บทที่ 4
วิจารณ์ผลการทดลอง

ผลการแยกแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายไดเบนโซไธโอฟีนจากตัวอย่างดินจำนวน 148 ตัวอย่าง ได้แบคทีเรียทั้งสิ้น 342 สายพันธุ์ เป็นแบคทีเรียที่ย่อยสลายไดเบนโซไธโอฟีนด้วยวิถี 4S เพียง 1 สายพันธุ์ คือ สายพันธุ์ K10 ซึ่งแยกได้จากดินบริเวณโป่งเดือด จังหวัดเชียงราย ผลการวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากการที่แบคทีเรียสายพันธุ์ K10 ย่อยสลายไดเบนโซไธโอฟีน โดยวิธีทิน เลเยอร์ โครมาโตกราฟฟี และวิธีแก๊ส โครมาโตกราฟฟี พบ 2-ไฮดรอกซีไบฟีนิล ซึ่ง Omori และคณะ (1992), Kilbane และ Jackowski (1992) และ Izumi และคณะ (1994) ได้รายงานว่าแบคทีเรีย *Corynebacterium* sp. SY1, *Rhodococcus rhodochrous* IGTS8 และ *R. erythropolis* D-1 ตามลำดับ ย่อยสลายไดเบนโซไธโอฟีนด้วยวิถี 4S ทั้งนี้เพราะตรวจพบ 2-ไฮดรอกซีไบฟีนิลในผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นจากกระบวนการย่อยสลาย ใช้แบคทีเรียสายพันธุ์ K10 ที่แยกได้นี้ในการศึกษาต่อไป

ผลการศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเจริญ โดยการแปรอุณหภูมิเป็นที่อุณหภูมิห้อง (ประมาณ 25-30 องศาเซลเซียส), 40, 45 และ 50 องศาเซลเซียส ใช้โคโลนีเดี่ยวเป็นเชื้อเริ่มต้น พบว่าเมื่อทำการเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว NBYE เชื้อเจริญได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ค่าความขุ่นของเซลล์ที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตรสูงสุดเท่ากับ 1.4 ที่เวลา 30 ชั่วโมง นอกจากนั้นระยะ lag phase ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียสยังสั้นกว่าที่อุณหภูมิ 25-30 องศาเซลเซียส เชื้อไม่สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส แต่เมื่อทำการเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว SFMM ที่เติมไดเบนโซไธโอฟีน ความเข้มข้นสุดท้าย 0.05 เปอร์เซนต์ (น้ำหนัก/ปริมาตร) พบว่าเชื้อเจริญได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 25-30 องศาเซลเซียส แต่ค่าความขุ่นของเซลล์ที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตรสูงสุดมีค่าเพียง 0.3 ที่เวลา 24 ชั่วโมง และมีค่าคงที่ตลอด 4 วันที่ทำการทดลอง เชื้อไม่สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ดังนั้นในขั้นตอนการเตรียมหัวเชื้อที่มีความหนาแน่นของเซลล์สูงในการศึกษาผลของสารอาหารชนิดต่าง ๆ ต่อการเจริญและการสร้าง 2-ไฮดรอกซีไบฟีนิล จึงทำโดยการปลูกโคโลนีเดี่ยวของแบคทีเรียสายพันธุ์ K10 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว NBYE ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ต่อจากนั้นจึงปั่นแยกเอาเซลล์มาแขวนลอยในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว SFMM ในปริมาตรเท่าเดิม

ผลการศึกษาองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว SFMM ต่อการเจริญและการสร้าง 2-ไฮดรอกซีไบฟีนิลเมื่อใช้ไดเบนโซไธโอฟีนเป็นแหล่งกำมะถันเพียงอย่างเดียวเพื่อการเจริญในภาวะที่ทดสอบ พบว่าจากองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว SFMM ความเข้มข้นที่เหมาะสมที่สุดของไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต โปแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต แอมโมเนียมไนเตรท เฟอริกคลอไรด์ แคลเซียมคลอไรด์ แมกนีเซียมคลอไรด์ และกลูโคส ต่อการเจริญ คือ 0.22, 0.08, 0.3, 0.001, 0.002, 0.002 และ 2.0 เปอร์เซนต์ (น้ำหนัก/

ปริมาตร) ตามลำดับ พบการเจริญสูงสุดในวันที่ 1 ของการทดลอง แต่เมื่อเปรียบเทียบค่าความขุ่นของเซลล์ที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตรสูงสุดที่ได้เมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว SFMM ที่มีความเข้มข้นขององค์ประกอบแต่ละชนิดทีละชนิดตามข้างต้น กับค่าความขุ่นของเซลล์เมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว SFMM ที่มีความเข้มข้นของไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต โปแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต แอมโมเนียมไนเตรท เฟอริกคลอไรด์ แคลเซียมคลอไรด์ แมกนีเซียมคลอไรด์ และกลูโคส เท่ากับ 0.22, 0.08, 0.3, 0.001, 0.001, 0.001 และ 1.0 เปอร์เซนต์ (น้ำหนัก/ปริมาตร) หรือชุดควบคุม พบว่ามีค่าใกล้เคียงกัน ค่าความขุ่นของเซลล์ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว SFMM ที่เติมและไม่เติมแคลเซียมคลอไรด์และแมกนีเซียมคลอไรด์มีค่าใกล้เคียงกัน แสดงว่าอาจมีแคลเซียมคลอไรด์และแมกนีเซียมคลอไรด์ในสภาพสิ่งปนเปื้อนมากับองค์ประกอบของสารอาหารอื่น องค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว SFMM ที่พบว่ามีผลต่อการเจริญของแบคทีเรียสายพันธุ์ K10 คือ สารสกัดจากยีสต์ กล่าวคือยิ่งความเข้มข้นที่ใช้สูงขึ้น การเจริญก็จะยิ่งมากขึ้นอย่างเห็นได้ชัด พบการเจริญสูงสุดในวันที่ 1 ของการทดลอง เมื่อแปรผันความเข้มข้นของสารสกัดจากยีสต์เป็น 0.05 เปอร์เซนต์ (น้ำหนัก/ปริมาตร) ค่าความขุ่นของเซลล์สูงสุดที่ได้จะมากกว่าค่าความขุ่นของเซลล์ในชุดควบคุม ซึ่งมีสารสกัดจากยีสต์ 0.005 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนัก/ปริมาตร) เป็นองค์ประกอบประมาณ 0.68 แต่เมื่อนำน้ำเลี้ยงเชื้อที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว SFMM ที่มีสารสกัดจากยีสต์เข้มข้น 0, 0.005, 0.01, 0.025 และ 0.05 เปอร์เซนต์ (น้ำหนัก/ปริมาตร) ทุกวันตลอด 4 วันของการทดลองมาวิเคราะห์หา 2-ไฮดรอกซีไบฟีนิลด้วยวิธีแก๊ส โครมาโตกราฟฟี พบ 2-ไฮดรอกซีไบฟีนิลเฉพาะในน้ำเลี้ยงเชื้อที่เติมสารสกัดจากยีสต์เข้มข้น 0.005 เปอร์เซนต์ (น้ำหนัก/ปริมาตร) ที่วันที่ 3 ของการทดลองเท่านั้น แสดงว่ากระบวนการย่อยสลายไดเบนโซไธโอฟีนโดยแบคทีเรียสายพันธุ์ K10 นั้น เชื้อต้องการสารสกัดจากยีสต์ แต่อาจเนื่องด้วยในสารสกัดจากยีสต์มีกำมะถันอินทรีย์ชนิดอื่นปนเปื้อน (Atlas และคณะ, 1984) เมื่อความเข้มข้นของสารสกัดจากยีสต์สูงกว่า 0.005 เปอร์เซนต์ (น้ำหนัก/ปริมาตร) เชื้อจึงไม่ย่อยสลายไดเบนโซไธโอฟีนเพื่อการเจริญ หรือในสารสกัดจากยีสต์มีสารที่สามารถยับยั้งกระบวนการย่อยสลายไดเบนโซไธโอฟีนปนเปื้อนอยู่ ดังนั้นการใช้สารสกัดจากยีสต์ในปริมาณสูงเกินไป จึงยับยั้งกระบวนการย่อยสลายไดเบนโซไธโอฟีน Oshiro และคณะ (1996) รายงานว่ากรดมีเธนซัลโฟนิค โซเดียมซัลเฟต สามารถยับยั้งเอนไซม์ในกระบวนการย่อยสลายไดเบนโซไธโอฟีน การเจริญของเชื้อโดยเปรียบเทียบจากค่าความขุ่นของเซลล์ที่ใกล้เคียงกันในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว SFMM ที่เติมสารสกัดจากยีสต์เข้มข้น 0.005 เปอร์เซนต์ (น้ำหนัก/ปริมาตร) นี้พบว่าอาจใช้วิตามิน ไบโอติน ไธยาโนโคบาลามิน หรือของผสมของวิตามินชนิดต่าง ๆ ที่ความเข้มข้นสุดท้ายชนิดละ 10 ไมโครกรัม/ลิตร กรดอะมิโน อะลานีน ทริปโตเฟน หรือของผสมของกรดอะมิโนชนิดต่าง ๆ ที่ความเข้มข้นสุดท้ายชนิดละ 50 ไมโครกรัม/ลิตร แทนสารสกัดจากยีสต์ได้ แต่ผลการวิเคราะห์น้ำเลี้ยงเชื้อไม่พบ 2-ไฮดรอกซีไบฟีนิล ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากค่าความเป็นกรดด่างในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ลดลง เมื่อเชื้อเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว SFMM ที่เติมวิตามิน หรือกรดอะมิโนข้างต้นแทนสารสกัดจากยีสต์นั้น มีผล

ยับยั้งเอนไซม์ย่อยสลายไดเบนโซไธโอฟีน หรือเชื้อต้องการสารบางชนิดที่เป็นองค์ประกอบอยู่ในสารสกัดจากยีสต์

การศึกษาผลของการใช้แหล่งไนโตรเจนอินทรีย์ 4 ชนิด คือ ทริปโตน เปปโตน เคซีน และสารสกัดจากเนื้อแทนสารสกัดจากยีสต์ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว SFMM ที่เติมไดเบนโซไธโอฟีนความเข้มข้นสุดท้าย 0.05 เปอร์เซนต์ (น้ำหนัก/ปริมาตร) ในภาวะที่ทดลองต่อการเจริญ พบว่าทริปโตนเป็นแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์ที่ดีที่สุด ทั้งนี้เพราะเมื่อเปรียบเทียบความเข้มข้นสุดท้ายของแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์ทั้ง 4 ชนิดที่ใช้เท่ากับ 0.10 เปอร์เซนต์ (น้ำหนัก/ปริมาตร) เท่ากันที่วันที่ 1 ของการทดลอง วัดค่าความขุ่นของเซลล์ที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตรในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมทริปโตน เปปโตน เคซีน และสารสกัดจากเนื้อได้ 1.05, 0.5, 0.32 และ 0.15 ตามลำดับ อัตราการเจริญของเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว SFMM ที่เติมสารสกัดจากเนื้อเป็นแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์ช้า เมื่อเทียบกับอัตราการเจริญของเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว SFMM ที่เติมทริปโตน เปปโตน และเคซีน การเพาะเชื้อเลี้ยงเชื้อไว้เป็นเวลา 4 วัน แล้วนำน้ำเลี้ยงเชื้อแต่ละวันมาวิเคราะห์หา 2-ไฮดรอกซีไบฟีนิลด้วยวิธีแก๊ส โครมาโตกราฟฟี พบ 2-ไฮดรอกซีไบฟีนิลเฉพาะในน้ำเลี้ยงเชื้อที่เติมสารสกัดจากเนื้อและเคซีน โดยพบในน้ำเลี้ยงเชื้อที่เติมเคซีนมากกว่าในน้ำเลี้ยงเชื้อที่เติมสารสกัดจากเนื้อ และมากกว่าในน้ำเลี้ยงเชื้อของชุดควบคุมที่เติมสารสกัดจากยีสต์ ความเข้มข้นสุดท้าย 0.005 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนัก/ปริมาตร) อาจเนื่องมาจากเคซีนเป็นแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์ที่มีปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดสูง แต่มีสารปนเปื้อนในปริมาณต่ำเมื่อเทียบกับสารสกัดจากยีสต์และสารสกัดจากเนื้อ จึงอาจเป็นไปได้ว่าเคซีนมีสารที่มีผลยับยั้งกระบวนการย่อยสลายไดเบนโซไธโอฟีนอยู่ในปริมาณน้อยเมื่อเทียบกับในสารสกัดจากยีสต์หรือไม่มีเลย ผลการแปรผันหาความเข้มข้นสุดท้ายของเคซีนที่เหมาะสม เพื่อให้ได้ปริมาณของ 2-ไฮดรอกซีไบฟีนิลสูงที่สุดในผลิตภัณฑ์ที่ได้จากกระบวนการย่อยสลายไดเบนโซไธโอฟีน คือ 0.20 เปอร์เซนต์ (น้ำหนัก/ปริมาตร) จึงเลือกใช้เคซีนแทนสารสกัดจากยีสต์

ผลการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญ ค่าความเป็นกรดด่างของน้ำเลี้ยงเชื้อ และการสร้าง 2-ไฮดรอกซีไบฟีนิล เมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว SFMM ที่เติมเคซีน ความเข้มข้นสุดท้าย 0.20 เปอร์เซนต์ (น้ำหนัก/ปริมาตร) และไดเบนโซไธโอฟีนความเข้มข้นสุดท้าย 0.05 เปอร์เซนต์ (น้ำหนัก/ปริมาตร) บนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 6 วัน พบ 2-ไฮดรอกซีไบฟีนิลในน้ำเลี้ยงเชื้อทุกวันตลอด 6 วันของการทดลอง ในวันที่ 3 ของการทดลอง ปริมาณ 2-ไฮดรอกซีไบฟีนิลที่พบมีค่าสูงสุดเท่ากับ 18.0 ไมโครกรัม/100 มล. ในวันที่ 2 ของการทดลองพบว่าเชื้อมีการเจริญสูงสุด ค่าความเป็นกรดด่างของน้ำเลี้ยงเชื้อลดลงต่ำสุดคือลดลงจากค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้น 7.2 เป็น 6.5 แล้วมีค่าคงที่ตลอดการทดลอง ผลการวิเคราะห์ไม่พบการเพิ่มขึ้นของไอออนซัลเฟต อาจเป็นเพราะเซลล์นำไอออนซัลเฟตที่เกิดขึ้นไปใช้ในกระบวนการสังเคราะห์สารอินทรีย์ที่เป็นองค์ประกอบของเซลล์ และเมื่อลดความเข้มข้นสุดท้ายของไดเบนโซไธโอฟีนลงจาก 0.05 เปอร์เซนต์ (น้ำหนัก/ปริมาตร) หรือ 2.714 มิลลิโมลาร์ เป็น 0.125 มิลลิโมลาร์ พบว่าภายใน 24 ชั่วโมงแรกของการทดลองปริมาณไดเบนโซไธโอฟีนลดลงอย่างรวดเร็ว เหลือเพียง 50 เปอร์เซนต์ ของ

ความเข้มข้นเริ่มต้น ตรวจพบปริมาณ 2-ไฮดรอกซีไบฟีนิลที่เกิดขึ้นสูงสุด และพบการเจริญของเชื้อสูงที่สุดเช่นเดียวกัน ผลการทดลองที่ได้แสดงให้เห็นว่า 2-ไฮดรอกซีไบฟีนิลเป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้จากกระบวนการย่อยสลายไดเบนโซไธโอฟีนของเชื้อ แต่ที่เวลา 96 ชั่วโมง ตรวจไม่พบ 2-ไฮดรอกซีไบฟีนิลอาจเกิดจากการที่เซลล์สามารถใช้ 2-ไฮดรอกซีไบฟีนิลเป็นสารตั้งต้นของวิถีอื่นต่อไป

ผลการศึกษาพบว่า NADH เร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายไดเบนโซไธโอฟีนของเอนไซม์ในสารสกัดจากเซลล์ของแบคทีเรียสายพันธุ์ K10 แสดงว่าเอนไซม์ย่อยสลายไดเบนโซไธโอฟีนของแบคทีเรียสายพันธุ์ K10 นี้เป็นเอนไซม์ในกลุ่มออกซิโดรีดักเตสต้องการ NADH เป็นโคแฟกเตอร์ ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Ohshiro และคณะ (1994) ที่พบเอนไซม์ย่อยสลายไดเบนโซไธโอฟีนโดยวิถี 4S ของ *R. erythropolis* D-1 นั้นเป็นเอนไซม์ในกลุ่มออกซิโดรีดักเตสที่ต้องการ NADH เป็นโคแฟกเตอร์

จากผลการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและปฏิกิริยาทางชีวเคมี สรุปได้ว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ K10 เป็นแบคทีเรียในจีนัส *Bacillus*

ผลการวิจัยข้างต้นทำให้ทราบภาวะที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียสายพันธุ์ K10 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมไดเบนโซไธโอฟีนเป็นแหล่งกำมะถันเพียงอย่างเดียวเพื่อการเจริญเพื่อให้ได้ 2-ไฮดรอกซีไบฟีนิลในปริมาณสูง ง่ายต่อการวิเคราะห์หา จึงสามารถใช้เป็นลักษณะที่แสดงออก (phenotype) เพื่อการตรวจหาทรานฟอร์แมนท์ที่รับเอายีนย่อยสลายไดเบนโซไธโอฟีนหรือกำมะถันอินทรีย์เข้าไปในกระบวนการถ่ายโอนยีนต่อไป

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สรุปผลการทดลอง

สามารถแยกแบคทีเรียซึ่งย่อยสลายไดเบนโซไธโอฟีนด้วยวิถี 4S ได้ 1 สายพันธุ์ เป็นแบคทีเรียในจีนัส *Bacillus* เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรปราศจากสารกำมะถันที่เติมไดเบนโซไธโอฟีน เชื้อไม่สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิมากกว่าหรือเท่ากับ 50 องศาเซลเซียส เมื่อเพิ่มปริมาณสารสกัดจากยีสต์ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรปราศจากกำมะถันที่เติมไดเบนโซไธโอฟีน จะทำให้การเจริญของเชื้อเพิ่มมากขึ้น แต่ผลการวิเคราะห์ 2-ไฮดรอกซีไบฟีนิลในน้ำเลี้ยงเชื้อพบว่า ปริมาณ 2-ไฮดรอกซีไบฟีนิลไม่ได้แปรผันโดยตรงกับการเจริญของเชื้อ การเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรปราศจากกำมะถันที่เติมไดเบนโซไธโอฟีน และเติมเคซีนความเข้มข้นสุดท้าย 0.20 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนัก/ปริมาตร) แทนสารสกัดจากยีสต์ บนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 25-30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน จะได้ 2-ไฮดรอกซีไบฟีนิลในน้ำเลี้ยงเชื้อปริมาณสูงสุดคือเท่ากับ 18.0 ไมโครกรัม/100 มล. ไม่พบพลาสมิดใด ๆ ในเซลล์ของแบคทีเรียที่แยกได้นี้

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย