

**INDUCED MUTATION OF CRUDE OIL BIODEGRADING
BACTERIA (*PSEUDOMONAS AERUGINOSA*)**

APIRADEE SUWANWONG

**A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENTS FOR
THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE
(ENVIRONMENTAL BIOLOGY)
FACULTY OF GRADUATE STUDIES
MAHIDOL UNIVERSITY
2004**

**ISBN: 974-04-4862-3
COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY**

การเหนี่ยวนำมิวเตชันในแบคทีเรียที่ย่อยสลายน้ำมัน (*Pseudomonas aeruginosa*)
INDUCED MUTATION OF CRUDE OIL BIODEGRADING BACTERIA
(*PSEUDOMONAS AERUGINOSA*)

อภิรดี สุวรรณวงศ์ 4336682 SCEB/M

วท.ม. (ชีววิทยาศาสตร์ภาวะแวดล้อม)

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์ : ประหยัด โภคจิตติคุณต์, Ph.D., มาลีญา เครือตราชู, Ph.D.,
สุจินดา ชนะภูมิ, Ph.D.

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้เป็นการพัฒนาเทคนิคทางชีววิทยาในการกำจัดคาร์บอนของปิโตรเลียมในสิ่งแวดล้อม โดยใช้เทคนิคในการเหนี่ยวนำให้เกิดมิวเตชันในแบคทีเรีย *Pseudomonas aeruginosa* MU 01 โดยใช้แสงอัลตราไวโอเล็ต (UV) จากการศึกษาได้แบคทีเรียที่กลายพันธุ์หลายชนิดในช่วง UV dose 3,000 $\mu\text{J}/\text{cm}^2$ และได้ทำการคัดเลือกแบคทีเรียที่กลายพันธุ์โดยใช้ blood agar เปรียบเทียบความสามารถในการย่อยสลายเม็ดเลือดแดงระหว่างแบคทีเรียตัวเดิมกับตัวกลายพันธุ์ พบว่ามี 1 ชนิดที่สามารถย่อยได้ดีที่สุดโดยได้ตั้งชื่อว่า สายพันธุ์ PMU 01 เนื่องจากว่าโคโลนีมีสีเขียวอ่อนๆ ต่างจากแบคทีเรียตัวเดิมซึ่งมีสีขาว ดังนั้นจึงนำ PMU 01 ไปทดสอบความสามารถในการย่อยสลายน้ำมันดิบหลายความเข้มข้น ได้แก่ 0.5%, 1%, และ 2% ในอาหารเลี้ยงเชื้อ MSM โดยเทคนิคเขย่าบนแท่นเขย่าเปรียบเทียบกับแบคทีเรียตัวเดิมแล้วทำการวิเคราะห์ปริมาณน้ำมันที่เหลืออยู่โดยใช้เครื่อง Gas chromatography/Flame ionization detector (GC/FID) จากนั้นเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์น้ำมันที่ย่อยสลายไปได้ระหว่างแบคทีเรียสายพันธุ์ PMU 01 กับ MU 01 ในเวลา 7 วัน ในการย่อยสลายน้ำมันสามารถแบ่งแยกได้เป็น 4 ช่วง ตามวิธีการสกัดคือช่วง C9-C20, ช่วง C21-C30, ช่วงไฮโดรคาร์บอนที่สกัดได้, และผลรวมของไฮโดรคาร์บอนทั้งหมด ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำมันดิบ 0.5% การย่อยสลายน้ำมันสูงสุดของสายพันธุ์ PMU 01 ในช่วง C21-C30 ได้ 95.45% ขณะที่สายพันธุ์ MU 01 ย่อยได้ 92.83% ใน 1% น้ำมันดิบ การย่อยสลายน้ำมันสูงสุดในช่วง C21-C30 ได้ 48.74% สำหรับ PMU 01 ขณะที่ MU 01 ย่อยได้ 28.42% และใน 2% น้ำมันดิบ การย่อยสลายน้ำมันสูงสุดอยู่ในช่วง C9-C20 ได้ 64.14% สำหรับ PMU 01 ขณะที่ MU 01 ย่อยได้ 51.58% อย่างไรก็ตาม การย่อยสลายน้ำมันดิบของ PMU 01 ในทุกเปอร์เซ็นต์ความเข้มข้นและในทุกองค์ประกอบของน้ำมันมีค่ามากกว่า MU 01 ดังนั้นผลที่ได้ชี้ให้เห็นว่า PMU 01 ที่กลายพันธุ์ไปแล้วสามารถย่อยสลายน้ำมันดิบได้โดยมีประสิทธิภาพมากขึ้นกว่าตัวเดิมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

INDUCED MUTATION OF CRUDE OIL BIODEGRADING BACTERIA
(*PSEUDOMONAS AERUGINOSA*)

APIRADEE SUWANWONG 4336682 SCEB/M

M.Sc. (ENVIRONMENTAL BIOLOGY)

THESIS ADVISORS: PRAYAD POKETHITIYOOK, Ph.D.,
MALEEYA KRUATRACHUE, Ph.D., SUJINDA THANAPHUM, Ph.D.

ABSTRACT

The objective of this research was to find techniques to enhance oil biodegradation in petroleum contaminated soil. Induced mutation by UV irradiation of *Pseudomonas aeruginosa* MU 01 was performed. The UV dose that caused the mutation was 3,000 μ J/cm². This dose also enhanced the survival rate of *P. aeruginosa* MU 01. This technique has yielded several mutants. Blood agar plates were used to screen the mutants. The biodegrading ability of control parents and mutants was compared using hemolytic activity. One mutant strain has been found to have the highest hemolytic activity. It was named PMU 01 strain according to the pale green colony color whereas the parent colony color was white. Therefore, PMU 01 was selected to test the ability of degradation compared to MU 01 at various concentrations of crude oil content (0.5%, 1%, and 2%) in mineral salt media with a shake-flask technique. Quantitative analyses of residual crude oil were conducted by gas chromatography / flame ionization detector. In 0.5% crude oil concentration, the highest removal percentage by PMU 01 at day 7 was 95.45% in C21-C30 region, whereas in MU 01 it was 92.83%. In 1% crude oil, the highest removal percentage at day 7 was 48.74% in C21-C30 region by PMU 01 whereas in MU 01, it was 28.42%. In 2% concentration crude oil, the highest removal percentage at day 7 by PMU 01 was 64.14% in C9-C20 region whereas in MU 01, it was 51.58%. However, the biodegradation of PMU 01 in all components and all ranges of crude oil concentration was greater than that of MU 01. This experiment indicated that the mutant strain PMU 01 could degrade crude oil with higher efficiency than the parent MU 01 ($p < 0.05$).

KEY WORDS: INDUCED MUTATION, CRUDE OIL, BIODEGRADATION,
PSEUDOMONAS AERUGINOSA, UV IRRADIATION

133 pp. ISBN: 974-04-4862-3