การย่อยสลายฟีแนนทรีนในระบบนิเวศจำลองดินที่มีภาวะเป็นกรด

นางสาวสุชุมาล ปานศรี

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2549

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4772519023

PHENANTHRENE DEGRADATION IN SOIL MICROCOSMS UNDER ACIDIC CONDITION

Miss Sukhumal Pansri

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Science Program in Industrial Microbiology

Department of Microbiology

Faculty of Science

Chulalongkorn University

Academic Year 2006

Copyright of Chulalongkorn University

402273

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การย่อยสลายฟีแนนทรีนในระบบนิเวศจำลองดินที่มีภาวะเป็นกรด
โดย	นางสาวสุขุมาล ปานศรี
สาขาวิชา	จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อรฤทัย ภิญญาคง
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	อาจารย์ ดร.เอกวัล ลือพร้อมชัย

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

.....คณบดีคณะวิทยาศาสตร์

(ศาสตราจารย์ ดร.เปี่ยมศักดิ์ เมนะเศวต)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร.ไพเราะ ปิ่นพานิชการ)

.....อาจารย์ที่ปรึกษา

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อรฤทัย ภิญญาคง)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

(อาจารย์ ดร.เอกวัล ลือพร้อมชัย)

.....กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.กอบชัย ภัทรกุลวณิชย์)

.....กรรมการ

(อาจารย์ ดร.ปาหนัน เริงสำราญ)

สุขุมาล ปานศรี : การย่อยสลายฟีแนนทรีนในระบบนิเวศจำลองดินที่มีภาวะเป็นกรด (PHENANTHRENE DEGRADATION IN SOIL MICROCOSMS UNDER ACIDIC CONDITION) อ.ที่ปรึกษา : ผศ.ดร.อรฤทัย ภิญญาคง, อ. ที่ปรึกษาร่วม : อ.ดร.เอกวัล ลือพร้อมชัย;152 หน้า.

ศึกษาการย่อยสลายฟีแนนทรีนในระบบนิเวศจำลองดินที่มีภาวะเป็นกรด โดยใช้ตัวอย่างดินซึ่งแบ่งได้เป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ 1 ได้แก่ ดิน NY1 NY2 NY3 และ NY4 (pH 4.3-5.0) และกลุ่มที่ 2 ได้แก่ ดิน PJ RB1 และ RB2 (pH 5.4-6.4) โดยได้ปรับ pH ของดินให้มีค่าประมาณ 4.0 ก่อนทำการทดลอง จากการวิเคราะห์สมบัติของดินพบว่าดินกลุ่มที่ 2 มีปริมาณสารอาหารมากกว่าดินกลุ่มที่ 1 และลักษณะเนื้อดินมีส่วนประกอบของดินเหนียวน้อย ส่วนในดินกลุ่มที่ 1 พบว่าดิน NY1 และ NY2 มีปริมาณสารอาหารต่ำ ลักษณะเนื้อดินของ NY3 และ NY4 มีส่วนผสมของดินเหนียวมากกว่าดินชนิดอื่น ดินทั้ง 2 กลุ่มมีจำนวนจุลินทรีย์ที่เจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB ทั้งที่มี pH 7.0 และ 4.0 ใกล้เคียงกัน คือ 4.60×10^5 - 5.40×10^6 และ 3.30×10^2 - 3.50×10^3 เซลล์/กรัมดิน ตามลำดับ ยกเว้นดิน NY1 ที่มีปริมาณจุลินทรีย์ที่เจริญใน LB pH 4.0 เพียง 7.80 X 10 เซลล์/กรัมดิน การสร้างระบบนิเวศจำลองดินที่ปนเปื้อนด้วยฟีแนนทรีน 300 ส่วนในล้านส่วน ได้แบ่งเป็นระบบนิเวศจำลองที่เติมและไม่เติมสารอาหารอื่น ทำการวิเคราะห์ปริมาณฟีแนนทรีนที่เหลือและการเปลี่ยนแปลงประชาคมจุลินทรีย์ ทุกๆ 2 สัปดาห์ เป็นเวลา 12 สัปดาห์ รวมทั้งตรวจนับจำนวนจุลินทรีย์ และตรวจหาส่วนของยีนไดออกซิจีเนส พบว่าในระบบนิเวศจำลองที่ใช้ดินกลุ่มที่ 1 ไม่พบการย่อยสลายฟีแนนทรีนทั้งในชุดที่เติมและไม่เติมสารอาหารอื่น แต่ในระบบนิเวศจำลองที่ใช้ดินกลุ่มที่ 2 พบการย่อยสลายฟีแนนทรีนทุกชุดทดลอง โดยฟีแนนทรีนเริ่มลดลงในสัปดาห์ที่ 6 เหลือ 62.49 - 85.87% และเมื่อสิ้นสุดการทดลองพบฟีแนนทรีนเหลืออยู่เพียง 7.74 - 53.31% และในการทดลองที่เติมสารสกัดจากยีสต์ พบส่วนของยีนไดออกซิจีเนสตลอดการทดลอง จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rDNA หรือ ITS ของประชากรเด่นในระบบนิเวศจำลอง คาดว่าจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายฟีแนนทรีนในชุดทดลองที่มีการเติมสารสกัดจากยีสต์ ประกอบด้วย *Sphingomonas Bacillus Halomonas Staphylococcus Mycobacterium* และ *Penicillium* จากผลการทดลองอาจกล่าวได้ว่าปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายฟีแนนทรีนในภาวะเป็นกรด ได้แก่ ลักษณะเนื้อดิน ปริมาณสารอาหาร และจำนวนและชนิดของจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายในดิน ซึ่งข้อมูลที่ได้สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการบำบัดดินที่ปนเปื้อนด้วยฟีแนนทรีนในภาวะเป็นกรดต่อไป

ภาควิชา จุลชีววิทยา ลายมือชื่อนิสิต.....สุขุมาล ปานศรี.....

สาขาวิชา จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....อรฤทัย ภิญญาคง.....

ปีการศึกษา 2549 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....เอกวัล.....

4772519023 : MAJOR MICROBIOLOGY

KEY WORD : Phenanthrene/ Degradation/ Acidic condition/ Bacterial communities

SUKHUMAL PANSRI : PHENANTHRENE DEGRADATION IN SOIL MICROCOSMS UNDER ACIDIC CONDITION THESIS ADVISOR : ASST. PROF. ONRUTHAI PINYAKONG, Ph. D., THESIS COADVISOR : EKAWAN LUEPROMCHAI, Ph.D.,152 pp.

Degradation of phenanthrene in soil microcosms under acidic condition was studied by using 2 groups of soil samples. Group 1 consisted of NY1, NY2, NY3, and NY4 (pH 4.3-5.0) and group 2 consisted of PJ, RB1, and RB2 (pH 5.4-6.4). Soil samples were adjusted pH to around 4.0 before the experiment. From soil analysis results, group 2 soil had higher amount of nutrients than group 1 soil and the soil texture contained small amount of clay. For group 1 soil, NY1 and NY2 had lower nutrients than other soil samples. The soil texture of NY3 and NY4 contained more clay fraction than others. Both soil groups contained similar number of microorganisms that capable of growing in LB pH 7.0 and 4.0, which were 4.60 X 10^5 - 5.40 X 10^6 and 3.30 X 10^2 - 3.50 X 10^3 cells/g soil, respectively. However, NY1 soil had the lowest number of microorganisms growing in LB pH 4.0, which was 7.80 X 10 cells/g soil. Microcosms of soil contaminated with 300 ppm phenanthrene were prepared and divided into the treatments with and without added nutrients. The remaining phenanthrene and change of microbial community structure were monitored every 2 wks for 12 wks. Microbial numbers and present of dioxygenase gene fragments were also measured. The results showed no phenanthrene degradation in group 1 soil microcosms both with and without added nutrients. However, microcosms of soil group 2 showed the degradation of phenanthrene in every treatment. The amounts of phenanthrene started to decrease after week 6^{th}, which there was 62.49 - 85.87% of remaining phenanthrene. At the end of experiment, the remaining phenanthrene was between 7.74 - 53.31%. In addition, the dioxygenase gene fragments were detected in the microcosms supplemented with yeast extract throughout the experiment. The nucleotide sequences analysis of 16S rDNA or ITS of dominant populations in the yeast extract added microcosms revealed that the microorganisms involved in phenanthrene degradation might be microorganism in the genus *Sphingomonas*, *Bacillus*, *Halomonas*, *Staphylococcus*, *Mycobacterium* and *Penicillium*. From these results, it can be concluded that soil texture, amount of nutrients, and number and types of effective degrading-microorganisms in soil are factors that involved in phenanthrene degradation under acidic condition. This information can be applied for further remediation of phenanthrene contaminated soil under acidic condition.

Department	Microbiology	Student's signature Sukhumal Pansri
Field of study	Industrial Microbiology	Advisor's signature Onruthai Pinyakong
Academic year	2006	Coadvisor's signature Ekawan L.

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้เสร็จสิ้นอย่างสมบูรณ์ โดยความช่วยเหลืออย่างดียิ่งของผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อรฤทัย ภิญญาคง อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ และอาจารย์ ดร.เอกวัล ลือพร้อมชัย อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วมที่ได้กรุณาถ่ายทอดความรู้ ให้คำปรึกษา คำแนะนำ ตลอดจนข้อคิดเห็นต่างๆ ที่เป็นประโยชน์ต่องานวิจัยนี้ รวมทั้งช่วยตรวจทานแก้ไขต้นฉบับวิทยานิพนธ์ให้ถูกต้องครบถ้วนสมบูรณ์ ทางผู้วิจัยจึงกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ โอกาสนี้

ขอกราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร.ไพเราะ ปิ่นพานิชการ ที่ให้เกียรติรับเป็นประธานกรรมการในการสอบป้องกันวิทยานิพนธ์ ตลอดจนให้ความรู้ คำแนะนำต่างๆ แก่ผู้วิจัยตลอดระยะเวลาการศึกษา

ขอกราบขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.กอบชัย ภัทรกุลวณิชย์ และอาจารย์ ดร.ปาหนัน เริงสำราญ ที่กรุณารับเป็นกรรมการสอบป้องกันวิทยานิพนธ์และให้ความรู้ คำแนะนำต่างๆ ตลอดจนช่วยตรวจทานแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

กราบขอบพระคุณคณาจารย์ทุกท่านในภาควิชาจุลชีววิทยาที่กรุณาให้ความรู้ ความช่วยเหลือและคำชี้แนะต่างๆ แก่ผู้วิจัย

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ในภาควิชาจุลชีววิทยาทุกท่าน ตลอดจนพี่ๆ เพื่อนๆ และน้องๆ ทุกคนที่มีส่วนช่วยเหลือและเป็นกำลังใจตลอดมา

ขอขอบคุณทุนอุดหนุนวิทยานิพนธ์ ประจำภาคต้น ปีการศึกษา 2549 บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สุดท้ายขอกราบขอบพระคุณบิดามารดา ที่ให้โอกาส ให้การสนับสนุนและช่วยเหลือในทุกด้าน ตลอดจนเป็นกำลังใจที่สำคัญยิ่งแก่ผู้วิจัยเสมอมา

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.....ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....จ
กิตติกรรมประกาศ.....ฉ
สารบัญ.....ช
สารบัญตาราง.....ฐ
สารบัญรูป.....ณ
คำย่อและสัญลักษณ์.....น

บทที่

1. บทนำ.....1
    วัตถุประสงค์ของงานวิจัย.....4
    ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....4
2. ปริทัศน์วรรณกรรม.....5
    พอลิไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน.....5
    แหล่งกำเนิดและวิธีการเข้าสู่สิ่งแวดล้อม.....7
    ฟีแนนทรีน (Phenanthrene).....9
    ประโยชน์ของฟีแนนทรีน.....10
    ความเป็นพิษของฟีแนนทรีน.....10
    การปนเปื้อน PAHs ในประเทศไทย.....11
    การเปลี่ยนแปลงของ PAHs ในสิ่งแวดล้อม.....12
    การบำบัด PAHs โดยวิธีทางชีวภาพ.....12
    ปัจจัยที่ส่งผลกระทบต่อการบำบัด PAHs โดยวิธีทางชีวภาพ.....13
    ดินเปรี้ยวในประเทศไทย.....19
    วิถีการย่อยสลาย PAHs โดยกระบวนการทางชีวภาพ.....20
        กระบวนการย่อยสลาย PAHs โดยแบคทีเรีย.....21
        กระบวนการย่อยสลาย PAHs โดยรา.....21

หน้า

กระบวนการย่อยสลาย PAHs โดยราไวท์รอท.....21
วิถีการย่อยสลายฟีแนนทรีนโดยกระบวนการทางชีวภาพ.....22
กระบวนการย่อยสลายฟีแนนทรีนโดยแบคทีเรีย.....22
กระบวนการย่อยสลายฟีแนนทรีนโดยรา.....23
กระบวนการย่อยสลายฟีแนนทรีนโดยราไวท์รอท.....23
การติดตามการเปลี่ยนแปลงประชาคมจุลินทรีย์.....27
ไดออกซิจีเนส.....29
3. อุปกรณ์ เคมีภัณฑ์ วิธีดำเนินงานวิจัย.....32
อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง.....32
เคมีภัณฑ์.....34
วิธีดำเนินงานวิจัย.....36
3.1 เก็บตัวอย่างดิน วิเคราะห์สมบัติทางฟิสิกส์และเคมีของดินและการปนเปื้อนของฟีแนนทรีน.....36
3.1.1 เก็บตัวอย่างดิน.....36
3.1.2 วิเคราะห์สมบัติทางฟิสิกส์และเคมีของดินและการปนเปื้อนของฟีแนนทรีน.....37
3.1.2.1 วิเคราะห์สมบัติทางฟิสิกส์และเคมีของดิน.....37
3.1.2.2 วิเคราะห์การปนเปื้อนของฟีแนนทรีน.....38
3.2 ตรวจนับจำนวนจุลินทรีย์โดยวิธี Most Probable Number (MPN).....38
3.2.1 ตรวจนับจำนวนจุลินทรีย์ที่เจริญได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB.....38
3.2.2 ตรวจนับจำนวนจุลินทรีย์ที่เจริญได้โดยใช้ฟีแนนทรีนเป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงาน.....38
3.3 สร้างระบบนิเวศจำลองดินที่มีภาวะเป็นกรดที่ทำให้ปนเปื้อนด้วยฟีแนนทรีน.....39
3.3.1 สร้างระบบนิเวศจำลองดินชุด NY (NY1-NY4).....39
3.3.2 สร้างระบบนิเวศจำลองดินชุด PJ และ RB (RB1 และ RB2).....40
3.4 วิเคราะห์ปริมาณฟีแนนทรีนที่เหลืออยู่ในระบบนิเวศจำลอง.....43

หน้า

3.5 ติดตามการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างประชาคมจุลินทรีย์โดยวิธี Denaturing Gradient Gel Electrophresis (DGGE).....43
3.5.1 สกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างดิน.....43
3.5.2 ตรวจความสมบูรณ์ของดีเอ็นเอที่สกัดได้และกำจัด humic acid โดยวิธีอะกาโรสเจลอีเลคโทรโฟเรซิส.....44
3.5.3 เพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (Polymerase Chain Reaction, PCR).....45
3.5.4 วิเคราะห์ Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE).....47
3.6 วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ชิ้นดีเอ็นเอเด่นจากโปรไฟล์ของ DGGE.....48
3.6.1 เพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอและทำให้บริสุทธิ์เพื่อการโคลน.....48
3.6.2 โคลนชิ้นผลิตภัณฑ์ PCR.....49
3.6.3 สกัดรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pGEM-T Easy.....51
3.6.4 การตัดรีคอมบิแนนท์พลาสมิดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ.....51
3.6.5 วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์.....52
3.7 แยกและจำแนกชนิดแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายฟีแนนทรีนได้ในภาวะกรด.....52
3.8 ตรวจติดตามส่วนของยีนไดออกซิจีเนสด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอเมอเรส.....53
4. ผลการทดลอง.....55
4.1 การเก็บตัวอย่างดิน การวิเคราะห์สมบัติทางฟิสิกส์และเคมีของดินและการปนเปื้อนของฟีแนนทรีน.....55
4.1.1 การเก็บตัวอย่างดิน.....55
4.1.2 การวิเคราะห์สมบัติทางฟิสิกส์และเคมีของดิน และการปนเปื้อนของฟีแนนทรีน.....56
4.1.2.1 การวิเคราะห์สมบัติทางฟิสิกส์และเคมีของดิน.....56
4.1.2.2 การวิเคราะห์การปนเปื้อนของฟีแนนทรีน.....57
4.2 การตรวจนับจำนวนจุลินทรีย์เริ่มต้น.....57
4.3 การสร้างระบบนิเวศจำลองดินที่มีภาวะเป็นกรดที่ทำให้ปนเปื้อนด้วยฟีแนนทรีน.....58
4.3.1 การสร้างระบบนิเวศจำลองดินชุดที่ 1.....58

หน้า

4.3.1.1 การสร้างระบบนิเวศจำลองดินชุดที่ 1 ที่เติมฟีแนนทรีนเป็นแหล่งคาร์บอน.....58
4.3.1.1.1 การวิเคราะห์ปริมาณฟีแนนทรีนที่เหลืออยู่ในระบบนิเวศจำลองดินชุดที่ 1 ที่เติมฟีแนนทรีนเป็นแหล่งคาร์บอน.....59
4.3.1.1.2 การติดตามการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างประชาคมแบคทีเรียโดยวิธี DGGE ในระบบนิเวศจำลองดินชุดที่ 1 ที่เติมฟีแนนทรีนเป็นแหล่งคาร์บอน.....62
4.3.1.1.3 การตรวจหาส่วนของยีนไดออกซิจีเนสในระบบนิเวศจำลองดินชุดที่ 1 ที่เติมฟีแนนทรีนเป็นแหล่งคาร์บอน.....63
4.3.1.1.4 การแยกและจำแนกชนิดแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายฟีแนนทรีนได้ในภาวะเป็นกรดในระบบนิเวศจำลองดินชุดที่ 1 ที่เติมฟีแนนทรีนเป็นแหล่งคาร์บอน.....64
4.3.1.2 การสร้างระบบนิเวศจำลองดินชุดที่ 1 ที่เติมฟีแนนทรีนร่วมกับสารอาหารอื่น.....64
4.3.1.2.1 การวิเคราะห์ปริมาณฟีแนนทรีนที่เหลืออยู่ในระบบนิเวศจำลองดินชุดที่ 1 ที่เติมฟีแนนทรีนร่วมกับสารอาหารอื่น.....65
4.3.1.2.2 การตรวจนับจำนวนจุลินทรีย์โดยวิธี Most Probable Number (MPN) ในระบบนิเวศจำลองดินชุดที่ 1 ที่เติมฟีแนนทรีนร่วมกับสารอาหารอื่น.....67
4.3.1.2.2.1 การตรวจนับจำนวนจุลินทรีย์ที่เจริญได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB ที่มี pH 4.0 ในระบบนิเวศจำลองดินชุดที่ 1ที่เติมฟีแนนทรีนร่วมกับสารอาหารอื่น.....67
4.3.1.2.2.2 การตรวจนับจำนวนจุลินทรีย์ที่เจริญได้โดยใช้ฟีแนนทรีนเป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงานในระบบนิเวศจำลองดินชุดที่ 1 ที่เติมฟีแนนทรีนร่วมกับสารอาหารอื่น.....69
4.3.2 การสร้างระบบนิเวศจำลองดินชุดที่ 2.....69

หน้า

4.3.2.1 การสร้างระบบนิเวศจำลองดินชุดที่ 1 ที่เติมฟีแนนทรีนร่วมกับ
สารสกัดจากยีสต์ความเข้มข้นสุดท้ายในดิน 200 ppm.....70
4.3.2.1.1 การวิเคราะห์ปริมาณฟีแนนทรีนที่เหลืออยู่ในระบบนิเวศจำลอง
ดินชุดที่ 2 ที่เติมฟีแนนทรีนร่วมกับสารสกัดจากยีสต์ความเข้มข้น
สุดท้าย ในดิน 200 ppm.....70
4.3.2.1.2 การติดตามการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างประชาคมจุลินทรีย์โดยวิธี
DGGE ในระบบนิเวศจำลองดินชุดที่ 2 ที่เติมฟีแนนทรีนร่วมกับ
สารสกัดจากยีสต์ความเข้มข้นสุดท้ายในดิน 200 ppm.....72
4.3.2.1.2.1 การติดตามการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างประชาคมแบคทีเรีย
ในระบบนิเวศจำลองดินชุดที่ 2 ที่เติมฟีแนนทรีนร่วมกับ
สารสกัดจากยีสต์ความเข้มข้นสุดท้ายในดิน 200 ppm.....72
4.3.2.1.2.2 การติดตามการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างประชาคมรา
ในระบบนิเวศจำลองดินชุดที่ 2 ที่เติมฟีแนนทรีนร่วมกับ
สารสกัดจากยีสต์ความเข้มข้นสุดท้ายในดิน 200 ppm.....79
4.3.2.1.3 การตรวจหาส่วนของยีนไดออกซิจีเนสในระบบนิเวศจำลองดิน
ชุดที่ 2 ที่เติมฟีแนนทรีนร่วมกับสารสกัดจากยีสต์ความเข้มข้น
สุดท้ายในดิน 200 ppm.....83
4.3.2.1.4 การแยกและจำแนกชนิดแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายฟีแนนทรีน
ได้ในภาวะกรดในระบบนิเวศจำลองดินชุดที่ 2 ที่เติมฟีแนนทรีน
ร่วมกับสารสกัดจากยีสต์ความเข้มข้นสุดท้ายในดิน 200 ppm.....85
4.3.2.2 การสร้างระบบนิเวศจำลองดินชุดที่ 2 ที่เติมฟีแนนทรีนเป็นแหล่ง
คาร์บอน.....85
4.3.2.2.1 การวิเคราะห์ปริมาณฟีแนนทรีนที่เหลืออยู่ในระบบนิเวศจำลองดิน
ชุดที่ 2 ที่เติมฟีแนนทรีนเป็นแหล่งคาร์บอน.....85

4.3.2.2.2 การติดตามการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างประชาคมแบคทีเรียโดยวิธี DGGE ในระบบนิเวศจำลองดินชุดที่ 2 ที่เติมฟีแนนทรีนเป็นแหล่งคาร์บอน.....87
4.3.2.2.3 การตรวจนับจำนวนจุลินทรีย์โดยวิธี Most Probable Number (MPN) ในระบบนิเวศจำลองดินชุดที่ 2 ที่เติมฟีแนนทรีนเป็นแหล่งคาร์บอน.....88
4.3.2.2.3.1 การตรวจนับจำนวนจุลินทรีย์ที่เจริญได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB ที่มี pH 4.0 ในระบบนิเวศจำลองดินชุดที่ 2 ที่เติมฟีแนนทรีนเป็นแหล่งคาร์บอน.....88
4.3.2.2.3.2 การตรวจนับจำนวนจุลินทรีย์ที่เจริญได้โดยใช้ฟีแนนทรีนเป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงานในระบบนิเวศจำลองดินชุดที่ 2 ที่เติมฟีแนนทรีนเป็นแหล่งคาร์บอน.....90
5. สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง.....91
ปัจจัยทางฟิสิกส์และเคมี และจำนวนจุลินทรีย์ในดิน.....92
การสร้างระบบนิเวศจำลองดิน.....94
ระบบนิเวศจำลองดินชุดที่ 1.....95
ระบบนิเวศจำลองดินชุดที่ 2.....97
สรุปผลการศึกษา.....100
รายการอ้างอิง.....103
ภาคผนวก.....118
ภาคผนวก ก.....119
ภาคผนวก ข.....122
ภาคผนวก ค.....129
ภาคผนวก ง.....132
ภาคผนวก จ.....146
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....152

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
2.1	สมบัติของฟีแนนทรีน	9
2.2	ปัจจัยทางชีวภาพและกายภาพที่มีผลต่อการดำรงชีวิตของแบคทีเรียในดิน	18
2.3	ภาวะที่เหมาะสมในการบำบัด PAHs ที่ปนเปื้อนในดินให้มีประสิทธิภาพสูง	19
2.4	แบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายฟีแนนทรีนได้	26
2.5	ราที่สามารถย่อยสลายฟีแนนทรีนได้	26
3.1	สถานที่เก็บตัวอย่างดินที่ใช้ในการสร้างระบบนิเวศจำลอง	36
3.2	วิธีการวิเคราะห์สมบัติทางฟิสิกส์และเคมีของดิน	37
4.1	ผลการวิเคราะห์สมบัติทางฟิสิกส์และเคมีของดิน	56
4.2	จำนวนจุลินทรีย์เริ่มต้นในตัวอย่างดินที่ใช้ในการทดลอง	57
4.3	ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ชิ้นดีเอ็นเอเด่นจากโครงสร้างประชาคมแบคทีเรียในระบบนิเวศจำลองดิน	78
4.4	ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ชิ้นดีเอ็นเอเด่นจากการเปลี่ยนแปลงโครง สร้างประชาคมราในระบบนิเวศจำลองดิน	82
4.5	ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ชิ้นผลิตภัณฑ์ PCR บริเวณ Rieske ของยีนไดออกซิจีเนส	84
5.1	สกุลของแบคทีเรียที่มีรายงานการย่อยสลายสารพิษ	98
5.2	สกุลของราที่พบในระบบนิเวศจำลองดินทั้ง 3 ชนิด	99
5.3	ปริมาณฟีแนนทรีนที่เหลืออยู่ในระบบนิเวศจำลองสัปดาห์ที่ 12	101
ง.1	แสดงปริมาณฟีแนนทรีนที่เหลือในระบบนิเวศจำลองดิน NY1 จำนวน 250 กรัม ที่เติมฟีแนนทรีนเป็นแหล่งคาร์บอน โดยการวิเคราะห์ด้วยวิธีแก๊สโครมาโตกราฟี	132
ง.2	แสดงปริมาณฟีแนนทรีนที่เหลือในระบบนิเวศจำลองดิน NY2 จำนวน 250 กรัม ที่เติมฟีแนนทรีนเป็นแหล่งคาร์บอน โดยการวิเคราะห์ด้วยวิธีแก๊สโครมาโตกราฟี	133

ตารางที่ หน้า

ง.3 แสดงปริมาณฟีแนนทรีนที่เหลือในระบบนิเวศจำลองดิน NY3 จำนวน 250 กรัม ที่เติมฟีแนนทรีนเป็นแหล่งคาร์บอน โดยการวิเคราะห์ด้วยวิธีแก๊สโครมาโตกราฟี..... 134

ง.4 แสดงปริมาณฟีแนนทรีนที่เหลือในระบบนิเวศจำลองดิน NY4 จำนวน 250 กรัม ที่เติมฟีแนนทรีนเป็นแหล่งคาร์บอน โดยการวิเคราะห์ด้วยวิธีแก๊สโครมาโตกราฟี..... 135

ง.5 แสดงปริมาณฟีแนนทรีนที่เหลือในระบบนิเวศจำลองดิน PJ จำนวน 6 กรัม ที่เติมฟีแนนทรีนร่วมกับสารสกัดจากยีสต์ความเข้มข้นสุดท้ายในดิน 200 ppm โดยการวิเคราะห์ด้วยวิธีแก๊สโครมาโตกราฟี..... 136

ง.6 แสดงปริมาณฟีแนนทรีนที่เหลือในระบบนิเวศจำลองดิน RB1 จำนวน 6 กรัม ที่เติมฟีแนนทรีนร่วมกับสารสกัดจากยีสต์ความเข้มข้นสุดท้ายในดิน 200 ppm โดยการวิเคราะห์ด้วยวิธีแก๊สโครมาโตกราฟี..... 137

ง.7 แสดงปริมาณฟีแนนทรีนที่เหลือในระบบนิเวศจำลองดิน RB2 จำนวน 6 กรัม ที่เติมฟีแนนทรีนร่วมกับสารสกัดจากยีสต์ความเข้มข้นสุดท้ายในดิน 200 ppm โดยการวิเคราะห์ด้วยวิธีแก๊สโครมาโตกราฟี..... 138

ง.8 แสดงปริมาณฟีแนนทรีนที่เหลือในระบบนิเวศจำลองดิน NY1 จำนวน 6 กรัม ที่เติมฟีแนนทรีนร่วมกับสารสกัดจากยีสต์ความเข้มข้นสุดท้ายในดิน 200 ppm โดยการวิเคราะห์ด้วยวิธีแก๊สโครมาโตกราฟี..... 139

ง.9 แสดงปริมาณฟีแนนทรีนที่เหลือในระบบนิเวศจำลองดิน NY1 จำนวน 6 กรัม ที่เติมฟีแนนทรีนร่วมกับเปลือกถั่ว 6% ของน้ำหนักดิน โดยการวิเคราะห์ด้วยวิธีแก๊สโครมาโตกราฟี..... 140

ง.10 แสดงปริมาณฟีแนนทรีนที่เหลือในระบบนิเวศจำลองดิน NY1 จำนวน 6 กรัม ที่เติมฟีแนนทรีนร่วมกับสารสกัดจากยีสต์ความเข้มข้นสุดท้ายในดิน 200 ppm และ เปลือกถั่ว 6% ของน้ำหนักดิน โดยการวิเคราะห์ด้วยวิธีแก๊สโครมาโตกราฟี..... 141

ตารางที่ **หน้า**

ง.11 แสดงปริมาณฟีแนนทรีนที่เหลือในระบบนิเวศจำลองดิน PJ จำนวน 6 กรัม ที่เติมฟีแนนทรีนเป็นแหล่งคาร์บอน โดยการวิเคราะห์ด้วยวิธีแก๊สโครมาโตกราฟี..... 142

ง.12 แสดงปริมาณฟีแนนทรีนที่เหลือในระบบนิเวศจำลองดิน RB1 จำนวน 6 กรัม ที่เติมฟีแนนทรีนเป็นแหล่งคาร์บอน โดยการวิเคราะห์ด้วยวิธีแก๊สโครมาโตกราฟี..... 143

ง.13 แสดงปริมาณฟีแนนทรีนที่เหลือในระบบนิเวศจำลองดิน RB2 จำนวน 6 กรัม ที่เติมฟีแนนทรีนเป็นแหล่งคาร์บอน โดยการวิเคราะห์ด้วยวิธีแก๊สโครมาโตกราฟี..... 144

ง.14 แสดงจำนวนจุลินทรีย์ในระบบนิเวศจำลองดิน NY1 จำนวน 6 กรัม ที่เติมฟีแนนทรีนร่วมกับสารสกัดจากยีสต์ความเข้มข้นสุดท้ายในดิน 200 ppm (NY1+YE); ร่วมกับเปลือกถั่ว 6% ของน้ำหนักดิน (NY1+PS) และร่วมกับสารสกัดจากยีสต์ความเข้มข้นสุดท้ายในดิน 200 ppm และเปลือกถั่ว 6% ของน้ำหนักดิน (NY1+YE+PS) โดยการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค MPN..... 145

ง.15 แสดงจำนวนจุลินทรีย์ในระบบนิเวศจำลองดิน PJ RB1 และ RB2 จำนวน 6 กรัม ที่เติมฟีแนนทรีนเป็นแหล่งคาร์บอน โดยการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค MPN... 145

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
2.1	โครงสร้างโมเลกุลของ PAHs ทั้ง16 ชนิด (Wilson และ Jones, 1993).....	6
2.2	โครงสร้างโมเลกุลของฟีแนนทรีน (Chang และคณะ, 2002).....	9
2.3	วิถีการย่อยสลาย PAHs โดยจุลินทรีย์ (Cerniglia, 1993).....	22
2.4	วิถีการย่อยสลายฟีแนนทรีนโดยแบคทีเรีย (Kiyohara และคณะ, 1976).....	24
2.5	วิถีการย่อยสลายฟีแนนทรีนโดยรา (Sutherland และคณะ, 1993).....	25
2.6	วิถีการย่อยสลายฟีแนนทรีนโดย *Phanerochaete chrysosporium* (Hammel และคณะ, 1992).....	25
2.7	แสดงระบบแนพธาลีน 1,2-ไดออกซิจีเนส (NDO).(Gibson และ Parales, 2000).....	29
2.8	แสดง Rieske iron-sulfur center ซึ่งเชื่อมต่อกับบริเวณอนุรักษ์ Cysteines และ Histidines (Parales, 2003).....	30
2.9	แสดงการเชื่อมต่อระหว่างอะตอมเหล็กกับ His-208 His-213 Asp-362 และน้ำ (Parales, 2003).....	30
3.1	ขั้นตอนการสร้างระบบนิเวศจำลองและการวิเคราะห์ตัวอย่างดิน.....	42
3.2	แสดงบริเวณตัดจำเพาะของเอนไซม์ *Bgl*II และ *Sac*I บน pPC1 (กรองกาญจน์ สายพิณ, 2549).....	54
4.1	ลักษณะเนื้อดินทั้ง 7 ตัวอย่าง ที่ใช้ในการทดลอง.....	55
4.2	ลักษณะระบบนิเวศจำลองดินชุดที่ 1 ที่เติมฟีแนนทรีนเป็นแหล่งคาร์บอน.....	59
4.3.1	การย่อยสลายฟีแนนทรีน 300 ppm ในระบบนิเวศจำลองดิน NY1 ขนาด 250 กรัม ที่เติมฟีแนนทรีนเป็นแหล่งคาร์บอน เป็นเวลา 8 สัปดาห์.....	60
4.3.2	การย่อยสลายฟีแนนทรีน 300 ppm ในระบบนิเวศจำลองดิน NY2 ขนาด 250 กรัม ที่เติมฟีแนนทรีนเป็นแหล่งคาร์บอน เป็นเวลา 8 สัปดาห์.....	60
4.3.3	การย่อยสลายฟีแนนทรีน 300 ppm ในระบบนิเวศจำลองดิน NY3 ขนาด 250 กรัม ที่เติมฟีแนนทรีนเป็นแหล่งคาร์บอน เป็นเวลา 8 สัปดาห์.....	61

รูปที่		หน้า
4.3.4	การย่อยสลายฟีแนนทรีน 300 ppm ในระบบนิเวศจำลองดิน NY4 ขนาด 250 กรัม ที่เติมฟีแนนทรีนเป็นแหล่งคาร์บอน เป็นเวลา 8 สัปดาห์.....	61
4.4	โครงสร้างประชาคมแบคทีเรียบริเวณ V-3 region ของ 16S rDNA โดยวิธี DGGE ของตัวอย่างดินชุดที่ 1 ช่องวิ่งที่1: จากตัวอย่างดิน NY1 ช่องวิ่งที่2: จากตัวอย่างดิน NY2 ช่องวิ่งที่3: จากตัวอย่างดิน NY3 ช่องวิ่งที่4: จากตัวอย่างดิน NY4.....	62
4.5	ขนาดชิ้นผลิตภัณฑ์ PCR บริเวณ Rieske ของยีนไดออกซิจีเนส ช่องวิ่งที่1: 100 bp DNA ladder ช่องวิ่งที่2: positive control (ใช้ดีเอ็นเอจาก *Alteromonas macleodii* BP-PH (Fuse และคณะ, 2003) เป็นดีเอ็นเอแม่แบบ) ช่องวิ่งที่3: จากตัวอย่างดิน NY4 ช่องวิ่งที่4: จากตัวอย่างดิน NY3 ช่องวิ่งที่5: จากตัวอย่างดิน NY2 ช่องวิ่งที่6: จากตัวอย่างดิน NY1.....	63
4.6	ลักษณะเปลือกถั่วที่เติมลงในระบบนิเวศจำลอง.....	64
4.7	ลักษณะระบบนิเวศจำลองดิน NY1 ที่เติมฟีแนนทรีนร่วมกับสารอาหารอื่น.....	65
4.8.1	การย่อยสลายฟีแนนทรีน 300 ppm ในระบบนิเวศจำลองดิน NY1 ขนาด 6 กรัม ที่เติมฟีแนนทรีนร่วมกับสกัดจากยีสต์ความเข้มข้นสุดท้ายในดิน 200 ppm เป็นเวลา 12 สัปดาห์.....	66
4.8.2	การย่อยสลายฟีแนนทรีน 300 ppm ในระบบนิเวศจำลองดิน NY1 ขนาด 6 กรัม ที่เติมฟีแนนทรีนร่วมกับเปลือกถั่วปริมาณ 0.36 กรัม เป็นเวลา 12 สัปดาห์.....	66
4.8.3	การย่อยสลายฟีแนนทรีน 300 ppm ในระบบนิเวศจำลองดิน NY1 ขนาด 6 กรัม ที่เติมฟีแนนทรีนร่วมกับสารสกัดจากยีสต์ความเข้มข้นสุดท้ายในดิน 200 ppm และเปลือกถั่วปริมาณ 0.36 กรัม เป็นเวลา 12 สัปดาห์.....	67
4.9.1	จำนวนจุลินทรีย์ในระบบนิเวศจำลองดิน NY1 ขนาด 6 กรัม ที่เติมฟีแนนทรีน 300 ppm ร่วมกับสารสกัดจากยีสต์ความเข้มข้นสุดท้ายในดิน 200 ppm.....	68
4.9.2	จำนวนจุลินทรีย์ในระบบนิเวศจำลองดิน NY1 ขนาด 6 กรัม ที่เติมฟีแนนทรีน 300 ppm ร่วมกับเปลือกถั่วปริมาณ 0.36 กรัม เป็นเวลา 12 สัปดาห์.....	68

รูปที่		หน้า
4.9.3	จำนวนจุลินทรีย์ในระบบนิเวศจำลองดิน NY1 ขนาด 6 กรัม ที่เติมฟีแนนทรีน 300 ppm ร่วมกับสารสกัดจากยีสต์ความเข้มข้นสุดท้ายในดิน 200 ppm และเปลือกถั่วปริมาณ 0.36 กรัม เป็นเวลา 12 สัปดาห์.....	69
4.10	ลักษณะระบบนิเวศจำลองดินชุดที่ 2 ที่เติมฟีแนนทรีนร่วมกับสารสกัดจากยีสต์.....	70
4.11.1	การย่อยสลายฟีแนนทรีน 300 ppm ในระบบนิเวศจำลองดิน PJ ขนาด 6 กรัม ที่เติมฟีแนนทรีนร่วมกับสารสกัดจากยีสต์ความเข้มข้นสุดท้ายในดิน 200 ppm เป็นเวลา 12 สัปดาห์.....	71
4.11.2	การย่อยสลายฟีแนนทรีน 300 ppm ในระบบนิเวศจำลองดิน RB1 ขนาด 6 กรัม ที่เติมฟีแนนทรีนร่วมกับสารสกัดจากยีสต์ความเข้มข้นสุดท้ายในดิน 200 ppm เป็นเวลา 12 สัปดาห์.....	71
4.11.3	การย่อยสลายฟีแนนทรีน 300 ppm ในระบบนิเวศจำลองดิน RB2 ขนาด 6 กรัม ที่เติมฟีแนนทรีนร่วมกับสารสกัดจากยีสต์ความเข้มข้นสุดท้ายในดิน 200 ppm เป็นเวลา 12 สัปดาห์.....	72
4.12.1	การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างประชาคมแบคทีเรียบริเวณ V-3 region ของ 16S rDNA โดยวิธี DGGE ในพอลิอะคริลาไมด์เจลที่มี 20 – 70% denaturant ของระบบนิเวศจำลองดิน PJ; PJ_1B คือ แถบดีเอ็นเอเด่นแถบที่ 1.....	73
4.12.2	การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างประชาคมแบคทีเรียบริเวณ V-3 region ของ 16S rDNA โดยวิธี DGGE ในพอลิอะคริลาไมด์เจลที่มี 20 – 70% denaturant ของระบบนิเวศจำลองดิน RB1; RB1.1_B คือ แถบดีเอ็นเอเด่นแถบที่ 1; RB1.2_B คือ แถบดีเอ็นเอเด่นแถบที่ 2; RB1.3_B คือ แถบดีเอ็นเอเด่นแถบที่ 3.....	74
4.12.3	การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างประชาคมแบคทีเรียบริเวณ V-3 region ของ 16S rDNA โดยวิธี DGGE ในพอลิอะคริลาไมด์เจลที่มี 20 – 70% denaturant ของระบบนิเวศจำลองดิน RB2; RB2.1_B คือ แถบดีเอ็นเอเด่นแถบที่ 1; RB2.2_B คือ แถบดีเอ็นเอเด่นแถบที่ 2; RB2.3_B คือ แถบดีเอ็นเอเด่นแถบที่ 3.....	75

รูปที่ **หน้า**

4.13.1 รูปแบบของรีคอมบิแนนท์พลาสมิดหลังจากถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bsu*RI ช่องวิ่งที่1: 100 bp DNA ladder ช่องวิ่งที่ 2: RB1.1.1_B ช่องวิ่งที่ 3: RB1.1.2_B ช่องวิ่งที่ 4: RB1.1.3_B ช่องวิ่งที่ 5: RB1.2.1_B ช่องวิ่งที่ 6: RB1.2.2_B ช่องวิ่งที่ 7: RB1.2.3_B ช่องวิ่งที่ 8: RB1.2.4_B ช่องวิ่งที่ 9: RB1.3.1_B ช่องวิ่งที่ 10: RB1.3.2_B ช่องวิ่งที่ 11: RB1.3.3_B (ทศนิยมตำแหน่งสุดท้ายหมายถึงโคลนที่)..... 76

4.13.2 รูปแบบของรีคอมบิแนนท์พลาสมิดหลังจากถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hinf*I ช่องวิ่งที่1: 100 bp DNA ladder ช่องวิ่งที่ 2: RB1.1.1_B ช่องวิ่งที่ 3: RB1.1.3_B (ทศนิยมตำแหน่งที่ 3 หมายถึงโคลนที่)..... 77

4.14 การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างประชากรในระบบนิเวศจำลองดิน PJ RB1 และ RB2 ในพอลิอะคริลาไมด์เจลที่มี 20 – 70% denaturant..... 80

4.15.1 รูปแบบของรีคอมบิแนนท์พลาสมิดหลังจากถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bsu*RI ช่องวิ่งที่1: 100 bp DNA ladder ช่องวิ่งที่ 2:PJ1.1_F ช่องวิ่งที่ 3: PJ1.2_F ช่องวิ่งที่ 4: PJ2.1_F ช่องวิ่งที่ 5: PJ2.2_F ช่องวิ่งที่ 6: PJ2.3_F ช่องวิ่งที่ 7: RB1.1.1_F ช่องวิ่งที่ 8: RB1.1.2_F ช่องวิ่งที่ 9: RB2.1.1_F ช่องวิ่งที่ 10: RB2.1.2_F ช่องวิ่งที่ 11: RB2.1.3_F ช่องวิ่งที่ 12: RB2.1.4_F (ทศนิยมตำแหน่งสุดท้ายหมายถึงโคลนที่)..... 81

4.15.2 รูปแบบของรีคอมบิแนนท์พลาสมิดหลังจากถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Rsa*I ช่องวิ่งที่1: 100 bp DNA ladder ช่องวิ่งที่ 2: PJ1.2_F ช่องวิ่งที่ 3: PJ2.1_F ช่องวิ่งที่ 4: PJ2.2_F ช่องวิ่งที่ 5: PJ2.3_F ช่องวิ่งที่ 6: RB1.1.1_F ช่องวิ่งที่ 7: RB1.1.2_F ช่องวิ่งที่ 8: RB2.1.1_F ช่องวิ่งที่ 9: RB2.1.2_F ช่องวิ่งที่ 10: RB2.1.3_F ช่องวิ่งที่ 11: RB2.1.4_F (ทศนิยมตำแหน่งสุดท้ายหมายถึงโคลนที่)..... 82

รูปที่		หน้า
4.16	ขนาดชิ้นผลิตภัณฑ์ PCR บริเวณ Rieske ของยีนไดออกซิจีเนสช่องวิ่งที่ 1: pPC1 (กรองกาญจน์ สายพิณ, 2549) ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bgl*II และ *Sac*I ช่องวิ่งที่ 2: PJ สัปดาห์ที่ 0 ช่องวิ่งที่ 3: PJ สัปดาห์ที่ 6 ช่องวิ่งที่ 4: PJ สัปดาห์ที่ 12 ช่องวิ่งที่ 5: RB1 สัปดาห์ที่ 0 ช่องวิ่งที่ 6: RB1 สัปดาห์ที่ 6 ช่องวิ่งที่ 7: RB1 สัปดาห์ที่ 12 ช่องวิ่งที่ 8: RB2 สัปดาห์ที่ 0 ช่องวิ่งที่ 9: RB2 สัปดาห์ที่ 6 ช่องวิ่งที่ 10: RB2 สัปดาห์ที่ 12.....	83
4.17.1	การย่อยสลายฟีแนนทรีน 300 ppm ในระบบนิเวศจำลองดิน PJ ขนาด 6 กรัม ที่เติมฟีแนนทรีนเป็นแหล่งคาร์บอน เป็นเวลา 12 สัปดาห์.....	86
4.17.2	การย่อยสลายฟีแนนทรีน 300 ppm ในระบบนิเวศจำลองดิน RB1 ขนาด 6 กรัม ที่เติมฟีแนนทรีนเป็นแหล่งคาร์บอน เป็นเวลา 12 สัปดาห์.....	86
4.17.3	การย่อยสลายฟีแนนทรีน 300 ppm ในระบบนิเวศจำลองดิน RB2 ขนาด 6 กรัม ที่เติมฟีแนนทรีนเป็นแหล่งคาร์บอน เป็นเวลา 12 สัปดาห์.....	87
4.18	การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างประชาคมแบคทีเรียในระบบนิเวศจำลองดิน PJ RB1 และ RB2 ในพอลิอะคริลาไมด์เจลที่มี 20 – 70% denaturant.....	88
4.19.1	จำนวนจุลินทรีย์ในระบบนิเวศจำลองดิน PJ ขนาด 6 กรัม ที่เติมฟีแนนทรีน 300 ppm เป็นเวลา 12 สัปดาห์.....	89
4.19.2	จำนวนจุลินทรีย์ในระบบนิเวศจำลองดิน RB1 ขนาด 6 กรัม ที่เติมฟีแนนทรีน 300 ppm เป็นเวลา 12 สัปดาห์.....	89
4.19.3	จำนวนจุลินทรีย์ในระบบนิเวศจำลองดิน RB2 ขนาด 6 กรัม ที่เติมฟีแนนทรีน 300 ppm เป็นเวลา 12 สัปดาห์.....	90
ค.1	กราฟมาตรฐานระหว่างปริมาณฟีแนนทรีนกับพื้นที่ใต้กราฟ ที่ได้จากการวิเคราะห์โดยวิธีแก๊สครมาโตกราฟี (GC).....	129
ค.2	โครมาโตแกรมแสดงการปนเปื้อนของฟีแนนทรีนในตัวอย่างดิน NY1 โดยวิธีแก๊สโครมาโตกราฟี (Retention time, RT = 13.121).....	129
ค.3	โครมาโตแกรมแสดงการปนเปื้อนของฟีแนนทรีนในตัวอย่างดิน NY2 โดยวิธีแก๊สโครมาโตกราฟี (Retention time, RT = 13.121).....	130

รูปที่		หน้า
ค.4	โครมาโตแกรมแสดงการปนเปื้อนของฟีแนนทรีนในตัวอย่างดิน NY3 โดยวิธีแก๊สโครมาโตกราฟี (Retention time, RT = 13.121).....	130
ค.5	โครมาโตแกรมแสดงการปนเปื้อนของฟีแนนทรีนในตัวอย่างดิน NY4 โดยวิธีแก๊สโครมาโตกราฟี (Retention time, RT = 13.121).....	130
ค.6	โครมาโตแกรมแสดงการปนเปื้อนของฟีแนนทรีนในตัวอย่างดิน PJ โดยวิธีแก๊สโครมาโตกราฟี (Retention time, RT = 13.121).....	131
ค.7	โครมาโตแกรมแสดงการปนเปื้อนของฟีแนนทรีนในตัวอย่างดิน RB1 โดยวิธีแก๊สโครมาโตกราฟี (Retention time, RT = 13.121).....	131
ค.8	โครมาโตแกรมแสดงการปนเปื้อนของฟีแนนทรีนในตัวอย่างดิน RB2 โดยวิธีแก๊สโครมาโตกราฟี (Retention time, RT = 13.121).....	131
จ.1	แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนบริเวณ Rieske ของยีนไดออกซิจีเนสโดยบริเวณที่แรเงาเป็นบริเวณอนุรักษ์ Cysteines และ Histidines ที่เชื่อมต่อกับ Rieske iron-sulfur center.....	151

คำย่อและสัญลักษณ์

A_{260}	=	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร
A_{280}	=	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร
bp	=	base pairs
CFMM	=	carbon free mineral medium
DGGE	=	Denaturing Gradient Gel Electrophoresis
GC	=	Gas chromatography
IARC	=	International Agency for Research on Cancer
LB	=	Luria-Bertani
LD_{50}	=	Lethal dose fifty%
MPN	=	Most Probable Number
OD	=	Optical density
PAH	=	Polycyclic aromatic hydrocarbon
PCR	=	Polymerase chain reaction
ppm	=	parts per million
U.S. EPA	=	United States Environmental Protection Agency