

ลักษณะสมบัติของสารมัธยันตร์จากการย่อยสลายฟลูออรีนโดย
Sphingomonas sp. P2



นางสาวธัญญรัตน์ ชำนาญกิจ

สถาบันวิทยบริการ

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย


ปีการศึกษา 2545

ISBN 974-17-3150-7

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

CHARACTERIZATION OF INTERMEDIATES FROM DEGRADATIONS OF FLUORENE

BY *Sphingomonas* sp. P2



Miss Thanyarat Chamnankit

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science in Industrial Microbiology

Department of Microbiology

Faculty of Science

Chulalongkorn University

Academic Year 2002

ISBN 974-17-3150-7

หัวข้อวิทยานิพนธ์	ลักษณะสมบัติของสารมัธยันตร์จากการย่อยสลายฟลูออรีนโดย
	<i>Sphingomonas</i> sp. P2
โดย	นางสาวธัญญรัตน์ ชำนาญกิจ
สาขาวิชา	จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม
อาจารย์ที่ปรึกษา	รองศาสตราจารย์ ดร.กาญจนา จันทองจีน
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	รองศาสตราจารย์ ดร.ไพเราะ ปิ่นพานิชการ

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้หัวข้อวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็น
ส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

..... คณบดีคณะวิทยาศาสตร์
(รองศาสตราจารย์ ดร.วันชัย โพธิ์พิจริต)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.อมร เพชรสม)

..... อาจารย์ที่ปรึกษา
(รองศาสตราจารย์ ดร.กาญจนา จันทองจีน)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
(รองศาสตราจารย์ ดร.ไพเราะ ปิ่นพานิชการ)

..... กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุเทพ ธานีวัน)

..... กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.กอบชัย ภัทรกุลวณิชย์)

ธัญญรัตน์ ชำนาญกิจ : ลักษณะสมบัติของสารมัธยันตร์จากการย่อยสลายฟลูออรีนโดย *Sphingomonas* sp. P2 (CHARACTERIZATION OF INTERMEDIATES FROM DEGRADATION OF FLUORENE BY *Sphingomonas* sp. P2) อ. ที่ปรึกษา : รองศาสตราจารย์ ดร. กาญจนา จันทองจีน, อ. ที่ปรึกษาร่วม : รองศาสตราจารย์ ดร. ไพเราะ ปิ่นพานิชกร จำนวนหน้า 85 หน้า. ISBN 974-17-3150-7

Sphingomonas sp. P2 เป็นแบคทีเรียที่คัดแยกจากดินที่ปนเปื้อนน้ำมันเครื่อง และสามารถย่อยสลายพีแนทรีนรวมทั้งสาร PAHs อื่นๆ ได้หลายชนิด เมื่อศึกษาการเจริญและการย่อยสลายฟลูออรีน 100 มก.ต่อลิตรในอาหารเหลว CFMM โดยแบคทีเรียนี้ เป็นเวลา 7 วัน พบว่าเจริญและย่อยสลายฟลูออรีนได้น้อยมาก (5.7%) แต่ในขณะเดียวกันพบการเปลี่ยนสีของอาหารเหลวเป็นสีเหลืองซึ่งดูดกลืนแสงสูงสุดที่ช่วง 450-460 นาโนเมตร และจากการวิเคราะห์ HPLC พบสารมัธยันตร์จากการย่อยสลายดังกล่าวเพียงเล็กน้อย การเติมสารอาหารอินทรีย์เช่นยีสต์สกัดซึ่ง *Sphingomonas* sp. P2 สามารถใช้เป็นสับสเตรทในการเจริญได้ ในอาหารเหลว CFMM ทำให้แบคทีเรียนี้สามารถย่อยสลายฟลูออรีนแบบโคเมแทบอลิซึมได้ โดยพบฟลูออรีนเหลือในอาหารเหลว CFMM 0.44 มก.ต่อลิตรหลังการเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 7 วัน การเติมยีสต์สกัดเข้มข้น 0.5 % ในอาหารเหลวตั้งแต่เริ่มเลี้ยงเชื้อทำให้ *Sphingomonas* sp. P2 เจริญและย่อยสลายฟลูออรีนอย่างรวดเร็วจนตรวจไม่พบฟลูออรีนในอาหารเหลวภายหลังเลี้ยงเชื้อ 36 ชั่วโมง และจากการวิเคราะห์ HPLC พบสารมัธยันตร์จากการย่อยสลายสะสมมากที่สุดในช่วงเวลาที่ 15 ของการเลี้ยงเชื้อ เมื่อแยกสารมัธยันตร์ให้บริสุทธิ์โดย preparative HPLC แล้ววิเคราะห์แมสสเปกตรัมเทียบกับสารมาตรฐานพบว่าสารนี้คือ 9-ฟลูออรีนอล ซึ่งเกิดจากการเติมออกซิเจนเข้าที่วงไซโคลเพนธินของฟลูออรีน นอกจากนี้ยังทดลองใช้สารอาหารจากดินสกัดทดแทนการใช้ยีสต์สกัดเพื่อทำนายประสิทธิภาพการย่อยสลายฟลูออรีนของ *Sphingomonas* sp. P2 เมื่อมีกิจกรรมในดิน พบว่าการย่อยสลายฟลูออรีนร่วมกับการเติมสารอาหารจากดินสกัดส่งผลให้ฟลูออรีนถูกย่อยสลายเพิ่มขึ้น 40 % เมื่อเทียบกับชุดที่ไม่เติมสารอาหารจากดินสกัด คือมีฟลูออรีนเหลืออยู่ในอาหารเหลว CFMM 48.1 มก.ต่อลิตร หลังจากเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 7 วัน

ภาควิชา จุลชีววิทยา	ลายมือชื่อนิสิต.....
สาขาวิชา จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม	ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....
ปีการศึกษา 2545	ลายมืออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จไปได้ด้วยดีด้วยความช่วยเหลืออย่างดียิ่งของรองศาสตราจารย์ ดร.กาญจนา จันทองจีน อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ และรองศาสตราจารย์ ดร.ไพเราะ ปิ่นพานิชการ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วมที่ได้กรุณาให้ความรู้ คำแนะนำและข้อคิดเห็น ต่างๆ ตลอดจนตรวจแก้ต้นฉบับวิทยานิพนธ์ ซึ่งผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้ ด้วย

ขอกราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร. อมร เพชรสม ที่กรุณารับเป็นประธาน กรรมการในการสอบ ตลอดจนให้ความรู้ คำแนะนำต่างๆ แก่ผู้วิจัยตลอดระยะเวลาการศึกษา

ขอกราบขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุเทพ ฐนิยวัน และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. กอบชัย ภัทรกุลวณิชย์ ที่กรุณารับเป็นกรรมการในการสอบ และให้ความรู้ คำแนะนำต่างๆ ตลอดจนช่วยแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

กราบขอบพระคุณอาจารย์ทุกท่านในภาควิชาจุลชีววิทยาที่กรุณาให้ความรู้ และ คำแนะนำต่างๆ แก่ผู้วิจัย

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ในภาควิชาจุลชีววิทยาทุกท่าน ตลอดจนพี่ๆ เพื่อนๆ และน้องๆ ทุกคนที่มีส่วนช่วยเหลือและให้กำลังใจตลอดมา

ขอขอบคุณเพื่อนๆ และพี่ๆ ในห้อง 462 โดยเฉพาะคุณสุพินดา ศิริวราศิลป์ที่มีส่วน ช่วยเหลือและให้กำลังใจตลอดมา

สุดท้ายขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดา น้องสาว และน้องชาย ที่ให้การสนับสนุนและ ความช่วยเหลือตลอดจนกำลังใจแก่ผู้วิจัยเสมอมา

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ซ
สารบัญรูป.....	ณ
บทที่	
1. บทนำ.....	1
2. วารสารปริทัศน์.....	4
3. อุปกรณ์และวิธีดำเนินงานวิจัย.....	19
4. ผลการทดลอง	29
5. สรุปและอภิปรายผลการทดลอง.....	63
6. ข้อเสนอแนะในการวิจัย.....	71
รายการอ้างอิง.....	72
ภาคผนวก	
ภาคผนวก ก.....	79
ภาคผนวก ข.....	81
ภาคผนวก ค.....	83
ภาคผนวก ง.....	84
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....	85

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
2.1 ชนิดของจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการย่อยสลายฟลูออรีน.....	15
3.1 แหล่งที่มาของตัวอย่างดินที่นำมาการสกัดสารอาหารเพื่อใช้เร่งการย่อยสลายฟลูออรีนโดย <i>Sphingomonas</i> sp. P2.....	28
4.1 เปรียบเทียบค่า retention time ของสารมัธยันตร์จากการย่อยสลายฟลูออรีนเมื่อวิเคราะห์โดย analytical HPLC และ preparative HPLC.....	51
4.2 ค่า Rf จากการวิเคราะห์ TLC และลักษณะการเรืองแสงของสารมัธยันตร์จากการย่อยสลาย ฟลูออรีนโดย <i>Sphingomonas</i> sp. P2 ภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ตช่วงความยาวคลื่น 215- 250 นาโนเมตรเปรียบเทียบกับสารมาตรฐานชนิดต่างๆ	57



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
2.1 โครงสร้างของสาร PAHs (Wilson และ Jones, 1993).....	5
2.2 โครงสร้างโมเลกุลของฟลูออรีน (Grifoll และคณะ, 1995).....	6
2.3 วิธีการย่อยสลายฟลูออรีนโดย <i>Pseudomonas</i> sp. F274 (Grifoll และคณะ, 1994).....	9
2.4 วิธีเมตาบอลิซึมของการย่อยสลายฟลูออรีนโดย <i>Pseudomonas cepacia</i> F297 (Grifoll และคณะ, 1995).....	10
2.5 วิธีการย่อยสลายฟลูออรีนโดย <i>Arthrobacter</i> sp. สายพันธุ์ F101 (Casellas และคณะ, 1997).....	12
2.6 วิธีการย่อยสลาย PAHs ชนิดต่างๆ โดย <i>Phanerochaete chrysosporium</i> (Sutherland และคณะ, 1995).....	13
4.1 ลักษณะการเจริญและการย่อยสลายฟลูออรีนของ <i>Sphingomonas</i> sp. P2 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM ที่มีฟลูออรีนเข้มข้น 100 มก.ต่อลิตร.....	31
4.2 ลักษณะของอาหารเหลว CFMM ที่เกิดจากการย่อยสลายฟลูออรีนเข้มข้น 100 มก. ต่อลิตรของ <i>Sphingomonas</i> sp. P2 ในการเลี้ยงเชื้อที่ระยะ 1-7 วัน.....	33
4.3 โคโรมาโทแกรม HPLC จากการวิเคราะห์ปริมาณฟลูออรีนและสารมัธยันตร์ที่เกิดขึ้นจากการย่อยสลายฟลูออรีนโดย <i>Sphingomonas</i> sp. P2 หลังจากเลี้ยงเชื้อที่เวลาต่างๆ.....	35
4.4 ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นต่างๆ (ตั้งแต่ 1100 ถึง 190 นาโนเมตร) ของสารมัธยันตร์ที่เกิดจากการย่อยสลายฟลูออรีนโดย <i>Sphingomonas</i> sp. P2 หลังจากเลี้ยงเชื้อที่เวลา 1-7 วัน.....	36
4.5 โคโรมาโทแกรม HPLC แสดงปริมาณฟลูออรีนที่เหลือและสารมัธยันตร์ที่เกิดขึ้นโดย <i>Sphingomonas</i> sp. P2 ในอาหารเหลว CFMM ที่มีฟลูออรีน 100 มก. ต่อลิตร และเติมยีสต์สกัด เปปโติน แอมโมเนียมคลอไรด์(0.1% น้ำหนักต่อปริมาตร).....	37
4.6 โคโรมาโทแกรม HPLC แสดงปริมาณฟลูออรีนที่เหลือและสารมัธยันตร์จากการย่อยสลายฟลูออรีนโดย <i>Sphingomonas</i> sp. P2 ในอาหารเหลว CFMM ที่มีฟลูออรีน 100 มก. ต่อลิตร และเติมยีสต์สกัด ภายหลังจากเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 7 วัน.....	38
4.7 ลักษณะโคโลนีของ <i>Sphingomonas</i> sp. P2 ที่มีอายุ 5 วันเมื่อเลี้ยงเชื้อบนอาหารแข็ง CFMM ที่เติมยีสต์สกัด และรอยผลึกฟลูออรีนที่ฝ้าเพท.....	39

สารบัญญรูป (ต่อ)

รูปที่	หน้า
4.8 โคโรมาโทแกรม HPLC แสดงปริมาณฟลูออรีนในอาหารเหลว CFMM ที่เติมยีสต์สกัดความเข้มข้นต่างๆ หลังจากเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 7 วัน.....	41
4.9 ลักษณะของอาหารเหลว CFMM ที่เกิดจากการย่อยสลายฟลูออรีนโดย <i>Sphingomonas</i> sp. P2 ที่เติมยีสต์สกัดความเข้มข้นต่างๆ หลังจากเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 7 วัน.....	42
4.10 ก. การย่อยสลายฟลูออรีนโดย <i>Sphingomonas</i> sp. P2 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM ที่มีฟลูออรีนความเข้มข้น 100 มก. ต่อลิตร และเติมยีสต์สกัด ที่เวลาต่างๆ.....	44
4.10 ข. เปรียบเทียบการย่อยสลายฟลูออรีนโดย <i>Sphingomonas</i> sp. P2 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM ที่มีฟลูออรีนความเข้มข้น 100 มก. ต่อลิตร และเติมยีสต์สกัด ที่เวลาต่างๆ	45
4.11 โคโรมาโทแกรม TLC ของสารมัธยันตร์ที่สะสมจากการย่อยสลายฟลูออรีนโดย <i>Sphingomonas</i> sp. P2 ที่เวลาต่างๆ	47
4.12 โคโรมาโทแกรม HPLC ของสารมัธยันตร์ที่สะสมจากการย่อยสลายฟลูออรีนโดย <i>Sphingomonas</i> sp. P2 ที่เวลาต่างๆ.....	49
4.13 โคโรมาโทแกรม HPLC ของสารมัธยันตร์ที่สะสมจากการย่อยสลายฟลูออรีนโดย <i>Sphingomonas</i> sp. P2 ที่เวลา 15 ชั่วโมง โดยใช้สารละลายอะซีโตไนโตรเข้มข้น 95 % ในเมทานอลเป็นตัวชะ.....	52
4.14 โคโรมาโทแกรม HPLC แสดงความบริสุทธิ์ของสารมัธยันตร์จากการย่อยสลายฟลูออรีนโดย <i>Sphingomonas</i> sp.P2.....	54
4.15 โคโรมาโทแกรม TLC แสดงความบริสุทธิ์ของสารมัธยันตร์จากการย่อยสลายฟลูออรีนโดย <i>Sphingomonas</i> sp. P2.....	55
4.16 โคโรมาโทแกรม TLC ของสารมัธยันตร์จากการย่อยสลายฟลูออรีนโดย <i>Sphingomonas</i> sp. P2 (7) เปรียบเทียบกับ ฟลูออรีน (1), 9-ฟลูออรีนอล (2), 9-ฟลูออรีโนน (3), 2,3-ไดไฮดรอกซีไบฟีนิล (4), กรดซาลิไซลิก (5), กรด 2,5-ไดไฮดรอกซีเบนโซอิก (6).....	56
4.17 โคโรมาโทแกรม TLC ของ 9-ฟลูออรีนอล (ก.) เปรียบเทียบกับสารมัธยันตร์จากการย่อยสลายฟลูออรีนโดย <i>Sphingomonas</i> sp. P2 (ข.).....	58
4.18 โคโรมาโทแกรม HPLCของ 9-ฟลูออรีนอล (ก.) เปรียบเทียบกับสารมัธยันตร์จากการย่อยสลายฟลูออรีนโดย <i>Sphingomonas</i> sp. P2 (ข.) (ใช้สารละลายอะซีโตไนโตรเข้มข้น 95 % ในเมทานอล อัตราการไหล 3.0 มล.ต่อนาที เป็นตัวชะ).....	59

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่	หน้า
4.19	โครมาโทแกรม HPLC ของสารผสมระหว่าง 9-ฟลูออรีนอลกับสารมัธยันตร์จากการย่อยสลายฟลูออรีนโดย <i>Sphingomonas</i> sp. P2 (ใช้สารละลายอะซีโตไนโตรเข้มข้น 95 % ในเมทานอลเป็นตัวชะ อัตราการไหล 3.0 มล.ต่อนาที).....60
4.20	แผนภูมิแสดงปริมาณฟลูออรีนในอาหารเหลว CFMM ที่เติมสารอาหารสกัดจากดินบริเวณด้านข้างตึกพฤกษศาสตร์ จุฬาฯ ความเข้มข้นต่างๆ หลังจากเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 7 วัน....62
5.1	วิธีการย่อยสลายฟลูออรีนโดย <i>Pseudomonas</i> sp. F274 (Grifoll และคณะ, 1994).....68
5.2	วิธีการย่อยสลายฟลูออรีนโดย <i>Arthrobacter</i> sp. F101 โดยเริ่มจากการเติมหมู่ออกซิเจนที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 3 และ 4 (Casellas และคณะ, 1997).....69
ค. 1	กราฟมาตรฐานระหว่างปริมาณฟลูออรีนกับพื้นที่ใต้กราฟ ที่ได้จากการวิเคราะห์โดยวิธี HPLC.....83
ง.1	แมสสเปกตรัมของสารมัธยันตร์จากการย่อยสลายฟลูออรีนโดย <i>Sphingomonas</i> sp. P2(ก.) เปรียบเทียบกับแมสสเปกตรัมของสารมาตรฐาน 9- ฟลูออรีนอล (ข.).....84

บทที่ 1

บทนำ

ผลของการขยายตัวทางด้านเศรษฐกิจของประเทศในช่วงทศวรรษที่ผ่านมา ทำให้ปริมาณการใช้สารเคมีชนิดต่าง ๆ ทั้งในภาคอุตสาหกรรม เกษตรกรรม และในชีวิตประจำวันเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว จึงเป็นช่วงที่มีการใช้สภาพแวดล้อมเป็นแหล่งรองรับมลพิษในระดับสูงไปด้วย ปัญหาที่เกิดขึ้นส่วนใหญ่มาจากการปนเปื้อนของสารมลพิษชนิดต่างๆ ในสิ่งแวดล้อม ได้แก่ ดิน น้ำและอากาศ ก่อให้เกิดผลกระทบและเป็นอันตรายต่อสุขภาพอนามัยของประชาชน จากข้อมูลของกรมควบคุมมลพิษ (2543) พบว่าปริมาณของเสียอันตรายมีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นทุกปี ผลที่ตามมาคือค่าใช้จ่ายในการบำบัดที่สูงขึ้นและหากทุกฝ่ายไม่ร่วมมือกันในการวางแผนการจัดการอย่างเป็นระบบ มลพิษเนื่องจากกากของเสียอันตรายอาจก่อให้เกิดผลกระทบร้ายแรงต่อสิ่งแวดล้อมและต่อมนุษย์เองด้วย ซึ่งอาจเป็นสาเหตุให้เกิดการเจ็บป่วย การเสียชีวิตและทรัพย์สิน ดังนั้นปัญหาการจัดการกากของเสียอันตราย จึงถือเป็นปัญหาที่สำคัญ ซึ่งควรได้รับการจัดการอย่างเร่งด่วน เพื่อป้องกันผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมและสิ่งมีชีวิตที่อาจเกิดตามมา

การจัดการกากของเสียเป็นปัญหาใหญ่ของประเทศในการที่จะหาวิธีที่เหมาะสม และมีประสิทธิภาพในการจัดการ แหล่งให้บริการการกำจัดยังมีอยู่น้อยและคิดค่าบริการอยู่ในระดับสูงซึ่งเมื่อรวมถึงค่าเดินทางในการขนส่งกากของเสียอันตรายเหล่านี้ไปสู่แหล่งบำบัด และสถานการณ์เศรษฐกิจของประเทศ ในปัจจุบันจึงมีผู้ประกอบการพยายามหลีกเลี่ยง และแอบนำไปทิ้งในพื้นที่ว่างเปล่า (กรมควบคุมมลพิษ, 2542) จากข้อเสนอแนะแนวทางแก้ไขปัญหาในรายงานสถานการณ์คุณภาพสิ่งแวดล้อม พ.ศ. 2543 กล่าวว่าควรศึกษาวิจัยเพื่อพัฒนาเทคโนโลยีใหม่ๆ ในการลดปริมาณกากของเสียอันตราย

ของเสียอันตรายจากน้ำมันปิโตรเลียมประกอบด้วยสารอินทรีย์หลายกลุ่ม ที่สำคัญคือสารพอลิไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน (polycyclic aromatic hydrocarbon, PAHs) เกิดจากการเผาไหม้ของสารอินทรีย์แบบไม่สมบูรณ์ ทำให้เกิดการกระจายตัวสู่บริเวณต่างๆ ได้แก่ บรรยากาศ แหล่งน้ำทั้งบริเวณผิวและตะกอน PAHs เป็นส่วนประกอบหลักของเข็อะเพลิ่งฟอสซิลและผลิตภัณฑ์ถนอมรักษาเนื้อไม้ (creosote) (Casellas และคณะ, 1998) และยังเป็นส่วนประกอบในน้ำมันดิบ และผลิตภัณฑ์จากถ่านหิน (Grifoll และคณะ, 1995) อุบัติเหตุการรั่วไหลหรือความผิดพลาดในกระบวนการกำจัด การขนส่ง และการใช้สารประเภทนี้ในอุตสาหกรรม ส่งผลให้ PAHs ปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อม (Chandra และคณะ, 1996) นอกจากนี้

PAHs ยังสามารถเกิดขึ้นจากผลกระทบตามธรรมชาติ เช่นไฟไหม้ป่า (Chandra และคณะ, 1996) ภูเขาไฟระเบิด และการรั่วซึมของน้ำมันตามธรรมชาติ (Cerniglia, 1992)

การบำบัดสิ่งแวดล้อมที่มีการปนเปื้อนด้วยสารเคมีเหล่านี้สามารถกระทำได้หลายวิธี และแนวทางหนึ่งที่มีประสิทธิภาพคือกระบวนการย่อยสลายด้วยวิธีทางชีวภาพ (Bioremediation) ซึ่งเป็นเทคโนโลยีที่ใช้จุลินทรีย์เป็นหลักในกระบวนการย่อยสลายสลายสารพิษต่างๆ (Mueller และ คณะ, 1989) การบำบัดสารพิษด้วยวิธีนี้มีข้อได้เปรียบกว่าวิธีการอื่น เนื่องจากจุลินทรีย์บางชนิดสามารถใช้สารพิษเป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงานได้ โดยย่อยสลายสารดังกล่าวอย่างสมบูรณ์จนได้ผลิตภัณฑ์สุดท้ายเป็นคาร์บอนไดออกไซด์และน้ำ (mineralization) (Wilson และ Jones, 1993) จึงไม่ก่อให้เกิดสารพิษตกค้างในสิ่งแวดล้อม

แบคทีเรียบางชนิดไม่สามารถย่อยสลาย PAHs ได้อย่างสมบูรณ์ แต่คาดว่ากระบวนการย่อยสลายสารดังกล่าวในระบบนิเวศน์ตามธรรมชาติอาจเกิดขึ้นโดยอาศัยกระบวนการโคเมตาบอลิซึม (co-metabolism) (Shiaris และ Cooney, 1983) ซึ่งเป็นกระบวนการออกซิไดส์สารที่ไม่สามารถใช้ในการเจริญไปพร้อมกับการเจริญของจุลินทรีย์บนสารที่สามารถใช้เป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงานได้ (Horvath, 1972) กระบวนการโคเมตาบอลิซึมเป็นกระบวนการที่มักพบอยู่ทั่วไปในสิ่งแวดล้อมโดยเฉพาะในดินซึ่งมีสารเคมีหลายชนิดผสมกันอยู่ Broadbent และ Norman (1946) อ้างถึงโดย Horvath (1972) กล่าวว่าวัฏจักรอินทรีย์ในดินเป็นแหล่งสารอาหารที่ดีสำหรับประชากรจุลินทรีย์ในดิน เมื่อเติมวัฏจักรอินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายได้ง่ายลงไปแล้วพบว่าจุลินทรีย์สามารถย่อยสลายสารพิษได้อย่างมีประสิทธิภาพมากขึ้น

ณัฐพันธุ์ ศุภกา (2542) ได้คัดแยก *Sphingomonas* sp. P2 จากดินที่มีประวัติการปนเปื้อนสาร PAHs โดยใช้ฟีนแอนทรีน (phenanthrene) เป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงาน เมื่อทดสอบความสามารถในการย่อยสลาย PAHs พบว่าแบคทีเรียนี้มีประสิทธิภาพสูงสามารถย่อยสลาย PAHs รวมทั้งสารอื่นที่ใกล้เคียงกันได้หลายชนิด แต่ในการย่อยสลายฟลูออรีนยังไม่เห็นผลการย่อยสลายที่ชัดเจนเนื่องจากจำนวนเซลล์ของ *Sphingomonas* sp. P2 เพิ่มขึ้นในระยะแรก แต่เวลาต่อมาจำนวนเซลล์ได้ลดลง ทั้งนี้คาดว่าอาจเป็นผลมาจากการสะสมสารมัธยันตร์บางชนิดจากการย่อยสลายสารฟลูออรีนที่อาจมีผลต่อการเจริญของ *Sphingomonas* sp. P2 ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงทดลองเติมสารที่เป็นแหล่งสารอาหารที่แบคทีเรียสามารถใช้เป็นสับสเตรทในการเจริญเพื่อย่อยสลายฟลูออรีนแบบโคเมตาบอลิซึมโดย *Sphingomonas* sp. P2 รวมทั้งผลต่อสารมัธยันตร์จากการย่อยสลายดังกล่าว และยังทดลองเติมสารอาหารจากดินสกัดเพื่อทำให้การย่อยสลายฟลูออรีนเกิดขึ้นอย่างสมบูรณ์ สำหรับใช้เป็นแนวทางในการทำนายประสิทธิภาพการย่อยสลายฟลูออรีนโดย *Sphingomonas* sp. P2 เมื่ออยู่ในแหล่งดินที่มีการปนเปื้อน PAHs

วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

ศึกษาผลของการย่อยสลายฟลูออรีนโดย *Sphingomonas* sp. P2 แบบโคเมตาบอลิซึม ร่วมกับสารอาหารที่แบคทีเรียใช้เป็นสับสเตรทในการเจริญ รวมทั้งลักษณะสมบัติของสารมัธยันตร์ที่เกิดจากการย่อยสลายดังกล่าว และผลของการเติมสารอาหารจากดินสกัดต่อการเจริญและย่อยสลายฟลูออรีนโดยแบคทีเรียนี้

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ทราบข้อมูลเกี่ยวกับการย่อยสลายฟลูออรีนโดย *Sphingomonas* sp. P2 แบบโคเมตาบอลิซึมร่วมกับสารอาหารที่แบคทีเรียใช้เป็นสับสเตรทในการเจริญและสารอาหารจากดินสกัด เพื่อเป็นแนวทางการเตรียมจุลินทรีย์ให้พร้อมสำหรับการนำไปใช้บำบัดในแหล่งดินที่มีการปนเปื้อนจริง ทั้งในแง่ของการเพิ่มจำนวนแบคทีเรีย และแสดงถึงการอยู่รอดและประสิทธิภาพการย่อยสลาย PAHs ของแบคทีเรียเมื่ออยู่ในแหล่งดินที่ปนเปื้อน

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

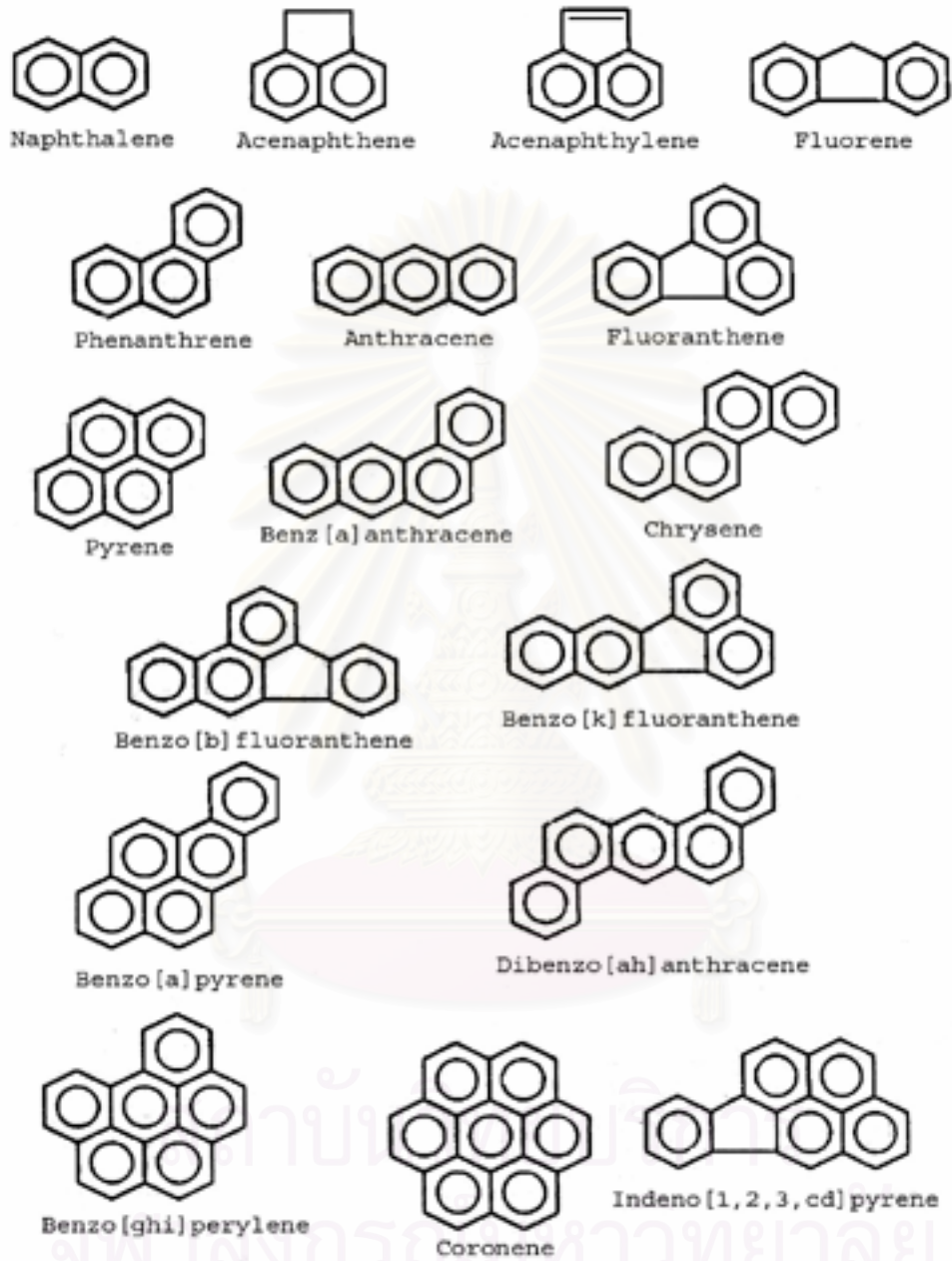
บทที่ 2

วารสารปริทัศน์

พอลิไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน (polycyclic aromatic hydrocarbon, PAHs) เป็นสารประกอบอินทรีย์ที่ประกอบด้วยวงแหวนอะโรมาติกตั้งแต่ 2 วงขึ้นไปมาเชื่อมต่อกันในลักษณะต่างๆ รูปแบบการเชื่อมต่อกันของ PAHs อาจเป็นแบบเส้นตรง (linear) มุมงอ (angular) หรือเป็นกลุ่ม (cluster) โดยทั่วไปการเพิ่มขนาดโมเลกุล และมุมของ PAHs จะมีผลทำให้ความเสถียร (stability) และความไม่ชอบน้ำ (hydrophobicity) เพิ่มขึ้นด้วย (Kanaly และ Harayama, 2000) ลักษณะทั้งสองเป็นปัจจัยสำคัญที่สนับสนุนให้ PAHs ที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงมีความคงทนอยู่ในสิ่งแวดล้อมได้เป็นเวลานาน

พบการปนเปื้อนของ PAHs ในสิ่งแวดล้อมอย่างกว้างขวาง ทั้งในแหล่งดิน แหล่งน้ำ ตะกอนทั้งในแม่น้ำและทะเล อากาศ โดยเกิดจากการเผาไหม้แบบไม่สมบูรณ์ของสารประกอบอินทรีย์ (Grifoll และคณะ, 1992) นอกจากนี้ PAHs ยังสามารถเกิดขึ้นได้เองตามธรรมชาติ เช่น จากไฟไหม้ป่า และการรั่วซึมของน้ำมันตามธรรมชาติ (Cerniglia, 1992)

PAHs จัดเป็นสารอันตรายเนื่องจากบางชนิดมีสมบัติเป็นสารก่อมะเร็ง (carcinogens) และสารก่อการกลายพันธุ์ (mutagens) และทำให้ทารกในครรภ์มีรูปร่างผิดปกติ (teratogens) (International Agency for Research on Cancer [IARC], 1983 อ้างถึงโดย Sutherland และคณะ, 1995) ดังนั้นหน่วยงานคุ้มครองสิ่งแวดล้อมของสหรัฐอเมริกา (The U.S. Environmental Protection Agency, EPA) จึงกำหนดรายการสาร PAHs 16 ชนิดที่ควรให้ความสำคัญเป็นอันดับต้น ควรติดตามในระบบนิเวศที่เป็นแหล่งน้ำและดิน (Keith และ Telliard, 1979) สาร PAHs ดังกล่าวได้แก่ แนพทาลีน (naphthalene), อะซีแนฟทีน (acenaphthene), อะซีแนฟทิลีน (acenaphthylene), ฟลูออรีน (fluorene), ฟีนแอนทรีน (phenanthrene), แอนทราซีน (anthracene), ฟลูออแรนทีน (fluoranthene), เบนโซ[เอ]แอนทราซีน (benz[a]anthracene), ไครซีน (chrysene), ไพรีน (pyrene), เบนโซ[บี]ฟลูออแรนทีน (benz[b]fluoranthene), เบนโซ[เค]ฟลูออแรนทีน (benz[k]fluoranthene), เบนโซ[เอ]ไพรีน (benzo[a]pyrene), ไดเบนโซ[เอ,เอช]แอนทราซีน (dibenz[a,h]anthracene), เบนโซ[จี,เอช,ไอ]เพอริลีน (benzo[g,h,i]perylene) และอินดีโน-[1,2,3,ซีดี]ไพรีน (indeno[1,2,3,cd]pyrene) (World Health Organization, 1983) โครงสร้างของสาร PAHs แสดงดังรูปที่ 2.1

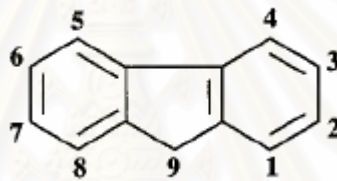


รูปที่ 2.1 โครงสร้างของสาร PAHs (Wilson และ Jones, 1993)

นอกจากนี้ในบางกรณีความเป็นพิษต่อยีน (genotoxicity) ของ PAHs ยังเพิ่มขึ้นตามขนาดโมเลกุล โดยขนาดต่ำที่สุดที่ทำให้เกิดพิษต่อยีนมักเป็น PAHs ที่มีวงเบนซีน 4-5 วง (Kanaly และ Harayama, 2000) Bezael และคณะ (1996) ยังกล่าวอีกว่าการเพิ่มขนาดโมเลกุลของ PAHs ทำให้สมบัติการละลายน้ำลดลงซึ่งแสดงถึงประสิทธิภาพการละลายของสารในเยื่อหุ้มเซลล์และเนื้อเยื่อของสิ่งมีชีวิตเพิ่มขึ้น และยังมีผลต่อความสามารถของจุลินทรีย์ในการนำ PAHs ไปใช้ประโยชน์ทางชีวภาพ (bioavailability) อีกด้วย

ฟลูออรีน (fluorene)

ฟลูออรีน (fluorene) เป็นสารแนฟทีโนอะโรมาติกที่ประกอบด้วยวงเบนซีน 2 วง และวงไซโคลเพนทีน 1 วง เชื่อมต่อกันโดยเรียงตัวเป็นเส้นตรง โครงสร้างของฟลูออรีนแสดงดังรูปที่ 2.1



รูปที่ 2.2 โครงสร้างโมเลกุลของฟลูออรีน (Grifoll และคณะ, 1995)

ฟลูออรีนเป็นผลิตภัณฑ์ที่พบในอุตสาหกรรมต่างๆ ได้แก่ในน้ำมันดิบ น้ำมันเครื่อง ถ่านหิน และการเผาไหม้กากของเสียต่างๆ แบบไม่สมบูรณ์ (Grifoll และคณะ, 1992) เป็นองค์ประกอบหลักในเชื้อเพลิงฟอสซิลและสารอนุพันธ์ และยังพบสารมัธยันตร์ 9-ฟลูออรีโนน (9-fluorenone) ซึ่งเป็นสารอนุพันธ์คีโตน (ketone derivative) ของฟลูออรีน ร่วมกับฟลูออรีนในบรรยากาศ แห้งน้ำ และส่วนของตะกอนทั้งในแม่น้ำและทะเล (Casellas และคณะ, 1997) ฟลูออรีนเป็นพิษทั้งต่อปลาและสาหร่ายในแหล่งน้ำและฟลูออรีน และ 9-ฟลูออรีโนนมีสมบัติเป็นสารก่อมะเร็งและสารก่อการกลายพันธุ์ (Casellas และคณะ, 1997) นอกจากนี้โครงสร้างของฟลูออรีนยังมีความเกี่ยวข้องกับสารเคมีอันตรายอื่นๆ ได้แก่ คาร์บาโซล (carbazoles), ไดเบนโซไทโอฟีน (dibenzothiophenes), ไดเบนโซฟูแรน (dibenzofurans) และไดเบนโซไดออกซิน (dibenzodioxin) ดังนั้นจึงใช้ฟลูออรีนเป็นสารต้นแบบในการศึกษากระบวนการย่อยสลายทางชีวภาพ (biodegradation) (Casellas และคณะ, 1997)

ความเป็นพิษของฟลูออรีน

Faust (1994) ได้รายงานสรุปความเป็นพิษของฟลูออรีนว่า ถึงแม้ไม่พบข้อมูลการดูดซึมฟลูออรีนบริเวณระบบทางเดินอาหารและระบบทางเดินหายใจของมนุษย์และสัตว์ แต่อย่างไรก็ตามจากการศึกษาความเป็นพิษโดยการให้สัตว์ทดลองกินโดยตรง พบฟลูออรีนถูกดูดซึมได้ในระบบทางเดินอาหาร และข้อมูลจากการศึกษา PAHs ที่มีโครงสร้างสัมพันธ์กับฟลูออรีนพบว่า อาจถูกดูดซึมทางปอดและผิวหนังได้อีกด้วย (U.S. EPA, 1991) ไม่พบข้อมูลความเป็นพิษของฟลูออรีนต่อมนุษย์ทั้งแบบเฉียบพลัน (acute toxicity) และเรื้อรัง (chronic toxicity) แต่พบความเป็นพิษของฟลูออรีนต่อสัตว์ทดลองโดย U.S. EPA (1989) รายงานว่าเมื่อให้ฟลูออรีน 250 หรือ 500 มก.ต่อ กก.ต่อ วัน เป็นเวลา 90 วันแก่หนูเพศผู้ ส่งผลให้การผลิตสเปิร์มในระยะสมบูรณ์ (mature spermatozoa) ลดลง และได้สรุปอวัยวะเป้าหมายของการก่อความเป็นพิษจากฟลูออรีนไว้ดังนี้

1. ระบบเลือด ทำให้เม็ดเลือดแดงและฮีโมโกลบินมีปริมาณลดลง และยังเพิ่มการสลายตัวของฮีโมไซเดอริน (hemosiderin) ในตับและม้าม
2. ตับ น้ำหนักของตับเพิ่มขึ้น เซลล์ตับแบ่งตัวผิดปกติ และการสลายตัวของฮีโมไซเดอรินเพิ่มขึ้น
3. ม้าม น้ำหนักของม้ามเพิ่มขึ้น เซลล์แบ่งตัวผิดปกติ และการสลายตัวของฮีโมไซเดอรินเพิ่มขึ้น
4. ระบบสืบพันธุ์ การผลิตสเปิร์มในระยะสมบูรณ์ลดลง และมีน้ำหนักของอวัยวะสืบพันธุ์เพิ่มขึ้น

นอกจากนี้ฟลูออรีนยังอาจเป็นพิษต่ออวัยวะอื่นๆ เช่นไตโดยทำให้ไตมีน้ำหนักเพิ่มขึ้น และระดับไนโตรเจนยูเรียในเลือดลดลง

Casellas และคณะ (1997) รายงานว่าฟลูออรีน และ 9-ฟลูออรีโนนมีสมบัติเป็นสารก่อมะเร็ง และสารก่อการกลายพันธุ์ รวมทั้งเป็นพิษทั้งต่อปลาและสาหร่ายในแหล่งน้ำ

การสลายหรือการเปลี่ยนแปลงของ PAHs ในธรรมชาติอาจเกิดขึ้นได้หลายทางได้แก่การระเหย (volatilization) การออกซิไดส์โดยแสง (photo-oxidation) การออกซิไดส์โดยสารเคมี (chemical oxidation) การสะสมในสิ่งมีชีวิต (bioaccumulation) และการดูดซับไว้ในอนุภาคดิน (soil adsorption) (Readman และ Mantoura, 1987; Witt และ Trost, 1999) แต่พบกระบวนการสำคัญในการกำจัด PAHs จากแหล่งน้ำมักเกิดจากการเปลี่ยนแปลงโดยจุลินทรีย์ (microbial transformation) และการสลายโดยแสง (photolysis) (Chen และคณะ, 1996; Jacquot และคณะ, 1996)

การย่อยสลาย PAHs โดยจุลินทรีย์เป็นวิธีหลักในการเปลี่ยนแปลงหรือกำจัด PAHs ในสิ่งแวดล้อม ดังนั้นการใช้ประโยชน์จากกระบวนการที่เกิดขึ้นโดยธรรมชาตินี้เพื่อบำบัดบริเวณที่มีการปนเปื้อนจึงเป็นทางเลือกใหม่ที่ดีกว่าการบำบัดด้วยวิธีทางเคมีและกายภาพ (Mueller และ Chapman, 1989)

การย่อยสลายฟลูออรีนโดยกระบวนการทางชีวภาพ

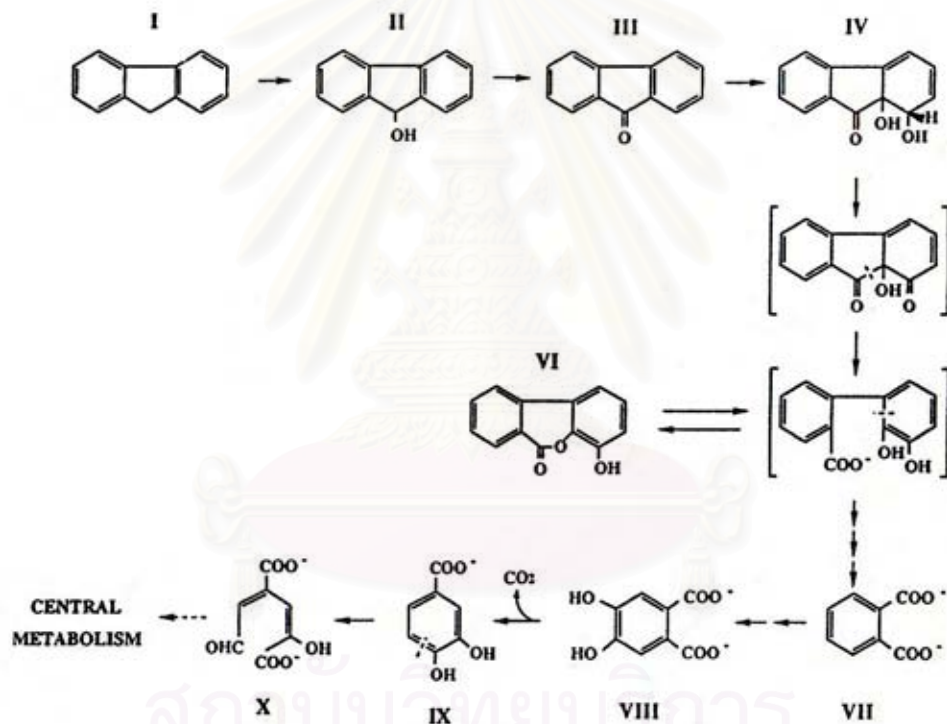
การย่อยสลายฟลูออรีนโดยสิ่งมีชีวิต พบว่าเกิดขึ้นได้ทั้งใน แบคทีเรีย เชื้อรา และสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม พบการย่อยสลายทั้งแบบเปลี่ยนแปลงโครงสร้างไปบางส่วนทำให้เกิดการสะสมสารมัธยันตร์ชนิดต่างๆ (transformation) และมีแบคทีเรียหลายชนิดที่สามารถย่อยสลายฟลูออรีนเพื่อใช้เป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงานได้

การย่อยสลายฟลูออรีนโดยแบคทีเรีย

Weissenfels และคณะ (1990) คัดแยกแบคทีเรียผสมที่สามารถเจริญโดยใช้สาร PAHs หลายชนิดเป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงาน เมื่อแยกแบคทีเรียให้เป็นเชื้อบริสุทธิ์พบแบคทีเรียทั้งหมด 3 สายพันธุ์ แต่ละสายพันธุ์มีความสามารถย่อยสลาย PAHs แต่ละชนิดได้แตกต่างกัน พบ *Pseudomonas vesicularis* สามารถเจริญโดยใช้ฟลูออรีนเป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงานได้

Monna และคณะ (1993) คัดแยกและศึกษาลักษณะสมบัติของแบคทีเรียแกรมบวก *Staphylococcus auriculans* DBF63 ที่สามารถเจริญบนฟลูออรีนโดยใช้เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงาน สามารถแยกสารมัธยันตร์จากการย่อยสลายฟลูออรีนได้หลายชนิด ได้แก่ 9-ฟลูออรีนอล, 9-ไฮดรอกซี-ฟลูออรีน, 1-ไฮดรอกซี-9-ฟลูออรีน (1-hydroxy-9-fluorenone), 1-ไฮโดร-1,1-ไดไฮดรอกซี-9-ฟลูออรีน (1-hydro-1,1a-dihydroxy-9-fluorenone) และ 4-ไฮดรอกซี-9-ฟลูออรีน (4-hydroxy-9-fluorenone)

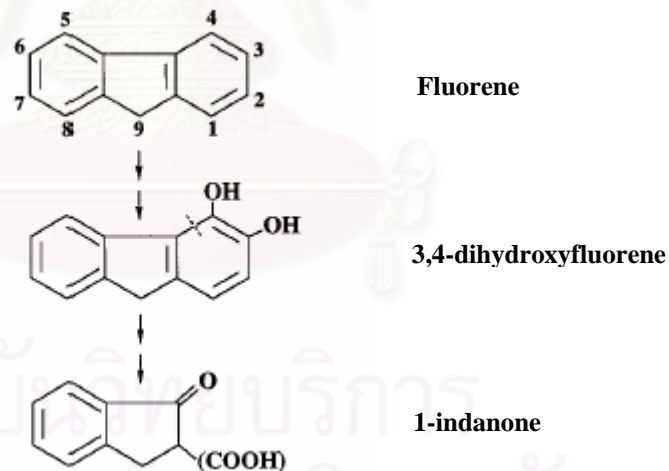
Grifoll และคณะ (1994) รายงานว่า *Pseudomonas* sp. F274 สามารถเจริญโดยใช้ฟลูออรีนเป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงานเพียงแหล่งเดียว และได้เสนอวิธีการย่อยสลายฟลูออรีนวิธีใหม่ แบคทีเรียนี้จะอาศัยกิจกรรมของเอนไซม์ไดออกซีจีเนสเปลี่ยน 9-ฟลูออรีโนนเป็น 1,1เอ-ไดไฮดรอกซี-1-ไฮโดร-9-ฟลูออรีโนน (1,1a-dihydroxy-1-hydro-9-fluorenone) แล้วจึงมีการเปิดวงไซโคลเพนธิน และย่อยสลายตามวิธีการย่อยสลายไบฟีนิล (biphenyl) ต่อไปจนได้ผลิตภัณฑ์เป็นกรดฟทาลิก (phthalic acid) และกรดโปรโตคาทีคูอิก (protocatechuic acid) ตามลำดับ



รูปที่ 2.3 วิธีการย่อยสลายฟลูออรีนโดย *Pseudomonas* sp. F274 (Grifoll และคณะ, 1994)
fluorene (I), 9-fluorenone (II), 9-fluorenone (III), 1,1a-dihydroxy-1-hydro-9-fluorenone (IV),
8-hydroxy-3,4-benzocoumarin (VI), phthalate (VII), 4,5-dihydroxyphthalate (VIII),
protocatechuate (IX), 2-hydroxy-4-carboxy-cis,cis-muconic semialdehyde (X)

Yang และคณะ (1994) โคลนยีนย่อยสลาย PAHs จาก *Pseudomonas putida* NCIB 9816 และให้แสดงออกใน *Escherichia coli* HB101 พบว่าแบคทีเรียสามารถย่อยสลายฟลูออรีนได้และตรวจพบสารมัธยันตร์ได้แก่ 9-ฟลูออรีนอล 9-ฟลูออรีโนน และสารมัธยันตร์ที่ไม่ทราบโครงสร้างอีก 2 ชนิด

Grifoll และคณะ (1995) รายงานว่า *Pseudomonas cepacia* F297 เมื่อเจริญโดยใช้ฟลูออรีนเป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงาน ในระหว่างการเจริญตรวจพบสารมัธยันตร์ที่ทำให้อาหารเลี้ยงเชื้อเปลี่ยนจากไม่มีสีเป็นสีเหลืองซึ่งเป็นลักษณะที่เกิดจากการแตกวงแบบเมตาและสะสมอยู่ในอาหารเหลวเพียงชั่วคราว แต่สารสีเหลืองที่เกิดขึ้นตรวจไม่พบเมื่อวิเคราะห์โดย HPLC แต่อย่างไรก็ตามผู้วิจัยตรวจพบสารมัธยันตร์อื่นๆ อีก 6 ชนิด และพบสารชนิดใหม่ที่สำคัญคือ 1-อินดาโนน (1-indanone) การย่อยสลายฟลูออรีนโดย *Pseudomonas cepacia* F297 มีกลไกคล้ายกับวิถีการย่อยสลายแนพธาซีน (naphthalene) คือมีการเติมออกซิเจนเข้าที่วงเบนซีนในตำแหน่งคาร์บอนที่ 3 และ 4 แล้วจึงเกิดการแตกวงพร้อมกับปลดปล่อยไพรูเวท (pyruvate) ผู้วิจัยเสนอวิถีการย่อยสลายฟลูออรีนดังรูปที่ 2.3

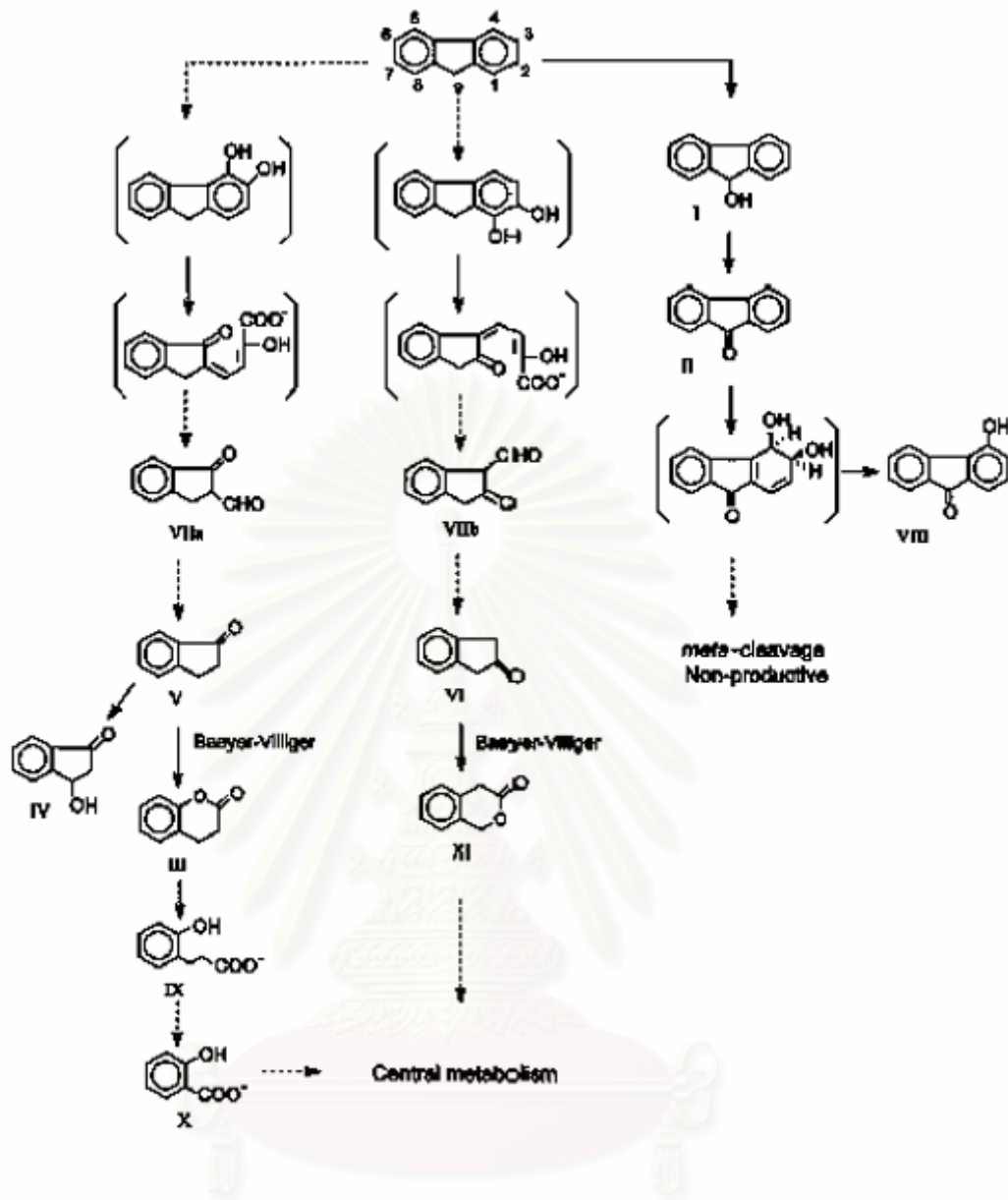


รูปที่ 2.4 วิถีเมแทบอลิซึมของการย่อยสลายฟลูออรีนโดย *Pseudomonas cepacia* F297

(Grifoll และคณะ, 1995)

Grifoll และคณะ (1992) และ Casellas และคณะ (1997) รายงานว่าเชื้อแบคทีเรีย *Arthrobacter* sp. F101 สามารถใช้ฟลูออรีนเป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงานในการเจริญได้ และมีการเสนอวิถีเมแทบอลิซึมในการย่อยสลายฟลูออรีนโดย *Arthrobacter* sp. F101 แบ่งเป็น 2 วิถี โดยวิถีหนึ่งฟลูออรีนถูกเปลี่ยนโครงสร้างเป็น 3,4-ไดไฮโดรคูมาริน (3,4-dihydrocoumarin) ซึ่งเป็นวิถีที่ทำให้เกิดการเพิ่มจำนวนเซลล์ ส่วนอีกวิถีหนึ่งมีการสะสม 9-ฟลูออรีนอล (9-fluorenol) และ 9เอช-ฟลูออรีโนน (9H-fluorenone) และไม่ถูกย่อยสลายต่อไปเป็นสารอื่น (dead-end route) ต่อมาพบสารมัธยันตร์ชนิดใหม่ที่สนับสนุนการนำเสนอวิถีการย่อยสลายฟลูออรีนโดย *Arthrobacter* sp. F101 และสามารถนำเสนอวิถีการย่อยสลายฟลูออรีนอย่างสมบูรณ์ โดยกล่าว ว่าวิถีการย่อยสลายฟลูออรีนเกิดขึ้นได้สามทาง สองทางแรกเกิดจากการเติม ออกซิเจนโดย เอนไซม์ไดออกซีจีเนสที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 1 และ 2 หรือตำแหน่งที่ 3 และ 4 ทำให้มีการแตก วงแบบเมตา แล้วจึงเกิดอัลโดเลส (aldolase) เปลี่ยนเป็นฟอร์มิล อินดาโนน (formyl indanone) ซึ่งเป็นวิถีที่แบคทีเรียใช้ในการเจริญ ส่วนวิถีการย่อยสลายฟลูออรีนแบบที่สาม เป็นวิถีที่เกิดโดย กิจกรรมของเอนไซม์โมโนออกซีจีเนสที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 9 ของฟลูออรีนซึ่งเป็นวิถีที่ทำให้เกิด การสมดุลของไพรูเวทในการเจริญของแบคทีเรีย วิถีเมแทบอลิซึมของการย่อยสลายฟลูออรีน โดย *Arthrobacter* sp. F101 แสดงดังรูปที่ 2.5

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

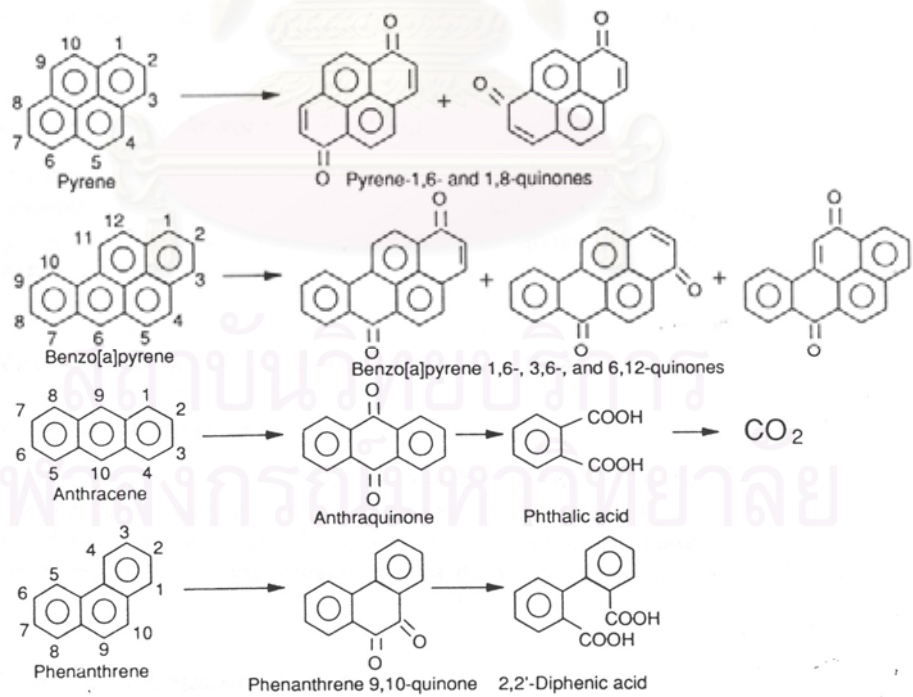


รูปที่ 2.5 วิธีเมแทบอลิซึมของการย่อยสลายฟลูออรีนโดย *Arthrobacter* sp. F101 I, 9-fluorenone; II, 9-fluorenone; III, 3,4-dihydroxycoumarin; IV, 3-hydroxy-1-indanone; V, 1-indanone; VI, 2-indanone; VIIa, 2-formyl-1-indanone; VIIb, 1-formyl-2-indanone; VIII, 4-hydroxy-9-fluorenone; IX, 3-(2-hydroxyphenyl)propionate; X, salicylate; XI, 3-isochromanone (Casellas และคณะ, 1997)

การย่อยสลายฟลูออรีนโดยรา

ราหลายชนิดย่อยสลาย PAHs โดยใช้ระบบไซโตโครมพี-450 โมโนออกซิจีเนส (cytochrome P-450 monooxygenase system) ราที่ใช้ระบบไซโตโครมพี-450 โมโนออกซิจีเนส จะเติมออกซิเจนแก่สับสเตรททำให้เกิดสารเอรีน ออกไซด์ (arene oxide) แล้วย่อยสลายต่อไปจะได้ผลิตภัณฑ์ที่เป็น ทรานส์-ไดไฮโดรไดออล (trans-dihydrodiol) ซึ่งไม่สามารถนำไปใช้เป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงานในการเจริญได้

นอกจากนี้ราไวท์รอตยังอาจใช้เอนไซม์ในกลุ่มย่อยสลายลิกนินซึ่งมีโครงสร้างเป็นอะโรมาติกคล้าย PAHs ในการย่อยสลายอีกด้วย เอนไซม์ในกลุ่มนี้ได้แก่ ลิกนินเปอร์ออกซิเดส แมงกานีสเปอร์ออกซิเดส และแลคเคส โดยมีรายงานการใช้แมงกานีสเปอร์ออกซิเดสจาก *Phanerochaete chrysosporium* ในการออกซิไดส์ฟลูออรีน (Bogan และ Hammel, 1996) ตัวอย่างราไวท์รอตที่ย่อยสลาย PAHs เช่น *Phanerochaete chrysosporium* และ *Trametes versicolor* แต่พบว่าการย่อยสลาย PAHs ที่เกิดขึ้นไม่สมบูรณ์ การย่อยสลาย PAHs ไปเป็น สารควิโนน (Quinone) โดยลิกนินเปอร์ออกซิเดสของ *Phanerochaete chrysosporium* แสดงในรูปที่ 2.6



รูปที่ 2.6 วิธีในการย่อยสลาย PAHs ชนิดต่างๆ โดย *Phanerochaete chrysosporium* (Sutherland และคณะ , 1995)

George และ Neufeld (1989) ศึกษาวิธีการและเทคนิคในการเตรียมดินสำหรับการย่อยสลายฟลูออรีนโดยราไวท์รอต *P. chrysosporium* สายพันธุ์ BKM-F1767 และเชื้อรานี้ยังสามารถย่อยสลายสารที่มีโครงสร้างใกล้เคียงกันเช่น 9-ฟลูออรีโนน และ 1,4 แนพโทควิโนน ได้อีกด้วย

Bezalel และคณะ (1996) แยกสารมัธยันตร์จากการย่อยสลาย PAHs หลายชนิดได้แก่ ไพรีน แอนทราซีน ฟลูออรีน และไดเบนโซไพเรน โดยราไวท์รอต *Pleurotus ostreatus* พบว่าฟลูออรีนถูกออกซิไดซ์กลายเป็น 9-ฟลูออรีนอล และ 9-ฟลูออรีโนน โดยกิจกรรมของเอนไซม์ไซโตโครมพี-450 ไมโนออกซีจีเนส

การย่อยสลายฟลูออรีนโดยสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (อ้างถึงโดย Faust, 1994)

Chen และ Lin (1989) พบการเติมหมู่ไฮดรอกซิลแก่ฟลูออรีนกลายเป็น 9-ฟลูออรีนอลเมื่อบ่ม (incubate) ฟลูออรีนร่วมกับตับหนูบดในหลอดทดลอง และการศึกษาเช่นเดียวกันโดย LaVoie และคณะ (1981) พบ 9-ฟลูออรีนอล 9-ฟลูออรีโนน และ 1-ไฮดรอกซีฟลูออรีน ซึ่งเป็นสารเมตาบอไลต์ที่เกิดขึ้นหลังจากบ่มฟลูออรีนร่วมกับตับหนูบดในหลอดทดลอง สำหรับการศึกษานี้มีชีวิตพบ 9-ฟลูออรีนอล กลูคูโรไซด์ (9-fluorenol glucuronide) และ 2-ฟลูออรีนอล ซัลเฟต (2-fluorenol sulfate) เป็นสารเมตาบอไลต์ปฐมภูมิในหนู และยังตรวจพบ 2-ฟลูออรีนอล และ 2-ฟลูออรีนอล กลูคูโรไซด์ ในปัสสาวะกระต่ายอีกด้วย

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

จากการศึกษาการย่อยสลายฟลูออรีนโดยสิ่งมีชีวิตชนิดต่างๆ จะเห็นได้ว่าสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิดสามารถย่อยสลายฟลูออรีนโดยใช้ระบบเอนไซม์แตกต่างกัน โดยแบคทีเรียจะใช้เอนไซม์ในกลุ่มออกซีจีเนส และราอาจใช้เอนไซม์ในกลุ่มย่อยสลายลิกนินหรือใช้ระบบไซโตโครมพี-450 ไมโนออกซีจีเนส ในการทำปฏิกิริยาย่อยสลายฟลูออรีน สามารถสรุปชนิดของจุลินทรีย์ที่ย่อยสลายฟลูออรีนได้ดังตารางที่ 2.1

ตารางที่ 2.1 ชนิดของจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการย่อยสลายฟลูออรีน

ชนิดจุลินทรีย์	เอกสารอ้างอิง
แบคทีเรีย	
<i>Pseudomonas vesicularis</i>	Weissenfels และคณะ (1990)
<i>Arthrobacter</i> sp. F101	Grifoll และคณะ (1992) และ Casellas และคณะ (1997)
<i>Staphylococcus auriculans</i> DBF63	Monna และคณะ (1993)
<i>Pseudomonas</i> sp. F274	Grifoll และคณะ (1994)
<i>Escherichia coli</i> HB101 ที่มีเอนไซม์ย่อยสลาย PAHs	Yang และคณะ (1994)
จาก <i>Pseudomonas putida</i> NCIB 9816	
<i>Pseudomonas cepacia</i> F297	Grifoll และคณะ (1995)
รา	
<i>Phanerochaete chrysosporium</i> BKM-F1767	George และ Neufeld (1989)

โคเมแทบอลิซึม (co-metabolism)

การย่อยสลาย PAHs ของจุลินทรีย์ในสิ่งแวดล้อมแตกต่างจากการย่อยสลายในห้องปฏิบัติการ เนื่องจากมีปัจจัยหลายประการที่ไม่สามารถควบคุมได้ เช่น อุณหภูมิ ค่าความเป็นกรด-ด่าง ความชื้น ปริมาณออกซิเจน ตลอดจนสารอาหารที่มีในสิ่งแวดล้อม มักพบสารเคมีต่างๆ อยู่ในรูปสารผสมไม่ว่าจะเป็นสารผสมระหว่าง PAHs ด้วยกันเองหรือ PAHs ผสมกับสับสเตรทที่ใช้ในการเจริญอื่นๆ (Boldrin และคณะ, 1993) ดังนั้นการย่อยสลายแบบโคเมแทบอลิซึมจึงอาจมีความสำคัญในกระบวนการบำบัดทางชีวภาพในสิ่งแวดล้อม

กระบวนการย่อยสลายสารเคมีแบบโคเมแทบอลิซึม หมายถึงกระบวนการที่จุลินทรีย์ออกซิไดส์สารที่ไม่สามารถใช้ในการเจริญ ไปพร้อมๆ กับการเจริญของจุลินทรีย์นั้นบนสารอาหารอื่นที่สามารถใช้เป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงานได้ (Horvath, 1972)

การย่อยสลายแบบโคเมแทบอลิซึมพบครั้งแรกโดย Leadbetter และ Foster (1959) รายงานว่าพบการออกซิไดส์อีเทนกลายเป็นกรดอะซีติก โพรเพนเป็นกรดโพรพิโอนิก และอะซีโตนกับบิวเทนกลายเป็นเมทิล เอทิล คีโตน กับกรดบิวทาโนอิก ในระหว่างการเจริญของ *Pseudomonas methanica* บนมีเทน

Matsumura และ Boush (1967) รายงานการย่อยสลายไดเอลดริน (dieldrin) โดยจุลินทรีย์ที่คัดแยกจากดิน 12 สายพันธุ์ เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารแมนนิทอล-ยีสต์สกัด (mannitol-yeast extract medium) และพบว่าประสิทธิภาพการย่อยสลายไดเอลดรินเสื่อมลงเมื่ออยู่ในภาวะที่ขาดแหล่งคาร์บอนและพลังงาน เมื่อศึกษาเพิ่มเติมพบว่าแมนนิทอลเป็นสารที่ทำหน้าเป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงานหลักที่ตอบสนองต่อการสลายสารฆ่าแมลงนี้โดยจุลินทรีย์ที่คัดแยกจากดิน

Horvath และ Koft (1972) พบการย่อยสลายสารแอลคิล เบนซีน ซัลโฟเนต (alkyl benzene sulfonate) โดย *Pseudomonas* sp. แบบโคเมแทบอลิซึมร่วมกับกลูโคส ได้ผลิตภัณฑ์เป็นไอโซโพรพานอล (isopropanol) จากการออกซิไดส์บริเวณกิ่ง และได้คาทีคอล (catechol) จากการออกซิไดส์วงอะโรมาติก

การย่อยสลาย PAHs แบบโคเมแทบอลิซึมเกิดขึ้นได้ทั้งย่อยสลายร่วมกับสับสเตรทที่เป็น PAHs ด้วยกันเอง หรือย่อยสลายร่วมกับสารอาหารอื่นๆ ที่จุลินทรีย์สามารถใช้เป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงานในการเจริญ ซึ่งมีรายงานอย่างแพร่หลายดังนี้

Shiaris และ Cooney (1983) คัดแยกแบคทีเรียย่อยสลายพีแนนทรีนแบบโคเมแทบอลิซึมร่วมกับแหล่งคาร์บอนที่เป็นสารอินทรีย์ ได้แก่กลูโคส โซเดียมเบนโซเอท น้ำมันเครื่อง และคีโรซีน การคัดแยกแบคทีเรียทำบนอาหารแข็งที่เติมแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ แล้วพ่นทับผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อด้วยพีแนนทรีน แบคทีเรียที่ย่อยสลายพีแนนทรีนแบบโคเมแทบอลิซึมเมื่อเจริญบน

อาหารแห้งที่เติมแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆจะสร้างบริเวณไฮดรอบโคโลนี แต่ไม่เกิดลักษณะเช่นนี้ในชุดควบคุมที่พันท้ายผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อด้วยพีแนทรีนแต่ไม่เติมสารอาหารชนิดอื่น

Heitkamp และ Cerniglia (1988) คัดแยกแบคทีเรียย่อยสลาย PAHs จากดินตะกอนที่มีประวัติการปนเปื้อนสารประกอบไฮโดรคาร์บอนเป็นเวลายาวนาน การคัดแยกแบคทีเรียทำบนอาหารแห้งที่เติมแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ ได้แก่ เปปโตเน ผงยีสต์สกัด และแป้ง แล้วพันท้ายผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อด้วยไฟรีน พบแบคทีเรียแกรมบวก รูปท่อน สร้างบริเวณไฮดรอบโคโลนีที่เจริญบนอาหารแห้งที่เติมแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ ที่พันท้ายผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อด้วยพีแนทรีนไฟรีน และฟลูออแรนธิน แบคทีเรียนี้ไม่สามารถใช้ PAHs เป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงานเพียงแหล่งเดียว แต่ย่อยสลาย PAHs อย่างสมบูรณ์จนได้ผลิตภัณฑ์เป็นคาร์บอนไดออกไซด์เมื่อเลี้ยงเชื้อในภาวะที่มี เปปโตเน ผงยีสต์สกัด และแป้ง ในอาหารเลี้ยงเชื้อ

Keuth และ Rehm (1991) ศึกษาการย่อยสลายพีแนทรีนโดยแบคทีเรีย *Arthrobacter polychromogenes* ที่คัดแยกจากดิน เมื่อเติมกลูโคสในอาหารเลี้ยงเชื้อ 0.45 กรัมต่อลิตรสามารถกระตุ้นให้แบคทีเรียย่อยสลายพีแนทรีนให้มีประสิทธิภาพดีขึ้น

Boldrin และคณะ (1993) พบว่าการย่อยสลายฟลูออรีนโดย *Mycobacterium* sp. BB1 เกิดขึ้นเมื่อเติมผงยีสต์สกัดและเปปโตเน (อย่างละ 500 มก. ต่อลิตร) และสามารถแยกสารมัธยันตร์จากการย่อยสลายดังกล่าวได้สามชนิดได้แก่ 9-ฟลูออรีนอล 9-ฟลูออรีโนน และ 1-อินดาโนน นอกจากนี้ยังพบการย่อยสลายฟลูออรีนแบบโคเมแทบอลิซึมร่วมกับ PAHs อื่นๆ ได้แก่ พีแนทรีน ฟลูออแรนธิน และไฟรีน และพบสารมัธยันตร์สี่เหลืองในอาหารเลี้ยงเชื้อเมื่อย่อยสลายร่วมกับฟลูออแรนธิน

Stringfellow และ Aitken (1995) พบการย่อยสลายฟลูออรีนแบบโคเมแทบอลิซึมร่วมกับเปปโตเนโดย *Pseudomonas stutzeri* P16 โดยกล่าวว่าเมื่อแบคทีเรียนี้เจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีฟลูออรีนและเปปโตเนทำให้สีของอาหารเหลวเปลี่ยนเป็นสีเหลืองใส และพบสารมัธยันตร์จากการวิเคราะห์ HPLC สองชนิดคือ 9-ฟลูออรีนอล และ 9-ฟลูออรีโนน

Yuan และคณะ (2000) ศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการย่อยสลายพีแนทรีนในดินตะกอนจากแม่น้ำ พบว่าการเติมแหล่งคาร์บอนที่เป็นสารอินทรีย์ ทำให้อัตราการย่อยสลายพีแนทรีนเพิ่มขึ้นโดยลำดับของสารอาหารที่ทำให้้อตราการย่อยสลายพีแนทรีนเพิ่มขึ้นเรียงลำดับจากสูงไปต่ำ ได้แก่ ผงยีสต์สกัด อะซีเตท กลูโคส และไพรูเวท (50 มก.ต่อลิตร) ตามลำดับ

การบำบัดสารพิษในสิ่งแวดล้อมโดยวิธีทางชีวภาพ โดยเฉพาะในดินพบว่ามีความซับซ้อนที่มีผลต่อการย่อยสลายสารเคมีต่างๆ ได้แก่ องค์ประกอบของสารเคมี อุณหภูมิ ค่าความเป็นกรด-ด่าง แสงสว่าง และปริมาณออกซิเจน (Miller และคณะ, 1988) รวมทั้งความต้องการสารอาหารของแบคทีเรียและการปรับตัวของประชากรจุลินทรีย์ในดิน (Philips และคณะ, 2000)

ได้มีการศึกษาผลของสารอาหารในดิน การเติมสารอาหารลงไปในดินต่อการย่อยสลายสารเคมีที่ปนเปื้อนในแหล่งดิน และการปรับตัวของจุลินทรีย์ก่อนเติมลงไปในบำบัดดินที่มีการปนเปื้อนดังนี้

Swindoll และคณะ (1988) ศึกษาผลของการเติมสารอาหารทั้งที่เป็นสารอินทรีย์ และสารอนินทรีย์ ต่อการย่อยสลายทางชีวภาพและการปรับตัวของกลุ่มจุลินทรีย์ที่มีแหล่งที่อยู่บริเวณเกือบจะถึงผิวดิน (subsurface) พบมีการปรับตัวของจุลินทรีย์ตอบสนองต่อการเติมสารอาหารอินทรีย์ โดยมีอัตราการย่อยสลายสารเคมีที่ใช้ทดสอบได้แก่ เอธิลีน ไดโบรไมด์ (ethylene dibromide) พี-ไนโตรฟีนอล (*p*-nitrophenol) ฟีนอล (phenol) และโทลูอีน (toluene) แต่พบว่าการเติมสารอาหารอินทรีย์กลับยับยั้งการย่อยสลายทดสอบต่างๆ สารอินทรีย์ที่เติมได้แก่ กลูโคส และกรดอะมิโน ซึ่งพบการย่อยสลายเป็นลำดับโดยจุลินทรีย์เลือกใช้สารอาหารที่ใช้ได้ง่ายกว่าในการเจริญแล้วจึงหันมาย่อยสลายสารเคมีทดสอบเมื่อแหล่งคาร์บอนที่ใช้ได้ง่ายกว่าถูกใช้หมดไป

Grosser และคณะ (1995) ศึกษาการย่อยสลาย PAHs ในดินที่มีการปนเปื้อนสารประกอบไฮโดรคาร์บอน 5 แหล่ง เมื่อวิเคราะห์ดินจากแหล่งต่างๆ พบปริมาณสารไฮโดรคาร์บอนทั้งหมดที่สกัดจากดินแต่ละแหล่งแตกต่างกัน และพบการย่อยสลาย PAHs ในดินสองแหล่งอย่างมีประสิทธิภาพโดย *Mycobacterium* sp. และสันนิษฐานว่าการย่อยสลายที่เกิดขึ้นอาจเกิดจากการมีสารไฮโดรคาร์บอนในดินทั้งสองแห่งในปริมาณสูง ซึ่งอาจกระตุ้นการย่อยสลาย PAHs ที่เติมลงไปในดินแบบโคเมแทบอลิซึม

Ortega-Calvo และ Saiz-Jimenez (1998) ได้ศึกษาผลของสารที่เป็นองค์ประกอบในดินต่อการย่อยสลายฟีนานทรีนโดย *Pseudomonas fluorescens* ที่คัดแยกจากดิน ได้แก่ ส่วนที่เป็นฮิวมิก (Humic fractions) ซึ่งประกอบด้วยกรดฮิวมิก และกรดฟัลวิก และส่วนที่เป็นดินเหนียว (clay) พบว่าเมื่อเติมส่วนฮิวมิก 100 ไมโครกรัมต่อมล. ส่งผลให้การย่อยสลายฟีนานทรีนเกิดขึ้นได้ดีที่สุด โดยเกิดการย่อยสลายอย่างสมบูรณ์ (mineralization) จนได้คาร์บอนไดออกไซด์ 25 % ส่วนดินเหนียวให้ผลดีต่อการย่อยสลายฟีนานทรีนเช่นกันแต่ไม่ดีเท่าส่วนฮิวมิก (ได้ผลิตภัณฑ์เป็นคาร์บอนไดออกไซด์ 15 %) นอกจากนี้ยังเติมดินทั้งสองส่วนร่วมกันกับการย่อยสลายฟีนานทรีนเนื่องจากดินทั้งสองส่วนจะพบอยู่ร่วมกันในธรรมชาติ แต่อาจมีผลกระทบต่ออัตราการย่อยสลายสาร PAHs โดยจุลินทรีย์ในแง่อัตราส่วนที่ผสมกันอยู่ พบว่าการเติมกรดฮิวมิก 100 ไมโครกรัมต่อ

มล.ร่วมกับส่วนดินเหนียว 1 และ 10 กรัมต่อลิตร ได้คาร์บอนไดออกไซด์ 27 และ 25 % ตามลำดับ ทำให้แบคทีเรียสามารถย่อยสลายพีแนทรีนอย่างมีประสิทธิภาพ และยังศึกษาผลการเติมกรดฮิวมิกร่วมกับดินเหนียว และกรดฟัลวิกร่วมกับดินเหนียว พบว่าดินทั้งสองส่วนต่างก็เสริมประสิทธิภาพการย่อยสลายพีแนทรีน แต่กรดฮิวมิกให้ผลดีกว่ากรดฟัลวิก โดยวัดปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์จากการย่อยสลายสมบูรณ์ได้เท่ากับ 23 และ 14 % ตามลำดับ

Molina และคณะ (1999) ทดสอบการย่อยสลายไพรีนโดยใช้จุลินทรีย์ย่อยสลาย PAHs จากดินตะกอนที่มีการปนเปื้อนโลหะและ PAHs เมื่อเปรียบเทียบการย่อยสลายไพรีนในดินตะกอน สารสกัดจากดินตะกอน และอาหารเลี้ยงเชื้อ mineral salt medium (MSM) ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญในแต่ละชุดการทดลอง

Philips และคณะ (2000) ศึกษาผลการเติมสารอาหารต่อการย่อยสลายไพรีนในดินที่มีการปนเปื้อนสารครีโอสทามแหล่ง (AC NB และ TI) พบว่าการเติมไนโตรเจนและฟอสฟอรัสแตกต่างกันในดินแต่ละชนิด

Juhasz และคณะ (2000) ปรับปรุงและพัฒนาอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมสำหรับใช้เป็นหัวเชื้อในการเติมจุลินทรีย์ลงไปดินเพื่อบำบัด PAHs ในดิน โดยพบว่าการใช้ผงยีสต์สกัดร่วมกับสารครีโอสทในการเลี้ยงจุลินทรีย์ ทำให้จุลินทรีย์สามารถเพิ่มจำนวนมากขึ้นและยังรักษาความสามารถในการย่อยสลายไพรีนของจุลินทรีย์กลุ่มนี้ไว้ได้ เมื่อนำจุลินทรีย์ไปบำบัด PAHs ที่ปนเปื้อนในดิน

จะเห็นได้วก่อนที่จะมีการนำจุลินทรีย์ไปบำบัดสิ่งแวดล้อมที่ปนเปื้อนด้วยสารเคมีอันตรายต่างๆ ควรมีการศึกษาระบบเมแทบอลิซึมและความสามารถในการย่อยสลายสารเคมีนั้นๆ รวมถึงปัจจัยต่างๆที่คาดว่าจะมีผลต่อการดำรงชีวิตและการย่อยสลายสารพิษในดิน เพื่อให้ได้ประโยชน์สูงสุดในการบำบัดสารเคมีอันตรายในสิ่งแวดล้อม

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 3

อุปกรณ์ เคมีภัณฑ์ และวิธีดำเนินงานวิจัย

อุปกรณ์ในการทดลอง

1. เครื่องชั่ง รุ่น L2200P และ A200S ของบริษัท Sartorius, USA.
2. เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH meter) รุ่น 240 ของบริษัท Corning, USA.
3. เครื่องนึ่งอบฆ่าเชื้อ (autoclave) ของบริษัท Kokusan, Japan.
4. ตู้เขี่ยเชื้อแบบ ISSCO laminar flow รุ่น BVT-124 ของบริษัท International Scientific Supply, USA.
5. เครื่องเขย่า (gyrotory shaker) รุ่น G10 ของบริษัท New Brunswick Scientific, USA.
6. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) รุ่น Spectronic 21 ของบริษัท Bausch & Lomb, USA.
7. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) รุ่น UV-160A ของบริษัท Shimadzu, Japan.
8. ตู้ป้อนเชื้อ (Contherm digital series cooled incubator) ของบริษัท Contherm Scientific, New Zealand.
9. ตู้ป้อนเชื้อ (Incubator) ของบริษัท Memmert, Germany.
10. เครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดควบคุมอุณหภูมิ (refrigerated centrifuge) รุ่น J2-21 ของบริษัท Beckman Instrument Inc., USA.
11. ตู้อบแห้ง (Contherm digital series oven) ของบริษัท Contherm Scientific, New Zealand.
12. ไมโครปิเปต (micropipette) ขนาด 20, 100, 200, 1000 และ 5000 ไมโครลิตร ของบริษัท Gilson, France.
13. เครื่องปั่นผสม (vortex mixer) รุ่น G-560E ของบริษัท Scientific Industries, USA.
14. เครื่องระเหยแห้งแบบสูญญากาศ (rotary vacuum evaporator) รุ่น N ของบริษัท Tokyo Rikakikai, Japan.
15. เครื่องระเหยแห้งแบบสูญญากาศ (rotary vacuum evaporator) รุ่น N-N ของบริษัท Tokyo Rikakikai, Japan.
16. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (waterbath) ของบริษัท Tokyo Rikakikai, Japan.
17. กรวยแยก (seporatory funnel) ขนาด 500 มล. ของบริษัท Sibata, Japan.
18. กระจกฉีดยาพลาสติกขนาด 1, 5 และ 10 มล. ของบริษัท Nissho Nipro, Japan.

19. ชุดกรองสำเร็จรูปชนิด PTFE ขนาด 0.2 ไมโครเมตร รุ่น DISMIC-13JP ของบริษัท Tokyo Roshi Kaisha, Japan.
20. ชุดกรองสำเร็จรูปชนิดเซลลูโลสอะซีเตท ขนาด 0.45 ไมโครเมตร รุ่น DISMIC-25CS ของบริษัท Tokyo Roshi Kaisha, Japan.
21. แผ่นกรองชนิด FH ขนาด 0.5 ไมโครเมตร ของบริษัท Tokyo Roshi Kaisha, Japan.
22. Disposable micropipette . ของบริษัท Merck, Germany.
23. แผ่นอลูมิเนียมที่แอลซี (TLC aluminium sheet) เคลือบด้วย silica gel 60 F₂₅₄ ขนาด 20 × 20 ซม. ของบริษัท Merck, Germany.
24. หลอดแสงอัลตราไวโอเล็ตช่วงความยาวคลื่น 215-250 นาโนเมตร (ultraviolet lamp) รุ่น UVGL-15 ของบริษัท UVP, USA.
25. เครื่องกำเนิดเสียงความถี่สูง (ultrasonicator) ชนิดอ่าง รุ่น FS4000 ของบริษัท Decan Ultrasonics, England.
26. ชุดเครื่องมือไฮเพอร์ฟอแมนซ์ลิควิดโครมาโตกราฟี (high performance liquid chromatography, HPLC) สำหรับตรวจวิเคราะห์ปริมาณฟลูออรีน
 - ลิควิดโครมาโตกราฟี (liquid chromatography) รุ่น LC-3A ของบริษัท Shimadzu, Japan.
 - คอลัมน์ (column) : Senshu Pak Pegasil ODS ขนาด 4.6 × 150 มม. ของบริษัท Senshu Scientific, Japan
 - เครื่องตรวจสอบ (UV-visible detector) รุ่น SPD-2A ของบริษัท Shimadzu, Japan.
 - เครื่องบันทึก (recorder) Chromatopac รุ่น C-R1A ของบริษัท Shimadzu, Japan.
 - กระบอกฉีดยาขนาดเล็ก (microsyringe) รุ่น MS-R100 ของบริษัท Exmire, USA.
27. ชุดเครื่องมือไฮเพอร์ฟอแมนซ์ลิควิดโครมาโตกราฟี (high performance liquid chromatography, HPLC) สำหรับการแยกสารมัธยันตร์ให้บริสุทธิ์
 - ลิควิดโครมาโตกราฟี (liquid chromatography) รุ่น LC-10ADVP ของบริษัท Shimadzu, Japan.
 - คอลัมน์ (column) : Inertsil PREP-ODS ขนาด 10 × 250 มม. ของบริษัท GL science, Japan
 - เครื่องตรวจสอบ (UV-visible detector) รุ่น SPD-10ADVP ของบริษัท Shimadzu, Japan.
 - กระบอกฉีดยาขนาดเล็ก (microsyringe) รุ่น 750SNR ของบริษัท Hamilton, USA

28. ชุดเครื่องมือแมสสเปกโตรเมตรี (mass spectrometry, MS) รุ่น Trio 2000 ของบริษัท Fisons Instruments จำกัด, England.

เคมีภัณฑ์

1. ฟลูออรีน (Fluorene) ของบริษัท Sigma, USA.
2. 9-ฟลูออรีนอล (Fluoreno) ของบริษัท TCE, Japan.
3. โซเดียมเบนโซเอต Merck, Germany.
4. กลีเซอรอล (glycerol) ของบริษัท Carlo ERBA, Italy.
5. ไดเมทิลซัลโฟไซด์ (CH_3SOCH_3) ของบริษัท Carlo ERBA, Italy.
6. แบคโตอะการ์ (bacto agar) ของบริษัท Difco Laboratories, USA.
7. แอมโมเนียมไนเตรต (NH_4NO_3) ของบริษัท BDH Chemicals, Australia.
8. ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟตไดเดคคาไฮเดรต ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$) ของบริษัท Carlo ERBA, Italy.
9. โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) ของบริษัท AJEX Chemicals, Australia.
10. แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) ของบริษัท Carlo ERBA, Italy.
11. เฟอริกคลอไรด์เฮกซะไฮเดรต ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) ของบริษัท May & Baker, England.
12. แคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรต ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) ของบริษัท AJEX Chemicals, Australia.
13. ทริปโตเน (tryptone) ของบริษัท Difco Laboratories, USA.
14. ยีสต์สกัด (yeast extract) ของบริษัท Difco Laboratories, USA.
15. โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ของบริษัท Merck, Germany.
16. โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ของบริษัท Merck, Germany.
17. กรดไฮโดรคลอริก (HCl) ของบริษัท BDH Chemicals, Australia.
18. เมทานอล (CH_3OH) ของบริษัท Merck, Germany.
19. อะซีโตนไนโตร (CH_3N) ของบริษัท Lab Scan, Ireland.
20. เอซิลอะซีเตท ($\text{CH}_3\text{COOC}_2\text{H}_5$) ของบริษัท Merck, Germany.
21. โซเดียมซัลเฟตแอนไฮไดรต์ (anhydrous Na_2SO_4) ของบริษัท Merck, Germany.
22. โทลูอีน ($\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_3$) ของบริษัท Carlo ERBA, Italy.
23. 1,4-ไดออกเซน ($\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_2$) Carlo ERBA, France.
24. กรดอะซีติกเข้มข้น (glacial CH_3COOH) ของบริษัท BDH Chemicals, Australia.

วิธีดำเนินงานวิจัย

3.1 แบคทีเรียและการเก็บรักษาแบคทีเรีย

3.1.1 การเก็บรักษาแบคทีเรีย

ถ่ายเชื้อ *Sphingomonas* sp. P2 (ณัฐพันธุ์ ศุภกา, 2542) ลงในอาหารแข็ง Carbon Free Mineral Medium (CFMM) (ภาคผนวก ก หมายเลข 2) ที่มีผลึกของพีแนทรีนบนฝาของจานอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นแหล่งคาร์บอน บ่มที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 5 วัน จากนั้นเชื้อโคโลนีเดียวลงในอาหารเหลว CFMM (ภาคผนวก ก หมายเลข 1) ที่มีพีแนทรีนความเข้มข้น 100 มก.ต่อลิตร เลี้ยงเชื้อบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 วัน จากนั้นนำมาผสมกับกลีเซอรอลในอัตราส่วนน้ำเลี้ยงเชื้อต่อกลีเซอรอลปลอดเชื้อเท่ากับ 70 : 30 และ 50 : 50 แล้วบรรจุลงในหลอดเก็บเชื้อแช่แข็ง สำหรับการเก็บเชื้อที่อุณหภูมิ -70 °C และ -20 °C ตามลำดับ

3.2 การศึกษาการเจริญและวิเคราะห์สารมัธยันตร์ที่สะสมจากการย่อยสลายฟลูออรีนโดย *Sphingomonas* sp. P2

3.2.1 เตรียมหัวเชื้อของแบคทีเรีย โดยทำการถ่ายเชื้อจากหลอดแช่แข็งที่เก็บไว้ลงบนจานอาหาร CFMM ที่มีผลึกของพีแนทรีนบนฝาของจานอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นแหล่งคาร์บอน บ่มที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 5 วัน จากนั้นเชื้อโคโลนีเดียว ถ่ายลงในอาหารเหลว CFMM ปริมาตร 5 มล. ที่มีโซเดียมเบนโซเอทความเข้มข้น 1 กรัมต่อลิตร (ภาคผนวก ก หมายเลข 3) เลี้ยงเชื้อบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วถ่ายเชื้อลงในอาหารเหลว CFMM ปริมาตร 100 มล. ที่มีโซเดียมเบนโซเอทความเข้มข้น 1 กรัมต่อลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มล. เลี้ยงเชื้อบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นแยกเซลล์ออกจากอาหารเหลวด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 10 นาที นำส่วนเซลล์แบคทีเรียมาล้างในสารละลายโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.85 % แล้วปั่นเหวี่ยงที่สภาวะเดิม ทำการทดลองในขั้นตอนนี้อีก 3 ครั้ง จากนั้นนำส่วนเซลล์มาแขวนลอยในอาหารเลี้ยงเชื้อ CFMM วัดความขุ่น (turbidity) ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร และเจือจางให้มีค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 1.0 นำหัวเชื้อที่เตรียมได้ไปเขย่าที่ 200 รอบต่อนาทีที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วทำการถ่ายหัวเชื้อลงในอาหารเหลว CFMM ปริมาตร 5 มล. ที่มีฟลูออรีนความเข้มข้น 100 มก.ต่อลิตร เลี้ยงเชื้อบนเครื่องเขย่าที่

ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 °C เก็บตัวอย่างทุก 24 ชั่วโมง เป็นเวลา 7 วัน เพื่อศึกษาการเพิ่มจำนวนของแบคทีเรีย และวิเคราะห์สารมัธยันตร์ที่สะสมจากการย่อยสลายฟลูออรีน

3.2.2 วัดการเจริญของแบคทีเรียด้วยวิธี viable plate count โดยนำอาหารเหลวมาเจือจางด้วยสารละลาย 0.85% โซเดียมคลอไรด์ ให้มีความเข้มข้นที่เหมาะสม นำมาเกลี่ยบนอาหารแข็ง Luria Bertani (LB) (ภาคผนวก ก หมายเลข 5) บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 3 วัน นับจำนวนโคโลนีที่เกิดขึ้น

3.2.3 นำอาหารเลี้ยงเชื้อมาทำการสกัดด้วยเอธิลอะซีเตทเพื่อวัดปริมาณฟลูออรีนที่เหลืออยู่และวิเคราะห์สารมัธยันตร์ที่เกิดขึ้นจากการย่อยสลายฟลูออรีนโดยวิธี HPLC ทำโดยนำอาหารเหลวที่ทราบปริมาตรแน่นอนมาปรับค่าความเป็นกรด-ด่างให้เท่ากับ 2.0-3.0 โดยการเติมกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น จากนั้นเติมเอธิลอะซีเตทปริมาตร 1 เท่าของน้ำเลี้ยงเชื้อลงในอาหารเหลวผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องปั่นผสมที่ความเร็วสูงเป็นเวลา 1 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้แยกชั้น จากนั้นแยกส่วนเอธิลอะซีเตทเก็บไว้ ทำการสกัดน้ำเลี้ยงเชื้อด้วยเอธิลอะซีเตทปริมาตร 1 เท่าของน้ำเลี้ยงเชื้อซ้ำอีกครั้งหนึ่ง รวมส่วนเอธิลอะซีเตททั้งหมดเข้าด้วยกัน กำจัดน้ำที่ปนออกมาโดยการเติมโซเดียมซัลเฟตแอนไฮดรัส จากนั้นนำส่วนเอธิลอะซีเตทไประเหยแห้งด้วยเครื่องระเหยแห้งสูญญากาศแบบหมุนจนได้ตะกอนของสารมัธยันตร์ เติมน้ำกลั่นปริมาตร 1 มล. ลงไปละลายสารมัธยันตร์ในขวดหลอดปริมาตร กรองผ่านชุดกรองสำเร็จรูปชนิด PTFE ขนาด 0.2 ไมโครเมตรใส่ลงในหลอดแก้วขนาดเล็ก เก็บที่อุณหภูมิ -20 °C จนกว่าจะนำไปวิเคราะห์ปริมาณฟลูออรีนที่เหลืออยู่และวิเคราะห์สารมัธยันตร์ที่เกิดขึ้นจากการย่อยสลายฟลูออรีนโดยวิธี HPLC ต่อไป

3.2.4 การวิเคราะห์ปริมาณฟลูออรีนที่เหลือและวิเคราะห์สารมัธยันตร์ที่เกิดขึ้นจากการย่อยสลายฟลูออรีนโดยวิธี HPLC

เตรียมชุดสารมาตรฐานของฟลูออรีนโดยละลายฟลูออรีนในอาหารเหลว CFMM ให้ได้ความเข้มข้น 0, 10, 20, 40, 60, 80, 100, 120 มก.ต่อลิตร จากนั้นทำการสกัดด้วยเอธิลอะซีเตทตามขั้นตอนในข้อ 3.2.3 นำชุดสารมาตรฐานและชุดทดลองมาวิเคราะห์หาปริมาณฟลูออรีนโดยวิธี HPLC ซึ่งมีส่วนประกอบต่างๆ ดังนี้

เครื่องลิควิดโครมาโตกราฟีรุ่น LC-3A ใช้คอลัมน์ Senshu Pak Pegasil ODS ขนาด 4.6 × 150 มม. ตั้งอุณหภูมิของคอลัมน์ที่ 40 °C ตรวจสอบการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 275 นาโนเมตร โดยใช้สารละลายตัวพาเป็นสารละลายเมทานอล 80 % ในน้ำ (ภาคผนวก ข.) และใช้อัตราการไหลเท่ากับ 1 มล.ต่อนาที ฉีดสารละลายตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์ปริมาตร 20

ไมโครลิตรด้วยกระบอกฉีดขนาดเล็กรุ่น MS -100 นำพื้นที่ได้กราฟที่ได้จากการวิเคราะห์ ตัวอย่างไปคำนวณหาปริมาณฟลูออรีนโดยใช้กราฟมาตรฐานที่ได้จากชุดสารมาตรฐาน กราฟมาตรฐานแสดงในภาคผนวก ค.

3.3 การเติมยีสต์สกัดเพื่อช่วยการย่อยสลายฟลูออรีนโดย *Sphingomonas* sp. P2

3.3.1 เตรียมหัวเชื้อของแบคทีเรียเช่นเดียวกับขั้นตอนในข้อ 3.2.1 แล้วถ่ายหัวเชื้อที่มีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตรเท่ากับ 1.0 ลงในอาหารเหลว CFMM ปริมาตร 5 มล. ที่มีฟลูออรีนความเข้มข้น 100 มก.ต่อลิตร เติมยีสต์สกัด 0.1 % (น้ำหนักต่อปริมาตร) เลี้ยงเชื้อบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 °ซ เป็นเวลา 7 วัน

3.3.2 นำอาหารเลี้ยงเชื้อมาทำการสกัดด้วยเอธิลอะซีเตทเช่นเดียวกับขั้นตอนในข้อ

3.2.3 แล้วนำไปวิเคราะห์ปริมาณฟลูออรีนที่เหลืออยู่ และวิเคราะห์สารมัธยันตร์ที่เกิดขึ้นจากการย่อยสลายฟลูออรีนโดยวิธี HPLC

3.4 ศึกษาปริมาณความเข้มข้นของยีสต์สกัดที่เหมาะสมต่อการย่อยสลายฟลูออรีนโดย *Sphingomonas* sp. P2

3.4.1 เตรียมหัวเชื้อของแบคทีเรียเช่นเดียวกับขั้นตอนในข้อ 3.2.1 แล้วถ่ายหัวเชื้อที่มีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตรเท่ากับ 1.0 ลงในอาหารเหลว CFMM ปริมาตร 5 มล. ที่มีฟลูออรีนความเข้มข้น 100 มก.ต่อลิตร และเติมยีสต์สกัดให้มีความเข้มข้นเท่า 0 0.02 0.05 0.07 0.1 0.5 และ 1.0 % เลี้ยงเชื้อบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 °ซ เป็นเวลา 7 วัน

3.4.2 นำอาหารเลี้ยงเชื้อมาทำการสกัดด้วยเอธิลอะซีเตทเช่นเดียวกับขั้นตอนในข้อ

3.2.3 แล้วนำไปวิเคราะห์ปริมาณฟลูออรีนที่เหลืออยู่ และวิเคราะห์สารมัธยันตร์ที่เกิดขึ้นจากการย่อยสลายฟลูออรีนโดยวิธี HPLC

3.5 การศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมในการเติมยีสต์สกัดเพื่อช่วยการย่อยสลายฟลูออรีน

3.5.1 เตรียมหัวเชื้อของแบคทีเรียเช่นเดียวกับขั้นตอนในข้อ 3.2.1 แล้วถ่ายหัวเชื้อที่มีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตรเท่ากับ 1.0 ลงในอาหารเหลว CFMM ปริมาตร 5 มล. ที่มีฟลูออรีนความเข้มข้น 100 มก.ต่อลิตร เติมยีสต์สกัดในปริมาณที่เหมาะสมในข้อ 3.4 ลงในอาหารเหลว CFMM ในช่วงเวลาที่ 0 12 24 และ 48 ของการเลี้ยงเชื้อ เลี้ยงเชื้อบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 °C เก็บตัวอย่างทุก 12 ชั่วโมง เป็นเวลา 7 วัน เพื่อศึกษาการเพิ่มจำนวนของแบคทีเรีย และวิเคราะห์สารมัธยันตร์ที่สะสมจากการย่อยสลายฟลูออรีน

3.5.2 วัดการเจริญของแบคทีเรียด้วยวิธี viable plate count เช่นเดียวกับขั้นตอนในข้อ 3.2.2

3.5.3 นำอาหารเลี้ยงเชื้อมาทำการสกัดด้วยเอธิลอะซีเตทเช่นเดียวกับขั้นตอนในข้อ 3.2.3 แล้วนำไปวิเคราะห์ปริมาณฟลูออรีนที่เหลืออยู่ และวิเคราะห์สารมัธยันตร์ที่เกิดขึ้นจากการย่อยสลายฟลูออรีนโดยวิธี HPLC

3.6 วิเคราะห์สารมัธยันตร์ที่สะสมจากการย่อยสลายฟลูออรีนโดย *Sphingomonas* sp. P2 ด้วยวิธี TLC และ HPLC

3.6.1 เตรียมหัวเชื้อของแบคทีเรียเช่นเดียวกับขั้นตอนในข้อ 3.2.1 แล้วถ่ายหัวเชื้อที่มีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตรเท่ากับ 1.0 ลงในอาหารเหลว CFMM ปริมาตร 5 มล. ที่มีฟลูออรีนความเข้มข้น 100 มก.ต่อลิตร และเติมยีสต์สกัดในปริมาณที่เหมาะสมในข้อ 3.4 เลี้ยงเชื้อบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 °C เก็บตัวอย่างทุก 3 ชั่วโมงของการเลี้ยงเชื้อ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

3.6.2 นำอาหารเลี้ยงเชื้อมาทำการสกัดด้วยเอธิลอะซีเตทเช่นเดียวกับขั้นตอนในข้อ 3.2.3 แล้วนำไปวิเคราะห์ปริมาณฟลูออรีนที่เหลืออยู่ และวิเคราะห์สารมัธยันตร์ที่เกิดขึ้นจากการย่อยสลายฟลูออรีนโดยวิธี HPLC

3.6.3 การวิเคราะห์สารมัธยันตร์ที่เกิดขึ้นจากการย่อยสลายฟลูออรีนโดยวิธี TLC

นำสารละลายตัวอย่างที่เหลือจากการวิเคราะห์ด้วย HPLC ในข้อ 3.6.2 ปริมาตร 5-10 ไมโครลิตรมาจุดลงบนแผ่น TLC ขนาดกว้าง 8 × 8 ซม. โดยใช้ระบบตัวทำละลาย (solvent system) เป็นโทลูอีน : 1,4-ไดออกเซน : กรดอะซิติกเข้มข้น ในอัตราส่วน 90:25:4 (ปริมาตรต่อปริมาตรต่อปริมาตร) ตรวจหาสารมัธยันตร์ภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ตช่วงความยาวคลื่น 215-250 นาโนเมตร

3.7 การแยกสารมัธยันตร์ที่สะสมจากการย่อยสลายฟลูออรีนโดย *Sphingomonas* sp. P2 ให้บริสุทธิ์โดยวิธี preparative HPLC

3.7.1 เตรียมหัวเชื้อของแบคทีเรียเช่นเดียวกับขั้นตอนในข้อ 3.2.1 แล้วถ่ายหัวเชื้อที่มีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตรเท่ากับ 1.0 ลงในอาหารเหลว CFMM ปริมาตร 1000 มล. ที่มีฟลูออรีนความเข้มข้น 100 มก.ต่อลิตร และเติมยีสต์สกัดในปริมาณที่เหมาะสมในข้อ 3.4 เลี้ยงเชื้อบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 °C เมื่อครบตามกำหนดเวลาที่เหมาะสมในข้อ 3.6 นำอาหารเลี้ยงเชื้อมาทำการสกัดด้วยเอธิลอะซิเตทเช่นเดียวกับขั้นตอนในข้อ 3.2.3 จากนั้นนำส่วนที่สกัดได้มาทำให้บริสุทธิ์ต่อไป

3.7.2 นำสารมัธยันตร์ที่สกัดได้จากข้อ 3.7.1 มาแยกให้บริสุทธิ์โดยใช้ preparative HPLC ซึ่งมีส่วนประกอบต่างๆ ดังนี้

เครื่องลิควิดโครมาโตกราฟีรุ่น LC-ADVP ใช้คอลัมน์ Inertsil PREP-ODS ขนาด 10 × 250 มม. ตั้งอุณหภูมิของคอลัมน์ที่ 40 °C ตรวจสอบการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 275 นาโนเมตร โดยใช้สารละลายตัวพาเป็นสารละลายอะซิโตไนไตร 95 % ในเมทานอล และใช้อัตราการไหลเท่ากับ 5 มล.ต่อนาที ฉีดสารละลายตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์ปริมาตร 500 ไมโครลิตรด้วยกระบอกฉีดขนาดเล็กรุ่น 750SNR แล้วทำการเก็บส่วนของตัวทำละลายที่ผ่านออกจากคอลัมน์ของ HPLC ในเวลาที่สารมัธยันตร์ปรากฏ peak โดยนำส่วนของตัวทำละลายที่เก็บได้ไประเหยแห้งด้วยเครื่องระเหยแห้งสูญญากาศแบบหมุนจนได้ตะกอนของสารมัธยันตร์ ทำซ้ำเช่นนี้หลายๆ ครั้ง เพื่อสะสมสารมัธยันตร์ให้ได้ปริมาณมาก และเก็บที่อุณหภูมิ -20 °C จนกว่าจะนำไปวิเคราะห์

3.8 การพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารมัธยันตร์ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ด้วยแมสสเปกโตรเมทรี (MS)

3.8.1 นำสารมัธยันตร์ที่เตรียมได้มาพิสูจน์เอกลักษณ์โดย MS ด้วยเทคนิค Electron Impact (EI) ที่ 70 eV เปรียบเทียบมวลโมเลกุลและรูปแบบการแตกตัวของสารมัธยันตร์ที่สะสมจากการย่อยสลายฟลูออรีนเทียบกับสารมัธยันตร์มาตรฐานต่างๆ

การวิเคราะห์ในส่วนนี้ทำโดยภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ภายใต้ความอนุเคราะห์ของ รศ.ดร.อมร เพชรสม

3.9 การเติมสารอาหารจากดินสกัดเพื่อเร่งการย่อยสลายฟลูออรีนโดย *Sphingomonas* sp. P2

3.9.1 เก็บตัวอย่างดินจากแหล่งดินต่างๆ ที่มีลักษณะอุดมสมบูรณ์ โดยสังเกตจากความชื้น มีสีดำ ร่วนซุย รวมทั้งลักษณะการเจริญเติบโตของพืชในบริเวณดังกล่าว ซึ่งใช้เป็นข้อบ่งชี้เบื้องต้นถึงความเป็นไปได้ที่จุลินทรีย์จะสามารถเจริญและอาจย่อยสลายสารเคมีต่างๆ ได้ เก็บดินที่ความลึกประมาณ 3-5 ซม. จากผิวน้ำดิน ตีฉลากระบุตำแหน่งดินให้ชัดเจน เก็บไว้ในที่อุณหภูมิ 4 °C จนกว่าจะทำการทดลอง โดยแสดงสถานที่เก็บตัวอย่างดินแต่ละตัวอย่างจำนวน 3 ตัวอย่างดังแสดงในตารางที่ 3.1

ตารางที่ 3.1 แหล่งที่มาของตัวอย่างดินที่นำมาการสกัดสารอาหารเพื่อใช้เร่งการย่อยสลายฟลูออรีนโดย *Sphingomonas* sp. P2

ตัวอย่างดิน	สถานที่เก็บ
1	ดินบริเวณใต้ต้นไทรหลังตึกคณิตศาสตร์ จุฬาฯ กรุงเทพฯ ฯ
2	ดินบริเวณสวนหย่อมด้านข้างตึกพฤกษศาสตร์ จุฬาฯ กรุงเทพฯ ฯ
3	ดินจากสวนผลไม้ จังหวัดชลบุรี

3.9.2 นำตัวอย่างดินมาสกัด ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ CFMM ตามวิธีของ Molina และคณะ (1999) โดยชั่งดิน 250 กรัม ละลายในอาหารเลี้ยงเชื้อ CFMM 250 มล. นำไปเขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่ออนาที ที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วแยกส่วนอาหารเลี้ยงเชื้อ CFMM ที่มีสารอาหารจากดินออกจากตะกอนด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อ

นาที่ ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 30 นาที กรองอาหารเหลวผ่านกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 เพื่อแยกเศษวัสดุที่แขวนลอยในสารละลายออกบางส่วน แล้วทำให้ปลอดเชื้อโดยการกรองผ่านชุดกรองสำเร็จรูปเซลลูโลสอะซีเตตขนาดรูกว้าง 0.22 ไมโครเมตร

3.9.3 เตรียมหัวเชื้อของแบคทีเรียเช่นเดียวกับขั้นตอนในข้อ 3.2.1 แล้วถ่ายหัวเชื้อที่มีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตรเท่ากับ 1.0 ลงในอาหารเหลว CFMM ปริมาตร 5 มล. ที่มีฟลูออรีนความเข้มข้น 100 มก.ต่อลิตร ที่เติมสารอาหารจากดินสกัดจากข้อ 3.9.2 โดยเจือจางให้มีความเข้มข้นของดินในอาหารเหลวเท่ากับ 0 0.05 0.1 0.25 0.5 0.75 และ 1.0 กรัมต่อมล. เลี้ยงเชื้อบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 7 วัน

3.9.3 นำอาหารเลี้ยงเชื้อมาทำการสกัดด้วยเอธิลอะซีเตตเช่นเดียวกับขั้นตอนในข้อ 3.2.3 แล้วนำไปวิเคราะห์ปริมาณฟลูออรีนที่เหลืออยู่ และวิเคราะห์สารมัธยันตร์ที่เกิดขึ้นจากการย่อยสลายฟลูออรีนโดยวิธี HPLC

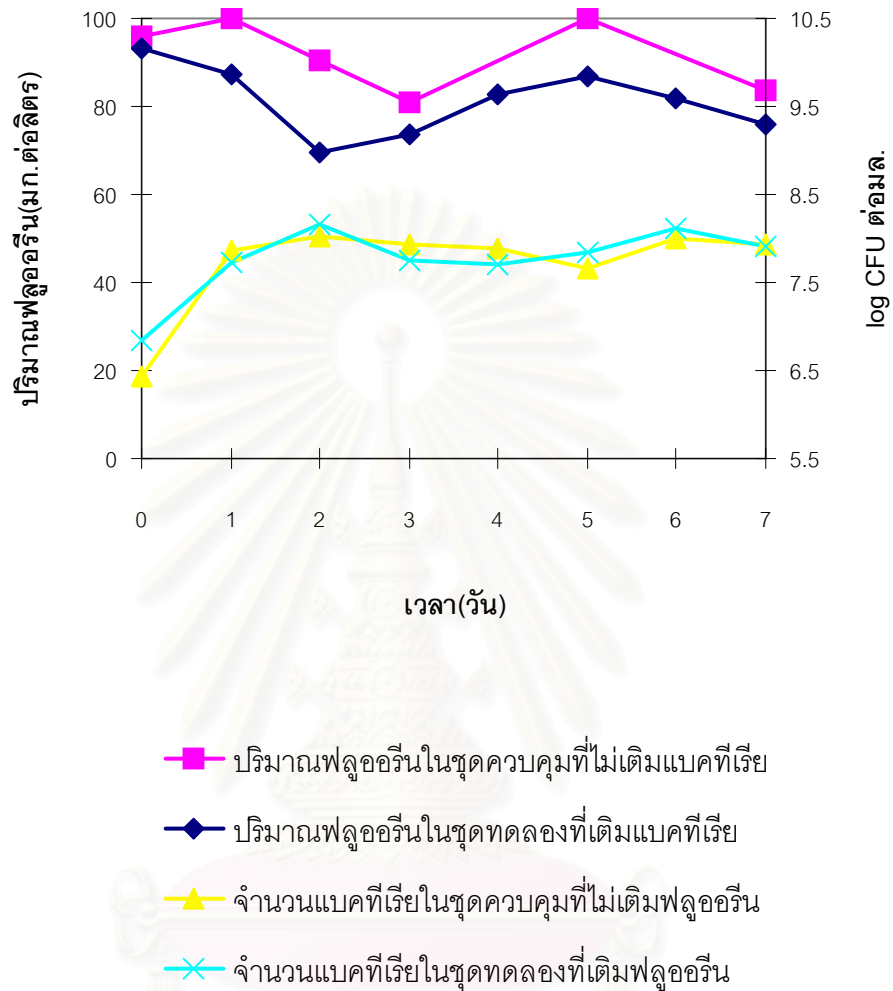
บทที่ 4

ผลการทดลอง

4.1 รูปแบบการเจริญและความสามารถในการย่อยสลายฟลูออรีนโดย *Sphingomonas* sp. P2

จากผลงานวิจัยของณัฐพันธุ์ ศุภกา (2542) ได้คัดแยกแบคทีเรีย *Sphingomonas* sp. P2 จากแหล่งดินที่มีการปนเปื้อน PAHs โดยใช้พีแนทรีนเป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงาน พบว่าแบคทีเรียนี้สามารถย่อยสลายฟลูออรีนได้ในระยะต้น และพบว่าจำนวนเซลล์ของแบคทีเรียเพิ่มขึ้นเช่นกัน แต่ในเวลาต่อมาจำนวนเซลล์ได้ลดลง จึงคาดว่าอาจมีการสะสมสารมัธยันตร์บางชนิดจากการย่อยสลายสารฟลูออรีน ที่อาจมีผลต่อการเจริญของ *Sphingomonas* sp. P2

ดังนั้นในเบื้องต้นงานวิจัยนี้จึงทำการศึกษารูปแบบการเจริญและความสามารถในการย่อยสลายฟลูออรีนของ *Sphingomonas* sp. P2 รวมทั้งวิเคราะห์สารมัธยันตร์ที่เกิดขึ้น โดยเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว CFMM ที่มีฟลูออรีนความเข้มข้น 100 มก. ต่อลิตร และติดตามการเจริญของแบคทีเรียควบคู่ไปกับการวิเคราะห์ปริมาณฟลูออรีนที่เหลือและสารมัธยันตร์ที่เกิดขึ้นด้วย HPLC ทุก 24 ชั่วโมง เป็นเวลา 7 วัน พบว่ารูปแบบการเจริญและความสามารถในการย่อยสลายฟลูออรีนของ *Sphingomonas* sp. P2 ดังแสดงผลการทดลองในรูปที่ 4.1



รูปที่ 4.1 ลักษณะการเจริญและการย่อยสลายฟลูออรีนของ *Shingomonas* sp. P2 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM ที่มีฟลูออรีนเข้มข้น 100 มก.ต่อลิตร

จากที่รูป 4.1 พบว่า *Sphingomonas* sp. P2 สามารถย่อยสลายฟลูออรีนได้ปริมาณน้อยมาก หลังจากเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียเป็นเวลา 7 วัน ยังคงมีปริมาณฟลูออรีนเหลืออยู่ในอาหารเหลว CFMM 75.86 มก.ต่อลิตร หรือสูญหายไปประมาณ 18.6 % ของปริมาณฟลูออรีนเริ่มต้น ส่วนในชุดควบคุมที่ไม่เติมแบคทีเรียนั้นมีฟลูออรีนเหลืออยู่ 83.7 มก.ต่อลิตร หรือสูญหายไปประมาณ 12.9 % ภายหลังจากการเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 7 วัน ซึ่งส่วนที่หายไปนี้อาจเกิดจากปัจจัยทางกายภาพ เช่น การระเหยของฟลูออรีน เป็นต้น จึงแสดงให้เห็นว่าปริมาณฟลูออรีนในอาหารเหลว CFMM ที่คาดว่าถูกย่อยสลายโดยแบคทีเรียมีปริมาณน้อยมาก (คิดเป็น 5.7 % เมื่อหักลบจากปริมาณฟลูออรีนในชุดควบคุมที่ไม่เติมแบคทีเรีย) ในขณะที่การเพิ่มจำนวนเซลล์ของแบคทีเรียเพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อยจากเริ่มต้น 7.3×10^6 CFU ต่อมล. ไปเป็น 8.0×10^7 CFU ต่อมล. ในวันที่ 7 ของการเลี้ยงเชื้อ ซึ่งไม่แตกต่างกันเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่เติมฟลูออรีนซึ่งมีปริมาณเซลล์เริ่มต้นเท่ากับ 2.8×10^6 CFU ต่อมล. และเพิ่มเป็น 8.5×10^7 CFU ต่อมล. ภายหลังจากเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียเป็นเวลา 7 วัน

แต่ในขณะเดียวกันพบว่า *Sphingomonas* sp. P2 สามารถทำให้สีของอาหารเหลว CFMM ที่มีฟลูออรีนเปลี่ยนจากไม่มีสีเป็นสีเหลืองได้ พบว่าสีดังกล่าวเกิดขึ้นภายหลังจากเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 24 ชั่วโมง และสีที่เกิดขึ้นมีการสะสมอยู่เพียงชั่วคราวเท่านั้น โดยอาหารเลี้ยงเชื้อจะมีสีเหลืองเข้มที่สุดในชั่วโมงที่ 24 และเมื่อเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียต่อไปสีเหลืองที่เกิดขึ้นจะค่อยๆ จางลงตามระยะเวลาที่เพิ่มขึ้น แต่อย่างไรก็ตามถึงแม้ว่าอาหารเหลว CFMM จะมีการเปลี่ยนแปลงเกิดขึ้น ยังคงพบว่ามีผลึกของฟลูออรีนเหลืออยู่ในอาหารเหลวปริมาณมาก ลักษณะของอาหารเหลว CFMM ที่เกิดจากการย่อยสลายฟลูออรีนโดย *Sphingomonas* sp. P2 ดังแสดงในรูปที่ 4.2

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 4.2 ลักษณะของอาหารเหลว CFMM ที่เกิดจากการย่อยสลายฟลูออรีนเข้มข้น 100 มก. ต่อ ลิตร ของ *Sphingomonas* sp. P2 ในการเลี้ยงเชื้อที่ระยะ 1-7 วัน

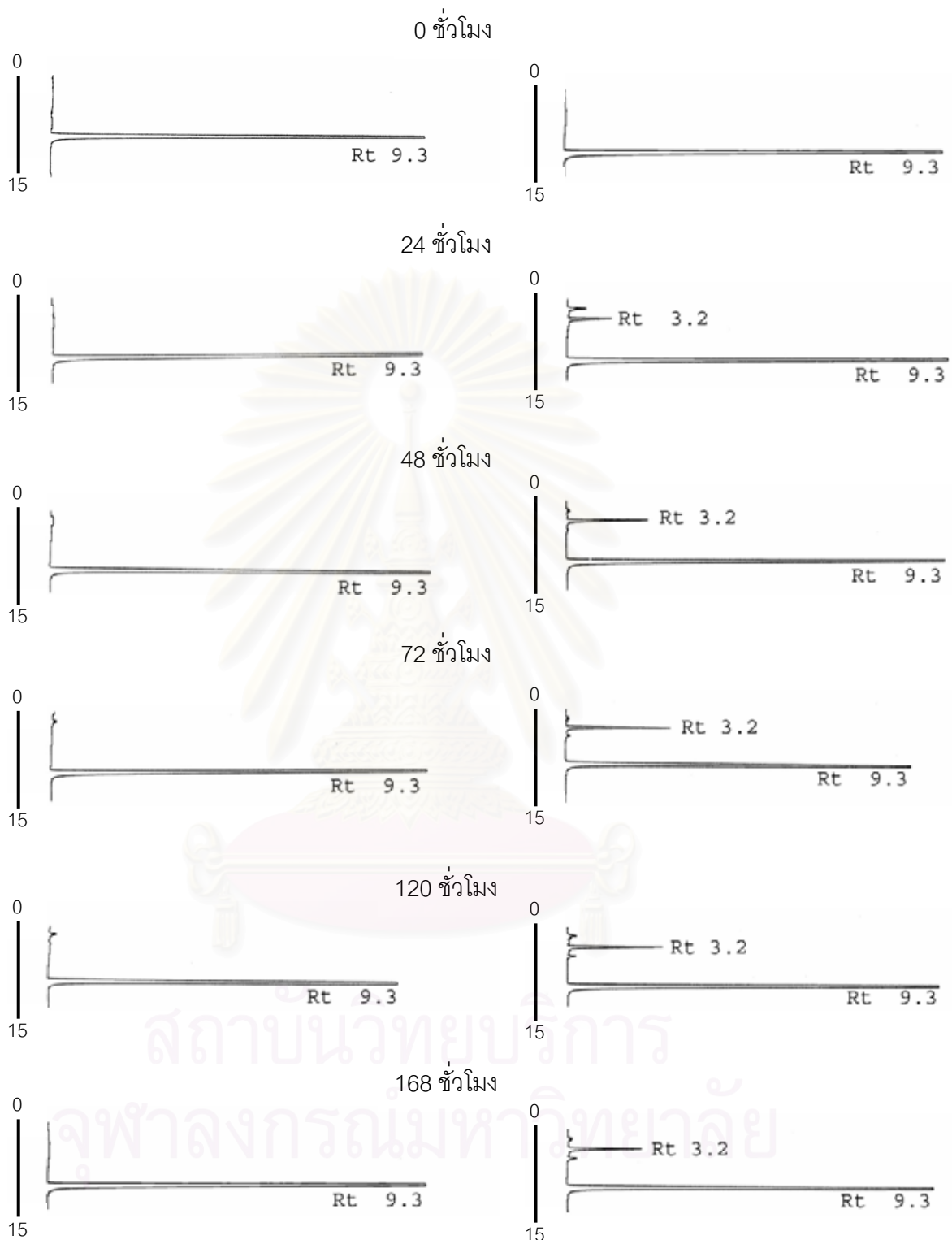
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ผลการติดตามโครมาโทแกรมจากการวิเคราะห์ HPLC เพื่อใช้ในการหาปริมาณฟลูออรีน และสารมัธยันตร์ที่เกิดขึ้นในอาหารเลี้ยงเชื้อ CFMM ดังแสดงในรูปที่ 4.3 พบว่าปริมาณของฟลูออรีนในชุดทดลองที่มีการเติมแบคทีเรียลดลงน้อยมาก แทบจะไม่แตกต่างจากชุดควบคุมที่ไม่เติมแบคทีเรีย แต่อย่างไรก็ตามพบว่าในชุดทดลอง *Sphingomonas* sp. P2 สามารถทำให้ฟลูออรีนถูกย่อยสลายไปได้บางส่วน และพบสารมัธยันตร์ที่มีค่า retention time (Rt) เท่ากับ 3.2 นาทีเกิดขึ้น ซึ่งปริมาณของสารมัธยันตร์ที่เกิดขึ้นน้อยมากและสอดคล้องกับปริมาณของฟลูออรีนที่ตรวจพบในอาหารเลี้ยงเชื้อ CFMM ที่พบว่ายังมีเหลืออยู่มาก การสร้างสารมัธยันตร์เริ่มเกิดขึ้นภายหลังจาก 24 ชั่วโมงของการเลี้ยงเชื้อ สารดังกล่าวจะค่อยๆ เพิ่มขึ้นจนกระทั่งมีปริมาณมากที่สุดในช่วงที่ 72 ของการเลี้ยงเชื้อ และปริมาณของสารมัธยันตร์จะค่อยๆ ลดลงตามระยะเวลาการเลี้ยงเชื้อ

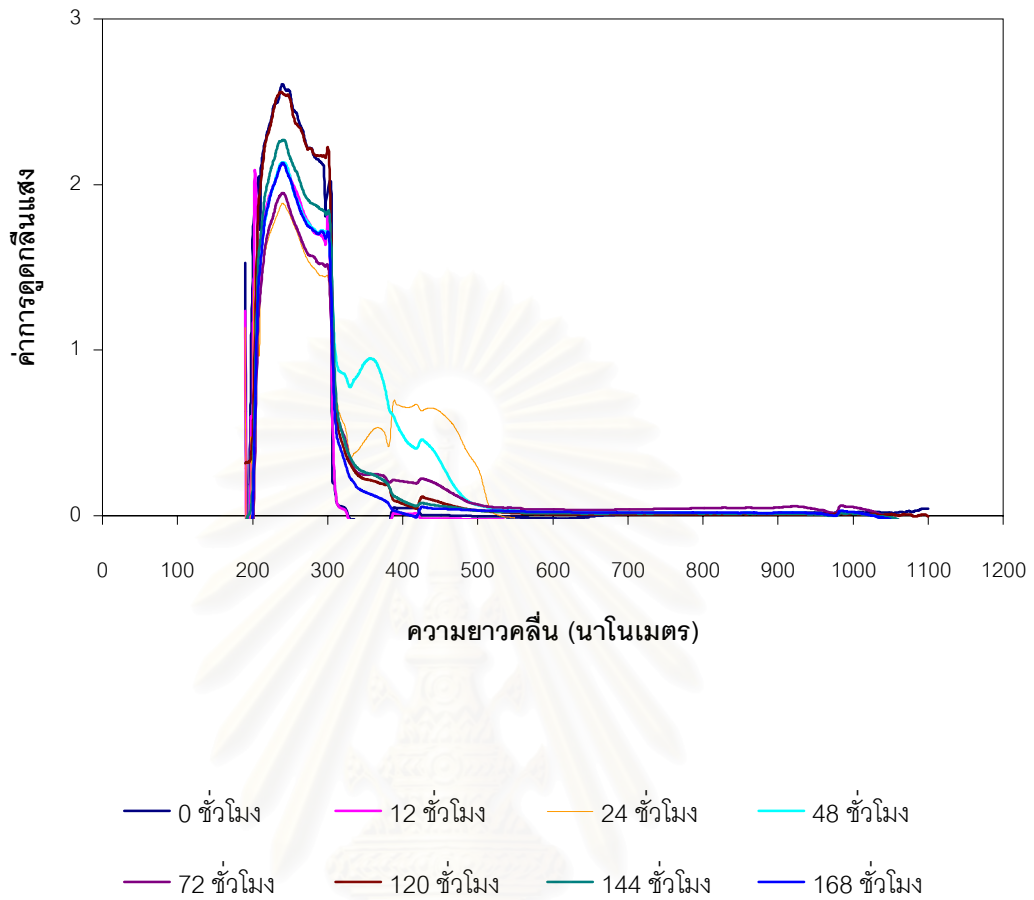
เมื่อนำตัวอย่างที่เหลือจากการวิเคราะห์ด้วย HPLC มาตรวจสอบการดูดกลืนแสงของสารมัธยันตร์ที่เกิดขึ้นในอาหารเลี้ยงเชื้อ CFMM ที่ความยาวคลื่นต่างๆ (1100 – 190 นาโนเมตร) พบว่าสารมัธยันตร์มีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นประมาณ 450-460 นาโนเมตร และมีปริมาณสอดคล้องกับระยะเวลาการเกิดสีเหลืองในอาหารเหลว CFMM โดยพบว่าปริมาณของสารที่ดูดกลืนแสงในช่วงความยาวคลื่นนี้มีปริมาณสูงที่สุดภายหลังจากเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 24 ชั่วโมง และเมื่อเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียต่อไปค่าการดูดกลืนแสงของสารที่ความยาวคลื่นนี้จะค่อยๆ ลดลงตามระยะเวลาที่เพิ่มขึ้น ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 4. 4

ก.) ชุดควบคุมไม่เติมแบคทีเรีย

ข.) ชุดทดลองเติมแบคทีเรีย



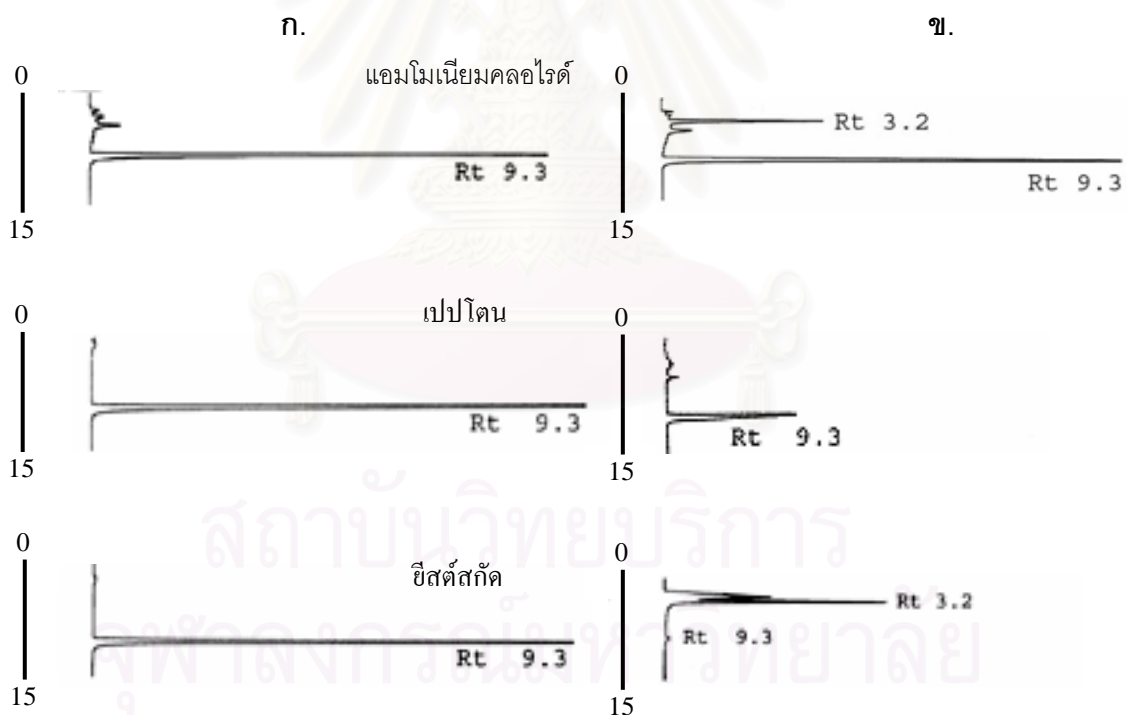
รูปที่ 4.3 โครมาโทแกรม HPLC จากการวิเคราะห์ปริมาณฟลูออรีนและสารมัธยันตร์ที่เกิดขึ้นจากการย่อยสลายฟลูออรีนโดย *Sphingomonas* sp. P2 หลังจากเลี้ยงเชื้อที่เวลาต่างๆ (Rt 9.3 นาทีคือฟลูออรีน)



รูปที่ 4.4 ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นต่างๆ (ตั้งแต่ 1100 ถึง 190 นาโนเมตร) ของ สารมัธยันตร์ที่เกิดจากการย่อยสลายฟลูออรีนโดย *Spingomonas* sp. P2 หลังจาก เลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 1-7 วัน

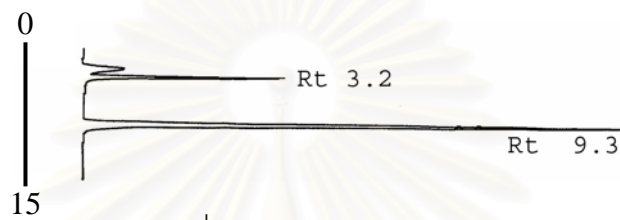
4.2 การเติมสารอาหารเพื่อช่วยการย่อยสลายฟลูออรีนโดย *Sphingomonas* sp. P2

จากรายงานต่างๆ ดังที่กล่าวไว้ในบทที่ 2 พบว่าการเติมสารอินทรีย์บางชนิด เช่น กลูโคส ยีสต์สกัดหรือเปปโตินช่วยเพิ่มประสิทธิภาพแบคทีเรียหลายชนิดในการย่อยสลาย PAHs และจากผลการทดลองของงานวิจัยนี้ในข้อ 4.1 พบว่า *Sphingomonas* sp. P2 สามารถเปลี่ยนฟลูออรีนไปเป็นสารมัธยันตร์ได้เพียงเล็กน้อยเท่านั้น และการเจริญของแบคทีเรียที่เรียกไม่ต่างจากชุดควบคุมที่ไม่เติมฟลูออรีน ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงทดลองเติมสารอาหารเพื่อส่งเสริมการเจริญของแบคทีเรียซึ่งอาจมีผลต่อการเจริญและการย่อยสลายฟลูออรีนโดย *Sphingomonas* sp. P2 โดยทดลองเติมแหล่งสารอินทรีย์ ได้แก่ ยีสต์สกัด เปปโติน และแหล่งสารอินทรีย์ ได้แก่ แอมโมเนียมคลอไรด์เข้มข้น 0.1 % (น้ำหนักต่อปริมาตร) ในอาหารเหลว CFMM ที่มีฟลูออรีน 100 มก. ต่อลิตร หลังการเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ซึ่งเป็นระยะที่สารมัธยันตร์สีเหลืองในอาหารเหลว CFMM มีสีเข้มมากที่สุด เลี้ยงแบคทีเรียที่ภาวะเดิมต่อจนครบเวลา 7 วัน แล้วจึงนำอาหารเหลวมาวิเคราะห์ปริมาณฟลูออรีนที่เหลือและสารมัธยันตร์ที่เกิดขึ้นโดย HPLC ดังแสดงผลการทดลองในรูปที่ 4.5



รูปที่ 4.5 โครมาโทแกรม HPLC แสดงปริมาณฟลูออรีนที่เหลือและสารมัธยันตร์ที่เกิดขึ้นโดย *Sphingomonas* sp. P2 ในอาหารเหลว CFMM ที่มีฟลูออรีน 100 มก. ต่อลิตร และเติมยีสต์สกัด เปปโติน แอมโมเนียมคลอไรด์(0.1% น้ำหนักต่อปริมาตร) ภายหลังจากเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 7 วัน ก.) ชุดควบคุมไม่เติมแบคทีเรีย ข.) ชุดทดลองเติมแบคทีเรีย

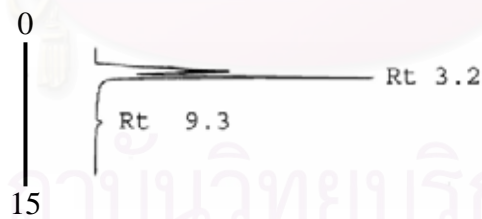
จากผลการทดลองจะเห็นได้ว่าการเติมสารอาหารอินทรีย์คือแอมโมเนียมคลอไรด์ไม่มีผลต่อการย่อยสลายฟลูออรีนโดย *Sphingomonas* sp. P2 แต่พบว่าการเติมสารอินทรีย์ได้แก่ยีสต์สกัดและเปปโตโนในอาหารเลี้ยงเชื้อ CFMM ส่งผลให้ความสามารถในการย่อยสลายฟลูออรีนของ *Sphingomonas* sp. P2 เพิ่มมากขึ้น โดยยีสต์สกัดส่งเสริมประสิทธิภาพที่ดีที่สุด จากโครมาโทแกรมการวิเคราะห์ HPLC พบว่าเมื่อเติมยีสต์สกัดฟลูออรีนถูกย่อยสลายได้มากขึ้น จนกระทั่งปริมาณฟลูออรีนลดลงเหลือเพียง 0.44 มก.ต่อลิตร และส่งผลทำให้สารมัธยันตร์ที่มีค่า Rt เท่ากับ 3.2 มีปริมาณเพิ่มขึ้นด้วย ดังแสดงผลการทดลองในรูปที่ 4.6



ก.) ชุดควบคุมที่เติมฟลูออรีน และแบคทีเรีย แต่ไม่เติมยีสต์สกัด



ข.) ชุดควบคุมที่เติมยีสต์สกัด และแบคทีเรีย แต่ไม่เติมฟลูออรีน



ค.) ชุดทดลองที่เติมทั้งฟลูออรีน แบคทีเรีย และยีสต์สกัด

รูปที่ 4.6 โครมาโทแกรม HPLC แสดงปริมาณฟลูออรีนที่เหลือและสารมัธยันตร์จากการย่อยสลายฟลูออรีนโดย *Sphingomonas* sp. P2 ในอาหารเหลว CFMM ที่มีฟลูออรีน 100 มก. ต่อลิตร และเติมยีสต์สกัด (0.1% น้ำหนักต่อปริมาตร) ภายหลังจากเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 7 วัน

นอกจากนี้เมื่อเลี้ยง *Sphingomonas* sp. P2 บนอาหารแข็ง CFMM เป็นเวลา 5 วัน (ผลการทดลองในรูปที่ 4.7) พบว่าในชุดทดลองที่เจริญบนอาหารแข็ง CFMM ที่เติมยีสต์สกัด 0.1 % และโรยผลึกฟลูออรีนที่ฝ้าเพท (ข.) แบคทีเรียสามารถเจริญได้อย่างรวดเร็ว โดยเมื่อเจริญบนอาหารดังกล่าวในระยะแรกโคโลนีจะมีสีเหลืองอ่อน และมีการสร้างสารมัธยันตรสีเหลืองเกิดขึ้นรอบๆ โคโลนีของแบคทีเรียภายหลังการเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จนกระทั่งในวันที่ 3 ของการเลี้ยงเชื้อพบว่าสีของโคโลนีของแบคทีเรียจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลเข้ม ในขณะที่ชุดควบคุมที่ไม่เติมยีสต์สกัด (ค.) ลักษณะโคโลนีของแบคทีเรียมีขนาดเล็กกว่าและมีสีน้ำตาลเข้มในบางโคโลนีซึ่งเกิดขึ้นเมื่อเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 5 วัน แต่พบว่ามีการสร้างสารมัธยันตรสีเหลืองเกิดขึ้นรอบๆ โคโลนีของแบคทีเรียในชั่วโมงที่ 24 เช่นเดียวกับกับชุดทดลอง ส่วนแบคทีเรียในชุดควบคุมที่เจริญบนอาหารแข็ง CFMM ที่เติมยีสต์สกัดแต่ไม่เติมฟลูออรีน (ก.) นั้นสามารถเจริญได้ดีเช่นเดียวกับชุดทดลองแต่พบว่าโคโลนีมีสีเหลืองอ่อน ไม่พบว่ามี การเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลเข้ม และไม่มีสารมัธยันตรสีเหลืองเกิดขึ้น ตลอดระยะเวลา 5 วันของการเลี้ยงเชื้อ



ก.

ข.

ค.

รูปที่ 4.7 ลักษณะโคโลนีของ *Sphingomonas* sp. P2 ที่มีอายุ 5 วันเมื่อเลี้ยงเชื้อบนอาหารแข็ง CFMM ที่เติมยีสต์สกัด และโรยผลึกฟลูออรีนที่ฝ้าเพท

- ก. เติมยีสต์สกัดแต่ไม่เติมฟลูออรีน
- ข. เติมยีสต์สกัด และโรยผลึกฟลูออรีนที่ฝ้าเพท
- ค. ไม่เติมยีสต์สกัด แต่โรยผลึกฟลูออรีนที่ฝ้าเพท

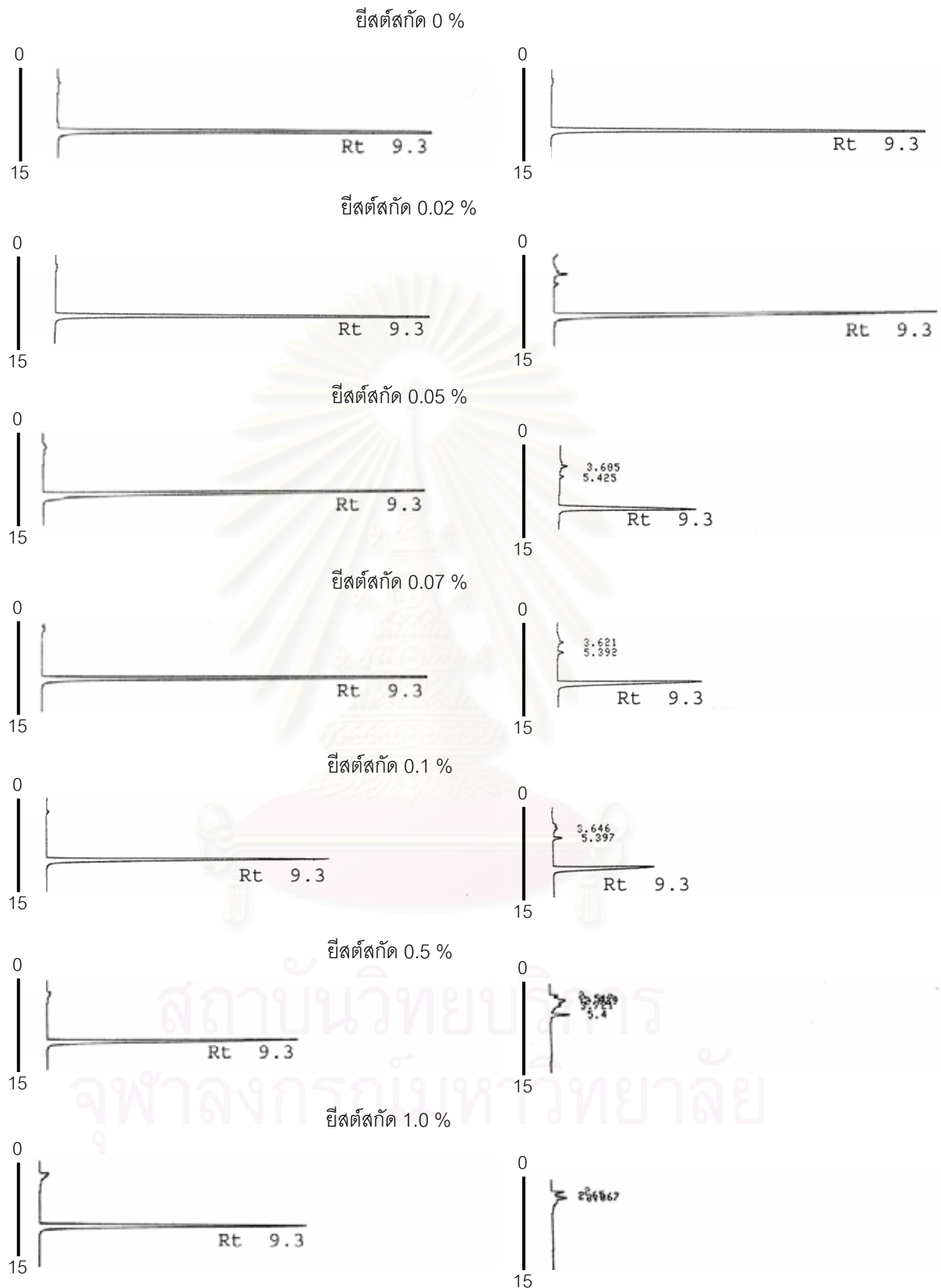
4.2.1 ความเข้มข้นของยีสต์สัปดาห์ที่เหมาะสมต่อการเจริญและย่อยสลายฟลูออรีนโดย *Sphingomonas* sp. P2

ความเข้มข้นของยีสต์สัปดาห์ที่เหมาะสมต่อการเจริญและการย่อยสลายฟลูออรีนโดย *Sphingomonas* sp. P2 ทำโดยการเติมยีสต์สัปดาห์ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 0 0.02 0.05 0.07 0.10 0.50 และ 1.0 % ในอาหารเหลว CFMM ที่มีฟลูออรีน 100 มก. ต่อลิตร เลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 7 วัน แล้วจึงนำมาวิเคราะห์ปริมาณฟลูออรีนที่เหลือและสารมัธยันตร์ที่เกิดขึ้นโดย HPLC ดังแสดงผลในรูปที่ 4.8 และ 4.9 จากผลการทดลองพบว่าเมื่อเติมยีสต์สัปดาห์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ CFMM ในปริมาณที่เพิ่มมากขึ้นจะส่งผลทำให้การย่อยสลายฟลูออรีนโดย *Sphingomonas* sp. P2 เพิ่มขึ้นตามไปด้วย โดยพบว่าการเติมยีสต์สัปดาห์ในอาหารเหลว CFMM ให้มีความเข้มข้นตั้งแต่ 0.5 % ขึ้นไปมีผลทำให้ปริมาณฟลูออรีนในอาหารเหลวลดลงจนไม่สามารถตรวจวัดได้ด้วย HPLC แต่ในขณะเดียวกันกลับพบว่าเมื่อเติมยีสต์สัปดาห์ในอาหารเหลวเพิ่มขึ้น มีผลทำให้ปริมาณของฟลูออรีนที่สกัดได้จากอาหารเหลวมียีสต์สัปดาห์ลดลงด้วย ดังแสดงในชุดควบคุมที่ไม่เติมแบคทีเรียในรูปที่ 4.8

นอกจากนี้ผลการทดลองในรูปที่ 4.9 พบว่าในชุดทดลองการเติมยีสต์สัปดาห์ในอาหารเหลวเพิ่มขึ้นจะทำให้มีสีเหลืองของสารมัธยันตร์ในอาหารเหลว CFMM มีสีเข้มมากขึ้นด้วย โดยสีของอาหารเหลวจะค่อยๆ เข้มขึ้นจากสีเหลืองอ่อนเพิ่มเป็นสีเหลืองเข้ม และพบว่าเมื่อเติมยีสต์สัปดาห์เข้มข้น 1.0 % ส่งผลให้สีของอาหารเหลว CFMM เปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลเข้ม ขณะที่ชุดควบคุมที่ไม่เติมแบคทีเรียพบว่าเมื่อเติมยีสต์สัปดาห์ในปริมาณมาก (0.5 และ 1.0%) ทำให้อาหารเลี้ยงเชื้อ CFMM มีสีเหลืองอ่อนเกิดขึ้นซึ่งเป็นลักษณะของยีสต์สัปดาห์ แต่อย่างไรก็ตามพบว่าลักษณะดังกล่าวมีความแตกต่างจากชุดทดลอง ซึ่งสีของอาหารที่พบน่าจะเป็นสีของสารมัธยันตร์ที่เกิดขึ้นจากการย่อยสลายฟลูออรีนโดยแบคทีเรีย

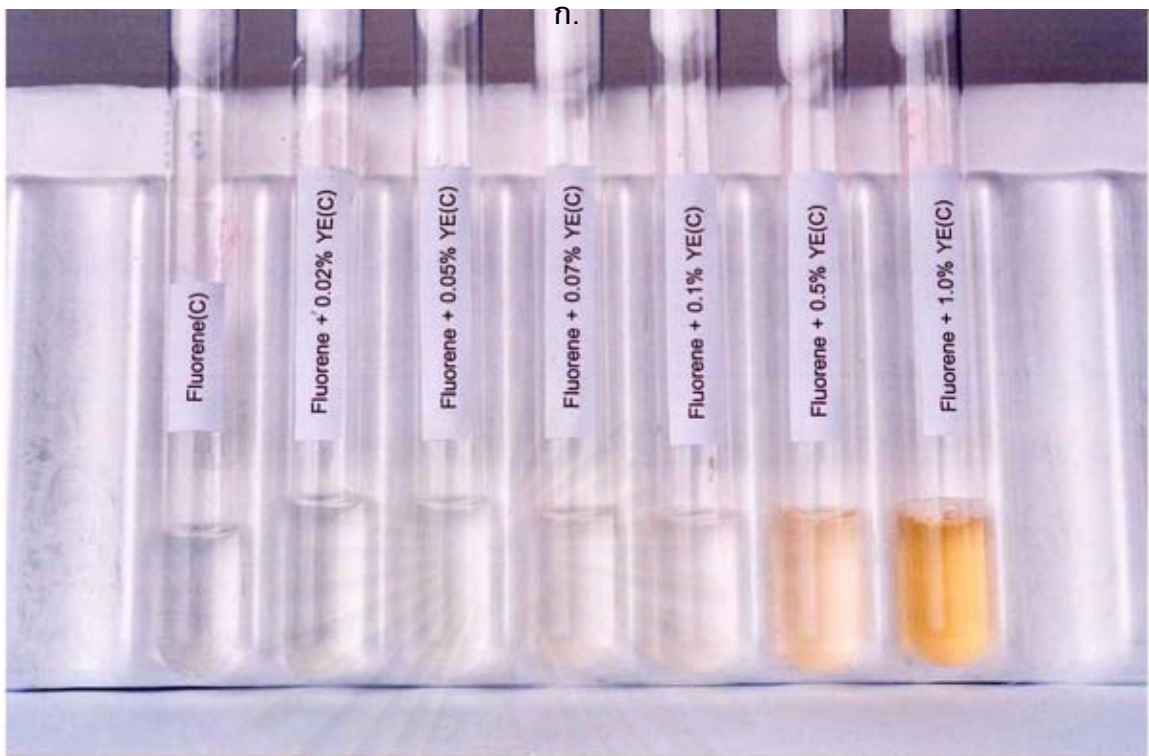
ก.

ข.



รูปที่ 4.8 โคโรมาโทแกรม HPLC แสดงปริมาณฟลูออรีนในอาหารเหลว CFMM ที่เติมยีสต์สกัด ความเข้มข้นต่างๆ หลังจากเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 7 วัน (Rt 9.3 นาทีคือฟลูออรีน)

ก.) ชุดควบคุมไม่เติมแบคทีเรีย ข.) ชุดทดลองเติมแบคทีเรีย



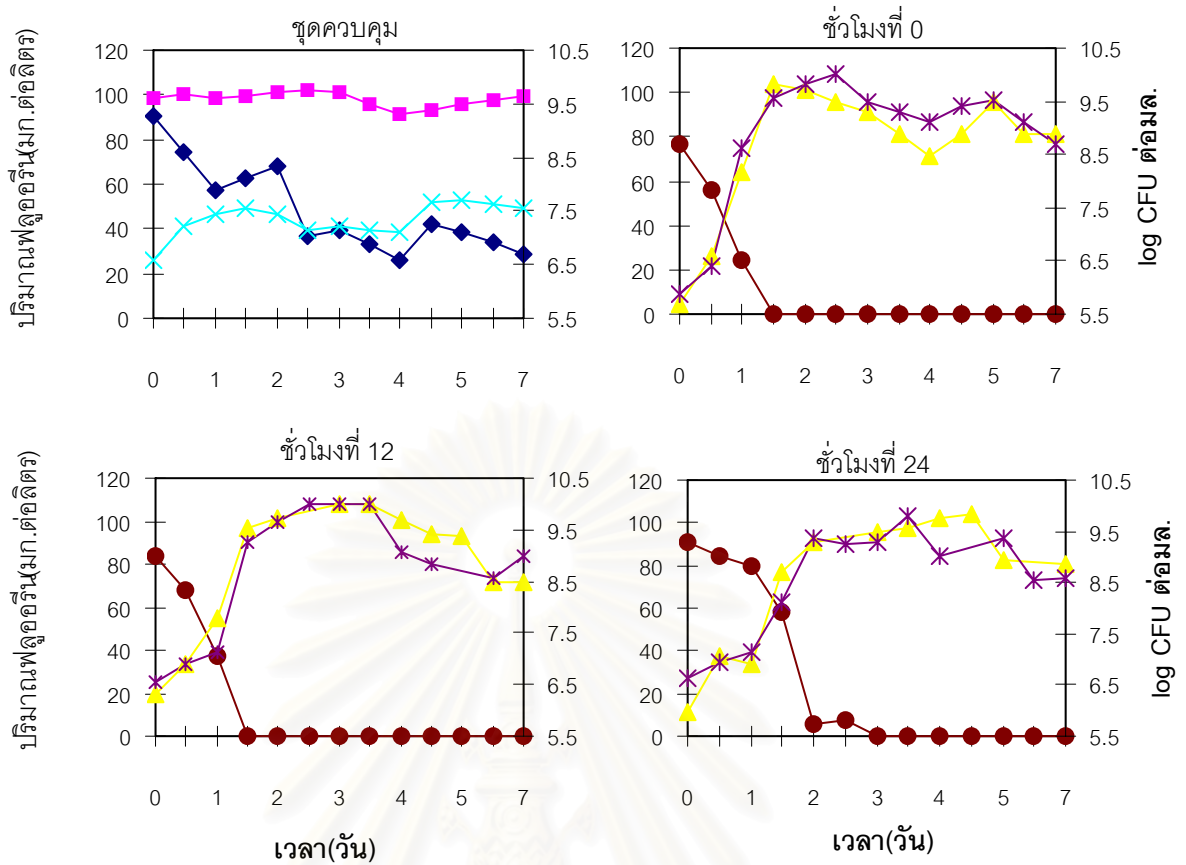
รูปที่ 4.9 ลักษณะของอาหารเหลว CFMM ที่เกิดจากการย่อยสลายฟลูออรีนโดย *Sphingomonas* sp. P2 ที่เติมยีสต์สกัดความเข้มข้นต่างๆ หลังจากเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 7 วัน

ก.) ชุดควบคุมไม่เติมแบคทีเรีย

ข.) ชุดทดลองเติมแบคทีเรีย

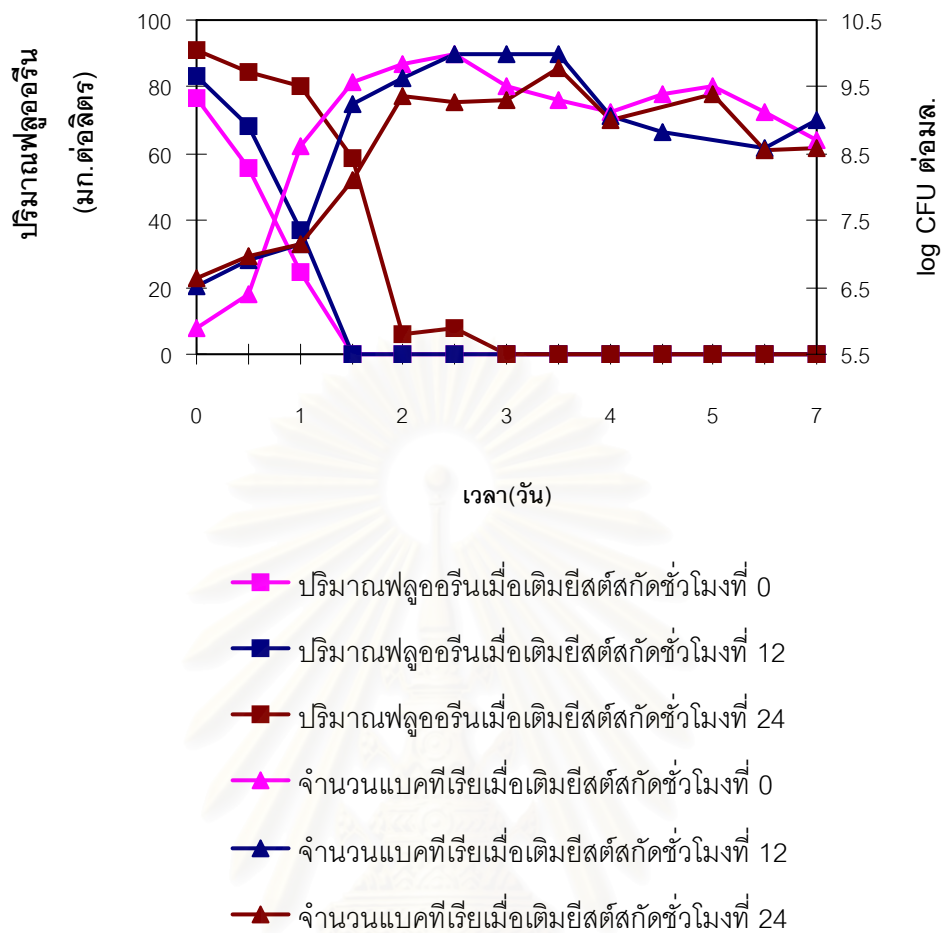
4.2.2 การศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมในการเติมยีสต์สกัดเพื่อช่วยการย่อยสลายฟลูออรีนโดย *Sphingomonas* sp. P2

เนื่องจากผลการทดลองในข้อ 4.2.1 พบว่าการเติมยีสต์สกัดเข้มข้น 0.5 % ในอาหารเหลว CFMM ภายหลังจากเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 24 ชั่วโมง มีผลทำให้ *Sphingomonas* sp. P2 สามารถย่อยสลายฟลูออรีนได้อย่างรวดเร็วจนไม่สามารถตรวจวัดได้ด้วย HPLC หลังจากเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียเป็นเวลา 7 วัน รวมทั้งยังส่งผลให้มีการสะสมสารมัธยันตร์ที่มีค่า Rt เท่ากับ 3.2 นาทีในปริมาณที่เพิ่มมากขึ้นด้วย ดังนั้นในการทดลองต่อไปนี้จะศึกษาผลของการเติมยีสต์สกัดที่ระยะเวลาต่างๆ กัน ทั้งต่อการเจริญ การย่อยสลายฟลูออรีน และการสร้างสารมัธยันตร์ของ *Sphingomonas* sp. P2 ในอาหารเหลว CFMM โดยเลี้ยงแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM ที่มีฟลูออรีนความเข้มข้น 100 มก. ต่อลิตร และเติมยีสต์สกัดให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 0.5 % ในชั่วโมงที่ 0 12 และ 24 ของการเลี้ยงเชื้อ แล้วติดตามการเจริญของแบคทีเรียควบคู่ไปกับวิเคราะห์ปริมาณฟลูออรีนที่เหลือและสารมัธยันตร์ที่เกิดขึ้นในอาหารเหลวด้วย HPLC ทุก 12 ชั่วโมง เป็นเวลา 7 วัน แสดงผลการทดลองดังรูปที่ 4.10



- ปริมาณฟลูออรีนในชุดควบคุมที่ไม่เติมแบคทีเรีย แต่เติมยีสต์สกัด
- ◆ ปริมาณฟลูออรีนในชุดควบคุมที่เติมแบคทีเรีย แต่ไม่เติมยีสต์สกัด
- ปริมาณฟลูออรีนในชุดทดลองที่เติมทั้งแบคทีเรียและยีสต์สกัด
- ▲ จำนวนแบคทีเรียในชุดควบคุมที่ไม่เติมฟลูออรีน แต่เติมยีสต์สกัด
- ✕ จำนวนแบคทีเรียในชุดควบคุมที่เติมฟลูออรีน แต่ไม่เติมยีสต์สกัด
- ✱ จำนวนแบคทีเรียในชุดทดลองที่เติมทั้งฟลูออรีนและยีสต์สกัด

รูปที่ 4.10 ก. การย่อยสลายฟลูออรีนโดย *Spingomonas* sp. P2 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM ที่มีฟลูออรีนความเข้มข้น 100 มก. ต่อลิตร และเติมยีสต์สกัด ที่เวลาต่างๆ



รูปที่ 4.10 ข. เปรียบเทียบการย่อยสลายฟลูออรีนโดย *Sphingomonas* sp. P2 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM ที่มีฟลูออรีนความเข้มข้น 100 มก. ต่อลิตร และเติมยีสต์สกัด ที่เวลาต่างๆ

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

จากผลการทดลองพบว่า การเติมยีสต์สกัดเข้มข้น 0.5 % ในอาหารเหลว CFMM ในเวลาที่ 0, 12 และ 24 ชั่วโมง ต่างก็ส่งผลให้การลดลงฟลูออรีนโดย *Sphingomonas* sp. P2 เกิดขึ้นอย่างรวดเร็ว โดยการเติมยีสต์สกัดในอาหารเลี้ยงเชื้อ CFMM ในชั่วโมงที่ 0 และ 12 มีผลทำให้ปริมาณฟลูออรีนลดลงได้อย่างรวดเร็ว เมื่อวิเคราะห์ด้วย HPLC ตรวจไม่พบฟลูออรีนเหลืออยู่ในอาหารเหลว CFMM ภายหลังจากเลี้ยงเชื้อ 36 ชั่วโมง ส่วนการเติมยีสต์สกัดในชั่วโมงที่ 24 พบการย่อยสลายฟลูออรีนเกิดขึ้นในลักษณะเดียวกัน โดยตรวจไม่พบฟลูออรีนเหลืออยู่ในอาหารเหลว CFMM ภายหลังจากเลี้ยงเชื้อ 72 ชั่วโมง ซึ่งจะเห็นได้ว่าเมื่อเติมยีสต์สกัดที่ระยะเวลาซ้ำออกไป ก็จะมีผลทำให้ระยะเวลาในการย่อยสลายฟลูออรีนซ้ำออกไปตามระยะเวลาที่ทำการเติมสารดังกล่าว

ส่วนการเจริญของ *Sphingomonas* sp. P2 พบว่าปริมาณเซลล์ของแบคทีเรียมีการเพิ่มจำนวนมากขึ้น เมื่อเติมยีสต์สกัดในชั่วโมงที่ 0 เซลล์ของแบคทีเรียเพิ่มจำนวนจากเริ่มต้น 6×10^5 CFU ต่อมล. ไปเป็น 6×10^8 CFU ต่อมล. ภายหลังจากการเลี้ยงเชื้อ 60 ชั่วโมง ส่วนการเจริญของแบคทีเรียในชุดทดลองอื่นๆ ให้ผลการทดลองเช่นเดียวกัน แต่ระยะเวลาในการย่อยสลายฟลูออรีนและการเจริญของแบคทีเรียจะซ้ำออกไปตามระยะเวลาที่เติมยีสต์สกัด

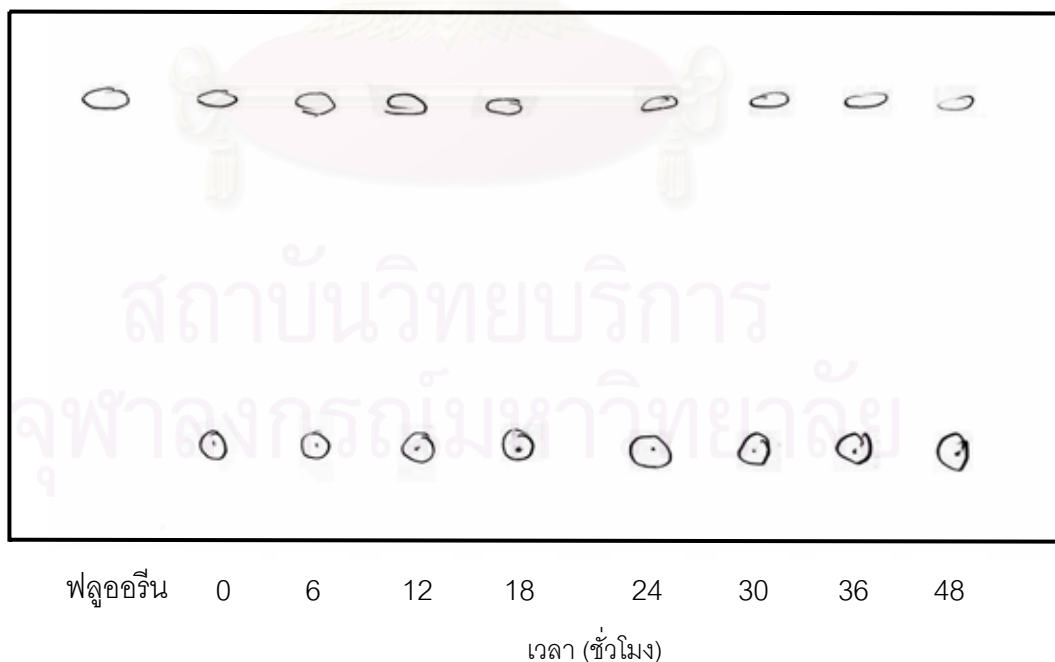
ดังนั้นการเติมยีสต์สกัดให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 0.5 % ในอาหารเหลว CFMM ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 0 หรือเริ่มแรกของการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียจึงเป็นการส่งเสริมการลดลงฟลูออรีนได้ดีที่สุด และเป็นภาวะที่เหมาะสมสำหรับการนำไปใช้ศึกษาและวิเคราะห์สารมัธยันตร์จากการย่อยสลายฟลูออรีนของแบคทีเรียนี้ในการทดลองขั้นต่อไป

4.3 วิเคราะห์สารมัธยันตร์ที่สะสมจากการย่อยสลายฟลูออรีนโดย *Sphingomonas* sp. P2 ด้วยวิธี TLC และ HPLC

คัดเลือกระยะเวลาที่เหมาะสมสำหรับการสกัดสารมัธยันตร์โดยหาระยะเวลาในการเลี้ยงเชื้อที่มีสารมัธยันตร์สะสมปริมาณสูงที่สุด เพื่อใช้ในการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียในระดับขยายส่วน และมีปริมาณเพียงพอสำหรับการแยกสารให้บริสุทธิ์ รวมทั้งการศึกษาลักษณะสมบัติของสารมัธยันตร์ในการทดลองขั้นต่อไป

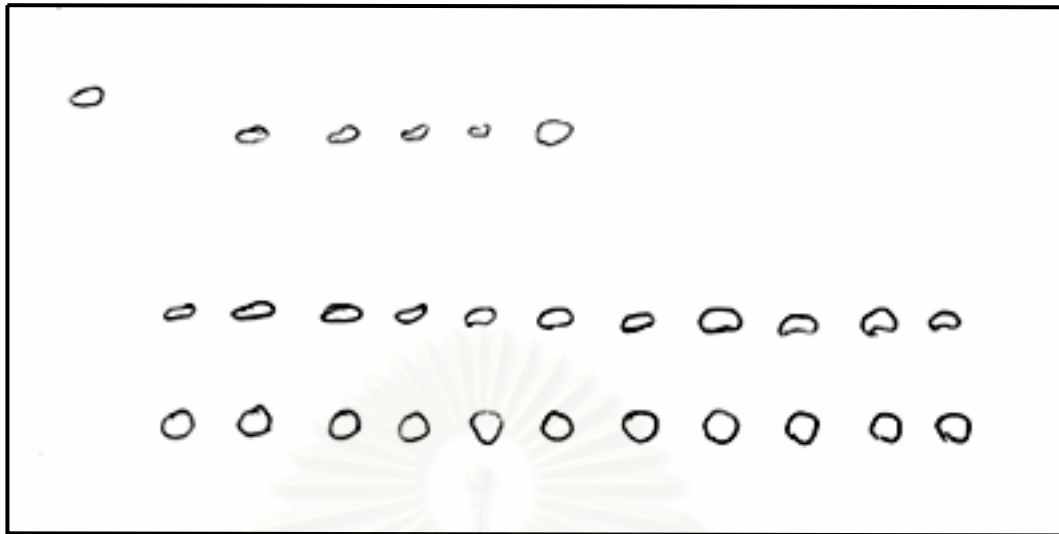
เนื่องจาก *Sphingomonas* sp. P2 สามารถย่อยสลายฟลูออรีนเมื่อเติมยีสต์สกัดในเวลาเริ่มต้นได้ภายในระยะเวลาอันรวดเร็ว ดังผลการทดลองในข้อ 4.2.2 พบว่าแบคทีเรียนี้สามารถย่อยสลายฟลูออรีนจนกระทั่งเมื่อวิเคราะห์ด้วย HPLC แล้วไม่พบฟลูออรีนในอาหารเหลว CFMM ภายหลังจากเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 36 ชั่วโมง ดังนั้นจึงติดตามการย่อยสลายฟลูออรีนและสารมัธยันตร์ที่เกิดขึ้นในระยะเวลาต่างๆ ภายในช่วง 48 ชั่วโมงของการเลี้ยงเชื้อ ซึ่งคาดว่าจะ เป็นช่วงเวลาที่เกิดกิจกรรมต่างๆ เพื่อย่อยสลายฟลูออรีน และเป็นช่วงที่มีสารมัธยันตร์ต่างๆ สะสมอยู่ปริมาณมาก การศึกษาขั้นตอนนี้ทำโดยติดตามการย่อยสลายฟลูออรีนโดย *Sphingomonas* sp. P2 ในอาหารเหลว CFMM ที่เติมยีสต์สกัดเข้มข้น 0.5 % แล้วติดตามวิเคราะห์สารมัธยันตร์ที่เกิดขึ้นที่เวลาต่างๆ ได้แก่ ชั่วโมงที่ 0 6 12 15 18 24 และ 48 ด้วยวิธี TLC และ HPLC ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 4.11 และ 4.12 ตามลำดับ

ก.



รูปที่ 4.11 โครมาโทแกรม TLC ของสารมัธยันตร์ที่สะสมจากการย่อยสลายฟลูออรีนโดย *Sphingomonas* sp. P2 ที่เวลาต่างๆ ในอาหารเหลว CFMM ที่มียีสต์สกัด 0.5 %

ข.



ฟลูออรีน 0 6 12 15 18 21 24 27 30 36 48
เวลา (ชั่วโมง)

ค.

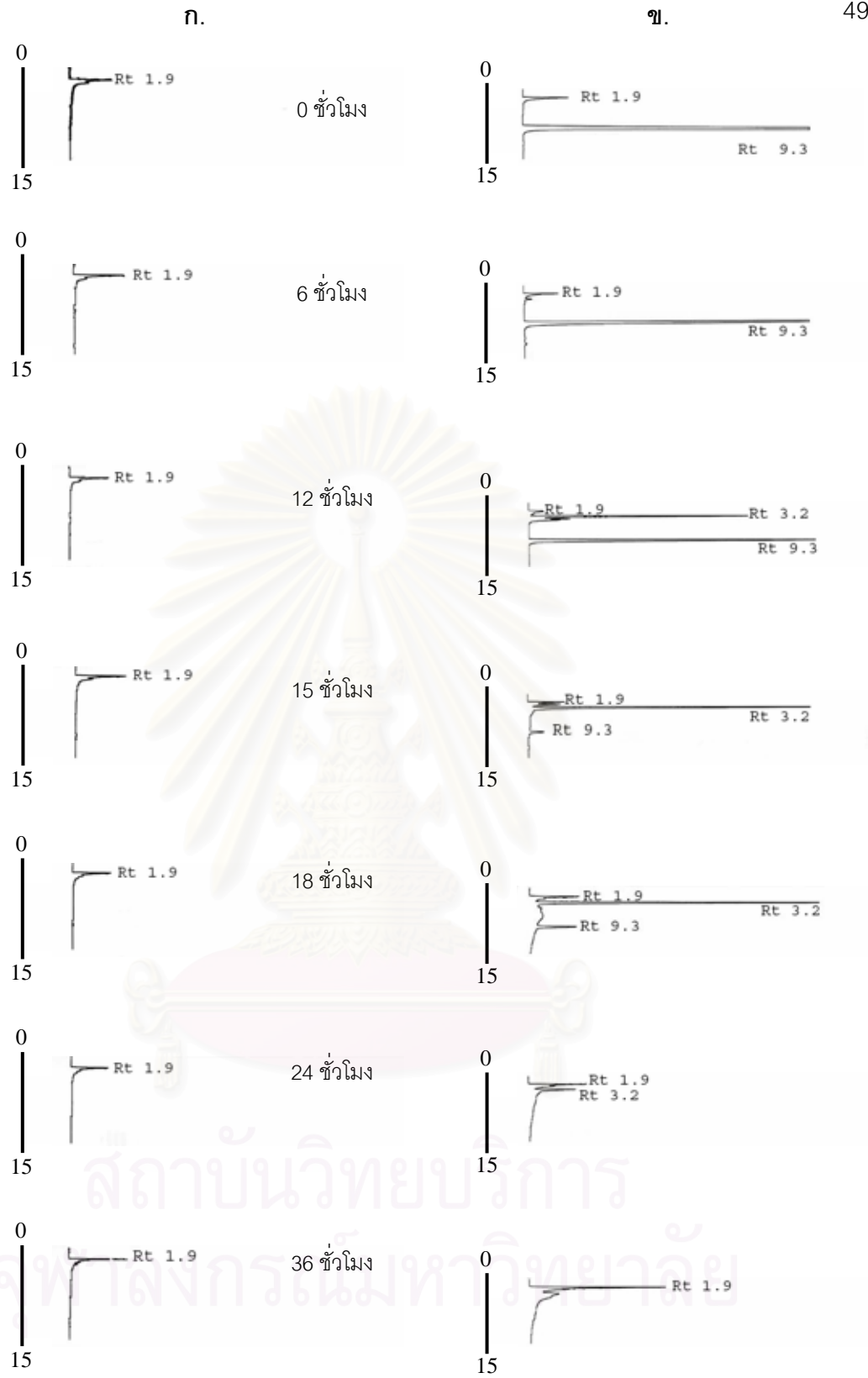


ฟลูออรีน 0 6 12 15 18 21 24 27 30 36 48
เวลา (ชั่วโมง)

ระบบตัวทำละลาย : โทลูอีน : 1,4-ไดออกเซน : กรดอะซิติกเข้มข้น
: 90 : 25 : 4 (ปริมาตรต่อปริมาตร)

รูปที่ 4.11 TLC โครมาโทแกรมของสารมัธยันตร์ที่สะสมจากการย่อยสลายฟลูออรีนโดย *Sphingomonas* sp. P2 ที่เวลาต่างๆ ในอาหารเหลว CFMM ที่มียีสต์สกัด 0.5 %

- ก. ชุดควบคุมที่เติมยีสต์สกัดและฟลูออรีน ไม่เติมแบคทีเรีย
- ข. ชุดควบคุมที่เติมยีสต์สกัดและแบคทีเรียแต่ไม่เติมฟลูออรีน
- ค. ชุดทดลองเติมทั้งยีสต์สกัด ฟลูออรีนและแบคทีเรีย



รูปที่ 4.12 โคโรนาโทแกรม HPLC ของสารมัธยันตรี้ที่สะสมจากการย่อยสลายฟลูออรีนโดย *Sphingomonas* sp. P2 ที่เวลาต่างๆ (Rt 9.3 นาทีคือฟลูออรีน)

ก.) ชุดควบคุมไม่เติมฟลูออรีน ข.) ชุดทดลองเติมฟลูออรีน

จากผลการวิเคราะห์ด้วย TLC และ HPLC พบสารหลายชนิดที่สกัดได้จากอาหารเหลว CFMM ทั้งชุดควบคุมที่ไม่เติมฟลูออรีน (รูปที่ 4.11 ก. และ 4.12 ก.) และชุดทดลองที่เติมฟลูออรีน (รูปที่ 4.11 ข. และ 4.12 ข.) เมื่อพิจารณา HPLC โคโรมาโทแกรมพบว่าในชุดทดลองฟลูออรีนถูกย่อยสลายภายในระยะเวลาอันรวดเร็ว โดยตรวจไม่พบสารดังกล่าวภายหลังการเลี้ยงเชื้อ 24 ชั่วโมง และในช่วงระยะเวลาดังกล่าวมีสารมัธยันตร์ที่มีค่า Rt เท่ากับ 3.2 นาทีปรากฏขึ้นภายหลังการเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 12 ชั่วโมง และสารดังกล่าวสะสมและเพิ่มปริมาณขึ้นจนกระทั่งมีปริมาณสูงในช่วงเวลาที่ 15 - 18 ของการเลี้ยงเชื้อ สารนี้มีการสะสมอยู่เพียงชั่วคราวเท่านั้น โดยจะค่อยๆลดปริมาณลงจนตรวจไม่พบในช่วงเวลาที่ 36 ของการเลี้ยงเชื้อ แต่พบว่าที่เวลา 24 ชั่วโมง ในขณะที่สารมัธยันตร์ที่มี Rt 3.2 นาทีลดปริมาณลงนั้น มีสารมัธยันตร์ที่มีค่า Rt เท่ากับ 1.9 นาที มีปริมาณเพิ่มขึ้น และพบสารที่ปรากฏ peak ที่เวลาเดียวกันนี้ในชุดทดลองที่ไม่เติมฟลูออรีนด้วยเช่นกัน ส่วน TLC โคโรมาโทแกรม พบว่าในเวลาเดียวกันคือชั่วโมงที่ 15 ของการเลี้ยงเชื้อ พบสารมัธยันตร์ที่มีค่า Rf เท่ากับ 0.69 ซึ่งมีความเข้มของจุด (spot) ของสารบนโคโรมาโทแกรมที่วิเคราะห์นี้ให้ผลสอดคล้องกับ HPLC โคโรมาโทแกรมในรูปที่ 4.11 ซึ่งตรวจพบสารมัธยันตร์ชนิดที่มี Rt เท่ากับ 3.2 นาทีที่มีปริมาณมากที่สุดในชั่วโมงที่ 15 ของการเลี้ยงเชื้อเช่นเดียวกัน โดยพิจารณาจากพื้นที่ใต้กราฟ

ดังนั้นระยะเวลาที่เหมาะสมสำหรับการเลี้ยงเชื้อในระดับขยายส่วน เพื่อนำมาสกัดสารมัธยันตร์ที่เกิดขึ้นจากการย่อยสลายฟลูออรีนโดย *Sphingomonas* sp. P2 คือชั่วโมงที่ 15 ของการเลี้ยงเชื้อ

4.3 แยกสารมัธยันตร์ที่เกิดจากการย่อยสลายฟลูออรีนโดย *Sphingomonas* sp. P2 ให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี preparative HPLC

ผลการทดลองในข้อ 4.3 พบว่าภายหลังการเลี้ยงเชื้อ *Sphingomonas* sp. P2 ในอาหารเหลว CFMM ที่มีฟลูออรีนเข้มข้น 100 มก.ต่อลิตร และยีสต์สกัด 0.5 % เป็นเวลา 15 ชั่วโมง มีการสะสมสารมัธยันตร์ที่มีค่า Rt เท่ากับ 3.2 นาทีในปริมาณมาก (วิเคราะห์ด้วย analytical HPLC โดยใช้ตัวทำละลาย 80 % เมทานอลเป็นตัวชะ) จึงนำสารสกัดที่ได้ในช่วงเวลานี้ไปวิเคราะห์โดยใช้ preparative HPLC เพื่อหาภาวะที่เหมาะสมในการแยกสารมัธยันตร์ที่เกิดขึ้น ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 4.13 พบว่าเมื่อใช้สารละลายอะซีโตนไตรเข้มข้น 95 % ในเมทานอล ที่มีอัตราการไหล 5.0 มล. ต่อนาทีเป็นตัวชะ ปรากฏ peak ของสารมัธยันตร์ที่มีค่า Rt เท่ากับ 3.3 และ 3.7 นาทีในชุดทดลอง (รูปที่ 4.13 ข.) และพบ peak ของสารมัธยันตร์ที่มีค่า Rt เท่ากับ 3.3 นาทีในชุดควบคุมที่ไม่เติมฟลูออรีน (รูปที่ 4.13 ก.) ซึ่งค่า Rt ของสารที่ปรากฏเมื่อวิเคราะห์ด้วย preparative HPLC จะมีความสอดคล้องกับค่า Rt ของสารที่วิเคราะห์ด้วย analytical HPLC ดังแสดงในตารางที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 เปรียบเทียบค่า retention time ของสารมัธยันตร์จากการย่อยสลายฟลูออรีนเมื่อวิเคราะห์โดย analytical HPLC และ preparative HPLC

วิธีวิเคราะห์	Retention time (Rt) (นาที)		
	สาร 1	สาร 2	ฟลูออรีน
analytical HPLC*	3.2	1.9	9.3
preparative HPLC**	3.7	3.3	4.8

* วิเคราะห์โดยใช้สารละลายเมทานอล 80 % ในน้ำเป็นตัวชะ

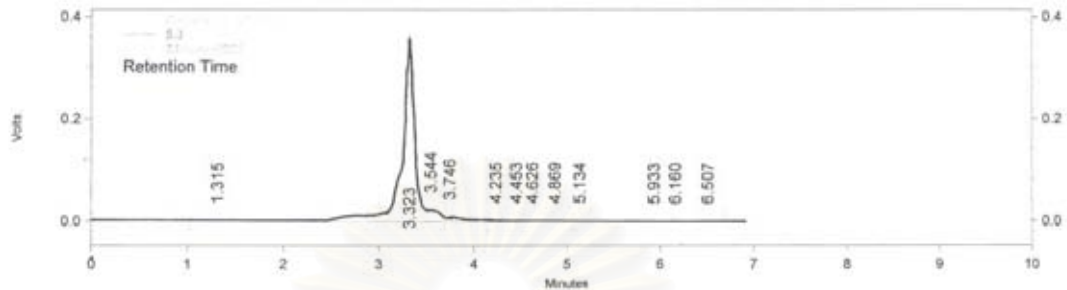
(อัตราการไหล 1.0 มล. ต่อนาที)

** วิเคราะห์โดยใช้สารละลายอะซีโตนไตรเข้มข้น 95 % ในเมทานอลเป็นตัวชะ

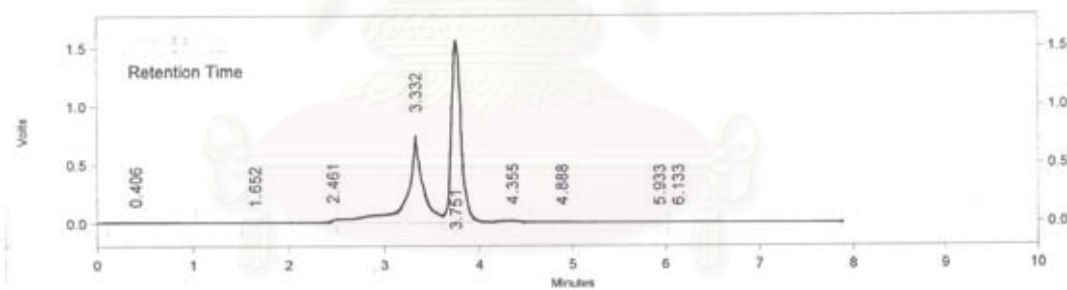
(อัตราการไหล 5.0 มล. ต่อนาที)

จากตารางจะเห็นว่าสาร 1 ซึ่งมีค่า Rt เท่ากับ 3.7 นาทีเมื่อวิเคราะห์โดย preparative HPLC ซึ่งเป็นสารชนิดเดียวกันกับสารมัธยันตร์ที่มีค่า Rt เท่ากับ 3.2 นาทีเมื่อวิเคราะห์ด้วย analytical HPLC ดังนั้นจึงใช้ภาวะดังกล่าวในการแยกสารมัธยันตร์ให้บริสุทธิ์ต่อไป

ก.



ข.



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

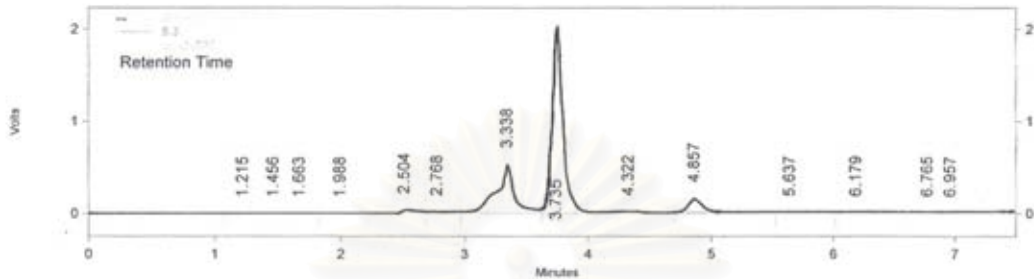
รูปที่ 4.13 โครมาโทแกรม preparative HPLC ของสารมัธยันตร์ที่สะสมจากการย่อยสลาย
ฟลูออรีนโดย *Sphingomonas* sp. P2 ที่เวลา 15 ชั่วโมง โดยใช้สารละลายอะซีโตไน
ไตรเข้มข้น 95 % ในเมทานอลเป็นตัวชะ

ก. ชุดควบคุมไม่เต็มฟลูออรีน ข. ชุดทดลองเต็มฟลูออรีน

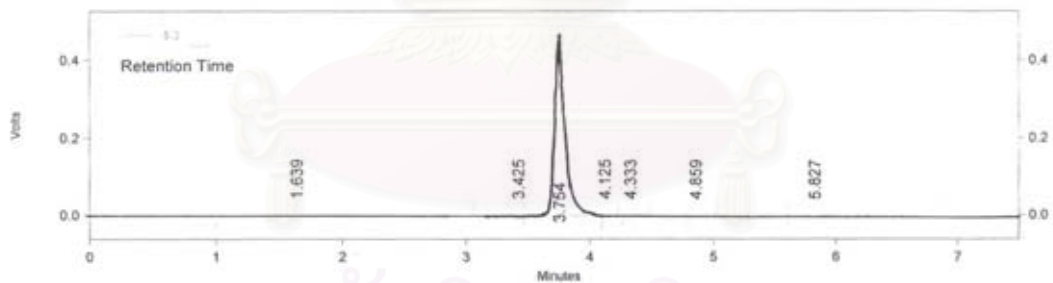
การทดลองในขั้นตอนนี้ต่อไปได้แยกสารมัธยันตร์ที่เกิดจากการย่อยสลายฟลูออรีนโดย *Sphingomonas* sp. P2 ให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี preparative HPLC ก่อนนำไปพิสูจน์เอกลักษณ์และชนิดของสารด้วยวิธีทางเคมี โดยเมื่อเลี้ยง *Sphingomonas* sp. P2 ในอาหารเหลว CFMM ที่มีฟลูออรีนเข้มข้น 100 มก.ต่อลิตร และยีสต์สกัดความเข้มข้น 0.5 % เป็นเวลา 15 ชั่วโมง นำไปสกัดสารมัธยันตร์ด้วยเอทิลอะซิเตต จากนั้นนำสารสกัด (crude extract) ที่ได้มาทำให้บริสุทธิ์ด้วย preparative HPLC โดยสารละลายอะซิโตไนโตรเข้มข้น 95 % ในเมทานอลเป็นตัวชะเก็บส่วนของตัวทำละลายที่ผ่านออกจากคอลัมน์ของ HPLC ในเวลาที่สารมัธยันตร์ปรากฏ peak ซึ่งตรงกับค่า Rt เท่ากับ 3.7 นาที แล้วนำไประเหยตัวทำละลายให้แห้งโดยใช้เครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุน แล้ววิเคราะห์ตรวจสอบความบริสุทธิ์ของสารมัธยันตร์ด้วย HPLC และ TLC ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 4.13 และ 4.14 ตามลำดับ

จากรูปที่ 4.14 พบว่าสามารถแยกสารมัธยันตร์ Rt 3.7 นาทีที่สะสมจากการย่อยสลายฟลูออรีนโดย *Sphingomonas* sp. P2 ให้มีความบริสุทธิ์ยิ่งขึ้น โดยพบว่าภายหลังจากการเก็บลำดับส่วนของตัวทำละลายที่แยกได้โดย preparative HPLC แล้วนำมาวิเคราะห์ซ้ำด้วย HPLC พบสารมัธยันตร์ปรากฏเพียง peak เดียวและมีค่า Rt เท่ากับ 3.7 นาที แต่จากผลการวิเคราะห์ด้วย TLC พบส่วนของสารมัธยันตร์ที่แยกได้นั้นยังไม่บริสุทธิ์ โดยพบจุดของสารมัธยันตร์ 2 จุดซึ่งมีค่า Rf เท่ากับ 0.69 และ 0.55 ซึ่งให้ชื่อว่าสารมัธยันตร์ ก. และ ข. ตามลำดับ แสดงผลการทดลองในรูปที่ 4.15

ก.



ข.



รูปที่ 4.14 โครมาโทแกรม preparative HPLC แสดงความบริสุทธิ์ของสารมัธยันตร์จากการย่อยสลายฟลูออรีนโดย *Sphingomonas* sp. P2 (Rt เท่ากับ 4.8 คือฟลูออรีน)

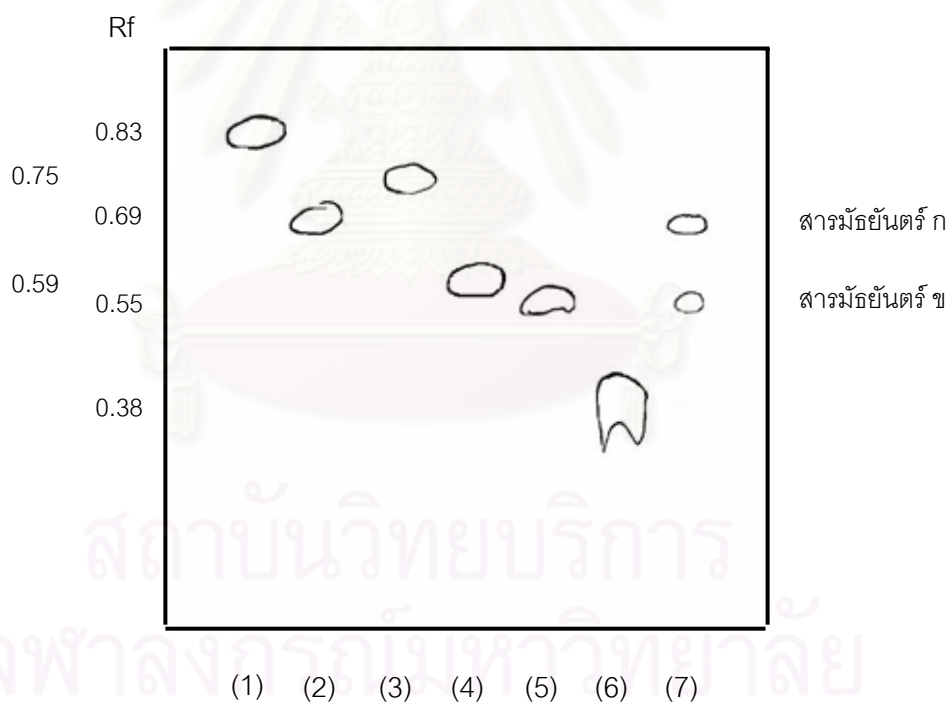
ก. สารสกัดจากน้ำเลี้ยงเชื้อ ข. สารมัธยันตร์ที่แยกได้โดยวิธี preparative HPLC



รูปที่ 4.15 โคโรมาโทแกรม TLC แสดงความบริสุทธิ์ของสารมัธยันตร์จากการย่อยสลายฟลูออรีน โดย *Sphingomonas* sp. P2
ก. สารสกัดจากน้ำเลี้ยงเชื้อ ข. สารมัธยันตร์ที่แยกได้โดยวิธี preparative HPLC

4.5 การตรวจสอบชนิดของสารเบื้องต้นด้วยวิธี TLC และ HPLC

การตรวจสอบชนิดของสารในเบื้องต้นด้วย TLC ทำได้โดยการเปรียบเทียบค่า Rf ซึ่งเป็นค่าเฉพาะตัวของสารแต่ละชนิดกับค่า Rf ของสารมาตรฐาน โดยการนำสารที่มีรายงานว่าเป็นสารมัธยันตร์ที่เกิดจากการย่อยสลายฟลูออรีน ได้แก่ 9-ฟลูออรีนอล 9-ฟลูออรีโนน 2,3-ไดไฮดรอกซีไบฟีนิล กรด 2,5-ไดไฮดรอกซีเบนโซอิก และกรดซาลิไซลิก มาวิเคราะห์ด้วย TLC เปรียบเทียบกับสารมัธยันตร์จากการย่อยสลายฟลูออรีนโดย *Sphingomonas* sp. P2 ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์บางส่วนในข้อ 4.4 ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 4.16 และตารางที่ 4.2 พบว่าสารมัธยันตร์ที่ได้จากการย่อยสลายฟลูออรีนโดย *Sphingomonas* sp. P2 ซึ่งมีจุดของสารมัธยันตร์ 2 จุด ได้แก่จุดที่มีค่า Rf เท่ากับ 0.69 เรืองแสงสีม่วงภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต ตรงกับ 9-ฟลูออรีนอลให้ชื่อว่าสารมัธยันตร์ ก ส่วนสารมัธยันตร์ที่มีค่า Rf เท่ากับ 0.55 ซึ่งใกล้เคียงกับกรดซาลิไซลิก แต่เรืองแสงสีเหลืองภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต ซึ่งไม่พบว่าตรงกับสารมาตรฐานใดเลยให้ชื่อว่าสารมัธยันตร์ ข ตามลำดับ



รูปที่ 4.16 TLC โคโรมาโทแกรมของสารมัธยันตร์จากการย่อยสลายฟลูออรีนโดย *Sphingomonas* sp. P2 (7) เปรียบเทียบกับ ฟลูออรีน (1), 9-ฟลูออรีนอล (2), 9-ฟลูออรีโนน (3), 2,3-ไดไฮดรอกซีไบฟีนิล (4), กรดซาลิไซลิก (5), กรด 2,5-ไดไฮดรอกซีเบนโซอิก (6)

ตารางที่ 4.2 ค่า Rf จากการวิเคราะห์ TLC และลักษณะการเรืองแสงของสารมัธยันตร์จากการย่อยสลายฟลูออรีนโดย *Sphingomonas* sp. P2 ภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ตช่วงความยาวคลื่น 215-250 นาโนเมตรเปรียบเทียบกับสารมาตรฐานชนิดต่างๆ

สาร	การเรืองแสง	ค่า Rf
สารมัธยันตร์ ก	ม่วง	0.69
สารมัธยันตร์ ข	เหลือง	0.55
ฟลูออรีน	ม่วง	0.83
9-ฟลูออรีนอล	ม่วง	0.69
9-ฟลูออรีโนน	ฟ้า	0.75
2,3-ไดไฮดรอกซีไบฟีนิล	น้ำตาล	0.59
กรดซาลิไซลิก	ม่วง	0.55
กรด 2,5-ไดไฮดรอกซีเบนโซอิก	ฟ้า	0.38

จากผลการทดลองจะเห็นได้ว่าสารมัธยันตร์ ก ซึ่งมีค่า Rf เท่ากับ 0.69 และเรืองแสงสีม่วงภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต ซึ่งมีสมบัติเช่นเดียวกับกับ 9-ฟลูออรีนอล ดังนั้นขั้นต่อไปจึงทำการวิเคราะห์สารมัธยันตร์ 1 เปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน 9-ฟลูออรีนอลด้วยวิธี TLC และ HPLC ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 4.17 และ 4.18 ตามลำดับ ส่วนสารมัธยันตร์ ข นั้นเมื่อตรวจสอบเบื้องต้นด้วย TLC แล้วไม่พบว่าตรงกับสารมาตรฐานใดๆ เลย

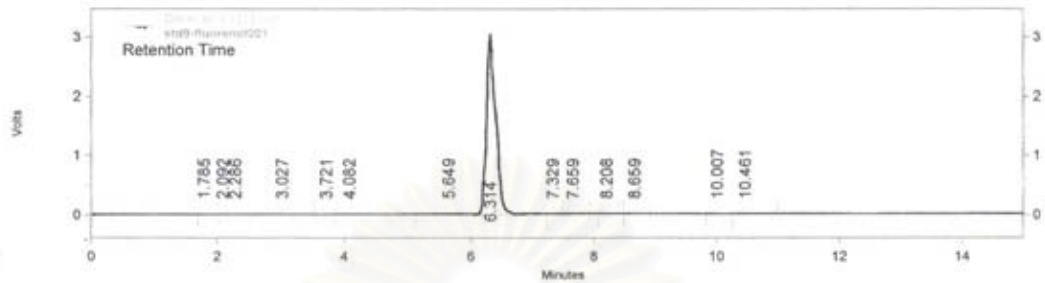
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



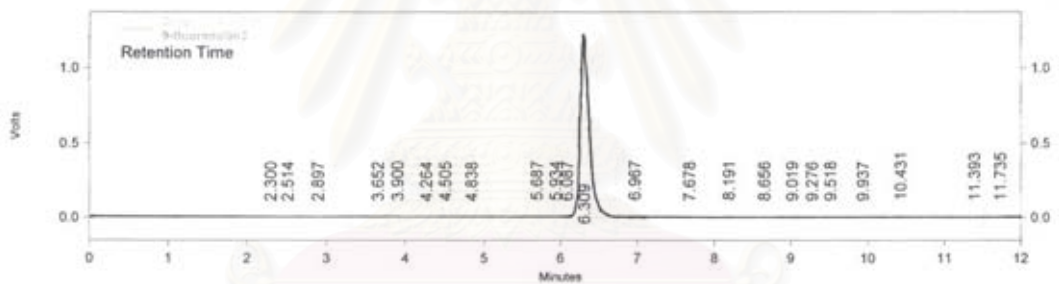
รูปที่ 4.17 โคโรมาโทแกรม TLC ของ 9-ฟลูออรีนอล (ก.) เปรียบเทียบกับสารมัธยันตร์จากการย่อยสลายฟลูออรีนโดย *Sphingomonas* sp. P2 (ข.)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ก.

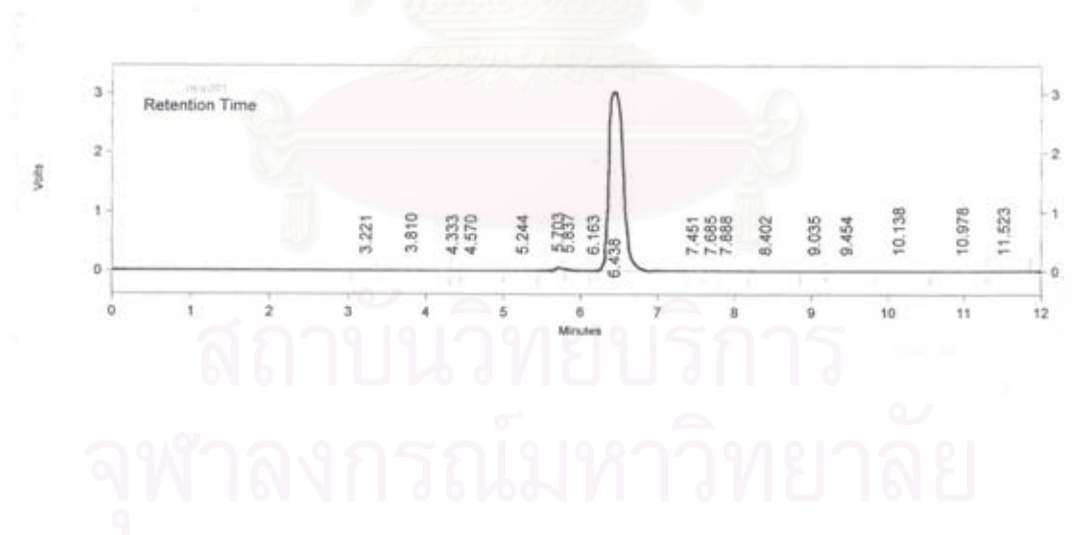


ข.



รูปที่ 4.18 HPLC โคโรมาโทแกรมของ 9-ฟลูออรีนอล (ก.) เปรียบเทียบกับสารมาตรฐานจากการย่อยสลายฟลูออรีนโดย *Sphingomonas* sp. P2 (ข.) (ใช้สารละลายอะซีโตไนไตรเข้มข้น 95 % ในเมทานอล อัตราการไหล 3.0 มล.ต่อนาที เป็นตัวชะ)

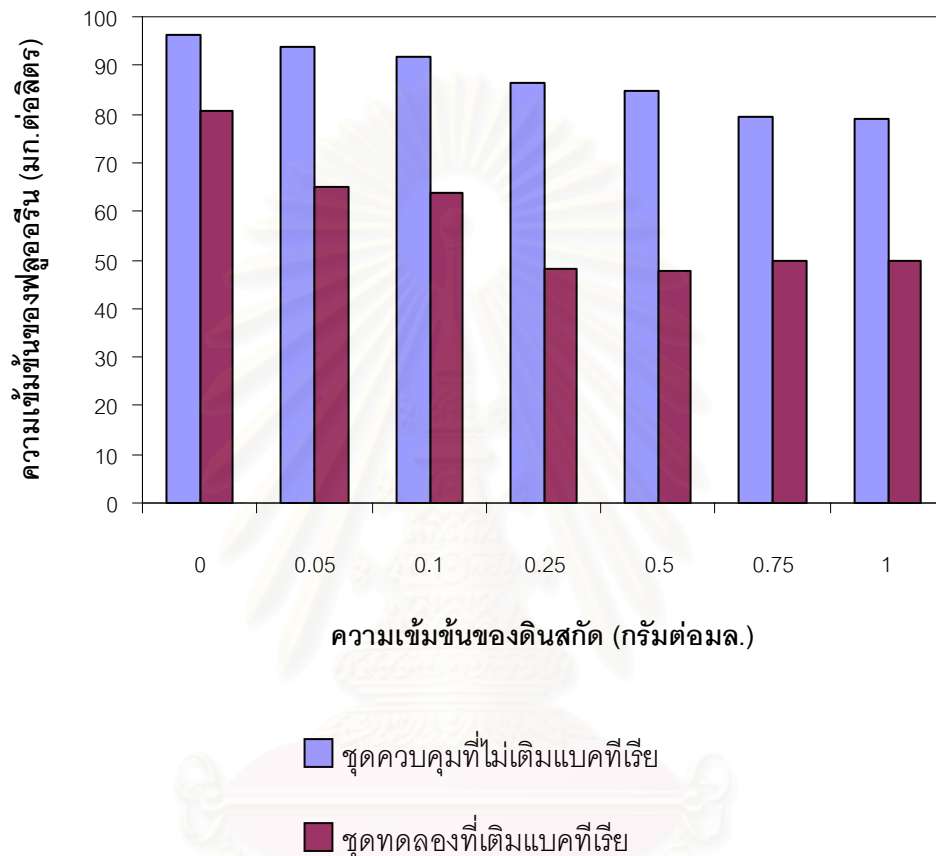
จากผลการทดลองในรูปที่ 4.16 และ 4.17 แสดงให้เห็นว่า สารมัธยันตร์จากการย่อยสลายฟลูออรีนโดย *Sphingomonas* sp. P2 ซึ่งทำให้บริสุทธิ์บางส่วนด้วย preparative HPLC มีลักษณะสมบัติในเบื้องต้นตรงกับ 9-ฟลูออรีนอล ซึ่งเป็นสารที่เคยมีรายงานอย่างแพร่หลายว่าเป็นสารมัธยันตร์ที่เกิดจากการย่อยสลายฟลูออรีนโดยแบคทีเรียต่างๆ โดยพบว่าทั้งสารมาตรฐานและสารมัธยันตร์ที่แยกได้ต่างก็มีค่า Rf เท่ากับ 0.69 เมื่อตรวจวิเคราะห์ด้วย TLC และเมื่อวิเคราะห์ด้วย HPLC โดยใช้สารละลายอะซีโตไนโตรเข้มข้น 95 % ในเมทานอล อัตราการไหล 3.0 มล.ต่อนาที เป็นตัวชะ เปรียบเทียบระหว่าง 9-ฟลูออรีนอล และสารมัธยันตร์ที่แยกได้ยังพบว่าทั้งสารมาตรฐานและสารตัวอย่างมีค่า retention time ตรงกัน คือ Rt เท่ากับ 6.3 นาที ดังผลการทดลองในรูปที่ 4.17 นอกจากนี้เมื่อนำสารมาตรฐาน 9-ฟลูออรีนอลผสมกับสารมัธยันตร์ที่สกัดแยกได้แล้วนำไปวิเคราะห์ด้วย HPLC พบสารมัธยันตร์ปรากฏ peak เพียงยอดเดียวซึ่งมีค่า Rt เท่ากับ 6.3 นาที และมีพื้นที่ใต้กราฟเพิ่มมากขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับรูปที่ 4.17 ก. ซึ่งเป็นโครมาโทแกรมของ 9-ฟลูออรีนอลเข้มข้น 1.0 มก. ต่อลิตร ผลการทดลองแสดงในรูปที่ 4.18



รูปที่ 4.19 โครมาโทแกรม HPLC ของสารผสมระหว่าง 9-ฟลูออรีนอลกับสารมัธยันตร์จากการย่อยสลายฟลูออรีนโดย *Sphingomonas* sp. P2 (ใช้สารละลายอะซีโตไนโตรเข้มข้น 95 % ในเมทานอลเป็นตัวชะ อัตราการไหล 3.0 มล.ต่อนาที)

4.4 การเติมสารอาหารจากดินสกัดเพื่อช่วยการย่อยสลายฟลูออรีนโดย *Sphingomonas* sp. P2

เนื่องจาก *Sphingomonas* sp. P2 สามารถเจริญและย่อยสลายฟลูออรีนแบบโคเมตาบอลิซึมได้เมื่อเติมยีสต์สกัดเป็นสับสเตรทในการเจริญ ในขั้นนี้จึงทดลองเติมสารอาหารที่สกัดจากดินแทนการเติมยีสต์สกัด เพื่อทำนายประสิทธิภาพเจริญและการย่อยสลายฟลูออรีนของแบคทีเรียที่อยู่ในแหล่งดินที่ปนเปื้อน โดยเติมสารอาหารที่สกัดจากดินที่มีความอุดมสมบูรณ์ 3 แหล่งได้แก่ ดินบริเวณด้านหลังตึกคณิตศาสตร์ ดินบริเวณด้านข้างตึกพฤกษศาสตร์ และดินสวนผลไม้ จังหวัดชลบุรี เจือจางให้มีความเข้มข้นของดินสกัดในอาหารเหลว CFMM เท่ากับ 0 0.05 0.1 0.25 0.5 0.75 และ 1.0 กรัมต่อมล. และมีฟลูออรีนเข้มข้น 100 มก. ต่อลิตร เลี้ยงเชื้อแบคทีเรียเป็นเวลา 7 วัน แล้วจึงนำอาหารเหลวมาวิเคราะห์ปริมาณฟลูออรีนที่เหลืออยู่โดย HPLC ดังแสดงผลการทดลองในรูปที่ 4.20 พบว่าเมื่อเติมดินสกัดจากแหล่งดินบริเวณด้านข้างตึกพฤกษศาสตร์เข้มข้น 0.05 กรัมต่อมล. ส่งผลให้ปริมาณของฟลูออรีนในชุดทดลองที่เติมแบคทีเรียลดลงเหลือ 65.0 มก.ต่อลิตร ในขณะที่ชุดทดลองที่ไม่เติมดินสกัด (0 กรัมต่อมล.) ปริมาณฟลูออรีนลดลงเหลือ 80.7 มก.ต่อลิตร และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของดินสกัดเป็น 0.25 กรัมต่อมล. ปริมาณฟลูออรีนในอาหารเหลวลดลงเหลือ 48.1 มก.ต่อลิตร แต่พบว่าปริมาณฟลูออรีนที่ถูกย่อยสลายคงที่แม้ว่าจะเติมดินสกัดเพิ่มขึ้นเป็น 1.0 กรัมต่อมล. โดยมีปริมาณฟลูออรีนในอาหารเหลว CFMM เหลืออยู่ 49.8 มก.ต่อลิตร ส่วนดินจากแหล่งอื่นๆ ให้ผลการย่อยสลายฟลูออรีนไม่แตกต่างจากชุดควบคุมที่ไม่เติมดินสกัด



รูปที่ 4.20 แผนภูมิแสดงปริมาณฟลูออรีนในอาหารเหลว CFMM ที่เติมสารอาหารสกั้ดจากดิน บริเวณด้านข้างตึกพฤกษศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ความเข้มข้นต่างๆ หลังจากเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 7 วัน

สรุปและอภิปรายผลการทดลอง

Sphingomonas sp. P2 เป็นแบคทีเรียที่คัดแยกจากแหล่งดินที่ปนเปื้อนน้ำมันเครื่อง บริเวณคู่อ้อมรถจังหวัดปราจีนบุรี โดยใช้พีแนทรีนเป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงาน (ณัฐพันธุ์ ศุภกา, 2542) และพบว่าแบคทีเรียนี้ยังสามารถใช้ฟลูออรีนเป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงาน โดยจำนวนเซลล์ของแบคทีเรียเพิ่มขึ้นในระยะแรก แต่ในเวลาต่อมาจำนวนเซลล์ได้ลดลง จึงคาดว่าอาจเป็นผลมาจากการสะสมสารมัธยันตร์บางชนิดจากการย่อยสลายฟลูออรีนที่อาจมีผลต่อการเจริญของ *Sphingomonas* sp. P2

ในงานวิจัยนี้ได้ทดลองขั้นต้นโดยเลี้ยง *Sphingomonas* sp. P2 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ CFMM ที่มีฟลูออรีน 100 มก.ต่อลิตร พบว่าแบคทีเรียมีอัตราการเจริญและมีประสิทธิภาพการย่อยสลายฟลูออรีนลดลง อาจเป็นผลมาจากการเก็บรักษาเชื้อแบคทีเรียซึ่งเก็บโดยวิธีการแช่แข็งที่อุณหภูมิ -70°C เป็นเวลานาน จึงทำให้ความสามารถในการเจริญและการย่อยสลายฟลูออรีนของแบคทีเรียนี้มีประสิทธิภาพลดลง

สัจจะ ธรรมสว่างสุข (2544) ศึกษาการเก็บรักษาเชื้อแบคทีเรียย่อยสลาย PAHs ได้แก่ *Sphingomonas* sp. P2 และ *Rhizobium* sp. CU-A1 ซึ่งมีความสามารถย่อยสลายพีแนทรีนและอะซีแนฟทาลีนได้ตามลำดับ พบว่าภายหลังเก็บรักษา *Rhizobium* sp. CU-A1 โดยวิธีแช่แข็งที่อุณหภูมิ -70°C เป็นเวลา 6 เดือน สามารถรักษาเซลล์แบคทีเรียให้มีชีวิตอยู่ได้แต่ความสามารถในการย่อยสลายอะซีแนฟทาลีนของแบคทีเรียลดลง ส่วนการเก็บรักษา *Sphingomonas* sp. P2 โดยวิธีการเดียวกัน สามารถรักษาเซลล์แบคทีเรียให้มีชีวิตอยู่และคงความสามารถในการย่อยสลายพีแนทรีนของแบคทีเรียได้ในเวลา 4 เดือน แต่เนื่องจากงานวิจัยนี้ทำการทดลองเพียง 4 เดือน ถ้าเพิ่มระยะเวลาทดลองให้ยาวขึ้น อาจพบว่าความสามารถในการย่อยสลายพีแนทรีนของแบคทีเรียมีแนวโน้มลดลง

Lang และ Malik (1996) ศึกษาผลของการเก็บรักษาแบคทีเรียกลุ่ม 6 สายพันธุ์ที่มีความสามารถในการย่อยสลายสารพิษชนิดต่างๆ กัน โดยวิธีทำให้แห้งในสภาพแข็ง (freeze-dried หรือ lyophilization) ทั้งในภาวะที่เติมและไม่เติมสารป้องกันเซลล์ (protective agent) และวิธี liquid-dried (การดึงน้ำออกจากสารละลายเซลล์ในสภาพเหลวแต่ไม่ผ่านภาวะแช่แข็ง) พบว่าภายหลังการเก็บรักษาเป็นเวลา 1 ปี ทั้งสามวิธีล้วนส่งผลทำให้การมีชีวิตและความสามารถของแบคทีเรียในการย่อยสลายสารพิษลดลงแตกต่างกัน รวมทั้งเมื่อทดลองสกัดพลาสมิดของแบคทีเรียเหล่านี้พบการสูญเสียพลาสมิดของแบคทีเรียภายหลังเก็บรักษาเชื้อแบคทีเรียด้วย

ดังนั้นจะเห็นได้ว่าการเก็บรักษาแบคทีเรียโดยวิธีแช่แข็งที่อุณหภูมิ -70°C เป็นวิธีที่สามารถเก็บรักษาเซลล์แบคทีเรียให้มีชีวิตอยู่ได้นาน แต่อาจจะไม่สามารถเก็บรักษาความสามารถในการย่อยสลาย PAHs เป็นเวลานานก็ได้ จึงอาจส่งผลให้ *Sphingomonas* sp. P2 ซึ่งผ่านการเก็บรักษาด้วยวิธีนี้มีประสิทธิภาพการย่อยสลายฟลูออรีนต่างไปจากเดิม

ถึงแม้ว่า *Sphingomonas* sp. P2 ย่อยสลายฟลูออรีนได้เพียงเล็กน้อย แต่พบการเปลี่ยนแปลงที่บ่งชี้ถึงการย่อยสลายคือมีสารมัธยันตรสีเหลืองสะสมอยู่ชั่วคราวในอาหารเลี้ยงเชื้อ CFMM ซึ่งสีเหลืองที่เกิดขึ้นมักเป็นลักษณะของการแตกวงแบบเมตาของสารอะโรมาติก (Grifoll และคณะ, 1995) และสารมัธยันตรสีเหลืองที่เกิดขึ้นดูดกลืนแสงสูงสุด (λ_{max}) ที่ความยาวคลื่นในช่วง 450-460 นาโนเมตร จึงไม่สามารถวัดปริมาณสารดังกล่าวโดยใช้ HPLC ที่ติดตั้งความยาวคลื่นตรวจสอบไว้ที่ 275 นาโนเมตรได้ แต่เมื่อเปรียบเทียบลักษณะการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นต่างๆ (absorption spectrum) ของสารมัธยันตรสีเหลืองนี้พบว่าใกล้เคียงกับสารมัธยันตรสีที่รายงานไว้ดังนี้

Foght และ Westlake (1988) พบสารที่มีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 460 นาโนเมตรในส่วนน้ำไลต์ที่ได้จากการบ่ม *Pseudomonas* sp. HL7b ร่วมกับฟลูออรีนในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว

นอกจากนี้ยังเคยมีรายงานโดย Grifoll และคณะ (1995) ซึ่งพบสารมัธยันตรสีเหลืองจากการย่อยสลายฟลูออรีนโดย *Pseudomonas cepacia* F297 มีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ความยาวคลื่น 462 นาโนเมตร คณะผู้วิจัยพยายามแยกสารมัธยันตรสีนี้แต่ไม่ประสบความสำเร็จเนื่องจากโครงสร้างทางเคมีของสารไม่คงตัว และไม่สามารถวัดปริมาณสารดังกล่าวโดยใช้ HPLC (ตรวจสอบที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร)

แต่อย่างไรก็ตามจากการวิเคราะห์ HPLC ยังพบสารมัธยันตรอีกชนิดหนึ่ง (R_t เท่ากับ 3.2 นาที) ซึ่งระยะเวลาและปริมาณของสารที่เกิดขึ้น ไม่สอดคล้องกับสารมัธยันตรสีเหลืองที่กล่าวก่อนหน้านี้นี้ จึงไม่น่าจะเป็นสารชนิดเดียวกัน รวมทั้งสารมัธยันตรที่พบมีปริมาณน้อยมากเมื่อเทียบสัดส่วนกับฟลูออรีนที่ยังเหลืออยู่ในอาหารเหลว CFMM ทำให้ไม่เพียงพอต่อการแยกและพิสูจน์เอกลักษณ์สารมัธยันตรที่ได้จากการทดลองในขั้นนี้

วิธีการหนึ่งส่งเสริมการย่อยสลาย PAHs โดยแบคทีเรียคือการใช้ตัวชักนำเพื่อกระตุ้นการเจริญของแบคทีเรียย่อยสลาย PAHs และชักนำให้สาร PAHs ถูกเมแทบอลิท์ (Chen และ Aitken, 1999) โดยเฉพาะการเติมแหล่งคาร์บอนที่สามารถย่อยสลายได้ง่ายอาจกระตุ้นการย่อยสลายสารเคมีอันตรายได้ (Shimp และ Pfaender, 1985) ดังนั้นในการทดลองขั้นต่อไปจึงเติมสารอาหารที่คาดว่า *Sphingomonas* sp. P2 สามารถใช้เป็นสับสเตรทในการเจริญได้

Lehtomake และ Niemela (1975) อ้างถึงโดย Dibble และ Bartha (1979) เติมนีเอสต์ที่หลีกเลี่ยงการหมักเบียร์เพื่อใช้กระตุ้นการย่อยสลายน้ำมันในดินที่ปนเปื้อนแบบโคเมแทบอลิซึม

Grifoll และคณะ (1992) ใช้อาหาร mineral salt medium (MSM) ที่เติมนีเอสต์สกัดในการคัดแยกแบคทีเรียย่อยสลายฟลูออรีน เพื่อเพิ่มจำนวนแบคทีเรีย และทดแทนสารอาหารที่แบคทีเรียต้องการเพื่อการเจริญ แต่ในเวลาต่อมาพบว่า *Arthrobacter* sp.F101 ต้องการวิตามินบี 12 เป็นปัจจัยสำคัญในการเจริญ (growth factor) และผู้วิจัยต้องการวิเคราะห์การเจริญและการย่อยสลายฟลูออรีนของ *Arthrobacter* sp.F101 เมื่อมีสารนี้เป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงานเพียงแหล่งเดียว จึงเปลี่ยนมาเติมนิวตามินบี 12 ในอาหารเลี้ยงเชื้อแทนนีเอสต์สกัด

ในงานวิจัยนี้พบว่าเมื่อเติมนีเอสต์สกัดซึ่งเป็นสารอินทรีย์ที่มักใช้เป็นสารอาหารเพื่อการเจริญสำหรับแบคทีเรียทั่วไป พบว่านอกจาก *Sphingomonas* sp. P2 สามารถใช้นีเอสต์สกัดเป็นสับสเตรทในการเจริญได้แล้วยังส่งผลให้ปริมาณฟลูออรีนลดลงจนตรวจไม่พบด้วย HPLC และทำให้ปริมาณสารมัธยันตร์ที่มี Rt เท่ากับ 3.2 มีปริมาณเพิ่มขึ้นด้วย เนื่องจากนีเอสต์สกัดประกอบด้วยแหล่งอาหารที่อุดมสมบูรณ์ โดยมีปริมาณโปรตีนสูงถึง 73-75 % รวมถึงวิตามินและแร่ธาตุซึ่งมีปริมาณแตกต่างกันขึ้นกับขั้นตอนการผลิต และภายในเซลล์นีเอสต์ยังมีกรดไรโบนิวคลีอิก (ribonucleic acid, RNA) ปริมาณสูง (6-8 %) ในบางสายพันธุ์อาจมีปริมาณสูงถึง 13 % (Sommer, 1996) จะเห็นได้ว่านีเอสต์สกัดมีสารอาหารหลากหลายชนิดซึ่งครอบคลุมชนิดของสารที่จำเป็นต่อการเจริญของแบคทีเรีย จึงเหมาะสำหรับใช้เป็นแหล่งอาหารสำหรับการเจริญของจุลินทรีย์

จากรูปแบบการเจริญของ *Sphingomonas* sp. P2 ในอาหารเหลว CFMM ที่มีนีเอสต์สกัด 0.5 % (น้ำหนักต่อปริมาตร) การเจริญของแบคทีเรียไม่แตกต่างกันทั้งในชุดทดลองและชุดควบคุมที่เติมและไม่เติมฟลูออรีนตามลำดับ จึงแสดงให้เห็นว่า *Sphingomonas* sp. P2 ใช้นีเอสต์สกัดเป็นสับสเตรทในการเจริญเพียงอย่างเดียว และย่อยสลายฟลูออรีนโดยการเปลี่ยนโครงสร้าง (biotransformation) เป็นสารชนิดอื่น จึงแสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียนี้ไม่สามารถย่อยสลายฟลูออรีนอย่างสมบูรณ์ (mineralization) จนสามารถสร้างการเจริญของเซลล์ได้

นอกจากการเติมนีเอสต์สกัดแล้วยังมีการเติมสารอินทรีย์อื่นๆ เพื่อส่งเสริมการเจริญและการย่อยสลายสารพิษต่างๆ โดยแบคทีเรียด้วย

Stringfellow และ Aitken (1995) พบการย่อยสลายฟลูออรีนแบบโคเมแทบอลิซึมร่วมกับเปปโตโนโดย *Pseudomonas stutzeri* P16 โดยทำให้สีของอาหารเหลวเปลี่ยนเป็นสีเหลืองใส และพบสารมัธยันตร์จากการวิเคราะห์ HPLC สองชนิดคือ 9-ฟลูออรีนอล และ 9-ฟลูออรีโนน

Yuan และคณะ (2000) พบว่าการเติมแหล่งคาร์บอนที่เป็นสารอินทรีย์ได้แก่ ยีสต์สกัดอะซีเตท กลูโคส และโพวเวท (50 มก.ต่อลิตร) ทำให้อัตราการย่อยสลายที่แน่นอนในดินตะกอนจากแม่น้ำเพิ่มขึ้น

จะเห็นได้ว่าเมื่อเติมสารอินทรีย์ต่างๆ ร่วมกับสาร PAHs มีผลทำให้การย่อยสลายโดยแบคทีเรียเกิดขึ้นอย่างมีประสิทธิภาพ และสารที่กล่าวมาล้วนเป็นสารที่จุลินทรีย์สามารถนำไปใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในการเจริญได้ง่ายกว่าการใช้สาร PAHs ซึ่งมีโครงสร้างและระบบเอนไซม์ที่ใช้ในการย่อยสลายซับซ้อนกว่า โดยไม่เกิดผลยับยั้งการย่อยสลายสาร PAHs แต่การเติมสารอินทรีย์ในการบำบัดทางชีวภาพอาจไม่ให้ผลดีเสมอไป Piehler และ Paerl (1996) พบว่าเมื่อเติมแมนนิทอลทำให้ย่อยสลายเชื้อเพลิงดีเซลได้ลดลง เนื่องจากแมนนิทอลอาจเป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงานที่จุลินทรีย์ใช้ในการเจริญได้ง่ายกว่า

การเติมสารอินทรีย์โดยเฉพาะการเติมปริมาณมากอาจมีผลยับยั้งการย่อยสลายเนื่องจากจุลินทรีย์เลือกใช้แหล่งคาร์บอนที่ใช้ในการเจริญได้ง่ายก่อน และเมื่อแหล่งคาร์บอนนั้นหมดไปแบคทีเรียจึงหันมาใช้แหล่งคาร์บอนที่มีโครงสร้างซับซ้อนยากแก่การย่อยสลาย ทำให้เกิดการย่อยสลายสารเป็นลำดับ (sequential degradation) (Molina และคณะ, 1999)

การเติมสารคาร์บอนเพื่อใช้เป็นสับสเตรทชนิดที่สองอาจส่งเสริมหรือยับยั้งการย่อยสลายสารพิษต่างๆ ขึ้นกับความสัมพันธ์ของสารที่เติมกับสารที่ต้องการบำบัด รวมทั้งกลไกในการย่อยสลายด้วย (Schmidt และ Alexander, 1985)

การย่อยสลาย PAHs แบบโคเมแทบอลิซึมร่วมกับสาร PAHs ด้วยตัวเอง มีรายงานแพร่หลายว่าเกิดจากเอนไซม์ที่ใช้ย่อยสลาย PAHs ที่ผลิตโดยแบคทีเรีย มักจะสามารถย่อยสลาย PAHs ได้หลายชนิด (broad substrate range) (Stringfellow และ Aitken, 1995) แต่กลไกการย่อยสลาย PAHs ร่วมกับสารอาหารอินทรีย์อื่นที่ไม่ใช่สารกลุ่ม PAHs แล้วทำให้สาร PAHs ถูกเมแทบอลิท์ต่อไปได้นั้นยังไม่มียางานที่ชัดเจน แต่ในงานวิจัยนี้อาจสันนิษฐานได้ว่า *Sphingomonas* sp. P2 ย่อยสลายฟลูออรีนร่วมกับยีสต์สกัดโดย

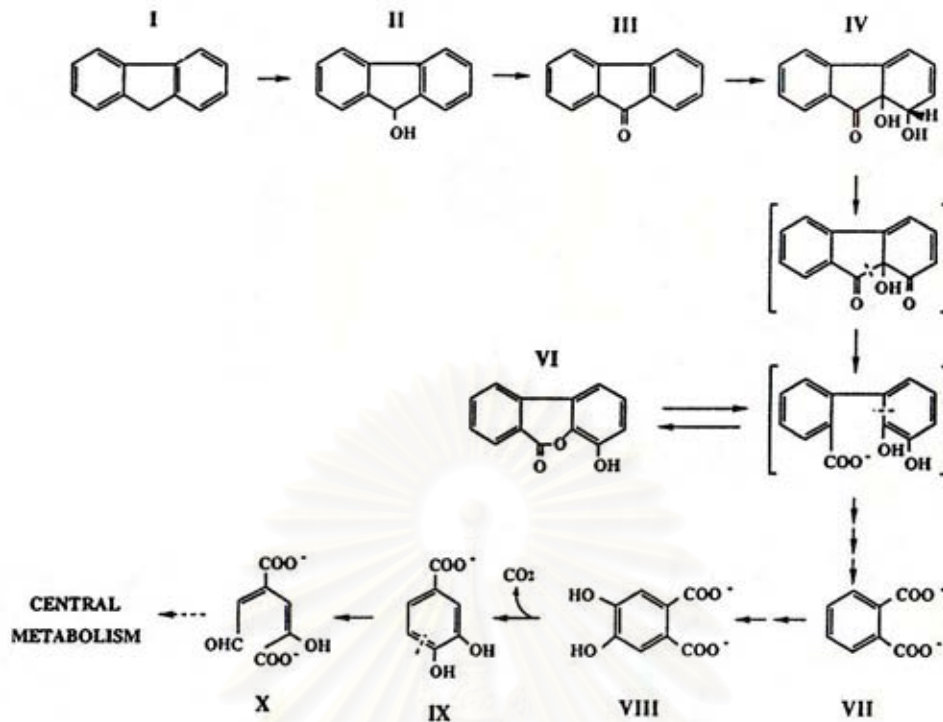
1. เติม *Sphingomonas* sp. P2 สามารถผลิตโมโนออกซีจีเนสเป็นเอนไซม์เริ่มแรก (initial enzyme) ที่เปลี่ยนฟลูออรีนไปเป็นสารอื่น ซึ่งพบได้ในแบคทีเรียย่อยสลายฟลูออรีนเช่น *Arthrobacter* sp. F101 (Casellas และคณะ, 1997) และ *Pseudomonas* sp. F274 (Grifoll และคณะ, 1994) เป็นต้น เอนไซม์ดังกล่าวทำหน้าที่เติมออกซีเจนแก่วงไฮโคไลเพนธินของฟลูออรีนทำให้เปลี่ยนฟลูออรีนเป็น 9-ฟลูออรีนอลได้ แต่เนื่องจาก *Sphingomonas* sp. P2 มีปริมาณเซลล์ที่จำกัดจึงมีเอนไซม์ผลิตขึ้นเพียงเล็กน้อย ทำให้ฟลูออรีนในอาหารเหลวถูกเปลี่ยนไปบางส่วน เมื่อเติมยีสต์สกัดทำให้แบคทีเรียสามารถเพิ่มจำนวนเซลล์ได้ ปริมาณโมโนออกซีจีเนส

สูงเพิ่มขึ้นด้วยซึ่งส่งผลให้ฟลูออรีนถูกเปลี่ยนรูปไปได้มากขึ้น จนตรวจไม่พบฟลูออรีนเหลืออยู่ในอาหารเหลว

2. ภายในองค์ประกอบของยีสต์สกัดมีกรดอะมิโนหลายชนิดที่มีโครงสร้างเป็นวงอะโรมาติก ได้แก่ ฟีนอลอะลานีน ไทโรซีน และทริปโตเฟน รวมทั้งกรดไขมันชนิดไม่อิ่มตัวหลายชนิดเหล่านี้มีโครงสร้างเป็นวงคล้ายกับสาร PAHs อาจชักนำให้ผลิตเอนไซม์ที่สามารถย่อยสลาย PAHs ได้ โดยเอนไซม์ที่ถูกชักนำให้สร้างขึ้นคือไดออกซีจีเนสซึ่งมีความจำเพาะต่ำสามารถเร่งปฏิกิริยาที่ใกล้เคียงกันได้หลายชนิด (Stringfellow และ Aitken, 1995) ในงานวิจัยนี้ยีสต์สกัดอาจชักนำให้ *Sphingomonas* sp. P2 ผลิตไดออกซีจีเนสที่สามารถเร่งปฏิกิริยาการเปลี่ยน 9-ฟลูออรีโนนซึ่งเป็นสารมัธยันตร์ที่เกิดขึ้นภายหลังจากสาร 9-ฟลูออรีนอลถูกดิงไฮโดรเจนออก โดยเปลี่ยน 9-ฟลูออรีโนนเป็น 1,1-ไดไฮดรอกซี-1-ไดไฮโดร-9-ฟลูออรีโนน (1,1a-dihydroxy-1-hydro-9-fluorenone) และถูกย่อยสลายต่อไป

จากการเติมยีสต์สกัดในงานวิจัยนี้มีผลทำให้ปริมาณฟลูออรีนลดลงและทำให้ปริมาณสารมัธยันตร์จากการวิเคราะห์ HPLC มีปริมาณเพิ่มขึ้นด้วย ผลการทำสารมัธยันตร์ให้บริสุทธิ์และการวิเคราะห์ทางเคมีพบว่าเมื่อ *Sphingomonas* sp. P2 ย่อยสลายฟลูออรีนแบบโคเมแทบอลิซึมร่วมกับยีสต์สกัดทำให้มีการสะสมสารมัธยันตร์จากการย่อยสลายน้อยกว่าอยู่ชั่วคราว และไม่มีผลทำให้จำนวนเซลล์แบคทีเรียลดลงแต่อย่างใด สารมัธยันตร์ที่แยกได้คือ 9-ฟลูออรีนอลซึ่งมีรายงานว่าเป็นสารมัธยันตร์ตัวแรกที่พบในการย่อยสลายฟลูออรีนโดยแบคทีเรียชนิดต่างๆ

Grifoll และคณะ (1994) ได้เสนอวิธีการย่อยสลายฟลูออรีนโดย *Pseudomonas* sp. F274 พบแบคทีเรียนี้อาศัยกิจกรรมของเอนไซม์ไดออกซีจีเนสเปลี่ยน 9-ฟลูออรีโนนเป็น 1,1-ไดไฮดรอกซี-1-ไดไฮโดร-9-ฟลูออรีโนน (1,1a-dihydroxy-1-hydro-9-fluorenone) แล้วจึงมีการเปิดวงไซโคลเพนธีน และย่อยสลายตามวิธีการย่อยสลายไบฟีนิล (biphenyl) ต่อไปจนได้ผลิตภัณฑ์เป็นกรดฟทาลิก (phthalic acid) และกรดโปรโตคาเทคิอิก (protocatechuic acid) ตามลำดับ



รูปที่ 5.1 วิธีการย่อยสลายฟลูออรีนโดย *Pseudomonas* sp. F274 (Grifoll และคณะ, 1994)
 fluorene (I), 9-fluorenol (II), 9-fluorenone (III), 1,1a-dihydroxy-1-hydro-9-fluorenone (IV),
 8-hydroxy-3,4-benzocoumarin (VI), phthalate (VII), 4,5-dihydroxyphthalate (VIII),
 protocatechuate (IX), 2-hydroxy-4-carboxy-cis,cis-muconic semialdehyde (X)

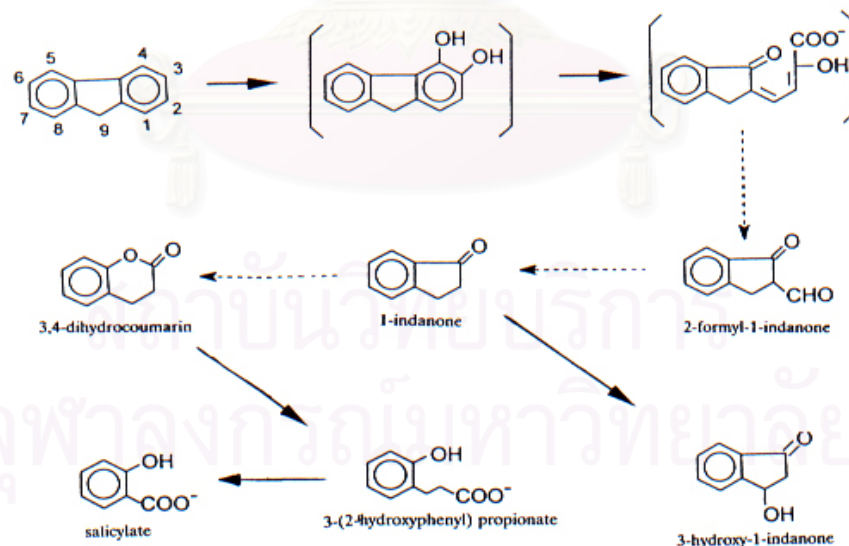
แต่ในงานวิจัยนี้ไม่สามารถแยก 9-ฟลูออรีโนน และสารมัธยันตรอื่นๆ ที่ถูกย่อยสลายต่อจากฟลูออรีโนน จึงยังไม่สามารถสรุปได้ว่าฟลูออรีนถูกย่อยสลายผ่าน 9-ฟลูออรีนอล แล้วดึงไฮโดรเจนออกกลายเป็น 9-ฟลูออรีโนน และย่อยสลายต่อไปตามวิธีนี้ รวมทั้งการพบสารมัธยันตรสีเหลืองในอาหารเหลว CFMM ซึ่งเป็นลักษณะของการแตกวงเบนซีนแบบเมตา การย่อยสลายฟลูออรีนโดย *Sphingomonas* sp. P2 จึงอาจเกิดโดยอาศัยแนวทางอื่นได้เช่นกัน

Grifoll และคณะ (1992) รายงานว่าเชื้อแบคทีเรีย *Arthrobacter* sp. F101 (Casellas และคณะ, 1997) สามารถใช้ฟลูออรีนเป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงานในการเจริญได้ และพบสารมัธยันตรสีเหลืองในอาหารเลี้ยงเชื้อ MSM จึงเสนอวิธีเฝ้าติดตามผลในการย่อยสลายฟลูออรีนโดย *Arthrobacter* sp. F101 อีกวิธีหนึ่งโดยฟลูออรีนถูกเปลี่ยนโครงสร้างเป็น 3,4-ไดไฮโดรคูมา

ริน (3,4-dihydrocoumarin) ซึ่งเกิดจากการแตกวงเบนซีนที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 3 และ 4 ของฟลูออรีน โดยวิธีนี้เป็นวิธีที่ทำให้เกิดการเพิ่มจำนวนเซลล์

Grifoll และคณะ (1995) รายงานว่าในระหว่างการเจริญของ *Pseudomonas cepacia* F297 โดยใช้ฟลูออรีนเป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงาน ตรวจพบสารมัธยันตร์ที่ทำให้อาหารเลี้ยวเชื้อเปลี่ยนจากไม่มีสีเป็นสีเหลืองซึ่งสะสมอยู่ในอาหารเหลวเพียงชั่วคราว แต่สารสีเหลืองที่เกิดขึ้นตรวจไม่พบเมื่อวิเคราะห์โดย HPLC แต่ผู้วิจัยตรวจพบสารมัธยันตร์อื่นๆ หลายชนิดและพบสารชนิดใหม่ที่สำคัญคือ 1-อินดาโนน (1-indanone) ซึ่งเกิดจากกลไกการย่อยสลายที่คล้ายกับวิธีการย่อยสลายแนพธาไลน์ (naphthalene) คือมีการเติมหมู่ออกซิเจนเข้าที่วงเบนซีนในตำแหน่งคาร์บอนที่ 3 และ 4 แล้วจึงเกิดการแตกวงและปลดปล่อยไพรูเวท (pyruvate) วิธีการย่อยสลายฟลูออรีนโดย *Pseudomonas cepacia* F297 แสดงดังรูปที่ 2.3 ในวารสารปริทัศน์

Casellas และคณะ (1997) พบสารมัธยันตร์ชนิดใหม่ที่สนับสนุนการนำเสนอวิธีการย่อยสลายฟลูออรีนโดย *Arthrobacter* sp. F101 ย่อยสลายฟลูออรีนโดยเริ่มจากการเติมหมู่ออกซิเจนโดยเอนไซม์ไดออกซีจีเนสที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 3 และ 4 ทำให้มีการแตกวงแบบเมตา แล้วจึงเกิดอัลโดเลส (aldolase) เปลี่ยนเป็นฟอร์มิล อินดาโนน (formyl indanone) ซึ่งเป็นวิธีที่แบคทีเรียใช้ในการเจริญ วิธีการย่อยสลายฟลูออรีนโดย *Arthrobacter* sp. F101 ดังรูปที่ 5.2



รูปที่ 5.2 วิธีการย่อยสลายฟลูออรีนโดย *Arthrobacter* sp. F101 โดยเริ่มจากการเติมหมู่ออกซิเจนที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 3 และ 4 (Casellas และคณะ, 1997)

ในงานวิจัยนี้ *Sphingomonas* sp. P2 อาจย่อยสลายฟลูออรีนโดยเติมออกซิเจนที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 9 ของฟลูออรีน ทำให้มีการสะสม 9-ฟลูออรีนอล และต่อมาถูกดั่งไฮโดรเจนออกกลายเป็น 9-ฟลูออรีโนน ซึ่งอาจถูกย่อยสลายต่อไปโดยอาศัยกลไกที่เหมือนกับ *Pseudomonas* sp. F274 (Grifoll และคณะ, 1994) คือเอนไซม์ไดออกซีจีนสเตอโมออกซิเจนแก่ 9-ฟลูออรีโนนกลายเป็น 1,1เอ-ไดไฮดรอกซี-1-ไดไฮโดร-9-ฟลูออรีโนน จึงทำให้วงไซโคลเพนธีนเปิดออกแล้วย่อยสลายตามวิถีการสลายไบฟีนิลจนได้ผลิตภัณฑ์เป็นกรดพธาลิกและกรดโปรโตคาที่คูอิก ซึ่งจะถูกร่อยสลายต่อไปในที่สุด

ในการทดลองเติมสารอาหารจากดินสกัดต่อการย่อยสลายฟลูออรีนโดย *Sphingomonas* sp. P2 พบว่าสารอาหารในดินบริเวณด้านข้างตึกพฤกษศาสตร์มีผลทำให้ปริมาณฟลูออรีนในอาหารเหลว CFMM ลดลง 40 % เมื่อเทียบกับชุดที่ไม่เติมสารจากดินสกัด อาจเป็นเพราะในดินสกัดมีสารอาหารเช่น กรดอะมิโน วิตามิน หรือแร่ธาตุต่างๆ ที่เกิดจากการทับถมของซากพืชซากสัตว์ ซึ่ง *Sphingomonas* sp. P2 สามารถนำไปใช้ในการเจริญได้ และสารต่างๆ เหล่านี้อาจชักนำให้แบคทีเรียผลิตเอนไซม์ย่อยสลาย PAHs ได้ด้วย ส่วนดินบริเวณอื่นๆ อาจมีปริมาณธาตุอาหารที่จุลินทรีย์สามารถนำไปใช้ได้เจือจางกว่า จึงไม่มีผลต่อการย่อยสลายฟลูออรีนโดยแบคทีเรียนี้

การย่อยสลายฟลูออรีนโดย *Sphingomonas* sp. P2 เพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มปริมาณของดินสกัดในอาหารเหลว CFMM แต่พบว่าเมื่อเพิ่มปริมาณสารจนถึงระดับหนึ่งฟลูออรีนที่ถูกย่อยสลายก็ไม่ได้เพิ่มขึ้นแต่อย่างใด คาดว่าเป็นเพราะในสารสกัดจากดินอาจมีสารหลายชนิดผสมกันอยู่ แต่ปริมาณธาตุอาหารที่จุลินทรีย์สามารถนำไปใช้ได้มีอยู่จำกัด ถึงแม้ว่าจะเพิ่มปริมาณของดินที่นำมาสกัดแต่ปริมาณของสารอาหารที่จุลินทรีย์นำมาใช้ได้ อาจไม่เพิ่มขึ้น

แต่เมื่อเปรียบเทียบผลการย่อยสลายฟลูออรีนโดย *Sphingomonas* sp. P2 ร่วมกับยีสต์สกัดและสารอาหารจากดินสกัดแล้วพบว่า สารอาหารจากยีสต์สกัดส่งผลให้การย่อยสลายฟลูออรีนเกิดได้อย่างรวดเร็วและมีประสิทธิภาพว่าการเติมสารอาหารจากดินสกัด อาจเป็นเพราะยีสต์สกัดเป็นแหล่งที่อุดมไปด้วยสารอาหารที่จุลินทรีย์สามารถนำไปใช้ได้ง่าย และประกอบด้วยสารอาหารที่เข้มข้นกว่า ส่วนสารอาหารจากดินสกัดนั้นอาจจะเจือจางกว่าทำให้จุลินทรีย์นำไปใช้ได้ปริมาณน้อย

บทที่ 6

ข้อเสนอแนะงานวิจัย

6.1 ก่อนนำเชื้อแบคทีเรียย่อยสลาย PAHs ที่เก็บรักษาโดยวิธีแช่แข็ง- 70 °ซ มาใช้ในการวิจัย ควรตรวจสอบความสามารถในการย่อยสลาย PAHs ว่ายังมีประสิทธิภาพหรือไม่ และควรหาวิธีการที่มีประสิทธิภาพในการเก็บรักษาเซลล์แบคทีเรียให้มีชีวิตอยู่ได้นาน และรักษาความสามารถในการย่อยสลาย PAHs ให้คงที่มากที่สุด

6.2 ก่อนเตรียมหัวเชื้อแบคทีเรียเพื่อใช้ในการทดลองควรเลี้ยง *Sphingomonas* sp. P2 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ CFMM ที่เติมฟลูออรีน และถ่ายเชื้อสู่อาหารใหม่อย่างน้อย 2-3 ครั้ง เพื่อให้แบคทีเรียปรับตัวจนคุ้นเคยกับสารฟลูออรีน จะทำให้ประสิทธิภาพการย่อยสลายฟลูออรีนคงที่เท่ากันทุกครั้งก่อนนำไปใช้ในการทดลอง

6.3 การวิเคราะห์สารมัธยันตร์ด้วย TLC และวิธี HPLC พบว่าสารมัธยันตร์หลายชนิดที่เกิดขึ้นมีค่า Rf และ ค่า Rt ใกล้เคียงกันมากซึ่งยากต่อการจำแนกว่าเป็นสารชนิดใด และประสิทธิภาพการแยกสารมัธยันตร์อาจไม่สมบูรณ์ อาจทำการปรับเปลี่ยนระบบตัวทำละลายที่ใช้ในการชะให้เหมาะสม

6.4 ควรจะทำการสกัดแยกและพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารมัธยันตร์ชนิดอื่นๆ ที่สะสมจากการย่อยสลายฟลูออรีนเพิ่มเติม เพื่อพิสูจน์ว่า *Sphingomonas* sp. P2 ย่อยสลายฟลูออรีนโดยผ่าน 9-ฟลูออรีนอลแล้วสารนี้ถูกย่อยสลายต่อไปโดยเช่นเดียวกับวิถีการย่อยสลายฟลูออรีนโดย *Pseudomonas* sp. F274 (Grifoll และคณะ, 1994) หรืออาจย่อยสลายฟลูออรีนผ่าน 3,4-ไดไฮดรอกซีฟลูออรีน หรือ 1,2-ไดไฮดรอกซีฟลูออรีน แต่ในขณะเดียวกันก็สามารถออกซิไดส์ฟลูออรีนผ่าน 9-ฟลูออรีนอลด้วย เพื่อใช้รักษาสมดุลไพรูเวทเช่นเดียวกับ *Pseudomonas cepacia* F297 (Grifoll และคณะ, 1995)

6.5 ควรวิเคราะห์องค์ประกอบและปริมาณสารอาหารในแหล่งดินที่นำมาทดสอบการย่อยสลายฟลูออรีนโดย *Sphingomonas* sp. P2 เพื่อให้ทราบว่าสารอาหารใดในแหล่งดินที่มีบทบาทต่อการย่อยสลายฟลูออรีน รวมถึงทราบแนวทางในการย่อยสลายฟลูออรีนโดย *Sphingomonas* sp. P2 เมื่ออยู่ในแหล่งดินที่มีการปนเปื้อน PAHs

6.6 ควรติดตามสารมัธยันตร์จากการวิเคราะห์ TLC เพิ่มเติมหลังจาก 15 ชม. เพื่อให้ทราบชนิดของสารมัธยันตร์อื่นๆ เพิ่มขึ้น เพื่อสามารถทำนายวิถีการย่อยสลายฟลูออรีนโดย *Sphingomonas* sp. P2 ได้ชัดเจนยิ่งขึ้น

รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

- ควบคุมมลพิษ, กรม. 2542. กากของเสียอันตราย. รายงานสถานการณ์คุณภาพสิ่งแวดล้อม 2542. กรุงเทพมหานคร.
- กรมควบคุมมลพิษ. 2543. ภาวะมลพิษ. รายงานสถานการณ์คุณภาพสิ่งแวดล้อม 2543. กรุงเทพมหานคร. : 81-93.
- ณัฐพันธุ์ ศุภกา. 2542. ความสามารถของแบคทีเรียดินที่คัดเลือกได้ในการย่อยสลายพีแนนทรีน และพอลิไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนชนิดอื่น. วิทยานิพนธ์ปริญญาโทมหาบัณฑิต ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- สัจจะ ธรรมสว่างสุข. 2544. การเก็บรักษาแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายสาร PAHs โดยวิธี Lyophilization. โครงการเสริมการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์ ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ภาษาอังกฤษ

- Bezalel, L., Hadar, Y., Fu, P. P., Freeman, J. P., and Cerniglia, C. E. 1996. Initial oxidation products in the metabolism of pyrene, anthracene, fluorene, and dibenzothiophene by the white rot fungus *Pleurotus ostreatus*. Appl. Environ. Microbiol. 62 : 2554-2559.
- Bogan, B., Lamar, R.T., and Hammel, K.E. 1996. Fluorene oxidation in vivo by *Phanerochaete chrysosporium* and in vitro during manganese peroxidase-dependent lipid peroxidation. Appl. Environ. Microbiol. 62 : 1788-1792.
- Boldrin, B., Tiehm, A., and Fritzsche, C. 1993. Degradation of phenanthrene, fluorene, fluoranthene, and pyrene by a *Mycobacterium* sp. Appl. Environ Microbiol. 59 : 1927-1930.
- Broadbent, F.E., and Norman, A.G. 1946. Some factor affecting of the organic nitrogen in soil. Soil Sci. Amer. Procc. 11 : 264-267.

- Casellas, M., Grifoll, M., Bayona, J. M., and Solas, A. M. 1997. New metabolites in the degradation of fluorene by *Arthrobacter* sp. strain F101. Appl. Environ. Microbiol. 63 : 819-826.
- Casellas, M., Griffol, M., Sabate, J., and Solanas, A. M. 1998. Isolation and characterization of a 9-fluorenone-degrading bacterial strain and its role in synergistic degradation of fluorene by a consortium. Can. J. Microbiol. 44 : 737-742.
- Cerniglia, C. E. 1992. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. Biodegradation 3 : 351-368.
- Chandra, S. D., Ward, C. H., and Hughes J. B. 1996. Biodegradaon of sorbed fluorene in sediment slurries. Hazardous Waste & Hazardous Materials. 13 : 375-385.
- Chen, J. W., Kong, L. R., Zhu, C. M., Huang, Q.G., and Wang, L.S. 1996. Correlation between photolysis rate constants of polycyclic aromatic hydrocarbons and frontier molecular orbital energy. Chemosphere. 33 : 1143-1150.
- Chen, S.H., and Aitken, M. D. 1999. Salicylate stimulates the degradation of high-molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons by *Pseudomonas saccharophila* P15. Environ. Sci. Technol. 33 : 435-439.
- Dibble. J. T., and Bartha, R. 1979. Effect of environmental parameters on the biodegradation of oil sludge. Appl. Environ. Microbiol 37 : 729-739.
- Faust, R. A. 1994. www.epa.gov/epaoswer/hazwaste/minimize/30factsht.pdf. Tennessee : Oak Ridge Reservation Enviromental Restoration Program.
- Foght, J. M., and Westlake, D. W. S. 1988. Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons and aromatic heterocycles by a *Pseudomonas* species. Can. J. Microbiol. 34 : 1135-1141.
- George, E. J., and Neufeld, R. D. 1989. Degradation of fluorene in soil by fungus *Phanerochaete chrysosporium*. Biotechnol. Bioeng. 33 : 1306-1310.
- Grifoll, M., Casellas, M., Bayona, J. M., and Solas, A. M. 1992. Isolation and characterization of a fluorene-degrading bacterium: identification of ring oxidation and ring fission products. Appl. Environ. Microbiol. 58 : 2910-2917.

- Grifoll, M., Selifonov, S. A., and Chapman, P. J. 1994. Evidence for a novel pathway in degradation of fluorene by *Pseudomonas* sp. F274. Appl. Environ. Microbiol. 60 : 2438-2449.
- Grifoll, M., Selifonov, S. A., Gatlin, C. V., and Chapman, P. J. 1995. Actions of versatile fluorene-degrading bacterial isolate on polycyclic aromatic compounds. Appl. Environ. Microbiol. 61: 3711-3723.
- Grosser, R. J., Warshawsky, D., and Vestal, J. R. 1995. Mineralization of polycyclic and *n*-heterocyclic aromatic compounds in hydrocarbon-contaminated soils. Environ. Toxicol. Chem. 14 : 375-382.
- Heitkamp, M. A., and Cerniglia C. E. 1988. Mineralization of polycyclic aromatic hydrocarbons by a bacterium isolated from sediment below an oil field. Appl. Environ. Microbiol. 54 : 1612-1614.
- Horvath, R. S. 1972. Microbial co-metabolism and the degradation of organic compounds in nature. Bacteriol Reviews. 36 : 146-155.
- Horvath, R. S., and Koft, B.W. 1972. Degradation of alkyl benzene sulfonate by *Pseudomonas* species. Appl. Microbiol. 23 : 407-414.
- International Agency for Research on Cancer. 1983: IARC Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans. Polynuclear Aromatic Compounds, Part I, Chemical, Environmental and Experimental Data, Vol 32. Geneva: World Health Organization.
- Jacquot, F., Guihano, M., Doumenq, P., Munoz, D., and Milie, G. 1996. In vitro photooxidation of crude oil maltenic fractions : evolution of fossil biomarkers and polycyclic aromatic hydrocarbons . Chemosphere. 33 : 671-681.
- Juhasz, A. L., Britz, M.L., and Stanley, G.A. 2000. Evaluation of a creosote-based medium for the growth and preparation of PAH-degrading bacterial community for bioaugmentation. J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 24 : 277-284.
- Kanaly, R. A., and Harayama, S. 2000. Biodegradation of high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons by bacteria. J. Bacteriol. 182 : 2059-2067.
- Keith, L.H., and Telliard, W. A. 1979. Priority pollutants I-A perspective view. Environ. Sci. Technol. 13: 416-423.

- Keuth, S., and Rehm, H. J. 1991. Biodegradation of phenanthrene by *Arthrobacter polychromogenes* isolated from a contaminated soil. Appl Microbiol. Biotech. 34: 804-808.
- Lang, E., and Malik, K. A. 1996. Maintenance of biodegradation capacities of aerobic bacteria during long-term preservation. Biodegradation. 7 : 65-71.
- Leadbetter, E.R., and Foster, J. w. 1959. Oxidation of product formed from gaseous alkanes by the bacterium *Pseudomonas methanica*. Arch. Biochem. Biophys. 82: 491-492.
- Miller, R. M., Singer, G. M., Rosen, J. D., and Bartha, R. 1988. Photolysis primes biodegradation of benzo (a) pyrene. Appl. Environ. Microbiol. 54 : 1724-1730.
- Molina, M., Araujo, R., and Hodson, R. E. 1999. Cross-induction of pyrene and phenanthrene in a *Mycobacterium* sp. Isolated from polycyclic aromatic hydrocarbon contaminated river sediments. Can. J. Microbiol. 45 : 520-529.
- Monna, L., Omori, T., and Kodama, T. 1993. Microbial degradation of dibenzofuran, fluorene, and dibenzo-*p*-dioxin by *Staphylococcus auriculans* DBF63. Appl. Environ. Microbiol. 59: 285-287.
- Mueller, J. G., Chapman, P. J., and Pritchard, P. H. 1989. Action of fluorene-utilizing bacterial community on polycyclic aromatic hydrocarbon components of creosote. Appl. Environ. Microbiol. 55 : 3085-3093.
- Matsumura, F., and Boush, G.M. 1967. Dieldrin : degradation by soil microorganisms. Science. 156 : 959-961.
- Phillips, T. M., Liu, D., Seech, A. G., Lee, H., and Trevors, J. T. 2000. Monitoring bioremediation in creosote-contaminated soils using chemical analysis and toxicity tests. J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 24 : 132-139.
- Pickard, M. A., Roman, R., Tinoco, R., and Vazquez-Duhalt, R. 1999. Polycyclic aromatic hydrocarbon metabolism by white rot fungi and oxidation by *Coriolopsis gallica* UAMH 8260 laccase. Appl. Environ. Microbiol. 65 : 3805-3809.
- Piehler, M. F., and Paerl, H. W. 1996. Enhanced biodegradation of diesel fuel through the addition of particulate organic carbon and inorganic nutrients in coastal marine waters. Biodegradation. 7 : 239-247.

- Readman, J. W., and Mantuara, R.E.C. 1987. A record of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) pollution obtained from accreting sediments of the Tamar Estuary UK : evidence for non equilibrium behavior of polycyclic aromatic hydrocarbons. Sci. Total. Environ. 66 : 73-94.
- Schmidt, S. K., and Alexander, M. 1985. Effect of dissolved organic carbon and second substrates on the biodegradation of organic compound at low concentrations. Appl. Environ. Microbiol. 49 : 822-827.
- Selifonov, S. A., Grifoll, M., Eaton, R. W., and Chapman, P. J. 1996. Oxidation of naphthoenaromatic and methyl-substituted aromatic compounds by naphthalene 1,2-dioxygenase. Appl. Environ. Microbiol. 62: 507-514.
- Shiaris, M. P., and Cooney, J. J. 1983. Replica plating method for estimating phenanthrene-utilizing and phenanthrene-cometabolizing microorganisms. Appl. Environ. Microbiol. 45 : 706-710.
- Shimp, R. J., and Pfaender, F. K. 1985. Influence of easily degradable naturally occurring carbon substrate on biodegradation of monosubstituted phenols by aquatic bacteria. Appl. Environ. Microbiol. 49 : 394-401.
- Sommer, R. 1996. [ohly.de/publications/download/ Yeast%20extracts%20Production.doc](http://ohly.de/publications/download/Yeast%20extracts%20Production.doc). Sydney : 9th International Symposium on Yeasts, Sydney, August 1996.
- Stringfellow, W. T., and Aitken, M. D. 1995. Competitive metabolism of naphthalene, methyl-naphthalenes, and fluorene by phenanthrene-degrading Pseudomonads. Appl. Environ. Microbiol. 61 : 357-362.
- Sutherland, J. B., Rafii, F., Khan A. A., and Cerniglia C. E. 1995. Mechanisms of polycyclic aromatic hydrocarbon degradation. In : L. Y. Young and C. E. Cerniglia (eds.), Microbial transformation and degradation of toxic organic chemicals, 269-305. New York : A John Wiley & Sons.
- Swindoll, C. M., Aelion, C. M., and Pfaender, F. K. 1988. Influence of inorganic and organic nutrients on aerobic biodegradation and on the adaptation response of subsurface microbial communities. Appl. Environ. Microbiol. 54 : 212-217.

- U.S. EPA (U.S. Environmental Protection Agency). 1989. Mouse Oral Subchronic Toxicity Study with Fluorene. Prepared by Toxicity Research Laboratories, Ltd., Muskegon, MI, for the Office of Solid Waste, Washington, DC. TRL Study No. 042-010.
- U.S. EPA (U.S. Environmental Protection Agency). 1991. Drinking Water Criteria Document for Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs). Prepared by the Environmental Criteria and Assessment Office, Office of Health and Environmental Assessment, U.S. Environmental Protection Agency, Cincinnati, OH, for the Office of Drinking Water. ECAO-CIN-D010.
- Weissenfels, W. D., Beyer, M., and Klein, J. 1990. Degradation of phenanthrene, fluorene and fluoranthene by pure bacterial cultures. Appl. Microbiol. Biotechnol. 32: 479-484.
- Wilson, S. C., and Jones, K. C. 1993. Bioremediation of soil contaminated with polynuclear aromatic hydrocarbon in soil (PAHs) a review. Environ. Pollution. 81 : 229-249.
- Witt, G., and Trost, E. 1999. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in sediments of Bultic Sea and of the German coastal waters. . Chemosphere. 38 : 1603-1614.
- Yang, Y., Chen, R. F., and Shiaris, M. P. 1994. Metabolism of naphthalene, fluorene, and phenanthrene : preliminary characterization of cloned gene cluster from *Pseudomonas putida* NCIB 9816. J. Bacteriol. 176 : 2158-2164.
- Yuan, S. Y., Chang, J. S., Yen J. H., and Chang B. V. 2001. Biodegradation of phenanthrene in river sediment. Chemosphere. 43 : 273-278.
- Yuan, S. Y., Wei, S. H., and Chang, B. V. 2000. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by a mixed culture. Chemosphere. 41 : 1463-1468.



ภาคผนวก

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ก

สูตรและวิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Carbon Free Mineral Salt Medium (CFMM)

แอมโมเนียมไนเตรต (NH_4NO_3)	3.0	กรัม
ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟตเดคะไฮเดรต ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)	5.5	กรัม
โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)	0.8	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	0.01	กรัม
เฟอริกคลอไรด์เฮกซะไฮเดรต ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)	0.005	กรัม
แคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรต ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	0.005	กรัม

ละลายสารสามชนิดแรกในน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มล. ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 1 นอร์มัล ให้เป็น 7.5 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 °ซ เป็นเวลา 20 นาที ในส่วนของสารละลายสามชนิดหลังทำการเตรียมแยกแต่ละชนิดแล้วทำให้ปลอดเชื้อโดยการกรองผ่านชุดกรองสำเร็จรูปเซลลูโลสอะซีเตต ขนาดรูกรว้าง 0.45 ไมโครเมตร แล้วจึงเติมลงในอาหารที่ทำกรนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว

2. อาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง CFMM (CFMM agar)

เตรียมอาหารด้วยวิธีเช่นเดียวกับการเตรียมอาหารเหลว CFMM แต่ละลายแบคทีโอะการ์ 15 กรัมต่ออาหาร 1,000 มล. ลงไปในสารสามชนิดแรกก่อนนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 °ซ เป็นเวลา 20 นาที ทิ้งไว้จนได้อุณหภูมิ 50-60 °ซ จึงเติมสารสามชนิดหลังที่ฆ่าเชื้อแล้วก่อนนำไปใช้

3. อาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับเตรียมหัวเชื้อแบคทีเรีย

เตรียมอาหารด้วยวิธีเช่นเดียวกับการเตรียมอาหารเหลว CFMM แต่เติมโซเดียมเบนโซเอท 1 กรัมต่ออาหาร 1,000 มล. ลงไปในสารสามชนิดแรกก่อนนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 °ซ เป็นเวลา 20 นาที แล้วจึงเติมสารสามชนิดหลังที่ฆ่าเชื้อแล้วก่อนนำไปใช้

4. อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Luria-Bertani (LB broth)

ทริปโตเน	10.0	กรัม
ผงสกัดจากยีสต์	5.0	กรัม
โซเดียมคลอไรด์	5.0	กรัม

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มล. ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 1 นอร์มัล ให้เป็น 7.5 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 °ซ เป็นเวลา 20 นาที

5. อาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง Luria-Bertani (LB agar)

เตรียมอาหารด้วยวิธีเช่นเดียวกับการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB แต่ละลายวุ้นผง 15 กรัมต่ออาหาร 1,000 มล. ลงไปในอาหารก่อนนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 °ซ เป็นเวลา 20 นาที

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ข

สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

1. สารละลายฟลูออรีนในไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (Fluorene in DMSO solution)

ชั่งฟลูออรีน 0.1 กรัม ละลายในไดเมทิลซัลฟอกไซด์ปริมาตร 1.0 มล. ผสมด้วยเครื่องปั่น ผสมจนฟลูออรีนละลายหมด ทำให้ปลอดเชื้อโดยกรองด้วยชุดกรองสำเร็จรูปชนิด PTFE ที่มีขนาดรูกว้าง 0.20 ไมโครเมตร เก็บรักษาในขวดสีชาหรือห่อให้มิดชิดเก็บที่อุณหภูมิ -20°C เติมนลงในอาหารเหลว CFMM ที่ผ่านการฆ่าเชื้อและเย็นลงที่อุณหภูมิห้องแล้ว

2. สารละลายมาตรฐานของ PAHs และอนุพันธ์ชนิดต่างๆ ในเมทานอล

ชั่งสารฟลูออรีน 9-ฟลูออรีนอล 9-ฟลูออรีโนน 2,3-ไดไฮดรอกซีไบฟีนิล กรดซาลิไซลิก และกรด 2,5-ไดไฮดรอกซีเบนโซอิก ชนิดละ 0.1 กรัม ละลายสารมาตรฐานแต่ละชนิดในเมทานอล ปริมาตร 10 มล. ผสมด้วยเครื่องปั่นผสมจนสารละลายหมด กรองด้วยชุดกรองสำเร็จรูปชนิด PTFE ที่มีขนาดรูกว้าง 0.20 ไมโครเมตร เก็บรักษาในขวดสีชาหรือห่อให้มิดชิดเก็บที่อุณหภูมิ -20°C เพื่อใช้เป็นสารมาตรฐานในการวิเคราะห์สารมัยันต์ด้วยวิธี TLC และ HPLC

3. สารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.85%

ชั่งโซเดียมคลอไรด์ 0.85 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 100 มล. หนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 20 นาที

4. กลีเซอรอล

นำกลีเซอรอลมาหนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 20 นาที ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำมาหนึ่งฆ่าเชื้อใหม่อีก 2 ครั้ง

5. สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 1 นอร์มัล

ซิงโซเดียมไฮดรอกไซด์ 4.0 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 90 มล. ในขวดวัดปริมาตรขนาด 100 มล. ปรับปริมาตรให้ครบ 100 มล. ด้วยน้ำกลั่น

6. สารละลายเมธานอลเข้มข้น 80 %ในน้ำ (ปริมาตรต่อปริมาตร)

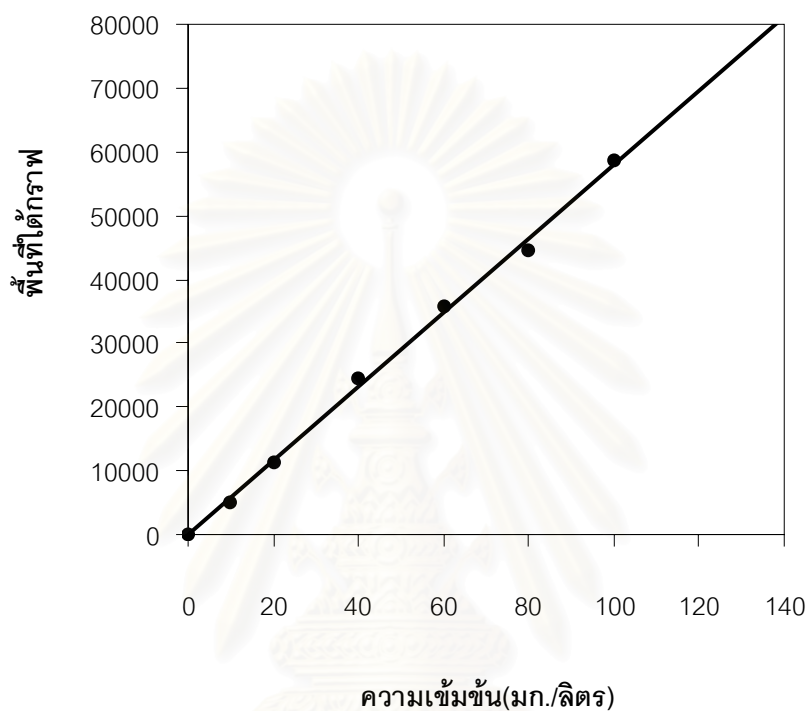
กรองเมธานอล 100 %ผ่านเยื่อกรองชนิด FH ที่มีขนาดรูกว้าง 0.5 ไมโครเมตร กำจัดอากาศออกด้วยเครื่องกำเนิดเสียงความถี่สูง จากนั้นผสมเมธานอล 100 %ปริมาตร 80 มล. กับน้ำกลั่นที่กรองและกำจัดอากาศออกแล้วปริมาตร 20 มล. นำไปกำจัดอากาศด้วยเครื่องกำเนิดเสียงความถี่สูงอีกครั้งจนไม่เหลือฟองอากาศ



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ค

กราฟมาตรฐานของฟลูออรีน



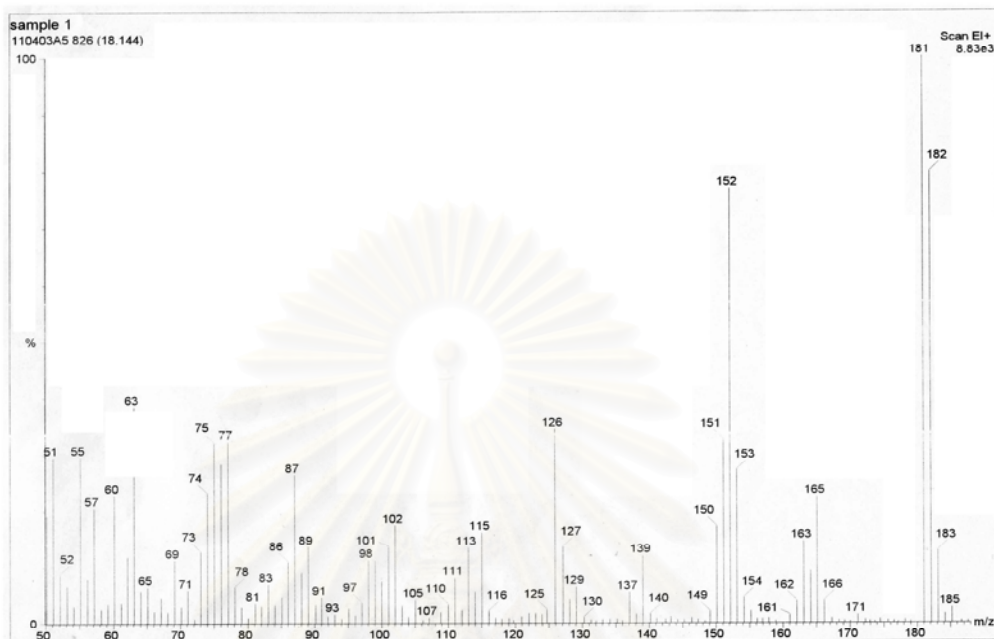
รูปที่ ค. 1 กราฟมาตรฐานระหว่างปริมาณฟลูออรีนกับพื้นที่ใต้กราฟ ที่ได้จากการวิเคราะห์โดยวิธี HPLC

ความเข้มข้นของฟลูออรีนหาได้จากนำพื้นที่ใต้กราฟที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC มาแทนค่าในสมการเส้นตรงดังนี้

$$\begin{aligned} \text{พื้นที่ใต้กราฟ} &= (\text{ความชันของกราฟมาตรฐาน} \times \text{ปริมาณฟลูออรีน}) + \text{จุดตัดแกนวาย} \\ \text{โดยที่} \quad \text{ความชันของกราฟมาตรฐาน} &= 581.35 \\ \text{จุดตัดแกนวาย} &= -54.292 \end{aligned}$$

ภาคผนวก ง

ก.



ข.



รูปที่ ง.1 แมสสเปกตรัมของสารมัยันตร์จากการย่อยสลายฟลูออรีนโดย *Spingomonas* sp. F¹

ก.) เปรียบเทียบกับแมสสเปกตรัมของสารมาตรฐาน 9- ฟลูออรีนอล (ข.)

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวธัญญรัตน์ ชำนาญกิจ เกิดเมื่อวันที่ 30 มกราคม พ.ศ. 2522 ที่จังหวัด นครราชสีมา สำเร็จการศึกษาปริญญาตรีวิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาจุลชีววิทยา ภาควิชา จุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ในปีการศึกษา 2542 และเข้ารับการศึกษต่อ ในระดับปริญญาโทมหาบัณฑิต สาขาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2543



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย