched from sediment samples. Biodegradation 20: 521-531.

Lors, C., Ryngaert, A., Perie, F., Diels, L. and Damidot, D. 2010. Evolution of bacterial community during bioremediation of PAHs in a coal tar contaminated soil. Chemosphere. 81(10): 1263-71.

Luepromchai, E., Lertthamrongsak, W., Pinphanichakarn, P., Thaniyavarn, S., Pattaragulwanit, K. and Juntongjin, K. 2007. Biodegradation of PAHs in petroleum-contaminated soil using tamarind leaves as microbial inoculums. Songklanakarin J. Sci. Technol. 29: 515-527.

MacKenzie, K. M. and Angevine, D. M. 1981. Infertility in mice exposed in utero to benzo (*a*) pyrene. Biol. Reprod. 24: 183-191.

Maeda, R., Nagashima, H., Zulkharnain, A. B., Iwata, K. and Omori, T. 2009. Isolation and characterization of a car gene cluster from the naphthalene, phenanthrene, and carbazole-degrading marine isolate *Lysobacter* sp. strain OC7. Curr. Microbiol. 59(2): 154-9.

Magurran, A. E. 2004. Measuring biological diversity. Oxford: Blackwell Publishing.

Mallick, S., Chatterjee, S. and Dutta, T. K. 2007. A novel degradation pathway in the assimilation of phenanthrene by *Staphylococcus* sp. strain PN/Y via meta-cleavage of 2-hydroxy-1-naphthoic acid: formation of trans-2, 3-dioxo-5-(2' hydroxyphenyl)-pent-4-enoic acid. Microbiology. 153: 2104-2115.

Marcos, M. S., Lozada, M. and Dionisi, H. M. 2009. Aromatic hydrocarbon degradation genes from chronically polluted Subantarctic marine sediments. Lett. Appl. Microbiol. 49: 602-608.

Miller, E. C. and Miller, J. A. 1981. Searches for ultimate chemical carcinogens and their reactions with cellular macromolecules. Cancer. 47: 2327–2345.

Miller, C. D., Hall, K., Liang, Y. N., Nieman, K., Sorensen, D., Issa, B., Anderson, A. J. and Sims, R. C. 2004. Isolation and characterization of polycyclic aromatic

hydrocarbon-degrading *Mycobacterium* isolates from soil. Microb. Ecol. 48: 230–238.

Mrozik, A. and Piotrowska-Seget, Z. 2010. Bioaugmentation as a strategy for cleaning up of soils contaminated with aromatic compounds. Microbiol. Res. 165: 363-375.

Muyzer, G., De, W. E. C. and Uitterlinden, A. G. 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. Appl. Environ. Microbiol. 59: 695–700.

Niepceron, M., Portet-Koltalo, F., Merlin, C., Motelay-Massei, A., Barray, S. and Bodilis, J. 2010. Both *Cycloclasticus* spp. and *Pseudomonas* spp. as PAH-degrading bacteria in the Seine estuary (France). FEMS Microbiol. Ecol. 71: 137-147.

Ono, A., Miyazaki, R., Sota, M., Ohtsubo, Y., Nagata, Y. and Tsuda, M. 2007. Isolation and characterization of naphthalene-catabolic genes and plasmids from oil-contaminated soil by using two cultivation-independent approaches. Appl. Microbiol. Biotechnol. 74(2): 501-10.

Parales, R. E., Parales, J. V. and Gibson, D. T. 1999. Aspartate 205 in the catalytic domain of naphthalene dioxygenase is essential for activity. J. Bacteriol. 181: 1831-1837.

Parales, R. E., Lee, K., Resnick, S. M., Jiang, H., Lessner, D. J. and Gibson, D. T. 2000. Substrate specificity of naphthalene dioxygenase: Effect of specific amino acids at the active site of the enzyme. J. Bacteriol. 182: 1641-1649.

Peng, R. H., Xiong, A. S., Xue, Y., Fu, X. Y., Gao, F., Zhao, W., Tian, Y. S. and Yao, Q. H. 2008. Microbial biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. FEMS Microbiol. Rev. 32: 927-955.

Peng, J. J., Cai, C., Qiao, M., Li, H. and Zhu, Y. G. 2010. Dynamic changes in functional gene copy numbers and microbial communities during degradation of pyrene in soils. Env. Pollut. 158: 2872-2879.

Perra, G., Pozo, K., Guerranti, C., Lazzeri, D., Volpi, V., Corsolini, S. and Focardi, S. 2011. Levels and spatial distribution of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in superficial sediment from 15 Italian marine protected areas (MPA). Marine Pollution Bulletin. 62 (4): 874-877.

Pielou, E. C. 1975. Ecological diversity. Wiley, New York.

Ping, L., Zhang, C., Zhu, Y., Wu, Min., Hu, X., Li, Z. and Zhao, H. 2011. Biodegrading of pyrene by a newly isolated *Pseudomonas putida* PL2. Biotechnol. Bioproc. Eng. 16 (5): 1000-1008.

Pinyakong, O., Habe, H. and Omori, T. 2003. The unique aromaticcatabolic genes in *sphingomonads* degrading polycyclic aromatichydrocarbons. J. Gen. Appl. Microbiol. 49: 1–9.

Pinyakong, O., Habe, H., Kouzuma, A., Nojiri, H. and Omori, T. 2004. Isolation and characterization of gene encoding polycyclic aromatic hydrocarbon dioxygenase from acenaphthene and acenaphthylene degrading *Sphingomonas* sp. strain A4. FEMS Microbiol. Lett. 238: 297-305.

Pumphrey, G. M. and Madsen, E. L. 2007. Naphthalene metabolism and growth inhibition by naphthalene in *Polaromonas naphthalenivorans* strain CJ2. Microbiology. 153 (11): 3730-8.

Reddy, M. S., Naresh, B., Leela, T., Prashanthi, M., Madhusudhan, N. C., Dhanasri, G. and Devi, P. 2010. Biodegradation of phenanthrene with biosurfactant production by a new strain of *Brevibacillus* sp. Bioresour. Technol. 101 (20): 7980–7983.

Rehmann, K., Hertkorn, N., Kettrup, A. A. 2001. Fluoranthene metabolism in *Mycobacterium* sp. strain KR20: identity of pathway intermediates during degradation and growth. Microbiology. 147: 2783–2794.

Reynoso-Cuevas, L., Gallegos-Martínez, M. E., Cruz- Sosa, F. and Gutierrez-Rojas, M. 2008. In vitro evaluation of germination and growth of five plant species on medium supplemented with hydrocarbons associated with contaminated soils. Bioresour. Technol. 99: 6379-6385.

Roling, W. F. M., Milner, M. G., Jones, D. M., Lee, K., Daniel, F., Swannell, R. J. P. and Head, I. M. 2002. Robust hydrocarbon degradation and dynamics of bacterial communities during nutrient-enhanced oil spill bioremediation. Appl. Environ. Microbiol. 68: 5537–5548.

Romine, M. F., Stillwell, L. C., Wong, K. K., Thurston, S. J., Sisk, E. C., Sensen, C., Gaasterland, T., Fredrickson, J. K. and Saffer, J. D. 1999. Complete sequence of a 184-kilobase catabolic plasmid from *Sphingomonas aromaticivorans* F199. J. Bacteriol. 181: 1585–1602.

Saiphet, A., Juntongjin, K., Pattaragulwanit, K., and Pinphanichakarn, P. 2006. Novel acenaphthene degrading bacterium *Sphingomonas* sp. strain SP2. J. Sci. Res. Chula. Univ. 31 (2): 83-94.

Saito, A., Iwabuchi, T. and Harayama, S. 2000. A novel phenanthrene dioxygenase from *Nocardioides* sp. strain KP7: Expression in *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 182: 2134-2141.

Saitou, N. and Nei, M. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. Mol. Biol. Evol. 4 (4): 406-425

Samata, S. K., Singh, O. V. and Jain, R. K. 2002. Polycyclic aromatic hydrocarbon: environment pollution and bioremediation. Trends Biotechnol. 20: 243-247.

Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T. 1989. Molecular Cloning: a Laboratory Manual. 2nd (edn). Cold Spring Harbor. NY: Cold Spring Harbor Laboratory.

Sambrook, J. and Russell, D. W. 2001. Molecular Cloning: A laboratory manual. 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York.

Santos, A. L., Peixoto, R. and Rosado, A. S. 2009. New approaches to understanding microbial diversity in wastewater, landfills and leachate treatment. Oecol. Bras. 13: 631-648

Sarkar, D., Ferguson, M., Datta, R. and Birnbaum, S. 2005. Bioremediation of petroleum hydrocarbons in contaminated soils: Comparison of biosolids addition, carbon supplementation and monitored natural attenuation. Environ. Pollut.136: 187–195.

Schocken, M. J. and Gibson, D. T.1984. Bacterial oxidation of the polycyclic aromatic hydrocarbons acenaphthene and acenaphthylene. Appl. Environ. Microbiol. 48: 10-6.

Schuler, L., Chadhain, S. M. N., Joyanneau, Y. and Agathos, S. N. 2008. Characterization of a novel angular dioxygenase from fluorene-degrading *Sphingomonas* sp. strain LB126. Appl. Environ. Microbiol. 74: 1050-1057.

Selifonov, S. A., Slepenkin, A. V., Adanin, V. M., Grechkina, G. M. and Starovoitov, I. I. 1993. Acenaphthene catabolism by strains of *Alcaligenes eutrophus* and *Alcaligene sparadoxus*. Microbiology. 62: 85-92.

Seo, J. S., Keum, Y. S., Hu, Y., Lee, S. E. and Li, Q. X. 2006. Phenanthrene degradation in *Arthrobacter* sp. Pl-1: initial 1, 2-, 3 ,4- and 9, 10-dioxygenation, and *meta*- and *ortho*-cleavages of naphthalene-1,2-diol after its formation from naphthalene-1,2-dicarboxylic acid and hydroxyl naphthoic acids. Chemosphere. 65: 2388–2394.

Seo, J. S., Keum, Y. S., Hu, Y., Lee, S. E. and Li, Q. X. 2007. Degradation of phenanthrene by *Burkholderia* sp. C3: Initial 1, 2- and 3, 4-dioxygenation and *meta*- and *ortho*-cleavages of naphthalene-1, 2-diol. Biodegradation. 18: 123–131.

Seo, J. S. 2006. Bacterial proteomes and metabolism of aromatic compounds. Ph.D. dissertation. University of Hawaii at Manoa: Honolulu. Hawaii. USA.

Shannon, C. E. 1948. A mathematical theory of communication. Bell. Syst. Tech. J. 27: 379-423 and 623-656.

Shi, T., Fredrickson J. K. and Balkwill, D. L. 2001. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by Sphingomonas strains isolated from the terrestrial subsurface. J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 26: 283-9.

Simon, M. J., Osslund, T. D., Saunders, R., Ensley, B. D., Suggs, S., Harcourt, A., Suen, W. C., Cruden, D. L., Gibson, D. T. and Zylstra, G. J. 1993. Sequences of genes encoding naphthalene dioxygenase in *Pseudomonas putida* strains G7 and NCIB 9816-4. Gene. 127(1): 31-7.

Simpson, E. H. 1949. Measurement of diversity. Nature. 163-688.

Singh, A. and Ward, O. P. 2004. Biodegradation and Bioremediation. Springer, New York.

Singleton, D. R., Ramirez, L. G. and Aitken, M. D. 2009. Characterization of polycyclic aromatic hydrocarbon degradation gene cluster in a phenanthrene-degrading *Acidovorax* strain. Appl. Environ. Microbiol. 75: 2613-2620.

Sojinu, O. S., Wang, J. Z., Sonnibare, O. O. and Zeng, E. Y. 2010. Polycyclic aromatic hydrocarbons in sediments and soils from oil exploration ares of the Niger Delta, Nigeria. J. Hazard. Mater. 174: 641-647.

Somboonna, N., Assawamakin, A., Wilantho, A., Tangphatsornruang, S. and Tongsima, S. 2012. Metagenomic profiles of free-living archaea, bacteria and small eukaryotes in coastal areas of Sichang Island, Thailand. BMC Genomics.13 (Suppl 7): S 29.

Stapleton, R. D., Savage, D. C., Sayler G. S. and Stacey, G. 1998. Biodegradation of aromatic hydrocarbons in an extremely acidic environment. Appl. Environ. Microbiol. 64: 4180-4184.

Story, S. P., Parker, S. H., Kline, J. D., Tzeng, T. R., Mueller, J. G. and Kline, E. L. 2000. Identification of four structural genes and two putative promoters necessary for utilization of naphthalene, phenanthrene fluoranthene by *Sphingomonas paucimobilis* var. EPA505. Gene. 260: 155–169.

Su, ZC., Hu, F. C., Li, X. Y., Zhang, H. W., Li, P. J. and Zhang, C. G. 2012. Isolation and Molecular Detection of Polycyclic Aromatic Hydrocarbon-degrading *Mycobacterium* spp. from the Shenfu Wastewater Irrigation Area in China advances in ENVIRONMENTAL SCIENCE AND ENGINEERING. PTS 1-6 Book Series: Advanced Materials Research Volume: 518-523 Pages: 411- 421.

Sverdrup, L. E., Hagen, S. B., Krough, P. H. and Van Gestel, C. A. M. 2007. Benzo (*a*) pyrene shows low toxicity to three species of terrestrial plants, two soil invertebrates and soil-nitrifying bacteria. Ecotox. Environ. Safe. 66: 362-368.

Takeuchi, M., Hamana, K. and Hiraishi, A. 2001. Proposal of the genus *Sphingomonas sensustricto* and three new genera, *Sphingobium, Novosphingobium* and *Sphingopyxis,* on the basis of phylogenetic and chemotaxonomic analysis. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 51: 1405–1417.

Takizawa, N., Kaida, N., Torigos, S., Moritani, T., Sawada, T., Satoh, S. and Kiyohara, H. 1994. Identification and characterization of genes encoding polycyclic aromatic hydrocarbon dioxygenase and polycyclic aromatic hydrocarbon dihydrodiol dehydrogenase in *Pseudomonas putida* OUS82. J. Bacteriol.176: 2444–2449.

Takizawa, N., Iida, T., Sawada, T., Yamauchi, K., Wang, Y. W., Fukuda, M. and Kiyohara, H. 1999. Nucleotide sequence and characterization of genes encoding naphthalene upper pathway of *Pseudomonas aeruginosa* PaK1 and *Pseudomonas putida* OUS82. J. Biosci. Bioeng. 87: 723-731.

Talley, W. J. 2006. Bioremediation of Recalcitrant Compounds. CRC Press, New York.

Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M. and Kumar, S. 2011. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance and Maximum Parsimony Methods. Mol. Biol. Evol. 28: 2731-2739.

Thavasi, R., S. Jayalakshmi, T., Balasubramanian. and Banat, I. M. 2006. Biodegradation of crude oil by nitrogen fixing marine bacteria *Azotobacter chroococcum*. Res. J. Microbiol. 1: 401-408.

Tian, Y., Liu, H. J., Zheng, T. L., Kwon, T. I., Kim, S. J. and Yan, C. L. 2008. PAHs contramination and bacteria communities in mangrove surface sediments of the Jiulong River Estuary, China. Mar. Pollut. Bull. 57: 707-715.

Tittabutr, P., Cho, I. K. and Li, Q. X. 2011. *Phn* and *Nag*-like dioxygenases metabolize polycyclic aromatic hydrocarbons in *Burkholderia* sp. C3. Biodegradation. 22: 1119–1133.

Tiwari, J. N., Reddy, Mudiam, M. K., Patel, D. K., Jain, S. K., Murthy, R. C. and Manickam, N. 2010. Isolation of pyrene degrading *Achromobacter xylooxidans*

and characterization of metabolic product. World J. Microb. Biot. 26 (10): 1727-1733.

Topping, D. C., Pal, B. C., Martin, D. H., Nelson, F. R. and Nettesheim, P. 1978. Pathologic changes induced in respiratory tract mucosa by polycyclic hydrocarbons differing carcinogenic activity. Am. J. Pathol. 93: 311-324.

Torronen, R., Nousiainen, U. and Hanninen, O. 1981. Induction of aldehyde dehydrogenase by polycyclic aromatic hydrocarbons in rats. Chem. Biol. Interact. 36: 33-44.

Torsvik, V., Ovreas, L. and Thingstad, T. F. 2002. Prokaryotic diversity-magnitude, dynamics and controlling factors. Science 296: 1064-1066.

Trower, M. K., Sariaslani, F. S. and Kitson, F. G. 1988. Xenobiotic oxidation by cytochrome P-450 enriched extracts of *Streptomyces griseus*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 157(3): 1417-1422.

U.S. EPA. Exposure Factors Handbook. 1997. U.S. Environmental Protection Agency. Washington.

Walter, U., Beyer, M., Klein, J. and Rehm, H. J. 1991. Degradation of pyrene by *Rhodococcus* sp. UW1. Appl. Microbiol. Biotechnol. 34: 671–676.

Wang, B. J., Lai, Q. L., Cui, Z. S., Tan, T. F. and Shao, Z. Z. 2008. A pyrene degrading consortium from deep-sea sediment of the West Pacific and its key member *Cycloclasticus* sp P1. Environ. Microbiol. 10:1948–1963.

Weissenfels, W. D., Beyer, M. and Klein, J. 1990. Degradation of phenanthrene, fluorene and fluoranthene by pure bacterial cultures. Appl. Microbiol. Biotechnol. 32: 479– 484.

Wilsey, B. and Stirling, G. 2007. Species richness and evenness respond in a different manner to propabule density in developing prairie microcosm communities. Plant Ecol.190: 259-273.

Vila, J., Lopez, Z., Sabate, J., Minguillon, C., Solanas, A. M. and Grifoll, M. 2001. Identification of a novel metabolite in the degradation of pyrene by

Mycobacterium sp. strain ap1: Actions of the isolate on two- and three-ring polycyclic aromatic hydrocarbons. Appl. Environ. Microbiol. 67: 5497-5505.

Vishnivetskaya, T. A. and Kathariou, S. 2005. Putative transposases conserved in *Exiguobacterium* isolates from ancient aiberian permafrost and from contemporary surface habitats. Appl. Environ. Microbiol. 71(11): 6954–6962.

Yang, Y., Chen, R. F. and Shiaris, M. P. 1994. Metabolism of naphthalene,fluorene,and phenanthrene: preliminary characterization of a cloned gene cluster from *Pseudomonas putida* NCIB9816. J. Bacteriol. 176: 2158-2164.

Yen, K. M. and Gunsalus, I. C. 1982. Plasmid gene organization naphthalene/salicylate oxidation. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 79: 874–878.

Yergeau, E., Arbour, M., Brousseau, R., Juck, D., Lawrenc, J. R., Masson, L., Whyte, L. G. and Greer, C. W. 2009. Microarray and real-time PCR analyses of the responses of high-arctic soil bacteria to hydrocarbon pollution and bioremediation treatments. Appl. Environ. Microbiol. 75: 6258–6267.

Yim, U. H., Hong, S. H. and Shim, W. J. 2007. Distribution and characteristics of PAHs in sediments from the marine environment of Korea. Chemosphere. 68: 85-92.

Zeng, J., Lin, X., Zhang, J. and Li, X. 2010. Isolation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs)- degrading *Mycobacterium* spp. and the degradation in soil. J. Hazard. Mater. 183(1-3): 718-23.

Zhang, H. B., Luo, Y. M., Wong, M. H., Zhao, Q. G. and Zhang, G. L. 2006. Distributions and concentrations of PAHs in Hong Kong Soils. Mar. Pollut. 141: 107-114.

Zhang, G. Y., Ling, J. Y., Sun, H. B., Luo, J., Fan, Y. Y. and Cui, Z. J. 2009. Isolation and characterization of newly isolated polycyclic aromatic hydrocarbons- degrading *Janibacter anophelis* strain JY11. J. Hazard. Mater. 172(2/3): 580–586

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

Zhou, N. Y., Al-Dulayymi, J., Baird, M. S. and Williama, P. A. 2002. Salicylate 5-hydroxylase from *Ralstonia* sp. strain U2: a monooxygenase with close

relationships to and shared electron transport proteins with naphthalene dioxygenase. J. Bacteriol. 184: 1547-1555.

Zhou, H. W., Guo, C. L., Wong, Y. S. and Tam, N. F. Y. 2006. Genetic diversity of dioxygenase genes in polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacteria isolated from mangrove sediments. FEMS Microbiol. Lett. 262: 148-157.

Zhou, L. S., Li, H., Zhang, Y., Wang, Y. F., Han, S. Q. and Xu, H. 2012. Abundance and diversity of *Sphingomonas* in Shenfu petroleum- wastewater irrigation zone, China. Environ. Sci. Poll. Res.19 (1): 282 294.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

สูตรและวิธีเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Nutrient Sea Water (NSW broth)

แอมโมเนียมไนเตรต (NH_4NO_3)	4	กรัม
ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4)	0.02	กรัม
สารสกัดจากยีสต์ (Yeast extract)	0.5	กรัม
เฟอริกซิเตรต ($FeC_6H_8O7•6H_2O$)	0.02	กรัม

ละลายสารในน้ำทะเลที่ผ่านการกรองด้วยเครื่องกรองสุญญากาศปริมาตร 200 มิลลิลิตร ยกเว้นเฟอริกซิเตรตที่ต้องทำให้ละลายด้วยไมโครเวฟก่อน จากนั้นจึงรวมสารละลายทั้งหมดเข้าด้วยกัน ปรับค่าความเป็นกรดด่างด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) เข้มข้น 5 โมลาร์ (ภาคผนวก ข) จนได้ค่า pH เท่ากับ 7.8 ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร และนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

อาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง Nutrient Sea Water (NSW Agar)

นำอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว NSW เติมแบคโตอะการ์ปริมาณ15 กรัมต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ 1,000 มิลลิลิตร ลงไปก่อนนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Marine medium (MB)

ชั่งอาหารเลี้ยงเชื้อสำเร็จรูป M medium จากบริษัท Difico ปริมาณ 37.4 กรัม ปรับค่าความเป็นกรดด่างด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) เข้มข้น 5 โมลาร์ (ภาคผนวก ข) จนได้ค่า pH เท่ากับ 7.8 และปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

อาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง Marine medium agar (MA)

นำอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MB เติมผงวุ้นปริมาณ15 กรัมต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ 1,000 มิลลิลิตร ลงไปก่อนนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

อาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง Marine medium agar (MA) **เจือจาง 4 เท่า**

นำอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MB ปริมาตร 250 มิลลิลิตร ผสมน้ำกลั่น 750 มิลลิลิตรเติมผงวุ้นปริมาณ15 กรัมต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ 1,000 มิลลิลิตร ลงไปก่อนนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Luria-Bertani (LB broth)

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

ละลายสารทั้งสามชนิดในน้ำกลั่น ปรับความเป็นกรดด่างด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) เข้มข้น 5 โมลาร์ (ภาคผนวก ข) จนกระทั่ง pH เท่ากับ 7 และปรับปริมาตรสุดท้าย 1,000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

อาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง Luria-Bertani (LB Agar) **เจือจาง 4 เท่า**

นำอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB ปริมาตร 250 มิลลิลิตร ผสมน้ำกลั่น 750 มิลลิลิตร และเติมผงวุ้นปริมาณ15 กรัม ต่ออาหาร 1,000 มิลลิลิตร ก่อนนำไปนึ่งฆ่าเชื้อนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Ψb (Ψb broth)

ผงสกัดจากยีสต์ (Yeast extract)	5	กรัม
ทริปโตน (Typtone)	20	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)	5	กรัม

ละลายสารทั้งสามชนิดในน้ำกลั่น ปรับความเป็นกรดด่างด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) เข้มข้น 5 โมลาร์ (ภาคผนวก ข) จนกระทั่ง pH เท่ากับ 7 และปรับปริมาตรสุดท้าย 1,000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

อาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง Ψb (Ψb Agar)

นำอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Ψb เติมละลายผงวุ้นปริมาณ15 กรัม ต่ออาหาร 1,000 มิลลิลิตร ก่อนนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ

อาหารเลี้ยงเชื้อ SOC

สารละลายส่วนที่ 1

ผงสกัดจากยีสต์ (Yeast extract)	5	กรัม
ทริปโตน (Typtone)	20	กรัม
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	0.58	กรัม
แมกนีเซียมคลอไรด์ ($MgCl_2$)	2	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)	2.46	กรัม
โพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl)	0.18	กรัม

ละลายสารทั้งหมดในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรสุดท้าย 980 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

สารละลายส่วนที่ 2

กลูโคส	3.6	กรัม
น้ำปลอดประจุ	20	มิลลิลิตร

กำจัดเชื้อด้วยการกรองสำเร็จรูปชนิดเซลลูโลสอะซีเทต (CA) ขนาดรูกรอง 0.22 ไมโครเมตร และผสมสารละลายทั้ง 2 ส่วนเข้าด้วยกัน เก็บรักษาที่ -20 องศาเซลเซียส

ภาคผนวก ข

สารเคมีที่ใช้ในห้องปฏิบัติการ

สารละลายฟีแนนทรีนในไดเมธิลฟอร์มาไมด์ ความเข้มข้น 10,000 มิลลิกรัมต่อลิตร

ฟีแนนทรีน	0.10	กรัม
ไดเมธิลฟอร์มาไมด์	10	มิลลิลิตร

ทำให้ปราศจากเชื้อด้วยการกรองผ่านชุดกรองสำเร็จรูปชนิด PTFE ขนาดรูกรอง 0.22 ไมโครเมตร

สารละลายไพรีนในไดเมธิลฟอร์มาไมด์ ความเข้มข้น 10,000 มิลลิกรัมต่อลิตร

ไพรีน	0.10	กรัม
ไดเมธิลฟอร์มาไมด์	10	มิลลิลิตร

ทำให้ปราศจากเชื้อด้วยการกรองผ่านชุดกรองสำเร็จรูปชนิด PTFE ขนาดรูกรอง 0.22 ไมโครเมตร

สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซค์ความเข้มข้น 1 นอร์มัล

โซเดียมไฮดรอกไซค์ (NaCl)	4	กรัม
เติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตรสุทธิ	100	มิลลิลิตร

สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซค์ความเข้มข้น 5 โมลาร์

โซเดียมไฮดรอกไซค์ (NaCl)	29.2	กรัม
เติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตรสุทธิ	100	มิลลิลิตร

สารละลายไฮโดรคลอริกเข้มข้นความเข้มข้น 1 นอร์มัล

กรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น (HCl) 12 นอร์มัล	8.33	มิลลิลิตร
เติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตรสุทธิ	100	มิลลิลิตร

70% เอทานอล

70% เอทานอล	700	มิลลิลิตร
น้ำปลอดประจุ	300	มิลลิลิตร

20% สารละลายโปรตีนเนสเค (Proteinase K)

โปรตีนเนสเค (Proteinase K)	20	มิลลิกรัม
น้ำปลอดประจุปลอดเชื้อ	1	มิลลิลิตร

สารละลาย Tris-HCl pH 8 เข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์

Trisma base ($C_4H_{11}NO_3$)	1.2	กรัม

ละลายในน้ำปลอดประจุปริมาตร 800 มิลลิลิตร จากนั้นปรับค่าความกรดด่างเป็น 8.0 ด้วย กรดไฮโดรคลอริก เติมน้ำปลอดประจุจนได้ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร นึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

บัฟเฟอร์ TE

Tris-HCl pH 8 เข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์	242	มิลลิลิตร
EDTA pH 8 เข้มข้น 0.1 มิลลิโมลาร์	0.2	มิลลิลิตร

ละลายในน้ำปลอดประจุให้ได้ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร นึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลาเซียส เป็นเวลา 15 นาที

สารละลาย CTAB/NaCl

โซเดียมไฮดรอกไซค์ (NaCl)	4.1	กรัม
CTAB	10	กรัม

ละลาย CTAB ในน้ำปลอดประจุที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส ปริมาตร 80 มิลลิลิตร จากนั้นเติมโซเดียมไฮดรอกไซค์ความเข้มข้น 0.7 โมลาร์ เมื่อละลายหมดจึงเติมน้ำปลอดประจุจนได้ปริมาตร 100 มิลลิลิตร และนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

สารละลายคลอโรฟอร์ม/ไอโซเอมิลแอลกฮอล์

สารละลายคลอโรฟอร์ม/ไอโซเอมิลแอลกฮอล์ในอัตราส่วน 24:1 โดยปริมาตรต่อปริมาตร เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

บัฟเฟอร์ TAE ความเข้มข้น 50 เท่า

Trisma base ($C_4H_{11}NO_3$)	242	กรัม
EDTA	18.6	กรัม

ละลายสารในน้ำปลอดประจุปริมาตร 500 มิลลิลิตร จากนั้นเติมสารละลายกรดอะซิติกเข้มข้น (Glacial CH_3COOH) ปริมาตร 57.1 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นปลอดประจุให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร และนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

บัฟเฟอร์ TAE ความเข้มข้น 1เท่า

บัฟเฟอร์ TAE ความเข้มข้น 50 เท่า	20	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	980	มิลลิลิตร

ผสมให้เข้ากัน เก็บรักษาในภาชนะสะอาด และมีฝาปิด

อะกาโรสเจลเข้มข้น 0.9%

อะกาโรสเจล	0.9	กรัม
บัฟเฟอร์ TAE ความเข้มข้น 1 เท่า	100	มิลลิลิตร

หลอมให้เข้ากันด้วยไมโครเวฟ

อะกาโรสเจลเข้มข้น 2%

อะกาโรสเจล	2	กรัม
บัฟเฟอร์ TAE ความเข้มข้น 1 เท่า	100	มิลลิลิตร

หลอมให้เข้ากันด้วยไมโครเวฟ

สารละลาย Tris-HCl pH 8 ความเข้มข้น 1 โมลาร์

Trisma base ($C_4H_{11}NO_3$)	121.1	กรัม

ละลายในน้ำปลอดประจุให้ได้ปริมาตร 800 มิลลิลิตร จากนั้นปรับค่าความเป็นกรด-ด่างให้เท่ากับ 8.0 ด้วยกรดไฮโดรคลอริก และเติมน้ำปลอดประจุให้ครบปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร นึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

20% โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต (Sodium dodecyl sulfate; SDS)

Sodium dodecyl sulfate	20	กรัม

นำมาละลายอย่างช้า ๆ ในน้ำปลอดประจุปริมาตร 80 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส จนกระทั่งสารละลายหมดจากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำปลอดประจุให้ครบ 100 มิลลิลิตร นึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

สารละลาย EDTA ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์

EDTA ($C_{10}H_{14}N_2O_8Na_2 \cdot 2H_2O$)	186.1	กรัม
โซเดียมไฮดรอกไซค์ (NaCl)	20	กรัม

นำ EDTA ละลายในน้ำปลอดประจุให้ได้ปริมาตร 800 มิลลิลิตร จากนั้นปรับค่าความเป็นกรด-ด่างให้เท่ากับ 8.0 ด้วยเกล็ดโซเดียมไฮดรอกไซค์ คนให้เข้ากัน รอให้เย็นแล้วเติมน้ำปลอดประจุให้ครบปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร นึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

สารละลายเอธิเดียมโบร์ไมด์ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

เอธิเดียมโบร์ไมด์	0.1	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	10	มิลลิลิตร

ละลายให้เข้ากันและเก็บในภาชนะปิดสนิทในที่มืด (ขณะที่เตรียมความสวมถุงมือป้องกันเนื่องจากเอธิเดียมโบร์ไมด์มีสมบัติในการก่อมะเร็ง)

สารละลายฟีนอล/คลอโรฟอร์ม

ดูดสารละลายฟีนอลและคลอโรฟอร์มในอัตราส่วน 25:25 โดยปริมาตรต่อปริมาตร ผสมให้เข้าโดยการกวนด้วยแท่งแม่เหล็กบนเครื่องกวนสารเคมีจนกระทั่งเกิดการแยกชั้นเก็บในภาชนะปิดสนิทและหุ้มด้วยอะลูมิเนียมฟอยล์ ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

สารปฏิชีวนะแอมพิซิลิน (Ampicillin)

แอมพิซิลิน	100	มิลลิกรัม
น้ำปลอดประจุ	100	มิลลิลิตร

ทำให้ปราศจากเชื้อด้วยการกรองผ่านชุดกรองสำเร็จรูปชนิดเซลลูโลสอะซีเทต (CA) ขนาดรูกรอง 0.22 ไมโครเมตร

สารละลาย X-gal ความเข้มข้น 2%

X-gal (5-Bromo-4-Chloro-3-indolyl-ß-D-galactoside)	20	มิลลิกรัม
ไดเมธิลฟอร์มาไมด์	1	มิลลิลิตร

ทำให้ปราศจากเชื้อด้วยการกรองผ่านชุดกรองสำเร็จรูปชนิด PTFE ขนาดรูกรอง 0.22 ไมโครเมตร

สารละลาย IPTG ความเข้มข้น 1โมลาร์

IPTG (Isopropyl thio-ß-D-galactoside)	238	มิลลิกรัม
น้ำปลอดประจุ	100	มิลลิลิตร

ทำให้ปราศจากเชื้อด้วยการกรองผ่านชุดกรองสำเร็จรูปชนิดเซลลูโลสอะซีเทต (CA) ขนาดรูกรอง 0.22 ไมโครเมตร

สารละลายTfbI

โพแทสเซียมอะซิเตต (CH_3COOK)	0.295	กรัม
รูบิเดียมคลอไรด์ (RbCl)	1.21	กรัม
แคลเซียมคลอไรด์2 น้ำ ($CaCl_2 \cdot 2H_2O$)	0.148	กรัม
แมกนีเซียมคลอไรด์ ($MgCl_2$)	0.99	กรัม
กลีเซอรอล	15	มิลลิลิตร

ละลายให้เข้ากันในน้ำกลั่นปริมาตร 70 มิลลิลิตร จากนั้นปรับค่าความเป็นกรด-ด่างให้เท่ากับ 5.8 ด้วยกรดอะซิติกเข้มข้น 0.2 โมล่าร์ และปรับปริมาตรสุดท้ายท้าย 100 มิลลิลิตร ทำให้ปราศจากเชื้อด้วยการกรองผ่านชุดกรองสำเร็จรูปชนิดเซลลูโลสอะซีเทต (CA) ขนาดรูกรอง 0.22 ไมโครเมตร

กรดอะซิติกเข้มข้น 0.2 โมล่าร์

นำสารละลายกรดอะซิติกเข้มข้นปริมาตร 1.26 มิลลิลิตร เติมลงไปในน้ำกลั่นปลอดประจุที่เตรียมไว้และปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นปลอดประจุจนครบ 100 มิลลิลิตร

สารละลาย TfbII

2-[*N*-morpholino] ethanesulfonic acid (MES)	0.29	กรัม
รูบิเดียมคลอไรด์ (RbCl)	0.121	กรัม
แคลเซียมคลอไรด์2 น้ำ ($CaCl_2 \cdot 2H_2O$)	1.103	กรัม
กลีเซอรอล	15	มิลลิลิตร

ปรับปริมาตรสุดท้ายท้าย 100 มิลลิลิตร ทำให้ปราศจากเชื้อด้วยการกรองผ่านชุดกรองสำเร็จรูปชนิดเซลลูโลสอะซีเทต (CA) ขนาดรูกรอง 0.22 ไมโครเมตร

สารละลายไลโซไซม์ (Lysozyme)

ไลโซไซม์ (Lysozyme)	60	มิลลิกรัม
บัฟเฟอร์ TE	1	มิลลิกรัม

10% แอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต (Ammonium persulfate; APS)

แอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต	0.1	กรัม
น้ำปลอดประจุปลอดเชื้อ	1	มิลลิลิตร

สารละลายยูเรียความเข้มข้น 7 โมลาร์

ยูเรีย	42.042	กรัม
น้ำปลอดประจุปลอดเชื้อ	100	มิลลิลิตร

สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์ DGGE

80% สารละลาย denaturant ใน 8% อะคลิราไมด์เจล

น้ำปลอดประจุปลอดเชื้อ	3.5	มิลลิลิตร
40% อะคลิราไมด์/บิส (อัตราส่วน 37:1)	3.38	มิลลิลิตร
บัฟเฟอร์ TAE ความเข้มข้น 50 เท่า	300	ไมโครลิตร
ฟอร์มาไมด์ (Formamide)	4.8	มิลลิลิตร
ยูเรีย (Urea)	4.9	มิลลิลิตร
กลีเซอรอล (Glycerol)	300	ไมโครลิตร
10% แอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต	150	ไมโครลิตร
TEMED	5	ไมโครลิตร

40% สารละลาย denaturant ใน 8% อะคลิราไมด์เจล

น้ำปลอดประจุปลอดเชื้อ	7.5	มิลลิลิตร
40% อะคลิราไมด์/บิส (อัตราส่วน 37:1)	3.22	มิลลิลิตร
บัฟเฟอร์ TAE ความเข้มข้น 50 เท่า	300	ไมโครลิตร
ฟอร์มาไมด์ (Formamide)	2.4	มิลลิลิตร
ยูเรีย (Urea)	2.5	มิลลิลิตร
กลีเซอรอล (Glycerol)	300	ไมโครลิตร
10% แอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต	150	ไมโครลิตร
TEMED	5	ไมโครลิตร

สารละลาย INT dye

INT dye (Iodonitrotetrazolium violet)	3	กรัม
ไดเมธิลซัลฟอกไซด์ (DMSO)	1,000	มิลลิลิตร

สารละลายนิสเตติน

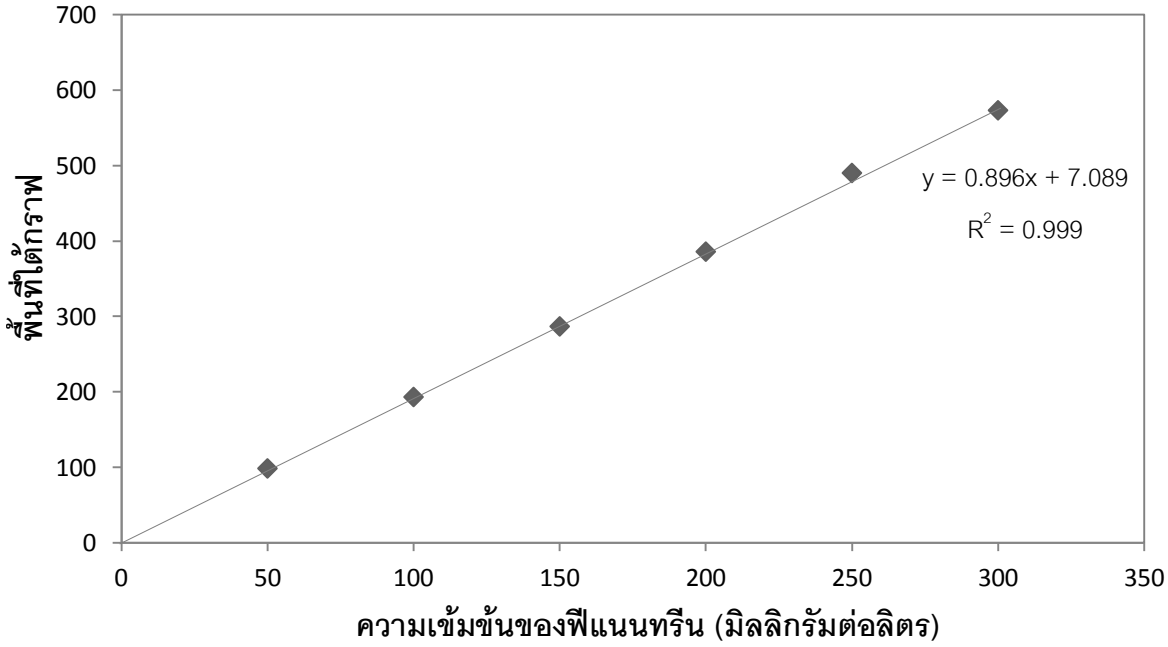
นิสเตติน	40	มิลลิกรัม
ไดเมธิลซัลฟอกไซด์ (DMSO)	1	มิลลิลิตร

80% สารละลาย Triton X-100

ละลาย Triton X-100 ปริมาตร 15 มิลลิลิตร ในน้ำกลั่นปริมาตร 85 มิลลิลิตร ผสมจน Triton X-100 ละลายเป็นเนื้อเดียว

ภาคผนวก ค

กราฟมาตรฐานในการวิเคราะห์ปริมาณ PAHs



รูปที่ ค. 1 กราฟมาตรฐานความเข้มข้นของฟีแนทรีน

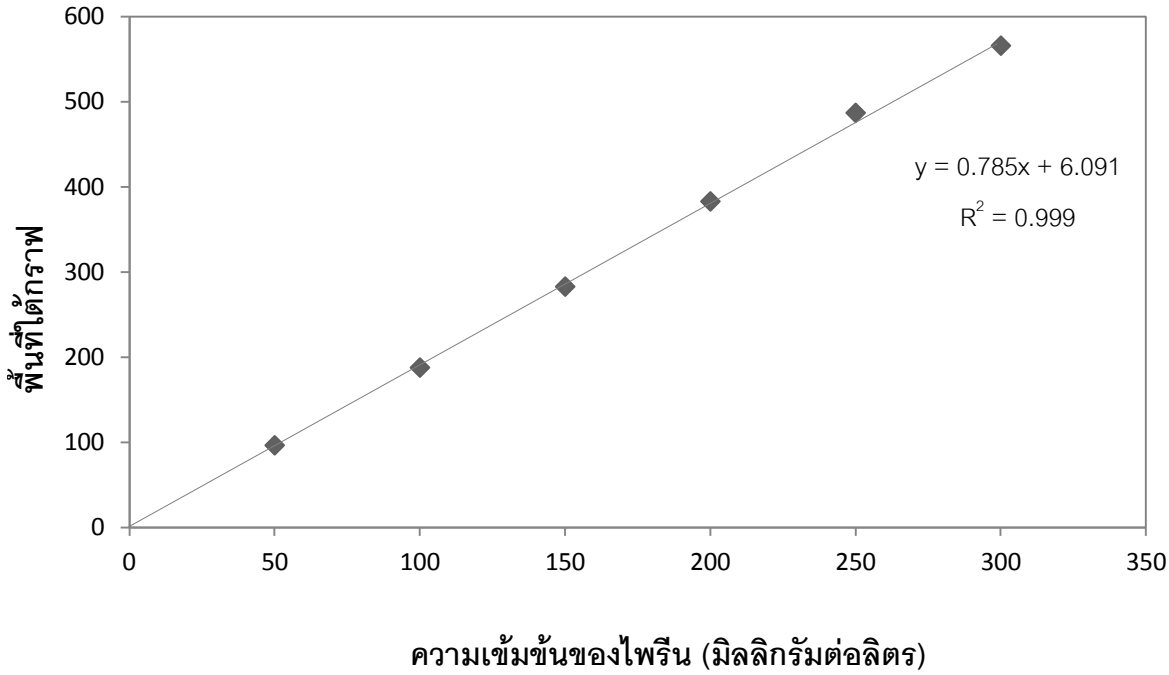
ความเข้มข้นของฟีแนนทรีนคำนวณได้จากนำพื้นที่ใต้กราฟที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยเครื่องแก๊สโครมาโทรกราฟี มาแทนในค่าสมการเส้นตรงดังนี้

พื้นที่ใต้กราฟ = (ค่าความชันของกราฟมาตรฐาน x ปริมาณฟีแนนทรีน) – จุดตัดแกน y

ความชันของกราฟมาตรฐาน = 0.896

จุดตัดแกน y = 7.089

% Recovery ของฟีแนนทรีนคำนวณได้จากเปอร์เซ็นต์ของพื้นที่ใต้กราฟของฟีแนนทรีนในตัวอย่างต่อพื้นที่ใต้ของฟีแนนทรีนในกราฟมาตรฐาน ที่ Retention time เดียวกัน (Retention time ของฟีแนนทรีน = 11.08)



รูปที่ ค.2 กราฟมาตรฐานความเข้มข้นของไพรีน

ความเข้มข้นของไพรีนคำนวณได้จากนำพื้นที่ใต้กราฟที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยเครื่องแก๊สโครมาโทรกราฟี มาแทนในค่าสมการเส้นตรงดังนี้

พื้นที่ใต้กราฟ = (ค่าความชันของกราฟมาตรฐาน x ปริมาณไพรีน) – จุดตัดแกน y

ความชันของกราฟมาตรฐาน = 0.785

จุดตัดแกน y = 6.091

% Recovery ของไพรีนคำนวณได้จากเปอร์เซ็นต์ของพื้นที่ใต้กราฟของไพรีนในตัวอย่างต่อพื้นที่ใต้ของไพรีนในกราฟมาตรฐาน ที่ Retention time เดียวกัน (Retention time ของไพรีน = 17.01)

ภาคผนวก ง

ข้อมูลดิบ

ตารางที่ ง. 1 จำนวนแบคทีเรียทั้งหมดและแบคทีเรียย่อยสลายฟีแนนทรีน หรือไพรีนในตัวอย่างดิน

ตัวอย่างดิน	Log MPN/กรัมดินแห้ง		
	จำนวนแบคทีเรียทั้งหมด	จำนวนแบคทีเรียย่อยสลายฟีแนนทรีน*	จำนวนแบคทีเรียย่อยสลายไพรีน*
A	7.38 ± 0.00	4.75 ± 0.19 [a]	2.58 ± 0.18 [bc]
B	7.57 ± 0.16	4.88 ± 0.00 [a]	2.27 ± 0.08 [cd]
C	7.47 ± 0.16	3.48 ± 0.00 [b]	2.36 ± 0.16 [cd]
D	7.38 ± 0.00	4.97 ± 0.00 [a]	4.38 ± 0.00 [a]
E	7.54 ± 0.16	4.75 ± 0.10 [a]	2.37 ± 0.01 [cd]
F	7.47 ± 0.16	3.50 ± 0.05 [b]	2.13 ± 0.15 [d]
G	7.41 ± 0.07	3.40 ± 0.06 [b]	2.36 ± 0.00 [cd]
H	7.18 ± 0.00	3.63 ± 0.13 [b]	2.53 ± 0.05 [bc]
I	7.36 ± 0.16	3.53 ± 0.05 [b]	2.40 ± 0.07 [cd]
J	7.93 ± 0.27	4.40 ± 0.06 [a]	2.83 ± 0.17 [b]

ตารางที่ ง. 2 จำนวนแบคทีเรียทั้งหมดและแบคทีเรียย่อยสลายฟีแนนทรีน หรือไพรีนในตัวอย่างน้ำทะเล

ตัวอย่างน้ำทะเล	Log MPN/มิลลิลิตรน้ำทะเล		
	จำนวนแบคทีเรียทั้งหมด	จำนวนแบคทีเรียย่อยสลายฟีแนนทรีน*	จำนวนแบคทีเรียย่อยสลายไพรีน
W1	6.13 ± 0.15	3.50 ± 0.05 [b]	2.58 ± 0.18
W2	6.59 ± 0.25	4.30 ± 0.00 [a]	3.50 ± 0.05
W3	6.32 ± 0.00	3.48 ± 0.00 [b]	2.56 ± 0.00
W4	6.36± 0.00	3.53 ± 0.05 [b]	2.47 ± 0.02

หมายเหตุ

(*) แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.01$)

[a, b] แสดง subset ของกลุ่มตัวอย่างเมื่อใช้วิธี Tukey HSD test ($p < 0.01$)

ตารางที่ ง. 3 จำนวนแบคทีเรียทั้งหมดและแบคทีเรียย่อยสลายฟีแนนทรีน หรือไพรีนในตัวอย่างดิน ตะกอน

ตัวอย่างดิน ตะกอน	Log MPN/กรัมดินแห้ง		
	จำนวนแบคทีเรียทั้งหมด*	จำนวนแบคทีเรียย่อยสลายฟีแนนทรีน*	จำนวนแบคทีเรียย่อยสลายไพรีน*
B1	8.75 ± 0.37 abc	5.86 ± 0.09 a	3.18 ± 0.00 f
B2	8.26 ± 0.07 cd	4.56± 0.00 a	3.46 ± 0.02 def
B3	8.27 ± 0.08 cd	4.50 ± 0.04 b	3.47 ± 0.02 cdef
B5	8.86 ± 0.19 ab	5.88 ± 0.08 a	4.38 ± 0.00 b
B6	8.75 ± 0.19 abc	4.50 ± 0.05 a	3.36 ± 0.00 ed
B7	8.54 ± 0.16 bc	4.52 ± 0.05 b	3.97 ± 0.26 bc
B9	8.45 ± 0.16 bcd	5.85 ± 0.04 b	3.48 ± 0.04 cdef
B10	8.36 ± 0.00 c	4.58 ± 0.18 b	3.53 ± 0.16 cdef
B11	8.59 ± 0.25 bc	4.48 ± 0.00 b	3.41 ± 0.07 def
1	8.10 ± 0.23 d	4.58 ± 0.18 b	3.32 ± 0.00 ef
2	8.18 ± 0.00 cd	5.85 ± 0.04 a	3.86 ± 0.19 bc
3	8.48 ± 0.26 bcd	5.86 ± 0.00 a	3.50 ± 0.05 cdef
4	8.86 ± 0.19 ab	5.85 ± 0.04 a	3.50 ± 0.05 cdef
5	8.97 ± 0.00 a	5.83 ± 0.17 a	3.75 ± 0.19 bcde
6	8.79 ± 0.14 abc	5.97 ± 0.00 a	5.54 ± 0.16 a
7	8.23 ± 0.23 cd	5.88 ± 0.08 a	3.56 ± 0.00 cdef
8	8.07 ± 0.18 d	4.58 ± 0.18 b	3.79 ± 0.14 bcd
9	8.75 ± 0.19 abc	5.83 ± 0.17 a	3.45 ± 0.16 cdef
10	8.97 ± 0.00 a	4.48 ± 0.00 b	3.41 ± 0.07 def
11	8.22 ± 0.08 cd	4.56 ± 0.00 b	3.26 ± 0.07 ef

หมายเหตุ

(*) แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.01$)

$^{a, b, c, d, e, f}$ แสดง subset ของกลุ่มตัวอย่างเมื่อใช้วิธี Tukey HSD test ($p < 0.01$)

ภาคผนวก จ

ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีน 16S rDNA ของแบคทีเรียสายพันธุ์บริสุทธิ์ และรีคอมบิแนนท์โคลนจาก PCR-DGGE

ตารางที่ จ.1 ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rDNA ของสายพันธุ์ TA-101 (1,434 bp) กับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล GenBank (BLASTn)

	สายพันธุ์แบคทีเรีย	Accession no.	Sequencing identity (%)	เอกสารอ้างอิง
1	*Oceanimonas smirnovii* สายพันธุ์ SS2	GU980766.1	1429/1434 (99%)	Ikram และคณะ 2010
2	*Oceanimonas smirnovii* สายพันธุ์ 31-13	NR_042963.1	1410/1435 (98%)	Ivanova และคณะ 2005
3	*Oceanimonas* sp. สายพันธุ์ RS231(2010)	GU968467.1	1384/1394 (99%)	Siddikee และคณะ 2010
4	*Oceanimonas* sp. สายพันธุ์ G2DM-26	DQ416806.1	1409/1434 (98%)	Desai และคณะ 2008
5	*Oceanimonas doudoroffii* สายพันธุ์ NBRC 103032	AB681912.1	1405/1433 (98%)	Nakagawa และคณะ 2011
6	*Pseudomonas doudoroffii*	AF094724.1	1402/1432 (98%)	Galdzicka และคณะ 1998

ตารางที่ จ. 2 ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rDNA ของสายพันธุ์ TB-101 (1,294 bp) กับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล GenBank (BLASTn)

	สายพันธุ์แบคทีเรีย	Accession no.	Sequencing identity (%)	เอกสารอ้างอิง
1	*Brucella* sp. สายพันธุ์ QQDP515	FJ555566.1	1293/1294 (99%)	Qiu และ Li 2008
2	*Brucella* sp. สายพันธุ์ GXY-1	EF514908.1	1293/1294 (99%)	Guan และคณะ 2007
3	*Brucella melitensis* สายพันธุ์ AUH2	EF187230.1	1293/1294 (99%)	Rajamanickam และคณะ 2006
4	*Brucella melitensis* สายพันธุ์ ASU-026	KC342250.1	1292/1294 (99%)	Hesham และคณะ 2012
5	*Ochrobactrum* sp. สายพันธุ์ DM1	DQ437526.1	1292/1294 (99%)	Thacker และคณะ 2007
6	*Brucella* sp. สายพันธุ์ CGL-1	DQ305288.1	1291/1294 (99%)	Ma 2005

ตารางที่ จ. 3 ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rDNA ของสายพันธุ์ TD-101 (1,436 bp) กับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล GenBank (BLASTn)

	สายพันธุ์แบคทีเรีย	Accession no.	Sequencing identity (%)	เอกสารอ้างอิง
1	*Gordonia* sp. สายพันธุ์ HEXBA05	JQ658424.1	1367/1385 (99%)	Angelim และ Melo 2012
2	*Gordonia* sp. สายพันธุ์ PETBA16	JQ658420.1	1367/1385 (99%)	Angelim และ Melo 2012
3	*Gordonia* sp. สายพันธุ์ PETBA15	JQ658419.1	1367/1385 (99%)	Angelim และ Melo 2012
4	*Gordonia* sp. สายพันธุ์ QUEBA05	JQ658402.1	1367/1385 (99%)	Angelim และ Melo 2012
5	*Gordonia bronchialis* สายพันธุ์ IFM 0974	FJ536302.1	1356/1369 (99%)	Aoyama และคณะ 2009
6	*Gordonia bronchialis* สายพันธุ์ IFM 0832	FJ536298.1	1356/1369 (99%)	Aoyama และคณะ 2009

ตารางที่ จ.4 ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rDNA ของสายพันธุ์ TE-101 (1,365 bp) กับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล GenBank (BLASTn)

	สายพันธุ์แบคทีเรีย	Accession no.	Sequencing identity (%)	เอกสารอ้างอิง
1	*Ochrobactrum* sp. สายพันธุ์ CH10	HQ619225.1	1365/1368 (99%)	Chen และ Wei 2010
2	*Ochrobactrum anthropi* สายพันธุ์ NMRL PED2	HQ596561.1	1365/1368 (99%)	Deshmukh และคณะ (ไม่ตีพิมพ์)
3	*Ochrobactrum* sp. สายพันธุ์ B2 BBTR46	DQ337583.1	1365/1368 (99%)	Maxwell และคณะ 2005
4	*Ochrobactrum anthropi*	AB490238.1	1365/1368 (99%)	Doi และคณะ 2005
5	*Ochrobactrum* sp. สายพันธุ์ CTN-11	FJ032012.1	1365/1368 (99%)	Liang และคณะ 2010
6	*Ochrobactrum anthropi* สายพันธุ์ SRK5	EU826071.1	1365/1368 (99%)	Sivaramakrishnan และคณะ 2008

ตารางที่ จ. 5 ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rDNA ของสายพันธุ์ TJ-101 (1,385 bp) กับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล GenBank (BLASTn)

	สายพันธุ์แบคทีเรีย	Accession no.	Sequencing identity (%)	เอกสารอ้างอิง
1	*Microbacterium* sp. สายพันธุ์ DB-10	JF734334.1	1384/1385 (99%)	Borzenkov 2011
2	*Microbacterium* sp. สายพันธุ์ Z5	HM171926.1	1384/1385 (99%)	Sadhu และคณะ 2010
3	*Microbacterium* sp. สายพันธุ์ 2134	JX566572.1	1383/1385 (99%)	Huang 2012
4	*Microbacterium* sp. สายพันธุ์ ADAT-G	JF834172.1	1383/1385 (99%)	Ghosal และคณะ 2011
5	*Microbacterium* sp. สายพันธุ์ 0710P1-6	HM222669.1	1383/1385 (99%)	Luo และคณะ 2010
6	*Microbacterium paraoxydans* สายพันธุ์ M-BtII-3	FJ828878.2	1383/1385 (99%)	Hung และคณะ 2009

ตารางที่ จ.6 ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rDNA ของสายพันธุ์ TW2-101 (1,356 bp) กับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล GenBank (BLASTn)

	สายพันธุ์แบคทีเรีย	Accession no.	Sequencing identity (%)	เอกสารอ้างอิง
1	*Pseudomonas stutzeri* สายพันธุ์ H3	JF727659.1	1354/1359 (99%)	Wang และคณะ 2011
2	*Pseudomonas* sp. สายพันธุ์ ZN-1-L	JX867253.1	1353/1358 (99%)	Chen 2012
3	*Pseudomonas stutzeri* สายพันธุ์ DQ-1	KC460328.1	1352/1358 (99%)	Huang และคณะ 2013
4	*Pseudomonas* sp. สายพันธุ์ DSMZ141-No.4	AB733584.1	1353/1359 (99%)	Ueno และ Shimizu 2012
5	*Pseudomonas* sp. สายพันธุ์ DSMZ141-No.615-4	AB733406.1	1353/1359 (99%)	Ueno และ Shimizu 2012
6	*Pseudomonas* sp. สายพันธุ์ NBRC 100991	AB681326.1	1353/1359 (99%)	Nakagawa และคณะ 2011 (ไม่ตีพิมพ์)

ตารางที่ จ. 7 ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rDNA ของสายพันธุ์ TB1-104 (1,451 bp) กับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล GenBank (BLASTn)

	สายพันธุ์แบคทีเรีย	Accession no.	Sequencing identity (%)	เอกสารอ้างอิง
1	*Marinobacter* sp. สายพันธุ์ SBS	AF482686.1	1444/1451 (99%)	Achenbach 2002
2	*Marinobacter* sp. สายพันธุ์ NBRC 101712	AB681537.1	1420/1444 (98%)	Nakagawa และคณะ 2011
3	*Marinobacter* sp. สายพันธุ์ CF6-10	FJ170004.1	1424/1451 (98%)	Zhou และคณะ 2009
4	*Marinobacter* sp. สายพันธุ์ EM494	GU223375.1	1422/1451 (98%)	Hwang และคณะ 2009
5	*Marinobacter* sp. สายพันธุ์ SI50	AB712345.1	1421/1449 (98%)	Romanenko และคณะ 2012
6	*Marinobacter guineae*	AM503092.1	1417/1444 (98%)	Hoste 2007

ตารางที่ จ. 8 ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rDNA ของสายพันธุ์ TB5-102 (1,362 bp) กับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล GenBank (BLASTn)

	สายพันธุ์แบคทีเรีย	Accession no.	Sequencing identity (%)	เอกสารอ้างอิง
1	*Pseudomonas* sp. สายพันธุ์ ZN-1-L	JX867253.1	1350/1362 (99%)	Chen 2012
2	*Pseudomonas stutzeri* สายพันธุ์ DQ-1	KC460328.1	1349/1362 (99%)	Huang และคณะ 2013
3	*Pseudomonas stutzeri* สายพันธุ์ B10v	JN228290.1	1349/1362 (99%)	Jutkina และ Heinaru 2011
4	*Pseudomonas stutzeri* สายพันธุ์ H3	JF727659.1	1349/1362 (99%)	Wang และคณะ 2011
5	*Pseudomonas* sp. สายพันธุ์ 2H105	JF411495.1	1349/1362 (99%)	Chiu และคณะ 2012
6	*Pseudomonas stutzeri* สายพันธุ์ RCH2	CP003071.1	1349/1362 (99%)	Lucas และคณะ 2011

ตารางที่ จ. 9 ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rDNA ของสายพันธุ์ TB9-105 (1,450 bp) กับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล GenBank (BLASTn)

	สายพันธุ์แบคทีเรีย	Accession no.	Sequencing identity (%)	เอกสารอ้างอิง
1	*Pseudomonas putida* สายพันธุ์ C-G-PDA3	HM755498.1	1444/1447 (99%)	Kim และคณะ 2010
2	*Pseudomonas putida* สายพันธุ์ KT2440	NR_074596.1	1445/1449 (99%)	Nelson และคณะ 2002
3	*Pseudomonas putida* สายพันธุ์ HB3267	CP003738.1	1445/1449 (99%)	Duque และคณะ 2012
4	*Pseudomonas putida* สายพันธุ์ 1106	AB513735.1	1445/1449 (99%)	Saimmai และคณะ 2012
5	*Pseudomonas putida* สายพันธุ์ C-G-TSA5	HM755529.1	1443/1446 (99%)	Kim และคณะ 2010
6	*Pseudomonas putida* สายพันธุ์ BIRD-1	CP002290.1	1445/1449 (99%)	Matilla และคณะ 2011

ตารางที่ จ.10 ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rDNA ของสายพันธุ์ T2-109 (1,366 bp) กับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล GenBank (BLASTn)

	สายพันธุ์แบคทีเรีย	Accession no.	Sequencing identity (%)	เอกสารอ้างอิง
1	*Pseudomonas* sp. สายพันธุ์ YY-23	JX575608.1	1351/1366 (99%)	Yu และ Yang 2012
2	*Pseudomonas* sp. สายพันธุ์ DSMZ141-No.1-1	AB733403.1	1351/1366 (99%)	Ueno และคณะ 2012
3	*Pseudomonas stutzeri* สายพันธุ์ 2Aphe5	JX177729.1	1351/1366 (99%)	Vedler และคณะ 2012
4	*Pseudomonas stutzeri* สายพันธุ์ 2A33	JX177724.1	1351/1366 (99%)	Vedler และคณะ 2012
5	*Pseudomonas stutzeri* สายพันธุ์ 2A38	JX177716.1	1351/1366 (99%)	Vedler และคณะ 2012
6	*Pseudomonas stutzeri* สายพันธุ์ 2Aben1	JX177709.1	1351/1366 (99%)	Vedler และคณะ 2012

ตารางที่ จ. 11 ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rDNA ของสายพันธุ์ T3-102 (1,460 bp) กับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล GenBank (BLASTn)

	สายพันธุ์แบคทีเรีย	Accession no.	Sequencing identity (%)	เอกสารอ้างอิง
1	*Pseudomonas* sp. สายพันธุ์ sampath10	HM749063.1	1456/1460 (99%)	Kamalakannan และคณะ 2010
2	*Pseudomonas stutzeri* สายพันธุ์ 13636J	EU741092.1	1456/1460 (99%)	Solano และคณะ 2008
3	*Pseudomonas stutzeri* สายพันธุ์ 13632C	EU741072.1	1456/1460 (99%)	Solano และคณะ 2008
4	*Pseudomonas* sp. สายพันธุ์ VI-71	FN377741.1	1456/1460 (99%)	Srinivas และคณะ 2009
5	*Pseudomonas stutzeri* สายพันธุ์ A1501	CP000304.1	1456/1460 (99%)	Yan และคณะ 2008
6	*Pseudomonas* sp. สายพันธุ์ R-25343	AM084028.1	1456/1460 (99%)	Heylen และคณะ 2006

ตารางที่ จ.12 ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rDNA ของสายพันธุ์ T4-101 (1,370 bp) กับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล GenBank (BLASTn)

	สายพันธุ์แบคทีเรีย	Accession no.	Sequencing identity (%)	เอกสารอ้างอิง
1	*Thalassospira* sp. สายพันธุ์ 2PR54-3	EU440969.1	1359/1370 (99%)	Yuan และคณะ 2008
2	*Thalassospira* sp. สายพันธุ์ MCCC 1A02031	EU440814.1	1359/1370 (99%)	Yuan และคณะ 2008
3	*Thalassospira* sp. สายพันธุ์ MCCC 1A02030	EU440813.1	1359/1370 (99%)	Yuan และคณะ 2008
4	*Thalassospira profundimaris* สายพันธุ์ mj01-PW1OH20	HQ425693.2	1358/1370 (99%)	Guangyu และคณะ 2010
5	*Thalassospira* sp. สายพันธุ์ ZUMI 95	AB548215.1	1358/1370 (99%)	Yoshizumi และ Miyazaki 2010
6	*Thalassospira xianhensis* สายพันธุ์ P-4	EU017546.1	1358/1370 (99%)	Zhao และ Wang 2007

ตารางที่ จ.13 ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rDNA ของสายพันธุ์ T5-101 (1,359 bp) กับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล GenBank (BLASTn)

	สายพันธุ์แบคทีเรีย	Accession no.	Sequencing identity (%)	เอกสารอ้างอิง
1	*Pseudomonas* sp. สายพันธุ์ TM6	KC294112.1	1351/1359 (99%)	Shi และคณะ 2012
2	*Pseudomonas* sp. สายพันธุ์ TF12	KC294103.1	1351/1359 (99%)	Shi และคณะ 2012
3	*Pseudomonas* sp. สายพันธุ์ TF7	KC294098.1	1351/1359 (99%)	Shi และคณะ 2012
4	*Pseudomonas* sp. สายพันธุ์ TF5	KC294096.1	1351/1359 (99%)	Shi และคณะ 2012
5	*Pseudomonas* sp. สายพันธุ์ YY-23	JX575608.1	1351/1359 (99%)	Yu และ Yang 2012
6	*Pseudomonas* sp. สายพันธุ์ DSMZ141-No.1-1	AB733403.1	1351/1359 (99%)	Ueno และ Shimizu 2012

ตารางที่ จ.14 ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rDNA ของสายพันธุ์ T6-101 (1,412 bp) กับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล GenBank (BLASTn)

	สายพันธุ์แบคทีเรีย	Accession no.	Sequencing identity (%)	เอกสารอ้างอิง
1	*Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ 2MPII	U90216.1	1411/1412 (99%)	Ying และคณะ 2005
2	*Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ F10(2008)	EU697082.1	1409/1412 (99%)	Liu และคณะ 2008
3	*Erythrobacter* sp. สายพันธุ์ MEBiC05008	EU581704.1	1400/1402 (99%)	Yang และคณะ 2008
4	Sphingopyxis sp. สายพันธุ์ 2PR58-1	EU440980.1	1380/1416 (97%)	Yang และคณะ 2008
5	*Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ E4A9	NR_044320.1	1380/1416 (97%)	Xu และ Wu 2011
6	*Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ NBRC 101086	AB681370.1	1374/1410 (97%)	Nakagawa และคณะ 2011

ตารางที่ จ. 15 ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rDNA ของสายพันธุ์ T6-102 (1,413 bp) กับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล GenBank (BLASTn)

	สายพันธุ์แบคทีเรีย	Accession no.	Sequencing identity (%)	เอกสารอ้างอิง
1	*Pseudomonas* sp. สายพันธุ์ hyss58	FJ613311.1	1406/1421 (99%)	Yu และคณะ 2009
2	*Pseudomonas* sp. สายพันธุ์ 53	FJ607427.1	1406/1421 (99%)	Qin และคณะ 2009
3	*Pseudomonas* sp. สายพันธุ์ CF14-10	FJ170038.1	1406/1421 (99%)	Zhang และคณะ 2008
4	*Pseudomonas* sp. สายพันธุ์ MG-1	DQ981492.2	1406/1421 (99%)	Li และคณะ 2008
5	*Pseudomonas stutzeri* สายพันธุ์ aa-28	EU652047.1	1406/1421 (99%)	Chen และ Yang 2008
6	*Pseudomonas* sp. สายพันธุ์ B12	EF599310.1	1406/1421 (99%)	Pacheco-Aguilar และคณะ 2007

ตารางที่ จ. 16 ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rDNA ของสายพันธุ์ T7-101 (1,418 bp) กับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล GenBank (BLASTn)

	สายพันธุ์แบคทีเรีย	Accession no.	Sequencing identity (%)	เอกสารอ้างอิง
1	*Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ F10 (2008)	EU697082.1	1413/1418 (99%)	Liu และคณะ 2008
2	*Erythrobacter* sp. สายพันธุ์ MEBiC05008	EU581704.1	1404/1408 (99%)	Yang และคณะ 2008
3	*Sphingopyxis* sp. สายพันธุ์ 2PR58-1	EU440980.1	1384/1422 (97%)	Yuan และคณะ 2008
4	*Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ E4A9 strain E4A9	NR_044320.1	1384/1422 (97%)	Xu และ Wu 2011
5	*Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ NBRC 101086	AB681370.1	1378/1416 (97%)	Nakagawa และคณะ 2011
6	*Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ MBIC1549	AB017110.1	1371/1409 (97%)	Hamada 1998

ตารางที่ จ. 17 ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rDNA ของสายพันธุ์ T9-101 (1,326 bp) กับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล GenBank (BLASTn)

	สายพันธุ์แบคทีเรีย	Accession no.	Sequencing identity (%)	เอกสารอ้างอิง
1	*Halomonas* sp. สายพันธุ์ BJGMM-B60	JQ716255.1	1295/1327 (98%)	Jia และคณะ 2012
2	*Halomonas* sp. สายพันธุ์ BJGMM-B47	JQ716247.1	1295/1327 (98%)	Jia และคณะ 2012
3	*Halomonas cupida* สายพันธุ์ DSM 4740	FN257742.1	1296/1328 (98%)	De la Haba และคณะ 2010
4	*Halomonas* sp. สายพันธุ์ BJGMM-B48	JQ716248.1	1294/1327 (98%)	Jia และคณะ 2012
5	*Halomonas* sp. สายพันธุ์ CR35	EU088257.1	1294/1327 (98%)	Antony และคณะ 2011
6	*Halomonas* sp. สายพันธุ์ 12g	AJ488178.2	1294/1327 (98%)	Loka Bharathi 2002

ตารางที่ จ. 18 ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rDNA ของสายพันธุ์ TD-204 (1,414 bp) กับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล GenBank (BLASTn)

	สายพันธุ์แบคทีเรีย	Accession no.	Sequencing identity (%)	เอกสารอ้างอิง
1	*Janibacter* sp. สายพันธุ์ SS10.9	KC160705.1	1407/1414 (99%)	Zhou และคณะ 2012
2	*Janibacter* sp. สายพันธุ์ 26	JF905614.1	1407/1414 (99%)	Lee และคณะ 2012
3	*Janibacter* sp. สายพันธุ์ 0711C1-5	HM222671.1	1407/1414 (99%)	Luo และคณะ 2010
4	*Janibacter melonis* สายพันธุ์ CM2110	AY522569.1	1401/1405 (99%)	Yoon 2004
5	*Janibacter* sp. สายพันธุ์ BSi20546	EU330340.1	1406/1414 (99%)	Yu และคณะ 2009
6	*Janibacter* sp. สายพันธุ์ Ho-13	AB166880.1	1406/1414 (99%)	Im และ Lee 2004

ตารางที่ จ. 19 ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rDNA ของสายพันธุ์ TB1-218 (1,364 bp) กับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล GenBank (BLASTn)

	สายพันธุ์แบคทีเรีย	Accession no.	Sequencing identity (%)	เอกสารอ้างอิง
1	*Aeromonas salmonicida* สายพันธุ์ DP2	GU596990.1	1336/1364 (98%)	Dubey และ Pandey 2010
2	*Marinomonas* sp. สายพันธุ์ H1594	JF346673.1	1338/1367 (98%)	Harshvardhan และ Jha 2011
3	*Marinomonas* sp. สายพันธุ์ D6084	DQ480145.1	1338/1367 (98%)	Zhou และ Li 2006
4	*Oceanimonas* sp. สายพันธุ์ 33	DQ386136.1	1338/1369 (98%)	Cai และ Zhou 2006
5	*Marinomonas* sp. สายพันธุ์ H1575	JF346674.1	1336/1367 (98%)	Harshvardhan และ Jha 2011
6	*Marinomonas* sp. สายพันธุ์ PSW3	KC109734.1	1332/1362 (98%)	Rajalaxmi และ Karutha Pandian 2012

ตารางที่ จ. 20 ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rDNA ของสายพันธุ์ T6-212 (1,416 bp) กับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล GenBank (BLASTn)

	สายพันธุ์แบคทีเรีย	Accession no.	Sequencing identity (%)	เอกสารอ้างอิง
1	*Marinobacter bacchus* สายพันธุ์ FB3	DQ282120.1	1412/1415 (99%)	Liebgott และคณะ 2005
2	*Marinobacter vinifirmus* สายพันธุ์ FB1	NR_043666.1	1412/1415 (99%)	Liebgott และคณะ 2006
3	*Marinobacter* sp. สายพันธุ์ ws22	AJ704789.1	1412/1415 (99%)	Xu และคณะ 2005
4	*Marinobacter* sp. สายพันธุ์ RHS-str.301	HE586880.1	1405/1405 (100%)	Ciobanu และคณะ 2012
5	*Marinobacter* sp. สายพันธุ์ CpA_a7	FN397897.1	1408/1410 (99%)	Sas 2009
6	*Marinobacter* sp. สายพันธุ์ RHS-str.1022EC	HE586862.1	1403/1404 (99%)	Ciobanu และคณะ 2012

ตารางที่ จ. 21 ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rDNA ของสายพันธุ์ T6-223 (1,413 bp) กับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล GenBank (BLASTn)

	สายพันธุ์แบคทีเรีย	Accession no.	Sequencing identity (%)	เอกสารอ้างอิง
1	*Microbacterium aquimaris* สายพันธุ์ JS63-1	AM778450.1	1397/1398 (99%)	Kim 2007
2	*Microbacterium aquimaris* สายพันธุ์ JS54-2	NR_042656.1	1396/1398 (99%)	Kim และคณะ 2011
3	*Microbacterium* sp. สายพันธุ์ OB44-1	JN942146.1	1391/1393 (99%)	Xin และคณะ 2011
4	*Microbacterium* sp. สายพันธุ์ QDHT-03	FJ210799.1	1383/1387 (99%)	Liu และ Wang 2008
5	*Microbacterium aquimaris* สายพันธุ์ DT27	HQ009858.1	1379/1390 (99%)	Hamidin 2010
6	*Microbacterium aquimaris* สายพันธุ์ F84066	JF281752.1	1346/1348 (99%)	Feby และ Nair 2011

ตารางที่ จ. 22 ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์จากแถบดีเอ็นเอเด่นในโครงสร้างประชาคมแบคทีเรียจากดินบริเวณเกาะสีชัง

ตัวอย่างดิน	สายพันธุ์แบคทีเรีย	Accession no.	Sequencing identity (%)	เอกสารอ้างอิง
DGGE-soil clone 01	Uncultured bacterium clone D12P4MbH	FJ152303.1	192/193 (99%)	Reis และคณะ 2009
	Uncultured bacterium clone CS-46	JN228672.1	189/193 (98%)	Zhang และคณะ 2011
	Uncultured bacterium clone F06_S02A	AM911584.1	188/193 (97%)	Neulinger และคณะ 2008
	Uncultured bacterium clone B05_S02A	AM911519.1	188/193 (97%)	Neulinger และคณะ 2008
	Uncultured bacterium clone CS-75	JN228700.1	188/193 (97%)	Zhang และคณะ 2011

ตารางที่ จ. 22 ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์จากแถบดีเอ็นเอเด่นในโครงสร้างประชาคมแบคทีเรียจากดินบริเวณเกาะสีชัง (ต่อ)

ตัวอย่างดิน	สายพันธุ์แบคทีเรีย	Accession no.	Sequencing identity (%)	เอกสารอ้างอิง
DGGE-soil clone 02	Uncultured bacterium clone EW-22	JN228836.1	186/192 (97%)	Zhang และคณะ 2011
	Uncultured gamma proteobacterium clone SS1_B_07_77	EU050820.1	181/192 (94%)	Tian และคณะ 2009
	Uncultured gamma proteobacterium clone FII-AN136	JQ580077.1	180/192 (94%)	Acosta-Gonzalez และคณะ 2013
	Uncultured *Legionella* sp. clone T13J-B39	JN860366.1	180/192 (94%)	Li และคณะ 2011
	Uncultured bacterium clone SF-Oct-121	HQ225336.1	180/192 (94%)	Bae และ Lee 2010
DGGE-soil clone 03	*Caulobacter* sp. สายพันธุ์ ZSGR14	KC577567.1	167/167 (100%)	Yan และ Hou 2013
	Uncultured bacterium clone MVB288	KC476257.1	167/167 (100%)	Yung และคณะ 2013
	Uncultured bacterium clone 4-23	KC521956.1	167/167 (100%)	Sheng และ Hao 2013
	Uncultured bacterium clone 4-130	KC521930.1	167/167 (100%)	Sheng และ Hao 2013
	Brevundimonas sp. สายพันธุ์ JNU-L071	KC493243.1	167/167 (100%)	Lee 2013
DGGE-soil clone 04	Uncultured bacterium clone NF027	JX391646.1	167/167 (100%)	Li 2012
	Uncultured bacterium clone NF026	JX391645.1	167/167 (100%)	Li 2012
	Uncultured bacterium clone NF013	JX391632.1	167/167 (100%)	Li 2012
	Uncultured bacterium clone NF003	JX391622.1	167/167 (100%)	Li 2012
	Uncultured bacterium clone N3091	JX391614.1	167/167 (100%)	Li 2012
DGGE-soil clone 05	*Rheinheimera aquimaris* สายพันธุ์ ML-2	HM371421.1	192/192 (100%)	Tudahong และ Yusuf 2010
	Rheinheimera sp. สายพันธุ์ R942	EF450321.1	192/192 (100%)	Cassler และคณะ 2008
	Rheinheimera sp. สายพันธุ์ R923	EF450318.1	192/192 (100%)	Cassler และคณะ 2008
	Rheinheimera sp. สายพันธุ์ R246	AY368567.1	192/192 (100%)	Sfanos และคณะ 2005
	Rheinheimera sp. สายพันธุ์ 325	JQ012972.1	191/192 (99%)	Moskot และคณะ 2012

ตารางที่ จ. 22 ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์จากแถบดีเอ็นเอเด่นในโครงสร้างประชาคมแบคทีเรียจากดินบริเวณเกาะสีชัง (ต่อ)

ตัวอย่างดิน	สายพันธุ์แบคทีเรีย	Accession no.	Sequencing identity (%)	เอกสารอ้างอิง
DGGE-soil clone 06	Uncultured bacterium clone NS013	JX391729.1	166/167 (99%)	Li 2012
	Uncultured bacterium clone NF027	JX391646.1	166/167 (99%)	Li 2012
	Uncultured bacterium clone NF026	JX391645.1	166/167 (99%)	Li 2012
	Uncultured bacterium clone NF013	JX391632.1	166/167 (99%)	Li 2012
	Uncultured bacterium clone NF003	JX391622.1	166/167 (99%)	Li 2012
DGGE-soil clone 07	*Paramoritella alkaliphila* สายพันธุ์ ssthio04PA7-c	AB364967.1	185/192 (96%)	Hosoya และคณะ 2009
	Paramoritella alkaliphila สายพันธุ์ A3F-7	NR_041653.1	185/192 (96%)	Hosoya และคณะ 2009
	Uncultured gamma proteobacterium clone C19	DQ884169.1	185/192 (96%)	Martinez-Garcia และคณะ 2007
	Uncultured bacterium clone G08CC	JQ062653.1	184/192 (96%)	Giles และคณะ 2013
	Uncultured bacterium clone E12CC	JQ062623.1	184/192 (96%)	Giles และคณะ 2013
DGGE-soil clone 08	Uncultured bacterium clone RS-G05	KC541465.1	167/167 (100%)	Li และ Sun 2013
	Uncultured bacterium clone RS-B36	KC541090.1	167/167 (100%)	Li และ Sun 2013
	Uncultured bacterium clone RS-B13	KC541067.1	167/167 (100%)	Li และ Sun 2013
	Uncultured bacterium clone BF5_1507	KC307667.1	167/167 (100%)	Tinta และคณะ 2012
	Uncultured bacterium clone BF5_0975	KC307553.1	167/167 (100%)	Tinta และคณะ 2012
DGGE-soil clone 09	*Brevundimonas diminuta* สายพันธุ์ R057	KC252887.1	167/167 (100%)	Tan และคณะ 2012
	Brevundimonas sp. สายพันธุ์ R043	KC252872.1	167/167 (100%)	Tan และคณะ 2012
	Brevundimonas diminuta สายพันธุ์ P053	KC252794.1	167/167 (100%)	Tan และคณะ 2012
	Brevundimonas diminuta สายพันธุ์ P051	KC252792.1	167/167 (100%)	Tan และคณะ 2012
	Brevundimonas diminuta สายพันธุ์ P025	KC252762.1	167/167 (100%)	Tan และคณะ 2012

ตารางที่ จ. 23 ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์จากแถบดีเอ็นเอเด่นในโครงสร้างประชาคมแบคทีเรียจากดิน และน้ำทะเลบริเวณเกาะสีชัง

ตัวอย่างดิน	สายพันธุ์แบคทีเรีย	Accession no.	Sequencing identity (%)	เอกสารอ้างอิง
DGGE-soil clone 10	Uncultured Bacteroidetes bacterium clone ZU-11-n-2	EU626698.1	186/186 (100%)	Balakirev 2008
	Uncultured Bacteroidetes bacterium clone ZU-11-n-3	EU626696.1	186/186 (100%)	Balakirev 2008
	Uncultured Bacteroidetes bacterium clone OG-20-1-3	EU626640.1	186/186 (100%)	Balakirev 2008
	Uncultured Bacteroidetes bacterium clone INT-U-11-1	EU432436.1	186/186 (100%)	Balakirev 2008
	Bizionia sp. สายพันธุ์ D58-E09	DQ873780.1	186/186 (100%)	Embar-Gopinath 2006
DGGE-seawater clone 01	Uncultured bacterium clone: CLA23	AB253372.2	168/168 (100%)	Santoh และคณะ 2006
	Uncultured Anaerolineaceae bacterium clone 4_229	KC010019.1	167/168 (99%)	Chistoserdov และ Luzan 2012
	Uncultured Chloroflexi bacterium clone C9001C_B01_1_C023	AB645003.1	167/168 (99%)	Nunoura และคณะ 2011
	Uncultured bacterium isolate DGGE band no.15	AB559962.1	167/168 (99%)	Tanaka และ Kobayashi 2010
	Uncultured bacterium clone 4 2B 27	FJ800267.1	167/168 (99%)	Rike และคณะ 2009
DGGE-seawater clone 02	Uncultured gamma proteobacterium clone 1_117	KC009913.1	192/192 (100%)	Chistoserdov และ Luzan 2012
	Uncultured bacterium clone FA-A11	JN637409.1	192/192 (100%)	Oliveira และคณะ 2011
	Uncultured gamma proteobacterium clone ONGS226	JX241018.1	192/192 (100%)	Keshri และคณะ 2012
	Uncultured gamma proteobacterium clone ONGS225	JX241017.1	192/192 (100%)	Keshri และคณะ 2012
	Uncultured gamma proteobacterium clone ONGS147	JX240952.1	192/192 (100%)	Keshri และคณะ 2012
DGGE-seawater clone 03	Uncultured bacterium isolate 1112864242305b	HQ120429.1	165/167 (99%)	Williamson และคณะ 2010
	Uncultured bacterium clone 1FSeds_E11	GQ412760.1	165/167 (99%)	Garren และคณะ 2009
	Uncultured actinobacterium clone ONGS232	JX241024.1	164/167 (98%)	Keshri และคณะ 2012
	Uncultured actinobacterium clone APC_2_E1	JX041751.1	164/167 (98%)	Piggot และคณะ 2012
	Uncultured actinobacterium clone APC_2_B5	JX041719.1	164/167 (98%)	Piggot และคณะ 2012

ตารางที่ จ. 23 ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์จากแถบดีเอ็นเอเด่นในโครงสร้างประชาคมแบคทีเรียจากน้ำทะเลบริเวณเกาะสีชัง (ต่อ)

ตัวอย่าง	สายพันธุ์แบคทีเรีย	Accession no.	Sequencing identity (%)	เอกสารอ้างอิง
DGGE-seawater clone 04	Uncultured bacterium clone pIR3BF04	AY354146.1	167/167 (100%)	Nercessian และคณะ 2005
	Uncultured bacterium clone bore9	GQ903364.1	166/167 (99%)	Nigro และคณะ 2012
	Uncultured *Kordiimonas* sp. สายพันธุ์ clone AC3_A11	EF092167.1	166/167 (99%)	Holmes และ Blanch 2006
	Uncultured bacterium clone 3M34_078	JQ287480.1	165/167 (99%)	Sylvan และคณะ 2012
	Uncultured bacterium clone 3M33_090	JQ287288.1	165/167 (99%)	Sylvan และคณะ 2012
DGGE-seawater clone 05	*Fusibacter* sp. enrichment culture clone 22-7A	EU517558.1	170/171 (99%)	Penner และ Foght 2010
	Uncultured bacterium clone XKE-011	EF490109.1	170/171 (99%)	Sun และ Wu 2010
	Uncultured bacterium clone NF085	JX391703.1	169/171 (99%)	Li 2012
	Uncultured bacterium clone NF035	JX391654.1	169/171 (99%)	Li 2012
	Uncultured bacterium clone LVBR10aG04	GQ167327.1	169/171 (99%)	Murray และคณะ 2012
DGGE-seawater clone 06	*Thalassobius* sp. สายพันธุ์ KU27E3	AB636141.1	164/166 (99%)	Iwaki 2011
	Uncultured bacterium clone ANGIII_17	HE574923.1	164/166 (99%)	Collins 2011
	Uncultured bacterium clone ANGIII_7	HE574913.1	164/166 (99%)	Collins 2011
	Uncultured alpha proteobacterium clone: TKTMmvi-B21	AB611492.1	164/166 (99%)	Yoshida-Takashima 2011
	Uncultured bacterium clone T229H2a	HM177763.1	164/166 (99%)	Webster และคณะ 2011
DGGE-seawater clone 07	*Formosa* sp. สายพันธุ์ AK20	HE653972.1	186/186 (100%)	Anil Kumar 2012
	Uncultured *Flavobacteriaceae* bacterium clone E0C103	HM171207.1	186/186 (100%)	Jimenez และคณะ 2011
	Uncultured bacterium clone BAC1	AB560670.1	186/186 (100%)	Shoji และคณะ 2010
	Bacterium enrichment culture clone NCAAH 30A7	GQ221073.1	186/186 (100%)	Rejish Kumar และคณะ 2009
	Flavobacteriaceae bacterium enrichment culture clone MT-1698	AM292402.1	186/186 (100%)	Alain และคณะ 2012

ตารางที่ จ. 23 ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์จากแถบดีเอ็นเอเด่นในโครงสร้างประชาคมแบคทีเรียจากน้ำทะเลบริเวณเกาะสีชัง (ต่อ)

ตัวอย่าง	สายพันธุ์แบคทีเรีย	Accession no.	Sequencing identity (%)	เอกสารอ้างอิง
DGGE-seawater clone 08	*Bizionia* sp. สายพันธุ์ SN-3-9-2	JX119046.1	186/186 (100%)	Xin และคณะ 2012
	Bizionia paragorgiae สายพันธุ์ Z2	HQ538734.1	186/186 (100%)	Zhang และคณะ 2010
	Bacteroidetes bacterium GM71	HQ607597.1	186/186 (100%)	Zhang และ Ji 2010
	Uncultured *Bizionia* sp. clone L.v-6	GU225818.1	186/186 (100%)	Liu และคณะ 2009
	Bizionia paragorgiae สายพันธุ์ Z2	HQ424860.1	186/186 (100%)	Zhang และ Ding 2010
DGGE-seawater clone 09	*Idiomarina* sp. สายพันธุ์ D3	FJ157171.1	192/192 (100%)	Huang และ Du 2008
	Uncultured bacterium clone ATT93	FJ809614.1	192/192 (100%)	Raina และคณะ 2009
	Uncultured bacterium clone ATT1	FJ809522.1	192/192 (100%)	Raina และคณะ 2009
	Uncultured bacterium clone AM55	FJ809193.1	192/192 (100%)	Raina และคณะ 2009
	Uncultured bacterium clone AM2	FJ809140.1	192/192 (100%)	Raina และคณะ 2009
DGGE-seawater clone 10	*Reinekea* sp. สายพันธุ์ KLE1125	GU644354.1	192/192 (100%)	Gavrish 2010
	Uncultured marine bacterium COL-38	AY028195.1	192/192 (100%)	Bidle และ Azam 2001
	Uncultured gamma proteobacterium clone FII-OX116	JQ579765.1	190/192 (99%)	Acosta Gonzalez และคณะ 2012
	Bacterium SVAL2.47	EF522935.1	190/192 (99%)	Costa และคณะ 2007
	Bacterium SVAL2.41	EF522930.1	190/192 (99%)	Costa และคณะ 2007
DGGE-seawater clone 11	*Pseudoalteromonas elyakovii* สายพันธุ์ J34	JX976300.1	192/192 (100%)	Oh และคณะ 2012
	Pseudoalteromonas sp. สายพันธุ์ TK-105	KC161577.2	192/192 (100%)	Gutierrez และคณะ 2013
	Pseudoalteromonas sp. สายพันธุ์ SS12.20	KC160912.1	192/192 (100%)	Zhou และคณะ 2012
	Pseudoalteromonas sp. สายพันธุ์ SS12.17	KC160909.1	192/192 (100%)	Zhou และคณะ 2012
	Pseudoalteromonas sp. สายพันธุ์ SS12.15	KC160907.1	192/192 (100%)	Zhou และคณะ 2012

ตารางที่ จ. 24 ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์จากแถบดีเอ็นเอเด่นในโครงสร้างประชาคมแบคทีเรียจากน้ำทะเล และดินตะกอนบริเวณเกาะสีชัง

ตัวอย่าง	สายพันธุ์แบคทีเรีย	Accession no.	Sequencing identity (%)	เอกสารอ้างอิง
DGGE-seawater clone 12	Bacteroidetes bacterium GM71	HQ607597.1	153/156 (98%)	Zhang และ Ji 2010
	Uncultured *Bizionia* sp. clone L.v-6	GU225818.1	153/156 (98%)	Liu และคณะ 2009
	Bizionia paragorgiae สายพันธุ์ Z2	HQ424860.1	153/156 (98%)	Zhang และ Ding 2010
	Bizionia paragorgiae สายพันธุ์ UDC468	HM032008.1	153/156 (98%)	Ghim 2010
	Uncultured Bacteroidetes bacterium clone ZU-11-n-2	EU626698.1	153/156 (98%)	Balakirev 2008
DGGE-seawater clone 13	*Gillisia* sp. สายพันธุ์ NP10	EU196346.1	181/187 (97%)	Perreault และคณะ 2007
	Bizionia saleffrena สายพันธุ์ HFD	NR_043124.1	181/187 (97%)	Bowman และ Nichols 2005
	Bizionia gelidisalsuginis สายพันธุ์ IC164	NR_043123.1	181/187 (97%)	Bowman และ Nichols 2005
	Marine psychrophile IC164	AF001372.1	181/187 (97%)	Bowman 1997
	Bizionia sp. สายพันธุ์ S1-75	JX103234.1	180/187 (96%)	Lo Giudice และ Michaud 2012
DGGE-sediment clone 01	Uncultured bacterium clone bore9	GQ903364.1	164/165 (99%)	Nigro และคณะ 2012
	Uncultured *Kordiimonas* sp. clone AC3_A11	EF092167.1	164/165 (99%)	Holmes และ Blanch 2006
	Uncultured bacterium clone 3M34_078	JQ287480.1	163/165 (99%)	Sylvan และคณะ 2012
	Uncultured bacterium clone 3M33_090	JQ287288.1	163/165 (99%)	Sylvan และคณะ 2012
	Uncultured bacterium clone 9M32_012	JQ286986.1	163/165 (99%)	Sylvan และคณะ 2012
DGGE-sediment clone 02	Uncultured Acidobacteria bacterium clone ANOX-115	JF344677.1	193/194 (99%)	Acosta-Gonzalez และคณะ 2013
	Uncultured bacterium clone A0-033	JN977172.1	185/194 (95%)	Zhao 2011
	Uncultured bacterium clone B0610D001_J16	AB660505.1	185/194 (95%)	Itoh และคณะ 2011
	Uncultured bacterium clone B0610D001_B20	AB660504.1	185/194 (95%)	Itoh และคณะ 2011
	Uncultured bacterium clone B1001R002_J19	AB660169.1	185/194 (95%)	Itoh และคณะ 2011

ตารางที่ จ. 24 ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์จากแถบดีเอ็นเอเด่นในโครงสร้างประชาคมแบคทีเรียจากดินตะกอนบริเวณเกาะสีชัง

ตัวอย่างดิน	สายพันธุ์แบคทีเรีย	Accession no.	Sequencing identity (%)	เอกสารอ้างอิง
DGGE-sediment clone 03	Uncultured bacterium clone 1FTfc10_E11	GQ413848.1	192/192 (100%)	Garren และคณะ 2009
	Uncultured bacterium clone 1FT1c8_B012	GQ413526.1	192/192 (100%)	Garren และคณะ 2009
	Uncultured bacterium clone 1FT1c8_A011	GQ413513.1	192/192 (100%)	Garren และคณะ 2009
	Uncultured bacterium clone 2FT1c8_E12	GQ413323.1	192/192 (100%)	Garren และคณะ 2009
	Uncultured bacterium clone 1FT1c8_B12	GQ413131.1	192/192 (100%)	Garren และคณะ 2009
DGGE-sediment clone 04	*Photobacterium* sp. สายพันธุ์ SL62	AY538750.1	192/192 (100%)	Seo และคณะ 2004
	Uncultured bacterium clone NS040	JX391756.1	191/192 (99%)	Li 2012
	Uncultured bacterium clone HS068	JX391404.1	191/192 (99%)	Li 2012
	Uncultured bacterium clone NF087	JX391704.1	190/192 (99%)	Li 2012
	Uncultured bacterium isolate 6215-R8	HM173304.1	190/192 (99%)	Gray และคณะ 2011
DGGE-sediment clone 05	*Maricaulis virginensis* สายพันธุ์ PR54-12	EU440987.1	167/167 (100%)	Yuan และคณะ 2008
	Uncultured bacterium clone 64-10_H06	EU155814.1	167/167 (100%)	Neufeld และคณะ 2008
	Maricaulis virginensis isolate MARC4M	DQ768642.1	167/167 (100%)	Cui และคณะ 2008
	Maricaulis sp. สายพันธุ์ JL898	DQ985054.1	167/167 (100%)	Wang และ Jiao 2006
	Uncultured alpha proteobacterium clone 131718	AY922222.1	167/167 (100%)	Tringe และคณะ 2005
DGGE-sediment clone 06	*Arenibacter* sp. สายพันธุ์ TBL_45	JX854294.1	187/187 (100%)	Hahnke และ Harder 2012
	Arenibacter sp. สายพันธุ์ TBL_39	JX854293.1	187/187 (100%)	Hahnke และ Harder 2012
	Arenibacter sp. สายพันธุ์ TBL_36	JX854292.1	187/187 (100%)	Hahnke และ Harder 2012
	Arenibacter sp. สายพันธุ์ TBL_35	JX854291.1	187/187 (100%)	Hahnke และ Harder 2012
	Arenibacter sp. สายพันธุ์ SRO_240	JX854270.1	187/187 (100%)	Hahnke และ Harder 2012

ตารางที่ จ. 24 ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์จากแถบดีเอ็นเอเด่นในโครงสร้างประชาคมแบคทีเรียจากดินตะกอนบริเวณเกาะสีชัง (ต่อ)

ตัวอย่างดิน	สายพันธุ์แบคทีเรีย	Accession no.	Sequencing identity (%)	เอกสารอ้างอิง
DGGE-sediment clone 07	Uncultured gamma proteobacterium clone APC_2_A10	JX041712.1	191/191 (100%)	Piggot และคณะ 2012
	Idiomarina sp. สายพันธุ์ D3	FJ157171.1	191/191 (100%)	Huang และ Du 2008
	Uncultured bacterium clone ATT93	FJ809614.1	191/191 (100%)	Raina และคณะ 2009
	Uncultured bacterium clone ATT1	FJ809522.1	191/191 (100%)	Raina และคณะ 2009
	Uncultured bacterium clone AM55	FJ809193.1	191/191 (100%)	Raina และคณะ 2009
DGGE-sediment clone 08	Uncultured bacterium clone CypR_68	JQ766927.1	191/191 (100%)	Rizoulis และคณะ 2012
	Uncultured bacterium clone AND_GV0309_IH8.2_8S0	JQ032369.1	191/191 (100%)	Cornall และคณะ 2011
	Uncultured bacterium clone AND_GV0309_C0.25.1_4S0	JQ032270.1	191/191 (100%)	Cornall และคณะ 2011
	Uncultured gamma proteobacterium clone *Alchichica*_AL52_2_1B_68	JN825485.1	191/191 (100%)	Couradeau และคณะ 2011
	Uncultured gamma proteobacterium clone: B02	AB597534.1	191/191 (100%)	Kitahara และคณะ 2012
DGGE-sediment clone 09	Uncultured bacterium clone EW_72	HQ910808.1	167/167 (100%)	Mehlig และคณะ 2011
	Uncultured bacterium isolate DGGE gel band 19	HQ010550.1	167/167 (100%)	Sun และ Wang 2010
	Uncultured bacterium clone ncd1131h08c1	HM334013.1	167/167 (100%)	Kong และคณะ 2012
	Uncultured *Brevundimonas* sp. clone RUGL1-108	GQ421073.1	167/167 (100%)	Pradhan และคณะ 2010
	Caulobacter sp. สายพันธุ์ JO126	AB793759.1	166/166 (100%)	Habibi และ Tadashi Y 2013
DGGE-sediment clone 10	*Flexibacter* sp. สายพันธุ์ 2216.15.5	AB094462.1	187/187 (100%)	Inagaki และคณะ 2009
	Arenibacter palladensis สายพันธุ์ LMG 21972	NR_042188.1	187/187 (100%)	Nedashkovskaya และคณะ 2006
	Arenibacter sp. สายพันธุ์ SS16.27	KC160947.1	186/187 (99%)	Zhou และคณะ 2012
	Arenibacter sp. สายพันธุ์ SS13.4	KC160750.1	186/187 (99%)	Zhou และคณะ 2012
	Arenibacter sp. สายพันธุ์ SS13.2	KC160748.1	186/187 (99%)	Zhou และคณะ 2012

ตารางที่ จ. 24 ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์จากแถบดีเอ็นเอเด่นในโครงสร้างประชาคมแบคทีเรียจากดินตะกอนบริเวณเกาะสีชัง (ต่อ)

ตัวอย่างดิน	สายพันธุ์แบคทีเรีย	Accession no.	Sequencing identity (%)	เอกสารอ้างอิง
DGGE-sediment clone 11	Uncultured *Gaetbulibacter* sp. clone DP25	JQ965726.1	182/187 (97%)	Jeyaraman และคณะ 2012
	Uncultured bacterium clone Tat-08-009_43_94	GU437521.1	182/187 (97%)	Engel และคณะ 2013
	Uncultured bacterium clone Tat-08-009_43_86	GU437513.1	182/187 (97%)	Engel และคณะ 2013
	Uncultured bacterium clone Tat-08-009_43_80	GU437507.1	182/187 (97%)	Engel และคณะ 2013
	Uncultured bacterium clone Tat-08-009_43_46	GU437478.1	182/187 (97%)	Engel และคณะ 2013
DGGE-sediment clone 12	Uncultured Flavobacteriaceae bacterium clone E0C103	HM171207.1	187/187 (100%)	Jimenez และคณะ 2011
	Uncultured bacterium clone: BAC1	AB560670.1	187/187 (100%)	Shoji และคณะ 2010
	Bacterium enrichment culture clone NCAAH 30A7	GQ221073.1	187/187 (100%)	Rejish Kumar และคณะ 2009
	Uncultured bacterium isolate DGGE gel band 49	DQ660959.1	187/187 (100%)	Schafer 2007
	Uncultured Bacteroidetes bacterium clone MT061	AM157575.1	187/187 (100%)	Lefebvre และคณะ 2006
DGGE-sediment clone 13	Flavobacteriaceae bacterium enrichment culture clone MT-1698	AM292402.1	187/187 (100%)	Alain และคณะ 2012
	Uncultured bacterium isolate DGGE gel band 49	DQ660959.1	186/186 (100%)	Schaefer 2007
	Uncultured Flavobacteriaceae bacterium isolate DGGE gel band E3	HM171125.1	185/185 (100%)	Jimenez และคณะ 2011
	Uncultured Flavobacteriaceae bacterium isolate DGGE gel band E2	HM171124.1	185/185 (100%)	Jimenez และคณะ 2011
	Uncultured Flavobacteriaceae bacterium isolate DGGE gel band E1	HM171123.1	185/185 (100%)	Jimenez และคณะ 2011

ตารางที่ จ. 24 ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์จากแถบดีเอ็นเอเด่นในโครงสร้างประชาคมแบคทีเรียจากดินตะกอนบริเวณเกาะสีชัง (ต่อ)

ตัวอย่างดิน	สายพันธุ์แบคทีเรีย	Accession no.	Sequencing identity (%)	เอกสารอ้างอิง
DGGE-sediment clone 14	*Alteromonas macleodii* สายพันธุ์ p1a1	FN811296.1	186/191 (97%)	El Bour 2011
	Uncultured bacterium clone MgKD02d005G01	FJ644611.1	186/191 (97%)	Wong และคณะ 2009
	Uncultured *Alteromonas* sp. clone AC3_H2	EF092177.1	186/191 (97%)	Holmes และ Blanch 2006
	Bacterium QM22	DQ822526.1	186/191 (97%)	Du และคณะ 2009
	Uncultured gamma proteobacterium clone JL-ECS-X2	AY663965.1	186/191 (97%)	Jiao และคณะ 2004
DGGE-sediment clone 15	Uncultured bacterium clone B8	JQ799933.1	172/172 (100%)	Ban 2012
	Uncultured Propionibacterineae bacterium clone OTU113	JQ217240.1	172/172 (100%)	Yan และคณะ 2011
	Uncultured organism clone ELU0034-T174-S	HQ752776.1	172/172 (100%)	Li และคณะ 2012
	Uncultured bacterium clone ncd2380h09c1	JF207554.1	172/172 (100%)	Kong และคณะ 2012
	Uncultured bacterium clone ncd2401a09c1	JF200671.1	172/172 (100%)	Kong และคณะ 2012
DGGE-sediment clone 16	Uncultured bacterium clone NS087	JX391802.1	171/171 (100%)	Li 2012
	Uncultured bacterium clone NS054	JX391769.1	171/171 (100%)	Li 2012
	Uncultured bacterium clone NS049	JX391765.1	171/171 (100%)	Li 2012
	Uncultured bacterium clone N0075	JX391511.1	171/171 (100%)	Li 2012
	Uncultured bacterium clone N0041	JX391477.1	171/171 (100%)	Li 2012
DGGE-sediment clone 17	Uncultured bacterium clone SG23	JQ678843.1	167/167 (100%)	Zhang และ Wang 2012
	Uncultured *Caulobacter* sp. clone GI5-006-F11	FJ192937.1	167/167 (100%)	La Duc และคณะ 2009
	Uncultured *Brevundimonas* sp. clone RSS-D6	AM989995.1	167/167 (100%)	Gangwar และคณะ 2009
	Caulobacter sp. สายพันธุ์ JO126	AB793759.1	166/167 (99%)	Habibi และ Tadashi 2013
	Uncultured bacterium clone RS-G05	KC541465.1	166/167 (99%)	Li และ Sun 2013

ตารางที่ จ. 24 ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์จากแถบดีเอ็นเอเด่นในโครงสร้างประชาคมแบคทีเรียจากดินตะกอนบริเวณเกาะสีชัง (ต่อ)

ตัวอย่างดิน	สายพันธุ์แบคทีเรีย	Accession no.	Sequencing identity (%)	เอกสารอ้างอิง
DGGE-sediment clone 18	Uncultured *Brevundimonas* sp. clone OTU160	JQ217298.1	167/167 (100%)	Yan และคณะ 2011
	Uncultured bacterium clone EW_72	HQ910808.1	167/167 (100%)	Mehlig และคณะ 2011
	Uncultured bacterium isolate DGGE gel band 19	HQ010550.1	167/167 (100%)	Sun และ Wang 2010
	Uncultured bacterium clone ncd1131h08c1	HM334013.1	167/167 (100%)	Kong และคณะ 2012
	Uncultured *Brevundimonas* sp. clone RUGL1-108	GQ421073.1	167/167 (100%)	Pradhan และคณะ 2010
DGGE-sediment clone 19	*Pseudoalteromonas* sp. สายพันธุ์ V4.ME.31	AJ244745.1	191/192 (99%)	Fritz 2000
	Uncultured bacterium clone BF5_1472	KC307753.1	190/191 (99%)	Tinta และคณะ 2012
	Uncultured bacterium clone BF5_1448	KC307729.1	190/191 (99%)	Tinta และคณะ 2012
	Uncultured bacterium clone CTD07_S13_2850m_44F	KC522913.1	190/191 (99%)	Mattes และ Morris 2013
	Uncultured bacterium clone P1-16	KC502875.1	190/191 (99%)	Ke 2013
DGGE-sediment clone 20	*Glaciecola* sp. สายพันธุ์ SW1-13	FR744829.1	190/193 (98%)	Zhang และคณะ 2011
	Glaciecola arctica สายพันธุ์ BSs20135	EU365479.1	190/193 (98%)	Zhang และคณะ 2011
	Glaciecola mesophila	AY771709.1	190/193 (98%)	Lee และคณะ 2004
	Uncultured gamma proteobacterium clone XSLA085	KC246139.1	189/193 (98%)	Zhang และคณะ 2012
	Uncultured gamma proteobacterium clone T19	JQ753102.1	189/193 (98%)	Ma และ Li 2012
DGGE-sediment clone 21	*Alishewanella* sp. สายพันธุ์ IARI-L-23	JF343184.1	191/192 (99%)	Saxena และคณะ 2010
	Rheinheimera sp. สายพันธุ์ Shira 15-11-03	JF421245.1	191/192 (99%)	Morozova และ Rogozin 2011
	Uncultured marine bacterium clone SiDSep07M141	GU326804.1	191/192 (99%)	Manes และคณะ 2011
	Uncultured marine bacterium clone SiDJun08M86	GU326559.1	191/192 (99%)	Manes และคณะ 2011

ตารางที่ จ. 24 ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์จากแถบดีเอ็นเอเด่นในโครงสร้างประชาคมแบคทีเรียจากดินตะกอนบริเวณเกาะสีชัง (ต่อ)

ตัวอย่างดิน	สายพันธุ์แบคทีเรีย	Accession no.	Sequencing identity (%)	เอกสารอ้างอิง
DGGE-sediment clone 22	*Halomonas meridian* สายพันธุ์ C538	AB741873.1	190/192 (99%)	Kudo และ Zhang 2012
	Halomonas sp. สายพันธุ์ Pb-WC11086	JX913846.1	190/192 (99%)	Xie และคณะ 2012
	Unidentified marine bacterioplankton clone E412B_17	KC003242.1	190/192 (99%)	Wang และคณะ 2012
	Uncultured gamma proteobacterium clone M114	JQ753127.1	190/192 (99%)	Ma และ Li 2012
	Uncultured bacterium clone AND GV0508 IH4.2 1G5	JQ032617.1	190/192 (99%)	Cornall และคณะ 2011
DGGE-sediment clone 23	Uncultured bacterium clone AND GV0309 IH8.2 8S0	JQ032369.1	190/192 (99%)	Cornall และคณะ 2011
	Uncultured bacterium clone AND GV0309 C0.25.1 4S0	JQ032270.1	190/192 (99%)	Cornall และคณะ 2011
	Uncultured gamma proteobacterium clone Alchichica AL52 2 1B_68	JN825485.1	190/192 (99%)	Couradeau และคณะ 2011
	Uncultured gamma proteobacterium clone: B02	AB597534.1	190/192 (99%)	Kitahara และคณะ 2012
	Uncultured bacterium clone A493 BATS	HM032241.1	190/192 (99%)	Hmelo และคณะ 2010

ภาคผนวก ฉ

ข้อมูลดิบของค่าความหลากหลายจากวิธี PCR-DGGE ในตัวอย่างเกาะสีชัง

ตารางที่ ฉ. 1 การวิเคราะห์ความหลากหลายที่ได้จากวิธี PCR-DGGE จากตัวอย่างเกาะสีชัง

ตัวอย่างดิน	*H**	*D***	*S****	E_H *****
A	2.08 ± 0.01	0.15 ± 0.00	13.0 ± 0.5	0.81 ± 0.02
B	2.02 ± 0.00	0.18 ± 0.01	13.0 ± 0.1	0.79 ± 0.02
C	2.20 ± 0.01	0.15 ± 0.01	14.0 ± 0.0	0.83 ± 0.02
D	2.09 ± 0.05	0.18 ± 0.01	14.0 ± 0.2	0.79 ± 0.01
E	1.77 ± 0.01	0.23 ± 0.00	9.0 ± 0.10	0.81 ± 0.01
F	2.19 ± 0.02	0.15 ± 0.01	14.0 ± 0.2	0.83 ± 0.00
G	1.57 ± 0.00	0.27 ± 0.01	8.0 ± 0.1	0.75 ± 0.00
H	2.07 ± 0.01	0.15 ± 0.03	11.0 ± 0.2	0.86 ± 0.04
I	2.13 ± 0.00	0.14 ± 0.01	11.0 ± 0.2	0.90 ± 0.01
J	1.85 ± 0.00	0.21 ± 0.00	10.0 ± 0.3	0.80 ± 0.00
ตัวอย่างน้ำทะเล	*H**	*D***	*S****	E_H *****
W1	2.16 ± 0.00	0.15 ± 0.1	14.0 ± 0.1	0.72± 0.00
W2	1.77 ± 0.01	0.20 ± 0.0	9.0 ± 0.1	0.80 ± 0.01
W3	1.96 ± 0.01	0.17 ± 0.1	9.0 ± 0.0	0.90 ± 0.01
W4	1.90 ± 0.02	0.25 ± 0.1	11.0 ± 0.0	0.90 ± 0.02
ตัวอย่างดินตะกอน	*H**	*D***	*S****	E_H *****
B1	1.99 ± 0.00	0.16 ± 0.05	12.0 ± 0.0	0.80 ± 0.10
B2	2.10 ± 0.01	0.18 ± 0.01	15.0 ± 0.1	0.78 ± 0.00
B3	2.38 ± 0.01	0.11 ± 0.00	16.0 ± 0.0	0.86 ± 0.00
B5	2.34 ± 0.00	0.14 ± 0.07	15.0 ± 0.0	0.87 ± 0.03
B6	2.32 ± 0.04	0.11 ± 0.10	17.0 ± 0.1	0.85 ± 0.02
B7	2.31 ± 0.08	0.12 ± 0.05	13.0 ± 0.2	0.90 ± 0.01

ตารางที่ ฉ. 1 การวิเคราะห์ความหลากหลายที่ได้จากวิธี PCR-DGGE จากตัวอย่างเกาะสีชัง (ต่อ)

ตัวอย่างดินตะกอน	*H**	*D***	*S****	E_H *****
B9	2.25 ± 0.01	0.14 ± 0.05	14.0 ± 0.5	0.85 ± 0.01
B10	1.85 ± 0.00	0.22 ± 0.01	12.0 ± 0.2	0.75 ± 0.02
B11	1.97 ± 0.00	0.18 ± 0.02	11.0 ± 0.1	0.82 ± 0.02
1	1.82 ± 0.01	0.20 ± 0.11	11.0 ± 0.1	0.76 ± 0.02
2	2.39 ± 0.05	0.12 ± 0.05	18.0 ± 0.2	0.83 ± 0.02
3	2.37 ± 0.01	0.13 ± 0.02	19.0 ± 0.2	0.80 ± 0.01
4	1.98 ± 0.00	0.17 ± 0.02	10.0 ± 0.0	0.86 ± 0.00
5	1.87 ± 0.07	0.20 ± 0.00	11.0 ± 0.0	0.78 ± 0.01
6	2.40 ± 0.01	0.11 ± 0.00	19.0 ± 0.0	0.81 ± 0.01
7	2.32 ± 0.01	0.12 ± 0.01	12.0 ± 0.1	0.93 ± 0.05
8	2.33 ± 0.01	0.13 ± 0.01	15.0 ± 0.3	0.86 ± 0.03
9	2.25 ± 0.01	0.13 ± 0.02	12.0 ± 0.0	0.90 ± 0.00
10	2.39 ± 0.00	0.14 ± 0.00	13.0 ± 0.0	0.93 ± 0.00
11	1.97 ± 0.01	0.17 ± 0.11	9.0 ± 0.1	0.85 ± 0.02

หมายเหตุ

*H** แสดงค่าความความหลากหลายที่คำนวณจากดัชนีของ Shannon

*D*** แสดงค่าความความหลากหลายที่คำนวณจากดัชนีของ Simpson

*S**** แสดงจำนวนแบนด์ดีเอ็นเอที่ปรากฏ

E_H ***** แสดงความค่าความสม่ำเสมอ หรือการกระจายตัวของ Shannon (E_H)

ภาคผนวก ช

ข้อมูลการจัดกลุ่มของรีคอมบิแนนท์

ตารางที่ ช.1 ข้อมูลการจัดกลุ่มของรีคอมบิแนนท์โคลนที่ได้จากยีนในกลุ่ม dox_{GN} จำนวน 130 โคลน หลังตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิด *HinfI* และ *BsuRI (HaeIII)*

รีคอมบิแนนท์ โคลน dox_{GN}	โคลนที่*				
GNA	GNA.1 (e)	GNA.2 (f)	GNA.3 (f)	GNA.4 (c)	GNA.5 (a)
GNB	GNB.1 (f)	GNB.2 (f)	GNB.3 (e)	GNB.4 (b)	GNB.5 (d)
GNC	GNC.1 (c)	GNC.2 (a)	GNC.3 (f)	GNC.4 (f)	GNC.5 (f)
GND	GND.1 (e)	GND.2 (d)	GND.3 (f)	GND.4 (f)	GND.5 (a)
GNE	GNE.1 (c)	GNE.2 (b)	GNE.3 (e)	GNE.4 (f)	GNE.5 (f)
GNF	GNF.1 (f)	GNF.2 (d)	GNF.3 (f)	GNF.4 (f)	GNF.5 (a)
GNG	GNG.1 (b)	GNG.2 (e)	GNG.3 (b)	GNG.4 (f)	GNG.5 (f)
GNH	GNH.1 (f)	GNH.2 (f)	GNH.3 (e)	GNH.4 (b)	GNH.5 (d)
GNI	GNI.1 (e)	GNI.2 (f)	GNI.3 (f)	GNI.4 (f)	GNI.5 (f)
GNJ	GNJ.1 (f)	GNJ.2 (f)	GNJ.3 (d)	GNJ.4 (a)	GNJ.5 (b)
GNW1	GNW1.1 (a)	GNW1.2 (b)	GNW1.3 (e)	GNW1.4 (f)	GNW1.5 (f)
GNW2	GNW2.1 (d)	GNW2.2 (f)	GNW2.3 (f)	GNW2.4 (f)	GNW2.5 (c)
GNW3	GNW3.1 (f)	GNW3.2 (f)	GNW3.3 (e)	GNW3.4 (a)	GNW3.5 (c)
GNW4	GNW4.1 (c)	GNW4.2 (f)	GNW4.3 (f)	GNW4.4 (f)	GNW4.5 (d)
GNB1	GNB1.1 (f)	GNB1.2 (f)	GNB1.3 (e)	GNB1.4 (b)	GNB1.5 (a)
GNB2	GNB2.1 (b)	GNB2.2 (f)	GNB2.3 (a)	GNB2.4 (f)	GNB2.5 (e)
GNB6	GNB6.1 (f)	GNB6.2 (a)	GNB6.3 (d)	GNB6.4 (f)	GNB6.5 (f)
GNB7	GNB7.1 (e)	GNB7.2 (c)	GNB7.3 (c)	GNB7.4 (f)	GNB7.5 (f)
GNB9	GNB9.1 (a)	GNB9.2 (f)	GNB9.3 (f)	GNB9.4 (f)	GNB9.5 (f)
GNB10	GNB10.1 (f)	GNB10.2 (f)	GNB10.3 (b)	GNB10.4 (c)	GNB10.5 (d)

ตารางที่ ช.1 ข้อมูลการจัดกลุ่มของรีคอมบิแนนท์โคลนที่ได้จากยีนในกลุ่ม dox_{GN} จำนวน 130 โคลน หลังตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิด *HinfI* และ *BsuRI (HaeIII)* (ต่อ)

รีคอมบิแนนท์โคลน dox_{GN}	โคลนที่*				
GNB11	GNB11.1 (e)	GNB11.2 (f)	GNB11.3 (f)	GNB11.4 (f)	GNB11.5 (c)
GN3	GN3.1 (f)	GN3.2 (e)	GN3.3 (f)	GN3.4 (f)	GN3.5 (b)
GN4	GN4.1 (f)	GN4.2 (f)	GN4.3 (e)	GN4.4 (f)	GN4.5 (c)
GN5	GN5.1 (b)	GN5.2 (f)	GN5.3 (f)	GN5.4 (f)	GN5.5 (a)
GN6	GN6.1 (f)	GN6.2 (f)	GN6.3 (f)	GN6.4 (e)	GN6.5 (a)
GN7	GN7.1 (d)	GN7.2 (e)	GN7.3 (b)	GN7.4 (f)	GN7.5 (f)

หมายเหตุ

* แสดงการรูปแบบจัดกลุ่มหลังตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 2 ชนิดคือ *HinfI* และ *BsuRI (HaeIII)*

ตารางที่ ช.2 ข้อมูลการจัดกลุ่มของรีคอมบิแนนท์โคลนที่ได้จากยีนในกลุ่ม dox_{GP} จำนวน 30 โคลน หลังตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิด *HinfI* และ *Rsa*I

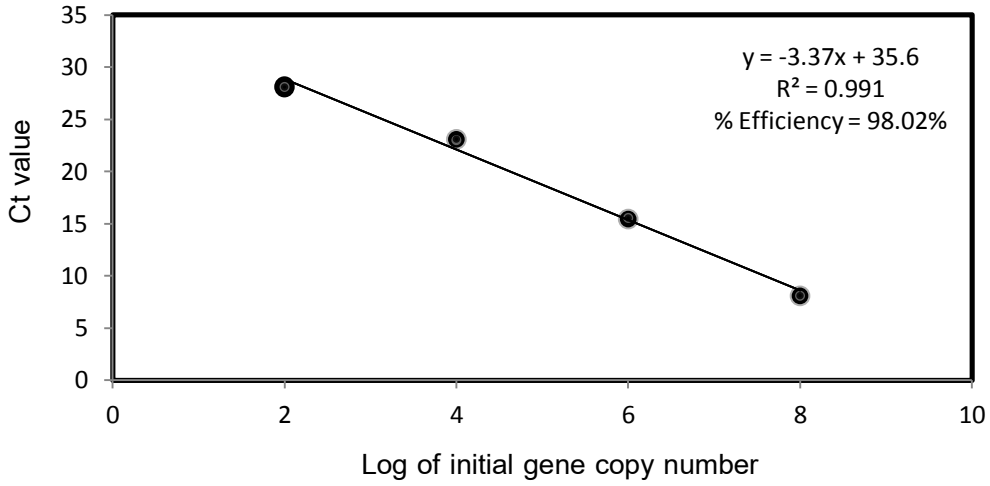
รีคอมบิแนนท์โคลน dox_{GP}	โคลนที่*				
GPE	GPE.1 (c)	GPE.2 (b)	GPE.3 (e)	GPE.4 (a)	GPE.5 (a)
GPH	GPH.1 (a)	GPH.2 (a)	GPH.3 (b)	GPH.4 (c)	GPH.5 (c)
GPI	GPI.1 (d)	GPI.2 (c)	GPI.3 (e)	GPI.4 (b)	GPI.5 (a)
GPJ	GPJ.1 (a)	GPJ.2 (d)	GPJ.3 (a)	GPJ.4 (b)	GPJ.5 (a)
GP3	GP3.1 (c)	GP3.2 (b)	GP3.3 (d)	GP3.4 (a)	GP3.5 (a)
GP7	GP7.1 (b)	GP7.2 (c)	GP7.3 (e)	GP7.4 (a)	GP7.5 (a)

หมายเหตุ

* แสดงการรูปแบบจัดกลุ่มหลังตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 2 ชนิดคือ *HinfI* และ *Rsa*I

ภาคผนวก ซ.

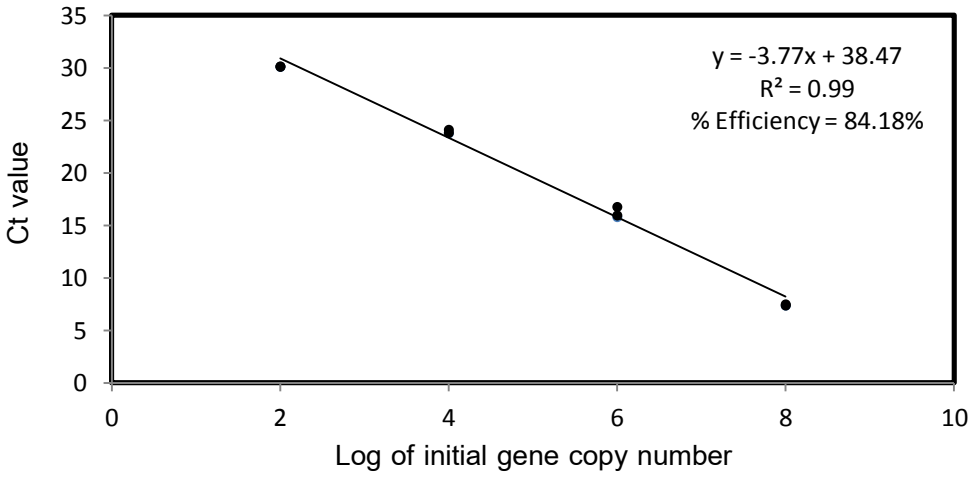
กราฟมาตรฐานของพลาสมิดดีเอ็นเอในการทำ Real-time PCR



รูปที่ ซ. 1 กราฟมาตรฐานของพลาสมิดดีเอ็นเอในการทำ Real-time PCR บริเวณยีน 16S rDNA

ประสิทธิภาพในการทำ Real-time PCR (% Efficiency) คำนวณได้จากสูตร (E – 1) x 100%

โดยที่ E = $10^{(-1/\text{slope})}$



รูปที่ ซ. 2 กราฟมาตรฐานของพลาสมิดดีเอ็นเอในการทำ Real-time PCR บริเวณยีนไดออกซิจีเนสในกลุ่มแบคทีเรียแกรมลบ

ประสิทธิภาพในการทำ Real-time PCR (% Efficiency) คำนวณได้จากสูตร (E – 1) x 100%

โดยที่ E = $10^{(-1/\text{slope})}$

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวทิพอัปสร รุ่งทวีมนัสชัย เกิดเมื่อวันที่ 22 สิงหาคม พ.ศ. 2529 ที่กรุงเทพมหานคร ได้รับปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ จากคณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ในปีการศึกษา 2551 และได้เข้าศึกษาต่อในระดับปริญญามหาบัณฑิต สาขาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2553 ปัจจุบันอาศัยอยู่บ้านเลขที่ 125/8 หมู่ 1 แขวงทุ่งครุ เขตทุ่งครุ กรุงเทพมหานคร

ผลงานตีพิมพ์เผยแพร่

1. Rungthaweemanuschai, T. and Pinyakong O. 2012. ENUMERATION OF PAH-DEGRADING BACTERIA AND DETECTION OF DIOXYGENASE GENES FROM SICHANG ISLAND, THAILAND. Proceedingsof the 38th the Congress on Science and Technology of Thailand (STT). October 17-19 2010, Empress Convention center, Chiang Mai, Thailand. (poster presentation) (Full text in CD-ROM)

2. Rungthaweemanuschai, T. and Pinyakong O. 2013. DIVERSITY OF 16S rRNA AND AROMATIC HYDROCARBON DIOXYGENASE GENES IN ENVIRONMENTAL SAMPLES OF SICHANG ISLAND. Abstract of the 21th the Science Forum 2013. March 14-15 2013, Faculty of Science, Chulalongkorn University. (Oral presentation)

รางวัลที่ได้รับ

รางวัลรองชนะเลิศในการนำเสนอโครงการวิจัย สาขาจุลชีววิทยา งาน Science forum 2013 คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย