

การตัดแยกและพิสูจน์ลักษณะแบคทีเรียที่ย่อยสลายสารพอลิไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน
จากตะกอนแม่น้ำและคลองในกรุงเทพมหานคร

นางสาว ศรัญญา ประภัสสรภิญโญ

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาการจัดการสิ่งแวดล้อม (สหสาขาวิชา)

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2546

ISBN 974-17-4924-4

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ISOLATION AND IDENTIFICATION OF POLYCYCLIC AROMATIC
HYDROCARBON DEGRADING BACTERIA FROM RIVER AND CANAL
SEDIMENTS IN BANGKOK METROPOLIS



Miss Saranya Prapatsornpinyo

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
For the Degree of Master of Science in Environmental Management (Inter-Department)

Graduate School

Chulalongkorn University

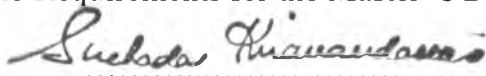
Academic Year 2003

ISBN 974-17-4924-4

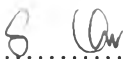
Copyright of Chulalongkorn University

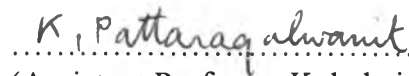
Thesis Title Isolation and identification of polycyclic aromatic hydrocarbon degrading bacteria from river and canal sediments in Bangkok metropolis
By Miss Saranya Prapatsornpinyo
Field of Study Environmental Management
Thesis Advisor Assistant Professor Kobchai Pattaragulwanit, Dr.rer.nat.
Thesis Co-advisor Vanvimol Patarasiriwong, Ph.D.


Accepted by the Graduate School, Chulalongkorn University in Partial Fulfillment of the Requirements for the Master 's Degree



..... Dean of the Graduate School
(Professor Suchada Kiranandana, Ph.D.)

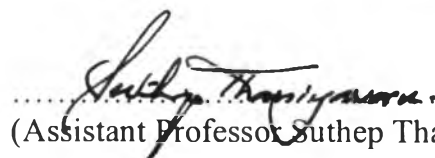
THESIS COMMITTEE


..... Chairman
(Assistant Professor Sutha Khaodhiar, Ph.D.)


..... Thesis Advisor
(Assistant Professor Kobchai Pattaragulwanit, Dr.rer.nat.)


..... Thesis Co-advisor
(Vanvimol Patarasiriwong, Ph.D.)


..... Member
(Associate Professor Kanchana Juntongjin, Ph.D.)


..... Member
(Assistant Professor Suthap Thanayavarn, Ph.D.)

ศรัณญา ประภัสสรภิญโญ : การคัดแยกและพิสูจน์ลักษณะแบคทีเรียที่ย่อยสลายสารพอลิไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนจากตะกอนแม่น้ำและคลองในกรุงเทพมหานคร
(ISOLATION AND IDENTIFICATION OF POLYCYCLIC AROMATIC HYDROCARBON FROM RIVER AND CANAL SEDIMENTS IN BANGKOK METROPOLIS) อ.ที่ปรึกษา : ผศ.ดร.กอบชัย ภัทรกุลวณิชช์, อ.ที่ปรึกษาร่วม : ดร.วรรณวิมล ภัทรสิริวงศ์, 82 หน้า. ISBN 974-17-4924-4

วัตถุประสงค์ของการศึกษานี้คือ เพื่อคัดแยกแบคทีเรียที่ย่อยสลายสารพอลิไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนจากตะกอนที่ปนเปื้อนด้วย PAHs โดยเพิ่มจำนวนแบคทีเรียจากตัวอย่างตะกอนในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวปราศจากแหล่งคาร์บอนที่เติมฟลูออรีน ฟลูออแรนธิน และไพรีนเป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงานเพียงอย่างเดียว สามารถคัดแยกแบคทีเรียได้ 2 สายพันธุ์จากจุดเก็บตัวอย่างในคลองแสนแสบและแม่น้ำเจ้าพระยา แบคทีเรียสายพันธุ์ PY1 สามารถย่อยสลายไพรีนได้ถึง 90.4 เปอร์เซ็นต์ที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตรภายใน 14 วัน ในขณะที่แบคทีเรียสายพันธุ์ FT1 สามารถออกซิไดซ์ฟลูออแรนธิน 39 เปอร์เซ็นต์ที่ความเข้มข้นเริ่มต้นเดียวกัน นอกจากนี้แบคทีเรียทั้งสองสายพันธุ์ยังสามารถใช้อะซีแนพทีลิน อะซีแนพทีน ไคเบนโซฟูแรน และฟีแนนทรีนเป็นแหล่งคาร์บอนเพียงอย่างเดียว จากลักษณะทางสัณฐานวิทยา ชีวเคมี และการวิเคราะห์ลำดับเบสของ 16 เอส โรโบโซมอลดีเอ็นเอ สามารถจำแนกแบคทีเรียสายพันธุ์ PY1 และ FT1 ได้เป็น *Mycobacterium* sp. และ *Sphingomonas* sp. ตามลำดับ จากการศึกษาความเข้มข้นของ PAHs 7 ชนิด ได้แก่ อะซีแนพทีลิน อะซีแนพทีน ไคเบนโซฟูแรน ฟลูออรีน ฟีแนนทรีน ฟลูออแรนธิน และไพรีนในตัวอย่างตะกอนพบฟลูออแรนธินและฟีแนนทรีนในระดับตั้งแต่ 0.82-6.5 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง และ 0.13-0.2 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้งตามลำดับ ในขณะที่ไม่สามารถตรวจพบสาร PAHs อื่น

สาขาวิชา การจัดการสิ่งแวดล้อม

ปีการศึกษา 2546

ลายมือชื่อนิสิต..... *Senanya Prapatsempim*

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา..... *Pornkajit*

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม..... *Si Si*

4589467820 : MAJOR ENVIRONMENTAL MANAGEMENT

KEY WORDS : *Mycobacteria* sp. / *Sphingomonas* sp. / FLUORANTHENE / PYRENE
POLYCYCLIC AROMATIC HYDROCARBON

SARANYA PRAPATSORNPINYO : ISOLATION AND
IDENTIFICATION OF POLYCYCLIC AROMATIC HYDROCARBON
DEGRADING BACTERIA FROM RIVER AND CANAL SEDIMENTS IN
BANGKOK METROPOLIS. THESIS ADVISOR : ASST.PROF. KOBCHAI
PATTARAGULWANIT, Dr.rer.nat. THESIS CO-ADIVISOR: VANVIMOL
PATARASIRIWONG, Ph.D., 82 pp., ISBN 974-17-4924-4

The objective of this study is to isolate the polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) degrading bacteria from the sediments contaminated with PAHs. PAHs degrading bacteria were enriched from sediment samples in carbon free mineral medium (CFMM) supplemented with fluorene, fluoranthene and pyrene as a sole carbon and energy source. Two bacterial strains could be isolated from the sampling sites at Saen-Saeb Canal and Chao-Phraya River. The strain PY1 could degrade pyrene up to 90.4% at the initial concentration of 100 mg/l within 14 days whereas strain FT1 was able to oxidize fluoranthene for 39% at the same initial condition. In addition, these 2 strains also demonstrated their ability in utilizing in acenaphthylene, acenaphthene, dibenzofuran and phenanthrene as sole carbon sources. On the basis of morphological, biochemical characteristics and 16S rDNA sequence analysis, the strain PY1 and FT1 were belonging to the Genus *Mycobacterium* sp. and *Sphingomonas* sp., respectively. Along the study, the concentration of 7 PAHs, namely acenaphthylene, acenaphthene, dibenzofuran, fluorene, phenanthrene, fluoranthene and pyrene, in sediments samples were determined. Fluoranthene and phenanthrene concentration are in the range of 0.82-6.5 $\mu\text{g/g}$ dry weight and phenanthrene 0.13-0.2 $\mu\text{g/g}$ dry weight, respectively whereas the other PAHs could not be detected.

Student's signature.....*Saranya Prapatsornpinyo*.....

Field of study Environmental Management
Academic year 2003

Advisor's signature.....*K. Pattaragulwanit*.....

Co-advisor's signature.....*Vanvimol Patarasiriwong*.....

Acknowledgement

I would like to express my deepest gratitude to my thesis advisor, Assist. Prof. Dr. Kobchai Pattaragulwanit, and thesis co-advisor, Dr. Vanvimol Patarasiriwong for their useful guidances and suggestions. My appreciation is also expanded to Assist. Prof. Dr. Sutha Khaodhiar, Chairman of the Committee, Assoc. Prof. Dr. Kanchana Juntongjin and Assist. Prof. Dr. Suthep Thaniyavarn, members of thesis committee for their kindness and valuable comments.

I would like to thank to all members of National Research Center-Environment and Hazardous Waste Management and Department of Microbiology at Chulalongkorn University. I also thank all my friends in Department of Microbiology, who always support and encourage me.

Finally, I am grateful to my lovely family and Mr. Ukrit Suwanmontree for their eternal love, inspiration, encouragement and support.

CONTENTS

	Pages
ABSTRACT IN THAI	iv
ABSTRACT IN ENGLISH	v
ACKNOWLEDGEMENT	vi
CONTENTS	vii
LIST OF FIGURES	x
LIST OF TABLES	xii
NOMENCLATURE	xiii
CHAPTER 1 INTRODUCTION	1
CHAPTER 2 LITERATURE REVIEWS	4
2.1 Fluorene, fluoranthene, pyrene and other polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs).....	4
2.1.1 Chemical structure.....	4
2.1.2 Source of PAHs.....	5
2.1.3 Occurrence of PAHs.....	6
2.1.4 Exposure routes.....	9
2.1.5 Toxicological properties.....	9
2.1.6 Laws and regulations.....	10
2.1.6.1 United States.....	10
2.1.6.2 Canada.....	11
2.1.6.3 Thailand.....	12
2.1.7 Decontamination of PAHs.....	12
2.2 Bioremediation.....	13
2.2.1 Biodegradation by microorganisms.....	13
2.2.2 Biodegradation by the isolated bacteria from contaminated sediments.....	17

CONTENTS (Cont'd)

	Pages
CHAPTER 3 MATERIALS AND METHODS.....	21
3.1 Materials.....	21
3.1.1 Equipments.....	21
3.1.2 Chemicals.....	22
3.1.3 Culture Media.....	22
3.2 Sediment analysis.....	23
3.2.1 Sediment sample collection.....	23
3.2.2 Sediment extraction.....	24
3.2.3 PAH concentration analysis.....	25
3.3 Isolation of the PAHs degrading bacteria.....	25
3.3.1 Enrichment culture.....	25
3.3.2 Isolation of the PAHs degrading bacteria.....	26
3.4 Identification and characterization of the PAH degrading bacteria.....	27
3.4.1 Morphological and biochemical characterizations.....	27
3.4.2 Identification of the isolated strain by 16S rDNA sequence analysis.....	27
3.4.2.1 Genomic DNA extraction.....	27
3.4.2.2 Polymerase Chain Reaction (PCR).....	28
3.4.2.3 Agarose gel electrophoresis.....	28
3.4.2.4 16S rDNA sequence analysis.....	29
3.5 PAHs degrading ability of the isolated strains.....	29
3.5.1 Degradation of PAH as growth-substrate.....	29
3.5.1.1 Inoculum preparation.....	29
3.5.1.2 PAHs utilization.....	30
3.5.2 Substrate specificity.....	31

CONTENTS (Cont'd)

	Pages
CHAPTER 4 RESULTS	32
4.1 Sediment samples.....	32
4.2 Concentration of PAHs in sediments.....	32
4.3 Isolation of the PAHs degrading bacteria.....	33
4.3.1 Enrichment culture.....	33
4.3.2 Isolation of the PAHs degrading bacterial strains.....	34
4.4 Identification and characterization the isolated strains.....	36
4.4.1 Morphological and biochemical characterizations.....	36
4.4.2 16S rDNA sequence analysis.....	39
4.5 PAHs degradation.....	40
4.5.1 Utilization of pyrene by <i>Mycobacterium</i> sp. strain PY1.....	40
4.5.2 Utilization of fluoranthene by <i>Sphingomonas</i> sp. strain FT1.....	42
4.6 Other PAHs utilization.....	44
CHAPTER 5 CONCLUSIONS AND DISCUSSIONS	49
CHAPTER 6 SUGGESTION FOR FUTURE WORK	58
REFERENCES	59
APPENDICES	71
BIOGRAPHY	82

LIST OF FIGURES

	Pages
2.1 Chemical structures of fluorene, fluoranthene and pyrene.....	4
2.2 Chemical structures of 16 PAHs of EPA priority pollutants.....	5
3.1 Stainless steel grab used as sediment collector.....	23
3.2 Diagram of PAH utilization experiment.....	31
4.1 The clear zone around the bacterial colony form S ₁ (A) and S ₅ (B).....	34
4.2 Colony characterization of isolated strain PY1 (A) and strain FT1 (B).....	35
4.3 Microscopic characteristics of the acid-fast stain of strain PY1 (A) and the Gram stain of FT1 (B).....	39
4.4 Time course of pyrene degradation, with initial concentration of 100 mg/l, by <i>Mycobacterium</i> sp. strain PY1.....	41
4.5 The change of liquid CFMM in pyrene degradation experiment.....	42
4.6 Time course of fluoranthene degradation, with initial concentration of 100 mg/l, by <i>Sphingomonas</i> sp. strain FT1.....	43
4.7 The change of liquid CFMM in fluoranthene degradation experiment.....	44
4.8 Medium colour of <i>Mycobacterium</i> sp. strain PY1 in liquid CFMM supplemented with individual substrate compared with control.....	45
4.9 Time course of other PAHs degradation at concentration of 100 mg/l of substrate by <i>Mycobacterium</i> sp. strain PY1 as following: acenaphthylene (A), acenaphthene (B), dibenzofuran (C) and phenanthrene (D).....	46
4.10 Medium colour of <i>Sphingomonas</i> sp. strain FT1 in liquid CFMM supplemented with individual substrate compared with control.....	47
4.11 Time course of other PAHs degradation at concentration of 100 mg/l of substrate <i>Sphingomonas</i> sp. strain FT1 as following: acenaphthylene (A), acenaphthene (B), dibenzofuran (C) and phenanthrene (D).....	48
D.1 Reverse phase HPLC profile of pyrene degradation from <i>Mycobacterium</i> sp. strain PY1 in 0, 1, 3, 5, 7, 10 and 14 days.....	77
D.2 Reverse phase HPLC profile of fluoranthene degradation from <i>Sphingomonas</i> sp. strain FT1 in 0, 1, 3, 5, 7, 10 and 14 days.....	78
E.1 S ₁ , Ratchathewi pier (The Saen-Saeb Canal).....	79
E.2 S ₂ , Pratunam pier (The Saen-Saeb Canal).....	79

LIST OF FIGURES (Cont'd)

	Pages
E.3 S ₃ , Panfa-leelard pier (The Saen-Saeb Canal).....	79
E.4 S ₄ , Wat Sri-boon-reung pier (The Saen-Saeb Canal).....	80
E.5 S ₅ , Phrachulachomklao Royal Navy Dockyard (The Chao-Phraya River).....	80
E.6 S ₆ , See-phraya pier (The Chao-Phraya River).....	80
E.7 S ₇ , Sa-thon pier (The Chao-Phraya River).....	81
E.8 S ₈ , Padungkrungkasem Canal.....	81

LIST OF TABLES

	Pages
2.1 Human activities associated with PAH productions.....	6
2.2 PAH concentrations (ng/g, dry weight) in surface sediments from various international locations.....	7
2.3 PAHs in various environments in Thailand.....	8
2.4 List of bacteria capable of fluorene, fluoranthene and pyrene degradation.....	15
2.5 List of fungi capable of fluoranthene and pyrene degradation.....	16
3.1 Components of CFMM and LB media.....	22
3.2 List of sampling sites.....	24
4.1 Concentration of PAHs in sediment samples.....	33
4.2 Colony characteristics of bacteria from S ₁ and S ₅	35
4.3 Morphological and biochemical characterizations of the isolated strain PY1.....	37
4.4 Morphological and biochemical characterizations of the isolated strain FT1.....	38
5.1 Comparative values of fluoranthene and phenanthrene concentrations in different sources.....	50
5.2 The proposed PAH concentrations in the sediment quality guideline	51
5.3 List of <i>Mycobacterium</i> strains capable of PAHs degradation.....	53
5.4 List of <i>Sphingomonas</i> strains capable of PAHs degradation.....	56

NOMENCLATURE

CFMM	carbon free mineral medium
PAHs	polycyclic aromatic hydrocarbons
PCR	polymerase chain reaction
DNA	deoxyribonucleic acid
dNTP	deoxyribonucleoside triphosphate
HPLC	high performance liquid chromatography
Kb	kilobase
Bp	base pair
hr	hour
min	minute
rpm	revolution per minute
R _t	retention time