ความสามารถของแบคทีเรียดินที่คัดแยกได้ในการย่อยสลายฟีแนนทรีน และพอลิไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนชนิดอื่น

นาย ณัฐพันธุ์ ศุภกา

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2542

ISBN 974-334-004-1

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

I 19065255

ABILITY OF ISOLATED SOIL BACTERIA IN DEGRADING OF PHENANTHRENE AND OTHER POLYCYCLIC AROMATIC HYDROCARBONS

Mr. Nuttapun Supaka

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Science in Industrial Microbiology

Department of Microbiology

Faculty of Science

Chulalongkorn University

Academic Year 1999

ISBN 974-334-004-1

หัวข้อวิทยานิพนธ์ ความสามารถของแบคทีเรียดินที่คัดแยกได้ในการย่อยสลายฟีแนนทรีนและพอลิไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนชนิดอื่น

โดย นาย ณัฐพันธุ์ ศุภกา

ภาควิชา จุลชีววิทยา

อาจารย์ที่ปรึกษา รองศาสตราจารย์ ดร. กาญจณา จันทองจีน

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

.....คณบดีคณะวิทยาศาสตร์

(รองศาสตราจารย์ ดร. วันชัย โพธิ์พิจิตร)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร. นลิน นิลอุบล)

.....อาจารย์ที่ปรึกษา

(รองศาสตราจารย์ ดร. กาญจณา จันทองจีน)

.....กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร. ไพเราะ ปิ่นพานิชการ)

.....กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุเทพ ธนียวัน)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ณัฐพันธุ์ ศุภกา : ความสามารถของแบคทีเรียดินที่คัดแยกได้ในการย่อยสลายฟีแนนทรีนและพอลิไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนชนิดอื่น (ABILITY OF ISOLATED SOIL BACTERIA IN DEGRATING OF PHENANTHRENE AND OTHER POLYCYCLIC AROMATIC HYDROCARBONS) อ. ที่ปรึกษา : รศ.ดร. กาญจนา จันทองจีน ; 137 หน้า. ISBN 974-334-004-1

แบคทีเรียสายพันธุ์ P2 ซึ่งคัดแยกได้จากตัวอย่างดินที่ปนเปื้อนด้วยน้ำมันเครื่องบริเวณอู่ซ่อมรถยนต์ จังหวัดปราจีนบุรี สามารถย่อยสลายฟีแนนทรีนเพื่อใช้เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงานได้ ผลการจำแนกชนิดทางอนุกรมวิธานด้วยการวิเคราะห์ลำดับเบสของจีน 16 เอสไรโบโซมัลอาร์เอ็นเอ พบว่าสายพันธุ์ P2 เป็นแบคทีเรียในสกุล *Sphingomonas* และให้ชื่อว่า *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ P2 สายพันธุ์ P2 สามารถย่อยสลายฟีแนนทรีนในอาหารเหลว MM ได้อย่างรวดเร็วจากปริมาณเริ่มต้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตรลดเหลือในปริมาณที่ไม่สามารถตรวจวัดได้ด้วยไฮเพอร์ฟอมานซ์ลิควิดโครมาโตกราฟี หลังเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 72 ชั่วโมง นอกจากนี้ *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ P2 สามารถย่อยสลายพอลิไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนชนิดอื่นได้อีกหลายชนิดคือ แนพธาลีน อะซีแนพธีลีน อะซีแนพธีน ฟลูออรีน แอนทราซีน และ ไดเบนโซฟูแรน จากการทดสอบพบว่าสายพันธุ์ P2 ยังสามารถย่อยสลายพอลิไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนที่มีมวลโมเลกุลสูง คือ ฟลูออแรนทีน และไพรีนได้เมื่อมีฟีแนนทรีนรวมอยู่ในอาหารเหลว MM ด้วย จากการตรวจสอบด้วยชินแลร์โครมาโตกราฟีพบว่ามีสารมัธยันต์เกิดขึ้นหลายชนิดระหว่างการย่อยสลายฟีแนนทรีนของ *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ P2 จากการนำสารมัธยันต์มาทำให้บริสุทธิ์ขึ้นโดยซิลิกาเจลคอลัมน์โครมาโตกราฟีและไฮเพอร์ฟอมานซ์ลิควิดโครมาโตกราฟี เมื่อเปรียบเทียบกับสารมาตราฐานที่ได้จากการวิเคราะห์แมสสเปกตรัมและสเปกตรัมของโปรตอนเอ็นเอ็มอาร์สามารถพิสูจน์เอกลักษณ์สารมัธยันต์ได้หนึ่งชนิดคือ กรด 1-ไฮดรอกซี-2-แนพโธอิก จากการนำ *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ P2 มาทดสอบความสามารถในการดำรงชีวิตและย่อยสลายฟีแนนทรีนในดิน (1 มิลลิกรัมต่อดินแห้ง 1 กรัม) พบว่าสายพันธุ์ P2 สามารถดำรงชีวิตและย่อยสลายฟีแนนทรีนได้อย่างมีประสิทธิภาพในดินปลอดเชื้อ แต่ในดินไม่ปลอดเชื้อพบว่าปัจจัยทางชีวภาพในดินทำให้การอยู่รอดและประสิทธิภาพในการย่อยสลายฟีแนนทรีนของสายพันธุ์ P2 ลดลง อย่างไรก็ตามสายพันธุ์ P2 สามารถเพิ่มอัตราการย่อยสลายฟีแนนทรีนในดินไม่ปลอดเชื้อได้ 23 % จากการทดลองพบว่าการที่ *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ P2 มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายฟีแนนทรีนลดลงในดินไม่ปลอดเชื้อ อาจมีสาเหตุมาจากการที่จุลินทรีย์ท้องถิ่นบางสายพันธุ์ในดินที่นำมาใช้ในการทดลองนี้สามารถยับยั้งการเจริญของสายพันธุ์ P2 ได้

ภาควิชา จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ลายมือชื่อนิสิต.....

สาขาวิชา จุลชีววิทยา ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....

ปีการศึกษา 2543 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

4072254023 : **MAJOR** INDUSTRIAL MICROBIOLOGY

KEY WORD: *Sphingomonas* sp. / PHENANTHRENE / POLYCYCLIC AROMATIC HYDROCARBONS

NUTTAPUN SUPAKA: ABILITY OF ISOLATED SOIL BACTERIA IN DEGRADING OF PHENANTHRENE AND OTHER POLYCYCLIC AROMATIC HYDROCARBONS. THESIS ADVISOR: ASSOC. PROF. KANCHANA JUNTONGJIN, Ph. D. 137 pp. ISBN 974-334-004-1

A bacterial strain P2, able to utilize phenanthrene as a sole source of carbon and energy, was isolated from lubricant-contaminated soil sample collected from a garage in Prajinburi province, Thailand. From 16 S rRNA gene sequence analysis, the strain P2 belonged to the genus *Sphingomonas* and was designated as *Sphingomonas* sp. strain P2. This strain rapidly degraded phenanthrene in liquid medium from 100 $mg.l^{-1}$ to undetectable amount by HPLC analysis within 72 h. In addition to phenanthrene, *Sphingomonas* sp. strain P2 was able to degrade a wide variety of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), including naphthalene, acenaphthylene, acenaphthene, fluorene, anthracene, and dibenzofuran. It was also able to co-metabolize high molecular weight PAHs, fluoranthene and pyrene, in liquid minimal medium supplemented with phenanthrene. During the growth in the presence of phenanthrene, several degradative metabolites were detected by thin-layer chromatography and were further purified by using silica gel-column chromatography and high-performance liquid chromatography. Comparison of mass spectral and proton nuclear magnetic resonance spectral analyses of the metabolites with authentic compounds, one of the metabolites was identified as 1-hydroxy-2-naphthoic acid. Survival of this strain and its ability to degrade phenanthrene (1 mg/g) in both sterile and non-sterile soils were tested. The bacterium was found to survive efficiently in sterile soil with high phenanthrene degradative ability (100 % degradation) while its growth was affected by some biotic factors in non-sterile soil. However, this strain could reduce the concentration of phenanthrene in non-sterile soil by 23 %. Some indigenous organisms with antagonistic activity against *Sphingomonas* sp. strain P2 isolated from the non-sterile soil possibly be the cause of reducing its ability.

ภาควิชา จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม	ลายมือชื่อนิสิต.....ณัฐพันธุ์.....ศุภกา:.....
สาขาวิชา จุลชีววิทยา	ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา...[illegible].....
ปีการศึกษา 2543	ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จไปได้ด้วยดีด้วยความช่วยเหลืออย่างดียิ่งของรองศาสตราจารย์ ดร. กาญจณา ฉันทองจีน อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ที่ได้กรุณาให้ความรู้ คำแนะนำ และข้อคิดเห็นต่างๆ ตลอดจนกำลังใจที่ผู้วิจัยได้รับมาตลอดเวลาขณะศึกษาอยู่ที่นี่ ซึ่งผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้

ขอกราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร. นลิน นิลอุบล ที่กรุณารับเป็นประธานกรรมการในการสอบ และความช่วยเหลือต่างๆที่ผู้วิจัยได้รับมาตลอดระยะเวลาการศึกษา

ขอกราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร. ไพเราะ ปิ่นพานิชการ และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุเทพ ธนียวัน ที่กรุณารับเป็นคณะกรรมการในการสอบ และให้คำแนะนำต่างๆ ตลอดจนช่วยแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณสำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ (สวทช) ที่ให้ทุนบัณฑิตศึกษาภายประเทศระหว่างปีการศึกษา พ.ศ. 2540-2542

ขอขอบพระคุณสมาคมการศึกษานานาชาติแห่งประเทศญี่ปุ่น (AIEJ) และสมาคมศิษย์เก่าจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้ทุนไปทำการวิจัยส่วนหนึ่งของวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ณ ประเทศญี่ปุ่น เป็นเวลา 6 เดือน

กราบขอบพระคุณอาจารย์ทุกท่านในภาควิชาจุลชีววิทยา และขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ในภาควิชาจุลชีววิทยาทุกท่าน ตลอดจนพี่ๆ เพื่อนๆ และน้องๆ ทุกคนที่มีส่วนช่วยเหลือและให้กำลังใจตลอดมา

ขอขอบคุณ Prof. Toshio Omori และทุกคนใน Biotechnology Research Center. The University of Tokyo. ที่มีส่วนช่วยเหลือระหว่างที่ผู้วิจัยทำการวิจัย ณ ประเทศญี่ปุ่น

สุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดา และญาติพี่น้องทุกคนที่ให้การสนับสนุน และความช่วยเหลือ ตลอดจนให้กำลังใจแก่ผู้วิจัยในการทำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ตลอดมา

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ

เรื่อง หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย .....ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ .....จ
กิตติกรรมประกาศ .....ฉ
สารบัญ .....ช
สารบัญตาราง .....ซ
สารบัญรูป .....ฌ
สัญลักษณ์และคำย่อ.....ฐ
บทที่
1. บทนำ 1
2. วารสารปริทัศน์ 3
3. อุปกรณ์ และวิธีดำเนินงานวิจัย 30
4. ผลการทดลอง.....48
5. สรุปและอภิปรายผลการทดลอง.....106
6. ข้อเสนอแนะในการวิจัย.....113
รายการอ้างอิง 115
ภาคผนวก
ภาคผนวก ก.....124
ภาคผนวก ข.....126
ภาคผนวก ค.....128
ประวัติผู้เขียน 137

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

2.1. ชนิดของแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายฟีแนนทรีนได้ 16
2.2. ชนิดของราและยีสต์ที่สามารถย่อยสลายฟีแนนทรีนได้ 17
2.3. ชนิดของสาหร่ายและไซยาโนแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายฟีแนนทรีนได้.....18
2.4. ปัจจัยทางชีวภาพที่มีผลต่อการดำรงชีวิตของแบคทีเรียในดิน.....25
2.5. ปัจจัยทางกายภาพที่มีผลต่อการดำรงชีวิตของแบคทีเรียในดิน.....26
2.6. สภาวะของสิ่งแวดล้อมที่เหมาะสมต่อการย่อยสลายฟีแนนทรีนและ PAHs ชนิดอื่นที่ปนเปื้อนในดิน..... 28
3.1. สถานที่เก็บตัวอย่างดินเพื่อนำมาคัดแยกแบคทีเรียย่อยสลายฟีแนนทรีนได้.....35
4.1. การเจริญของเชื้อในแต่ละตัวอย่างดินหลังการเพิ่มจำนวนแบคทีเรียย่อยสลายฟีแนนทรีนได้ในอาหารเหลวโดยการถ่ายเชื้อ 5 ครั้งติดต่อกัน.....48
4.2. ระยะเวลาที่พบการเจริญของแบคทีเรียในแต่ละตัวอย่างดินระหว่างการถ่ายเชื้อ.....49
4.3. ลักษณะโคโลนีของแบคทีเรีย 4 สายพันธุ์ที่คัดแยกได้จากตัวอย่างดินที่ 8 บนอาหารแข็ง MM ที่พ่นทับผิวหน้าด้วยฟีแนนทรีน.....51
4.4. ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียสายพันธุ์ P2.....53
4.5. ลักษณะทางสรีระวิทยาของแบคทีเรียสายพันธุ์ P2.....54
4.6. ผลการเปลี่ยนสีอาหารเหลวที่มีสารทดสอบแต่ละชนิดหลังการเลี้ยงเชื้อ *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ P2 เป็นเวลา 7 วัน.....65
4.7. ผลการเจริญและอัตราการย่อยสลายสารทดสอบแต่ละชนิดของ *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ P2 75
4.8. ตัวทำละลายที่ใช้ในการชะสารมัธยันต์ออกจากซิลิกาเจลคอลัมน์.....89
4.9. รายละเอียดของสารมัธยันต์ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี HPLC 91
4.10. ค่าพารามิเตอร์ที่ได้จากสเปกตรัมของ ^{1}H NMR ขนาดความถี่ 500 เมกกะเฮิร์ตของ product 4 เปรียบเทียบกับสารมาตรฐานกรด 1-ไฮดรอกซี-2-แนพโธอิก.....94
4.11.ลักษณะทางกายภาพและองค์ประกอบทางเคมีของดินที่นำมาใช้ในการทดลองการย่อยสลายฟีแนนทรีนโดย *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ P2 ในดิน.....98
5.1. แบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายฟีแนนทรีนไปเป็นกรด 1-ไฮดรอกซี-2-แนพโธอิก.....110

สารบัญรูป

รูปที่ หน้า

2.1. โครงสร้างโมเลกุลของฟีแนนทรีน.....3
2.2. โครงสร้างโมเลกุลของ PAHs ทั้ง 16 ชนิดตามรายงานของ U.S. EPA 8
2.3. บริเวณเบย์และบริเวณเคที่พบในโครงสร้างโมเลกุลของฟีแนนทรีนและ PAHs ที่มีสมบัติเป็นสารก่อมะเร็ง.....9
2.4. กระบวนการเมตาบอลิสมของเบนโซ[เอ]ไพรีนภายในเซลล์สิ่งมีชีวิต.....10
2.5. วิธีเมตาบอลิสมที่แบคทีเรียใช้ในการย่อยสลายฟีแนนทรีน.....20
2.6. วิธีเมตาบอลิสมที่เชื้อราและยีสต์ใช้ในการย่อยสลายฟีแนนทรีน.....22
2.7. กระบวนการย่อยสลายฟีแนนทรีนโดย *Phanerochaete chrysosporium*.....23
4.1. ลักษณะบริเวณใสรอบโคโลนีของแบคทีเรียที่พบในตัวอย่างดินที่ 8 ที่เลี้ยงบนอาหารแข็ง MM ที่พ่นทับผิวหน้าด้วยฟีแนนทรีนเป็นเวลา 4 วัน.....48
4.2. โครมาโตแกรมของ TLC แสดงผลการเปรียบเทียบปริมาณฟีแนนทรีนและสารมัธยันต์ชนิดต่างๆที่เกิดจากการย่อยสลายฟีแนนทรีนโดยแบคทีเรียสายพันธุ์ P1.1 P1.2 P2 และ P3.....51
4.3. ลักษณะโคโลนีของแบคทีเรียสายพันธุ์ P2 บนอาหารแข็ง LB 52
4.4. ลักษณะรูปร่างของแบคทีเรียสายพันธุ์ P2 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (กำลังขยาย 100x10)...53
4.5.ขนาดของชิ้นจีโนของ 16 เอสไรโบโซมัลดีเอ็นเอของแบคทีเรียสายพันธุ์ P2..... .55
4.6. ลำดับเบสของ 16 เอสไรโบโซมัลของแบคทีเรียสายพันธุ์ P2 เปรียบเทียบกับลำดับเบส 16 เอสไรโบโซมัลของ *Sphingomonas yanoikuyae*.....56
4.7. ลักษณะของอาหารเหลว MM ที่มีฟีแนนทรีนหลังเลี้ยงเชื้อ *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ P2 เป็นเวลา 24 ชั่วโมงเปรียบเทียบกับชุดควบคุม.....58
4.8. ลักษณะกลุ่มเซลล์ของ *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ P2 ที่ติดแน่นอยู่กับผลึกฟีแนนทรีนภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (กำลังขยาย 40x10).....59
4.9. การเจริญของ *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ P2 ในอาหารเหลว MM ที่มีฟีแนนทรีนเป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงาน.....60

4.10. HPLC โครมาโตแกรมจากการวิเคราะห์ปริมาณฟีแนนทรีนและสารมัธยันต์ที่เกิดจากการย่อยสลายฟีแนนทรีนโดย *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ P2 หลังการเลี้ยงเชื้อที่เวลาต่าง ๆ.....62
4.11. ลักษณะของอาหารเหลว MM ที่มีแนพธาลีน อะซีแนพธิลีน และฟลูออลีน หลังการเลี้ยง *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ P2 เป็นเวลา 7 วัน เปรียบเทียบกับชุดควบคุม.....63
4.12. ลักษณะของอาหารเหลว MM ที่มีอะซีแนพธีน แอนทราซีน และฟีแนนทรีนหลังการเลี้ยง *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ P2 เป็นเวลา 7 วัน เปรียบเทียบกับชุดควบคุม.....64
4.13. ลักษณะของอาหารเหลว MM ที่มีไดเบนโซฟูแรน ฟลูออแรนธีน และไพรีนหลังการเลี้ยง *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ P2 เป็นเวลา 7 วัน เปรียบเทียบกับชุดควบคุม.....64
4.14. การเจริญของ *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ P2 โดยการใช้แนพธาลีนเป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงาน.....66
4.15. การเจริญของ *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ P2 โดยการใช้อะซีแนพธิลีนเป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงาน.....67
4.16. การเจริญของ *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ P2 โดยการใช้อะซีแนพธีนเป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงาน.....68
4.17. การเจริญของ *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ P2 โดยการใช้ฟลูออรีนเป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงาน.....69
4.18. การเจริญของ *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ P2 โดยการใช้ไดเบนโซฟูแรนเป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงาน.....70
4.19.การเจริญของ *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ P2 โดยการใช้แอนทราซีนเป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงาน.....71
4.20. การเจริญของ *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ P2 โดยการใช้ฟีแนนทรีนเป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงาน.....72
4.21. การเจริญของ *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ P2 โดยการใช้ฟลูออแรนธีนเป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงาน.....73
4.22. การเจริญของ *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ P2 โดยการใช้ไพรีนเป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงาน.....74
4.23. ลักษณะของอาหารเหลว MM ที่มีสารทดสอบแต่ละชนิดหลังการเลี้ยง *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ P2 เป็นเวลา 14 วัน 76

4.24. การเจริญของ *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ P2 โดยการใช้สารมัธยันต์ชนิดต่างๆที่เกิดจากการย่อยสลายฟีแนนทรีนโดยแบคทีเรียสกุล Pseudomonads.....77
4.25. ลักษณะของอาหารเหลว MM ที่มีฟีแนนทรีนและฟลูออแรนธีนเป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงานเพียงชนิดเดียวเปรียบเทียบกับอาหารเหลวที่มีฟีแนนทรีนและฟลูออแรนธีนเป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงานร่วมกัน หลังการเลี้ยง *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ P2 เป็นเวลา 7 วัน.....79
4.26. การเจริญของ *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ P2 โดยการใช้ฟีแนนทรีนและฟลูออแรนธีนเป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงานร่วมกัน.....80
4.27. HPLCโครมาโตแกรมที่ได้จากชุดควบคุมและชุดทดลองการย่อยสลายฟีแนนทรีนและฟลูออแรนธีนหลังการเลี้ยง *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ P2 เป็นเวลา 7 วัน.....82
4.28. ลักษณะของอาหารเหลว MM ที่มีฟีแนนทรีนและไพรีนเป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงานเพียงชนิดเดียวเปรียบเทียบกับอาหารเหลวที่มีฟีแนนทรีนและไพรีนเป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงานร่วมกัน หลังการเลี้ยง*Sphingomonas* sp.สายพันธุ์ P2 เป็นเวลา 7 วัน 83
4.29. การเจริญของ *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ P2 โดยการใช้ฟีแนนทรีนและไพรีนเป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงานร่วมกัน.....84
4.30. HPLCโครมาโตแกรมที่ได้จากการวิเคราะห์ชุดควบคุมและชุดทดลองการย่อยสลายฟีแนนทรีนและไพรีนหลังการเลี้ยง *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ P2เป็นเวลา 7 วัน.....86
4.31. TLC โครมาโตแกรมของการวิเคราะห์สารมัธยันต์ที่เกิดจากการย่อยสลายฟีแนนทรีนของ *Sphingomonas* sp. P2.....87
4.32. HPLC โครมาโตแกรมแสดงการเปรียบเทียบชนิดและปริมาณสารมัธยันต์ที่เกิดจากการย่อยสลายฟีแนนทรีนที่สะสมอยู่ในส่วนที่เป็นกลางและส่วนที่เป็นกรด.....88
4.33. โครมาโตแกรมจากการวิเคราะห์ TLC แสดงชนิดและจำนวนสารมัธยันต์ที่สะสมอยู่ในแต่ละลำดับส่วนของตัวชะล้างที่ผ่านออกมาจากซิลิกาเจลคอลัมน์..... 90
4.34. HPLCโครมาโตแกรมของลำดับส่วนที่ถูกชะออกจากซิลิกาเจลคอลัมน์.....92
4.35. TLCโครมาโตแกรมจากการวิเคราะห์ชนิดและปริมาณสารมัธยันต์ที่พบอยู่ในลำดับส่วน A ที่ใช้ 20% และ 30% เอทธิลอะซีเตตเป็นตัวชะล้าง หลังทำให้บริสุทธิ์ด้วย HPLC.....93

4.36. ^{1}H NMR สเปกตรัมของสารมัธยันต์ที่พบในกลุ่ม product 4 ที่เกิดจากการย่อยสลายฟีแนนทรีนโดย *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ P2 (ก) เปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน 1-ไฮดรอกซี-2-แฟโธอิคแอซิด (ข).....95
4.37. แมสสเปกตรัมของ product 4 ที่เกิดจากการย่อยสลายฟีแนนทรีนโดย *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ P2.....97
4.38. รูปแบบในการย่อยสลายฟีแนนทรีนของ *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ P2 ในชุดดินปลอดเชื้อ.....100
4.39. รูปแบบในการย่อยสลายฟีแนนทรีนของ *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ P2 ในชุดดินไม่ปลอดเชื้อ.....102
4.40. ลักษณะโคโลนีของแบคทีเรียท้องถิ่นบางชนิดที่สร้างบริเวณใสล้อมโคโลนีบนอาหารแข็ง MM.....103
4.41. จำนวนแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายฟีแนนทรีนได้ในชุดการทดลองต่างๆ ระหว่างการทดลองการย่อยสลายฟีแนนทรีนในดิน.....104
4.42. ลักษณะโคโลนีของแบคทีเรียที่สร้างบริเวณใสบนอาหารแข็ง LB ที่มีเกลี่ยผิวหน้าด้วย *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ P2.....105
ค.1. กราฟมาตรฐานระหว่างปริมาณฟีแนนทรีนกับพื้นที่ใต้กราฟที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC.....128
ค.2. กราฟมาตรฐานระหว่างปริมาณฟลูออแรนธีนกับพื้นที่ใต้กราฟที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC.....129
ค.3. กราฟมาตรฐานระหว่างปริมาณไพรีนกับพื้นที่ใต้กราฟที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC.....130
ค.4. ไดอะแกรมสามเหลี่ยมมาตรฐาน.....135
ค.5. ชุดคัดกรองขนาดดิน.....136

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สัญลักษณ์และคำย่อ

มก. = มิลลิกรัม

มล. = มิลลิลิตร

มม. = มิลลิเมตร

°ซ = องศาเซลเซียส

% = เปอร์เซ็นต์

กก. = กิโลกรัม

LD_{50} = lethal dose fifty %

TDL_0 = ขนาดต่ำสุดที่เกิดพิษ (toxic dose low)

TD = ขนาดที่เกิดพิษ (toxic dose)

m/z = มวลต่อประจุ

ppm = หนึ่งส่วนในล้านส่วน (part per million)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย