กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบพระคุณภาควิชาเคมีและภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ที่อนุญาตให้ใช้สถานที่ในการทำการทดลอง ตลอดจนสนับสนุนอุปกรณ์และเครื่องมือสำหรับการวิจัย งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากสถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ภายใต้โครงการวิจัย เรื่อง การย่อยสลายทางชีวภาพของสารประกอบโพลีไซคลิก อะโรมาติก ไฮโดรคาร์บอน (พีเอเอช) ด้วยจุลินทรีย์เขตร้อน รหัสโครงการ (ว-ท(พ-ท(ด)111.56) นิสิตผู้ช่วยวิจัยได้รับการสนับสนุนจากภาควิชาเคมี และคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ภายใต้โครงการทุนสนับสนุนการทำวิจัยระดับปริญญาตรี (URMF) คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ รวมถึงความอนุเคราะห์การใช้อุปกรณ์และครุภัณฑ์วิทยาศาสตร์จากศูนย์วิทยาการขั้นสูงด้านนาโนเทคโนโลยีเพื่ออุตสาหกรรมเคมี อาหาร และการเกษตร ภายใต้สถาบันวิทยาการขั้นสูงแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

คณะผู้วิจัย
กันยายน 2558

สารบัญ

เรื่อง	หน้า
บทคัดย่อ	**3**
บทที่ 1 บทนำ	**5**
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	**7**
บทที่ 3 วิธีการดำเนินการวิจัยและผลการวิจัย	**11**
ตอนที่ 1 การศึกษาการย่อยสลายทางชีวภาพของสารประกอบพีเอเอชโดยแบคทีเรีย	11
วิธีการดำเนินการวิจัย	11
ผลการวิจัย	14
ตอนที่ 2 การศึกษาการย่อยสลายทางชีวภาพของสารประกอบพีเอเอชโดยรา	**21**
วิธีการดำเนินการวิจัย	21
ผลการวิจัย	24
บทที่ 4 สรุป วิจารณ์ และข้อเสนอแนะ	**32**
เอกสารอ้างอิงของโครงการวิจัย	**33**
บทความทางวิชาการที่ได้รับการตอบรับให้ตีพิมพ์	**35**

Biodegradation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) by tropical microorganisms.

Chetsada Pothiratana[1], Churapa Teerapatsakul[2], Surachai Thachepan[3]*

Department of Chemistry, Faculty of Science, Kasetsart University, Jatujak, Bangkok 10900, Thailand

E-mail: fscisct@ku.ac.th

In this research, phenanthrene-degrading bacteria strain CH3 was isolated from oil-contaminated soil in Thailand using a spraying plate technique. The strain CH3 was identified as *Pseudomonas* sp. CH3 based on its 16S rDNA sequence analysis. Complete degradation of phenanthrene in the minimal salt medium culture was observed within 3 days of incubation at room temperature (30±2°C) whereas at 37 °C, complete degradation of phenanthrene occurred within 6 days. At 42°C, the strain CH3 was still able to grow and degrade approximately 23% of phenanthrene. Therefore, the strain CH3 is suitable for phenanthrene bioremediation in tropical areas, where temperature may exceed 40°C during the hot season. Additionally, *Pseudomonas* sp. CH3 can utilize aromatics and small carbon compounds, thus offering an environmentally friendly method to remove hazardous substances from the environment.

Screening of white rot fungi with capability to degrade PAHs, phenanthrene, fluorene and pyrene, were investigated. A newly isolated white rot fungal strain RYNF13 was selected according to its high efficiency in biodegradation of PAHs. Complete degradation of phenanthrene in the mineral salt glucose medium culture was observed within 18 days of incubation at room temperature (30±2°C) whereas 95% of fluorene and 50% of pyrene were degraded in the same condition. The strain RYNF13 secreted three kinds of ligninolytic enzyme, manganese peroxidase, laccase and lignin peroxidase, during PAHs biodegradation. Manganese peroxidase was the major enzyme produced by the fungus. In the culture containing phenanthrene, manganese peroxidase showed the highest enzymatic activity at 178 UmL^{-1}. Thus, RYNF13 is a promising tropical white rot fungus for an environmentally friendly removal of hazardous substances from the environment.

การย่อยสลายทางชีวภาพของสารประกอบโพลีไซคลิก อะโรมาติก ไฮโดรคาร์บอน (พีเอเอช) ด้วยจุลินทรีย์เขตร้อน

เจษฎา โพธิรัตน์[1], ชุรภา ธีรภัทรสกุล[2], สุรชัย ธชีพันธ์[3]*

ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ จตุจักร กรุงเทพ 10900

อีเมล์: fscisct@ku.ac.th

งานวิจัยนี้ได้ทำการแยกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลายฟีแนนทรีน (strain CH3) จากดินที่ปนเปื้อนน้ำมันในประเทศไทยด้วยเทคนิค spraying plate ผลการวิเคราะห์ลำดับ 16S rDNA ของแบคทีเรีย strain CH3 นี้แสดงว่าเป็น *Pseudomonas* sp. เมื่อทำการเลี้ยงในอาหาร minimal salt medium พบว่าแบคทีเรีย *Pseudomonas* sp. CH3 ย่อยสลายฟีแนนทรีนทั้งหมดในอาหารได้ภายใน 3 วัน ที่อุณหภูมิห้อง (30±2°C) และภายใน 6 วันที่อุณหภูมิ 37 °C เมื่อเลี้ยงแบคทีเรีย *Pseudomonas* sp. CH3 ที่อุณหภูมิ 42°C พบว่า แบคทีเรียสามารถเจริญได้และย่อยสลายฟีแนนทรีนได้ประมาณ 23% ของความเข้มข้นฟีแนนทรีนเริ่มต้นในอาหาร ดังนั้น แบคทีเรียชนิดนี้จึงเหมาะสมสำหรับใช้ในการย่อยสลายฟีแนนทรีนในเขตร้อนที่อาจมีอุณภูมิเกิน 40°C ในฤดูร้อน นอกจากนี้ แบคทีเรีย *Pseudomonas* sp. CH3 สามารถใช้สารอะโรมาติกและสารประกอบคาร์บอนที่มีขนาดเล็ก ซึ่งนับเป็นการกำจัดวัตถุมีพิษด้วยวิธีที่เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม

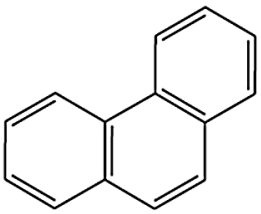
นอกจากแบคทีเรียแล้ว งานวิจัยนี้ศึกษาและคัดเลือก white rot fungi ที่สามารถย่อยสลาย PAHs ได้แก่ ฟีแนนทรีน ฟลูออรีน และไพรีน ผลการศึกษาพบ white rot fungi ชนิดใหม่ คือ strain RYNF13 ที่สามารถย่อยสลายพีเอเอชอย่างมีประสิทธิภาพสูง ราชนิดนี้ย่อยสลายฟีแนนทรีนทั้งหมดในอาหาร mineral salt glucose medium ได้ภายใน 18 วันที่อุณหภูมิห้อง (30±2°C) และย่อยสลายฟลูออรีนและไพรีนได้ 95% และ 50% ตามลำดับที่สภาวะแบบเดียวกัน ในการย่อยสลายทางชีวภาพของพีเอเอช strain RYNF13 หลั่งเอนไซม์ย่อยสลายลิกนิน 3 ชนิด ได้แก่ manganese peroxidase, laccase และ lignin peroxidase เอนไซม์หลักที่หลั่งออกมา คือ manganese peroxidase โดยวัดค่า enzyme activity ได้สูงสุด คือ 178 UmL^{-1} ในอาหารที่ผสมฟีแนนทรีน ดังนั้น strain RYNF13 เป็นราในเขตร้อนที่มีศักยภาพสำหรับการกำจัดวัตถุมีพิษจากสิ่งแวดล้อม

บทที่ 1 บทนำ

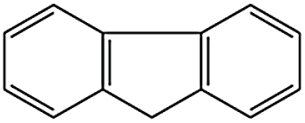
ความสำคัญ และที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

ในปัจจุบัน ปัญหาสิ่งแวดล้อมรวมถึงสภาพดินฟ้าอากาศถูกจัดให้อยู่ในกลุ่มที่ต้องได้รับการแก้ไขอย่างเร่งด่วน เนื่องจากมีความสำคัญต่อชีวิตและความเป็นอยู่ของประชากรทั้งในชุมชนชนบทและชุมชนเมือง การแก้ปัญหาเหล่านี้ซึ่งมีความเกี่ยวเนื่องสัมพันธ์กันจำเป็นต้องเริ่มตั้งแต่ส่วนย่อยของชุมชนรวมไปถึงองค์รวมของประเทศ ส่วนหนึ่งของปัญหาสิ่งแวดล้อมที่ประสบอยู่ในปัจจุบัน ได้แก่ ภาวะสารพิษตกค้างอยู่ในสิ่งแวดล้อมเป็นเวลานาน ตัวอย่างเช่น สารประกอบประเภทโพลีไซคลิก อะโรมาติก ไฮโดรคาร์บอนหรือเรียกอย่างสั้นว่า พีเอเอช (Polycyclic Aromatic Hydrocarbons, PAHs) พีเอเอชเป็นกลุ่มสารประกอบไฮโดรคาร์บอนที่มีโครงสร้างโมเลกุลประกอบด้วยวงอะโรมาติก (Aromatic ring) ตั้งแต่ 2 วงขึ้นไปเชื่อมต่อกัน (fused rings) ลักษณะการเชื่อมต่อกัน คือ วงอะโรมาติก 2 วงที่อยู่ติดกันต้องใช้คาร์บอน 2 อะตอมร่วมกัน โดยจัดเรียงเป็นเส้นตรง เป็นมุม หรือเป็นกลุ่ม ตัวอย่างของสารประกอบเหล่านี้ได้แก่ ฟีแนนทรีน (3 วง) ฟลูออรีน (3 วง) ไพรีน (4 วง) และอื่นๆ การปนเปื้อนของสารประกอบเหล่านี้เป็นผลมาจากกิจกรรมตามธรรมชาติ เช่น การระเบิดของภูเขาไฟและการเกิดไฟป่า และจากกิจกรรมของมนุษย์ เช่น การเผาไหม้แบบไม่สมบูรณ์ของถ่านหิน น้ำมันเตา และขยะ เป็นต้น

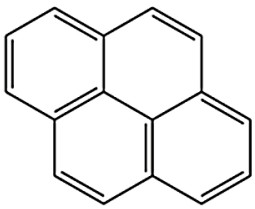
ตัวอย่างของสารประกอบโพลีไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน (PAHs)



Phenanthrene



Fluorene



pyrene

พีเอเอชเป็นสารไม่มีขั้ว จึงมีสภาพการละลายในน้ำต่ำ ส่งผลให้สารเหล่านี้ตกค้างในสิ่งแวดล้อมเป็นเวลานาน ข้อมูลจากรายงานในวารสารการวิจัยและหน่วยงานภาครัฐมีการระบุว่า พีเอเอชเป็นพิษต่อสิ่งมีชีวิตทั้งคนและสัตว์ และมีความเป็นไปได้ว่าพีเอเอชบางชนิดเป็นสารก่อมะเร็ง (carcinogen) และสารที่ก่อการกลาย (mutagen)[1-6]

งานวิจัยนี้มีจุดมุ่งหมายที่จะศึกษาความเป็นไปได้ในการย่อยสลายสารประเภทพีเอเอชที่ตกค้างอยู่ในธรรมชาติด้วยวิธีการทางชีวภาพโดยอาศัยจุลินทรีย์ที่มีอยู่ในธรรมชาติ ได้แก่ แบคทีเรียและรา การใช้จุลินทรีย์ที่มีอยู่ในธรรมชาติเพื่อย่อยสลายสารประเภทพีเอเอชอาศัยหลักการของธรรมชาติบำบัด ช่วยลดการใช้สารเคมีที่ไม่จำเป็น ทำให้นิเวศวิทยาของสิ่งแวดล้อมกลับคืนสู่ภาวะสมดุล ซึ่งเป็นการแก้ปัญหาสิ่งแวดล้อมอย่างยั่งยืน

วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1. เพื่อศึกษาความเป็นไปได้ในการใช้จุลินทรีย์เขตร้อนย่อยสลายสารประเภทพีเอเอช (PAHs)
2. เพื่อทำการคัดเลือกกลุ่มแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลายสารประเภทพีเอเอช
3. เพื่อทำการคัดเลือกกลุ่มราที่มีความสามารถในการย่อยสลายสารประเภทพีเอเอช
4. เพื่อศึกษาและเปรียบเทียบความสามารถในการย่อยสลายสารประเภทพีเอเอชของกลุ่มแบคทีเรียและราในเขตร้อน

ขอบเขตของโครงการวิจัย

ทำการคัดเลือกสายพันธุ์จุลินทรีย์เขตร้อน ได้แก่ แบคทีเรียและราที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายสารประเภทพีเอเอช ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการย่อยสลายสารพิษในห้องปฏิบัติการเพื่อเป็นแนวทางในการนำไปประยุกต์ใช้ในสภาวะแวดล้อมจริง รวมถึงการเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการย่อยสลายทางชีวภาพของแบคทีเรียและรา

คำสำคัญ (keywords) ของโครงการวิจัย

การย่อยสลายทางชีวภาพ (Biodegradation) สารประกอบโพลีไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน (PAHs) แบคทีเรียที่ใช้ออกซิเจน (aerobic bacteria) ราจำพวกที่ย่อยสลายลิกนิน (ligninolytic fungi) รากลุ่มไวรอท (white rot fungi)

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ทำให้ทราบแนวทางการนำจุลินทรีย์ซึ่งได้จากธรรมชาติ มาประยุกต์ใช้ในการย่อยสลายสารประกอบพีเอเอช
2. สามารถผลิตนักวิจัยคือ นิสิตในระดับบัณฑิตศึกษา และปริญญาตรี
3. การเผยแพร่ในวารสารทั้งในระดับชาติ และนานาชาติ หรือจดสิทธิบัตร

บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

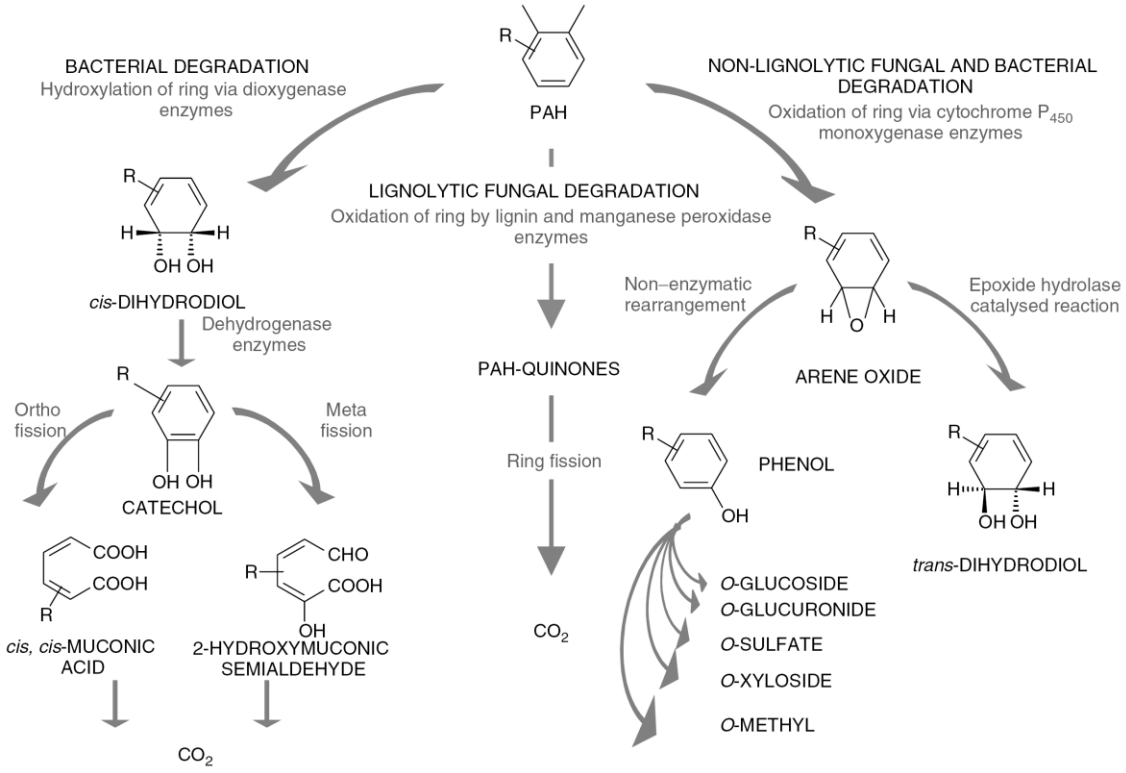
ทฤษฎี สมมุติฐาน และกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย

ในการคัดเลือกสายพันธุ์จุลินทรีย์ที่ทนทานและมีประสิทธิภาพในการย่อยสลายพีเอเอช สามารถทำได้โดยนำดินหรือน้ำจากบริเวณที่มีการปนเปื้อนพีเอเอชในปริมาณสูงมาเพิ่มปริมาณจุลินทรีย์จากตัวอย่างดังกล่าวในห้องปฏิบัติการและแยกให้ได้สายพันธุ์บริสุทธิ์[6-8]

การทบทวนวรรณกรรม/สารสนเทศ (information) ที่เกี่ยวข้อง

การวิจัยเกี่ยวกับการแก้ปัญหาการปนเปื้อนของพีเอเอช โดยเฉพาะอย่างยิ่งการย่อยสลายพีเอเอชด้วยวิธีทางชีวภาพได้รับความสนใจอย่างกว้างขวาง เนื่องจากพีเอเอชเป็นสารปนเปื้อนที่เป็นอันตรายและส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมและสิ่งมีชีวิตในระบบนิเวศน์ ในธรรมชาติการย่อยสลายโดยชีวภาพของพีเอเอช (Biodegradation of PAHs) เกิดขึ้นได้โดยสิ่งมีชีวิตขนาดเล็กจำพวกแบคทีเรียและเชื้อรา กลไกของการเปลี่ยนรูปของพีเอเอช (mechanism of transformation of PAHs) โดยแบคทีเรียที่ใช้ออกซิเจน (aerobic bacteria) เริ่มต้นจากการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันที่วงอะโรมาติก (ring oxidation) ให้ *cis*-dihydrodiol ซึ่งจะเกิดปฏิกิริยาต่อไปเป็น catechol และในขั้นสุดท้ายเป็นก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์และน้ำ ดังแผนภาพ

การย่อยสลายสารประเภทพีเอเอชโดยราจำพวกที่ไม่ย่อยสลายลิกนิน (non-ligninolytic fungi) เกิดผ่านปฏิกิริยาออกซิเดชันของวงอะโรมาติกได้สารประกอบอะรีนออกไซด์ (arene oxide) ซึ่งจะเกิดปฏิกิริยาต่อให้ *trans*-dihydrodiol หรือในบางกรณีให้อนุพันธ์ของฟีนอล อย่างไรก็ตาม การย่อยสลายโดยราจำพวกที่ย่อยสลายลิกนิน (ligninolytic fungi) มีกลไกการย่อยสลายที่แตกต่างไป เอนไซม์ที่ได้จากราจำพวกที่ย่อยสลายลิกนินจะเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารประเภทพีเอเอชให้เกิดหมู่ควิโนน จากนั้นจะเกิดการแตกวง (ring fission) แล้วย่อยสลายต่อไปจนขั้นสุดท้ายได้คาร์บอนไดออกไซด์ ดังแผนภาพ



แผนภาพแสดงกลไกการย่อยสลายทางชีวภาพของสารประเภทพีเอเอชโดยแบคทีเรียที่ใช้ออกซิเจน รา จำพวกที่ย่อยสลายและไม่ย่อยสลายลิกนิน[3]

ในช่วงระยะเวลากว่ายี่สิบปีที่ผ่านมา มีรายงานวิจัยหลายเรื่องระบุถึงความเป็นไปได้ในการแยกแบคทีเรีย (Isolation of bacteria) ที่มีความสามารถในการย่อยสลายสารประกอบพีเอเอชจากดินหรือน้ำที่เก็บมาจากแหล่งที่มีการปนเปื้อนของพีเอเอชในปริมาณสูง จากนั้นนำแบคทีเรียที่ได้มาเพาะเลี้ยงเพื่อเพิ่มปริมาณแล้วนำไปใช้ในปฏิกิริยาการย่อยสลายพีเอเอชในห้องปฏิบัติการ[1] ประสิทธิภาพของแบคทีเรียจากแหล่งต่าง ๆ ในการย่อยสลายสารประกอบพีเอเอชจะแตกต่างกันไป ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับสภาวะของการทดลอง ปัจจัยที่ส่งผลต่อการเจริญของจุลินทรีย์และประสิทธิภาพในการย่อยสลายสารประกอบพีเอเอช ได้แก่ อุณหภูมิ ค่าพีเอช ออกซิเจน สารอาหาร (Nutrient) สภาพพร้อมใช้ทางชีวภาพ (Bioavailability)[2]

แบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายพีเอเอชได้โดยทั่วไป จะเป็นแบคทีเรียที่ใช้ออกซิเจน (aerobic bacteria) ซึ่งสามารถเจริญได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อทั่วไปที่มีแหล่งคาร์บอนอื่น ที่ไม่ใช่พีเอเอช แบคทีเรียที่ใช้ออกซิเจนที่สามารถย่อยสลายพีเอเอชได้นั้น จะต้องสามารถสร้างเอนไซม์ dioxygenase ดังนั้นจึงมีแบคทีเรียบางสายพันธุ์เท่านั้นที่สามารถย่อยสลายพีเอเอชได้โดยออกซิเจนจะถูกเติมลงไปที่คาร์บอน 2 อะตอมในวงเบนซีนของสารประกอบพีเอ

เอชเกิดเป็นสารประกอบ *cis*-dihydrodiol ซึ่งจะถูกเปลี่ยนเป็น dihydroxylated intermediate โดยเอนไซม์ dehydrogenase จากนั้นจะถูกตัดวงและก่อให้เกิดเป็นสารตัวกลางใน TCA cycle[1] โดยแบคทีเรียสามารถย่อยสลายพีเอเอชได้หนึ่งชนิดหรือมากกว่าหนึ่งชนิด ขึ้นกับชนิดและสายพันธุ์ของแบคทีเรีย ตัวอย่างของการคัดแยกและศึกษาแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายโพลีอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน(พีเอเอช) ได้แก่ การคัดแยกแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลาย naphthalene พบว่าได้แก่ *Alcaligenes denitrificans*, *Mycobacterium* sp., *Pseudomonas putida*, *P. fluorescens*, *P. paucimobilis*, *P. vesicularis*, *P. cepacia*, *P. testosteroni*, *Rhodococcus* sp., *orynebacterium venale*, *Bacillus cereus*, *Moraxella* sp., *Streptomyces* sp., *Vibrio* sp. และ *Cyclotrophicus* sp.[9-10] การคัดแยกแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายสารประกอบ phenantrene ได้แก่ *Aeromonas* sp., *Alcaligenes faecalis*, *A. denitrificans*, *Arthrobacter polychromogenes*, *Beijerinckia* sp., *Micrococcus* sp., *Mycobacterium* sp., *Pseudomonas putida*, *P. paucimobilis*, *Rhodococcus* sp., *Vibrio* sp., *Nocardia* sp., *Flavobacterium* sp., *Streptomyces* sp. and *Bacillus* sp.[11-12] มีรายงานการคัดแยกแบคทีเรียที่สามารถย่อยสาร pyrene, phenanthrene และ fluoranthene ได้แก่ *Aureobacterium* sp., *Arthrobacter* sp. และ *Rhodococcus* sp. [8] เป็นต้น

วิธีการคัดแยกแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายโพลีอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน (พีเอเอช) มีหลายวิธีแต่วิธีที่นิยมใช้กันมี 2 วิธี ได้แก่

1. Enrichment technique เป็นวิธีที่ใช้ในการคัดเลือกแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายสารประกอบโพลีไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน(พีเอเอช) โดยการนำดินปนเปื้อนใส่ในอาหาร Mineral salts medium ที่มีฟีแนนทรีน (MSP) ซึ่งใช้เป็นตัวแทนสารพีเอเอช บ่ม เป็นเวลา 1 สัปดาห์ที่ 30 °C บ่มเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที หลังจากนั้นถ่ายเชื้อ 5 มิลลิลิตรลงในอาหาร MSPใหม่ ทุกสัปดาห์เป็นเวลา 2 สัปดาห์ หลังจากนั้นถ่ายเชื้อลงใน Mineral salts medium 10 มิลลิลิตรที่มีฟีแนนทรีน บ่มเชื้อเป็นเวลา 1สัปดาห์ แล้ว นำเชื้อมาทำเจือจางและ spread บนผิวหน้าอาหาร Nutrient agar ทำให้ได้แบคทีเรียที่ สามารถย่อยสลายฟีแนนทรีนได้[7,13-15]

2. Spraying plate technique เป็นวิธีที่ใช้ในการคัดเลือกแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายสารประกอบโพลีไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน (พีเอเอช) โดยการนำตัวอย่างที่ต้องการคัดแยกไปเจือจางแล้ว spread ลงบนผิวหน้าอาหาร จากนั้นนำสารพีเอเอชละลายในตัวทำละลายเช่น อีเทอร์ พ่นลงบนผิวหน้าอาหาร mineral salt agar ซึ่งแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายสารพีเอเอชได้จะเกิดโซนใส (clear zone) บนผิวหน้าอาหาร[16-17]

การย่อยสลายสารพีเอเอชโดยใช้รากลุ่มไวรอท (white rot fungi) กำลังได้รับความสนใจและมีการศึกษาอย่างกว้างขวางมากขึ้นในช่วงระยะเวลา 10 ปีที่ผ่านมา รากลุ่มไวรอทเป็นราที่สามารถย่อยสลายลิกนินในธรรมชาติได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยราจะปล่อยกลุ่มของเอนไซม์ย่อยลิกนิน (ligninolytic enzyme) ออกมานอกเซลล์เพื่อย่อยลิกนิน เอนไซม์ย่อยลิกนินหลักที่ราสร้างได้แก่ Lignin peroxidase (LiP), Manganese peroxidase (MnP) และ laccase (Lac) ซึ่งมีความจำเพาะต่อสับสเตรตต่ำ ดังนั้นจึงสามารถย่อยสารได้หลากหลายชนิดรวมทั้ง

สารพีเอเอชด้วย ราไวรอทที่มีรายงานว่าสามารถย่อยสลายพีเอเอชได้หลายชนิดอย่างมีประสิทธิภาพ คือ *Phanerochaete chrysosporium*[18-19] *Pleurotus* spp., *Trametes* spp., *Bjerkandera* spp. และ *Ganoderma lucidum*[20-22] เป็นต้น สายพันธุ์ราและชนิดของสารพีเอเอชที่รายย่อยแสดงดังตาราง

ตารางแสดงชนิดของสารพีเอเอชและราที่สามารถย่อยสลายสารพีเอเอช

ยีนัส	สารพีเอเอช
Aspergillus	Phenanthrene, pyrene[23]
Cladosporium	Benzo[a] pyrene[24]
Penicillium	Pyrene[25]
Phanerochaete	สารพีเอเอชเกือบทุกชนิด[19]
Pleurotus	Anthracene, phenanthrene, pyrene, fluoranthene, fluorene[21,26]
Bjerkandera	Anthracene, fluoranthene, phenanthrene, benzo[a] pyrene[26]
Ganoderma lucidum	Phenanthrene, pyrene[22]

บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัยและผลการวิจัย

ตอนที่ 1 การศึกษาการย่อยสลายทางชีวภาพของสารประกอบพีเอเอชโดยแบคทีเรีย

วิธีการดำเนินการวิจัย

1. การคัดเลือกแบคทีเรียจากธรรมชาติ

1. เก็บตัวอย่างดินบริเวณที่คาดว่ามีการปนเปื้อนของพีเอเอช เช่น บริเวณริมถนน บริเวณอู่ซ่อมรถยนต์ บริเวณที่มีการปนเปื้อนของน้ำมัน และศึกษาคุณลักษณะได้แก่ ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) และจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดโดยวิธี dilution plate count

2. การเพิ่มจำนวนแบคทีเรียจำเพาะที่สามารถย่อยสลายสารประกอบฟีแนนทรีนโดยวิธี Enrichment technique โดยนำดินตัวอย่าง 1 g ใส่ในอาหาร Mineral Salt Medium (MSM) ที่มีการเติมฟีแนนทรีน เป็นแหล่งคาร์บอน บ่มทิ้งไว้โดยใช้เครื่องเขย่า (shaker) เป็นเวลา 7 วัน หลังจากนั้นถ่ายลงในอาหาร Mineral Salt Medium ที่มีการเติมสารฟีแนนทรีน ใหม่ และบ่มต่อไป แบคทีเรียที่เพิ่มจำนวนขึ้นจะถูกนำไปคัดแยกในขั้นตอนต่อไป

3. การคัดแยกแบคทีเรียที่มีความสามารถย่อยสลายสารพีเอเอชโดยใช้วิธี spraying plate โดยดูจากโซนใส (clear zone) ที่เกิดขึ้น จากนั้นเก็บโคโลนีที่มีโซนใสเกิดขึ้นมาทำการแยกเชื้อแบคทีเรียให้บริสุทธิ์ต่อไป เมื่อได้เชื้อบริสุทธิ์แล้ว ทำการจำแนกชนิดของเชื้อที่ได้ โยการศึกษาคุณลักษณะของเชื้อ เช่น ลักษณะของโคโลนี ความสามารถในการเคลื่อนที่ คุณสมบัติในการติดสีแบบแกรม และช่วงอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญ

4. การจัดจำแนกชนิดของแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายสารพีเอเอช โดยการใช้ลำดับเบสของ 16S rDNA gene

4.1 การสกัด Genomic DNA ของแบคทีเรีย

ในการสกัด Genomic DNA ของแบคทีเรียจะใช้ Genomic DNA Purification Kit (Fermentas) โดยมีหลักการคือ การใช้ lysis solution ทำให้ผนังเซลล์และเยื่อหุ้มเซลล์แตก จากนั้นใส่ chloroform ลงไป กลับหลอดทดลองไป (invert) เพื่อสกัดแยกเอาส่วนของโปรตีนออกมา จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยง นำเอาส่วนของ aqueous phase ซึ่งอยู่ชั้นบนซึ่งมี DNA อยู่ย้ายไปใส่ใน eppendorf tube หลอดใหม่ ใส่ precipitation solution เพื่อตกตะกอน genomic DNA ลงมาและนำไปปั่นเหวี่ยง ส่วนของ DNA จะตกตะกอนลงมา นำตะกอนไปละลายใน NaCl solution และนำไปตกตะกอนอีกครั้งด้วย ethanol เย็น

4.2 การเพิ่มปริมาณ 16S rDNA ด้วยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR)

Primer สำหรับเพิ่มปริมาณ 16S rDNA (bacteria: 27F/1389R) คือ

forward primer 27F ; 5′-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3′

reversed primer 1389R ; 5′-ACGGGCGGTGTGTACAAG-3′

ทำ Polymerase chain reaction (PCR) โดยอาศัย *Taq* DNA polymerse จากบริษัท Fermentas ประกอบด้วย1x *Taq* DNA polymerase buffer, 1.5 mM $MgCl_2$, 0.25 mM dNTP, 1 μM Forward primer, 1 μM Reverse primer, 0.025U/μl *Taq* DNA polymerase และ DNA template 1 μl ต่อ 50 μl reaction

PCR Cycle ที่ใช้แสดงได้แก่ Initial Denaturation ที่ 94 °C 180 วินาที ตามด้วย Denaturation ที่ 94 °C 30 วินาที จำนวน 30 รอบ Annealing ที่ 50 °C 30 วินาที และ Extension ที่ 72 °C 120 วินาที และปิดท้ายด้วย Final Extension ที่ 72 °C 240 วินาที

4.3 นำมาวิเคราะห์ด้วย Agarose gel Electrophoresis โดยใช้ 1.5 % ใน 0.5XTAE buffer เพื่อดูความบริสุทธิ์และปริมาณ PCR product ที่ได้ และส่ง PCR product ที่ได้ไปวิเคราะห์ลำดับเบสที่บริษัท First BASE Laboratories Sdn Bhd.โดยใช้วิธี Direct sequence ไม่อาศัยการโคลนนิ่งโดย primer ที่ใช้ได้แก่ forward primer 27F หรือ reversed primer 1389R

4.4 วิเคราะห์ลำดับเบสของดีเอ็นเอ โดยนำลำดับเบสของ partial 16S rRNA gene ที่ได้เปรียบเทียบกับข้อมูลลำดับเบสในฐานข้อมูลทางดีเอ็นเอ (GenBank) โดยใช้โปรแกรม BLASTn (NCBI) และจัดจำแนกชนิดของแบคทีเรียเบื้องต้นที่เว็บไซต์ของ Eztaxon-e (http://eztaxon-e.ezbiocloud.net/)

4.5 การเปรียบเทียบความสัมพันธ์ของสายพันธุ์ที่คัดแยกได้กับสายพันธุ์อ้างอิง (Alignment) โดยใช้โปรแกรม BioEdit version 7.1.11 ด้วยวิธี ClustalW Multiple Alignment และสร้าง Phylogenetic tree โดยโปรแกรม Mega 4 ด้วยวิธี N-J method

2. การศึกษาการย่อยสลายทางชีวภาพของฟีแนนทรีนโดยแบคทีเรีย

การศึกษาการย่อยสลายและใช้ฟีแนนทรีนเป็นแหล่งคาร์บอนเดี่ยวโดยแบคทีเรีย

1. นำแบคทีเรียที่คัดเลือกไว้มาเลี้ยงในอาหาร MSM ที่มีฟีแนนทรีนเข้มข้น 100 ppm บ่มเขย่าที่อุณหภูมิห้อง ด้วยเครื่อง reciprocal shaker ที่ 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 วัน จากนั้นจึงย้ายมาเพาะเลี้ยงในอาหาร nutrient broth บ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

2. นำ culture ไปปั่นเหวี่ยงที่ 3000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ดูดส่วนใสทิ้ง จากนั้นล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 3000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ดูดส่วนใสทิ้ง ทำซ้ำ 2 ครั้ง ปรับค่าความขุ่นสุดท้ายให้ $OD_{600\ nm}$ ~ 0.5

3. นำเชื้อที่เพิ่มจำนวนแล้วใส่ลงในอาหาร MSM ในอัตราส่วน 1:100 แบ่งเชื้อส่วนหนึ่งไปผ่านการ autoclave เพื่อใช้สำหรับเป็น negative control

4. เตรียมชุดทดลอง โดยนำฟีแนนทรีน (10,000 ppm) 100 µl ใส่ลงใน flask 50 ml รอให้ตัวทำละลาย (methanol) ระเหยให้หมด จากนั้นเติมอาหาร MSM ที่เติมแบคทีเรียที่เพิ่มจำนวนแล้ว 10 ml ซึ่งแต่ละ flask จะใช้เป็นตัวแทนของตัวอย่างในแต่ละวัน สำหรับ 1 ซ้ำ

5. เตรียมชุด negative control โดยนำฟีแนนทรีน (10,000 ppm) 100 µl ใส่ลงใน flask 50 ml จากนั้นเติมอาหาร MSM ที่เติมแบคทีเรียที่เพิ่มจำนวนแต่ผ่านการ autoclave แล้ว 10 ml

6. บ่มแบบเขย่าด้วยเครื่อง reciprocal shaker และวัดค่าการลดลงของฟีแนนทรีน และการเจริญของเชื้อ โดยวัดปริมาณฟีแนนทรีนโดยเตรียมความเจือจางของตัวอย่างด้วย methanol ให้อยู่ในช่วงความความเข้มข้นที่มีความสัมพันธ์เป็นเส้นตรง (linear) วัดค่า absorbance ในช่วง 200 – 400 nm บันทึกความยาวคลื่นที่ maximum absorbance ซึ่งมีค่า 251 nm ด้วยเครื่องมือ JASCO V-670 UV-visible spectrophotometer และวัดค่าการเจริญของแบคทีเรียที่คัดเลือกไว้โดยวัดค่า OD_{600} เป็นเวลา 6 วัน

ผลการวิจัยตอนที่ 1 การศึกษาการย่อยสลายทางชีวภาพของสารประกอบพีเอเอชโดยแบคทีเรีย

ผลการทดลองที่แยกเชื้อแบคทีเรียที่สามารถสร้าง clear zone บนอาหาร mineral salt medium ที่พ่นด้วยฟีแนนทรีน พบว่า มีจำนวน 7 ไอโซเลท: 1-1, 2-1, 3-1, 5-2, 6-2, 7-2, 8-2 จากนั้นนำไอโซเลท 3-1 และ 5-2 ไปศึกษาการย่อยสลายและใช้ฟีแนนทรีนเป็นแหล่งคาร์บอนเดี่ยว พบว่า เชื้อทั้งสองย่อยสลายฟีแนนทรีนได้ประมาณ 45% และ 30% ตามลำดับภายใน 18 วัน แต่ไม่พบการเจริญของแบคทีเรียเพิ่มขึ้น มีความเป็นไปได้ว่าเชื้อดังกล่าวสูญเสียประสิทธิภาพในการย่อยสลายและใช้ฟีแนนทรีนเป็นแหล่งคาร์บอนไประหว่างการเก็บรักษาเชื้อแบคทีเรีย ผู้วิจัยจึงได้ทำการคัดแยกเชื้อแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายฟีแนนทรีนอีกครั้ง และพบว่า การเก็บรักษาเชื้อแบคทีเรียดังกล่าวให้คงความสามารถในการย่อยสลายฟีแนนทรีนได้นั้นต้องเก็บรักษาในอาหารที่มีฟีแนนทรีนด้วย จึงใช้เป็นแนวทางในการทดลองขั้นต่อไป

1. การคัดแยกเชื้อแบคทีเรียจากดินที่มีการปนเปื้อนน้ำมัน

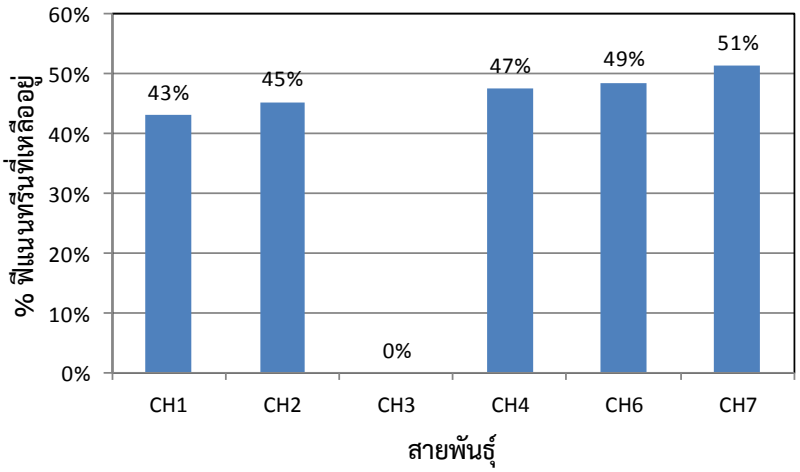
คัดแยกเชื้อจากตัวอย่างดินโคลนจากโรงเรียนช่างอุตสาหกรรม กรุงเทพฯ หัวหมาก จำนวน 1 ตัวอย่าง โดยมีค่าความเป็นกรด–ด่างของดิน (pH) เท่ากับ 7.25 การนับจำนวนจุลินทรีย์จากตัวอย่างดิน (Total count) มีค่า 2.6 x 10^6 CFU/g ของดิน และค่าความชื้นในดินเท่ากับ 14.8 % เมื่อนำดินมาทำการเพิ่มจำนวนแบคทีเรียและคัดแยกสายพันธุ์ที่มีการย่อยสลายฟีแนนทรีนโดยวิธี spraying plate บนอาหาร Mineral Salt Agar พบว่าสามารถคัดแยกแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายฟีแนนทรีนได้ทั้งหมด 6 ไอโซเลท คือ CH1, CH2, CH3, CH4, CH6 และ CH7

2. การวัดค่าการลดลงของฟีแนนทรีนและการเจริญของแบคทีเรียที่คัดเลือกไว้

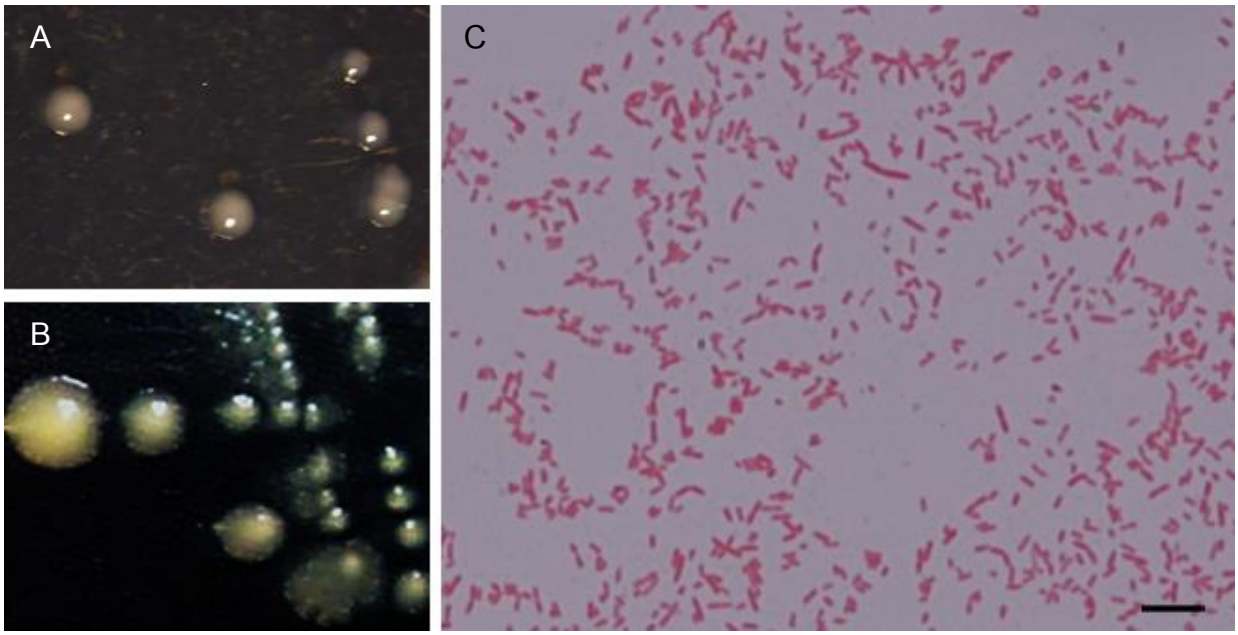
นำเชื้อที่คัดเลือกไว้มาทดสอบในฟลาสก์ที่มีอาหาร Mineral salt medium และฟีแนนทรีนเข้มข้น 100 ppm จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 251 nm เพื่อวิเคราะห์ปริมาณฟีแนนทรีนที่เหลืออยู่และเปรียบเทียบความสามารถในการย่อยสลายฟีแนนทรีนของเชื้อแบคทีเรีย ในวันที่ 6 ด้วย UV-Visible spectrophotometer ได้ผลการทดลองดังรูปที่ 1-1 ซึ่งแสดงเปอร์เซ็นต์ฟีแนนทรีนที่เหลืออยู่ในอาหารที่ใช้เลี้ยงแต่ละไอโซเลทที่คัดเลือกไว้เปรียบเทียบกับชุดควบคุม (control set) ผลการทดลองแสดงว่า เชื้อสายพันธุ์ CH3 มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายฟีแนนทรีนได้ดีกว่าเชื้อสายพันธุ์อื่นที่คัดเลือกไว้ จึงคัดเลือกเชื้อสายพันธุ์ CH3 ไปทำการทดลองต่อไป

3. การศึกษาคุณลักษณะแบคทีเรียสายพันธุ์ CH3

ลักษณะโคโลนีของเชื้อสายพันธุ์ CH3 ที่พบบนอาหาร Nutrient agar ที่เจริญเป็นเวลา 24 ชั่วโมงมี สีขาวทึบแสง (opaque) โคโลนีมีลักษณะกลม ขอบเรียบ (รูปที่ 1-2A) และเมื่อบ่มเป็นระยะเวลานานขึ้นโคโลนีมีสีเหลืองและขอบขรุขระ (รูปที่ 1-2B) เชื้อสายพันธุ์ CH3 รูปร่างเป็นท่อนสั้น ติดสีแกรมลบ สามารถเคลื่อนที่ได้ (motile) (รูปที่ 1-2C)



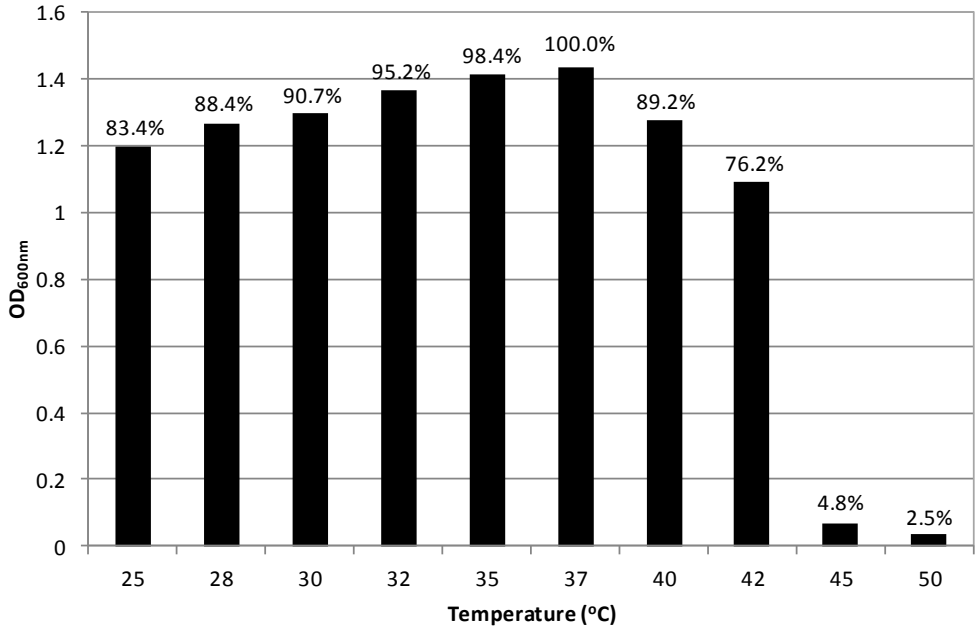
รูปที่ 1-1 เปอร์เซ็นต์ของฟีแนนทรีนที่เหลืออยู่ในอาหารที่ใช้เลี้ยงแต่ละไอโซเลท เมื่อบ่มไว้เป็นเวลา 6 วัน



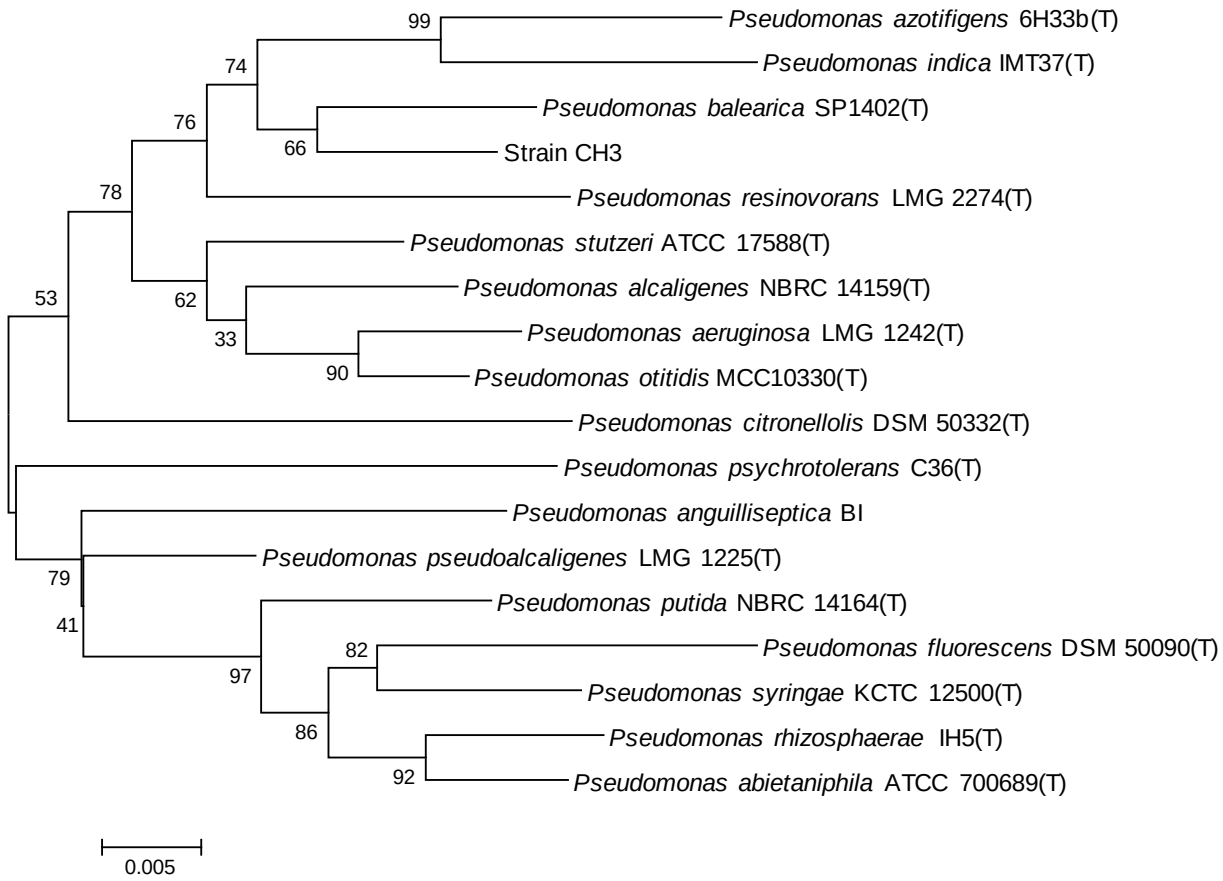
รูปที่ 1-2 ภาพลักษณะของโคโลนีของสายพันธุ์ CH3 บนอาหาร NA เมื่อบ่มเป็นเวลา (A) 1 วัน (B) 2 วัน และ (C) การย้อมสีแบบแกรม scale bar = 5 μm

เมื่อทดสอบการเจริญระหว่างช่วง 25 – 50°C ใน nutrient broth (NB) พบว่าสายพันธุ์ CH3 เจริญได้ในช่วง 25 – 42°C โดยพบการเจริญสูงสุดที่ 37°C (optimal temperature) และในระหว่างช่วง 25-40°C พบการเจริญได้มากกว่า 80% ของค่าการเจริญสูงสุด ส่วนที่ 42° พบการเจริญคิดเป็น 76.2% ของค่าการเจริญสูงสุด (รูปที่ 1-3)

เมื่อจัดจำแนกชนิดของแบคทีเรียสายพันธุ์ CH3 โดยการหาลำดับเบสบางส่วนของ 16S rDNA gene (partial 16S rDNA gene Sequence) เพิ่มจำนวนโดยอาศัย 27F และ 1389R primer ซึ่งเป็น universal primer และหาลำดับเบสโดยใช้วิธี Direct sequencing ด้วย primer 27F หรือ 1389R โดยตรงโดยไม่ต้องอาศัยการโคลน 16S rDNA sequence ที่เพิ่มจำนวนขึ้นมามีขนาด 1287 นิวคลีโอไทด์ เมื่อเปรียบเทียบความคล้ายคลึงในฐานข้อมูลทางดีเอ็นเอ (GenBank) พบว่า แบคทีเรียสายพันธุ์ CH3 มีความคล้ายคลึงมากที่สุดกับ *Pseudomonas* sp. S2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence (HQ721241) โดยเหมือนกันถึง 100% และเมื่อนำไปจัดจำแนกชนิดโดยเปรียบเทียบกับ type strain พบว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ CH3 มีความคล้ายคลึงกับ *Pseudomonas balearica* SP1402 (U26418) (97.98%) and *P. resinovorans* LMG 2274 (Z76668) (97.5%). และเมื่อนำไปวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการกับแบคทีเรียใน genus *Pseudomonas* พบว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ CH3 มีความใกล้ชิดกับ *P. azotifigens* 6H33B and *P. indica* IMT37 ด้วย แบคทีเรียใน genus *Pseudomonas* ที่ใกล้ชิดกับแบคทีเรียสายพันธุ์ CH3 สามารถเจริญได้ที่อุณหูมิสูงโดย *P. balearica* SP1402 สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิสูงถึง 46°C[27] *P. indica* IMT37 สามารถเจริญได้ในอุณหูมิช่วง 25 ถึง 42°C[28] การเจริญของ *P. azotifigens* 6H33B ใน LB medium พบได้ในช่วง 28 – 41°C ขณะที่ optimal temperature ของ *P. resinovorans* อยู่ในช่วง 28 – 30°C แต่ไม่พบการเจริญที่ 42°C[29,30] ดังนั้น แบคทีเรียสายพันธุ์ CH3 จึงถูกจัดจำแนกขั้นต้นเป็น *Pseudimonas* sp. CH3 ซึ่งมีช่วงการเจริญครอบคลุมอุณหูมิภายนอกของประเทศไทยตลอดทั้งปีซึ่งอยู่ในช่วง 27-40 °C[31] จึงมีความเหมาะสมในการนำไปใช้งานจริงในประเทศไทย



รูปที่ 1-3 การเจริญของแบคทีเรียโดยพิจารณาจากค่า $OD_{600\ nm}$ ในช่วงอุณหภูมิ 25-50°C ตัวเลขที่แสดงอยู่เหนือแท่งกราฟของแสดงเปอร์เซ็นต์การเจริญของแบคทีเรียที่อุณหภูมินั้นเปรียบเทียบกับค่าการเจริญสูงสุดที่ 37°C

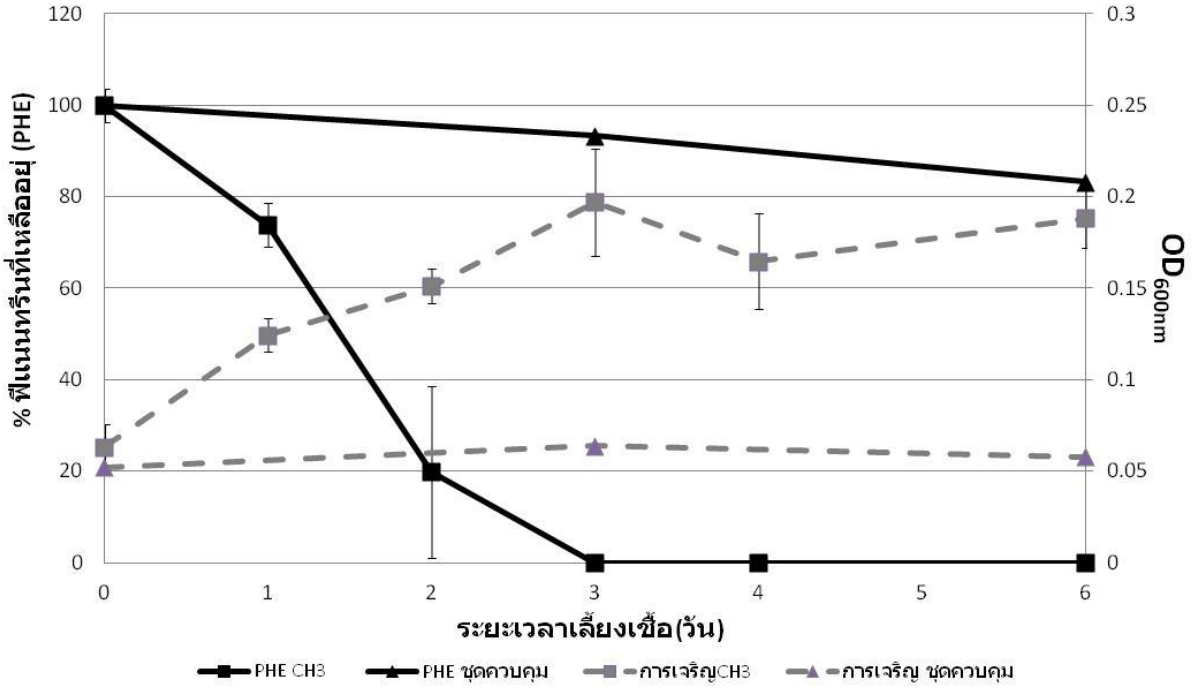


รูปที่ 1-4 ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการโดยอาศัยลำดับเบส partial 16S rDNA gene ของแบคทีเรียสายพันธุ์ CH3 ในงานวิจัยนี้กับแบคทีเรียใน genus *Pseudomonas* 17 species ได้แก่ *Pseudomonas alcaligenes* NBRC 14159(T), *Pseudomonas aeruginosa* LMG 1242(T), *Pseudomonas otitidis* MCC10330(T), *Pseudomonas azotifigens* 6H33b(T), *Pseudomonas balearica* SP1402(T), *Pseudomonas citronellolis* DSM 50332(T), *Pseudomonas fluorescens* DSM 50090(T), *Pseudomonas indica* IMT37(T), *Pseudomonas pseudoalcaligenes* LMG 1225(T), *Pseudomonas psychrotolerans* C36(T), *Pseudomonas resinovorans* LMG 2274(T), *Pseudomonas rhizosphaerae* IH5(T), *Pseudomonas stutzeri* ATCC 17588(T), *Pseudomonas abietaniphila* ATCC 700689(T), *Pseudomonas syringae* KCTC 12500(T), *Pseudomonas putida* NBRC 14164(T), *Pseudomonas anguilliseptica* BI โดยใช้วิธี Neighbor-Joining (bootstrap test 1000 replicates) แผนภูมิที่ได้แสดงความยาวที่ถูกสัดส่วนโดย Scale bar มีหน่วยคือ 0.005 การเปลี่ยนแปลงแทนที่เบสต่อตำแหน่ง (number of base substitutions per site) ตำแหน่งที่นำมาคำนวณทั้งหมดคือ 1261 ตำแหน่ง โดยการคำนวณจะนำตำแหน่งที่เป็นช่องว่าง (gap) ออก (Complete deletion option) โดยแผนภูมิความสัมพันธ์ที่ได้ถูกสร้างโดยโปรแกรม MEGA4

4. การวัดค่าการลดลงของฟีแนนทรีนและการเจริญของ *Pseudomonas* sp. CH3

เมื่อทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายฟีแนนทรีนโดย *Pseudomonas* sp. CH3 ที่ความเข้มข้นของฟีแนนทรีนเริ่มต้น 100 ppm และวัดความเข้มข้นของฟีแนนทรีนในตัวอย่าง โดยใช้ UV-Visible spectrophotometry ที่ λmax = 251 nm ในวันที่ 0, 1, 2, 3, 4 และ 6 ของการเพาะเลี้ยงเชื้อ และคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ฟีแนนทรีนที่เหลืออยู่ในตัวอย่างเปรียบเทียบกับตอนเริ่มต้น และวัดการเจริญของเชื้อโดยการวัดค่า OD_{600nm} ของตัวอย่าง ผลการทดลองแสดงว่า *Pseudomonas* sp. CH3 สามารถย่อยสลายฟีแนนทรีนได้อย่างมีประสิทธิภาพเมื่อเพาะเลี้ยงใน mineral salt medium ที่อุณหภูมิห้อง (30±2°C) โดยหลังจากเพาะเลี้ยงเชื้อเพียง 2 วัน ปริมาณฟีแนนทรีนเหลือเพียง 20% เมื่อเทียบกับตอนเริ่มต้น และในวันที่ 3 ของการเลี้ยงเชื้อตรวจไม่พบฟีแนนทรีนในอาหาร นอกจากนี้พบว่า แบคทีเรียมีการเจริญอย่างรวดเร็วในตอนเริ่มต้นจนถึงวันที่ 3 และหลังจากนั้นจำนวนของแบคทีเรียจะค่อนข้างคงที่ไปตลอดจนเสร็จสิ้นการทดลองในวันที่ 6 (รูปที่ 1-5) การเพิ่มขึ้นของแบคทีเรียควบคู่ไปกับการลดลงของฟีแนนทรีนในตัวอย่างชี้ให้เห็นว่า *Pseudomonas* sp. CH3 สามารถย่อยสลายฟีแนนทรีนและใช้ฟีแนนทรีนเป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงานเพื่อการเจริญเติบโตได้ ผลการทดลองจากชุดควบคุมแสดงว่า การลดลงของฟีแนนทรีนจากปัจจัยอื่นๆ เช่น ปัจจัยทางกายภาพ มีน้อยกว่า 20%

รายงานอื่นที่นำแบคทีเรียใน genus Pseudomonas และ genus ใกล้เคียง ในการย่อยสลายฟีแนนทรีนมีตัวอย่างดังต่อไปนี้ เช่น *Pseudomonas* sp. USTB-RU ย่อยสลายฟีแนนทรีนได้ 86.65% ที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 100 ppm ในเวลา 8 วัน ที่อุณหภูมิ 30°C[32] *Pseudomonas stutzeri* ZP2 ย่อยสลายฟีแนนทรีนได้ 96% ที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 250 ppm ในเวลา 6 วัน ที่อุณหภูมิ 37°C[33] แบคทีเรียใน gemus Pseudomonas and Sphingomonas strains สามารถย่อยสลายฟีแนนทรีนได้อย่างมรประสิทธิภพถึง 75-100% ที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 150 ppm ในเวลา 72-168 ชั่วโมงที่อุณหภูมิที่ 25°C[34] Sphingomonas sp. GY2B ย่อยสลายฟีแนนทรีนได้ 99.8% ที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 100 ppm ที่อุณหภูมิ 30°C ในเวลา 2 วัน[35] เมื่อเปรียบเทียบกับงานวิจัยก่อนหน้า *Pseudomonas* sp. CH3 มีประสิทธิภาพสูงในการย่อยสลายฟีแนนทรีน โดยสามารถย่อยสลายฟีแนนทรีนได้ 100% ที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 100 ppm ที่อุณหภูมิห้อง (30±2°C) ในเวลา 3 วัน



รูปที่ 1-5 เปอร์เซ็นต์ของฟีแนนทรีนที่เหลืออยู่และการเจริญของแบคทีเรีย *Pseudomonas* sp. CH3 error bar แสดงค่าความคลาดเคลื่อน (SD) จากการทดลอง 3 ซ้ำ ชุดควบคุมใช้แบคทีเรียที่ผ่านการทำให้ตายโดยการ autoclave แทนเซลล์ที่มีชีวิต โดยทำการทดลอง 2 ซ้ำ

ตอนที่ 2 การศึกษาการย่อยสลายทางชีวภาพของสารประกอบพีเอเอชโดยรา

วิธีการดำเนินการวิจัย

1. สายพันธุ์ราที่ใช้ในงานวิจัย

1.1 สายพันธุ์ราที่คัดแยกใหม่จากธรรมชาติ

คัดเลือกเก็บตัวอย่างราจากธรรมชาติ โดยมุ่งเน้นไปที่เห็ดรากลุ่มไวท์รอท (white rot fungi) เนื่องจากมีงานวิจัยที่รายงานว่ากลุ่มไวท์รอทสามารถย่อยสลายสารพีเอเอชได้หลายชนิด โดยเห็ดรากลุ่มไวท์รอทมักเจริญอยู่บริเวณโคนต้นไม้ บนซากใบไม้ที่ทับถม และบนท่อนไม้ โดยมักจะพบวงขาวตรงบริเวณไม้ที่ถูกย่อยเนื่องจากราสร้างเอนไซม์ย่อยลิกนินและปล่อยออกนอกเซลล์เพื่อย่อยไม้ ซึ่งจากรายงานพบว่าเอนไซม์กลุ่มนี้มีคุณสมบัติในการย่อยสลายสารพีเอเอชด้วย ทำให้ได้สารผลิตภัณฑ์คือ quinines ซึ่งมีความเป็นพิษต่ำกว่า และมีโครงสร้างง่ายต่อการย่อยสลายต่อไป

เมื่อได้ตัวอย่างแล้วทำการจดบันทึกอธิบายลักษณะภายนอกของดอกเห็ด และทำรอยพิมพ์สปอร์ (spore print) ในขณะที่ดอกเห็ดยังสดอยู่ เมื่อบันทึกลักษณะภายนอกเรียบร้อยแล้ว จึงทำการจัดจำแนก (identify) ดอกเห็ด แต่ถ้ายังไม่สามารถจัดจำแนกได้ให้เก็บดอกเห็ดไว้ในที่ที่เย็นและแห้ง เช่น ตู้เย็นช่องธรรมดา หรือนำดอกเห็ดไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 45-50 องศาเซลเซียส เมื่อแห้งดีแล้ว นำออกมาเก็บในถุงพลาสติกและปิดปากถุงให้สนิท โดยสามารถนำมาคืนรูปโดยการแช่ในน้ำ หรือหยด 3-5% KOH ลงไปสักครู่หนึ่ง แล้วนำมาตรวจสอบใต้กล้องจุลทรรศน์ต่อไป[36]

นำเห็ดมาคัดแยกให้บริสุทธิ์ในห้องปฏิบัติการ โดยใช้อาหาร Potato dextrose agar (PDA) ดอกเห็ดที่จะนำมาแยกบนอาหารแข็งจะใช้มีด sterile เฉือนดอกเห็ดให้เป็นรอย ใช้คีมคีบแยกดอกเห็ดออกแล้วนำเนื้อเยื่อในส่วน stalk ของดอกเห็ด วางลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA โดยเทคนิคปลอดเชื้อ บ่มที่อุณหภูมิห้อง เวลา 3 – 5 วัน เมื่อเชื้อเจริญนำมาทำให้เชื้อบริสุทธิ์โดยใช้วิธี hyphal tip isolation วางลงบนอาหาร PDA ในจานอาหารเลี้ยงเชื้อใหม่ ทำซ้ำ 2 ครั้งเพื่อให้ได้เชื้อบริสุทธิ์ ส่องดูลักษณะของเส้นใยภายใต้กล้องจุลทรรศน์ นำเชื้อที่บริสุทธิ์เก็บลงหลอดอาหารแข็งผิวหน้าเอียง ชนิด PDA

1.2 สายพันธุ์เห็ดราที่ได้รับความอนุเคราะห์ตัวอย่างเชื้อบริสุทธิ์จากโครงการวิจัยของ รศ. ดร. เลอลักษณ์ จิตรดอน และจากโครงการวิจัยของ ดร. ชุรภา ธีรภัทรสกุล ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ ม. เกษตรศาสตร์ จำนวน 22 ไอโซเลท

2. การคัดเลือกราที่มีความสามารถย่อยสลายสารพีเอเอช

2.1 การเตรียมกล้าเชื้อ

เตรียมกล้าเชื้อโดยการเพาะเลี้ยงราบนอาหาร PDA ให้มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีประมาณ ¾ของจานเพาะเชื้อ จากนั้นใช้ cork borer เบอร์ 4 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเท่ากับ 0.5 เซนติเมตร ตัดชิ้นวุ้นบริเวณปลายเส้นใยเพื่อใช้เป็นกล้าเชื้อในการทดลองต่อไป

2.2 การคัดเลือกราที่สามารถย่อยสลายสารพีเอเอชในเบื้องต้น (Primary screening)

ทำการคัดเลือกโดยใช้วิธี spraying plate บนอาหารทดสอบ 2 ชนิด คือ wood meal-based agar (WMBA) โดยเพาะกล้าเชื้อจำนวน 1 ชิ้นวุ้นลงบนอาหารแข็งดังกล่าว บ่มทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เมื่อราเจริญจนมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีเท่ากับ ¾ ของจานเพาะเลี้ยงเชื้อ จึงทำการพ่นสารพีเอเอชลงไปที่ผิวหน้าของอาหาร โดยสารพีเอเอชที่ใช้ในการทดลองคือ ฟีแนนทรีน ไพรีน และฟลูออรีน จากนั้นบ่มทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง สังเกตการเจริญของรา ทำการวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีทุกสัปดาห์ การคัดเลือกราที่มีความสามารถในการย่อยฟีแนนทรีนในเบื้องต้นนี้ คัดเลือกจากราที่สามารถเจริญได้บนอาหารแข็งที่มีฟีแนนทรีน

3. การศึกษาประสิทธิภาพการย่อยสลายสารพีเอเอชโดยราสายพันธุ์ที่คัดเลือกได้

3.1 การศึกษาประสิทธิภาพการย่อยสลายสารพีเอเอช

ทำการทดลองโดยนำราสายพันธุ์ที่คัดเลือกจากการทดลองที่ 2 มาศึกษาการย่อยสลายสารพีเอเอชในอาหารเหลว สารพีเอเอชที่ศึกษามี 3 ชนิดได้แก่ ฟีแนนทรีน ฟลูออรีน และไพรีน ทำการเพาะเลี้ยงราในอาหารเหลว mineral salt glucose broth (MSG) ที่ไม่มีการเติมสารเหนี่ยวนำการสร้างเอนไซม์ย่อยลิกนิน โดยใช้อาหารปริมาตร 10 มิลลิลิตร บรรจุในฟลาสก์ขนาด 50 มิลลิลิตร บ่มทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องให้ราเจริญเป็นเวลา 3 วัน แล้วเติมพีเอเอชลงไปจนมีความเข้มข้นเท่ากับ 100 ppm จากนั้นทำการบ่มในสภาวะที่มีการเขย่าบนเครื่องเขย่าแบบ Rotary Shaker เก็บตัวอย่างมาวัดปริมาณสารประกอบพีเอเอชที่ลดลงโดยใช้เทคนิคทางสเปคโตรโฟโตรเมทรี ในขั้นตอนการเก็บตัวอย่างเพื่อนำไปวัดปริมาณพีเอเอชที่ลดลงโดยใช้เทคนิคทางสเปคโตรโฟโตรเมทรีนั้น ทำโดยนำฟลาสก์ตัวอย่างมาสกัดสารพีเอเอช โดยเติมเมทานอล ปริมาตร 30 มิลลิลิตร ลงไปในฟลาสก์ แล้วตั้งทิ้งไว้ 15 นาที จากนั้นกรองเอาเส้นใยเชื้อราออก นำส่วนใสที่ได้ไปปรับความเข้มข้นต่อ โดยดูดส่วนใสมาปริมาตร 250 ไมโครลิตร ใส่ใน appendrof แล้วเติมเมทานอลปริมาตร 375 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันจากนั้นดูดสารละลายที่ผสมกันดีแล้วมา 500 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลอดทดลอง แล้วเติมเมทานอลปริมาตร 4500 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน นำสารละลายที่ผสมจนเข้ากันดีแล้วไปวัดปริมาณสารประกอบฟีแนนทรีน ฟลูออรีน และไพรีน ที่ความยาวคลื่น 251, 262 และ 239 nm ตามลำดับ

3.2 ศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ย่อยลิกนินที่สร้างขึ้นในระหว่างการย่อยสลายสารพีเอเอช

วิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์ย่อยลิกนิน 3 ชนิด ได้แก่ laccase, manganese peroxidase (MnP) และ lignin peroxidase (LiP)

3.2.1 การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ Laccase

กิจกรรมของเอนไซม์ Laccase วิเคราะห์จากปฏิกิริยา oxidation ของ 2,6-dimethoxyphenol (DMP) โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 469 นาโนเมตร สารที่ใช้ทำปฏิกิริยาประกอบด้วย DMP เข้มข้น 3.0 mM Malonate buffer pH 4.5 เข้มข้น 50 mM สารละลายเอนไซม์ความเข้มข้นที่เหมาะสม

3.2.2 การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ Manganese peroxidase

กิจกรรมของเอนไซม์ MnP วิเคราะห์จากปฏิกิริยา oxidation ของ DMP โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 469 นาโนเมตร สารที่ใช้ทำปฏิกิริยาประกอบด้วย DMP เข้มข้น 3.0 mM $MnSO_4$ เข้มข้น 3.0 mM H_2O_2 เข้มข้น 6 mM Malonate buffer pH 4.5 เข้มข้น 50 mM สารละลายเอนไซม์ความเข้มข้นที่เหมาะสม

3.3.3 การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ Lignin peroxidase

กิจกรรมของเอนไซม์ LiP วิเคราะห์จากปฏิกิริยา oxidation ของ veratryl alcohol วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 310 นาโนเมตร สารที่ใช้ทำปฏิกิริยาประกอบด้วย Veratryl alcohol เข้มข้น 1.5 mM H_2O_2 เข้มข้น 0.2 mM Malonate buffer pH 4.5 เข้มข้น 50 mM สารละลายเอนไซม์ความเข้มข้นที่เหมาะสม

เอนไซม์ทั้ง 3 ชนิดวัดการดูดกลืนแสงแบบ time scan บันทึกค่าภายในช่วงเวลา 3 นาทีโดยใช้เครื่อง UNICO 2802 UV/VIS spectrophotometer โดยที่กeหนดให้ 1 Unit ของเอนไซม์ทั้ง 3 ชนิดในการทดลองนี้คือปริมาณของเอนไซม์ที่สามารถออกซิไดส์สับสเตรทปริมาณ 1 µmol ต่อนาที

ผลการทดลองตอนที่ 2 การศึกษาการย่อยสลายทางชีวภาพของสารประกอบพีเอเอชโดยรา

1. สายพันธุ์ราที่ใช้ในงานวิจัย

1.1 สายพันธุ์ราที่คัดแยกใหม่จากธรรมชาติ

ผลการคัดแยกได้สายพันธุ์ราจำนวน 3 ไอโซเลท แสดงดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 แสดงรหัส ชื่อสามัญ ชื่อวิทยาศาสตร์ และแหล่งที่มาของตัวอย่างราที่คัดแยกใหม่จากธรรมชาติ

รหัส	ชื่อสามัญ	ชื่อวิทยาศาสตร์	แหล่งที่มา
KU-Eng 01	-	*Lenzites elegan*	บริเวณโคนต้นจามจุรี หน้าคณะวิศวกรรมศาสตร์ มก.
KU-Rec 01	-	*Ischnoderma* sp.	บริเวณกอไผ่ หน้าคณะวนศาสตร์ มก.
KU-Mb 01	-	*Ganoderma lucidum*	บริเวณใต้ต้นไม้ ข้างตึกจุลชีววิทยา มก.

ตารางที่ 2 แสดงลักษณะ fruiting body ของเชื้อ KU-Eng 01 และผลการระบุชนิด

ภาพแสดง fruiting body ของ KU-Eng 01

ภาพแสดง fruiting body ของ *Lenzites elegan*

ที่มา: ศศิธร เอี่ยมธนะมาศ และคณะ (2001)

ลักษณะ fruiting body ของ KU-Eng 01 หมวกขนาด 30 x 24 ซม. หนา 1-7 ซม. เส้นใยอัดแน่น เหนียว สีขาวถึงครีม เมื่อสัมผัสจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล เจริญติดกับโคนต้นไม้พบที่โคนต้นจามจุรี บริเวณคณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ผลการระบุชนิดในระดับสัณฐานวิทยา KU-Eng 01 มีลักษณะใกล้เคียงกับ *Lenzites elegans* จัดอยู่ใน Order Polyporales และ Family Polyporaceae

ตารางที่ 3 แสดงลักษณะ fruiting body ของเชื้อ KU-Rec 01และผลการระบุชนิด

ภาพแสดง fruiting body ของ KU-Rec 01	**ภาพแสดง fruiting body ของ *Ischnoderma benzoinum*** ที่มา:http://it.wikipedia.org/wiki/Ischnoderma_benzoinum
ลักษณะ fruiting body ของ KU-Rec 01 กว้างประมาณ 20 cm. ขนาดรัศมี 14 cm. ความหนา 2 cm. สีแดงถึงน้ำตาล หรือน้ำตาล พบบริเวณคณะวนศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์	
ผลการระบุชนิดในระดับสัณฐานวิทยา KU-Rec 01 มีลักษณะใกล้เคียงกับ *Ischnoderma benzoinum* จัดอยู่ใน Order Polyporales และ Family Fomitopsidaceae	

ตารางที่ 4 แสดงลักษณะ fruiting body ของเชื้อ KU-Mb 01และผลการระบุชนิด

ภาพแสดง fruiting body ของ KU-Mb 01	**ภาพแสดง fruiting body ของ *Ganoderma lucidum*** ที่มา: อนงค์ จันทร์ศรีสกุล และคณะ., 2551
ลักษณะ fruiting body ของ KU-Mb 01 หมวกขนาด 3x 5 ซม. หนา 1 ซม. ก้านยาว 3-4 cm. หมวกดอกซ้อนทับกัน เนื้อแข็ง สีน้ำตาลแดง ขอบเหลือง พบบริเวณตึกภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์	
ผลการระบุชนิดในระดับสัณฐานวิทยา KU-Mb 01 มีลักษณะใกล้เคียงกับ *Ganoderma lucidum* จัดอยู่ใน Order Polyporales และ Family Ganodermataceae	

1.2 สายพันธุ์ราที่ได้รับความอนุเคราะห์ตัวอย่างเชื้อบริสุทธิ์จากโครงการวิจัยของ รศ. ดร. เลอลักษณ์ จิตรดอน และ ดร. ชุรภา ธีรภัทรสกุล ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ ม. เกษตรศาสตร์ จำนวน 22 ไอโซเลท แสดงดังตารางที่ 5

ตารางที่ 5 แสดงรหัส ชื่อสามัญ ชื่อวิทยาศาสตร์ และที่มาของตัวอย่างราแต่ละชนิด

รหัส	ชื่อสามัญ	ชื่อวิทยาศาสตร์	แหล่งที่มา
KU-Alk4	-	*Garnoderma* sp.	โครงการวิจัย รศ.ดร. เลอลักษณ์ จิตรดอน มก.
SW19	-	-	โครงการวิจัย รศ.ดร. เลอลักษณ์ จิตรดอน มก.
BKN01	-	*Ganoderma oregonese*	โครงการวิจัย ดร. ชุรภา ธีรภัทรสกุล มก.
T14	ขอนดำ	*Lentinus polychrous*	โครงการวิจัย ดร. ชุรภา ธีรภัทรสกุล มก.
T15	ขอนขาว	*Lentinus squarrosulus*	โครงการวิจัย ดร. ชุรภา ธีรภัทรสกุล มก.
T2	-	*Pleurotus ostreatus*	โครงการวิจัย ดร. ชุรภา ธีรภัทรสกุล มก.
T4	-	*Plueotus sajor-caju*	โครงการวิจัย ดร. ชุรภา ธีรภัทรสกุล มก.
T27	-	*Pleurotus oryngii*	โครงการวิจัย ดร. ชุรภา ธีรภัทรสกุล มก.
T6	-	*Pleurotus cystidiosus*	โครงการวิจัย ดร. ชุรภา ธีรภัทรสกุล มก.
T7	-	*Auricularia auricular*	โครงการวิจัย ดร. ชุรภา ธีรภัทรสกุล มก.
RRIT01	-	*Trametes versicolor*	โครงการวิจัย ดร. ชุรภา ธีรภัทรสกุล มก.
RRIT02	-	*Trametes* sp.	โครงการวิจัย ดร. ชุรภา ธีรภัทรสกุล มก.
RYNF13	-	-	โครงการวิจัย ดร. ชุรภา ธีรภัทรสกุล มก.
TMC20	-	-	โครงการวิจัย ดร. ชุรภา ธีรภัทรสกุล มก.
TMC21	-	-	โครงการวิจัย ดร. ชุรภา ธีรภัทรสกุล มก.
TMCQ	-	-	โครงการวิจัย ดร. ชุรภา ธีรภัทรสกุล มก.
Unk-B	-	-	โครงการวิจัย ดร. ชุรภา ธีรภัทรสกุล มก.
Unk-D	-	-	โครงการวิจัย ดร. ชุรภา ธีรภัทรสกุล มก.
Unk-I	-	-	โครงการวิจัย ดร. ชุรภา ธีรภัทรสกุล มก.
Unk-J	-	-	โครงการวิจัย ดร. ชุรภา ธีรภัทรสกุล มก.
Unk-K	-	-	โครงการวิจัย ดร. ชุรภา ธีรภัทรสกุล มก.
Unk-N	-	-	โครงการวิจัย ดร. ชุรภา ธีรภัทรสกุล มก.
Unk-R	-	-	โครงการวิจัย ดร. ชุรภา ธีรภัทรสกุล มก.
Unk-T	-	-	โครงการวิจัย ดร. ชุรภา ธีรภัทรสกุล มก.

2. การคัดเลือกราที่สามารถย่อยสลายสารพีเอเอชได้ในเบื้องต้น

การคัดเลือกราที่มีความสามารถในการเจริญบนอาหารทดสอบ wood meal-based agar (WMBA) ที่มีการพ่นสารพีเอเอชแต่ละชนิดลงไป จากราที่ทำการทดสอบจำนวน 27 ไอโซเลท ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 6

ตารางที่ 6 แสดงการเจริญของราบนอาหาร WMBA ที่มีการพ่นสารพีเอเอชแต่ละชนิดลงบนผิวหน้าอาหาร

สายพันธุ์รา	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีราบนอาหาร WMBA ที่มีสารพีเอเอช		
	Phenanthrene	Fluorene	Pyrene
KU-Alk4-*Ganoderma* sp.	+++	+++	+++
KU-Mb01-*Ganoderma lucidum*	+++	+	-
BKN01-*Ganoderma oregonese*	++	+	-
T14-*Lentinus polychrous*	+++	++	++
T15-*Lentinus squarrosulus*	-	-	-
RRIT01-*Trametes versicolor*	++	+	-
RRIT02- *Trametes* sp.	++	+	-
T2-*Pleurotus ostreatus*	+	+	+
T4-*Plueotus sajor-caju*	-	+	+
T27-*Pleurotus oryngii*	+	-	-
T6-*Pleurotus cystidiosus*	-	-	-
RYNF-13	+++	+++	+++
KU-Eng01-*Lenzites elegan*	++	+	-
KU-Rec01-*Ischnoderma* sp.	++	+	-
T7-*Auricularia auricular*	+	-	-
TMC20	+	-	-
TMC21	+	-	-
TMCQ	-	-	-
Unk-B	+	+	+
Unk-D	+	+++	+++
Unk-I	-	-	-
Unk-J	+	+	-
Unk-K	+	-	-
Unk-N	+	-	-
Unk-R	+	+++	+++
Unk-T	+	++	-
SW19	+	-	-

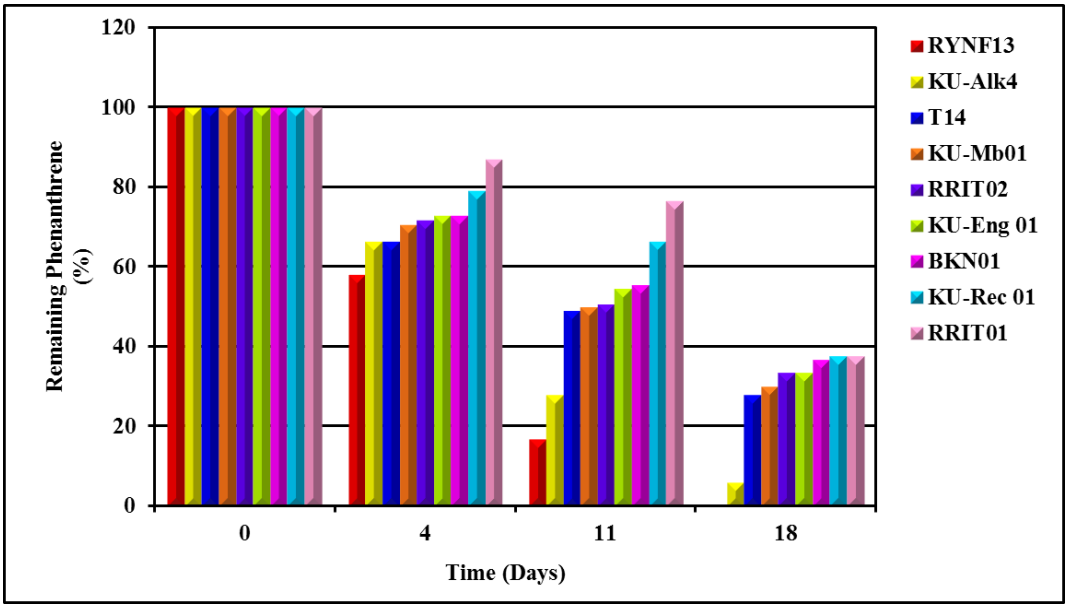
หมายเหตุ : +++ ($4.0 \leq \phi < 6.0$ cm), ++ ($2.0 \leq \phi < 4.0$ cm), + ($0.5 \leq \phi < 2.0$ cm), ─ (ไม่เจริญ)

จากตัวอย่างราที่นำมาทดสอบทั้งหมด 27 สายพันธุ์ พบว่า สายพันธุ์ที่สามารถเจริญได้ดีบนอาหารที่มีฟีแนนทรีน คือ RYNF-13, KU-Alk4, T14, KU-Mb 01, RRIT02, KU-Eng 01, BKN01, KU-Rec 01 และRRIT01 สายพันธุ์ที่เจริญได้ดีบนอาหารที่มีฟลูออรีน คือ RYNF-13, KU-Alk 4, Unk-D, Unk-R, Unk-T และ T14 สายพันธุ์ที่เจริญได้ดีบนอาหารที่มีไพรีน คือ RYNF-13, KU-Alk 4, Unk-D, Unk-R และ T14 สายพันธุ์ที่สามารถเจริญได้ดีบนอาหารที่มีสารพีเอเอช 3 ชนิด จะถูกคัดเลือกและนำไปศึกษาประสิทธิภาพการย่อยสลายสารพีเอเอชในการทดลองขั้นต่อไป

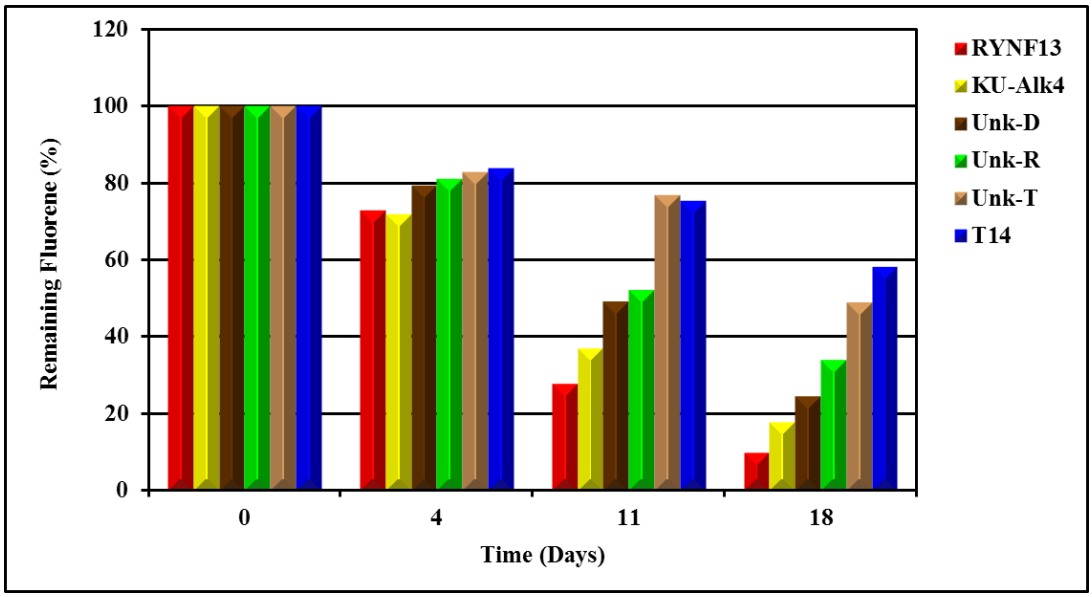
3. การศึกษาประสิทธิภาพการย่อยสลายสารพีเอเอชโดยราสายพันธุ์ที่คัดเลือกได้

3.1 การศึกษาประสิทธิภาพการย่อยสลายสารพีเอเอช

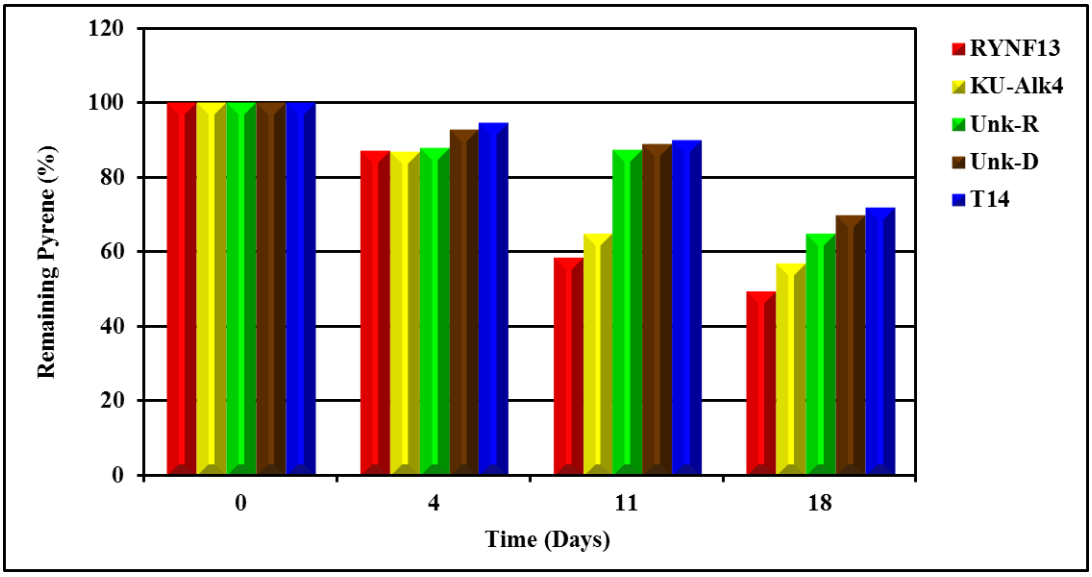
ผลการศึกษาประสิทธิภาพการย่อยสลายสารพีเอเอชชนิดต่างๆ โดยราไวท์รอทแสดงดังรูปที่ 2-1, 2-2 และ 2-3 ราไวท์รอทที่สามารถย่อยสลายพีเอเอชได้ทั้ง 3 ชนิด คือ ฟีแนนทรีน ฟลูออรีน และไพรีน อย่างมีประสิทธิภาพคือ สายพันธุ์ RYNF13 ซึ่งสามารถย่อยสลายฟีแนนทรีนทั้งหมดในอาหาร mineral salt glucose medium ได้ภายใน 18 วันที่อุณหภูมิห้อง และย่อยสลายฟลูออรีนและไพรีนได้ 95% และ 50% ตามลำดับที่สภาวะแบบเดียวกัน สำหรับสายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพย่อยสลายสารพีเอเอชรองลงมาคือ สายพันธุ์ KU-Alk4 สามารถย่อยสลายฟีแนนทรีนในอาหาร mineral salt glucose medium ได้ 98% ภายใน 18 และย่อยสลายฟลูออรีนและไพรีนได้ 82% และ 43% ตามลำดับ



รูปที่ 2-1 แสดงการย่อยสลายสารฟีแนนทรีนโดยราสายพันธุ์ต่างๆ



รูปที่ 2-2 แสดงการย่อยสลายสารฟลูออรีนโดยราสายพันธุ์ต่างๆ

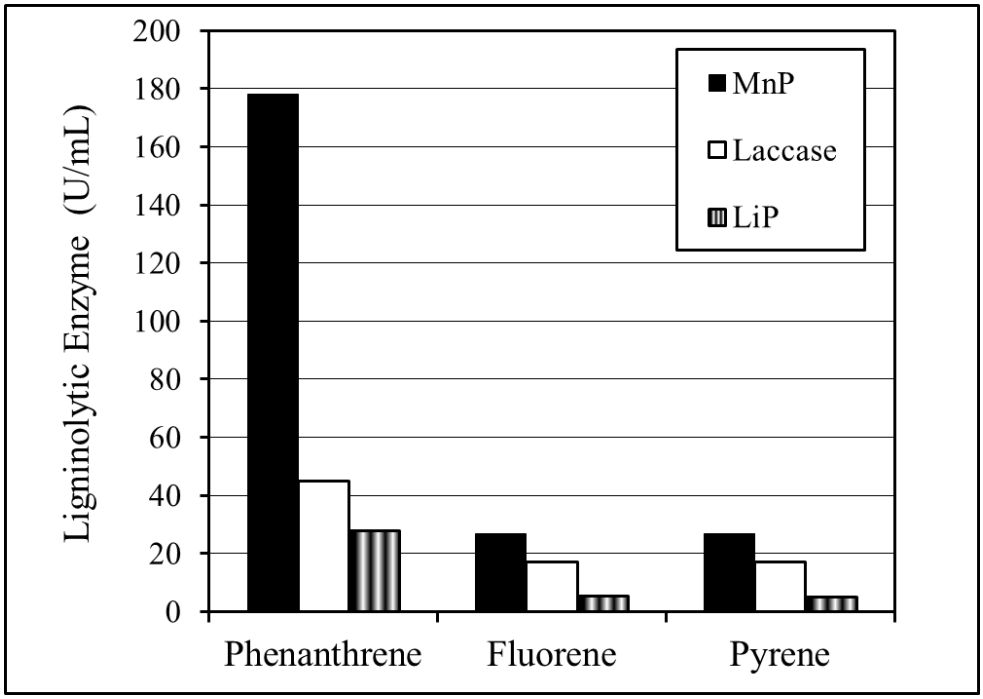


รูปที่ 2-3 แสดงการย่อยสลายสารไพรีนโดยราสายพันธุ์ต่างๆ

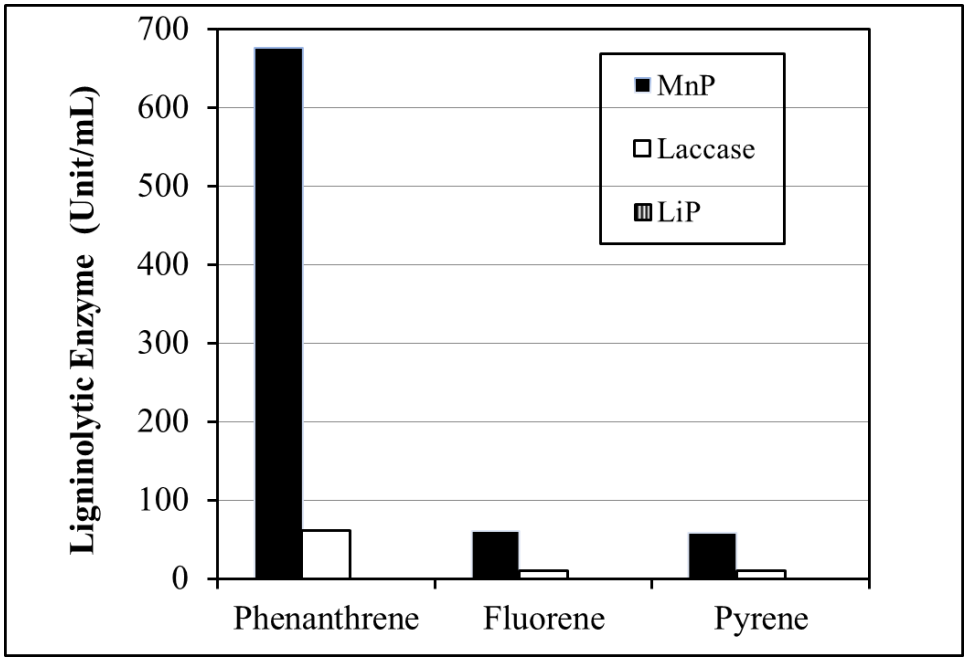
3.2 ศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ย่อยลิกนินที่สร้างในระหว่างการย่อยสลายสารพีเอเอช

ผลารตรวจวัดกิจกรรมของเอนไซม์ย่อยลิกนินในระหว่างการย่อยสลายสารพีเอเอชโดยราสายพันธุ์ RYNF13 และ KU-Alk4 ผลการทดลองพบว่า ในการย่อยสลายทางชีวภาพของพีเอเอช รา RYNF13 หลั่งเอนไซม์ย่อยสลายลิกนิน 3 ชนิด ได้แก่ MnP, laccase และ LiP เอนไซม์หลักที่หลั่งออกมา คือ MnP โดยวัดค่ากิจกรรมเอนไซม์ MnP ได้สูงสุด คือ 178 UmL^{-1} ในอาหารที่ผสมฟีแนนทรีน (รูปที่ 2-4) และกิจกรรมของเอนไซม์ laccase และ LiP สูงสูดในอาหารที่ผสมฟีแนนทรีนเท่ากับ 45 UmL^{-1} และ 28 UmL^{-1} ตามลำดับ สำหรับในอาหารที่มีฟลูออรีนและไพรีน รา RYNF13 สร้างเอนไซม์ย่อยลิกนินทั้งสามชนิดเช่นกัน แต่กิจกรรมของเอนไซม์ที่พบน้อยกว่าที่พบในอาหารที่มีฟีแนนทรีน

รา KU-Alk4 หลั่งเอนไซม์ย่อยสลายลิกนิน 2 ชนิด ได้แก่ MnPและ laccase โดยไม่พบกิจกรรมของเอนไซม์ LiP เอนไซม์หลักที่รา KU-Alk4 หลั่งออกมา คือ MnP โดยวัดค่ากิจกรรมเอนไซม์ MnP ได้สูงสุด คือ 675.7 UmL^{-1} ในอาหารที่ผสมฟีแนนทรีน (รูปที่ 2-5) พบกิจกรรมของเอนไซม์ laccase สูงสูดในอาหารที่ผสมฟีแนนทรีนเท่ากับ 60.7 UmL^{-1} สำหรับในอาหารที่มีฟลูออรีนและไพรีน รา KU-Alk4 ก็สร้างเอนไซม์ย่อยลิกนินทั้งสองชนิดเช่นกัน แต่กิจกรรมของเอนไซม์ที่พบน้อยกว่าที่พบในอาหารที่มีฟีแนนทรีน



รูปที่ 2-4 กิจกรรมของเอนไซม์ย่อยลิกนินที่สร้างจากรา RYNF 13 ในระหว่างการย่อยสลายสารพีเอเอชชนิดต่างๆ



รูปที่ 2-5 กิจกรรมของเอนไซม์ย่อยลิกนินที่สร้างจากรา KU-Alk4 ในระหว่างการย่อยสลายสารพีเอเอชชนิดต่างๆ

บทที่ 4 สรุป วิจารณ์ และข้อเสนอแนะ

ผลการวิจัยแสดงว่า แบคทีเรียสายพันธุ์ *Pseudomonas* sp. strain CH3 ที่คัดแยกจากดินที่มีการปนเปื้อนน้ำมันบริเวณริมถนนหรืออู่ซ่อมรถยนต์มีความสามารถย่อยสลายฟีแนนทรีนซึ่งเป็นสารตัวแทนของกลุ่มสารพีเอเอชได้ทั้งสภาวะที่อุณหภูมิห้องและสภาวะที่มีอุณหภูมิสูงถึง 42°C ในส่วนของรา พบว่า รากลุ่มไวท์รอท strain RYNF13 สามารถย่อยสลายฟีแนนทรีนอย่างมีประสิทธิภาพสูง นอกจากนี้ยังพบว่า strain RYNF13 สามารถย่อยสลายฟลูออรีนและไพรีนซึ่งเป็นสารพีเอเอชที่มีโครงสร้างใกล้เคียงกันและซับซ้อนขึ้นได้อีกด้วย

สิ่งที่น่าสังเกต คือ ถึงแม้ว่าแบคทีเรียและราที่คัดแยกมาได้ จะสามารถย่อยสลายกลุ่มสารพีเอเอชได้ แต่ประสิทธิภาพในการย่อยสลายยังมีความแตกต่างกันในแง่ของเวลาที่ใช้ รวมถึงอุณหภูมิของการบ่มเพาะ ในสภาพจริงที่ต้องการใช้แบคทีเรียหรือราอย่างใดอย่างหนึ่งเพื่อช่วยย่อยสลายสารพีเอเอชในธรรมชาติ ปัจจัยเช่น อุณหภูมิ รวมถึงการปริมาณที่เพิ่มขึ้นหรือลดลงของสารพีเอเอช ย่อมส่งผลต่อประสิทธิภาพการย่อยสลายสารพีเอเอชของแบคทีเรียหรือรา แนวคิดที่น่าสนใจคือ การใช้แบคทีเรียและราร่วมกันในลักษณะที่ส่งเสริมกันเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการย่อยสลายสารพีเอเอช รวมถึงการใช้เอนไซม์ที่ผลิตได้โดยราในช่วงเริ่มต้นของการบ่มเพาะ เพื่อลดเวลาในการเข้าสู่สภาวะการเจริญอย่างรวดเร็วของแบคทีเรียและรา และช่วยให้แบคทีเรียและราที่บ่มเพาะมีประสิทธิภาพสูงขึ้นในการย่อยสลายสารพีเอเอช ดังนั้น ประเด็นที่น่าสนใจต่อไปสำหรับการศึกษา คือ การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับแบคทีเรียหรือราในการย่อยสลายสารพีเอเอช รวมถึงการย่อยสลายโดยการบ่มเพาะแบคทีเรียและราร่วมกัน นอกจากนี้ การศึกษาเกี่ยวกับอินเทอร์มิเดียตที่เกิดขึ้นในระหว่างการย่อยสลาย จะช่วยให้เข้าใจและสามารถทำนายสภาะที่เอื้อต่อการย่อยสลายสารพีเอเอชของสายพันธุ์แบคทีเรียและราด้วย

เอกสารอ้างอิงของโครงการวิจัย

(1) Samanta, S. K., Singh, O. V., Jain, R. K. Trends Biotechnol. 2002, 20, 243.

(2) Bamforth, S. M., Singleton, I. J. Chem. Technol. Biotechnol. 2005, 80, 723.

(3) Hwang, H. M., Hu, X., Zhao, X. J. Environ. Sci. Health., Part C Environ. Carcinog. Ecotoxicol. Rev. 2007, 25, 313.

(4) กรมควบคุมมลพิษ พีเอเอช (โพลีไซคลิก อะโรมาติก ไฮโดรคาร์บอน), กระทรวงวิทยาศาสตร์ เทคโนโลยี และสิ่งแวดล้อม, 2543.

(5) Wiesmann, U., Choi, I. S., Dombrowski, E. M. Fundamentals of Biological Wastewater Treatment; Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA: Weinheim, 2007.

(6) Šepic, E., Bricelj, M., Leskovšek, H. J. Appl. Microbiol. 1997, 83, 561.

(7) Wong, J. W. C., Lai, K.M., Wan, C.K., Ma, K.K., Fang, M. Water Air Soil Pollut. 2001, 139, 1.

(8) Maskaoui, K., Zheng, T., Hong, H., Yu, Z., Yuan, J., Hu, Z. Chin. J. Oceanol. 2004, 22, 431.

(9) Hedlund, B. P., James, T.S. Int. J. Sys. Evol. Microbiol. 2001, 51, 61.

(10) Samanta, S. K., Bhushan, B., Jain, R.K. Appl. Microbiol. Biotechnol. 2001, 55, 627.

(11) Samanta, S. K., Chakraborti, A.K., Jain, R.K. Appl. Microbiol. Biotechnol. 1999, 53, 98.

(12) Johri, A. K., Dua, M., Singh, A., Sethunathan, N., Legge, R.L. Crit. Rev. Microbiol. 1999, 25, 245.

(13) Guo, C. L., Zhou, H.W., Wong, Y.S., Tam, N.F.Y. Mar. Pollut. Bull. 2005, 51, 1054.

(14) Yirui, W., Tengteng, H., Mingqi, Z., Yueling, Z., Enmin, L., Tongwang, H., Zhong, H. J. Environ. Sci. (china). 2009, 21, 1446.

(15) Bidaud, C., Tran-Minh, C. J. Mol. Catal. B: Enzym. 1998, 5, 417.

(16) Hohzoh K., K., N. and Keiji, Y. Appl. Microbial. Biot. 1982, 43, 454.

(17) Dean Ross. D., M., J.D., Freeman, J.P., Doerge, D. R. and Cerniglia, C.E. FEMS Microbiol. Lett. 2001, 204.

(18) Tien, M., Kirk, K. Science 1983, 221, 661.

(19) Yan, J., Cheng, S. P., Zhang, X. X., Shi, L., Zhu, J. B. Environ. Contam. Tox. 2004, 72, 387.

(20) Boyle, D., Wiesner, C., Richardson, A. Soil Biol. Biochem. 1998, 30, 873.

(21) Akdogan, H. A., Pazarlioglu, N.K. Process Biochem. 2011, 46, 46: 834.

(22) Ting, W. T. E., Yuan, S.Y., Wu, S.D., Chang, B.V. Int. Biodeter. Biodegr. 2011, 65, 238.

(23) Boonchan, S., Britz, M. L., Stanley, G. A. Appl. Environ. Microb. 2000, 66, 1007.

(24) Potin, O., Veignie, E., Rafin, C. FEMS Microbiol. Ecol. 2004, 51, 71.

(25) Launen, L. A., Pinto, L. J., Percival, P. W., Lam, S. F. S., Moore, M. M. Biodegradation 2000, 11, 305.

(26) Schutzendubel, A., Majcherczyk, A., Johannes, C., Huttermann, A. Int. Biodeter. Biodegr. 1999, 43, 93.

(27) Bennasar A., Rosselló-Mora R., Lalucat J. and Moore E.R., Int. J. Syst. Bacteriol., 1996, 46, 200.

(28) Pandey K.K., Mayilraj S. and Chakrabarti TInt. J. Syst. Bacteriol., 2002, 52, 1559.

(29) Hatayama K., Kawai S., Shoun H., Ueda Y. and Nakamura A., Int. J. Syst. Bacteriol., 2005, 55, 1539.

(30) Palleroni N.J., Genus I., Pseudomonas. In: Garrity G.M., Brenner D.J., Krieg N.R. and James T.S. editors. Bergey's manual of systematic bacteriology. Vol. 2, New York (NY), Springer, 2005: 323-379.

(31) Thepa S., Feasibility of Evaporative Cooling Applications For a Lentinus edodes (Berk.) Sing House, PhD Thesis, King Mongkut's University of Technology Thonburi, Thailand, 2008.

(32) Masakorala K., Yao J., Cai M., Chandankere R., Yuan H. and Chen H, J. Hazard. Mater., 2013, 263, 493.

(33) Zhao H.P., Wu Q.S., Wang L., Zhao X.T. and Gao H.W., J. Hazard. Mater., 2009, 164, 863.

(34) Pedetta A., Pouyte K., Herrera S.M.K., Babay P.A., Espinosa M., Costagliola M., Studdert C.A. and Peressutti S.R., Int. Biodeter. Biodegr., 2013, 84, 161.

(35) Tao X.Q., Lu G.N., Dang Z., Yang C. and Yi X.Y., Process Biochem., 2007, 42, 401.

(36) อนงค์ จันทร์ศรีกุลและคณะ. ความหลากหลายของเห็ดและราขนาดใหญ่ในประเทศไทย สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ., 2551

(37) Matsubara, M. ,J.M. Lynch, F. A.A.M. De Leij., Enzyme and Microbial Technology., 2006, 39, 1365.

Chiang Mai Journal of Science
Journal of the Science Faculty of Chiang Mai University

Chiang Mai Journal of Science

Published by Faculty of Science

Chiang Mai University

Chiang Mai 50200, Thailand

September 30, 2014

Dear Authors,

I am pleased to inform you that, following the satisfactory completion of your revisions in response to the comments of the referees, your paper **"Phenanthrene Biodegradation by Bacterial Strain Pseudomonas sp. CH3 Isolated from Oil-contaminated Soil"** has now been accepted for publication as a Research Paper. The article will be published in the next available issue. You will also receive a complimentary free copy of that issue. Reprints of your paper will be available for download free of charge from our journal website http://it.science.cmu.ac.th/ ejournal/.

On behalf of our Editorial Board, may I thank you very much indeed for publishing your work in our Chiang Mai Journal of Science and I sincerely hope that you will consider submitting further articles in the future.

Yours sincerely,

Wasu Pathom-aree

(Dr. Wasu Pathom-aree)
Editor-in-Chief

Chiang Mai J. Sci. 2015; 42(X) : 1-7
http://epg.science.cmu.ac.th/ejournal/
Contributed Paper

Phenanthrene Biodegradation by *Pseudomonas* sp. CH3 Isolated from Oil-contaminated Soil

Chetsada Pothiratana [a, b], Thanabhorn Jitthanasuwan [a], Jirayut Ratchawong [a] and Surachai Thachepan* [c]

[a] Department of Microbiology, Faculty of Science, Kasetsart University, Jatujak, Bangkok 10900, Thailand.
[b] Center for Advanced Studies in Tropical Natural Resources, NRU-KU, Kasetsart University, Jatujak, Bangkok 10900, Thailand.
[c] Department of Chemistry, Faculty of Science, Kasetsart University, Jatujak, Bangkok 10900, Thailand.
*Author for correspondence; e-mail: fscisct@ku.ac.th

Received: 5 June 2014
Accepted: 30 September 2014

ABSTRACT

In this research, phenanthrene-degrading bacterial strain CH3 was isolated from oil-contaminated soil in Thailand using a spraying plate technique. The strain CH3 was identified as *Pseudomonas* sp. CH3 based on its 16S rDNA sequence analysis. Complete degradation of phenanthrene in the minimal salt medium culture was observed within 3 days of incubation at room temperature (30±2°C) whereas at 37°C, complete degradation of phenanthrene occurred within 6 days. At 42°C, the strain CH3 was still able to grow and degrade approximately 23% of phenanthrene. Therefore, the strain CH3 is suitable for phenanthrene bioremediation in tropical areas, where temperature may exceed 40°C during the hot season. Additionally, *Pseudomonas* sp. CH3 can utilize aromatics and small carbon compounds, thus offering an environmentally friendly method to remove hazardous substances from the environment.

Keywords: Phenanthrene, *Pseudomonas* sp., PAHs

1. INTRODUCTION

Environmental pollution currently becomes socially interested and concerned. Polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH), a class of hydrocarbon compounds containing two or more fused benzene rings, is widely distributed in environment as a consequence of rapid growth of industry. PAHs are highly toxic, carcinogenic and mutagenic to human and living organisms. However, the removal of PAHs from the environment is extremely difficult due to their low solubility in water, strong absorption on solid particles and high stability. Elimination of PAHs from environment can be achieved by cheaper and more environmentally friendly microbial transformation and degradation. Phenanthrene was used as a model compound to study PAH biodegradation by microorganisms and to isolate novel PAH-degrading bacteria. Most of the reported PAH-degrading bacteria belong to the genus of *Pseudomonas*, *Mycobacterium, Burkhodelria* and *Sphingomonas*. The PAH degradation by microorganisms is typically affected by environmental factors,

such as temperature, pH, the presence of nutrient, oxygen and bioavailability [1, 2]. The factor strongly limiting the application of microbial bioremediation in fields, especially in the tropical area, is temperature. For example, the outdoor temperature measured in Thailand can be as high as 40°C, depending on season [3]. Therefore, the bacterial strains that are capable of rapid degradation of PAH and able to acclimatize to a range of temperature are necessarily required.

In this study, isolation and characterization of phenanthrene-degrading bacteria from oil-contaminated soil in Thailand have been carried out. The phenanthrene biodegradation efficacy of the bacteria was examined for a range of temperature up to 42°C. Moreover, the capability of the bacteria to utilize other PAHs and carbon compounds was also studied.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1 Chemicals and Media

All chemicals used are analytical reagent grade. Minimal salt medium (MSM) was composed of 18 mM $(NH_4)_2SO_4$, 1 μM $FeSO_4.7H_2O$, 100 μM $CaCl_2.2H_2O$, 1 mM $MgSO_4.7H_2O$, and 8.5 mM NaCl in 10 mM Na_2HPO_4-KH_2PO_4 buffer (pH 7.0) [4]. One litre of nutrient broth (NB) comprised 3 g of peptone and 5 g of beef extract and the pH was adjusted to 6.8-7.0. Mineral salt agar (MSA) and nutrient agar (NA) were prepared by addition of agarose and agar in MSM and NB, respectively, to make a final concentration of 1.5%. All media used were autoclaved at 121.5°C for 15 min. Stock solution of phenanthrene in methanol (10 gL^{-1}) was freshly prepared prior to use.

2.2 Soil Samples and Enrichment Process

Muddy soil samples were collected from oil-contaminated areas in Bangkok, Thailand and stored at 4°C. The total count of bacteria, relative humidity and pH of the soil sample were 2.6×10^6 cfu/g of soil, 14.8% and 7.25, respectively. Enrichment medium was prepared as follows; firstly adding 1 mL of freshly prepared phenanthrene stock solution in methanol (10 gL^{-1}) to a 250-ml sterile erlenmeyer flask and allowing methanol to evaporate overnight. Then, 100 mL of the autoclaved minimal salt medium was transferred into the prepared flask to make a final phenanthrene concentration of 100 ppm. To prepare the enriched consortium, 1 g of the soil sample was mixed with the enrichment medium, followed by incubation at room temperature (30±2°C) on a rotary shaker at 200 rpm for 1 week. Then, a 1-mL aliquot of the suspension was transferred to 100 mL of another fresh mineral salt medium containing the same amount of phenanthrene as described above. This enriched consortium was incubated under the same condition for another 1 week.

2.3 Isolation and Characterization of Phenanthrene-degrading Bacteria

Phenanthrene-degrading bacteria were isolated from the consortium using a spraying plate technique as previously described [4]. The sprayed plates were incubated at room temperature (30±2°C) for 2 weeks. Colonies surrounded by a clear zone were isolated. The isolated bacterial strain was characterized for its colony morphology on nutrient agar, Gram's stain and cell shape. The motility was observed under a light microscope using a hanging drop technique. Optimal temperature for growth of the isolated bacterial strain in nutrient broth was examined for an incubation period of 48 hours using a temperature gradient incubator (Tokyo Kagaku Sangyo, Japan). The examined temperature ranged from 25 to 50°C. The growth was determined by spectrophotometric method.

The isolated bacterial strain was molecularly identified by searching for their 16S rDNA sequence homology in Genbank database. Bacterial genomic DNA was purified by Genomic DNA Purification Kit (Fermentas, USA) according to manufacturer's protocol. The universal primers (forward primer 27F: 5′-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3′ and reverse primer 1389R: 5′- CTTGTGCG GGCCCCCGTCAATTC-3′) were used for the amplification of the 16S rDNA gene fragment with *Taq* DNA polymerase (Fermentas, USA). DNA sequences were compared to sequence homology using BLASTN program (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST). Phylogenetic tree was constructed by neighbour-joining method with a 1000-replication bootstrap analysis using MEGA4 program [5].

2.4 Phenanthrene Biodegradation

To examine biodegradation of phenanthrene by isolated bacterial strains, the bacterial culture was inoculated in mineral salt medium containing phenanthrene as follows; the sterile 50-mL erlenmayer flask was initially filled with 0.100 mL of phenanthrene stock solution in methanol (10 gL^{-1}). Methanol was allowed to evaporate overnight. After that 10 mL of the overnight culture in nutrient broth inoculated in mineral salt medium at a ratio of 1:100 was transferred to the prepared flask containing phenanthrene. The final phenanthrene concentration in culture media was 100 ppm. The culture flasks were shaken on a reciprocal shaker at 150 rpm. The phenanthrene biodegradation efficacy was investigated at room temperature (30±2°C), 37 and 42°C using a water bath shaker (Taitec MM-10, Japan). Each experiment was performed in triplicate. Control experiment was carried out in duplicate using the autoclaved sterile bacterial culture instead of the living culture.

The concentration of phenanthrene in culture media was determined spectrophotometrically at λ_{max} = 251 nm using a JASCO V-670 UV-visible spectrophotometer [6]. Calibration curve for phenanthrene showed a linear relation in a concentration range of 0.1 - 1.6 ppm (R^2 = 0.998). Typical procedure for determination of phenanthrene concentration in culture media was as follows; the collected sample was diluted with methanol by a factor of 4 to completely dissolve the remaining phenanthrene, followed by centrifugation at 14,000 rpm for 2 min to separate residual bacterial cells. The supernatant liquid was then diluted by appropriate folding (4 or 100 folding) depending on amounts of phenanthrene remained in the culture. Bacterial growth was determined from the methanol-diluted culture by an OD_{600nm} spectrophotometry.

2.5 Carbon Source Utilization

In addition to phenanthrene, the utilization of other carbon compounds was examined for the tested strain. The tested bacterial strain pre-grown in phenanthrene-containing media were inoculated at an initial OD_{600nm} of 0.01 to fresh mineral salt medium supplied with one of following substrates at 0.01% (w/v or v/v): phenanthrene, fluorene, pyrene, benzo[a]anthracene, benzene, toluene, xylene, phenol, methanol, ethanol and acetone. The cultures were incubated at 30°C with the 150 rpm shaking condition for 4 days. The cell growth in the media were indicated by the increase of OD_{600nm} value.

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1 Isolation and Characterization of Strain CH3

Phenanthrene degrading bacterium

CH3 was isolated from oil-contaminated soil, using 1-week followed by additional 1-week time interval enrichments without an elevated concentration of phenanthrene. The strain CH3 colony on nutrient agar was white, opaque and circular in shape with a smooth edge and surface after 24 hours of incubation. When incubated longer, the colony became yellow with an undulate edge (Figure 1A). The strain CH3 was motile, gram-negative, short rod bacterium. The optimum and maximum temperatures for the growth of the strain CH3 were at 37 and 42°C, respectively. Spots of the CH3 cells suspension on minimal medium (MM) sprayed with phenanthrene showed a clear zone around bacterial colony after incubation at room temperature for 7 days, indicating that the strain CH3 retained phenanthrene-degrading capability (Figure 1B). A 16S rDNA sequence, consisting of 1287 nucleotides from the amplification showed the highest sequence similarity to *Pseudomonas* sp. S2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence (HQ721241) (100%). According to the sequence similarity compared to type strains, the strain CH3 showed a close relation to *Pseudomonas balearica* SP1402 (U26418) (98%). Additionally, phylogenetic analysis showed that the position of the strain CH3 in phylogenetic tree was also close to *P. azotifigens* 6H33B and *P. indica* IMT37 (Figure 1C). The DNA sequence of the strain CH3 16S rDNA gene (partial) was deposited in GenBank database under the Accession No. AB932518.

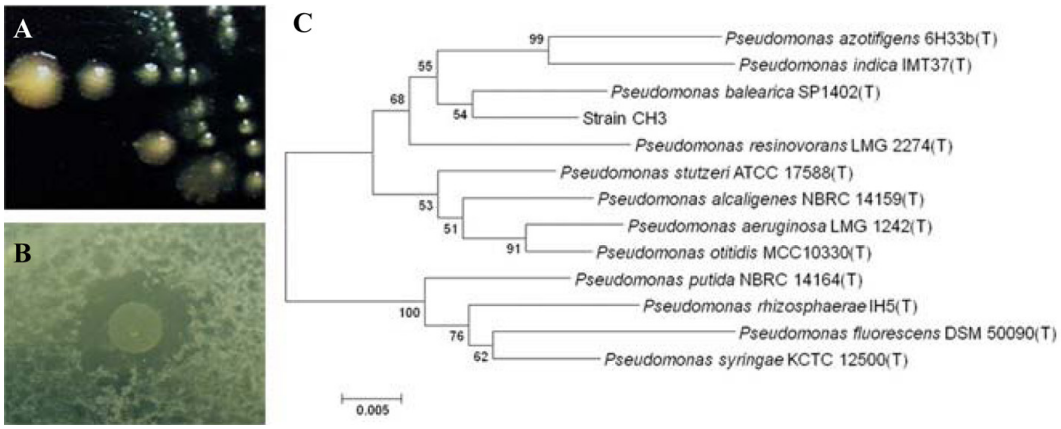


Figure 1. Characterization of strain CH3: (A) colony morphology at day 2 (B) clear-zone surrounding colony on phenanthrene sprayed plate (C) Phylogenetic tree of *Pseudomonas* sp. CH3 and related species in Genus *Pseudomonas* constructed on the basis of 16S rDNA sequences using the neighbor-joining method. Bar = 0.005 base substitution per site. There were a total of 1261 positions in the final dataset. Bootstrap values are shown next to the branches.

3.2 Biodegradation of Phenanthrene by *Pseudomonas* sp. CH3

The efficacy in biodegradation of phenanthrene by *Pseudomonas* sp. CH3 was investigated at room temperature (30±2°C), 37 and 42°C. The percentage of remaining phenanthrene in the culture was calculated from the remaining concentration relative to the initial concentration of 100 ppm. The results demonstrated a significant reduction in phenanthrene concentration in mineral salt medium culture at room temperature (30±2°C). It was found that phenanthrene was degraded by 80% after 2 days of incubation (data not shown). The strain CH3 completely degraded phenanthrene within 3 days of incubation (Figure 2A). The growth of the strain CH3 was also monitored by changes in OD_{600nm} value. It was found that the OD_{600nm} reached the maximum on day 3 and remained relatively steady until the end of incubation (Figure 2B). In a control set, the reduction of phenantherne by abiotic factor was less than 10% at 3 days of incubation. At 37 °C, the results showed that 70% of phenanthrene remained in the culture after 3 days of incubation but no phenanthrene was detectable after 6 days of incubation. The bacterial growth slightly increased during the incubation and the OD_{600nm} reached ~0.2. At 42°C, approximately 77% of phenanthrene remained after 6 days of incubation and the strain CH3 slowly grew during the incubation period (Figure 2A and 2B). At 37 and 42 °C, the reduction of phenantherne by abiotic factor was less than 10% at 6 days of incubation. In this experiment, the higher phenanthrene-degrading capability was observed at lower temperature. Although the solubility of phenanthrene increases at higher temperature, oxygen availability decreases, leading to the reduction of aerobic phenanthrene biodegradation. The optimum temperature for phenanthrene biodegradation was dependent on the sites where the species were sampled and isolated [7].

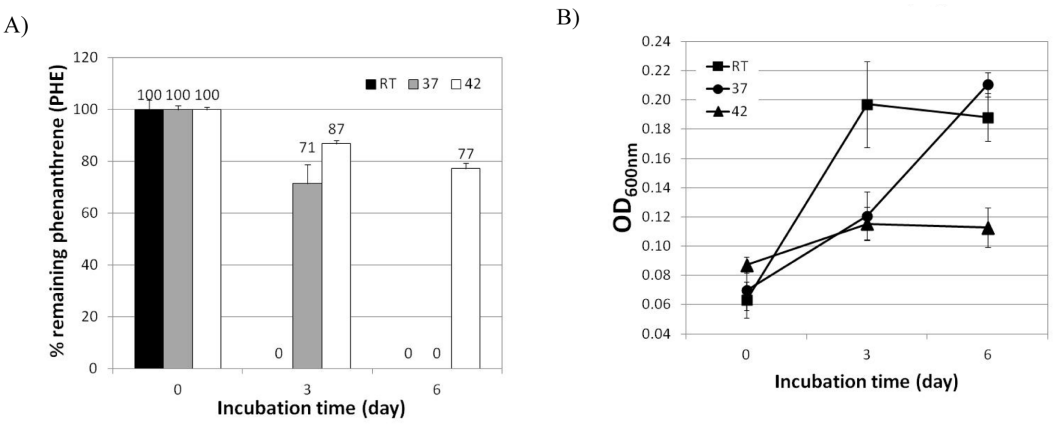


Figure 2. (A) The percentage of remaining phenanthrene and (B) the bacterial growth of *Pseudomonas* sp. strain CH3 at room temperature (RT), 37 and 42°C. An error bar showed the standard deviation of three replicates.

Table 1. Utilization of various carbon substrates by strain CH3

Substrate	Growth[a]
Phenanthrene	++
Fluorene	+
Benzo[a]anthracene	-
Pyrene	-
Benzene	+
Toluene	+
Xylene	+
Phenol	+++
Methanol	-
Ethanol	++
Acetone	-

[a]Growth was monitored by the increase of OD_{600nm} values for 4 days.
- High growth (+++): Growth > 10 fold compared to initial value.
- Medium growth (++): Growth 5- 10 fold compared to initial value.
- Growth (+): Growth 2 – 5 fold compared to initial value.
- No growth (-): Growth < 2 fold compared to initial value.

There were reports about phenanthrene biodegradation by *Pseudomonas* spp and related genera. For example, *Pseudomonas* sp. USTB-RU degraded 86.65% of phenanthrene (initial concentration of 100 ppm) within 8 days at 30 °C [8]. Isolated *Pseudomonas* and *Sphingomonas* strains showed high degradation of phenanthrene (75-100% of 150 ppm) in 72-168 hours at 25 °C [9]. The strain CH3 showed comparable efficacy in phenanthrene biodegradation. Only a few bacterial strains have been studied for their phenanthrene degradation at relatively high temperature. For example *Pseudoxanthomonas* sp. DMVP showed 90% of phenanthrene degradation at 40 °C after 5 days of incubation [10]. The high efficacy of phenanthrene degradation and survival at a wide range of temperature make the utilization of the *Pseudomonas* CH3 in phenanthrene bioremediation outdoor extremely attractive and beneficial, especially in tropical areas where the temperature sometimes reaches 40 °C.

3.3 Utilization of Other PAHs and Carbon Compounds by *Pseudomonas* sp. CH3

In addition to phenanthrene, the results showed that the strain CH3 was capable of utilizing other PAHs such as fluorene. The strain CH3 was able to utilize small aromatic compounds, i.e. benzene, toluene, xylene and especially phenol. It also utilized small carbon compounds such as ethanol but neither methanol nor acetone.

4. CONCLUSIONS

Bacterial strain CH3 was isolated from oil-contaminated soil and identified as *Pseudomonas* sp. based on its 16S rDNA sequence. *Pseudomonas* sp. CH3 was able to degrade phenanthrene completely within 3 and 6 days of incubation at room temperature (30±2 °C) and 37 °C, respectively. Partial degradation of phenanthrene by *Pseudomonas* sp. CH3 was obtained within 6 days of incubation at 42 °C. Additionally, *Pseudomonas* sp. CH3 could utilize other harmful carbon compounds such as phenol and benzene. Thus, *Pseudomonas* sp. CH3 is a potential candidate for *in situ* bioremediation of phenanthrene and possibly other toxic organic compounds, commonly contaminated in the environment in tropical area where temperature can reach 40 °C.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported in part by grants from the Science Research Fund (ScRF), Undergraduate Research Matching Fund (URMF) and ScAWAKE from the Faculty of Science, Kasetsart University, Center of Nanotechnology, Kasetsart

University and Kasetsart University Research and Development Institute (KURDI) and by the Commission on Higher Education, Ministry of Education through the National Research University Project of Thailand (NRU).

REFERENCES

[1] Doyle E., Muckian L., Hickey A.M. and Clipson N., Microbial PAH degradation, *Adv. App.l Microbiol.*, 2008; **65**: 27-66. DOI 10.1016/S0065-2164(08)00602-3.

[2] Avramova T., Sotirova A., Galabova D. and Karpenko E., Effect of Triton X-100 and rhamnolipid PS-17 on the mineralization of phenanthrene by *Pseudomonas* sp. cells, *J. Hazard. Mater.*, 2008; **152**: 1293-1300. DOI: 10.1016/j.ibiod.2008.03.008.

[3] Thepa S., *Feasibility of Evaporative Cooling Applications For a* Lentinus edodes *(Berk.) Sing House*, PhD Thesis, King Mongkut's University of Technology Thonburi, Thailand, 2008.

[4] Hohzoh K., Kazutaka N. and Keiji Y., Rapid screen for bacteria degrading water-insoluble, solid hydrocarbons on agar plates, *Appl. Environ. Microbiol.,* 1982; **43**: 454-457.

[5] Tamura K., Dudley J., Nei M. and Kumar S. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol. Biol. Evol.,* 2007; **24**: 1596-1599.

[6] Tao X.Q., Lu G.N., Liu J.P., Li T. and Yang L.N., Rapid Degradation of Phenanthrene by Using *Sphingomonas* sp. GY2B Immobilized in Calcium Alginate Gel Beads, *Int. J. Environ. Res. Public Health*, 2009; **6**: 2470-2480. DOI 10.3390/ijerph6092470.

[7] Hwang H.M., Hu X. and Zhao X., Enhanced bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons by environmentally friendly techniques, *J. Environ. Sci. Health C Environ. Carcinog. Ecotoxicol. Rev.*, 2007; **25**: 313-352. DOI 10.1080/10590500701704011.

[8] Masakorala K., Yao J., Cai M., Chandankere R., Yuan H. and Chen H., Isolation and characterization of a novel phenanthrene (PHE) degrading strain *Psuedomonas* sp. USTB-RU from petroleum contaminated soil, *J. Hazard. Mater.*, 2013; **263**: 493-500. DOI 10.1016/j.jhazmat.2013.10.007.

[9] Pedetta A., Pouyte K., Herrera S.M.K., Babay P.A., Espinosa M., Costagliola M., Studdert C.A. and Peressutti S.R., Phenanthrene degradation and strategies to improve its bioavailability to microorganisms isolated from brackish sediments, *Int. Biodeter. Biodegr.*, 2013; **84**: 161-167. DOI 10.1016/j.ibiod.2012.04.018.

[10] Patel V., Cheturvedula S. and Madamwar D., Phenanthrene degradation by *Pseudoxanthomonas* sp. DMVP2 isolated from hydrocarbon contaminated sediment of Amlakhadi canal, Gujarat, India, *J. Hazard. Mater.*, 2012; **201-202**: 43-51. DOI 10.1016/j.jhazmat.2011.11.002.