



การแยกและศึกษาคุณสมบัติของแบคทีเรียที่มีศักยภาพในการย่อยโพลีไซคลิกอะโรมาติก
ไฮโดรคาร์บอนและพลาสติกจากบริเวณที่มีการปนเปื้อน



สิริกัญจน์ เล็กอุทัย

วิทยานิพนธ์เสนอบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยนเรศวร
เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาจุลชีววิทยา
ปีการศึกษา 2566
ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยนเรศวร

การแยกและศึกษาคุณสมบัติของแบคทีเรียที่มีศักยภาพในการย่อยโพลีไซคลิกอะโรมาติก
ไฮโดรคาร์บอนและพลาสติกจากบริเวณที่มีการปนเปื้อน



วิทยานิพนธ์เสนอบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยนเรศวร
เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาจุลชีววิทยา
ปีการศึกษา 2566
ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยนเรศวร

วิทยานิพนธ์ เรื่อง "การแยกและศึกษาคุณสมบัติของแบคทีเรียที่มีศักยภาพในการย่อยโพลีไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนและพลาสติกจากบริเวณที่มีการปนเปื้อน"

ของ สิริกาญจน์ เล็กอุทัย

ได้รับการพิจารณาให้นับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยา

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์
(รองศาสตราจารย์ นายสัตวแพทย์ ดร.ภัทรรัฐ จันท์ฉาย
ทอง)

..... ประธานที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์
(ดร.ระพี ธรรมมีภักดิ์)

..... กรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์
(รองศาสตราจารย์ ดร.สุทธิรัตน์ สิทธิศักดิ์)

..... กรรมการผู้ทรงคุณวุฒิภายใน
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.จินตนา ว่องวิทย์การ)

..... กรรมการผู้ทรงคุณวุฒิภายใน
(ดร.ศิริวัฒน์ คูเจริญไพบูลย์)

อนุมัติ

.....
(รองศาสตราจารย์ ดร.กรองกาญจน์ ชูทิพย์)
คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

ชื่อเรื่อง	การแยกและศึกษาคุณสมบัติของแบคทีเรียที่มีศักยภาพในการย่อยโพลีไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนและพลาสติกจากบริเวณที่มีการปนเปื้อน
ผู้วิจัย	สิริกัญจน์ เล็กอุทัย
ประธานที่ปรึกษา	ดร.ระพี ธรรมมีภักดิ์
กรรมการที่ปรึกษา	รองศาสตราจารย์ ดร.สุทธิรัตน์ สิทธิศักดิ์
ประเภทสารนิพนธ์	วิทยานิพนธ์ วท.ม. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 2566
คำสำคัญ	โพลีไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน, พลาสติก, แบคทีเรีย

บทคัดย่อ

พลาสติกและสารประกอบโพลีไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน (Polycyclic Aromatic Hydrocarbons; PAHs) มีการปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อมและเป็นปัญหาต่อสุขภาพชุมชน จุลินทรีย์บางชนิดในสิ่งแวดล้อมสามารถใช้พลาสติกหรือสารประกอบโพลีไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน เป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงานในการเจริญเติบโต จึงมีการประยุกต์ใช้จุลินทรีย์ในการบำบัดสารปนเปื้อนดังกล่าว ดังนั้นการศึกษาค้นคว้าวิจัยจึงมีวัตถุประสงค์เพื่อคัดแยกแบคทีเรียที่สามารถย่อยพลาสติกหรือ PAHs รวมถึงศึกษาคุณสมบัติทางจุลชีววิทยา และคุณสมบัติต่างๆ โดยในการศึกษาค้นคว้านี้ทำการเก็บและคัดแยกเชื้อแบคทีเรียจากตัวอย่างดินบริเวณที่ปนเปื้อนขยะพลาสติกหรือบริเวณพื้นที่ทำเกษตรกรรมจากจังหวัดอุดรธานีและจังหวัดพิษณุโลก ทั้งหมด 62 ตัวอย่าง โดยไม่พบแบคทีเรียที่สามารถย่อยพลาสติก (Polycaprolactone) อย่างไรก็ตามจากการคัดกรองแบคทีเรียย่อย PAHs บนอาหารที่ผสม Naphthalene ที่ความเข้มข้น 200 µg/ml พบว่ามีแบคทีเรียจากตัวอย่างดิน 36 ตัวอย่าง ที่สามารถย่อยและเจริญบนอาหารที่ผสม Naphthalene ได้ จากนั้นนำแบคทีเรียทั้ง 36 ไอโซเลตมาศึกษาในระดับความเข้มข้นน้อยที่สุดของ Naphthalene ที่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแต่ละไอโซเลตได้ (Minimum Inhibitory Concentrations of Naphthalene; MIC_{Nap}) โดยพบว่าเชื้อที่ทดสอบมีค่า MIC_{Nap} ตั้งแต่ 400 µg/ml ถึงสูงสุด 6,400 µg/ml ซึ่งเราได้นำเชื้อที่มีค่า MIC_{Nap} สูงสุดจำนวนทั้งหมด 14 ไอโซเลตมาศึกษาคุณสมบัติทางจุลชีววิทยา โดยพบว่าเชื้อทั้งหมดเป็นแกรมลบและมีรูปแบบผลการทดสอบทางชีวเคมีคล้ายกัน เราจึงสุ่มคัดเลือกเชื้อจำนวน 7 ไอโซเลตมาระบุจีโนมด้วยการหาลำดับเบสของยีน 16s rDNA โดยเทคนิค Sanger sequencing จากการเทียบลำดับเบสกับเชื้อในฐานข้อมูลและเชื้อสายพันธุ์อ้างอิง (ATCC type strains) พบว่าแบคทีเรียที่ศึกษาจัดเป็นจีแนส *klebsiella* spp. จำนวน 6 ไอโซเลตและ *Enterobacter* spp. จำนวน 1 ไอโซเลต จากนั้นทำการศึกษาค้นคว้าอื่น ๆ เช่นอัตราการอยู่รอด ที่ระดับ MIC_{Nap} พบว่าเชื้อทั้งหมดไม่

สามารถเจริญได้ในระดับความเข้มข้น MIC_{Nap} การศึกษาลักษณะทางจีโนมไทป์ด้วยเทคนิค ERIC-PCR พบว่าเชื้อมีความหลากหลายทางจีโนมไทป์ นอกจากนั้นยังทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะจำนวนหกกลุ่มยาปฏิชีวนะ พบว่าเชื้อทั้งหมดไวต่อยาปฏิชีวนะทุกตัวที่ทดสอบ มีเพียงแบคทีเรียไอโซเลตเดี่ยวที่ดื้อต่อยา Tetracycline จากการศึกษาครั้งนี้พบแบคทีเรียที่สามารถย่อย PAHs จากตัวอย่างดินของจังหวัดอุดรดิตถ์และจังหวัดพิษณุโลก โดยพบว่าเชื้อที่แยกได้สามารถทนต่อ Naphthalene ที่ความเข้มข้นสูงได้และมีความหลากหลายของจีโนมไทป์ แต่อย่างไรก็ตามเชื้อทั้งหมดจัดอยู่ในจีโนมที่อาจก่อโรคในสัตว์และมนุษย์ได้ ทั้งยังพบการดื้อยาปฏิชีวนะบางชนิด เพราะฉะนั้นการศึกษาในระดับจีโนมเพื่อตรวจหาชนิดที่เกี่ยวข้องกับการดื้อยาปฏิชีวนะและความรุนแรงในการก่อโรค รวมถึงการย่อยสลาย PAHs จึงมีความจำเป็น ก่อนการนำแบคทีเรียไอโซเลตต่างๆไปประยุกต์ใช้เพื่อการบำบัดในอนาคตต่อไป

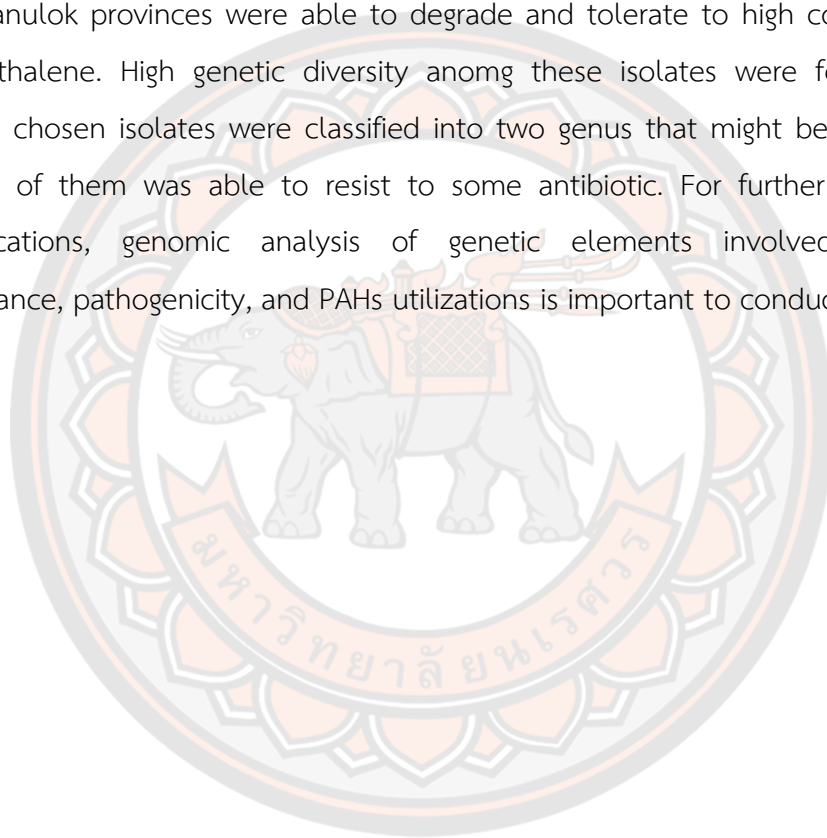


Title	ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF BACTERIA WITH THE POTENTIAL TO DEGRADE POLYCYCLIC AROMATIC HYDROCARBONS AND PLASTICS FROM WASTE CONTAMINATED AREAS
Author	Sirikran Lekuthai
Advisor	Rapee Thammeepak, Ph.D.
Co-Advisor	Assistant Professor Sutthirat Sitthisak, Ph.D.
Academic Paper	M.Sc. Thesis in Microbiology, Naresuan University, 2023
Keywords	Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), Plastic, Bacteria

ABSTRACT

Contaminations of plastic wastes and polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in environments are pollution issues for community health. Some bacteria colonized in environments have capabilities to use plastic or PAHs as carbon sources to produce energy and survive. Bacterial bioremediations of these pollutants are applicable. Therefore, purposes of this study are to isolate and characterize bacteria that show ability to degrade plastic (Polycaprolactone) or PAHs (Naphthalene) from soil samples contaminated with plastic waste or in agricultural areas in Uttaradit and Phitsanulok provinces. This study collected 62 soil samples. No bacteria were isolated and able to degrade Polycaprolactone. However, PAHs-degradation screening in agar supplemented with Naphthalene at 200 µg/ml revealed that 36 bacterial isolates were detected from 36 soil samples. We also determined the lowest concentration (Minimum Inhibitory Concentrations of Naphthalene; MIC_{Nap}) that inhibit the growth of these 36 isolates. The detected MIC_{Nap} were ranged from 400 to 6,400 µg/ml. Only 14 isolates that showed highest MIC_{Nap} were selected for the next experiment. Among selected isolates, all of them were gram-negative and showed the same biochemical profiles. By considering results of microbiological characteristics, we randomly chosen 7 representative isolates for genus identification by Sanger sequencing of amplified 16S rDNA. Sequence analysis against bacteria from databases and ATCC type strains demonstrated that 6 isolates were found to

be *klebsiella* spp. and remaining isolate was identified as *Enterobacter* spp. Next, we examined the survival rate of 7 isolates in the presence of MIC_{Nap} and found all isolates could not survive. ERIC-PCR-based genotyping revealed genetic diversity among studied bacterial isolates. In addition, susceptibility to six classes of antibiotics were determined. Most of isolates were found sensitive to all tested antibiotic, except for one isolate which was resistant to tetracycline. In conclusion, this study demonstrated that bacterial isolates obtained from soil sample in Uttaradit and Phitsanulok provinces were able to degrade and tolerate to high concentrations of Naphthalene. High genetic diversity among these isolates were found. However, these chosen isolates were classified into two genus that might be pathogens and some of them was able to resist to some antibiotic. For further bioremediation applications, genomic analysis of genetic elements involved in antibiotic resistance, pathogenicity, and PAHs utilizations is important to conduct.



ประกาศคุณูปการ

ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงในความกรุณาของ ดร.ระพี ธรรมมีภักดี ประธานที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่ได้อุทิศสละเวลาอันมีค่ามาเป็นที่ปรึกษา พร้อมทั้งให้คำแนะนำตลอดระยะเวลาในการทำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ และขอกราบขอบพระคุณคณะกรรมการวิทยานิพนธ์อันประกอบไปด้วย รองศาสตราจารย์ น.สพ.ดรภัทรัฐ จันทร์ฉายสว่าง กรรมการผู้ทรงคุณวุฒิภายนอก รองศาสตราจารย์ ดร.สุทธิรัตน์ สิทธิศักดิ์ กรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ดร.ศิริวัฒน์ คุเจริญไพบูลย์ และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.จินตนา ว่องวิทย์การ กรรมการผู้ทรงคุณวุฒิ ที่ได้กรุณาให้คำแนะนำตลอดจนแก้ไขข้อบกพร่องของวิทยานิพนธ์ด้วยความเอาใจใส่ จนทำให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงได้อย่างสมบูรณ์ และทรงคุณค่า

เหนือสิ่งอื่นใดขอกราบขอบพระคุณ บิดา มารดา ของผู้วิจัยที่ให้กำลังใจและให้ การสนับสนุนในทุกๆ ด้านอย่างดีที่สุดเสมอมา

คุณค่าและคุณประโยชน์อันพึงจะมีจากวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ผู้วิจัยขอมอบและอุทิศแต่ผู้มีพระคุณทุกๆ ท่าน ผู้วิจัยหวังเป็นอย่างยิ่งว่า งานวิจัยนี้จะเป็นประโยชน์ต่อการประยุกต์ใช้แบบที่เรียกรในการกำจัดโพลีไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนและพลาสติกในประเทศและผู้ที่มีสนใจบ้างไม่มากก็น้อย

สิริกัญจน์ เล็กอุทัย

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ค
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
ประกาศคุณูปการ.....	ช
สารบัญ.....	ซ
สารบัญตาราง.....	ฅ
สารบัญภาพ.....	ฐ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
ความเป็นมาของปัญหา.....	1
จุดประสงค์ของการศึกษา.....	3
ขอบเขตของงานวิจัย.....	3
สมมติฐานของการวิจัย.....	4
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	5
ชนิดของพลาสติก.....	5
การกำจัดขยะพลาสติกแบบดั้งเดิม.....	9
อันตรายและความเป็นพิษของสารที่เกิดจากการย่อยสลายพลาสติกอย่างไม่สมบูรณ์..	10
พลาสติกชนิด Polycaprolactone (PCL).....	13
ชนิดของ Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs).....	15
คุณสมบัติของ PAHs.....	17
แหล่งการเกิดของสาร PAHs ในสิ่งแวดล้อม.....	17

การปนเปื้อนของ PAHs ในดิน	18
การบำบัด PAHs ในดิน.....	19
อันตรายและความเป็นพิษของ PAHs.....	19
Naphthalene	21
การเข้าสู่สิ่งแวดล้อมของ Naphthalene	22
อันตรายของ Naphthalene ต่อร่างกาย	22
การใช้จุลินทรีย์เพื่อการบำบัดทางชีวภาพ	23
กระบวนการย่อยสลาย PAHs โดยแบคทีเรีย	24
เอนไซม์ที่แบคทีเรียใช้ในการย่อยพลาสติก	26
กลไกการทำงานของเอนไซม์แลคเคส	28
สารตั้งต้นและตัวกลางสำหรับสร้างเอนไซม์แลคเคส.....	28
งานวิจัยที่มีการคัดแยกแบคทีเรียและศึกษาความสามารถของแบคทีเรียในการย่อย พลาสติก	29
งานวิจัยที่มีการคัดแยกและศึกษาแบคทีเรียย่อย PAHs.....	34
บทที่ 3 วิธีดำเนินงานวิจัย.....	38
การเก็บตัวอย่างดินและการทำ sample enrichment	38
การแยกแบคทีเรียที่สามารถย่อย PAHs เบื้องต้นด้วยวิธี Naphthalene agar plate assay	38
การยืนยันความสามารถของแบคทีเรียที่สามารถย่อยพลาสติกด้วยวิธี PCL agar plate agar	38
การศึกษาระดับความเข้มข้นน้อยที่สุดของ Naphthalene ที่สามารถยับยั้งการเจริญของ แบคทีเรีย ด้วยวิธี agar dilution assay (MIC _{nap})	39
การศึกษาคูสมบัติทางจุลชีววิทยาของเชื้อแบคทีเรียที่ทนต่อ Naphthalene ได้.....	39

การสกัด DNA ด้วยชุดสกัดสำเร็จรูปและการหาลำดับเบส	40
การระบุจีโนมของแบคทีเรียที่ทนต่อ Naphthalene ระดับสูงด้วยการหาลำดับเบส 16s rDNA.....	40
การหาลำดับเบสด้วยวิธีดั้งเดิมและการระบุจีโนมของเชื้อ	41
การศึกษาความเข้มข้นจาก MIC ของ Naphthalene (6400 µg/ml) ต่อการอยู่รอดของ เซลล์แบคทีเรียที่แยกได้.....	41
การศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเชื้อด้วยวิธี Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus-Polymerase Chain Reaction (ERIC-PCR)	41
ทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะของเชื้อที่ทนต่อ Naphthalene ได้ในระดับสูง.....	42
บทที่ 4 ผลการวิจัย	43
การเก็บตัวอย่างและการคัดแยกเชื้อแบคทีเรีย	43
การศึกษาระดับความเข้มข้นน้อยที่สุดของ Naphthalene ที่สามารถยับยั้งการเจริญของ แบคทีเรีย ด้วยวิธี agar dilution assay (MIC _{Nap}).....	44
คุณสมบัติทางสัณฐานวิทยาจุลชีววิทยาและชีวเคมีของเชื้อที่ทนต่อ Naphthalene ได้ใน ระดับสูง.....	45
การระบุจีโนมของไอโซเลตที่ทนต่อ Naphthalene ระดับสูง ด้วยการหาลำดับเบสของยีน 16S rDNA.....	48
ผลของความเข้มข้นของ Naphthalene (MIC _{Nap}) ต่อการอยู่รอดของเซลล์แบคทีเรียที่แยก ได้	53
การศึกษาความสัมพันธ์ทางจีโนมไทป์ของเชื้อแบคทีเรียด้วยเทคนิค ERIC-PCR	53
การทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะของเชื้อที่ทนต่อ Naphthalene ได้ในระดับสูง.....	54
บทที่ 5 อภิปรายผลการทดลอง.....	56
สรุปผลการทดลอง	62

ข้อเสนอแนะ62

ภาคผนวก.....63

บรรณานุกรม72

ประวัติผู้วิจัย84



สารบัญตาราง

	หน้า
ตาราง 1 สรุปสารประกอบในพลาสติกที่เป็นอันตรายต่อสุขภาพ	12
ตาราง 2 รูปแบบและโครงสร้างทางเคมีของสาร PAHs 16 ชนิด	15
ตาราง 3 แหล่งที่มาของสาร PAHs ที่สำคัญ.....	18
ตาราง 4 แสดงการศึกษาของแบคทีเรียย่อยพลาสติก	25
ตาราง 5 แสดงการศึกษาที่มีการคัดแยกแบคทีเรียที่สามารถย่อยพลาสติกโพลีเมอร์ได้....	32
ตาราง 6 แสดงการศึกษาที่มีการคัดแยกแบคทีเรียที่สามารถย่อยโพลีไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน (PAHs)	36
ตาราง 7 แสดงลักษณะทางสัณฐานจุลชีววิทยาและชีวเคมีของเชื้อทั้ง 14 ไอโซเลต.....	46
ตาราง 8 การระบุจีโนมของไอโซเลตที่ทนต่อ Naphthalene ในระดับสูงด้วยวิธีอนุชีววิทยา	49
ตาราง 9 แสดงค่าความเหมือนเมื่อเปรียบเทียบทั้ง 7 ไอโซเลตกับเชื้อ Type strains	52
ตาราง 10 จำนวนโคโลนี (CFU/ml) ในแต่ละช่วงเวลา	53
ตาราง 11 การแปลผลการทดสอบความไวต่อยา 6 กลุ่ม.....	55

สารบัญภาพ

หน้า

ภาพ 1 โครงสร้างทางเคมีของ Polyethylene terephthalate หรือ PETE และสัญลักษณ์รีไซเคิลหมายเลข 1	6
ภาพ 2 โครงสร้างทางเคมีของ High Density Polyethylene หรือ HDPE และสัญลักษณ์รีไซเคิลหมายเลข 2	6
ภาพ 3 โครงสร้างทางเคมีของ Polyvinyl chloride หรือ PVC และสัญลักษณ์รีไซเคิลหมายเลข 3	7
ภาพ 4 โครงสร้างทางเคมีของ Low density polyethylene หรือ LDPE และสัญลักษณ์รีไซเคิลหมายเลข 4	7
ภาพ 5 โครงสร้างทางเคมีของ Polypropylene หรือ PP และสัญลักษณ์รีไซเคิลหมายเลข 5	8
ภาพ 6 โครงสร้างทางเคมีของ Polystyrene หรือ PS และสัญลักษณ์รีไซเคิลหมายเลข 6	8
ภาพ 7 สัญลักษณ์รีไซเคิลหมายเลข 7	9
ภาพ 8 โครงสร้างทางเคมีของ Polycaprolactone (PCL)	14
ภาพ 9 กระบวนการผลิตพลาสติกชีวภาพที่สามารถย่อยสลายได้ทางชีวภาพ	14
ภาพ 10 โครงสร้างเคมีของ Naphthalene	22
ภาพ 11 แสดงกระบวนการย่อยสลาย PAHs โดยแบคทีเรีย	26
ภาพ 12 แสดงกลไกการทำงานของเอนไซม์แลคเคส	28
ภาพ 13 แสดงตัวอย่างลักษณะโคโลนีบนจานอาหารที่ใช้ในการคัดแยกแบคทีเรียที่ทนต่อ Naphthalene	43
ภาพ 14 แสดงกราฟเปรียบเทียบจำนวนไอโซเลตของแบคทีเรียที่สามารถทนต่อ Naphthalene แต่ละความเข้มข้นที่แยกได้จากจังหวัดอุดรดิตต์และพิษณุโลก	44

ภาพ 15 แสดงการตรวจสอบขนาดของ PCR product ด้วยเทคนิค agarose gel electrophoresis.....	48
ภาพ 16 ภาพ Agarose gel electrophoresis ที่แสดง ERIC-PCR patterns	54



บทที่ 1

บทนำ

ความเป็นมาของปัญหา

ปัจจุบันทั่วโลกกำลังเผชิญกับปัญหาขยะพลาสติก ที่ส่งผลกระทบต่อระบบนิเวศและสัตว์ รวมถึงมนุษย์เป็นอย่างมาก โดยพลาสติกถือเป็นวัสดุสังเคราะห์ที่มีบทบาทอย่างมากในชีวิตประจำวัน และมีแนวโน้มในการใช้งานมากขึ้น เนื่องจากพลาสติกมีคุณสมบัติเบา แข็งแรง ทนทาน และราคาถูก สามารถผลิตให้มีรูปแบบตามที่ต้องการ ทำให้ปัจจุบันมีผลิตภัณฑ์พลาสติกหลากหลายรูปแบบ ด้วยคุณสมบัติที่โดดเด่นทำให้พลาสติก ได้รับความนิยมนอย่างรวดเร็ว เช่น ถุงพลาสติก ภาชนะบรรจุอาหาร ของเล่นเด็ก เพอร์นิจเจอร์ ด้วยสาเหตุนี้จึงส่งผลให้เกิดปริมาณขยะพลาสติกที่มีปริมาณมากขึ้น สำหรับประเทศไทย (ธารา บัวคำศรี, 2563) กระทรวงทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม รายงานข้อมูลใน พ.ศ. 2560 พบว่า มีปริมาณขยะถึง 27 ล้านตัน และเป็นขยะพลาสติกถึง 2 ล้านตัน โดยมีการใช้ ถุงพลาสติกประมาณ 4.5 หมื่นล้านใบต่อปี และเมื่อเทียบกับข้อมูลของโครงการสิ่งแวดล้อมแห่ง สหประชาชาติพบว่า ในแต่ละปีทั่วโลกมีการใช้ถุงพลาสติกมากถึง 5 แสนล้านใบ โดยเฉพาะครึ่งหนึ่ง เป็นพลาสติกแบบใช้ครั้งเดียวทิ้ง (กรุงเทพฯธุรกิจ, 2562) ถึงแม้จะมีการรณรงค์ให้นำพลาสติกกลับมา ใช้ใหม่ แต่เมื่อนำมาใช้ซ้ำหลายครั้งคุณภาพของพลาสติกจะลดลง และต้องคำนึงถึงความสะอาดและ ความปลอดภัย แต่ปัจจุบันบางพื้นที่มีการกำจัดขยะพลาสติกด้วยกระบวนการที่ยังไม่ถูกวิธีและ ก่อให้เกิดปัญหาต่างๆ คือ ปัญหาสุขภาพ ปัญหาเศรษฐกิจ และปัญหาสิ่งแวดล้อมทั้งทางตรงและ ทางอ้อม ที่ส่งผลกระทบต่อทั้งมนุษย์และสิ่งแวดล้อม เช่น การเผาโดยไม่มีการควบคุมอย่างเป็นระบบ ทำให้ สารพิษที่อยู่ในพลาสติก กระจายในอากาศและปนเปื้อนในแหล่งน้ำ ดิน และอาหาร ทำให้คนส่วน ใหญ่ได้รับสารพิษจากการสูดดม ดื่มน้ำและรับประทานอาหารที่มีสารปนเปื้อน โดยเฉพาะการเผา พลาสติกจะทำให้เกิดสารโพลีไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน (PAHs) ซึ่งส่งผลกระทบต่อระบบต่างๆ ใน ร่างกาย เช่น ก่อให้เกิดสารก่อมะเร็ง และรบกวนการทำงานของ ระบบฮอร์โมน หากมีการสะสมอยู่ใน ร่างกายของสตรีมีครรภ์มากเกินไปอาจส่งผลกระทบต่อลูกในครรภ์ได้ นอกจากนี้ ยังเพิ่มความเสี่ยง ของการเป็นโรคหัวใจ ระบบทางเดินหายใจ เกิดอาการผื่นคัน คลื่นไส้ ปวดหัว หรืออาจทำลายระบบ ประสาท ตับ ไต และระบบสืบพันธุ์ได้ แต่ถ้านำไปทิ้งกลางแจ้ง สำหรับขยะพลาสติกที่นำไปฝังกลบจะ ใช้ระยะเวลาในการย่อยสลายนานถึง 450 ปี เมื่อเวลาผ่านไป ถุงพลาสติกที่ถูกแสงแดดจะทำให้

พลาสติกแตกออกเป็นชิ้นเล็กๆ และไม่สามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่าหรือที่เรียกว่า ไมโครพลาสติก (microplastic) จึงทำให้สารเคมีที่เป็นสารพิษในเศษพลาสติกเหล่านั้นแทรกซึมลงไปในชั้นดินและแหล่งน้ำได้เช่นกัน และหากขยะพลาสติกถูกทิ้งลงในทะเล จะทำให้สัตว์ทะเลหลายชนิดกินพลาสติกเข้าไปจนทำให้เสียชีวิตได้ (ณิชา บวรณสิงห์, 2558.)

นอกจากนี้ PAHs (Polycyclic Aromatic Hydrocarbons) ที่คุณสมบัติคล้ายกับพลาสติกสังเคราะห์บางชนิด ซึ่งเป็นสารพิษและเป็นสารก่อมะเร็งที่เกิดจากการเผาไหม้ไม่สมบูรณ์ของเชื้อเพลิง เช่น การเผาถ่านหินและไฟไหม้ป่าตามธรรมชาติหรือการระเบิดของภูเขาไฟ รวมทั้งกิจกรรมต่างๆ ของมนุษย์ เช่น การเผาไหม้เชื้อเพลิงฟอสซิลประเภทต่างๆ โรงงานอุตสาหกรรมบรรจุภัณฑ์ โรงงานไฟฟ้า เตาเผาขยะ และการนำมาใช้ในทางเกษตรกรรม เช่น สารเคมีที่นำมาป้องกันแมลงศัตรูพืชหรือจากไอเสียของเครื่องยนต์การเกษตร เป็นต้น (อรวรรณ ฉัตรศรีรุ่ง, 2002) ทำให้สามารถพบ PAHs สะสมอยู่ได้ทั้งในอากาศ น้ำ ดินโดยเฉพาะดินที่ใช้ในการทำเกษตร เนื่องจาก PAHs มีมอดเมอร์ที่แตกต่างกัน 16 ชนิด มีคุณสมบัติในการละลายน้ำต่ำ และเนื่องจากมีความคงทนในสิ่งแวดล้อมสูง PAHs จะไปสะสมในตะกอนดินซึ่งจะส่งผลกระทบต่อสิ่งมีชีวิตหน้าดินในระยะยาว และมีการถ่ายทอดสู่สิ่งมีชีวิตในลำดับขั้นการบริโภคห่วงโซ่อาหารจนเข้าสู่มนุษย์ในที่สุด ซึ่ง PAHs ที่พบมากที่สุดในชีวิตประจำวัน คือ Naphthalene (แนฟทาลีน) สามารถพบได้ในถ่านหิน น้ำมันปิโตรเลียม และการเผาไหม้ของสารประกอบอินทรีย์ เช่น ไม้ บุหรี่ ปัจจุบันมีการผลิต Naphthalene เพื่อนำไปใช้ประโยชน์ต่างๆ เช่น ใช้ในการผลิต PVC เรซิน สารฟอกหนัง สีย้อม และสารฆ่าแมลงคาบาริล หรือนำไปใช้โดยตรง เช่น ลูกเหม็น (ระบบงานวัตถุอันตราย, 2549) ปัจจุบันลูกเหม็นถูกจัดเป็นผลิตภัณฑ์วัตถุอันตราย ตามพระราชบัญญัติวัตถุอันตราย พ.ศ. 2535 ซึ่งอยู่ในการกำกับดูแลของสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา (อย.) ปัจจุบันลูกเหม็นรวมทั้งผลิตภัณฑ์ก๊อบก๊อบกลิ่นที่เกี่ยวข้องได้รับอนุญาตให้จำหน่ายในท้องตลาด มีจำนวนกว่า 27 รายการ โดยอยู่ในรูปแบบที่หลากหลาย เช่น ก้อนกลมคล้ายลูกบอลขนาดเล็ก ก้อนดับกลิ่นบรรจุในตลับ เป็นต้น ลูกเหม็นโดยทั่วไปมีส่วนผสมของสารออกฤทธิ์ ได้แก่ สารแนฟทาลีน (naphthalene) และสารพาราไดคลอโรเบนซีน (para-dichlorobenzene) สารเคมีเหล่านี้สามารถระเหิดเป็นไอได้ที่อุณหภูมิห้อง รวมทั้งเป็นอันตรายต่อสุขภาพของมนุษย์ สัตว์ และสิ่งแวดล้อม (วาริรัตน์ เลิศนที, 2564)

แนวทางในการที่จะแก้ปัญหาขยะพลาสติกที่ปนเปื้อนอยู่ในสิ่งแวดล้อมอาจทำได้โดยการ ใช้จุลินทรีย์จากแหล่งต่างๆ ในธรรมชาติที่มีความสามารถในการย่อยสลายพลาสติกหรือที่เรียกว่าการบำบัดทางชีวภาพ (Microbial Bioremediation) โดยอาศัยเอนไซม์ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาการสลาย

สายของพอลิเมอร์ให้กลายเป็นโอลิโกเมอร์ (oligomer) หรือโมโนเมอร์ (monomer) ซึ่งจะถูกนำไปใช้ในการสลายสารอาหารภายในเซลล์ของจุลินทรีย์ ซึ่งถ้าเป็นการสลายสารอาหารแบบใช้ออกซิเจน จะได้ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ และน้ำ เป็นผลิตภัณฑ์สุดท้าย ในขณะที่การสลายสารอาหารแบบไม่ใช้ออกซิเจน จะได้ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ น้ำ และยังได้ก๊าซมีเทนกลับเข้าสู่สิ่งแวดล้อมอีกด้วย การย่อยสลายพลาสติกโดยจุลินทรีย์ถือเป็นการย่อยสลายที่สมบูรณ์เพราะไม่มีผลิตภัณฑ์ที่เป็นพิษตกค้างในสิ่งแวดล้อม ซึ่งแตกต่างจากพลาสติกที่เกิดการย่อยสลายได้เองจาก แสง หรือความร้อน ซึ่งยังเหลือผลิตภัณฑ์ชนิดอื่นๆ ที่ไม่สามารถย่อยสลายต่อไปได้ตกค้างอยู่ในสิ่งแวดล้อม นอกจากการย่อยสลายพลาสติกแล้ว จุลินทรีย์ยังสามารถย่อยสลาย PAHs ได้อย่างสมบูรณ์ โดยจุลินทรีย์จะใช้สารดังกล่าวเป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงานในการเจริญเติบโตได้ โดยจุลินทรีย์จะสร้างเอนไซม์ PHA depolymerase ได้ทั้งภายในเซลล์หรือนอกเซลล์ สามารถย่อยสลาย PHA โดยใช้เอนไซม์ PHA depolymerases dioxygenases ผ่านการเติมออกซิเจนในวงแหวนอะโรมาติกทำให้วงแหวนนั้นแตกออกจากกัน (Knoll et al., 2009) จึงเป็นที่มาของการวิจัยครั้งนี้ ที่มีวัตถุประสงค์เพื่อคัดแยกแบคทีเรีย จากดินที่มีการปนเปื้อน ที่มีความสามารถในการย่อยพลาสติก หรือโพลีไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน และศึกษาคุณลักษณะของแบคทีเรียดังกล่าว เพื่อการประยุกต์ใช้กลุ่มแบคทีเรีย (bacterial consortium) ในการบำบัดทางชีวภาพ ของพลาสติกหรือโพลีไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนที่มีการปนเปื้อนในดิน ในอนาคตต่อไป

จุดประสงค์ของการศึกษา

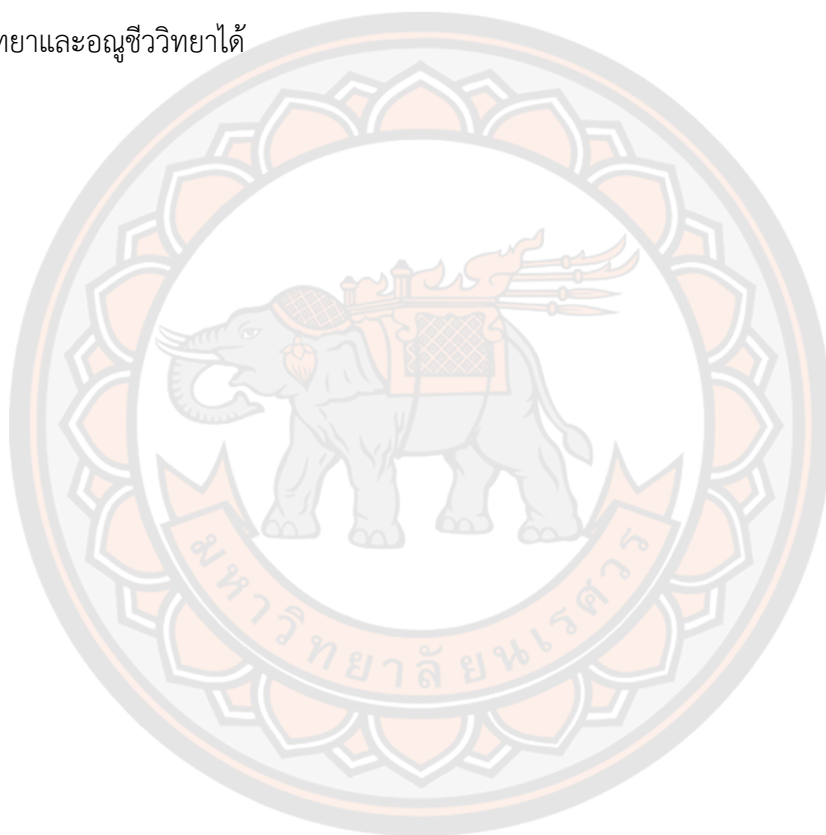
1. เพื่อแยกแบคทีเรียและศึกษาความสามารถในการย่อยพลาสติกหรือ PAHs ได้
2. เพื่อศึกษาคุณลักษณะในการเจริญเติบโตของแบคทีเรียที่มีความสามารถย่อยสลายพลาสติกหรือ PAHs

ขอบเขตของงานวิจัย

เก็บตัวอย่างดินที่มีการปนเปื้อนพลาสติกและพื้นที่ทำการเกษตร 62 ตัวอย่าง ในพื้นที่จังหวัดอุดรดิตถ์และพิษณุโลก เพื่อแยกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยพลาสติกหรือสารประกอบโพลีไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน (PAHs) จากนั้นนำมาทดสอบความไวของแบคทีเรียต่อ Naphthalene และศึกษาคุณสมบัติทั่วไปของเชื้อที่แยกได้ จากนั้นนำมาระบุชนิดด้วย 16S rDNA

สมมติฐานของการวิจัย

ในพื้นที่จังหวัดพิษณุโลกและจังหวัดอุตรดิตถ์ มีพื้นที่ทำเกษตรกรรมและแหล่งกำจัดขยะมากมาย รวมถึงการทำเกษตรกรรมที่มีการเผาไหม้ของเชื้อเพลิงหรือสารเคมีที่ส่งผลให้เกิดการสะสมของ PAHs เพราะฉะนั้นตัวอย่างดินจากแหล่งดังกล่าวอาจมีการคัดเลือกโดยธรรมชาติ โดยจุลินทรีย์ที่สามารถเจริญได้ในแหล่งดินดังกล่าว อาจจะมีความสามารถย่อยสลายพลาสติกโพลีเมอร์หรือ PAHs เพื่อนำมาใช้เป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงานในการเจริญเติบโต ทำให้มีความเป็นไปได้ที่เราจะสามารถแยกจุลินทรีย์ที่มีศักยภาพในการย่อยพลาสติกและ PAHs ได้ และสามารถนำมาศึกษาคุณลักษณะทางจุลชีววิทยาและอณูชีววิทยาได้



บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ชนิดของพลาสติก

พลาสติกเป็นวัสดุสังเคราะห์ที่ถูกนำมาใช้ในชีวิตประจำวันมากที่สุด เนื่องจากเป็นวัสดุที่แปรรูปได้ง่ายและมีความแข็งแรง เหนียว ยืดหยุ่นได้ ทนต่อการกระแทกและมีน้ำหนักเบา มีอายุการใช้งานนาน พลาสติกจึงถูกแบ่งตามประเภทการใช้งานได้ 2 ประเภท คือ เทอร์โมพลาสติก (Thermoplastic) และเทอร์โมเซตติง (thermosetting)

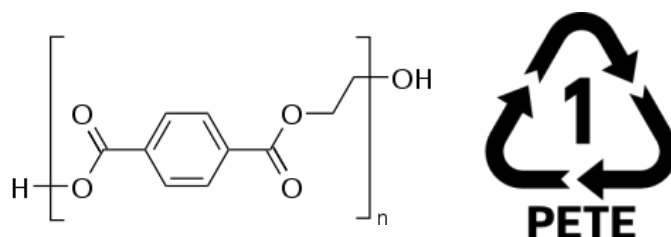
1.1 เทอร์โมพลาสติก (Thermoplastic)

เทอร์โมพลาสติกเป็นพอลิเมอร์ (Polymer) ที่มีโครงสร้างเป็นแบบเส้นตรงหรือแบบกิ่งสั้นๆ โครงสร้างภายในโมเลกุลยึดเหนี่ยวระหว่างโมเลกุลด้วยพันธะทุติยภูมิ สามารถละลายได้ดีในตัวทำละลายบางชนิด เช่น carbon tetrachloride, toluene เมื่อถูกความร้อนสามารถหลอมตัวได้และเมื่อเย็นจะแข็งตัว สามารถนำกลับมาหลอมและทำให้แข็งตัวได้หลายครั้ง โดยไม่ทำให้สมบัติทางเคมีและทางกายภาพเปลี่ยนไป โดยสามารถแบ่งออกเป็นกลุ่มย่อย คือ เทอร์โมพลาสติกอสัณฐาน (Amorphous thermoplastic) และ เทอร์โมพลาสติกที่มีผลึกบางส่วน (Partial crystalline thermoplastic)

พอลิเมอร์ชนิดนี้มีข้อเสียและข้อจำกัดของการใช้งาน คือ ไม่สามารถใช้งานที่อุณหภูมิสูงได้ เพราะอาจเกิดจากการบิดและเสียรูปทรงได้ง่าย เนื่องจากเทอร์โมพลาสติกเมื่อถูกความร้อนทำให้เกิดการอ่อนตัว สามารถนำกลับมาหลอมเหลวและขึ้นรูปได้หลายครั้ง จึงนิยมนำพลาสติกชนิดนี้มารีไซเคิล โดยการบด และหลอมด้วยความร้อนเพื่อขึ้นรูปเป็นผลิตภัณฑ์ใหม่ ผลิตภัณฑ์ที่ผลิตจากเทอร์โมพลาสติกรีไซเคิล จะแสดงสัญลักษณ์ไว้บนผลิตภัณฑ์ โดยใช้สัญลักษณ์ลูกศรวิ่งวนเป็นรูปสามเหลี่ยมด้านเท่า มีเลขกำกับภายในและมีภาษาอังกฤษที่ฐานสามเหลี่ยม โดยเทอร์โมพลาสติกที่นำมารีไซเคิลแบ่งออกเป็น 7 ชนิด (บรรเลง ศรีนิล, 2544) ดังนี้

1. Polyethylene terephthalate หรือ PET

เป็นพอลิเมอร์ใสไม่มีสี แข็งแรงทนต่อแรงกระแทก จึงนิยมใช้ทำเป็นขวดน้ำ และมีคุณสมบัติในการป้องกันการแพร่ผ่านของก๊าซได้ดีจึงนำมาใช้ทำขวดบรรจุน้ำอัดลม สามารถนำมารีไซเคิลได้โดยการทำเป็นเส้นใยพอลิเอสเตอร์ (Polyester) เช่น เส้นใย สำหรับทำเสื้อกันหนาว พรม ใยสังเคราะห์ สำหรับยัดหมอน ถุงหูหิ้ว กระเป๋า

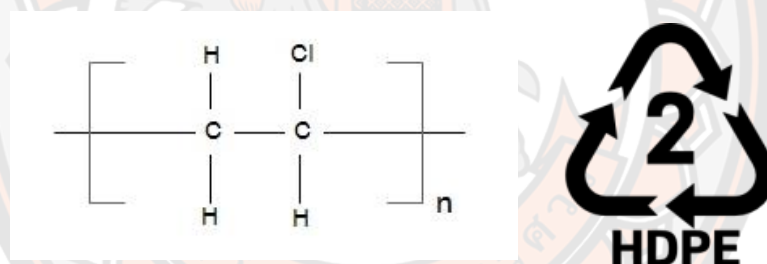


ภาพ 1 โครงสร้างทางเคมีของ Polyethylene terephthalate หรือ PETE และสัญลักษณ์รีไซเคิล
หมายเลข 1

ที่มา : กวลัยพร मुखสุวรรณ. (2008).

2. โพลีเอทิลีนชนิดความหนาแน่นสูง (High Density Polyethylene หรือ HDPE)

การจัดเรียงตัวภายในโครงสร้างมีความเป็นระเบียบ มีความหนาแน่นสูงและมีความขุ่น แต่โปร่งแสงน้อยกว่าโพลีเอทิลีน ทนกรดและด่างได้ดี จึงนิยมใช้ทำภาชนะบรรจุสารเคมี ถังน้ำ ถังขยะ HDPE สามารถป้องกันกรแพร่ผ่านของความชื้นได้ดี จึงนำมาใช้ทำขวดนม นิยมนำมารีไซเคิลเป็น ม้านั่ง ขวดใส่น้ำยาซักผ้า ผลิตขวดนม เป็นต้น

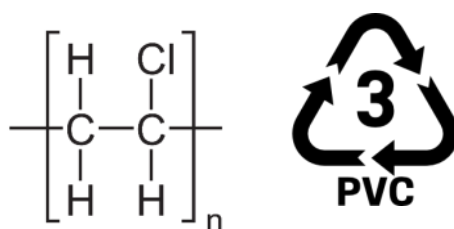


ภาพ 2 โครงสร้างทางเคมีของ High Density Polyethylene หรือ HDPE และสัญลักษณ์รีไซเคิล
หมายเลข 2

ที่มา : กวลัยพร मुखสุวรรณ. (2008).

3. Polyvinyl chloride หรือ PVC

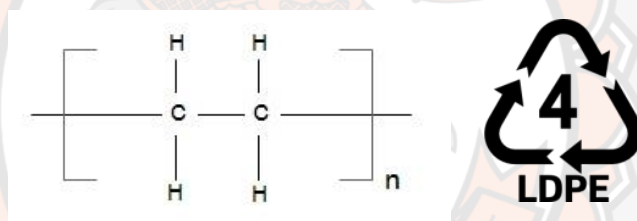
เนื่องจากมีคลอรีนอะตอมอยู่ในสายโซ่ จึงทำให้มีแรงดึงดูดระหว่างโมเลกุลสูง จึงทำให้มีแรงดึงดูดระหว่างโมเลกุล ทำให้มีความแข็งแรงมาก ทนน้ำได้ดี นิยมใช้ทำท่อประปา ผนังเทียม ฉนวนหุ้มสายไฟ ถ้าเติมพลาสติกไซเซเซอร์ (Plasticizer) ลงไปจะทำให้มัน นุ่มนำมาทำเป็นโฟม สายยาง ม่าน พลาสติกชนิดนี้ ถูกนำมารีไซเคิลเป็นท่อประปาเพื่อการเกษตร กรวยจราจร เพอร์นิเจอร์ ม้านั่งพลาสติก ตลับเทปเคเบิล แผ่นไม้เทียม



ภาพ 3 โครงสร้างทางเคมีของ Polyvinyl chloride หรือ PVC และสัญลักษณ์รีไซเคิลหมายเลข 3
ที่มา : กวลัยพร मुखสุวรรณ. (2008).

4. (Low density polyethylene หรือ LDPE)

โครงสร้าง LDPE มีกิ่งก้านสาขาจำนวนมาก จึงทำให้มีปริมาตรสูง มีความหนาแน่นต่ำ มีความโปร่งแสง เป็นพลาสติกที่เหมาะสมสำหรับนำมาเป็นถังเย็น ถังใส่อาหารแช่แข็ง เพราะมีความยืดหยุ่นสูง เหนียว ไม่มีกลิ่น ไม่มีสี พลาสติกชนิดนี้ไม่เหมาะที่จะบรรจุอาหารร้อน นิยมใช้ทำสายหุ้มทองแดง ถูบรรจุอาหาร แผ่นฟิล์ม กระเบื้องปูพื้น เฟอร์นิเจอร์ แท่งไม้เทียม

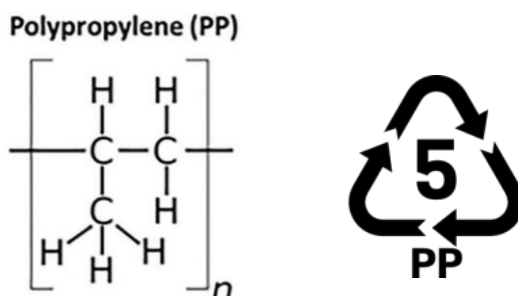


ภาพ 4 โครงสร้างทางเคมีของ Low density polyethylene หรือ LDPE และสัญลักษณ์
รีไซเคิลหมายเลข 4

ที่มา : กวลัยพร मुखสุวรรณ. (2008).

5. Polypropylene หรือ PP

มีสมบัติคล้ายกับ PE (Polyethylene) แต่มีความหนาแน่นต่ำกว่า PE เป็นพลาสติกที่เบาที่สุด แต่มีความแข็งแรง ทนทานต่อแรงกระแทกสูง นิยมทำบานพับและฝาขวดที่มีการเปิด-ปิดเป็นประจำ ทำภาชนะบรรจุอาหารสำหรับนำเข้าไมโครเวฟ เพราะมีความยืดหยุ่นสูง ทนสารเคมี และสามารถใช้งานกับอุณหภูมิที่สูงถึง 175 องศาเซลเซียส เป็นฉนวนไฟฟ้าได้ดี เนื่องจากมีโครงสร้างเป็นผลึก สามารถนำกลับมารีไซเคิลเป็นไฟท้าย กันชน กล้องแบตเตอรี่รถยนต์ แปรง ไม้กวาดพลาสติกได้

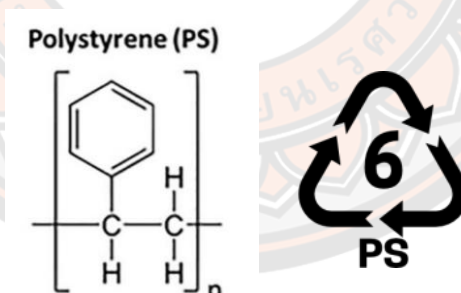


ภาพ 5 โครงสร้างทางเคมีของ Polypropylene หรือ PP และสัญลักษณ์รีไซเคิลหมายเลข 5

ที่มา : กวลัยพร मुखสุวรรณ. (2008).

6. Polystyrene หรือ PS

พอลิเมอร์ในเชิงการค้าอยู่ในรูปของอสังฐาน มีลักษณะแข็ง ใส แต่เปราะ ข้อดีของ PS คือ สามารถผลิตเป็นรูปร่างต่างๆได้ง่าย นิยมใช้งานขึ้นรูปด้วยการฉีด เป็นพลาสติกที่เหมาะสมสำหรับทำเป็น โฟม กล่อง ถ้วย และจาน เนื่องจากง่ายต่อการขึ้นรูป สามารถพิมพ์สีส้น และลวดลายให้สวยงามได้ และสามารถใช้งานกับอุณหภูมิตั้งแต่ -10 องศาเซลเซียส ถึง 80 องศาเซลเซียส นอกจากนี้นำมาทำเป็นภาชนะบรรจุของใช้ เช่น ทำถาดโฟมบรรจุอาหาร นำมารีไซเคิลเป็นกล่องวิดีโอ ไม้แขวนเสื้อ ไม้บรรทัด กระเปาะเทอร์โมมิเตอร์ แผงสวิทช์ไฟ



ภาพ 6 โครงสร้างทางเคมีของ Polystyrene หรือ PS และสัญลักษณ์รีไซเคิลหมายเลข 6

ที่มา : กวลัยพร मुखสุวรรณ. (2008).

พลาสติกชนิดอื่นๆ เช่น พอลิคาร์บอเนต (Polycarbonate : PC) พอลิเมอร์ชนิดนี้มีความแข็งแรง ทนทานต่อแรงกระแทกสูง ทนอุณหภูมิได้ดี นิยมใช้ทำหมวกนิรภัย แวนนิรภัย ขวดนมเด็ก ฝาครอบไฟรถยนต์ ไฟจราจร ป้ายโฆษณา



ภาพ 7 สัญลักษณ์รีไซเคิลหมายเลข 7

ที่มา : กวลัยพร मुखสุวรรณ. (2008).

1.2 Thermosetting plastic

พอลิเมอร์ประเภทนี้จะมีโครงสร้างเป็นแบบร่างแห สามารถหลอมเหลวขึ้นรูปได้เพียงครั้งเดียว เมื่อผ่านกรรมวิธีการผลิตโดยใช้ความร้อนหรือความดัน เกิดการเปลี่ยนแปลงทางเคมี โดยเกิดการเชื่อมโยงระหว่างสายโซ่โมเลกุล มีการสร้างพันธะโควาเลนต์ (Covalent bond) ระหว่างสายโซ่โมเลกุล ทำให้ผลผลิตที่ได้ไม่สามารถนำกลับมาหลอมใหม่ได้อีกครั้ง พอลิเมอร์ชนิดนี้จะแข็งตัวเมื่อได้รับความร้อนและสามารถเอาออกจากพิมพ์ได้โดยไม่ต้องรอให้เย็นก่อนเนื่องจากพลาสติกจะแข็งตัวอยู่ในแม่พิมพ์ ถ้าให้ความร้อนสูงเกินไป พอลิเมอร์จะเกิดการไหม้และสมบัติเปลี่ยนไปจากเดิม เนื่องจากพันธะระหว่างโมเลกุลแตกออก จึงไม่มีความเป็นพอลิเมอร์อีกต่อไป พลาสติกชนิดนี้ เช่น ขวดบรรจุน้ำอัดลม เป็นต้น (ปิ่นสุภา ปีติรักษ์สกุล, 2546)

การกำจัดขยะพลาสติกแบบดั้งเดิม

การกำจัดขยะพลาสติกแบบเดิม มีอยู่ด้วยกัน 2 วิธี คือ การฝังกลบอย่างถูกหลักสุขาภิบาลและการเผาในเตาเผา โดยการฝังกลบอย่างถูกหลักสุขาภิบาล (Sanitary Landfill) เป็นการนำขยะมูลฝอยทั้งหมดที่ไม่ได้ผ่านการคัดแยกหรือผ่านการคัดแยกมาแล้ว ฝังลงในหลุมดินที่ขุดรองรับขยะไว้ โดยที่หลุมมีการปูวัสดุกันซึม เช่น ดินเหนียวหรือแผ่นพลาสติกกันซึม เมื่อนำขยะบรรจุลงในหลุมมีการบดอัดแน่นแล้ว มีการกลบทับด้วยดินหรือวัสดุที่ทำหน้าที่ ป้องกันกลิ่น แมลง หรือสัตว์ไปคืบเขี่ยในแต่ละวัน ระบบฝังกลบมีการรวบรวมน้ำชะขยะ ที่เกิดขึ้นออกไปบำบัดก่อนทิ้งลงสู่แหล่งน้ำสาธารณะ นอกจากนั้นยังมีการระบายก๊าซที่เกิดจากหลุมฝังกลบออกจากหลุมเพื่อป้องกันการเกิดระเบิดหรือการติดไฟของก๊าซมีเทน เป็นต้น ซึ่งจะส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมดังนี้ (วรารักษ์ จันทาสี, 2553)

2.1 มลพิษต่อแหล่งน้ำบนดิน หากมีการนำขยะพลาสติกไปฝังกับขยะประเภทอื่นๆ ใกล้แหล่งน้ำ เมื่อขยะและพลาสติกเกิดการเน่าเสียมีปริมาณสารอินทรีย์เพิ่มขึ้น ก่อให้เกิดมลภาวะทางน้ำ เนื่องจากการเพิ่มจำนวนของจุลินทรีย์ นอกจากนี้ยังก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของระบบนิเวศทางน้ำ

ซึ่งจะมีการส่งกลิ่นเหม็นจากการย่อยสลายสารอินทรีย์ จากนั้นจะไหลปนกับแหล่งน้ำบริเวณใกล้เคียง จนทำให้คุณภาพน้ำไม่เหมาะสมและไม่ปลอดภัยต่อการอุปโภค บริโภค รวมทั้งไม่เหมาะสมต่อการดำรงชีวิตของสัตว์น้ำชนิดต่างๆ อีกด้วย

2.2 มลพิษต่อน้ำใต้ดิน โดยผลกระทบที่เกิดขึ้นจะเกิดการปนเปื้อนของน้ำขยะมูลฝอย รวมถึงพลาสติกลงสู่ใต้ดิน ทำให้น้ำใต้ดินมีคุณภาพน้อยลง และเสี่ยงต่อการนำมาใช้เป็นแหล่งน้ำเพื่อการบริโภค นอกจากนี้ขยะประเภทพลาสติกยังปล่อยสารเคมีอันตรายลงสู่แหล่งน้ำใต้ดินได้เช่นเดียวกัน

2.3 มลพิษต่อดิน ความเป็นพิษของการหมักขยะพลาสติก จะทำให้พลาสติกเกิดการย่อยสลายได้ทางชีวภาพ ทำให้นดินมีสารตกค้าง เนื่องจากเนื้อพลาสติกประกอบด้วยสารเคมีหรือใช้สารเติมแต่งที่มีความเป็นพิษ และส่งผลกระทบต่อพืชและสัตว์ที่อาศัยอยู่ในดิน (สมาคมพัฒนาคุณภาพสิ่งแวดล้อม, 2559)

ส่วนการเผาในเตาเผา (Incineration) โดยใช้เตาเผาที่มีข้อดีคือ สามารถกำจัดได้อย่างรวดเร็ว สามารถลดปริมาณขยะมูลฝอยได้เกือบหมด (เหลือกากและขี้เถ้าจำนวนน้อย) สามารถนำความร้อนจากการเผาไปใช้ประโยชน์ได้ แต่มีข้อเสียคือค่าใช้จ่ายในการติดตั้งระบบควบคุมมลพิษที่ระบายออกมาจากปล่องค่อนข้างแพง และยังมีผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมอย่างมาก

ผลกระทบจากการเผาพลาสติกทำให้เกิดสารพิษในชั้นบรรยากาศ จะส่งผลทำให้เกิดควันพิษในอากาศและก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ที่เป็นสาเหตุของภาวะโลกร้อน ส่วนประกอบของพลาสติกอาจนำไปสู่การปนเปื้อนของแหล่งน้ำ แหล่งดิน ซึ่งจะส่งผลกระทบต่อประชาชนส่วนใหญ่ ได้รับสารพิษจากการสูดดม น้ำดื่ม และทานอาหารที่มีสารปนเปื้อน นอกจากนี้ขยะพลาสติกอาจส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมภาวะเป็นพิษ การอุดตันตามท่อระบายน้ำ ทำให้เกิดภาวะโลกร้อนที่อันตรายต่อสัตว์และสิ่งมีชีวิตอื่น ๆ

อันตรายและความเป็นพิษของสารที่เกิดจากการย่อยสลายพลาสติกอย่างไม่สมบูรณ์

สารพิษในพลาสติกแม้จะยังไม่ถูกพิจารณาให้เป็นปัญหาหลักของระบบสาธารณสุข แต่การใช้งานผลิตภัณฑ์จากพลาสติกที่ไม่ถูกต้องและไม่ปลอดภัย โดยเฉพาะที่เกี่ยวข้องกับการอาหารและเครื่องดื่ม อาจนำมาซึ่งการสะสมสารพิษและความเสี่ยงต่อการเกิดโรคเรื้อรังต่างๆของผู้บริโภค สารประกอบบางชนิดที่เป็นสาเหตุของการเกิดโรค (ศุสิทธิ์ แสงกระจ่าง, 2556) ได้แก่

1. สาร Phthalate เป็น plasticizer ที่เติมลงไป ในการผลิตพลาสติกชนิด Polyvinylchloride เพื่อให้พลาสติกมีคุณสมบัติที่อ่อนนุ่มและสามารถยืดหยุ่น ได้ดี สารนี้ก่อให้เกิดผลกระทบต่อสุขภาพ เนื่องจาก เป็นสารที่มีกลไกทำงานคล้ายฮอร์โมน จึงไปรบกวนการทำงานของฮอร์โมนตามธรรมชาติ (Endocrine disruption) จากการศึกษาในสัตว์ทดลองทำให้ทราบ ผลที่แน่ชัดว่า Phthalate ทำให้มีการเปลี่ยนแปลง ระดับฮอร์โมนและการคลอดลูกในหนูทดลอง ผิดปกติ แต่

การศึกษาในคนยังไม่มีข้อสรุปที่ชัดเจน IARC จึงจัดให้ Phthalate เป็นสารก่อมะเร็งกลุ่ม 2B (Possible carcinogen) คือ สารที่อาจทำให้เกิดมะเร็งในคนได้

สาร Phthalate เป็นสารที่หลุดออกจากพลาสติกได้ง่าย เนื่องจากการจับตัวของสารนี้กับพีวีซี ไม่ได้เป็นแบบพันธะโควาเลนต์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งพลาสติกที่สัมผัสความร้อนและผ่านการใช้งานมานาน สหภาพยุโรปและประเทศสหรัฐอเมริกาจึงมีการออกกฎหมายห้ามใช้ของเล่นเด็กที่มีส่วนผสม Phthalate โดยเฉพาะชนิดที่เอาเข้าปากได้ นอกจากนี้หากใช้ฟิล์มถนอมอาหารปิดอาหารเพื่อใส่ไมโครเวฟ อาจทำให้สาร Phthalate ละลายและปนเปื้อนสู่อาหารได้อีกด้วย (จิวาริ โอภิชากร และ คัมภีร์ พ่วงทอง, 2022)

2. สาร Vinyl chloride เป็นวัตถุดิบในการผลิตเม็ด Polyvinylchloride Resin หรือ PVC Resin) ที่ความดันบรรยากาศปกติ จะเป็นแก๊สไม่มีสี แต่ส่วนใหญ่ จะบรรจุอยู่ในรูปของแก๊สที่อัด อยู่ในรูปของเหลว (compressed liquefied gas) นิยมใช้ทำท่อน้ำ สายไฟฟ้า ของเด็กเล่นชนิดเป่าลม และ เฟอร์นิเจอร์ จากรายงานของ IARC พบว่า สาร Vinyl chloride เป็นสาเหตุให้เกิดมะเร็ง ตับ ชนิด angiosarcoma จึงจัดให้ Vinyl chloride เป็นสารก่อมะเร็งในกลุ่ม 1

3. สาร Styrene เป็นสารตั้งต้นของการผลิตพลาสติกชนิดพอลิสไตรีน คือ ก่อ โฟม สาร Styrene ซึ่งเป็นสารอันตรายส่งผลกระทบต่อระบบประสาทส่วนกลางและระบบเม็ดเลือด อีกทั้งยังมีผลต่อ DNA และโครโมโซม จากรายงานการวิจัยพบว่า สารนี้ทำให้เกิดมะเร็งในสัตว์ทดลอง อย่างไรก็ตาม ยังไม่มีข้อสรุปที่ยืนยันว่า สารนี้ทำให้เกิดโรคมะเร็งในมนุษย์ ดังนั้น Agency for Research on Cancer (IARC) จึงจัดให้ Styrene เป็นสารก่อมะเร็งในกลุ่ม 2B (สุพัฒน์ หวังวงศ์วัฒนา และคณะ, 2553)

เนื่องด้วยสาร Styrene เป็นสารที่ละลายในน้ำมันและแอลกอฮอล์ อีกทั้ง ทำปฏิกิริยากับความร้อน ดังนั้นการใช้ก่อก่อโฟมบรรจุอาหารโดยเฉพาะอาหารประเภททอดร้อนๆ จึงควรเพิ่มความระมัดระวังมากขึ้น เพื่อป้องกันสาร Styrene ละลายออกมาจากภาชนะและปนเปื้อนสู่อาหาร

4. สาร Bisphenol A ใช้ในการผลิตพลาสติกชนิด Polycarbonate ซึ่งใช้ทำขวดนมเด็ก ขวดน้ำดื่มแบบใส สาร Bisphenol A เป็นสารที่ทำหน้าที่คล้าย ฮอร์โมนเอสโตรเจน สามารถรบกวนการทำงานของฮอร์โมนธรรมชาติ (Endocrine disruption) ซึ่งมีรายงาน (Li et al., 2010) พบว่า คนงานเพศชายซึ่งทำงานอยู่ในโรงงานที่ผลิตสาร Bisphenol A ในประเทศจีน มีความเสี่ยงต่อการมีฮอร์โมนเพศที่ผิดปกติ นอกจากนี้การศึกษาอันตรายของ Bisphenol A ในระดับเซลล์และสัตว์ทดลองพบว่า มีส่วนเกี่ยวข้องกับการเกิดมะเร็งเต้านมและมะเร็งต่อมลูกหมาก อย่างไรก็ตามยังไม่มีข้อยืนยันที่ชัดเจนว่า สารนี้ก่อให้เกิดโรคมะเร็งในคน IARC จึงจัดให้ Bisphenol A เป็นสารก่อมะเร็งในกลุ่ม 2B

จากคุณสมบัติของพลาสติกที่มีลักษณะใส และคงทนทำให้มีผู้นิยมนำไปทำ ขวดน้ำชนิดแบบใช้ซ้ำ (Reuse) และยังมีนิยมนำไปเคลือบบนผิวในของกระป๋องที่ใช้บรรจุอาหารหรือเครื่องดื่ม เพื่อไม่ให้ อาหารหรือเครื่องดื่มนั้นติดกระป๋อง อย่างไรก็ตามสาร Bisphenol A สามารถละลายออกมาเมื่อสัมผัสกับความร้อนหรือน้ำยาล้างจานที่เป็นกรด ในกรณีการนำขวดน้ำ ดื่มมาใช้ซ้ำ ไม่ควรวางไว้ในรถ เนื่องจากอาจทำให้น้ำในขวดร้อนขึ้นและสาร Bisphenol A ละลายออกมาได้นอกจากนั้นควรต้องให้ความใส่ใจเป็นพิเศษหากจำเป็นต้องใช้ผลิตภัณฑ์ ชนิดนี้กับเด็ก เนื่องจากเด็กมีความไวต่อสารพิษ ดังนั้นการใช้ขวดนมที่ทำด้วยพลาสติกชนิดนี้จึงไม่ควรทำความสะอาดด้วยวิธีใช้ความร้อนในการต้มหรือนึ่งหรือใช้สารดีเทอร์เจนแบบรุนแรง แต่ควรทำความสะอาดด้วยน้ำเย็นและผึ่งให้แห้งแทนจากการ รายงานของ J. Maia และคณะ (Maia et al., 2009) พบว่าสาร detergents 5 ชนิด ทำให้สาร Bisphenol A ถูกชะออกมาจากขวดนมเด็กที่ทำจากพลาสติก polycarbonate

5. สาร Formaldehyde อาจปนเปื้อนสู่อาหาร จากการใช้ภาชนะที่ทำจาก Melamine ไม่ถูกวิธี เช่น นำไปใช้กับไมโครเวฟหรือเตาอบอุณหภูมิสูง (กิตติมา วัฒนากมลกุล, 2563) โดยสารฟอรัมาลดีไฮด์ที่ถูกปลดปล่อยออกมาจะอยู่ทั้งในรูปของสารละลายและในรูปของแก๊สฟอรัมาลดีไฮด์ ซึ่งอุณหภูมิที่ปลอดภัยในการใช้เมลามีน จะอยู่ที่ระดับ 70-80 องศาเซลเซียส จากรายงาน (Zhang et al., 2010) พบว่าสาร Formaldehyde อาจเป็นสาเหตุให้เกิดโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาวได้ และจากรายงานของ IARC Formaldehyde จัดเป็นสารก่อมะเร็งในกลุ่ม 1

ตาราง 1 สารประกอบในพลาสติกที่เป็นอันตรายต่อสุขภาพ

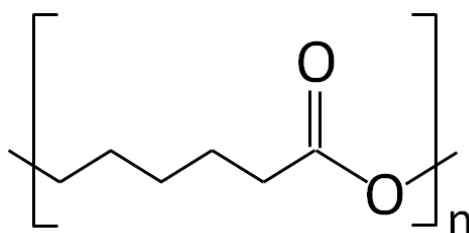
ชนิดของพลาสติก	สารที่เป็นอันตราย	ความเป็นพิษ
PVC	Phthalate	สารนี้มักจะแสดงในลักษณะพิษเรื้อรังเป็นผลให้เกิดอาการตกเลือดในปอด, อาการตับโต เป็นต้น
PVC	Vinyl chloride	1. พิษเฉียบพลัน เช่น มีอาการวิงเวียน อ่อนเพลีย ง่วง เสียการทรงตัว การได้ยินและการมองเห็นไม่ชัดเจน 2. พิษเรื้อรัง ทำให้เกิดความผิดปกติทางระบบประสาท การทำงานของตับ อาจมีโรคแทรกซ้อน เช่น ความดันโลหิตสูง เลือดออกตามบริเวณทางเดินอาหาร ความเสี่ยงในการเกิดโรคมะเร็งตับชนิด angiosarcoma

ชนิดของพลาสติก	สารที่เป็นอันตราย	ความเป็นพิษ
Polystyrene	Styrene	1. พิษเฉียบพลัน เช่น ระคายเคืองผิวหนัง หรือทางเดินหายใจ 2. พิษเรื้อรัง ส่งผลต่อระบบประสาทส่วนกลาง ทำให้การเคลื่อนไหวและการทรงตัวไม่ดี ความจำเสื่อม สมาธิสั้น และเป็นสารก่อกลายพันธุ์อาจก่อให้เกิดโรคมะเร็ง
Polycarbonate	Bisphenol A	1. พิษเฉียบพลัน เช่น ก่อให้เกิดการระคายเคืองของจมูกและทางเดินหายใจส่วนต้น ตา ลำคอ อาการทางผิวหนัง เช่น ทำให้เกิดภูมิแพ้หรือผิวหนังอักเสบ 2. พิษเรื้อรังส่งผลต่อระบบฮอร์โมนเพศที่ผิดปกติ มีพิษต่อตับเป็นและสารก่อการกลายพันธุ์
Melamine	Formaldehyde	พิษเฉียบพลัน เช่น ก่อให้เกิดการระคายเคืองของจมูกและทางเดินหายใจส่วนต้น ตา ลำคอ อาการทางผิวหนัง เช่น ทำให้เกิดภูมิแพ้หรือผิวหนังอักเสบ

ที่มา : ศุภิพร แสงกระจ่าง และคณะ. (2556)

พลาสติกชนิด Polycaprolactone (PCL)

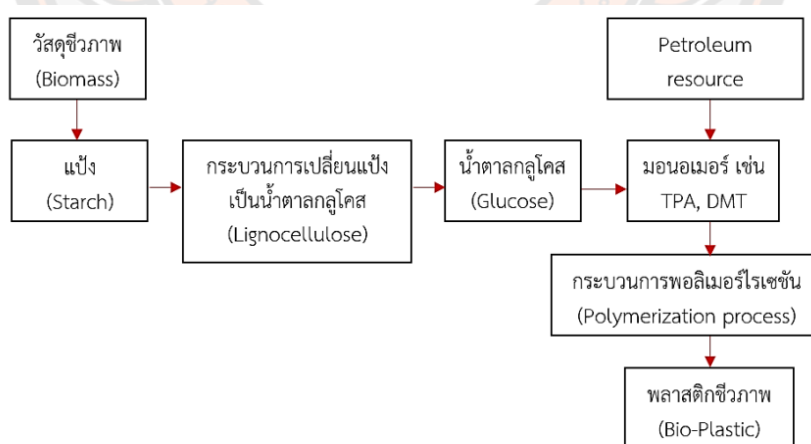
จัดเป็นเป็นเทอร์โมพลาสติกชนิดหนึ่ง ซึ่งจัดอยู่ในกลุ่มพอลิเอสเตอร์ที่มีสายโซ่ตรง ที่สามารถสังเคราะห์ได้จากน้ำมันดิบผ่านกระบวนการทางเคมี ซึ่งสามารถย่อยสลายได้ทางชีวภาพ ซึ่งมีลักษณะทางกายภาพเป็นสารกึ่งผลึก อุณหภูมิหลอมเหลวได้ที่อุณหภูมิต่ำ (ประมาณ 60 องศาเซลเซียส) มีความแข็งแรง ไม่เป็นพิษ และมีสมบัติทนแรงกระแทกได้ดี มีความยืดหยุ่น และสามารถเข้ากับวัสดุอื่นๆ ได้ง่าย จึงใช้เป็นสารเติมแต่งสำหรับเรซิน เนื่องจากสามารถขึ้นรูปได้ง่าย นอกจากนี้ PCL มีความทนต่อการเสื่อมสภาพจากความร้อนสูง และไม่เป็นพิษต่อร่างกายมนุษย์ จึงถูกนำไปใช้ในอุตสาหกรรมที่หลากหลาย เช่น วัสดุทางชีวภาพ ไหมละลาย หรือใช้เป็นสารช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในกระบวนการผลิตและมีอุณหภูมิหลอมเหลวที่ต่ำ จึงนิยมนำมาใช้เป็นพอลิเมอร์ สำหรับทำชิ้นงานต้นแบบ เพื่อใช้สำหรับงานพิมพ์สามมิติ และใช้เติมในพอลิเมอร์อื่นเพื่อเป็นสารทำให้ยืดหยุ่นและอ่อนนุ่มขึ้น (ยศฐา ศรีเทพ, 2563) โครงสร้างของ PCL แสดงดังภาพที่ 8



ภาพ 8 โครงสร้างทางเคมีของ Polycaprolactone (PCL)

ที่มา : สถาบันพลาสติก. http://asp.plastics.or.th:8001/Article_Detail.aspx?id=57

Polycaprolactone (PCL) ผลิตได้จากกระบวนการผลิตพลาสติกชีวภาพจากปิโตรเคมี โดยการหมักแป้งจากข้าวโพด เพื่อเปลี่ยนแป้งให้เป็นน้ำตาลกลูโคส จากนั้นนำกลูโคสที่ได้ผ่านกระบวนการหมัก (Fermentation Process) เพื่อทำให้กลูโคสแตกตัวเป็นมอนอเมอร์ โดยจะได้มอนอเมอร์ในกลุ่มของโพรเพนไดออล (1,3 Propanediol: PDO) จากนั้นจึงเติมสารละลายกรดเทเรพทาเลต (Terephthalate acid: TPA) หรือ ไดเมทิลเทเรพทาเลต (Dimethylterephthalate: DMT) ซึ่งเป็นสารที่ได้จากน้ำมันปิโตรเลียมเพื่อทำปฏิกิริยาทรานส์เอสเตอริฟิเคชัน (Transesterification) จากนั้นจึงนำมาเข้ากระบวนการพอลิเมอไรเซชัน (Polymerization process) เพื่อเปลี่ยนมอนอเมอร์ให้เป็นพอลิเมอร์ คือ PLC โดยกระบวนการสังเคราะห์แสดงดังภาพที่ 9



ภาพ 9 กระบวนการผลิตพลาสติกชีวภาพที่สามารถย่อยสลายได้ทางชีวภาพ

ที่มา : มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าพระนครเหนือ. (2015)

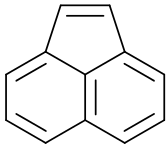
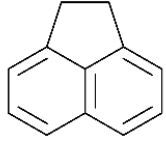
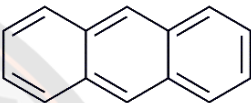
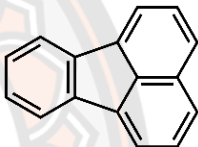
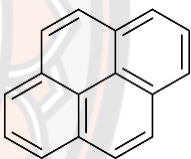
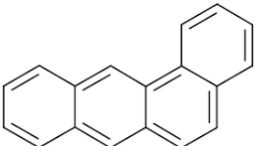
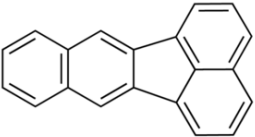
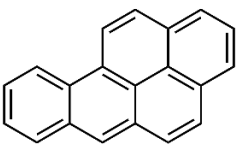
ชนิดของ Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs)

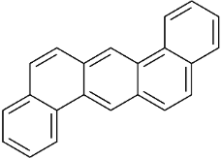
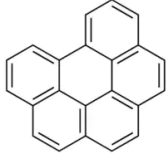
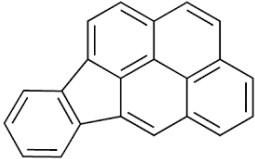
โพลีไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน (Polycyclic Aromatic Hydrocarbon ; PAHs) เป็นสารประกอบไฮโดรคาร์บอนที่ประกอบด้วยวงเบนซินตั้งแต่ 2 วงขึ้นไป จัดเรียงเป็นเส้นตรง เป็นมุม หรือเป็นกลุ่ม มีเฉพาะอะตอมของไฮโดรเจนและคาร์บอน สาร PAHs ที่ประกอบด้วยวงเบนซิน ไม่เกิน 6 วง จัดอยู่ในกลุ่มขนาดเล็ก หากประกอบด้วยวง เบนซินมากกว่า 6 วงขึ้นไป จัดอยู่ในกลุ่มขนาดใหญ่ คุณสมบัติโดยทั่วไป PAHs เป็นสารประกอบที่มีจุดเดือด และจุดหลอมเหลวสูง ความดันไอต่ำ และละลายน้ำได้เล็กน้อย สามารถละลายได้ดีในไขมัน มีความไวต่อแสง และทนต่อความร้อน (ศูนย์วิจัยและตรวจสอบคุณภาพสัตว์น้ำและผลิตภัณฑ์สัตว์น้ำสงขลา, มปป.)

PAHs เป็นสารพิษและเป็นสารก่อมะเร็งในกลุ่มสารอินทรีย์ที่เป็นมลพิษในสิ่งแวดล้อม โดยทั่วไปเกิดจากการเผาไหม้ไม่สมบูรณ์ของเชื้อเพลิง (Curtosi et al., 2009; Ma et al., 2010) มีคุณสมบัติในการละลายน้ำต่ำ และเนื่องจากมีความคงทนในสิ่งแวดล้อมสูง PAHs จะไปสะสมในตะกอนดินซึ่งจะส่งผลกระทบต่อสิ่งมีชีวิตหน้าดินในระยะยาว (Liu et al., 2012) และมีการถ่ายทอดสู่สิ่งมีชีวิตในลำดับขั้นการบริโภคห่วงโซ่อาหารจนเข้าสู่มนุษย์ในที่สุด เนื่องจาก PAHs ที่มีมวลโมเลกุลสูง มีจุดเดือดต่ำและความดันไอต่ำ การย่อยสลายและการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างทางเคมีเกิดขึ้นได้ยากกว่า PAHs ต่ำ ทำให้ PAHs ที่มีมวลโมเลกุลสูงสะสมตัวอยู่ในสิ่งแวดล้อมได้เป็นเวลานาน (Nasher et al., 2013) ทำให้ PAHs แต่ละชนิดมีลักษณะและความเป็นพิษแตกต่างกัน องค์การพิทักษ์สิ่งแวดล้อมแห่งสหรัฐอเมริกา (United State Environment Protection Agency; US-EPA) ให้ความสำคัญกับ PAHs 16 ชนิด ได้แก่ Naphthalene (Nap), Acenaphthylene (Acy), Acenaphthene (Ace), Fluorene (FL), Phenanthrene (Phe), Anthracene (An), Fluoranthene (Fluo), Pyrene (Pyr), Chrysene (Chry), Benzo[a]anthracene (B[a]A), Benzo[b]fluoranthene (B[b]F), Benzo[k]fluoranthene (B[k]F), Benzo[a]pyrene (B[a]P), Indeno (1,2,3 -cd) pyrene (Ind), Dibenzo[a,h]anthracene (D[a,h]A) และ Benzo[g,h,i]perylene (B[g,h,i]P) แสดงดังตารางที่ 2

ตาราง 2 รูปแบบและโครงสร้างทางเคมีของสาร PAHs 16 ชนิด

PAHs	สัญลักษณ์	โครงสร้างทางเคมี
Naphthalene	Nap	

PAHs	สัญลักษณ์	โครงสร้างทางเคมี
Acenaphthylene	Acy	
Acenaphthene	Ace	
Anthracene	Ant	
Fluoranthene	Fluo	
Pyrene	Pyr	
Benzo[a]anthracene	B[a]A	
Benzo[k]fluoranthene	B[k]F	
Benzo[a]pyrene	B[a]P	

PAHs	สัญลักษณ์	โครงสร้างทางเคมี
Dibenzo[a,h]anthracene	D[a,h]A	
Benzo[g,h,i] perylene	B[g,h,i]P	
Indeno (1,2,3 -cd) pyrene	Ind	

ที่มา : Wang et al., 2007

คุณสมบัติของ PAHs

PAHs เป็นกลุ่มสารที่มีลักษณะเป็น ของแข็ง สีขาว หรือสีเหลืองอ่อนปนเขียว ในธรรมชาติ จะไม่พบสารนี้อยู่เดี่ยวๆ มักพบปะปน อยู่กับสารอื่นเสมอ ความสามารถในการละลายได้ ของ PAHs จะเกิดการเปลี่ยนแปลงอย่างมากในขณะที่ความเค็มมีการเปลี่ยนแปลงเล็กน้อย โดยเฉพาะในที่ อุณหภูมิต่ำ PAHs มีความไวต่อการออกซิไดซ์โดยแสง ปัจจัยที่เกี่ยวข้องได้แก่ อุณหภูมิ ความเค็ม และชนิดของ PAHs ในด้านความสามารถกลายเป็นไอจะพกผันกับน้ำหนักโมเลกุล (สถาบันอาหาร กระทรวงอุตสาหกรรม)

แหล่งการเกิดของสาร PAHs ในสิ่งแวดล้อม

แหล่งกำเนิดของสาร PAHs ในสิ่งแวดล้อมส่วนใหญ่มาจาก 2 แหล่งใหญ่ คือ จากธรรมชาติ (Nature source) และเกิดจากกิจกรรมของมนุษย์ (anthropogenic source) (Tolosa et al., 2004) ซึ่งแต่ละแหล่งกำเนิดก่อให้เกิด PAHs ที่แตกต่างกันไป (ตารางที่ 2) ดังนี้

1. แหล่งกำเนิด PAHs จากธรรมชาติ มาจากการเผาไหม้ที่ไม่สมบูรณ์ของสารอินทรีย์ เช่น การเกิดไฟป่า ภูเขาไฟระเบิด (Wolska et al., 2012) ที่เกิดขึ้นจะสะสมอยู่ในอากาศและน้ำฝน ชะล้างลงน้ำ จึงอาจส่งผลกระทบต่อคุณภาพน้ำได้ (Herngren et al., 2010)

2. แหล่งกำเนิด PAHs จากกิจกรรมของมนุษย์ เช่น การเผาไหม้ของเชื้อเพลิงในโรงงาน

อุตสาหกรรม การกลั่นน้ำมันดิบ ควันท่อไอเสียรถยนต์ การเผาขยะ และการเผาตอพงข้าวของเกษตรกร ในกรณีความเข้มข้นของ PAHs ในสิ่งแวดล้อมจะขึ้นอยู่กับระยะห่างระหว่างบริเวณที่ปนเปื้อนกับแหล่งกำเนิด และการเคลื่อนย้ายของ PHAs (Kanaly & Harayama, 2000) PAHs จากกิจกรรมของมนุษย์แบ่งออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ ตามกระบวนการการเกิด ดังนี้

2.1 PAHs ที่เกิดจากการเผาไหม้ของเชื้อเพลิง (pyrogenic source) เป็นสาร PAHs ที่มีจำนวนวงแหวนเบนซีน 4-6 วง มีน้ำหนักโมเลกุลสูง โดยมีแหล่งกำเนิดจากการเผาไหม้ไขมันเชื้อเพลิงที่ไม่สมบูรณ์ของเชื้อเพลิงฟอสซิล ได้แก่ ไม้ ถ่านหิน และน้ำมัน นอกจากนี้ยังมี น้ำชะจากเกษตรกรรม บ้านเรือน น้ำทิ้งจากขยะ และการเผาไหม้จากบ้านเรือน เช่น การทำอาหารจำพวกปิ้งย่าง

2.2 PAHs ที่เกิดจากปิโตรเลียม (petrogenic source) คือ PAHs ที่มีอยู่ในน้ำมันปิโตรเลียมและผลิตภัณฑ์จากการกลั่นน้ำมันดิบ โมเลกุลของสารกลุ่มนี้มีจำนวนวงแหวนเบนซีน 2-3 วง (Hong, 2016) ส่วนใหญ่มีแหล่งกำเนิดจากการเผาไหม้ปิโตรเลียม การรั่วไหลของน้ำมัน การรั่วของน้ำมันจากยานพาหนะ รวมไปถึงน้ำทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรมด้วยแหล่งกำเนิดที่มาจากพวกน้ำชะและน้ำทิ้งต่างๆ ปนเปื้อนลงสู่แหล่งน้ำโดยตรง ส่วนแหล่งกำเนิดจากการเผาไหม้ก็ปนเปื้อนเข้าสู่ชั้นบรรยากาศ (Genualdi et al., 2009) โดยมีลมพัดพาไป และสามารถตกลงสู่พื้นล่างได้โดยการชะของน้ำค้างหรือน้ำฝน (precipitation) เข้าไปปนเปื้อนในแหล่งน้ำ สุดท้ายไปสะสมตัวอยู่ในตะกอนดิน (Romanek et al., 1992)

ตาราง 3 แหล่งที่มาของสาร PAHs ที่สำคัญ

แหล่งที่มา (Source)	สาร PAHs ที่พบ
กระบวนการเผาไหม้ถ่านหิน	Phe, Fluo และ Pyr
การใช้แก๊สจากบ้านเรือน	Chry, Pyr และ Fluo
กระบวนการเผาไหม้	B[a]P และ Fluo
เชื้อเพลิงจากน้ำมันในโรงงานอุตสาหกรรม	Fluo, Pyr และ Chry
การเผาไหม้ฟางข้าว	Ind, B[a]P และ D[a,h]A
เตาเผาขยะ	Pyr, phe และ Fluo
การใช้น้ำมันเบนซินและดีเซลในยานพาหนะ	Fluo, Pyr, B[b]F และ B[k]F

ที่มา : ATSDR, 1995.

การปนเปื้อนของ PAHs ในดิน

PAHs ในชั้นบรรยากาศถูกสะสมลงสู่พื้นโลกอย่างต่อเนื่องโดยกระบวนการตกตะกอนแบบแห้งหรือแบบเปียก PAHs บางส่วนมาจาก เช่น ท่อไอเสียรถยนต์ จากบริเวณพื้นที่ใกล้ถนน PAHs ถูกพัดพาไปในอากาศ และ PAHs เกิดการสะสมได้ในดิน โดยเฉพาะจากการเกษตร เช่น การใช้ PAHs

เป็นวัสดุเคลือบเมล็ดพันธุ์พืช เพื่อเป็นการรักษาคุณภาพเมล็ดพันธุ์ หรือใช้เป็นวัสดุเคลือบเม็ดปุ๋ยเคมี หรือสารกำจัดศัตรูพืช ที่ช่วยให้สารเคมีเหล่านี้เกิดการกระจายตัวอย่างช้าๆ ปัจจุบันเหล่านี้ทำให้ดินดูดซับ PAHs สะสมไว้ในดินเป็นจำนวนมาก (Abdel-Shafy & Mansour, 2016)

การบำบัด PAHs ในดิน

การบำบัด PAHs โดยการใช้แบคทีเรียร่วมกับพืช เนื่องจากพืชจะช่วยส่งเสริมให้แบคทีเรียทำงานได้ดีขึ้น (Chouychai et al., 2009; Huang et al., 2004) การใช้แบคทีเรียร่วมกับพืชเพื่อย่อยสลาย PAHs เป็นวิธีการหนึ่งที่มีประสิทธิภาพในการกำจัด PAHs ออกจากดิน โดยพืชจะช่วยเพิ่มอัตราการรอดชีวิตของแบคทีเรียที่ย่อยสลาย PAHs เพิ่มปริมาณแบคทีเรียที่ย่อยสลายได้ทั้งหมดในดิน และเพิ่มอัตราการย่อยสลาย PAHs ได้ดีกว่าดินที่ไม่ปลูกพืชโดยเฉพาะในบริเวณไรโซสเฟียร์ของพืช (Anokhina et al., 2004; Paulik et al., 2018) การใช้พืชร่วมกับจุลินทรีย์ในการย่อยสลาย PAHs เป็นกระบวนการที่เรียกว่า การกระตุ้นด้วยพืช (Phytostimulation) ซึ่งเป็นกระบวนการที่รากพืชยังมีชีวิตอยู่หลังสารออกมาหรือจากการสลายตัวของรากพืชที่ตายแล้ว หรือกระบวนการอื่นๆ ที่ให้สารอาหารเพื่อกระตุ้นการเจริญเติบโตของแบคทีเรียในดิน หรือเชื้อราไมคอร์ไรซา ทำให้จุลินทรีย์เหล่านี้ย่อยสลายสารมลพิษได้ดีขึ้น (McCracken, 2003) ตัวอย่างเช่น สารอินทรีย์กลุ่มโพลีฟีนอลที่หลังจากรากพืชกระตุ้นการสร้างเอนไซม์ที่ใช้ในการย่อยสลายสารมลพิษของแบคทีเรีย ทำให้แบคทีเรียย่อยสลายสารมลพิษได้ดีขึ้น

อันตรายและความเป็นพิษของ PAHs

โดยทั่วไป โพลีไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนเป็นสารเคมีที่มีความเป็นพิษเฉียบพลันต่ำในสิ่งมีชีวิตชั้นสูงจะพบความเป็นพิษเรื้อรัง การได้รับแบบเรื้อรังอาจทำให้เกิดความเป็นพิษต่อระบบต่างๆ ของร่างกายได้ แต่อาการไม่รุนแรงนัก ความเป็นพิษที่สำคัญของ PAHs คือความสามารถในการก่อมะเร็งในอวัยวะต่างๆ นอกจากนี้ PAHs ยังเกิดได้จากควันบุหรี่ น้ำมันดิบ เขม่าจากเตาเผาถ่านหิน หรือจากท่อไอเสียรถยนต์ (Christensen and Arora, 2007) แต่ไม่มีผลต่อการพัฒนาของตัวอ่อนและพฤติกรรมของสิ่งมีชีวิต

การเข้าสู่ร่างกาย

PAHs เข้าสู่ร่างกายได้หลายวิธี ทั้งโดยการกินอาหารที่ปนเปื้อน PAHs การสูดดมไอระเหยหรือเขม่าควันไฟที่มี PAHs ผสมอยู่ หรือโดยการสัมผัสทางผิวหนัง การแพร่กระจายของ PAHs ในร่างกายของสัตว์ทดลองพบว่า เมื่อได้รับโดยการสูดดมและการกินจะ แพร่ไปยัง ปอด ตับ ไต และทางเดินอาหาร หนูที่ได้รับเบนโซเอไพรีนโดยการหยอดเข้าหลอดคอ พบว่าเบนโซเอไพรีนจะกระจายไปยังปอด ตับ ทางเดินอาหารและซาก โดยเมตาบอลิซึมในลำไส้จะมากขึ้นเมื่อเวลานานขึ้น แสดงว่ามีการขับออกทางน้ำดีและมีการหมุนเวียนระหว่างลำไส้และตับ แต่ไม่มีรายงานเกี่ยวกับการแพร่กระจายหลังการสัมผัสทางผิวหนัง

การเป็นสารก่อกลายพันธุ์

PAHs ที่เป็นสารก่อมะเร็งจะมีฤทธิ์เป็นสารก่อกลายพันธุ์ด้วย โดย PHAs บางชนิดเมื่อเข้าสู่ร่างกายจะถูกเมตาโบไลต์โดยเอนไซม์ cytochrome P-450 ทำให้เกิดการเติมหมู่ไฮดรอกซี (-OH) ที่เป็นวงเบนซินได้เป็นสารอนุพันธ์ epoxide ซึ่งเป็นสารที่ว่องไวมาก สร้างพันธะโควาเลนต์ได้ดีกับพวกโปรตีนและกรดนิวคลีอิก จากการศึกษาตำแหน่งบนโครงสร้าง DNA พบว่าคูเบสและหมู่ฟอสเฟตเป็นตำแหน่งที่เกิดจากการสร้างพันธะโควาเลนต์กับสารก่อมะเร็ง

ความเป็นพิษแบบอื่น

PAHs สามารถรบกวนระบบต่อมไร้ท่อในปลา และมีผลกระทบต่อสเตอรอยด์ฮอร์โมนในกลุ่มอาร์โททรพอดและมีผลต่อการลอกคราบของปู ครัสเตเชียนหลายชนิดที่สัมผัสกับน้ำมันดิน มักมีการลอกคราบที่ผิดปกติ รบกวนการสื่อสารระหว่างเซลล์ Naphthalene สามารถเข้าไปจับกับโมเลกุลของตับ ไต ปอด และยับยั้งกระบวนการหายใจที่ไม่โทคอนเดรีย เป็นพิษต่อระบบประสาท ระบายเคืองต่อผิวหนังและตา เป็นสารก่อภูมิแพ้ที่อ่อน

การกระจายตัวของสาร PAHs ในสิ่งแวดล้อม

PAHs เข้าสู่สิ่งแวดล้อมได้หลายทาง ทั้งจากทางธรรมชาติและจากกิจกรรมของมนุษย์ จากเส้นทางธรรมชาติ ได้แก่ การดูดซึมของน้ำมันดิบจากแหล่งน้ำมันใต้ดิน ทำให้เกิดการปนเปื้อนของ PAHs ในแหล่งน้ำธรรมชาติและดิน ส่วนที่เกิดจากการกระทำของมนุษย์ที่สำคัญ คือ กิจกรรมที่มีการเผาไหม้แบบไม่สมบูรณ์ ทำให้เกิด PAHs แตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับวัสดุที่นำมาเผาไหม้ ดังนั้น จึงพบ PAHs กระจายตัวอยู่ในดิน และอาจจะเกิดจากการแพร่จาก เช่น ที่อยู่อาศัย โรงงานอุตสาหกรรม คาดว่าปริมาณของสาร PAHs ที่ปนเปื้อนในดินส่วนใหญ่้นั้นมาจากการปนเปื้อนจากควันเสียจากโรงงานอุตสาหกรรม และการเผาไหม้ไม่สมบูรณ์ของยานพาหนะ

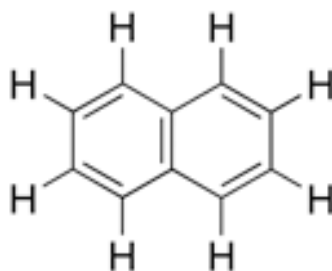
สาร PAHs มีแหล่งกำเนิดมาจากหลายแหล่ง ไม่ว่าจะเป็นแหล่งกำเนิดจากธรรมชาติและแหล่งกำเนิดจากกิจกรรมมนุษย์ ซึ่งโดยส่วนใหญ่่มักมาจากการเผาไหม้ที่สมบูรณ์และ PHAs ที่เกิดขึ้นก็จะออกสู่ชั้นบรรยากาศและสะสมตัวอยู่ในชั้นบรรยากาศ ในเขตเมืองจึงมักพบความเข้มข้นของสาร PHAs สูง (Oros & Ross, 2005) และจากการที่ PAHs จึงเคลื่อนตัวได้ง่ายในอากาศแพร่กระจายโดยการเกาะติดกับอนุภาคในชั้นบรรยากาศ และตกลงสู่พื้นล่างโดยแรงโน้มถ่วงของโลกหรือถูกชะลงมาสู่แหล่งน้ำค้ำหรือน้ำฝน จากนั้นสาร PAHs จะกระจายตัวอยู่ในน้ำรวมตัวกับอนุภาคแขวนลอย และท้ายที่สุดก็ตกสะสมอยู่ในตะกอนดิน PAHs ส่วนใหญ่เข้าสู่แหล่งน้ำโดยตรง เมื่อปนเปื้อนในน้ำจะรวมตัวกันหรือเกาะกับคอลลอยด์ (colloids) และตกตะกอนสะสมอยู่กับดินตะกอน จึงมักพบว่า PAHs ในดินตะกอนมีค่าสูงกว่าในน้ำประมาณ 3-5 เท่า (Gocht et al., 2001)

ความเป็นพิษของ PAHs ต่อพืช

เป็นพิษต่อพืชโดยยับยั้งทั้งการเจริญเติบโต การสังเคราะห์ด้วยแสงและการดูดซึมแร่ธาตุ เช่น การทำลายคลอโรฟิลล์ ยับยั้งขนส่งอิเล็กตรอน ทำให้พืชเกิดสีเหลือง ขึ้น ทำให้พืชเหี่ยวเฉาโดยลดแรงดันเต่งภายในเซลล์พืช ซึ่งเกิดจากการรบกวนการทำงานของเยื่อหุ้มเซลล์เป็นพิษต่อการเจริญของต้นอ่อนมากกว่าการงอก ความเป็นพิษของ PAHs แต่ละชนิดนั้นจะต่างกันไป ขึ้นอยู่กับชนิดของพืช ความสามารถในการระเหย และสภาพแวดล้อมอื่นๆ เช่น ความเป็นกรด-ด่างของดิน เป็นต้น

Naphthalene

นอกจากนี้ยังมี PAHs ที่พบการสะสมในธรรมชาติมากที่สุด ก็คือ Naphthalene เป็นสารประกอบไฮโดรคาร์บอนชนิดไม่อิ่มตัว Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) โครงสร้างประกอบด้วยวงเบนซีน 2 วงเชื่อมต่อกันด้วยพันธะเดี่ยว ที่ผลิตได้จากกระบวนการกลั่นน้ำมันปิโตรเลียม มีสถานะเป็นของแข็งสีขาว ไม่ละลายน้ำ แต่ละลายได้ดีในตัวทำละลาย เช่น เอทานอล เบนซีน อีเทอร์ คีโตน เป็นต้น มีกลิ่นฉุนเฉพาะ สามารถระเหยหรือเปลี่ยนสถานะจากของแข็ง กลายเป็นไอได้ที่อุณหภูมิห้อง และ Naphthalene สามารถเกิดขึ้นได้เองตามธรรมชาติ พบในถ่านหิน น้ำมันปิโตรเลียมและการเผาไหม้ของของสารประกอบอินทรีย์ ซึ่งในปัจจุบันมีการผลิต Naphthalene เพื่อนำไปใช้ประโยชน์ต่างๆ ไม่ว่าจะเป็นด้านอุตสาหกรรม เกษตรกรรม เช่น ใช้ในการผลิตพลาสติก PVC resin สารฆ่าแมลงหรือนำไปทำเป็นลูกเหม็น ซึ่งเป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดการปนเปื้อนของ Naphthalene ในสิ่งแวดล้อม ถึงแม้ว่า Naphthalene สามารถสลายได้จากการกระบวนการตามธรรมชาติ แต่ยังคงตกค้างในดินและน้ำได้ (Kim & Zylstra, 1999) นอกจากนี้ยังมีการสะสมในพืชและสัตว์ โดยพบ Naphthalene ทั้งในผัก เช่น คื่นช่าย กะหล่ำปลี และแครอทที่ปลูกในเขตอุตสาหกรรม รวมทั้งพืชที่ขึ้นในบริเวณที่ปกคลุมด้วยควันไฟจากการเผาไหม้ของพลาสติกพวก polypropylene (Maharg et al., 2023) ส่วนการสะสมในสัตว์ เช่น หอยนางรม ไข่เดือนทะเล และสามารถถ่ายทอดไปตามห่วงโซ่อาหารได้อีกด้วย (Shores et al., 2017) Naphthalene สามารถเข้าสู่ร่างกายได้หลายช่องทาง เช่น การสูดหายใจเอาอากาศที่ปนเปื้อนสารเคมีอันตรายในลูกเหม็นเข้าไปผ่านทางเดินหายใจ การได้รับสารผ่านทางผิวหนังเมื่อสัมผัสลูกเหม็นโดยตรงหรือสัมผัสเสื้อผ้าเครื่องนุ่งห่มที่มีสารอันตรายในลูกเหม็นตกค้างอยู่ สารยังสามารถเข้าสู่ร่างกายผ่านการรับประทานอาหารหรือน้ำที่ปนเปื้อนได้



ภาพ 10 โครงสร้างเคมีของ Naphthalene

ที่มา : Garcia, Solsona, & Taylor. (2005).

การเข้าสู่สิ่งแวดล้อมของ Naphthalene

Naphthalene สามารถเข้าสู่สิ่งแวดล้อมจากการใช้ตามบ้านเรือน จากการเกษตร หรือจากการเผาไหม้เชื้อเพลิงจากโรงงานอุตสาหกรรม เนื่องจาก Naphthalene สามารถระเหิดได้อย่างรวดเร็ว เมื่อเข้าสู่สิ่งแวดล้อม Naphthalene จะอยู่ในรูปของไอระเหยในอากาศเป็นส่วนใหญ่ ความชื้นและแสงแดดในอากาศสามารถทำให้ Naphthalene สลายตัว ซึ่งโดยทั่วไปจะใช้เวลาภายใน 1 วัน

อันตรายของ Naphthalene ต่อร่างกาย

Naphthalene สามารถเข้าสู่ร่างกายของเราได้จากการหายใจเอาอากาศที่ปนเปื้อนด้วย Naphthalene หรือจากไอระเหยของ Naphthalene โดยตรง นอกจากนี้เราอาจได้รับ Naphthalene จากการสัมผัสทางผิวหนังโดยตรง เมื่อเข้าสู่ร่างกาย Naphthalene จะถูกกำจัดที่ตับ และขับออกทางปัสสาวะ โดยทั่วไปจะใช้เวลาในการขับออกจากร่างกายภายใน 1 ถึง 3 วัน เมื่อร่างกายได้รับไอระเหยของ Naphthalene จะเกิดอาการระคายเคืองตา จมูก คอ และผิวหนัง ไอระเหยมีพิษต่อระบบประสาท ยับยั้งการทำงานของระบบหายใจ การได้รับ Naphthalene ในปริมาณที่มากเกินไป จะทำให้เกิดอาการคลื่นไส้ อาเจียน ท้องเดิน มีเลือดออกในปัสสาวะ ผิวหนังซีดเหลือง และอาจทำให้เสียชีวิตได้ นอกจากนี้ การได้รับสัมผัสสาร Naphthalene ยังอาจส่งผลกระทบต่อเป็นอันตรายต่อตับและไต เมื่อเข้าสู่ร่างกาย Naphthalene จะถูกเปลี่ยนแปลงให้กลายเป็นสาร alpha-naphthol ซึ่งสามารถทำให้เม็ดเลือดแดงถูกทำลาย ไม่สามารถลำเลียงออกซิเจนในเลือด และอาจเป็นสาเหตุของการเกิดภาวะโลหิตจาง โดยเฉพาะในทารก เด็ก สตรีมีครรภ์ผู้ที่มีภาวะระดับเม็ดเลือดแดงผิดปกติ หรือผู้ที่มีภาวะเซลล์เม็ดเลือดแดงที่แตกง่าย เช่น ผู้ป่วยโรคทางพันธุกรรมที่พ่วงเอนไซม์ จีซิกพีดี (G6PD deficiency) Naphthalene ยังเป็นสารที่อาจก่อให้เกิดมะเร็งได้ โดยสถาบันการวิจัยมะเร็งนานาชาติ (International Agency for Research on Cancer: IARC) ขององค์การอนามัยโลกได้ทำการศึกษาข้อมูลหลักฐานวิชาการในมนุษย์ สัตว์ทดลองกลไกการออกฤทธิ์ของ

Naphthalene และจัดกลุ่มให้สารดังกล่าวเป็นสารที่อาจจะก่อมะเร็งในมนุษย์ในกลุ่ม 2B (possibly carcinogenic to humans) (อาทิตยา จิตจำนง, 2016)

นอกจากนี้ยังพบว่า Naphthalene เพิ่มอุบัติการณ์การเกิดเนื้องอกและมะเร็งที่จมูกและปอดจากการทดลองในหนูที่ได้รับ Naphthalene ทางการหายใจต่อเนื่องเป็นเวลานาน และหน่วยงาน U.S. Environment Protection Agency (U.S. EPA), National Toxicology Program (NTP, USA) และ International Agency for Research on cancer (IARC) ได้จัดให้ Naphthalene เป็นสารก่อมะเร็งในคน

การใช้จุลินทรีย์เพื่อการบำบัดทางชีวภาพ

การบำบัดทางชีวภาพ เป็นการบำบัดสภาพแวดล้อมที่ปนเปื้อนสารมลพิษโดยการใช้จุลินทรีย์ ซึ่งวิธีนี้จะได้ผลดีก็ต่อเมื่อสารเคมีนั้นเป็นสารที่สามารถย่อยสลายได้ (Biodegradation Pollution) โดยวิธีนี้มีความจำเพาะกับชนิดและกิจกรรมของจุลินทรีย์ที่นำมาใช้ และผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากการทำ Bioremediation ต้องเป็นสารที่ปลอดภัยและไม่ส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม นอกจากนี้ปัจจัยสภาวะแวดล้อมต่างๆ ต้องเหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์โดยเฉพาะอย่างยิ่งการบำบัด ณ แหล่งที่มีการปนเปื้อนโดยตรงหรือการสกัดแยกเอาสารพิษออกจากสิ่งแวดล้อม ในปัจจุบันเทคโนโลยีการฟื้นฟูทางชีวภาพเป็นเทคโนโลยีที่ได้รับความนิยมอย่างกว้างขวาง เนื่องจากเป็นเทคโนโลยีที่ใช้ในกระบวนการย่อยสลายทางธรรมชาติของสิ่งมีชีวิต ได้แก่ จุลินทรีย์ พืช หรือวัสดุชีวภาพในการบำบัดสารปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อม และด้วยความที่เป็นเทคโนโลยีที่เป็นมิตรซึ่งงบประมาณในการดำเนินการน้อย ทำให้เป็นที่ยอมรับของสาธารณชน ในกรณีที่จะประยุกต์ใช้เทคโนโลยีดังกล่าวในพื้นที่จริง ตัวอย่างการบำบัดทางชีวภาพ (สุพัตรา เอี่ยมนาค, 2556) เช่น การใช้จุลินทรีย์ในการบำบัดโลหะหนักในดิน โดยการใช้จุลินทรีย์ทำให้โลหะหนักละลายหรือเคลื่อนที่ออกมาจากดิน โดยวิธีนี้ใช้หลักการการเพิ่มค่า Bioavailability ของโลหะหนักในดินโดยการใช้จุลินทรีย์ที่สามารถนำโลหะหนักเข้าสู่เซลล์แบคทีเรียได้ (Cellular uptake) รวมถึงการใช้แบคทีเรียเพื่อดูดซับโลหะหนักที่ยึดติดอยู่กับอนุภาคดินให้หลุดออกมา ซึ่งแนวทางนี้ใช้ในการบำบัดโลหะหนักออกจากดินได้อย่างถาวร โดยกระบวนการที่จุลินทรีย์ทำให้โลหะหนักละลายหรือเคลื่อนที่ได้มีหลายวิธี (ชนิษฐา สมตระกูล, 2013) ได้แก่

- 1) ปฏิกิริยาออกซิเดชัน (Oxidation) เปลี่ยนรูปของโลหะให้อยู่ในรูปที่ละลายน้ำหรือระเหยได้ (Volatile organometallic compounds)
- 2) การสร้างกรดอินทรีย์ (Organic acids) ของจุลินทรีย์ ทำให้ค่า pH ของดินลดลง โลหะหนักจึงละลายหรือถูกชะออกมาจากดินได้มากขึ้น
- 3) การสร้างสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ (Biosurfactant) ของจุลินทรีย์ โดย Biosurfactant

ไปจับกับโลหะหนักในอนุภาคดินโดยอาศัยสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่มีประจุลบกับประจุบวกของโลหะหนัก ทำให้ดึงโลหะหนักหลุดออกจากดินได้

4) การสร้างไซเดอร์โรฟอร์ (Siderophore) ที่ผลิตโดยจุลินทรีย์บางชนิด ซึ่งสารไซเดอร์โรฟอร์เป็นดีเลเตอร์ของเหล็ก (Fe-natural chelator) และยังสามารถจับกับโลหะอื่นได้ เช่น อลูมิเนียม โครเมียม สังกะสี ตะกั่ว แคดเมียม ทำให้โลหะหนักเหล่านี้หลุดออกมาจากอนุภาคของดินได้ (เบญจภรณ์ ประภักดี, 2559) คล้ายกับการใช้สารคีเลเตอร์สังเคราะห์อื่นๆ เช่น Ethylene Diamine Tetraacetate Acid (EDTA)

5) การสร้างพอลิเมอร์ออกมานอกเซลล์ หรือ Expolymer หรือ Extracellular polymeric substance (EPS) ของจุลินทรีย์โดย EPS เป็นพอลิเมอร์ที่มีหมู่ฟังก์ชันเคมี เช่น Carboxyl, Hydroxyl, Sulhydryl (เบญจภรณ์ ประภักดี และ จิรวีรุ้ แสงทอง. 2559)

กระบวนการย่อยสลาย PAHs เกิดขึ้นได้จากทั้งในภาวะที่มีออกซิเจน (Aerobic) และไม่มีออกซิเจน (anaerobic) แต่เนื่องจากกระบวนการย่อยสลายในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจนจะเกิดได้ช้า (Harayama, 1997) ส่วนใหญ่จึงมุ่งเน้นศึกษากระบวนการย่อยสลายในภาวะที่มีออกซิเจน โดยกระบวนการย่อยสลายเริ่มจากการเติมออกซิเจนเข้าไปที่วงอะโรมาติกโดยอาศัยกิจกรรมของเอนไซม์ที่แตกต่างกันของจุลินทรีย์แต่ละชนิด หลังจากนั้นผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นจะถูกลดปล่อยต่อไป โดยในขั้นตอนแรกของการย่อยสลายจึงเกิดขึ้นภายนอกเซลล์ โดยการปลดปล่อยเอนไซม์ของจุลินทรีย์ซึ่งเกิดได้ทั้งแบบใช้ Endo-enzyme หรือเอนไซม์ที่ทำให้เกิดการแตกตัวของพันธะในสายโซ่พอลิเมอร์อย่างไม่เป็นระเบียบและแบบ Exo-enzyme หรือเอนไซม์ที่ทำให้เกิดการแตกหักของพันธะ เมื่อพอลิเมอร์แตกตัวจนมีขนาดเล็กพอจะแพร่ผ่านผนังเซลล์เข้าไปในเซลล์และเกิดการย่อยสลายต่อในขั้นตอนที่ 2 ได้ผลิตภัณฑ์ในขั้นสุดท้าย (Ultimate biogradation) คือ พลังงานและสารประกอบขนาดเล็กที่เสถียรในธรรมชาติ (Mineralization) เช่น แก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ แก๊สมีเทน น้ำ เกลือ แร่ธาตุต่างๆ และมวลชีวภาพ (ทิพย์ธิดา อัครกะประสาและคณะ, 2563)

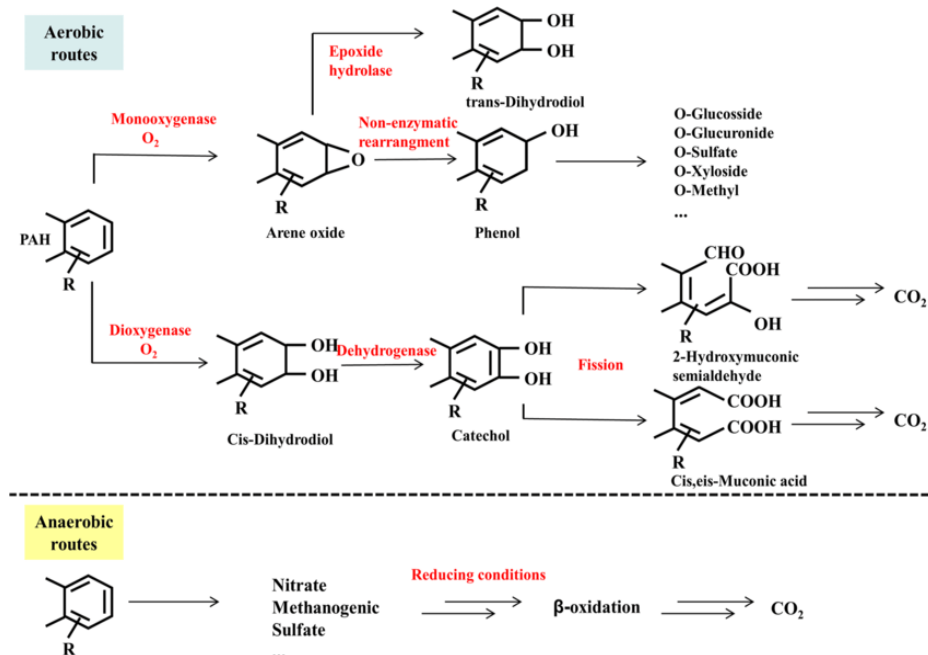
กระบวนการย่อยสลาย PAHs โดยแบคทีเรีย

ขั้นตอนแรกเป็นการนำออกซิเจนเข้ามาয়วงอะโรมาติก ที่เกิดจากการเร่งปฏิกิริยาโดยเอนไซม์ออกซิจีเนส (oxygenase) ซึ่งพบว่าแบคทีเรียจะย่อยสลาย PAHs โดยการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ซึ่งจะเกิดได้ทั้งโมโนออกซิจีเนส (monooxygenase) และ ไดออกซิจีเนส (dioxygenase) จากนั้นเร่งปฏิกิริยาต่อโดยเอนไซม์ดีไฮโดรจีเนส (dehydrogenase) ได้เป็นสารคาทีคอล (catechol) แล้วถูกตัดด้วยการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ออกซิจีเนส (oxygenase) ผ่านทางการแตกวงเบนซินแบบออโธ (ortho pathway) ที่เกิดขึ้นระหว่างอะตอมคาร์บอนที่มีกลุ่มไฮดรอกซิล 2 อะตอมอยู่ติดกัน หรืออีกวิธีหนึ่ง คือ ผ่านทางการแตกวงเบนซินแบบเมตา (meta pathway) ที่เกิดขึ้นระหว่างอะตอม

คาร์บอนที่มีกลุ่มไฮดรอกซิลกับอะตอมคาร์บอนที่อยู่ถัดมา (Mueller et al., 1996) ดังที่แสดงในภาพที่ 11 และ โดยจุลินทรีย์ที่ถูพบว่ามีสามารถในการย่อยสลายพลาสติกในช่วงแรกแสดงในตารางที่ 4

ตาราง 4 แสดงการศึกษาของแบคทีเรียย่อยพลาสติก

แบคทีเรีย	เอนไซม์	การย่อยพลาสติก
<i>Idonella sakainis</i>	PETasec และ MHEtase	สามารถย่อยสลาย Polyethylene Terephthalate (PET) ที่ใช้ในการผลิตขวดน้ำ ได้ โดยเอนไซม์ PETase ย่อยสลาย PET ให้หลายเป็น MHET และ เอนไซม์ MHEtase จะย่อยสลายให้กลายเป็น Ethylene glycol และ Terephthalic acid
<i>Pseudomonas putida</i>	-	โดยมีการผลิตเอนไซม์ที่สามารถย่อยสลายพันธะ Polyurethane (PU) ให้กลายเป็นคาร์บอน ไนโตรเจน และพลังงานที่ใช้แทนยางธรรมชาติได้ และใช้เป็นแบคทีเรียในการโคลนยีนเพื่อใช้ในการบำบัดทางชีวภาพ เนื่องจากมีเมทาบอลิซึมที่สามารถย่อยสลายสารเคมีและส่วนประกอบของน้ำมันเบนซิน และสามารถย่อย Styrofoam ที่นำมาใช้ทำเป็นภาชนะบรรจุอาหารได้



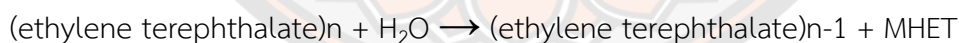
ภาพ 11 แสดงกระบวนการย่อยสลาย PAHs โดยแบคทีเรีย

ที่มา : Lin et al., 2019

เอนไซม์ที่แบคทีเรียใช้ในการย่อยพลาสติก

1. เอนไซม์ PETase

เป็นเอนไซม์ที่ช่วยเร่งให้พลาสติกชนิด PET (Polyethylene Terephthalate) เกิดการย่อยสลายได้เร็วขึ้นถึง 6 เท่า โดย PETases เป็นเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของพลาสติกพอลิเอทิลีนเทเรฟทาเลต (PET) เป็นโมโนเมอร์โมโน-2-hydroxyethyl terephthalate (MHET)



PET แตกตัวเป็น (2-hydroxyethyl) terephthalate (BHET) นอกจากนี้ PETases ยังสามารถสลายพลาสติก PEf (polyethylene-2,5-furandicarboxylate) ซึ่งเป็นการทดแทน PET ทางชีวภาพ PETases ไม่สามารถเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของพอลิเอสเตอร์อะลิฟาติก เช่น พอลิบิวทิลีนซัคซิเนตหรือกรดโพลีแล็กติกได้ การย่อยสลาย PET ตามธรรมชาติแบบไม่ใช้เอนไซม์จะใช้เวลาหลายร้อยปี แต่ PETases สามารถย่อยสลาย PET ได้ภายในเวลาไม่กี่วัน (Litchfield, 2020)

2. เอนไซม์ MHETase

Enzyme MHETase เป็นไฮโดรเลส โดยจะทำหน้าที่แยกกรดเทเรฟทาลิก Mono-(2-hydroxyethyl) ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ย่อยสลาย PET โดย PETase ไปเป็น ethylene glycol และกรด

terephthalic เอนไซม์คู่นี้คือ PETase และ MHETase ช่วยให้แบคทีเรีย *Ideonella sakaiensis* เกาะอยู่บนพลาสติก PET เป็นแหล่งคาร์บอนได้ (Shosuke Yoshida; et al, 2016)

เอนไซม์ตัวแรกของการย่อยสลาย PET คือ เอนไซม์ PETase จะแยกพลาสติกนี้เข้าสู่ตัวกลาง MHET (Mono- (2-hydroxyethyl) terephthalic acid) และ BHET Bis- (2-hydroxyethyl) terephthalic acid ในปริมาณเล็กน้อย ส่วน เอนไซม์ MHETase ไฮโดรไลซ์พันธะเอสเทอร์ของ MHET และสร้างกรด terephthalic acid และ ethylene glycol (Yoshida et al., 2016) (สมาคมพัฒนาคุณภาพสิ่งแวดล้อม, 2559)

3. เอนไซม์ laccase

Laccase เป็นเอนไซม์ที่อยู่ในกลุ่ม multi-copper oxidases (MCOs) ภายในโมเลกุลของเอนไซม์มีคอปเปอร์ทั้งหมด 4 อะตอม มีหน้าที่เร่งปฏิกิริยาออกซิเดชัน และมีความสามารถในการใช้สารตั้งต้นที่หลากหลาย ได้แก่ สารประกอบฟีนอลิก (phenolic compound) ซึ่งส่วนใหญ่พบตามผนังเซลล์ของพืชและสารที่ไม่ใช่ฟีนอลิก (nonphenolic compound) (Madhavi and lee, 2009) ในปีคริสต์ศักราช 1883 พบเอนไซม์แลคเคสครั้งแรกโดย Yoshida (Yoshida et al., 2016) จากยางของต้น lacquer มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Rhus vernicifera* ในประเทศญี่ปุ่น และปีต่อมาจากงานวิจัยสามารถพบเอนไซม์แลคเคสได้ทั่วไปในธรรมชาติ ส่วนใหญ่พบในพืชและเชื้อรา (Sakurai, 1992) ต่อมาได้มีการศึกษาพบเอนไซม์แลคเคสได้ในแบคทีเรียตัวแรกคือ *Azospirillum lipoferum* เป็นแบคทีเรียแกรมบวก เอนไซม์แลคเคสจึงได้รับความนิยมในการนำมาประยุกต์ใช้ทางด้านอุตสาหกรรมอย่างกว้างขวาง ได้แก่ อุตสาหกรรมอาหาร โดยนำไปใช้ประโยชน์ทางการกำจัด phenolic compound ในการอบขนม กระบวนการทำน้ำผลไม้ กำจัดน้ำเสีย และการผลิตไวน์ (Couto & Herrera, 2006) อุตสาหกรรมกระดาษ ในขั้นตอนของการแยกลิกนิน เอนไซม์แลคเคสจะทำหน้าที่ย่อยลิกนินแทนการใช้คลอรีน (chlorine) เพราะคลอรีนมีความเป็นพิษต่อสิ่งแวดล้อมและสิ่งมีชีวิต (Heo et al., 2020) ส่วนอุตสาหกรรมสิ่งทอ ในกระบวนการแปรรูปผ้า จำเป็นต้องมีการใช้สารเคมีและสีในการผลิต ซึ่งสารเคมีบางตัวไม่สามารถย่อยสลายเองได้ จึงทำให้เกิดการตกค้างในสิ่งแวดล้อม ซึ่งเอนไซม์แลคเคสจะเข้าไปทำหน้าที่ในการกำจัดสารประกอบทางเคมี ปัจจุบันเริ่มมีการศึกษาเอนไซม์แลคเคสที่สร้างจากแบคทีเรียในการกำจัดสี เพราะมีคุณสมบัติที่น่าสนใจคือ ใช้เวลาน้อยในการผลิต นอกจากนี้ยังสามารถนำมาย่อยสลายสารเคมีตกค้างในสิ่งแวดล้อม โดยเอนไซม์แลคเคสจะเข้าไปทำหน้าที่ย่อยสารประกอบกลุ่ม polycyclic aromatic hydrocarbon (PAHs)

แลคเคสทำหน้าที่ในการเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันหรือเรียกว่า oxidoreductase enzyme ในสารประกอบที่หลากหลาย ได้แก่ ฟีนอลิก (phenolic) จากโครงสร้างสารประกอบฟีนอลิก จะประกอบด้วยวงแหวนที่เป็นอนุพันธ์ของเบนซีน (benzene ring) 1 วง พบได้ในธรรมชาติ 2 ลักษณะ

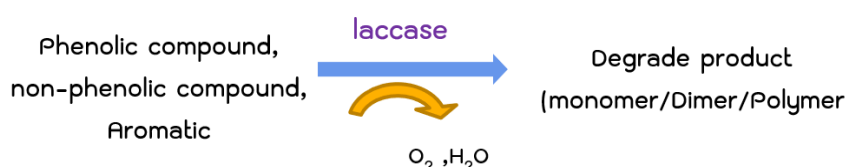
คือ แบบอิสระ สามารถละลายน้ำได้ แยกออกมาได้ด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ และแบบไม่อิสระ ไม่สามารถละลายน้ำ และสารประกอบที่ไม่ใช่ฟีนอลิก (non-phenolic) โดยเอนไซม์แลคเคสจะเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารประกอบได้น้ำออกมาจำนวน 2 โมเลกุล (เรณูภา ภูอาลัย, 2562)

กลไกการทำงานของเอนไซม์แลคเคส

การทำงานของเอนไซม์แลคเคสเมื่อเสร็จสิ้นกระบวนการเร่งปฏิกิริยา จะได้น้ำออกมา 2 โมเลกุล พร้อมกับการสูญเสียอิเล็กตรอนของออกซิเจนไป 1 โมเลกุล อิเล็กตรอนที่แยกออกมาจากสารตั้งต้นที่มีวงแหวนอนุพันธ์เบนซีน (benzene ring) เป็นส่วนประกอบ จะถูกนำเข้าสู่กระบวนการออกซิเดชัน (oxidation) (Chauhan, 2017) จากคุณสมบัติการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์แลคเคสมีความสำคัญเพิ่มมากขึ้น คือจะไปช่วยในการย่อยสลายสารประกอบของอะโรมาติกเกิดเป็นประจวบทำให้เกิดความเสถียรลดลง ดังนั้นถ้ามีเอนไซม์แลคเคสเป็นส่วนประกอบในผลิตภัณฑ์จะทำให้เกิดความคงตัวมากขึ้น

สารตั้งต้นและตัวกลางสำหรับสร้างเอนไซม์แลคเคส

แลคเคสเป็นเอนไซม์พิเศษที่จำเพาะกับสารตั้งต้นและสามารถออกซิไดซ์สารประกอบได้หลากหลายชนิด เช่น สารประกอบฟีนอลิก (phenolic compound), phenylpropanoids, สีย้อมเอโซ (azo dyes) และสีย้อมคราม (indigo dye) เมื่อสารตั้งต้นมีขนาดใหญ่ การเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันก็ทำให้ช้าลงไปด้วย จึงจำเป็นต้องมีตัวกลางเข้ามาช่วยในการเร่งปฏิกิริยา



ภาพ 12 แสดงกลไกการทำงานของเอนไซม์แลคเคส

ดัดแปลงจาก : Z. Li et al., 2020

การประยุกต์ใช้แลคเคสมีประโยชน์ในการสังเคราะห์และหยุดการสังเคราะห์ของสารตั้งต้นที่เป็นสารอินทรีย์และสารประกอบอะโรมาติก (aromatic) เป็นส่วนประกอบ ลดการปนเปื้อนของสารที่เป็นพิษต่อสิ่งมีชีวิตและสิ่งแวดล้อม ในขณะที่การสังเคราะห์สารประกอบเชิงซ้อนจะนำไปใช้ในการบำบัดสารมลพิษด้วยวิธีทางชีวภาพ (bioremediation) โครงสร้างผลิตภัณฑ์ที่ไม่เป็นพิษต่อสิ่งมีชีวิตและสิ่งแวดล้อม โดยการใช้เอนไซม์แลคเคส เช่น hydroquinone และ catechol เป็นสารตั้งต้นที่ดีสำหรับเอนไซม์แลคเคส มากไปกว่านั้นยังสามารถที่ใช้สารตั้งต้นอื่นๆได้อีก เช่น methoxy-

substituted phenolic compounds syringaldazine guaiacol และ DMP (2,4-di-methoxy phenol) สารเหล่านี้นิยมใช้กันโดยทั่วไป (Hadibarata & Yuniarto, 2020) แต่สารบางตัวก็ไม่สามารถถูกเอนไซม์แลคเคสย่อยสลายได้โดยตรง เพราะมีขนาดใหญ่ทำให้การแพร่ของสารตั้งต้นไปสู่บริเวณที่เกิดการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์แลคเคสเกิดได้ช้า หรือเนื่องมาจากต้องใช้ปฏิกิริยาออกซิเดชันรีดักชัน (oxidation-reduction reaction) ที่มากขึ้นในการย่อยสารตั้งต้น เพื่อเพิ่มช่วงของสารตั้งต้นเอนไซม์แลคเคสให้หลากหลายมากขึ้น จำเป็นต้องอาศัยสารตัวกลางในการเร่งปฏิกิริยาที่แตกต่างกันออกไป การอาศัยตัวกลางในการทำปฏิกิริยาจึงทำหน้าที่เป็นสื่อตัวกลางให้กับสารตั้งต้นของแลคเคส ขั้นตอนแรกจะถูกออกซิไดส์โดยแลคเคส และหลังจากนั้นจะเกิดการออกซิไดซ์โดยสารที่อยู่ในรูปของอนุมูลอิสระคือ โมเลกุลหรือสารที่มีความเสถียรต่ำ เนื่องจากสูญเสียประจุอิเล็กตรอนไป 1 ตัว และมีความว่องไวในการทำปฏิกิริยากับสารชีวโมเลกุลภายในเซลล์สูง ทำให้กระบวนการเร่งปฏิกิริยาเกิดได้ง่ายขึ้นในสารตั้งต้นที่มีขนาดใหญ่ ตัวกลางตัวแรกที่ผลิตขึ้นมาเพื่อใช้ในการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์แลคเคส คือ ABTS (2,20-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (Madhavi, 2009) โดยสารตั้งต้นของเอนไซม์แลคเคสสามารถแบ่งออกเป็น 3 กลุ่ม (Awasthi et al., 2015) ได้แก่

1. Ortho เช่น guaiacol, o-phenylenediamine, dihydroxyphenylalanine, pyrogallol, caffeic acid และ gallic acid เป็นต้น
2. Protocatechuicacidmeta เช่น m-phenylenediamine, orcinol และ resorcinol
3. Phloroglucinpara เช่น p-phenylenediamine, p-cresol และ hydroquinone

งานวิจัยที่มีการคัดแยกแบคทีเรียและศึกษาความสามารถของแบคทีเรียในการย่อยพลาสติก

มีการศึกษาเกี่ยวกับแบคทีเรียย่อยพลาสติกโดยใช้เอนไซม์แลคเคส ในปี ค.ศ. 2018 Christabel และคณะ ได้ทำการศึกษาลักษณะโมเลกุลของ low-Density Polyethene (LLDPE) โดยการย่อยของแบคทีเรียและมาจากดินบริเวณหลุมขยะในประเทศเคนย่า ซึ่ง LLDPE เป็นสาเหตุหลังที่ทำให้เกิดปัญหามลพิษทางสิ่งแวดล้อมเนื่องจากมีความแข็งแรง น้ำหนักเบา ไม่ละลายน้ำและทนต่อการย่อยสลายของแบคทีเรีย โดยส่วนมากนิยมนำไปทำเป็นถุงพลาสติก ซึ่งในงานวิจัยนี้สามารถแยกแบคทีเรียได้ 20 ชนิดและราอีก 10 ชนิด ซึ่งแบคทีเรียที่แยกได้ ได้แก่ *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Brevibacillus*, *Rhodococcus* และ *Micrococcus* ที่มีเอนไซม์ n-alkanes ที่สามารถย่อยสลาย polyethene ได้ ราที่แยกได้จากดิน ได้แก่ *Gliocladium*, *Cunninghamella*, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Mucor* และ *Mortierella* มีการระบุโดยใช้ 16S rDNA และ 18S rDNA sequence ซึ่งการทำงานของเอนไซม์จะทำให้สายโซ่พอลิเมอร์ของพลาสติกแตกเป็น

monomer และ oligomer จากนั้นแบคทีเรียก็จะดูดซึมแล้วใช้พลาสติกเหล่านี้เป็นแหล่งคาร์บอนในการเจริญ และมีการผลิตคาร์บอนไดออกไซด์และน้ำออกมา นอกจากเอนไซม์ n-alkanes แล้ว ยังมีการสำรวจพบเอนไซม์แลคเคสโดยใช้ Guaiacol เป็นสารตั้งต้น ใส่ลงในอาหาร minimal salt media ถ้ามีการผลิตเอนไซม์แลคเคสจะเกิดสีน้ำตาลแดงรอบๆ โคลินี และ esterase โดยเติม 1% tween 20 ให้เป็นแหล่งคาร์บอน ถ้ามีการสร้างเอนไซม์เอนไซม์ esterase จะเห็นผลึกแคลเซียมรอบๆ โคลินี ซึ่งการที่จะผลิตเอนไซม์ laccase ออกมาได้จะมีการใช้ polyethene เป็นแหล่งคาร์บอนเช่นกัน และพบยีน AlkB genes ซึ่งเป็นยีนที่ผลิตเอนไซม์ Alkane อีกด้วย

เช่นเดียวกับในปี ค.ศ. 2016 (Sumathi et al., 2016) มีการศึกษาเรื่องการผลิต laccase ในรา โดย *Cochliobolus* sp. ที่แยกได้จากดินบริเวณหลุมฝังขยะพลาสติกและความสามารถในการย่อย low Molecular weight (PVC) ในประเทศอินเดีย โดยนำตัวอย่างดินมาละลายใน NaCl จากนั้นนำมาทำ serial dilution และ spread ลงบนอาหาร Czapek Dox Agar plate ที่เติม 0.02 % guaiacol เป็นสารตั้งต้นในการผลิตเอนไซม์แลคเคส บ่มเป็นเวลา 7 วัน หากมีการผลิตเอนไซม์แลคเคส ที่สามารถย่อย guaiacol ได้ จะเกิดสีน้ำตาลแดงรอบๆ โคลินี จากนั้นนำราที่ได้มาระบุชนิดโดยใช้ 18s rRNA sequence ส่วนในการศึกษาความสามารถในการย่อย PVC โดยมีการใช้ PVC medium เป็นแหล่งคาร์บอน ซึ่งเอนไซม์ laccase เป็น multicopper enzyme ที่พบได้ในธรรมชาติ ในปี ค.ศ. 1883 มีการสกัดเอนไซม์แลคเคสครั้งแรก ได้จากต้น Japanesse lacquer เนื่องจากความสามารถในการ oxidize สารประกอบฟีนอลิก ได้มีรายงานครั้งแรกว่า laccase สามารถผลิตได้โดย *Cochliobolus* spp. ซึ่ง PVC มีโครงสร้างคล้ายกับสารประกอบ chlorophenolic โดยใช้เป็นแหล่งคาร์บอนที่ทำให้สามารถผลิต laccase เพิ่มขึ้นได้อีกด้วย

และในปี ค.ศ. 2021 Abirami และคณะ (Abirami et al., 2021) ได้ศึกษาความสามารถในการย่อยพลาสติกของเอนไซม์แลคเคส ที่แยกได้จากดินที่ปนเปื้อนขยะ โดยนำตัวอย่างดินมาละลายในน้ำที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ทิ้งให้ตกตะกอนแล้วนำมาทำ serial dilution และ pour plate โดยใช้อาหาร Minimal salt agar ที่เติม plastic powder ซึ่งใช้เป็นแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนให้กับจุลินทรีย์ พอบ่มครบเวลานำแบคทีเรียมาจำแนกโดยการทดสอบทางชีวเคมี จากนั้นนำแบคทีเรีย 13 ชนิดที่แยกได้มา streak บน อาหาร nutrient agar ที่เติม 0.01% Guaiacol เพื่อทำการศึกษาเอนไซม์แลคเคสถ้าแบคทีเรียมีการผลิตเอนไซม์แลคเคส จะเกิดสีน้ำตาลแดงรอบๆ โคลินี โดยผลที่ได้คือ มีแบคทีเรียเพียง 5 ตัว ที่สามารถสร้างเอนไซม์แลคเคสได้

งานวิจัยของ Nikolina Atanasova (Atanasova et al., 2021) ที่ได้ทำการเก็บตัวอย่างจากบ่อน้ำพุร้อนประเทศบัลแกเรีย เพื่อนำมาศึกษาความสามารถในการย่อย PCL โดยใช้อาหาร basal medium ที่ผสมกับ PCL 80,000 Mw และได้มีการปรับสภาพแวดล้อมให้เหมาะสมต่อการย่อย

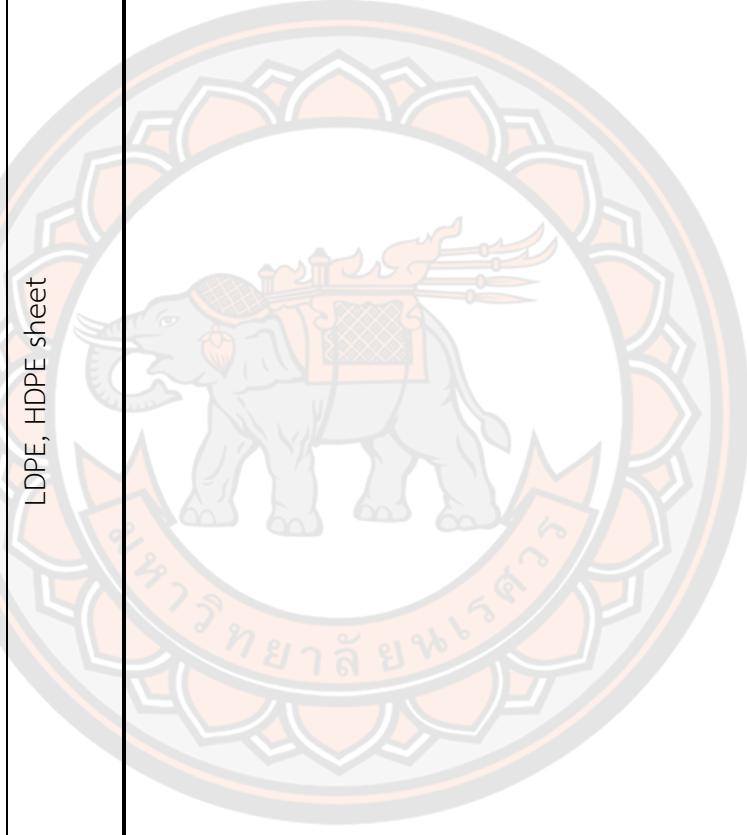
แบคทีเรีย โดยพบว่าแบคทีเรียที่สามารถย่อย PCL ได้ 63.6% คือ *Brevibacillus thermoruber* strain 7 โดยอุณหภูมิที่เหมาะสมอยู่ที่ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 28 วัน



ตาราง 5 แสดงการศึกษาที่มีการคัดแยกแบคทีเรียที่สามารถย่อยพลาสติกโพลีเอทิลีนได้

แหล่งที่แยกได้ (ประเทศ)	แบคทีเรีย	แหล่งคาร์บอน	Substrate for Screening (Media)	เอกสารอ้างอิง
ดินจากการเกษตร (China)	<i>Pseudomonas</i> , <i>Methylobacillus</i> , <i>Nocardioidea</i> , <i>Methylphilaceae</i> , <i>Achromobacter</i> , <i>Pseudoxanthomonas</i> , <i>Caulobacter</i>	Naphthalene, Acenaphthylene, Acenaphthene, Fluorene, Phenanthrene, Anthracene, Fluoranthene, Pyrene, Benzo [a]anthracene	-	(Chen et al., 2021)
ดินบริเวณหลุมฝัง ขยะ (India)	<i>Pseudomonas</i> sp.	Pyrene (ND)	-	(Kumari et al., 2020)
ดินบริเวณหลุมฝัง กลบขยะ (Switzerland)	<i>Bacillus subtilis</i>	Natural rubber	Mineral salt Medium	(Nayanashree & Thippeswamy, 2015)
ดินที่ปนเปื้อนขยะ	<i>Bacillus weihenstephanensis</i>	Polyethylene powder,	Synthetic medium (SM)	(Ingavale & Raut, 2018;

แหล่งที่แยกได้ (ประเทศ)	แบคทีเรีย	แหล่งคาร์บอน	Substrate for Screening (Media)	เอกสารอ้างอิง
พลาสติก (India)		LDPE, HDPE sheet		Nayanashree & Thippeswamy, 2015)

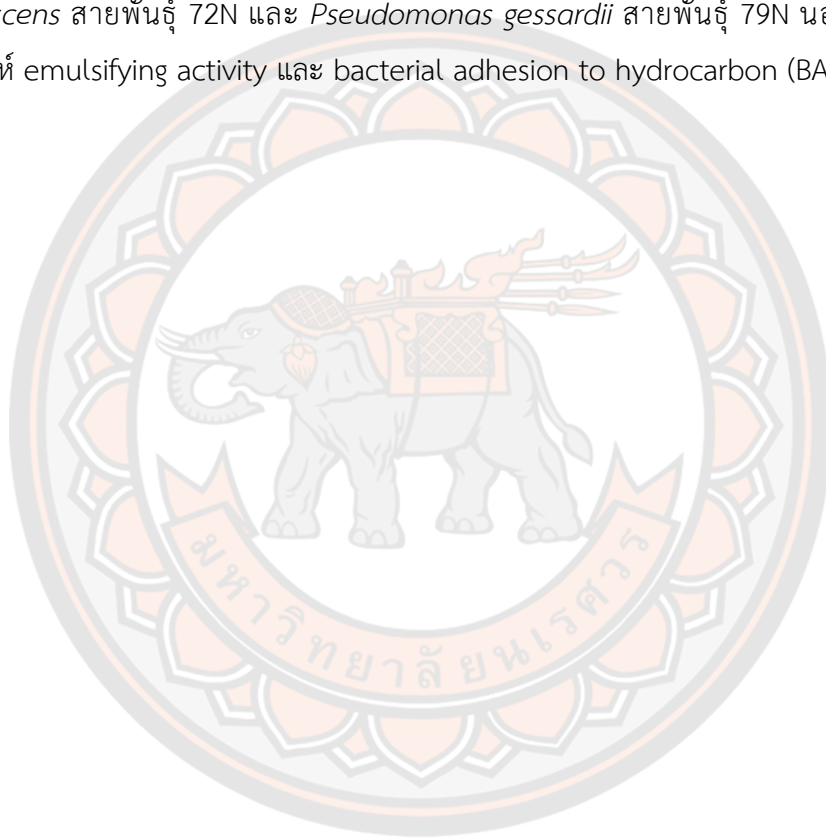


งานวิจัยที่มีการคัดแยกและศึกษาแบคทีเรียย่อย PAHs

มีงานวิจัยที่ศึกษาแบคทีเรียที่สามารถย่อย polycyclic aromatic hydrocarbon ในปี 2019 Khalida และ Malik (Khatoun & Malik, 2019) ได้ทำการศึกษาแบคทีเรียที่แยกได้จากน้ำเสียจากโรงงานกลั่นน้ำมันที่มีความสามารถในการย่อย polycyclic aromatic hydrocarbon เนื่องจากโรงกลั่นน้ำมันมีความสำคัญในทางอุตสาหกรรมและก็เป็นปัญหาที่ทำให้เกิดปัญหามลพิษทั้งทางดิน อากาศและน้ำ ในน้ำเสียที่โรงกลั่นน้ำมันปล่อยออกมาประกอบไปด้วยฟีนอล, ซัลไฟด์, แอมโมเนีย, โลหะหนักและสารประกอบ polycyclic aromatic hydrocarbon ได้ทำการศึกษาโดยการเก็บตัวอย่างน้ำเสีย 12 บริเวณที่แตกต่างกันพร้อมกับระบุพิกัดนำมาวิเคราะห์ทางเคมี และนำมาศึกษาความสามารถในการย่อย PAHs โดยใช้อาหาร Minimal salt medium ที่มี phenanthrene 100 µg พบว่าจากทั้งหมด 25 isolate มีเพียง 6 isolate ที่มีความสามารถในการย่อย polycyclic aromatic hydrocarbon นอกจากนี้ได้มีการตรวจหา conjugative plasmid ใน polycyclic aromatic hydrocarbon และตรวจหาแบคทีเรียต้านทานโลหะหลายชนิด

เช่นเดียวกับในปีค.ศ. 2020 Nagshetty และ Basutkar (Nagshetty & Basutkar, 2020) ได้ทำการศึกษาผลของแหล่งไนโตรเจนต่อการย่อยสลายของ Naphthalene โดย *Pseudomonas* SPS NGK1 NCIM 5120 ที่แยกได้จากดินและน้ำบริเวณโรงเครื่องจักรกลที่มีน้ำมัน ถ่านไม้จากอุตสาหกรรม โดยการนำแบคทีเรียที่แยกได้ มาเลี้ยงบนอาหาร mineral salt ที่เติม Naphthalene 1 gm เป็นแหล่งคาร์บอนและมีแอมโมเนียและไนเตรตเป็นแหล่งไนโตรเจน บ่มที่ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 3-4 วัน จากนั้นนำมาวิเคราะห์ Naphthalene โดยวัดการเจริญของแบคทีเรียโดยใช้ spectrophotometry ที่ 660 นาโนเมตร (O.D 660) พบว่าแบคทีเรียใช้ Naphthalene เป็นแหล่งคาร์บอนในการเจริญได้ดีกว่าอาหาร mineral salt ซึ่งแหล่งไนโตรเจนที่ไม่ได้เติม Naphthalene และในปี 2016 Moslem และคณะ ได้ทำการศึกษาการเสื่อมสภาพของ Naphthalene โดยแบคทีเรียที่แยกได้จาก Gol Gohar Mine ประเทศอิหร่าน เนื่องจาก Naphthalene เป็นปัญหามลพิษทางสิ่งแวดล้อมที่เป็นของเสียจากแหล่งอุตสาหกรรมต่างๆ และยังเป็นสารประกอบ polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) และสารก่อมะเร็ง โดยทำการเก็บตัวอย่างน้ำและดินที่ความลึก 0-10 cm จาก 3 บริเวณ นำมาทำ serial dilution และเลี้ยงบนอาหาร Bushnell Hass agar (BH) บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน นำมาหาปริมาณแบคทีเรียที่ย่อยสลาย Naphthalene โดยใช้ microtiter plate และวิธี colony forming unit (CFU) ส่วนในการศึกษาและการแยกแบคทีเรียที่สามารถย่อย Naphthalene โดยใช้อาหาร Bushnell Hass agar (BH) ที่เติม Naphthalene 200 mg ที่ละลายใน 0.1 ml acetone บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 168 ชั่วโมง หลังจากบ่มครบเวลาแล้วนำแบคทีเรียที่สามารถย่อย naphthalene มา streak บนอาหาร Bushnell Hass agar

(BH) ที่เติม naphthalene 200 mg เพื่อให้ได้ pure culture และเก็บใน glycerol ที่ -20 องศาเซลเซียส ก่อนนำมาวิเคราะห์การเจริญ (Growth curves) และการย่อย Naphthalene โดยการวัดค่า O.D. 600 นาโนเมตร โดยใช้ Naphthalene 1-10 mg/l เป็น standard graphs และได้มีการนำแบคทีเรียที่แยกได้มาจำแนกลักษณะโดยการทดสอบทางชีวเคมีและระบุชนิดด้วย 16S rRNA gene พบว่าแบคทีเรียที่แยกได้ 22 isolate 7 สายพันธุ์ มีเพียงแค่ 2 isolate ที่เจริญได้โดยใช้ naphthalene ที่ความเข้มข้นสูงในการเจริญ (600 mg/l) ภายใน 7 วัน พบว่าเป็น *Pseudomonas fluorescens* สายพันธุ์ 72N และ *Pseudomonas gessardii* สายพันธุ์ 79N นอกจากนี้ยังมีการวิเคราะห์ emulsifying activity และ bacterial adhesion to hydrocarbon (BATH)



ตาราง 6 แสดงการศึกษาที่มีการคัดแยกแบคทีเรียที่สามารถย่อยโพลีไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน (PAHs)

แหล่งที่แยกได้ (ประเทศ)	แบคทีเรีย	แหล่งคาร์บอน	Substrate for Screening (Media)	เอกสารอ้างอิง
น้ำเสีย (India)	<i>Enterobacter ludwigii</i>	Naphthalene, Anthracene, Phenanthrene, pyrene	Minimal salt medium (MSM)	(Khatoon & Malik, 2019)
น้ำทะเล (South Africa)	<i>Proteobacteria, Planctomycetes,</i> <i>Cyanobacteria</i>	benzanthracene , Naphthalene, diesel	Minimal salt medium (MSM)	(Selvarajan et al., 2017)
ดิน (Iran)	<i>Pseudomonas fluorescens,</i> <i>Pseudomonas gessardii</i>	Naphthalene	Bushnell Hass (BH) medium	(Hassanshahian et al., 2017)
น้ำทะเล (India)	<i>Shewanella, Salegentibacter,</i> <i>Halomonas, Marinobacter,</i> <i>Oceanicola, Idiomarina,</i> <i>Thalassospira</i>	Naphthalene	ONR7a medium	(Hassanshahian & Boroujeni, 2016)

ตารางที่ 6 แสดงการศึกษาที่มีการคัดแยกแบคทีเรียที่สามารถย่อยโพลีไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน (PAHs) (ต่อ)

แหล่งที่แยกได้ (ประเทศ)	ชื่อจุลินทรีย์	แหล่งคาร์บอน	อาหารเลี้ยงเชื้อ	เอกสารอ้างอิง
ดินบริเวณหลุมฝังกลบขยะ (Iran)	<i>Pseudomonas</i> sp. and <i>Corynebacterium</i> sp.	Naphthalene, phenanthrene, pyrene	Minimal basal salts (MBS)	(Pour, 2012)
ดินบริเวณบ่อน้ำมัน (Saudi Arabia)	<i>Methylobacterium</i> <i>radiotolerans</i>	Naphthalene, Salicylate, catechol, phenol, benzene, toluene, anthracene, phenanthrene	BH medium, LuriaBertani Broth (LB)	(Nzila et al., 2016)

บทที่ 3

วิธีดำเนินงานวิจัย

การเก็บตัวอย่างดินและการทำ sample enrichment

เก็บตัวอย่างดินที่มีการปนเปื้อนขยะพลาสติกหรือพื้นที่ทำการเกษตร ภายในจังหวัดอุดรดิตถ์ และพิษณุโลกจำนวน 62 ตัวอย่าง พร้อมกับระบุพิกัดบริเวณที่เก็บตัวอย่าง จากนั้นนำตัวอย่างดินมา 5 g ใส่ใน normal saline 20 ml ทิ้งไว้ให้ตกตะกอน ประมาณ 5 -10 นาที นำแต่ส่วนใส ปริมาตร 10 ml มาใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ 2xTryptic Soy Broth (2xTSB) ปริมาตร 10 ml บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาบ่ม ย้ายไปใส่ในหลอดใหม่ 15 มิลลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง รุ่น ScanSpeed 2236R (LaboGene Aps, Denmark) ที่ 15,000 rpm เป็นเวลา 15 นาที เทส่วนที่ใสทิ้งไป แล้วใช้ normal saline ละลายตะกอน 15 mlจากนั้นเก็บไว้ในหลอด glycerol ที่มี TSB เก็บที่ -40 องศาเซลเซียส (ชุตติมา วิไลพันธุ์, 2542)

การแยกแบคทีเรียที่สามารถย่อย PAHs เบื้องต้นด้วยวิธี Naphthalene agar plate assay

นำ Sample enrichment ที่ได้ มาคัดเลือกเบื้องต้น โดยแต่ละตัวอย่าง จะถูกนำมาคัดเลือก 2 วิธี โดยวิธีหนึ่ง คือนำ Sample enrichment มาปริมาตร 5 μ l แล้วหยดลงบนอาหารแข็ง naphthalene agar และทำการ cross streak เพื่อให้ได้โคโลนีเดี่ยว ส่วนวิธีที่สองทำได้โดย การนำ sample enrichment มาทำ 10-fold serial dilution ตั้งแต่ 10^{-1} จนถึง 10^{-6} แล้วนำเฉพาะตัวอย่างที่ 10^{-4} ถึง 10^{-6} มาเกลี่ยบนจานอาหารแข็ง Naphthalene จากนั้นนำเพลตอาหารของทั้งสองวิธี มาบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน และคอยสังเกตผลการเจริญของแบคทีเรีย ถ้ามีแบคทีเรียสามารถทนต่อ Naphthalene ได้ และนำโคโลนีเดี่ยวมาเก็บเป็น stock เชื้อ ดัดแปลงจาก (Sushma Rani Tirkey et al., 2021; Ni'matuzahroh et al., 2017)

การยืนยันความสามารถของแบคทีเรียที่สามารถย่อยพลาสติกด้วยวิธี PCL agar plate agar

นำเชื้อ enrichment ที่เก็บไว้ที่ -40 องศาเซลเซียส มาเลี้ยงในอาหารเหลว TSB ปริมาตร 5 ml บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำเชื้อ 5 μ l แล้วนำไปหยดลงบนอาหารแข็ง PCL agar ทำการ cross streak เพื่อให้ได้โคโลนีเดี่ยว บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน (Atanasova et al., 2021)

การศึกษาระดับความเข้มข้นน้อยที่สุดของ Naphthalene ที่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย ด้วยวิธี agar dilution assay (MIC_{Nap})

เพื่อยืนยันความสามารถในการทนต่อ Naphthalene ด้วยวิธี agar dilution method (Khalida and Abdul, 2019 ; Anjali Saini et al., 2021) โดยการเตรียมอาหารแข็ง Minimal M9 ที่ผสมกับ Naphthalene ที่ความเข้มข้นต่างๆ ดังนี้ 200 $\mu\text{g/ml}$, 400 $\mu\text{g/ml}$, 800 $\mu\text{g/ml}$, 1600 $\mu\text{g/ml}$, 3200 $\mu\text{g/ml}$ และ 6400 $\mu\text{g/ml}$ โดยอาหาร Minimal M9 ที่ไม่ผสม Naphthalene ใช้เป็นตัวควบคุม จากนั้นนำ stock ของเชื้อที่ให้ผลบวกจาก Naphthalene agar plate assay มาเลี้ยงบนอาหารแข็ง TSB agar บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อนำโคโลนีเดี่ยวมาปรับความขุ่นเซลล์ให้ได้เท่ากับ 0.5 McFarland ในสารละลาย Normal saline และนำเซลล์ที่ผ่านการปรับความขุ่น ปริมาตร 5 μl ไปหยดลงบนอาหาร TSB agar ที่ผสมกับ Naphthalene ที่ความเข้มข้นต่างๆ และบ่มที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นทำการจดบันทึก โดยบันทึกความเข้มข้นต่ำสุดที่ยังสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียหรือ Minimum inhibitory concentration of Naphthalene (MIC_{Nap})

การศึกษาคุณสมบัติทางจุลชีววิทยาของเชื้อแบคทีเรียที่ทนต่อ Naphthalene ได้

เลือกโคโลนีที่ได้มาทำการย้อมแกรมและทดสอบปฏิกิริยาทางชีวเคมี ดังนี้ Indole test, Oxidase test, Triple Sugar Iron (TSI) test และ Lactose fermentation (Elufisan et al., 2020)

5.1 Indole test เป็นการทดสอบว่าแบคทีเรียสามารถเปลี่ยน tryptophan เป็น indole ได้หรือไม่ โดยการทดสอบในอาหาร Tryptophan broth (กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์, 2560)

การอ่านผล : + เกิดวงแหวนสีแดงหลังหยดสารละลาย Kovacs's reagent

5.2 Oxidase test เป็นการทดสอบการมีเอนไซม์ cytochrome oxidase โดยใช้รีเอเจนต์ที่ไม่มีสี แต่จะปรากฏสีม่วงหรือสีน้ำเงินเมื่อถูกออกซิไดซ์ ซึ่งมีความสำคัญในการระบุชนิดของแบคทีเรียแกรมลบ (กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์, 2560)

การอ่านผล : + ปรากฏสีม่วงหรือสีน้ำเงินเมื่อถูกออกซิไดซ์

5.3 Triple Sugar Iron (TSI) test เป็นการทดสอบการใช้น้ำตาลกลูโคส น้ำตาลแลคโตสและน้ำตาลซูโครส โดยใช้อาหาร Triple Sugar Iron (TSI) เพื่อจำแนกแบคทีเรียแกรมลบ รูปร่างท่อน (กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์, 2560)

การอ่านผล :

1. Alkaline/Acid (K/A): อาหารด้านล่างของหลอดจะเปลี่ยนเป็นสีเหลือง เนื่องจากแบคทีเรียสามารถใช้น้ำตาลกลูโคสได้

2. Acid/Acid (A/A): อาหารเปลี่ยนเป็นสีเหลืองทั้งหมด เนื่องจากแบคทีเรียใช้น้ำตาลกลูโคส แลคโตสและซูโคส

3. Alkaline/ Alkaline (K/K): ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง เนื่องจากแบคทีเรียไม่สามารถหมัก น้ำตาลได้

4. G+/ G-: ความสามารถในการสร้างแก๊ส

5. H₂S: อาหารที่ก้นหลอดเปลี่ยนเป็นสีดำ เนื่องจากเกิดแก๊สไฮโดรเจนซัลไฟด์

5.4 Lactose fermentation เป็นการทดสอบความสามารถของแบคทีเรียในการย่อยสลายน้ำตาล แลคโตส ซึ่งใช้อาหาร Mac Conkey agar ที่เป็นอาหาร Selective medium เพื่อเลี้ยงแบคทีเรีย แกรมลบและเกิดสีต่างกันตามปฏิกิริยาการหมักแลคโตส โดยแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายน้ำตาล แลคโตสได้จะให้โคโลนีสีชมพู และแบคทีเรียที่ไม่สามารถย่อยน้ำตาลแลคโตสจะให้โคโลนีไม่มีสี (กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์, 2560)

การอ่านผล : + โคโลนีเปลี่ยนเป็นสีชมพูบนอาหาร Mac Conkey agar

การสกัด DNA ด้วยชุดสกัดสำเร็จรูปและการหาลำดับเบส

คัดเลือกเชื้อมาเพียงหนึ่งสายพันธุ์ จากการพิจารณาสายพันธุ์ที่มีค่า MIC naphthalene สูง ที่สุด หรือสายพันธุ์ที่ย่อย PCL ได้ดีที่สุด โดยการนำเชื้อสายพันธุ์ดังกล่าวมาเลี้ยงใน TSB broth ปริมาตร 5 ml เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำมาสกัดดีเอ็นเอด้วยชุดสกัดสำเร็จรูป Genomic DNA Isolation kit (PureDireX, BIO-HELIX Co.,LTD) โดยขั้นตอนตามคำแนะนำของบริษัทผู้ผลิต และละลายดีเอ็นเอกลับในน้ำกลั่นปริมาตร 100 µl และนำมาตรวจสอบด้วยวิธี agarose gel electrophoresis โดยใช้กระแสไฟฟ้าที่ 95 โวลต์ เป็นเวลา 45 นาที

การระบุจีโนมของแบคทีเรียที่ทนต่อ Naphthalene ระดับสูงด้วยการหาลำดับเบส 16s rDNA

ทำการเพิ่มปริมาณยีน 16S rRNA ด้วยเทคนิค PCR โดยในหลอดปฏิกิริยาประกอบไปด้วย 10 mM Tris-HCL, 50 mM KCL, 1.5 mM MgCl₂, 2.5 mM each dNTPs, 1.25 IU Taq DNA polymerase, 20 mM 16s rRNA primer 0.5 µl, น้ำกลั่น 25 µl DNA template 2 µl โดยใช้ 16s rRNA universal primers: 27 F (5´-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3´) และ 511R (5´-GCGGCTGCTGGCACRAGT-3´) และเติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 25 µl และนำไปเข้าเครื่อง Thermal cycler (Veriti TM 96-Well Fast Thermal Cycler) ตั้งสภาวะการทำ PCR ดังต่อไปนี้ Initial denaturation 95 องศาเซลเซียส 5 นาที 1 รอบ, Denaturation 94 องศาเซลเซียส 1 นาที 36 รอบ, Annealing 55 องศาเซลเซียส 1 นาที, Extension 55 องศาเซลเซียส 1.50 นาที และ Final extension 72 องศาเซลเซียส 7 นาที

จากนั้นตรวจเช็ค PCR product ด้วยเทคนิค agarose gel electrophoresis ด้วยเครื่องแยก DNA ด้วยกระแสไฟฟ้า (BIO-HELIX co., LTD) 95 โวลต์ เป็นเวลา 45 นาที จากนั้นนำ PCR product ที่เหลือไปทำให้บริสุทธิ์ โดยการใช้ชุดทำบริสุทธิ์สำเร็จรูป Thermo Scientific GeneJET PCR Purification Kit และขั้นตอนการทำตามคำแนะนำของบริษัทผู้ผลิต

การหาลำดับเบสด้วยวิธีดั้งเดิมและการระบุจีโนมของเชื้อ

หลังจากที่ได้ PCR product ที่บริสุทธิ์แล้ว ทำการหาลำดับเบสด้วยวิธี Sanger sequencing โดยการส่ง PCR product ไปยังบริษัท Macrogen และนำผลลำดับเบสของยีน 16s rRNA มาเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) ด้วยวิธีการ BLASTn เพื่อทำการระบุจีโนมของเชื้อและเทียบลำดับเบสกับเชื้อสายพันธุ์อ้างอิง (ATCC type strains)

การศึกษาความเข้มข้นจาก MIC ของ Naphthalene (6400 µg/ml) ต่อการอยู่รอดของเซลล์แบคทีเรียที่แยกได้

เพื่อต้องการทราบว่า Naphthalene 6400 µg/ml ส่งผลต่อการอยู่รอดของแบคทีเรียหรือไม่ โดยทำการคัดเลือกเชื้อจากการพิจารณาสายพันธุ์ที่ทนต่อ Naphthalene ความเข้มข้นสูงสุด โดยแบ่งการทดสอบออกเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่เลี้ยงในอาหาร minimal medium โดยที่ไม่ใส่ Naphthalene หรือกลุ่ม control และกลุ่มที่เลี้ยงในอาหาร minimal medium ที่ผสม Naphthalene ความเข้มข้น 6400 µg/ml โดยทำการบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสและเก็บตัวอย่างที่เวลา 5, 15 และ 30 นาที เมื่อครบเวลาทำการดูดตัวอย่างออกมา 100 µl เพื่อทำการเจือจางจนถึง 10^{-7} แล้วจึงนำทุกความเจือจางมาหยดลงบนอาหาร MHA บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 7 วัน และบันทึกผลโดยการนับจำนวนโคโลนี CFU/ml

การศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเชื้อด้วยวิธี Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus-Polymerase Chain Reaction (ERIC-PCR)

นำ DNA ที่สกัดได้มาเพิ่มจำนวนด้วยวิธี ERIC-PCR โดยใช้ primer ERIC 2 primer : 5'- AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG-3' (Sedighi et al., 2020) โดยทำปฏิกิริยาที่ปริมาตร 25 µl ซึ่งประกอบด้วย H₂O 15 µl, 5xbuffer 2 µl, dNTP 1.25mM 1 µl, Primer eric2 2 µl, Tag polymerase 7 µl และ Template 3 µl และนำไปเข้าเครื่อง Thermal cycler ตั้งสภาวะการทำ PCR (ดัดแปลงจาก พรทิพย์ พึ่งม่วง, 2557) ดังนี้ Initial denaturation 95 องศาเซลเซียส 5 นาที 1 รอบ, Denaturation 94 องศาเซลเซียส 1 นาที, Annealing 45 องศาเซลเซียส 1 นาที, Extension 72 องศาเซลเซียส 2 นาที 45 รอบ และ Final extension 65 องศาเซลเซียส 16 นาที

จากนั้นนำ PCR product ที่ได้ผสมกับ Novel Juice (Supplied in 6X Loading Buffer) (GeneDireX, Inc.) 4 µl และตรวจเช็ค PCR product ด้วยเทคนิค agarose gel electrophoresis 95 โวลต์ เป็นเวลา 45 นาที เพื่อดูขนาดของ PCR product เพื่อหาความแตกต่างของแต่ละจีโนไทป์

ทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะของเชื้อที่ทนต่อ Naphthalene ได้ในระดับสูง

เลี้ยงแบคทีเรียบนอาหาร MHA บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำมาปรับ McFarland 0.5 ใช้สำลี swab เกลี่ยลงบนหน้าอาหาร MHA ให้ทั่ว จากนั้นนำ disk ยาทั้ง 6 กลุ่ม โดยใช้ยา 9 ชนิด ได้แก่ ceftazidime, cefepime, Amikacin, Gentamicin, Ciprofloxacin, Tetracycline, Tigecycline, colistin และ Trimethoprim/Sulfamethoxazole มาวางบนอาหารที่ swab แล้ว และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง บันทึกผลโดยการวัดเส้นผ่านศูนย์กลางของ inhibition zone ที่เกิดขึ้นรอบ disk ยา โดยใช้เกณฑ์ CLSI ปี 2020 (CLSI, 2020) ในการแปลผล

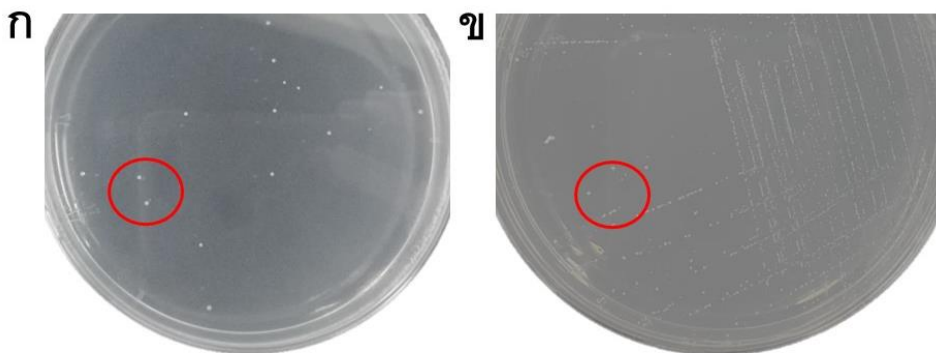


บทที่ 4

ผลการวิจัย

การเก็บตัวอย่างและการคัดแยกเชื้อแบคทีเรีย

จากการเก็บตัวอย่างดินที่มีการปนเปื้อนขยะพลาสติกหรือจากพื้นที่ทำการเกษตรกรรมได้ทั้งหมด 62 ตัวอย่าง โดยแบ่งเป็นจังหวัดอุดรธานี 30 ตัวอย่างและจังหวัดพิษณุโลก 32 ตัวอย่าง และนำแต่ละตัวอย่างดินมาคัดแยกแบคทีเรียที่สามารถย่อยพลาสติกและย่อยโพลีไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน (PAHs) ผลที่ได้พบว่า จากตัวอย่างทั้งหมดไม่พบแบคทีเรียที่สามารถย่อยพลาสติกได้ (Polycaprolactone หรือ PCL) แต่อย่างไรก็ตามพบว่า สามารถแยกแบคทีเรียที่สามารถย่อย PAHs (Naphthalene) โดยพบแบคทีเรียที่สามารถย่อย Naphthalene ได้จากตัวอย่างดิน 36 ตัวอย่าง หรือคิดเป็นร้อยละ 58.06 (36/62 ตัวอย่างดิน) ดังแสดงในภาพที่ 13 (และภาคผนวกตารางที่ 1) ซึ่งเป็นการคัดแยกบนอาหารแข็ง minimal medium M9 ที่ผสม Naphthalene ที่ความเข้มข้นสุดท้าย 200 µg/ml การคัดแยกบนอาหารแข็งโดยการใช้เทคนิค spread plate (ภาพที่ 13 ก) และ cross streak (ภาพที่ 13 ข) พบลักษณะของโคโลนีที่คล้ายกัน จึงคัดเลือกเพียง 1 โคโลนี ต่อตัวอย่างดิน 1 ตัวอย่าง และนำแบคทีเรียทั้ง 36 ไอโซเลตไปใช้ในการศึกษาขั้นต่อไป

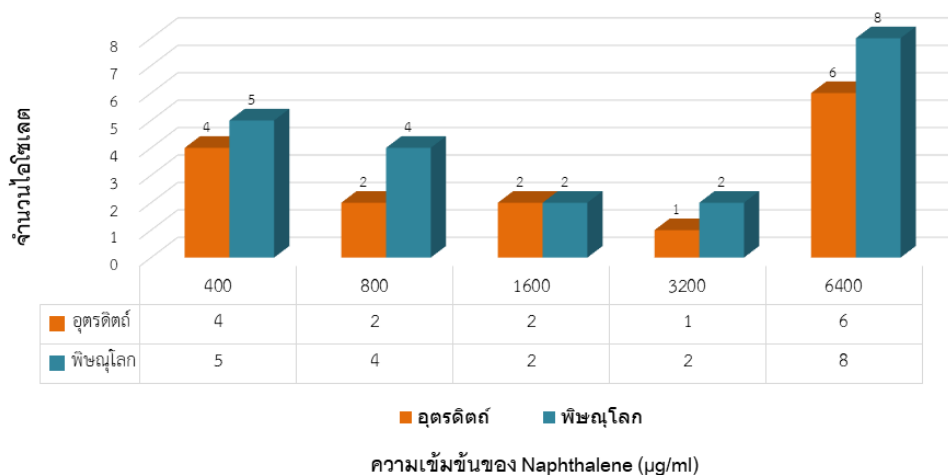


ภาพ 13 แสดงตัวอย่างลักษณะโคโลนีบนจานอาหารที่ใช้ในการคัดแยกแบคทีเรียที่ทนต่อ Naphthalene

โดยใช้อาหารแข็ง minimal M9 ที่ผสม Naphthalene 200 µg/ml บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน (ก) แสดงตัวอย่างจานอาหารที่คัดเลือกโดยใช้เทคนิค serial dilution และ spread plate (ข) แสดงตัวอย่างจานอาหารที่คัดเลือกโดยใช้เทคนิค cross streak

การศึกษาระดับความเข้มข้นน้อยที่สุดของ Naphthalene ที่สามารถยับยั้งการเจริญของ แบคทีเรีย ด้วยวิธี agar dilution assay (MIC_{Nap})

นำแบคทีเรียที่ย่อย PAHs ที่ได้จากการคัดกรองบนอาหารที่ผสม Naphthalene ที่ความเข้มข้น 200 $\mu\text{g/ml}$ จำนวน 36 ไอโซเลตมาศึกษาระดับการทนต่อ Naphthalene โดยวิธี Agar dilution method โดยใช้ Naphthalene ที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 400 $\mu\text{g/ml}$ ถึง 6400 $\mu\text{g/ml}$ พบว่าแบคทีเรียทั้ง 36 ไอโซเลตมีความทนทานต่อ Naphthalene ในระดับที่ต่างกัน ซึ่งความเข้มข้นของ Naphthalene ที่น้อยที่สุด ที่เชื้อสามารถเจริญได้ คือ Naphthalene ที่ความเข้มข้น 400 $\mu\text{g/ml}$ คิดเป็นร้อยละ 25 (9/36 ไอโซเลต) Naphthalene ที่ความเข้มข้น 800 $\mu\text{g/ml}$ คิดเป็นร้อยละ 16.68 (6/36 ไอโซเลต) Naphthalene ที่ความเข้มข้น 1600 $\mu\text{g/ml}$ คิดเป็นร้อยละ 11.11 (4/36 ไอโซเลต) Naphthalene ที่ความเข้มข้น 3200 $\mu\text{g/ml}$ คิดเป็นร้อยละ 8.33 (3/36 ไอโซเลต) และที่สามารถทนต่อ Naphthalene ความเข้มข้นสูงสุด 6400 $\mu\text{g/ml}$ มีทั้งหมด 14 ไอโซเลต คิดเป็นร้อยละ 38.88 (14/36 ไอโซเลต) ดังที่แสดงในภาพที่ 14 ดังนั้นจึงนำแบคทีเรียที่ทนต่อ Naphthalene ความเข้มข้นสูงสุด 6400 $\mu\text{g/ml}$ มาทำการศึกษาต่อไป



ภาพ 14 แสดงกราฟเปรียบเทียบจำนวนไอโซเลตของแบคทีเรียที่สามารถทนต่อ Naphthalene แต่
ละความเข้มข้นที่แยกได้จากจังหวัดอุดรดิตถ์และพิษณุโลก

คุณสมบัติทางสัณฐานวิทยาจุลชีววิทยาและชีวเคมีของเชื้อที่ทนต่อ Naphthalene ได้ในระดับสูง

จากการศึกษาคุณลักษณะสัณฐานวิทยาทางจุลชีววิทยาของเชื้อแบคทีเรียที่ทนต่อ Naphthalene ได้ในระดับสูง (6400 µg/ml) ด้วยเทคนิคการย้อมแกรม พบว่าเชื้อทั้ง 14 ไอโซเลต มีโคโลนีสีขาวขุ่น ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 1 มิลลิเมตร และมีรูปร่างท่อนย้อมติดสีแกรมลบ (Gram negative) และจากการทดสอบปฏิกิริยาทางชีวเคมี โดยการทดสอบ Indole test, Oxidase test, Lactose fermentation และ Triple Sugar Iron (TSI) test พบว่าในการทดสอบ Indole test และ Oxidase test แบคทีเรียให้ผลเป็นลบ และผลการทดสอบความสามารถในการย่อยสลายน้ำตาลแลคโตส Lactose fermentation พบว่าแบคทีเรียให้โคโลนีสีชมพูบนอาหาร Mac Conkey agar แสดงว่าแบคทีเรียทั้ง 14 ไอโซเลต สามารถย่อยสลายน้ำตาลแลคโตสได้ และเมื่อทดสอบการใช้น้ำตาลกลูโคส (Triple Sugar Iron - TSI) พบว่าผลการทดสอบจะสามารถแบ่งแบคทีเรียได้ออกเป็น 2 กลุ่ม โดยกลุ่มแรกจะเป็นแบคทีเรียที่สามารถสร้างก๊าซจนเกิดรอยแตกของอาหารได้อย่างชัดเจน หรือ อ่านผลเป็น G+ ได้แก่ ไอโซเลต N2, N3, N8, N9, N12, N13, N19, N23, N25 และกลุ่มที่สอง กลุ่มที่ไม่สามารถสร้างก๊าซได้ หรืออ่านผลเป็น G- ได้แก่ N14, N15, N20, N26 และ N28 ดังที่แสดงในตารางที่ 7

จากผลการศึกษาระดับการทนต่อ Naphthalene ได้คัดเลือกไอโซเลตที่ทนต่อ Naphthalene ได้ในระดับสูงสุด คือ 6400 µg/ml ได้หมด 14 ไอโซเลต นำมาศึกษาคุณสมบัติทางจุลชีววิทยาโดยการย้อมแกรมและการทดสอบทางชีวเคมี พบว่าทั้ง 14 ไอโซเลตมีคุณสมบัติที่คล้ายกันดังที่กล่าวไปข้างต้น จึงได้ทำการสุ่มเลือกแบคทีเรียที่ทนต่อ Naphthalene ในระดับสูง (MIC_{Nap}) มา 7 ไอโซเลต จากทั้ง 2 จังหวัด ได้แก่ จากจังหวัดอุดรดิตถ์ ได้แก่ N12 และ N14 และจากจังหวัดพิษณุโลก ได้แก่ N8, N25, N20, N26 และ N28 เพื่อทำการระบุจีโนมของแบคทีเรียด้วยยีน 16s rDNA ต่อไป

ตาราง 7 แสดงลักษณะทางสัณฐานจุลชีววิทยาและชีวเคมีของเชื้อทั้ง 14 ไอโซเลต

รหัส ไอโซ เลต	ลักษณะ โคโลนีบน อาหาร TSA	คุณลักษณะจาก การย้อมแกรม	คุณสมบัติทางชีวเคมี			
			Indole test	Oxidase test	MacConkey agar	Triple Sugar Iron (TSI)
N2	สีขาวขุ่น (Ø 1 มม.)	แกรมลบ รูปร่าง ท่อน	-	-	โคโลนีสีชมพู	K/A, G+
N3	สีขาวขุ่น (Ø 1 มม.)	แกรมลบ รูปร่าง ท่อน	-	-	โคโลนีสีชมพู	K/A, G+
N8	สีขาวขุ่น (Ø 1 มม.)	แกรมลบ รูปร่าง ท่อน	-	-	โคโลนีสีชมพู	K/A, G+
N9	สีขาวขุ่น (Ø 1 มม.)	แกรมลบ รูปร่าง ท่อน	-	-	โคโลนีสีชมพู	K/A, G+
N12	สีขาวขุ่น (Ø 1 มม.)	แกรมลบ รูปร่าง ท่อน	-	-	โคโลนีสีชมพู	K/A, G+
N13	สีขาวขุ่น (Ø 1 มม.)	แกรมลบ รูปร่าง ท่อน	-	-	โคโลนีสีชมพู	K/A, G+
N14	สีขาวขุ่น (Ø 1 มม.)	แกรมลบ รูปร่าง ท่อน	-	-	โคโลนีสีชมพู	K/A, G-
N15	สีขาวขุ่น (Ø 1 มม.)	แกรมลบ รูปร่าง ท่อน	-	-	โคโลนีสีชมพู	K/A, G-
N19	สีขาวขุ่น (Ø 1 มม.)	แกรมลบ รูปร่าง ท่อน	-	-	โคโลนีสีชมพู	K/A, G+

ตารางที่ 7 แสดงลักษณะทางสัณฐานจุลชีววิทยาและชีวเคมีของเชื้อทั้ง 14 ไอโซเลต (ต่อ)

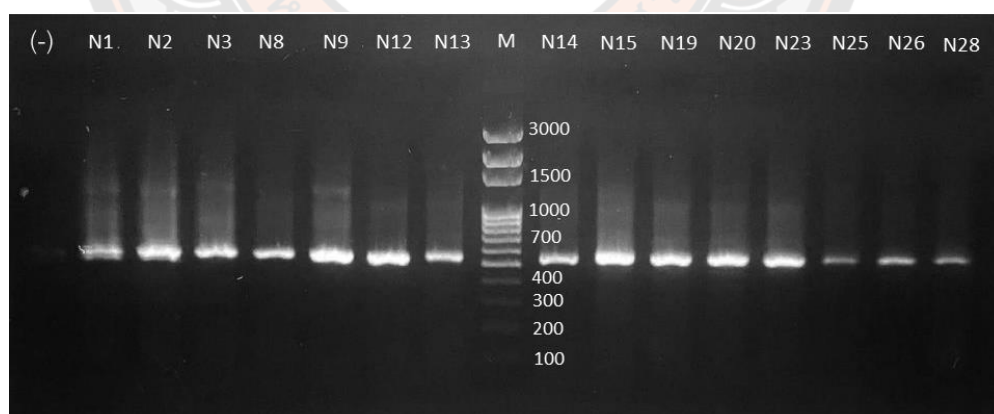
รหัสไอโซเลต	ลักษณะโคโลนีบนอาหาร TSA	คุณลักษณะจากการย้อมแกรม	คุณสมบัติทางชีวเคมี			
			Indole test	Oxidase test	Lactose fermentation	Triple sugar Iron (TSI)
N20	สีขาวขุ่น (Ø 1 มม.)	แกรมลบ รูปร่างท่อน	-	-	โคโลนีสีชมพู	K/A, G-
N23	สีขาวขุ่น (Ø 1 มม.)	แกรมลบ รูปร่างท่อน	-	-	โคโลนีสีชมพู	K/A, G+
N25	สีขาวขุ่น (Ø 1 มม.)	แกรมลบ รูปร่างท่อน	-	-	โคโลนีสีชมพู	K/A, G+
N26	สีขาวขุ่น (Ø 1 มม.)	แกรมลบ รูปร่างท่อน	-	-	โคโลนีสีชมพู	K/A, G-
N28	สีขาวขุ่น (Ø 1 มม.)	แกรมลบ รูปร่างท่อน	-	-	โคโลนีสีชมพู	K/A, G-

หมายเหตุ : (-) = Negative, (+) = Positive

G+ = เกิดรอยแตกของแก๊ส, G- = ไม่เกิดรอยแตกของแก๊ส, K/A = Alkaline slant/acid Butt

การระบุจีโนมของไอโซเลตที่ทนต่อ Naphthalene ระดับสูง ด้วยการหาลำดับเบสของยีน 16S rDNA

จากการนำทั้ง 7 ไอโซเลต มาทำ PCR เพื่อเพิ่มปริมาณยีน 16S rDNA ซึ่งมีขนาดประมาณ 590 bp โดยใช้ universal primer ซึ่งผลจากการทำ PCR ดังแสดงในภาพที่ 15 พบว่าทั้ง 7 ไอโซเลต มีขนาด PCR product ประมาณ 500 bp ดังที่แสดงในภาพที่ 15 จากนั้นทำการ purified PCR product โดยใช้ชุดสำเร็จรูป และนำไปหาลำดับเบสด้วยวิธี sanger sequencing ซึ่งจากการทำ sanger sequencing ได้นำมา trimming ลำดับเบสของยีน 16s ของทุกสายพันธุ์มาตัดให้มีขนาดเท่ากัน ประมาณ 450 bp จากนั้นนำข้อมูลลำดับเบส ที่ได้มาเปรียบเทียบกับข้อมูลของแบคทีเรียที่มีอยู่ในฐานข้อมูล NCBI โดยใช้โปรแกรม Blast N เปรียบเทียบ พิจารณาผลการทดสอบกับความคล้ายคลึงของจุลินทรีย์แต่ละสปีชีส์ในฐานข้อมูลด้วย % similarity ซึ่งหากเปรียบเทียบแล้วพบว่า % similarity ตั้งแต่ 95-97% ให้จำแนกเป็นจีโนมเดียวกัน และ 98-100% ให้จำแนกเป็นสปีชีส์เดียวกัน (Alves, 2020) ดังที่แสดงในตารางที่ 8 จากการจำแนกจีโนมของแบคทีเรียที่ทนต่อ Naphthalene ในระดับสูง พบว่า ทุกไอโซเลตที่มี % similarity ตั้งแต่ 97-100% ซึ่งทำให้ไม่สามารถระบุได้ว่าเป็นสปีชีส์ใด แต่สามารถจำแนกได้เป็น 2 จีโนม ได้แก่ *Klebsiella* spp. 6 ไอโซเลต ได้แก่ N8,N12,N14,N20,N26 และ N28 และ *Enterobacter* spp. 1 ไอโซเลต ได้แก่ N25 จากนั้นนำมาเทียบลำดับเบสกับเชื้อสายพันธุ์อ้างอิง (ATCC type strains) ต่อไป



ภาพ 15 แสดงการตรวจสอบขนาดของ PCR product ด้วยเทคนิค agarose gel electrophoresis

เลนส์ (-) คือ Negative control

เลนส์ M คือ Marker DNAมาตรฐาน (100 bp DNA Ladder, Gene direct)

ตาราง 8 การระบุชนิดของไอโซเลตที่หน่อ Naphthalene ในระดับสูงด้วยวิธีชีววิทยา

รหัสไอโซเลต	Bacteria strain	Accession number	Query coverage	E value	% Identity
N8	<i>Klebsiella</i> sp. CCFM8384	KJ803941.1	100%	0.0	100
	<i>Klebsiella</i> sp. MW-D 2302	KC835122.1	100%	0.0	100
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	KT026097.1	100%	0.0	99.78
N12	<i>Klebsiella</i> sp. strain AAUGM-17	MT550667.1	100%	0.0	100
	<i>Klebsiella pneumoniae</i> strain IOB-L	MN555336.1	100%	0.0	100
	<i>Klebsiella pneumoniae</i> strain AB1816	MK027254.1	100%	0.0	100
N14	<i>Klebsiella pneumoniae</i> strain KP-F20	MT225946.1	100%	0.0	100
	<i>Klebsiella pneumoniae</i> strain ZG2	MF767574.1	100%	0.0	100
	<i>Klebsiella pneumoniae</i> strain KP1513	KJ746503.1	100%	0.0	100
N20	<i>Klebsiella pneumoniae</i> strain 7604	MT516157.1	100%	0.0	100
	<i>Klebsiella pneumoniae</i> strain KPBIQ19	MT102627.1	100%	0.0	100
	<i>Klebsiella pneumoniae</i> strain A1763	MW433676.1	100%	0.0	100

ตาราง 8 การระบุชนิดของไอโซเลตที่พบต่อ Naphthalene ในระดับสูงด้วยวิธีชีววิทยา (ต่อ)

รหัสไอโซเลต	Bacteria strain	Accession number	Query coverage	E value	% Identity
N25	<i>Enterobacter cloacae</i> strain A1	MF289448.1	99%	0.0	98.43
	<i>Enterobacter huaxiensis</i> strain S15	MN044786.1	100%	0.0	97.75
	<i>Enterobacter asburiae</i> strain AB1816	MK045607.1	100%	0.0	97.52
N26	<i>Klebsiella pneumoniae</i> strain OU7	MN999954.1	100%	0.0	100
	<i>Klebsiella pneumoniae</i> strain NPK3_2_46	MN691789.1	100%	0.0	100
	<i>Klebsiella pneumoniae</i> strain 45	MZ389281.1	100%	0.0	100
N28	<i>Klebsiella pneumoniae</i> strain KP-F20	MT225946.1	100%	0.0	100
	<i>Klebsiella pneumoniae</i> strain IGM4-7	MT197248.1	100%	0.0	100
	<i>Klebsiella pneumoniae</i> strain ORKVG01	MK461575.1	100%	0.0	100

จากการนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16s rDNA มาทำการ blast กับเชื้อสายพันธุ์อ้างอิง (ATCC type strains) โดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์จากฐานข้อมูล American Type Culture Collection (<https://www.atcc.org/>) ของ *Klebsiella* spp. ได้แก่ *Klebsiella oxytoca* ATCC 13182, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 11296, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883 และ *Enterobacter* spp. ได้แก่ *Enterobacter asburiae* ATCC 35953, *Enterobacter cloacae* ATCC 13047 และ *Enterobacter cloacae* ATCC 23355 ดังที่แสดงในตารางที่ 9 แต่เนื่องจาก บางไอโซเลต มี %identity มากกว่า 95% เมื่อเทียบกับสายพันธุ์ type strains แล้ว จึงสามารถ จำแนกจีโนมได้เพียง *Klebsiella* spp. และ *Enterobacter* spp.



ตาราง 9 แสดงค่าความเหมือนเมื่อเปรียบเทียบกับ 7 ไอโซเลตกับเชื้อ Type strains

รหัส ไอโซ เลต	ค่าร้อยละ identity (coverage) ของลำดับ 16s rDNA ของเชื้อทดสอบต่อเชื้อ type strains ต่างๆ					
	<i>Klebsiella oxytoca</i> ATCC 13182	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 11296	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 13883	<i>Enterobacter asburiae</i> ATCC 35953	<i>Enterobacter Cloacae</i> ATCC 13047	<i>Enterobacter Cloacae</i> ATCC 23355
N8	96.83 (98)	99.02 (100)	99.27 (100)	97.76 (99)	97.26 (99)	97.01 (99)
N12	96.88 (99)	98.56 (100)	99.80 (100)	99.00 (100)	97.01 (99)	97.26 (99)
N14	99.28 (99)	99.04 (99)	99.28 (99)	98.51 (99)	96.52 (99)	96.77 (99)
N20	94.69 (99)	98.82 (100)	99.04 (100)	98.26 (99)	96.77 (99)	97.01 (99)
N25	94.28 (99)	95.04 (99)	95.29 (100)	95.66 (99)	95.77 (99)	97.02 (100)
N26	96.88 (99)	98.56 (100)	98.80 (100)	96.00 (99)	97.01 (99)	97.26% (99)
N28	96.39 (99)	99.04 (100)	99.28 (100)	98.51 (99)	96.52 (99)	96.77 (99)

ผลของความเข้มข้นของ Naphthalene (MIC_{Nap}) ต่อการอยู่รอดของเซลล์แบคทีเรียที่แยกได้

ในการทดลองนี้ต้องการทราบว่า Naphthalene ความเข้มข้น 6400 $\mu\text{g/ml}$ ส่งผลต่อการอยู่รอดของแบคทีเรียทั้ง 7 ไอโซเลตได้หรือไม่ โดยการนับ CFU/ml ที่เวลา 5, 15 และ 30 นาที โดยพบว่า ที่ 5 นาทีแรก แบคทีเรียไอโซเลต N8, N14, N20 และ N28 ไม่สามารถทนต่อ Naphthalene ความเข้มข้น 6400 $\mu\text{g/ml}$ ใดๆก็ตาม มีแบคทีเรียเพียง 4 ไอโซเลตที่สามารถทนต่อ Naphthalene ความเข้มข้น 6400 $\mu\text{g/ml}$ ได้ ได้แก่ N12, N25 และ N26 แต่จะมีปริมาณเซลล์ลดลงจาก 10^6 เหลือ 10^3 แต่เมื่อเวลาผ่านไป 15 นาที ไม่พบแบคทีเรียที่สามารถเจริญได้ จึงสามารถสรุปได้ว่าไม่มีแบคทีเรียไอโซเลตใดที่สามารถทนต่อ Naphthalene (MIC_{Nap}) ได้เลย ดังที่แสดงในตารางที่ 10

ตาราง 10 จำนวนโคโลนี (CFU/ml) ในแต่ละช่วงเวลา

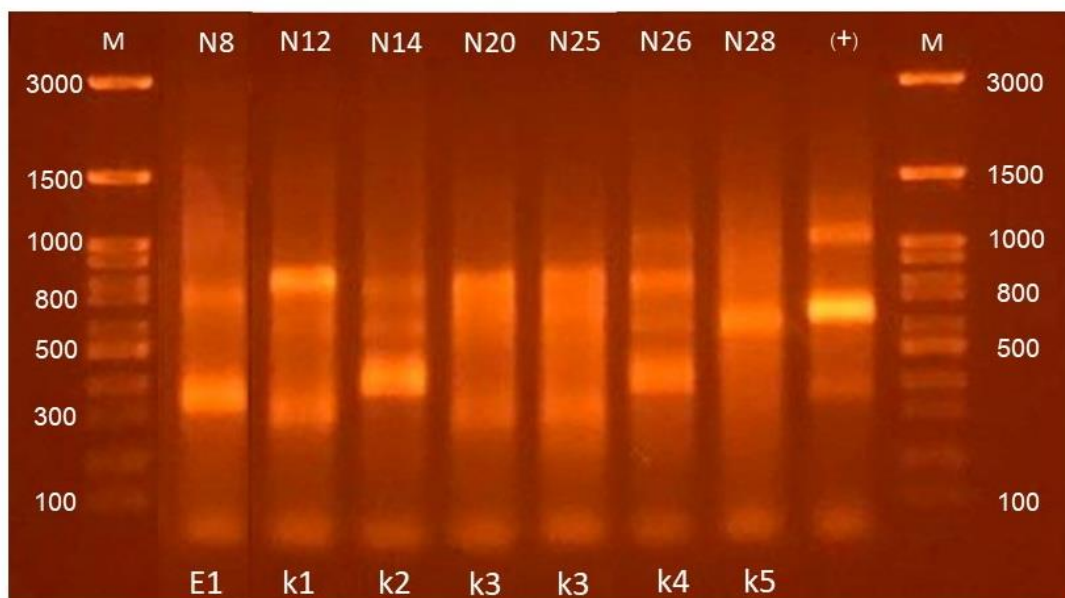
Isolate	จำนวนโคโลนี (CFU/ml)					
	Control			Treated Naphthalene 6400 $\mu\text{g/ml}$		
	5 min	15 min	30 min	5 min	15 min	30 min
N8	4×10^6	4×10^6	5×10^6	0	0	0
N12	3×10^6	4×10^6	5×10^6	1.8×10^3	0	0
N14	2×10^6	2×10^6	7×10^6	0	0	0
N20	5×10^6	1×10^7	5×10^6	0	0	0
N25	1×10^7	3×10^6	3×10^6	0.9×10^3	0	0
N26	2×10^6	3×10^6	2×10^6	2.5×10^3	0	0
N28	3×10^6	3×10^6	3×10^6	0	0	0

หมายเหตุ : 0 = ไม่มีแบคทีเรียเจริญ

การศึกษาความสัมพันธ์ทางจีโนไทป์ของเชื้อแบคทีเรียด้วยเทคนิค ERIC-PCR

การจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อที่ทนต่อ Naphthalene ในระดับสูง ทั้ง 7 ไอโซเลต ด้วยเทคนิค ERIC-PCR ทำให้ได้ PCR product มีขนาดระหว่าง 100 bp ถึง 1000 bp สามารถจำแนกจีโนไทป์ของเชื้อได้ 6 กลุ่ม ได้แก่ ERIC-k1, ERIC-k2, ERIC-k3, ERIC-k4, ERIC-k5 และ ERIC-E1 ซึ่งแต่ละไอโซเลตมี ERIC-PCR รูปแบบที่แตกต่างกันดังที่แสดงในภาพที่ 18 พบว่า ERIC-k1 คือ ไอโซเลต N8 มีแถบขนาด 800, 300, 100 bp N12 คือ ERIC-k2 มีขนาดแบนด์ 800, 400, 100 bp N14 และ N20 มีลักษณะแบนด์ที่คล้ายกัน คือ ERIC-k3 มีขนาดประมาณ 600, 200, 100 bp N26 คือ ERIC-k4 มี

ขนาด 1000, 800, 700, 200,100 bp N28 คือ ERIC-k5 มีขนาด 700, 100 bp และ N25 คือ ERIC-E1 มีขนาดประมาณ 700, 300, 100 bp



ภาพ 16 ภาพ Agarose gel electrophoresis ที่แสดง ERIC-PCR patterns
เลนส์ M : Marker 100 bp DNA Ladder (Invitrogen™, US) เลนส์ (+) : positive

การทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะของเชื้อที่ทนต่อ Naphthalene ได้ในระดับสูง

ในการทดลองนี้ต้องการศึกษาความไวต่อยาปฏิชีวนะโดยใช้ยาทั้งหมด 6 กลุ่ม (9 ยา) ในเชื้อทั้งหมด 7 ไอโซเลต ทดสอบกับยากลุ่ม cephems ที่ประกอบด้วยยา Caftazidime และ Cafepime , กลุ่ม Aminoglycosides ที่ประกอบด้วยยา Amikacin และ Gentamicin, กลุ่ม Fluoroquinolones ที่ประกอบด้วยยา Ciprofloxacin, กลุ่ม Tetracyclines ที่ประกอบด้วยยา Tetracycline และ Tigecycline, กลุ่ม Polypeptide ที่ประกอบด้วยยา Colistin และกลุ่ม Folate pathway antagonists ที่ประกอบด้วยยา Trimethoprim/Sulfamethoxazole โดยใช้เกณฑ์ของ CLSI ปี ค.ศ. 2020 พบว่า แบคทีเรียทั้ง 7 ไอโซเลต ส่วนมากมีความไวต่อยาปฏิชีวนะ ยกเว้น N14 ที่ดื้อต่อยา Tetracycline ดังที่แสดงในตารางที่ 11

ตาราง 11 การแปลผลการทดสอบความไวต่อยา 6 กลุ่ม

กลุ่ม	สารต้านจุลชีพ	ผลการทำ disk diffusion (มิลลิเมตร)						
		N8	N12	N14	N20	N25	N26	N28
Cephems	Ceftazidime	30	29	30	30	31	33	31
	Cefepime	33	35	35	32	34	34	33
Aminoglycosides	Amikacin	22	21	21	25	22	21	21
	Gentamicin	21	21	20	20	21	18	19
Fluoroquinolones	Ciprofloxacin	28	29	30	28	29	28	30
Tetracyclines	Tetracycline	25	26	9	25	24	24	23
	Tigecycline	23	23	23	22	24	24	23
Polypeptide	Colistin	14	13	12	14	15	12	14
Folate pathway antagonists	Trimethoprim/ Sulfamethoxazole	29	30	0	29	27	30	30

หมายเหตุ : S = Susceptible (ไวต่อยา), R = Resistance (ดื้อต่อยา)

บทที่ 5

อภิปรายผลการทดลอง

จากการเก็บตัวอย่างดินบริเวณที่ปนเปื้อนทั้งหมด 62 ตัวอย่าง จากจังหวัดอุดรดิตถ์ 30 ตัวอย่างและจังหวัดพิษณุโลก 32 ตัวอย่าง ซึ่งสามารถแยกเชื้อแบคทีเรียที่ได้จากตัวอย่างดินได้ทั้งหมด 36 ไอโซเลต เนื่องจากดินเป็นวัตุธรรมชาติที่เกิดจากการทับถมของซากพืช ซากสัตว์ มีแร่ธาตุอาหารที่อุดมสมบูรณ์และเป็นแหล่งที่อยู่ของจุลินทรีย์หลายชนิด จึงเหมาะแก่การเพาะปลูก เนื่องจากในขณะที่พืชเจริญจะมีการขับสารต่างๆ ออกมา เช่น กรดอะมิโน เกลือแร่ วิตามิน ซึ่งสารเหล่านี้เป็นสารอาหารสำหรับจุลินทรีย์เพื่อใช้เป็นแหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจนและแหล่งพลังงาน (สำนักงานพัฒนาการวิจัยการเกษตร) การคัดแยกแบคทีเรียที่ได้จากดินทำให้พบแบคทีเรียที่มีความหลากหลาย โดยในประเทศไทยสามารถแบ่งดินได้ออกเป็น 3 ประเภท ได้แก่ ดินทราย ดินเหนียว และดินร่วน ซึ่งจังหวัดอุดรดิตถ์ตั้งอยู่ในเขตภาคเหนือตอนล่าง มีพื้นที่ในการทำการเกษตรร้อยละ 25.48 ของพื้นที่ทั้งหมด ซึ่งลักษณะของดินส่วนมากจะเป็นดินเหนียว (สถานีพัฒนาที่ดินจังหวัดอุดรดิตถ์) ส่วนจังหวัดพิษณุโลกตั้งอยู่ในเขตภาคกลาง มีพื้นที่เกษตรกรรมร้อยละ 52.09 ของพื้นที่ ลักษณะดินส่วนใหญ่เป็นดินร่วนเหนียว ดินจึงมีความอุดมสมบูรณ์ปานกลาง (สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตรเขต 2) นอกจากนี้ปริมาณความหนาแน่นของจุลินทรีย์ก็ขึ้นอยู่กับปัจจัยต่างๆ ของดิน เช่น ความเป็นกรด-ด่าง อุณหภูมิ ความลึกของดิน ความชื้นและชนิดของดินโดยที่จุลินทรีย์ในดินมีส่วนช่วยในการย่อยอินทรีย์วัตถุ ทำให้รักษาระดับและปริมาณของคาร์บอนไดออกไซด์ในดิน ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ อนันท์ญาและนิภาพร (อนันท์ญา แสนสวัสดิ์ และ นิภาพร, 2022) ที่ได้ทำการคัดแยกแบคทีเรียจากชายฝั่งทะเลภาคตะวันออกของประเทศไทย เพื่อศึกษาประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นใช้แล้วของแบคทีเรียที่แยกได้ จำนวน 315 ไอโซเลต พบว่ามีแบคทีเรียเพียง 18 ไอโซเลต ที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นใช้แล้วได้มากกว่า 80% ภายในระยะเวลา 7 วัน และได้ทำการศึกษาประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันโดยเปรียบเทียบระหว่างไอโซเลตเดี่ยวและผสมกัน 3 ไอโซเลต (*Pseudomonas* sp. CB-2.1, *Staphylococcus* sp. TR-46.6 และ *Pseudomonas* sp. TR-47.5) และพบว่าทั้ง 2 กลุ่มสามารถย่อยสลายสารในกลุ่ม glycerol, n-alkanes และ fatty acid ให้ลดลงมากกว่ากลุ่มการทดลองอื่น จึงทำให้งานวิจัยนี้ต้องมีการศึกษาแบคทีเรียที่แยกได้ เพื่อหาความสามารถในการกำจัด Naphthalene ซึ่งเป็นวิธีทางชีวภาพที่ส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมน้อยที่สุด และเมื่อนำมาทดสอบความสามารถในการย่อยพลาสติก Polycaprolactone (PCL) และ Naphthalene เบื้องต้น พบว่าแบคทีเรียไม่สามารถย่อยพลาสติก

PCL ได้ แต่สามารถย่อยสลาย Naphthalene ได้เพียงอย่างเดียว สาเหตุที่แบคทีเรียไม่สามารถย่อยสลาย PCL ได้ เนื่องจากอาหาร M9 มีสารอาหารและสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมต่อการทำงานของจุลินทรีย์ จึงอาจจะต้องมีการเติมสารอาหารบางอย่างเข้าไป รวมถึงการปรับค่า pH ให้เหมาะสม นอกจากนี้แบคทีเรียที่ถูกค้นพบในงานวิจัยก่อนหน้านี้ส่วนมากมักจะเป็นแบคทีเรียที่สามารถทนต่อความร้อนได้สูง (Thermophilic bacteria) เช่นงานวิจัยของ Nikolina (Atanasova et al., 2021) ที่ได้ทำการศึกษาความสามารถของ *Brevibacillus thermoruber* สายพันธุ์ 7 ที่แยกได้จากบ่อน้ำพุในประเทศ บัลแกเรีย โดยได้มีการศึกษาผลของค่า pH พบว่าค่า pH 8.0-8.5 ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 28 วัน ซึ่งเป็นสภาวะที่พบว่าแบคทีเรียสามารถลดน้ำหนักโมเลกุลของ PCL ได้ หรืองานวิจัยของ Linying Li (Linying Li et al., 2022) ที่ได้ทำการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ PCLase I และ PCLase II ที่แยกได้จาก *Pseudomonas hydrolytica* sp. DSWY01 ซึ่งพบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสม คือ 40-50 องศาเซลเซียส และค่า pH 9-10 คือสภาวะที่เหมาะสมที่ทำให้แบคทีเรียผลิตเอนไซม์ออกมาย่อย PCL ได้ดีที่สุด

จากการศึกษาระดับการทนต่อ Naphthalene (MIC_{Nap}) ของแบคทีเรียทั้ง 36 ไอโซเลต พบว่า มีแบคทีเรียเพียง 14 ไอโซเลตที่สามารถทนต่อ Naphthalene ที่ความเข้มข้นสูงสุด 6400 g/ml ซึ่งทนได้มากกว่างานวิจัยของ Sushma Tirkey (Tirkey et al., 2021) ที่ได้ทำการศึกษา *Pseudomonas* sp. strain SA3 ในการย่อย Naphthalene 500 ppm (500 $\mu\text{g/ml}$) ซึ่งสามารถย่อย Naphthalene ได้ 98.06% ในเวลา 72 ชั่วโมงในสภาวะแวดล้อมที่เหมาะสม หรืองานวิจัยของ Rabani (Rabani et al., 2022) ที่ได้ทำการศึกษาแบคทีเรียที่แยกได้จากบริเวณที่ปนเปื้อนปิโตรเลียม ซึ่งพบว่าเป็น *Bacillus licheniformis* และ *Bacillus sonorensis* ที่สามารถทนต่อ Naphthalene ได้ถึง 1000 mg/l^{-1} ซึ่งยังถือว่าเป็นความเข้มข้นที่น้อยกว่า

หลังจากการศึกษาระดับการทนต่อ Naphthalene (MIC_{Nap}) จึงนำแบคทีเรียที่แยกได้โคลนเดี่ยวมาศึกษาคุณสมบัติทางจุลชีววิทยาโดยการย้อมแกรมและการทดสอบปฏิกิริยาทางชีวเคมี พบว่าเชื้อทั้ง 14 ไอโซเลต เป็นแบคทีเรียแกรมลบ (gram negative) มีรูปร่างเป็นท่อน และทดสอบปฏิกิริยาทางชีวเคมี โดยการทดสอบ Indole test และ Oxidase test แบคทีเรียให้ผลเป็นลบ และการทดสอบการย่อยสลายน้ำตาลแลคโตส (Lactose fermentation) พบว่าแบคทีเรียทั้ง 14 ไอโซเลตให้โคโลนีสีชมพูบนอาหาร Mac Conkey agar จึงสามารถย่อยสลายน้ำตาลแลคโตสได้ ส่วนการทดสอบ Triple Sugar Iron (TSI) สามารถแบ่งแบคทีเรียได้ออกเป็น 2 กลุ่ม คือกลุ่มที่สามารถสร้างแก๊สไฮโดรเจนซัลไฟด์ 3 ไอโซเลต และกลุ่มที่ไม่สร้างแก๊สไฮโดรเจนซัลไฟด์ 4 ไอโซเลต ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Darío (Cruz et al., 2021) ที่ได้ทำการเก็บตัวอย่างดิน 40 ตัวอย่าง มาทดสอบปฏิกิริยาทางชีวเคมีแบคทีเรียที่แยกได้จากดินบริเวณที่ทำการเกษตรในประเทศเอกวาดอร์ โดยนำมาทดสอบความสามารถในการหมักน้ำตาลแลคโตสบนอาหาร MacConkey agar และการทดสอบ TSI

แล้วพบว่า แบคทีเรียที่แยกได้จากดินส่วนใหญ่เป็นแบคทีเรียแกรมลบ ให้โคโลนีสีชมพูบนอาหาร MacConkey และมีผลการทดสอบ TSI เป็นลบ จากการศึกษาคุณสมบัติทางจุลชีววิทยาและทดสอบปฏิกิริยาทางชีวเคมี แล้วพบว่าแบคทีเรียทั้ง 14 ไอโซเลต ให้ผลการทดสอบปฏิกิริยาทางชีวเคมีที่คล้ายกัน จึงทำการสุ่มเลือกแบคทีเรียมา 7 ไอโซเลต มาทำการระบุจีโนมต่อไป

การระบุจีโนมด้วยยีน 16s rDNA ของทั้ง 7 ไอโซเลต เนื่องจากยีน 16s rDNA เป็นยีนที่พบในแบคทีเรียทุกชนิด มีลำดับนิวคลีโอไทด์และหน้าที่ของยีนไม่เปลี่ยนแปลง จึงเหมาะสำหรับการจัดจำแนกจุลินทรีย์ (ภรณ์ แก้วรวม, 2556) หลังจากทำการเพิ่มจำนวนด้วยเทคนิค PCR และตรวจสอบขนาดของ PCR product พบว่าทั้ง 14 ไอโซเลต มีขนาด PCR product ประมาณ 500 bp จึงได้ทำการส่ง sanger sequence ทั้ง 14 ไอโซเลตและมาเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล NCBI และเชื้อสายพันธุ์อ้างอิง (ATCC type strains) (Ratul Saha et al., 2013) สามารถจำแนกจีโนมของแบคทีเรียเป็น *Klebsiella* spp. จำนวน 6 ไอโซเลต และ *Enterobacter* spp. 1 ไอโซเลต แต่อย่างไรก็ตามการใช้ยีน 16s rDNA มีข้อจำกัดในเรื่องของความแม่นยำต่ำ เนื่องจากมีรหัสพันธุกรรมคล้ายคลึงกันในแบคทีเรียหลายกลุ่มส่งผลให้มีความคลาดเคลื่อนในการศึกษาความหลากหลายของแบคทีเรีย (Yin Chen et al., 2007) นอกจากนี้ *Klebsiella* spp. และ *Enterobacter* spp. แล้วยังมีงานวิจัยส่วนมากที่พบแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลาย PAHs นอกเหนือจาก *Klebsiella* spp. และ *Enterobacter* spp. คือ *Pseudomonas* spp. ดังเช่น งานวิจัยของ Sushma (Tirkey et al., 2021) ที่ได้ทำการศึกษาการย่อยสลายของ Naphthalene โดยใช้เชื้อ *Pseudomonas* spp. สายพันธุ์ SA3 ที่รัฐคุชราต ประเทศอินเดีย โดยได้ทำการแยกแบคทีเรียจากน้ำและดินบริเวณอู่ต่อเรือทั้งหมด 50 ตัวอย่าง มาทำการคัดกรองความสามารถในการย่อย Naphthalene ซึ่งพบว่าแบคทีเรียที่แยกได้คือ *Pseudomonas* sp. สายพันธุ์ SA3 ที่สามารถย่อยสลาย Naphthalene ความเข้มข้น 500 ppm ได้ 98.74% โดยใช้เวลา 96 ชั่วโมง และมีการปรับพารามิเตอร์ของสิ่งแวดล้อม เช่น ค่า pH, ความเค็ม, อุณหภูมิ และแหล่งคาร์บอน ให้เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ โดยพบว่าสามารถเร่งอัตราการย่อยสลายได้เล็กน้อยในเวลา 72 ชั่วโมง และแบคทีเรียที่อีก 1 สายพันธุ์ที่มีการทดสอบ คือ *Bacillus* spp. เช่นงานวิจัยของ Ni'matuzahroh (Ni'matuzahroh et al., 2017) ที่ได้ศึกษาอัตราการย่อยของ Naphthalene และ Phenanthrene โดยใช้ *Bacillus subtilis* สายพันธุ์ 3KP เพื่อดูการตอบสนองการเจริญเติบโต ความสามารถในการย่อยสลาย และกลไกการดูดซึมของ Naphthalene และ Phenanthrene โดย *Bacillus subtilis* 3KP ที่เลี้ยงในอาหาร Mineral Synthetic (MS) ที่เติมสารสกัดจากยีสต์ 1% และ Naphthalene และ Phenanthrene ที่ความเข้มข้น 200 ppm โดยวิธี Total Plate Count (TPC) และตรวจหาอัตราการย่อยสลายโดยเครื่อง UV-Vis spectrophotometer และกลไกการดูดซึมของไฮโดรคาร์บอนโดย emulsification activity การลดลงของแรงตึงผิว และกิจกรรมการยึดเกาะของแบคทีเรียกับไฮโดรคาร์บอน (BATH) พบว่า

Bacillus subtilis 3KP สามารถเติบโตและแสดงรูปแบบการเติบโตแบบ biphasic บนพื้นผิวทั้งของ Naphthalene และ Phenanthrene ที่ถูกใช้เป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับการเติบโตที่อุณหภูมิ ± 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน *Bacillus subtilis* 3KP สามารถย่อยสลาย Naphthalene ได้ 70.5% และ Phenanthrene ได้ 24.8% จากการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง UV-Vis spectrophotometer พบ metabolites ได้แก่ 1-hydroxy-2-naphthoic acid, salicylic acid และ pyrocatechol ในอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่ง metabolites เหล่านี้อาจจะเกิดจากการย่อยสลายของ Naphthalene และ Phenanthrene โดยแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* สายพันธุ์ 3KP

หลังจากที่ทำการระบุจีโนมของแบคทีเรียแล้ว จึงได้ทำการศึกษา ผลของความเข้มข้นของ Naphthalene (MIC_{Nap}) ต่อการอยู่รอดของเซลล์แบคทีเรียที่แยกได้เป็นเวลา 5, 15 และ 30 นาที พบว่าที่เวลา 5 นาทีแรก มีแบคทีเรียบางไอโซเลตที่ไม่สามารถทนต่อ Naphthalene ความเข้มข้น 6400 $\mu\text{g/ml}$ เนื่องจาก เนื่องจาก Naphthalene ที่มีความเข้มข้นสูง ทำให้ไปยังยังกระบวนการหายใจในไมโทคอนเดรียได้ (รุ่งตะวันและคณะ, 2013) อย่างไรก็ตามยังมีแบคทีเรีย 4 ไอโซเลตที่สามารถทนต่อ Naphthalene ความเข้มข้น 6400 $\mu\text{g/ml}$ ได้ แต่จะมีปริมาณเซลล์ลดลงจาก 10^6 เหลือ 10^3 แต่เมื่อเวลาผ่านไป 15 นาที ไม่มีแบคทีเรียไอโซเลตใดที่สามารถทนต่อ Naphthalene ความเข้มข้น 6400 $\mu\text{g/ml}$ ได้เลย ซึ่งการศึกษาของ Ruby doley (Doley & Barthakur, 2020) ที่ได้ศึกษาความสามารถของแบคทีเรียที่แยกได้จากกากตะกอนน้ำมันจากโรงกลั่นน้ำมันในประเทศอินเดีย ในการย่อยสลาย Naphthalene ที่ความเข้มข้น 20, 40, 60, 80 และ 100 mg/l พบว่า แบคทีเรียเจริญได้ดี ($CFU \times 10^6$) ในอาหาร MS medium ที่มี Naphthalene 60 mg/l เป็นแหล่งคาร์บอน และนำมาจำแนกแบคทีเรียด้วย 16s rDNA ซึ่งพบว่าเป็น *Bacillus cereus* RD6 (MH114968) นอกจากนี้ยังได้มีการวิเคราะห์ประสิทธิภาพในการย่อย Naphthalene โดยใช้เทคนิค GC-MS โดยการใช้ n-hexane ในการสกัด Naphthalene โดยพบ metabolite เช่น oxalic acid, dibutylphthalate, 1,2-benzenedicarboxylic acid, fumaric acid, 2-propenoic acid, phthalic acid, Benzoic acid และ Eicosane ซึ่งอาจจะเป็นเพราะแบคทีเรียสามารถใช้ Naphthalene เป็นแหล่งคาร์บอนได้จริง เนื่องจากในอาหาร Minimal medium มีสารอาหารในปริมาณน้อย เช่น แมกนีเซียม ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส และกำมะถัน จึงต้องมีการเพิ่มแหล่งคาร์บอนซึ่งก็คือ Naphthalene เพื่อให้แบคทีเรียใช้ในการเจริญเติบโต หรืออาจจะเกิดจากการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของ Naphthalene โดยการที่แบคทีเรียเข้าไปย่อยบริเวณวงแหวนอะโรมาติกของ Naphthalene จึงทำให้วงแหวนแตกออกจากกัน (Eckert-Maksić, 1999) หรือเกิดจาก Naphthalene ไปรบกวนการทำงานของลิพิดและโปรตีนบริเวณผนังเซลล์ ทำให้โครงสร้างของผนังเซลล์มีรูปร่างเปลี่ยนแปลงไป จึงทำให้ไม่สามารถควบคุมปริมาณสารเข้าออกได้ นอกจากนี้การทำให้แบคทีเรียมีประสิทธิภาพในการกำจัดสารพิษหรือลดความเป็นพิษของสารพิษในสิ่งแวดล้อม จึงอาจจะต้องมีการเติมสารอาหาร

บางอย่างเข้าไป เช่น การให้ออกซิเจน หรือการเติมสารลดแรงตึงผิว ซึ่งจะช่วยให้เพิ่มการละลายสารไฮโดรคาร์บอนลงในบริเวณที่ปนเปื้อนสารพิษต่างๆ จึงทำให้แบคทีเรียสามารถย่อยสลายได้ง่ายขึ้น (Bao et al., 1996) โดยวิธีนี้ช่วยกระตุ้นให้จุลินทรีย์ประจำถิ่นเจริญ และเพิ่มประสิทธิภาพในการย่อยสลายได้ดีขึ้น โดยสอดคล้องกับรายงานของ Cheung (Cheung & K, 2005) ซึ่งได้ศึกษาผลกระทบของสารอาหาร KNO_3 และ KH_2PO_4 และสารลดแรงตึงผิว TritonX-100 และ Tergitol NP-10 ต่อการย่อยสลายโพรตีนและ Mycobacterium ในดินที่มีการปนเปื้อน พบว่าในดินที่มีการเติมสารอาหารเกิดการย่อยโพรตีนได้เร็วกว่าในดินที่เติมสารลดแรงตึงผิวเล็กน้อยหรือมีการเติมกลุ่มของแบคทีเรียที่มากกว่า 2 ชนิดลงไป ในบริเวณที่มีการปนเปื้อนของสารนั้นๆ เพื่อส่งเสริมให้เกิดการย่อยสลายสารปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อม เช่นงานวิจัยของ Yu และคณะ (Yu et al., 2005) ได้เปรียบเทียบการย่อยสลาย PAHs ได้แก่ fluorene, phenanthrene และ pyrene จากตัวอย่างตะกอนดินป่าชายเลน โดย 2 วิธี คือ การบำบัดโดยธรรมชาติที่มีการเติมสารอาหาร และการเติมกลุ่มของจุลินทรีย์ลงไป พบว่าในการบำบัดโดยธรรมชาติ ภายใน 4 สัปดาห์ fluorene และ Phenanthrene ถูกย่อยสลายไปมากกว่า 99% แต่ pyrene ถูกย่อยสลายไปเพียง 30% เท่านั้น ในขณะที่การทดลองที่เติมสารอาหารลงไป พบว่า PAHs ทั้ง 3 ชนิด ถูกย่อยสลายไปมากกว่า 99% แสดงว่าการเติมสารอาหารช่วยส่งเสริมการย่อยสลาย pyrene ในขณะที่การเติมกลุ่มจุลินทรีย์สามารถย่อยสลาย PAHs ที่แยกได้มาจากตะกอนดินป่าชายเลน พบว่าผลที่ได้ไม่แตกต่างจากการบำบัดโดยธรรมชาติ ซึ่งน่าจะเกิดจากการแข่งขันกันระหว่างแบคทีเรียประจำถิ่น โดยในบริเวณดังกล่าวอาจไม่พบจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายสาร จึงจำเป็นต้องอาศัยกิจกรรมของจุลินทรีย์ต่างถิ่น (exogenous microorganism) เพื่อกระตุ้นให้เกิดกระบวนการย่อยสลาย (Watanabe, 2001) เช่นเดียวกับรายงานของ Hwang (Hwang & Cutright, 2002) ที่ได้ศึกษาการย่อยสลาย pyrene และ phenanthrene ทางชีวภาพที่มีการปนเปื้อนในแหล่งดินเป็นเวลานาน โดยวิธี biostimulation คือ การเติมสารอาหารที่จำเป็นลงไป ในดิน และ bioaugmentation คือ การเติมจุลินทรีย์ร่วมกับการเติมสารอาหาร พบว่าในการทดลองที่มีการเติมจุลินทรีย์นั้นการย่อยสลายมีประสิทธิภาพดีกว่าการเติมสารอาหารเพียงอย่างเดียว

การศึกษาความสัมพันธ์ทางจีโนมไทป์ของแบคทีเรียหน่อ Naphthalene ในระดับสูง ทั้ง 7 ไอโซเลตด้วยเทคนิค ERIC-PCR โดยได้ PCR product มีขนาดระหว่าง 100 bp ถึง 1000 bp และสามารถจำแนกจีโนมไทป์ได้ 6 ไทป์ แต่อย่างไรก็ตามเทคนิค ERIC-PCR ถึงแม้จะเป็นการศึกษาทางจีโนมไทป์ที่ง่ายและสะดวก แต่มีข้อเสียคือให้รูปแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่มีความคล้ายคลึงกัน ทำให้ความสามารถในการจำแนกต่ำ (Orasa et al., 1996) การศึกษาทางจีโนมไทป์ มีข้อจำกัด เช่น สภาพแวดล้อมที่ใช้เลี้ยงเชื้อส่งผลต่อการแสดงออกของยีน ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัย Madhu Singh และ Dileep Kumar Singh (Singh & Singh, 2014) ที่ได้ทำการศึกษาแบคทีเรียที่แยกได้จากดินในการ

ย่อย Endosulfan หรือ ปีนยาฆ่าแมลงกลุ่มออร์กาโนคลอรีน เป็นของแข็ง ไม่มีสี เป็นสารที่มีความเป็นพิษสูง สะสมในสิ่งมีชีวิตได้ดี โดยการเก็บตัวอย่างดินบริเวณพื้นที่ทำการเกษตรภายในมหาวิทยาลัยปัญจาบ (Punjab Agricultural University) ประเทศอินเดีย มาทำการเลี้ยงแบคทีเรียที่แยกได้ในอาหาร NSM 100 ml ที่ผสม Endosulfan 50 ppm (50 µg/ml) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 วัน จากนั้นนำแบคทีเรียที่สามารถย่อย Endosulfan มาทำการ BLAST กับฐานข้อมูลด้วยยีน 16S rDNA พบว่าเป็นเชื้อส่วนใหญ่ *Klebsiella* sp. จึงได้มีการนำมาทำ ERIC-PCR เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ทางจีโนมไทป์ของแบคทีเรียที่สามารถย่อย Endosulfan ซึ่งพบว่าแบคทีเรียที่มีการเจริญได้ดีที่สุดในอาหารที่ผสม Endosulfan คือ *Klebsiella* sp. M3 แต่ในการทำ ERIC-PCR มีประสิทธิภาพในการจัดกลุ่มเชื้อแบคทีเรียได้ต่ำ เนื่องจากจัดกลุ่มอาศัยความแตกต่างของรูปแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ความเหมือนร้อยละ 80 (เสริมิวิทยวงศ์, 2558) ดังนั้นหากต้องการนำมาประยุกต์ใช้ในการจัดกลุ่มเชื้อโดยอาศัยความแตกต่างของรูปแบบจำแนกสายพันธุ์ของเชื้ออาจจำเป็นต้องแปลผลร่วมกับวิธีอื่นๆ เช่น การทำ genotyping หรือการทำ PFGE (Pulsed field gel electrophoresis) ควบคู่กันไป

ก่อนที่จะมีการนำแบคทีเรียไปประยุกต์ใช้ในการบำบัดในสิ่งแวดล้อม จึงต้องมีการทดสอบการต่ออายุปฏิชีวนะ เนื่องจาก *klebsiella* sp. เป็นสาเหตุให้เกิดโรคปอดอักเสบ ส่งผลให้ผู้ที่ได้รับเชื้อเข้าไปมีไข้ ไอ เจ็บหน้าอก หายใจไม่ออก มีเสมหะหรือน้ำมูกที่อาจข้นและปนเลือดได้ และ *Enterobacter* sp. ก่อให้เกิดโรคติดเชื้อในระบบทางเดินปัสสาวะ และการติดเชื้อในกระแสเลือด จึงได้ทำการทดสอบกับยาทั้งหมด 6 กลุ่ม (9 ยา) พบว่าแบคทีเรียทั้ง 6 ไอโซเลต มีความไวต่อยาปฏิชีวนะ ยกเว้น N14 ที่ต่อยา Tetracycline ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัย Diego (Nobrega et al., 2021) ที่ได้ทำการศึกษาลักษณะทางโมเลกุลของการต่อยาต้านจุลชีพใน *Klebsiella* sp. ที่ก่อโรคปอดบวมที่แยกได้จากฝูงโคนมของบราซิล โดยทำการทดสอบกับยา 4 กลุ่ม ดังนี้ gentamicin, cephalosporins, sulfamethoxazole-trimethoprim และ tetracycline ซึ่งพบว่าเชื้อที่แยกได้ต่อยา Tetracycline 22.5% สาเหตุที่ต้องมีการทดสอบการต่อยาของเชื้อ เนื่องจากเพื่อความปลอดภัยก่อนการนำไปประยุกต์ใช้ในการบำบัดพลาสติกหรือโพลีไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน เพื่อป้องกันไม่ให้แบคทีเรียที่จะนำไปใช้ก่อโรคต่อคนและสัตว์ที่อยู่บริเวณโดยรอบได้

ถึงแม้ว่าในการศึกษาครั้งนี้จะสามารถแยกแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายและทนต่อ Naphthalene ได้ในระดับสูง แต่อย่างไรก็ตาม ในสิ่งแวดล้อมยังมีการปนเปื้อน PAHs ชนิดอื่นๆ เช่น Benzo- α -Pyrene (Alamo et al., 2019) ที่พบได้จากการสูบบุหรี่และมลพิษทางสิ่งแวดล้อม

เพราะฉะนั้นในการศึกษาในอนาคตอาจจะต้องศึกษาความสามารถในการย่อยสลายและทนทานต่อ pyrene ดังเช่นรายงานของ Khalida และ Abdu (Khalida and Abdu, 2019) ที่ได้ทำการผสม naphthalene (Nap), anthracene (Ant), phenanthrene (Phe), และ pyrene (Pyr) ในอัตราส่วน 1:1:1:1 ที่ความเข้มข้น 5, 10, 20, 30, 40, และ 50 µg/disc บ่ม 69 ชั่วโมง และพบว่า *Enterobacter ludwigii* เป็นแบคทีเรียสายพันธุ์เดียวที่สามารถทนต่อ PAHs ที่ความเข้มข้น 5000 µg/ml (50µg/disc) ที่ผสมกันในหลอดทดลอง

สรุปผลการทดลอง

จากการเก็บตัวอย่างดินบริเวณที่ทำการเกษตรจากจังหวัดอุดรธานีและพิษณุโลก ทั้งหมด 62 ตัวอย่างจึงนำมาคัดกรองความสามารถในการย่อย Naphthalene ที่ความเข้มข้น 200 µg/ml พบว่ามีแบคทีเรียที่แยกได้จากดินสามารถย่อย Naphthalene ได้ 36 ตัวอย่าง แต่ไม่สามารถย่อยพลาสติก PCL ได้ จากนั้นนำแบคทีเรียที่แยกได้มาศึกษาความเข้มข้นน้อยที่สุดของ Naphthalene ที่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย (MIC_{Nap}) พบว่าแบคทีเรียสามารถทนต่อ Naphthalene ที่ความเข้มข้นสูงสุด 6400 µg/ml จำนวน 14 ไอโซเลต จากนั้นนำมาทดสอบคุณสมบัติทางจุลชีววิทยา พบว่าเชื้อทั้ง 14 ไอโซเลตมีรูปร่างเป็นท่อน ย้อมติดสีแกรมลบ และมีผลทางชีวเคมีที่คล้ายกัน จึงทำการสุ่มเลือกแบคทีเรียจำนวน 7 ไอโซเลต มาระบุจีโนมด้วยยีน 16s rDNA ทำให้สามารถจัดจีโนมเป็น *Klebsiella* spp. และ *Enterobacter* spp. การศึกษาผลของความเข้มข้นของ Naphthalene (MIC_{Nap}) ต่อการอยู่รอดของเซลล์ พบว่าเชื้อทั้งหมดไม่สามารถทนต่อ ระดับความเข้มข้น MIC_{Nap} ได้ การศึกษาลักษณะทางจีโนมไทป์ด้วยเทคนิค ERIC-PCR สามารถจำแนกจีโนมไทป์ได้เป็น 6 ไทป์ และทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะ พบว่าเชื้อทั้งหมดไวต่อยาปฏิชีวนะทุกตัวที่ทดสอบ แต่มีเพียงไอโซเลตเดียวที่ดื้อต่อยา tetracycline

ข้อเสนอแนะ

ระหว่างที่ทำการเก็บตัวอย่างดิน ควรมีการจดบันทึกลักษณะของดิน ตรวจวัดค่า pH และความชื้นของดินแต่ละตัวอย่าง เนื่องจากระดับความลึกของดิน ค่า pH และค่าความชื้นอาจมีผลต่อปริมาณของจุลินทรีย์ รวมถึงการเก็บในฤดูการที่แตกต่างกัน ซึ่งอาจจะทำให้พบความหลากหลายของแบคทีเรียมากขึ้น ก่อนที่จะมีการนำแบคทีเรียที่แยกประยุกต์ใช้ในการย่อยพลาสติกและโพลีไคลคลอโรมาติกไฮโดรคาร์บอนชนิดอื่นๆ อาจจะต้องศึกษาลำดับเบสทั้งจีโนมเพื่อระบุยีนที่น่าจะเกี่ยวข้องกับการย่อยสลาย PAHs และใช้เทคนิค heterologous expression โดยการถ่ายกลุ่มยีนดังกล่าวไปใส่ในแบคทีเรียที่เป็น environmental friendly strains และศึกษาประสิทธิภาพและประยุกต์ใช้ในการบำบัดทางชีวภาพต่อไป



ภาคผนวก

มหาวิทยาลัยนครพนม

ภาคผนวก ก

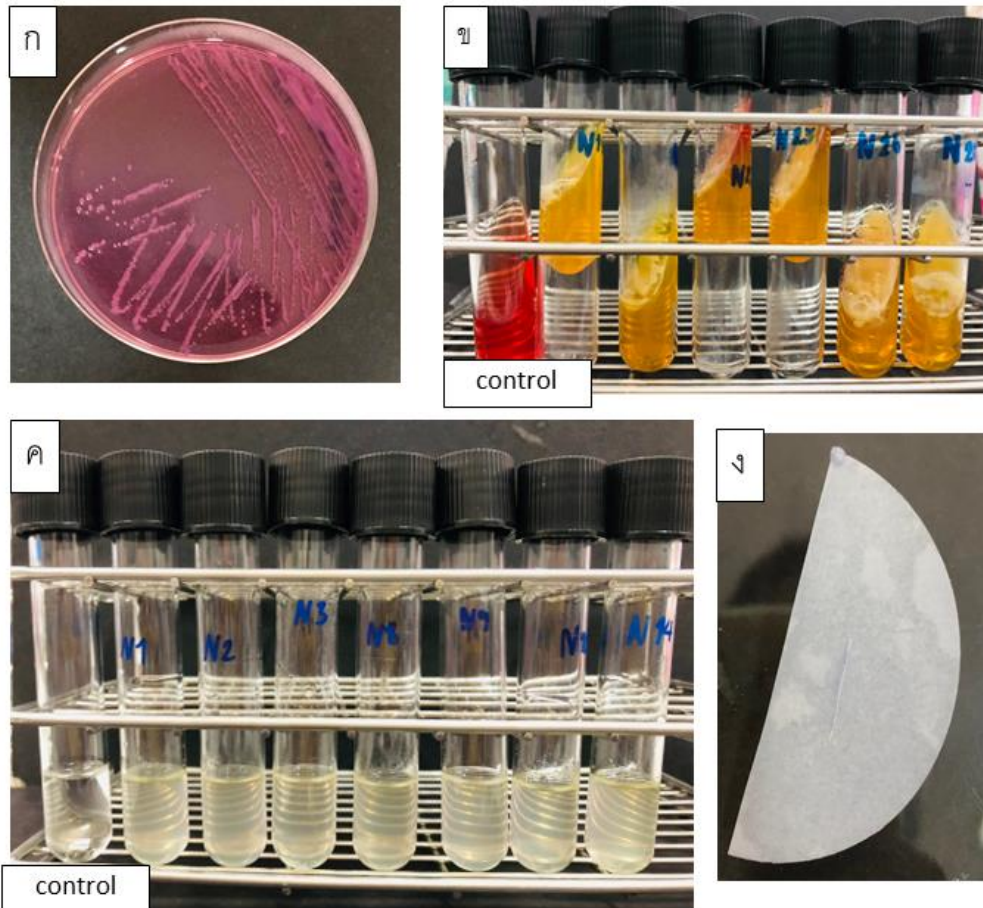
ตาราง 1 แสดงการเก็บบันทึกตัวอย่างดินทั้งหมด 62 ตัวอย่าง

ลำดับ ที่	รหัส ตัวอย่าง	พิกัด	แบคทีเรียสามารถ เจริญบนอาหาร 2% naphthalene	รหัส ไอโซ เลต	จังหวัด
1	1.1	17° 39'23"N 100° 34'06" E 5 กม.			พิษณุโลก
2	1.2	17° 39'23"N 100° 34'06" E 5 กม.	✓	N1	พิษณุโลก
3	1.3	17° 39'23"N 100°34'06" E 5 กม.			พิษณุโลก
4	2w	17° 47'32"N 100°21'02" E 639 ม.			พิษณุโลก
5	2.1	17° 47'32"N 100°21'02" E 632 ม.			พิษณุโลก
6	2.2	17° 47'32"N 100°21'02" E 451 ม.			พิษณุโลก
7	3.1	17°47'23"N 100° 19'39" E 594 ม.			พิษณุโลก
8	3.2	17 °47'23"N 100°19'39" E 594 ม.	✓	N2	พิษณุโลก
9	NUs2	16°44'53"N 100°11'27" E 543 ม.			พิษณุโลก
10	NUs4	16°44'38"N 100°11'30" E 543 ม.	✓	N3	พิษณุโลก
11	NUs5	16°44'36"N 100°11'23" E 543 ม.			พิษณุโลก
12	NUs7	16°44'17"N 100°11'40" E 543 ม.	✓	N4	พิษณุโลก
13	NUs8	16°43'58"N 100°11'36" E 543 ม.	✓	N5	พิษณุโลก
14	NUs9	16°43'58"N 100°11'36" E 621 ม.			พิษณุโลก
15	NUs10	16°44'10"N 100 °11'52" E 542 ม.			พิษณุโลก
16	NUs11	16° 44'11"N 100°11'52" E 542 ม.			พิษณุโลก
17	D1	16°45'41"N 100°11'57"E 546 ม.			พิษณุโลก
18	D2	16°46'36"N 100°11'58"E 547 ม.			พิษณุโลก
19	D4	16°44'37"N 100°12'58"E 546 ม.	✓	N6	พิษณุโลก
20	D5	16°45'11"N 100°11'28"E 543 ม.	✓	N7	พิษณุโลก
21	D6	16°45'12"N 100°11'27"E 543 ม.	✓	N8	พิษณุโลก
22	D7	16°44'56"N 100°12'00"E 544 ม.	✓	N9	พิษณุโลก
23	D8	16°44'56"N 100°12'00"E 544 ม.	✓	N10	พิษณุโลก

ลำดับ ที่	รหัส ตัวอย่าง	พิกัด	แบคทีเรียสามารถ เจริญบนอาหาร 2%Naphthalene	รหัส ไอโซ เลต	จังหวัด
24	D9	16°45'14"N 100°11'30"E 543 ม.	✓	N11	พิษณุโลก
25	D10	16°45'14"N 100°11'30"E 543 ม.			พิษณุโลก
26	1	16°45'07"N 100°11'29"E 544 ม.	✓	N25	พิษณุโลก
27	2	16°45'05"N 100°11'28"E 44.1 ม.	✓	N26	พิษณุโลก
28	3	16°45'08"N 100°11'32"E 42.7 ม.	✓	N27	พิษณุโลก
29	4	16°45'15"N 100°11'33"E 43.1 ม.	✓	N28	พิษณุโลก
30	5	16°45'15"N 100°11'32"E 43.1 ม.	✓	N29	พิษณุโลก
31	6	16°45'21"N 100°11'30"E 43.2 ม.	✓	N30	พิษณุโลก
32	7	16°45'28"N 100°11'26"E 43.3 ม.	✓	N31	พิษณุโลก
33	8	16°45'35"N 100°11'25"E 44.6 ม.	✓	N32	พิษณุโลก
34	9	16°45'44"N 100°11'29"E 44.1 ม.	✓	N33	พิษณุโลก
35	10	16°44'49"N 100°11'10"E 42.7 ม.	✓	N34	พิษณุโลก
36	11	16°44'49"N 100°11'10"E 50.5 ม.	✓	N35	พิษณุโลก
37	12	16°44'49"N 100°11'10"E 70.2 ม.	✓	N36	พิษณุโลก
38	UT1	17°38'15"N 100°06'26"E 568 ม.			อุตรดิตถ์
39	UT2	17°38'16"N 100°06'23"E 568 ม.			อุตรดิตถ์
40	UT3	17°38'18"N 100°06'22"E 2 ม.			อุตรดิตถ์
41	UT4	17°38'22"N 100°06'21"E 568 ม.			อุตรดิตถ์
42	T1	17°42'21"N 100°19'40"E 591 ม.	✓	N12	อุตรดิตถ์
43	T2	17°42'21"N 100°19'40"E 1 กม.	✓	N13	อุตรดิตถ์
44	T3	17°47'25"N 100°21'00"E 634 ม.	✓	N14	อุตรดิตถ์
45	T4	17°47'25"N 100°21'01"E 910 ม.	✓	N15	อุตรดิตถ์
46	T5	17°42'25"N 100°21'01"E 270 ม.	✓	N16	อุตรดิตถ์
47	T6	17°42'25"N 100°21'01"E 3 กม.	✓	N17	อุตรดิตถ์
48	T7	17°42'25"N 100°21'01"E 634 ม.			อุตรดิตถ์

ลำดับ ที่	รหัส ตัวอย่าง	พิกัด	แบคทีเรียสามารถ เจริญบนอาหาร 2%Naphthalene	รหัส ไอโซ เลต	จังหวัด
50	T9	17°47'32"N 100°21'02"E 784 ม.			อุตรดิตถ์
51	T10	17°42'17"N 100°19'38"E 587 ม.			อุตรดิตถ์
52	T11	17°42'17"N 100°19'38"E 624 ม.			อุตรดิตถ์
53	T12	17°42'17"N 100°19'38"E 587 ม.	✓	N24	อุตรดิตถ์
54	B1	16°46'18"N 100°11'06"E 2 กม.	✓	N18	พิษณุโลก
55	B2	16°46'58"N 100°15'45"E 546ม.	✓	N19	พิษณุโลก
56	B3	16°46'58"N 100°15'45"E 428ม.	✓	N20	พิษณุโลก
5	B4	16°46'58"N 100°12'45"E 446ม.	✓	N21	พิษณุโลก
58	LB1	17°39'05"N 100°02'26"E 586ม.	✓	N22	อุตรดิตถ์
59	LB2	17°39'05"N 100°02'26"E 596ม.	✓	N23	อุตรดิตถ์
60	LB3	17°39'05"N 100°02'26"E 874			อุตรดิตถ์
61	Tr1	17°29'43"N 100°06'48"E 561 ม.			อุตรดิตถ์

ภาคผนวก ข



ภาพ 1 การทดสอบปฏิกิริยาทางชีวเคมี (Biochemical test)

- (ก) ตัวอย่างงานอาหารเลี้ยงเชื้อจากการทดสอบ Lactose fermentation บนอาหาร Mac Conkey agar
- (ข) การทดสอบ Triple Sugar Iron (TSI) test
- (ค) การทดสอบ Indole test
- (ง) การทดสอบ Oxidase test

หมายเหตุ: control - หลอดที่ใช้ในการเปรียบเทียบ

ภาคผนวก ค

อาหารเลี้ยงเชื้อ

1. การเตรียมอาหาร Minimal agar medium (M9) ปริมาตร 1000 ml

NH_2NO_3	6	g
KH_2PO_4	10	g
NaCl	2	g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.4	g
Tween 20	0.4	g
Agar	30	g
เติมน้ำกลั่น	1000	ml

ก่อนนำไปฆ่าเชื้อโดยใช้หม้อนึ่งความดันไอ อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที และทำการเทอาหารลงจานอาหารเลี้ยงเชื้อ

2. การเตรียมอาหาร 2% Naphthalene Agar 1000 ml

NH_2NO_3	6	g
KH_2PO_4	10	g
NaCl	2	g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.4	g
Tween 20	0.4	g
Agar	30	g
Naphthalene	2	g
Acetone 99%	5	ml
เติมน้ำกลั่น	1000	ml

ละลาย Naphthalene ใน Acetone ก่อนนำไปผสมกับอาหาร minimal medium จากนั้นนำไปฆ่าเชื้อโดยใช้หม้อนึ่งความดันไอ อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที และทำการเทอาหารลงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ

3. การเตรียมอาหาร PCL agar

ชั่ง Polycaprolactone (PCL) pellet 2 g

ละลายใน acetone 99% นำไปต้มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส คนจนกว่า PCL ละลายจนหมด

จากนั้นเติมอาหาร TSB 15 g

ผงวุ้น 5 g

ก่อนนำไปฆ่าเชื้อโดยใช้หม้อนึ่งความดันไอบุญ อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที และทำการเทลงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ

4. การเตรียมอาหาร LB (Lysogeny) Broth ปริมาตร 300 ml

ชั่งอาหาร LB 7.5 g

เติมน้ำกลั่น 300 ml

ก่อนนำไปฆ่าเชื้อโดยใช้หม้อนึ่งความดันไอบุญ อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที และทำการเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

5. การเตรียมอาหาร TSB (Tryptone Soya Broth) ปริมาตร 300 ml

ชั่งอาหาร TSB 9 g

เติมน้ำกลั่น 300 ml

นำไปฆ่าเชื้อโดยใช้หม้อนึ่งความดันไอบุญ อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที และทำการเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

6. การเตรียมอาหาร TSA (Tryptone Soy) Agar ปริมาตร 300 ml

ชั่งอาหาร TSB 9 g

เติมน้ำกลั่น 300 ml

เติม Agar 4.5 g

ก่อนนำไปฆ่าเชื้อโดยใช้หม้อนึ่งความดันไอบุญ อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที และทำการเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

7. เตรียม glycerol 60% TSB ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

ชั่งอาหาร TSB 3 g

เติม glycerol 60% 60 ml

ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น 40 ml

ละลายส่วนผสมต่างๆให้เข้ากัน จากนั้นนำไปต้มและแบ่งใส่หลอด 5 มิลลิลิตร ก่อนนำไปฆ่าเชื้อโดยใช้หม้อนึ่งความดันไอลูณภูมิ 121 องศาเซลเซียส ที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที และทำการเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

8. เตรียมอาหาร MacConkey agar ปริมาตร 300 ml

ชั่งอาหาร MacConkey agar	12.009	g
เติมน้ำ	300	ml

ไปฆ่าเชื้อโดยใช้หม้อนึ่งความดันไอลูณภูมิ 121 องศาเซลเซียส ที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที และทำการเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

9. เตรียมอาหาร Nutrient Agar

ชั่งอาหาร Nutrient broth	8	g
Agar	15	g
Water	1,000	ml

นำไปฆ่าเชื้อโดยใช้หม้อนึ่งความดันไอลูณภูมิ 121 องศาเซลเซียส ที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที และทำการเทลงจานอาหารเลี้ยงเชื้อ

สารเคมี

1. การเตรียม 0.85% NaCl ปริมาตร 100 ml

ชั่ง NaCl	0.85	g
เติมน้ำกลั่น	100	ml

ก่อนนำไปฆ่าเชื้อโดยใช้หม้อนึ่งความดันไอลูณภูมิ 121 องศาเซลเซียส ที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที และทำการเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

2. การเตรียม 5x TBE buffer (450 mM Tris-borate, 10 mM EDTA) ปริมาตร 1 L

Tris base	54	g
Boric acid	27.5	g
0.5 M EDTA (pH 8.0)	20	ml

ละลายส่วนผสมต่างๆทั้งหมดเข้าด้วยกัน จากนั้นทำการปรับปริมาตร 1 L จากนั้นทำการเจือจางด้วยน้ำกลั่นให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 0.5X สำหรับนำไปใช้ในการเตรียม agarose gel และการทำ agarose gel electrophoresis และทำการเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

3. การเตรียม 0.5 M EDTA-H₂O ปริมาตร 100 ml

ละลาย disodium EDTA-H₂O ปริมาตร 18.16 กรัม ในน้ำกลั่น 80 ml ก่อนนำไปปรับ pH โดยใช้ 3 M NaOH จนได้ pH 8.0 จากนั้นนำมาปรับปริมาตรให้ได้ 100 ml นำไปฆ่าเชื้อโดยใช้หม้อนึ่ง ความดันไอ อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที และทำการเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

4. การเตรียม Agarose Gel

ชั่ง agarose	25	g
เติม 0.5x TBE buffer	25	ml

ให้ความร้อนใน microwave oven จน agarose ละลายหมด จากนั้นปล่อยให้ agarose gel เย็นลง จนมีอุณหภูมิประมาณ 60 องศาเซลเซียส เติม ethidium bromide 1-2 µl เท agarose gel ลงใน gel tray ปล่อยให้ agarose gel แข็งตัวที่อุณหภูมิห้อง

สารเคมีสำหรับการทดสอบปฏิกิริยาทางชีวเคมี (Biochemical test)

1. สารละลาย Kovac's oxidase test ปริมาตร 150 ml

Tetramethyl-p-phenylenediamine hydrochloride	15	g
L-Ascorbic acid	0.15	g
น้ำกลั่น	150	ml

ละลายสารทั้งหมดให้เข้ากันและเก็บไว้ในขวดสีชา

2. Triple Sugar Iron Agar (TSI) ปริมาตร 1000 ml

ชั่ง Triple sugar Iron Agar	59	g
น้ำกลั่น	1000	ml

ละลายส่วนผสมให้เข้ากัน นำไปต้มจนวุ้นละลายและแบ่งใส่หลอดละ 3 ml ก่อนนำไปฆ่าเชื้อโดยใช้หม้อนึ่งความดันไอ อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที และวางให้เย็นประมาณ 45 องศา จนวุ้นแข็งและเก็บไว้ในตู้เย็น

3. สารละลาย Oxidase test ปริมาตร 200 มิลลิลิตร

ชั่งสาร 1% Tetramethyl-p-phenylene-p-phenylenediamine hydrochloride 2 g ละลายในน้ำกลั่น 200 ml แบ่งใส่ขวดสีชาเก็บในตู้เย็น

บรรณานุกรม



บรรณานุกรม

- กรมควบคุมมลพิษ. (2563). <https://www.pcd.go.th/>
- กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์. (2560). คู่มือมาตรฐานห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยาทางการแพทย์และสาธารณสุข
- กรุงเทพธุรกิจ. (2562). ขยะพลาสติก ปัญหาระดับโลก.
<https://www.bangkokbiznews.com/news/detail/820466>.
- กวลัยพร มุขสุวรรณ. (2008). รหัสชนิดพลาสติก. หน่วยข้อเสนอสิ่งแวดล้อมอันตรายและความปลอดภัย ศูนย์ความเป็นเลิศแห่งชาติด้านการจัดการสิ่งแวดล้อมและของเสียอันตราย.
<http://www.chemtrack.org/News-Detail.asp?TID=4&ID=18>
- การทดสอบทางชีวเคมี. (มปป.)
https://kb.psu.ac.th/psukb/bitstream/2553/2842/7/272617_ch2.pdf
- กิตติมา วัฒนากมลกุล. (2563). ผลกระทบพลาสติกกับอาหาร.
- เกศินี จีร์วัฒนกุล. (2558). การใช้ดีเอ็นเอบริเวณยีน 16S-23S rRNA Intergenic Spacer Region (ISR) ในการจำแนก สายพันธุ์ของเชื้อ *Acinetobacter baumannii*.
- ชนิษฐา สมตระกูล และ วราภรณ์ ฉุยฉาย. (2013). ความเป็นไปได้ของการฟื้นฟูสภาพดินที่มีการปนเปื้อนร่วมกันระหว่าง โลหะหนักกับสารประกอบ โพลีไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนด้วยพืช. Rajabhat Maha Sarakham University Journal, 7(1), 187-194.
- จันทิรา วงศ์เนตร และ ฉลอง วชิราภากร. (2557). การใช้ functional gene ในการศึกษาประชากรของแบคทีเรียกลุ่มย่อย สลายเยื่อใยในกระเพาะรูเมนของสัตว์เคี้ยวเอื้อง. แก่นเกษตร, 42(1), 105-118.
- ชมพูนุท พรหมภักดี. (2563). สถานการณ์ขยะพลาสติกของกรุงเทพมหานครในปัจจุบัน.
<https://www.senate.go.th/docu>
- ชุดิมา วิไลพันธุ์. (2542). การศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเก็บเชื้อจุลินทรีย์. กลุ่มงานจุลชีววิทยา. กรมวิทยาศาสตร์บริการ.
- ณิชา บุรณสิงห์. (2558). ขยะพลาสติก: ภัยใกล้ตัว. สำนักงานเลขาธิการสภาผู้แทนราษฎร. สืบค้นจาก https://library2.parliament.go.th/ejournal/content_af/2559/feb2559-7.pdf พลาสติก.
- ทิพย์ธิดา อัคระประสา, อรปรียา เวียงอินทร และ ยศฐา ศรีเทพ. (2563). อิเล็กโตรสปินนิงของวัสดุผสมพอลิคาโพรแลคโตนและพอลิแลคไทด์ : สมบัติทางความร้อนทางกลและการย่อยสลาย. วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี ปีที่ 22, 2.

- ธิวารี โอภิชากร และ คัมภีร์ พ่วงสมทอง. (2022). การ ประเมิน ความ เสี่ยง ต่อ สุขภาพ ของ สาร ทา เลต ใน ของเล่น สำหรับ เด็ก: Health Risk Assessment of Phthalates in Children's Toys. วารสาร วิทยาศาสตร์ บูรพา, 26(1), 545-560.
- ธารา บัวคำศรี. (2563). ความทำทหายและวิกฤตมลพิษพลาสติกของประเทศไทย. <https://www.greenpeace.org/thailand/story/18232/plastic-challenge-to-combat-plastic-pollution-in-thailand/>.
- นริศรา สุวรรณ. (มปป.). การทดสอบคุณสมบัติทางสัณฐานวิทยาและชีวเคมีของแบคทีเรียปฏิปักษ์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ .
- นารีรัตน์ เจริญช่าง. (2546). การใช้วัสดุจากการเกษตรเร่งการย่อยสลายสารพอลิไซคลิกอะโรมาติก ไฮโดรคาร์บอนโดยจุลินทรีย์ในดิน. 28(1). วิทยาลัยวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- บรรเลง ศรีนิล. (2544). เทคโนโลยีพลาสติก. มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี. 14(1).
- บุคคพ บัณฑิต,วันเชิญ โปธาเจริญ, ผังสินธุ์ ขวัญจิต ควรรตี และ ลาวลย์ ชदानนท์. การใช้เทคนิคอย่างง่ายในการเก็บรักษาจุลินทรีย์.
- เบญจภรณ์ ประภักดี, และ จิรวีรุ้ แสงทอง. (2559). แนวทางการฟื้นฟูพื้นที่ปนเปื้อนแคดเมียมด้วยวิธีที่เป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม. 20(1).
- ปิ่นสุภา ปีติรักษสกุล. (2546). พอลิเมอร์เบื้องต้น. (1).
- พรทิพย์ พึ่งม่วง และ พจมาน ผู้มีสัตย์. (2557). การจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อ *Vibrio parahaemolyticus* โดยวิธีการศึกษาทางพีโนไทป์และจีโนไทป์. วารสารมหาวิทยาลัย ศรีนครินทรวิโรฒ (สาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี), 11.
- ภรณ์ แก้วราม. (2556). การศึกษาความหลากหลายของแบคทีเรียชอบร้อนสูงใน Order Thermotogales ที่แยกได้จาก นำพุร้อนในประเทศไทยโดยวิธีการเพาะเลี้ยงและรอยพิมพ์ นิ้วมือที่อาร์เอ็นเอสร้างจากเทคนิค Arbitrarily Primed PCR มหาวิทยาลัยศิลปากร.
- มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าพระนครเหนือ. (2015). พอลิคาโพรแลคโตน (Polycaprolactone).
- เบญจภรณ์ ประภักดี และ จิรวีรุ้ แสงทอง. (2559). แนวทางการฟื้นฟูพื้นที่ปนเปื้อนแคดเมียมด้วยวิธีที่เป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม. 20(1).
- ยศฐา ศรีเทพ, (2563). อิเล็กโตรสปินนิงของวัสดุผสมพอลิคาโพรแลคโตนและพอลิแลคไทด์ : สมบัติทางความร้อน ทางกล และการย่อยสลาย. วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัย อุบลราชธานี ปีที่ 22, 2.
- ระบบงานวัตถุอันตราย. (2549). กลุ่มควบคุมวัตถุอันตราย.

- เรณูภา ภูอาลัย. (2562). การศึกษาลักษณะทางอนุชีววิทยาของเอนไซม์แลคเคสในเชื้อ *Acinetobacter* spp. ที่แยกได้จากสิ่งแฉดล้อม.
- วราภรณ์ จันทาสี, ชาญวิทย์ โฆษิตานนท์ และ ธนาวดี ลีจากภัย. (2553). การย่อยสลายพลาสติกชนิด Polybutylene succinate (PBS) ในอาหารเหลวด้วยแบคทีเรียที่คัดแยกจากหลุมฝังกลบขยะ https://kukrdb.lib.ku.ac.th/proceedings/kucon/search_detail/result/315277
- วัลย์พร मुखสุวรรณ. (2008). รหัสชนิดพลาสติก. ศูนย์ความเป็นเลิศแห่งชาติด้านการจัดการสิ่งแฉดล้อมและของเสียอันตราย.
- วาริรัตน์ เลิศนที, เยาวเรศ อุปมายันต์, ออรัศ คงพานิช, พิชญญา เอี่ยมสำอางค์, กิรณา รุณภัย และ วีรญา ปัญญาประพากร. (2564). ความปลอดภัยด้านเคมีวัตถุ. 26(2). <http://fdathaiteci.fda.moph.go.th/IndexFiles/document/>
- วีระพงศ์ ปรัชชญาสิทธิกุล, รัตนา ลาวัง และ วิภา น้อยท่าช้าง. (2563). สถานการณ์เชื้อ *Klebsiella pneumoniae* ตื้อยากกลุ่ม Carbapenem ในโรงพยาบาลอุตรดิตถ์. วารสารสถาบันบำราศนราดูร 2563, 14(1), 1-9.
- ศุสิทธิ์ แสงกระจ่าง และคณะ. (2556). ผลกระทบของพลาสติกต่อสุขภาพและสิ่งแฉดล้อม. 28(1). ศูนย์วิจัยและตรวจสอบคุณภาพสัตว์น้ำและผลิตภัณฑ์สัตว์น้ำสงขลา. (มปป.). การปนเปื้อน Polycyclic Aromatic Hydrocarbon (PAHs) ในผลิตภัณฑ์สัตว์น้ำ. <https://www4.fisheries.go.th/local/index.php/main/welcome/rgm-songkhla>
- สถาบันอาหารกระทรวงอุตสาหกรรม. <https://www.nfi.or.th/home.php>
- สถานีพัฒนาที่ดินจังหวัดอุตรดิตถ์. (มปป.). http://r08.ldd.go.th/web_utt/soil_group/soil_utt.html
- สมคิด ดีจริง, รัฐพร จันทร์เดช และพีรภานต์ บรรเจิดกิจ. (2551). การแยกและคัดเลือกรจุลินทรีย์ย่อยสลายน้ำมัน.
- สมจิตต์ ตั้งชัยวัฒนา. (2558). ชนิดของพลาสติก. <https://www.dss.go.th/images/st-article/pep-2-2558-Thermoplastic.pdf>.
- สมาคมพัฒนาคุณภาพสิ่งแวดล้อม. (2559). ZERO WASTE ขยะเหลือศูนย์เป็นจริงได้ไม่ใช่แค่ฝัน. <https://adeq.or.th/>
- สำนักงานกองทุนการสร้างเสริมสุขภาพ (สสส.), (2554). จับตาทิศทางสุขภาพคนไทย. <https://www.thaihealth.or.th/e-book>.
- สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา. (2549). แนพทาลีน (Naphthalene). ระบบงานวัตถุอันตราย.
- สำนักงานวิจัยและพัฒนาที่ดินเขต 2. (มปป.). <https://www.doa.go.th/oard2/>

- สุพัฒน์ หวังวงศ์วัฒนา, วิจารย์ สิมาฉายา, รังสรรค์ ปิ่นทอง, สุเมธา วิเชียรเพชร, อาภาภรณ์ ศิริพร ประสาร, ลักษณ์มี ไตเตอร์, สารินี จันทพรประภา และ ชัยพร นพกิตติลาภ. (2553). คู่มือ แนวทางการจัดการพื้นที่ปนเปื้อนสารอันตราย. (1). <https://www.pcd.go.th/>
- สุภางค์ จุฬาลักษณ์านุกูล และ ชมภูษุช วิรุณานนท์. (มปป.). การย่อยสลายทางชีวภาพสารโพลีอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนด้วยแบคทีเรียดีไนทริไฟเออร์ Biodegradation of Polyaromatic Hydrocarbons by Denitrifying Bacteria.
- เสาทฤท นิตยวรรณนะ. (มปป.). การศึกษากระบวนการย่อยสลายผลิตภัณฑ์พลาสติกชีวภาพชนิดกรดพอลิแลกติกด้วยกลุ่มจุลินทรีย์.
- อนันตญา แสนสวัสดิ์ทอง และ นิภา พรก้าน. (2022). การย่อยสลายทางชีวภาพของน้ำมันหล่อลื่น ใช้แล้วด้วยแบคทีเรียที่แยกได้จากชายฝั่งทะเลภาคตะวันออกของประเทศไทย. วารสาร วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยมหาสารคาม, 41(5), 257-266.
- อนุช เหนือคลอง และ ดนัย ทิพย์มณี. (2561). การประเมินการปนเปื้อนและการจำแนกแหล่งกำเนิดของสารโพลีไซคลิก อะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน ในอ่าวไทยตอนในฝั่งตะวันออก มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์. วิชาเทคโนโลยีและการจัดการสิ่งแวดล้อม.
- อรัศ คงพานิช, วารินทร์ เลิศนที, กิรณา รุณภัย, เยาวเรศ อุปมายันต์ , พิชญ์ เอี่ยมสำอางค์ และ วีรญา ปัญญาประพากร. (2554). ความปลอดภัยด้านเคมีวัตถุ. 2.
- อาทิตยา จิตจำนง. (2016). สารก่อมะเร็งในโรงงานอุตสาหกรรม. Eau heritage journal Science and Technology, 10(2).
- Abdel-Shafy, H. I., & Mansour, M. S. (2016). A review on polycyclic aromatic hydrocarbons: source, environmental impact, effect on human health and remediation. Egyptian journal of petroleum, 25(1), 107-123.
- Abirami, G., Srimathi, M., Suganthi, M., Ramprasath, C., & Manjunathan, J. (2021). Plastic Degrading Ability Of Laccase Enzyme Isolated From Garbage Dumping Sites Of Chennai. Poll Res, 40(1), 199-202.
- Akan, O. D., Udofia, G. E., Okeke, E. S., Mgbachidinma, C. L., Okoye, C. O., Zoclanclounon, Y. A. B., Atakpa, E. O., & Adebajo, O. O. (2021). Plastic waste: Status, degradation, and microbial management options for Africa. *Journal of Environmental Management*, 292, 112758.
- Alamo, A., Condorelli, R. A., Mongioi, L. M., Cannarella, R., Giacone, F., Calabrese, V.,

- La Vignera, S., & Calogero, A. E. (2019). Environment and male fertility: Effects of benzo-**a**-pyrene and resveratrol on human sperm function in vitro. *Journal of clinical medicine*, 8(4), 561.
- Alves, R. (2020). *Integrating metatranscriptomes and metagenomes for deconvolution of composition and expression in human gut and artificial communities*.
- Anokhina, T., Kochetkov, V., Zelenkova, N., Balakshina, V., & Boronin, A. (2004). Biodegradation of phenanthrene by *Pseudomonas* bacteria bearing rhizospheric plasmids in model plant-microbial associations. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 40, 568-572.
- Atanasova, N., Paunova-Krasteva, T., Stoitsova, S., Radchenkova, N., Boyadzhieva, I., Petrov, K., & Kambourova, M. (2021). Degradation of poly (ϵ -caprolactone) by a thermophilic community and *Brevibacillus thermoruber* strain 7 Isolated from Bulgarian hot spring. *Biomolecules*, 11(10), 1488.
- ATSDR, (1995). Toxicological profile for polycyclic aromatic hydrocarbon. Atlanta GA.
- Awasthi, M., Jaiswal, N., Singh, S., Pandey, V. P., & Dwivedi, U. N. (2015). Molecular docking and dynamics simulation analyses unraveling the differential enzymatic catalysis by plant and fungal laccases with respect to lignin biosynthesis and degradation. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 33(9), 1835-1849.
- Bao, X., Muhler, M., Schedel-Niedrig, T., & Schlögl, R. (1996). Interaction of oxygen with silver at high temperature and atmospheric pressure: A spectroscopic and structural analysis of a strongly bound surface species. *Physical Review B*, 54(3), 2249.
- Chauhan, P. S., Goradia, B. and Saxena, A. (2017). Bacterial laccase: recent update on production, properties and industrial application. *3 Biotech*, 7(5), 1-20.
- Chen, Q., Wang, F., Yang, H., Wang, X., Zhang, A., Ling, X., Huang, L. (2021). Exposure

to fine particulate matter-bound polycyclic aromatic hydrocarbons, male semen quality, and reproductive hormones: the MARCHS study.

Environmental Pollution, 280, 116883.

Chen, Y., Dumont, M. G., Cébron, A., & Murrell, J. C. (2007). Identification of active methanotrophs in a landfill cover soil through detection of expression of 16S rRNA and functional genes. *Environmental Microbiology*, 9(11), 2855-2869.

Cheung, P.-Y., & K, K. a. B. (2005). Effects of nutrients and surfactants on pyrene mineralization and Mycobacterium spp. populations in contaminated soil. *Soil Biology and Biochemistry*, 37(7), 1401-1405.

Kruatrachue. (2009). Plant -Enhanced Phenanthrene and Pyrene Biodegradation in Acidic Soil. *Journal of Environmental Biology*, 30(1), 139-144.

Christensen, E. R., and Arora, S. (2007). Source apportionment of PAHs in sediments using factor analysis by time records: application to Lake Michigan, USA. *Water Res.* 41(1), 168-176.

CLSI. (2020). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing (Vol. 40).

Couto, S. R., & Herrera, J. L. T. (2006). Industrial and biotechnological applications of laccases: a review. *Biotechnology Advances*, 24(5), 500-513.

Cruz, D., Cisneros, R., Benítez, Á., Zúñiga-Sarango, W., Peña, J., Fernández, H., & Jaramillo, A. (2021). Gram-Negative Bacteria from Organic and Conventional Agriculture in the Hydrographic Basin of Loja: Quality or Pathogen Reservoir *Agronomy*, 11(11), 2362.

Curtosi, Antonio, Pelletier, Emilien, Vodopivec, Cristian, & Walter, M. C. a. (2009). Distribution of PAHs in the water column, sediments and biota of Potter Cove, South Shetland Islands, Antarctica. *Antarctic Science*, 21(4), 329-339.

Doley, R., & Barthakur, M. (2020). Microbial Degradation of Naphthalene through Bacillus cereus RD6 isolation from refinery oil sludge. *Pollution Research*, 39, 166-172.

Garcia, T., Solsona, B., & Taylor, S. H. (2005). Nano-crystalline ceria catalysts for the

- abatement of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Catalysis Letters*, 105(3), 183-189.
- Genualdi, S. A., Killin, R.K., Woods, J., Schmedding, D., and Simonich, S.L.M. (2009). Trans-pacific and regional atmospheric transport of polycyclic aromatic hydrocarbons and pesticides in biomass burning emission to western North America. *Environ Sci Technol*, 43(4), 1061-1066.
- Gocht, T., Moldenhauer, K.M. and Puttmann, W. (2001). Historical record of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and heavy metals in floodplain sediment from the Rhine River (Hessisches Ried, Germany). *Appl. Geochem*, 16, 1707-17821.
- Harayama, S. (1997). Polycyclic aromatic hydrocarbon bioremediation design. *Current Opinion in Biotechnology*, 8(3), 268-273.
- Hassanshahian, M., & Boroujeni, N. A. (2016). Enrichment and identification of naphthalene-degrading bacteria from the Persian Gulf. *Marine Pollution Bulletin*, 107(1), 59-65.
- Hadibarata, T., & Yuniarto, A. (2020). Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by high-laccase basidiomycetes fungi isolated from tropical forest of Borneo. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 28, 101717.
- Heo, S. J., Kim, A.-J., Park, M.-J., Kang, K., & Soung, D. Y. (2020). Nutritional and functional properties of fermented mixed grains by solid-state fermentation with *Bacillus amyloliquefaciens* 245. *Foods*, 9(11), 1693.
- Herngren, L., Goonetilleke, A., Ayoko, G. A., & Mostert, M. M. (2010). Distribution of polycyclic aromatic hydrocarbons in urban stormwater in Queensland, Australia. *Environmental Pollution*, 158(9), 2848-2856.
- Hong, W. J., Jia, H. L., Li, Y. F., Sun, Y.Q., Liu, X. J., and Wang, L. (2016). Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and alkylated PHAs in the coastal seawater, surface sediment and oyster from Dalian, Northeast China. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 128, 11-20
- Huang, X.-D., El-Alawi, Y., Penrose, D. M., Glick, B. R., & Greenberg, B. M. (2004). A

- multi-process phytoremediation system for removal of polycyclic aromatic hydrocarbons from contaminated soils. *Environmental Pollution*, 130(3), 465-476.
- Ingavale, R., & Raut, P. (2018). Comparative biodegradation studies of LDPE and HDPE using *Bacillus weihenstephanensis* isolated from garbage soil. *Nature Environment and Pollution Technology*, 17(2), 649-655.
- Kanaly, R. A., & Harayama, S. (2000). Biodegradation of high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons by bacteria. *Journal of Bacteriology*, 182(8), 2059-2067.
- Khatoon, K., & Malik, A. (2019). Screening of polycyclic aromatic hydrocarbon degrading bacterial isolates from oil refinery wastewater and detection of conjugative plasmids in polycyclic aromatic hydrocarbon tolerant and multi-metal resistant bacteria. *Heliyon*, 5(10).
- Kim, E., & Zylstra, G. (1999). Functional analysis of genes involved in biphenyl, naphthalene, phenanthrene, and m-xylene degradation by *Sphingomonas yanoikuyae* B1. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 23(4), 294-302.
- Knoll, Michael, Hamm, M, T., Wagner, Florian, Martinez, Virginia, & Jürgen, P. a. (2009). The PHA depolymerase engineering database: a systematic analysis tool for the diverse family of polyhydroxyalkanoate (PHA) depolymerases. *BMC Bioinformatics*, 10, 1-8.
- Kumari, M., Ghosh, P., & Thakur, I. S. (2020). Evaluation of a biosurfactant producing bacterial strain *Pseudomonas* sp. ISTPY2 for efficient pyrene degradation and landfill soil bioremediation through soil microcosm and proteomic studies. *Bioresource Technology Reports*, 12, 100607.
- Li, D. K., Zhou, Z., Miao, M., He, Y., Qing, D., Wu, T., Wang, J., Weng, X., Ferber, J., & Herrinton, L. J. (2010). Relationship between urine bisphenol-A level and declining male sexual function. *Journal of Andrology*, 31(5), 500-506.

- Li, L., Lin, X., Bao, J., Xia, H., & Li, F. (2022). Two Extracellular Poly (ϵ -caprolactone)-Degrading Enzymes From *Pseudomonas hydrolytica* sp. DSWY01T: Purification, Characterization, and Gene Analysis. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 405.
- Lin, J.-H., Zhang, K.-C., Tao, W.-Y., Wang, D., & Li, S. (2019). *Geobacillus* strains that have potential value in microbial enhanced oil recovery. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 103, 8339-8350.
- Litchfield, M. (2020). Molecular imaging of cyclooxygenase-2 (COX-2) and autotaxin (ATX) in cancer using positron emission tomography (PET).
- Liu, Wang, Wei, & Guan, a. Z. (2012). Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in continental shelf sediment of China: implications for anthropogenic influences on coastal marine environment. *Environ Sci Technol*, 167, 155-162.
- Maia, J., Cruz, J., Sendón, R., Bustos, J., Sanchez, J., & Paseiro, P. (2009). Effect of detergents in the release of bisphenol A from polycarbonate baby bottles. *Food Research International*, 42(10), 1410-1414.
- Madhavi V.(2009). Laccase: properties and application. *Bioresources*, 4(4), 1694-1717.
- McCracken, A. J. D. a. C. M. (2003). Microbial degradation of high and low molecular weight polyaromatic hydrocarbons in a two-phase partitioning bioreactor by two strains of *Sphingomonas* sp.
- Mueller, J. G., Cerniglia, C. E., & Pritchard, P. H. (1996). Bioremediation of environments contaminated by polycyclic aromatic hydrocarbons. *Biotechnology Research Series*, 6, 125-194.
- Mahgoub, S. A., Qattan, S. Y. A., Salem, S. S., Abdelbasit, H. M., Raafat, M., Ashkan, M. F., Al-Quwaie, D. A., Motwali, E. A., Alqahtani, F. S., & Abd El-Fattah, H. I. (2023). Characterization and Biodegradation of Phenol by *Pseudomonas aeruginosa* and *Klebsiella variicola* Strains Isolated from Sewage Sludge and Their Effect on Soybean Seeds Germination. *Molecules*, 28(3).
- Minoru Shimura, G. M.-D., Kazuhide Kimbara , HirokoNagato , Hohzoh Kiyohara and

- Takashi Hatta (1999). Isolation and characterization of a thermophilic *Bacillus* sp. JF8 capable of degrading polychlorinated biphenyls and naphthalene. 87-93.
- Nagshetty, K., & Basutkar, M. R. (2020). Effect of nitrogen sources on the degradation of salicylate by a *Pseudomonas* sp. *International Journal Of Life Sciences and Applied Sciences*.
- Nasher, E., Heng, L. Y., Zakaria, Z., & Surif, S. (2013). Concentrations and sources of polycyclic aromatic hydrocarbons in the seawater around Langkawi Island, Malaysia. *Journal of Chemistry*, 2013.
- Nayanashree, G., & Thippeswamy, B. (2015). Biodegradation of natural rubber by laccase and manganese peroxidase enzyme of *Bacillus subtilis*. *Environmental Processes*, 2, 761-772.
- Ni'matuzahroh, Trikuniadewi, N., Pramadita, A., Pratiwi, I., Salamun, Fatimah, & Sumarsih, S. (2017). Biodegradation of naphthalene and phenanthren by *Bacillus subtilis* 3KP. *AIP Conference Proceedings*.
- Novianty, R., Antika, B., Saryono, S., Awaluddin, A., Pratiwi, N. w., & Juliantari, E. (2022). Naphthalene degradation by *Pseudomonas* sp. LBKURCC419 strain with addition of glucose as cosubstrate. *Biodiversitas Journal of Biological Diversity*, 23(11).
- Oros, D. R., & Ross, J. R. (2005). Polycyclic aromatic hydrocarbons in bivalves from the San Francisco estuary: spatial distributions, temporal trends, and sources (1993–2001). *Marine Environmental Research*, 60(4), 466-488.
- Paulik, L. B., Hobbie, K. A., Rohlman, D., Smith, B. W., Scott, R. P., Kincl, L., Haynes, E. N., & Anderson, K. A. (2018). Environmental and individual PAH exposures near rural natural gas extraction. *Environmental Pollution*, 241, 397-405.
- Pour, F. K. a. F. H. (2012). Degradation of naphthalene, phenanthrene and pyrene by *Pseudomonas* sp. and *Corynebacterium* sp. in the landfills. *International Journal of Biosciences (IJB)*.

- Romanek, C. S., Grossman, E. L., & Morse, J. W. (1992). Carbon isotopic fractionation in synthetic aragonite and calcite: effects of temperature and precipitation rate. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 56(1), 419-430.
- Saha, R., Farrance, C. E., Verghese, B., Hong, S., & Donofrio, R. S. (2013). *Klebsiella michiganensis* sp. nov., a new bacterium isolated from a toothbrush holder. *Current Microbiology*, 66, 72-78.
- Sakurai, T. (1992). Anaerobic reactions of *Rhus vernicifera* laccase and its type-2 copper-depleted derivatives with hexacyanoferrate (II). *Biochemical Journal*, 284(3), 681-685.
- Sedighi, P., Zarei, O., Karimi, K., Taheri, M., Karami, P., & Shokoozadeh, L. (2020). Molecular typing of *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates by Enterobacterial repetitive intergenic consensus polymerase chain reaction. *International Journal of Microbiology*, 2020, 1-5
- Selvarajan, R., Sibanda, T., Tekere, M., Nyoni, H., & Meddows-Taylor, S. (2017). Diversity analysis and bioresource characterization of halophilic bacteria isolated from a South African saltpan. *Molecules*, 22(4), 657.
- Singh, M., & Singh, D. K. (2014). Biodegradation of endosulfan in broth medium and in soil microcosm by *Klebsiella* sp. M3. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 92, 237-242.
- Shores, A., Laituri, M., & Butters, G. (2017). Produced water surface spills and the risk for BTEX and naphthalene groundwater contamination. *Water, Air, and Soil Pollution*, 228, 1-13.
- Sumathi, T., Srilakshmi, A., & Gopal, D. V. R. S. (2016). Isolation of fungi from plastic dumped soils and screening for laccase enzyme activity. *World journal of pharmacy and pharmaceutical sciences*, 5, 1591-1596.
- Tirkey, S. R., Ram, S., & Mishra, S. (2021). Naphthalene degradation studies using *Pseudomonas* sp. strain SA3 from Alang-Sosiya ship breaking yard, Gujarat. *Heliyon*, 7(3), e06334. doi:10.1016/j.heliyon.2021.e06334

- Tolosa, I., de Mora, S., Sheikholeslami, M. R., Villeneuve, J.-P., Bartocci, J., & Cattini, C. (2004). Aliphatic and aromatic hydrocarbons in coastal Caspian Sea sediments. *Marine Pollution Bulletin*, 48(1-2), 44-60.
- Wang, S., Sheng, Y., Feng, M., Leszczynski, J., Wang, L., Tachikawa, H., & Yu, H. (2007). Light-induced cytotoxicity of 16 polycyclic aromatic hydrocarbons on the US EPA priority pollutant list in human skin HaCaT keratinocytes: Relationship between phototoxicity and excited state properties. *Environmental Toxicology: An International Journal*, 22(3), 318-327.
- Watanabe, K. (2001). Microorganisms relevant to bioremediation. *Current Opinion in Biotechnology*, 12(3), 237-241.
- Wolska, L., Mechlińska, A., Rogowska, J., & Namieśnik, J. (2012). Sources and fate of PAHs and PCBs in the marine environment. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 42(11), 1172-1189.
- Yoshida, S., Hiraga, K., Takehana, T., Taniguchi, I., Yamaji, H., Maeda, Y., Oda, K. (2016). Response to comment on “A bacterium that degrades and assimilates poly (ethylene terephthalate)”. *Science*, 353(6301), 759-759.
- Yu, K., Wong, A., Yau, K., Wong, Y., & Tam, N. (2005). Natural attenuation, biostimulation and bioaugmentation on biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in mangrove sediments. *Marine Pollution Bulletin*, 51(8-12), 1071-1077.
- Zhang, L., Tang, X., Rothman, N., Vermeulen, R., Ji, Z., Shen, M., Reiss, B. (2010). Occupational exposure to formaldehyde, hematotoxicity, and leukemia-specific chromosome changes in cultured myeloid progenitor cells. *Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention*, 19(1), 80-88.