

บทบาทของแบคทีเรียที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายน้ำมันดีเซลในดินแอนตาร์กติกภายใต้อุณหภูมิต่ำ

นางสาวศุภิกา แหวนทองคำ

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของวิทยานิพนธ์ ที่ส่งผ่านทางบัณฑิตวิทยาลัย

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 University Graduate School.

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2559

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ROLE OF BACTERIA INVOLVED IN DIESEL OIL BIODEGRADATION IN ANTARCTIC SOIL
UNDER LOW TEMPERATURE

Miss Supisa Waenthongkham



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

Faculty of Science

Chulalongkorn University

Academic Year 2016

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์

บทบาทของแบคทีเรียที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายน้ำมัน
ดีเซลในดินแอนตาร์กติกภายใต้อุณหภูมิต่ำ

โดย

นางสาวศุภิกา แหวนทองคำ

สาขาวิชา

เทคโนโลยีชีวภาพ

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

รองศาสตราจารย์ ดร.อรุทัย ภิญญาคง

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้บัณฑิตวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่ง
ของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

..... คณบดีคณะวิทยาศาสตร์
(รองศาสตราจารย์ ดร.พลกฤษณ์ แสงวณิช)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.กอบชัย ภัทรกุลวณิช)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(รองศาสตราจารย์ ดร.อรุทัย ภิญญาคง)

..... กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.สุชาดา จันทร์ประทีป นภทร)

..... กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(รองศาสตราจารย์ ดร.เบญจภรณ์ ประภักดิ์)

ศุภิศา แหวนทองคำ : บทบาทของแบคทีเรียที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายน้ำมันดีเซลในดินแอนตาร์กติกภายใต้อุณหภูมิต่ำ (ROLE OF BACTERIA INVOLVED IN DIESEL OIL BIODEGRADATION IN ANTARCTIC SOIL UNDER LOW TEMPERATURE) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: รศ. ดร.อรุณทัย ภิญญาคง, 155 หน้า.

ทวีปแอนตาร์กติกาได้รับผลกระทบจากกิจกรรมของมนุษย์ทั้งทางตรงและทางอ้อม ซึ่งเป็นสาเหตุหลักในการปนเปื้อนสารปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอน เนื่องจากน้ำมันดีเซลถูกใช้เป็นแหล่งพลังงานหลักภายในทวีป งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาบทบาทของแบคทีเรียประจำถิ่นในดินแอนตาร์กติกาที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายน้ำมันดีเซลภายใต้อุณหภูมิต่ำ เพื่อใช้ในการบำบัดพื้นที่หนาวเย็นที่ปนเปื้อนน้ำมันดีเซล โดยตัวอย่างดินที่ใช้ในงานวิจัยถูกเก็บมาจากภูเขาหลังสถานีวิจัยเกอร์ทอลล์ ทวีปแอนตาร์กติกา เมื่อทดสอบประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันดีเซลความเข้มข้น 1% และ 3% (น้ำหนัก/น้ำหนัก) โดยสร้างระบบนิเวศจำลองดินที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส พบว่าแบคทีเรียประจำถิ่นในดินแอนตาร์กติกามีประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันดีเซล เมื่อเปรียบเทียบกับระหว่างชุด abiotic control กับ ชุด natural attenuation และ biostimulation (ปรับอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนต่อฟอสฟอรัสให้ได้อัตราส่วน 100:10:1) โดยพบว่าการเติมสารอาหารช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันดีเซลในช่วงแรกของการทดลองเท่านั้น และจากการคัดแยกแบคทีเรียสายพันธุ์บริสุทธิ์จากระบบนิเวศจำลองดินพบว่า *Pseudomonas* spp. และ *Sphingomonas* sp. ซึ่งจัดอยู่ในคลาส Gammaproteobacteria และ Alphaproteobacteria มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันดีเซล และมีแนวโน้มในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ จากการวิเคราะห์ไมโครไบโอมด้วยการวิเคราะห์ลำดับเบสของแอมพลิคอนของยีน 16S rRNA และซีตกันเมตาจีโนมิกส์ พบว่า Gammaproteobacteria, Alphaproteobacteria และ Actinobacteria เป็นแบคทีเรียเด่นที่พบในระบบนิเวศจำลองดินแอนตาร์กติกาที่เติมน้ำมันดีเซล นอกจากนี้ผลการศึกษายีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายน้ำมันดีเซล ยังพบยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายน้ำมันดีเซลของ Gammaproteobacteria, Alphaproteobacteria และ Actinobacteria จึงสรุปได้ว่าแบคทีเรียในคลาสดังกล่าวมีบทบาทสำคัญในการย่อยสลายน้ำมันดีเซลในระบบนิเวศจำลองดินแอนตาร์กติกาภายใต้อุณหภูมิต่ำ งานวิจัยนี้เป็นงานวิจัยแรกที่ศึกษาบทบาทของแบคทีเรียที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายน้ำมันดีเซลภายใต้อุณหภูมิต่ำ ซึ่งศึกษาถึงปัจจัยสารอาหาร และความเข้มข้นของน้ำมันดีเซลต่อการเปลี่ยนแปลงประชาคมแบคทีเรีย โดยผลที่ได้จะเป็นประโยชน์ต่อการศึกษาความสัมพันธ์และบทบาทในการทำงานร่วมกันของแบคทีเรีย เพื่อนำข้อมูลที่ได้ไปใช้ในการบำบัดและฟื้นฟูสิ่งแวดล้อมที่มีอุณหภูมิต่ำอย่างมีประสิทธิภาพในอนาคตต่อไป

สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ

ปีการศึกษา 2559

ลายมือชื่อนิสิต

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาหลัก

5772173823 : MAJOR BIOTECHNOLOGY

KEYWORDS: BIOREMEDIATION / NATURAL ATTENUATION / BIOSTIMULATION / ANTARCTIC SOIL / DIESEL OIL CONTAMINATED SOIL / LOW TEMPERATURE

SUPISA WAENTHONGKHAM: ROLE OF BACTERIA INVOLVED IN DIESEL OIL BIODEGRADATION IN ANTARCTIC SOIL UNDER LOW TEMPERATURE. ADVISOR: ASSOC. PROF. ONRUTHAI PINYAKONG, Ph.D., 155 pp.

Human activities have both direct and indirect effects on Antarctic ecosystem; it is the main reason for petroleum hydrocarbon contamination because diesel oil is used as the main power source in the area. This work aimed to study the role of indigenous bacteria from Antarctic soil involved in diesel oil biodegradation under low temperature. The samples were collected from the mountain back from the Great Wall research station, Antarctica. The soil microcosms were constructed using 1% and 3% (w/w) diesel oil as substrate under 15°C. When compare abiotic control with natural attenuation and biostimulation (adjust C: N: P to 100:10:1), the result showed that indigenous bacteria were able to degrade diesel oil. Nevertheless, the addition of nutrient enhanced diesel oil biodegradation efficiency at the early stage. The Isolation of pure cultures from soil microcosm found that *Pseudomonas* spp., grouped in Gammaproteobacteria and *Sphingomonas* sp., grouped in Alphaproteobacteria degraded diesel oil and had biosurfactant production potential. The results of microbiome analysis using the analysis of 16S rRNA gene amplicon and shotgun metagenomics showed that Gammaproteobacteria, Alphaproteobacteria, and Actinobacteria are predominant in the soil microcosms with diesel oil. In addition, the genes involved in diesel oil biodegradation found in the soil microcosms were belong to Gammaproteobacteria, Alphaproteobacteria, and Actinobacteria. Therefore, these bacteria may play an important role in diesel oil degradation in the soil microcosms under low temperature. This is the first report that studies the role of bacteria involved in diesel oil biodegradation under low temperature; the effects of nutrient and diesel oil concentration on bacterial community structure were investigated. The information obtained from this study can be used for the better understanding of the role of bacterial community and further develop a suitable method for remediation of contaminated site under low temperature.

Field of Study: Biotechnology

Student's Signature

Academic Year: 2016

Advisor's Signature

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จได้ด้วยความช่วยเหลืออย่างดียิ่งของรองศาสตราจารย์ ดร.อรุณทัย ภิญญา คอง อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่กรุณาเก็บตัวอย่างดินเพื่อใช้ในงานวิจัย รวมทั้งถ่ายทอดความรู้ ให้คำปรึกษา คำแนะนำที่เป็นประโยชน์ต่องานวิจัย และช่วยตรวจแก้ไขให้วิทยานิพนธ์นี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี ผู้วิจัยขอกราบ ขอบพระคุณอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้

ขอขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.กอบชัย ภัทรกุลวณิช ที่ให้เกียรติเป็นประธานกรรมการ สอบป้องกันวิทยานิพนธ์ ตลอดจนให้ความรู้ คำแนะนำ และตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์นี้ให้มีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร.สุชาดา จันทร์ประทีป นภทร และรองศาสตราจารย์ ดร.เบญจ ภรณ์ ประภักดิ์ เป็นอย่างสูงในความกรุณาเป็นกรรมการในการสอบป้องกันวิทยานิพนธ์พร้อมทั้งให้คำแนะนำ เพื่อปรับปรุงแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้มีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบคุณโครงการวิจัยชั่วโลกตามพระราชดำริ สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี ที่ทำให้มีโอกาสได้ทำงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับชั่วโลกซึ่งเป็นงานที่มีความท้าทายและยังมีงานวิจัยไม่มากนัก

ขอขอบคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วโรตม เจริญสุวรรณ ที่ให้คำปรึกษาในด้านชีวสารสนเทศศาสตร์

ขอขอบคุณ ดร.พินิตพล พรหมบุตร นักวิจัยศูนย์วิทยาศาสตร์โอมิกส์และชีวสารสนเทศ จุฬาลงกรณ์ มหาวิทยาลัย ที่ให้ความช่วยเหลือและคำปรึกษาในการใช้โปรแกรม MG-RAST

ขอขอบคุณนางสาวชนกภรณ์ เมืองจินดา ในการเตรียม library เพื่อส่งวิเคราะห์เมตาจีโนมิกส์ และ คอยให้คำปรึกษารวมทั้งความช่วยเหลืออย่างดีตลอดมา

ขอขอบคุณหน่วยปฏิบัติการบำบัดมลพิษทางสิ่งแวดล้อมโดยชีววิธี ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะ วิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และหลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์ มหาวิทยาลัย

ขอขอบคุณศูนย์ความเป็นเลิศด้านการจัดการสารและของเสียอันตราย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ขอขอบคุณคณาจารย์และเจ้าหน้าที่ธุรการ ภาควิชาจุลชีววิทยา และหลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในความกรุณาอำนวยความสะดวกในการทำงานวิจัยนี้

ขอขอบคุณเพื่อนและพี่น้องในห้องปฏิบัติการคอยให้คำแนะนำ และกำลังใจตลอดการทำงานวิจัย

สุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณบิดามารดา และครอบครัวที่ให้การสนับสนุน ความช่วยเหลือและเป็น กำลังใจสำคัญแก่ผู้วิจัย ทำให้งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ฐ
สารบัญรูปภาพ.....	ฌ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา	1
1.2 วัตถุประสงค์.....	3
1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	4
1.4 ภาพรวมของงานวิจัย.....	4
บทที่ 2 ทบทวนวรรณกรรมและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	5
2.1 แบคทีเรียในสิ่งแวดล้อม.....	5
2.2 แบคทีเรียที่เจริญได้ที่อุณหภูมิต่ำ	5
2.3 ทวีปแอนตาร์กติกา	8
2.3.1 การรั่วไหลและปนเปื้อนของน้ำมันในทวีปแอนตาร์กติกา	9
2.3.2 การปนเปื้อนของน้ำมันในดินแอนตาร์กติกา	9
2.3.3 น้ำมันดีเซล	10
2.4 การบำบัดสิ่งแวดล้อมภายในทวีปแอนตาร์กติกาที่ปนเปื้อนน้ำมันโดยทางชีวภาพ	11
2.4.1 การบำบัดสิ่งแวดล้อมที่ปนเปื้อนสารมลพิษตามธรรมชาติ	11
2.4.2 การบำบัดสิ่งแวดล้อมที่ปนเปื้อนสารมลพิษโดยการกระตุ้นทางชีวภาพ	12
2.4.3 การเติมจุลินทรีย์เพื่อบำบัดสิ่งแวดล้อมที่ปนเปื้อนสารมลพิษ	12

2.5 กลไกและวิถีเมแทบอลิซึมในการย่อยสลายน้ำมันดีเซลโดยแบคทีเรีย	13
2.5.1 วิธีการย่อยสลายสารประกอบไฮโดรคาร์บอนในน้ำมันดีเซล	14
2.5.1.1 วิธีการย่อยสลายอะลิฟาติกไฮโดรคาร์บอน	14
2.5.1.2 วิธีการย่อยสลายไซโคลอะลิฟาติกไฮโดรคาร์บอน	15
2.5.1.3 วิธีการย่อยสลายอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน	16
2.5.1.4 วิธีการย่อยสลายพอลิไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน	17
2.6 ยีนที่เกี่ยวข้องในการย่อยสลายสารปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนในน้ำมันดีเซล	18
2.7 ปัจจัยที่ส่งผลต่อการบำบัดสิ่งแวดล้อมที่ปนเปื้อนน้ำมันโดยวิธีทางชีวภาพ	20
2.7.1 ลักษณะของแบคทีเรียย่อยสลายน้ำมันด้วยวิธีทางชีวภาพ	20
2.7.1.1 ชนิดของแบคทีเรีย	20
2.7.1.2 ความสามารถในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพและความไม่ชอบน้ำของเซลล์	22
2.8 การย่อยสลายสารประกอบไฮโดรคาร์บอนโดยแบคทีเรียภายใต้อุณหภูมิต่ำ	23
2.9 การตรวจติดตามการบำบัดโดยใช้เทคนิคชีววิทยาโมเลกุลเมตาจีโนมิกส์ (Metagenomics)	24
2.9.1 การวิเคราะห์ลำดับเบสของแอมพลิคอนของยีน 16S rRNA	25
2.9.2 ซ็อตกันเมตาจีโนมิกส์ (Shotgun metagenomics)	27
บทที่ 3 วิธีการดำเนินการวิจัย	29
อุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย	29
เคมีภัณฑ์ที่ใช้ในงานวิจัย	30
โปรแกรมที่ใช้ในงานวิจัย	32
วิธีดำเนินงานวิจัย	33
3.1 ศึกษาลักษณะสมบัติทางกายภาพ เคมี และชีวภาพของดินแอนตาร์กติก	33
3.1.1 ตัวอย่างดินแอนตาร์กติก	33

3.1.2	ศึกษาลักษณะสมบัติทางกายภาพและเคมีของตัวอย่างดินแอนตาร์กติก	34
3.1.3	ศึกษาลักษณะสมบัติทางชีวภาพของตัวอย่างดินแอนตาร์กติก	35
3.1.3.1	ตรวจนับจำนวนแบคทีเรียย่อยสลายน้ำมันดีเซลโดยวิธี Most Probable Number (MPN).....	35
3.1.3.2	ตรวจสอบยีนที่เกี่ยวข้องในการย่อยสลายน้ำมันดีเซลของตัวอย่างดินแอนตาร์กติก	35
3.1.3.2.1	สกัด DNA จากตัวอย่างดินแอนตาร์กติก	35
3.1.3.2.2	ตรวจสอบความสมบูรณ์ของ DNA	36
3.1.3.2.3	ตรวจสอบชิ้นส่วน DNA บริเวณ 16S rRNA.....	36
3.1.3.2.4	ตรวจสอบยีนที่เกี่ยวข้องในการย่อยสลายน้ำมันดีเซล	37
3.2	วิเคราะห์บทบาทของแบคทีเรียที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายน้ำมันดีเซลในตัวอย่างดินแอนตาร์กติกภายใต้อุณหภูมิต่ำ	39
3.2.1	สร้างระบบนิเวศจำลองดินแอนตาร์กติกปนเปื้อนน้ำมันดีเซลภายใต้อุณหภูมิต่ำ	39
3.2.2	วิเคราะห์ปริมาณน้ำมันดีเซลที่เหลืออยู่ในระบบนิเวศจำลองดิน	41
3.2.2.1	สร้างกราฟมาตรฐานสำหรับวิเคราะห์ Gas Chromatography- Flame ionization detector (GC-FID)	41
3.2.2.2	สกัดน้ำมันดีเซลที่เหลืออยู่ในดินด้วยเฮกเซน	41
3.2.2.3	วิเคราะห์อัตราการย่อยสลายน้ำมันดีเซลโดยใช้จลนพลศาสตร์การย่อยสลายของน้ำมันดีเซล	42
3.2.3	คัดแยกและศึกษาลักษณะสมบัติของแบคทีเรียย่อยสลายน้ำมันดีเซลจากระบบนิเวศจำลองดิน	42
3.2.3.1	คัดแยกและระบุชนิดของแบคทีเรียย่อยสลายน้ำมันดีเซลจากระบบนิเวศจำลองดิน	42
3.2.3.2	ทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายองค์ประกอบของน้ำมันดีเซลของแบคทีเรียที่คัดแยกได้.....	43

3.2.3.2.1	เตรียมหัวเชื้อแบคทีเรีย	43
3.2.3.2.2	ทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายองค์ประกอบของน้ำมัน ดีเซล	43
3.2.3.2.3	สกัดและวิเคราะห์ปริมาณองค์ประกอบของน้ำมันดีเซลที่ เหลืออยู่จากการย่อยสลาย	44
3.2.3.3	ศึกษาแนวโน้มในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพเบื้องต้นและความไม่ ชอบน้ำของเซลล์ทดสอบประสิทธิภาพการสร้างสารลดแรงตึงผิว	45
3.2.3.3.1	การวัดค่าแรงตึงผิว (Surface tension)	45
3.2.3.3.2	การวัดค่าการกระจายน้ำมัน (Oil displacement)	45
3.2.3.3.3	การวัดค่าดัชนีอิมัลชัน (Emulsion Index, E24)	45
3.2.3.3.4	การตรวจสอบความไม่ชอบน้ำของเซลล์ (Hydrophobicity)	46
3.2.4	วิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงและความสัมพันธ์ของแบคทีเรียในระบบนิเวศจำลองดิน	46
3.2.4.1	ตรวจติดตามการเปลี่ยนแปลงประชาคมแบคทีเรียในดินด้วยวิธี polymerase chain reaction denature gradient gel electrophoresis (PCR-DGGE)	46
3.2.4.2	การโคลนชิ้นส่วนผลิตภัณฑ์ลูกโซ่พอลิเมอร์เรสเพื่อวิเคราะห์และยืนยันผล ลำดับนิวคลีโอไทด์ของแถบ DNA เด่น	48
3.2.4.2.1	ทำบริสุทธิ์ผลิตภัณฑ์ PCR	48
3.2.4.2.2	โคลนผลิตภัณฑ์ PCR	48
3.2.4.2.3	สกัดรีคอมบิแนนท์พลาสมิด	50
3.2.4.2.4	ตรวจสอบผลิตภัณฑ์ PCR ในรีคอมบิแนนท์พลาสมิด	50
3.2.4.2.5	วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rRNA	51
3.2.4.3	วิเคราะห์ลักษณะและโครงสร้างประชาคมแบคทีเรียทั้งหมดด้วยการ วิเคราะห์ลำดับเบสของแอมพลิคอนของยีน 16S rRNA	51

3.2.4.4 วิเคราะห์โครงสร้างประชาคมแบคทีเรียทั้งหมดและยีนที่เกี่ยวข้องกับการ ย่อยสลายน้ำมันดีเซลภายใต้อุณหภูมิต่ำด้วยเทคนิคซีอตกันเมตาจีโนมิกส์	52
บทที่ 4 ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง	54
4.1 ลักษณะสมบัติทางกายภาพ เคมี และชีวภาพของตัวอย่างดินแอนตาร์กติก	54
4.1.1 ลักษณะสมบัติทางกายภาพและเคมีของตัวอย่างดินแอนตาร์กติก	54
4.1.2 ลักษณะสมบัติทางชีวภาพของตัวอย่างดินแอนตาร์กติก	55
4.1.2.1 จำนวนแบคทีเรียทั้งหมดและจำนวนแบคทีเรียย่อยสลายน้ำมันดีเซลใน ตัวอย่างดินแอนตาร์กติก	55
4.1.2.2 ยีนที่เกี่ยวข้องในการย่อยสลายน้ำมันดีเซลของตัวอย่างดินแอนตาร์กติก	55
4.2 แบคทีเรียที่มีบทบาทเกี่ยวข้องกับการย่อยสลายน้ำมันดีเซลในตัวอย่างดินแอนตาร์กติก ภายใต้อุณหภูมิต่ำ	56
4.2.1 การย่อยสลายน้ำมันดีเซลในตัวอย่างดินแอนตาร์กติกในระบบนิเวศจำลองดิน ภายใต้อุณหภูมิต่ำ	56
4.2.2 ลักษณะสมบัติของแบคทีเรียสายพันธุ์บริสุทธิ์ที่คัดแยกได้จากระบบนิเวศจำลองดิน	61
4.2.2.1 ชนิดของแบคทีเรียสายพันธุ์บริสุทธิ์ที่คัดแยกได้จากระบบนิเวศจำลองดิน ภายใต้อุณหภูมิต่ำ	61
4.2.2.2 ประสิทธิภาพการย่อยสลายองค์ประกอบของน้ำมันดีเซลของแบคทีเรีย ย่อยสลายน้ำมันดีเซลจากระบบนิเวศจำลองดิน	67
4.2.2.3 แนวโน้มในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพเบื้องต้นและความไม่ชอบน้ำ ของเซลล์	68
4.2.3 การเปลี่ยนแปลงไปของประชาคมแบคทีเรียในระบบนิเวศจำลองดินภายใต้อุณหภูมิ ต่ำ	70
4.2.3.1 การเปลี่ยนแปลงประชาคมแบคทีเรียในดินจากการวิเคราะห์ด้วยวิธี PCR- DGGE	70

4.2.3.2 ลักษณะและโครงสร้างประชาคมแบคทีเรียทั้งหมดจากการวิเคราะห์ลำดับเบสของแอมพลิคอนของยีน 16S rRNA	73
4.2.3.3 ลักษณะและโครงสร้างประชาคมแบคทีเรียทั้งหมดและยีนที่เกี่ยวข้องกับการทนเย็นและการย่อยสลายน้ำมันดีเซลจากการวิเคราะห์ด้วยวิธีซีออตกันเมตาจีโนมิกส์	79
4.2.3.3.1 โครงสร้างประชาคมแบคทีเรียทั้งหมดในระบบนิเวศจำลองดินแอนตาร์กติกภายใต้อุณหภูมิต่ำ	80
4.2.3.3.2 การวิเคราะห์ยีนที่เกี่ยวข้องกับการทนเย็นจากตัวอย่างดินแอนตาร์กติกในระบบนิเวศจำลองดิน	84
4.2.3.3.3 การวิเคราะห์ยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายน้ำมันดีเซลจากตัวอย่างดินแอนตาร์กติกในระบบนิเวศจำลองดิน	86
4.2.3.3.4 การวิเคราะห์ข้อมูลเมตาจีโนมิกส์ด้วยการวิเคราะห์ทางสถิติ	90
บทที่ 5 บทสรุปและข้อเสนอแนะ	96
บทสรุป	96
ข้อเสนอแนะ	98
รายการอ้างอิง	99
ภาคผนวก	115
ภาคผนวก ก สูตรและวิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ	115
ภาคผนวก ข สูตรและวิธีการเตรียมสารเคมี	117
ภาคผนวก ค กราฟ	123
ภาคผนวก ง ตารางผลการทดลอง	135
ภาคผนวก จ รูปเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส	149
ภาคผนวก ฉ ลำดับนิวคลีโอไทด์	150
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์	155

สารบัญตาราง

ตารางที่ 2.1	ความเป็นพิษของสารประกอบไฮโดรคาร์บอนแต่ละชนิด	10
ตารางที่ 2.2	ยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายสารปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนในน้ำมันดีเซล	19
ตารางที่ 2.3	ตัวอย่างแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายสารปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอน	21
ตารางที่ 2.4	ตัวอย่างแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายสารประกอบไฮโดรคาร์บอนภายใต้อุณหภูมิ ต่ำ.....	23
ตารางที่ 2.5	ตัวอย่างงานวิจัยที่ใช้วิธีการวิเคราะห์ลำดับเบสของแอมพลิคอนของยีน 16S rRNA จากสิ่งแวดล้อม	26
ตารางที่ 2.6	ตัวอย่างงานวิจัยที่ใช้วิธีซีอ์ตกันเมตาจีโนมิกส์ในการศึกษา	27
ตารางที่ 3.1	ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ที่ใช้ในการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์	32
ตารางที่ 3.2	ระบบนิเวศจำลองดินแอนตาร์กติกปนเปื้อนน้ำมันดีเซล	40
ตารางที่ 3.3	องค์ประกอบของพอลิอะคริลาไมด์เจล	47
ตารางที่ 3.4	แนวทางการเปรียบเทียบทางสถิติด้วยข้อมูลเมตาจีโนมิกส์ควบคู่กับการวิเคราะห์ ประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันดีเซลในระบบนิเวศจำลองดินแอนตาร์กติกภายใต้อุณหภูมิต่ำ	53
ตารางที่ 4.1	สมบัติทางกายภาพและเคมีของตัวอย่างดินแอนตาร์กติก	54
ตารางที่ 4.2	ยีนที่เกี่ยวข้องในการย่อยสลายน้ำมันดีเซลโดยใช้ 10 คู่ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน ย่อยสลายอะลิฟาติกไฮโดรคาร์บอน	56
ตารางที่ 4.3	การย่อยสลายน้ำมันดีเซลในระบบนิเวศจำลองดินแอนตาร์กติกภายใต้อุณหภูมิต่ำที่ เติมน้ำมันดีเซล 1% (น้ำหนัก/น้ำหนัก)	57
ตารางที่ 4.4	การย่อยสลายน้ำมันดีเซลในระบบนิเวศจำลองดินแอนตาร์กติกภายใต้อุณหภูมิต่ำที่ เติมน้ำมันดีเซล 3% (น้ำหนัก/น้ำหนัก)	58
ตารางที่ 4.5	ค่าคงที่อัตราเร็วปฏิกิริยาอันดับหนึ่งของการย่อยสลายน้ำมันดีเซลในระบบนิเวศ จำลองดินภายใต้อุณหภูมิต่ำ	61
ตารางที่ 4.6	แบคทีเรียสายพันธุ์บริสุทธิ์ที่สามารถย่อยสลายน้ำมันดีเซลจากการคัดแยกจากระบบ นิเวศจำลองดินแอนตาร์กติกภายใต้อุณหภูมิต่ำ	63

ตารางที่ 4.7 ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีน 16S rRNA ของสายพันธุ์ SP1	64
ตารางที่ 4.8 ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีน 16S rRNA ของสายพันธุ์ SP2	65
ตารางที่ 4.9 ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีน 16S rRNA ของสายพันธุ์ SP3	65
ตารางที่ 4.10 ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีน 16S rRNA ของสายพันธุ์ EN1	66
ตารางที่ 4.11 ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีน 16S rRNA ของสายพันธุ์ EN2	66
ตารางที่ 4.12 ผลการวิเคราะห์การเกิดไฮโดรโฟบิกกับเฮกซะเดคเคน ค่าแรงตึงผิว และค่าการเกิดอิมัลชันของแบคทีเรียสายพันธุ์บริสุทธิ์ทั้ง 5 สายพันธุ์.....	69
ตารางที่ 4.13 จำนวน sequence ที่อ่านได้จากการวิเคราะห์ลำดับเบสของแอมพลิคอนของยีน 16S rRNA ของตัวอย่างดินจากระบบนิเวศจำลองดินที่เติมน้ำมันดีเซล 1% (น้ำหนัก/น้ำหนัก).....	74
ตารางที่ 4.14 จำนวนเบส และ sequence ที่อ่านได้จากการวิเคราะห์ด้วยวิธีซีออตกันเมตาจีโนมิกส์ของตัวอย่างดินจากระบบนิเวศจำลองดิน	80
ตารางที่ 4.15 ยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายน้ำมันดีเซลจากการวิเคราะห์ด้วย MG-RAST จากฐานข้อมูล KEGG Orthology.....	90

สารบัญรูปภาพ

รูปที่ 2.1	อุณหภูมิมีผลต่อการเจริญของแบคทีเรีย	6
รูปที่ 2.2	การปรับตัวทางสรีรวิทยาของแบคทีเรียที่เจริญได้ที่อุณหภูมิต่ำ	7
รูปที่ 2.3	ลักษณะภูมิประเทศของทวีปแอนตาร์กติกา	8
รูปที่ 2.4	การย่อยสลายสารปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนโดยแบคทีเรียในสภาวะที่มีออกซิเจน	14
รูปที่ 2.5	วิธีการย่อยสลายอะลิฟาติกไฮโดรคาร์บอนในสภาวะที่มีออกซิเจน	15
รูปที่ 2.6	วิธีการย่อยสลายไซโคลอะลิฟาติกไฮโดรคาร์บอนในสภาวะที่มีออกซิเจน	16
รูปที่ 2.7	วิธีการย่อยสลายอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนในสภาวะที่มีออกซิเจน	16
รูปที่ 2.8	วิธีการย่อยสลายพอลิไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนในสภาวะที่มีออกซิเจน	18
รูปที่ 2.9	ภาพรวมของปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการบำบัดดินปนเปื้อนน้ำมัน	20
รูปที่ 2.10	ขั้นตอนการวิเคราะห์ลำดับเบสของแอมพลีคอนของยีน 16S rRNA	25
รูปที่ 3.1	การเก็บตัวอย่างดินแอนตาร์กติกา	34
รูปที่ 3.2	แผนที่บริเวณเก็บตัวอย่างดินแอนตาร์กติกา บริเวณภูเขาลังสถานีวิจัยเกรทวอลล์	34
รูปที่ 3.3	ระบบนิเวศจำลองดินแอนตาร์กติกาปนเปื้อนน้ำมันดีเซล	40
รูปที่ 4.1	การทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันดีเซลในระบบนิเวศจำลองดินแอนตาร์กติกาที่เติมน้ำมันดีเซล 1% (น้ำหนัก/น้ำหนัก)	58
รูปที่ 4.2	การทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันดีเซลในระบบนิเวศจำลองดินแอนตาร์กติกาที่เติมน้ำมันดีเซล 3% (น้ำหนัก/น้ำหนัก)	59
รูปที่ 4.3	ลักษณะการเปลี่ยนแปลงของอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MSM ภายหลังจากการย่อยสลายน้ำมันดีเซล 0.25% (ปริมาตร/ปริมาตร) ของแบคทีเรียสายพันธุ์บริสุทธิ์ SP1 SP2 และ SP3	62
รูปที่ 4.4	ลักษณะการเปลี่ยนแปลงของอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MSM ภายหลังจากการย่อยสลายน้ำมันดีเซล 0.25% (ปริมาตร/ปริมาตร) ของแบคทีเรียสายพันธุ์บริสุทธิ์ EN1 และ EN2	62
รูปที่ 4.5	ประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันดีเซล 0.25% (ปริมาตร/ปริมาตร) ฟีนานทริน 50 มิลลิกรัม/ลิตร เตตระเดเคน และเฮกซะเดเคน 500 มิลลิกรัม/ลิตร ของแบคทีเรียสายพันธุ์บริสุทธิ์ ทั้ง 5 สายพันธุ์	67

รูปที่ 4.6 โครงสร้างของประชาคมแบคทีเรียในระบบนิเวศจำลองดินที่เติมน้ำมันดีเซล 1% (น้ำหนัก/น้ำหนัก) ชุกการทดลอง natural attenuation	71
รูปที่ 4.7 โครงสร้างของประชาคมแบคทีเรียในระบบนิเวศจำลองดินที่เติมน้ำมันดีเซล 1% (น้ำหนัก/น้ำหนัก) ชุกการทดลอง biostimulation	72
รูปที่ 4.8 ผลการวิเคราะห์ลำดับเบสของแอมพลิคอนของยีน 16S rRNA ระดับคลาสในระบบนิเวศจำลองดินที่เติมน้ำมันดีเซล 1% (น้ำหนัก/น้ำหนัก) ในชุด natural attenuation.....	76
รูปที่ 4.9 ผลการวิเคราะห์ลำดับเบสของแอมพลิคอนของยีน 16S rRNA ระดับคลาสในระบบนิเวศจำลองดินที่เติมน้ำมันดีเซล 1% (น้ำหนัก/น้ำหนัก) ในชุด biostimulation.....	77
รูปที่ 4.10 ผลการวิเคราะห์ลำดับเบสของแอมพลิคอนของยีน 16S rRNA ระดับจีโนสในระบบนิเวศจำลองดินที่เติมน้ำมันดีเซล 1% (น้ำหนัก/น้ำหนัก) ในชุด natural attenuation.....	78
รูปที่ 4.11 ผลการวิเคราะห์ลำดับเบสของแอมพลิคอนของยีน 16S rRNA ระดับจีโนสในระบบนิเวศจำลองดินที่เติมน้ำมันดีเซล 1% (น้ำหนัก/น้ำหนัก) ในชุด biostimulation.....	79
รูปที่ 4.12 ผลการวิเคราะห์ด้วยวิธีซีดกันเมตาจีโนมิกส์ระดับคลาสในระบบนิเวศจำลองดินที่เติมน้ำมันดีเซล 1% (น้ำหนัก/น้ำหนัก)	82
รูปที่ 4.13 ผลการวิเคราะห์ด้วยวิธีซีดกันเมตาจีโนมิกส์ระดับคลาสในระบบนิเวศจำลองดินที่เติมน้ำมันดีเซล 3% (น้ำหนัก/น้ำหนัก)	83
รูปที่ 4.14 ยีนประมวลรหัสโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการทนเย็นจากตัวอย่างดินในระบบนิเวศจำลองดินแอนตาร์กติกภายใต้อุณหภูมิต่ำ	85
รูปที่ 4.15 ยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายน้ำมันดีเซล (แอลเคน 1-โมโนออกซิจีเนส)	87
รูปที่ 4.16 ยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายน้ำมันดีเซล (แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนส).....	88
รูปที่ 4.17 ยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายน้ำมันดีเซล (แอลดีไฮด์ดีไฮโดรจีเนส)	88
รูปที่ 4.18 ผลการวิเคราะห์ทางสถิติโดยเปรียบเทียบปัจจัยน้ำมันดีเซลต่อประชาคมแบคทีเรียในระบบนิเวศจำลองดินแอนตาร์กติกภายใต้อุณหภูมิต่ำ	91
รูปที่ 4.19 ผลการวิเคราะห์ทางสถิติโดยเปรียบเทียบปัจจัยความเข้มข้นของน้ำมันดีเซลต่อประชาคมแบคทีเรียในระบบนิเวศจำลองดินแอนตาร์กติกภายใต้อุณหภูมิต่ำ	92
รูปที่ 4.20 ผลการวิเคราะห์ทางสถิติโดยเปรียบเทียบปัจจัยสารอาหารต่อประชาคมแบคทีเรียในระบบนิเวศ จำลองดินแอนตาร์กติกภายใต้อุณหภูมิต่ำ	93

รูปที่ 4.21 ผลการวิเคราะห์ทางสถิติด้วยวิธีการวิเคราะห์องค์ประกอบหลัก (PCA) ของปัจจัย น้ำมันดีเซล	94
รูปที่ 4.22 ผลการวิเคราะห์ทางสถิติด้วยวิธีการวิเคราะห์องค์ประกอบหลัก (PCA) ของปัจจัย ความเข้มข้นน้ำมันดีเซล	94
รูปที่ 4.23 ผลการวิเคราะห์ทางสถิติด้วยวิธีการวิเคราะห์องค์ประกอบหลัก (PCA) ของปัจจัย สารอาหาร.....	95



บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

แบคทีเรียมีบทบาทสำคัญในสิ่งแวดล้อม โดยเป็นทั้งผู้ผลิต ผู้บริโภค และผู้ย่อยสลาย รวมทั้งมีบทบาทในการหมุนเวียนสารในระบบนิเวศและห่วงโซ่อาหาร ซึ่งบทบาทของแบคทีเรียขึ้นอยู่กับลักษณะของประชากรจุลินทรีย์ สภาพแวดล้อม และสารอินทรีย์ที่แบคทีเรียย่อยสลาย (Fenchel และคณะ, 2012) แบคทีเรียมีความหลากหลายทางชีวภาพมากกว่าพืชและสัตว์ เนื่องจากเป็นสิ่งมีชีวิตที่มีการวิวัฒนาการมาอย่างยาวนานและต่อเนื่อง ทำให้สามารถอาศัยอยู่ในสิ่งแวดล้อมที่หลากหลายได้ทั้งในน้ำ อากาศ และดิน รวมถึงสามารถดำรงชีวิตและเจริญได้ในสิ่งแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมกับสิ่งมีชีวิต เช่น แบคทีเรียที่ชอบอุณหภูมิต่ำเจริญได้ในสภาพแวดล้อมที่มีอุณหภูมิต่ำกว่า -5 องศาเซลเซียส (Boudouresque และคณะ, 2015) เช่น ในทวีปแอนตาร์กติกา ซึ่งปกคลุมด้วยน้ำแข็ง 99.6% ทิวทัศน์หิมะ มีอากาศที่หนาวเย็น รวมถึงฤดูกาลที่แปรปรวน โดยอุณหภูมิเฉลี่ยในฤดูร้อนอยู่ระหว่าง 0 องศาเซลเซียส ถึง -30 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิเฉลี่ยในฤดูหนาวอยู่ระหว่าง -15 องศาเซลเซียส ถึง -65 องศาเซลเซียส (Bockheim, 2015) ดังนั้นแบคทีเรียที่เจริญได้ในทวีปแอนตาร์กติกาจะเป็นแบคทีเรียที่ชอบอุณหภูมิต่ำหรือทนอุณหภูมิต่ำ ซึ่งอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเจริญคือ ≤ 15 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิสูงสุดที่แบคทีเรียเหล่านี้เจริญได้คือ ≤ 20 องศาเซลเซียส (D'Amico และคณะ, 2006)

แบคทีเรียที่พบบริเวณทวีปแอนตาร์กติกามีความสามารถในการปรับตัวให้เจริญได้ในอุณหภูมิต่ำ โดยผลิตกรดไขมันไม่อิ่มตัวเพื่อเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของเยื่อหุ้มเซลล์ ช่วยลดการเรียงตัวกันแน่นเมื่ออยู่ในสภาพแวดล้อมที่มีอุณหภูมิต่ำ (Chintalapati และคณะ, 2004) เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องในกระบวนการถอดรหัสและแปลรหัส รวมถึงเอนไซม์ที่ช่วยในการม้วนพับของโปรตีนก็มีการปรับตัวให้ทำงานได้ดีในอุณหภูมิต่ำ (Lim และคณะ, 2000) รวมทั้งมีการผลิตโปรตีนด้านการเยือกแข็งป้องกันไม่ให้เกิดผลึกน้ำแข็งที่แทงเซลล์ให้เกิดอันตราย และนอกจากนี้เอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ (exopolysaccharides) ยังมีบทบาทสำคัญในการป้องกันการเสียสภาพของโปรตีนอีกด้วย (Nichols และคณะ, 2005)

แบคทีเรียที่เจริญได้ในอุณหภูมิต่ำยังมีอีกหนึ่งบทบาทที่น่าสนใจ คือบทบาทในการย่อยสลายสารประกอบไฮโดรคาร์บอน เนื่องจากในทวีปแอนตาร์กติกามีการใช้น้ำมันเป็นแหล่งพลังงาน รวมถึงมีการปนเปื้อนจากกิจกรรมของมนุษย์ เช่น สถานีวิจัย การประมง การท่องเที่ยว ซึ่งกิจกรรมเหล่านี้ต้องอาศัยการขนส่ง ซึ่งใช้น้ำมันดีเซลเป็นแหล่งพลังงาน (Vázquez และคณะ, 2008) น้ำมันดีเซล

เป็นผลิตภัณฑ์เชื้อเพลิงที่ได้จากการกลั่นลำดับส่วนของน้ำมันดิบโดยให้ความร้อนในช่วงอุณหภูมิ 150-400 องศาเซลเซียส (Vendeuvre และคณะ, 2005) น้ำมันดีเซลเป็นสารประกอบไฮโดรคาร์บอน ซึ่งประกอบด้วย แอลเคน ได้แก่ อะลิฟาติกแอลเคน และไซโคลแอลเคน ประมาณ 71.7% และ อะโรมาติกประมาณ 28.3% (Tobias และคณะ, 2001) วิธีการบำบัดสิ่งแวดล้อมที่ปนเปื้อน สารประกอบไฮโดรคาร์บอนที่เหมาะสมกับทวีปแอนตาร์กติกา คือ วิธีการบำบัดสิ่งแวดล้อมด้วย กระบวนการทางชีวภาพโดยแบคทีเรีย ซึ่งมีความปลอดภัยต่อสิ่งแวดล้อม ต้นทุนต่ำ และไม่ก่อให้เกิด สารพิษตกค้าง (Chan, 2011)

อย่างไรก็ตามภายใต้สภาพแวดล้อมที่หนาวเย็นภายในทวีปแอนตาร์กติกาส่งผลให้ ประสิทธิภาพของการบำบัดสิ่งแวดล้อมที่ปนเปื้อนสารประกอบไฮโดรคาร์บอนด้วยกระบวนการทาง ชีวภาพลดต่ำลง (Coulon และคณะ, 2005) เนื่องจากปัจจัยด้านสิ่งแวดล้อม ได้แก่ ความผันผวน ของอุณหภูมิ โดยอุณหภูมิมีบทบาทสำคัญในการควบคุมวิเมแทบอลิซึมที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลาย สารประกอบไฮโดรคาร์บอนของแบคทีเรีย (Mohn และ Stewart, 2000) แม้ว่ากระบวนการย่อย สลายสารประกอบไฮโดรคาร์บอนของแบคทีเรียจะช้าลงที่อุณหภูมิต่ำ แต่หลายองค์ประกอบ ของ น้ำมันดีเซลก็สามารถถูกย่อยสลายได้โดยแบคทีเรียที่ชอบความเย็นและแบคทีเรียที่ทนความเย็น (Baraniecki และคณะ, 2002; Delille, 2000; Eckford และคณะ, 2002)

การใช้แบคทีเรียเพียงสายพันธุ์เดียวในการบำบัดสิ่งแวดล้อมที่ปนเปื้อนน้ำมันดีเซลใน สภาพแวดล้อมจริงเป็นไปได้ยาก เนื่องจากกระบวนการบำบัดสิ่งแวดล้อมด้วยกระบวนการทางชีวภาพ ขึ้นอยู่กับการทำงานร่วมกันของวิเมแทบอลิซึมที่เกี่ยวข้องในการย่อยสลายน้ำมันดีเซลของกลุ่ม แบคทีเรีย ซึ่งเป็นการเพิ่มประสิทธิภาพของกระบวนการย่อยสลาย (Janbandhu และ Fulekar, 2011) โดยแบคทีเรียต่างชนิดกันจะเข้าทำปฏิกิริยากับสารที่ปนเปื้อนในตำแหน่งที่แตกต่างกัน หรือใช้ สารตัวกลางที่เกิดจากแบคทีเรียสายพันธุ์อื่นเพื่อการย่อยสลายต่อไป นอกจากนี้ความหลากหลายของ ชนิดแบคทีเรียในกลุ่มแบคทีเรียทำให้สามารถเพิ่มการอยู่รอดได้มากยิ่งขึ้นในสิ่งแวดล้อมที่มีการ เปลี่ยนแปลงอยู่ตลอดเวลา ดังนั้นการใช้กลุ่มแบคทีเรียในการบำบัดสิ่งแวดล้อมที่ปนเปื้อนน้ำมันดีเซล จึงเป็นทางเลือกที่น่าสนใจ (He และคณะ, 2013) นอกจากนี้ชนิดของแบคทีเรียแล้ว ยังมีปัจจัยอื่น ๆ ที่มีผลต่อการย่อยสลายน้ำมันดีเซล เช่น การเติมสารอาหารเป็นอีกวิธีหนึ่งที่ทำให้การย่อยสลายน้ำมัน ดีเซลมีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น โดยแบคทีเรียต้องการสารอาหารเพื่อนำไปสร้างส่วนประกอบของ เซลล์และสร้างพลังงาน เนื่องจากดินในทวีปแอนตาร์กติกา มีสารอาหารน้อยมาก เมื่อมีน้ำมันปนเปื้อน ทำให้อัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจนต่อฟอสฟอรัสเปลี่ยนแปลงไปจากอัตราส่วน 100:10:1 ซึ่งเป็นอัตราส่วนที่ดีที่สุดในการย่อยสลายสารประกอบไฮโดรคาร์บอน (Ron และ Rosenberg, 2010) ความเข้มข้นของน้ำมันเป็นอีกปัจจัยที่มีผลต่อการย่อยสลายของแบคทีเรีย หากมีความเข้มข้น ของ น้ำมันมากเกินไป ส่งผลให้แบคทีเรียย่อยสลายน้ำมันได้ช้าลงและเกิดการสะสมสารมลพิษภายในเซลล์

ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงประชาคมแบคทีเรีย และเนื่องจากองค์ประกอบหลายชนิดในน้ำมันดีเซลย่อยสลายได้ยากและใช้เวลานาน แบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพอาจช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันดีเซล โดยทำหน้าที่เพิ่มความสามารถในการละลายของสารที่ละลายน้ำได้น้อย ทำให้องค์ประกอบของน้ำมันดีเซลสามารถขนส่งเข้าสู่เซลล์ได้อย่างรวดเร็ว (Lee และคณะ, 2006) และนอกจากนี้ ความชื้น ค่าความเป็นกรดต่าง และปริมาณออกซิเจนในดินจะช่วยส่งเสริมประสิทธิภาพในการย่อยสลายสารประกอบไฮโดรคาร์บอนที่ปนเปื้อนในดินให้สมบูรณ์และรวดเร็วยิ่งขึ้น ดังนั้นการศึกษาความสัมพันธ์ของปัจจัยทางสิ่งแวดล้อม การปรับตัวของแบคทีเรียและบทบาทต่าง ๆ ของแบคทีเรียจึงมีความสำคัญ

อย่างไรก็ตามงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายน้ำมันดีเซลด้วยแบคทีเรียภายใต้อุณหภูมิต่ำในปัจจุบันยังมีไม่มากนัก รวมถึงยังขาดความเข้าใจในความสัมพันธ์ของแบคทีเรียและบทบาทการทำงานร่วมกันของแบคทีเรียเพื่อย่อยสลายน้ำมันดีเซล จากเหตุผลดังกล่าวงานวิจัยนี้จึงมุ่งเน้นการศึกษบทบาทและความสัมพันธ์ของแบคทีเรียที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายน้ำมันดีเซลในดินแอนตาร์กติกภายใต้อุณหภูมิต่ำ โดยศึกษาประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันดีเซลที่ความเข้มข้นแตกต่างกันของแบคทีเรียประจำถิ่นในระบบนิเวศจำลองดินแอนตาร์กติกภายใต้อุณหภูมิต่ำ ควบคู่กับการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของประชาคมแบคทีเรียในระบบนิเวศจำลองดิน โดยศึกษาทั้ง 2 วิธี คือวิธีการที่อาศัยการเพาะเลี้ยง ได้แก่ คัดแยกและระบุชนิดแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันดีเซลจากระบบนิเวศจำลองดิน รวมทั้งทดสอบความสามารถในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพเบื้องต้น และทดสอบความสามารถในการย่อยสลายองค์ประกอบของน้ำมันดีเซล และวิธีการที่ไม่อาศัยการเพาะเลี้ยง ได้แก่ ศึกษาโครงสร้างประชาคมแบคทีเรียเด่นด้วยวิธี polymerase chain reaction-denaturing gradient gel electrophoresis (PCR-DGGE) วิเคราะห์ลำดับเบสของแอมพลิคอนของยีน 16S rRNA และติดตามการเปลี่ยนแปลงของแบคทีเรียและยีนต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายน้ำมันดีเซลด้วยเทคนิคซีออตกันเมตาจีโนมิกส์ เพื่อนำข้อมูลที่ได้ไปใช้ในการบำบัดและฟื้นฟูสิ่งแวดล้อมที่มีอุณหภูมิต่ำอย่างมีประสิทธิภาพในอนาคตต่อไป

1.2 วัตถุประสงค์

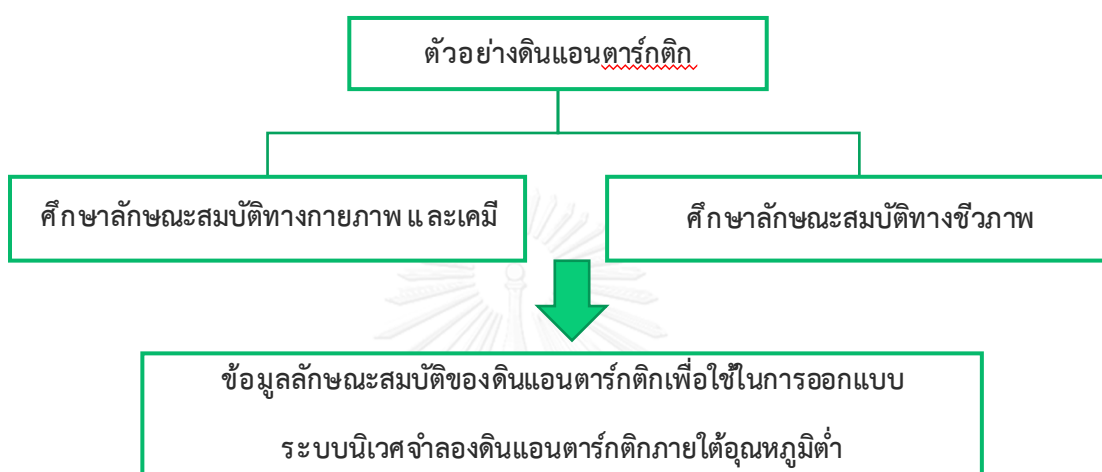
- 1) ทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันดีเซลของแบคทีเรียประจำถิ่นในดินแอนตาร์กติกภายใต้อุณหภูมิต่ำ
- 2) ศึกษาบทบาทของแบคทีเรียที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายน้ำมันดีเซลในดินแอนตาร์กติกภายใต้อุณหภูมิต่ำ

1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

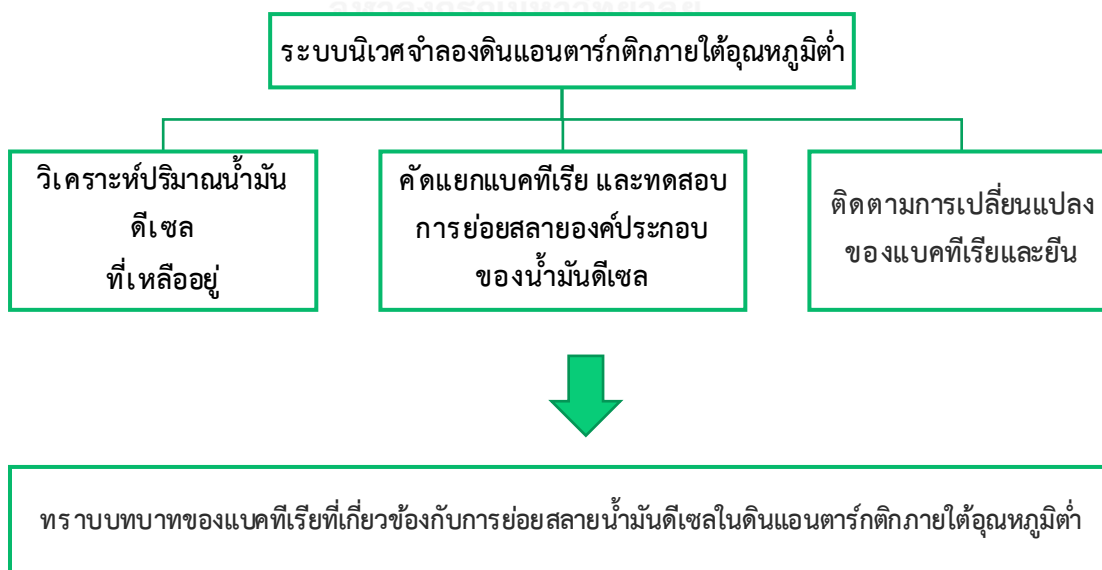
ทราบบทบาทของแบคทีเรียที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายน้ำมันดีเซลและนำไปปรับปรุงเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการบำบัดสิ่งแวดล้อมที่ปนเปื้อนน้ำมันดีเซลภายใต้อุณหภูมิต่ำ

1.4 ภาพรวมของงานวิจัย

ส่วนที่ 1 : ศึกษาลักษณะสมบัติทางกายภาพ เคมี และชีวภาพของดินแอนตาร์กติก



ส่วนที่ 2 : ศึกษาบทบาทของแบคทีเรียที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายน้ำมันดีเซลในดินแอนตาร์กติกภายใต้อุณหภูมิต่ำ



บทที่ 2

บททวนวรรณกรรมและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

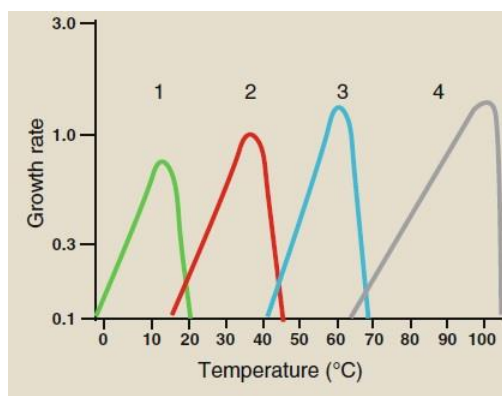
2.1 แบคทีเรียในสิ่งแวดล้อม

แบคทีเรียมีบทบาทสำคัญในสิ่งแวดล้อม โดยเป็นทั้งผู้ผลิต ผู้บริโภค และผู้ย่อยสลาย และมีส่วนร่วมในทุกขั้นตอนการเปลี่ยนแปลงของสารอินทรีย์และธาตุอาหาร (Fenchel และคณะ, 2012) แบคทีเรียจึงเป็นส่วนสำคัญในห่วงโซ่อาหาร แม้ในกรณีที่ไม่มีพืชหรือสัตว์ในสิ่งแวดล้อมก็ยังสามารถดำเนินกิจกรรมต่อไปได้ บทบาทของแบคทีเรียขึ้นอยู่กับลักษณะประชากรแบคทีเรีย สภาพแวดล้อม และสารอินทรีย์ที่แบคทีเรียย่อยสลาย แบคทีเรียอาศัยอยู่ในสิ่งแวดล้อมที่เปลี่ยนแปลงอย่างต่อเนื่องและหลากหลาย เช่น น้ำ อากาศ ดิน รวมถึงสามารถดำรงชีวิตและเจริญอยู่ได้ในสิ่งแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมกับสิ่งมีชีวิตชนิดอื่นหรือไม่มีสิ่งมีชีวิตอื่นอาศัยอยู่ได้ เช่น แบคทีเรียที่ชอบอุณหภูมิต่ำเจริญได้ในสภาวะที่มีอุณหภูมิต่ำกว่า -5 องศาเซลเซียส เช่น บริเวณขั้วโลก แบคทีเรียที่ชอบอุณหภูมิสูงเจริญได้ในสภาวะที่มีอุณหภูมิสูงกว่า 105 องศาเซลเซียส เช่น บริเวณภูเขาไฟ แบคทีเรียที่ชอบความเค็มเจริญได้ในสภาวะที่มีสารละลายเกลือถึงจุดอิ่มตัว แบคทีเรียที่ชอบกรดเจริญได้ในสภาวะที่มีความเป็นกรดสูง แบคทีเรียที่ชอบด่างเจริญได้ในสภาวะที่มีความเป็นด่างสูง หรือแม้แต่ในแหล่งที่มีระดับกัมมันตภาพรังสีสูงจนเป็นอันตรายต่อสิ่งมีชีวิตอื่น ก็ยังมีแบคทีเรียที่ทนกัมมันตภาพรังสี เช่น *Deinococcus* sp. อาศัยอยู่ได้ ด้วยเหตุผลนี้แบคทีเรียจึงต้องปรับตัว โดยเปลี่ยนแปลงลักษณะทางสัณฐานวิทยา วิถีเมแทบอลิซึม และสรีรวิทยา ซึ่งเป็นการพัฒนากลไกการทำงานของเซลล์ให้มีความซับซ้อน สามารถปกป้องและซ่อมแซมตัวเองเพื่อรับมือกับการเปลี่ยนแปลงเหล่านี้ (Bertrand และคณะ, 2015)

2.2 แบคทีเรียที่เจริญได้ที่อุณหภูมิต่ำ

อุณหภูมิเป็นหนึ่งในปัจจัยสำคัญที่มีอิทธิพลต่อการเจริญและการอยู่รอดของแบคทีเรีย ภายใต้อุณหภูมิต่ำแบคทีเรียต้องเผชิญกับหลายข้อจำกัด เช่น สมบัติการเป็นของไหลของเยื่อหุ้มเซลล์ที่ลดลง อัตราการเกิดปฏิกิริยาเอนไซม์ลดลง และการรักษาเสถียรภาพของโครงสร้างเป็นผลให้ประสิทธิภาพของกระบวนการถอดรหัสและแปลรหัสลดลง เมื่ออุณหภูมิลดต่ำลง การทำงานของเซลล์ยังคงดำเนินต่อไปที่เยื่อหุ้มเซลล์ยังคงมีสถานะเป็นของไหล เมื่ออุณหภูมิลดต่ำลงมากทำให้เยื่อหุ้มเซลล์แข็งตัวขัดขวางการขนส่งสารอาหาร กระบวนการหายใจ รวมถึงการสร้างพลังงาน อย่างไรก็ตามในสภาวะที่อุณหภูมิต่ำสำหรับโปรคาริโอตแล้ว เซลล์จะไม่ถูกทำลายแต่จะสามารถดำรงอยู่ในสภาวะพักตัว โดยแบคทีเรียที่เจริญได้ที่อุณหภูมิต่ำเรียกว่า ไสโครไฟล์ (psychrophile)

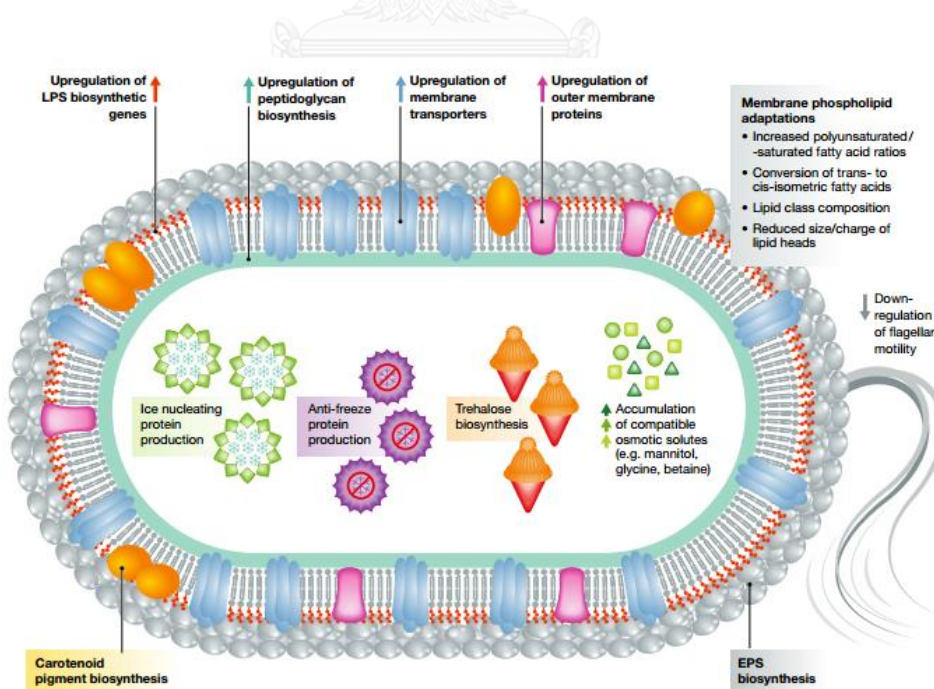
สามารถเจริญได้ดีในช่วงอุณหภูมิ 6-15 องศาเซลเซียส ดังรูปที่ 2.1 และแบคทีเรียที่ทนต่ออุณหภูมิต่ำ เรียกว่า ไฮโครโทเลอแรนท์ (psychrotolerant) สามารถทนต่ออุณหภูมิต่ำกว่า 0 องศาเซลเซียสได้ และเจริญได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 20-25 องศาเซลเซียส (D'Amico และคณะ, 2006; De Maayer และคณะ, 2014)



รูปที่ 2.1 อุณหภูมิมีผลต่อการเจริญของแบคทีเรีย; 1 psychrophile, 2 mesophile, 3 thermophile, 4 extreme thermophile (Normand และคณะ, 2015)

แบคทีเรียที่ชอบอุณหภูมิต่ำจะมีช่วงอุณหภูมิในการทำงานของเอนไซม์ที่แตกต่างจากแบคทีเรียปกติ โดยเอนไซม์จะทำงานได้สูงที่สุดในช่วง 15-25 องศาเซลเซียส และจะเสียสภาพเมื่ออุณหภูมิสูงกว่า 25 องศาเซลเซียส เช่น เอนไซม์มาเลตดีไฮโดรจีเนส (malate dehydrogenase) เอนไซม์แลคเตตดีไฮโดรจีเนส (lactate dehydrogenase) เอนไซม์ซักซิเนตดีไฮโดรจีเนส (succinate dehydrogenase) เอนไซม์เฮกโซไคเนส (hexokinase) เอนไซม์แอลโดเลส (aldolase) และเอนไซม์ฟอสโฟกลูโคสไอโซเมอเรส (phosphoglucose isomerase) ซึ่งเอนไซม์เหล่านี้สามารถปรับให้เข้ากับอุณหภูมิต่ำโดยเปลี่ยนแปลงโครงสร้างให้มีกรดอะมิโนที่มีขั้วมากขึ้น เพื่อเพิ่มความยืดหยุ่น ส่วนโครงสร้างทุติยภูมิจะมีการปรับเปลี่ยนสัดส่วนโครงสร้างแบบเกลียวให้สูงขึ้น และโครงสร้างแบบแผ่นให้ลดลงเพื่อลดความแข็งแรงของเอนไซม์ที่อุณหภูมิต่ำ รวมทั้งยังมีสัดส่วนของกรดไขมันไม่อิ่มตัวในเยื่อหุ้มเซลล์สูง เนื่องจากพันธะคู่ของกรดไขมันไม่อิ่มตัวจะช่วยลดการเรียงตัวกันแน่นและทำให้เยื่อหุ้มเซลล์ยังคงสมบัติการเป็นของไหลเมื่ออยู่ในอุณหภูมิต่ำ ในขณะที่แบคทีเรียทั่วไปจะมีกรดไขมันอิ่มตัวมาก ทำให้เยื่อหุ้มเซลล์กลายเป็นแว็กซ์ (wax) และไม่สามารถทำงานได้ในอุณหภูมิต่ำ และเนื่องจากสัดส่วนของกรดไขมันไม่อิ่มตัวในแบคทีเรียที่ชอบอุณหภูมิต่ำมีมาก ทำให้เกิดความแปรปรวนของเยื่อหุ้มเซลล์ที่อุณหภูมิห้องจนเกิดการรั่วซึมของสารโมเลกุลขนาดใหญ่ออกนอกเซลล์ ดังนั้นแบคทีเรียที่ชอบอุณหภูมิต่ำจึงไม่เหมาะสำหรับการเจริญในอุณหภูมิห้อง (Lim และคณะ, 2000) นอกจากนี้ยังพบยีนประมวลรหัส cold-shock proteins (CSPs) ซึ่งควบคุมกระบวนการต่าง ๆ

ของเซลล์ เช่น กระบวนการถอดรหัส แปลรหัส การหมุนพับโปรตีน และควบคุมความเป็นของไหลของเยื่อหุ้มเซลล์ (Phadtare, 2004) ในจีโนมของแบคทีเรียที่เจริญได้ที่อุณหภูมิต่ำ เช่น *Desulfotalea psychrophila* และ *Pseudoalteromonas haloplanktis* (Feller, 2013) โดยจะผลิตในระยะ lag phase เพื่อปรับตัวต่อความเครียดและลดผลกระทบเมื่ออุณหภูมิลดต่ำลง เมื่ออุณหภูมิลดต่ำลงมากจนน้ำแข็งก่อตัวขึ้น ทำให้เซลล์เกิดออสโมติกช็อก (osmotic shock) และขาดน้ำ แบคทีเรียบางชนิดสามารถทนต่อการแช่แข็งได้ เนื่องจากมี nucleating protein ช่วยในการตกผลึกน้ำแข็งที่อุณหภูมิต่ำกว่าจุดเยือกแข็งของน้ำ โดยจะหลั่งออกมาภายนอกเซลล์ ทำงานร่วมกับโปรตีนต้านการเยือกแข็ง (antifreeze protein) ที่จะจับกับผลึกน้ำแข็งไม่ให้ขยายตัวทิ่มแทงเซลล์ให้เป็นอันตราย (D'Amico และคณะ, 2006) นอกจากนี้เอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ (exopolysaccharide) ที่แบคทีเรียผลิตออกมา ยังมีส่วนช่วยให้แบคทีเรียอยู่รอดได้ในสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม (Nichols และคณะ, 2005) โดยส่วนใหญ่จะผลิตจากแบคทีเรียที่เจริญได้ที่อุณหภูมิต่ำ เช่น *Alteromonas*, *Pseudoalteromonas*, *Shewanella* และ *Vibrio* โดยมีรายงานว่าแบคทีเรียที่เจริญได้ที่อุณหภูมิต่ำ *Pseudoalteromonas* ผลิตเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์เพิ่มขึ้นเมื่ออุณหภูมิต่ำกว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเจริญของแบคทีเรียชนิดนี้ ดังนั้นเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์อาจมีบทบาทในการป้องกันการเยือกแข็ง (cryoprotection) ในสิ่งแวดล้อมที่หนาวเย็น (D'Amico และคณะ, 2006) โดยแบคทีเรียที่เจริญได้ที่อุณหภูมิต่ำจะมีการปรับตัวทางสรีรวิทยาดังรูปที่ 2.2



รูปที่ 2.2 การปรับตัวทางสรีรวิทยาของแบคทีเรียที่เจริญได้ที่อุณหภูมิต่ำ

(De Maayer และคณะ, 2014)

2.3 ทวีปแอนตาร์กติกา

ทวีปแอนตาร์กติกาเป็นทวีปที่หนาวเย็นที่สุดในโลก มีลักษณะภูมิประเทศปกคลุมไปด้วยน้ำแข็ง โดยมีแผ่นน้ำแข็งปกคลุม 99.6% ทั่วทั้งทวีป ดังรูปที่ 2.3 โดยอุณหภูมิในฤดูร้อนอยู่ระหว่าง 0 ถึง -30 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิในฤดูหนาวอยู่ระหว่าง -15 ถึง -65 องศาเซลเซียส (Cassano, 2013) นอกจากนี้ทวีปแอนตาร์กติกายังเป็นทวีปที่มีกระแสลมแรง ส่งผลให้อุณหภูมิภายในทวีปมีความผันผวน และเนื่องจากอุณหภูมิต่ำมากทำให้เกิดความแห้งแล้ง โดยมีปริมาณน้ำฝนเฉลี่ยเพียง 100 มิลลิเมตร/ปี ผลกระทบของการเปลี่ยนแปลงสภาพภูมิอากาศในทวีปแอนตาร์กติกาจะมีผลโดยตรงต่อโลก โดยมีรายงานว่ามีการละลายอย่างรวดเร็วของหิมะและน้ำแข็งเพิ่มมากขึ้นในทุก ๆ ปี ส่งผลให้ระดับน้ำทะเลสูงขึ้น (Dodds, 2012) นอกจากนี้สารอาหารในดินแอนตาร์กติกามีปริมาณน้อย โดยมีคาร์บอนและไนโตรเจนต่ำกว่า 2% และค่าความเป็นกรดต่างอยู่ในช่วง 6-9 (Bockheim, 2015)

สภาพแวดล้อมทางชีวภาพของทวีปแอนตาร์กติกาประกอบด้วยสองระบบนิเวศที่แตกต่างกันมาก ได้แก่ ระบบนิเวศบก (น้ำจืด ทะเลสาบ และแม่น้ำ) และระบบนิเวศทางทะเล โดยพืชและจุลินทรีย์จะกระจายตัวอยู่บริเวณพื้นดินที่ไม่ถูกปกคลุมด้วยน้ำแข็งบริเวณใกล้ชายฝั่ง ซึ่งมีความหนาแน่นของประชากรสิ่งมีชีวิตต่ำ ส่วนสิ่งมีชีวิตทางทะเลจะกระจายตัวอยู่ทั่วไปและมีความหนาแน่นของประชากรสิ่งมีชีวิตสูง เช่น แมวน้ำ นกทะเล ซึ่งอาศัยอยู่ได้ทั้งบนบกและในทะเล เนื่องจากความหนาแน่นของประชากรสิ่งมีชีวิตสูง และมีความซับซ้อนของระบบนิเวศ ทำให้ผลกระทบจากกิจกรรมของมนุษย์ส่งผลต่อระบบนิเวศทางทะเลมากกว่าระบบนิเวศบก (Convey และ Stevens, 2007)



รูปที่ 2.3 ลักษณะภูมิประเทศของทวีปแอนตาร์กติกา

(Cook และ Storey, 2015)

ทวีปแอนตาร์กติกา มีแร่ธาตุและน้ำมันที่อุดมสมบูรณ์ ทำให้เหล่านานาประเทศพยายามเข้ามาครอบครองเพื่อเก็งกำไร แต่กิจกรรมทางทรัพยากรแร่ยังเป็นสิ่งต้องห้ามในปัจจุบันเนื่องจากพิธีสารคุ้มครองสิ่งแวดล้อมสนธิสัญญาแอนตาร์กติก โดยดินแดนหลายส่วนในทวีปถูกประเทศต่าง ๆ อ้างกรรมสิทธิ์ครอบครอง เช่น ประเทศอาร์เจนตินา ชิลี ออสเตรเลีย นิวซีแลนด์ สหราชอาณาจักร เป็นต้น และมีศูนย์วิจัยของประเทศต่าง ๆ ตั้งอยู่มากมายกว่า 20 ประเทศ จำนวน 60 แห่ง รวมถึงมีกิจกรรมการท่องเที่ยว ซึ่งทำให้เกิดการปนเปื้อนน้ำมันภายในทวีปแอนตาร์กติกา ส่งผลกระทบต่อสิ่งมีชีวิตที่อาศัยอยู่ในทวีป (Liggett และคณะ, 2015)

2.3.1 การรั่วไหลและปนเปื้อนของน้ำมันในทวีปแอนตาร์กติกา

การรั่วไหลของน้ำมันเป็นปัญหาสิ่งแวดล้อมที่สำคัญในทวีปแอนตาร์กติกา เนื่องจากน้ำมันเป็นเชื้อเพลิงที่ใช้กันโดยทั่วไปสำหรับผู้ประกอบการในระดับชาติและเชิงพาณิชย์ โดยกิจกรรมของผู้ประกอบการส่งผลให้เกิดการรั่วไหลของน้ำมันจากอุบัติเหตุทั้งทางบกและทางทะเล (Baraniecki และคณะ, 2002)

เหตุการณ์น้ำมันรั่วไหลในทวีปแอนตาร์กติกาและบริเวณใกล้เคียงเกิดขึ้นหลายเหตุการณ์ เช่น ในปี ค.ศ. 1978 เรือ Amoca Cadiz ของประเทศฝรั่งเศสล่มบริเวณใกล้ชายฝั่งแม็กซิโก ส่งผลให้น้ำมันดิบกว่า 22 ล้านบาร์เรลรั่วไหลลงสู่มหาสมุทรแอนตาร์กติก (Gundlach และคณะ, 1983) และในปี ค.ศ. 2007 เรือ M/S Explorer ชนแผ่นน้ำแข็งลุ่มบริเวณ Bransfield Strait ส่งผลให้น้ำมันดีเซล 178 ลูกบาศก์เมตร น้ำมันเตา 24 ลูกบาศก์เมตร และแก๊สโซลีน 1,200 ลิตร รั่วไหลลงสู่มหาสมุทรแอนตาร์กติก (Liggett และคณะ, 2011)

นอกจากการรั่วไหลของน้ำมันแล้ว การเข้าออกของประชากรภายในและนอกทวีป การใช้เครื่องจักรที่จำเป็นต่อการดำรงชีวิต กิจกรรมการท่องเที่ยวภายในทวีป และการพัฒนาจากพื้นที่ใกล้เคียงที่มีการตั้งถิ่นฐานก็มีความเสี่ยงในการปนเปื้อนน้ำมันอีกด้วย

2.3.2 การปนเปื้อนของน้ำมันในดินแอนตาร์กติก

เนื่องจากมีกิจกรรมที่ต้องใช้น้ำมันเป็นแหล่งพลังงานภายในทวีปแอนตาร์กติกา ทำให้มีการปนเปื้อนน้ำมันในดินเกิดขึ้น โดยน้ำมันมีการกระจายตัวในดินอย่างไม่สม่ำเสมอ อาจถูกดูดซับกับอนุภาคดินทำให้แบคทีเรียในธรรมชาติเข้าถึงได้ยาก ดังนั้นจึงทำให้น้ำมันตกค้างในดินเป็นเวลานาน การปนเปื้อนของน้ำมันในทวีปแอนตาร์กติกาจึงมักพบได้ในดิน โดย Vázquez และคณะ (2008) ได้เก็บตัวอย่างดินที่ปนเปื้อนน้ำมันดีเซลบริเวณสถานีวิจัยจูเบนี อาร์เจนตินา ทวีปแอนตาร์กติกา พบว่ามีน้ำมันดีเซลปนเปื้อนอยู่ 6 มิลลิกรัม/กรัม น้ำหนักดินแห้ง และพบว่าการปนเปื้อนน่าจะมาจากถังเก็บเชื้อเพลิงของสถานีวิจัย Dias และคณะ (2012) ได้เก็บตัวอย่างดินปนเปื้อนน้ำมันดีเซลบริเวณ

สถานีวิจัยคาร์ลีนี ทวีปแอนตาร์กติกา พบว่ามีน้ำมันดีเซลปนเปื้อนอยู่ 10,336 มิลลิกรัม/กิโลกรัม น้ำหนักดินแห้ง และ Delille และ Coulon (2008) ได้เก็บตัวอย่างดินปนเปื้อนน้ำมันดีเซลบริเวณ Kerguelen Archipelago ทวีปแอนตาร์กติกา พบว่ามีน้ำมันดีเซลปนเปื้อนอยู่ 49 มิลลิกรัม/กรัม น้ำหนักดินแห้ง ซึ่งพบว่าการปนเปื้อนน้ำมันในแต่ละพื้นที่จะมีความเข้มข้นของน้ำมันที่แตกต่างกัน ขึ้นอยู่กับกิจกรรมในแต่ละพื้นที่

2.3.3 น้ำมันดีเซล

จากเหตุการณ์ปนเปื้อนน้ำมันในทวีปแอนตาร์กติกา จะเห็นว่าน้ำมันดีเซลเป็นเชื้อเพลิงหลัก ในทวีปแอนตาร์กติกา โดยน้ำมันดีเซลเป็นผลิตภัณฑ์เชื้อเพลิงที่ได้จากการกลั่นลำดับส่วนของ น้ำมันดิบโดยให้ความร้อนในช่วงอุณหภูมิ 150-400 องศาเซลเซียส (Vendeuvre และคณะ, 2005) น้ำมันดีเซลเป็นสารประกอบไฮโดรคาร์บอนที่มีจำนวนอะตอม 10-25 อะตอม ซึ่งประกอบด้วย แอลเคน ได้แก่ อะลิฟาติกแอลเคน (พาราฟิน) และไซโคลแอลเคน (แนฟทีน) ประมาณ 71.7% และอะโรมาติกประมาณ 28.3% (Tobias และคณะ, 2001)

น้ำมันดีเซลส่งผลกระทบต่อสุขภาพทั้งเฉียบพลันและเรื้อรัง ซึ่งระดับความอันตรายต่อสุขภาพขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของน้ำมันดีเซล การแพร่กระจายของคราบน้ำมัน การตกตะกอนน้ำมัน และระยะเวลาที่น้ำมันตกค้าง (Philp และคณะ, 2005) โดยน้ำมันดีเซลประกอบด้วยสารประกอบไฮโดรคาร์บอนหลากหลายชนิดซึ่งมีความเป็นพิษที่แตกต่างกัน ดังแสดงในตารางที่ 2.1

ตารางที่ 2.1 ความเป็นพิษของสารประกอบไฮโดรคาร์บอนแต่ละชนิด

ชนิดของไฮโดรคาร์บอน	ความเป็นพิษ
ไฮโดรคาร์บอนอิ่มตัว - ออกเทน เพนเทน เป็นต้น	ทำให้ระคายเคืองเยื่อจมูก ผิวหนัง และตา
ไฮโดรคาร์บอนไม่อิ่มตัว - เอทิลีน โพรพิลีน เป็นต้น	ไม่มีพิษเฉียบพลันหากได้รับในปริมาณที่ต่ำกว่า 31,000 ppm ก่อระบบประสาทส่วนกลาง ทำลายตับไต และเลือด
อะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน - เบนซีน โทลูอิน เป็นต้น	ทำให้ระคายเคืองระบบหายใจ ตา และผิวหนัง มีผลต่อหัวใจ คลื่นไส้ โลหิตจาง
พอลิไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน - น้ำหนักโมเลกุลต่ำ ได้แก่ แนฟทาลีน - น้ำหนักโมเลกุลสูง ได้แก่ ไพรีน	เป็นพิษเฉียบพลันทำให้ระคายเคืองผิวหนัง และตา ปวดศีรษะ ก่อมะเร็งก่ออวัยวะ

ที่มา: กรมควบคุมมลพิษ (2553)

2.4 การบำบัดสิ่งแวดล้อมภายในทวีปแอนตาร์กติกาที่ปนเปื้อนน้ำมันโดยทางชีวภาพ

การปนเปื้อนน้ำมันในทวีปแอนตาร์กติกาถือเป็นปัญหาสำคัญ และหากเลือกใช้วิธีการบำบัดสิ่งแวดล้อมที่ปนเปื้อนน้ำมันไม่เหมาะสม อาจยังส่งผลกระทบต่อสิ่งมีชีวิตและสิ่งแวดล้อมได้ เนื่องจากทวีปแอนตาร์กติกามีข้อจำกัดมากมาย ความห่างไกลทำให้การนำเข้าของเครื่องมือที่ใช้ในการบำบัดเป็นไปได้ยาก ยิ่งไปกว่านั้นสิ่งมีชีวิตต่างถิ่นยังถูกห้ามนำเข้าตามสนธิสัญญาแอนตาร์กติกา (Beeby, 1991) ดังนั้นวิธีบำบัดทางชีวภาพจึงเป็นวิธีที่เหมาะสมที่สุดสำหรับทวีปแอนตาร์กติกา

วิธีการบำบัดทางชีวภาพเป็นวิธีที่ใช้สิ่งมีชีวิตเช่น แบคทีเรีย รา ยีสต์ และสาหร่าย ในการย่อยสลายสารประกอบไฮโดรคาร์บอน โดยสิ่งมีชีวิตเหล่านี้จะใช้สารประกอบไฮโดรคาร์บอนในกระบวนการเมแทบอลิซึม ส่งผลให้สารประกอบไฮโดรคาร์บอนมีความเป็นพิษน้อยลงหรือหมดความเป็นพิษไป โดยสามารถแบ่งออกได้ 3 วิธี ได้แก่ การบำบัดสิ่งแวดล้อมที่ปนเปื้อนสารมลพิษตามธรรมชาติ (natural attenuation) การบำบัดสิ่งแวดล้อมที่ปนเปื้อนสารมลพิษโดยการกระตุ้นทางชีวภาพ (biostimulation) และการเติมจุลินทรีย์เพื่อบำบัดสารมลพิษในสิ่งแวดล้อม (bioaugmentation) (Dash และ Das, 2014)

2.4.1 การบำบัดสิ่งแวดล้อมที่ปนเปื้อนสารมลพิษตามธรรมชาติ

การบำบัดสิ่งแวดล้อมที่ปนเปื้อนสารมลพิษตามธรรมชาติเป็นกระบวนการที่เกิดขึ้นได้เองตามธรรมชาติในพื้นที่ที่มีการปนเปื้อนสารมลพิษ โดยมีกระบวนการย่อยสลายทางชีวภาพโดยจุลินทรีย์ในสิ่งแวดล้อม ทำให้ความเป็นพิษของสารมลพิษลดลงหรือหมดไป

จากรายงานของ Stallwood และคณะ (2005) ได้ศึกษาการย่อยสลายน้ำมันดีเซลความเข้มข้น 1% (น้ำหนัก/น้ำหนักดินแห้ง) โดยใช้ดินที่เก็บจากเกาะชิกนี ทวีปแอนตาร์กติกา บ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส วิเคราะห์ผลด้วย Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS) เมื่อเวลาผ่านไป 18 สัปดาห์ พบว่าสามารถย่อยสลายไพเทนได้ 30% จากการทดลองสรุปได้ว่าน้ำมันดีเซลมีการดูดซับกับดินในช่วงแรก หลังจากผ่านไป 4 สัปดาห์ แบคทีเรียประจำถิ่นจึงปรับตัวเข้าย่อยสลายน้ำมันดีเซลได้

Ruberto และคณะ (2003) ได้ศึกษาการย่อยสลายน้ำมันดีเซลความเข้มข้น 1.5% (น้ำหนัก/น้ำหนัก น้ำหนักดินแห้ง) โดยใช้ดินที่เก็บจากสถานีวิจัยจูเบนี ทวีปแอนตาร์กติกา บ่มที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส เมื่อเวลาผ่านไป 51 วัน พบว่าสามารถย่อยสลายน้ำมันดีเซลได้ 35% เมื่อเปรียบเทียบกับชุด abiotic control

2.4.2 การบำบัดสิ่งแวดล้อมที่ปนเปื้อนสารมลพิษโดยการกระตุ้นทางชีวภาพ

การบำบัดสิ่งแวดล้อมที่ปนเปื้อนสารมลพิษโดยการกระตุ้นทางชีวภาพ คือการเติมสารอาหารที่เหมาะสม ได้แก่ น้ำ สารอาหาร หรือออกซิเจนลงไปในพื้นที่ที่ปนเปื้อนสารมลพิษ เพื่อกระตุ้นให้จุลินทรีย์ในธรรมชาติเจริญได้อย่างเหมาะสม สร้างพลังงานและเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับวิถีเมแทบอลิซึมในการย่อยสลายสารมลพิษ จากรายงานของ Wu และคณะ (2016) ได้ศึกษาวิธีการบำบัดแบบ bioaugmentation และ biostimulation ที่มีต่อการย่อยสลายสารปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนในระบบนิเวศจำลองดิน ในชุดการทดลอง bioaugmentation เป็นชุดที่เติม *Acinetobacter* SZ-1 สายพันธุ์ KF453955 ซึ่งคัดแยกมาจากดินที่ได้รับการปนเปื้อนสารปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอน ส่วนชุดการทดลอง biostimulation เป็นชุดที่เติมสารอาหารโดยใช้ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ และ KH_2PO_4 ในการปรับอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนต่อฟอสฟอรัสให้เท่ากับ 100:10:1 บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นระยะเวลา 10 สัปดาห์ พบว่าวิธี bioaugmentation และ biostimulation สามารถเพิ่มการย่อยสลายสารปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนได้ 34% และ 60% ตามลำดับ ภายหลัง 6 สัปดาห์

Ruberto และคณะ (2009) ได้ศึกษาการย่อยสลายน้ำมันดีเซล 2% (ปริมาตร/ปริมาตร) โดยสร้างระบบนิเวศจำลองดิน 2.5 กิโลกรัม และเติมสารอาหารคือ NH_4Cl 13.4% (น้ำหนัก/ปริมาตร) และ Na_2HPO_4 3.13% (น้ำหนัก/ปริมาตร) โดยปรับอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนต่อฟอสฟอรัสให้เท่ากับ 100:12.9:2.6 บ่มที่อุณหภูมิปกติของทวีปแอนตาร์กติกา เมื่อเวลาผ่านไป 45 วัน พบว่าในชุดที่เติมสารอาหารมีความเข้มข้นของน้ำมันดีเซลลดลง 81% เมื่อเปรียบเทียบกับชุดที่ไม่ได้เติมสารอาหารพบว่าความเข้มข้นของน้ำมันดีเซลลดลงเพียง 61% จากการทดลองดังกล่าวสามารถสรุปได้ว่า ชนิดและความเข้มข้นของสารอาหารมีบทบาทสำคัญในการกระตุ้นการย่อยสลายน้ำมันดีเซล ดังนั้นวิธีการบำบัดสิ่งแวดล้อมที่ปนเปื้อนน้ำมันดีเซลโดยการกระตุ้นทางชีวภาพร่วมกับการเติมสารอาหารที่เหมาะสม สามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการบำบัดดินที่ปนเปื้อนน้ำมันดีเซลได้

2.4.3 การเติมจุลินทรีย์เพื่อบำบัดสิ่งแวดล้อมที่ปนเปื้อนสารมลพิษ

การเติมจุลินทรีย์เพื่อบำบัดสิ่งแวดล้อมที่ปนเปื้อนสารมลพิษคือการเติมจุลินทรีย์สายพันธุ์บริสุทธิ์หรือกลุ่มจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการย่อยสลายสารมลพิษลงไปในพื้นที่ที่มีการปนเปื้อน เพื่อให้สารมลพิษมีความเป็นพิษน้อยลงหรือสะสมในจุลินทรีย์ (Mrozik และ Piotrowska-Seget, 2010)

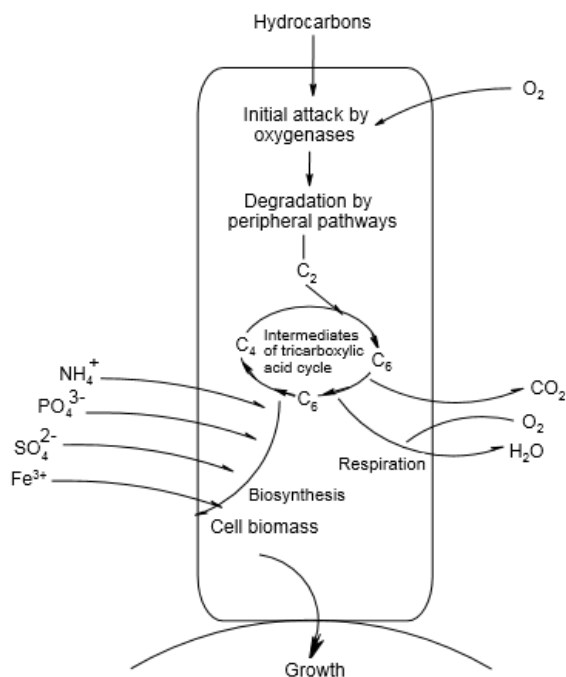
Ruberto และคณะ (2010) ได้ศึกษาการย่อยสลายสารปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอน 9566.1 มิลลิกรัม/กิโลกรัม ในระบบนิเวศจำลองดิน 20 กรัม ซึ่งเก็บมาจากสถานีวิจัยจูเบนี ทวีปแอนตาร์กติกา ที่มีรายงานว่ามีการปนเปื้อนน้ำมันดีเซลมาเป็นเวลานาน โดยเติมกลุ่มแบคทีเรีย M10 ซึ่งมีแบคทีเรียเด่นอยู่ในแฟมิลี Pseudomonadaceae คัดแยกได้จากดินที่ปนเปื้อนน้ำมันดีเซลปริมาณ 6

และ 9 log CFU/กรัม บ่มที่อุณหภูมิปกติของทวีปแอนตาร์กติกา ซึ่งมีการผันผวนตลอดเวลา พบว่าเมื่อเวลาผ่านไป 60 วัน สารบีโตรีเลียมไฮโดรคาร์บอนในชุดที่เติมกลุ่มแบคทีเรีย M10 ปริมาณ 6 log CFU/กรัม และ 9 log CFU/กรัม ลดลง 50% และ 57% ตามลำดับ และสารบีโตรีเลียมไฮโดรคาร์บอนในชุดที่ไม่ได้เติมกลุ่มแบคทีเรียลดลงเพียง 15% จากการทดลองดังกล่าวสรุปได้ว่าการเติมกลุ่มแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลายน้ำมันดีเซลสามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการบำบัดดินที่ปนเปื้อนน้ำมันดีเซลได้มากกว่าแบคทีเรียประจำถิ่น

2.5 กลไกและวิถีเมแทบอลิซึมในการย่อยสลายน้ำมันดีเซลโดยแบคทีเรีย

การบำบัดสิ่งแวดล้อมที่ปนเปื้อนสารมลพิษด้วยกระบวนการทางชีวภาพโดยอาศัยความสามารถของแบคทีเรีย จำเป็นจะต้องผ่านกระบวนการและอาศัยการทำงานของเอนไซม์ต่าง ๆ ในการย่อยสลายและเปลี่ยนแปลงสารมลพิษให้มีความซับซ้อนน้อยลง และช่วยในการเข้าจับกับโมเลกุลของสารมลพิษ ซึ่งแบคทีเรียแต่ละชนิดจะสร้างเอนไซม์ที่แตกต่างกัน และใช้คาร์บอนเป็นแหล่งพลังงานที่แตกต่างกัน ส่งผลให้เกิดวิถีการย่อยสลายที่หลากหลาย โดยการย่อยสลายน้ำมันดีเซลที่เกิดขึ้นได้อย่างสมบูรณ์ส่วนใหญ่จะเป็นการย่อยสลายในสถานะที่มีออกซิเจน ดังนั้นออกซิเจนจึงเป็นปัจจัยหนึ่งที่มีความสำคัญในวิถีการย่อยสลายน้ำมันดีเซล

โดยเริ่มต้นสารมลพิษจะเกิดกระบวนการออกซิเดชันกับออกซิเจน โดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์ออกซิจีเนส และเข้าสู่วิถีเมแทบอลิซึมที่จำเพาะต่อสารนั้น ๆ เกิดสารมัธยันต์ของกระบวนการย่อยสลายโดยวิถีเมแทบอลิซึมหลัก เช่น Tricarboxylic acid cycle (TCA cycle) และเกิดกระบวนการสังเคราะห์ทางชีวภาพของเซลล์ (biosynthesis) จากสารตั้งต้นที่มาจากวิถีเมแทบอลิซึมหลัก เช่น อะซิติลโคเอ ซัคซิเนท (Acetyl-CoA Succinate) และ ไพรูเวท (Pyruvate) ดังรูปที่ 2.4



รูปที่ 2.4 การย่อยสลายสารปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนโดยแบคทีเรียในสภาวะที่มีออกซิเจน

(Olajire และ Essien, 2014)

2.5.1 วิธีการย่อยสลายสารประกอบไฮโดรคาร์บอนในน้ำมันดิเซล

น้ำมันดิเซลเป็นสารประกอบไฮโดรคาร์บอนประกอบด้วย อะลิฟาติก ไชโคลอะลิฟาติก อะโรมาติก และพอลิไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน ซึ่งเป็นสารมวลโมเลกุลขนาดเล็กและขนาดใหญ่ วิธีการย่อยสลายจึงมีความแตกต่างกันเพื่อให้จำเพาะต่อสารมลพิษเป้าหมาย ได้แก่ วิธีการย่อยสลายอะลิฟาติกไฮโดรคาร์บอน วิธีการย่อยสลายไซโคลอะลิฟาติกไฮโดรคาร์บอน วิธีการย่อยสลายอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน และวิธีการย่อยสลายพอลิไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน

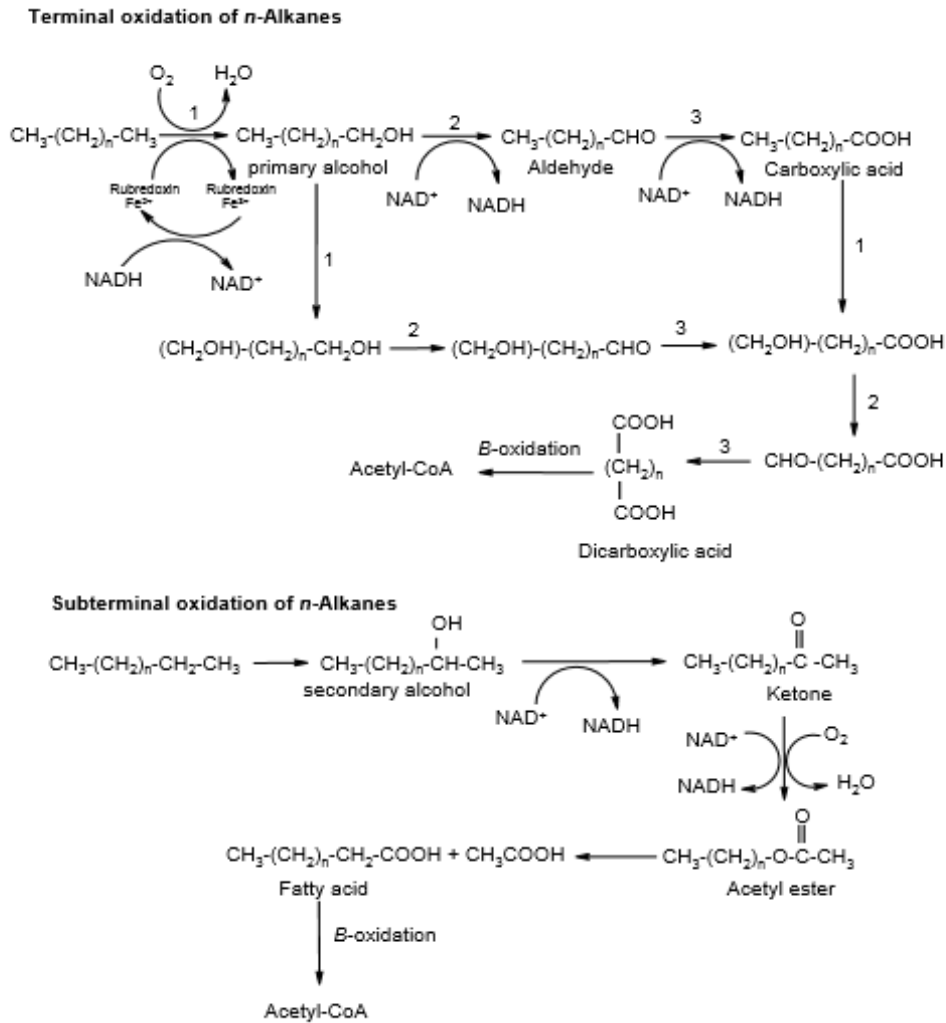
2.5.1.1 วิธีการย่อยสลายอะลิฟาติกไฮโดรคาร์บอน

แอลเคนสายสั้นที่มีโครงสร้างต่ำกว่า C_9 จะสามารถระเหยออกไปได้บางส่วน แอลเคนสายกลาง C_{10} - C_{24} จะเกิดการย่อยสลายได้ 2 ทางคือ

1) ที่ตำแหน่งปลาย (terminal) โดยเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันด้วยเอนไซม์แอลเคนโมโนออกซิจีเนส ได้ผลิตภัณฑ์เป็นแอลกอฮอล์ปฐมภูมิ จากนั้นแอลกอฮอล์ไฮโดรจีเนสจะออกซิไดซ์ได้แอลดีไฮด์ และถูกออกซิไดซ์ด้วยแอลดีไฮด์ไฮโดรจีเนสได้กรดไขมัน และเข้าสู่วัฏจักรออกซิเดชัน (β -oxidation cycle) ต่อไป

2) ที่ตำแหน่งถัดจากปลาย (subterminal) แอลเคนถูกออกซิไดซ์เป็นแอลกอฮอล์ทุติยภูมิ และถูกออกซิไดซ์ต่อเป็นเมทิลคีโตน (methylketone) และอะซิติลเอสเทอร์ (acetyl ester)

ตามลำดับ และจะถูกไฮโดรไลซ์โดยเอนไซม์เอสเทอร์เรสได้สาร 2 ตัว คือแอลกอฮอล์ปฐมภูมิและอะซิเตท เข้าสู่วิถีเบต้าออกซิเดชัน (β -oxidation cycle) ต่อไป (Fritsche และ Hofrichter, 2008) ดังรูปที่ 2.5



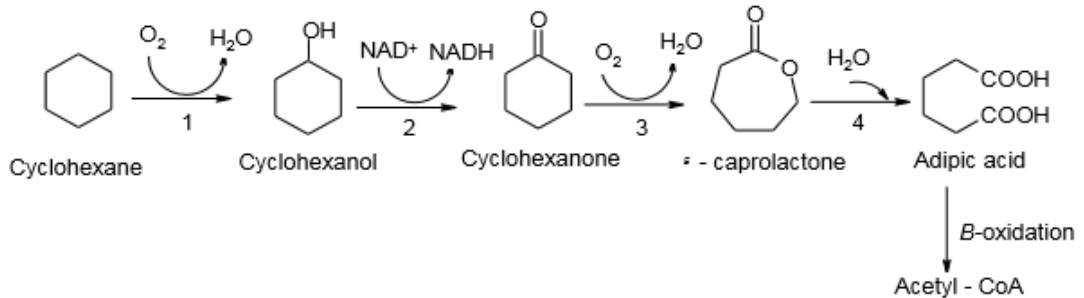
รูปที่ 2.5 วิธีการย่อยสลายอะลิฟาติกไฮโดรคาร์บอนในสภาวะที่มีออกซิเจน

1 = alkane monooxygenase 2 = fatty alcohol dehydrogenase และ 3 = fatty aldehyde dehydrogenase (Olajire และ Essien, 2014)

2.5.1.2 วิธีการย่อยสลายไซโคลอะลิฟาติกไฮโดรคาร์บอน

ไซโคลอะลิฟาติกจะถูกออกซิไดซ์ด้วยเอนไซม์ไซโคลเฮกเซนโมโนออกซิจีเนสได้ไซโคลเฮกซานอล จากนั้นเอนไซม์ไซโคลเฮกซานอลดีไฮโดรจีเนสเข้าทำปฏิกิริยาเปลี่ยนเป็นไซโคลเฮกซานอน และเอนไซม์ไซโคลเฮกซานอนโมโนออกซิจีเนสเข้าทำปฏิกิริยาได้คาโพรแลคโตน ซึ่งถูกไฮโดรไลซ์ด้วย

คาโพรแลคโตนไฮโดรเลสได้ผลิตภัณฑ์เป็นกรดอะดิค (adipic acid) เข้าสู่วิถีเบต้าออกซิเดชัน (β -oxidation cycle) ดังรูปที่ 2.6



รูปที่ 2.6 วิธีการย่อยสลายไซโคลอะลิฟาติกไฮโดรคาร์บอนในสภาวะที่มีออกซิเจน

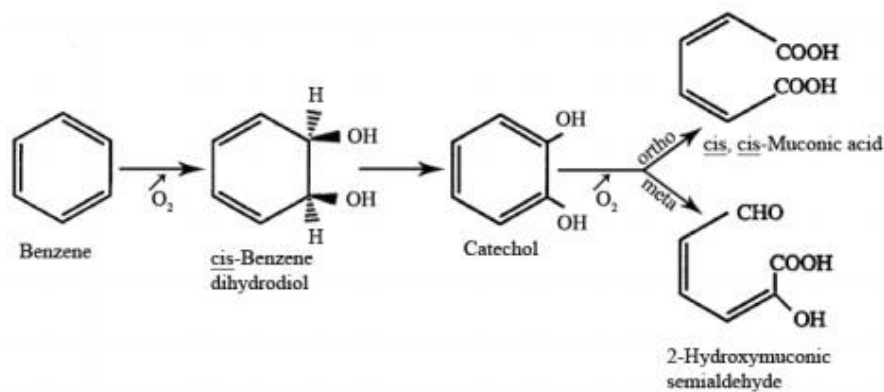
1 = cyclohexane monooxygenase 2 = cyclohexanol dehydrogenase

3 = cyclohexanone monooxygenase 4 = ϵ -caprolactone hydrolase

(Olajire และ Essien, 2014)

2.5.1.3 วิธีการย่อยสลายอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน

วิธีการย่อยสลายอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนในสภาวะที่มีออกซิเจน ขั้นแรกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนถูกออกซิไดซ์โดยเอนไซม์ไดออกซิจีเนส ได้ ซิส-ไดไฮไดรไดออล (cis-dihydrodiol) จากนั้นเอนไซม์ดีไฮโดรจีเนสจะมาเปลี่ยนเป็นคาทีคอล (catechol) จากนั้นคาทีคอลจะเข้าสู่กระบวนการแตกวงของอะโรมาติกได้ 2 แบบคือ การแตกวงแบบออโธ (ortho-cleavage) และการแตกวงแบบเมตา (meta-cleavage) ได้ผลิตภัณฑ์เป็นอะลิฟาติกเพื่อเข้าสู่ TCA cycle ต่อไป ดังรูปที่ 2.7

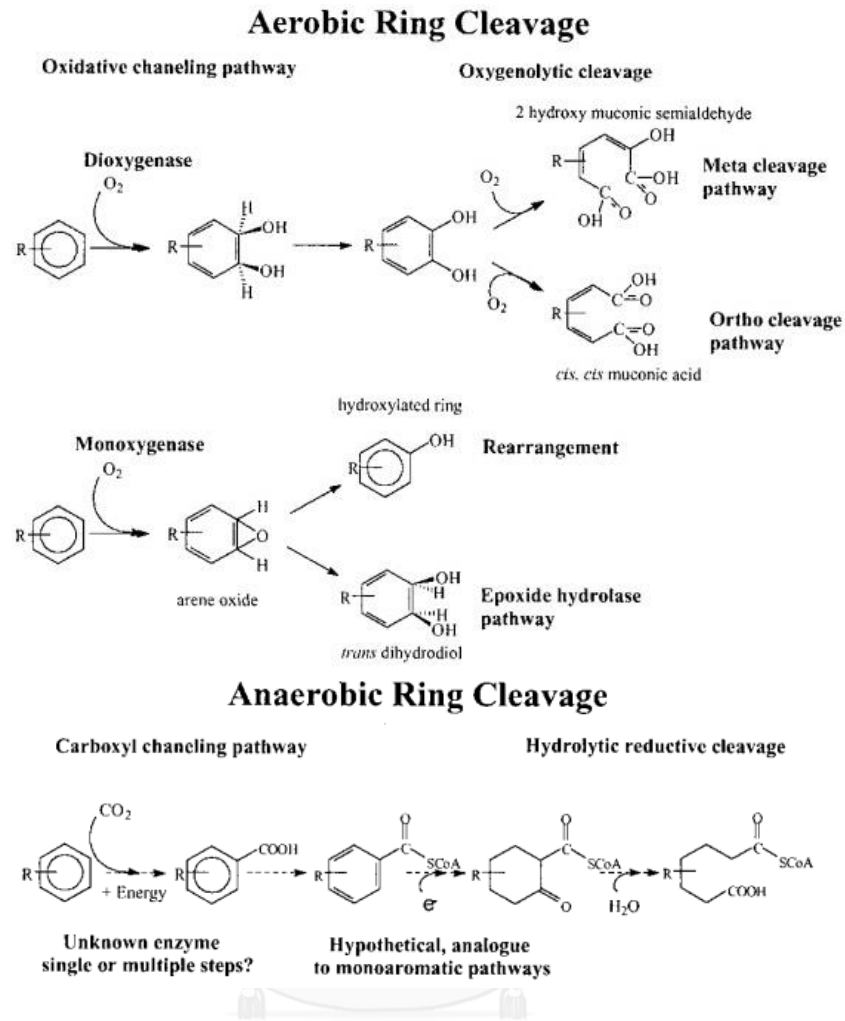


รูปที่ 2.7 วิธีการย่อยสลายอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนในสภาวะที่มีออกซิเจน

(Leja และ Lewandowicz, 2010)

2.5.1.4 วิธีการย่อยสลายพอลิไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน

แบคทีเรียสามารถย่อยสลายพอลิไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนได้ทั้งสภาวะที่มีและไม่มีออกซิเจน ด้วยวิธีการย่อยสลายที่แตกต่างกัน (รูปที่ 2.8) กลไกการย่อยสลายพอลิไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนของแบคทีเรียในสภาวะที่มีออกซิเจนเริ่มจากปฏิกิริยาไฮดรอกซิเลชัน (hydroxylation) โดยอาศัยระบบเอนไซม์ไดออกซิจีเนส (aromatic ring hydroxylating dioxygenase; ARHD หรือ RHD) เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาเติมออกซิเจน 2 อะตอม ให้กับโมเลกุลคาร์บอนที่เป็นพันธะคู่ในวงอะโรมาติกได้ผลิตภัณฑ์เป็น *ซิส*-ไดไฮโดรไดออล (*cis*-dihydrodiol) แล้วถูกออกซิไดซ์ด้วยเอนไซม์ดีไฮโดรจีเนส (dehydrogenase) ในปฏิกิริยารีดักชัน (reduction) เกิดผลิตภัณฑ์เป็นสารตัวกลางที่มีหมู่ไฮดรอกซิล 2 หมู่ (PAHs dihydroxy derivatives) ที่คล้ายคาทีคอล (catechol) ซึ่งจะเป็นสารตั้งต้นเพื่อเข้าสู่กระบวนการแตกวงอะโรมาติก โดยเติมออกซิเจน 2 โมเลกุลผ่านทางวิธีการแตกวงแบบออโธหรือเมตา วิธีการแตกวงแบบออโธ (*ortho* cleavage pathway) จะเกิดการแตกวงระหว่างคาร์บอน 2 อะตอมที่มีหมู่ไฮดรอกซิลด้วยเอนไซม์อินตราไดออลไดออกซิจีเนส (intradiol dioxygenase) หรือเอนไซม์แคทีคอล-1,2-ไดออกซิจีเนส (catechol-1,2 dioxygenase) ได้ผลิตภัณฑ์เป็น *ซิส,ซิส* กรดมุโคนิก (*cis, cis* muconic acid) ที่มีหมู่คาร์บอกซิลิก 2 หมู่ ซึ่งจะถูกเปลี่ยนรูปเป็นมุโคนแลคโตน (muconolactone) ด้วยเอนไซม์มุโคนไซโคลไอโซเมอเรส (muconate cycloisomerase) แล้วเปลี่ยนพันธะคู่กลายเป็นออกโซอะดิเพตอินอลแลคโตน (3-oxoadipate-enol-lactone) ด้วยเอนไซม์มุโคนแลคโตนไอโซเมอเรส (muconolactone isomerase) แล้วผ่านกระบวนการต่าง ๆ จนถึงขั้นสุดท้าย จะได้ผลิตภัณฑ์เป็นอะเซทิลโคเอ (acetyl-CoA) และซักซินิลโคเอ (succinyl-CoA) ในขณะที่วิธีการแตกวงแบบเมตา (*meta* cleavage pathway) จะเกิดการแตกวงระหว่างคาร์บอน 2 อะตอมที่ตำแหน่งอื่นด้วยเอนไซม์เอ็กซ์ตราไดออลไดออกซิจีเนส (extradiol dioxygenase) หรือเอนไซม์คาทีคอล-2,3-ไดออกซิจีเนส (catechol-2,3-dioxygenase) ได้ผลิตภัณฑ์เป็นไฮดรอกซีมุโคนิกเซมิอัลดีไฮด์ (2-hydroxy muconic semialdehyde) ที่มีหมู่คาร์บอกซิลิกเพียง 1 หมู่ ซึ่งจะสามารถผ่านกระบวนการแตกวงโดยอาศัยเอนไซม์แอลโดเลส (aldolase) เกิดเป็นไพรูเวท (pyruvate) และสารตัวกลางของ PAHs ที่มีจำนวนวงอะโรมาติกลดลง 1 วง เมื่อผ่านกระบวนการแตกวงจนถึงขั้นสุดท้ายจะได้ผลิตภัณฑ์เป็นไพรูเวทและอะซีทัลดีไฮด์ (acetaldehyde) จากนั้นผลิตภัณฑ์สุดท้ายของการแตกวงอะโรมาติกทั้งสองแบบจะเข้าสู่วัฏจักรกรดไตรคาร์บอกซิลิกต่อไป (Baboshin และ Golovleva, 2012; Habe และ Omori, 2003; Peng และคณะ, 2008)



รูปที่ 2.8 วิธีการย่อยสลายพอลิไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนในสภาวะที่มีออกซิเจน และไม่มีออกซิเจน (Makkar และ Rockne, 2003)

2.6 ยีนที่เกี่ยวข้องในการย่อยสลายสารปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนในน้ำมันดีเซล

เนื่องจากองค์ประกอบหลักในน้ำมันดีเซลมากกว่า 70% คือแอลเคน ดังนั้นแอลเคนไฮดรอกซิเลส หรือแอลเคนโมนอกออกซิจีเนสจึงเป็นเอนไซม์ที่มีความสำคัญ และพบได้ในแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลายแอลเคน โดยยีนประมวลรหัสการสร้างเอนไซม์แอลเคนไฮดรอกซิเลส มีหลายกลุ่ม ได้แก่ ยีน *alkB* ซึ่งเกี่ยวข้องกับการย่อยสลายแอลเคนที่มีคาร์บอน 5–16 อะตอม ยีน *alkM* เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายแอลเคนที่มีคาร์บอนมากกว่า 12 อะตอม (Kohnno และคณะ, 2002) นอกจากนี้ยังมียีน *CYP153* ซึ่งสังเคราะห์ไซโตโครม พี450 แอลเคนไฮดรอกซิเลส (cytochrome P450 alkane hydroxylase) เกี่ยวข้องในการย่อยสลายแอลเคนที่มีคาร์บอน 8–16 อะตอม (van Beilen และคณะ, 2006) โดยสรุปได้ดังตารางที่ 2.2

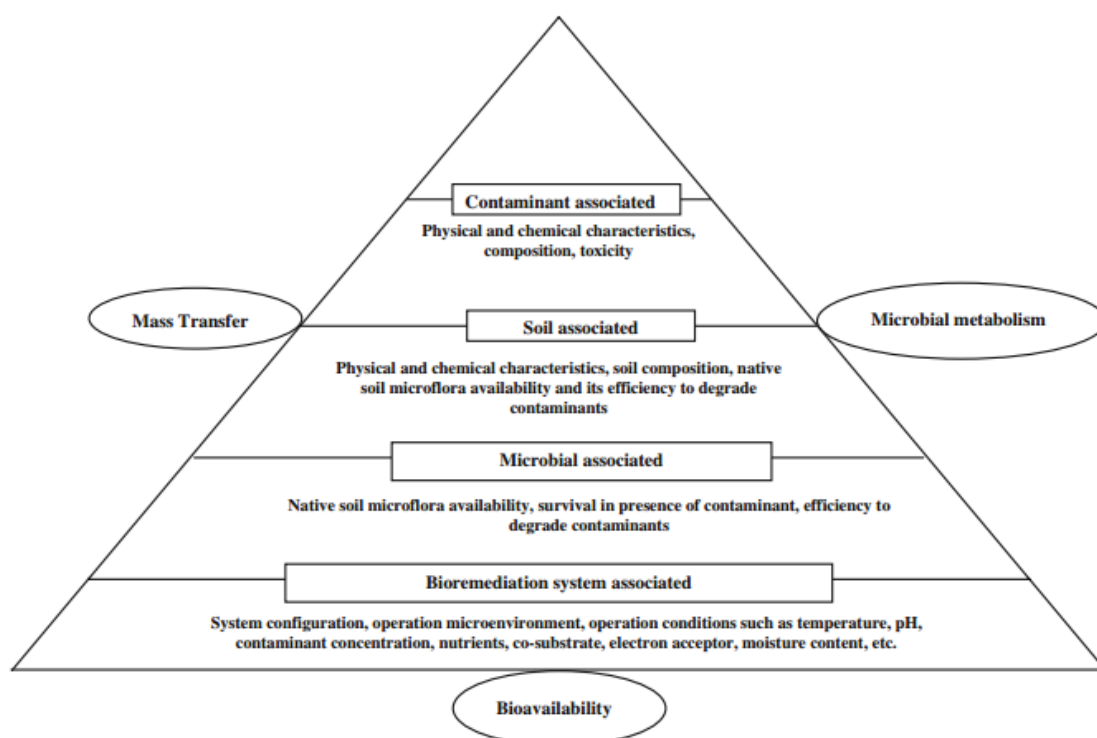
ตารางที่ 2.2 ยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายสารปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนในน้ำมันดีเซล

ยีน	เอนไซม์	จำเพาะต่อจำนวนคาร์บอน	อ้างอิง
<i>alkB</i>		5-16	Kohno และคณะ (2002)
<i>alkB1</i>	แอลเคนโมนอกซีจีเนส	12-26 ไซ่กิ่ง	Liu และคณะ (2011); Whyte และคณะ (2002)
<i>alkB2</i>		12-26	
<i>alkM</i>	แอลเคนโมนอกซีจีเนส	มากกว่า 12	Kohno และคณะ (2002)
<i>CYP153</i>	ไซโตโครม พี450 แอลเคนไฮดรอกซีเลส	8-16	van Beilen และคณะ (2006)
<i>almA</i>	Flavin-binding monooxygenase	22-36	(Liu และคณะ, 2011)

Whyte และคณะ (2002) ได้ศึกษาความโดดเด่นของยีนแอลเคนโมนอกซีจีเนสในดินที่มีการปนเปื้อนสารประกอบไฮโดรคาร์บอน และดินที่ไม่มีการปนเปื้อนบริเวณทวีปอาร์กติกและทวีปแอนตาร์กติกา โดยวิธีโคลนนิ่งไฮบริดเซชันและวิธีพีซีอาร์ไฮบริดเซชัน โดยใช้คู่มือที่จำเพาะกับยีน *alk* จีโนไทป์ต่าง ๆ ดังนี้ *Pseudomonas putida* GPo1, Pp *alkB*; *Rhodococcus* sp. Q15, Rh *alkB1* และ Rh *alkB2*; และ *Acinetobacter* sp. ADP-1, Ac *alkM* จากวิธีพีซีอาร์ไฮบริดเซชันพบว่าพบยีน *alkB* ของ *Rhodococcus* sp. Q15 ในดินที่ปนเปื้อนสารประกอบไฮโดรคาร์บอนมากกว่าดินที่ไม่มีการปนเปื้อนเล็กน้อย และพบยีน Pp *alkB* ในดินที่ปนเปื้อนสารประกอบไฮโดรคาร์บอนมากกว่าดินที่ไม่มีการปนเปื้อนจำนวนมาก ส่วนยีน Ac *alkM* ตรวจพบในดินน้อยมาก และจากวิธีโคลนนิ่งไฮบริดเซชันโดยเพาะเลี้ยงในอุณหภูมิที่แตกต่างกันคือ 5 และ 37 องศาเซลเซียส พบว่าเมื่อเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส พบยีน Rh *alkB* ในสัดส่วนที่สูงมาก ตามด้วย Pp *alkB* และ Ac *alkM* ตามลำดับ และพบว่าจีโนไทป์ของยีน Rh *alkB1* พบมากอย่างชัดเจนในแบคทีเรียที่เจริญที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส เมื่อเปรียบเทียบกับแบคทีเรียที่เจริญที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ดังนั้นจึงสรุปได้ว่า *Acinetobacter* spp. ไม่ใช่แบคทีเรียเด่นในประชาคมแบคทีเรียที่ย่อยสลายแอลเคนในสิ่งแวดล้อม ส่วน *Pseudomonas* spp. น่าจะถูกเพิ่มจำนวนขึ้นในดินสิ่งแวดล้อมเมื่อเกิดเหตุการณ์ปนเปื้อนน้ำมัน และ *Rhodococcus* spp. อาจเป็นแบคทีเรียเด่นที่สามารถย่อยสลายแอลเคนได้ทั้งในดินที่ไม่มีการปนเปื้อนและในดินสิ่งแวดล้อมที่มีการปนเปื้อนสารประกอบไฮโดรคาร์บอนอีกด้วย

2.7 ปัจจัยที่ส่งผลต่อการบำบัดสิ่งแวดล้อมที่ปนเปื้อนน้ำมันโดยวิธีทางชีวภาพ

การบำบัดสิ่งแวดล้อมที่ปนเปื้อนน้ำมันด้วยวิธีทางชีวภาพที่มีประสิทธิภาพขึ้นอยู่กับหลายปัจจัย เช่น ชนิดของปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอน ความเข้มข้น อุณหภูมิ สารอาหาร ความสามารถในการย่อยสลายของแบคทีเรีย ลักษณะประชาคมแบคทีเรีย ลักษณะของดิน ซึ่งแต่ละปัจจัยมีผลกระทบต่ออัตราการถ่ายเทมวลสาร และวิธีการย่อยสลายสารพิษของแบคทีเรีย ดังรูปที่ 2.9



รูปที่ 2.9 ภาพรวมของปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการบำบัดดินปนเปื้อนน้ำมัน (Mohan และคณะ, 2006)

2.7.1 ลักษณะของแบคทีเรียย่อยสลายน้ำมันด้วยวิธีทางชีวภาพ

2.7.1.1 ชนิดของแบคทีเรีย

แบคทีเรียหลายชนิดถูกคัดแยกได้จากสิ่งแวดล้อมที่มีการปนเปื้อนน้ำมัน โดยแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายสารปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอน จัดเป็นปัจจัยสำคัญในการกำจัดสารปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนที่ปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อม และจากงานวิจัยจำนวนมากได้คัดแยกแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายสารปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนจากสิ่งแวดล้อมที่ปนเปื้อนปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอน เช่น ดังแสดงในตารางที่ 2.3

ตารางที่ 2.3 ตัวอย่างแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายสารปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอน

ชนิดแบคทีเรีย	แหล่งที่คัดแยก	สารปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนที่ย่อยสลายได้	อ้างอิง
<i>Acinetobacter</i> sp., <i>Gordonia</i> sp. และ <i>Rhodococcus</i> sp.	ดินปนเปื้อนน้ำมันดีเซล ประเทศเกาหลี	น้ำมันดีเซล	Lee และคณะ (2010)
<i>Rhodococcus erythropolis</i>	โคลนทะเลปนเปื้อน น้ำมัน ประเทศจีน	น้ำมันดีเซล	Huang และคณะ (2008)
<i>Alcanivorax</i> sp. และ <i>Oleispira</i> sp.	น้ำทะเลอาร์กติก	น้ำมันดีเซล	Crisafi และคณะ (2016)
<i>Pseudomonas</i> sp., <i>Sphingomonas</i> sp. และ <i>Acinetobacter</i> sp.	ดินที่ปนเปื้อนน้ำมัน ดีเซลบริเวณสถานีวิจัย ในทวีปแอนตาร์กติกา	น้ำมันดีเซล	de Jesus และคณะ (2015)
<i>Oceanobacillus</i> sp. BRI 10	น้ำทะเลแอนตาร์กติกา	น้ำมันดิบ	Jadhav และคณะ (2013)
<i>Exiguobacterium</i> <i>aurantiacum</i> และ <i>Burkholderia cepacia</i>	ดินตะกอนที่ปนเปื้อน น้ำมันดีเซล ประเทศอินเดีย	เฮกซะเดเคน น้ำมันดีเซล	Mohanty และ Mukherji (2008)
<i>Achromobacter</i> sp. HZ01	น้ำทะเลบริเวณอ่าว ดงาย่า ประเทศจีน	น้ำมันดีเซล แอนทราซีน ไพรีน ฟิแนนทรีน	Deng และคณะ (2014)
<i>Acinetobacter beijerinckii</i> ZRS	ดินบริเวณบ่อน้ำมัน ซินเจียง ประเทศจีน	น้ำมันดีเซล	Huang และคณะ (2013)
<i>Rhodococcus erythropolis</i> BZ4, <i>Rhodococcus</i> <i>cercidiphyllus</i> BZ22, <i>Arthrobacter sulfureus</i> BZ73 และ <i>Pimelobacter</i> <i>simplex</i> BZ91	ดินบริเวณเขต อุตสาหกรรมโบลซาโน ประเทศอิตาลี	<i>n</i> -แอลเคน ฟีนอล แอนทราซีน ไพรีน	Margesin และคณะ (2013)

2.7.1.2 ความสามารถในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพและความไม่ชอบน้ำของเซลล์

ความสามารถในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ (biosurfactant) และความไม่ชอบน้ำของเซลล์ (cell hydrophobicity) ทำให้แบคทีเรียเข้าถึงสารมลพิษได้ดีขึ้น รวมทั้งเพิ่มความสามารถในการยึดเกาะของแบคทีเรียให้สามารถนำสารมลพิษไปใช้เป็นแหล่งคาร์บอนและสร้างพลังงานได้ดียิ่งขึ้นนอกจากนี้สารลดแรงตึงผิวยังก่อให้เกิดอิมัลชันบริเวณรอยต่อระหว่างชั้นน้ำและน้ำมัน ซึ่งเป็นการเพิ่มพื้นที่ผิวสัมผัสของแบคทีเรียกับน้ำมันอีกด้วย (Ron และ Rosenberg, 2001)

จากรายงานของ Jadhav และคณะ (2013) ได้ศึกษาไกลโคไลโปโปรตีน (glycolipoprotein) ซึ่งเป็นสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตมาจาก *Oceanobacillus* sp. BRI 10 ซึ่งคัดแยกได้จากน้ำทะเลในมหาสมุทรแอนตาร์กติก เมื่อเติมสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้ลงไป พบว่าสามารถย่อยสลายน้ำมันดิบความเข้มข้น 1% (ปริมาตร/ปริมาตร) ได้ถึง 90% ในขณะที่ไม่เติมสารลดแรงตึงผิวสามารถย่อยสลายน้ำมันดิบได้เพียง 56% ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 27 วัน จากการทดลองสรุปได้ว่าสารลดแรงตึงผิวทำให้แบคทีเรียเข้าถึงน้ำมันดิบได้ดีขึ้น จึงช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันดิบได้มากขึ้น

2.7.2 โครงสร้างและชนิดของสารมลพิษ

2.7.2.1 ชนิดและองค์ประกอบของสารมลพิษ

แบคทีเรียแต่ละชนิดมีความสามารถในการย่อยสลายสารประกอบไฮโดรคาร์บอนที่แตกต่างกันขึ้นอยู่กับชนิดและองค์ประกอบของสาร โดยน้ำมันดีเซลมีองค์ประกอบส่วนใหญ่เป็นอะลิฟาติกไฮโดรคาร์บอนสายกลาง ที่มีจำนวนคาร์บอน 10-25 อะตอม จากรายงานของ Atlas และ Bragg (2009) พบว่าแบคทีเรียสามารถย่อยสลายสารประกอบไฮโดรคาร์บอน แอลเคนสายตรง > แอลเคนสายกิ่ง > อะโรมาติกขนาดเล็ก > ไฮโคลแอลเคน > พอลิไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน ส่วนแอลเคนสายสั้นที่มีจำนวนอะตอมของคาร์บอนต่ำกว่า 9 อะตอม จะระเหยได้ง่ายและมีความเป็นพิษต่อแบคทีเรียสูง

2.7.2.2 ความเข้มข้นของสารมลพิษที่ปนเปื้อน

ความเข้มข้นของสารมลพิษมีผลต่อแบคทีเรีย เมื่อมีความเข้มข้นของสารมลพิษน้อย แบคทีเรียสามารถนำไปใช้เป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงานได้ หากมีความเข้มข้นของสารมลพิษมากเกินไป จะทำให้แบคทีเรียย่อยสลายสารมลพิษได้ช้าลงและเกิดการสะสมสารมลพิษภายในเซลล์ อาจทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงประชาคมแบคทีเรีย (Anderson และ Lovley, 2000)

จากรายงานของ Jung และคณะ (2010) ได้ศึกษาการรั่วไหลของน้ำมันดิบ โดยศึกษาในระบบนิเวศจำลองขนาด 10 ลิตร ใช้ น้ำมันดิบที่มีความเข้มข้นตั้งแต่ 10-10,000 มิลลิกรัม/ลิตร เป็นระยะเวลา 8 วัน ผลการทดลองพบว่าความอุดมสมบูรณ์ของสาหร่ายในระบบลดลงอย่างรวดเร็วที่ความเข้มข้นน้ำมันดิบตั้งแต่ 1,000 มิลลิกรัม/ลิตร ขึ้นไป ในขณะที่แบคทีเรีย heterotrophic เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วที่ความเข้มข้นน้ำมันสูงขึ้น โดยความหลากหลายของประชาคมแบคทีเรียจากการติดตามด้วยวิธี PCR-DGGE พบว่าเมื่อความเข้มข้นของน้ำมันดิบเพิ่มขึ้นทำให้แบนชีวนส์ดีเอ็นเอ (DNA) ชัดขึ้นตามไปด้วย จากการทดลองจึงสรุปได้ว่า เมื่อมีการปนเปื้อนน้ำมันดิบที่ความเข้มข้นมากกว่า 1,000 มิลลิกรัม/ลิตร จะมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงไปของประชาคมแบคทีเรีย

2.8 การย่อยสลายสารประกอบไฮโดรคาร์บอนโดยแบคทีเรียภายใต้อุณหภูมิต่ำ

กระบวนการย่อยสลายทางชีวภาพของสารประกอบไฮโดรคาร์บอนโดยแบคทีเรียในดิน แอนตาร์กติก หรือบริเวณที่มีอุณหภูมิต่ำเป็นไปได้ยาก เนื่องจากจากอุณหภูมิเป็นข้อจำกัดกิจกรรมของแบคทีเรีย ซึ่งมีเพียงแบคทีเรียที่เจริญได้ที่อุณหภูมิต่ำเท่านั้นที่สามารถย่อยสลายสารประกอบไฮโดรคาร์บอนให้หมดไปจากดินที่มีอุณหภูมิต่ำได้ โดยมีหลายงานวิจัยที่รายงานว่าแบคทีเรียที่เจริญได้ที่อุณหภูมิต่ำมีความสามารถในการย่อยสลายสารประกอบไฮโดรคาร์บอน ดังตารางที่ 2.4

ตารางที่ 2.4 ตัวอย่างแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายสารประกอบไฮโดรคาร์บอนภายใต้อุณหภูมิต่ำ

ชนิดแบคทีเรีย	แหล่งที่มา	อุณหภูมิ	ประสิทธิภาพการย่อยสลาย	อ้างอิง
<i>Alcanivorax</i> sp.	น้ำทะเลอาร์กติก	15 °C	ย่อยสลายน้ำมันดีเซล 500 ppm ได้ 78% ในเวลา 60 วัน	Crisafi และคณะ (2016)
<i>Oleispira</i> sp.			ย่อยสลายน้ำมันดีเซล 500 ppm ได้ 82% ในเวลา 60 วัน	
<i>Pseudomonas</i> sp. ST41	ดินที่ปนเปื้อนน้ำมันดีเซลบริเวณสถานีวิจัยชิกนี ทวีปแอนตาร์กติกา	4 °C	ย่อยสลายไพเทนในน้ำมันดีเซล 1% (น้ำหนัก/น้ำหนัก) ได้ 45% ในเวลา 18 สัปดาห์	Stallwood และคณะ (2005)

ตารางที่ 2.4 (ต่อ)

ชนิดแบคทีเรีย	แหล่งที่มา	อุณหภูมิ	ประสิทธิภาพการย่อย สลาย	อ้างอิง
<i>Pseudomonas</i> sp. DRYJ3	ดินที่ปนเปื้อนน้ำมัน ดีเซลบริเวณสถานี วิจัยจูเบนี ทวีป แอนตาร์กติกา	10 °C	ย่อยสลายน้ำมันดีเซล 0.5% (ปริมาตร/ ปริมาตร) ได้ 19% ในเวลา 10 วัน	Shukor และ คณะ (2009)
<i>Rhodococcus luteus</i> E60	น้ำทะเลจากอ่าว เทอรานอวา ทวีป แอนตาร์กติกา	4 °C	ย่อยสลายน้ำมันดีเซล 1% (ปริมาตร/ปริมาตร) ได้ 58% ในเวลา 60 วัน	Michaud และ คณะ (2004)
<i>Chryseobacterium</i> sp.	กากตะกอนดินจาก โรงงานดาเลี่ยน ปิโตรเคมีคอล จำกัด ในประเทศ จีน	10 °C	ย่อยสลายน้ำมันดิบ 1000 ppm ได้ 67% ในเวลา 6 วัน	Wang และคณะ (2015)
<i>Bacillus</i> sp.			ย่อยสลายน้ำมันดิบ 1000 ppm ได้ 61% ในเวลา 6 วัน	
<i>Pseudomonas</i> sp.			ย่อยสลายน้ำมันดิบ 1000 ppm ได้ 60% ในเวลา 6 วัน	
<i>Pseudoalteromonas</i> sp. P29	ตะกอนดินใน มหาสมุทรอาร์กติก	5 °C	ย่อยสลายน้ำมันผสม (น้ำมันดิบ:น้ำมันดีเซล เท่ากับ 1:4) 2000 ppm ได้ 90% ในเวลา 28 วัน	Lin และคณะ (2009)

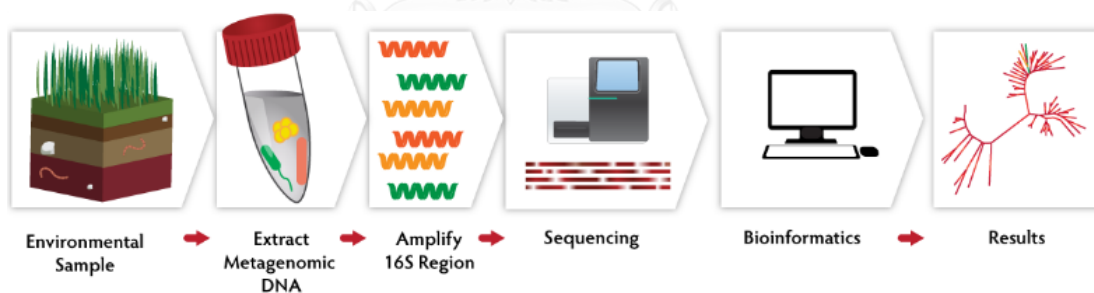
2.9 การตรวจติดตามการบำบัดโดยใช้เทคนิคชีววิทยาโมเลกุลเมตาจีโนมิกส์ (Metagenomics)

จากหลากหลายวิธีที่ทำให้มนุษย์เข้าใจถึงสรีรวิทยาและพันธุกรรมของจุลินทรีย์โดยไม่อาศัยการเพาะเลี้ยง พบว่าเมตาจีโนมิกส์เป็นวิธีการที่มีประสิทธิภาพมากที่สุด โดยวิเคราะห์จีโนมของจุลินทรีย์จากสิ่งแวดล้อมครอบคลุมจุลินทรีย์กว่า 99.8% ที่ไม่สามารถเพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการได้ ดังนั้นสารชีวภาพและกลุ่มยีนที่ควบคุมการทำงานต่าง ๆ อีกมากมายจึงยังไม่ถูกค้นพบ และไม่สามารถนำมาใช้ประโยชน์ได้ เมตาจีโนมิกส์จึงเป็นเทคนิคที่ทำให้ข้อจำกัดในการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์หมดไป และเพิ่มความรู้ความเข้าใจถึงโครงสร้างและบทบาทของประชาคมจุลินทรีย์ที่ซับซ้อน ซึ่งถือ

ว่าเป็นความท้าทายสำหรับนักจุลชีวิทยาในปัจจุบัน (Handelsman, 2004; Streit และ Schmitz, 2004)

2.9.1 การวิเคราะห์ลำดับเบสของแอมพลิคอนของยีน 16S rRNA

จุลินทรีย์มีบทบาทสำคัญในระบบนิเวศส่วนใหญ่ รวมถึงมีความหลากหลายทางอนุกรมวิธาน ซึ่งแสดงให้เห็นถึงการวิวัฒนาการมาอย่างยาวนาน แต่มนุษย์ยังคงขาดความเข้าใจในความสัมพันธ์ของจุลินทรีย์ในสิ่งแวดล้อม จึงได้มีการพัฒนาเทคโนโลยี high-throughput sequencing (HTS) เช่น 454 และ Illumina (Logares และคณะ, 2012) ขึ้น เพื่อใช้ตรวจสอบความหลากหลายของจุลินทรีย์ในสิ่งแวดล้อม โดยวิธี 454 pyrosequencing ถูกนำมาใช้ครั้งแรกเพื่อวิเคราะห์ลำดับเบสของแอมพลิคอนของยีน rRNA จากตัวอย่างสิ่งแวดล้อม (Sogin และคณะ, 2006) และหลังจากนั้นได้มีการใช้วิธี Illumina-sequenced polymerase chain reaction (PCR) เพื่อวิเคราะห์ลำดับเบสของแอมพลิคอนของยีน 16S rRNA เพื่อตรวจสอบประชาคมจุลินทรีย์ในสิ่งแวดล้อม โดยอาศัยหลักการสกัด DNA จากตัวอย่างที่ต้องการศึกษา จากนั้นเพิ่มจำนวนชิ้นส่วน DNA บริเวณยีน 16S rRNA โดยใช้วิธีปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์เรสและวิเคราะห์ลำดับเบสของแอมพลิคอนของยีน 16S rRNA เพื่อใช้ในการจัดจำแนกชนิดของแบคทีเรียในสิ่งแวดล้อม ดังรูปที่ 2.10 และตัวอย่างงานวิจัยที่ใช้วิธีการวิเคราะห์ลำดับเบสของแอมพลิคอนของยีน 16S rRNA แสดงในตารางที่ 2.5



รูปที่ 2.10 ขั้นตอนการวิเคราะห์ลำดับเบสของแอมพลิคอนของยีน 16S rRNA

ที่มา : Lucigen (2017)

ตารางที่ 2.5 ตัวอย่างงานวิจัยที่ใช้วิธีการวิเคราะห์ลำดับเบสของแอมพลิคอนของยีน 16S rRNA จากสิ่งแวดล้อม

ประชาคมแบคทีเรียที่พบ	แหล่งตัวอย่าง	อ้างอิง
<i>Lactobacillus kefiranofaciens</i> (81.45 -91.93%) และ <i>Lactobacillus kefiri</i> (2.01–2.47%)	ธัญพืชคีเฟอร์ จาก ประเทศมาเลเซีย	Zamberi และ คณะ (2016)
<i>Betaproteobacteria</i> เป็นคลาสที่เด่นในตัวอย่าง หิมะ Leningradskaia, Druzhnaja และ Mirnii ส่วน <i>Flavobacteriia</i> เป็นคลาสที่เด่นในตัวอย่าง Progress	หิมะบริเวณ สถานีวิจัยรัสเซีย ทวีปแอนตาร์กติกา 4 ตัวอย่าง	Lopatina และ คณะ (2016)
<i>Streptococcus</i> (13.7–41.3%), <i>Haemophilus</i> (2.0–25.8%), <i>Rothia</i> (0.9–16.7%) และ <i>Capnocytophaga</i> (3.1–13.0%)	คราบจุลินทรีย์ จากฟัน	Wang และคณะ (2013)
ไฟลัมเด่นในตัวอย่าง ML4 และ ML7 คือ Proteobacteria (40.3% and 43.3%) และ Actinobacteria (22.9% and 24.9%)	ตัวอย่างธารน้ำแข็ง เกาะสวาลบาร์ด ประเทศนอร์เวย์ 2 ตัวอย่าง	Seok และคณะ (2016)
Firmicutes 39.3%, Proteobacteria 27.8% และ Actinobacteria 6.3%	ตัวอย่างน้ำลาย	Lazarevic และ คณะ (2009)
Proteobacteria 40%, Bacteroidetes 22%, Firmicutes 12%, Actinobacteria 9%, Cyanobacteria 5%, Acidobacteria 3%, Verrucomicrobia 3% และ Planctomycetes 2%	ตัวอย่างธารน้ำแข็งโบราณ อลาสก้า	Choudhari และ คณะ (2013)
Proteobacteria 88.12%, Bacteroidetes 10.76%, Firmicutes 0.35%, Spirochetes 0.18% และ Chloroflexi 0.11%	ตะกอนจากบ่อน้ำพุร้อน Deulajhari ประเทศอินเดีย	Singh และ Subudhi (2016)

2.9.2 ช็อตกันเมตาจีโนมิกส์ (Shotgun metagenomics)

วิธีช็อตกันเมตาจีโนมิกส์เป็นวิธีที่ใหม่และมีประสิทธิภาพในด้านสิ่งแวดล้อม ซึ่งจะให้ข้อมูลเชิงลึกเกี่ยวกับความหลากหลายทางชีวภาพและการทำงานของประชาคมจุลินทรีย์ แต่การวิเคราะห์ด้วยวิธีเมตาจีโนมิกส์มีความซับซ้อนเนื่องจากโครงสร้างของข้อมูล ดังนั้นวิธีช็อตกันเมตาจีโนมิกส์จึงได้รับการพัฒนาเพื่อหลีกเลี่ยงความซับซ้อนนั้น และช่วยให้นักวิจัยสามารถตรวจสอบได้ว่าจุลินทรีย์ใดมีบทบาทในสิ่งแวดล้อม (Oulas และคณะ, 2015)

ช็อตกันเมตาจีโนมิกส์เป็นทางเลือกหนึ่งในการศึกษาจุลินทรีย์ที่ไม่อาศัยการเพาะเลี้ยง โดย DNA จากสิ่งแวดล้อมจะถูกสกัดออกมาจากเซลล์ แต่ไม่ได้กำหนดเป้าหมายเฉพาะตำแหน่งของยีนที่สนใจเหมือนกับวิธีวิเคราะห์ลำดับเบสของแอมพลีคอนของยีน 16S rRNA โดย DNA จะถูกตัดเป็นชิ้นเล็ก ๆ อย่างอิสระซึ่งส่งผลให้ลำดับ DNA มากมายอยู่ในตำแหน่งที่กระจัดกระจาย และการวิเคราะห์ผลจะถูกอ่านจากตำแหน่งจีโนมโดยให้ข้อมูลเชิงอนุกรมวิธาน เช่น ยีน 16S rRNA โดยสามารถวิเคราะห์ได้จากโปรแกรมชีวสารสนเทศต่าง ๆ เพื่อให้ได้ข้อมูลเชิงลึกซึ่งเกี่ยวข้องกับหน้าที่ของจุลินทรีย์ในสิ่งแวดล้อมนั้น ๆ (Sharpton, 2014) และมีตัวอย่างงานวิจัยมากมายที่ใช้วิธีช็อตกันเมตาจีโนมิกส์ในการวิเคราะห์บทบาทหน้าที่ของจุลินทรีย์ในสิ่งแวดล้อม รวมถึงประชาคมจุลินทรีย์ที่เปลี่ยนแปลงไปดังตารางที่ 2.6

ตารางที่ 2.6 ตัวอย่างงานวิจัยที่ใช้วิธีช็อตกันเมตาจีโนมิกส์ในการศึกษา

หัวข้อที่สนใจศึกษา	แหล่งตัวอย่าง	โปรแกรมชีวสารสนเทศ	ฐานข้อมูล	อ้างอิง
- ประชาคมแบคทีเรียในทะเลสาบ Joyce - ยีนที่เกี่ยวข้องกับการทนเย็น (antifreeze proteins, cold-shock DEAD-box protein A, cold shock family of proteins, fatty acid desaturase, ice nucleation protein และ trehalose synthase)	Microbial mats จากทะเลสาบ Joyce ทวีปแอนตาร์กติกา	MG-RAST และ R-code	SEED	Koo และคณะ (2016)
- ประชาคมแบคทีเรียในระบบนิเวศจำลองดิน - ยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายแอลเคน (alkane monooxygenase, cytochrome P450, alcohol dehydrogenases และ aldehyde dehydrogenases)	ดินจากระบบนิเวศจำลองดินที่มีการปนเปื้อนน้ำมันดีเซล	MG-RAST และ STAMP	M5RNA	Jung และคณะ (2016)

ตารางที่ 2.6 (ต่อ)

หัวข้อที่สนใจศึกษา	แหล่งตัวอย่าง	โปรแกรมชีวสารสนเทศ	ฐานข้อมูล	อ้างอิง
- ยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายน้ำมันดีเซล (alkyl group hydroxylase, extradiol aromatic-ring-cleavage dioxygenase และ intradiol aromatic-ring-cleavage dioxygenase)	ดินอาร์กติกที่ปนเปื้อนน้ำมันดีเซล	MG-RAST และ BLAST	SEED	Yergeau และคณะ (2012)
- ยีนต้านทานยาปฏิชีวนะ (<i>sul2</i> , <i>qnrD</i> , <i>aph(6)-Ia</i> , <i>aph(3)-Ib 0</i> , <i>CMY2</i> , <i>sul1</i> , <i>qnrS</i> , <i>ant(3)-Ia</i> , <i>dfrB1/dfrB5/dfrB6/dfrB8</i> , <i>GES</i> , <i>ere(A)/ere(C)</i> , <i>qnrC</i> , <i>mph(E)</i> , <i>dfrA1/dfrA15</i> , <i>erm(F)</i> , <i>ant(2)-Ia</i> , <i>dfrA5/dfrA14/dfrA25/dfrA30</i> , <i>OXA-2</i> , <i>cmlA</i> และ <i>tet(39)</i>)	ดินตะกอนจากทะเลสาบ Kazipally อินเดีย และทะเลสาบ Nydalasjön สวีเดน	BLAST	TIGRFAM, RefSeq และ NCBI	Bengtsson -Palme และคณะ (2014)
- ประชาคมแบคทีเรียใต้น้ำแข็งในแอนตาร์กติกาและอาร์กติก - ยีนตอบสนองต่อความเครียด (Acid resistance mechanism, Detoxification, Periplasmic stress, Bacitracin stress response, Copper homeostasis, Sigma B stress response regulation, Universal stress protein family, Phage shock protein (psp) operon, Flavohemoglobin, Bacterial hemoglobin, Heat shock dnaK gene cluster extended, Hfl operon และ Carbon starvation)	ตัวอย่างใต้น้ำแข็งในแอนตาร์กติกาและอาร์กติก	MG-RAST	SEED	Varin และคณะ (2012)
- ประชาคมแบคทีเรียในน้ำพุร้อน - การสังเคราะห์สารเมแทบอลิซึมทุติยภูมิ - วิธีการย่อยสลายสารประกอบไฮโดรคาร์บอน (วิถีเมแทบอลิซึมของมีเทน, วิธีการย่อยสลายโพลีอีน, วิธีการย่อยสลายเบนโซเอท, วิธีการย่อยสลายเบนซีน และ วิธีการย่อยสลายไซลีน)	น้ำจากน้ำพุร้อน Anthoni และ Tattapani อินเดีย	egglog และ QIIME	KEGG pathway และ Green genes	Saxena และคณะ (2016)

บทที่ 3

วิธีการดำเนินการวิจัย

อุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย

1. เครื่องแก้วและอุปกรณ์พื้นฐานที่ใช้โดยทั่วไปในห้องปฏิบัติการ
2. เครื่องแก๊สโครมาโตกราฟี (gas chromatography, GC) ประกอบด้วย
 - เครื่องแก๊สโครมาโตกราฟีรุ่น 6890N บริษัท Agilent Technologies, USA
 - คอลัมน์ (column) ชนิด HP-5 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 320 ไมโครเมตร ความยาว 30 เมตร ภายในเคลือบด้วยเฟนิล เมทิล ซิโลเซน เข้มข้น 5% หน้า 0.25 ไมครอน บริษัท Agilent Technologies, USA
 - เครื่องตรวจวัด (detector) ชนิด Flame Ionization Detector (FID) บริษัท Agilent Technologies, USA
 - เข็มฉีดยาขนาดเล็ก (microsyring) 10 ไมโครลิตร
3. เครื่องเขย่ารุ่น PNP, Green Seriker 2 บริษัท Pana Polytech
4. เครื่องเขย่าชนิดควบคุมอุณหภูมิ (controlled environment incubator shaker) รุ่น NB-205V บริษัท N-Biotek, Korea
5. เครื่องเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส (mini agarose gel electrophoresis system) รุ่น i-mupid บริษัท Cosmo Bio, Japan
6. เครื่องถ่ายและวิเคราะห์ภาพเจล (Gel documentation system) รุ่น Gel Doc 2909TM บริษัท Bio-Rad, USA
7. เครื่องชั่ง รุ่น P2002-S และ AG285 บริษัท Mettler Toledo, Switzerland
8. เครื่องปั่นผสม (vortex) รุ่น Gene 2 บริษัท Scientific Industries, USA
9. เครื่องปั่นเหวี่ยงแบบตั้งโต๊ะชนิดควบคุมอุณหภูมิ (centrifuge) รุ่น 1920 บริษัท Kubota, Japan
10. เครื่องเพิ่มปริมาณ DNA (DNA-Thermal Cycle) รุ่น G-STORM บริษัท Gene Technologies, England
11. เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) รุ่น UV-160A บริษัท Shimadzu, Japan
12. เครื่องวัดความเข้มข้น DNA (UV-vis spectrophotometer) รุ่น Nanodrop 2000 บริษัท Thermo Scientific, USA
13. เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH meter) รุ่น 240 บริษัท Corning, USA

14. เครื่องวัดแรงตึงผิว (dynamic contact angle meter and tensiometer) รุ่น DCAT21 บริษัท Future Digital Scientific Corp., USA
15. เครื่องไมโครเพลทรีดเดอร์ (microplate reader) บริษัท Bio-Tex Instrument, USA
16. ชุด PowerSoil DNA Isolation Kit บริษัท MO BIO laboratories, INC., USA
17. ชุด DCode™ System บริษัท Bio-Rad, USA
18. ตู้เขี่ยเชื้อ (ISSCO laminar flow) รุ่น HT-122.5 บริษัท International Scientific Supply, USA
19. ตู้แช่แข็งจุดเยือกแข็ง (deep freezer) อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส รุ่น ULT1786 บริษัท Forma Scientific, USA
20. ตู้แช่แข็งจุดเยือกต่ำ (deep freezer) อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส รุ่น MDF-U332 บริษัท Sanyo Electric, Japan
21. ตู้บ่มเชื้ออุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส บริษัท New Brunswick Scientific, USA
22. ตู้อบฆ่าเชื้อ (hot air oven) รุ่น D06063 บริษัท Memmert, German
23. ตู้อบแห้ง (oven) บริษัท Contherm Scientific, New Zealand
24. หม้อนึ่งฆ่าเชื้อความดันไอ (autoclave) บริษัท Kakusan, Japan
25. เครื่อง Mini-Bead Beater บริษัท Biospec products, USA
26. หัวกรอง PTFE (PTFE filter) ขนาดความกว้างรู 0.2 ไมโครเมตร บริษัท Chrom Tech, USA
27. อ่างควบคุมอุณหภูมิ (water bath) รุ่น digital water bath SB-1000 บริษัท Eyela, Japan

เคมีภัณฑ์ที่ใช้ในงานวิจัย

1. กรดอะซิติก ($C_2H_4O_2$) (AR grade) บริษัท Merck, Germany
2. กรดไฮโดรคลอริก (HCl) (AR grade) บริษัท BDH Chemicals, Australia
3. กลีเซอรอล ($C_3H_8O_3$) บริษัท Research organics, USA
4. กลูโคส ($C_6H_{12}O_6$) บริษัท Merck, Germany
5. แคลเซียมคลอไรด์ ($CaCl_2 \cdot 2H_2O$) บริษัท Merck, Germany
6. คลอโรฟอร์ม (chloroform) (AR grade) บริษัท RCI Labscan, Thailand
7. เซทิลไตรเมทิลแอมโมเนียมโบรไมด์ (CTAB) บริษัท Bio Basic, Canada
8. โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) บริษัท Merck, Germany
9. โซเดียมซัลเฟต (Na_2SO_4) บริษัท Merck, Germany
10. โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต (SDS) บริษัท Nacalai Tesque, Japan

11. โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) บริษัท Merck, Germany
12. น้ำมันดีเซล (Diesel oil) บริษัท ปตท. จำกัด (มหาชน)
13. ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4) บริษัท Merck, Germany
14. โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) บริษัท Merck, Germany
15. ทริปโตเนน (tryptone) บริษัท Difco, USA
16. ทริส [ไฮดรอกซีเมทิล] อะมิโนเมเทน (Tris) บริษัท Sigma, USA
17. แอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต (APS) บริษัท Promega, USA
18. แอมโมเนียมคลอไรด์ (NH_4Cl) บริษัท Merck, Germany
19. โปรตีนเอสเค (Proteinase K) บริษัท United States Biological, USA
20. แอมโมเนียมไนเตรต (NH_4NO_3) บริษัท Merck, Germany
21. ผงสกัดจากยีสต์ (yeast extract) บริษัท Difco, USA
22. โพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl) บริษัท Merck, Germany
23. โพแทสเซียมอะซิเตท (CH_3COOK) บริษัท Merck, Germany
24. ฟีนอล (phenol) บริษัท Merck, Germany
25. เฟอร์ริกซิเตรท ($C_6H_5O_7Fe \cdot 5H_2O$) บริษัท BDH Chemicals, England
26. เมทานอล (CH_3OH) (HPLC grade) บริษัท Merck, Germany
27. แมกนีเซียมคลอไรด์ ($MgCl_2$) บริษัท Merck, Germany
28. แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$) บริษัท Carlo Erba, France
29. แมงกานีสคลอไรด์ ($MnCl_2$) บริษัท Merck, Germany
30. รูบิเดียมคลอไรด์ (RbCl) บริษัท Sigma, USA
31. ยูเรีย (CH_4N_2O) บริษัท Research organics, USA
32. โซเดียมไนเตรท ($NaNO_3$) บริษัท Merck, Germany
33. ไลโซไซม์ (lysozyme) บริษัท Bio Basic, Canada
34. สารละลาย DNA มาตรฐาน 100 bp DNA ladder บริษัท Geneaid, Taiwan
35. สารละลาย DNA มาตรฐาน Lamda *Hind*III บริษัท New England Biolabs, UK
36. อะกาโรส (agarose) บริษัท Research organics, USA
37. เอทานอล (ethanol) (AR grade) บริษัท Merck, Germany
38. เอทิลีนไดเอมีนเททราอะซีติกแอซิด (EDTA) บริษัท Sigma, USA
39. เอธิเดียมโบรมไนด์ (ethidium bromide) บริษัท Promega, USA
40. เอนไซม์อาร์เอ็นเอสเอ (Rnase A) บริษัท Promega, USA
41. เอนไซม์โปรตีนเอสเค (proteinase K) บริษัท United States Biological, USA

42. ไอโซโพรพานอล (isopropanol) (HPLC grade) บริษัท Merck, Germany
43. เฮกเซน (hexane) (HPLC grade) บริษัท RCI Labscan, Thailand
44. เฮกซะเดคเคน (hexadecane) บริษัท Sigma, USA
45. เตตระเดคเคน (tetradecane) บริษัท Sigma, USA
46. แอมพิซิลลิน (ampicillin) บริษัท Nacal Tesque, Japan
47. เอนไซม์ *EcoRI* บริษัท Promega, USA
48. 40% Acrylamide: Bis (37:1) บริษัท Bio-Rad, USA
49. GoTaq[®] qPCR Master Mix บริษัท Promega, USA
50. IPTG (Isopropyl thio- β -D-galactoside) บริษัท BIO BASIC INC, Canada
51. X-gal (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactoside) บริษัท BIO BASIC INC, Canada
52. pGEM[®] – T Easy Vector System บริษัท Promega, USA
53. Pestro[™] Mini Plasmid Kit บริษัท Geneaid, Taiwan

ไพรเมอร์ที่ใช้ในงานวิจัย

ตารางที่ 3.1 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ที่ใช้ในการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

ไพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์ (5'-3')	ขนาด (bp)	อ้างอิง
ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rDNA			
314F-GC clamp	CCTACGGGAGGCAGCAG-GC clamp		Muyzer และ คณะ (1993)
314F	CCTACGGGAGGCAGCAG-GC		
520R	ACCGCGGCTGCTGGC		
ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีนย่อยสลายอะลิฟาติก			
ALK1F	CATAATAAAGGGCATCACCGT	185	Kohno และ คณะ (2002)
ALK1R	GATTTCAATCTCGAAACTCCAAAC	(<i>alkB</i>)	
ALK2F	GAGACAAATCGTCTAAAACGTAA	271	Kohno และ คณะ (2002)
ALK2R	TTGTTATTATTCCAATATGCTC	(<i>alkM</i>)	
ALK3F	TCGAGCACATCCGCGGCCACCA	330	Kohno และ คณะ (2002)
ALK3R	CCGTAGTGCTCGACGTAGTT	(<i>alkB₁</i>)	
AlkB-1F	AAYACNGCNCAYGARCTNGGNCAYAA	550	Kloos และ คณะ (2006)
AlkB-1R	GCRTGRTGRTCNGARTGNCGYTG	(<i>alkB-1</i>)	

ตารางที่ 3.1 (ต่อ)

ไพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์ (5'-3')	ขนาด (bp)	อ้างอิง
ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีนย่อยสลายอะลิฟาติก (ต่อ)			
AlkB1F	ATCTGGGCGCGTTGGGATTTGAGCG	629	Whyte และ
AlkB1R	CGCATGGTGATCGCTGTGCCGCTGC	(<i>alkB1</i>)	คณะ (2002)
AlkB2F	ACTCTGGCGCAGTCGTTTTACGGCC	552	Whyte และ
AlkB2-R	CCCCTGGGCGAGTTGGGCGCACCG	(<i>alkB2</i>)	คณะ (2002)
CYP153F	ATGTTYATYGCNATGGAYCCN	820	Wang และ
CYP153R	GCGRTTVCCCATRCARCGRGTG	(CYP153)	คณะ (2011)
P450F	TGTCGGTTGAAATGTTTCATYGCNMTG GAYCC	800	Wang และ
P450R	TGCAGTTCGGCAAGGCGGTTDCCSRY RCAVCK RTG	(CYP153)	คณะ (2010)
AlmAwF	GGNGGNACNTGGGAYCTNTT	1131	Liu และคณะ
AlmAwR	ATRTCNGCYTTNAGNGTCC	(<i>almA</i>)	(2011)
P450fw1	GTSGGCGGCAACGACACSAC	339	van Beilen
P450rv3	GCASCGGTGGATGCCGAAGCCRAA	(CYP153)	และคณะ (2006)

วิธีดำเนินงานวิจัย

3.1 ศึกษาลักษณะสมบัติทางกายภาพ เคมี และชีวภาพของดินแอนตาร์กติก

3.1.1 ตัวอย่างดินแอนตาร์กติก

ตัวอย่างดินแอนตาร์กติกที่ใช้ในงานวิจัยนี้ รศ.ดร.อรุทัย ภิญญาคง เก็บมาจากบริเวณภูเขาหลังสถานีวิจัยเกรทวอลล์ (รูปที่ 3.1) ซึ่งเป็นสถานีวิจัยของสาธารณรัฐประชาชนจีน ตั้งอยู่บนเกาะคิงส์จอร์จ ทางตอนเหนือของคาบสมุทรแอนตาร์กติก ทวีปแอนตาร์กติกา พิกัด GPS 62°13'14.0"S 58°57'27"W ดังรูปที่ 3.2 ภายใต้โครงการวิจัยทั่วโลกตามพระราชดำริสมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี ซึ่งเป็นความร่วมมือระหว่างสาธารณรัฐประชาชนจีนและประเทศไทย เก็บตัวอย่างดินวันที่ 18 มกราคม พ.ศ. 2557 และเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ก่อนการทดลอง



รูปที่ 3.1 การเก็บตัวอย่างดินแอนตาร์กติกบริเวณสถานีวิจัยเกรทวอลล์



รูปที่ 3.2 แผนที่บริเวณเก็บตัวอย่างดินแอนตาร์กติก บริเวณภูเขาหลังสถานีวิจัยเกรทวอลล์ ซึ่งตั้งอยู่บนเกาะคิงจอร์จ (พิกัด GPS 62°13'14.0"S 58°57'27"W) ที่มา : Google map

3.1.2 ศึกษาลักษณะสมบัติทางกายภาพและเคมีของตัวอย่างดินแอนตาร์กติก

ส่งวิเคราะห์สมบัติทางกายภาพและเคมีของตัวอย่างดินแอนตาร์กติก ที่โครงการพัฒนาวิชาการดิน-ปุ๋ย และสิ่งแวดล้อม ภาควิชาปฐพีวิทยา คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ โดยวิเคราะห์สมบัติทางกายภาพและเคมีได้แก่ ลักษณะเนื้อดิน ด้วยวิธี Hydrometer อินทรีย์วัตถุ ด้วยวิธี Walkley and Black ฟอสฟอรัส ด้วยวิธี Bray II โพแทสเซียม ไนโตรเจน ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ใช้ pH meter (ดิน:น้ำ เท่ากับ 1:1) ค่าความชื้น และอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน

3.1.3 ศึกษาลักษณะสมบัติทางชีวภาพของตัวอย่างดินแอนตาร์กติก

3.1.3.1 ตรวจนับจำนวนแบคทีเรียที่ย่อยสลายน้ำมันดีเซลโดยวิธี Most Probable Number (MPN)

ตรวจนับจำนวนแบคทีเรียที่ย่อยสลายน้ำมันดีเซลตามวิธีที่ดัดแปลงจาก Johnsen และคณะ (2002) โดยนำสารละลายของน้ำมันดีเซลที่ละลายใน *n*-Hexane (5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ปิเปตลงในจานหลุม 96 หลุม เพื่อให้ได้ความเข้มข้นเริ่มต้นเท่ากับ 0.1 มิลลิกรัม/หลุม ระบายตัวทำละลาย ประมาณสองชั่วโมง จึงเติมอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Mineral salt medium (MSM) (ภาคผนวก ก) ปริมาตร 180 ไมโครลิตร และตัวอย่างดินแอนตาร์กติก (ตัวอย่างดิน 1 กรัม ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MSM 9 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมสาร) ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ลงในจานหลุม 96 หลุม และเจือจางตั้งแต่ 10^{-2} - 10^{-5} โดยทำ 5 หลุม จำนวน 3 ซ้ำ แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 สัปดาห์ วิเคราะห์ผลการเจริญของแบคทีเรียที่ย่อยสลายน้ำมันดีเซลโดยเติมสารละลายไอโอดีนไตรเตตระโซเลียม-คลอไรด์ (INT dye) ปลอดภัย ความเข้มข้น 15 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร และไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (DMSO) ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ลงในจานหลุม 96 หลุมผสมให้เข้ากันโดยนำไปวางบนเครื่องเขย่าเป็นเวลา 24 ชั่วโมง สังเกตตะกอนสีชมพูของ formazan ที่เกิดจากการเปลี่ยนโครงสร้างของเตตระโซเลียม-คลอไรด์ที่ถูกรีดิวซ์จากกระบวนการเมแทบอลิซึมของแบคทีเรียที่ใช้ไขมันดีเซลเป็นแหล่งพลังงาน แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร นำผลที่ได้มาเปรียบเทียบกับตาราง MPN และคำนวณหาจำนวนแบคทีเรียที่ย่อยสลายน้ำมันดีเซลทั้งหมดเพื่อประเมินการมีอยู่ของแบคทีเรียที่ย่อยสลายน้ำมันดีเซลในตัวอย่างดินแอนตาร์กติกเบื้องต้น

3.1.3.2 ตรวจสอบยีนที่เกี่ยวข้องในการย่อยสลายน้ำมันดีเซลของตัวอย่างดินแอนตาร์กติก

3.1.3.2.1 สกัด DNA จากตัวอย่างดินแอนตาร์กติก

สกัด DNA จากตัวอย่างดินแอนตาร์กติกโดยใช้ชุด PowerSoil DNA Isolation Kit ตามวิธีที่ระบุในคู่มือโดยนำตัวอย่างดินแอนตาร์กติก 0.25 กรัม ใส่ลงในหลอดของชุด PowerSoil DNA โดยทำ 3 ซ้ำ ผสมสารด้วยเครื่องผสมสาร 1 นาที เติมสาร C1 ปริมาตร 60 ไมโครลิตร ผสมสารด้วยเครื่องผสมสาร 1 นาที นำตัวอย่างใส่ในเครื่อง Mini-Bead Beater 3 นาที และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบ/นาที 30 วินาที ดูดส่วนของเหลวใสปริมาณ 500 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ เติมสาร C2 ปริมาตร 250 ไมโครลิตร แล้วผสมสารด้วยเครื่องผสมสาร 5 นาที บ่มที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส 5 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบ/นาที 1 นาที ดูดส่วนใส

ปริมาตร 750 ไมโครลิตร ลงในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์หลอดใหม่ แล้วเติมสาร C4 ปริมาตร 1,200 มิลลิลิตร ผสมสารด้วยเครื่องผสมสาร 5 นาที ดูดส่วน ของเหลวใสจากหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ ปริมาตร 675 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลอด Spin Filter ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบ/นาที 1 นาที ทิ้งส่วนของเหลว และทำซ้ำอีกครั้งโดยการดูดส่วนของเหลวใสที่เหลืออยู่ในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ อีก 675 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลอด Spin Filter ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบ/นาที 1 นาที ทิ้งส่วนของเหลว และเติมสาร C5 ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบ/นาที 30 วินาที และทิ้งส่วนของเหลว จากนั้นนำเฉพาะตัวกรองของ Spin Filter ใส่ลงในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์หลอดใหม่ เติมสาร C6 ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบ/นาที 30 วินาที ถอด Spin Filter ทิ้ง จะได้ส่วนของเหลวคือ DNA เก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

3.1.3.2.2 ตรวจสอบความสมบูรณ์ของ DNA

ตรวจสอบความสมบูรณ์ของสารละลาย DNA ที่สกัดได้จากข้อ 3.1.3.2.1 ด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส (agarose gel electrophoresis) โดยเตรียมอะกาโรสเจลความเข้มข้น 2% ที่ละลายในบัฟเฟอร์ Tris-acetate-EDTA ความเข้มข้น 1 เท่า (1X TAE) เกล่งในแม่พิมพ์ที่มีหัวเสียบอยู่ ทิ้งให้อะกาโรสเจลแข็งตัว จากนั้นนำหัวเสียบออกและวางชิ้นอะกาโรสเจลที่ได้ลงในแชมเบอร์ที่มีบัฟเฟอร์ 1X TAE ผสม DNA ที่สกัดได้ปริมาตร 5 ไมโครลิตรกับสีย้อมติดตามปริมาตร 1 ไมโครลิตร หยอดลงในช่องวิ่ง โดยให้ช่องวิ่งแรกเป็นสารละลาย DNA มาตรฐาน Lambda HindIII ที่ผสมกับสีย้อมติดตาม ปริมาตร 5 ไมโครลิตร ทำอิเล็กโทรโฟรีซิส โดยใช้ความต่างศักย์ 100 โวลต์ เป็นเวลา 28 นาที แล้วย้อมแผ่นอะกาโรสเจลด้วยสารละลายเอธิเดียมโบรไมด์ ความเข้มข้น 0.5 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร 15 นาที และตรวจดูแถบ DNA ภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ตที่ความยาวคลื่น 312 นาโนเมตร

3.1.3.2.3 ตรวจสอบชิ้นส่วน DNA บริเวณ 16S rRNA

นำ DNA ที่สกัดได้จากข้อ 3.1.3.2.1 มาตรวจสอบชิ้นส่วน DNA บริเวณ 16S rRNA ด้วยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์เรส (Polymerase chain reaction, PCR) โดยใช้ไพรเมอร์ 341-F และ 520-R และเตรียมส่วนผสมสุดท้ายของสารแต่ละชนิดดังนี้

- GoTaq® Green Master Mix ปริมาตร 15 ไมโครลิตร
- สารละลายไพรเมอร์ของแต่ละตัวความเข้มข้น 20 พิโคโมล/ไมโครลิตร 1 ไมโครลิตร
- DNA ที่สกัดได้ปริมาตร 1 ไมโครลิตร
- น้ำปลอดประจุปลอดเชื้อปริมาตร 12 ไมโครลิตร

รวมส่วนผสมทั้งหมดให้มีปริมาตรสุทธิเป็น 30 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน จากนั้นดำเนินการปฏิกิริยาอุณหภูมิโพลิเมอเรสด้วยเครื่องเพิ่มปริมาณ DNA (DNA Thermo Cycle) โดยให้มีสภาวะที่เหมาะสมดังนี้

1. Initial denaturation	ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส	เป็นเวลา 5 นาที
2. Denaturation	ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส	เป็นเวลา 30 วินาที
3. Annealing	ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส	เป็นเวลา 30 วินาที
4. Extension	ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส	เป็นเวลา 1 นาที
ทำซ้ำขั้นตอนที่ 2-4 จำนวน 30 รอบ		
5. Final extension	ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส	เป็นเวลา 7 นาที

ตรวจสอบผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสด้วยวิธีเช่นเดียวกับข้อ 3.1.3.2.2 โดยเปรียบเทียบกับ DNA มาตรฐาน 100 bp DNA ladder

3.1.3.2.4 ตรวจสอบยีนที่เกี่ยวข้องในการย่อยสลายน้ำมันดีเซล

นำ DNA ที่สกัดได้จากข้อ 3.1.3.2.1 มาตรวจหายีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายน้ำมันดีเซลด้วยวิธีปฏิกิริยาอุณหภูมิโพลิเมอเรส โดยใช้คู่ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีนอัลเคนโมโนออกซิจีเนส (alkane monooxygenase; *alkB*) ยีนอัลเคนไฮดรอกซิเลส (alkane hydroxylase; *alkM*) ยีนโมโนออกซิจีเนส (flavin-binding monooxygenase; *almA*) ยีน P450 ไซโตโครมโมโนออกซิจีเนส (P450 cytochrome monooxygenase; CYP153) องค์ประกอบของสารต่าง ๆ ในปฏิกิริยาแสดงดังข้อ

3.1.3.2.3 และดำเนินการปฏิกิริยาตามสภาวะดังนี้

คู่ไพรเมอร์ Alk1F, Alk1R และ Alk2F, Alk2R และ Alk3F, Alk3R

1. Initial denaturation	ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส	เป็นเวลา 5 นาที
2. Denaturation	ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส	เป็นเวลา 1 นาที
3. Annealing	ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส	เป็นเวลา 30 วินาที
4. Extension	ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส	เป็นเวลา 30 วินาที
ทำซ้ำขั้นตอนที่ 2-4 จำนวน 30 รอบ		
5. Final extension	ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส	เป็นเวลา 5 นาที

คู่มือ AlkB-1F และ AlkB-1R

- | | | |
|-------------------------------|-----------------------------|--------------------|
| 1. Initial denaturation | ที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส | เป็นเวลา 5 นาที |
| 2. Denaturation | ที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส | เป็นเวลา 30 วินาที |
| 3. Annealing | ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส | เป็นเวลา 30 วินาที |
| 4. Extension | ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส | เป็นเวลา 1 นาที |
| ทำขั้นตอนที่ 2-4 จำนวน 35 รอบ | | |
| 5. Final extension | ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส | เป็นเวลา 5 นาที |

คู่มือ AlkB1F, AlkB1R และ AlkB2F, AlkB2R

- | | | |
|-------------------------------|-----------------------------|-----------------|
| 1. Initial denaturation | ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส | เป็นเวลา 5 นาที |
| 2. Denaturation | ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส | เป็นเวลา 1 นาที |
| 3. Annealing | ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส | เป็นเวลา 1 นาที |
| 4. Extension | ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส | เป็นเวลา 1 นาที |
| ทำขั้นตอนที่ 2-4 จำนวน 30 รอบ | | |
| 5. Final extension | ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส | เป็นเวลา 3 นาที |

คู่มือ AlmAwF และ AlmAwR

- | | | |
|-------------------------------|-----------------------------|--------------------|
| 1. Initial denaturation | ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส | เป็นเวลา 5 นาที |
| 2. Denaturation | ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส | เป็นเวลา 30 วินาที |
| 3. Annealing | ที่อุณหภูมิ 52 องศาเซลเซียส | เป็นเวลา 30 วินาที |
| 4. Extension | ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส | เป็นเวลา 1 นาที |
| ทำขั้นตอนที่ 2-4 จำนวน 30 รอบ | | |
| 5. Final extension | ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส | เป็นเวลา 7 นาที |

คู่มือ CYP153F และ CYP153R

- | | | |
|-------------------------------|-----------------------------|--------------------|
| 1. Initial denaturation | ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส | เป็นเวลา 5 นาที |
| 2. Denaturation | ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส | เป็นเวลา 45 วินาที |
| 3. Annealing | ที่อุณหภูมิ 54 องศาเซลเซียส | เป็นเวลา 30 วินาที |
| 4. Extension | ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส | เป็นเวลา 1 นาที |
| ทำขั้นตอนที่ 2-4 จำนวน 35 รอบ | | |
| 5. Final extension | ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส | เป็นเวลา 10 นาที |

คู่มือ P450F, P450R

1. Initial denaturation	ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส	เป็นเวลา 4 นาที
2. Denaturation	ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส	เป็นเวลา 30 วินาที
3. Annealing	ที่อุณหภูมิ 52 องศาเซลเซียส	เป็นเวลา 30 วินาที
4. Extension	ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส	เป็นเวลา 1 นาที
ทำขั้นตอนที่ 2-4 จำนวน 32 รอบ		
5. Final extension	ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส	เป็นเวลา 10 นาที

คู่มือ P450fw, P450rv

1. Initial denaturation	ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส	เป็นเวลา 4 นาที
2. Denaturation	ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส	เป็นเวลา 45 วินาที
3. Annealing	ที่อุณหภูมิ 58 องศาเซลเซียส	เป็นเวลา 1 นาที
4. Extension	ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส	เป็นเวลา 1 นาที
ทำขั้นตอนที่ 2-4 จำนวน 25 รอบ		
5. Final extension	ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส	เป็นเวลา 5 นาที

ตรวจสอบผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสตามวิธีที่ ระบุไว้ในข้อ

3.1.3.2.2 โดยเปรียบเทียบกับสารละลาย DNA มาตรฐาน 100 bp DNA ladder

3.2 วิเคราะห์บทบาทของแบคทีเรียที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายน้ำมันดีเซลในตัวอย่างดินแอนตาร์กติกภายใต้อุณหภูมิต่ำ

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.2.1 สร้างระบบนิเวศจำลองดินแอนตาร์กติกปนเปื้อนน้ำมันดีเซลภายใต้อุณหภูมิต่ำ

ซึ่งตัวอย่างดินแอนตาร์กติก 8 กรัม ใส่ลงในขวดแก้วฝาเกลียวขนาด 30 มิลลิลิตร เติมน้ำมันดีเซล 1% และ 3% (น้ำหนัก/น้ำหนัก) แบ่งเป็น 8 ชุดการทดลอง ชุดละ 3 ซ้ำ ดังตารางที่ 3.2 และรูปที่ 3.3 โดยชุดการทดลอง AC (abiotic control) นำตัวอย่างดินแอนตาร์กติกนี้มาเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที จำนวน 1 ครั้ง/วัน เป็นเวลา 3 วัน ชุดการทดลอง NA (natural attenuation) เพื่อทดสอบการย่อยสลายน้ำมันดีเซลโดยแบคทีเรียประจำถิ่น ชุดการทดลอง BS (biostimulation) เพื่อทดสอบการย่อยสลายน้ำมันดีเซลด้วยการกระตุ้นการเจริญของแบคทีเรียโดยการเติมสารอาหาร ปรับปริมาณสารอาหารในชุดการทดลอง BS ให้มีอัตราส่วน คาร์บอนต่อไนโตรเจนต่อฟอสฟอรัสใกล้เคียงกับ 100:10:1 โดยเติมโซเดียมไนเตรทเป็นแหล่งไนโตรเจนและเติมไดโทแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟตเป็นแหล่งฟอสฟอรัส กวนผสมสารทั้งหมดให้เข้ากัน และเพื่อทดสอบว่าน้ำมันดีเซลมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของประชาคมแบคทีเรียจึงจัดทำชุดการทดลอง

CT (Control) โดยนำตัวอย่างดินแอนตาร์กติกใส่ในขวดแก้วและตั้งไว้ที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส ชุดการทดลอง CT+BS (control+biostimulation) นำตัวอย่างดินแอนตาร์กติกใส่ในขวดแก้วละปรับปริมาณสารอาหารให้มีอัตราส่วนคาร์บอน:ไนโตรเจน:ฟอสฟอรัสใกล้เคียงกับ 100:10:1 บ่มที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่าง วันที่ 0, 15, 30, 45, 60, 75, 90, 105 และ 120 สำหรับชุดการทดลองที่เติมน้ำมันดีเซล 1% (น้ำหนัก/น้ำหนัก) และเก็บตัวอย่างวันที่ 0, 30, 90, 150 และ 210 สำหรับชุดการทดลองที่เติมน้ำมันดีเซล 3% (น้ำหนัก/น้ำหนัก) เพื่อวิเคราะห์ปริมาณน้ำมันดีเซลที่เหลืออยู่ วิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงไปของประชาคมแบคทีเรีย และ คัดแยกแบคทีเรียสายพันธุ์บริสุทธิ์จากระบบนิเวศจำลองดินแอนตาร์กติกภายใต้อุณหภูมิต่ำ

ตารางที่ 3.2 ระบบนิเวศจำลองดินแอนตาร์กติกปนเปื้อนน้ำมันดีเซล

ชุดการทดลอง	ดินที่ไม่ได้ ฆ่าเชื้อ	ดินที่ผ่าน การฆ่าเชื้อ	น้ำมันดีเซล (น้ำหนัก/น้ำหนัก)	สารอาหาร
control (CT)	✓	-	-	
control+biostimulation (CT+BS)	✓	-	-	✓
abiotic control1 (AC1)	-	✓	1%	-
abiotic control2 (AC2)	-	✓	3%	-
natural attenuation1 (NA1)	✓	-	1%	-
natural attenuation2 (NA2)	✓	-	3%	-
biostimulation1 (BS1)	✓	-	1%	✓
biostimulation2 (BS2)	✓	-	3%	✓



รูปที่ 3.3 ระบบนิเวศจำลองดินแอนตาร์กติกปนเปื้อนน้ำมันดีเซล

3.2.2 วิเคราะห์ปริมาณน้ำมันดีเซลที่เหลืออยู่ในระบบนิเวศจำลองดิน

3.2.2.1 สร้างกราฟมาตรฐานสำหรับวิเคราะห์ Gas Chromatography-Flame ionization detector (GC-FID)

ชั่งน้ำมันดีเซล 300 มิลลิกรัม ผสมลงในเฮกเซน 10 มิลลิลิตร และ เจือจางให้ได้ความเข้มข้น 5,000 10,000 20,000 และ 30,000 มิลลิกรัม/ลิตร กรองด้วยหัวกรอง PTFE (PTFE filter) ขนาดความกว้างรู 0.2 ไมโครเมตร ลงในขวดสำหรับวิเคราะห์ GC-FID และนำไปวิเคราะห์ปริมาณน้ำมันดีเซลด้วยเครื่อง GC-FID จากนั้นนำข้อมูลที่ได้มาสร้างกราฟมาตรฐานของน้ำมันดีเซลระหว่างพื้นที่ได้กราฟและความเข้มข้นของน้ำมันดีเซล

3.2.2.2 สกัดน้ำมันดีเซลที่เหลืออยู่ในดินด้วยเฮกเซน

สกัดน้ำมันดีเซลที่เหลืออยู่ในดินตามวิธีที่ระบุไว้ใน Nopcharoenkul และคณะ (2011) โดยตักดินแอนตาร์กติกจากระบบนิเวศจำลองดิน 2 กรัม ใส่ในขวดแก้วฝาเกลียวขนาด 50 มิลลิลิตร เติมเฮกเซน 5 มิลลิลิตร ลงไปในขวดแก้วฝาเกลียว ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมสารเป็นเวลา 2 นาที และนำไปเขย่าบนเครื่องเขย่าด้วยความเร็วรอบ 200 รอบ/นาที 24 ชั่วโมง แช่แข็งที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง เพื่อแยกชั้นเฮกเซน หลังจากนั้นดูดส่วนเฮกเซนใส่ในหลอดทดลองหลอดใหม่ เติมโซเดียมซัลเฟตที่ผ่านการอบฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส ปั่นผสมเพื่อให้โซเดียมซัลเฟตกำจัดน้ำที่เหลืออยู่ในส่วนของเฮกเซน นำส่วนของเฮกเซนที่ผ่านการกำจัดน้ำออกไประเหยแห้งที่อุณหภูมิ 150 องศาเซลเซียส เติมเฮกเซน 1 มิลลิลิตร ปั่นผสมด้วยเครื่องผสมสาร 1 นาที กรองสารละลายผ่านหัวกรอง PTFE ที่มีขนาดความกว้างรู 0.20 ไมโครเมตร ลงในขวดสำหรับวิเคราะห์ GC-FID และวิเคราะห์ปริมาณน้ำมันดีเซลที่เหลืออยู่ด้วยเครื่อง GC-FID ภายใต้สภาวะดังนี้

คอลัมน์ HP-N5	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.32 มิลลิเมตร ยาว 30 เมตร ภายใน เคลือบด้วยเฟนนิลเมทิลไซโลเซน 5% หนา 0.25 ไมโครเมตร
อุณหภูมิคอลัมน์	เริ่มต้น 80 องศาเซลเซียส เพิ่มด้วยอัตรา 25 องศาเซลเซียส/นาที จนถึง 160 องศาเซลเซียส หยุดเป็นเวลา 3 นาที เพิ่มด้วยอัตรา 3 องศาเซลเซียส/นาที จนถึง 240 องศาเซลเซียส หยุดเป็นเวลา 2 นาที และเพิ่มด้วยอัตรา 40 องศาเซลเซียส/นาที จนถึง 300 องศาเซลเซียส หยุดเป็นเวลา 10 นาที
แก๊สตัวพา	ฮีเลียม
อัตราเร็วของแก๊สตัวพา	1.7 มิลลิลิตร/นาที
โหมด	split

คำนวณปริมาณน้ำมันที่หายไป ดังสมการ

$$\text{ปริมาณน้ำมันที่หายไป (\%)} = \frac{(\text{พื้นที่ใต้กราฟวันที่ } 0 - \text{พื้นที่ใต้กราฟของตัวอย่าง}) \times 100}{\text{พื้นที่ใต้กราฟวันที่ } 0}$$

คำนวณปริมาณน้ำมันที่เหลืออยู่ ดังสมการ

$$\text{ปริมาณน้ำมันที่เหลืออยู่ (\%)} = 100 - \text{ปริมาณน้ำมันที่หายไป (\%)}$$

3.2.2.3 วิเคราะห์อัตราการย่อยสลายน้ำมันดีเซลโดยใช้จลนพลศาสตร์การย่อยสลายของน้ำมันดีเซล

โดยศึกษาจากแบบจำลองค่าคงที่อัตราเร็วปฏิกิริยาอันดับหนึ่ง (Pseudo-first order) (Ho และ McKay, 1998) ดังสมการ

$$\log(q_e - q_t) = \log q_e - \frac{k_1}{2.303} t$$

เมื่อ k_1 คือ ค่า Rate Constant ของการย่อยสลายแบบ Pseudo-First Order
 q_e คือ ปริมาณการย่อยสลายสารที่สภาวะสมดุล
 q_t คือ ปริมาณการย่อยสลายสารที่เวลา t

3.2.3 คัดแยกและศึกษาลักษณะสมบัติของแบคทีเรียย่อยสลายน้ำมันดีเซลจากระบบนิเวศจำลองดิน

3.2.3.1 คัดแยกและระบุชนิดของแบคทีเรียย่อยสลายน้ำมันดีเซลจากระบบนิเวศจำลองดิน

เพิ่มจำนวนแบคทีเรียย่อยสลายน้ำมันดีเซลโดยนำตัวอย่างดินแอนตาร์กติกจากระบบนิเวศจำลองดิน 0.5 กรัม แขนวลอยในอาหารเหลว MSM ปริมาตร 4.5 มิลลิลิตร เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นดูดส่วนน้ำใส 0.5 มิลลิลิตร ใส่หลอดทดลองที่บรรจุอาหารเหลว MSM ปริมาตร 4.5 มิลลิลิตร และเติมน้ำมันดีเซล 0.25% (ปริมาตร/ปริมาตร) บ่มในเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส เมื่อครบเวลา 7 วัน จึงถ่ายอาหารเหลวที่มีความขุ่นหรือมีการเปลี่ยนสีของอาหารเหลวเมื่อเทียบกับชุดควบคุม ลงในอาหารเหลว MSM หลอดใหม่ ที่มีน้ำมันดีเซล 0.25% (ปริมาตร/ปริมาตร) ทำซ้ำเป็นจำนวน 3-4 ครั้ง จากนั้นคัดแยกแบคทีเรียย่อยสลายน้ำมันดีเซลโดยถ่ายเชื้อจากหลอดอาหารเหลว MSM ที่เปลี่ยนแปลงเมื่อเทียบกับชุดควบคุม 0.1 มิลลิลิตร เกลี่ยลงบนอาหารแข็ง MSM ที่พ่นทับด้วย 0.25% (ปริมาตร/ปริมาตร) น้ำมันดีเซล บ่มที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส จนกว่าจะพบการเจริญของโคโลนี แยกเชื้อให้บริสุทธิ์ตามวิธีของ Velho-Pereira และ Kamat (2011) โดยวิธี cross streak

plate ด้วยการนำห้วงเช็ยเชื้อ (loop) เช็ยเชื้อที่มีลักษณะโคโลนีแตกต่างกันมาลากทำแนวระนาบ ติดต่อกันลงบนอาหารแข็ง 100% Luria-Bertani (LB) จากนั้นนำไปบ่มที่ อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นระบุชนิดของแบคทีเรียด้วยการส่งเชื้อไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA ที่บริษัท Macrogen ประเทศเกาหลีใต้ และนำผลของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ไปจำแนก ชนิดจุลินทรีย์และเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล GenBank โดยโปรแกรม nucleotide blast (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>)

3.2.3.2 ทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายองค์ประกอบของน้ำมันดีเซลของ แบคทีเรียที่คัดแยกได้

3.2.3.2.1 เตรียมหัวเชื้อแบคทีเรีย

เลี้ยงแบคทีเรียในอาหารเหลว 0.25 เท่า (0.25X LB) ปริมาตร 45 มิลลิลิตร โดยการถ่ายเชื้อ แบคทีเรียที่ได้จากการคัดแยก 5 มิลลิลิตรลงไป เขย่าบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส 7 วัน จากนั้นนำมาปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกเซลล์ด้วยความเร็ว 8,000 รอบ/นาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส 10 นาที ล้างตะกอนเซลล์ในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.85% 2 ครั้ง แขนวลอยเซลล์ในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.85% จากนั้นวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาว คลื่น 600 นาโนเมตร (OD_{600}) โดยใช้เครื่อง Spectrophotometer ให้มีค่าประมาณ 1 ตรวจสอบ จำนวนหัวเชื้อแบคทีเรียที่ได้ และใช้สารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.85% ในการปรับหัวเชื้อให้มีจำนวน แบคทีเรียเริ่มต้นประมาณ 6 log CFU/มิลลิลิตร

3.2.3.2.2 ทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายองค์ประกอบของน้ำมัน ดีเซล

ทดสอบความสามารถในการย่อยสลายองค์ประกอบของน้ำมันดีเซลของแบคทีเรียที่คัดแยก ได้ในหลอดทดลองที่บรรจุอาหารเหลว MSM 4.5 มิลลิลิตร ที่มีสารแต่ละชนิดได้แก่ น้ำมันดีเซลความ เข้มข้น 0.25% (ปริมาตร/ปริมาตร) ฟีนานทรินความเข้มข้น 50 มิลลิกรัม/ลิตร เตตระเดเคน และ เฮกซะเดเคนความเข้มข้น 500 มิลลิกรัม/ลิตร โดยเติมหัวเชื้อแบคทีเรีย 0.5 มิลลิลิตร ที่ผ่าน การเขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำการ ทดลอง 3 ซ้ำ ควบคุมกับชุดควบคุม อาหารเหลว MSM ที่เติม สารแต่ละชนิด แต่ไม่เติมหัวเชื้อ แบคทีเรีย บ่มในเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างวันที่ 0 และ 14

3.2.3.2.3 สกัดและวิเคราะห์ปริมาณองค์ประกอบของน้ำมันดีเซลที่

เหลืออยู่จากการย่อยสลาย

สกัดและวิเคราะห์ปริมาณองค์ประกอบของน้ำมันดีเซลที่เหลืออยู่หลังจากการย่อยสลายด้วยเครื่อง GC-FID ตามวิธีที่อธิบายไว้ในงานวิจัยของ (Nopcharoenkul และคณะ, 2011) โดยการเติมเฮกเซน 5 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองที่มีตัวอย่าง ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมสารเป็นเวลา 2 นาที แช่เย็นที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อแยกชั้นของเฮกเซน จากนั้นดูดสารชั้นบนซึ่งเป็นเฮกเซนใสลงในหลอดทดลองใหม่ เติมโซเดียมซัลเฟตที่ผ่านการอบข้ามคืนที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส ปั่นผสมด้วยเครื่องผสมสารเพื่อให้โซเดียมซัลเฟตกำจัดน้ำที่เหลืออยู่ในส่วนของเฮกเซน แล้วระเหยแห้งที่ อุณหภูมิ 150 องศาเซลเซียส จากนั้นเติมเฮกเซน 1 มิลลิลิตร ปั่นผสมด้วยเครื่องผสมสารเป็นเวลา 1 นาที แล้วกรองสารละลายผ่านหัวกรอง PTFE ที่มีขนาดความกว้างรู 0.20 ไมโครเมตร ลงในขวดสำหรับวิเคราะห์ GC-FID และวิเคราะห์ปริมาณองค์ประกอบของน้ำมันดีเซลที่เหลืออยู่ด้วยเครื่อง GC-FID สำหรับพีแนนทรีน เตตระเดเคน และเฮกซะเดเคนภายใต้สภาวะดังนี้

คอลัมน์ HP-N5	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.32 มิลลิเมตร ยาว 30 เมตร ภายใน เคลือบด้วยเฟนิลเมทิลไซโลเซน 5% หนา 0.25 ไมโครเมตร
อุณหภูมิคอลัมน์	เริ่มต้น 80 องศาเซลเซียส เพิ่มด้วยอัตรา 25 องศาเซลเซียส/นาที จนถึง 160 องศาเซลเซียส หยุดเป็นเวลา 3 นาที เพิ่มด้วยอัตรา 3 องศาเซลเซียส/นาที จนถึง 220 องศาเซลเซียส หยุดเป็นเวลา 2 นาที และเพิ่มด้วยอัตรา 40 องศาเซลเซียส/นาที จนถึง 300 องศาเซลเซียส หยุดเป็นเวลา 7 นาที
แก๊สตัวพา	ฮีเลียม
อัตราเร็วของแก๊สตัวพา	2.1 มิลลิลิตร/นาที
โหมด	splitless

คำนวณประสิทธิภาพการย่อยสลาย ดังสมการ

$$\text{ประสิทธิภาพการย่อยสลาย (\%)} = \frac{(\text{พื้นที่ใต้กราฟชุดควบคุม} - \text{พื้นที่ใต้กราฟตัวอย่าง}) \times 100}{\text{พื้นที่ใต้กราฟชุดควบคุม}}$$

3.2.3.3 ศึกษาแนวโน้มในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพเบื้องต้นและความไม่ชอบน้ำของเซลล์ทดสอบประสิทธิภาพการสร้างสรรค์สารลดแรงตึงผิว

ศึกษาแนวโน้มในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพเบื้องต้นและความไม่ชอบน้ำของเซลล์ของแบคทีเรียตามวิธีของ (Abouseoud และคณะ, 2010) โดยเตรียมหัวเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์บริสุทธิ์ตามวิธีที่ระบุในข้อ 3.2.3.2.1 โดยใช้จำนวนเซลล์เริ่มต้นประมาณ $6 \log \text{CFU/มิลลิลิตร}$ เติมหักเชื้อแบคทีเรียปริมาณ 5 มิลลิลิตร ลงในขวดรูปชมพู่ที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MSM ปริมาตร 45 มิลลิลิตร และเติมน้ำมันดีเซลความเข้มข้น 0.25% (ปริมาตร/ปริมาตร) เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงาน โดยทำควบคุมกับชุดควบคุมที่มีการ เติมน้ำมันดีเซลความเข้มข้น 0.25% (ปริมาตร/ปริมาตร) ลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MSM ทำการทดลอง 3 ซ้ำ จากนั้นนำไปบ่มบนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน ปั่นแยกเซลล์ด้วยความเร็ว 8,000 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำส่วนของเหลวใส (supernatant) และส่วนตะกอนเซลล์ที่แยกได้ไปศึกษาแนวโน้มในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพเบื้องต้นและความไม่ชอบน้ำของเซลล์โดยวิธีการต่าง ๆ ดังนี้

3.2.3.3.1 การวัดค่าแรงตึงผิว (Surface tension)

นำส่วนของเหลวใส (supernatant) จากข้อ 3.2.3.3 ปริมาตร 25 มิลลิลิตร ไปวัดค่าแรงตึงผิวด้วยเครื่องวัดแรงตึงผิว (Tensiometer) ตามวิธีที่ระบุในคู่มือ โดยทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง บันทึกค่าที่ได้และเปรียบเทียบกับชุดควบคุม

3.2.3.3.2 การวัดค่าการกระจายน้ำมัน (Oil displacement)

วัดค่าการกระจายน้ำมันโดยเติมน้ำกลั่นปริมาตร 20 มิลลิลิตร ลงในงานเพาะเลี้ยงเชื้อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 15 เซนติเมตร หยดน้ำมันดีเซลปริมาตร 10 ไมโครลิตร ลงบนผิวน้ำ จากนั้นนำส่วนของเหลวใส (supernatant) จากข้อ 3.2.3.3 ปริมาตร 10 ไมโครลิตร หยดลงบนผิวน้ำน้ำมัน แล้ววัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณใสที่น้ำมันกระจายตัว (clear zone) โดยทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง และนำผลมาคำนวณหาพื้นที่การกระจายน้ำมันดังสมการ

$$\text{พื้นที่การกระจายน้ำมัน} = \pi r^2$$

3.2.3.3.3 การวัดค่าดัชนีอีมัลชัน (Emulsion Index, E24)

นำส่วนของเหลวใส (supernatant) จากข้อ 3.2.3.3 ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลอง จากนั้นเติมน้ำมันดีเซลปริมาตร 2 มิลลิลิตรลงไป ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมสารเป็นเวลา

2 นาที โดยทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำมาวัดค่าความสูงของชั้นอิมัลชันที่เกิดขึ้น และคำนวณค่าการเกิดอิมัลชันดังสมการ

$$E24 (\%) = (\text{ความสูงของชั้นอิมัลชัน} / \text{ความสูงของของเหลวทั้งหมด}) \times 100$$

3.2.3.3.4 การตรวจสอบความไม่ชอบน้ำของเซลล์ (Hydrophobicity)

นำส่วนตะกอนเซลล์จากข้อ 3.2.3.3 มาตรวจสอบความไม่ชอบน้ำของเซลล์ตามวิธีของ (Costa และคณะ, 2010) โดยล้างตะกอนเซลล์ด้วยบัฟเฟอร์ฟอสเฟตยูเรียแมกนีเซียมซัลเฟต (PUM) (ภาคผนวก ข) จำนวน 1 ครั้ง แขนวลอยเซลล์ในบัฟเฟอร์ PUM จากนั้นวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 400 นาโนเมตรให้มีค่าเท่ากับ 1.0 แล้วนำเซลล์ที่แขวนลอยปริมาตร 4 มิลลิลิตรมาผสมกับเฮกซะเดคเคน (hexadecane) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมสารเป็นเวลา 1 นาที โดยทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง ตั้งทิ้งไว้ให้แยกชั้นที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นดูดสารแขวนลอยของแบคทีเรียชั้นล่างมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 400 นาโนเมตรอีกครั้ง และคำนวณการเกิดไฮโดรโฟบิกดังสมการ

$$\text{การเกิดไฮโดรโฟบิก (\%)} = \frac{(1 - \text{OD}_{400} \text{ สุดท้าย})}{\text{OD}_{400} \text{ เริ่มต้น}} \times 100$$

3.2.4 วิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงและความสัมพันธ์ของแบคทีเรียในระบบนิเวศจำลองดิน

3.2.4.1 ตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงประชาคมแบคทีเรียในดินด้วยวิธี

polymerase chain reaction denature gradient gel electrophoresis (PCR-DGGE)

เพิ่มปริมาณ DNA (ที่สกัดได้จากระบบนิเวศจำลองดิน ตามวิธีข้อ 3.1.3.2.1 โดยสกัดตัวอย่างละ 3 ซ้ำ นำ DNA ทั้ง 3 ซ้ำมาผสมรวมกัน) บริเวณ 16S rRNA ด้วยวิธี PCR โดยใช้คู่ไพร์เมอร์ 341F-GC และ 520R (ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพร์เมอร์แสดงในตารางที่ 3.1) ซึ่งมีส่วนผสมสุดท้ายของแต่ละสารดังข้อ 3.1.3.2.3 และดำเนินปฏิกิริยาตามสภาวะดังนี้

1. Initial denaturation	ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส	เป็นเวลา 5 นาที
2. Denaturation	ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส	เป็นเวลา 30 วินาที
3. Annealing	ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส	เป็นเวลา 30 วินาที
4. Extension	ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส	เป็นเวลา 30 วินาที
ทำซ้ำขั้นตอนที่ 2-4 จำนวน 30 รอบ		
5. Final extension	ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส	เป็นเวลา 7 นาที

ตรวจสอบประสิทธิภาพแบบที่เรียกว่าวิธี DGGE (Muangchinda และคณะ, 2013) โดยใช้ชุด DCode™ System เริ่มจากเตรียมพอลิอะคริลาไมด์เจลเข้มข้น 8% ที่มีความเข้มข้นของ denaturant ได้แก่ ยูเรียและฟอร์มามาไมด์ เป็นเกรเดียนท์เท่ากับ 30-70% (องค์ประกอบของสารที่ใช้ในการเตรียมพอลิอะคริลาไมด์เจล ปริมาตร 32 มิลลิลิตร แสดงในตารางที่ 3.3) ทำพอลิอะคริลาไมด์เจลในชุดแซนวิชเตรียมเจล เสียบหัวลงไประหว่างกระจกแซนวิช ระวังอย่าให้เกิดฟองอากาศ ทิ้งให้พอลิอะคริลาไมด์เจลแข็งตัวที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลาข้ามคืน (หรืออย่างน้อย 5 ชั่วโมง) วางชุดเจลแซนวิชที่ได้ลงในแชมเบอร์ที่มีบัฟเฟอร์ 1X TAE ปริมาตร 7 ลิตร ที่ผ่านการให้ความร้อนจนมี อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส หยุดผลิตภัณฑ์ PCR 25 ไมโครลิตร ที่ผสมกับสตีติดตาม 5 ไมโครลิตร ลง ในช่องวิ่ง ทำอิเล็กโทรโฟรีซิสที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ความต่างศักย์ 130 โวลต์ เป็นเวลา 270 นาที แล้วนำพอลิอะคริลาไมด์เจลมาย้อมด้วยสารละลายเอธิเดียมโบรไมด์ เป็นเวลา 20 นาที ตรวจสอบและถ่ายภาพแถบ DNA ด้วยเครื่องถ่ายและวิเคราะห์ภาพเจล ภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ตความยาวคลื่น 312 นาโนเมตร

ตารางที่ 3.3 องค์ประกอบของพอลิอะคริลาไมด์เจลที่มี denaturant 30-70%

สาร	ปริมาณของสาร (มิลลิลิตร)		ความเข้มข้นสุดท้าย
	denaturant 30%	denaturant 70%	
น้ำกลั่นปราศจากเชื้อ	8.25	4.25	-
40% อะคริลาไมด์:บิส (37:1)	3.25	3.25	8%
50 เท่า TAE	0.3	0.3	1 เท่า
7 โมลาร์ ยูเรีย	1.9	4.4	แปรผัน
40% ฟอร์มามาไมด์	1.8	4.3	แปรผัน
กลีเซอรอล	0.3	0.3	2%
10% แอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต (APS)	81 ไมโครลิตร	81 ไมโครลิตร	0.5 กรัม/ลิตร
เตตระเมทิลีนไดอะมีน (TEMED)	20 ไมโครลิตร	20 ไมโครลิตร	-

3.2.4.2 การโคลนชิ้นส่วนผลิตภัณฑ์ลูกโซ่พอลิเมอร์เรสเพื่อวิเคราะห์และยืนยันผลลำดับนิวคลีโอไทด์ของแถบ DNA เด่น

3.2.4.2.1 ทำบริสุทธิ์ผลิตภัณฑ์ PCR

ตัดแถบผลิตภัณฑ์ PCR ตามขนาดที่ต้องการจากอะกาโรสเจลมาใส่ในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ ซึ่งนำหนักชิ้นอะกาโรสเจล แล้วทำบริสุทธิ์ผลิตภัณฑ์ PCR ด้วย Gel/PCR DNA Fragments Extraction Kit ตามวิธีที่ระบุในคู่มือ โดยเติม DF buffer 500 ไมโครลิตร ลงในชิ้นอะกาโรสเจลขนาด 300 มิลลิกรัม ปั่นผสมเล็กน้อย ละลายชิ้นอะกาโรสเจลอย่างสมบูรณ์ที่อุณหภูมิ 55-60 องศาเซลเซียส ประมาณ 10-15 นาที พร้อมทั้งกลับหลอดไปมาทุก ๆ 2-3 นาที จากนั้นตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องจนสารละลายผสมเย็น ดูดสารละลายผสม 800 ไมโครลิตร ลงในคอลัมน์ DF ที่มี collection tube ขนาด 2 มิลลิลิตร ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 30 วินาที เทส่วนน้ำใส่ทิ้ง เติม W1 buffer 400 ไมโครลิตร ลงในคอลัมน์ ปั่นเหวี่ยงด้วยสภาวะเดิมและเทส่วนใส่ทิ้ง เติม wash buffer (ที่เติมเอทานอลแล้ว) 600 ไมโครลิตร ลงในคอลัมน์ ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 นาที ปั่นเหวี่ยงด้วยสภาวะเดิมและเทส่วนใส่ทิ้ง ล้างด้วย wash buffer ซ้ำอีกครั้ง ระเหยเอทานอลออกจากคอลัมน์โดยปั่นเหวี่ยงอีกครั้งด้วยความเร็ว 13,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 3 นาที ย้ายคอลัมน์ไปยังหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์หลอดใหม่ หยด elution buffer 30 ไมโครลิตร ลงตรงกลางคอลัมน์ ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลาอย่างน้อย 2 นาที ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 2 นาที จะได้สารละลายบริสุทธิ์ของผลิตภัณฑ์ PCR เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

3.2.4.2.2 โคลนผลิตภัณฑ์ PCR

ไลเกทผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้จากข้อ 3.2.3.2.1 เข้ากับพลาสมิดเวกเตอร์ pGEM[®]-T Easy ด้วย pGEM[®]-T Easy Vector Systems ตามวิธีที่ระบุในคู่มือ โดยผสมสารต่าง ๆ ดังนี้

บัฟเฟอร์ 2X rapid ligation	5	ไมโครลิตร
พลาสมิดเวกเตอร์ pGEM [®] -T easy (50 นาโนกรัม)	1	ไมโครลิตร
เอนไซม์ T4 DNA ligase (3 หน่วย/ไมโครลิตร)	1	ไมโครลิตร
ผลิตภัณฑ์ PCR	3	ไมโครลิตร

ผสมให้เข้ากันด้วยการปิเปตต์ บ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง จะได้รีคอมบิแนนท์พลาสมิด (recombinant plasmid) ที่มีผลิตภัณฑ์ PCR สอดแทรกอยู่

เตรียมเซลล์คอมพีเทนต์ (competent) ของ *Escherichia coli* JM109 ตามวิธีของ (Sambrook และ Russell, 2001) โดยเลี้ยง *E. coli* JM109 บนอาหารแข็ง Ψ b (ภาคผนวก ก)

บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง เชื้อโคโลนีเดี่ยวลงในอาหารเหลว Ψ_b ปริมาตร 5 มิลลิลิตร เชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง หรือจนกระทั่งมีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร (OD_{600}) เท่ากับ 0.3-0.5 เพื่อใช้เป็นหัวเชื้อ จากนั้นถ่ายหัวเชื้อ 5 มิลลิลิตร ไปยังอาหารเหลว Ψ_b ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ที่บรรจุในขวดรูปชมพู่ชนิด arm flask เชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จนกระทั่งมีค่า OD_{600} เท่ากับ 0.5 แล้วย้ายเชื้อลงไปในหลอดเซนตริฟิวจ์ปราศจากเชื้อ แช่ในน้ำแข็งเป็นเวลา 5 นาที (ทำที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ตั้งแต่ขั้นตอนนี้) ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 3,000 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที เทอาหารเลี้ยงเชื้อทิ้ง เติมสารละลาย TfbI (ภาคผนวก ข) ที่เย็น 40 มิลลิลิตร กระจายตะกอนเซลล์ให้เข้ากัน (ห้ามใช้เครื่องปั่นผสม) แช่ในน้ำแข็งเป็นเวลา 5 นาที ปั่นเหวี่ยงด้วยสภาวะเดิมและ เติมสารละลาย TfbI ที่เย็น เติมสารละลาย TfbII (ภาคผนวก ข) ที่เย็น 4 มิลลิลิตร กระจายตะกอนเซลล์ให้เข้ากัน (ห้ามใช้เครื่องปั่นผสม) แช่ในน้ำแข็งเป็นเวลาอย่างน้อย 15 นาที แบ่งใส่หลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ปราศจากเชื้อหลอดละ 100 ไมโครลิตร แช่แข็งในไนโตรเจนเหลวทันที เก็บเซลล์ คอมพิวเตอร์ไว้ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส

ทรานสฟอร์มรีคอมบิแนนท์พลาสมิดเข้าสู่เซลล์คอมพิวเตอร์ *E. coli* JM109 ด้วยวิธี heat shock (Sambrook และ Russell, 2001) โดยละลายเซลล์คอมพิวเตอร์อย่างช้า ๆ ในอ่างน้ำแข็ง จากนั้นเติมรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่ไลเกตไว้ 3 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน แช่ในน้ำแข็งเป็นเวลา 20 นาที บ่มที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45-50 วินาที แล้วแช่ในน้ำแข็งทันทีเป็นเวลา 2 นาที

เติมอาหารเหลว SOC (ภาคผนวก ก) 1 มิลลิลิตร เชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 2 ชั่วโมง จะได้สารแขวนลอยของเซลล์คอมพิวเตอร์ที่ทรานสฟอร์มรีคอมบิแนนท์พลาสมิด

คัดเลือกทรานสฟอร์มแมนท์ (transformant) ที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่ต้องการด้วยวิธี Blue/White selection (Sambrook และ Russell, 2001) โดยปั่นเหวี่ยงสารแขวนลอยของเซลล์คอมพิวเตอร์ที่ทรานสฟอร์มรีคอมบิแนนท์พลาสมิดแล้วด้วยความเร็ว 4,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 4 นาที ดูดอาหารเลี้ยงเชื้อทิ้งให้เหลือปริมาตรสุดท้ายในหลอดประมาณ 100 ไมโครลิตร กระจายตะกอนเซลล์ในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ แล้วนำมาเกลี่ยลงบนอาหารแข็ง LB ที่ผสม 0.1 มิลลิลิตรของสารละลายแอมพิซิลิน (ภาคผนวก ข) ความเข้มข้นสุดท้าย 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร 0.1 มิลลิลิตรของสารละลาย X-gal (ภาคผนวก ข) ความเข้มข้นสุดท้าย 80 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และ 0.1 มิลลิลิตรของสารละลาย IPTG (ภาคผนวก ข) ความเข้มข้นสุดท้าย 0.5 มิลลิโมลาร์ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-24 ชั่วโมง คัดเลือกโคโลนีสีขาวซึ่งเป็นโคโลนีที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิด

3.2.4.2.3 สกัดรีคอมบิแนนท์พลาสมิด

เลี้ยงเซลล์คอมพิเทนต์ที่ได้จากการโคลนผลิตภัณฑ์ PCR ในข้อ 3.2.3.2.2 ในอาหารเหลว LB ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ที่ผสมสารละลายแอมพิซิลิน ความเข้มข้นสุดท้าย 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12-14 ชั่วโมง จากนั้นนำมาสกัดคอมบิแนนท์พลาสมิด ด้วย Presto Mini Plasmid Kit (Gereaid, Taiwan) ตามวิธีที่ระบุในคู่มือ โดยนำเซลล์แบคทีเรีย 1.5 มิลลิลิตร ลงในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ ปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกเซลล์ด้วยความเร็ว 13,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 1 นาที เทอาหารเลี้ยงเชื้อทิ้ง เติม PD1 buffer (ที่เติมอาร์เอ็นเอสเอแล้ว) 200 ไมโครลิตร ปั่นผสมเพื่อ กระจายตะกอนเซลล์ เติม PD2 buffer 200 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยการกลับหลอดไปมา บ่มที่ อุณหภูมิห้องเป็นเวลาอย่างน้อย 2 นาที เติม PD3 buffer 300 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยการกลับหลอดไปมา ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 3 นาที ดูดสารละลายส่วนใสลงในคอลัมน์ PD ที่มี collection tube ขนาด 2 มิลลิลิตร ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 30 วินาที เทส่วนน้ำใส่ทิ้ง เติม W1 buffer 400 ไมโครลิตรลงในคอลัมน์ ปั่นเหวี่ยงด้วยสภาวะเดิมและเทส่วนใสทิ้ง เติม wash buffer (ที่เติมเอทานอลแล้ว) 600 ไมโครลิตร ลงในคอลัมน์ ปั่นเหวี่ยงด้วยสภาวะเดิมและเทส่วนใสทิ้ง ล้างด้วย wash buffer ซ้ำอีกครั้ง ระบายเอทานอลออกจากคอลัมน์โดยปั่นเหวี่ยงอีกครั้งด้วยความเร็ว 13,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 3 นาที ย้าย คอลัมน์ไปยังหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์หลอดใหม่ หยด elution buffer 50 ไมโครลิตร ลงตรงกลางคอลัมน์ ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 2 นาที ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,000 รอบ/ นาที เป็นเวลา 2 นาที จะได้สารละลายบริสุทธิ์ของรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่คาดว่าจะมีผลิตภัณฑ์ PCR อยู่ เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

3.2.4.2.4 ตรวจสอบผลิตภัณฑ์ PCR ในรีคอมบิแนนท์พลาสมิด

ตัดรีคอมบิแนนท์พลาสมิดด้วยเอนไซม์ EcoRI โดยมีองค์ประกอบของปฏิกิริยาปริมาตร 10 ไมโครลิตร ในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ (ผสมสารทั้งหมดให้เข้ากันก่อนเติมเอนไซม์) ดังนี้

น้ำปลอดประจุปราศจากเชื้อ	7	ไมโครลิตร
10 เท่าบัฟเฟอร์ (restriction enzyme buffer)	1	ไมโครลิตร
รีคอมบิแนนท์พลาสมิด pGEM [®] -T Easy	1	ไมโครลิตร
เอนไซม์ EcoRI	1	ไมโครลิตร

ผสมเบา ๆ ให้เข้ากันอีกครั้ง ปั่นเหวี่ยงเพื่อให้สารผสมมารวมกันที่ก้นหลอด บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1-4 ชั่วโมง จากนั้นนำสารผสมหลังเกิดปฏิกิริยามาตรวจสอบชิ้น DNA สอดแทรกด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสในบัฟเฟอร์ 1X TAE โดยใช้อะกาโรสเจลความเข้มข้น 2% เปรียบเทียบกับสารละลาย DNA มาตรฐาน 100 bp DNA ladder รีคอมบิแนนท์

พลาสมิด pGEM®-T Easy ที่มีชิ้น DNA สอดแทรกขนาดเท่ากับผลิตภัณฑ์ PCR จะถูกส่งไปวิเคราะห์ ลำดับนิวคลีโอไทด์

3.2.4.2.5 วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rRNA

ส่งวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้น DNA สอดแทรกในรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่บริษัท Ward Medic Ltd., Part ด้วยระบบ Li-Cor® NEN 4200 Global IR2 และเครื่อง ABI® Prism DNA Sequencers ในการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยใช้ไพรเมอร์ M13F และ M13R ซึ่งจำเพาะกับ ลำดับนิวคลีโอไทด์ของพลาสมิดเวกเตอร์ เมื่อได้ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้น DNA สอดแทรก นำข้อมูลที่ได้ไปเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์กับข้อมูลที่มีในฐานข้อมูล GenBank โดยใช้โปรแกรม BLASTn (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)

3.2.4.3 วิเคราะห์ลักษณะและโครงสร้างประชาคมแบคทีเรียทั้งหมดด้วยการ วิเคราะห์ลำดับเบสของแอมพลิคอนของยีน 16S rRNA

สกัด DNA จากตัวอย่างดินในชุดการทดลองโดยใช้ชุด PowerSoil DNA Isolation Kit ตาม วิธีที่ระบุในข้อ 3.1.3.2.1 โดยสกัด DNA ตัวอย่างละ 3 ซ้ำ และนำ DNA ทั้ง 3 ซ้ำมาผสมรวมกัน ส่งวิเคราะห์ตัวอย่างด้วยวิธีวิเคราะห์ลำดับเบสของแอมพลิคอนของยีนมีชิ้นตอนหลักดังนี้

นำ DNA ที่ได้จากการสกัดมาเพิ่มจำนวน DNA บริเวณ 16S rRNA ด้วย PCR โดยใช้ไพรเมอร์ 515F (5'- GTG CCA GCM GCC GCG GTAA – 3') และ 806R (5'- GGA CTA CHV GGG TWT CTA AT – 3') (V4 region) (Walters และคณะ, 2016)

ทำบริสุทธิ์ผลิตภัณฑ์ DNA ที่ได้จากปฏิกิริยาถูกโซฟอลิเมอไรเซชัน (PCR Clean up) โดยใช้ AMPure XP beads ของบริษัท Beckman Coulter, USA เพื่อชะล้างบัฟเฟอร์ ไพรเมอร์ และ ไพรเมอร์ไดมอร์ที่อาจมีปะปนอยู่ในระหว่างขั้นตอนของการเพิ่มจำนวน DNA ด้วยการทำ PCR ใช้ 2x KAPA HiFi HotStart ReadyMix ของบริษัท Kapa Biosystems, USA ในการติด Index (ชุด Nextera XT Index Kit ของบริษัท Illumina, USA) ที่บริเวณปลาย sequencing primer ทั้ง 2 ด้าน และติดที่ Illumina sequencing adapters ทำบริสุทธิ์ผลิตภัณฑ์ DNA ที่ได้จากการทำ PCR ครั้งที่ 2 (PCR Cleanup 2) โดยใช้ AMPure XP beads เพื่อชะล้างสารละลายไพรเมอร์ไดมอร์ที่อาจ ยังคงมีหลงเหลืออยู่ในระหว่างขั้นตอนของการเพิ่มจำนวน DNA จากการทำ PCR ก่อนหน้านั้น วัดความเข้มข้นโดยใช้เครื่อง DeNovix ของบริษัท DeNovix, USA และ คำนวณความเข้มข้นของ DNA เจือจาง และรวมตัวอย่างโดยมีสูตรคำนวณความเข้มข้นของ DNA ดังนี้

$$\frac{(\text{concentration in ng}/\mu\text{l}) \times 10^6}{(660 \text{ g/mol} \times \text{average library size})} = \text{concentration in nM}$$

วิเคราะห์ลำดับเบสของแอมพลิคอนของยีน 16S rRNA ด้วยเครื่อง Miseq ของบริษัท Illumina, USA โดยใช้ Miseq Reagent kit V2 ของบริษัท Illumina, USA และนำผลที่ได้ไปวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงของประชาคมแบคทีเรียในระบบนิเวศจำลองดินที่ปนเปื้อนน้ำมันดีเซล ภายใต้อุณหภูมิต่ำ ด้วยโปรแกรม Base space ด้วยฐานข้อมูล Greengenes คำนวณจำนวนกลุ่มโดยการจัดกลุ่มที่ระดับความคล้ายคลึงของลำดับเบสที่ 97% หรือ Operational taxonomic units (OTUs) ด้วยโปรแกรม mothur (Schloss และคณะ, 2009) และวิเคราะห์ค่าดัชนีความหลากหลาย Shannon-Wiener (Peet, 1975) จากสมการ

$$H' = - \sum_{i=1}^s pi(\ln pi)$$

เมื่อ	H'	คือ	ค่าดัชนีความหลากหลายของ Shannon-Wiener
	pi	คือ	สัดส่วนระหว่างจำนวนแบคทีเรีย i ต่อจำนวนแบคทีเรียทั้งหมด (เมื่อ i = 1, 2, 3,...s)
	s	คือ	จำนวนชนิดแบคทีเรียทั้งหมด
	ln	คือ	ลอการิทึมฐานธรรมชาติ

3.2.4.4 วิเคราะห์โครงสร้างประชาคมแบคทีเรียทั้งหมดและยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายน้ำมันดีเซลภายใต้อุณหภูมิต่ำด้วยเทคนิคซีออตกันเมตาจีโนมิกส์

สกัด DNA จากตัวอย่างดินในชุดการทดลองโดยใช้ชุด PowerSoil DNA Isolation Kit ตามวิธีที่ระบุในข้อ 3.1.3.2.1 โดยสกัด DNA ตัวอย่างละ 3 ซ้ำ และนำ DNA ทั้ง 3 ซ้ำมาผสมรวมกัน ส่งวิเคราะห์ตัวอย่างด้วยวิธีซีออตกันเมตาจีโนมิกส์ซึ่งมีขั้นตอนหลักดังนี้

ใช้ 2x KAPA HiFi HotStart ReadyMix ของบริษัท Kapa Biosystems, USA ในการติด Index (ชุด Nextera XT Index Kit ของบริษัท Illumina, USA) บ่มที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส 5 นาทีเพื่อตัดให้ได้ชิ้นส่วนที่ต้องการ นำ Neutralize NTA ออก ติด index 1(i7) และ index2 (i5) ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์เรส ทำบริสุทธิ์ผลิตภัณฑ์ DNA ที่ได้จากการทำ PCR ครั้งที่ 2 (PCR Cleanup 2) โดยใช้ 1.8x AMPure XP beads วัดขนาดชิ้นส่วน DNA ด้วย Bioanalyzer และวิเคราะห์ Metagenomic sequencing ด้วยเครื่อง Miseq ของบริษัท Illumina, USA โดยใช้ Miseq Reagent kit V2 ของบริษัท Illumina, USA

3.2.4.5 วิเคราะห์ข้อมูลเมตาจีโนมิกส์ด้วยโปรแกรมชีวสารสนเทศ

นำข้อมูลเมตาจีโนมิกส์จากการวิเคราะห์ด้วยวิธีซีออตกันเมตาจีโนมิกส์ไปวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงของประชาคมแบคทีเรียและยีนในระบบนิเวศจำลองดินที่ปนเปื้อนน้ำมันดีเซลภายใต้

อุณหภูมิต่ำ โดยอัลโพลดลง MG-RAST (<https://metagenomics.anl.gov>) เวอร์ชัน 4.0 (Meyer และคณะ, 2008) ประมวลผลผ่าน QC โดย metagenomic sequences ถูกเก็บอยู่ใน MG-RAST ลำดับ mgm4721951.3 ถึง mgm4721963.3 วิเคราะห์ประชาคมแบคทีเรียด้วยการเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) วิเคราะห์ยีนที่เกี่ยวข้องกับการทนเย็นด้วยการเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล COG (Clusters of Orthologous Groups) และยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายน้ำมันดีเซลด้วยการเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล KO (KEGG Orthology) โดยใช้ค่า e-value สูงสุดคือ 10^{-5} ค่าความเหมือนของนิวคลีโอไทด์มากกว่า 60% และความยาวในการจัดเรียงอย่างน้อย 15 bp สำหรับการวิเคราะห์ประชาคมแบคทีเรีย และอย่างน้อย 15 กรดอะมิโนสำหรับการวิเคราะห์ยีนที่เกี่ยวข้องกับการทนเย็นและย่อยสลายน้ำมันดีเซล

3.2.4.6 วิเคราะห์ข้อมูลเมตาจีโนมิกส์ด้วยการวิเคราะห์ทางสถิติ

วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติโดยใช้ White's non-parametric *t* test ด้วย false discovery rate (FDR) ซึ่งแสดงผลออกมาเป็นค่า q-value ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% และวิเคราะห์ทางสถิติด้วยวิธีการวิเคราะห์องค์ประกอบหลัก (Principal component analysis; PCA) ด้วยโปรแกรม STAMP เวอร์ชัน 2.1.3 (Parks และคณะ, 2014) โดยแนวทางการเปรียบเทียบแสดงดังตารางที่ 3.4

ตารางที่ 3.4 แนวทางการเปรียบเทียบทางสถิติด้วยข้อมูลเมตาจีโนมิกส์ควบคู่กับการวิเคราะห์ประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันดีเซลในระบบนิเวศจำลองดินแอนตาร์กติกภายใต้อุณหภูมิต่ำ

Treatment	ข้อมูลช็อตกันเมตาจีโนมิกส์		ประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันดีเซลในระบบนิเวศจำลองดิน
น้ำมันดีเซล	ชุดควบคุมที่ไม่ได้เติมน้ำมันดีเซล (CT30 และ CT30BS)	ชุดการทดลองที่เติมน้ำมันดีเซล 1% (NA30, NA90, BS30, และ BS90), 3% (NA30, NA90, NA210, BS30, BS90, BS210)	-
ความเข้มข้นน้ำมันดีเซล	ชุดที่เติมน้ำมันดีเซล 1% (น้ำหนัก/น้ำหนัก) (NA30, NA90, BS30, และ BS90)	ชุดที่เติมน้ำมันดีเซล 3% (น้ำหนัก/น้ำหนัก) (NA30, NA90, NA210, BS30, BS90, BS210)	✓
สารอาหาร	ชุด natural attenuation 1% (NA30 และ NA90) 3% (NA30, NA90 และ NA210)	ชุด biostimulation 1% (BS30 และ BS90) 3% (BS30, BS90 และ BS210)	✓

บทที่ 4

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

4.1 ลักษณะสมบัติทางกายภาพ เคมี และชีวภาพของตัวอย่างดินแอนตาร์กติก

4.1.1 ลักษณะสมบัติทางกายภาพและเคมีของตัวอย่างดินแอนตาร์กติก

ผลการวิเคราะห์ลักษณะสมบัติทางกายภาพและเคมีของตัวอย่างดินแอนตาร์กติกที่ได้มาจากบริเวณภูเขาหลังสถานีวิจัยเกรทวอลล์ ทวีปแอนตาร์กติกา จากการส่งวิเคราะห์ที่โครงการพัฒนาวิชาการดิน-ปุ๋ย และสิ่งแวดล้อม ภาควิชาปฐพีวิทยา คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์แสดงดังตารางที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 สมบัติทางกายภาพและเคมีของตัวอย่างดินแอนตาร์กติก

ลักษณะดิน	pH	ความชื้น (%)	อินทรีย์วัตถุ(%)	Total N (%)	Total P (%)	C/N ratio
ดินร่วนปนทราย	7	1.28%	0.45	0.03	0.04	8.6

จากผลการวิเคราะห์ลักษณะของดินพบว่าอนุภาคของดินมีลักษณะเป็นทราย 73% ทรายแป้ง 16% และดินเหนียว 10% โดยอนุภาคของดินมีผลต่อการแทรกซึมของน้ำและสารอาหารรวมถึงน้ำมันลงสู่ดิน ซึ่งดินที่มีลักษณะเป็นดินทรายนั้น น้ำมันสามารถซึมผ่านได้ดีกว่าดินร่วนหรือดินเหนียว และอาจส่งผลต่อการเข้าถึงน้ำมันของแบคทีเรียในดิน (Labud และคณะ, 2007) และพบว่าดินตัวอย่างแอนตาร์กติกมีค่า pH เท่ากับ 7 ซึ่งอยู่ในช่วงที่เหมาะสมสำหรับการเจริญของแบคทีเรียส่วนใหญ่ที่ย่อยสลายสารประกอบไฮโดรคาร์บอน เนื่องจากค่า pH มีผลต่อการละลายและการเข้าถึงทางชีวภาพของสารประกอบไฮโดรคาร์บอน โดยช่วงค่า pH ที่เหมาะสมต่อการย่อยสลายสารประกอบไฮโดรคาร์บอนอยู่ในช่วง 5.0-9.0 (Lu และคณะ, 2011; Rahman และคณะ, 2002) และผลการวิเคราะห์สารอาหารในดินแอนตาร์กติกพบว่ามีปริมาณน้อย โดยอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนต่อฟอสฟอรัสในดิน มีอัตราส่วนประมาณ 8.6:1:1.3 โดยรายงานของ Ron และ Rosenberg (2010) พบว่าอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนต่อฟอสฟอรัส 100:10:1 เป็นอัตราส่วนที่เหมาะสมที่สุดในการย่อยสลายสารประกอบไฮโดรคาร์บอนโดยแบคทีเรีย ดังนั้นหากมีการปนเปื้อนน้ำมันปิโตรเลียม อัตราส่วนของ C:N:P อาจมีผลต่อกิจกรรมของจุลินทรีย์ ในการศึกษาจึงเลือกใช้

วิธี biostimulation ซึ่งเป็นการเติมสารอาหารเป็นหนึ่งในวิธีที่ใช้ในการทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันดีเซลของแบคทีเรียประถิ่นในดินแอนตาร์กติกต่อไป

4.1.2 ลักษณะสมบัติทางชีวภาพของตัวอย่างดินแอนตาร์กติก

4.1.2.1 จำนวนแบคทีเรียทั้งหมดและจำนวนแบคทีเรียย่อยสลายน้ำมันดีเซลในตัวอย่างดินแอนตาร์กติก

ผลการตรวจนับจำนวนแบคทีเรียโดยวิธี MPN ในตัวอย่างดินแอนตาร์กติก พบว่ามีจำนวนแบคทีเรียทั้งหมด $1.1 \pm 0 \times 10^7$ MPN/กรัม น้ำหนักดินเปียก และมีจำนวนแบคทีเรียย่อยสลายน้ำมันดีเซล $1.96 \pm 1.20 \times 10^4$ MPN/กรัม น้ำหนักดินเปียก ซึ่งแสดงถึงการมีอยู่ของแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลายน้ำมันดีเซลในตัวอย่างดินแอนตาร์กติก โดย Coulon และคณะ (2005) ได้นับจำนวนแบคทีเรียย่อยสลายปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนในตัวอย่างดินที่ปกคลุมด้วยพีช บริเวณสถานีวิจัยของฝรั่งเศสในทวีปแอนตาร์กติกา ซึ่งใช้น้ำมันดิบเป็นแหล่งคาร์บอน บ่มที่อุณหภูมิ 12 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วัน พบว่ามีจำนวนแบคทีเรียย่อยสลายปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอน 2.2×10^5 MPN/กรัม น้ำหนักดินเปียก แต่งานวิจัยดังกล่าวไม่ได้รายงานจำนวนแบคทีเรียทั้งหมด เมื่อเปรียบเทียบกับงานวิจัยนี้พบว่างานวิจัยของ Coulon และคณะ (2005) พบแบคทีเรียย่อยสลายปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนมากกว่างานวิจัยนี้เพียงเล็กน้อย คาดว่าเป็นผลมาจากลักษณะทางกายภาพของดิน และสารประกอบไฮโดรคาร์บอนในดินที่แตกต่างกัน ซึ่งในงานวิจัยของ Coulon และคณะ (2005) พบว่า C/N ratio ในดินมีค่า 13.6 ซึ่งปัจจัยเหล่านี้ น่าจะส่งผลต่อจำนวนแบคทีเรียย่อยสลายปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอน

4.1.2.2 ยีนที่เกี่ยวข้องในการย่อยสลายน้ำมันดีเซลของตัวอย่างดินแอนตาร์กติก

จากผลการตรวจนับจำนวนแบคทีเรียที่ย่อยสลายน้ำมันดีเซลโดยวิธี MPN พบว่าในตัวอย่างดินแอนตาร์กติกมีแบคทีเรียที่ย่อยสลายน้ำมันดีเซล ดังนั้นจึงตรวจสอบยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายน้ำมันดีเซลเพื่อยืนยันผลการมีอยู่ของแบคทีเรียที่มีแนวโน้มในการย่อยสลายน้ำมันดีเซล ซึ่งผลการตรวจสอบยีนโดยใช้ 10 คู่ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีนย่อยสลายอะลิฟาติกไฮโดรคาร์บอน แสดงดังตารางที่ 4.2 และรูปที่ จ.1, ภาคผนวก จ พบว่าในตัวอย่างดินแอนตาร์กติกสามารถตรวจพบผลิตภัณฑ์ PCR จากคู่ไพรเมอร์ P450fw1 และ P450rv3 ตามขนาดที่คาดหวัง 339 bp ซึ่งจำเพาะต่อยีน CYP153 ที่ประมวลรหัสเอนไซม์ไซโตโครม P450 โมโนออกซิจีเนส (cytochrome P450 monooxygenase; CYP153) ที่จำเพาะกับการย่อยสลายแอลเคนสายกลางที่มีจำนวนคาร์บอน 8-16 อะตอม (van Beilen และคณะ, 2006) โดยอาศัยระบบขนส่งอิเล็กตรอนที่ประกอบด้วยเฟอร์รีดอกซิน (ferredoxin) และเฟอร์รีดอกซินรีดักเตส (ferredoxin reductase) เช่น CYP153

ของ *Acinetobacter* sp. EB104 ที่สามารถย่อยสลายแอลเคนที่มีจำนวนคาร์บอน 6-11 อะตอม (Maier และคณะ, 2001)

ผลการตรวจหายีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายแอลเคนของตัวอย่างดินแอนตาร์กติกไม่พบผลิตภัณฑ์ PCR จากไพรเมอร์ ALK1 ซึ่งจำเพาะต่อยีน *alkB* ที่มีบทบาทในการย่อยสลายแอลเคนสายสั้นถึงกลาง และผลิตภัณฑ์ PCR จากไพรเมอร์ ALK2 และ AlmAw ซึ่งจำเพาะต่อยีน *alkM* และ *almA* ที่มีบทบาทในการย่อยสลายแอลเคนสายกลางถึงยาว แต่พบผลิตภัณฑ์ PCR จากไพรเมอร์ P450fw1 และ P450rv3 ที่จำเพาะต่อยีน CYP153 ซึ่งมีบทบาทในการย่อยสลายแอลเคนสายกลางที่มีจำนวนคาร์บอน 8-16 อะตอม อย่างไรก็ตามไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีน CYP153 ที่ใช้ในงานวิจัยนี้มีหลายคู่ แต่สามารถตรวจพบด้วยไพรเมอร์ที่จำเพาะกับบริเวณ substrate-binding GGNDTTRN และ heme-binding cysteine (HLSFGFGIHRC) โดยผลิตภัณฑ์ PCR จากไพรเมอร์ P450 fw1 & rv3 ที่พบในตัวอย่างดินแอนตาร์กติกมีความคล้ายคลึงกับลำดับกรดอะมิโนของยีน Cytochrome P450 ที่พบใน Actinobacteria 80% (ตารางที่ ง.1, ภาคผนวก ง) จึงคาดว่าในตัวอย่างดินแอนตาร์กติกน่าจะมี Actinobacteria และแบคทีเรียดังกล่าวอาจมีบทบาทในการย่อยสลายน้ำมันดีเซล

ตารางที่ 4.2 ยีนที่เกี่ยวข้องในการย่อยสลายน้ำมันดีเซลโดยใช้ 10 คู่ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีนย่อยสลายอะลิฟาติกไฮโดรคาร์บอน (รูปที่ จ.1, ภาคผนวก จ)

ตัวอย่างดิน	ไพรเมอร์									
	ALK1 (ยีน <i>alkB</i>)	ALK2 (ยีน <i>alkM</i>)	ALK3 (ยีน <i>alkB₁</i>)	ALKB-1 (ยีน <i>alkB-1</i>)	ALKB1 (ยีน <i>alkB1</i>)	ALKB2 (ยีน <i>alkB2</i>)	CYP153 (ยีน CYP153)	P450 (ยีน CYP153)	AlmAw (ยีน <i>almA</i>)	P450 fw1 & rv3 (ยีน CYP153)
	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+

หมายเหตุ: - หมายถึง ไม่พบผลิตภัณฑ์ PCR ตามขนาดที่คาดหวัง

+ หมายถึง พบผลิตภัณฑ์ PCR ตามขนาดที่คาดหวัง

4.2 แบคทีเรียที่มีบทบาทเกี่ยวข้องกับการย่อยสลายน้ำมันดีเซลในตัวอย่างดินแอนตาร์กติกภายใต้อุณหภูมิต่ำ

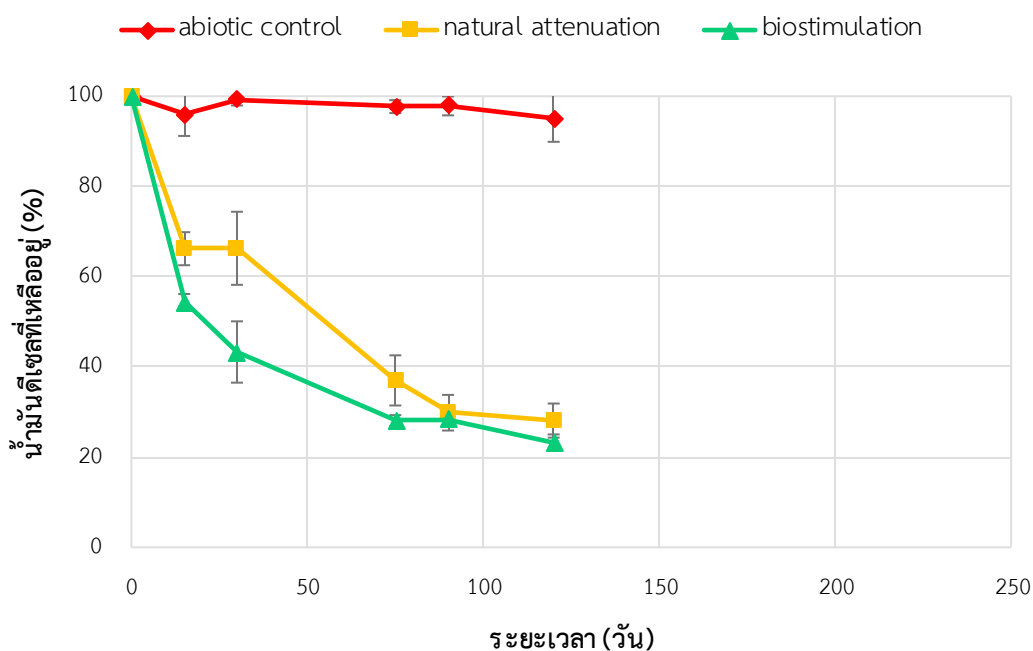
4.2.1 การย่อยสลายน้ำมันดีเซลในตัวอย่างดินแอนตาร์กติกในระบบนิเวศจำลองดินภายใต้อุณหภูมิต่ำ

จากผลการตรวจนับจำนวนแบคทีเรียที่ย่อยสลายน้ำมันดีเซล และการตรวจสอบยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายแอลเคน พบว่ามีแบคทีเรียที่ย่อยสลายน้ำมันดีเซล และพบยีน CYP153 ซึ่งเกี่ยวข้องกับการย่อยสลายแอลเคนสายกลาง ดังนั้นคาดว่าแบคทีเรียประจำถิ่นในตัวอย่างดิน

แอนตาร์กติกน่าจะมีประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันดีเซลได้ จึงทดสอบการย่อยสลายน้ำมันดีเซลในดินแอนตาร์กติกในระบบนิเวศจำลองดินภายใต้อุณหภูมิต่ำ โดยเติมน้ำมันดีเซล 1% และ 3% (น้ำหนัก/น้ำหนัก) เพื่อทดสอบปัจจัยความเข้มข้นของน้ำมันดีเซลต่อการเปลี่ยนแปลงประชาคมแบคทีเรียและประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันดีเซลของแบคทีเรียในตัวอย่างดินแอนตาร์กติก ทดสอบ 3 ชุดการทดลอง ชุด AC คือ abiotic control หรือชุดควบคุม ชุด NA คือ natural attenuation เพื่อทดสอบการย่อยสลายน้ำมันดีเซลโดยแบคทีเรียประจำถิ่นในดินแอนตาร์กติก ชุด BS คือ biostimulation เพื่อทดสอบการย่อยสลายน้ำมันดีเซลด้วยการกระตุ้นการเจริญของแบคทีเรียประจำถิ่นในดินแอนตาร์กติกโดยการเติมสารอาหารที่ปรับให้มีอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนต่อฟอสฟอรัสเท่ากับ 100:10:1 เนื่องจากสารอาหารในตัวอย่างดินแอนตาร์กติก มีปริมาณต่ำ ซึ่งอาจไม่เหมาะสมต่อการย่อยสลายทางชีวภาพของแบคทีเรีย ผลการวิเคราะห์ค่าเฉลี่ยของปริมาณน้ำมันดีเซลที่เหลืออยู่ในชุดการทดลองที่เติมน้ำมันดีเซล 1% (น้ำหนัก/น้ำหนัก) เมื่อเวลาผ่านไป 15, 30, 75, 90 และ 120 วัน แสดงดังตารางที่ 4.3 และรูปที่ 4.1 และผลการวิเคราะห์ค่าเฉลี่ยของปริมาณน้ำมันดีเซลที่เหลืออยู่ในชุดการทดลองที่เติมน้ำมันดีเซล 3% (น้ำหนัก/น้ำหนัก) เมื่อเวลาผ่านไป 30, 90, 150 และ 210 วัน แสดงดังตารางที่ 4.4 และรูปที่ 4.2

ตารางที่ 4.3 การย่อยสลายน้ำมันดีเซลในระบบนิเวศจำลองดินแอนตาร์กติกภายใต้อุณหภูมิต่ำที่เติมน้ำมันดีเซล 1% (น้ำหนัก/น้ำหนัก) และวิเคราะห์ปริมาณน้ำมันดีเซลที่เหลืออยู่ด้วย GC-FID

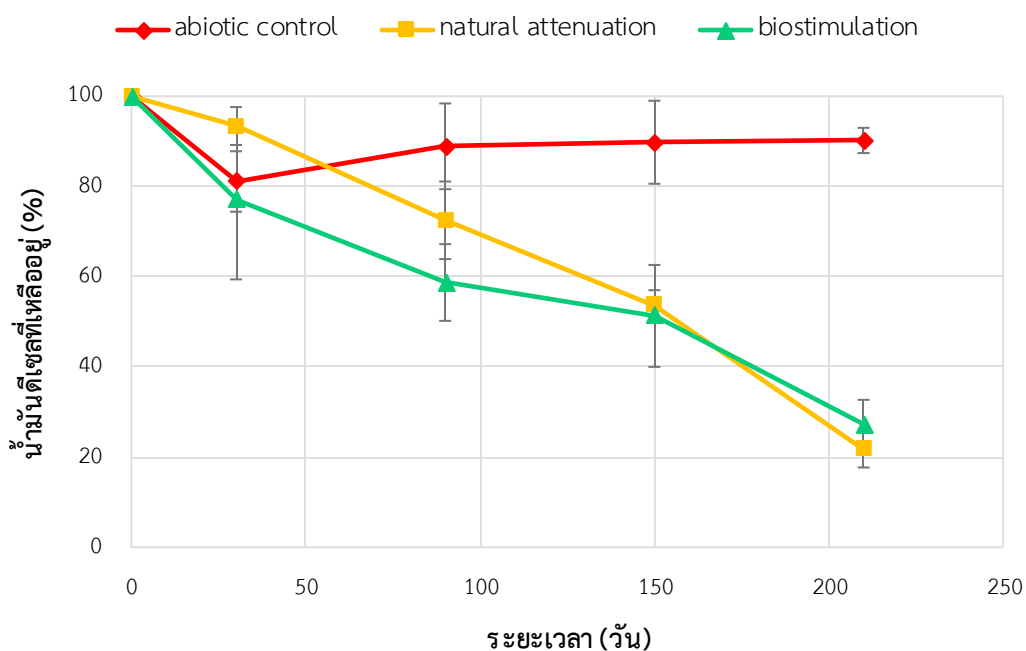
ชุดการทดลอง	น้ำมันดีเซลที่เหลืออยู่ (%)				
	วันที่ 15	วันที่ 30	วันที่ 75	วันที่ 90	วันที่ 120
ชุด AC abiotic control	96±4.8	99.3±1.3	97.7±1.4	97.8±2.1	95.1±5.2
ชุด NA natural attenuation	66.2±3.6	66.2±8.1	37±5.5	29.8±3.9	28.1±3.7
ชุด BS biostimulation	54.3±1.8	43.3±6.8	28.1±1.2	28.2±0.8	23.2±1.8



รูปที่ 4.1 การทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันดีเซลในระบบนิเวศจำลองดินแอนตาร์กติกที่เติมน้ำมันดีเซล 1% (น้ำหนัก/น้ำหนัก) และวิเคราะห์ปริมาณน้ำมันดีเซลที่เหลืออยู่โดย GC-FID

ตารางที่ 4.4 การย่อยสลายน้ำมันดีเซลในระบบนิเวศจำลองดินแอนตาร์กติกภายใต้อุณหภูมิต่ำที่เติมน้ำมันดีเซล 3% (น้ำหนัก/น้ำหนัก) และวิเคราะห์ปริมาณน้ำมันดีเซลที่เหลืออยู่ด้วย GC-FID

ชุดการทดลอง	น้ำมันดีเซลที่เหลืออยู่ (%)			
	วันที่ 30	วันที่ 90	วันที่ 150	วันที่ 210
ชุด AC abiotic control	81.1±6.7	88.9±9.5	89.8±9.2	90.2±2.8
ชุด NA natural attenuation	93.4±4.2	72.5±8.6	53.7±3.3	21.7±4
ชุด BS biostimulation	77.1±17.7	58.7±8.5	51.3±11.3	27.3±5.4



รูปที่ 4.2 การทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันดีเซลในระบบนิเวศจำลองดินแอนตาร์กติกที่เติมน้ำมันดีเซล 3% (น้ำหนัก/น้ำหนัก) และวิเคราะห์ปริมาณน้ำมันดีเซลที่เหลืออยู่โดย GC-FID

จากผลการทดสอบการย่อยสลายน้ำมันดีเซลในระบบนิเวศจำลองดินแอนตาร์กติกที่เติมน้ำมันดีเซล 1% และ 3% (น้ำหนัก/น้ำหนัก) เมื่อเปรียบเทียบระหว่างชุด abiotic control และ ชุดที่มีแบคทีเรียประจำถิ่นในดินแอนตาร์กติก (natural attenuation และ biostimulation) พบว่าตลอดการทดลอง น้ำมันดีเซลในชุดการทดลอง abiotic control ลดลงเพียงเล็กน้อยไม่ถึง 10% และ 20% ตามลำดับ ซึ่งน่าจะเป็นผลมาจากการระเหยของน้ำมันดีเซลเนื่องจากปฏิกิริยาเป็นเวลานาน ในขณะที่ชุดที่มีแบคทีเรียประจำถิ่นพบว่าการลดลงของน้ำมันดีเซลอย่างมาก ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าภายในระบบนิเวศจำลองดินแอนตาร์กติกที่เติมน้ำมันดีเซล 1% และ 3% (น้ำหนัก/น้ำหนัก) เกิดการย่อยสลายทางชีวภาพโดยแบคทีเรีย และพบว่าในระยะแรกของชุด biostimulation ทั้งในชุดการทดลองที่เติมน้ำมันดีเซล 1% และ 3% (น้ำหนัก/น้ำหนัก) มีปริมาณน้ำมันดีเซลลดลงอย่างรวดเร็วและมีแนวโน้มในการย่อยสลายน้ำมันดีเซลดีกว่าชุด natural attenuation จนกระทั่งระยะเวลาหนึ่ง พบว่าปริมาณน้ำมันดีเซลในชุด natural attenuation และ biostimulation ทั้งชุดการทดลองที่เติมน้ำมันดีเซล 1% และ 3% (น้ำหนัก/น้ำหนัก) เหลืออยู่ใกล้เคียงกัน โดยชุดที่เติมน้ำมันดีเซล 1% (น้ำหนัก/น้ำหนัก) ในวันที่ 90 พบว่ามีปริมาณน้ำมันดีเซลเหลืออยู่ประมาณ 30% และชุดที่เติมน้ำมันดีเซล 3% (น้ำหนัก/น้ำหนัก) ในวันที่ 150 พบว่ามีปริมาณน้ำมันดีเซลเหลืออยู่ประมาณ 50%

จากผลการย่อยสลายน้ำมันดีเซล 1% และ 3% (น้ำหนัก/น้ำหนัก) ในระบบนิเวศจำลองดิน แอนตาร์กติกภายใต้อุณหภูมิต่ำแสดงให้เห็นว่า การเติมสารอาหารเพื่อกระตุ้นการเจริญของแบคทีเรียประจำถิ่นสามารถเพิ่มประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันดีเซลได้ในระยะแรก เมื่อเวลาผ่านไปการเติมสารอาหารไม่ได้ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันดีเซล ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากเมื่อเวลาผ่านไป สารอาหารถูกใช้ไปจนเหลือน้อยลง ซึ่งอาจส่งผลกระทบต่อสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของแบคทีเรียที่ย่อยสลายน้ำมันดีเซล และแบคทีเรียประจำถิ่นในชุด natural attenuation อาจมีการปรับตัวเมื่อมีการปนเปื้อนของน้ำมันดีเซล โดยเพิ่มจำนวนแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายน้ำมันดีเซล และทำให้เกิดการชักนำให้เกิดการสร้างเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องเพื่อใช้ในการย่อยสลายน้ำมันดีเซล (Bento และคณะ, 2005) จึงทำให้ปริมาณน้ำดีเซลที่เหลืออยู่ในช่วงท้ายการทดลองในชุด natural attenuation และ biostimulation มีค่าใกล้เคียงกัน สอดคล้องกับการทดลองของ Coulon และคณะ (2005) ซึ่งได้ศึกษาปัจจัยของสารอาหารที่มีผลต่อการย่อยสลายน้ำมันดีเซลความเข้มข้น 27.33 มิลลิกรัม/กรัม น้ำหนักดินเปียก สร้างระบบนิเวศจำลองดินโดยใช้ดินที่ปนเปื้อนสารปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนในทวีปแอนตาร์กติกา แบ่งเป็นชุดการทดลองที่ไม่ได้เติมสารอาหาร และชุดการทดลองที่เติมสารอาหาร โดยเติม Inipol EAP22 เป็นสารอาหารซึ่งมีอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนต่อฟอสฟอรัสคือ 62:7.4:0.7 บ่มที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 180 วัน พบว่าชุดการทดลองที่ไม่ได้เติมสารอาหาร และชุดการทดลองที่เติมสารอาหารมีปริมาณน้ำมันดีเซลลดลง 85% และ 90% ตามลำดับ

นอกจากนี้ได้ใช้จลนพลศาสตร์การย่อยสลายของน้ำมันดีเซลโดยศึกษาจากแบบจำลองค่าคงที่อัตราเร็วปฏิกิริยาอันดับหนึ่ง (Pseudo-first order) เพื่อเปรียบเทียบปัจจัยสารอาหารและความเข้มข้นของน้ำมันดีเซลต่อการย่อยสลายน้ำมันดีเซลของแบคทีเรียในตัวอย่างดินแอนตาร์กติกา พบว่า ผลการย่อยสลายน้ำมันดีเซลในระบบนิเวศจำลองดินแอนตาร์กติกาภายใต้อุณหภูมิต่ำเมื่อนำมาเขียนกราฟเส้นตรงตามสมการค่าคงที่อัตราเร็วปฏิกิริยาอันดับหนึ่ง พบว่ามีค่าคงที่การย่อยสลายน้ำมันดีเซลแสดงดังตารางที่ 4.5 เมื่อพิจารณาจากค่าคงที่การย่อยสลายน้ำมันดีเซลพบว่า ในระบบนิเวศจำลองดินแอนตาร์กติกาที่เติมน้ำมันดีเซล 1% (น้ำหนัก/น้ำหนัก) มีค่าคงที่การย่อยสลายมากกว่าชุดที่เติมน้ำมันดีเซล 3% (น้ำหนัก/น้ำหนัก) แสดงให้เห็นว่าความเข้มข้นของน้ำมันดีเซลมีผลต่ออัตราการย่อยสลายของแบคทีเรีย โดย Van Hamme และคณะ (2003) รายงานว่าเมื่อมีความเข้มข้นของสารประกอบไฮโดรคาร์บอนน้อย แบคทีเรียสามารถนำไปใช้เป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงานได้ หากมีความเข้มข้นของสารประกอบไฮโดรคาร์บอนมากเกินไปทำให้แบคทีเรียย่อยสลายสารประกอบไฮโดรคาร์บอนได้ช้าลง เกิดการสะสมสารมลพิษภายในเซลล์ อาจทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงประชาคมแบคทีเรีย และเมื่อเปรียบเทียบค่าคงที่การย่อยสลายน้ำมันดีเซลภายในชุดการทดลองที่เติมน้ำมันดีเซล 1% และ 3% (น้ำหนัก/น้ำหนัก) พบว่าทั้งสองชุดการทดลองมีค่าคงที่การย่อยสลายน้ำมันดีเซล

ในชุด natural attenuation และ biostimulation ไม่แตกต่างกัน แสดงให้เห็นว่าสารอาหารไม่มีผลต่ออัตราการย่อยสลายน้ำมันดีเซลในระบบนิเวศจำลองดินแอนตาร์กติกภายใต้อุณหภูมิต่ำ

ตารางที่ 4.5 ค่าคงที่อัตราเร็วปฏิกิริยาอันดับหนึ่งของการย่อยสลายน้ำมันดีเซลในระบบนิเวศจำลองดินภายใต้อุณหภูมิต่ำ

ระบบนิเวศจำลองดิน	ค่าคงที่การย่อยสลายน้ำมันดีเซล (วัน ⁻¹)
ชุด NA ที่เติมน้ำมันดีเซล 1% (น้ำหนัก/น้ำหนัก)	0.024
ชุด BS ที่เติมน้ำมันดีเซล 1% (น้ำหนัก/น้ำหนัก)	0.025
ชุด NA ที่เติมน้ำมันดีเซล 3% (น้ำหนัก/น้ำหนัก)	0.016
ชุด BS ที่เติมน้ำมันดีเซล 3% (น้ำหนัก/น้ำหนัก)	0.012

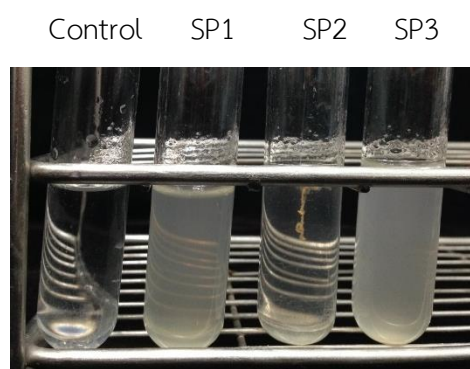
4.2.2 ลักษณะสมบัติของแบคทีเรียสายพันธุ์บริสุทธิ์ที่คัดแยกได้จากระบบนิเวศจำลองดิน

จากผลการทดสอบประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันดีเซลของแบคทีเรียประจำถิ่นในระบบนิเวศจำลองดินแอนตาร์กติกภายใต้อุณหภูมิต่ำ พบว่าแบคทีเรียประจำถิ่นในตัวอย่างดินแอนตาร์กติกมีประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันดีเซล ดังนั้นเพื่อศึกษาบทบาทในการย่อยสลายน้ำมันดีเซลของแบคทีเรียประจำถิ่นในดินแอนตาร์กติก จึงคัดแยกแบคทีเรียสายพันธุ์บริสุทธิ์จากระบบนิเวศจำลองดินแอนตาร์กติกภายใต้อุณหภูมิต่ำ และทดสอบการย่อยสลายองค์ประกอบของน้ำมันดีเซล รวมไปถึงการศึกษาแนวโน้มในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพเบื้องต้นและความไม่ชอบน้ำของเซลล์

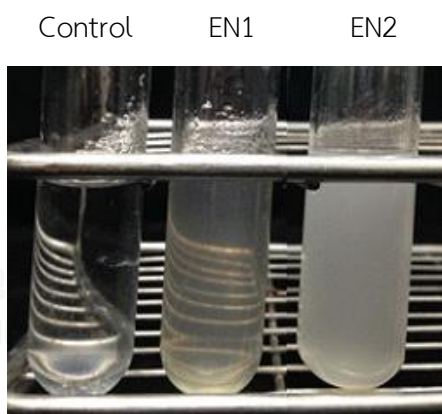
4.2.2.1 ชนิดของแบคทีเรียสายพันธุ์บริสุทธิ์ที่คัดแยกได้จากระบบนิเวศจำลองดินภายใต้อุณหภูมิต่ำ

ผลการคัดแยกแบคทีเรียสายพันธุ์บริสุทธิ์จากระบบนิเวศจำลองดิน พบว่าสามารถคัดแยกแบคทีเรียสายพันธุ์บริสุทธิ์ที่มีความสามารถในการย่อยสลายน้ำมันดีเซลได้ทั้งหมด 5 สายพันธุ์ ดังรูปที่ 4.3-4.4 และตารางที่ 4.6 และผลการจัดจำแนกชนิดแบคทีเรียโดยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA ของแบคทีเรียสายพันธุ์บริสุทธิ์ทั้ง 5 สายพันธุ์ พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA ของแบคทีเรียสายพันธุ์บริสุทธิ์ SP1, SP3, EN1 และ EN2 มีความคล้ายคลึงกับแบคทีเรียในจีนัส *Pseudomonas* 98%, 99%, 98% และ 97% ตามลำดับ และลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA ของแบคทีเรียสายพันธุ์บริสุทธิ์ SP2 มีความคล้ายคลึงกับแบคทีเรียในจีนัส

Sphingomonas 99% เมื่อเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rRNA ของสายพันธุ์บริสุทธิ์ ทั้ง 5 สายพันธุ์กับลำดับนิวคลีโอไทด์จากฐานข้อมูล GenBank แสดงดังตารางที่ 4.7-4.11

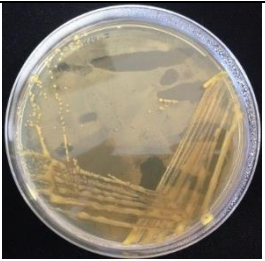
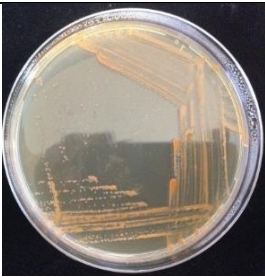
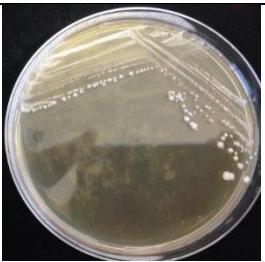
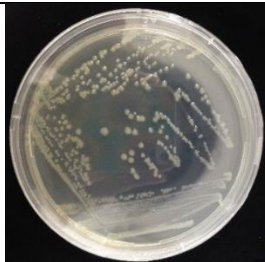



รูปที่ 4.3 ลักษณะการเปลี่ยนแปลงของอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MSM ภายหลังจากการย่อยสลายน้ำมันดีเซล 0.25% (ปริมาตร/ปริมาตร) ระยะเวลา 7 วัน ของแบคทีเรียสายพันธุ์บริสุทธิ์ SP1 SP2 และ SP3 เปรียบเทียบกับชุดควบคุม



รูปที่ 4.4 ลักษณะการเปลี่ยนแปลงของอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MSM ภายหลังจากการย่อยสลายน้ำมันดีเซล 0.25% (ปริมาตร/ปริมาตร) ระยะเวลา 7 วัน ของแบคทีเรียสายพันธุ์บริสุทธิ์ EN1 และ EN2 เปรียบเทียบกับชุดควบคุม

ตารางที่ 4.6 แบคทีเรียสายพันธุ์บริสุทธิ์ที่สามารถย่อยสลายน้ำมันดีเซลจากการคัดแยกจากระบบนิเวศจำลองดินแอนตาร์กติกภายใต้อุณหภูมิต่ำ

แบคทีเรียสายพันธุ์บริสุทธิ์	ลักษณะของแบคทีเรีย	แหล่งที่มา
SP1	 สีเหลืองนวล ขอบเรียบ มันวาว	ระบบนิเวศจำลองดินที่เติมน้ำมันดีเซล 1% (น้ำหนัก/น้ำหนัก) ทุกชุดการทดลอง natural attenuation
SP2	 สีส้ม ขอบเรียบ มันวาว	ระบบนิเวศจำลองดินที่เติมน้ำมันดีเซล 1% (น้ำหนัก/น้ำหนัก) วันที่ 15 ในชุดการทดลอง natural attenuation
SP3	 สีขาวขุ่น ขอบหยัก	ระบบนิเวศจำลองดินที่เติมน้ำมันดีเซล 1% (น้ำหนัก/น้ำหนัก) ทุกชุดการทดลอง
EN1	 สีเหลืองนวล ขอบหยัก ด้าน	ระบบนิเวศจำลองดินที่เติมน้ำมันดีเซล 1% (น้ำหนัก/น้ำหนัก) วันที่ 90 ในชุดการทดลอง natural attenuation โดยวิธีเอนริชเมนต์ด้วยน้ำมันดีเซล
EN2	 สีเหลืองส้ม มันวาว ขอบเรียบ	ระบบนิเวศจำลองดินที่เติมน้ำมันดีเซล 1% (น้ำหนัก/น้ำหนัก) วันที่ 90 ในชุดการทดลอง natural attenuation โดยวิธีเอนริชเมนต์ด้วยน้ำมันดีเซล

จากผลการคัดแยกแบคทีเรียสายพันธุ์บริสุทธิ์พบว่าแบคทีเรียจีโนม *Pseudomonas* 4 สายพันธุ์ และแบคทีเรียจีโนม *Sphingomonas* 1 สายพันธุ์ โดยแบคทีเรียจีโนม *Sphingomonas* พบเฉพาะในชุดการทดลอง natural attenuation น่าจะเป็นผลมาจาก *Sphingomonas* อาจมีการแข่งขันหรือการทำงานเป็นปฏิปักษ์กับแบคทีเรียอื่นภายในระบบนิเวศจำลองดินทำให้ *Sphingomonas* ลดจำนวนลง และไม่สามารถคัดแยกได้ในระยะเวลาต่อมา จากผลการคัดแยกแบคทีเรียสายพันธุ์บริสุทธิ์สอดคล้องกับการศึกษาของ de Jesus และคณะ (2015) ซึ่งได้คัดแยกกลุ่มแบคทีเรียจากดินที่ปนเปื้อนน้ำมันดีเซลจากบริเวณคาบสมุทรแอนตาร์กติก เมื่อตรวจสอบประชากรแบคทีเรียด้วยวิธี PCR-DGGE พบว่าแบคทีเรียเด่นในดินที่ปนเปื้อนน้ำมันดีเซลคือ *Pseudomonas* sp., *Sphingomonas* sp. และ *Acinetobacters* sp. จึงสรุปได้ว่าแบคทีเรียจีโนม *Pseudomonas* และ *Sphingomonas* สามารถพบได้ในดินแอนตาร์กติกที่ปนเปื้อนน้ำมันดีเซล

ตารางที่ 4.7 ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีน 16S rRNA ของสายพันธุ์ SP1 กับลำดับนิวคลีโอไทด์จากฐานข้อมูล GenBank

ลำดับที่	สายพันธุ์ของแบคทีเรีย	Accession no.	ความเหมือน(%)	อ้างอิง
1	<i>Pseudomonas</i> sp. Tibet-IIA21	DQ177468	1413/1437(98%)	Zhang และคณะ (2007)
2	<i>Pseudomonas</i> sp. EC-V20-9	AB379687	1417/1445(98%)	Hara และคณะ (2009)
3	<i>Pseudomonas</i> sp. Pier17	KC195902	1414/1445(98%)	Colinon และคณะ (2013)
4	<i>Pseudomonas</i> sp. Marine-13	FN377713	1422/1448(98%)	Srinivas และคณะ (2009)
5	<i>Pseudomonas</i> sp. hp7	JN637314	1401/1425(98%)	Liu และคณะ (2012)

ตารางที่ 4.8 ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีน 16S rRNA ของสายพันธุ์ SP2 กับลำดับนิวคลีโอไทด์จากฐานข้อมูล GenBank

ลำดับที่	สายพันธุ์ของแบคทีเรีย	Accession no.	ความเหมือน(%)	อ้างอิง
1	<i>Sphingomonas aerolata</i> AIC10-14	JF970599	1442/1458(99%)	Shivaji และคณะ (2013)
2	<i>Sphingomonas</i> sp. R-36533	FR682705	1427/1438(99%)	Peeters และคณะ (2011)
3	<i>Sphingomonas aerolata</i> NW12	NR042130	1432/1460(98%)	Busse และคณะ (2003)
4	<i>Sphingomonas</i> sp. M3C203B-B	AF395031	1399/1418(99%)	Christner และคณะ (2001)
5	<i>Sphingomonas</i> sp. NBGD25	HQ003449	1419/1451(98%)	Sahay และคณะ (2013)

ตารางที่ 4.9 ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีน 16S rRNA ของสายพันธุ์ SP3 กับลำดับนิวคลีโอไทด์จากฐานข้อมูล GenBank

ลำดับที่	สายพันธุ์ของแบคทีเรีย	Accession no.	ความเหมือน(%)	อ้างอิง
1	<i>Pseudomonas mandelii</i> CIP 105273	NR024902	1457/1479(99%)	Verhille และคณะ (1999)
2	<i>Pseudomonas</i> sp. M39	AY263482	1455/1477(99%)	Meyer และคณะ (2004)
3	<i>Pseudomonas</i> sp. IpA-93	AF177919	1460/1481(99%)	Yu และคณะ (2000)
4	<i>Pseudomonas</i> sp. PsE	AF105383	1461/1480(99%)	Kuske และคณะ (1999)
5	<i>Pseudomonas mandelii</i> JR-1	CP005960	1457/1479(99%)	Jang และคณะ (2012)

ตารางที่ 4.10 ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีน 16S rRNA ของสายพันธุ์ EN1 กับลำดับนิวคลีโอไทด์จากฐานข้อมูล GenBank

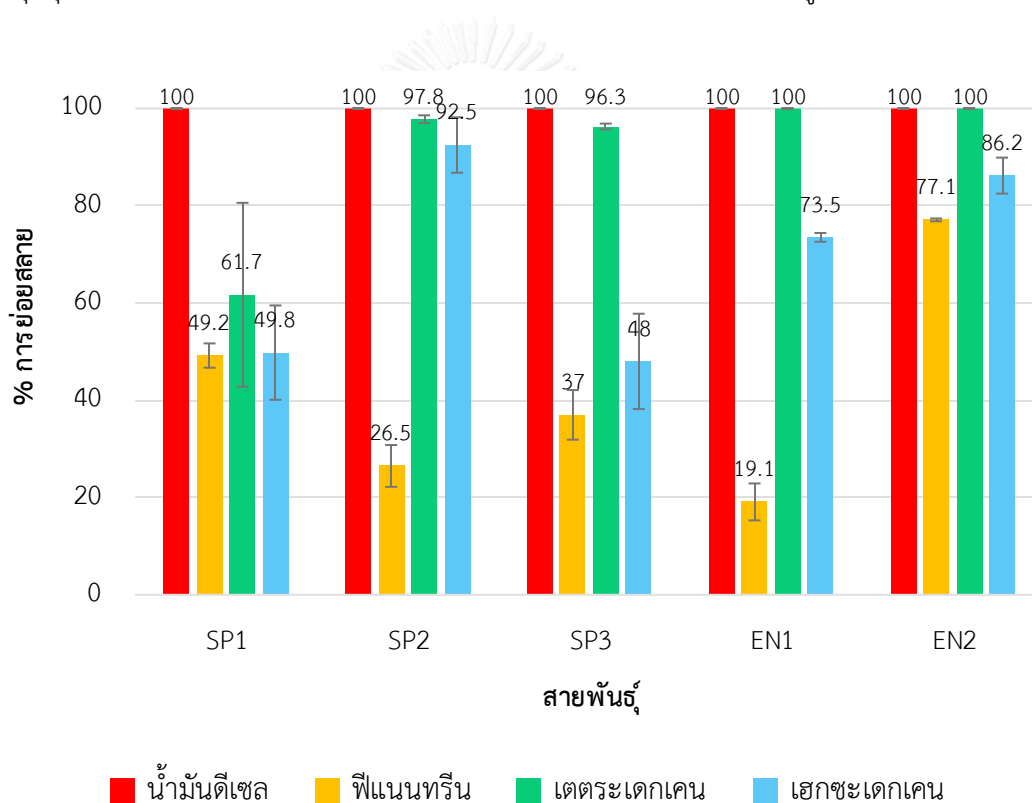
ลำดับที่	สายพันธุ์ของแบคทีเรีย	Accession no.	ความเหมือน(%)	อ้างอิง
1	<i>Pseudomonas syringae</i> HS191	CP006256	1479/1503(98%)	Ravindran และคณะ (2015)
2	<i>Pseudomonas cannabina</i> CFBP 2341	AJ492827	1479/1503(98%)	Behrendt และคณะ (2003)
3	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. actinidiae Kw11	AB001439	1479/1503(98%)	Sawada และคณะ (1997)
4	<i>Pseudomonas</i> sp. In5	GQ254719	1479/1508(98%)	Michelsen และ Stougaard (2011)
5	<i>Pseudomonas</i> sp. SV5	AF251335	1481/1505(98%)	Sentchilo และคณะ (2000)

ตารางที่ 4.11 ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีน 16S rRNA ของสายพันธุ์ EN2 กับลำดับนิวคลีโอไทด์จากฐานข้อมูล GenBank

ลำดับที่	สายพันธุ์ของแบคทีเรีย	Accession no.	ความเหมือน(%)	อ้างอิง
1	<i>Pseudomonas</i> sp. IC1-11	HQ448935	1367/1408(97%)	Zeng และคณะ (2013)
2	<i>Pseudomonas lini</i> CFBP 5737	AY035996	1379/1428(97%)	Delorme และคณะ (2002)
3	<i>Pseudomonas</i> sp. PsJ	AF105388	1411/1476(96%)	Kuske และคณะ (1999)
4	<i>Pseudomonas</i> sp. PsC	AF105381	1383/1425(97%)	Kuske และคณะ (1999)
5	<i>Pseudomonas lini</i> DLE411J	NR029042	1379/1428(97%)	Delorme และคณะ (2002)

4.2.2.2 ประสิทธิภาพการย่อยสลายองค์ประกอบของน้ำมันดีเซลของแบคทีเรีย ย่อยสลายน้ำมันดีเซลจากระบบนิเวศจำลองดิน

เนื่องจากแบคทีเรียประจำถิ่นในตัวอย่างดินแอนตาร์กติกมีประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันดีเซล จึงทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายองค์ประกอบของน้ำมันดีเซลของแบคทีเรียสายพันธุ์บริสุทธิ์ทั้ง 5 สายพันธุ์ที่คัดแยกจากระบบนิเวศจำลองดิน เพื่อศึกษาบทบาทที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายน้ำมันดีเซล โดยทดสอบประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันดีเซล 0.25% (ปริมาตร/ปริมาตร) และตัวแทนองค์ประกอบของน้ำมันดีเซล ได้แก่ ฟีนานทริน 50 มิลลิกรัมต่อลิตร เตตระเดเคน และเฮกซะเดเคน 500 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างวันที่ 14 ของทุกชุดการทดลอง โดยผลการทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายแสดงดังรูปที่ 4.5



รูปที่ 4.5 ประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันดีเซล 0.25% (ปริมาตร/ปริมาตร) ฟีนานทริน 50 มิลลิกรัม/ลิตร เตตระเดเคน และเฮกซะเดเคน 500 มิลลิกรัม/ลิตร ภายในระยะเวลา 14 วันของแบคทีเรียสายพันธุ์บริสุทธิ์ ทั้ง 5 สายพันธุ์

จากผลการทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันดีเซล 0.25% (ปริมาตร/ปริมาตร) พบว่าในระยะเวลา 14 วัน แบคทีเรียสายพันธุ์บริสุทธิ์ทั้ง 5 สายพันธุ์สามารถย่อยสลายน้ำมันดีเซลได้ 100% และจากผลจากการทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายฟีนานทริน 50 มิลลิกรัม/ลิตร พบว่า *Pseudomonas* sp. EN2 มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายฟีนานทรินมากที่สุดคือ 77%

รองลงมาคือ *Pseudomonas* sp. SP1, *Pseudomonas* sp. SP3, *Sphingomonas* sp. SP2 และ *Pseudomonas* sp. EN1 ซึ่งมีประสิทธิภาพในการย่อยสลายพีแนทรีน 49%, 37%, 26% และ 19% ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันดีเซล พบว่าแบคทีเรียสามารถย่อยสลายพีแนทรีนได้น้อยกว่า เนื่องจากแบคทีเรียสายพันธุ์บริสุทธิ์ผ่านการเอนริชเมนต์ด้วยน้ำมันดีเซลซึ่งมีองค์ประกอบของ PAHs น้อยมาก รวมไปถึง PAHs เป็นวงแหวนเบนซีนหลายวงซึ่งถูกย่อยสลายโดยแบคทีเรียได้ช้ากว่าองค์ประกอบส่วนใหญ่ของน้ำมันดีเซล ซึ่งประกอบด้วยแอลเคนเป็นส่วนใหญ่ (Hendrikse และคณะ, 2015) เมื่อเปรียบเทียบกับงานวิจัยของ Crisafi และคณะ (2016) ซึ่งได้คัดแยกแบคทีเรียจากน้ำทะเลอาร์กติก และทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายพีแนทรีน 50 มิลลิกรัม/ลิตร โดยบ่มที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 60 วัน พบว่า *Alcanivorax* สามารถย่อยสลายพีแนทรีนได้เพียง 10% สรุปได้ว่าแบคทีเรียสายพันธุ์บริสุทธิ์ที่คัดแยกได้จากระบบนิเวศจำลองดินแอนตาร์กติกในงานวิจัยนี้มีประสิทธิภาพการย่อยสลายพีแนทรีนมากกว่างานวิจัยดังกล่าว

จากการทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายเตตระเดเคน 500 มิลลิกรัม/ลิตร พบว่า *Pseudomonas* sp. EN1 และ EN2 มีประสิทธิภาพการย่อยสลายเตตระเดเคนสูงที่สุดคือ 100% รองลงมาคือ *Sphingomonas* sp. SP2, *Pseudomonas* sp. SP3 และ *Pseudomonas* sp. SP1 โดยมีประสิทธิภาพการย่อยสลายเตตระเดเคน 98%, 96% และ 62% ตามลำดับ และผลการทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายเฮกซะเดเคน 500 มิลลิกรัม/ลิตร พบว่า *Sphingomonas* sp. SP2 มีประสิทธิภาพการย่อยสลายเฮกซะเดเคนสูงที่สุดคือ 93% รองลงมาคือ *Pseudomonas* sp. EN2, *Pseudomonas* sp. EN1, *Pseudomonas* sp. SP1 และ *Pseudomonas* sp. SP3 โดยมีประสิทธิภาพการย่อยสลาย 86%, 73%, 50% และ 48% ตามลำดับ จากการทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันดีเซลและองค์ประกอบของน้ำมันดีเซลพบว่า *Pseudomonas* spp. และ *Sphingomonas* sp. เป็นแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากตัวอย่างดินแอนตาร์กติกซึ่งมีบทบาทสำคัญเกี่ยวข้องกับการย่อยสลายน้ำมันดีเซล เนื่องจากสามารถย่อยสลายน้ำมันดีเซลได้ 100% ภายในระยะเวลา 14 วัน รวมถึงสามารถย่อยสลายองค์ประกอบต่าง ๆ ของน้ำมันดีเซลได้อีกด้วย

4.2.2.3 แนวโน้มในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพเบื้องต้นและความไม่ชอบน้ำของเซลล์

การทดสอบขั้นตอนนี้เพื่อประเมินความสามารถของแบคทีเรียสายพันธุ์บริสุทธิ์ทั้ง 5 สายพันธุ์ที่คัดแยกจากระบบนิเวศจำลองดินเบื้องต้น เพื่อบ่งชี้บทบาทที่เกี่ยวข้องเพิ่มเติมในการย่อยสลายน้ำมันดีเซลภายใต้อุณหภูมิต่ำ โดยทดสอบความสามารถในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพด้วยการวิเคราะห์ค่าแรงตึงผิว ค่าตอร์ชันนิอิมัลชัน และค่าการกระจายน้ำมัน และยังตรวจสอบการเกิดไฮโดรโฟบิกของเซลล์เมื่อเลี้ยงแบคทีเรียในอาหาร MSM ที่ใช้น้ำมันดีเซลเป็นแหล่งคาร์บอน

ที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน ผลการวิเคราะห์ความสามารถในการเกิดไฮโดรโฟบิกของเซลล์พบว่า *Pseudomonas* sp. EN2 มีค่าการเกิดไฮโดรโฟบิกของเซลล์มากที่สุด โดยมีค่าประมาณ 54% ผลการวิเคราะห์ความสามารถในการผลิตสารลดแรงตึงผิวพบว่าแบคทีเรียทั้ง 5 สายพันธุ์มีความสามารถในการผลิตสารลดแรงตึงผิวใกล้เคียงกัน และผลการวิเคราะห์การเกิดชั้นอิมัลชันสูงสุดใน *Pseudomonas* sp. EN1 โดยมีค่าประมาณ 19% และแบคทีเรียทั้ง 5 สายพันธุ์ไม่มีความสามารถในการเกิดการกระจายน้ำมัน แสดงดังตารางที่ 4.12

ตารางที่ 4.12 ผลการวิเคราะห์การเกิดไฮโดรโฟบิกกับเฮกซะเดคเคน ค่าแรงตึงผิว และค่าการเกิดอิมัลชันของแบคทีเรียสายพันธุ์บริสุทธิ์ทั้ง 5 สายพันธุ์ในอาหารเหลว MSM ที่ใช้น้ำมันดีเซล บ่มที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน

แบคทีเรีย	การเกิดไฮโดรโฟบิกของเซลล์กับเฮกซะเดคเคน (%)	ค่าแรงตึงผิว (มิลลินิวตัน/ตารางเมตร)	E24 (%)
<i>Pseudomonas</i> sp. SP1	11.7±1.2	36±4	3.3±0
<i>Sphingomonas</i> sp. SP2	16.6±2.4	27±0	8.8±1.7
<i>Pseudomonas</i> sp. SP3	7.5±1.7	31±2.6	4.4±1.9
<i>Pseudomonas</i> sp. EN1	29.1±5.2	27±0	18.8±5.0
<i>Pseudomonas</i> sp. EN2	54±2.8	32±2.3	11±3.8
ชุดควบคุม (MSM + น้ำมันดีเซล)	0	40±2.5	-

จากผลการวิเคราะห์การเกิดไฮโดรโฟบิกกับเฮกซะเดคเคน ค่าแรงตึงผิว และค่าการเกิดอิมัลชัน พบว่าแบคทีเรียสายพันธุ์บริสุทธิ์ทั้ง 5 สายพันธุ์ มีแนวโน้มในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ ซึ่งจากงานวิจัยของ Zhao และคณะ (2011) พบว่าค่าไฮโดรโฟบิกของเซลล์หรือความไม่ชอบน้ำของเซลล์ ช่วยส่งเสริมการเข้าถึงทางชีวภาพของสารประกอบไฮโดรคาร์บอนและทำให้แบคทีเรียสามารถยึดเกาะกับอนุภาคของสารประกอบไฮโดรคาร์บอนได้ดียิ่งขึ้น และส่งผลให้ประสิทธิภาพในการย่อยสลายเพิ่มขึ้น และการเกิดอิมัลชันระหว่างน้ำมันและน้ำทำให้มีพื้นที่ผิวมากขึ้น ซึ่งทำให้แบคทีเรียเข้าถึงสารได้มากขึ้นและช่วยเพิ่มการย่อยสลายน้ำมันได้อีกด้วย

จากผลการทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันดีเซล องค์ประกอบของน้ำมันดีเซล และผลการทดสอบแนวโน้มในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพเบื้องต้นและความไม่ชอบน้ำของเซลล์ พบว่า แบคทีเรียสายพันธุ์บริสุทธิ์ทั้ง 5 สายพันธุ์มีความสามารถในการย่อยสลายน้ำมันดีเซลและ องค์ประกอบของน้ำมันดีเซล รวมทั้งมีแนวโน้มในการผลิตลดแรงตึงผิวชีวภาพ ดังนั้น *Pseudomonas* sp. และ *Sphingomonas* sp. น่าจะมีบทบาทสำคัญที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลาย น้ำมันดีเซลในตัวอย่างดินแอนตาร์กติกภายใต้อุณหภูมิต่ำ

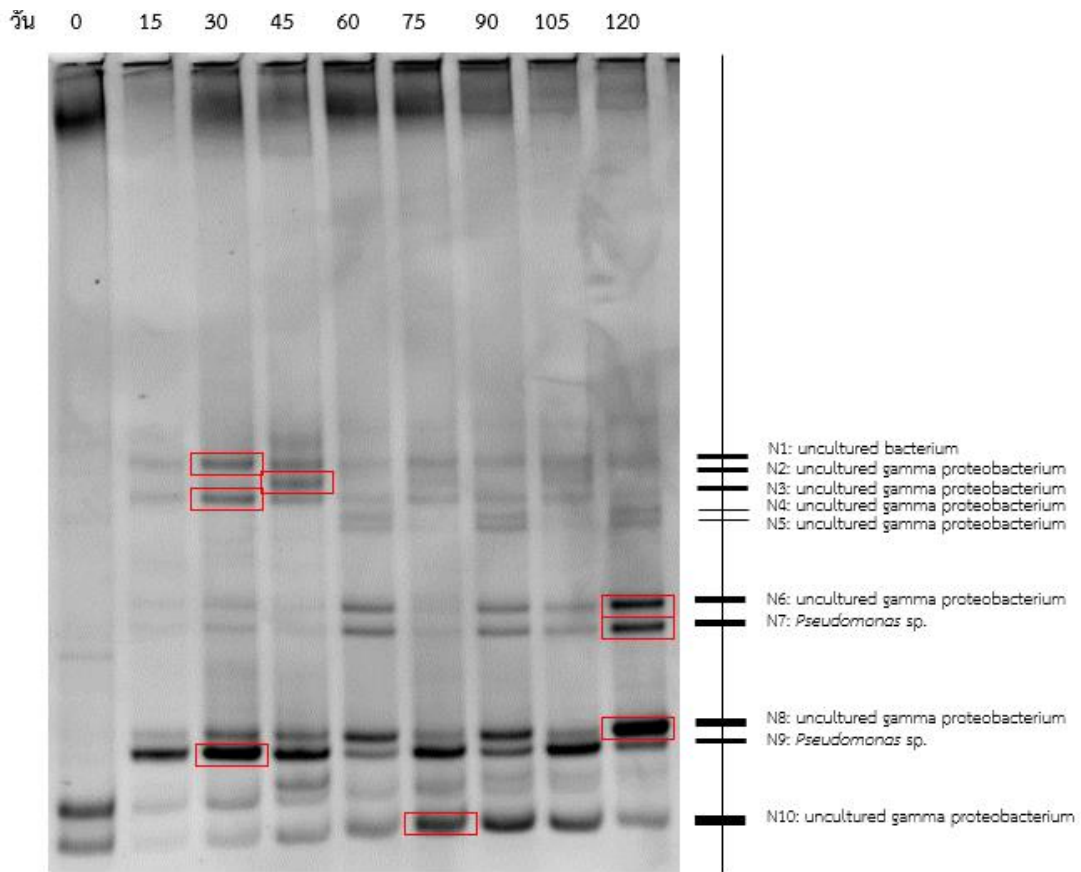
4.2.3 การเปลี่ยนแปลงไปของประชาคมแบคทีเรียในระบบนิเวศจำลองดินภายใต้ อุณหภูมิต่ำ

จากการทดสอบการย่อยสลายน้ำมันดีเซลในระบบนิเวศจำลองดินแอนตาร์กติกภายใต้ อุณหภูมิต่ำ พบว่าแบคทีเรียประจำถิ่นในดินแอนตาร์กติกมีประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันดีเซล จึงศึกษาบทบาทที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายน้ำมันดีเซลโดยวิธีการที่อาศัยการเพาะเลี้ยง ด้วยการคัด แยกแบคทีเรียสายพันธุ์บริสุทธิ์ พบว่าสามารถคัดแยกได้เพียง 2 จีโนส คือ *Pseudomonas* และ *Sphingomonas* ดังนั้นการเลือกใช้วิธีการที่ไม่อาศัยการเพาะเลี้ยงจึงเป็นวิธีที่เหมาะสมสำหรับการ ศึกษาบทบาทของแบคทีเรียในดินแอนตาร์กติกและการเปลี่ยนแปลงไปของประชาคมแบคทีเรีย ซึ่งครอบคลุมกับแบคทีเรียกว่า 99.8% ที่ไม่สามารถเพาะเลี้ยงได้ในห้องปฏิบัติการ

4.2.3.1 การเปลี่ยนแปลงประชาคมแบคทีเรียในดินจากการวิเคราะห์ด้วยวิธี

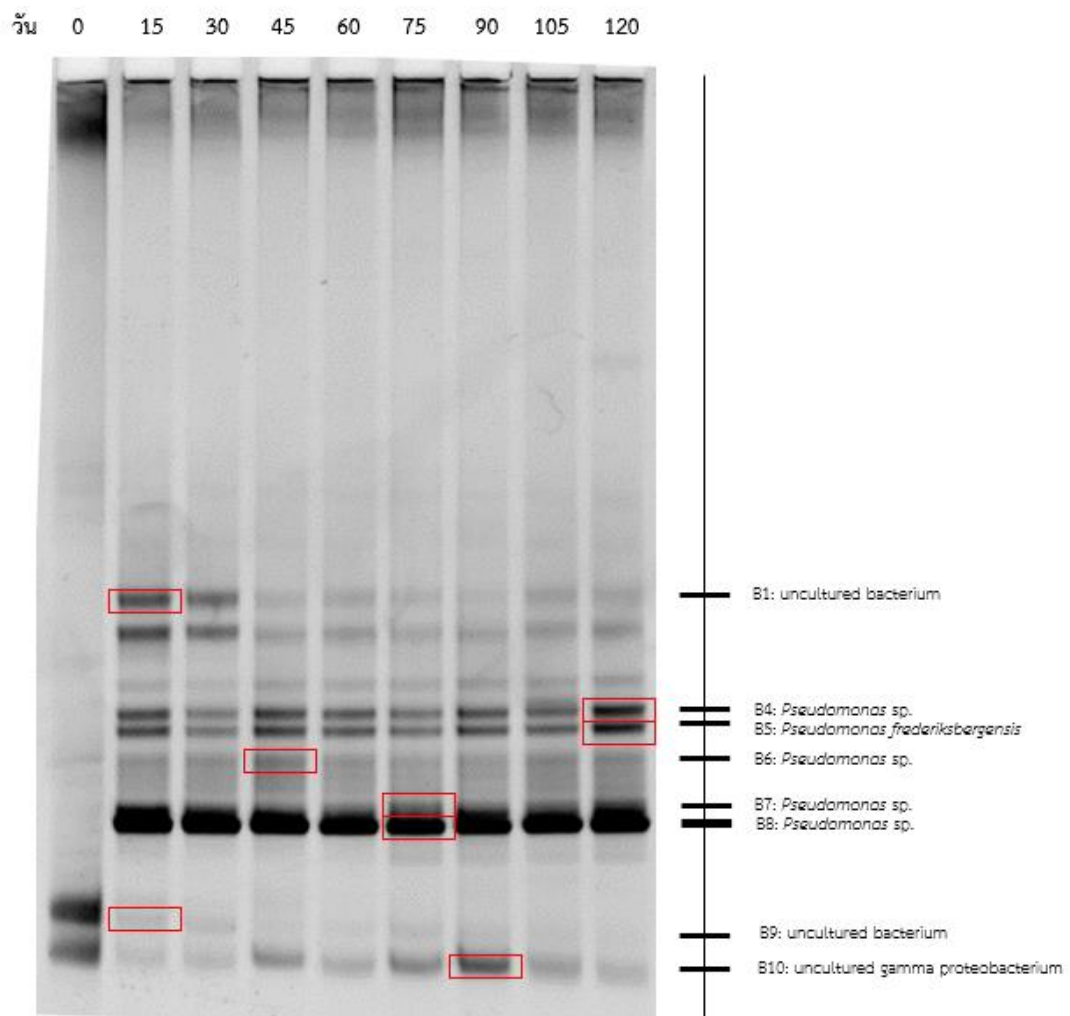
PCR-DGGE

ผลการตรวจสอบผลิตภัณฑ์ PCR ด้วย PCR-DGGE โดยสกัด DNA จากดินในระบบนิเวศ จำลองดินที่เติมน้ำมันดีเซล 1% (น้ำหนัก/น้ำหนัก) ในชุดการทดลอง natural attenuation และ biostimulation ดังรูปที่ 4.6 และ 4.7 พบแถบ DNA ที่แตกต่างกันประมาณ 10-11 แถบ และมีแถบ เข้ม 2-3 แถบ โดยแถบเข้มเพิ่มขึ้นหลังจากเติมน้ำมันดีเซลลงในระบบนิเวศจำลองดินเมื่อเปรียบ เทียบกับวันที่ 0 และจากการยืนยันผลการระบุชนิดของแบคทีเรียเด่นด้วยวิธีการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอ ไทด์บริเวณยีน 16S rRNA (Partial Sequence) เปรียบเทียบกับฐานข้อมูล GenBank พบว่า แบคทีเรียเด่นหลังจากเติมน้ำมันดีเซลลงไปในระบบนิเวศจำลองดิน คือ *Pseudomonas* และ แบคทีเรียในคลาส Gammaproteobacteria ทั้งในชุดการทดลอง natural attenuation และ biostimulation จากผลการทดลองดังกล่าวจึงคาดว่า การเติมน้ำมันดีเซลกระตุ้นให้แบคทีเรียกลุ่ม ดังกล่าวเพิ่มขึ้น และแบคทีเรียกลุ่มนี้มีความสามารถทนต่อน้ำมันดีเซลได้ จึงมีแนวโน้มว่าแบคทีเรีย กลุ่มนี้มีบทบาทสำคัญในการย่อยสลายน้ำมันดีเซลในระบบนิเวศจำลองดินที่เติมน้ำมันดีเซล 1% (น้ำหนัก/น้ำหนัก) ทั้งในชุด natural attenuation และ biostimulation



รูปที่ 4.6 โครงสร้างของประชาคมแบคทีเรียในระบบนิเวศจำลองดินที่เติมน้ำมันดีเซล 1% (น้ำหนัก/น้ำหนัก) ชุดการทดลอง natural attenuation UNIVERSITY

จากการทดลองของ Shukor และคณะ (2009) พบว่า *Pseudomonas* sp. ที่คัดแยกจากสถานีวิจัยจูเบนี ทวีปแอนตาร์กติกา สามารถใช้น้ำมันดีเซลเป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงานได้ โดยสามารถย่อยสลายน้ำมันดีเซลความเข้มข้น 3.5% (ปริมาตร/ปริมาตร) ได้ 18.8% ในระยะเวลา 8 วัน ที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส และจากงานวิจัยของ Stallwood และคณะ (2005) พบว่า *Pseudomonas* sp. ST41 ที่คัดแยกจากสถานีวิจัยซิกนี ทวีปแอนตาร์กติกา สามารถย่อยสลายน้ำมันดีเซลความเข้มข้น 1% (น้ำหนัก/น้ำหนัก) ได้ 45% ในระยะเวลา 18 สัปดาห์ ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และมีแนวโน้มที่จะสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการบำบัดพื้นที่ปนเปื้อนปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนที่มีอุณหภูมิต่ำได้



รูปที่ 4.7 โครงสร้างของประชาคมแบคทีเรียในระบบนิเวศจำลองดินที่เติมน้ำมันดีเซล 1% (น้ำหนัก/น้ำหนัก) ชุดการทดลอง biostimulation

จากการวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงไปของประชาคมแบคทีเรียในระบบนิเวศจำลองดินแอนตาร์กติกภายใต้อุณหภูมิต่ำด้วยวิธี PCR-DGGE สามารถวิเคราะห์ได้เพียงแบคทีเรียเด่นโดยไม่ทราบสัดส่วนของประชาคมแบคทีเรีย และเนื่องจากงานวิจัยนี้มุ่งเน้นศึกษาบทบาทของแบคทีเรียที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายน้ำมันดีเซล ซึ่งจำเป็นต้องทราบข้อมูลที่ครอบคลุมแบคทีเรียทั้งหมดที่มีอยู่ในระบบนิเวศจำลองดิน การเลือกใช้วิธีวิเคราะห์ลำดับเบสของแอมพลิคอนของยีน 16S rRNA ในการศึกษาบทบาทที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายน้ำมันดีเซลในดินแอนตาร์กติกภายใต้อุณหภูมิต่ำจึงเป็นวิธีที่เหมาะสมเพิ่มเติมจากวิธี PCR-DGGE

4.2.3.2 ลักษณะและโครงสร้างประชาคมแบคทีเรียทั้งหมดจากการวิเคราะห์ ลำดับเบสของแอมพลิคอนของยีน 16S rRNA

การวิเคราะห์โครงสร้างประชาคมแบคทีเรียทั้งหมดได้คัดเลือกตัวอย่างจากระบบนิเวศจำลอง ดินแอนตาร์กติกภายใต้อุณหภูมิต่ำจากในชุดที่เติมน้ำมันดีเซล 1% (น้ำหนัก/น้ำหนัก) โดยวิเคราะห์ ลำดับเบสของแอมพลิคอนของยีน 16S rRNA ด้วยโปรแกรม Basespace โดยใช้ฐานข้อมูล Greengenes แสดงดังรูปที่ 4.8-4.11 และ จำนวน sequence ที่อ่านได้จากการวิเคราะห์ลำดับเบส ของแอมพลิคอนของยีน 16S rRNA แสดงดังตารางที่ 4.13 โดยจำนวน sequence ที่อ่านได้เพียงพอ สำหรับการวิเคราะห์โครงสร้างประชาคมแบคทีเรียในระบบนิเวศจำลองดินเนื่องจากมีจำนวน sequence มากกว่าจำนวน sequence ขั้นต่ำ (30,000 reads) (Lazarevic และคณะ, 2009) และ จากผลการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม mothur (Schloss และคณะ, 2009) พบว่าจำนวนกลุ่มโดยการ จัดกลุ่มที่ระดับความคล้ายคลึงของลำดับเบสที่ 97% หรือ Operational taxonomic units (OTUs) อยู่ในช่วง 19-223 OTUs ในแต่ละตัวอย่าง ซึ่งค่า OTUs สามารถใช้วิเคราะห์ความหลากหลายของ ประชาคมแบคทีเรียได้ โดยพบว่าตัวอย่างดินแอนตาร์กติกในวันที่ 0 (Original (NA0, BS0)) พบ จำนวน OTUs ที่สูง และมีแนวโน้มลดลงเมื่อเติมน้ำมันดีเซลลงในระบบนิเวศจำลองดิน เมื่อ เปรียบเทียบระหว่างชุด NA และ BS พบว่า ชุด BS มีค่า OTUs ลดลงมากกว่าชุด NA ในระยะแรก และหลังของการทดลอง ส่วนระยะกลางของการทดลองพบว่า ชุด BS มีค่า OTUs เพิ่มขึ้น อาจ เนื่องมาจากมีการเปลี่ยนแปลงของประชาคมแบคทีเรียเนื่องจากการปรับตัวเมื่อสัมผัสกับน้ำมันดีเซล ส่งผลให้ค่า OTUs มีความแปรปรวน และเมื่อพิจารณาค่าดัชนีความหลากหลาย Shannon-Wiener พบว่าไม่สอดคล้องกับค่า OTUs เนื่องมาจากค่า OTUs ใช้การจัดกลุ่มตามความคล้ายคลึงของลำดับ เบสที่ 97% เป็นหลักเท่านั้น แต่ค่าดัชนีความหลากหลาย Shannon-Wiener (ดังสมการในข้อ 3.2.4.3) วิเคราะห์จากจำนวนแบคทีเรียแต่ละชนิดในตัวอย่างเปรียบเทียบกับจำนวนแบคทีเรียทั้งหมด เป็นสัดส่วน ดังนั้นทั้งสองวิธีจึงให้ค่าที่ไม่สอดคล้องกัน แต่ทั้งสองวิธีให้แนวโน้มการลดลงของค่า OTUs และค่าดัชนีความหลากหลายของ Shannon-Wiener เมื่อเปรียบเทียบระหว่างตัวอย่างดิน แอนตาร์กติกในวันที่ 0 (Original (NA0, BS0)) ที่ไม่ได้เติมน้ำมัน และตัวอย่าง NA120 และ BS120 แสดงให้เห็นว่าน้ำมันดีเซลช่วยคัดกรองแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลายน้ำมันดีเซล และ สารอาหารกระตุ้นให้แบคทีเรียบางกลุ่มเจริญเพิ่มมากขึ้น

การทดลองของ Jung และคณะ (2016) ซึ่งได้วิเคราะห์ความหลากหลายของประชาคม แบคทีเรียจากระบบนิเวศจำลองดินที่เติมน้ำมันดีเซล 0.1% (ปริมาตร/ปริมาตร) ที่อุณหภูมิ 20 องศา เซลเซียส เป็นเวลา 6 สัปดาห์ พบว่าชุดควบคุมที่ไม่ได้เติมน้ำมันดีเซลมีจำนวน 268 OTUs และชุดที่

เติมน้ำมันดีเซลมีจำนวน 162 OTUs ส่วนในชุดที่เติมน้ำมันดีเซลร่วมกับ processed red clay เป็นสารอาหารมีจำนวน 90 OTUs

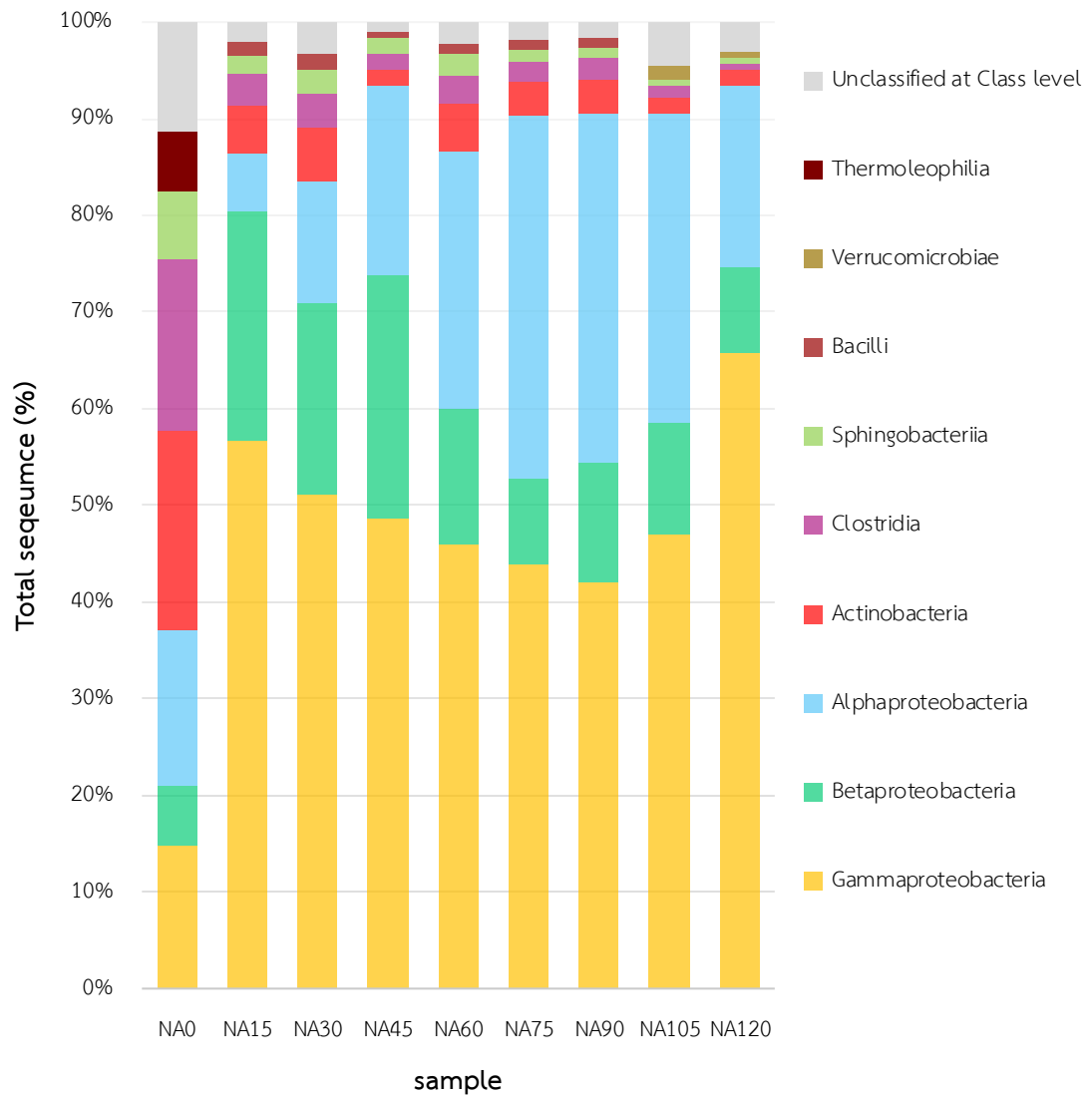
ตารางที่ 4.13 จำนวน sequence ที่อ่านได้จากการวิเคราะห์ลำดับเบสของแอมพลิคอนของยีน 16S rRNA ของตัวอย่างดินจากระบบนิเวศจำลองดินที่เติมน้ำมันดีเซล 1% (น้ำหนัก/น้ำหนัก)

ตัวอย่าง	จำนวน sequence ที่อ่านได้	OTU	Shannon-Wiener Diversity Index
Original (NA0, BS0)	454,510	221	1.93
NA15	322,069	93	1.25
NA30	363,442	139	1.10
NA45	448,585	129	1.13
NA60	342,366	90	1.09
NA75	359,384	87	1.29
NA90	349,750	104	1.24
NA105	248,865	82	1.10
NA120	246,115	62	0.79
BS15	315,569	65	0.49
BS30	126,968	60	0.91
BS45	238,903	84	0.97
BS60	474,650	119	1.04
BS75	593,026	223	1.12
BS90	168,523	77	0.62
BS105	264,770	96	0.46
BS120	103,463	19	0.34

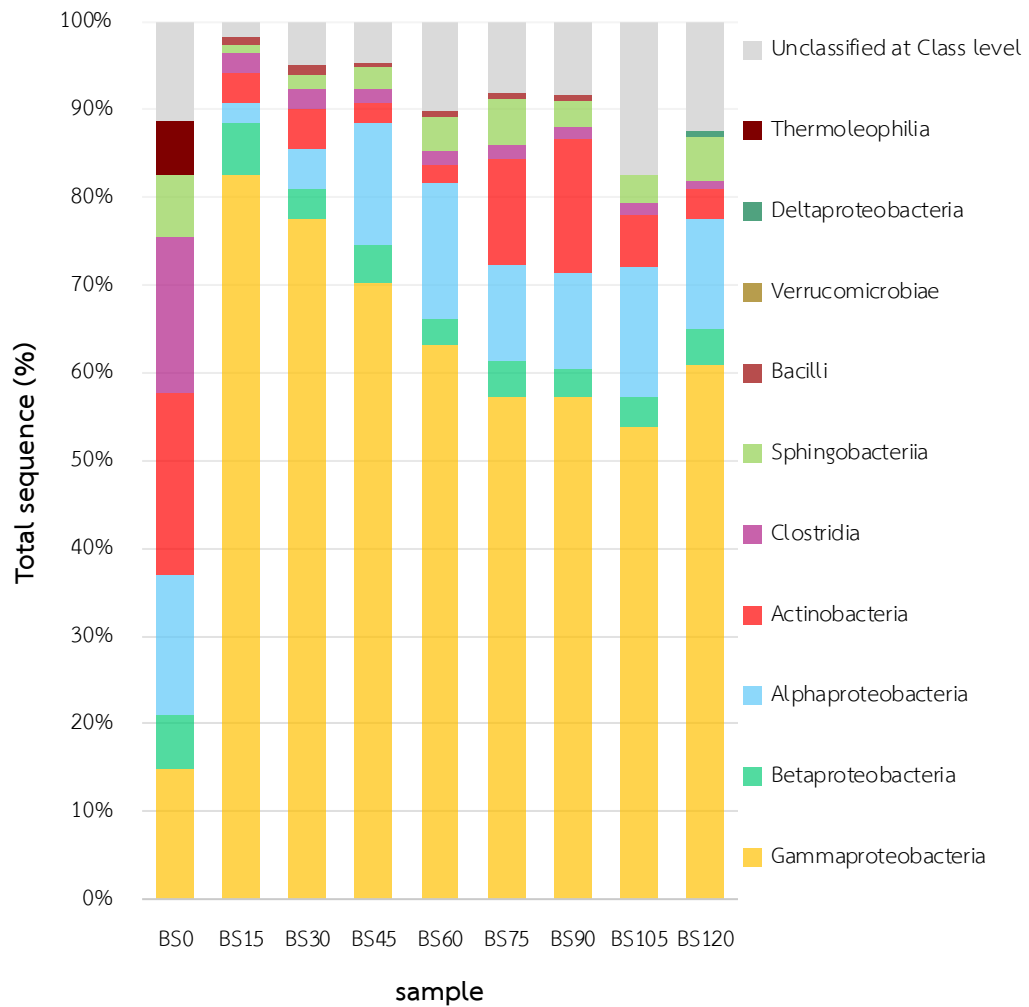
จากผลการวิเคราะห์ลำดับเบสของแอมพลิคอนของยีน 16S rRNA ของตัวอย่างดินในระบบนิเวศจำลองดินที่เติมน้ำมันดีเซล 1% (น้ำหนัก/น้ำหนัก) พบว่าเมื่อมีการเติมน้ำมันดีเซลลงในระบบนิเวศจำลองดินทำให้ประชาคมแบคทีเรียภายในระบบนิเวศจำลองดินมีการเปลี่ยนแปลงไป โดยมีการเพิ่มขึ้นของแบคทีเรียในระดับคลาส คือ Gammaproteobacteria และ Alphaproteobacteria (รูปที่ 4.8 และ 4.9) และในระดับจีโนส คือ *Pseudomonas* (รูปที่ 4.10 และ 4.11) และยังพบว่าแบคทีเรียจีโนส *Pseudomonas* เพิ่มมากขึ้นในชุดการทดลอง biostimulation มากกว่าชุดการทดลอง natural attenuation ในช่วงแรก ดังนั้นสารอาหารน่าจะกระตุ้นการเจริญของแบคทีเรียจีโนสนี้ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Wu และคณะ (2016) พบว่าในชุดการทดลอง biostimulation

ที่เติมสารอาหาร $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ และ KH_2PO_4 โดยปรับอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนต่อฟอสฟอรัส เป็น 100:10:1 พบว่าเป็นชุดที่สามารถเพิ่มประสิทธิภาพการย่อยสลายปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนได้ สูงที่สุดในระยะเวลา 6 สัปดาห์ และพบว่าในช่วงแรกเท่านั้นที่พบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยปริมาณ ปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนที่เหลืออยู่เมื่อเปรียบเทียบกับชุดการทดลองอื่น เนื่องมาจากสารอาหาร ถูกใช้ไปจนเหลือน้อยลง ส่งผลต่อสถานะที่เหมาะสมต่อการเจริญของแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลายปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอน จากงานวิจัยดังกล่าวสอดคล้องกับการพบแบคทีเรียจีส *Pseudomonas* ที่เพิ่มมากขึ้นในช่วงแรกของชุด biostimulation เปรียบเทียบกับผลการทดสอบ ประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันดีเซลในระบบนิเวศจำลองดินที่เติมน้ำมันดีเซล 1% (น้ำหนัก/น้ำหนัก) และวิเคราะห์ปริมาณน้ำมันดีเซลที่เหลืออยู่โดย GC-FID ในรูปที่ 4.1 ซึ่งพบว่าใน ชุด biostimulation มีน้ำมันดีเซลลดลงมากกว่าชุด natural attenuation ในช่วงแรก จึงคาดว่า แบคทีเรียจีส *Pseudomonas* น่าจะมีบทบาทในการย่อยสลายน้ำมันดีเซล เนื่องจากการมีอยู่ของ แบคทีเรียจีสนี้ในสัดส่วนที่มากส่งผลต่อการลดลงของน้ำมันดีเซลในระบบนิเวศจำลองดิน นอกจากนี้ ยังพบว่าในชุด natural attenuation (รูปที่ 4.10) มีประชาคมแบคทีเรียที่หลากหลายกว่าในชุด biostimulation (รูปที่ 4.11) คาดว่าน่าจะมีการปรับตัวของแบคทีเรียเมื่อได้รับการปนเปื้อนน้ำมัน ดีเซลให้สามารถใช้ไขมันดีเซลเป็นแหล่งคาร์บอน (Vyas และ Dave, 2010) รวมทั้งสารอาหารในชุด biostimulation กระตุ้นให้แบคทีเรียบางชนิดมีการเจริญเพิ่มมากขึ้น ส่งผลให้แบคทีเรียในชุด biostimulation มีความหลากหลายน้อยกว่าชุด natural attenuation

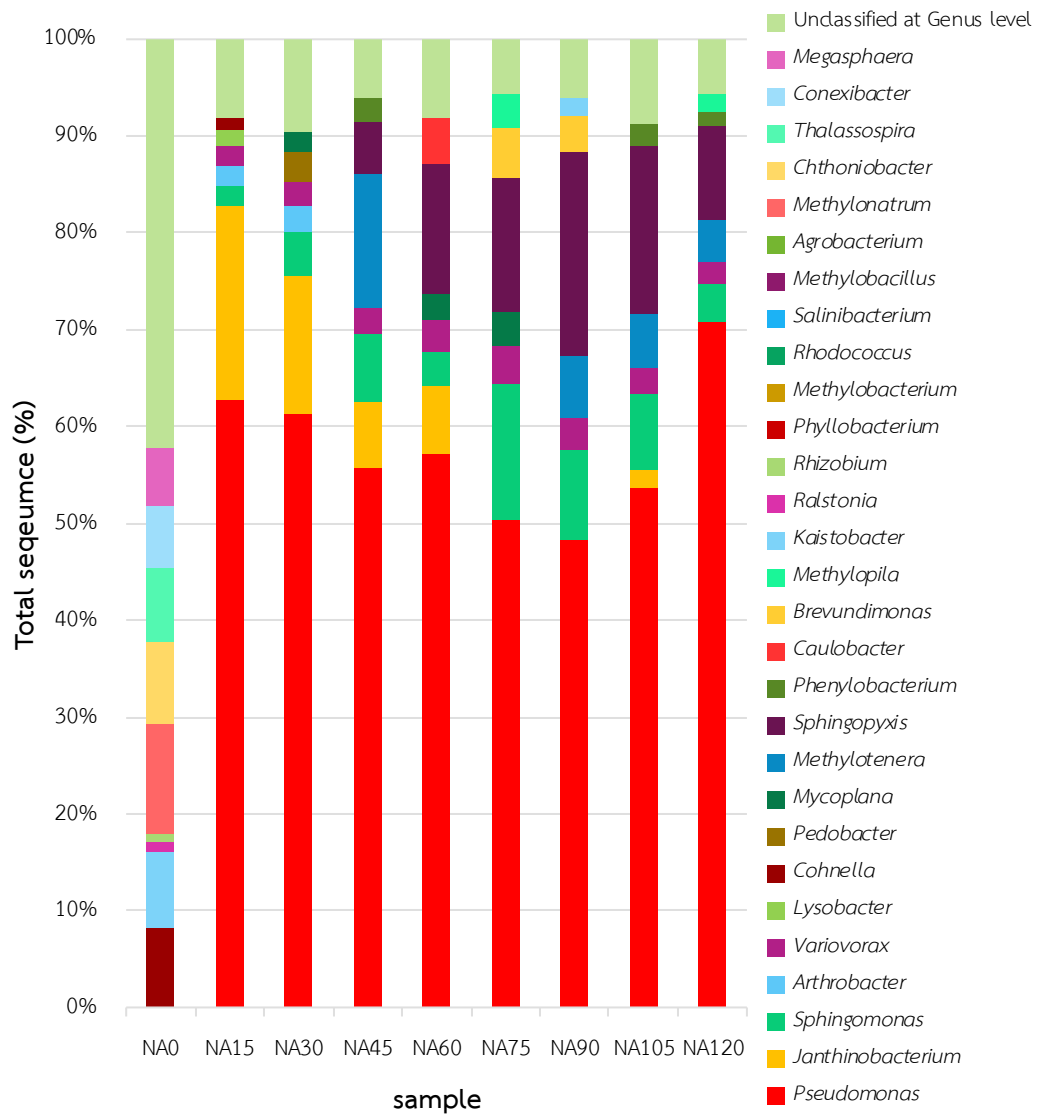
และนอกจากนี้แบคทีเรียจีส *Janthinobacterium* และ *Sphingomonas* น่าจะมีบทบาท ที่เกี่ยวข้องกับกรย่อยสลายน้ำมันดีเซลอีกด้วย เนื่องจาก *Janthinobacterium* มีการเพิ่มขึ้นอย่าง ชัดเจนในช่วงต้นของชุด natural attenuation (รูปที่ 4.10; NA15) และค่อย ๆ ลดลง ส่วน *Sphingomonas* เพิ่มขึ้นในช่วงกลางของการทดลอง (รูปที่ 4.10; NA75) ซึ่งน่าจะเป็นผลมาจาก *Sphingomonas* สามารถใช้สารมัธยันตร์ที่ได้จากการย่อยสลายน้ำมันดีเซลจากแบคทีเรียอื่นหรืออาจ ย่อยสลายสารที่มีโครงสร้างซับซ้อน จากรายงานของ Kim และคณะ (2012) ได้คัดแยก *Janthinobacterium* sp. สายพันธุ์ PAMC 25724 ซึ่งเป็นแบคทีเรียทนอุณหภูมิต่ำจากธารน้ำแข็งใน เทือกเขาแอลป์ และจากงานวิจัยของ Ronca และคณะ (2015) ได้คัดแยกแบคทีเรียแกรมลบ *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ Ant20 จากดินบริเวณสถานีวิจัยสกอตเบส ทวีปแอนตาร์กติกา โดย แบคทีเรียสายพันธุ์นี้สามารถใช้สารประกอบไฮโดรคาร์บอน เช่น พีแนนทริน และ 1-เมทิลเนพทาลิน เป็นแหล่งคาร์บอน



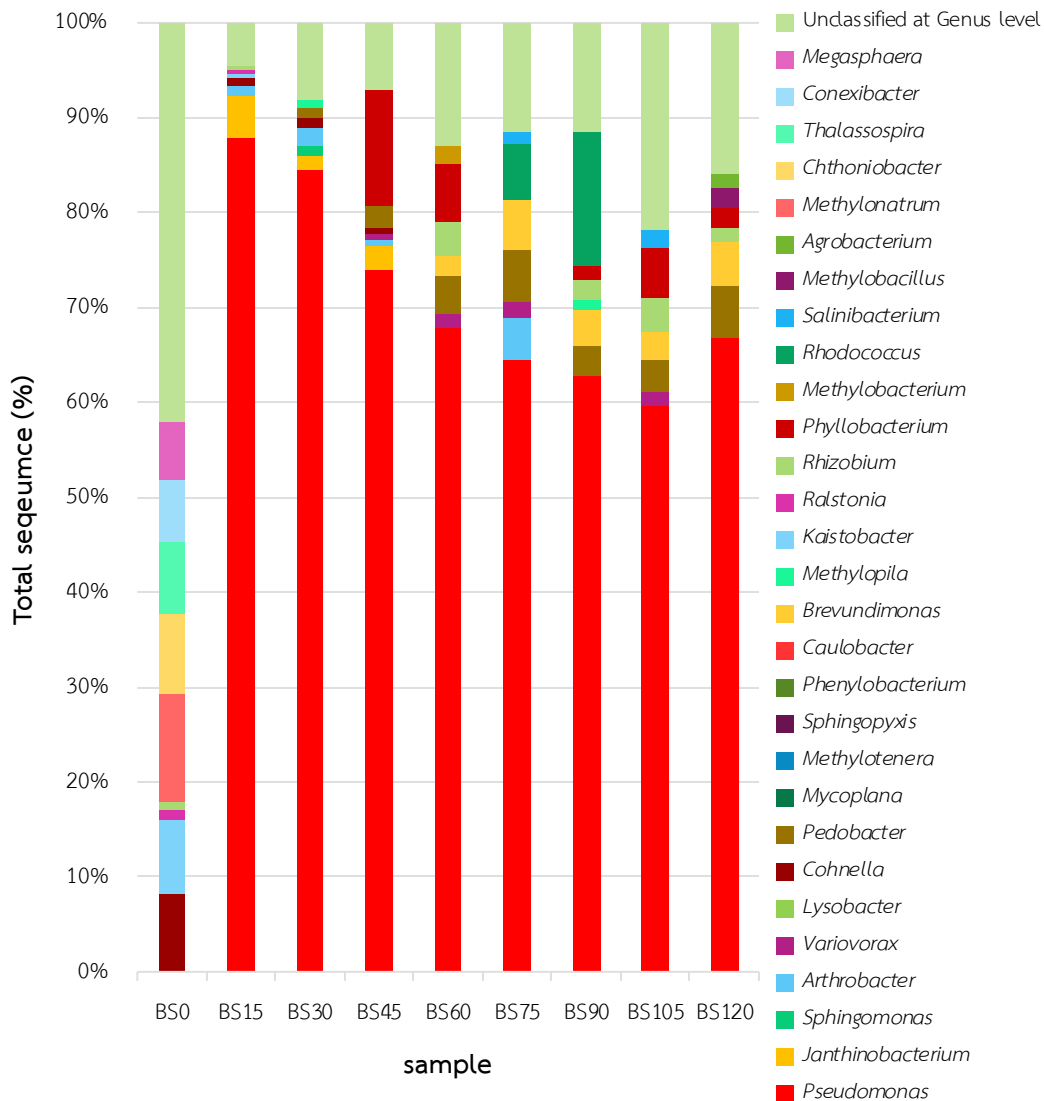
รูปที่ 4.8 ผลการวิเคราะห์ลำดับเบสของแอมพลิคอนของยีน 16S rRNA ระดับคลาสในระบบนิเวศจำลองดินที่เติมน้ำมันดีเซล 1% (น้ำหนัก/น้ำหนัก) ในชุด natural attenuation



รูปที่ 4.9 ผลการวิเคราะห์ลำดับเบสของแอมพลิคอนของยีน 16S rRNA ระดับคลาสในระบบนิเวศจำลองดินที่เติมน้ำมันดีเซล 1% (น้ำหนัก/น้ำหนัก) ในชุด biostimulation



รูปที่ 4.10 ผลการวิเคราะห์ลำดับเบสของแอมพลีคอนของยีน 16S rRNA ระดับจีโนมในระบบนิเวศจำลองดินที่เติมน้ำมันดีเซล 1% (น้ำหนัก/น้ำหนัก) ในชุด natural attenuation



รูปที่ 4.11 ผลการวิเคราะห์ลำดับเบสของแอมพลิคอนของยีน 16S rRNA ระดับจีโนมในระบบนิเวศจำลองดินที่เติมน้ำมันดีเซล 1% (น้ำหนัก/น้ำหนัก) ในชุด biostimulation

4.2.3.3 ลักษณะและโครงสร้างประชาคมแบคทีเรียทั้งหมดและยีนที่เกี่ยวข้องกับการทนเย็นและการย่อยสลายน้ำมันดีเซลจากการวิเคราะห์ด้วยวิธีซีอตันเมตาจีโนมิกส์

เนื่องจากปัจจุบันเทคโนโลยี Next generation sequencing (NGS) ได้มีการใช้กันอย่างแพร่หลายมากขึ้น รวมถึงต้นทุนในการดำเนินการก็มีราคาถูกลง ดังนั้นในการทดลองนี้จึงเลือกใช้เทคนิคซีอตันเมตาจีโนมิกส์มาใช้เพิ่มเติมจากการวิเคราะห์ลำดับเบสของแอมพลิคอนของยีน 16S rRNA เนื่องจากซีอตันเมตาจีโนมิกส์เป็นวิธีที่วิเคราะห์ลำดับเบสจากชิ้นส่วนเล็ก ๆ ที่ถูกตัดเป็นชิ้น ๆ และนำมาจัดเรียงกลับเป็น DNA เส้นเดิมอย่างสมบูรณ์ ลำดับเบสที่ได้นั้นจะมีความยาวพอที่จะนำมาทำนายโครงสร้างและตำแหน่งของยีนในจีโนมได้ (Zhang และคณะ, 2011) จึงเลือกใช้วิธีนี้ในการ

วิเคราะห์โครงสร้างประชาคมแบคทีเรียและยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายน้ำมันดีเซลในระบบนิเวศจำลองดินภายใต้อุณหภูมิต่ำที่เติมน้ำมันดีเซล 1% และ 3% (น้ำหนัก/น้ำหนัก) ต่อไป

4.2.3.3.1 โครงสร้างประชาคมแบคทีเรียทั้งหมดในระบบนิเวศจำลองดินแอนตาร์กติกภายใต้อุณหภูมิต่ำ

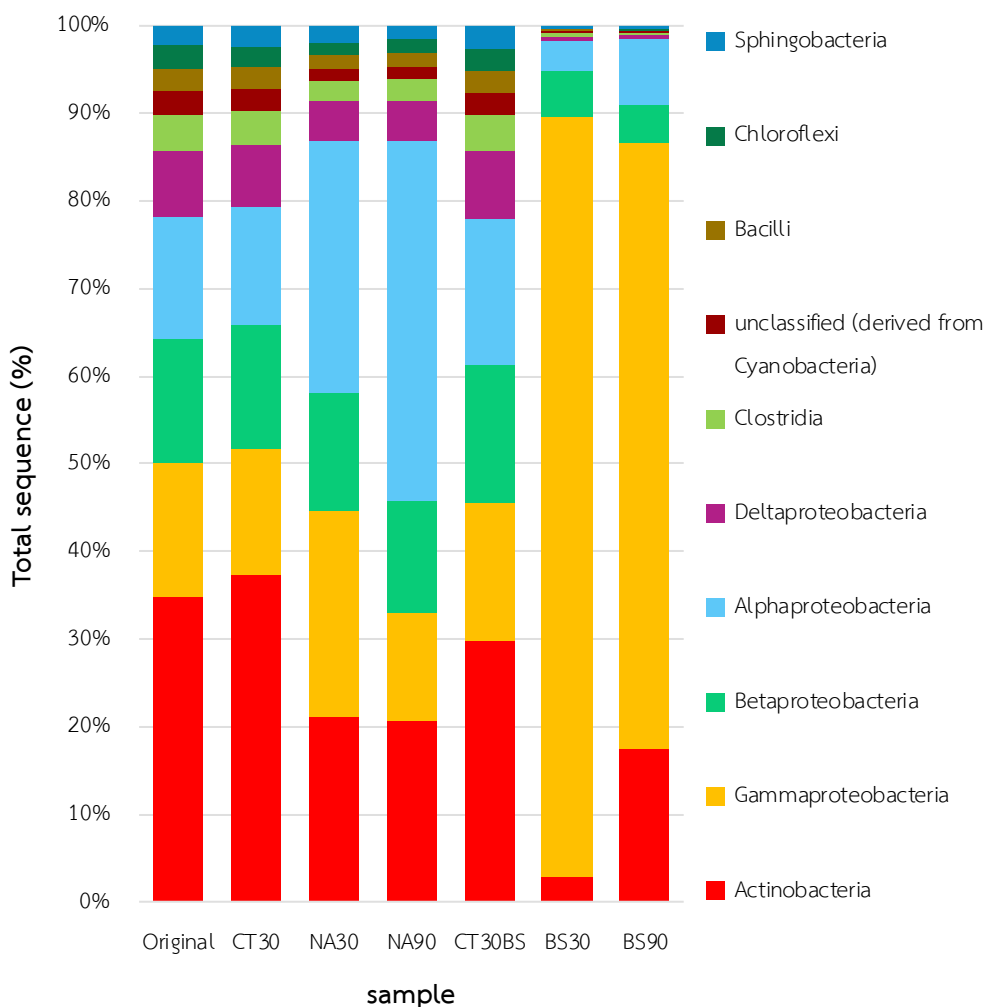
การวิเคราะห์โครงสร้างประชาคมแบคทีเรียทั้งหมดได้เลือกตัวอย่างจากระบบนิเวศจำลองดินแอนตาร์กติกภายใต้อุณหภูมิต่ำจากในชุดที่เติมน้ำมันดีเซล 1% และ 3% โดยจำนวนเบส และ sequence ที่อ่านได้จากการวิเคราะห์ด้วยวิธีซีตกันเมตาจีโนมิกส์แสดงดังตารางที่ 4.14 ซึ่งจำนวนเบสที่อ่านได้เพียงพอสำหรับการวิเคราะห์โครงสร้างประชาคมแบคทีเรียและยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายน้ำมันดีเซลในระบบนิเวศจำลองดินเนื่องจากมีจำนวนเบสมากกว่าจำนวนเบสขั้นต่ำ (5,375,854 bp) (Jung และคณะ, 2016)

ตารางที่ 4.14 จำนวนเบส และ sequence ที่อ่านได้จากการวิเคราะห์ด้วยวิธีซีตกันเมตาจีโนมิกส์ของตัวอย่างดินจากระบบนิเวศจำลองดินที่เติมน้ำมันดีเซล 1% และ 3% (น้ำหนัก/น้ำหนัก)

ตัวอย่าง	จำนวนเบสที่อ่านได้ (bp)	จำนวน sequence ที่อ่านได้
Original	211,831,041	1,097,260
ชุดควบคุม		
CT30	808,291,729	2,867,433
CT30BS	918,682,861	3,215,171
ระบบนิเวศจำลองดินที่เติมน้ำมันดีเซล 1% (น้ำหนัก/น้ำหนัก)		
NA30	580,603,029	2,063,872
NA90	313,891,329	1,105,951
BS30	199,071,052	1,067,649
BS90	300,199,429	1,686,048
ระบบนิเวศจำลองดินที่เติมน้ำมันดีเซล 3% (น้ำหนัก/น้ำหนัก)		
NA30	73,636,596	358,379
NA90	253,927,694	1,294,113
NA210	576,423,324	2,059,400
BS30	283,889,428	2,119,288
BS90	267,412,762	1,726,909
BS210	636,308,178	2,287,098

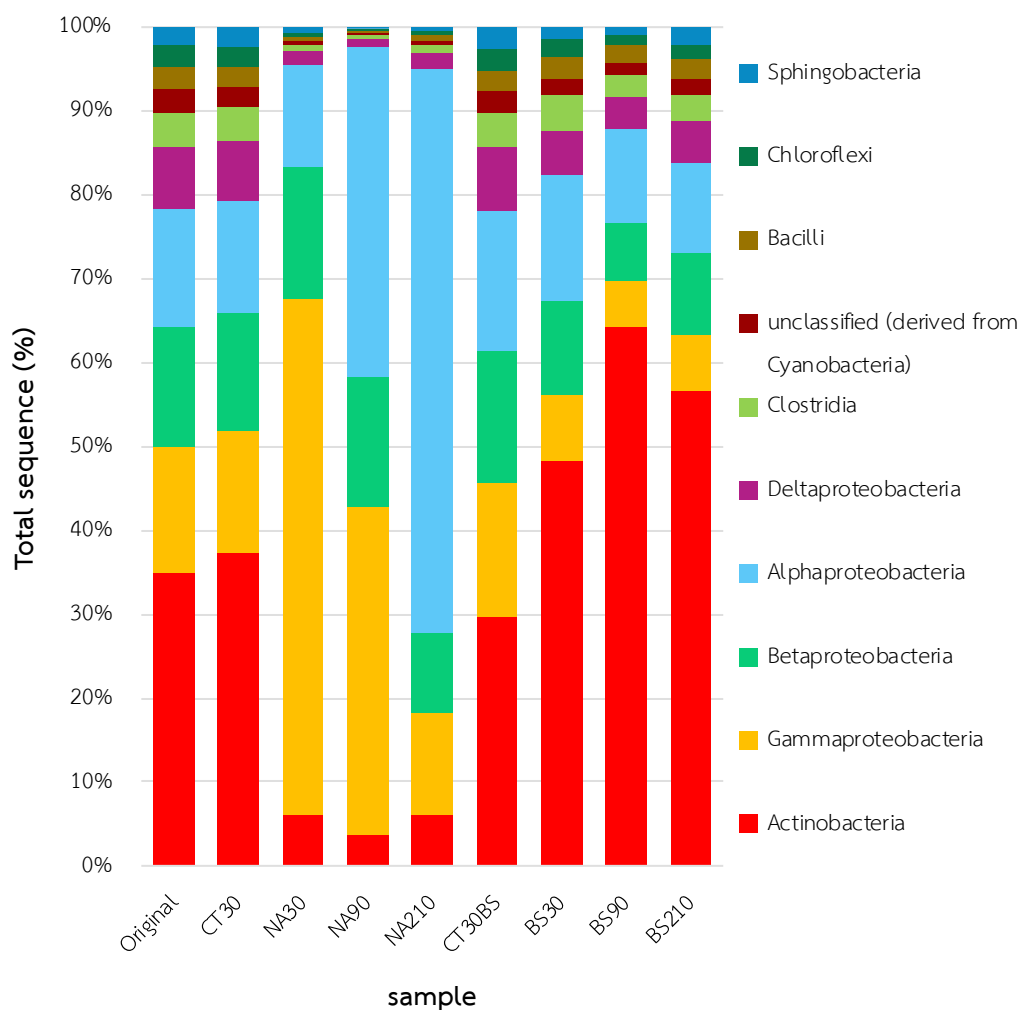
จากผลการวิเคราะห์ด้วยวิธีซีออตกันเมตาจีโนมิกส์และโปรแกรม MG-RAST โดยใช้ฐานข้อมูล KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) แสดงกราฟประชาคมแบคทีเรียในระดับคลาส เนื่องจากการวิเคราะห์ด้วยซีออตกันเมตาจีโนมิกส์มีความละเอียดมากเมื่อเปรียบเทียบกับ การวิเคราะห์ลำดับเบสของแอมพลิคอนของยีน 16S rRNA ซึ่งผ่านการเพิ่มปริมาณยีน 16S rRNA ด้วย PCR โดยใช้ไพรเมอร์ 515F และ 806R (V4 region) ทำให้ได้เส้น DNA ที่สั้นกว่า (291 bp) เมื่อเปรียบเทียบกับ การวิเคราะห์ด้วยวิธีซีออตกันเมตาจีโนมิกส์ ซึ่งวิเคราะห์ด้วยลำดับเบสทั้งหมดใน จีโนม จึงไม่สามารถแสดงกราฟออกมาได้ลึกกว่าระดับคลาส จากรูปที่ 4.12 แสดงผลการวิเคราะห์ ซีออตกันเมตาจีโนมิกส์จากตัวอย่างดินในระบบนิเวศจำลองดินที่เติมน้ำมันดีเซล 1% (น้ำหนัก/น้ำหนัก) เมื่อเปรียบเทียบกับผลการวิเคราะห์ลำดับเบสของแอมพลิคอนของยีน 16S rRNA ในระดับคลาส (รูป ที่ 4.8 และ 4.9) พบว่ามีความคล้ายคลึงกัน โดยพบว่าเมื่อมีน้ำมันดีเซลในระบบนิเวศจำลองดิน ทำให้ แบคทีเรียในคลาส Gammaproteobacteria เพิ่มจำนวนขึ้น โดยเฉพาะในชุด biostimulation มีจำนวนเพิ่มขึ้นอย่างชัดเจน

จากผลการวิเคราะห์ประชาคมแบคทีเรียในรูปที่ 4.12 เมื่อเปรียบเทียบเฉพาะชุดควบคุม CT30 (ชุดการทดลองที่ไม่ได้เติมน้ำมันดีเซล และตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 วัน) และ CT30BS (ชุดการทดลองที่ไม่ได้เติมน้ำมันดีเซล แต่มีการเติมสารอาหารให้มีอัตราส่วน คาร์บอนต่อไนโตรเจนต่อฟอสฟอรัส เท่ากับ 100:10:1 และตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียสเป็น เวลา 30 วัน) กับดินแอนตาร์กติก (Original) พบว่ามีสัดส่วนของประชาคมแบคทีเรียที่ไม่แตกต่างกัน ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าอุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียสที่ชุดควบคุมถูกตั้งทิ้งไว้ ไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลง ประชาคมแบคทีเรีย ในขณะที่เมื่อเติมน้ำมันดีเซลลงในระบบนิเวศจำลองดิน พบว่าในชุด natural attenuation มีการเพิ่มขึ้นของ Gammaproteobacteria และ Alphaproteobacteria ในเวลา ต่อมา (NA30 และ NA90) ส่วนในชุด biostimulation พบว่า Gammaproteobacteria เพิ่มขึ้น อย่างชัดเจน (BS30 และ BS90) ส่วน Alphaproteobacteria มีจำนวนเพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อย (BS30 และ BS90) จึงคาดว่าน้ำมันดีเซลและสารอาหารช่วยกระตุ้นให้ Gammaproteobacteria เพิ่มขึ้น และแบคทีเรียในคลาสดังกล่าวมีแนวโน้มในการย่อยสลายน้ำมันดีเซลอีกด้วย



รูปที่ 4.12 ผลการวิเคราะห์ด้วยวิธีซีตกันเมตาจีโนมิกส์ระดับคลาสในระบบนิเวศจำลองดินที่เติมน้ำมันดีเซล 1% (น้ำหนัก/น้ำหนัก)

จากผลการวิเคราะห์ในรูป 4.13 ชุดการทดลองระบบนิเวศจำลองดินที่เติมน้ำมันดีเซล 3% (น้ำหนัก/น้ำหนัก) พบว่าในชุด Natural attenuation เมื่อมีการปนเปื้อนน้ำมันดีเซล ทำให้แบคทีเรียในคลาส Gammaproteobacteria เพิ่มขึ้นอย่างชัดเจน และค่อย ๆ ลดลงในเวลาต่อมา ซึ่งสอดคล้องกับกราฟการทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันดีเซล (รูปที่ 4.2) โดยวันที่ 30 และ 90 พบว่าน้ำมันดีเซลลดลงอย่างรวดเร็ว ดังนั้นแบคทีเรียในคลาส Gammaproteobacteria น่าจะมีบทบาทในการย่อยสลายน้ำมันดีเซลในช่วงต้นโดยไม่ต้องกระตุ้นด้วยการเติมสารอาหาร เนื่องจากแบคทีเรียแกรมลบเป็นแบคทีเรียที่เจริญได้ดีและโดดเด่นในการทนต่อความเย็น (Labbé และคณะ, 2007)



รูปที่ 4.13 ผลการวิเคราะห์ด้วยวิธีซีออตกันเมตาจีโนมิกส์ระดับคลาสในระบบนิเวศจำลองดินที่เติมน้ำมันดีเซล 3% (น้ำหนัก/น้ำหนัก)

โดยการศึกษาส่วนใหญ่พบว่าแบคทีเรียแกรมลบที่มีความสามารถในการย่อยสลายปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนโดยคัดแยกได้จากดินแอนตาร์กติก (*Pseudomonas* spp. และ *Sphingomonas* spp.) (Aislabie และคณะ, 2001) และบริเวณเทือกเขาแอลป์ (Labbé และคณะ, 2007) ซึ่ง *Pseudomonas* spp. จัดอยู่ในคลาส Gammaproteobacteria และในวันที่ 210 ของการทดลอง และพบว่าแบคทีเรียในคลาส Alphaproteobacteria มีการเพิ่มขึ้นแทนที่จึงคาดว่า Alphaproteobacteria น่าจะมีบทบาทในการย่อยสลายน้ำมันดีเซลในช่วงท้าย จากรายงานของ Zhang และคณะ (2014) ได้คัดแยกและศึกษาลักษณะสมบัติของ *Sphingomonas* sp. ซึ่งเป็นแบคทีเรียในคลาส Alphaproteobacteria จากดินที่ปนเปื้อนสารปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนในประเทศจีน พบว่าสามารถย่อยสลายน้ำมันดีเซล 500 ppm 82.6% ในระยะเวลา 15 วัน ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และในชุดการทดลอง biostimulation พบว่ามีประชาคมแบคทีเรียที่แตกต่างกับ

ชุด natural attenuation อย่างชัดเจน โดยสารอาหารที่เติมลงไปนั้นน่าจะมีผลไปกระตุ้นการเจริญของแบคทีเรียในคลาส Actinobacteria และแบคทีเรียในคลาส Actinobacteria น่าจะมีบทบาทในการย่อยสลายน้ำมันดีเซลในชุด biostimulation โดยรายงานของ Huang และคณะ (2008) ได้คัดเลือก *Rhodococcus erythropolis* ซึ่งเป็นแบคทีเรียในคลาส Actinobacteria จากโคลนทะเลที่ปนเปื้อนน้ำมันจากตอนเหนือของประเทศจีน พบว่ามีความสามารถในการย่อยสลายน้ำมันดีเซลที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส และเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันดีเซลโดยเติม $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2.53 กรัม/ลิตร Na_2HPO_4 2.75 กรัม/ลิตร และ สารสกัดยีสต์ 0.01 กรัม/ลิตร ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันดีเซลจาก 12.6% เป็น 75% ภายในระยะเวลา 7 วัน

นอกจากนี้เมื่อเปรียบเทียบระหว่างระบบนิเวศจำลองดินภายใต้อุณหภูมิที่เติมน้ำมันดีเซล 1% และ 3% (น้ำหนัก/น้ำหนัก) พบว่าความเข้มข้นของน้ำมันดีเซลมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของประชาคมแบคทีเรีย ซึ่งมีสัดส่วนของแบคทีเรียที่แตกต่างกัน โดยในชุด natural attenuation พบว่ามีความคล้ายคลึงกันของการเปลี่ยนแปลงประชาคมแบคทีเรียในช่วงท้ายของการทดลอง โดยพบว่า Alphaproteobacteria เพิ่มขึ้นเช่นเดียวกัน แต่ในชุด biostimulation พบว่าแบคทีเรียเด่นในระบบนิเวศจำลองดินชุดที่เติมน้ำมันดีเซล 1% (น้ำหนัก/น้ำหนัก) คือ Gammaproteobacteria แตกต่างกับชุดระบบนิเวศจำลองดินชุดที่เติมน้ำมันดีเซล 3% (น้ำหนัก/น้ำหนัก) ซึ่งแบคทีเรียเด่นที่พบคือ Actinobacteria โดยคาดว่า Actinobacteria น่าจะมีความสามารถในการทนต่อสารพิษที่สูงในสิ่งแวดล้อม จากการศึกษาของ Polti และคณะ (2014) พบว่า Actinobacteria เป็นแบคทีเรียที่สำคัญในดินที่สามารถทนต่อน้ำมันและโลหะหนัก และมีประสิทธิภาพสูงในการใช้บำบัดสิ่งแวดล้อมอีกด้วย

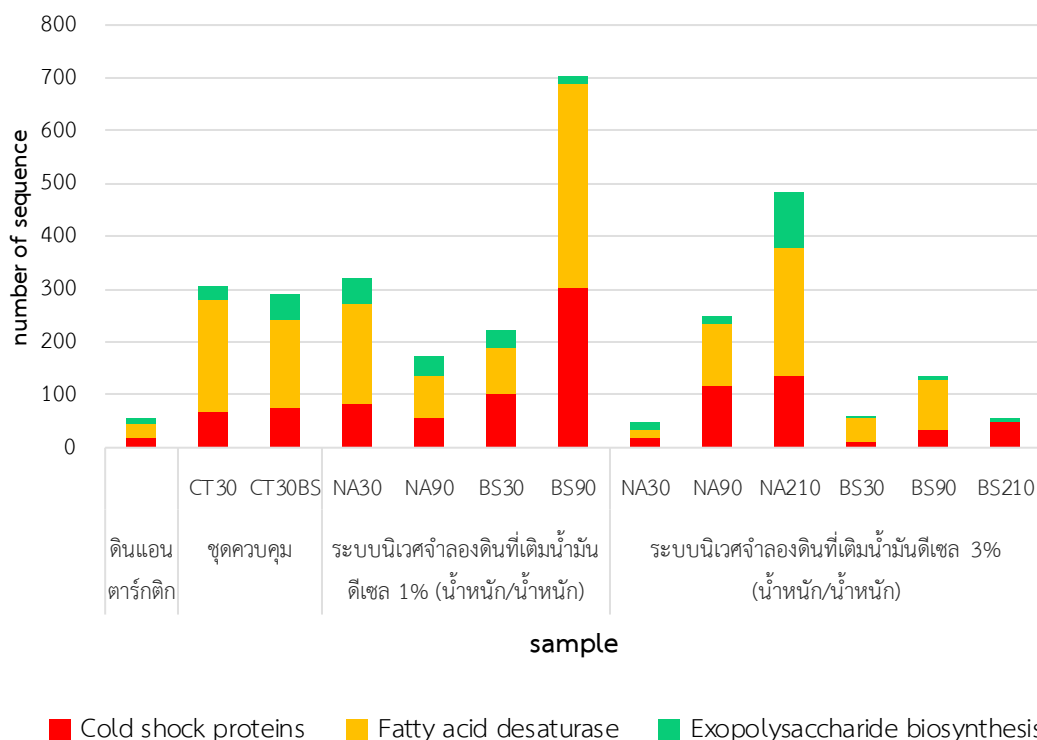
4.2.3.3.2 การวิเคราะห์ยีนที่เกี่ยวข้องกับการทนเย็นจากตัวอย่างดิน

แอนตาร์กติกในระบบนิเวศจำลองดิน

เนื่องจากตัวอย่างดินในระบบนิเวศจำลองดินเป็นดินจากทวีปแอนตาร์กติกา ซึ่งเป็นพื้นที่ที่มีอากาศหนาวเย็นตลอดเวลา ดังนั้นคาดว่าจะพบยีนประมวลรหัสโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการทนเย็นในแบคทีเรียประจำถิ่นในตัวอย่างดินแอนตาร์กติกา จากผลการวิเคราะห์ยีนประมวลรหัสโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการทนเย็น ด้วยโปรแกรม MG-RAST โดยใช้ฐานข้อมูล COG (alignment length of >15 bp; percent identity of >60%; E value of $\leq 10^{-5}$) และใช้ฟิลเตอร์ที่เกี่ยวข้องกับการทนเย็นทั้ง 3 ฟิลเตอร์ ได้แก่ โปรตีนโคลด์ช็อก (Cold shock proteins), แพตตีแอซิดดีแซททูเรส (Fatty acid desaturase) และ โปรตีนในวิถีการสังเคราะห์เอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ แสดงในรูปที่ 4.14 พบว่ายีนประมวลรหัสโปรตีนทั้งสามชนิดที่เกี่ยวข้องกับการทนเย็นพบในทุกตัวอย่างดินจากระบบนิเวศจำลองดิน โปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการทนเย็นส่วนใหญ่ที่พบคือ โปรตีนโคลด์ช็อก (Trevors และคณะ,

2012) ซึ่งจะทำงานเมื่ออุณหภูมิลดต่ำลงและยังคงทำงานอยู่ทั้งชั่วคราวหรือเป็นระยะเวลานานเพื่อให้แบคทีเรียปรับตัวทางสรีรวิทยาให้เข้ากับสิ่งแวดล้อม (Mojib และคณะ, 2011) โดยจากผลการวิเคราะห์แสดงให้เห็นถึงยีนประมวลรหัสโปรตีนโคลด์ช็อกที่น้อยในช่วงต้นของแต่ละชุดการทดลอง และเพิ่มขึ้นเล็กน้อยในช่วงท้ายของการทดลอง คาดว่ามีการเพิ่มขึ้นเนื่องจากแบคทีเรียเจริญในสิ่งแวดล้อมที่มีความหนาวเย็นเป็นเวลานาน รวมถึงมีการเจริญของแบคทีเรียเพิ่มขึ้นทำให้ยีนดังกล่าวมีจำนวนเพิ่มมากขึ้น

ส่วนยีนประมวลรหัสโปรตีนในวิธีการสังเคราะห์เอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ พบในทุกตัวอย่างดิน แสดงให้เห็นถึงการผลิตเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์เพื่อช่วยปกป้องเซลล์แบคทีเรียและลดความเครียดในสิ่งแวดล้อมที่มีความหนาวเย็น (Mojib และคณะ, 2011) เนื่องจากงานวิจัยนี้ทดลองที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียสตลอดการทดลอง และยีนประมวลรหัสโปรตีนแพตตีแอซิดดีแซททูเรสพบว่ามีจำนวนที่แตกต่างกันในแต่ละช่วงเวลา อาจเนื่องมาจากสภาวะที่เปลี่ยนแปลงไปในระบบนิเวศจำลองดินในแต่ละช่วงเวลา และมีการเปลี่ยนแปลงของประชาคมแบคทีเรียส่งผลให้พบยีนประมวลรหัสโปรตีนแพตตีแอซิดดีแซททูเรสในจำนวนที่แตกต่างกัน

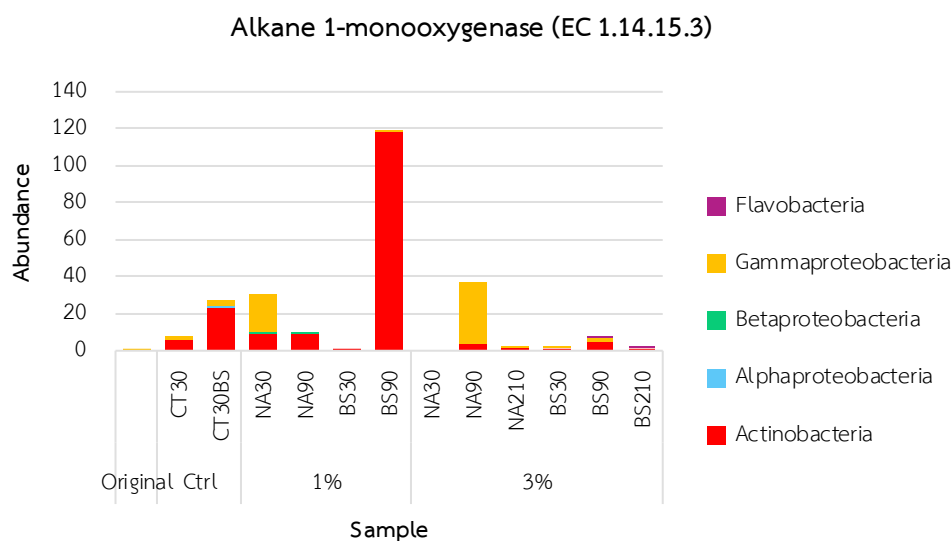


รูปที่ 4.14 ยีนประมวลรหัสโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการทนเย็นจากตัวอย่างดินในระบบนิเวศจำลองดินแอนตาร์กติกภายใต้อุณหภูมิต่ำด้วย MG-RAST จากฐานข้อมูล Clusters of Orthologous Groups

4.2.3.3.3 การวิเคราะห์ยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายน้ำมันดีเซลจากตัวอย่างดินแอนตาร์กติกในระบบนิเวศจำลองดิน

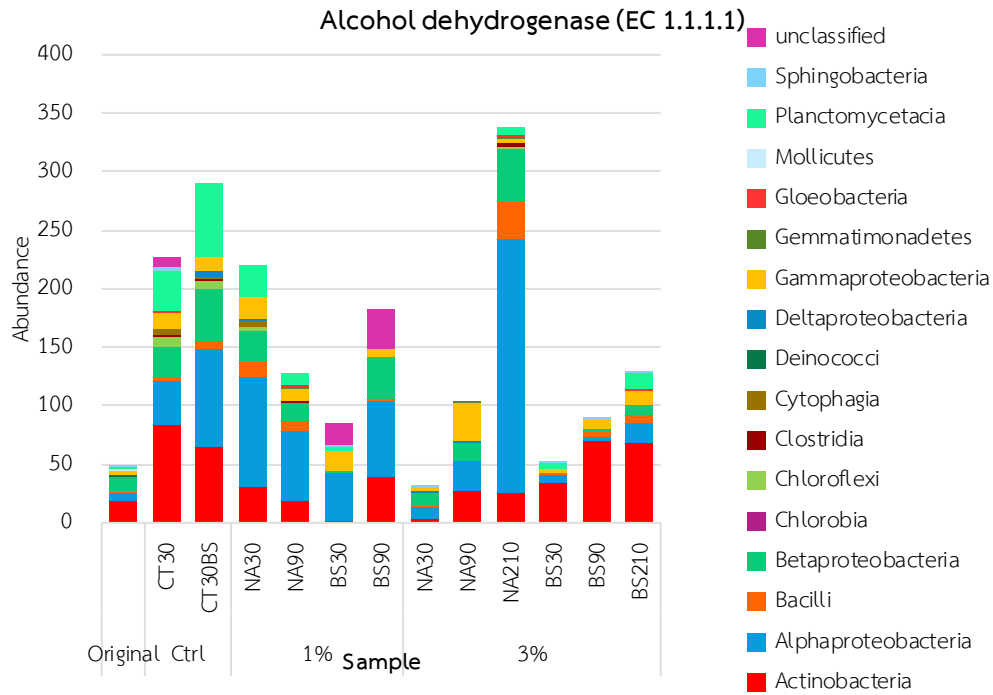
การศึกษาที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายน้ำมันดีเซลนั้นสามารถบ่งชี้บทบาทหลักของแบคทีเรียในการย่อยสลายน้ำมันดีเซลภายในระบบนิเวศจำลองดินแอนตาร์กติกภายใต้อุณหภูมิต่ำได้ และเพื่อศึกษาความหลากหลายของยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายน้ำมันดีเซล จึงวิเคราะห์ยีนที่เกี่ยวข้องกับแอลเคนออกซิเดชัน เช่น แอลเคนโมโนออกซิจีเนส (Alkane monooxygenase), แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนส (Alcohol dehydrogenase) และ แอลดีไฮด์ดีไฮโดรจีเนส (Aldehyde dehydrogenase) ด้วยโปรแกรม MG-RAST โดยใช้ฐานข้อมูล KO (KEGG Orthology) (alignment length of >15 bp; percent identity of >60%; E value of $\leq 10^{-5}$)

จากรูป 4.15 พบว่าเมื่อเปรียบเทียบปริมาณยีนแอลเคน 1-โมโนออกซิจีเนส ระหว่างดินแอนตาร์กติก (Original) และ ชุดควบคุม (Ctrl) พบว่าการเพิ่มขึ้นของยีนแอลเคน 1-โมโนออกซิจีเนส แม้จะไม่ได้เติมน้ำมันดีเซลลงไป น่าจะเป็นผลมาจากแบคทีเรียในดินใช้แหล่งคาร์บอนอื่นจากในดิน ส่งผลให้พบยีนแอลเคน 1-โมโนออกซิจีเนสในชุดควบคุม และในระบบนิเวศจำลองดินที่เติมน้ำมันดีเซล 1% (น้ำหนัก/น้ำหนัก) ในชุด natural attenuation พบยีนแอลเคน 1-โมโนออกซิจีเนสของ Actinobacteria และ Gammaproteobacteria ดังนั้นแบคทีเรียในคลาสดังกล่าวน่าจะมีบทบาทในการย่อยสลายน้ำมันดีเซลในชุด natural attenuation ส่วนในชุด biostimulation พบยีนแอลเคน 1-โมโนออกซิจีเนสของ Actinobacteria โดยยีนดังกล่าวเพิ่มมากขึ้นอย่างชัดเจนในวันที่ 90 น่าจะเนื่องมาจากการได้รับสารอาหารช่วยกระตุ้นการเจริญของ Actinobacteria และในระบบนิเวศจำลองดินที่เติมน้ำมันดีเซล 3% (น้ำหนัก/น้ำหนัก) พบว่าในชุด natural attenuation มียีนแอลเคน 1-โมโนออกซิจีเนสของ Actinobacteria และ Gammaproteobacteria ซึ่งคล้ายคลึงกับชุด natural attenuation ในระบบนิเวศจำลองดินที่เติมน้ำมันดีเซล 1% (น้ำหนัก/น้ำหนัก) ส่วนในชุด biostimulation พบยีนดังกล่าวนี้ในทุกช่วงการทดลอง

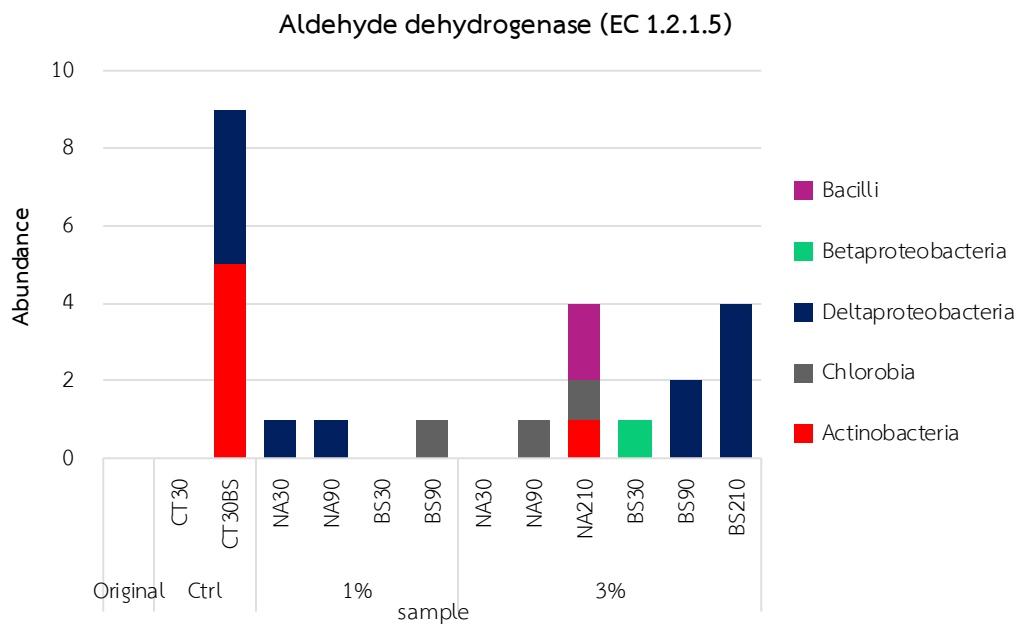


รูปที่ 4.15 ยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายน้ำมันดีเซล (แอลเคน 1-โมนอกซิจีเนส) วิเคราะห์การมีอยู่ของยีนด้วย MG-RAST จากฐานข้อมูล KEGG Orthology

จากการมีอยู่ของยีนแอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนส (รูปที่ 4.16) พบว่ามีความหลากหลายของยีนแอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนสมาก โดย Alphaproteobacteria และ Actinobacteria มีบทบาทสำคัญในการผลิตเอนไซม์ดังกล่าว ซึ่งการมีอยู่ของยีนจะเพิ่มมากขึ้นเรื่อย ๆ เมื่อระยะเวลาผ่านไป ส่วนการมีอยู่ของยีนแอลดีไฮด์ดีไฮโดรจีเนส (รูปที่ 4.17) พบมากที่สุดที่ชุดควบคุมที่มีการเติมสารอาหารลงไป คาดว่าสารอาหารจะช่วยกระตุ้นการเจริญของแบคทีเรียในดินให้สามารถผลิตเอนไซม์ดังกล่าวได้ และเมื่อระยะเวลาผ่านไปในแต่ละชุดการทดลองพบว่ามียีนดังกล่าวเพิ่มมากขึ้นอีกด้วย จากข้อมูลดังกล่าวพบว่าวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงไปของประชาคมแบคทีเรียมีความสอดคล้องกับยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยน้ำมันดีเซล โดยพบว่าแบคทีเรียเด่นในระบบนิเวศจำลองดินนั้นยังคงมีบทบาทที่สำคัญเนื่องจากการพบการมีอยู่ของยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายน้ำมันดีเซล



รูปที่ 4.16 ยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายน้ำมันดีเซล (แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนส) วิเคราะห์การมีอยู่ของยีนด้วย MG-RAST จากฐานข้อมูล KEGG Orthology



รูปที่ 4.17 ยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายน้ำมันดีเซล (แอลดีไฮด์ดีไฮโดรจีเนส) วิเคราะห์การมีอยู่ของยีนด้วย MG-RAST จากฐานข้อมูล KEGG Orthology

จากตารางที่ 4.17 แสดงการมีอยู่ของยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายน้ำดีเซลพบว่า การมีอยู่ของยีนแอลเคน 1-โมนอกซิจีเนส ยีนแอลกอฮอล์ไฮโดรจีเนส และยีนแอลดีไฮด์ไฮโดรจีเนส ซึ่งเกี่ยวข้องกับวิถีการย่อยสลายอะลิฟาติกไฮโดรคาร์บอน รวมทั้งยีนเอกซ์ตราไดออกไซด์ออกซิจีเนส ยีนอินตราไดออกไซด์ออกซิจีเนส และยีนเจนติเสต/โฮโมเจนติเสต (Gentisate/Homogentisate) ซึ่งเกี่ยวข้องกับวิถีการย่อยสลายอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนซึ่งมีน้อยในน้ำมันดีเซล มีแนวโน้มว่าพบมากขึ้นเมื่อมีการปนเปื้อนของน้ำมันดีเซล และเพิ่มมากขึ้นตามระยะเวลา ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าการเติมน้ำมันดีเซลลงไปสามารถใช้ในการคัดเลือกแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนได้อีกด้วย ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Yergeau และคณะ (2012) ได้ศึกษายีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายไฮโดรคาร์บอนในดิน โดยจัดชุดการทดลองจากดินอาร์กติก เป็นดินที่ไม่ปนเปื้อนน้ำมันดีเซล ดินที่ปนเปื้อนน้ำมันดีเซลที่ผ่านการบำบัดวันที่ 0 ($t=0$) ดินที่ปนเปื้อนน้ำมันดีเซลที่ผ่านการบำบัด 1 เดือน ($t=1m$) และดินที่ปนเปื้อนน้ำมันดีเซลที่ผ่านการบำบัด 1 ปี ($t=1y$) พบยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายไฮโดรคาร์บอนของ Gammaproteobacteria ที่ตัวอย่าง $t=0$ และ $t=1m$ พบยีนของ Alphaproteobacteria และ Actinobacteria ที่ $t=1y$ และพบว่ายีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายน้ำมันจะพบในชุดการทดลองที่ปนเปื้อนน้ำมันดีเซล มากกว่าชุดการทดลองที่ไม่ปนเปื้อนน้ำมันดีเซล

จากผลการวิเคราะห์ยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายน้ำมันดีเซลพบว่า แบคทีเรียเด่นที่พบในประชาคมแบคทีเรียเป็นแบคทีเรียที่มีบทบาทในการย่อยสลายน้ำมันดีเซล เนื่องจากเป็นแบคทีเรียหลักที่พบการมีอยู่ของยีนดังกล่าว ส่วนข้อมูลด้านปริมาณไม่สามารถสรุปได้ เนื่องจากข้อมูลไม่เป็นไปในทิศทางเดียวกันกับผลการทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันดีเซลในระบบนิเวศจำลองดินแอนตาร์กติกภายใต้อุณหภูมิต่ำ อาจเนื่องมาจากข้อมูลเมตาจีโนมิกส์ที่นำไปวิเคราะห์ยังไม่ผ่านการเรียงลำดับ (assembly) ทำให้ผลการวิเคราะห์ยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายน้ำมันดีเซลยังไม่สมบูรณ์ และการตรวจสอบการมีอยู่ของยีนไม่สามารถบ่งบอกการแสดงออกของยีน (gene expression) ได้ รวมทั้งยีนแอลกอฮอล์ไฮโดรจีเนส และยีนแอลดีไฮด์ไฮโดรจีเนส สามารถพบได้ในแบคทีเรียอื่นนอกเหนือจากแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลายน้ำมันดีเซล แตกต่างจากยีนแอลเคน 1-โมนอกซิจีเนส ซึ่งจำเพาะต่อการย่อยสลายน้ำมันดีเซลโดยตรง เนื่องจากส่วนประกอบหลักของน้ำมันดีเซลประกอบด้วยน้ำมันดีเซลมากกว่า 70% จึงส่งผลให้การตรวจสอบยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายน้ำมันดีเซลไม่สอดคล้องกับผลการทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันดีเซล

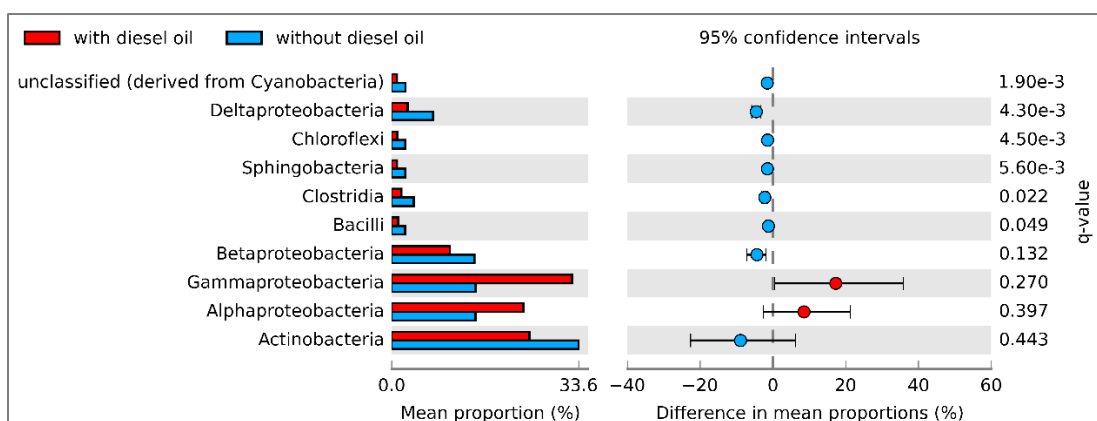
ตารางที่ 4.15 ยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายน้ำมันดีเซลจากการวิเคราะห์ด้วย MG-RAST จากฐานข้อมูล KEGG Orthology (e-value, 10^{-5}) in normalized datasets (100,000 sequences)

Sample		Alkane 1- monooxygenase	Alcohol dehydrogenase	Aldehyde dehydrogenase	Extradiol aromatic- ring-cleavage	Intradiol aromatic-ring- cleavage dioxygenase	Gentisate/ Homogentisate
Original		1	49	0	6	27	71
Control	CT30	8	227	0	29	139	365
	CT30BS	7	291	9	30	92	469
1%	NA30	31	221	1	32	68	385
	NA90	10	128	1	31	38	115
	BS30	1	85	0	14	109	123
	BS90	119	183	1	9	137	255
3%	NA30	0	31	0	10	30	36
	NA90	37	105	1	5	42	183
	NA210	3	338	4	98	67	533
	BS30	3	53	1	16	25	45
	BS90	8	90	2	44	32	32
	BS210	2	130	4	43	60	101

4.2.3.3.4 การวิเคราะห์ข้อมูลเมตาจีโนมิกส์ด้วยการวิเคราะห์ทางสถิติ

จากข้อมูลเมตาจีโนมิกส์สามารถวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติด้วยโปรแกรม STAMP (Parks และคณะ, 2014) ด้วยการวิเคราะห์ White's non-parametric t test โดยใช้ false discovery rate (FDR) ซึ่งแสดงผลออกมาเป็นค่า q -value ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

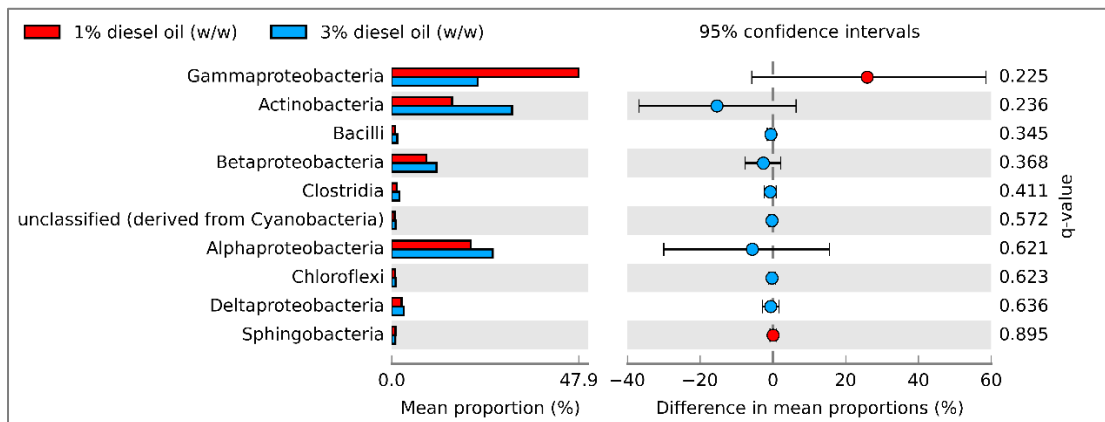
จากผลการวิเคราะห์ทางสถิติโดยเปรียบเทียบปัจจัยน้ำมันดีเซลต่อประชาคมแบคทีเรียในระบบนิเวศจำลองดินแอนตาร์กติกภายใต้อุณหภูมิต่ำในรูป 4.18 พบว่า Gammaproteobacteria และ Alphaproteobacteria มีการเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% จึงสรุปได้ว่าน้ำมันดีเซลมีผลต่อประชาคมแบคทีเรียในระบบนิเวศจำลองดิน โดยช่วยกระตุ้นให้ Gammaproteobacteria และ Alphaproteobacteria เจริญเพิ่มมากขึ้น



รูปที่ 4.18 ผลการวิเคราะห์ทางสถิติโดยเปรียบเทียบปัจจัยน้ำมันดีเซลต่อประชาคมแบคทีเรียในระบบนิเวศจำลองดินแอนตาร์กติกภายใต้อุณหภูมิต่ำ แห่งสีแดงคือชุดที่เติมน้ำมันดีเซล และแห่งสีฟ้าคือชุดที่ไม่ได้เติมน้ำมันดีเซล

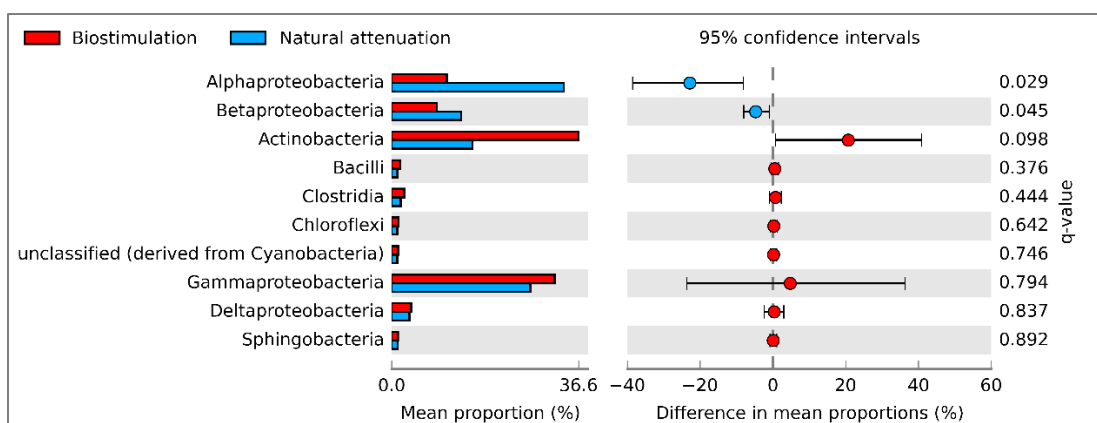
จากผลการวิเคราะห์ทางสถิติโดยเปรียบเทียบปัจจัยความเข้มข้นของน้ำมันดีเซลต่อประชาคมแบคทีเรียในระบบนิเวศจำลองดินแอนตาร์กติกภายใต้อุณหภูมิต่ำในรูป 4.19 พบว่าที่ความเข้มข้นน้ำมันดีเซล 1% (น้ำหนัก/น้ำหนัก) พบ Gammaproteobacteria มากกว่าในชุดที่เติมน้ำมันดีเซล 3% (น้ำหนัก/น้ำหนัก) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% และ Actinobacteria, Bacilli, Betaproteobacteria และ Clostridia พบในชุดการทดลองที่เติมน้ำมันดีเซล 3% (น้ำหนัก/น้ำหนัก) มากกว่าชุดการทดลองที่เติมน้ำมันดีเซล 1% (น้ำหนัก/น้ำหนัก) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าความเข้มข้นของน้ำมันดีเซลมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงประชาคมแบคทีเรียในระบบนิเวศจำลองดิน โดย Actinobacteria มีจำนวนเพิ่มขึ้นอย่างชัดเจน จึงมีแนวโน้มว่า Actinobacteria เป็นแบคทีเรียที่สามารถทนต่อน้ำมันดีเซลที่ความเข้มข้นสูงได้ จากการรายงานของ Polti และคณะ (2014) พบว่า Actinobacteria เป็นแบคทีเรียที่สำคัญในดินที่สามารถทนต่อน้ำมันและโลหะหนัก และมีประสิทธิภาพสูงในการใช้บำบัดสิ่งแวดล้อมอีกด้วย

และเมื่อพิจารณาการวิเคราะห์ทางสถิติควบคู่กับประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันดีเซลในระบบนิเวศจำลองดิน โดยพิจารณาจากค่าคงที่อัตราเร็วปฏิกิริยาอันดับหนึ่งของการย่อยสลายน้ำมันดีเซลในระบบนิเวศจำลองดินภายใต้อุณหภูมิต่ำ (ตารางที่ 4.5) พบว่ามีค่าคงที่อัตราเร็วปฏิกิริยาอันดับหนึ่งของการย่อยสลายน้ำมันดีเซลในชุดที่เติมน้ำมันดีเซล 1% และ 3% (น้ำหนัก/น้ำหนัก) คือ 0.2 และ 0.1 ตามลำดับ ซึ่งชุดที่เติมน้ำมันดีเซล 1% (น้ำหนัก/น้ำหนัก) มีอัตราการย่อยสลายที่เร็วกว่าน่าจะมีผลมาจากความเข้มข้นของน้ำมันดีเซลและสัดส่วนของแบคทีเรียในระบบนิเวศจำลองดินที่ส่งผลต่ออัตราเร็วปฏิกิริยาการย่อยสลายน้ำมันดีเซล



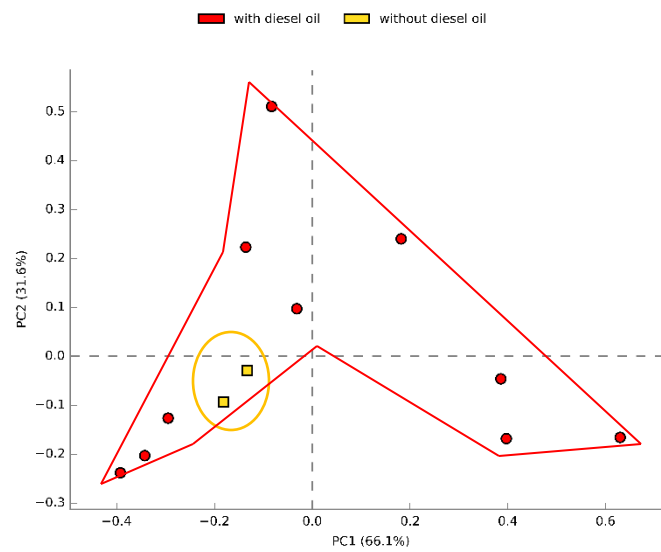
รูปที่ 4.19 ผลการวิเคราะห์ทางสถิติโดยเปรียบเทียบปัจจัยความเข้มข้นของน้ำมันดีเซลต่อประชาคมแบคทีเรียในระบบนิเวศจำลองดินแอนตาร์กติกภายใต้อุณหภูมิต่ำ แท่งสีแดงคือชุดที่เติมน้ำมันดีเซล 1% (น้ำหนัก/น้ำหนัก) และแท่งสีฟ้าคือชุดที่เติมน้ำมันดีเซล 3% (น้ำหนัก/น้ำหนัก)

จากผลการวิเคราะห์ทางสถิติโดยเปรียบเทียบปัจจัยสารอาหารต่อประชาคมแบคทีเรียในระบบนิเวศจำลองดินแอนตาร์กติกภายใต้อุณหภูมิต่ำในรูป 4.21 พบว่า Actinobacteria, Bacilli และ Clostridia มีการเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% เมื่อเติมสารอาหารลงไปในระบบนิเวศจำลองดิน ดังนั้นจากการวิเคราะห์ทางสถิติพบว่าสารอาหารมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงประชาคมแบคทีเรียในระบบนิเวศจำลองดิน แต่เมื่อพิจารณาประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันดีเซลในรูปที่ 4.1 และ 4.2 ควบคู่กับค่าคงที่อัตราเร็วปฏิกิริยาอันดับหนึ่งของการย่อยสลายน้ำมันดีเซลในระบบนิเวศจำลองดินภายใต้อุณหภูมิต่ำ (ตารางที่ 4.5) พบว่าในชุดการทดลอง natural attenuation และ biostimulation ทั้งในชุดการทดลองที่เติมน้ำมันดีเซล 1% และ 3% (น้ำหนัก/น้ำหนัก) มีการลดลงของน้ำมันดีเซล และค่าคงที่อัตราเร็วการย่อยสลายน้ำมันดีเซลที่ไม่แตกต่างกัน จึงสรุปได้ว่าสารอาหารมีผลต่อประชาคมแบคทีเรีย แต่ไม่มีผลต่อประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันดีเซลในระบบนิเวศจำลองดินแอนตาร์กติกภายใต้อุณหภูมิต่ำ

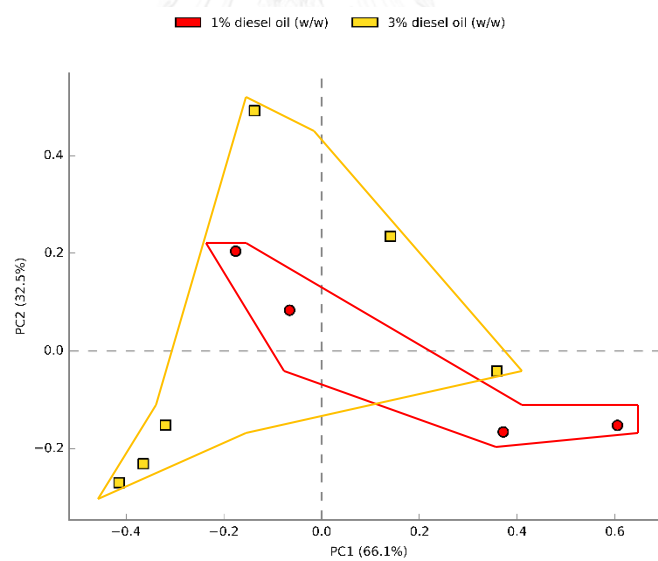


รูปที่ 4.20 ผลการวิเคราะห์ทางสถิติโดยเปรียบเทียบปัจจัยสารอาหารต่อประชาคมแบคทีเรียในระบบนิเวศ จำลองดินแอนตาร์กติกภายใต้อุณหภูมิต่ำ แห่งสีแดงคือชุดที่เติมสารอาหาร และแห่งสีฟ้าคือชุดที่ไม่ได้เติมสารอาหาร

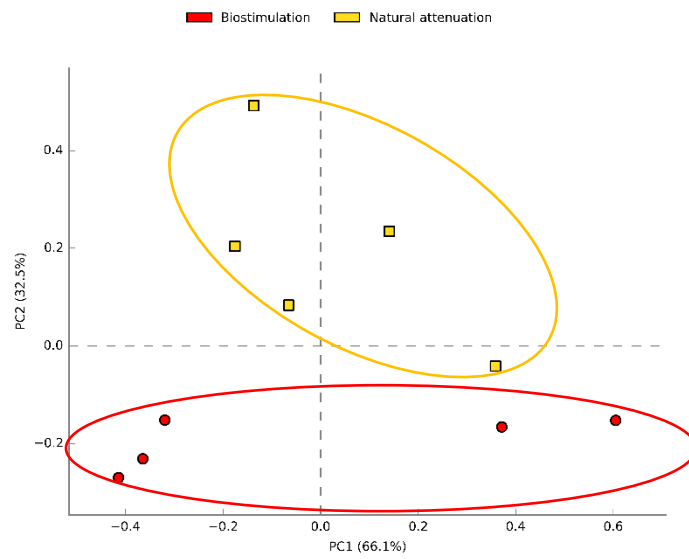
จากข้อมูลเมตาจีโนมิกส์สามารถนำข้อมูลไปวิเคราะห์ทางสถิติด้วยวิธีการวิเคราะห์องค์ประกอบหลัก (Principal component analysis; PCA) เพื่อจัดกลุ่มตัวอย่างตามปัจจัยที่มีผลต่อประชาคมแบคทีเรีย ได้แก่ น้ำมันดีเซล ความเข้มข้นของน้ำมันดีเซล และสารอาหาร โดยแผนภาพที่วิเคราะห์ขึ้นแสดงอันดับของ PCA score ที่ 2 อันดับแรก (PC1 และ PC2) ซึ่งแสดงให้เห็นว่าข้อมูลเมตาจีโนมิกส์ของตัวอย่างดินแอนตาร์กติกมีระดับความผันแปรในอันดับทั้งสอง 66.1% และ 31.6% ตามลำดับ ผลการวิเคราะห์ PCA ของปัจจัยน้ำมันดีเซล (รูปที่ 4.21) พบว่าไม่สามารถแยกกลุ่มที่เติมน้ำมันดีเซลและกลุ่มที่ไม่ได้เติมน้ำมันดีเซลออกจากกันได้ และเช่นเดียวกันกับปัจจัยความเข้มข้นของน้ำมันดีเซล (รูปที่ 4.22) พบว่าไม่สามารถแยกกลุ่มที่เติมน้ำมันดีเซล 1% (น้ำหนัก/น้ำหนัก) ออกจากกลุ่มที่เติมน้ำมันดีเซล 3% (น้ำหนัก/น้ำหนัก) ได้ เนื่องจากทั้งสองปัจจัยดังกล่าวมีประชาคมแบคทีเรียทั้งสองกลุ่มที่ใกล้เคียงกัน สอดคล้องกับผลการวิเคราะห์ประชาคมแบคทีเรียด้วยวิธีช็อตกันเมตาจีโนมิกส์ (รูปที่ 4.12 และ 4.13) พบว่าประชาคมแบคทีเรียในชุดการทดลองที่เติมน้ำมันดีเซล และไม่เติมน้ำมันดีเซล รวมทั้งชุดการทดลองที่เติมน้ำมันดีเซล 1% และ 3% (น้ำหนัก/น้ำหนัก) เป็นแบคทีเรียกลุ่มเดียวกัน และผลการวิเคราะห์ PCA ของปัจจัยสารอาหาร (รูปที่ 4.23) พบว่ากลุ่มที่เติมสารอาหารและไม่เติมสารอาหารมีความแตกต่างกันของประชาคมแบคทีเรีย เนื่องจากการวิเคราะห์ PCA สามารถแยกออกจากกันได้ สอดคล้องกับผลการวิเคราะห์ประชาคมแบคทีเรียด้วยวิธีช็อตกันเมตาจีโนมิกส์ (รูปที่ 4.12 และ 4.13) พบว่าประชาคมแบคทีเรียในชุดที่เติมสารอาหารและไม่เติมสารอาหารมีส่วนของแบคทีเรียที่ต่างกัน โดยในชุดการทดลองที่เติมน้ำมันดีเซล 1% (น้ำหนัก/น้ำหนัก) พบว่าสัดส่วนของ Gammaproteobacteria เพิ่มขึ้นอย่างชัดเจน และในชุดการทดลองที่เติมน้ำมันดีเซล 3% (น้ำหนัก/น้ำหนัก) พบว่าสัดส่วนของ Actinobacteria เพิ่มขึ้นอย่างชัดเจน เมื่อเติมสารอาหารลงในระบบนิเวศจำลองดินแอนตาร์กติก



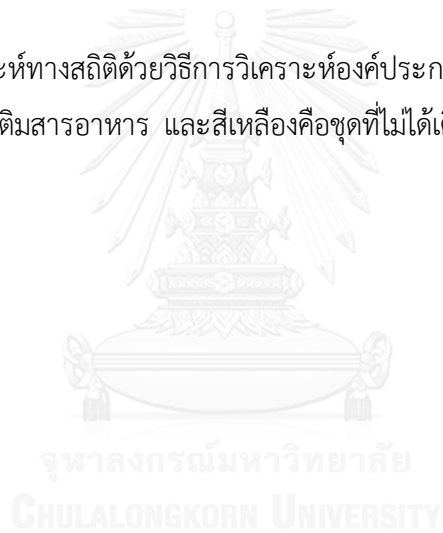
รูปที่ 4.21 ผลการวิเคราะห์ทางสถิติด้วยวิธีการวิเคราะห์องค์ประกอบหลัก (PCA) ของปัจจัยน้ำมันดีเซล สีแดงคือชุดที่เติมน้ำมันดีเซล และสีเหลืองคือชุดที่ไม่ได้เติมน้ำมันดีเซล



รูปที่ 4.22 ผลการวิเคราะห์ทางสถิติด้วยวิธีการวิเคราะห์องค์ประกอบหลัก (PCA) ของปัจจัยความเข้มข้นน้ำมันดีเซล สีแดงคือชุดที่เติมน้ำมันดีเซล 1% (น้ำหนัก/น้ำหนัก) และสีเหลืองคือชุดที่เติมน้ำมันดีเซล 3% (น้ำหนัก/น้ำหนัก)



รูปที่ 4.23 ผลการวิเคราะห์ทางสถิติด้วยวิธีการวิเคราะห์องค์ประกอบหลัก (PCA) ของปัจจัยสารอาหาร สีแดงคือชุดที่เติมสารอาหาร และสีเหลืองคือชุดที่ไม่ได้เติมสารอาหาร



บทที่ 5

บทสรุปและข้อเสนอแนะ

บทสรุป

ในการบำบัดสิ่งแวดล้อมที่หนาวเย็นและมีการปนเปื้อนน้ำมันดีเซลในทวีปแอนตาร์กติกา ซึ่งเป็นทวีปที่ห่างไกลและมีสนธิสัญญาแอนตาร์กติก ห้ามนำสิ่งมีชีวิตภายนอกเข้ามาภายในทวีป จึงจำเป็นต้องใช้แบคทีเรียประจำถิ่นในการบำบัดสิ่งแวดล้อมที่ปนเปื้อนน้ำมันดีเซล ซึ่งคาดว่าจะมีประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันดีเซลภายใต้อุณหภูมิต่ำ งานวิจัยนี้ได้ทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันดีเซลด้วยแบคทีเรียประจำถิ่นในตัวอย่างดินแอนตาร์กติกา โดยสร้างระบบนิเวศจำลองดินแอนตาร์กติกาภายใต้อุณหภูมิต่ำ แบ่งเป็นชุดการทดลอง abiotic control, natural attenuation และ biostimulation ซึ่งเติมสารอาหารและปรับอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนต่อฟอสฟอรัสให้ได้อัตราส่วนเป็น 100:10:1 รวมทั้งเติมน้ำมันดีเซลความเข้มข้น 1% และ 3% (น้ำหนัก/น้ำหนัก) เพื่อศึกษาปัจจัยความเข้มข้นของน้ำมันดีเซลที่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของประชาคมแบคทีเรียและบทบาทการย่อยสลายน้ำมันดีเซลของแบคทีเรีย พบว่าแบคทีเรียประจำถิ่นในตัวอย่างดินแอนตาร์กติกา มีประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันดีเซลทั้งในชุดการทดลองที่เติมน้ำมันดีเซล 1% และ 3% (น้ำหนัก/น้ำหนัก) โดยการเติมสารอาหารช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันดีเซลในช่วงแรกเท่านั้น

เพื่อศึกษาบทบาทการย่อยสลายน้ำมันดีเซลในตัวอย่างดินแอนตาร์กติกาภายใต้อุณหภูมิต่ำ จึงคัดแยกแบคทีเรียสายพันธุ์บริสุทธิ์พบว่า สามารถคัดแยกแบคทีเรียสายพันธุ์บริสุทธิ์ได้ 5 สายพันธุ์ ซึ่งมีความสามารถในการย่อยสลายองค์ประกอบของน้ำมันดีเซลและมีแนวโน้มในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพเบื้องต้น อย่างไรก็ตามการศึกษาบทบาทของแบคทีเรียที่ย่อยสลายน้ำมันดีเซลด้วยวิธีการอาศัยการเพาะเลี้ยง สามารถคัดแยกแบคทีเรียได้เพียง 2 จินัส คือ *Pseudomonas* spp. และ *Sphingomonas* sp. ซึ่งจัดอยู่ในคลาส Gammaproteobacteria และ Alphaproteobacteria ตามลำดับ จึงเลือกใช้วิธีการที่ไม่อาศัยการเพาะเลี้ยงเพื่อกำจัดข้อจำกัดในการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียที่ไม่สามารถเพาะเลี้ยงได้ในห้องปฏิบัติการ ซึ่งได้แก่ วิธี PCR-DGGE วิธีวิเคราะห์ลำดับเบสของแอมพลิคอนของยีน 16S rRNA และวิธีซีออตกันเมตาจีโนมิกส์ พบว่าทุกวิธีให้ผลลัพธ์ที่สอดคล้องกันคือ Gammaproteobacteria Alphaproteobacteria และ Actinobacteria เป็นแบคทีเรียเด่นในระบบนิเวศจำลองดินแอนตาร์กติกาภายใต้อุณหภูมิต่ำ

จากการวิเคราะห์บทบาทของแบคทีเรียที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายน้ำมันดีเซลในดินแอนตาร์กติกาภายใต้อุณหภูมิต่ำ โดยวิเคราะห์ประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันดีเซลในระบบนิเวศ

จำลองดิน ศึกษาโครงสร้างของประชาคมแบคทีเรียที่เปลี่ยนแปลงไปด้วยวิธีการวิเคราะห์ลำดับเบสของแอมพลิคอนของยีน 16S rRNA และวิธีช็อตกันเมตาจีโนมิกส์ รวมไปถึงการคัดแยกและศึกษาลักษณะสมบัติของแบคทีเรียจากระบบนิเวศจำลองดิน โดยผลจากการวิเคราะห์ดังกล่าวสามารถใช้ประมวลผลเพื่อวิเคราะห์บทบาทที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายน้ำมันดีเซลของแบคทีเรียประจำถิ่นในตัวอย่างดินแอนตาร์กติก จากผลการวิเคราะห์ทางสถิติด้วยข้อมูลเมตาจีโนมิกส์ควบคู่กับการวิเคราะห์ประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันดีเซลในระบบนิเวศจำลองดินแอนตาร์กติกภายใต้อุณหภูมิต่ำสรุปได้ว่า ทุกปัจจัยล้วนมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของประชาคมแบคทีเรียภายในระบบนิเวศจำลองดิน ทั้งปัจจัยน้ำมันดีเซล ความเข้มข้นของน้ำมันดีเซล และสารอาหาร แต่ทุกปัจจัยไม่ได้มีผลต่อประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันดีเซล เนื่องจากบทบาทของแบคทีเรียที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายน้ำมันดีเซลในระบบนิเวศจำลองดินนั้นแตกต่างกัน และอาจเป็นไปได้ว่ามีแบคทีเรียหลายกลุ่มที่ย่อยสลายน้ำมันดีเซลได้ โดยมีบทบาทในสภาวะที่แตกต่างกัน ดังนั้นจึงศึกษาชนิดที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายน้ำมันดีเซลเพื่อพิสูจน์ว่าแบคทีเรียกลุ่มใดมีบทบาทหลักในการย่อยสลายน้ำมันดีเซล ซึ่งจากการวิเคราะห์ด้วยวิธีช็อตกันเมตาจีโนมิกส์ พบชนิดที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายน้ำมันดีเซลของแบคทีเรียในคลาส Gammaproteobacteria, Alphaproteobacteria และ Actinobacteria จึงสรุปได้ว่าแบคทีเรียในคลาสดังกล่าวมีบทบาทสำคัญในการย่อยสลายน้ำมันดีเซลในระบบนิเวศจำลองดินแอนตาร์กติกภายใต้อุณหภูมิต่ำ

ในปัจจุบันงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายน้ำมันดีเซลด้วยแบคทีเรียภายใต้อุณหภูมิต่ำและการศึกษาบทบาทของแบคทีเรียที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายน้ำมันดีเซลภายใต้อุณหภูมิต่ำยังมีไม่มากนัก งานวิจัยนี้จึงมีจุดเด่นคือศึกษาบทบาทของแบคทีเรียที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายน้ำมันดีเซลในแต่ละช่วงเวลา โดยศึกษาปัจจัยต่าง ๆ ได้แก่ สารอาหาร น้ำมันดีเซล และความเข้มข้นของน้ำมันดีเซล ซึ่งปัจจัยเหล่านี้ส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงของประชาคมแบคทีเรียและบทบาทของแบคทีเรียต่อการย่อยสลายน้ำมันดีเซล โดยการศึกษาบทบาทของแบคทีเรียที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายน้ำมันดีเซลในงานวิจัยนี้ ได้เลือกใช้หลากหลายวิธี เช่น วิธีการที่อาศัยการเพาะเลี้ยง ได้แก่ การคัดแยกแบคทีเรีย และวิธีการที่ไม่อาศัยการเพาะเลี้ยง ได้แก่ วิธี PCR-DGGE วิธีการวิเคราะห์ลำดับเบสของแอมพลิคอนของยีน 16S rRNA และ วิธีช็อตกันเมตาจีโนมิกส์ รวมทั้งการวิเคราะห์ทางสถิติมาช่วยในการประมวลผลเพื่อให้ได้แนวทางความสัมพันธ์ของแบคทีเรียและบทบาทในการทำงานร่วมกันของแบคทีเรียที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายน้ำมันดีเซล เพื่อนำข้อมูลที่ได้ไปใช้ในการบำบัดและฟื้นฟูสิ่งแวดล้อมที่มีอุณหภูมิต่ำอย่างมีประสิทธิภาพในอนาคตต่อไป

ข้อเสนอแนะ

1) การวิเคราะห์และปรับสัดส่วนของสารอาหารในชุด biostimulation ควรใช้ค่าฟอสฟอรัสที่อยู่ในรูปที่แบคทีเรียสามารถนำไปใช้ได้ (available phosphorus) หากใช้ค่าฟอสฟอรัสทั้งหมด (total phosphorus) ในการคำนวณจะส่งผลให้สัดส่วนของสารอาหารเปลี่ยนแปลงไปจากที่ต้องการ และอาจส่งผลให้การเติมสารอาหารไม่ส่งเสริมประสิทธิภาพการย่อยสลายของแบคทีเรีย

2) การเติมสารอาหารสามารถเพิ่มประสิทธิภาพการย่อยสลายของแบคทีเรียในช่วงต้น เมื่อแบคทีเรียใช้สารอาหารที่เติมลงไป อาจส่งผลให้สัดส่วนของสารอาหารเปลี่ยนแปลงไปจากเดิม ดังนั้นการเติมสารอาหารลงไปเป็นช่วง ๆ ระหว่างการทดลอง จึงเป็นวิธีที่สามารถเพิ่มประสิทธิภาพการย่อยสลายของแบคทีเรียได้ตลอดการทดลอง

3) การเปรียบเทียบทางสถิติด้วยการวิเคราะห์ PCA ของปัจจัยน้ำมันดีเซลในรูปที่ 4.21 พบว่าให้ผลไม่ชัดเจน จึงควรพิจารณาเพิ่มเติม เนื่องจากมีปัจจัยซ้ำซ้อน คือ สารอาหาร รวมทั้งตัวอย่างที่ใช้ในการเปรียบเทียบในชุดที่ไม่ได้เติมน้ำมันดีเซลมีจำนวนน้อยกว่าชุดที่เติมน้ำมันดีเซล

4) ข้อมูลจากการวิเคราะห์เมตาจีโนมิกส์ของแบคทีเรียในตัวอย่างดินแอนตาร์กติกสามารถใช้ต่อยอดการศึกษาเชิงลึกเกี่ยวกับวิถีการย่อยสลายน้ำมันดีเซลของแบคทีเรียภายใต้อุณหภูมิต่ำ ร่วมกับองค์ความรู้ด้านทรานสคริปโตมิกส์ และโปรตีโอมิกส์ เพื่อให้เข้าใจกลไกการปรับตัวของแบคทีเรียให้อยู่รอดในสิ่งแวดล้อมที่หนาวเย็น และเนื่องจากยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายน้ำมันดีเซลยังมีข้อจำกัด ซึ่งไม่ครอบคลุมกับการวิเคราะห์บทบาทของแบคทีเรียที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายน้ำมันดีเซลภายใต้อุณหภูมิต่ำ รวมถึงยีนบางชนิดอาจยังไม่ถูกค้นพบ จึงจำเป็นต้องศึกษาจากฐานข้อมูลหลายแหล่งเพื่อให้ได้ข้อมูลที่ครอบคลุม

5) การวิเคราะห์บทบาทของแบคทีเรียที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายน้ำมันดีเซลภายใต้อุณหภูมิต่ำ สามารถใช้เป็นข้อมูลในการคัดเลือกเชื้อที่มีอยู่ในสิ่งแวดล้อมมาใช้ให้มีประสิทธิภาพสูงสุด โดยเลือกอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย และสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการคัดเลือกแบคทีเรีย เพื่อให้ได้แบคทีเรียที่ต้องการนำมาใช้ประโยชน์ในการบำบัดสิ่งแวดล้อมที่ปนเปื้อนน้ำมันดีเซลภายใต้อุณหภูมิต่ำได้จริง

รายการอ้างอิง

- Abouseoud, M., Yataghene, A., Amrane, A. and Maachi, R. 2010. Effect of pH and salinity on the emulsifying capacity and naphthalene solubility of a biosurfactant produced by *Pseudomonas fluorescens*. *Journal of Hazardous Materials*, 180(1), 131-136.
- Aislabie, J., Fraser, R., Duncan, S. and Farrell, R. L. 2001. Effects of oil spills on microbial heterotrophs in Antarctic soils. *Polar Biology*, 24(5), 308-313.
- Anderson, R. T. and Lovley, D. R. 2000. Biogeochemistry: hexadecane decay by methanogenesis. *Nature*, 404(6779), 722-723.
- Atlas, R. and Bragg, J. 2009. Bioremediation of marine oil spills: when and when not—the Exxon Valdez experience. *Microbial Biotechnology*, 2(2), 213-221.
- Baboshin, M. and Golovleva, L. 2012. Aerobic bacterial degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and its kinetic aspects. *Microbiology*, 81(6), 639-650.
- Baraniecki, C. A., Aislabie, J. and Foght, J. M. 2002. Characterization of *Sphingomonas* sp. Ant 17, an aromatic hydrocarbon-degrading bacterium isolated from Antarctic soil. *Microbial Ecology*, 43(1), 44-54.
- Beeby, C. D. 1991. The Antarctic Treaty System: goals, performance and impact *The Antarctic Treaty System in World Politics* (pp. 4-21). Palgrave Macmillan UK: Springer.
- Behrendt, U., Ulrich, A. and Schumann, P. 2003. Fluorescent pseudomonads associated with the phyllosphere of grasses; *Pseudomonas trivialis* sp. nov., *Pseudomonas poae* sp. nov. and *Pseudomonas congelans* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 53(5), 1461-1469.
- Bengtsson-Palme, J., Boulund, F., Fick, J., Kristiansson, E. and Larsson, D. 2014. Shotgun metagenomics reveals a wide array of antibiotic resistance genes and mobile elements in a polluted lake in India. *Frontiers in Microbiology*, 5, 648.
- Bento, F. M., Camargo, F. A., Okeke, B. C. and Frankenberger, W. T. 2005. Comparative bioremediation of soils contaminated with diesel oil by natural attenuation,

- biostimulation and bioaugmentation. *Bioresource Technology*, 96(9), 1049-1055.
- Bertrand, J.-C., Brochier-Armanet, C., Gouy, M. and Westall, F. 2015. For Three Billion Years, Microorganisms Were the Only Inhabitants of the Earth *Environmental Microbiology: Fundamentals and Applications* (pp. 75-106): Springer.
- Bockheim, J. G. 2015. Soils of Antarctica: History and Challenges. In J. G. Bockheim (Ed.), *The Soils of Antarctica* (pp. 1-3). Cham: Springer International Publishing.
- Boudouresque, C.-F., Caumette, P., Bertrand, J.-C., Normand, P. and Sime-Ngando, T. 2015. Systematic and Evolution of Microorganisms: General Concepts. In J.-C. Bertrand, P. Caumette, P. Lebaron, R. Matheron, P. Normand and T. Sime-Ngando (Eds.), *Environmental Microbiology: Fundamentals and Applications: Microbial Ecology* (pp. 107-144). Dordrecht: Springer Netherlands.
- Busse, H.-J., Denner, E. B., Buczolits, S., Salkinoja-Salonen, M., Bennisar, A. and Kämpfer, P. 2003. *Sphingomonas aurantiaca* sp. nov., *Sphingomonas aerolata* sp. nov. and *Sphingomonas faeni* sp. nov., air-and dustborne and Antarctic, orange-pigmented, psychrotolerant bacteria, and emended description of the genus *Sphingomonas*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 53(5), 1253-1260.
- Cassano, J. J. 2013. Climate of extremes *Antarctica: global science from a frozen continent*. (pp. 102-160): Cambridge University Press, Cambridge.
- Chan, H. 2011. Biodegradation of petroleum oil achieved by bacteria and nematodes in contaminated water. *Separation and Purification Technology*, 80(3), 459-466.
- Chintalapati, S., Kiran, M. D. and Shivaji, S. 2004. Role of membrane lipid fatty acids in cold adaptation. *Cellular and Molecular Biology (Noisy-le-Grand, France)*, 50(5), 631-642.
- Choudhari, S., Smith, S., Owens, S., Gilbert, J. A., Shain, D. H., Dial, R. J. and Grigoriev, A. 2013. Metagenome sequencing of prokaryotic microbiota collected from Byron Glacier, Alaska. *Genome Announcements*, 1(2), e00099-00013.

- Christner, B. C., Mosley-Thompson, E., Thompson, L. G. and Reeve, J. N. 2001. Isolation of bacteria and 16S rDNAs from Lake Vostok accretion ice. *Environmental Microbiology*, 3(9), 570-577.
- Colinon, C., Deredjian, A., Hien, E., Brothier, E., Bouziri, L., Cournoyer, B., Hartman, A., Henry, S., Jolivet, C. and Ranjard, L. 2013. Detection and enumeration of *Pseudomonas aeruginosa* in soil and manure assessed by an ecfX qPCR assay. *Journal of Applied Microbiology*, 114(6), 1734-1749.
- Convey, P. and Stevens, M. I. 2007. Antarctic biodiversity. *Science*, 317(5846), 1877-1878.
- Cook, Y. and Storey, B. 2015. A Continent Under Ice *Exploring the Last Continent* (pp. 9-27): Springer.
- Costa, S. G., Nitschke, M., Lepine, F., Déziel, E. and Contiero, J. 2010. Structure, properties and applications of rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* L2-1 from cassava wastewater. *Process Biochemistry*, 45(9), 1511-1516.
- Coulon, F., Pelletier, E., Gourhant, L. and Delille, D. 2005. Effects of nutrient and temperature on degradation of petroleum hydrocarbons in contaminated sub-Antarctic soil. *Chemosphere*, 58(10), 1439-1448.
- Crisafi, F., Giuliano, L., Yakimov, M. M., Azzaro, M. and Denaro, R. 2016. Isolation and degradation potential of a cold-adapted oil/PAH-degrading marine bacterial consortium from Kongsfjorden (Arctic region). *Rendiconti Lincei*, 27(1), 261-270.
- D'Amico, S., Collins, T., Marx, J. C., Feller, G. and Gerday, C. 2006. Psychrophilic microorganisms: challenges for life. *EMBO Reports*, 7(4), 385-389.
- Dash, H. R. and Das, S. 2014. Bioremediation potential of mercury by *Bacillus* species isolated from marine environment and wastes of steel industry. *Bioremediation Journal*, 18(3), 204-212.
- de Jesus, H. E., Peixoto, R. S., Cury, J. C., van Elsas, J. D. and Rosado, A. S. 2015. Evaluation of soil bioremediation techniques in an aged diesel spill at the Antarctic Peninsula. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99(24), 10815-10827.

- De Maayer, P., Anderson, D., Cary, C. and Cowan, D. A. 2014. Some like it cold: understanding the survival strategies of psychrophiles. *EMBO Reports*, 15(5), 508-517.
- Delille, D. 2000. Response of Antarctic soil bacterial assemblages to contamination by diesel fuel and crude oil. *Microbial Ecology*, 40(2), 159-168.
- Delille, D. and Coulon, F. 2008. Comparative mesocosm study of biostimulation efficiency in two different oil-amended sub-Antarctic soils. *Microbial Ecology*, 56(2), 243-252.
- Delorme, S., Lemanceau, P., Christen, R., Corberand, T., Meyer, J.-M. and Gardan, L. 2002. *Pseudomonas lini* sp. nov., a novel species from bulk and rhizospheric soils. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 52(2), 513-523.
- Deng, M.-C., Li, J., Liang, F.-R., Yi, M., Xu, X.-M., Yuan, J.-P., Peng, J., Wu, C.-F. and Wang, J.-H. 2014. Isolation and characterization of a novel hydrocarbon-degrading bacterium *Achromobacter* sp. HZ01 from the crude oil-contaminated seawater at the Daya Bay, southern China. *Marine Pollution Bulletin*, 83(1), 79-86.
- Dias, R. L., Ruberto, L., Hernández, E., Vázquez, S. C., Balbo, A. L., Del Panno, M. T. and Mac Cormack, W. P. 2012. Bioremediation of an aged diesel oil-contaminated Antarctic soil: evaluation of the “on site” biostimulation strategy using different nutrient sources. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 75, 96-103.
- Dodds, K. 2012. *The Antarctic: a very short introduction*: OUP Oxford.
- Eckford, R., Cook, F. D., Saul, D., Aislabie, J. and Foght, J. 2002. Free-living heterotrophic nitrogen-fixing bacteria isolated from fuel-contaminated Antarctic soils. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(10), 5181-5185.
- Feller, G. 2013. Psychrophilic enzymes: from folding to function and biotechnology. *Scientifica*, 2013.
- Fenchel, T., King, G. M. and Blackburn, T. H. 2012. Chapter 1 - Bacterial Metabolism *Bacterial Biogeochemistry (Third Edition)* (pp. 1-34). Boston: Academic Press.
- Fritsche, W. and Hofrichter, M. 2008. Aerobic degradation by microorganisms. *Biotechnology Set, Second Edition*, 144-167.

- Ghai, R., Mizuno, C. M., Picazo, A., Camacho, A. and Rodriguez-Valera, F. 2014. Key roles for freshwater Actinobacteria revealed by deep metagenomic sequencing. *Molecular Ecology*, 23(24), 6073-6090.
- Gundlach, E. R., Boehm, P. D., Marchand, M., Atlas, R. M., Ward, D. M. and Wolfe, D. A. 1983. The fate of Amoco Cadiz oil. *Science*, 221(4606), 122-129.
- Habe, H. and Omori, T. 2003. Genetics of polycyclic aromatic hydrocarbon metabolism in diverse aerobic bacteria. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 67(2), 225-243.
- Handelsman, J. 2004. Metagenomics: application of genomics to uncultured microorganisms. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 68(4), 669-685.
- Hara, S., Hashidoko, Y., Desyatkin, R. V., Hatano, R. and Tahara, S. 2009. High rate of N₂ fixation by East Siberian cryophilic soil bacteria as determined by measuring acetylene reduction in nitrogen-poor medium solidified with gellan gum. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(9), 2811-2819.
- He, Z., Xiao, H., Tang, L., Min, H. and Lu, Z. 2013. Biodegradation of di-*n*-butyl phthalate by a stable bacterial consortium, HD-1, enriched from activated sludge. *Bioresource Technology*, 128, 526-532.
- Hendrikse, J., Grutters, M. and Schäfer, F. 2015. *Identifying Ignitable Liquids in Fire Debris: A Guideline for Forensic Experts*: Academic Press.
- Ho, Y. and McKay, G. 1998. A comparison of chemisorption kinetic models applied to pollutant removal on various sorbents. *Process Safety and Environmental Protection*, 76(4), 332-340.
- Huang, L., Ma, T., Li, D., Liang, F.-l., Liu, R.-L. and Li, G.-q. 2008. Optimization of nutrient component for diesel oil degradation by *Rhodococcus erythropolis*. *Marine Pollution Bulletin*, 56(10), 1714-1718.
- Huang, L., Xie, J., Lv, B.-y., Shi, X.-f., Li, G.-q., Liang, F.-l. and Lian, J.-y. 2013. Optimization of nutrient component for diesel oil degradation by *Acinetobacter beijerinckii* ZRS. *Marine Pollution Bulletin*, 76(1), 325-332.
- Jadhav, V. V., Yadav, A., Shouche, Y. S., Aphale, S., Moghe, A., Pillai, S., Arora, A. and Bhadekar, R. K. 2013. Studies on biosurfactant from *Oceanobacillus* sp. BRI 10 isolated from Antarctic sea water. *Desalination*, 318, 64-71.

- Janbandhu, A. and Fulekar, M. 2011. Biodegradation of phenanthrene using adapted microbial consortium isolated from petrochemical contaminated environment. *Journal of Hazardous Materials*, 187(1), 333-340.
- Jang, S.-H., Kim, J., Kim, J., Hong, S. and Lee, C. 2012. Genome sequence of cold-adapted *Pseudomonas mandelii* strain JR-1. *Journal of Bacteriology*, 194(12), 3263-3263.
- Johnsen, A. R., Bendixen, K. and Karlson, U. 2002. Detection of microbial growth on polycyclic aromatic hydrocarbons in microtiter plates by using the respiration indicator WST-1. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(6), 2683-2689.
- Jung, J., Philippot, L. and Park, W. 2016. Metagenomic and functional analyses of the consequences of reduction of bacterial diversity on soil functions and bioremediation in diesel-contaminated microcosms. *Scientific Reports*, 6.
- Jung, S. W., Park, J. S., Kwon, O. Y., Kang, J.-H., Shim, W. J. and Kim, Y.-O. 2010. Effects of crude oil on marine microbial communities in short term outdoor microcosms. *The Journal of Microbiology*, 48(5), 594-600.
- Kim, S. J., Shin, S. C., Hong, S. G., Lee, Y. M., Lee, H., Lee, J., Choi, I.-G. and Park, H. 2012. Genome sequence of *Janthinobacterium* sp. strain PAMC 25724, isolated from Alpine glacier cryoconite. *Journal of Bacteriology*, 194(8), 2096-2096.
- Kloos, K., Munch, J. C. and Schloter, M. 2006. A new method for the detection of alkane-monooxygenase homologous genes (*alkB*) in soils based on PCR-hybridization. *Journal of Microbiological Methods*, 66(3), 486-496.
- Kohno, T., Sugimoto, Y., Sei, K. and Mori, K. 2002. Design of PCR primers and gene probes for general detection of alkane-degrading bacteria. *Microbes and Environments*, 17(3), 114-121.
- Koo, H., Hakim, J. A., Fisher, P. R., Grueneberg, A., Andersen, D. T. and Bej, A. K. 2016. Distribution of cold adaptation proteins in microbial mats in Lake Joyce, Antarctica: Analysis of metagenomic data by using two bioinformatics tools. *Journal of Microbiological Methods*, 120, 23-28.
- Kuske, C. R., Busch, J. D., Adorada, D. L., Dunbar, J. M. and Barns, S. M. 1999. Phylogeny, ribosomal RNA gene typing and relative abundance of new *Pseudomonas*

- species (*sensu stricto*) isolated from two pinyon-juniper woodland soils of the arid southwest US. *Systematic and Applied Microbiology*, 22(2), 300-311.
- Labbé, D., Margesin, R., Schinner, F., Whyte, L. G. and Greer, C. W. 2007. Comparative phylogenetic analysis of microbial communities in pristine and hydrocarbon-contaminated Alpine soils. *FEMS Microbiology Ecology*, 59(2), 466-475.
- Labud, V., Garcia, C. and Hernandez, T. 2007. Effect of hydrocarbon pollution on the microbial properties of a sandy and a clay soil. *Chemosphere*, 66(10), 1863-1871.
- Lazarevic, V., Whiteson, K., Huse, S., Hernandez, D., Farinelli, L., Østerås, M., Schrenzel, J. and François, P. 2009. Metagenomic study of the oral microbiota by Illumina high-throughput sequencing. *Journal of Microbiological Methods*, 79(3), 266-271.
- Lee, M., Kim, M., Singleton, I., Goodfellow, M. and Lee, S. T. 2006. Enhanced biodegradation of diesel oil by a newly identified *Rhodococcus baikonurensis* EN3 in the presence of mycolic acid. *Journal of Applied Microbiology*, 100(2), 325-333.
- Lee, Y.-C., Shin, H.-J., Ahn, Y., Shin, M.-C., Lee, M. and Yang, J.-W. 2010. Biodegradation of diesel by mixed bacteria immobilized onto a hybrid support of peat moss and additives: A batch experiment. *Journal of Hazardous Materials*, 183(1), 940-944.
- Leja, K. and Lewandowicz, G. 2010. Polymer biodegradation and biodegradable polymers—a review. *Polish Journal of Environmental Studies*, 19(2), 255-266.
- Liggett, D., McIntosh, A., Thompson, A., Gilbert, N. and Storey, B. 2011. From frozen continent to tourism hotspot? Five decades of Antarctic tourism development and management, and a glimpse into the future. *Tourism Management*, 32(2), 357-366.
- Liggett, D., Storey, B., Cook, Y. and Meduna, V. 2015. *Exploring the Last Continent: An Introduction to Antarctica*: Springer.
- Lim, J., Thomas, T. and Cavicchioli, R. 2000. Low temperature regulated DEAD-box RNA helicase from the antarctic archaeon, *Methanococoides burtonii*1. *Journal of Molecular Biology*, 297(3), 553-567.

- Lin, X., Yang, B., Shen, J. and Du, N. 2009. Biodegradation of crude oil by an Arctic psychrotrophic bacterium *Pseudoaltertomomas* sp. P29. *Current Microbiology*, 59(3), 341-345.
- Liu, C., Wang, W., Wu, Y., Zhou, Z., Lai, Q. and Shao, Z. 2011. Multiple alkane hydroxylase systems in a marine alkane degrader, *Alcanivorax dieselolei* B-5. *Environmental Microbiology*, 13(5), 1168-1178.
- Liu, G.-X., Hu, P., Zhang, W., Wu, X., Yang, X., Chen, T., Zhang, M. and Li, S.-W. 2012. Variations in soil culturable bacteria communities and biochemical characteristics in the Dongkemadi glacier forefield along a chronosequence. *Folia Microbiologica*, 57(6), 485-494.
- Logares, R., Haverkamp, T. H., Kumar, S., Lanzén, A., Nederbragt, A. J., Quince, C. and Kauterud, H. 2012. Environmental microbiology through the lens of high-throughput DNA sequencing: synopsis of current platforms and bioinformatics approaches. *Journal of Microbiological Methods*, 91(1), 106-113.
- Lopatina, A., Medvedeva, S., Shmakov, S., Logacheva, M. D., Krylenkov, V. and Severinov, K. 2016. Metagenomic analysis of bacterial communities of Antarctic surface snow. *Frontiers in Microbiology*, 7.
- Lu, X.-Y., Zhang, T. and Fang, H. H.-P. 2011. Bacteria-mediated PAH degradation in soil and sediment. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 89(5), 1357-1371.
- Lucigen. 2017. *Metagenomics Service*. Retrieved from <http://www.lucigen.com/metagenomic-sequencing-ngs-sequencing-services.html>
- Maier, T., Förster, H.-H., Asperger, O. and Hahn, U. 2001. Molecular characterization of the 56-kDa CYP153 from *Acinetobacter* sp. EB104. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 286(3), 652-658.
- Makkar, R. S. and Rockne, K. J. 2003. Comparison of synthetic surfactants and biosurfactants in enhancing biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 22(10), 2280-2292.
- Margesin, R., Moertelmaier, C. and Mair, J. 2013. Low-temperature biodegradation of petroleum hydrocarbons (*n*-alkanes, phenol, anthracene, pyrene) by four

- Actinobacterial strains. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 84, 185-191.
- Meyer, A., Lipson, D., Martin, A., Schadt, C. and Schmidt, S. 2004. Molecular and metabolic characterization of cold-tolerant Alpine soil *Pseudomonas* sensu stricto. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(1), 483-489.
- Meyer, F., Paarmann, D., D'Souza, M., Olson, R., Glass, E. M., Kubal, M., Paczian, T., Rodriguez, A., Stevens, R. and Wilke, A. 2008. The metagenomics RAST server—a public resource for the automatic phylogenetic and functional analysis of metagenomes. *BMC Bioinformatics*, 9(1), 386.
- Michaud, L., Giudice, A. L., Saitta, M., De Domenico, M. and Bruni, V. 2004. The biodegradation efficiency on diesel oil by two psychrotrophic Antarctic marine bacteria during a two-month-long experiment. *Marine Pollution Bulletin*, 49(5), 405-409.
- Michelsen, C. F. and Stougaard, P. 2011. A novel antifungal *Pseudomonas fluorescens* isolated from potato soils in Greenland. *Current Microbiology*, 62(4), 1185-1192.
- Mohan, S. V., Kisa, T., Ohkuma, T., Kanaly, R. A. and Shimizu, Y. 2006. Bioremediation technologies for treatment of PAH-contaminated soil and strategies to enhance process efficiency. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, 5(4), 347-374.
- Mohanty, G. and Mukherji, S. 2008. Biodegradation rate of diesel range *n*-alkanes by bacterial cultures *Exiguobacterium aurantiacum* and *Burkholderia cepacia*. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 61(3), 240-250.
- Mohn, W. W. and Stewart, G. R. 2000. Limiting factors for hydrocarbon biodegradation at low temperature in Arctic soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 32(8–9), 1161-1172.
- Mojib, N., Andersen, D. T. and Bej, A. K. 2011. Structure and function of a cold shock domain fold protein, *CspD*, in *Janthinobacterium* sp. Ant5 - 2 from East Antarctica. *FEMS Microbiology Letters*, 319(2), 106-114.
- Mrozik, A. and Piotrowska-Seget, Z. 2010. Bioaugmentation as a strategy for cleaning up of soils contaminated with aromatic compounds. *Microbiological Research*, 165(5), 363-375.

- Muangchinda, C., Pansri, R., Wongwongsee, W. and Pinyakong, O. 2013. Assessment of polycyclic aromatic hydrocarbon biodegradation potential in mangrove sediment from Don Hoi Lot, Samut Songkram Province, Thailand. *Journal of Applied Microbiology*, 114(5), 1311-1324.
- Muyzer, G., De Waal, E. C. and Uitterlinden, A. G. 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology*, 59(3), 695-700.
- Nichols, C. M., Lardi re, S. G., Bowman, J. P., Nichols, P. D., A.E. Gibson, J. and Gu ezennec, J. 2005. Chemical characterization of exopolysaccharides from Antarctic marine bacteria. *Microbial Ecology*, 49(4), 578-589.
- Nopcharoenkul, W., Pinphanichakarn, P. and Pinyakong, O. 2011. The development of a liquid formulation of *Pseudoxanthomonas* sp. RN402 and its application in the treatment of pyrene-contaminated soil. *Journal of Applied Microbiology*, 111(1), 36-47.
- Normand, P., Caumette, P., Goulas, P., Pujic, P. and Wisniewski-Dy e, F. 2015. Adaptations of Prokaryotes to Their Biotopes and to Physicochemical Conditions in Natural or Anthropized Environments *Environmental Microbiology: Fundamentals and Applications* (pp. 293-351): Springer.
- Olajire, A. and Essien, J. 2014. Aerobic degradation of petroleum components by microbial consortia. *Journal of Petroleum & Environmental Biotechnology*, 5(5), 1.
- Oulas, A., Pavloudi, C., Polymenakou, P., Pavlopoulos, G. A., Papanikolaou, N., Kotoulas, G., Arvanitidis, C. and Iliopoulos, I. 2015. Metagenomics: tools and insights for analyzing next-generation sequencing data derived from biodiversity studies. *Bioinformatics and Biology Insights*, 9, 75.
- Parks, D. H., Tyson, G. W., Hugenholtz, P. and Beiko, R. G. 2014. STAMP: statistical analysis of taxonomic and functional profiles. *Bioinformatics*, 30(21), 3123-3124.
- Peet, R. K. 1975. Relative diversity indices. *Ecology*, 56(2), 496-498.

- Peeters, K., Ertz, D. and Willems, A. 2011. Culturable bacterial diversity at the princess Elisabeth station (Utsteinen, Sør Rondane Mountains, East Antarctica) harbours many new taxa. *Systematic and Applied Microbiology*, 34(5), 360-367.
- Peng, R. H., Xiong, A. S., Xue, Y., Fu, X. Y., Gao, F., Zhao, W., Tian, Y. S. and Yao, Q. H. 2008. Microbial biodegradation of polyaromatic hydrocarbons. *FEMS Microbiology Reviews*, 32(6), 927-955.
- Phadtare, S. 2004. Recent developments in bacterial cold-shock response. *Current Issues in Molecular Biology*, 6(2), 125-136.
- Philp, J. C., Bamforth, S., Singleton, I. and Atlas, R. M. 2005. Environmental pollution and restoration: a role for bioremediation *Bioremediation* (pp. 1-48): American Society of Microbiology.
- Polti, M. A., Aparicio, J. D., Benimeli, C. S. and Amoroso, M. J. 2014. Simultaneous bioremediation of Cr (VI) and lindane in soil by Actinobacteria. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 88, 48-55.
- Rahman, K., Thahira-Rahman, J., Lakshmanaperumalsamy, P. and Banat, I. 2002. Towards efficient crude oil degradation by a mixed bacterial consortium. *Bioresource Technology*, 85(3), 257-261.
- Ravindran, A., Jalan, N., Yuan, J. S., Wang, N. and Gross, D. C. 2015. Comparative genomics of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* strains B301D and HS191 and insights into intrapathovar traits associated with plant pathogenesis. *Microbiology Open*, 4(4), 553-573.
- Ron, E. and Rosenberg, E. 2010. Role of fertilizers: biostimulation *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology* (pp. 2501-2504): Springer.
- Ron, E. Z. and Rosenberg, E. 2001. Natural roles of biosurfactants. *Environmental Microbiology*, 3(4), 229-236.
- Ronca, S., Frossard, A., Guerrero, L. D., Makhalanyane, T. P., Aislabie, J. M. and Cowan, D. A. 2015. Draft genome sequence of *Sphingomonas* sp. strain Ant20, isolated from oil-contaminated soil on Ross Island, Antarctica. *Genome Announcements*, 3(1), e01309-01314.
- Ruberto, L., Dias, R., Lo Balbo, A., Vazquez, S., Hernandez, E. and Mac Cormack, W. 2009. Influence of nutrients addition and bioaugmentation on the hydrocarbon

- biodegradation of a chronically contaminated Antarctic soil. *Journal of Applied Microbiology*, 106(4), 1101-1110.
- Ruberto, L., Vazquez, S. C., Dias, R. L., Hernández, E. A., Coria, S. H., Levin, G., Balbo, A. L. and Mac Cormack, W. P. 2010. Small-scale studies towards a rational use of bioaugmentation in an Antarctic hydrocarbon-contaminated soil. *Antarctic Science*, 22(05), 463-469.
- Ruberto, L., Vazquez, S. C. and Mac Cormack, W. P. 2003. Effectiveness of the natural bacterial flora, biostimulation and bioaugmentation on the bioremediation of a hydrocarbon contaminated Antarctic soil. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 52(2), 115-125.
- Sahay, H., Babu, B. K., Singh, S., Kaushik, R., Saxena, A. K. and Arora, D. K. 2013. Cold-active hydrolases producing bacteria from two different sub-glacial Himalayan lakes. *Journal of Basic Microbiology*, 53(8), 703-714.
- Sambrook, J. and Russell, D. 2001. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (pp. 3.17-13.32): Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sawada, H., Takeuchi, T. and Matsuda, I. 1997. Comparative analysis of *Pseudomonas syringae* pv. actinidiae and pv. phaseolicola based on phaseolotoxin-resistant ornithine carbamoyltransferase gene (*argK*) and 16S-23S rRNA intergenic spacer sequences. *Applied and Environmental Microbiology*, 63(1), 282-288.
- Saxena, R., Dhakan, D. B., Mittal, P., Waiker, P., Chowdhury, A., Ghatak, A. and Sharma, V. K. 2016. Metagenomic analysis of hot springs in central India reveals hydrocarbon degrading thermophiles and pathways essential for survival in extreme environments. *Frontiers in Microbiology*, 7.
- Schloss, P. D., Westcott, S. L., Ryabin, T., Hall, J. R., Hartmann, M., Hollister, E. B., Lesniewski, R. A., Oakley, B. B., Parks, D. H. and Robinson, C. J. 2009. Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(23), 7537-7541.
- Sentchilo, V. S., Perebituk, A. N., Zehnder, A. J. and van der Meer, J. R. 2000. Molecular diversity of plasmids bearing genes that encode toluene and xylene

- metabolism in *Pseudomonas* strains isolated from different contaminated sites in Belarus. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(7), 2842-2852.
- Seok, Y. J., Song, E.-J., Cha, I.-T., Lee, H., Roh, S. W., Jung, J. Y., Lee, Y. K., Nam, Y.-D. and Seo, M.-J. 2016. Microbial Community of the Arctic Soil from the Glacier Foreland of Midtre Lovénbreen in Svalbard by Metagenome Analysis.
- Sharpton, T. J. 2014. An introduction to the analysis of shotgun metagenomic data. *Frontiers in Plant Science*, 5, 209.
- Shivaji, S., Begum, Z., Rao, S. S. S. N., Reddy, P. V. V. V., Manasa, P., Sailaja, B., Prathiba, M. S., Thamban, M., Krishnan, K. P. and Singh, S. M. 2013. Antarctic ice core samples: culturable bacterial diversity. *Research in Microbiology*, 164(1), 70-82.
- Shukor, M., Hassan, N., Jusoh, A., Perumal, N., Shamaan, N., MacCormack, W. and Syed, M. 2009. Isolation and characterization of a *Pseudomonas* diesel-degrading strain from Antarctica.
- Singh, A. and Subudhi, E. 2016. Structural insights of microbial community of Deulajhari (India) hot spring using 16 s-rRNA based metagenomic sequencing. *Genomics Data*, 7, 101-102.
- Sogin, M. L., Morrison, H. G., Huber, J. A., Welch, D. M., Huse, S. M., Neal, P. R., Arrieta, J. M. and Herndl, G. J. 2006. Microbial diversity in the deep sea and the underexplored "rare biosphere". *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(32), 12115-12120.
- Srinivas, T., Rao, S. N., Reddy, P. V. V., Prathiba, M., Sailaja, B., Kavya, B., Kishore, K. H., Begum, Z., Singh, S. and Shivaji, S. 2009. Bacterial diversity and bioprospecting for cold-active lipases, amylases and proteases, from culturable bacteria of Kongsfjorden and Ny-Ålesund, Svalbard, Arctic. *Current Microbiology*, 59(5), 537-547.
- Stallwood, B., Shears, J., Williams, P. A. and Hughes, K. A. 2005. Low temperature bioremediation of oil-contaminated soil using biostimulation and bioaugmentation with a *Pseudomonas* sp. from maritime Antarctica. *Journal of Applied Microbiology*, 99(4), 794-802.
- Streit, W. R. and Schmitz, R. A. 2004. Metagenomics—the key to the uncultured microbes. *Current Opinion in Microbiology*, 7(5), 492-498.

- Tobias, H. J., Beving, D. E., Ziemann, P. J., Sakurai, H., Zuk, M., McMurry, P. H., Zurling, D., Waytulonis, R. and Kittelson, D. B. 2001. Chemical analysis of diesel engine nanoparticles using a nano-DMA/thermal desorption particle beam mass spectrometer. *Environmental Science & Technology*, 35(11), 2233-2243.
- Trevors, J., Bej, A., Mojib, N., Van Elsas, J. and Van Overbeek, L. 2012. Bacterial gene expression at low temperatures. *Extremophiles*, 16(2), 167-176.
- van Beilen, J. B., Funhoff, E. G., van Loon, A., Just, A., Kaysser, L., Bouza, M., Holtackers, R., Röthlisberger, M., Li, Z. and Witholt, B. 2006. Cytochrome P450 Alkane hydroxylases of the CYP153 family are common in alkane-degrading eubacteria lacking integral membrane Alkane hydroxylases. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(1), 59-65.
- Van Hamme, J. D., Singh, A. and Ward, O. P. 2003. Recent advances in petroleum microbiology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 67(4), 503-549.
- Varin, T., Lovejoy, C., Jungblut, A. D., Vincent, W. F. and Corbeil, J. 2012. Metagenomic analysis of stress genes in microbial mat communities from Antarctica and the High Arctic. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(2), 549-559.
- Vázquez, S., Nogales, B., Ruberto, L., Hernández, E., Christie-Oleza, J., Lo Balbo, A., Bosch, R., Lalucat, J. and Mac Cormack, W. 2008. Bacterial community dynamics during bioremediation of diesel oil-contaminated Antarctic soil. *Microbial Ecology*, 57(4), 598.
- Vendeuvre, C., Ruiz-Guerrero, R., Bertoncini, F., Duval, L., Thiébaud, D. and Hennon, M.-C. 2005. Characterisation of middle-distillates by comprehensive two-dimensional gas chromatography (GC x GC): A powerful alternative for performing various standard analysis of middle-distillates. *Journal of Chromatography A*, 1086(1-2), 21-28.
- Verhille, S., Baida, N., Dabboussi, F., Izard, D. and Leclerc, H. 1999. Taxonomic study of bacteria isolated from natural mineral waters: proposal of *Pseudomonas jessenii* sp. nov. and *Pseudomonas mandelii* sp. nov. *Systematic and Applied Microbiology*, 22(1), 45-58.

- Vyas, T. K. and Dave, B. 2010. Effect of addition of nitrogen, phosphorus and potassium fertilizers on biodegradation of crude oil by marine bacteria. *Indian Journal of Marine Sciences*, 39(1), 143-150.
- Walters, W., Hyde, E. R., Berg-Lyons, D., Ackermann, G., Humphrey, G., Parada, A., Gilbert, J. A., Jansson, J. K., Caporaso, J. G. and Fuhrman, J. A. 2016. Improved bacterial 16S rRNA gene (V4 and V4-5) and fungal internal transcribed spacer marker gene primers for microbial community surveys. *mSystems*, 1(1), e00009-00015.
- Wang, J., Liu, X., Wang, H., Wu, T., Hu, X., Qin, F. and Wang, Z. 2010. Expression of two cytochrome P450 aromatase genes is regulated by endocrine disrupting chemicals in rare minnow *Gobiocypris rarus* juveniles. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 152(3), 313-320.
- Wang, J., Qi, J., Zhao, H., He, S., Zhang, Y., Wei, S. and Zhao, F. 2013. Metagenomic sequencing reveals microbiota and its functional potential associated with periodontal disease. *Scientific Reports*, 3, 1843.
- Wang, J., Wang, J., Zhang, Z., Li, Y., Zhang, B., Zhang, Z. and Zhang, G. 2015. Cold-adapted bacteria for bioremediation of crude oil-contaminated soil. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*.
- Wang, X.-B., Chi, C.-Q., Nie, Y., Tang, Y.-Q., Tan, Y., Wu, G. and Wu, X.-L. 2011. Degradation of petroleum hydrocarbons (C6–C40) and crude oil by a novel *Dietzia* strain. *Bioresource Technology*, 102(17), 7755-7761.
- Whyte, L., Schultz, A., Beilen, J. v., Luz, A., Pellizari, V., Labbé, D. and Greer, C. 2002. Prevalence of Alkane monooxygenase genes in Arctic and Antarctic hydrocarbon-contaminated and pristine soils. *FEMS Microbiology Ecology*, 41(2), 141-150.
- Wu, M., Dick, W. A., Li, W., Wang, X., Yang, Q., Wang, T., Xu, L., Zhang, M. and Chen, L. 2016. Bioaugmentation and biostimulation of hydrocarbon degradation and the microbial community in a petroleum-contaminated soil. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 107, 158-164.

- Yergeau, E., Sanschagrin, S., Beaumier, D. and Greer, C. W. 2012. Metagenomic analysis of the bioremediation of diesel-contaminated Canadian high Arctic soils. *PLoS One*, 7(1), e30058.
- Yu, Z., Stewart, G. R. and Mohn, W. W. 2000. Apparent contradiction: psychrotolerant bacteria from hydrocarbon-contaminated Arctic tundra soils that degrade diterpenoids synthesized by trees. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(12), 5148-5154.
- Zamberi, N. R., Mohamad, N. E., Yeap, S. K., Ky, H., Beh, B. K., Liew, W. C., Tan, S. W., Ho, W. Y., Boo, S. Y. and Chua, Y. H. 2016. 16S Metagenomic microbial composition analysis of kefir grain using MEGAN and BaseSpace. *Food Biotechnology*, 30(3), 219-230.
- Zeng, Y.-X., Yan, M., Yu, Y., Li, H.-R., He, J.-F., Sun, K. and Zhang, F. 2013. Diversity of bacteria in surface ice of Austre Lovénbreen glacier, Svalbard. *Archives of Microbiology*, 195(5), 313-322.
- Zhang, G., Niu, F., Ma, X., Liu, W., Dong, M., Feng, H., An, L. and Cheng, G. 2007. Phylogenetic diversity of bacteria isolates from the Qinghai-Tibet Plateau permafrost region. *Canadian Journal of Microbiology*, 53(8), 1000-1010.
- Zhang, Q., Wang, D., Li, M., Xiang, W.-N. and Achal, V. 2014. Isolation and characterization of diesel degrading bacteria, *Sphingomonas* sp. and *Acinetobacter junii* from petroleum contaminated soil. *Frontiers of Earth Science*, 8(1), 58.
- Zhang, T., Zhang, X.-X. and Ye, L. 2011. Plasmid metagenome reveals high levels of antibiotic resistance genes and mobile genetic elements in activated sludge. *PLoS One*, 6(10), e26041.
- Zhao, Z., Selvam, A. and Wong, J. W.-C. 2011. Synergistic effect of thermophilic temperature and biosurfactant produced by *Acinetobacter calcoaceticus* BU03 on the biodegradation of phenanthrene in bioslurry system. *Journal of Hazardous Materials*, 190(1), 345-350.
- กรมควบคุมมลพิษ. ข้อมูลวัตถุอันตรายและเคมีภัณฑ์. [ออนไลน์]. 2553. แหล่งที่มา: <http://msds.pcd.go.th/index.asp>

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก สูตรและวิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

อาหารเลี้ยงเชื้อ Luria-Bertani (LB)

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

ละลายสารทั้งหมดในน้ำกลั่น ปรับความเป็นกรด-ด่างด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ เข้มข้น 5 โมลาร์ จนมีค่าเท่ากับ 7 และปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 1,000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที อาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง เตรียมโดยละลายผงวุ้น 20 กรัม ในอาหารเหลว 1,000 มิลลิลิตร ก่อนนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ

อาหารเลี้ยงเชื้อ Luria-Bertani เจือจาง 4 เท่า (0.25X LB)

ผสมอาหารเหลว LB ปริมาตร 250 มิลลิลิตร และน้ำกลั่น ปริมาตร 750 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

อาหารเลี้ยงเชื้อ Mineral Salt Medium (MSM)

ไดโพแทสเซียมฟอสเฟต (K_2HPO_4)	1.8	กรัม
โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)	1.2	กรัม
แอมโมเนียมคลอไรด์ (NH_4Cl)	4.0	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)	0.2	กรัม
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	0.1	กรัม
เฟอร์รัสซัลเฟต ($FeSO_4 \cdot 7H_2O$)	0.01	กรัม

ปรับปริมาตรสุดท้ายด้วยน้ำกลั่นเป็น 1,000 มิลลิลิตร นึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เตรียมเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง โดยละลายผงวุ้น 20 กรัม ในอาหารเลี้ยงเชื้อ 1,000 มิลลิลิตร ก่อนนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ

อาหารเลี้ยงเชื้อ Ψ b

ทริปโตเน (Tryptone)	20	กรัม
ผงสกัดจากยีสต์ (Yeast extract)	5	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)	5	กรัม

ละลายสารทั้งหมดในน้ำกลั่น ปรับความเป็นกรด-ด่างด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ เข้มข้น 5 โมลาร์ จนมีค่าเท่ากับ 7 และปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 1,000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที อาหารเลี้ยงเชื้อแห้งเตรียมโดยละลายผงวุ้น 20 กรัม ในอาหารเหลว 1,000 มิลลิลิตร ก่อนนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ

อาหารเลี้ยงเชื้อ SOC

สารละลายส่วนที่ 1

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

ละลายสารทั้งหมดในน้ำกลั่น ปริมาตร 980 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

สารละลายส่วนที่ 2

กลูโคส ($C_6H_{12}O_6$)	3.6	กรัม
---------------------------	-----	------

ละลายสารในน้ำกลั่น ปริมาตร 20 มิลลิลิตร กำจัดเชื้อโดยกรองสารละลายแต่ละชนิดผ่านชุดกรองสำเร็จรูปเซลลูโลสอะซีเตท (CA) ขนาดรูกรอง 0.22 ไมโครเมตร แล้วผสมสารละลายส่วนที่ 2 ลงในสารละลายส่วนที่ 1 เก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

ภาคผนวก ข สูตรและวิธีการเตรียมสารเคมี

สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 5 โมลาร์

โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH)	20	กรัม
น้ำปลอดประจุ	100	มิลลิลิตร

ละลายสารในน้ำปลอดประจุ 70 มิลลิลิตร ในบีกเกอร์ที่มีแท่งกวนแม่เหล็ก จนสารเกิดการละลายอย่างสมบูรณ์ รอให้เย็นลง แล้วปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 100 มิลลิลิตร

สารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.85 เปอร์เซ็นต์

โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	8.5	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

ละลายสารในน้ำกลั่น นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

สารละลายโซเดียมโดเดซิลซัลเฟตเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์

โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต (SDS)	10	กรัม
น้ำปลอดประจุปราศจากเชื้อ	100	มิลลิลิตร

สารละลาย Trisเข้มข้น 1 โมลาร์ pH 8.0

Tris (tris [hydroxymethyl] aminomethane)	12.11	กรัม
น้ำปลอดประจุ	100	มิลลิลิตร

ละลายสารในน้ำปลอดประจุ 70 มิลลิลิตร ในบีกเกอร์ที่มีแท่งกวนแม่เหล็ก จนสารเกิดการละลายสมบูรณ์ ปรับความเป็นกรด-ด่างด้วยกรดไฮโดรคลอริกจนมีค่าเท่ากับ 8 และปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 100 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

สารละลาย EDTA เข้มข้น 0.5 โมลาร์ pH 8.0

EDTA (ethylenediamine tetraacetic acid disodium salt)	16.81	กรัม
น้ำปลอดประจุ	100	มิลลิลิตร

ละลายสารในน้ำปลอดประจุ 50 มิลลิลิตร ในบีกเกอร์ที่มีอ่างกวนแม่เหล็ก ปรับความเป็นกรด-ด่างด้วยเกลือโซเดียมไฮดรอกไซด์ จนมีค่าเท่ากับ 8 กวนจนสารเกิดการละลายอย่างสมบูรณ์ และปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 100 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

สารละลาย Tris-EDTA (Tris-ethylenediaminetetraacetic acid; TE)

สารละลาย Tris เข้มข้น 1 โมลาร์ pH 8.0	1.0	มิลลิลิตร
สารละลาย EDTA เข้มข้น 0.5 โมลาร์ pH 8.0	0.2	มิลลิลิตร
น้ำปลอดประจุ	98.8	มิลลิลิตร

ผสมสารทั้งหมดเข้าด้วยกัน นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

สารละลายไลโซไซม์ เข้มข้น 60 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร

ไลโซไซม์ (lysozyme)	60	มิลลิกรัม
สารละลาย TE	1	มิลลิลิตร

สารละลายโปรตีนเนสเค เข้มข้น 10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร

โปรตีนเนสเค (proteinase K)	10	มิลลิกรัม
น้ำปลอดประจุปราศจากเชื้อ	1	มิลลิลิตร

เอทานอล 70 เปอร์เซ็นต์

เอทานอล 99 เปอร์เซ็นต์	70	มิลลิลิตร
น้ำปลอดประจุ	30	มิลลิลิตร

สารละลายโซเดียมคลอไรด์ เข้มข้น 5 โมลาร์

โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	29.22	กรัม
น้ำปลอดประจุ	100	มิลลิลิตร

ละลายสารในน้ำปลอดประจุ นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

สารละลายเซทิลไตรเมทิลแอมโมเนียมโบรไมด์ในโซเดียมคลอไรด์ (CTAB/NaCl)

เซทิลไตรเมทิลแอมโมเนียมโบรไมด์ (CTAB)	10	กรัม
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	4.1	กรัม
น้ำปลอดประจุ	100	มิลลิลิตร

ละลายโซเดียมคลอไรด์ในน้ำปลอดประจุ 70 มิลลิลิตร ในบีกเกอร์ที่มีแท่งกวนแม่เหล็ก ให้ความร้อนพออุ่น แล้วค่อย ๆ ละลาย CTAB ปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 100 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

ฟีนอล:คลอโรฟอร์ม อัตราส่วน 1:1

ฟีนอล	50	มิลลิลิตร
คลอโรฟอร์ม	50	มิลลิลิตร

บัฟเฟอร์ Tris-acetate-EDTA เข้มข้น 1 เท่า (1X TAE)

บัฟเฟอร์ 50X TAE	20	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	980	มิลลิลิตร

สารละลายเอธิเดียมโบรไมด์ (ethidium bromide) เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัม/ลิตร

เอธิเดียมโบรไมด์ เข้มข้น 10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร	10	ไมโครลิตร
น้ำกลั่น	200	มิลลิลิตร

บัฟเฟอร์ PUM (phosphate-urea-magnesium sulfate)

ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4)	16.9	กรัม
โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)	7.3	กรัม
ยูเรีย (CH_4N_2O)	1.8	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)	0.2	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

ละลายสารในน้ำกลั่น นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

สารละลายไอโอดีนไนโตรเตตระโซเลียมคลอไรด์ (INT) เข้มข้น 15 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร

INT (iodonitrotetrazolium chloride)	150	มิลลิกรัม
ไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (dimethyl sulfoxide; DMSO)	10	มิลลิลิตร

ละลายสารในไดเมทิลซัลฟอกไซด์จนสมบูรณ์ กำจัดเชื้อโดยกรองสารละลายผ่านชุดกรองสำเร็จรูปพอลิเตตระฟลูออโรเอทิลีน (PTFE) ขนาดรูกรอง 0.22 ไมโครเมตร เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

สารละลาย Tfb1

โพแทสเซียมอะซิเตท (CH_3COOK)	0.296	กรัม
รูบิเดียมคลอไรด์ ($RbCl$)	1.21	กรัม
แคลเซียมคลอไรด์ ($CaCl_2 \cdot 2H_2O$)	0.148	กรัม
แมงกานีสคลอไรด์ ($MnCl_2$)	2 0.99	กรัม
กลีเซอรอล	15	มิลลิลิตร
น้ำปลอดประจุ	100	มิลลิลิตร

ละลายสารในน้ำปลอดประจุ 50 มิลลิลิตร ในปั๊กเกอร์ที่มีแท่งกวนแม่เหล็ก จนสารเกิดการละลายอย่างสมบูรณ์ ปรับความเป็นกรด-ด่างด้วยกรดอะซิติกจนมีค่าเท่ากับ 5.8 และปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 100 มิลลิลิตร กำจัดเชื้อโดยกรองผ่านชุดกรองสำเร็จรูปเซลลูโลสอะซิเตท (CA) ขนาดรูกรอง 0.22 ไมโครเมตร เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

สารละลาย TfbII

MES (2-[N-morpholino]ethanesulfonic acid)	0.29	กรัม
รูบิเดียมคลอไรด์ (RbCl)	0.121	กรัม
แคลเซียมคลอไรด์ (CaCl ₂ .2H ₂ O)	1.103	กรัม
กลีเซอรอล	15	มิลลิลิตร
น้ำปลอดประจุ	100	มิลลิลิตร

ละลายสารในน้ำปลอดประจุ 50 มิลลิลิตร ในปีกเกอร์ที่มีแท่งกวนแม่เหล็ก จนสารเกิดการละลายอย่างสมบูรณ์ ปรับความเป็นกรด-ด่างด้วยโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์จนมีค่าเท่ากับ 6.5 และปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 100 มิลลิลิตร กำจัดเชื้อโดยกรองผ่านชุดกรองสำเร็จรูปเซลลูโลสอะซีเตท (CA) ขนาดรูกรอง 0.22 ไมโครเมตร เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

สารละลายแอมพิซิลิน เข้มข้น 100 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร

แอมพิซิลิน (ampicillin)	100	มิลลิกรัม
น้ำปลอดประจุ	1	มิลลิลิตร

ละลายสารในน้ำปลอดประจุ กำจัดเชื้อโดยกรองสารละลายผ่านชุดกรองสำเร็จรูปเซลลูโลสอะซีเตท (CA) ขนาดรูกรอง 0.22 ไมโครเมตร เก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

สารละลาย X-gal เข้มข้น 80 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร

X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactoside)	80	มิลลิกรัม
ไดเมทิลฟอร์มมาไมด์ (dimethylformamide)	1	มิลลิลิตร

ละลายสารในไดเมทิลฟอร์มมาไมด์ กำจัดเชื้อโดยกรองสารละลายผ่านชุดกรองสำเร็จรูปพอลิเตตระฟลูออโรเอทีลีน (PTFE) ขนาดรูกรอง 0.22 ไมโครเมตร เก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

สารละลาย IPTG เข้มข้น 0.5 โมลาร์

IPTG (isopropyl thio- β -D-galactoside)	119	มิลลิกรัม
น้ำปลอดประจุ	1	มิลลิลิตร

ละลายสารในน้ำปลอดประจุ กำจัดเชื้อโดยกรองสารละลายผ่านชุดกรองสำเร็จรูปเซลลูโลสอะซีเตท (CA) ขนาดรูกรอง 0.22 ไมโครเมตร เก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

น้ำปลอดประจุปราศจาก RNase (DEPC-treated water)

สารละลายไดเอทิลไพโรคาร์บอเนต (DEPC)	1	มิลลิลิตร
-------------------------------------	---	-----------

น้ำปลอดประจุ	1000	มิลลิลิตร
--------------	------	-----------

ผสมสารละลายไดเอทิลไพโรคาร์บอเนตในน้ำปลอดประจุ ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลาข้ามคืน นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว อุณหภูมิ 12 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

สารละลายยูเรีย (urea) เข้มข้น 7 โมลาร์

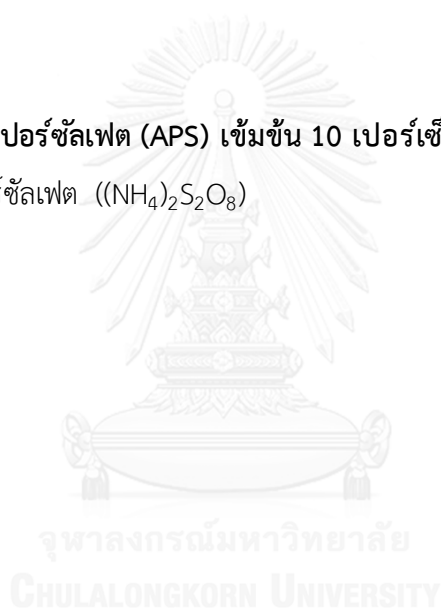
ยูเรีย ($\text{CH}_4\text{N}_2\text{O}$)	42.042	กรัม
--	--------	------

น้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร
----------	-----	-----------

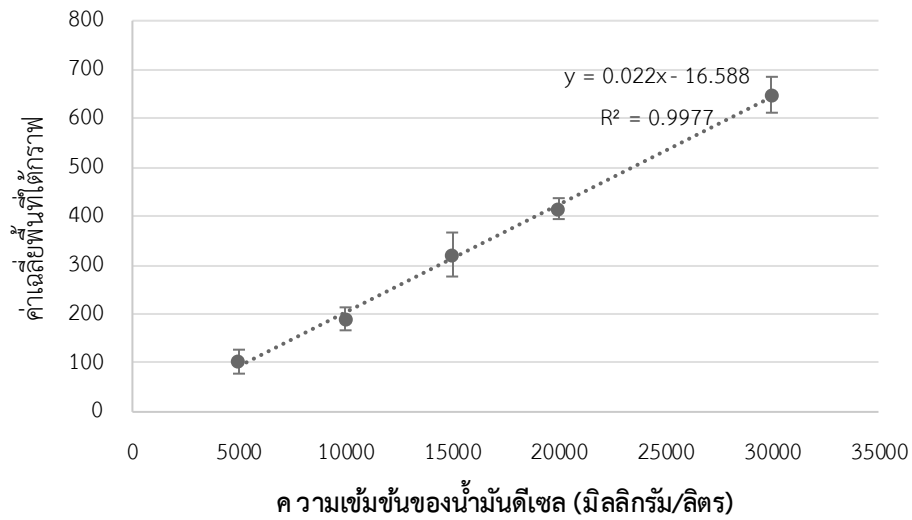
สารละลายแอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต (APS) เข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์

แอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต ($(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$)	0.1	กรัม
---	-----	------

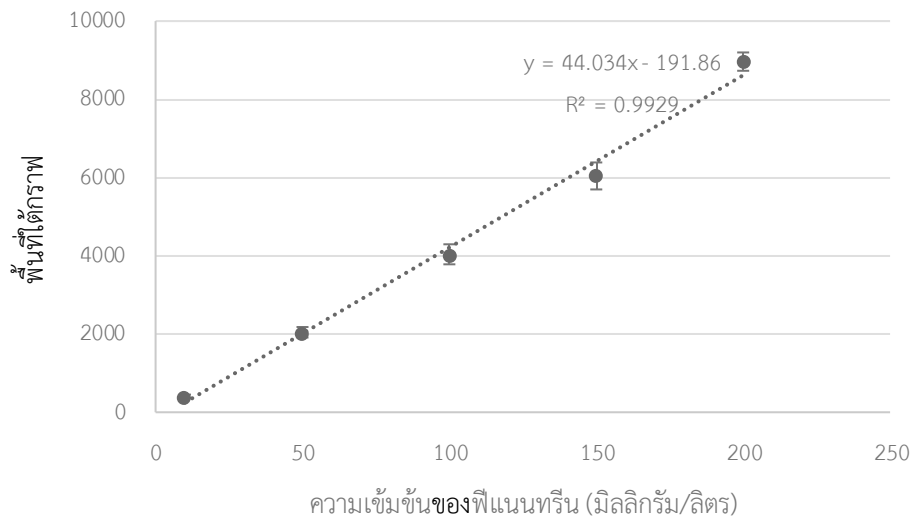
น้ำปลอดประจุ	1	มิลลิลิตร
--------------	---	-----------



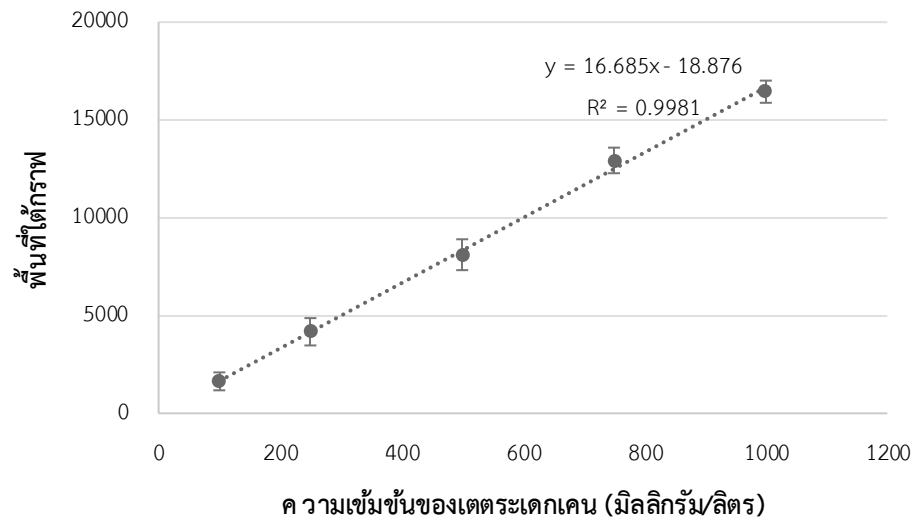
ภาคผนวก ค กราฟ



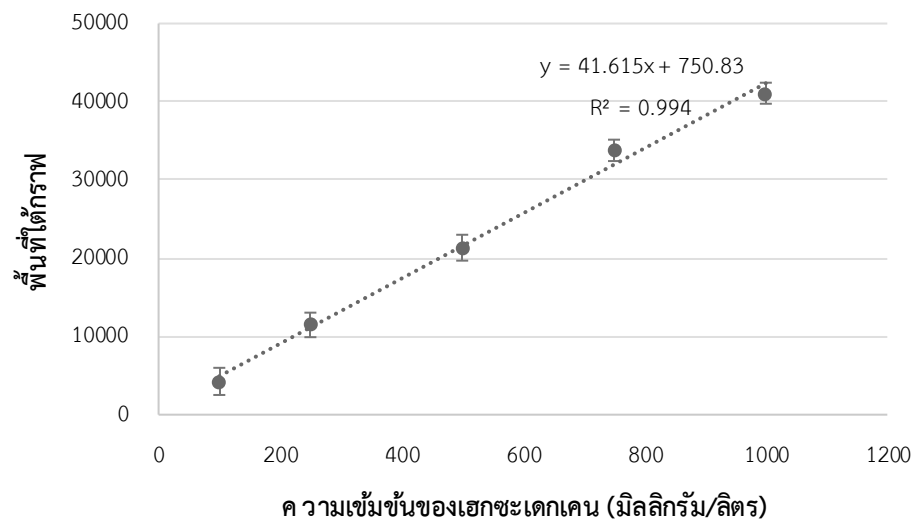
รูปที่ ค.1 กราฟมาตรฐานของน้ำมันดีเซลในช่วงความเข้มข้น 5,000 ถึง 30,000 มิลลิกรัม/ลิตร โดย GC-FID



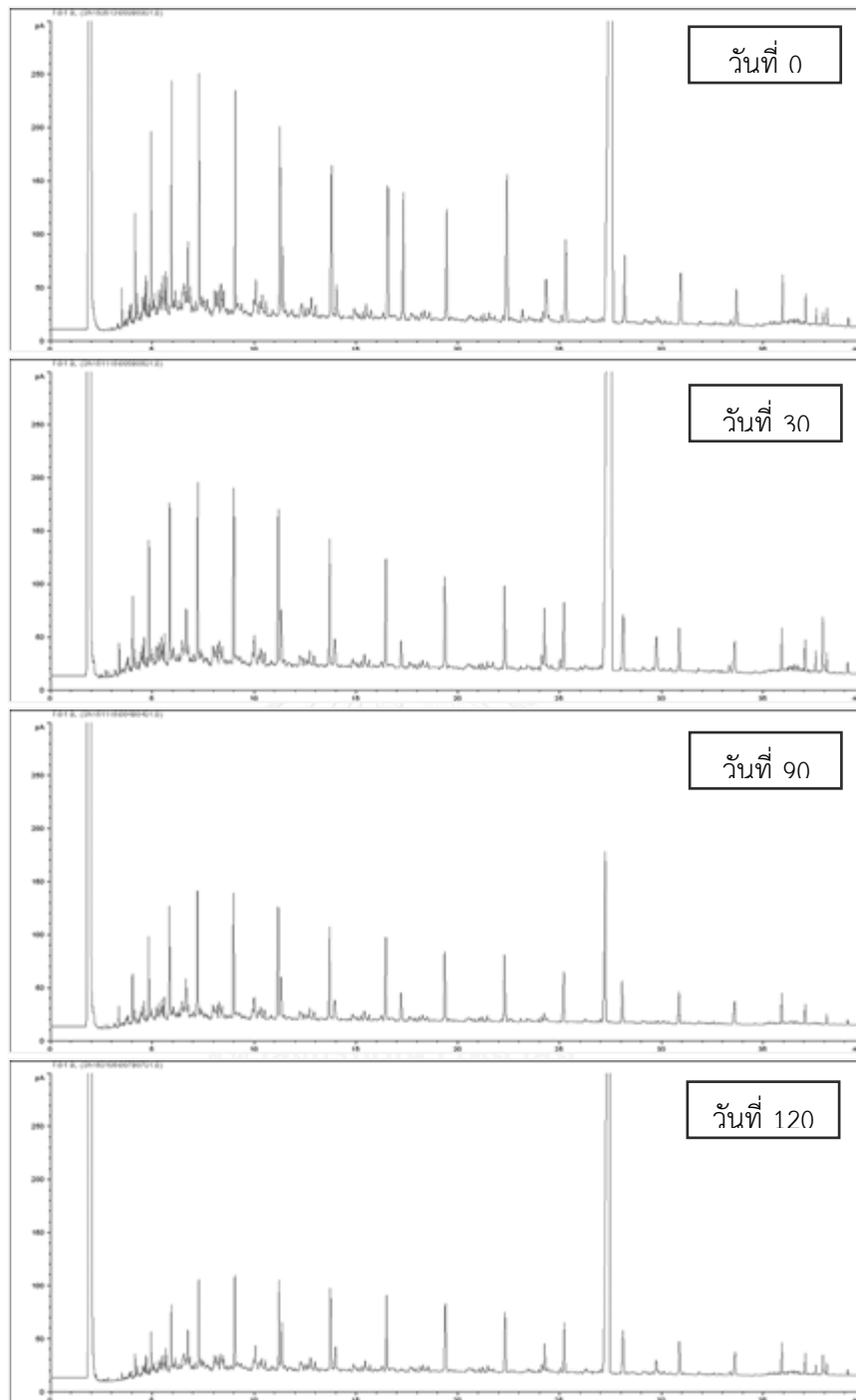
รูปที่ ค.2 กราฟมาตรฐานของพีแนนทรินในช่วงความเข้มข้น 10 ถึง 200 มิลลิกรัม/ลิตร โดย GC-FID



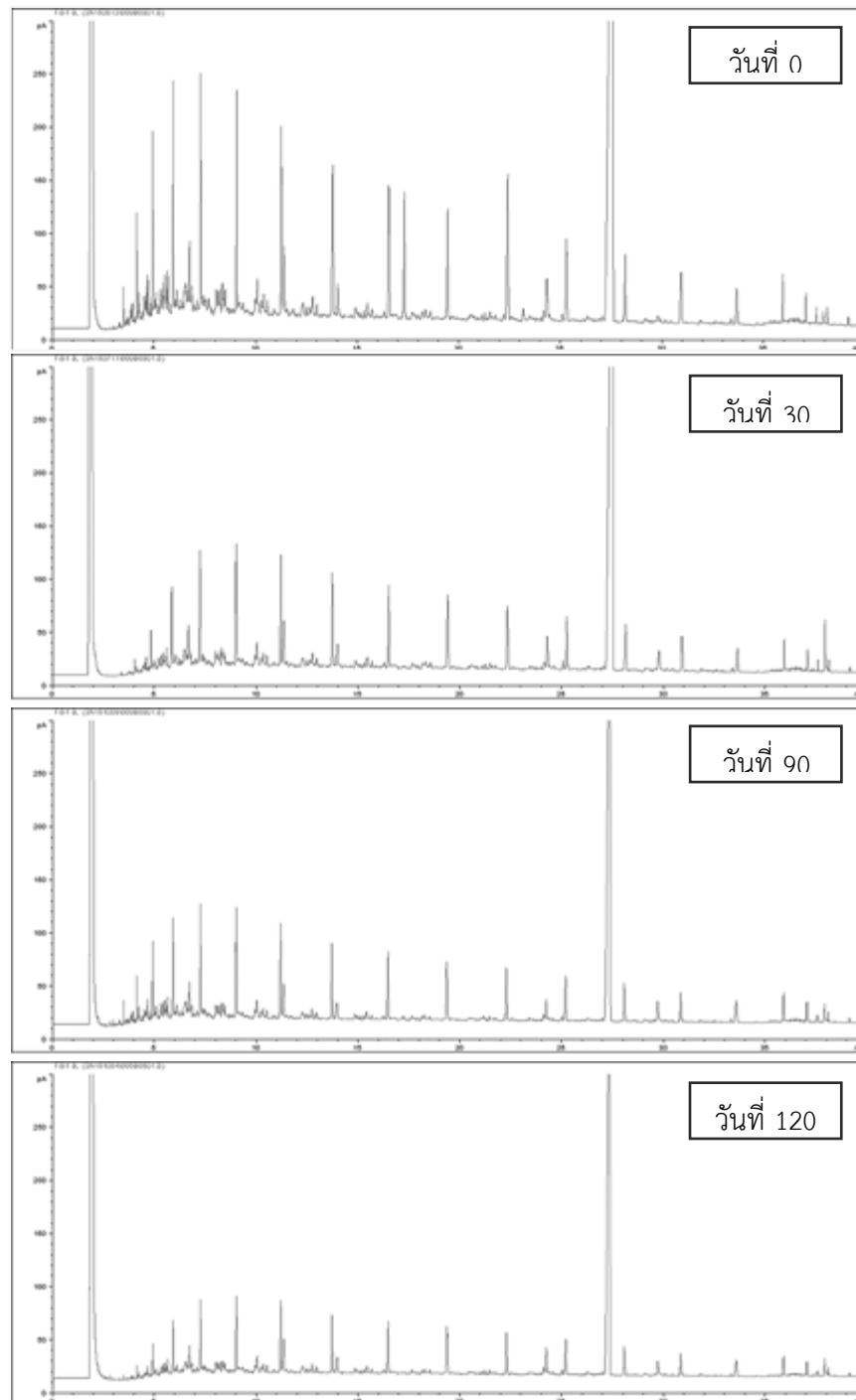
รูปที่ ค.3 กราฟมาตรฐานของอะซิโตนในช่วงความเข้มข้น 100 ถึง 1,000 มิลลิกรัม/ลิตร โดย GC-FID



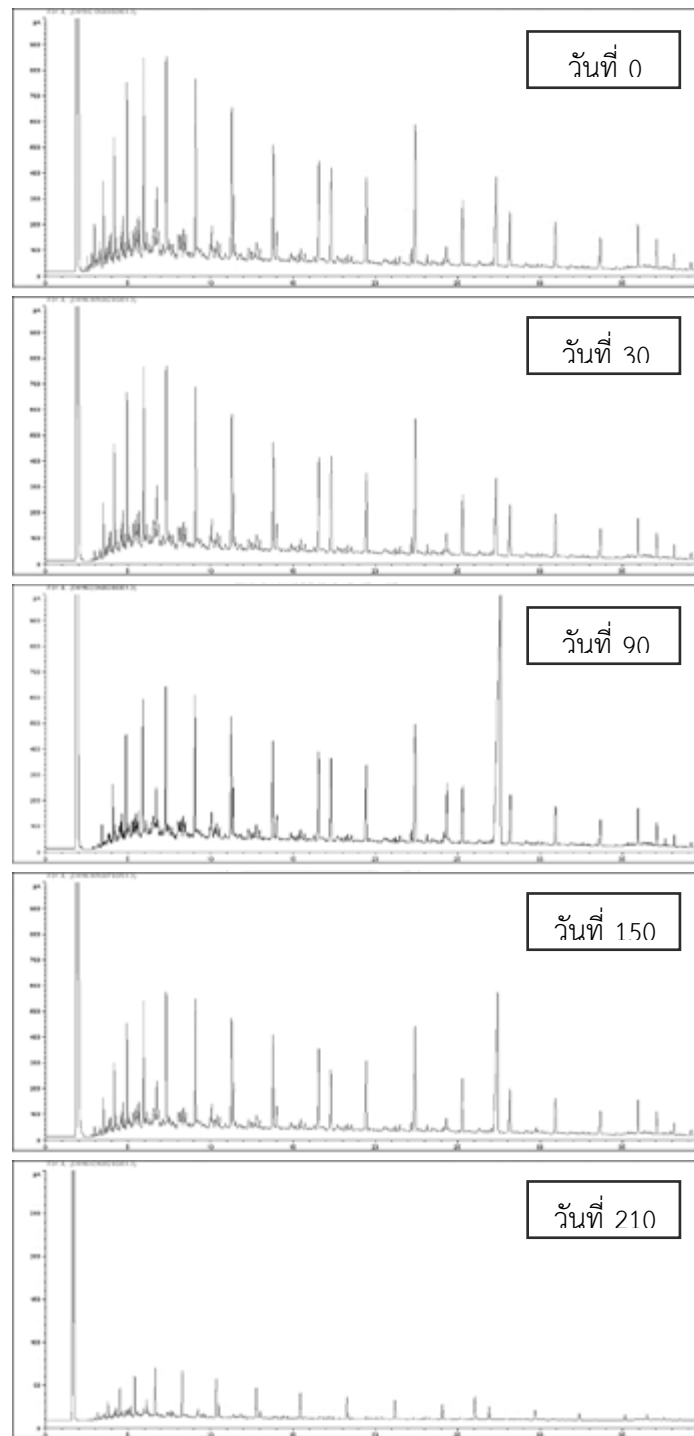
รูปที่ ค.4 กราฟมาตรฐานของเฮกซะเดคเคนในช่วงความเข้มข้น 100 ถึง 1,000 มิลลิกรัม/ลิตร โดย GC-FID



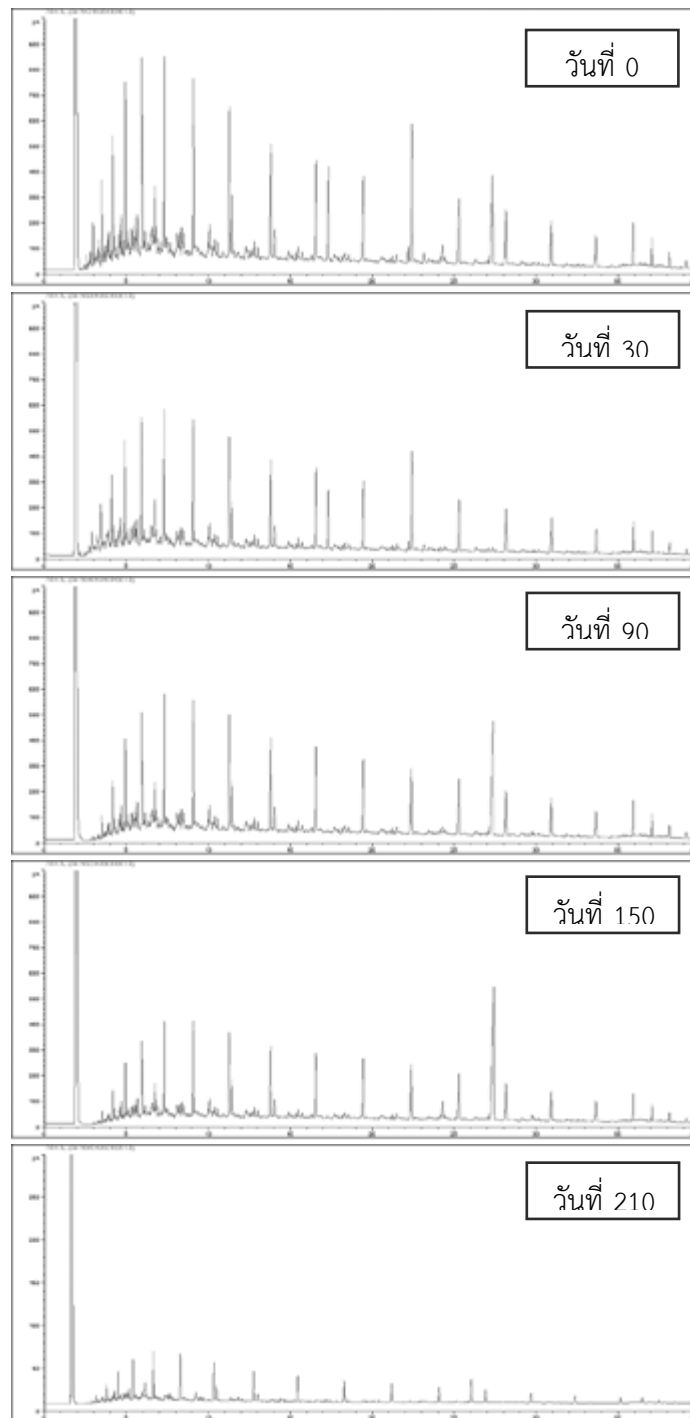
รูปที่ ค.5 โครมาโตแกรมการวิเคราะห์น้ำมันดีเซลที่เหลื่ออยู่ในระบบนิเวศจำลองดินแอนตาร์กติกาที่เติมน้ำมันดีเซล 1% (น้ำหนัก/น้ำหนัก) ชูด natural attenuation โดย GC-FID



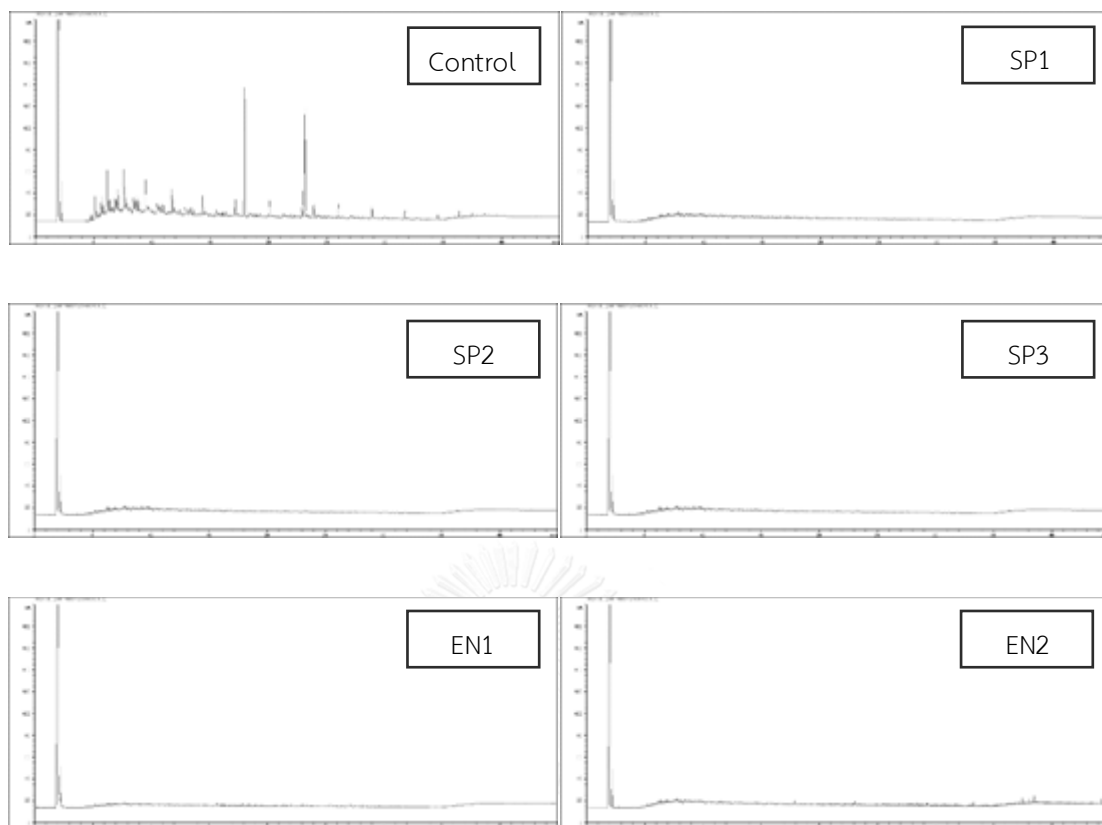
รูปที่ ค.6 โครมาโตแกรมการวิเคราะห์น้ำมันดีเซลที่เหลืออยู่ในระบบนิเวศจำลองดินแอนตาร์กติกที่เติมน้ำมันดีเซล 1% (น้ำหนัก/น้ำหนัก) ชุด biostimulation โดย GC-FID



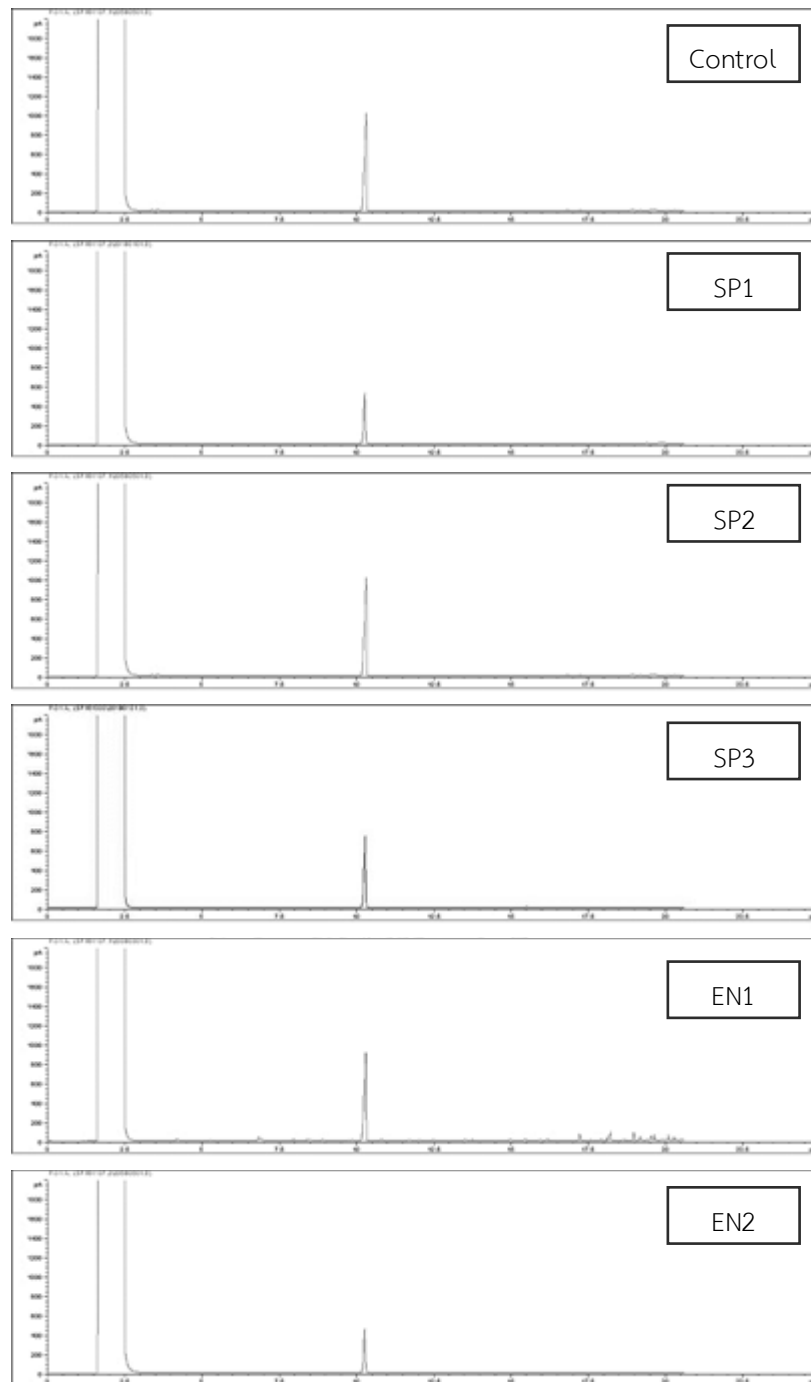
รูปที่ ค.7 โครมาโตแกรมการวิเคราะห์น้ำมันดีเซลที่เหลืออยู่ในระบบนิเวศจำลองดินแอนตาร์กติก
ที่เติมน้ำมันดีเซล 3% (น้ำหนัก/น้ำหนัก) ชุด natural attenuation โดย GC-FID



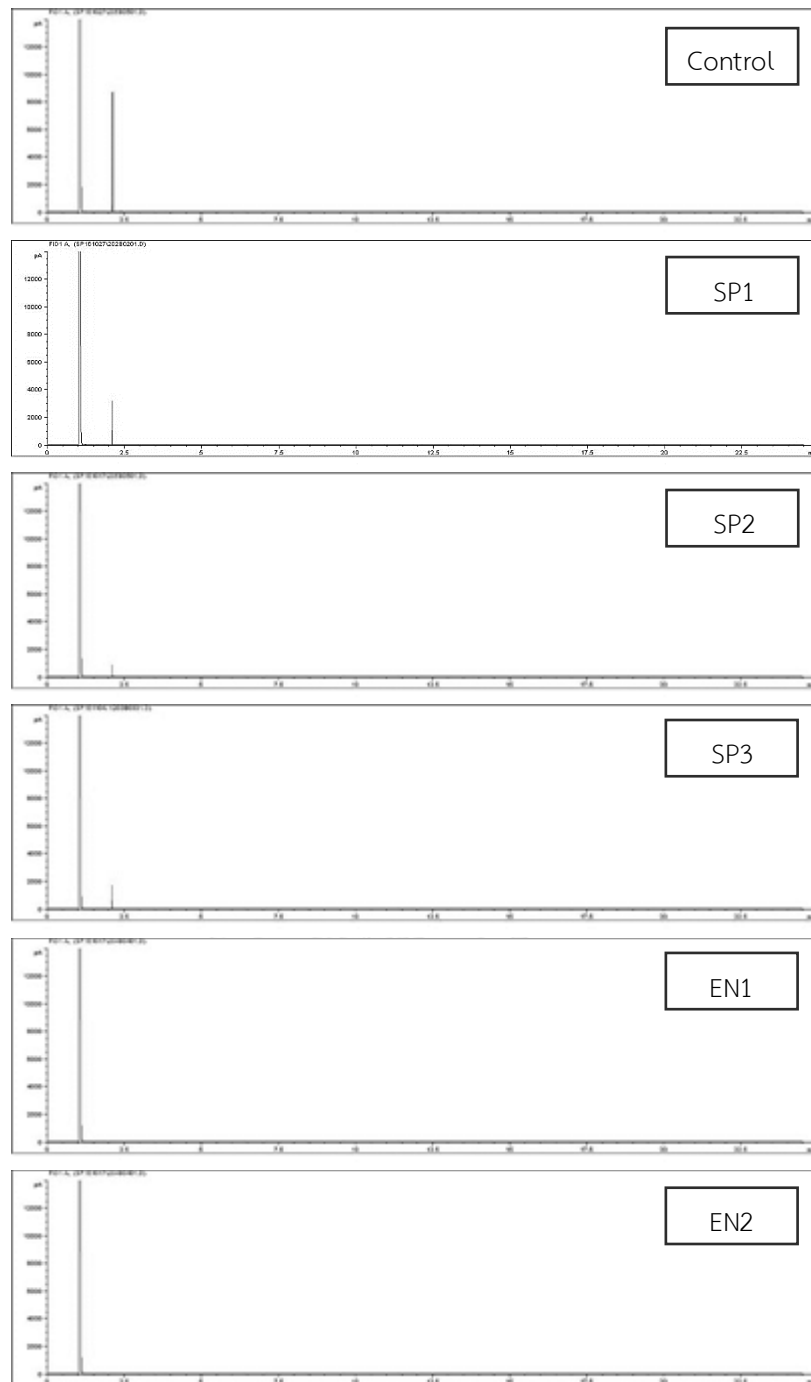
รูปที่ ค.8 โครมาโตแกรมการวิเคราะห์น้ำมันดีเซลที่เหลืออยู่ในระบบนิเวศจำลองดินแอนตาร์กติกที่เติมน้ำมันดีเซล 3% (น้ำหนัก/น้ำหนัก) ชุด biostimulation โดย GC-FID



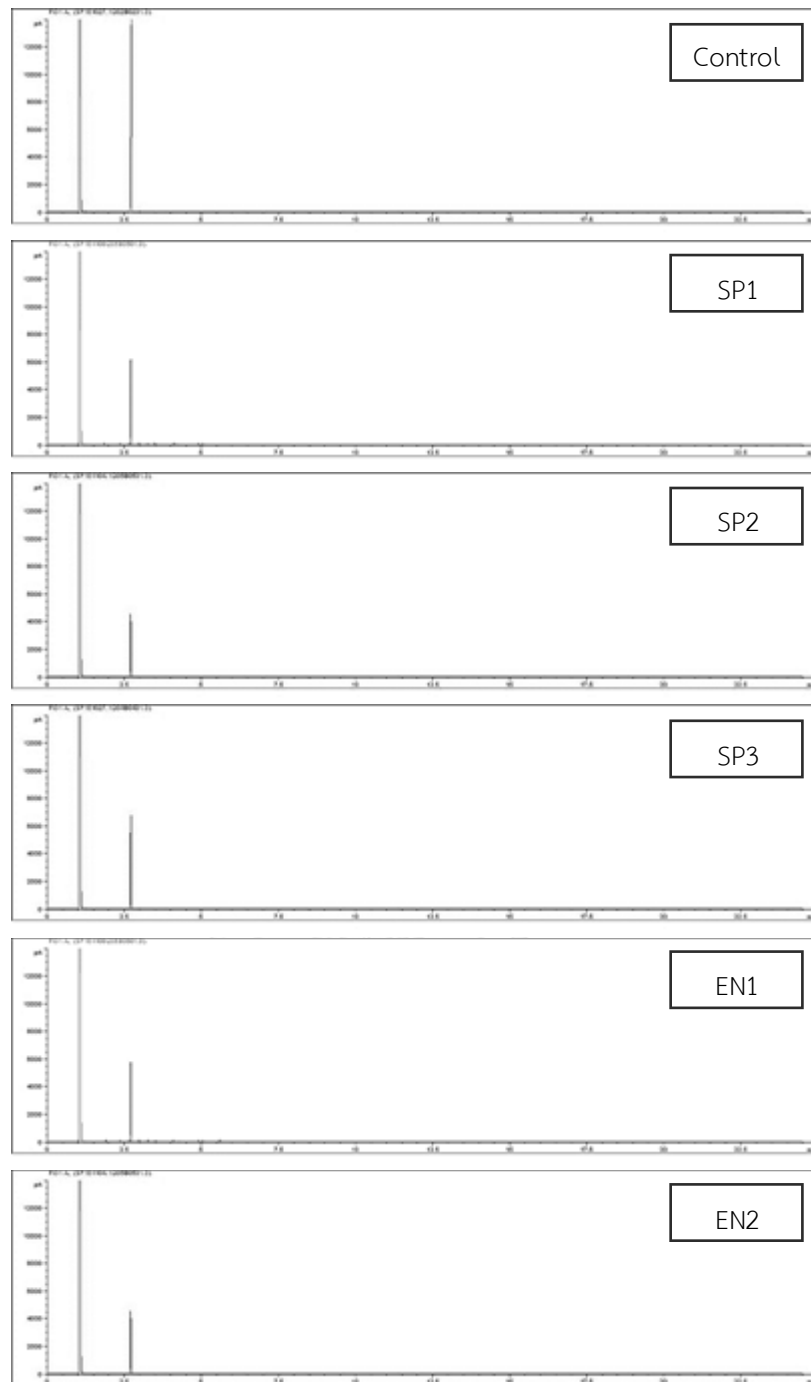
รูปที่ ค.9 โครมาโตแกรมประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันดีเซล 0.25% (ปริมาตร/ปริมาตร) ของแบคทีเรียสายพันธุ์บริสุทธิ์ทั้ง 5 สายพันธุ์ ภายในระยะเวลา 14 วัน โดย GC-FID



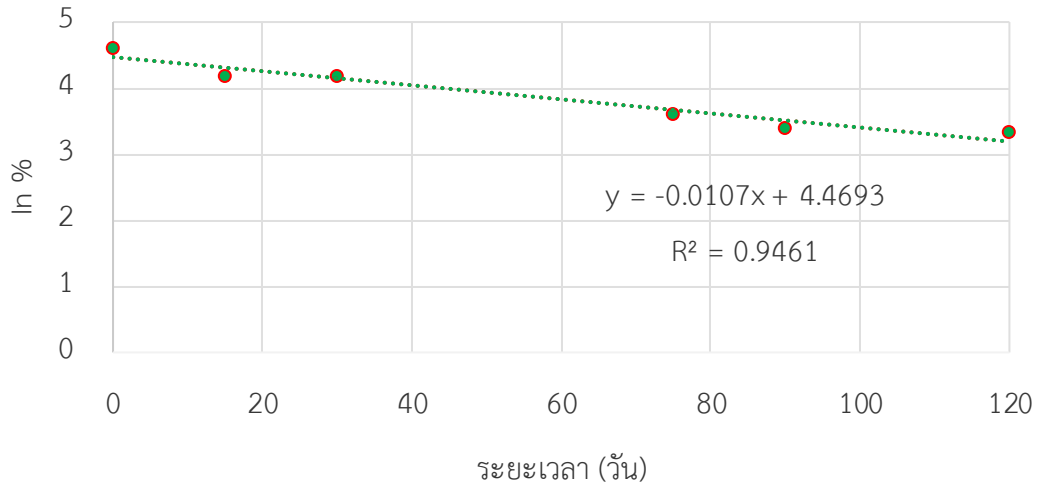
รูปที่ ค.10 โครมาโตแกรมประสิทธิภาพการย่อยสลายฟิแนนทรีน 50 (มิลลิกรัม/ลิตร) ของแบคทีเรียสายพันธุ์บริสุทธิ์ทั้ง 5 สายพันธุ์ ภายในระยะเวลา 14 วัน โดย GC-FID



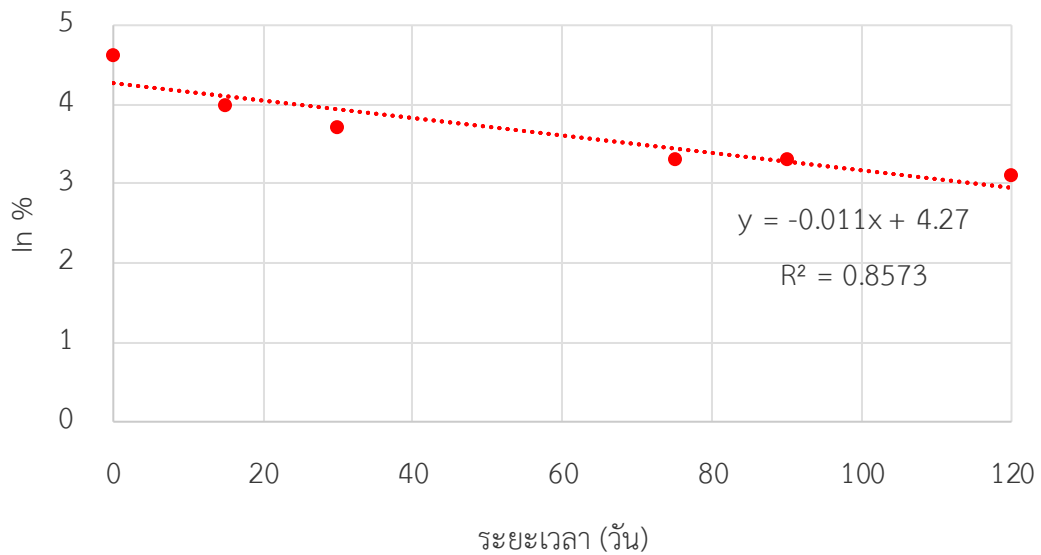
รูปที่ ค.11 โครมาโตแกรมประสิทธิภาพการย่อยสลายเตตระเดคเคน 500 (มิลลิกรัม/ลิตร) ของแบคทีเรียสายพันธุ์บริสุทธิ์ทั้ง 5 สายพันธุ์ ภายในระยะเวลา 14 วัน โดย GC-FID



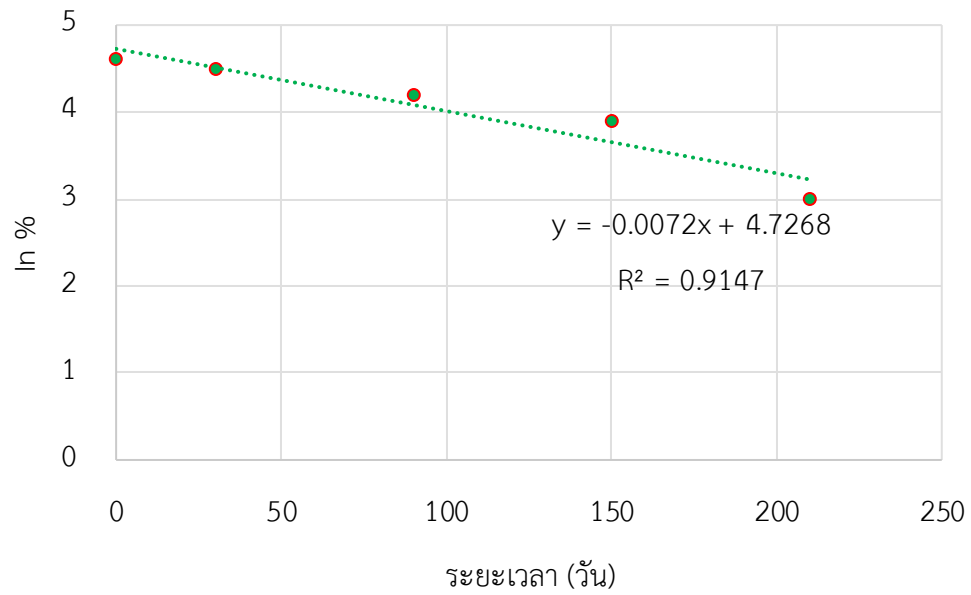
รูปที่ ค.12 โครมาโตแกรมประสิทธิภาพการย่อยสลายเฮกซะเดคเคน 500 (มิลลิกรัม/ลิตร) ของแบคทีเรียสายพันธุ์บริสุทธิ์ทั้ง 5 สายพันธุ์ ภายในระยะเวลา 14 วัน โดย GC-FID



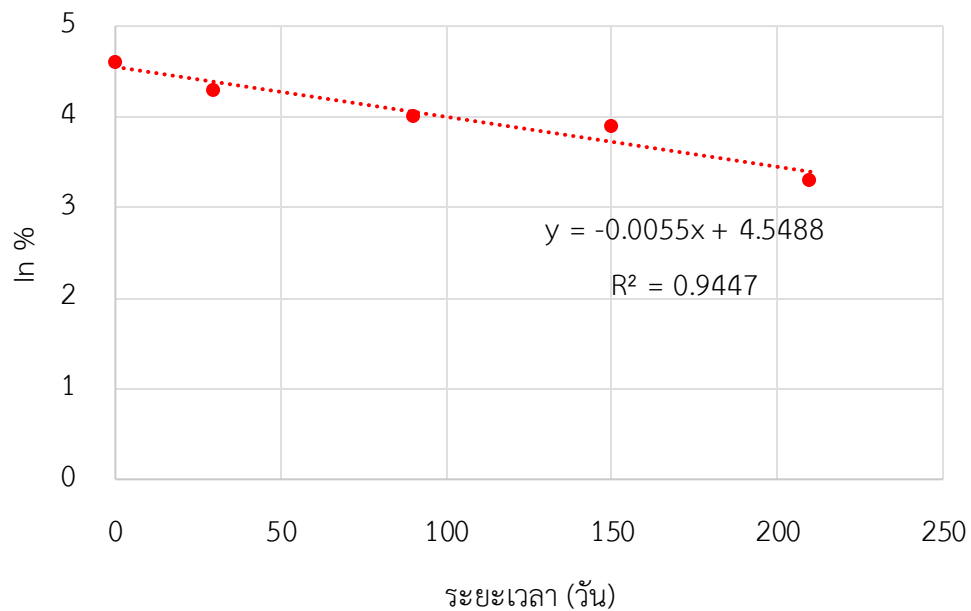
รูปที่ ค.13 กราฟเส้นตรงสมการค่าคงที่อัตราเร็วปฏิกิริยาอันดับหนึ่งของการย่อยสลายของระบบนิเวศจำลองดินแอนตาร์กติกที่เติมน้ำมันดีเซล 1% (น้ำหนัก/น้ำหนัก) ชุด natural attenuation



รูปที่ ค.14 กราฟเส้นตรงสมการค่าคงที่อัตราเร็วปฏิกิริยาอันดับหนึ่งของการย่อยสลายของระบบนิเวศจำลองดินแอนตาร์กติกที่เติมน้ำมันดีเซล 1% (น้ำหนัก/น้ำหนัก) ชุด biostimulation



รูปที่ ค.15 กราฟเส้นตรงสมการค่าคงที่อัตราเร็วปฏิกิริยาอันดับหนึ่งของการย่อยสลายของระบบนิเวศจำลองดินแอนตาร์กติกที่เติมน้ำมันดีเซล 3% (น้ำหนัก/น้ำหนัก) ชุด natural attenuation



รูปที่ ค.16 กราฟเส้นตรงสมการค่าคงที่อัตราเร็วปฏิกิริยาอันดับหนึ่งของการย่อยสลายของระบบนิเวศจำลองดินแอนตาร์กติกที่เติมน้ำมันดีเซล 3% (น้ำหนัก/น้ำหนัก) ชุด biostimulation

ภาคผนวก ง ตารางผลการทดลอง

ตารางที่ ง.1 ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนของแบคทีเรียประจำถิ่นในดินแอนตาร์กติกกับลำดับนิวคลีโอไทด์จากฐานข้อมูล GenBank

ไพรเมอร์	โคลนที่	Description	Identity	ACCNO	อ้างอิง
P450 fw1 & rv3	1	cytochrome P450 <i>Actinobacterium acAcidi</i>	92/114(80%)	KGA11575	Ghai และคณะ (2014)
	2	cytochrome P450 <i>Actinobacterium acAcidi</i>	93/114(81%)	KGA11762	Ghai และคณะ (2014)

ตารางที่ ง.2 ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rRNA ของแถบ DNA เด่นจากการทำ PCR-DGGE กับลำดับนิวคลีโอไทด์จากฐานข้อมูล GenBank

ลำดับที่	ลำดับนิวคลีโอไทด์	ชนิดแบคทีเรีย	Identity	ACCNO	Ref
N1	GCTCCCGCCGCATGGCGCCGCGGAATTCG ATTACCGCGCTGCTGGCAGTAGTTAGCCGGTG CTTATTCTTCAGGTACCGTCATTAGTGAGGATA TTAGCCCCACCGTTTCTCCCTGACAAAAGAGC TTTACAACCCGAAGCCTTCTCACTCACGCGGC ATTGCTGGATCAGGCTTGCGCCATTGTCCAA	uncultured bacterium	100%	KU51506 5	Lu และคณะ ไม่ตีพิมพ์
	CCGGCCGCATGGCGCCGCGGAATTCGATTC CTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATTTGGACAA TGGGCGCAAGCCTGATCCAGCAATGCCGCTGA GTGAAGAAGCCTTCGGTTGTAAAGCTCTTTG TCAGGGAAGAAACGGTGGGGGCTAATATCCTCC ACTAATGACGGTACCTGAAGAATAAGCACCGGCT	uncultured bacterium	99%	KU51506 5	Lu และคณะ ไม่ตีพิมพ์
	CTCCCGCCGCATGGCGCCGCGGAATTCGA TTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATTTGGGA CAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCAATGCCGCG TGAGTGAAGAAGCCTTCGGTTGTAAAGCTCTT TTGTCAGGGAAGAAACGGTGGGGGCTAATATCCT CCACTAATGACGGTACCTGAAGAATAAGCACCG	uncultured bacterium	99%	KU51506 5	Lu และคณะ ไม่ตีพิมพ์

ตาราง ง.2 (ต่อ)

ลำดับที่	ลำดับนิวคลีโอไทด์	ชนิดแบคทีเรีย	Identity	ACCNO	Ref
N1	TCCCGGCCCATGGCGCCGCGGAATTCGAT TCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATTTGGAC AATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCAATGCCGCGT GAGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAGCTCTTT TGTCAGGGAAGAAACGGTGGGGCTAATATCCT CCTACTAATGACGGTACCTGAAGAATAAGCACC	uncultured bacterium	99%	KU51506 5	Lu และคณะ ไม่ตีพิมพ์
N2	CGCATGCTCCCGGCCCATGGCGCCGCGGGA ATTCGATTACCGCGGCTGCTGGCACAGAGTTAGC CGGTGCTTATTCTGTCGGTAACGTCAAACAGAT ACGTATTAGGTAACGTGCCCTTCCTCCCACTTAA AGTGCTTTACAATCCGAAGACCTTCTCACACAC GCGGCATGGCTGGATCAGGCTTTCGCCATTG	uncultured gamma proteobacterium	100%	FM25241 5	Ladygina และคณะ, 2009
	CTCCCGGCCCATGGCGCCGCGGAATTCGA TTACCGCGGCTGCTGGCACAGAGTTAGCCGGTG CTTATTCTGTCGGTAACGTCAAACAGATACGTA TTAGGTAACGTGCCCTTCCTCCCACTTAAAGTGC TTTACAATCCGAAGACCTTCTCACACACGCGGC ATGGCTGGATCAGGCTTTCGCCATTGTCCAAT	uncultured gamma proteobacterium	97%	FM25224 2	Ladygina และคณะ, 2009
	GTCGCATGCTCCCGGCCCATGGCGCCGCGG GAATTCGATTACCGCGGCTGCTGGCACAGAGTTA GCCGGTGTATTCTGTCGGTAACGTCAAACAG ATACGTATTAGGTAACGTGCCCTTCCTCCCACTT AAAGTGCTTTACAATCCGAAGACCTTCTCACAC ACGCGGCATGGCTGGATCAGGCTTTCGCCCAT	uncultured gamma proteobacterium	97%	FM25224 2	Ladygina และคณะ, 2009
	GCTCCCGGCCCATGGCGCCGCGGAATTCG ATTACCGCGGCTGCTGGCACAGAGTTAGCCGGT GCTTATTCTGTCGGTAACGTCAAACAGATACGT ATTAGGTAACGTGCCCTTCCTCCCACTTAAAGTG CTTTACAATCCGAAGACCTTCTCACACACGCGG CATGGCTGGATCAGGCTTTCGCCATTGTCCA	uncultured gamma proteobacterium	97%	FM25224 2	Ladygina และคณะ, 2009
	CTCCCGGCCCATGGCGCCGCGGAATTCGA TTACCGCGGCTGCTGGCACAGAGTTAGCCGGTG CTTATTCTGTCGGTAACGTCAAACAGATACGTA TTAGGTAACGTGCCCTTCCTCCCACTTAAAGTGC TTTACAATCCGAAGACCTTCTCACACACGCGGC ATGGCTGGATCAGGCTTTCGCCATTGTCCAAT	uncultured gamma proteobacterium	97%	FM25224 2	Ladygina และคณะ, 2009
N3	CCCGGCCCATGGCGCCGCGGAATTCGATT ACCGCGGCTGCTGGCACAGAGTTAGCCGGTGT TATTCTGTCGGTAACGTCAAACAGATACGTATT AGGTAACGTGCCCTTCCTCCCACTTAAAGTGCTT TACAATCCGAAGACCTTCTCACACACGCGGCAT GGCTGGATCAGGCTTTCGCCATTGTCCAATA	uncultured gamma proteobacterium	97%	FM25224 2	Ladygina และคณะ 2009

ตาราง ง.2 (ต่อ)

ลำดับที่	ลำดับนิวคลีโอไทด์	ชนิดแบคทีเรีย	Identity	ACCNO	Ref
N3	CTCCCGCCGCATGGCGCCGCGGAATTCGA TTACCGCGGCTGCTGGCACAGAGTTAGCCGGTG CTTATTCTGTCGGTAACGTCAAACAGATACGTA TTAGGTAACAGCCCTTCTCCCAACTAAAGTGC TTTACAATCCGAAGACCTTCTCACACACGCGGC ATGGCTGGATCAGGCTTTCGCCATTGTCCAAT	uncultured gamma proteobacterium	97%	FM25224 2	Ladygina และคณะ 2009
	CTCCCGCCGCATGGCGCCGCGGAATTCGA TTCCTACGGGAGGAGCAGTGGGAATATTGGA CAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCG TGTGTGAAGAAGGTCTTCGATTGTAAGCACTT TAAGTTGGGAGGAAGGCGATTACCTAATACGTA TCTGTTTTGACGTTACCGACAGAATAAGCACCGG	<i>Pseudomonas lini</i>	99%	KX09442 6	Jung และ คณะ, ไม่ ตีพิมพ์
	GCTCCCGCCGCATGGCGCCGCGGAATTCG ATTCTACGGGAGGAGCAGTGGGAATATTGGT CAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCG TGTGTGAAGAAGGTCTTCGATTGTAAGCACTT TAAGTTGGGAGGAAGGCGATTACCTAATACGTA AGTGTGTTTTGACGTTACCGACAGAATAAGCACCG	uncultured <i>Pseudomonas</i> sp.	99%	GQ3293 82	Shivaji และ คณะ 2011
N4	CTCCCGCCGCATGGCGCCGCGGAATTCGA TTACCGCGGCTGCTGGCACAGAGTTAGCCGGTG CTTATTCTGTCGGTAACGTCAAACACTTACGTA TTAGGTAATGCCCTTCTCCCAACTAAAGTGC TTTACAATCCGAAGACCTTCTCACACACGCGGC ATGGCTGGATCAGGCTTTCGCCATTGTCCAAT	uncultured gamma proteobacterium	99%	FM25224 2	Ladygina และคณะ 2009
	CCCGCCGCATGGCGCCGCGGAATTCGATT ACCGCGGCTGCTGGCACAGAGTTAGCCGGTGCT TATTCTGTCGGTAACGTCAAACAGCAAGTATT CGCTTACTGCCCTTCTCCCAACTAAAGTGCCT TACAATCCGAAGACCTTCTCACACACGCGGCAT GGCTGGATCAGGCTTTCGCCATTGTCCAATAT	uncultured gamma proteobacterium	97%	FM25224 2	Ladygina และคณะ 2009
	CCCGCCGCATGGCGCCGCGGAATTCGATT ACCGCGGCTGCTGGCACAGAGTTAGCCGGTGCT TATTCTGTCGGTAACGTCAAACACTTACGTATT AGGTAATGCCCTTCTCCCAACTAAAGTGCCT TACAATCCGAAGACCTTCTCACACACGCGGCAT GGCTGGATCAGGCTTTCGCCATTGTCCAATAT	uncultured gamma proteobacterium	99%	FM25224 2	Ladygina และคณะ 2009
N5	CTCCCGCCGCATGGCGCCGCGGAATTCGA TTACCGCGGCTGCTGGCACAGAGTTAGCCGGTG CTTATTCTGTCGGTAACGTCAAACAGATACGTA TTAGGTAACAGCCCTTCTCCCAACTAAAGTGC TTTACAATCCGAAGACCTTCTCACACACGCGGC ATGGCTGGATCAGGCTTTCGCCATTGTCCAA	uncultured gamma proteobacterium	97%	FM25224 2	Ladygina และคณะ, 2009

ตาราง ง.2 (ต่อ)

ลำดับที่	ลำดับนิวคลีโอไทด์	ชนิดแบคทีเรีย	Identity	ACCNO	Ref
N5	GCTCCCGCCGCATGGCGCCGCGGAATTCG ATTACCGCGCTGCTGGCACAGAGTTAGCCGGT GCTTATTCTGTCGGTAACGTCAAACAGATACGT ATTAGGTAAGTCCCTTCTCCCAACTTAAAGTG CTTTACAATCCGAAGACCTTCTTACACACGCGG CATGGCTGGATCAGGCTTTGCCCCATTGTCCAA	uncultured gamma proteobacterium	97%	FM25224 2	Ladygina และคณะ, 2009
	TCCCGCCGCATGGCGCCGCGGAATTCGAT TACCGCGCTGCTGGCACAGAGTTAGCCGGTGC TTATTCTGTCGGTAACGTCAAACAGATACGTAT TAGGTAAGTCCCTTCTCCCAACTTAAAGTGCT TTACAATCCGAAGACCTTCTTACACACGCGGCA TGGCTGGATCAGGCTTTGCCCCATTGTCCAATAT TCCCCACTG	uncultured gamma proteobacterium	97%	FM25224 2	Ladygina และคณะ, 2009
	CCCGCCGCATGGCGCCGCGGAATTCGATT ACCGCGCTGCTGGCACAGAGTTAGCCGGTGC TATTCTGTCGGTAACGTCAAACAGATACGTATT AGGTAAGTCCCTTCTCCCAACTTAAAGTGCTT TACAATCCGAAGACCTTCTTACACACGCGGCAT GGCTGGATCAGGCTTTGCCCCATTGTCCAATATT CCCCACTGC	uncultured gamma proteobacterium	97%	FM25224 2	Ladygina และคณะ, 2009
N6	CCGGCCGCATGGCGCCGCGGAATTCGATTA CCCGCGCTGCTGGCACAGAGTTAGCCGGTGC ATTCTGTCGGTAACGTCAAACAATTACGTATTA GGTAAGTCCCTTCTCCCAACTTAAAGTGCTTT ACAATCCGAAGACCTTCTTACACACGCGGCATG GCTGGATCAGGCTTTGCCCCATTGTCCAATATT CCCACTGCT	uncultured gamma proteobacterium	98%	FM25224 2	Ladygina และคณะ, 2009
	CTCCCGCCGCATGGCGCCGCGGAATTCGA TTACCGCGCTGCTGGCACAGAGTTAGCCGGTG CTTATTCTGTCGGTAACGTCAAACAGATACGTA TTAGGTAAGTCCCTTCTCCCAACTTAAAGTGC TTTACAATCCGAAGACCTTCTTACACACGCGGC ATGGCTGGATCAGGCTTTGCCCCATTGTCCAATA TTCCCCAC	uncultured gamma proteobacterium	97%	FM25224 2	Ladygina และคณะ, 2009
	TCCCGCCGCATGGCGCCGCGGAATTCGAT TACCGCGCTGCTGGCACAGAGTTAGCCGGTGC ATTCTGTCGGTAACGTCAAACAGATACGTATTA GGTAAGTCCCTTCTCCCAACTTAAAGTGCTTT ACAATCCGAAGACCTTCTTACACACGCGGCATG GCTGGATCAGGCTTTGCCCCATTGTCCAATATT CCCCACTGC	uncultured gamma proteobacterium	97%	FM25224 2	Ladygina และคณะ, 2009

ตาราง ง.2 (ต่อ)

ลำดับที่	ลำดับนิวคลีโอไทด์	ชนิดแบคทีเรีย	Identity	ACCNO	Ref
N7	CTCCCCGCCGCATGGCGGCCGCGGAATTCTGA TTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGA CAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCG TGTGTGAAGAAGGTCTTCGGATTGTAAGCACTT TAAGTTGGGAGGAAGGGCAGTTACCTAATACGTA ATTGTTTTGACGTTACCGACAGAATAAGCACCG	<i>Pseudomonas</i> sp. PG24	99%	KU35061 1	Gkorezis และThijs, ไม่ ตีพิมพ์
	GCTCCCCGCCGCATGGCGGCCGCGGAATTCTG ATTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGG ACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCG GTGTGTGAAGAAGGTCTTCGGATTGTAAGCACT TTAAGTTGGGAGGAAGGGCAGTTACCTAATACGT ATCTGTTTTGACGTTACCGACAGAATAAGCACCG	<i>Pseudomonas</i> sp. ALBL_065	99%	KT86570 1	Bechy Loizeau และคณะ, ไม่ ตีพิมพ์
	TGCTCCCCGCCGCATGGCGGCCGCGGAATTC GATTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTG GACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCCATGCCG CGTGTGTGAAGAAGGTCTTCGGATTGTAAGCAC TTAAGTTGGGAGGAAGGGCAGTTACCTAATACG TAATTGTTTTGACGTTACCGACAGAATAAGCAC	<i>Pseudomonas</i> <i>frederiksbergensis</i>	99%	KU64724 8	Zheng และ คณะ, ไม่ ตีพิมพ์
	GCTCCCCGCCGCATGGCGGCCGCGGAATTCG ATTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGG ACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCG GTGTGTGAAGAAGGTCTTCGGATTGTAAGCACT TTAAGTTGGGAGGAAGGGCAGTTACCTAATACGT AATTGTTTTGACGTTACCGACAGAATAAGCACCG	<i>Pseudomonas</i> sp. R76	99%	KT89030 4	De Vrieze และคณะ, 2015
	GCCATGGCGGCCGCGGAATTCGATTCCTACGG GAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCG AAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGA AGGTCTTCGGATTGTAAGCACTTTAAGTTGGGA GGAAGGGCAGTTACCTAATACGTAATTGTTTTGA CGTTACCGACAGAATAAGCACCG	<i>Pseudomonas</i> <i>frederiksbergensis</i>	99%	KU64724 8	Zheng และ คณะ, ไม่ ตีพิมพ์
	N8	ACGTGCGATGCTCCCCGCCGCATGGCGGCCGC GGGAATTCGATTACCGCGGCTGCTGGCACAGAG TTAGCCGGTGCTTATTCTGTCCGTAACGTCAAAA CAATTACGTATTAGGTAAGTCCCTTCTCCCAA CTTAAAGTGCTTTACAATCCGAAGACCTTCTTCA CACACGCGGCATGGCTGGATCAGGCTTTCGCC	uncultured gamma proteobacterium	98%	FM25224 2
GCTCCCCGCCGCATGGCGGCCGCGGAATTCG ATTACCGCGGCTGCTGGCACAGATTAGCCGGT GCTTATTCTGTCCGTAACGTCAAAACAATTACGT ATTAGGTAAGTCCCTTCTCCCAACTTAAAGTG CTTTACAATCCGAAGACCTTCTTACACACGCGG CATGGCTGGATCAGGCTTTCGCCATTGTCCA		uncultured gamma proteobacterium	98%	FM25224 2	Ladygina และคณะ, 2009

ตาราง ง.2 (ต่อ)

ลำดับที่	ลำดับนิวคลีโอไทด์	ชนิดแบคทีเรีย	Identity	ACCNO	Ref
N8	GCTCCCGCCGCCATGGCGCCCGGGAATTCG ATTACCGCGGCTGCTGGCACAGAGTTAGCCGGT GCTTATTCTGTCGGTAACGTCAAACAATTACGT ATTAGGTAAGTCCCTTCTCCCAACTTAAAGTG CTTTACAATCCGAAGACCTTCTTACACACGCGG CATGGCTGGATCAGGCTTTCGCCATTGTCAA	uncultured gamma proteobacterium	98%	FM25224 2	Ladygina และคณะ, 2009
	TGCTCCCGCCGCCATGGCGCCCGGGAATTC GATTACCGCGGCTGCTGGCACAGAGTTAGCCGG TGCTTATTCTGTCGGTAACGTCAAACAATTACG TATTAGGTAAGTCCCTTCTCCCAACTTAAAGT GCTTTACAATCCGAAGACCTTCTTACACACGCG GCATGGCTGGATCAGGCTTTCGCCATTGTCC	uncultured gamma proteobacterium	98%	FM25224 2	Ladygina และคณะ, 2009
	GCTCCCGCCGCCATGGCGCCCGGGAATTCG ATTACCGCGGCTGCTGGCACAGAGTTAGCCGGT GCTTATTCTGTCGGTAACGTCAAACAATTACGT ATTAGGTAAGTCCCTTCTCCCAACTTAAAGTG CTTTACAATCCGAAGACCTTCTTACACACGCGG CATGGCTGGATCAGGCTTTCGCCATTGTCAA	uncultured gamma proteobacterium	98%	FM25224 2	Ladygina และคณะ, 2009
N9	TGCTCCCGCCGCCATGGCGCCCGGGAATTC GATTACCGCGGCTGCTGGCACAGAGTTAGCCGG TGCTTATTCTGTCGGTAACGTCAAACAGATACG TATTAGGTAAGTCCCTTCTCCCAACTTAAAGT GCTTTACAATCCGAAGACCTTCTTACACACGCG GCATGGCTGGATCAGGCTTTCGCCATTGTCC	<i>Pseudomonas</i> sp. RZ1	100%	KT71081 3	Rocha และ คณะ, 2016
	CTCCCGCCGCCATGGCGCCCGGGAATTCGA TTACCGCGGCTGCTGGCACAGAGTTAGCCGGT CTTATTCTGTCGGTAACGTCAAACAGATACGTA TTAGGTAAGTCCCTTCTCCCAACTTAAAGTGC TTTACAATCCGAAGACCTTCTTACACACGCGGC ATGGCTGGATCAGGCTTTCGCCATTGTCCAAT	<i>Pseudomonas</i> sp. RZ1	100%	KT71081 3	Rocha และ คณะ, 2016
	CCCGCCGCCATGGCGCCCGGGAATTCGATT ATCACTAGTGAATTCGCGCCGCTGCAGGTGCA CCATATGGGAGAGTCCCAACGCTTGGATGCAT AGCTTGAGTATTCTATAGTGCACCTAAATAGCT TGGCGTAATCATGGTCATAGCTGTTTCTGTGTG AAATTGTTATCCGCTCACAATCCACACAACA	uncultured <i>Pseudomonas</i> sp.	100%	FN66622 5	Sayeh และ คณะ, 2010
	CTCCCGCCGCCATGGCGCCCGGGAATTCGA TTACCGCGGCTGCTGGCACAGAGTTAGCCGGT CTTATTCTGTCGGTAACGTCAAACAGATACGTA TTAGGTAAGTCCCTTCTCCCAACTTAAAGTGC TTTACAATCCGAAGACCTTCTTACACACGCGGC ATGGCTGGATCAGGCTTTCGCCATTGTCAA	uncultured gamma proteobacterium	100%	FM25224 2	Ladygina และคณะ, 2009

ตาราง ง.2 (ต่อ)

ลำดับที่	ลำดับนิวคลีโอไทด์	ชนิดแบคทีเรีย	Identity	ACCNO	Ref
N9	TCCCGGCCCATGGCGCCGCGGAATTCGAT TCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATATTGGAC AATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGT GTGTGAAGAAGTCTTCGGATTGTAAGCACTTT AAGTTGGGAGGAAGGCAGTTACCTAATACGTAT CTGTTTTGACGTTACCGACAGAATAAGCACCGGC	<i>Pseudomonas</i> sp. RZ1	100%	KT71081 3	Rocha และ คณะ, 2016
N10	CCCGGCCCATGGCGCCGCGGAATTCGATT ACCGCGGCTGCTGGCACAGAGTTAGCCGGTGT TATTCTGTCGGTAACGTCAAAACAGATAGGTATT CGGTTACTGCCCTTCTCCCACTTAAAGTGCTT TACAATCCGAAGACCTTCTTACACACGCGGCAT GGCTGGATCAGGCTTTCGCCATTGTCCAATA	uncultured gamma proteobacterium	97%	FM25224 2	Ladygina และคณะ, 2009
	GACGTCGCATGCTCCCGCCGCATGGCGCCG CGGAATTCGATTACCGCGGCTGCTGGCACAGA GTTAGCCGGTCTTATTCTGTCGGTAACGTCAAA ACAGATAGGTATTGGTACTGCCCTTCTCCCA ACTTAAAGTGCTTACAATCCGAAGACCTTCTT ACACACGCGGCATGGCTGGATCAGGCTTTCGC	uncultured gamma proteobacterium	97%	FM25224 2	Ladygina และคณะ, 2009
B1	TCCCGGCCCATGGCGCCGCGGAATTCGAT TACCGCGGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGGTGC TTATTTCTCAGGTACCGTCATTAGTGGAGGATAT TAGCCCCACCGTTTCTTCCCTGACAAAAGAGCT TTACAACCCGAAGGCTTCTTCACTCACGCGGCA TTGCTGGATCAGGCTTGCGCCATTGTCCAAAA	uncultured bacterium	100%	KU51506 5	Lu และคณะ ไม่ตีพิมพ์
	TCCCGGCCCATGGCGCCGCGGAATTCGAT TCCTACGGGAGGCAGCAGCCGCGTAATACGCC TACGGGAGGCAGCAGCCGCGTAATACGGGAGC CAGCAGCCGCGTAATACGCTACGGGAGGAGC CAGCCGCGTAATACGGGAGCCAGCAGCCGCGG TAATCACTAGTGAATTGCGGCCGCTGCAGGTC	uncultured bacterium	99%	KU51542 1	Lu และคณะ ไม่ตีพิมพ์
B4	CCCGGCCCATGGCGCCGCGGAATTCGATT CCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATATTGGACA ATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTG TGTGAAGAAGTCTTCGGATTGTAAGCACTTTA AGTTGGGAGGAAGGCAGTTACCTAATACGTATC TGTTTTGACGTTACCGACAGAATAAGCACCGTC	<i>Pseudomonas</i> sp. SR72	99%	KX27967 4	Dominguez และคณะ ไม่ ตีพิมพ์
	GCTCCCGCCCATGGCGCCGCGGAATTCG ATTACCGCGGCTGCTGGCACAGAGTTAGCCGGT GCTTATTCTGTCGGTAACGTCAAAACAATTACGT ATTAGTAACTGCCCTTCTCCCACTTAAAGTG CTTTACAATCCGAAGACCTTCTTACACACGCGG CATGGCTGGATCAGGCTTTCGCCATTGTCCAA	uncultured gamma proteobacterium	98%	FM25224 2	Ladygina และคณะ 2009

ตาราง ง.2 (ต่อ)

ลำดับที่	ลำดับนิวคลีโอไทด์	ชนิดแบคทีเรีย	Identity	ACCNO	Ref
B4	GCTCCCGCCGCCATGGCGCCCGGGAATTCG ATTCTACGGAGGCAGCAGTGGGAATATTGG ACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCCATGCCGC GTGTGTGAAGAAGTCTTCGGATTGTAAGCACT TTAAGTTGGGAGGAAGGGCAGTTACCTAATACGT AATTGTTTTGACGTTACCGACAGAATAAGCAC	<i>Pseudomonas frederiksbergensis</i>	99%	KU29126 0	Jardak และ คณะ ไม่ ตีพิมพ์
	CTCCCGCCGCCATGGCGCCCGGGAATTCGA TTACCGCGGCTGCTGGCACGGAGTTAGCCGATC CTTATTCTTCGGTACATTAGCTATCTACACGT AGATAGTTTTATTCCCGAATAAAGCAGTTTACG ACCCAGAGGGCTGTCTTCTGCACGCGCATGG CTGGTTCAGAGTTGCCTCCATTGACCAATATTC	uncultured gamma proteobacterium	98%	FM25224 2	Ladygina และคณะ 2009
B5	GCTCCCGCCGCCATGGCGCCCGGGAATTCG ATTACCGGGCTGCTGGCACAGAGTTAGCCGGT GCTTATTCTGTCGGTAACGTCAAACAATTACGT ATTAGTAACTGCCCTTCTCCCACTTAAAGTG CTTTACAATCCGAAGACCTTCTCACACGCGG CATGGCTGGATCAGGCTTTCGCCATTGTCCAA	uncultured gamma proteobacterium	98%	FM25224 2	Ladygina และคณะ 2009
	CTCCCGCCGCCATGGCGCCCGGGAATTCGA TTCCTACGGAGGCAGCAGTGGGAATATTGGA CAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCG TGTGTGAAGAAGTCTTCGGATTGTAAGCACTT TAAGTTGGGAGGAAGGGCAGTTACCTAATACGTA ATTGTTTTGACGTTACCGACAGAATAAGCACCGG	<i>Pseudomonas frederiksbergensis</i>	99%	KU29126 0	Jardak และ คณะ ไม่ ตีพิมพ์
	TCCCGCCGCCATGGCGCCCGGGAATTCGAT TACCGGGCTGCTGGCACAGAGTTAGCCGGTGC TTATTCTGTCGGTAACGTCAAACAATTACGTAT TAGGTAACCTGCCCTTCTCCCACTTAAAGTGCT TTACAATCCGAAGACCTTCTCACACGCGGCA TGGCTGGATCAGGCTTTCGCCATTGTCCAATA	uncultured gamma proteobacterium	98%	FM25224 2	Ladygina และคณะ 2009
	CTCCCGCCGCCATGGCGCCCGGGAATTCGA TTCCTACGGAGGCAGCAGTGGGAATATTGGA CAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCG TGTGTGAAGAAGTCTTCGGATTGTAAGCACTT TAAGTTGGGAGGAAGGGCAGTTACCTAATACGTA ATTGTTTTGACGTTACCGACAGAATAAGCACCGG	<i>Pseudomonas frederiksbergensis</i>	99%	KU29126 0	Jardak และ คณะ ไม่ ตีพิมพ์
B6	TCCCGCCGCCATGGCGCCCGGGAATTCGAT TCCTACGGAGGCAGCAGTAGGGAATATTGGAC AATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGT GTGTGAAGAAGTCTTCGGATTGTAAGCACTTT AAGTTGGGGGAAGGGCAGTTACCTAATACGTAT CTGTTTTGACGTTACCGACAGAATAAGCACCGG	<i>Pseudomonas</i> sp. SR72	98%	KX27967 4	Dominguez และคณะ ไม่ ตีพิมพ์

ตาราง ง.2 (ต่อ)

ลำดับที่	ลำดับนิวคลีโอไทด์	ชนิดแบคทีเรีย	Identity	ACCNO	Ref
B6	CTCCCGCCGCATGGCGCCGCGGAATTCGA TTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATATTGGA CAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCG TGTGTGAAGAAGGTCTTCGGATTGTAAGCACTT TAAGTTGGGAGGAAGGGCAGTTACCTAATACGTA TCTGTTTTGACGTTACCGACAGAATAAGCACCG	<i>Pseudomonas</i> sp. SR72	99%	KX27967 4	Dominguez และคณะ ไม่ ตีพิมพ์
	TCCCGCCGCATGGCGCCGCGGAATTCGAT TACCGCGGCTGCTGGCACAGATTAGCCGGTGC TTATTCTGTGGTAACGTCAAACAGATACGTAT TAGGTAACCTGCCCTTCTCCCAACTAAAGTGCT TTACAATCCGAAGACCTTCTTACACACGCGGCA TGGCTGGATCAGGCTTTCGCCATTGTCCAATA	uncultured gamma proteobacterium	97%	FM25224 2	Ladygina และคณะ 2009
	CCCGCCGCATGGCGCCGCGGAATTCGATT CCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATATTGACA ATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTG TGTGAAGAAGGTCTTCGGATTGTAAGCACTTTA AGTTGGGAGGAAGGGCAGTTACCTAATACGTATC TGTTTTGACGTTACCGACAGAATAAGCACCGCT	<i>Pseudomonas</i> sp. SR72	99%	KX27967 4	Dominguez และคณะ ไม่ ตีพิมพ์
B7	CCCGCCGCATGGCGCCGCGGAATTCGATT CCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATATTGACA ATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTG TGTGAAGAAGGTCTTCGGATTGTAAGCACTTTA AGTTGGGAGGAAGGGCAGTTACCTAATACGTATC TGTTTTGACGTTACCGACAGAATAAGCACCGCT	<i>Pseudomonas</i> sp. SR72	99%	KX27967 4	Dominguez และคณะ ไม่ ตีพิมพ์
	GCTCCCGCCGCATGGCGCCGCGGAATTCG ATTCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATATTGG ACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCG GTGTGTGAAGAAGGTCTTCGGATTGTAAGCACT TTAAGTTGGGAGGAAGGGCAGTTACCTAATACGT ATCTGTTTTGACGTTACCGACAGAATAAGCACCG	<i>Pseudomonas</i> sp. SR72	99%	KX27967 4	Dominguez และคณะ ไม่ ตีพิมพ์
	GCTCCCGCCGCATGGCGCCGCGGAATTCG ATTCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATATTGG ACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCG GTGTGTGAAGAAGGTCTTCGGATTGTAAGCACT TTAAGTTGGGAGGAAGGGCAGTTACCTAATACGT ATCTGTTTTGACGTTACCGACAGAATAAGCACCG	<i>Pseudomonas</i> sp. SR72	99%	KX27967 4	Dominguez และคณะ ไม่ ตีพิมพ์
B8	CTCCCGCCGCATGGCGCCGCGGAATTCGA TTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATATTGGA CAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCG TGTGTGAAGAAGGTCTTCGGATTGTAAGCACTT TAAGTTGGGAGGAAGGGCAGTTACCTAATACGTA TCTGTTTTGACGTTACCGACAGAATAAGCACCGG	<i>Pseudomonas</i> sp. SR72	99%	KX27967 4	Dominguez และคณะ ไม่ ตีพิมพ์

ตาราง ง.2 (ต่อ)

ลำดับที่	ลำดับนิวคลีโอไทด์	ชนิดแบคทีเรีย	Identity	ACCNO	Ref
B8	CCC GGCCGCCATGGCGCCGCGGGAATTCGATT CCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATATTGGACA ATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTG TGTGAAGAAGTCTTCGGATTGTAAGCACTTTA AGTTGGGAGGAAGGGCAGTTACCTAATACGTATC TGTTTTGACGTTACCGACAGAATAAGCACCGGC	<i>Pseudomonas</i> sp. SR72	99%	KX27967 4	Dominguez และคณะ ไม่ ตีพิมพ์
	CTCCCGCCGCCATGGCGCCGCGGGAATTCGA TTCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATATTGGA CAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCG TGTGTGAAGAAGTCTTCGGATTGTAAGCACTT TAAGTTGGGAGGAAGGGCAGTTACCTAATACGTA TCTGTTTTGACGTTACCGACAGAATAAGCACCG	<i>Pseudomonas</i> sp. SR72	99%	KX27967 4	Dominguez และคณะ ไม่ ตีพิมพ์
B9	TCCCGCCGCCATGGCGCCGCGGGAATTCGAT TACCGCGGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGAGAC TTATTCTGGGATACTGCTTTTCATCTCCCA GAAAAGCACTTACGACCCGAAGGCCTTCATCGT GCACGCGCGTGTGTCATCAGGCTTCGCCCAT TGTGCAATATTCCTACTGCTGCTCCCGTAGG	uncultured soil bacterium	100%	EU09731 5	Shivaji และ Singh ไม่ ตีพิมพ์
	GCTCCCGCCGCCATGGCGCCGCGGGAATTCG ATTCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATCTTGC GCAATGCGGAAAGCGTGACGCAGCAACGCCGC GTGGGGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAACCCC TTTCAGGAGGACGAAGGTGTGGCGTTAATAG CCGACCGCACTGACGGTACCTCCACAAGAAGCC CCG	uncultured bacterium	99%	KU92967 2	Xiao และ คณะ ไม่ ตีพิมพ์
	CTCCCGCCGCCATGGCGCCGCGGGAATTCGA TTACCGCGGCTGCTGGCACGGAGTTAGCCGGTG CTTCTCACCCGGTACCGTCAGGCTCGATTAATC GAGCTATTCGTCGGGCAACAGTGGTTTACACT CCGAAGAGCTTCATCCACACGCGCGTTCGCTG CGTCAGCCGTTAGGCCATTGCGCAAGATTCCTCA	uncultured bacterium	100%	KU93038 3	Xiao และ คณะ ไม่ ตีพิมพ์
B10	TCCCGCCGCCATGGCGCCGCGGGAATTCGAT TACCGCGGCTGCTGGCACAGAGTTAGCCGGTGC TTATTCTGTCGGTAACGTCAAACAGATACGTAT TAGGTAACCTCCCTCCTCCCAACTAAAGTGCT TTACAATCCGAAGACCTTCTTACACACGCGGCA TGCTGGATCAGGCTTTCGCCATTGTCCAAT	uncultured gamma proteobacterium	97%	FM25224 2	Ladygina และคณะ 2009

ตาราง ง.3 การวิเคราะห์น้ำมันดีเซลที่เหลืออยู่ในระบบนิเวศจำลองดินแอนตาร์กติกที่เติมน้ำมันดีเซล 1% (น้ำหนัก/น้ำหนัก) ชุด abiotic control โดย GC-FID

ระยะเวลา	น้ำมันดีเซลที่เหลืออยู่ (%)			ค่าเฉลี่ย
	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	
15 วัน	101.62	94.18	92.38	96.06±4.8
30 วัน	100.29	98.37	99.33	99.33±1.3
75 วัน	96.75	*	98.78	97.77±1.4
90 วัน	99.34	96.37	*	97.86±2.1
120 วัน	91.44	*	98.80	95.12±5.2

* มีค่าความคลาดเคลื่อนสูงจึงไม่สามารถนำมาคำนวณได้

ตาราง ง.4 การวิเคราะห์น้ำมันดีเซลที่เหลืออยู่ในระบบนิเวศจำลองดินแอนตาร์กติกที่เติมน้ำมันดีเซล 1% (น้ำหนัก/น้ำหนัก) ชุด natural attenuation โดย GC-FID

ระยะเวลา	น้ำมันดีเซลที่เหลืออยู่ (%)			ค่าเฉลี่ย
	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	
15 วัน	63.60	68.79	*	66.20±3.6
30 วัน	60.53	72.04	*	66.29±8.1
75 วัน	36.80	31.63	42.74	37.05±5.5
90 วัน	27.04	32.64	*	29.84±5.5
120 วัน	25.45	*	30.81	28.13±3.7

* มีค่าความคลาดเคลื่อนสูงจึงไม่สามารถนำมาคำนวณได้

ตาราง ง.5 การวิเคราะห์น้ำมันดีเซลที่เหลืออยู่ในระบบนิเวศจำลองดินแอนตาร์กติกที่เติมน้ำมันดีเซล 1% (น้ำหนัก/น้ำหนัก) ชุด biostimulation โดย GC-FID

ระยะเวลา	น้ำมันดีเซลที่เหลืออยู่ (%)			ค่าเฉลี่ย
	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	
15 วัน	*	53.01	55.64	54.33±1.8
30 วัน	44.65	42.06	*	43.36±6.8
75 วัน	29.01	27.30	*	28.15±1.2
90 วัน	27.66	28.82	*	28.24±0.8
120 วัน	24.54	*	21.95	23.25±1.8

* มีค่าความคลาดเคลื่อนสูงจึงไม่สามารถนำมาคำนวณได้

ตาราง ง.6 การวิเคราะห์น้ำมันดีเซลที่เหลืออยู่ในระบบนิเวศจำลองดินแอนตาร์กติกที่เติมน้ำมันดีเซล 3% (น้ำหนัก/น้ำหนัก) ชุด abiotic control โดย GC-FID

ระยะเวลา	น้ำมันดีเซลที่เหลืออยู่ (%)			ค่าเฉลี่ย
	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	
30 วัน	85.72	84.40	73.44	81.19±6.7
90 วัน	94.15	94.67	77.95	88.92±9.5
150 วัน	88.74	99.66	81.21	89.87±9.2
210 วัน	84.19	78.96	106.93	90.2±2.8

* มีค่าความคลาดเคลื่อนสูงจึงไม่สามารถนำมาคำนวณได้

ตาราง ง.7 การวิเคราะห์น้ำมันดีเซลที่เหลืออยู่ในระบบนิเวศจำลองดินแอนตาร์กติกที่เติมน้ำมันดีเซล 3% (น้ำหนัก/น้ำหนัก) ชุด natural attenuation โดย GC-FID

ระยะเวลา	น้ำมันดีเซลที่เหลืออยู่ (%)			ค่าเฉลี่ย
	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	
30 วัน	96.50	90.46	*	93.48±4.2
90 วัน	78.71	66.48	*	72.59±8.6
150 วัน	56.16	*	51.35	53.75±3.3
210 วัน	25.46	22.46	17.38	21.77±4

* มีค่าความคลาดเคลื่อนสูงจึงไม่สามารถนำมาคำนวณได้

ตาราง ง.7 การวิเคราะห์น้ำมันดีเซลที่เหลืออยู่ในระบบนิเวศจำลองดินแอนตาร์กติกที่เติมน้ำมันดีเซล 3% (น้ำหนัก/น้ำหนัก) ชุด biostimulation โดย GC-FID

ระยะเวลา	น้ำมันดีเซลที่เหลืออยู่ (%)			ค่าเฉลี่ย
	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	
30 วัน	75.45	60.23	95.68	77.12±17.7
90 วัน	63.31	48.89	63.97	58.72±8.5
150 วัน	48.61	41.56	63.75	51.31±11.3
210 วัน	30.32	30.67	21.14	27.38±5.4

* มีค่าความคลาดเคลื่อนสูงจึงไม่สามารถนำมาคำนวณได้

ตาราง ง.8 ประสิทธิภาพการย่อยสลายองค์ประกอบของน้ำมันดีเซลของแบคทีเรียสายพันธุ์บริสุทธิ์ *Pseudomonas* sp. SP1 ในระยะเวลา 14 วัน

ไฮโดรคาร์บอน	ประสิทธิภาพการย่อยสลาย (%)			ค่าเฉลี่ย
	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	
น้ำมันดีเซล 0.25%	100	100	100	100±0
พีแชนทริน 50 ppm	50.39	46.27	51.08	49.25±2.5
เตตระเดเคน 500 ppm	48.36	75.19	*	61.77±18.9
เฮกซะเดเคน 500 ppm	42.88	56.71	*	49.8±9.7

* มีค่าความคลาดเคลื่อนสูงจึงไม่สามารถนำมาคำนวณได้

ตาราง ง.9 ประสิทธิภาพการย่อยสลายองค์ประกอบของน้ำมันดีเซลของแบคทีเรียสายพันธุ์บริสุทธิ์ *Sphingomonas* sp. SP2 ในระยะเวลา 14 วัน

ไฮโดรคาร์บอน	ประสิทธิภาพการย่อยสลาย (%)			ค่าเฉลี่ย
	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	
น้ำมันดีเซล 0.25%	100	100	100	100±0
พีแชนทริน 50 ppm	29.29	21.48	28.74	26.5±4.3
เตตระเดเคน 500 ppm	96.87	98.23	98.41	97.84±0.8
เฮกซะเดเคน 500 ppm	86.47	97.97	93.23	92.56±5.78

* มีค่าความคลาดเคลื่อนสูงจึงไม่สามารถนำมาคำนวณได้

ตาราง ง.10 ประสิทธิภาพการย่อยสลายองค์ประกอบของน้ำมันดีเซลของแบคทีเรียสายพันธุ์บริสุทธิ์ *Pseudomonas* sp. SP3 ในระยะเวลา 14 วัน

ไฮโดรคาร์บอน	ประสิทธิภาพการย่อยสลาย (%)			ค่าเฉลี่ย
	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	
น้ำมันดีเซล 0.25%	100	100	100	100±0
พีแชนทริน 50 ppm	36.88	31.96	42.18	37.00±5.11
เตตระเดเคน 500 ppm	96.68	96.83	95.61	96.37±0.66
เฮกซะเดเคน 500 ppm	36.95	51.16	55.96	48.03±9.88

ตาราง ง.11 ประสิทธิภาพการย่อยสลายองค์ประกอบของน้ำมันดีเซลของแบคทีเรียสายพันธุ์บริสุทธิ์ *Pseudomonas* sp. EN1 ในระยะเวลา 14 วัน

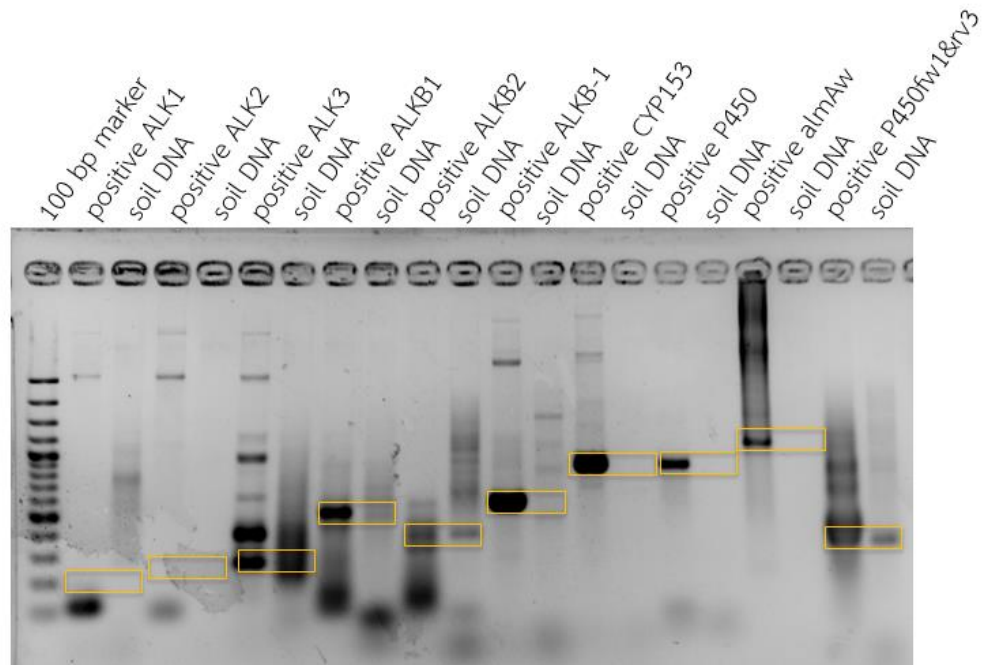
ไฮโดรคาร์บอน	ประสิทธิภาพการย่อยสลาย (%)			ค่าเฉลี่ย
	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	
น้ำมันดีเซล 0.25%	100	100	100	100±0
พีแนทรีน 50 ppm	19.41	15.18	22.95	19.18±3.89
เตตระเดเคน 500 ppm	100	100	100	100±0
เฮกซะเดเคน 500 ppm	72.88	74.71	*	73.52±0.91

* มีค่าความคลาดเคลื่อนสูงจึงไม่สามารถนำมาคำนวณได้

ตาราง ง.12 ประสิทธิภาพการย่อยสลายองค์ประกอบของน้ำมันดีเซลของแบคทีเรียสายพันธุ์บริสุทธิ์ *Pseudomonas* sp. EN2 ในระยะเวลา 14 วัน

ไฮโดรคาร์บอน	ประสิทธิภาพการย่อยสลาย (%)			ค่าเฉลี่ย
	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	
น้ำมันดีเซล 0.25%	100	100	100	100±0
พีแนทรีน 50 ppm	77.31	77.27	76.78	77.11±0.29
เตตระเดเคน 500 ppm	100	100	100	100±0
เฮกซะเดเคน 500 ppm	89.86	82.46	86.48	86.26±3.7

ภาคผนวก จ รูปเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส



รูป จ.1 ผลิตภัณฑ์ PCR ด้วย 10 คู่ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีนย่อยสลายอะลิฟาติกไฮโดรคาร์บอนของแบคทีเรียประจำถิ่นในดินแอนตาร์กติก

*หมายเหตุ positive คือ recombinant plasmid ของกลุ่มแบคทีเรีย ของนางสาวปิยะนุช อยู่กล้า

ภาคผนวก ฉ ลำดับนิวคลีโอไทด์

แบคทีเรียสายพันธุ์บริสุทธิ์ SP1

GTCCTCCCGAAGGTTAGACTAGCTACTTCTGGTGCAACCCACTCCCATGGTGTGACGGGCGGTG
 TGTACAAGGCCCGGGAACGTATTCACCGCGACATTCTGATTCGCGATTACTAGCGATTCCGACT
 TCACGCAGTCGAGTTGCAGACTGCGATCCGGACTACGATCGGTTTTCTGGGATTAGCTCCACCT
 CGCGGCTTGGCAACCCTCTGTACCGACCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCAGGCCGTAAGGGCCA
 TGATGACTTGACGTCATCCCCACCTTCTCCGGTTTGTACCGGCAGTCTCCTTAGAGTGCCCA
 CCATTACGTGCTGGTAACTAAGGACAAGGGTTGCGCTCGTTACGGGACTTAACCCAACATCTCA
 CGACACGAGCTGACGACAGCCATGCAGCACCTGTCTCAATGTTCCCGAAGGCACTCCGCTATCT
 CTAGCAGATTCATTGGATGTCAAGGCCTGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCTTCGAATTAACCCACA
 TGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCGTCAATTCATTTGAGTTTTAACCTTGCGGCCGAAATCCC
 CAGGGCGGGTCAACTTAATGCGTTAGCTGCGCCACTAAGAGCTCAAGGCTCCCAACGGCTAGTT
 GACATCCCTCCCACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGCTCCCCACGCTTTCGCA
 CCTCAGTGTGAGTATCAGTCCAGGTGGTCGCCTTCGCCACTGGTGTTCCTTCTATATCTACGC
 ATTTACCGCTACACAGGAAATTCACCACCCTCTACCATACTCTAGCTCGTCAGTTTGAATGC
 AGTTCCCAGGTTGAGCCCGGGGATTTACATCCAACTTAACGAACCACCTACGCGCGCTTACG
 CCCAGTAATTCCGATTAACGCTTGACCCCTCTGTATTACCGCGGCTGCTGGCACAGAGTTAGCC
 GGTGCTTATTCTGTGCGTAACGTCAAACAATTACGTATTAGGTAAGTCCCTTCTCCCAACTT
 AAAGTGCTTTACAATCCGAAGACCTTCTTACACACGCGGCATGGCTGGATCAGGCTTTCGCCC
 ATTGTTCCAATATTCCTCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGACCGTGTCTCAGTTCCAGTGTG
 ACTGATCATCCTCTCAGACCAGTTACGGATCGTCGCCTTGGTGAGCCATTACCTCACCAACTAG
 CTAATCCGACCTAGGCTCATCTGATAGCGCAAGGCCCGAAGGTCCCCTGCTTTCTCCCGTAGGA
 CGTATGCGGTATTAGCGTCCGTTTCCGAGCGTTATCCCCACTACCCGGGCAGATTCTAAGGC
 ATTACTTAACCCGTCGACCGCTCGCCACCCAGGGTACAAGTAACCCGTTGCCTGCCACCTCAA
 ACTTTGCATTGTGTTTAAGGCCCTGCCCCCAAGCGTTTTTAATCCTGAAGCCAATGAATCAA
 AACCTCTACAAGGTGGTGGTGGTGTGATTGTATGTGTGTGGTGGTTCGTCGGCTGCAGTCTC
 GTGTTCTCGAGTAGTATGTGAA

แบคทีเรียสายพันธุ์บริสุทธิ์ SP2

ACCATTTTTTTCCTTTAGTTTTGCGGATGGGTTTGCAGGGAAC TGGGTTACCTTGTTACGACTTCA
CCCCAGTCGCTAAACCCACCGTGGTCGCCTGCCTCTCATTGCTGAGTTAGCGCAACGCCTTCGG
GTGAATCCAAC TCCCATGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCTGGGAACGTATTCACCGCG
GCATGCTGATCCGCGATTACTAGCGATTCCGCCTTCATGCTCTCGAGTTGCAGAGAACAATCCG
AACTGAGACGGCTTTTGGAGATTAGCTCACACTCGCGTGCTTGCTGCCACTGTCACCGCCATT
GTAGCACGTGTGTAGCCAGCGCGTAAGGGCCATGAGGACTTGACGTCATCCCCACCTTCTCTCC
GGCTTATCACCGGCGGTTACCTTAAAGTGCCCAACTAAATGATGGCAACTAAGGTCGAGGGTTG
CGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAGCCATGCAGCACCTG
TGTGCAGGTCCCCGAAGGGAAGAAATCTGTCTCCAGAAGTCGTCTGCCATGTCAAACGCTGGT
AAGGTTCTGCGCGTTGCTTCAATTAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCAGGCCCCCGTCAAT
TCATTTGAGTTTTAACCTTGCGGCCGAAC TCCCAGGGCCGGAAAAC TTAATGCGTTAGCTGCG
CCACCCAAACACCAAGTGTCCGGACAGGCTAGTTATCATTGTTTTACGGCGTGGACTACCAGGG
TATCTAATCCTGTTTGCTCCCCACGCTTTTCGCACCTCAGCGTCAATACATGTCCAGTCAGCCGC
CTTCGCCACTGGTGTCTTCCGAATATCTACGAATTTACCTCTACACTCGGAATTCCTACTGACC
TCTCCATGATTCAAGCGATGCAGTCTAAAAGGCAATTCAGAGTTGAGCTCTGGGCTTTACCT
CTTACTTACAAAGCCGCCTACGTGCGCTTTACGCCAGTAATTCGAATAACGCTAGCTCCCTC
CGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGGAGTTAGCCGGAGCTTATTCTCCCGGTACTGTCATTATCA
TCCCGGGTAAAAGAGCTTTACAACCCTAAGGCCTTCATCACTCACGCGGCATTGCTGGATCAGG
CTTTCGCCATTGTCCAATATTCCTACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGGCCGTGTCTCAGT
CCCAGTGTGGCTGATCATCCTCTCAGACCAGCTAAGGATCGTCGGCTTGGTGCGCCTTTACCAC
ACCAACTACCTAATCCTACGCGGGCTCATCCCTCGGCGATAAATCTTTGGACTTACGTCGTCAT
CCGGTATTAGCAGTCGTTTTCCAAC TGTATTCCGAACCAAGGGGCAGATTCACCGCGTTACGC
ACCCGTGCGCCACTAACTACCCGAAGGTAATTCGTTTCGACTTGATGTGTTAGGCATGCCGCCA
GCGTTCATTCTGAGCCATGATCCAAACTCTAAAGCGGGGGGGTGGGGTGTGAGGTGTGTGGG
GGGTTGTTCTGGGTTGTTTCGCGTTGTTTGTGCTTGGT

แบบที่เรียสายพันธุ์บริสุทธิ์ SP3

CGGGGGTTTTCCCTGTACGACTTCACCCCAGTCATGAATCACACCGTGGTAACCGTCCTCCCGAA
GGTTAGACTAGCTACTTCTGGTGCAACCCACTCCCATGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCC
CGGGAACGTATTCACCGCGACATTCTGATTCGCGATTACTAGCGATTCCGACTTCACGCAGTCG
AGTTGCAGACTGCGATCCGGACTACGATCGGTTTTCTGGGATTAGCTCCACCTCGCGGCTTGGC
AACCTCTGTACCGACCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCAGGCCGTAAGGGCCATGATGACTTGA
CGTCATCCCCACCTTCTCCGGTTTGTACCGGCAGTCTCCTTAGAGTGCCCACCATGACGTGC
TGTAACCTAAGGACAAGGGTTGCGCTCGTTACGGGACTTAACCCAAC ATCTCACGACACGAGCT
GACGACAGCCATGCAGCACCTGTCTCAATGTTCCCGAAGGCACTCCGCTATCTCTAGCAGATTC
ATTGGATGTCAAGGCCTGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCTTCGAATTAACCACATGCTCCACCGC
TTGTGCGGGCCCCGTCAATTCATTTGAGTTTTAACAAAGTCCGGCCGTACTCCCCAGGCGGTCA
ACTTAATGCGTTAGCTGCGCCACTAAGAGCTCAAGGCTCCCAACGGCTAGTTGACATCTCCGTT
CACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGTCCCCACGCTTTCGCACCTCAGTGTCA
GTATCAGTCCAGGTGGTCGCCTTCGCCACTGGTGTTCCTTCTATATCTACGCATTTACCGCT
ACACAGGAAATTCCACCACCCTCTACCATACTCTAGCTTGACAGTTTTGAATGCAGTTCACAGG
TTGAGCCCCGGGATTTACATCCAACCTTAACAAACCACCTACGCGCGCTTTACGCCAGTAATT
CCGATTAACGCTTGCACCCTCTGTATTACCGCGGCTGCTGGCACAGAGTTAGCCGGTGCTTATT
CTGTGCGTAACGTCAAAACAGATACGTATTAGGTAACCTGCCCTTCTCCCAACTTAAAGTGCTT
TACAATCCGAAGACCTTCTTCCACACACGCGGCATGGCTGGATCAGGCTTTCGCCCATTTGCCAA
TATTCCCCACTGCTGCCCTCCCGTAGGAGTCTGGACCGTGTCTCAGTTCCAGTGTGACTGATCAT
CCTCTCAGACCAGTTACGGATCGTCGCCTTGGTGAGCCATTACCCACCAACTAGCTAATCCGA
CCTAGGCTCATCTGATAGCGCAAGGCCCGAAGGTCCCCTGCTTCTCCCGTAGGACGTATGCGG
TATTAGCGTCCGTTTTCCGAACGTTATCCCCACTACCAGGCAGATTCCTAGGCATTACTCACCC
GTCCGCCGCTCGCCACCAGGTACAAGTACCCGTGCTGCCGCTCGACTTGATGTGTTAGGCCTG
CCGCCAGCGTTCAATCTGAGCTGGTCCCAAAACCTATAAAGGGCAAAAAAAAAACAATTAAAAA
ATCCATAATACTTTAT

แบบที่เรียสายพันธุ์บริสุทธิ์ EN1

GTTGGTTACCCTTGTACGACTTCACCCCAGTCATGAATCACACCGTGGTAACCGTCCCCCGAA
GGTTAGACTAGCTACTTCTGGTGCAACCCACTCCCATGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCC
CGGGAACGTATTACCGCGACATTCTGATTCGCGATTACTAGCGATTCCGACTTCACGCAGTCG
AGTTGCAGACTGCGATCCGGACTACGATCGGTTTTCTGGGATTAGCTCCACCTCGCGGCTTGGC
AACCTCTGTACCGACCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCAGGCCGTAAGGGCCATGATGACTTGA
CGTCATCCCCACCTTCCTCCGGTTTGTACCGGCAGTCTCCTTAGAGTGCCACCATGACGTGC
TGTAAC TAAGGACAAGGGTTGCGCTCGTTACGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCT
GACGACAGCCATGCAGCACCTGTCTCAATGCTCCCGAAGGCACTCCGCCATCTCTGGCAGATTC
ATTGGATGTCAAGGCCTGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCTTCGAATTAACCACATGCTCCACCGC
TTGTGCGGGCCCCGTCAATTCATTTGAGTTTTAACGGTTTTGCGGCCGATACTCCCAGGCGG
TCAACTTAATGCGTTAGCTGCGCCACTAAGAGCTCAAGGCTCCCAACGGCCTAGTTGACATCGT
TTACCGGCCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGCTCCCCACGTTTTCGCACCTCAGTG
TCAGTATCAGTCCAGGTGGTCGCTTCGCCACTGGTGTTCTTCCTATATCTACGCATTTACC
GCTACACAGGAAATTCACCACCCTCTACCATACTTAGCTTGCCAGTTTTGCATGCAGTTCCC
AGGTTGAGCCCGGGGATTTACATTCAACTTAACAAACCACCTACGCGCGCTTTACGCCAGTA
ATTCCGATTAACGCTTGACCCCTCTGTATTACCGCGGCTGCTGGCACAGAGTTAGCCGGTGCTT
ATTCTGTGCGTAACGTCAAAACAGATACGTATTAGGTAAC TGCCCTTCCTCCCAACTTAAAGTG
CTTTACAATCCGAAGACCTTCTTCACACACGCGGCATGGCTGGATCAGGCTTTCGCCATTGTC
CAATATTCCCCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGACCGTGTCTCAGTTCCAGTGTGACTGAT
CATCCTCTCAGACCAGTTACGGATCGTCGCCTTGGTGAGCCATTACCCACCAACTAGCTAATC
CGACCTAGGCTCATCTGATAGCGCAAGGCCCGAAGGTCCCCTGCTTCTCCCGTAGGACGTATG
CGGTATTAGCGTCCGTTTCCGAGCGTTATCCCCACTACCAGGCAGATTCTAGGCATTACTCA
CCCGTCCGCCGCTCGCCACCAGGTACAAGTACCCGTGCTGCCGCTCGACTTGCATGTGTTAGGC
CTGCCGCCAGCGTTCAATCTGAGCCATGATCCAAACTCTAAAGGGGGAACCAGATCGTGGGGG
GTGTATTTGGTGTT

แบคทีเรียสายพันธุ์บริสุทธิ์ EN2

ATGGTTACCTTGTTACGACTTCACCCAGTCATGAATCACACCGTGGTAAACCGTCCCTCCCGA
AGGTTAGACTAGCTACTTCTGGTGCAACCCACTCCCCATGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGG
CCCGGGAACGTATTCACCGCGACATTCTGATTCGCGATTACTAGCGATTCCGACTTCACGCAGT
CGAGTTGCAGACTGCGATCCGGACTACGATCGGTTTTCTGGGATTAGCTCCACCTCGCGGCTTG
GCAACCCTCTGTACCGACCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCAGGCCGTAAGGGCCATGATGACTT
GACGTCATCCCCACCTTCCTCCGGTTTGTACCGGCAGTCTCCTTAGAGTGCCCACCATTACGT
GCTGGTAACTAAGGACAAGGGTTGCGCTCGTTACGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAG
CTGACGACAGCCATGCAGCACCTGTCTCAATGTTCCCGAAGGCACTCCGCTATCTCTAGCAGAT
TCATTGGATGTCAAGGCCTGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCTTAGAATTAACCACATGCTCCACC
GCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCATTTGAGTTTTAACAGTATGCGGCCGGACTCCCAAGGGC
GGTCAACTTAATGCGTTAGCTGCGCCACTAAAGAGCTCCAAGGCTCCCCAACGGCCTAGTTAAC
ATCGTTCACGAGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGCTCCCCACGCTTTTCGCACCTC
AGTGTCAAGTATCAGTCCAGGTGGTCGCTTCGCCACTGGTGTTCCTTCTATATCTACGCATTT
CACCGCTACACAGGAAATTCACCACCCTCTACCATACTCTAGCTCGTCAGTTTTGAATGCAGT
TCCCAGGTTGAGCCCGGGATTTACATCCAACCTAACGAACCACCTACGCGCGCTTTACGCC
AGTAATCCGATTAACGCTTGACCCCTCTGTATTACCGCGGCTGCTGGCACAGAGTTAGCCGGT
GCTTATTCTGTGCGTAACGTCAAAACAATTACGTATTAGGTAAGTCCCTTCTCCCAACTTAAA
GTGCTTTACAATCCGAAGACCTTCTTCACACACGCGGCATGGCTGGATCAGGCTTTTCGCCATT
GTCCAATATTCCCCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGACCGTGTCTCAGTTCCAGTGTGACT
GATCATCCTCTCAGACCAGTTACGGATCGTCGCCTTGGTGAGCCATTACCTCACCAACTAGCTA
ATCCGACCTTAGGCTCATCTGATAGCGCAAGGCCCGAAGGTCCCCTGCTTTTCTCCTCGTACG
ACGTATGCGGGTATTAGCGGTCCGTTTTCCGAGCGGTTATCCCCCACTACCCAGGGCAGATTC
CCTAAGGCATTTACTTCACCCCGATCCGGCCGCTTCGGCCACCCAGGGTACAAAGATACCCCGG
TGCTGCCCCGCTTCGAACTTTGCCATGGTGTAAAGGCCCTGCCCGCCAGCGGTTTTCAAATCT
TGAAGCCCATGGATTCT

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวศุภิกา แหวนทองคำ เกิดเมื่อวันที่ 5 เมษายน พ.ศ. 2534 สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยในปีการศึกษา 2556 และได้เข้าศึกษาต่อในระดับปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต หลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยในปีการศึกษา 2557

บทความวิจัยที่ตีพิมพ์ในรายงานการประชุมวิชาการระดับนานาชาติ

Waenthongkham, S., Muangchinda, C., Chavanich, S., และ Pinyakong, O. (2015). Assessment of diesel oil biodegradation potential in Antarctic soil. The 1st International Conference on Environment, Livelihood and Services: Environment for Life. 25 November 2015, Bangkok, Thailand (Poster presentation, proceeding)