สำนักหอสมุด มหาวิทยาลัยบูรพา
ต.แสนสุข อ.เมือง จ.ชลบุรี 20131

2 ②

การย่อยสลายสารประกอบโพลีซัยคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนโดยจุลินทรีย์

(Biodegradation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons)

สุดารัตน์ สวนจิตร

AQ 0004544
26 ก.ย. 2544
148635

คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา
มิถุนายน 2544

ประกาศคุณูประการ

งานวิจัยเรื่องการย่อยสลายสารประกอบโพลีซัยคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนโดยจุลินทรีย์ได้กระทำสำเร็จลุล่วงไปได้เป็นอย่างดีโดยการสนับสนุนเงินทุนวิจัยจากเงินงบประมาณแผ่นดิน ปี 2543 ซึ่งผู้วิจัยขอขอบคุณอย่างสูงมา ณ ที่นี้ นอกจากนี้ผู้วิจัยขอขอบคุณ Dr. Grant Stanley, School of life Sciences and Technology, Victoria University of Technology, Melbourne, Australia ซึ่งได้ให้ความช่วยเหลือในการศึกษาวิจัย และให้คำแนะนำที่มีประโยชน์เป็นอย่างมากต่อการศึกษาในครั้งนี้ ขอขอบคุณนางสาววิภา ต้นแพง นางสาวเกษร นพกาล และนางสาววโรทัย รัตนเวชชานนท์ ซึ่งมีส่วนร่วมและช่วยเหลือในการศึกษาครั้งนี้ และขอขอบคุณภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา รวมถึงคณาจารย์ นักวิทยาศาสตร์ และเจ้าหน้าที่ทุกท่านของภาควิชาที่มีส่วนในการช่วยเหลือและสนับสนุนให้งานวิจัยนี้เสร็จสมบูรณ์

บทคัดย่อ

จากการคัดแยกจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการย่อยสลายสารประกอบ PAHs จากดินและน้ำที่ปนเปื้อนสารประกอบไฮโดรคาร์บอน สามารถแยกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลายสารประกอบ phenanthrene และ pyrene โดยนำมาใช้เป็นแหล่งของคาร์บอนและพลังงานในการเจริญได้แบคทีเรียบริสุทธิ์ที่มีความสามารถในการย่อยสลาย phenanthrene จำแนกได้เป็น *Acetetobacter* sp. สายพันธุ์ PHEN-1 สำหรับแบคทีเรียที่มีความสามารถในการเจริญบน pyrene ซึ่งเป็นแหล่งของคาร์บอนและพลังงานเพียงแหล่งเดียวในอาหารเลี้ยงเชื้อจำแนกได้เป็น *Pseudomonas fluorescens* สายพันธุ์ PYR-1 แบคทีเรียชนิดนี้สามารถย่อยสลาย pyrene จนถึงระดับที่ไม่สามารถตรวจสอบปริมาณได้ภายในระยะเวลา 7 วัน ซึ่งจากการศึกษาพบว่าแบคทีเรียสายพันธุ์นี้มีความสามารถในการเจริญบนสับเสตรทชนิดต่างๆ ได้เป็นอย่างมาก เช่น hexane, octane, benzene, toluene, naphthalene, fluorene, fluoranthene, catechol, cinnamic acid, phthalic acid และ salicylic acid อย่างไรก็ตามพบว่าแบคทีเรียชนิดนี้ไม่สามารถเจริญได้บนสารประกอบ benzo[*a*]pyrene การศึกษาการย่อยสลาย benzo[*a*]pyrene ในสภาวะที่เซลล์มีการเจริญบน pyrene ไม่พบว่า *Ps. fluorescens* PYR-1 มีการ cometabolized สารประกอบดังกล่าว

สารบัญ

บทที่		หน้า
1	บทนำ	1
2	เอกสารที่เกี่ยวข้องกับการศึกษา	3
3	วัสดุอุปกรณ์และวิธีการทดลอง	20
4	ผลการทดลอง	29
5	สรุปและอภิปรายผลการทดลอง	39
เอกสารอ้างอิง		48
ภาคผนวก		53

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	โครงสร้างของสารประกอบ PAHs บางชนิด	4
2	คุณสมบัติและความคงทนของสารประกอบ PAHs	6
3	การเปลี่ยนแปลงของสารประกอบ PAHs ในสิ่งแวดล้อม	8
4	กลไกการย่อยสลายสารประกอบ PAHs โดยจุลินทรีย์	19
5	การย่อยสลาย PAHs โดย enrichment cultures	31
6	การแยกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลาย PAHs โดยวิธี spray plate	32
7	การย่อยสลายสารประกอบ pyrene โดย S1 consortium และ *Ps. fluorescens* PYR-1	36
8	การย่อยสลาย benzo[*a*]pyrene โดย *Ps. fluorescens* PYR-1	37
9	กลไกการย่อยสลาย phenanthrene โดยแบคทีเรีย	45
10	วิถีเมตาบอลิซึมของสารประกอบ PAHs โดยแบคทีเรีย	46
11	กราฟมาตรฐานของ bovine serum albumin	60
12	กราฟมาตรฐานของ resorcinol	62

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	คุณสมบัติของสารประกอบ PAHs	5
2	แหล่งที่มาของสารประกอบ PAHs ในสิ่งแวดล้อม	7
3	แบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลายสารประกอบ PAHs	11
4	เชื้อราที่มีความสามารถในการย่อยสลายสารประกอบ PAHs	12
5	สาหร่ายเซลล์เดียวและไซยาโนแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลายสารประกอบ PAHs	12
6	ตัวอย่างดินและน้ำที่นำมาใช้แยกแบคทีเรียที่ย่อยสลาย PAHs	21
7	การเจริญของแบคทีเรียใน enriched cultures	29
8	การเปลี่ยนแปลงทางกายภาพของสารประกอบ PAHs ใน enriched cultures	30
9	ผลการทดสอบทางชีวเคมีเพื่อจำแนกแบคทีเรีย	33
10	การเจริญของแบคทีเรียบนสับเสตรทชนิดต่างๆ	34
11	ผลการตรวจสอบการสร้างและกิจกรรมของเอนไซม์ dioxygenases	38
12	การเตรียมสารละลายมาตรฐาน bovine serum albumin	59
13	การเตรียมสารละลายมาตรฐาน resorcinol	61

บทที่ 1

บทนำ

Polycyclic aromatic hydrocabons (PAHs) เป็นสารประกอบที่มีคาร์บอนและไฮโดรเจนเป็นองค์ประกอบโมเลกุลของ PAHs เป็นวงอะโรมาติกหรือวงแหวนเบนซีนมารวมกันตั้งแต่ 2 วงขึ้นไป สารประกอบ PAHs เป็นองค์ประกอบที่สำคัญที่พบในถ่านหินและปิโตรเลียม นอกจากนี้สารประกอบ PAHs ยังเกิดขึ้นได้จากขบวนการประกอบอาหารในครัวเรือน เช่น การปิ้ง ย่าง หรือรมควัน ก็ทำให้เกิดสารประกอบ PAHs ได้ (Harayama, 1997) สารประกอบ PAHs จัดเป็นสารก่อมลพิษที่มีอันตรายสูงเนื่องจากพบว่าสารประกอบ PAHs บางชนิดก่อให้เกิดความเป็นพิษอย่างเฉียบพลันซึ่งก่อให้เกิดการตายของสิ่งมีชีวิตอย่างรวดเร็ว สารประกอบ PAHs บางชนิดเป็นสารก่อมะเร็งและ/หรือสารก่อการกลายพันธุ์ในสิ่งมีชีวิต เนื่องจาก PAHs นั้นสามารถปนเปื้อนได้ในทุกๆแหล่งของสิ่งแวดล้อมทั้งในอากาศ แหล่งน้ำ ดิน และตะกอน จุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการย่อยสลายสารประกอบ PAHs มักแยกได้จากบริเวณที่มีการปนเปื้อนสารดังกล่าว จุลินทรีย์กลุ่มสำคัญที่พบว่าสามารถย่อยสลายสารประกอบ PAHs ได้แก่ แบคทีเรียและเชื้อรา (Wilson and Jones, 1992) ซึ่งจุลินทรีย์แต่ละกลุ่มจะมีกลไกที่ใช้ในการย่อยสลายสารประกอบ PAHs แตกต่างกันออกไป สารประกอบ PAHs ที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำสามารถถูกกำจัดออกจากสิ่งแวดล้อมได้ง่าย จุลินทรีย์หลายชนิดสามารถใช้สารเหล่านี้เป็นแหล่งของคาร์บอนและพลังงานในการเจริญได้ อย่างไรก็ตามสารประกอบ PAHs ที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงจะถูกย่อยสลายได้ยาก การย่อยสลายอาจเกิดขึ้นแบบไม่สมบูรณ์ (partial degradation) ทำให้มีการสะสมของสารเมตาบอไลต์ชนิดต่างๆ ในสภาพแวดล้อมซึ่งบางชนิดอาจมีความเป็นพิษสูงกว่าสารตั้งต้น ในธรรมชาตินั้นสารเหล่านี้อาจถูกย่อยสลายอย่างสมบูรณ์ (mineralization) ได้โดยอาศัยกิจกรรมของกลุ่มจุลินทรีย์ที่มีอยู่ในบริเวณนั้น การจำแนกและการศึกษาถึงประสิทธิภาพของจุลินทรีย์ในการย่อยสลายสารประกอบ PAHs อย่างรอบคอบมีความสำคัญมากต่อการนำเอาจุลินทรีย์เหล่านี้ไปใช้กำจัดสารประกอบกลุ่มนี้ที่ปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อมโดยปราศจากผลกระทบข้างเคียงอื่น

วัตถุประสงค์ของการทำการศึกษาทดลอง

1. เพื่อคัดแยกจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการย่อยสลายสารประกอบ PAHs จากดินและน้ำที่มีการปนเปื้อนสารประกอบดังกล่าว
2. เพื่อจำแนกชนิดของจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการย่อยสลายสารประกอบ PAHs
3. เพื่อทดสอบความสามารถของจุลินทรีย์ในการย่อยสลายสารประกอบ PAHs ที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง
4. เพื่อศึกษาถึงเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องในการย่อยสลายสารประกอบ PAHs ที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง

บทที่ 2

เอกสารที่เกี่ยวข้องกับการศึกษา

เอกสารที่เกี่ยวข้องกับการศึกษาการย่อยสลายสารประกอบ PAHs แบ่งออกเป็น 4 ตอน ได้แก่ คุณสมบัติโดยทั่วไปของสารประกอบกลุ่มนี้ทั้งทางด้านกายภาพ เคมี และชีวภาพ รวมถึงแหล่งของการปนเปื้อนสารเหล่านี้สู่สิ่งแวดล้อม การเปลี่ยนแปลงของสารประกอบ PAHs ในสิ่งแวดล้อมโดยกระบวนการต่างๆ และการย่อยสลายโดยจุลินทรีย์รวมถึงกลไกที่จุลินทรีย์ใช้ในการย่อยสลายสารประกอบ PAHs ดังมีรายละเอียดในหัวข้อต่อไปนี้

1. คุณสมบัติโดยทั่วไปและแหล่งกำเนิดสารประกอบ PAHs
2. การเปลี่ยนแปลงของสารประกอบ PAHs ในสิ่งแวดล้อม
3. การย่อยสลายสารประกอบ PAHs โดยจุลินทรีย์
4. กลไกการย่อยสลายสารประกอบ PAHs โดยจุลินทรีย์

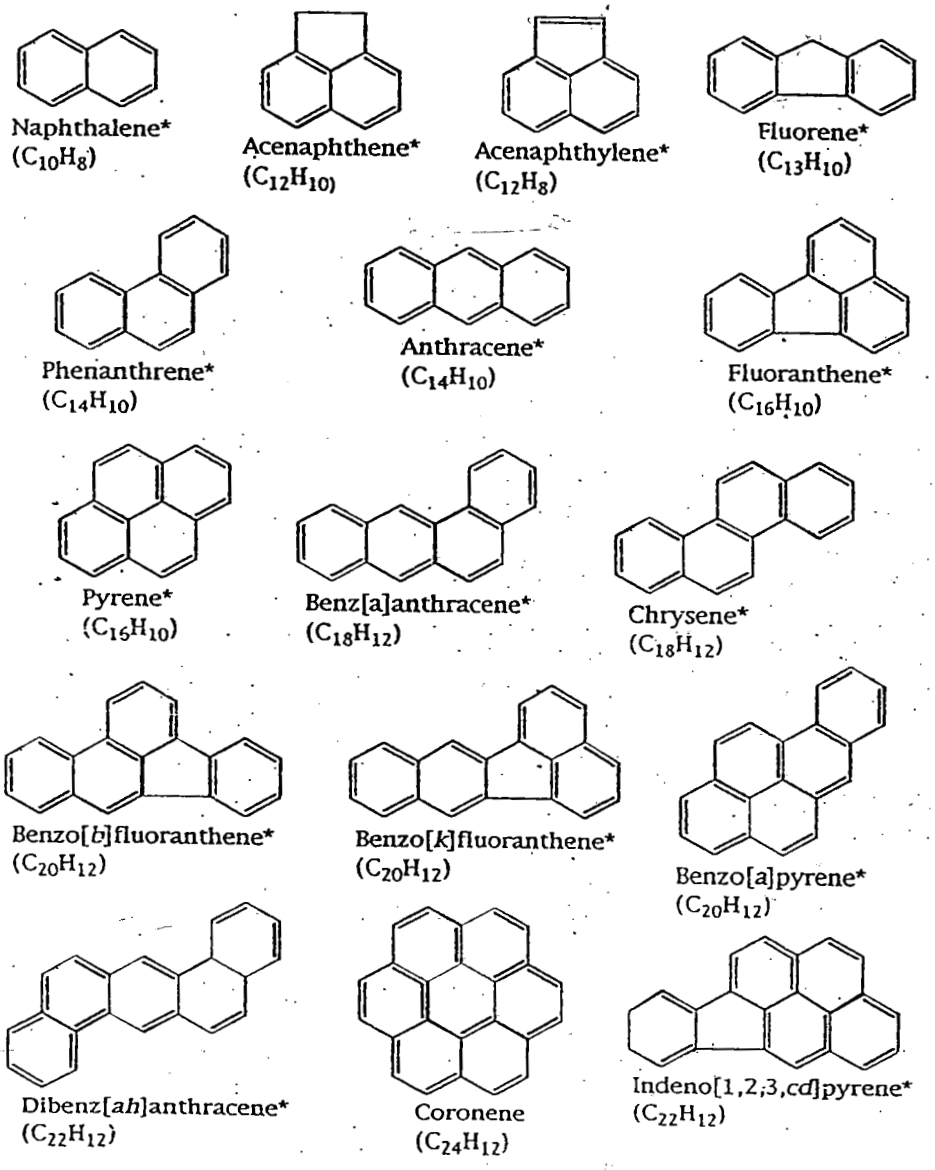
1. คุณสมบัติโดยทั่วไปและแหล่งกำเนิดของสารประกอบ PAHs

1.1 ลักษณะและคุณสมบัติทางเคมีของสารประกอบ PAHs

Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) โดยทั่วไปหมายถึงสารประกอบไฮโดรคาร์บอนที่ประกอบด้วยวงเบนซีนตั้งแต่สองวงขึ้นไปมาเชื่อมรวมกัน โมเลกุลประกอบด้วยไฮโดรเจนอะตอมและคาร์บอนอะตอม อย่างไรก็ตามสารประกอบ PAHs บางชนิดมีอะตอมของธาตุอื่นเข้ามาอยู่ในโมเลกุลด้วยเช่นกัน เช่น ไนโตรเจน (nitrogen) กำมะถัน (sulfur) และออกซิเจน (oxygen) (McElroy *et.al.*, 1989)

โครงสร้างของ PAHs ประกอบด้วยวงเบนซีนตั้งแต่ 2 วงขึ้นไปมาเชื่อมต่อกัน (Harayama, 1997) การเรียงตัวของวงเบนซีนในโมเลกุลเกิดขึ้นได้หลายรูปแบบ เช่น เป็นเส้นตรง (linear) เป็นมุมงอ (angular) และเป็นกลุ่มก้อน (cluster) (Cerniglia, 1992) ดังแสดงในภาพที่ 1 PAHs ที่มีโครงสร้างธรรมดาที่สุด ได้แก่ naphthalene (MW 128.16) (Ashok and Saxena, 1995) สารประกอบ PAHs ที่โมเลกุลประกอบด้วยวงเบนซีนน้อยกว่า 4 วง จัดเป็นกลุ่มที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ (low molecular weight PAHs) ส่วน PAHs ที่โมเลกุลประกอบด้วยวงแหวนเบนซีนตั้งแต่ 4 วงขึ้นไป จัดอยู่ในกลุ่มที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง (high molecular weight PAHs) (McElroy *et al.*, 1989) คุณสมบัติทางด้านโครงสร้างของ PAHs ดังกล่าวนี้มีผลต่อการสลายตัวหรือการย่อยสลาย

สารประกอบกลุ่มนี้คือ การเรียงลำดับอัตราการย่อยสลายจากมากไปน้อย: linear > angular > cluster และสารประกอบ PAHs ที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำจะถูกย่อยสลายได้ง่ายกว่าสารประกอบ PAHs ที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง (Wilson and Jones, 1993)



ภาพที่ 1 โครงสร้างของสารประกอบ PAHs บางชนิดที่พบโดยทั่วไปในสิ่งแวดล้อม

* เป็นสารที่ USEPA จัดให้อยู่ในกลุ่ม priority pollutants

(ที่มา: Wilson and Jone, 1993)

1.2 ลักษณะคุณสมบัติทางกายภาพของสารประกอบ PAHs

PAHs เป็นสารประกอบประเภท hydrophobic ดังนั้นจึงมีความสามารถในการละลายน้ำได้ต่ำมาก (Cerniglia, 1992) โดยพบว่าถ้าสารประกอบ PAHs มีน้ำหนักโมเลกุลสูงขึ้นจะทำให้ความสามารถในการละลายน้ำลดลงดังแสดงในภาพที่ 2 แต่สามารถละลายได้ในไขมันหรือ octanol ได้มากขึ้นซึ่งดูได้จากค่าสัมประสิทธิ์ของการละลายใน octanol/water (K_{ow}) ดังแสดงในตารางที่ 1

1.3 คุณสมบัติทางชีวภาพ

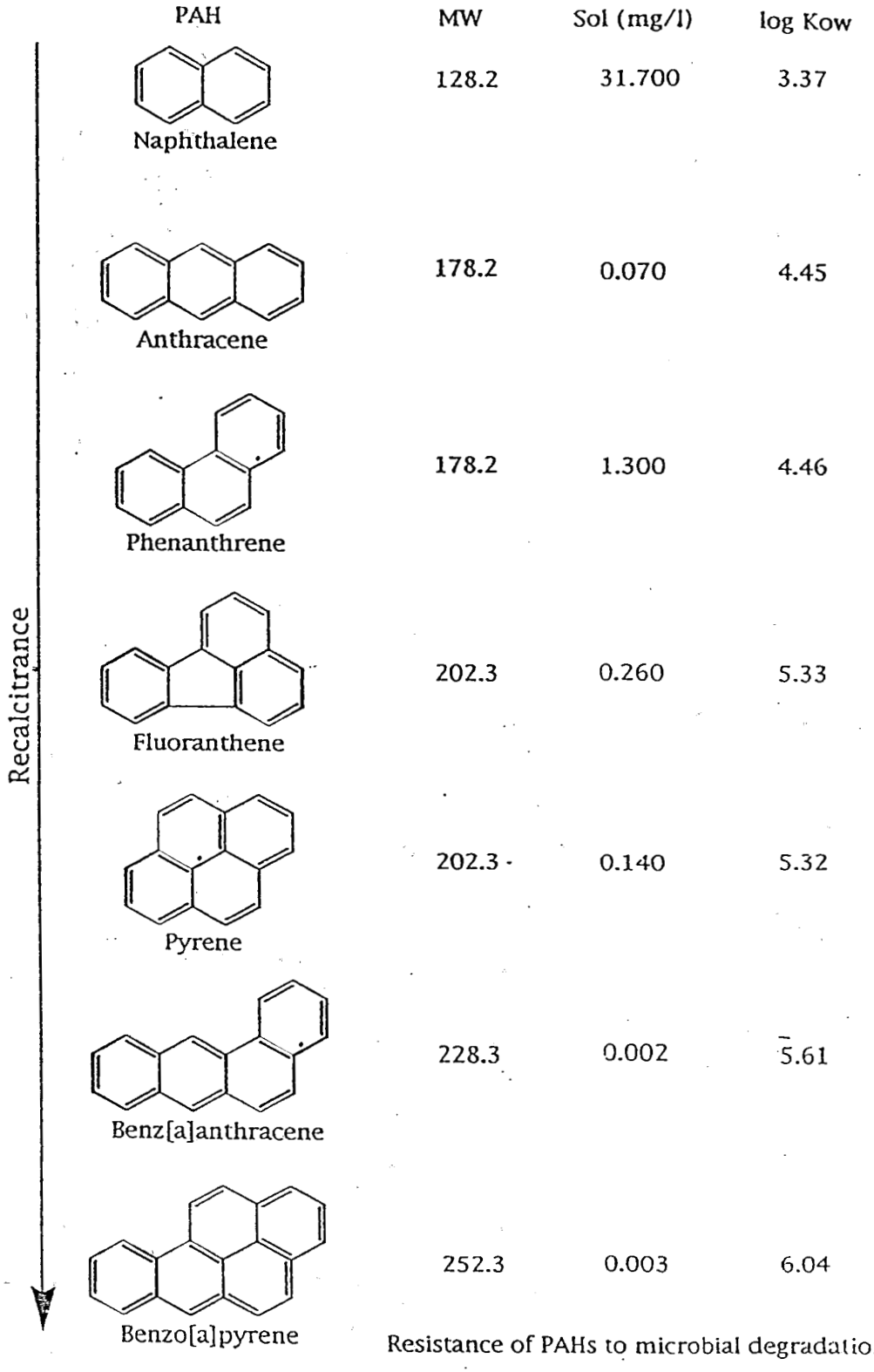
สารประกอบ PAHs เป็นสารพิษที่ก่อให้เกิดการเป็นพิษได้หลายแบบทั้งการเกิดการเป็นพิษแบบเฉียบพลันก่อให้เกิดการตายของสิ่งมีชีวิตอย่างรวดเร็ว (acute effects) และการเกิดการเป็นพิษแบบเรื้อรัง (chronic effects) (Narro *et al.*, 1992) ได้แก่การก่อให้เกิดการกลายพันธุ์ (mutagenicity) และการก่อมะเร็ง (carcinogenicity) ดังแสดงในตารางที่ 1 โดยที่แนวโน้มในการเกิดการเป็นพิษแบบเฉียบพลันจะเกิดได้ในสารประกอบ PAHs ที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ ส่วนแนวโน้มในการเกิดการเป็นพิษแบบเรื้อรังมักเกิดได้ในสารประกอบ PAHs ที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง (Ashok and Saxena, 1995)

ตารางที่ 1 คุณสมบัติทางกายภาพ เคมีและชีวภาพ ของสารประกอบ PAHs

PAH	Molecular weight	Water solubility ($mg.L^{-1}$)	Vapour Pressure ($N.m^{-2}$ at 20°C)	Log octanol/ Water Coefficient	Sorption coefficient	Acute toxicity	Carcinogenicity/ Mutagenicity
Naphthalene	128	31.700	6056	3.37	1300	+	-/-
Phenanthrene	178	1.290	$9.07x10^{-2}$	4.46	23000	+	-/-
Anthracene	178	0.073	$2.61x10^{-2}$	4.45	26000	?	-/-
Pyrene	202	0.135	$8.00x10^{-4}$	5.32	84000	?	-/-
Fluoranthene	202	0.260	$9.11x10^{-5}$	5.33	100000	+	-/-
Benz[*a*]anthacene	228	0.040	$6.67x10^{-7}$	5.61	260000	?	-/-
Chrysene	228	0.002	$8.00x10^{-4}$	5.61	200000	?	-/-
Benzo[*a*]pyrene	252	0.004	$6.67x10^{-5}$	6.04	690000	++	+++/+

+Relative degree of effect on organism, - No effect, ? Unknown effect, 1atm=101325$N.m^{-2}$

(ที่มา: Ashok and Saxena, 1995)



ภาพที่ 2 แสดงคุณสมบัติทางกายภาพ เคมี และความคงทนต่อการถูกย่อยสลายของสารประกอบ PAHs

(ที่มา: Cerniglia, 1992)

1.4 แหล่งกำเนิดของสารประกอบ PAHs ในสิ่งแวดล้อม

PAHs ที่ปนเปื้อนอยู่ในสิ่งแวดล้อมมาจากหลายแหล่งในธรรมชาติ ได้แก่ การสังเคราะห์โดยจุลินทรีย์ การรั่วซึมของปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนหรือน้ำมันดิบจากธรรมชาติ และจากกิจกรรมต่างๆ ของมนุษย์ ซึ่งเป็นสาเหตุที่สำคัญในการปนเปื้อนของสารกลุ่มนี้ในสิ่งแวดล้อม เช่น การเผาไหม้อย่างไม่สมบูรณ์ของสารอินทรีย์และน้ำมันเชื้อเพลิง การเผาไหม้ของถ่านหิน อุตสาหกรรมน้ำมัน การใช้สารครีโอโสต (creosote) ในการรักษาเนื้อไม้ ไอเสียจากการเครื่องยนต์ ควันบุหรี่ การย่างหรือการปิ้งอาหารจนไหม้ ดังแสดงในตารางที่ 2

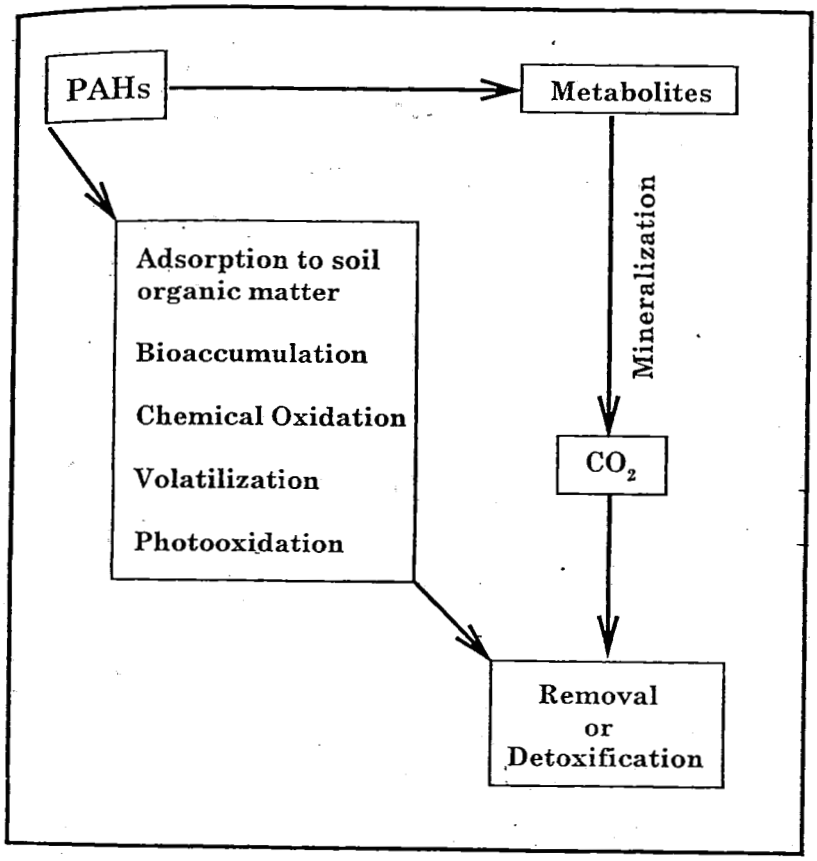
ตารางที่ 2 แหล่งที่มาของสารประกอบ PAHs ในสิ่งแวดล้อม

Natural oil seeps
Refinery and oil storage wastes
Accidental spills from oil tankers and other ships
Municipal and urban wastewater discharge runoff
River-borne poliution
Atmosheric fallout of fly ash particulates
Petrochemical industrial effluents
Coal tar and other coal processing wastes
Automobile engine exhuausts
Combustion of fossil fuel (gasoline, kerosene, coal, diesel fuel
Smoked, charcoal broiled, or pan fried foods
Forest and prairie fires
Rural and urban sewage sludge
Refuse and waste incineration
Coal gasificaiton and liquefaction processes
Creosote and other wood preservative wastes
Commercial and pleasure boating activities

(ที่มา: Cerniglia, 1992)

2. การเปลี่ยนแปลงของสารประกอบ PAHs ในสิ่งแวดล้อม

เมื่อเข้าสู่สิ่งแวดล้อม PAHs สามารถเกิดการเปลี่ยนแปลงได้โดยขบวนการต่างๆ ทั้งทางด้านกายภาพ เคมี และชีวภาพ การเปลี่ยนแปลงของ PAHs เป็นไปได้หลายวิธี เช่น การถูกดูดซับติดกับอนุภาคของดินหรือตะกอน (sorption) การระเหย (volatilization) การถูกย่อยสลายทางเคมี (chemical degradation) และการถูกย่อยสลายทางชีวภาพ (biodegradation) ดังแสดงในภาพที่ 3 ขบวนการดังกล่าวจะเกิดขึ้นได้มากน้อยเพียงใดขึ้นอยู่กับคุณสมบัติทางกายภาพและคุณสมบัติทางเคมีของสารประกอบนั้นๆ รวมทั้งขึ้นกับปัจจัยสิ่งแวดล้อมต่างๆ ด้วย (Ashok and Saxena, 1995)



ภาพที่ 3 การเปลี่ยนแปลงของ PAHs ในสิ่งแวดล้อมโดยขบวนการต่างๆ

(ที่มา: Cerniglia, 1992)

2.1 การดูดซับ (Sorption)

จากคุณสมบัติที่สารประกอบ PAHs เป็นสารประกอบที่มีความสามารถในการละลายน้ำได้ต่ำ ดังนั้น PAHs จึงสามารถถูกดูดซับติดกับอนุภาคของดินหรือตะกอนได้มากโดยเฉพาะในดินที่ประกอบด้วยอนุภาคของสารอินทรีย์เป็นส่วนมากจะถูกดูดซับไว้ได้ดี การถูกดูดซับของ PAHs ให้ติดกับอนุภาคของดินหรือตะกอนได้อย่างแน่นหนานั้นขึ้นอยู่กับความไม่มีขั้วของ PAHs เองและขึ้นกับว่า PAHs ทำปฏิกิริยากับสารอื่นอยู่หรือไม่ (Ashok and Saxena, 1995)

2.2 การระเหย (Volatillization)

สำหรับ PAHs ที่ปนเปื้อนอยู่ในดินการระเหยเกิดขึ้นได้น้อยมากเนื่องจาก PAHs ชอบที่จะเกาะติดกับอนุภาคของดินหรือตะกอนมากกว่า การระเหยของ PAHs เกิดจากการรวมเป็นโครงสร้างของน้ำแล้วระเหยไป ซึ่ง PAHs ที่อยู่ที่ผิวน้ำจะมีอัตราการระเหยสูงกว่า PAHs ที่อยู่ที่ผิวดิน จากการศึกษาพบว่า PAHs ที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำๆ เช่น naphthalene จะมีอัตราการระเหยได้สูงกว่า PAHs ที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงๆ (Ashok and Saxena, 1995)

2.3 การย่อยสลายโดยใช้แสง (Photochemical degradation)

การย่อยสลาย PAHs โดยใช้แสงนั้นเป็นขบวนการย่อยสลายทางเคมี (chemical degradation)ในกระบวนการย่อยสลายโดยใช้แสงจะมีออกซิเจนเป็นตัวสำคัญที่ทำให้เกิดปฏิกิริยาการย่อยสลาย ในน้ำกลไกการย่อยสลายขึ้นอยู่กับปริมาณออกซิเจน อุณหภูมิและปริมาณความเข้มข้นของแสง ดังนั้นความไวต่อการตอบสนองของสารประกอบกลุ่ม hydrophobic ซึ่งมักเกาะติดกับอนุภาคต่างๆยังไม่ทราบแน่ชัด อย่างไรก็ตามมีรายงานว่าการเกาะติดกับอนุภาคของดินหรือตะกอนของ PAHs มีผลทั้งในด้านส่งเสริมและยับยั้งการเกิดการย่อยสลายโดยขบวนการดังกล่าวนี้ (Ashok and Saxena, 1995)

2.4 การย่อยสลายโดยจุลินทรีย์ (Microbial degradation)

จุลินทรีย์ในธรรมชาติใช้ขบวนการเมตาบอลิซึมหลายแบบในการย่อยสลายสารประกอบทางธรรมชาติและสารสังเคราะห์ที่มนุษย์สร้างขึ้น ในขณะที่วงการอุตสาหกรรมมีการพัฒนาอย่างรวดเร็วจุลินทรีย์ก็มีวิวัฒนาการให้มีความสามารถย่อยสลายสารสังเคราะห์ชนิดต่างๆ ที่ปนเปื้อนเข้ามาในสิ่งแวดล้อม ซึ่งก็รวมทั้งสารประกอบ PAHs ด้วย การปรับตัวของจุลินทรีย์เพื่อให้มีความสามารถในการย่อยสลายสารดังกล่าวได้อาจเกิดขึ้นโดยมีการชักนำให้สร้างเอนไซม์ที่จำเป็นหรือมีการเปลี่ยนแปลงในระดับยีนซึ่งเป็นผลทำให้จุลินทรีย์สามารถพัฒนาวิถีเมตาบอลิซึมขึ้น

มาใหม่เพื่อใช้ในการย่อยสลาย PAHs ได้จุลินทรีย์แต่ละกลุ่มจะมีกลไกการย่อยสลาย PAHs แตกต่างกันไป อย่างไรก็ตามพบว่าการย่อยสลาย PAHs โดยจุลินทรีย์เป็นขบวนการสำคัญในการทำให้เกิดการลดลงหรือกำจัด PAHs ให้หมดไปจากสิ่งแวดล้อมได้ (Ashok and Saxena, 1995)

3. การย่อยสลายสารประกอบ PAHs โดยจุลินทรีย์ (Microbial Degradation of PAHs)

สารประกอบ PAHs ที่พบอยู่ในธรรมชาติจะเกิดการเปลี่ยนแปลง (transformation) ได้โดยขบวนการต่างๆ เช่น การดูดซับกับดินหรือตะกอน การสลายตัวโดยแสง การระเหย การเกิด oxidation และการสะสมอยู่ในสิ่งมีชีวิตเป็นต้น ขบวนการต่างๆ บางขบวนการเหล่านี้อาจทำให้สารประกอบ PAHs หายไปจากสิ่งแวดล้อมได้ส่วนหนึ่ง โดยเฉพาะในกลุ่มของสารประกอบ PAHs ที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ แต่ในส่วนของสารประกอบ PAHs ที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง ส่วนใหญ่แล้วมักจะถูกดูดซับไว้กับอนุภาคของดินหรือตะกอน ทำให้เกิดการสะสมและเพิ่มความคงทนในสิ่งแวดล้อมมากขึ้น อีกกระบวนการหนึ่งที่นักวิจัยให้ความสนใจศึกษาเป็นอย่างมากก็คือการย่อยสลายสารประกอบ PAHs โดยอาศัยกิจกรรมของจุลินทรีย์ (biodegradation) ซึ่งเป็นขบวนการสำคัญในการกำจัดสารประกอบ PAHs ออกจากสิ่งแวดล้อม จุลินทรีย์บางชนิดสามารถใช้สารประกอบ PAHs เป็นแหล่งของคาร์บอนและพลังงาน ในขณะที่บางชนิดมีการย่อยสลายสารประกอบ PAHs ทำให้มีการเปลี่ยนแปลงไปเป็นสารประกอบชนิดต่างๆ ที่มีความเป็นพิษน้อยลง

3.1 กลุ่มของจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการย่อยสลาย PAHs

ความสามารถในการย่อยสลายสารประกอบ PAHs พบในจุลินทรีย์ทุกกลุ่มได้แก่ แบคทีเรีย เชื้อรา ไซยาโนแบคทีเรียและสาหร่ายเซลล์เดียว ดังแสดงในตารางที่ 3 - 5

ตารางที่ 3 แบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลายสารประกอบ PAHs

PAH	แบคทีเรีย	เอกสารอ้างอิง
Anthracene	*Beijerinkia* sp., *Mycobacterium* sp., *Flavobacterium* sp., *Arthrobacter* sp.	Cerniglia, 1992; Kastner *et.al.*, 1994
Phenanthrene	*Aeromonas* sp., *Alcaligenes faecalis*, *Vibrio* sp., *Arthrobacter olychromogenes*,*Burkholderia cepacia*	Cerniglia, 1992; Geisilbrecht *et.al.*, 1996; Juhasz *et.al.*, 1997
Fluoranthene	*Sphingomonas paucimobilis*, *Alcaligenes denitrificans*, *Rhodococcus* sp., *Gordona* sp.	Ye *et.al.*, 1996; Weissenfels *et.al.*, 1990; Kastner *et.al.*, 1994
Pyrene	*Stenotrophomonas maltophilia*, *Mycobacterium* sp., *Cycloclasticus* sp.	Boonchan *et.al.*, 1998; Sepic *et.al.*, 1997; Geiselbrecht *et.al.*, 1998;
Chrycene	*Rhodococcus* sp.	Cerniglia, 1992
Benz[*a*]anthracene**	*Pseudomonas* sp., *Sphingomonas paucimobilis*, *Beijerinkia* sp.	Aitken *et.al.*, 1998; Ye *et.al.*, 1996; Cerniglia, 1992
Benzo[*a*]pyrene**	*Beijerinkia* sp., *Stenotrophomonas maltophilia*, *Mycobacterium* sp.	Cerniglia,1992; Boonchan *et.al.*, 1998; Dean and Cerniglia, 1996
Coronene**	*Stenotrophomonas maltophilia*	Boonchan *et.al.*, 1998

** แบคทีเรียไม่สามารถใช้สารประกอบ PAH ชนิดนั้นๆ ซึ่งเป็นแหล่งของคาร์บอนและพลังงานเพียงแหล่งเดียวที่มีอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อได้ การย่อยสลายเกิดขึ้นโดยขบวนการ cometabolism

ตารางที่ 4 เชื้อราที่มีความสามารถในการออกซิไดซ์สารประกอบ PAHs

PAH	เชื้อรา	เอกสารอ้างอิง
Naphtalene	*Absidia glauca, Aspergillus niger, Basidiobolus ranarum, Candida utitis, Rhizopus stolonifer*	Cerniglia, 1992
Anthrcene	*Phanerochaete chrysosporium, Ramaria* sp., *Trametes versicolor*	Andresson and Henrysson, 1996; Cerniglia, 1992
Phenanthrene	*Cunninghamella elegans, Phanerochaete chrysosporium, Trametes versicolor*	Cerniglia, 1992; Hammel *et.al.*, 1992
Fluoranthene	*Cunninghamella elegans*	Cerniglia, 1992
Pyrene	*Cunninghamella elegans, Phanerochaete chrysosporium*	Cerniglia, 1992
Benz[*a*]nthracene	*Cunninghamella elegans*	Cerniglia, 1992
Benzo[*a*]pyrene	*Aspergillus ochraceus, Candida maltosa, Chrysosporium pannorum, Phanerochaete chrysosporium, Trametes versicolor*	Cerniglia, 1992

ตารางที่ 5 สาหร่ายเซลล์เดียวและไซยาโนแบคทีเรียที่สามารถออกซิไดซ์ PAHs ได้

PAH	สาหร่ายเซลล์เดียวและไซยาโนแบคทีเรีย	เอกสารอ้างอิง
Naphtalene	*Oscillatoria* sp. (strain JCM), *Microcoleus chtonoplastes, Agmenellum quadruplicatum, Chlorella sorokiniana*	Narro *et.al.*,1992A; Cerniglia, 1992: Narro *et.al.*, 1992B
Phenanthrene	*Oscillatoria* sp., (strain JCM), *Agmenellum quadruplicatum*	Narro *et.al.*, 1992A; Narro *et.al.*, 1992B
Benzo[*a*]pyrene	*Selenastrum capricornutum*	Cerniglia, 1992

3.2 ปัจจัยที่มีผลต่อกระบวนการย่อยสลายโดยจุลินทรีย์

ประสิทธิภาพของการย่อยสลายสารประกอบ PAHs ในสิ่งแวดล้อมขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายประการทั้งปัจจัยภายในเช่น การปรับตัวของจุลินทรีย์ pH ปริมาณออกซิเจน การมีอยู่ของสารปนเปื้อนชนิดอื่นๆ รวมทั้งปริมาณสารอินทรีย์ที่มีอยู่ในบริเวณนั้นด้วย ในที่นี้จะขอกล่าวถึงปัจจัยบางประการที่มีผลต่อการย่อยสลายสารประกอบ PAHs ที่ปนเปื้อนอยู่ในดิน

3.2.1 การปรับตัวของจุลินทรีย์

การย่อยสลายสารประกอบที่มีความคงทนต่อการถูกย่อยสลายโดยจุลินทรีย์นั้นพบว่าไม่สามารถที่จะเกิดขึ้นได้ถ้าสารประกอบนั้นมีโครงสร้างที่จุลินทรีย์ไม่เคยพบในธรรมชาติมาก่อน หรือถ้าจุลินทรีย์เหล่านั้นไม่เคยพบมาก่อนก็จะต้องมีการปรับตัวเองเพื่อให้มีความสามารถในการย่อยสลายสารดังกล่าวได้ (Ashok and Saxena, 1995) เนื่องจาก PAHs ได้มีการปนเปื้อนอยู่ในสิ่งแวดล้อมมาเป็นเวลานานจุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่บริเวณแหล่งที่มีการปนเปื้อนได้นั้นจะต้องมีการปรับตัวเพื่อที่จะใช้ PAHs ที่ปนเปื้อนให้เป็นประโยชน์ต่อการเจริญหรือมีการย่อยสลายสารประกอบ PAHs เพื่อลดความเป็นพิษที่อาจเกิดขึ้นโดยขบวนการชักนำให้มีการสร้างวิถีเมตาบอลิซึมขึ้นมาใหม่เพื่อย่อยสลายสารประกอบ PAHs จุลินทรีย์ที่ปรับตัวได้ก็จะสามารถดำรงชีวิตอยู่ในสภาพแวดล้อมบริเวณนั้นได้ จุลินทรีย์บางชนิดอาจมีความสามารถในการย่อยสลายสารประกอบไฮโดรคาร์บอนได้เพียงหนึ่งหรือสองชนิด ในขณะที่จุลินทรีย์บางชนิดอาจมีความสามารถในการย่อยสลายสารประกอบไฮโดรคาร์บอนได้หลายชนิดทั้งนี้ขึ้นอยู่กับการปรับตัวและการพัฒนาระบบเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับขบวนการย่อยสลายของจุลินทรีย์เอง

การนำเอาจุลินทรีย์ที่แยกได้จากบริเวณที่มีการปนเปื้อนของสารประกอบ PAHs จะพบว่าช่วยลดระยะเวลาที่จุลินทรีย์ใช้ในการปรับตัวต่อสภาวะใหม่และยังเพิ่มความสามารถในการย่อยสลาย PAHs การนำจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการย่อยสลาย PAHs ที่เพาะเลี้ยงไว้มาใส่ลงในบริเวณที่มีการปนเปื้อนจะพบว่าเกิดการย่อยสลายได้อย่างรวดเร็ว (Wilson and Jones,1992) อย่างไรก็ตามในการย่อยสลายตามธรรมชาติมักเกิดได้ค่อนข้างช้า ในปัจจุบันจึงได้มีการกระตุ้นหรือมีการเร่งเพื่อช่วยให้ขบวนการย่อยสลายเกิดได้ดีขึ้นและมีประสิทธิภาพมากขึ้น การย่อยสลายโดยวิธีเร่งธรรมชาติ (bioremediation) กระทำได้โดยการเติมธาตุอาหาร (organic หรือ inorganic nutrient) หรือตัวกระตุ้น (inducer) เพื่อช่วยในการย่อยสลายสารประกอบไฮโดรคาร์บอนโดยจุลินทรีย์ ธาตุอาหารที่มีรายงานวิจัยว่ามีส่วนช่วยเร่งการย่อยสลายได้แก่ ไนโตรเจนและฟอสฟอรัส (Atlas,1991) นอกจากนี้ยังมีการนำสารลดแรงตึงผิว (surfactants) มาใช้ในการเพิ่มความสามารถในการละลายน้ำของ PAHs ซึ่งจะทำให้ง่ายต่อจุลินทรีย์ที่จะเข้าย่อยสลายสารดังกล่าว (Ashok and Saxena, 1995)

3.2.2 โครงสร้างของ PAHs (Structure and Biodegradation)

สิ่งที่สำคัญต่อการย่อยสลายคือคุณสมบัติในการเป็นสารประกอบ PAHs เช่น โครงสร้างของแต่ละสารประกอบ ขนาดของโมเลกุล ความสามารถในการละลายน้ำ การระเหย ความเข้ม-ข้นและการจับตัวกันของสารประกอบ PAHs ความคงทนของสารประกอบซึ่งจะส่งผลต่อการ ย่อยสลายได้ยากด้วย (Ashok and Saxena, 1995)

3.2.3 ปัจจัยทางด้านสิ่งแวดล้อมทั่วไป

ปัจจัยสิ่งแวดล้อมต่างๆเช่น โครงสร้างของดิน pH อุณหภูมิ ปริมาณออกซิเจน ความเค็ม ความสามารถในการละลายน้ำ สารอาหารที่เป็นสารอนินทรีย์ น้ำที่มีความจำเป็นต่อกิจกรรมของจุลินทรีย์ในดิน จุลินทรีย์ประจำถิ่นและจุลินทรีย์ในระบบนิเวศน์ที่มีความสำคัญต่อการย่อยสลายสารประกอบ PAHs ได้สำเร็จ (Ashok and Saxena, 1995)

3.3 ขบวนการย่อยสลายสารประกอบ PAHs โดยจุลินทรีย์

รูปแบบของการย่อยสลายสารประกอบ PAHs โดยจุลินทรีย์แบ่งออกได้ 3 แบบใหญ่ๆ คือ การย่อยสลาย PAHs เพื่อที่จะใช้เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงาน (PAHs assimilation) การย่อยสลาย PAHs โดยขบวนการ co-metabolism (หรือ co-oxidation ถ้าเกิดมีการ oxidation เกิดขึ้น) และการย่อยสลาย PAHs โดยอาศัยการย่อยสลายแบบส่งเสริมกันของกิจกรรมของจุลินทรีย์มากกว่า 1 ชนิด (synergism)

3.3.1 ขบวนการ PAHs assimilation

ขบวนการ PAHs assimilation หมายถึง แบคทีเรียมีการย่อยสลายสารประกอบ PAHs เพื่อนำมาใช้ในการเจริญของเซลล์ สามารถอธิบายได้ด้วยสมการดังนี้

$$\text{PAH} \rightarrow \text{Cells} + CO_2 + H_2O + \text{Energy}$$

การย่อยสลายสารประกอบ PAHs เพื่อใช้เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงานของจุลินทรีย์เป็นกระบวนการสำคัญเพราะมีผลต่ออัตราการเจริญของจุลินทรีย์และกำจัดสารประกอบ PAHs ออกจากสิ่งแวดล้อมได้อย่างสมบูรณ์ การย่อยสลายอย่างสมบูรณ์จนได้ผลิตภัณฑ์สุดท้ายเป็นคาร์บอนไดออกไซด์และน้ำ (mineralization) ส่วนใหญ่จะเกิดขึ้นได้ดีกับ PAHs ที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำซึ่งประกอบไปด้วยวงเบนซีน 2 - 3 วง โดยที่จุลินทรีย์สามารถนำไปใช้เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงานได้ ทำให้มีการเจริญของจุลินทรีย์เกิดขึ้น สำหรับ PAHs ที่มีน้ำหนัก

โมเลกุลสูง (โมเลกุลประกอบด้วยวงเบนซีนตั้งแต่ 4 วงขึ้นไป) จะมีความสามารถในการละลายน้ำได้น้อย มีความคงตัวมากยากต่อการย่อยสลายได้ สารประกอบที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงบางชนิดซึ่งโมเลกุลประกอบด้วยวงเบนซีน 4 วงเช่น pyrene สามารถถูกนำมาใช้ในการเจริญของแบคทีเรียได้ (Cerniglia, 1992) จากการศึกษาจนถึงปัจจุบันนี้ยังไม่มีการค้นพบว่ามีแบคทีเรียชนิดใดสามารถย่อยสลาย PAHs ที่มี 5 วงแหวนเบนซีน แบบ assimilation ได้ การทดลองในระดับของห้อง ปฏิบัติการได้นำเชื้อจากดินที่มีการปนเปื้อนมาทำการทดลอง พบว่าการย่อยสลาย PAHs ที่มี 5 วงแหวนเบนซีนหรือมากกว่านั้นต้องอาศัยขบวนการ co-metabolism หรือ synergism (Wilson and Jones, 1992)

ในปัจจุบันพบว่าจุลินทรีย์ที่มีการค้นพบใหม่ๆ จะมีความสามารถในการย่อยสลาย PAHs ที่มี 3 - 4 วงแหวนเบนซีนให้เป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงานได้ Churchill และคณะ (1999) ได้ทำการศึกษาค้นคว้าพบว่า *Mycobacterium* sp. strain CH1 ที่แยกได้จากตะกอนในน้ำจืดที่มีการปนเปื้อน PAHs มีความสามารถในการย่อยสลาย PAHs ที่มีวงเบนซีน 3-4 วงได้อย่างสมบูรณ์ ชนิดของสารประกอบ PAHs ที่แบคทีเรียชนิดนี้ย่อยสลายได้ก็คือ phenanthrene, pyrene และ fluoranthene โดยพบว่า *Mycobacterium* sp. strain CH1 สามารถใช้ phenanthrene และ pyrene เป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงานได้ด้วย

3.3.2 ขบวนการ Co-metabolism

ขบวนการ Co-metabolism หมายถึงการที่แบคทีเรียเจริญเพิ่มจำนวนบนสับเสตรทชนิดหนึ่งและมีความสามารถในการย่อยสลายสับสเตรทอีกชนิดหนึ่งได้โดยไม่มีการนำมาใช้เป็นองค์ประกอบของเซลล์ (ไม่มีการเจริญบนสับสเตรทชนิดที่ 2) ขบวนการนี้มักเกิดกับการย่อยสลาย PAHs ที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงซึ่งยากต่อการย่อยสลายของจุลินทรีย์ สับสเตรทที่จุลินทรีย์ใช้ในการเจริญอาจเป็นสารอินทรีย์ชนิดต่างๆ ที่อยู่ในบริเวณนั้นหรืออาจเป็นสารประกอบ ~~PAHs~~ ที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำซึ่งจุลินทรีย์มีการเจริญเพิ่มจำนวนมากขึ้นแล้วเข้าไปย่อยสลายสารประกอบ ~~PAHs~~ ที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง

จากการศึกษาของ Walter และคณะพบว่า *Rhodococcus* sp. UW1 ที่แยกได้จากดินที่ปนเปื้อนสารประกอบ PAHs มีความสามารถในการเจริญบน pyrene phenanthrene anthracene fluoranthene หรือ chrysene และมีความสามารถในการย่อยสลาย dibenzofuran, fluorene และ dibenzothiophene แบบ co-metabolism โดยใช้ pyrene เป็นแหล่งของการเจริญ (Walter *et.al.*,1991)

Juhasz และคณะ (Juhasz *et.al.*, 1997) คัดแยกแบคทีเรียจากดินที่เก็บจากแหล่งปนเปื้อนสารประกอบ PAHs ได้กลุ่มของแบคทีเรีย (bacterial community) ซึ่งใช้ pyrene เป็นแหล่งของคาร์บอนและพลังงาน เมื่อนำมาทำการแยกเชื้อบริสุทธิ์และจัดจำแนกชนิดของแบคทีเรียพบว่า

เป็นแบคทีเรีย *Burkholderia cepacia* 3 สายพันธุ์ ซึ่งนอกจาก pyrene แล้ว แบคทีเรียเหล่านี้ยังมีความสามารถในการใช้ fluorene และ phenanthrene เป็นแหล่งของคาร์บอนและพลังงานได้ โดยที่ปริมาณสารประกอบเหล่านี้ที่ใส่ลงในอาหาร basal salt medium (100 มิลลิกรัมต่อลิตร) จะถูกย่อยสลายหมดภายในเวลา 7-10 วัน สำหรับ pyrene นั้น แบคทีเรียเหล่านี้สามารถย่อยสลายได้มากจนถึงระดับความเข้มข้น 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร นอกจากนี้ *Burkholderia cepacia* ทั้งสามสายพันธุ์ยังมีความสามารถในการย่อยสลาย Benz[*a*]-anthracene และ Dibenza[*a,h*]anthracene ได้อีกด้วย ซึ่งในการย่อยสลายดังกล่าวจะเกิดได้ดีขึ้นภายใต้สภาวะของการเกิด co-metabolism โดยมี pyrene เป็นสับสเตรทเพื่อการเจริญของแบคทีเรีย benzo[*a*]pyrene เป็นสารประกอบ PAH อีกชนิดหนึ่งที่มีความเป็นพิษสูงและถูกย่อยสลายได้ยาก ในปัจจุบันยังไม่พบว่ามีแบคทีเรียชนิดใดที่สามารถเจริญบนสารประกอบชนิดนี้ได้ การย่อยสลาย Benzo[*a*]pyrene เกิดได้ โดยขบวนการ co-metabolism แต่มักไม่พบการ ย่อยสลายอย่างสมบูรณ์ (mineralization) (Aitken *et.al*., 1998, Kanaly *et.al*.,1997) อย่างไรก็ตามในปัจจุบันได้พบว่ามีแบคทีเรียสายพันธุ์หนึ่งคือ *Stenotrophomonas maltophilia* สายพันธุ์ VUN 10010 เมื่อเจริญอยู่บน pyrene สามารถย่อยสลาย Benzo[*a*]pyrene ได้อย่างสมบูรณ์ (mineralization) (Boonchan *et.al*., 2000)

3.3.3 ขบวนการ Synergism

การย่อยสลายสารประกอบ PAHs โดยอาศัยขบวนการ synergism จะเป็นการอาศัยกิจกรรมของจุลินทรีย์มากกว่า 1 ชนิดช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการย่อยสลาย PAHs ได้ดียิ่งขึ้นจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการย่อยสลายได้อาจไม่ใช่จุลินทรีย์ชนิดเดียวกันแต่มีการเจริญร่วมกันได้โดยที่สามารถย่อยสลาย PAHs ได้แบบส่งเสริมกัน ดังรายงานของ Andresson และ Henryson (Andresson and Henryson, 1996) ซึ่งได้ทำการทดสอบการย่อยสลายสารประกอบ PAHs ชนิดต่างๆ ในดินโดยใช้เชื้อรา *Phanerochaete chrysosporium* จากการศึกษาพบว่าการย่อยสลายสารประกอบ PAHs ในดินที่ผ่านการฆ่าเชื้อมาก่อนจะมีการสะสมของสารเมตาบอไลต์ ซึ่งไม่ถูกย่อยสลายต่อไป อาจเกิดจากกิจกรรมของจุลินทรีย์ที่อยู่ในดิน (indeginous microfloras) ที่สามารถย่อยสลายสารเมตาบอไลต์ต่อได้จนหมด ในทางตรงข้ามการย่อยสลายสารประกอบ PAHs ในดินที่ไม่ได้ผ่านการฆ่าเชื้อมาก่อน จะไม่พบการสะสมของสารเมตาบอไลต์ดังกล่าวซึ่งสารเมตาบอไลต์ที่เกิดขึ้นจะถูกย่อยสลายต่อไปโดยจุลินทรีย์ประจำถิ่นในดิน

การทดลองในห้องปฏิบัติการซึ่งแสดงให้เห็นว่าขบวนการ synergism มีความสำคัญต่อการย่อยสลายสารประกอบ PAHs ที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงคือ การใช้เชื้อรา *Penicillium janthinellum* สายพันธุ์ VUO10004 ย่อยสลาย benzo[*a*]pyrene ได้เป็นสารเมตาบอไลต์ที่ไม่ถูก

ย่อยสลายต่อ (dead-end metabolites) เมื่อนำเอาแบคทีเรีย *Stenotrophomonas maltophilia* สายพันธุ์ VUN10010 มาเลี้ยงร่วมกันกับราชนิดนี้ในอาหาร BSM เพื่อทำการย่อยสลาย benzo[*a*]pyrene พบการเจริญของแบคทีเรียและเกิดการย่อยสลาย benzo[*a*]pyrene ได้อย่างสมบูรณ์ (Stanley *et.al.*, inpress, Boonchan *et.al.*, 2000)

4. กลไกการย่อยสลายสารประกอบ PAHs โดยจุลินทรีย์

4.1 กลไกการย่อยสลายสารประกอบ PAHs โดยแบคทีเรีย

ในแบคทีเรียกลไกการย่อยสลาย PAHs คือ แบคทีเรียใช้เอนไซม์ dioxygenase ออกซิไดซ์โมเลกุลของ PAHs ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงไปเป็น *cis*-dihydrodiol ซึ่งจะถูกเปลี่ยนแปลงต่อโดยขบวนการ dehydrogenation ซึ่งอาศัยการทำงานของเอนไซม์ dehydrogenase เกิดเป็นสารประเภท dihydroxylated intermediates เช่น catechol (ภาพที่ 2.4) สารดังกล่าวจะเกิด การเปลี่ยนแปลงต่อไปโดยขบวนการตัดวงแหวนเบนซีน (ring fission) ที่เป็นองค์ประกอบในโมเลกุลโดยการทำงานของเอนไซม์ dioxygenase การเกิด ring-fission นี้เกิดขึ้นได้โดย 2 กลไก ได้แก่ (1) *ortho* fission คือเกิดการตัดวงแหวนเบนซีนตรงบริเวณระหว่างหมู่ไฮดรอกซิลสองหมู่ที่อยู่ติดกันในวงเบนซีน และ (2) *meta* fission คือการตัดวงแหวนเบนซีนบริเวณจุดที่ใกล้กับหมู่ไฮดรอกซิล 2 หมู่ที่อยู่ติดกันในวงเบนซีน ผลผลิตที่เกิดขึ้นจาก *ortho* fission จะได้เป็น succinyl CoA และ acetyl CoA สำหรับผลผลิตที่เกิดจาก *meta* fission จะได้เป็น pyruvate และ acetyldehyde ซึ่งสามารถถูกเปลี่ยนแปลงต่อและเข้าสู่ TCA cycle ได้ต่อไป (Cerniglia, 1992)

จากรายงานของ Cerniglia (Cerniglia, 1994) กล่าวถึงตัวอย่างการย่อยสลายิ phenanthrene โดยแบคทีเรียพบว่า phenanthrene ถูกออกซิไดซ์ได้เป็น cis-3,4-dihydroxy-3,4-dihydrophenanthrene ซึ่งจะถูกเมตาบอไลต์ต่อเป็น 1-hydroxy-2-napthoic acid ซึ่งหลังจากนั้นจะถูก decarboxylated ไปเป็น 1,2-dihydroxynapthalene ใน *Aeromonas* จะเมตาบอไลต์สารดังกล่าวนี้ไปเป็น protocatechoic acid ในขณะที่ *Pseudomonas* จะใช้วิถีเมตาบอลิซึมอีกวิถีหนึ่งในการย่อยสลายสารชนิดนี้ไปเป็น catechol สารประกอบทั้งสองชนิดนี้จะเข้าสู่ ring fission pathway ซึ่งอาจเป็นแบบ *meta*- หรือ *ortho*-fission ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิดของแบคทีเรีย

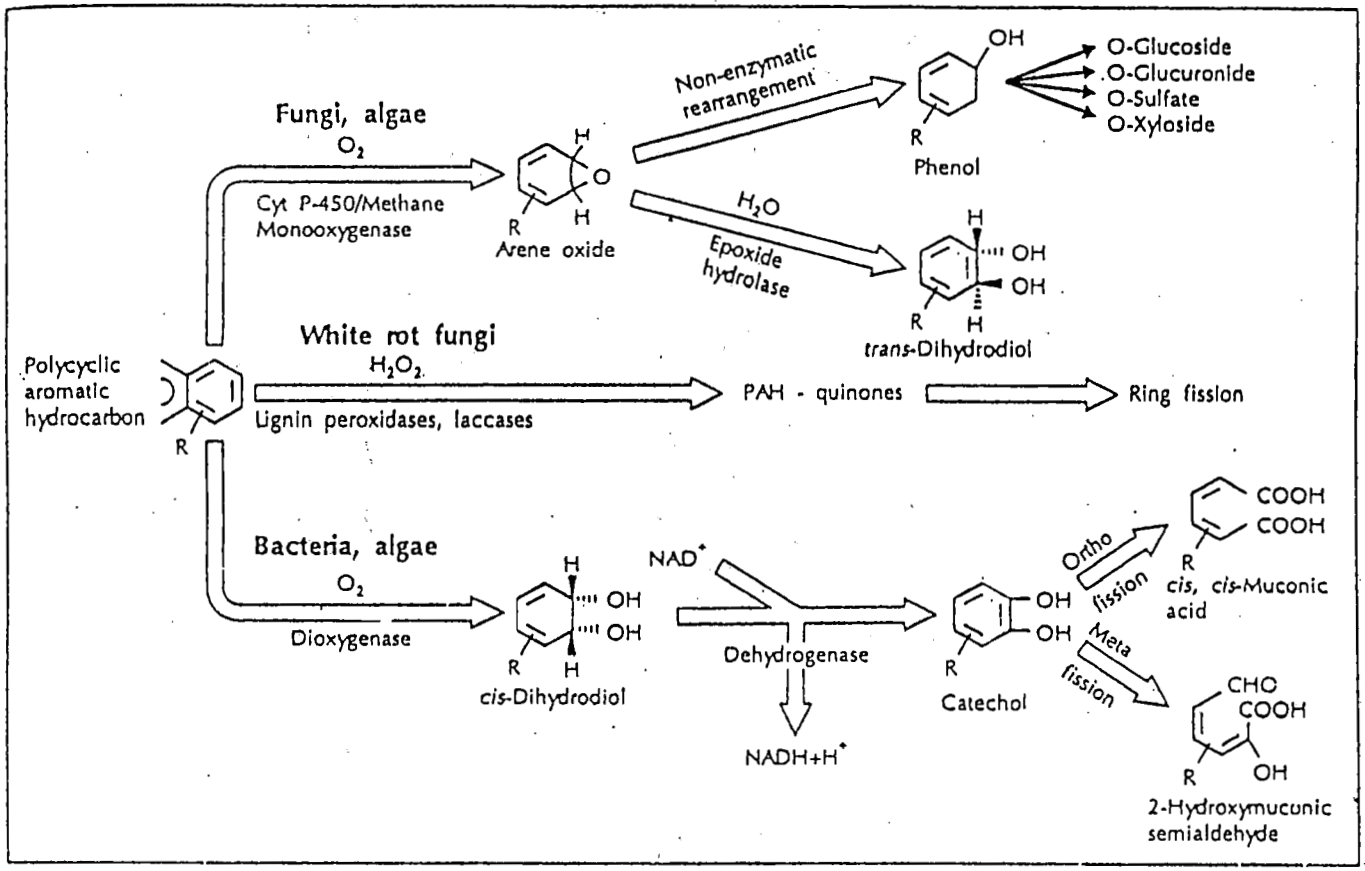
4.2 กลไกการย่อยสลายสารประกอบ PAHs โดยเชื้อรา

กลไกการย่อยสลายสารประกอบ PAHs โดยเชื้อราจะแตกต่างจากแบคทีเรีย (ภาพที่ 4) โดยที่เชื้อราในกลุ่ม non-lignolytic fungi จะใช้เอนไซม์ cytochrome P-450 monooxygenase ในการออกซิไดซ์โมเลกุลของ PAHs ทำให้เกิดสารอินเทอร์มิเดียทประเภท arene oxide ซึ่งสาร

อินเทอร์มิเดียทชนิดนี้จะถูกเปลี่ยนแปลงต่อไปอย่างรวดเร็วโดย 2 กลไก คือ (1) เป็นกลไกที่ไม่ใช้เอนไซม์โดยการเปลี่ยนแปลงจะเป็นการจัดเรียงตัวใหม่ของ arene oxide เปลี่ยนแปลงเป็นสารประเภท phenol ซึ่ง phenol นี้สามารถรวมตัวกับ sulfer, xyloside, glucoside และ glucuronide ได้ (2) เกิดขบวน hydration โดยการกระตุ้นของเอนไซม์ epoxide hydrolase โดยจะเติมน้ำเข้าไปในโมเลกุลของ arene oxide ทำให้เกิดเป็นสารอินเทอร์มิเดียทประเภท *trans*-dihydrodiol (Cerniglia, 1992) เชื้อราที่มีความสามารถในการย่อยสลายสารประกอบ PAHs โดยอาศัยกลไกดังกล่าวนี้ เช่น *Cunninghamella elegans* ย่อยสลาย phenanthrene ไปเป็น phenanthrene-1,2-dihydrodiol (Muncnerqva and Augustin, 1994) จากการศึกษาพบว่าเชื้อราไม่มีการใช้สารประกอบ PAHs เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงาน ดังนั้นในขบวนการย่อยสลายที่เกิดขึ้นจะพบการสะสมของสารอินเทอร์มิเดียทชนิดต่างๆ ซึ่งส่วนใหญ่เป็นสารที่ไม่ถูกย่อยสลายต่อไปโดยเชื้อราชนิดนั้นๆ (dead-end metabolites) สารเหล่านี้ส่วนใหญ่มีความเป็นพิษน้อยกว่าสาร PAHs ตั้งต้น เช่น การย่อยสลาย benzo[*a*]pyrene เกิดเป็น benzo[*a*]pyrene *trans*-4,5-dihydrodiol ซึ่งมีคุณสมบัติในการก่อการกลายพันธุ์หรือการก่อมะเร็งลดลงเมื่อเทียบกับ benzo[*a*]pyrene (Cerniglia, 1992)

เชื้อรากลุ่มที่มีบทบาทสำคัญในการย่อยสลายสารประกอบ PAHs ได้แก่ white-rot fungi โดยที่เชื้อรากลุ่มนี้จะใช้ ligninolytic enzymes เช่น lignin peroxidase และ laccase ในการย่อยสลาย PAHs สารอินเทอร์มิเดียทที่เกิดขึ้นเป็นพวก quinones ซึ่งสามารถถูกเปลี่ยนแปลงต่อไปโดยขบวนการ ring fission มีรายงานว่า white-rot fungi บางชนิด เช่น *Phanerochaete chrysosporium* สามารถทำให้เกิดการย่อยสลายสารประกอบ PAHs ที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง เช่น benzo[*a*]pyrene ได้อย่างสมบูรณ์ (mineralization) โดยอาศัยกลไกดังกล่าว (Bumpus *et al.* 1985)

ดังนั้นจะเห็นได้ว่าจุลินทรีย์แต่ละกลุ่มจะมีกลไกที่ใช้ในการย่อยสลาย PAHs ได้แตกต่างกัน การย่อยสลายสารประกอบ PAHs ที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงอาจต้องอาศัยกลไกที่สลับซับซ้อนขึ้นหรืออาศัยการทำงานร่วมกันของจุลินทรีย์หลายชนิด (synergism) เพื่อให้ขบวนการย่อยสลายเกิดได้สมบูรณ์



ภาพที่ 4 กลไกการย่อยสลายสารประกอบ PAHsโดยจุลินทรีย์

(ที่มา: Cerniglia, 1993)

บทที่ 3

วัสดุอุปกรณ์และวิธีการทดลอง

วัสดุอุปกรณ์

1. ตัวอย่างดินสำหรับการแยกแบคทีเรีย

ดินที่ใช้สำหรับการแยกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลายสารประกอบได้มาจากบริเวณที่มีการปนเปื้อนคราบน้ำมันหรือปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอน 5 แหล่งคือ

1.1 ดินจากบริเวณจุดทิ้งน้ำมัน บริษัทไทโคโพลีอุตสาหกรรมจำกัด

1.2 น้ำจากบริเวณจุดทิ้งน้ำมัน บริษัทไทโคโพลีอุตสาหกรรมจำกัด

1.3 ดินจากร้านซ่อมรถจักรยานยนตร์ "ร้านลุงแกะ"

1.4 ดินจากร้านซ่อมรถจักรยานยนตร์ เยื้องกับสดใสอพาร์ตเมนต์

1.5 ดินจากร้านซ่อมรถจักรยานยนตร์ ด้านหลังโรงเรียนสาธิตพิบูลย์บำเพ็ญ

2. สารเคมี

2.1 Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs)

2.1.1 Phenanthrene (Sigma Chemical Company, St Louis, MO, USA)

2.1.2 Pyrene (Sigma Chemical Company, St Louis. MO, USA)

2.2 สารเคมีอื่นๆ

2.2.1 Dimethyl formamide (BDH Laboratory Supplies, Poole, England)

2.2.2 สารเคมีอื่นๆ (ระบุรายละเอียดในแต่ละส่วนที่เกี่ยวข้อง)

3. อาหารเลี้ยงเชื้อ

3.1 Basal salt medium (BSM) (ภาคผนวก ก)

3.2 Nutrient agar (ภาคผนวก ก)

4. เครื่องมือ

4.1 Rotary shaker

4.2 Spectophotometer

4.3 Centrifuge

วิธีการทดลอง

1. การเก็บตัวอย่างดินและน้ำจากแหล่งที่มีการปนเปื้อนสารประกอบปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอน

การเก็บตัวอย่างดินจากบริเวณที่พบมีการปนเปื้อนของสารประกอบปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนโดยขุดดินลึกประมาณ 5-10 เซนติเมตร แล้วจึงทำการเก็บตัวอย่างใส่ในขวดปราศจากเชื้อ การเก็บตัวอย่างน้ำโดยดูดน้ำที่ลึกระดับประมาณ 5 เซนติเมตร ใส่ในขวดปราศจากเชื้อ แล้วเก็บตัวอย่างดินและน้ำใส่ในถังน้ำแข็งนำมายังห้องปฏิบัติการและเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส บันทึกแหล่งที่มาลักษณะทางกายภาพของตัวอย่างดินและน้ำแสดงในตารางที่ 6

ตารางที่ 6 ตัวอย่างดินและน้ำที่นำมาใช้ในการคัดแยกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลายสารประกอบ PAHs

ตัวอย่าง	ลักษณะทางกายภาพ	แหล่งที่มา
ดิน (F1)	ดินมีสีดำ เป็นเม็ดจับกันเหนียวหนืดเนื่องมาจากการปนเปื้อนของน้ำมัน มีกลิ่นน้ำมัน	บริเวณจุดทิ้งน้ำมันจากการผลิต ของบริษัทไทโคโพลีอุตสาหกรรมจำกัด
น้ำ (F2)	น้ำมีสีเหลืองขุ่นมาก บนผิวน้ำมีชั้นของน้ำมันลอยอยู่	บริเวณจุดทิ้งน้ำมันจากการผลิต ของบริษัทไทโคโพลีอุตสาหกรรมจำกัด
ดิน (S1)	ดินมีสีดำ เป็นดินร่วน ไม่หนืด	ร้านซ่อมรถจักรยานยนต์ “ร้านลุงแกะ”
ดิน (S2)	ดินมีสีเทา เป็นดินทราย	ร้านซ่อมรถจักรยานยนต์ เยื้องกับสดใสอพาร์ตเมนต์
ดิน (S3)	ดินมีสีดำ เป็นดินร่วน ไม่หนืด	ร้านซ่อมรถจักรยานยนต์ ด้านหลังโรงเรียนสาธิตพิบูลย์บำเพ็ญ

2. การทำ Enrichment แบคทีเรียที่ย่อยสลายสารประกอบ PAHs

2.1 นำตัวอย่างดินที่ปนเปื้อน 20 กรัมใส่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่บรรจุสารละลาย Ringer’s solution ที่ปราศจากเชื้อ 100 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปเขย่าบนเครื่องเขย่า 150 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 - 16 ชั่วโมง

2.2 นำ suspension ของดิน มาตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลาประมาณ 15 นาที เพื่อให้อนุภาคของดินตกตะกอนจากนั้นดูดเอาน้ำส่วนบนปริมาตร 1 มิลลิลิตร มาใส่ในขวดขนาด 30 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุ Basal salt mediam (BSM) และสารประกอบ PAH (phenanthrene หรือ pyrene ความเข้มข้นในอาหารเท่ากับ 100 มิลลิกรัมต่อลิตร) ชุดควบคุมได้แก่ BSM ที่มีสารประกอบ PAH แต่ละชนิดผสมอยู่แต่ไม่ได้รับ หัวเชื้อ นำชุดทดสอบและชุดควบคุมมาบ่มบนเครื่องเขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส สังเกตการเจริญของจุลินทรีย์โดยดูจากความขุ่นการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางกายภาพของสารประกอบ PAHs ในอาหารเลี้ยงเชื้อภายในชุดทดสอบเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ระยะเวลาต่างๆ

2.3 เมื่อพบการเปลี่ยนแปลงในชุดทดสอบ ทำการถ่ายเชื้อลงในขวดที่บรรจุ BSM และสารประกอบ PAH ที่ปราศจากเชื้อ 10 มิลลิลิตร (ปริมาณหัวเชื้อเท่ากับ 10% โดยปริมาตร) นำมาบ่มบนเครื่องเขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

2.4 เมื่อทำการถ่ายเชื้อต่ออีก 3-4 ครั้ง ในการถ่ายเชื้อครั้งที่ 5 เปลี่ยนความเข้มข้นของ phenanthrene ที่ใช้เป็นความเข้มข้นในอาหารเท่ากับ 250 มิลลิกรัมต่อลิตรจากนั้นทำการถ่ายเชื้อต่อไปอีก 3-4 ครั้ง นำจุลินทรีย์ผสม (mix consortium) ส่วนหนึ่งเก็บใน glycerol medium ที่อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส (ดังรายละเอียดในข้อ 4) อีกส่วนหนึ่งนำไปทำการแยกแบคทีเรียบริสุทธิ์ที่มีความสามารถในการย่อยสลายสารประกอบ PAH (ดังรายละเอียดในข้อ 3)

3. การแยกจุลินทรีย์ที่ย่อยสลายสารประกอบ PAHs

3.1 นำจุลินทรีย์ผสม (mixed culture) ที่ได้จากการทำ enrichment (ข้อ 1) มาทำการเจือจางตามลำดับ 10 เท่า (10^{-1} ถึง10^{-4}) จากนั้นนำ suspension ของจุลินทรีย์ผสมแต่ละค่าความเจือจางมา เกลี่ยบนอาหาร BSM agar

3.2 เตรียมสารละลาย PAH ใน diethyl ether (5% phenanthrene และ 2% pyrene) จากนั้นนำไปพ่นทับผิวหน้าอาหารที่เตรียมในข้อ 3.1 เปิดฝาจานทิ้งไว้ประมาณ 15 นาที เพื่อให้ diethyl ether ระเหยจนหมด จากนั้นปิดฝาจาน แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส สังเกตการเจริญของแบคทีเรียและการเกิดโซนใสรอบๆ โคโลนี ซึ่งแสดงถึงการย่อยสลายสารประกอบ PAH

3.3 นำโคโลนีเดี่ยวๆ ที่ได้ในข้อ 3.2 ซึ่งมีลักษณะที่แตกต่างกันมาขีดบนอาหาร BSM agar และพ่นทับด้วยสารละลาย PAH อีกครั้งเพื่อแยกเชื้อให้บริสุทธิ์

สำนักหอสมุด มหาวิทยาลัยบูรพา
ต.แสนสุข อ.เมือง จ.ชลบุรี 20131

3.4 นำแบคทีเรียแต่ละโคโลนีมาทดสอบเพื่อยืนยันความสามารถเบื้องต้นในการย่อยสลายสารประกอบ PAH ในอาหาร BSM ที่มีสารประกอบ PAH เป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงาน จากนั้นเก็บแบคทีเรียแต่ละไอโซเลทใน glycerol medium ที่อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส

4. การเก็บรักษาจุลินทรีย์

4.1 นำแบคทีเรียผสมจากข้อ 1 และแบคทีเรียบริสุทธิ์ที่แยกได้ในข้อ 2 มาเลี้ยงเพื่อเพิ่มปริมาณในอาหาร BSM ที่มีสารประกอบ PAH (ความเข้มข้น 250 มิลลิกรัมต่อลิตร) เป็นแหล่งของคาร์บอนและพลังงาน นำมาบ่มบนเครื่องเขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

4.2 เก็บเซลล์โดยการปั่นที่ความเร็ว 7,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นล้างเซลล์ด้วย BSM ที่ปราศจากเชื้อ นำไปปั่นอีกครั้งทำการเก็บเซลล์และทำเป็น suspension ใน 50% glycerol medium ปราศจากเชื้อที่มี phenanthrene หรือ pyrene ผสมอยู่ ผสมให้เข้ากันดีแล้วดูดใส่ eppendorf tubes หลอดละ 1 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปเก็บรักษาที่อุณหภูมิ –70 องศาเซลเซียส

2. การจำแนกแบคทีเรียบริสุทธิ์ที่มีความสามารถในการย่อยสลายสารประกอบ PAHs

นำแบคทีเรียบริสุทธิ์ที่แยกได้จากข้อ 2 มาจำแนกโดยทางสัณฐานวิทยาและวิธีชีวเคมี (biochemical tests) โดยวิธีของ Bergey's manual (Krieg and Holt, 1984) ซึ่งประกอบด้วยการทดสอบต่างๆ ดังนี้ (รายละเอียดของวิธีการทดสอบแสดงในภาคผนวก ง)

6. การศึกษาประสิทธิภาพของการย่อยสลายสารประกอบ PAHs โดยแบคทีเรีย

6.1 เลี้ยงเซลล์แบคทีเรียเชื้อบริสุทธิ์หรือเชื้อผสมในอาหาร BSM ที่มีสารประกอบ PAH (ความเข้มข้น 250 มิลลิกรัมต่อลิตร) เป็นแหล่งของคาร์บอนและพลังงานจนถึงระยะ exponential phase

6.2 นำเซลล์ที่ได้จากข้อ 6.1 มาใช้เป็นหัวเชื้อ โดยใส่ลงในขวดขนาด 30 มิลลิลิตร ซึ่งมีอาหาร BSM 10 มิลลิลิตร ที่มีสารประกอบ PAH ผสมอยู่ (ความเข้มข้น 250 มิลลิกรัมต่อลิตร) ขนาดของหัวเชื้อที่ใช้เท่ากับ 10% โดยปริมาตร การทดลองชุดควบคุมมี 2 ชุด คือ ชุดที่ 1 ได้แก่ BSM ที่มี PAH ผสมอยู่ แต่ไม่มีการใส่หัวเชื้อ และชุดที่ 2 คือ BSM ที่มี PAH ผสมอยู่ และมีการใส่หัวเชื้อซึ่งเป็นเซลล์แบคทีเรียแต่ละชนิดที่ถูกฆ่าด้วย 0.2%

547.6
ส769
ค.2

148635

$HgCl_2$ ชุดการทดลองและชุดควบคุมจะทำ 2 ซ้ำจากนั้นนำขวดทั้งหมดไปบ่ม บนเครื่องเขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

6.3 เก็บตัวอย่างทุกช่วงเวลาที่กำหนด (0, 12, ,24, 36, 42, 48, 54, 60, 66 และ 72 ชั่วโมง สำหรับการย่อยสลาย phenanthrene และเก็บตัวอย่างเพื่อทำการวิเคราะห์ทุกวันสำหรับการย่อยสลาย pyrene) เพื่อนำไปวิเคราะห์ปริมาณ PAH ปริมาณสารเมตาบอไลต์ในกลุ่มสารประกอบฟีนอลและการเจริญของแบคทีเรีย

7. การวัดการเจริญของของแบคทีเรียบนสารประกอบ PAHs

การเจริญของแบคทีเรียในการศึกษานี้แสดงโดยปริมาณโปรตีนของเซลล์ ซึ่งวิเคราะห์โดยวิธีที่ดัดแปลงจากวิธีของ Lowry และคณะ (Lowry *et al.*, 1951) มีขั้นตอนดังนี้

7.1 นำตัวอย่างที่เก็บในข้อ 6 ที่เก็บในแต่ละช่วงเวลา ปริมาตร 10 มิลลิลิตร มาปั่นด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง (Sorvall RC 26 plus) ด้วยความเร็ว 3,800-4,000 รอบต่อนาที (rpm) เป็นเวลา 20 นาที

7.2 แยกส่วนน้ำใสออก(ส่วนนี้จะถูกนำไปวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลตามวิธีที่อธิบายในข้อ 8) นำส่วนของเซลล์ (cell pellet) มา resuspend ในสารละลาย 0.46 N NaOH (1 มิลลิลิตร) ใส่ลงใน eppendorf tubes แล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

7.3 นำ suspension ของเซลล์ในข้อ 7.2 มาต้มในน้ำร้อนที่มีอุณหภูมิ 90 องศา-เซลเซียส เป็นเวลา10 นาที ดูด suspension ของเซลล์ที่ผ่านการต้มแล้วปริมาตร 50 ไมโครลิตร ใส่ในหลอดทดลองขนาด 5 มิลลิลิตร ซึ่งภายในบรรจุ 0.45 M NaH_2PO_4-ปริมาตร 450 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยใช้เครื่องปั่นผสม (vortex)

7.4 เติม reagent C (ภาคผนวก ก) ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันโดยใช้เครื่องปั่นผสม จากนั้นตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเติม Folin-Ciocalteau reagent (ภาคผนวก ก) ปริมาตร 0.25 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันโดยใช้เครื่องปั่นผสม จากนั้นตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร

7.5 นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปคำนวณค่าความเข้มข้นของโปรตีน โดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานซึ่งใช้ bovine serum albumin เป็นโปรตีนมาตรฐาน

8. การวัดปริมาณสารฟีนอลที่เกิดขึ้นในขบวนการย่อยสลายสารประกอบ PAHs

การวัดปริมาณสารประกอบกลุ่มฟีนอล (phenolic compounds) ซึ่งถูกสร้างขึ้นใน ขบวนการย่อยสลายสารประกอบ PAHs กระทำตามวิธีของ Box (Box ,1983) ดังมีขั้นตอนดังนี้

8.1 เติมสารละลาย Na_2CO_3 (200 มิลลิกรัมต่อลิตร) ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร ลงใน ส่วนน้ำใสที่ได้จากการปั่นแยกเซลล์ (ข้อ 7.2) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน

8.2 เติม Folin-Ciocalteau reagent ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันโดยใช้เครื่องปั่นผสม จากนั้นตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง

8.3 นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง Spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปคำนวณหาปริมาณสารประกอบฟีนอลโดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานซึ่งใช้ resorcinol เป็นสารมาตรฐาน

9. การวิเคราะห์ปริมาณ PAH

นำตัวอย่างของชุดการทดลองและชุดควบคุมมาสกัด PAH ออกจากอาหารเลี้ยงเชื้อโดยการใช้ เทคนิค liquid-liquid extraction ดังรายละเอียดดังต่อไปนี้

9.1 เติม 1 มิลลิลิตร ของ dichloromethane และ 0.1 มิลลิลิตร ของ 2,3-benzo[*b*]fluorene (จาก stock solution เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร; เป็น internal standard) ลงในแต่ละขวดตัวอย่างของชุดการทดลองและชุดควบคุม เขย่าด้วยมืออย่างแรงเป็นเวลาประมาณ 30 วินาที จากนั้นตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1-2 ชั่วโมง ซึ่งจะพบการแยกเป็นชั้นระหว่างชั้นของตัวทำละลาย (solvent phase) ซึ่งมี PAH อยู่ และชั้นของน้ำ (water phase) ซึ่งจะเป็นส่วนของเซลล์และอาหารเลี้ยงเชื้อ

9.2 นำขวดตัวอย่างที่ผ่านการสกัดในข้อ 9.1 ไปเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12-16 ชั่วโมง

9.3 นำขวดตัวอย่างในข้อ 9.2 มาวางที่อุณหภูมิห้องเพื่อให้น้ำแข็งละลาย จากนั้นใช้ glass syringe ดูดส่วนของตัวทำละลาย (solvent phase) ออกมาประมาณ 0.5-0.8 มิลลิลิตร ใส่ลงใน vials ขนาด 2 มิลลิลิตร

9.4 นำสารสกัด PAH ที่ได้ในข้อ 9.3 ไปวิเคราะห์ปริมาณโดยใช้ เทคนิค gas chromatography ซึ่งมีสภาวะของการทำเป็นดังนี้ **Column:** BPX-5 capillary column (25 m x 0.22 mm) **Flow rate:** 0.8 มิลลิลิตรต่อนาที **Pressure:** 20 psi **Oven temperature:** 200 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นเพิ่มอุณหภูมิ (ด้วยอัตรา 10 องศาเซลเซียส ต่อนาที)

เป็น 320 องศาเซลเซียส จากนั้นอยู่ที่อุณหภูมิ 320 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที **Injector & Detector temperature:** 300 องศาเซลเซียส

9.5 คำนวณค่าอัตราส่วนระหว่างพื้นที่ใต้พีค (peak area) ของ PAH แต่ละชนิด และพื้นที่ใต้พีคของ internal standard

9.6 คำนวณค่าความเข้มข้นของ PAH แต่ละชนิดจากกราฟมาตรฐานซึ่งเป็นกราฟที่เขียนขึ้นระหว่างความเข้มข้นต่างๆ ของสารประกอบ PAH (แกน x) และอัตราส่วนค่าอัตราส่วนระหว่างพื้นที่ใต้พีคของ PAH แต่ละชนิด และพื้นที่ใต้พีคของ internal standard (แกน y)

10. การตรวจสอบการสร้างเอนไซม์ Dioxygenases

ความสามารถในการออกซิไดซ์ indole ไปเป็น indigo แสดงถึงว่าแบคทีเรียดังกล่าวมีระบบเอนไซม์ dioxygenases อยู่ เอนไซม์ dioxygenases เกี่ยวข้องกับขบวนการย่อยสลายสารประกอบ PAHs โดยเฉพาะในขั้นตอนแรกของขบวนการย่อยสลาย เพื่อที่จะแสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียที่แยกได้ในการทดลองนี้มีการย่อยสลายสารประกอบ phenanthrene โดยใช้ระบบเอนไซม์ dioxygenases จึงได้มีการตรวจสอบการสร้างเอนไซม์ชนิดนี้ โดยกระทำตามวิธีของ Ensley และคณะ (1983) ซึ่งมี รายละเอียดดังต่อไปนี้

10.1 เลี้ยงแบคทีเรียบริสุทธิ์ที่แยกได้ ในอาหาร BSM (10 มิลลิลิตร) ซึ่งมี phenanthrene (ความเข้มข้น 250 มิลลิกรัมต่อลิตร) ผสมอยู่ บ่มบนเครื่องเขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส จนกระทั่งเซลล์มีการเจริญอยู่ในระยะ exponential phase

10.2 นำเซลล์ในข้อ 10.1 มาปั่นด้วยความเร็ว 7,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 10 นาทีเพื่อแยกเซลล์ออกจากอาหารเลี้ยงเชื้อ จากนั้นล้างเซลล์ 1 ครั้งด้วย BSM ที่ปราศจากเชื้อแล้วนำมา resuspend ใน BSM ที่ปราศจากเชื้อในปริมาตร 10 มิลลิลิตรใช้เป็นหัวเชื้อ

10.3 นำหัวเชื้อที่เตรียมได้ในข้อ 10.2 มาใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ BSM (10 มิลลิลิตร) ซึ่งมี phenanthrene (ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร) และ indole (0.2 มิลลิโมล) ผสมอยู่ บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 130 รอบต่อนาที ชุดควบคุมได้แก่ ชุดที่ 1 BSM ซึ่งมี phenanthrene และ indole ผสมอยู่และใส่หัวเชื้อเป็นแบคทีเรียที่ ถูกฆ่าด้วย 0.2% $HgCl_2$ ชุดที่ 2 BSM ที่มี phenanthrene และ indole แต่ไม่ใส่หัวเชื้อ และชุดที่ 3 BSM ที่มี phenanthrene และใส่หัวเชื้อแต่ไม่ใส่ indole สังเกตการเปลี่ยนแปลงในชุดการทดลองและชุดควบคุม หากมีการสร้างเอนไซม์ dioxygenase จะทำให้สังเกตพบการเปลี่ยนแปลงของอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นสีฟ้าซึ่งเกิดขึ้นจากการเปลี่ยนแปลงของ indole ที่เติมลงไปเปลี่ยนเป็น indigo ซึ่งมีสีฟ้า

10.4 นำตัวอย่างจากข้อ 10.3 มาสกัดด้วย ethyl acetate (ปริมาตร 2 เท่า) เก็บส่วนที่เป็น solvent phase นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร

11. การสกัด crude enzymes จากเซลล์ แบคทีเรีย

11.1 เลี้ยงเซลล์แบคทีเรียบริสุทธิ์ที่แยกได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อ BSM ที่มี pyrene (ความเข้มข้น 250 มิลลิกรัมต่อลิตร) เป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงานจนถึงระยะ exponential phase

11.2 นำเซลล์ในข้อ 11.1 มาปั่นด้วยความเร็ว 7,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 20 นาทีเพื่อแยกเซลล์ออกจากอาหารเลี้ยงเชื้อ จากนั้นล้างเซลล์ 1 ครั้งด้วย BSM ที่ปราศจากเชื้อปริมาตรเท่าเดิมแล้วนำมาปั่นด้วยความเร็ว 7,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 20 นาที

11.3 เก็บเซลล์ที่ได้จากการปั่นแยกนำมา resuspend ใน phosphate buffer pH 7.0 และ pH 7.5 ที่ปราศจากเชื้อในปริมาตร 5 มิลลิลิตร

11.4 ทำให้เซลล์แตกโดยการ freeze-thaw จำนวน 10 รอบจากนั้นนำไปทำ heat treatment ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

11.5 นำเซลล์ที่ได้ไปปั่นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ความเร็ว 7,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที

11.6 เก็บส่วนน้ำใสเพื่อนำไปวิเคราะห์ dioxygenase activity ดังรายละเอียดแสดงในข้อ 12

12. การตรวจสอบวิถีเมตาบอลิซึมเบื้องต้นของการย่อยสลาย pyrene โดยแบคทีเรีย

12.1 การวิเคราะห์เอนไซม์ catechol-1,2-oxygenase (Gibson, 1971)

12.1.1 นำตัวอย่างสำหรับการวิเคราะห์ใส่ลงใน cuvette ซึ่งประกอบด้วย phosphate buffer pH 7.0 (2.0 มิลลิลิตร), EDTA (0.4 มิลลิลิตร) และ crude enzymeที่ได้จากข้อ 11 (0.1 มิลลิลิตร) ปรับปริมาตรเป็น 2.7 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ

12.1.2 เติม catechol solution (0.3 มิลลิลิตร) ลงใน cuvette ที่มี reaction mix ในข้อ 12.1.1 อยู่

12.1.3 อ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร ทุกๆ 30 วินาที ส่วนหลอด cuvette ที่เป็น blank ประกอบด้วย phosphate buffer pH 7.0 (2.0 มิลลิลิตร), EDTA (0.4 มิลลิลิตร), crude enzyme (0.1 มิลลิลิตร) และใช้น้ำกลั่น (0.3 มิลลิลิตร) แทนสารละลาย catechol

12.1.4 การทดสอบเพื่อยืนยันว่าการเปลี่ยนแปลงของ catechol ใน reaction mix เกิดจาก crude enzyme ทำโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 260 นาโนเมตร ของชุดควบคุม อีกชุดหนึ่งที่ประกอบองค์ประกอบทุกอย่างเหมือนในข้อ 11.1.1 แต่ใช้ phosphate buffer แทน crude enzyme

12.1.5 บันทึกผลเป็น positive ถ้าค่า OD_{260} สูงสุดในระยะเวลาที่ทดสอบมากกว่าชุดควบคุมเกิน 0.05 และมีค่ามากกว่า 0.1 สำหรับ reaction ที่ทำการทดสอบ ถ้าค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไม่อยู่ในเกณฑ์ดังกล่าวถือว่าผลเป็น negative (ไม่มีเอนไซม์ชนิดนี้ใน crude enzyme)

12.2 การวิเคราะห์เอนไซม์ catechol-2,3-oxygenase (Gibson, 1971)

12.2.1 ใส่ตัวอย่างสำหรับการวิเคราะห์ลงใน cuvette ซึ่งประกอบด้วย phosphate buffer pH 7.5 (2.8 มิลลิลิตร) และ crude enzyme (0.1 มิลลิลิตร)

12.2.2 เติมสารละลาย catechol 0.1 มิลลิลิตร ลงใน cuvette ที่มี reaction mix อยู่ อ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 375 นาโนเมตร ทุกๆ 30 วินาที ชุดควบคุมที่เป็น reference cuvette ประกอบด้วย phosphate buffer 2.9 มิลลิลิตร และ 0.1 มิลลิลิตร ของ crude enzyme

12.2.3 การทดสอบเพื่อยืนยันว่าการเปลี่ยนแปลงของ catechol ใน reaction mix เกิดจาก crude enzyme ทำโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 375 นาโนเมตร ของชุดควบคุม อีกชุดหนึ่งที่ประกอบองค์ประกอบทุกอย่างเหมือนในข้อ 11.2.1 แต่ใช้ phosphate buffer แทน crude enzyme

12.2.4 บันทึกผลเป็น positive คือมีเอนไซม์ชนิดนี้อยู่ใน crude enzymes ซึ่งใน reaction mix ที่ทดสอบจะต้องมีค่า OD_{375} สูงสุดในระยะเวลาที่ทดสอบมากกว่าชุดควบคุมเกิน 0.05 และมีค่ามากกว่า 0.1 ถ้าค่า OD_{375} ที่ได้ไม่อยู่ในเกณฑ์ดังกล่าว ถือว่าผลเป็น negative

บทที่ 4

ผลการทดลอง

4.1 การทำ Enrichment แบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลายสารประกอบ PAHs

จากการนำตัวอย่างดินและน้ำที่ปนเปื้อนสารประกอบปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนมาทำ enrichment ในอาหาร BSM ที่มีสารประกอบ PAH (phenanthrene, pyrene หรือ benzo[*a*]pyrene) เป็นแหล่งของคาร์บอนและพลังงานเพียงอย่างแหล่งเดียว หลังจากที่พบการเจริญของแบคทีเรีย (สังเกตจากความขุ่น) และการเปลี่ยนแปลงของสารประกอบ PAHs (ผลึก PAH สีขาวขุ่นหายไปจากอาหาร) จะทำการถ่ายเชื้อต่อไป (มากกว่า 4 ครั้ง) เพื่อกำจัดแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ ที่ติดมากับตัวอย่างดินและน้ำ เมื่อผ่านการถ่ายเชื้อไป 5 ครั้งพบการเจริญของแบคทีเรียและการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพของสารประกอบ phenanthrene และ pyrene ที่มีอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อดังแสดงในตารางที่ 7 และ 8 และภาพที่ 5 ตามลำดับ สำหรับอาหารที่มี benzo[*a*]pyrene เป็นแหล่งของคาร์บอนและพลังงานนั้นไม่พบการเจริญของแบคทีเรียและการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพของสารประกอบชนิดนี้

ตารางที่ 7 การเจริญของแบคทีเรียใน enriched cultures[a]

PAH	Growth from inoculum :				
	F1[b]	F2[b]	S1[b]	S1[b]	S3[b]
Phenanthrene	+++	+++	+++	+++	+++
Pyrene	+	+	+++	+++	+++
Benzo[*a*]pyrene	-	-	-	-	-

[a] การเจริญของแบคทีเรียในอาหาร BSM ที่มี phenanthrene (250 มิลลิกรัมต่อลิตร) หรือ pyrene (100 มิลลิกรัมต่อลิตร) หรือ benzo[*a*]pyrene (50 มิลลิกรัมต่อลิตร) โดยสังเกตจากความขุ่นของเซลล์ในอาหารและการวัดการเปลี่ยนแปลงของปริมาณโปรตีนทั้งหมดในอาหารเลี้ยงเชื้อ เมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 วัน (สำหรับ phenanthrene) หรือ 7 วัน (สำหรับ pyrene) หรือ 14 วัน (สำหรับ benzo[*a*]pyrene) ในตารางแสดงการเจริญของแบคทีเรียเมื่อผ่านการ subcultured มาแล้ว 5 ครั้ง โดยกำหนดให้ + หมายถึงเจริญได้น้อย, ++ หมายถึงเจริญได้ปานกลาง และ +++ หมายถึงเจริญได้มาก

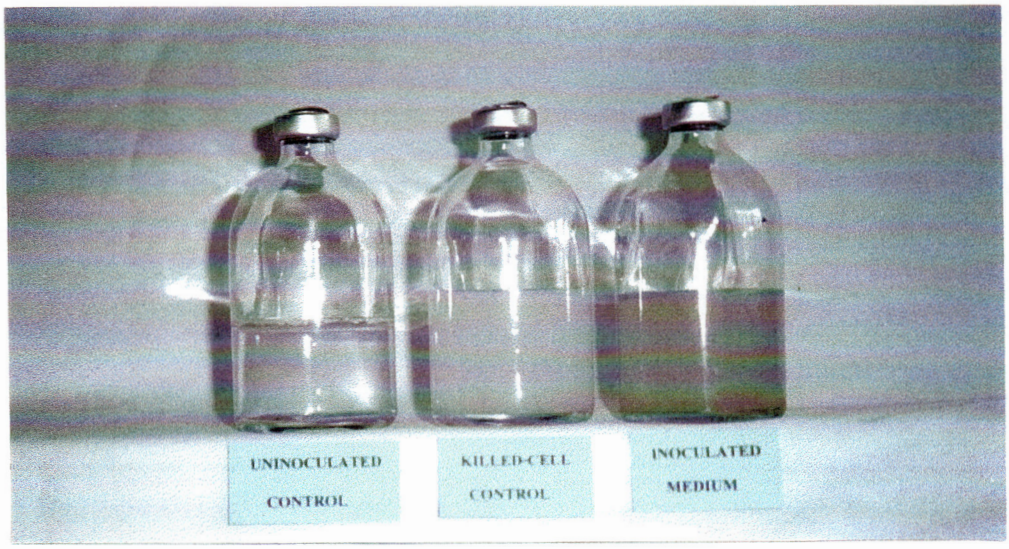
[b] ตัวอย่างดินหรือน้ำที่ปนเปื้อนดังแสดงรายละเอียดในตารางที่ 6

ตารางที่ 8 การเปลี่ยนแปลงทางกายภาพของสารประกอบ PAHs ใน enriched cultures[a]

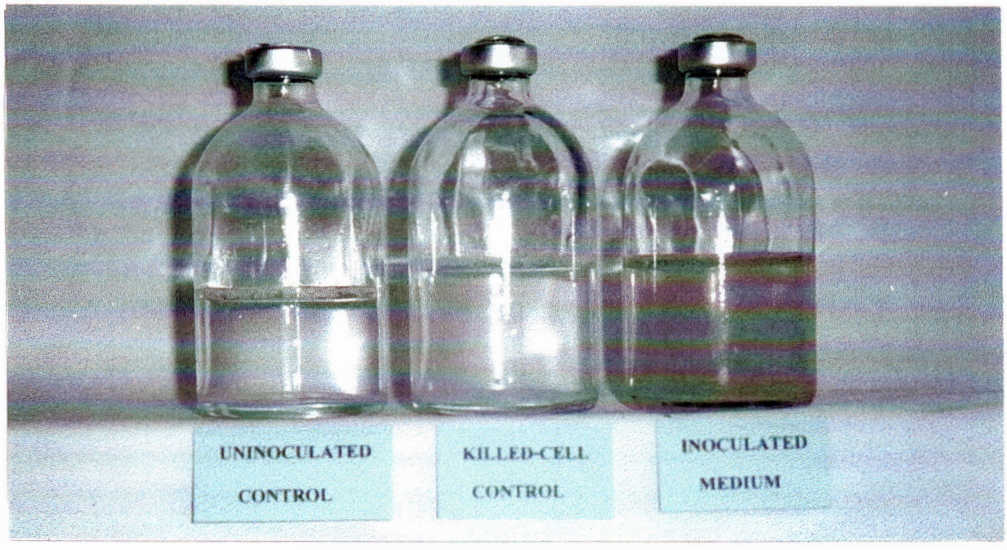
Enriched culture from:	PAH	
	Phenanthrene	Pyrene
F1	ผลึกสีขาวของ phenanthrene หมดไป อาหารเลี้ยงเชื้อใสสีเหลือง	มีผลึกสีขาวของ pyrene ลอยอยู่ อาหารเลี้ยงเชื้อมีลักษณะขุ่น เล็กน้อย
F2	ผลึกสีขาวของ phenanthrene หมดไป อาหารเลี้ยงเชื้อใสสีเหลืองน้ำตาล	มีผลึกสีขาวของ pyrene ลอยอยู่ อาหารเลี้ยงเชื้อมีลักษณะขุ่น เล็กน้อย
S1	ผลึกสีขาวของ phenanthrene หมดไป อาหารเลี้ยงเชื้อใสสีเหลือง	ผลึกสีขาวของ pyrene หมดไป อาหารเลี้ยงเชื้อขุ่น และเปลี่ยนเป็นสีเหลือง
S2	ผลึกสีขาวของ phenanthrene หมดไป อาหารเลี้ยงเชื้อใสสีส้มชมพู มีตะกอนสีขาวขุ่น	มีผลึกสีขาวของ pyrene ลอยอยู่ อาหารเลี้ยงเชื้อมีลักษณะขุ่น เล็กน้อย
S3	ผลึกสีขาวของ phenanthrene หมดไป อาหารเลี้ยงเชื้อใสสีเหลืองอ่อน มีตะกอนสีขาวขุ่น	มีผลึกสีขาวของ pyrene ลอยอยู่ อาหารเลี้ยงเชื้อมีลักษณะขุ่น เล็กน้อย

[a] เป็นการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพของสารประกอบ phenanthrene หรือ pyrene ในอาหาร BSM ซึ่งใช้หัวเชื้อจาก enriched cultures ของตัวอย่างดินและน้ำเช่นเดียวกับที่แสดงในตารางที่ 7 เมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 วัน (สำหรับ phenanthrene) หรือ 7 วัน (สำหรับ pyrene) ไม่พบการเปลี่ยนแปลงของชุดควบคุมซึ่งเป็นอาหาร BSM ที่มี phenanthrene หรือ pyrene เป็นองค์ประกอบแต่ไม่มีการใส่หัวเชื้อ หรือใส่หัวเชื้อที่ฆ่าแล้วด้วย $HgCl_2$

A



B



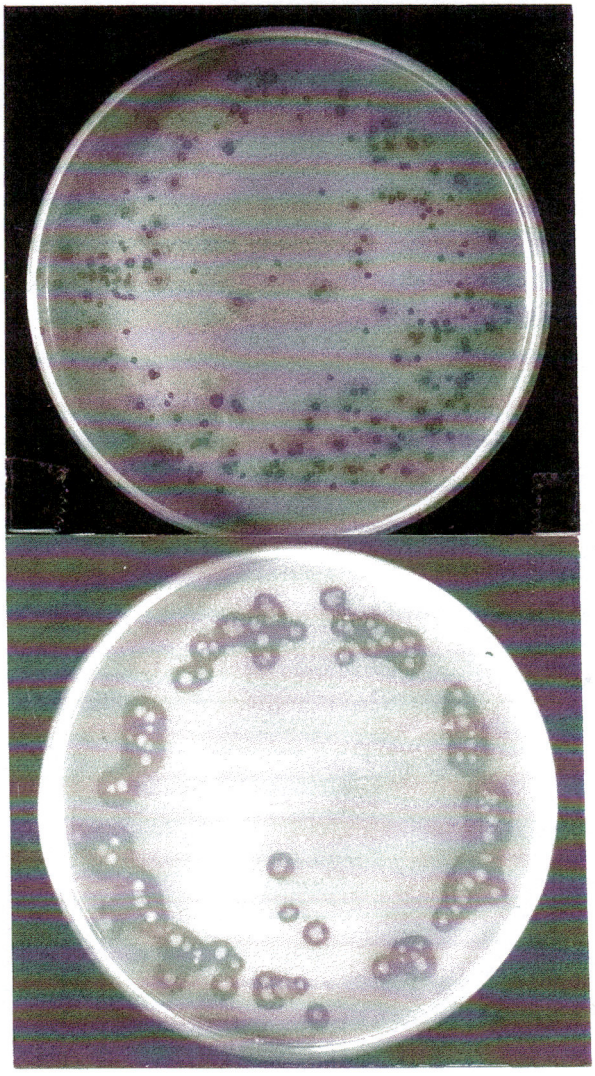
ภาพที่ 5 Enriched cultures ของ (A) แบคทีเรียที่ย่อยสลาย phenanthrene (S3 consortium) และ (B) แบคทีเรียที่ย่อยสลาย pyrene (S1 consortium) ในอาหาร BSM ที่มีสารประกอบ PAH แต่ละชนิดเป็นแหล่งของคาร์บอนและพลังงาน (250 มิลลิกรัมต่อลิตร) บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 วัน (สำหรับ phenanthrene) หรือ 7 วัน (สำหรับ pyrene) ไม่พบการเปลี่ยนแปลงของชุดควบคุมซึ่งเป็นอาหาร BSM ที่มี phenanthrene หรือ pyrene เป็นองค์ประกอบแต่ไม่มีการใส่หัวเชื้อหรือใส่หัวเชื้อที่ฆ่าแล้วด้วย $HgCl_2$

4.2 การแยกแบคทีเรียบริสุทธิ์ที่มีความสามารถในการย่อยสลายสารประกอบ PAHs

แบคทีเรียผสมที่สามารถเจริญย่อยสลาย phenanthrene หรือ pyrene ที่ได้จากการทำ enrichment ของตัวอย่างดินและน้ำทั้ง 5 ตัวอย่าง เมื่อนำมาทำการแยกเชื้อโดยวิธี spray plate และตรวจสอบการสร้างโซนใสรอบๆ โคโลนี (ภาพที่ 6) สามารถแยกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลาย phenanthrene ได้ 1 ไอโซเลท จาก S3 consortium (ให้ชื่อเป็นไอโซเลท PHEN-1) และสามารถแยกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลาย pyrene ได้ 1 ไอโซเลท จาก S1 consortium (ให้ชื่อเป็นไอโซเลท PYR-1) แบคทีเรีย PHEN-1 และ PYR-1 สามารถเจริญโดยใช้ phenanthrene และ pyrene เป็นแหล่งของคาร์บอนและพลังงานเพียงแหล่งเดียวได้

A

B



ภาพที่ 6 การแยกแบคทีเรียบริสุทธิ์ที่มีความสามารถในการย่อยสลายสารประกอบ PAHs โดยวิธี spray plate (A) แสดงโซนใสรอบโคโลนีของแบคทีเรียที่ย่อยสลาย phenanthrene และ (B) แสดงโซนใสรอบโคโลนีของแบคทีเรียที่ย่อยสลาย pyrene

4.3 การจำแนกแบคทีเรีย

แบคทีเรีย 2. ไอโซเลทซึ่งมีความสามารถในการย่อยสลายสารประกอบ phenanthrene (PHEN-1) และ pyrene (PYR-1) ที่ได้จากการแยกจากข้อ 4.2 เมื่อนำมาทำการจัดจำแนกโดยใช้วิธีทางชีวเคมี (biochemical tests) ดังมีรายละเอียดแสดงในตารางที่ 9 พบว่าเป็นแบคทีเรียในสกุล *Acinetobacter* และ *Pseudomonas fluorescens* ตามลำดับ ผลการจำแนกแบคทีเรียดังกล่าวได้ทำการยืนยันโดยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA และเปรียบเทียบกับข้อมูลจาก GenBank พบว่าให้ผลที่ตรงกัน

ตารางที่ 9 ผลการทดสอบทางชีวเคมีเพื่อจำแนกแบคทีเรีย

การทดสอบ	ผลการทดสอบ	
	PHEN-1	PYR-1
1. ลักษณะโคโลนีบนอาหาร Nutrient agar	โคโลนีลักษณะกลม ขอบเรียบ ผิวเรียบ มีขนาดเล็ก สีขาวนวล	โคโลนีลักษณะกลม ขอบเรียบ ผิวเรียบ สีเหลืองอ่อน
2. Gram's staining	แกรมลบ รูปท่อนสั้น	แกรมลบ รูปท่อน
3. Oxidation – fermentation test	Oxidizer	Oxidizer
4. Triple sugar iron (TSI) test	N/N ไม่มี H_2S ไม่มีแก๊ส	N/N ไม่มี H_2S ไม่มีแก๊ส
5. การเจริญบน MacConkey Agar	-	-
6. Motility test	-	-
7. Catalase test	-	-
8. Indole test	-	-
9. Oxidase test	-	-
10. Fluorescent pigment		-
11. Gelatin liquefaction test	-	-
12. Citrate utilization test	-	ND
13. Nitrate reduction	-	-/-
จัดจำแนกเป็น	*Acinetobacter* sp.	*Pseudomonas fluorescens*

ND, not determined

4.4 การเก็บรักษาแบคทีเรีย

แบคทีเรียผสม (S1 และ S3 consortium) และแบคทีเรียบริสุทธิ์ (*Acinetobacter* sp. PHEN-S3 และ *Ps. Fluorescens* PYR-1) ที่มีความสามารถในการย่อยสลาย phenanthrene และแบคทีเรียผสมที่มีความสามารถในการย่อยสลาย pyrene (S1 consortium) ที่ได้ในข้อ 4.1และ4.2 จะนำมาเก็บรักษาใน glycerol medium ที่อุณหภูมิ –70 องศาเซลเซียส

4.5 ความสามารถของแบคทีเรียในการเจริญบนสับเสตรทชนิดต่างๆ

จากการนำเอาแบคทีเรียสองไอโซเลทคือ *Acinetobacter* sp. PHEN-1 และ *Ps. fluorescens* PYR-1 มาทดสอบความสามารถในการเจริญบนสับเสตรทชนิดต่างๆ จำนวน 14 ชนิด พบว่า PYR-1 มีความสามารถในการใช้สับเสตรทได้กว้างกว่า PHEN-1 กล่าวคือนอกจาก fluoranthene และ benzo[*a*]pyrene แล้ว PYR-1 สามารถเจริญได้บนสับเสตรททุกชนิดที่นำมาทดสอบ (ตารางที่ 10) ทั้งในกลุ่มของสารประกอบอัลเคน สารประกอบ PAHs และกลุ่มของอินเทอร์มิเดียทของวิถีการย่อยสลายสารประกอบไฮโดรคาร์บอนชนิดต่างๆ สำหรับ *Acinetobacter* sp. PHEN-1 นั้น นอกจาก phenanthrene แล้ว มีความสามารถในการเจริญบน benzene, salicylic acid catechol, phthalic acid, benzene และ naphthalene

ตารางที่ 10 การเจริญของแบคทีเรียบนสับเสตรทชนิดต่างๆ

สับเสตรท	แบคทีเรียทดสอบ	
	Acinetobacter sp. PHEN-1	*Ps. fluorescens* PYR-1
Hexane*	+	+
Octane*	+	+
Benzene*	+	+
Toluene*	+	+
Naphthalene**	+	+
Phenanthrene**	+	+
Fluorene***	+	+
Fluoranthene***	+	+
Pyrene**	+	+
Benzo[*a*]pyrene***	+	+
Catechol*	+	+
Cinnamic acid**	+	+
Phthalic acid*	+	+
Salicylic acid*	+	+

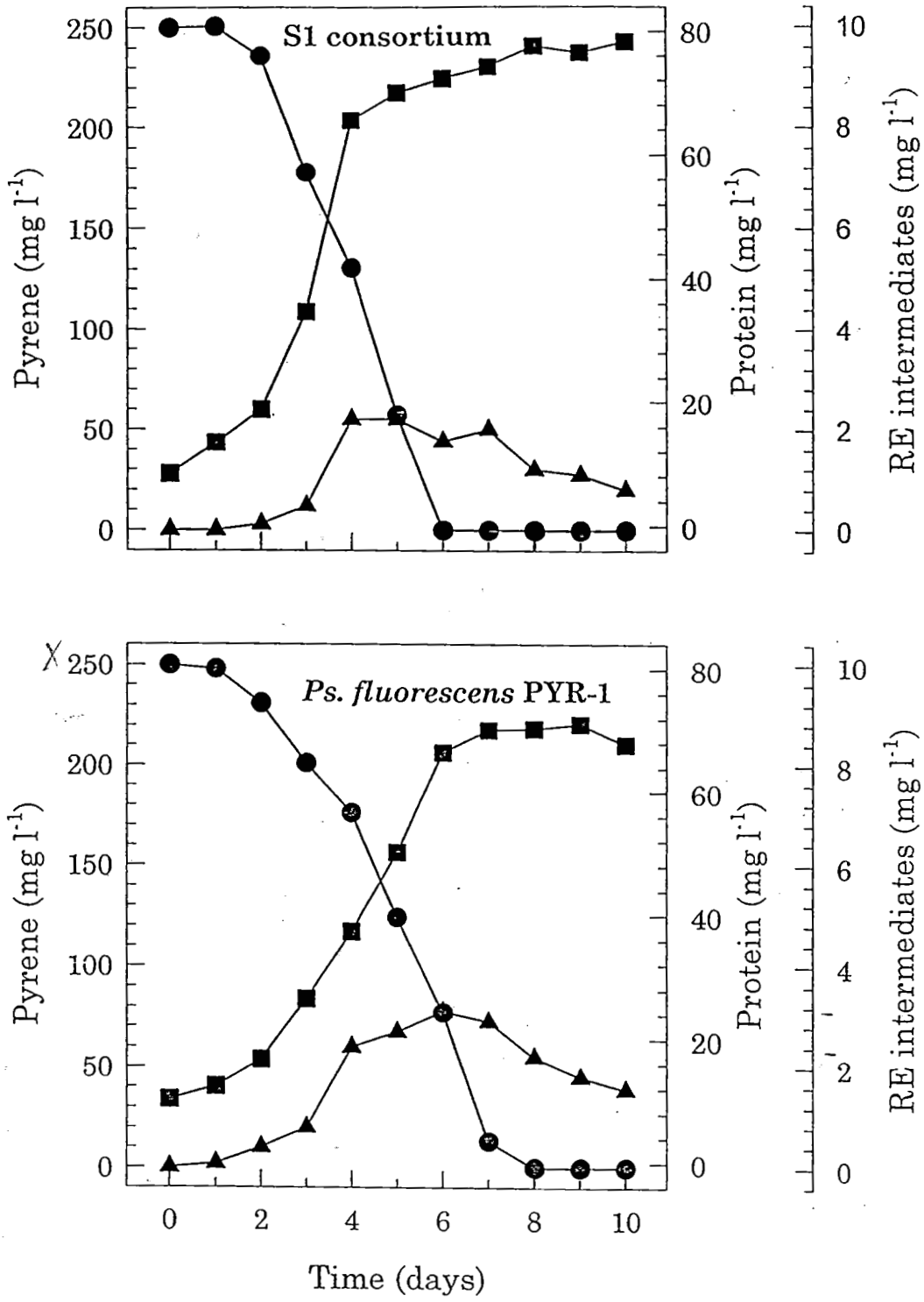
a การเจริญของแบคทีเรียวัดจากความขุ่นของอาหารและการเพิ่มขึ้นของปริมาณโปรตีนทั้งหมดในอาหาร BSM ที่มีสับเสตรทแต่ละชนิดเป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงาน บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง + หมายถึงมีการเจริญ และ - หมายถึงไม่พบการเจริญ (*), 3-7 วัน (**) และ 8-14 วัน (***) ตามลำดับ

ในการศึกษาครั้งนี้ได้เลือกแบคทีเรีย *Ps. fluorescens* PYR-1 มาทำการศึกษาต่อถึงความสามารถในการย่อยสลายสารประกอบ pyrene ในเชิงปริมาณ และการย่อยสลายสารประกอบ benzo[*a*]pyrene ในลักษณะของ cometabolism เนื่องจากแบคทีเรียดังกล่าวนี้มีความสามารถในการย่อยสลายสารประกอบ PAHs ที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง เช่น pyrene และ fluoranthene ได้โดยนำมาใช้เป็นแหล่งของคาร์บอนและพลังงานในการเจริญ อีกทั้งยังมีความสามารถในการใช้สับเสตรทได้หลากหลาย

4.5 การเจริญและการย่อยสลายสารประกอบ pyrene โดย S1 consortium และ *Ps. fluorescens* PYR-1

เมื่อนำแบคทีเรียผสม S1 consortium และ *Ps. fluorescens* PYR-1 มาทดสอบความสามารถในการเจริญและการย่อยสลาย pyrene ในอาหาร BSM ที่มี pyrene (250 มิลลิกรัมต่อลิตร) เป็นแหล่งของคาร์บอนและพลังงานเพียงแหล่งเดียวพบว่ามีการเจริญของแบคทีเรียในอาหารดังกล่าวโดยตรวจพบการเพิ่มขึ้นของปริมาณโปรตีนทั้งหมดในอาหารเลี้ยงเชื้อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมซึ่งใช้หัวเชื้อเป็นแบคทีเรียที่ถูกฆ่าด้วย 0.2% $HgCl_2$ (killed-cell controls) ดังแสดงในภาพที่ 3 ปริมาณโปรตีนเริ่มต้นของแบคทีเรียผสม ณ เวลาเริ่มต้นใส่หัวเชื้อมีปริมาณ 8.4 (±2.6) มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อเวลาที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อผ่านไป 7 วัน พบว่าปริมาณโปรตีนเพิ่มสูงสุดถึง 74.2 (±1.7) มิลลิกรัมต่อลิตร ในทำนองเดียวกัน *Ps. fluorescens* PYR-1 มีการเจริญโดยใช้ pyrene เป็นแหล่งของคาร์บอนและพลังงาน ซึ่งตรวจพบการเพิ่มขึ้นของปริมาณโปรตีนจาก 10.3 (±2.4) มิลลิกรัมต่อลิตร ณ เวลาเริ่มต้นใส่หัวเชื้อเป็น 70.2 (±0.6) มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อผ่านการบ่มไปเป็นเวลา 7 วัน (ภาพที่ 7) นอกจากนี้ยังพบว่าในช่วงเวลาดังกล่าวมีการสร้างและเปลี่ยนแปลงของปริมาณสารเมตาบอไลต์ในกลุ่มของ phenolic compounds เปรียบเทียบกับชุดควบคุม (killed-cell controls) ซึ่งไม่พบการเปลี่ยนแปลงดังกล่าวอย่างมีนัยสำคัญ ดังแสดงในภาพที่ 7

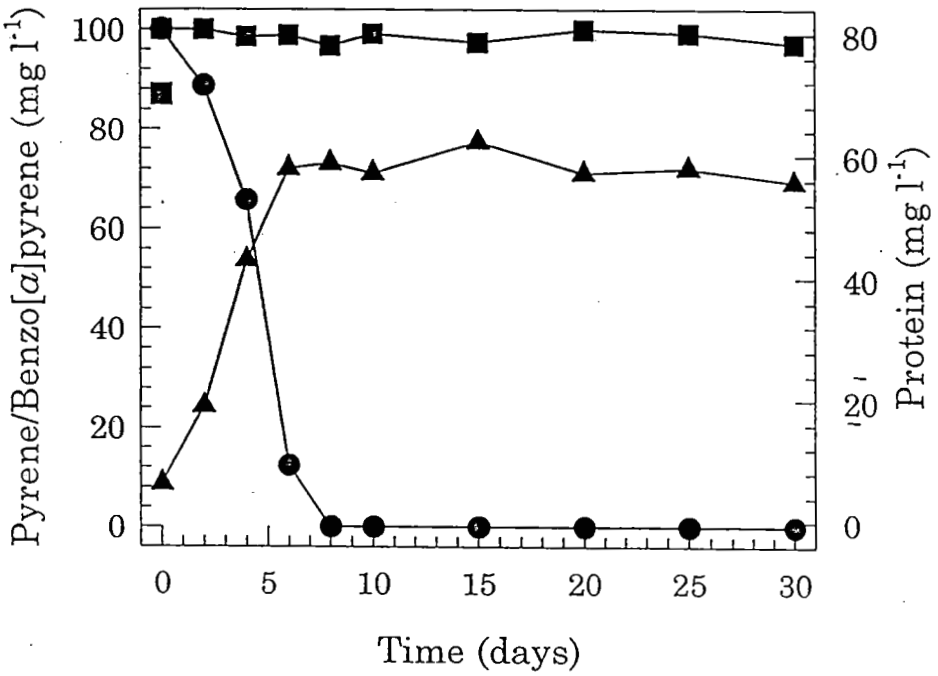
ในระหว่างที่มีการเจริญของแบคทีเรียในชุดการทดลองทั้งสองชุด (S1 consortium และ *Ps. fluorescens* PYR-1) พบว่าผลึกของ pyrene ที่มีอยู่ในอาหารในชุดการทดลองจะค่อยๆ ลดลงและหมดไปภายในเวลา 4 วัน พร้อมกันนี้จะพบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อจะเปลี่ยนจากสีขาวเป็นฟ้าขุ่นเป็นสีเหลืองใสจนถึงสีส้ม



ภาพที่ 7 การเจริญของแบคทีเรีย (■) การย่อยสลายสารประกอบ pyrene (●) และการสร้างสารเมตาบอไลต์ (▲) ในอาหาร BSM ซึ่งมี pyrene (250 มิลลิกรัมต่อลิตร) เป็นแหล่งของคาร์บอนและพลังงานเพียงแหล่งเดียว หัวเชื้อแบคทีเรียได้แก่ S1 consortium (A) และ *Pseudomonas fluorescens* PYR-1 (B) ชุดควบคุมซึ่งเป็น killed-cell control ไม่พบการเปลี่ยนแปลงของปริมาณโปรตีน pyrene และไม่พบการสร้างสารเมตาบอไลต์

4.6 การย่อยสลาย benzo[*a*]pyrene โดย *Ps. fluorescens* PYR-1 โดยขบวนการ cometabolism

เนื่องจากการศึกษาในเบื้องต้นพบว่า *Ps. fluorescens* PYR-1 ไม่สามารถย่อยสลายสารประกอบ benzo[*a*]pyrene โดยนำมาใช้แหล่งของคาร์บอนและพลังงานได้ จึงได้ทำการศึกษาการย่อยสลายสารประกอบชนิดนี้ในสภาวะที่แบคทีเรียมีการเจริญอยู่บนสารประกอบ pyrene อย่างไรก็ตามพบว่าเมื่อการทดลองดำเนินไปจนถึง 30 วัน พบว่าปริมาณ benzo[*a*]pyrene มีการเปลี่ยนแปลงลดลงของน้อยมาก ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมซึ่งใช้หัวเชื้อเป็น killed cell จะไม่แสดงความแตกต่างของปริมาณ benzo[*a*]pyrene อย่างมีนัยสำคัญ ดังแสดงในภาพที่ 8 ซึ่งแสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียสายพันธุ์นี้ไม่มีความสามารถในการย่อยสลายสารประกอบชนิดนี้ถึงแม้ว่าแบคทีเรียจะสามารถเพิ่มจำนวนได้บนสารประกอบชนิดอื่นแล้วก็ตาม การทดลองโดยใช้แบคทีเรียผสม (S1 consortium) ก็ให้ผลในลักษณะเช่นเดียวกัน



ภาพที่ 8 การย่อยสลาย benzo[*a*]pyrene โดยแบคทีเรีย *Ps. fluorescens* PYR-1 ในอาหาร BSM ซึ่งมี pyrene (250 มิลลิกรัมต่อลิตร) และ benzo[*a*]pyrene (50 มิลลิกรัมต่อลิตร) เป็นแหล่งของคาร์บอนและพลังงาน สัญลักษณ์ (▲) แสดงการเจริญของแบคทีเรียแสดงโดยปริมาณโปรตีน (●) แสดงปริมาณ pyrene และ (■) แสดงปริมาณ benzo[*a*]pyrene

4.7 การศึกษากลไกเบื้องต้นในการย่อยสลาย pyrene โดย *Ps. fluorescens* PYR-1

กลไกการย่อยสลายสารประกอบ PAH โดยแบคทีเรียที่มีความสามารถในการนำสารประกอบ PAH ชนิดดังกล่าวมาใช้เป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงานได้นั้นส่วนใหญ่เกี่ยวข้องกับระบบเอนไซม์ dioxygenases (Yang, 1994) ในการศึกษาครั้งนี้จึงได้มีการทดสอบว่าในระหว่างที่มีการย่อยสลาย phenanthrene โดย *Ps. fluorescens* PYR-1 มีการสร้างเอนไซม์ dioxgenases หรือไม่ โดยสังเกตจากการสร้าง indigo จาก indole ที่เติมลงในอาหาร BSM ที่มี pyrene (250 มิลลิกรัมต่อลิตร) เป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงานเพียงแหล่งเดียว และจากผลการศึกษาพบว่า *Ps. fluorescens* PYR-1 มีความสามารถในการผลิต indigo จาก indole ได้ดังแสดงในตารางที่ 9 โดยตรวจพบเซลล์ของแบคทีเรียเปลี่ยนเป็นสีน้ำเงินซึ่งแสดงถึงการสะสม indigo อยู่ภายในเซลล์ นอกจากการตรวจสอบการสร้าง indigo แล้ว การศึกษาครั้งนี้ยังได้ทำการศึกษาระบบเอนไซม์ที่เฉพาะลงไปเกี่ยวกับการย่อยสลายสารอินเตอร์มิเดียทที่มีโอกาสเกิดขึ้นในระหว่างขบวนการ ย่อยสลาย pyrene ซึ่งจะทำให้ทราบว่าแบคทีเรียชนิดนี้ใช้กลไกหรือวิถีเมตาบอลิซึมใดใน การย่อยสลาย pyrene สารอินเทอร์มิเดียทที่นำมาศึกษาในที่นี้คือ catechol ซึ่งจะถูกนำมาใช้เป็นสับสเตรตสำหรับเอนไซม์ catechol-2,3-oxygenase และเอนไซม์ catechol-1,2-oxygenase แหล่งของเอนไซม์ได้จากการสกัดจากเซลล์ของ *Ps. fluorescens* PYR-1 (crude enzyme) ที่เลี้ยงในอาหาร BSM ที่มี pyrene เป็นแหล่งของคาร์บอนและพลังงาน ผลการทดสอบพบว่าใน crude enzyme ที่นำมาศึกษามีส่วนที่เป็นเอนไซม์ catechol-2,3-oxygenase อยู่ โดยทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของ catechol ไปเป็นสารประกอบที่สามารถดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 375 นาโนเมตรได้ อย่างไรก็ตามไม่พบกิจกรรมของเอนไซม์ catechol-1,2-oxygenase ใน crude enzyme ที่นำมาทดสอบ (ตารางที่ 11) –

ตารางที่ 11 ผลการตรวจสอบการสร้างและกิจกรรมของเอนไซม์ dioxygenases โดยแบคทีเรีย *Ps. fluorescens* PYR-1

กิจกรรม	ผลการวิเคราะห์
Indigo formation	+
Catechol-2,3-oxygenase	+
Catechol-1,2-oxygenase	-

+ หมายถึงพบกิจกรรมที่ตรวจสอบ

- หมายถึงไม่พบกิจกรรมที่ตรวจสอบ

บทที่ 5

สรุปและอภิปรายผลการทดลอง

สรุปผลการทดลอง

การทำ enrichment ตัวอย่างดินและน้ำที่ปนเปื้อนสารประกอบไฮโดรคาร์บอนโดยใช้อาหาร basal salt medium (BSM) ซึ่งมีสารประกอบ phenanthrene, pyrene หรือ benzo[*a*]pyrene เป็นแหล่งของคาร์บอนและพลังงานเพียงแหล่งเดียวนั้นสามารถคัดแยกกลุ่มของแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลายสารประกอบ PAHs ชนิดดังกล่าวได้ กลุ่มของแบคทีเรียผสมที่นำมาศึกษาต่อเป็นแบคทีเรียที่ย่อยสลาย phenanthrene (S3 consortium) หรือ pyrene (S1 consortium) ซึ่ง enriched มาจากตัวอย่างดินปนเปื้อนสารประกอบไฮโดรคาร์บอนที่เก็บจากร้านซ่อมรถจักรยานยนต์ด้านหลังโรงเรียนสาธิตพิบูลย์บำเพ็ญ และร้านซ่อมรถจักรยานยนต์ (ร้านลุงแกะ) ตามลำดับ ในการแยกเชื้อบริสุทธิ์จาก S3 consortium นั้นสามารถแยกได้แบคทีเรียบริสุทธิ์ 1 ไอโซเลท ซึ่งจำแนกเป็น *Acinetobacter* sp. สายพันธุ์ PHEN-1 มีความสามารถในการย่อยสลาย phenanthrene โดยใช้เป็นแหล่งของคาร์บอนและพลังงานในการเจริญได้ สำหรับแบคทีเรียบริสุทธิ์ที่มีความสามารถในการย่อยสลาย pyrene แยกได้ 1 ไอโซเลท เมื่อจัดจำแนกโดยวิธีทางชีวเคมี และยืนยันผลการจัดจำแนกโดยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA พบว่าเป็นแบคทีเรีย *Pseudomonas fluorescens* ซึ่งในการศึกษาครั้งนี้ได้จัดให้เป็นสายพันธุ์ PYR-1

เมื่อนำแบคทีเรีย *Acinetobacter* sp. PHEN-1 และ *Ps. fluorescens* PYR-1 มาทดสอบความสามารถในการเจริญบนสับเสตรทชนิดต่างๆ พบว่าแบคทีเรียทั้งสองชนิดมีความสามารถในการใช้สับเสตรทได้ค่อนข้างกว้าง อย่างไรก็ตามพบว่าความสามารถในการเจริญบนสับเสตรทที่เป็นสารประกอบ PAHs ชนิดต่างๆ ของแบคทีเรียทั้งสองแตกต่างกัน โดยที่ *Ps. fluorescens* PYR-1 นั้นนอกจากจะสามารถเจริญได้บน pyrene แล้ว ยังมีความสามารถในการย่อยสลาย naphthalene, fluorene และ fluoranthene โดยนำมาใช้เป็นแหล่งของคาร์บอนและพลังงานได้อีกด้วย ในขณะที่ *Acinetobacter* sp. PHEN-1 นั้นสามารถเจริญได้บน naphthalene และ phenanthrene เท่านั้น ความสามารถในการย่อยสลาย pyrene ของ *Ps. fluorescens* PYR-1 เปรียบเทียบกับแบคทีเรียผสม (S1 consortium) เกิดขึ้นในอัตราที่ใกล้เคียงกัน เมื่อนำ *Ps. fluorescens* PYR-1 มาศึกษาการย่อยสลายสารประกอบ benzo[*a*]pyrene ในสภาวะที่แบคทีเรียเจริญอยู่บน pyrene ไม่พบว่ามีการย่อยสลาย benzo[*a*]pyrene เกิดขึ้นในช่วงระยะเวลา 30 วันที่ทำการศึกษา

จากการศึกษาพบว่าเอนไซม์ dioxygenases พบว่า *Ps. fluorescens* PYR-1 มีการสร้างเอนไซม์กลุ่มนี้ขึ้นมาในระหว่างที่มีการย่อยสลาย pyrene โดยจะใช้วิถีเมตาบอลิซึมแบบ *meta* cleavage pathway ซึ่งมีการสร้างเอนไซม์ catechol-2,3-oxygenase ออกมาย่อยสลาย dihydroxylated intermediates ที่เกิดขึ้นในระหว่างการย่อยสลาย pyrene ซึ่งทำให้คาดได้ว่าผลผลิตที่เกิดขึ้นของวิถีเมตาบอลิซึมนี้จะเป็น pyruvate และ acetaldehyde ซึ่งจะเข้าสู่ TCA cycle ต่อไป

อภิปรายผลการทดลอง

จากผลของการศึกษาทดลองพบว่าแบคทีเรียที่แยกได้จากแหล่งของดินและน้ำที่มีการปนเปื้อนของสารประกอบปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนมาเป็นเวลานาน มีความสามารถในการย่อยสลายสารประกอบ PAH ที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ ได้แก่ phenanthrene และสารประกอบ PAH ที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง ได้แก่ pyrene ได้ ในขบวนการคัดแยกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลาย phenanthrene และ pyrene มีขั้นตอนที่สำคัญคือการทำ enrichment เนื่องจากเป็นขั้นตอนที่มีการคัดเลือก (selective) เฉพาะแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลายสารดังกล่าวเป็นแหล่งของคาร์บอนและพลังงานเพียงแหล่งเดียวในอาหารเลี้ยงเชื้อ กลุ่มของแบคทีเรีย (bacterial consortia) ที่มีความสามารถในการย่อยสลายสารประกอบ phenanthrene หรือ pyrene ถูกเพิ่มปริมาณขึ้นได้โดยการนำตัวอย่างดินและน้ำที่มีการปนเปื้อนสารประกอบไฮโดรคาร์บอนมาใส่ลงในอาหาร BSM ที่มีสารประกอบ phenanthrene หรือ pyrene เป็นแหล่งของคาร์บอนและพลังงาน แบคทีเรียเหล่านี้มีความสามารถในการย่อยสลาย phenanthrene (S3 consortium) หรือ pyrene (S1 consortium) ได้โดยนำมาใช้เป็นแหล่งของคาร์บอนและพลังงาน การที่สามารถ enriched กลุ่มของแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลาย phenanthrene และ pyrene ได้นั้นอาจมาจากการที่ตัวอย่างดินและน้ำที่นำมาศึกษาได้มีการปนเปื้อนอยู่ของสารเหล่านี้มาเป็นระยะเวลานาน ทำให้แบคทีเรียที่อาศัยอยู่ในบริเวณนั้นมีการปรับตัวเพื่ออยู่รอดและมีกิจกรรมต่างๆ ได้ตามปกติโดยการพัฒนาระบบเอนไซม์เพื่อมาย่อยสลายสารประกอบ PAHs (Cerniglia, 1992) ดังนั้นในขบวนการคัดแยกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลายสารประกอบ PAHs จึงมีความจำเป็นที่จะต้องใช้ตัวอย่างที่ได้มาจากบริเวณที่มีการปนเปื้อนสารประกอบไฮโดรคาร์บอน โอกาสของการที่จะได้แบคทีเรียที่มีความสามารถดังกล่าวจึงมีจะมีได้มาก และการทำ enrichment จะเป็นขั้นตอนที่สำคัญที่จะทำให้สามารถค้นพบแบคทีเรียที่มีความสามารถดังกล่าว ดังรายงานการศึกษาของ Stringfellow และ Michael (Stringfellow and Michael, 1995) ซึ่งใช้วิธีการทำ enrichment ในการคัดแยกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลาย phenanthrene จากดินที่มีการปนเปื้อนสารครีโอโสต (creosote) แบคทีเรียที่แยกได้จัดจำแนกเป็น *Pseudomonas stutzeri* P-16 และ *Ps.*

saccharophila P-15 ซึ่งสามารถเจริญโดยใช้ phenanthrene เป็นแหล่งของคาร์บอนและพลังงานเพียงแหล่งเดียวได้ นอกจากนี้แบคทีเรียที่แยกได้ดังกล่าวยังมีความสามารถในการย่อยสลายสารประกอบ PAHs ที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำชนิดอื่นๆ ได้อีกด้วย เช่น naphthalene และ anthracene อย่างไรก็ตามในการศึกษาครั้งนี้ไม่สามารถแยกจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการย่อยสลายสารประกอบ benzo[*a*]pyrene ได้ ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากสารชนิดนี้มีน้ำหนักโมเลกุลสูง (สูงกว่า pyrene โมเลกุลประกอบด้วยวงเบนซีน 5 วง) จึงมีความทนทานต่อการถูกย่อยสลายเป็นอย่างมาก ซึ่งจากรายงานการวิจัยยังไม่พบการรายงานความสามารถของจุลินทรีย์ในการใช้สารประกอบชนิดนี้เป็นแหล่งของคาร์บอนและพลังงานเพียงแหล่งเดียวได้ การย่อยสลาย benzo[*a*]pyrene จะพบเกิดขึ้นโดยขบวนการ cometabolism หรือ synergism (Boonchan *et al.*, 2000)

การเปลี่ยนแปลงลักษณะทางกายภาพของสารประกอบ phenanthrene และ pyrene ซึ่งในช่วงเวลาที่ยังไม่มีการใส่หัวเชื้อจะมีลักษณะเป็นผลึกสีขาว ไม่รวมตัวกับน้ำ แต่เมื่อใส่หัวเชื้อลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อแล้ว ผลึกของ phenanthrene และ pyrene จะค่อยๆ ลดปริมาณลงจนกระทั่งไม่สามารถตรวจพบได้ด้วยการสังเกตด้วยตาเปล่ารวมทั้งการเปลี่ยนแปลงสีของอาหารเลี้ยงเชื้อจากสีขาวขุ่นเป็นสีเหลืองใส สีส้มหรือสีน้ำตาลนั้นสามารถกล่าวได้ว่าเกิดขึ้นโดยขบวนการย่อยสลายโดยแบคทีเรีย (biodegradation) ที่มีอยู่ในตัวอย่างดินและน้ำที่นำมาศึกษา ผลดังกล่าวนี้สามารถยืนยันได้เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ได้จัดทำขึ้นในการทดลองซึ่งเป็นชุดที่ใช้เซลล์แบคทีเรียที่ถูกฆ่าด้วย 0.2%$HgCl_2$ เหตุผลที่ใช้ชุดควบคุมชุดนี้เพื่อตรวจสอบว่าการหายไปของ phenanthrene และ pyrene ไม่ได้เกิดมาจากการเกาะติด (adsorption) กับผนังเซลล์ของแบคทีเรียนอกจากนี้ยังสามารถยืนยันได้จากการสร้างสารเมตาบอไลต์ในระหว่างที่มีการย่อยสลาย phenanthrene และ pyrene โดยเซลล์ที่ยังมีชีวิตอยู่เท่านั้น สารเมตาบอไลต์ที่ตรวจสอบในการศึกษาครั้งนี้เป็นสารประกอบในกลุ่มฟีนอล (phenolic compounds) ซึ่งเป็นสารเมตาบอไลต์ที่พบโดยทั่วไปในระหว่างที่มีการย่อยสลายสารประกอบ PAHs (Cerniglia, 1992)

โดยปกติแล้วแบคทีเรียสามารถย่อยสลายสารสับเสตรทที่ละลายน้ำได้โดยง่าย แต่ในกรณีของการย่อยสลายสารประกอบ PAHs ซึ่งเป็นสารประกอบที่มีความสามารถในการละลายน้ำต่ำการย่อยสลายโดยแบคทีเรียเกิดขึ้นได้ยาก ในการย่อยสลายสารประกอบ PAHs โดยแบคทีเรียนั้นสามารถเกิดขึ้นได้โดยกลไกดังต่อไปนี้ (Prince, 1993)

(1) แบคทีเรียเข้ามาใช้สารประกอบ PAHs ที่อยู่ในรูปของสารละลาย ซึ่งถึงแม้ว่าปริมาณของสารละลาย PAHs จะมีอยู่ในปริมาณต่ำมาก แต่อัตราของการนำไปใช้จะเกิดขึ้นในอัตราที่สมดุลกับอัตราการละลายน้ำของ PAHs ดังนั้นการย่อยสลายสารประกอบ PAHs จึงเกิดขึ้นได้อย่างต่อเนื่อง

(2) แบคทีเรียเข้าไปทำปฏิกิริยากับสารประกอบ PAHs ได้โดยสัมผัสโดยตรงกับผลึกของสารประกอบ PAHs

(3) แบคทีเรียเข้าไปทำปฏิกิริยากับสารประกอบ PAHs ที่ละลายอยู่ในสารลดแรงตึงผิว (surfactant)

ในกลไกที่ 2 และกลไกที่ 3 พบว่าเกี่ยวข้องกับการสร้างสารลดแรงตึงผิว (biosurfactant) ออกมาช่วยให้แบคทีเรียเข้าไปสัมผัสกับสับเสตรทได้ดีขึ้น รวมทั้งช่วยให้สารประกอบ PAHs มีความสามารถในการละลายน้ำได้สูงขึ้น ทำให้ง่ายต่อแบคทีเรียในการนำเข้าสู่เซลล์เพื่อทำการย่อยสลายได้ ตัวอย่างเช่นในการศึกษาของ Burd และ Ward (Burd and Ward, 1996) พบว่า *Pseudomonas marginalis* PD-14B ซึ่งแยกได้จากดินที่ปนเปื้อนสารประกอบ PAHs มีความสามารถในการสร้างสารประเภท biosurfactant ได้ ซึ่งสารดังกล่าวมีคุณสมบัติในการเพิ่มการละลายน้ำของสารประกอบ PAHs (anthracene, acenapthylene, naphthalene และ chrysene) เป็นผลทำให้แบคทีเรียสามารถย่อยสลายและเจริญบนสารประกอบ PAHs เหล่านั้นได้

แบคทีเรียหลายชนิดที่แยกได้จากแหล่งปนเปื้อนสารประกอบไฮโดรคาร์บอนมีความสามารถในการย่อยสลาย phenanthrene โดยใช้เป็นแหล่งของคาร์บอนและพลังงาน เช่น *Burkhloderia cepacia* (Juhasz *et.al.*, 1997), *Stenotrophomonas maltophilia* และ *Ps. fluorescens* (Boonchan *et.al.*, 1998), *Mycobacterium* sp. (Sepic, 1997) และ *Vibrio* sp. (Geisilbrechl *et.al.*, 1996) เป็นต้น ในการศึกษานี้พบว่าแบคทีเรียบริสุทธิ์ที่แยกได้ซึ่งมีความสามารถในการย่อยสลาย phenanthrene เป็นแบคทีเรียในสกุล *Acinetobacter* แบคทีเรียสายพันธุ์นี้มีการเจริญได้อย่างรวดเร็วในอาหารที่มี phenanthrene เป็นแหล่งของคาร์บอนและพลังงาน

สำหรับสารประกอบ pyrene ซึ่งจัดเป็นสารประกอบ PAH ที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง ในปัจจุบันมีจำนวนแบคทีเรียไม่มากนักที่มีความสามารถในการย่อยสลายสารประกอบชนิดนี้ได้โดยใช้เป็นแหล่งของคาร์บอนและพลังงาน เช่น *Rhodococcus* sp. (Walter *et.al.*, 1991), *Burkholderia cepacia* (Juhasz *et.al.*, 1997), *Mycobacterium* sp.(Sepic *et.al.*, 1996) และ *Stenotrophomonas maltophilia* (Boonchan *et.al.*, 1998) ในการศึกษาครั้งนี้สามารถแยกแบคทีเรียบริสุทธิ์ที่มีความสามารถในการย่อยสลาย pyrene โดยใช้เป็นแหล่งของคาร์บอนและพลังงานเพียงแหล่งเดียวได้จาก S1 consortium ซึ่งจัดจำแนกโดยวิธีทดสอบทางชีวเคมีและการวิเคราะห์ลำดับของยีน 16S rRNA (ribotyping) ได้เป็น *Ps. fluorescens* สายพันธุ์ PYR-1

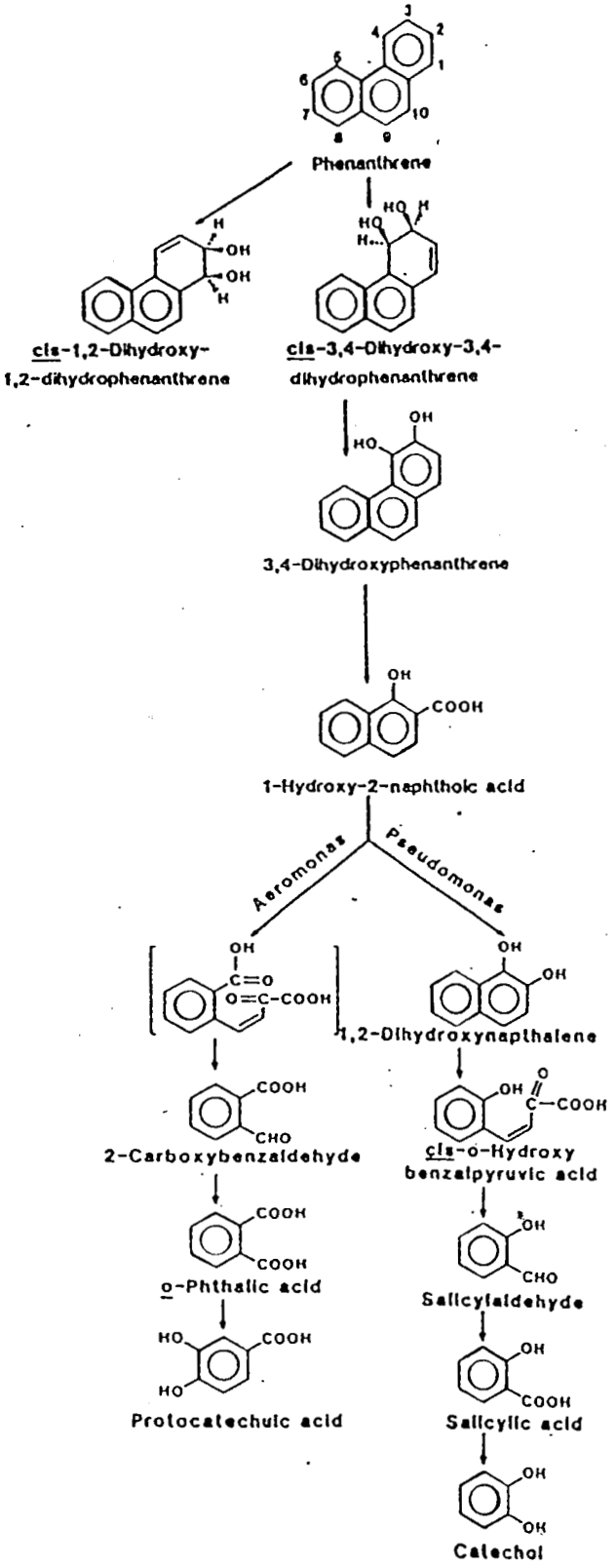
กลไกที่แบคทีเรียใช้ในการย่อยสลายสารประกอบ PAHs โดยนำมาใช้เป็นแหล่งของคาร์บอนและพลังงานนั้นเกี่ยวข้องกับระบบเอนไซม์ dioxygenases (Cerniglia, 1992) จากการศึกษาถึงกลไกโดยละเอียดที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายสารประกอบ PAHs จะพบว่ามีการเริ่มต้นโดย

แบคทีเรียใช้เอนไซม์ dioxygenase ออกซิไดซ์โมเลกุลของ PAHs ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงไปเป็น *cis*-dihydrodiol ซึ่งจะถูกเปลี่ยนแปลงต่อโดยขบวนการ dehydrogenation ซึ่งอาศัยการทำงานของเอนไซม์ dehydrogenase เกิดเป็นสารประเภท dihydroxylated intermediates เช่น catechol สารดังกล่าวจะเกิดการเปลี่ยนแปลงต่อไปโดยขบวนการตัดวงแหวนเบนซีน (ring fission) ที่เป็นองค์ประกอบในโมเลกุลโดยการทำงานของเอนไซม์ dioxygenase การเกิด ring-fission นี้เกิดขึ้นได้โดย 2 กลไก ได้แก่ (1) *ortho* fission คือเกิดการตัดวงแหวนเบนซีนตรงบริเวณระหว่างหมู่ไฮดรอกซิลสองหมู่ที่อยู่ติดกันในวงเบนซีน และ (2) *meta* fission คือการตัดวงแหวนเบนซีนบริเวณจุดที่ใกล้กับหมู่ไฮดรอกซิล 2 หมู่ที่อยู่ติดกันในวงเบนซีน ผลผลิตที่เกิดขึ้นจาก *ortho* fission จะได้เป็น succinyl CoA และ acetyl CoA สำหรับผลผลิตที่เกิดจาก *meta* fission จะได้เป็น pyruvate และ acetaldehyde ซึ่งสามารถถูกเปลี่ยนแปลงต่อและเข้าสู่ TCA cycle ได้ต่อไป (Cerniglia, 1992) อินเทอร์มิเดียทเมตาบอไลต์ในกลุ่มของ dihydroxylated intermediates ที่มักเกิดขึ้นในขบวนการย่อยสลายสารประกอบ PAHs ส่วนใหญ่จะเป็น catechol หรือ protocatechuic acid ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิดของแบคทีเรีย (ภาพที่ 9) ซึ่งสารดังกล่าวนี้จะเข้าสู่ขบวนการ ring fission เพื่อเปลี่ยนแปลงไปเป็นสารอินเทอร์มิเดียทชนิดต่างๆ ก่อนที่จะเข้าสู่ TCA cycle (Cerniglia, 1992) การเกิดขบวนการ ring fision หรือ ring cleavage นั้นสามารถเกิดขึ้นได้สองแบบดังกล่าวแล้วข้างต้น คือ *ortho* fission หรือ *meta* fission แล้วแต่ชนิดของแบคทีเรียว่าแบคทีเรียชนิดนั้นจะใช้วิถีเมตาบอลิซึมแบบใด (ภาพที่ 10) เช่น *Micrococcus* sp. ซึ่งแยกได้จากดินปนเปื้อนสารประกอบปิโตรเลียมมีการย่อยสลาย phenanthrene โดยมีวิถีเมตาบอลิซึมแบบ *meta*-clevage pathway (Dipak *et.al.*, 1983) ในการศึกษาครั้งนี้พบว่า *Ps. fluorescens* PYR-1 ที่แยกได้จากดินปนเปื้อนมีความสามารถในการย่อยสลาย pyrene โดยใช้เป็นแหล่งของคาร์บอนและพลังงานเพียงแหล่งเดียวได้จากการตรวจสอบพบว่าความสามารถดังกล่าวนี้เกี่ยวข้องกับการสร้างเอนไซม์กลุ่ม dioxygenases ซึ่งพบว่ามีการสร้างเอนไซม์กลุ่มนี้ออกมาในระหว่างที่มีการย่อยสลาย pyrene ดังเช่นที่พบในขบวนการย่อยสลายสารประกอบ PAH ที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ เช่น phenanthrene (Cerniglia, 1992) วิธีการตรวจสอบที่ใช้เป็นการตรวจวัดสี (colorimetric assay) ที่เกิดขึ้นในอาหารที่ใช้ทดสอบซึ่งมีการใส่ indole ลงไป เอนไซม์ dioxygenases สามารถเปลี่ยน indole ไปเป็น indigo ซึ่งมีสีฟ้า ทำให้ทราบได้ในเบื้องต้นว่าแบคทีเรียมีการสร้างเอนไซม์ dioxygenases จึงยืนยัน *Ps. fluorescens* PYR-1 ย่อยสลายสารประกอบ pyrene โดยใช้ระบบเอนไซม์ dioxygenases เมื่อศึกษาในรายละเอียดพบว่าแบคทีเรียสายพันธุ์นี้มีการสร้างเอนไซม์ catechol-2,3-oxygenase ซึ่งเป็นเอนไซม์ชนิดหนึ่งในกลุ่มของเอนไซม์ dioxygenases ย่อยสลายสารประกอบ catechol ไปเป็นผลผลิตที่ดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 375 นาโนเมตร ซึ่งก็คือ 2-hydroxymuconic acid ซึ่งทำให้สามารถกล่าวได้ว่า

Acinetobacter sp. PHEN-S3 ย่อยสลาย phenanthrene โดยใช้วิถีเมตาบอลิซึมเป็นแบบ *meta*-clevage pathway (ภาพที่ 10) มีการเปลี่ยนของ catechol ไปเป็น 2-hydroxymuconic acid สารดังกล่าวเมื่อถูกย่อยสลายต่อไปในที่สุดจะถูกเปลี่ยนไปเป็น pyruvate และ acetaldehyde ก่อนที่จะเข้าสู่ TCA cycle (Eaton and Chapman, 1995)

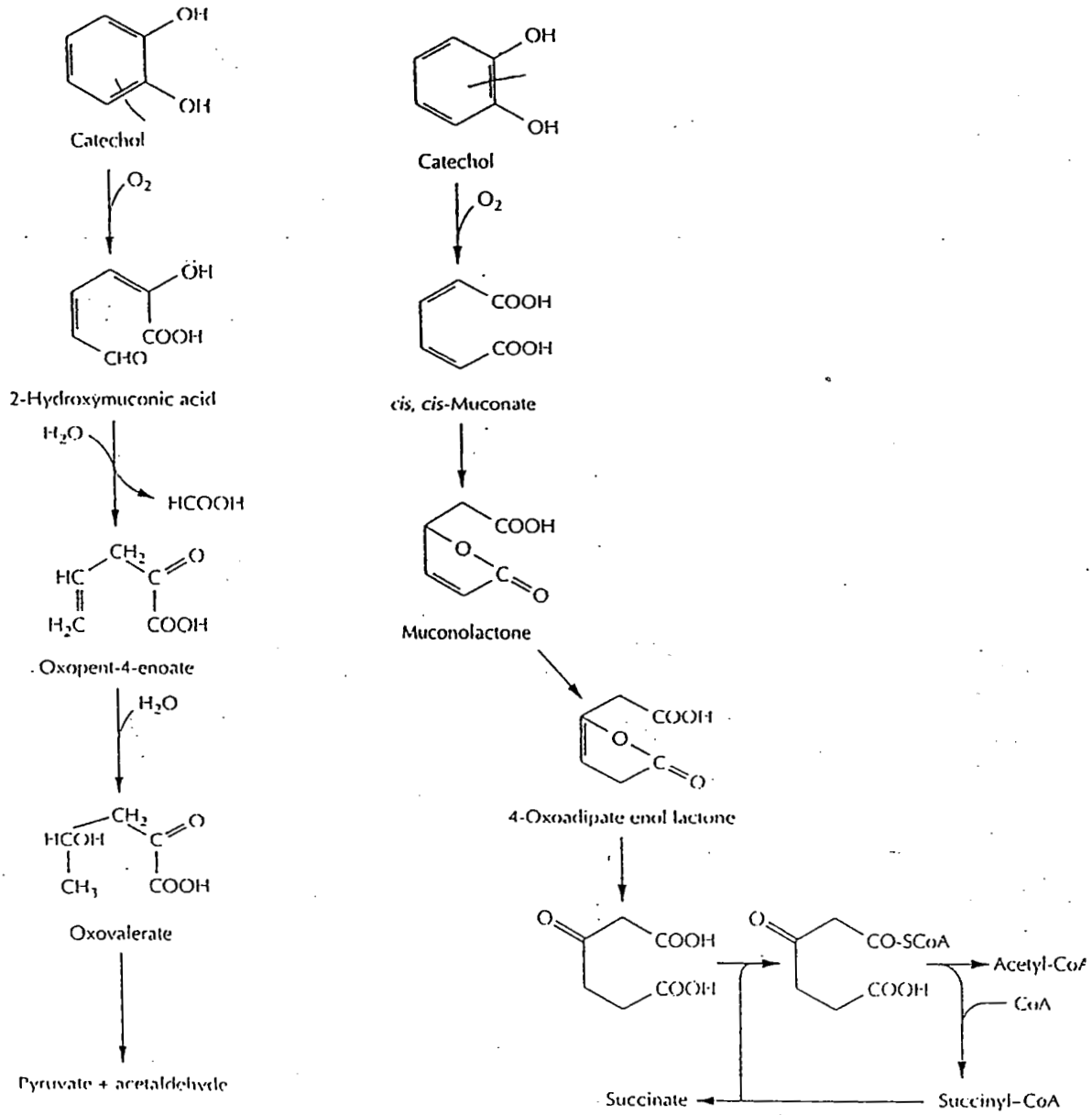
การย่อยสลายสารประกอบ pyrene ที่ศึกษาในครั้งนี้พบว่าทำให้เกิดการลดความเป็นพิษของสารประกอบกลุ่มนี้ เนื่องจากการย่อยสลายเกิดขึ้นได้อย่างสมบูรณ์ ผลผลิตสุดท้ายที่เกิดขึ้นคือมวลชีวภาพของแบคทีเรีย คาร์บอนไดออกไซด์และน้ำ ซึ่งไม่มีอันตรายต่อสิ่งมีชีวิตและสภาพแวดล้อม

การศึกษานี้ไม่พบการย่อยสลาย benzo[*a*]pyrene ของเชื้อผสม (S1 consortium) และ *Ps. fluorescens* PYR-1 ทั้งในสภาวะที่เป็นแหล่งของสับเสตรทในการเจริญเพียงแหล่งเดียวหรือในสภาวะการเกิด cometabolism ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากแบคทีเรียดังกล่าวไม่มีระบบเอนไซม์ที่จะนำมาใช้ในการย่อยสลายสารประกอบชนิดนี้ หรืออาจเนื่องมาจากสารดังกล่าวมีโมเลกุลที่ใหญ่และคงทนละลายน้ำได้น้อยมาก จึงยากที่จะถูกย่อยสลายโดยเอนไซม์ที่อยู่ภายในเซลล์ ดังนั้นแบคทีเรียที่แยกได้จากการศึกษานี้จึงไม่สามารถลดความเป็นพิษของ benzo[*a*]pyrene ลงได้ อย่างไรก็ตามมีรายงานการย่อยสลายสารชนิดนี้โดยขบวนการ co-metabolism เช่น จากการศึกษาของ Ye และคณะ (Ye *et.al.*,1996) พบว่า *Sphingomonas paucimobilis* ซึ่งแยกได้จากดินที่มีการปนเปื้อนสารครีโอโสตมีความสามารถในการย่อยสลาย pyrene ได้เมื่อเจริญอยู่บน fluoranthene สำหรับการเกิด synergism ระหว่างแบคทีเรียในขบวนการย่อยสลายสารประกอบ pyrene หรือ PAHs ชนิดอื่นๆ นั้นยังไม่พบการรายงาน เท่าที่มีข้อมูลนั้นจะเป็นการศึกษาในกลุ่มของราและแบคทีเรีย เช่น จากการศึกษาของ Stanley และคณะ (Stanley *et.al.*, inpress) และ Boonchan และคณะ (Boonchan *et.al.*, inpress) ซึ่งใช้เชื้อรา *Penicillium janthinellum* สายพันธุ์ VUO10004 ย่อยสลาย benzo[*a*]pyrene ได้เป็นสารเมตาบอไลต์ที่ไม่ถูกย่อยสลายต่อ (dead-end metabolites) เมื่อนำเอาแบคทีเรีย *Stenotrophomonas maltophilia* สายพันธุ์ VUN10010 มาเลี้ยงร่วมกันกับราชนิดนี้ในอาหาร BSM เพื่อทำการย่อยสลาย benzo[*a*]pyrene พบการเจริญของแบคทีเรียและเกิดการย่อยสลาย benzo[*a*]pyrene ได้อย่างสมบูรณ์



ภาพที่ 9 กลไกการย่อยสลาย phenanthrene โดยแบคทีเรีย

(ที่มา : Cerniglia, 1984)



ภาพที่ 10 การย่อยสลาย catechol ซึ่งเป็นอินเตอร์มิเดียทในขบวนการย่อยสลายสารประกอบ PAHs โดยแบคทีเรีย (ซ้าย) *meta*-cleavage pathway (ขวา) *ortho*-cleavage pathway

(ที่มา : ดัดแปลงจาก Cerniglia, 1984)

การใช้แบคทีเรียผสม (mixed cultures) หรือแบคทีเรียบริสุทธิ์ (pure cultures) ในการย่อยสลายสารประกอบ PAHs นั้นมีข้อดีและข้อเสียแตกต่างกันไป กล่าวคือในการใช้แบคทีเรียผสมนั้นมีข้อดีในแง่ของโอกาสที่จะเกิดการย่อยสลายอย่างสมบูรณ์ (mineralization) นั้นเป็นไปได้มาก โดยเฉพาะในกรณีของสารประกอบ PAHs ที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงซึ่งโดยปกติถูกย่อยสลายได้ยาก เนื่องจากในแบคทีเรียผสมนั้นมีความหลากหลายของระบบเอนไซม์ที่จะเข้ามามีส่วนเกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงของสารประกอบ PAHs และสารอินเทอร์มิเดียทต่างๆ ซึ่งระบบเอนไซม์เหล่านี้ไม่พบในแบคทีเรียเพียงชนิดเดียวนอกจากนี้การใช้แบคทีเรียผสมอาจมีส่วนทำให้เกิดการย่อยสลายสารประกอบ PAHs ชนิดนั้นๆ ได้มากขึ้น หรือมีการย่อยสลายสารประกอบ PAHs ได้มากชนิดขึ้น ซึ่งมีประโยชน์ต่อการนำไปใช้ในสภาพแวดล้อมจริงที่มีการปนเปื้อนสารเหล่านี้ เนื่องจากในสภาพความเป็นจริงในบริเวณที่มีการปนเปื้อนจะมีสารเหล่านี้อยู่อย่างหลากหลายตั้งแต่ชนิดที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ ถูกย่อยสลายได้ง่ายไปจนถึงชนิดที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงทนทานต่อการถูกย่อยสลายโดยจุลินทรีย์ที่มีอยู่ในธรรมชาติ ดังเช่นการศึกษาของ Mlynarz และ Ward (Mlynarz and Ward, 1995) ซึ่งรายงานว่าแบคทีเรียผสมซึ่งแยกได้จากดินปนเปื้อนสารประกอบ PAHs มีความสามารถในการย่อยสลายสารประกอบ PAHs ที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงได้อย่างหลากหลาย เช่น anthracene, phenanthrene, benzo[*a*]pyrene, acenaphthene และ fluorene และความสามารถในการย่อยสลายสารประกอบ PAHs เหล่านี้แต่ละชนิดมีสูงกว่าแบคทีเรียบริสุทธิ์ (*Ps. putida*, *Flavobacterium* sp.และ *Ps.aeruginosa*) ที่แยกจากแบคทีเรียผสมกลุ่มนี้ ถึงแม้ว่าความสามารถในการย่อยสลายสารประกอบ PAHs ที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำระหว่างแบคทีเรียทั้งสองกลุ่มจะไม่มีความแตกต่างกันก็ตาม

อย่างไรก็ตามการใช้แบคทีเรียผสมมีข้อเสียในด้านการเก็บรักษาและนำมาฟื้นเชื้อเพื่อเพิ่มปริมาณเพื่อในวัตถุประสงค์ของการนำมาใช้ในขบวนการเร่งการย่อยสลาย โดยเฉพาะอย่างยิ่งเราไม่ทราบว่าในเชื้อผสมที่มีความสามารถในการย่อยสลายนั้นประกอบด้วยเชื้ออะไรบ้าง (undefined mixture) การเพาะเลี้ยงเพื่อเพิ่มปริมาณโดยเชื้อผสมนั้นยังคงคุณสมบัติเดิมจึงค่อนข้างลำบาก การใช้แบคทีเรียบริสุทธิ์จะมีข้อได้เปรียบกว่าซึ่งการเพาะเลี้ยงเชื้อในปริมาณมากและการเก็บรักษากระทำได้โดยง่าย อย่างไรก็ตามเนื่องจากการใช้เชื้อผสมมีข้อดีหลายประการดังกล่าวแล้ว ก็อาจเป็นไปได้ที่จะมีการนำเชื้อบริสุทธิ์ที่ผ่านการทดสอบความสามารถในการย่อยสลายสารประกอบ PAHs รวมทั้งทราบกิจกรรมเฉพาะที่เกิดขึ้นในระหว่างการย่อยสลายสารดังกล่าวโดยเชื้อบริสุทธิ์แต่ละชนิดมาผสมเป็นเชื้อผสม (defined mixed culture) ก็จะมีผลดีในแง่ของการนำไปใช้ในบริเวณที่มีการปนเปื้อนสารประกอบเหล่านี้ อย่างไรก็ตามการที่จะสร้างเชื้อผสมในลักษณะนี้จะต้องมีการศึกษาในรายละเอียดด้านต่างๆ เช่น ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นระหว่างเชื้อต่างชนิด เป็นต้น

เอกสารอ้างอิง

1. **Aitken M.D., Stringfellow W.T., Nagel R.D., Kazunga C., Chen S.H.** 1998. Characteristics of phenanthrene-degrading bacteria isolated from soils contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons. *Can J Microbiol.* 44 : 743-752
2. **Andersson B.E and Henrysson T.** 1996. Accumulation and degradation of dead-end metabolites during treatment of soil contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons with five strains of white-rot fungi. *Appl Microbiol Biotechnol.* 46 : 647-652
3. **Ashok BT, Saxena S.** 1995. Biodegradation of polycyclic - a review. *J Sci Ind Res.* 54 : 443-451
4. **Atlas M.R.** 1991. Microbial hydrocarbon degradation-bioremediation of oil spills. *J Chem Tech Biotechnol.* 52 : 149-156
5. **Boonchan S., Britz M.L, and Stanley G.A.** 2000. The degradation and mineralization of high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons by defined fungal-bacterial co-culture. *Appl Environ Microbiol.* 66: 1007-1019.
6. **Boonchan S., Britz M.L, and Stanley G.A.** 1998. Surfactant-enhanced biodegradation of high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons by *Stenotrophomonas maltophilia. Biotechnol Bioeng.* 59 : 482-494
7. **Boldrin B., Tiehm A., and Fritzsche C.** 1993. Degradation of phenanthrene, fluorene, fluoranthene, and pyrene by a *Mycobacterium* sp. *Appl Environ Microbiol* . 59 : 1927-1930
8. **Bouchez M., Blanchet D., and Vandecasteele J.P.** 1995. Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by pure strains and by defined strain association : inhibition phenomena and cometabolism. *Appl Microbiol Biotechnol.* 43 : 156-164
9. **Box J.D.** 1983. Investigation of the folin-ciocalteua phenol reagent for the determination of polyphenolic substances in natural waters. *Water Res.* 17 : 511-525
10. **Burd G., Ward O.P.** 1996. Involvement of a surface-active high moleculelar weight factor in degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by *Pseudomonas marginalis. Can J Microbiol.* 42 : 791-797
11. **Cermiglia C.E.** 1984. Microbial metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Appl. Microbiol.* 30: 31-63

12. **Cerniglia C.E.** 1992. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Biodegradation.* 3 : 351-368

13. **Cerniglia C.E.** 1993. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Curr Opin Biotechnol.* 4 : 331-338

14. **Churchill S.A., Harper J.P., and Churchill P.F.** 1999. Isolation and characterization of a *Mycobacterium* species capable of degrading three and four-ring aromatic and aliphatic hydrocarbons. *Appl Environ Microbiol.* 65 : 549-552

15. **Cullen W.R., Li X.F., Reimer K.J.** 1994. Degradation of phenanthrene and pyrene by microorganisms isolated from marine sediment and seawater. *Sci Total Environ.* 156: 27-37

16. **Eaton R.W. and Chapman P.J.** 1995. Formation of indigo and related compounds from indolecarboxylic acids by aromatic acid-degrading bacteria:chromogenic reactions for cloning genes encoding dioxygenases that act on aromatic acids. *J Bacteriol.* 177: 6983-6988

17. **Dean R.D. and Cerniglia C.E.** 1996. Degradation of pyrene by *Mycobacterium flavescens. Appl Microbiol Biotechnol.* 46 : 307-312

18. **Ensley B.D., Ratzkin B.J, Osslund T.D., and Simon M.J.** 1983. Expression of napthalene oxidation genes in *Escherichia coli* results in the biosynthesis of indigo. *Science.* 222: 167-169

19. **Geiselbrecht A.D., Herwig R.P., Deming J.W., and Stanley J T.** 1996. Enumeration and phylogenetic analysis of polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading marine bacteria from Puget Sound sediments. *Appl Environ Microbiol.* 62 : 3344-3349.

20. **Geiselbrecht A .D., Herwig R.P., Deming J.W., and Stalney J.T.** 1998. Isolation of marine polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH)-degrading *Cycloclasticus* strains from the gulf of Mexico and comparison of their PAH degrading ability with that of Puget Sound *Cycloclasticus* strains. *Appl Environ Microbiol* . 64 : 4703-4710

21. **Gibson D.T.** 1971. Assay of enzymes of aromatic metabolism. *Methods in microbiology.* 6A: 463-478

22. **Hammel K.E., Gai W.Z., Green B., and Moen M.** 1992. Oxidative degradation of phenanthrene by the lignolytic fungus *Phanerochaete chrysosporium. Appl Environ Microbiol.* 58 : 1832-1838

23. **Harayama S.** 1997. Polycyclic aromatic hydrocarbon bioremediation design. *Curr Opin Biotechnol.* 8 : 268-273

24. **Hedlund B.P., Geiselbrecht A.D., Bair T.J., and Stanley J.T.** 1999. Polycyclic aromatic hydrocarbon degradation by a new marine bacterium, *Neptunomonas naphthovorans* gen. Nov., sp. Nov. *Appl Environ Microbiol.* 65 : 251-259

25. **Juhasz A.J., Britz M.L., and Stanley G.A.** 1997. Degradation of fluoranthene, pyrene, benz[*a*]anthracene and dibenz[*a,h*]anthracene by *Burkholderia cepacia. J Appl Microbiol.* 83 : 189-198

26. **Kastner M., Breuer J.M., and Mahro B.** 1994. Enumeration and characterization of the soil microflora from hydrocarbon-contaminated soil sites able to mineralize polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH). *Appl Microbiol Biotechnol.* 41 : 267-273

27. **Kleespies M., Kroppenstdt R.M., Rainey F.A., Webb L.E., and Stackebrandt E.** 1996. *Mycobacterium holderi* sp. Nov., a new member of the fast-growing mycobacteria capable of degrading polycyclic aromatic hydrocarbons. *J Syst Bacteriol.* 46 : 683-687

28. **Kriea N.R. and Holt S.G.** 1984. Bergey's manual of systemic bacteriology vol.1. Williams and Wilkins. Baltimore.

29. **Lal B. and Khanna S.** 1996. Degradation of crude oil by *Acinetobacter calcoaceticus* and *Alcaligenes odorans. J Appl Bacteriol.* 81 : 355-362

30. **Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., and Randall R.J.** 1951. Protien measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 193 : 265-275

31. **Mlynarz T.D. and Ward O.P.** 1995. Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by a mixed culture and its component pure cultures, obtained from PAH-contaminated soil. *Can J Microbial.* 41 : 470-476

32. **Muncnerova D. and Augustin J.** 1994. Fungal metabolism detoxification of polycyclic aromatic hydrocarbons: a review. *Bioresource Technol.* 48: 97-106

33. **Narro M.L., Cerniglia C.E., Balen C.V., and Gibson D.T.** 1992a. Evidence for an NIH shift in oxidation of naphthalene by the marine cyanobacterium *Oscillatoria* sp. strain JCM. *Appl Environ Microbiol.* 58 : 1360-1363

34. **Narro M.L., Cerniglia C.E., Balen C.V., and Gibson D.T.** 1992b. Metabolism of phenanthrene by the marine cyanobacterium *Agmenellum quadruplicatum* PR-6. *Appl Environ Microbiol.* 58 :1351-1359

35. **Prince R.C.** 1993. Petroleum spill bioremediation in marine environments. *Crit Rev Microbiol.* 19 : 217-242

36. **Sepic E., Bricelij M., and Leskovsek H.** 1997. Biodegradation studies of polycyclic aromatic hydrocarbons in aqueous media. *J Appl Microbiol.* 83 : 561-568

37. **Shuttleworth K.L. and Cerniglia C.E.** 1995. Environmental aspects of polycyclic aromatic hydrocarbons biodegradation. *Appl Biochem Biotechnol.* 54 : 291-302

38. **Stanley G.A., Britz M.L., Boonchan S., and Juhasz A.L.** Detoxification of soils containing high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by gram-negative bacterial and bacterial-fungal co-cultures. In DL, Wise DJ, Tranto L, Chichon EJ. (ed.). Remediation of hazardous waste contaminated soils. 2nd.ed. New York. Marcel dekker,Inc., Inpress

39. **Stringfellow W.T. and Aitden M.D.** 1995. Competitive metabolism of naphthalene, methylnaphthalene and fluorene by phenanthrene-degrading Pseudomonads. *Appl Environ Microbiol.* 61 : 357-362

40. **Tiehm A., Stiever M., Werner P., Frimnel F.H.** 1997. Surfactant-enhanced metabolization and biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in manufactured gas plant soil. *Environ. Sci. Technol.* 31: 2570-2576

41. **Walter U., Beyer M., Klein J., and Rehm H.J.** 1991. Degradation of pyrene by *Rhodococcus* sp. UW1. *Appl Environ Microbiol.* 34 : 671-676

42. **Weissenfels W.D.,.Beyer M., and Klein J.** 1990. Degradation of phenanthrene, fluorene and fluoranthene by pure bacterial cultures. *Appl Microbiol Biotechnol* . 45 : 479-484

43. **Wilson S.C., Jone K.C.** 1993. Bioremediation of soil contaminated with polynuclear aromatic hydrocarbons (PAHs): a review. *Environ Pol.* 81 : 229-249

44. **Ye D., Siddiqi M.A., Maccubbin A.E., Kumar S., and Sika H.C.** 1996. Degradation of polynuclear aromatic hydrocarbons by *Sphingomonas paucimobilis. Environ Sci Technol.* 30: 136-145

45. **Yujing Y., Robert F.C, and Michael P.S.** 1994. Metabolism of naphthalene, fluorene, and phenanthrene: preliminary characterization of cloned gene cluster from *Pseudomonas putida* NCIB 9816. *J Bacteriol.* 176: 2158-2164

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการทดลอง

1. Basal salt medium (BSM) ใน 1 ลิตร ประกอบด้วย

Basal salt solution[a]	985	มิลลิลิตร
Trace element solution[b]	5	มิลลิลิตร
Vitamin solution[c]	5	มิลลิลิตร
Mg/Ca solution[d]	5	มิลลิลิตร

นำ Basal salt solution ไปนึ่งฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันที่ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที ทิ้งไว้ให้เย็น เติม trace element solution, vitamin solution และ Mg/Ca solution (ที่ผ่านการทำให้ปลอดเชื้อโดยการกรอง ด้วยกระดาษกรองเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.45 มิลลิเมตร) ผสมให้เข้ากัน

[a] Basal Salt Solution ใน 1ลิตร ประกอบด้วย

K_2HPO_4	0.4	กรัมต่อลิตร
KH_2PO_4	0.4	กรัมต่อลิตร
$(NH_4)_2SO_4$	0.4	กรัมต่อลิตร
NaCl	0.3	กรัมต่อลิตร

นำส่วนผสมทั้งหมด ผสมในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส

[b] Trace element solution ปริมาตร 1 ลิตร ประกอบด้วย

$FeSO_4.7H_2O$	200	มิลลิกรัม
$ZnSO_4.7H_2O$	10	มิลลิกรัม
$MnCl_2.4H_2O$	3	มิลลิกรัม
$CoCl_2.6H_2O$	20	มิลลิกรัม
$CuCl_2.2H_2O$ (Cupric chloride)	1	มิลลิกรัม
$NiCl_2.6H_2O$	2	มิลลิกรัม

$NaMoO_4.2H_2O$	500	มิลลิกรัม
H_3BO_3 (Boric acid)	30	มิลลิกรัม

[c] Vitamin solution ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ประกอบด้วย

Biotin	2	มิลลิกรัม
Folic acid	2	มิลลิกรัม
Thiamine HCl (B1)	5	มิลลิกรัม
D – calcium pantothenate	5	มิลลิกรัม
Vitamin B12	5	มิลลิกรัม
Riboflavin (B2)	5	มิลลิกรัม
Niacin (nicotinic acid)	20	มิลลิกรัม
Pyridoxal HCl (B6)	3	มิลลิกรัม
p-aminobenzoic acid	2	มิลลิกรัม

[d] Mg/Ca Solution (1 ลิตร) ประกอบด้วย

$MgSO_4.7H_2O$	0.4	กรัม
$CaCl_2.2H_2O$	0.4	กรัม

2. Nutrient Agar (NA) (1ลิตร) ประกอบด้วย

Beef extract	3	กรัม
Peptone	5	กรัม
Agar	15	กรัม

นำส่วนผสมทั้งหมดผสมในน้ำกลั่นปริมาตร 1000 มิลลิลิตร หลอมให้ละลาย นำไปฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันที่ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

3. Nutrient Broth (NB) (1ลิตร) ประกอบด้วย

Beef extract	3	กรัม
Peptone	5	กรัม

นำส่วนผสมทั้งหมดผสมในน้ำกลั่นปริมาตร 1000 มิลลิลิตร หลอมให้ละลาย นำไปฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันที่ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

4. 50% Glycerol Medium (100 มิลลิลิตร) ประกอบด้วย

Glycerol	50	มิลลิลิตร
NB (2X)	50	มิลลิลิตร

นำ glycerol ผสมกับ NB ผสมให้เข้ากันดีนำไปนึ่งฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันที่ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

5. 0.1% Peptone water (100 มิลลิลิตร) ประกอบด้วย

Peptone	0.1	กรัม
NaCl	0.5	กรัม

ผสมส่วนผสมให้ละลายนำไปนึ่งฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันที่ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

ภาคผนวก ข

สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

1. สารประกอบ PAHs

1.1 สารละลาย Phenanthrene (stock solution ความเข้มข้น 100 mg/10 ml)

phenanthrene	100	มิลลิกรัม
N,N-Dimethylformamide	10	มิลลิลิตร

ชั่ง phenanthrene 100 มิลลิกรัม ละลายใน *N,N*-Dimethylformamide 10 มิลลิลิตร

1.2 สารละลาย Phenanthrene (stock solution ความเข้มข้น 250 mg/10 ml)

phenanthrene	250	มิลลิกรัม
N,N-Dimethylformamide	10	มิลลิลิตร

ชั่ง phenanthrene 250 มิลลิกรัม ละลายใน N,N-Dimethylformamide 10 มิลลิลิตร

1.3 สารละลาย Pyrene (stock solution ความเข้มข้น 100 mg/10ml)

Pyrene	100	มิลลิกรัม
N,N-Dimethylformamide	10	มิลลิลิตร

ชั่ง pyrene 100 มิลลิกรัม ละลายใน *N,N*-Dimethylformamide 10 มิลลิลิตร

2. Reagents สำหรับวิเคราะห์สารประกอบฟีนอล

2.1 Na_2CO_3 solution

ชั่ง Na_2CO_3 200 กรัม ผสมในน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อในหม้อนึ่ง ความดันที่ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้วอุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

2.2 Resorcinol standard (stock solution)

ชั่ง 200 มิลลิกรัม ละลายใน BSM ฆ่าเชื้อ 10 มิลลิลิตร เจือจางให้ได้ความเข้มข้นเท่ากับ 2 มิลลิกรัมใน 10 มิลลิลิตร

3. Reagents สำหรับวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน

3.1 Reagent A (Lowry A)

Na_2CO_3	20	กรัม
0.1 N NaOH	1	ลิตร

ละลาย Na_2CO_3 ใน 0.1 N NaOH นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่หม้อนึ่งความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

3.2 Reagent B (Lowry B)

$CuSO_4.5H_2O$	0.5	กรัม
K-Na-Tratrate	1%	โดยปริมาตร

ชั่ง K-Na-Tratrate 1 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร ปรับ pH ให้ได้เท่ากับ 9.0นำมาละลายใน $CuSO_4.5H_2O$ 0.5 กรัม

3.3 Reagent C (Lowry C)

Reagent A	50	มิลลิลิตร
Reagent B	1	มิลลิลิตร

3.4 Folin/ciocalteau reagent (เจือจาง)

F/C Reagent	2	มิลลิลิตร
น้ำกลั่นฆ่าเชื้อ	3	มิลลิลิตร

4. Bovine serum albumin (BSA)

เตรียม BSA ที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยนำสารละลาย BSA (5% stock solution) ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ละลายใน 0.45 M NaH_2PO_4 9980 ไมโครลิตร

ภาคผนวก ค

กราฟมาตรฐาน

1. กราฟมาตรฐานของโปรตีน

โปรตีนมาตรฐานที่ใช้ในการทดลองคือ **BSA**

1.1 เตรียมสาร BSA ที่ความเข้มข้น 100 ต่างๆ (0 - 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) ใน 0.45 M NaH_2PO (ตารางที่ ผ.1)

1.2 เติม Reagent C (ภาคผนวก ข) 2.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ตั้งไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 นาที

1.3 เติม Folin-Ciocalteau reagent ปริมาตร 0.25 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันโดยใช้ เครื่องปั่นผสม ตั้งไว้ใน water bath อุณหภูมิ 52 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที

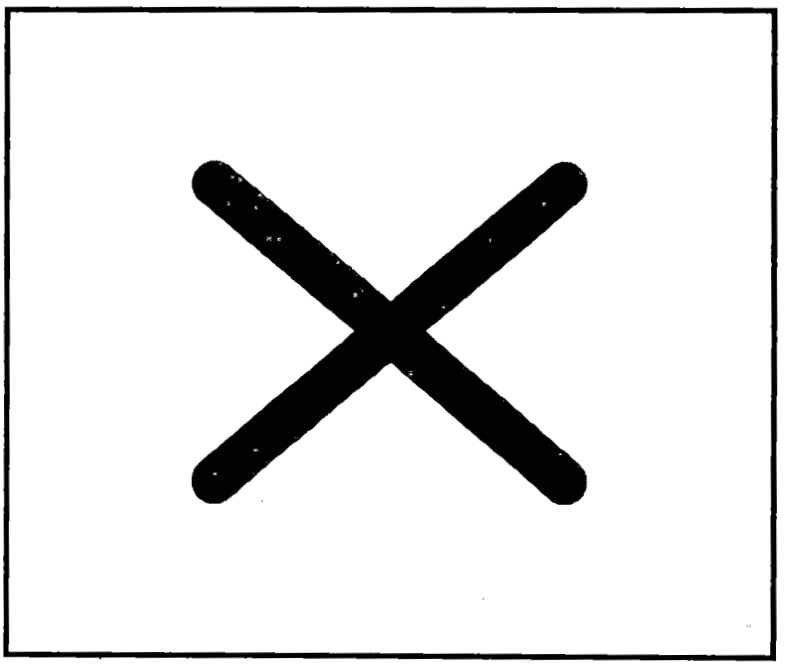
1.4 จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 680 นาโนเมตร ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 680 นาโนเมตรของ BSA ที่ความเข้มข้นต่างๆ แสดงในตารางที่ ผ. 1

ตารางที่ 12 ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 680 นาโนเมตร ของ BSA ที่มีความเข้มข้นต่างๆ

No.	1	2	3	4	3	6
BSA conc.(ug/ml)	0	20	40	60	60	100
BSA solution (ml) จาก stock (100ug/ml)	0	0.1	0.1	0.1	0.4	0.5
0.45 M NaH_2PO_4(ml)	0.5	0.4	0.5	0.4	0.1	0
ค่าการดูดกลืนแสง (OD_{680})	0	0.0705	0.132	0.184	0.243	0.284

*** การทำการทดลองวัดการเจริญโดยการวัดปริมาณโปรตีนที่เพิ่มขึ้นในแต่ละครั้งของการทดลองจะมีการทำกราฟมาตรฐานทุกครั้งที่ทำการทดลอง เพื่อใช้เป็นค่ามาตรฐานในการคำนวณค่าความเข้มข้นของปริมาณโปรตีน ค่าต่างๆ ที่แสดงดังตารางเป็นค่าของตัวอย่างที่ได้จากการทำกราฟมาตรฐานครั้งหนึ่งเท่านั้น

จากตารางนำมาเขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ BSA กับค่าการดูดกลืนแสงที่ 680 นาโนเมตร ดังแสดงในภาพที่ 12



ภาพที่ 11 กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ BSA กับค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 680 นาโนเมตร

หมายเหตุ หากตัวอย่างที่ทดสอบมีปริมาณโปรตีนมากกว่า 10 มิลลิกรัมต่อลิตร จะทำการเจือจางก่อนการวิเคราะห์ จากนั้นจึงทำการคำนวณความเข้มข้นที่แท้จริง โดยคูณด้วย dilution factor

จากกราฟมาตรฐานที่ได้นี้ นำมาคำนวณปริมาณในตัวอย่างต่างๆ ที่ทำการทดลอง โดยใช้สูตรดังต่อไปนี้

$$y = 0.0023x$$

โดยที่ y = ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 680 นาโนเมตร

x = ค่าความเข้มข้นของโปรตีน

ตัวอย่างการคำนวณ ค่าการดูดกลืนแสง (680 นาโนเมตร) ที่วัดได้จากการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนของ *Ps. fluorescens* sp. PYR-1 ณ เวลาเริ่มต้นใส่เชื้อได้เท่ากับ 0.025 เมื่อนำมาคำนวณค่าความเข้มข้นของโปรตีนโดยใช้สูตรข้างต้น จะได้ดังนี้

ความเข้มข้นของโปรตีน (x) = 0.025 / 0.0023

= 10.87 มิลลิกรัมต่อลิตร

2. กราฟมาตรฐานของสารประกอบฟีนอล

2.1 เตรียมสารละลาย resorcinol ที่ความเข้มข้นต่างๆ (0 - 5 มิลลิกรัมต่อลิตร) ใน BSM (ตารางที่ ผ.2)

2.2 เติม Na_2CO_3 1.5 มิลลิลิตร และ Folin-Ciocalteau reagent 0.5 มิลลิลิตร ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 60 นาที

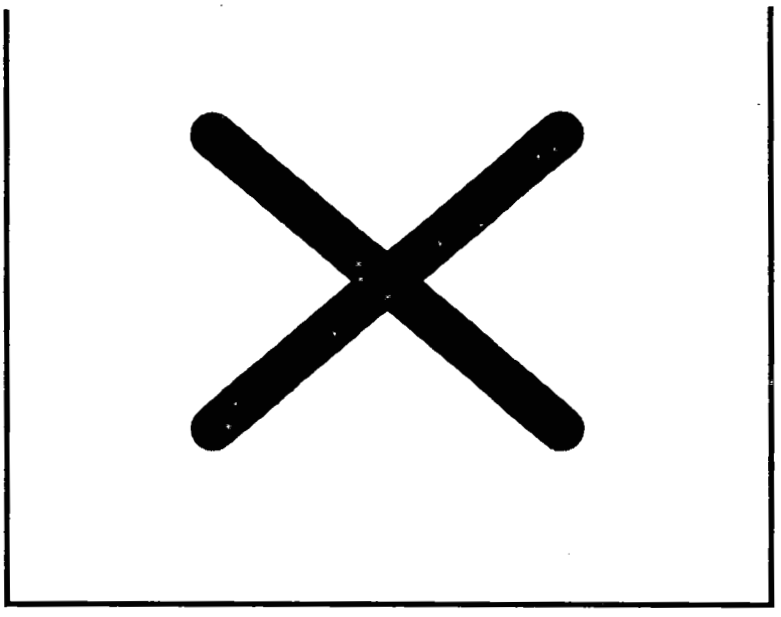
2.3 นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร ซึ่งค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร ของ resorcinol ที่ความเข้มข้นต่างๆ แสดงในตารางที่ ผ.2

ตารางที่ 13 ค่าดูดกลืนแสงที่วัดได้จากสารละลาย resorcinol ที่มีความเข้มข้นต่างๆ

No.	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Resorcinol conc.(mg/l)	0	0.4	0.6	0.8	1	2	3	4	5
Stock solution (ml) จาก Stock (0.2 mg/1ml)	0	0.02	0.02	0.04	0.05	0.10	0.15	0.20	0.25
BSM (ml)	10	9.980	9.970	9.960	9.950	9.900	9.850	9.800	9.750
ค่าการดูดกลืนแสง	0	0.063	0.099	0.118	0.159	0.300	0.416	0.541	0.656

*** การทำการทดลองตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงของสารเมตาบอไลต์โดยการวัดการเปลี่ยนแปลงของสารในกลุ่มของ phenolic compounds ในแต่ละครั้งของการทดลองจะมีการทำกราฟมาตรฐานทุกครั้งที่ทำการทดลอง เพื่อใช้เป็นค่ามาตรฐานในการคำนวณค่าความเข้มข้นของปริมาณ phenolic compounds ค่าต่างๆ ที่แสดงดังตารางเป็นค่าของตัวอย่างที่ได้จากการทำกราฟมาตรฐานครั้งหนึ่งเท่านั้น

จากตารางนำมาเขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มของ resorcinol กับค่าการดูดกลืนแสงที่ 750 นาโนเมตร ดังภาพที่ 13



ภาพที่ 12 กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ resorcinol กับค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร

หมายเหตุ หากตัวอย่างที่ทดสอบมีปริมาณของ resorcinol มากกว่า 10 มิลลิกรัมต่อลิตร จะทำการเจือจางก่อนการวิเคราะห์ จากนั้นจึงคำนวณความเข้มข้นที่แท้จริง โดยคูณด้วย dilution factor

จากกราฟมาตรฐานที่ได้นี้ นำมาคำนวณปริมาณ resorcinol ในตัวอย่างต่างๆ ที่ทำการทดลองโดยใช้สูตรดังนี้

$$y = 0.1359x$$

โดยที่ y = ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร

x = ค่าความเข้มข้นของ resorcinol

ตัวอย่างการคำนวณ ค่าการดูดกลืนแสง (750 นาโนเมตร) ของปริมาณสารประกอบฟีนอล ในระหว่างที่มีการย่อยสลายสารประกอบ phenanthrene หลังจากที่ใส่หัว *Ps. fluorescens* sp. PYR-1 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง 0.044 เมื่อนำมาคำนวณความเข้มข้นของสารประกอบฟีนอลโดยใช้สูตรข้างต้นจะได้ดังนี้

ความเข้มข้นของสารประกอบฟีนอล (x) = 0.044 / 0.1359

= 0.324

ภาคผนวก ง

การจำแนกแบคทีเรียโดยการตรวจสอบทางสัณฐานวิทยาและชีวเคมี

1. Gram' s staining

หลักการ เป็นการศึกษาเบื้องต้นทางลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อที่ต้องการจัดจำแนก โดยการย้อมสีแกรมจะทำให้ทราบถึงคุณสมบัติเบื้องต้นของเชื้อคือจะทราบได้ว่าเชื้อมีลักษณะรูปร่างเป็นอย่างไร รูปท่อน กลมหรือเกลียว เป็นต้น ที่สำคัญจะทราบถึงประเภทของเชื้อว่าเป็นแกรมบวกหรือแกรมลบ ซึ่งจะบอกได้ว่าเชื้อนี้มีผนังเซลล์เป็นแบบใด นอกจากนี้ลักษณะการเรียงตัวของเซลล์แบคทีเรียบางชนิดก็สามารถใช้ในการจัดจำแนกเชื้อได้ด้วย

การทดสอบ แตะเชื้อที่ต้องการทดสอบลงบนสไลด์สะอาดที่มีน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ 1 loopful เขี่ยเชื้อให้กระจายบาง ๆ รอให้แห้ง นำไปลนไฟหลังจากนั้นนำไปย้อมสี crystal violet, Gram's iodine, alcohol และ safranin เรียงตามลำดับ โดยแต่ละขั้นตอนปล่อยทิ้งไว้ 1 นาทียกเว้น alcohol ทิ้งไว้ 30 วินาที นำไปส่องดูใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายของเลนส์ใกล้วัตถุ 100 เท่า

การอ่านผล

แกรมบวก : เซลล์ติดสีม่วงของ crystal violet เชื้อเป็นแบคทีเรียแกรมบวก

แกรมลบ : เซลล์ติดสีแดงของ safranin เชื้อเป็นแบคทีเรียชนิดแกรมลบ

2. Oxidation – Fermentation test

หลักการ การทดสอบการใช้น้ำตาลชนิดต่างๆ ในสภาพที่มีหรือไม่มีออกซิเจน เป็นการทดสอบเพื่อจำแนกชนิดของแบคทีเรีย การใช้น้ำตาลเหล่านี้จะได้กรด โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อประกอบด้วย โปรตีนเล็กน้อย โซเดียมคลอไรด์ บัฟเฟอร์ อินดิเคเตอร์ วุ้น และคาร์โบไฮเดรต การที่ใส่โปรตีนเพียงเล็กน้อยเพื่อหลีกเลี่ยงการเกิดด่างที่ได้จากการย่อยสลายโปรตีนจากขบวนการ deamination

สูตรอาหาร OF Basal medium มีสูตรดังนี้ (กรัมต่อลิตร)

Bacto tryptone	2	กรัม
Sodium chloride	5	กรัม
Dipotassium phosphate	0.3	กรัม
Bromthymol blue	0.08	กรัม

Bacto agar	2	กรัม

นำส่วนผสมทั้งหมดผสมในน้ำกลั่นปริมาตร 1000 มิลลิลิตร หลอมละลายนำไปนึ่งฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที นำมาเติม 10% glucose ที่ปลอดเชื้อ 10 มิลลิลิตรต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ 100 มิลลิลิตร

การทดสอบ โดยการเพาะเชื้อลงในอาหารแต่ละหลอด (2 หลอด) หลอดหนึ่งคลุมอาหารที่เพาะเชื้อแล้วนั้นด้วย parafin oil แต่อีกหลอดไม่คลุม สำหรับแบคทีเรียที่ใช้น้ำตาลในสภาวะที่มีออกซิเจน หรือเกิด oxidation ซึ่งต้องการออกซิเจนร่วมปฏิกิริยาด้วย แบคทีเรียกลุ่มนี้สามารถให้กรดในหลอดที่เปิดอยู่ แต่จะไม่สามารถให้กรดในหลอดที่มีพาราฟินคลุมอาหารเลี้ยงเชื้อ สำหรับแบคทีเรียที่สามารถใช้น้ำตาลในสภาพที่ไม่มีออกซิเจน หรือสามารถหมักย่อยน้ำตาลได้ จะให้กรดทั้งสองหลอด แบคทีเรียบางชนิดไม่สามารถใช้น้ำตาลทั้งในสภาพที่มีหรือไม่มีออกซิเจนเลย จะไม่ให้กรดในหลอดทั้งสอง แบคทีเรียเหล่านี้ถูกเรียกว่า asaccharolytic การเกิดกรดทำให้ pH ในอาหารเลี้ยงเชื้อต่ำลง สามารถเปลี่ยนสีอินดิเคเตอร์ได้ อินดิเคเตอร์ Bromthymol blue จะมีสีเหลืองในสภาพที่เป็นกรด และให้สีเขียวในสภาพที่เป็นด่าง

การอ่านผล

ผลบวก : อาหารเลี้ยงเชื้อเปลี่ยนจากสีเขียวเป็นสีเหลือง

ผลลบ : อาหารเลี้ยงเชื้อสีเดิม ไม่เปลี่ยนแปลง

3. Triple Sugar Iron (TSI) agar

หลักการ ใช้ในการจำแนกชนิดของแบคทีเรียแกรมลบ รูปร่างท่อน โดยใช้ความสามารถของแบคทีเรียในการใช้น้ำตาลกลูโคส แลคโตส และซูโครส ทำให้ได้กรด และอาจให้ก๊าซ เป็นผลผลิตสุดท้าย นอกจากนั้นยังเป็นการทดสอบถึงความสามารถของแบคทีเรียในการให้ไฮโดรเจนซัลไฟด์ (H_2S) ด้วย

สูตรอาหาร มีส่วนผสมดังนี้

Peptone 140 (pancreatic digest of casein)	14	กรัม
Peptone 100 (peptic digest of animal tissue)	3	กรัม
Yeast extract	3	กรัม
Dextrose	1	กรัม
Lactose	10	กรัม
Sucrose	10	กรัม
Ferric ammonium citrate	0.2	กรัม

Sodium chloride	5	กรัม
Sodium thiosulfate	0.3	กรัม
Agar	12.5	กรัม
Phenol red	0.024	กรัม

นำส่วนผสมทั้งหมดผสมในน้ำกลั่นปริมาตร 1000 มิลลิลิตร หลอมละลาย ปรับค่า pH ให้มีค่าประมาณ 7.4 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

การทดสอบ เพาะเชื้อที่ต้องการทดสอบ โดยการขีดเชื้อบนผิวหน้าวุ้นของ TSI agar ให้ทั่วและแทง (stab) ปลายเข็มที่ขีดเชื้อในตอนแรกลงลึกประมาณ 2 ใน 3 ของในอาหารเลี้ยงเชื้อจนถึงก้นหลอด บ่มไว้ที่อุณหภูมิที่ต้องการ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง อ่านผล

การอ่านผล

1. ผลการหมักย่อยน้ำตาลต่างๆ
   1.1 ถ้าแบคทีเรียสามารถหมักย่อยน้ำตาลกลูโคสอย่างเดียว บนผิวหน้าวุ้น (slant) ที่มีสีแดงส้มซึ่งเป็นสีของอาหารเลี้ยงเชื้อ เปลี่ยนไปเป็นสีแดงเข้ม (alkaline หรือ K) ส่วนที่ก้นหลอด (butt) เปลี่ยนจากสีแดง-ส้มเป็นสีเหลือง (acid หรือ A) หรืออ่านผลว่า K/A
   1.2 ถ้าแบคทีเรียสามารถหมักย่อยทั้งน้ำตาลกลูโคส และน้ำตาลแลคโตส หรือสามารถหมักย่อยน้ำตาลกลูโคสร่วมกับน้ำตาลซูโครส หรือสามารถหมักย่อยน้ำตาลทั้งสามชนิด ทั้งบนผิว (slant) และที่ก้น (butt) ของหลอดที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อเปลี่ยนจากสีแดง-ส้มเป็นสีเหลืองทั้งหลอด หรืออ่านผลว่า A/A
   1.3 หากแบคทีเรียไม่สามารถใช้น้ำตาลชนิดใดๆ เลย มีอยู่ 3 แบบ คือ N/N, K/N, K/K (N : ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงสีของอาหารเลี้ยงเชื้อ , K : เปลี่ยนเป็นสีแดงเข้ม)
2. การเกิดก๊าซ จะเห็นเป็นรอยแตก หรือสังเกตเห็นฟองอากาศ
3. การเกิดก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ จะเห็นสีดำของตะกอน เฟอร์รัสซัลไฟด์ อยู่ที่ก้นหลอดถ้าเห็นสีดำบนผิวของวุ้น (slant) เป็นสีแดงของโคโลนีมากกว่า

4. MacConkey Agar (MAC agar)

หลักการ MAC agar ประกอบด้วยโปรตีน เกลือน้ำดี โซเดียมคลอไรด์ น้ำตาลแลคโตส วุ้นและสี 2 ชนิด อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดนี้ใช้สี crystal violet และเกลือน้ำดี ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวก ทำให้แบคทีเรียแกรมลบเจริญได้ดี และสามารถจำแนกคุณสมบัติการ

หมักย่อยน้ำตาลแลคโตส แบคทีเรียที่สามารถหมักย่อยน้ำตาลแลคโตส เมื่อเจริญแล้วให้ โคโลนีสีแดง หรือสีชมพู และรอบๆ โคโลนีอาจเห็นตะกอนของเกลือน้ำดี ซึ่งเกิดขึ้นในสภาวะที่เป็นกรด สีแดงนั้นเป็นผลมาจากสีของ neutral red ในสภาวะที่เป็นกรด (pH ต่ำกว่า 6.8)

สูตรอาหาร มีส่วนผสมดังนี้

Peptone (prancreatic digest of gelatin)	17	กรัม
Peptone (animal tissue-casein polypeptone)	3	กรัม
Lactose	10	กรัม
Bile salts	1.5	กรัม
Sodium chloride	5	กรัม
Agar	13.5	กรัม
Neutral red	0.03	กรัม
Crystal violet	0.001	กรัม

นำส่วนผสมทั้งหมดใส่ลงในน้ำกลั่นปริมาตร 1000 มิลลิลิตร ปรับ pH ให้มีค่าประมาณ 7 หลอมให้ละลาย นำไปนึ่งฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

การทดสอบ เพาะเชื้อลงบน MAC agar โดยขีดเพื่อให้โคโลนีแยกเป็นโคโลนีเดี่ยว บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง

การอ่านผล

ผลบวก : โคโลนีสีชมพู แสดงว่าเป็นแบคทีเรียแกรมลบที่สามารถหมักย่อยน้ำตาลแลคโตส

ผลลบ : โคโลนีใส (ไม่มีสี) แสดงว่า เป็นแบคทีเรียแกรมลบที่ไม่สามารถหมักย่อยน้ำตาลแลคโตส

5. Motility Test

หลักการ เป็นการทดสอบความสามารถในการเคลื่อนที่ของเชื้อ ซึ่งเนื่องมาจากการที่เชื้อมีแฟลกเจลล่า (flagella) เชื้อที่สามารถเคลื่อนที่ได้จะสามารถเคลื่อนออกจากบริเวณเดิมไปยังบริเวณใหม่ซึ่งจะเกิดการเจริญ และแบ่งตัวยังบริเวณนั้นต่อไป

สูตรอาหาร มีส่วนผสมดังนี้

Tryptone	10	กรัม
Sodium chloride	5	กรัม
Agar	5	กรัม

นำส่วนผสมทั้งหมดละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 1000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดัน15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

การทดสอบ เพาะเชื้อที่ต้องการทดสอบลงใน Motility test medium โดย stab ตรงๆ เพียงครั้งเดียว ประมาณ 2/3 ของส่วนสูงของอาหาร บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส นาน 18-24 ชั่วโมงอ่านผล ถ้ายังให้ผลลบให้ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องต่อไปอีก 1-2 สัปดาห์ สังเกตการเปลี่ยนแปลงเป็นระยะ

การอ่านผล

ผลบวก : เห็นการเจริญของเชื้อออกมานอกรอย stab หรือไม่มีรอยการเจริญที่ชัดเจน บริเวณ รอย stab แต่อาหารเลี้ยงเชื้อทั้งหลอดขุ่นกว่าเดิม

ผลลบ : เห็นการเจริญของเชื้ออย่างชัดเจน ที่บริเวณรอย stab โดยเห็นขอบเขตของเชื้อที่เจริญอย่างชัดเจนแม้จะบ่มเชื้อต่ออีก 2 สัปดาห์ สังเกตการเปลี่ยนแปลง

6. Catalase Test

หลักการ เป็นการทดสอบเพื่อจำแนกแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์ catalase โดยปกติในขบวนการหายใจแบบใช้ออกซิเจน อะตอมของไฮโดรเจนจะรวมตัวกับออกซิเจน ทำให้เกิดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) ซึ่งเป็นอันตรายต่อเซลล์ แต่แบคทีเรียส่วนใหญ่สามารถผลิตเอนไซม์ catalase เพื่อย่อยสลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์แตกออก ให้ก๊าซออกซิเจนและน้ำ ดังนั้นการทดสอบว่า แบคทีเรียผลิตเอนไซม์ catalase หรือไม่ ทำได้โดยการใส่ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ แล้วสังเกตดู ถ้าให้ก๊าซแสดงว่า ให้ผลบวก การทดลองนี้ไม่ควรทำบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเลือดผสมอยู่ด้วย เพราะเม็ดเลือดแดงมีเอนไซม์ catalasc ภายในเซลล์ทำการแปรผลอาจผิดพลาดได้

การทดสอบ ใช้เข็มเขี่ยเชื้อตรงกลางโคโลนี แตะบนสไลด์ที่สะอาด แล้วหยด 3% H_2O_2 ลงบนเชื้อที่อยู่บนสไลด์ ดูฟองอากาศที่เกิดขึ้นในทันที

การอ่านผล

ผลบวก : มีฟองอากาศเกิดขึ้นทันที

ผลลบ : ไม่มีฟองอากาศเกิดขึ้น

7. Indole Test

หลักการ เป็นการทดสอบความสามารถของแบคทีเรียในการผลิต indole จากทริปโตเฟน (tryptophan) โดยที่อาหารเลี้ยงเชื้อ indole broth ประกอบด้วย peptone เมื่อทริปโตเฟนในเปปโตนถูกออกซิไดซ์โดยแบคทีเรีย ให้ indole, skatole และ indoleacetic (โดยใช้ alcoholic *p*-dimethylaminobenzaldehyde โดย indole จะทำปฏิกิริยากับอัลดีไฮด์ (aldehyde) ให้ผลผลิตสีแดงในส่วนที่เป็นแอลกอฮอล์ (alcoholic layer)

สูตรอาหาร มีส่วนผสมดังนี้

Peptone	20	กรัม
Sodium phosphate	2	กรัม
Potassium nitrate	1	กรัม
Dextrose	1	กรัม
Agar	1	กรัม

นำส่วนผสมทั้งหมดใส่ลงในน้ำกลั่นปริมาตร 1000 มิลลิลิตร ปรับ pH ให้มีค่าประมาณ 7.2 หลอมให้ละลาย นำไปนึ่งฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดัน15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศา-เซลเซียส นาน 15 นาที

การทดสอบ เพาะเชื้อที่ต้องการทดสอบลงใน Tryptophan broth บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง อ่านผลโดยการหยด Kovac's reagent ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ 5 หยด เขย่าเบาๆ สังเกตสีที่เกิดขึ้น อ่านผล

การอ่านผล

ผลบวก : สีของรีเอเจนต์เปลี่ยนเป็นสีแดง

ผลลบ : สีของรีเอเจนต์ไม่เปลี่ยนแปลง

8. Oxidase Test

หลักการ เป็นการทดสอบการผลิตเอนไซม์ Cytodhrome oxidase ของแบคทีเรียบางชนิด แบคทีเรียกลุ่มแอโรปส์มีขบวนการ oxidative phosphorylation สำหรับขบวนการหายใจและสร้างพลังงาน ในระหว่างที่ขบวนการดังกล่าวเกิดขึ้น จะมีการถ่ายเทอิเลคตรอนให้แก่ออกซิเจนโดยผ่านลูกโซ่ขนส่งอิเลคตรอน โดยอาศัยการทำงานของไซโตโครมต่างๆ (cytochrome) ซึ่งก็คือลูกโซ่ของเอนไซม์นั่นเอง ผลที่ได้ทำให้เกิดน้ำ ไซโตโครมสุดท้ายที่จับออกซิเจนในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมหรือยีสต์เป็น cytochrome C oxidase อย่างไรก็ตามในแบคทีเรียมีไซโตโครมมากมายที่ทำหน้าที่เป็นเอนไซม์ oxidase ตัวสุดท้าย ในการถ่ายทอดอิเลกตรอนให้ออกซิเจน

การทดสอบ เตรียมสารละลายรีเอเจนต์ 1% tetramenthy–*p*–phenylenediamine dihydrochloride ในน้ำเกลือปราศจากเชื้อ แล้วหยดสารละลายลงบนแผ่นกระดาษกรองปราศจากเชื้อ ใช้เข็มขีดเชื้อมาขีดบนแผ่นกระดาษกรองนั้น สีของแบคทีเรียที่เขี่ยลงบนกระดาษกรองเปลี่ยนเป็นสีน้ำเงินเข้มหรือสีม่วงภายใน 10 วินาที แสดงถึงผลบวก (อย่าใช้ไม้เขี่ยเชื้อที่ทำด้วยเหล็ก หรือนิโครม อาจให้ผลบวกได้) การทดสอบอาจทำได้โดยหยดรีเอเจนต์โดยตรงลงบนโคโลนีที่เจริญบน Blood หรือ Chocolate agar แล้วสังเกตการเปลี่ยนแปลงเป็นสีน้ำเงินเข้ม หรือสีม่วงให้เห็น

การอ่านผล

ผลบวก : เกิดสีม่วงหรือสีน้ำเงินเข้มบนกระดาษกรอง หรือสีน้ำเงินเข้มบนโคโลนีที่อยู่บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Blood หรือ Chocolate agar เมื่อหยดรีเอเจนต์ลงไป

ผลลบ : ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง

9. Gelatin Liquefaction Test

หลักการ เป็นการทดสอบความสามารถของแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ gelatinase ในการย่อยสลายเจลาติน (gelatin) สามารถตรวจสอบคุณสมบัติความแข็งของเจลาติน เจลาตินจะอยู่ในสภาพเป็นของเหลว ที่อุณหภูมิสูงกว่า 30 องศาเซลเซียส แต่จะมีสภาพเป็นของแข็งที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ดังนั้นเมื่อเจลาตินถูกย่อยสลายด้วยเอนไซม์ gelatinase แล้วเจลาตินจะไม่มีสภาพเป็นเจล หรือแข็งตัวที่อุณหภูมิ 4-5 องศาเซลเซียส

สูตรอาหาร มีส่วนผสมดังนี้

Beff extract	3	กรัม
Peptone	5	กรัม
Gelatin	120	กรัม

นำส่วนผสมทั้งหมดละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 1000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดัน15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

การทดสอบ เพาะเชื้อที่ต้องการทดสอบลงใน nutrient gelatin broth บ่มเชื้อไว้ที่ 37 องศาเซลเซียส อย่างน้อย 48 ชั่วโมง อ่านผลโดยนำหลอดที่มีเชื้อ และ nutrient gelatin broth ซึ่งยังไม่ได้ เพาะเชื้ออีกหนึ่งหลอด ใส่ในตู้เย็น ประมาณ 5-10 นาที หรือจนกว่า nutrient gelatin broth หลอดที่ไม่มีเชื้อเกิดการแข็งตัว

การอ่านผล

ผลบวก : nutrient gelatin broth ยังเป็นของเหลวเหมือนเดิม ไม่ได้เกิดการแข็งตัว

เหมือนหลอดที่ไม่มีเชื้อ

ผลลบ : nutrient gelatin broth แข็งตัวเหมือนหลอดที่ไม่มีเชื้อ

10. Citrate Utilization Test

หลักการ ใช้ในการจำแนกแบคทีเรียแกรมลบโดยอาศัยความสามารถในการใช้ซิเตรต (citrate) เป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงาน โดยแบคทีเรียที่สามารถใช้ซิเตรตจะผลิตเอนไซม์ citrate ย่อยซิเตรตให้ผลผลิตเป็นออกซาโลอะซิเตต (oxaloacitate) และอะซิเตต (acetate) และยังมีเอนไซม์อีกชนิดหนึ่งคือ oxaloacitate decarboxylase ซึ่งสามารถย่อยสลายอะซิเตตไปเป็นไพรูเวต (pyruvate) และก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์นี้จะรวมตัวกับโซเดียมและน้ำและสีของอินดิเคเตอร์บรอมไธมอลบลูในอาหารเลี้ยงเชื้อ Simmons citrate agar เปลี่ยนจากสีเขียวเป็นสีน้ำเงิน

สูตรอาหาร มีส่วนผสมดังนี้

$MnSo_4$	0.2	กรัม
$(NH_4)H_2PO_4$	1	กรัม
K_2HPO_4	1	กรัม
NaCl	5	กรัม
Sodium citrate	2	กรัม
Bromthymol blue	0.08	กรัม
Agar	15	กรัม

นำส่วนผสมทั้งหมดใส่ลงในน้ำกลั่นปริมาตร 1000 มิลลิลิตร ปรับ pH ให้มีค่าประมาณ 6.8 หลอมให้ละลาย นำไปนึ่งฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

การทดสอบ เพาะเชื้อที่ต้องการทดสอบลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Simmons citrate agar บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง อ่านผล

การอ่านผล

ผลบวก : อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเชื้อเจริญเปลี่ยนเป็นสีน้ำเงิน

ผลลบ : อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเชื้อเจริญไม่เปลี่ยนสี สีคงเดิม

11. Nitrate reduction

หลักการ เป็นการทดสอบความสามารถของเชื้อในการรีดิวซ์ไนไตรต์หรือก๊าซไนโตรเจน แบคทีเรียที่สามารถหายใจแบบไม่ใช้ออกซิเจนและใช้ไนเตรตเป็นตัวรับอิเล็กตรอนแทนออกซิเจน

แบคทีเรียบางชนิดสามารถรีดิวซ์ไนเตรตไปเป็นไนไตรต์และสามารถรีดิวซ์จากไนเตรตไปเป็นแอมโมเนียได้ เช่น *Pseudomonas aeruginosa*

สูตรอาหาร มีส่วนผสมดังนี้

Beef extract	3	กรัม
Peptone	5	กรัม
Potassium nitrate	1	กรัม

นำส่วนผสมทั้งหมดละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 1000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดัน15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

การทดสอบ เพาะเชื้อที่ต้องการทดสอบลงบน nitrate broth บ่มที่ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 18-24 ชั่วโมง เติม 0.5% alpha–naphthylamine และ 0.8% sulfanilic acid solution อย่างละ 5 หยด อ่านผลการเปลี่ยนแปลงของอาหาร

การอ่านผล

ผลบวก : มีสีแดงเกิดขึ้นหรือไม่มีสีแดงเกิดขึ้นในการทดสอบในตอนแรกและเมื่อเติมผงสังกะสีลงไปก็ยังไม่มีการเปลี่ยนแปลง แสดงว่าเชื้อที่ทดสอบสามารถรีดิวซ์ไนเตรทได้

ผลลบ : ไม่มีสีแดงเกิดขึ้นตอนแรกและจะมีสีแดงเกิดขึ้นเมื่อเติมผงสังกะสีลงไปแสดงว่าเชื้อที่ทดสอบไม่สามารถรีดิวซ์ไนเตรตได้