

แบบที่เรียนชนิดใหม่ที่ย่อยสลายไพลีนที่คัดแยกจากดิน

นายพิริยะ กลั่นแก้ว

สถาบันวิทยบริการ

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2550

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

NOVEL PYRENE-DEGRADING BACTERIA ISOLATED FROM SOIL

Mr. Piriya Klankeo

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

Department of Microbiology

Faculty of Science

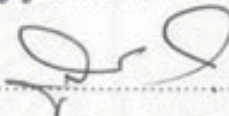
Chulalongkorn University

Academic Year 2007


Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์ แบททีเรียชนิดใหม่ที่ย่อยสลายไฟรินที่คัดแยกจากดิน
โดย นายพิริยะ กลั่นแก้ว
สาขาวิชา จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม
อาจารย์ที่ปรึกษา ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อรุณทัย ภิญญาคง

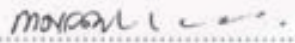
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้หัวข้อวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่ง
ของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต


..... คณบดีคณะวิทยาศาสตร์
(ศาสตราจารย์ ดร. สุพจน์ หารหนองบัว)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์


..... ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุเทพ ธนียวัน)


..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อรุณทัย ภิญญาคง)


..... กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. กาญจนา จันทองจิ้น)


..... กรรมการ
(อาจารย์ ดร. เอกวัล สือพร้อมชัย)

สถาบัน
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

พิริยะ กลั่นแก้ว : แบคทีเรียชนิดใหม่ที่ย่อยสลายไพรีนที่คัดแยกจากดิน (NOVEL PYRENE-DEGRADING BACTERIA ISOLATED FROM SOIL) อ.ที่ปรึกษา : ผศ. ดร. อรุณชัย ภิญญาคง; 160 หน้า.

กลุ่มแบคทีเรีย 2 กลุ่ม คือ กลุ่มแบคทีเรีย KOT และ กลุ่มแบคทีเรีย RN ถูกคัดแยกจากตัวอย่างดิน บริเวณทางรถไฟ จ.นครราชสีมา และบริเวณริมถนนราชดำเนิน ตามลำดับ เมื่อเลี้ยงแบคทีเรียสายพันธุ์บริสุทธิ์ KOTLB จากกลุ่มแบคทีเรีย KOT และ แบคทีเรียสายพันธุ์บริสุทธิ์ RN402 จากกลุ่มแบคทีเรีย RN ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวปราศจากคาร์บอน (CFMM) ที่มีไพรีนความเข้มข้นสุดท้าย 100 มล.ต่อลิตร เป็นระยะเวลา 20 วัน พบว่ามีปริมาณไพรีนเหลืออยู่ 8.77% และ 34.37% ตามลำดับ นอกจากนี้ แบคทีเรียทั้ง 2 สายพันธุ์สามารถย่อยสลายพีนานทรินได้ จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16เอส ไรโบโซมอลอาร์ดีเอ็นเอของแบคทีเรียทั้ง 2 สายพันธุ์ สามารถจำแนกสายพันธุ์ KOTLB และ RN402 ได้เป็นสกุล *Diaphorobacter* และ *Pseudoxanthomonas* ตามลำดับ การเพิ่มดีเอ็นเอของสายพันธุ์ KOTLB และ RN402 ที่สกัดจากอาหารเหลว CFMM ที่เติมไพรีน ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (PCR) โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีนที่ประมวลรหัสหน่วยย่อยแอลฟาของเทอร์มินัลโคออกซิจีเนสของ *Mycobacterium vanbaalenii* สายพันธุ์ PYR-1 (*nidA*) ได้ผลิตภัณฑ์ PCR ขนาดที่คาดหวังคือ 508 bp ผลการทำนายลำดับกรดอะมิโนจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลิตภัณฑ์ PCR พบว่าคล้ายกับ *NidA* ใน *Mycobacterium* sp. สายพันธุ์ JLS ซึ่งมีความสามารถในการย่อยสลายไพรีน การทดลองเซาท์เทิร์นไฮบริดส์เซชัน โดยใช้ผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน *nidA* จากแบคทีเรียทั้ง 2 สายพันธุ์เป็นดีเอ็นเอติดตาม พบว่าแบคทีเรียทั้ง 2 สายพันธุ์ มียีน *nidA* อยู่บนเมกะพลาสมิด รายงานนี้คือรายงานแรกที่แสดงว่า แบคทีเรียในสกุล *Diaphorobacter* และ *Pseudoxanthomonas* สามารถย่อยสลายสารประกอบ PAHs ได้ ยิ่งไปกว่านั้น *Diaphorobacter* sp. สายพันธุ์ KOTLB และ *Pseudoxanthomonas* sp. สายพันธุ์ RN402 มียีน *nid* เป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายสารประกอบ PAHs และตำแหน่งของยีน *nidA* อยู่บนเมกะพลาสมิด

ภาควิชา.....จุลชีววิทยา.....ลายมือชื่อนิสิต.....
 สาขาวิชา.....จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม.....ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....
 ปีการศึกษา.....2550.....

4772406823 : MAJOR INDUSTRIAL MICROBIOLOGY

KEY WORD: pyrene/ *Diaphorobacter* sp./ *Pseudoxanthomonas* sp./ PAHs/ biodegradation

PIRIYA KLANKEO : NOVEL PYRENE-DEGRADING BACTERIA ISOLATED FROM SOIL.

THESIS ADVISOR : ASST. PROF. ONRUTHAI PINYAKONG, Ph.D., 160 pp.

Two bacterial consortia, KOT-consortium and RN-consortium were isolated from the soil samples near the railway Nakorn Ratchasima province and from roadside of Ratchadumnern Road, Bangkok, respectively. When cultured the purified isolates strain KOTLB from KOT-consortium and RN402 from RN-consortium in carbon free mineral medium (CFMM) supplemented with pyrene to the final concentration 100 mg/l for 20 days, percentage of pyrene remaining were 8.77% and 34.37%, respectively. In addition, both strains could degrade phenanthrene. On the basis of 16S rDNA nucleotide sequence of both strains, the strain KOTLB and RN402 were belong to the genus *Diaphorobacter* and *Pseudoxanthomonas*, respectively. DNA amplification of the strain KOTLB and RN402 which extracted from CFMM supplemented with pyrene by Polymerases Chain Reaction (PCR) with primers specified to gene encoding alpha subunit of terminal dioxygenase of *Mycobacterium vanbaalenii* PYR-1 (*nidA*) was conducted. The expected PCR product size was 508 bp. The result exhibited that amino acid sequences of PCR product were similar to NidA of *Mycobacterium* sp. JLS which could degrade pyrene. Southern hybridization by using PCR product of *nidA* from both strains as a probe found that both have *nidA* located on megaplasmid. This is the first report showing that genus *Diaphorobacter* and *Pseudoxanthomonas* could degrade PAHs. Moreover, it also inferred that *Diaphorobacter* sp. KOTLB and *Pseudoxanthomonas* sp. RN402 had *nid* catabolic genes involved in PAHs degradation and the location of *nidA* was on megaplasmid.

Department.....Microbiology.....Student's signature.....*Piriya Klankao*.....
 Field of study.....Industrial Microbiology....Advisor's signature.....*Onruthai Pinyakong*.....
 Academic year.....2007.....

กิตติกรรมประกาศ

ขอกราบขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อรุณทัย ภิญญาคง อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ที่กรุณาให้ความรู้ คำปรึกษา คำแนะนำ และข้อคิดต่างๆ ในการทำวิจัยจนสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี ตลอดจนได้กรุณาปรับปรุงวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์มากขึ้น รวมถึงกำลังใจที่มีให้ตลอดมา

ขอกราบขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุเทพ ธนียวัน ที่กรุณารับเป็นประธาน ขอกราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร. กาญจนา จันทองจิ้น และอาจารย์ ดร. เอกวัล ลือพร้อมชัย ที่กรุณารับเป็นคณะกรรมการในการสอบวิทยานิพนธ์ รวมทั้งให้ คำปรึกษา-คำแนะนำ และกำลังใจ ตลอดจนปรับปรุงวิทยานิพนธ์ฉบับนี้จนสมบูรณ์

ขอกราบขอบพระคุณคณาจารย์ในภาควิชาจุลชีววิทยาทุกท่าน และขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ทุกท่านในภาควิชาจุลชีววิทยาที่กรุณาอำนวยความสะดวกและเป็นกำลังใจในการทำงานวิจัยนี้

ขอขอบคุณทุนอุดหนุนวิทยานิพนธ์ ที่ให้การสนับสนุนด้านค่าใช้จ่ายในงานวิจัยนี้

ขอขอบคุณ คุณอภิขญา เตชะวสุธัญญ์ คุณปาริฉัตร ราวีศรี และคุณปิยรัตน์ หมื่นศรีชัย ที่คอยให้คำปรึกษา ความช่วยเหลือและกำลังใจที่ดียิ่งเสมอมา

ขอขอบคุณ เพื่อนๆ และน้องๆ ห้อง 406 ที่คอยให้คำปรึกษาและความช่วยเหลือ

ขอขอบคุณพี่ๆ เพื่อนๆ และน้องๆ ทุกคนบนภาควิชาจุลชีววิทยาแห่งนี้ที่คอยช่วยเหลือ และให้กำลังใจตลอดการทำงานวิจัย

สุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ พี่น้อง ญาติๆ ทุกคนและเพื่อนๆ รุ่นพี่ที่ได้ช่วยเหลือสนับสนุนและให้กำลังใจในการทำงานวิจัยตลอดมาจนงานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ญ
สารบัญรูป.....	ฎ
คำย่อและสัญลักษณ์.....	ต
บทที่	
1. บทนำ.....	1
2. ปรีทัศน์วรรณกรรม.....	4
2.1 สารประกอบพอลิไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน.....	4
2.2 การบำบัดสิ่งแวดล้อมโดยชีววิธี.....	8
2.3 การย่อยสลายสารประกอบ PAHs โดยแบคทีเรีย.....	9
2.4 กระบวนการย่อยสลายสารประกอบ PAHs โดยแบคทีเรีย.....	14
2.5 ยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายสารประกอบ PAHs.....	25
2.6 ไดออกซิจีเนส.....	37
3. อุปกรณ์ เคมีภัณฑ์ และวิธีดำเนินการทดลอง.....	41
เครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง.....	41
เคมีภัณฑ์ที่ใช้ในการทดลอง.....	43
แบคทีเรีย พลาสติด และไพรเมอร์ที่ใช้ในการทดลอง.....	45
วิธีการดำเนินงานวิจัย.....	47
3.1 คัดแยกและจำแนกชนิดของแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลาย ไฟรีน.....	47
3.1.1 เก็บตัวอย่างดิน และหมักดินด้วยไฟรีน.....	47
3.1.2 เพิ่มจำนวนแบคทีเรียที่ย่อยสลายไฟรีนจากดิน.....	47
3.1.3 คัดแยกแบคทีเรียที่ย่อยสลายไฟรีน.....	48
3.2 จำแนกชนิดของแบคทีเรียที่คัดแยกได้.....	49
3.2.1 ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา.....	49

3.2.2 วิเคราะห์ลำดับเบสนิวคลีโอไทด์ของ 16S rDNA.....	49
3.3 ศึกษาประสิทธิภาพการย่อยสลายไพรีนของกลุ่มแบคทีเรียและแบคทีเรียสายพันธุ์บริสุทธิ์ และรูปแบบการเจริญของแบคทีเรียสายพันธุ์บริสุทธิ์โดยการใช้ไพรีนเป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงาน.....	55
3.4. ศึกษาประสิทธิภาพการย่อยสลายสารประกอบ PAHs ชนิดอื่นๆ ของแบคทีเรียสายพันธุ์บริสุทธิ์.....	57
3.5 ตรวจสอบยีนที่ประมวลรหัสไดออกซีจีเนสที่คาดว่าเกี่ยวข้องกับการย่อยสลายไพรีน ของแบคทีเรียบริสุทธิ์.....	57
3.5.1 ตรวจสอบยีนที่ประมวลรหัสไดออกซีจีเนสด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส.....	57
3.5.2 ตรวจหาตำแหน่งของยีนที่ประมวลรหัสไดออกซีจีเนสด้วยเทคนิคเซาท์เทิร์นไฮบริไดเซชัน.....	62
4. ผลการทดลอง.....	65
4.1 คัดแยกและจำแนกชนิดของแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลายไพรีน.....	65
4.2 จำแนกชนิดของแบคทีเรียบริสุทธิ์ที่คัดแยกได้.....	69
4.3 ประสิทธิภาพการย่อยสลายไพรีนของกลุ่มแบคทีเรียและแบคทีเรียสายพันธุ์บริสุทธิ์ และรูปแบบการเจริญของแบคทีเรียสายพันธุ์บริสุทธิ์โดยการใช้ไพรีนเป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงาน.....	76
4.4 ประสิทธิภาพการย่อยสลายสารประกอบ PAHs ชนิดอื่นๆ ของแบคทีเรียสายพันธุ์บริสุทธิ์.....	85
4.5 ตรวจสอบยีนที่ประมวลรหัสไดออกซีจีเนสที่คาดว่าเกี่ยวข้องกับการย่อยสลายไพรีนของแบคทีเรียบริสุทธิ์.....	91
5. สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง.....	98
รายการอ้างอิง.....	111
ภาคผนวก.....	125
ภาคผนวก ก.....	126
ภาคผนวก ข.....	129
ภาคผนวก ค.....	138
ภาคผนวก ง.....	140

ภาคผนวก จ.....	147
ภาคผนวก ฉ.....	157
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....	160



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญตาราง

ตาราง	หน้า
2.1 สมบัติทางเคมีและกายภาพของไพรีน (ATSDR, 1995).....	6
2.2 แบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายไพรีน.....	11
2.3 หน้าที่ของยีนที่เกี่ยวข้องในการย่อยสลายไพรีนของ <i>Mycobacterium vanbaalenii</i> สายพันธุ์ PYR-1 (Kim และคณะ, 2007).....	34
3.1 สมบัติของแบคทีเรียและพลาสมิดที่ใช้ในการวิจัย.....	45
3.2 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ที่ใช้ในการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ 16S rDNA	45
3.3 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ที่ใช้ในการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอบริเวณยีนที่ประมวล รหัสหน่วยย่อยแอลฟาของเทอร์มินัลไดออกซีจีเนส.....	46
3.4 สถานที่เก็บตัวอย่างดินที่ใช้ในการคัดแยกแบคทีเรียที่ย่อยสลายไพรีน.....	47
4.1 ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rDNA ของสายพันธุ์ KOTLB กับ ลำดับนิวคลีโอไทด์จากฐานข้อมูล (BLASTn).....	71
4.2 ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rDNA ของสายพันธุ์ RN402 กับ ลำดับนิวคลีโอไทด์จากฐานข้อมูล (BLASTn).....	72
4.3 ผลของผลิตภัณฑ์ PCR เมื่อใช้ไพรเมอร์คู่ต่างๆ.....	92
4.4 ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ <i>nidA</i> ความยาว 436 bp ของ <i>Diaphorobacter</i> sp. สายพันธุ์ KOTLB กับลำดับกรดอะมิโนจากฐานข้อมูล BLASTx.....	94
4.5 ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ <i>nidA</i> ความยาว 441 bp ของ <i>Pseudoxanthomonas</i> sp. สายพันธุ์ RN402 กับลำดับกรดอะมิโนจากฐานข้อมูล BLASTx.....	95
5.1 ประสิทธิภาพการย่อยสลายไพรีนของกลุ่มแบคทีเรียและแบคทีเรียสายพันธุ์บริสุทธิ์	103
5.2 ชนิดของแบคทีเรียที่มียีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายสารประกอบ PAHs บนพลาสมิด (อ้างใน Nojiri และคณะ, 2004).....	109
๑.1 ปริมาณไพรีนที่เหลือในอาหารเหลว CFMM ที่มีไพรีนความเข้มข้นสุดท้าย 100 ppm หลังจากเลี้ยงกลุ่มแบคทีเรีย KOT ณ เวลาต่างๆ.....	147
๑.2 ปริมาณไพรีนที่เหลือในอาหารเหลว CFMM ที่มีไพรีนความเข้มข้นสุดท้าย 100 ppm หลังจากเลี้ยงกลุ่มแบคทีเรีย RN ณ เวลาต่างๆ.....	148

ตาราง	หน้า
๑.3 ปริมาณไพลินที่เหลือในอาหารเหลว CFMM ที่มีไพลินความเข้มข้นสุดท้าย 100 มิลลิกรัมต่อลิตร หลังจากเลี้ยง <i>Diaphorobacter</i> sp. สายพันธุ์ KOTLB ณ เวลาต่างๆ.....	149
๑.4 ปริมาณไพลินที่เหลือในอาหารเหลว CFMM ที่มีไพลินความเข้มข้นสุดท้าย 100 ppm หลังจากเลี้ยง <i>Pseudoxanthomonas</i> sp. สายพันธุ์ RN402 ณ เวลาต่างๆ...	150
๑.5 ปริมาณ PAHs ที่เหลือในอาหารเหลว CFMM ที่มี PAHs ความเข้มข้นสุดท้าย 100 ppm หลังจากเลี้ยง <i>Diaphorobacter</i> sp. สายพันธุ์ KOTLB.....	151
๑.6 จำนวน <i>Diaphorobacter</i> sp. สายพันธุ์ KOTLB ในอาหารเหลว CFMM ที่มีไพลินความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 100 ppm โดยการวิเคราะห์ด้วยวิธี Viable plate count (CFU ต่อมิลลิลิตร).....	153
๑.7 จำนวน <i>Diaphorobacter</i> sp. สายพันธุ์ KOTLB ในอาหารเหลว CFMM ที่มีไพลินความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 100 ppm โดยการวิเคราะห์ด้วยวิธี Viable plate count (log CFU ต่อมิลลิลิตร).....	154
๑.8 จำนวน <i>Pseudoxanthomonas</i> sp. สายพันธุ์ RN402 ในอาหารเหลว CFMM ที่มีไพลิน ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 100 ppm โดยการวิเคราะห์ด้วยวิธี Viable plate count (CFU ต่อมิลลิลิตร).....	155
๑.9 จำนวน <i>Pseudoxanthomonas</i> sp. สายพันธุ์ RN402 ในอาหารเหลว CFMM ที่มีไพลิน ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 100 ppm โดยการวิเคราะห์ด้วยวิธี Viable plate count (log CFU ต่อมิลลิลิตร).....	156

สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
2.1 โครงสร้างของสารประกอบ PAHs 16 ชนิด.....	5
2.2 วิธีการย่อยสลายสารประกอบ PAHs ทั่วไปโดยจุลินทรีย์แบบใช้ออกซิเจน (Cerniglia, 1992).....	14
2.3 การเร่งปฏิกิริยาการเติมออกซิเจนของแบคทีเรียไดออกซิจีเนสและยีนประมวลรหัส แบคทีเรียไดออกซิจีเนสใน <i>Pseudomonas putida</i> สายพันธุ์ NCIB9816-4 (Gibson และ Parales, 2000).....	16
2.4 วิถีบนของการย่อยสลายแบคทีเรียโดยแบคทีเรีย (1) <i>Pseudomonads</i> sp. (Davies และ Evans, 1964; Yen และ Gunsalus, 1982) (2) <i>Mycobacterium</i> sp. (Kelly และคณะ, 1990) (3) <i>Bacillus thermoleovorans</i> สายพันธุ์ Humburg 2 (Annweilerและคณะ, 2000).....	18
2.5 วิถีล่างของการย่อยสลายแบคทีเรียโดยจุลินทรีย์ต่างๆ (1) <i>Pseudomonas</i> sp. (Davies และ Evans, 1964; Yen และ Gunsalus, 1982) (2) <i>Ralstonia</i> sp. สายพันธุ์ U2 (Zhou และคณะ, 2001).....	20
2.6 วิธีการย่อยสลายของพีแนนทรินโดยแบคทีเรีย (Evan และคณะ, 1965; Kiyohara และคณะ, 1976).....	22
2.7 วิธีการย่อยสลายไพรีนโดย <i>Mycobacterium vanbaalenii</i> สายพันธุ์ PYR-1 (Kim และคณะ, 2007) โดย P หมายถึงสารมัธยันตร์ที่เกิดขึ้นจากการย่อยสลายไพรีน และ S หมายถึง ลำดับชั้นของเอนไซม์ที่เข้าปฏิกิริยา (ดูตารางที่ 2.3 หน้า 31 และ 32 ประกอบ).....	24
2.8 การจัดเรียงตัวของยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายแบคทีเรียและระบบควบคุมการทำงานของยีน (Yen และ Gunsalus, 1982).....	26

รูปที่	หน้า
2.9 การเรียงของยีนกลุ่มคล้าย <i>nah</i> ในวิถีบนของการย่อยสลายเนพธาลินของ <i>Pseudomonas</i> สายพันธุ์ต่างๆ ได้แก่ <i>P. putida</i> สายพันธุ์ G7 (Eaton 1994; Simon และคณะ 1993), <i>P. putida</i> สายพันธุ์ NCIB9816 (Kurkela และคณะ, 1988), <i>P. putida</i> สายพันธุ์ NCIB9816-4 (Simon และคณะ, 1993), <i>Pseudomonas</i> สายพันธุ์ C18 (Denome และคณะ, 1993), <i>P. aeruginosa</i> สายพันธุ์ PaK1 (Takizawa และคณะ, 1999), <i>P. putida</i> สายพันธุ์ OUS82 (Kiyohara และคณะ, 1994), และ <i>P. stutzeri</i> สายพันธุ์ AN10 (Bosch และคณะ, 1999).....	27
2.10 กลุ่มยีนที่มีการเรียงตัวแตกต่างจากกลุ่มคล้าย <i>nah</i> ได้แก่ยีน <i>nah</i> ของ <i>Comamonas testeroni</i> สายพันธุ์ GZ42 (Goyal และ Zyltra, 1996) ยีน <i>nag</i> ของ <i>Ralstonia</i> sp. สายพันธุ์ U2 (Zhou และคณะ, 2001) ยีน <i>nag</i> ของ <i>Polaromonas naphthalenivorans</i> สายพันธุ์ CJ2 (Jeon และคณะ, 2006) และยีน <i>phn</i> ของ <i>Burkholderia</i> sp. สายพันธุ์ RP007 (Laurie และ Lloyd-Jones, 1999).....	29
2.11 การเรียงตัวของกลุ่มยีนในแบคทีเรียแกรมบวก ได้แก่ <i>Nocardiodes</i> sp. สายพันธุ์ KP7 (saito และคณะ, 2000) และ <i>Rhodococcus</i> sp. สายพันธุ์ NCIMB12038 (Larkin และคณะ, 1999; Kulakov และคณะ, 2000).....	33
2.12 การเรียงตัวของยีนที่เกี่ยวข้องในการย่อยสลายไพรีนของ <i>Mycobacterium vanbaalenii</i> สายพันธุ์ PYR-1 (Kim และคณะ, 2007).....	36
2.13 การจัดเรียงของระบบการทำงานร่วมกันของริงไฮดรอกซีเลทที่ไดออกซีจีเนส (Butler และ Mason, 1997).....	37
2.14 Rieske iron-sulfur center ซึ่งเชื่อมต่อกับบริเวณอนุรักษ์ Cysteines และ Histidines (Parales, 2003).....	38
2.15 การเชื่อมต่อระหว่างอะตอมเหล็กกับ His-208 His-213 Asp-326 และโมเลกุลน้ำ (Parales, 2003).....	39
4.1 ลักษณะสีของอาหารเหลว CFMM ที่เติมไพรีน เมื่อมีการเจริญของแบคทีเรียจากตัวอย่างดินบริเวณรางรถไฟ จังหวัดนครราชสีมา เป็นเวลา 10 วัน.....	66
4.2 ลักษณะสีของอาหารเหลว CFMM ที่เติมไพรีน เมื่อมีการเจริญของแบคทีเรียจากตัวอย่างดินจากกรมถนนราชดำเนิน เป็นเวลา 10 วัน.....	66

รูปที่	หน้า
4.3 ลักษณะโคโลนีของแบคทีเรียที่สร้างบริเวณใสเมื่อเลี้ยงบนอาหารแข็ง CFMM ที่พ่นทับด้วยไฟรีนเป็นเวลา 14 วัน (ก) ตัวอย่างดินจากบริเวณรางรถไฟ (ข) ตัวอย่างดินจากริมถนนราชดำเนิน.....	67
4.4 ลักษณะโคโลนีของแบคทีเรียสายพันธุ์บริสุทธิ์บนอาหารแข็ง CFMM ที่พ่นทับด้วยไฟรีน เมื่อเลี้ยงเป็นเวลา 14 วัน (ก) สายพันธุ์ KOTLB (ข) สายพันธุ์ RN402.....	68
4.5 ลักษณะโคโลนีของแบคทีเรียสายพันธุ์บริสุทธิ์บนอาหารแข็ง LB (ก) สายพันธุ์ KOTLB และ (ข) สายพันธุ์ RN402.....	69
4.6 ลักษณะรูปร่างของแบคทีเรียสายพันธุ์บริสุทธิ์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (กำลังขยาย 100×10) (ก) สายพันธุ์ KOTLB (ข) สายพันธุ์ RN402.....	70
4.7 phylogenetic tree ของ 16S rDNA ของแบคทีเรียสายพันธุ์บริสุทธิ์ KOTLB สกุล <i>Diaphorobacter</i> จำนวน 8 สายพันธุ์ และ สกุล <i>Acidovorax</i> จำนวน 8 สายพันธุ์ โดยใช้ 16S rDNA ของ <i>Sphingomonas</i> sp. สายพันธุ์ A4 เป็น out-group และตัวเลขที่กิ่งสาขาบอกถึงการนับที่ให้ผลซ้ำจากทั้งหมด 100 ครั้ง ด้วย bootstrap.....	74
4.8 phylogenetic tree ของ 16S rDNA ของแบคทีเรียสายพันธุ์บริสุทธิ์ RN402 สกุล <i>Pseudoxanthomonas</i> จำนวน 10 สายพันธุ์ และ สกุล <i>Stenotrophomonas</i> จำนวน 8 สายพันธุ์ โดยใช้ 16S rDNA ของ <i>Xanthomonas hyacinthi</i> สายพันธุ์ LMG739 ^T เป็น out-group และตัวเลขที่กิ่งสาขาบอกถึงการนับที่ให้ผลซ้ำจากทั้งหมด 100 ครั้ง ด้วย bootstrap.....	75
4.9 ปริมาณไฟรีนที่เหลือ ณ เวลา ต่างๆ เมื่อเลี้ยงกลุ่มแบคทีเรีย KOT.....	77
4.10 ปริมาณไฟรีนที่เหลือ ณ เวลา ต่างๆ เมื่อเลี้ยงกลุ่มแบคทีเรีย RN.....	77
4.11 การเปลี่ยนสีของอาหารเหลว CFMM ที่มีไฟรีน ณ เวลาต่างๆ เมื่อเลี้ยงกลุ่มแบคทีเรีย KOT.....	78
4.12 การเปลี่ยนสีของอาหารเหลว CFMM ที่มีไฟรีน ณ เวลาต่างๆ เมื่อเลี้ยงกลุ่มแบคทีเรีย RN.....	78
4.13 การเจริญของ <i>Diaphorobacter</i> sp. สายพันธุ์ KOTLB ในอาหารเหลว CFMM ที่มีไฟรีนเป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงาน.....	80
4.14 การเปลี่ยนสีของอาหารเหลว CFMM ที่มีไฟรีน ณ เวลาต่างๆ เมื่อเลี้ยง <i>Diaphorobacter</i> sp. สายพันธุ์ KOTLB.....	80

รูปที่	หน้า
4.15 โคโรมาโทแกรม HPLC จากการวิเคราะห์ปริมาณไพรีนและสารมัธยันตร์ที่เกิดขึ้นจากการย่อยสลายไพรีนโดย <i>Diaphorobacter</i> sp. สายพันธุ์ KOTLB หลังจากเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา (ก) 8 วัน (ข) 12 วัน (ค) 16 วัน (ง) 20 วัน.....	81
4.16 การเจริญของ <i>Pseudoxanthomonas</i> sp. สายพันธุ์ RN402 ในอาหารเหลว CFMM ที่มีไพรีนเป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงาน.....	83
4.17 การเปลี่ยนสีของอาหารเหลว CFMM ที่มีไพรีน ณ เวลาต่างๆ เมื่อเลี้ยง <i>Pseudoxanthomonas</i> sp. สายพันธุ์ RN402.....	83
4.18 โคโรมาโทแกรม HPLC จากการวิเคราะห์ปริมาณไพรีนและสารมัธยันตร์ที่เกิดขึ้นจากการย่อยสลายไพรีนโดย <i>Pseudoxanthomonas</i> sp. สายพันธุ์ RN402 หลังจากเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา (ก) 10 วัน (ข) 15 วัน (ค) 20 วัน.....	84
4.19 ปริมาณสารประกอบ PAHs ที่เหลือ เมื่อเลี้ยง <i>Diaphorobacter</i> sp. สายพันธุ์ KOTLB ในอาหาร CFMM ที่เติมแนพธาลินและพีแนนทรีนเป็นเวลา 7 วัน และอะซีแนพทีน แอนทราซีน อะซีแนพทีลีน และฟลูออรีน เป็นเวลา 10 วัน.....	85
4.20 ปริมาณสารประกอบ PAHs ที่เหลือ เมื่อเลี้ยง <i>Diaphorobacter</i> sp. สายพันธุ์ KOTLB เป็นเวลา 30 วัน (หมายเหตุ: ใช้ชุดควบคุมวันที่ 30 ของโครซีน และเบนโซ[เอ]ไพรีน เปรียบเทียบกับชุดทดลอง).....	86
4.21 การเปลี่ยนสีของอาหารเหลว CFMM ที่มี (ก) พีแนนทรีน (ข) ฟลูออแรนทีน เมื่อเลี้ยง <i>Diaphorobacter</i> sp. สายพันธุ์ KOTLB เป็นเวลา 7 วัน และ 30 วันตามลำดับ.....	87
4.22 ปริมาณสารประกอบ PAHs ที่เหลือ เมื่อเลี้ยง <i>Pseudoxanthomonas</i> sp. สายพันธุ์ RN402 ในอาหาร CFMM ที่เติมแนพธาลินและพีแนนทรีนเป็นเวลา 7 วัน และอะซีแนพทีน แอนทราซีน อะซีแนพทีลีน และฟลูออรีน เป็นเวลา 10 วัน (หมายเหตุ: ใช้ชุดควบคุมวันที่ 10 สำหรับอะซีแนพทีลีน และวันที่ 20 สำหรับแอนทราซีน เปรียบเทียบกับชุดทดลอง).....	88
4.23 ปริมาณสารประกอบ PAHs ที่เหลือ เมื่อเลี้ยง <i>Pseudoxanthomonas</i> sp. สายพันธุ์ RN402 เป็นเวลา 30 วัน (หมายเหตุ: ใช้ชุดควบคุมวันที่ 30 ของโครซีน และเบนโซ[เอ]ไพรีน เปรียบเทียบกับชุดทดลอง).....	89

รูปที่	หน้า
4.24 การเปลี่ยนสีของอาหารเหลว CFMM ที่มี (ก) พีแนนทรีน (ข) แอนทราซีน (ค) ฟลูออแรนธิน เมื่อเลี้ยง <i>Pseudoxanthomonas</i> sp. สายพันธุ์ RN402 เป็นเวลา 7 วัน 20 วัน และ 30 วัน ตามลำดับ.....	90
4.25 ขนาดชิ้นผลิตภัณฑ์ PCR บริเวณยีน <i>nidA</i> ช่องวิ่ง M: 100 bp DNA ladder ช่องวิ่งที่ 1: ดีเอ็นเอจากแบคทีเรียสายพันธุ์บริสุทธิ์ RN402 ที่สกัดจากการเลี้ยงในอาหารเหลว LB ช่องวิ่งที่ 2: ดีเอ็นเอจากแบคทีเรียสายพันธุ์บริสุทธิ์ RN402 ที่สกัดจากการเลี้ยงในอาหารเหลว CFMM ที่เติมไพรีน ช่องวิ่งที่ 3: ดีเอ็นเอจาก <i>Diaphorobacter</i> sp. สายพันธุ์ KOTLB ที่สกัดจากการเลี้ยงในอาหารเหลว LB ช่องวิ่งที่ 4: ดีเอ็นเอจาก <i>Diaphorobacter</i> sp. สายพันธุ์ KOTLB ที่สกัดจากการเลี้ยงในอาหารเหลว CFMM ที่เติมไพรีน ช่องวิ่งที่ 5: ตัวแปรควบคุมผลลบ.....	93
4.26 รูปที่ 4.26 ดีเอ็นเอที่สกัดด้วยวิธีสกัดเมกะพลาสมิด ช่องวิ่ง M: ดีเอ็นเอ Lambda HindIII ช่องวิ่งที่ 1: ดีเอ็นเอของ <i>Diaphorobacter</i> sp. สายพันธุ์ KOTLB ที่เลี้ยงในอาหารเหลว LB ช่องวิ่งที่ 2: ดีเอ็นเอของ <i>Pseudoxanthomonas</i> sp. สายพันธุ์ RN402 ที่เลี้ยงในอาหารเหลว LB ช่องวิ่งที่ 3: เมกะพลาสมิดของ <i>Diaphorobacter</i> sp. สายพันธุ์ KOTLB ที่เลี้ยงในอาหารเหลว CFMM ที่เติมไพรีน ช่องวิ่งที่ 4: เมกะพลาสมิดของ <i>Pseudoxanthomonas</i> sp. สายพันธุ์ RN402 ที่เลี้ยงในอาหารเหลว CFMM ที่เติมไพรีน.....	96
4.27 รูปที่ 4.27 (ก) ภาพอะกาโรสเจลที่มีเมกะพลาสมิดของ <i>Diaphorobacter</i> sp. สายพันธุ์ KOTLB และ <i>Pseudoxanthomonas</i> sp. สายพันธุ์ RN402 (บริเวณลูกศรชี้แสดงถึง เมกะพลาสมิด) (ข) สัญญาณจากเซาท์เทิร์นไฮบริไดเซชันด้วยดีเอ็นเอติดตามี่สร้างขึ้นจากผลิตภัณฑ์ PCR (บริเวณลูกศรชี้แสดงถึงสัญญาณที่เกิดขึ้น).....	97
ค.1 ลักษณะโคโลนีของกลุ่มแบคทีเรีย NT ที่สร้างบริเวณใสเมื่อเลี้ยงบนอาหารแข็ง CFMM ที่พ่นทับด้วยไพรีนเป็นเวลา 21 วัน.....	138
ค.2 ปริมาณไพรีนที่เหลือ ณ เวลาต่างๆ เมื่อทำการเลี้ยงกลุ่มแบคทีเรีย NT.....	139
ค.3 การเปลี่ยนสีของอาหารเหลว CFMM ที่มีไพรีน ณ เวลาต่างๆ เมื่อทำการเลี้ยงกลุ่มแบคทีเรีย NT.....	139
ง.1 HPLC โครมาโทแกรมของไพรีนที่เหลือหลังจากการเลี้ยงกลุ่มแบคทีเรีย KOT เป็นเวลา 16 วัน เปรียบเทียบกับชุดควบคุม (ลูกศรคือพีคของไพรีนที่ R _{8.5}).....	140

รูปที่	หน้า
ง.2 HPLC โคโรมาโทแกรมของไฟรีนที่เหลือหลังจากการเลี้ยงกลุ่มแบคทีเรีย RN เป็นเวลา 12 วัน เปรียบเทียบกับชุดควบคุม (ลูกศรคือพีคของไฟรีนที่ R _t 10).....	141
ง.3 HPLC โคโรมาโทแกรมของไฟรีนที่เหลือหลังจากการเลี้ยง <i>Diaphorobacter</i> sp. สายพันธุ์ KOTLB เป็นเวลา 20 วัน เปรียบเทียบกับชุดควบคุม (ลูกศรคือพีคของไฟรีนที่ R _t 15).....	142
ง.4 HPLC โคโรมาโทแกรมของไฟรีนที่เหลือหลังจากการเลี้ยง <i>Pseudoxanthomonas</i> sp. สายพันธุ์ RN402 เป็นเวลา 20 วัน เปรียบเทียบกับชุดควบคุม (ลูกศรคือพีคของไฟรีนที่ R _t 14).....	143
ง.5 HPLC โคโรมาโทแกรมของพีแนนทรินและฟลูออแรนธินที่เหลือหลังจากการเลี้ยง <i>Diaphorobacter</i> sp. สายพันธุ์ KOTLB เป็นเวลา 7 วัน และ 30 วัน ตามลำดับ เปรียบเทียบกับชุดควบคุม (ลูกศรคือพีคของพีแนนทรินที่ R _t 10.5 และฟลูออแรนธินที่ R _t 14.4).....	144
ง.6 HPLC โคโรมาโทแกรมของพีแนนทรินและแอนทราซีนที่เหลือหลังจากการเลี้ยง <i>Pseudoxanthomonas</i> sp. สายพันธุ์ RN402 เป็นเวลา 7 วัน และ 20 วัน ตามลำดับ เปรียบเทียบกับชุดควบคุม (ลูกศรคือพีคของพีแนนทรินที่ R _t 10.8 และแอนทราซีนที่ R _t 10.5).....	145

คำย่อและสัญลักษณ์

A_{260}	=	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความความคลื่น 260 นาโนเมตร
A_{280}	=	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความความคลื่น 280 นาโนเมตร
a.a.	=	กรดอะมิโน
bp	=	base pairs
CFU	=	colony forming unit
kb	=	Kilobase
R_t	=	retention time
°ซ	=	องศาเซลเซียส
มก.	=	มิลลิกรัม



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 1

บทนำ

ปัจจุบันสารเคมีต่างๆ เข้ามามีบทบาทสำคัญในการดำรงชีวิตของมนุษย์ เช่น ใช้ทางการเกษตร ใช้ปรุงแต่งอาหาร และใช้ในอุตสาหกรรมต่างๆ เป็นต้น ซึ่งการใช้สารเคมีต่างๆ เหล่านี้โดยขาดความระมัดระวังหรือใช้เกินขอบเขตที่กำหนด อาจส่งผลให้เกิดของเสียปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อมเป็นผลให้สภาพแวดล้อมเสื่อมโทรม ของเสียประเภทน้ำมันและปิโตรเลียมมีส่วนประกอบของสารอินทรีย์หลายชนิด โดยหนึ่งในนั้นก็คือสารในกลุ่มพอลิไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน (Polycyclic Aromatic Hydrocarbon, PAHs)

สารประกอบ PAHs มีโครงสร้างโมเลกุลประกอบด้วยวงเบนซีนตั้งแต่ 2 วงเชื่อมต่อการจัดเรียงตัวอาจเป็นเส้นตรง มุมงอ หรือรวมเป็นกลุ่ม พบว่าปนเปื้อนอยู่ทั่วไปในสิ่งแวดล้อม ทั้งในแหล่งน้ำ ดิน และอากาศ แหล่งกำเนิดมาจากกระบวนการทางธรรมชาติ และเกิดจากกิจกรรมของมนุษย์ เช่น การเผาไหม้เชื้อเพลิง การเผาไหม้ในเครื่องยนต์ การประกอบอาหารภายในครัวเรือน และจากควันบุหรี่ เป็นต้น จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่า สารประกอบ PAHs มีความเป็นพิษทั้งแบบเฉียบพลันและแบบเรื้อรัง เป็นสารเนื้องอกก่อให้เกิดการกลายพันธุ์ มะเร็งและความผิดปกติของทารกในครรภ์ (Wilson และ Jones, 1993)

ไพรีนจัดเป็นสารประกอบ PAHs ที่มีมวลโมเลกุลสูง มีโครงสร้างโมเลกุลประกอบด้วยวงเบนซีน 4 วง เชื่อมต่อกันเป็นกลุ่ม แม้ว่า IARC (International Agency for Research on Cancer) ไม่ได้ระบุให้ไพรีนเป็นสารที่ก่อให้เกิดมะเร็งในมนุษย์ แต่มีรายงานที่แสดงถึงความเป็นพิษต่อสิ่งมีชีวิต จากการศึกษาผลของสารประกอบ 8 ชนิดที่มีอยู่ในน้ำมันดิบรวมทั้งไพรีน ต่อการแพ้แสงของหนูตะเภาโดยการป้ายสารละลายเหล่านี้บนผิวหนังหนูตะเภา แล้วฉายด้วยแสงอัลตราไวโอเล็ตพบว่า ไพรีนทำให้เกิดการอักเสบแดงของผิวหนังได้มากที่สุด (Kochewar และคณะ, 1992)

การบำบัดสารประกอบ PAHs โดยวิธีทางชีวภาพ (bioremediation) เป็นแนวทางหนึ่งที่มีประสิทธิภาพโดยอาศัยกิจกรรมของ จุลินทรีย์เพื่อย่อยสลายหรือลดความเป็นพิษของสารประกอบ PAHs ที่ปนเปื้อนอยู่ในสิ่งแวดล้อม สารประกอบ PAHs จะถูกจุลินทรีย์ย่อยสลายได้อย่างสมบูรณ์ (mineralization) ได้เป็นคาร์บอนไดออกไซด์ น้ำ และพลังงานเพื่อใช้ในการเจริญ หรือจุลินทรีย์สามารถเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของสารประกอบ PAHs บางส่วน กระบวนการเหล่านี้ อาจเกิดโดยจุลินทรีย์เพียงชนิดเดียว หรือโดยกลุ่มจุลินทรีย์ (Cerniglia และคณะ, 1992)

จากรายงานการวิจัยที่ผ่านมา มีการคัดแยกแบคทีเรียบริสุทธิ์หลายสายพันธุ์ที่ย่อยสลายสารประกอบ PAHs ที่มีมวลโมเลกุลต่ำ เช่น แบคทีเรียในสกุล *Pseudomonas* แต่แบคทีเรียบริสุทธิ์ที่ย่อยสลายสารประกอบ PAHs ที่มีมวลโมเลกุลสูง ยังพบเป็นจำนวนน้อย แบคทีเรียที่ย่อยสลายไพรีนมีทั้งกลุ่มที่เป็นแกรมบวกและแกรมลบ แบคทีเรียบริสุทธิ์ที่ย่อยสลายไพรีนถูกคัดแยกมาจากทั้งในตัวอย่างดิน น้ำ หรือตะกอนดินในแหล่งน้ำ เช่น *Mycobacterium vanbaalenii* สายพันธุ์ PYR-1 ซึ่งคัดแยกมาจากตะกอนดินที่มีการปนเปื้อนของน้ำมันปิโตรเลียม (Heitkamp และคณะ, 1988a) *Rhodococcus* sp. สายพันธุ์ UW1 ซึ่งคัดแยกมาจากดินในบริเวณที่มีการปนเปื้อนของสารประกอบ PAHs (Walter และคณะ, 1991) *Gordona* sp. สายพันธุ์ BP9 และ *Sphingomonas paucimobilis* สายพันธุ์ BA2 ซึ่งคัดแยกมาจากดินในบริเวณที่มีการปนเปื้อนของสารประกอบไฮโดรคาร์บอน (Kastner และคณะ, 1994) *Burkholderia cepacia* สายพันธุ์ VUN10,010 ซึ่งคัดแยกมาจากดินที่มีการปนเปื้อนของสารประกอบ PAHs (Juhasz และคณะ, 1997) *Mycobacterium* sp. สายพันธุ์ AP1 ซึ่งคัดแยกมาจากทรายปนเปื้อนของน้ำมันดิบ (Vila และคณะ, 2001) และ *Leclercia adecarboxylata* สายพันธุ์ PS4040 ซึ่งคัดแยกมาจากตะกอนเลนที่มีการปนเปื้อนของน้ำมัน (Sarma และคณะ, 2004) เป็นต้น

การศึกษาทางพันธุศาสตร์ของยีนที่เกี่ยวข้องในวิถีการย่อยสลายสารประกอบ PAHs จากแบคทีเรีย มีดังนี้ กลุ่มยีน *nah* จาก *Pseudomonas putida* สายพันธุ์ G7 กลุ่มยีนคล้าย *nah* (*nah*-like) จาก *Pseudomonas* สายพันธุ์ต่างๆ กลุ่มยีน *phn* จาก *Burkholderia* sp. สายพันธุ์ RP007 กลุ่มยีน *nag* จาก *Ralstonia* sp. สายพันธุ์ U2 กลุ่มยีน *arh* จาก *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ A4 โดยแบคทีเรียดังกล่าวมีความสามารถในการย่อยสลายสารประกอบ PAHs ที่มีมวลโมเลกุลต่ำ (Habe และคณะ, 2003; Pinyakong และคณะ, 2004) ยีนที่เกี่ยวข้องกับวิถีการย่อยสลายไพรีน ซึ่งจัดเป็นสารประกอบ PAHs ที่มีมวลโมเลกุลสูง ได้มีการศึกษาใน *Mycobacterium* สายพันธุ์ต่างๆ เช่น *Mycobacterium vanbaalenii* สายพันธุ์ PYR-1 พบว่ามีกลุ่มยีนหลายกลุ่มที่ประมวลรหัสของเอนไซม์ต่างๆ ที่เกี่ยวข้องในวิถีการย่อยสลายไพรีนให้ได้เป็นสารมัธยันตร์ที่สามารถเข้าสู่วัฏจักรกรดไตรคาร์บอกซิลิก โดยกลุ่มยีน *nid* เป็นกลุ่มยีนที่ประมวลรหัสไดออกซิจีเนสซึ่งเป็นเอนไซม์เริ่มต้นในวิถีการย่อยสลายไพรีน (Kim และ คณะ, 2007) และใน *Mycobacterium* sp. สายพันธุ์ 6PY1 พบ โปรตีน 2 ชนิดที่ทำหน้าที่เป็นไดออกซิจีเนส คือ โปรตีน Pdo1 และ โปรตีน Pdo2 โดย Pdo1 มีความจำเพาะต่อไพรีน ซึ่งยีน *pdoA1* และ *pdoA2* ประมวลรหัสหน่วยย่อยแอลฟาและหน่วยย่อยบีตาของเทอร์มินัลไดออกซิจีเนสตามลำดับ ส่วนโปรตีน Pdo2 มีความจำเพาะต่อ พีแนนทริน (Krivobok และ คณะ, 2003) เป็นต้น

การย่อยสลายไพรีนโดยแบคทีเรียมักถูกใช้เป็นตัวแบบในการศึกษาการย่อยสลายสารประกอบ PAHs ที่มีมวลโมเลกุลสูง อย่างไรก็ตามชนิดของแบคทีเรียที่ย่อยสลายไพรีนยังมีไม่

มากนักและจำกัดเฉพาะสกุล *Mycobacterium* เป็นส่วนใหญ่ ทั้งที่แบคทีเรียในสิ่งแวดล้อมต่างๆ มีอยู่ด้วยกันหลายชนิด จึงน่ามีความหลากหลายของชนิดแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายไพรีน ดังนั้นการคัดแยกแบคทีเรียให้ได้แบคทีเรียชนิดใหม่ๆ เพื่อเป็นการเพิ่มทางเลือกในการนำแบคทีเรียไปใช้บำบัดสิ่งแวดล้อม งานวิจัยนี้จึงมีจุดมุ่งหมายที่จะคัดแยกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลายไพรีน และศึกษายีนที่ประมวลรหัสไดออกซิจีเนสที่คาดว่าเกี่ยวข้องในวิธีการย่อยสลายไพรีนในชั้นเบื้องต้น

วัตถุประสงค์

คัดแยกและจำแนกชนิดแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายไพรีน ตรวจสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายไพรีนและสารประกอบ PAHs ชนิดอื่นๆ รวมทั้งตรวจสอบยีนที่ประมวลรหัสไดออกซิจีเนสที่เกี่ยวข้องในวิธีการย่อยสลายไพรีนในชั้นเบื้องต้นของแบคทีเรียที่คัดแยกได้

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

สามารถคัดแยกแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายไพรีน และทราบข้อมูลเบื้องต้นของยีนที่ประมวลรหัสไดออกซิจีเนสของแบคทีเรียที่คัดแยกได้

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 2

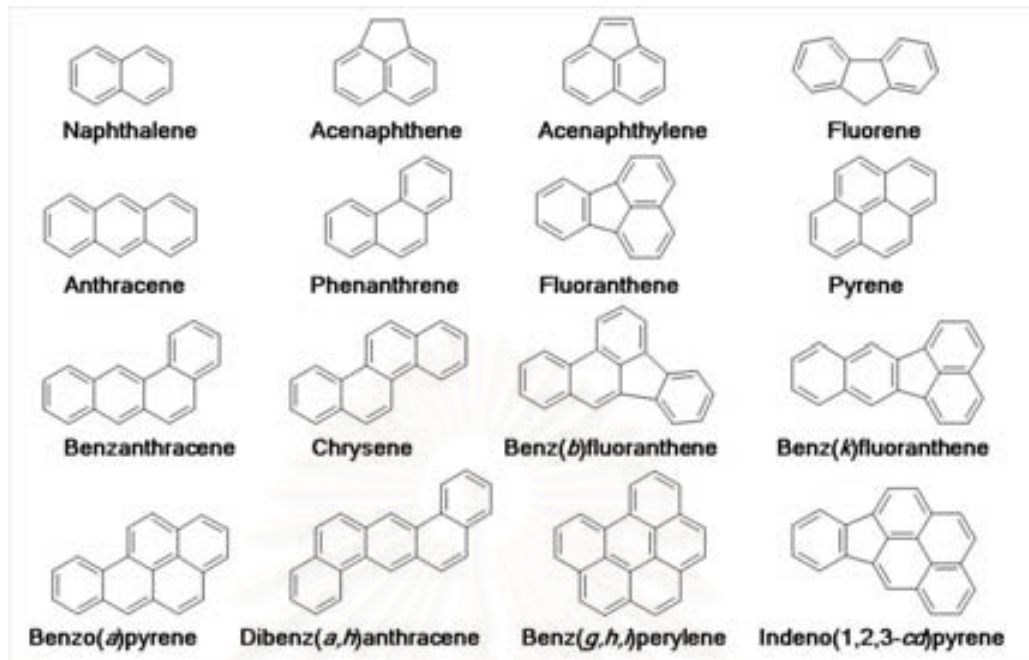
ปรีทัศน์วรรณกรรม

2.1 สารประกอบพอลิไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน

สารประกอบพอลิไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน (Polycyclic Aromatic Hydrocarbons, PAHs) เป็นกลุ่มสารเคมีที่มีโครงสร้างโมเลกุลประกอบไปด้วยวงเบนซีน ตั้งแต่ 2 วงเชื่อมต่อกัน ลักษณะการเชื่อมต่อกัน คือ วงเบนซีน 2 วงที่อยู่ติดกันต้องใช้คาร์บอน 2 อะตอมร่วมกัน วงเบนซีนอาจมีคาร์บอน 5 หรือ 6 อะตอมก็ได้ สารประกอบ PAHs ประกอบด้วยสารที่มีโครงสร้างหลักแตกต่างกัน 35 ชนิด และแต่ละสูตรโครงสร้างหลักประกอบไปด้วยอนุพันธ์ต่างๆ สารประกอบ PAHs เป็นสารประกอบอินทรีย์ที่ปนเปื้อนอยู่ทั่วไปในสิ่งแวดล้อมทั้งในแหล่งน้ำ ดิน และอากาศ เกิดขึ้นจากกระบวนการสังเคราะห์ตามธรรมชาติ เช่น ไฟไหม้ป่า หรือจากกิจกรรมต่างๆ ของมนุษย์ เช่น การเผาไหม้เชื้อเพลิงในชีวิตประจำวัน การเผาไหม้เชื้อเพลิงของเครื่องยนต์ การประกอบอาหารในครีวเรือน และจากควันบุหรี่ รวมไปถึงการปล่อยของเสียจากโรงงานอุตสาหกรรมปิโตรเคมี อุตสาหกรรมการผลิตที่ใช้เครื่องจักรยนต์ และการใช้สารรักษาเนื้อไม้ เป็นต้น (Cerniglia, 1992) ส่งผลให้มีการปนเปื้อน ตกค้างและสะสมอยู่ในสิ่งแวดล้อมเป็นเวลานาน เนื่องจากเป็นสารที่มีโครงสร้างโมเลกุลที่เสถียร ในรูปผลึกของแข็ง และละลายอยู่ในน้ำแต่น้อยมาก รวมทั้งดูดซับกับสารอินทรีย์ได้อย่างรวดเร็ว ทำให้สารประกอบ PAHs สลายตัวได้ช้ามาก (Grosser และคณะ, 1991)

รายงานของสำนักงานคุ้มครองสิ่งแวดล้อมของสหรัฐอเมริกา (The U.S. Environmental Protection Agency, EPA) ได้กำหนดให้สารประกอบ PAHs 16 ชนิด เป็นสารพิษอันตรายที่ควรให้ความสำคัญ (Cerniglia และคณะ, 1992) ได้แสดงโครงสร้างโมเลกุลและสมบัติของสารประกอบ PAHs ทั้ง 16 ชนิด ในรูปที่ 2.1 ทั้งนี้สามารถแบ่งสารประกอบ PAHs ออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ คือ สารประกอบ PAHs ที่มีมวลโมเลกุลต่ำ (Low molecular weight PAHs, LMW PAHs) ซึ่งประกอบไปด้วยวงอะโรมาติก 2 ถึง 3 วง และ สารประกอบ PAHs ที่มีมวลโมเลกุลสูง (High molecular weight PAHs, HMW PAHs) ซึ่งประกอบด้วยวงเบนซีนตั้งแต่ 4 วงขึ้นไป

ไพรีน (pyrene) เป็นหนึ่งในสารประกอบ PAHs ที่มีมวลโมเลกุลสูง มีชื่อเรียกทางเคมีว่า เบนโซ[ดี,อี,เอฟ]ฟีแนนทรีน (benzo[*d,e,f*]phenanthrene) ซึ่งเกิดจากการรวมตัวของวงเบนซีน 4 วง โดยมีการจัดเรียงตัวเป็นกลุ่ม (cluster arrangement) และมีสมบัติทางเคมีและกายภาพแสดงในตารางที่ 2.1



รูปที่ 2.1 โครงสร้างของสารประกอบ PAHs 16 ชนิด

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 2.1 สมบัติทางเคมีและกายภาพของไพรีน

สูตรโมเลกุล	C ₁₆ H ₁₀
น้ำหนักโมเลกุล	202.3
ลักษณะปรากฏ	ผลึกสีขาวหรือสีเหลืองอ่อน
อุณหภูมิหลอมเหลว	156 °ซ
อุณหภูมิการกลายเป็นไอ	393-404 °ซ
ความหนาแน่นที่ 14 °ซ	1.271 กรัมต่อ ตารางเซนติเมตร
ความถ่วงจำเพาะที่ 23 °ซ	1.271
การละลายในน้ำ	0.077 กรัมต่อลิตรที่ 25 °ซ
การละลายตัวทำละลาย	เบนซีน ไดเอทิลอีเทอร์ อีเทอร์ ปิโตรเลียม-อีเทอร์ โทลูอิน เอทานอล คาร์บอนไดซัลไฟด์
สัมประสิทธิ์แบ่งการละลาย Log K _{ow}	4.88
สัมประสิทธิ์แบ่งการละลาย Log K _{oc}	4.58
ความดันไอที่ 25 °ซ	2.5 × 10 ⁻⁶ มิลลิเมตรปรอท

2.1.1 ความเป็นพิษของสารประกอบ PAHs

มีรายงานความเป็นพิษของสารประกอบ PAHs เช่น ก่อให้เกิดความเป็นพิษในระดับยีน (genotoxic) หรือ ชักนำให้เกิดมะเร็ง (carcinogen) เป็นต้น

สำนักงานวิจัยมะเร็งแห่งชาติ (The International Agency for Research Cancer; IARC, 1999) ได้แบ่งกลุ่มสารประกอบ PAHs ออกเป็น 3 กลุ่ม ตามการออกฤทธิ์ในการก่อมะเร็ง ดังนี้

กลุ่ม 2A สารที่น่าจะก่อมะเร็งในมนุษย์ได้สูงกว่ากลุ่มอื่นๆ มี 3 ชนิด ได้แก่ เบนโซ[เอ]แอนทราซีน เบนโซ[เอ]ไพรีน และไดเบนซี[เอ,เอช]แอนทราซีน

กลุ่ม 2B สารที่อาจจะก่อมะเร็งในมนุษย์มี 11 ชนิด ได้แก่ แนพทาลีน เบนโซ[บี]ฟลูออแรนธิน เบนโซ[เค]ฟลูออแรนธิน เบนโซ[เจ]ฟลูออแรนธิน ไดเบนซี[เอ,เอช]ไพรีน ไดเบนซี[เอ,แอล]ไพรีน ไดเบนซี[เอ,อี]ไพรีน ไดเบนซี[เอ,ไอ]ไพรีน ไดเบนซี[เอ,เอช]อะคริดีน ไดเบนซี[เอ,เจ]อะคริดีน และอินดิโน[1,2,3-ซีดี]ไพรีน

กลุ่ม 3 สารที่ไม่ก่อมะเร็งในมนุษย์มี 23 ชนิด ได้แก่ ไตรฟีนิลีน พีแนนทรีน แอนทราซีน ฟลูออรีน ฟลูออแรนธิน ไพรีน ไครซีน ไครนิน เพอร์ลิ้น เบนโซ[เอ]อะคริดีน เบนโซ[ซี]อะคริดีน เบน

ไซ[จี,เอช,ไอ]ฟลูออแรนธิน เบนไซ[เอ]ฟลูออธรีน เบนไซ[บี]ฟลูออธรีน เบนไซ[ซี]ฟลูออธรีน เบนไซ[จี,เอช,ไอ]เพอร์ลิธิน เบนไซ[ซี]ฟิแนนทริน เบนไซ[อี]ไพรีน ไซโคลเพนทะ[ซี,ดี]ไพรีน ไดเบนซ์[เอ,ซี]แอนทราซีน ไดเบนไซ[เอ,เจ]แอนทราซีน ไดเบนไซ[เอ,อี]ฟลูออแรนธิน และไดเบนไซ[เอช,อาร์,เอส,ที]เพนทะฟีน

อย่างไรก็ตามแม้ว่าหน่วยงานคุ้มครองสิ่งแวดล้อมของสหรัฐอเมริกาไม่ได้ระบุให้ไพรีนเป็นสาเหตุก่อให้เกิดมะเร็งในมนุษย์โดยตรง แต่ไพรีนสามารถเสริมฤทธิ์ของเบนไซ[เอ]ไพรีน ให้เกิดฤทธิ์การก่อมะเร็งเพิ่มมากขึ้น และนอกจากนี้ยังมีรายงานว่า ไพรีนทำให้เกิดอาการแพ้แสงของผิวหนังได้อย่างรุนแรงในหนูตะเภา โดยจากการศึกษาผลของสารประกอบ 8 ชนิดที่มีอยู่ในน้ำมันดิบรวมทั้งไพรีน ที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 5 มิลลิโมโครโมล ถึง 5 ไมโครโมล โดยการป้ายสารละลายเหล่านี้บนผิวหนังของหนูตะเภาแล้วฉายด้วยแสงอัลตราไวโอเล็ต พบว่า ไพรีนทำให้เกิดการอักเสบ บวมแดง ของผิวหนังได้มากที่สุด (Kochavar และคณะ, 1982)

2.1.2 การปนเปื้อนของสารประกอบ PAHs ในสิ่งแวดล้อม

สารประกอบ PAHs เข้าสู่สิ่งแวดล้อมได้หลายทาง ทั้งจากทางธรรมชาติ เช่น การรั่วซึมของน้ำมันดิบจากแหล่งน้ำมันใต้ดิน ไฟไหม้ป่า ภูเขาไฟระเบิด และจากการกระทำของมนุษย์ซึ่งกิจกรรมที่สำคัญคือ การเผาไหม้ที่เกิดไม่สมบูรณ์ นับเป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดการปนเปื้อนของสารประกอบ PAHs ในสิ่งแวดล้อม

การปนเปื้อนของไพรีนในสิ่งแวดล้อม พบว่าสามารถตรวจพบไพรีนจากของเสียที่ปล่อยออกมาจากโรงงานอุตสาหกรรมที่เกี่ยวข้องกับผลิตภัณฑ์ถนอมและรักษาเนื้อไม้ โรงงานอุตสาหกรรมทางปิโตรเคมี การรั่วไหลของผลิตภัณฑ์ ระบบขนส่ง การดูแลเก็บรักษา และการกำจัดของเสียจากกระบวนการอุตสาหกรรม (Pereira Netto, Sisino และคณะ, 2002)

ในประเทศไทยมีงานวิจัยที่รายงานเกี่ยวกับสารประกอบ PAHs ที่ปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อม โดยพบปริมาณไพรีนและสารประกอบ PAHs ชนิดอื่นๆ ในปริมาณที่แตกต่างกัน เช่น

ในงานวิจัยของ Amagai และคณะ (1999) พบว่าดินที่เก็บจากตัวเมืองในจังหวัดเชียงใหม่ บริเวณที่มีการจราจรคับคั่งพบสารประกอบ PAHs ที่มีวงเบนซีน 4 ถึง 7 วง ปริมาณเฉลี่ย 824 ± 399 นาโนกรัมต่อกรัมดิน โดยพบว่าปริมาณของสารประกอบ PAHs ที่พบมากที่สุดคือ ไพรีน และฟลูออแรนธิน ซึ่งมีปริมาณ 168 ± 103 และ 146 ± 75 นาโนกรัมต่อกรัมดิน ตามลำดับ และในงานวิจัยของ Wilcke และคณะ (1999) พบว่าดินที่อยู่ใกล้บริเวณจราจรคับคั่งมีการปนเปื้อนของสารประกอบ PAHs อยู่ถึง 20 ชนิด มีปริมาณ 20 ถึง 380 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัมดิน โดยพบปริมาณของไพรีน 0.3 ถึง 48.3 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัมดิน

2.2 การบำบัดสิ่งแวดล้อมโดยชีววิธี

เมื่อสารประกอบ PAHs เข้าสู่สิ่งแวดล้อม พบว่ามักจะสะสมอยู่ในดิน ตะกอนดิน น้ำ ฝุ่น ละออง พืช และอากาศ โดยเกาะติดอยู่ในอนุภาคของดิน ตะกอนดิน หรือฝุ่น ซึ่งการเปลี่ยนแปลงของสารประกอบ PAHs เกิดขึ้นได้หลายวิธีทั้งทางกายภาพและชีวภาพ โดยการเปลี่ยนแปลงของสารประกอบ PAHs ทางชีวภาพนั้นเกิดขึ้นจากจุลินทรีย์ในธรรมชาติใช้กระบวนการเมตาบอลิซึมหลายแบบในการย่อยสลายสารประกอบ PAHs เพื่อนำไปใช้เป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงานหรืออาจจะเปลี่ยนแปลงโครงสร้างบางส่วน ดังนั้นจึงได้มีการศึกษาเพื่อนำจุลินทรีย์ต่างๆ มาใช้ประโยชน์ในการบำบัดสิ่งแวดล้อม เรียกว่าการบำบัดสิ่งแวดล้อมโดยชีววิธี (bioremediation)

การบำบัดสิ่งแวดล้อมโดยชีววิธี มีหลายวิธี เช่น (Trejo และ Quintero, 2000)

Bioaugmentation เป็นการเติมจุลินทรีย์ที่ทดสอบแล้วว่ามีประสิทธิภาพในการย่อยสลายสารพิษ เพื่อให้เกิดการย่อยสลายสารพิษในบริเวณที่มีการปนเปื้อน แบบที่เรียกว่ามีบทบาทสำคัญในกระบวนการนี้ นอกจากการใช้จุลินทรีย์แล้ว การปลูกพืชเพื่อให้เกิดการใช้สารที่ไม่ต้องการก็นับเป็น Bioaugmentation ด้วย

Biofilters เป็นการกำจัดของเสียในอากาศจำพวกก๊าซอินทรีย์ (organic gas) โดยผ่านวัสดุที่มีจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายก๊าซอินทรีย์ได้ติดอยู่ด้วย ใช้ในการกำจัดสารอินทรีย์ที่สามารถระเหยเข้าสู่อากาศ

Bioreactor เป็นการกำจัดสารปนเปื้อนในถังหมักที่มีจุลินทรีย์ มักใช้ในการกำจัดสารพิษที่มีในของเสียที่สภาพเป็นของแข็งหรือในดิน

Biostimulation มีการใช้สารอาหารหรือสารใดๆ ที่จะช่วยกระตุ้นการทำงานของจุลินทรีย์ให้มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายดีขึ้นหรือทำให้จุลินทรีย์เพิ่มจำนวนได้มากขึ้น ส่วนใหญ่จะใช้ปุ๋ยหรือสารที่ช่วยการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ บางครั้งสารพิษที่ปนเปื้อนในปริมาณน้อยๆ ก็สามารถช่วยในการกระตุ้นการทำงานของจุลินทรีย์หรือเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องในการย่อยสลายได้ด้วย

Bioventing คล้ายกับ Biostimulation แต่มีการให้ออกซิเจนเพื่อกระตุ้นการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ให้ดีขึ้นด้วย มักใช้ในการกำจัดสารพิษปนเปื้อนประเภทปิโตรเคมีออกจากดิน แต่ไม่เหมาะกับการกำจัดสารประเภท Halogenated gas ที่มีผลทำลายชั้นโอโซน

Composting เป็นการนำวัสดุใดๆ ก็ตามที่มีสารพิษปนเปื้อนทางสิ่งแวดล้อมผสมกับปุ๋ยหมักหรือวัสดุทางการเกษตรเพื่อเป็นวัสดุค้ำจุนให้กับจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการบำบัดสารพิษนั้นได้ บ่มภายใต้สภาวะที่มีอากาศและอุณหภูมิที่เหมาะสม เพื่อให้จุลินทรีย์ได้เจริญเติบโตและทำการย่อยสลายสารพิษที่มีอยู่นั้น

Landfarming เป็นการปรับสภาพพื้นดินที่มีสารพิษปนเปื้อน ซึ่งอาจทำได้โดยการปลูกพืชหรือเติมปุ๋ยในดินเพื่อให้จุลินทรีย์ในดินเจริญเติบโตและย่อยสลายสารนั้นๆ ในดิน ใช้ได้ดีในการกำจัดคราบน้ำมันที่ปนเปื้อนในดิน

2.3 การย่อยสลายสารประกอบ PAHs โดยแบคทีเรีย

ได้มีการศึกษาการย่อยสลายสารประกอบ PAHs โดยแบคทีเรีย โดยสามารถตัดแยกแบคทีเรียหลายๆ สายพันธุ์ที่มีความสามารถในการย่อยสลายโดยใช้เป็นแหล่งพลังงานและแหล่งคาร์บอน หรือสามารถเปลี่ยนแปลงโครงสร้างโมเลกุล (transformation) ของสารได้ ทั้งนี้สามารถตัดแยกแบคทีเรียได้จากแหล่งดิน ตะกอนดิน หรือแหล่งน้ำต่างๆ

2.3.1 แบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายสารประกอบ PAHs ที่มีมวลโมเลกุลต่ำ

แบคทีเรียบางกลุ่มสามารถผลิตเอนไซม์ที่สามารถย่อยสลายสารประกอบ PAHs จากรายงานการวิจัยในอดีตที่ผ่านมา สามารถตัดแยกแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายสารประกอบ PAHs ที่มีมวลโมเลกุลต่ำได้เป็นจำนวนมาก มีทั้งแบคทีเรียในกลุ่มแกรมลบเช่น แบคทีเรียในสกุล *Pseudomonas* และสกุล *Sphingomonas* (Ye และคณะ, 1996) เป็นต้น และแกรมบวก เช่น แบคทีเรียในสกุล *Mycobacterium* (Kelly และคณะ, 1991) และสกุล *Rhodococcus* (Walter และคณะ, 1991) เป็นต้น

2.3.2 แบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายสารประกอบ PAHs ที่มีมวลโมเลกุลสูง

สารประกอบ PAHs ที่มีมวลโมเลกุลสูงซึ่งประกอบด้วยวงเบนซีนตั้งแต่ 4 วงขึ้นไป มีความเสถียรสูง ทำให้ยากต่อการสลาย จึงเป็นเหตุให้รายงานการวิจัยที่ตัดแยกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลายยังมีจำนวนไม่มากนัก อย่างไรก็ตาม ก็ยังมีการตัดแยกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลายได้ เนื่องจากแบคทีเรียบางสายพันธุ์อาจจะมีลักษณะพิเศษต่างๆ เช่น แบคทีเรียในสกุล *Mycobacterium* มีโครงสร้างของผนังเซลล์เป็นกรดไมโคลิก (mycolic acid) ซึ่งนักวิทยาศาสตร์เชื่อว่า ลักษณะพิเศษของผนังเซลล์อาจเป็นสิ่งสำคัญที่ทำให้แบคทีเรียสกุลนี้สามารถนำสารประกอบที่มีคุณสมบัติเป็นไฮโดรโฟบิก (hydrophobic) เช่น สารประกอบ PAHs เข้าสู่เซลล์เพื่อนำไปใช้เป็นแหล่งพลังงานและแหล่งคาร์บอน (Wattiau, 2002) แบคทีเรียที่ตัดแยกได้นั้นก็มีทั้งแบคทีเรียในกลุ่มแกรมลบ เช่น แบคทีเรียในสกุล *Pseudomonas* (Kazunga

และ Aitken, 2000) สกุล *Sphingomonas* (Kastner และคณะ, 1994) และ สกุล *Burkholderia* (Juhasz และคณะ, 1997) และแกรมบวก เช่น สกุล *Mycobacterium* (Heitkamp และคณะ, 1988) และสกุล *Rhodococcus* (Walter และคณะ, 1991) เป็นต้น

แบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลายไพรีน มักถูกใช้เป็นตัวแบบในการศึกษาในด้านต่างๆ ของการสลายสารประกอบ PAHs ที่มีมวลโมเลกุลสูง เพราะมีโครงสร้างคล้ายสารประกอบ PAHs ที่มีมวลโมเลกุลสูงที่มีความเป็นพิษมาก เช่น เบนโซ[เอ]ไพรีน ในรายงานการวิจัยที่ผ่านๆ มา มีการคัดเลือกแบคทีเรียสายพันธุ์บริสุทธิ์ที่สามารถย่อยสลายไพรีน โดยส่วนใหญ่จัดอยู่ในสกุล *Mycobacterium* ซึ่งเป็นแบคทีเรียในกลุ่มแกรมบวก แต่ในปัจจุบันก็มีรายงานชนิดของแบคทีเรียในกลุ่มแกรมลบที่สามารถย่อยสลายได้เป็นจำนวนมากขึ้น ดังแสดงในตารางที่ 2.2



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 2.2 แบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายไฟรีน

แบคทีเรีย	โคสับสเตรท	เอกสารอ้างอิง
<i>Mycobacterium vanbaalenii</i> สายพันธุ์ PYR-1	เปปโตนและสารสกัดจากยีสต์ และแป้งที่ละลายน้ำ	Heitkamp และคณะ (1988); Khan และคณะ (2002)
<i>Rhodococcus</i> sp. สายพันธุ์ UW1	ไม่มี	Walter และคณะ (1991)
<i>Rhodococcus</i> sp. สายพันธุ์ S Flt Na1	เนพทาลีน ฟลูออรีน แอนทรา ซีน พีแนนทริน	Bouchez และคณะ (1995)
<i>Burkholderia cepacia</i> สาย พันธุ์ VUN10,001	ไม่มี	Juhasz และคณะ (1997)
<i>Pseudomonas</i> <i>saccharophila</i> สายพันธุ์ P15	ไม่มี	Chen และคณะ (1999)
<i>Acidovorax delafieldii</i> สาย พันธุ์ P4-1	ไม่มี	Samanta และคณะ (1999)
<i>Mycobacterium</i> sp. สาย พันธุ์ LB208	ฟลูออรีน พีแนนทริน ไดเบนโซ ไทโอพีน ฟลูออเรนธิน	Bastiaens และคณะ (2000)
<i>Stenotrophomonas</i> <i>maltophilia</i> สายพันธุ์ VUN10,003	ไม่มี	Juhasz และคณะ (2000)
<i>Mycobacterium</i> sp. สาย พันธุ์ AP1	ไม่มี	Vila และคณะ (2001)
<i>Sphingomonas</i> sp. สายพันธุ์ P2	พีแนนทริน	Supaka และคณะ (2001)
<i>Burkholderia cepacia</i> สาย พันธุ์ 2A-12	สารสกัดจากยีสต์	Kim และคณะ (2003)
<i>Mycobacterium</i> sp. สาย พันธุ์ MHP-1	ไม่มี	Habe และคณะ (2004)

ตารางที่ 2.2 (ต่อ) แบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายไฟรีน

แบคทีเรีย	โคสับสเตรท	เอกสารอ้างอิง
<i>Leclercia adecarboxylata</i> สายพันธุ์ PS4040	ไม่มี	Sarma และคณะ (2004)
<i>Paracoccus</i> sp. สายพันธุ์ Ophe1	ไม่มี	Zhang และคณะ (2004)
<i>Sphingomonas</i> sp. สายพันธุ์ ZL5	ไม่มี	Liu และคณะ (2004)
<i>Saccharothrix xinjiangensis</i> สายพันธุ์ PYX-6	ไม่มี	Hu และคณะ (2004)
<i>Mycobacterium</i> <i>pyrenivorans</i> สายพันธุ์ 17A3 ^T	ไม่มี	Derz และคณะ (2004)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

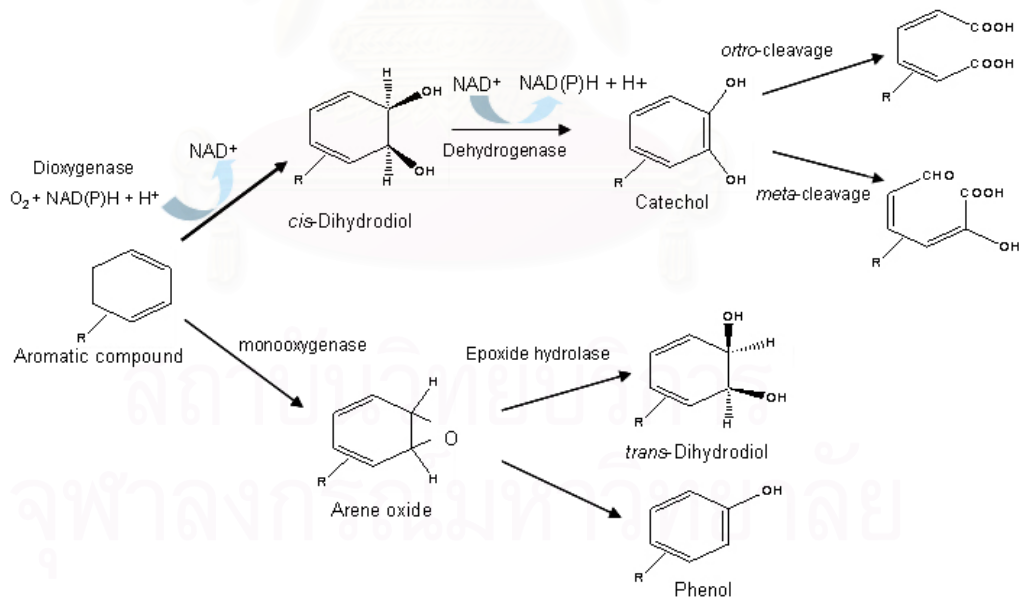
2.3.3 การย่อยสลายสารประกอบ PAHs โดยกลุ่มจุลินทรีย์

ในบางกรณีการทำงานของแบคทีเรียบริสุทธิ์เพียงชนิดเดียวไม่สามารถย่อยสลายสารประกอบ PAHs ได้อย่างสมบูรณ์ อาจจำเป็นต้องอาศัยการย่อยสลายโดยกลุ่มจุลินทรีย์ (Wilson และ Jones, 1993) ซึ่งเป็นการทำงานร่วมกันของจุลินทรีย์หลายๆ ชนิด โดยที่จุลินทรีย์เหล่านี้จะอยู่รวมกันแบบ synergism การย่อยสลายโดยกลุ่มจุลินทรีย์จะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการย่อยสลายสารประกอบ PAHs ให้ดียิ่งขึ้น ทำให้อัตราเร็วในการย่อยสลายเพิ่มขึ้น ที่สำคัญยังทำให้เกิดการย่อยสลายสารได้อย่างสมบูรณ์ (mineralization) สิ่งที่สำคัญสำหรับกลไกที่เกิดขึ้นระหว่างการทำงานร่วมกันของจุลินทรีย์ต่อการย่อยสลายสาร คือ ระบบเอนไซม์ เช่น จุลินทรีย์ชนิดที่ 1 สามารถสร้างเอนไซม์ย่อยสลายสารตั้งต้นได้ แต่เนื่องจากไม่มีระบบเอนไซม์ที่สามารถย่อยสลายได้อย่างสมบูรณ์ เมื่อจุลินทรีย์ไม่สามารถย่อยสลายสารมัธยันตร์ที่เกิดขึ้นภายในระบบได้ จึงทำให้เกิดการสะสมของสารมัธยันตร์ (dead-end metabolite) และอาจจะเป็นพิษต่อจุลินทรีย์ชนิดที่ 1 ในขณะที่จุลินทรีย์ชนิดที่ 2 มีระบบเอนไซม์ที่สามารถย่อยสลายสารมัธยันตร์นั้นได้ อาจมีผลทำให้ความเป็นพิษของสารมัธยันตร์ลดลงหรือสามารถนำสารดังกล่าวไปใช้ในการเจริญต่อได้ ผลจากการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดที่ 2 อาจสร้างวิตามิน กรดอะมิโน หรือสารที่ช่วยให้มีการย่อยสลายสารตั้งต้นดีขึ้น เช่น สารลดแรงตึงผิวชีวภาพ (biosurfactant) ซึ่งอาจช่วยในการเจริญและการย่อยสลายสารประกอบ PAHs ของแบคทีเรียชนิดอื่นๆ (Mueller และคณะ, 1989)

จุลินทรีย์ที่อยู่รวมกันนั้น อาจจะเป็นแบคทีเรียในสกุลเดียวกันแต่คนละสายพันธุ์ เช่น ในงานวิจัยของ Juhasz และ คณะ (1997) สามารถคัดแยกแบคทีเรียจากดินที่มีการปนเปื้อนของสารประกอบ PAHs ได้กลุ่มแบคทีเรียที่ประกอบด้วยแบคทีเรีย 3 สายพันธุ์ ได้แก่ *Burkholderia cepacia* สายพันธุ์ VUN10,001 VUN10,002 และ VUN 10,003 เมื่อมาเลี้ยงร่วมกัน พบว่ากลุ่มแบคทีเรียนี้สามารถใช้ไฟรีน ฟลูออรีน และพีแนนทริน เป็นแหล่งพลังงานและแหล่งคาร์บอนได้ หรือ อาจจะเป็นแบคทีเรียต่างสกุล เช่น ในงานวิจัยของ Yu และคณะ (2005) ศึกษาการย่อยสลายฟลูออรีน พีแนนทริน และไฟรีน โดยกลุ่มแบคทีเรียที่คัดแยกมาจากตะกอนดินชายเลน ประกอบไปด้วยแบคทีเรียที่อยู่ในสกุล *Rhodococcus* *Acinetobacter* และ *Pseudomonas* พบว่าสามารถย่อยสลายฟลูออรีนและพีแนนทรินความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตรได้ 100% ภายใน 4 สัปดาห์ และย่อยสลายไฟรีนความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตรได้หมดภายใน 6 สัปดาห์ หรือ อาจจะเป็นจุลินทรีย์ต่างชนิดกัน เช่น ในงานวิจัยของ Boonchan และคณะ (2000) พบว่าเมื่อทำการเลี้ยงแบคทีเรีย *Stenotrophomonas maltophilia* สายพันธุ์ 10,010 ร่วมกับเชื้อรา *Penicillium janthinellum* สายพันธุ์ VUN10,201 พบว่ามีการเจริญของแบคทีเรียและมีการย่อยสลายเบนโซ[เอ]ไพรีนความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตรได้อย่างสมบูรณ์

2.4 กระบวนการย่อยสลายสารประกอบ PAHs โดยแบคทีเรีย

กระบวนการย่อยสลายสารประกอบ PAHs ในสภาวะมีออกซิเจนโดยจุลินทรีย์แบ่งได้เป็น 2 วิธี คือวิธีแรกซึ่งส่วนใหญ่เกิดขึ้นในแบคทีเรีย เริ่มต้นจากการเติมออกซิเจนให้กับโมเลกุลคาร์บอนที่เป็นพันธะคู่โดยเกิดจากการเร่งปฏิกิริยาด้วยระบบเอนไซม์ไดออกซิจีเนส (multicomponent dioxygenase) ได้เป็นซิส-ไดไฮโดรไดออล (*cis*-dihydrodiol) จากนั้นเร่งปฏิกิริยาต่อโดยซิส-ไดไฮโดรไดออลดีไฮโดรจีเนส (*cis*-dihydrodiol dehydrogenase) ได้เป็นสารอนุพันธ์ประเภทไดไฮดรอกซิล จากนั้นสารตั้งต้นที่คล้ายแคทีคอล (catechol) จะถูกย่อยสลายด้วยเอกซ์ตราไดออลไดออกซิจีเนส (extradiol dioxygenase) ผ่านทางวิถีการแตกวงเบนซีนแบบ *ortho* หรือ *meta* และเข้าสู่วัฏจักรกรดไตรคาร์บอกซิลิกต่อไป ในวิธีที่สอง จุลินทรีย์บางชนิดเช่น เชื้อราสามารถใช้โมโนออกซิจีเนสเติมออกซิเจน 1 อะตอม เข้ายังวงเบนซีนได้เป็นแอรินออกไซด์ (Arene oxide) จากนั้นเติมไฮโดรเจนและหมู่ไฮดรอกซิลลงในโมเลกุลโดยกิจกรรมของอีพอกไซด์ไฮโดรเลส (epoxide hydrolase) ได้ผลิตภัณฑ์เป็น *trans*-ไดไฮโดรไดออล (*trans*-dihydrodiol) หรืออีกวิธีหนึ่งที่มีการจัดเรียงโครงสร้างใหม่ได้เป็นอนุพันธ์ประเภทฟีนอล (Cerniglia, 1992; Habe และ Omori, 2003) ดังแสดงในรูป 2.2

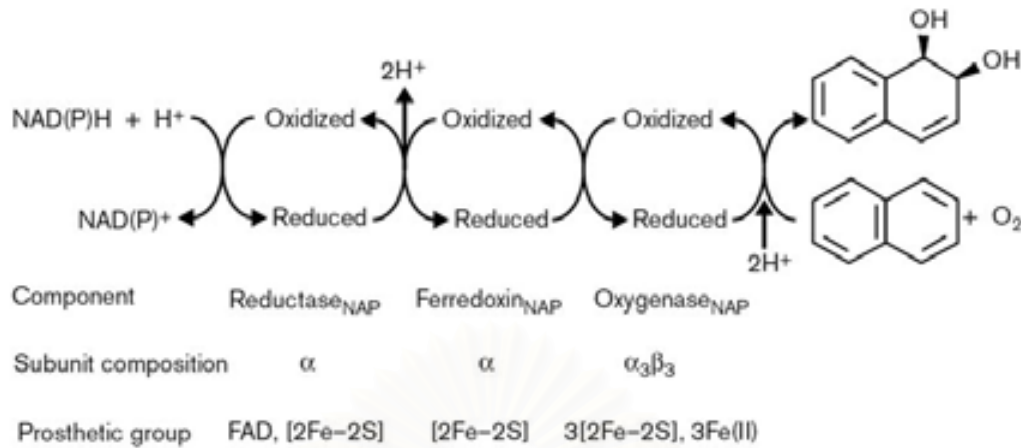


รูปที่ 2.2 วิธีกรย่อยสลายสารประกอบ PAHs ทั่วไปโดยจุลินทรีย์แบบใช้ออกซิเจน (Cerniglia, 1992)

2.4.1 วิธีการย่อยสลายเนฟธาลิน

เนื่องจากเนฟธาลินเป็นสารประกอบ PAHs ที่มีโครงสร้างประกอบด้วยวงเบนซีน 2 วง เชื่อมกัน ซึ่งเป็นโครงสร้างที่ง่ายที่สุดในกลุ่มของสารประกอบ PAHs จึงมักใช้เนฟธาลินเป็น ต้นแบบในการศึกษาวิธีการย่อยสลายรวมทั้งยีนที่เกี่ยวข้องในวิธีการย่อยสลายสารประกอบ PAHs ที่มีโครงสร้างซับซ้อนอื่น รายงานแรกของวิธีการย่อยสลายเนฟธาลินโดยแบคทีเรียได้ ศึกษาใน *Pseudomonas putida* สายพันธุ์ G7 (Yen และ Gunsalus, 1982) โดยปฏิกิริยาเริ่ม จากการเติมออกซิเจน 2 อะตอมเข้ายังพันธะคู่ของวงเบนซีนได้เป็น ซิส-1,2-เนฟธาลินไดไฮโดรไดออล (*cis*-1,2-naphthalene dihydrodiol) ด้วยกิจกรรมของเนฟธาลินไดออกซิจีเนส (naphthalene dioxygenase) (Yen และ Serdar, 1988) ซึ่งประกอบด้วยระบบการทำงานของ เอนไซม์หลายองค์ประกอบร่วมกัน (multicomponent enzyme system) ได้แก่ reductase_{NAP} ferredoxin_{NAP} และ terminal oxidase หรือ iron-sulfur flavoprotein (ISP_{NAP}) ที่ประกอบด้วย หน่วยย่อย 2 หน่วย คือ หน่วยย่อยแอลฟา (α -subunit, large subunit) และหน่วยย่อยบีตา (β -subunit, small subunit) (Ensley และ Gibson, 1983)

การเร่งปฏิกิริยาไฮดรอกซิเลชัน (hydroxylation) ของเนฟธาลินไดออกซิจีเนสเริ่มจากการ ส่งผ่านของอิเล็กตรอนจาก NAD(P)H ไปยัง reductase_{NAP} จากนั้นส่งต่อไปยัง ferredoxin_{NAP} และ ISP_{NAP} ตามลำดับ สุดท้าย ISP_{NAP} จะเป็นส่วนที่เร่งปฏิกิริยาโดยตรงด้วยการเติมออกซิเจน 2 อะตอมยังวงเบนซีนของเนฟธาลินเกิดผลิตภัณฑ์ ซิส-1,2-เนฟธาลินไดไฮโดรไดออล ดังแสดงใน รูปที่ 2.3



รูปที่ 2.3 การเร่งปฏิกิริยาการเติมออกซิเจนของแนพทาลีนไดออกซิจีเนสและยีนประมวลรหัสแนพทาลีนไดออกซิจีเนสใน *Pseudomonas putida* สายพันธุ์ NCIB9816-4 (Gibson และ Parales, 2000)

ซิส-1,2-แนพทาลีนไดไฮโดรไดออล จะเปลี่ยนเป็น 1,2-ไดไฮดรอกซีแนพทาลีน (1,2-dihydroxynaphthalene) และ กรด 2-ไฮดรอกซีโครมีน-2-คาร์บอกซิลิก (2-hydroxychromene-2-carboxylic acid, HCCA) ด้วยกิจกรรมของแนพทาลีนไดไฮโดรไดออลดีไฮโดรจีเนส และไดไฮดรอกซีแนพทาลีนดีไฮโดรจีเนส ตามลำดับ จากนั้นกรด 2-ไฮดรอกซีโครมีน-2-คาร์บอกซิลิก จะถูกออกซิไดส์เป็น ทรานส์-ออโร-ไฮดรอกซีเบนซิลิดีนไพรูวิก (*trans*-o-hydroxybenzylidenepyruvic acid, tHBPA) โดย HCCA ไฮโซเมอเรส แล้วเปลี่ยนเป็นซาลิไซแอลดีไฮด์ (salicylaldehyde) จนได้เป็นกรดซาลิไซลิกโดยการเร่งปฏิกิริยาของไฮดรอกซี-แอลโดเลส และซาลิไซลัลดีไฮด์ดีไฮโดรจีเนส ตามลำดับ ซึ่งเรียกรวมกันว่าวิถีการย่อยสลายส่วนบน (upper pathway) ดังแสดงในรูปที่ 2.4

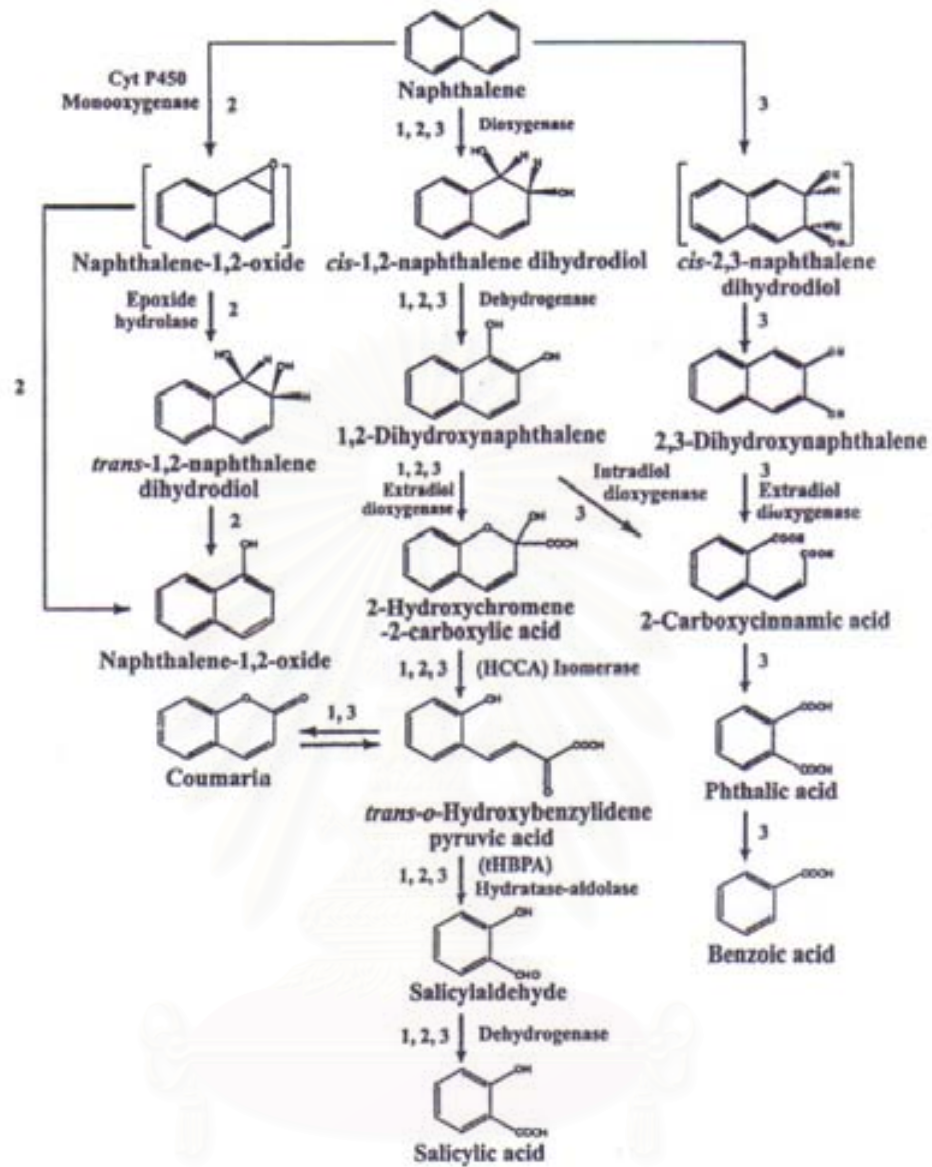
นอกจากนี้พบว่าวิถีการย่อยสลายแนพทาลีนไปเป็นกรดซาลิไซลิกของแบคทีเรียในสกุล *Pseudomonas* สายพันธุ์อื่นๆ และแบคทีเรียสกุลอื่นๆ โดยทั่วไปมักมีความคล้ายคลึงกับแบคทีเรียสายพันธุ์นี้ เช่น Kim และคณะ (1997) รายงานว่าวิถีการย่อยสลายแนพทาลีนโดย *Sphingomonas yanoikuyae* สายพันธุ์ B1 มีความคล้ายคลึงกับการย่อยสลายแนพทาลีนไปเป็นกรดซาลิไซลิกโดย *P. putida* สายพันธุ์ G7

การย่อยสลายของแนพทาลีนโดยแบคทีเรียบางสกุลอาจใช้วิถีอื่นที่ไม่ผ่านทางกรดซาลิไซลิก เช่น *Mycobacterium* sp. สามารถย่อยสลายแนพทาลีนได้ทั้งแบบโมโนออกซิเจเนชัน (monooxygenation) และไดออกซิเจเนชัน (dioxygenation) ได้สารมัธยันตร์ ทรานส์-1,2-แนพทาลีนไดไฮโดรไดออล (*trans*-1,2-naphthalene dihydrodiol) และซิส-1,2-แนพทาลีนไดไฮโดรไดออล ตามลำดับ (Kelly และคณะ, 1990) และในรายงานของ Annweiler และคณะ (2000) พบว่า

Bacillus thermoleovorans สายพันธุ์ Humburg 2 สามารถย่อยสลายแนพทาลีนได้ทั้งแบบโมโนออกซิจีนชั้นและไดออกซิจีนชั้น ผ่านกรดซาลิไซลิก และยังสามารถย่อยสลายแนพทาลีนในวิธีอื่นที่แตกต่างออกไปได้อีก กล่าวคือ แบคทีเรียสายพันธุ์นี้สามารถย่อยสลายแนพทาลีนผ่าน 2,3-ไดไฮดรอกซีแนพทาลีน (2,3-dihydroxynaphthalene) กรด 2-คาร์บอกซีซินนามิก (2-carboxycinnamic acid) กรดพธาลิก (phthalic acid) และกรดเบนโซอิก (benzoic acid) ดังแสดงในรูปที่ 2.4



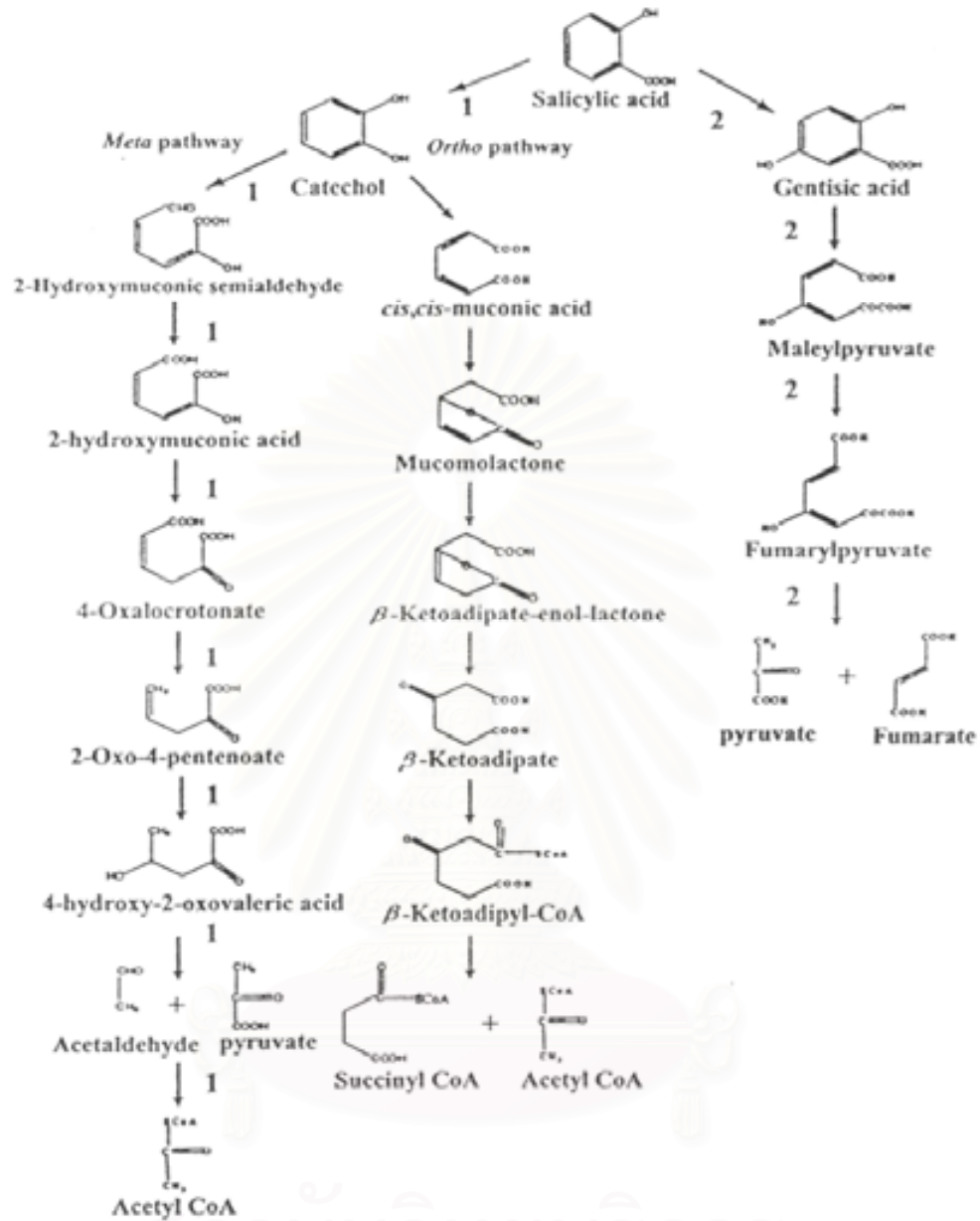
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 2.4 วิถีป็นของการย่อยสลายเนฟทาลีนโดยแบคทีเรีย (1) *Pseudomonads* sp. (Davies และ Evans, 1964; Yen และ Gunsalus, 1982) (2) *Mycobacterium* sp. (Kelly และคณะ, 1990) (3) *Bacillus thermoleovorans* สายพันธุ์ Humburg 2 (Annweiler และคณะ, 2000)

จากนั้นจุลินทรีย์ส่วนใหญ่จะเปลี่ยนกรดซาลิไซลิกไปเป็นแคทีคอล โดยซาลิไซเลตไฮดรอกซีเลส (salicylate hydroxylase) โดยแคทีคอล จะย่อยสลายต่อโดยแตกวงเบนซีนแบบ ออโท หรือ เมตา จนกระทั่งได้ผลิตภัณฑ์เป็น ซัคซินิลโคเอ (succinyl Co A) หรืออะซิติลโคเอ (acetyl Co A) (Yen และ Gunsalus, 1982) นอกจากนี้จุลินทรีย์บางชนิดยังมีการย่อยสลายกรดซาลิไซลิกที่ไม่ผ่านแคทีคอล แต่เปลี่ยนกรดซาลิไซลิกไปเป็นกรดเจนทิสิก (gentisic acid) เช่น *Rhodococcus* sp. สายพันธุ์ NCIMB12038 (Allen และคณะ, 1997) และ *Ralstonia* sp. สายพันธุ์ U2 (Zhou และคณะ, 2001) โดยกรดเจนทิสิกจะถูกออกซิไดส์ไปเป็นมาเรอิลไพรูเวต (maleylpyruvate) ด้วยกิจกรรมของเจนทิเสต-1,2-ไดออกซิจีเนส (gentisate-1,2-dioxygenase) และได้ผลิตภัณฑ์สุดท้ายที่สามารถเข้าวัฏจักรกรดไตรคาร์บอกซิลิก ได้แก่ ไพรูเวต (pyruvate) และ ฟูมาเรต (fumarate) เรียกว่าวิถีการย่อยสลายตั้งแต่กรดซาลิไซลิกจนกระทั่งได้ผลิตภัณฑ์ที่เข้าสู่วัฏจักรกรดไตรคาร์บอกซิลิกกว่าวิถีการย่อยสลายส่วนล่าง (lower pathway) ดังแสดงในรูปที่ 2.5

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

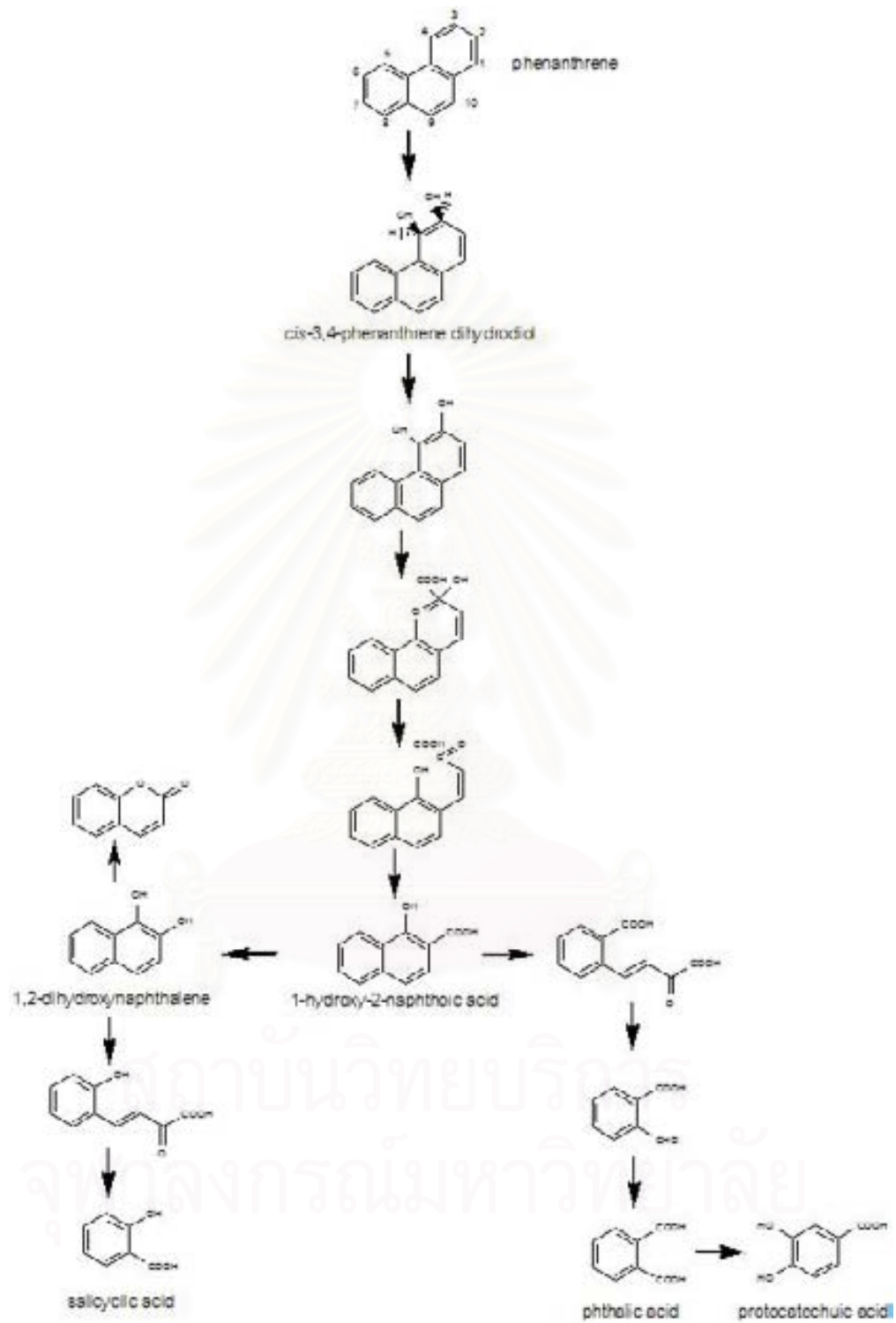


รูปที่ 2.5 วิถีต่างของการย่อยสลายเนฟทาลีนโดยจุลินทรีย์ต่างๆ (1) *Pseudomonas* sp. (Davies และ Evans, 1964; Yen และ Gunsalus, 1982) (2) *Ralstonia* sp. สายพันธุ์ U2 (Zhou และคณะ, 2001)

2.4.2 วิธีการย่อยสลายพีแนนทรีน

แบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลายไพรีน เช่น สกุล *Pseudomonas* พบว่าเริ่มการแตกโมเลกุลของพีแนนทรีนตรงระหว่างคาร์บอนตำแหน่งที่ 3 และ 4 โดยอาศัยกิจกรรมของไดออกซิจีเนสได้สารมัธยันตร์ ซิส-3,4-พีแนนทรีนไดไฮโดรไดออกอล (*cis*-3,4-phenanthrene dihydrodiol) และหลังจากนั้นก็จะถูกย่อยสลายต่อไปจนได้สารมัธยันตร์เป็นกรด 1-ไฮดรอกซี-2-แนฟโธอิก (1-hydroxy-2-naphthoic acid) ซึ่งสารมัธยันตร์ตัวนี้จะถูกย่อยสลายต่อไปโดยวิธีการย่อยสลายที่แตกต่างกัน 2 วิธีคือ วิธีการย่อยสลายโดยใช้กระบวนการย่อยสลายเช่นเดียวกับการย่อยสลายเนพธาลีน โดยจะได้ผลิตภัณฑ์เป็น แคทีคอล (Evan และคณะ, 1965) หรืออีกวิธีการย่อยสลายคือวิธีการย่อยสลายที่ถูกย่อยสลายไปเป็นกรดอโรพธาลิก (o-phthalic acid) และเปลี่ยนต่อไปเป็นกรดโปรโตคาซูอิก (protocatechuic acid) (Kiyohara และคณะ, 1976) ดังแสดงในรูปที่ 2.6

นอกจากนี้ Jerina และคณะ (1976) ได้รายงานว่าการย่อยสลายพีแนนทรีนโดย *Bejerinkia* sp. สายพันธุ์ B-836 (หลังจากนั้นได้ถูกเปลี่ยนเป็น *Sphingobium yanoikuyae* (Takeuchi และคณะ, 2001)) จะแตกโมเลกุลของพีแนนทรีนตรงระหว่างคาร์บอนตำแหน่งที่ 1 และ 2 ได้ผลิตภัณฑ์เป็น ซิส-1,2-ไดไฮดรอกซี-1,2-ไดไฮโดรพีแนนทรีน (*cis*-1,2-dihydroxy-1,2-dihdropyrene) รวมทั้งในงานวิจัยของ Moody และคณะ (2001) ได้รายงานการย่อยสลาย *Mycobacterium vanbaalenii* สายพันธุ์ PYR-1 นอกจากแตกโมเลกุลของพีแนนทรีนตรงตำแหน่งคาร์บอนที่ 3 และ 4 แล้ว พบว่ายังสามารถแตกตรงคาร์บอนตำแหน่งที่ 9 และ 10 ได้อีกด้วย โดยพบผลิตภัณฑ์คือ ซิส-9,10-พีแนนทรีนไดไฮโดรไดออกอล (*cis*-9,10-phenanthrene dihydrodiol) และ ทรานส์-9,10-พีแนนทรีนไดไฮโดรไดออกอล (*trans*-9,10-phenanthrene dihydrodiol)



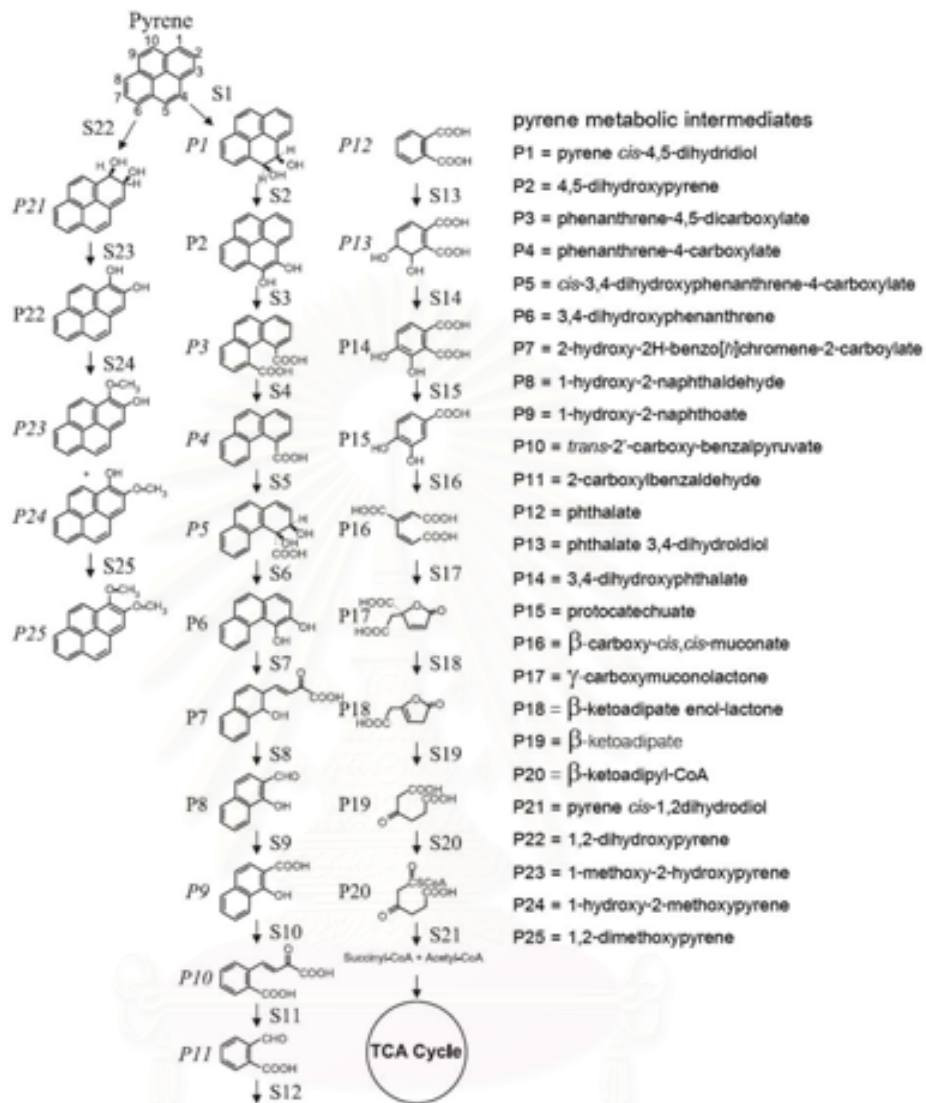
รูปที่ 2.6 วิธีการย่อยสลายของฟีนแอนทรินโดยแบคทีเรีย (Evan และคณะ, 1965; Kiyohara และคณะ, 1976)

2.4.3 วิธีการย่อยสลายไพรีน

จากงานวิจัยในอดีตที่ผ่านมา การตัดแยกแบคทีเรียที่มีความสามารถย่อยสลายไพรีนพบว่ามีเป็นแบคทีเรียในกลุ่มแอคติโนมัยซิส เช่น สกุล *Mycobacterium* และ *Rhodococcus* (Kanaly และคณะ, 2000) รายงานการศึกษาวิธีการย่อยสลายไพรีนโดยแบคทีเรียมักเป็นรายงานของแบคทีเรียในสกุล *Mycobacterium*

Mycobacterium vanbaalenii สายพันธุ์ PYR-1 เป็นแบคทีเรียสายพันธุ์แรกที่ได้ศึกษาถึงวิธีการย่อยสลายไพรีน โดยอาศัยกิจกรรมของโมโนออกซิจีเนสและไดออกซิจีเนส (Heitkamp และคณะ, 1988) และในรายงานของ Kim และคณะ (2007) ได้ใช้การศึกษายีนทั้งหมดของเซลล์ (Genomic) การศึกษาโปรตีนทั้งหมดของเซลล์ (Proteomic) และ การศึกษาสารมัธยันตร์ทั้งหมดของเซลล์ (Metabolomic) สามารถรายงานวิธีย่อยสลายไพรีน ของแบคทีเรียสายพันธุ์นี้ได้อย่างสมบูรณ์ การย่อยสลายไพรีนเริ่มต้นจากการแตกโมเลกุลไพรีนตรงระหว่างคาร์บอนตำแหน่ง 1 กับ 2 และ 4 กับ 5 ได้สารมัธยันตร์ ซิส-1,2-ไพรีนไดไฮโดรไดออล (*cis*-1,2-pyrene dihydrodiol) หรือ ทรานส์-1,2-ไพรีนไดไฮโดรไดออล (*trans*-1,2-pyrene dihydrodiol) และซิส-4,5-ไพรีนไดไฮโดรไดออล (*cis*-4,5-pyrene dihydrodiol) หรือ ทรานส์-4,5-ไพรีนไดไฮโดรไดออล (*trans*-4,5-pyrene dihydrodiol) โดยอาศัยกิจกรรมของไดออกซิจีเนส และ/หรือ โมโนออกซิจีเนส จากนั้นก็จะถูกย่อยสลายจนเหลือสารมัธยันตร์ที่ประกอบด้วยวงเบนซีน 3 วง เพื่อพร้อมที่จะเข้าสู่วิธีการย่อยสลายพีแนทรีนจนในที่สุดสารมัธยันตร์จะถูกย่อยสลายต่อและเข้าสู่วัฏจักรกรดไพรูเวตคาร์บอกซิลิก (Kreb's cycle) ต่อไป ดังแสดงในรูปที่ 2.7

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 2.7 วิธีการย่อยสลายไพรีนโดย *Mycobacterium vanbaalenii* สายพันธุ์ PYR-1 (Kim และคณะ, 2007) โดย P หมายถึงสารมัธยันตร์ที่เกิดขึ้นจากการย่อยสลายไพรีน และ S หมายถึงลำดับขั้นของเอนไซม์ที่เข้าปฏิกิริยา (ดูตารางที่ 2.3 หน้า 31 และ 32 ประกอบ)

นอกจากนี้ยังมีการศึกษาวิถีการย่อยสลายไพรีนในสกุล *Mycobacterium* สายพันธุ์อื่นๆ ซึ่งวิถีการย่อยสลายก็จะมีคล้ายคลึงกัน แต่อาจจะมีสารมัธยันตร์บางสารที่มีความแตกต่างออกไปในแต่ละสายพันธุ์ เช่น ในการย่อยสลายไพรีนโดย *Mycobacterium* sp. สายพันธุ์ AP1 พบกรด 6,6'-ไดไฮดรอกซี-2,2'-ไบฟีนิล ไดคาร์บอกซิลิก (6,6'-dihydroxy-2,2'-biphenyl dicarboxylic acid) (Vila และคณะ, 2001) และการย่อยโดย *Mycobacterium* sp. สายพันธุ์ KMS พบ ไพรีน-4,5-ไดโอน (pyrene-4,5-dione) (Liang และคณะ, 2006) เป็นต้น

Rhodococcus sp. สายพันธุ์ UW1 เป็นแบคทีเรียอีกสายพันธุ์หนึ่งที่มีความสามารถในการย่อยสลายไพรีนได้เช่นเดียวกัน จากการศึกษาสารมัธยันตร์บางสารที่เกิดขึ้นจากการย่อยสลายไพรีน พบว่ามีความแตกต่างไปจากแบคทีเรียในสกุล *Mycobacterium* โดยพบสารมัธยันตร์ที่ละลายน้ำได้ 2 ชนิด มีสูตรโมเลกุลคือ $C_{16}H_{10}O_4$ (Walter และคณะ, 1991)

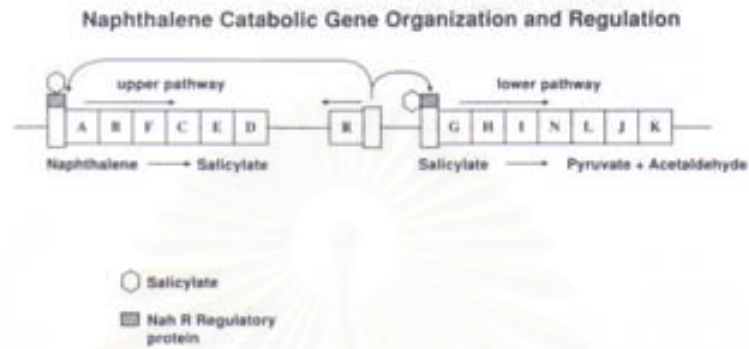
และยังมีรายงานเกี่ยวกับการย่อยสลายไพรีนแบบไม่สมบูรณ์ของแบคทีเรียบางสกุล ได้แก่ งานวิจัยของ Kazunga และ Aiken (2000) พบว่า *Pseudomonas stutzeri* สายพันธุ์ P16 และ *Bacillus cereus* สายพันธุ์ P21 สามารถย่อยสลายไพรีนแบบเปลี่ยนแปลงโครงสร้างโมเลกุลของไพรีน (transformation) ให้เป็น 4,5-ไพรีนไดไฮโดรไดออล (4,5-pyrenedihydrodiol) ซึ่งเป็นสารที่ไม่สามารถใช้ในการเกิดกระบวนการเมตาบอลิซึมต่อไปได้ (Dead-end metabolite) นอกจากนี้ *Sphingomonas yanoikuyae* สายพันธุ์ R1 และ *Pseudomonas saccharophila* สายพันธุ์ P15 เปลี่ยนไพรีนให้เป็น ซีส-4,5-ไพรีนไดไฮโดรไดออล และไพรีน-4,5-ไดโอน

2.5 ยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายสารประกอบ PAHs

2.5.1 ยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายสารประกอบ PAHs ในแบคทีเรียแกรมลบ

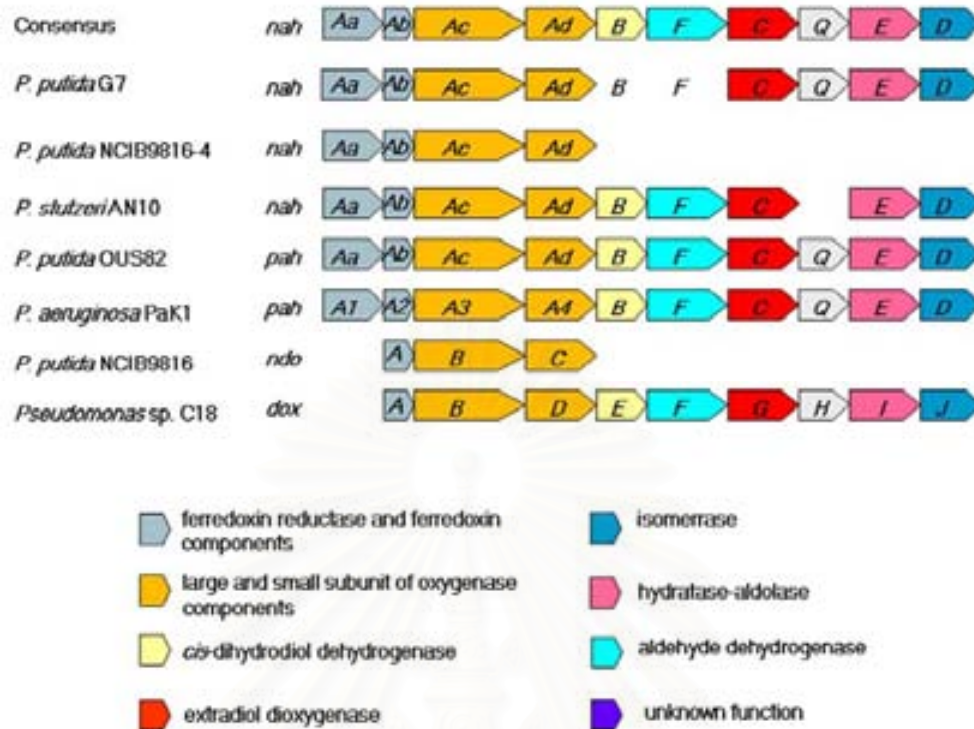
แบคทีเรียในสกุล *Pseudomonas* เป็นแบคทีเรียสกุลแรกๆ ที่ได้มีการศึกษายีนที่เกี่ยวข้องในการย่อยสลายสารประกอบ PAHs และปัจจุบันได้ศึกษายีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายเนฟธาลินอย่างสมบูรณ์ จากรายงานของ Yen และ Gunsalus (1982) พบพลาสมิด NAH7 ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายเนฟธาลินของ *P. putida* สายพันธุ์ G7 ที่มีการเรียงตัวของยีนเป็น 2 โอเปอรอน คือ โอเปอรอน *nah* ประกอบด้วย *nahABFCED* ประมวลรหัสสำหรับเอนไซม์ในส่วนวิถีบน โดยทำหน้าที่ในการย่อยสลายเนฟธาลินไปเป็นกรดซาลิไซลิก และโอเปอรอน *sal* ประกอบด้วย *nahGHINLJK* ประมวลรหัสสำหรับเอนไซม์ในส่วนวิถีล่าง โดยทำหน้าที่ในการย่อยสลายกรดซาลิไซลิกผ่านทางแคทีคอลและย่อยสลายจนกระทั่งได้เป็นไพรูเวตและอะซีทัลดีไฮด์ โดยมีระบบยีนควบคุม คือยีน *nahR* ซึ่งมีตำแหน่งอยู่ระหว่างโอเปอรอน *nah* และ *sal* โดยมีการ

จัดเรียงตัวของยีนในทิศทางตรงกันข้าม ทำหน้าที่ควบคุมการทำงานของทั้ง 2 โอเปอรอน ซึ่งต้องการสารเหนี่ยวนำ ได้แก่ กรดซาลิไซลิกและโปรตีน NahR ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์จากยีนควบคุม *nahR* ดังแสดงในรูปที่ 2.8



รูปที่ 2.8 การจัดเรียงตัวของยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายเนฟทาไลน์และระบบควบคุมการทำงานของยีน (Yen และ Gunsalus, 1982)

Pseudomonas sp. สายพันธุ์อื่นๆ ที่มีความสามารถในการย่อยสลายสารประกอบ PAHs ที่มีมวลโมเลกุลต่ำ เช่น เนฟทาไลน์และพีแนนทรีน ก็มียีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายสารประกอบ PAHs ที่มีการเรียงตัวคล้ายกับยีน *nah* ของ *P. putida* สายพันธุ์ G7 มากกว่า 90% (Simon และคณะ, 1993) จึงเรียกยีนกลุ่มนี้ว่ายีนกลุ่มคล้าย *nah* (*nah*-like) ตัวอย่างยีนในกลุ่มนี้ที่มีการศึกษา ได้แก่ ยีน *ndo* ของ *P. putida* สายพันธุ์ NCIB9816 (Kurkela และคณะ, 1988) ยีน *dox* ของ *Pseudomonas* สายพันธุ์ C18 (Denome และคณะ, 1993) ยีน *pah* ของ *P. aeruginosa* สายพันธุ์ PaK1 (Takizawa และคณะ, 1999) ยีน *pah* ของ *P. putida* สายพันธุ์ OUS82 (Kiyohara และคณะ, 1994) ยีน *nah* ของ *P. putida* สายพันธุ์ NCIB9816-4 (Simon และคณะ, 1993) และ ยีน *nah* ของ *P. stutzeri* สายพันธุ์ AN10 (Bosch และคณะ, 1999) เป็นต้น ตัวอย่างการเรียงตัวของยีนกลุ่มคล้าย *nah* ในวิถีบนของการย่อยสลายเนฟทาไลน์ ดังแสดงในรูปที่ 2.9



รูปที่ 2.9 การเรียงของยีนกลุ่มคล้าย *nah* ในวิถีบนของการย่อยสลายเนฟธาดีนของ *Pseudomonas* สายพันธุ์ต่างๆ ได้แก่ *P. putida* สายพันธุ์ G7 (Eaton 1994; Simon และคณะ 1993), *P. putida* สายพันธุ์ NCIB9816 (Kurkela และคณะ, 1988), *P. putida* สายพันธุ์ NCIB9816-4 (Simon และคณะ, 1993), *Pseudomonas* สายพันธุ์ C18 (Denome และคณะ, 1993), *P. aeruginosa* สายพันธุ์ PaK1 (Takizawa และคณะ, 1999), *P. putida* สายพันธุ์ OUS82 (Kiyohara และคณะ, 1994), และ *P. stutzeri* สายพันธุ์ AN10 (Bosch และคณะ, 1999)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

นอกจากแบคทีเรียในสกุล *Pseudomonas* แล้ว ยังพบว่าแบคทีเรียในสกุลอื่นๆ ที่มีความสามารถในการย่อยสลายสารประกอบ PAHs แต่พบว่าการเรียงตัวและลำดับเบสของยีนมีความแตกต่างไปจากยีนในกลุ่มคล้าย *nah*

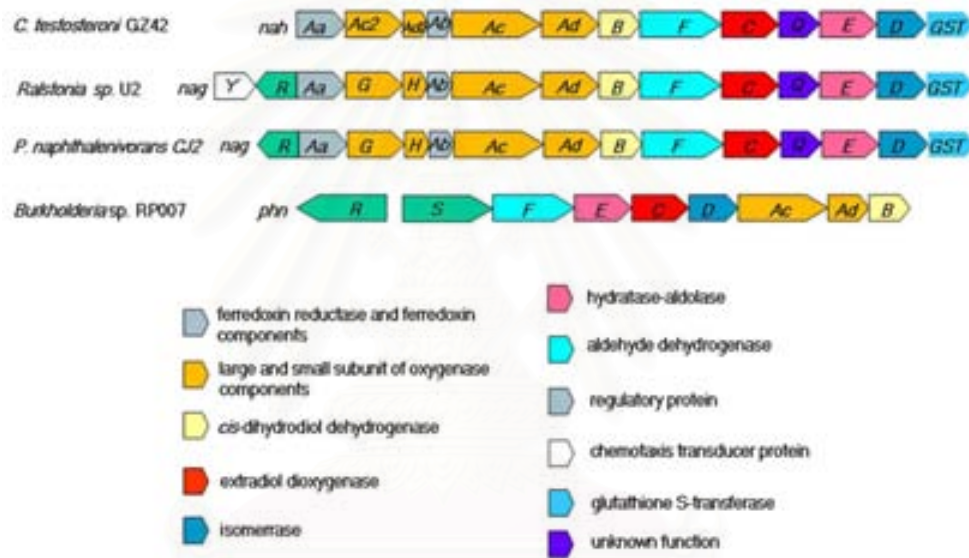
Goyal และ Zylstra (1996) รายงานเกี่ยวกับยีน *nah* ที่เกี่ยวข้องกับกรย่อยสลายพีแนทรีนและแนพทาลีนใน *Comamonas testosteroni* สายพันธุ์ต่างๆ พบว่ายีน *nah* จากสายพันธุ์ GZ42 มีความแตกต่างจากยีน *nah* ของ *P. putida* สายพันธุ์ G7 เนื่องจากไม่เกิดสัญญาณไฮบริดส์กับดีเอ็นเอติดตามยีน *nah* ที่สร้างจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *nah* บนพลาสมิด NAH7 และพบยีนประมวลรหัสเพอร์ริดอกซินรีดักเทส (*nahAa*) เพอร์ริดอกซิน (*nahAb*) ISP หน่วยย่อยแอลฟา และหน่วยย่อยบีตา (*nahAcAd*) ซิส-ไดไฮโดรไดออกซีไฮโดรจีเนส (*nahB*) และ แอลดีไฮด์ดีไฮโดรจีเนส (*nahF*) แต่ระหว่างยีน *nahAa* และ *nahAb* มียีน *nahAc2* และ *nahAd2* ที่ประมวลรหัส ISP หน่วยย่อยแอลฟา และหน่วยย่อยบีตาแทรกอยู่ การเรียงตัวของยีนแสดงดังในรูป 2.10

Laurie และ Lloyd-Jones (1999) ศึกษาเกี่ยวกับยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายพีแนทรีนและแนพทาลีนใน *Burkholderia* sp. สายพันธุ์ RP007 พบยีน *phnR* และ *phnS* ซึ่งประมวลรหัสโปรตีนควบคุม และพบยีนประมวลรหัสแอลดีไฮด์ดีไฮโดรจีเนส (*phnF*) ไฮดรอกซี-แอลโดเลส (*phnE*) ไดออกซีจีเนส (*phnC*) ไอโซเมอเรส (*phnD*) ISP หน่วยย่อยแอลฟา และบีตา (*phnAcAd*) และไดไฮโดรไดออกซีไฮโดรจีเนส (*phnB*) ซึ่งมีการเรียงตัวเป็น *phnFECDACAdB* ต่างจาก *nahAaAbAcAdBFCQED* ของสายพันธุ์ G7 และไม่พบยีนประมวลรหัสเพอร์ริดอกซินรีดักเทสและเพอร์ริดอกซิน แต่เมื่อโคลน *phnFECDACAdB* ร่วมกับ *phnR* และ *phnS* เข้าใน *E. coli* สายพันธุ์ DH5 α พบว่าสามารถย่อยสลายแนพทาลีนจนได้กรดซาลิไซลิกได้ และพบว่า *phn* นี้มีการถอดรหัสร่วมกันเมื่อเลี้ยงในแนพทาลีนและพีแนทรีน การเรียงตัวของยีน แสดงดังรูป 2.10

Zhou และคณะ (2001) รายงานว่า *Ralstonia* sp. สายพันธุ์ U2 ซึ่งสามารถย่อยสลายแนพทาลีนได้ มียีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายแนพทาลีนผ่านไประดเจเนทิลิก โดยพบยีนประมวลรหัสเพอร์ริดอกซินรีดักเทส (*nagAa*) เพอร์ริดอกซิน (*nagAb*) ISP หน่วยย่อยแอลฟา และหน่วยย่อยบีตา (*nagAcAd*) ซิส-ไดไฮโดรไดออกซีไฮโดรจีเนส (*nagB*) และ แอลดีไฮด์ดีไฮโดรจีเนส (*nagF*) ซึ่งมีการจัดเรียงตัวเหมือนกับยีน *nah* ในพลาสมิด NAH7 แต่ระหว่างยีน *nagAa* และ *nagAb* มียีน *nagGH* ซึ่งประมวลรหัสหน่วยย่อยของซาลิไซเลต 5-ไฮดรอกซีเลสแทรกอยู่ โดยมีการเรียงตัวของยีนดังนี้ *nagAaGHAbAcAdBFCQED* และพบ *nagJKLMN* ซึ่งประมวลรหัสยีนที่ย่อยสลายกรดเจเนทิลิกที่ตำแหน่ง downstream ของยีน *nagD* โดยเมื่อศึกษาโปรตีนที่ประมวลรหัสโดยยีน *nagI nagL* และ *nagK* พบว่ายีน *nagI* ประมวลรหัสเป็นเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายกรดเจเนทิลิกเป็น มาเลอิลไพรูเวต ยีน *nagL* ประมวลรหัสเป็นมาเลอิลไพรูเวตไอโซเมอเรสทำหน้าที่เปลี่ยนมาเลอิลไพรูเวตเป็นฟูมาริลไพรูเวต และยีน *nagK* ประมวลรหัสเป็นไฮโดรเลส

ทำหน้าที่ไฮโดรไลซ์ฟูมาริลไพรูเวตเป็นฟูมาเรตและไพรูเวต และคาดว่ายีน *nag* น่าจะมีการถอดรหัสร่วมกันเป็นโอเปอรอนเดียวกัน การเรียงตัวของยีน แสดงดังในรูป 2.10

Jeon และคณะ (2006) รายงานว่า *Polaromonas naphthalenivorans* สายพันธุ์ CJ2 มีความสามารถในการย่อยสลายแนพธาลิน และมียีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายผ่านทางกรดเจนทิลิกเช่นเดียวกับ *Ralstonia* sp. สายพันธุ์ U2 แต่พบว่ามียีน *nag* แบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม คือกลุ่มใหญ่และกลุ่มเล็ก โดยการเรียงตัวของยีนกลุ่มใหญ่นั้น พบว่ามีการเรียงตัวคล้ายคลึงกับการเรียงตัวของยีน *nag* ใน *Ralstonia* สายพันธุ์ U2 และหน้าที่ของยีนที่ประมวลรหัสการย่อยสลายแนพธาลินผ่านทางกรดเจนทิลิกเหมือนกันอีกด้วย ดังแสดงในรูป 2.10



รูปที่ 2.10 กลุ่มยีนที่มีการเรียงตัวแตกต่างจากกลุ่มคล้าย *nah* ได้แก่ยีน *nah* ของ *Comamonas testostevoni* สายพันธุ์ GZ42 (Goyal และ Zyltra, 1996) ยีน *nag* ของ *Ralstonia* sp. สายพันธุ์ U2 (Zhou และคณะ, 2001) ยีน *nag* ของ *Polaromonas naphthalenivorans* สายพันธุ์ CJ2 (Jeon และคณะ, 2006) และยีน *phn* ของ *Burkholderia* sp. สายพันธุ์ RP007 (Laurie และ Lloyd-Jones, 1999)

แบคทีเรียหลาย ๆ สายพันธุ์ในสกุล *Sphingomonas* พบว่ามีความสามารถในการย่อยสลายสารประกอบ PAHs ได้เช่นกัน แต่การเรียงตัวและลำดับเบสของยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายมีความแตกต่างไปจากแบคทีเรียในสกุลที่กล่าวในข้างต้น

Romine และคณะ (1999) รายงานเกี่ยวกับ *Sphingomonas aromaticivorans* สายพันธุ์ F199 (หลังจากนั้นได้ถูกเปลี่ยนเป็น *Novosphingobium aromaticivorans* สายพันธุ์ F199 (Takeuchi และคณะ, 2001)) โดยพบว่ามียีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายสารประกอบ PAHs ได้แก่ แนพทาลีน และฟีนแอนทริน รวมถึงไบฟีนิล บนพลาสมิดขนาด 184 กิโลเบส มียีนที่ประมวลรหัสเทอร์มินัลไดออกซีจีเนสทั้ง 6 ชุด ได้แก่ ยีน *bphA1[a-e]* *bphA2[a-e]* และ *bphA1fA2f* เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายสารประกอบอะโรมาติกหลายชนิด ได้แก่ ไบฟีนิล แนพทาลีน เมตา-ไซลีน และพารา-ครีซอล ซึ่งยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายแนพทาลีน ได้แก่ ยีน *nahE nahD* และ *nahF* โดยมีการกระจายตัวอยู่ห่างกันและถูกคั่นด้วยยีนในวิถีการย่อยสลายสารอื่น แต่เมื่อเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของยีนทั้ง 3 กับลำดับกรดอะมิโนของยีนกลุ่มคล้าย *nah* พบว่ายีนดังกล่าวมีเปอร์เซ็นต์ความเหมือนค่อนข้างต่ำ และยังพบยีนและการเรียงตัวของยีนลักษณะดังกล่าวใน *Sphingobium yanoikuyae* สายพันธุ์ B1 (ยีน *bphA1[a-e]* และ *bphA2[a-e]*) และ *Sphingobium* sp. สายพันธุ์ P2 (ยีน *ahdA1[a-e]* และ *ahdA2[a-e]*) (Pinyakong และคณะ, 2003)

Pinyakong และคณะ (2004) ได้ศึกษา *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ A4 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่สามารถย่อยสลายอะซีแนพทีนและอะซีแนพทีลีนแต่ไม่สามารถย่อยสลายสารประกอบ PAHs ชนิดอื่นๆ ได้ พบว่าแบคทีเรียสายพันธุ์นี้มียีน *arhA1* และ *arhA2* ที่ประมวลรหัสหน่วยย่อยแอลฟาและบีตาของเทอร์มินัลไดออกซีจีเนส ตามลำดับ โดยมีลำดับของกรดอะมิโนเหมือนกับโปรตีน PhnAc และ PhnAd ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายฟีนแอนทริน ใน *Burkholderia* sp. สายพันธุ์ RP007 56% และ 45% ตามลำดับ ต่อมาในงานวิจัยของ Kouzuma และคณะ (2006) รายงานว่าพบยีนเพอร์ริดอกซิน (*arhA3*) เพอร์ริดอกซิน ริตักเทส (*arhA4*) และยีนควบคุม (*arhR*) ของวิถีการย่อยสลายอะซีแนพทีน ซึ่งอยู่ห่างออกไปทาง upstream ของยีนที่ประมวลรหัสอะซีแนพทีนไดออกซีจีเนส

Demaneche และคณะ (2004) ทำการพิสูจน์เอกลักษณ์และศึกษาหน้าที่ของยีนประมวลรหัสไดออกซีจีเนสจาก *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ CHY-1 โดยการแยกโปรตีนจากสายพันธุ์ CHY-1 ที่เลี้ยงในอาหารที่มีไครซินและแนพทาลีนเป็นแหล่งคาร์บอน พบโปรตีน 2 ชนิดที่มีลำดับกรดอะมิโนที่คล้ายหน่วยย่อยบีตาของเทอร์มินัลไดออกซีจีเนส (*BphA2f*) และเอ็กซ์ตราไดออกซีจีเนส (*BphC*) ของ *Novosphingobium aromaticivorans* สายพันธุ์ F199 (Romine และคณะ, 1999) เพื่อออกแบบตัวติดตามเพื่อคัดแยกโคลนจากห้องสมุดดีเอ็นเอของสายพันธุ์ CHY-1 พบว่า

โคลนแรกบรรจุ 3 ยีน คือ ยีนประมวลรหัสเทอร์มินัลออกซิจีเนส (*phnA1_a*, *phnA2_a*; โปรตีน PhnI) และเอริลแอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนส (*phnB*) โคลนที่ 2 พบ 6 ยีนประมวลรหัสเอ็กตราไดออกไซด์ออกซิจีเนส (*phnC*), เพอร์รีดอกซิน (*phnA3*), รีดักเทส (*phnA4*), ออกซิจีเนส (*phnA1_b*, *phnA2_b*; โปรตีน PhnII) และไอโซเมอเรส (*phnD*) เมื่อศึกษาหน้าที่ของ PhnI และ PhnII ใน *E. coli* พบว่า PhnI สามารถย่อยสลายโครซีนและ สารในกลุ่ม PAHs ที่มีวงเบนซินมากกว่า 2 วง ส่วน PhnII สามารถย่อยสลายกรดซาลิไซลิก และอนุพันธ์ของกรดซาลิไซลิก นอกจากนี้พบว่าสายพันธุ์กลายของ *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ CHY-1 ที่บกพร่องการผลิต PhnI ไม่สามารถย่อยโครซีนและ สารประกอบ PAHs แสดงให้เห็นว่ายีนประมวลรหัส PhnI สามารถผลิตเอนไซม์ที่ย่อยสลายโครซีนและสารประกอบ PAHs ของสายพันธุ์ CHY-1

กรองกาญจน์ สายพิณ (2006) ได้ศึกษา *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ SP2 ซึ่งสามารถย่อยสลายอะซีแนพทินเป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงาน โดยโคลนขึ้นดีเอ็นเอขนาด 4.6 กิโลเบส บรรจุยีนออกซิจีเนสจากสายพันธุ์ SP2 ซึ่งแยกและคัดเลือกโคลนโดยอาศัยสมบัติการเปลี่ยนอินโดลเป็นอินดิโกของออกซิจีเนส ซึ่งทำงานร่วมกับโปรตีนส่งถ่ายอิเล็กตรอนจาก *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ P2 และเมื่อวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์พบ *orf2* และ *orf3* ซึ่งประมวลรหัสโปรตีนคล้ายกับหน่วยย่อยแอลฟาและบีตาของเทอร์มินัลออกซิจีเนส (ArhA1 และ ArhA2) จากสายพันธุ์ A4 ถึง 99% ตามลำดับ โดยลำดับกรดอะมิโนของ ORF2 แตกต่างจาก ArhA1 ของสายพันธุ์ A4 ที่ตำแหน่ง Met261 และ Ser347 และพบบริเวณอนุรักษ์ของหน่วยย่อยแอลฟาเทอร์มินัลออกซิจีเนส คือ บริเวณอนุรักษ์ใน Rieske center ([2Fe-2S]) (Cys50, Cys67, His52 และ His70) และบริเวณอนุรักษ์ที่จับกับ Fe²⁺ ที่บริเวณเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ (His204, His209 และ Asp358) และเมื่อศึกษาความจำเพาะต่อสารตั้งต้นของเทอร์มินัลออกซิจีเนสจากสายพันธุ์ SP2 ที่แสดงออกใน *E. coli* พบว่าจำเพาะต่อสารประกอบ PAHs แตกต่างจากเทอร์มินัลออกซิจีเนสของสายพันธุ์ A4 ใน *E. coli*

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

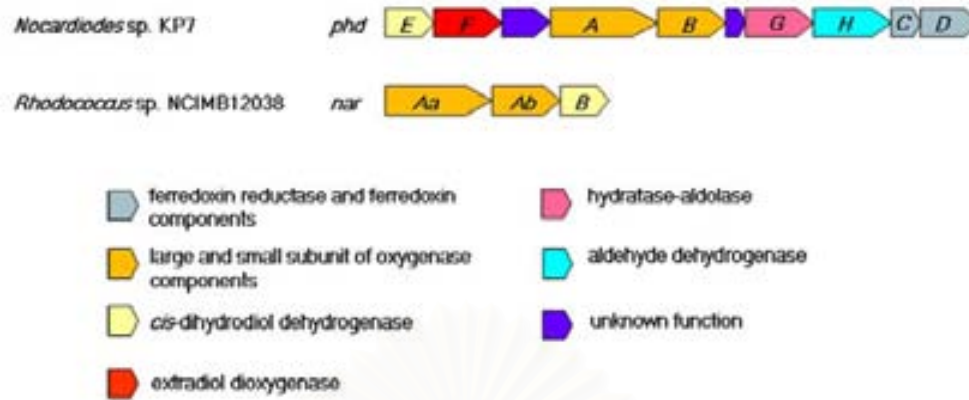
2.5.2 ยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายสารประกอบ PAHs ในแบคทีเรียแกรมบวก

ได้มีการศึกษาเกี่ยวกับยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายสารประกอบ PAHs ในแบคทีเรียแกรมบวก ซึ่งพบว่า การเรียงตัวและลำดับเบสของยีนจะมีความแตกต่างไปจากแบคทีเรียในกลุ่มแกรมลบ

Saito และคณะ (2000) รายงานว่า *Nocardiooides* sp. สายพันธุ์ KP7 มียีน *phd* ซึ่งประมวลรหัสเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายพีแนทรีนผ่านทางพธาลเอท (phthalate) โดย *phd* ประกอบด้วยยีน 2 กลุ่ม คือ กลุ่มแรกประกอบด้วย *phdEFABGHCD* ประมวลรหัสเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ในการย่อยสลายพีแนทรีนไปเป็น 1-ไฮดรอกซี-2-แนพธานีโอเอท (1-hydroxy-2-naphthoate) และ *phdIJK* ประมวลรหัสยีนที่ทำหน้าที่ในการย่อยสลาย 1-ไฮดรอกซี-2-แนพธานีโอเอท ไปเป็นพธาลเอท การเรียงตัวของยีนดังแสดงในรูป 2.11

Larkin และคณะ (1999) และ Kulakov และคณะ (2005) ยังได้รายงานถึงยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายแนพธาลีนของแบคทีเรียแกรมบวกพบว่า *Rhodococcus* sp. สายพันธุ์ NCIMB12038 มียีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายแนพธาลีนทางด้านเมตา กระจ่ายอยู่บน พลาสมิด p2SL1 โดยพบยีน *narAa narAb* และ *narB* ประมวลรหัสหน่วยย่อยแอลฟาและบีตาของแนพธาลีนไดออกซิจีเนส และ ซิล-แนพธาลีนไดไฮโดรไดออกซิไดไฮโดรจีเนส ตามลำดับ พบว่ายีนทั้ง 3 มีการถอดรหัสร่วมกันเพื่อตอบสนองต่อแนพธาลีนเท่านั้น โดยเมื่อเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของยีน *narAa* และ *narAb* กับฐานข้อมูล EMBL และ GenBank พบว่ายีน *narAa* และ *narAb* มีความเหมือนกับยีนประมวลรหัสหน่วยย่อยแอลฟาและบีตาของริงไฮดรอกซิเลทิงไดออกซิจีเนส (ring-hydroxylating dioxygenase) ของ *Pseudomonas* sp. เพียง 31% และ 39% ตามลำดับ และไม่พบยีนประมวลรหัสเพอร์รีดอกซินและเพอร์รีดอกซินรีดักเทส นอกจากนี้ยังพบยีน *narR1* และ *narR2* ประมวลรหัสโปรตีนที่ควบคุมการทำงานของยีนกลุ่มนี้ด้วย การจัดตัวของยีนดังแสดงในรูป 2.11

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 2.11 การเรียงตัวของกลุ่มยีนในแบคทีเรียแกรมบวก ได้แก่ *Nocardiodes* sp. สายพันธุ์ KP7 (Saito และคณะ, 2000) และ *Rhodococcus* sp. สายพันธุ์ NCIMB12038 (Larkin และคณะ, 1999; Kulakov และคณะ, 2000)

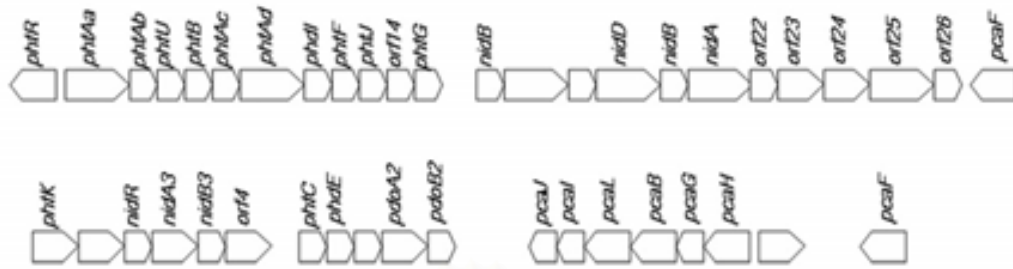
Khan และคณะ (2001) ได้ใช้เทคนิคทางโปรตีน (Proteomic) ศึกษา *Mycobacterium vanbaalenii* สายพันธุ์ PYR-1 ซึ่งมีความสามารถในการย่อยสลายไพรีน ฟลูออแรนทรีน พีแนนทรีน แอนทราซีน เบนโซ[เอ]ไพรีน โดยเลี้ยง *Mycobacterium vanbaalenii* สายพันธุ์ PYR-1 ในอาหารที่มีไพรีน หรือพีแนนทรีนหรือไดเบนโซไทโอพีน พบโปรตีนอย่างน้อย 6 ชนิด เมื่อวิเคราะห์ลำดับของกรดอะมิโนของโปรตีนที่มีขนาด 50 กิโลดาลตัน พบว่ามีความคล้ายคลึงกับลำดับของกรดอะมิโนของไดออกซิจีเนส และเมื่อทำการค้นหาโคลนจากห้องสมุดดีเอ็นเอโดยการใช้ลำดับของอะมิโนของโปรตีนที่มีขนาด 50 กิโลดาลตัน เป็นโพรบติดตามทำให้ทราบว่า *Mycobacterium vanbaalenii* สายพันธุ์ PYR-1 มียีน *nidA* ประมวลรหัสหน่วยย่อยแอลฟาของไดออกซิจีเนสใน ส่วน ISP ยีน *nidB* ประมวลรหัสหน่วยย่อยบีตาของไดออกซิจีเนสในส่วน ISP และยีน *nidD* ประมวลรหัสอัลติไฮโดรจีเนส และพบอีกว่าลำดับนิวคลีโอไทด์และการจัดเรียงตัวของยีนแตกต่างจากยีนในกลุ่มคล้าย *nah* โดยมีการเรียงตัวเป็น *nidDBA* และลำดับนิวคลีโอไทด์มีความแตกต่างจาก *nah*-like มากกว่า 60% ต่อมา Kim และคณะ (2006b) ได้ใช้เทคนิคทางโปรตีนศึกษา *Mycobacterium vanbaalenii* สายพันธุ์ PYR-1 เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีฟลูออแรนธิน ทำให้พบยีน *nidA3B3* ที่ประมวลรหัสไดออกซิจีเนสซึ่งมีความจำเพาะต่อฟลูออแรนธินและไพรีน จนกระทั่งปี 2007 Kim และคณะ ได้ศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมดในจีโนมของสายพันธุ์ PYR-1 สามารถวิเคราะห์หน้าที่ของยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายไพรีนจนเข้าสู่วัฏจักรกรดไตรคาร์บอกซิลิก ดังแสดงในตารางที่ 2.3 และการเรียงตัวของยีนแสดงในรูป 2.12 และ Kweon และคณะ (2007) ได้วิเคราะห์ยีนทั้งหมดที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายฟลูออแรนธิน และนำเสนอวิธีการย่อยสลายฟลูออแรนธินจนเข้าสู่วัฏจักรกรดไตรคาร์บอกซิลิกได้ อย่างสมบูรณ์

ตารางที่ 2.3 หน้าที่ของยีนที่เกี่ยวข้องในการย่อยสลายไพรีนของ *Mycobacterium vanbaalenii* สายพันธุ์ PYR-1 (Kim และคณะ, 2007)

ชื่อยีน	หน้าที่ประมวลรหัสเอนไซม์	ลำดับขั้นที่เข้าทำ ปฏิกิริยา รูปที่ 2.7 หน้า 21
<i>nidA</i>	pyrene/phenanthrene ring hydroxylating oxygenase, α subunit	1
<i>nidB</i>	pyrene/phenanthrene ring hydroxylating oxygenase, β subunit	1
<i>nidB2</i>	pyrene/phenanthrene ring hydroxylating oxygenase, β subunit	1
<i>phdE</i>	dihydroldiol dehydrogenase	2 6 และ 23
<i>phdF</i>	ring cleavage dioxygenase	3 และ 7
<i>phtC</i>	decarboxylase	4 และ 15
<i>pdoA2</i>	phenanthrene ring hydroxylating oxygenase, α subunit	5
<i>pdoB2</i>	phenanthrene ring hydroxylating oxygenase, β subunit	5
<i>phdG</i>	hydratase-aldolase	8
<i>nidD</i>	aldehyde dehydrogenase	9
<i>phdI</i>	1-hydroxy-2-naphthoate dioxygenase	10
<i>phdJ</i>	<i>trans</i> -2'-carboxybenzaldehyde dehydrogenase	11
<i>phdK</i>	2-carboxylbenzaldehyde dehydrogenase	12
<i>phtAa</i>	phthalate 3,4-dioxygenase, α subunit	13

ตารางที่ 2.3 (ต่อ) หน้าที่ของยีนที่เกี่ยวข้องในการย่อยสลายไพรีนของ *Mycobacterium vanbaalenii* สายพันธุ์ PYR-1 (Kim และคณะ, 2007)

ชื่อยีน	หน้าที่ประมวลรหัสเอนไซม์	ลำดับขั้นที่เข้าทำ ปฏิกิริยา รูปที่ 2.7 หน้า 21
<i>phtAb</i>	phthalate 3,4-dioxygenase, β subunit	13
<i>phtAc</i>	oxygenase ferredoxin component	1 5 13 และ 22
<i>phtAd</i>	oxygenase reductase coponent	1 5 13 และ 22
<i>phtB</i>	phthalate 3,4-dihydrodiol dehydrogenase	14
<i>pcaG</i>	protocatechuate 3,4-dioxygenase, α subunit	16
<i>pcaH</i>	protocatechuate 3,4-dioxygenase, β subunit	16
<i>pcaB</i>	β -carboxy- <i>cis,cis</i> -muconate cycloisomerase	17
<i>pcaL</i>	γ -carboxymuconolactone decarboxylase/ β - keto adipate	18 และ 19
<i>pcaI</i>	β -keto adipate succinyl-CoA transferase, α subunit	20
<i>pcaJ</i>	β -keto adipate succinyl-CoA transferase, β subunit	20
<i>pcaF</i>	β -keto adipyl-CoA thiolase	21 24 และ 25
<i>nidA3</i>	fluoranthene/pyrene ring hydroxylating, α subunit	1 และ 22
<i>nidB3</i>	fluoranthene/pyrene ring hydroxylating, β subunit	1 และ 22



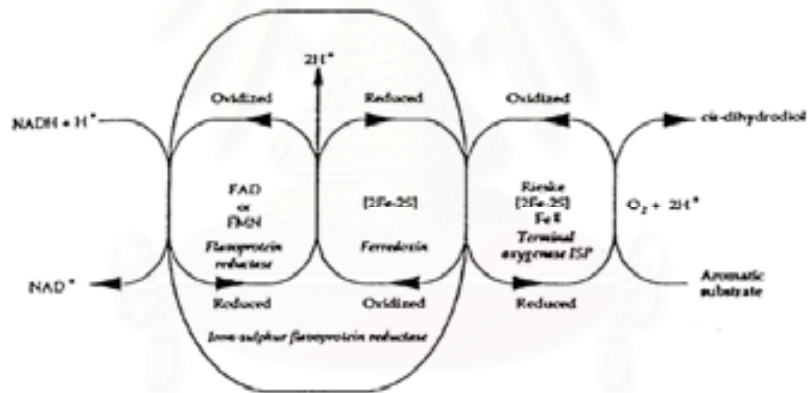
รูปที่ 2.12 การเรียงตัวของยีนที่เกี่ยวข้องในการย่อยสลายไฟรีนของ *Mycobacterium vanbaalenii* สายพันธุ์ PYR-1 (Kim และคณะ, 2007)

นอกจากนี้ยังมีงานวิจัยที่ได้ศึกษาพันธุกรรมที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายไฟรีนในแบคทีเรียอื่นๆ เช่น ในงานวิจัยของ Krivobok และคณะ (2003) ได้ใช้เทคนิคทางโปรตีนศึกษาหาพันธุกรรมที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายไฟรีนใน *Mycobacterium* sp. สายพันธุ์ 6PY1 พบว่ามีการแสดงออกของโปรตีน Pdo1 และ Pdo2 ซึ่งมีหน้าเป็นไดออกซิจีเนสเมื่อเลี้ยง *Mycobacterium* sp. สายพันธุ์ 6PY1 ในอาหารที่มีไฟรีน หรือพีแนนทริน หรือกรดเบนโซอิก โดยโปรตีนทั้ง 2 ชนิดถูกประมวลผลมาจากยีน *pdoA1B1* และ *pdoA2B2* ตามลำดับ และเมื่อศึกษาความจำเพาะของโปรตีนทั้ง 2 พบว่าโปรตีน PdoA1 มีความจำเพาะต่อไฟรีนสูงกว่าพีแนนทรินแต่โปรตีน PdoA2 มีความจำเพาะต่อพีแนนทรินสูงกว่าไฟรีน สำหรับในงานวิจัยของ Sho และคณะ (2004) ได้ศึกษาพันธุกรรมที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายไฟรีนใน *Mycobacterium* sp. สายพันธุ์ S65 โดยใช้ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของแบคทีเรียด้วยไพรเมอร์ที่มียีน *nidA* เป็นยีนเป้าหมาย แล้วใช้ผลิตภัณฑ์ PCR เป็นโพรบในการทำเซาท์เทิร์นไฮบริไดเซชัน (Southern hybridization) พบว่า *Mycobacterium* sp. สายพันธุ์ S65 มีกลุ่มยีน *nid* และ *pdo* และเมื่อใช้ปฏิกิริยาลูกโซ่แบบย้อนกลับ (Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction; RT-PCR) พบว่ามีการแสดงออกของกลุ่มยีนทั้ง 2 กลุ่ม โดยเลี้ยง *Mycobacterium* sp. สายพันธุ์ S65 ในอาหารที่มีไฟรีน

2.6 ไดออกซิจีเนส

ออกซิจีเนสเป็นเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาการเติมออกซิเจนแก่สารประกอบอินทรีย์ มีหลายชนิดซึ่งแตกต่างกันในทางโครงสร้าง กลไกการทำงาน และความต้องการของโคเอนไซม์ (coenzyme) ในการเร่งปฏิกิริยา เมื่อจำแนกออกซิจีเนสตามลักษณะการเร่งปฏิกิริยาสามารถจำแนกออกซิจีเนสได้ 2 กลุ่ม คือ โมโนออกซิจีเนสและไดออกซิจีเนส ซึ่งจะเร่งปฏิกิริยาการเติมออกซิเจน 1 และ 2 อะตอมเข้ายังโมเลกุลของสารตั้งต้น ตามลำดับ

อะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนไดออกซิจีเนส เป็นไดออกซิจีเนสที่สำคัญในการย่อยสลายสารประกอบ PAHs ซึ่งถูกจัดอยู่ในกลุ่ม อะโรมาติกริงไฮดรอกซิเลทิงไดออกซิจีเนส (aromatic ring-hydroxylating dioxygenase) (Mason และ Cammack, 1992; Butler และ Mason, 1997) โดยที่สมาชิกในกลุ่มนี้จะมี 1 หรือ 2 โปรตีนที่ทำหน้าที่ขนส่งอิเล็กตรอนก่อนหน้าออกซิจีเนส ดังแสดงในรูปที่ 2.13

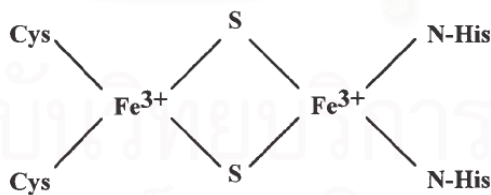


รูปที่ 2.13 การจัดเรียงของระบบการทำงานร่วมกันของริงไฮดรอกซิเลทิงไดออกซิจีเนส (Butler และ Mason, 1997)

Kauppi และคณะ (1998) ได้รายงานถึงโครงสร้างของแนพทาลีน 1,2-ไดออกซีซีเนส (NDO) ซึ่งต่อมาได้ใช้เป็นต้นแบบในการศึกษาของระบบเอนไซม์ที่อยู่ในกลุ่มนี้ โครงสร้างของ NDO มีลักษณะเป็น $\alpha_3\beta_3$ hexamer โดยการทำงานของหน่วยย่อยแอลฟาจะควบคุมความจำเพาะของเอนไซม์ต่อสารตั้งต้น และในแต่ละหน่วยย่อยแอลฟาประกอบไปด้วย 2 โดเมน ได้แก่ Rieske โดเมน และ catalytic โดเมน ใน Rieske โดเมน มี [2Fe-2S] โดย Fe^{3+} อะตอมแรกจะเกิดพันธะซัลไฟด์กับกรดอะมิโน Cys-81 และ Cys-101 ในขณะที่ Fe^{3+} อีกอะตอมจะเกิดพันธะซัลไฟด์กับกรดอะมิโน His-83 และ His-104 ดังแสดงในรูปที่ 2.14 ใน catalytic โดเมน มี Fe^{3+} ที่บริเวณเร่ง จะเกิดพันธะไฮโดรเจนกับกรดอะมิโน His-208 His-213 Asp-326 และโมเลกุลของน้ำ ดังแสดงในรูปที่ 2.15 สำหรับการทำงานของหน่วยย่อยบีตานั้นยังไม่ทราบหน้าที่ที่แน่ชัดในแง่ของการเข้าทำปฏิกิริยากับสารตั้งต้นกล่าวคือหน่วยย่อยบีตาไม่เกี่ยวข้องกับการเร่งปฏิกิริยาหรือความจำเพาะต่อเอนไซม์ แต่เมื่อทำบริสุทธิ์ของหน่วยย่อยแอลฟาพบว่าทำให้ไม่มีแอกติวิตี แต่แอกติวิตีจะมีขึ้นเมื่อรวมหน่วยย่อยแอลฟาเข้าหน่วยย่อยบีตา (Jiang และคณะ, 1999) หน้าที่หลักของหน่วยย่อยบีตาที่มีรายงานคือเป็นโครงสร้างของโปรตีน

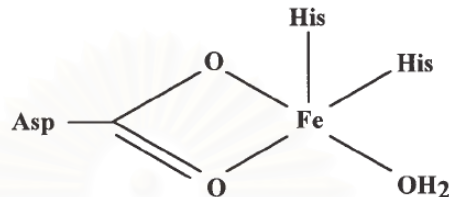
		81	83		101	104			
9816-4 NahAc	FLNV	C	R	H	RGKTLVSVEAGNAKGFV	C	SY	H	GWGFGSNGELQS
DNT DntAc	FLNV	C	R	H	RGKTIVDAAEAGNAKGFV	C	GY	H	GWGYGSNGELQS
JS42 NtdAc	FLNV	C	R	H	RGKTLVHTEAGNAKGFV	C	GY	H	GWGYGSNGELQS
LB400 BphA	FLNQ	C	R	H	RGMRICRSDAGNAKAFT	C	SY	H	GWAYDIAGKLVN
KF707 BphA1	FLNQ	C	R	H	RGMRICRSDAGNAKAFT	C	SY	H	GWAYDIAGKLVN
KKS102 BphA1	FLNQ	C	R	H	RGMRICRSDAGNAKAFT	C	TY	H	GWAYDIAGNLVN
PpF1 TodC1	FLNQ	C	R	H	RGMRICRADAGNAKAFT	C	SY	H	GWAYDTAGNLVN
P51 TcbAa	FLNQ	C	R	H	RGMRICRSDAGNAKAFT	C	SY	H	GWAYDTAGNLVN

Consensus sequence CxH-x15-17-CxxH



รูปที่ 2.14 Rieske iron-sulfur center ซึ่งเชื่อมต่อกับบริเวณอนุรักษ์ Cysteines และ Histidines (Parales, 2003)

			208		213		362
9816-4	NahAc	ENFVGDAY	H	VGWT.	H	ASSLRSG	D
DNT	DntAc	ENFVGDIY	H	IGWT.	H	ASILRAG	D
JS42	NtdAc	ENFVGDIY	H	VGWT.	H	AAALRAG	D
KKS102	BphA1	EQFCSDMY	H	AGTMS	H	LSGVLSS	D
KF707	BphA1	EQFCSDMY	H	AGTMS	H	LSGILAG	D
LB400	BphA	EQFCSDMY	H	AGTTT	H	LSGILAG	D
F1	TodC1	EQFCSDMY	H	AGTTS	H	LSGILAG	D
P51	TcbAa	EQFCSDAY	H	AGTTS	H	LSGILAG	D



รูปที่ 2.15 การเชื่อมต่อระหว่างอะตอมเหล็กกับ His-208 His-213 Asp-326 และโมเลกุลน้ำ (Parales, 2003)

ในงานวิจัยของ Kim และคณะ (2006a) ได้คัดแยก *Pseudomonas rhodesiae* สายพันธุ์ KK1 จากแหล่งดิน ซึ่งพบว่าสามารถย่อยสลายสารประกอบอะโรมาติก ได้แก่ เบนซีน เบนโซเอต ไบฟีนิล คาร์บาไซล ρ -คิวเมต และวานิลเลต และสารประกอบ PAHs ได้แก่ แอนทราซีน แนพทาลีน และฟิแนนทรีน เมื่อเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอบริเวณ Riese ของยีนไดออกซิจีเนส พบว่าผลการวิเคราะห์กรดอะมิโนจากลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากจำนวน 50 โคลน สามารถแบ่งได้เป็น 5 กลุ่ม คือ กลุ่ม G1 ได้แก่ ไดออกซิจีเนสที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายแนพทาลีน กลุ่ม G2 ได้แก่ ไดออกซิจีเนสที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายไบฟีนิลหรือฟิแนนทรีน กลุ่ม G3 ได้แก่ ไดออกซิจีเนสที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายคาร์บาไซลหรือเบนโซเอต กลุ่ม G4 ได้แก่ ไดออกซิจีเนสที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายวานิลเลต และกลุ่ม G5 ยังไม่สามารถระบุได้

Ni Chadhain และคณะ (2006) ออกแบบไพรเมอร์ที่มีเป้าหมายคือส่วนของยีนประมวลรหัสของ Riese iron center ของไดออกซิจีเนสที่ย่อยสลาย PAHs ซึ่งไพรเมอร์ที่สร้างขึ้นนี้ใช้ในการติดตามการเปลี่ยนแปลงประชาคมของแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ปนเปื้อนด้วย แนพทาลีน ฟิแนนทรีน และไพรีน โดยสกัดดีเอ็นเอหลังจากมีการย่อยสลายของสารประกอบ PAHs และเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอบริเวณส่วนของ Riese และทำห้องสมุดยีน พบว่าผลการวิเคราะห์กรดอะมิโนจากลำดับนิวคลีโอไทด์ ของโคลนที่มาจากอาหารเลี้ยงเชื้อที่ปนเปื้อนด้วยแนพทาลีน มีความคล้ายกับแนพทาลีนไดออกซิจีเนสของ *Pseudomonas putida* สายพันธุ์ NCIB9816-4 และ *Comamonas testosteroni* สายพันธุ์ GZ42 โคลนที่มาจากอาหารเลี้ยงเชื้อที่ปนเปื้อนด้วยฟิแนนทรีน มีความคล้ายกับแอลคิลเบนซีนไดออกซิจีเนสของ *Rhodococcus* sp. สายพันธุ์ DK17 ได

เบนโซไทโอพีนไดออกซิจีเนสของ *Burkholderia* sp. สายพันธุ์ DBT1 ไดออกซิจีเนสที่ยังระบุไม่ได้ของ *Sphingomonas aromaticivorans* และ คาร์บาไซลไดออกซิจีเนสของ *Pseudomonas* sp. สายพันธุ์ CA10 และโคลนที่มาจากอาหารเลี้ยงเชื้อที่ปนเปื้อนด้วยไฟรีน มีความคล้ายกับ แอลคิลเบนซีนไดออกซิจีเนสของ *Rhodococcus* sp. สายพันธุ์ DK17 และ ไดออกซิจีเนสที่ยังระบุไม่ได้ของ *Sphingomonas aromaticivorans* ซึ่งโคลนที่ได้จากอาหารเลี้ยงเชื้อที่ปนเปื้อนด้วยไฟรีนมีความคล้ายกับโคลนที่ได้จากอาหารเลี้ยงเชื้อที่ปนเปื้อนด้วยพีแนนทรีน แสดงให้เห็นว่า ในสภาวะการเลี้ยงเชื้อที่แตกต่างกันทำให้พบยีนประมวลรหัสไดออกซิจีเนสที่ต่างกันออกไป



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 3

อุปกรณ์ เคมีภัณฑ์ และวิธีดำเนินการวิจัย

อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

1. กระจกชั่งตวงพลาสติก ขนาด 1 และ 5 มิลลิลิตร บริษัท นิโปร (ประเทศไทย) จำกัด
2. ชุดกรองสำเร็จรูปชนิด PTFE ขนาดความกว้างรู 0.2 ไมครอนเมตร บริษัท Chrom Tech, USA
3. ชุดเครื่องระเหยแห้งสูญญากาศ (Rotary vacuum evaporator) บริษัท EYELA, Japan
4. ชุดเครื่องเจลอิเล็กโทรโฟเรซิส mini Gel migration trough รุ่น i-mupid บริษัท COSMO BIO, Japan
5. ชุดเครื่องไฮเพอร์ฟอมาชันลิกวิดโครมาโตกราฟี (High Performance Liquid Chromatography, HPLC)
 - ลิกวิดโครมาโตกราฟี (liquid chromatography) รุ่น LC-A3 ของบริษัท Shimadzu, Japan.
 - คอลัมน์ (column) : Senshu Pak Pegasil ODS ขนาด 4.6×150 มิลลิเมตร ของบริษัท Senshu Scientific, Japan.
 - เครื่องตรวจสอบ (UV-visible detector) รุ่น SPD-2A ของบริษัท Shimadzu, Japan.
 - เครื่องบันทึก (recorder) Chromatopac รุ่น C-R1A ของบริษัท Shimadzu, Japan.
 - กระจกชั่งตวงขนาดเล็ก (microsyringe) รุ่น MS-R50 ของบริษัท Exmire, USA.
6. ตู้เขี่ยเชื้อแบบ ISSCO laminar flow รุ่น HT-122.5 บริษัท International Scientific supply, Japan
7. ตู้แช่แข็งจุดเยือกแข็งต่ำ (deep freezer) อุณหภูมิ -70°C รุ่น ULT1786 บริษัท Forma Scientific, USA
8. ตู้แช่แข็งจุดเยือกแข็งต่ำ (deep freezer) อุณหภูมิ -20°C รุ่น MDF-U332 บริษัท Sanyo Electric, Japan
9. ตู้บ่มเชื้ออุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ยี่ห้อ Memmert รุ่น BE800, Germany
10. ตู้บ่มเชื้ออุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ยี่ห้อ New Brunswick Scientific ของบริษัท Edison, NJ., USA
11. ตู้อบฆ่าเชื้อ (hot air oven) รุ่น D06063 บริษัท Memmert, Germany
12. ตู้อบแห้ง (oven) บริษัท Contherm Scientific, New Zealand

13. หลอดเก็บเชื้อแช่แข็ง (cryotube) บริษัท Nalgene, USA
14. หัวกรองพลาสติกและกระดาษกรองขนาด 0.22 ไมโครเมตร
15. หัวกรองสำเร็จรูป ขนาดความกว้างรู 0.22 ไมโครเมตร
16. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath) รุ่น digital water bath SB-1000 บริษัท Eyla, Japan
17. เครื่องกำเนิดเสียงความถี่สูง (ultrasonicator) ชนิดอ่าง รุ่น FS4000 บริษัท Decan Ultrasonics, England
18. เครื่องเขย่าชนิดควบคุมอุณหภูมิ (controlled environment incubator shaker) รุ่น G-27 บริษัท New Brunswick Scientific, USA
19. เครื่องควบคุมอุณหภูมิและระเหยแห้งแบบให้ความร้อน (Digital DryBath) รุ่น D1100 บริษัท Labnet International, USA
20. เครื่องฉายแสงอัลตราไวโอเล็ต ของบริษัท Fotodyne Co., Inc., USA
21. เครื่องชั่ง รุ่น P2002-S และ AG285 บริษัท Mettler Toledo, Switzerland
22. เครื่องปั่นผสม (vortex mixer) รุ่น Gene 2 บริษัท Scientific Industries, USA
23. เครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดควบคุมอุณหภูมิ (refrigerated centrifuge) รุ่น 1920 บริษัท Kubota, Japan
24. เครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดตั้งโต๊ะ (bench-top centrifuge) รุ่น Mikro20 บริษัท Hettich zentrifugen, Germany
25. เครื่องตรวจสอบเจล (Gel documentation system) รุ่น Gel DOC 2000™ บริษัท Bio-Rad Laboratories Inc., USA
26. เครื่องนึ่งอบฆ่าเชื้อ (autoclave) บริษัท Kakusan, Japan
27. เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) รุ่น UV-160A บริษัท Shimadzu, Japan
28. เครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (DNA Thermal Cycler) รุ่น 2400 บริษัท Perkin Elmer, USA
29. ไมโครปิเปตต์ (micropipette) ขนาด 2, 10, 20, 200, 1000 และ 5000 ไมโครลิตร บริษัท Gilson, France

เคมีภัณฑ์

1. กรดเมอร์ฟอลินอีเทนซัลโฟนิก (2-[N-morpholino]ethanesulfonic acid, MES) บริษัท Sigma, USA
2. กรดไฮโดรคลอริก (HCl) บริษัท BDH Chemicals, Australia
3. กลีเซอรอล (glycerol) บริษัท Research organics, Inc., USA
4. กลูโคส (glucose) บริษัท Merck, Germany
5. ทริปโตเนน (tryptone) บริษัท Difco Laboratories, USA
6. ชุดสกัดพลาสมิดปริมาณน้อย QIAprep Spin Miniprep Kit บริษัท Qiagen, Germany
7. ชุด PCR purification kit QIAquick PCR purification kit บริษัท Qiagen, Germany
8. ชุดเอนไซม์ตัดจำเพาะ EcoRI บริษัท Promega, USA
9. ชุดเอนไซม์ Taq DNA polymerase บริษัท New England Biolabs, USA
10. ชุด PCR cloning kit pGEM-T Easy Vector System II บริษัท Promega, USA
11. ชุด PCR cloning kit pDrive cloning vector บริษัท Qiagen, Germany
12. ผงสกัดจากยีสต์ (yeast extract) บริษัท Difco Laboratories, USA
13. ฟลูออรีน (fluorene) บริษัท Kanto Chemical Co., INC, Japan
14. ฟลูออแรนทีน (fluoranthene) บริษัท Kanto Chemical Co., INC, Japan
15. ฟีนอล (phenol) บริษัท Merck, Germany
16. ฟีนแอนทรีน (phenanthrene) บริษัท Sigma, USA
17. รูบิเดียมคลอไรด์ (RbCl) บริษัท Sigma, USA
18. สารปฏิชีวนะแอมพิซิลลิน (ampicillin, Ap) ($C_{16}H_{18}N_3NaO_4S$) บริษัท Nacalai Tesque, Japan
19. สีบรอมฟีนอลบลู (bromphenol blue) บริษัท Fluka, Germany
20. อะกาโรสเจล (agarose gel) บริษัท IUI, Japan
21. อะซีแนฟทีน (acenaphthene) บริษัท Wako, Japan
22. อะซีแนฟทิลีน (acenaphthylene) บริษัท Kanto Chemical Co., INC, Japan
23. เบนโซ(เอ)ไพเร็น (benzo(a)pyrene) บริษัท Kanto Chemical Co., INC, Japan
24. เฟอรัสคลอไรด์ ($FeCl_3 \cdot 6H_2O$) บริษัท Merck, Germany
25. เมทานอล (CH_3OH) บริษัท Merck, Germany
26. เอทิลอะซีเตต (C_2H_5) บริษัท Merck, Germany

27. เอทิลีนไดเอมีนเททราอะซิติกแอซิด (ethylenediaminetetraacetic acid, EDTA),
($C_{10}H_{14}N_2O_8Na_2 \cdot 2H_2O$) บริษัท Sigma, USA
28. แคลเซียมคลอไรด์ ($CaCl_2 \cdot 2H_2O$) บริษัท Merck, Germany
29. แนพทาลีน (naphthalene) บริษัท Kanto Chemical Co., INC, Japan
30. แบคโตอะการ์ (bacto agar) บริษัท Difco, USA.
31. แมงกานีสคลอไรด์ ($MnCl_2$) บริษัท Merck, Germany
32. แมกนีเซียมคลอไรด์ ($MgCl_2$) บริษัท Merck, Germany
33. แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$) บริษัท Carlo ERBA, France
34. แอนทราซีน (anthracene) บริษัท Kanto Chemical Co., INC, Japan
35. แอมโมเนียมไนเตรต (NH_4NO_3) บริษัท Merck, Germany
36. โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) บริษัท Merck, Germany
37. โซเดียมซัลเฟตแอนไฮดรัส (anhydrous Na_2SO_4) บริษัท Merck, Germany
38. โซเดียมไพรูเวท บริษัท Fluka, Switzerland
39. โซเดียมอะซิเตต ($CH_3COONa \cdot 3H_2O$) บริษัท Merck, Germany
40. โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต (sodium dodecyl sulfate, SDS), ($C_{12}H_{25}OSO_3$) บริษัท Nacalai
Tesque, Japan
41. โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) บริษัท Merck, German
42. โพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl) บริษัท Merck, Germany
43. โพแทสเซียมอะซิเตต (CH_3COOK) บริษัท Merck, Germany
44. โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) บริษัท Merck, Germany
45. ไครซีน (chrycene) Kanto Chemical Co., INC, Japan
46. ไดเมทิลฟอร์มามาไมด์ (dimethyl formamide, DMF) บริษัท BIOBASIC, INC. Japan
47. เอทิลอีเทอร์ บริษัท Merck, Germany
48. ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ($Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$) บริษัท Merck, Germany
49. ไพรีน (pyrene) บริษัท Sigma, USA
50. ไอโซโพรพานอล (isopropanol) บริษัท Merck, Germany
51. IPTG (Isopropyl thio- β -D-galactoside) บริษัท BIO BASIC INC, Canada
52. Lambda HindIII บริษัท Bio-Rad, UK
53. Proteinase K บริษัท US.Biological, US
54. Ribonuclease A (Rnase A) บริษัท Promega, USA
55. Trizma base (tris [hydroxymethyl] aminomethane), ($C_4H_{11}NO_3$) บริษัท Sigma, USA

56. X-gal (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactoside) บริษัท BIO BASIC, INC, Canada
57. 1 kilobase DNA ladder บริษัท Bio-Rad, UK
58. 100 base pair DNA ladder บริษัท Bio-Rad, UK
59. ชุดติดฉลากและติดตามตำแหน่งดีเอ็นเอ DIG High Prime DNA labeling and detection starter kit บริษัท Roche, Germany
60. ไนลอนเมมเบรน (nylon membrane) บริษัท Pall Bio Support, USA
61. กระดาษกรอง (filter paper) บริษัท Advantec, Japan
62. กรดอะซิติกเข้มข้น (glacial CH₃COOH) ของบริษัท Merck, Germany

แบคทีเรีย พลาสมิด และไพรเมอร์ที่ใช้ในการวิจัย

ตารางที่ 3.1 สมบัติของแบคทีเรียและพลาสมิดที่ใช้ในการวิจัย

ชื่อ	ลักษณะสมบัติ	แหล่งที่มา
<i>Escherichia coli</i> JM109	e14 ⁻ (<i>mceA</i>) <i>recA1 endA1</i> <i>gyrA96 thi-1 hsdR17</i> (r _k ⁻ m _k ⁻) <i>supE44 relA1</i> Δ (<i>lac-</i> <i>proAB</i>) (F' <i>traD36 proAB</i> <i>lac</i> ^{ra} ZΔM15	Sambrook และคณะ, 1989

หมายเหตุ Ap^r; มียีนต้านยาปฏิชีวนะแอมพิซิลิน

ตารางที่ 3.2 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ที่ใช้ในการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ 16S rDNA

ชื่อไพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์ (5' ถึง 3')
M13(-29)	CACGACGTTGTAAACGA
M13R	GGATAACAATTTACACAGG
27F	AGAGTTTGATCMTGGCTCAG
800R	CTACCAGGGTATCTAAT
1,100R	AGGGTTGCGCTCGTTG
1,492R	TACGGHTACCTTGTTACGACTT

ตารางที่ 3.3 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของโพรเมอร์ที่ใช้ในการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอบริเวณยีนที่ประมวลรหัสหน่วยย่อยแอลฟาของเทอร์มินัลไดออกซิจีเนส

ชื่อโพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์ (5' ถึง 3')	ขนาด คาดหวัง (bp)	เอกสารอ้างอิง
ndoBF ndoBR	CACTCATGATAGCCTGATTCCTGCCCCGGCG CCGTCCCACAACACCCCATGCCGCTGCCG	642	Kurkela และ คณะ 1988
phnAcF phnAcR	CCATTACGGTGATTCGTGACC ACAAAATTCTCTGACGGCGC	462	Laurie และ คณะ 1999
nidAF nidAR	ATCTTCGGGCGCGGCTGGGTGTTTCTCGG AATTGTCGGCGGCTGTCTCCAGTTCGC	508	Khan และ คณะ 2001
nagAcF nagAcR	GGCTGTTTTGATGCAGA GGGCCTACAAGTTCCA	107	Dionisi และ คณะ 2004
ComF ComR	AAAAGAGTTGTACGGCGATG ACGGTAGAATCCGCGATAGC	900	Moser และ Stahl 2001
RhoF RhoR	CAAGGATGCGTATGGCAATC TTCGAGGAAGTTGCGCTGGT	900	Moser และ Stahl 2001
phdAF phdAR	TGTCAGTCTATTCTATTCCATCGGGATCTGG TCGATCGACGATCGCAGAATCTTCCAAGTT	300	Saito และ คณะ 2000
arhA1F arhA1R	CGCCGACTGAAAATTTTGTT GTCGTCAGCTTCCCAGTAGC	518	สร้างใน งานวิจัย
bphA1F bphA1R	TATTTGGGGGACTTCTGCTG TTGGGAGGATCGACGTATTC	424	สร้างใน งานวิจัย
RieskeIF RieskeIR	TGYMGICAYMGIGG CCAICCRTGRTAISWRCA	78	Ni Chadhain และคณะ 2006

วิธีดำเนินงานวิจัย

3.1 คัดแยกและจำแนกชนิดของแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลายไฟรีน

3.1.1 เก็บตัวอย่างดิน และหมักดินด้วยไฟรีน

เลือกเก็บตัวอย่างดินจากแหล่งดินที่คาดว่าจะมีการปนเปื้อนของสารปิโตรเลียม หรือได้รับควันหรือไอเสียเครื่องยนต์ แสดงดังตารางที่ 3.4 โดยจุดดินลึกประมาณ 1.5 เซนติเมตรถึง 5 เซนติเมตร จากผิวน้ำดิน

ตารางที่ 3.4 สถานที่เก็บตัวอย่างดินที่ใช้ในการคัดแยกแบคทีเรียที่ย่อยสลายไฟรีน

ลำดับที่	สถานที่เก็บตัวอย่างดิน
1	บริเวณรางรถไฟ อ.เมือง นครราชสีมา
2	ริมถนนราชดำเนิน กทม.
3	บริเวณใกล้ปั๊มน้ำมัน อ.เมือง นครปฐม
4	บริเวณใต้ต้นไม้ อ.เขาใหญ่ นครราชสีมา
5	บริเวณใต้ต้นไม้ ริมถนนบริพัตร กทม.

3.1.2 เพิ่มจำนวนแบคทีเรียที่ย่อยสลายไฟรีนจากดิน

นำดินจากแหล่งดินที่ 2 ถึง 5 มาหมักด้วยไฟรีน โดยชั่งดิน 50 กรัม เติมหอาหารเหลว Carbon Free Mineral (CFMM) (Habe และคณะ, 2004) (ภาคผนวก ก) ที่มีไฟรีนในโดเมทิลฟออร์มาไมด์ (*N,N*-Dimethylformamide, DMF) (ภาคผนวก ก) ความเข้มข้นสุดท้ายของไฟรีนเท่ากับ 100 มิลลิกรัมต่อลิตร คลุกเคล้าให้ทั่ว ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 วัน ทำการเติมอาหารเหลว CFMM และคลุกเคล้าให้ทั่วทุกๆ 7 วัน สำหรับดินจากแหล่งดินลำดับที่ 1 ไม่ทำการหมักดินด้วยไฟรีน

เตรียมหัวเชื้อของแบคทีเรียโดยการเติมดิน 20 กรัม ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่บรรจุอาหารเหลว CFMM ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เขย่าบนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิ 30°C ด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลา ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง เพื่อให้อนุภาคดินตกตะกอน จากนั้นนำส่วนน้ำใสปริมาตร 5 มิลลิลิตร เติกลงในขวดรูปชมพู่ ซึ่งบรรจุอาหารเหลว CFMM ปริมาตร 45 มิลลิลิตร และเติมไฟรีนในรูปสารละลายไฟรีนในโด

เมทิลฟออร์มาไมด์ โดยให้มีความเข้มข้นสุดท้ายของไพรีนเท่ากับ 100 มิลลิกรัมต่อลิตร เลี้ยงเชื้อบนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิ 30°C ด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที จนพบการเปลี่ยนแปลงของอาหารเหลวโดยสังเกตจากสีของอาหารเหลวที่เปลี่ยนเป็นสีเหลืองส้มเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม ถ่ายอาหารเหลวปริมาตร 5 มิลลิลิตร ลงในอาหารเหลว CFMM ที่เตรียมใหม่

3.1.3 คัดแยกแบคทีเรียที่ย่อยสลายไพรีน

ถ่ายอาหารเหลวปริมาตร 100 ไมโครลิตร จากอาหารเหลวที่เปลี่ยนสีจากข้อ 3.1.2 เกลี่ยบนอาหารแข็ง CFMM และทำการพ่นทับผิวหน้าอาหารแข็งด้วยสารละลายไพรีนเข้มข้น 2% ในไดเอทิลอีเทอร์ (Diethyl ether) ทำขั้นตอนดังกล่าวนี้ทุกๆ ครั้งที่ทำการถ่ายอาหารเหลวลงในอาหารเหลว CFMM ที่เตรียมใหม่ จากนั้นบ่มอาหารแข็งที่อุณหภูมิ 30°C จนกระทั่งพบการเจริญของแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายไพรีนได้ โดยสังเกตได้จากโคโลนีบนผิวหน้าของอาหารแข็งจะสร้างบริเวณใส นำแบคทีเรียที่สร้างบริเวณใสเลี้ยงบนอาหารแข็ง LB (ภาคผนวก ก) เพื่อดูความบริสุทธิ์ของเชื้อ และทำให้เป็นสายพันธุ์บริสุทธิ์ จากนั้นยืนยันความสามารถในการย่อยสลายไพรีนเบื้องต้นโดยนำโคโลนีที่สร้างบริเวณใส และแบคทีเรียที่เป็นสายพันธุ์บริสุทธิ์ เลี้ยงในอาหารเหลว CFMM ปริมาตร 5 มิลลิลิตร มีไพรีน ความเข้มข้นสุดท้าย 100 มิลลิกรัมต่อลิตร เขย่าบนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิ 30°C ด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที สังเกตการเปลี่ยนแปลงของอาหารเหลวที่เกิดขึ้นโดยสังเกตจากสีของอาหารเหลวที่เปลี่ยนเป็นสีเหลืองส้มเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม

เมื่อเลี้ยงโคโลนีที่สร้างบริเวณใสในอาหารเหลว CFMM ที่เติมไพรีน แล้วพบว่าอาหารเหลวมีการเปลี่ยนสีเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม นำอาหารเหลวที่มีการเปลี่ยนสีมาเจือจางด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.85% (ภาคผนวก ข) ให้ได้ความเข้มข้นที่เหมาะสม แล้วนำมาเกลี่ยบนอาหารแข็ง LB เจือจาง 4 เท่า (ภาคผนวก ก) และพ่นทับผิวหน้าอาหารแข็งด้วยสารละลายไพรีนเข้มข้น 2% ในไดเอทิลอีเทอร์ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30°C จนพบโคโลนีที่สร้างบริเวณใส แล้วนำแบคทีเรียที่สร้างบริเวณใสที่ตกลงบนอาหารแข็ง LB เพื่อดูความบริสุทธิ์ของเชื้อ จากนั้นยืนยันความสามารถในการย่อยสลายไพรีนดังวิธีที่กล่าวไว้ข้างต้น

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.2 จำแนกชนิดของแบคทีเรียที่คัดแยกได้

3.2.1 ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา

นำแบคทีเรียสายพันธุ์บริสุทธิ์มาศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาจากลักษณะโคโลนีบนอาหารแข็ง LB และลักษณะการติดสีแกรมภายใต้กล้องจุลทรรศน์

3.2.2 วิเคราะห์ลำดับเบสนิวคลีโอไทด์ของ 16S rDNA

3.2.2.1. สกัดจีโนมิกดีเอ็นเอ

สกัดจีโนมิกดีเอ็นเอจากแบคทีเรียสายพันธุ์บริสุทธิ์ตามวิธีของ Ausubel และคณะ (1999) โดยเขียนโคโลนีเดี่ยวของเชื้อลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB 5 มิลลิลิตร นำไปเขย่าที่ 30°ซ เป็นเวลา 16 ถึง 18 ชั่วโมง ถ่ายเชื้อ 1.5 มิลลิลิตร ลงหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกเซลล์ที่ 4°ซ 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที กระจายตะกอนเซลล์ในบัฟเฟอร์ TE (ภาคผนวก ข) 517 ไมโครลิตร ให้เป็นเนื้อเดียวกับบัฟเฟอร์ เติมสารละลายไลโซไซม์ (Lysozyme) เข้มข้น 60 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (ภาคผนวก ข) 50 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยการกลับหลอดไปมาและบ่มที่ 37°ซ เป็นเวลา 1 ชม. แล้วเติมสารละลายโซเดียมโดเดซิลซัลเฟต (sodium dodecyl sulfate, SDS) เข้มข้น 10% (ภาคผนวก ข) 30 ไมโครลิตร และโปรตีนเนสเค (proteinase K) เข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (ภาคผนวก ข) 10 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน บ่มที่ 37°ซ เป็นเวลา 1 ชม. เติมสารละลายโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 5 โมลาร์ (ภาคผนวก ข) 120 ไมโครลิตร และเติมสารละลาย CTAB/NaCl (ภาคผนวก ข) 220 ไมโครลิตร บ่มที่ 65°ซ เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเติมคลอโรฟอร์ม/ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ (ภาคผนวก ข) ในปริมาตรที่เท่ากับปริมาตรของสารละลายสุดท้าย นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที นำสารละลายชั้นบนมาเติมฟีนอล/คลอโรฟอร์ม (ภาคผนวก ข) ในปริมาตรที่เท่ากับปริมาตรของสารละลายสุดท้าย นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วเดิม นำสารละลายชั้นบนมาเติมไอโซโพรพานอล 0.6 เท่าของปริมาตรสุดท้าย กลับหลอดให้เข้ากันจนปรากฏสายดีเอ็นเอนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เทส่วนใสทิ้งและล้างตะกอนด้วยเอทานอล 70% (ภาคผนวก ข) 450 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยง เทส่วนใสทิ้ง ระบายเอทานอลจนแห้งและละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วยบัฟเฟอร์ TE 100 ไมโครลิตรและไรโบนิวคลีเอสเอ (RNase A) เข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร 0.2 ไมโครลิตร บ่มที่ 37°ซ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เก็บดีเอ็นเอที่ -20°ซ จนกว่าจะนำมาใช้

3.2.2.2 แยกดีเอ็นเอด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิส วิเคราะห์ความบริสุทธิ์และความเข้มข้นของดีเอ็นเอ

นำดีเอ็นเอที่สกัดได้มาแยกด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิส โดยเตรียมอะกาโรสเจลเข้มข้น 0.8% ที่หลอมในบัฟเฟอร์ TAE (ภาคผนวก ข) เทลงในแม่พิมพ์ที่มีหัวเสียบอยู่เมื่ออะกาโรสแข็งตัว วางชิ้นอะกาโรสเจลที่ตกลงในช่องเบอร์ เทปเปอร์ให้ท่วมอะกาโรสเจล ผสมผลิตภัณฑ์ปฏิกิริยาถูกใช้กับสีติดตาม หยอดลงในช่องวิ่ง โดยช่องวิ่งที่ 1 จะหยอดด้วยดีเอ็นเอมาตรฐาน Lambda HindIII ที่ผสมกับสีติดตามแล้วปริมาตร 2 ไมโครลิตร จากนั้นทำอิเล็กโทรโฟเรซิส ใช้ความต่างศักย์ 100 โวลต์ จนกระทั่งสีติดตามเคลื่อนที่ได้ในระยะทางที่เหมาะสม ย้อมอะกาโรสเจลด้วยสารละลายเอธิเดียมโบรไมด์ เป็นเวลา 1 นาที ตรวจสอบแถบดีเอ็นเอด้วยแสงอัลตราไวโอเล็ตความยาวคลื่น 312 นาโนเมตร

การวิเคราะห์ความบริสุทธิ์และความเข้มข้นของดีเอ็นเอทำได้โดย นำสารละลายดีเอ็นเอไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร (A_{260} และ A_{280}) แล้วคำนวณหาความเข้มข้นของดีเอ็นเอจากสมการ

$$\text{ดีเอ็นเอสายคู่ (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)} = A_{260} \times 50 \times \text{dilution factor}$$

3.2.2.3 เพิ่มจำนวนดีเอ็นเอบริเวณ 16S rDNA โดยใช้ปฏิกิริยาถูกใช้พอลิเมอร์เรส (Polymerase Chain reaction, PCR)

นำดีเอ็นเอที่สกัดได้ไปทำปฏิกิริยาถูกใช้พอลิเมอร์เรส โดยใช้ส่วนผสมของสารในปฏิกิริยาและโอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์ 27F และ 1492R ซึ่งจำเพาะต่อบริเวณ 16S rDNA ของแบคทีเรีย ผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้คือ 1,456 bp ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์แสดงดังตารางที่ 3.2

ความเข้มข้นสุดท้ายของแต่ละสารในปฏิกิริยามีดังนี้ สารละลายแมกนีเซียมคลอไรด์ ($MgCl_2$) ความเข้มข้น 2 มิลลิโมลาร์ สารละลาย dNTP ความเข้มข้น 0.2 มิลลิโมลาร์ $1 \times Taq$ DNA polymerase ปริมาณ 2.5 หน่วย สารละลายไพรเมอร์ความเข้มข้น 100 พิโคโมลต่อไมโครลิตร (ของแต่ละตัว) ดีเอ็นเอที่สกัดจากวิธี 3.2.2.1 ปริมาณ 1 พิโคกรัม ถึง 1 ไมโครกรัม ปรับปริมาตรด้วยน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อ รวมส่วนผสมทั้งหมดให้มีปริมาตรสุทธิ 30 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน หลังจากนั้นดำเนินปฏิกิริยาถูกใช้พอลิเมอร์เรสด้วยเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (DNA Thermo Cycle) โดยให้มีสภาวะดังนี้

- | | | |
|--------------------------------------|------------------|--------------------|
| 1. Initial denaturation | ที่อุณหภูมิ 94°C | เป็นเวลา 5 นาที |
| 2. Denaturation | ที่อุณหภูมิ 94°C | เป็นเวลา 1 นาที |
| 3. Annealing | ที่อุณหภูมิ 55°C | เป็นเวลา 1.30 นาที |
| 4. Extension | ที่อุณหภูมิ 72°C | เป็นเวลา 2 นาที |
| 5. ทำซ้ำขั้นตอน 2 ถึง 4 จำนวน 30 รอบ | | |
| 6. Final extension | ที่อุณหภูมิ 72°C | เป็นเวลา 7 นาที |

ตรวจสอบผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นโดยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสในบัฟเฟอร์ TAE ความเข้มข้น 1 เท่า โดยใช้อะกาโรสเจลเข้มข้น 2% เพื่อตรวจสอบขนาดของผลิตภัณฑ์ PCR โดยการเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA ladder ตามวิธีที่ระบุในข้อ 3.2.2.2 ต่อไป

3.2.2.4 ทำบริสุทธิ์ผลิตภัณฑ์ PCR เพื่อการโคลน

นำผลิตภัณฑ์ที่ได้ทำให้บริสุทธิ์ด้วย QIAquick PCR purification kit (Qiagen, Germany) ตามวิธีที่ระบุในคู่มือ โดยเติมบัฟเฟอร์ PB ปริมาตร 5 เท่าของผลิตภัณฑ์ PCR ผสมให้เข้ากันแล้วดูดลงใน QIAprep spin column นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ที่อุณหภูมิห้อง เทส่วนน้ำใส่ทิ้ง เติมบัฟเฟอร์ PE ปริมาตร 750 ไมโครลิตร ลงในคอลัมน์ นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ที่อุณหภูมิห้อง เทส่วนน้ำใส่ทิ้งก่อนทำการปั่นเหวี่ยงซ้ำอีกครั้งเพื่อกำจัดส่วนน้ำที่เหลือติดคอลัมน์ ย้ายคอลัมน์มายังหลอดไมโครพิพเจ็ทใหม่ เติมน้ำประจุปลอดเชื้อหรือบัฟเฟอร์ EB ปริมาตร 30 ถึง 50 ไมโครลิตรให้ลงตรงกลางแผ่นกรอง ตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 1 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ที่อุณหภูมิห้อง จะได้ผลิตภัณฑ์ PCR ที่บริสุทธิ์ เก็บไว้ที่ -20°C จนกว่าจะนำมาใช้

3.2.2.5 โคลนชิ้นผลิตภัณฑ์ PCR

3.2.2.5.1 ไลเกทชิ้นผลิตภัณฑ์ PCR

ไลเกทชิ้นผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้จากข้อ 3.2.2.4 เข้ากับพลาสมิดเวกเตอร์ pGEM-T Easy ด้วยไลเกส (ligase) (Promega, USA) ตามวิธีที่ระบุในคู่มือ โดยทำส่วนผสมของปฏิกิริยา (ปริมาตร 10 ไมโครลิตร) ดังนี้

2x ไลเกชันบัฟเฟอร์	5 ไมโครลิตร
พลาสมิดเวกเตอร์ pGEM-T Easy (50 นาโนกรัม)	1 ไมโครลิตร
ผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้จากข้อ 3.2.2.4 (ประมาณ 150 นาโนกรัม)	3 ไมโครลิตร
T4 DNA ligase (3 หน่วยต่อไมโครลิตร)	1 ไมโครลิตร
ทำไลเกชันที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 16 ถึง 18 ชั่วโมง	

3.2.2.5.2 ทรานส์ฟอร์มรีคอมบิแนนท์พลาสมิดเข้าสู่คอมพีเทนต์เซลล์ *E. coli* JM109 และคัดเลือกทรานส์ฟอร์มแมนท์ที่มีชั้นยีนที่ต้องการอยู่ภายในชั้นดีเอ็นเอแทรกสอด

การเตรียมคอมพีเทนต์เซลล์โดยวิธี Calcium chloride (Sambrook และ Russell, 2001) ทำโดยลงเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ JM109 บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง Ψ b (ภาคผนวก ก) บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง แล้วเชยโคโลนีเดี่ยวของ *E. coli* สายพันธุ์ JM109 ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Ψ b ปริมาตร 5 มิลลิลิตร แล้วนำไปเขย่าที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 4 ชั่วโมง จนกระทั่ง OD₆₀₀ มีค่าเท่ากับ 0.3 ถึง 0.5 เพื่อใช้เป็นหัวเชื้อ จากนั้นถ่ายหัวเชื้อ ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ไปยังอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Ψ b ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ที่บรรจุใน arm flask นำไปเขย่าที่อุณหภูมิ 37°C จนกระทั่ง OD₆₀₀ มีค่าเท่ากับ 0.5 เมื่อเซลล์เจริญจนถึงค่า OD₆₀₀ ที่ต้องการ ให้ถ่ายเชื้อลงในหลอดเซนตริฟิวจ์ปลอดเชื้อ แช่ในน้ำแข็งเป็นเวลา 5 นาที และนำไปปั่นเหวี่ยงตกตะกอนเซลล์ด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดควบคุมอุณหภูมิ ที่อุณหภูมิ 4°C ความเร็วในการปั่นเหวี่ยง 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที (ตั้งแต่ขั้นตอนนี้ทำที่อุณหภูมิ 4°C) เทอาหารเลี้ยงเชื้อทิ้ง เดิมสารละลาย TfbI (ภาคผนวก ข) ที่เย็นปริมาตร 40 มิลลิลิตร ลงในตะกอนเซลล์ กระจายตะกอนให้เข้ากับสารละลาย TfbI แช่หลอดเซนตริฟิวจ์ที่มีตะกอนเซลล์และสารละลาย TfbI ในอ่างน้ำแข็งเป็นเวลา 5 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4°C ความเร็วในการปั่นเหวี่ยง 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เทส่วนน้ำใสทิ้ง จากนั้นเติมสารละลาย TfbII (ภาคผนวก ข) ที่เย็นปริมาตร 4 มิลลิลิตร ลงในตะกอนเซลล์อีกครั้ง กระจายตะกอนให้เข้ากับสารละลาย TfbII แช่ในน้ำแข็งเป็นเวลา 15 นาที หรือมากกว่านั้น แบ่งใส่หลอดไมโครฟิวจ์ปลอดเชื้อที่เย็น ปริมาตรหลอดละ 100 ไมโครลิตร เก็บคอมพีเทนต์เซลล์ไว้ที่อุณหภูมิ -70°C จนกว่าจะนำมาใช้งาน

ทรานส์ฟอร์มรีคอมบิแนนท์พลาสมิดเข้าสู่คอมพีเทนต์เซลล์ *E. coli* JM109 ด้วยวิธี heat shock (Sambrook และ Russell, 2001) โดยนำคอมพีเทนต์เซลล์ *E. coli* JM109 ที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -70°C มาแช่ในอ่างน้ำแข็งให้ละลายช้าๆ ใส่รีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่ไลเกตไว้ปริมาตร 2 ไมโครลิตร ลงในคอมพีเทนต์เซลล์ *E. coli* JM109 ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วบ่มในอ่างน้ำแข็งเป็นเวลา 20 นาที heat shock ที่อุณหภูมิ 42°C เป็นเวลานาน

45 ถึง 50 วินาที เมื่อครบเวลาให้แช่ลงในน้ำแข็งทันทีเป็นเวลา 2 นาที แล้วจึงเติมอาหารเหลว SOC (ภาคผนวก ก) ปริมาตร 950 ไมโครลิตร ลงในหลอดบรรจุเชื้อ และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลาอย่างน้อย 1 ชั่วโมง

คัดเลือกรานสฟออร์แมนท์ (transformant) ที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่ต้องการด้วยวิธี Blue/White selection (Sambrook และ Russell, 2001) ทำโดยนำสารละลายแขวนลอยของ *E. coli* JM109 ที่ทรานสฟออร์มรีคอมบิแนนท์พลาสมิดแล้วปริมาตร 100 ไมโครลิตร มาเกลี่ยลงบนอาหารแข็ง LB ที่ผสมสารปฏิชีวนะแอมพิซิลลิน (ภาคผนวก ข) ความเข้มข้นสุดท้าย 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งผ่านการเกลี่ยด้วย X-gal (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactoside) เข้มข้น 2% (ภาคผนวก ข) ให้มีความเข้มข้นสุดท้าย 2 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ IPTG (Isopropyl thio- β -D-galactoside) เข้มข้น 1 โมลาร์ (ภาคผนวก ข) ให้มีความเข้มข้นสุดท้าย 100 ไมโครโมลาร์ เก็บอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมได้ไว้ในที่มืด หลังจากเกลี่ยเชื้อแล้ว บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 16 ถึง 24 ชั่วโมง

3.2.2.6 สกัดรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pGEM-T Easy

สกัดรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pGEM-T Easy ด้วยชุดสกัดพลาสมิดปริมาณน้อย QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen, Germany) ตามวิธีที่ระบุในคู่มือ โดยเลี้ยง *E. coli* JM109 ที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pGEM-T Easy ในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB ที่มีสารปฏิชีวนะแอมพิซิลลิน (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร บ่มบนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิ 37°C ด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 16 ถึง 18 ชั่วโมง ปั่นเก็บเซลล์ในหลอดไมโครพิวเจอร์ด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง ด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที ที่อุณหภูมิห้อง แขนงลอยเซลล์ด้วยบัฟเฟอร์ P1 ปริมาตร 250 ไมโครลิตร จากนั้นเติมบัฟเฟอร์ P2 ปริมาตร 250 ไมโครลิตร ผสมโดยการกลับหลอดจนกระทั่งสารแขวนลอยเริ่มเหนียวและใสขึ้นภายในระยะเวลาไม่เกิน 5 นาที เติมน้ำละลาย N3 ปริมาตร 350 ไมโครลิตร ผสมโดยกลับหลอดไปมาจนเกิดตะกอนขาว นำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อให้เกิดตะกอนที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิห้อง แยกส่วนน้ำใสลงใน QIAprep spin column นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ที่อุณหภูมิห้อง เทส่วนน้ำใสทิ้ง เติมน้ำบัฟเฟอร์ PB ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ลงในคอลัมน์ นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ที่อุณหภูมิห้อง เทส่วนน้ำใสทิ้ง เติมน้ำบัฟเฟอร์ PE ปริมาตร 750 ไมโครลิตร ลงในคอลัมน์ นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ที่อุณหภูมิห้อง เทส่วนน้ำใสทิ้งก่อนปั่นเหวี่ยงซ้ำอีกครั้งเพื่อกำจัดส่วนน้ำใสที่เหลือติดคอลัมน์ ย้ายคอลัมน์มายังหลอดไมโครพิวเจอร์ใหม่ เติมน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อหรือบัฟเฟอร์ EB ปริมาตร 50 ถึง 100 ไมโครลิตร ให้หลอดตรงแผ่นกรอง ตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 1 นาที นำไป

ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ที่อุณหภูมิห้อง จะได้สารละลายพลาสมิดอยู่ในส่วนน้ำใส เก็บสารละลายพลาสมิดที่อุณหภูมิ -20°C จนกว่าจะนำมาใช้

3.2.2.7 การตัดรีคอมบิแนนท์พลาสมิดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

ตรวจสอบชิ้นดีเอ็นเอสอดแทรกภายในรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pGEM-T Easy ตามวิธีที่ระบุในคู่มือ โดยทำส่วนผสมของปฏิกิริยา (ปริมาตร 10 ไมโครลิตร) ดังนี้

รีคอมบิแนนท์พลาสมิด pGEM-T Easy	1 ไมโครลิตร
10x บัฟเฟอร์	1 ไมโครลิตร
เอนไซม์ <i>EcoRI</i>	0.5 ไมโครลิตร
น้ำปลอดประจุปลอดเชื้อ	7.5 ไมโครลิตร

ผสมให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 2 ถึง 4 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำส่วนผสมของปฏิกิริยาที่ได้ปริมาตร 5 ไมโครลิตร มาทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสในบัฟเฟอร์ TAE (ภาคผนวก ข) ความเข้มข้น 1 เท่า โดยใช้อะกาโรสเจลเข้มข้น 2% (ภาคผนวก ข) เพื่อตรวจสอบชิ้นดีเอ็นเอสอดแทรกโดยการเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA ladder ตามวิธีที่ระบุในข้อ 3.2.2.2

3.2.2.8 วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นดีเอ็นเอแทรกสอดในรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pGEM-T Easy โดยส่งวิเคราะห์ที่ First BASE Laboratories Sdn Bhd ประเทศมาเลเซีย ผ่านทางบริษัท Ward Medic Ltd., Part โดยบริษัทนี้ใช้ระบบ LI-COR[®] NEN 4200 Global IR2 DNA Sequencing และเครื่อง ABI[®] PRISM DNA Sequencers ในการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ ซึ่งตัวอย่างดีเอ็นเอที่ใช้ในการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ดังกล่าวคือ รีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่มีชิ้นดีเอ็นเอที่ต้องการสอดแทรกอยู่ โดยสกัดจาก *E. coli* JM109 ด้วยชุดสกัดพลาสมิดปริมาณน้อยแล้วละลายรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่ได้ด้วยน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อ วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์โดยใช้ไพรเมอร์ M13F M13R ซึ่งจำเพาะกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของพลาสมิดเวกเตอร์ และไพรเมอร์ 800R และ 1,100R ซึ่งจำเพาะกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rDNA ของแบคทีเรีย ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์แสดงดังตาราง 3.2

เมื่อได้ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นดีเอ็นเอสอดแทรกแล้ว นำไปเชื่อมลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยโปรแกรม DNASIS-Mac software version 2.05 (Hitachi Software Engineering Co.Ltd) วิเคราะห์จัดจำแนกชนิดของจุลินทรีย์โดยเปรียบเทียบกับข้อมูลที่มีในฐานข้อมูล GenBank โดยใช้โปรแกรม BLASTn (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)

3.2.2.9 สร้าง phylogenetic tree

นำลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rDNA ที่ผ่านการวิเคราะห์แล้ว และลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rDNA ของแบคทีเรียที่คัดเลือกไว้ ทำการปรับแนวของลำดับนิวคลีโอไทด์ (multiple alignment) โดยใช้โปรแกรม Clustal X จากนั้นนำข้อมูลที่ได้มาคำนวณ distance matrix สร้าง phylogenetic tree ด้วยวิธีการวิเคราะห์แบบ Neighbor-joining และ Bootstrap ด้วยโปรแกรม PHYLIP software package version 3.572c ซึ่งประกอบไปด้วย DNADIST.EXE NEIGHBOR.EXE และ SEQBOOT.EXE ตามลำดับ phylogenetic tree ที่ถูกสร้างขึ้น นำเสนอโดยใช้โปรแกรม TREEVIEW (Felsenstein, 1985)

3.3 ศึกษาประสิทธิภาพการย่อยสลายไฟรีนของกลุ่มแบคทีเรียและแบคทีเรียสายพันธุ์บริสุทธิ์ และรูปแบบการเจริญของแบคทีเรียสายพันธุ์บริสุทธิ์โดยการใช้ไฟรีนเป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงาน

การเตรียมหัวเชื้อสำหรับกลุ่มแบคทีเรีย ทำได้โดยนำโคโลนีที่สร้างบริเวณใสจากอาหารแข็ง CFMM ที่ถูกปนทับด้วยไฟรีน เลี้ยงในอาหารเหลว CFMM ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ที่มีโพวเวทความเข้มข้น 0.2% (w/v) (ภาคผนวก ก) นำไปเขย่าบนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิ 30°C ด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เมื่อครบเวลา บั่นแยกเซลล์ด้วยเครื่องบั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาทีที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นล้างเซลล์ในสารละลายไซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.85% ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ทำขั้นตอนดังกล่าวซ้ำอีก 1 ครั้ง นำเซลล์ที่ได้มาละลายในอาหารเหลว CFMM วัดความขุ่นที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร และเจือจางสารละลายเซลล์ให้มีความขุ่นแสงเท่ากับ 0.1 จากนั้นจึงนำสารละลายเซลล์ไปเขย่าบนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิ 30°C ด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อให้แบคทีเรียใช้สารอาหารที่สะสมอยู่ในเซลล์ให้หมดไป

การเตรียมหัวเชื้อสำหรับแบคทีเรียสายพันธุ์บริสุทธิ์ ทำได้โดยนำโคโลนีเดี่ยวที่เจริญบนอาหารแข็ง LB ไปเลี้ยงในอาหารเหลว LB เจือจาง 10 เท่า (ภาคผนวก ก) นำไปเขย่าที่อุณหภูมิ 30°C ด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาทำการบั่นแยกเซลล์ ล้างเซลล์ และทำสารละลายเซลล์ดังวิธีที่กล่าวในข้างต้น

เติมหัวเชื้อปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงในอาหารเหลว CFMM ปริมาตร 5 มิลลิลิตร เพื่อให้ปริมาณของแบคทีเรียเริ่มต้นเท่ากับ 10^6 CFU ต่อ มิลลิลิตร และเติมไฟรีนให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 100 มิลลิกรัมต่อลิตร เลี้ยงเชื้อบนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิ 30°C ด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างเป็นช่วงเวลา โดยทำการทดลอง 3 ซ้ำ

สำหรับการทดลองประสิทธิภาพการย่อยสลายไพลิน มีชุดการทดลองควบคุมคือ อาหารเหลว CFMM ที่มีไพลินแต่ไม่เติมหัวเชื้อแบคทีเรีย ตรวจสอบไพลินที่เหลืออยู่ในอาหารเหลวโดยนำอาหารเหลวมาทำการสกัดด้วยเอทิลอะซิเตต ตามวิธีของ Grifoll และคณะ (1992) ดังนี้ นำอาหารเหลวมาปรับค่าความเป็นกรด-ด่างให้เท่ากับ 2.0 ถึง 3.0 โดยการเติมกรดไฮโดรคลอริก (HCL) เข้มข้น จากนั้นเติมเอทิลอะซิเตตปริมาตร 1 เท่าของอาหารเหลว ผสมให้เข้ากันโดยใช้เครื่องปั่นผสมด้วยความเร็วสูงเป็นเวลา 1 นาที 30 วินาที ตั้งทิ้งไว้ให้แยกชั้น แยกส่วนเอทิลอะซิเตตเก็บไว้ สกัดซ้ำอีก 1 ครั้ง ด้วยเอทิลอะซิเตตปริมาตร 1 เท่าของอาหารเหลวตามวิธีเดิม รวมส่วนเอทิลอะซิเตตที่ได้ เติม anhydrous Na_2SO_4 ที่ผ่านการอบฆ่าเชื้อ เพื่อกำจัดน้ำที่เหลืออยู่ จากนั้นเปลี่ยนตัวทำละลายโดยการนำไประเหยให้แห้งด้วยเครื่องระเหยแห้งสูญญากาศแบบหมุน จากนั้นเติมเมทานอลปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงไปเพื่อละลายสาร กรองสารละลายที่ได้ผ่านชุดกรองสำเร็จรูปชนิด PTFE ที่มีขนาดรูกรอง 0.20 ไมโครเมตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20°C จนกว่าจะทำการวิเคราะห์

นำสารละลายที่สกัดได้ ทำการวิเคราะห์ปริมาณไพลินด้วยวิธี High Performance Liquid Chromatography (HPLC) ซึ่งมีสภาวะต่างๆ ในระบบดังนี้

คอลัมน์ (column)	inertsill [®] ODS ขนาด 4.6 × 150 มม.
ตัวชะสาร (mobile phase)	เมทานอล 80%
อัตราไหล (flow rate)	1 มล.ต่อนาที
อุณหภูมิคอลัมน์	40 [°] C
ความยาวคลื่นแสงอุลตราไวโอเลต	275 นาโนเมตร
ที่ใช้ตรวจวิเคราะห์	
ปริมาณสารที่ฉีดวิเคราะห์	10 ไมโครลิตร

นำพื้นที่ใต้กราฟที่ได้จากการวิเคราะห์ตัวอย่างไปคำนวณหาร้อยละของปริมาณไพลินที่เหลืออยู่โดยเทียบกับชุดควบคุม

สำหรับการทดลองรูปแบบการเจริญของแบคทีเรียสายพันธุ์บริสุทธิ์ มีชุดควบคุม 2 ชุดคือ อาหารเหลว CFMM ที่มีไพลินแต่ไม่เติมหัวเชื้อ และ อาหารเหลว CFMM ที่มีหัวเชื้อแต่ไม่เติมไพลิน วัดการเจริญของแบคทีเรียด้วยวิธี Viable plate count โดยนำอาหารเหลวมาเจือจางด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.85% ให้มีความเข้มข้นที่เหมาะสม นำมาเกลี่ยบนอาหารแข็ง LB บ่มที่อุณหภูมิ 30[°]C จนพบการเจริญของโคโลนีของแบคทีเรีย และนับจำนวนโคโลนีที่เกิดขึ้น

3.4 ศึกษาประสิทธิภาพการย่อยสลายสารประกอบ PAHs ชนิดอื่นๆ ของแบคทีเรียสายพันธุ์บริสุทธิ์

เตรียมหัวเชื้อของแบคทีเรียสายพันธุ์บริสุทธิ์ตามวิธีที่ระบุในข้อ 3.4 แต่เติมสารประกอบ PAHs อื่นๆ แทนการเติมไพรีน โดยใช้ แนพธาลีน หรืออะซีแนพทีลีน ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร แอนทราซีน พีแนนทรีน ฟลูออแรนธิน อะซีแนพทีนหรือฟลูออรีน ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 100 มิลลิกรัมต่อลิตร และไครซีนหรือเบนโซ[เอ]ไพรีน ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 40 มิลลิกรัมต่อลิตร เลี้ยงเชื้อบนเครื่องเขย่า เก็บตัวอย่าง วันที่ 7 สำหรับแนพธาลีน และพีแนนทรีน วันที่ 10 สำหรับ อะซีแนพทีลีน อะซีแนพทีน ฟลูออรีน วันที่ 20 สำหรับแอนทราซีน วันที่ 30 สำหรับฟลูออแรนธิน ไครซีนและเบนโซ[เอ]ไพรีน ตรวจสอบสารประกอบ PAHs ที่เหลืออยู่ในอาหารเหลวโดยนำอาหารเหลวนำมาสกัดด้วยเอทิลอะซีเตท จากนั้นวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบ PAHs ที่เหลือด้วยวิธี HPLC ตามวิธีที่ระบุในข้อ 3.4 และนำพื้นที่ใต้กราฟที่ได้จากการวิเคราะห์ตัวอย่างไปคำนวณหาร้อยละของปริมาณสารประกอบ PAHs ที่เหลืออยู่โดยเทียบกับชุดควบคุม

3.5 ตรวจสอบยีนที่ประมวลรหัสไดออกซีจีเนสที่คาดว่าเกี่ยวข้องกับการย่อยสลายไพรีนของแบคทีเรียบริสุทธิ์

3.5.1 ตรวจสอบยีนที่ประมวลรหัสไดออกซีจีเนสด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส

3.5.1.1 สกัดดีเอ็นเอ

สกัดดีเอ็นเอจากแบคทีเรียสายพันธุ์บริสุทธิ์จากการเลี้ยงในอาหารเหลว LB และอาหารเหลว CFMM ที่เติมไพรีน แยกดีเอ็นเอ วิเคราะห์ความเข้มข้นของดีเอ็นเอ และความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอตามวิธีที่ระบุในข้อ 3.2.2.1 และ 3.2.2.2 ตามลำดับ

3.5.1.2 เพิ่มจำนวนดีเอ็นเอบริเวณยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายไพรีนโดยใช้ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส

นำดีเอ็นเอที่สกัดได้ไปทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส โดยใช้ส่วนผสมของสารในปฏิกิริยาและโพลิโกนิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์ที่มียื่นเป้าหมายเป็นยีนที่ประมวลรหัสหน่วยย่อยแอลฟาของ

เทอร์มินัลไดออกซีจีเนสของแบคทีเรียกลุ่มต่างๆ ที่สามารถย่อยสลายสารประกอบ PAHs ได้ ดังนี้ *ndoB* ของ *Pseudomonas putida* สายพันธุ์ NCIB9816 *phnAc* ของ *Burkholderia* sp. สายพันธุ์ RP007 *nagAc* ของ *Ralstonia* sp. สายพันธุ์ U2 *nahAc* ของ *Comamonas* sp. สายพันธุ์ GZ42 *arhA1* ของ *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ A4 *bphA1* ของ *Novosphingobium aromaticivorans* สายพันธุ์ F199 *nidA* ของ *Mycobacterium vanbaalenii* สายพันธุ์ PYR-1 *narAa* ของ *Rhodococcus* sp. สายพันธุ์ *phdA* ของ *Nocardioides* sp. สายพันธุ์ KP7 และ บริเวณ *Rieske* ของยีนที่ประมวลรหัสออกซีจีเนสของแบคทีเรียบางกลุ่มที่ย่อยสลายสารประกอบอะโรมาติก โดยลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์และขนาดคาดหวังของผลิตภัณฑ์ PCR แสดงดังตารางที่ 3.3

ความเข้มข้นสุดท้ายของแต่ละสารในปฏิกิริยามีดังนี้ สารละลายแมกนีเซียมคลอไรด์ ($MgCl_2$) ความเข้มข้น 2 มิลลิโมลาร์ สารละลาย dNTP ความเข้มข้น 0.2 มิลลิโมลาร์ $1\times$ Taq DNA polymerase ปริมาณ 2.5 หน่วย สารละลายไพรเมอร์ความเข้มข้น 25 พิโคโมลต่อไมโครลิตร (ของแต่ละตัว) ดีเอ็นเอที่สกัดจากวิธีในข้อ 3.2.2.1 ปริมาณ 1 พิโคกรัม ถึง 1 ไมโครกรัม ปรับปริมาตรด้วยน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อ รวมส่วนผสมทั้งหมดให้มีปริมาตรสุทธิ 30 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน หลังจากนั้นดำเนินการปฏิกิริยาถูกโซ่พอลิเมอเรสด้วยเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (DNA Thermo Cycle) โดยให้มีสภาวะที่เหมาะสมกับไพรเมอร์กันดังนี้

ไพรเมอร์ *ndoBF* และ *ndoBR* ใช้สภาวะ

- | | | |
|-------------------------|------------------|-----------------|
| 1. Initial denaturation | ที่อุณหภูมิ 94°ซ | เป็นเวลา 5 นาที |
| 2. Denaturation | ที่อุณหภูมิ 94°ซ | เป็นเวลา 1 นาที |
| 3. Annealing | ที่อุณหภูมิ 62°ซ | เป็นเวลา 1 นาที |
| 4. Extension | ที่อุณหภูมิ 72°ซ | เป็นเวลา 1 นาที |
| 5. ทำขั้นตอน 2 ถึง 4 | จำนวน 30 รอบ | |
| 6. Final extension | ที่อุณหภูมิ 72°ซ | เป็นเวลา 7 นาที |

ไพรเมอร์ phnAcF และ phnAcR ใช้สภาวะ

- | | | |
|--------------------------------------|--------------------|-----------------|
| 1. Initial denaturation | ที่อุณหภูมิ 94°C | เป็นเวลา 5 นาที |
| 2. Denaturation | ที่อุณหภูมิ 94°C | เป็นเวลา 1 นาที |
| 3. Annealing | ที่อุณหภูมิ 57.5°C | เป็นเวลา 1 นาที |
| 4. Extension | ที่อุณหภูมิ 72°C | เป็นเวลา 1 นาที |
| 5. ทำซ้ำขั้นตอน 2 ถึง 4 จำนวน 30 รอบ | | |
| 6. Final extension | ที่อุณหภูมิ 72°C | เป็นเวลา 7 นาที |

ไพรเมอร์ nidAF และ nidAR ใช้สภาวะ

- | | | |
|--------------------------------------|------------------|-----------------|
| 1. Initial denaturation | ที่อุณหภูมิ 94°C | เป็นเวลา 5 นาที |
| 2. Denaturation | ที่อุณหภูมิ 94°C | เป็นเวลา 1 นาที |
| 3. Annealing | ที่อุณหภูมิ 65°C | เป็นเวลา 1 นาที |
| 4. Extension | ที่อุณหภูมิ 72°C | เป็นเวลา 1 นาที |
| 5. ทำซ้ำขั้นตอน 2 ถึง 4 จำนวน 30 รอบ | | |
| 6. Final extension | ที่อุณหภูมิ 72°C | เป็นเวลา 7 นาที |

ไพรเมอร์ nagAcF และ nagAcR ใช้สภาวะ

- | | | |
|--------------------------------------|------------------|-----------------|
| 1. Initial denaturation | ที่อุณหภูมิ 94°C | เป็นเวลา 5 นาที |
| 2. Denaturation | ที่อุณหภูมิ 94°C | เป็นเวลา 1 นาที |
| 3. Annealing | ที่อุณหภูมิ 50°C | เป็นเวลา 1 นาที |
| 4. Extension | ที่อุณหภูมิ 72°C | เป็นเวลา 1 นาที |
| 5. ทำซ้ำขั้นตอน 2 ถึง 4 จำนวน 30 รอบ | | |
| 6. Final extension | ที่อุณหภูมิ 72°C | เป็นเวลา 7 นาที |

ไพรเมอร์ ComF และ ComR ใช้สภาวะ

- | | | |
|--------------------------------------|------------------|--------------------|
| 1. Initial denaturation | ที่อุณหภูมิ 94°C | เป็นเวลา 5 นาที |
| 2. Denaturation | ที่อุณหภูมิ 94°C | เป็นเวลา 30 วินาที |
| 3. Annealing | ที่อุณหภูมิ 55°C | เป็นเวลา 30 วินาที |
| 4. Extension | ที่อุณหภูมิ 72°C | เป็นเวลา 1 นาที |
| 5. ทำซ้ำขั้นตอน 2 ถึง 4 จำนวน 35 รอบ | | |
| 6. Final extension | ที่อุณหภูมิ 72°C | เป็นเวลา 7 นาที |

ไพรเมอร์ RhoF และ RhoR ใช้สภาวะ

- | | | |
|--------------------------------------|------------------|--------------------|
| 1. Initial denaturation | ที่อุณหภูมิ 94°ซ | เป็นเวลา 5 นาที |
| 2. Denaturation | ที่อุณหภูมิ 94°ซ | เป็นเวลา 30 วินาที |
| 3. Annealing | ที่อุณหภูมิ 55°ซ | เป็นเวลา 30 วินาที |
| 4. Extension | ที่อุณหภูมิ 72°ซ | เป็นเวลา 1 นาที |
| 5. ทำซ้ำขั้นตอน 2 ถึง 4 จำนวน 35 รอบ | | |
| 6. Final extension | ที่อุณหภูมิ 72°ซ | เป็นเวลา 7 นาที |

ไพรเมอร์ phdAF และ phdAR ใช้สภาวะ

- | | | |
|--------------------------------------|------------------|-----------------|
| 1. Initial denaturation | ที่อุณหภูมิ 94°ซ | เป็นเวลา 5 นาที |
| 2. Denaturation | ที่อุณหภูมิ 94°ซ | เป็นเวลา 1 นาที |
| 3. Annealing | ที่อุณหภูมิ 50°ซ | เป็นเวลา 1 นาที |
| 4. Extension | ที่อุณหภูมิ 72°ซ | เป็นเวลา 1 นาที |
| 5. ทำซ้ำขั้นตอน 2 ถึง 4 จำนวน 30 รอบ | | |
| 6. Final extension | ที่อุณหภูมิ 72°ซ | เป็นเวลา 7 นาที |

ไพรเมอร์ arhA1F และ arhA1R ใช้สภาวะ

- | | | |
|--------------------------------------|------------------|-----------------|
| 1. Initial denaturation | ที่อุณหภูมิ 94°ซ | เป็นเวลา 5 นาที |
| 2. Denaturation | ที่อุณหภูมิ 94°ซ | เป็นเวลา 1 นาที |
| 3. Annealing | ที่อุณหภูมิ 55°ซ | เป็นเวลา 1 นาที |
| 4. Extension | ที่อุณหภูมิ 72°ซ | เป็นเวลา 1 นาที |
| 5. ทำซ้ำขั้นตอน 2 ถึง 4 จำนวน 30 รอบ | | |
| 6. Final extension | ที่อุณหภูมิ 72°ซ | เป็นเวลา 7 นาที |

ไพรเมอร์ bphA1F และ bph1R ใช้สภาวะ

- | | | |
|--------------------------------------|------------------|--------------------|
| 1. Initial denaturation | ที่อุณหภูมิ 94°ซ | เป็นเวลา 5 นาที |
| 2. Denaturation | ที่อุณหภูมิ 94°ซ | เป็นเวลา 1 นาที |
| 3. Annealing | ที่อุณหภูมิ 55°ซ | เป็นเวลา 30 วินาที |
| 4. Extension | ที่อุณหภูมิ 72°ซ | เป็นเวลา 30 วินาที |
| 5. ทำซ้ำขั้นตอน 2 ถึง 4 จำนวน 30 รอบ | | |
| 6. Final extension | ที่อุณหภูมิ 72°ซ | เป็นเวลา 5 นาที |

ไพรเมอร์ RieskeIF และ RieskeIR ใช้สภาวะ

- | | | |
|--------------------------------------|------------------|--------------------|
| 1. Initial denaturation | ที่อุณหภูมิ 94°ซ | เป็นเวลา 5 นาที |
| 2. Denaturation | ที่อุณหภูมิ 94°ซ | เป็นเวลา 30 วินาที |
| 3. Annealing | ที่อุณหภูมิ 48°ซ | เป็นเวลา 30 วินาที |
| 4. Extension | ที่อุณหภูมิ 72°ซ | เป็นเวลา 30 วินาที |
| 5. ทำซ้ำขั้นตอน 2 ถึง 4 จำนวน 35 รอบ | | |
| 6. Final extension | ที่อุณหภูมิ 72°ซ | เป็นเวลา 5 นาที |

ตรวจสอบผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นโดยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิสในบัฟเฟอร์ TAE ความเข้มข้น 1 เท่า โดยใช้อะกาโรสเจลเข้มข้น 2% เพื่อตรวจสอบขนาดของผลิตภัณฑ์ PCR โดยการเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA ladder ตามวิธีที่ระบุในข้อ 3.2.2.2 ต่อไป

3.5.1.3 สกัดดีเอ็นเอจากอะกาโรสเจลด้วย QIAquick gel extraction kit

ตัดแถบดีเอ็นเอตามขนาดที่ต้องการจากเจล นำเจลใส่ลงในหลอดไมโครพิวจ์ ซึ่งน้ำหนักชิ้นอะกาโรสเจล เติมสารละลายบัฟเฟอร์ QG ปริมาตรเป็น 3 เท่าของน้ำหนักชิ้นอะกาโรสเจล บ่มที่อุณหภูมิ 50°ซ เป็นเวลา 10 นาที เพื่อให้ชิ้นอะกาโรสเจลละลายจนหมด เติมไอโซโพรพานอล ปริมาตรเป็น 1 เท่าของน้ำหนักชิ้นอะกาโรสเจล ดูดสารละลายทั้งหมดผ่านคอลัมน์ QIAquick บั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เทสารละลายที่ผ่านคอลัมน์ทิ้ง แล้วเติมสารละลายบัฟเฟอร์ QG ปริมาตร 500 ไมโครลิตรผ่านคอลัมน์ QIAquick บั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เทสารละลายที่ผ่านคอลัมน์ทิ้ง ล้างคอลัมน์ด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ PE ที่เติมเอทานอลแล้ว ปริมาตร 750 ไมโครลิตร บั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เทสารละลายที่ผ่านคอลัมน์ทิ้ง จากนั้นบั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที อีก 1 ครั้ง จากนั้นย้ายคอลัมน์ QIAquick วางบนหลอดไมโครพิวจ์หลอดใหม่ ชะดีเอ็นเอที่ติดอยู่ที่คอลัมน์ด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ EB ปริมาตร 30 ไมโครลิตรโดยเติมให้ลงตรงกลางแผ่นเมมเบรนของคอลัมน์ ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 นาที แล้วบั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที

3.5.1.4 วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

ส่งวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของแถบดีเอ็นเอที่สกัดได้จากอะกาโรสเจล ดังวิธีในข้อ 3.2.2.8 นำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่วิเคราะห์ได้ เปรียบเทียบกับข้อมูลที่มีในฐานข้อมูล GenBank โดยใช้โปรแกรม BLASTx (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)

3.5.2 ตรวจหาตำแหน่งของยีนที่ประมวรวรหัสไดออกซีจีเนสด้วยเทคนิคเซาท์เทิร์นไฮบริโดเซชัน

3.5.2.1 เตรียมดีเอ็นเอติดตาม (DNA probe)

ใช้ผลิตภัณฑ์ PCR ที่เพิ่มดีเอ็นเอจากบริเวณยีนที่ประมวรวรหัสไดออกซีจีเนสเป็นดีเอ็นเอติดตาม ติดฉลากดีเอ็นเอติดตามด้วย Digoxigenin-dUTP ด้วยวิธี random labeling โดยใช้ชุดติดฉลากและติดตามดีเอ็นเอ DIG High Prime Labeling and Detection Starter Kit (Roche, Germany) (ภาคผนวก ข) ตามวิธีของบริษัทผู้ผลิตดังนี้ ดูดสารละลายดีเอ็นเอจากข้อ 3.5.1.3 ให้ได้ความเข้มข้น 500 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร และเติมน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อให้ปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 16 ไมโครลิตร นำไปทำให้เดือดที่อุณหภูมิ 95°C เป็นเวลา 10 นาที แล้วแช่แข็งทันที เป็นเวลา 2 นาที เติมสารละลาย DIG High Prime (หลอดหมายเลข 1) (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 4 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37°C หยุดปฏิกิริยาด้วยการเติม สารละลาย EDTA pH8.0 ความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 2 ไมโครลิตร และตกตะกอนดีเอ็นเอด้วยวิธีการตกตะกอนโดยเอทานอล 99% เริ่มจากการเติมสารละลายโซเดียมอะซิเตตเข้มข้น 3 โมลาร์ (ภาคผนวก ข) 0.1 เท่าของปริมาตรสุดท้าย และเติมเอทานอล 99% 2 เท่าของปริมาตรสุดท้าย แช่ที่ -70°C 15 นาที ปั่นเหวี่ยงที่ 4°C 15,000 รอบต่อนาที 15 นาที เทส่วนใสทิ้งและล้างตะกอนด้วยเอทานอล 70% 450 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที 5 นาที เทส่วนใสทิ้ง ระเหยเอทานอลจนแห้งและละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วยบัฟเฟอร์ TE 30 ไมโครลิตร เก็บรักษาดีเอ็นเอติดตามไว้ที่อุณหภูมิ -20°C

3.5.2.2 สกัดเมกะพลาสมิด (Megaplasmid)

สกัดเมกะพลาสมิดจากแบคทีเรียสายพันธุ์บริสุทธิ์ที่เลี้ยงในอาหารเหลว LB และอาหารเหลว CFMM ที่เติมไพรีนตามวิธีของ Hu และคณะ (2008) โดย ล้างตะกอนเซลล์ด้วย สารละลาย Tris-HCl pH8.0 ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ 2 ครั้ง ละลายเซลล์ให้เหลือปริมาตร 30 ไมโครลิตร

เติม Lysis solution (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 150 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน และบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 15 นาที แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 65°C เป็นเวลา 2 นาที จากนั้นเติมฟีนอล/คลอโรฟอร์ม (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 180 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที ดูดเก็บสารละลายชั้นบนซึ่งเป็น สารละลายเมกะพลาสมิดไว้ที่อุณหภูมิ -20°C จนกว่าจะนำมาใช้ ตรวจสอบเมกะพลาสมิดโดย วิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิสในบัฟเฟอร์ TAE ความเข้มข้น 1 เท่า โดยใช้อะกาโรสเจลเข้มข้น 0.7% จากนั้นทำอิเล็กโทรโฟเรซิส ใช้ความต่างศักย์ 100 โวลต์ เป็นเวลา 2 ชั่วโมง 30 นาที

3.5.2.3 ย้ายดีเอ็นเอจากอะกาโรสเจลไปยังไนลอนเมมเบรน (Southern blot)

ล้างอะกาโรสเจลที่ได้จากข้อ 3.5.2.2 ด้วย สารละลายกรดไฮโดรคลอริก เขย่าเบาๆ เป็น เวลา 10 นาที เทสารละลายทิ้ง เติม denaturation buffer (ภาคผนวก ข) เขย่าเบาๆ เป็นเวลา 30 นาที เทสารละลายทิ้ง เติม neutralization buffer (ภาคผนวก ข) เป็นเวลา 30 นาที เทสารละลาย ทิ้ง จากนั้นถ่ายดีเอ็นเอจากอะกาโรสเจลไปยังแผ่นไนลอนเมมเบรนด้วยวิธี Capillary transfer (Sambrook และ Russell, 2001) โดยใช้ 20×SSC (ภาคผนวก ข) เป็น transfer buffer นำไนลอน เมมเบรนที่ได้ไปตรึงด้วยแสงอัลตราไวโอเล็ตเป็นเวลา 3 นาที เก็บไนลอนเมมเบรนไว้ที่ อุณหภูมิห้องได้นาน 6 เดือน

3.5.2.4 ไฮบริไดเซชันดีเอ็นเอด้วยดีเอ็นเอติดตาม

ทำพรีไฮบริไดเซชัน (prehybridization) โดยเติมสารละลาย Hybridization buffer (DIG Easy Hyb) (หลอดหมายเลข 7) (ภาคผนวก ข) ที่อุณหภูมิ 42°C ลงบนไนลอนเมมเบรนที่มี ดีเอ็นเอ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 42°C ใน Hybridization oven เป็นเวลา 30 นาที

เตรียมสารละลายดีเอ็นเอติดตามสำหรับการไฮบริไดเซชัน โดยเติมดีเอ็นเอติดตามที่ เตรียมจากข้อ 3.5.2.1 ในสารละลาย Hybridization buffer (DIG Easy Hyb) นำไปต้มในน้ำเดือด เป็นเวลา 10 นาที แล้วทำให้เย็นลงที่อุณหภูมิไฮบริไดเซชัน (42°C)

เทสารละลายที่ prehybridization ทิ้ง แล้วเติมสารละลายดีเอ็นเอติดตามที่เตรียมไว้ ช้างต้น นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 42°C ใน Hybridization oven เป็นเวลา 16 ชั่วโมง เมื่อครบเวลา นำ ไนลอนเมมเบรนที่ได้ล้างดีเอ็นเอติดตามส่วนเกินด้วยสารละลาย 2×SSC/0.1%SDS (ภาคผนวก ข) เขย่าเบาๆ เป็นเวลา 15 นาที แล้วเทสารละลายทิ้ง ทำซ้ำ 2 ครั้ง จากนั้นล้างอีก 2 ครั้งด้วย 0.5×SSC/0.1%SDS (ภาคผนวก ข) ที่อุณหภูมิ 68°C เป็นเวลา 15 นาที แล้วเทสารละลายทิ้ง

ตรวจหาดีเอ็นเอที่ไฮบริดซ์ได้กับดีเอ็นเอติดตามด้วยวิธี Enzyme immunoassay โดยใช้ ชุดติดฉลากและติดตามดีเอ็นเอ DIG High Prime labeling and Detection Starter Kit I ตามวิธี ดังนี้ นำไนลอนเมมเบรนที่ล้างดีเอ็นเอติดตามส่วนเกินแล้ว ล้างด้วย Buffer1 (Maleic acid) (ภาคผนวก ข) เขย่าเบาๆ เป็นเวลา 5 นาที เทสารละลายทิ้ง จากนั้นเติม Buffer2 (Blocking solution ที่ผสมกับ Buffer1) (ภาคผนวก ข) เขย่าเบาๆ เป็นเวลา 30 นาที เทสารละลายทิ้ง แล้วเติม antibody solution (Anti-DIG-AP conjugate) (หลอดหมายเลข 4) (ภาคผนวก ข) ที่เจือจาง ด้วย Buffer2 เขย่าเบาๆ เป็นเวลา 30 นาที เทสารละลายทิ้ง ล้าง Anti-DIG-AP conjugate ส่วนเกินด้วย Buffer1 เขย่าเบาๆ เป็นเวลา 15 นาที เทสารละลายทิ้ง ทำซ้ำ 2 ครั้ง แล้วเติม Buffer3 (detection buffer) (ภาคผนวก ข) เขย่าเบาๆ เป็นเวลา 5 นาที เทสารละลายทิ้ง จากนั้นเตรียมสับเสตรท NBT/BCIP (หลอดหมายเลข 5) (ภาคผนวก ข) โดยเจือจางใน Buffer3 (เตรียมก่อนใช้และห้ามให้โดนแสง) เทสับเสตรทลงในถุงที่มีไนลอนเมมเบรน ปิดผนึก นำไปปมในที่มืดจนพบแถบสีชัดเจน นำเมมเบรนมาล้างในน้ำปลอดประจุตลอดเชื้อ เป็นเวลา 10 นาที ซับแล้วตากให้แห้งแล้วจึงเก็บใส่ถุงเพื่อถ่ายรูปต่อไป

บทที่ 4

ผลการทดลอง

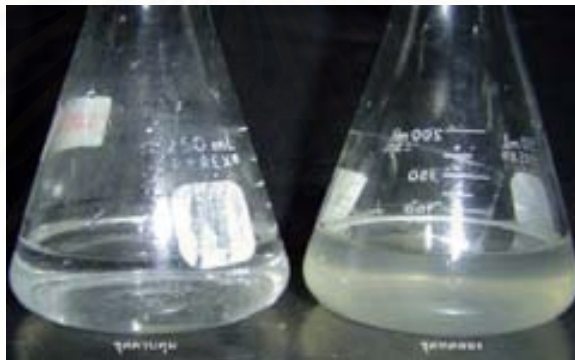
4.1 คัดแยกและจำแนกชนิดของแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลายไฟรีน

4.1.1 เพิ่มจำนวนแบคทีเรียที่ย่อยสลายไฟรีน

จากการนำตัวอย่างดินมาเพิ่มจำนวนแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลายไฟรีน โดยเลี้ยงในอาหารเหลว CFMM ที่เติมไฟรีนให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 100 มิลลิกรัมต่อลิตร สังเกตการเจริญของแบคทีเรียได้โดยพบการเปลี่ยนสีของอาหารเหลว (Mueller และคณะ, 1989) หลังจากถ่ายอาหารเหลวที่มีการเปลี่ยนสีลงในอาหารที่เตรียมขึ้นใหม่พบว่า แบคทีเรียจากตัวอย่างดินที่ทำให้มีการเปลี่ยนแปลงของอาหารเหลว ได้แก่ ตัวอย่างดินจากบริเวณรางรถไฟ จังหวัดนครราชสีมา ริมถนนราชดำเนิน กทม. โดยพบการเปลี่ยนแปลงเมื่อเลี้ยงเป็นเวลา 10 วัน บริเวณใกล้ปั้มน้ำมัน จังหวัดนครปฐม โดยพบการเปลี่ยนแปลงเมื่อเลี้ยงเป็นเวลา 20 วัน และบริเวณใต้ต้นไม้ ริมถนน บริพัตรณ์ กทม. โดยพบการเปลี่ยนแปลงเมื่อเลี้ยงเป็นเวลา 25 วัน แต่ไม่พบการเปลี่ยนแปลงจากตัวอย่างดิน ในบริเวณใต้ต้นไม้ อ.เขาใหญ่ จังหวัดนครราชสีมาเมื่อเลี้ยงเป็นเวลาถึง 30 วัน ลักษณะของสีอาหารเหลวที่มีการเปลี่ยนแปลงของตัวอย่างดินจากบริเวณรางรถไฟ จังหวัดนครราชสีมา และริมถนนราชดำเนิน กทม. แสดงดังรูปที่ 4.1 และ 4.2



รูปที่ 4.1 ลักษณะสีของอาหารเหลว CFMM ที่เติมไฟรีน เมื่อมีการเจริญของแบคทีเรียจากตัวอย่างดินบริเวณรางรถไฟ จังหวัดนครราชสีมา เป็นเวลา 10 วัน

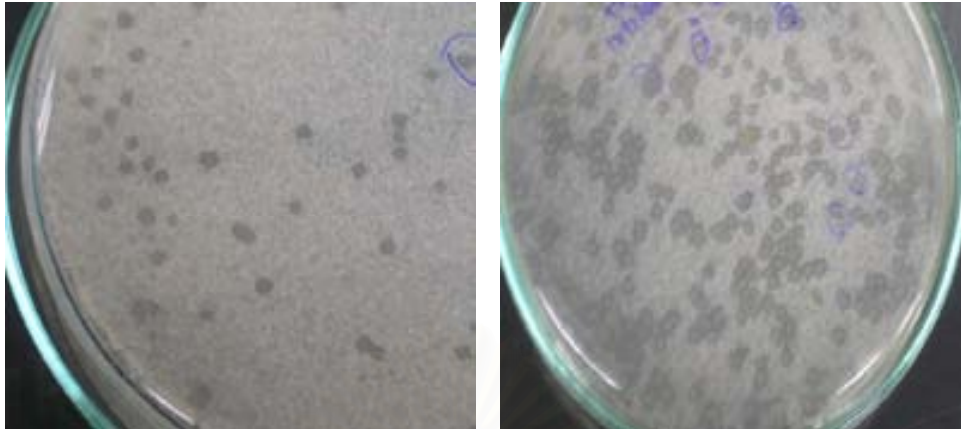


รูปที่ 4.2 ลักษณะสีของอาหารเหลว CFMM ที่เติมไฟรีน เมื่อมีการเจริญของแบคทีเรียจากตัวอย่างดินจากริมถนนราชดำเนิน เป็นเวลา 10 วัน

4.1.2 คัดแยกแบคทีเรียที่ย่อยสลายไฟรีน

จากการนำอาหารเหลวที่มีอาหารเหลวที่มีการเปลี่ยนสีมาเปลี่ยนบนอาหารแข็ง CFMM แล้วพ่นทับผิวหน้าอาหารแข็งด้วยสารละลายไฟรีน พบโคโลนีแบคทีเรียที่สามารถสร้างบริเวณใสบนอาหารแข็งที่ถูกพ่นทับด้วยไฟรีนเมื่อเลี้ยงเป็นเวลา 14 วัน ได้จากตัวอย่างดินทั้ง 2 แหล่ง คือ บริเวณรางรถไฟและริมถนนราชดำเนิน ลักษณะโคโลนีของแบคทีเรียที่สร้างบริเวณใสแสดงดังรูปที่

4.3



(ก)

(ข)

รูปที่ 4.3 ลักษณะโคโลนีของแบคทีเรียที่สร้างบริเวณใสเมื่อเลี้ยงบนอาหารแข็ง CFMM ที่ปนทับด้วยไฟรีนเป็นเวลา 14 วัน (ก) ตัวอย่างดินจากบริเวณรางรถไฟ (ข) ตัวอย่างดินจากริมถนนราชดำเนิน

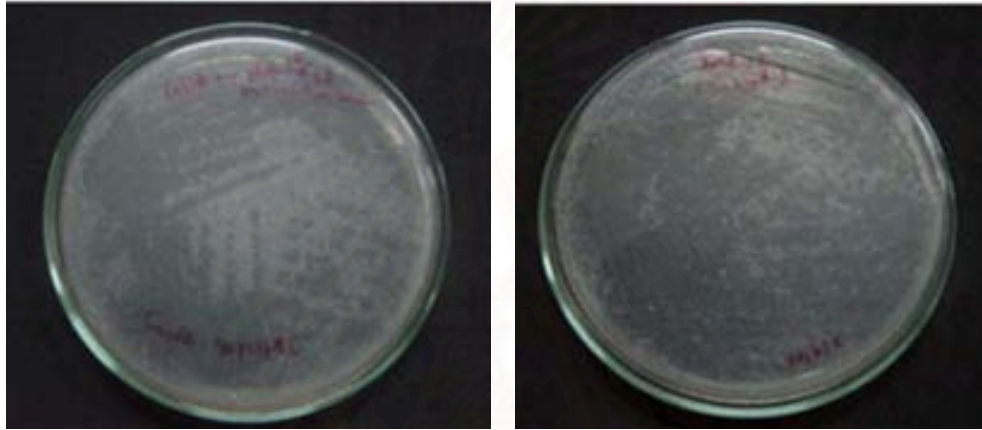
เมื่อนำโคโลนีของแบคทีเรียที่สร้างบริเวณใสมาเลี้ยงบนอาหารแข็ง LB เพื่อดูความบริสุทธิ์ของเชื้อ พบว่าโคโลนีที่สร้างบริเวณใสที่คัดแยกมาจากตัวอย่างดินทั้ง 2 แหล่งนั้น มีแบคทีเรียหลายสายพันธุ์ซึ่งอยู่รวมกันเป็นกลุ่ม ตั้งชื่อกลุ่มแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากตัวอย่างดินที่เก็บจากบริเวณรางรถไฟว่า กลุ่มแบคทีเรีย KOT และริมถนนราชดำเนินว่า กลุ่มแบคทีเรีย RN

ทำการยืนยันความสามารถในการย่อยสลายไฟรีนในชั้นเบื้องต้นโดยเลี้ยงแบคทีเรียในอาหารเหลว CFMM ที่เติมไฟรีน พบว่ากลุ่มแบคทีเรีย KOT และกลุ่มแบคทีเรีย RN ที่มาจากโคโลนีที่สร้างบริเวณใสสามารถย่อยสลายไฟรีนได้โดยสังเกตจากอาหารเหลวที่มีการเปลี่ยนสี แต่แบคทีเรียสายพันธุ์บริสุทธิ์จากกลุ่มแบคทีเรียทั้ง 2 กลุ่ม ไม่สามารถย่อยสลายไฟรีนได้ เนื่องจากไม่พบการเปลี่ยนสีของอาหารเหลว และเมื่อรวมแบคทีเรียบริสุทธิ์ของแต่ละกลุ่มเข้าด้วยกัน เลี้ยงในอาหารเหลว CFMM ที่เติมไฟรีนก็พบว่าไม่มีการเปลี่ยนสีของอาหารเหลวเช่นเดียวกัน

ดังนั้นจึงเลี้ยงกลุ่มแบคทีเรีย KOT และกลุ่มแบคทีเรีย RN ในอาหารเหลว CFMM ที่เติมไฟรีนจนพบอาหารเหลวมีการเปลี่ยนสี เจือจางอาหารเหลวที่มีการเปลี่ยนสีด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.85% และนำไปเกลี่ยบนอาหารแข็ง LB และอาหารแข็ง LB เจือจาง 4 เท่า บ่มที่อุณหภูมิ 30°ซ จนพบการเจริญของแบคทีเรีย จากนั้นพ่นไฟรีนทับบนผิวหน้าอาหารแข็ง แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30°ซ พบว่ามีแบคทีเรียที่สร้างบริเวณใสบนอาหารแข็ง LB เจือจาง 4 เท่า ทั้งจากอาหารเหลวที่มาจากกลุ่มแบคทีเรีย KOT และกลุ่มแบคทีเรีย RN เมื่อนำโคโลนีแบคทีเรียที่สร้างบริเวณใสมาเลี้ยงบนอาหารแข็ง LB พบว่าเป็นแบคทีเรียสายพันธุ์บริสุทธิ์ จึงตั้งชื่อแบคทีเรียสาย

พันธุ์ที่มาจากกลุ่มแบคทีเรีย KOT ว่า KOTLB และสายพันธุ์ที่มาจากกลุ่มแบคทีเรีย RN ว่า RN402 ตามลำดับ

เมื่อนำแบคทีเรียสายพันธุ์บริสุทธิ์ KOTLB และ RN402 ไปเลี้ยงในอาหารเหลว CFMM ที่เติมไพริน พบว่ามีการย่อยสลายของไพรินเนื่องจากสังเกตเห็นมีการเปลี่ยนสีของอาหารเหลวและเมื่อเลี้ยงบนอาหารแข็ง CFMM ที่พันทับผิวหน้าด้วยไพรินเป็นเวลา 14 วัน ก็พบว่าโคโลนีของแบคทีเรียสร้างบริเวณใสอีกด้วย แสดงดังรูปที่ 4.4



(ก)

(ข)

รูปที่ 4.4 ลักษณะโคโลนีของแบคทีเรียสายพันธุ์บริสุทธิ์บนอาหารแข็ง CFMM ที่พันทับด้วยไพรินเมื่อเลี้ยงเป็นเวลา 14 วัน (ก) สายพันธุ์ KOTLB (ข) สายพันธุ์ RN402

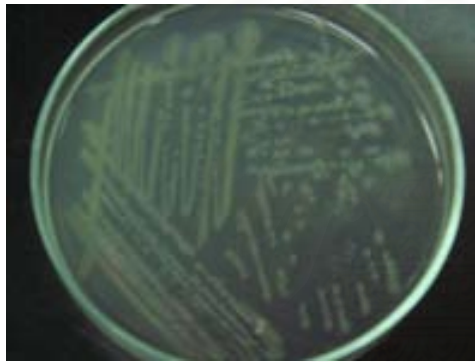
การนำแบคทีเรียไปใช้ในการศึกษาต่อไป ทำโดยเชื้อโคโลนีที่สร้างบริเวณใสบนอาหารแข็ง CFMM ที่พันทับด้วยไพรินไปฉีดลงบนอาหารแข็ง LB (สำหรับสายพันธุ์ KOTLB) และ อาหารแข็ง LB เจือจาง 4 เท่าที่มีไพรินความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 100 มิลลิกรัมต่อลิตร (สำหรับสายพันธุ์ RN402)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

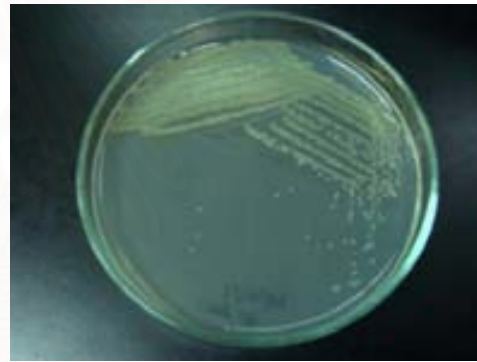
4.2 จำแนกชนิดของแบคทีเรียบริสุทธิ์ที่คัดแยกได้

4.2.1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

จากการศึกษาลักษณะของแบคทีเรียสายพันธุ์บริสุทธิ์ KOTLB พบว่าลักษณะของโคโลนีเมื่อเลี้ยงบนอาหารแข็ง LB มีรูปร่างกลม สีเหลืองอ่อน โคโลนีเรียบ มันวาว ขอบหยักและโปร่งแสง ดังแสดงในรูปที่ 4.5 และเมื่อศึกษาใต้กล้องจุลทรรศน์พบว่าเซลล์ของแบคทีเรียมีลักษณะเป็นแท่ง และติดสีแกรมลบ ดังแสดงในรูปที่ 4.6 ในขณะที่ลักษณะของแบคทีเรียสายพันธุ์บริสุทธิ์ RN402 มีรูปร่างกลม สีเหลืองเข้ม โคโลนีนูน มันวาว ขอบเรียบและโปร่งแสง ดังแสดงในรูปที่ 4.5 และเมื่อศึกษาใต้กล้องจุลทรรศน์พบว่าเซลล์ของแบคทีเรียมีลักษณะเป็นแท่ง และติดสีแกรมลบ ดังแสดงในรูปที่ 4.6



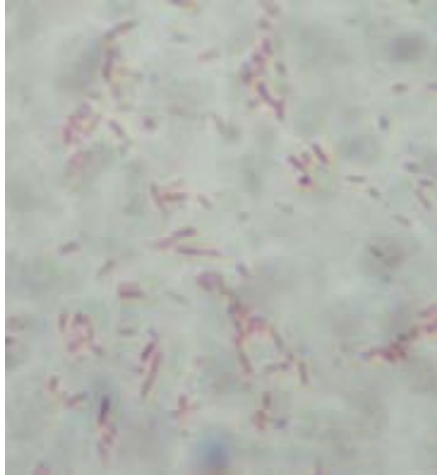
(ก)



(ข)

รูปที่ 4.5 ลักษณะโคโลนีของแบคทีเรียสายพันธุ์บริสุทธิ์บนอาหารแข็ง LB (ก) สายพันธุ์ KOTLB และ (ข) สายพันธุ์ RN402

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



(ก)



(ข)

รูปที่ 4.6 ลักษณะรูปร่างของแบคทีเรียสายพันธุ์บริสุทธิ์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (กำลังขยาย 100×10) (ก) สายพันธุ์ KOTLB (ข) สายพันธุ์ RN402

4.2.2 วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rDNA

การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rDNA ของแบคทีเรียสายพันธุ์บริสุทธิ์ KOTLB ความยาว 1,456 bp และ RN402 ความยาว 1,361 bp เปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rDNA ของแบคทีเรียสายพันธุ์ต่างๆ ที่มีบันทึกไว้ในฐานข้อมูล GenBank โดยใช้โปรแกรม BLASTn พบว่า ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rDNA ของแบคทีเรียสายพันธุ์บริสุทธิ์ KOTLB มีความคล้ายกับลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rDNA ของแบคทีเรียในสกุล *Diaphorobacter* 99% (Yan และ Li, 2005) และ สกุล *Acidovorax* 96% ถึง 99% (Billy และ คณะ, 1994) ดังแสดงในตารางที่ 4.1 และของแบคทีเรียสายพันธุ์บริสุทธิ์ RN402 มีความคล้ายกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rDNA ของแบคทีเรียในสกุล *Pseudoxanthomonas* 97% ถึง 99% (Hu และคณะ, 2007) และสกุล *Stenotrophomonas* 96% (Zou และคณะ, 2007) ดังแสดงในตารางที่ 4.2

ตารางที่ 4.1 ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rDNA ของสายพันธุ์ KOTLB กับลำดับนิวคลีโอไทด์จากฐานข้อมูล (BLASTn)

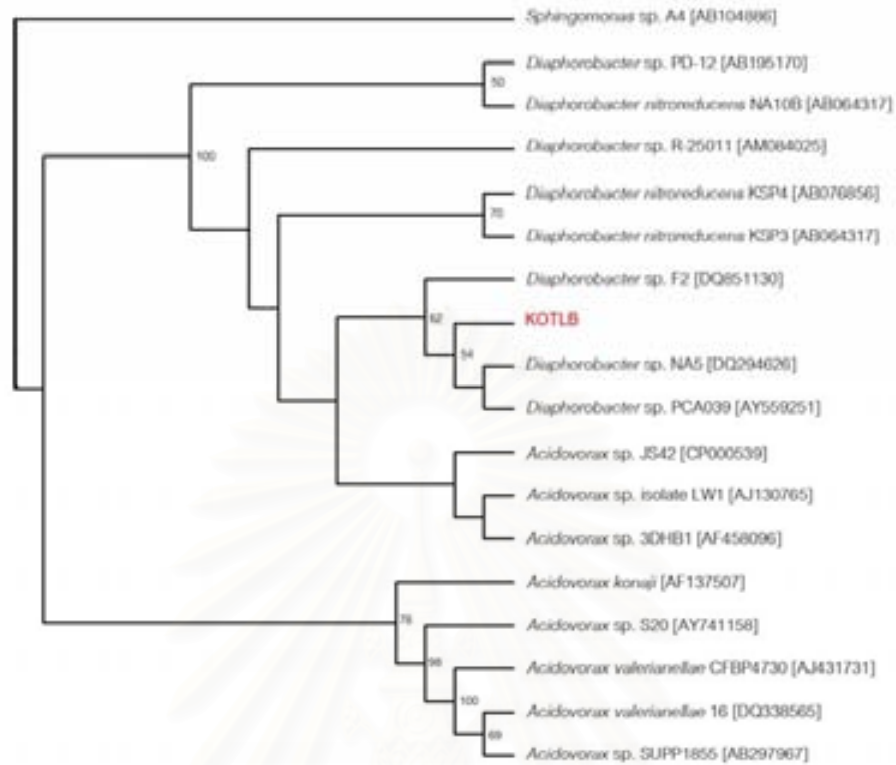
	สายพันธุ์แบคทีเรีย	Accession no.	Sequencing identity (%)	เอกสารอ้างอิง
1	<i>Diaphorobacter</i> sp. สายพันธุ์ NA5	DQ294626	1455/1456 (99%)	Yan และ Li, 2005. ไม่ตีพิมพ์
2	<i>Acidovorax</i> sp. สายพันธุ์ JS42	CP000539	1453/1454 (99%)	Billy และคณะ, 1994.
3	<i>Diaphorobacter nitroreducens</i> สายพันธุ์ KSP4	AB076856	1451/1453 (99%)	Khan และคณะ, 2002.
4	<i>Diaphorobacter nitroreducens</i> สายพันธุ์ KSP3	AB064855	1451/1453 (99%)	Khan และคณะ, 2002.
5	<i>Diaphorobacter nitroreducens</i> สายพันธุ์ NA10B	AB064317	1451/1453 (99%)	Khan และคณะ, 2002.
6	<i>Acidovorax</i> sp. สายพันธุ์ 3DHB1	AF458096	1442/1443 (99%)	Mechichi และ Fuchs, 2001. ไม่ตีพิมพ์
7	<i>Diaphorobacter</i> sp. สายพันธุ์ R-25011	AM084025	1439/1442 (99%)	Heylen และคณะ, 2006.
8	<i>Diaphorobacter</i> sp. สายพันธุ์ PCA039	AY559251	1429/1431 (99%)	Ren และ Lui, 2004. ไม่ตีพิมพ์
9	<i>Acidovorax</i> sp. สายพันธุ์ LW1	AJ130765	1430/1433 (99%)	Katsivela และคณะ, 1999.
10	<i>Diaphorobacter</i> sp. สายพันธุ์ PD-12	AB195170	1439/1455 (98%)	Horiba และคณะ, 2005.
11	<i>Diaphorobacter</i> sp. สายพันธุ์ F2	DQ851130	1406/1407 (99%)	Xu และ Gun , 2006. ไม่ตีพิมพ์
12	<i>Acidovorax</i> sp. สายพันธุ์ S20	AY741158	1400/1439 (97%)	Muthukumarasamy และ Kang, 2004. ไม่ตีพิมพ์
13	<i>Acidovorax valerianellae</i> สายพันธุ์ 16	DQ338565	1391/1429 (97%)	Tsuyoshi และคณะ, 2006. In press.
14	<i>Acidovorax valerianellae</i> สายพันธุ์ CFBP4730	AJ431731	1401/1448 (96%)	Gardan และคณะ, 2003.
15	<i>Acidovorax</i> sp. สายพันธุ์ SUPP1855	AB297967	1396/1438 (97%)	Takikawa และ Kawada, 2007. ไม่ตีพิมพ์
16	<i>Acidovorax konjaci</i>	AF137507	1387/1433 (97%)	Hu และคณะ, 2001.

ตารางที่ 4.2 ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rDNA ของสายพันธุ์ RN402 กับลำดับนิวคลีโอไทด์จากฐานข้อมูล (BLASTn)

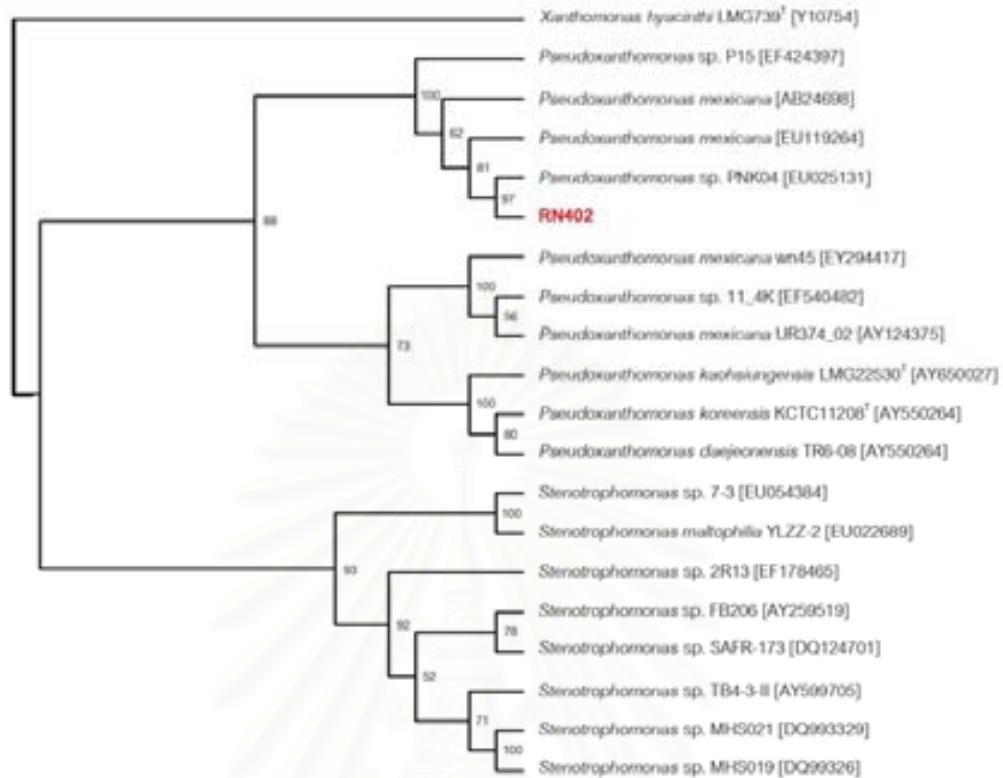
	สายพันธุ์แบคทีเรีย	Accession No.	Sequencing identity (%)	เอกสารอ้างอิง
1	<i>Pseudoxanthomonas mexicana</i>	EU119264	1357/1358 (99%)	Hu และคณะ, 2007. ไม่ตีพิมพ์
2	<i>Pseudoxanthomonas</i> sp. สายพันธุ์ PNK04	EU025131	1357/1358 (99%)	Nayak และคณะ, 2007. ไม่ตีพิมพ์
3	<i>Pseudoxanthomonas mexicana</i>	AB246798	1356/1358 (99%)	Kishimoto และคณะ, 2006. ไม่ตีพิมพ์
4	<i>Pseudoxanthomonas</i> sp. สายพันธุ์ P15	EF424397	1345/1356 (99%)	Kumari และ Lal, 2007. ไม่ตีพิมพ์
5	<i>Pseudoxanthomonas</i> sp. สายพันธุ์ 11_4K	EF540482	1324/1358 (97%)	Vedler และคณะ, 2007. ไม่ตีพิมพ์
6	<i>Pseudoxanthomonas mexicana</i> สายพันธุ์ wn45	EU294417	1326/1362 (97%)	Zhao และคณะ, 2007. ไม่ตีพิมพ์
7	<i>Pseudoxanthomonas mexicana</i> สายพันธุ์ UR374_02	AY124375	1323/1358 (97%)	Thierry และคณะ, 2004.
8	<i>Stenotrophomonas</i> sp. สายพันธุ์ MHS021	DQ993329	1314/1361 (96%)	Zou และคณะ, 2007
9	<i>Stenotrophomonas</i> sp. สายพันธุ์ MHS019	DQ993326	1311/1358 (96%)	Zou และคณะ, 2007
10	<i>Stenotrophomonas</i> sp. สายพันธุ์ FB206	AY259519	1310/1358 (96%)	Fani และคณะ, 2003. ไม่ตีพิมพ์
11	<i>Stenotrophomonas</i> sp. สายพันธุ์ 7-3	EU054384	1311/1316 (96%)	Zhu และคณะ, 2007. ไม่ตีพิมพ์
12	<i>Stenotrophomonas</i> sp. สายพันธุ์ 2R13	EF178465	1309/1358 (96%)	Yang และคณะ, 2008.
13	<i>Stenotrophomonas</i> sp. สายพันธุ์ SAFR-173	DQ124701	1308/1358 (96%)	Osman และคณะ, 2006.
14	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> สายพันธุ์ YLZZ-2	EU022689	1309/1361 (96%)	Zhao และคณะ, 2006. ไม่ตีพิมพ์
15	<i>Stenotrophomonas</i> sp. สายพันธุ์ TB4-3-II	AY599705	1310/1360 (96%)	Barbieri และคณะ, 2005.

เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rDNA ของแบคทีเรียสายพันธุ์บริสุทธิ์ KOTLB และแบคทีเรียสายพันธุ์ต่างๆ ที่คัดเลือกไว้จากตารางที่ 1 มาทำการปรับแนวของลำดับนิวคลีโอไทด์ (multiple alignment) โดยใช้โปรแกรม Clustal X และนำข้อมูลที่ได้จากการปรับแนว มาสร้าง phylogenetic tree ด้วยโปรแกรม PHYLIP software package ดังแสดงในรูปที่ 4.7 แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียสายพันธุ์บริสุทธิ์ KOTLB มีความใกล้เคียงกับแบคทีเรียในสกุล *Diaphorobacter*

สำหรับสายพันธุ์บริสุทธิ์ RN402 เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rDNA และแบคทีเรียสายพันธุ์ต่างๆ ที่คัดเลือกไว้จากตารางที่ 1 มาทำการปรับแนวของลำดับนิวคลีโอไทด์ และสร้าง phylogenetic tree ดังแสดงในรูปที่ 4.8 แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียสายพันธุ์บริสุทธิ์ RN402 มีความใกล้เคียงกับแบคทีเรียในสกุล *Pseudoxanthomonas*



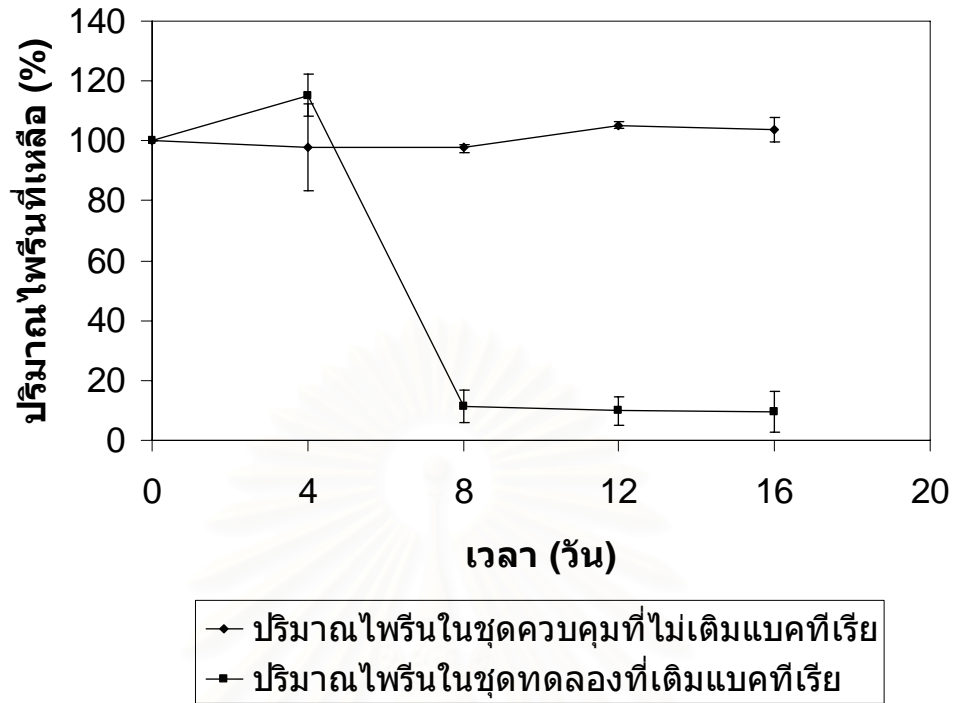
รูปที่ 4.7 phylogenetic tree ของ 16S rDNA ของแบคทีเรียสายพันธุ์บริสุทธิ์ KOTLB สกุล *Diaphorobacter* จำนวน 8 สายพันธุ์ และ สกุล *Acidovorax* จำนวน 8 สายพันธุ์ โดยใช้ 16S rDNA ของ *Spingomonas* sp. สายพันธุ์ A4 เป็น out-group และตัวเลขที่กิ่งสาขาบอกถึงการนับที่ให้ผลซ้ำจากทั้งหมด 100 ครั้ง ด้วย bootstrap



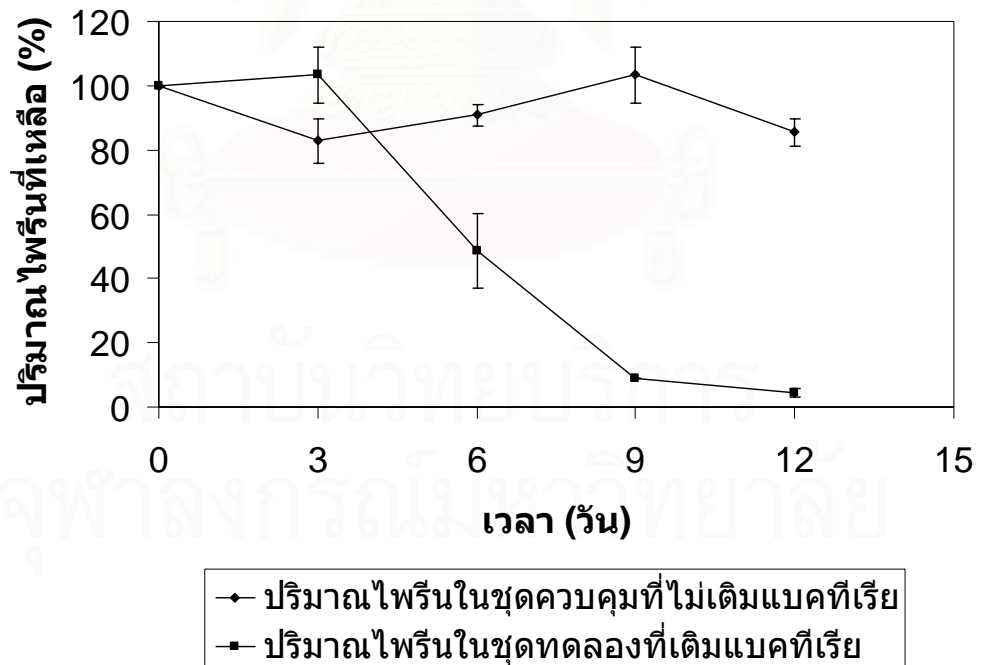
รูปที่ 4.8 phylogenetic tree ของ 16S rDNA ของแบคทีเรียสายพันธุ์บริสุทธิ์ RN402 สกุล *Pseudoxanthomonas* จำนวน 10 สายพันธุ์ และ สกุล *Stenotrophomonas* จำนวน 8 สายพันธุ์ โดยใช้ 16S rDNA ของ *Xanthomonas hyacinthi* สายพันธุ์ LMG739^T เป็น out-group และตัวเลขที่กิ่งสาขาบอกถึงการนับที่ให้ผลซ้ำจากทั้งหมด 100 ครั้ง ด้วย bootstrap

4.3 ประสิทธิภาพการย่อยสลายไพรินของกลุ่มแบคทีเรียและแบคทีเรียสายพันธุ์บริสุทธิ์ และรูปแบบการเจริญของแบคทีเรียสายพันธุ์บริสุทธิ์โดยการใช้ไพรินเป็นแหล่งคาร์บอน และพลังงาน

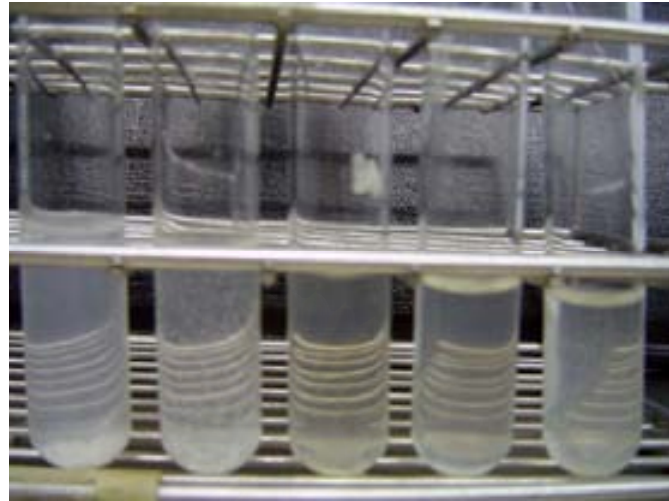
ศึกษาประสิทธิภาพการย่อยสลายไพรินของกลุ่มแบคทีเรีย KOT และ RN โดยการเลี้ยงหัวเชื้อของกลุ่มแบคทีเรียลงในอาหารเหลว CFMM ที่เติมไพรินให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 100 มิลลิกรัมต่อลิตร และวิเคราะห์ปริมาณไพรินที่เหลืออยู่ พบว่าเมื่อเลี้ยงกลุ่มแบคทีเรีย KOT ในอาหารเหลว CFMM ที่มีไพรินเป็นเวลา 16 วัน มีปริมาณไพรินที่เหลืออยู่ในอาหารเหลวเหลือ 9.62% โดยปริมาณไพรินลดลงอย่างรวดเร็วในช่วงวันที่ 4 ถึง 8 จาก 100% เหลือ 11.43% ในขณะที่เมื่อเลี้ยงกลุ่มแบคทีเรีย RN เป็นเวลา 12 วัน มีปริมาณไพรินที่เหลืออยู่ในอาหารเหลวเหลือ 4.52% โดยในช่วงวันที่ 3 ถึง 9 ปริมาณไพรินลดลงจาก 100% เหลือ 4.52% ดังแสดงในรูปที่ 4.9 และ 4.10 นอกจากนี้ลักษณะของอาหารเหลวพบว่าการเปลี่ยนแปลงโดยเริ่มจากวันที่ 0 สีของอาหารเหลวมีลักษณะเป็นสีขาวขุ่นของไพริน เมื่อเวลาผ่านไป 8 12 และ 16 วัน สีของอาหารมีลักษณะเป็นสีเหลืองส้ม และมีอนุภาคของไพรินลดลง ดังแสดงในรูปที่ 4.11 และ 4.12



รูปที่ 4.9 ปริมาณโปรตีนที่เหลือ ณ เวลา ต่างๆ เมื่อเลี้ยงกลุ่มแบคทีเรีย KOT

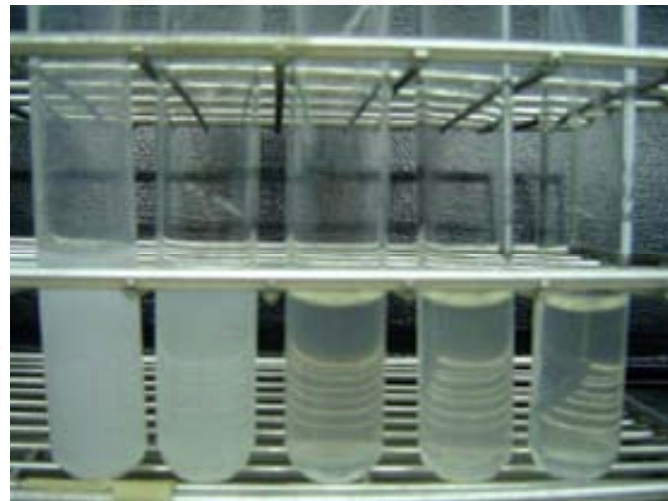


รูปที่ 4.10 ปริมาณโปรตีนที่เหลือ ณ เวลา ต่างๆ เมื่อเลี้ยงกลุ่มแบคทีเรีย RN



0 วัน 4 วัน 8 วัน 12 วัน 16 วัน

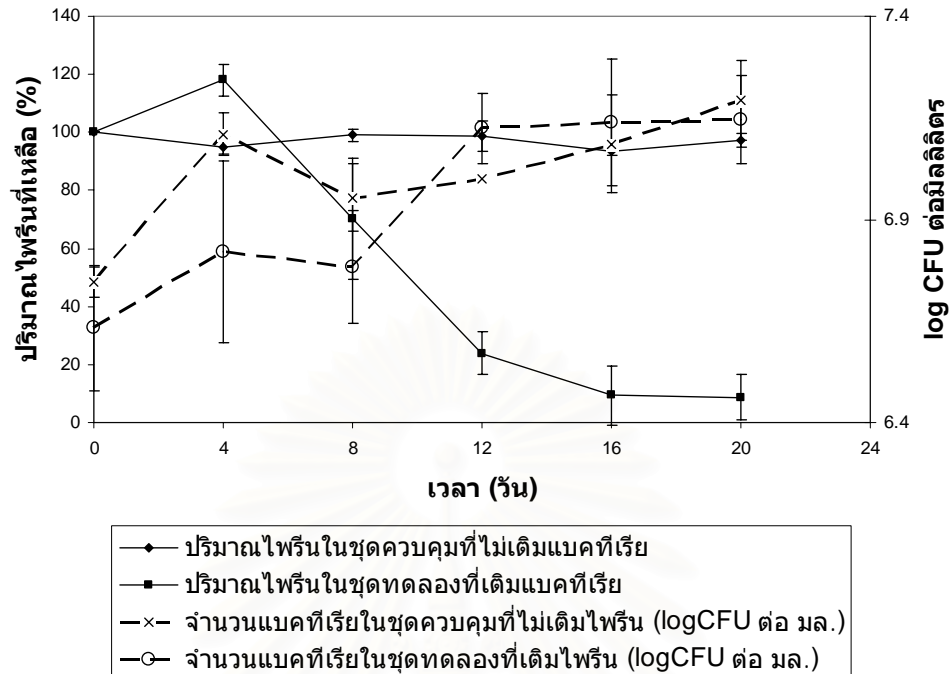
รูปที่ 4.11 การเปลี่ยนสีของอาหารเหลือ CFMM ที่มีไฟรีน ณ เวลาต่างๆ เมื่อเลี้ยงกลุ่มแบคทีเรีย KOT



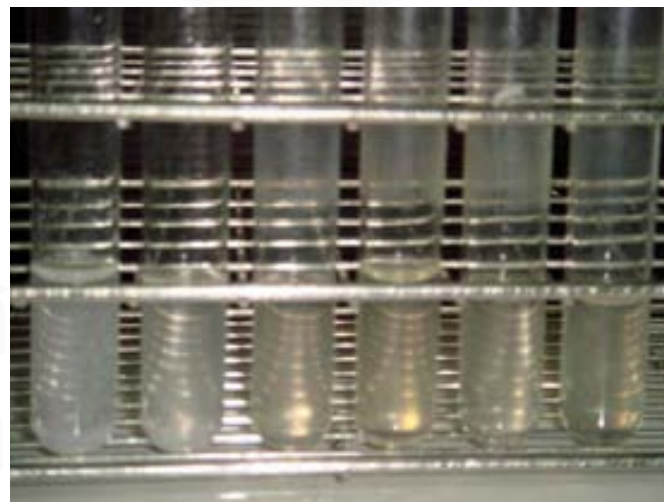
0 วัน 3 วัน 6 วัน 9 วัน 12 วัน

รูปที่ 4.12 การเปลี่ยนสีของอาหารเหลือ CFMM ที่มีไฟรีน ณ เวลาต่างๆ เมื่อเลี้ยงกลุ่มแบคทีเรีย RN

การศึกษาประสิทธิภาพการย่อยสลายไพรินและรูปแบบการเจริญโดยการใส่ไพรินเป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงานของ *Diaphorobacter* sp. สายพันธุ์ KOTLB โดยการนำหัวเชื้อแบคทีเรียมาเลี้ยงในอาหารเหลว CFMM ที่เติมไพรินให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ติดตามการเจริญของแบคทีเรีย และวิเคราะห์ปริมาณไพรินที่เหลืออยู่ในอาหารเหลวทุกๆ 4 วัน พบว่าเมื่อเลี้ยง *Diaphorobacter* sp. สายพันธุ์ KOTLB เป็นเวลา 16 วัน ปริมาณไพรินลดลงเหลือ 8.87% โดยในช่วงวันที่ 4 ถึงวันที่ 12 ไพรินลดลงอย่างรวดเร็ว จาก 100% เหลือ 23.92% และเมื่อเข้าสู่ในช่วงวันที่ 16 ถึงวันที่ 20 พบว่าการลดลงของไพรินเริ่มช้าลง จาก 9.33% เหลือ 8.77% ในขณะที่ชุดควบคุมพบว่าปริมาณของไพรินแทบไม่มีการเปลี่ยนแปลง ได้ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 4.13 และในการศึกษารูปแบบการเจริญของ *Diaphorobacter* sp. สายพันธุ์ KOTLB ในอาหารเหลว CFMM ที่เติมไพริน โดยเมื่อเวลาผ่านไป 20 วัน จำนวนของแบคทีเรียเพิ่มจำนวนจากเริ่มต้น 4.5×10^6 CFU ต่อมิลลิลิตร ไปเป็น 1.43×10^7 CFU ต่อมิลลิลิตร โดยจำนวนของแบคทีเรียเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในช่วงวันที่ 8 ถึงวันที่ 12 โดยเพิ่มจาก 6.3×10^6 CFU ต่อมิลลิลิตร ไปเป็น 1.36×10^7 CFU ต่อมิลลิลิตร และเมื่อหลังจากวันที่ 12 เป็นต้นไป จำนวนของแบคทีเรียเริ่มคงที่อยู่ที่ประมาณ 1.4×10^7 CFU ต่อมิลลิลิตร ไปจนถึงวันที่ 20 สำหรับในชุดควบคุม จำนวนของแบคทีเรียเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในช่วง 4 วันแรก โดยเพิ่มจากจำนวนแบคทีเรียเริ่มต้น 5.6×10^6 CFU ต่อมิลลิลิตร ไปเป็น 1.3×10^7 CFU ต่อมิลลิลิตร และหลังจากผ่านไป 4 วัน พบว่าจำนวนของแบคทีเรียเริ่มคงที่อยู่ที่ประมาณ 1.2×10^7 CFU ต่อมิลลิลิตร ไปจนถึงวันที่ 20 แสดงดังรูปที่ 4.13 นอกจากนี้เมื่อสังเกตลักษณะของอาหารเหลวในชุดทดลองพบว่า วันที่ 0 สีของอาหารเหลวมีลักษณะเป็นสีขาวขุ่นของไพริน เมื่อเข้าสู่วันที่ 8 สีของอาหารเหลวเปลี่ยนเป็นสีเหลืองส้ม เมื่อเวลาผ่านไปจนถึงวันที่ 20 พบว่าสีของอาหารเหลวไม่มีการเปลี่ยนแปลงไปจากวันที่ 8 มากนัก แต่พบว่าจำนวนอนุภาคของไพรินมีน้อยลง ดังแสดงในรูปที่ 4.14



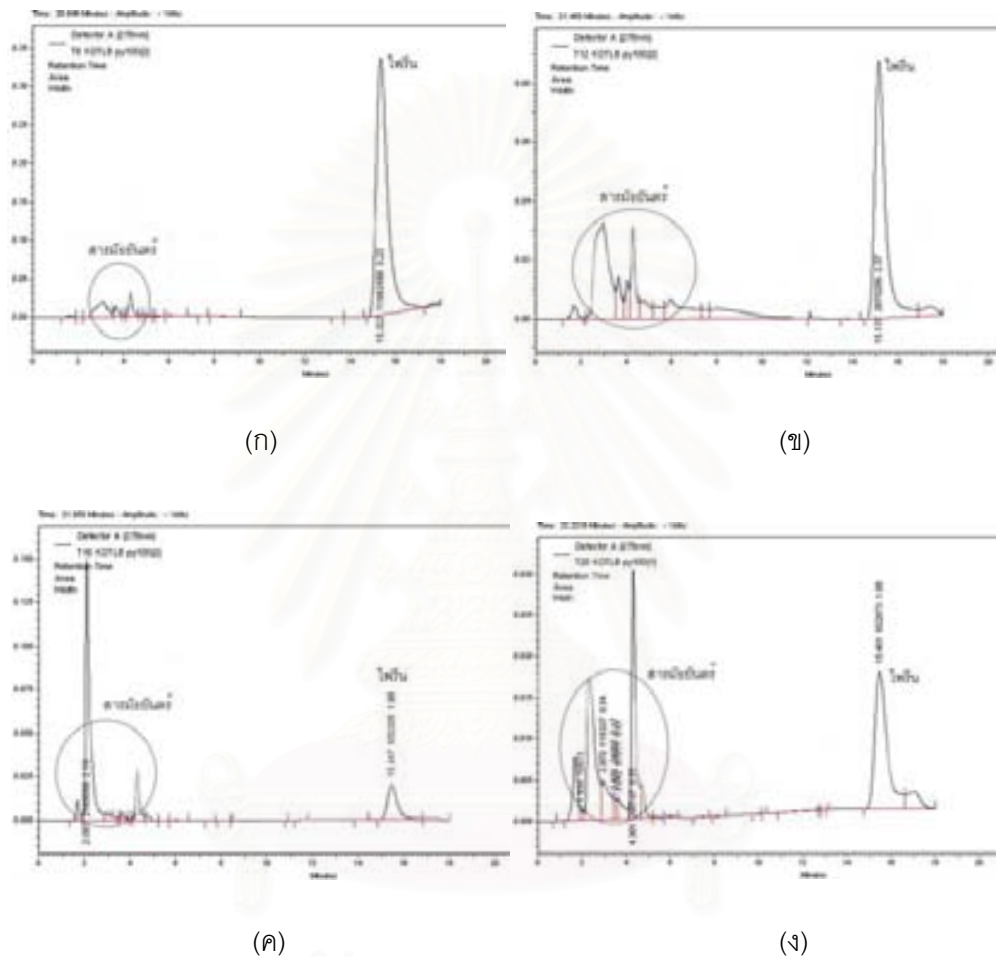
รูปที่ 4.13 การเจริญของ *Diaphorobacter* sp. สายพันธุ์ KOTLB ในอาหารเหลว CFMM ที่มีไนพรีน เป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงาน



0 วัน 4 วัน 8 วัน 12 วัน 16 วัน 20 วัน

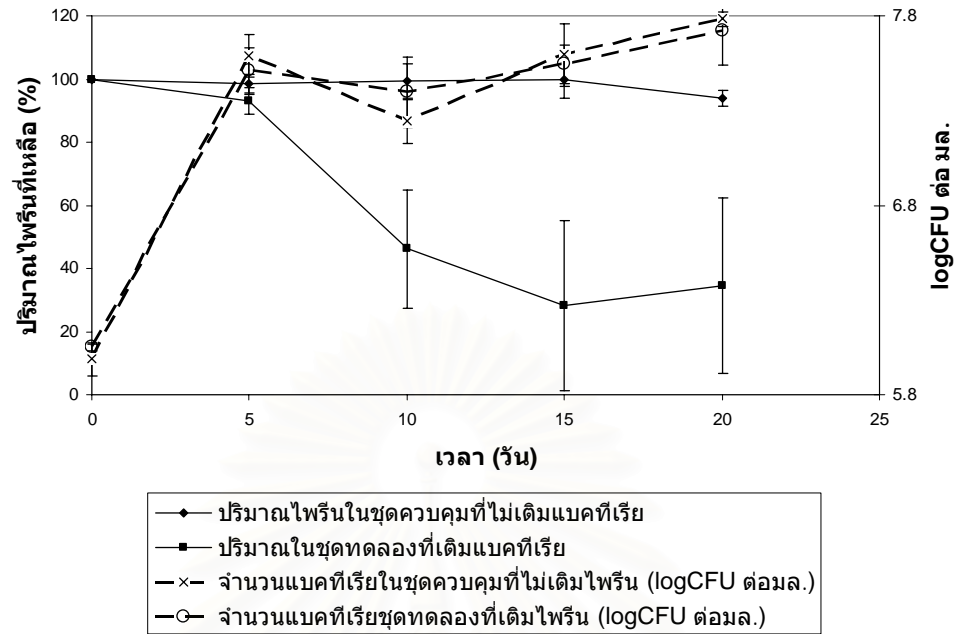
รูปที่ 4.14 การเปลี่ยนสีของอาหารเหลว CFMM ที่มีไนพรีน ณ เวลาต่างๆ เมื่อเลี้ยง *Diaphorobacter* sp. สายพันธุ์ KOTLB

ผลการติดตามโครมาโทแกรมจากการวิเคราะห์ HPLC เพื่อติดตามการลดลงของไฟรีนเมื่อเข้าสู่วันที่ 8 ซึ่งเป็นวันที่เริ่มมีการลดลงของปริมาณไฟรีน พบว่ามีพีคของสารมัธยันตร์ที่เกิดขึ้นจากการย่อยสลายของไฟรีนโดย *Diaphorobacter* sp. สายพันธุ์ KOTLB และพบว่าพีคของสารมัธยันตร์จะสูงขึ้นเรื่อยๆ จนถึงวันที่ 20 ดังแสดงในรูปที่ 4.15

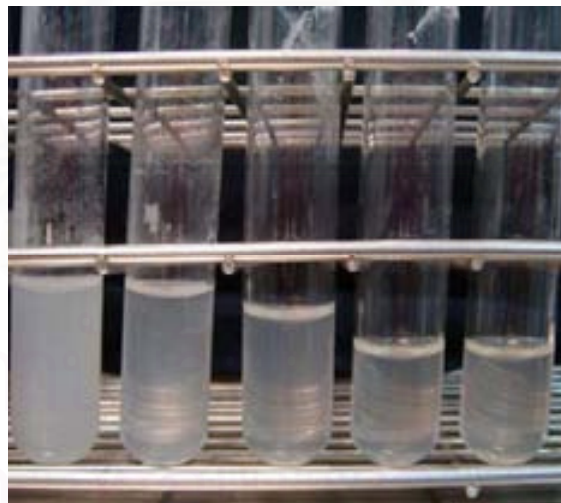


รูปที่ 4.15 โครมาโทแกรม HPLC จากการวิเคราะห์ปริมาณไฟรีนและสารมัธยันตร์ที่เกิดขึ้นจากการย่อยสลายไฟรีนโดย *Diaphorobacter* sp. สายพันธุ์ KOTLB หลังจากเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา (ก) 8 วัน (ข) 12 วัน (ค) 16 วัน (ง) 20 วัน

การศึกษาประสิทธิภาพการย่อยสลายไฟรีนและรูปแบบการเจริญโดยการใส่ไฟรีนเป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงานของ *Pseudoxanthomonas* sp. สายพันธุ์ RN402 พบว่า ในช่วงวันที่ 5 ถึงวันที่ 10 ไฟรีน จาก 93.12% เหลือ 46.21% และ เมื่อเข้าสู่ช่วงวันที่ 15 ถึง 20 การลดลงของไฟรีนเริ่มคงที่โดยปริมาณไฟรีนลดลงเหลือ 28.06% ถึง 34.37% ในขณะที่ชุดควบคุมพบว่ามีปริมาณของไฟรีนแทบไม่มีการเปลี่ยนแปลง ได้ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 4.16 และในการศึกษารูปแบบการเจริญของแบคทีเรียสายพันธุ์บริสุทธิ์ RN402 ในอาหารเหลว CFMM ที่เติมไฟรีน เมื่อเวลาผ่านไป 20 วัน จำนวนของแบคทีเรียเพิ่มจำนวนจากเริ่มต้น 1.125×10^6 CFU ต่อมิลลิลิตร ไปเป็น 5.32×10^7 CFU ต่อมิลลิลิตร จำนวนแบคทีเรียเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในช่วง 5 วันแรกโดยเพิ่มขึ้นเป็น 4.9×10^7 CFU ต่อมิลลิลิตร จากนั้นเมื่อเข้าถึงวันที่ 10 จำนวนแบคทีเรียลดลงเหลือ 2.5×10^7 CFU ต่อมิลลิลิตร และเมื่อเข้าสู่วันที่ 15 จำนวนแบคทีเรียเพิ่มขึ้นเป็น 3.5×10^7 ต่อมิลลิลิตร สำหรับในชุดควบคุมการเจริญของแบคทีเรียมีแนวโน้มเช่นเดียวกัน กล่าวคือ เมื่อเวลาผ่านไป 20 วัน จำนวนของแบคทีเรียเพิ่มจำนวนจากเริ่มต้น 9.75×10^5 CFU ต่อมิลลิลิตร ไปเป็น 6.1×10^7 CFU ต่อมิลลิลิตร จำนวนแบคทีเรียเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในช่วง 5 วันแรกโดยเพิ่มขึ้นเป็น 3.9×10^7 CFU ต่อมิลลิลิตร จากนั้นเมื่อเข้าถึงวันที่ 10 จำนวนแบคทีเรียลดลงเหลือ 1.8×10^7 CFU ต่อมิลลิลิตร และเมื่อเข้าสู่วันที่ 15 จำนวนแบคทีเรียเพิ่มขึ้นเป็น 3.93×10^7 ต่อมิลลิลิตร แสดงดังรูปที่ 4.16 นอกจากนี้เมื่อสังเกตลักษณะของอาหารเหลวในชุดทดลอง พบว่า วันที่ 0 สีของอาหารเหลวมีลักษณะเป็นสีขาวขุ่นของไฟรีน เมื่อเข้าสู่วันที่ 10 สีของอาหารเหลวเปลี่ยนเป็นสีเหลืองส้มเข้ม และเมื่อเวลาผ่านไป 15 วันจนถึง 20 วัน พบว่าสีของอาหารเหลวจากสีส้มเปลี่ยนเป็นสีเหลืองส้มอ่อนๆ รวมทั้งจำนวนอนุภาคของไฟรีนที่น้อยลงด้วย ดังแสดงในรูปที่ 4.17



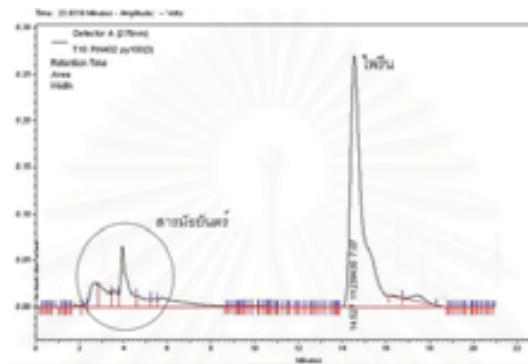
รูปที่ 4.16 การเจริญของ *Pseudoxanthomonas* sp. สายพันธุ์ RN402 ในอาหารเหลว CFMM ที่มีไพลินเป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงาน



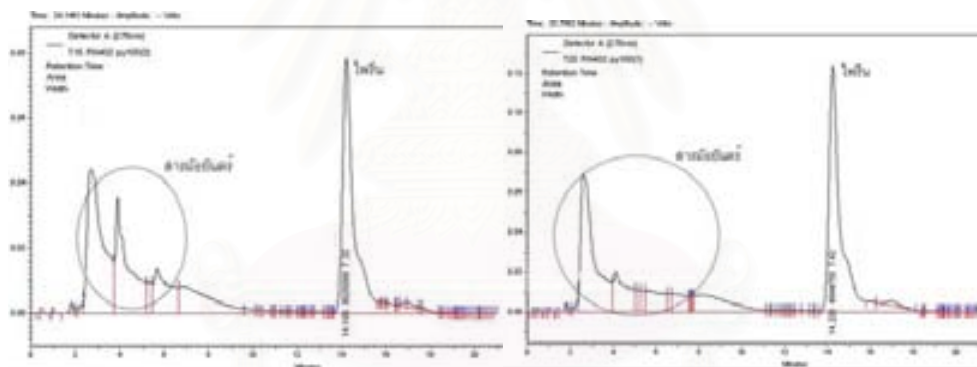
0 วัน 5 วัน 10 วัน 15 วัน 20 วัน

รูปที่ 4.17 การเปลี่ยนสีของอาหารเหลว CFMM ที่มีไพลิน ณ เวลาต่างๆ เมื่อเลี้ยง *Pseudoxanthomonas* sp. สายพันธุ์ RN402

ผลการติดตามโครมาโทแกรมจากการวิเคราะห์ HPLC เมื่อเข้าสู่วันที่ 10 ซึ่งเป็นวันที่เริ่มมีการลดลงของปริมาณไฟรีน พบว่ามีพีคของสารมัธยันตร์ที่เกิดขึ้นจากการย่อยสลายของไฟรีนโดย *Pseudoxanthomonas* sp. สายพันธุ์ RN402 และพบว่าพีคของสารมัธยันตร์จะสูงขึ้นเรื่อยๆ จนถึงวันที่ 20 ดังแสดงในรูปที่ 4.18



(ก)



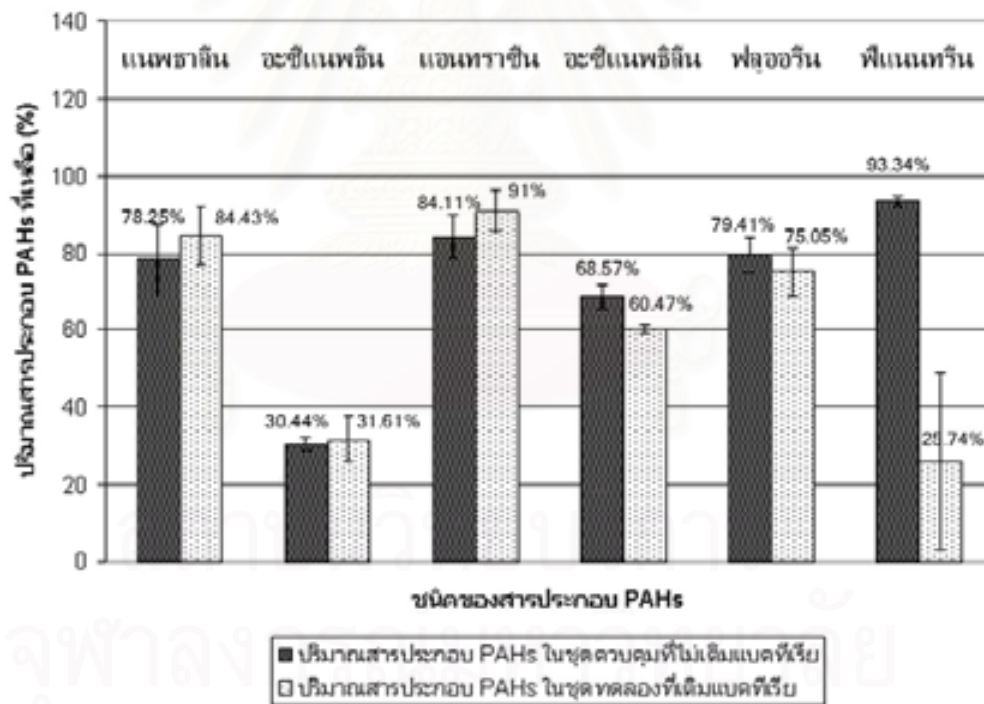
(ข)

(ค)

รูปที่ 4.18 โครมาโทแกรม HPLC จากการวิเคราะห์ปริมาณไฟรีนและสารมัธยันตร์ที่เกิดขึ้นจากการย่อยสลายไฟรีนโดย *Pseudoxanthomonas* sp. สายพันธุ์ RN402 หลังจากเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา (ก) 10 วัน (ข) 15 วัน (ค) 20 วัน

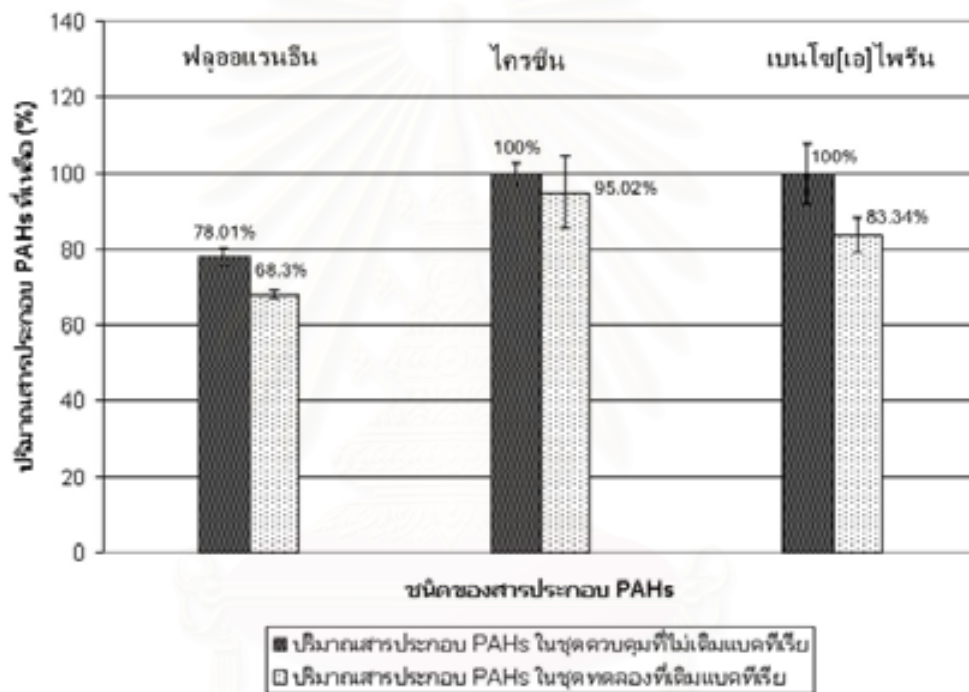
4.4 ประสิทธิภาพการย่อยสลายสารประกอบ PAHs ชนิดอื่นๆ ของแบคทีเรียสายพันธุ์บริสุทธิ์

ในการศึกษาประสิทธิภาพการย่อยสลายสารประกอบ PAHs ชนิดอื่นๆ ของแบคทีเรียสายพันธุ์บริสุทธิ์ พบว่า *Diaphorobacter* sp. สายพันธุ์ KOTLB สามารถย่อยสลายสารประกอบ PAHs ที่มีมวลโมเลกุลต่ำที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ได้เพียงชนิดเดียวคือพีแนทรีน โดยมีปริมาณพีแนทรีนเหลืออยู่ 25.74% เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมในวันเริ่มต้น หลังจากเลี้ยงแบคทีเรียด้วยพีแนทรีนเป็นเวลา 7 วัน ดังแสดงในรูปที่ 4.19 และการเปลี่ยนสีของอาหารเหลวเปลี่ยนเป็นสีเหลืองเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม แสดงดังรูปที่ 4.21 ในขณะที่ปริมาณสารประกอบ PAHs ที่มีมวลโมเลกุลต่ำชนิดอื่นๆ ได้แก่ แนพทาลีน อะซีแนพทีน แอนทราซีน อะซีแนพทีน และฟลูออรีน แทบไม่มีการเปลี่ยนแปลง เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม หลังจากเลี้ยงแบคทีเรียเป็นเวลา 7 วัน ดังแสดงในรูปที่ 4.19

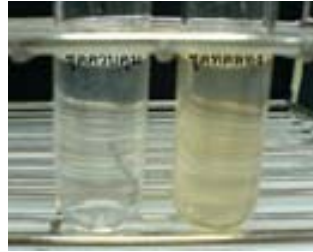


รูปที่ 4.19 ปริมาณสารประกอบ PAHs ที่เหลือ เมื่อเลี้ยง *Diaphorobacter* sp. สายพันธุ์ KOTLB ในอาหาร CFMM ที่เติมแนพทาลีนและพีแนทรีนเป็นเวลา 7 วัน และอะซีแนพทีน อะซีแนพทีน และฟลูออรีน เป็นเวลา 10 วัน และแอนทราซีน เป็นเวลา 20 วัน

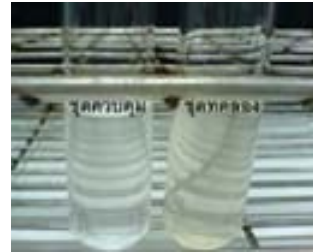
สำหรับการย่อยสลายสารประกอบ PAHs ที่มีมวลโมเลกุลสูง พบว่ามีการเปลี่ยนแปลงของปริมาณฟลูออแรนธิน ไครซีน และเบนโซ[เอ]ไพรีนได้เพียงเล็กน้อย เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม โดยมีปริมาณฟลูออแรนธิน ไครซีน และเบนโซ[เอ]ไพรีน เหลืออยู่ 68.3% เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมในวันเริ่มต้น 95.02% และ 83.34% ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 4.20 และอาหารเหลวมีการเปลี่ยนสีเป็นสีเหลืองส้มอ่อนๆ แสดงดังรูปที่ 4.21 หลังจากเลี้ยงแบคทีเรียเป็นเวลา 30 วัน ในขณะที่ปริมาณของไครซีนมีการเปลี่ยนแปลงน้อยมาก เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม หลังจากเลี้ยงแบคทีเรียเป็นเวลา 30 วัน ดังแสดงในรูปที่ 4.20



รูปที่ 4.20 ปริมาณสารประกอบ PAHs ที่เหลือ เมื่อเลี้ยง *Diaphorobacter* sp. สายพันธุ์ KOTLB เป็นเวลา 30 วัน (หมายเหตุ: ใช้ชุดควบคุมวันที่ 30 ของไครซีน และเบนโซ[เอ]ไพรีน เปรียบเทียบกับชุดทดลอง)



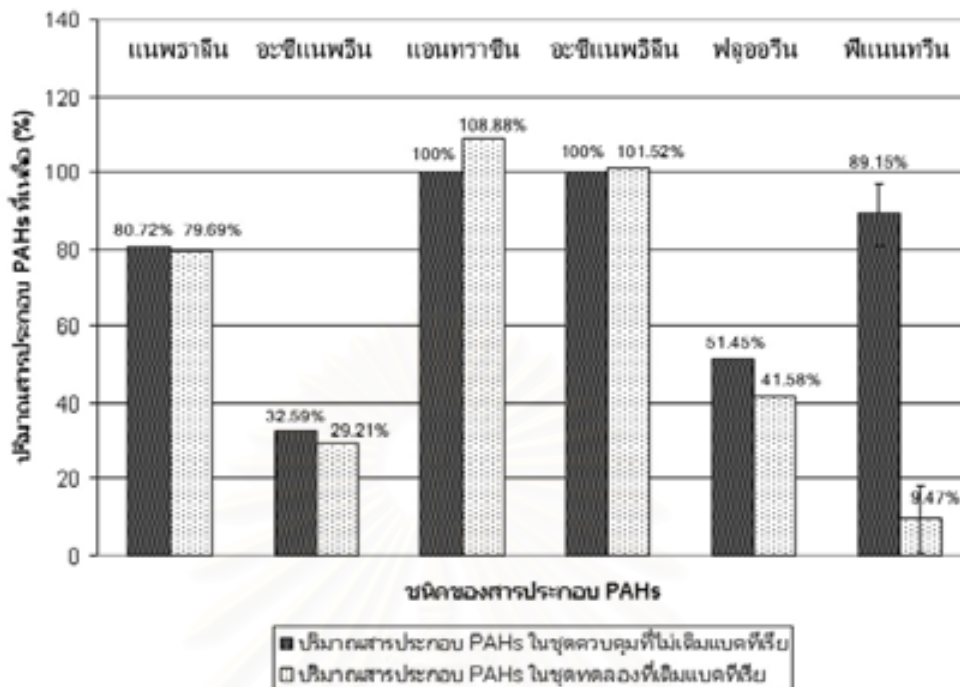
(ก)



(ข)

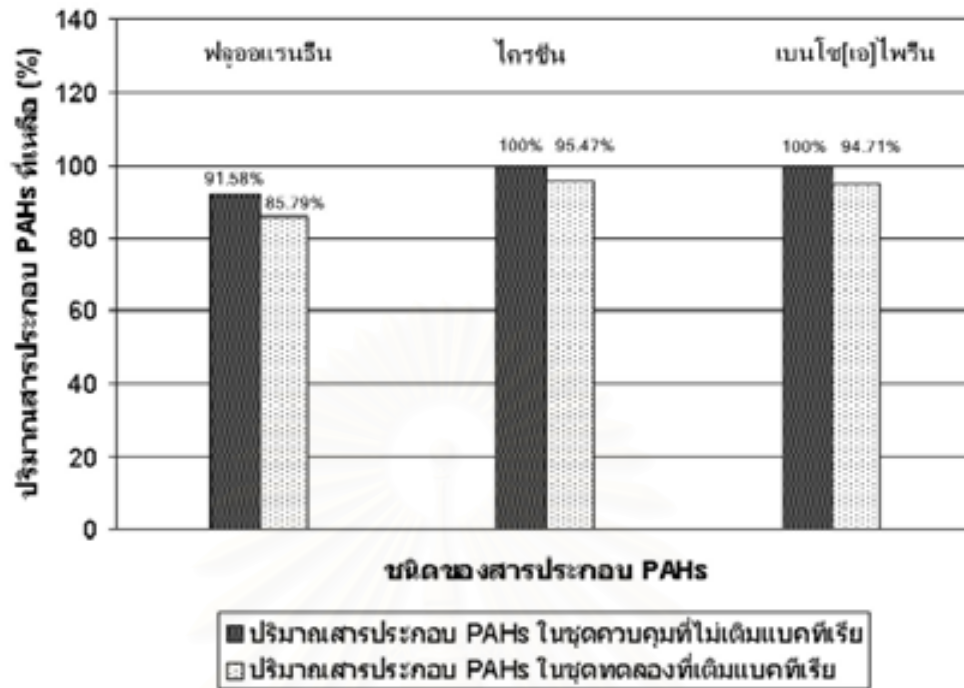
รูปที่ 4.21 การเปลี่ยนสีของอาหารเหลว CFMM ที่มี (ก) พีแนนทริน (ข) ฟลูออแรนธิน เมื่อเลี้ยง *Diaphorobacter* sp. สายพันธุ์ KOTLB เป็นเวลา 7 วัน และ 30 วัน ตามลำดับ

ประสิทธิภาพการย่อยสลายสารประกอบ PAHs ชนิดอื่นๆ ของ *Pseudoxanthomonas* sp. สายพันธุ์ RN402 พบว่าสามารถย่อยสลายสารประกอบ PAHs ที่มีมวลโมเลกุลต่ำที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ได้ คือ พีแนนทริน โดยมีปริมาณ พีแนนทรินเหลืออยู่ 9.47% เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมในวันเริ่มต้น หลังจากเลี้ยงแบคทีเรียด้วยพีแนนทรินเป็นเวลา 7 วัน สำหรับแอนทราซีนพบว่าอาหารเหลวมีการเปลี่ยนสีแต่มีปริมาณที่วิเคราะห์ได้ไม่ได้ลดลง หลังจากเลี้ยงแบคทีเรียด้วยแอนทราซีนเป็นเวลา 20 วัน ดังแสดงในรูปที่ 4.22 และการเปลี่ยนสีของอาหารเหลวเปลี่ยนเป็นสีเหลืองเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมและมีการลดลงของปริมาณผลึกพีแนนทรินและแอนทราซีนแสดงดังรูปที่ 4.24 ในขณะที่ปริมาณสารประกอบ PAHs ที่มีมวลโมเลกุลต่ำชนิดอื่นๆ ได้แก่ แนพทาซีน อะซีแนพธิน อะซีแนพธิลีน และฟลูออรีนแทบไม่มีการเปลี่ยนแปลง เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม หลังจากเลี้ยงแบคทีเรียเป็นเวลา 7 วัน สำหรับแนพทาซีน 10 วัน สำหรับอะซีแนพธิน อะซีแนพธิลีน และฟลูออรีน และ 20 วัน สำหรับแอนทราซีน ดังแสดงในรูปที่ 4.23

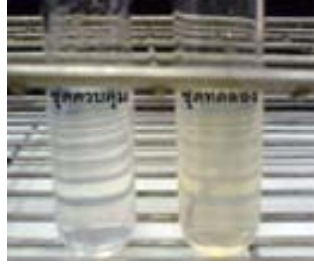


รูปที่ 4.22 ปริมาณสารประกอบ PAHs ที่เหลือ เมื่อเลี้ยง *Pseudoxanthomonas* sp. สายพันธุ์ RN402 ในอาหาร CFMM ที่เติมแนพทาลีนและพีแนทรีนเป็นเวลา 7 วัน และอะซีแนพทีน แอนทราซีน อะซีแนพทีน และฟลูออรีน เป็นเวลา 10 วัน (หมายเหตุ: ใช้ชุดควบคุมวันที่ 10 สำหรับอะซีแนพทีน และวันที่ 20 สำหรับแอนทราซีน เปรียบเทียบกับชุดทดลอง)

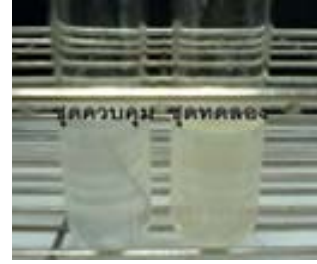
สำหรับประสิทธิภาพการย่อยสลายสารประกอบ PAHs ที่มีมวลโมเลกุลสูงนอกจากไพรีนของ *Pseudoxanthomonas* sp. สายพันธุ์ RN402 พบว่า สีของอาหารเหลวที่เติมฟลูออแรนทีนเปลี่ยนเป็นสีเหลืองส้มอ่อนๆ แสดงดังรูปที่ 4.24 และมีปริมาณฟลูออแรนทีนเหลืออยู่ประมาณ 85.79% เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมในวันเริ่มต้น หลังจากเลี้ยงแบคทีเรียเป็นเวลา 30 วัน ดังแสดงในรูปที่ 4.23 ในขณะที่ปริมาณของโครซิน และเบนโซ[เอ]ไพรีน แทบไม่มีการเปลี่ยนแปลง เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม หลังจากเลี้ยงแบคทีเรียเป็นเวลา 30 วัน ดังแสดงในรูปที่ 4.23



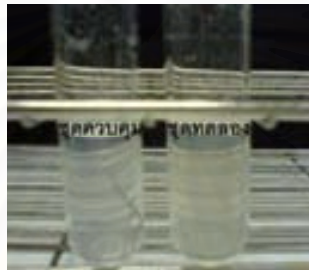
รูปที่ 4.23 ปริมาณสารประกอบ PAHs ที่เหลือ เมื่อเลี้ยง *Pseudoxanthomonas* sp. สายพันธุ์ RN402 เป็นเวลา 30 วัน (หมายเหตุ: ใช้ชุดควบคุมวันที่ 30 ของโครซีน และเบนโซ[เอ]ไพรีน เปรียบเทียบกับชุดทดลอง)



(ก)



(ข)



(ค)

รูปที่ 4.24 การเปลี่ยนสีของอาหารเหลว CFMM ที่มี (ก) พีแนนทรีน (ข) แอนทราซีน (ค) ฟลูออแรนธิน เมื่อเลี้ยง *Pseudoxanthomonas* sp. สายพันธุ์ RN402 เป็นเวลา 7 วัน 20 วัน และ 30 วัน ตามลำดับ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.5 ตรวจสอบยีนที่ประมวลรหัสไดออกซีจีเนสที่คาดว่าเกี่ยวข้องกับการย่อยสลายไฟรีนของแบคทีเรียบริสุทธิ์

ในการเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอบริเวณยีนที่ประมวลหน่วยย่อยแอลฟารหัสไดออกซีจีเนสด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสโดยใช้ดีเอ็นเอจาก *Diaphorobacter* sp. สายพันธุ์ KOTLB และ *Pseudoxanthomonas* sp. สายพันธุ์ RN402 ที่สกัดจากการเลี้ยงในอาหารเหลว LB และอาหารเหลว CFMM ที่เติมไฟรีน เป็นดีเอ็นเอแม่แบบ และใช้ไพรเมอร์คู่ต่างๆ ที่จำเพาะต่อยีนในแบคทีเรียแกรมลบ ผลแสดงดังตารางที่ 4.3

เมื่อใช้ไพรเมอร์คู่ต่างๆ ที่จำเพาะต่อยีนในแบคทีเรียแกรมบวก และไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อบริเวณของ Rieske ของยีนที่ประมวลรหัสออกซีจีเนสของแบคทีเรียบางกลุ่มที่ย่อยสลายสารประกอบอะโรมาติก พบว่าผลแสดงดังตารางที่ 4.3

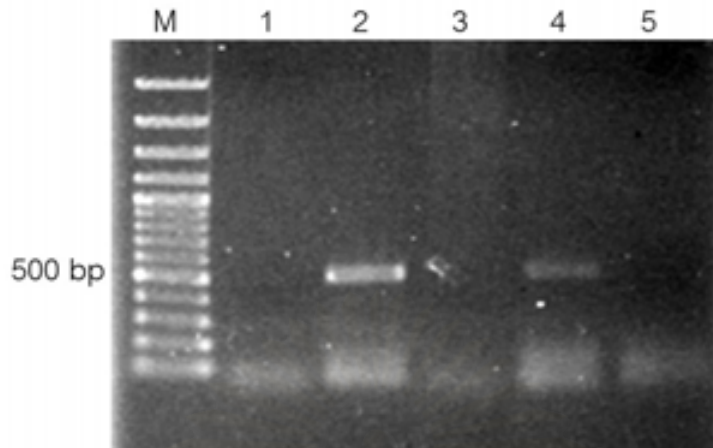
ตารางที่ 4.3 ผลของผลิตภัณฑ์ PCR เมื่อใช้ไพรเมอร์คู่ต่างๆ

ไพรเมอร์	ดีเอ็นเอจาก <i>Diaphorobacter</i> sp. สายพันธุ์ KOTLB		ดีเอ็นเอจาก <i>Pseudoxanthomonas</i> sp. สายพันธุ์ RN402	
	สกัดจากอาหาร เหลว LB	สกัดจากอาหาร เหลว CFMM ที่ เติมไพรีน	สกัดจากอาหาร เหลว LB	สกัดจากอาหาร เหลว CFMM ที่ เติมไพรีน
ndoBF/ndoBR	-	-	-	-
nagAcF/nagAcR	-	-	-	-
ComF/ComR	-	-	-	-
phnAcF/phnAcR	-	-	-	-
arhA1F/arhA1R	-	-	-	-
bphA1F/bphA1R	-	-	-	-
nidAF/nidAR	-	+	-	+
RhoF/RhoR	-	-	-	-
phdAF/phdAR	-	-	-	-
RieskeF/RieskeR	-	-	-	-

+ หมายถึง ได้ผลิตภัณฑ์ PCR ตามที่คาดหวัง

- หมายถึง ไม่ได้ผลิตภัณฑ์ PCR ตามที่คาดหวัง

ได้ผลิตภัณฑ์ PCR ขนาดตามที่คาดหวัง 508 bp เมื่อใช้ไพรเมอร์ nidAF และ nidAR ซึ่งจำเพาะที่ตำแหน่ง 148 bp ถึง 176 bp และ 628 bp ถึง 655 bp ตามลำดับ โดยใช้ดีเอ็นเอที่สกัดจากอาหารเหลว CFMM ที่เติมไพรีน แต่เมื่อใช้ดีเอ็นเอที่สกัดจากอาหารเหลว LB ไม่พบผลิตภัณฑ์ PCR แสดงดังรูปที่ 4.25



รูปที่ 4.25 ขนาดชิ้นผลิตภัณฑ์ PCR บริเวณยีน *nidA* ช่องวิ่ง M: 100 bp DNA ladder ช่องวิ่งที่ 1: ดีเอ็นเอจาก *Pseudoxanthomonas* sp. สายพันธุ์ RN402 ที่สกัดจากการเลี้ยงในอาหารเหลว LB ช่องวิ่งที่ 2: ดีเอ็นเอจาก *Pseudoxanthomonas* sp. สายพันธุ์ RN402 ที่สกัดจากการเลี้ยงในอาหารเหลว CFMM ที่เติมไพรีน ช่องวิ่งที่ 3: ดีเอ็นเอจาก *Diaphorobacter* sp. สายพันธุ์ KOTLB ที่สกัดจากการเลี้ยงในอาหารเหลว LB ช่องวิ่งที่ 4: ดีเอ็นเอจาก *Diaphorobacter* sp. สายพันธุ์ KOTLB ที่สกัดจากการเลี้ยงในอาหารเหลว CFMM ที่เติมไพรีน ช่องวิ่งที่ 5: ตัวควบคุมผลลบ

หลังจากตัดเจลชิ้นผลิตภัณฑ์ PCR ขนาด 508 bp ที่ใช้ดีเอ็นเอแม่แบบที่สกัดจาก *Diaphorobacter* sp. สายพันธุ์ KOTLB และ *Pseudoxanthomonas* sp. สายพันธุ์ RN402 ที่เลี้ยงในอาหารเหลว CFMM ที่เติมไพรีน นำไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์และเปรียบเทียบกับข้อมูลใน GenBank พบว่ามีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ประมวลผลห้สกรอตอะมิโนคล้ายคลึงกับ *NidA* ของ *Mycobacterium* สายพันธุ์ต่างๆ แสดงในตารางที่ 4.4 และ 4.5 ตามลำดับ

ตารางที่ 4.4 ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ *nidA* ความยาว 436 bp ของ *Diaphorobacter* sp. สายพันธุ์ KOTLB กับลำดับกรดอะมิโนจากฐานข้อมูล BLASTx

โปรตีน	ยีน	สายพันธุ์ แบคทีเรีย	Accession No.	% amino acid identity	เอกสารอ้างอิง
NidA	<i>nidA</i>	<i>Mycobacterium</i> sp. สายพันธุ์ JLS	YP_001070514	144/144 (100%)	Miller และ คณะ (2004)
NidA	<i>nidA</i>	<i>Mycobacterium</i> sp. สายพันธุ์ MHP-1	BAD20297	144/144 (100%)	Habe และ คณะ (2004)
NidA	<i>nidA</i>	<i>Mycobacterium</i> <i>gilvum</i> สายพันธุ์ PYR-GCK	YP_001131939	144/144 (100%)	Copeland และคณะ (2007). ไม่ ตีพิมพ์

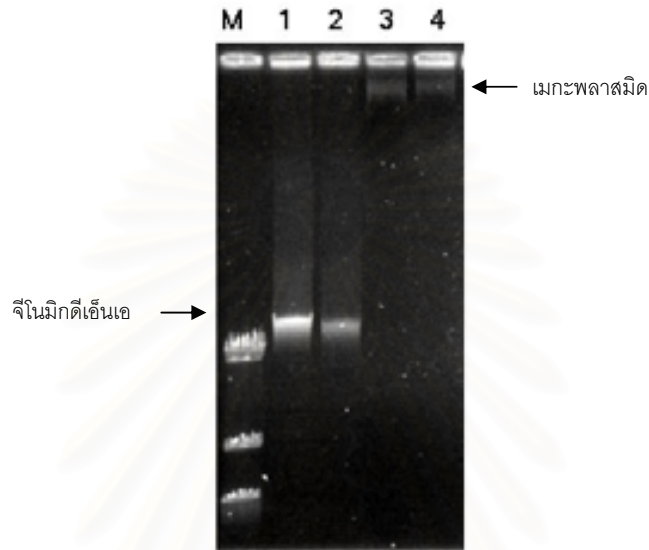
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4.5 ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ *nidA* ความยาว 441 bp ของ *Pseudoxanthomonas* sp. สายพันธุ์ RN402 กับลำดับกรดอะมิโนจากฐานข้อมูล BLASTx

โปรตีน	ยีน	สายพันธุ์ แบคทีเรีย	Accession No.	% amino acid identity	เอกสารอ้างอิง
NidA	<i>nidA</i>	<i>Mycobacterium</i> sp. สายพันธุ์ JLS	YP_001070514	146/146 (100%)	Miller และ คณะ (2004)
NidA	<i>nidA</i>	<i>Mycobacterium</i> sp. สายพันธุ์ MHP-1	BAD20297	146/146 (100%)	Habe และ คณะ (2004)
NidA	<i>nidA</i>	<i>Mycobacterium</i> <i>gilvum</i> สายพันธุ์ PYR-GCK	YP_001131939	146/146 (100%)	Copeland และคณะ (2007). ไม่ ตีพิมพ์

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

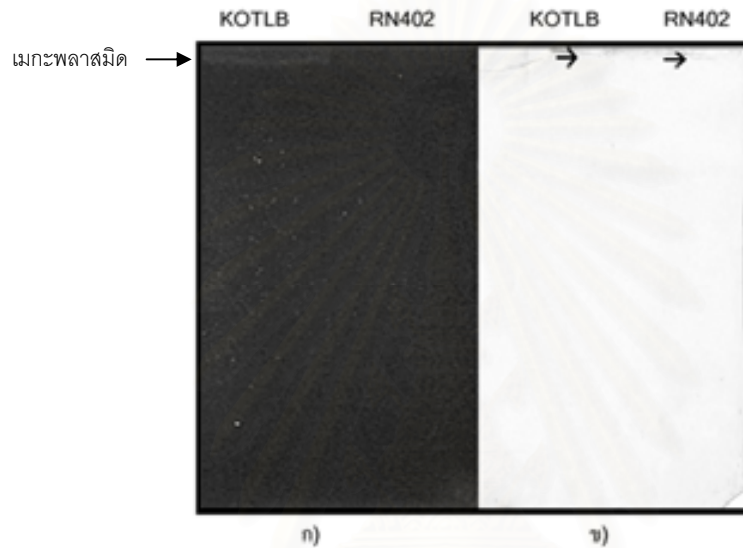
เมื่อสกัดเมกะพลาสมิดจาก *Diaphorobacter* sp. สายพันธุ์ KOTLB และ *Pseudoxanthomonas* sp. สายพันธุ์ RN402 จากการเลี้ยงแบคทีเรียในอาหารเหลว LB พบว่า ไม่พบดีเอ็นเอที่เป็นเมกะพลาสมิด ในขณะที่ การเลี้ยงแบคทีเรียใน CFMM ที่เติมไพรีน พบดีเอ็นเอที่เป็นเมกะพลาสมิด แสดงดังรูปที่ 4.26



รูปที่ 4.26 ดีเอ็นเอที่สกัดด้วยวิธีสกัดเมกะพลาสมิด **ช่องวิ่ง M:** ดีเอ็นเอ Lambda HindIII **ช่องวิ่งที่ 1:** ดีเอ็นเอของ *Diaphorobacter* sp. สายพันธุ์ KOTLB ที่เลี้ยงในอาหารเหลว LB **ช่องวิ่งที่ 2:** ดีเอ็นเอของ *Pseudoxanthomonas* sp. สายพันธุ์ RN402 ที่เลี้ยงในอาหารเหลว LB **ช่องวิ่งที่ 3:** เมกะพลาสมิดของ *Diaphorobacter* sp. สายพันธุ์ KOTLB ที่เลี้ยงในอาหารเหลว CFMM ที่เติมไพรีน **ช่องวิ่งที่ 4:** เมกะพลาสมิดของ *Pseudoxanthomonas* sp. สายพันธุ์ RN402 ที่เลี้ยงในอาหารเหลว CFMM ที่เติมไพรีน

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เมื่อนำดีเอ็นเอติดตามซึ่งสร้างขึ้นจากผลิตภัณฑ์ PCR ที่ถูกเพิ่มจำนวนจากบริเวณยีน *nidA* มาไฮบริดซ์กับเมกะพลาสมิดของ *Diaphorobacter* sp. สายพันธุ์ KOTLB และ *Pseudoxanthomonas* sp. สายพันธุ์ RN402 ผลการไฮบริดซ์พบว่าเกิดสัญญาณจากการไฮบริดซ์กับเมกะพลาสมิดของแบคทีเรียทั้ง 2 สายพันธุ์ แสดงดังรูปที่ 4.27 แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียทั้ง 2 สายพันธุ์มียีน *nidA* บนเมกะพลาสมิด



รูปที่ 4.27 (ก) ภาพอะกาโรสเจลที่มีเมกะพลาสมิดของ *Diaphorobacter* sp. สายพันธุ์ KOTLB และ *Pseudoxanthomonas* sp. สายพันธุ์ RN402 (บริเวณลูกศรชี้แสดงถึงเมกะพลาสมิด)
 (ข) สัญญาณจากเซาท์เทิร์นไฮบริดเซชันด้วยดีเอ็นเอติดตามที่สร้างขึ้นจากผลิตภัณฑ์ PCR (บริเวณลูกศรชี้แสดงถึงสัญญาณที่เกิดขึ้น)

สถาบันวิทยบริการ
 จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 5

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

สารประกอบ PAHs เกิดขึ้นจากการเผาไหม้ไม่สมบูรณ์ และปนเปื้อนอยู่ทั่วไปในสิ่งแวดล้อม ในงานวิจัยนี้ได้คัดเลือกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลายไพรีน โดยเก็บตัวอย่างจากแหล่งดินที่คาดว่ามีการปนเปื้อนของสารปิโตรเลียม ได้แก่ ตัวอย่างดินจากบริเวณทางรถไฟ จ.นครราชสีมา แหล่งดินที่คาดว่าได้รับควันไอเสียจากรถยนต์ ได้แก่ ตัวอย่างดินจากบริเวณริมถนนราชดำเนิน บริเวณใต้ต้นไม้ถนนบริพัตร กทม. และบริเวณปั้มน้ำมัน จ.นครปฐม และแหล่งดินที่ไม่ได้ปนเปื้อนสารปิโตรเลียม หรือได้รับควันไอเสียจากรถยนต์ ได้แก่ ตัวอย่างดินจากใต้ต้นไม้ อ.เขาใหญ่ จ.นครราชสีมา การหมักดินด้วยไพรีนในกระป๋องพลาสติกก่อนนำตัวอย่างดินไปเพิ่มจำนวนแบคทีเรีย (enrichment) เพื่อเป็นการสร้างความคุ้นเคย (acclimation) และเกิดการปรับตัว (adaptation) ของแบคทีเรีย และสามารถคัดเลือกแบคทีเรียได้จากตัวอย่างดินจากบริเวณทางรถไฟ จ.นครราชสีมา ตัวอย่างดินจากบริเวณริมถนนราชดำเนิน บริเวณใต้ต้นไม้ถนน บริพัตร กรุงเทพฯ และบริเวณปั้มน้ำมัน จ.นครปฐม แต่ไม่สามารถคัดเลือกแบคทีเรียจากตัวอย่างดินจากใต้ต้นไม้ อ.เขาใหญ่ จ.นครราชสีมาได้ อาจเป็นเพราะการหมักดินด้วยไพรีนด้วยระยะเวลาเพียง 30 วันและ การถ่ายอาหารเลี้ยงเชื้อในการเพิ่มจำนวนแบคทีเรีย อาจยังไม่นานพอที่จะสามารถสร้างความคุ้นเคยและทำให้เกิดการปรับตัวของแบคทีเรียในแหล่งที่ไม่ได้รับการปนเปื้อนของสารประกอบ PAHs มาก่อน แสดงให้เห็นว่า แบคทีเรียที่อยู่ในสิ่งแวดล้อมที่มีการปนเปื้อนของสารปิโตรเลียม หรือได้รับควันไอเสียรถยนต์มาเป็นเวลานาน จะมีการปรับตัวเพื่ออยู่รอดและสร้างระบบเอนไซม์ที่มาย่อยสลายสารประกอบ PAHs (Cerniglia, 1992)

เมื่อนำโคโลนีของแบคทีเรียที่สร้างบริเวณใสบนอาหารแข็ง CFMM ที่พ่นทับด้วยไพรีนจากการเกลี่ยอาหารเหลวที่มีการเปลี่ยนสีของตัวอย่างดินบริเวณทางรถไฟและบริเวณริมถนนราชดำเนิน ทดสอบความบริสุทธิ์ของแบคทีเรียบนอาหารแข็ง LB พบว่าโคโลนีของแบคทีเรียที่สร้างบริเวณใสประกอบด้วยแบคทีเรียหลายๆ สายพันธุ์อยู่รวมกันเป็นกลุ่ม (consortium) ได้แก่ กลุ่มแบคทีเรีย KOT และกลุ่มแบคทีเรีย RN และเมื่อทดสอบการย่อยสลายไพรีนในชั้นเบื้องต้นโดยสังเกตจากการเปลี่ยนสีของอาหารเหลวของแบคทีเรียสายพันธุ์บริสุทธิ์ของแต่ละกลุ่มแบคทีเรียพบว่า แบคทีเรียสายพันธุ์บริสุทธิ์จากทั้ง 2 กลุ่มแบคทีเรียไม่สามารถย่อยสลายไพรีนได้รวมถึงการนำแบคทีเรียสายพันธุ์บริสุทธิ์ของแต่ละกลุ่มรวมเข้าด้วยกันก็พบว่าไม่สามารถย่อยสลายไพรีนได้เช่นกัน ปรากฏการณ์ที่เกิดขึ้นนี้ อาจเป็นเพราะในขั้นตอนการทำให้เป็นแบคทีเรียสายพันธุ์บริสุทธิ์นั้นต้องผ่านการเลี้ยงเชื้อในอาหารที่มีความอุดมสมบูรณ์ (ในการศึกษาใช้ LB) อาจจะทำให้

สูญเสียความสามารถในการย่อยสลายได้ การสูญเสียความสามารถในการย่อยสลายนั้นอาจเกิดขึ้นจากยีนที่เกี่ยวข้องในการย่อยสลายไม่ถูกชักนำ (induce) ให้มีการแสดงออก (Li และคณะ, 1996) หรืออาจเกิดขึ้นจากการสูญเสียพลาสมิดที่มียีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายสาร เนื่องจากแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลายสารพิษบางชนิดพบว่ามียีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายสารพิษอยู่บนพลาสมิด เช่น *Novosphingobium aromaticivorans* สายพันธุ์ F199 เป็นแบคทีเรียที่มียีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายสารประกอบ PAHs อยู่บนพลาสมิด pNL1 (Romine และคณะ, 1999) เป็นต้น

ในงานวิจัยของ Harada และคณะ (2006b) ได้ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ LB เจือจาง 10 เท่าที่เติมยาฆ่าวัชพืช mefenacet ในการคัดแยกแบคทีเรียสายพันธุ์บริสุทธิ์ที่สามารถย่อยสลายยาฆ่าวัชพืช mafenacet จากตัวอย่างดิน ดังนั้นในการศึกษาต่อมา จึงเลี้ยงกลุ่มแบคทีเรีย KOT และ RN ในอาหารเหลว CFMM ที่เติมไพรีนจนพบการเปลี่ยนสีของอาหารเหลว เจือจางอาหารเหลวให้ได้ความเข้มข้นที่เหมาะสม เกลี่ยบนอาหารแข็ง LB เจือจาง 4 เท่า นำไปบ่มจนพบการเจริญของแบคทีเรีย จากนั้นพ่นไพรีนทับผิวหน้า แล้วบ่มต่อ พบว่ามีโคโลนีของแบคทีเรียที่สร้างบริเวณใต้วีถีการดังกล่าวทำให้สามารถคัดแยกแบคทีเรียสายพันธุ์บริสุทธิ์ KOTLB จากกลุ่มแบคทีเรีย KOT และสายพันธุ์บริสุทธิ์ RN402 จากกลุ่มแบคทีเรีย RN ซึ่งทั้ง 2 สายพันธุ์มีความสามารถในการย่อยสลายไพรีน แสดงให้เห็นว่าการใช้อาหารที่เหมาะสมทำให้สามารถคัดแยกแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายสารพิษต่างๆ ได้

การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rDNA ความยาว 1,456 bp ของสายพันธุ์ KOTLB พบว่ามีความใกล้เคียงกับแบคทีเรียในสกุล *Diaphorobacter* และสกุล *Acidovorax* โดยมีความคล้ายกับสกุล *Diaphorobacter* 99% และ *Acidovorax* 96% ถึง 99% และเมื่อสร้าง phylogenetic tree พบว่าสายพันธุ์ KOTLB จัดอยู่ในสกุล *Diaphorobacter* เนื่องจาก 16S rDNA ของแบคทีเรีย 2 สกุลนี้มีความใกล้เคียงกันมาก เช่นเดียวกับการสร้าง phylogenetic tree ของแบคทีเรียสายพันธุ์ NA10B สายพันธุ์ KSP3 และ สายพันธุ์ KSP4 ในงานวิจัยของ Khan และคณะ (2002) ที่ได้คัดแยกแบคทีเรียทั้ง 3 สายพันธุ์จาก activated sludge และเมื่อวิเคราะห์องค์ประกอบของกรดไขมันทั้งหมดในเซลล์พบว่าแบคทีเรียทั้ง 3 สายพันธุ์มีสายคาร์บอนของกรดไขมันที่มีคาร์บอน 16 ตัว มีพันธะคู่ 1 ตำแหน่งโดยอยู่ที่ตำแหน่ง ๑7 ในรูปแบบซิส (C16:1๑7ซิส) และมีสายของกรดไขมันที่มีคาร์บอน 16 ตัว (C16:0) เป็นองค์ประกอบหลัก และเมื่อวิเคราะห์หมู่ไฮดรอกซีที่อยู่ตำแหน่งที่ 3 ของสายคาร์บอนของกรดไขมัน (3-hydroxy fatty acid) ทั้งหมดของเซลล์ พบว่าอยู่ที่สายของกรดไขมันที่มีคาร์บอน 10 ตัว (3-OH-C10:0) ของเซลล์ทั้งหมด ซึ่งแตกต่างจากแบคทีเรียในสกุล *Acidovorax* โดยพบว่าอยู่ทั้งในสายของกรดไขมันที่มีคาร์บอน 8

ตัว (3-OH-C8:0) และคาร์บอน 10 ตัว (3-OH-C10:0) และเมื่อรวมกับข้อมูลอื่นๆ จึงทำให้ผู้วิจัยจัดแบคทีเรียทั้ง 3 สายพันธุ์แยกออกจากสกุล *Acidovorax* ตั้งเป็นสกุลใหม่ คือ *Diaphorobacter* แบคทีเรียสกุล *Diaphorobacter* เป็นแบคทีเรียแกรมลบ จัดอยู่ในแฟมิลี *Comamonadaceae* โดยมีแบคทีเรียร่วมแฟมิลี เช่น สกุล *Acidovorax* *Comamonas* และ *Polaromonas* เป็นต้น ปัจจุบันยังไม่มีรายงานถึงสายพันธุ์ของแบคทีเรียในสกุล *Diaphorobacter* ที่สามารถย่อยสลายสารประกอบ PAHs ได้ แต่มีรายงานถึงความสามารถในการย่อยสลายสารต่างๆ ของแบคทีเรียในสกุลนี้ เช่น *Diaphorobacter* sp. สายพันธุ์ NA10B สายพันธุ์ KSP3 และสายพันธุ์ KSP4 สามารถย่อยสลายโพลี (3-ไฮดรอกซีบิวไทเรต) (พีเอชบี; PHB) และโพลี (3-ไฮดรอกซีบิวไทเรต-co-3-ไฮดรอกซีวาเลอโรต) (พีเอชบีวี; PHBV) (Khan และคณะ, 2002) แต่มีรายงานถึงความสามารถในการย่อยสลายสารประกอบ PAHs ของแบคทีเรียในสกุล *Acidovorax* ซึ่งเป็นสกุลที่มีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกับสกุล *Diaphorobacter* เช่น *Acidovorax delafieldii* สายพันธุ์ TNA921 ที่ถูกคัดแยกมาจากแหล่งดินที่มีการปนเปื้อนของครีโอสต์ (creosote) สามารถย่อยสลายพีแนนทริน (Shuttleworth และ Cerniglia, 1996) และ *Acidovorax delafieldii* สายพันธุ์ P4-1 สามารถย่อยสลายพีแนนทริน ฟลูออรีน ฟลูออแรนธิน และไพรีนได้ (Samanta และคณะ, 1999)

สำหรับการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rDNA ความยาว 1,361 bp ของสายพันธุ์ RN402 พบว่ามีความใกล้เคียงกับสกุล *Pseudoxanthomonas* 97% ถึง 99% และ *Stenotrophomonas* 96% และเมื่อสร้าง phylogenetic tree พบว่าสายพันธุ์ RN402 อยู่ในสกุล *Pseudoxanthomonas*

แบคทีเรียสกุล *Pseudoxanthomonas* เป็นแบคทีเรียแกรมลบ ได้ถูกตั้งขึ้นครั้งแรกโดย Finkmann และคณะ (2000) และจัดอยู่ในแฟมิลี *Xanthomonaceae* โดยมีแบคทีเรียร่วมแฟมิลี เช่น สกุล *Xanthomonas* *Xylella* และ *Stenotrophomonas* เป็นต้น แต่ลักษณะที่สำคัญที่แตกต่างไปจากสกุลอื่นๆ คือ สามารถรีดิวส์ไนโตรเจนได้เป็นไนตรัสออกไซด์ (N_2O) แต่ไม่สามารถรีดิวส์ไนเตรทให้เป็นไนตรัสออกไซด์ได้ และไม่พบ C13:0 iso 3-OH ในองค์ประกอบของกรดไขมันทั้งหมดในเซลล์ (Thierry และคณะ, 2004) ปัจจุบันยังไม่มีรายงานถึงสายพันธุ์ของแบคทีเรียในสกุล *Pseudoxanthomonas* ที่สามารถย่อยสลายสารประกอบ PAHs แต่มีรายงานถึงการคัดแยกแบคทีเรียสกุลนี้จากแหล่งดินที่มีการปนเปื้อนของสารปิโตรเลียม เช่น งานวิจัยของ Young และคณะ (2007) ได้คัดแยก *Pseudoxanthomonas spadix* สายพันธุ์ IMMIB AFH-5^T จากแหล่งดินที่มีการปนเปื้อนของน้ำมัน อย่างไรก็ตาม ยังมีรายงานถึงการย่อยสลายสารประกอบอะโรมาติกของแบคทีเรียสกุลนี้โดยเป็นงานวิจัยของ Harada และคณะ (2006a) ได้คัดแยก *Pseudoxanthomonas kalamensis* สายพันธุ์ JA40^T จากแหล่งดินที่มีการปนเปื้อนสารประกอบ PAHs และโพลีคลอริเนตไบฟีนิล และต่อมา Cheng และคณะ (2008) ได้รายงานถึงสายพันธุ์

JA40^T สามารถย่อยสลายไดโนโตรโทลูอิน (DNT) ได้ นอกจากนี้ ในงานวิจัยของ Chang และคณะ (2005) ได้พบว่า *Pseudoxanthomonas kaohsiungensis* สายพันธุ์ J36^T ที่ถูกคัดแยกจากน้ำเสียที่มีการปนเปื้อนของน้ำมันสามารถสร้างสารลดแรงตึงผิวได้ ซึ่งคุณลักษณะนี้ อาจพบในแบคทีเรียสายพันธุ์ RN402 ซึ่งช่วยให้เพิ่มการละลายของสารประกอบ PAHs ที่มีมวลโมเลกุลสูง เช่น ไพรีนได้ดีขึ้นทำให้สามารถย่อยสลายและนำไปใช้ในการเจริญได้ง่ายขึ้น

ในการศึกษาประสิทธิภาพการย่อยสลายไพรีนความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ของแบคทีเรียที่คัดแยกได้โดยเปรียบเทียบประสิทธิภาพการย่อยสลายไพรีนระหว่างกลุ่มแบคทีเรียและแบคทีเรียสายพันธุ์บริสุทธิ์ พบว่ากลุ่มแบคทีเรีย KOT ย่อยสลายไพรีนเหลือ 11.43% ในระยะเวลา 8 วัน ในขณะที่ *Diaphorobacter* sp. สายพันธุ์ KOTLB ย่อยสลายไพรีนเหลือ 70.37% ในระยะเวลา 8 วัน สำหรับกลุ่มแบคทีเรีย RN ย่อยสลายไพรีนเหลือ 4.52% ในระยะเวลา 12 วัน ในขณะที่ *Pseudoxanthomonas* sp. สายพันธุ์ RN402 ย่อยสลายไพรีนเหลือ 30.47% เมื่อเวลาผ่านไป 20 วัน จะเห็นได้ว่าประสิทธิภาพการย่อยสลายไพรีนด้วยกลุ่มแบคทีเรียมีประสิทธิภาพกว่าการย่อยสลายด้วยแบคทีเรียเพียงชนิดเดียว ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Guo และคณะ (2005) โดยพบว่ากลุ่มแบคทีเรีย HC สามารถย่อยสลายสารประกอบ PAHs รวมกัน 3 ชนิด ได้แก่ พีแนทรีน ฟลูออแรนธินและไพรีน ได้ดีกว่า *Rhodococcus opacus* สายพันธุ์ HCCS ซึ่งถูกแยกมาจากกลุ่มแบคทีเรีย HC เพียงชนิดเดียว แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียชนิดอื่นๆ ที่อยู่รวมในกลุ่มแบคทีเรียอาจจะมีส่วนช่วยในการย่อยสลายสาร เช่น ช่วยสร้างวิตามิน เป็นต้น

เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพการย่อยสลายไพรีนของ *Diaphorobacter* sp. สายพันธุ์ KOTLB กับ *Pseudoxanthomonas* sp. สายพันธุ์ RN402 พบว่า สายพันธุ์ KOTLB มีประสิทธิภาพการย่อยสลายไพรีนที่ดีกว่า สายพันธุ์ RN402 และแบคทีเรียทั้ง 2 สายพันธุ์ สามารถย่อยสลายพีแนทรีนได้ เมื่อเปรียบเทียบกับงานวิจัยที่มีการคัดแยกแบคทีเรียสายพันธุ์บริสุทธิ์ที่มีความสามารถในการย่อยสลายไพรีนพบว่า มีประสิทธิภาพแตกต่างกันออกไปทั้งในแง่ของการย่อยสลายไพรีนและสารประกอบ PAHs ชนิดอื่นๆ ดังนี้

แบคทีเรียแกรมลบ เช่น *Sphingomonas paucimobilis* สายพันธุ์ EPA505 คัดแยกจากดินที่มีการปนเปื้อนของถ่านหินและครีโอสต์ สามารถย่อยสลายไพรีนความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตรได้ 80% เมื่อเวลาผ่านไป 16 ชั่วโมง รวมถึงสามารถย่อยสลายฟลูออแรนธินความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตรได้ 48% เมื่อเวลาผ่านไป 48 ชั่วโมง และเบนซ[เอ]แอนทราซีน ไครซีน เบนโซ[เอ]ไพรีน เบนโซ[บี]ฟลูออแรนธิน และ ไดเบนซ[เอ,เอช]แอนทราซีน ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร ได้ 72.9% 31.5% 33.3% 12.5% และ 7.8% เมื่อเวลาผ่านไป 16 ชั่วโมง ตามลำดับ (Mueller และคณะ, 1990; Ye และคณะ, 1996)

Stenotrophomonas maltophilia สายพันธุ์ VUN10,003 (ก่อนหน้านี้ได้จำแนกเป็น *Burkholderia cepacia*) คัดแยกจากดินที่มีการปนเปื้อนของสารประกอบ PAHs สามารถย่อยสลายไพรีนความเข้มข้น 250 ถึง 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยสามารถย่อยสลายไพรีนได้ 95% ถึง 100% ที่ความเข้มข้น 250 มิลลิกรัมต่อลิตรเมื่อเวลาผ่านไป 7 ถึง 10 วัน และสามารถย่อยสลายฟลูออแรนธิน เบนซ[เอ]แอนทราซีนความเข้มข้น 250 มิลลิกรัมต่อลิตร เบนโซ[เอ]ไพรีน ไดเบนซ[เอ,เอช]แอนทราซีนความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร และโคโรนีนความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อลิตร ได้ 45% 26% 22% 22% และ 55% ตามลำดับ เมื่อเวลาผ่านไป 14 วัน สำหรับฟลูออแรนธิน เบนซ[เอ]แอนทราซีน และ 42 วัน สำหรับเบนโซ[เอ]ไพรีน ไดเบนซ[เอ,เอช]แอนทราซีนและโคโรนีน (Juhasz และคณะ, 1997 และ 2000)

และ *Leclecia adecarboxylata* สายพันธุ์ PS4040 คัดแยกจาก sludge ที่มีการปนเปื้อนของน้ำมัน สามารถย่อยสลายไพรีนความเข้มข้น 250 มิลลิกรัมต่อลิตร ได้ 38.5% เมื่อเวลาผ่านไป 20 วัน และสามารถย่อยสลาย แนพทาลีน ฟลูออรีน และฟลูออแรนธิน ความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตรได้ 73.2% 40.6% และ 47.6% เมื่อเวลาผ่านไป 20 วัน ตามลำดับแต่ไม่พบการย่อยสลายของแอนทราซีน (Sarma และคณะ, 2004) เป็นต้น

แบคทีเรียแกรมบวก เช่น *Mycobacterium vanbaalenii* สายพันธุ์ PYR-1 คัดแยกจากตะกอนดินปนเปื้อนสารปิโตรเลียม สามารถย่อยสลายไพรีนความเข้มข้น 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรได้ 48% เมื่อเวลาผ่านไป 72 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 24 องศาเซลเซียส และสามารถย่อยสลายประกอบ PAHs อื่นๆ ได้แก่ แนพทาลีน พีแนนทรีนและฟลูออแรนธิน โดยย่อยสลายได้ 59.5% 50.9% และ 89.7% เมื่อเวลาผ่านไป 2 สัปดาห์ ตามลำดับ (Heitkamp และ Cerniglia, 1988a)

Rhodococcus sp. สายพันธุ์ UW1 คัดแยกจากดินที่มีการปนเปื้อนของสารประกอบ PAHs สามารถย่อยสลายไพรีนความเข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อลิตรได้ 72% เมื่อเวลาผ่านไป 2 สัปดาห์ และสามารถย่อยสลายประกอบ PAHs อื่นๆ และนำไปใช้ในการเจริญ ได้แก่ พีแนนทรีน แอนทราซีน ฟลูออแรนธิน ความเข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อลิตร และโครซีน 200 มิลลิกรัมต่อลิตร และย่อยสลายแนพทาลีน และฟลูออรีนได้เมื่อมีไพรีนเป็นโคสับสเตรท (Walter และคณะ, 1991)

และ *Mycobacterium* sp. สายพันธุ์ 1B คัดแยกจากแหล่งดินที่มีการปนเปื้อนของครีโอสไต สามารถย่อยสลายไพรีนและพีแนนทรีนความเข้มข้น 250 มิลลิกรัมต่อลิตรได้หมดภายในเวลา 5 ถึง 6 วัน แต่ย่อยสลายฟลูออแรนธินความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตรได้หมดภายในระยะเวลา 20 วัน (Dandie และคณะ, 2004) เป็นต้น

ได้สรุปเปรียบเทียบประสิทธิภาพการย่อยสลายไพรีนและสารประกอบ PAHs ชนิดอื่นๆ แสดงในตารางที่ 5.1

ตารางที่ 5.1 ประสิทธิภาพการย่อยสลายไพรีนของกลุ่มแบคทีเรียและแบคทีเรียสายพันธุ์บริสุทธิ์

ชนิดของแบคทีเรีย	การย่อยสลายไพรีน	การย่อยสลายสารประกอบ PAHs ชนิดอื่นๆ	เอกสารอ้างอิง
กลุ่มแบคทีเรีย KOT	100 มก.ต่อลิตร ได้ 90.38% เมื่อเวลาผ่านไป 16 วัน	ไม่ได้ทำการศึกษา	ในการทดลองนี้
กลุ่มแบคทีเรีย RN	100 มก.ต่อลิตร ได้ 95.48% เมื่อเวลาผ่านไป 12 วัน	ไม่ได้ทำการศึกษา	ในการทดลองนี้
<i>Diaphorobacter</i> sp. สายพันธุ์ KOTLB	100 มก.ต่อลิตร ได้ 76.08% เมื่อเวลาผ่านไป 8 วัน	พีแนทรีน	ในการทดลองนี้
<i>Pseudoxanthomonas</i> sp. สายพันธุ์ RN402	100 มก.ต่อลิตร ได้ 53.79% เมื่อเวลาผ่านไป 10 วัน	พีแนทรีน	ในการทดลองนี้
กลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3	100 มก.ต่อลิตร ได้ 100% เมื่อเวลาผ่านไป 14 วัน	อะซีแนพทีน ฟลูออรีน พีแนทรีน และ ฟลูออแรนทีน	จิริทีปส์ แชนรัก (2547)

ตารางที่ 5.1 (ต่อ) ประสิทธิภาพการย่อยสลายไพรีนของกลุ่มแบคทีเรียและแบคทีเรียสายพันธุ์บริสุทธิ์

ชนิดของแบคทีเรีย	การย่อยสลายไพรีน	การย่อยสลายสารประกอบ PAHs ชนิดอื่นๆ	เอกสารอ้างอิง
กลุ่มแบคทีเรีย STK	100 มก.ต่อลิตร ได้ 100% เมื่อเวลาผ่านไป 10 วัน	พีแนทรีน ฟลูออรีน อะซีแนพทีลิน แอนทราซีน อะซีแนพทีน ไดเบนโซฟูแรน และเบนโซ[เอ]ไพรีน (เมื่อมีน้ำมันดีเซลเป็นโคสับสเตรท)	ทิมากร แสงคำ (2547)
<i>Mycobacterium</i> sp. สายพันธุ์ PY1	100 มก.ต่อลิตร ได้ 90.4% เมื่อเวลาผ่านไป 14 วัน	อะซีแนพทีน อะซีแนพทีลิน พีแนทรีน และไดเบนโซฟูแรน	Prapatsornpinyo (2003)
<i>Sphingomonas paucimobilis</i> สายพันธุ์ EPA505	10 มก.ต่อลิตร ได้ 80% เมื่อเวลาผ่านไป 16 ชั่วโมง	ฟลูออแรนทีน ไครซีน และ เบนโซ[เอ]ไพรีน เป็นต้น	Mueller และคณะ (1990); Ye และคณะ (1996)
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> สายพันธุ์ VUN10,003	250 มก.ต่อลิตร ได้ 95% เมื่อเวลาผ่านไป 7 วัน	ฟลูออแรนทีน และ เบนโซ[เอ]ไพรีน เป็นต้น	Juhasz และคณะ (1997 และ 2000)
<i>Leclercia adecarboxylata</i> สายพันธุ์ PS4040	250 มก.ต่อลิตร ได้ 38.5% เมื่อเวลาผ่านไป 20 วัน	แนพทาลีน ฟลูออรีน และฟลูออแรนทีน	Sarma และคณะ (2004)

ตารางที่ 5.1 (ต่อ) ประสิทธิภาพการย่อยสลายไพรีนของกลุ่มแบคทีเรียและแบคทีเรียสายพันธุ์บริสุทธิ์

ชนิดของแบคทีเรีย	การย่อยสลายไพรีน	การย่อยสลายสารประกอบ PAHs ชนิดอื่นๆ	เอกสารอ้างอิง
<i>Mycobacterium vanbaalenii</i> สายพันธุ์ PYR-1	0.5 ไมโครกรัม ได้ 48% เมื่อเวลาผ่านไป 72 ชั่วโมง	แนพทาลีน พีแนนทรีน ฟลูออแรนธิน เบนโซ [เอ]ไพรีน เป็นต้น	Heitkamp และ Cerniglia (1988a); Moody และคณะ (2004)
<i>Rhodococcus</i> sp. สายพันธุ์ UW1	500 มก.ต่อลิตร ได้ 72% เมื่อเวลาผ่านไป 2 สัปดาห์	พีแนนทรีน ฟลูออแรนธิน และ ไครซีน เป็นต้น	Walter และคณะ (1991)
<i>Mycobacterium</i> sp. สายพันธุ์ 1B	250 มก.ต่อลิตร ได้หมดภายในเวลา 5 วัน ถึง 6 วัน	พีแนนทรีน และ ฟลูออแรนธิน	Dandie และคณะ (2004)

รูปแบบการเจริญของ *Diaphorobacter* sp. สายพันธุ์ KOTLB และ *Pseudoxanthomonas* sp. สายพันธุ์ RN402 เมื่อเลี้ยงในอาหารแข็ง CFMM ที่ปนทับด้วยสารละลายไพรีนความเข้มข้น 2% พบโคโลนีที่สร้างบริเวณใส ซึ่งแสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียทั้ง 2 สายพันธุ์สามารถนำไพรีนไปใช้ในการเจริญได้ แต่เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลว CFMM ที่มีไพรีนความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 20 วัน พบว่า จำนวนของแบคทีเรียไม่แตกต่างจากจำนวนแบคทีเรียเริ่มต้นมากนัก ทั้งที่มีการลดลงของปริมาณไพรีน และเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่เติมไพรีน พบว่าจำนวนแบคทีเรียมีแนวโน้มเพิ่มมากขึ้นเช่นเดียวกัน การเจริญของแบคทีเรียในชุดทดลองที่เติมไพรีนไม่แตกต่างจากชุดควบคุมที่ไม่เติมไพรีนอาจเป็นไปได้หลายกรณี กรณีที่ 1 เมื่อพิจารณาความสูงพีคของสารมัธยันตร์ที่เกิดขึ้นจากจากย่อยสลายไพรีนของทั้ง 2 สายพันธุ์ (รูปที่ 4.15 และ 4.18) พบว่าในช่วงวันท้ายๆ ของการทดลอง พีคของสารมัธยันตร์สูงขึ้นกว่าในช่วงแรกๆ ของการทดลอง ปรากฏการณ์ที่เกิดขึ้นอาจเป็นเพราะสารมัธยันตร์ที่เกิดจากการย่อยสลายไพรีนนั้น แบคทีเรียไม่สามารถย่อยสลายต่อไปได้ทำให้เกิดการสะสมของสารมัธยันตร์ต่างๆ (dead end

metabolite) เช่น 4,5-ไพรีนไดไฮโดรไดออกโซไพรีน-4,5-ไดโอน (Kazunga และ Aiken, 2000) และกรด 6,6'-ไดไฮดรอกซี-2,2'-ไบฟีนิล ไดคาร์บอกซิลิก (Vila และคณะ, 2001) เป็นต้น กรณีที่ 2 คือปริมาณไพรีนที่เติมลงไปนั้นมีความเข้มข้นสูงเกินไป เมื่อเกิดการย่อยสลายไพรีน สารมัธยันตร์ที่เกิดขึ้นมีความเข้มข้นสูงจนถึงจุดที่ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย กรณีดังกล่าวพบในงานวิจัยของ Juhasz และคณะ (1997) โดยเมื่อเลี้ยง *Burkholderia cepacia* ในอาหารที่มีไพรีน ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่ามีการย่อยสลายไพรีนและมีการเจริญของแบคทีเรีย แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของไพรีนเป็น 400 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่ามีการย่อยสลายไพรีนแต่ไม่มีการเจริญของแบคทีเรียเพิ่มขึ้น กรณีที่ 3 การเพิ่มเวลาในการเตรียม resting cell ให้ระยะเวลาเพิ่มขึ้นอาจทำให้เห็นการเจริญของแบคทีเรียในอาหารที่เติมไพรีนแตกต่างจากชุดควบคุมมากขึ้น เนื่องจากระยะเวลาที่ใช้ในการเตรียม resting cell เพียง 24 ชั่วโมง อาจทำให้แบคทีเรียยังไม่สามารถใช้อาหารที่สะสมอยู่ในเซลล์ได้หมด

ในการตรวจสอบหาชนิดที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายไพรีนใน *Diaphorobacter* sp. สายพันธุ์ KOTLB และ *Pseudoxanthomonas* sp. สายพันธุ์ RN402 ด้วยการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอบริเวณยีนที่ประมวลรหัสหน่วยย่อยแอลฟาของเทอร์มินัลไดออกซีจีเนสจากดีเอ็นเอที่สกัดจากอาหารเหลว LB และที่สกัดจากอาหารเหลว CFMM ที่เติมไพรีน สาเหตุที่เลือกเพิ่มจำนวนยีนดังกล่าวเนื่องจากไดออกซีจีเนสเป็นเอนไซม์ตัวแรกที่เข้าทำปฏิกิริยากับสารประกอบ PAHs (Bulter และ Mason, 1997) และหน่วยย่อยแอลฟาเป็นบริเวณที่มีความอนุรักษ์ (Moser และ Stahl, 2001) ผลการทดลองคือ ไม่พบผลิตภัณฑ์ PCR เมื่อใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีนของแบคทีเรียแกรมลบ ได้แก่ *ndoB* ของ *Pseudomonas putida* สายพันธุ์ NCIB9816 ซึ่งเป็นตัวแทนของยีนกลุ่มคล้าย *nah nagAc* ของ *Ralstonia* sp. สายพันธุ์ U2 *nahAc* ของ *Comamonas* sp. สายพันธุ์ GZ42 *arhA1* ของ *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ A4 *bphA1* ของ *Novosphingobium aromaticivorans* สายพันธุ์ F199 และ *phnAc* ของ *Burkholderia* sp. สายพันธุ์ RP007 จากผลการทดลองนี้แสดงว่า ยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายในแบคทีเรียทั้ง 2 สายพันธุ์ มีความคล้ายคลึงในระดับต่ำหรือไม่คล้ายคลึงกับยีนในกลุ่มคล้าย *nah* ของ *Pseudomonas nagAc* ของ *Ralstonia* sp. สายพันธุ์ U2 *nahAc* ของ *Comamonas* sp. สายพันธุ์ GZ42 *arhA1* ของ *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ A4 *bphA1* ของ *Novosphingobium aromaticivorans* สายพันธุ์ F199 และ *phnAc* ของ *Burkholderia cepacia* สายพันธุ์ RP007

และเมื่อใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีนของแบคทีเรียแกรมบวก ได้แก่ *nidA* ของ *Mycobacterium vanbaalenii* สายพันธุ์ PYR-1 *nidA* ของ *Rhodococcus* sp. สายพันธุ์ และ *phdA* ของ *Norcardioides* sp. สายพันธุ์ KP7 และไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อบริเวณ Rieske ของยีนที่ประมวลรหัสออกซีจีเนสของแบคทีเรียบางกลุ่มที่ย่อยสลายสารประกอบอะโรมาติก (Ni Chadhain

และคณะ, 2006) ไม่พบผลิตภัณฑ์ PCR ขนาดที่คาดหวัง แต่พบผลิตภัณฑ์ PCR ขนาดที่คาดหวัง คือ 508 bp เมื่อใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *nidA* ของ *Mycobacterium vanbaalenii* สายพันธุ์ PYR-1 เพิ่มดีเอ็นเอจาก *Diaphorobacter* sp. สายพันธุ์ KOTLB และ *Pseudoxanthomonas* sp. สายพันธุ์ RN402 ที่สกัดจากอาหารเหลว CFMM ที่เติมไพรีน และเมื่อวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์แล้ว พบว่า ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่แปลรหัสเป็นกรดอะมิโนเหมือนกับลำดับอะมิโนของโปรตีน NidA ของ *Mycobacterium* sp. สายพันธุ์ JLS ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลายไพรีน และสารประกอบ PAHs อื่นๆ โดยมีความเหมือน 100% แต่เนื่องจากผลิตภัณฑ์ PCR ที่เพิ่มขึ้นได้นั้นมีความยาวเพียง 508 bp ซึ่งเป็นแค่ส่วนหนึ่งของยีน *nidA* ดังนั้น การทำยีนวอล์กิ้ง (Gene Walking) จะทำให้ทราบถึงลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมดของยีน *nidA* ใน *Diaphorobacter* sp. สายพันธุ์ KOTLB และ *Pseudoxanthomonas* sp. สายพันธุ์ RN402 และสามารถบอกความสัมพันธ์ของยีน *nidA* ในแบคทีเรียทั้ง 2 สายพันธุ์กับ *Mycobacterium* ซึ่งอาจจะมีแตกต่างจากแบคทีเรียในสกุล *Mycobacterium*

ได้มีการศึกษาหน้าที่และความจำเพาะของโปรตีน Nid ใน *Mycobacterium vanbaalenii* สายพันธุ์ PYR-1 พบว่ามีโปรตีน NidA เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีไพรีน หรือฟิแนนทรีน หรือโดเบนโซไทโอพีน และพบว่ามี ความจำเพาะต่อไพรีนและสารประกอบ PAHs อื่นๆ (Khan และคณะ, 2001) ผลการทดลองนี้อาจกล่าวได้ว่าแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายไพรีนได้นั้นอาจมีกลุ่มยีน *nid* ซึ่งมีหน้าที่ในการประมวลผลของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายไพรีนและสารประกอบ PAHs ชนิดอื่นๆ มีงานวิจัยที่ตรวจหายีน *nid* ในแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลายไพรีน เช่น (Miller และคณะ (2004) คัดแยก *Mycobacterium* sp. สายพันธุ์ JLS KMS และ MCS และ จากดินที่มีการปนเปื้อนของครีโอลิสต เมื่อเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอบริเวณยีนที่ประมวลผลหน่วยย่อยแอลฟาและบีตาของเทอร์มินัลไดออกซิจีเนสโดยใช้ ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *nidA* และ *nidB* ได้ผลผลิตของ PCR ขนาดตามที่คาดหวังคือ 1,368 bp และ 510 bp ตามลำดับ

กลุ่มยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายสารประกอบ PAHs นอกจากจะมีความจำเพาะต่อชนิดของสารแตกต่างกันแล้ว ก็พบว่ากลุ่มยีนต่างๆ นั้นมีความจำเพาะต่อชนิดของแบคทีเรียด้วย เช่น กลุ่มยีนคล้าย *nah* จำเพาะต่อแบคทีเรียในสกุล *Pseudomonas* หรือกลุ่มยีน *nid* จำเพาะต่อแบคทีเรียในสกุล *Mycobacterium* เป็นต้น แต่ก็พบว่าในแบคทีเรียกลุ่มเดียวกัน เช่น กลุ่ม Sphingomonads ก็มียีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายสารที่แตกต่างกันออกไปทั้งในแง่การเรียงตัวของยีนและความคล้ายของลำดับนิวคลีโอไทด์ รวมถึงความจำเพาะของสารตั้งต้น กล่าวคือ แบคทีเรียในกลุ่ม Sphingomonads ที่สามารถย่อยสลายไปฟีนิล หรือฟิแนนทรีน พบว่ามีการเรียงตัวของยีนและลำดับนิวคลีโอไทด์ที่คล้ายคลึงกัน (*Novosphingobium aromaticivorans* สายพันธุ์ F199 และ *Sphingobium yanoikuyae* สายพันธุ์ B1) มีกลุ่มยีน *bph*) แต่กลุ่ม Sphingomonads ที่

สามารถย่อยสลายอะซีแนพทีน พบว่าการเรียงตัวของยีน และความคล้ายของลำดับนิวคลีโอไทด์ แตกต่างไปจาก Sphingomonads ที่สามารถย่อยสลายไบฟีนิล หรือฟีแนพทีน (*Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ A4 และ สายพันธุ์ SP2 มียีน *arh*) (Pinyakong และคณะ, 2003; 2004; Kouzuma และคณะ, 2006; และ กรองกาญจน์ สายพิณ, 2549)

นอกจากนี้ ยังพบกลุ่มยีนเดียวกันในแบคทีเรียต่างกลุ่ม ดังที่พบใน *Polaromonas naphthalenivorans* สายพันธุ์ CJ2 มีกลุ่มยีน *nag* ที่เกี่ยวข้องกับกร่อยสลายเนพธาดีน เหมือนกับกลุ่มยีน *nag* ใน *Ralstonia* sp. สายพันธุ์ U2 ทั้งในแง่ของการเรียงตัวของยีนและความคล้ายของลำดับนิวคลีโอไทด์ และพบว่าในกลุ่มยีน *nag* ของ *Polaromonas naphthalenivorans* สายพันธุ์ CJ2 มียีนประมวลรหัสทรานสโพเอส (*tnpA*) ซึ่งเป็นหลักฐานอย่างหนึ่งที่แสดงความเป็นไปได้ว่ากลุ่มยีน *nag* ของ *Polaromonas naphthalenivorans* สายพันธุ์ CJ2 มาจาก *Ralstonia* sp. สายพันธุ์ U2 (Jeon และคณะ, 2006) ดังนั้น การทำยีนวอกคิงจากที่ได้กล่าวในข้างต้น นอกจากทำให้ทราบถึงความสัมพันธ์ของยีน *nidA* ระหว่างแบคทีเรียทั้ง 2 สายพันธุ์กับ *Mycobacterium* แล้ว ยังทำให้ทราบว่ามียีนที่ประมวลรหัส ทรานสโพเอสหรือไม่ ดังนั้น ปรากฏการณ์จากรายงานวิจัยที่กล่าวมาอาจเกิดขึ้นใน *Diaphorobacter* sp. สายพันธุ์ KOTLB และ *Pseudoxanthomonas* sp. สายพันธุ์ RN402 ส่งผลให้สามารถเพิ่มดีเอ็นเอบริเวณยีน *nid* ที่พบในสายพันธุ์ของแบคทีเรียสกุล *Mycobacterium* ซึ่งเป็นแบคทีเรียในกลุ่มแกรมบวกที่สามารถย่อยสลายสารประกอบ PAHs ขึ้นได้ในแบคทีเรียทั้ง 2 สายพันธุ์ซึ่งเป็นแบคทีเรียในกลุ่มแกรมลบ และ ในงานวิจัยของ Marquez-Rocha (2005) ได้เพิ่มดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อบริเวณยีน *ndoB* ของแบคทีเรียสกุล *Pseudomonas* ซึ่งเป็นแบคทีเรียในกลุ่มแกรมลบ โดยใช้ดีเอ็นเอจาก *Bacillus* ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมบวกที่คัดแยกมาจากดินที่อยู่ในบริเวณถังน้ำมัน พบว่าได้ผลิตภัณฑ์ PCR ขนาด 642 bp ตามขนาดที่ต้องการ

อย่างไรก็ตามผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้นั้น เป็นการใส่ดีเอ็นเอที่สกัดจากอาหารเหลว CFMM ที่เติมไพรีน แต่เมื่อใส่ดีเอ็นเอที่สกัดจากอาหารเหลว LB ไม่พบผลิตภัณฑ์ PCR และเมื่อลองใช้วิธีการสกัดเมกะพลาสมิดจากแบคทีเรียทั้ง 2 สายพันธุ์ ที่เลี้ยงในอาหารเหลว LB และอาหารเหลว CFMM ที่เติมไพรีน พบดีเอ็นเอที่เป็นเมกะพลาสมิดจากการเลี้ยงแบคทีเรียในอาหารเหลวที่เติมไพรีนแต่ไม่พบในอาหารเหลว LB และการพบสัญญาณไฮบริดซ์จากเมกะพลาสมิดของ *Diaphorobacter* sp. สายพันธุ์ KOTLB และ *Pseudoxanthomonas* sp. สายพันธุ์ RN402 สรุปได้ว่า ยีน *nidA* อยู่บนเมกะพลาสมิด ในตารางที่ 5.2 ได้แสดงถึงแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายสารประกอบ PAHs โดยมียีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายอยู่บนพลาสมิด

ตารางที่ 5.2 ชนิดของแบคทีเรียที่มียีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายสารประกอบ PAHs บนพลาสติก (อ้างอิง Nojiri และคณะ, 2004)

ชนิดของแบคทีเรีย	พลาสติก	สารตั้งต้น	ขนาด	ยีน
<i>Pseudomonas putida</i> สายพันธุ์ G7	NAH7	แนพทาลีน	83 kb	<i>nah</i>
<i>Pseudomonas putida</i> สายพันธุ์ Cg1	pCG1	แนพทาลีน	86 kb	<i>nah</i>
<i>Terrabacter</i> sp. สายพันธุ์ DBF63	pDBF1	ไดเบนโซฟิวแรน และ ฟลูออรีน	160 kb	<i>dbf fln</i> และ <i>pht</i>
<i>Terrabacter</i> sp. สายพันธุ์ DBF63	pDBF2	ไดเบนโซฟิวแรน และ ฟลูออรีน	190 kb	<i>dbf fln</i> และ <i>pht</i>
<i>Pseudomonas putida</i> สายพันธุ์ NCIB9816-4	pDTG1	แนพทาลีน	81 kb	<i>nah</i>
<i>Novosphingobium</i> <i>aromaticivorans</i> สายพันธุ์ F199	pNL1	ไบฟีนิล เบนโซเอต ไซลีน และ แนพทาลีน	184 kb	<i>bph xyl nah</i> และ <i>pch</i>

จากผลการทดลองที่กล่าวมา แสดงให้เห็นว่าอาหารที่มีความอุดมสมบูรณ์อาจทำให้สูญเสียยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายสาร หรืออาจกล่าวได้ว่ายีนบางส่วนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายไพรีน (ในที่นี้คือ *nidA*) ของ *Diaphorobacter* sp. สายพันธุ์ KOTLB และ *Pseudoxanthomonas* sp. สายพันธุ์ RN402 อยู่บนดีเอ็นเอที่สามารถเคลื่อนที่ได้ (Mobile genetic element) เช่น ทรานสโพซอน และ พลาสติก เป็นต้น

ในกรณีของทรานสโพซอน มีรายงานวิจัยที่พบยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายสารพิษในทรานสโพซอน เช่น *Pseudomonas putida* สายพันธุ์ G7 มียีนส่วนหนึ่งจากยีนกลุ่ม *nah* ที่เกี่ยวข้องในการย่อยสลายแนพทาลีนผ่านทางคะทีคอลล ขนาด 37.5 kb อยู่บนทรานสโพซอน *Tn4655* (Tsuda และ Lino, 1990) และยีนดังกล่าวมีความการเรียงตัวของยีนคล้ายกับยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายไซลีนผ่านทางคะทีคอลลในพลาสติก pWWO จาก *Pseudomonas putida* สายพันธุ์ mt-2 นอกจากนี้ *Pseudomonas putida* สายพันธุ์ mt-2 มียีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายไซลีนและโทลูอีน ผ่านทางคะทีคอลล อยู่บนทรานสโพซอน *Tn4651* ซึ่งทรานสโพซอนนี้ ยังอยู่บนทรานสโพซอน *Tn4663* ด้วย (Tan, 1999 และ Sentchillo และคณะ, 2000) เป็นต้น

ในกรณีของพลาสติก พลาสติกอาจได้รับการถ่ายโอนมาจากแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลายไพลีน โดยในงานวิจัยของ Ma และคณะ (2005) รายงานว่า *Pseudomonas* sp. หลายๆ สายพันธุ์ ที่คัดแยกจากดินที่มีการปนเปื้อนของสารปิโตรเลียม จากแอนตาร์กติก มีความสามารถในการย่อยสลายสารประกอบ PAHs พบว่า ความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *ndoB* ที่อยู่บนเมกะพลาสติกความแตกต่างกัน ถึงแม้ว่า 16S rDNA จะจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกัน และเมื่อถ่ายโอน พลาสติกจาก *Pseudomonas* sp. ที่สามารถย่อยสลายสารประกอบ PAHs เข้าสู่ *Pseudomonas* sp. ที่ไม่สามารถย่อยสลายสารประกอบ PAHs สามารถทำให้ย่อยสลายสารประกอบ PAHs ได้ และ Hedlund และ Staley (2006) ได้คัดแยก *Pseudoalteromonas* sp. สายพันธุ์ EH-2-1 จากน้ำทะเล สามารถย่อยสลายเนฟทาลินได้ และเมื่อเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอบริเวณยีนที่ประมวลรหัสแอลฟาของไดออกซีจีเนส ด้วยไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *nahAc* พบว่า ลำดับนิวคลีโอไทด์มีความคล้ายคลึงกับ *nahAc* ของ *Neptunomonas naphthovorans* สายพันธุ์ ATCC700637^T โดยมีลำดับนิวคลีโอไทด์ต่างกันเพียง 2 นิวคลีโอไทด์ และเมื่อใช้ไพรเมอร์ติดตาม *nahAc* ของ *Pseudomonas putida* G7 และ *nahAc* ของ *Neptunomonas naphthovorans* สายพันธุ์ ATCC700637^T ในการทำไฮบริโดเซชัน พบว่าเกิดสัญญาณขึ้นกับดีเอ็นเอของ *Pseudoalteromonas* sp. สายพันธุ์ EH-2-1 ซึ่งแสดงให้เห็นว่า *Pseudoalteromonas* sp. สายพันธุ์ EH-2-1 อาจได้รับยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายเนฟทาลินมาจาก *Neptunomonas naphthovorans* สายพันธุ์ ATCC700637^T

ดังนั้นจึงอาจเป็นไปได้ว่า *Diaphorobacter* sp. สายพันธุ์ KOTLB และ *Pseudoxanthomonas* sp. สายพันธุ์ RN402 อาจได้รับการถ่ายโอนยีน *nidA* และยีนอื่นๆ ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลาย มาจาก *Mycobacterium* สายพันธุ์ที่มีความสามารถในการย่อยสลายไพลีน ซึ่งการได้รับยีนอาจได้รับการถ่ายโอนยีนทางพลาสติกหรือทรานสโพซอน

งานวิจัยนี้เป็นงานวิจัยแรกๆ ที่แสดงว่าแบคทีเรียในสกุล *Diaphorobacter* และสกุล *Pseudoxanthomonas* ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมลบ มีความสามารถในการย่อยสลายสารประกอบ PAHs โดยเฉพาะไพลีน ที่จัดเป็นสารประกอบ PAHs ที่มีมวลโมเลกุลสูง และมียีน *nidA* เป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายไพลีนอยู่บนเมกะพลาสติก ดังนั้นแบคทีเรียที่คัดแยกได้จึงเป็นการเพิ่มทางเลือกในการนำแบคทีเรียไปใช้ในการบำบัดสิ่งแวดล้อมที่มีการปนเปื้อนของสารพิษต่อไปในอนาคต

รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

- กรองกาญจน์ สายพิน. 2549. การแยกและลักษณะสมบัติของยีส่แฉะที่เน่พ้นออกซิจีเนสของ *Sphingomonas* sp. SP2. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณทิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- จีรทีปส์ แสนรัก. 2547. การย่อยสลายไพรีนและสารประกอบพอลิไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนชนิดอื่นโดยกลุ่มแบคทีเรียที่แยกได้จากใบพืชตระกูลถั่ว. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณทิต ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- ทิมากร แสงคำ. 2547. การแยกและลักษณะสมบัติของแบคทีเรียที่มีสมบัติในการติดและการย่อยสลายไพรีนจากปุ๋ยหมักใบพืชตระกูลถั่ว. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณทิต ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ภาษาอังกฤษ

- Allen, C.C., Boyd, C., Larkin, M.J., Reid, K.A., Sharma, N.D., and Wilson, K. 1997. Metabolism of naphthalene, 1-naphthol, indene, and indole by *Rhodococcus* sp. strain NCIMB 12038. Appl. Environ. Microbiol. 63: 151-155.
- Amagai, T., Takaharachi, Y., mutsushita, H., Morkjoy, D., Sukasem, P., and Tabucanon, M. 1999. A survey on aromatic hydrocarbon concentrations in soil in Chiang-Mai, Thailand. Environ. International. 25: 572-593.
- Annweiler, E., Richnow, H. H., Antranikian, G., Hebenbrock, S., Garms, C., Franke, S., Francke, W., and Michaelis, W. 2000. Naphthalene degradation and incorporation of naphthalene-derived carbon into biomass by the thermophile *Bacillus thermoleovorans*. Appl. Environ. Microbiol. 66: 518-523.
- Ausubel, F.M, Brent, R.E., Kington, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A., Struhl, K. 1999. Current protocol in molecular biology. New York, John Wiley and Sons.
- Barbieri, E., Bertini, L., Rossi, I., Ceccaroli, P., Saltarelli, R., Guidi, C., Zambonelli, A. and Stocchi, V. 2005. New evidence for bacterial diversity in the ascoma of the ectomycorrhizal fungus *Tuber borchii* Vittad. FEMS Microbiol. Lett. 247: 23-35.

- Bastiaens, L., Springael, D., Wattiau, P., Harms, H., deWachter, R., Verachtert, H., and Diels, L. 2000. Isolation of adherent polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH)-degrading bacteria using PAH-sorbing carries. Appl. Environ. Microbiol. 66: 1834-1843.
- Boonchan, S., Britz, M. L., and Stanley, G. A. 2000. Degradation and mineralization of high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons by defined fungal-bacterial cocultures. Appl. Environ. Microbiol. 66: 1007-1019.
- Bosch, R., Garcia-Valdes, E., and Moore, E. R. 1999. Genetic characterization and evolutionary implications of a chromosomally encoded naphthalene-degradation upper pathway from *Pseudomonas stutzeri* AN10. Gene 236:149-157.
- Bouchez, M., Blanchet, D., and Vandecasteele, J.P. 1995. Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by pure strains and by defined strain associations: inhibition phenomena and cometabolism. Appl. Microbiol. Biotechnol. 43:156-164.
- Butler, C.S., and Mason J.R. 1997. Structure-function analysis of the bacterial aromatic ring-hydroxylating dioxygenases. Adv. Microb. Physiol. 38: 47-84.
- Cerniglia, C.E. 1992. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. Biodegradation 3: 351-368.
- Chang, J. S., Chou, C. L., Lin, G. H., Sheu, S. Y., and Chen, W. M. 2005. *Pseudoxanthomonas kaohsiungensis*, sp. nov., a novel bacterium isolated from oil-polluted site produces extracellular surface activity. Syst. Appl. Microbiol. 28: 137-144.
- Chen, S.-H., and Aitken, M.D. 1999. Salicylate stimulates the degradation of high-molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons by *Pseudomonas saccharophila* P15. Environ. Sci. Technol. 33: 435-439.
- Cheng, J. Z., Harada, R., Campbell, and Li, Q.X. 2008. Biodegradation of dinitrotoluene by *Pseudoxanthomonas* sp. JA40. J. Y. Investi. <http://www.jyi.org>. last update 6 march 2551.
- Dandie, C. E., Thomas, S. M., Bentham, R. H., and McClure, N. C. 2004. Physiological characterization of *Mycobacterium* sp. strain 1B isolated from a bacterial culture

- able to degrade high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons. J. Appl. Microbiol. 97: 246-255.
- Davies, J.I., and Evans, W.C. 1964. Oxidative metabolism of naphthalene by soil pseudomonads the ring-fission mechanism. J. Biochem. 91: 251-261.
- Demaneche, S., Meyer, C., Micoud, J., Louwagie, M., Willison, J. C., and Jouanneau, Y. 2004. Identification and functional analysis of two aromatic-ring-hydroxylating dioxygenases from a *Sphingomonas* strain that degrades various polycyclic aromatic hydrocarbons. Appl. Environ. Microbiol. 70: 6714-6725.
- Denome, S. A., Stanley, D. C., Olson, E. S., and Young, K. D. 1993. Metabolism of dibenzothiophene and naphthalene in *Pseudomonas* strains: complete DNA sequence of an upper naphthalene catabolic pathway. J. Bacteriol. 175: 6890-6901.
- Derz, K., Klinner, U., Schuphan, I., Stackebrandt, E., and Kroppenstedt, R. M. 2004. *Mycobacterium pyrenivorans* sp. nov., a novel polycyclic-aromatic-hydrocarbon-degrading species. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 54: 2313-2317.
- Dionisi, H. M., Chewing, C. S., Morgan, K. H., Menn, F. M., Easter, J. P., and Sayler, G. S. 2004. Abundance of dioxygenase genes similar to *Ralstonia* sp. strain U2 *nagAc* is correlated with naphthalene concentrations in coal tar-contaminated freshwater sediments. Appl. Environ. Microbiol. 70: 3988-3995.
- Ensley, B. D., and Gibson, D. T. 1983. Naphthalene dioxygenase: purification and properties of a terminal oxygenase component. J. Bacteriol. 155: 505-511.
- Evans, W.C., Fernley, H.N., and Griffiths, E. 1965. Oxidative metabolism of phenanthrene and anthracene by soil pseudomonads: the ring fission mechanism. J. Biochem. 95: 819-831.
- Felsenstein, J. 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. Evolution 39. 783-791.
- Finkmann, W., Altendorf, K., Stackebrandt, E., and Lipski, A. 2000. Characterization of N₂O-producing *Xanthomonas*-like isolates from biofilters as *Stenotrophomonas nitritireducens* sp. nov., *Luteimonas mephitis* gen. nov., sp. nov. and

- Pseudoxanthomonas broegbernensis* gen. nov., sp. nov. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 50: 273-282.
- Gardan, L., Stead, D.E., Dauga, C. and Gillis, M. 2003. *Acidovorax valerianellae* sp. nov., a novel pathogen of lamb's lettuce [*Valerianella locusta* (L.) Laterr.]. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 53: 795-800.
- Gibson, D.T., and Parales, R.E. 2000. Aromatic hydrocarbon dioxygenases in environmental biotechnology. Curr. Opin. Biotechnol. 11: 236-243.
- Goyal, A. K., and Zylstra, G. J. 1996. Molecular cloning of novel genes for polycyclic aromatic hydrocarbon degradation from *Comamonas testosteroni* GZ39. Appl. Environ. Microbiol. 62: 230-236.
- Grifoll, M., Casellas, M., Bayona, J.M., and Solanas, A.M. 1992. Isolation and characterization of a fluorene-degrading bacterium: identification of ring oxidation and ring fission products. Appl. Environ. Microbiol. 58: 2910-2917.
- Grosser, R. J., Warshawsky, D., and Vestal, J. R. 1991. Indigenous and enhanced mineralization of pyrene, benzo[a]pyrene, and carbazole in soils. Appl. Environ. Microbiol. 57: 3462-3469.
- Guo, C. L., Zhou, H. W., Wong, Y. S., and Tam, N. F. 2005. Isolation of PAH-degrading bacteria from mangrove sediments and their biodegradation potential. Mar. Pollut. Bull. 51: 1054-1061.
- Habe, H., and Omori, T. 2003. Genetics of polycyclic aromatic hydrocarbon metabolism in diverse aerobic bacteria. Biosci. Biotechnol. Biochem. 67: 225-243.
- Habe, H., Kanemitsu, M., Nomura, M., Takemura, T., Iwata, K., Nojiri, H., Yamane, H., and Omori, T. 2004. Isolation and characterization of an alkaliphilic bacterium utilizing pyrene as a carbon source. J. Biosci. Bioeng. 98: 306-308.
- Haigler, B.E., Wallace, W.H., and Spain, J.C. 1994. Biodegradation of 2-nitrotoluene by *Pseudomonas* sp. Strain JS42. Appl. Environ. Microbiol. 60: 3466-3469.
- Harada, R. M., Campbell, S., and Li, Q. X. 2006a. *Pseudoxanthomonas kalamensis* sp. nov., a novel gammaproteobacterium isolated from Johnston Atoll, North Pacific Ocean. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 56: 1103-1107.

- Harada, N. T. K., Harazono, A., Fujii, K., and Iwasaki, A. 2006b. Isolation and characterization of microorganisms capable of hydrolysing the herbicide mefenacet. Soil Biol. Biochem 38: 173-179.
- Hedlund, B.P., and Staley, J.T. 2006. Isolation and characterization of *Pseudalteromonas* strains with divergent polycyclic aromatic hydrocarbon catabolic properties. Environ. Microbiol. 8: 178-182.
- Heitkamp, M. A., Franklin, W., and Cerniglia, C. E. 1988a. Microbial metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons: isolation and characterization of a pyrene-degrading bacterium. Appl. Environ. Microbiol. 54: 2549-2555.
- Heitkamp, M.A., Freeman, J.P., Miller, D.W., and Cerniglia, C.E. 1988b. Pyrene degradation by a *Mycobacterium* sp.: identification of ring oxidation and ring fission products. Appl. Environ. Microbiol. 54: 2556-2565.
- Heylen, K., Vanparys, B., Wittebolle, L., Verstraete, W., Boon, N. and De Vos, P. 2006. Cultivation of denitrifying bacteria: optimization of isolation conditions and diversity study. Appl. Environ. Microbiol. 72: 2637-2643.
- Horiba, Y., Khan, S.T. and Hiraishi, A. 2005. Characterization of the microbial community and culturable denitrifying bacteria in a solid-phase-denitrification process using poly(epsilon-caprolactone) as the carbon and energy source. Microbes. Environ. 20: 25-33
- Hu, F.P., Young, J.M., Triggs, C.M., Park, D.C. and Saul, D.J. 2001. Relationships within the Proteobacteria of plant pathogenic *Acidovorax* species and subspecies, *Burkholderia* species, and *Herbaspirillum rubrisubalbicans* by sequence analysis of 16S rDNA, numerical analysis and determinative tests. Antonie Van Leeuwenhoek 80: 201-214.
- Hu, X., Mamoto, R., Fujioka, Y., Tani, A., Kimbara, K., and Kawai, F. 2008. The *pva* operon is located on the megaplasmid of *Sphingopyxis* sp. strain 113P3 and is constitutively expressed, although expression is enhanced by PVA. Appl. Microbiol. Biotechnol. 78: 685-693.

- Hu, Y. T., Zhou, P. J., Zhou, Y. G., Liu, Z. H., and Liu, S. J. 2004. *Saccharothrix xinjiangensis* sp. nov., a pyrene-degrading actinomycete isolated from Tianchi Lake, Xinjiang, China. Int.J. Syst. Evol. Microbiol. 54: 2091-2094.
- IARC. 1999. Overall Evaluations of Carcinogenicity of Humams. International Agency for Research on Cancer. <http://193.51.164.11/monoeval/erthall.html>. Last updated: 20 January 1999.
- Jeon, C. O., Park, M., Ro, H. S., Park, W., and Madsen, E. L. 2006. The naphthalene catabolic (*nag*) genes of *Polaromonas naphthalenivorans* CJ2: evolutionary implications for two gene clusters and novel regulatory control. Appl. Environ. Microbiol. 72: 1086-1095.
- Jerina, D.M., Selander, H., Yagi, H. Wells, M.C., Davey, J.F., Mahadevan., and Gibson, D.T. 1976. Dihydrindols from anthracene and phenanthrene. J. AM. Chem. Soc. 98: 5988-5996.
- Jiang, H., Parales, R.E., and Gibson, D.T. 1999. The α subunit of toluene dioxygenase from *Pseudomonas putida* F1 can accept electrons from reduced ferredoxinTOL but is catalytically inactive in the absence of the β subunit. Appl. Environ. Microbiol. 65: 315-318.
- Juhasz, A. L., Britz, M.L., and Stanley, G.A. 1997. Degradation of fluoranthene, pyrene, benz[*a*]anthracene and bibenz[*a,h*]anthracene by *Burkholderia cepacia*. J. Appl. Microbiol 83: 189-198.
- Juhasz, A. L., Stanley, G. A., and Britz, M. L. 2000. Microbial degradation and detoxification of high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons by *Stenotrophomonas maltophilia* strain VUN 10,003. Lett. Appl. Microbiol. 30: 396-401.
- Kanaly, R.A., and Harayama, S. 2000. Biodegradation of high- molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons by bacteria. J. Bacteriol. 182: 2059-2097.
- Kastner, M., breuer-Jammali, M., and Mahro, B. 1994. Enumeration and characterization of the soil microflora from hydrocarbon-contaminated soil sites able to mineralize polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). Appl. Environ. Microbiol. 41: 267-273.

- Katsivela, E., Wray, V., Pieper, D.H. and Wittich, R.M. 1999. Initial reactions in the biodegradation of 1-chloro-4-nitrobenzene by a newly isolated bacterium, strain LW1. Appl. Environ. Microbiol. 65: 1405-1412.
- Kauppi B, Lee K, Carredano E, Parales R.E, Gibson D.T, Eklund H, and Ramaswamy S. 1998. Structure of an aromatic-ring-hydroxylating dioxygenase-naphthalene 1,2-dioxygenase. Structure 6: 571-586.
- Kazunga, C., and Aitken, M. D. 2000. Products from the incomplete metabolism of pyrene by polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacteria. Appl. Environ. Microbiol. 66: 1917-1922.
- Kelly, I., Freeman, J.P., and Cerniglia, C.E. 1990. Identification of metabolites from degradation of naphthalene by *Mycobacterium* sp. Biodegradation 1: 283-290.
- Khan, A. A., Wang, R. F., Cao, W. W., Doerge, D. R., Wennerstrom, D., and Cerniglia, C. E. 2001. Molecular cloning, nucleotide sequence, and expression of genes encoding a polycyclic aromatic ring dioxygenase from *Mycobacterium* sp. strain PYR-1. Appl. Environ. Microbiol. 67: 3577-3585.
- Khan, S. T., and Hiraishi, A. 2002. *Diaphorobacter nitroreducens* gen nov, sp nov, a poly(3-hydroxybutyrate)-degrading denitrifying bacterium isolated from activated sludge. J Gen. Appl. Microbiol. 48: 299-308.
- Khan, A. A., Kim, S. J., Paine, D. D., and Cerniglia, C. E. 2002. Classification of a polycyclic aromatic hydrocarbon-metabolizing bacterium, *Mycobacterium* sp. strain PYR-1, as *Mycobacterium vanbaalenii* sp. nov. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 52: 1997-2002.
- Kim, E., Zylstra, G. J., Freeman, J. P., Heinze, T. M., Deck, J., and Cerniglia, C. E. 1997. Evidence for the role of 2-hydroxychromene-2-carboxylate isomerase in the degradation of anthracene by *Sphingomonas yanoikuyae* B1. FEMS Microbiol. Lett. 153: 479-484.
- Kim, S.-I., Kuor, J.J., Oh, K.-H., and Kahng, H.Y. 2006a. Evaluating the genetic diversity of dioxygenases for initial catabolism of aromatic hydrocarbons in *Pseudomonas rhodesiae* KK1. Enzyme. Microb. Technol. 40: 71-78.

- Kim, S. J., Kweon, O., Freeman, J. P., Jones, R. C., Adjei, M. D., Jhoo, J. W., Edmondson, R. D., and Cerniglia, C. E. 2006b. Molecular cloning and expression of genes encoding a novel dioxygenase involved in low- and high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbon degradation in *Mycobacterium vanbaalenii* PYR-1. Appl. Environ. Microbiol. 72: 1045-1054.
- Kim, S. J., Kweon, O., Jones, R. C., Freeman, J. P., Edmondson, R. D., and Cerniglia, C. E. 2007. Complete and integrated pyrene degradation pathway in *Mycobacterium vanbaalenii* PYR-1 based on systems biology. J. Bacteriol. 189: 464-472.
- Kim, T.J., Lee, E.Y., Kim, Y.J., Cho, K-S., and Ryu, H.W. 2003. Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by *Burkholderia cepacia* 2A-12. World J. Microbiol. & Biotechnol. 19: 411-417.
- Kiyohara, H., Nagao, K., and Nomi, R. 1976. Degradation of phenanthrene through o-phthalate by an *Aeromonas* sp. Agric. Biol. Chem. Soc. 99: 8121-8123.
- Kiyohara, H., Torigoe, S., Kaida, N., Asaki, T., Iida, T., Hayashi, H., and Takizawa, N. 1994. Cloning and characterization of a chromosomal gene cluster, *pah*, that encodes the upper pathway for phenanthrene and naphthalene utilization by *Pseudomonas putida* OUS82. J. Bacteriol. 176: 2439-2443.
- Kochevar, I. E., Armstrong, R. B., Einbinder, J., Walther, R. R., and Harber, L. C. 1982. Coal tar phototoxicity: active compounds and action spectra. Photochem. Photobiol. 36: 65-69.
- Kouzuma, A., Pinyakong, O., Nojiri, H., Omori, T., Yamane, H., and Habe, H. 2006. Functional and transcriptional analyses of the initial oxygenase genes for acenaphthene degradation from *Sphingomonas* sp. strain A4. Microbiology 152: 2455-2467.
- Krivobok, S., Kuony, S., Meyer, C., Louwagie, M., Willison, J. C., and Jouanneau, Y. 2003. Identification of pyrene-induced proteins in *Mycobacterium* sp. strain 6PY1: evidence for two ring-hydroxylating dioxygenases. J. Bacteriol. 185: 3828-3841.

- Kulakov, L. A., Allen, C. C., Lipscomb, D. A., and Larkin, M. J. 2000. Cloning and characterization of a novel cis-naphthalene dihydrodiol dehydrogenase gene (*narB*) from *Rhodococcus* sp. NCIMB12038. FEMS Microbiol. Lett 182: 327-331.
- Kulakov, L.A., Chen, S., Allen, C.C., and Larkin, M.J. 2005. Web-type evolution of *Rhodococcus* gene clusters associated with utilization of naphthalene. Appl. Environ. Microbiol. 71: 1754-1764.
- Kurkela, S., Lehvaslaiho, H., Palva, E. T., and Teeri, T. H. 1988. Cloning, nucleotide sequence and characterization of genes encoding naphthalene dioxygenase of *Pseudomonas putida* strain NCIB9816. Gene 73: 355-362.
- Kweon, O., Kim, S. J., Jones, R. C., Freeman, J. P., Adjei, M. D., Edmondson, R. D., and Cerniglia, C. E. 2007. A polyomic approach to elucidate the fluoranthene-degradative pathway in *Mycobacterium vanbaalenii* PYR-1. J. Bacteriol 189: 4635-4647.
- Larkin, M.J., Allen, C.C., Kulakov, L.A., and Lipscomb, D.A. 1999. Purification and characterization of a novel naphthalene dioxygenase from *Rhodococcus* sp. strain NCIMB12038. J. Bacteriol.181: 6200-6204.
- Laurie, A. D., and Lloyd-Jones, G. 1999. The *phn* genes of *Burkholderia* sp. strain RP007 constitute a divergent gene cluster for polycyclic aromatic hydrocarbon catabolism. J. Bacteriol.181: 531-540.
- Liang, Y., Gardner, D. R., Miller, C. D., Chen, D., Anderson, A. J., Weimer, B. C., and Sims, R. C. 2006. Study of biochemical pathways and enzymes involved in pyrene degradation by *Mycobacterium* sp. strain KMS. Appl. Environ. Microbiol. 72: 7821-7828.
- Liu, Y., Zhang, J., and Zhang, Z. 2004. Isolation and characterization of polycyclic aromatic hydrocarbons-degrading *Sphingomonas* sp. strain ZL5. Biodegradation 15: 205-212.
- Ma, Y., Wang, L., and Shao, Z. 2006. *Pseudomonas*, the dominant polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacteria isolated from Antarctic soils and the role of large plasmids in horizontal gene transfer. Environ. Microbiol. 8: 455-465.

- Marquez-Rocha, F.J., Olmos-soto, J., Rosano-Hernández, M.C., Muriel-García, M. 2005. Determination of the hydrocarbon-degrading metabolic capabilities of tropical bacterial isolates. Int. Biodeterior. Biodegradation. 55: 17-23.
- Mason, J.R., and Cammack, R. 1992. The electron-transport proteins of hydroxylating bacterial dioxygenases. Annu. Rev. Microbiol. 46: 277-305.
- Miller, C. D., Hall, K., Liang, Y.N., Nieman, K., Sorensen, D., Issa, B., Anderson, A.J., and Sims, R.C. 2004. Isolation and characterization of polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading *Mycobacterium* isolated from soil. Microb. Ecol 48: 230-238.
- Moody, J. D., Freeman, J. P., Doerge, D. R., and Cerniglia, C. E. 2001. Degradation of phenanthrene and anthracene by cell suspensions of *Mycobacterium* sp. strain PYR-1. Appl. Environ. Microbiol. 67: 1476-1483.
- Moody, J.D., Freeman, J.P., Fu, P.P., and Cerniglia, C.E. 2004. Degradation of benzo[a]pyrene by *Mycobacterium vanbaalenii* PYR-1. Appl. Environ. Microbiol. 70: 340-345.
- Moser, R., and Stahl, U. 2001. Insights into the genetic diversity of initial dioxygenases from PAH-degrading bacteria. Appl. Microbiol. Biotechnol. 55: 609-618.
- Mueller, J. G., Chapman, P. J., and Pritchard, P. H. 1989. Action of fluoranthene-utilizing bacterial community on polycyclic aromatic hydrocarbon components of creosote. Appl. Environ. Microbiol. 55: 3085-3090.
- Mueller, J. G., Chapman, P. J., Blattmann, B. O., and Pritchard, P. H. 1990. Isolation and characterization of a fluoranthene-utilizing strain of *Pseudomonas paucimobilis*. Appl. Environ. Microbiol. 56: 1079-1086.
- Ni Chadhain, S. M., Norman, R. S., Pesce, K. V., Kukor, J. J., and Zylstra, G. J. 2006. Microbial dioxygenase gene population shifts during polycyclic aromatic hydrocarbon biodegradation. Appl. Environ. Microbiol. 72: 4078-4087.
- Nojiri, H., Shintani, M., and Omori, T. 2004. Divergence of mobile genetic elements involved in the distribution of xenobiotic-carabolic capacity. Appl. Microbiol. Biotechnol. 64: 154-174.

- Osman, S., Satomi, M. and Venkateswaran, K. 2006. *Paenibacillus pasadenensis* sp. nov. and *Paenibacillus barengoltzii* sp. nov., isolated from a spacecraft assembly facility. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 56: 1509-1514.
- Parales, R.E. 2003. The role of active-site residues in naphthalene dioxygenase. J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 30: 271-278.
- Pereira Netto, A.D., Sisino, C.L.S., Moreira, J.C., Arbillia, G., and Dufrayer, M.C. 2002. Polycyclic aromatic hydrocarbons in leachate from a municipal solid waste dump of Niteroi City, RJ, Brazil. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 68: 148-154.
- Pinyakong, O., Habe, H., and Omori, T. 2003. The unique aromatic catabolic genes in sphingomonads degrading polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). J. Gen. Appl. Microbiol. 49: 1-19.
- Pinyakong, O., Habe, H., Kouzuma, A., Nojiri, H., Yamane, H., and Omori, T. 2004. Isolation and characterization of genes encoding polycyclic aromatic hydrocarbon dioxygenase from acenaphthene and acenaphthylene degrading *Sphingomonas* sp. strain A4. FEMS Microbiol. Lett. 238: 297-305.
- Prapatsornpinyo, S. 2003. Isolation and identification of polycyclic aromatic hydrocarbon degrading bacteria from river and canal sediments in Bangkok metropolis. Master's Thesis. Inter-Department of Science in Environmental Management, Chulalongkorn University.
- Romine, M. F., Stillwell, L. C., Wong, K. K., Thurston, S. J., Sisk, E. C., Sensen, C., Gaasterland, T., Fredrickson, J. K., and Saffer, J. D. 1999. Complete sequence of a 184-kilobase catabolic plasmid from *Sphingomonas aromaticivorans* F199. J. Bacteriol. 181: 1585-1602.
- Rousseaux, S. Soulas, G., and Hartmann, A. 2002. Plasmid localization of atrazine-degrading genes in newly described *Chelatobacter* and *Arthrobacter* strains. FEMS Microbiol. Ecol. 41: 69-75.
- Saito, A., Iwabuchi, T., and Harayama, S. 2000. A novel phenanthrene dioxygenase from *Nocardioides* sp. Strain KP7: expression in *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 182: 2134-2141.

- Samanta, S. K., Chakraborti, A. K., and Jain, R. K. 1999. Degradation of phenanthrene by different bacteria: evidence for novel transformation sequences involving the formation of 1-naphthol. Appl. Microbiol. Biotechnol 53: 98-107.
- Sambrook J, and Russell D.W. 2001. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 3rd ed. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sarma, P. M., Bhattacharya, D., Krishnan, S., and Lal, B. 2004. Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by a newly discovered enteric bacterium, *Leclercia adecarboxylata*. Appl. Environ. Microbiol. 70: 3163-3166.
- Sentchilo, V.S., Perebituk, A.N., Zehnder, A.J.B., and van der Meer, J.R. 2000. Molecular diversity of plasmids bearing genes that encode toluene and xylene metabolism in *Pseudomonas* strain isolated from different contaminated site in Belarus. Appl. Environ. Microbiol. 66: 2842-2852.
- Sho M, Hamel C, and Greer C.W. 2004. Two distinct gene clusters encode pyrene degradation in *Mycobacterium* sp. strain S65. FEMS Microbiol. Ecol. 48:209-220.
- Shuttleworth, K. L., and Cerniglia, C.E. 1996. Bacterial degradation of low concentration of phenanthrene and inhibition by naphthalene. Microb. Ecol. 31: 305-317.
- Simon, M. J., Osslund, T. D., Saunders, R., Ensley, B. D., Suggs, S., Harcourt, A., Suen, W. C., Cruden, D. L., Gibson, D. T., and Zylstra, G. J. 1993. Sequences of genes encoding naphthalene dioxygenase in *Pseudomonas putida* strains G7 and NCIB 9816-4. Gene 127: 31-37.
- Supaka, N. Pinphanichakarn, P., Pattaragulwanit, K., Thaniyavarn, S., Omori, T., and Juntongjin, K. 2001. Isolation and characterization of a phenanthrene-degrading *Sphingomonas* sp. Strain P2 and its ability to degrade fluoranthene and pyrene via cometabolism. Sci. Asia. 27: 21-28.
- Takeuchi, M., Hamana, K., and Hiraishi, A. 2001. Proposal of the genus *Sphingomonas* sensu stricto and three new genera, *Sphingobium*, *Novosphingobium* and *Sphingopyxis*, on the basis of phylogenetic and chemotaxonomic analyses. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 51: 1405-1417.

- Takizawa, N., Iida, T., Sawada, T., Yamauchi, K., Wang, Y. W., Fukuda, M., and Kiyohara, H. 1999. Nucleotide sequences and characterization of genes encoding naphthalene upper pathway of *Pseudomonas aeruginosa* PaK1 and *Pseudomonas putida* OUS82. J. Biosci. Bioeng. 87: 721-731.
- Tan, H.M. 1999. Bacterial catabolic transposons. Appl. Microbiol. Biotechnol. 51: 1-12.
- Thierry, S., Macarie, H., Iizuka, T., Geissdorfer, W., Assih, E. A., Spanevello, M., Verhe, F., Thomas, P., Fudou, R., Monroy, O., Labat, M., and Ouattara, A. S. 2004. *Pseudoxanthomonas mexicana* sp. nov. and *Pseudoxanthomonas japonensis* sp. nov., isolated from diverse environments, and emended descriptions of the genus *Pseudoxanthomonas* Finkmann et al. 2000 and of its type species. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 54: 2245-2255.
- Trejo, M., and Quintero, R. 2000. Bioremediation of contaminated soils. In: J.O.Eugenia, G. Sanchez and H. Elizabeth (eds.), Environmental biotechnology and cleaner bioprocess, 179-189. London: Taylor and Francis.
- Tsuda, M. and Lino, T. 1990. Naphthalene degrading genes on plasmid NAH7 are on a defective transposon. Mol. Gen. Genet. 223: 33-39.
- Tsuyoshi, T., Toshiyuki, N., Masayuki, N., Hisashi, I. and Kei, A. 2006. The incidence of bacterial spot of tea caused by *Acidovorax valerianellae*. Nippon Shokubutsu Byori Gakkaiho: In press.
- Vila, J., Lopez, Z., Sabate, J., Minguillon, C., Solanas, A. M., and Grifoll, M. 2001. Identification of a novel metabolite in the degradation of pyrene by *Mycobacterium* sp. strain AP1: actions of the isolate on two- and three-ring polycyclic aromatic hydrocarbons. Appl. Environ. Microbiol. 67: 5497-5505.
- Walter, U., Beyer, M., Klein, J., and Rehm, H.-J. (1991). Degradation of pyrene by *Rhodococcus* sp. UW1. Appl. Microbiol. Biotechnol 34: 671-676.
- Wattiau, Pierre. 2002. Microbial aspects in PAH bioremediation. Focus on Biotechnology 3: 2-22.

- Wilcke, W., Muller, Silke., Kanchanakool, N., Niamskul, C., and Zech, W. 1999. Polycyclic aromatic hydrocarbons in hydromorphic soils of the tropical metropolis Bangkok. Geoderma 91: 297-309.
- Wilson, S. C., and Jones, K. C. 1993. Bioremediation of soil contaminated with polynuclear aromatic hydrocarbons (PAHs): a review. Environ. Pollut. 81: 229-249.
- Yang, J.-H., Liu, H.-X., Zhu, G.-M., Pan, Y.-L., Xu, L.-P. and Guo, J.-H. 2008. Diversity analysis of antagonists from rice-associated bacteria and their application in biocontrol of rice diseases. J. Appl. Microbiol. 104: 91-104.
- Ye, D., Siddiqi, A., Maccubbin, A.E., Kumar, S., and Sikka, H.C. 1996. Degradation of polynuclear aromatic hydrocarbons by *Sphingomonas paucimobilis*. Environ.Sci.Technol. 30: 136-142.
- Yen, K. M., and Gunsalus, I. C. 1982. Plasmid gene organization: naphthalene/salicylate oxidation. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 79: 874-878.
- Yen, K.M., and Serdar, C.M. 1988. Genetics of naphthalene catabolism in pseudomonads. Crit. Rev. Microbiol. 15: 247-268.
- Young, C. C., Ho, M. J., Arun, A. B., Chen, W. M., Lai, W. A., Shen, F. T., Rekha, P. D., and Yassin, A. F. 2007. *Pseudoxanthomonas spadix* sp. nov., isolated from oil-contaminated soil. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 57: 1823-1827.
- Yu, K. S., Wong, A. H., Yau, K. W., Wong, Y. S., and Tam, N. F. 2005. Natural attenuation, biostimulation and bioaugmentation on biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in mangrove sediments. Mar. Pollut. Bull. 51: 1071-1077.
- Zhang, H., Kallimanis, A., Koukkou, A. I., and Drainas, C. 2004. Isolation and characterization of novel bacteria degrading polycyclic aromatic hydrocarbons from polluted Greek soils. Appl. Microbiol. Biotechnol. 65: 124-131.
- Zhou, N. Y., Fuenmayor, S. L., and Williams, P. A. 2001. *nag* genes of *Ralstonia* (formerly *Pseudomonas*) sp. strain U2 encoding enzymes for gentisate catabolism. J. Bacteriol. 183: 700-708.
- Zou, C.S., Mo, M.H., Gu, Y.Q., Zhou, J.P. and Zhang, K.Q. 2007. Possible contributions of volatile-producing bacteria to soil fungistasis. Soil Biol. Biochem. 39: 2371-2379.



ภาคผนวก

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ก

สูตรและวิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

อาหารเลี้ยงเชื้อ Luria-Bertani (LB)

ผงสกัดจากยีสต์ (Yeast extract)	5	กรัม
ทริปโตเนน (tryptone)	10	กรัม
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	10	กรัม

ละลายสารทั้งสามชนิดในน้ำกลั่นปรับความเป็นกรด-ด่าง ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) เข้มข้น 5 โมลาร์ (ภาคผนวก ข) จน pH เท่ากับ 7 และปรับปริมาตรสุดท้าย 1,000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 °ซ เป็นเวลา 15 นาที

อาหารเลี้ยงเชื้อแห้งละลายผงวุ้นหรือแบคโตอะการ์ 15 กรัม ต่ออาหาร 1,000 มิลลิลิตร ก่อนนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ

อาหารเลี้ยงเชื้อ Luria-Bertani (LB) เจือจาง 4 เท่า

นำอาหารเหลว LB ปริมาตร 250 มิลลิลิตร ผสมกับน้ำกลั่น 750 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 °ซ เป็นเวลา 15 นาที

อาหารเลี้ยงเชื้อแห้งละลายผงวุ้นหรือแบคโตอะการ์ 15 กรัม ต่ออาหาร 1,000 มิลลิลิตร ก่อนนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ

อาหารเลี้ยงเชื้อ Luria-Bertani (LB) เจือจาง 10 เท่า

นำอาหารเหลว LB ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ผสมกับน้ำกลั่น 900 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 °ซ เป็นเวลา 15 นาที

อาหารเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากแหล่งคาร์บอน (Carbon Free Mineral Medium, CFMM)

สารละลายส่วนที่ 1

แอมโมเนียมไนเตรต (NH_4NO_3)	3	กรัม
โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)	2.2	กรัม
ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)	0.8	กรัม

ปรับปริมาตรสุดท้าย 1,000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 °ซ เป็นเวลา 15 นาที

อาหารเลี้ยงเชื้อแข็งละลายผงวุ้นหรือแบคทีโอะการ์ 15 กรัม ต่ออาหาร 1,000 มิลลิลิตร ก่อนนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ

สารละลายส่วนที่ 2

เฟอร์ริสคลอไรด์ ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)	0.05	กรัม/มิลลิลิตร
แคลเซียมคลอไรด์ ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	0.05	กรัม/มิลลิลิตร
แมกนีเซียมซัลเฟต ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	0.1	กรัม/มิลลิลิตร

กำจัดเชื้อด้วยการกรองผ่านกระดาษกรองขนาด 0.22 ไมโครเมตร

สารละลายส่วนที่ 2 ชนิดละ 1 มิลลิลิตรต่อสารละลายส่วนที่ 1 1,000 มิลลิลิตร

อาหารเลี้ยงเชื้อ Ψ_b

ผงสกัดจากยีสต์ (Yeast extract)	5	กรัม
ทริปโตน (tryptone)	20	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟต ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	5	กรัม

ละลายสารทั้งสามชนิดในน้ำกลั่นปรับความเป็นกรด-ด่าง ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ เข้มข้น 5 โมลาร์ จน pH เท่ากับ 7 และปรับปริมาตรสุดท้าย 1,000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 °ซ เป็นเวลา 15 นาที

อาหารเลี้ยงเชื้อแข็งละลายผงวุ้นหรือแบคทีโอะการ์ 15 กรัม ต่ออาหาร 1,000 มิลลิลิตร ก่อนนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ

อาหารเลี้ยงเชื้อ SOC

สารละลายส่วนที่ 1

ผงสกัดจากยีสต์ (Yeast extract)	5	กรัม
ทริปโตน (tryptone)	20	กรัม
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	0.58	กรัม
แมกนีเซียมคลอไรด์ (MgCl)	2	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟต (MgSO ₄ ·7H ₂ O)	2.46	กรัม
โพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl)	0.18	กรัม

ละลายสารทั้งหมดในน้ำกลั่นปรับความเป็นปริมาตรสุดท้าย 980 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 °ซ เป็นเวลา 15 นาที

สารละลายส่วนที่ 2

กลูโคส	3.6	กรัม
น้ำปลอดประจุ	20	มิลลิลิตร

กำจัดเชื้อด้วยการกรองผ่านกระดาษกรองขนาด 0.22 ไมครอนเมตร

ผสมสารละลายทั้ง 2 ส่วน เก็บรักษาที่ -20°ซ

ภาคผนวก ข

สูตรและวิธีการเตรียมสารละลาย

เอทานอล 70%

เอทานอล 99%	700	มิลลิลิตร
น้ำกลั่นปลอดประจุ	300	มิลลิลิตร

10% โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต (sodium dodecyl sulfate, SDS)

Sodium lauryl sulfate	10	กรัม
-----------------------	----	------

ค่อยๆ ละลายในน้ำปลอดประจุอุณหภูมิ 60°C ปริมาตร 80 มิลลิลิตร เมื่อละลายหมด เติมน้ำปลอดประจุจนเป็นปริมาตร 100 มิลลิลิตร นิ่งงาด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 °C เป็นเวลา 15 นาที

สารละลาย Triton x-100 15%

Triton x-100	15	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	85	มิลลิลิตร

สารละลายโปรตีนเนสเค (proteinase K)

โปรตีนเนสเค (proteinase K)	10	มิลลิกรัม
น้ำปลอดประจุและเชื้อ	1	มิลลิลิตร

สารละลาย Tris-HCl pH 8 เข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์

Trizma base ($C_4H_{11}NO_3$)	1.2	กรัม
---------------------------------	-----	------

ละลายในน้ำปลอดประจุปริมาตร 800 มิลลิลิตร จากนั้นปรับค่าความเป็นกรด-ด่างเป็น 8.0 ด้วย กรดไฮโดรคลอริก (HCl) เติมน้ำปลอดประจุให้เป็นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร นิ่งงาด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 °C เป็นเวลา 15 นาที

สารละลาย EDTA เข้มข้น 0.5 โมลาร์

EDTA ($C_{10}H_{14}O_8Na_2 \cdot 2H_2O$)	186.1	กรัม
โซเดียมไฮดรอกไซด์	20	กรัม

ละลาย EDTA ในน้ำปลอดประจุปริมาตร 800 มิลลิลิตร จากนั้นเติมเกล็ดโซเดียมไฮดรอกไซด์คนให้เข้ากัน รอให้เย็นลงแล้วจึงปรับค่าความเป็นกรด-ด่างเป็น 8.0 เติมน้ำปลอดประจุให้เป็นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร หนึ่งชั่วโมงด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 °ซ เป็นเวลา 15 นาที

บัฟเฟอร์ TE

Tris-HCl pH 8 เข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์	10	มิลลิลิตร
EDTA pH 8.0 เข้มข้น 0.1 มิลลิโมลาร์	0.2	มิลลิลิตร

เติมน้ำปลอดประจุให้เป็นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร หนึ่งชั่วโมงด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 °ซ เป็นเวลา 15 นาที

สารละลายไลโซไซม์ (Lysozyme)

ไลโซไซม์ (Lysozyme)	60	มิลลิกรัม
บัฟเฟอร์ TE	1	มิลลิลิตร

สารละลายโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 5 โมลาร์

โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	29.2	กรัม
-----------------------	------	------

ละลายในน้ำปลอดประจุจนปริมาตรสุดท้ายเป็น 100 มิลลิลิตร หนึ่งชั่วโมงด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 °ซ เป็นเวลา 15 นาที

สารละลาย CTAB/NaCl (Hexadecyl trimethyl ammoniumbromide/sodium chloride)

โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	4.1	กรัม
CTAB	10	กรัม

ละลาย CTAB ในน้ำปลอดประจุอุณหภูมิ 65 °ซ ปริมาตร 80 มิลลิลิตร จากนั้นเติมโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.7 โมลาร์ เมื่อละลายหมดเติมน้ำปลอดประจุจนเป็นปริมาตร 100 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 °ซ เป็นเวลา 15 นาที

สารละลายคลอโรฟอร์ม/ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์

ผสมคลอโรฟอร์มกับไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ ในอัตราส่วน 24 :1 (ปริมาตร ต่อปริมาตร) เก็บที่อุณหภูมิ 4 °ซ

สารละลายฟีนอล/คลอโรฟอร์ม

เตรียมสารละลายฟีนอลอิมิตัวในบัฟเฟอร์ Tris-HCl โดยละลายฟีนอลในอ่างน้ำอุณหภูมิ 68 °ซ จากนั้นเติมผง hydroxyquinoline ให้ได้ความเข้มข้น 0.1% (น้ำหนัก/น้ำหนัก) เติมสารละลาย Tris-HCl pH 8.0 เข้มข้นเป็น 0.5 โมลาร์ ปริมาตร 1 เท่าคนด้วยแท่งแม่เหล็กเป็นเวลา 15 นาที ทิ้งให้แยกชั้น ดูดชั้นน้ำส่วนบนออก เติมสารละลาย Tris-HCl pH 8.0 เข้มข้นเป็น 0.1 โมลาร์ ปริมาตร 1 เท่าคนด้วยแท่งแม่เหล็กเป็นเวลา 15 นาที ทิ้งให้แยกชั้น ดูดชั้นน้ำส่วนบนออก ทำขั้นนี้หลายๆ ครั้งด้วย Tris-HCl pH 8.0 เข้มข้นเป็น 0.1 โมลาร์ จนค่าความเป็นกรดต่างของฟีนอลมากกว่า 7.8 สุดท้ายเติมสารละลาย Tris-HCl pH 8.0 เข้มข้นเป็น 0.1 โมลาร์ ที่ผสม β -mercaptoethanol เข้มข้น 0.2% ปริมาตร 0.1 เท่าของฟีนอลที่เตรียมได้ เก็บในขวดสีชาที่อุณหภูมิ 4 °ซ ผสมฟีนอลที่เตรียมได้กับคลอโรฟอร์ม ในอัตราส่วน 25:25 (ปริมาตรต่อ ปริมาตร) เก็บในขวดสีชาที่อุณหภูมิ 4 °ซ

บัฟเฟอร์ TAE เข้มข้น 50 เท่า

Tris-HCl	242	กรัม
EDTA pH 8.0 เข้มข้น 0.5 โมลาร์	100	มิลลิลิตร
กรดอะซิติกเข้มข้น	57.1	มิลลิลิตร

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำปลอดประจุปริมาตร 800 มิลลิลิตร แล้วเติมน้ำปลอดประจุให้เป็นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร นิ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 °ซ เป็นเวลา 15 นาที

อะกาโรสเจลเข้มข้น 0.7%

อะกาโรสเจล	0.7	กรัม
บัฟเฟอร์ TAE เข้มข้น 1 เท่า	100	มิลลิลิตร

หลอมให้เข้ากันด้วยไมโครเวฟหรือการต้มให้ความร้อน

อะกาโรสเจลเข้มข้น 0.9%

อะกาโรสเจล	0.9	กรัม
บัฟเฟอร์ TAE เข้มข้น 1 เท่า	100	มิลลิลิตร

หลอมให้เข้ากันด้วยไมโครเวฟหรือการต้มให้ความร้อน

อะกาโรสเจลเข้มข้น 1.5%

อะกาโรสเจล	1.5	กรัม
บัฟเฟอร์ TAE เข้มข้น 1 เท่า	100	มิลลิลิตร

หลอมให้เข้ากันด้วยไมโครเวฟหรือการต้มให้ความร้อน

สารละลายเอธิเดียมโบรไมด์เข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

เอธิเดียมโบรไมด์	0.1	มิลลิกรัม
น้ำกลั่น	10	มิลลิลิตร

ละลายให้เข้ากันเก็บในภาชนะปิดสนิทในที่มืด (ขณะเตรียมควรสวมถุงมือป้องกัน เนื่องจากเอธิเดียมโบรไมด์เป็นสารก่อมะเร็ง)

สารปฏิชีวนะแอมพิซิลิน (Ampicilin, Ap)

แอมพิซิลิน	100	มิลลิกรัม
น้ำปลอดประจุ	1	มิลลิลิตร

กำจัดเชื้อด้วยการกรองผ่านหัวกรองสำเร็จรูปขนาด 0.22 ไมโครเมตร

2% 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactoside (X-gal)

X-gal	20	มิลลิกรัม
ไดเมทิลฟอร์มาไมด์ (DMF)	1	มิลลิลิตร

กำจัดเชื้อด้วยการกรองผ่านชุดกรองสำเร็จรูปชนิด PTFE ขนาด 0.2 ไมโครเมตร

isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside (IPTG) เข้มข้น 1 โมลาร์

IPTG	238	มิลลิกรัม
น้ำปลอดประจุ	1	มิลลิลิตร

กำจัดเชื้อด้วยการกรองผ่านหัวกรองสำเร็จรูปขนาด 0.22 ไมโครเมตร

สารละลาย PAHs ได้แก่ อะซีแนพทีน พีแนนทีน แอนทราซีน ฟลูออรีน ไพรีน และ ฟลูออแรนทีน เข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (10,000 มิลลิกรัมต่อลิตร)

สารประกอบ PAHs	0.1	กรัม
ไดเมทิลฟอร์มาไมด์ (DMF)	10	มิลลิลิตร

กำจัดเชื้อด้วยการกรองผ่านชุดกรองสำเร็จรูปชนิด PTFE ขนาด 0.2 ไมโครเมตร

สารละลาย PAHs ได้แก่ แนพธาซีนและอะซีแนพทีนเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (100,000 มิลลิกรัมต่อลิตร)

สารประกอบ PAHs	1	กรัม
ไดเมทิลฟอร์มาไมด์ (DMF)	10	มิลลิลิตร

กำจัดเชื้อด้วยการกรองผ่านชุดกรองสำเร็จรูปชนิด PTFE ขนาด 0.2 ไมโครเมตร

สารละลาย PAHs ได้แก่ ไครซีนและเบนโซ(เอ)ไพรีนเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (2,000 มิลลิกรัมต่อลิตร)

สารประกอบ PAHs	0.02	กรัม
ไดเมทิลฟอร์มาไมด์ (DMF)	10	มิลลิลิตร

กำจัดเชื้อด้วยการกรองผ่านชุดกรองสำเร็จรูปชนิด PTFE ขนาด 0.2 ไมโครเมตร

สารละลาย TfbI

โพแทสเซียมอะซิเตด (CH_3COOK)	0.295	กรัม
รูบิเดียมคลอไรด์ (RbCl)	1.21	กรัม
แคลเซียมคลอไรด์ ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	0.148	กรัม
แมงกานีสคลอไรด์ (MnCl_2)	0.99	กรัม
กลีเซอรอล	15	มิลลิลิตร

ละลายสารในน้ำกลั่น 70 มิลลิลิตร ปรับความเป็นกรด-ด่าง ด้วยกรดอะซิติกเข้มข้น 0.2 โมลาร์ จน pH เท่ากับ 5.8 ด้วย และปรับปริมาตรสุดท้าย 100 มิลลิลิตร กำจัดเชื้อด้วยการกรองผ่านกระดาษกรองขนาด 0.22 ไมโครเมตร

สารละลาย TfbII

2-[N-morpholino]ethanesulfonic acid (MES)	0.29	กรัม
รูบิเดียมคลอไรด์ (RbCl)	0.121	กรัม
แคลเซียมคลอไรด์ ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	1.103	กรัม
กลีเซอรอล	15	มิลลิลิตร

ปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 100 มิลลิลิตร กำจัดเชื้อด้วยการกรองผ่านกระดาษกรองขนาด 0.22 ไมครอนเมตร

ชุดติดฉลากและติดตามตำแหน่งดีเอ็นเอ DIG High Prime DNA labeling and detection starter kit (Roche, Germany)

ประกอบด้วย

หลอดหมายเลข 1	DIG-High Prime, 5× conc.
หลอดหมายเลข 2	DIG-labeled control DNA 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร
หลอดหมายเลข 3	DNA dilution buffer
หลอดหมายเลข 4	Anti-Digoxigenin-AP Conjugate 750 อนุตต่อมิลลิลิตร
หลอดหมายเลข 5	NBT/BCIP, 50× conc.
หลอดหมายเลข 6	Blocking solution, 10×
หลอดหมายเลข 7	DIG Easy Hyb Granules

สารละลาย Buffer1 (Maleic acid buffer)

กรดมาเลอิก	0.1 โมลาร์
โซเดียมคลอไรด์	0.15 โมลาร์

ผสมสารทั้งหมดเข้าด้วยกันในน้ำปลอดประจุปริมาตร 800 มิลลิลิตร ปรับความเป็นกรด-ด่างด้วยเกล็ดโซเดียมไฮดรอกไซด์เป็น 7.5 เติมน้ำปลอดประจุจนเป็นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 15 นาที

Buffer2

สารละลาย 10× blocking solution ใน Buffer1 ที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้วด้วยอัตราส่วน 1 ต่อ 9 (ปริมาตรต่อปริมาตร)

Buffer3 (Detection buffer)

Trismabase	0.1 โมลาร์
โซเดียมคลอไรด์	0.1 โมลาร์

ผสมสารทั้งหมดเข้าด้วยกันในน้ำปลอดประจุปริมาตร 800 มิลลิลิตร ปรับความเป็นกรด-ด่างด้วยเกลือโซเดียมไฮดรอกไซด์เป็น 9.5 เติมน้ำปลอดประจุจนเป็นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 15 นาที

Denaturation buffer

โซเดียมไฮดรอกไซด์	0.5 โมลาร์
โซเดียมคลอไรด์	1.5 โมลาร์

ละลายโซเดียมคลอไรด์ในน้ำปลอดประจุปริมาตร 800 มิลลิลิตร จนหมดแล้วจึงละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ เติมน้ำปลอดประจุจนครบปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 15 นาที

Neutralization buffer

Trismabase	0.5 โมลาร์
โซเดียมคลอไรด์	3.0 โมลาร์

ละลายโซเดียมคลอไรด์ในน้ำปลอดประจุปริมาตร 800 มิลลิลิตร ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างเป็น 7.0 ด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น เติมน้ำปลอดประจุจนครบปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 15 นาที

สารละลาย 20×SSC

โซเดียมคลอไรด์	3.0 โมลาร์
โซเดียมอะซิเตท	0.3 โมลาร์

ผสมสารทั้งหมดเข้าด้วยกันในน้ำปลอดประจุปริมาตร 800 มิลลิลิตร ปรับความเป็นกรด-ด่างเป็น 7.0 เติมน้ำปลอดประจุจนเป็นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 15 นาที

สารละลาย 2×SSC

ละลาย 20×SSC ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ในน้ำปลอดประจุให้ครบปริมาตร 100 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 15 นาที

สารละลาย 0.5×SSC/0.1%SDS

ละลาย 20×SSC ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร ในน้ำปลอดประจุ 96.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นเติมสารละลาย 10%SDS ปริมาตร 1 มิลลิลิตร

สารละลาย 2×SSC/0.1%SDS

ละลาย 20×SSC ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ในน้ำปลอดประจุ 89 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นเติมสารละลาย 10%SDS ปริมาตร 1 มิลลิลิตร

สารละลายโซเดียมอะซีเตทเข้มข้น 3 โมลาร์

ละลายโซเดียมอะซีเตทน้ำหนัก 204 กรัม ในน้ำปลอดประจุให้ได้ปริมาตร 400 มิลลิลิตร นำไปปรับค่าความเป็นกรด-ด่างให้เป็น 5.2 ด้วยกรดอะซีติกปริมาตรประมาณ 57 มิลลิลิตร เติมน้ำปลอดประจุให้ได้ปริมาตรครบ 500 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 15 นาที

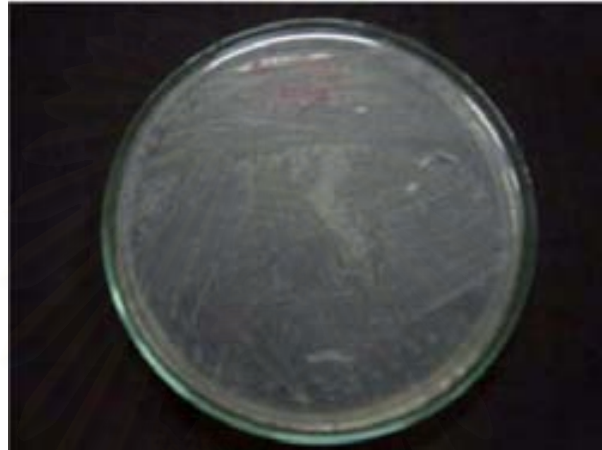
Lysis solution สำหรับสกัดเมกะพลาสมิด

ผสม Trismabase ความเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 5 มิลลิลิตร กับสารละลาย 10%SDS ปริมาตร 3 มิลลิลิตร และเติมน้ำปลอดประจุ 2 มิลลิลิตร

ภาคผนวก ค

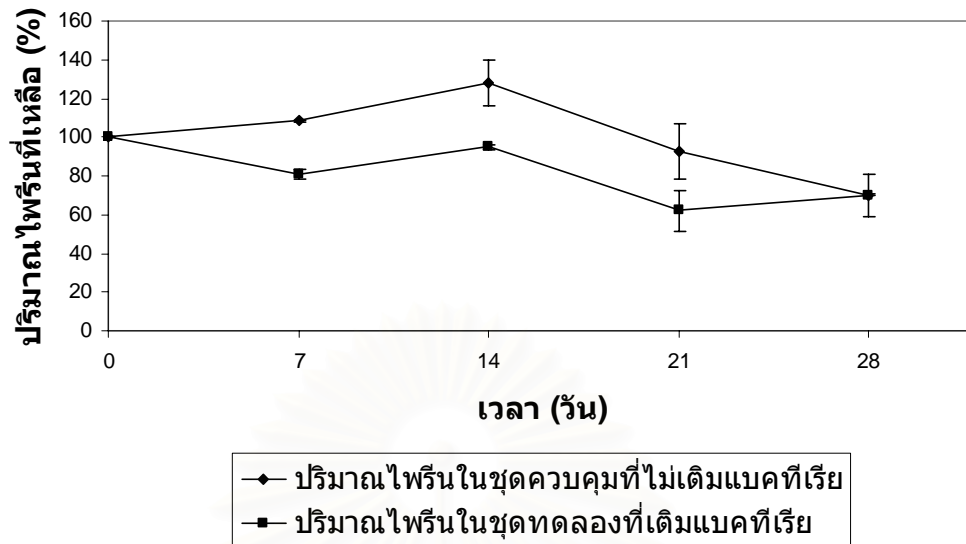
ผลการตัดแยกกลุ่มแบคทีเรีย NT

กลุ่มแบคทีเรียถูกตัดแยกมาจากตัวอย่างที่อยู่ใกล้ปั๊มน้ำมัน จังหวัดนครปฐม ตั้งชื่อว่ากลุ่มแบคทีเรีย NT โดยลักษณะของโคโลนีที่สร้างบริเวณใส แสดงดังรูปที่ ค.1

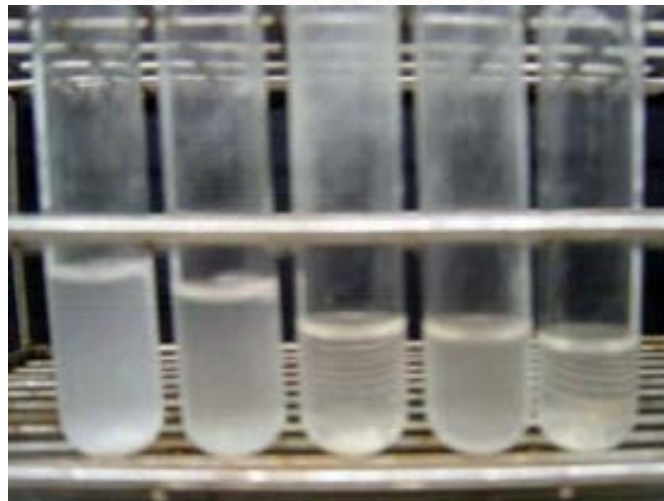


รูปที่ ค.1 ลักษณะโคโลนีของกลุ่มแบคทีเรีย NT ที่สร้างบริเวณใสเมื่อเลี้ยงบนอาหารแข็ง CFMM ที่พ่นทับด้วยไฟรินเป็นเวลา 21 วัน

เมื่อทำการศึกษาประสิทธิภาพการย่อยสลายไฟรินของกลุ่มแบคทีเรีย NT พบว่าเมื่อเลี้ยงกลุ่มแบคทีเรีย NT ในอาหารเหลว CFMM ที่เติมไฟริน เป็นเวลา 28 วัน มีปริมาณไฟรินเหลืออยู่ประมาณ 70.23% แสดงดังรูปที่ ค.2 และเมื่อสังเกตลักษณะของอาหารเหลวพบว่า อาหารเหลวมีการเปลี่ยนสีจากขาวขุ่นด้วยไฟรินไปเป็นสีเหลืองส้มอ่อนๆ แสดงดังรูปที่ ค.3



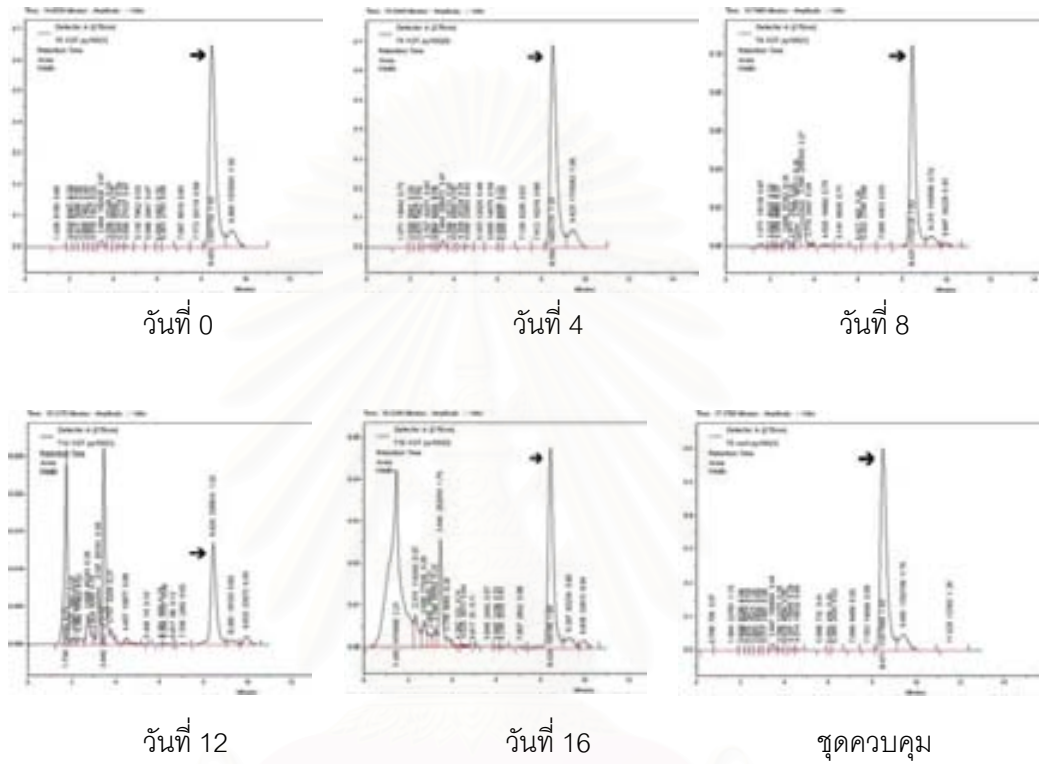
รูปที่ ค.2 ปริมาณโปรตีนที่เหลือ ณ เวลาต่างๆ เมื่อทำการเลี้ยงกลุ่มแบคทีเรีย NT



รูปที่ ค.3 การเปลี่ยนสีของอาหารเหลว CFMM ที่มีโปรตีน ณ เวลาต่างๆ เมื่อทำการเลี้ยงกลุ่มแบคทีเรีย NT

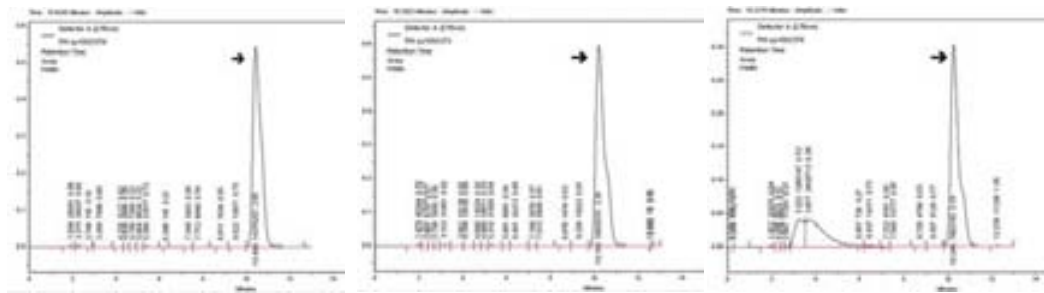
ภาคผนวก ง

HPLC โครมาโตแกรม



รูปที่ ง.1 HPLC โครมาโทแกรมของไพรีนิกซินที่เหลือหลังจากการเลี้ยงกลุ่มแบคทีเรีย KOT เป็นเวลา 16 วัน เปรียบเทียบกับชุดควบคุม (ลูกศรคือพีคของไพรีนิกซินที่ R_t 8.5)

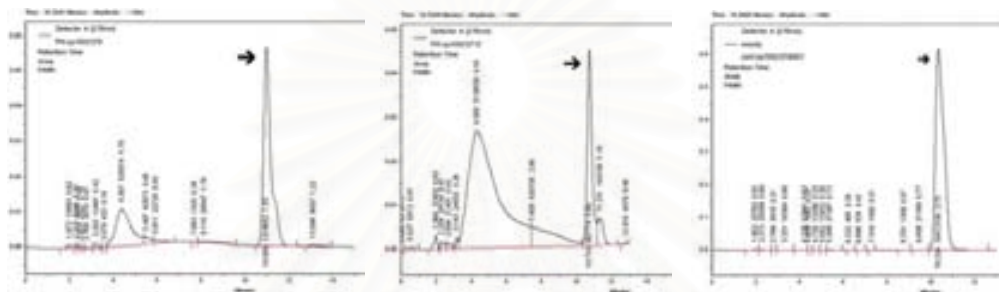
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



วันที่ 0

วันที่ 3

วันที่ 6



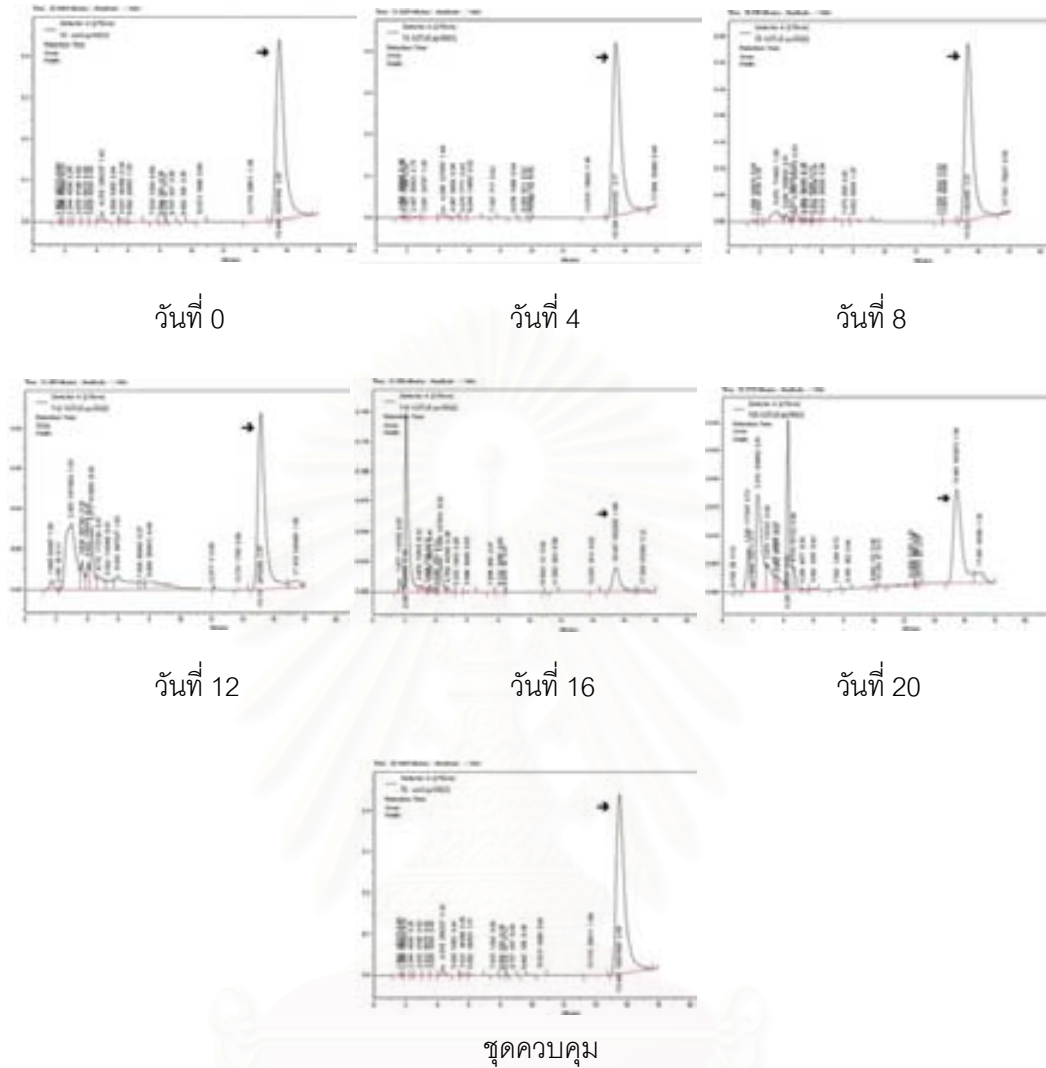
วันที่ 9

วันที่ 12

ชุดควบคุม

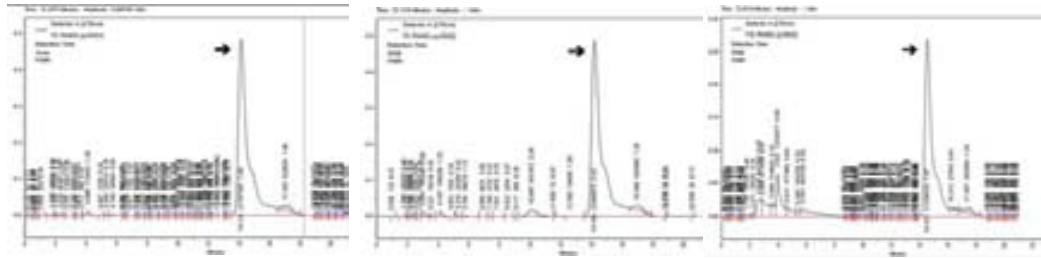
รูปที่ ง.2 HPLC โคโรมาโทแกรมของไพรีนที่เหลือหลังจากการเลี้ยงกลุ่มแบคทีเรีย RN เป็นเวลา 12 วัน เปรียบเทียบกับชุดควบคุม (ลูกศรคือพีคของไพรีนที่ R₁₀)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 3 HPLC โคโรมาโทแกรมของโพลียูรีเทนที่เหลือหลังจากการเลี้ยง *Diaphorobacter* sp. สายพันธุ์ KOTLB เป็นเวลา 20 วัน เปรียบเทียบกับชุดควบคุม (ลูกศรคือพีคของโพลียูรีเทนที่ R_t15)

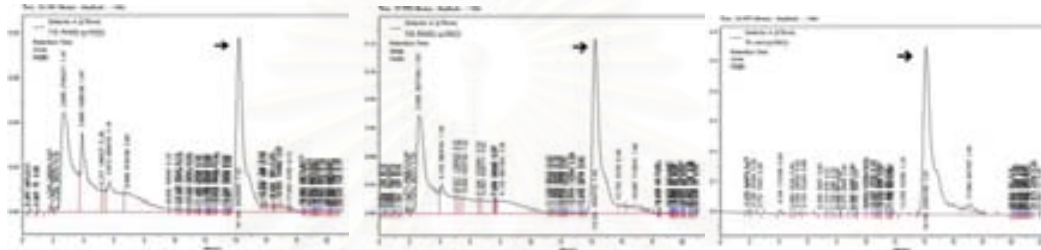
สถาบันวิจัยบวร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



วันที่ 0

วันที่ 5

วันที่ 10



วันที่ 15

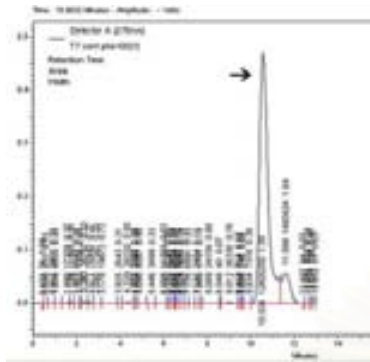
วันที่ 20

ชุดควบคุม

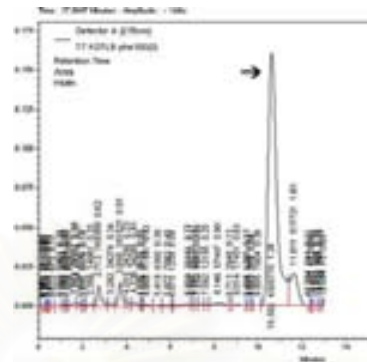
รูปที่ ง.4 HPLC โครมาโทแกรมของไฟรีนที่เหลื่อหลังจากการเลี้ยง *Pseudoxanthomonas* sp. สายพันธุ์ RN402 เป็นเวลา 20 วัน เปรียบเทียบกับชุดควบคุม (ลูกศรคือพีคของไฟรีนที่ R₁₄)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ฟีแนนทริน

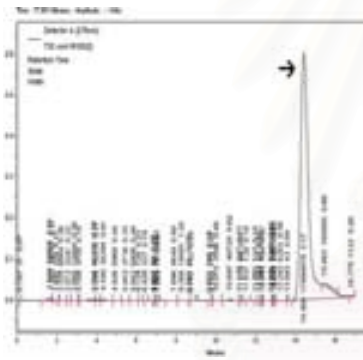


ชุดควบคุม

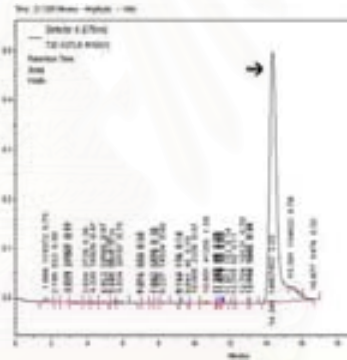


ชุดทดลอง

ฟลูออแรนธิน



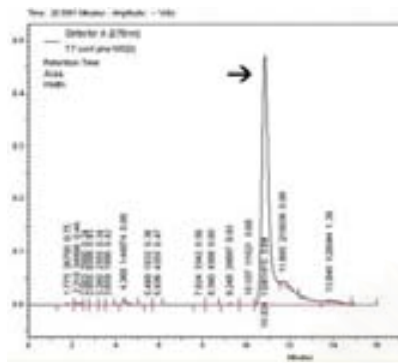
ชุดควบคุม



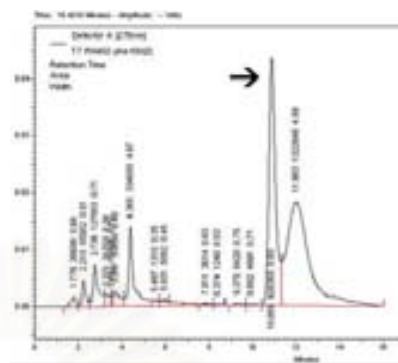
ชุดทดลอง

รูปที่ ง.5 HPLC โคโรมาโทแกรมของฟีแนนทรินและฟลูออแรนธินที่เหลือหลังจากการเลี้ยง *Diaphorobacter* sp. สายพันธุ์ KOTLB เป็นเวลา 7 วัน และ 30 วัน ตามลำดับ เปรียบเทียบกับชุดควบคุม (ลูกศรคือพีคของฟีแนนทรินที่ R_t 10.5 และฟลูออแรนธินที่ R_t 14.4)

ฟีแนนทรีน

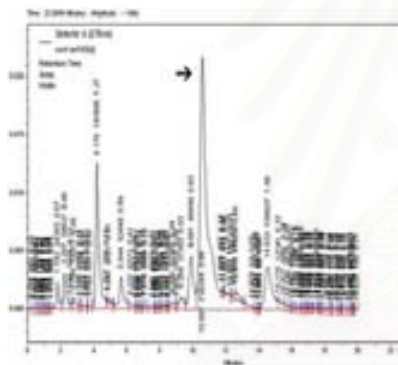


ชุดควบคุม

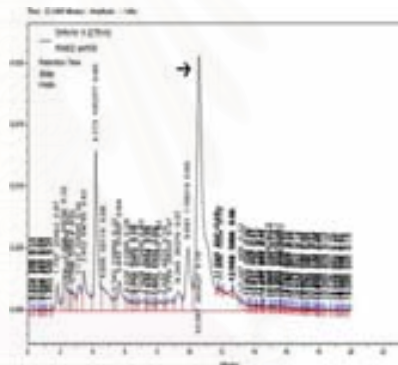


ชุดทดลอง

แอนทราซีน



ชุดควบคุม

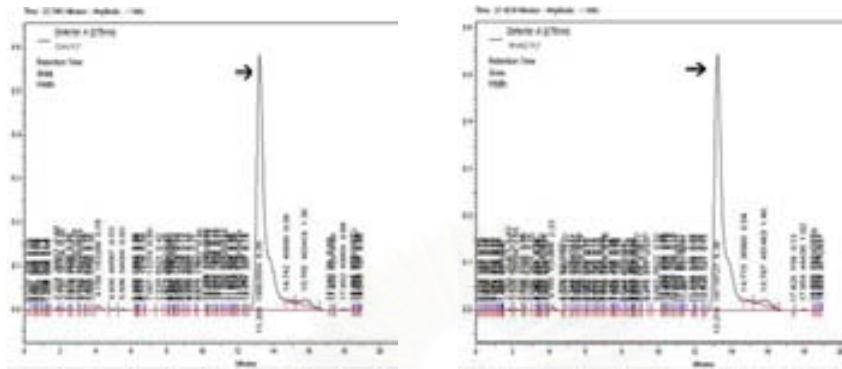


ชุดทดลอง

รูปที่ ง.6 HPLC โครมาโทแกรมของฟีแนนทรีนและแอนทราซีนที่เหลือหลังจากการเลี้ยง *Pseudoxanthomonas* sp. สายพันธุ์ RN402 เป็นเวลา 7 วัน และ 20 วัน ตามลำดับ เปรียบเทียบกับชุดควบคุม (ลูกศรคือพีคของฟีแนนทรีนที่ R_t 10.8 และแอนทราซีนที่ R_t 10.5)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ฟลูออแรนธิน



ชุดควบคุม

ชุดทดลอง

รูปที่ ง.6 (ต่อ) HPLC โครมาโทแกรมของฟลูออแรนธินที่เหลือหลังจากการเลี้ยง *Pseudoxanthomonas* sp. สายพันธุ์ RN402 เป็นเวลา 30 วัน เปรียบเทียบกับชุดควบคุม (ลูกศร คือพีคของฟลูออแรนธินที่ R_t13.2)

ภาคผนวก จ

ข้อมูลดิบ

ตารางที่ จ.1 ปริมาณไฟรินที่เหลือในอาหารเหลว CFMM ที่มีไฟรินความเข้มข้นสุดท้าย 100 มิลลิกรัมต่อลิตร หลังจากเลี้ยงกลุ่มแบคทีเรีย KOT ณ เวลาต่างๆ

วันที่	% ปริมาณไฟรินที่เหลือในชุดควบคุม	% ปริมาณไฟรินที่เหลือในชุดทดลอง	% ปริมาณไฟรินที่เหลือในชุดควบคุม (เฉลี่ย)	% ปริมาณไฟรินที่เหลือในชุดทดลอง (เฉลี่ย)	ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) ในชุดควบคุม	ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) ในชุดทดลอง
0	100.00 100.00 100.00	100.00 100.00 100.00	100.00	100.00	0.00	0.00
4	88.35 114.69 90.42	107.92 122.02 115.97	97.82	115.30	14.65	7.07
8	98.84 95.81 98.69	15.22 7.63	97.78	11.43	1.71	5.37
12	104.94 104.3 106.71	15.22 8.31 5.86	105.32	9.80	1.25	4.85
16	103.08 100.13 108.05	17.45 4.52 6.91	103.75	3.25	4.00	6.88

ตารางที่ ๑.2 ปริมาณไฟรินที่เหลือในอาหารเหลว CFMM ที่มีไฟรินความเข้มข้นสุดท้าย 100 มิลลิกรัมต่อลิตร หลังจากเลี้ยงกลุ่มแบคทีเรีย RN ณ เวลาต่างๆ

วันที่	% ปริมาณไฟรินที่เหลือในชุดควบคุม	% ปริมาณไฟรินที่เหลือในชุดทดลอง	% ปริมาณไฟรินที่เหลือในชุดควบคุม (เฉลี่ย)	% ปริมาณไฟรินที่เหลือในชุดทดลอง (เฉลี่ย)	ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) ในชุดควบคุม	ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) ในชุดทดลอง
0	100.00 100.00 100.00	100.00 100.00 100.00	100.00	100.00	0.00	0.00
3	75.05 86.03 87.81	112.88 95.80 101.18	82.96	103.29	6.91	8.73
6	86.97 93.16 92.29	52.45 35.50 57.58	90.81	48.51	3.35	3.35
9	96.53 113.13 100.22	8.77 8.81	103.29	8.79	8.72	0.03
12	86.04 89.45 81.08	5.79 4.42 3.36	85.52	4.52	4.21	1.22

ตารางที่ ๑.3 ปริมาณไฟรินที่เหลือในอาหารเหลว CFMM ที่มีไฟรินความเข้มข้นสุดท้าย 100 มิลลิกรัมต่อลิตร หลังจากเลี้ยง *Diaphorobacter* sp. สายพันธุ์ KOTLB ณ เวลาต่างๆ

วันที่	% ปริมาณไฟรินที่เหลือในชุดควบคุม	% ปริมาณไฟรินที่เหลือในชุดทดลอง	% ปริมาณไฟรินที่เหลือในชุดควบคุม (เฉลี่ย)	% ปริมาณไฟรินที่เหลือในชุดทดลอง (เฉลี่ย)	ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) ในชุดควบคุม	ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) ในชุดทดลอง
0	100.00 100.00 100.00	100.00 100.00 100.00	100.00	100.00	0.00	0.00
4	97.70 94.05 93.13	116.21 124.21 113.82	94.95	118.1	2.42	5.44
8	98.50 97.20 101.18	47.78 88.71 74.61	98.96	70.37	2.03	20.79
12	95.09 96.82 104.88	32.19 22.02 17.55	98.93	23.92	5.22	7.50
16	94.53 92.31 93.27	1.98 4.99 21.02	93.37	9.33	1.11	10.24
20	99.99 94.92 96.82	5.01 3.41 17.90	97.24	8.77	2.56	7.94

ตารางที่ ๑.4 ปริมาณไฟรินที่เหลือในอาหารเหลว CFMM ที่มีไฟรินความเข้มข้นสุดท้าย 100 มิลลิกรัมต่อลิตร หลังจากเลี้ยง *Pseudoxanthomonas* sp. สายพันธุ์ RN402 ณ เวลาต่างๆ

วันที่	% ปริมาณไฟรินที่เหลือในชุดควบคุม	% ปริมาณไฟรินที่เหลือในชุดทดลอง	% ปริมาณไฟรินที่เหลือในชุดควบคุม (เฉลี่ย)	% ปริมาณไฟรินที่เหลือในชุดทดลอง (เฉลี่ย)	ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) ในชุดควบคุม	ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) ในชุดทดลอง
0	100.00 100.00 100.00	100.00 100.00 100.00	100.00	100.00	0.00	0.00
5	99.06 95.50 101.12	88.97 97.20 93.20	98.56	97.20	2.91	4.12
10	97.14 102.34 98.16	63.48 26.36 48.78	99.21	46.21	5.81	18.69
15	88.09 99.92 92.21	11.85 59.20 13.13	99.92	28.06	6.01	26.96
20	90.57 94.00 95.44	21.03 15.81 66.26	93.34	34.37	2.50	27.74

ตารางที่ ๑.5 ปริมาณ PAHs ที่เหลือในอาหารเหลว CFMM ที่มี PAHs ความเข้มข้นสุดท้าย 100 มิลลิกรัมต่อลิตร หลังจากเลี้ยง *Diaphorobacter* sp. สายพันธุ์ KOTLB

ชนิดของ PAHs	% ปริมาณ PAHs ที่เหลือในชุดควบคุม	% ปริมาณ PAHs ที่เหลือในชุดทดลอง	% ปริมาณ PAHs ที่เหลือในชุดควบคุม (เฉลี่ย)	% ปริมาณ PAHs ที่เหลือในชุดทดลอง (เฉลี่ย)	ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) ในชุดควบคุม	ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) ในชุดทดลอง
แนพธาลีน	85.58 68.01 81.17	92.97 79.6 80.73	78.25	84.43	7.41	9.14
อะซีแนพทีน	29.65 29.1 32.59	27.4 29.07 38.38	30.44	31.61	1.88	5.92
แอนทราซีน	90.19 83.45 78.71	89.7 96.89 86.41	84.11	91.0	5.46	5.77
อะซีแนพทีลิน	72.2 67.47 66.05	68.14 67.6 70.04	68.57	60.47	1.28	3.22
ฟลูออรีน	81.97 82.17 74.1	79.31 78.14 67.71	79.41	75.05	4.60	6.39
พีแนนทีน	94.51 93.34 92.15	45.0 31.78 0.44	93.34	25.74	1.18	22.89

ตารางที่ ๑.5 (ต่อ) แสดงปริมาณ PAHs ที่เหลือในอาหารเหลว CFMM ที่มี PAHs ความเข้มข้นสุด
ท้าย 100 มิลลิกรัมต่อลิตร หลังจากเลี้ยง *Diaphorobacter* sp. สายพันธุ์ KOTLB

ชนิดของ PAHs	% ปริมาณ PAHs ที่เหลือในชุดควบคุม	% ปริมาณ PAHs ที่เหลือในชุดทดลอง	% ปริมาณ PAHs ที่เหลือในชุดควบคุม (เฉลี่ย)	% ปริมาณ PAHs ที่เหลือในชุดทดลอง (เฉลี่ย)	ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) ในชุดควบคุม	ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) ในชุดทดลอง
ฟลูออแรนทีน	78.74 75.12 80.18	67.22 68.46 69.22	78.01	68.3	2.61	1.01
โครซีน	102.56 100.41 97.02	105.79 91.11 88.17	100.00	95.02	2.80	9.44
เบนโซ[เอ]ไพรีน	94.96 104.25 100.80	92.89 78.56 80.10	100.00	83.84	7.87	4.69

ตาราง ๑.6 จำนวน *Diaphorobacter* sp. สายพันธุ์ KOTLB ในอาหารเหลว CFMM ที่มีไพรีน ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 100 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยการวิเคราะห์ด้วยวิธี Viable plate count (CFU ต่อมิลลิลิตร)

วันที่	ชุดควบคุม (CFUต่อมล.)	ชุดทดลอง (CFU ต่อมล.)	ชุดควบคุม (เฉลี่ย)	ชุดทดลอง (เฉลี่ย)
0	5.55×10 ⁶ 5.15×10 ⁶ 6.10×10 ⁶	3.15×10 ⁶ 4.00×10 ⁶ 6.30×10 ⁶	5.60×10 ⁶	4.5×10 ⁶
4	1.435×10 ⁷ 1.31×10 ⁷ 1.13×10 ⁷	3.65×10 ⁶ 9.35×10 ⁶ 8.45×10 ⁶	1.30×10 ⁷	7.40×10 ⁶
8	9.60×10 ⁶ 7.25×10 ⁶ 1.05×10 ⁷	8.80×10 ⁶ 5.05×10 ⁶ 5.05×10 ⁶	9.20×10 ⁶	6.30×10 ⁶
12	1.02×10 ⁷ 9.70×10 ⁶ 1.05×10 ⁷	1.215×10 ⁷ 1.165×10 ⁷ 1.675×10 ⁶	1.00×10 ⁷	1.36×10 ⁷
16	9.05×10 ⁶ 1.56×10 ⁷ 1.285×10 ⁷	1.94×10 ⁷ 1.425×10 ⁶ 9.45×10 ⁶	1.25×10 ⁷	1.44×10 ⁷
20	1.825×10 ⁷ 1.325×10 ⁷	1.625×10 ⁶ 1.61×10 ⁶ 1.05×10 ⁶	1.58×10 ⁷	1.43×10 ⁷

ตาราง ๑.7 จำนวน *Diaphorobacter* sp. สายพันธุ์ KOTLB ในอาหารเหลว CFMM ที่มีไพริน ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 100 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยการวิเคราะห์ด้วยวิธี Viable plate count (log CFU ต่อมิลลิลิตร)

วันที่	ชุดควบคุม (log CFU ต่อมล.)	ชุดทดลอง (log CFU ต่อมล.)	ชุดควบคุม (เฉลี่ย)	ชุดทดลอง (เฉลี่ย)	ส่วน เบี่ยงเบน มาตรฐาน (SD) ในชุด ควบคุม	ส่วน เบี่ยงเบน มาตรฐาน (SD) ในชุด ทดลอง
0	6.744 6.708 6.785	6.498 6.602 6.800	6.746	6.663	0.04	0.15
4	7.157 7.117 7.053	6.562 6.971 6.927	7.109	6.820	0.05	0.22
8	6.982 6.860 7.021	6.944 6.703 6.703	6.954	6.783	0.08	0.14
12	7.009 6.987 7.002	7.085 7.066 7.224	6.999	7.125	0.01	0.09
16	6.957 7.193 7.109	7.288 7.154 6.975	7.086	7.139	0.12	0.16
20	7.261 7.122	7.211 7.207 7.021	7.192	7.146	0.10	0.11

ตาราง ๑.8 จำนวน *Pseudoxanthomonas* sp. สายพันธุ์ RN402 ในอาหารเหลว CFMM ที่มีไพรีน ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 100 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยการวิเคราะห์ด้วยวิธี Viable plate count (CFU ต่อมิลลิลิตร)

วันที่	ชุดควบคุม (CFUต่อมล.)	ชุดทดลอง (CFU ต่อมล.)	ชุดควบคุม (เฉลี่ย)	ชุดทดลอง (เฉลี่ย)
0	8.10×10 ⁵ 9.15×10 ⁵ 1.20×10 ⁶	1.16×10 ⁶ 1.14×10 ⁶ 1.075×10 ⁶	9.75×10 ⁵	1.125×10 ⁶
5	4.80×10 ⁷ 2.90×10 ⁷ 4.00×10 ⁷	3.70×10 ⁷ 3.80×10 ⁷ 2.30×10 ⁷	3.90×10 ⁷	3.27×10 ⁷
10	1.50×10 ⁷ 2.355×10 ⁷ 1.44×10 ⁷	1.45×10 ⁷ 2.90×10 ⁷ 3.15×10 ⁷	1.765×10 ⁷	2.50×10 ⁷
15	5.80×10 ⁷ 3.15×10 ⁷ 2.85×10 ⁷	4.00×10 ⁷ 3.90×10 ⁷ 2.60×10 ⁷	3.93×10 ⁷	3.50×10 ⁷
20	5.85×10 ⁷ 6.75×10 ⁷ 5.70×10 ⁷	5.50×10 ⁷ 7.30×10 ⁷ 3.15×10 ⁷	6.10×10 ⁷	5.32×10 ⁷

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตาราง ๑.9 จำนวน *Pseudoxanthomonas* sp. สายพันธุ์ RN402 ในอาหารเหลว CFMM ที่มีไพรีน ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 100 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยการวิเคราะห์ด้วยวิธี Viable plate count (log CFU ต่อมิลลิตร)

วันที่	ชุดควบคุม (log CFU ต่อมล.)	ชุดทดลอง (log CFU ต่อมล.)	ชุดควบคุม (เฉลี่ย)	ชุดทดลอง (เฉลี่ย)	ส่วน เบี่ยงเบน มาตรฐาน (SD) ในชุด ควบคุม	ส่วน เบี่ยงเบน มาตรฐาน (SD) ในชุด ทดลอง
0	5.908 5.961 6.079	6.064 6.057 6.031	5.983	6.051	0.09	0.02
5	7.681 7.462 7.602	7.568 7.580 7.362	7.582	7.510	0.11	0.12
10	7.176 7.372 7.158	7.161 7.462 7.498	7.235	7.370	0.12	0.19
15	7.763 7.498 7.455	7.602 7.591 7.415	7.572	7.536	0.17	0.10
20	7.767 7.829 7.756	7.740 7.863 7.498	7.784	7.700	0.04	0.19

ภาคผนวก จ

ลำดับนิวคลีโอไทด์

ลำดับนิวคลีโอไทด์ 16S rDNA ของ *Diaphorobacter* sp. สายพันธุ์ KOTLB

```

1   ATTAGAGTTT GATCCTGGCT CAGATTGAAC GCTGGCGGCA TGCCTTACAC
51  ATGCAAGTCG AACGGTAACA GGTCTTCGGA TGCTGACGAG TGGCGAACGG
101 GTGAGTAATA CATCGGAACG TGCCCGATCG TGGGGGATAA CGAGGCGAAA
151 GCTTTGCTAA TACCGCATA C GATCTACGGA TGAAAGCGGG GGATCTTCGG
201 ACCTCGCGCG GACGGAGCGG CCGATGGCAG ATTAGGTAGT TGGTGGGATA
251 AAAGCTTACC AAGCCGACGA TCTGTAGCTG GTCTGAGAGG ATGATCAGCC
301 ACACTGGGAC TGAGACACGG CCCAGACTCC TACGGGAGGC AGCAGTGGGG
351 AATTTTGGAC AATGGGCGAA AGCCTGATCC AGCCATGCCG CGTGCAGGAT
401 GAAGGCCTTC GGGTTGTAAA CTGCTTTTGT ACGGAACGAA AAGCCTCTTT
451 CTAATAAAGA GGGGTCAATGA CCGTACCGTA AGAATAAGCA CCGGCTAACT
501 ACGTGCCAGC AGCCGCGGTA ATACGTAGGG TGCAAGCGTT AATCGGAATT
551 ACTGGGCGTA AAGCGTGCCG AGGCGGTTTT GTAAGACAGA GGTGAAATCC
601 CCGGGCTCAA CCTGGGAACT GCCTTTGTGA CTGCAAGGCT GGAGTGCGGC
651 AGAGGGGGAT GGAATTCGCG GTGTAGCAGT GAAATGCGTA GATATGCGGA
701 GGAACACCGA TGGCGAAGGC AATCCCCTGG GCCTGCACTG ACGCTCATGC
751 ACGAAAGCGT GGGGAGCAAA CAGGATTAGA TACCCTGGTA GTCCACGCCC
801 TAAACGATGT CAACTGGTTG TTGGGTCTTC ACTGACTCAG TAACGAAGCT
851 AACGCGTGAA GTTGACCGCC TGGGGAGTAC GGCCGCAAGG TTGAAACTCA
901 AAGGAATTGA CGGGACCCG CACAAGCGGT GGATGATGTG GTTTAATTCG
951 ATGCAACGCG AAAAACCTTA CCCACCTTTG ACATGGCAGG AAGTTTCCAG
1001 AGATGGATTC GTGCCGAAA GGGAACTGAC ACACAGGTGC TGCATGGCTG
1051 TCGTCAGCTC GTGTCGTGAG ATGTTGGGTT AAGTCCCGCA ACGAGCGCAA
1101 CCCTTGCCAT TAGTTGCCAC GAAAGGGCAC TCTAATGGGA CTGCCGGTGA
1151 CAAACCGGAG GAAGGTGGGG ATGACGTCAA GTCCTCATGG CCCTTATAGG
1201 TGGGGCTACA CACGTCATAC AATGGCTGGT ACAGAGGGTT GCCAACCCGC
1251 GAGGGGAGC TAATCCCATA AAGCCAGTCG TAGTCCGGAT CGCAGTCTGC
1301 AACTCGACTG CGTGAAGTCG GAATCGCTAG TAATCGCGGA TCAGAATGTC
1351 GCGGTGAATA CGTTCCCGGG TCTTGTACAC ACCGCCGTC ACACCATGGG
1401 AGCGGGTTCT GCCAGAAGTA GGTAGCCTAA CCGTAAGGAG GCGCCTTACC
1451 ACGGCA

```

ลำดับนิวคลีโอไทด์ 16S rDNA ของ *Pseudoxanthomonas* sp. สายพันธุ์ RN402

```

1   TGCAGTCGAA CGGCAGCACA GGAGAGCTTG CTCTCTGGGT GCGGAGTGGC
51  GGACGGGTGA GGAATACATC GGAATCTACC TTGTTCGTGGG GGATAACGTA
101 GGGAAACTTA CGCTAATACC GCATACGACC TTCGGGTGAA AGTGGGGGAC
151 CGCAAGGCCT CACGCGATTA GATGAGCCGA TGTCGGATTA GCTAGTTGGC
201 GGGGTAAAAG CCCACCAAGG CGACGATCCG TAGCTGGTCT GAGAGGATGA
251 TCAGCCACAC TGGAACTGAG ACACGGTCCA GACTCCTACG GGAGGCAGCA
301 GTGGGGAATA TTGGACAATG GGCGCAAGCC TGATCCAGCC ATACCGCGTG
351 GGTGAAGAAG GCCTTCGGGT TGTAAAGCCC TTTTGTGGG AAAGAAATCT
401 TGCCGGTTAA TACCTGGCGA GGATGACGGT ACCCAAAGAA TAAGCACCGG
451 CTAACCTTCGT GCCAGCAGCC GCGGTAATAC GAAGGGTGCA AGCGTTACTC
501 GGAATTACTG GGCGTAAAGC GTGCGTAGGT GGTGGTTTAA GTCTGCTGTG
551 AAAGCCCTGG GCTCAACCTG GGAATGTCAG TGGATACTGG GTCACTAGAG
601 TGTGGTAGAG GGATGCGGAA TTTCCGGTGT AGCAGTGAAA TCGGTAGAGA
651 TCGGAAGGAA CATCCGTGGC GAAGGCGGCA TCCTGGGCCA AACTGACAC
701 TGAGGCACGA AAGCGTGGGG AGCAAACAGG ATTAGATACC CTGGTAGTCC
751 ACGCCCTAAA CGATGCGAAC TGGATGTTGG GTGCAACTTG GCACCCAGTA
801 TCGAAGCTAA CGCGTTAAGT TCGCCGCCTG GGGAGTACGG TCGCAAGACT
851 GAAACTCAAA GGAATTGACG GGGGCCCGCA CAAGCGGTGG AGTATGTGGT
901 TTAATTCGAT GCAACGCGAA GAACCTTACC TGGCCTTGAC ATGTCGCGAA
951 CTTTCCAGAG ATGGATTGGT GCCTTCGGGA ACGCGAACAC AGGTGCTGCA
1001 TGGCTGTCGT CAGCTCGTGT CGTGAGATGT TGGGTAAAGT CCCGCAACGA
1051 GCGCAACCCT TGTCTTAGT TGCCAGCACG TAATGGTGGG AACTCTAAGG
1101 AGACCGCCGG TGACAAACCG GAGGAAGGTG GGGATGACGT CAAGTCATCA
1151 TGGCCCTTAC GGCCAGGGCT ACACACGTAC TACAATGGGA AGGACAGAGG
1201 GCTGCAAACC CGCGAGGGCA AGCCAATCCC AGAAACCTTC TCTCAGTCCG
1251 GATTGGAGTC TGCAACTCGA CTCCATGAAG TCGGAATCGC TAGTAATCGC
1301 AGATCAGCAT TGCTGCGGTG AATACGTTCC CGGGCCTTGT ACACACCGCC
1351 CGTCACACCA T

```


ลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนบริเวณยีน *nidA* ของ *Diaphorobacter* sp. สายพันธุ์ KOTLB และ *Pseudoxanthomonas* sp. สายพันธุ์ RN402

```

      D F V V R H I G A D S V I V C R D
1 CCG TCG TGC GGC ACA TCG GGG CCG ATT CGG TGA TCG TTT GCC GGG ACA AC

      N S G R I Q A L S N S C R H R G A
51 T CCG GCC GCA TCC AGG CGC TGT CCA ATT CTT GTC GCC ACC GTG GTG CGC T

      L V C R A E M G N T A H F Q C P
101 CG TGT GCC GCG CTG AGA TGG GAA ACA CCG CGC ACT TCC AAT GCC CGT ACC

      Y H G W V Y S N T G E L V G V P A
151 ACG GCT GGG TGT ACA GCA ACA CCG GAG AGC TCG TCG GCG TGC CGG CGA TG

      M T E A Y P G G F D K S Q W G L
201 A CGG AGG CCT ATC CCG GCG GCT TCG ACA AGT CGC AGT GGG GAT TAC GTC A

      R H I P H V D S Y A G F I F G S V
251 CA TCC CCC ATG TCG ACT CGT ACG CCG GAT TCA TCT TCG GCA GCG TCG ATC

      D P K A P S L T D Y L G D T T F Y
301 CGA AGG CGC CGA GCC TGA CCG ACT ACC TCG GCG ACA CGA CGT TCT ACC TC

      L D L I A K K T A G G L E V I G
351 G ACC TCA TTG CGA AGA AGA CAG CGG GCG GTC TGG AGG TGA TAG GGG CAC C

      A P H R W V M S A N W K
401 GC ATC GAT GGG TGA TGT CAG CGA ACT GGA AGA CAG C

```

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นายพิริยะ กลั่นแก้ว เกิดเมื่อวันที่ 21 ตุลาคม พ.ศ. 2524 ที่จังหวัดกรุงเทพมหานคร ได้รับปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาชีววิทยา จากคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล ในปีการศึกษา 2546 และได้เข้าศึกษาต่อในระดับปริญญาโท สาขาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2547 ปัจจุบันอาศัยอยู่ที่บ้านเลขที่ 5 ซอย อินทามระ 39 แยก 3 ถนน สุทธิสาร แขวง ดินแดง เขต ดินแดง กรุงเทพมหานคร 10400



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย