

บทที่ 4

โครงการที่ 3: การย่อยสลายทางชีวภาพสารโพลีอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนด้วยแบคทีเรียดีไนทรีไฟเออร์

Biodegradation of Polyaromatic Hydrocarbons by Denitrifying Bacteria

โดย

ผศ. ดร.สุภาวศ์ จุฬาลักษณ์านุกูล และดร. ชมกฤษ วิรุณานนท์

บทคัดย่อ

การคัดแยกจุลินทรีย์ชนิดดีไนทรีไฟเออร์จากดินตะกอนใต้ทะเลบริเวณเกาะสีชัง จังหวัด ชลบุรี จำนวน 26 ตัวอย่าง พบจุลินทรีย์ที่สามารถเจริญได้ดีในอาหารที่มีส่วนประกอบของ PAHs (Naphthalene, Phenanthrene, Pyrene และ Benzo[a]pyrene) ความเข้มข้น 200 ppm ในสภาวะไร้ออกซิเจน ซึ่งถูกคัดแยกมา สกัด จีโนมิกดีเอ็นเอและเพิ่มปริมาณ 16S rDNA รวมถึงวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บน 16S rDNA เพื่อ ระบุชนิด และทำการทดสอบทางชีวเคมี ผลการวิจัยพบว่าจุลินทรีย์ที่สามารถคัดแยกจากตะกอนดินใต้ทะเล มี 63 ไอโซเลต มี 8 ไอโซเลตที่พบใน 5 สถานี (สถานีที่ 2, 7, 9, 12, 15) คือ *Enterococcus faecalis*, *Paenibacillus macerans*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus tequilensis*, *Proteus mirabilis* และ *Enterobacter asburiae* จัดเป็นดีไนทรีไฟเออร์แบคทีเรียทั้ง 8 ไอโซเลต โดยมีลำดับนิวคลีโอไทด์คล้ายคลึงกับฐานข้อมูล Genbank 96% และมีการประเมินประสิทธิภาพการย่อยสลายสารประกอบPAHs ทั้ง 4 ชนิดคือ Naphthalene, Phenanthrene, Pyrene และ Benzo[a]pyrene ด้วยเทคนิค HPLC พบว่าเมื่อเวลาผ่านไป 16 วัน จุลินทรีย์ทั้ง 8 ไอโซเลตสามารถย่อยสลาย สารประกอบPAHs ที่มีจำนวนวงเบนซินต่างกัน ที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 200 ppm ได้ ในปริมาณที่แตกต่างกันเมื่อใส่เชื้อดีไนทรีไฟเออร์แบคทีเรีย ทั้งนี้โดยเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่ ใส่ดีไนทรีไฟเออร์แบคทีเรีย ซึ่งไม่พบการลดลงของสารประกอบPAHs ดังนั้นแสดงให้เห็นว่า ดีไนทรีไฟเออร์ แบคทีเรียมีความสามารถในการย่อยสลายสารประกอบโพลีไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนที่มีจำนวน องค์ประกอบของวงเบนซินต่างๆกันได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยเฉพาะ Naphthalene ซึ่งเป็นสารประกอบ PAHs ตัวที่เล็กที่สุด ดีไนทรีไฟเออร์แบคทีเรียทุกตัวสามารถย่อยสลายได้มากกว่า 60% ส่วน pyrene พบดี ไนทรีไฟเออร์แบคทีเรียบางตัวที่สามารถย่อยสลายได้ประสิทธิภาพอยู่ระหว่าง 50% ถึง 60% คือ *Enterococcus faecalis*, *Paenibacillus macerans*, *Bacillus tequilensis*, และ *Bacillus subtilis* สำหรับ Benzo[a]pyrene นั้น มีดีไนทรีไฟเออร์แบคทีเรียชนิด *Proteus mirabilis* และ *Paenibacillus macerans* ที่มีประสิทธิภาพสามารถย่อย สลายได้ 50% และ 60%ตามลำดับ ส่วน Phenanthrene นั้นมีดีไนทรีไฟเออร์แบคทีเรีย คือ *Proteus mirabilis* ที่ มีความสามารถในการย่อยสลายได้ 50% ส่วนดีไนทรีไฟเออร์แบคทีเรียตัวอื่นๆ พบความสามารถในการย่อย สลายได้น้อยกว่า 50%

คำสำคัญ: ดีไนทรีไฟเออร์แบคทีเรีย โพลีอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน การย่อยสลายทางชีวภาพ

Abstract

Denitrifying bacteria were screened from 26 marine sediments collected from Sichang Island, Chonburi province. The anaerobic bacteria that grown on 200 ppm PAHs (Naphthalene, Phenanthrene, Pyrene and Benzo[a]pyrene) supplemented media were selected for further genomic identification. The genetical identification of bacteria was performed by using 16S rRNA gene sequence comparison then using BLASTn to search the bacterial database and identifying the species that closely matches their sequence. In this study, 8 of 63 bacterial isolates screened from marine sediments in station 2, 7, 9, 12, 15 could be identified as species of *Enterococcus faecalis*, *Paenibacillus macerans*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus tequilensis*, *Proteus mirabilis* and *Enterobacter asburiae*. All of them are denitrifying bacteria. The PAH degrading anaerobe isolations were identified closed to GenBank database above 96%. Furthermore, the degradation efficiency was determined for 4 PAHs (Naphthalene, Phenanthrene, Pyrene and Benzo[a]pyrene) by HPLC technique. All 8 bacterial isolates showed different ability in degrading different PAH compounds, at initial concentration of 200 ppm, after incubation for 16 days. Naphthalene, the smallest PAHs, was found to be degraded more than 60% by all denitrifying bacteria under studied. Pyrene was degraded in the range of 50-60% by some of the denitrifying bacteria which were *Enterococcus faecalis*, *Paenibacillus macerans*, *Bacillus tequilensis* and *Bacillus subtilis*. Denitrifying bacteria in the species of *Proteus mirabilis* and *Paenibacillus macerans* could degrade benzo[a]pyrene at the efficiency of 50% and 60%, respectively. Phenanthrene was decomposed by *Proteus mirabilis* at the degradation ability of 50% while the others denitrifying bacteria had lower than 50% degradation efficiency.

Keywords: denitrifying bacteria, polyaromatic hydrocarbons, biodegradation

4.1 บทนำ

4.1.1 ความสำคัญและที่มาในการวิจัย

สารประกอบโพลีไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน (Polycyclic Aromatic Hydrocarbon; PAHs) เป็นกลุ่มของสารประกอบอินทรีย์ที่มีโครงสร้างโมเลกุลประกอบด้วยวงเบนซีนตั้งแต่ 2 วงขึ้นไป สาร PAHs เป็นตัวการสำคัญที่ก่อให้เกิดปัญหาสิ่งแวดล้อม เนื่องจากส่วนใหญ่มีความสามารถในการละลายน้ำต่ำ ทำให้ยากแก่การกำจัดและยังมีความเป็นพิษสูง (Kanaly and Harayama, 2000) PAHs เป็นองค์ประกอบที่พบได้ในน้ำมันดิบ ถ่านหิน และสามารถเกิดขึ้นเองได้ตามธรรมชาติจากการเผาไหม้ที่ไม่สมบูรณ์ของอินทรีย์สาร นอกจากนี้ยังเป็นผลผลิตพลอยได้จากกระบวนการเคมีที่ใช้ในทางอุตสาหกรรม เช่น การผลิตสีพลาสติก สารปราบศัตรูพืช รวมไปถึงยาบางชนิด ดังนั้นการปนเปื้อนของ PAHs ในสิ่งแวดล้อมจึงเกิดขึ้นได้จากหลายสาเหตุ ทั้งจากไฟฟ้า ท่อไอเสียรถยนต์ น้ำทิ้งจากบ้านเรือนและโรงงานอุตสาหกรรม กระบวนการกลั่นน้ำมันดิบ เหมืองถ่านหิน รวมไปถึงการอัปปางและรั่วไหลจากเรือบรรทุกน้ำมันสู่ทะเล และด้วยคุณสมบัติที่ละลายน้ำได้น้อย (hydrophobicity) และ electrochemical stability (Harvey, 1997) ที่มีสัมพันธ์กับขนาดโมเลกุลและจำนวนวงเบนซีน ทำให้ PAHs มีช่วงครึ่งชีวิต (half-life) ในสิ่งแวดล้อมที่ยาวนานขึ้น ตัวอย่างเช่น Phenanthrene ที่มีวงเบนซีนเป็นองค์ประกอบ 3 วง มีช่วงครึ่งชีวิตอยู่ที่ 16–26 วัน ในขณะที่ Benzo[a]pyrene ซึ่งมีวงเบนซีน 5 วงเป็นองค์ประกอบมีช่วงครึ่งชีวิตอยู่ที่ 229–1,400 วัน หรือมากกว่า (Shuttleworth, 1995)

กระบวนการย่อยสลายทางชีวภาพ (Biodegradation) เป็นกระบวนการหนึ่งที่มีความสนใจเพื่อนำมาใช้ในการบำบัดการปนเปื้อนสารไฮโดรคาร์บอนในทะเล (Head et al., 1999) เนื่องจากการนำจุลินทรีย์มาใช้ในการย่อยสลายสารไฮโดรคาร์บอน หรือโลหะหนักต่างๆ ทำให้สารเปลี่ยนไปอยู่ในรูปที่ไม่เป็นอันตราย หรือก่อปัญหาต่อสิ่งแวดล้อมน้อยกว่าวิธีการอื่นๆ จึงมีแนวโน้มในการนำมาใช้อย่างกว้างขวาง ซึ่งได้แก่ แบคทีเรียดีไนทริไฟเออร์ หรือดีไนทริไฟอิงแบคทีเรีย

ดีไนทริไฟอิงแบคทีเรีย (Denitrifying bacteria) เป็นจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการรีดิวซ์สารประกอบไนเตรตให้อยู่ในรูปของก๊าซไนโตรเจนได้ พบได้ทั้งในแบคทีเรียและรา และสามารถเจริญได้ในสภาวะที่ไม่ใช้ออกซิเจน แบคทีเรียดีไนทริไฟเออร์นับเป็นจุลินทรีย์ที่น่าสนใจจากคุณลักษณะความสามารถในการสร้างเอนไซม์ที่สามารถย่อยสลายของค์ประกอบสารเคมีชนิดไนเตรตได้ จุลินทรีย์นี้เจริญเติบโตได้ดีในสภาวะแวดล้อมกึ่งไร้ออกซิเจน ซึ่งสามารถใช้ทั้งออกซิเจนและไนเตรตเป็นตัวรับอิเล็กตรอนตัวสุดท้ายที่เกี่ยวข้องกับกลไกการย่อยสลายและการแตกตัวของสารประกอบโพลีไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนไปเป็นสารที่มีสภาพความเป็นพิษลดลงได้ (Roger, 1982)

การศึกษาและแยกชนิดของแบคทีเรียดีไนทริไฟเออร์เพื่อนำไปประยุกต์ใช้เพื่อการบำบัดน้ำทิ้ง (สิรินันท์, 2552) ซึ่งมีการปนเปื้อนน้ำมันหรือสารไฮโดรคาร์บอน จึงมีความน่าสนใจเป็นอย่างมาก โดยเฉพาะเพื่อการกำจัดน้ำมันดิบ (Crude oil) ซึ่งรั่วไหลจากเรือโดยสารหรือเรือประมง รวมทั้งในอุตสาหกรรมเคมีบางประเภท งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อการคัดแยกแบคทีเรียดีไนทริไฟเออร์และมี

คุณสมบัติในการดูดซึมหรือกำจัดสารประกอบโพลีอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนได้ดี อันจะเป็นประโยชน์ในการประยุกต์ใช้เพื่อรักษาสภาพแวดล้อมต่อไป

โดยธรรมชาติ ปฏิกริยาระหว่างแสงแดดและสารไฮโดรคาร์บอน จะช่วยลดความเป็นพิษของสารประกอบประเภทไฮโดรคาร์บอนได้ ส่วนในทางชีวภาพ สามารถใช้จุลินทรีย์ซึ่งมีความสามารถในการใช้สารประกอบประเภทไฮโดรคาร์บอนในการเจริญเติบโตและเปลี่ยนรูปไปเป็นสารประกอบอินทรีย์ชนิดอื่นซึ่งลดความเป็นพิษลง ดังนั้น ในงานวิจัยนี้ จึงมีความสนใจที่จะทำการศึกษาเพื่อคัดแยกแบคทีเรียดีไนทริไฟเออร์ดังกล่าวจากดินตะกอนบริเวณพื้นที่ชายฝั่งเกาะสีชังที่อาจปนเปื้อนน้ำมันจากเรือประมง เพื่อประเมินความสามารถในการนำไปใช้ในกระบวนการบำบัดสารประกอบโพลีอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนในสิ่งแวดล้อมต่อไป

4.1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

คัดแยกแบคทีเรียดีไนทริไฟเออร์จากตะกอนดินที่มีคุณสมบัติในการกำจัดสารประกอบประเภทโพลีอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนในสถานะไร้ออกซิเจน

4.1.3 ขอบเขตของการวิจัย

- คัดแยกแบคทีเรียดีไนทริไฟเออร์ที่สามารถเจริญในอาหารที่มีสารประกอบโพลีอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน
- ศึกษาคุณลักษณะเฉพาะความสามารถในการรีดิวซ์ nitrite-nitrate ของจุลินทรีย์ที่คัดไว้
- ศึกษาคุณลักษณะเฉพาะทางพันธุศาสตร์ของ nitrite reductase gene ของจุลินทรีย์ที่คัดไว้
- ทดสอบความสามารถและประสิทธิภาพการย่อยสลายโพลีอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน

4.1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

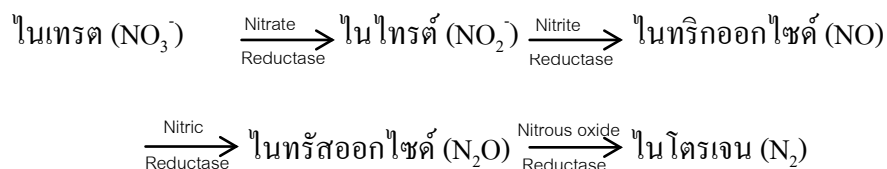
ได้สายพันธุ์แบคทีเรียกลุ่มดีไนทริไฟเออร์ที่มีความสามารถย่อยสารโพลีไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน และความหลากหลายของแบคทีเรียกลุ่มดีไนทริไฟเออร์ในตะกอนดินทะเลที่ปนเปื้อนสารโพลีอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน

4.2 ทฤษฎีและการทบทวนวรรณกรรม

4.2.1 กระบวนการดีไนทริฟิเคชัน (Denitrification)

กระบวนการดีไนทริฟิเคชันเป็นกระบวนการทางชีวเคมีที่สำคัญ มีผลทางนิเวศวิทยาทำให้เกิดการสูญเสียไนโตรเจนจากสิ่งแวดล้อมทางบกและทางน้ำ และส่งผลทางชีวภาพให้ได้พลังงานออกมาในรูป ATP จากกระบวนการถ่ายทอดอิเล็กตรอน โดยสารอินทรีย์หรือสารอนินทรีย์จะถ่ายทอดอิเล็กตรอนให้แก่ไน

เทรต ทำให้ไนเตรดถูกรีดิวซ์ไปเป็นไนไตรต์ ซึ่งจะกลายมาเป็นตัวรับอิเล็กตรอนตัวใหม่ และถูกรีดิวซ์ต่อไปเป็นไนตริกออกไซด์ ไนตรัสออกไซด์ และก๊าซไนโตรเจนในที่สุด กระบวนการนี้เป็นขั้นตอนหนึ่งของกระบวนการหายใจแบบไม่ใช้ออกซิเจน (anaerobic respiration) (Delwiche, 1981) สารประกอบออกไซด์ของไนโตรเจน (Nitrogen oxide) ต่างๆที่เป็นตัวรับอิเล็กตรอนตัวสุดท้ายในระหว่างกระบวนการดีไนตริฟิเคชัน จะทำให้เกิดกระบวนการดีไนตริฟิเคชันขึ้น ดังสมการ (Payne, 1973)



ในแต่ละขั้นตอนของกระบวนการดีไนตริฟิเคชันถูกกระตุ้นด้วยเอนไซม์ไนโตรเจนออกไซด์รีดักเทส (Nitrogen oxide reductase) ต่างชนิดกัน ซึ่งแต่ละชนิดจะทำหน้าที่ถ่ายทอดอิเล็กตรอนจากกระบวนการไปสู่วัสดุกลางที่เหมาะสมแล้วให้พลังงานออกมา ดังนั้นถ้าในสิ่งแวดล้อมมีสารไนโตรเจนออกไซด์ที่เป็นตัวกลางของกระบวนการดีไนตริฟิเคชันอยู่ แบคทีเรียที่มีเอนไซม์ไนโตรเจนออกไซด์รีดักเทสเพียง 1 ชนิดจะสามารถเจริญเติบโตได้โดยใช้ตัวกลางที่เหมาะสม ทำให้เกิดขั้นตอนใดขั้นตอนหนึ่งของกระบวนการดีไนตริฟิเคชันขึ้น (Delwiche, 1981)

4.2.2. ดีไนตริไฟอิงแบคทีเรีย (Denitrifying bacteria) หรือ ดีไนตริไฟเออร์ (Denitrifier)

เป็นกลุ่มของแบคทีเรียที่มีความหลากหลายทางสรีรวิทยา (Physiology) และอนุกรมวิธาน (Taxonomy) สามารถใช้แหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงานได้ต่างกัน (Bitton, 1999) โดยทั่วไปแบคทีเรียสามารถแบ่งเป็นกลุ่มได้ตามแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงานที่ใช้ ดังสรุปในตารางที่ 2-1

แบคทีเรียที่พบในกระบวนการดีไนตริฟิเคชันเป็นพวกแอโรบิกออโทโทรฟ (aerobic autotrophs) หรือแอโรบิกเฮเทอโรโทรฟ (aerobic heterotrophs) ที่สามารถสลับการเจริญไปเป็นแบบไร้ออกซิเจนได้ เมื่อมีการใช้ในเทรตเป็นตัวรับอิเล็กตรอนในภาวะที่ขาดออกซิเจนแบคทีเรียที่สามารถหายใจโดยไม่ใช้ออกซิเจนได้เท่านั้นที่จะทำให้เกิดกระบวนการดีไนตริฟิเคชันขึ้น ในทางทฤษฎีดีไนตริไฟอิงแบคทีเรียควรเป็นแบคทีเรียที่ทำให้เกิดกระบวนการดีไนตริฟิเคชันครบทุกขั้นตอน ตั้งแต่รีดิวซ์ไนเตรตจนได้ก๊าซไนโตรเจนเท่านั้น แต่อย่างไรก็ตามการทำงานร่วมกันของแบคทีเรียที่ทำให้เกิดเพียงขั้นตอนใดขั้นตอนหนึ่งหรือบางขั้นตอนของกระบวนการก็ทำให้เกิดกระบวนการดีไนตริฟิเคชันทั้งหมดขึ้นได้ ดังนั้นในทางนิเวศวิทยาแบคทีเรียใดๆที่ทำให้เกิดเพียงขั้นตอนใดขั้นตอนหนึ่งของกระบวนการ ก็สามารถทำให้เกิดกระบวนการดีไนตริฟิเคชันขึ้นได้ เรียกแบคทีเรียเหล่านั้นว่า ดีไนตริไฟอิงแบคทีเรียที่ทำให้เกิดกระบวนการขึ้นบางส่วน (partial denitrifying bacteria) (Bitton, 1999)

ตารางที่ 4.1 การแบ่งประเภทของแบคทีเรีย (ธงชัย พรรณสวัสดิ์, 2544; กรมโรงงานอุตสาหกรรม, 2545)

ประเภทของแบคทีเรีย	แหล่งคาร์บอน (Carbon source)	แหล่งพลังงาน (Energy source)
Heterotrophs (Organotrophs) -Photoheterotrophs -Chemoheterotrophs	สารอินทรีย์ สารอินทรีย์	แสง ปฏิกิริยาออกซิเดชันรีดักชัน ของสารอินทรีย์
Autotrophs (Lithotrophs) -Photoautotrophs -Chemoautotrophs	สารอนินทรีย์ (CO ₂) สารอนินทรีย์ (CO ₂)	แสง ปฏิกิริยาออกซิเดชันรีดักชัน ของสารอนินทรีย์

กระบวนการดีไนทริฟิเคชันแบบบางส่วน (Partial denitrification) เกิดขึ้นจากสาเหตุทาง สรีรวิทยา หรือทางพันธุกรรม ดังต่อไปนี้คือ

1. ตัวกลางในกระบวนการ เมื่อไม่มีไนเตรตอยู่ด้วย
2. ภาวะทางสิ่งแวดล้อม เช่น ความเข้มข้นของออกซิเจน ค่าความดันกรด-ด่างหรือความเข้มข้นของตัวกลางในกระบวนการ เป็นต้น ซึ่งจะทำให้ขั้นตอนใดขั้นตอนหนึ่งหรือหลายขั้นตอนไม่เกิดขึ้น
3. เนื่องจากเอนไซม์ไนโตรเจนออกไซด์รีดักเทสแต่ละชนิด กระตุ้นขั้นตอนที่แตกต่างกันในกระบวนการดีไนทริฟิเคชัน ดังนั้นจึงปรากฏขึ้นในเซลล์ในเวลาที่แตกต่างกัน แล้วแต่ว่าการกระตุ้นขั้นตอนใดจะเริ่มต้นขึ้น (ในสิ่งแวดล้อมธรรมชาติ ภาวะที่กระตุ้นและยับยั้งกระบวนการดีไนทริฟิเคชันจะเกิดขึ้นสลับกันเสมอ)

4. ในทางพันธุกรรมแบคทีเรียบางชนิดไม่สามารถสังเคราะห์เอนไซม์ไนโตรเจนออกไซด์รีดักเทสในทุกขั้นตอนของกระบวนการดีไนทริฟิเคชันได้

แบคทีเรียที่ทำให้เกิดกระบวนการดีไนทริฟิเคชันขึ้นบางส่วน สามารถแบ่งตามรูปแบบความหลากหลายทางพันธุกรรมได้ 4 กลุ่ม (Delwiche, 1981) ดังนี้

1. แบคทีเรียที่สามารถรีดิวซ์ไนเตรตเป็นไนไตรต์ได้เท่านั้น

ในทางพันธุกรรมแบคทีเรียกลุ่มนี้ขาดเอนไซม์ไนไตรต์รีดักเทส ไนทริกออกไซด์รีดักเทส และไนทรีสออกไซด์รีดักเทส บางครั้งเรียกกระบวนการรีดิวซ์ไนเตรตแบบดิสสิมิลีเลชันที่จำกัดอยู่ แต่นี้ว่ากระบวนการหายใจโดยใช้ไนเตรต (Nitrate respiration) เกิดขึ้นในแบคทีเรียหลายชนิด และพบว่ามิดีไนทรีไฟอิงแบคทีเรียที่ทำให้เกิดกระบวนการขึ้น บางส่วนอยู่ในกลุ่มนี้มากที่สุด Hall (1978) ได้รวบรวมแบคทีเรีย

ในสกุล (genera) ต่างๆตาม Bergey's manual ฉบับพิมพ์ครั้งที่ 8 ที่สามารถเกิดกระบวนการหายใจโดยใช้ไนเตรดได้ไว้ ดังตารางที่ 4-2 ซึ่งจะเห็นว่าเป็นกลุ่มที่มีความหลากหลายทางสรีรวิทยาอย่างมาก

ตารางที่ 4.2 แบคทีเรียสกุลต่างๆ ที่มีรายงานว่ามีความสามารถทำให้เกิดการหายใจโดยใช้ไนเตรด (nitrate respiration) (Delwiche, 1981)

<i>Actinobacillus</i>	<i>Escherichia</i>	<i>Peptococcus</i>
<i>Actinomyces</i>	<i>Eubacterium</i>	<i>Photobacterium</i>
<i>Aeromonas</i>	<i>Flavobacterium</i>	<i>Planobispora</i>
<i>Agrobacterium</i>	<i>Fusobacterium</i>	<i>Planomonospora</i>
<i>Alcaligenes</i>	<i>Geodermatophilus</i>	<i>Plesiomonas</i>
<i>Arachnia</i>	<i>Haemophilus</i>	<i>Propionibacterium</i>
<i>Arthrobacter</i>	<i>Halobacterium</i>	<i>Proteus</i>
<i>Bacillus</i>	<i>Halococcus</i>	<i>Pseudomonas</i>
<i>Bacterionema</i>	<i>Hyphomicrobium</i>	<i>Rhizobium</i>
<i>Bacteroides</i>	<i>Hyphomonas</i>	<i>Rothia</i>
<i>Beneckea</i>	<i>Klebsiella</i>	<i>Salmonella</i>
<i>Bordetella</i>	<i>Lactobacillus</i>	<i>Selenomonas</i>
<i>Branhamella</i>	<i>Leptothrix</i>	<i>Serratia</i>
<i>Brucella</i>	<i>Listeria</i>	<i>Shigella</i>
<i>Campylobacter</i>	<i>Lucibacterium</i>	<i>Simonsiella</i>
<i>Cellulomonas</i>	<i>Microbispora</i>	<i>Spirillum</i>
<i>Chromobacterium</i>	<i>Micrococcus</i>	<i>Sporosarcina</i>
<i>Citrobacter</i>	<i>Micromonospora</i>	<i>Streptomyces</i>
<i>Clostridium</i>	<i>Moraxella</i>	<i>Streptosporangium</i>
<i>Corynebacterium</i>	<i>Mycobacterium</i>	<i>Thiobacillus</i>
<i>Cytophaga</i>	<i>Neisseria</i>	<i>Thiomicrospira</i>
<i>Dactylsporangium</i>	<i>Nocardia</i>	<i>Veillonella</i>
<i>Enterobacter</i>	<i>Paracoccus</i>	<i>Vibrio</i>
<i>Erwinia</i>	<i>Pasteurella</i>	

2. แบคทีเรียที่สามารถรีดิวซ์ไนเตรดเป็นไนตรัสออกไซด์ได้เท่านั้น

ในทางพันธุกรรมแบคทีเรียกลุ่มนี้ขาดเอนไซม์ไนตรัสออกไซด์รีดักเทส บางครั้งแบคทีเรียในกลุ่มนี้ เช่น *Aquaspirillum itersonii* และ *Pseudomonas fluorescens* บางสายพันธุ์ จะถูกนำไปเลี้ยงในห้องทดลอง ทำให้ไม่แน่ชัดว่ากระบวนการดีไนทริฟิเคชันบางส่วนลักษณะนี้เกิดขึ้นในสายพันธุ์แท้ (wild type strain) หรือเกิดขึ้นจากการกลายพันธุ์ (mutation) หลายๆครั้ง แล้วทำให้เอนไซม์ไนตรัสออกไซด์รีดัก

ทดสอบไป อย่างไรก็ตามแบคทีเรียที่มีรายงานว่ารีดิวซ์ไนเตรตและไนไตรต์โดยไม่ผลิตก๊าซจืดอยู่ในดีไนทริไฟอิงแบคทีเรียที่ทำให้เกิดกระบวนการขึ้นบางส่วนกลุ่มนี้

ตารางที่ 4.3แบคทีเรียที่สามารถรีดิวซ์ได้ทั้งไนเตรตและไนไตรต์ (สมศักดิ์ วังโน, 2524)

<i>Bacillus pyocyaneus (Pseudomonas aeruginosa)</i>	<i>Micrococcus denitrificans</i>
<i>Thiobacillus denitrificans</i>	<i>Pseudomonas denitrificans</i>
<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>Pseudomonas stutzeri</i>	

แบคทีเรียเหล่านี้ส่วนใหญ่เป็นพวกเฮเทอโรโทรฟ บางพวกก็เป็นคีโมออโตโทรฟ เช่น *Micrococcus denitrificans* และ *Thiobacillus denitrificans*

3. แบคทีเรียที่สามารถรีดิวซ์ไนไตรต์แต่ไม่รีดิวซ์ไนเตรตเป็นก๊าซไนโตรเจน

ในทางพันธุกรรมแบคทีเรียกลุ่มนี้ขาดเอนไซม์ไนเตรรีดักเตส แบคทีเรียที่จัดอยู่ในกลุ่มนี้ เช่น *Neisseria* และ *Pseudomonas* บางสายพันธุ์ ในการศึกษาทางนิเวศวิทยาแบคทีเรียกลุ่มนี้ไม่สามารถแยกออกมาได้อย่างชัดเจน เนื่องจากในการทดสอบทางจุลชีววิทยาทั่วไปพบว่าไม่สามารถผลิตก๊าซจากไนเตรตได้ จึงถูกมองว่าไม่ใช่ดีไนทริไฟอิงแบคทีเรีย ถึงแม้ว่าเมื่อนำการทำงานของแบคทีเรียกลุ่มนี้มารวมกับของพวกที่หายใจโดยใช้ไนเตรตแล้ว จะทำให้เกิดกระบวนการดีไนทริฟิเคชันที่สมบูรณ์ก็ตาม

4. แบคทีเรียที่สามารถรีดิวซ์ไนเตรตไปเป็นไนไตรต์ และไนทริกออกไซด์ไปเป็นไนตรัสออกไซด์

ในทางพันธุกรรมแบคทีเรียกลุ่มนี้ขาดเอนไซม์ไนเตรรีดักเตส และไนตรัสออกไซด์รีดักเตส มีเพียงรายงานเดียวที่บอกว่า *Bacillus licheniformis* จัดอยู่ในกลุ่มนี้ กระบวนการดีไนทริฟิเคชันแบบบางส่วนลักษณะนี้อาจพบน้อยและไม่มีความสำคัญทางนิเวศวิทยา แต่เป็นลักษณะที่แสดงให้เห็นถึงความสำคัญของแต่ละขั้นตอน ถึงแม้ว่าแบคทีเรียหลายสายพันธุ์จะสามารถทำให้เกิดกระบวนการดีไนทริฟิเคชันที่สมบูรณ์ได้ แต่ก็ยังมีแบคทีเรียสายพันธุ์อื่นอีกมากที่ทำให้เกิดกระบวนการดีไนทริฟิเคชันได้เพียงบางขั้นตอนของกระบวนการเท่านั้น เนื่องจากแบคทีเรียพวกนี้มีเอนไซม์ไนโตรเจนออกไซด์รีดักเตสที่ค่อนข้างหลากหลาย แบคทีเรียที่สามารถทำให้เกิดกระบวนการดีไนทริฟิเคชัน สรุปได้ดังตารางที่ 4. 4

ตารางที่ 4.4 แบคทีเรียที่สามารถทำให้เกิดกระบวนการดีไนทริฟิเคชัน (Delwiche, 1981)

A. Phototrophic bacteria

- | | |
|--|--|
| 1. <i>Rhodopseudomonas sphaeroides</i> | การเกิดกระบวนการดีไนทริฟิเคชันขึ้นอยู่กับ
สายพันธุ์ มีความสามารถในการตรึงไนโตรเจน |
|--|--|

B. Gliding bacteria

- | | |
|-----------------------------------|---|
| 2. <i>Cytophaga johnsonae</i> | การเกิดกระบวนการดีไนทริฟิเคชันขึ้นอยู่กับ
สายพันธุ์ จากการศึกษานี้พบ 4 สายพันธุ์ที่รีดิวซ์ไนเตรตไปเป็นไนไตรต์ซึ่งใน
จำนวนนั้นมี 1 สายพันธุ์ที่รีดิวซ์ไนเตรตไปเป็น
ก๊าซ |
| 3. <i>Lysobacter antibioticus</i> | |
| 4. <i>Simonsiella muelleri</i> | จากการศึกษานี้พบ 9 สายพันธุ์ที่รีดิวซ์ไนเตรต ซึ่งในจำนวนนั้นมี 4 สายพันธุ์ที่รีดิวซ์ไนเตรตโดยมีหรือไม่มีการผลิตก๊าซ |

C. Budding bacteria

- | | |
|------------------------------|-----------------------|
| 5. <i>Hypomicrobium</i> spp. | ดีไนทริไฟแบบเมธิลทรอฟ |
|------------------------------|-----------------------|

D. Spiral and curved bacteria

- | | |
|---------------------------------------|--|
| 6. <i>Aquaspirillum itersonii</i> | ผลิตไนตรัสออกไซด์เป็นผลิตภัณฑ์สุดท้ายของ
กระบวนการดีไนทริฟิเคชัน |
| 7. <i>Aquaspirillum psychrophilum</i> | ผลิตก๊าซที่มองเห็นได้ (visible gas) เป็น
ผลิตภัณฑ์สุดท้ายของกระบวนการดีไนทริฟิเคชัน |
| 8. <i>Aquaspirillum dispar</i> | ไม่ผลิตก๊าซเป็นผลิตภัณฑ์สุดท้ายของ
กระบวนการดีไนทริฟิเคชัน |
| 9. <i>Azospirillum lipoferum</i> | การเกิดกระบวนการดีไนทริฟิเคชันขึ้นอยู่กับ
สายพันธุ์ บางสายพันธุ์ผลิตไนตรัสออกไซด์
เป็นผลิตภัณฑ์สุดท้ายของกระบวนการ
ดีไนทริฟิเคชัน มีความสามารถในการตรึง
ไนโตรเจน |
| 10. <i>Campylobacter sputorum</i> | |
-

ตารางที่ 4.4 (ต่อ)

E. Gram-negative bacteria

11. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	
12. <i>Pseudomonas fluorescens</i>	บางสายพันธุ์ผลิตไนโตรสออกไซด์เป็นผลิตภัณฑ์สุดท้ายของกระบวนการดีไนทริฟิเคชัน
13. <i>Pseudomonas chlororaphis</i>	บางสายพันธุ์ผลิตไนโตรเจนเป็นผลิตภัณฑ์สุดท้ายของกระบวนการ
14. <i>Pseudomonas aureofaciens</i>	
15. <i>Pseudomonas stutzeri</i>	บางสายพันธุ์เจริญโดยมีไนโตรสออกไซด์เป็นตัวรับอิเล็กตรอนตัวสุดท้าย
16. <i>Pseudomonas mendocina</i>	
17. <i>Pseudomonas mallei</i>	ทำให้เกิดโรคในสัตว์
18. <i>Pseudomonas pseudomallei</i>	ทำให้เกิดโรคในสัตว์
19. <i>Pseudomonas caryophylli</i>	ทำให้เกิดโรคในพืช
20. <i>Pseudomonas lemoignei</i>	
21. <i>Pseudomonas solanacearum</i>	ทำให้เกิดโรคในพืช
22. <i>Pseudomonas pickettii</i>	บางสายพันธุ์เจริญโดยมีไนโตรสออกไซด์เป็นตัวรับอิเล็กตรอนตัวสุดท้าย
23. <i>Pseudomonas pseudoflava</i>	เป็นแฟลคัลเลทีฟลิโมลิโทรอฟ (ไฮโดรเจนแบคทีเรีย)
24. <i>Pseudomonas denitrificans</i>	
25. <i>Pseudomonas perfectomarinus</i>	แบคทีเรียที่พบในทะเล
26. <i>Pseudomonas nautica</i>	แบคทีเรียที่พบในทะเล
27. <i>Pseudomonas</i> spp.	
28. <i>Alcaligenes faecalis</i>	บางสายพันธุ์ดิวัชไนโตรได้ไปเป็นก๊าซแต่ไม่สามารถดิวัชไนโตรได้เป็นไนโตรได้
29. <i>Alcaligenes eutrophus</i>	เป็นแฟลคัลเลทีฟลิโมลิโทรอฟ (ไฮโดรเจนแบคทีเรีย)
30. <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	ทำให้เกิดโรคในพืช บางสายพันธุ์เจริญโดยมีไนโตรสออกไซด์เป็นตัวรับอิเล็กตรอนตัวสุดท้าย
31. <i>Agrobacterium radiobacter</i>	บางสายพันธุ์เจริญโดยมีไนโตรสออกไซด์เป็นตัวรับอิเล็กตรอนตัวสุดท้าย

ตารางที่ 4.4 (ต่อ)

F. Gram-negative facultatively anaerobic bacteria

- | | |
|--------------------------------------|---|
| 32. <i>Chromobacterium violaceum</i> | โดยปกติก๊าซที่มองเห็นได้ไม่ได้ผลิตจากไนโตรเจนหรือไนเตรต |
| 33. <i>Chromobacterium lividum</i> | โดยปกติก๊าซที่มองเห็นได้ไม่ได้ผลิตจากไนโตรเจนหรือไนเตรต |
| 34. <i>Flavobacterium</i> spp. | บางสายพันธุ์ไม่สามารถรีดิวซ์ได้ |

G. Gram-negative cocci and coccobacilli

- | | |
|---|--|
| 35. <i>Neisseria sicca</i> | สามารถรีดิวซ์ไนโตรเจนแต่ไม่สามารถรีดิวซ์ไนเตรต |
| 36. <i>Neisseria subflava</i> | สามารถรีดิวซ์ไนโตรเจนแต่ไม่สามารถรีดิวซ์ไนเตรต |
| 37. <i>Neisseria flavescens</i> | สามารถรีดิวซ์ไนโตรเจนแต่ไม่สามารถรีดิวซ์ไนเตรต |
| 38. <i>Neisseria mucosa</i> | สามารถรีดิวซ์ไนโตรเจนแต่ไม่สามารถรีดิวซ์ไนเตรต |
| 39. <i>Neisseria animalis</i> | การรีดิวซ์ไนเตรตขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ |
| 40. <i>Neisseria cavie</i> | การรีดิวซ์ไนเตรตขึ้นอยู่กับสายพันธุ์
โดยปกติจะไม่ผลิตก๊าซที่มองเห็นได้ |
| 41. <i>Neisseria denitrificans</i> | สามารถรีดิวซ์ไนโตรเจนแต่ไม่สามารถรีดิวซ์ไนเตรต |
| 42. <i>Branhamella catarrhalis</i> | การรีดิวซ์ไนเตรตขึ้นอยู่กับสายพันธุ์
อาจผลิตหรือไม่ผลิตก๊าซที่มองเห็นได้ |
| 43. <i>Acinetobacter</i> spp. | |
| 45. <i>Paracoccus denitrificans</i> | ไนตรัสออกไซด์และไนโตรเจนผลิตจากไนเตรต เป็นแฟคัลเททีฟลิโมลิโททรอฟ (ไฮโดรเจนแบคทีเรีย) |
| 46. <i>Paracoccus halodenitrificans</i> | ไนตรัสออกไซด์และไนโตรเจนผลิตจากไนเตรต |
-

ตารางที่ 4.4 (ต่อ)

H. Gram-negative chemolithotrophic sulfur bacteria

- | | |
|---|---|
| 47. <i>Thiobacillus denitrificans</i> | บางสายพันธุ์รีดิวซ์ไนตริกออกไซด์และ
ไนตรัสออกไซด์ไปเป็นไนโตรเจน |
| 48. <i>Thiomicrospira denitrificans</i> | ไม่เจริญในภาวะมีออกซิเจน เป็นออบลิเกต
ดีไนทริไฟเออร์ |
| 49. <i>Thermothrix thioparus</i> | ไม่ผลิตก๊าซที่มองเห็นได้จากไนเตรต แตรี้ดิวซ์
ไนไตรต์ เป็นเทอร์โมฟิลิกแฟลคัลเททีฟ
คีโมลิโธโทรฟ |

I. Gram-positive spore-forming bacteria

- | | |
|--|--|
| 50. <i>Bacillus licheniformis</i> | |
| 51. <i>Bacillus cereus</i> | |
| 52. <i>Bacillus polymyxa</i> | |
| 53. <i>Bacillus macerans</i> | |
| 54. <i>Bacillus stearothermophilus</i> | |
| 55. <i>Bacillus laterosporus</i> | |
| 56. <i>Bacillus pasteurii</i> | |
| 57. <i>Bacillus pantothenicus</i> | |
| 58. <i>Bacillus pulvifaciens</i> | |
| 59. <i>Bacillus nitrollens</i> | |
| 60. <i>Bacillus azotoformans</i> | คัดเลือกโดยอาหารที่อุดมด้วยไนตรัสออกไซด์ |

J. Gram-positive non-spore-forming bacteria

- | | |
|--|--|
| 61. <i>Corynebacterium nephridii</i> | ค้นพบเพียง 1 สายพันธุ์ ผลิตไนตรัสออกไซด์
เป็นผลิตภัณฑ์สุดท้าย |
| 62. <i>Propionibacterium acidipropionici</i> | การเกิดกระบวนการดีไนทริฟิเคชันขึ้นอยู่กับ
สายพันธุ์ |

K. Others

- | | |
|------------------------------|--|
| 63. <i>Halobacterium</i> sp. | |
|------------------------------|--|

4.2.3. การทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

น้ำมันและผลผลิตที่เกิดขึ้นจากน้ำมันนับวันเป็นปัญหาที่สำคัญต่อมวลมนุษย์ จากอัตราที่เพิ่มขึ้นการนำมาใช้ประโยชน์ จึงมีกิจกรรมการขนส่งมากยิ่งขึ้น มีระบบการเก็บรักษาเพิ่มขึ้น โดยเฉพาะอย่างยิ่งการรั่วไหลและปนเปื้อนของสารประกอบไฮโดรคาร์บอนที่เกิดขึ้นจะมีผลกระทบอย่างสูงกับสุขภาพอนามัยของมนุษย์ (เก็จากัญจน์, 2546)

กระบวนการไบโอรีเมเดชันเป็นการนำสิ่งมีชีวิตเพื่อมาใช้ในการบำบัดรักษาสีแวดล้อมที่มีการปนเปื้อนจากน้ำมันหรือสารประกอบไฮโดรคาร์บอนต่างๆ ให้หมดไปหรือให้มีสภาพที่ดีขึ้นและฟื้นฟูได้รวดเร็วขึ้น จึงนับเป็นกระบวนการเพื่อการรักษาสภาพแวดล้อมให้ดียิ่งขึ้นจนเป็นปกติ สะอาด สำหรับสุขภาพอนามัยของสิ่งมีชีวิตที่อยู่ในสิ่งแวดล้อมนั้นๆ (เจษฎา, 2541)

จากการศึกษาก่อนหน้าของ Boonyatumanond et al., (2006) ที่ได้การศึกษาการกระจายตัวของสาร PAHs และ Molecular Marker ในตะกอนดินบริเวณคลอง แม่น้ำเจ้าพระยา ปากแม่น้ำและอ่าวไทยตอนบน พบว่าการปนเปื้อนของสาร PAHs ในตะกอนดินจากคลอง แม่น้ำ ปากแม่น้ำ และอ่าวไทยตอนบนเป็นการตกค้างที่เกิดจาก Petrogenic และ Pyrogenic และจากการศึกษาพบปริมาณความเข้มข้นของสาร PAHs พบว่าในคลองมีความเข้มข้นของสาร PAHs อยู่ระหว่าง 512 – 8399 นาโนกรัมต่อกรัม (น้ำหนักแห้ง) แม่น้ำเจ้าพระยาพบ 33 – 590 นาโนกรัมต่อกรัม (น้ำหนักแห้ง) ปากแม่น้ำพบ 29 – 724 นาโนกรัมต่อกรัม (น้ำหนักแห้ง) และชายฝั่งทะเลของไทยพบ 6 – 228 นาโนกรัมต่อกรัม (น้ำหนักแห้ง) ตามลำดับ ซึ่งแนวโน้มการกระจายตัวและสาเหตุการปนเปื้อนสาร PAHs บริเวณปากแม่น้ำเจ้าพระยาและอ่าวไทยตอนใน น่าจะเกิดจากกิจกรรมการใช้น้ำมันในเมืองและมีการชะล้างสู่แหล่งน้ำธรรมชาติผ่านทางคลองต่างๆเป็นหลัก

Rakhimova et al., (2004) ศึกษาประสิทธิภาพของจุลินทรีย์ที่ใช้ในการ oxidize น้ำมันในการย่อยสลายทางชีวภาพของดินที่ปนเปื้อนน้ำมันในห้องปฏิบัติการ ภาวะที่ใช้ในการศึกษาความสามารถในการออกซิไดซ์มีทั้งภาวะไร้ออกซิเจน (anaerobic หรือ anoxic) ความสามารถในการย่อยสลายน้ำมันที่เป็นสารไฮโดรคาร์บอนมีลำดับดังนี้ การปล่อยให้เกิดย่อยสลายทางชีวภาพขึ้นเอง (self-remediation) 40% < เมื่อมีการประยุกต์ใช้ในเทรต 42% < ระบบ denitrifying oil-oxidizing 50% ระบบที่ใช้ร่วมกันระหว่าง denitrification พร้อมกับเติมไนเทรต 60%

Coates et al., (1997) ศึกษาการย่อยสลายทางชีวภาพของตะกอนดินบริเวณท่าเรือที่ปนเปื้อนสารประกอบโพลีไซคลิกแอโรมาติกไฮโดรคาร์บอนและสารประกอบอัลเคนจากน้ำมันปิโตรเลียมในสภาวะไร้ออกซิเจน (Coates และ คณะ, 1997) และประสบผลสำเร็จเป็นที่น่าพอใจ

Häner et al., (1995) พบว่าจุลินทรีย์จาก diesel fuel-contaminated source มีความสามารถเจริญบน p-xylene การออกซิเดชันของ p-xylene ควบคู่ไปกับ CO₂ แสดงให้เห็นว่าสามารถลดปริมาณ NO₃⁻ ได้สำเร็จ การเพิ่มปริมาณเชื้อในการเจริญบน toluene และ m-xylene สามารถตรวจพบได้ อย่างไรก็ตามพบว่าเชื้อไม่สามารถย่อย benzene, ethylbenzene และ o-xylene ได้

Mille et al., (2007) ทำการทดลอง *in situ* และได้ถูกนำมาใช้ในการวิเคราะห์ตัวอย่างจากตะกอนชายฝั่งทะเลเมดิเตอร์เรเนียนบริเวณ Gulf of Fos เพื่อจะศึกษาอิทธิพลของสารประกอบไฮโดรคาร์บอนกับการเกิดดีไนทริฟิเคชัน (denitrification) หลังจาก 1, 4 และ 6 เดือน สำหรับตัวอย่างควบคุมจะไม่มีตะกอนไฮโดรคาร์บอนในตะกอน การมีอยู่ของจุลินทรีย์และสัตว์หน้าดินกระตุ้นให้เกิดอัตราของดีไนทริฟิเคชันถึง 160% การกระตุ้นถูกเหนี่ยวนำโดยตะกอนทั้ง NO_3^- การมีอยู่ของสารประกอบไฮโดรคาร์บอนในการทดลองส่งผลทั้งช่วยกระตุ้นและยับยั้งการเกิดดีไนทริฟิเคชัน กระบวนการดีไนทริฟิเคชันตอบสนองการมีอยู่ของสารไฮโดรคาร์บอนขึ้นกับ ปริมาณของสารที่เกิดจากกิจกรรมของจุลินทรีย์และสัตว์หน้าดิน สารอินทรีย์ในปริมาณเพียงเล็กน้อยก็สามารถเพิ่มประสิทธิภาพของกระบวนการดีไนทริฟิเคชันที่เกี่ยวข้องกับสารไฮโดรคาร์บอน 120% ในทางตรงกันข้าม เมื่อมีปริมาณไฮโดรคาร์บอนอิมัลชันมากกว่า 100 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมของตะกอนแห้ง พบว่ากระบวนการดีไนทริฟิเคชันถูกยับยั้ง

Bradley et al., (1992) กล่าวถึง ในปี 1975 การรั่วไหลของ JP-4 grade jet fuel ปริมาณราว 83,000 แกลลอนทำให้เกิดการปนเปื้อนใกล้กับ North Charleston South California เป็นบริเวณกว้าง เพื่อที่จะศึกษาปัจจัยที่จะส่งผลต่อจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการดีไนทริฟิเคชัน ปริมาณ NO_3^- ค่าความเป็นกรดด่าง และปริมาณ PO_4 ได้ถูกบันทึกถึงผลกระทบต่อกระบวนการดีไนทริฟิเคชันในตะกอนที่เก็บอย่างหลากหลาย พบว่ากระบวนการดีไนทริฟิเคชันลดลง 98% ภายใต้ภาวะไร้ออกซิเจน อัตราการเกิดดีไนทริฟิเคชันและคาร์บอนมิเนอราไลเซชันเพิ่มขึ้นเมื่อมีปริมาณ NO_3^- มากที่สุดโดยประมาณ 1 mM ส่วน PO_4 ไม่มีผลต่อทั้งสองกระบวนการ การเกิดดีไนทริฟิเคชันลดลง 38% เป็นอย่างน้อยที่ความเป็นกรดด่างต่ำกว่า 4 เมื่อเทียบกับความเป็นกรดด่างที่ 7 การวิเคราะห์ตัวอย่างพบว่ามี ความแตกต่างเกิดขึ้นในการปนเปื้อนสารประกอบไฮโดรคาร์บอนอย่างน้อย 10 เท่าในบริเวณชายฝั่งที่เก็บตัวอย่าง ซึ่งมีความคล้ายคลึงกับงานของ Oleszczuk and Baran (2003) ซึ่งศึกษาการย่อยสลายในดินที่มีการปนเปื้อนสารประกอบ PAHs

Fukui et al., (1999) สรุปว่าน้ำมันดิบเป็นองค์ประกอบที่มีความซับซ้อนโดยองค์ประกอบหลักประกอบด้วยหลาย ๆ อย่าง (saturated aromatic hydrocarbons) การย่อยสลายสารประกอบไฮโดรคาร์บอนด้วยแบคทีเรียที่ใช้ออกซิเจนในการหายใจเป็นที่รู้จักกันมานานนับร้อยปี ส่วนการย่อยสลายสารอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนภายใต้ภาวะไร้ออกซิเจนเพิ่งมีการค้นพบมาในไม่กี่สิบปี ในงานวิจัยนี้กล่าวถึงการสำรวจการย่อยสลายสารประกอบโพลีอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนในน้ำมันดิบที่ภาวะไร้ออกซิเจน จุลินทรีย์ที่มีความสามารถดังกล่าวอยู่ในกลุ่มที่เป็นซัลไฟด์รีดิวซิงแบคทีเรีย (sulfite-reducing bacteria) นอกจากนี้สารประกอบ alkyl-benzene และ n-alkane ถูกพบว่ามี การย่อยสลายได้ไปพร้อมกับการเปลี่ยนซัลเฟต (sulfate) ไปเป็นซัลไฟด์ (sulfide) ซึ่งนับเป็น 10% aromatic hydrocarbons ในน้ำมันดิบ อย่างไรก็ตามการใช้สารประกอบไฮโดรคาร์บอนเกิดขึ้นแบบไม่สมบูรณ์ตามค่าการวัด C_{13} และ C_{12} และจึงเป็นคำอธิบายที่ว่าทำไมแบคทีเรียโบราณบางชนิดจึงสามารถพบว่าเจริญได้ในแหล่งน้ำมันดิบซึ่งมีกำมะถันอยู่ และเป็นสาเหตุว่าทำไมจึงมีซัลไฟด์ที่ไม่พึงประสงค์ปนอยู่ในน้ำมันและโรงกลั่นน้ำมัน ยิ่งไปกว่านั้นยังมีการพบแอนแอโร

บิกเบคทีเรียที่ใช้ alkylbenzene และ n-alkane และเชื้อไวรัสที่เป็นจุลินทรีย์ในกลุ่มดีไนทรีไฟเออร์ในน้ำมันดิบจากการศึกษา

วิธีการวิจัยที่มีความสำคัญอย่างยิ่งโดยรวมคือการศึกษาคัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีความสามารถดำรงชีวิตอยู่ในสิ่งแวดล้อมที่มีการปนเปื้อนน้ำมันไฮโดรคาร์บอน เข้าใจวิถีการดำรงชีวิต ในอาหารที่มีสารปนเปื้อนนั่นๆอยู่กลไกความสามารถการเจริญเติบโตพร้อมไปกับการใช้สารปนเปื้อนหรือน้ำมันไฮโดรคาร์บอน เข้าใจในระดับพันธุศาสตร์ถึงยีนที่เกี่ยวข้องกลไกการสลายสารไฮโดรคาร์บอน รวมทั้งการศึกษาหาสภาวะแวดล้อมและอาหารเพื่อให้จุลินทรีย์นั้นๆมีความสามารถสูงสุดสู่การบำบัดรักษาและกำจัดน้ำมันไฮโดรคาร์บอนให้หมดไปหรือลดลง

จากงานวิจัยเกือบทั้งหมดที่เกี่ยวข้องกับการประยุกต์ใช้กระบวนการดีไนทรีฟิเคชัน พบว่าจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการใช้กระบวนการดีไนทรีฟิเคชันนั้นมีศักยภาพในการนำมาใช้เพื่อบำบัดและแก้ไขปัญหาสีสิ่งแวดล้อมซึ่งเกิดจากการปนเปื้อนของสารประกอบไนโตรเจน ฟอสฟอรัส โพลีไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน ซึ่งการใช้แบคทีเรียดีไนทรีไฟเออร์นับเป็นวิธีที่สามารถช่วยกำจัดไนเตรตและไนไตรต์และสารในกลุ่มของสารประกอบโพลีไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนออกจากระบบได้โดยไม่เป็นอันตรายต่อสิ่งมีชีวิตในระบบนั้นๆ นอกจากนี้ยังมีค่าใช้จ่ายที่น้อยกว่า ไม่เพิ่มปัญหามลภาวะ และประหยัดพลังงาน

4.3 ระเบียบวิธีดำเนินการวิจัย

4.3.1. การเก็บตัวอย่างตะกอนดิน

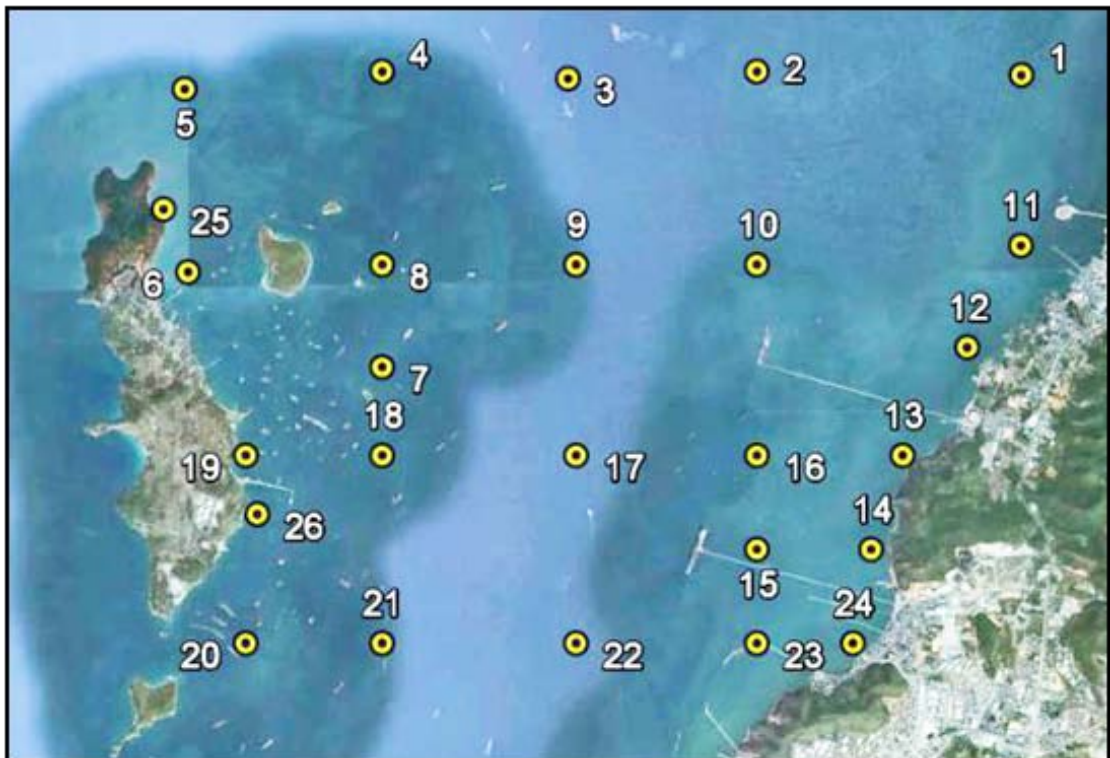
ทำการเก็บตัวอย่างตะกอนดินจากพื้นที่ในทะเลระหว่างเกาะสีชังและศรีราชา จังหวัดชลบุรี (แสดงดังภาพที่ 4.1) เกาะสีชังตั้งอยู่ที่พิกัดเส้นรุ้ง 13 องศา ถึง 12 องศาเหนือและระหว่างเส้นแวง 10 องศา 48 ลิปดา ถึง 100 องศา 51 ลิปดา ตั้งอยู่ตะวันออกบริเวณอ่าวไทยตอนใน ตรงกันข้ามกับอำเภอศรีราชา จังหวัดชลบุรี อยู่ห่างจากอำเภอศรีราชาประมาณ 12 กิโลเมตร ห่างจากจังหวัดชลบุรี ประมาณ 35 กิโลเมตรและอยู่ห่างจากกรุงเทพฯประมาณ 117 กิโลเมตร มีเนื้อที่บนเกาะรวมประมาณ 7.9 ตารางกิโลเมตร

ภาพที่ 4.2 แสดงสถานที่เก็บตัวอย่างตะกอนดินใต้ทะเลหรือบริเวณพื้นที่อ่าวรอบเกาะสีชัง ในบริเวณที่คาดว่าจะปนเปื้อนด้วยสารประกอบไฮโดรคาร์บอน โดยพิกัดทางภูมิศาสตร์ที่แน่นอนแต่ละสถานี แสดงในตารางที่ 4.5

สำหรับตัวอย่างดินตะกอนที่เก็บแล้ว จะทำการเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่ำ ก่อนนำเข้าห้องปฏิบัติการเพื่อทำการตรวจวิเคราะห์คุณสมบัติทางเคมีและทางชีวภาพต่อไป



ภาพที่ 4.1 แสดงแผนที่เกาะสี่ช้างและชายฝั่งทะเล



ภาพที่ 4.2 แสดงสถานีเก็บตัวอย่างบริเวณพื้นที่เกาะสี่ช้าง-ศรีราชา จ.ชลบุรี

ตารางที่ 4.5 พิกัดทางภูมิศาสตร์ของสถานีเก็บตัวอย่าง

สถานี	ละติจูด	ลองจิจูด	ความลึกน้ำ (เมตร)
1	13°11'26.05"N	100°54'53.68"E	6.0
2	13°11'27.59"N	100°52'56.44"E	10.0
3	13°11'24.54"N	100°51'32.75"E	15.4
4	13°11'27.59"N	100°50'10.41"E	18.6
5	13°11'20.03"N	100°48'42.87"E	24.6
6	13°10'1.07"N	100°48'44.40"E	8.0
7	13°9'20.10"N	100°50'10.42"E	30.5
8	13°10'4.26"N	100°50'10.42"E	31.6
9	13°10'4.26"N	100°51'36.32"E	16.8
10	13°10'4.26"N	100°52'56.44"E	10.0
11	13°10'12.50"N	100°54'53.41"E	6.7
12	13° 9'20.7"N	100°55'33.72"E	4.5
13	13° 8'42.00"N	100°54'1.00"E	7.9
14	13° 8'1.50"N	100°53'47.00"E	8.4
15	13° 8'1.50"N	100°52'56.44"E	19.5
16	13° 8'42.00"N	100°52'56.44"E	18.3
17	13° 8'42.00"N	100°51'36.32"E	26.5
18	13° 8'42.00"N	100°50'10.42"E	17.4
19	13° 8'42.00"N	100°49'10.00"E	5.7
20	13° 7'21.00"N	100°49'10.00"E	17.4
21	13° 7'21.00"N	100°50'10.42"E	28.2
22	13° 7'21.00"N	100°51'36.32"E	25.9
23	13° 7'21.00"N	100°52'56.44"E	14.5
24	13° 7'21.00"N	100°53'39.00"E	6.2
25	13°10'28.00"N	100°48'33.91"E	3.0
26	13° 8'16.65"N	100°49'15.09"E	2.5

4.3.2 การวิเคราะห์คุณสมบัติทางกายภาพหรือองค์ประกอบทางเคมีของตัวอย่างตะกอนดิน

บันทึกลักษณะสี ค่าความเป็นกรดด่าง ปริมาณสารประกอบไนโตรเจนในรูปแบบต่างๆที่พบในตะกอนดิน ดังนี้คือ ปริมาณไนโตรเจนที่พบทั้งหมด (%Total nitrogen) ปริมาณสารประกอบ NH_4^+ (mg/kg) ปริมาณสารประกอบ NO_3^- (mg/kg) โดยนำตัวอย่างตะกอนดินทุกสถานีมาตากให้แห้งในที่ร่ม จากนั้นนำมาบดให้ละเอียดแล้วนำไปสกัดตามวิธีที่กำหนด โดยซังผงตะกอนใส่ขวดพลาสติกในปริมาณที่กำหนด และใส่น้ำยาสกัดเบอร์ 1 ลงไปปริมาณ 20 มิลลิลิตร เขย่าให้ทำปฏิกิริยากันเป็นเวลา 5 นาที จากนั้นกรองสารละลายตะกอนดินด้วยกระดาษกรอง แล้วนำของเหลวที่กรองได้ไปทำการทดสอบเพื่อหาค่าแอมโมเนียมและไนเตรด

4.3.3 การคัดแยกชนิดของจุลินทรีย์จากตะกอนดิน

นำตัวอย่างตะกอนดินปริมาณ 1 กรัม ใส่ลงในอาหารเพาะเลี้ยง PDB + 2% Yeast Extract ที่มีการเติมสารประกอบไฮโดรคาร์บอน นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 วัน คัดเลือกตัวอย่างที่มีการเจริญมาทำการเพาะเลี้ยงต่อไปอีก 45 วัน ในอาหารเลี้ยงที่มีการเติมสารประกอบไฮโดรคาร์บอน นำจุลินทรีย์มาซัดลงบนอาหารแข็ง จนได้เป็นโคโลนีเดี่ยว เพื่อบ่งชี้ชนิดของจุลินทรีย์ที่สามารถเจริญในสภาพที่มีสารประกอบ PAHs

4.3.4 การคัดแยกดีเอ็นเอในทรีไฟอิงแบคทีเรียที่มีความสามารถในการเจริญใน PAHs

คัดแยกดีเอ็นเอในทรีไฟอิงแบคทีเรียจากตัวอย่างตะกอนดินด้วยเทคนิคการ Pour plate โดยทำการเจือจางตัวอย่างตะกอนดินด้วย 0.85% NaCl เขย่าเป็นเวลา 15 นาที แล้วดูดส่วนใสปริมาณ 1 มิลลิลิตร ลงในอาหารวุ้น (Nitrate Agar) ทำการบ่มที่ 37 องศาเซลเซียสในสภาพไร้ออกซิเจน (ภายใน Anaerobic Chamber) เป็นเวลา 5 วัน เมื่อแบคทีเรียมีการเจริญเติบโตจึงทำการแยกให้เป็นไอโซเลตเดี่ยว และนำไปเลี้ยงในอาหารเหลวไนเตรด (Nitrate Broth) ซึ่งมีหลอดดักแก๊ส (Durham tube) บรรจุอยู่ นำไปบ่มเป็นเวลา 7 วัน ในสภาพไร้ออกซิเจน (Beishir, 1996)

ทดสอบความสามารถในการรีดิวซ์ในกระบวนการ Nitrification/Denitrification ด้วยวิธีแอลฟา-แนพทิลลามีน (alpha-naphthylamine method) (Theerachat et al., 2010) นำดีเอ็นเอในทรีไฟอิงแบคทีเรียที่คัดแยกได้ มาสกัดดีเอ็นเอและวิเคราะห์บ่งชี้ชนิดของจุลินทรีย์ต่อไป

4.3.5 การจำแนกชนิดจุลินทรีย์ด้วยยีน 16S rRNA

นำโคโลนีเดี่ยวของแบคทีเรียที่คัดกรองได้มาสกัดจีโนมิกส์ดีเอ็นเอ และเพิ่มปริมาณ 16S ribosomal RNA fragment ตามวิธีของ Virunanon (2008) โดยทำให้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอบริสุทธิ์ด้วย Genomics DNA Purification Kit (Omega) เพื่อนำไปใช้เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อตำแหน่ง 27F และ 1492R ทำปฏิกิริยาอุณหภูมิสูง (พีซีอาร์) โดยเริ่มต้นที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที

จากนั้นที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที 55 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที และ 72 องศาเซลเซียส นาน 2 นาที และในรอบสุดท้ายเพิ่มเวลาต่อไปอีก 10 นาที ทำซ้ำเป็นจำนวน 30 รอบ จากนั้นใช้เทคนิคเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสเพื่อตรวจสอบชิ้นดีเอ็นเอที่มีขนาด 1600 bp ทำบนเจลที่มีความเข้มข้นของอะกาโรส 0.8 % ในสารละลาย 1X TAE และให้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 45 นาที จากนั้นนำตัวอย่างที่ได้จากกระบวนการพีซีอาร์และผ่านการตรวจสอบด้วยเทคนิคเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสไปทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ Viogene's Gel Extraction System ก่อนส่งตัวอย่างไปวิเคราะห์ลำดับเบสที่บริษัท แปซิฟิกไซน์ ประเทศไทย เพื่อนำข้อมูลลำดับเบสที่ได้ไปเปรียบเทียบกับตารางข้อมูลของ NCBI (Shi and Lee, 2006) เพื่อวิเคราะห์ลำดับจีโนมของแบคทีเรียที่คัดกรองได้

4.3.6 การทดสอบความสามารถในการย่อยสลายประกอบ PAHs

นำแบคทีเรียที่คัดแยกได้มาเพาะเลี้ยงในอาหาร enrichment และ Mineral Salt Medium ที่มีการดัดแปลงโดยเติมโปแตสเซียมไนเตรดเพื่อใช้เป็นแหล่งของไนโตรเจน และเติมสารประกอบ PAHs เพื่อใช้เป็นแหล่งคาร์บอน โดยใช้สารประกอบ PAHs ที่มีวงเบนซีนตั้งแต่ 2 - 5 วงเป็นองค์ประกอบ จำนวน 4 ชนิด ได้แก่ Naphthalene (2 วง) Phenanthrene (3 วง) Pyrene (4 วง) และ Benzo[a]pyrene (5 วง) ที่ความเข้มข้น 200 ppm นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจน ทำการเก็บตัวอย่างและทดสอบปริมาณสารประกอบ PAHs ที่เหลืออยู่ด้วยเครื่อง High-Performance Liquid Chromatography (HPLC)

4.3.7 การวิเคราะห์ปริมาณด้วยเครื่อง High-Performance Liquid Chromatography (HPLC)

รายละเอียดของเครื่อง HPLC มีดังนี้: ใช้คอลัมน์ Inertsil ODS-P HP (Shimadzu) column ขนาด 4.6 x 150 mm โดยใช้อะซิโตนไนไตรด์ (Acetonitrile; CH_3CN) และน้ำเป็น mobile phase ตามลำดับ มี $\text{CH}_3\text{CN}:\text{H}_2\text{O} = 40:60$ v/v และวิเคราะห์ด้วย UV-VIS detector อุณหภูมิของคอลัมน์ 40 องศาเซลเซียส วิเคราะห์ผลเทียบกับกราฟมาตรฐานของสารประกอบ PAHs แต่ละชนิด

4.4. ผลการวิจัย

4.4.1 การวิเคราะห์คุณสมบัติทางกายภาพหรือองค์ประกอบทางเคมีของตัวอย่างตะกอนดิน

ตัวอย่างตะกอนดินที่นำมาศึกษา มีลักษณะที่สังเกตได้ด้วยตาเปล่าคล้ายคลึงกัน ทั้งนี้โดยทั่วไปตะกอนดินมีลักษณะอนุภาคของดินเลน (clay) มากกว่าทราย (sand) ตะกอนมีสีเทาอ่อน บางตัวอย่างมีกลิ่นเหม็นของก๊าซไข่เน่า แต่บางตัวอย่างไม่มีกลิ่น

ลักษณะทางกายภาพของตัวอย่างตะกอนดินจากบริเวณเกาะสีชัง นอกจากใช้การสังเกตลักษณะสีของตะกอนด้วยตาแล้ว ได้ทำการตรวจวัด pH ด้วยเครื่อง pH Meter และตรวจสอบปริมาณแอมโมเนียม (NH_4^+-N) และไนเตรด (NO_3^--N) โดยใช้ชุดตรวจสอบดินจากโครงการพัฒนาวิชาการดิน-ปุ๋ย และสิ่งแวดล้อมภาควิชาวปฐพีวิทยา คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ซึ่งผลของการตรวจวัด pH ปริมาณ แอมโมเนียม

($\text{NH}_4^+\text{-N}$) และไนเตรต ($\text{NO}_3\text{-N}$) เบื้องต้นดังแสดงในตารางที่ 4.6 โดยพบว่าปริมาณแอมโมเนียมในตะกอนดินมีปริมาณสูงที่สถานีที่ 1, 5 และ 11 (ในช่วง 6-15 ppm) ส่วนปริมาณไนเตรตนั้นพบว่ามีค่าเข้มข้นใกล้เคียงกันในทุกสถานีเก็บตัวอย่าง โดยอยู่ในช่วง 1-10 ppm ทั้งนี้ความเข้มข้นของไนเตรตยังไม่สูงมากจนเกิดอันตรายต่อสุขภาพของมนุษย์ แต่บ่งชี้ว่าอาจมีการปนเปื้อนของของเสียในน้ำ

ตารางที่ 4.6 คุณสมบัติทางกายภาพตัวอย่างตะกอนดินของเกาะสีชังในบริเวณสถานี 1– 12

Physical Character Area	Color	pH (1:5)	$\text{NH}_4^+\text{-N}$ (ppm)	$\text{NO}_3\text{-N}$ (ppm)
Station 1	เทาอ่อน	8.57	6-15	1-10
Station 2	เทาอ่อน	8.63	1-10	1-10
Station 3	เทาอ่อน	8.64	1-10	1-10
Station 4	เทาอ่อน	8.56	1-10	1-10
Station 5	เทาอ่อน	8.54	6-15	1-10
Station 6	เทาอ่อน	8.61	1-10	1-10
Station 7	เทาอ่อน	8.56	1-10	1-10
Station 8	เทาอ่อน	8.64	1-10	1-10
Station 9	เทาอ่อน	8.62	1-10	1-10
Station 10	เทาอ่อน	8.57	1-10	1-10
Station 11	เทาอ่อน	8.63	6-15	1-10
Station 12	เทาอ่อน	8.64	1-10	1-10

4.4.2 ผลการคัดแยกชนิดของจุลินทรีย์จากตะกอนดิน

จากการเพาะเลี้ยงเพื่อคัดแยกชนิดของจุลินทรีย์จากตะกอนดินด้วยสารละลาย PDB + 2% Yeast Extract ที่มีการเติมสารประกอบไฮโดรคาร์บอนพบว่า พบการเจริญของจุลินทรีย์ในอาหารเหลวที่มีการเติมสารประกอบไฮโดรคาร์บอนชนิด Naphthalene ดังนั้น จึงทำการคัดเลือกตัวอย่างที่มีการเจริญมาทำการ

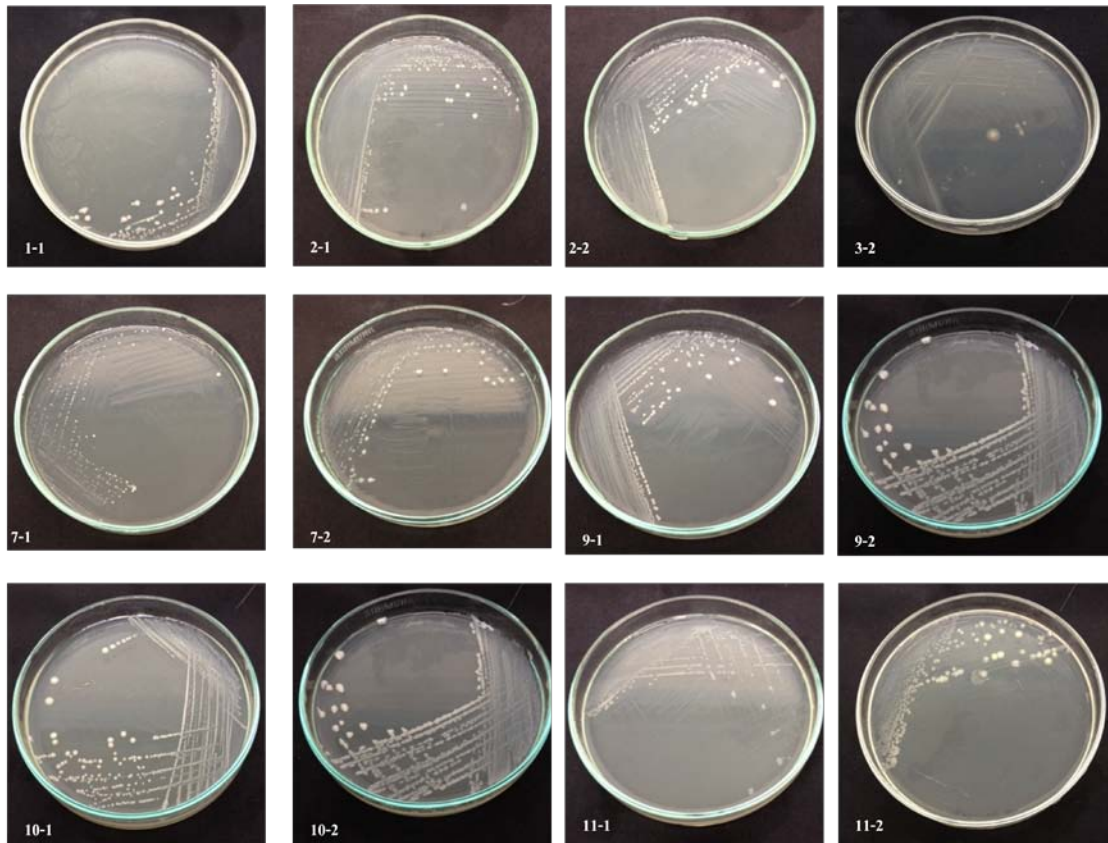
เพาะเลี้ยงต่อไปอีก 45 วัน ในอาหารเลี้ยงที่มีการเติมสารประกอบไฮโดรคาร์บอนชนิดเนฟทาซีน นำจุลินทรีย์มาจัดลงบนอาหารแข็ง ได้เป็นโคโลนีเดี่ยว ดังแสดงในภาพที่ 4.3 ลักษณะของโคโลนีมีขนาดเล็ก เส้นผ่านศูนย์กลาง 0.2 มิลลิเมตร โคโลนีเรียบเป็นมันวาว มีสีขาวนวล โดยพบโคโลนีลักษณะนี้จากตัวอย่างตะกอนดินบริเวณสถานีที่ 9



ภาพที่ 4.3 แสดงโคโลนีของจุลินทรีย์ที่ได้จากการคัดแยกจากตัวอย่างตะกอนดินสถานีที่ 9

เมื่อนำผลการตรวจวิเคราะห์หาสารประกอบไนโตรเจนจากตัวอย่างที่ 9 ซึ่งสามารถคัดแยกจุลินทรีย์ได้นั้น พบว่า มีปริมาณสารประกอบ NH_4^+ (mg/kg) 6-15 mg/kg และปริมาณสารประกอบ NO_3^- (mg/kg) 10 mg/kg (ผลการวิเคราะห์จากภาควิชาปฐพีวิทยา คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์) แสดงให้เห็นว่า ตัวอย่างตะกอนจากชายฝั่งทะเลบริเวณนั้น มีกิจกรรมของจุลินทรีย์ในกระบวนการไนตริฟิเคชัน (nitrification) อยู่ เมื่อมีการสะสมของ NH_4^+ ในบริเวณที่มี NO_3^- แสดงว่า NH_4^+ มาจากกระบวนการไนตริฟิเคชัน และแสดงให้เห็นคุณภาพของตะกอนดินและน้ำในบริเวณนั้น ว่าเกิดการปนเปื้อนไนเตรดหรือสารประกอบไนโตรเจนเกิดขึ้นในระยะเวลาหนึ่ง โดยที่ปริมาณของไนเตรดมีค่าน้อยกว่าปริมาณแอมโมเนียมไอออน แสดงให้เห็นว่า ตะกอนดินไม่ได้มีการสะสมการปนเปื้อนมานานนัก การปนเปื้อนอาจเพิ่งเกิดขึ้น และในบริเวณนี้น่าจะเป็นที่อยู่ของจุลินทรีย์ประเภท *Nitrosomonas* spp. และ *Nitrobacter* spp.

ทั้งนี้ตัวอย่างเชื้อแบคทีเรียที่คัดแยกได้แสดงดังภาพที่ 4.4 และจำนวนไอโซเลตของแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากตะกอนดินบริเวณเกาะสีชังได้ทั้งหมด 63 ไอโซเลต ได้รวบรวมแสดงในตารางที่ 4.7



ภาพที่ 4.4 ตัวอย่างเชื้อที่คัดแยกได้จากสถานีต่างๆ: (1-1) จากสถานีที่ 1, (2-1, 2-2) จากสถานีที่ 2, (3-2) จากสถานีที่ 3, (7-1, 7-2) จากสถานีที่ 7, (9-1, 9-2) จากสถานีที่ 9, (10-1, 10-2) จากสถานีที่ 10, และ (11-1, 11-2) จากสถานีที่ 11

ตารางที่ 4.7 จำนวนไอโซเลตที่ได้จากตะกอนดินในแต่ละสถานี

สถานี	จำนวนไอโซเลต	สถานี	จำนวนไอโซเลต
1	3	13	2
2	6	14	4
3	2	15	3
4	1	16	1
5	2	17	2
6	3	18	3
7	2	19	5
8	4	20	1
9	2	21	2
10	3	22	2
11	2	23	6
12	2	รวมทั้งหมด	63

4.4.3 การคัดแยกดีไนทริไฟอิงแบคทีเรีย

จากจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้ทั้งหมด 63 ไอโซเลต ซึ่งเมื่อนำแต่ละไอโซเลตที่แยกได้มาทดสอบความสามารถในการรีดิวซ์ในกระบวนการ Nitrification/Denitrification ด้วยวิธีแอลฟา-แนพทิลลามีน (alpha-naphthylamine method) จากการทดสอบ Nitrate Reduction ด้วยวิธี α -Naphthylamine test พบว่ามีไอโซเลตที่เป็น nitrate-positive strains และมีความสามารถในการรีดิวซ์ไนเตรตเป็นไนไตรต์ทั้งสิ้น 40 ไอโซเลต จากสถานีต่างๆ โดยสังเกตจากการเปลี่ยนสีของสารละลายจากสีน้ำตาลแดง เป็นไม่มีสี ทั้งนี้ ได้รวบรวมแสดงในตารางที่ 4-8 ถึง ตารางที่ 4-11 แต่มีเพียง 8 ไอโซเลตเท่านั้น ซึ่งได้แก่ ไอโซเลต B3/1 ไอโซเลต B3/2 ไอโซเลต A2/2 ไอโซเลต A2/3 ไอโซเลต A7/1 ไอโซเลต A7/2 ไอโซเลต A9/1 และ ไอโซเลต A12/1 ที่มีความสามารถในการเปลี่ยนไนเตรตไปเป็นก๊าซไนโตรเจนและจัดว่าเป็นดีไนทริไฟอิงแบคทีเรียอย่างแท้จริง ดังแสดงในภาพที่ 4.5 โดยแสดงลักษณะ โคลโลนิ การเกิดแก๊ส และสีที่เกิดขึ้นเมื่อทดสอบด้วยวิธี α -Naphthylamine test

ตารางที่ 4.8 ความสัมพันธ์ระหว่างความสามารถในการเกิดแก๊สและ Nitrate Reducing ของแต่ละไอโซเลต

สถานี	ไอโซเลต	Gas (วัน)														Nitrate-Positive	Denitrifier
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14		
1 (A1)	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	—
	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	—
	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	—
2 (A2)	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	—
	2	-	-	-	-	-	-	-	√	√	√	√	√	√	√	+	√
	3	-	-	-	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	+	√
	4	-	-	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	-	—
	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	—
	6	-	-	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	-	—
3 (A3)	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	—
	2	-	-	-	-	-	-	-	-	√	√	√	√	√	√	-	—
4 (A4)	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	—
5 (A5)	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	—
	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	—
6 (A6)	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	—
	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	—
	3	-	-	-	-	-	-	-	-	√	√	√	√	√	√	-	—
7 (A7)	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	√	√	√	+	√
	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	√	√	√	√	√	+	√

ตารางที่ 4.9 ความสัมพันธ์ระหว่างความสามารถในการเกิดแก๊สและ Nitrate Reducing ของแต่ละไอโซเลต

สถานี	ไอโซเลต	Gas (วัน)														Nitrate-Positive	Denitrifier
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14		
8 (A8)	1	-	-	-	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	-	—
	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	—
	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	—
	4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	—
9 (A9)	1	-	-	-	-	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	+	√
	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	—
10 (A10)	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	—
	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	—
	3	-	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	-	—
11 (A11)	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	—
	2	-	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	-	—
12 (A12)	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	—
	2	-	-	-	-	-	-	√	√	√	√	√	√	√	√	+	√
13 (B1)	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	—
	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	—
14 (B2)	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	—
	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	—
	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	—
	4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	—

ตารางที่ 4.10 ความสัมพันธ์ระหว่างความสามารถในการเกิดแก๊สและ Nitrate Reducing ของแต่ละไฮโซเลต

สถานี	ไฮโซเลต	Gas (วัน)														Nitrate-Positive	Denitrifier
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14		
15 (B3)	1	-	-	-	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	+	√
	2	-	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	+	√
	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	—
16(B4)	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	—
17 (B5)	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	—
	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	—
18 (B6)	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	—
	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	—
	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	—
19 (B7)	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	—
	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	—
	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	—
	4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	—
	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
20 (B8)	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	—
21 (B9)	1	-	-	-	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	-	—
	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	—
22 (B10)	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	—
	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	—

ตารางที่ 4.11 ความสัมพันธ์ระหว่างความสามารถในการเกิดแก๊สและ Nitrate Reducing ของแต่ละไอโซเลต

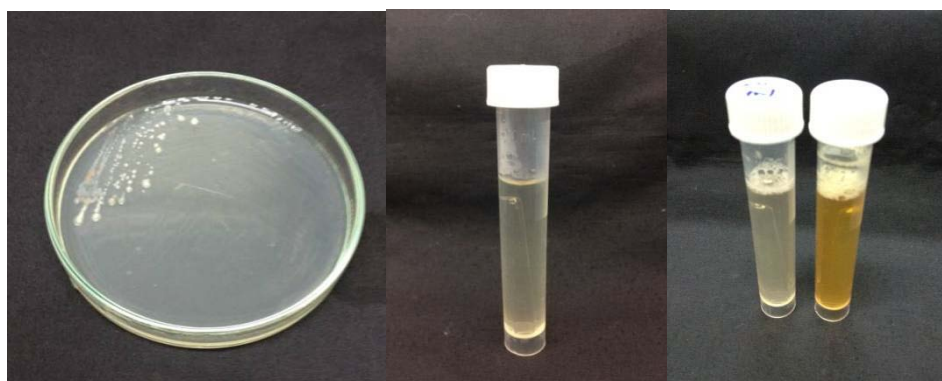
สถานี	ไอโซเลต	Gas (วัน)														Nitrate-Positive	Denitrifier
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14		
23 (B11)	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	—
	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	—
	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	—
	4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	—
	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	—
	6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	—

ภาพที่ 4.5 แสดงการเกิดกระบวนการdenitrificationของดีไนทริไฟอิงแบคทีเรียที่คัดแยกได้ จากสถานีต่างๆ ดังนี้

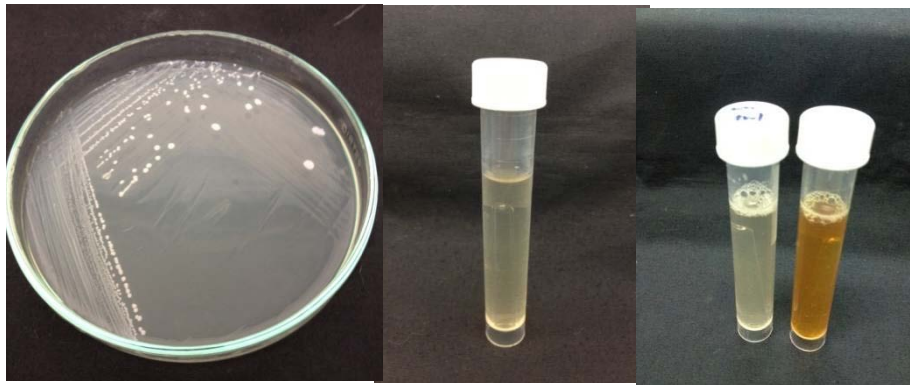
(ก) สถานี 2จากไอโซเลตที่ 2 (A2/2)



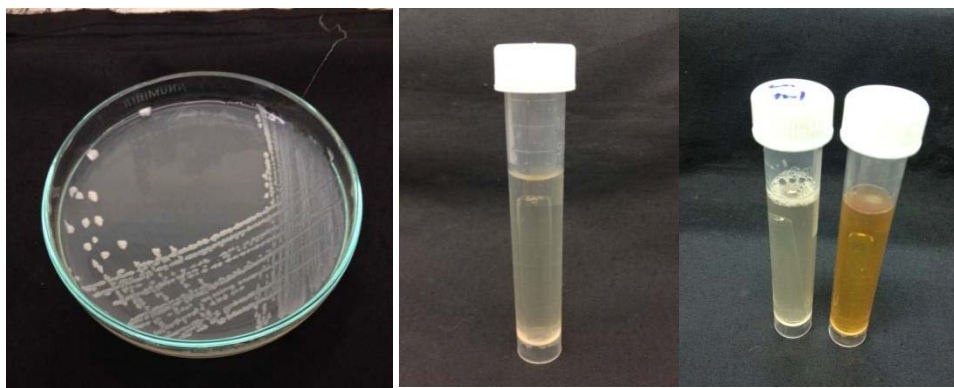
(ข) สถานี 2จากไอโซเลตที่ 3 (A2/3)



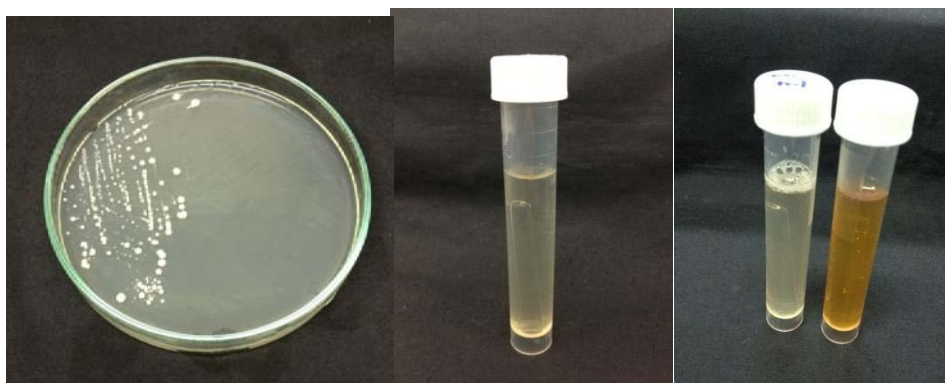
(ค) สถานี 7 จากไอโซเลตที่ 1 (A7/1)



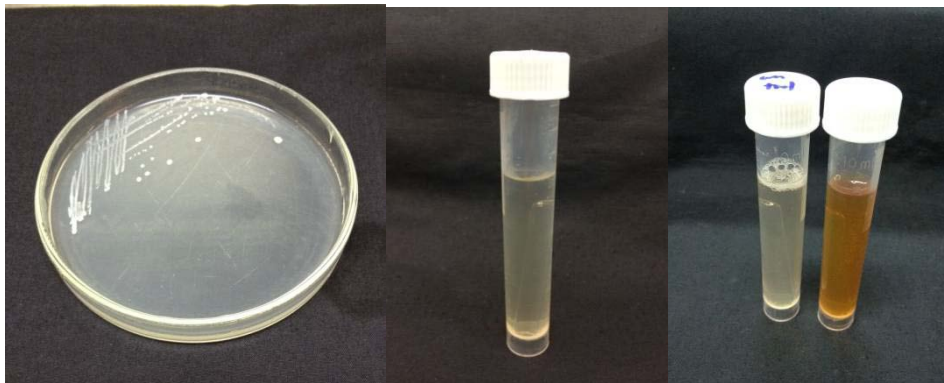
(ง) สถานี 7 จากไอโซเลตที่ 2 (A7/2)



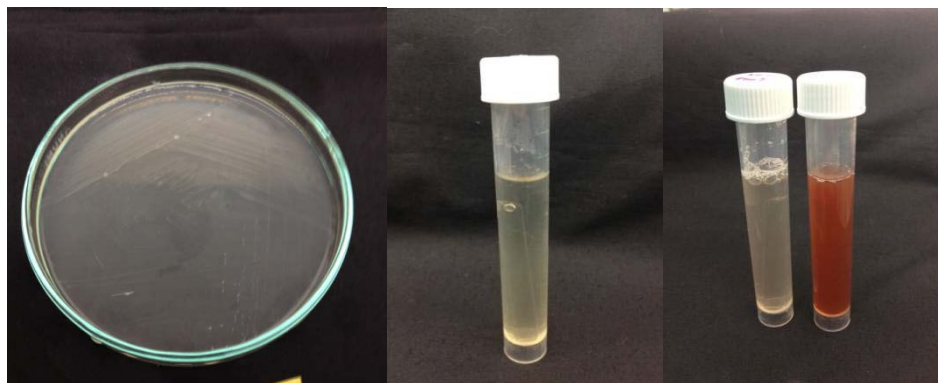
(จ) สถานี 9 จากไอโซเลตที่ 1 (A9/1)



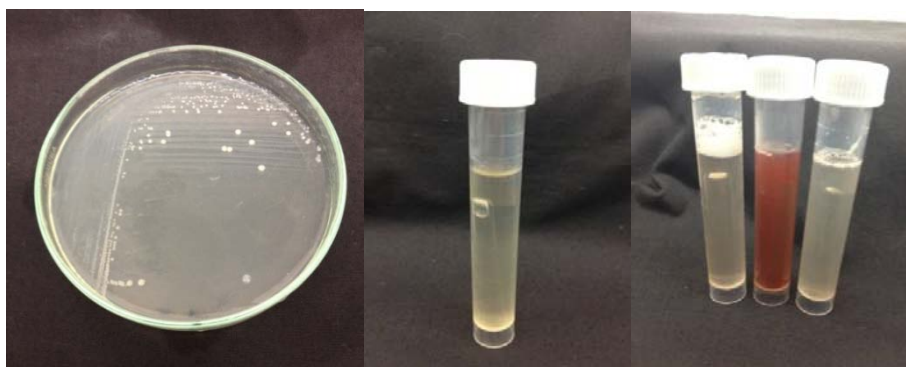
(ก) สถานี 12 จากไอโซเลตที่ 2 (A12/2)



(ข) สถานี 15 จากไอโซเลตที่ 1 (B3/1)



(ค) สถานี 15 จากไอโซเลตที่ 2 (B3/2)



ภาพที่ 4.5 (ก) - (ค) แสดงดิโนทริไฟอิงแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากสถานีต่างๆ โดยแสดงลักษณะโคโลนี การสร้างก๊าซและการเป็น nitrate-positive strains จากสีที่เปลี่ยนแปลงเมื่อทดสอบด้วยวิธี α -Naphthylamine test

เมื่อทำการรวบรวมจำนวนไอโซเลตที่เป็นดีไนทรีไฟอิงแบคทีเรียที่สามารถแสดงในตารางที่ 4.12
 ทั้งนี้ ไอโซเลตที่มีคุณสมบัติเป็นดีไนทรีไฟอิงแบคทีเรีย จะนำไปใช้ในการย่อยสลายสารประกอบ PAHs
 ต่อไป

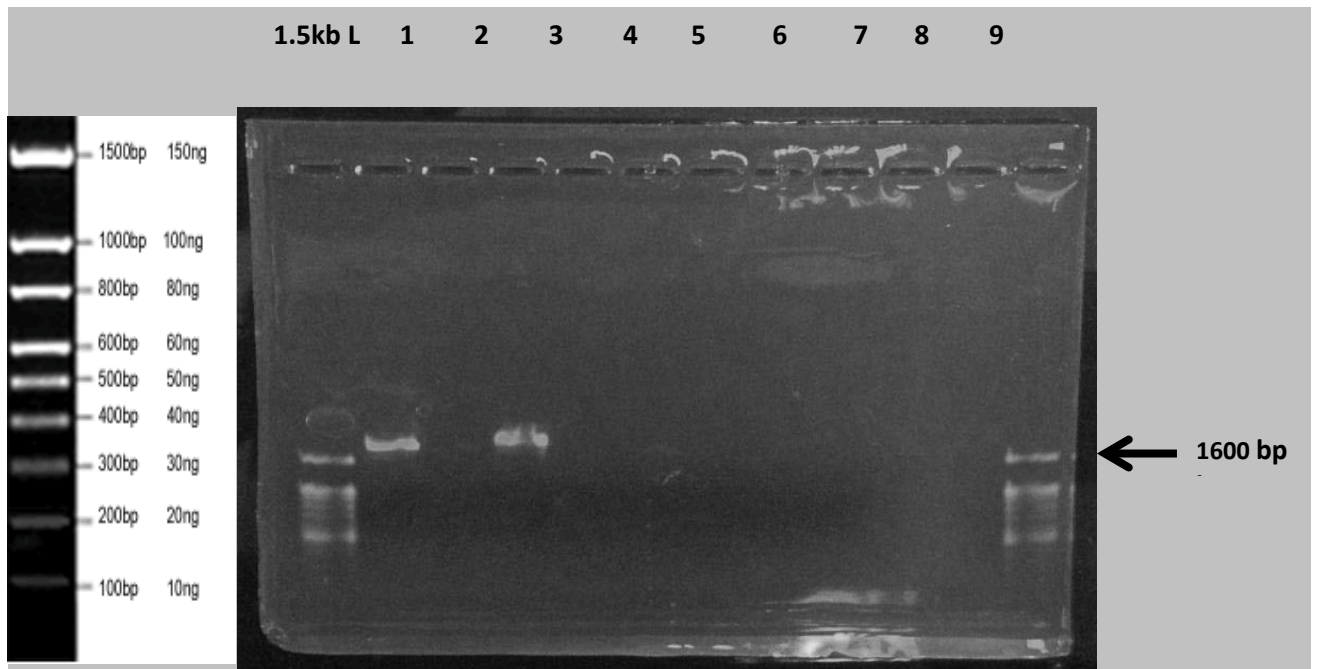
ตารางที่ 4.12 แสดงสถานีและไอโซเลตที่มีคุณสมบัติเป็นดีไนทรีไฟอิงแบคทีเรีย

สถานี	ไอโซเลต
15	B3/1
15	B3/2
2	A2/2
2	A2/3
7	A7/1
7	A7/2
9	A9/1
12	A12/2

4.4.4 ผลการบ่งชี้ชนิดจุลินทรีย์ด้วยยีน 16SrRNA

โคโลนีเดี่ยวของจุลินทรีย์ถูกนำมาสกัดจีโนมดีเอ็นเอและเพิ่มปริมาณ 16S ribosomal DNA fragment ด้วยด้วยลำดับเบสของ 16S rDNA โดยใช้ 27F-eubac universal primer คู่กับ 1492R-eubac universal primer พบตัวอย่างชิ้นส่วนของดีเอ็นเอขนาด 1600 คู่เบส ในเลนที่ 1 และ 3 ทั้งนี้แสดงตัวอย่างจาก Electrophoresis bands ในภาพที่ 4.6

จากการบ่งชี้สายพันธุ์จุลินทรีย์ด้วยยีน 16SrDNA ที่ได้จากการคัดแยกโดยสูตรอาหารที่มี PAHs เป็นองค์ประกอบพบว่าจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการย่อยสลาย PAHs และพบทั้งหมดเป็นแบคทีเรีย โดยแบคทีเรียที่จำแนกได้จากตะกอนดินจำนวน 8 ชนิด ดังนี้ คือ *Ralstoniapicketti*, *Paenibacillus polymyxa*, *Clostridium beijerinckii*, *Clostridium diolis*, *Clostridium acidisoli*, *Clostridium acidotolerans*, *Clostridium drakei* และเชื้อ *Bacillus subtilis*



ภาพที่ 4.6 แสดงดีเอ็นเอขนาด 1600 กิโลเบสของ 16S rDNA ในเลนที่ 1 คือดีเอ็นเอของจุลินทรีย์สกัดได้จาก ตะกอนดินหมายเลข 5 และในเลนที่ 3 คือดีเอ็นเอของจุลินทรีย์สกัดได้จากตะกอนดินหมายเลข 9

แต่เพื่อแยกชนิดของดีเอ็นเอในทรีไฟอิงแบคทีเรีย จึงมีการดัดแปลงสูตรอาหารที่ใช้ในการคัดแยกเพื่อให้มีความเหมาะสมกับการคัดแยกเฉพาะดีเอ็นเอในทรีไฟอิงแบคทีเรียเท่านั้น โดยปรับสูตรอาหารเป็น Nitrate broth เพื่อความสามารถในการรีดิวซ์ไนเตรด ก่อนการทดสอบความสามารถในการใช้ PAHs เป็นแหล่งคาร์บอน โดยเลี้ยงในอาหารสูตร MSM mineral medium และให้ 200 ppm Naphthalene, Phenanthrene, Pyrene และ Benzo[a]pyrene เป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าแบคทีเรียที่คัดแยกได้เป็นดีเอ็นเอในทรีไฟอิงแบคทีเรีย 8 ไอโซเลต โดยความสามารถในการรีดิวซ์สารประกอบไนเตรดไปเป็น N_2 ได้ทั้งหมด และหลังจากการวิเคราะห์ลำดับเบสในส่วนอนุรักษ์ คือ 16S rDNA แล้ว พบว่าแบคทีเรียที่พบในกลุ่มนี้ คือ *Enterococcus faecalis*, *Paenibacillus macerans*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus tequilensis*, *Proteus mirabilis* และ *Enterobacter asburiae* ซึ่งทั้งหมดนี้พบในตะกอนดินได้ทะเลที่มีความลึกแตกต่างกัน เช่น *Bacillus subtilis* พบในตะกอนดินได้ทะเลที่มีความลึก 30.5 เมตร *Proteus mirabilis* พบในตะกอนดินได้ทะเลที่มีความลึก 16.8 เมตร *Enterococcus faecalis* และ *Paenibacillus macerans* พบในตะกอนดินได้ทะเลที่มีความลึก 19.5 เมตร ส่วน *Enterobacter asburiae* พบในตะกอนดินได้ทะเลที่มีความลึก 4.5 เมตร และทั้งหมดจัดเป็นแบคทีเรียไร้อากาศ (anaerobic bacteria) แสดงในตารางที่ 4.13

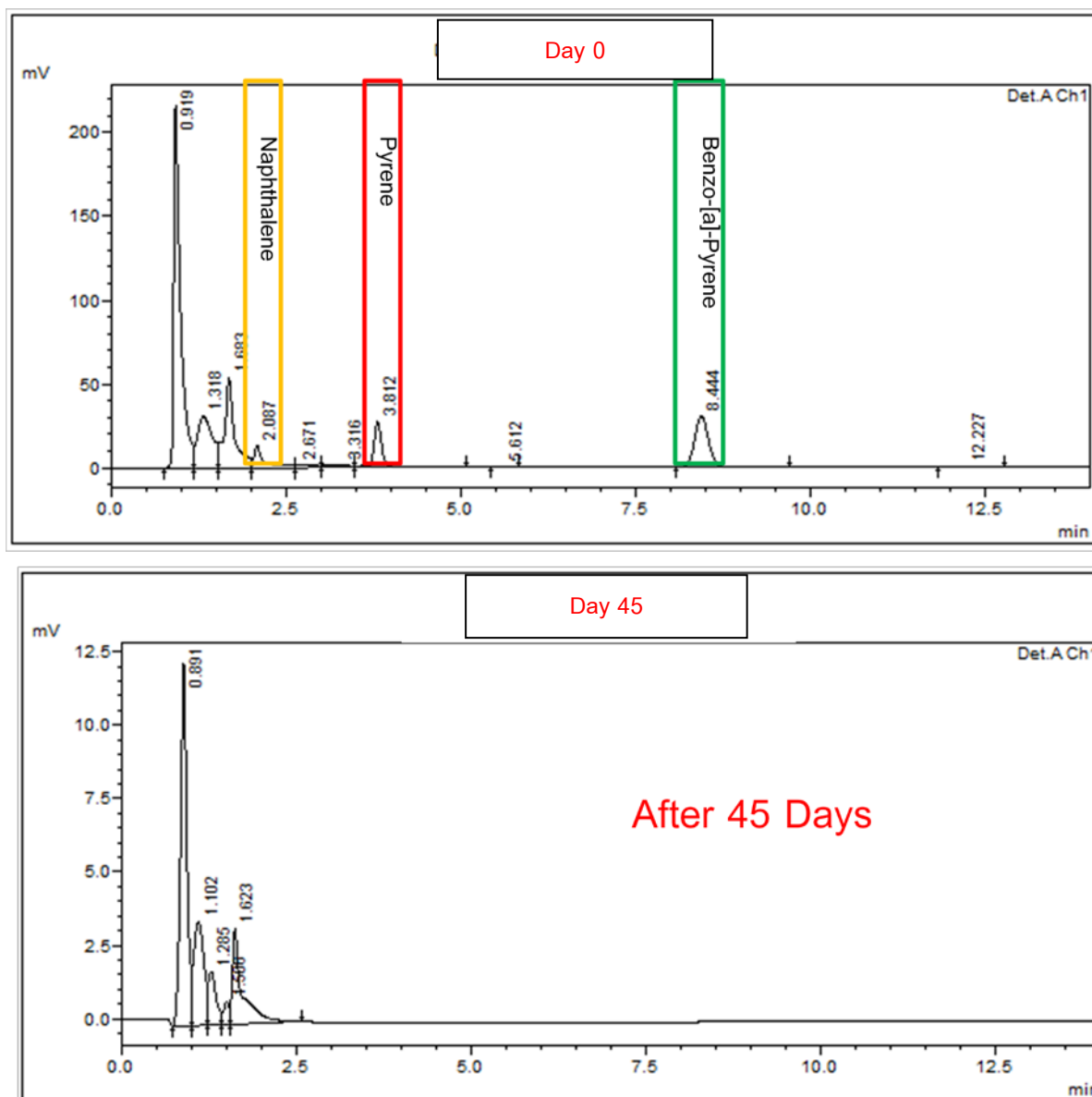
ดีเอ็นเอในทรีไฟอิงแบคทีเรียที่ได้จะถูกเก็บรักษาในสภาพที่เหมาะสมเพื่อนำไปใช้ทดสอบความสามารถในการย่อยสลาย สารประกอบ PAHs ต่อไป

ตารางที่ 4.13 ชนิดของดีไนทรีฟอยิ่งแบคทีเรีย ที่มีความสามารถในการใช้สารประกอบโพลีไซคลิก
แอโรมาติกไฮโดรคาร์บอนเป็นแหล่งคาร์บอนในการเจริญได้ ที่คัดแยกได้จากตะกอน
ใต้ทะเลจากจุดพิภักที่กำหนด

Isolation code	Sampling area	Depth (m)	Species identified	Acc.Number (GenBank)
B3/1	station 15	19.5	<i>Enterococcus faecalis</i>	JX975422.1
B3/2	station 15	19.5	<i>Paenibacillus macerans</i>	AM406669.1
A2/2	station 2	10.0	<i>Bacillus subtilis</i>	KC441812.1
A2/3	station 2	10.0	<i>Bacillus tequilensis</i>	JN999833.1
A7/1	station 7	30.5	<i>Bacillus subtilis</i>	JQ398853.1
A7/2	station 7	30.5	<i>Bacillus subtilis</i>	JQ398853.1
A9/1	station 9	16.8	<i>Proteus mirabilis</i>	KC456557.1
A12/2	station 12	4.5	<i>Enterobacter asburiae</i>	JQ659607.1

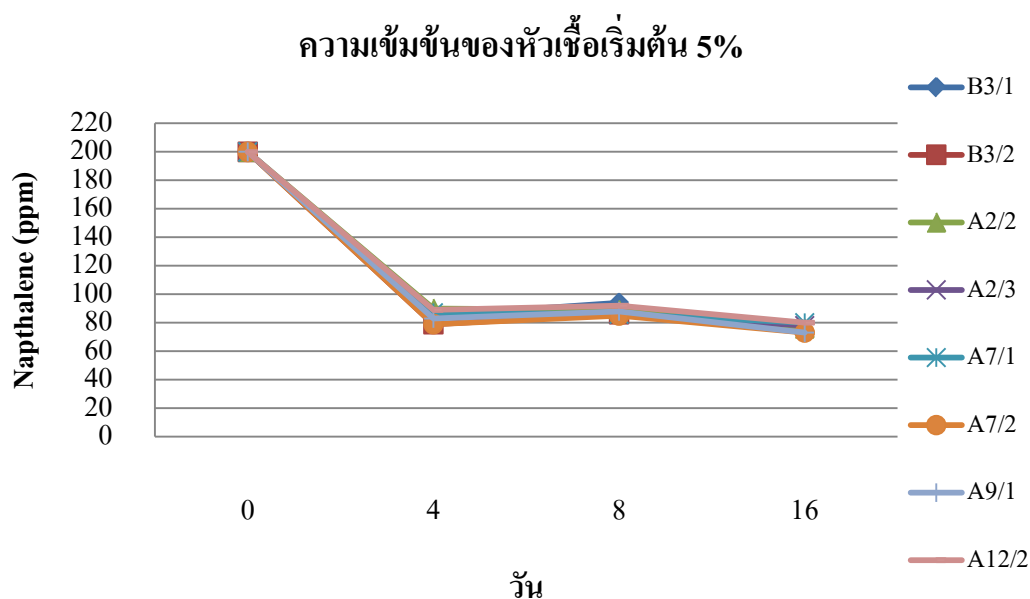
4.4.5. ความสามารถของดีไนทรีฟอยิ่งแบคทีเรียในการย่อยสลายสารประกอบ PAHs

จากการทดสอบความสามารถของดีไนทรีฟอยิ่งแบคทีเรียทั้ง 8 ไอโซเลตที่แยกได้จากตะกอนดินจากเกาะสีชังที่มีต่อการย่อยสลายสารประกอบโพลีไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนที่มีจำนวนองค์ประกอบของวงเบนซีนต่าง ๆ กัน ได้แก่ Naphthalene (2 วง), Phenanthrene (3 วง), Pyrene (4 วง), และ Benzo[a]pyrene (5 วง) โดยทำการวิเคราะห์ปริมาณ PAHs ที่เหลืออยู่ในอาหารด้วยเครื่อง HPLC ที่ใช้ UV detector พบว่าเมื่อเวลาผ่านไป 45 วัน ตรวจไม่พบปริมาณ PAHs เหลืออยู่ในอาหารเลย เมื่อเปรียบเทียบกับ control ที่ไม่ใช้ดีไนทรีฟอยิ่งแบคทีเรีย ผลการวิเคราะห์ปริมาณ PAHs ที่เหลืออยู่ด้วยเครื่อง HPLC แสดงในภาพที่ 4.7



ภาพที่ 4.7 ปริมาณPAHsที่เหลืออยู่จากการวิเคราะห์ด้วยเครื่องHPLC เมื่อเวลาเริ่มต้นและเมื่อเวลาผ่านไป 45 วัน

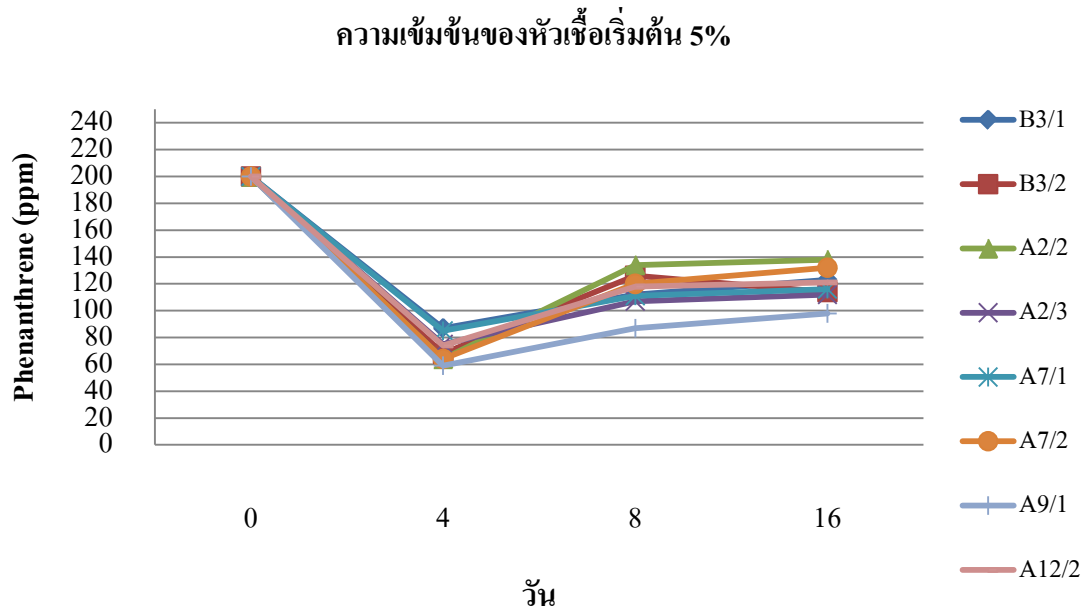
เมื่อพิจารณาความสามารถของดีโนทริไฟอิงแบคทีเรียในการย่อยสลาย PAHs ทั้ง 4 ชนิด คือ Naphthalene (2R), Phenanthrene (3R), Pyrene (4R) และ Benzo[a]pyrene (5R) ผลการศึกษาการย่อยสลายสารประกอบ PAHs ทั้ง 4 ชนิด เป็นเวลา 16 วัน โดยตรวจวิเคราะห์ปริมาณที่เหลืออยู่ของสารประกอบ PAHs ที่ทำการศึกษา ทั้งนี้สามารถแสดงในภาพที่ 4.8 เมื่อใช้ความเข้มข้นของหัวเชื้อเริ่มต้น 5% สำหรับการย่อยสลาย Naphthalene



ภาพที่ 4.8 แสดงความสัมพันธ์ของปริมาณ Naphthalene ต่อเวลา เมื่อใช้ความเข้มข้นหัวเชื้อเริ่มต้น 5%

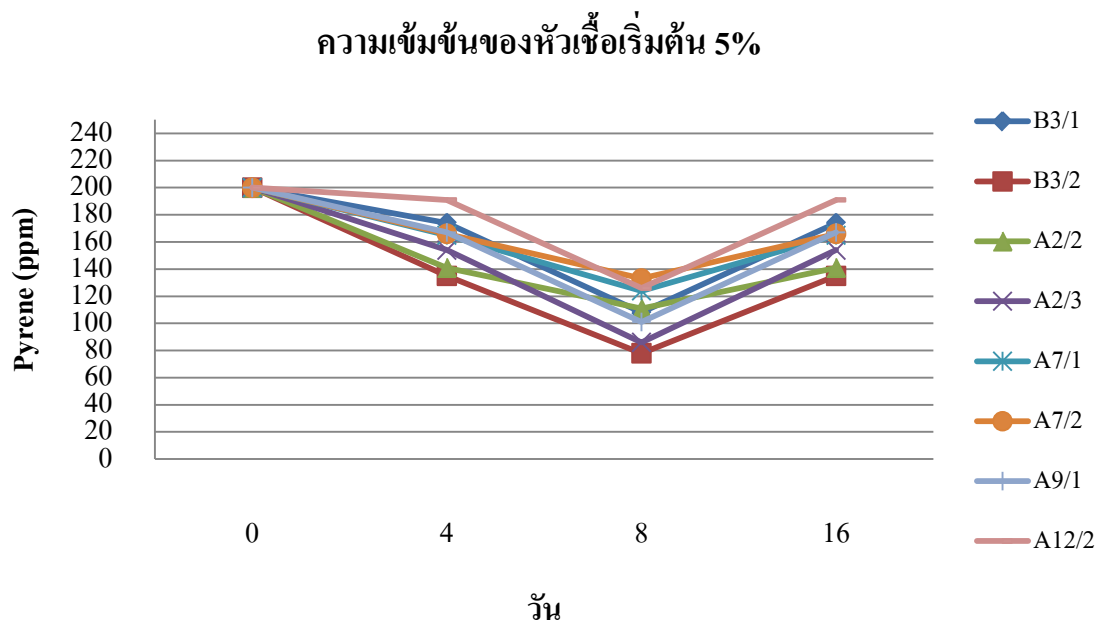
จากผลการทดลองพบว่า ปริมาณของ Naphthalene เมื่อเวลาผ่านไป มีค่าลดลง โดยพบการย่อยสลายได้มากกว่า 50% ไม่ว่าจะเป็นเชื้อแบคทีเรียไอโซเลตใดก็ตาม โดยไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของปริมาณการลดลงของ Naphthalene เมื่อใช้ความเข้มข้นหัวเชื้อเริ่มต้นที่ 5%

สำหรับผลการศึกษาการย่อยสลายสารประกอบ Phenanthrene เป็นเวลา 16 วัน สามารถแสดงในภาพที่ 4.9 เมื่อใช้ความเข้มข้นของเชื้อเริ่มต้น 5% โดยผลการศึกษาการย่อยสลายสารประกอบ Phenanthrene พบว่า เมื่อเวลาผ่านไป ปริมาณของ Phenanthrene มีค่าลดลง โดยพบการย่อยสลายเกิดได้มากกว่า 50% ไม่ว่าจะเป็นเชื้อแบคทีเรียไอโซเลตใดก็ตาม



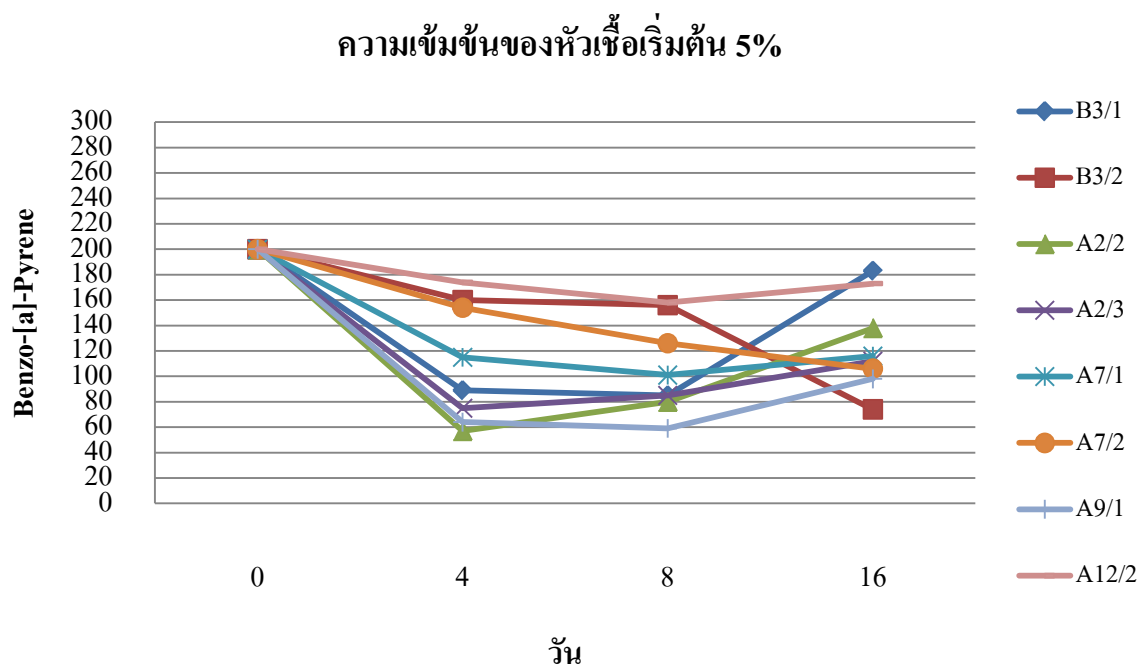
ภาพที่ 4.9 แสดงความสัมพันธ์ของปริมาณ Phenanthrene ต่อเวลา เมื่อใช้ความเข้มข้นหัวเชื้อเริ่มต้น 5%

เมื่อทำการศึกษาการย่อยสลายสารประกอบ Pyrene (4R) พบว่า เมื่อเวลาผ่านไป ปริมาณของ Pyrene มีค่าลดลงอย่างรวดเร็วเมื่อใช้ทั้ง 8 ไอโซเลต และพบบางไอโซเลตที่ย่อยสลาย Pyrene ได้อย่างดี โดยเฉพาะ ไอโซเลต B3/2 ผลการทดลองแสดงดัง ภาพที่ 4.10



ภาพที่ 4.10 แสดงความสัมพันธ์ของปริมาณ Pyrene ต่อเวลา เมื่อใช้ความเข้มข้นหัวเชื้อเริ่มต้น 5%

สำหรับผลการศึกษาการย่อยสลายสารประกอบ Benzo[a]pyrene เป็นเวลา 16 วัน สามารถแสดงในภาพที่ 4.11 ผลการทดลองพบว่า ปริมาณของ Benzo[a]pyrene เมื่อเวลาผ่านไป มีค่าลดลงและปริมาณการลดลงมีความแตกต่างกันอย่างชัดเจนเมื่อใช้เชื้อต่างชนิดกัน โดยพบการย่อยสลายได้มากกว่า 50% สำหรับปริมาณการลดลงของ Benzo[a]pyrene มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ



ภาพที่ 4.11 แสดงความสัมพันธ์ของปริมาณ Benzo[a]pyrene ต่อเวลาเมื่อใช้ความเข้มข้นหัวเชื้อเริ่มต้น 5%

ดังผลการทดลองที่กล่าวแล้ว สำหรับประสิทธิภาพการย่อยสลายสารประกอบ PAHs ทั้ง 4 ชนิดคือ Naphthalene, Phenanthrene, Pyrene, และ Benzo[a]pyrene เป็นเวลา 16 วัน พบสารประกอบ PAHs จะถูกย่อยสลายไปเมื่อใส่เชื้อดีไนทรีไฟอิงแบคทีเรียในปริมาณที่แตกต่างกัน แสดงในตารางที่ 4.14 ทั้งนี้โดยเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่ใส่ดีไนทรีไฟอิงแบคทีเรีย ซึ่งไม่พบการลดลงของสารประกอบ PAHs ซึ่งแสดงให้เห็นว่าดีไนทรีไฟอิงแบคทีเรียมีความสามารถในการย่อยสลายสารประกอบโพลีไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนที่มีจำนวนองค์ประกอบของวงเบนซีนต่างๆกันได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยเฉพาะ Naphthalene ซึ่งเป็นสารประกอบ PAHs ตัวที่เล็กที่สุด ดีไนทรีไฟอิงแบคทีเรีย สามารถย่อยสลายได้มากกว่า 60 % ส่วน pyrene พบดีไนทรีไฟอิงแบคทีเรียบางตัวที่สามารถย่อยสลายได้ประสิทธิภาพอยู่ระหว่าง 50 % ถึง 60 % คือ *E. faecalis*, *P. macerans*, *B. tequilensis*, และ *B. subtilis* สำหรับ Benzo[a]pyrene นั้นมีดีไนทรีไฟอิงแบคทีเรียชนิด *P. macerans* และ *P. mirabilis* ที่มีประสิทธิภาพสามารถย่อยสลายได้ 60 % และ 50 % ตามลำดับ ส่วน Phenanthrene นั้นมีดีไนทรีไฟอิงแบคทีเรีย คือ *P. mirabilis* ที่มีความสามารถในการย่อยสลายได้ 50% ส่วนดีไนทรีไฟอิงแบคทีเรีย ตัวอื่นๆ พบความสามารถในการย่อยสลายได้น้อยกว่า 50%

ตารางที่ 4.14 ความสามารถในการใช้โพลีไซคลิกแอโรมาติกไฮโดรคาร์บอนของดีไนทริไฟอิงแบคทีเรียแต่ละชนิด หลังจากการบ่มในอาหารที่มี PAHs 200 ppm ที่ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 16 วัน

Isolation code	Samnling area	Species	PAHs degradation ability	Amonth of PAHs elimination (nm) within 16 days in 5% inoculation
B3/1	station 15	<i>E. faecalis</i>	naphthalene	122
			phenanthrene	77
			pyrene	119
			benzo[a]pyrene	17
B3/2	station 15	<i>P. macerans</i>	naphthalene	125
			phenanthrene	86
			pyrene	122
			benzo[a]pyrene	126
A2/2	station 2	<i>B. subtilis</i>	naphthalene	124
			phenanthrene	62
			pyrene	89
			benzo[a]pyrene	62
A2/3	station 2	<i>B. tequilensis</i>	naphthalene	122
			phenanthrene	88
			pyrene	114
			benzo[a]pyrene	88
A7/1	station 7	<i>B. subtilis</i>	naphthalene	120
			phenanthrene	84
			pyrene	114
			benzo[a]pyrene	88
A7/2	station 7	<i>B. subtilis</i>	naphthalene	127
			phenanthrene	68
			pyrene	67
			benzo[a]pyrene	94

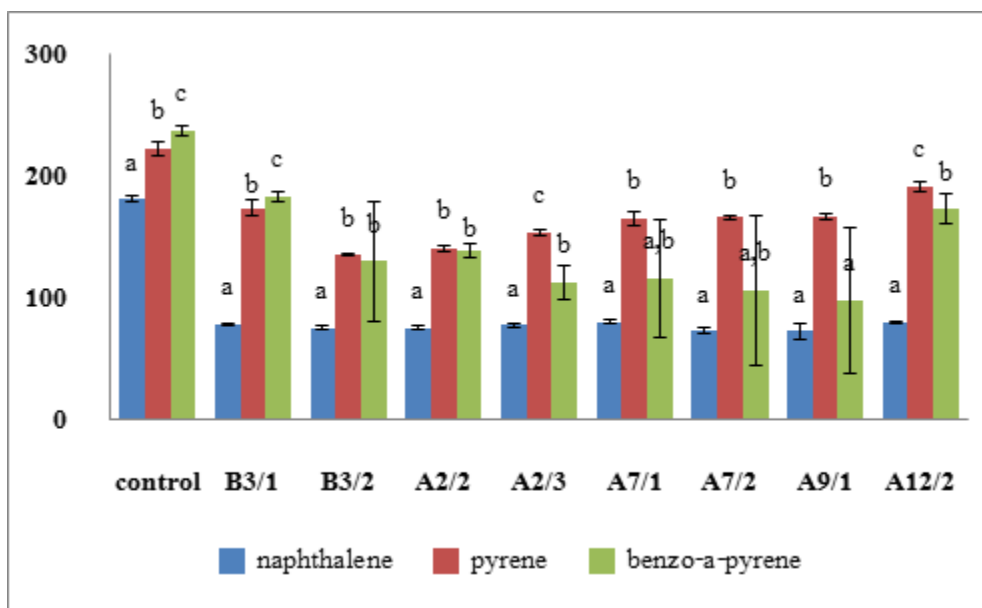
ตารางที่ 4.14 (ต่อ)

Isolation code	Samnling area	Species	PAHs degradation ability	Amonth of PAHs elimination (nm) within 16 days in 5% inoculation
A9/1	station 9	<i>P. mirabilis</i>	napthalene	127
			phenanthrene	102
			pyrene	99
			benzo[a]pyrene	102
A12/2	station 12	<i>E. asburiae</i>	napthalene	120
			phenanthrene	79
			pyrene	74
			benzo[a]pyrene	27

ตารางที่ 4.15 ปริมาณ PAHs ที่เหลืออยู่เมื่อเวลาผ่านไป 16 วัน ของแบคทีเรียดีไนทริไฟอิงที่คัดแยกได้จากตะกอนดินใต้ทะเล เมื่อเลี้ยงในอาหารสูตร MSM ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็ว 160 รอบต่อนาที

	ค่าเฉลี่ย $\pm$ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (ppm)		
	Naphthalene	pyrene	benzo[a]pyrene
Control	180.67 $\pm$ 2.49 ^a	222.00 $\pm$ 6.24 ^b	237.00 $\pm$ 4.58 ^c
B3/1	78.00 $\pm$ 1.00 ^a	173.67 $\pm$ 6.51 ^b	183.33 $\pm$ 4.04 ^c
B3/2	75.33 $\pm$ 1.53 ^a	135.00 $\pm$ 1.00 ^b	130.00 $\pm$ 48.54 ^b
A2/2	75.67 $\pm$ 1.15 ^a	140.67 $\pm$ 3.06 ^b	138.33 $\pm$ 5.69 ^b
A2/3	77.67 $\pm$ 2.08 ^a	154.00 $\pm$ 2.65 ^c	112.33 $\pm$ 14.15 ^b
A7/1	80.33 $\pm$ 1.53 ^a	164.67 $\pm$ 5.86 ^b	116.33 $\pm$ 48.13 ^{a,b}
A7/2	73.00 $\pm$ 2.65 ^a	166.00 $\pm$ 1.00 ^b	106.33 $\pm$ 61.86 ^{a,b}
A9/1	73.00 $\pm$ 6.08 ^a	167.33 $\pm$ 2.31 ^b	97.67 $\pm$ 59.65 ^a
A12/2	80.00 $\pm$ 1.00 ^a	191.00 $\pm$ 3.61 ^c	172.67 $\pm$ 12.01 ^b

*ค่าเฉลี่ย $\pm$ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน จากการทดลอง 3 ซ้ำ ตัวอักษรยกที่ต่างกันในแนวดิ่งแสดงผลการทดลองที่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($P \leq 0.05$)



ภาพที่ 4.12 เปรียบเทียบปริมาณ PAHs ที่เหลืออยู่เมื่อเวลาผ่านไป 16 วัน ของแบคทีเรียดีไนทรีไฟอิงที่คัดแยกได้จากตะกอนดินใต้ทะเล เมื่อเลี้ยงในอาหารสูตร MSM ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็ว 160 รอบต่อนาที

4.5 อภิปรายและวิจารณ์ผล

ผลการวิจัยของการศึกษารั้งนี้พบว่า แบคทีเรียที่สามารถคัดแยกจากตะกอนดินใต้ทะเลมี 63 ไอโซเลต มี 8 ไอโซเลต ที่พบใน 5 สถานี (สถานีที่ 2, 7, 9, 12, 15) ซึ่งเป็นแบคทีเรีย 6 ชนิด คือ *Enterococcus faecalis*, *Paenibacillus macerans*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus tequilensis*, *Bacillus subtilis*, *Proteus mirabilis* และ *Enterobacter asburiae* ซึ่งทั้งหมดนี้พบในตะกอนดินใต้ทะเลที่มีความลึกแตกต่างกัน (10.0, 31.6, 16.8, 18.3 และ 5.7 เมตร ตามลำดับ) และทั้งหมดจัดเป็นแบคทีเรียไร้อากาศ (anaerobic bacteria) โดยเป็นดีไนทรีไฟอิงแบคทีเรียทั้ง 8 ไอโซเลต ทั้งนี้ มีลำดับนิวคลีโอไทด์คล้ายคลึงกับฐานข้อมูล Genbank 96% และมีการประเมินประสิทธิภาพการย่อยสลาย 200 ppm Naphthalene, Phenanthrene, Pyrene และ Benzo[a]pyrene ด้วยเทคนิคการวิเคราะห์ด้วย HPLC พบว่าแบคทีเรียทุกไอโซเลตสามารถย่อยสลาย Naphthalene หลังจากการบ่มเป็นเวลา 16 วัน โดยมีความเข้มข้นของ Naphthalene ลดลง 100-120 ppm ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยก่อนหน้าของ Lu et al., (2010) ที่พบว่าแบคทีเรียกลุ่มดีไนทรีไฟอิงแบคทีเรีย มีความสามารถในการย่อยสลายประกอบโพลิไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนชนิด Naphthalene ได้อย่างมีประสิทธิภาพ

สำหรับแบคทีเรียดีไนทรีไฟอิงที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายดีที่สุดที่ได้จากการทดลองนี้คือ ไอโซเลตที่ A9/1 ซึ่งเป็นแบคทีเรีย *P. mirabilis* โดยสามารถย่อยสลาย PAHs ชนิดต่างๆ ได้แก่ Naphthalene, Phenanthrene, Pyrene และ Benzo[a]pyrene ที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 200 ppm จนลดลงเหลือ 73, 98, 101 และ

98 ppm ตามลำดับ ซึ่งตรงกับรายงานของ Taoufik et al., (2004) ที่ระบุว่า *P. mirabilis* มีความสามารถในการย่อยสลาย PAHs ชนิด Benzene Toluene และ Napthalene เป็นแหล่งคาร์บอนได้ และสอดคล้องกับงานวิจัยก่อนหน้านี้ของ Ceyman (2012) เช่นกันที่พบว่าแบคทีเรียชนิด *Proteus* sp. มีความสามารถในการย่อยสลายประกอบโพลีไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนชนิด Pyrene ได้ ส่วนไอโซเลตที่ B3/2 ซึ่งเป็นแบคทีเรีย *P. macerans* เช่นเดียวกันที่มีความสามารถในการลดความเข้มข้นของ 200 ppm Benzo[a]pyrene ในอาหารเหลือจาก 200 ppm ลดลงเหลือ 74 ppm

นอกจากนี้ยังมีงานวิจัยหลายชิ้นระบุตรงกับผลการทดลองนี้ที่ว่า *B. subtilis* มีความสามารถในการย่อยสลาย PAHs ได้ *B. subtilis* เป็นจุลินทรีย์ที่เจริญได้ทั้งในภาวะที่มีและไม่มีอากาศ โดย Bayoumi et al., (2009) ได้ทำการศึกษาแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลาย PAHs ในตัวอย่างดินที่มีการปนเปื้อนน้ำมันในบริเวณโรงกลั่นน้ำมัน และพบว่ามี 6 สายพันธุ์ที่สามารถย่อยสลายน้ำมันได้ แบคทีเรียดังกล่าวอยู่ในกลุ่มของ *Bacillus firmus* APIS272, *Bacillus licheniformis* APIS473, *Bacillus subtilis* SBS26, *Burkholderia cepacia* DAFS11, *Micrococcus lylae* SBS661 และ *Pseudomonas alcaligenes* DAFS331 โดยเป็นแบคทีเรียในกลุ่มของ *Bacillus* จำนวน 3 สายพันธุ์ โดย *B. firmus* APIS272 สามารถย่อยสลาย Acenaphthylene Anthracene และ Benzo[b]fluoranthrene ได้อย่างสมบูรณ์ โดยใช้เวลา 21 วัน ภายใต้ mesophilic condition

ผลการถูกย่อยสลายของ PAHs โดยแบคทีเรียดีในทรีฟโอฟอิงจากการทดลองพบว่าจำนวนวงเบนซีนมีผลต่อการถูกย่อยสลาย โดย PAHs ที่มีองค์ประกอบเป็นจำนวนวงเบนซีนที่มากกว่าจะถูกย่อยสลายได้ช้า และเห็นได้ว่า Napthalene ที่มีจำนวนวงเบนซีน 2 วง ถูกย่อยสลายได้ดีกว่า Phenanthrene, Pyrene และ Benzo[a]pyrene ที่มีวงเบนซีนเป็นองค์ประกอบจำนวน 3 วง 4 วง และ 5 วง ตามลำดับ สอดคล้องกับงานของ Mrozik et al., (2003) และ Oleszczuk and Baran (2003) ที่กล่าวว่าจำนวนวงเบนซีนและน้ำหนักโมเลกุลที่เพิ่มมากขึ้นนั้นส่งผลต่อความสามารถในการละลายน้ำและความทนทานต่อการถูกย่อยสลายของ PAHs

แต่ที่เห็นชัดเจนคือ แบคทีเรียที่มีความสามารถในการลดปริมาณ PAHs ทุกชนิดที่นำมาทดสอบสามารถเพิ่มความสามารถในการละลายของ PAHs ทุกชนิด โดยเฉพาะชนิดที่มีโครงสร้างของวงเบนซีนหลายวงเช่น 5 วง ซึ่งสามารถสังเกตเห็นได้ด้วยตาเปล่าว่าตะกอนของ PAHs ที่ตกตะกอนอยู่ข้างใต้ขวดหายไปหลังจากการเลี้ยงบ่มด้วยแบคทีเรียที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่ 8 วัน ทุกไอโซเลตแสดงความสามารถในการย่อย 200 ppm Pyrene ได้ดีที่สุด คือ 140 ppm ที่เวลา 8 วัน อย่างไรก็ตาม ความสามารถในการใช้ Benzo[a]pyrene ยังไม่สามารถสรุปผลที่ชัดเจนได้ เช่น ไอโซเลต B3-1 ที่พบปริมาณ Benzo[a]pyrene ไม่คงที่ อาจเนื่องมาจากคุณสมบัติของแบคทีเรียเอง หรือปัญหาการละลายของ Benzo[a]pyrene ในอาหารที่ไม่สม่ำเสมอ ส่งผลให้การวิเคราะห์มีข้อจำกัดก็ว่าได้

4.6 ข้อเสนอแนะ

1. การศึกษาการย่อยสลายสารประกอบ PAHs ด้วยจุลินทรีย์ผสม (Mixed culture) ที่คัดแยกได้ อาจทำให้การย่อยสลายเกิดได้เร็วและมากยิ่งขึ้น
2. หากสามารถนำผลการทดลองในห้องปฏิบัติการไปประยุกต์ใช้ในพื้นที่ที่ปนเปื้อนสารประกอบโพลีไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน จะทำให้งานมีความสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น แต่อย่างไรก็ตาม ยังมีปัจจัยอื่นๆอีกมาก ที่ส่งผลต่อประสิทธิภาพการย่อยสลายสารประกอบนี้ จึงควรมีการศึกษาเพิ่มเติมต่อไป

4.7 บรรณานุกรม

- เกื้อกาญจน์ สมานวิฑูริคุณ. 2546. การตรวจสอบยีนไนโตรรีดักเตสในดีไนทริไฟอิงแบคทีเรียโดยเทคนิคพีซีอาร์-อาร์เอฟแอลพี. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพฯ. 119 หน้า.
- กรมโรงงานอุตสาหกรรม 2545. ดำราระบบบำบัดมลพิษน้ำ พิมพ์ครั้งที่ 1 กรุงเทพมหานคร: สมาคมวิศวกรรมสิ่งแวดล้อมแห่งประเทศไทย.
- เจษฎา โพธิรัตน์ 2541. การคัดเลือกเชื้อดีไนทริไฟอิงแบคทีเรียเพื่อลดไนเตรดในน้ำ วิทยานิพนธ์ ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- ธงชัย พรธนะสวัสดิ์ 2554. การกำจัดไนโตรเจนและฟอสฟอรัสทางชีวภาพ พิมพ์ครั้งที่ 1 กรุงเทพมหานคร: สมาคมวิศวกรรมสิ่งแวดล้อมแห่งประเทศไทย.
- สมศักดิ์ วัณ. 2524. จุลินทรีย์และกิจกรรมในดิน ภาควิชาปฐพีวิทยา คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ 193 หน้า
- สิรินันท์ ศรีดำ 2552. การคัดเลือกแบคทีเรียดีไนทริไฟอิงที่มีประสิทธิภาพเพื่อการบำบัดไนเตรดในน้ำทิ้งจากการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง
- แหล่งข้อมูล: <http://www.pt.tsu.ac.th/rdi/ConAll/POSTER19/P17.pdf> (2 มิถุนายน 2554)
- Bayoumi, R. A. 2009. Bacterial bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons in heavy oil contaminated soil, J. Appl. Sci. Res, 5(2): 197-211.
- Beishir, L., 1996. Microbiology I practice: A self-instructional laboratory course, 6th ed, Harper Collins College Publisher, New York, pp 318-319.
- Bitton, G. 1999. Wastewater Microbiology, 2nd ed, New York: Wiley-Liss, Inc.
- Boonyatumanond, R., Wattayakorn, G., Togo, A., and Takada, H., 2006. Distribution and origins of polycyclic aromatic hydrocarbon (PAHs) in riverine, estuarine, and marine sediments in Thailand, Marine Pollution Bulletin, 52: 942-956.
- Bradley, P.M., Aelion, C.M. and Vroblecky, D.A., 1992. Influence of environmental factors on denitrification in sediment contaminated with JP-4 Jet Fuel, Ground Water, 30: 843-848.

- Ceyman, N., 2012. Biodegradation of pyrene by a newly isolated *Proteus vulgaris*, Scientific Research and Essay, 7: 66-77.
- Coates, J. D., Woodward, J., Allen, J., Philp, P., and Lovley, D. R. 1997. Anaerobic degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons and alkane in petroleum-contaminated marine harbor sediment, Applied and Environmental Microbiology, 97: 3589-3593
- Delwiche, C.C. 1981. Denitrification, Nitrification and Atmospheric Nitrous Oxide, New York: John Wiley and Sons, Inc.
- Fukui, M., Harms, G., Rabus, R., Schramm, A., Widdel, F., Zengler, K., Boreham C., and Wilkes, H. 1999. Anaerobic degradation of oil hydrocarbons by sulfate-reducing and nitrate-reducing bacteria, Microbial Biosystems (Online): New Frontiers Proceedings of the 8th International Symposium on Microbial Ecology Bel.
- Available at: <http://plato.acadiau.ca/isme/Symposium12/fukui.PDF> (June 3, 2011).
- Hall, J. B. 1978. Nitrate-reducing bacteria, pp. 296-298. Cited in Schlessinger, D., ed. 1978. Microbiology, USA: American society for microbiology.
- Haner, A., Hohner, P., and Zeyer, J. 1995. Degradation of p-xylene by a denitrifying enrichment culture, Applied and Environmental Microbiology, 61(8): 3185-3188.
- Harayama, S., Kishira, H., Kasai, Y., and Shutsubo, K. 1999. Petroleum Biodegradation in Marine Environments, Journal of Molecular Microbiology Biotechnology, 1: 63-70.
- Harvey, R.G. 1997. Polycyclic Aromatic Hydrocarbon, Wiley-VCH, Inc, New York, USA. p 667.
- Head, I. M., and Swannell, R. P. J., 1999. Bioremediation of petroleum hydrocarbon contaminants in marine habitats, Current Opinion in Biotechnology, 10: 234-239.
- Kanary, R. A., and Harayama, S. 2000. Minireview: Biodegradation of high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbon by bacteria, Journal of Bacteriology, 182: 2059-2067.
- Lu, X., Zhang, T., Fang, H. H-P., Leung, K. M. Y., and Zhang, G. 2010. Biodegradation of Naphthalene by enriched marine denitrifying bacteria, International Biodeterioration & Biodegradation, 65: 204-211.
- Mille, G., Asia, L., Guillianio, M., Malleret, L., and Doumeng, P. 2007. Hydrocarbons in coastal sediments from the Mediteranean Sea (Gulf of Fos area, France), Marine Pollution Bulletin, 54(5): 566- 575.
- Mrozik, A., Piotrowska, Z., and Labuzek, S. 2003. Review Bacterial degradation and bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons, Polish Journal of Environmental Studies, 12: 15-25.
- Oleszczuk, P., and Baran, S. 2003. Degradation of Individual Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) in Soil Polluted with Aircraft Fuel, Polish Journal of Environmental Studies, 12: 431-437.

- Payne, W.J. 1973. Reduction of nitrogenous oxides by microorganisms, *Bacteriology Review*, 37: 409-452.
- Rakhimova, E.R., Osipova, A.L. and Zaripova, S.K. 2004. Purification of soil from oil pollutants with the use of denitrifying hydrocarbon-oxidizing microorganisms, *Applied Biochemistry and Microbiology*, 40: 563–567.
- Roger, K. 1982. Denitrification, *Microbiological Reviews*, 46: 43-70.
- Shi, H.P. and Lee, C.M. 2006. Combining anoxic denitrifying ability with aerobic–anoxic phosphorus-removal examinations to screen denitrifying phosphorus-removing bacteria, *International Biodeterioration and Biodegradation*, 57: 121–128.
- Shuttleworth, K.L., and Cerniglia, C.E. 1995. Environmental aspects of PAH biodegradation, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 54: 291-302.
- Theerachat, M., Virunanon, C., Chulalaksananukul, S., Sinbuathong N. and Chulalaksananukul, W., 2011. *NirK* and *nirS* nitrite reductase genes from non-agricultural forest soil bacteria in Thailand, *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 27: 999-1003.
- Taoufik, J., Zeroual, Y., Moutaouakkil, A., Moussaid, S., Dzairi, F. Z., Talbi, M., Hammoumi, A., Belghmi, K., Lee, K., Loutfi, M., and Blaghen, M., 2004. Aromatic hydrocarbons removal by immobilized bacteria (*Pseudomonas* sp., *Staphylococcus* sp.) in fluidized bed bioreactor, *Annals of Microbiol*, 54(2): 189-200.
- Virunanon, C., Chantaroopamai, S., Denduangbaripant, J., and Chulalaksananukul, W., 2008. Solventogenic-cellulolytic clostridia from 4-step-screening process in agricultural waste and cow intestinal tract, *Anaerobe*, 14(2): 109-117.

ภาคผนวก

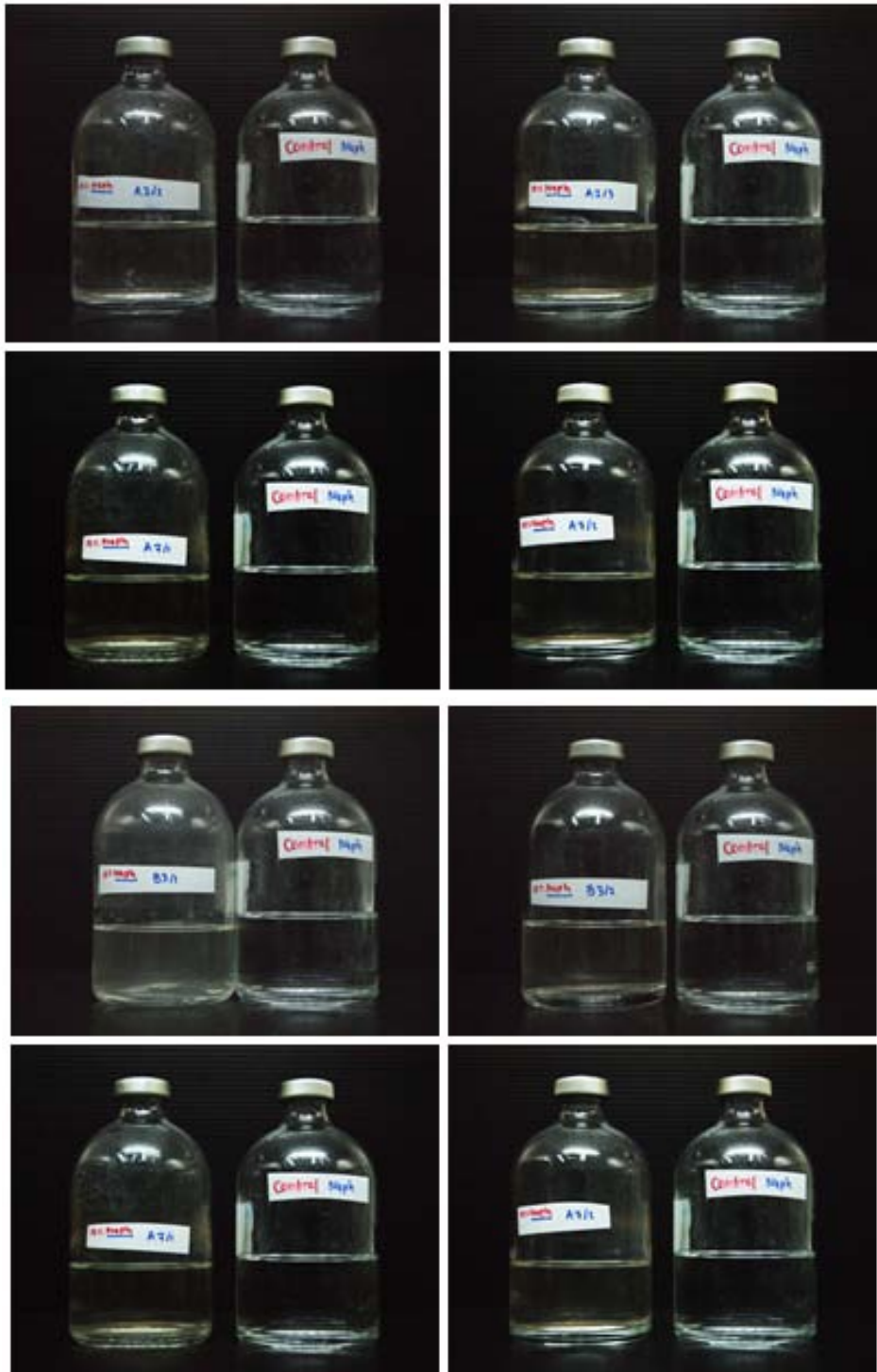
ภาคผนวก ก. ความสามารถในการละลายของสารประกอบ PAHs

สารประกอบ PAHs ทั้ง 4 ชนิด คือ Naphthalene, Phenanthrene, Pyrene และ Benzo[a]pyrene สามารถละลายน้ำได้ค่อนข้างน้อย จึงเกิดตะกอนที่ก้นภาชนะในอาหารเลี้ยงเชื้อ แสดงดังภาพที่ ก-1

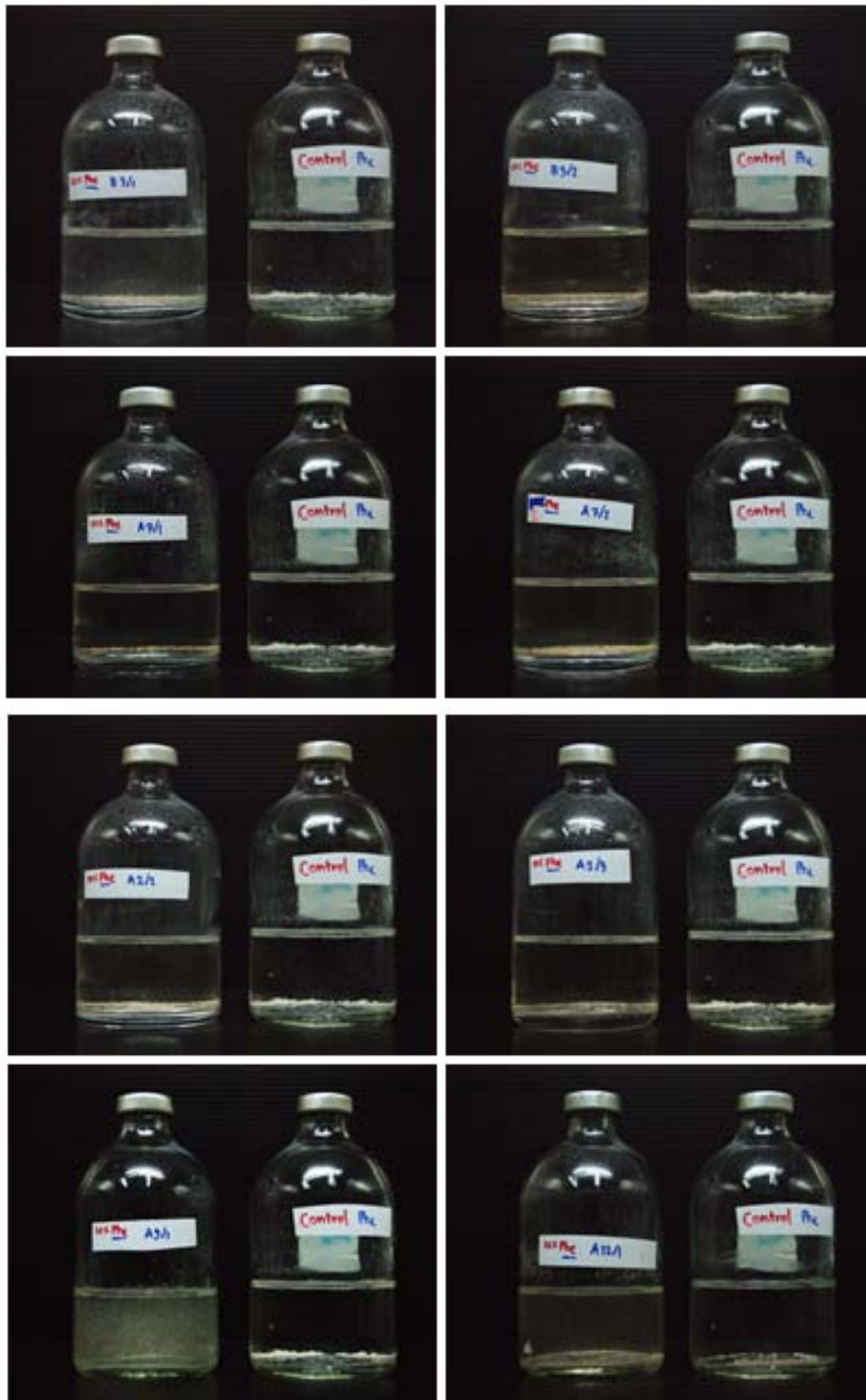
การละลายของ PAHs ทั้ง 4 ชนิดที่ความเข้มข้น 200 ppm ในอาหารเลี้ยงเชื้อ เมื่อมีการลงเชื้อที่ความเข้มข้น 5% เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่ใส่เชื้อ แสดงดังภาพที่ 4.12 ถึง 4.16



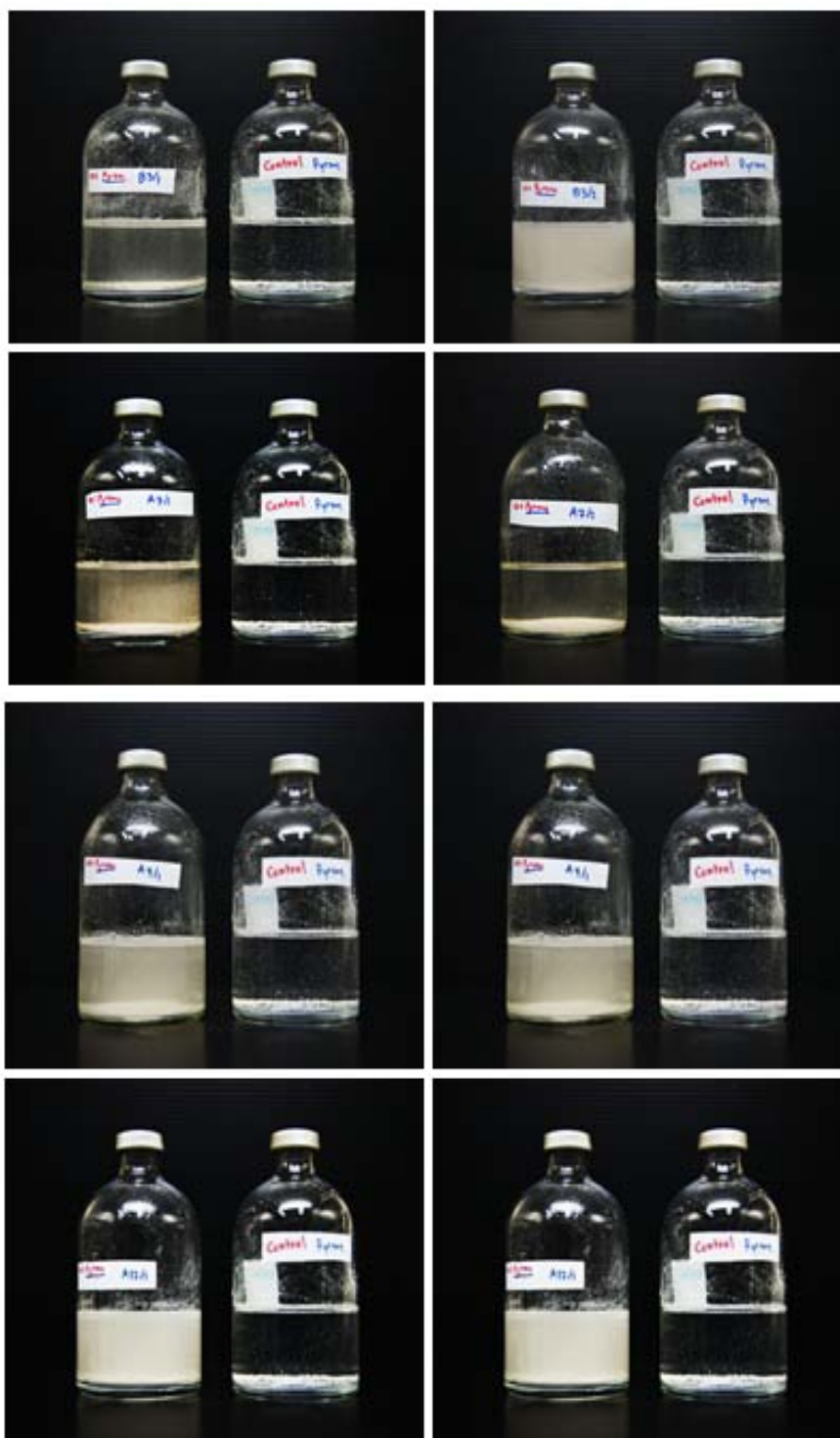
ภาพที่ 4.13 ความสามารถในการละลายของ PAHs ทั้ง 4 ชนิดคือ Naphthalene, Phenanthrene, Pyrene และ Benzo[a]pyrene ที่ความเข้มข้น 200 ppm ในอาหารเลี้ยงเชื้อ



ภาพที่ 4.14 สภาพการละลายของ PAHs ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้แหล่งคาร์บอนคือ Naphthalene ที่ความเข้มข้น 200 ppm เมื่อมีการลงเชื้อที่ความเข้มข้น 5% (ซ้าย) เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่ใส่เชื้อ (ขวา) เป็นเวลา 8 วัน ที่ 37 องศาเซลเซียส



ภาพที่ 4.15 สภาพการละลายของ PAHs ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้แหล่งคาร์บอน คือ Phenanthrene ที่ความเข้มข้น 200 ppm เมื่อมีการลงเชื้อที่ความเข้มข้น 5% (ซ้าย) เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่ใส่เชื้อ (ขวา) เป็นเวลา 8 วัน ที่ 37 องศาเซลเซียส



ภาพที่ 4.16 สภาพการละลายของ PAHs ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้แหล่งคาร์บอนคือ Pyrene ที่ความเข้มข้น 200 ppm เมื่อมีการลงเชื้อที่ความเข้มข้น 5% (ซ้าย) เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่ใส่เชื้อ (ขวา) เป็นเวลา 8 วัน ที่ 37 องศาเซลเซียส



ภาพที่ 4.17 สภาพการละลายของ PAHs ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้แหล่งคาร์บอนคือ Benzo[a]pyrene ที่ความเข้มข้น 200 ppm เมื่อมีการลงเชื้อที่ความเข้มข้น 5% (ซ้าย) เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่ได้เชื้อ (ขวา) เป็นเวลา 8 วัน ที่ 37 องศาเซลเซียส

ภาคผนวก ข. ผลงานทางวิชาการของโครงการที่เผยแพร่แล้ว

1. เสนอผลงานเรื่อง **Screening of Anaerobic Bacteria for Polycyclic Aromatic Hydrocarbons Degradation from Marine Sediment** ตีพิมพ์ใน International Proceeding of the 24th Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology “Renewable Energy and Global Care”, November 2012. Number P-II-04 234.

The 24th Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology
“Renewable Energy and Global Care”

P-II-04

Screening of anaerobic Bacteria for polycyclic aromatic hydrocarbons degradation from marine sediment

Jiraporn Puangkeaw¹, Suphang Chulalaksananukul², Gullaya Wattayakorn³ and Chompunuch Virunanon⁴

¹ Biotechnology Program, Faculty of Science, Chulalongkorn University, 254 Phayathai Road, Bangkok 10330, Thailand

² Chemical Engineering Department Faculty of Engineering, Mahidol University

³ Department of Marine Science, Faculty of Science, Chulalongkorn University, 254 Phayathai Road, Bangkok 10330, Thailand

⁴ Biofuels by Biocatalysts Research Unit, Faculty of Science, Chulalongkorn University, 254 Phayathai Road, Bangkok 10330, Thailand

⁵ Department of Botany, Faculty of Science, Chulalongkorn University, 254 Phayathai Road, Bangkok 10330, Thailand

Abstract

Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) are organic compounds which considered of two or more benzene rings which are potentially to be hazardous substances. They are common pollutants that effect human health by its characteristics of toxicity, mutagenicity and carcinogenicity. PAHs usually contaminated in the environment from human activities. They are usually found in fossil fuel, crude oil, coal, used motor oil, soot smoke from incomplete combustion, oil drilling rig capsize, or even wastewater from factories and in various complex mixtures of hazardous chemicals. PAHs can persist in the environment for very long periods of time due to their stability, high affinity to the sediment, high melting and boiling point, low volatility and low aqueous solubility. Contamination of PAHs in marine sediment effect ecosystem especially benthic organism, include decreased benthic invertebrate abundance, diversity, growth, physiological and behavioural changes. This research was proposed to screen for PAHs degrading bacteria from Sichang marine sediment. From 11 sampling areas an anaerobic Naphthalene degraded bacteria was isolated in 200 ppm PAHs modified media. Identification of bacteria was performed by using 16S rRNA gene sequence comparison then using BLASTn to search the bacterial database and identifying the species that closely matches their sequence. The PAH degrading anaerobe isolated was identified to be *Clostridium bartlettii*. Finally, determination of PAHs degradation was performed by 2-rings (Naphthalene) using HPLC test which shown that 48.98 ppm of Naphthalene can be eliminated after incubated *C. bartlettii* with initial 171.79 ppm naphthalene for 8 days.

Keywords: anaerobic bacteria, PAHs degradation, 16S rRNA gene analysis, marine sediment

Introduction and Objective

Polycyclic aromatic hydrocarbons are usually known as PAHs. These compounds consist of two or more benzene rings (Figure 1.) with potential to be hazardous substances. Many of the constituents of PAHs are not only carcinogenic and mutagenic compounds, but they are also potentially to be immunotoxicant. There have even been reports of their impacts on critical habitats such as the benthic ecosystems, which may ultimately get into the marine food chain and finally effects human health. The results depend on the

concentration of PAHs and the type and extent of exposure (Vincent, 2009). The distribution of PAHs in the environment is extensive and varied in structure. PAHs can be found in soil/dust, air, water, food or household products which are produced during the industrial process, petroleum spills, and incomplete combustion (SA Health, 2009). PAHs can persist in the environment for long time due to their properties such as high melting and boiling point, low volatility, low solubility and high affinity to the sediment.

Nowadays, PAHs contamination is increasing which leads to environmental concern. PAHs may be treated using various methods and applications via physical treatment such as thermal or chemical process (Piskonen and Itävaara, 2004). Application of microorganisms for bioremediation of PAH-contaminated environment seems to be an attractive technology because they are more specific, effective, economic and more environmental friendly. The purpose of this study was to isolate potentially PAH-degrading bacteria from the marine sediment. This may be useful for preliminary studies and understanding in PAHs degrading by environmental microorganisms.

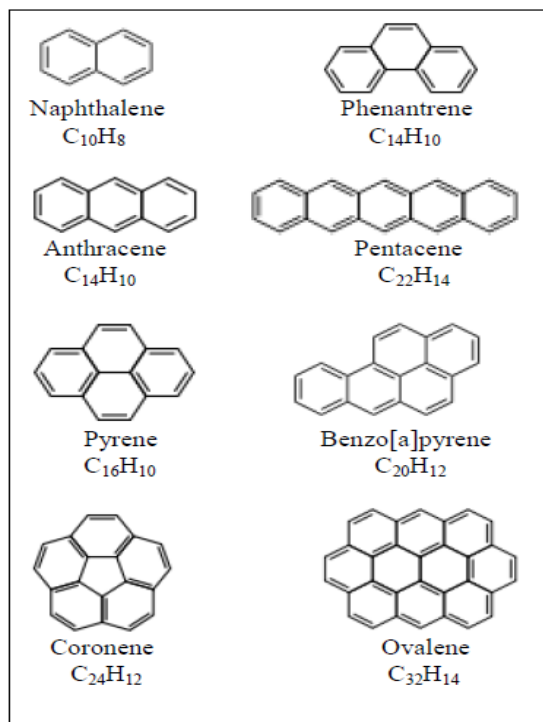


Figure 1. PAHs representatives and their chemical structures

Materials and Methods

2.1 Sediment Sample Collections

Sediment sample were collected from marine sediment around Koh Sichang, Chonburi province, Thailand. Eleven sediment samples were obtained from Aquatic Resources Research Institute (ARRI),

Chulalongkorn University. All samples were stored at 4°C until use.

2.2 Bacterial Isolation

To select PAHs-degrading bacteria, the PAHs-tolerant bacteria were isolated from marine sediment by inoculated 1 g of sample into PAHs modified media (Potato Dextrose Media plus 2% yeast extract with 0.2% Naphthalene) by spread plate method. The plates were incubated at 30 °C under anaerobic condition (or limited oxygen) in the anaerobic chamber (Bactron, Sheldon). Bacteria were isolated from the agar plates and prepared to be single colony by using streak plate method.

2.3 Species identification by 16S rRNA gene amplification and sequencing

Bacterial DNA extraction was performed and the extracted DNA was used in PCR experiments. About 1.6 kb fragments of 16S ribosomal RNA gene were amplified by PCR technique with Taq polymerase and primers Eubac 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') and 1492R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3').

PCR amplification was incubated for 3 min at 94 °C and then subjected to 25 cycles consisting of denaturation at 94 °C for 1 min, annealing at 55 °C for 1 min, and primer extension at 72 °C for 2 min. The tubes were then incubated for 10 min at 72 °C. PCR products were separated on 0.8% agarose gel electrophoresis. PCR products were purified by DNA purification kit (omega, USA) before 16S rRNA gene sequencing by an automated sequencer (Pacific Science Co., Ltd., Thailand). Sequence were compared to sequence in the RDP using BLASTn (Virunanon *et al.*, 2008).

2.4 Naphthalene degradation test

PAHs degradation test were performed by using cultures in serum bottles under anaerobic conditions. PAHs modified media with no Naphthalene solution was prepare then N_2 gas was always added into the bottles of media and capped the bottles with 20 mm butyl rubber stoppers. After autoclaved, steriled media were supplemented with a filter-sterilized 0.2% (wt/vol) solution of Naphthalene. Inoculation, the bottles were incubated at 37 °C for 7 days with control without microorganism inoculation. The test bottles were sampled periodically with a

syringe for determination of PAHs. Samples were analyzed by Scientific and Technological Research Equipment Centre by using HPLC. Samples were transferred to an HPLC vial insert for analysis on an HPLC fitted with Inertsil ODS-P HP (Shimadzu) column size 4.8 x 150 mm and FL detector. The mobile phase was CH₃CN : H₂O = 40:60 v/v.

Results

PAHs degrading bacteria can be isolated from marine sediment under anaerobic

condition. Isolates Nap1 and Nap9 were identified by partial sequencing of the PCR amplified 16S rRNA gene. The obtained sequences were compared to known sequences.

Bacteria identification was performed by using 16S rRNA gene sequence analysis and BLAST to find relatively similar nucleotide sequences in GenBank database. Results by BLASTn revealed that both isolates are 96% similar to *Clostridium bartlettii* as showed in Table1.

Table 1. Similarity percentage of 16S rRNA gene sequences for the selected isolates compared to those obtained from database

Isolates	Acc. Num.	Bacteria / Similarity percentage
Nap1 Nap9	JQ782209	<i>Clostridium bartlettii</i> / 96%

200 ppm Naphthalene (200 mg/L) was supplemented in medium to test PAHs degradation by bacterial isolates. Initially, the naphthalene concentration was detected at about 171.79 ppm on day 0 by HPLC. Some of naphthalene were lost because some part of naphthalene can be adhered to the inside walls of the serum bottles or the stoppers. The

results of the control experiments without inoculation of microorganism indicated that no significant loss of naphthalene occurred due to the process within 8 days. After incubation, Naphthalene can be eliminated for 48.98 ppm by *C. bartlettii* with initial 171.79 ppm Naphthalene for 8 days (Figure 2).

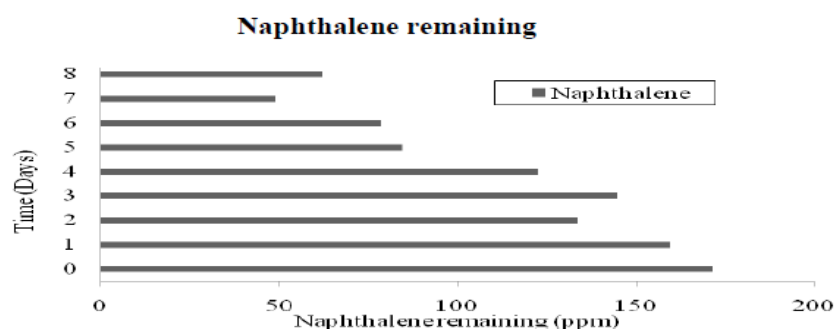


Figure 2. Naphthalene remaining on various times

Discussions

PAHs are very stable compounds so they can remain in the environment for a long time. They can cause environmental pollution as they accumulated in the surrounding sediment.

Various physical and chemical applications are currently employed to remediate the problems caused by PAHs pollution. Microbial degradation of PAHs is challenged idea with more specificity and strongly influenced. In addition, only a few microorganisms reported

ability to degrade PAHs especially higher ring contain PAHs. In this research, the isolates of Nap1 and Nap9 were related to *C. bartlettii*. This results agreed with report of Yuan et al. (2007) that some *Clostridium* spp. found in mangrove soil has capability to degrade PAHs.

In this research, degradation of naphthalene can be detected within 8-10 days. This may related to the structure of naphthalene that contain 2 benzene rings which is not as complicate as 3 or 4 rings hydrocarbon compound. The degradation of PAHs with higher number of rings are slower than those with lower number of rings (Lors *et al.*, 2010). Most of bioremediation of PAHs are based on enhancing microbial activity such as addition of nutrients and use PAHs as a sole carbon source in media. Rate of biodegradation depends on bacteria strains that were selected from PAHs contaminated sites and quantities of PAHs observed in contaminated sites.

Acknowledgment

This research granted by The National Research Council of Thailand (NRCT). Marine sediment samples were gifted from the Aquatic Resources Research Institute (ARRI), Chulalongkorn University.

References

1. Department of Health, Government of South Australia. 2009. Available at: <http://www.health.sa.gov.au/pehs/PDF-files/ph-factsheet-PAHs-health.pdf> [September 10, 2012].
2. Lors C, Ryngaert A, Perie F, Diels L, Damidot D. Evolution of bacterial community during bioremediation of PAHs in a coal tar contaminated soil. *Chemosphere*. 2010; 81: 1263-1271.
3. Piskonen R, Itävaara M. Evaluation of chemical pretreatment of contaminated soil for improved PAH bioremediation. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2004; 65(5):627-34.
4. Vincent M. Microbial bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in oily sludge wastes. Iowa State, CE 521. 2009.
5. Virunanon C, Chantaroopamai S, Denduangbaripant, J, Chulalaksananukul W. Solventogenic-cellulolytic clostridia from 4-step-screening process in agricultural waste and cow intestinal tract. *Anaerobe*. 2008; 14(2): 109-117.
6. Yuan SY, Chang BV. Anaerobic degradation of five polycyclic aromatic hydrocarbons from river sediment in Taiwan. *J Environ. Sci Health B*. 2007; 42: 63-69.

2. เสนอผลงานรูปแบบ poster เรื่อง **The screening of denitrifying bacteria from marine sediment for polycyclic aromatic hydrocarbon degradation** ในการประชุมวิชาการระดับนานาชาติ The First Asian Marine Biology Symposium in Phuket, Thailand, December 13 -17, 2012.

The screening of denitrifying bacteria from marine sediment for polycyclic aromatic hydrocarbon degradation

Abstract

This research presented the ability of denitrifying bacteria, collected from marine sediments around Sichang Island, Chonburi province, for degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. The result found that 8 isolations of denitrifying bacteria were obtained from total of 40 bacterial isolations screened from 23 of marine sediments. These isolations were identified by 16 s rRNA and indicated that one of them was *Bacillus subtilis* species. This isolation was performed under the anoxic condition to degrade of 200 ppm of naphthalene in liquid media. The result was successfully degradation of PAH by denitrification process.

Introduction

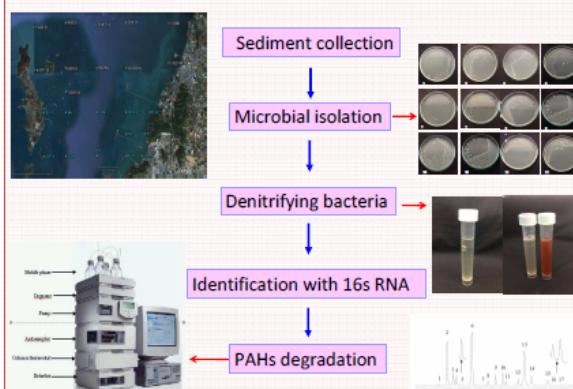
Polycyclic aromatic hydrocarbons are usually known as PAHs. They are generated from the incomplete combustion of fossil fuel. These compounds consist of two or more benzene rings as shown in Figure 1. PAHs have been classified as potential carcinogenic substances by USEPA.

PAHs		PAHs	
Naphthalene		<u>Pyrene</u>	
<u>Anthracene</u>		<u>Pentacene</u>	
<u>Phenanthrene</u>		<u>Benzofluoranthene</u>	
<u>Fluoranthene</u>		<u>Coronene</u>	
Chrysene		<u>Benzo[a]pyrene</u>	
<u>Triphenylene</u>		<u>Coronene</u>	
		<u>Ovalene</u>	

Figure 1. PAHs and their chemical representative structures

PAHs may be treated using various methods via physical treatment, chemical process, including of biological remediation. Biodegradation of PAH by applying microorganisms has been an attractive technology because it is more specific, economic than the other two methods, as well as it plays an advantage for environmental performance.

Materials and Methods



Result and Discussion

Microbial isolation

Total bacterial isolations including of denitrifying bacteria were addressed in Table1.

Table 1. Number of bacterial isolations achievement

Sediment sample	Number of bacterial isolations		
	Total isolates	Gas generation	Denitrifying bacteria
23	63	16	8



Figure 3 Molecular identification with 16S RNA sequencing

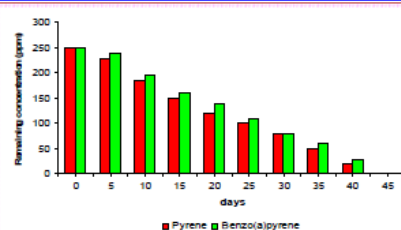


Figure 2 Benzo(a)pyrene and Pyrene degradation by *B. subtilis*

PAHs degradation

The degradation of PAHs (4R and 5R) was completed within 45 days of incubation as showed in figure 2.

Molecular identification

Bacteria identification performed by 16S rRNA gene sequence analysis and BLAST the nucleotide sequences to GenBank database for its relative similarity. The result was revealed the 96% similarity to *Bacillus subtilis* as showed in Figure3.

Acknowledgment

This research was financially supported by The National Research Council of Thailand (NRCT).

PROGRAM AND ABSTRACTS

The 1st Asian Marine Biology Symposium

13th-17th December 2012

Cape Panwa Hotel
Phuket, Thailand

Organized by:
Department of Marine Science
Faculty of Fisheries, Kasetsart University

The Japanese Association of Benthology
The Japanese Plankton Society

K-Benthos



P6-7 The screening of denitrifying bacteria from marine sediment for polycyclic aromatic hydrocarbon degradation

Jiraporn Puangkaew¹⁾, Gullaya Wattayakorn^{2, 3)}, Chompunuch Virunanon⁴⁾, and *Suphang Chulalaksananukul⁵⁾

1) Program of Biotechnology, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Pathumwan, Bangkok, 10330, Thailand

2) Department of Marine Science, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Pathumwan, Bangkok, 10330, Thailand

3) Aquatic Resources Research Institute (ARRI), Chulalongkorn University, Bangkok, 10330, Thailand

4) Department of Botany, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Pathumwan, Bangkok, 10330, Thailand

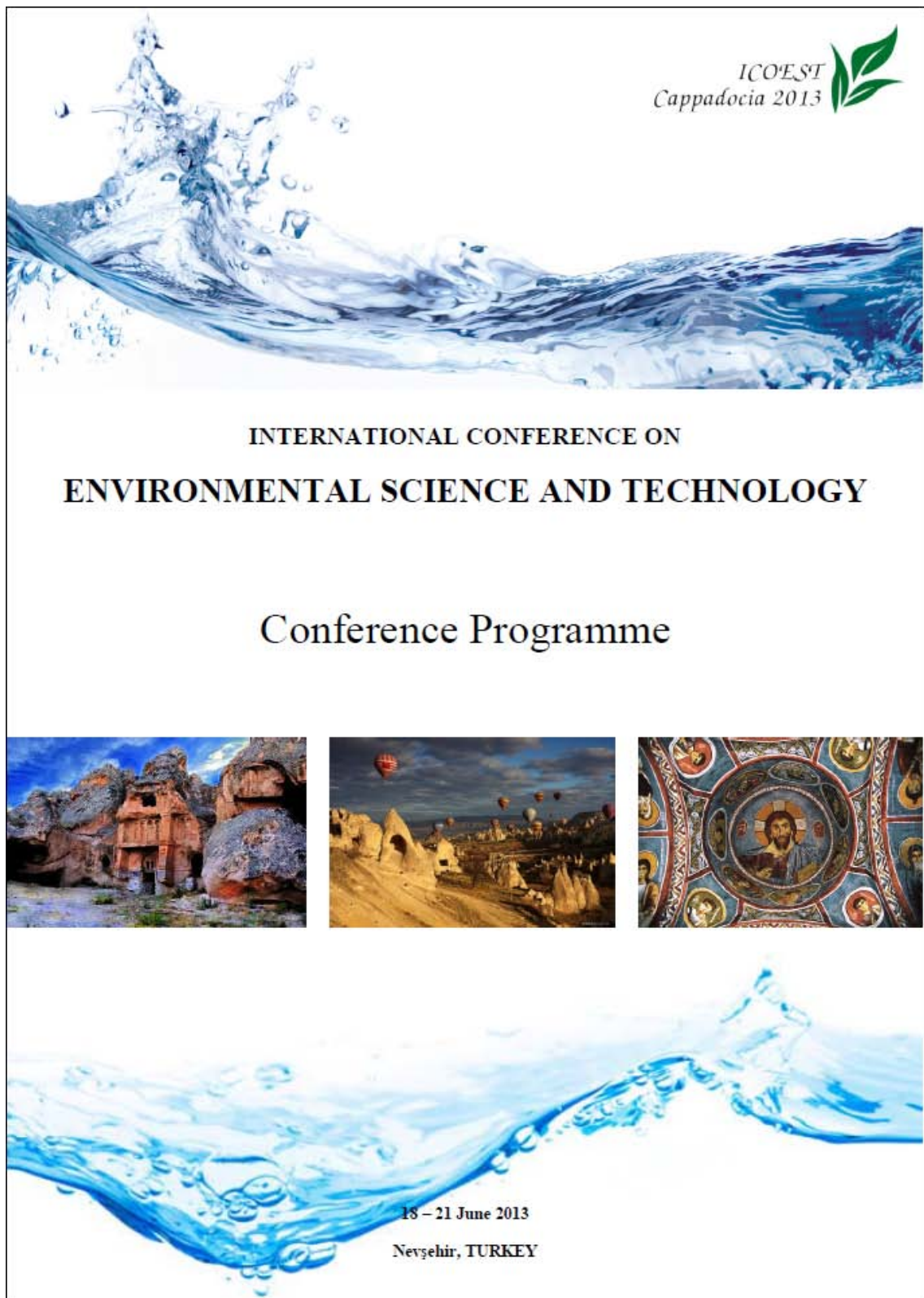
5) Department of Chemical Engineering, Faculty of Engineering, Mahidol University, Nakornpathom, 73170, Thailand

Abstract: This research presented the ability of denitrifying bacteria for degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. The experiments were started from the collection of marine sediments from Sichang Island, Chonburi province and screened for the existing of denitrifying bacteria. After that, they were applied for remediation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) contamination. The result found that 8 isolations of denitrifying bacteria were obtained from total of 40 bacterial isolations screened from 23 of marine sediments. These isolations were identified by 16 s RNA and indicated that one of them was *Bacillus subtilis* species. This isolation was further incubated under the anoxic condition to degrade of 200 ppm of naphthalene in liquid media. The result showed the successfully biodegradation of PAH by denitrification process.

Keywords: denitrifying bacteria, marine sediment, polycyclic aromatic hydrocarbon

*Presenter: E mail: suphang.chu@mahidol.ac.th

3. เสนอผลงานทางวิชาการ เรื่อง **Biodegradation of Benzo(a)pyrene by Marine Denitrifying Bacteria** นำเสนอในรูปแบบ oral presentation ในการประชุม International Conference on Environmental Science and Technology, ICOEST'2013 – CAPPADOCIA Urgup, Turkey, June 18-21, 2013



Biodegradation of Benzo(a)pyrene by Marine Denitrifying Bacteria

Jiraporn Puangkaew¹, Gullaya Wattayakorn^{2,3}, Chompunuch Virunanon⁴, Warawut Chulalaksananukul^{3,4,5} and Suphang Chulalaksananukul^{*6}

¹) Program of Biotechnology, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Pathumwan, Bangkok, 10330, THAILAND.

²) Department of Marine Science, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Pathumwan, Bangkok, 10330, THAILAND.

(E- mail:gullaya@gmail.com)

³) Aquatic Resources Research Institute (ARRI), Chulalongkorn University, Bangkok, 10330, THAILAND.

⁴) Department of Botany, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Pathumwan, Bangkok, 10330, THAILAND.

(E- mail:chompunuch.v@chula.ac.th)

⁵) Biofuels by Biocatalysts Research Unit, Chulalongkorn University, Bangkok, 10330, Thailand.

(E- mail: warawut.c@chula.ac.th)

⁶) Department of Chemical Engineering, Faculty of Engineering, Mahidol University, Nakornpathom, 73170, THAILAND.

(* Corresponding Author E- mail: suphang.chu@mahidol.ac.th)

ABSTRACT

This research presented the successfully ability of denitrifying bacteria for degradation of benzo(a)pyrene , a five fused ring of polycyclic aromatic hydrocarbons. The experiments were started from the collection of marine sediments from Chonburi province, Thailand. Then, these sediments were screened for the existing of denitrifying bacteria by nitrate reduction ability to alpha-naphthylamine. The result found that 8 isolations of denitrifying bacteria were achieved from total of 40 bacterial isolations screened from 23 of marine sediments. These selected denitrifying bacteria were further applied to degrade of 200 ppm of initially concentration of benzo(a)pyrene contamination in liquid media. The remediation process was incubated under the anoxic condition for more than 50 days. The result showed the complete biodegradation of benzo(a)pyrene by denitrification process within 45 days. Finally, the obtained denitrifying bacteria isolations were genetically identified by 16 s RNA and result was indicated that one of them was *Bacillus subtilis* specie.

Keywords: Alpha-naphthylamine, Benzo(a)pyrene, Denitrifying bacteria, Marine sediment, Polycyclic aromatic hydrocarbon.

1. INTRODUCTION

Environmental pollution with polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) has attracted much attention in last decades because of their genotoxic and carcinogenic potential for mammals

[1]. Benzo(a)pyrene (BaP) is one of the high molecular weight, 5 ring-PAHs which is listed as one of the priority pollutants classified as a carcinogen by the US Environmental Protection Agency and an Agency for Toxic Substances and Disease Registry and BaP is ranked at the number 9 from 275 substances priority list [2]. The toxicity of BaP is highly concerned because of its ability to accumulate in animal tissues, to cause cancer and hormone disruption as well as its potential to affect the reproduction. Moreover, BaP was found to depress immune function [3, 4].

The principle natural sources of BaP are forest fires, volcanic eruption, pest fires and burning of crude oil. While anthropogenic sources include the incomplete combustion of coal, oil, gas, wood, rubbish and other organic substances, incinerator, vehicle exhausts and cigarette [1, 5]. BaP has been reported to derive from gasoline automobile accounted for 98%. [6].

PAHs may be treated using various methods and applications via physical treatment such as thermal or chemical process [7]. The recalcitrant natures of PAHs, attributed in part to the strong absorption of PAHs molecule to soil organic matter and in part to their low solubility, make them less amenable to microbial degradation [5, 8]. However, compared to other processes whereby these compounds are removed from the environment, the microbial degradation plays a major role in the remediation of contaminated sites [1, 5, 9]. The natural presence of PAHs in the environment allows many microorganisms to adapt to exploit this naturally-occurring as the potential growth substrate. Thus, many bacterial, fungal, and algal strains have been shown to utilize wide varieties of PAHs containing from three to five aromatic rings [1, 9, 10]. The application of microorganisms for bioremediation of PAH-contaminated environment seems to be an attractive technology because they are more specific, effective, economic and more environmental friendly. Biodegradation in marine environment was also described attractively [11, 12].

In 1988, Heitkamp and Cerniglia published the first study on the isolation of bacteria capable of extensive degradation of PAHs containing four aromatic rings [13]. Muller *et al.* (1989) demonstrated for the first time that the utilization of a PAH containing four or more aromatic rings as a sole source of carbon and energy by bacteria was possible [14]. Biodegradation of BaP by some interesting bacteria was disclosed [15, 16]. Bioremediation of BaP in soil is reported to have half-lives of 50 days to about 8.2 years [17].

Denitrification process is a process that involves a stepwise reduction of nitrogen oxides as nitrate and producing nitric oxide (NO), nitrous oxide (N₂O), and finally to primarily molecular nitrogen gas (N₂). With seriously, for any of nitrous oxide and nitric oxide releasing could contribute to global warming and to the destruction of stratospheric ozone [18]. Denitrification is a major importance process that denitrifying bacteria responses to environmental conditions by the cycling of nitrogen gas back to the atmosphere. These denitrifying bacteria utilize nitrate (NO₃⁻), nitrite (NO₂⁻), nitric oxide (NO), and nitrous oxide (N₂O) as terminal electron acceptors in anaerobic respiration [19, 20].

In this study, denitrifying bacteria from marine sediments exposed to petroleum contamination were isolated and then screened for nitrate reduction of alpha-naphthylamine. After that, the ability of these bacteria to degrade benzo(a)pyrene were performed under anaerobic condition for about 50 days. The selected isolation was further genetically identification of their species by 16 sRNA for the application to environmental performance.

2. MATERIAL AND METHODS

2.1 Collection of marine sediments

Marine sediments were collected from the stations located between Sichang Island and the territorial site of Chonburi province, Thailand. Koh Sichang is an island located 12 km. Away from the western shore of Siracha district, Chonburi province. These area are usually contaminated with anthropogenic activities, including from the petroleum trans-shipment activity occurred within the gulf of Thailand. The stations was located between the latitudes of 13°11'27.59"N to 13°7'21.00" N and with the longitudes of 100° 48' 42.87"E to 100° 54'56.44" E as shown in Fig. 1.

All samples were well stored at 4°C until use.

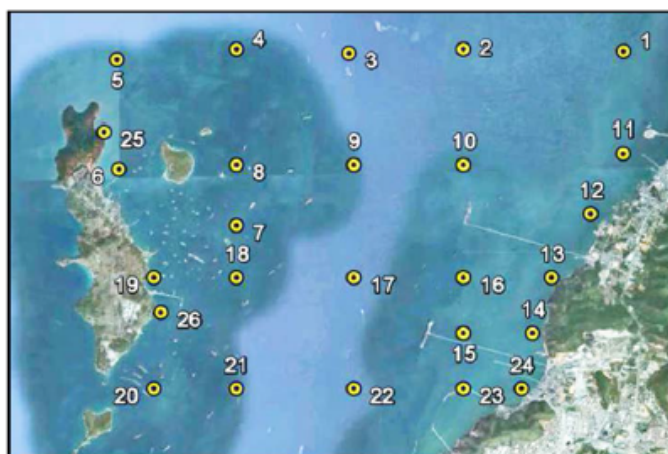


Figure1. The sampling stations around Sichang Island, Chonburi province, Thailand.

2.2 Bacterial isolation and screening for potent BaP degrader

Bacteria were isolated from marine sediments exposed to petroleum contamination. The toleration to BaP of bacterial isolations were selected on solid media using spread plate method by inoculated 1 g of marine sediment into PAHs modified media (Potato Dextrose Media supplemented with 2% of yeast extract and added of 0.2% of Benzo(a)pyrene). All plates were incubated at 30 °C under anaerobic condition (or limited oxygen) in the anaerobic chamber (Bactron, Sheldon). The potential BaP-degrader(s) was selected depending on their growths compared to that of the control. Then, the selected strain(s) was sub-cultured using streak plate method and test for BaP degradation [21].

2.3 Screening for Denitrifying Bacteria

All potential BaP-degraders were further tested for denitrifying bacteria by transferring to nitrate broth with durham tube. These tubes were incubated at 30°C for 14 days to test for denitrification. One millilitre of each culture was transferred into a micro-centrifuge tube and analyzed for their denitrification potential using the alpha-naphthylamine method described by Wistreich and Lechtman in 1988 [22]. Denitrifying bacteria was selected and cultivated anaerobically in nutrient broth (Difco) at 30° C and stored in 15% glycerol at - 80°C. The

identification of denitrifying bacteria was performed by API kit (BioMerieux)

2.4 Ability to reduce nitrate and nitrite

Denitrifying bacteria were cultivated in nutrient broth at 30°C for 18-24 hours. One ml of cell suspension were transferred to 250 ml. Erlenmeyer flask containing 150 ml nitrate broth and then on rotary shaker at 30°C for 14 days. Nitrate and nitrite were measured at 0, 3, 7, 10, 14 days by nitrate-nitrogen and nitrite-nitrogen test kit (HACH, USA), respectively.

2.5 Biodegradation of benzo(a) pyrene

The selected strain(s) was tested for their abilities and their degradation of BaP when grown on liquid media in serum bottles under anaerobic conditions. The experiments were carried out from the prepared pure PAHs modified media solution. After that, filled media into the serum bottles and purged with N₂ gas. The bottles were immediately capped with 20 mm butyl rubber stoppers. After autoclaved, these sterilization media were added with a 0.2 % (w/v) of sterilized solution of benzo(a)pyrene and 5% of inoculums. The bottles were incubated at 37 °C for 7 days compared with the control that without adding any inoculation. The bottled media were sampled periodically with a syringe for determination of the reduction of BaP using HPLC. The control was performed in order to compensate for the photo-oxidation, if any.

2.6. Analysis of benzo(a)pyrene

The extracted benzo(a)pyrene was analyzed using reverse phase HPLC (Shimadzu) equipped with a fluorescence detector and C18 column (Inertsil ODS-P HP column, 150mm x 4.8mm) using acetonitrile: water at a ratio of 40:60 (v/v) as the mobile phase at a flow rate of 1ml/min. All measurements are the means of six replicates.

2.7 Species identification by 16S rRNA gene sequencing

Bacterial DNA extraction was performed using the PCR experiments. About 1.6 kb fragments of 16S ribosomal RNA gene were amplified by PCR technique with Taq DNA polymerase and primers Eubac 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') and 1492R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3').

PCR amplification was incubated, in thermal cycles, for 3 min at 94 °C and followed by 25 cycles consisting of denaturation at 94 °C for 1 min, annealing at 55 °C for 1 min, and primer extension at 72 °C for 2 min. The tubes were then incubated for 10 min at 72 °C. PCR products were separated on 0.8% agarose gel electrophoresis. PCR products were purified by DNA purification kit (omega, USA) before 16S rRNA gene was sequenced by an automated sequencer (Pacific Science Co., Ltd., Thailand). Sequencing was compared to sequence in the RDP using BLASTn [23, 24].

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1 Isolation and ability to reduce nitrate and nitrite of denitrifying bacteria

Total sixty three isolates were obtained from twenty three of marine sediments. All these isolations were analysis for denitrification process. Thirty eight isolates were found to reduce

the colour of alpha-naphthylamine, while sixteen isolates were found to produce gas in Durham tube. Among of these two groups of bacteria, there are only eight isolates that produced gas in Durham tube, as well as, gave colourless solution in the same time. According to the method described by Wistreich and Lechtman (1988) confirmed that they are denitrifying bacteria as summarized in table 1. Eight denitrifiers were further identified by biochemical testing with API test kit. The results illustrated eight isolates of denitrifiers was *Bacillus subtilis* as the dominant denitrifier specie [22].

Table 1 The obtained bacterial isolations from marine sediments and classified into four different types

Marine sediment samples	Bacterial isolations			
	Total isolations	Nitrate reduction bacteria	Gas generation bacteria	Denitrifying bacteria
23	63	38	16	8

The classification of bacterial isolations for their ability to reduce nitrate using nitrate broth as substrate was summarized in Table 2. The results showed that 30 isolates could reduce nitrate in nitrate broth called nitrate reducing bacteria. Eight isolations generated gas but could not reduce nitrate. These bacteria were probably either sulphate reducing bacteria which reduced sulphate to be hydrogen sulphide gas or they were methane formation bacteria which digested carbon source (PAHs) to be a methane gas. For the eight denitrifying bacteria or denitrifier isolations, four isolations were found to reduce nitrate rapidly and did not show any accumulation of nitrite. The other four isolates were found to have the accumulation of nitrite and also to reduce nitrate slowly. All nitrate and nitrite were reduced to be nitrogen gas [24].

Table 2 The bacterial ability to reduce nitrate in denitrification process

Number of bacterial isolations	Ability to reduce nitrate	Nitrite accumulation	Gas generation
30	Yes	Yes	No
8	No	-	Yes
4	High	No	Yes
4	Low	No	Yes

3.3 Biodegradation of benzo(a)pyrene

The substrate depletion kinetics revealed in this study are similar to the classical pattern of benzo(a)pyrene degradation. The results revealed in Figure 2 that the degradation was not occurred at the first five days of incubation. The degradation was represented the slowly rate at the early stages of incubation. The rapidly increased in degradation rate was observed after 10 days passed and the same rate was continued until 45 days of incubation. The completed

degradation of benzo(a)pyrene was achieved with the noticeably concentration of benzo(a)pyrene in liquid media was undetectable. The disappeared of benzo(a)pyrene in the solution was also observed (The image was not presented).

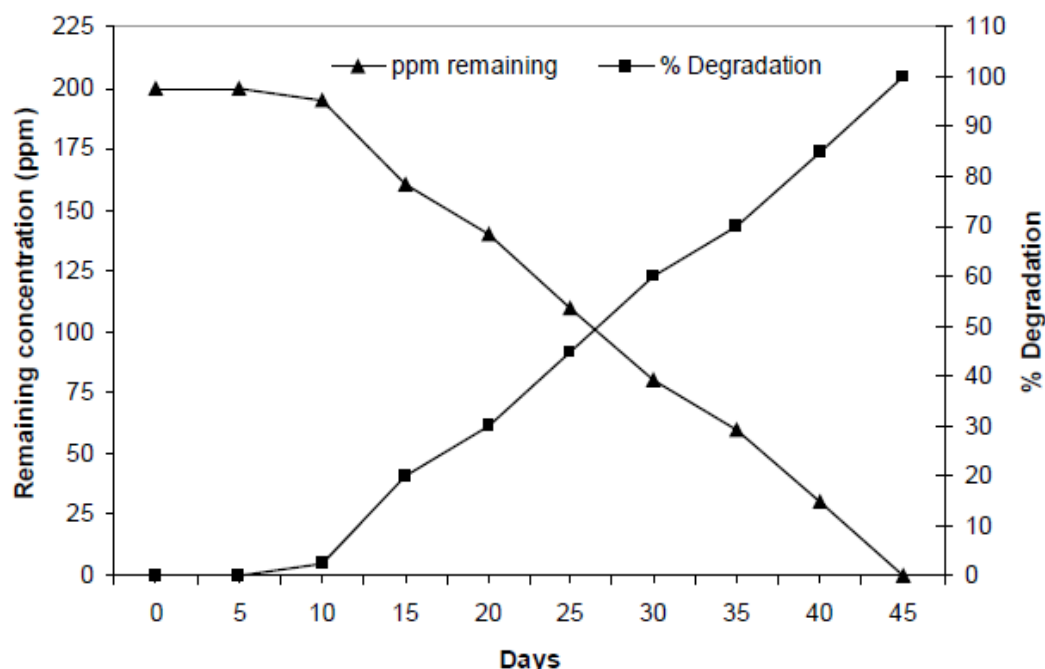


Figure 2 The remaining concentration and biodegradation of benzo(a)pyrene under denitrification process of *Bacillus subtilis* specie.

The impact of denitrification on remediation coupled with bio-treatment of PAHs was obviously reported. In this study, even of the biodegradation of benzo(a)pyrene was clearly observed after 45 days of incubation under denitrification condition, the biomass was not significantly increased. This phenomenon was previously noted that degradation of PAHs of four or more rings generally did not result in a remarkable increase in the biomass yield of the microbial consortia used, suggesting that these compounds were not preferentially used as a biosynthetic carbon source, but mostly as an energy source [19].

3.4 Molecular identification

PAHs degradeing bacteria isolated from marine sediment under anaerobic condition was further performed to know the species. Bacteria identification performed by 16S rRNA gene sequence analysis and BLASTS the nucleotide sequences to GenBank database for its relative similarity. The result was revealed that both bacterial isolations in this study related to 96% similarity to *Bacillus subtilis*. Gel electrophoresis of PCR amplification of DNA fragment at 1.6 kb was observed as showed in Figure3.

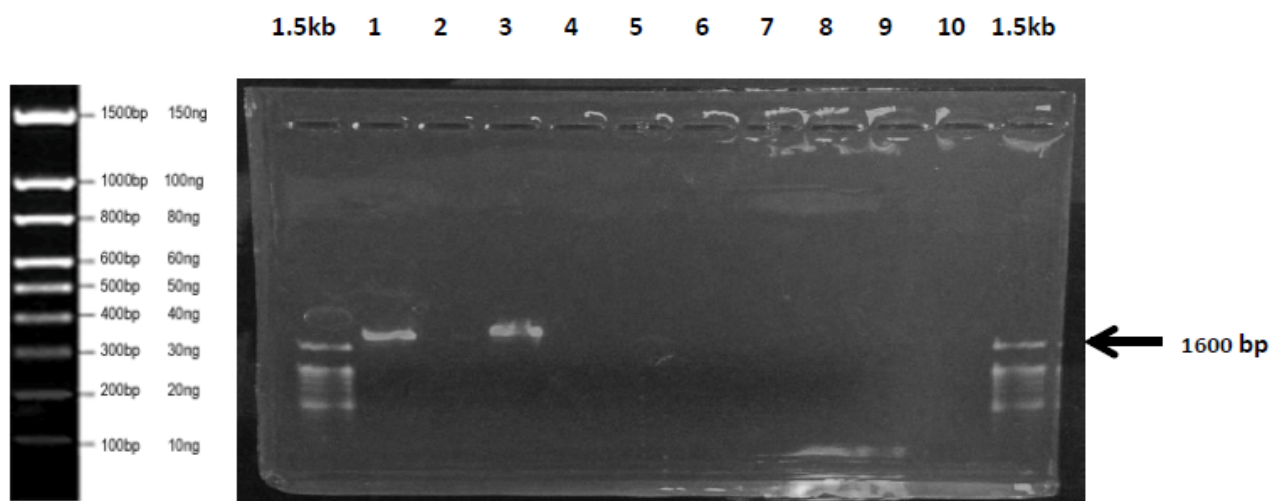


Figure 3 PCR amplification of DNA fragment of 1.6 kb of 16 s rDNA identification. Lane 1 and lane 3 was the amplified DNA of bacterial isolations of this research.

3.5 *Bacillus subtilis* and Benzo(a)pyrene degradation

In this study, the bacterial obtained for degradation of benzo(a)pyrene was *Bacillus subtilis* species. Correspondingly to the results above, the tolerance and a marked ability of *Bacillus subtilis* sp. to degrade high concentrations of benzo(a)pyrene up to 200 ppm (0.8mM) of benzo(a)pyrene in an anaerobic condition was investigated over 50 days at ambient temperature (approximately 30 C in a PAHs modified medium). It was shown that *Bacillus subtilis* could survive at higher concentrations of benzo(a)pyrene. The degradation rate of benzo(a)pyrene was not occurred in the first 10 days of incubation as the concentration of benzo(a)pyrene was not decreased. But after that the degradation rate was rapidly increased as the concentration of benzo(a)pyrene was continuously decreased (Fig.2). Until 45 days of incubation, the biodegradation of benzo(a)pyrene was completed as shown on the undetectable amount of benzo(a)pyrene in the solution.

Benzo(a)pyrene degradation by *Bacillus subtilis* was previously reported. Hunter *et al.* (2005) reported the first time of *Bacillus subtilis* as bacterial strain to degrade 33 ug/ ml of pyrene and/ or benzo(a)pyrene at 30° C for 4 days of incubation and *Bacillus subtilis* could transform 40% of pyrene and 50% of benzo(a)pyrene [25]. Lily *et al.*, (2009) studied with the new species of *Bacillus subtilis* to degrade of 50 ug/ ml of benzo(a)pyrene in BSM medium and it showed ability to survive up to 40 days and peak growth was on 7 days of incubation. The degradation was started from 24 hours and the maximum achievement of degradation was 84.66% within 28 days [26]. Even at a higher concentration of benzo(a)pyrene (500 mg/L in mineral salts medium), it was observed that *Bacillus subtilis* could utilize benzo(a)pyrene as the sole source of carbon and finally reach 58.98 % degradation of the initial amount of benzo(a)pyrene after 35 days of incubation [27]. This indicates a good benzo(a)pyrene degradation ability of *Bacillus subtilis* when compared with other benzo(a)pyrene-degrading bacteria. For instance, benzo(a)pyrene degradation studies using bacterial consortium of *Ochrobactrum* sp. *Stenotrophomonas maltophilia* and *Pseudomonas fluorescens* were generally carried out at a lower range of benzo(a)pyrene concentrations (10 mg/l) [28]

In the other hand, the report of degradation of benzo(a)pyrene under thermophilic condition by *Bacillus subtilis* (Strain BUM) was also examined by Zhao and Wong, (2010) that the degradation of 250 mg/l of benzo(a)pyrene was occurred within 30 days of incubation

regarding of phenanthrene was existed. The percentage of degradation was corresponding to the concentration of phenanthrene. The degradation rate was constant with a value of 12.3 mg/l/day in aqueous solution at a maximum 63.6% degrading [29].

At the evidence of absence of oxygen (anaerobic condition), *Bacillus subtilis* was able to oxidising complex organic carbon as PAHs by using nitrate as electron acceptor. This is an effective low cost treatment on biodegradation of PAHs. As there has been an illustrative report of many bacterial consortium in soil bioremediation of PAHs [30, 31, 32], the results of this study demonstrating a relatively high benzo(a)pyrene biodegradability and tolerance of suggested a potential use of *Bacillus subtilis* in bioremediation of soil contaminated with benzo(a)pyrene.

4. CONCLUSION

Denitrifying bacteria achievement isolated from marine sediment was *Bacillus subtilis* in majority. A *Bacillus subtilis* had the ability to degrade benzo(a)pyrene with a complete degradation efficiency of the initial amount of 200 mg/l supplied over 45 days of incubation at 30° C. *Bacillus subtilis* was successfully biodegradation of benzo(a)pyrene but failed to increased biomass production. Nonetheless, due to the significant ability of *Bacillus subtilis* to degrade benzo(a)pyrene up to 0.8 mM, the potential use of this isolated bacterial in soil remediation has been suggested. The studies on its biodegradation mechanisms as well as benzo(a)pyrene biodegradation were also crucial to find out.

This research gives not only the valuable data of the potential application of denitrifying bacteria to remove PAHs, but also can be able to apply for excess nitrogen in waste water treatment, as well. Further comprehensive study of the relationships among qualitative and quantitative microbial community will help in the design of advanced abatement and management for qualify environmental performance.

ACKNOWLEDGMENT

The authors would like to express gratefully acknowledge to The National Research Council of Thailand (NRCT) for the financial supporting of this research.

REFERENCES

- [1] J.V. Pothuluri, and C.E. Cerniglia, Current aspects on polycyclic aromatic hydrocarbon degradation processes, in Bioremediation: Principles and practice volume III, ed. Sikdar S.K., and Irvine R.L., Lancaster USA, Technomic Publishing Company, Inc., 1998. pp. 461-520.
- [2] ATSDR, 2011. Substances Priority List
URL-<http://www.atsdr.cdc.gov> (Accessed: January, 2013)
- [3] R.J. Irwin, M.V. Monwerik, L. Stevens, M.D. Seese, and W. Basham, 1997. Environmental Contaminants Encyclopedia: Benzo(a)pyrene (BaP) entry

- [4] J.F. McCarthy, L.W. Burrus, and V.R. Tolbert, 2003. Bioaccumulation of benzo(a)pyrene from sediment by fathead minnows: effects of organic content, resuspension and metabolism. *Archived Environmental Contamination and Toxicology*. 45: 364-370.
- [5] C.E. Cerniglia, 1992. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbon. *Biodegradation*. 3:351-368.
- [6] R. Harkov, A. Greenberg, F. Darack, J.M. Dalsey, and P.J. Lioy, 1984. Summer time variations in polyaromatic hydrocarbon at four sites in New Jersey, *Environmental Science and Technology*. 18: 287-291.
- [7] R. Piskonen, and M. Itävaara, 2004. Evaluation of chemical pretreatment of contaminated soil for improved PAH bioremediation. *Applied Microbiology Biotechnology*. 65(5) 627-634.
- [8] S.W. Rogers, S.K. Ong, B.H. Kjartanson, J. Golchin, and G.A. Stenback, 2002. Natural attenuation of polycyclic aromatic hydrocarbon-contaminated sites: review, *Practical Period of Hazardous Toxicology Radioactive Waste Management*. 6(3)141-155.
- [9] D.T. Gibson, Microbial degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons: in *Microorganisms to combat pollution*, ed. Rosenberg E., Netherlands, Kluwer Academic Publishers, 1993. pp. 57-66.
- [10] S.Y. Yuan, and B.V. Chang, 2007. Anaerobic degradation of five polycyclic aromatic hydrocarbons from river sediment in Taiwan. *Journal of Environmental Science Health B*. 42: 63-69.
- [11] S. Harayama, H. Kishira, Y. Kasai, and K. Shutsubo, 1999. Petroleum biodegradation in marine environments. *Journal of Molecular Microbiology Biotechnology*. 1: 63-70.
- [12] I.M. Head, and R. P. J. Swannell, 1999. Bioremediation of petroleum hydrocarbon contaminants in marine habitats. *Current Opinion in Biotechnology*. 10: 234-239.
- [13] M.A. Heitkamp, C.E. Cerniglia, 1988. Mineralisation of polycyclic aromatic hydrocarbons by a bacterium isolated from sediment below and oil field. *Applied Environmental Microbiology*. 54: 1612-1614.
- [14] J.G. Muller, P.J. Chapman, P.H. Pritchard, 1989. Creosote contaminated sites. *Environmental Science and Technology*. 23: 1197-1201.
- [15] A.L. Juhasz, and R. Naidu, 2000. Bioremediation of high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbon: a review of the microbial degradation of benzo(a)pyrene. *International Biodeterioration and Biodegradation*. 45: 57-88.
- [16] R.A. Kanary, and S. Harayama, 2000. Minireview: Biodegradation of high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbon by bacteria. *Journal of Bacteriology*. 182: 2059-2067.
- [17] G. Gramss, K-D. Voigt, and B. Kirsche, 1999. Degradation of polycyclic aromatic

hydrocarbons with three to seven aromatic rings by higher fungi in sterile and unsterile soils. *Biodegradation*.10(1) 51-62.

- [18] C. C. Delwiche, Denitrification, nitrification, and atmospheric nitrous oxide. New York: John Wiley & Sons, Inc. 1981.
- [19] K. Roger, 1982. Denitrification. *Microbiological Reviews* 46: 43-70.
- [20] R.W. Ye, B.A. Averill, and J.M. Tiedje, 1994. Denitrification: production and consumption of nitric oxide. *Applied Environmental Microbiology*. 60: 1053-1058.
- [21] B. Song, N. J. Palleroni, and M. M. Häggblom, 2000. Isolation and characterization of diverse halobenzoate-degrading denitrifying bacteria from soil and sediments. *Applied Environmental Microbiology*. 66: 3446-3453.
- [22] G.A. Wistreich, and M.D. Lechtman, Laboratory exercises in microbiology. 6th ed. New York: Macmillan Publishing Company, 1988.
- [23] C. Virunanon, S. Chantaroopamai, J. Denduangbaripantand, and W. Chulalaksananukul, 2008. Solventogenic-cellulolytic clostridia from 4-step-screening process in agricultural waste and cow intestinal tract. *Anaerobe*. 14(2)109-117.
- [24] M. Theerachat, C. Virunanon, S. Chulalaksananukul, N. Sinbuathong, and W. Chulalaksananukul, 2011. *Nir K* and *nir S* nitrite reductase genes from non-agricultural forest soil bacteria in Thailand. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 27: 999-1003.
- [25] R.D. Hunter, S.I.N. Ekunwe, D.E Dodor, H-M Hwang, and L. Ekunwe, 2005. *Bacillus subtilis* is a potential degrader of pyrene and benzo(a)pyrene. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 2(2)267- 271.
- [26] M.K. Lily, A. Bahuguna, K. Dangwal, and V. Gang, 2009. Degradation of benzo(a)pyrene by a novel strain *Bacillus subtilis* BMT4i (MTCC9447). *Bazilian Journal of Microbiology*. 40: 884- 892.
- [27] R. Mohandass, P. Rout, S. Jiwal, and C. Sasikala, 2012. Biodegradation of Benzo(a)pyrene by The mixed culture of *Bacillus cereus* and *Bacillus vireti* isolated from the petrochemical industry. *Journal of Environmental Biology*. 33(6)985- 989.
- [28] Y.R. Luo, Y. Tian, X. Huang, C. Yan, H.S. Hong, G.H Lin, and T.L. Zheng, 2009. Analysis of community structure of a microbial consortium capable of degrading benzo(a)pyrene by DGGE. *Marine Pollution Bullitin*. 58: 1159- 1163.
- [29] Z. Zhao, and J. W-C. Wong, 2010. Rapid biodegradation of benzo(a)pyrene by *Bacillus subtilis* BUM under thermophylic condition. *Environmental Engineering Science*. 27(11)939- 945.
- [30] A. R. Johnsen, L.Y. Wick, and H. Harms, 2005. Principles of microbial PAH-degradation in soil. *Environmental Pollution*. 133: 71-84.

- [31] X. Li, X. Lin., P. Li, W. Liu, L. Wang, F. Ma, and K.S. Chukwaku, 2009. Biodegradation of the low concentration of polycyclic aromatic hydrocarbon in soil by microbial consortium during incubation. *Journal of Hazardous Material*. 172: 601-605.
- [32] X. Lu, T. Zhang, H. H-P. Fang, K. M. Y. Leung, and G. Zhang, 2010. Biodegradation of naphthalene by enriched marine denitrifying bacteria. *International Biodeterioration and Biodegradation*. 65: 204-211.