การแยกและลักษณะสมบัติของแบคทีเรียที่มีสมบัติในการเกาะติดและย่อยสลายไพรีนจากปุ๋ยหมักใบพืชตระกูลถั่ว

นางสาวทิมากร แสงดำ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2547

ISBN 974-53-1588-5

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF ADHERENT PYRENE-DEGRADING BACTERIA FROM LEGUMINOUS PLANT LEAVES COMPOST

Miss Timakorn Sangdam

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Sciences in Industrial Microbiology

Department of Microbiology
Faculty of Science
Chulalongkorn University

Academic Year 2004

ISBN 974-53-1588-5

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การแยกและลักษณะสมบัติของแบคทีเรียที่มีสมบัติในการเกาะติดและย่อยสลายไพรีนจากปุ๋ยหมักใบพืชตระกูลถั่ว
โดย	นางสาวทิมากร แสงดำ
สาขาวิชา	จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม
อาจารย์ที่ปรึกษา	รองศาสตราจารย์ ดร.กาญจณา จันทองจีน

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

.....คณบดีคณะวิทยาศาสตร์

(ศาสตราจารย์ ดร.เปี่ยมศักดิ์ เมนะเศวต)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุเทพ ธนียวัน)

.....อาจารย์ที่ปรึกษา

(รองศาสตราจารย์ ดร.กาญจณา จันทองจีน)

.....กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร.ไพเราะ ปิ่นพานิชการ)

.....กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.กอบชัย ภัทรกุลวณิชย์)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ทิมากร แสงดำ: การแยกและลักษณะสมบัติของแบคทีเรียที่มีสมบัติในการเกาะติดและย่อยสลายไพรีนจากปุ๋ยหมักใบพืชตระกูลถั่ว (ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF ADHERENT PYRENE-DEGRADING BACTERIA FROM LEGUMINOUS PLANT LEAVES COMPOST) อ.ที่ปรึกษา: รองศาสตราจารย์.ดร.กาญจณา จันทองจีน; 100 หน้า. ISBN 974-53-1588-5

ในการศึกษาครั้งนี้ สามารถแยกกลุ่มแบคทีเรีย STK ได้จากปุ๋ยหมักใบมะขาม โดยใช้แผ่นพอลิเตตระฟลูออโรเอทธิลีน (PTFE) ที่เคลือบด้วยไพรีนซึ่งเป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงานในการเจริญของกลุ่มแบคทีเรีย ผู้วิจัยพบว่า กลุ่มแบคทีเรีย STK สามารถย่อยสลายไพรีนความเข้มข้น 100 มก.ต่อลิตรได้จนถึงระดับที่ไม่สามารถวิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC ภายในเวลา 10 วัน และสามารถแยกแบคทีเรียบริสุทธิ์ได้ 3 สายพันธุ์ (STK1 STK2 และ STK3) โดยการจำแนกด้วยอนุกรมวิธานและสมบัติทางชีวเคมี ร่วมกับลำดับนิวคลีโอไทด์ 16s rDNA พบว่ามีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับแบคทีเรียในสกุล *Zoogloea* sp. *Stenotrophomonas* sp. และ *Mesorhizobium* sp. ตามลำดับ โดยแบคทีเรียทั้ง 3 สายพันธุ์มีสมบัติไฮโดรโฟบิซิตี้สูง นอกจากนี้ยังสามารถย่อยสลายจนฟีแนนทรีนได้ 99.72 มก.ต่อลิตร,อะซีแนพธิลีน 99.66 มก.ต่อลิตร, ไดเบนโซฟูแรน 97.28 มก.ต่อลิตร และอะซีแนพธีน 97.26 มก.ต่อลิตร ภายในระยะเวลา 14 วัน ในขณะที่มีปริมาณแอนทราซีน และฟลูออรีน เหลืออยู่ 37.79 และ 66.84 มก.ต่อลิตร ตามลำดับ จากปริมาณสาร PAHs เริ่มต้น 100 มก.ต่อลิตร และพบว่าแบคทีเรียกลุ่มนี้ไม่สามารถย่อยสลายฟลูออแรนทีน, ไครซีน, เบนโซ[*เอ*]ไพรีน และเพอริลีน อย่างไรก็ตาม กลุ่มแบคทีเรีย STK สามารถย่อยสลายเบนโซ[*เอ*]ไพรีนได้ 57.26 มก.ต่อลิตร ภายในเวลา 30 วัน เมื่อมีการเติมน้ำมันดีเซล 300 ไมโครลิตรซึ่งเป็นซับสเตรทร่วมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาควิชา.....จุลชีววิทยา.....ลายมือชื่อนิสิต.....

สาขาวิชา.....จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม.....ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....

ปีการศึกษา..2547...

4572312223: MAJOR INDUSTRIAL MICROBIOLOGY

KEY WORD: Pyrene/ Leguminous leaves/ Adhesion/ Bacteria consortium

TIMAKORN SANGDAM: ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF ADHERENT PYRENE-DEGRADING BACTERIA FROM LEGUMINOUS PLANT LEAVES COMPOST. THESIS ADVISOR: ASSOC. PROF. KANCHANA JUNTONGJIN, Ph. D. 100 pp. ISBN 974-53-1588-5

In this study, the bacterial consortium, STK, was isolated from *Tamarindus indica* leaves compost by enrichment culture method using hydrophobic membrane (PTFE; polytetrafluoroethylene) containing sorbed pyrene as the sole source of carbon and energy for recovering these bacterial. A consortium STK was able to utilize pyrene from 100 $mg.l^{-1}$ to undetectable level by HPLC analysis within 10 days. This consortium consisted of three isolates (STK1, STK2 and STK3) which from morphological and biochemical properties and 16s rDNA identification were closely related to genus *Zoogloea* sp., *Stenotrophomonas* sp. and *Mesorhizobium* sp., respectively. Each strain was strongly hydrophobic. Moreover, they could degrade a wide variety of polycyclic aromatic hydrocarbon (PAHs) such as phenanthrene, acenaphthylene, dibenzofuran, and acenaphthene at concentration of 99.72, 99.66, 97.28 and 97.26 $mg.l^{-1}$, respectively, within 14 days. Moreover, they were able to decrease of 100 $mg.l^{-1}$ concentration of anthracene, and fluorene to 37.79 and 66.84 $mg.l^{-1}$, respectively. No degrading activities were observed which fluoranthene, chrysene, benzo[*a*]pyrene, and perylene. However, the benzo[*a*]pyrene utilization occurred when the culture was supplemented with 300 µl of diesel fuel. It was able to co-metabolically degrade 57.26 $mg.l^{-1}$ of benzo[*a*]pyrene within 30 days of incubation.

Department.....Microbiology.....Student's signature...Timakorn Sangdam.....

Field of study....Industrial Microbiology.....Advisor's signature...Kanchana Juntongjin.....

Academic year...2004...

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จเสร็จสิ้นอย่างสมบูรณ์ด้วยดี โดยความช่วยเหลืออย่างดียิ่งของรองศาสตราจารย์ ดร.กาญจณา จันทองจีน อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่ได้กรุณาถ่ายทอดความรู้ ให้คำปรึกษา คำแนะนำ ตลอดจนข้อคิดเห็นต่างๆ ที่เป็นประโยชน์ต่องานวิจัยนี้ รวมทั้งช่วยตรวจทานแก้ไขต้นฉบับวิทยานิพนธ์ให้ถูกต้องครบถ้วนสมบูรณ์ ทางผู้วิจัยจึงกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ โอกาสนี้

ขอกราบขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุเทพ ธนียวัน ที่ให้เกียรติรับเป็นประธานกรรมการในการสอบป้องกันวิทยานิพนธ์ ตลอดจนให้ความรู้ คำแนะนำต่างๆ แก่ผู้วิจัยตลอดระยะเวลาการศึกษา

ขอกราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร.ไพเราะ ปิ่นพานิชการ และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.กอบชัย ภัทรกุลวณิชย์ ที่กรุณารับเป็นกรรมการสอบป้องกันวิทยานิพนธ์และให้ความรู้ คำแนะนำต่างๆ ตลอดจนช่วยตรวจทานแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

กราบขอบพระคุณคณาจารย์ทุกท่านในภาควิชาจุลชีววิทยาที่กรุณาให้ความรู้ ความช่วยเหลือและคำชี้แนะต่างๆ แก่ผู้วิจัย

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ในภาควิชาจุลชีววิทยาทุกท่าน ตลอดจนพี่ๆ เพื่อนๆ และน้องๆ ทุกคนที่มีส่วนช่วยเหลือและเป็นกำลังใจตลอดมา

สุดท้ายขอกราบขอบพระคุณบิดามารดา ที่ให้โอกาส ให้การสนับสนุนและช่วยเหลือในทุกด้าน ตลอดจนเป็นกำลังใจที่สำคัญยิ่งแก่ผู้วิจัยเสมอมา

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.....ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....จ
กิตติกรรมประกาศ.....ฉ
สารบัญ.....ช
สารบัญตาราง.....ซ
สารบัญรูป.....ฌ
คำย่อและสัญลักษณ์.....ฎ

บทที่

1. บทนำ.....1
2. ปริทัศน์วรรณกรรม.....4
3. อุปกรณ์และวิธีดำเนินงานวิจัย.....26
4. ผลการทดลอง.....41
5. สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง.....58
6. ข้อเสนอแนะในการวิจัย.....65

รายการอ้างอิง.....66

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก.....79
ภาคผนวก ข.....81
ภาคผนวก ค.....85
ภาคผนวก ง.....94
ภาคผนวก จ.....97

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....100

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
2.1	สมบัติทางเคมีของสาร PAHs.....	6
2.2	แบคทีเรียบริสุทธิ์ที่สามารถย่อยสลายไพรีนได้.....	20
3.1	ชนิดของใบไม้สถานที่เก็บตัวอย่างและการเรียกชื่อ.....	30
3.2	โอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์ที่ใช้สำหรับหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16s rDNA.	37
3.3	ชนิดและโครงสร้างทางเคมีของสารลดแรงตึงผิวที่ใช้ในการศึกษา.....	38
4.1	ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียสายพันธุ์บริสุทธิ์.....	44
4.2	สมบัติทางสรีรวิทยาและปฏิกิริยาทางชีวเคมีของแบคทีเรียบริสุทธิ์ที่แยกได้....	46
4.3	การย่อยสลายไพรีนและสาร PAHs อื่นๆ โดยกลุ่มแบคทีเรีย STK.....	50
จ.1	การวิเคราะห์ค่ามุมสัมผัสระหว่างหยดน้ำกับผิวเซลล์แบคทีเรียสายพันธุ์ต่างๆ	98
จ.2	การเจริญของกลุ่มแบคทีเรีย STK ในอาหารเลี้ยงเชื้อ CFMM ที่มี Brij 35 ความเข้มข้น 0.2 mM.....	99

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
2.1	โครงสร้างสาร PAHs ทั้ง 16 ชนิด (USEPA, 1990).....	5
2.2	โครงสร้างโมเลกุลของไพรีน.....	7
2.3	กระบวนการที่มีอิทธิพลต่อสาร PAHs ในสิ่งแวดล้อม (Cerniglia.1993).....	13
2.4	ความสัมพันธ์ระหว่างสิ่งแวดล้อมกับการย่อยสลายทางชีวภาพ (Suthersan, 1999).....	16
2.5	วิถีการย่อยสลายสาร PAHs โดยแบคทีเรีย.....	19
2.6	วิถีการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของสาร PAHs โดยรา.....	20
2.7	วิถีการย่อยสลายไพรีนโดยแบคทีเรียที่ใช้ออกซิเจน.....	22
3.1	การแยกกลุ่มแบคทีเรียย่อยสลายไพรีน โดยใช้แผ่น PTFE.....	32
3.2	แผ่น PTFE ที่มีกลุ่มแบคทีเรียวางบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง CFMM โดยวางผลึกไพรีนบนฝาจานเพาะเลี้ยงเชื้อ.....	32
4.1	ลักษณะอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM เมื่อมีการย่อยสลายไพรีนโดยกลุ่มแบคทีเรีย (PYR test) เปรียบเทียบกับชุดควบคุม (Ctrl PYR).....	41
4.2	ลักษณะวงใสรอบโคโลนีที่เจริญบนอาหารแข็ง CFMM ที่พ่นทับด้วยไพรีนที่ได้จากปุ๋ยหมักใบมะขาม (ก.) และใบจามจุรี (ข.).....	41
4.3	การเจริญและการย่อยสลายไพรีนของกลุ่มแบคทีเรีย STK ที่แยกจากปุ๋ยหมักใบมะขามเปรียบเทียบกับกลุ่มแบคทีเรีย SSK ที่แยกได้จากปุ๋ยหมักใบจามจุรี.	42
4.4	กลุ่มแบคทีเรีย STK ที่เจริญอยู่บนผลึกไพรีนจากกล้องจุลทรรศน์อิเลกตรอนแบบส่องผ่าน (S.E.M.) กำลังขยาย 10,000 เท่า (A; ผลึกไพรีน, ลูกศรชี้; เซลล์แบคทีเรีย).....	43
4.5	ลักษณะโคโลนีบนอาหารแข็ง LB และรูปร่างเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ของแบคทีเรียสายพันธุ์ STK1 STK2 และ STK3 หลังจากบ่มที่อุณหภูมิ 30 °ซ เป็นเวลา 3 วัน.....	45
4.9	ค่ามุมสัมผัสของแบคทีเรียสายพันธุ์ต่างๆ.....	48
4.10	ลักษณะอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM ที่มีการย่อยสลายสาร PAHs ชนิดต่างๆ โดยกลุ่มแบคทีเรีย STK เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม.....	49
4.11	ก. การเจริญและการย่อยสลายฟีแนนทรีน โดยกลุ่มแบคทีเรีย STK.....	51
	ข. การเจริญและการย่อยสลายไดเบนโซฟูแรน โดยกลุ่มแบคทีเรีย STK.....	51

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่		หน้า
4.11(ต่อ)	ค. การเจริญและการย่อยสลายอะซีแนพธิลีน โดยกลุ่มแบคทีเรีย STK.....	51
	ง. การเจริญและการย่อยสลายอะซีแนพธีน โดยกลุ่มแบคทีเรีย STK.....	51
	จ. การเจริญและการย่อยสลายฟลูออรีน โดยกลุ่มแบคทีเรีย STK.....	52
	ฉ. การเจริญและการย่อยสลายฟลูออแรนทีน โดยกลุ่มแบคทีเรีย STK.....	52
	ช. การเจริญและการย่อยสลายแอนทราซีน โดยกลุ่มแบคทีเรีย STK.....	52
	ซ. การเจริญและการย่อยสลายเบนโซ[เอ]ไพรีน โดยกลุ่มแบคทีเรีย STK.....	53
	ฌ.การเจริญและการย่อยสลายเพอริลีน โดยกลุ่มแบคทีเรีย STK.....	53
	ญ.การเจริญและการย่อยสลายไครซีน โดยกลุ่มแบคทีเรีย STK.....	53
4.12.	การละลายของเบนโซ[เอ]ไพรีน เมื่อมีสารลดแรงตึงผิวแต่ละชนิดที่ความเข้มข้นต่างๆ.....	54
4.13	การเจริญและการย่อยสลายเบนโซ[เอ]ไพรีน โดยกลุ่มแบคทีเรีย STK เมื่อมีการเติม Brij35 ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อCFMM.....	55
4.14	การเจริญและการย่อยสลายเบนโซ[เอ]ไพรีน โดยกลุ่มแบคทีเรีย STK เมื่อมีการเติมน้ำมันดีเซลลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ CFMM.....	56
4.15	ลักษณะอาหารเลี้ยงเชื้อที่เกิดการย่อยสลายเบนโซ[เอ]ไพรีนโดยกลุ่มแบคทีเรีย STK เมื่อมีน้ำมันดีเซลเป็นสับสเตรทร่วม; (1) ชุดควบคุมปริมาณเบนโซ[เอ]ไพรีนที่ไม่มีกลุ่มแบคทีเรีย (2) ชุดควบคุมกลุ่มแบคทีเรียที่มีน้ำมันดีเซล (3) ชุดควบคุมปริมาณเบนโซ[เอ]ไพรีนและน้ำมันดีเซล ที่ไม่มีกลุ่มแบคทีเรีย (4) ชุดทดลอง.....	57
ค.1	กราฟมาตรฐานระหว่างปริมาณไพรีนและพื้นที่ใต้พีคที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC.....	85
ค.2	กราฟมาตรฐานระหว่างปริมาณฟีแนนทรีนและพื้นที่ใต้พีคที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC.....	86
ค.3	กราฟมาตรฐานระหว่างปริมาณแอนทราซีนและพื้นที่ใต้พีคที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC.....	87
ค.4	กราฟมาตรฐานระหว่างปริมาณไดเบนโซฟูแรนและพื้นที่ใต้พีคที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC.....	88

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่		หน้า
ค.5	กราฟมาตรฐานระหว่างปริมาณอะซีแนพธีนและพื้นที่ใต้พีคที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC.....	89
ค.6	กราฟมาตรฐานระหว่างปริมาณอะซีแนพธิลีนและพื้นที่ใต้พีคที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC.....	90
ค.7	กราฟมาตรฐานระหว่างปริมาณฟลูออรีนและพื้นที่ใต้พีคที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC.....	91
ค.8	กราฟมาตรฐานระหว่างปริมาณฟลูออแรนทีนและพื้นที่ใต้พีคที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC.....	92
ค.9	กราฟมาตรฐานระหว่างปริมาณเบนโซ[เอ]ไพรีนและพื้นที่ใต้พีคที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC.....	93
ง.1	ลำดับนิวคลีโอไทด์ของแบคทีเรีย STK1 เปรียบเทียบกับ *Z.ramigera* ATCC 19623.....	94
ง.2	ลำดับนิวคลีโอไทด์ของแบคทีเรีย STK2 เปรียบเทียบกับ *S. maltophilia*.....	95
ง.3	ลำดับนิวคลีโอไทด์ของแบคทีเรีย STK3 เปรียบเทียบกับ *Mesorhizobium* sp.	96
จ.1	การวัดค่ามุมสัมผัสระหว่างหยดน้ำกับชั้นของเซลล์แบคทีเรีย.....	97
จ.2	เครื่องมือวัดค่ามุมสัมผัส (contact angle measurement).....	97

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

คำย่อและสัญลักษณ์

กก.	=	กิโลกรัม
มก.	=	มิลลิกรัม
มล.	=	มิลลิลิตร
ชม.	=	ชั่วโมง
^{o}ซ.	=	องศาเซลเซียส
มม.	=	มิลลิเมตร
ลบ.ม.	=	ลูกบาศก์เมตร
ตร.ซม.	=	ตารางเซนติเมตร
µl	=	ไมโครลิตร
M	=	โมลาร์
mM	=	มิลลิโมลาร์
CFU	=	Colony Forming Unit
%	=	เปอร์เซ็นต์

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย