บทคัดย่อ

T160277

Trichloroethylene (TCE) เป็นสารระเหย (Volatile organic compound, VOC) ชนิดหนึ่งที่นิยมใช้ในอุตสาหกรรมหลายชนิด กระบวนการย่อยสลาย TCE มีลักษณะเป็นโคเมทาบอลิซึม (Cometabolism) จุลินทรีย์ที่ใช้สาร toluene เป็นสารต้นตอคาร์บอนมีความสามารถในการย่อยสลาย TCE ได้ ในงานวิจัยนี้ได้ทำการแยกและคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียที่ใช้ toluene 250 ppm เป็นแหล่งต้นตอคาร์บอนได้ ภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจน ที่ 30 °C จากตัวอย่างเชื้อที่ได้จากแหล่งธรรมชาติ 5 สายพันธุ์ คือ T1/2, T1/3, T1/4, T1/8, และ T5/10 และแยกได้จากแหล่งปนเปื้อน 4 เชื้อ คือ T4/1, T3/5, T3/9 และ T3/13 ผลการบ่งบอกเอกลักษณ์ของเชื้อพบว่า T1/2, T1/3, T1/4, T1/8, T5/10 T4/1, T3/9 และ T3/13 เป็นแบคทีเรียแกรมลบมีรูปร่าง coccobacilli ส่วน T3/5 เป็นแบคทีเรียแกรมบวกและมีรูปร่างเป็น coccus T1/2 คือ *Pseudomonas putida*, T1/3 คือ *Pseudomonas putida*, T1/4 คือ *Pseudomonas putida*, T1/8 คือ *Pseudomonas putida*, T3/9 คือ *Rastonia picketti*, T3/13 คือ *Acinetobactor lwoffii* และ T5/10 คือ *Comamonas acidovorans*

ผลการศึกษาวิธีการเก็บเชื้อ 3 วิธีได้แก่ วิธีที่ 1 การเลี้ยงเชื้อในอาหารแข็งสูตรปรับต่ำที่มี tolueneเป็นแหล่งต้นตอคาร์บอนใน slant แล้วทำการเก็บเชื้อด้วยสารละลายอาหาร Luria Bertani broth (LB) ที่มี 15% glycerol แช่แข็งที่ -70^{0}C วิธีที่ 2 การเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวสูตรปรับต่ำที่มี tolueneเป็นแหล่งต้นตอคาร์บอน แล้วทำการเก็บเซลล์ด้วยสารละลายอาหาร Luria Bertani broth (LB)แล้วทำแห้ง แช่แข็งที่ -70^{0}C วิธีที่ 3 ทำการเลี้ยงเหมือนวิธีที่ 2 แต่เก็บเซลล์ใน สารละลายอาหาร Luria Bertani broth (LB) ที่มี 15% glycerol แช่แข็งที่ -70^0 C พบว่าผลการเก็บเชื้อทั้ง 3 วิธีมีค่า viability และ activity ลดลงทันทีหลังการเก็บ ($p < 0.001$) และระยะเวลาในการเก็บเป็นเวลา 6 เดือนมีผลต่อการลดลงของ viability และ activity ($p < 0.001$)

ผลการศึกษาความสามารถของเชื้อที่ระยะ late log phase ในการสลาย trichloroethylene ด้วยเทคนิค Head space และตรวจสอบปริมาณ TCE ด้วย Gas chromatography ในสารละลายอาหารสูตรปรับต่ำภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจน พบว่า เชื้อ T1/2,T1/3,T1/4,T3/5,T3/9,T3/13 ทนต่อ TCE ได้ถึง 10ppm โดยพบว่าค่าการสลาย TCE ของเชื้อ T3/9, T1/4, T3/5, T1/3, T1/2, T3/13, T1/8, T5/10 และ T4/1ภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจนเป็นเวลา 18 ชั่วโมงที่ 30^{0}C มีความสามารถสลาย TCE ที่ 10ppm ได้เท่ากับ 20.01, 17.07, 16.56, 16.56, 12.12, 7.04, 3.78, 2.24 และ 0.91 ppm/mg protein ซึ่งผลการวิเคราะห์ทางสถิติพบว่า T3/9,T1/4,T3/5 และ T1/3 มีประสิทธิภาพสูงสุดในการสลาย TCE ($p < 0.001$)

ผลการศึกษาความสามารถของเชื้อ T1/3,T3/5,T3/9,T3/13และ T4/1 ในการใช้สารต้นตอคาร์บอน 11 ชนิด ได้แก่ toluene, benzene, ethyl benzene, o-cresol, m-cresol, p-cresol, o-xylene,

m-xylene, p-xylene, phenol และ ethanol ที่ความเข้มข้น 1 และ 5 mM ภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจนที่ 30°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และ 48 ชั่วโมง พบว่าที่ระดับความเข้มข้นของสารต้นตอคาร์บอนในปริมาณต่ำ 1 mM เชื้อ T1/3 T3/5, T3/9 สามารถใช้สารต้นตอคาร์บอนได้เกือบทุกชนิด ส่วนที่ระดับความเข้มข้นของสารต้นตอคาร์บอนในปริมาณสูงเชื้อสามารถใช้ชนิดของสารต้นตอคาร์บอนได้น้อยลง ส่วนเชื้อ T3/13 เป็นเชื้อที่สามารถใช้สารต้นตอคาร์บอนได้เพียง 3 ชนิดคือ toluene, benzene และ ethanol ทั้งที่ความเข้มข้นต่ำและสูงถึง 5 mM ผลการศึกษาความสามารถของเชื้อที่ดีที่สุดในการใช้สารต้นตอคาร์บอนชนิดต่างๆ คือ toluene ได้แก่เชื้อ T3/5, T3/9 และ T3/13 benzene และ ethanol ได้แก่ T1/3, T3/5, T3/9 และ T3/13 และพบว่าเชื้อทุกสายพันธุ์สามารถใช้ ethylbenzene และ xylene ได้น้อยมากหรือใช้ไม่ได้เลยแม้ที่ความเข้มข้นต่ำ เชื้อ T1/3 สามารถใช้ cresol ได้ดีที่สุด และเชื้อ T1/3 กับ T3/5 สามารถใช้ phenol ได้ดีที่สุด

ผลการศึกษาชนิดของเอนไซม์ toluene oxygenases ของเชื้อด้วยเทคนิค PCR สำหรับ Toluene dioxygenase gene จากการออกแบบ primer จาก conserve sequence ของลำดับกรดอะมิโนบริเวณ catalytic site บน α - subunit ของโปรตีนในกลุ่ม dioxygenase โดยออกแบบ primer ที่บริเวณ TodC1 gene จากเชื้อ *Pscudomonas putida* ผลการทดลองพบว่า primer ที่ออกแบบมีความจำเพาะและให้ PCR product แถบเดียวที่ขนาดประมาณ 310 bp ตรงกับขนาดที่ออกแบบไว้ และพบว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ T3/5, T3/9 (*Rastonia picketti*) และ T5/10 (*Comamonas acidovorans*) มี Toluene dioxygenase gene

สำหรับ toluene monooxygenase ได้ออกแบบ primer จาก catalytic subunit 3 แบบคือ 1. จากบริเวณยีนทั้งที่ต่างกันมากที่สุด 2. บริเวณ conserve sequence และ 3. บริเวณที่มีด้านใดด้านหนึ่งแตกต่างกันมากที่สุดส่วนอีกด้านหนึ่งเป็น conserve sequence จากการเปรียบเทียบลำดับเบสของ toluene 2-monooxygenase, toluene 3-monooxygenase และ toluene 4-monooxygenase ประการแรกพบว่ากลุ่ม primer ที่ออกแบบมีความจำเพาะต่อ T1/2, T1/3 และ T1/4 แต่ไม่จำเพาะต่อ T3/5, T3/9 และ T5/10 ซึ่งมี toluene dioxygenase gene และไม่จำเพาะต่อ *E. coli* ซึ่งไม่มี toluene oxygenase gene ใดๆ ได้แก่ primer จากกลุ่มที่1 คือ AF3 กับ AR3 primer จากกลุ่มที่ 2 คือ AF4/2กับ AR4/2 และจากกลุ่มที่ 3 คือ AF2/3 กับ AR2/2 และ AF3/2 กับ AR3/4 ประการที่ 2 พบว่า primer คู่ที่ให้ PCR product แถบเดียวที่ขนาด 720 bp ในเชื้อสายพันธุ์ T1/2, T1/3 และ T1/4 ได้แก่ AF3 กับ AR3 จากการออกแบบจาก *tbuA2* gene (U04052) ของ toluene 3-monooxygenase ซึ่งแสดงว่า primer น่าจะมีความจำเพาะต่อ แบคทีเรียทั้ง 3 สายพันธุ์ แต่อาจยังไม่จำเพาะต่อการเพิ่มจำนวนยีนของ toluene monooxygenases หรืออาจมียีนที่แตกต่างกันกับใน database ประการที่ 3 primer ที่ให้ PCR product ทุกคู่ยังไม่สามารถเพิ่มจำนวนยีนของ toluene monooxygenases ในขนาดที่คาดการณ์ไว้ได้