

การคัดกรองแบคทีเรียดีในทรีฟองจากตะกอนดินใต้ทะเลเพื่อการย่อยสลาย  
สารประกอบพอลิไซคลิกแอโรแมติกไฮโดรคาร์บอน

นางสาวจิราพร พวงแก้ว

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2555

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทคัดย่อและเพิ่มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 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.

SCREENING OF DENITRIFYING BACTERIA FROM MARINE SEDIMENT  
FOR POLYCYCLIC AROMATIC HYDROCARBON DEGRADATION

Miss Jiraporn Puangkaew

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirement  
for the Degree of Master of Science Program in Biotechnology

Faculty of Science

Chulalongkorn University

Academic Year 2012

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์ การคัดกรองแบคทีเรียดีในทรีฟองจากตะกอนดินใต้

ทะเลเพื่อการย่อยสลายพอลิไซคลิกแอโรแมติก

ไฮโดรคาร์บอน

โดย นางสาวจิราพร พวงแก้ว

สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก อาจารย์ ดร. ชมกฤษ วิภูวนานนท์

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุภางค์ จุฬาลักษณ์านุกูล

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้บัณฑิตวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วน

หนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

.....คณบดีคณะวิทยาศาสตร์

(ศาสตราจารย์ ดร. สุพจน์ หารหนองบัว)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ต่อศักดิ์ สีลานันท์)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(อาจารย์ ดร. ชมกฤษ วิภูวนานนท์)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุภางค์ จุฬาลักษณ์านุกูล)

.....กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร. กัลยา วัฒนากว)

.....กรรมการ

(อาจารย์ ดร. กิตตินันท์ โกมลภิส)

.....กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย

(ดร. สุริษา สุวรรณรังษี)

จิราพร พวงแก้ว : การคัดกรองแบคทีเรียดีในทริไฟอิงจากตะกอนดินใต้ทะเลเพื่อการย่อยสลายพอลิไซคลิกแอโรแมติกไฮโดรคาร์บอน . (SCREENING OF DENITRIFYING BACTERIA FROM MARINE SEDIMENT FOR POLYCYCLIC AROMATIC HYDROCARBON DEGRADATION) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: ดร. ชมภูณัฐ วิภูณานนท์ , อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วมศ. ดร. สุภาวงศ์ จุฬาลักษณ์านุกูล, 90 หน้า.

สารประกอบพอลิไซคลิกแอโรแมติกไฮโดรคาร์บอน (PAHs) สามารถเกิดขึ้นได้เองตามธรรมชาติจากการเผาไหม้ที่ไม่สมบูรณ์ของสารอินทรีย์ กิจกรรมของมนุษย์ การขุดเจาะ - ถ่านน้ำมันดิบ รวมไปถึงการรั่วไหลจากเรือบรรทุกน้ำมันและเรือขนส่งสินค้า เป็นต้น การรั่วไหลของ PAHs เหล่านี้ส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมโดยตรง โดยเฉพาะอย่างยิ่งเมื่อเกิดการรั่วไหลลงสู่บริเวณตะกอนใต้ทะเลที่มีออกซิเจนต่ำและการย่อยสลายเกิดได้ช้า งานวิจัยนี้จึงมีจุดประสงค์เพื่อคัดกรองแบคทีเรียดีในทริไฟอิงที่สามารถย่อยสลาย PAHs ได้ในภาวะไร้ออกซิเจน ผลการคัดแยกได้แบคทีเรียในทริไฟอิง 1 สายพันธุ์ คือ *Clostridium barlettii* และแบคทีเรียดีในทริไฟอิงได้อีก 6 สายพันธุ์ คือ *Enterococcus faecalis*, *Paenibacillus macerans*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus tequilensis*, *Proteus mirabilis* และ *Enterobacter asburiae* โดย *P. macerans* มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายดีที่สุด สามารถย่อยสลายเนฟทาซีน ไพรีน และเบนโซ-เอ-ไพรีนได้เมื่อเวลาผ่านไป 16 วัน จากปริมาณเริ่มต้น 200 ppm จนเหลือ 73, 167 และ 98 ppm ตามลำดับ นอกจากนี้ประสิทธิภาพในการย่อยสลายยังขึ้นอยู่กับจำนวนวงเบนซีนที่เป็นองค์ประกอบภายในโครงสร้างและในเทรตซึ่งเป็นตัวรับอิเล็กตรอนในวิถีการย่อยสลาย PAHs ที่เกิดขึ้นภายใต้ภาวะไร้ออกซิเจนอีกด้วย

สาขาวิชา.....เทคโนโลยีชีวภาพ.....ลายมือชื่อนิสิต.....  
ปีการศึกษา\_2555.....ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก.....  
ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม.....

# # 5372548123 : MAJOR BIOTECHNOLOGY

KEYWORDS : ANAEROBE / DENITRIFYING BACTERIA / MARINE SEDIMENT /  
POLYCYCLIC AROMATIC HYDROCARBON

JIRAPORN PUANGKAEW : SCREENING OF DENITRIFYING BACTERIA FROM  
MARINE SEDIMENT FOR POLYCYCLIC AROMATIC HYDROCARBON  
DEGRADATION. ADVISOR : CHOMPUNUCH VIRUNANON, Ph.D., CO-ADVISOR :  
ASST. PROF. SUPHANG CHULALAKSANANUKUL, Ph.D., 90 pp.

Polycyclic Aromatic Hydrocarbons are produced during natural processes such as incomplete combustion of organic materials, human activity, oil drilling rig capsizes and present in crude oil that has spent time in the ocean and eventually reaches shore. Environmental contamination with PAHs are a concern, especially when they are contaminated in marine sediment, they do not break down easily in the water and can stay in the environment for long periods of time. The work in this thesis is focused on screening of denitrifying bacteria from marine sediment for PAHs degradation. The results showed that Nitrification bacteria specie from identification were *Clostridium bartlettii* and Denitrification bacteria species were *Enterococcus faecalis*, *Paenibacillus macerans*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus tequilensis*, *Proteus mirabilis* and *Enterobacter asburiae*. The highest number of PAHs degrading ability were observed in *P. mirabilis* and *P. macerans*. At 16 days of incubation, Napthalene, Pyrene and Benzo-a-Pyrene can be eliminated for 73, 167 and 98 ppm, respectively with initial 200 ppm of PAHs. In addition, the performance of degradation is also depend on a number of benzene ring in PAHs structure and nitrate as an electron acceptor in the way to degrade PAHs occurs under anaerobic condition as well.

Field of Study : Biotechnology..... Student's Signature.....

Academic Year : 2012..... Advisor's Signature.....

Co-advisor's Signature.....

## กิตติกรรมประกาศ

ขอกราบขอบพระคุณอาจารย์ ดร. ชมภูษุช วิรุณานนท์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก และ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุภางค์ จุฬาลักษณ์านุกูล อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วมที่กรุณาให้ความรู้ คำปรึกษา คำแนะนำ และข้อคิดต่างๆ ในการทำวิจัยจนสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี ตลอดจนได้กรุณาปรับปรุงวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์มากขึ้น รวมไปถึงกำลังใจที่มีให้เสมอมา ขอกราบขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ต๋อศักดิ์ สีลานันท์ที่กรุณารับเป็นประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ และขอกราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร. กัลยา วัฒยากร อาจารย์ ดร.กิตตินันท์ โกมลภิส และดร. สุริษา สุวรรณรังษี ที่กรุณารับเป็นคณะกรรมการในการสอบวิทยานิพนธ์ รวมทั้งให้คำปรึกษา คำแนะนำ ตลอดจนช่วยปรับปรุงวิทยานิพนธ์ฉบับนี้จนสมบูรณ์

ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์.ดร.วรวิมล จุฬาลักษณ์านุกูล ที่กรุณาอำนวยความสะดวก และให้คำปรึกษา ข้อเสนอแนะที่ดีเสมอมา

ขอขอบคุณคณาจารย์ในสาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพและเจ้าหน้าที่ทุกท่านที่กรุณาอำนวยความสะดวกและเป็นกำลังใจในการทำวิทยานิพนธ์นี้

ขอขอบคุณหน่วยปฏิบัติการวิจัย Biofuels by biocatalysts รวมถึงพี่ๆ เพื่อนๆ และน้องๆ ในหน่วยปฏิบัติการวิจัยที่สนับสนุนเครื่องมือ อุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย และคอยให้ความช่วยเหลือ ให้กำลังใจอันดีมาโดยตลอด

ขอบคุณเพื่อนๆ ในสาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพทุกคนที่สนับสนุน เป็นกำลังใจ และให้คำปรึกษาที่ดีตลอดมา

ขอขอบคุณสถาบันวิจัยทรัพยากรทางน้ำ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยสำหรับทุนสนับสนุนงานวิจัย

และสุดท้ายขอกราบขอบพระคุณคุณแม่และทุกคนในครอบครัวที่คอยให้กำลังใจในการทำงานวิจัยตลอดมาจนสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

## สารบัญ

หน้า	
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ฎ
สารบัญภาพ.....	ฑ
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ.....	ณ
บทที่	
1 บทนำ .....	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา .....	1
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย .....	3
1.3 ขอบเขตของการวิจัย.....	5
1.4 วิธีดำเนินการวิจัย .....	5
1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	5
2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง .....	5
2.1 ชนิดของสารประกอบพอลิไซคลิกแอโรแมติกไฮโดรคาร์บอน .....	6
2.2 การปนเปื้อนของสารประกอบพอลิไซคลิกแอโรแมติกไฮโดรคาร์บอน ในสิ่งแวดล้อม .....	8
2.3 การเข้าสู่ร่างกาย ความเป็นพิษ และการเป็นสารก่อมะเร็ง ของสารประกอบพอลิไซคลิกแอโรแมติกไฮโดรคาร์บอน .....	10
2.4 วิธีการกำจัดและการย่อยสลายสารประกอบพอลิไซคลิก แอโรแมติกไฮโดรคาร์บอน .....	12
2.4.1 การเผาที่อุณหภูมิสูง .....	12
2.4.2 วิธีทางกายภาพ.....	12
2.4.3 วิธีทางเคมี .....	12

บทที่	หน้า	
2.4.4	วิธีทางเคมี-ฟิสิกส์.....	12
2.4.5	วิธีบำบัดทางชีวภาพ .....	12
2.5	แบคทีเรียดีในทรีฟอง .....	13
2.6	ความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้าง สภาพพิษ และการถูกย่อยสลายได้ของสารปนเปื้อน .....	15
2.6.1	สภาพพร้อมใช้ทางชีวภาพ.....	15
2.6.2	โครงสร้างของสารปนเปื้อน .....	17
2.6.3	สภาพความเป็นพิษ .....	17
2.7	ปัจจัยทางสิ่งแวดล้อมที่มีผลต่อการย่อยสลาย .....	18
2.7.1	ภาวะมีออกซิเจนและภาวะไร้ออกซิเจน .....	18
2.7.2	ปริมาณสารอินทรีย์ .....	19
2.7.3	ปริมาณไนโตรเจน .....	19
2.8	การประยุกต์ใช้จุลินทรีย์เพื่อการย่อยสลายทางชีวภาพ ของสารประกอบพอลิไซคลิกแอโรแมติกไฮโดรคาร์บอน .....	19
3	อุปกรณ์ เคมีภัณฑ์ และวิธีดำเนินการวิจัย .....	23
วัสดุอุปกรณ์	.....	23
เคมีภัณฑ์	.....	24
วิธีการดำเนินงานวิจัย	.....	26
3.1	การเก็บตัวอย่างตะกอนดินจากพื้นที่เกาะสีชัง จังหวัดชลบุรี .....	26
3.2	วิเคราะห์องค์ประกอบทางกายภาพจากตัวอย่างตะกอนดินใต้ทะเล .....	28
3.3	คัดแยกแบคทีเรียดีในทรีฟองจากตัวอย่างตะกอนดินด้วยเทคนิค Pour plate... ..	28
3.4	บ่งชี้ชนิดของจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้จากตะกอนดิน ด้วยการตรวจสอบลำดับเบสของ 16 S rDNA identification.....	28
3.5	ทดสอบความสามารถในการย่อยสารประกอบพอลิไซคลิก แอโรแมติก ไฮโดรคาร์บอนชนิดเนฟธาซีน .....	30
3.6	ตรวจสอบปริมาณการย่อยสารประกอบพอลิไซคลิกแอโรแมติกไฮโดรคาร์บอน ด้วยเครื่อง High-performance liquid chromatography.....	31



บทที่	หน้า
3.7 ทดสอบการเกิดกระบวนการรีดิวซ์ ไนทริไฟเคชัน/ ดีไนทริไฟเคชัน ในจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้แต่ละชนิด.....	31
3.8 ทดสอบความสามารถในการย่อยสลายประกอบพอลิไซคลิก แอโรแมติก ไฮโดรคาร์บอนชนิดเนฟธาซีน ไพรีน และเบนโซ-เอ-ไพรีน .....	31
4 ผลการทดลอง .....	32
4.1 ผลการคัดแยกจุลินทรีย์จากตัวอย่างตะกอนดินใต้ทะเลด้วย สูตรอาหารโบเตโต้เดกซ์โตรสตัดแปลงและมีการเติมเนฟธาซีน 200 ppm.....	32
4.1.1 ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบทางกายภาพ จากตัวอย่างตะกอนดินใต้ทะเล .....	32
4.1.2 ผลการคัดแยกแบคทีเรียดีไนทริไฟอิงจากตัวอย่างตะกอนใต้ทะเล .....	35
4.1.3 ผลการบ่งชี้บ่งชี้ชนิดของจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้จากตะกอนดิน ด้วย 16 S rDNA sequence identification.....	36
4.1.4 ผลการทดสอบความสามารถในการย่อยสลายเนฟธาซีน และการทำปริมาณวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC.....	38
4.1.5 ผลการทดสอบความสามารถในการรีดิวซ์ ในกระบวนการไนทริไฟเคชัน / ดีไนทริไฟเคชัน.....	39
4.2 ผลการคัดแยกจุลินทรีย์จากตัวอย่างตะกอนดินใต้ทะเล ด้วยอาหารวุ้นสูตรไนเตรต (Nitrate Agar) ดัดแปลง และมีการเติมเนฟธาซีน 200 ppm.....	39
4.2.1 ผลการคัดแยกแบคทีเรียดีไนทริไฟอิงจากตัวอย่างตะกอนใต้ทะเล .....	39
4.2.2 ผลการทดสอบความสามารถในการย่อยสลายประกอบ พอลิไซคลิกแอโรแมติก ไฮโดรคาร์บอน ชนิดเนฟธาซีน ไพรีน และเบนโซ-เอ-ไพรีน .....	47
4.2.3 ผลการบ่งชี้บ่งชี้ชนิดของแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากตะกอนดิน ด้วย 16 S rDNA identification.....	53
5 สรุปและวิจารณ์การทดลอง .....	54
รายการอ้างอิง.....	61
ภาคผนวก.....	66

หน้า	หน้า
ภาคผนวก ก .....	67
ภาคผนวก ข .....	70
ภาคผนวก ค .....	73
ภาคผนวก ง .....	81
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....	90

## สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า	
2.1	คุณสมบัติทางกายภาพและเคมีของ PAHs ชนิดต่างๆ.....	8
2.2	ตัวอย่างเกณฑ์การปนเปื้อนของโรงงานอุตสาหกรรม .....	9
2.3	ความสามารถในการเป็นสารก่อมะเร็งของสารประกอบพอลิไซคลิก แอโรแมติกไฮโดรคาร์บอน .....	11
2.4	งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับแบคทีเรียดีไนทริไฟอิงและการย่อยสลาย PAHs.....	15
3.1	แสดงรายละเอียดจุดเก็บตัวอย่างตะกอนดินใต้ทะเลจากบริเวณพื้นที่เกาะสีชัง .....	27
3.2	ไพรมอร์ 27F และ 1492R.....	30
3.3	ส่วนผสมที่ใช้ในการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอโดยวิธี PCR.....	30
4.1	บันทึกผลคุณสมบัติทางกายภาพตัวอย่างตะกอนดินใต้ทะเลของเกาะสีชัง .....	34
4.2	ลักษณะโคโลนีของแบคทีเรียที่แยกได้จากอาหารวุ้น ที่มีการเติมเนพธาลินเป็นองค์ประกอบ .....	34
4.3	แสดงปริมาณเนพธาลินที่เหลืออยู่ในเชื้อเมื่อเวลาผ่านไป .....	38
4.4	จำนวนไอโซเลตที่ได้จากตะกอนดินใต้ทะเลในแต่ละสถานที่เก็บตัวอย่าง.....	40
4.5	ผลการทดสอบวิธี Alpha-Naphthylamine Method .....	41
4.6	ผลการทดสอบวิธี Alpha-Naphthylamine Method (ต่อ) .....	42
4.7	ผลการทดสอบวิธี Alpha-Naphthylamine Method (ต่อ).....	43
4.8	ผลการทดสอบวิธี Alpha-Naphthylamine Method (ต่อ).....	44
4.9	แสดงสถานะและไอโซเลตที่มีคุณสมบัติเป็นแบคทีเรียดีไนทริไฟอิง .....	45
4.10	ปริมาณ PAHs ที่เหลืออยู่เมื่อเวลาผ่านไป 16 วัน ของแบคทีเรียดีไนทริไฟอิงที่คัดแยกได้จากตะกอนดินใต้ทะเล .....	48
4.11	ผลการทำปริมาณวิเคราะห์เนพธาลินด้วยเครื่อง HPLC.....	50
4.12	ผลการทำปริมาณวิเคราะห์ไพรีนด้วยเครื่อง HPLC.....	51
4.13	ผลการทำปริมาณวิเคราะห์เบนโซ-เอ-ไพรีนด้วยเครื่อง HPLC.....	52
4.14	ชนิดของแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากตะกอนใต้ทะเล .....	53
5.1	ผลการตรวจสอบสายพันธุ์ของแบคทีเรียดีไนทริไฟอิง ที่คัดแยกได้จากตะกอนดินใต้ทะเลจากบริเวณเกาะสีชัง .....	57

ตารางที่ หน้า

ค .1 ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ		
แบคทีเรียดีในทรีฟองไอโซเลต	B3/1 <i>E. faecalis</i> .....	73
ค .2 ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ		
แบคทีเรียดีในทรีฟองไอโซเลต	B3/2 <i>P. macerans</i> .....	74
ค.3 ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ		
แบคทีเรียดีในทรีฟองไอโซเลต	A2/2 <i>B. subtilis</i> .....	75
ค.4 ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ		
แบคทีเรียดีในทรีฟองไอโซเลต	A2/3 <i>B. tequilensis</i> .....	76
ค .5 ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ		
แบคทีเรียดีในทรีฟองไอโซเลต	A7/1 <i>B. subtilis</i> .....	77
ค.6 ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ		
แบคทีเรียดีในทรีฟองไอโซเลต	A7/2 <i>B. subtilis</i> .....	78
ค.7 ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ		
แบคทีเรียดีในทรีฟองไอโซเลต	A9/1 <i>P. mirabilis</i> .....	79
ค .8 ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ		
แบคทีเรียดีในทรีฟองไอโซเลต	A12/2 <i>E. asburiae</i> .....	80
ง .1 ผลการวิเคราะห์ด้วย Oneway ANOVA โปรแกรม SPSS ของไอโซเลต B3/1		
<i>E. faecalis</i> ต่อการย่อยสลาย PAHs ในวันที่ 16.....		81
ง .2 ผลการวิเคราะห์ด้วย Oneway ANOVA โปรแกรม SPSS ของไอโซเลต B3/2		
<i>P. macerans</i> ต่อการย่อยสลาย PAHs ในวันที่ 16.....		82
ง .3 ผลการวิเคราะห์ด้วย Oneway ANOVA โปรแกรม SPSS ของไอโซเลต A2/2		
<i>B. subtilis</i> ต่อการย่อยสลาย PAHs ในวันที่ 16 .....		83
ง .4 ผลการวิเคราะห์ด้วย Oneway ANOVA โปรแกรม SPSS ของไอโซเลต A2/3		
<i>B. tequilensis</i> ต่อการย่อยสลาย PAHs ในวันที่ 16 .....		84
ง .5 ผลการวิเคราะห์ด้วย Oneway ANOVA โปรแกรม SPSS		
ของไอโซเลต A7/1 <i>B. subtilis</i> ต่อการย่อยสลาย PAHs ในวันที่ 16.....		85

ตารางที่	หน้า
ง .6 ผลการวิเคราะห์ด้วย Oneway ANOVA โปรแกรม SPSS ของไอโซเลต A7/2 <i>B. subtilis</i> ต่อการย่อยสลาย PAHs ในวันที่ 16.....	86
ง .7 ผลการวิเคราะห์ด้วย Oneway ANOVA โปรแกรม SPSS ของไอโซเลต A9/1 <i>P. mirabilis</i> ต่อการย่อยสลาย PAHs ในวันที่ 16.....	87
ง .8 ผลการวิเคราะห์ด้วย Oneway ANOVA โปรแกรม SPSS ของไอโซเลต A12/2 <i>E. asburiae</i> ต่อการย่อยสลาย PAHs ในวันที่ 16.....	88
ง .9 ผลการวิเคราะห์ด้วย Oneway ANOVA โปรแกรม SPSS ของ control ที่ไม่มีการเติมเชื้อ ต่อการย่อยสลาย PAHs ในวันที่ 16.....	89

## สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า	
2.1	โครงสร้างโมเลกุลของ PAHs.....	7
2 .2	กระบวนการดีไนทริฟิเคชัน และสรุปสาระสำคัญ.....	14
3.1	แสดงตำแหน่งที่มีการเก็บตัวอย่างจากบริเวณพื้นที่เกาะสีชัง.....	26
4 .1	ชุมชนขนาดใหญ่ริมทะเลและแหล่งจอดเรือขนส่งสินค้าบริเวณน้ำลึกของเกาะสีชัง..	33
4 .2	แสดงโคโลนีของจุลินทรีย์ที่ได้จากการตัดแยก.....	35
4 .3	แสดงชิ้นดีเอ็นเอขนาด 1600 กิโลเบสของ 16S rDNA.....	36
4 .4	ผลการตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ของ <i>Clostridium barlettii</i> ที่ตัดแยกได้จากฐานข้อมูล GenBank.....	37
4 .5	ลักษณะทางสรีรวิทยาของ <i>Clostridium barlettii</i> .....	37
4 .6	แสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณเนพธาลิน ที่เหลืออยู่ในอาหารเมื่อเวลาผ่านไป .....	38
4 .7	ตัวอย่างเชื้อที่ตัดแยกได้จากสถานีต่างๆ.....	46
4 .8	เปรียบเทียบปริมาณ PAHs ที่เหลืออยู่เมื่อเวลาผ่านไป 16 วัน ของแบคทีเรียดีไนทริฟิเคชันที่ตัดแยกได้จากตะกอนดินใต้ทะเล .....	49
4 .9	แสดงความสัมพันธ์ของปริมาณเนพธาลินต่อเวลา เมื่อใช้ความเข้มข้นหัวเชื้อเริ่มต้น 5 %.....	50
4 .10	แสดงความสัมพันธ์ของปริมาณไพรีนต่อเวลา เมื่อใช้ความเข้มข้นหัวเชื้อเริ่มต้น 5 %.....	53
4 .11	แสดงความสัมพันธ์ของปริมาณเบนโซ-เอ-ไพรีนต่อเวลา เมื่อใช้ความเข้มข้นหัวเชื้อเริ่มต้น 5 %.....	52
5.1	กลไกการย่อยสลายเบื้องต้นของเนพธาลินภายใต้ภาวะไร้ออกซิเจน.....	56

ภาพที่ หน้า

ข .1	กระบวนการไนโตรฟิกเคชัน / ดีไนโตรฟิกเคชัน.....	70
ข.2	แผนภูมิการทดสอบด้วยวิธีแอลฟา-แนพธิลไมด์.....	72
ง .1	ผลการย่อยสลาย PAHs เมื่อเวลาผ่านไป 16 วัน ของไอโซเลต B3/1 <i>E. faecalis</i> ที่ความเข้มข้นของหัวเชื้อเริ่มต้น 5%.....	81
ง.2	ผลการย่อยสลาย PAHs เมื่อเวลาผ่านไป 16 วัน ของไอโซเลต B3/2 <i>P. macerans</i> ที่ความเข้มข้นของหัวเชื้อเริ่มต้น 5%.....	82
ง.3	ผลการย่อยสลาย PAHs เมื่อเวลาผ่านไป 16 วัน ของไอโซเลต A2/2 <i>B. subtilis B. subtilis</i> ที่ความเข้มข้นของหัวเชื้อเริ่มต้น 5%.....	83
ง.4	ผลการย่อยสลาย PAHs เมื่อเวลาผ่านไป 16 วัน ของไอโซเลต A2/3 <i>B. tequilensis</i> ที่ความเข้มข้นของหัวเชื้อเริ่มต้น 5%.....	84
ง.5	ผลการย่อยสลาย PAHs เมื่อเวลาผ่านไป 16 วัน ของไอโซเลต A7/1 <i>B. subtilis</i> ที่ความเข้มข้นของหัวเชื้อเริ่มต้น 5%.....	85
ง.6	ผลการย่อยสลาย PAHs เมื่อเวลาผ่านไป 16 วัน ของไอโซเลต A7/2 A7/2 <i>B. subtilis</i> ที่ความเข้มข้นของหัวเชื้อเริ่มต้น 5%.....	86
ง.7	ผลการย่อยสลาย PAHs เมื่อเวลาผ่านไป 16 วัน ของไอโซเลต A9/1 <i>P. mirabilis</i> ที่ความเข้มข้นของหัวเชื้อเริ่มต้น 5%.....	87
ง.8	ผลการย่อยสลาย PAHs เมื่อเวลาผ่านไป 16 วัน ของไอโซเลต A12/2 <i>E. asburiae</i> ที่ความเข้มข้นของหัวเชื้อเริ่มต้น 5%.....	88

**คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ**

Naph	หมายถึง	naphthalene
Py	“	pyrene
Benzo	“	benzo-a-pyrene
B3/1	“	เชื้อที่คัดแยกได้ใน Lot B จากสถานีที่ 3 ไอโซเลตที่ 1
B3/2	“	เชื้อที่คัดแยกได้ใน Lot B จากสถานีที่ 3 ไอโซเลตที่ 2
A2/2	“	เชื้อที่คัดแยกได้ใน Lot A จากสถานีที่ 2 ไอโซเลตที่ 2
A2/3	“	เชื้อที่คัดแยกได้ใน Lot A จากสถานีที่ 2 ไอโซเลตที่ 3
A7/1	“	เชื้อที่คัดแยกได้ใน Lot A จากสถานีที่ 7 ไอโซเลตที่ 1
A7/2	“	เชื้อที่คัดแยกได้ใน Lot A จากสถานีที่ 7 ไอโซเลตที่ 2
A9/1	“	เชื้อที่คัดแยกได้ใน Lot A จากสถานีที่ 9 ไอโซเลตที่ 1
A12/2	“	เชื้อที่คัดแยกได้ใน Lot A จากสถานีที่ 12 ไอโซเลตที่ 2



# บทที่ 1

## บทนำ

### 1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

สารประกอบพอลิไซคลิกแอโรแมติกไฮโดรคาร์บอน (Polycyclic Aromatic Hydrocarbon) หรือที่เรียกโดยย่อว่า PAHs เป็นสารประกอบอินทรีย์ที่มีโครงสร้างโมเลกุลเป็นวงเบนซินตั้งแต่ 2 วงขึ้นไป สามารถเกิดขึ้นได้เองตามธรรมชาติจากการเผาไหม้ที่ไม่สมบูรณ์ของสารอินทรีย์ โดยมักเกิดการปนเปื้อนในธรรมชาติจากกิจกรรมของมนุษย์และกิจกรรมจากโรงงานอุตสาหกรรม เช่น การขุดเจาะ การกลั่นน้ำมันดิบ รวมไปถึงการรั่วไหลจากเรือบรรทุกน้ำมันและเรือขนส่งสินค้า เป็นต้น

การรั่วไหลของ PAHs เหล่านี้ส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมโดยตรง โดยเฉพาะอย่างยิ่งเมื่อเกิดการรั่วไหลลงสู่ระบบนิเวศในทะเล เพราะสารเหล่านี้มีความสามารถในการละลายน้ำต่ำหรือไม่ละลายน้ำเลย ทำให้ไปปิดกั้นการละลายของออกซิเจนลงสู่แหล่งน้ำ อีกทั้งหากมีการปนเปื้อนในระดับที่รุนแรงก็ลงไปยังชั้นตะกอนดินใต้น้ำ สารประกอบเหล่านี้จะยึดเกาะกับอนุภาคดิน จึงทำให้สะสมอยู่ในสิ่งแวดล้อมได้เป็นเวลานานขึ้น นอกจากนี้ยังมีความเป็นพิษสูง โดยไปมีผลต่อระบบสืบพันธุ์และภูมิคุ้มกันของสัตว์น้ำ รวมทั้งมีความเป็นพิษต่อมนุษย์เรื้อรังและพบว่ามีความสามารถเป็นสารก่อมะเร็งได้ (Kanaly และ Harayama, 2000)

โดยธรรมชาติปฏิกิริยาระหว่างแสงแดดและสารประกอบไฮโดรคาร์บอนจะช่วยลดความเป็นพิษของสารประกอบเหล่านี้ลงได้ ซึ่งในอดีตของเสียจำพวกสารอินทรีย์มลพิษ รวมไปถึง PAHs จะถูกกำจัดโดยการกลบฝังที่จัดเป็นวิธีทางกายภาพ แต่วิธีนี้หากปฏิบัติโดยขาดความรู้ความเข้าใจจะทำให้เกิดการแพร่กระจายไปปนเปื้อนสู่ดินและแหล่งน้ำได้เป็นวงกว้าง ส่วนในทางชีวภาพ การย่อยสลายจะเกิดขึ้นโดยอาศัยกิจกรรมของจุลินทรีย์ โดยสารประกอบเหล่านี้จะถูกใช้ไปในรูปของแหล่งอาหารหรือขั้วเสถียรของจุลินทรีย์ หากกระบวนการย่อยสลายเกิดขึ้นอย่างสมบูรณ์ (mineralization) จะได้ผลิตภัณฑ์จากการออกซิไดซ์สารประกอบเป็นคาร์บอนไดออกไซด์และน้ำที่จะถูกนำไปใช้เพื่อเป็นแหล่งพลังงานในการเจริญเติบโตและการสืบพันธุ์ของเซลล์ กิจกรรมการย่อยสลายอย่างสมบูรณ์นี้สามารถเกิดขึ้นได้ในภาวะที่มีและไม่มีออกซิเจน โดยการย่อยในแต่ละขั้นตอนเกิดจากการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ที่สร้างขึ้นโดยเซลล์ เพราะส่วนใหญ่เอนไซม์ถูก

ปลดปล่อยออกมาในกระบวนการย่อยเบื้องต้น เพื่อช่วยให้ซับสเตรทที่มีขนาดเล็กถึงจนสามารถผ่านเข้าสู่เซลล์ และกระบวนการย่อยทั้งหมดจะสิ้นสุดลงเมื่อไม่มีเอนไซม์ที่สามารถย่อยซับสเตรทเหล่านี้ต่อไปได้ แต่โดยทั่วไป PAHs มีโครงสร้างทางเคมีที่ซับซ้อน ทำให้เอนไซม์ปกติไม่สามารถย่อยได้ และนอกจากนี้ยังมีกระบวนการย่อยสลายอีกรูปแบบหนึ่งซึ่งเป็นการย่อยสลายแบบไม่สมบูรณ์ เกิดได้จากกระบวนการเมแทบอลิซึมร่วม (co-metabolism) ของจุลินทรีย์หรือสิ่งมีชีวิตหลายชนิดที่เกิดร่วมกัน เป็นการออกซิไดซ์เพียงบางส่วน และพลังงานที่ได้ไม่ถูกนำไปใช้เพื่อการเจริญของเซลล์ โดยกระบวนการนี้เกิดขึ้นขณะที่เซลล์มีการหลั่งเอนไซม์ที่สามารถย่อยสารปกติได้ แต่เอนไซม์เหล่านี้ไม่ค่อยมีความจำเพาะจึงทำให้เกิดการย่อยสลายสารอื่นร่วมด้วย กระบวนการย่อยสลายแบบไม่สมบูรณ์ยังอาจเป็นผลมาจากกระบวนการเกิดพอลิเมอร์ (Polymerization) หรือการเกิดเป็นสารที่มีความซับซ้อนหรือคงทนมากกว่าสารเริ่มต้น มักจะเกิดขึ้นในช่วงแรกของขั้นตอนการย่อยสลาย โดยสารที่มีความแอกทีฟสูงจะเข้าจับกันเองหรือจับกับสารตัวอื่น เป็นผลให้สารเหล่านี้ค่อนข้างคงทนในสิ่งแวดล้อม ทั้งนี้ความคงทนที่เกิดขึ้นนั้นเนื่องมาจากการมีคุณสมบัติการละลายน้ำต่ำ การขาดเอนไซม์ย่อย รวมไปถึงการถูกดูดซับที่อนุภาคของดินสูง (วีรานูช หลาง , 2554)

การบำบัด PAHs ที่ปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อมสามารถทำได้หลายวิธี ได้แก่ วิธีทางกายภาพ เช่น การฝังกลบ และการกรองที่นิยมใช้กันในกระบวนการทำน้ำประปาจากแหล่งน้ำดิบธรรมชาติ และวิธีทางชีวภาพซึ่งเป็นการบำบัดโดยอาศัยวิถีเมแทบอลิซึมของสิ่งมีชีวิต เช่น พืช รา และแบคทีเรีย สำหรับระบบนิเวศในทะเลบริเวณก้นมหาสมุทรและตะกอนชายฝั่งที่มีออกซิเจนอย่างจำกัดหรือไม่มีออกซิเจนเลย (anoxic) การเลือกใช้วิธีทางชีวภาพจึงเป็นวิธีที่เหมาะสมและมีความสะดวกที่สุด เพราะมีค่าใช้จ่ายน้อยกว่า (Selina และ Ian, 2005; Lors และคณะ , 2012) และยังสามารถใช้แบคทีเรียที่มีอยู่ตามธรรมชาติในระบบนิเวศนั้นๆได้ โดยมีรายงานของ Bonin และคณะ (1994) ซึ่งได้ทำการศึกษาตะกอนในทะเลเมดิเตอร์เรเนียนชายฝั่งประเทศฝรั่งเศส พบว่าการปนเปื้อนไปด้วยโลหะหนักและสารประกอบไฮโดรคาร์บอนมากถึง 31 กรัมต่อกิโลกรัมของตะกอน และพบว่าในตะกอนที่ปนเปื้อนด้วยสารประกอบไฮโดรคาร์บอนอย่างมากนั้นกลับไม่มีผลกระทบต่อกระบวนการดีไนทริฟิเคชันของจุลินทรีย์ในบริเวณนั้น จึงเป็นสมมติฐานที่เป็นไปได้ว่าแบคทีเรียดีไนทริไฟอิงอาจมีความสามารถทนทานต่อสารประกอบไฮโดรคาร์บอนได้ โดยใช้ไฮโดรคาร์บอนเหล่านั้นเป็นแหล่งคาร์บอนในการเจริญ

ดีไนทริไฟอิงเป็นแบคทีเรียที่มีความสามารถในการรีดิวซ์สารประกอบไนเตรตให้อยู่ในรูปของก๊าซไนโตรเจนได้ พบได้ทั้งในแบคทีเรียและรา และสามารถเจริญได้ในภาวะที่ไม่ใช้ออกซิเจน

จึงนับเป็นจุดอินทรีย์ที่น่าสนใจจากคุณลักษณะความสามารถในการสร้างเอนไซม์ที่สามารถย่อยสลายองค์ประกอบสารเคมีชนิดไนเทรตได้ แบคทีเรียดีไนทริไฟอิงเจริญเติบโตได้ดีในภาวะแวดล้อมกึ่งไร้ออกซิเจน คือสามารถใช้ทั้งออกซิเจนและไนเทรตเป็นตัวรับอิเล็กตรอนตัวสุดท้ายที่เกี่ยวข้องกับกลไกการย่อยสลายและการแตกตัวของ PAHs ไปเป็นสารที่มีสภาพความเป็นพิษลดลงได้

ในงานวิจัยนี้ จึงมีความสนใจที่จะทำการศึกษาเพื่อคัดแยกแบคทีเรียดีไนทริไฟอิงดังกล่าวจากดินตะกอนบริเวณพื้นที่ชายฝั่งเกาะสีชังที่อาจปนเปื้อนน้ำมันจากเรือประมง เพื่อประเมินความสามารถในการนำไปใช้ในกระบวนการบำบัด PAHs ในสิ่งแวดล้อมต่อไป

## 1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

วิทยานิพนธ์นี้มีวัตถุประสงค์เพื่อการคัดแยกแบคทีเรียดีไนทริไฟอิงที่สามารถย่อยสลายสารประกอบพอลิไซคลิกแอโรแมติกไฮโดรคาร์บอนจากตะกอนดินใต้ทะเลได้ ทั้งนี้เนื่องจากคุณสมบัติการละลายน้ำต่ำของ PAHs จึงทำให้ตกค้างในสิ่งแวดล้อมได้เป็นเวลานาน ทำให้เกิดปัญหามลภาวะสิ่งแวดล้อม โดยเฉพาะอย่างยิ่งบริเวณตะกอนดินใต้ทะเลที่มีออกซิเจนอยู่น้อย การย่อยสลาย PAHs จึงเป็นไปได้ไม่ดี ส่งผลให้เกิดการสะสมในร่างกายและกระทบต่อสิ่งมีชีวิตที่ผิวตะกอนใต้ทะเล เช่น กุ้ง ปู และครัสเตเชียนอื่นๆ หนทางหนึ่งในการแก้ปัญหาคือการใช้แบคทีเรียดีไนทริไฟอิง เพราะเป็นแบคทีเรียที่สามารถเจริญได้ในภาวะที่มีออกซิเจนต่ำหรือไม่มีออกซิเจนได้ และมีรายงานหลายชิ้นที่ศึกษาเกี่ยวกับการใช้แบคทีเรียดีไนทริไฟอิงในการย่อยสลาย PAHs

การทดลองนี้เริ่มจากการจากการสุ่มเก็บตัวอย่างตะกอนดินใต้ทะเลจากบริเวณเกาะสีชัง โดยได้รับความอนุเคราะห์จากสถาบันวิจัยทางน้ำ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เกาะสีชังเป็นแหล่งท่องเที่ยวที่สำคัญและเป็นแหล่งชุมชนขนาดใหญ่ในจังหวัดชลบุรี อีกทั้งเกาะสีชังยังมีความสำคัญในการเป็นท่าเทียบเรือสำเภา เพื่อขนถ่ายสินค้าไปสู่เรือลากจูงและลำเลียงไปยังจุดรับสินค้าในบริเวณลุ่มแม่น้ำเจ้าพระยา จึงทำให้มีการคาดการณ์ว่าบริเวณดังกล่าวเหล่านี้มีการปนเปื้อนของ PAHs จากกิจกรรมชุมชน และการรั่วไหลของน้ำมันจากเรือลากจูงและบรรทุกสินค้า งานวิจัยจากรูจยา บุรยทุมานนท์และคณะ (2006) ที่ได้ทำการศึกษาการกระจายตัวของ PAHs และโมเลกุลมาร์คเกอร์ในตะกอนดินบริเวณคลอง แม่น้ำเจ้าพระยา ปากแม่น้ำและอ่าวไทยตอนบน พบว่าการปนเปื้อนของ PAHs ในตะกอนดินจากคลอง แม่น้ำ ปากแม่น้ำ และอ่าวไทยตอนบนเป็นการ

ตกค้างที่เกิดจากการรั่วไหลของน้ำมัน (Petrogenic) และกิจกรรมการเผาไหม้ที่ไม่สมบูรณ์ (Pyrogenic) จากการศึกษาพบปริมาณความเข้มข้นของ PAHs ในโคลงมีความเข้มข้นของสาร อยู่ระหว่าง 512 – 8399 นาโนกรัมต่อกรัม (น้ำหนักแห้ง) แม่น้ำเจ้าพระยาพบ 33 – 590 นาโนกรัมต่อกรัม (น้ำหนักแห้ง) ปากแม่น้ำพบ 29 – 724 นาโนกรัมต่อกรัม (น้ำหนักแห้ง) และชายฝั่งทะเลของไทยพบ 6 – 228 นาโนกรัมต่อกรัม (น้ำหนักแห้ง) ตามลำดับ

การบำบัดทางชีวภาพมีจุดประสงค์เพื่อใช้ประโยชน์ของกระบวนการย่อยสลายที่เกิดขึ้นตามธรรมชาติ ใช้ทำความสะอาดแหล่งที่มีการปนเปื้อน ซึ่งโดยทั่วไปมีวิธีดังต่อไปนี้ (วีรานุช หลาง, 2554)

1. การเติมออกซิเจนหรือแก๊สชนิดอื่นเช่น ไนโตรเจนและมีเทน เป็นต้น
  2. การเติมสารอาหารเช่น ไนโตรเจนและฟอสฟอรัส โดยแหล่งปนเปื้อนหลายแห่งมักอุดมไปด้วยแหล่งคาร์บอนแต่มีไนโตรเจนและฟอสฟอรัสในปริมาณต่ำ การเติมสารอาหารเพิ่มลงไปก็เพื่อการสร้างสมดุลที่เหมาะสม คือมีสัดส่วนของคาร์บอน ไนโตรเจน และฟอสฟอรัส เป็นไปในอัตราส่วน 100: 10: 1
  3. การกระตุ้นการย่อยแบบไร้อากาศโดยใช้ตัวรับอิเล็กทรอนิกส์อื่น ซึ่งแม้ว่าการย่อยในภาวะที่มีออกซิเจนจะเกิดขึ้นได้รวดเร็วกว่ามาก แต่เนื่องมาจากการปนเปื้อนในบางบริเวณมีออกซิเจนอยู่อย่างจำกัด และเป็นที่ยากที่จะรักษาสภาพออกซิเจนในบางบริเวณ จึงทำให้มีการใช้อิเล็กทรอนิกส์อื่น เช่น ไนเตรต ซัลเฟต เหล็ก และคาร์บอนไดออกไซด์
  4. การเติมจุลินทรีย์เพื่อกระตุ้นการเกิดกระบวนการย่อยสลายทางชีวภาพ โดยทั่วไปถ้าจุลินทรีย์ที่ย่อยสลายได้ไม่ถูกพบในดินหรือการที่กลุ่มประชากรจุลินทรีย์มีจำนวนลดลงเนื่องจากเกิดการปนเปื้อนของสารพิษ การเติมจุลินทรีย์ลงไปจะเป็นการชักนำการเพิ่มประชากร เรียกว่า กระบวนการเพิ่มพูนทางชีวภาพ (Bioaugmentation) แต่วิธีนี้มักประสบความล้มเหลวเนื่องจากจุลินทรีย์ที่เติมลงไปไม่สามารถเจริญในสิ่งแวดล้อมนั้นได้จริงๆ และมักรอดชีวิตเพียงไม่กี่สัปดาห์ ทางแก้ไขคือการคัดแยกเชื้อจากบริเวณที่ปนเปื้อนมาใช้ เพราะเป็นจุลินทรีย์ที่มีอยู่เดิมในบริเวณนั้นอยู่แล้ว

### 1.3 ขอบเขตของการวิจัย

คัดแยกแบคทีเรียดีไนทริไฟอิงที่สามารถเจริญในอาหารที่มีสารประกอบพอลิไซคลิก แอโรแมติก ไฮโดรคาร์บอน และมีคุณลักษณะเฉพาะที่สามารถรีดิวซ์ไนไตรต์-ไนเตรต (nitrite-nitrate) และทดสอบความสามารถในการย่อยสลาย PAHs ของจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้

### 1.4 วิธีดำเนินการวิจัย

1. การเก็บตัวอย่างตะกอนดินจากพื้นที่เกาะสีชัง จังหวัดชลบุรี
2. วิเคราะห์องค์ประกอบทางกายภาพจากตัวอย่างตะกอนดินใต้ทะเล
3. คัดแยกแบคทีเรียดีไนทริไฟอิงจากตัวอย่างตะกอนดินด้วยเทคนิค Pour plate
4. บ่งชี้ชนิดของจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้จากตะกอนดินด้วยการตรวจสอบลำดับเบสของ 16 S rDNA identification
5. ทดสอบความสามารถในการย่อย PAHs ชนิดแนพทาลีน
6. ตรวจสอบปริมาณการย่อย PAHs ด้วยเครื่อง High-performance liquid chromatography (HPLC)
7. ทดสอบการเกิดกระบวนการรีดิวซ์ nitrification/ denitrification ในจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้แต่ละชนิด
8. ทดสอบความสามารถในการย่อย PAHs ชนิดแนพทาลีน ไพรีน และเบนโซ-เอ-ไพรีน
9. รวบรวมผลการทดลอง สรุปผลและเขียนวิทยานิพนธ์

### 1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ได้แบคทีเรียดีไนทริไฟอิงจากตะกอนดินใต้ทะเล อย่างน้อย 2-5 ชนิดที่มีความสามารถ ในการย่อยสลาย PAHs

## บทที่ 2

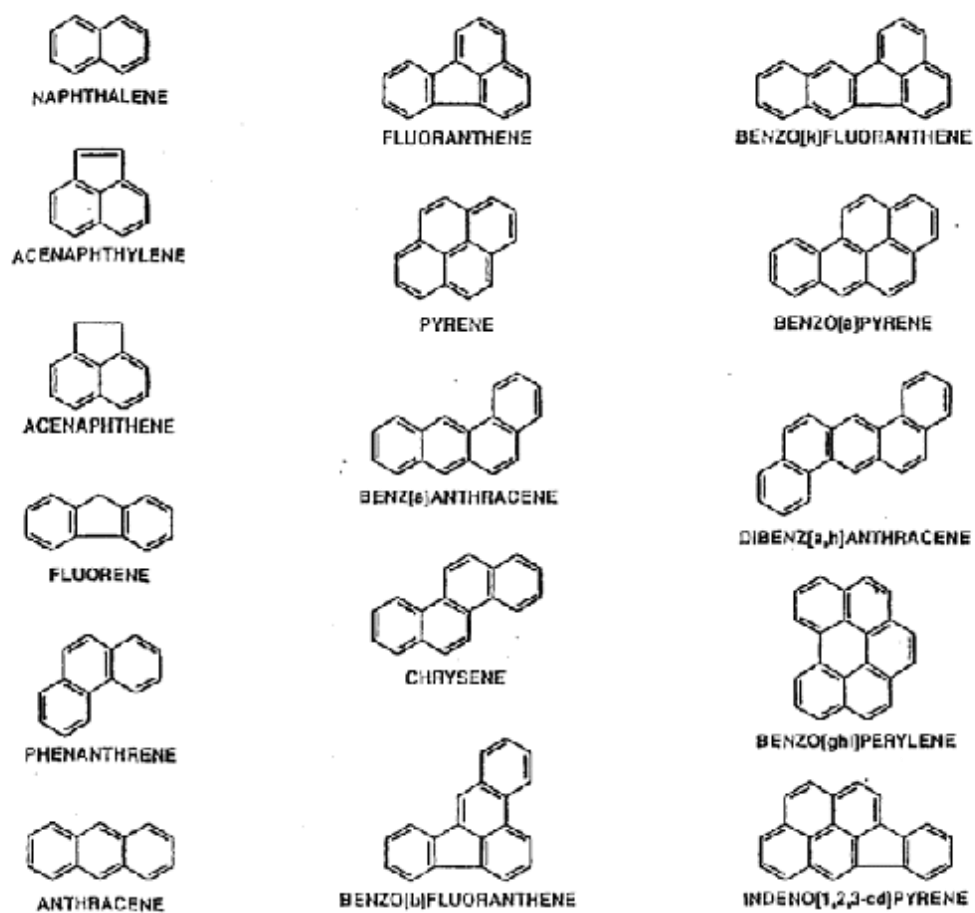
### เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

#### 2.1 ชนิดของสารประกอบพอลิไซคลิกแอโรแมติกไฮโดรคาร์บอน (Polycyclic Aromatic Hydrocarbon ; PAHs)

กลุ่มของสารประกอบอินทรีย์ที่มีโครงสร้างโมเลกุลประกอบด้วยวงเบนซีนตั้งแต่ 2 วงขึ้นไป PAHs เป็นตัวการสำคัญที่ก่อให้เกิดปัญหาสิ่งแวดล้อม เนื่องจากส่วนใหญ่มีความสามารถในการละลายน้ำต่ำ ทำให้ยากแก่การกำจัดและยังมีความเป็นพิษสูง (Kanaly และ Harayama, 2000) และยังเป็นองค์ประกอบที่พบได้ในน้ำมันดิบ ถ่านหิน และสามารถเกิดขึ้นเองได้ตามธรรมชาติจากการเผาไหม้ที่ไม่สมบูรณ์ของสารอินทรีย์นอกจากนี้ยังสามารถผลิตได้จากกระบวนการเคมีเพื่อนำไปใช้ในอุตสาหกรรม เช่น การผลิตสี พลาสติก สารปราบศัตรูพืช รวมไปถึงยาบางชนิด

PAHs นั้นมีคุณสมบัติเป็น hydrophobicity และ electrochemical stability (Harvey, 1997) ที่สัมพันธ์กับขนาดโมเลกุลและจำนวนวงเบนซีน ทำให้ PAHs มีช่วงชีวิต (half-life) ในสิ่งแวดล้อมที่ยาวนาน โดยแปรผันตามจำนวนวงเบนซีนที่เป็นองค์ประกอบ เช่น ฟิแนนทรีน (phenanthrene) มีวงเบนซีนเป็นองค์ประกอบจำนวน 3 วง มีช่วงชีวิตอยู่ที่ 16 – 26 วัน ในขณะที่ เบนโซ-เอ-ไพรีน (benzo-a-pyrene) ซึ่งมีวงเบนซีน 5 วงเป็นองค์ประกอบมีช่วงชีวิตอยู่ที่ 229 – 1,400 วัน หรือมากกว่า (Shuttleworth, 1995)

ในธรรมชาติสามารถจำแนก PAHs ได้เป็นร้อยชนิด ชนิดที่มีผลกระทบต่อสุขภาพและสิ่งแวดล้อมนั้น มีอยู่ด้วยกันทั้งหมด 16 ชนิด โดยสำนักงานคุ้มครองสิ่งแวดล้อมของสหรัฐอเมริกา (The U.S. Environmental Protection Agency, EPA) กำหนดให้ PAHs จำนวน 16 ชนิด เป็นสารมลพิษลำดับที่สองรองจากกลุ่มโลหะหนักและไซยาไนด์ที่อาจก่อให้เกิดมะเร็งในมนุษย์ รายชื่อและโครงสร้างของ PAHs ตามการจำแนกของสำนักงานคุ้มครองสิ่งแวดล้อมของสหรัฐอเมริกา แสดงดังภาพที่ 2.1 และข้อมูลแสดงคุณสมบัติทางกายภาพและเคมีดังตารางที่ 2.1



ภาพที่ 2.1 โครงสร้างโมเลกุลของ PAHs ทั้ง 16 ชนิดที่สำนักงานคุ้มครองสิ่งแวดล้อมของสหรัฐอเมริกาประกาศให้เป็นสารมลพิษสำคัญในลำดับที่สอง (Boonyatumanond และคณะ , 2007)

ตารางที่ 2.1 คุณสมบัติทางกายภาพและเคมีของ PAHs ชนิดต่างๆ (Nikolaou และคณะ, 2009)

	สูตรเคมี	น้ำหนักโมเลกุล	จุดหลอมเหลว (°C)	จุดเดือด (°C)	ความสามารถในการละลายน้ำ (g 100ml <sup>-1</sup> )	Log K <sub>ow</sub>	ความดันไอ (mmHg)
Naphthalene		128	80.5	218			
Phenanthrene	C <sub>14</sub> H <sub>10</sub>	178.233	99.5	340	1.18 x 10 <sup>-4</sup>	4.45	
Fluoranthene	C <sub>6</sub> H <sub>12</sub>	202.255	110.8	375	2.65x10 <sup>-5</sup>	4.90	5.0x10 <sup>-6**</sup>
Pyrene	C <sub>6</sub> H <sub>10</sub>	202.255	156	404	1.3x10 <sup>-6</sup>	4.88	2.5x10 <sup>-6**</sup>
Benzo-[a]-anthracene	C <sub>18</sub> H <sub>12</sub>	228.2928	159.8	437.6	1.4x10 <sup>-6</sup>	5.61	2.2x10 <sup>-8*</sup>
Benzo-[b]-fluoranthene	C <sub>20</sub> H <sub>12</sub>	252.3148	167	357	1.2x10 <sup>-7</sup>	6.04	5.0x10 <sup>-7*</sup>
Benzo-[k]-fluoranthene	C <sub>20</sub> H <sub>12</sub>	252.3148	215.7	480	5.5x10 <sup>-8</sup>	6.06	9.59x10 <sup>-11</sup>
Benzo-[e]-pyrene	C <sub>20</sub> H <sub>12</sub>	252.3148	178	492	<0.1		5.6x10 <sup>-9**</sup>
Indeno-[1,2,3]-cd-pyrene	C <sub>22</sub> H <sub>12</sub>	276.3368	162.5	536	6.2x10 <sup>-6</sup>	6.58	10 <sup>-11</sup> x10 <sup>-6*</sup>
Benzo-[g,h,i]-perylene	C <sub>22</sub> H <sub>12</sub>	276.3368	278.3	500	2.6x10 <sup>-8</sup>	6.50	1.03x10 <sup>-10**</sup>
Dibenzo-[a,h]-anthracene	C <sub>22</sub> H <sub>14</sub>	278.3526	266	524	5x10 <sup>-8</sup>	6.84	1.0x10 <sup>-10*</sup>

\* ที่ 20°C \*\* ที่ 25°C

## 2.2 การปนเปื้อนของสารประกอบพอลิไซคลิกแอโรแมติกไฮโดรคาร์บอนในสิ่งแวดล้อม (PAHs contamination in environment)

การปนเปื้อนของ PAHs ในสิ่งแวดล้อมนั้นมีหลายสาเหตุ ทั้งจากเหตุการณ์ธรรมชาติ เช่น ไฟป่า ภูเขาไฟระเบิด การเกิดน้ำท่วมและสึนามิที่ทำให้มีการชะ PAHs จากบนบกลงสู่ได้ทะเล แต่สำหรับสาเหตุที่ก่อให้เกิดการปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อมที่สำคัญที่สุดก็คือการกระทำของมนุษย์ ทั้ง



จากการเผาไหม้ของเชื้อเพลิงในรถยนต์และโรงงานอุตสาหกรรม การกลั่นและการรั่วไหลจากการขนส่งน้ำมันดิบ อุตสาหกรรมไม้ซึ่งใช้สารเคลือบทาเนื้อไม้เพื่อป้องกันแมลง อย่างไรก็ตาม มีเกณฑ์การกำหนดค่าต่างๆ ขึ้นอยู่กับมาตรการของแต่ละประเทศ สำหรับประเทศไทยนั้นก็มีกำหนดปริมาณค่าการปนเปื้อนปกติในธรรมชาติ ทั้งในดินและแหล่งน้ำ ที่ถือเป็นเกณฑ์ที่ไม่ควรเกินกำหนดเช่นกันดังแสดงในตารางที่ 2.2

**ตารางที่ 2.2** ตัวอย่างเกณฑ์การปนเปื้อนของโรงงานอุตสาหกรรม (ศูนย์บริการข้อมูลมลพิษดิน , 2554)

PAHs	CAS No.	ความเป็นอันตราย (Hazard)		เกณฑ์การปนเปื้อน	
		Cancer (Class)	Non-Cancer	ดิน (mg/kg)	น้ำใต้ดิน (mg/L)
Acenaphthene	83-32-9	-		1,541	2.0
Anthracene	120-12-7	-		65,513	10
Benzo-[a]-pyrene	50-32-8	A	-	0.01	0.0002
Benzo-[b]-fluoranthene	205-99-2	2B	-	0.1	0.0001
Benzo-[k]-fluoranthene	207-08-9	2B	-	1.0	0.001
Dibenz-[a,h]-anthracene	53-70-3	2B	-	0.01	0.00001
Fluoranthene	206-44-0	-		1,027	1.3
Fluorene	86-73-7	-		1,027	1.3
Indeno-[1,2,3-cd]-pyrene	193-39-5	2B	-	0.1	0.0001
Napthalene	91-20-3	2B	-	1,027	1.3
Pyrene	129-00-0	-		807	1.0

\*Group A: เป็นสารก่อมะเร็งในคน (Human carcinogen)

\*Group B: น่าจะเป็นสารก่อมะเร็งในคน (Probable human carcinogen)

1B: มีหลักฐานจากการศึกษาด้านระบาดวิทยาที่จำกัดว่าเป็นสารก่อมะเร็ง

2B: มีหลักฐานสนับสนุนเพียงพอจากการศึกษาในสัตว์ทดลองสัตว์ว่าเป็นสารก่อมะเร็ง

แต่มีหลักฐานสนับสนุนไม่เพียงพอหรือไม่ใช่ข้อมูลจากการศึกษาด้านระบาดวิทยาที่จำกัดว่าเป็นสารก่อมะเร็ง (“Sufficient” evidence from animal studies and “inadequate” evidence or “no data” from epidemiologic studies)

### 2.3 การเข้าสู่ร่างกาย ความเป็นพิษ และการเป็นสารก่อมะเร็งของสารประกอบพอลิไซคลิกแอโรแมติกไฮโดรคาร์บอน (Absorption, toxicity and carcinogen properties of PAHs)

PAHs มีความเป็นพิษ โดยมีรายงานจากสำนักงานคุ้มครองสิ่งแวดล้อมสหรัฐอเมริกา สหภาพยุโรป (European Union: EU) รวมไปถึงศูนย์บริการข้อมูลมลพิษดิน (Soil Pollution Information Center: sPIC) ของไทย งานวิจัยหลายชิ้นที่ระบุตรงกันว่า PAHs มีความเป็นพิษเฉียบพลันต่ำ (สำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์) การก่อกำเนิดของ PAHs ในสิ่งมีชีวิตชั้นสูงจะพบความเป็นพิษเนื่องมาจากการได้รับสารพิษแบบเรื้อรังทำให้เกิดผลกระทบต่อระบบต่างๆ ของร่างกาย แต่อาการไม่รุนแรงนัก ความเป็นพิษที่สำคัญของ PAHs คือความสามารถในการก่อมะเร็งในอวัยวะหลายชนิด มีรายงานว่าเมื่อให้สัตว์ทดลองได้รับสารเข้าสู่ร่างกายด้วยการสูดดมและการกินจะมีผลแพร่ไปยัง ปอด ตับ ไต และทางเดินอาหาร ในหนูทดลองที่ได้รับเบนโซ-เอ-ไพรีนโดยการหยอดเข้าหลอดคอ พบว่าเบนโซ-เอ-ไพรีนมีการกระจายไปยังปอด ตับ ทางเดินอาหาร (Wiersma และ Roth, 1982) โดยเมแทบอลิต์ในลำไส้จะมากขึ้นเมื่อเวลาผ่านไปนานขึ้น แสดงว่ามีการขับออกทางน้ำดีและมีการหมุนเวียนระหว่าง ตับ ลำไส้ และสามารถแพร่ไปยังตัวอ่อนในครรภ์ได้ อย่างไรก็ตามยังไม่มีรายงานเกี่ยวกับการแพร่กระจายหลังจากมีการสัมผัสทางผิวหนัง นอกจากนี้ PAHs ยังไปมีผลรบกวนต่อระบบต่อมไร้ท่อ ของปลา (Monterio และคณะ, 2000) และมีผลกระทบต่อสเตอรอยด์ฮอร์โมนในกลุ่มอาร์โทรพอด มีผลต่อการลอกคราบของปู และครัสเตเชียนหลายชนิดที่สัมผัสกับน้ำมันดิบมักมีการลอกคราบที่ผิดปกติ (Oberdoerster และคณะ, 1999)

PAHs ยังมีความสามารถในการเป็นสารก่อมะเร็ง โดยเอนไซม์ ของยูคาริโอตสามารถเปลี่ยน PAHs ให้เป็นอนุพันธ์ อีพอกไซด์ (epoxides) ซึ่งเข้าไปยึดเกาะกับ ดีเอ็นเอ ได้ (Mahadevan, 2005) และเมื่อมีการเข้าสู่ร่างกายจะถูกเปลี่ยนรูปด้วยเอนไซม์ในกลุ่มไซโตโครม พี-450 (cytochrome P-450) ทำงานแบบออกซิเดส ซึ่งจะได้เมแทบอลิต์ต่างกันไปแล้วแต่ชนิดของ PAHs เมแทบอลิต์ที่ได้บางชนิดเป็นพิษและเป็นสารก่อมะเร็ง เช่น 3,4-diol-1,2, epoxide ซึ่งเป็นเมแทบอลิต์ของเบนโซ-เอ-แอนทราซีน และบีพีดีอี (7,8,α-dihydroxy-9α,10α-7,8,9,10-tetrahydrobenzo-[a]-pyrene: BPDE) ซึ่งเป็นเมแทบอลิต์ของเบนโซ-เอ-ไพรีน โดยมีการจำแนกความสามารถในการเป็นสารก่อมะเร็งของ PAHs ไว้ดังตารางที่ 2.3

ตารางที่ 2.3 ความสามารถในการเป็นสารก่อมะเร็งของสารประกอบพอลิไซคลิกแอโรแมติกไฮโดรคาร์บอน (Kanaki, 2005)

PAHs	Indicator of carcinogenesis <sup>1</sup>	Total estimation <sup>2</sup>	EPA Classification (EPA, 1994) <sup>3</sup>	Toxicity Equivalence Factor (TEF) (EPA; 1993)
Acenaphthylene			D	0.001
Anthracene	I	3	D	0.01
Benzo[a]anthracene	S	2A	B2	0.1
Benzo[b]fluoranthene	S	2B	B2	0.1
Benzo[k]fluoranthene	S	2B	B2	0.1
Benzo[b]fluorene	I	3		
Benzo[g,h,i]perylene	I	3	D	0.01
Benzo[a]pyrene	S	2A	B2	1
Benzo[e]pyrene	I	3		
Chrysene	L	3	B2	0.01
Fluoranthene	I	3	D	0.001
Fluorene	I	3	D	0.001
Indeno[1,2,3-c,d]pyrene	S	2B	B2	0.1
Perylene	I	3		
Phenanthrene	I	3	D	0.001
Pyrene	I	3	D	0.001
Dibenzo[a,h]anthracene	S	2A	B2	5
Dibenzo[a,h]pyrene	S	2B		
Benzo[c]fluorene	I	3		
Benzo[j]fluoranthene	S	2B		
Dibenzo[a,e]pyrene	S	2B		

<sup>1</sup> ยังศึกษาข้อมูลไม่เพียงพอในมนุษย์, ทำการทดลองในสัตว์: I, ข้อมูลไม่เพียงพอ; L, ข้อมูลจำกัด; S, ข้อมูลเพียงพอ

<sup>2</sup> 1, เป็นสารก่อมะเร็งสำหรับมนุษย์; 2A, อาจจะมีความเป็นไปได้ในการก่อมะเร็งสำหรับมนุษย์;

2B, เป็นสารก่อมะเร็งได้สำหรับมนุษย์; 3, ไม่ได้เกี่ยวกับการจำแนกให้เป็นสารก่อมะเร็งสำหรับมนุษย์

<sup>3</sup> D: ไม่จัดเป็นสารก่อมะเร็งในมนุษย์; B2: มีความน่าจะเป็นไปได้ในการเป็นสารก่อมะเร็งในมนุษย์

## 2.4 วิธีการกำจัดและการย่อยสลายสารประกอบพอลิไซคลิกแอโรแมติกไฮโดรคาร์บอน (Elimination and degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons)

การสลาย PAHs มีวิธีการกำจัดเช่นเดียวกับสารพิษอันตรายทั่วไป ซึ่งสามารถจำแนกได้เป็น 5 กลุ่มดังนี้ (Lee และคณะ, 1996)

**2.4.1 การเผาที่อุณหภูมิสูง (incineration)** ใช้การเก็บรวบรวม PAHs บรรจุในภาชนะเพื่อนำไปกำจัดโดยเตาเผา (incinerator) ที่ถูกจัดทำขึ้นเป็นพิเศษให้เผาได้ที่อุณหภูมิสูง โดยทำการเผาที่ 2000°F แล้วนำไปฝังกลบ อย่างไรก็ตามวิธีนี้เป็นวิธีที่อาจก่อให้เกิดสารพิษชนิดใหม่และปัญหาสิ่งแวดล้อมมากขึ้นหากการเผาและการฝังกลบทำในบริเวณที่เกิดการกระจายรั่วไหลของสารประกอบได้

**2.4.2 วิธีทางกายภาพ (physical alteration)** เช่น ให้ความร้อน ใช้อากาศเป่า หรือใช้การฝังกลบ

**2.4.3 วิธีทางเคมี (chemical alteration)** โดยมีการเติมสารเคมีลงไปทำปฏิกิริยากับ PAHs เพื่อให้เกิดการละลายหรือสลายตัวแล้วจึงนำไปจัดเก็บในภาชนะที่เหมาะสมต่อไป

**2.4.4 วิธีทางเคมี-ฟิสิกส์ (physical-chemical technique)** ได้แก่ การเติมถ่านกัมมันต์ลงในบริเวณที่มีการปนเปื้อนเพื่อให้เกิดการดูดซับไว้ภายใน การใช้แสงอัลตราไวโอเล็ตหรือรังสีแกมมาเพื่อให้เกิดการสลายตัว (photodegradation)

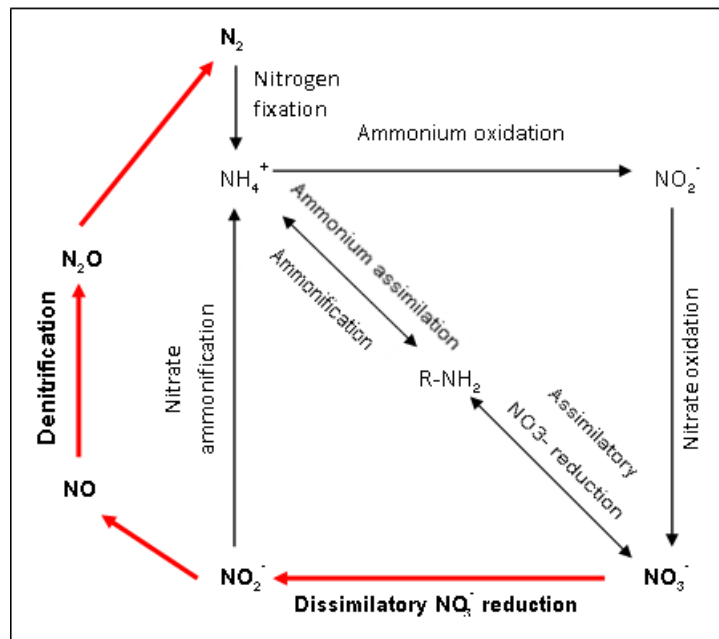
**2.4.5 วิธีบำบัดทางชีวภาพ (bioremediation)** เป็นวิธีการกำจัดสารพิษหรือสารปนเปื้อนโดยกระบวนการเมแทบอลิซึมของสิ่งมีชีวิต เช่น การใช้พืช รา แบคทีเรีย ฯลฯ เป็นตัวเปลี่ยนสารปนเปื้อนเหล่านี้ให้อยู่ในรูปของสารอื่นเพื่อนำไปใช้เป็นแหล่งพลังงานให้กับเซลล์ การบำบัดด้วยวิธีทางชีวภาพสามารถนำไปใช้ร่วมกับวิธีอื่นๆ ได้ เพื่อช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการบำบัดได้ดีขึ้น

การบำบัดทางชีวภาพโดยการใช้จุลินทรีย์ได้มีการศึกษากันอย่างแพร่หลาย ( Mrozik และคณะ, 2003; Jaimin และคณะ, 2011) เนื่องจากเป็นวิธีที่มีต้นทุนต่ำและยังไม่ส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมเมื่อเทียบกับวิธีอื่นๆ (Bamforth และ Singleton, 2005) ปัจจุบัน การบำบัดทางชีวภาพด้วยแบคทีเรียเป็นวิธีการที่สามารถทำเป็นผลิตภัณฑ์ทางการค้าได้ ตัวอย่างเช่น ผลิตภัณฑ์และนวัตกรรมจาก KLEEN ที่พัฒนาขึ้นโดยอาศัยเทคโนโลยีชีวภาพ ใช้การทำงานของแบคทีเรียเพื่อบำบัดความเป็นพิษของโลหะหนัก PAHs และสารพิษชนิดอื่นๆ นวัตกรรมดังกล่าวนี้ นอกจากจะมีประสิทธิภาพในการย่อยสลายที่ดี เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม และยังมีค่าใช้จ่ายน้อยกว่าการใช้วิธี

ทางเคมีอีกด้วย โดยทั่วไปการย่อยสลายด้วยวิธีทางชีวภาพจากแบคทีเรียนิยมกระทำในภาวะที่มีออกซิเจน ปฏิกริยาเริ่มต้นจากการเติมหมู่ไฮดรอกซิลและรับอิเล็กตรอนให้วงแหวนอะโรมาติก ปฏิกริยานี้เกิดขึ้นจากเอนไซม์ไดออกซิจีเนส (dioxygenase) ในแบคทีเรีย เปลี่ยนสารตั้งต้นซึ่งเป็นสาร PAHs ไปจนมีโครงสร้างคล้ายแคทีคอล (catechol) ทำให้ถูกย่อยสลายด้วยเอนไซม์เอ็กซ์ตราไดออกซิเดอออกซิจีเนส (extradioldioxygenase) ก่อนเข้าสู่วัฏจักรกรดไตรคาร์บอกซิลิกต่อไป (Habe และ Omori, 2003) แม้การบำบัดทางชีวภาพในภาวะที่มีออกซิเจนจะมีประสิทธิภาพที่ดีในการย่อยสลาย PAHs และสารปนเปื้อนอื่นๆ แต่ยังมีข้อจำกัดต่อการนำไปประยุกต์ใช้ในบริเวณที่มีออกซิเจนต่ำ เช่น การปนเปื้อนในแหล่งน้ำใต้ดินและตะกอนดินใต้ทะเล หนทางหนึ่งในการแก้ปัญหาการปนเปื้อนในภาวะนี้คือการเลือกใช้จุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการย่อยสลายสารพอลิไซคลิก อะโรมาติก ไฮโดรคาร์บอนได้แม้อยู่ในภาวะที่มีออกซิเจนต่ำหรือไม่มีออกซิเจนเลย

## 2.5 แบคทีเรียดีไนทริไฟอิง (Denitrifying Bacteria)

จุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการรีดิวซ์สารประกอบไนเตรตให้อยู่ในรูปของก๊าซไนโตรเจน (ภาพที่ 2.2) พบได้ทั้งในแบคทีเรียและรา แต่โดยมากแล้ว ราส่วนใหญ่จะสามารถเจริญได้ดีในภาวะที่มีออกซิเจน ส่วนแบคทีเรียสามารถเจริญได้ในภาวะที่มีและไม่มีออกซิเจน แบคทีเรียดีไนทริไฟอิงนับเป็นจุลินทรีย์ที่น่าสนใจจากคุณลักษณะความสามารถในการสร้างเอนไซม์ที่สามารถย่อยสลายองค์ประกอบสารเคมีชนิดไนเตรตได้ แบคทีเรียนี้จะเจริญได้ดีในภาวะแวดล้อมกึ่งไร้ออกซิเจน ซึ่งสามารถใช้ทั้งออกซิเจนและไนเตรตเป็นตัวรับอิเล็กตรอนตัวสุดท้ายที่เกี่ยวข้องกับกลไกการย่อยสลายและการแตกตัวของ PAHs ไปเป็นสารที่มีสภาพความเป็นพิษลดลงได้ และมีงานวิจัยหลายชิ้นดังแสดงในตารางที่ 2.4 ที่ระบุตรงกันถึงความสามารถของแบคทีเรียดีไนทริไฟอิงต่อการย่อยสลาย PAHs ที่จะเกิดขึ้นร่วมกับกระบวนการดีไนทริฟิเคชัน



ภาพที่ 2.2 กระบวนการดีไนทริฟิเคชัน และสภาวะสำคัญ (วีรานูช หลาง, 2554)

#### สภาวะสำคัญของปฏิกิริยา

- เป็นกระบวนการหายใจแบบไม่ใช้ออกซิเจน โดยมีไนเตรตเป็นตัวรับอิเล็กตรอนตัวสุดท้าย
- ออกซิเจนยับยั้งกระบวนการ แต่แอมโมเนียไม่ยับยั้งกระบวนการนี้
- ผลิตภัณฑ์ระหว่างแก๊สไนโตรเจนและไนตรัสออกไซด์
- แบคทีเรียเฮเทอโรโทรฟ (heterotrophic bacteria) หลายชนิดเป็นดีไนทริไฟเออร์

ตารางที่ 2.4 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับแบคทีเรียดีไนทรีไฟอิงและการย่อยสลาย PAHs

ผู้วิจัย	หัวข้อ	แบคทีเรียดีไนทรีไฟอิง
Weissenfels <i>et al.</i> (1990)	Degradation of fluoranthene by pure bacterial cultures	<i>Alcaligenes sp.</i>
McNally <i>et al.</i> (1998)	Biodegradation of three- and four-ring polycyclic aromatic hydrocarbons under aerobic and denitrifying conditions.	<i>Pseudomonas stutzeri</i> <i>P. Putida</i> <i>P. Fluorescens</i>
Rockne <i>et al.</i> (2000)	Anaerobic naphthalene degradation by microbial pure cultures under nitrate-reducing conditions.	<i>Vibrio Pelagius</i> <i>P. aeruginosa</i>
Graham and Eugene (2007)	Naphthalene metabolism and growth inhibition by naphthalene in <i>Polaromonas naphthalenivorans</i> strain CJ2.	<i>Polaromonas naphthalenivorans</i> CJ2

2.6 ความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้าง สภาพพิษ และการถูกย่อยสลายได้ของสารปนเปื้อน (Relationship between contaminant structure, toxicity, and biodegradability) (วีรานุช หลาง , 2545)

### 2.6.1 สภาพพร้อมใช้ทางชีวภาพ (Bioavailability)

กลไกการย่อยสลายจะประกอบด้วย 2 ขั้นตอน ประกอบด้วยการนำสารตั้งต้นเข้าสู่เซลล์ และขั้นตอนการเมแทบอลิซึมหรือการย่อยสารตั้งต้นนั้นๆ ซึ่งสารประกอบเหล่านี้จะถูกละลายได้เร็วขึ้น โดยเฉพาะอย่างยิ่งเมื่ออยู่ในรูปที่ละลายน้ำได้ (water-soluble form) อย่างไรก็ตามการย่อย

สลายสารปนเปื้อนมักถูกจำกัดด้วยความสามารถในการละลายหรือมักถูกดูดซับอยู่ที่อนุภาคหรือตะกอนดิน ซึ่งทำให้สภาพพร้อมใช้ทางชีวภาพเกิดได้ยาก

การเจริญของจุลินทรีย์บนสารอินทรีย์มักถูกจำกัดด้วยคุณสมบัติการละลายน้ำของสาร เนื่องจากจุลินทรีย์ไม่สามารถนำสารเหล่านี้ไปใช้ได้โดยอิสระในสภาพของเหลว อีกทั้งการสัมผัสกับสารอินทรีย์ที่มีการละลายน้ำได้ต่ำจึงเกิดขึ้นอย่างจำกัด ซึ่งสารเหล่านี้อาจจะอยู่ในรูปของเหลวหรือของแข็ง หรือสามารถอยู่ได้ทั้งในสองสถานะ ตัวอย่างเช่น พีซีบี (Polychlorinated biphenyls; PCBs) และตัวทำละลายที่มีคลอรีนเป็นองค์ประกอบ เช่น ทีซีอี (TCE) มีความหนาแน่นมากกว่าน้ำจึงแยกชั้นอยู่ใต้ผิวน้ำ ส่วนพวกเบนซีนหรือปิโตรเลียมมีความหนาแน่นต่ำกว่าจึงลอยตัวอยู่ผิวน้ำ การที่จุลินทรีย์จะนำของเหลวอินทรีย์ที่กล่าวนี้เข้าสู่เซลล์ได้ต้องอาศัยวิธีการ

4 วิธีดังนี้คือ

- 1) ใช้สารอินทรีย์ส่วนน้อยที่พอจะละลายอยู่ในน้ำบ้างเล็กน้อย แต่วิธีนี้มักถูกจำกัดเนื่องจากคุณสมบัติการละลายน้ำของสารที่ละลายน้ำได้ต่ำ
- 2) สัมผัสสารอินทรีย์โดยตรงที่หยดน้ำมัน โดยใช้อวัยวะพิเศษ เช่น ฟิมเบรีย (Fimbriae) หรืออาศัยคุณสมบัติของผนังเซลล์ที่เป็นไฮโดรโฟบิก ซึ่งวิธีนี้มีข้อจำกัดอยู่ที่รอยต่อระหว่างเฟสน้ำ และไฮโดรคาร์บอน
- 3) สัมผัสโดยตรงกับสารอินทรีย์ขนาดเล็กที่กระจายอยู่ในน้ำ ซึ่งวิธีนี้มีข้อจำกัดในกรณีน้ำมัน เนื่องจากการกระจายเป็นหยดน้ำมันขนาดเล็กในดินนั้นยากมาก แตกต่างจากการกระจายตัวในทะเล ที่มีคลื่นในทะเลเป็นตัวที่ทำให้เกิดการกระจายเป็นหยดน้ำมันขนาดเล็กๆ ได้
- 4) อาศัยสารลดแรงตึงผิว (surfactant) หรือตัวกระทำอิมัลชัน (emulsifier) เพื่อช่วยเพิ่มการละลายจากการเกิดเป็นไมเซลล์ (micelles) หรือฟอง (vesicles) โดยโครงสร้างส่วนหางของสารลดแรงตึงผิวที่เป็นไฮโดรโฟบิกจะเข้าจับกับสารคล้ายชั้นไขมัน และหันส่วนหัวที่เป็นไฮโดรโฟบิกเข้าหาน้ำ จึงช่วยเพิ่มการละลายเนื่องจากมีความเป็นไฮโดรโฟบิกที่เพิ่มมากขึ้น ทำให้จุลินทรีย์สามารถเกาะติดกับสารได้ดีขึ้น



สำหรับสารอินทรีย์ที่อยู่ในสภาพของแข็ง เช่น แวกซ์ พลาสติก หรือ PAHs มีเพียง 2 วิธีที่ จุลินทรีย์จะนำสารเหล่านี้เข้าสู่เซลล์ คือ

- 1) การสัมผัสโดยตรงกับสารตั้งต้น
- 2) ใช้สารตั้งต้นที่มีอยู่ในสภาพละลาย

จากการศึกษาพบว่าจุลินทรีย์แทบทั้งหมดใช้สารตั้งต้นที่อยู่ในสภาพละลาย ดังนั้น สารอินทรีย์ในสภาพของแข็งที่มีคุณสมบัติละลายน้ำต่ำจึงมักถูกย่อยสลายได้ยากกว่า ปัจจัยอื่นที่มีผลต่อการนำสารอินทรีย์ไปใช้ ได้แก่ การดูดซับ (sorption) ของสารที่อนุภาคดินหรือตะกอน โดยอาจเกิดพันธะที่แข็งเช่น พันธะโควาเลนต์หรือพันธะที่ค่อนข้างอ่อน เช่น พันธะไฮโดรเจน แรงแวลเดอวัลส์หรือพันธะไฮโดรโฟบิก การจับโดยพันธะที่ค่อนข้างอ่อนนี้เป็นแบบย้อนกลับได้ (reversible) สารที่จับโดยพันธะเหล่านี้จะถูกปล่อยกลับมาละลายในน้ำและถูกนำไปใช้โดย จุลินทรีย์ สารอินทรีย์ที่ตกค้างในธรรมชาติเป็นระยะเวลาานานๆ มักพบปัญหาการถูกย่อยสลายได้ ยาก เนื่องจากการไหลซึมเข้าไปในช่องหรือโพรงเล็ก ๆ ของอนุภาคดิน ทำให้จุลินทรีย์ไม่สามารถ เข้าถึง จึงมีสภาพพร้อมใช้ทางชีวภาพต่ำ นอกจากนี้ยังมีปัจจัยร่วมซึ่งเกี่ยวข้องกับการเกาะยึด อนุภาคดินที่อาศัยการเร่งปฏิกิริยาของพวกเอนไซม์ออกซิเดทีฟ (oxidative enzyme) เกิดเป็น ปฏิกิริยา ฮิวมิฟิเคชัน (humification) ซึ่งเป็นกระบวนการที่ย้อนกลับไม่ได้ และสารที่จับกับ อนุภาคดินด้วยวิธีนี้จึงมักจะถูกย่อยสลายได้ช้า

## 2.6.2 โครงสร้างของสารปนเปื้อน (Contaminant Structure)

โครงสร้างของสารบางชนิดถูกย่อยสลายได้ช้าแม้ว่าจะมีโครงสร้างคล้ายคลึงกับสารที่อยู่ ตามธรรมชาติก็ตาม ทั้งนี้เนื่องมาจากการมีแขนงและหมู่หน้าที่ (functional group) ที่ไปมีผลต่อ บริเวณเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ กล่าวคือเมื่อบริเวณเร่งดังกล่าวถูกกีดขวางจากโครงสร้างแขนง และหมู่หน้าที่ทำให้ไปขัดขวางการดำเนินไปของปฏิกิริยา นอกจากนี้ยังอาจมีสาเหตุจากผลของ อิเล็กตรอนของหมู่หน้าที่ของสารไปทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงต่อจำนวนอิเล็กตรอนที่บริเวณเร่ง ปฏิกิริยาของเอนไซม์ ซึ่งหมู่หน้าที่ที่ทำหน้าที่เป็นตัวให้อิเล็กตรอนแก่บริเวณเร่งปฏิกิริยามักจะเพิ่ม อัตราการย่อยสลาย แต่ถ้าหมู่หน้าที่ที่เป็นตัวดึงอิเล็กตรอนจากบริเวณเร่งจะทำให้อัตราการย่อยช้า ลง

### 2.6.3 สภาพความเป็นพิษ (Toxicity)

ในสภาพที่สารปนเปื้อนมีความเข้มข้นสูงก็จะทำให้การย่อยสลายเกิดได้ช้าลง เนื่องมาจากผลของความเป็นพิษต่อจุลินทรีย์ ตัวอย่างเช่น บีโตรีเลียมหรือพวกตัวทำลายอินทรีย์ ทำให้เกิดการละลายในส่วนไขมันของผนังเซลล์และคุณสมบัติการเป็นเยื่อเลือกผ่านของผนังเซลล์จึงถูกทำลายลงไปด้วย นอกจากนี้ค่าสัมประสิทธิ์การละลายของสาร ( $K_{ow}$ ) ซึ่งเป็นค่าที่แสดงคุณสมบัติการเป็นไฮโดรโฟบิกของสาร สารที่มีค่านี้สูง เช่น แนพทาลีน ไพรีดีน ฟีนอล และเบนซีนที่หม้ออัลคิลเกาะอยู่ พบว่ามีความสามารถในการยับยั้งการเจริญและเป็นพิษต่อจุลินทรีย์ได้อีกด้วย

## 2.7 ปัจจัยทางสิ่งแวดล้อมที่มีผลต่อการย่อยสลาย (Environmental factors affecting biodegradation) (วีรานูช หลาง, 2554)

ปัจจัยที่มีผลต่อกิจกรรมของจุลินทรีย์และอัตราการรอดชีวิตนั้นมีด้วยกันหลายปัจจัย แต่ปัจจัยหลักที่สำคัญก็คือ สารอินทรีย์ (organic matter) เป็นแหล่งคาร์บอนของจุลินทรีย์ชนิดที่ได้สารอาหารประเภทแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนจากสารอินทรีย์ (heterotrophic microorganism) บริเวณผิวดินซึ่งค่อนข้างมีสารอินทรีย์ปริมาณสูงและหลากหลายจึงเป็นแหล่งที่พบจำนวนมากและความหลากหลายของจุลินทรีย์สูง นอกจากนี้ยังมีปัจจัยอีกหลากหลายไม่ว่าจะเป็นปัจจัยทางด้านกายภาพและเคมี เช่น ปริมาณออกซิเจน น้ำ สารอินทรีย์ อุณหภูมิ พีเอช ความเค็ม ฯลฯ โดยจะขอกกล่าวถึงปัจจัยที่สำคัญดังต่อไปนี้

### 2.7.1 ภาวะมีออกซิเจนและภาวะไร้ออกซิเจน (Aerobic / Anaerobic biodegradation)

โดยทั่วไปการย่อยสลายภายใต้ภาวะที่มีออกซิเจนจะเกิดขึ้นได้เร็วกว่าภาวะไร้ออกซิเจน ตัวอย่างเช่นการปนเปื้อนของบีโตรีเลียมในบริเวณทะเลสาบ บริเวณน้ำจืดหรือแม่น้ำที่มีออกซิเจน จะเกิดการย่อยสลายได้ดีกว่าบริเวณดินตะกอนที่ไร้ออกซิเจน ซึ่งมักจะเกิดการตกค้างของสารปนเปื้อน สารอินทรีย์บางชนิดจะเกิดการย่อยสลายได้ภายใต้ภาวะไร้ออกซิเจนเมื่อมีไนเตรต เหล็กหรือซัลเฟตเป็นตัวรับอิเล็กตรอน แต่การย่อยสลายภายใต้ภาวะเหล่านี้มักใช้เวลามากกว่าการย่อยสลายภายใต้ภาวะที่มีออกซิเจน

## 2.7.2 ปริมาณสารอินทรีย์ (Organic matter content)

ที่บริเวณผิวดินเป็นบริเวณที่มีออกซิเจนและสารอินทรีย์มากกว่า อีกทั้งยังมีปริมาณจุลินทรีย์อยู่เป็นจำนวนมาก ทำให้การย่อยสลายเกิดได้เร็วกว่า แตกต่างจากบริเวณใต้ดินลงไปที่มีน้ำและปริมาณออกซิเจนน้อย จึงมีปริมาณจุลินทรีย์ที่น้อยกว่า และการตอบสนองต่อแหล่งคาร์บอนจึงน้อยลงตามไปด้วย ดังนั้นการย่อยสลายที่เกิดขึ้นในชั้นใต้ดินลึกลงไปจึงเกิดขึ้นได้ช้ากว่าที่บริเวณผิวดิน

## 2.7.3 ปริมาณไนโตรเจน

การย่อยสลายสารอินทรีย์โดยเฉพาะอย่างยิ่งสารประกอบไฮโดรคาร์บอนที่มีคาร์บอนและไฮโดรเจนเป็นองค์ประกอบ ทำให้เกิดความต้องการสารอาหารจำพวกไนโตรเจนและฟอสฟอรัสเพิ่มมากขึ้น โดยทั่วไปจุลินทรีย์มีอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน (C:N) ภายในเซลล์ตั้งแต่ 5:1 ถึง 10:1 ขึ้นอยู่กับชนิดของจุลินทรีย์ การย่อยจะเกิดได้ดีขึ้นเมื่อมีการเติมไนโตรเจน เช่นในกรณีการย่อยปิโตรเลียมที่ปนเปื้อนอยู่ในสิ่งแวดล้อมจะมีการเติมไนโตรเจนในรูปของปุ๋ย เพื่อให้การย่อยสลายเกิดได้ดีขึ้น และการสลายจะให้ผลที่ดีขึ้นเมื่อมีการเติมคาร์บอนต่อไนโตรเจน (C:N) 200:1 ซึ่งเป็นอัตราส่วนที่สูงกว่าภายในเซลล์มาก แต่อย่างไรก็ตามอาจเป็นไปได้ว่าเมื่อเกิดกระบวนการเมแทบอลิซึมและได้ผลิตภัณฑ์เป็นคาร์บอนไดออกไซด์ จึงทำให้ปริมาณคาร์บอนที่พบในระบบหายไป

## 2.8 การประยุกต์ใช้จุลินทรีย์เพื่อการย่อยสลายทางชีวภาพของสารประกอบพอลิไซคลิกแอโรแมติกไฮโดรคาร์บอน (Application of microorganisms in PAHs bioremediation)

น้ำมันและผลผลิตที่เกิดขึ้นจากน้ำมันนับวันเป็นปัญหาที่สำคัญต่อมวลมนุษย์ จากอัตราที่เพิ่มขึ้นการนำมาใช้ประโยชน์ จึงมีกิจกรรมการขนส่งมากยิ่งขึ้น มีระบบการเก็บรักษาเพิ่มขึ้น โดยเฉพาะอย่างยิ่งการรั่วไหลและปนเปื้อนของสารประกอบไฮโดรคาร์บอนที่เกิดขึ้นจะมีผลกระทบอย่างสูงกับสุขภาพอนามัยของมนุษย์ (เก็จกาญจน์ สมานวิฑูฒิกุล, 2546)

กระบวนการย่อยสลายทางชีวภาพเป็นการนำสิ่งมีชีวิตเพื่อมาใช้ในการบำบัดรักษา สิ่งแวดล้อมที่มีการปนเปื้อนจากน้ำมันหรือสารประกอบไฮโดรคาร์บอนต่างๆ ให้หมดไปหรือให้มีสภาพที่ดีขึ้นและฟื้นฟูได้รวดเร็วขึ้น จึงนับเป็นกระบวนการเพื่อการรักษาสภาพแวดล้อมให้ดียิ่งขึ้น จนเป็นปกติ สะอาด สำหรับสุขภาพอนามัยของสิ่งมีชีวิตที่อยู่ในสิ่งแวดล้อมนั้นๆ (เจษฎา ไพริรัตน์, 2541)

จากการศึกษาก่อนหน้า Boonyatumanond และคณะ (2006) ที่ได้การศึกษาการกระจายตัวของ PAHs และออกแบบเครื่องหมายทางโมเลกุล (Molecular marker) ในตะกอนดินบริเวณคลอง แม่น้ำเจ้าพระยา ปากแม่น้ำและอ่าวไทยตอนบน พบว่าการปนเปื้อนของ PAHs ในตะกอนดินจากคลอง แม่น้ำ ปากแม่น้ำ และอ่าวไทยตอนบนเป็นการตกค้างจากไฮโดรคาร์บอนที่เป็นองค์ประกอบในผลิตภัณฑ์ปิโตรเลียม (petrogenic) และไฮโดรคาร์บอนที่การเผาไหม้สารอินทรีย์ ผลิตภัณฑ์ปิโตรเลียม ไม้ ถ่านหิน ฯลฯ (pyrogenic) จากการศึกษาดังกล่าว พบว่าปริมาณความเข้มข้นของ PAHs ในคลองมีความเข้มข้นของ PAHs อยู่ระหว่าง 512 – 8399 นาโนกรัมต่อกรัม (น้ำหนักแห้ง) แม่น้ำเจ้าพระยาพบ 33 – 590 นาโนกรัมต่อกรัม (น้ำหนักแห้ง) ปากแม่น้ำพบ 29 – 724 นาโนกรัมต่อกรัม (น้ำหนักแห้ง) และชายฝั่งทะเลของไทยพบ 6 – 228 นาโนกรัมต่อกรัม (น้ำหนักแห้ง) ตามลำดับ ซึ่งแนวโน้มการกระจายตัวและสาเหตุการปนเปื้อน PAHs ของไทย น่าจะเกิดจากเมืองและมีการชะล้างสู่แหล่งน้ำธรรมชาติผ่านทางคลองต่างๆเป็นหลัก

Agnelli และคณะ (2004) ติดตามการเปลี่ยนแปลงประชาคมแบคทีเรียและราประจำถิ่นในดินที่ปนเปื้อน PAHs โดยนำมาวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) พบว่าความหลากหลายของประชาคมแบคทีเรียมีมากกว่ารา

Bradley และคณะ (1992) กล่าวถึง ในปี 1975 การรั่วไหลของ JP-4 grade jet fuel ปริมาณราว 83,000 แกลลอนทำให้เกิดการปนเปื้อนใกล้กับ North Charleston South California เป็นบริเวณกว้าง เพื่อที่จะศึกษาปัจจัยที่จะส่งผลต่อจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการดีไนทริฟิเคชัน ปริมาณ  $\text{NO}_3$  ค่าความเป็นกรดต่าง และปริมาณ  $\text{PO}_4$  ได้ถูกบันทึกถึงผลกระทบต่อกระบวนการดีไนทริฟิเคชันในตะกอนที่เก็บอย่างหลากหลาย พบว่ากระบวนการดีไนทริฟิเคชันลดลง 98% ภายใต้ภาวะไร้ออกซิเจน อัตราการเกิดดีไนทริฟิเคชันและคาร์บอนมิเนอรัลไลเซชันเพิ่มขึ้นเมื่อมีปริมาณ  $\text{NO}_3$  มากที่สุดโดยประมาณ 1 mM ส่วน  $\text{PO}_4$  ไม่มีผลต่อทั้งสองกระบวนการ การเกิดดีไนทริฟิเคชันลดลง 38% เป็นอย่างน้อยที่ความเป็นกรดต่างต่ำกว่า 4 เมื่อเทียบกับความเป็นกรดต่างที่ 7 การวิเคราะห์ตัวอย่างพบว่ามีความแตกต่างเกิดขึ้นในการปนเปื้อนสารประกอบไฮโดรคาร์บอนอย่างน้อย 10 เท่าในบริเวณชายฝั่งที่เก็บตัวอย่าง

Fukui และ คณะ (1999) สรุปว่าน้ำมันดิบ (crude oil) เป็นองค์ประกอบที่มีความซับซ้อน โดยองค์ประกอบหลักประกอบด้วยหลาย ๆ ชนิด (saturated aromatic hydrocarbon) การย่อยสลายสารประกอบไฮโดรคาร์บอนด้วยแบคทีเรียที่ใช้ออกซิเจนในการหายใจเป็นที่รู้จักกันมานานนับร้อยปี ส่วนการย่อยสลายสารแอมโมเนียไฮโดรคาร์บอนภายใต้ภาวะไร้ออกซิเจนเพิ่งมีการค้นพบมาในไม่กี่สิบปี ในงานวิจัยนี้กล่าวถึงการสำรวจการย่อยสลายสารประกอบพอลิแอมโมเนียไฮโดรคาร์บอนในน้ำมันดิบที่ภาวะไร้ออกซิเจน จุลินทรีย์ที่มีความสามารถดังกล่าวอยู่ในกลุ่มที่เป็นซัลไฟด์รีดิวซิงแบคทีเรีย (sulfite-reducing bacteria) นอกจากนี้สารประกอบ alkyl-benzene และ n-alkane ถูกพบว่ามี การย่อยสลายได้ไปพร้อมกับการเปลี่ยนซัลเฟต (sulfate) ไปเป็นซัลไฟด์ (sulfide) ซึ่งนับเป็น 10% aromatic hydrocarbon ในน้ำมันดิบ อย่างไรก็ตามการใช้สารประกอบไฮโดรคาร์บอนเกิดขึ้นแบบไม่สมบูรณ์ตามค่าการวัด  $^{13}\text{C}$  และ  $^{12}\text{C}$  และจึงเป็นคำอธิบายที่ว่าทำไมแบคทีเรียโบราณบางชนิดจึงสามารถพบว่าเจริญได้ในแหล่งน้ำมันดิบซึ่งมีกำมะถันอยู่ และเป็นสาเหตุว่าทำไมจึงมีซัลไฟด์ที่ไม่เพียงประสงค์ปนอยู่ในน้ำมันและโรงกลั่นน้ำมัน ยิ่งไปกว่านั้นการยังมีการพบแอนแอโรบิกแบคทีเรียที่ใช้ alkylbenzene และ n-alkane และเชื้อบริสุทธิ์ที่เป็นจุลินทรีย์ในกลุ่มดีไนโตรไฟเออร์ในน้ำมันดิบจากการศึกษานี้

Gilbert และคณะ (1997) ทำการทดลอง *in situ* และได้ถูกนำมาใช้ในการวิเคราะห์ตัวอย่างจากตะกอนชายฝั่งทะเลเมดิเตอร์เรเนียนบริเวณ Gulf of Fos เพื่อจะศึกษาอิทธิพลของสารประกอบไฮโดรคาร์บอนกับการเกิดดีไนโตรฟิเคชัน (denitrification) หลังจาก 1, 4 และ 6 เดือนสำหรับตัวอย่างควบคุมจะไม่มีตะกอนไฮโดรคาร์บอนในตะกอน การมีอยู่ของไมโครฟาวนากระตุ้นให้เกิดอัตราของดีไนโตรฟิเคชันถึง 160% การกระตุ้นถูกเหนี่ยวนำโดยตะกอนทั้ง  $\text{NO}_3^-$  การมีอยู่ของสารประกอบไฮโดรคาร์บอนในการทดลองส่งผลทั้งช่วยกระตุ้นและยับยั้งการเกิดดีไนโตรฟิเคชัน กระบวนการดีไนโตรฟิเคชัน ตอบสนองการมีอยู่ของสารไฮโดรคาร์บอนขึ้นกับ ปริมาณของสารที่เกิดจากแอคทิวิตีของไมโครฟาวนา สารอินทรีย์ในปริมาณเพียงเล็กน้อยก็สามารถเพิ่มประสิทธิภาพของกระบวนการดีไนโตรฟิเคชันที่เกี่ยวข้องกับสารไฮโดรคาร์บอน 120% ในทางตรงกันข้าม เมื่อมีปริมาณไฮโดรคาร์บอนอิมิตัวมากกว่า 100 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมของตะกอนแห่ง พบว่ากระบวนการดีไนโตรฟิเคชันถูกยับยั้ง

Häner และคณะ (1995) พบว่าจุลินทรีย์จาก diesel fuel-contaminated source มีความสามารถเจริญบน p-xylene การออกซิเดชันของ p-xylene ควบคู่ไปกับ  $\text{CO}_2$  แสดงให้เห็นว่าสามารถลดปริมาณ  $\text{NO}_3^-$  ได้สำเร็จ การเพิ่มปริมาณเชื้อในการเจริญบน toluene และ m-xylene

สามารถตรวจพบได้ อย่างไรก็ตามพบว่าเชื้อไม่สามารถย่อย benzene, ethylbenzene และ o-xylene ได้

Rakhimova และคณะ (2004) ศึกษาประสิทธิภาพของจุลินทรีย์ที่ใช้ในการ oxidize น้ำมัน ในการย่อยสลายทางชีวภาพของดินที่ปนเปื้อนน้ำมันถูกทำในห้องปฏิบัติการ ภาวะที่ใช้ในการศึกษาความสามารถในการออกซิไดซ์มีทั้งภาวะไร้ออกซิเจน (anaerobic) หรือภาวะแอนอกสิก (anoxic) ความสามารถในการย่อยสลายน้ำมันที่เป็นสารไฮโดรคาร์บอนมีลำดับดังนี้ การปล่อยให้เกิดขึ้นเอง (self-remediation 40% < เมื่อมีการประยุกต์ใช้ในเทรต 42% ระบบ denitrifying oil-oxidizing 50% ระบบที่ใช้ร่วมกันระหว่างปฏิกิริยาดีไนทริฟิเคชันพร้อมกับเติมไนเทรต 60%

โดยสรุป แนวทางการวิจัยที่มีความสำคัญอย่างยิ่งที่เกี่ยวกับกระบวนการย่อยสลายทางชีวภาพของ PAHs ยังต้องการจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพสูงที่สามารถทำงานได้ดีทั้งในภาวะที่มีและไร้ออกซิเจน เนื่องจาก PAHs สามารถพบตกค้างในสิ่งแวดล้อมทั้งในบริเวณผิวดิน ผิวน้ำ และสามารถพบในสภาพที่ตกตะกอนหรืออยู่ลึกกลงไปในดินได้ ดังนั้นในงานวิจัยนี้จะเน้นวัตถุประสงค์เพื่อการศึกษาคัดเลือกแบคทีเรียที่มีความสามารถดำรงชีวิตอยู่ในสิ่งแวดล้อมที่มีการปนเปื้อนน้ำมันไฮโดรคาร์บอน โดยเน้นภาวะที่ไม่มีออกซิเจนอยู่ ซึ่งยังมีการศึกษาไม่มากนัก ในอาหารที่มีสารปนเปื้อนนี้อยู่ กลไกความสามารถการเจริญเติบโต จากงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการประยุกต์ใช้กระบวนการดีไนทริฟิเคชันที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลาย PAHs พบว่า แบคทีเรียที่มีความสามารถในการใช้กระบวนการดีไนทริฟิเคชันนั้นมีศักยภาพในการนำมาใช้เพื่อบำบัดและแก้ไขปัญหาสิ่งแวดล้อมซึ่งเกิดจากการปนเปื้อนของสารประกอบไนโตรเจน ฟอสฟอรัส พอลิไซคลิกแอโรแมติกไฮโดรคาร์บอน การใช้แบคทีเรียดีไนทริฟิเคชันจะเป็นวิธีการทางเลือกที่สามารถช่วยกำจัดไนเทรตและไนไทรต์ และสารในกลุ่มของสารประกอบพอลิไซคลิกแอโรแมติกไฮโดรคาร์บอน ออกจากระบบได้โดยไม่เป็นอันตรายต่อสิ่งมีชีวิตในระบบนั้นๆ ซึ่งจะเป็นประโยชน์ต่อการประยุกต์ใช้ในระบบการบำบัดน้ำเสียในโรงงานอุตสาหกรรมที่เกี่ยวข้องต่อไปในอนาคต

### บทที่ 3

## อุปกรณ์ เคมีภัณฑ์ และวิธีดำเนินการวิจัย

### วัสดุอุปกรณ์

เครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูง สำหรับการวิเคราะห์

- คอลัมน์โครมาโทกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูง (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) รุ่น Inertsil ODS-P HP (Shimadzu) column ขนาด 4.8 x 150 mm
- เครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูง
- ดีเทคเตอร์ยูวีสำหรับเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูง

ชุดเครื่องมือสำหรับเตรียมตัวอย่าง เพื่อการวิเคราะห์

- กระบอกล้างขวด (Nipro, Thailand)
- กล้องจุลทรรศน์ รุ่น CH30RF200 (Olympus, Japan)
- ขวดแก้วพร้อมฝาสำหรับเตรียมตัวอย่างวิเคราะห์ (Amani, Thailand)
- ขวดยาชนิด ขนาด 50 และ 100 มิลลิลิตร (BTI packaging, Thailand)
- เข็มชนิดยา (Nipro, Thailand)
- คริมเปอร์ (The Finest in Crimping Tool & Accessories, USA)
- เครื่องกวนสารให้ความร้อนแบบแท่งแม่เหล็ก รุ่น PC-420 (Corning, USA)
- เครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิ รุ่น VS-8480SFN (Vision Scientetific, Korea)
- เครื่องเขย่าผสมสาร รุ่น KMC-1300V (Vision Scientetific, Korea)
- เครื่องชั่งตวงวัด 2 ตำแหน่ง รุ่น BJ 1000C (Precisa, Switzerland)
- เครื่องชั่งตวงวัด 4 ตำแหน่ง รุ่น AG285 (Mettler Toledo, USA)
- เครื่องดูดสุญญากาศ รุ่น DOA-V502-BN (GAST, USA)
- เครื่องปั่นเหวี่ยง รุ่น BiofugeA (Heraeus, Sepatech, Germany)
- เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง รุ่น DR/2010 (HACH, USA)

- เครื่องวัดค่าความเป็นกรดต่าง รุ่น PP-50 (Sartorius, Germany)
- เครื่องอ่านปฏิกิริยาบนไมโครเพลท รุ่น Zenyth 200 rt (Anthos Labtec Instruments GmbH, Austria)
- จุกยาง ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 20 มิลลิเมตร (Amani, Thailand)
- ชุดกรองสารเคมีสำหรับการวิเคราะห์ (Sartorius, Germany)
- ตู้ถ่ายเชื้อ รุ่น Clean model: BC (Lab Services, Thailand)
- ตู้ปัมเชื้อ (EHRET, Germany)
- ตู้เพาะเชื้อภาวะไร้ออกซิเจน รุ่น Bactron (SHEL LAB, USA)
- ตู้อบลมร้อน (Mettler, Germany)
- ตัวกรองสำหรับเตรียมตัวอย่าง ขนาดรูพรุน 0.45 ไมโครเมตร (Amani, Thailand)
- บั้มกรองสารเคมีสำหรับการวิเคราะห์ (GAST, USA)
- ฝาอลูมิเนียม ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 20 มิลลิเมตร (Amani, Thailand)
- หม้อนิ่งฆ่าเชื้อ (DAIHAN Scientific, Korea)
- อ่างน้ำแบบควบคุมอุณหภูมิ (Mettler, Germany)

## เคมีภัณฑ์

สารเคมีมาตรฐานสำหรับการวิเคราะห์

- แนพทาลีน (Naphthalene, ความบริสุทธิ์ประมาณ 99 เปอร์เซ็นต์)
- เบนโซ-เอ-ไพรีน (Benzo-[A]-Pyrene, ความบริสุทธิ์ประมาณ 99 เปอร์เซ็นต์)
- ไพรีน (Pyrene, ความบริสุทธิ์ประมาณ 99 เปอร์เซ็นต์)

สารเคมีสำหรับการวิเคราะห์ด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูง

- น้ำ (Water, HPLC grade: Labscan, Thailand)
- อะซิโตนไนไตรต์ (Acetonitrile, HPLC grade: Labscan, Thailand)



#### สารเคมีสำหรับการทดลอง

- ผงสกัดจากยีสต์ (yeast extract: Difco Laboratories, USA)
- ฐันผง Bacto agar (Difco Laboratories, USA)
- สีบรอมฟีนอลบลู (bromphenolblue: Fluka, Swietzerland)
- อะกาโรสเจล (agarose gel: IUAI, Japan)
- เบนโซ-เอ-ไพรีน (benzo-a-pyrene: sigma, USA)
- เฟอร์รัสซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ( $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ : Merck, Germany)
- เอทานอล ( $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ : Merck, Germany)
- แคลเซียมคลอไรด์ ไดไฮเดรต ( $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ : sigma, USA)
- แนพทาลีน (naphthalene: sigma, USA)
- แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ( $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ : Merck, Germany)
- แมงกานีสซัลเฟต ( $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ : Merck, Germany)
- แอมโมเนียมไนเตรต ( $\text{NH}_4\text{NO}_3$ : Merck, Germany)
- โซเดียมคลอไรด์ ( $\text{NaCl}$ : Merck, USA)
- โซเดียมไฮดรอกไซด์ ( $\text{NaOH}$ : Merck, Germany)
- โปเตโต้เดกซ์โทรสบรธ (PDB: Difco Laboratories, USA)
- โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ : Merck, Germany)
- ไนเตรตบรธ (Nitratr broth: Difco Laboratories, USA)
- ไพรีน (pyrene: sigma, USA)
- ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ : Merck, Germany)

## วิธีการดำเนินงานวิจัย

วิธีเตรียมสารเคมีและกราฟมาตรฐานของการวิจัยแสดงในภาคผนวก

### 3.1 การเก็บตัวอย่างตะกอนดินจากพื้นที่เกาะสีชัง จังหวัดชลบุรี

ตัวอย่างตะกอนดินได้จากบริเวณเกาะสีชังซึ่งอยู่ที่พิกัดเส้นรุ้ง 13 องศา ถึง 12 องศาเหนือ และระหว่างเส้นแวง 10 องศา 48 ลิปดา ถึง 100 องศา 51 ลิปดา ตั้งอยู่ตะวันออกบริเวณก้นอ่าวไทยตรงกันข้ามกับอำเภอศรีราชา จังหวัดชลบุรี ห่างจากจังหวัดชลบุรี ประมาณ 35 กม. อยู่ห่างจากกรุงเทพฯ ประมาณ 117 กม. และห่างจากศรีราชาประมาณ 12 กม. รวมเนื้อที่ประมาณ 100 ตารางกิโลเมตร ตำแหน่งที่ทำการเก็บตัวอย่างแสดงตามภาพที่ 3.1 และตารางที่ 3.1 โดยการเก็บตัวอย่างดินได้รับความอนุเคราะห์จากสถาบันวิจัยทรัพยากรทางน้ำ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และถูกนำมาเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จนกว่าจะทำการวิเคราะห์คุณสมบัติทางเคมีและกายภาพเบื้องต้นอื่นๆ



ภาพที่ 3.1 แสดงตำแหน่งที่มีการเก็บตัวอย่างจากบริเวณพื้นที่เกาะสีชัง

วิธีการเก็บตัวอย่างที่ บริเวณผิวหน้าตะกอนดิน โดยใช้เครื่องมือเก็บตัวอย่างตะกอนดิน หรือใช้เครื่องมือเก็บตัวอย่างตะกอนดินตามระดับความลึก ในกรณีที่ไม่มีเครื่องมือดังกล่าว สามารถใช้ภาชนะที่ไม่ใช่โลหะตักเฉพาะส่วนหน้าที่เป็นดินเลน และเก็บตัวอย่างตะกอนดินในแต่ละจุดประมาณ 1 กิโลกรัม

ตารางที่ 3.1 แสดงรายละเอียดจุดเก็บตัวอย่างตะกอนดินใต้ทะเลจากบริเวณพื้นที่เกาะสี่ช้าง

Station	Latitude	Longitude
1) B1.1	13°11'20.03"N	100°48'42.87"E
2) B2	13°11'27.59"N	100°50'10.41"E
3) B2.1	13°11'24.54"N	100°51'32.75"E
4) B3	13°11'27.59"N	100°52'56.44"E
5) B4	13°11'26.05"N	100°54'53.68"E
6) D7.1	13°10'1.07"N	100°48'44.40"E
7) D8	13°10'4.26"N	100°50'10.42"E
8) D9	13°10'4.26"N	100°51'36.32"E
9) D10	13°10'4.26"N	100°52'56.44"E
10) D10.1	13°10'12.50"N	100°54'53.41"E
11) D8.1	13°9'20.10"N	100°50'10.42"E
12) B5.1	13° 8'42.00"N	100°49'10.00"E
13) B6	13° 8'42.00"N	100°50'10.42"E
14) D14	13° 8'42.00"N	100°51'36.32"E
15) D14.1	13° 8'42.00"N	100°52'56.44"E
16) D14.2	13° 8'42.00"N	100°54'1.00"E
17) D17.1	13° 7'21.00"N	100°49'10.00"E
18) D18	13° 7'21.00"N	100°50'10.42"E
19) D19	13° 7'21.00"N	100°51'36.32"E
20) D20	13° 7'21.00"N	100°52'56.44"E
21) D20.1	13° 7'21.00"N	100°53'39.00"E
22) X1	13° 8'1.50"N	100°52'56.44"E
23) X2	13° 8'1.50"N	100°53'47.00"E

### 3.2 วิเคราะห์องค์ประกอบทางกายภาพจากตัวอย่างตะกอนดินใต้ทะเล

บันทึกลักษณะสี ค่าความเป็นกรดต่าง ปริมาณสารประกอบไนโตรเจนในรูปแบบต่างๆที่พบในตะกอนดิน ดังนี้คือ ปริมาณไนโตรเจนที่พบทั้งหมด (Total nitrogen %) ปริมาณสารประกอบ  $\text{NH}_4^+$  (mg/kg) ปริมาณสารประกอบ  $\text{NO}_3^-$  (mg/kg) โดยใช้ชุดทดสอบดินจากภาควิชาปฐพีวิทยา คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพมหานคร

### 3.3 คัดแยกแบคทีเรียดีไนทริไฟอิงจากตัวอย่างตะกอนดินด้วยเทคนิค Pour plate

การคัดแยกแบคทีเรียดีไนทริไฟอิงจากตะกอนดินใต้ทะเลในการทดลองนี้ใช้อาหารในการคัดแยกด้วยกัน 2 สูตร โดยสูตรแรกเป็นการประยุกต์ใช้อาหารเหลวที่มีโปเตโต้เดกซ์โตรสและยีสต์สกัดร่วมกับแนพทาลีน (ภาคผนวก ก) เพื่อเป็น selective medium ในการคัดแยกแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายสารประกอบพอลิไซคลิก แอโรแมติก ไฮโดรคาร์บอน แล้วจึงนำแบคทีเรียที่ได้ไปทดสอบความสามารถในการสร้างกระบวนการดีไนทริไฟเคชันต่อไป สำหรับการคัดแยกด้วยอาหารสูตรที่สองใช้อาหารสูตรในเทรตเพื่อแยกแบคทีเรียที่สามารถสร้างกระบวนการดีไนทริไฟเคชัน / ดีไนทริไฟเคชัน และนำเฉพาะแบคทีเรียที่สามารถสร้างกระบวนการดีไนทริไฟเคชันไปทดสอบความสามารถในการย่อยสลาย PAHs ต่อ

วิธีการแรกนำตัวอย่างตะกอนดินปริมาณ 1 กรัม ใส่ลงในอาหารเหลวสูตรที่มีโปเตโต้เดกซ์โตรสและยีสต์สกัดที่มีการเติมสารประกอบไฮโดรคาร์บอนชนิดแนพทาลีน 200 ppm (ภาคผนวก ก) เพื่อเป็นตัวคัดกรองให้ได้จุลินทรีย์ที่สามารถทนต่อแนพทาลีนซึ่งมีความเป็นพิษต่อเซลล์ได้ ทำการเลี้ยงภายในขวดยาฉีด (serum bottle) และทำการเติมแก๊สไนโตรเจนเพื่อไล่ออกซิเจนออกจากระบบ จากนั้นนำไปนิ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็ว 160 รอบต่อนาที เพื่อให้จุลินทรีย์สัมผัสกับสารอาหารและแนพทาลีนได้อย่างทั่วถึง สังเกตการเจริญเป็นเวลา 5 วัน จากนั้นนำอาหารเหลวที่มีการเจริญของจุลินทรีย์ในปริมาตร 200 ไมโครลิตร เกลี่ยลงบนอาหารวุ้นสูตร เดียวกัน (ภาคผนวก ก) ด้วยเทคนิค pour plate สังเกตการเจริญของแบคทีเรียบนอาหารวุ้น และเมื่อมีการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย จึงนำโคโลนี่ที่ได้มาขีดลงบนอาหารวุ้นสูตรเดิมด้วยเทคนิค streak plate เพื่อให้ได้เป็นโคโลนี่เดี่ยว ปมที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ภายใต้ภาวะไร้ออกซิเจนภายใน anaerobic chamber

วิธีการที่สองทำการเจือจางตัวอย่างตะกอนดินด้วยน้ำเกลือ (0.85% NaCl) เขย่าเป็นเวลา 15 นาที ดูดส่วนใสปริมาตร 200 ไมโครลิตร เกลี่ยด้วยเทคนิค pour plate ลงในอาหารรุ้นสูตรไนเตรต (nitrate agar) (ภาคผนวก ก) บ่มที่ 37 องศาเซลเซียสในสภาพไร้ออกซิเจนภายใน anaerobic chamber เป็น เมื่อแบคทีเรียมีการเจริญเติบโตจึงทำการแยกให้เป็นโคโลนีเดี่ยว และโคโลนีที่ได้ไปเลี้ยงในอาหารเหลวไนเตรต (nitrate broth) (ภาคผนวก ก) ภายในขวดชนิดยาโดยมีการเติมแก๊สไนโตรเจนเพื่อไล่ออกซิเจนจากระบบ ก่อนนำไปบ่มที่อุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส และเขย่าที่ความเร็ว 160 รอบต่อนาที

### 3.4 บ่งชี้ชนิดของจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้จากตะกอนดินด้วยการตรวจสอบลำดับเบสของ 16S rDNA identification

โคโลนีเดี่ยวของจุลินทรีย์จะถูกนำมาสกัดจีโนมที่ดีเอ็นเอและเพิ่มปริมาณ 16 S rDNA fragment ด้วยวิธีของ Virunanon (2008) ทำการบ่งชี้ชนิดจุลินทรีย์ด้วยเทคนิค 16 S rDNA identification โดยใช้ Genomics DNA Purification Kit (Omega) เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้ไพรเมอร์ที่ถูกตัดในตำแหน่ง 27F และ 1492R (ตารางที่ 3.2) เพื่อนำไปใช้ในเทคนิคพีซีอาร์ (ตารางที่ 3.3 และ 3.4) และใช้อุณหภูมิที่ 94 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที จากนั้นทำซ้ำ 30 รอบที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที 55 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที และ 72 องศาเซลเซียส นาน 2 นาที และในรอบสุดท้ายเพิ่มเวลาต่อไปอีก 10 นาที เทคนิคพีซีอาร์จะทำบนเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส เพื่อตรวจสอบชิ้นดีเอ็นเอที่มีขนาด 1500 bp จากนั้นทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ Viogene's Gel Extraction System เพื่อวิเคราะห์หาชนิดของจุลินทรีย์ด้วยลำดับเบสของ 16 S rDNA โดยใช้ 27 F-eubac universal primer คู่กับ 1492R-eubac universal primer นำตัวอย่างจากการทำปฏิกิริยาลูกโซ่ที่ได้มาวิเคราะห์บนเจลอะกาโรสความเข้มข้น 0.8 % ในสารละลาย 1X TAE ด้วยกระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ เวลา 45 นาทีจนได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่มีความบริสุทธิ์ แล้วส่งไปวิเคราะห์ลำดับเบสที่บริษัท แปะซิฟิกไซน์ ประเทศไทย แล้วนำข้อมูลลำดับเบสไปเปรียบเทียบกับ 16S rDNA ของแบคทีเรียในฐานข้อมูล GenBank (Shi และ Lee, 2006)

### ตารางที่ 3.2 ไพรเมอร์ 27F และ 1492R

ไพรเมอร์	Sequence (5'-3')
27F	AGAGTTTGATCMTGGCTCAG
1492R	ACCTTGTTACGACTT

### ตารางที่ 3.3 ส่วนผสมที่ใช้ในการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอโดยวิธี PCR

สารเคมี	ปริมาตร / 1 reaction (50 µl)
10X PCR buffer	10 µl
d NTP mix	10 µl
Primer 1 (27F 10 µM)	1 µl
Primer 2 (1492R 10 µM)	1 µl
Template	50 ng
Taq DNA polymerase	0.5 µl

### 3.5 ทดสอบความสามารถในการย่อยสารประกอบพอลิไซคลิกแอโรแมติกไฮโดรคาร์บอนชนิดเนฟทาลีน

ทดสอบการย่อยสลายสารประกอบพอลิไซคลิกแอโรแมติกไฮโดรคาร์บอน โดยนำไอโซเลตที่แยกได้ไปเลี้ยงในอาหารเหลว (ภาคผนวก ก) ภายในขวดยาฉีด (serum bottle) ซึ่งเป็นระบบปิด และทำการเติมแก๊สไนโตรเจนเพื่อไล่ออกซิเจนออกจากระบบก่อนนำไปนิ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที แล้วทำการเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 160 รอบต่อนาที เพื่อให้จุลินทรีย์สัมผัสกับสารประกอบพอลิไซคลิกแอโรแมติกไฮโดรคาร์บอนได้อย่างทั่วถึง แล้วทำการเก็บตัวอย่างทุก 24 ชั่วโมงเป็นเวลา 7 วัน

### 3.6 ตรวจสอบปริมาณการย่อยสลายประกอบพอลิไซคลิกแอโรแมติกไฮโดรคาร์บอนด้วยเครื่อง High-performance liquid chromatography (HPLC)

นำตัวอย่างส่งวิเคราะห์ผลของการย่อยสลายเนพธาลีนด้วยเทคนิคทาง HPLC ที่ศูนย์เครื่องมือและเทคโนโลยี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

### 3.7 ทดสอบการเกิดกระบวนการรีดิวซ์ ไนทริไฟเคชัน/ ดีไนทริไฟเคชัน ในจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้แต่ละชนิด

นำโคโลนีเดี่ยวที่แยกได้ในแต่ละไฮโซเลตมา 1 โคโลนี ถ่ายลงในอาหารเหลวสูตรไนเตรต (nitrate broth) ที่บรรจุหลอดดักแก๊สอยู่ใน บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสภายใต้ภาวะไร้อากาศใน anaerobic chamber สังเกตและบันทึกผลแก๊สที่เกิดขึ้นภายในหลอดดักแก๊สเป็นเวลา 14 วัน จากนั้นจึงนำไปทดสอบความสามารถในการรีดิวซ์ไนทริไฟเคชัน/ ดีไนทริไฟเคชันด้วยวิธีแอลฟา-เมทิลลาไมน์ (alpha-methylamine method) (Theerachat และคณะ, 2010) ซึ่งมีขั้นตอนดังภาคผนวก ข

### 3.8 ทดสอบความสามารถในการย่อยสลายประกอบพอลิไซคลิกแอโรแมติกไฮโดรคาร์บอนชนิดเนพธาลีน ไพรีน และเบนโซ-เอ-ไพรีน

นำแบคทีเรียที่คัดแยกได้มาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวที่มีการดัดแปลงโดยเติมโปแตสเซียมไนเตรตเพื่อใช้เป็นแหล่งของไนเตรต และเติม PAHs เพื่อใช้เป็นแหล่งคาร์บอน โดยใช้ PAHs ที่มีวงเบนซีนตั้งแต่ 2 - 5 วงเป็นองค์ประกอบ จำนวน 3 ชนิด ได้แก่ เนพธาลีน (2 วง) ไพรีน (4 วง) และเบนโซ-เอ-ไพรีน (5 วง) ที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 200 ppm นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสภายใต้ภาวะไร้ออกซิเจน ทำการเก็บตัวอย่างและทดสอบปริมาณสารประกอบ PAHs ที่หลงเหลืออยู่ด้วยเครื่อง HPLC ซึ่งมีรายละเอียดดังนี้

ใช้คอลัมน์ Inertsil ODS-P HP (Shimadzu) column ขนาด 4.8 x 150 mm โดยใช้อะซิโตนไนไตรต์ (Acetonitrile; CH<sub>3</sub>CN) และน้ำเป็น mobile phase ตามลำดับ มี CH<sub>3</sub>CN : H<sub>2</sub>O เป็น 40:60 v/v และวิเคราะห์ด้วย UV-VIS detector อุณหภูมิของคอลัมน์ 40 องศาเซลเซียส วิเคราะห์ผลเทียบกับกราฟมาตรฐานของสารประกอบ PAHs

## บทที่ 4 ผลและวิจารณ์การทดลอง

### 4.1 ผลการตัดแยกจุลินทรีย์จากตัวอย่างตะกอนดินใต้ทะเลด้วยสูตรอาหารโปเตโต้ เดกซ์โตรสตัดแปลงและมีการเติมแนพธาซีน 200 ppm

#### 4.1.1 ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบทางกายภาพจากตัวอย่างตะกอนดินใต้ ทะเล

ตัวอย่างตะกอนดินที่เก็บได้ทั้งหมดมีลักษณะที่สังเกตได้ด้วยตาเปล่าคล้ายคลึงกัน กล่าวคือ ตะกอนเป็นเลน (clay) มีทราย (sand) ปนอยู่ในตะกอนตัวอย่าง ตะกอนทั้งหมดมีสีเทา ดำ ไม่มีกลิ่นฉุน ผลจากการสุ่มตรวจวิเคราะห์หาสารประกอบไนโตรเจนจากตัวอย่างที่ 9 ซึ่งสามารถตัดแยกแบคทีเรียได้นั้น พบว่า มีปริมาณไนโตรเจนที่พบทั้งหมด (Total nitrogen %) เท่ากับ 0.18 % ปริมาณสารประกอบ  $\text{NH}_4^+$  (mg/kg) 11.2 mg/kg และปริมาณสารประกอบ  $\text{NO}_3^-$  (mg/kg) 11.2 mg/kg แสดงให้เห็นว่า ตัวอย่างตะกอนจากชายฝั่งทะเลบริเวณนั้นมีกิจกรรมของ จุลินทรีย์ในกระบวนการไนตริฟิเคชัน (nitrification) อยู่ เมื่อมีการสะสมของ  $\text{NH}_4^+$  ในบริเวณที่มี  $\text{NO}_3^-$  แสดงว่า  $\text{NH}_4^+$  มาจากกระบวนการไนตริฟิเคชัน และแสดงให้เห็นคุณภาพของตะกอนดินและ น้ำในบริเวณนั้นว่าเกิดการปนเปื้อนไนเตรตหรือสารประกอบไนโตรเจนเกิดขึ้นในระยะเวลาหนึ่ง โดยที่ปริมาณของไนเตรตมีเท่ากับแอมโมเนียไฮดรอกไซด์ แสดงให้เห็นว่าตะกอนดินไม่ได้มีการสะสม การปนเปื้อนมานานนักและการปนเปื้อนอาจเพิ่งเกิดขึ้นอีกทั้งลักษณะตะกอนที่เป็นเลนอาจ สอดคล้องกับเหตุการณ์กระบวนการชะล้างที่เกิดขึ้นจากภาคพื้นดินไปสู่ภาคมหาสมุทรเป็นปกติ โดยการปนเปื้อนมีสาเหตุมาจากกิจกรรมทางชุมชนและการเป็นแหล่งจุดร้อนส่งคืนคาร์บอน น้ำลึกของเกาะสีชังดังแสดงในภาพที่ 4.1





ภาพที่ 4.1 ชุมชนขนาดใหญ่ริมทะเลและแหล่งจอดเรือขนส่งสินค้าบริเวณน้ำลึกของเกาะสีชัง

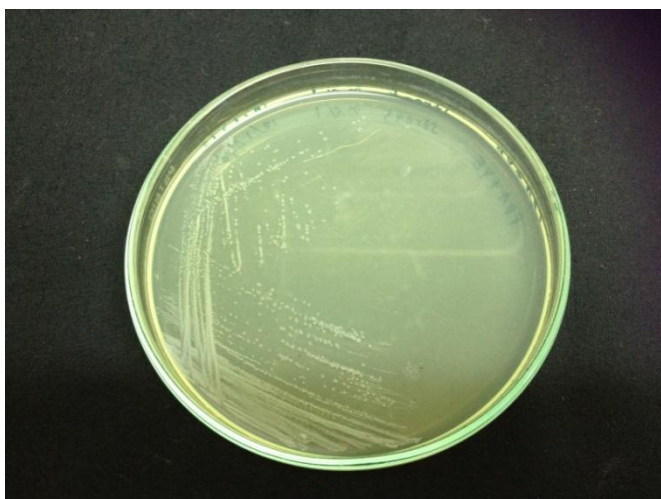
ลักษณะทางกายภาพของตัวอย่างตะกอนดินใต้ทะเลจากบริเวณเกาะสีชัง โดยเป็นการสังเกตลักษณะสีของตะกอน วัด pH ด้วยเครื่อง pH Meter และตรวจสอบปริมาณแอมโมเนีย ( $\text{NH}_4^+ - \text{N}$ ) และไนเตรต ( $\text{NO}_3 - \text{N}$ ) ใช้ชุดตรวจสอบดินจากโครงการพัฒนาวิชาการดิน - ปุ๋ย และสิ่งแวดล้อม ภาควิชาปฐพีวิทยา คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ซึ่งจะให้ผลของปริมาณแอมโมเนีย ( $\text{NH}_4^+ - \text{N}$ ) และไนเตรต ( $\text{NO}_3 - \text{N}$ ) เบื้องต้น ได้ผลดังแสดงต่อไปนี้

ตารางที่ 4.1 บันทึกผลคุณสมบัติทางกายภาพตัวอย่างตะกอนดินใต้ทะเลของเกาะสีชัง

Physical Character Area	Color	pH (1:5)	$\text{NH}_3$	$\text{NO}_3$
Station 1	เทาดำ	8.57	6-15	1-10
Station 2	เทาดำ	8.63	1-10	1-10
Station 3	เทาดำ	8.64	1-10	1-10
Station 4	เทาดำ	8.56	1-10	1-10
Station 5	เทาดำ	8.54	6-15	1-10
Station 6	เทาดำ	8.61	1-10	1-10
Station 7	เทาดำ	8.56	1-10	1-10
Station 8	เทาดำ	8.64	1-10	1-10
Station 9	เทา	8.62	1-10	1-10
Station 10	เทา	8.57	1-10	1-10
Station 11	เทา	8.63	6-15	1-10
Station 12	เทาดำ	8.64	1-10	1-10

#### 4.1.2 ผลการคัดแยกแบคทีเรียดีไนทริไฟอิงจากตัวอย่างตะกอนใต้ทะเล

ผลการนำตัวอย่างตะกอนดินปริมาณ 1 กรัม ใส่ลงในอาหารเหลวสูตร โปเตโต้เดกซ์โตรส เต็ม 2% ยีสต์สกัด และมีการเติมแนพธาซีน 200 ppm นำไปเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ภายใน anaerobic chamber พบการเจริญของจุลินทรีย์ในอาหารเหลวจากนั้นจึงนำจุลินทรีย์มาขีดลงบนอาหารวุ้นด้วยเทคนิคการขีด (streak plate) ได้เป็นโคโลนีเดี่ยว ดังแสดงในภาพที่ 4.2 ลักษณะของโคโลนีมีขนาดเล็ก เส้นผ่านศูนย์กลาง 0.2 มิลลิเมตร โคโลนีเรียบเป็นมันวาว มีสีขาวนวล โดยพบโคโลนีลักษณะดังกล่าวนี้ (ตารางที่ 4.2) จากตัวอย่างตะกอนดินที่ 5 และตัวอย่างตะกอนดินที่ 9 ระบุชื่อไอโซเลตเป็นไอโซเลตที่ 5 และ 9 ตามลำดับ



ภาพที่ 4.2 แสดงโคโลนีของจุลินทรีย์ที่ได้จากการคัดแยก

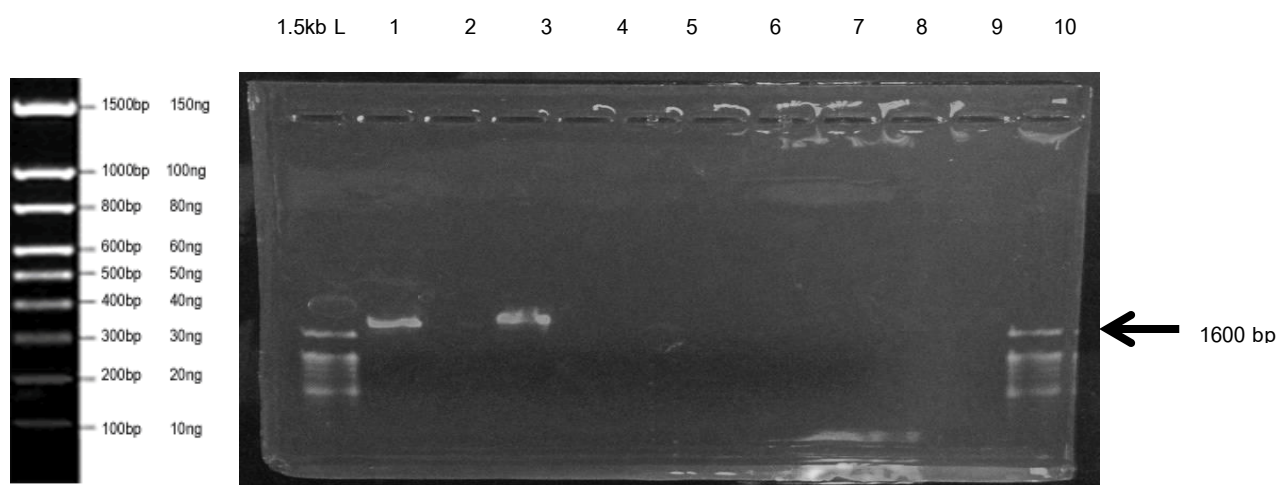
ตารางที่ 4.2 ลักษณะโคโลนีของแบคทีเรียที่แยกได้จากอาหารวุ้นที่มีการเติมแนพธาซีนเป็นองค์ประกอบ

ตัวอย่าง	ลักษณะโคโลนีบนอาหารวุ้นที่เติมแนพธาซีน
ไอโซเลต 5	โคโลนีรูปร่างกลมขนาดใหญ่ สีขาว โปร่งแสง ขอบเรียบ
ไอโซเลต 9	โคโลนีรูปร่างกลมขนาดเล็ก สีขาว โปร่งแสง ขอบเรียบ

#### 4.1.3 ผลการบ่งชี้พันธุ์ชนิดของจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้จากตะกอนดินด้วย 16S

##### rDNA sequence identification

โคโลนีเดี่ยวของจุลินทรีย์ถูกนำมาสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอและเพิ่มปริมาณ 16S rDNA fragment ด้วยด้วยลำดับเบสของ 16S rDNA โดยใช้ 27F-eubac universal primer คู่กับ 1492R-eubac universal primer พบตัวอย่างขึ้นส่วนของดีเอ็นเอขนาด 1600 คู่เบส ในเลนที่ 1 และ 3 ซึ่งก็คือไอโซเลตที่ 5 และ 9 ดังแสดงในภาพที่ 4.3



ภาพที่ 4.3 แสดงขึ้นดีเอ็นเอขนาด 1600 กิโลเบสของ 16S rDNA ในเลนที่ 1 คือดีเอ็นเอของจุลินทรีย์ที่สกัดได้จากตะกอนดินหมายเลข 5 และในเลนที่ 3 คือดีเอ็นเอของจุลินทรีย์สกัดได้จากตะกอนดินหมายเลข 9

จากการคัดแยกแบคทีเรียด้วยวิธีการเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีส่วนผสมของ PAHs เมื่อนำไปทำการระบุสายพันธุ์ด้วยเทคนิค 16 S rDNA identification และส่งชิ้นส่วนของ 16 S rDNA ไปวิเคราะห์หาลำดับเบสด้วยวิธีการ DNA sequencing โดยบริษัทแปซิฟิกไซน์ประเทศไทย จากนั้นจึงทำการค้นหาและเปรียบเทียบจากฐานข้อมูลใน GenBankพบว่าแบคทีเรียที่แยกได้จากทั้ง 2 สถานีมีความคล้ายคลึงกับแบคทีเรียในสายพันธุ์ *Clostridium barlettii* ถึง 96% ดังที่แสดงการเปรียบเทียบลำดับเบสในภาพที่ 4.4 และมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาวิทยาตามภาพที่ 4.5

> [ref|NR\\_027573.1|](#) Clostridium bartlettii DSM 16795 16S ribosomal RNA, partial sequence  
Length=1429

Score = 1640 bits (888), Expect = 0.0  
Identities = 983/1029 (96%), Gaps = 8/1029 (1%)  
Strand=Plus/Plus

```

Query 4      GGC GCGGTG-CT-AC-CATGC-AGTCGAGCGA-TCTCTTCGGAG-AGAGCGGCGGACGGG 57
Sbjct 13     GGC GCGGTGCTTAACACATGCAAGTCGAGCGATTNTCTTCGGAGAAGAGCGGCGGACGGG 72

Query 58     TGAGTAACGCGTGGGTAACCTGCCCTGTACACACGGATAACATACCGAAAGGTATACTAA 117
Sbjct 73     TGAGTAACGCGTGGGTAACCTGCCCTGTACACACGGATAACATACCGAAAGGTATGCTAA 132

Query 118    TACGGGATAACATACGAAAGTCGCAIGGCTTTT-GTATCAAAGCTCCGGCGGTACAGGAT 176
Sbjct 133    TACGGGATAACATAAGAAATTCGCAT-GTTTTCTTATCAAAGCTCCGGCGGTACAGGAT 191

Query 177    GGACCCGCGTCTGATTAGCTAGTTGGTAAGGTAATGGCTTACCAAGGCAACGATCAGTAG 236
Sbjct 192    GGACCCGCGTCTGATTAGCTAGTTGGTAGGTAACGGCTCACCAAGGCGACGATCAGTAG 251

Query 237    CCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGAAGTACGACACGGTCCAGACTCCTACGGGA 296
Sbjct 252    CCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGAAGTACGACACGGTCCAAACTCCTACGGGA 311

Query 297    GGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGAAAGCCTGATGCAGCAACGCCGCGTGAGC 356
Sbjct 312    GGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGAAAGCCTGATGCAGCAACGCCGCGTGAGC 371

Query 357    GATGAAGGCCTTCGGGTGCTAAAGCTCTGTCCTCAAGGAAGATAATGACGGTACTTGAGG 416
Sbjct 372    GATGAAGGCCTTCGGGTGCTAAAGCTCTGTCCTCAAGGAAGATAATGACGGTACTTGAGG 431

Query 417    AGGAAGCCCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGGTAATACGTAGGGGGCTAGCGTTAT 476
Sbjct 432    AGGAAGCCCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGGTAATACGTAGGGGGCTAGCGTTAT 491

Query 477    CCGGAATTACTGGGCGTAAAGGGTGCCTAGGTGGTTTTTTAAGTCAGAAGTGAAAGGCTA 536
Sbjct 492    CCGGATTTACTGGGCGTAAAGGGTGCCTAGGTGGTTTTTTAAGTCAGGAGTGAAAGGCTA 551

```

ภาพที่ 4.4 ผลการตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *Clostridium bartlettii* ไอโซเลต 9 ที่คัดแยกได้จากฐานข้อมูล GenBank

Some properties by which *C. bartlettii* can be differentiated from phylogenetically related clostridia<sup>a</sup>

	<i>C. bartlettii</i>	<i>C. glycolicum</i>	<i>C. lituseburense</i>	<i>C. difficile</i>	<i>C. hiranonis</i>	<i>C. mayombi</i>
Cell size, µm	1.0-1.5 × 5.0-50	0.3-1.3 × 2-15	1.4-1.7 × 3.1-6.3	1-1.5 × 3-12	1-1.6 × 0.8-10	1-1.2 × 2-6
Motility	-	+-	+	+-	-	+
Lecithinase activity	-	-	+	-	-	-
Esculin hydrolysis	-	-	+	+-	-	-
Acid produced from						
Mannitol	+	-	-	-	-	-
Sucrose	+	-	+ <sup>w</sup>	-	+	-
Xylose	-	+	-	-	-	+ <sup>w</sup>
Fermentation products	A, IV, IB (paa)	A, IV, IB (paa, l, s)	A, B, IV, p, f, ib	B, A, ic, iv ib (v, l)	A, IV	A, IV, ib, p, f
CFA	18:1 CIS 9 FAME; 18:1 CIS 9 DMA	18:1 CIS 9 FAME	ND	19 CYC, 10:1 FAME; 16:0 DMA	ND	18:1 CIS 9 FAME; 16:0 FAME
G + C Content (mol%)	29.8	29	27	28	31.3	25.6

Fermentation products (upper case letters indicate major components, lower case minor), A-acetate; B-butyrate; F-formate; IB-isobutyrate; IC-isocaproate; IV-isovalerate; L-lactate; S-succinic acid; V-valeric acid; PAA-phenylacetic acid.

<sup>a</sup>Data from Refs. [21-23] and the present study. Symbols and abbreviations: +, positive; -, negative; <sup>w</sup>, weak reaction; ND, not determined.

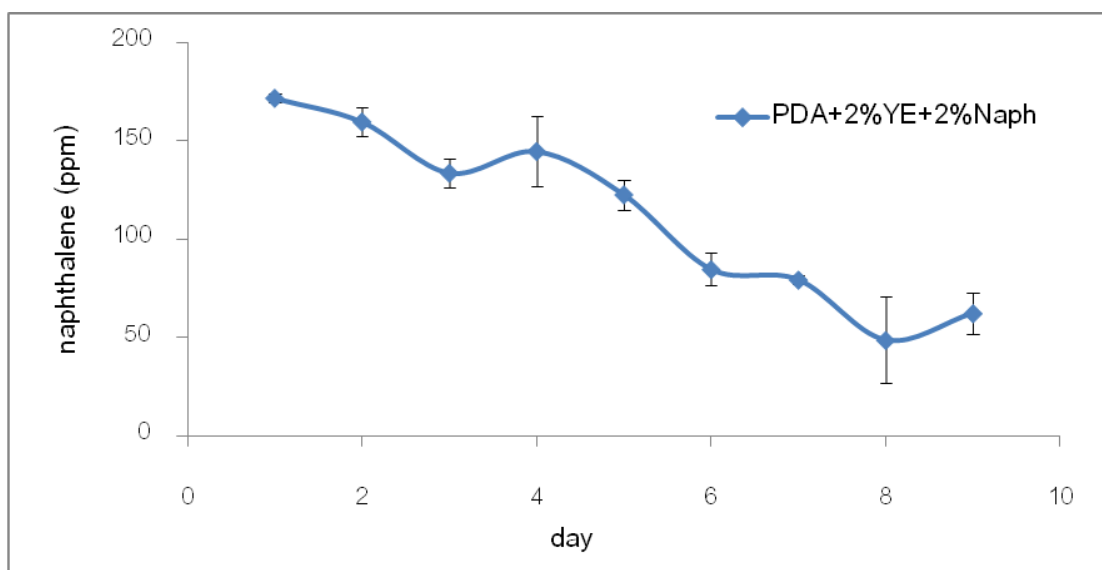
ภาพที่ 4.5 ลักษณะทางสรีรวิทยาของ *Clostridium bartlettii*

#### 4.1.4 ผลการทดสอบความสามารถในการย่อยสลายแนพธาซีนและการทำปริมาณวิเคราะห์ด้วยเครื่อง High-performance liquid chromatography

ผลการทดสอบความสามารถในการย่อย PAHs ชนิดแนพธาซีนนำไปส่งวิเคราะห์ที่ศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย จากการทดสอบความสามารถในการย่อยสลาย PAHs ชนิดแนพธาซีนที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 200 ppm พบว่า *C. barlettii* ที่คัดเลือกได้มีความสามารถในการลดปริมาณแนพธาซีนที่ผสมอยู่ในอาหารเลี้ยงได้ โดยปริมาณแนพธาซีนที่ตรวจพบในอาหารมีการลดลง (ตารางที่ 4.3 และภาพที่ 4.6) โดยมีปริมาณแนพธาซีนตั้งต้นอยู่ที่ 171.79 ppm และลดลงเหลือ 62.36 ppm ในวันที่ 8 ผลรวมปริมาณแนพธาซีนที่หายไปมีทั้งหมด 109.43 ppm

ตารางที่ 4.3 แสดงปริมาณแนพธาซีนที่หลงเหลืออยู่ในเชื้อเมื่อเวลาผ่านไป

วันที่	ppm	วันที่	ppm
0	172 ± 2.08	5	85 ± 8.14
1	160 ± 7.37	6	79 ± 2.08
2	134 ± 7.37	7	49 ± 22.12
3	145 ± 17.79	8	62.36 ± 10.50
4	123 ± 7.64		



ภาพที่ 4.6 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณแนพธาซีนที่หลงเหลืออยู่ในอาหารเมื่อเวลาผ่านไป

#### 4.1.5 ผลการทดสอบความสามารถในการรีดิวซ์ในกระบวนการไนตริฟิเคชัน/ ดีไนตริฟิเคชัน

จากการทดสอบความสามารถในการรีดิวซ์ในกระบวนการ nitrification/ denitrification โดยนำ *C. barlettii* ที่คัดแยกได้ไปเลี้ยงในอาหารเหลวสูตรไนเตรต ซึ่งมีหลอดดักแก๊สด้วยวิธี Alpha-Naphthylamine Method (Beishir 1996) ผลการทดสอบ *C. barlettii* โดยเมื่อหยดรีเอเจนต์เอและรีเอเจนต์บี (reagent A: sulfalinic Acid, reagent B: alpha-naphylamine) มีการเปลี่ยนสีเป็นสีแดงแสดงว่ามีเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทส (nitrate reductase) แต่ไม่มีพบการเกิดแก๊สในหลอดดักแก๊ส แสดงว่า *C. barlettii* มีความสามารถในการเกิดกระบวนการ Nitrification แต่ไม่สามารถเกิดกระบวนการ denitrification หรืออาจเกิดกระบวนการ denitrification ได้เพียงบางส่วน (partial denitrification)

#### 4.2 ผลการคัดแยกจุลินทรีย์จากตัวอย่างตะกอนดินใต้ทะเลด้วยอาหารวุ้นสูตรไนเตรต (nitrate agar) ดัดแปลงและมีการเติมแนพธาไลน์ 200 ppm

##### 4.2.1 ผลการคัดแยกแบคทีเรียดีไนตริไฟอิงจากตัวอย่างตะกอนใต้ทะเล

การคัดแยกในอาหารสูตรที่ 2 นี้ เป็นการดัดแปลงสูตรอาหารเพื่อทำการคัดแยกแบคทีเรียดีไนตริไฟอิงที่มีความสามารถในการใช้ PAHs เป็นแหล่งคาร์บอนได้ โดยได้รับตัวอย่างตะกอนใต้ทะเลเพิ่มเติมจากสถาบันวิจัยทรัพยากรทางน้ำ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ตัวอย่างในชุดนี้มีการเพิ่มจำนวนจุลินทรีย์ในการเก็บ และเพิ่มปริมาณในการเก็บ เนื่องจากการคัดแยกในครั้งแรก ได้ปริมาณจุลินทรีย์เพียงชนิดเดียวคือ *C. barlettii* ดังที่กล่าวไปข้างต้นการทดลองมีการปรับสูตรโดยนำตัวอย่างตะกอนใต้ทะเลที่ได้มาทำการเจือจางด้วย 0.85% NaCl เขย่าเป็นเวลา 15 นาที แล้วดูส่วนในปริมาณ 200 ไมโครลิตร ลงในอาหารวุ้นสูตรไนเตรต (nitrate agar) แล้วเกลี่ยให้ทั่วด้วยเทคนิค spread plate ทำการบ่มที่ 37 องศาเซลเซียสในสภาพไร้ออกซิเจน (ภายใน anaerobic chamber) เมื่อแบคทีเรียมีการเจริญเติบโตจึงทำการแยกให้เป็นไอโซเลตเดี่ยวได้ทั้งสิ้นจำนวน 65 ไอโซเลต ดังที่แสดงในตารางที่ 4.4 และตัวอย่างไอโซเลตที่แยกได้บางส่วนแสดงในภาพที่ 4.7 เมื่อนำแต่ละไอโซเลตไปเลี้ยงในอาหารเหลวไนเตรต (nitrate broth) ที่มีหลอดดักแก๊ส (durham tube) บรรจุอยู่ ก่อนนำไปบ่มเป็นเวลา 7 วัน ในสภาพไร้ออกซิเจน เพื่อนำไปทดสอบความสามารถการ

รีดิวซ์ในกระบวนการ ไนทริฟิเคชัน / ดีไนทริฟิเคชัน ด้วยวิธี Alpha-Naphthylamine test พบว่ามี  
ไฮโซเลตที่เป็น nitrate-positive strains และมีความสามารถในการรีดิวซ์ไนเตรตเป็นไนไตรต์  
ทั้งสิ้น 40 ไฮโซเลต และพบไฮโซเลตที่มีความสามารถในการสร้างแก๊สทั้งสิ้น 16 ไฮโซเลต แต่มี  
เพียง 8 ไฮโซเลตเท่านั้นที่มีความสามารถในการเกิดกระบวนการดีไนทริฟิเคชัน ดังแสดงในตาราง  
ที่ 4.5 – 4.9

**ตารางที่ 4.4** จำนวนไฮโซเลตที่ได้จากตะกอนดินใต้ทะเลในแต่ละสถานีที่เก็บตัวอย่าง

สถานี (Code A)	จำนวน ไฮโซเลต	สถานี (Code B)	จำนวน ไฮโซเลต
1 (B4)	3	13 (B6)	2
2 (B3)	6	14 (D14)	4
3 (B2.1)	4	15 (D14.1)	3
4 (B2)	1	16 (D14.2)	1
5 (B1.1)	2	17 (D17.1)	2
6 (D7.1)	3	18 (D18)	3
7 (D8)	2	19 (D19)	5
8 (D8.1)	4	20 (D20)	1
9 (D9)	2	21 (D20.1)	2
10 (D10)	3	22 (X1)	2
11 (D10.1)	2	23 (X2)	6
12 (B5.1)	2	<b>รวม</b>	<b>65</b>



ตารางที่ 4.5 ผลการทดสอบวิธี Alpha-Naphthylamine Method

(สถานี) /Code	ไฮโซ เลข	Gas (วัน)														Nitrate- Positive	Denitrifier
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14		
(B4) /A1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	
	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	
	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
(B3) /A2	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
	2	-	-	-	-	-	-	-	√	√	√	√	√	√	√	+	√
	3	-	-	-	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	+	√
	4	-	-	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√		
	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
	6	-	-	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	+	
(B2.1) /A3	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+		
	2	-	-	-	-	-	-	-	-	√	√	√	√	√	+		
(B2) /A4	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+		
(B1.1) /A5	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+		
	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+		
(D7.1) /A6	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
	3	-	-	-	-	-	-	-	-	√	√	√	√	√			

ตารางที่ 4.6 ผลการทดสอบวิธี Alpha-Naphthylamine Method (ต่อ)

(สถานี) /Code	ไอ ไซ เลข	Gas (วัน)														Nitrate- Positive	Denitrifier
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14		
(D8) /A7	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	✓
	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	✓	✓	✓	✓	✓	+	✓
(D8.1) /A8	1	-	-	-	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓			
	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
	4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
(D9) /A9	1	-	-	-	-	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	+	✓	
	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+		
(D10) /A10	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+		
	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+		
	3	-	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓			
(D10.1) /A11	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
	2	-	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓			
(B5.1) /A12	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+		
	2	-	-	-	-	-	-	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	+	✓	

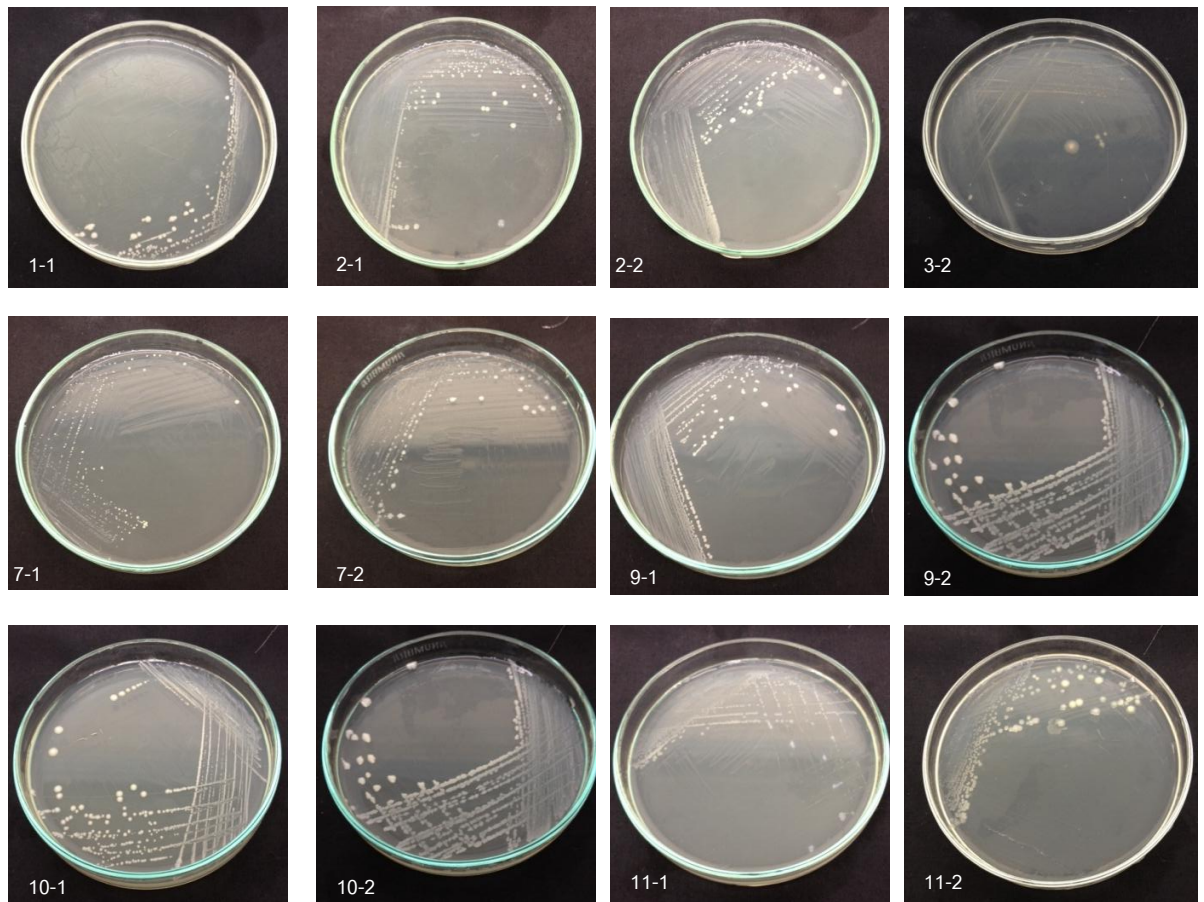
ตารางที่ 4.7 ผลการทดสอบวิธี Alpha-Naphthylamine Method (ต่อ)

(สถานี) /Code	ไอ ไซ เลข	Gas (วัน)														Nitrate- Positive	Denitrifier
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14		
(B6) /B1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	
	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	
(D14) /B2	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	
	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	
	4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	
(D14.1) /B3	1	-	-	-	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	+	√
	2	-	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	+	√
	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	
(D14.2) /B4	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+		
(D17.1) /B5	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+		
(D18) /B6	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+		
	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+		



ตารางที่ 4.9 แสดงสถานีและไอโซเลตที่มีคุณสมบัติเป็นแบบที่เรียกในทรีไฟอิง

สถานี	สัญลักษณ์ไอโซเลต (Code)
D14.1	B3/1
D14.1	B3/2
B3	A2/2
B3	A2/3
D8	A7/1
D8	A7/2
D9	A9/1
B5.1	A12/2



ภาพที่ 4.7 ตัวอย่างเชื้อที่คัดแยกได้จากสถานีต่างๆ โดยไฮโซเลต (1-1) จากสถานี (B4), ไฮโซเลต (2-1, 2-2) จากสถานี (B3), (3-2) จากสถานี (B2.1), ไฮโซเลต (7-1, 7-2) จากสถานี (D8), ไฮโซเลต (9-1, 9-2) จากสถานี 9 (D9), ไฮโซเลต (10-1, 10-2) จากสถานี (D10), ไฮโซเลต (11-1, 11-2) จากสถานี 11 (D10.1)

#### 4.2.2 ผลการทดสอบความสามารถในการย่อยสลายประกอบพอลิไซคลิก แอโรแมติกไฮโดรคาร์บอนชนิดเนฟธาไลน์ ไพรีน และเบนโซ-เอ-ไพรีน

จากการวิเคราะห์ความสามารถในการย่อยสลาย PAHs แบบที่เรียดีไนทรีฟิอิงที่คัดแยกได้ทั้ง 8 ไอโซเลตในอาหารเหลวสูตร MSM โดยใช้เนฟธาไลน์ ไพรีน และเบนโซ-เอ-ไพรีนความเข้มข้นเริ่มต้นที่ 200 ppm เป็นแหล่งคาร์บอนเพื่อการเจริญเติบโตโดยเลี้ยงที่ภาวะไร้ออกซิเจนและใช้การเติมแก๊สไนโตรเจนลงไปในอาหารที่บรรจุอยู่ในขวดซีรัม เพื่อแทนที่ออกซิเจนในระบบและเพื่อให้แบคทีเรียดีไนทรีฟิอิงสามารถใช้ไนโตรเจนเป็นตัวรับอิเล็กตรอนในวิถีของกระบวนการย่อยสลาย PAHs การเลี้ยงกระทำที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และเขย่าด้วยความเร็ว 160 รอบต่อนาที เพื่อให้แบคทีเรียดีไนทรีฟิอิงสามารถสัมผัสกับ PAHs ได้อย่างทั่วถึง

ผลการเปรียบเทียบความสามารถของแบคทีเรียดีไนทรีฟิอิงทั้ง 8 ไอโซเลตต่อการนำเนฟธาไลน์ไปใช้เป็นแหล่งคาร์บอนแสดงดังตารางที่ 4.11 และภาพที่ 4.9 ผลเปรียบเทียบการนำไพรีนไปใช้เป็นแหล่งคาร์บอนแสดงดังตารางที่ 4.12 และภาพที่ 4.10 และผลเปรียบเทียบการนำเบนโซ-เอ-ไพรีนไปใช้เป็นแหล่งคาร์บอนแสดงดังตารางที่ 4.13 และภาพที่ 4.11 ตามลำดับ

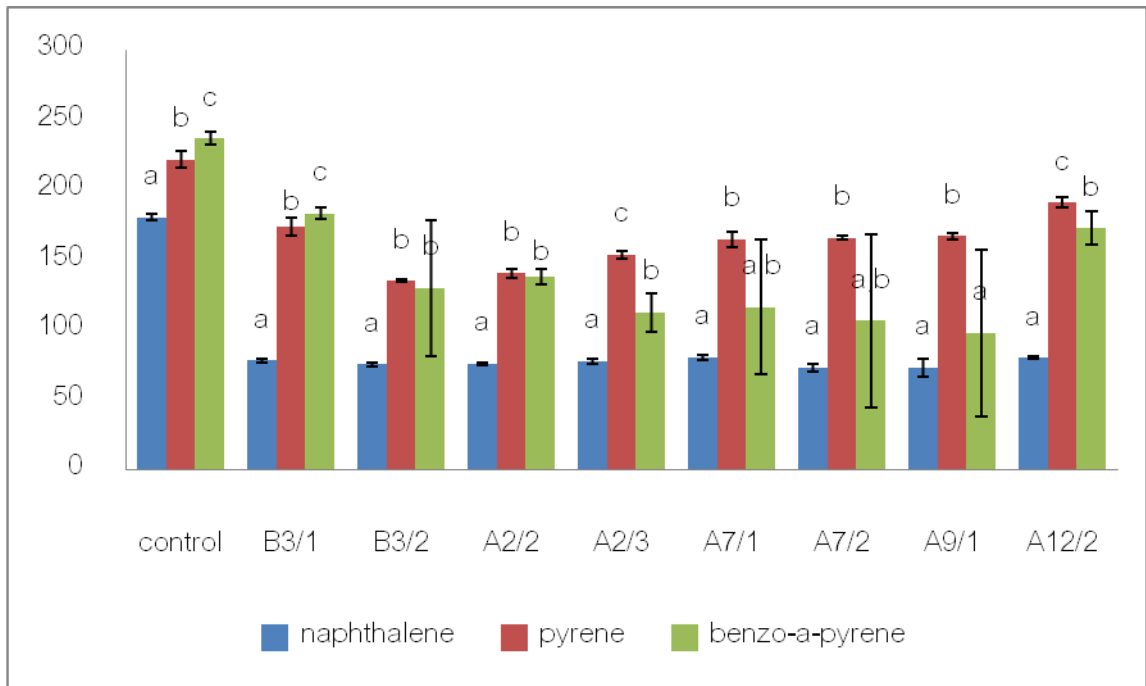
จากการวิเคราะห์ทางสถิติ นำปริมาณ PAHs ที่เหลืออยู่เมื่อเวลาผ่านไป 16 วัน มาเปรียบเทียบกัน พบว่าเนฟธาไลน์ถูกย่อยสลายได้ดีที่สุดในทุกๆไอโซเลต และในไอโซเลต A9/1 สามารถย่อยสลายเนฟธาไลน์ได้ดีที่สุด เมื่อคำนวณจากค่าเฉลี่ย  $\pm$  ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน จากการทดลอง 3 ซ้ำ ตัวอักษรยกที่ต่างกันในแนวดิ่งแสดงผลการทดลองที่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ( $P \leq 0.05$ ) ดังแสดงในตารางที่ 4.10 และภาพที่ 4.8

ตารางที่ 4.10 ปริมาณ PAHs ที่เหลืออยู่เมื่อเวลาผ่านไป 16 วัน ของแบคทีเรียดีไนทริไฟอิงที่คัดแยกได้จากตะกอนดินใต้ทะเล เมื่อเลี้ยงในอาหารสูตร MSM ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็ว 160 รอบต่อนาที

	ค่าเฉลี่ย $\pm$ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (ppm)		
	naphthalene	pyrene	benzo-a-pyrene
Control	180.67 $\pm$ 2.49 <sup>a</sup>	222.00 $\pm$ 6.24 <sup>b</sup>	237.00 $\pm$ 4.58 <sup>c</sup>
B3/1	78.00 $\pm$ 1.00 <sup>a</sup>	173.67 $\pm$ 6.51 <sup>b</sup>	183.33 $\pm$ 4.04 <sup>c</sup>
B3/2	75.33 $\pm$ 1.53 <sup>a</sup>	135.00 $\pm$ 1.00 <sup>b</sup>	130.00 $\pm$ 48.54 <sup>b</sup>
A2/2	75.67 $\pm$ 1.15 <sup>a</sup>	140.67 $\pm$ 3.06 <sup>b</sup>	138.33 $\pm$ 5.69 <sup>b</sup>
A2/3	77.67 $\pm$ 2.08 <sup>a</sup>	154.00 $\pm$ 2.65 <sup>c</sup>	112.33 $\pm$ 14.15 <sup>b</sup>
A7/1	80.33 $\pm$ 1.53 <sup>a</sup>	164.67 $\pm$ 5.86 <sup>b</sup>	116.33 $\pm$ 48.13 <sup>a,b</sup>
A7/2	73.00 $\pm$ 2.65 <sup>a</sup>	166.00 $\pm$ 1.00 <sup>b</sup>	106.33 $\pm$ 61.86 <sup>a,b</sup>
A9/1	73.00 $\pm$ 6.08 <sup>a</sup>	167.33 $\pm$ 2.31 <sup>b</sup>	97.67 $\pm$ 59.65 <sup>a</sup>
A12/2	80.00 $\pm$ 1.00 <sup>a</sup>	191.00 $\pm$ 3.61 <sup>c</sup>	172.67 $\pm$ 12.01 <sup>b</sup>

\*ค่าเฉลี่ย  $\pm$  ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน จากการทดลอง 3 ซ้ำ ตัวอักษรยกที่ต่างกันในแนวดิ่งแสดงผลการทดลองที่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ( $P \leq 0.05$ )

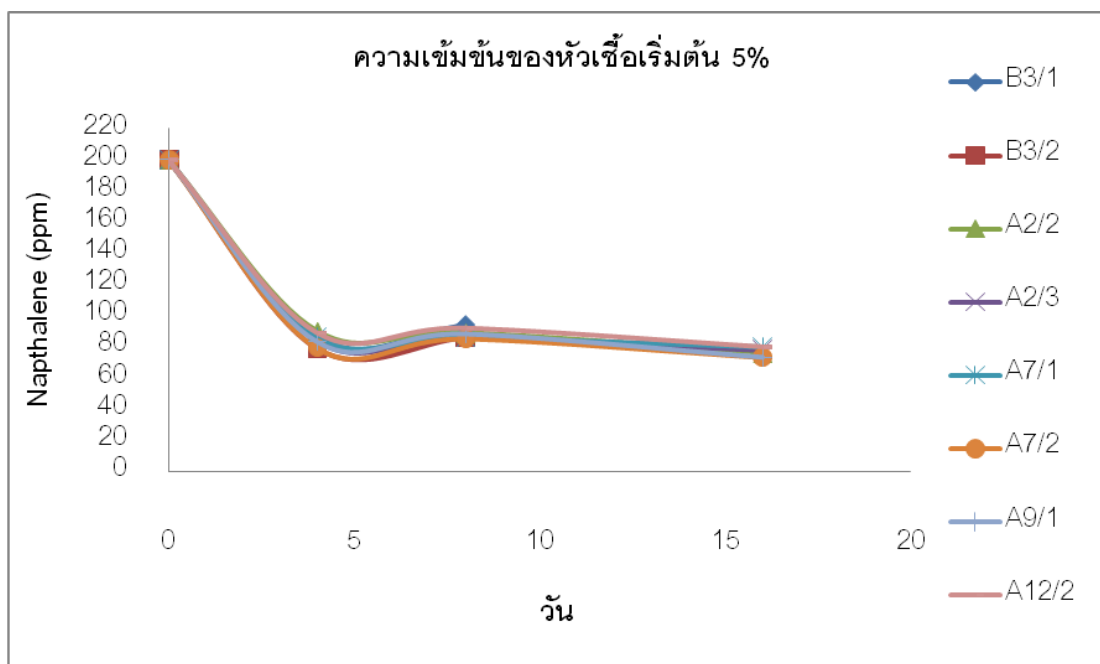




ภาพที่ 4.8 เปรียบเทียบปริมาณ PAHs ที่เหลืออยู่เมื่อเวลาผ่านไป 16 วัน ของแบคทีเรียดีในทริฟลิงที่คัดแยกได้จากตะกอนดินใต้ทะเล เมื่อเลี้ยงในอาหารสูตร MSM ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็ว 160 รอบต่อนาที

ตารางที่ 4.11 ผลการทำปริมาณวิเคราะห์เนฟทาไลน์ด้วยเครื่อง HPLC

ไอโซเลต	เนฟทาไลน์ ความเข้มข้นของหัวเชื้อเริ่มต้น 5%			
	Day 0 (ppm)	Day 4 (ppm)	Day 8 (ppm)	Day 16 (ppm)
B3/1	200	85	94	78
B3/2	200	79	86	75
A2/2	200	90	89	76
A2/3	200	84	86	78
A7/1	200	87	86	80
A7/2	200	79	85	73
A9/1	200	83	88	73
A12/2	200	89	92	80

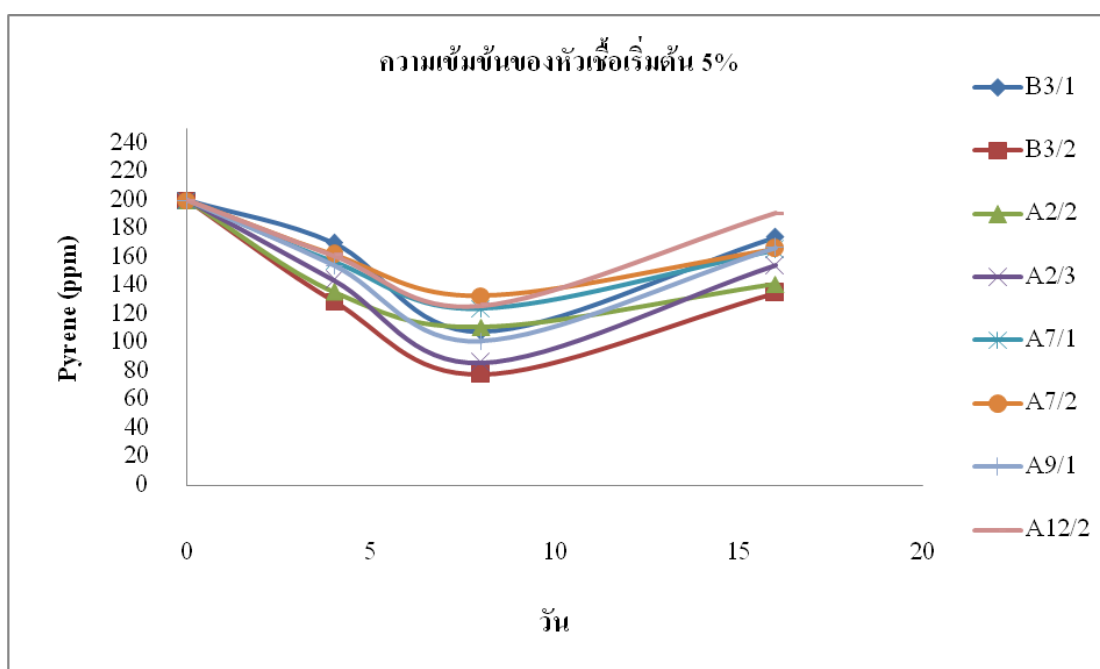


ภาพที่ 4.9 แสดงความสัมพันธ์ของปริมาณเนฟทาไลน์ต่อเวลา เมื่อใช้ความเข้มข้นหัวเชื้อเริ่มต้น

5%

ตารางที่ 4.9 ผลการทำปริมาณวิเคราะห์ไพรีนด้วยเครื่อง HPLC

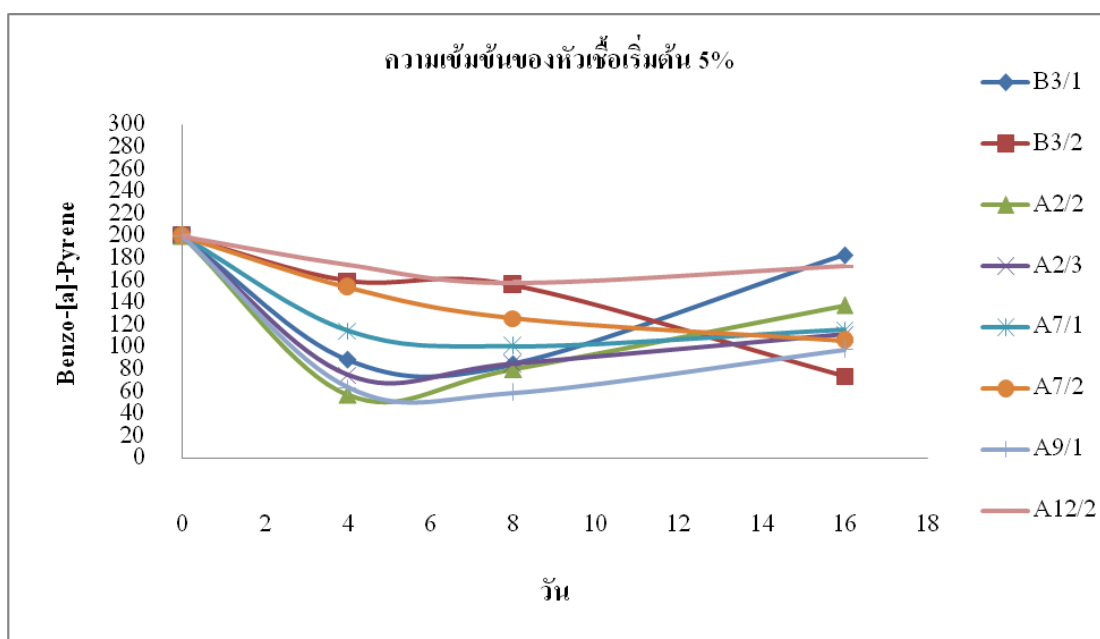
ไอโซเลต	ไพรีน ความเข้มข้นของหัวเชื้อเริ่มต้น 5%			
	Day 0 (ppm)	Day 4 (ppm)	Day 8 (ppm)	Day 16 (ppm)
B3/1	200	170	108	174
B3/2	200	129	78	135
A2/2	200	136	111	141
A2/3	200	144	86	154
A7/1	200	157	124	165
A7/2	200	162	133	166
A9/1	200	154	101	167
A12/2	200	161	126	191



ภาพที่ 4.10 แสดงความสัมพันธ์ของปริมาณไพรีนต่อเวลา เมื่อใช้ความเข้มข้นหัวเชื้อเริ่มต้น 5%

ตารางที่ 4.10 ผลการทำปริมาณวิเคราะห์เบนโซ-เอ-ไพรีนด้วยเครื่อง HPLC

ไอโซเลต	เบนโซ-เอ-ไพรีน ความเข้มข้นของหัวเชื้อเริ่มต้น 5%			
	Day 0 (ppm)	Day 4 (ppm)	Day 8 (ppm)	Day 16 (ppm)
B3/1	200	89	85	183
B3/2	200	160	156	130
A2/2	200	57	80	138
A2/3	200	75	85	112
A7/1	200	115	101	116
A7/2	200	154	126	106
A9/1	200	64	59	98
A12/2	200	174	158	173



ภาพที่ 4.11 แสดงความสัมพันธ์ของปริมาณเบนโซ-เอ-ไพรีนต่อเวลา เมื่อใช้ความเข้มข้นหัวเชื้อเริ่มต้น 5%

#### 4.2.3 ผลการบ่งชี้ชนิดของแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากตะกอนดินด้วย 16 S rDNA identification

สกัดจีโนมิกดีเอ็นเอของแต่ละไอโซเลตที่แยกได้ทำเช่นเดียวกับการทดลองในส่วนแรก โดยเริ่มจากการเพิ่มปริมาณ 16S rDNA fragment ด้วยด้วยลำดับเบสของ 16S rDNA โดยใช้ 27F-eubac universal primer คู่กับ 1492 R-eubac universal primer ก่อนส่งวิเคราะห์หาลำดับเบสของ 16S rDNA ด้วยวิธีการ DNA sequencing ที่บริษัทแบซิฟิกไซน์ประเทศไทยจากนั้นจึงทำการค้นหาข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของ unknown มาเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลของแบคทีเรียใน GenBank พบว่าจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้มีความใกล้เคียงกับจุลินทรีย์สายพันธุ์ดังตารางที่ 4.11 ลำดับนิวคลีโอไทด์จากไอโซเลตที่ทำการแยกได้ทั้ง 8 ไอโซเลต (ภาคผนวก ค) และพบว่าไอโซเลต A9/1 ซึ่งมีความสามารถในการย่อยสลายเนพธาลินได้ดีที่สุดคือ *P. mirabilis*

ตารางที่ 4.11 ชนิดของแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากตะกอนใต้ทะเล

Isolation Code	bacteria	GenBank Acc.Number
B3/1	<i>Enterococcus faecalis</i>	JX975422.1
B3/2	<i>Paenibacillus macerans</i>	AM406669.1
A2/2	<i>Bacillus subtilis</i>	KC441812.1
A2/3	<i>Bacillus tequilensis</i>	JN999833.1
A7/1	<i>Bacillus subtilis</i>	JQ398853.1
A7/2	<i>Bacillus subtilis</i>	JQ398853.1
A9/1	<i>Proteus mirabilis</i>	KC456557.1
A12/2	<i>Enterobacter asburiae</i>	JQ659607.1

## บทที่ 5

### สรุปการทดลอง

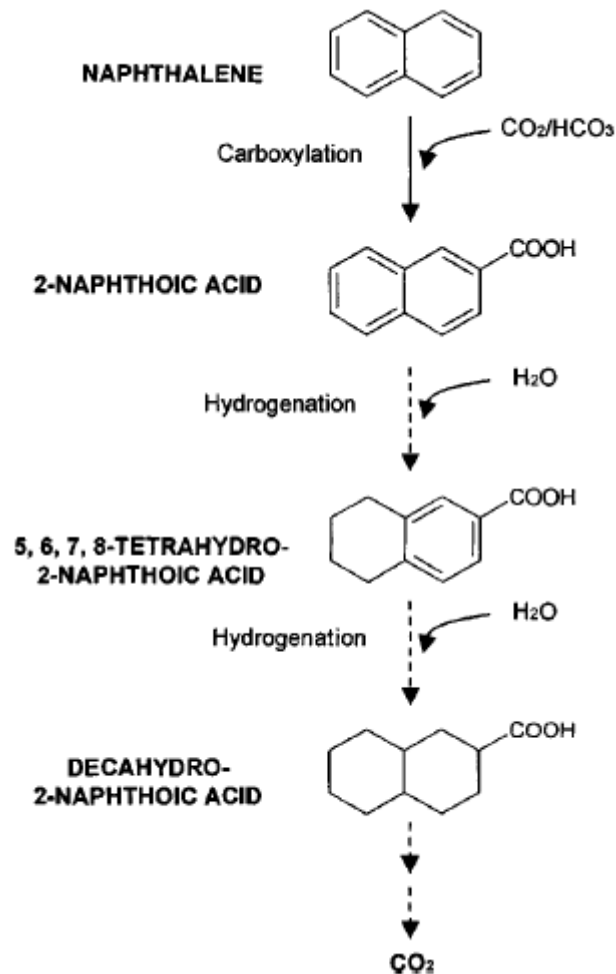
สำหรับในส่วนแรกของการศึกษาเป็นการคัดแยกจุลินทรีย์จากตะกอนดินใต้ทะเลโดยใช้  
สูตรอาหารที่มีความอุดมสมบูรณ์ (enrich media) และเติมแนพทาลีนซึ่งมีความเป็นพิษต่อเซลล์  
ลงในสูตรอาหารตั้งแต่เริ่มแรกเพื่อใช้เป็นตัวคัดกรองแบคทีเรียที่สามารถเจริญได้ ร่วมกับการเติม  
แก๊สไนโตรเจนเพื่อเป็นการไล่ออกซิเจนออกจากระบบ แบคทีเรียที่คัดแยกได้ในขั้นต้นถูกอนุมานว่า  
มีความทนทานต่อแนพทาลีนและสามารถย่อยสลาย PAHs ได้ จากนั้นจึงนำไปบ่งชี้ชนิดของ  
จุลินทรีย์จาก 16SrDNA โดยส่งไปวิเคราะห์ลำดับเบสที่บริษัทแปซิฟิกโซล ประเทศไทย เมื่อได้  
ลำดับเบสมาแล้วจึงนำไปเทียบ 16S rDNA ของแบคทีเรียในฐานข้อมูลของ GenBank โดยใช้  
โปรแกรม BLASTn ผลการวิเคราะห์พบว่าแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากตัวอย่างตะกอนดินใต้ทะเล  
จากเกาะสีชังมีความคล้ายคลึงกับ *Clostridium barlettii* ถึง 96%

เมื่อทราบชนิดของแบคทีเรียแล้วจึงนำไปทำการทดสอบความสามารถในการย่อยสลาย  
แนพทาลีน โดยเลี้ยงแบคทีเรียที่คัดแยกได้ภายใต้ภาวะไร้อากาศด้วยการเติมแก๊สไนโตรเจนลงใน  
อาหารสูตรเดิม (PDB + 2% Yeast Extract + 200ppm Naphthalene) นำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง  
วิเคราะห์ High performance liquid chromatography (ศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์และ  
เทคโนโลยี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ) ผลการทดสอบพบว่าในอาหารที่ใช้ทดสอบมีแนพทาลีน  
เริ่มต้นอยู่ 171.79 ppm และลดลงเหลือ 62.36 ppm เมื่อเวลาผ่านไป 8 วัน ปริมาณแนพทาลีนที่  
หายไปทั้งหมดคือ 109.43 ppm แต่เมื่อนำ *C. barlettii* ไปทดสอบความสามารถในการเป็นตัว  
ออกซิไดซ์ในกระบวนการ nitrification / denitrification พบว่า *C. barlettii* มีความสามารถเป็น  
ตัวออกซิไดซ์ในกระบวนการ nitrification แต่ไม่สามารถเป็นตัวออกซิไดซ์ในกระบวนการ  
denitrification จึงทำให้ *C. barlettii* อาจจัดเป็นแบคทีเรียที่สามารถเป็นตัวออกซิไดซ์ในตรรกแบบ  
เกิดขึ้นบางส่วน จึงไม่ใช่แบคทีเรียดีไนโตรไฟอิงที่แท้จริง อย่างไรก็ตาม แบคทีเรียที่พบมี  
ความสามารถในการย่อยสลายแนพทาลีนซึ่งพบปะปนในสิ่งแวดล้อมที่มีการปนเปื้อนของ PAHs  
ได้ในเวลาอันสั้น แม้มีความสามารถเป็นตัวออกซิไดซ์ในกระบวนการ nitrification แต่ไม่สามารถ  
เป็นตัวออกซิไดซ์ในกระบวนการ denitrification แสดงว่า แบคทีเรียมีกระบวนการรีดิวซ์ในตรรก  
เกิดขึ้นเป็นบางส่วน จึงอาจเป็นไปได้ว่าแบคทีเรียชนิดนี้มีบทบาทในการเกิด partial  
denitrification เมื่ออยู่ในระบบนิเวศ ซึ่งมีแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติแบบ partial denitrification นี้

พบมากในสิ่งแวดล้อมในภาวะที่ไม่มีออกซิเจนต่ำ (anoxic condition) (Kornaros และคณะ, 2010) และจากการสืบค้นเพิ่มเติมเกี่ยวกับวิถีการย่อยสลายเนฟธาไลน์ (naphthalene degradation pathway) และจากฐานข้อมูล Kyoto Encyclopedia of Gene and Genomes (KEGG) ยังพบว่าวิถีการย่อยสลายเนฟธาไลน์ประกอบด้วยเอนไซม์ในวิถีหลายขั้นตอนเช่นกัน เพื่อที่จะเปลี่ยนเนฟธาไลน์ให้เข้าสู่วิถีเมแทบอลิซึมอื่นของเซลล์ เช่น Tyrosine metabolism

การศึกษาที่เกี่ยวข้องกับ *C. barlettii* ยังมีไม่มากนัก และยังไม่เคยมีงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการใช้ *C. barlettii* ในการย่อยสลาย PAHs มาก่อน จึงทำให้ยังไม่ทราบแน่ชัดว่ากลไกการย่อยสลายที่แท้จริงเกิดขึ้นในลักษณะใด (Selina และ Ian, 2005) อย่างไรก็ตาม Meckenstock และคณะ (2000) และ Zhang และคณะ (2000) ได้อธิบายถึงกลไกเบื้องต้นของการย่อยสลายเนฟธาไลน์ภายใต้ภาวะไร้ออกซิเจนดังภาพที่ 5.1 เริ่มต้นด้วยวงแหวนแอโรแมติกถูกไฮโดรไลซิส (hydrolysis) ในกระบวนการคาร์บอกซิเลชัน (carboxylation) ไปเป็นกรด 2-เนฟโทอิก (2-naphthoic acid) จากนั้นกรด 2-เนฟโทอิกจะเกิดการรีดักชัน (reduction) ในปฏิกิริยาไฮโดรจีเนชัน (hydrogenation reaction) เกิดเป็นกรดเดคะลิน -2-คาร์บอกซิลิก (decaclin-2-carboxylic acid) และกรดเดคะไฮโดร-2-เนฟโทอิก (dehydro-2-naphthoic acid)

กระบวนการที่สามารถย่อยสลายเนฟธาไลน์ภายใต้ภาวะไร้ออกซิเจนสามารถเกิดขึ้นได้จากอีกหลายกระบวนการ แต่กลไกยังไม่เป็นที่กระจ่างชัด เช่น กลไกขั้นต้นของการย่อยสลายเนฟธาไลน์ภายใต้ภาวะการรีดิวซ์ด้วยซัลเฟต (sulfate-reducing) ที่เกิดขึ้นภายใต้ปฏิกิริยาไฮดรอกซิเลชันจนได้สารตัวกลางในรูปเนฟทอล (naphthol)



ภาพที่ 5.1 กลไกการย่อยสลายเบื้องต้นของแนพทาลินภายใต้ภาวะไร้ออกซิเจน (Selina และ Ian, 2005)

เนื่องจากการทดลองในส่วนแรกไม่บรรลุตามวัตถุประสงค์ของการทดลอง จึงเริ่มทำการทดลองในส่วนที่ 2 โดยทำการคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียดีไนทริไฟอิงจากตะกอนดินใต้ทะเลอีกครั้ง และได้รับตัวอย่างตะกอนดินมาจากสถาบันวิจัยทรัพยากรทางน้ำ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยเช่นเดิม แต่ขั้นตอนการคัดเลือกแตกต่างจากการทดลองในช่วงแรก โดยทำการคัดเลือกแบคทีเรียเพื่อหาเชื้อแบคทีเรียดีไนทริไฟอิงก่อนเพื่อให้เกิดความจำเพาะต่อแบคทีเรียที่ต้องการคัดเลือก แล้วจึงทดสอบเพื่อหาเชื้อที่มีความสามารถในการย่อยสลาย PAHs ต่อไป

ผลการคัดเลือกเชื้อจากตัวอย่างตะกอนดินใต้ทะเลบริเวณเกาะสีชังได้รับความอนุเคราะห์จากสถาบันวิจัยทางน้ำ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โดยใช้อาหารฐานสูตรไนเทรตและเพาะเลี้ยงภายใต้ภาวะไร้ออกซิเจนภายใน Anaerobic chamber และสามารถแยกจุลินทรีย์ได้ทั้งสิ้น 65



ไอโซเลต เมื่อนำไอโซเลตที่แยกได้ทั้งหมดไปทดสอบต่อเพื่อตรวจสอบหาไอโซเลตที่มีความสามารถเป็นแบคทีเรียดีไนทริไฟอิง พบว่ามีแบคทีเรียที่มีความสามารถในการเกิดกระบวนการไนทริฟิเคชันโดยรีดิวซ์ไนเตรตเป็นไนไตรต์ได้ถึง 40 ไอโซเลต แต่มีเพียง 8 ไอโซเลตเท่านั้นที่มีความสามารถในการเกิดกระบวนการดีไนทริฟิเคชัน แบคทีเรียดีไนทริไฟอิงทั้งแปดนั้น ได้แก่ ไอโซเลต B3/1 ไอโซเลต B3/2 ไอโซเลต A2/1 ไอโซเลต A2/2 ไอโซเลต A7/1 ไอโซเลต A7/2 ไอโซเลต A9/1 และไอโซเลต A12/2 ซึ่งเมื่อนำไปสืบค้นข้อมูลเพิ่มเติมจากงานวิจัยที่เคยมีมาก่อนหน้าพบว่ามีความสอดคล้องกับผลการทดสอบความสามารถในการเกิดกระบวนการ denitrification ของแบคทีเรียที่คัดแยกได้ เมื่อนำไปวิเคราะห์หาสายพันธุ์ของแบคทีเรียด้วยวิธีการเดียวกับการทดลองในช่วงแรก พบสายพันธุ์ของจุลินทรีย์เป็นดังตารางที่ 5.1

**ตารางที่ 5.1** ผลการตรวจสอบสายพันธุ์ของแบคทีเรียดีไนทริไฟอิงที่คัดแยกได้จากตะกอนดินใต้ทะเลจากบริเวณเกาะสีชัง

Isolation Code	Organism	แกรม	Denitrification	อ้างอิง
B3/1	<i>Enterococcus faecalis</i>	+	✓	BIOCYC Database Collection
B3/2	<i>Paenibacillus macerans</i>	+	✓	Ines และคณะ (2011)
A2/2	<i>Bacillus subtilis</i>	+	✓	Ines และคณะ (2011)
A2/3	<i>Bacillus tequilensis</i>	+	✓	-
A7/1	<i>Bacillus subtilis</i>	+	✓	Ines และคณะ (2011)
A7/2	<i>Bacillus subtilis</i>	+	✓	Ines และคณะ (2011)
A9/1	<i>Proteus mirabilis</i>	-	✓	Oltmann และคณะ (1976)
A12/2	<i>Enterobacter asburiae</i>	-	✓	Caspi (2010)

สำหรับแบคทีเรียดีไนทริไฟอิงที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายดีสุดที่ได้จากการทดลองนี้คือ ไอโซเลต A9/1 *P. mirabilis* โดยสามารถย่อยสลาย PAHs ชนิดต่างๆ ได้แก่ แนพทาลีน ไพรีน และเบนโซ-เอ-ไพรีนที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 200 ppm จนลดลงเหลือ 73 167 และ 98 ppm

ตามลำดับ ซึ่งเมื่อนำไปสืบค้นข้อมูลเพิ่มเติม พบว่า Taoufik และคณะ (2004) ที่ได้ทำการคัดแยก แบคทีเรียจากแม่น้ำ Oued El Maleh ในเมือง Mohammedia ประเทศ Morocco พบ *Proteus mirabilis* และแบคทีเรียแกรมลบอีกจำนวน 3 สายพันธุ์คือ *Pseudomonas* sp., *Klebsiella pneumoniae* และ *Staphylococcus* sp. และใช้อาหารสูตร minimum medium ที่มี PAHs ชนิด เบนซีน โทลูอีน และแนพธาซีนเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่า *P. mirabilis* สามารถย่อยสลาย PAHs ได้ดีที่สุด แต่ไม่ได้กล่าวเพิ่มเติมว่าสามารถย่อยสลายได้ไปในปริมาณเท่าใด

*B. subtilis* ที่ทำการคัดแยกจากไอโซเลต A2/2 A7/1 และ A7/2 มีความสามารถในการย่อยสลาย PAHs ได้เช่นกัน โดยเมื่อทำการสืบค้นเพิ่มเติมพบว่า Bayoumi และคณะ (2009) ได้ทำการศึกษาแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลาย PAHs ในตัวอย่างดินที่มีการปนเปื้อน น้ำมันในบริเวณโรงกลั่นน้ำมัน และพบว่ามี 6 สายพันธุ์ที่สามารถย่อยสลายน้ำมันได้ แบคทีเรียดังกล่าวอยู่ในกลุ่มของ *Bacillus firmus* APIS272, *Bacillus licheniformis* APIS473, *Bacillus subtilis* SBS26, *Burkholderia cepacia* DAFS11, *Micrococcus lylae* SBS661 และ *Pseudomonas alcaligenes* DAFS331 จากผลการคัดแยกดังกล่าวพบว่าเป็นแบคทีเรียในกลุ่มของ *Bacillus* ถึง 3 สายพันธุ์ โดย *B. firmus* APIS272 สามารถย่อยสลายอะซีแนพทีซีน แอนทราซีน และเบนโซ-พี-ฟลูออแรนทรีนได้อย่างสมบูรณ์ที่มีความเข้มข้น 0.381, 13.148 และ 0.229 ppm ตามลำดับโดยใช้เวลา 21 วัน ภายใต้ mesophilic condition ซึ่งเมื่อนำมาเปรียบเทียบกับ การทดลองในงานวิจัยนี้พบว่า *B. subtilis* จากทั้ง 3 ไอโซเลตที่คัดแยกมาได้มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายแนพธาซีนได้ดีกว่า โดยสามารถใช้น้ำมันไปได้ถึง 117 – 106 ppm

นอกจากนี้ผลการถูกย่อยสลายของ PAHs โดยแบคทีเรียดีไนโตรฟิอิงที่คัดแยกได้จากการทดลอง พบว่าจำนวนวงเบนซีนมีผลต่อการถูกย่อยสลาย โดย PAHs ที่มีองค์ประกอบเป็นจำนวนวงเบนซีนที่มากกว่าจะถูกย่อยสลายได้ช้า และเห็นได้ว่าแนพธาซีนที่มีจำนวนวงเบนซีน 2 วง ถูกย่อยสลายได้ดีกว่าไพรีน และเบนโซ-เอ-ไพรีนที่มีวงเบนซีนเป็นองค์ประกอบจำนวน 4 วง และ 5 วง ตามลำดับ (ภาคผนวก ง) สอดคล้องกับงานของ Mrozik และคณะ (2003) และ Oleszczuk และ Baran (2003) ที่กล่าวว่าจำนวนวงเบนซีนและน้ำหนักโมเลกุลที่เพิ่มมากขึ้นนั้นส่งผลต่อความสามารถในการละลายน้ำความทนทานต่อการถูกย่อยสลายของ PAHs

นอกจากนี้เมื่อได้ไอโซเลตที่มีความสามารถในการเกิดกระบวนการดีไนโตรฟิเคชันแล้วจึงนำมาทดสอบความสามารถในการย่อยสลายต่อ โดยได้เปลี่ยนจากการใช้อาหารสูตรอุดมสมบูรณ์ที่ใช้ในช่วงแรกมาเป็นการใช้อาหารสูตรมินิมอลซอลต์ (Minimal salt medium; MSM) ที่ดัดแปลงด้วยการเติมไนเตรตเพิ่มร่วมกับการเติมแก๊สไนโตรเจนในระบบ อาหารสูตรนี้ไม่มีแหล่งคาร์บอน

ชนิดอื่นทำให้จุลินทรีย์ถูกบังคับให้ใช้แหล่งคาร์บอนจาก PAHs เพียงอย่างเดียวเท่านั้น โดยผลจากการทดลองนี้พบว่าปริมาณของ PAHs นี้มีค่าลดลงจากวันแรกที่ปริมาณเริ่มต้น 200 ppm และลดลงต่ำสุดในวันที่ 4 ของทุกชุดการทดลอง ดังแสดงในตารางที่ 4.11 – 4.13 แต่เมื่อเวลาผ่านไปพบว่าปริมาณของ PAHs มีความผันผวนเกิดขึ้นโดยที่ไม่ทราบสาเหตุ โดยเมื่อทำการสืบค้นข้อมูลเพิ่มเติมพบว่าสาเหตุการเปลี่ยนรูปกลับของสารมัธยันตร์ (intermediate) ซึ่งเป็นสารตัวกลางที่เกิดขึ้นในระหว่างกระบวนการย่อยสลาย PAHs การเปลี่ยนรูปกลับของสารมัธยันตร์นี้เกิดจากค่ารีดอกซ์โพเทนเชียล (Redox potential; Eh) ซึ่งเป็นความสามารถในการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน (oxidation) หรือรีดักชัน (reduction) PAHs เป็นสารที่มีโครงสร้างซับซ้อนและไม่มีหมู่เกาะ จึงทำให้ถูกย่อยสลายได้ยากและช้าในภาวะไร้ออกซิเจน และยังต้องการค่ารีดอกซ์โพเทนเชียลที่สูงในการเกิดการย่อยสลาย ซึ่งการย่อยสลายสารพวกแอโรแมติกมักเริ่มต้นจากการหมักที่มีการสร้างกรดแอโรแมติกซึ่งเป็นกรดอินทรีย์ (เช่น กรด 2-แนพโทอิกที่เป็นสารมัธยันตร์ในวิธีการย่อยเนพธาไลน์ภายใต้ภาวะไร้ออกซิเจน) กรดอินทรีย์และแอลกอฮอล์เหล่านี้จะถูกย่อยได้ที่ค่ารีดอกซ์ที่ต่ำกว่า โดยสุดท้ายการย่อยจะเสร็จสมบูรณ์ได้เมื่อกรดอินทรีย์และแอลกอฮอล์สร้างขึ้นที่ค่ารีดอกซ์สูงกว่าถูกถ่ายเทโดยการแพร่หรือการเคลื่อนที่ของน้ำไปที่บริเวณที่มีค่ารีดอกซ์ต่ำกว่า (วีรานูช หลาง, 2554) ดังนั้นเมื่อกระบวนการย่อยสลาย PAHs ดำเนินไปและเกิดการสร้างมัธยันตร์ขึ้นมาจึงทำให้วัดปริมาณสารประกอบที่หลงเหลืออยู่ในระบบได้ลดลง แต่เมื่อเวลาผ่านไปสารมัธยันตร์เหล่านี้กลับถูกออกซิไดซ์/รีดิวซ์กลับไปเป็นสารตั้งต้นโดยไอออนของเกลือและสารอื่นที่อยู่ในระบบ ทำให้ผลจากการทำปริมาณวิเคราะห์มีค่าเพิ่มขึ้นและไม่เสถียร สอดคล้องกับงานวิจัยหลายชิ้นที่ระบุว่ากระบวนการย่อยสลาย PAHs ภายใต้ภาวะไร้ออกซิเจนจะเกิดขึ้นได้ดีเมื่อมีกลุ่มประชากรหรืออาศัยการทำงานแบบที่เรียหลายชนิด (consortium) เพราะจุลินทรีย์แต่ละชนิดต้องการค่ารีดอกซ์โพเทนเชียลที่แตกต่างกัน เช่น การย่อยเบนโซเอพที่ เกิดได้ด้วยการเจริญของจุลินทรีย์ย่อยเบนโซเอพที่ไม่ใช้ออกซิเจนร่วมกับจุลินทรีย์ที่ย่อยมีเทนหรือซัลเฟต แต่อย่างไรก็ตามสรุปผลการทดลองในเรื่องของการเปลี่ยนรูปกลับของสารมัธยันตร์ยังมีคงมีข้อมูลน้อย และไม่สามารถตรวจสอบหาสารมัธยันตร์ที่เกิดขึ้นในการทดลองนี้ได้จึงควรทำการทดลองเพิ่มเติมเพื่อยืนยันเหตุผลนี้ต่อไปในอนาคต

นอกจากนี้ผลของการมีอยู่อย่างจำกัดของไนโตรเจนภายในระบบยังส่งผลสำคัญต่อการย่อยสลาย แบคทีเรียดีไนทริไฟอิงคือแบคทีเรียที่สามารถใช้ในเทรตแทนออกซิเจนเพื่อเป็นตัวรับอิเล็กตรอนตัวสุดท้ายในวิธีการย่อยสลายที่ไม่มีออกซิเจน แต่ในขณะเดียวกันแบคทีเรียดีไนทริไฟอิงยังจำเป็นต้องใช้ในเทรตเพื่อเป็นแหล่งของไนโตรเจน (N-source) ในการเจริญเติบโตและแบ่ง

เซลล์ด้วยเช่นกัน ทำให้ไนเตรดที่มีอยู่ในระบบไม่เพียงพอต่อความต้องการ และในอาหารสูตร MSM (ภาคผนวก ก) ที่ใช้ในการทดลองช่วงที่สองนี้เป็นสูตรอาหารที่มีการจำกัดแหล่งคาร์บอน (C-source) ทำให้แบคทีเรียถูกบังคับให้ PAHs เป็นแหล่งคาร์บอนและมีเพียงธาตุหลักที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตเท่านั้น จึงทำให้การย่อยสลายที่เกิดขึ้นนี้เป็นไปได้ไม่ดีเท่าที่ควร (Junfeng และคณะ, 2009)

จากการศึกษาทั้งหมดแสดงให้เห็นว่าสามารถแยกแบคทีเรียดีไนทริไฟอิงได้จากตะกอนดินใต้ทะเล และความสามารถในการย่อยสลาย PAHs ภายใต้ภาวะไร้ออกซิเจนของแบคทีเรียดีไนทริไฟอิงขึ้นอยู่กับปัจจัยภายนอกอื่นๆ ร่วมด้วย ซึ่งปัจจัยที่เกี่ยวข้องและควรให้ความสำคัญ คือ ค่ารีดอกซ์โพเทนเชียล ปริมาณไนเตรดที่มีในระบบ และความอุดมสมบูรณ์ของอาหารที่ใช้ในการเลี้ยง นอกจากนี้การคัดแยกแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายด้วยการใช้อาหารสูตรชั๊กนำที่มีการเติม PAHs จะทำให้ได้จุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการย่อยสลายดีกว่าแบคทีเรียที่ได้จากการคัดแยกเพื่อชั๊กนำให้ได้แบคทีเรียดีไนทริไฟอิง

## รายการอ้างอิง

### ภาษาไทย

- เกื้อกาญจน์ สมานวิฑูรย์. 2546. การตรวจสอบยีนไนโตรรีดักเทสในดินในทริไฟอิงแบคทีเรียโดยเทคนิคพีซีอาร์-อาร์เอฟแอลพี. วิทยานิพนธ์ปริญญาโทมหาบัณฑิต. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- ควบคุมมลพิษ, กรม. 2546. ของเสียอันตราย. สรุปสถานการณ์มลพิษของประเทศไทย พ.ศ. 2546. กรุงเทพฯ : ที.พรินติ้ง.กรุป.
- จิตผกา สันต์ตรบ ทองสุข ปายะนันท์ และกนกพร อธิสุข. การพัฒนาวิธีตรวจวิเคราะห์ Benzo(a)pyrene ในเนื้อสัตว์ปิ้งย่าง. นนทบุรี: สำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์.
- วีรานุช หลาง . 2554. จุลชีววิทยาสิ่งแวดล้อม. พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพฯ : สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 166 หน้า.

### ภาษาอังกฤษ

- Agnelli, A., Ascher, J., Corti, G., Ceccherini, M. T., and Pietramellara, G. 2004. Distribution of microbial communities in a forest soil profile investigated by microbial biomass, soil respiration and DGGE of total and extracellular DNA. Soil Biol. Biochem. 36: 859-868.
- Ambrosoli, R., Petruzzelli, L., Luis, M. J., and Ajmone, M. F. 2005. Anaerobic PAH degradation in soil by mixed bacterial consortium under denitrifying conditions. Chemosphere. 60: 1231-1236.
- Bamforth, S. M., and Singleton, I. 2005. Review bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons: current knowledge and future directions. J. Chem. Technol. Biotechnol. 80: 723-736.
- Bayoumi, R. A. 2009. Bacterial bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons in heavy oil contaminated soil. J. Appl. Sci. Res. 5(2): 197-211.
- Beishir, L. 1996. Microbiology I practice: a self-instructional laboratory course, 6<sup>th</sup> ed. Harper Collins College Publisher, New York, pp 318-319.

- BIOCYC Database Collection. [Online]. 2013. Available from : <http://biocyc.org/biocyc-pgdb-list.shtml> [2013, April 6]
- Boonyatumanond, R., Murakami, M., Wattayakorn, G., Togo, A., and Takada, H. 2007. Sources of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in street dust in a tropical Asian mega-city, Bangkok, Thailand. *Sci. Total Environ.* 384: 420-432.
- Boonyatumanond, R., Wattayakorn, G., Togo, A., and Takada, H. 2006. Distribution and origins of polycyclic aromatic hydrocarbon (PAHs) in riverine, estuarine, and marine sediments in Thailand. *Mar. Pollut. Bull.* 52: 942-956.
- Caspi, R., Altman, T., Dale, J. M., Dreher, K., Fulcher, C. A., Gilham, F., et al. 2009. The MetaCyc database of metabolic pathways and enzymes and the BioCyc collection of pathway/genome databases. *Nucleic Acids Res.* 38: 473-479.
- Chung, W. K., and King, G. M. 1999. Biogeochemical transformations and potential polyaromatic hydrocarbon degradation in macrofaunal burrow sediments. *Aquat. Microb. Ecol.* 19: 285-295.
- Coates, J. D., Woodward, J., Allen, J., Philp, P., and Lovley, D. R. 1997. Anaerobic degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons and alkane in petroleum-contaminated marine harbor sediment. *Appl. Environ. Microbiol.* 97: 3589-3593.
- Department of Health, Government of South Australia. [Online]. 2009. Available from : <http://www.health.sa.gov.au/pehs/PDF-files/ph-factsheet-PAHs-health.pdf> [2012, August 1]
- Gilbert, F., Stora, G., Bonin, P., Le Dreau, Y., Mile, G., et al. 1997. Hydrocarbon influence on denitrification in bioturbated Mediterranean coastal sediments. *Hydrobiologia.* 345: 67-77.
- Habe, H., and Omori, T. 2003. Genetics of polycyclic aromatic hydrocarbon metabolism in diverse aerobic bacteria. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 67: 225-243.
- Haner, A., Hohener, P., Zeyer, J., 1995. Degradation of *p*-xylene by a denitrifying enrichment culture. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 3185-3188.

- Kanaki. 2005. Analytical methods for the determination of PAHs in sediments. PhD proposal. personal communication. University of the Aegean. Department of Environmental Studies. Mytilene.
- Kanary, R. A., and Harayama, S. 2000. Minireview : Biodegradation of high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbon by bacteria. J. Bacteriol. 182: 2059-2067.
- Kornaros, M., Dokianakis, S. N., and Lyberatos, G. 2010. Partial nitrification/denitrification can be attributed to the slow response of nitrite oxidizing bacteria to periodic anoxic disturbances. Environ. Sci. Technol. 44: 7245-53.
- Lee, S. and Cutright, T. J. 1996. Nutrient medium for the bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbon contaminated soil. US. Patent. 5. 508. 194.
- Lors, C., Damidot, D., Ponge, JF., and Perie, F. 2012. Comparison of a bioremediation process of PAHs in a PAH contaminated soil at field and laboratory scales. Environ Pollut. 165: 11-7.
- Lu, X., Zhang, T., Fang, H. H-P., Leung, K. M. Y., and Zhang, G. 2010. Biodegradation of naphthalene by enriched marine denitrifying bacteria. Int. Biodeterior. Biodegradation. 65: 204-211.
- Mahadevan, B., Luch, A., Bravo, C. F., Atkin, J., Steppan, L. B., Pereira, C., Kerkuliet, N. I., and Baird, W. M. 2005. Dibenzo [a, I] pyrene induce DNA adduct formation in lung tissue in vivo. Cancer Lett. 227: 25-32.
- Meckenstock, R. U., Annweiler, E., Michaelis, W., Richnow, H. H., and Schink, B. 2000. Anaerobic naphthalene degradation by a sulphate reducing enrichment culture. Appl. Environ. Microbiol. 66: 2743-2747.
- Monterio, P. P. R., Reis-Henriques, M. A., and Coimbra, J. 2000. Plasma steroid levels in female flounder (*Platichthys flesus*) after chronic dietary exposure to single Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. Mar. Env. Res. 49: 453-467.
- Mrozik, A., Piotrowska, Z., and Labuzek, S. 2003. Review Bacterial degradation and bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons. PJOES. 12: 15-25.

- Nikolaou, A., Kostopoulou, M., Lofrano, G., and Meric, S. 2009. Determination of PAHs in marine sediments: Analytical method and environmental concerns. Global NEST J. 11: 391-405.
- Oberdoerster, E., Cottam, D. M., Wilmot, F. A., Milner, M. J., and Mclachlan, J. A. 1999. Interaction of PAHs and PCBs with ecdysone-dependent gene expression and cell proliferation. Toxicol. Appl. Pharmacol. 160 (1): 101-108.
- Oleszczuk, P., and Baran, S. 2003. Degradation of Individual Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) in Soil Polluted with Aircraft Fuel. PJOES. 12: 431-437.
- Oltmann, L. P., Reijnders, W. N. M., and Stouthamer, A. H. 1976. The correlation between the protein composition of cytoplasmic membranes and the formation of nitrate reductase A, chlorate reductase C and tetrathionate reductase in *Proteus mirabilis* wild type and some chlorate resistant mutants. Arch. Microbiol. 111: 37-43.
- Rich, J. J., Heichen, R. S., Bottomley, P. J., Cromack, K., and Myrold, D. D. 2003. Community composition and function of denitrifying bacteria from adjacent meadow and forest soils. Appl. Environ. Microbiol. 69: 5974-5982.
- Shi, H. P. and Lee, C. M. 2006. Combining anoxic denitrifying ability with aerobic-anoxic phosphorus-removal examinations to screen denitrifying phosphorus-removing bacteria. Int. Biodeterior. Biodegradation. 57: 121-128.
- Shuttleworth, K. L., Cerniglia, C. E. 1995. Environmental aspects of PAH biodegradation. Appl. Biochem. Biotechnol. 54: 291.
- Taoufik, J., Zeroual, Y., Moutaouakkil, A., Moussaid, S., Dzairi, F. Z., Talbi, M., Hammoumi, A., Belghmi, K., Lee, K., Loutfi, M., and Blaghen, M. 2004. Aromatic hydrocarbons removal by immobilized bacteria (*Pseudomonas* sp., *Staphylococcus* sp.) in fluidized bed bioreactor. Ann. Microbiol. 54(2): 189-200.
- The U.S. Environmental Protection Agency. [Online]. 2012. Available from : <http://www.epa.gov/> [2012, August 1]



- Theerachat, M., Virunanon, C., Chulalaksananukul, S., Sinbuathong, N., and Chulalaksananukul, W. 2011. *NirK* and *nirS* reductase gene from non-agricultural forest soil bacteria in Thailand. World J. Microbiol. Biotechnol. 27: 999-1003.
- Verbaendert, I., Vos, PD., Boom, N., and Heylen, K. 2011. Denitrification in Gram-positive bacteria: an underexplored trait. Biochem. Soc. Trans. 39: 254-258.
- Virunanon, C., Chantaropamai, S., Denduangbaripant, J., and Chulalaksananukul, W. 2008. Solventogenic-cellulolytic clostridia from 4-step-screening process in agricultural waste and cow intestinal tract. Anaerobe. 14(2): 109-117.
- Wiersma, DA., and Roth, RA. 1983. The prediction of benzo[a]pyrene clearance by rat liver and lung from enzyme kinetic data. Mol Pharmacol. 24(2):300-8.
- Zhang, X., Sullivan, E. R., and Young, L. Y. 2000. Evidence for aromatic ring reduction in the biodegradation pathway of carboxylated naphthalene by a sulphate-reducing consortium. Biodegradation. 11:117-124.

ภาคผนวก

## ภาคผนวก ก

## สูตรและวิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

## อาหารเหลว PDB + 2% Yeast extract + 200 ppm Naphthalene (100 มิลลิลิตร)

PDB	3.9 กรัม
ผงสกัดจากยีสต์	2.0 กรัม
สารละลายแนพทาลีน	2 %

ละลาย PDB และผงสกัดจากยีสต์เข้าด้วยกันโดยน้ำกลั่น ปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 80 มิลลิลิตร ต้มให้เดือดเพื่อไล่ออกซิเจน แล้วจึงแบ่งใส่ขวดซีดยา (serum bottle) ขนาด 100 มิลลิลิตร ปริมาณขวดละ 40 มิลลิลิตร แล้วจึงนำไปเติมแก๊สไนโตรเจนความบริสุทธิ์ 99.99% นาน 30 นาที ปิดด้วยจุกยางและฝาโลหะ นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที หลังฆ่าเชื้อเสร็จเติมสารละลายแนพทาลีน 2% ที่ละลายในเอทานอลและผ่านการกรองให้ปลอดเชื้อ ปริมาณขวดละ 10 มิลลิลิตร โดยใช้เข็มซีดยาและเทคนิคปลอดเชื้อ

## อาหารวุ้นแข็ง PDA + 2% Yeast extract + 200 ppm Naphthalene (100 มิลลิลิตร)

PDB	3.9 กรัม
ผงสกัดจากยีสต์	2.0 กรัม
วุ้นผง	2.0 กรัม
สารละลายแนพทาลีน	2 %

ละลาย PDB ผงสกัดจากยีสต์ และวุ้นผง ปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 80 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที หลังฆ่าเชื้อเสร็จเติมสารละลายแนพทาลีน 2% ที่ละลายในเอทานอลและผ่านการกรองให้

ปลอดเชื้อ ปริมาณ 20 มิลลิลิตร ก่อนนำไปเทลงในจานแก้ว เมื่ออาหารแข็งแล้วจึงนำไปตั้งไว้ภายใต้ภาวะไร้ออกซิเจนใน anaerobic chamber เป็นเวลา 1 คืน ก่อนการใช้งาน

#### อาหารเหลวไนเตรต (nitrate broth)

ละลายอาหารเลี้ยงเชื้อไนเตรต ปริมาณด้วยน้ำกลั่น ต้มให้เดือดเพื่อไล่ออกซิเจน แล้วจึงแบ่งใส่ขวดซีดขนาด 50 มิลลิลิตร ในปริมาณ 25 มิลลิลิตร นำไปเติมแก๊สไนโตรเจนความบริสุทธิ์ 99.99% นาน 30 นาที ปิดด้วยจุกยางและฝาโลหะ นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

#### อาหารวุ้นแข็งไนเตรต (nitrate agar)

ละลายอาหารเลี้ยงเชื้อไนเตรตเข้ากับผลวุ้น ปริมาณด้วยน้ำกลั่น นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ก่อนนำไปเทลงในจานแก้ว เมื่ออาหารแข็งแล้วจึงนำไปตั้งไว้ภายใต้ภาวะไร้ออกซิเจนใน anaerobic chamber เป็นเวลา 1 คืน ก่อนการใช้งาน

#### อาหารเหลวมินิมอลซอลต์ (MSM broth)

สารละลาย A (400 มิลลิลิตร)

แอมโมเนียมไนเตรต ( $\text{NH}_4\text{NO}_3$ )	16 กรัม
โพแทสเซียมไดไฮโดรเจน ฟอสเฟต ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )	18.8 กรัม
ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ )	0.476 กรัม
แคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรต ( $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ )	0.04 กรัม

ละลายส่วนผสมทั้งหมดให้เข้ากันด้วยน้ำกลั่น และปรับเป็น pH 7 ด้วย โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ปริมาณสุดท้ายเป็น 400 มิลลิลิตร และเก็บไว้ใช้เป็น stock ต่อไป

สารละลาย B (400 มิลลิลิตร)แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ( $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ) 4.0 กรัมแมงกานีสซัลเฟต ( $MnSO_4 \cdot H_2O$ ) 0.03 กรัม

ละลายส่วนผสมทั้งหมดเข้าด้วยกัน และปรับปริมาตรเป็น 400 มิลลิลิตร และเก็บไว้ใช้เป็น Stock ต่อไป

สารละลาย C (400 มิลลิลิตร)เฟอร์รัสซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ( $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ ) 0.03 กรัม

ละลายส่วนผสมและปรับปริมาตรเป็น 400 มิลลิลิตร นำไปแยกหนึ่งชั่วโมงที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที เพื่อป้องกันการเกิดตะกอน

การเตรียมอาหารสูตรมินิมอลซอลต์ (100 มิลลิลิตร)

สารละลาย A 10 มิลลิลิตร ผสมกับน้ำกลั่น 60 มิลลิลิตร

สารละลาย B 10 มิลลิลิตร

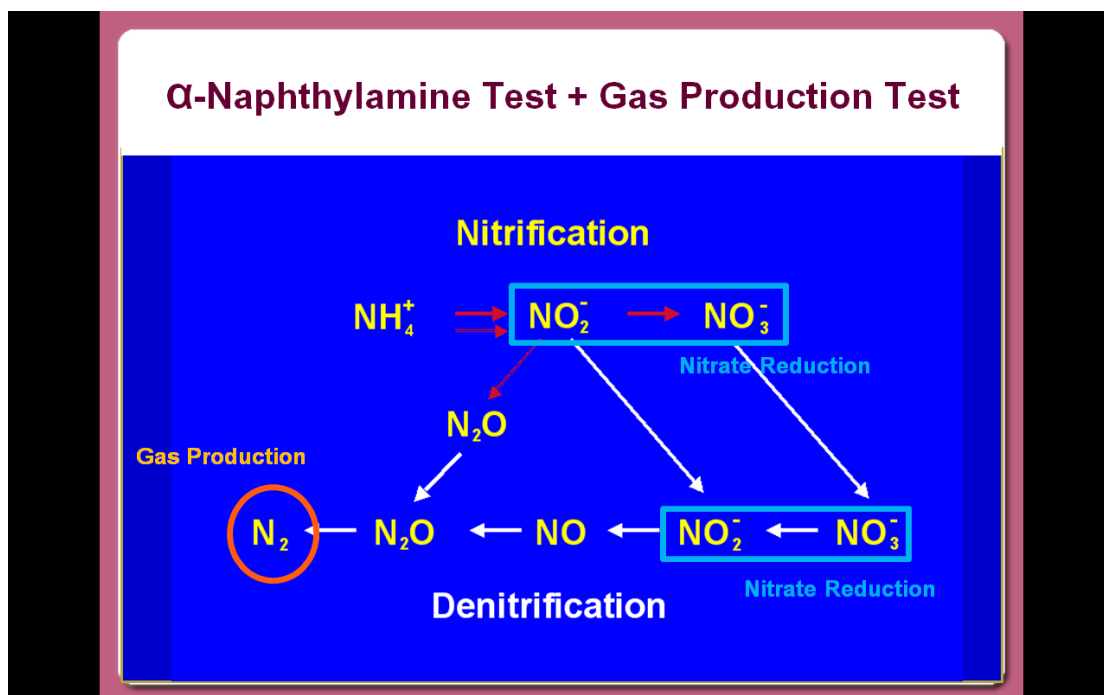
สารละลาย C 20 มิลลิลิตร (แยกหนึ่งชั่วโมง)

ผสมสารละลาย A และ B ที่เตรียมไว้เข้าด้วยกัน ก่อนนำไปต้มให้เดือดเพื่อไล่ออกซิเจน แบ่งบรรจุใส่ขวดซีดขนาด 100 มิลลิลิตร และเติมแก๊สไนโตรเจนความบริสุทธิ์ 99.99% 30 นาที ปิดด้วยจุกยางและฝาโลหะ นำไปหนึ่งชั่วโมงที่ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

## ภาคผนวก ข

## วิธีแอลฟา-แนพธิลามีน (Alpha - Naphthylamine test)

การทดสอบด้วยวิธีแอลฟา-แนพธิลามีน เป็นการวัดความสามารถในการเปลี่ยนไนโตรตเป็นไนไตรต์ เมื่อนำมาใช้ควบคู่กับการวัดความสามารถในการสร้างแก๊ส ซึ่งเป็นปฏิกิริยาขั้นสุดท้ายของกระบวนการดีไนตริฟิเคชัน จึงทำให้สามารถทดสอบได้ว่ามีกระบวนการ nitrification/denitrification เกิดขึ้นหรือไม่ ทั้งนี้แก๊สที่เกิดขึ้นจะเป็นแก๊สไนโตรเจน เนื่องจากอิทธิพลของอาหารสูตรไนโตรตบรอด



ภาพที่ ข.1 กระบวนการไนตริฟิเคชัน/ ดีไนตริฟิเคชัน

## อุปกรณ์และสารเคมี

ผงซิงค์ (zinc powder)

หลอดดักแก๊ส

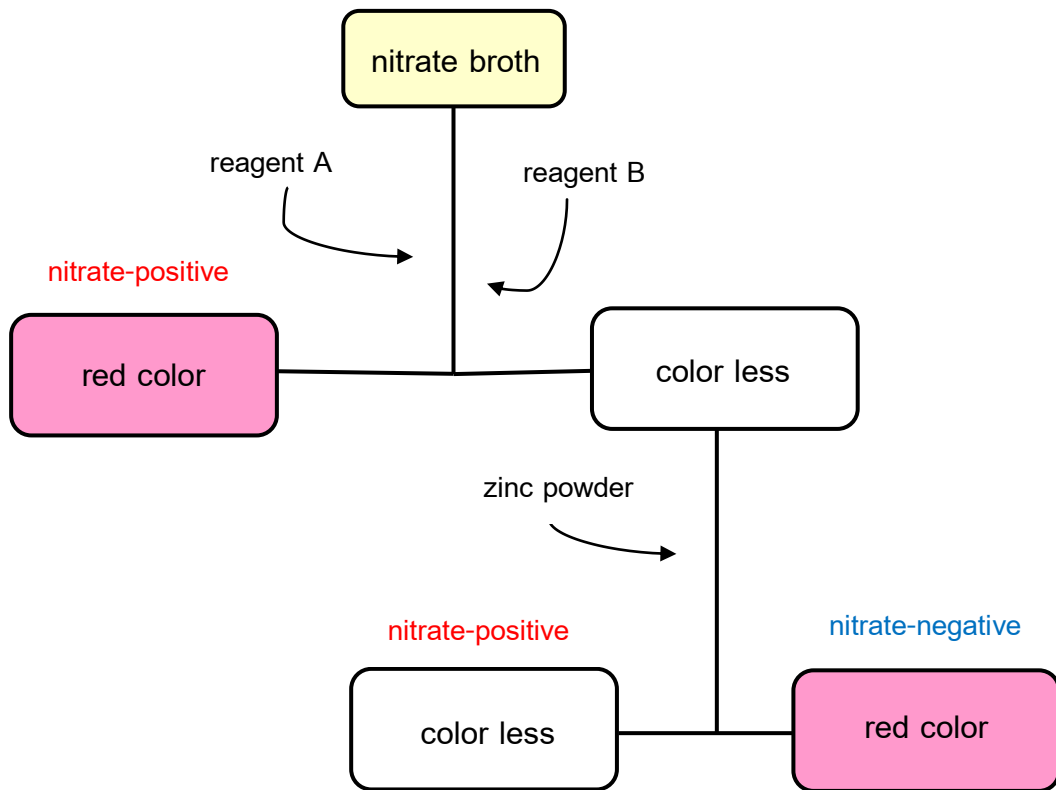
อาหารเหลวสูตรไนเตรต (nitrate broth)

nitrate reagent A (sulfanilic acid)

nitrate reagent B (alpha - naphthylamine)

## วิธีการทดลอง

นำโคโลนีเดี่ยวที่แยกได้ในแต่ละไอโซเลตมา 1 โคโลนี ถ้ายกลงในอาหารเหลวสูตรไนเตรต (nitrate broth) ที่บรรจุหลอดดักแก๊สอยู่ใน บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสภายใต้ภาวะไร้อากาศใน anaerobic chamber สังเกตและบันทึกผลแก๊สที่เกิดขึ้นภายในหลอดดักแก๊สเป็นเวลา 14 วัน จากนั้นหยด nitrate reagent A และ nitrate reagent B จำนวน 3 หยด ตามลำดับ เขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 1-3 นาที สังเกตการเปลี่ยนแปลงของสี โดยหากเปลี่ยนเป็นสีแดง แสดงว่าไอโซเลตนั้นมีความสามารถในการเกิดกระบวนการ nitrification สามารถเปลี่ยนไนเตรตไปเป็นไนไตรต์ได้ (nitrate-positive) หากไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงให้ทำการเติมผงซิงค์ลงไป ปริมาณเล็กน้อย เขย่าให้เข้ากัน สังเกตความเปลี่ยนแปลง หากสารละลายมีการเปลี่ยนเป็นสีแดง หลังจากเติมผงซิงค์ แสดงว่าไอโซเลตนั้นไม่สามารถรีดิวซ์ไนเตรตไปเป็นไนไตรต์ได้ (nitrate-negative) แต่ถ้าหากเติมผงซิงค์แล้วไม่มีการเปลี่ยนแปลงใดๆ เกิดขึ้น แสดงว่าไอโซเลตนั้นสามารถรีดิวซ์ไนเตรตไปเป็นไนไตรต์ได้อย่างสมบูรณ์ และสามารถเปลี่ยนไนไตรต์ไปเป็นไนโตรเจนแก๊สได้ (nitrate-positive)



ภาพที่ ข.2 แผนภูมิการทดสอบด้วยวิธีแอลฟา-แนพธิดาไมด์



## ภาคผนวก ค

## ลำดับนิวคลีโอไทด์ของแบคทีเรียที่คัดแยกได้

ตารางที่ ค.1 ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของแบคทีเรียดีไนทรีฟิอิงไฮโซเลต B3/1

*E. faecalis*

Isolation Code	ลำดับเบสของ 16S rDNA (บางส่วน)
B3/1 <i>E. faecalis</i>	TGGTCGTA CTGGCATGTAATGCAAGTCGAGCGCTTCTTTCTCCCGAGTG CTTGCACTCAATTGAAAAGAGGAGTGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGG CAAACCTACCCATCAGAGGGGGATAACACTTGGAAACAGGTGCTAATAC CGCATAACAGTTTATGCCGCATGGCATAAGAGTGAAAGGCGCTTTCGGGT GTCGCTGATGGATGGACCCGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACG GCTCACCAAGGCCACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCA CACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGG GAATCTTCGGCAATGGACGAAAGTCTGACCGAGCAACGCCGCGTGAGTG AAGAAGGTTTTCGGATCGTAAACTCTGTTGTTAGAGAAGAACAAGGACG TTAGTAACTGAACGTCCCCTGACGGTATCTAACCAGAAAGCCACGGCTAA CTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGG ATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAA AGCCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAAACTGGGAGACTTGAG TGCAGAAGAGGAGAGTGGAAATCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAT ATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTCTCTGGTCTGTA ACTGAC GCTGAGGCTCGAAAGCGTGCGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAG TCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAACTGTTGGAGGGTTTCCGCCCTTCA CTGCTGCAGCAAACACATTACGCACTCCGCCTGGGGAGTACGACCGCAA GGTTGAAACTCAGAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCTGCGGAGCA TGTGTGTTACTTACGAGCAACCGGAACAGCCTTACCAGGTCTAGACATCG TTTGACCGCTCTAGACATGCAGGTTACCTTCAGGGACTAACGGCCTGTTC TTCCTTGATTA

ตารางที่ ค.2 ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของแบคทีเรียดีไนทรีฟิอิงไฮโซเลต B3/2

*P. macerans*

Isolation Code	ลำดับเบสของ 16S rDNA (บางส่วน)
B3/2 <i>P. macerans</i>	GCGTTGATGCATCCTATAACATGCAAGTCGAGCGGACTTGATAGGAG TGCTTGCACTCCTGATGGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTA GGCAACCTGCCCGTAAGACTGGGATAACTACCGGAAACGGTAGCT AATACCGGATAATCAAGTTTCTCGCATGAGAGGCTTGGGAAAGGCG GAGCAATCTGTCACTTACGGATGGGCCTGCGGCGCATTAGTTAGTT GGTGGGGTAACGGCTCACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGA GAGGGTGAACGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCT ACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTG ACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGTTTTCGGATCGTAAAG CTCTGTTGCCAGGGAAGAACGTCTTCTGGAGTAACTGCCAGGAGAG TGACGGTACCTGAGAAGAAAGCCCCGGCTAACTACGTGCCAGCAG CCGCGGTAATACGTAGGGGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGC GTAAAGCGCGCGCAGGCGGCTGTTTAAGTCTGGTGTTTAATCCTGG GGCTCAACTCCGGGTCGCACTGGAAACTGGATGGCTTGAGTGCAG AAGAGGAGAGTGGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGAT GTGGAGGAACACCAGTGGCGAATGCGACTCTCTGGGCTGTAAGT ACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGAGGAGCAAACACGATTAGATACCC TGGTAGTCCACGCCGTAAGTAACTATGAGTGCTACGTGTTATGGGTTTCT ATACCCTTGGTGCCGAAGTAAACACATTAACACTCCGCCTGAGGA GTACCGTCGCATGACTGACACTCATTAGAATTGACCCTGACCCCGC TATACTGATTATGTGGTATAATTCTTAGCCACCTCGAAATACTGAC CATGTCTTGACATCCCTCTGACGGGTACTTATATGTAGTATCCCTACT CTACATGACGAGTAACGTGTGCATGTCGTCTCAGCTACATGTCTTA GATATCCGGATAACTTCTTCAATCAAGCGGAAGCTGCT

ตารางที่ ค.3 ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของแบคทีเรียดีไนทรีฟิอิงไฮโซเลต A2/2

*B. subtilis*

Isolation Code	ลำดับเบสของ 16S rDNA (บางส่วน)
A2/2 <i>B. subtilis</i>	CAGGGATGGCGTCATCATATACATGCAAGTCGAGCGGACAGATGA GGAGCTTGCTCCCTGATGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGT GGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGG CTAATACCGGATGGTTGTTTGAACCGCATGGTTCAAACATAAAAGGT GGCTTCGGCTACCACTTACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAG TTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCT GAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACT CCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCGCAATGGACGAAAGT CTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGTTTTTCGGATCGTA AAGCTCTGTTGTTAGGGAAAAACAAGTACCGTTCCAATAGGGCGGT ACCTTGACGGGACCTCCTATCAAAGCCATTGCTAAAGGATGTCCAG ACCCCGCGGGGATCTTCGCGTGGCTTCCGTTTACCCCAATTGCTG CACCGCTTGGGCTGGCCCGCGGCTACTCCTTTGAGATTCAAACCTTG CGACCGTACTCCCCAGGCGGAGTGCTTAATGCGGTAACCTGCGGCA CTAAAGGAGGGAAACGCCCTAACACTTAGCACTCATCGTTTACGGC GTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTCGCTCCTCACGTTTTCGC TCCTCAGCGTCAGTTACAGACCAGAGAGTCGCCTTCGCCACTAGT GTTCCTCCACATCTCTACGCATTTACCGCTACACGTGGAATTCCAC TCTCCTCTTCTGCACTCAAGTTCGCCAGTTTCCAATGACCCTCCCCG GGTGAGCCGGGGGCTTTCACATCAGACTTAAGAAACCGGCCTGCG AGCCCTTACGCCCAATAATTCCGGACAACGCTTGCCACCTACGTA TTACCGCGGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGTGGCTTTCTGGTTAGT ACCGTCCAGGTACCGCCCTACTCGAACGGTACTTGTCTTCGCTTA CCAACAGAGCTTACGATTCGGAAA

ตารางที่ ค.4 ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของแบคทีเรียดีในทรีฟองไข่เลต A2/3

*B. tequilensis*

Isolation Code	ลำดับเบสของ 16S rDNA (บางส่วน)
A2/3 <i>B. tequilensis</i>	CTGTGAGGCATTACTACTACGTACGGCTGACTCCTAGGAGGTTAC CTTACCCGACTTCGGGTGTTACAACTCTCGTGGTGTGACGGGCG GTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTCACCGCGGCATGCTGATC CGCGATTACTAGCGATTCCAGCTTCACGCAGTCGAGTTGCAGACT GCGATCCGAACTGAGAACAGATTTGTGGGATTGGCTTAACCTCGC GGTTTCGCTGCCCTTTGTTCTGTCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCC AGGTCATAAGGGGCATGATGATTTGACGTCATCCCCACCTTCCTC CGGTTTGTACCCGGCAGTCACCTTAGAGTGCCCAACTGAATGCTG GCAACTAAGATCAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAAC ATCTCACGACACGAGCTGACGACAACCATGCACCACCTGTCACTC TGCCCCCGAAGGGGACGTCCTATCTCTAGGATTGTCAGAGGATGT CAAGACCTGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCTTCGAATTAACCACATG CTCCACCGCTTGTCGGGGCCCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTCAGT CTTGCGACCGTACTCCCCAGGCGGAGTGCTTAATGCGTTAGCTGC AGCACTAAGGGGCGGAAACCCCTAACACTTAGCACTCATCGTTT ACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTCGCTCCCCACGC TTTCGCTCCTCAGCGTCAGTTACAGACCAGAGAGTCGCCTTCGCC ACTGGTGTTCCTCCACATCTCTACGCATTTACCGCTACACGTGGA ATTCCACTCTCCTCTTCTGCACTCAAGTTCCCCAGTTTCCAATGAC CCTCCCCGTTGAGCCGGGGGCTTTCACATCAGACTTAAGAAACC GCCTGCGAGCCCTTTACGCCAATAATTCGGACAACGCTTGCCA CCTACGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGTGGCTTT CTGGTTAGGTACCGTCCAGGTACCGGCCCTATTCGAACGGAACCTT GTTCTCCCTAACAAACAGAGCTTTACGATCCGAAAACCTCATCACT CACGCGGCGTTGCTTCGG

ตารางที่ ค.5 ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของแบคทีเรียดีไนทรีฟิอิงไอโซเลต A7/1

*B. subtilis*

Isolation Code	ลำดับเบสของ 16S rDNA (บางส่วน)
<p style="text-align: center;">A7/1 <i>B. subtilis</i></p>	<p>CCAGGCTGAATCACTACTACGGCGGCTGGCTCCTAAAAGGTTACCT  CACCGACTTCGGGTGTTACAACTCTCGTGGTGTGACGGGCGGTG  TGTACAAGGCCCGGGAACGTATTCACCGCGGCATGCTGATCCGCG  ATTACTAGCGATTCCAGCTTCACGCAGTCGAGTTGCAGACTGCGAT  CCGAACTGAGAACAGATTTGTGGGATTGGCTTAACCTCGCGGTTTC  GCTGCCCTTTGTTCTGTCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCAGGTCA  TAAGGGGCATGATGATTTGACGTCATCCCCACCTTCCTCCGGTTTG  TCACCGGCAGTCACCTTAGAGTGCCCAACTGAATGCTGGCAACTAA  GATCAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCACG  ACACGAGCTGACGACAACCATGCACCACCTGTCACTCTGCCCCCG  AAGGGGACGTCTATCTCTAGGATTGTCAGAGGATGTCAAGACCTG  GTAAGGTTCTTCGCGTTGCTTCGAATTAACCACATGCTCCACCGCT  TGTGCGGGCCCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTCAGTCTTGCGACCGT  ACTCCCCAGGCGGAGTGCTTAATGCGTTAGCTGCAGCACTAAGGG  GCGGAAACCCCTAACACTTAGCACTCATCGTTTACGGCGTGGACT  ACCAGGGTATCTAATCCTGTTGCTCCCCACGCTTTCGCTCCTCAG  CGTCAGTTACAGACCAGAGAGTCGCCTTCGCCACTGGTGTTCTCCTC  ACATCTCTACGCATTTACCGCTACACGTGGAATTCCACTCTCCTCT  TCTGCACTCAAGTTCCCCAGTTTCCAATGACCCTCCCCGGGTTGAG  CCGGGGGCTTTCACATCAGACTTAAGAAACCGCCTGCGAGCCCTT  TACGCCAATAATTCCGGACAACGCTTGCCACCTACGTATTACCGC  GGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGTGGCTTTCTGGTTAGGTACCGTC  AAGGTACCGCCCTATTCGAACGGTACTTGTTCCTTCCCTAACAAACAG  AGCTTTACGATCCGAAAA</p>

ตารางที่ ค.6 ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของแบคทีเรียดีไนทรีไฟอิงไฮโซเลต A7/2

*B. subtilis*

Isolation Code	ลำดับเบสของ 16S rDNA (บางส่วน)
<p style="text-align: center;">A7/2 <i>B. subtilis</i></p>	<p>ACCGGCTGACCACTACTACGGCGGCTGACTCCTAAAAGGTTACCT  GTCACCGACTTCGGGTGTTACAAACTCTCGTGGTGTGACGGGCGG  TGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTCACCGCGGCATGCTGATCCG  CGATTACTAGCGATTCCAGCTTCACGCAGTCGAGTTGCAGACTGCG  ATCCGAACTGAGAACAGATTTGTGGGATTGGCTTAACCTCGCGGTT  TCGCTGCCCTTTGTTCTGTCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCAGGT  CATAAGGGGCATGATGATTTGACGTCATCCCCACCTTCTCCGGTT  TGTCACCGGCAGTCACCTTAGAGTGCCCAACTGAATGCTGGCAACT  AAGATCAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCAC  GACACGAGCTGACGACAACCATGCACCACCTGTCACTCTGCCCCC  GAAGGGGACGTCCTATCTCTAGGATTGTCAGAGGATGTCAAGACCT  GGTAAGGTTCTTCGCGTTGCTTCGAATTAACCACATGCTCCACCG  CTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTCAGTCTTGCGACC  GTAATCCCCAGGCGGAGTGCTTAATGCGTTAGCTGCAGCACTAAG  GGGCGGAAACCCCTAACACTTAGCACTCATCGTTTACGGCGTGG  ACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTGCTCCCCACGCTTTGCTCCT  CAGCGTCAGTTACAGACCAGAGAGTCGCCTTCGCCACTGGTGTTT  CTCCACATCTCTACGCATTTACCGCTACACGTGGAATTCACCTCTC  CTCTTCTGCACTCAAGTTCCCCAGTTTCCAATGACCCTCCCCGGTT  GAGCCGGGGGCTTTCACATCAGACTTAAGAAACCGCCTGCGAGCC  CTTTACGCCAATAATTCCGGACAACGCTTGCCACCTACGTATTAC  CGCGGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGTGGCTTTCTGGTTAGGTAC  CGTCAAGGTACCGGCCCTATTCGAACGGTACGTGGTTCTTCCCTAC  CAACAGAGCTTTACGGATCCGAAAACCTTCATCACTCACG</p>

ตารางที่ ค.7 ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของแบคทีเรียดีไนทรีฟายิ่งไฮโซเลต A9/1

*P. mirabilis*

Isolation Code	ลำดับเบสของ 16S rDNA (บางส่วน)
A9/1 <i>P. mirabilis</i>	GACAGTATCACTACTAGTAGCGCCCTCCCGAAGGTTAAGCTAACTA CTTCTTTTGAACCCACTCCCATGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAA GGCCCGGGAACGTATTCACCGTAGCATTCTGATCTACGATTACTAG CGATTCCGACTTCATGGAGTCGAGTTGCAGACTCCAATCCGGACTA CGACAGACTTTATGAGTTCCGCTTGCTCTCGCGAGGTCGCTTCTCTT TGTATCTGCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCTACTCGTAAGGGCCA TGATGACTTGACGTCATCCCCACCTTCTCCGGTTTATCACCGGCA GTCTCCTTTGAGTTCCCACCATTACGTGCTGGCAACAAAGGATAAG GGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATTTACAACACGAGC TGACGACAGCCATGCAGCACCTGTCTCAGCGTTCCCGAAGGCACT CCTCTATCTCTAAAGGATTCGCTGGATGTCAAGAGTAGGTAAGGTT CTTGCGGTTGCATCGAATTAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGG GCCCCCGTCAATTCATTTGAGTTTTAACCTTGCGGCCGTACTION AGGCGGTCGATTTAACGCGTTAGCTCCAGAAGCCACGGTTCAAGA CCACAACCTCTAAATCGACATCGTTTACAGCGTGGACTACCAGGGT ATCTAATCCTGTTTGCTCCCCACGCTTTCGCACCTGAGCGTCAGTCT TTGTCCAGGGGGCCGCCTTCGCCACCGGTATTCTCCACATCTCTA CGCATTTACCGCTACACATGGAATTCTACCCCCCTCTACAAGACT CTAGCCAACCAGTTTCAGATGCAATTCCAAGTTAAGCTCGGGGCT TTCACATCTGACTTAATTGACCGCCTGCGTGCGCTTACGCCAGT AATTCCGATTAACGCTTGACACTCCGTATTACCGCGGCTGCTGGC ACGGAGTTAGCCGGTGCTTCTTCTGCGGGTAACGTCAATTGATAAG GGTATTAACCTTATCACCTTCTCCCCGCTGAAAGTACTTTA

ตารางที่ ค.8 ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของแบคทีเรียดีไนทรีฟิอิงไอโซเลต A12/2

*E. asburiae*

Isolation Code	ลำดับเบสของ 16S rDNA (บางส่วน)
A12/2 <i>E. asburiae</i>	<p>GCAATGATCGACGCTGCGAATCGCTGAGCGAAGGGTAACTCTACT  ACTTCTTTTGGACCCACTCCCATGGTGTGACGGGCGGTGTGTACA  AGGGCCGGGAACGTATTCACCGTGGCATTCTGATCCACGATTACT  AGCGATTCCGACTTCATGGAGTCGAGTTGCAGACTCCAATCCGGA  CTACGACGCACTTTATGAAGTCCGCTTGCTCTCGCGAGGTGCTT  CTCTTTGTATGCGCCATTGGAGCACGTGTGGAGCCCTACTCGTAA  GGGCCATGATGACTTGACGTCATCCCCACCTTCCTCCAGTTTATCA  CTGGCAGTCTCCTTTGAGTTCCCGGCCGGACCGCTGGCAACAAA  GGATAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATTTACA  ACACGAGCTGACGACAGCCATGCAGCACCTGTCTCAGAGTTCCC  GAAGGCACCAAACCATCTCTGGAAAGTTCTCTGGATGTCAAGAGT  AGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCATCCAATTAACCACATGCTCCACC  GCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCATTTGAGTTTTAACCTTGCGGC  CGTACTCCCCAGGCGGACGACTTAACGCGTTAGCTCCGGAAGCC  ACGGCTCAAGGCCACAACCTCCAAGTCAATCTCGTTTACGGCGTG  GACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGCTCCCCACGCTTTCCCACC  TGATCGTCAGTCTTTGTCCAGGGGGCCGCCTTACCCCCTGTATTT  CTCCAGATCTCTACACATTTACCGCTACACCTGGAATTCTACCCC  CCTCTACCAGACTCTAGCCTGCCAGTTTCCAATGCAGGTTCCCCG  TTGAGCCCCGGGATTTACATCCAGACTTGACAGACCGCCTGCGT  GCGCTTTACGCCAGTAATTCGGATTAACGCTGCACCACTCCGTAT  TACCGCTGCTGCTGCACGTAGTAGCAGTGCTCTCTGTAGTACGTC  ATCGACATGTATGAACATTATCGCTTCCTCCCGCTGAAGTACTTAC  TACCCCA</p>



## ภาคผนวก ง

## ผลการย่อยสลาย PAHs ของเชื้อแต่ละไอโซเลต

ผลการวิเคราะห์ด้วย Oneway ANOVA โปรแกรม SPSS ของแต่ละไอโซเลตที่ได้จากการทดลอง 3 ซ้ำ อักษรยกที่ต่างกันในแนวดิ่งแสดงผลการทดลองที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ( $P \leq 0.05$ )

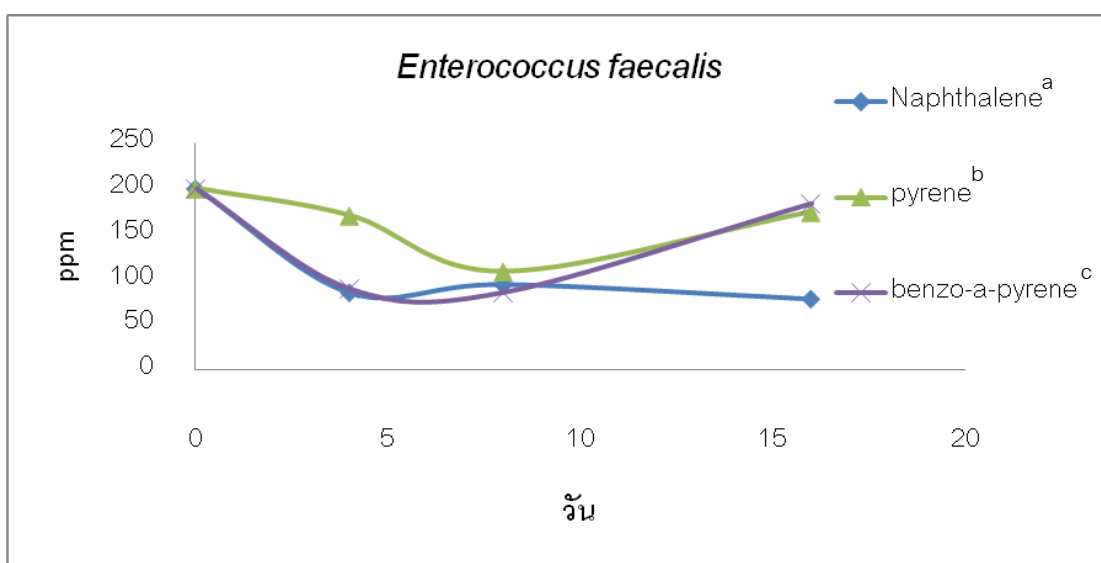
ตารางที่ ง.1 ผลการวิเคราะห์ด้วย Oneway ANOVA โปรแกรม SPSS ของไอโซเลต B3/1

*E. faecalis* ต่อการย่อยสลาย PAHs ในวันที่ 16

	PAHS	N	Subset for alpha = .05		
			1	2	3
Duncan <sup>(a)</sup>	naph	3	78.0000		
	pyrene	3		173.6667	
	benzo	3			183.3333
	Sig.		1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

<sup>a</sup> Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.



ภาพที่ ง.1 ผลการย่อยสลาย PAHs เมื่อเวลาผ่านไป 16 วัน ของไอโซเลต B3/1

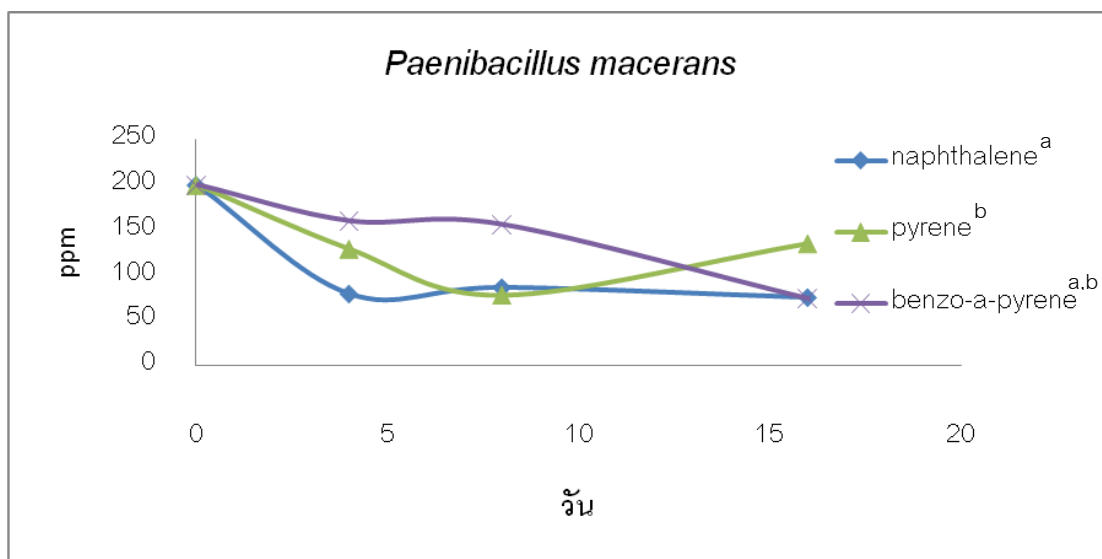
*E. faecalis* ที่ความเข้มข้นของหัวเชื้อเริ่มต้น 5%

ตารางที่ ง.2 ผลการวิเคราะห์ด้วย Oneway ANOVA โปรแกรม SPSS ของไอโซเลต B3/2 *P. macerans* ต่อการย่อยสลาย PAHs ในวันที่ 16

	PAHS	N	Subset for alpha = .05	
			1	2
Duncan <sup>(a)</sup>	naph	3	75.3333	
	benzo	3	130.0000	130.0000
	pyrene	3		135.0000
	Sig.		.054	.834

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

<sup>a</sup> Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.



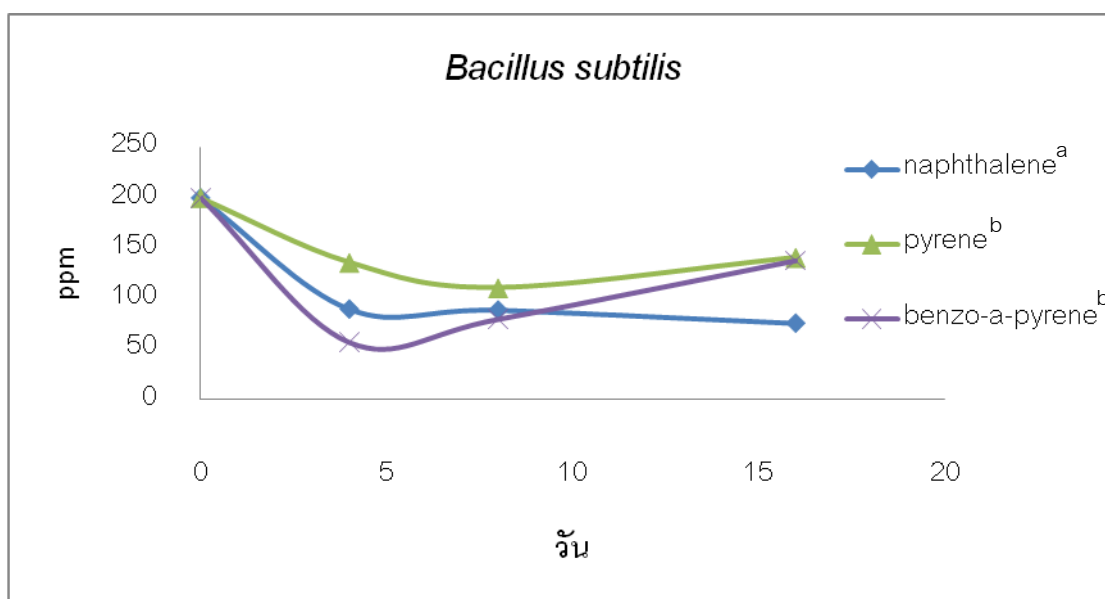
ภาพที่ ง.2 ผลการย่อยสลาย PAHs เมื่อเวลาผ่านไป 16 วัน ของไอโซเลต B3/2 *P. macerans* ที่ความเข้มข้นของหัวเชื้อเริ่มต้น 5%

ตารางที่ ง.3 ผลการวิเคราะห์ด้วย Oneway ANOVA โปรแกรม SPSS ของไอโซเลต A2/2 *B. subtilis* ต่อการย่อยสลาย PAHs ในวันที่ 16

	PAHS	N	Subset for alpha = .05	
			1	2
Duncan <sup>(a)</sup>	naph	3	75.6667	
	benzo	3		138.3333
	pyrene	3		140.6667
	Sig.		1.000	.479

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

<sup>a</sup> Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.



ภาพที่ ง.3 ผลการย่อยสลาย PAHs เมื่อเวลาผ่านไป 16 วัน ของไอโซเลต A2/2

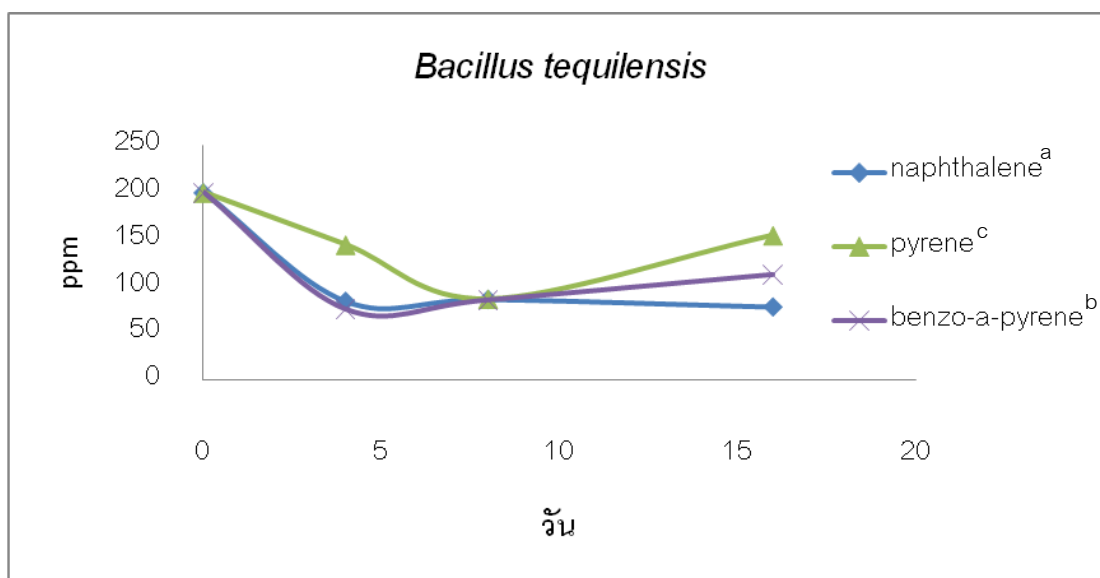
*B. subtilis* ที่ความเข้มข้นของหัวเชื้อเริ่มต้น 5%

ตารางที่ ๓.4 ผลการวิเคราะห์ด้วย Oneway ANOVA โปรแกรม SPSS ของไอโซเลต A2/3 *B. tequilensis* ต่อการย่อยสลาย PAHs ในวันที่ 16

	PAHS	N	Subset for alpha = .05		
			1	2	3
Duncan <sup>(a)</sup>	naph	3	77.6667		
	benzo	3		112.3333	
	pyrene	3			154.0000
	Sig.		1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

<sup>a</sup> Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.



ภาพที่ ๓.4 ผลการย่อยสลาย PAHs เมื่อเวลาผ่านไป 16 วัน ของไอโซเลต A2/3

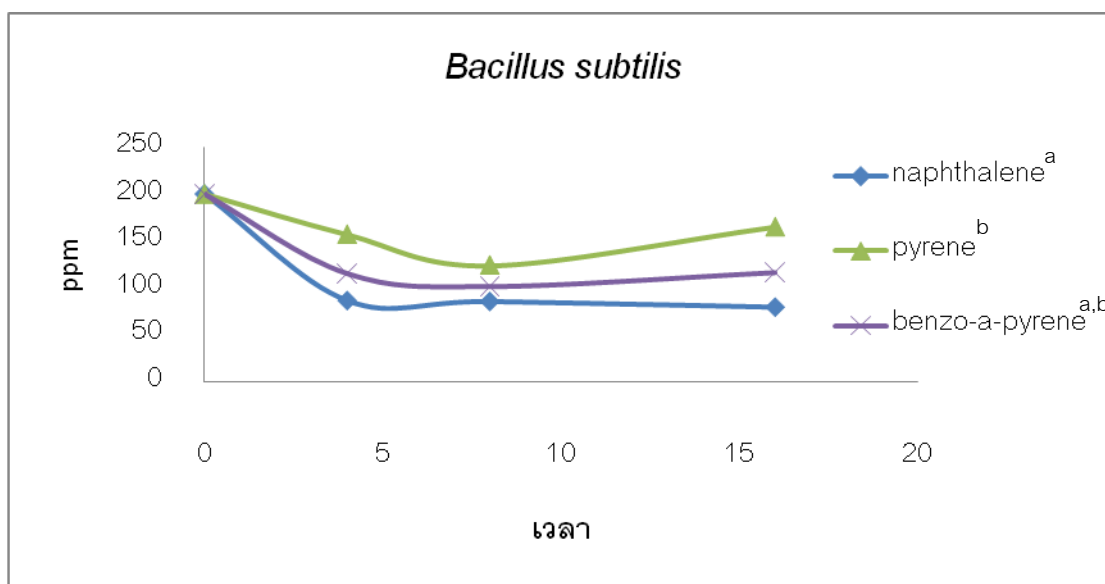
*B. tequilensis* ที่ความเข้มข้นของหัวเชื้อเริ่มต้น 5%

ตารางที่ ๓.5 ผลการวิเคราะห์ด้วย Oneway ANOVA โปรแกรม SPSS ของไอโซเลต A7/1 *B. subtilis* ต่อการย่อยสลาย PAHs ในวันที่ 16

	PAHS	N	Subset for alpha = .05	
			1	2
Duncan <sup>(a)</sup>	naph	3	80.3333	
	benzo	3	116.3333	116.3333
	pyrene	3		164.6667
	Sig.		.166	.079

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

<sup>a</sup> Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.



ภาพที่ ๓.5 ผลการย่อยสลาย PAHs เมื่อเวลาผ่านไป 16 วัน ของไอโซเลต A7/1 *B. subtilis* ที่ความเข้มข้นของหัวเชื้อเริ่มต้น 5%

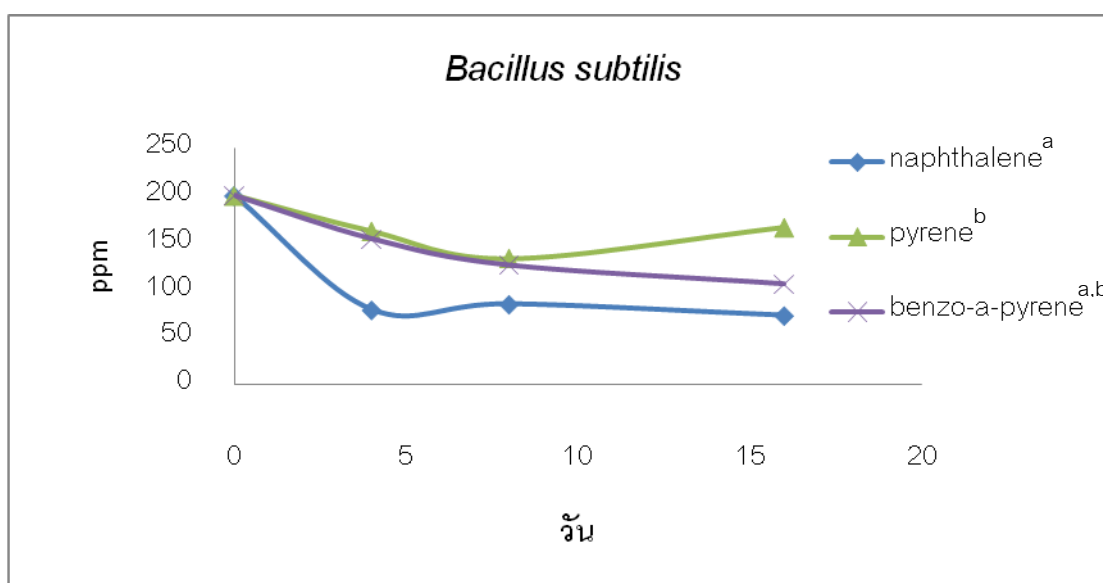
ตารางที่ ๖.6 ผลการวิเคราะห์ด้วย Oneway ANOVA โปรแกรม SPSS ของไอโซเลต A7/2 *B.*

*subtilis*

	PAHS	N	Subset for alpha = .05	
			1	2
Duncan <sup>(a)</sup>	naph	3	73.0000	
	benzo	3	106.3333	106.3333
	pyrene	3		166.0000
	Sig.		.297	.087

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

<sup>a</sup> Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.



ภาพที่ ๖.6 ผลการย่อยสลาย PAHs เมื่อเวลาผ่านไป 16 วัน ของไอโซเลต A7/2

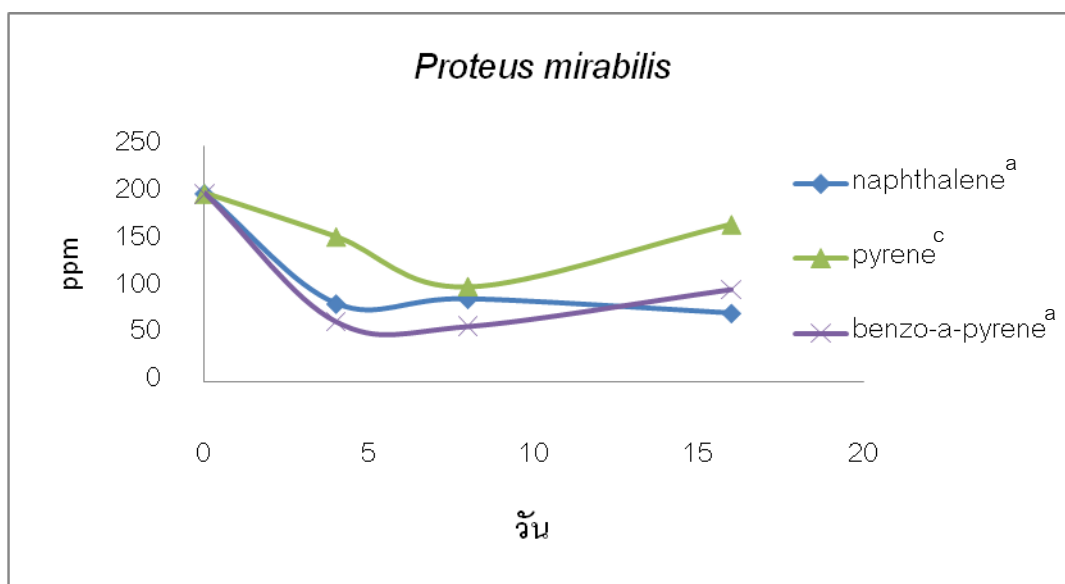
*B. subtilis* ที่ความเข้มข้นของหัวเชื้อเริ่มต้น 5%

ตารางที่ ๓.7 ผลการวิเคราะห์ด้วย Oneway ANOVA โปรแกรม SPSS ของไอโซเลต A9/1 *P. mirabilis* ต่อการย่อยสลาย PAHs ในวันที่ 16

	PAHS	N	Subset for alpha = .05	
			1	2
Duncan <sup>(a)</sup>	naph	3	73.0000	167.3333
	benzo	3	97.6667	
	pyrene	3		
	Sig.		.417	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

<sup>a</sup> Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.



ภาพที่ ๓.7 ผลการย่อยสลาย PAHs เมื่อเวลาผ่านไป 16 วัน ของไอโซเลต A9/1

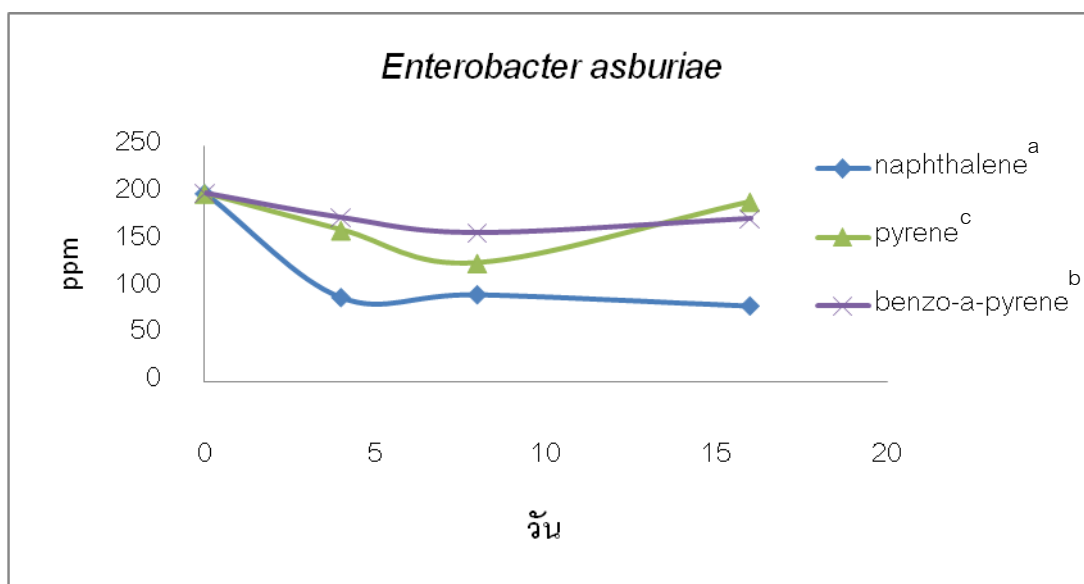
*P. mirabilis* ที่ความเข้มข้นของหัวเชื้อเริ่มต้น 5%

ตารางที่ ๓.8 ผลการวิเคราะห์ด้วย Oneway ANOVA โปรแกรม SPSS ของไอโซเลต A12/2 *E. asburiae* ต่อการย่อยสลาย PAHs ในวันที่ 16

	PAHS	N	Subset for alpha = .05		
			1	2	3
Duncan <sup>(a)</sup>	naph	3	80.0000		
	benzo	3		172.6667	
	pyrene	3			191.0000
	Sig.		1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

<sup>a</sup> Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.



ภาพที่ ๓.8 ผลการย่อยสลาย PAHs เมื่อเวลาผ่านไป 16 วัน ของไอโซเลต A12/2 *E. asburiae* ที่ความเข้มข้นของหัวเชื้อเริ่มต้น 5%



ตารางที่ ง.9 ผลการวิเคราะห์ด้วย Oneway ANOVA โปรแกรม SPSS ของ control ที่  
 ไม่มีการเติมเชื้อ ต่อการย่อยสลาย PAHs ในวันที่ 16

	PAHS	N	Subset for alpha = .05		
			1	2	3
Duncan <sup>(a)</sup>	naph	3	180.6667		
	pyrene	3		222.0000	
	benzo	3			237.0000
	Sig.		1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

<sup>a</sup> Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

## ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวจิราพร พวงแก้ว เกิดเมื่อวันที่ 28 พฤศจิกายน พ.ศ. 2530 ที่จังหวัดสมุทรสงคราม ได้รับปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ จากคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ในปีการศึกษา 2552 และได้เข้าศึกษาต่อในระดับปริญญาโท สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2553 ปัจจุบันอาศัยอยู่บ้านเลขที่ 9/8 หมู่ 4 ตำบล แม่กลอง อำเภอ เมืองฯ จังหวัดสมุทรสงคราม 75000

### ผลงานตีพิมพ์เผยแพร่

1. ชมภูนุช วิรุณานนท์ , จิราพร พวงแก้ว , และวรรุณี จุฬาลักษณ์นุกูล . ดีไนทรีไฟอิงแบคทีเรียในระบบนิเวศและบทบาทในการแก้ปัญหามลภาวะในสภาพแวดล้อม . วารสารเกษตร 2554; 27.

2. Puangkaew, J., Chulalaksananukul , S., Wattayakorn , G., and Virunanon , C. SCREENING OF ANAEROBIC BACTERIA FOR POLYCYCLIC AROMATIC HYDROCARBONS DEGRADATION FROM MARINE SEDIMENT. Proceedings in the 24<sup>th</sup> Annual Meeting and of the Thai Society for Biotechnology (TSB2012). November 29-30, 2012, Sunee Grand Hotel, Ubon Ratchatani, Thailand. (poster presentation) (Full text in CD-ROM).