

ความหลากหลายและความอุดมสมบูรณ์ของแบคทีเรียและยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอน ในดินตะกอนจากอ่าวไทย

Diversity and Abundance of Bacteria and Genes Involved in Biodegradation of Petroleum Hydrocarbons in Sediment from Gulf of Thailand

ชนกภรณ์ เมืองจินดา¹ พลอยชนก จันทร์เอี่ยม¹ เพ็ญใจ สมพงษ์ชัยกุล² และ อรุณทัย ภิญญาคง^{1,3*}

Chanokporn Muangchinda¹, Ploychanoke Chanaimand¹, Penjai Sompongchaiyakul², and Onruthai Pinyakong^{1,2*}

¹หน่วยวิจัยการบำบัดมลพิษทางสิ่งแวดล้อมโดยชีววิธี ภาควิชาจุลชีววิทยา จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ถ.พญาไท ปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330

²ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ถ.พญาไท ปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330

³ศูนย์ความเป็นเลิศด้านการจัดการสารและของเสียอันตราย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ถ.พญาไท ปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330

*Corresponding author's e-mail: onruthai@gmail.com

บทคัดย่อ: อ่าวไทยเป็นที่พื้นที่เสี่ยงต่อการปนเปื้อนของปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอน เช่น น้ำมันดิบ และพอลิไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน (polycyclic aromatic hydrocarbons, PAHs) ซึ่งสารประกอบเหล่านี้คงอยู่ได้นานในสิ่งแวดล้อม และส่งผลกระทบต่อสิ่งมีชีวิต งานวิจัยนี้มีจุดประสงค์เพื่อศึกษาความหลากหลายและความอุดมสมบูรณ์ของแบคทีเรียและยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนในดินตะกอนจากอ่าวไทย และประเมินแนวโน้มในการเกิดกระบวนการย่อยสลายทางชีวภาพ โดยเก็บดินตะกอนจำนวน 45 ตัวอย่างจากบริเวณอ่าวไทย วิเคราะห์ปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดในแต่ละตัวอย่าง วิเคราะห์ความหลากหลายของประชาคมแบคทีเรีย และตรวจหายีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายน้ำมันดิบ และ PAHs และแบ่งตัวอย่างออกเป็น 14 กลุ่ม ตามพื้นที่และลักษณะทางกายภาพ เพื่อคัดแยกกลุ่มแบคทีเรียย่อยสลายปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอน โดยใช้ น้ำมันดิบและสารผสม PAHs (ฟีแนนทริน แอนทราซีน ฟลูออแรนทีน และไพรีน) เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงาน โดยผลการทดลองพบว่าดินตะกอนตัวอย่างมีจำนวนแบคทีเรียอยู่ในช่วง 1.5×10^8 - 1.1×10^{10} MPN/กรัมดินเปียก และได้วิเคราะห์พบความหลากหลายของแบคทีเรียในแต่ละตัวอย่างที่น่าสนใจคือสามารถตรวจพบยีนที่ประมวลรหัสแอลเคนโมโนออกซิจีเนส (*alkB*) ซึ่งเกี่ยวข้องกับการย่อยสลายแอลเคน โดยวิธี PCR ในบางตัวอย่างดินตะกอน รวมทั้งสามารถคัดแยกกลุ่มแบคทีเรียย่อยสลายน้ำมันดิบ PAHs ผสมฟีแนนทริน และแอนทราซีน ได้ 7 กลุ่ม 5 กลุ่ม 5 กลุ่ม และ 5 กลุ่ม ตามลำดับ จากผลการทดลองดังกล่าวแสดงให้เห็นว่า ในดินตะกอนตัวอย่างมีแบคทีเรียประจำถิ่นที่มีความสามารถในการย่อยสลายน้ำมันดิบและ PAHs ซึ่งข้อมูลที่ได้สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการบำบัดดินตะกอนที่ปนเปื้อนด้วยปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนต่อไปได้

คำสำคัญ: อ่าวไทย, ดินตะกอน, ปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอน, PAHs, น้ำมันดิบ

Abstract: The Gulf of Thailand is considered as the risk area for contamination of petroleum hydrocarbons such as crude oil and polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). These components are persistent in the environment and affect to living organisms. This study aimed to examine diversity and abundance of bacteria and genes involved in the degradation of petroleum hydrocarbons in sediments from Gulf of Thailand and to assess the bioremediation potential in this area. Forty-five sediment samples collected from Gulf of Thailand were determined for the population sizes of total bacteria, diversity of bacterial community and the presence of genes involved in crude oil and PAH degradation. In addition, the samples were grouped into 14 groups based on their locations and characteristics for isolation of bacterial consortia capable of utilizing crude oil and mixed PAHs (phenanthrene, anthracene, fluoranthene and pyrene) as the sole carbon and energy source. As a result, the abundance of total bacteria in the samples was found to range from 1.5×10^8 to 1.1×10^{10} MPN g⁻¹ wet weight. Diversity of bacterial community was analyzed in each sample. Interestingly, alkane monooxygenase genes (*alkB*) involved in alkane degradation were detected by PCR method in some samples. Furthermore, seven crude oil-, five mixed PAHs-, five phenanthrene- and five anthracene-degrading consortia were obtained by the enrichment approach. Our results suggest that indigenous bacteria in this sediment had the ability to degrade crude oil and PAHs. This information is useful for further bioremediation of petroleum hydrocarbons contaminated sediments.

Keywords: Gulf of Thailand, sediment, petroleum hydrocarbons, PAHs, crude oil

บทนำ

อ่าวไทยเป็นน่านน้ำที่อยู่ในทะเลจีนใต้ มหาสมุทรแปซิฟิก ล้อมรอบด้วยประเทศไทย มาเลเซีย กัมพูชาและเวียดนาม มีพื้นที่ประมาณ 320,000 ตารางกิโลเมตร จากการเพิ่มจำนวนของประชากรและการขยายตัวทางเศรษฐกิจ ทำให้เกิดการพัฒนาดินที่

ชายฝั่งและก่อให้เกิดปัญหาสิ่งแวดล้อมทางทะเลตามมา โดยมีสาเหตุการปนเปื้อนหลักๆ มาจากกิจกรรมการเดินเรือขนส่งสินค้า การลักลอบทิ้งน้ำมันลงสู่แหล่งน้ำ การสัญจรทางเรือ การปนเปื้อนของน้ำมันในน้ำทิ้งจากบ้านเรือน เรือโดยสาร เรือท่องเที่ยว อุตสาหกรรมการขุดเจาะน้ำมัน เป็นต้น (Wattayakorn, 2012) ซึ่งจากสถิติการเกิดเหตุการณ์น้ำมันรั่วไหลลงสู่แหล่งน้ำ พบว่ามีแนวโน้มที่จะเกิดบ่อยขึ้น (Marine Department, 2009) ดังนั้นอ่าวไทยจึงเป็นพื้นที่เสี่ยงต่อการปนเปื้อนของปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอน เช่น น้ำมันดิบและพอลิไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน (polycyclic aromatic hydrocarbons, PAHs) ซึ่งสารประกอบเหล่านี้คงอยู่ได้นานในสิ่งแวดล้อมและส่งผลกระทบต่อสิ่งมีชีวิต เช่น ชักนำให้เกิดมะเร็งและก่อให้เกิดการกลายพันธุ์ เป็นต้น (Talley, 2006)

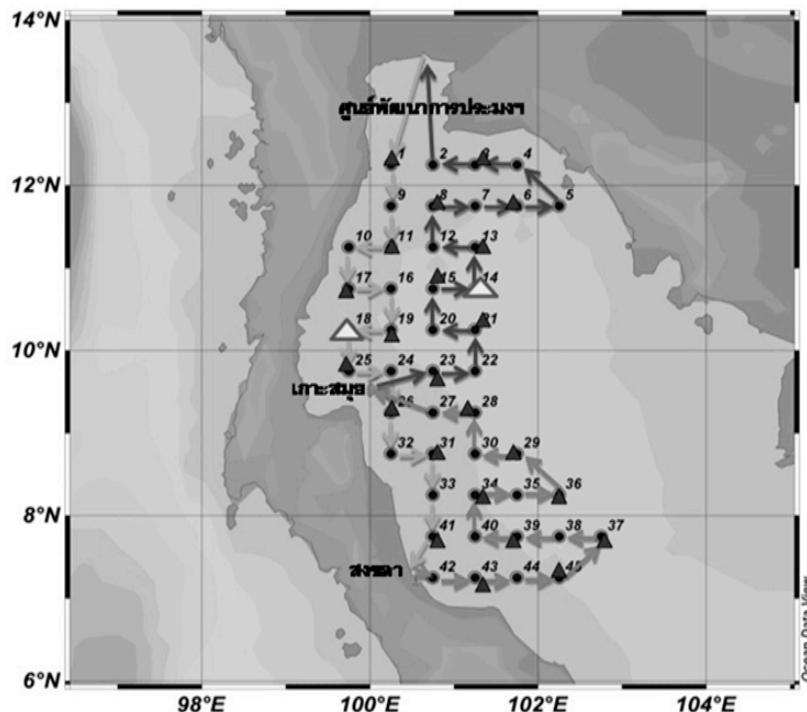
การบำบัดการปนเปื้อนสารพิษในสิ่งแวดล้อมด้วยวิธีทางชีวภาพ เป็นวิธีหนึ่งที่มีความสนใจเนื่องจากมีต้นทุนต่ำและไม่ส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม โดยอาศัยการทำงานของจุลินทรีย์เพื่อย่อยสลายหรือลดปริมาณสารพิษในสิ่งแวดล้อม (Lu และคณะ, 2011) กระบวนการย่อยสลายน้ำมันปิโตรเลียม มีเอนไซม์ที่สำคัญ คือ แอลเคนไฮดรอกซิเลส ซึ่งมีเอนไซม์ที่ประมวลรหัสการสร้างเอนไซม์แอลเคนไฮดรอกซิเลสหลายกลุ่ม เช่น ยีน *alkB* ซึ่งเกี่ยวข้องกับการย่อยสลายแอลเคนที่มีคาร์บอน 5-16 อะตอม (Smith และคณะ, 2002) ยีน *alkB1* ซึ่งเกี่ยวข้องกับการย่อยสลายแอลเคนที่มีกิ่งสาขา (Kohnno และคณะ, 2002) ยีน CYP153 ซึ่งเกี่ยวข้องกับการย่อยสลายแอลเคนที่มีคาร์บอน 8-16 อะตอม (Liu และคณะ, 2002) เป็นต้น สำหรับกระบวนการย่อยสลาย PAHs นั้น มีเอนไซม์ที่สำคัญ คือ เอนไซม์ไดออกซิจีเนส ซึ่งประกอบด้วย 3 ส่วน คือ เฟอร์รีดอกซินรีดักเทส เฟอร์รีดอกซิน และเทอร์มินัลไดออกซิจีเนส ซึ่งส่วนสุดท้ายนี้ประกอบด้วยหน่วยย่อย 2 หน่วย คือ หน่วยย่อยแอลฟา และหน่วยย่อยเบตา โดยที่ส่วนของหน่วยย่อยแอลฟา เป็นส่วนที่เร่งการเกิดปฏิกิริยาการเติมออกซิเจน 2 อะตอมเข้าสู่โครงสร้าง PAHs หรือวงอะโรมาติก (Habe และ Omori, 2003) ซึ่งข้อมูลยีนเหล่านี้มีประโยชน์ในหลายด้าน เช่น ใช้เป็นยีนเครื่องหมายในการตรวจติดตามแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพการย่อยปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนได้

ดังนั้นงานวิจัยนี้มีจุดประสงค์เพื่อศึกษาความหลากหลายและความอุดมสมบูรณ์ของแบคทีเรียและยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนในดินตะกอนจากบริเวณอ่าวไทยและประเมินแนวโน้มในการเกิดกระบวนการย่อยสลายทางชีวภาพ

วิธีการศึกษา

1. เก็บตัวอย่างดินตะกอน

เก็บตัวอย่างดินตะกอนจากสถานีสำรวจ 45 สถานี ในบริเวณอ่าวไทย แสดงดังรูปที่ 1 ในระหว่างวันที่ 14 มีนาคม ถึง 12 เมษายน พ.ศ. 2556 โดยเรือ M.V. SEAFDEC



รูปที่ 1 สถานีเก็บตัวอย่างดินตะกอนจากบริเวณอ่าวไทย จำนวน 45 สถานี

2. ตรวจวัดจำนวนแบคทีเรียเริ่มต้นในตัวอย่างดินตะกอน

2.1 ตรวจวัดจำนวนแบคทีเรียเริ่มต้นทั้งหมดในตัวอย่างดินตะกอน

ซังดินตะกอน 1 กรัม ใส่ในหลอดทดลองที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB ปริมาตร 9 มิลลิลิตร (เจือจาง 10 เท่า) เจือจางเชื้อใน

96-well plate โดยใส่อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB ปริมาตร 180 ไมโครลิตร ลงทุกหลุมก่อน จากนั้นนำอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB ที่เจือจาง 10 เท่า ผสมให้เข้ากับอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB ในแถวแรก (เจือจาง 100 เท่า) เจือจางเชื้อจนมีความเข้มข้นเชื้อเป็น 1:100,000 เท่า บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง วัดความขุ่นที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร และนำไปเปรียบเทียบกับตาราง MPN เพื่อ คำนวณหาจำนวนจุลินทรีย์ (Cochran, 1950)

2.2 ตรวจวัดจำนวนแบคทีเรียเริ่มต้นที่สามารถย่อยสลายสารประกอบ PAHs ในตัวอย่างดินตะกอน

ซึ่งดินตะกอน 1 กรัม ใส่ หลอดทดลองที่มีอาหารเหลว Natural Seawater Medium (NSW) ปริมาตร 9 มิลลิตร (เจือจาง 10 เท่า) เจือจางเชื้อใน 96-well plate โดยใส่ PAHs ที่ละลายใน *n*-hexane ความเข้มข้น 100 ppm ลงทุกหลุมก่อน รอง *n*-hexane ระบาย เต็มอาหารเลี้ยงเชื้อ เหลว NSW ปริมาตร 180 ไมโครลิตร ลงทุกหลุม จากนั้นนำ NSW ที่เจือจาง 10 เท่า ผสมให้เข้ากับอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว NSW ในแถว แรก (เจือจาง 100 เท่า) เจือจางเชื้อจนมีความเข้มข้นเชื้อเป็น 1:100,000 เท่า บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 2 สัปดาห์ ใส่สารละลาย electron donor 10 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง วัดความขุ่นที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร และนำไปเปรียบเทียบกับตาราง MPN เพื่อคำนวณหาจำนวนจุลินทรีย์ (Johnsen และคณะ, 2002)

2.3 ตรวจวัดจำนวนแบคทีเรียเริ่มต้นที่สามารถเจริญบนน้ำมันดิบในตัวอย่างดินตะกอน

ซึ่งดินตะกอน 1 กรัม ใส่หลอดทดลองที่มี 0.85% NaCl ปริมาตร 9 มิลลิตร (เจือจาง 10 เท่า) จากนั้นทำให้เจือจางลงไปเรื่อยๆ จนมีความเข้มข้นเป็น 1:100,000 เท่า นำตัวอย่างจากแต่ละความเจือจางมา 100 ไมโครลิตร spread บนอาหารแข็ง NSW มีผสมน้ำมันดิบ บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 2-3 วัน นับจำนวนแบคทีเรียที่เจริญได้ จากนั้นคำนวณหาจำนวนแบคทีเรียในหน่วย CFU ต่อกรัมดิน

3. การศึกษาความหลากหลายและความอุดมสมบูรณ์ของจุลินทรีย์ในตัวอย่างดินตะกอน

3.1 สกัดดีเอ็นเอจากดินตัวอย่าง

ซึ่งดินตัวอย่าง 0.25 กรัม ใส่หลอดเซนติพิฟจขนาด 2 มิลลิตร จากนั้นสกัดดีเอ็นเอด้วยชุด PowerSoil DNA Isolation kit (MoBio Laboratories, Inc.) ทำ 3 ซ้ำ เก็บสารละลายดีเอ็นเอที่ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาใช้

3.2 ศึกษาโครงสร้างประชากรจุลินทรีย์ด้วยวิธี Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE)

นำสารละลายดีเอ็นเอที่ได้จากข้อ 3.1 มาทำ PCR โดยใช้ส่วนผสมของสารในปฏิกิริยาและโอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์ 341F-GC/520R ซึ่งจำเพาะต่อบริเวณ 16S rDNA ของแบคทีเรีย และ Sphingo 108f/Sphingo 420r ซึ่งจำเพาะต่อบริเวณ 16S rDNA ของแบคทีเรียในกลุ่ม Sphingomonas ขนาดของผลิตภัณฑ์ PCR ที่คาดหวังคือ 179 และ 312 คู่เบส ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์แสดงในตารางที่ 1 สารละลายในปฏิกิริยามีดังนี้ สารละลาย GoTaq® Green Master Mix สารละลายไพรเมอร์ ความเข้มข้น 20 พิโคโมลต่อไมโครลิตร (ของแต่ละตัว) สารละลายดีเอ็นเอความเข้มข้น 100 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร และน้ำกลั่นปลอดประจุปลอดเชื้อ รวมส่วนผสมทั้งหมดให้มีปริมาตรสุทธิ 30 ไมโครลิตร จากนั้นทำ PCR ด้วยเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (DNA Thermo cycle) โดยใช้สภาวะดังนี้

ไพรเมอร์ 341F-GC และ 520R ใช้สภาวะ

- 1) Initial denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เวลา 5 นาที
- 2) Denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เวลา 1 นาที
- 3) Annealing ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เวลา 1 นาที
- 4) Extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เวลา 2 นาที
- 5) ทำขั้นตอนที่ 2) ถึง 4) จำนวน 30 รอบ
- 6) Final extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เวลา 10 นาที

ไพรเมอร์ Sphingo 108f และ Sphingo 420r ใช้สภาวะ

- 1) Initial denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เวลา 2 นาที
- 2) Denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เวลา 15 วินาที
- 3) Annealing ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เวลา 30 วินาที
- 4) Extension ที่อุณหภูมิ 74 องศาเซลเซียส เวลา 30 วินาที
- 5) ทำขั้นตอนที่ 2) ถึง 4) จำนวน 30 รอบ
- 6) Final extension ที่อุณหภูมิ 74 องศาเซลเซียส เวลา 10 นาที

ตรวจสอบผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นโดยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิส ในบัฟเฟอร์ TAE ความเข้มข้น 1 เท่า โดยใช้
อะกาโรสเจลเข้มข้น 2% เพื่อตรวจสอบขนาดผลิตภัณฑ์ PCR โดยเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA Ladder

ใช้อุปกรณ์ของ DCode™ system (Bio-Rad Laboratories Inc., USA) ในการทำ DGGE โดยเตรียมพอลิอะคริลาไมด์
เจลเข้มข้น 8% ที่มีเกรเดียนท์ของสารละลาย denaturant 30-70% (100% ของ denaturant ประกอบด้วย 7 M urea และ 40%
formamide) ซึ่งทำเกรเดียนท์ของสารละลาย denaturant โดยใช้ระบบจ่ายเกรเดียนท์ตามวิธีที่ระบุในคู่มือ เมื่อทำเกรเดียนท์ของสาร
ละลาย denaturant ลงในชุดแซนวิชที่เตรียมเจลแล้วเสียบหัวลงระหว่างกระจกแซนวิช ปล่อยให้พอลิอะคริลาไมด์แข็งตัว ประมาณ 5
ชั่วโมงหรือตั้งทิ้งไว้ข้ามคืน นำชุดเจลแซนวิชใส่ลงในบัฟเฟอร์ TAE ปริมาตร 7 ลิตร ที่ผ่านการให้ความร้อน จนมีอุณหภูมิ 60 องศา
เซลเซียส ผสมผลิตภัณฑ์ PCR กับสีย้อมหยอดลงในช่องวิ่งจากนั้นทำ DGGE โดยใช้ ความต่างศักย์ 130 โวลต์ ที่อุณหภูมิ 60 องศา
เซลเซียส นาน 4.5 ชั่วโมง ย้อมพอลิอะคริลาไมด์เจลด้วยสารละลายเอธิเดียมโบรไมด์เข้มข้น 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นำไปส่องดู
ภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต

ตารางที่ 1 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ที่ใช้ในการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rDNA

ไพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์ (5' ถึง 3')	เอกสารอ้างอิง
341F	CCTACGGGAGGCAGCAG	Muyzer และคณะ, 1993
520R	ACCGCGGCTGCTGGC	Muyzer และคณะ, 1993
Sphingo 108f	TTAGCTCCACCTCGCGGC	Leys และคณะ, 2004
Sphingo 420r	TTACAACCTAAGGCCTTC	Leys และคณะ, 2004
GC clamp	CGCCCCCGCGCCCCGCGCCGTCCCG CCGCCCCCGCCCG	Kim และคณะ, 2002

4. ตรวจสอบยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนในดินตัวอย่างด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์เรส

นำดีเอ็นเอที่สกัดได้จากข้อ 3.1 ตรวจสอบเบื้องต้นเพื่อหาชนิดออกซิจีเนสและยีนแอลเคนไฮดรอกซิเลส ด้วยวิธีปฏิกิริยา
ลูกโซ่พอลิเมอร์เรส ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์และขนาดคาดหวังของผลิตภัณฑ์ลูกโซ่พอลิเมอร์เรส ดังแสดงในตารางที่ 2 และ 3
โดยใช้ส่วนผสมของสารในปฏิกิริยาดังนี้ สารละลาย GoTaq® Green Master Mix สารละลายไพรเมอร์ ความเข้มข้น 20 พิโคโมล
ต่อไมโครลิตร (ของแต่ละตัว) สารละลายดีเอ็นเอความเข้มข้น 100 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร และน้ำกลั่นปลอดประจุปลอดเชื้อ รวมส่วน
ผสมทั้งหมดให้มีปริมาตรสุทธิ 30 ไมโครลิตร จากนั้นทำ PCR ด้วยเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (DNA Thermo cycle) โดยใช้สภาวะ
ดังนี้

ไพรเมอร์ GPF และ GPR ใช้สภาวะ

- 1) Initial denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เวลา 5 นาที
- 2) Denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เวลา 1 นาที
- 3) Annealing ที่อุณหภูมิ 57 องศาเซลเซียส เวลา 1 นาที
- 4) Extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เวลา 1 นาที
- 5) ทำขั้นตอนที่ 2) ถึง 4) จำนวน 30 รอบ
- 6) Final extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เวลา 7 นาที

ไพรเมอร์ GNF และ GNR ใช้สภาวะ

- 1) Initial denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เวลา 5 นาที
- 2) Denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เวลา 1 นาที
- 3) Annealing ที่อุณหภูมิ 57 องศาเซลเซียส เวลา 1 นาที
- 4) Extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เวลา 1 นาที
- 5) ทำขั้นตอนที่ 2) ถึง 4) จำนวน 30 รอบ
- 6) Final extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เวลา 7 นาที

ไพรเมอร์ alkB1-F และ alkB1-R, alkB2-F และ alkB2-R ใช้สภาวะ

- 1) Initial denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เวลา 5 นาที
- 2) Denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เวลา 1 นาที
- 3) Annealing ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เวลา 1 นาที
- 4) Extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เวลา 1 นาที

- 5) ทำขั้นตอนที่ 2) ถึง 4) จำนวน 30 รอบ
- 6) Final extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เวลา 3 นาที

ไพรเมอร์ P450fw1 และ P450rv3 ใช้สภาวะ

- 1) Initial denaturation ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เวลา 4 นาที
- 2) Denaturation ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เวลา 45 วินาที
- 3) Annealing ที่อุณหภูมิ 58 องศาเซลเซียส เวลา 1 นาที
- 4) Extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เวลา 1 นาที
- 5) ทำขั้นตอนที่ 2) ถึง 4) จำนวน 25 รอบ
- 6) Final extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เวลา 5 นาที

ตรวจสอบผลิตภัณฑ์เอ็นเอที่เกิดขึ้นโดยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิสในบัฟเฟอร์ TAE ความเข้มข้น 1 เท่า โดยใช้อะกาโรสเจลเข้มข้น 2% เพื่อตรวจสอบขนาดผลิตภัณฑ์ PCR โดยเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA Ladder

ตารางที่ 2 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ที่ใช้ในการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอบริเวณยีนที่ประมวลรหัสหน่วยย่อยแอลฟาของเทอร์มินัลไดออกซิเจเนส

ไพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์ (5' ถึง 3')	ยีน	ขนาดคาดหวัง (bp)	เอกสารอ้างอิง
GNF	GAG ATGCATACCACGTTGGTTGGA	PAH-RHD α ในแบคทีเรียแกรมลบ	306	Cébron และคณะ, 2008
GNR	AGCTGTTGTTCCGGGA AGAYWGTGCMGTT			
GPF	CGGCGCCGACAAYTTYGTNGG	PAH-RHD α ในแบคทีเรียแกรมบวก	292	Cébron และคณะ, 2008
GPR	GGGGAACACGGTGCCRTGDATRAA			

ตารางที่ 3 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ที่ใช้ในการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอบริเวณยีนที่ประมวลรหัสแอลเคนไฮดรอกซิเลส

ไพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์ (5' ถึง 3')	ยีน	ขนาดคาดหวัง (bp)	เอกสารอ้างอิง
alkB1-F	ATCTGGGCGGTTGGGATTTGAGCG	<i>alkB1</i>	629	Whyte และคณะ, 2002
alkB1-R	CGCATGGTGATCGCTGTGCCGCTGC			
alkB2-F	ACTCTGGCGCAGTCGTTTTACGGCC	<i>alkB2</i>	552	Whyte และคณะ, 2002
alkB2-R	CCCCTGGGCGAGTTGGGCGCACCG			
P450fw1	GTSGGCGGCAACGACACSAC	CYP153	339	van Beilen และคณะ, 2005
P450rv3	GCASCGGTGGATGCCGAAGCCRAA			

5. การคัดแยกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลายน้ำมันดิบและสารประกอบ PAHs ในตัวอย่างดินตะกอนบริเวณอ่าวไทยตอนกลาง

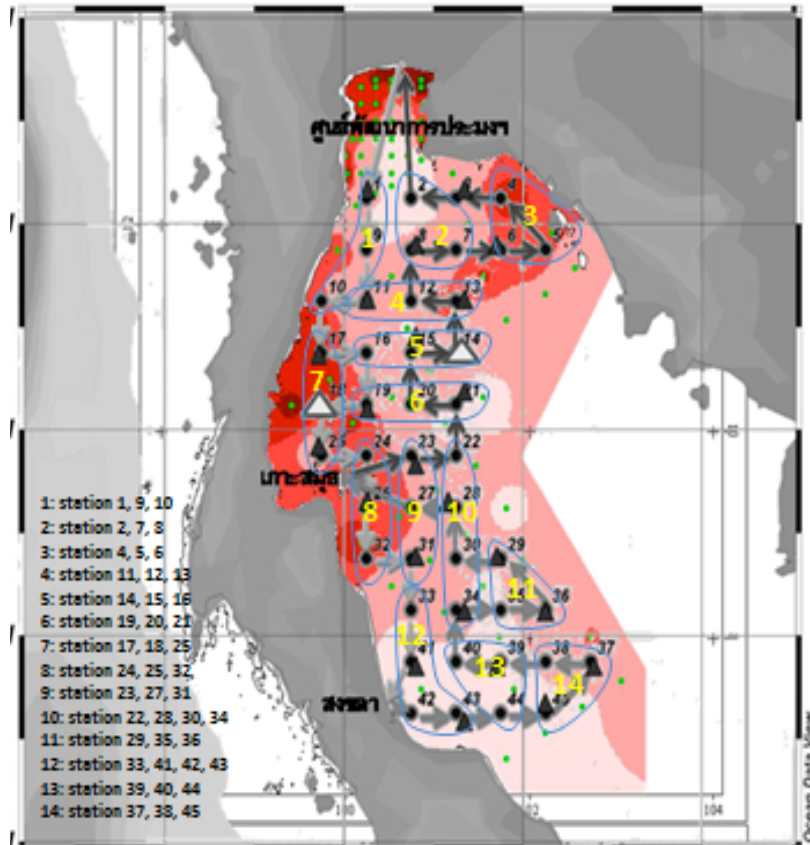
จากดินตะกอนจำนวน 45 ตัวอย่าง ได้แบ่งตัวอย่างออกเป็น 14 กลุ่มตามพื้นที่และลักษณะทางกายภาพ แสดงดังรูปที่ 2 จากนั้นคัดแยกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลายน้ำมันดิบและสารประกอบ PAHs โดยวิธีการ enrichment technique ในอาหารเหลว Natural Seawater Medium (NSW) ที่ใส่น้ำมันดิบ 0.5% (v/v) สำหรับการคัดแยกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลายน้ำมันดิบ และใส่ PAHs ได้แก่ ฟิแนนทรีน ฟลูออแรนทีน แอนทราซีนและไพรีนโดยมีความเข้มข้นสุดท้ายของ PAHs ชนิดละ 50 มิลลิกรัมต่อลิตร สำหรับการคัดแยกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลายสารประกอบ PAHs

ผลการศึกษาและวิจารณ์ผล

1. การตรวจวัดจำนวนแบคทีเรียในดินตะกอนตัวอย่าง

จากการนำตัวอย่างดินตะกอนบริเวณอ่าวไทยจำนวน 45 ตัวอย่าง มาตรวจนับจำนวนแบคทีเรียเริ่มต้นทั้งหมดและแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายสารประกอบ PAHs โดยใช้วิธี Most Probable Number พบว่าจำนวนแบคทีเรียที่ได้มีค่าแสดงดังตารางที่ 4 โดยมีจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดอยู่ในช่วง $1.5 \times 10^8 - 1.1 \times 10^{10}$ MPN/กรัมดินเปียก แบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลายฟิแนนทรีน อยู่ในช่วง $3.6 \times 10^4 - 2.34 \times 10^6$ MPN/กรัมดินเปียก แบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลายแอนทราซีน อยู่ในช่วง $3.0 \times 10^4 - 1.1 \times 10^7$ MPN/กรัมดินเปียก แบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลายฟลูออแรนทีน อยู่ในช่วง $3.0 \times 10^4 - 1.1 \times 10^7$ MPN/กรัมดินเปียก และแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลายไพรีนอยู่ในช่วง $3.0 \times 10^4 - 8.03 \times 10^6$ MPN/กรัมดินเปียก นอกจากนี้ยังตรวจนับจำนวนแบคทีเรียที่สามารถเจริญได้บนน้ำมันดิบ พบว่าจำนวนแบคทีเรียที่ได้ มีค่าแสดงดังตารางที่ 5 โดยมีค่าอยู่ในช่วง $2.28 \times 10^7 - 2.9 \times 10^9$ CFU/กรัมดินเปียก

เมื่อพิจารณาจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดในดินตะกอนทั้ง 45 ตัวอย่าง พบว่ามีจำนวนแบคทีเรียค่อนข้างมาก และใกล้เคียงกันทุกตัวอย่าง เมื่อพิจารณาจำนวนแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลาย PAHs พบว่าสามารถพบแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลาย พีแนนทรีน แอนทราซีน ฟลูออแรนทีน และไพรีน ได้ในดินตะกอนทุกตัวอย่าง รวมทั้งแบคทีเรียที่สามารถเจริญได้ในน้ำมันดิบ ทั้งนี้เนื่องจากดินตะกอนเป็นแหล่งสะสมของสารอาหารและสารพิษต่างๆ และมีความหลากหลายของจุลินทรีย์สูง ทำให้สามารถพบจำนวนแบคทีเรียต่างๆ ในปริมาณค่อนข้างสูง



รูปที่ 2 การแบ่งตัวอย่างดินตะกอนออกเป็น 14 กลุ่มตามพื้นที่และลักษณะทางกายภาพจากตัวอย่างทั้งหมด 45 ตัวอย่าง เพื่อคัดแยกกลุ่มแบคทีเรียย่อยสลายปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอน

2. การศึกษาความหลากหลายและความอุดมสมบูรณ์ของจุลินทรีย์ในตัวอย่างดินตะกอน

จากการนำตัวอย่างดินตะกอนบริเวณอ่าวไทยตอนกลาง จำนวน 45 ตัวอย่าง มาสกัดดีเอ็นเอและนำไปเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์เรส โดยใช้ไพรเมอร์ 341F-GC/520R ผลการทดลองพบว่าสามารถพบผลิตภัณฑ์ PCR ในดินทุกตัวอย่าง จากนั้นนำผลิตภัณฑ์ PCR จากตัวอย่างที่ 1-15 วิเคราะห์โครงสร้างประชาคมจุลินทรีย์ด้วยเทคนิค DGGE แสดงดังรูปที่ 3 พบว่าในดินตะกอนแต่ละตัวอย่างมีความหลากหลายของประชาคมจุลินทรีย์ นอกจากนี้สามารถพบผลิตภัณฑ์ PCR ของไพรเมอร์คู่ Sphingo108f/Sphingo420r-GC ในดินตะกอนบางตัวอย่าง แสดงดังรูปที่ 4 โดยแบคทีเรียในกลุ่ม *Sphingomonas* มีรายงานว่า เป็นแบคทีเรียกลุ่มหลักที่พบในดินที่มีการปนเปื้อน PAHs และสามารถย่อยสลาย PAHs ได้หลายชนิด (Kanaly และคณะ, 2000; Guo และคณะ, 2010)

3. ตรวจสอบยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนในดินตัวอย่างด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์เรส

ในการเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอบริเวณยีนที่ประมวลรหัสเอนไซม์อะโรมาติก ริง-ไฮดรอกซิเลทิงไดออกซีจีเนส และแอลเคนไฮดรอกซิเลส ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์เรสในดินตะกอนตัวอย่าง พบว่าพบผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้จากการใช้ไพรเมอร์คู่ alkB1-F/alkB1-R และ P450fw1/ P450rv3 ในดินตะกอนบางตัวอย่าง แสดงดังรูปที่ 5 และ 6 โดยคู่ไพรเมอร์ alkB1-F/alkB1-R มีความจำเพาะต่อยีน *alkB1* ซึ่งเกี่ยวข้องกับการย่อยสลายแอลเคนที่มีคาร์บอน 12-26 อะตอม และแบบสายโซ่กิ่ง (Whyte และคณะ, 2002; Liu และคณะ, 2011) สำหรับคู่ไพรเมอร์ P450fw1/ P450rv3 มีความจำเพาะต่อยีน CYP153 ซึ่งเกี่ยวข้องกับการย่อยสลายแอลเคนที่มีคาร์บอน 8-16 อะตอม (van Beilen และคณะ, 2006)

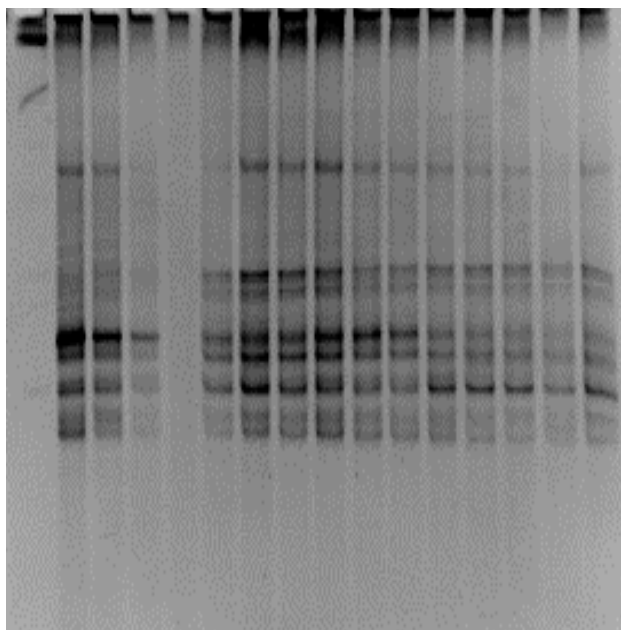
ตารางที่ 4 จำนวนแบคทีเรียเริ่มต้นทั้งหมดและแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายสารประกอบ PAHs ในดินตะกอนตัวอย่าง (MPN/กรัมดินเปียก)

ตัวอย่าง	แบคทีเรียเริ่มต้นทั้งหมด	แบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลายฟิแนนทริน	แบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลายแอนทราซีน	แบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลายฟลูออแรนทีน	แบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลายไพรีน
ST1	1.64×10^9	6.5×10^5	3.6×10^5	3.2×10^5	2.55×10^5
ST2	3.2×10^8	1.46×10^6	1.39×10^6	1.1×10^7	1.38×10^6
ST3	7.73×10^8	1.31×10^5	7.5×10^5	1.19×10^5	3.0×10^4
ST4	1.77×10^8	1.57×10^5	1.8×10^5	1.83×10^5	2.45×10^5
ST5	1.71×10^9	9.53×10^5	9.0×10^5	4.67×10^5	6.4×10^5
ST6	8.3×10^9	2.34×10^6	4.6×10^6	1.65×10^6	5.7×10^6
ST7	5.6×10^8	6.4×10^4	1.68×10^5	1.06×10^6	2.3×10^5
ST8	2.4×10^8	2.2×10^5	1.9×10^5	1.4×10^5	1.14×10^5
ST9	1.15×10^9	2.51×10^5	1.84×10^5	1.43×10^5	4.3×10^5
ST10	5.13×10^9	1.38×10^5	6.87×10^5	3.13×10^6	3.87×10^5
ST11	2.0×10^9	8.67×10^4	6.33×10^4	1.5×10^5	7.33×10^4
ST12	1.83×10^9	3.6×10^4	3.6×10^4	4.67×10^4	9.93×10^4
ST13	1.1×10^9	1.8×10^6	1.1×10^7	1.15×10^5	2.4×10^6
ST14	1.09×10^9	4.27×10^5	2.24×10^5	3.7×10^5	5.97×10^5
ST15	3.99×10^9	4.43×10^5	6.74×10^5	3.47×10^5	2.97×10^5
ST16	6.73×10^9	5.1×10^4	1.19×10^5	4.53×10^5	2.93×10^5
ST17	4.67×10^8	3.37×10^5	3.15×10^5	3.25×10^5	1.57×10^5
ST18	5.0×10^8	5.9×10^5	2.9×10^6	1.1×10^7	2.1×10^5
ST19	9.97×10^8	5.97×10^5	2.15×10^5	2.4×10^5	3.6×10^5
ST20	7.51×10^9	9.3×10^5	3.57×10^5	1.18×10^5	8.55×10^4
ST21	5.13×10^9	1.31×10^6	7.33×10^4	4.7×10^5	6.93×10^5
ST22	1.62×10^9	3.3×10^5	3.57×10^5	1.7×10^6	1.93×10^6
ST23	1.1×10^{10}	1.06×10^6	3.03×10^5	6.6×10^4	1.23×10^5
ST24	7.48×10^9	2.3×10^5	2.0×10^5	1.73×10^5	4.6×10^6
ST25	3.93×10^9	7.73×10^4	2.1×10^6	1.97×10^5	3.05×10^6
ST26	2.4×10^8	4.17×10^5	2.9×10^5	5.2×10^5	1.93×10^5
ST27	4.52×10^9	9.73×10^4	7.07×10^4	8.27×10^4	7.07×10^4
ST28	3.87×10^8	3.07×10^5	2.15×10^5	5.23×10^5	2.6×10^5
ST29	2.4×10^9	1.65×10^6	7.77×10^5	3.63×10^5	1.33×10^6
ST30	1.4×10^9	6.27×10^5	2.97×10^5	7.03×10^5	1.7×10^6
ST31	2.83×10^8	1.47×10^6	3.0×10^4	4.83×10^5	8.03×10^6
ST32	1.25×10^9	9.63×10^5	3.27×10^5	2.77×10^5	1.77×10^6
ST33	2.3×10^8	5.1×10^4	5.47×10^4	1.5×10^5	9.27×10^4
ST34	1.91×10^9	1.55×10^5	6.1×10^4	3.0×10^4	1.17×10^5
ST35	2.9×10^8	1.05×10^5	1.1×10^5	1.13×10^6	1.55×10^5
ST36	4.6×10^9	1.3×10^5	3.5×10^5	1.17×10^6	1.47×10^5
ST37	1.18×10^9	1.3×10^6	2.7×10^5	1.1×10^5	9.2×10^4
ST38	2.4×10^9	3.13×10^5	3.47×10^5	4.7×10^5	5.1×10^5
ST39	1.91×10^9	2.75×10^5	1.27×10^5	1.1×10^5	1.55×10^5
ST40	1.5×10^8	3.5×10^5	1.5×10^5	5.8×10^4	6.1×10^5
ST41	5.97×10^8	1.06×10^5	4.83×10^5	2.63×10^5	2.21×10^5
ST42	2.03×10^9	9.58×10^5	1.25×10^6	1.17×10^5	4.55×10^4
ST43	1.25×10^9	1.2×10^5	2.4×10^5	1.51×10^5	1.55×10^5
ST44	3.87×10^9	1.8×10^6	1.26×10^6	2.5×10^5	4.6×10^6
ST45	2.4×10^9	1.0×10^6	5.1×10^4	2.2×10^5	6.83×10^4

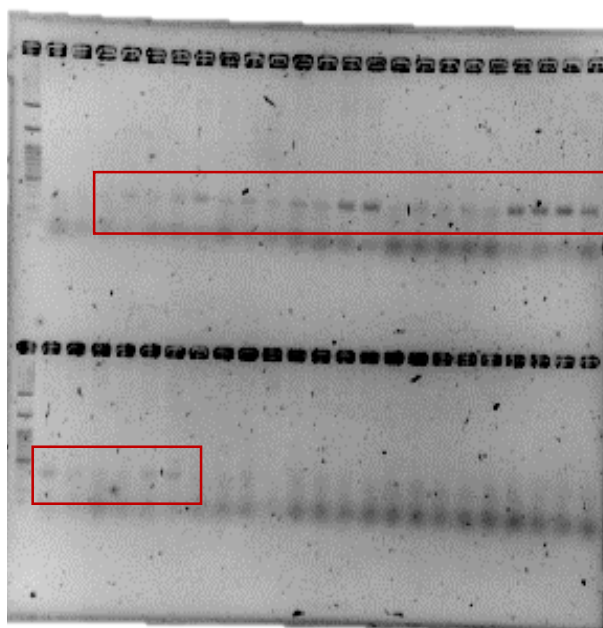
ตารางที่ 5 จำนวนแบคทีเรียที่สามารถเจริญได้บนน้ำมันดิบ

ตัวอย่าง	จำนวนแบคทีเรียที่สามารถเจริญได้บนน้ำมันดิบ (CFU ต่อกรัมดินเปียก)
ST1	1.01×10^9
ST2	1.98×10^8
ST3	2.51×10^8
ST4	2.37×10^8
ST5	1.84×10^8
ST6	2.19×10^8
ST7	4.40×10^7
ST8	5.60×10^7
ST9	3.00×10^7
ST10	3.45×10^7
ST11	5.40×10^7
ST12	3.70×10^7
ST13	6.40×10^7
ST14	5.95×10^7
ST15	2.28×10^7
ST16	9.80×10^7
ST17	1.96×10^8
ST18	1.60×10^8
ST19	2.01×10^8
ST20	1.29×10^8
ST21	1.58×10^8
ST22	1.23×10^8
ST23	6.90×10^7
ST24	1.28×10^8
ST25	2.64×10^8
ST26	1.39×10^8
ST27	1.23×10^8
ST28	1.17×10^8
ST29	1.35×10^8
ST30	2.16×10^8
ST31	1.40×10^8
ST32	8.00×10^7
ST33	2.00×10^8
ST34	1.90×10^8
ST35	1.50×10^8
ST36	1.27×10^8
ST37	2.25×10^8
ST38	2.11×10^8
ST39	2.71×10^8
ST40	2.80×10^8
ST41	2.76×10^9
ST42	2.62×10^9
ST43	2.60×10^9
ST44	2.90×10^9
ST45	2.76×10^9

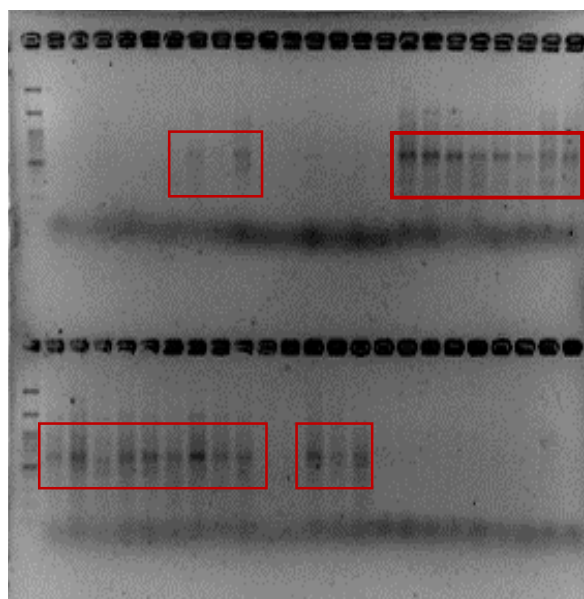
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15



รูปที่ 3 โครงสร้างประชาคมแบคทีเรียโดยวิธี DGGE จากบริเวณ 16S rDNA ของแบคทีเรียทั้งหมด
ช่องวิ่งที่1-15: ดีเอ็นเอจากตัวอย่างดินตะกอนสถานีที่ 1-15



รูปที่ 4 ผลิตภัณฑ์ PCR จากไพรเมอร์คู่ Sphingo108f/ Sphingo
420r-GC



รูปที่ 5 ผลิตภัณฑ์ PCR จากไพรเมอร์คู่ alkB1-F/alkB1-R

4. การคัดแยกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลายน้ำมันดิบและสารประกอบ PAHs

จากดินตะกอนจำนวน 45 ตัวอย่าง ได้แบ่งตัวอย่างออกเป็น 14 กลุ่มตามพื้นที่และลักษณะทางกายภาพเพื่อคัดแยกกลุ่มแบคทีเรียย่อยสลายปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอน โดยใช้ไขมันดิบและสารผสม PAHs (พีแนนทริน แอนทราซีน ฟลูออแรนทีน และไพรีน) เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงาน สามารถคัดแยกกลุ่มแบคทีเรียย่อยสลายน้ำมันดิบ PAHs ผสม พีแนนทริน และแอนทราซีนได้ 7 กลุ่ม 5 กลุ่ม 5 กลุ่ม และ 5 กลุ่ม ตามลำดับ ดังแสดงสรุปในตารางที่ 6

ตารางที่ 6 ผลการคัดแยกกลุ่มแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลายน้ำมันดิบและสารประกอบ PAHs

ตัวอย่าง	สารตั้งต้น					
	น้ำมันดิบ	สารผสม PAHs*	พีแนทรีน	แอนทราซีน	ฟลูออแรนทีน	ไพรีน
G1	+	+	+	+	-	-
G2	+	+	+	+	-	-
G3	+	-	-	-	-	-
G4	+	-	-	-	-	-
G5	+	+	+	+	-	-
G6	+	+	+	+	-	-
G7	+	+	+	+	-	-

*สารผสม PAHs: พีแนทรีน, แอนทราซีน, ฟลูออแรนทีน และไพรีน

+ สามารถคัดแยกเชื้อกลุ่มได้

สรุปผลการศึกษา

ในงานวิจัยนี้ สามารถตรวจวัดปริมาณแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลาย PAHs ชนิดต่างๆ และปริมาณแบคทีเรียที่สามารถเจริญได้ในน้ำมันดิบได้ในดินตะกอนทุกตัวอย่าง รวมทั้งสามารถคัดแยกกลุ่มแบคทีเรียย่อยสลายน้ำมันดิบ PAHs ผสมพีแนทรีนและแอนทราซีนได้โดยอาศัยวิธีการแบบเพาะเลี้ยง นอกจากนี้ยังพบกลุ่มแบคทีเรียประจำถิ่นที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลาย PAHs ได้แก่ แบคทีเรียในกลุ่ม *Sphingomonas* ในดินตะกอนบางตัวอย่าง รวมทั้งตรวจพบยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายแอลเคนในดินตะกอนหลายตัวอย่างโดยอาศัยวิธีการแบบไม่เพาะเลี้ยง จากผลการทดลองที่ได้แสดงให้เห็นว่า ในดินตะกอนตัวอย่างมีแบคทีเรียประจำถิ่นที่มีความสามารถในการย่อยสลายน้ำมันดิบและสารประกอบ PAHs และมีแนวโน้มในการเกิดกระบวนการย่อยสลายปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนด้วยวิธีทางชีวภาพได้ ซึ่งข้อมูลที่ได้นั้นสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการบำบัดดินตะกอนที่ปนเปื้อนด้วยปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนต่อไปได้

เอกสารอ้างอิง

- Cébron, A., Norini, M. P., Beguiristain, T. and Leyval, C. 2008. Real-time PCR quantification of PAH-ring hydroxylating dioxygenase (PAH-RHDa) genes from gram positive and gram negative bacteria in soil and sediment samples. *J Microbiol Meth.* 73: 148–159.
- Cochran, W.C. 1950 Estimation of bacterial densities by means of the ‘most probable number. *Biometrics.* 6: 105-116.
- Guo, C., Ke, L., Dang, Z., and Tam, N. F. 2010. Temporal changes in *Sphingomonas* and *Mycobacterium* populations in mangrove sediments contaminated with different concentrations of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). *Mar Pollu Bull.* 62: 133-139.
- Habe, H. and Omori, T. 2003. Genetics of polycyclic aromatic hydrocarbon metabolism in diverse aerobic bacteria. *Biosci Biotechnol Biochem.* 67: 225-243.
- Johnsen, A. R., Bendixen, K. and Karlson, U. 2002. Detection of microbial growth on polycyclic aromatic hydrocarbons in microtiter plates by using the respiration indicator WST-1. *Appl Environ Microbiol.* 68: 2683-2689.
- Kanally, R. A. and Harayama, S. 2000. Biodegradation of high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons by bacteria. *J Bacteriol.* 182: 2059- 2097.
- Kim, A. S., Holmquist, G .P. and Thilly, W. G. 2002. High-efficiency DNA ligation for clamp attachment without polymerase chain reaction. *Anal Biochem.* 310: 179-185.
- Kohno, T., Sugimoto, Y., Sei, K. and Mori, K. 2002 Design of PCR primers and gene probes for extensive detection of alkane-degrading bacteria. *Microb Environ.* 17: 114-121.
- Leys, N. M., Ryngaert, A., Bastiaens, L., Verstraete, W. and Springael, D. 2004. Occurrence and phylogenetic diversity of *Sphingomonas* strain in soils contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons. *Appl Environ Microbiol.* 70: 1944–1955.

- Liu, C., Wang, W., Wu, Y., Zhou, Z., Lai, Q. and Shao, Z. 2011. Multiple alkane hydroxylase systems in a marine alkane degrader, *Alcanivorax dieselolei* B-5. *Environ Microbiol.* 13: 1168-1178.
- Lu, X. Y., Zhang, T. and Fang, H. H. 2011. Bacteria-mediated PAH degradation in soil and sediment. *Appl Microbiol Biotechnol.* 89: 1355–1371.
- Marine Department. 2009. Oil spill incidents in the Thai waters. http://www.md.go.th/safety_environment/04_3_pdf/Oil_Spill%202552.pdf. (in Thai).
- Muyzer, G., De Waal, E. C. and Uitterlinden, A. G. 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl Environ Microbiol.* 59: 695–700.
- Smith, T. H. M., Balada, S. B., Witholt, B. and Beilen, J. B. 2002. Functional analysis of alkane hydroxylases from Gram-negative and Gram-positive bacteria. *J Bacteriol.* 184: 1733-1742.
- Talley, W. J. 2006. *Bioremediation of recalcitrant compounds*. CRC Press. New York.
- Van Beilen, J. B., Funhoff, E. G., van Loon, A., Just, A., Kaysser L., Bouza, M., Holtackers, R., Röthlisberger, M., Li, Z. and Witholt, B. 2006. Cytochrome P450 alkane hydroxylases of the CYP153 family are common in alkane-degrading eubacteria lacking integral membrane alkane hydroxylases. *Appl Environ Microbiol.* 72: 59–65.
- Van Beilen, J. B., Holtackers, R., Lüscher, D., Bauer, U., Witholt, B. and Duetz, W. A. 2005. Biocatalytic production of perillyl alcohol from limonene by using a novel *Mycobacterium* sp. cytochrome P450 alkane hydroxylase expressed in *Pseudomonas putida*. *Appl Environ Microbiol.* 71: 1737–1744.
- Wattayakorn, G. 2012. Petroleum pollution in the Gulf of Thailand: A historical review. *Coast Mar Sci.* 35: 234-245.
- Whyte, L. G., Schultz, A., Beilen, J. B., Luz, A. P., Pellizari, V., Labbé, D. and Greer C. W. 2002. Prevalence of alkane monooxygenase genes in Arctic and Antarctic hydrocarbon-contaminated and pristine soils. *FEMS Microbiol Ecol.* 41:141-150.