การประยุกต์ใช้เทคนิค DGGE เพื่อเพิ่มศักยภาพทางด้านการกำจัดโดยใช้จุลินทรีย์ โดยวิธี Bioaugmentation ในดินที่มีการปนเปื้อนด้วยสารประกอบไฮโดรคาร์บอน

Application of DGGE and isolation technique to improve a bioremediation strategy for hydrocarbon-contaminated soils based on bioaugmentation

ศวพร ศุภผล[1] **ศุภมาศ พนิชศักดิ์พัฒนา**[1] **สาวิตร ตระกูลน่าเลื่อมใส**[2] **และ** Anthony Gerade O'Donnell[3]

S. Supaphol, S. Panichsakpatana, S. Trakulnaleamsai and A.G. O'Donnell

[1]**ภาควิชาปฐพีวิทยา คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ลาดยาว กรุงเทพฯ** 10900

Department of Soil Science, Faculty of Agriculture, Kasetsart University, Bangkok 10900

[2] **ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ลาดยาว กรุงเทพฯ** 10900

Department of Microbiology, Faculty of Science, Kasetsart University, Bangkok 10900

[3] School of Biology, University of Newcastle upon Tyne, Newcastle upon Tyne, United Kingdom

บทคัดย่อ

การศึกษาพัฒนาเทคนิคทางด้าน Bioremediation เพื่อแก้ปัญหาการปนเปื้อนของสารประกอบไฮโดรคาร์บอนในดิน ด้วยวิธีการเพิ่มปริมาณแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสารประกอบไฮโดรคาร์บอน (Bioaugmentation) โดยใช้เทคนิค Denature Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) ร่วมกับการแยกแบคทีเรียจากตัวอย่างดินที่ปนเปื้อน ทำการคัดเลือกแบคทีเรียประชากรหลัก (dominant species) ด้วยเทคนิค DGGE โดยทำการปรับอัตราส่วน C:N:P ของตัวอย่างดินที่ปนเปื้อนด้วนน้ำมันหล่อลื่นเป็น 100:10:2 บ่มที่ 25^{0}C ในระบบปิด เก็บตัวอย่างดินที่ 0 ชั่วโมง 1, 7, 28 และ 42 วัน นำมาสกัด DNA และ RNA ใช้เป็นต้นแบบสารพันธุกรรมในการสังเคราะห์เพื่อเพิ่มปริมาณ DNA ในส่วน 16S rDNA ด้วย primer ที่มีความจำเพาะในช่วง V3 region ด้วยเทคนิค PCR ทำการเปรียบเทียบลายพิมพ์ DNA ที่ได้จากการทำ electrophoresis และวิเคราะห์ลายพิมพ์ของแถบ DNA ด้วยวิธี Multivariate pattern recognition (stepwise discriminate function) เพื่อเลือกแถบ DNA ของแบคทีเรียประชากรหลัก ซึ่งแถบ DNA ดังกล่าวมีระดับความเข้มของปริมาณ DNA เพิ่มขึ้นตั้งแต่วันที่ 1 จนถึงวันที่ 42 ของการทดลอง ผลจากการแสดงความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการพบว่าแถบ DNA ดังกล่าวเป็น *Bacillus marisflavi* (A18), *Microbacterium oxydans* (A20) และ *Pseudomonas oleovorans* (A16) ใช้ข้อมูลจากเทคนิค DGGE เป็นแนวทางในการคัดเลือกแบคทีเรีย โดยทำการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียจากตัวอย่างดินที่ปนเปื้อน แล้วทำการสุ่มเลือกแบคทีเรียที่มีลักษณะโคโลนีแตกต่างกัน เพื่อศึกษาสัณฐานวิทยา โดยคัดเลือกแบคทีเรียที่มีลักษณะโคโลนี รูปร่างของเซลล์ และการติดสีแกรม เหมือนกับแบคทีเรียใน Genus *Bacillus, Microbacterium* และ *Pseudomonas* ต่อมาทำการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี สามารถจัดจำแนกแบคทีเรียได้เป็น *Bacillus*, Actinobacteria และ Proteobacteria นำตัวอย่างแบคทีเรียดังกล่าวมาทำการวิเคราะห์ความหลากหลายของชนิดแบคทีเรีย พบ *Bacillus marisflavi* (D46A), *Microbacterium oxydans* (B31) และ *Pseudomonas oleovorans* (My1) ซึ่งเหมือนกับแบคทีเรียประชากรหลักจากเทคนิค DGGE นอกจากนั้นยังสนใจคัดเลือกแบคทีเรียใน Genus Brevibacillus, Brevibacterium, Arthrobacter, Brachybacterium และ Massilia เนื่องจากมีข้อมูลว่าสามารถเจริญในแหล่งปนเปื้อนด้วยสารประกอบไฮโดรคาร์บอน เพื่อนำแบคทีเรียที่ได้ทำการคัดเลือกไปประยุกต์ใช้ในการแก้ปัญหาดินที่ปนเปื้อนด้วยสารประกอบไฮโดรคาร์บอนในสภาพแวดล้อมโดยวิธี Bioaugmentation

ABSTRACT

The research aims to develop a bioremediation strategy for hydrocarbon contaminated soils based on bioaugmentation with ecologically relevant identified bacteria using Denature Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) and Isolation technique. In the present study, a culture-independent study we conducted using the DGGE technique. Microcosms were set up by an adjusted C:N:P ratio in lubricant contaminated soil to 100:10:2 and incubated at 25^0C. Soil samples were collected at 0 hr, 1, 7, 28, and 42 days. DNA and RNA were extracted and then 16S rDNA was amplified following PCR with a specific primer which was established by targeting the variable V3 regions of the 16S rDNA. The fingerprinting of the bacterial community was separated using electrophoresis. Then the DGGE patterns were analyzed and the dominant bands were chosen using Multivariate pattern recognition (Stepwise discriminate function). We found that diverse relationships between dominant bacteria were represented. The phylogenetic tree revealed the dominant species as *Bacillus marisflavi* (A18), *Microbacterium oxydans* (A20), and *Pseudomonas oleovorans* (A16). The cultures of bacteria population samples were grown in the laboratory. The colonies with different morphology were chosen for classification. The isolates were close in character to Genus *Bacillus, Microbacteriun*, and *Pseudomonas* were selected for biochemical tests. The results from biochemical tests could classify most bacteria closed to *Bacillus, Actinobacteria*, and *Proteobacteria*. Phylogenetic relationship can be shown in a variety of bacteria species. The results from a phylogenetic tree found *Bacillus marisflavi* (D46A), *Microbacterium oxydans* (B31), and *Pseudomonas oleovorans* (My1) which were close to the dominant species from the DGGE technique. The members of the other Genus that were chosen for this study that probably they could survive in contaminated soil with hydrocarbon as Genus *Brevibacillus, Brevibacterium, Arthrobacter, Brachybacterium* and *Massilia*. The possibilities of using the prospective bacteria as bioaugmentation for the *in situ* remediation of petroleum-contaminated soil will be studied.

Keywords; Bioremediation, Bioaugmentation, DGGE, hydrocarbon-degrading bacteria, multivariate pattern recognition techniques

E-mail address; orn478@yahoo.com

คำนำ

ดินเป็นทรัพยากรที่เป็นแหล่งผลิตปัจจัย 4 แก่มนุษย์ เนื่องด้วยในปัจจุบันมนุษย์มีการใช้ที่ดินเพื่อการเกษตรกรรม และอตุสาหกรรมอย่างมาก ทำให้ดินเกิดการเสื่อมสภาพนำมาใช้ประโยชน์ได้น้อยลง โดยเฉพาะพื้นที่ที่เป็นแหล่งรองรับสิ่งปฏิกูลแห่งเทคโนโลยีเช่น การสะสมของสารเคมีกำจัดศัตรูพืชจากการเกษตรกรรม โลหะหนักและของเสียต่างๆ จากการผลิตทางอุตสาหกรรม กากตะกอนจากก้นถังน้ำมันดิบ ภาชนะบรรจุน้ำมัน น้ำมันหล่อลื่นใช้แล้วจากเครื่องจักร และ เครื่องยนต์ ซึ่งผลกระทบที่ปรากฏขึ้นในปัจจุบันย่อมทำให้มนุษย์ตระหนักถึงปัญหาต่างๆ ที่ส่งผลต่อคุณสมบัติต่างๆ ของดิน และยังมีผลต่อสิ่งบริโภคทั้ง พืช ผัก ผลไม้ และ สัตว์ (Parr และคณะ, 1992)

การปนเปื้อนของน้ำมันในสภาพแวดล้อมก่อให้เกิดผลกระทบต่อทรัพยากรธรรมชาติ และมีผลให้เกิดความเสียหายต่อทรัพย์สินของมนุษย์ เช่น เมื่อน้ำมันซึ่งลงสู่ช่องว่างของดิน เกิดการปนเปื้อนในแหล่งน้ำใต้ดินที่ใช้ในการอุปโภคและบริโภค อีกทั้งยังส่งผลกระทบในระยะยาวทำเกิดการเปลี่ยนแปลงของระบบนิเวศน์ ปัจจุบันมีเทคนิคต่างๆ ที่ใช้แก้ปัญหาการปนเปื้อนของสารมลพิษในสภาพแวดล้อม เช่นวิธีการทางกายภาพ วิธทางเคมี และวิธีทางชีวภาพ อย่างไรก็ดีเมื่อทำการเปรียบเทียบต้นทุนในการแก้ปัญหาโดยวิธีทางกายภาพ และ การใช้สารเคมี พบว่าวิธีทางชีวภาพ โดยวิธี Bioremediation เป็นเทคนิคที่มีประสิทธิภาพและมีต้นทุนที่ถูกกว่าเมื่อเทียบกับเทคนิคอื่น (Atlas, 1995)

เทคนิคทางด้าน Bioremediation เป็นกระบวนการแก้ปัญหาการเกิดการปนเปื้อนของดินโดยใช้จุลินทรีย์เพื่อเร่งให้เกิดการย่อยสลาย เช่นในกรณีการเกิดอุบัติเหตุเกิดการรั่วไหลของน้ำมันดิบลงสู่ดิน เชื้อจุลินทรีย์บางชนิดซึ่งดำรงชีวิตอยู่ในดินสามารถใช้สารประกอบไฮโดรคาร์บอนดังกล่าวเป็นแหล่งคาร์บอน และแหล่งพลังงานในการเจริญเติบโต ก่อให้เกิดการเปลี่ยนรูป (mechanism) ของสารประกอบ aromatic และ aliphatic เป็นสารเมตาโบไลต์ที่สามารถใช้ในการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ต่อไป (Meyer และคณะ, 1999) อย่างไรก็ดีการนำเอาเทคนิคทางด้าน Bioremediation โดยวิธี Bioaugmentation มาใช้งานยังคงมีข้อจำกัดในการคัดเลือกสายพันธุ์จุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการย่อยสลายสารปนเปื้อนในพื้นที่ที่เกิดปัญหาอย่างแท้จริง ผู้วิจัยจึงเล็งเห็นว่าการศึกษาเพื่อพัฒนาเทคนิคทางด้าน Bioremediation ในแก้ไขปัญหาการปนเปื้อนของสารประกอบไฮโดรคาร์บอนในดิน โดยใช้เทคนิค Denature Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) ร่วมกับการแยกแบคทีเรียจากตัวอย่างดินที่มีการปนเปื้อน เป็นแนวทางในการคัดเลือกแบคทีเรียประจำถิ่น (indigenous bacteria) ที่เจริญในตัวอย่างดินปนเปื้อน และมีความสามารถในการย่อยสารประกอบไฮโดรคาร์บอน ซึ่งเป็นการเพิ่มศักยภาพให้กับเทคนิค Bioaugmentation เพื่อนำไปใช้ในการแก้ไขปัญหาดินที่มีการปนเปื้อนด้วยสารประกอบไฮโดรคาร์บอนในสภาพแวดล้อมต่อไป

วิธีการทดลอง

การเตรียมตัวอย่างดิน

ดินที่ใช้ทดลองคือตัวอย่างดินที่มีการปนเปื้อนด้วยสารประกอบไฮโดรคาร์บอนประเภทน้ำมันหล่อลื่นจากบริเวณคลังเก็บน้ำมัน ของบริษัท TPI กรุงเทพ ที่มีสาเหตุของการปนเปื้อนมาจากการล้างตะกอนก้นถังน้ำมัน โดยทำการปรับอัตราส่วนของธาตุอาหารของตัวอย่างดินคือ คาร์บอน (C): ไนโตรเจน (N): ฟอสฟอรัส (P) เป็น 100:10:2 เพื่อเพิ่มจำนวนแบคทีเรีย (enrichment) เสนอโดย Margesin และ Schinner (1999) แบ่งตัวอย่างดินจำนวน 20 กรัม ใส่ใน flask ขนาด 250 มิลลิลิตร และปิดด้วยจุกยาง ทำการบ่มตัวอย่างดินที่ 25 ^{0}C เก็บตัวอย่างดินที่บ่ม 0 ชั่วโมง 1, 7, 28 และ 42 วัน ตัวอย่างละ 4 ซ้ำ เพื่อนำไปใช้ในการสกัดสารพันธุกรรม และทำการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียในห้องปฏิบัติการ

การเพิ่มปริมาณชิ้น 16S rDNA จากตัวอย่าง DNA และ RNA

ตัวอย่างดินที่บ่ม 0 ชั่วโมง 1, 7, 28 และ 42 วัน นำมาสกัด DNA และ RNA โดยการปรับปรุงวิธีการของ Griffiths และคณะ (2000) นำตัวอย่าง RNA มาสังเคราะห์ cDNA โดยใช้ primer 534R ในขั้นตอนการทำ RT-PCR ด้วยวิธีของ Griffiths และคณะ (2000) ตัวอย่าง DNA และ cDNA ใช้เป็นต้นแบบสารพันธุกรรมในการสังเคราะห์เพื่อเพิ่ม 16S rDNA โดยใช้เทคนิค PCR ด้วย universal primer ที่มีความจำเพาะกับช่วง V3 region ของ 16S rDNA

(Medlin และคณะ, 1998) ประกอบไปด้วย forward primer 341F-$G_{22}C_{12}$ ซึ่งมี GC-clamp และ reverse primer ที่ 534R ซึ่งเสนอโดย Muyzer และคณะ (1993)

การทำ Denature Gradient Gel Electrophoresis (DGGE)

การเตรียม gel เพื่อทำ electrophoresis ใช้วิธีการของ Muyzer และคณะ (1993) ยกเว้นความเข้มข้นของ acrylamide เป็น 10% ซึ่งมีความแตกต่างของ urea gradient ตั้งแต่ 20% ถึง 70%

การเลือกแถบ DNA จากลายพิมพ์ DNA ของโครงสร้างประชากรแบคทีเรีย (Multivariate pattern recognition)

ทำการเปลี่ยนความเข้มของลายพิมพ์แต่ละแถบ DNA ซึ่งมาจากการทำ electrophoresis แสดงเป็นค่าความเข้มของแถบ DNA ด้วยโปรแกรม Biomuneric distance matrix และวิเคราะห์เปรียบเทียบลายพิมพ์จากขนาดและความเข้มของแถบ DNA ด้วยวิธี Stepwise discriminate function วิเคราะห์แบบ Principle coordinates ในโปรแกรม STATISTICA เพื่อเลือกแถบ DNA ที่มีความเข้มเพิ่มขึ้นตั้งแต่วันที่เริ่มต้นบ่มตัวอย่างดินจนถึงวันสุดท้าย ซึ่งเป็นตัวแทนของแบคทีเรียประชากรหลัก (dominant species) จากประชากรแบคทีเรียทั้งหมดในตัวอย่างดิน

การเตรียมตัวอย่าง DNA เพื่อหาลำดับนิวคลีโอไทด์

เลือกแถบชิ้น DNA ที่เป็นตัวแทนของแบคทีเรียประชากรหลัก ซึ่งมีความเข้มของแถบ DNA ในลายพิมพ์สูงสุด ทำการยืนยันผลว่าเป็น DNAเพียงแถบเดียว (single band DNA) โดยทำการ re-amplified ด้วย primer 341F-GC และ 534R เพื่อทำ electrophoresis ด้วย 10% acrylamide ซึ่งมีความแตกต่างของ urea gradient ตั้งแต่ 30% ถึง 70% จนกระทั่งได้ DNA แถบเดียว จากนั้นทำการสกัด DNA จาก acrylamide gel แล้วทำการเพิ่มปริมาณ DNA ด้วย primer 341F และ 534R เพื่อนำตัวอย่าง DNA ดังกล่าวไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์

การเพาะเลี้ยงแบคทีเรียในห้องปฏิบัติการ

ทำการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียบนอาหารที่ใช้น้ำมันหล่อลื่นเป็นแหล่งคาร์บอน (MSM+oil) และ nutrient agar (NA) โดยเทคนิค spread plate ทำการสุ่มเลือกแบคทีเรียที่สามารถเจริญบนอาหารดังกล่าว นำมาทำให้บริสุทธิ์แล้วเก็บโคโลนีเดี่ยวลงใน MSM+oil และ NA slant

การคัดเลือกสายพันธุ์แบคทีเรีย จากการศึกษาทางสัณฐานวิทยา ชีวเคมี และ การวิเคราะห์ 16S rDNA

ใช้ข้อมูลทางสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียใน Genus *Bacillus, Microbacterium* และ *Pseudomonas* ซึ่งเป็นประชากรหลักจากการศึกษาด้วยเทคนิค DGGE เพื่อใช้เป็นแนวทางในการจัดกลุ่มในการศึกษาทางด้านชีวเคมี เพื่อจำแนกสายพันธุ์แบคทีเรีย จากนั้นทำการวิเคราะห์ 16S rDNA จากตัวอย่างแบคทีเรียใน Genus ที่สนใจ โดยวิธี direct sequence ด้วย primer 520F, 520R, 750R และ 900F

การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของแบคทีเรียที่คัดเลือกจากตัวอย่างดินปนเปื้อน

ทำการตรวจแก้ไขลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยโปรแกรม Chromas version 1.44 (Klatte, 1997) ทำการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์กับ DNA ของแบคทีเรียในฐานข้อมูลโดยใช้โปรแกรม BLAST (Altschul และคณะ, 1997) ผลที่ได้นำมาประกอบการทำ alignment โดยโปรแกรม CLASTAL X version 1.81 สร้าง Phylogenetic tree ด้วยวิธีการหา distance ของ Galtier และ Gouy (1995) จากโปรแกรม TREECON version 1.3b (Vande Peer และ De Wachter, 1993)

ผลการทดลองและวิจารณ์

ลายพิมพ์ DNA ของโครงสร้างประชากรแบคทีเรีย

ผลจากการเปรียบเทียบลายพิมพ์ DNA จากตัวอย่างที่ 0 ชั่วโมง 1, 7, 28 และ 42 แสดงให้เห็นว่ามีความหลากหลายทางโครงสร้างประชากรของแบคทีเรียเกิดขึ้นตั้งแต่วันที่ 1 จนถึงวันที่ 42 ของตัวอย่างดินที่มีการปรับอัตราส่วนของ C:N:P เมื่อทำการเปรียบเทียบระหว่าง DGGE profile ของลายพิมพ์ DNA ที่ใช้ DNA (รูป 1A) และ RNA (รูป 1B) เป็นต้นแบบในการเพิ่มปริมาณชิ้น 16S rDNA ในช่วง V3 region พบว่าความหลากหลายของประชากรแบคทีเรียในลายพิมพ์ DNA ที่ใช้ 16S rRNA (รูป 1B) เป็นต้นแบบ บ่งบอกว่ามีจำนานประชากรน้อยกว่าลายพิมพ์ DNA ที่ใช้ 16S rDNA (รูป 1A) เป็นต้นแบบ เนื่องมาจาก 16S rRNA เป็นเครื่องมือที่ใช้ในการบ่งบอกความมีชีวิต (Friedrich และคณะ, 1997) ซึ่งแถบ DNA ที่ปรากฏบนลายพิมพ์จะเป็นตัวแทนของแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์ซึ่งกำลังเจริญเติบโตในตัวอย่างดินที่ปนเปื้อนด้วยสารประกอบไฮโดรคาร์บอน เพราะมีการเปลี่ยนแปลงของลายพิมพ์ DNA ของตัวอย่างดินที่บ่มตั้งแต่วันที่ 1 จนถึงวันที่ 42 ทำการวิเคราะห์ความเข้มของแถบชิ้น DNA เพื่อนำข้อมูลที่ได้ไปทำการวิเคราะห์เพื่อเปรียบเทียบความเหมือนของลายพิมพ์ในแต่ละซ้ำ และพิจารณาความแตกต่างของลายพิมพ์ในแต่ละวัน ด้วยวิธี Stepwise discriminate function วิเคราะห์แบบ Principle coordinates ในโปรแกรม STATISTICA

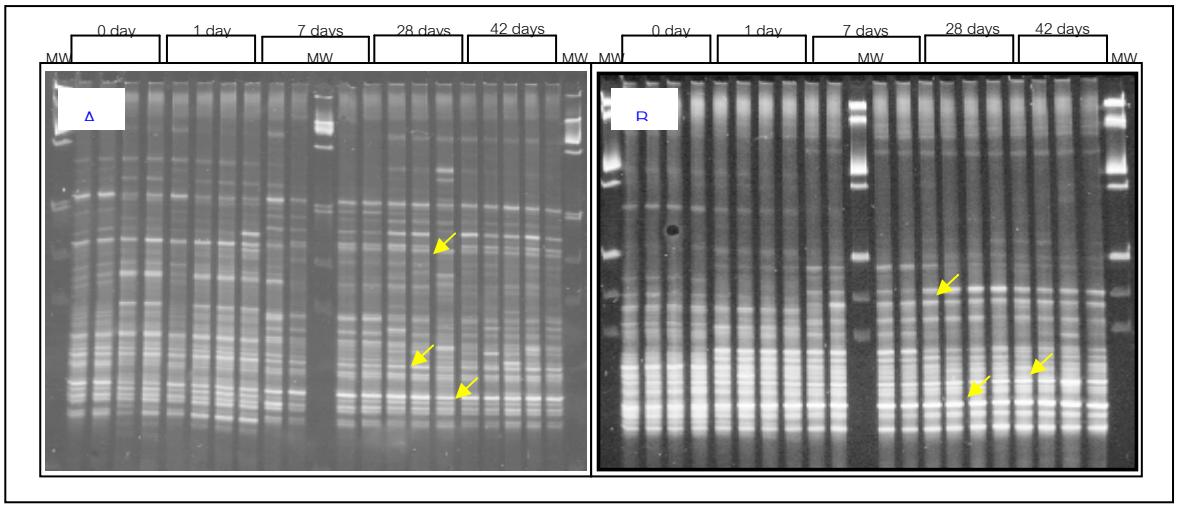

Figure 1 Denaturing gradient gel of environmental sample 16S rDNA from soil contaminated with lubricant (1A), 16S rRNA from soil contaminated with lubricant (1B) showing the diversity relationship between of bacteria had been responded with N and P. Arrow mark bands extracted and sequence to verify specificity of the stepwise analysis result (Figure 2). MW identified the molecular weight marker used to normalize the gels.

การวิเคราะห์ลายพิมพ์ DNA โดยวิธี Stepwise discrimination function

ผลของการวิเคราะห์ด้วยวิธี Stepwise discriminate function วิเคราะห์แบบ Principle coordinates ในโปรแกรม STATISTICA เป็นการเปรียบเทียบลายพิมพ์ DNA จากขนาดและความเข้มของแถบ DNA เพื่อเปรียบเทียบความเหมือนของลายพิมพ์ในแต่ละซ้ำ และพิจารณาความแตกต่างของลายพิมพ์ในแต่ละวัน ซึ่งผลที่ได้จากการ

วิเคราะห์มีความสอดคล้องกันระหว่างแต่ละ 4 ซ้ำของตัวอย่างในแต่ละวัน ดังแสดงผลโดยการจับกลุ่มข้อมูลในรูปที่ 2 ผลจากการวิเคราะห์แสดงให้เห็นว่าแถบชิ้น DNA ที่เป็นตัวแทนของแบคทีเรียที่เป็นประชากรหลัก (dominant species) สามารถแยกออกจากลายพิมพ์โครงสร้างประชากรแบคทีเรียทั้งหมดตั้งแต่วันที่ 1 ของการบ่มตัวอย่างดิน ซึ่ง DGGE profile ของลายพิมพ์ DNA ที่ใช้ 16S rDNA เป็นต้นแบบ ใช้การวิเคราะห์เพื่อเปรียบเทียบความเหมือนและความแตกต่างจากแถบชิ้น DNA ที่มีความสำคัญทั้งหมดจำนวน 14 แถบ เรียกการเปรียบเทียบขั้นนี้ว่า Maximum steps จากนั้นทำการเปรียบเทียบขั้น Minimum steps เป็นการเปรียบเทียบแถบชิ้น DNA จำนวนน้อยที่สุด พบว่ามีแถบ DNA เพียง 3 แถบคือ D13, D16 และ D18 เป็นตัวแทนของแบคทีเรียที่มีความสำคัญที่สุดในโครงสร้างประชากรของแบคทีเรียทั้งหมด (รูปที่ 2B) ส่วนลายพิมพ์ DNA ที่ใช้ 16S rRNA เป็นต้นแบบ พบว่าข้อมูลที่ใช้ในการเปรียบเทียบขั้น Maximum steps ของแถบชิ้น DNA ประกอบด้วยแถบ DNA จำนวน 11 แถบจากโครงสร้างของประชากรแบคทีเรียทั้งหมด (รูปที่ 2C) จากนั้นเมื่อทำการเปรียบเทียบขั้นสุดท้ายของการวิเคราะห์ขั้น Minimum steps (รูปที่2D) พบว่ามีเพียง 3 แถบที่มีความสำคัญคือ A16, A18 และ A20 นำข้อมูลจากการวิเคราะห์ดังกล่าวไปทำการเลือกแถบชิ้น DNA ที่มีความสำคัญ (รูปที่ 1) เพื่อวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้น DNA ทั้ง 6 แถบคือ D13, D16, D18, A16, A18 และ A20 แล้วทำการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์กับ DNA ของแบคทีเรียในฐานข้อมูลโดยใช้โปรแกรม BLAST เพื่อนำมาประกอบการวิเคราะห์สร้าง phylogenetic tree โดยการทำalignment ลำดับเบสด้วยโปรแกรม CLASTAL X version 1.81 และทำการสร้าง phylogenetic tree โดยวิธี distance matrix ด้วย algorithms แบบ Neighbor-joining (NJ) method และ estimate จำนวน nucleotide substitutions ด้วย Galtier–Gouy model ผล

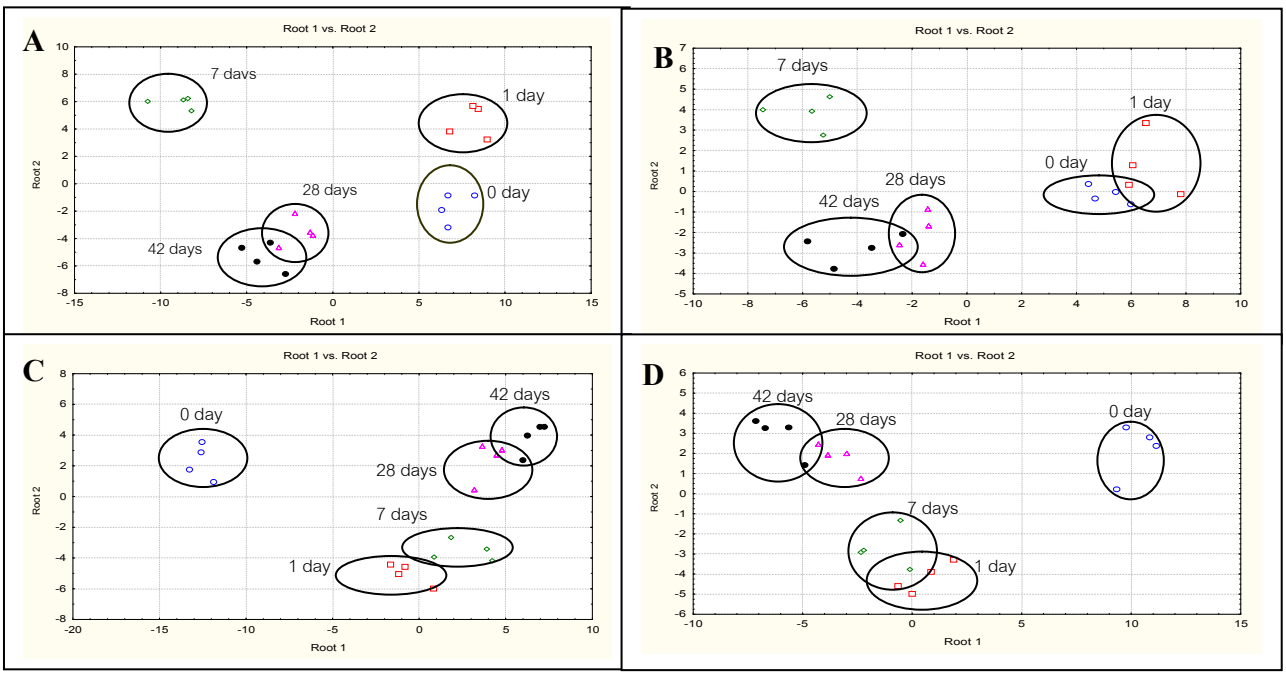

Figure 2 Stepwise analysis in STATISTICA package shown the important band was separate from another band in denaturing gradient gel. Environmental sample 16S rDNA from soil contaminated with lubricant shown 14 steps to compare variable between bands (2.A) and 3 steps to compare variable between

bands (2.B). Environmental sample 16S rRNA from soil contaminated with lubricant shown 11 steps to compare variable between bands (2.C) and 3 steps to compare variable between bands (2.D).

จากการแสดงความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการพบว่ามีความหลากหลายของแบคทีเรียประชากรหลัก และแถบ DNA จาก 16S rRNA เป็น *Bacillus marisflavi* (A18), *Microbacterium oxydans* (A20) และ *Pseudomonas oleovorans* (A16) ดังแสดงในรูปที่ 3

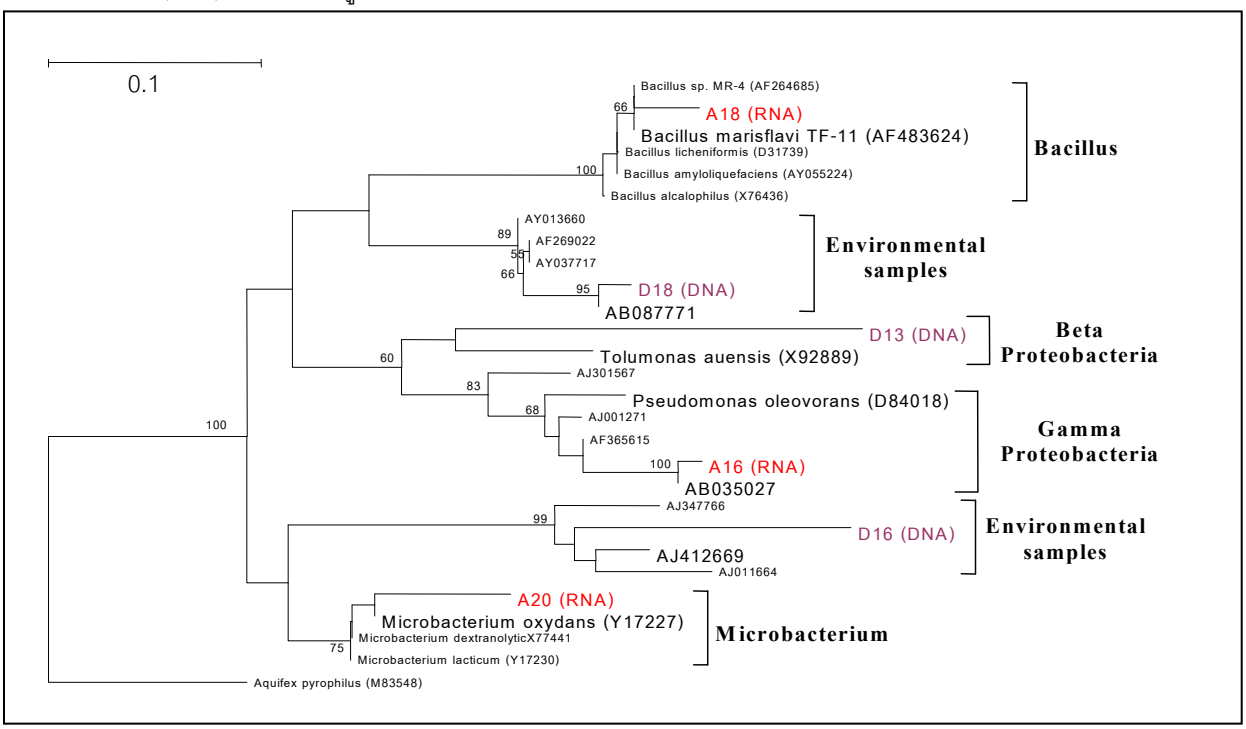

Figure 3 Phylogenetic tree from soil contaminated with lubricant analysis showing the relationship between DGGE bands were amplified using primer 341F and 534R (16S rDNA and 16S rRNA) and they're nearest neighbors held on-line. The tree is based on a final alignment of 134 bases. The distance scale indicates 0.1 substitutions/site. Numbers represent the number of times the clade to the right of the node was recovered in 100 bootstrap re-samplings of the data. *Aquifex pyrophilus* (EMBL Accession No. M83548) was used to root the tree.

ผลการคัดเลือกสายพันธุ์แบคทีเรีย

ทำการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียจากตัวอย่างดินที่ปนเปื้อน แล้วทำการสุ่มเลือกแบคทีเรียที่มีลักษณะโคโลนีแตกต่างกัน เพื่อศึกษาสัณฐานวิทยา โดยคัดเลือกแบคทีเรียที่มีลักษณะโคโลนี รูปร่างของเซลล์ และการติดสีแกรมเหมือนกับแบคทีเรียใน Genus *Bacillus, Microbacterium* และ *Pseudomonas* ต่อมาทำการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี สามารถจัดจำแนกแบคทีเรียได้เป็น Genus *Bacillus*, Order Actinobacteria และ Phylum Proteobacteria นำตัวอย่างแบคทีเรียดังกล่าวมาทำการวิเคราะห์ความหลากหลายของชนิดแบคทีเรีย โดยการวิเคราะห์ 16S rDNA แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียที่คัดเลือกมีความหลากหลายของชนิดแบคทีเรียดังแสดงในรูปที่ 4 แสดงให้เห็นถึงความหลากหลายของชนิดแบคทีเรียที่พบ ซึ่งแบคทีเรียแต่ละชนิดที่คัดเลือกมามีข้อมูลสนับสนุนว่าน่าจะมีความสามารถใน

การย่อยสารประกอบไฮโดรคาร์บอน เนื่องจากมีข้อมูลสนับสนุนจากเทคนิค DGGE และข้อมูลจากการทำ BLAST ซึ่งมีรายงานว่าพบในตัวอย่างดินที่มีการปนเปื้อนด้วยสารประกอบไฮโดรคาร์บอนได้แก่ Phenanthrene degrading bacteria (F25 และ F25A) สามารถย่อย Phenanthrene ได้, Bacillus firmus (65 และ F38) พบในพื้นที่ปนเปื้อนด้วย Polycyclic Aromatic Hydrocarbon (PAH) เป็นต้น

สรุปผลการทดลอง

ผลจากการทดลองพบว่าการวิเคราะห์เปรียบเทียบลายพิมพ์ความเข้มของแถบ DNA ด้วยวิธี Multivariate pattern recognition (Stepwise discriminate function) มีประสิทธิภาพในการวิเคราะห์ลายพิมพ์ DNA เพื่อเลือกแถบ DNA ของแบคทีเรียที่เป็นประชากรหลัก (dominant species) ผลจากการศึกษาโดยใช้ 16S rRNA พบว่าเป็นแถบDNA ดังกล่าวคือ *Bacillus marisflavis* (A18), *Microbacterium oxydans* (A20) และ *Pseudomonas oleovorans* (A16) จากนั้นทำการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียในห้องปฏิบัติ แล้วทำการศึกษาทางสัณฐานวิทยาและคุณสมบัติทางชีวเคมี จากนั้นทำการศึกษา 16S rDNA phylogenetic analysis ของแบคทีเรียที่คัดเลือกแสดงให้เห็นถึงความหลากหลายของชนิดแบคทีเรีย พบว่าสามารถจำแนกได้ 15 phylotype ประกอบด้วยแบคทีเรียใน Genus *Arthrobacter, Brachybacterium, Microbacterium, Brevibacterium, Bacillus, Brevibacillus, Pseudomonas* และ *Massilia* (Family *Beta-Proteobacteria)* นอกจากนั้นยังพบว่าแบคทีเรียที่สามารถเพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการคือ *Bacillus marisflavis* (D46A), *Microbacterium oxydans* (B31) และ *Pseudomonas oleovorans* (My1) เหมือนกับแบคทีเรียประชากรหลักจากการศึกษาด้วยเทคนิค DGGE

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณกองทุนสนับสนุนการวิจัย ภายใต้โครงการปริญญาเอกกาญจนาภิเษก ที่เสนับสนุนทุนเพื่อทำการศึกษาวิจัย และขอบคุณภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ที่ได้อนุเคราะห์ให้ใช้เครื่องมืออุปกรณ์การทดลอง และสารเคมีต่างๆ ในการทำงานวิจัย

เอกสารอ้างอิง

Atlas, R. M. 1995. Bioremediation of petroleum pollutants. International Biodeterioration & Biodegradation. 35:317-327.

Griffiths, R. I., A. S. Whiteley, A. G. O'Donnell, and M. J. Bailey. 2000. Rapid method for coextraction of DNA and RNA from natural environments for analysis of ribosomal DNA and rRNA-based microbial community composition. Applied and Environmental Microbiology. 66:5488-5491.

Medlin, L., H. J. Elwood, S. Stickel, and M. L. Sogin. 1988. The characterization of enzymatically amplified eukaryotic 16S-like rRNA-coding regions. Gene. 71:491-499.

Margesin, R., and Schinner, F. 1999. Review biological decontamination of oil spills in cold environments. Journal of Chemical Technology and Biotechnology 74:381-389.

Meyer, S., R. Moser, A. Neef, U. Stahl, and P. Kampfer. 1999. Differential detection of key enzymes of polyaromatic-hydrocarbon-degrading bacteria using PCR and gene probes. Microbiology. 145:1731-1741.

Parr, J. F., R. I. Papendick, S. B. Hornick, and R. E. Meyer. 1992. Soil quality : attributes and relationships to alternative and sustainable agriculture. American Journal of Alternative Agriculture. 7:2-3.

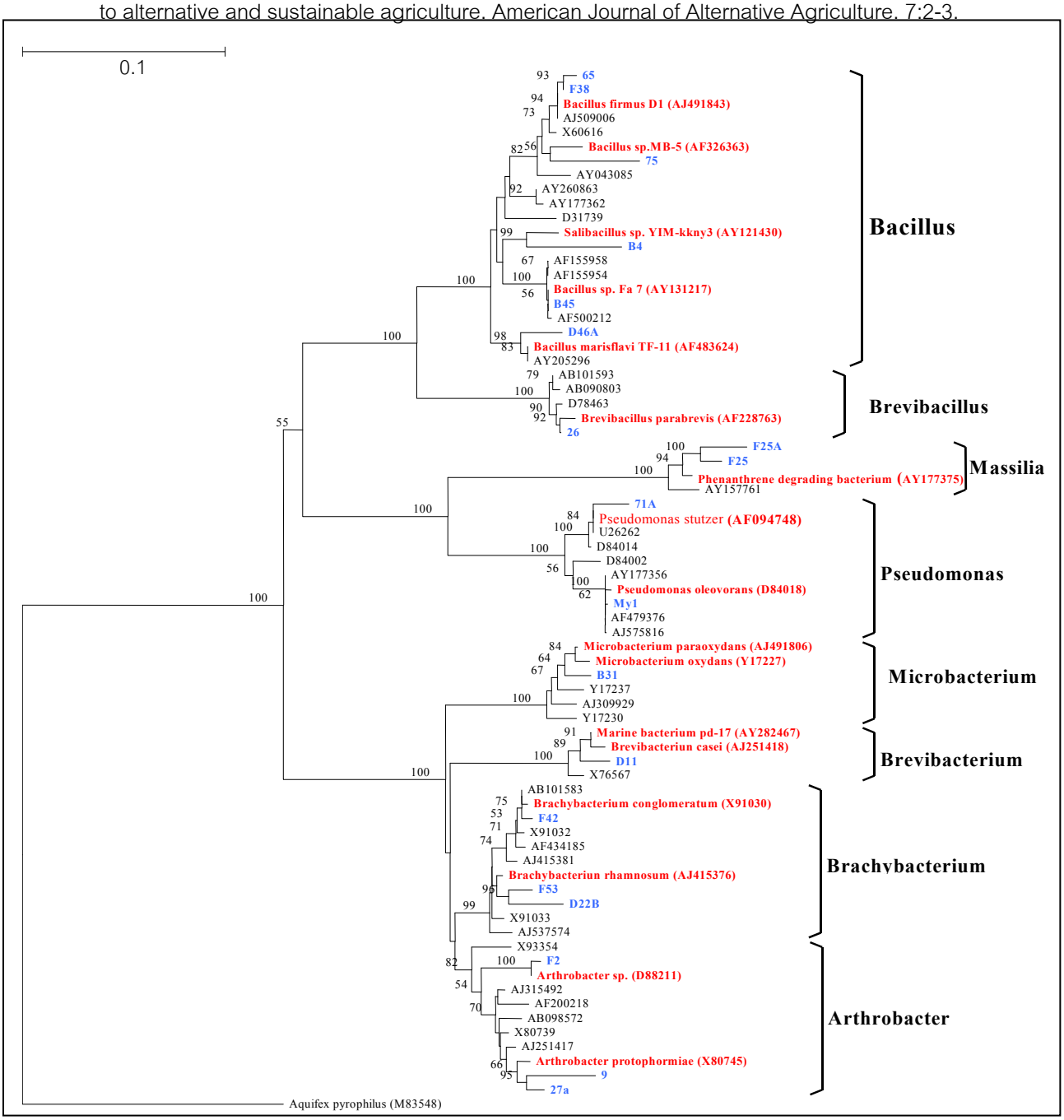

Figure 4 Neighbour joining dendrogram of cultivated bacteria 16S rDNA sequence types obtained from the lubricant-contaminated soil. Reference sequence were chosen with the BLAST program. The tree is based on a final alignment of 1496 bases. The distances scale indicates 0.1 substitution/site. Bootstrap values (in percent) are based on 100 replicates each and are shown for brances with more than 50% boot strap support. *Aquifex pyrophilus* (EMBL accession No. M83548)

was used to root the tree. Blue color indicate cultivated bacteria and red color was represent reference sequence that closed to cultivated bacteria.