

การพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารมัธยันต์ที่สะสมจากการย่อยสลายอะซีแนฟทิลีนโดยสายพันธุ์กลาย
Rhizobium sp. CU-A1 ที่กลายพันธุ์ด้วยทรานสโปซอน



นายศิริวัตร ปุณฺทริกพันธ์

สถาบันวิทยบริการ

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา

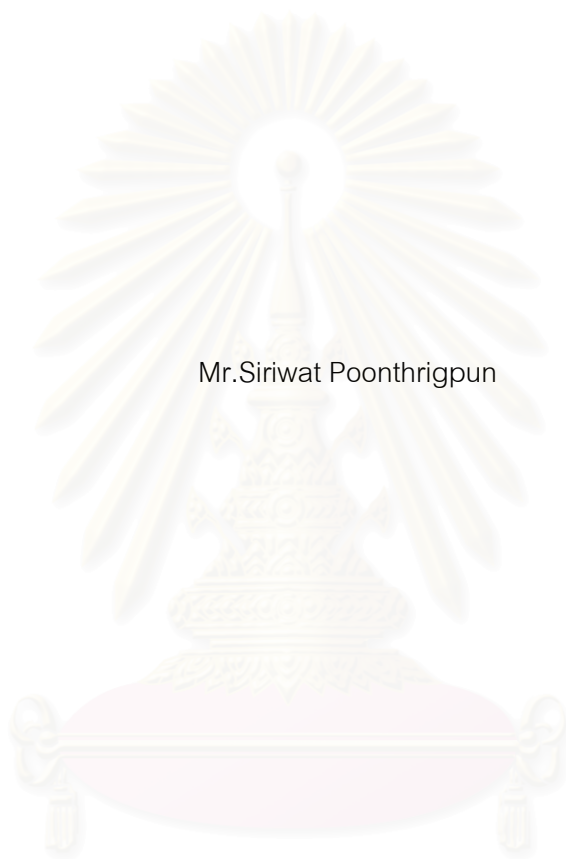
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2545

ISBN 974-17-1118-2

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

IDENTIFICATION OF ACCUMULATED INTERMEDIATES FROM THE DEGRADATION OF
ACENAPHTHYLENE BY *RHIZOBIUM* SP. CU-A1 TRANSPOSON MUTANTS



Mr.Siriwat Poonthrigpun

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

Faculty of Science
Chulalongkorn University
Academic Year 2002
ISBN 974-17-1118-2

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารมัธยันต์ที่สะสมจากการย่อยสลาย อะซีแนพติลินโดยสายพันธุ์กลาย <i>Rhizobium</i> sp. CU-A1 ที่ กลายพันธุ์ด้วยทรานสโปซอน
โดย	นายศิริวัตร ปุณทริกพันธ์
สาขาวิชา	จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม
อาจารย์ที่ปรึกษา	รองศาสตราจารย์ ดร.ไพเราะ ปิ่นพานิชการ
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	รองศาสตราจารย์ ดร.อมร เพชรสม

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้หัวข้อวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็น
ส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

..... คณบดีคณะวิทยาศาสตร์
(รองศาสตราจารย์ ดร.วันชัย โพธิ์พิจิตร)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.กาญจนา จันทร์ทองจีน)

..... อาจารย์ที่ปรึกษา
(รองศาสตราจารย์ ดร.ไพเราะ ปิ่นพานิชการ)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
(รองศาสตราจารย์ ดร.อมร เพชรสม)

..... กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุเทพ ฐนีย์วัน)

..... กรรมการ
(อาจารย์ ดร.กอบชัย ภัทรกุลวณิชย์)

ศิริวัตร ปุณฺทริกพันธ์ : การพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารมัธยันต์ที่สะสมจากการย่อยสลายอะซีแนพทีลินโดยสายพันธุ์กลาย *Rhizobium* sp. CU-A1 ที่กลายพันธุ์ด้วยทรานสโปซอน.
(IDENTIFICATION OF ACCUMULATED INTERMEDIATES FROM THE DEGRADATION OF ACENAPHTHYLENE BY *RHIZOBIUM* SP. CU-A1 TRANSPOSON MUTANTS) อ.ที่ปรึกษา : รองศาสตราจารย์.ดร.ไพเราะ ปิ่นพานิชการ, อ.ที่ปรึกษาร่วม : รองศาสตราจารย์.ดร.อมร เพชรสม, จำนวนหน้า 126 หน้า. ISBN 974-17-1118-2.

สายพันธุ์กลายของ *Rhizobium* sp. CU-A1 จำนวน 18 สายพันธุ์ที่ผ่านการกลายพันธุ์ด้วยทรานสโปซอนให้มีความบกพร่องในการย่อยสลายอะซีแนพทีลินสามารถจัดได้เป็น 6 กลุ่ม โดยการวิเคราะห์จากรูปแบบการเจริญและรูปแบบการสะสมสารมัธยันต์เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีอะซีแนพทีลินเป็นแหล่งคาร์บอน ได้คัดเลือกสายพันธุ์กลาย A53, B1 และ B5 ซึ่งอยู่ในกลุ่มที่ 5, 2 และ 3 ตามลำดับซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่สะสมสารมัธยันต์ที่แตกต่างจากที่พบในสายพันธุ์เดิมได้ในปริมาณสูงมาทำการแยกและทำสารมัธยันต์ให้บริสุทธิ์โดยวิธี preparative TLC และซิลิกาเจลคอลัมน์โครมาโตกราฟี แล้วพิสูจน์เอกลักษณ์โดยวิธีแมสสเปกโตรเมตรี และนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์พบว่าสายพันธุ์ A53 สะสมกรด 2,5-ไดไฮดรอกซีเบนโซอิก (กรดเจนทิสิก) สายพันธุ์ B1 สะสมอะซีแนพทีนควิโนน และสายพันธุ์ B5 สะสมกรดแนพทาลีน-1,8-ไดคาร์บอกซิลิก ดังนั้นจึงสามารถทำนายวิถีเมตาบอลิซึมเบื้องต้นของอะซีแนพทีลินใน *Rhizobium* sp. CU-A1 ได้ดังนี้ คือ อะซีแนพทีลินจะถูกเมตาบอลิไทป์ไปเป็นอะซีแนพทีนควิโนน, กรดแนพทาลีน-1,8-ไดคาร์บอกซิลิก และกรด 2,5-ไดไฮดรอกซีเบนโซอิก ตามลำดับ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาควิชา จุลชีววิทยา.....ลายมือชื่อ.....
สาขาวิชา จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม...ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....
ปีการศึกษา 2545.....ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

4272410823: MAJOR INDUSTRIAL MICROBIOLOGY

KEY WORD: *Rhizobium* sp./ acenaphthylene/ acenaphthenequinone/ naphthalene-1,8-dicarboxylic acid/ gentisic acid

SIRIWAT POONTHRIGPUN : IDENTIFICATION OF ACCUMULATED INTERMEDIATES FROM THE DEGRADATION OF ACENAPHTHYLENE BY *RHIZOBIUM* SP. CU-A1 TRANSPOSON MUTANTS. THESIS ADVISOR : ASSOC. PROF.PAIROH PINPANICHAKARN, Ph.D., THESIS COADVISOR : ASSOC. PROF.AMORN PETSOM, Ph.D., 126 pp. ISBN 974-17-1118-2

Eighteen transposon mutants of *Rhizobium* sp. CU-A1 defective in acenaphthylene degradation could be classified into 6 groups by the growth and intermediate accumulation patterns when grown in the presence of acenaphthylene as a sole carbon source. The mutant strains A53, B1 and B5 belonging to groups 5, 2 and 3, respectively, were selected for further purification of the accumulated intermediates as they showed different types of intermediates from those found in the wild type and also in high concentration. These intermediates were isolated and purified by preparative thin-layer chromatography and silica gel column chromatography, then identified by mass spectrometry and nuclear magnetic resonance to be 2,5-dihydroxybenzoic acid (gentisic acid) from strain A53, acenaphthenequinone from strain B1 and naphthalene-1,8-dicarboxylic acid from strain B5. Therefore, the pathway of acenaphthylene degradation in *Rhizobium* sp. CU-A1 is tentatively proposed as follow: acenaphthylene is metabolized to acenaphthenequinone, naphthalene-1,8-dicarboxylic acid and 2,5-dihydroxybenzoic acid, respectively.

Department Microbiology

Student's signature.....

Field of study Industrail Microbiology

Advisor's signature.....

Academic year 2002

Co-advisor's signature.....

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จไปได้ด้วยดีด้วยความช่วยเหลืออย่างดียิ่งของรองศาสตราจารย์ ดร.ไพเราะ ปิ่นพานิชการ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ และรองศาสตราจารย์ ดร.อมร เพชรสม อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วมที่ได้กรุณาให้ความรู้ คำแนะนำและข้อคิดเห็นต่างๆ ตลอดจนตรวจแก้ต้นฉบับวิทยานิพนธ์ ซึ่งผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้ด้วย

ขอกราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร. กาญจนา จันทองจีน ที่กรุณาได้รับเป็นประธานกรรมการในการสอบ ตลอดจนให้ความรู้ คำแนะนำต่างๆ แก่ผู้วิจัยตลอดระยะเวลาการศึกษา

ขอกราบขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุเทพ ธนียวัน และอาจารย์ ดร.กอบชัย ภัทรกุลวณิชย์ ที่กรุณาได้รับเป็นกรรมการในการสอบ และให้ความรู้ คำแนะนำต่างๆ ตลอดจนช่วยแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

กราบขอบพระคุณอาจารย์ทุกท่านในภาควิชาจุลชีววิทยาที่กรุณาให้ความรู้ และคำแนะนำต่างๆ แก่ผู้วิจัย

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ในภาควิชาจุลชีววิทยาทุกท่าน ตลอดจนพี่ๆ เพื่อนๆ และน้องๆ ทุกคนที่มีส่วนช่วยเหลือและให้กำลังใจตลอดมา

สุดท้ายขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดา และพี่ชาย ที่ให้การสนับสนุนและความช่วยเหลือตลอดมาทั้งใจแก่ผู้วิจัยเสมอมา

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ฌ
สารบัญรูป.....	ฉ
บทที่	
1. บทนำ.....	1
2. วารสารปริทัศน์.....	4
3. อุปกรณ์และวิธีดำเนินงานวิจัย.....	21
4. ผลการทดลอง	32
5. สรุปและอภิปรายผลการทดลอง.....	73
6. ข้อเสนอแนะในการวิจัย.....	80
รายการอ้างอิง.....	82
ภาคผนวก	
ภาคผนวก ก.....	89
ภาคผนวก ข.....	91
ภาคผนวก ค.....	94
ภาคผนวก ง.....	95
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....	126

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
2.1 จุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการย่อยสลายอะซีแนฟธิลีน.....	16
3.1 สายพันธุ์ก๊ลายของ <i>Rhizobium</i> sp. CU-A1 และความสามารถในการเจริญในแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ ที่ใช้ในงานวิจัยนี้.....	26
4.1 การจัดกลุ่มสายพันธุ์ก๊ลายของ <i>Rhizobium</i> sp. ตามรูปแบบการเจริญและการสะสมสารมัธยันต์ที่เกิดจากการย่อยสลายอะซีแนฟธิลีน.....	44
4.2 ค่า R_f จากการวิเคราะห์ TLC และลักษณะการเรืองแสงของสารมัธยันต์ A53(1), B1(1) และ B5(1) ภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ตช่วงความยาวคลื่น 215-250 นาโนเมตรเปรียบเทียบกับสารมาตรฐานชนิดต่างๆ.....	55
4.3 <i>Rhizobium</i> sp. สายพันธุ์ก๊ลายที่เลือกเป็นตัวแทนในแต่ละกลุ่ม.....	59



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
2.1 โครงสร้างโมเลกุลของอะซีแนพธิดีน.....	5
2.2 วิธีการย่อยสลายเนพธาลีนเป็นกรดซาลิไซลิก (Yen และ Gunsalus, 1982, Kim และคณะ, 1997).....	7
2.3 วิธีการย่อยสลายแอนทราซีนโดย <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (Sutherland และคณะ, 1995).....	8
2.4 วิธีการย่อยสลายฟลูออรีนโดย <i>Arthrobacter</i> sp. สายพันธุ์ F101 (Merce และคณะ, 1997).....	8
2.5 วิธีการย่อยสลายกรดซาลิไซลิก (Yen และ Gunsalus, 1982)) (<i>nahG</i> คือซาลิไซเลส ไฮดรอกซีเลส, <i>nahH</i> คือคาทีคอล-2,3-ไดออกซีจีเนส, <i>nahI</i> คือ 2-ไฮดรอกซีมีวโคนิกเซมิอัลดีไฮด์ ดีไฮโดรจีเนส, <i>nahJ</i> คือ 2-ไฮดรอกซีมีวโคเนท ดีไฮโดรจีเนส, <i>nahK</i> คือ 4-ออกซาโลโครโตเนท ดีคาร์บอกซีเลส, <i>nahL</i> คือ 2-ออกโซเพนท์-4-อีโนเอท ไฮดราเทส, <i>nahM</i> คือ 4-ไฮดรอกซี-2-คีโตวาเลเรท อัลโดเรส, <i>nahN</i> คือ 2-ไฮดรอกซีมีวโคนิกเซมิอัลดีไฮด์ ไฮโดรเลส).....	9
2.6 วิธีการย่อยสลายกรดซาลิไซลิกโดย <i>Rhodococcus</i> sp. สายพันธุ์ B4 (Grund และคณะ, 1992).....	10
2.7 วิธีการย่อยสลายกรดซาลิไซลิกโดย <i>Pseudomonas</i> sp. สายพันธุ์ U2 (Fuenmayor และคณะ, 1998).....	10
2.8 วิธีการย่อยสลายกรดเจนทีสิกโดย <i>Ralstonia</i> สายพันธุ์ U2 (Ning และคณะ, 2001) (<i>NagI</i> คือ เจนทีเสท-1,2-ไดออกซีจีเนส, <i>NagL</i> คือมาริลไพรูเวท ไฮโซเมอเรส, <i>NagK</i> คือฟูมาริลไพรูเวท ไฮโดรเลส).....	11
2.9 วิธีการย่อยสลายอะซีแนพธิดีนโดย <i>Pseudomonas aeruginosa</i> สายพันธุ์ PAO1 ที่มี พลาสมิด pRE695 ซึ่งมียีนที่เป็นรหัสของเอนไซม์เนพธาลีนไดออกซีจีเนส (Selifenov และคณะ, 1996).....	13
2.10 วิธีการย่อยสลายอะซีแนพธิดีนโดยราไวร์รอก <i>Trametes versicolor</i> (Johannes และคณะ, 1998).....	15
2.11 วิธีการย่อยสลายคาร์บาไซลโดย <i>Pseudomonas</i> sp. สายพันธุ์ CA10 (Toshiaki และคณะ, 1995).....	18

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่	หน้า
4.1 ก. การเจริญของสายพันธุ์กลาย <i>Rhizobium</i> sp. A8, A18, A35, A49 และ A53 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM ที่มีอะซีแนพริลีนเข้มข้น 600 มก.ต่อลิตร เปรียบเทียบกับ <i>Rhizobium</i> sp. สายพันธุ์ CU-A1.....	33
4.1 ข. การเจริญของสายพันธุ์กลาย <i>Rhizobium</i> sp. B1, B5, D1, D2 และ E11 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM ที่มีอะซีแนพริลีนเข้มข้น 600 มก.ต่อลิตร เปรียบเทียบกับ <i>Rhizobium</i> sp. สายพันธุ์ CU-A1.....	34
4.1 ค. การเจริญของสายพันธุ์กลาย <i>Rhizobium</i> sp. E32, G12, G39, G62, และ G101 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM ที่มีอะซีแนพริลีนเข้มข้น 600 มก.ต่อลิตร เปรียบเทียบกับ <i>Rhizobium</i> sp. สายพันธุ์ CU-A1.....	35
4.1 ง. การเจริญของสายพันธุ์กลาย <i>Rhizobium</i> sp. G531, H1 และ J1 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM ที่มีอะซีแนพริลีนเข้มข้น 600 มก.ต่อลิตร เปรียบเทียบกับ <i>Rhizobium</i> sp. สายพันธุ์ CU-A1.....	36
4.2 ก. TLC โคโรมาโตแกรมของสารมัธยันต์ที่สะสมจากการย่อยสลายอะซีแนพริลีนในวันที่ 0 และวันที่ 14 โดย <i>Rhizobium</i> sp. A8, A18, A35, A49, A53, B1, B5, D1 และ D2 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM ที่มีอะซีแนพริลีนความเข้มข้น 600 มก.ต่อลิตร เปรียบเทียบกับ <i>Rhizobium</i> sp. CU-A1 (AE คืออะซีแนพริลีน, W/O คืออาหารเหลวที่ไม่มีการเติมเชื้อ).....	38
4.2 ข. TLC โคโรมาโตแกรมของสารมัธยันต์ที่สะสมจากการย่อยสลายอะซีแนพริลีนในวันที่ 0 และวันที่ 14 โดย <i>Rhizobium</i> sp. E11, E32, G12, G39, G62, G101, G531, H1 และ J1 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ CFMM ที่มีอะซีแนพริลีนความเข้มข้น 600 มก.ต่อลิตร เปรียบเทียบกับ <i>Rhizobium</i> sp. CU-A1 (AE คืออะซีแนพริลีน, W/O คืออาหารเหลวที่ไม่มีการเติมเชื้อ).....	39
4.3 ก. HPLC โคโรมาโตแกรมของสารมัธยันต์ที่สะสมจากการย่อยสลายอะซีแนพริลีนในวันที่ 0 และวันที่ 14 โดย <i>Rhizobium</i> sp. A8, A18, A35, A49 และ A53 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ CFMM ที่มีอะซีแนพริลีนความเข้มข้น 600 มก.ต่อลิตร เปรียบเทียบกับ <i>Rhizobium</i> sp. CU-A1 (W/O คืออาหารเหลวที่ไม่มีการเติมเชื้อ, R _t 7.38 นาทีคืออะซีแนพริลีน).....	40

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่	หน้า
4.3 ข. HPLC โคโรมาโตแกรมของสารมัธยันต์ที่สะสมจากการย่อยสลายอะซีแนพธิลีนในวันที่ 0 และวันที่ 14 โดย <i>Rhizobium</i> sp. B1, B5, D1, D5, E11, E32 และ G12 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ CFMM ที่มีอะซีแนพธิลีนความเข้มข้น 600 มก.ต่อลิตร เปรียบเทียบกับ <i>Rhizobium</i> sp. CU-A1 (W/O คืออาหารเหลวที่ไม่มีการเติมเชื้อ, R _f 7.38 นาที่คืออะซีแนพธิลีน).....	41
4.3 ค. HPLC โคโรมาโตแกรมของสารมัธยันต์ที่สะสมจากการย่อยสลายอะซีแนพธิลีนในวันที่ 0 และวันที่ 14 โดย <i>Rhizobium</i> sp. G39, G62, G101, G531, H1 และ J1 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ CFMM ที่มีอะซีแนพธิลีนความเข้มข้น 600 มก.ต่อลิตร เปรียบเทียบกับ <i>Rhizobium</i> sp. CU-A1 (W/O คืออาหารเหลวที่ไม่มีการเติมเชื้อ, R _f 7.38 นาที่คืออะซีแนพธิลีน).....	42
4.4 การจัดกลุ่มสายพันธุ์กลายของ <i>Rhizobium</i> sp. 18 สายพันธุ์ ตามรูปแบบ TLC โคโรมาโตแกรมของสารมัธยันต์ที่สะสมจากการย่อยสลายอะซีแนพธิลีนในวันที่ 14 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ CFMM ที่มีอะซีแนพธิลีนความเข้มข้น 600 มก.ต่อลิตร เปรียบเทียบกับ <i>Rhizobium</i> sp. CU-A1.....	43
4.5 ก.) TLC โคโรมาโตแกรม ข.) HPLC โคโรมาโตแกรมแสดงความบริสุทธิ์ของสารมัธยันต์ I จากสายพันธุ์ A53 ที่แยกได้โดยวิธี preparative TLC (A) เปรียบเทียบกับสารสกัดจากน้ำเลี้ยงเชื้อ (B) (R _f 7.38 นาที่คืออะซีแนพธิลีน).....	46
4.6 TLC โคโรมาโตแกรมของแต่ละลำดับส่วนหลังจากนำสารมัธยันต์ I จากสายพันธุ์ A53 มาทำให้บริสุทธิ์ด้วยซิลิกาเจลคอลัมน์โครมาโตกราฟีด้วย 0 – 100% เอทิลอะซิเตตในเฮกเซน.....	46
4.7 HPLC โคโรมาโตแกรมของแต่ละลำดับส่วนหลังจากนำสารมัธยันต์ I จากสายพันธุ์ A53 มาทำให้บริสุทธิ์ด้วยซิลิกาเจลคอลัมน์โครมาโตกราฟีด้วย 0 – 100% เอทิลอะซิเตตในเฮกเซน (R _f 7.38 นาที่คืออะซีแนพธิลีน).....	47
4.8 ก.) TLC โคโรมาโตแกรม ข.) HPLC โคโรมาโตแกรมแสดงความบริสุทธิ์ของสารมัธยันต์ II จากสายพันธุ์ B1 ที่แยกได้โดยวิธี preparative TLC (A) เปรียบเทียบกับสารสกัดจากน้ำเลี้ยงเชื้อ (B) (R _f 7.38 นาที่คืออะซีแนพธิลีน).....	49
4.9 TLC โคโรมาโตแกรมของแต่ละลำดับส่วนหลังจากนำสารมัธยันต์ II จากสายพันธุ์ B1 มาทำให้บริสุทธิ์ด้วยซิลิกาเจลคอลัมน์โครมาโตกราฟีด้วย 0 – 100% เอทิลอะซิเตตในเฮกเซน.....	49
4.10 HPLC โคโรมาโตแกรมของแต่ละลำดับส่วนหลังจากนำสารมัธยันต์ II จากสายพันธุ์ B1 มาทำให้บริสุทธิ์ด้วยซิลิกาเจลคอลัมน์โครมาโตกราฟีด้วย 0 – 100% เอทิลอะซิเตตในเฮกเซน .50	.50

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่	หน้า
4.11 ก.) TLC โครมาโตแกรม ข.) HPLC โครมาโตแกรมแสดงความบริสุทธิ์ของสารมัธยันต์ III จากสายพันธุ์ B5 ที่แยกได้โดยวิธี preparative TLC (A) เปรียบเทียบกับสารสกัดจากน้ำเลี้ยงเชื้อ (B) (R_f 7.38 นาทีคืออะซีแนพธิน).....	52
4.12 TLC โครมาโตแกรมของแต่ละลำดับส่วนหลังจากนำสารมัธยันต์ III จากสายพันธุ์ B5 มาทำให้บริสุทธิ์ด้วยซิลิกาเจลคอลัมน์โครมาโตกราฟีด้วย 0 – 100% เอทิลอะซีเตตในเฮกเซน.....	52
4.13 HPLC โครมาโตแกรมของแต่ละลำดับส่วนหลังจากนำสารมัธยันต์ III จากสายพันธุ์ B5 มาทำให้บริสุทธิ์ด้วยซิลิกาเจลคอลัมน์โครมาโตกราฟีด้วย 0 – 100% เอทิลอะซีเตตในเฮกเซน .53	53
4.14 TLC โครมาโตแกรมของสารมัธยันต์ A53(1), B1(1) และ B5(1) เปรียบเทียบกับ (1) อะซีแนพธินควิโนน, (2) กรดแนพธาลีน 1,8-ไดคาร์บอกซิลิก, (3) กรดซาลิไซลิก, (4) กรด 2,5-ไดไฮดรอกซีเบนโซอิก, (5) กรดโปรโตคาทีคูอิก.....	54
4.15 โครงสร้างโมเลกุลของกรด 2,5-ไดไฮดรอกซีเบนโซอิก (กรดเจนทิสิก).....	56
4.16 โครงสร้างโมเลกุลของอะซีแนพธินควิโนน.....	57
4.17 โครงสร้างโมเลกุลของ 1,8-แนพธาลิกแอนไฮไดรด์ และ กรดแนพธาลีน-1,8-ไดคาร์บอกซิลิก.....	58
4.18 การเจริญของเชื้อสายพันธุ์กลาย G531, B1, B5, J1, A53 และ D1 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM ที่มีสารมัธยันต์ A53(1) หรือกรด 2,5-ไดไฮดรอกซีเบนโซอิกความเข้มข้น 300 มก.ต่อลิตร เปรียบเทียบกับ <i>Rhizobium</i> sp. CU-A1.....	61
4.19 TLC โครมาโตแกรมสารมัธยันต์ที่สะสมจากการย่อยสลายสารมัธยันต์ A53(1) หรือกรด 2,5-ไดไฮดรอกซีเบนโซอิกในวันที่ 0 และวันที่ 8 โดยสายพันธุ์กลาย G531, H1, B1, B5, A53 และ D1 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ CFMM ที่มีสารมัธยันต์ A53(1) กรด 2,5-ไดไฮดรอกซีเบนโซอิกความเข้มข้น 300 มก.ต่อลิตร (W/O คืออาหารเหลวที่ไม่มีการเติมเชื้อ, R_f 0.22 คือกรด 2,5-ไดไฮดรอกซีเบนโซอิก).....	62
4.20 HPLC โครมาโตแกรมของสารมัธยันต์ที่เกิดขึ้นจากการย่อยสลายสารมัธยันต์ A53(1) หรือกรด 2,5-ไดไฮดรอกซีเบนโซอิกในวันที่ 0 และวันที่ 8 โดยสายพันธุ์กลาย G531, H1, B1, B5, A53 และ D1 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ CFMM ที่มีกรด 2,5-ไดไฮดรอกซีเบนโซอิกความเข้มข้น 300 มก.ต่อลิตร เปรียบเทียบกับ <i>Rhizobium</i> sp. CU-A1 (R_f 3.23 นาที คือกรด 2,5-ไดไฮดรอกซีเบนโซอิก).....	63

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่	หน้า
4.21 การเจริญของเชื้อสายพันธุ์กลาย G531, B1, B5, J1, A53 และ D1 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM ที่มีสารมัยยันต์ B1(1) หรืออะซีแนพธินควิโนนความเข้มข้น 300 มก.ต่อลิตร เปรียบเทียบกับ <i>Rhizobium</i> sp. CU-A1.....	66
4.22 TLC โครมาโตแกรมสารมัยยันต์ที่สะสมจากการย่อยสลายสารมัยยันต์ B1(1) หรืออะซีแนพธินควิโนนในวันที่ 0 และวันที่ 8 โดยสายพันธุ์กลาย G531, H1, B1, B5, A53 และ D1 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ CFMM ที่มีสารมัยยันต์ B1(1) หรืออะซีแนพธินควิโนนความเข้มข้น 300 มก.ต่อลิตร (W/O คืออาหารเหลวที่ไม่มีการเติมเชื้อ, R _f 0.58 คือ อะซีแนพธินควิโนน).....	67
4.23 HPLC โครมาโตแกรมของสารมัยยันต์ที่เกิดขึ้นจากการย่อยสลายสารมัยยันต์ B1(1) หรือ อะซีแนพธินควิโนนในวันที่ 0 และวันที่ 8 โดยสายพันธุ์กลาย G531, H1, B1, B5, A53 และ D1 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ CFMM ที่มีสารมัยยันต์ B1(1) หรืออะซีแนพธินควิโนนความเข้มข้น 300 มก.ต่อลิตร เปรียบเทียบกับ <i>Rhizobium</i> sp. CU-A1 (R _f 2.61 คืออะซีแนพธินควิโนน).....	68
4.24 การเจริญของเชื้อสายพันธุ์กลาย G531, B1, B5, J1, A53 และ D1 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM ที่มีสารมัยยันต์ B5(1) หรือกรดแนพธาไลน์ 1,8-ไดคาร์บอกซิลิกความเข้มข้น 300 มก.ต่อลิตร เปรียบเทียบกับ <i>Rhizobium</i> sp. CU-A1.....	70
4.25 TLC โครมาโตแกรมสารมัยยันต์ที่สะสมจากการย่อยสลายสารมัยยันต์ B5(1) หรือกรดแนพธาไลน์ 1,8-ไดคาร์บอกซิลิกในวันที่ 0 และวันที่ 8 โดยสายพันธุ์กลาย G531, H1, B1, B5, A53 และ D1 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ CFMM ที่มีสารมัยยันต์ B5(1) หรือกรดแนพธาไลน์ 1,8-ไดคาร์บอกซิลิกความเข้มข้น 300 มก.ต่อลิตร (W/O คืออาหารเหลวที่ไม่มีการเติมเชื้อ, R _f 0.58 คือกรดแนพธาไลน์ 1,8-ไดคาร์บอกซิลิก).....	71
4.26 HPLC โครมาโตแกรมของสารมัยยันต์ที่เกิดขึ้นจากการย่อยสลายสารมัยยันต์กรดแนพธาไลน์ 1,8-ไดคาร์บอกซิลิกในวันที่ 0 และวันที่ 8 โดยสายพันธุ์กลาย G531, H1, B1, B5, A53 และ D1 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ CFMM ที่มีกรดแนพธาไลน์ 1,8-ไดคาร์บอกซิลิกความเข้มข้น 300 มก.ต่อลิตร เปรียบเทียบกับ <i>Rhizobium</i> sp. CU-A1 (R _f 2.61 คือกรดแนพธาไลน์ 1,8-ไดคาร์บอกซิลิก).....	72
5.1 วิธีการย่อยสลายอะซีแนพธินมาเป็นกรดแนพธาไลน์-1,8-ไดคาร์บอกซิลิกโดย <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1 (Selifenov และคณะ, 1996) (ก.) และไดอะแกรมเสนอวิธีการย่อยสลายอะซีแนพธินโดย <i>Rhizobium</i> sp. CU-A1 (ข.).....	74

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่	หน้า
5.2 วิธีกำรย่ำยสลายไฟรีนโดย <i>Mycobacterium</i> sp. AP1 (Vila และคณะ, 2001) (ก.) และไดอะแกรมเสนอวิธีกำรย่ำยสลายกรดแนพธาลีน-1,8-ไดคาร์บอกลิลิกโดย <i>Rhizobium</i> sp. CU-A1 (ข.).....	76
5.3 วิธีกำรย่ำยสลายกรดแนพธอิกโดย <i>Pseudomonas maltophilia</i> CSV89 (Phale และคณะ, 1995) (ก.) และไดอะแกรมเสนอวิธีกำรย่ำยสลายกรดแนพธาลีน-1,8-ไดคาร์บอกลิลิกโดย <i>Rhizobium</i> sp. CU-A1 (ข.).....	77
5.4 วิธีกำรย่ำยสลายกรดซาลิไซลิก (Fuenmayor และคณะ, 1998) และกรดเจนทิลิก (Ning และคณะ, 2001) (ก.) และไดอะแกรมเสนอวิธีกำรย่ำยสลายกรดซาลิไซลิกโดย <i>Rhizobium</i> sp. CU-A1 (ข.).....	78
5.5 ไดอะแกรมเสนอวิธีกำรย่ำยสลายอะซีแนพทิลีนโดย <i>Rhizobium</i> sp. CU-A1.....	79
ค. 1 กราฟมาตรฐานระหว่างปริมาณอะซีแนพทิลีนกับพื้นที่ใต้กราฟ ที่ได้จากการวิเคราะห์โดยวิธี HPLC.....	94
ง. 1 TLC โครมาโตแกรมของชุดควบคุมซึ่งไม่ได้มีการเติมเชื้อลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ CFMM ที่มีอะซีแนพทิลีนความเข้มข้น 600 มก.ต่อลิตร เพื่อติดตามกำรย่ำยสลายของอะซีแนพทิลีนโดยปัจจัยทางกายภาพ ที่ระยะเวลาต่างๆ กัน (AE คืออะซีแนพทิลีน).....	95
ง. 2 TLC โครโตแกรมของสารมัยันต์ที่สะสมจากกำรย่ำยสลายอะซีแนพทิลีนโดยเชื้อ <i>Rhizobium</i> sp. สายพันธุ์ CU-A1 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ CFMM ที่มีอะซีแนพทิลีนความเข้มข้น 600 มก.ต่อลิตร ที่ระยะเวลาต่างๆ กัน (AE คืออะซีแนพทิลีน).....	95
ง. 3 TLC โครโตแกรมของสารมัยันต์ที่สะสมจากกำรย่ำยสลายอะซีแนพทิลีนโดยเชื้อ <i>Rhizobium</i> sp. A8, A18 และ A35 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ CFMM ที่มีอะซีแนพทิลีนความเข้มข้น 600 มก.ต่อลิตร ที่ระยะเวลาต่างๆ กัน (AE คืออะซีแนพทิลีน).....	96
ง. 4 TLC โครโตแกรมของสารมัยันต์ที่สะสมจากกำรย่ำยสลายอะซีแนพทิลีนโดยเชื้อ <i>Rhizobium</i> sp. A49, A53 และ B1 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ CFMM ที่มีอะซีแนพทิลีนความเข้มข้น 600 มก.ต่อลิตร ที่ระยะเวลาต่างๆ กัน (AE คืออะซีแนพทิลีน).....	97
ง. 5 TLC โครโตแกรมของสารมัยันต์ที่สะสมจากกำรย่ำยสลายอะซีแนพทิลีนโดยเชื้อ <i>Rhizobium</i> sp. B5, D1 และ D2 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ CFMM ที่มีอะซีแนพทิลีนความเข้มข้น 600 มก.ต่อลิตร ที่ระยะเวลาต่างๆ กัน (AE คืออะซีแนพทิลีน).....	98

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่	หน้า
ง. 6 TLC โคโรโตแกรมของสารมัธยันต์ที่สะสมจากการย่อยสลายอะซีแนฟธิลีนโดยเชื้อ <i>Rhizobium</i> sp. E11, E32 และ G12 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ CFMM ที่มีอะซีแนฟธิลีนความเข้มข้น 600 มก.ต่อลิตร ที่ระยะเวลาต่างๆ กัน (AE คืออะซีแนฟธิลีน)	99
ง. 7 TLC โคโรโตแกรมของสารมัธยันต์ที่สะสมจากการย่อยสลายอะซีแนฟธิลีนโดยเชื้อ <i>Rhizobium</i> sp. G39, G62 และ G101 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ CFMM ที่มีอะซีแนฟธิลีนความเข้มข้น 600 มก.ต่อลิตร ที่ระยะเวลาต่างๆ กัน (AE คืออะซีแนฟธิลีน).....	100
ง. 8 TLC โคโรโตแกรมของสารมัธยันต์ที่สะสมจากการย่อยสลายอะซีแนฟธิลีนโดยเชื้อ <i>Rhizobium</i> sp. G531, H1 และ J1 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ CFMM ที่มีอะซีแนฟธิลีนความเข้มข้น 600 มก.ต่อลิตร ที่ระยะเวลาต่างๆ กัน (AE คืออะซีแนฟธิลีน)	101
ง. 9 HPLC โคโรมาโตแกรมของสารมัธยันต์ที่สะสมจากการย่อยสลายอะซีแนฟธิลีนโดย <i>Rhizobium</i> sp. A8 ที่ระยะเวลาต่างๆ กัน (R _f 7.38 คืออะซีแนฟธิลีน).....	102
ง. 10 HPLC โคโรมาโตแกรมของสารมัธยันต์ที่สะสมจากการย่อยสลายอะซีแนฟธิลีนโดย <i>Rhizobium</i> sp. A18 ที่ระยะเวลาต่างๆ กัน (R _f 7.38 คืออะซีแนฟธิลีน).....	103
ง. 11 HPLC โคโรมาโตแกรมของสารมัธยันต์ที่สะสมจากการย่อยสลายอะซีแนฟธิลีนโดย <i>Rhizobium</i> sp. A35 ที่ระยะเวลาต่างๆ กัน (R _f 7.38 คืออะซีแนฟธิลีน).....	104
ง. 12 HPLC โคโรมาโตแกรมของสารมัธยันต์ที่สะสมจากการย่อยสลายอะซีแนฟธิลีนโดย <i>Rhizobium</i> sp. A49 ที่ระยะเวลาต่างๆ กัน (R _f 7.38 คืออะซีแนฟธิลีน).....	105
ง. 13 HPLC โคโรมาโตแกรมของสารมัธยันต์ที่สะสมจากการย่อยสลายอะซีแนฟธิลีนโดย <i>Rhizobium</i> sp. A53 ที่ระยะเวลาต่างๆ กัน (R _f 7.38 คืออะซีแนฟธิลีน).....	106
ง. 14 HPLC โคโรมาโตแกรมของสารมัธยันต์ที่สะสมจากการย่อยสลายอะซีแนฟธิลีนโดย <i>Rhizobium</i> sp. B1 ที่ระยะเวลาต่างๆ กัน (R _f 7.38 คืออะซีแนฟธิลีน).....	107
ง. 15 HPLC โคโรมาโตแกรมของสารมัธยันต์ที่สะสมจากการย่อยสลายอะซีแนฟธิลีนโดย <i>Rhizobium</i> sp. B5 ที่ระยะเวลาต่างๆ กัน (R _f 7.38 คืออะซีแนฟธิลีน).....	108
ง. 16 HPLC โคโรมาโตแกรมของสารมัธยันต์ที่สะสมจากการย่อยสลายอะซีแนฟธิลีนโดย <i>Rhizobium</i> sp. D1 ที่ระยะเวลาต่างๆ กัน (R _f 7.38 คืออะซีแนฟธิลีน).....	109
ง. 17 HPLC โคโรมาโตแกรมของสารมัธยันต์ที่สะสมจากการย่อยสลายอะซีแนฟธิลีนโดย <i>Rhizobium</i> sp. D2 ที่ระยะเวลาต่างๆ กัน (R _f 7.38 คืออะซีแนฟธิลีน)	110

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่	หน้า
ง. 18 HPLC โคโรมาโตแกรมของสารมัธยันต์ที่สะสมจากการย่อยสลายอะซีแนพธิลีนโดย <i>Rhizobium</i> sp. E11 ที่ระยะเวลาต่างๆ กัน (R_f 7.38 คืออะซีแนพธิลีน).....	111
ง. 19 HPLC โคโรมาโตแกรมของสารมัธยันต์ที่สะสมจากการย่อยสลายอะซีแนพธิลีนโดย <i>Rhizobium</i> sp. E32 ที่ระยะเวลาต่างๆ กัน (R_f 7.38 คืออะซีแนพธิลีน).....	112
ง. 20 HPLC โคโรมาโตแกรมของสารมัธยันต์ที่สะสมจากการย่อยสลายอะซีแนพธิลีนโดย <i>Rhizobium</i> sp. G12 ที่ระยะเวลาต่างๆ กัน (R_f 7.38 คืออะซีแนพธิลีน).....	113
ง. 21 HPLC โคโรมาโตแกรมของสารมัธยันต์ที่สะสมจากการย่อยสลายอะซีแนพธิลีนโดย <i>Rhizobium</i> sp. G39 ที่ระยะเวลาต่างๆ กัน (R_f 7.38 คืออะซีแนพธิลีน).....	114
ง. 22 HPLC โคโรมาโตแกรมของสารมัธยันต์ที่สะสมจากการย่อยสลายอะซีแนพธิลีนโดย <i>Rhizobium</i> sp. G62 ที่ระยะเวลาต่างๆ กัน (R_f 7.38 คืออะซีแนพธิลีน).....	115
ง. 23 HPLC โคโรมาโตแกรมของสารมัธยันต์ที่สะสมจากการย่อยสลายอะซีแนพธิลีนโดย <i>Rhizobium</i> sp. G101 ที่ระยะเวลาต่างๆ กัน (R_f 7.38 คืออะซีแนพธิลีน).....	116
ง. 24 HPLC โคโรมาโตแกรมของสารมัธยันต์ที่สะสมจากการย่อยสลายอะซีแนพธิลีนโดย <i>Rhizobium</i> sp. G531 ที่ระยะเวลาต่างๆ กัน (R_f 7.38 คืออะซีแนพธิลีน).....	117
ง. 25 HPLC โคโรมาโตแกรมของสารมัธยันต์ที่สะสมจากการย่อยสลายอะซีแนพธิลีนโดย <i>Rhizobium</i> sp. H1 ที่ระยะเวลาต่างๆ กัน (R_f 7.38 คืออะซีแนพธิลีน).....	118
ง. 26 HPLC โคโรมาโตแกรมของสารมัธยันต์ที่สะสมจากการย่อยสลายอะซีแนพธิลีนโดย <i>Rhizobium</i> sp. J1 ที่ระยะเวลาต่างๆ กัน (R_f 7.38 คืออะซีแนพธิลีน).....	119
ง. 27 แมสสเปกตรัมของสารมัธยันต์ A53(1) ที่สะสมจากการย่อยสลายอะซีแนพธิลีนโดยเชื้อสายพันธุ์กลาย A53 (ก.) เปรียบเทียบกับแมสสเปกตรัมของสารมาตรฐานกรด 2,5-ไดไฮดรอกซีเบนโซอิก (ข.).....	120
ง. 28 แมสสเปกตรัมของสารมัธยันต์ B1(1) ที่สะสมจากการย่อยสลายอะซีแนพธิลีนโดยเชื้อสายพันธุ์กลาย B1 (ก.) เปรียบเทียบกับแมสสเปกตรัมของสารมาตรฐานอะซีแนพธินควิโนน (ข.).....	121
ง. 29 แมสสเปกตรัมของสารมัธยันต์ B5(1) ที่สะสมจากการย่อยสลายอะซีแนพธิลีนโดยเชื้อสายพันธุ์กลาย B5 (ก.) เปรียบเทียบกับแมสสเปกตรัมของสารมาตรฐาน 1,8-แนพทาลิกแอนไฮไดรด์ (ข.).....	122

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่	หน้า
ง. 30 ^1H NMR สเปกตรัม ของสารมัธยันต์ A53(1) ที่สะสมจากการย่อยสลายอะซีแนพธิลีนโดย เชื้อสายพันธุ์กัลยา A53.....	123
ง. 31 C^{13} NMR สเปกตรัม ของสารมัธยันต์ A53(1) ที่สะสมจากการย่อยสลายอะซีแนพธิลีนโดย เชื้อสายพันธุ์กัลยา A53.....	124
ง. 32 ^1H NMR สเปกตรัม (ก) ของสารมัธยันต์ B5(1) ที่สะสมจากการย่อยสลายอะซีแนพธิลีนโดย เชื้อสายพันธุ์กัลยา B1.....	125



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 1

บทนำ

ภาวะสิ่งแวดล้อมเป็นพิษจากการแพร่กระจายของสารพิษปนเปื้อนลงสู่สิ่งแวดล้อมในปัจจุบันเกิดจากการขยายตัวของการผลิตในภาคอุตสาหกรรมเพื่อตอบสนองต่อความต้องการของประชากร โดยสารเคมีบางชนิดที่นำมาใช้ในกระบวนการผลิตจัดเป็นสารมีพิษที่มีอันตรายสูง ซึ่งสามารถที่จะแพร่กระจายปนเปื้อนลงสู่สิ่งแวดล้อมได้จากการขาดความรู้และการควบคุมดูแลเอาใจใส่อย่างเคร่งครัดในการเก็บรักษา การนำไปใช้ในกระบวนการผลิต และการกำจัดกากของเสีย ทำให้สารพิษนั้นกระจายสู่สิ่งแวดล้อม

จากการศึกษาปริมาณของเสียอันตรายที่มีผลต่อสุขภาพและสิ่งแวดล้อมที่เกิดขึ้นจากอุตสาหกรรมและทุกกิจกรรมทั่วทั้งประเทศ ในปี พ.ศ. 2535 พบว่ามีของเสียอันตรายเกิดขึ้นประมาณ 1 ล้านตัน และคาดว่าในปี พ.ศ. 2544 จะมีของเสียอันตรายเกิดขึ้นประมาณ 2,813,980 ตัน โดยเป็นของเสียอันตรายประเภทน้ำมัน (oil) ประมาณ 589,508 ตัน (สำนักเทคโนโลยีสิ่งแวดล้อมโรงงาน, 2542) และเป็นของเสียอันตรายที่เกิดจากอุตสาหกรรมปิโตรเลียม 11,813 ตัน (บุญยงค์ ไล่ห์วงศ์วัฒน์, 2540) โดยของเสียอันตรายประเภทน้ำมันและปิโตรเลียมจะประกอบด้วยสารอินทรีย์หลายชนิด และที่มีความสำคัญคือ สารในกลุ่มพอลิไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน (polycyclic aromatic hydrocarbon, PAHs) ซึ่งเป็นสารประกอบอินทรีย์ที่มีโครงสร้างของคาร์บอนและไฮโดรเจนรวมกันเป็นวงอะโรมาติกเบนซีนมาเชื่อมต่อกันเป็นเส้นตรง (linear) เป็นมุมงอ (angular) หรือเป็นกลุ่ม (cluster) ตั้งแต่ 2 วงขึ้นไป

สาร PAHs จัดเป็นสารที่ก่อให้เกิดอันตรายร้ายแรงต่อสิ่งมีชีวิตเนื่องจากความเป็นพิษของตัวมัน เป็นสารซึ่งก่อให้เกิดมะเร็ง (carcinogen) เป็นสารที่ก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของยีน (mutagen) และเป็นสารที่ก่อให้เกิดลักษณะทารกในครรภ์มีรูปร่างผิดปกติ (teratogen) (World Health Organization, 1983 อ้างถึงโดย Wilson และ Jones, 1993) โดยสารเหล่านี้มีแหล่งกำเนิดมาจากกระบวนการผลิตในภาคอุตสาหกรรม น้ำมัน ถ่านหิน กระบวนการเผาไหม้ที่ไม่สมบูรณ์ของเชื้อเพลิงฟอสซิล (Volkering และคณะ, 1992) และสามารถปนเปื้อนสู่สิ่งแวดล้อมได้ นอกจากนี้ สาร PAHs ยังสามารถเกิดขึ้นได้เองตามธรรมชาติจากการรั่วซึมของน้ำมันตามธรรมชาติ ไฟไหม้ป่า และภูเขาไฟระเบิด (Cerniglia, 1992)

การบำบัดสิ่งแวดล้อมที่มีการปนเปื้อนด้วยสารพิษเหล่านี้ แนวทางหนึ่งที่มีประสิทธิภาพเป็นที่ยอมรับและใช้กันอย่างแพร่หลาย คือ กระบวนการย่อยสลายทางชีวภาพ (bioremediation) โดยการใช้ประโยชน์จากความสามารถของจุลินทรีย์มาย่อยสลายสารพิษให้มีความเป็นพิษลดลง

หรือหมดไป (Mueller และคณะ, 1989) ซึ่งเป็นวิธีที่ได้เปรียบกว่าการบำบัดทางเคมี การฝังกลบ และการเผาที่อุณหภูมิสูงมาก เนื่องจากปลอดภัยต่อสิ่งแวดล้อม ค่าใช้จ่ายต่ำ (Lee และ Cutright, 1996) และไม่ค่อยทำให้เกิดสารพิษชนิดใหม่ที่มีอันตรายมากกว่าเดิมเนื่องจากจุลินทรีย์ใช้สารพิษเป็นแหล่งพลังงานและคาร์บอน โดยสามารถย่อยสลายสาร PAHs บางชนิดได้อย่างสมบูรณ์ (mineralization) ได้ผลิตภัณฑ์เป็นน้ำและคาร์บอนไดออกไซด์ (Wilson และ Jones, 1993) หรือเปลี่ยนแปลงโครงสร้างบางส่วนของสาร PAHs ทำให้ความเป็นพิษลดลงหรือหมดไป

การศึกษาวិถีการย่อยสลายสาร PAHs ในจุลินทรีย์ได้มีการนำเทคนิคทางด้านพันธุวิศวกรรมมาช่วยในการศึกษาอย่างกว้างขวาง วิธีหนึ่งที่เป็นที่นิยมคือการก่อการกลายพันธุ์โดยทรานสโปซอน Tn5 ซึ่งทรานสโปซอนจะเข้าสู่เซลล์ผู้รับและแทรกสอดในยีนแบบสุ่ม มีผลทำให้ยีนที่ถูกทรานสโปซอนเข้าแทรกสอดสูญเสียหน้าที่ไป ทำให้เกิดสายพันธุ์กลายที่มีลักษณะต่างๆกัน (Harwood, 1993) ตัวอย่างของการศึกษาวิถีการย่อยสลายสาร PAHs โดยการก่อการกลายพันธุ์ด้วยทรานสโปซอน Tn5 เช่น การศึกษาวิถีการย่อยสลายแนพธาไลน์โดยการกลายพันธุ์ *Pseudomonas putida* สายพันธุ์ G7 ซึ่งทำให้ได้สายพันธุ์กลายที่มีการสะสมของสารมัธยันต์ต่างๆกันไป (Yen และ Gunsalus, 1982)

Rhizobium sp. CU-A1 (ศรัลยา แพงไตร, 2543) ซึ่งคัดแยกได้จากแหล่งดินในกรุงเทพมหานครที่มีการปนเปื้อนของน้ำมันเครื่อง มีความสามารถในการย่อยสลายอะซีแนพทีลีน (acenaphthylene) ซึ่งจัดเป็นสารประกอบชนิดหนึ่งในกลุ่มพอลิไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนที่พบปนเปื้อนอยู่ในอากาศของกรุงเทพมหานครในปริมาณสูง นอกจากนี้ยังมีความสามารถในการย่อยสลายแนพทีลีนเพื่อใช้เป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงานในการเจริญ รวมทั้งมีความสามารถในการย่อยสลาย ฟีนแอนทรีน (phenanthrene) ฟลูออรีน (fluorene) และอะซีแนพทีน (acenaphthene) ร่วมกับอะซีแนพทีลีน

สายพันธุ์กลายของ *Rhizobium* sp. CU-A1 ที่กลายพันธุ์ด้วยทรานสโปซอน Tn5 พบว่ามีความบกพร่องในการย่อยสลายอะซีแนพทีลีนเพื่อใช้เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงานในการเจริญเมื่อเปรียบเทียบกับ *Rhizobium* sp. CU-A1 สายพันธุ์เดิม (ธัญนุช เกรียงไกรพิพัฒน์, 2544) โดยแต่ละสายพันธุ์กลายจะสะสมสารมัธยันต์ที่เกิดขึ้นจากการย่อยสลายอะซีแนพทีลีนแตกต่างกันไป ในปัจจุบันไม่มีรายงานที่อ้างถึงการย่อยสลายสารประกอบ PAHs โดย *Rhizobium* โดยเฉพาะอย่างยิ่งการย่อยสลายอะซีแนพทีลีน ประกอบกับการย่อยสลายสารอะซีแนพทีลีนโดยจุลินทรีย์ชนิดอื่นทั้งในประเทศไทยและประเทศอื่นๆ ก็ยังมีการศึกษารายละเอียดกันน้อยมาก ดังนั้นจึงมีความน่าสนใจที่จะทำการพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารมัธยันต์ที่สะสมจากการย่อยสลายอะซีแนพทีลีนโดย *Rhizobium* สายพันธุ์กลาย เพื่อใช้ทำนายวิถีการย่อยสลายอะซีแนพทีลีนโดย *Rhizobium* sp. CU-A1

วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

เพื่อพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารมัยันต์ที่สะสมจากการย่อยสลายอะซีแนพริลีนโดยเชื้อสายพันธุ์กลายของ *Rhizobium* sp. CU-A1 ที่กลายพันธุ์ด้วยทรายสไปซอน Tn5

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

สามารถพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารมัยันต์ชนิดต่างๆ ที่เกิดขึ้นจากการย่อยสลายอะซีแนพริลีน เพื่อเป็นข้อมูลเบื้องต้นในการทำนายวิถีการย่อยสลายอะซีแนพริลีนโดยเชื้อ *Rhizobium* sp. CU-A1 ซึ่งสามารถนำไปใช้เป็นข้อมูลในการพัฒนาปรับปรุงสายพันธุ์ของจุลินทรีย์ให้เหมาะสมเพื่อที่จะใช้ในกระบวนการย่อยสลายอะซีแนพริลีนในสิ่งแวดล้อมต่อไป รวมทั้งสามารถนำข้อมูลที่ได้ไปใช้ในการศึกษาเปรียบเทียบในวิถีการย่อยสลายสาร PAHs ชนิดอื่นๆ



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 2

วารสารปริทัศน์

พอลิไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน (polycyclic aromatic hydrocarbons, PAHs) เป็นสารประกอบอินทรีย์ชนิดหนึ่งที่มีโครงสร้างของวงอะโรมาติกเบนซีนมาเชื่อมต่อกันเป็นเส้นตรง (linear) เป็นมุมงอ (angular) หรือเป็นกลุ่ม (cluster) โดยมีวงอะโรมาติกเบนซีนตั้งแต่ 2 วงขึ้นไป โดยสาร PAHs มีแหล่งกำเนิดมาจากกระบวนการผลิตในภาคอุตสาหกรรม เป็นส่วนประกอบในน้ำมันดิบ ถ่านหิน น้ำมันดำจากถ่านหิน (coal tar) ครีโอสท (creosote) ผลิตภัณฑ์จากน้ำมันปิโตรเลียม และเกิดจากกระบวนการเผาไหม้ที่ไม่สมบูรณ์ของเชื้อเพลิงฟอสซิล (Volkering และคณะ, 1992) และสามารถปนเปื้อนสู่สิ่งแวดล้อมทั้งอากาศ แหล่งน้ำใต้ดินและแหล่งน้ำบนดินในปริมาณสูง (Fernandez และคณะ, 1992) นอกจากนี้สาร PAHs ยังสามารถเกิดขึ้นได้เองตามธรรมชาติจากการรั่วซึมของแหล่งน้ำมันตามธรรมชาติ ไฟไหม้ป่า และภูเขาไฟระเบิด (Cerniglia, 1992)

สาร PAHs จัดเป็นสารที่ก่อให้เกิดอันตรายร้ายแรงต่อสิ่งมีชีวิตเนื่องจากความเป็นพิษของตัวมัน เป็นสารซึ่งก่อให้เกิดมะเร็ง (carcinogen) เป็นสารที่ก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของยีน (mutagen) และเป็นสารที่ก่อให้เกิดลักษณะทารกในครรภ์มีรูปร่างผิดปกติ (teratogen) (World Health Organization, 1983 อ้างถึงโดย Wilson และ Jones, 1993) หน่วยงานคุ้มครองสิ่งแวดล้อมของสหรัฐอเมริกา (The U.S. Environmental Protection Agency, EPA) กำหนดให้สาร PAHs 16 ชนิดได้แก่ แนพทาลีน (naphthalene), อะซีแนพทีน (acenaphthene), อะซีแนพทิลีน (acenaphthylene), ฟลูออรีน (fluorene), ฟีนแอนทรีน (phenanthrene), แอนทราซีน (anthracene), ฟลูออแรนทีน (fluoranthene), เบนโซ[เอ]แอนทราซีน (benz[a]anthracene), ไครซีน (chrysene), ไพรีน (pyrene), เบนโซ[บี]ฟลูออแรนทีน (benzo[b]fluoranthene), เบนโซ[เค]ฟลูออแรนทีน (benzo[k]fluoranthene), เบนโซ[เอ]ไพรีน (benzo[a]pyrene), ไดเบนโซ[เอ,เอช]แอนทราซีน (dibenz[ah]anthracene), เบนโซ[จี,เอช,ไอ]เพอริลีน (benzo[ghi]perylene) และอินดีโน-[1,2,3,ซีดี]ไพรีน (indeno[1,2,3cd]pyrene) เป็นสารพิษที่ให้ความสำคัญในอันดับต้นๆ ในอันที่จะป้องกันการปนเปื้อนของสารพิษดังกล่าวสู่สิ่งแวดล้อม (World Health Organization, 1983 อ้างถึงโดย Wilson และ Jones, 1993)

ในส่วนของประเทศไทยมีการกำหนดพระราชบัญญัติวัตถุอันตราย พ.ศ. 2535 โดยกำหนดให้สาร PAHs มีสมบัติจัดอยู่ในประเภทวัตถุอันตรายประเภทที่ 7 คือ วัตถุที่ก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรม (พระราชบัญญัติวัตถุอันตราย, 2535)

อะซีแนพทิลีน (acenaphthylene)

อะซีแนพทิลีน จัดเป็นสารประกอบอินทรีย์ชนิดหนึ่งในกลุ่มพอลิไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน ที่มีโครงสร้างโมเลกุลประกอบด้วยวงเบนซีน 2 วงและวงไซโคลเพนทีน 1 วงเชื่อมต่อกันเป็นกลุ่ม ดังแสดงในรูปที่ 2.1



รูปที่ 2.1 โครงสร้างโมเลกุลของอะซีแนพทิลีน

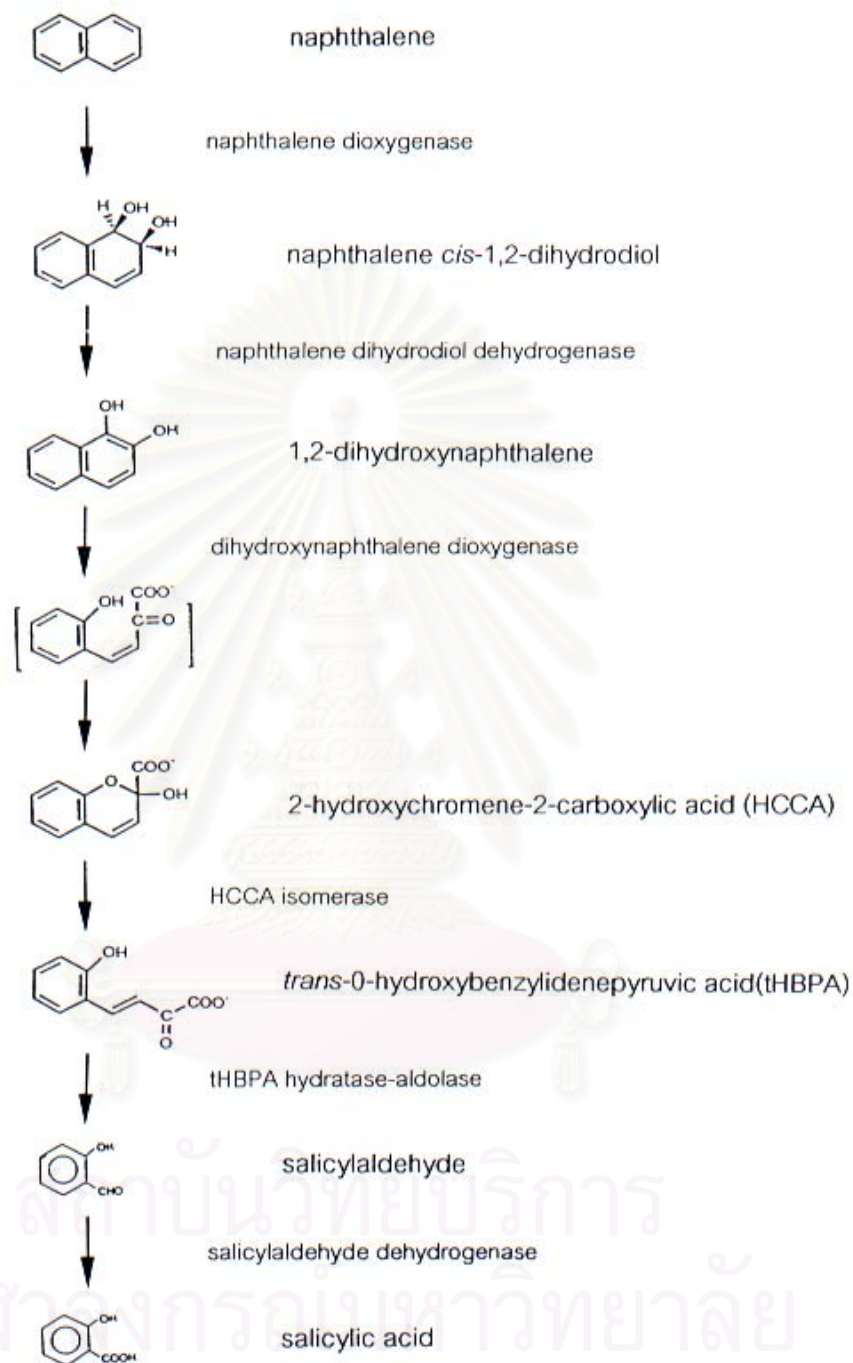
อะซีแนพทิลีนพบเป็นส่วนประกอบของน้ำมันดิบ, น้ำมันดำจากถ่านหิน, ควีนบูห์รี (Neurath, 1972) ผลิตภัณฑ์ปิโตรเคมี, ผลิตภัณฑ์จากถ่านหิน และเกิดจากการเผาไหม้ที่ไม่สมบูรณ์ของเชื้อเพลิงฟอสซิล (Alexander และคณะ, 1985; Radke, 1987) และพบในอุตสาหกรรมผลิตภัณฑ์ถนนและรักษาเนื้อไม้ (Wilson และ Jones, 1993) ซึ่งสามารถกระจายสู่สิ่งแวดล้อมทั้งอากาศ พื้นดิน แหล่งน้ำใต้ดิน และแหล่งน้ำบนดิน (Mattox และ Humenick, 1980) จากการรั่วไหลของผลิตภัณฑ์ดังกล่าวจากการนำไปใช้ในกระบวนการอุตสาหกรรม รวมทั้งการขนส่ง การดูแลเก็บรักษา ตลอดจนการกำจัดกากของเสียจากอุตสาหกรรมดังกล่าว นอกจากนี้อะซีแนพทิลีนยังมีแหล่งกำเนิดจากการกระทำของมนุษย์โดยพบในเขม่าสีดำจากการเผาไหม้เชื้อเพลิงอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนร่วมกับไพริดีน (pyridine) (Verschueren, 1996) เนื่องจากอะซีแนพทิลีนจัดเป็นสารที่มีผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม มีความเป็นพิษอย่างสูงทั้งต่อมนุษย์ สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม และสัตว์น้ำ (Lederer, 1985) มีสมบัติเป็นสารก่อมะเร็งและก่อการกลายพันธุ์ (Lavoie และ Rice, 1988) ทำให้มีความสนใจที่จะบำบัดสิ่งแวดล้อมที่มีการปนเปื้อนด้วยอะซีแนพทิลีนและสาร PAHs ชนิดอื่น

การบำบัดสิ่งแวดล้อมที่มีการปนเปื้อนด้วยอะซีแนพทิลีนและสาร PAHs ชนิดอื่นๆ สามารถกระทำได้หลายวิธี เช่น การบำบัดด้วยวิธีทางกายภาพ อาทิการกรอง การทำให้แห้ง การสกัดด้วยตัวทำละลาย การใช้ผงถ่านกัมมันต์ในการดูดซับ (Manahan, 1993) การบำบัดด้วยวิธีทางเคมี (Cockson, 1995) การเผาที่อุณหภูมิสูงมาก (incineration) การฝังกลบ (landfill) และแนวทางหนึ่งที่มีประสิทธิภาพเป็นที่ยอมรับและใช้กันอย่างแพร่หลาย คือ กระบวนการย่อยสลาย

ทางชีวภาพ (bioremediation) โดยการนำประโยชน์จากความสามารถของจุลินทรีย์มาย่อยสลายสารพิษให้มีความเป็นพิษลดลงหรือหมดไป (Mueller และคณะ, 1989) ซึ่งเป็นวิธีที่ได้เปรียบกว่าการบำบัดด้วยวิธีอื่น เนื่องจากมีความปลอดภัยต่อสิ่งแวดล้อม ค่าใช้จ่ายต่ำ (Lee และ Cutright, 1996) และไม่ก่อให้เกิดสารพิษชนิดใหม่ที่มีอันตรายมากกว่าเดิมเนื่องจากจุลินทรีย์ใช้สารพิษเป็นแหล่งพลังงานและคาร์บอน โดยสามารถย่อยสลายสาร PAHs บางชนิดได้อย่างสมบูรณ์ (mineralization) ได้ผลิตภัณฑ์เป็นน้ำและคาร์บอนไดออกไซด์ (Wilson และ Jones, 1993) หรือเปลี่ยนแปลงโครงสร้างบางส่วนของสาร PAHs ทำให้ความเป็นพิษลดลงหรือหมดไป กระบวนการบำบัดโดยวิธีการย่อยสลายทางชีวภาพอาจทำได้โดยการกระตุ้นให้จุลินทรีย์ในแหล่งที่มีการปนเปื้อนของสารพิษนั้นให้มีความสามารถในการย่อยสลายสาร PAHs ได้ (biostimulation) หรือทำการเติมจุลินทรีย์จากภายนอกที่มีความสามารถในการย่อยสลายสาร PAHs ลงไปในแหล่งที่มีการปนเปื้อนของสาร PAHs (bioaugmentation) ซึ่งมีความจำเป็นที่จะต้องศึกษาคุณสมบัติต่างๆ ของจุลินทรีย์นั้น เพื่อเป็นข้อมูลในการศึกษาติดตาม เพื่อให้การบำบัดสาร PAHs นั้นเป็นไปอย่างมีประสิทธิภาพ

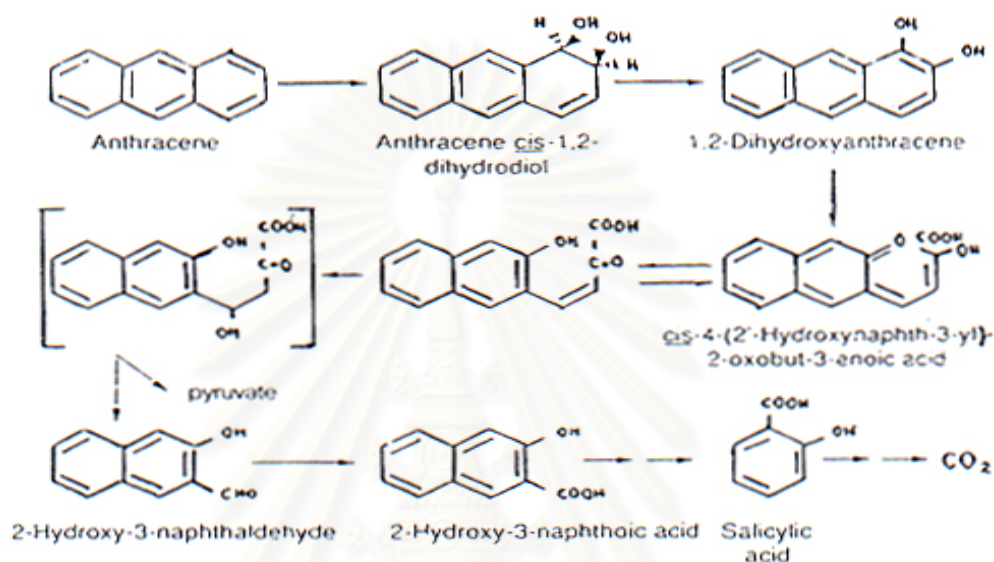
วิธีการย่อยสลายสาร PAHs โดยกระบวนการทางชีวภาพและเอนไซม์ที่เกี่ยวข้อง

Kim และคณะ (1997) รายงานวิธีการย่อยสลายเนฟธาลินโดย *Sphingomonas yanoikuyae* B1 ซึ่งมีความคล้ายคลึงกับการย่อยสลายเนฟธาลินไปเป็นกรดซาลิไซลิกโดย *Pseudomonas putida* G7 (Yen และ Gunsalus, 1982) ดังแสดงในรูปที่ 2.2 เนฟธาลินจะถูกเติมออกซิเจน 2 อะตอมกลายเป็น เนฟธาลิน ซิส-1,2-ไดไฮโดรไดออล (naphthalene *cis*-1,2-dihydrodiol) จากการทำงานของเอนไซม์เนฟธาลินไดออกซีจีเนส จากนั้นจะเปลี่ยนเป็น 1,2-ไดไฮดรอกซีเนฟธาลิน (1,2-dihydroxynaphthalene) จากกิจกรรมของเอนไซม์เนฟธาลินไดไฮโดรไดออลดีไฮโดรจีเนส จากนั้นเอนไซม์ไดไฮดรอกซีเนฟธาลินดีไฮโดรจีเนสจะออกซิไดซ์ 1,2-ไดไฮดรอกซีเนฟธาลินไปเป็นกรด 2-ไฮดรอกซีโครมีน-2-คาร์บอกซิลิก (2-hydroxychromene-2-carboxylic acid: HCCA) จากนั้นจะถูกเปลี่ยนเป็น กรด ทรานส-0-ไฮดรอกซีเบนซิลิดีนไพรูวิก (*trans*-0-hydroxybenzylidenepyruvic acid: tHBPA) จากกิจกรรมของเอนไซม์ HCCA ไฮโซเมอเรส จากนั้นเปลี่ยนเป็นซาลิไซลัลดีไฮด์ (salicylaldehyde) และกรดซาลิไซลิก (salicylic acid) จากการทำงานของเอนไซม์ไฮดรอกซีโครมีน-2-คาร์บอกซิลิกและซาลิไซลัลดีไฮด์ดีไฮโดรจีเนส ตามลำดับ

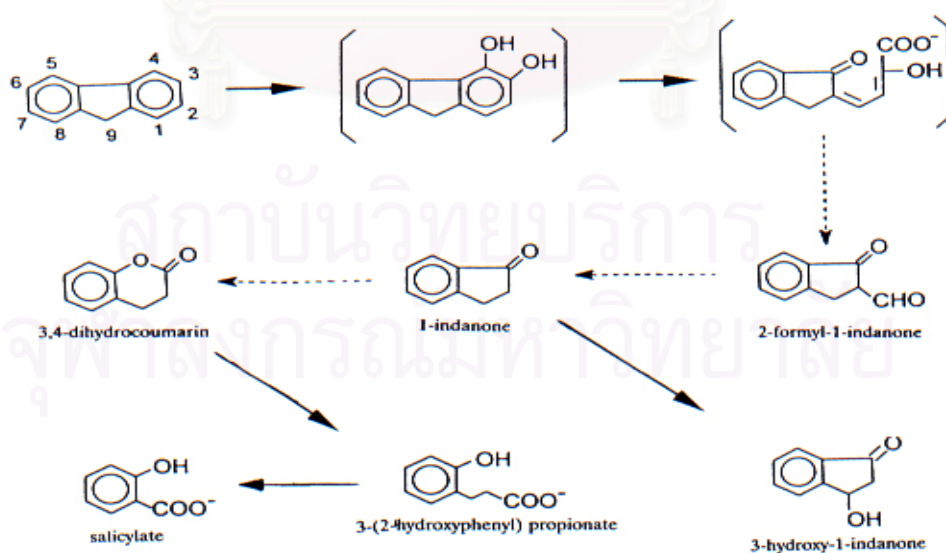


รูปที่ 2.2 วิธีการย่อยสลายเนฟทาลีนเป็นกรดซาลิไซลิก (Yen และ Gunsalus, 1982, Kim และคณะ, 1997)

นอกจากนี้ยังมีรายงานการย่อยสลาย PAHs ชนิดต่างๆที่พบกรดซาลิไซลิกเป็นสารมัธยันต์ในวิธีการย่อยสลายเช่น วิธีการย่อยสลายแอนทราซีนไปเป็นกรดซาลิไซลิกโดย *Pseudomonas aeruginosa* (Sutherland และคณะ ,1995) ดังแสดงในรูปที่ 2.3 และวิธีการย่อยสลายฟลูออรีนโดย *Arthrobacter* sp. สายพันธุ์ F101 (Merce และคณะ, 1997) ดังแสดงในรูปที่ 2.4

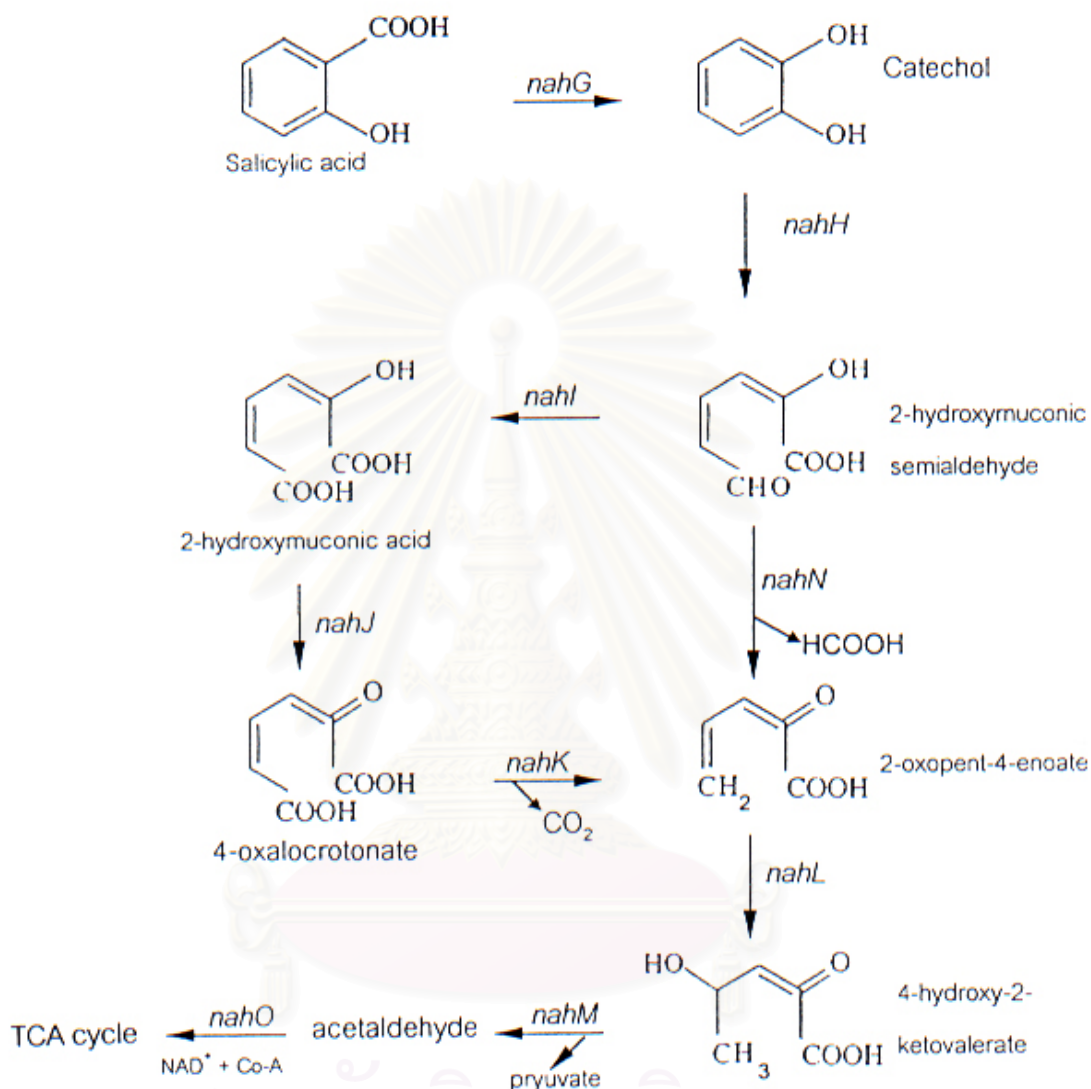


รูปที่ 2.3 วิธีการย่อยสลายแอนทราซีนโดย *Pseudomonas aeruginosa* (Sutherland และคณะ ,1995)



รูปที่ 2.4 วิธีการย่อยสลายฟลูออรีนโดย *Arthrobacter* sp. สายพันธุ์ F101 (Merce และคณะ, 1997)

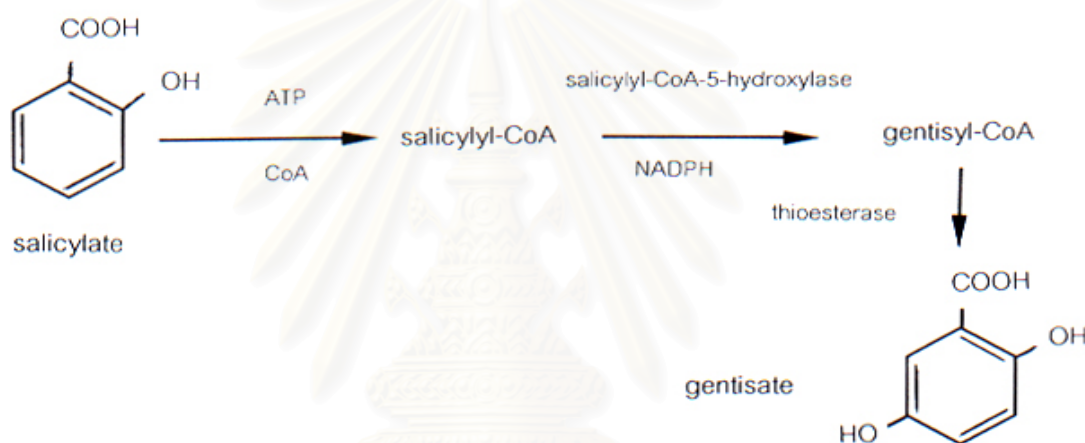
จากนั้นจุลินทรีย์ส่วนใหญ่จะเปลี่ยนกรดซาลิไซลิกไปเป็นคาทีคอลโดยเอนไซม์ซาลิไซเลส ไฮดรอกซีเลส (salicylate hydroxylase) เพื่อแตกวงและเข้าสู่วัฏจักรเครบส์ต่อไปดังแสดงในรูปที่ 2.5



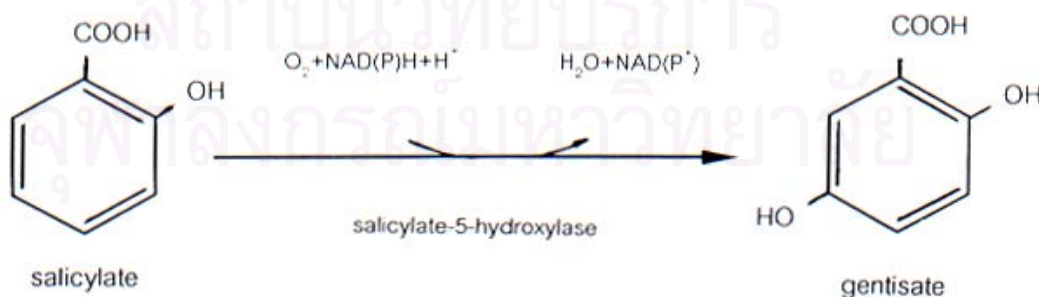
รูปที่ 2.5 วิธีการย่อยสลายกรดซาลิไซลิก (Yen และ Gunsalus, 1982) (*nahG* คือซาลิไซเลส ไฮดรอกซีเลส, *nahH* คือคาทีคอล-2,3-ไดออกซีจีเนส, *nahI* คือ 2-ไฮดรอกซีมิวโคนิกเซมิอัลดีไฮด์ ดีไฮโดรจีเนส, *nahJ* คือ 2-ไฮดรอกซีมิวโคนิก ดีไฮโดรจีเนส, *nahK* คือ 4-ออกซาลอคโรโตเนต ดีคาร์บอกซีเลส, *nahL* คือ 2-ออกซิเพนท-4-อีโนเอต ไฮโดรเลส, *nahM* คือ 4-ไฮดรอกซี-2-คีโตวาเลเรท อัลโดเลส, *nahN* คือ 2-ไฮดรอกซีมิวโคนิกเซมิอัลดีไฮด์ ไฮโดรเลส, *nahO* คือ)

แต่ก็มีรายงานว่า การย่อยสลายเบนซีนโดยกระบวนการทางชีวภาพในสภาวะที่มีออกซิเจน (Baker และคณะ, 1994) เบนซีนไม่ได้ถูกย่อยสลายผ่านทางคาทีคอลแต่เพียงวิธีเดียวอาจจะถูก

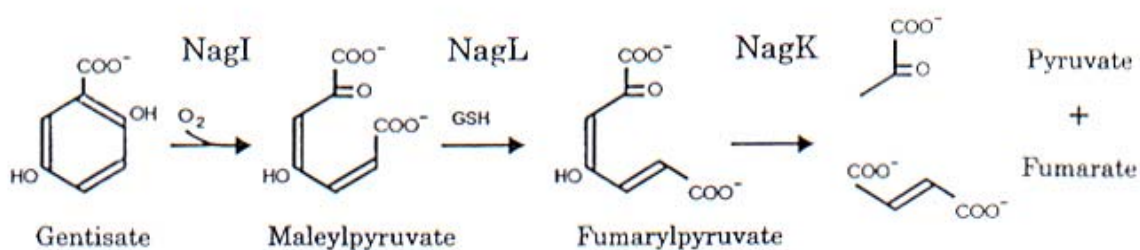
ย่อยสลายผ่านทางกรดโปรโตคาที่คูอิก ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Kiyohara และคณะ (1972) ที่พบการย่อยสลายพีแนทรีนผ่านกรดโปรโตคาที่คูอิก นอกจากนี้ยังมีรายงานการย่อยสลายกรดซาลิไซลิกที่ไม่ผ่านทางคาที่คอลแต่ย่อยสลายกรดซาลิไซลิกเป็นกรดเจนทิลิก เช่นการย่อยสลายแนพธาดีนโดย *Pseudomonas fluorescens* (Starovoitov, 1975), การย่อยสลายกรดซาลิไซลิกโดย *Pseudomonas* sp. TA-2 (Ohmoto และคณะ, 1991), *Rhodococcus* sp. สายพันธุ์ B4 ดังแสดงในรูปที่ 2.6 (Grund และคณะ, 1992) และ *Pseudomonas* sp. สายพันธุ์ U2 (Fuenmayor และคณะ, 1998) ดังแสดงในรูปที่ 2.7 และกรดเจนทิลิกจะถูกออกซิไดซ์เป็นมาริลไพรูเวท (maleylpyruvate) โดยเอนไซม์เจนทิลิเสท-1,2-ไดออกซิจีเนส (gentisate-1,2-dioxygenase) จากนั้นจะถูกเปลี่ยนเป็น ไพรูเวทและฟูมาเรท (Ning และคณะ, 2001) ดังแสดงในรูปที่ 2.8



รูปที่ 2.6 วิธีการย่อยสลายกรดซาลิไซลิกโดย *Rhodococcus* sp. สายพันธุ์ B4 (Grund และคณะ, 1992)



รูปที่ 2.7 วิธีการย่อยสลายกรดซาลิไซลิกโดย *Pseudomonas* sp. สายพันธุ์ U2 (Fuenmayor และคณะ, 1998)



รูปที่ 2.8 วิธีการย่อยสลายกรดเจนนิกโดย *Ralstonia* สายพันธุ์ U2 (Ning และคณะ, 2001) (NagI คือเจนนิก-1,2-ไดออกซีจีเนส, NagL คือมาริลไพรูเวท ไฮโซเมอเรส, NagK คือฟูมาริลไพรูเวท ไฮโดรเลส)

การย่อยสลายอะซีแนพทิลีนโดยกระบวนการทางชีวภาพ

การย่อยสลายอะซีแนพทิลีนมีรายงานการศึกษามาเป็นเวลานาน ทั้งในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม แบคทีเรีย และราไวท์รอต โดยส่วนใหญ่พบเป็นการย่อยสลายแบบเปลี่ยนแปลงโครงสร้างโมเลกุลให้เป็นสารมัธยันต์ชนิดต่างๆ (transformation) มีแบคทีเรียบางชนิดเท่านั้นที่สามารถย่อยสลายอะซีแนพทิลีนเพื่อใช้เป็นแหล่งพลังงานและคาร์บอนได้

การย่อยสลายอะซีแนพทิลีนโดยแบคทีเรีย

Dean-Raymond และ Bartha (1975) ได้ทำการคัดแยกแบคทีเรียจากน้ำทะเลที่ปนเปื้อนด้วยน้ำมัน พบว่าแบคทีเรียที่คัดแยกได้เมื่อทำการเลี้ยงโดยใช้แนพทาลีนและอะซีแนพทิลีนเป็นแหล่งคาร์บอน จะมีความสามารถในการโคออกซิไดซ์อะซีแนพทิลีนไปเป็นสารมัธยันต์ประเภทควิโนน (quinone) ที่ยังไม่ทราบโครงสร้างทางเคมีที่แน่นอน

Chapman (1979) รายงานว่า *Pseudomonas* sp. ซึ่งมีความสามารถในการเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแนพทาลีน สามารถออกซิไดซ์อะซีแนพทิลีนไปเป็น *cis*-1,2-อะซีแนพทีนไดออล (*cis*-1,2-acenaphthenediol) และสารมัธยันต์อื่นๆ ที่ยังไม่มีการศึกษารายละเอียดของโครงสร้างที่แน่นอน

Shocken และ Gibson (1984) พบว่าแบคทีเรีย *Beijerinckia* sp. สามารถโคออกซิไดซ์อะซีแนพทิลีนได้เมื่อทำการเลี้ยงแบคทีเรียในอาหารที่มีไบฟีนิล (biphenyl) เป็นแหล่งคาร์บอน โดย

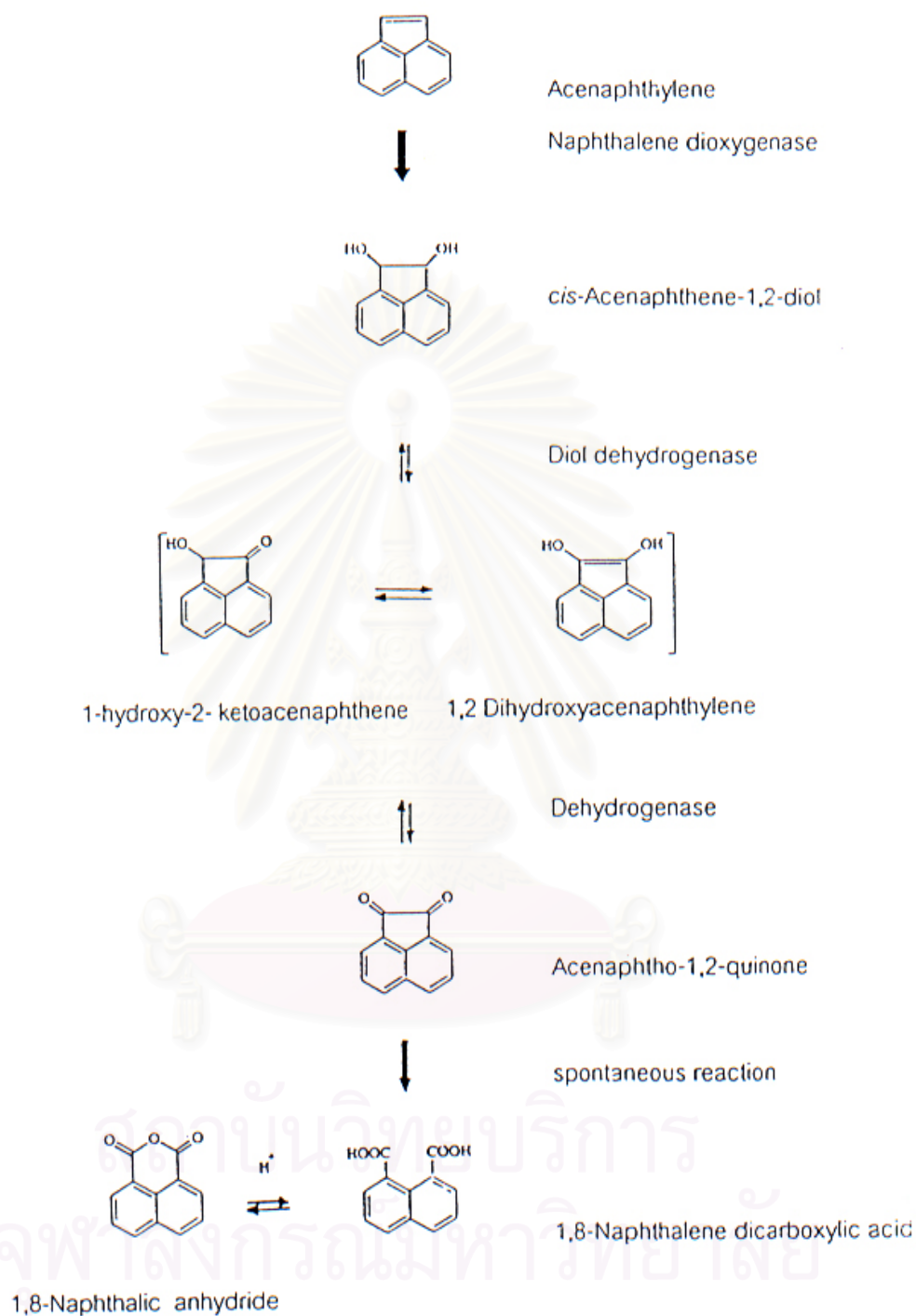
Beijerinckia sp. จะออกซิไดซ์อะซีแนพทีลีนได้ผลิตภัณฑ์เป็นอะซีแนพทีนควิโนน (acenaphthenequinone) และ 1,2-ไดไฮดรอกซีอะซีแนพทีลีน (1,2-dihydroxyacenaphthylene) ซึ่งเป็นสารมัธยันต์ที่เกิดขึ้นเมื่อเลี้ยงเซลล์กับ ซีส-1,2-อะซีแนพทีนไดออกไซด์เช่นกัน ในขณะที่เชื้อสายพันธุ์กลาย *Beijerinckia* sp. B8/36 ที่มีความบกพร่องของเอนไซม์ไดออกซีไฮโดรจีเนสจะออกซิไดซ์อะซีแนพทีลีนและทำให้เกิดการสะสมของ ซีส-1,2-อะซีแนพทีนไดออกไซด์ซึ่งเกิดจากกิจกรรมของเอนไซม์ไดออกซีจีเนสเติมออกซิเจนให้แก่วงไฮโคลเพนทีน

Komatsu และคณะ (1993) รายงานว่า *Pseudomonas* sp. สายพันธุ์ A4 ที่คัดแยกได้จากแหล่งดินที่มีการปนเปื้อนของเสียจากโรงงานอุตสาหกรรม มีความสามารถในการใช้อะซีแนพทีลีนเป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงานเพียงแหล่งเดียวในการเจริญ และพบกรด 1,8-แนพธาไลน์ไดคาร์บอกซิลิก (1,8-naphthalene dicarboxylic acid) เป็นสารมัธยันต์

Grifoll และคณะ (1995) รายงานว่า *Pseudomonas cepacia* F297 ที่มีความสามารถในการเจริญในอาหารที่มีฟลูออรีนเป็นแหล่งพลังงานและคาร์บอนเพียงแหล่งเดียว สามารถโคออกซิไดซ์อะซีแนพทีลีนในอาหารที่มีฟลูออรีน เกิดเป็นสารมัธยันต์จำพวก 1-อะซีแนพทีน (1-acenaphthenone), อะซีแนพโท-1,2-ควิโนน, 1,8-แนพธาอิกแอนไฮไดรด์ (1,8-naphthalic anhydride) และกรด 1,8-แนพธาไลน์ไดคาร์บอกซิลิก ซึ่งคาดว่ากรดย่อยสลายอะซีแนพทีลีนนี้เกิดจากการทำงานของระบบเอนไซม์ไดออกซีจีเนสเช่นเดียวกับในวิถีการย่อยสลายแนพธาไลน์ของ *Pseudomonas cepacia* F297

Selifenov และคณะ (1996) รายงานว่า *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 ที่มีพลาสมิด pRE695 ซึ่งมียีน *nahA* ที่เป็นรหัสในการสังเคราะห์เอนไซม์แนพธาไลน์ไดออกซีจีเนส สามารถออกซิไดซ์อะซีแนพทีลีนไปเป็นสารมัธยันต์ต่างๆ คือ ซีส-1,2-อะซีแนพทีนไดออกไซด์, 1,2-อะซีแนพโทควิโนน และกรด 1,8-แนพธาไลน์ไดคาร์บอกซิลิก

จากรายงานการย่อยสลายอะซีแนพทีลีนโดยแบคทีเรียพบว่า อะซีแนพทีลีนจะถูกเติมออกซิเจน 2 อะตอมลงบนวงไฮโคลเพนทีนได้ผลิตภัณฑ์เป็น ซีส-อะซีแนพทีน-1,2-ไดออกไซด์จากกิจกรรมของเอนไซม์ไดออกซีจีเนส จากนั้นซีส-อะซีแนพทีน-1,2-ไดออกไซด์จะถูกเอนไซม์ไดออกซีไฮโดรจีเนสออกซิไดซ์ไปเป็น 1,2-ไดไฮดรอกซีอะซีแนพทีลีน และ 1-ไฮดรอกซี-2-คีโตอะซีแนพทีน (1-hydroxy-2-ketoacenaphthene) ซึ่งเป็น tautomer จากนั้นผลิตภัณฑ์ทั้งสองจะถูกออกซิไดซ์หรือรีดิวซ์ไปเป็น อะซีแนพโท-1,2-ควิโนนโดยการทำงานของเอนไซม์ดีไฮโดรจีเนสและรีดักเทส หลังจากนั้นอะซีแนพโท-1,2-ควิโนน จะแตกตัวได้เองทำให่วงไฮโคลเพนทีนแตกออกได้ผลิตภัณฑ์สุดท้ายเป็นกรด 1,8-แนพธาไลน์ไดคาร์บอกซิลิก ดังแสดงในรูปที่ 2.9



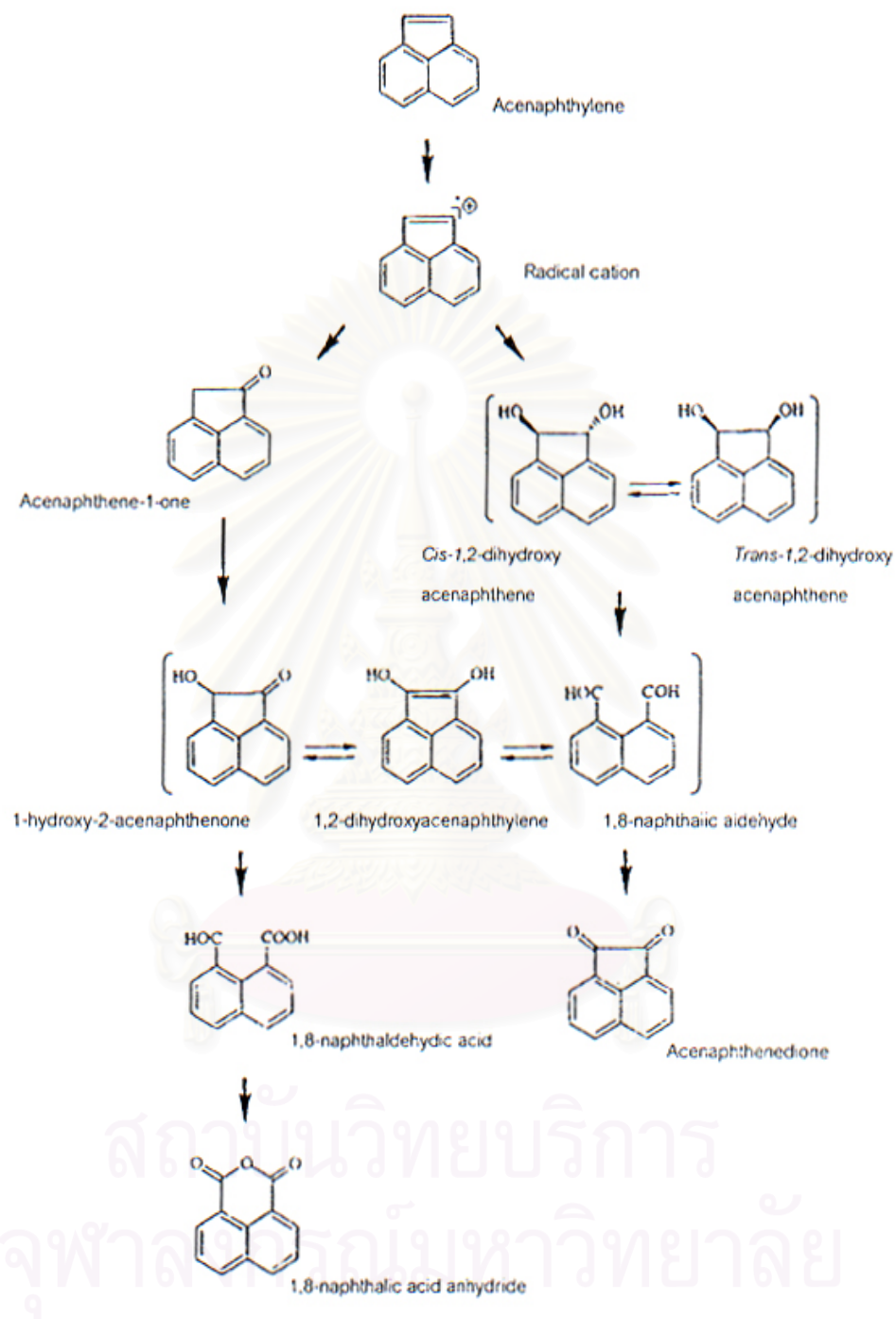
รูปที่ 2.9 วิธีการย่อยสลายอะซีแนฟลิ้นโดย *Pseudomonas aeruginosa* สายพันธุ์ PAO1 ที่มีพลาสมิด pRE695 ซึ่งมียีนที่เป็นรหัสของเอนไซม์แนฟธาลินไดออกซีจีเนส (Selifenov และคณะ, 1996)

การย่อยสลายอะซีแนฟทิลีนโดยราไทรอท

ราไทรอทมีความสามารถในการย่อยสลายลิกนินที่มีโครงสร้างเป็นวงอะโรมาติกที่มีความซับซ้อนได้ ซึ่งเกิดจากกิจกรรมของเอนไซม์ในกลุ่มเปอร์ออกซิเดส ซึ่งได้แก่ ลิกนินเปอร์ออกซิเดส แมงกานีสเปอร์ออกซิเดส และแลคเคส โดยเอนไซม์ในกลุ่มนี้ไม่มีความจำเพาะต่อสารตั้งต้น จึงสามารถย่อยสลายลิกนินและสารพอลิไซคลิกอะโรมาติกที่มีลักษณะโครงสร้างเป็นวงอะโรมาติกเหมือนกันได้ จึงมีการศึกษาความสามารถของราไทรอทในการย่อยสลายสาร PAHs หลายชนิด เช่น ศึกษาความสามารถในการย่อยสลายเบนโซ[เอ]ไพรีนโดย *Bjerkandera* sp. สายพันธุ์ BOS55 ซึ่งจะใช้เอนไซม์ในกลุ่มเปอร์ออกซิเดสทั้ง 3 ชนิดร่วมกันในการย่อยสลาย (Michiel และคณะ, 1998) ศึกษาความสามารถในการย่อยสลายเบนโซ[เอ]ไพรีนโดยเอนไซม์ลิกนินเปอร์ออกซิเดสที่เตรียมได้จาก *Phanerochaete chrysosporium* (Hammel และคณะ, 1986)

จากการศึกษาวิถีการย่อยสลายอะซีแนฟทิลีนโดยราไทรอท *Trametes versicolor* โดยกิจกรรมของเอนไซม์แลคเคสพบว่า อะซีแนฟทิลีนจะถูกออกซิไดซ์ไปเป็นอะซีแนฟทิลีน-1-โอินและเปลี่ยนเป็น 1-ไฮดรอกซี-2-อะซีแนฟทิลีน หรืออะซีแนฟทิลีนจะถูกออกซิไดซ์ไปเป็น ซิส-1,2-ไดไฮดรอกซีอะซีแนฟทิลีนและ tautomer ทรานส์-1,2-ไดไฮดรอกซีอะซีแนฟทิลีนและเปลี่ยนเป็น 1,8-แนฟธาลิกอัลดีไฮด์ (1,8-naphthalic aldehyde) จากนั้นผลิตภัณฑ์เหล่านี้รวมทั้ง 1,2-ไดไฮดรอกซีอะซีแนฟทิลีนซึ่งเป็น tautomer จะถูกออกซิไดซ์เป็นอะซีแนฟทิลีนไดโอิน และกรด 1,8-แนฟธอลดีไฮดริก ซึ่งสกัดออกมาได้ในรูปกรด 1,8-แนฟธาลิกแอนไฮไดรด์ (Johannes และคณะ, 1998) ดังแสดงในรูปที่ 2.10 คล้ายกับรายงานการย่อยสลายอะซีแนฟทิลีนโดยแบคทีเรีย

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 2.10 วิธีการย่อยสลายอะซีแนฟทีลีนโดยราไวท์รอก *Trametes versicolor* (Johannes และคณะ, 1998)

การย่อยสลายอะซีแนพธิลีนโดยสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม

วิธีการย่อยสลายอะซีแนพธิลีนในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมพบว่า อะซีแนพธิลีนจะถูกออกซิไดซ์เป็นอะซีแนพธิลีนอีพอกไซด์จากกิจกรรมของเอนไซม์ไซโตโครม P₄₅₀ จากนั้นเอนไซม์อีพอกไซด์ไฮโดรเลสจะเติมไฮโดรเจนและหมู่ไฮดรอกซิลลงในโมเลกุลเกิดเป็น ซีส- และทรานส-1,2-อะซีแนพธิลีนไดออล, อะซีแนพธีนควิโนน และกรดแนพธาลิก (Hopskins และคณะ, 1962) ซึ่งมีวิธีการย่อยสลายคล้ายคลึงกับในแบคทีเรีย

จากรายงานวิธีการย่อยสลายอะซีแนพธิลีนโดยแบคทีเรียต่างๆ ราไวท์รอกท และในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม พบว่าในสิ่งมีชีวิตแต่ละกลุ่มจะอาศัยกิจกรรมของเอนไซม์ที่แตกต่างกันไปในการย่อยสลายอะซีแนพธิลีน แต่ผลิตภัณฑ์ส่วนใหญ่ที่เกิดขึ้นจากการย่อยสลายมีความคล้ายคลึงกันโดยสรุปชนิดของจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการย่อยสลายอะซีแนพธิลีนไว้ในตารางที่ 2.1

ตารางที่ 2.1 จุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการย่อยสลายอะซีแนพธิลีน

จุลินทรีย์	เอกสารอ้างอิง
แบคทีเรีย	
<i>Nocardia corallina</i>	Jamison และคณะ, 1971
<i>Pseudomonas</i> sp.	Chapman, 1979
<i>Beijerinckia</i> sp.	Shocken และ Gibson, 1984
<i>Beijerinckia</i> sp. สายพันธุ์ 8/36	Shocken และ Gibson, 1984
<i>Pseudomonas</i> sp. สายพันธุ์ A4	Komatsu และคณะ, 1993
<i>Pseudomonas cepacia</i> สายพันธุ์ F297	Grifoll และคณะ, 1995
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> สายพันธุ์ PAO1 ที่มีพลาสมิด pRE695	Selifenov และคณะ, 1996
ราไวท์รอกท	
<i>Trametes versicolor</i>	Johannes และคณะ, 1998

Rhizobium sp. สายพันธุ์ CU-A1

Rhizobium sp. CU-A1 (ศรัลยา แพงไทร, 2543) ที่คัดแยกได้จากแหล่งดินที่มีการปนเปื้อนของน้ำมันเครื่อง บริเวณโรงซ่อมยานยนต์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพมหานคร เป็นแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายอะซีแนฟทีนเพื่อใช้เป็นแหล่งพลังงานและคาร์บอนในการเจริญ นอกจากนี้ความสามารถในการย่อยสลายอะซีแนฟทีนแล้ว *Rhizobium* sp. CU-A1 ยังสามารถย่อยสลายเนฟธาซีน และกรดโปรโตคาที่คูอีกเป็นแหล่งคาร์บอนในการเจริญได้ด้วย รวมทั้งสามารถย่อยสลายอะซีแนฟทีน ฟลูออรีน และพีแนทรีนในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีอะซีแนฟทีนได้

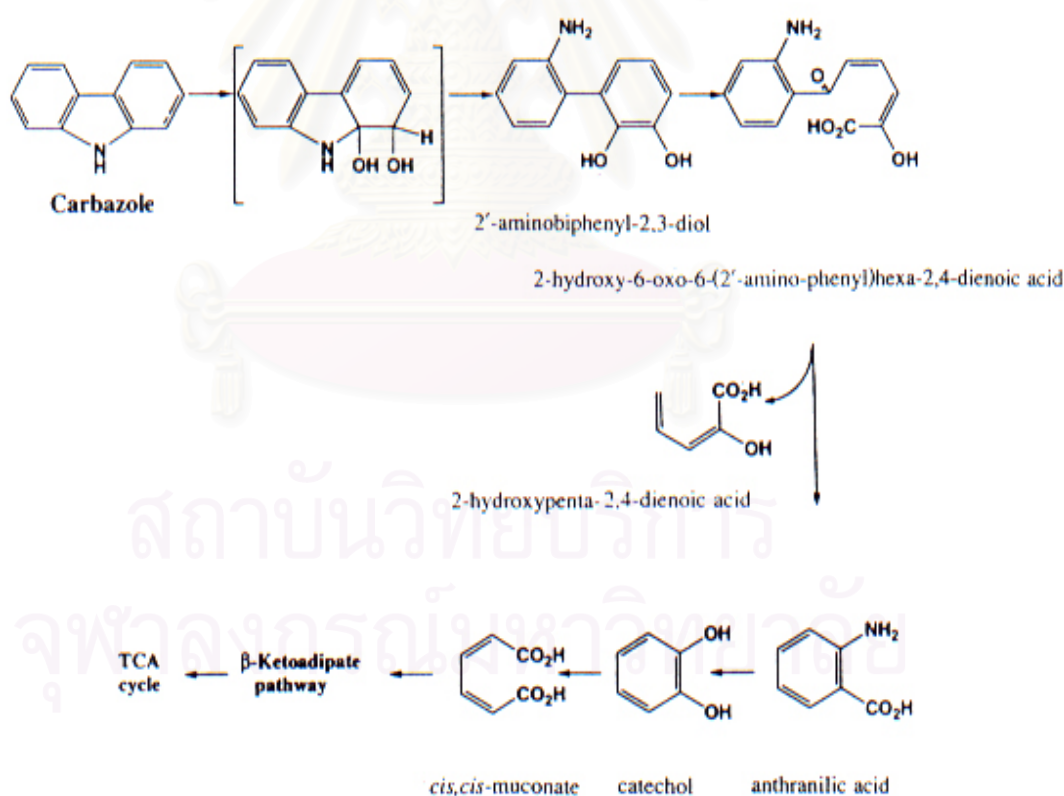
เป็นที่น่าสนใจว่า ในปัจจุบันยังไม่เคยมีรายงานว่าแบคทีเรียในสกุล *Rhizobium* มีความสามารถในการย่อยสลายอะซีแนฟทีนรวมทั้งสาร PAHs ชนิดอื่นๆ ได้ รวมทั้งการศึกษาวิธีการย่อยสลายอะซีแนฟทีนโดยจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ ก็ยังมีการศึกษาน้อยมากมีเพียงรายงานของ Komatsu และคณะ (1993) ที่พบกรดเนฟธาซีน-1,8-ไดคาร์บอกซิลิกเป็นสารมัธยันต์ที่เกิดขึ้นจากการย่อยสลายอะซีแนฟทีนโดย *Pseudomonas* sp. สายพันธุ์ A4 เช่นเดียวกับรายงานของ Selifenov และคณะ (1996) ที่ได้เสนอวิธีการย่อยสลายอะซีแนฟทีนโดย *Pseudomonas aeruginosa* สายพันธุ์ PAO1 และพบสารมัธยันต์สุดท้ายจากการย่อยสลายอะซีแนฟทีนเป็นกรดเนฟธาซีน-1,8-ไดคาร์บอกซิลิกเช่นเดียวกัน เป็นที่น่าสังเกตว่าจากสารมัธยันต์ดังกล่าวยังไม่มีการนำคาร์บอนตำแหน่งใดในโมเลกุลของอะซีแนฟทีนไปใช้ในการเจริญเลย รวมทั้งยังไม่มีรายงานการย่อยสลายกรดเนฟธาซีน-1,8-ไดคาร์บอกซิลิกโดยแบคทีเรียอีกด้วย เนื่องจาก *Rhizobium* sp. CU-A1 สามารถใช้อะซีแนฟทีนเป็นแหล่งคาร์บอนในการเจริญได้จึงน่าสนใจที่จะทำการศึกษาวិธีการย่อยสลายอะซีแนฟทีนของ *Rhizobium* sp. CU-A1 ว่ามีวิธีการย่อยสลายเหมือนหรือต่างกับใน *Pseudomonas aeruginosa* สายพันธุ์ PAO1 และ *Pseudomonas* sp. สายพันธุ์ A4

การศึกษาวิธีการย่อยสลายสาร PAHs โดยการก่อการกลายพันธุ์โดยทรานสโปซอน Tn5

ทรานสโปซอน คือ ดีเอ็นเอชนิดหนึ่งซึ่งสามารถเคลื่อนที่จากตำแหน่งหนึ่งไปแทรกสอดลงบนดีเอ็นเออีกตำแหน่งหนึ่งแบบไม่จำเพาะ โดยอาศัยกิจกรรมของเอนไซม์ทรานสโปเซส ซึ่งการก่อการกลายพันธุ์โดยทรานสโปซอนอาศัยหลักการคือ เมื่อทรานสโปซอนเคลื่อนที่เข้าแทรกสอดในตำแหน่งของยีนใดแบบสุ่ม จะทำให้ยีนนั้นสูญเสียหน้าที่ไป (insertion inactivation) ทำให้เกิดสายพันธุ์กลายที่มีลักษณะแตกต่างไปจากสายพันธุ์เดิม (Harwood, 1993)

ในปัจจุบันได้มีการศึกษาวิธีการย่อยสลาย PAHs โดยการก่อการกลายพันธุ์โดยทรานสโปซอน Tn5 กันอย่างกว้างขวาง อาทิ Yen และ Gunsalus (1982) ได้ทำการกลายพันธุ์ *Pseudomonas putida* สายพันธุ์ G7 โดยทรานสโปซอน Tn5 เพื่อศึกษาวิธีการย่อยสลายเนพทาลีนพบว่าเมื่อยีนในวิธีการย่อยสลายเนพทาลีนเป็นกรดซาลิไซลิก (upper pathway) ถูกแทรกสอดด้วยทรานสโปซอน Tn5 จะทำให้แบคทีเรียไม่สามารถเจริญได้ในเนพทาลีนและสะสมสารมัธยันต์ชนิดต่างๆ แต่เจริญได้ในกรดซาลิไซลิก ในขณะที่ถ้ายีนในวิธีการย่อยสลายกรดซาลิไซลิกเป็นไพรูเวทและอะซีทิลโคเอ (lower pathway) ถูกแทรกสอดด้วยทรานสโปซอน Tn5 จะทำให้แบคทีเรียไม่สามารถเจริญได้ในทั้งเนพทาลีนและกรดซาลิไซลิก

Toshiaki และคณะ (1995) พบว่าสายพันธุ์กลาย *Pseudomonas* sp. สายพันธุ์ TE1 ที่กลายพันธุ์ด้วยทรานสโปซอน Tn5 ไม่สามารถย่อยสลายคาร์บาโซล (carbazole) ได้เมื่อเปรียบเทียบกับ *Pseudomonas* sp. สายพันธุ์ CA10 สายพันธุ์เดิมและพบการสะสมของสารมัธยันต์ คาทิคอล (catechol) และ ซิส,ซิส-มิวโคเนท (*cis,cis*-muconate) ดังแสดงในรูปที่ 2.11



รูปที่ 2.11 วิธีการย่อยสลายคาร์บาโซลโดย *Pseudomonas* sp. สายพันธุ์ CA10 (Toshiaki และคณะ, 1995)

นอกจากนี้ Foght และ Westlake (1996) ได้ศึกษาวิธีการย่อยสลายพีแนมทรีนและแนพธาลีนของ *Pseudomonas fluorescens* สายพันธุ์ LP6a โดยการกลายพันธุ์ด้วยทรานสโปซอน Tn5 แล้วคัดเลือกสายพันธุ์กลายที่ได้มาวิเคราะห์สารมัธยันต์ที่สะสมจากการย่อยสลายพีแนมทรีนและแนพธาลีน พบว่าสายพันธุ์กลายที่คัดเลือกจะสะสม 1,2-ไดไฮดรอกซี-1,2-ไดไฮโดรแนพธาลีนจากการย่อยสลายแนพธาลีน และจะสะสมพีแนมทรีน ไดไฮโดรไดออกอล และ พีแนมทรอลจากการย่อยสลายพีแนมทรีน นอกจากนี้ยังสะสมสารมัธยันต์ประเภทไดไฮโดรไดออกอลจากการย่อยสลายแอนทราซีน, อะซีแนพทีน, ไบฟีนิล, เบนโซไธโอฟินและ ไดเบนโซไธโอฟิน

การก่อการกลายพันธุ์ *Rhizobium* โดยทรานสโปซอน Tn5 เพื่อนำมาใช้ประโยชน์ในการศึกษาถึงยีนที่เกี่ยวข้องในวิถีเมตาบอลิซึมต่างๆ ได้มีรายงานไว้ เช่นการศึกษาเกี่ยวกับยีนที่ใช้ในกระบวนการตรึงไนโตรเจนของ *Rhizobium meliloti* (Watson และ Rastogi, 1993) และการศึกษาถึงยีนที่เกี่ยวข้องในกระบวนการสังเคราะห์ลิโปโพลีแซคคาไรด์ของ *Rhizobium etli* สายพันธุ์ KIM5s (Botero และคณะ, 2000)

สายพันธุ์กลายของ *Rhizobium* sp. CU-A1 ที่กลายพันธุ์ด้วยทรานสโปซอน Tn5

ธัญนุช เกรียงไกรพิพัฒน์ (2544) ได้ทำการกลายพันธุ์ *Rhizobium* sp. CU-A1 ด้วยทรานสโปซอน Tn5 โดยใช้ *E. coli* สายพันธุ์ S17-1 ที่มีพลาสมิด pSUP2021 ในการคอนจูเกชันกับ *Rhizobium* sp. CU-A1 และจากการสุ่มเลือกทรานสคอนจูแกนท์ (transconjugants) มาทดลองติดตามการแทรกสอดของทรานสโปซอน Tn5 ด้วยวิธีไฮบริดไนเซชัน (southern hybridization) กับชิ้นส่วนของทรานสโปซอน Tn5 พบว่าทรานสโปซอน Tn5 มีการแทรกสอดบนดีเอ็นเอของ *Rhizobium* sp. CU-A1 แบบสุ่มทำให้เกิดสายพันธุ์กลายที่หลากหลาย เช่นเดียวกับการกลายพันธุ์ *Rhizobium meliloti* ด้วยทรานสโปซอน Tn5 (Simon และคณะ, 1983) จากการศึกษาความสามารถของสายพันธุ์กลายในการย่อยสลายอะซีแนพทีน, อะซีแนพทีนควิโนน และกรดแนพธาลีน-1,8-ไดคาร์บอกซิลิกซึ่งมีรายงานว่าเป็นสารมัธยันต์ที่เกิดขึ้นจากการย่อยสลายอะซีแนพทีนโดยแบคทีเรีย พบว่ามีความหลากหลายของสายพันธุ์กลาย โดยสามารถแบ่งสายพันธุ์กลายออกได้เป็น 4 กลุ่มใหญ่ คือ

- สายพันธุ์กลายกลุ่มที่ 1 ซึ่งมีความบกพร่องในการย่อยสลายอะซีแนพทีน แต่สามารถเจริญได้ในอะซีแนพทีนควิโนน และ กรดแนพธาลีน-1,8-ไดคาร์บอกซิลิก
- สายพันธุ์กลายกลุ่มที่ 2 มีความบกพร่องในการย่อยสลายอะซีแนพทีน และอะซีแนพทีนควิโนน แต่สามารถเจริญได้ในกรดแนพธาลีน-1,8-ไดคาร์บอกซิลิก

- สายพันธุ์กลายกลุ่มที่ 3 มีความบกพร่องในการย่อยสลายอะซีแนพริลีน, อะซีแนพรีนควิโนน และกรดแนพธาไลน์-1,8-ไดคาร์บอกซิลิก
- สายพันธุ์กลายกลุ่มที่ 4 มีความบกพร่องในการย่อยสลายอะซีแนพริลีน แต่สามารถเจริญได้ในอะซีแนพรีนควิโนน และ กรดแนพธาไลน์-1,8-ไดคาร์บอกซิลิก เช่นเดียวกับสายพันธุ์กลายกลุ่มที่ 1 และไม่สามารถเจริญได้ในแนพธาไลน์ซึ่งแตกต่างจากสายพันธุ์กลายกลุ่มที่ 1

สายพันธุ์กลายเหล่านี้จึงมีประโยชน์มากต่อการศึกษา การพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารมัธยันต์ที่ถูกสะสมจากการย่อยสลายอะซีแนพริลีน เพื่อนำไปสู่การทำนายวิถีเมตาบอลิซึมของอะซีแนพริลีนโดยจุลินทรีย์นี้



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. เครื่องเขย่าชนิดควบคุมอุณหภูมิ (controlled environment incubators shaker) รุ่น G-27 ของบริษัท New Brunswick Scientific, USA.
7. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) รุ่น Spectronic 21 ของบริษัท Bausch & Lomb, USA.
8. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) รุ่น UV-160A ของบริษัท Shimadzu, Japan.
9. ตู้ป้อนเชื้อ (Contherm digital Series cooled incubator) ของบริษัท Contherm Scientific, New Zealand.
10. ตู้ป้อนเชื้อ (Incubator) ของบริษัท Memmert, Germany.
11. เครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดควบคุมอุณหภูมิ (refrigerated centrifuge) รุ่น J2-21 ของบริษัท Beckman Instrument Inc., USA.
12. เครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดตั้งโต๊ะ (bench-top centrifuge) รุ่น D-7200 ของบริษัท GS, Germany
13. เครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดตั้งโต๊ะ (bench-top centrifuge) รุ่น KM-15200 ของบริษัท Kubota, Japan.
14. เครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดตั้งพื้น (centrifuge) รุ่น ของบริษัท Kubota, Japan.
15. ตู้อบแห้ง (Contherm digital series oven) ของบริษัท Contherm Scientific, New Zealand.
16. ไมโครปิเปต (micropipette) ขนาด 20, 100, 200, 1000 และ 5000 ไมโครลิตร ของบริษัท Gilson, France.
17. เครื่องปั่นผสม (vortex mixer) รุ่น G-560E ของบริษัท Scientific Industries, USA.

18. เครื่องระเหยแห้งแบบสูญญากาศ (rotary vacuum evaporator) รุ่น N ของบริษัท Tokyo Rikakikai, Japan.
19. เครื่องระเหยแห้งแบบสูญญากาศ (rotary vacuum evaporator) รุ่น N-N ของบริษัท Tokyo Rikakikai, Japan.
20. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (waterbath) ของบริษัท Tokyo Rikakikai, Japan.
21. กรวยแยก (separatory funnel) ขนาด 500 มล. ของบริษัท Sibata, Japan.
22. กระจกขีดยาพลาสติกขนาด 1, 5 และ 10 มล. ของบริษัท Nissho Nipro, Japan.
23. ชุดกรองสำเร็จรูปชนิด PTFE ขนาด 0.2 ไมโครเมตร รุ่น DISMIC-13JP ของบริษัท Tokyo Roshi Kaisha, Japan.
24. ชุดกรองสำเร็จรูปชนิดเซลลูโลสอะซีเตต ขนาด 0.45 ไมโครเมตร รุ่น DISMIC-25CS ของบริษัท Tokyo Roshi Kaisha, Japan.
25. แผ่นกรองชนิด FH ขนาด 0.5 ไมโครเมตร ของบริษัท Tokyo Roshi Kaisha, Japan.
26. Disposable micropipette . ของบริษัท E. Merck, Germany.
27. แผ่นอลูมิเนียมที่แอลซี (TLC aluminium sheet) เคลือบด้วย silica gel 60 F₂₅₄ ขนาด 20 × 20 ซม. ของบริษัท E. Merck, Germany.
28. แผ่นอลูมิเนียมที่แอลซี (PLC aluminium sheet) เคลือบด้วย silica gel 60 F₂₅₄ หน้า 1 มม. ขนาด 20 × 20 ซม. ของบริษัท E. Merck, Germany.
29. หลอดแสงอัลตราไวโอเล็ตช่วงความยาวคลื่น 215-250 นาโนเมตร (ultraviolet lamp) รุ่น UVGL-15 ของบริษัท UVP, USA.
30. เครื่องกำเนิดเสียงความถี่สูง (ultrasonicator) ชนิดอ่าง รุ่น FS4000 ของบริษัท Decan Ultrasonics, England.
31. ชุดเครื่องมือไฮเพอร์ฟอแมนซ์ลิควิดโครมาโตกราฟี (high performance liquid chromatography, HPLC)
 - 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.
 - กระจกขีดยาขนาดเล็ก (microsyringe) รุ่น MS-R50 ของบริษัท Exmire, USA.

32. ชุดเครื่องมือแมสสเปกโตรเมตรี (mass spectrometry, MS) รุ่น Trio 2000 ของบริษัท Fisons Instruments จำกัด, England.
33. ชุดเครื่องมือนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์ (nuclear magnetic resonance, NMR) ของบริษัท Bruker Spectrospin จำกัด, Switzerland.

เคมีภัณฑ์

1. อะซีแนพทิลีน (acenaphthylene) ของบริษัท Kanto Chemical, Japan
2. อะซีแนพทีน (acenaphthene) ของบริษัท Sigma, USA.
3. อะซีแนพทีนควิโนน (acenaphthenequinone) ของบริษัท Kanto Chemical, Japan
4. กรด แนพทาลีน 1,8-ไดคาร์บอกซิลิก (naphthalene-1,8-dicarboxylic acid) ของบริษัท Kanto Chemical, Japan
5. กรด 2,5-ไดไฮดรอกซีเบนโซอิก (2,5-dihydroxybenzoic acid) ของบริษัท Kanto Chemical, Japan
6. กรดโปรโตคาเทอิก (protocatechuic acid) ของบริษัท Kanto Chemical, Japan
7. กรดซาลิไซลิก (salicylic acid) ของบริษัท Kanto Chemical, Japan
8. กลีเซอรอล (glycerol) ของบริษัท Carlo ERBA, Italy.
9. ไดมethylซัลฟอกไซด์ (CH_3SOCH_3) ของบริษัท Carlo ERBA, Italy.
10. สารปฏิชีวนะกานามัยซิน (Kanamycin) ของบริษัท Nacalia tesque, Japan.
11. แบคโตอการ์ (bacto agar) ของบริษัท Difco Laboratories, USA.
12. แอมโมเนียมไนเตรด (NH_4NO_3) ของบริษัท BDH Chemicals, Australia.
13. ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟตไดเดคคะไฮเดรต ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$) ของบริษัท Carlo ERBA, Italy.
14. โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) ของบริษัท AJEX Chemicals, Australia.
15. แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) ของบริษัท Carlo ERBA, Italy.
16. เฟอริกคลอไรด์เฮกซะไฮเดรต ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) ของบริษัท May & Baker, England.
17. แคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรต ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) ของบริษัท AJEX Chemicals, Australia.
18. ทริปโตน (tryptone) ของบริษัท Difco Laboratories, USA.
19. ผงสกัดจากยีสต์ (yeast extract) ของบริษัท Difco Laboratories, USA.
20. โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ของบริษัท E. Merck, Germany.
21. โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ของบริษัท E. Merck, Germany.

22. กรดไฮโดรคลอริก (HCl) ของบริษัท BDH Chemicals, Australia.
23. เมทานอล (CH_3OH) ของบริษัท E. Merck, Germany.
24. เอทิลอะซิเตต ($\text{CH}_3\text{COOC}_2\text{H}_5$) ของบริษัท E. Merck, Germany.
25. โซเดียมซัลเฟตแอนไฮไดรต์ (anhydrous Na_2SO_4) ของบริษัท E. Merck, Germany.
26. นอร์มัลเฮกเซน (C_6H_{14}) ของบริษัท J.T. Baker, USA.
27. โทลูอีน ($\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_3$) ของบริษัท Carlo ERBA, Italy.
28. 1,4-ไดออกเซน ($\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_2$) Carlo ERBA, France.
29. กรดอะซิติกเข้มข้น (glacial CH_3COOH) ของบริษัท BDH Chemicals, Australia.
30. ซิลิกาเจล 60 (silica gel 60) ขนาด 0.063-0.2 มม. ของบริษัท E. Merck, Germany.



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิธีดำเนินงานวิจัย

3.1 แบคทีเรียและการเก็บรักษาแบคทีเรีย

3.1.1 แบคทีเรีย *Rhizobium* sp. CU-A1 และสายพันธุ์กลายของ *Rhizobium* sp. CU-A1 ที่เกิดจากการแทรกสอดของทรานสโปซอน Tn5 ที่ใช้ในงานวิจัยนี้ดังรายชื่อและความสามารถในการเจริญในแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ ดังแสดงในตารางที่ 3.1

3.1.2 การเก็บรักษาแบคทีเรีย

ถ่ายเชื้อ *Rhizobium* sp. CU-A1 จากอาหารแข็ง LB ลงในอาหารแข็ง CFMM ที่มีผลึกของอะซีแนพรีดีนบนฝาของจานอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นแหล่งคาร์บอน บ่มที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 3 วัน จากนั้นเขี่ยโคโลนีเดียวลงในอาหารเหลว CFMM ที่มีอะซีแนพรีดีนความเข้มข้น 600 มก.ต่อลิตร เลี้ยงเชื้อบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 วัน จากนั้นนำมาผสมกับกลีเซอรอลในอัตราส่วนน้ำเลี้ยงเชื้อต่อกลีเซอรอลเท่ากับ 3:7 แล้วบรรจุลงในหลอดเก็บเชื้อแช่แข็ง เก็บที่อุณหภูมิ -20 °C หรือ -70 °C

ในส่วน of สายพันธุ์กลายของ *Rhizobium* sp. CU-A1 สายพันธุ์ต่างๆ ทำโดยถ่ายเชื้อลงบนอาหารแข็ง CFMM ที่มีกรดโปรโตคาที่คูอิกความเข้มข้น 1 กรัมต่อลิตรและสารปฏิชีวนะกานามัยซินความเข้มข้น 30 มก.ต่อลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 3 วัน จากนั้นเขี่ยโคโลนีเดียวลงในอาหารเหลว CFMM ที่มีกรดโปรโตคาที่คูอิกความเข้มข้น 1 กรัมต่อลิตรและสารปฏิชีวนะกานามัยซินความเข้มข้น 30 มก.ต่อลิตร เลี้ยงเชื้อบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 วัน จากนั้นนำมาผสมกับกลีเซอรอลและเก็บที่อุณหภูมิ -20 °C หรือ -70 °C

ตารางที่ 3.1 สายพันธุ์กลายของ *Rhizobium* sp. CU-A1 และความสามารถในการเจริญในแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ (ธัญนุช เกรียงไกรพิพัฒน์, 2544) ที่ใช้ในงานวิจัยนี้

สายพันธุ์ <i>Rhizobium</i>	การเจริญในแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ					
	อะซีแนพธิดีน	อะซีแนพธิดีนควิโนน	แนพธาลีน-1,8-ไดคาร์บอกซิลิก	แนพธาลีน	กรดซาลิไซลิก	กรดเจนทิสิก
CU-A1	+	+	+	+	+	+
G12	-	+	+	+	+	+
G39	-	+	+	+	+	+
G101	-	+	+	+	+	+
G531	-	+	+	+	+	+
G62	-	+	+	-	-	-
H1	-	-	+	+	+	+
B1	-	-	-	+	+	+
B5	-	-	-	+	+	+
E11	-	-	-	+	+	+
E32	-	+	+	-	-	-
D1	-	+	+	-	-	-
D2	-	+	+	-	-	+
J1	-	+	+	-	-	+
A8	-	ND	ND	ND	ND	ND
A18	-	ND	ND	ND	ND	ND
A35	-	+	+	-	-	-
A49	-	ND	ND	ND	ND	ND
A53	-	+	+	-	-	-

หมายเหตุ + หมายถึงมีการเจริญ - หมายถึงไม่มีการเจริญ ND ไม่ได้ทำการทดลอง

3.2 การศึกษาการเจริญและวิเคราะห์สารมัธยันต์ที่สะสมจากการย่อยสลายอะซีแนพทิลีนโดยสายพันธุ์กลายของ *Rhizobium* sp. CU-A1

3.2.1 เตรียมหัวเชื้อของแบคทีเรีย โดยทำการถ่ายเชื้อจากหลอดแช่แข็งที่เก็บไว้ลงบนจานอาหาร CFMM ที่มีกรดโปรโตคาที่คูอิกความเข้มข้น 1 กรัมต่อลิตร และสารปฏิชีวนะกานามัยซิน ความเข้มข้น 30 มิลลิกรัมต่อลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 3 วัน จากนั้นเขี่ยโคโลนีเดี่ยวของสายพันธุ์กลายถ่ายลงในอาหารเหลว CFMM ปริมาตร 5 มล. ที่มีกรดโปรโตคาที่คูอิกความเข้มข้น 1 กรัมต่อลิตร และ สารปฏิชีวนะกานามัยซิน ความเข้มข้น 30 มิลลิกรัมต่อลิตร เลี้ยงเชื้อบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 24 ชม. แล้วถ่ายเชื้อลงในอาหารเหลว CFMM ปริมาตร 100 มล. ที่มีกรดโปรโตคาที่คูอิกความเข้มข้น 1 กรัมต่อลิตร และสารปฏิชีวนะกานามัยซินความเข้มข้น 30 มิลลิกรัมต่อลิตรในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มล. เลี้ยงเชื้อบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 24 ชม. จากนั้นแยกเซลล์ออกจากอาหารเหลวด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 10 นาที นำส่วนเซลล์แบคทีเรียมาล้างในสารละลาย 0.85% โซเดียมคลอไรด์ แล้วปั่นเหวี่ยงที่สภาวะเดิม ทำการทดลองในขั้นตอนนี้ซ้ำ 3 ครั้ง จากนั้นนำส่วนเซลล์มาแขวนลอยในอาหารเลี้ยงเชื้อ CFMM วัดความขุ่น (turbidity) ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร แล้วทำการถ่ายหัวเชื้อลงในอาหารเหลว CFMM ปริมาตร 5 มล. ที่มีอะซีแนพทิลีนความเข้มข้น 600 มิลลิกรัมต่อลิตร และสารปฏิชีวนะกานามัยซินความเข้มข้น 30 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้มีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตรเท่ากับ 1.0 เลี้ยงเชื้อบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 °C เก็บตัวอย่างทุกวัน เป็นเวลา 14 วันเพื่อศึกษาการเพิ่มจำนวนของแบคทีเรีย และวิเคราะห์สารมัธยันต์ที่สะสม เปรียบเทียบกับสายพันธุ์เดิม

3.2.2 วัดการเจริญของแบคทีเรียด้วยวิธี viable plate count โดยนำอาหารเหลวมาเจือจางด้วยสารละลาย 0.85% โซเดียมคลอไรด์ ให้มีความเข้มข้นที่เหมาะสม นำมาเกลี่ยบนอาหารแข็ง CFMM ที่มีกรดโปรโตคาที่คูอิก 1 กรัมต่อลิตรและสารปฏิชีวนะกานามัยซินความเข้มข้น 30 มิลลิกรัมต่อลิตรบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 3 วัน นับจำนวนโคโลนีที่เกิดขึ้น

3.2.3 นำอาหารเลี้ยงเชื้อมาทำการสกัดด้วยเอทิลอะซีเตตเพื่อวัดปริมาณอะซีแนพทิลีนที่เหลืออยู่โดยวิธี HPLC และวิเคราะห์สารมัธยันต์ที่เกิดขึ้นจากการย่อยสลายอะซีแนพทิลีนโดยวิธี TLC และ HPLC ทำโดยนำอาหารเหลวที่ทราบปริมาณแน่นอนมาปรับค่าความเป็นกรด-ด่างให้เท่ากับ 2.0-3.0 โดยการเติมกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น จากนั้นเติมเอทิลอะซีเตตปริมาตร 1 เท่า

ของน้ำเลี้ยงเชื้อลงในอาหารเหลว ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องปั่นผสมที่ความเร็วสูงเป็นเวลา 2 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้แยกชั้น จากนั้นแยกส่วนเอทิลอะซีเตตเก็บไว้ ทำการสกัดน้ำเลี้ยงเชื้อด้วยเอทิลอะซีเตตปริมาตร 1 เท่าของน้ำเลี้ยงเชื้อซ้ำอีกครั้งหนึ่ง รวมส่วนเอทิลอะซีเตตทั้งหมดเข้าด้วยกัน กำจัดน้ำที่ปนออกมาโดยการเติมโซเดียมซัลเฟตแอนไฮดรัส จากนั้นนำส่วนเอทิลอะซีเตตไประเหยแห้งด้วยเครื่องระเหยแห้งสูญญากาศแบบหมุนจนได้ตะกอนของสารมัธยันต์ เดิมเมทธานอลปริมาตร 0.5 มล. ลงไปละลายสารมัธยันต์ในขวดลดปริมาตร กรองผ่านชุดกรองสำเร็จรูปชนิด PTFE ขนาด 0.2 ไมโครเมตรใส่ลงในหลอดแก้วขนาดเล็ก เก็บที่อุณหภูมิ -20°C จนกว่าจะนำไปวิเคราะห์ ปริมาณอะซีแนพริลีนที่เหลืออยู่โดยวิธี HPLC และวิเคราะห์สารมัธยันต์ที่เกิดขึ้นจากการย่อยสลายอะซีแนพริลีนต่อไป

3.2.4 การวิเคราะห์ปริมาณอะซีแนพริลีนที่เหลือและวิเคราะห์สารมัธยันต์ที่เกิดขึ้นจากการย่อยสลายอะซีแนพริลีนโดยวิธี HPLC

เตรียมชุดสารมาตรฐานของอะซีแนพริลีนโดยละลายอะซีแนพริลีนในอาหารเหลว CFMM ให้ได้ความเข้มข้น 0,100, 200,300, 400,500, 600,700, 800,900, 1000 มก.ต่อลิตร จากนั้นทำการสกัดด้วยเอทิลอะซีเตตตามขั้นตอนในข้อ 3.2.3 นำชุดสารมาตรฐานและชุดทดลองมาวิเคราะห์หาปริมาณอะซีแนพริลีนโดยวิธี HPLC ซึ่งมีส่วนประกอบต่างๆ ดังนี้

เครื่องลิควิดโครมาโตกราฟีรุ่น LC-3A ใช้คอลัมน์ Senshu Pak Pegasil ODS ขนาด 4.6×150 มม. ตั้งอุณหภูมิของคอลัมน์ที่ 40°C ตรวจสอบการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 275 นาโนเมตร โดยใช้สารละลายตัวพาเป็นสารละลายเมทธานอล 80% ในน้ำ (ภาคผนวก ก.) และใช้อัตราการไหลเท่ากับ 1 มล.ต่อนาที ฉีดสารละลายตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์ปริมาตร 20 ไมโครลิตรด้วยกระบอกฉีดขนาดเล็กรุ่น MS-100 นำพื้นที่ได้กราฟที่ได้จากการวิเคราะห์ตัวอย่างไปคำนวณหาปริมาณอะซีแนพริลีนโดยใช้กราฟมาตรฐานที่ได้จากชุดสารมาตรฐาน กราฟมาตรฐานแสดงในภาคผนวก ค. รูปที่ ค. 1

3.2.5 การวิเคราะห์สารมัธยันต์ที่เกิดขึ้นจากการย่อยสลายอะซีแนพริลีนโดยวิธี TLC

นำสารละลายตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์ที่ผ่านการสกัดด้วยเอทิลอะซีเตตดังวิธีในข้อ 3.2.3 ปริมาตร 5-10 ไมโครลิตรมาจุดลงบนแผ่น TLC ขนาดกว้าง 8×8 ซม. โดยใช้ระบบตัวทำละลาย (solvent system) เป็นโทลูอีน : 1,4-ไดออกเซน : กรดอะซีติกเข้มข้น ในอัตราส่วน 90:25:4 (ปริมาตรต่อปริมาตรต่อปริมาตร) ตรวจสอบสารมัธยันต์ภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ตช่วงความยาวคลื่น 215-250 นาโนเมตร

3.3 การแยกสารมัธยันต์ที่สะสมจากการย่อยสลายอะซีแนฟทีนโดยสายพันธุ์กลายต่างๆ ของ *Rhizobium* sp. CU-A1 ให้บริสุทธิ์โดยวิธี preparative TLC และ ซิลิกาเจลคอลัมน์โครมาโตกราฟี

3.3.1 เตรียมหัวเชื้อของแบคทีเรียเช่นเดียวกับขั้นตอนในข้อ 3.2.1 แล้วถ่ายหัวเชื้อลงในอาหารเหลว CFMM ปริมาตร 1000 มล. ที่มีอะซีแนฟทีนความเข้มข้น 600 มิลลิกรัมต่อลิตร และ สารปฏิชีวนะกานามัยซินความเข้มข้น 30 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้มีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตรเท่ากับ 1.0 เลี้ยงเชื้อบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 °C เมื่อครบตามกำหนดเวลาที่เหมาะสม นำอาหารเลี้ยงเชื้อมาทำการสกัดด้วยเอทิลอะซีเตตเช่นเดียวกับขั้นตอนในข้อ 3.2.3 จากนั้นนำส่วนที่สกัดได้มาทำให้บริสุทธิ์ต่อไป

3.3.2 การแยกสารมัธยันต์ให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี preparative TLC โดยนำสารละลายตัวอย่างในเมทานอลที่ต้องการทำให้บริสุทธิ์มาจุดให้เป็นแนวลงบนแผ่น PLC ที่เคลือบด้วยซิลิกาเจล 60 หนา 1 มม. โดยใช้ระบบตัวทำละลายเป็น เฮกเซน : เอทิลอะซีเตต : กรดอะซีติกเข้มข้น ในอัตราส่วน 10:10:1 (ปริมาตรต่อปริมาตรปริมาตร) ตรวจหาสารมัธยันต์ภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ตช่วงความยาวคลื่น 215-250 นาโนเมตร จากนั้นจุดแถบของซิลิกาเจลที่มีตัวอย่างที่ต้องการออกมาสกัดด้วยเอทิลอะซีเตตที่อุณหภูมิ 250 มล. แยกส่วนเอทิลอะซีเตตเก็บไว้ ทำการสกัดผงซิลิกาเจลด้วยเอทิลอะซีเตตปริมาตร 250 มล. อีกครั้งหนึ่ง รวมส่วนเอทิลอะซีเตตทั้งหมดเข้าด้วยกัน กำจัดน้ำที่ปนออกมาโดยการผ่านคอลัมน์ที่บรรจุด้วยไซเดียมซัลเฟตแอนไฮดรัส นำส่วนเอทิลอะซีเตตไประเหยแห้งด้วยเครื่องระเหยแห้งสูญญากาศแบบหมุนจนได้ตะกอนของสารมัธยันต์ เติมนเมทานอลปริมาตร 5 มล. ลงไปละลายสารมัธยันต์ในขวดลดปริมาตร กรองผ่านชุดกรองสำเร็จรูปชนิด PTFE ขนาด 0.2 ไมโครเมตรใส่ลงในหลอดแก้วขนาดเล็ก เก็บที่อุณหภูมิ -20 °C นำไปตรวจสอบความบริสุทธิ์ของสารมัธยันต์ด้วยวิธี TLC ดังวิธีการในข้อ 3.2.5 และวิธี HPLC ดังวิธีการในข้อ 3.2.4

3.3.3 การแยกสารมัธยันต์ให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีซิลิกาเจลคอลัมน์โครมาโตกราฟี

เตรียมคอลัมน์ โดยแขวนลอยซิลิกาเจล 60 ขนาด 0.063-0.2 มม. ปริมาณ 10 กรัม ลงในเฮกเซน แล้วนำมาบรรจุลงในคอลัมน์ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1 ซม. ยาว 30 ซม. หลังจากบรรจุเสร็จทำการล้างคอลัมน์ด้วยเฮกเซนปริมาตร 100 มล.

เตรียมตัวอย่าง โดยนำส่วนสกัดที่ต้องการทำให้บริสุทธิ์มาผสมกับซิลิกาเจลปริมาณ 3 กรัม จากนั้นนำไประเหยแห้งด้วยเครื่องระเหยแห้งสูญญากาศแบบหมุน เติมหกเซนปริมาตรเล็ก

น้อยลงไปละลาย แล้วนำมาบรรจุลงในคอลัมน์ที่เตรียมไว้ ชะคอลัมน์ด้วยตัวทำละลายปริมาตร 100 มล. ตามลำดับดังนี้

100%	เฮกเซน
90%	เฮกเซนในเอทิลอะซีเตต
80%	เฮกเซนในเอทิลอะซีเตต
70%	เฮกเซนในเอทิลอะซีเตต
60%	เฮกเซนในเอทิลอะซีเตต
50%	เฮกเซนในเอทิลอะซีเตต
40%	เฮกเซนในเอทิลอะซีเตต
30%	เฮกเซนในเอทิลอะซีเตต
20%	เฮกเซนในเอทิลอะซีเตต
10%	เฮกเซนในเอทิลอะซีเตต
0%	เอทิลอะซีเตต

เก็บแต่ละลำดับส่วนที่ชะได้ลงในขวดรูปชมพู่ นำไประเหยแห้งโดยเครื่องระเหยแห้งสูญญากาศแบบหมุน แล้วละลายสารมัธยันต์ที่ได้ด้วยเมทานอลในขวดลดปริมาตร กรองผ่านชุดกรองสำเร็จรูปชนิด PTFE ขนาด 0.2 ไมโครเมตรใส่ลงในหลอดแก้วขนาดเล็ก เก็บที่อุณหภูมิ -20°C นำสารมัธยันต์ในแต่ละลำดับส่วนไปตรวจสอบความบริสุทธิ์ด้วยวิธี TLC ดังวิธีการในข้อ 3.2.5 และวิธี HPLC ดังวิธีการในข้อ 3.2.4

3.4 การพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารมัธยันต์ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ด้วยแมสสเปกโตรเมทรี (MS) และ นิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์ (NMR)

3.4.1 นำสารมัธยันต์ที่เตรียมได้มาทำให้บริสุทธิ์ต่อไปพร้อมทั้งพิสูจน์เอกลักษณ์โดย MS ด้วยเทคนิค Electron Impact (EI) ที่ 70 eV เปรียบเทียบมวลโมเลกุลและรูปแบบการแตกตัวของสารมัธยันต์ที่สะสมจากการย่อยสลายอะซีแนฟทิลีนโดยเชื้อสายพันธุ์กลายเทียบกับสารมัธยันต์มาตรฐานต่างๆ

3.4.2 นำสารมัธยันต์ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้วมาทำการพิสูจน์เอกลักษณ์โดย NMR ใช้ CDCl_3 เป็นตัวทำละลาย วิเคราะห์ $^1\text{H-NMR}$ ที่ 200 MHz และ $^{13}\text{C-NMR}$ ที่ 50 MHz โดยใช้สัญญาณจากตัวทำละลายเป็นพีคอ้างอิง และรายงานผลเป็นค่าเคมีคัล ชิฟต์ในหน่วย พีพีเอ็ม (ppm)

การวิเคราะห์ในส่วนนี้ทำโดยภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ภายใต้ความอนุเคราะห์ของ รศ.ดร.อมร เพชรสม

3.5 ความสามารถในการเจริญของสายพันธุ์กลายของ *Rhizobium* sp. CU-A1 ในอาหารที่มีสารมัธยันต์จากการย่อยสลายอะซีแนพรีลินที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้วเป็นแหล่งคาร์บอน

3.5.1 เตรียมหัวเชื้อของแบคทีเรียเช่นเดียวกับขั้นตอนในข้อ 3.2.1 แล้วถ่ายหัวเชื้อลงในอาหารเหลว CFMM ปริมาตร 2.5 มล. ที่มีสารมัธยันต์จากการย่อยสลายอะซีแนพรีลินที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้วความเข้มข้น 300 มก.ต่อลิตรและสารปฏิชีวนะกานามัยซินความเข้มข้น 30 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้มีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตรเท่ากับ 1.0 เลี้ยงเชื้อบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 °C เก็บตัวอย่างทุก 2 วัน เป็นเวลา 8 วัน

3.5.2 นำตัวอย่างจากข้อ 3.5.1 มาวัดการเจริญของแบคทีเรียด้วยวิธี viable plate count เช่นเดียวกับวิธีในข้อ 3.2.2

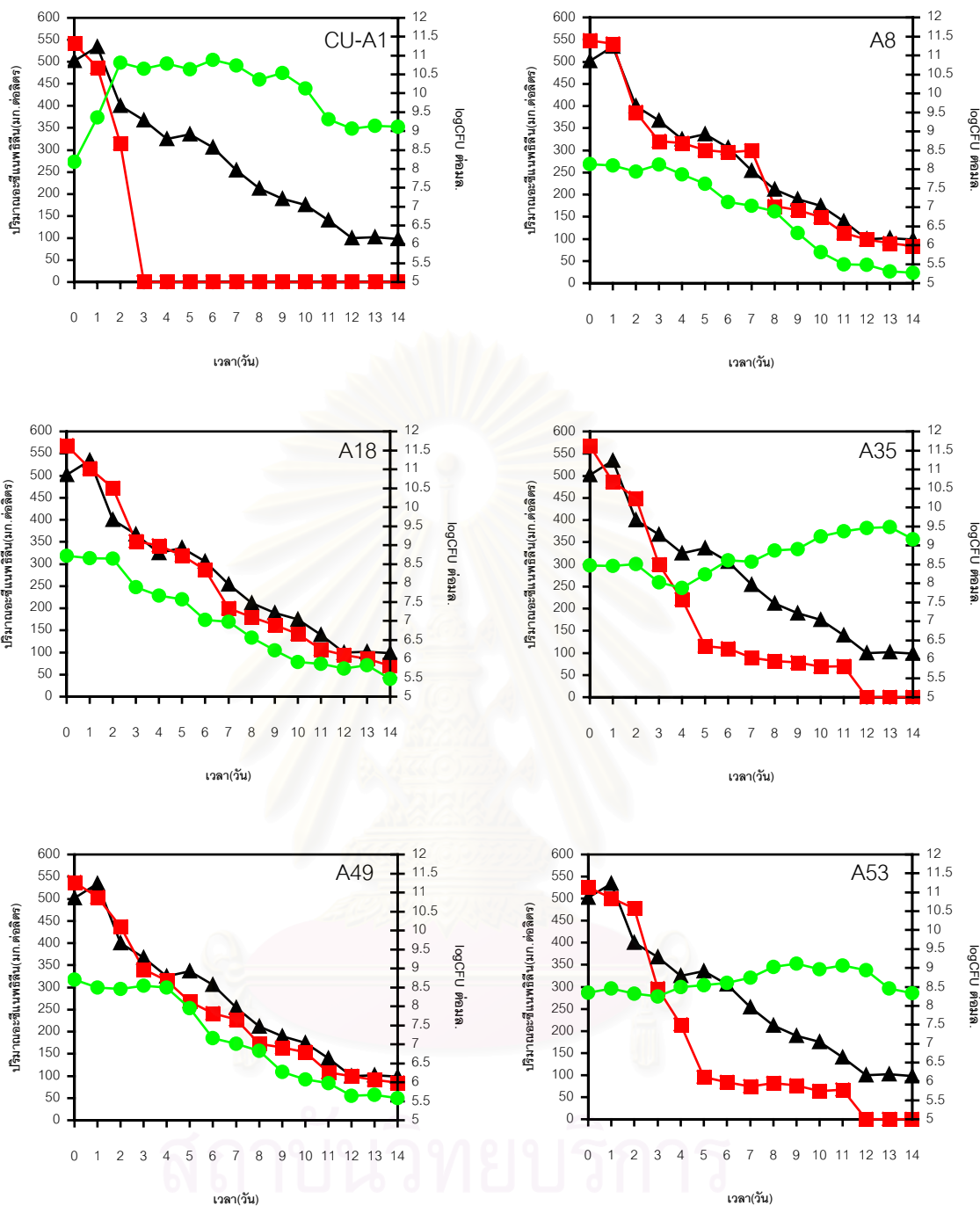
3.5.3 นำตัวอย่างจากข้อ 3.5.1 มาสกัดด้วยเอทิลอะซิเตตเช่นเดียวกับวิธีในข้อ 3.2.3 แล้ววัดปริมาณแหล่งคาร์บอนที่เหลืออกอยู่โดยวิธี HPLC หาเปอร์เซ็นต์ของแหล่งคาร์บอนที่ลดลงเปรียบเทียบกับในวันเริ่มต้น และวิเคราะห์สารมัธยันต์ที่เกิดขึ้นจากการย่อยสลายแหล่งคาร์บอนนั้นโดยวิธี TLC และ HPLC

บทที่ 4

ผลการทดลอง

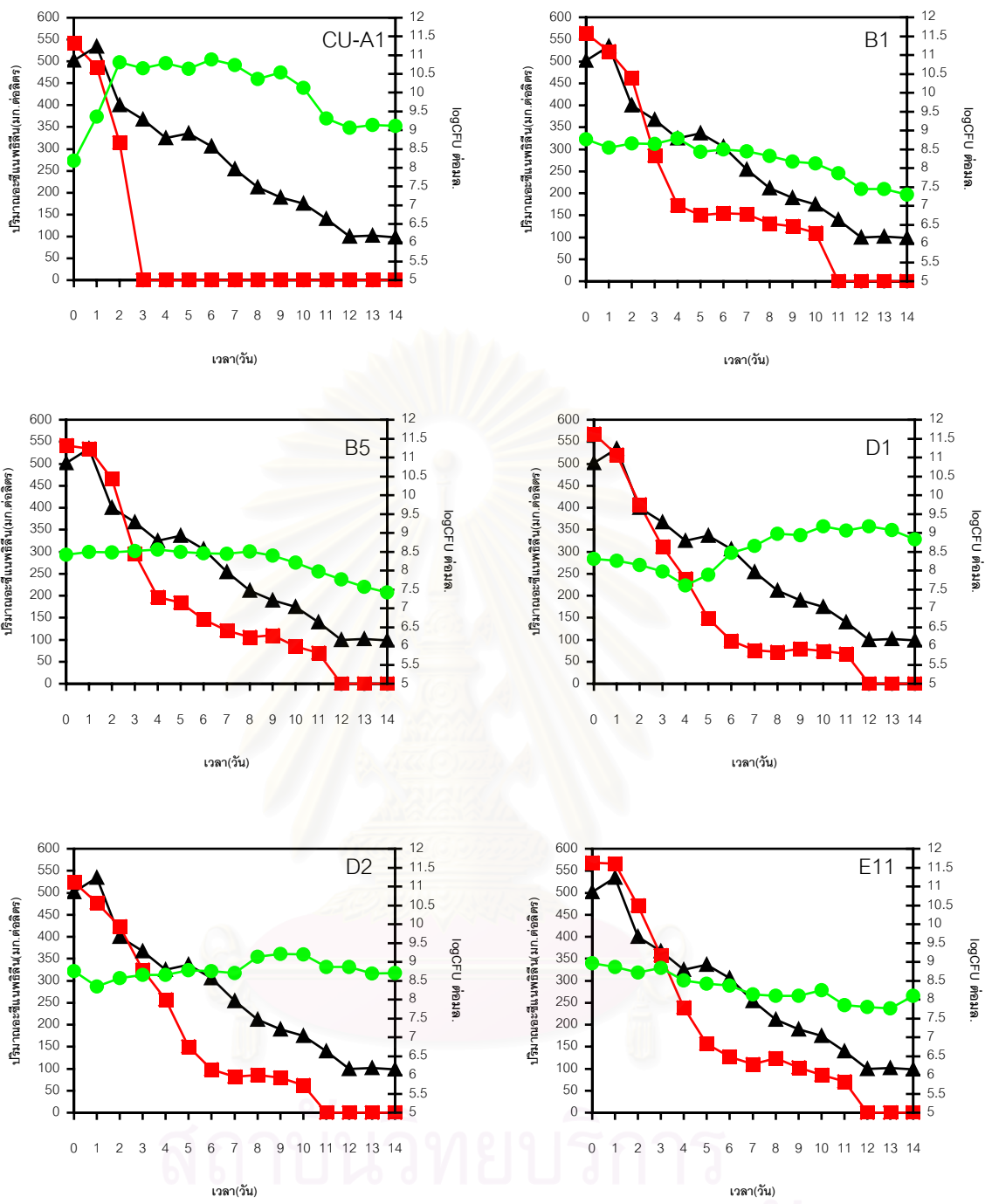
4.1 ศึกษาการเจริญและวิเคราะห์สารมัธยันต์ที่สะสมจากการย่อยสลายอะซีแนพริลีนโดยสายพันธุ์กลายของ *Rhizobium* sp. CU-A1

จากผลงานวิจัยของธัญนุช เกரியงไกรพิพัฒน์ (2544) ที่ได้ทำการกลายพันธุ์ *Rhizobium* sp. CU-A1 ด้วยทรานสโปซอน Tn5 ทำให้ได้สายพันธุ์กลายชนิดต่างๆ ที่มีความบกพร่องในการย่อยสลายอะซีแนพริลีน งานวิจัยนี้จึงได้นำสายพันธุ์กลายดังกล่าวจำนวน 18 สายพันธุ์คือ A8, A18, A35, A49, A53, B1, B5, D1, D2, E11, E32, G12, G39, G62, G101, G531, H1 และ J1 มาเลี้ยงในอาหารเหลว CFMM ที่มีอะซีแนพริลีนความเข้มข้น 600 มก.ต่อลิตร เพื่อศึกษารูปแบบการเจริญและความสามารถในการย่อยสลายอะซีแนพริลีนเพื่อใช้เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงานในการเจริญเปรียบเทียบกับ *Rhizobium* sp. CU-A1 ซึ่งเป็นสายพันธุ์เดิม พบว่า *Rhizobium* sp. สายพันธุ์กลายแต่ละสายพันธุ์มีรูปแบบในการเจริญและความสามารถในการย่อยสลายอะซีแนพริลีนแตกต่างกันไปเมื่อเทียบกับ *Rhizobium* sp. CU-A1 ที่สามารถย่อยสลายอะซีแนพริลีนจนไม่สามารถวิเคราะห์ปริมาณอะซีแนพริลีนที่เหลืออยู่ได้ภายในระยะเวลา 3 วัน ของการเลี้ยงเชื้อและพบว่าการเจริญของเชื้อสอดคล้องกัน ดังแสดงผลการทดลองในรูปที่ 4.1 ก. ถึง 4.1 ง.



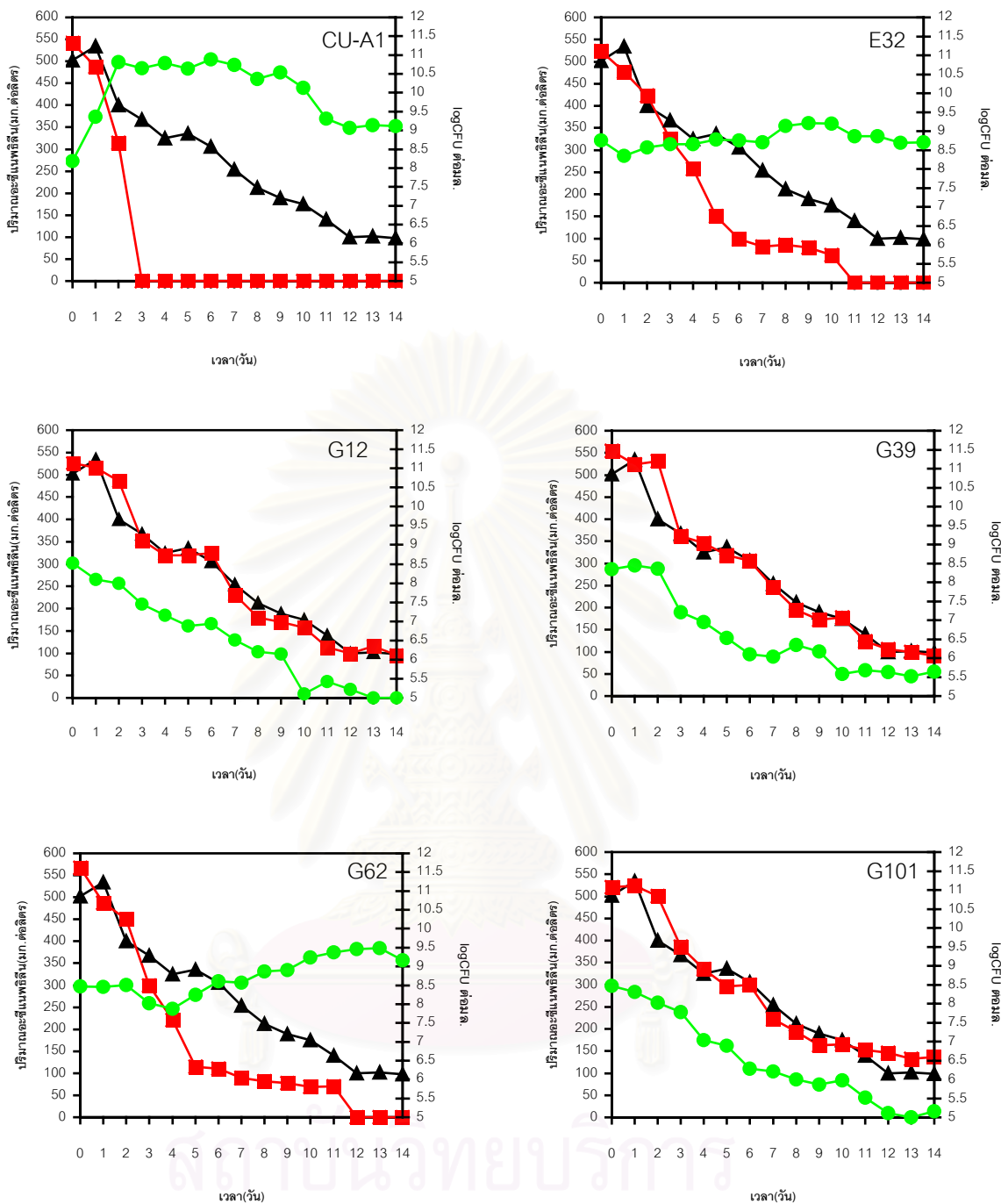
- ▲ ปริมาณอะซีแนฟทอลีนในชุดควบคุมที่ไม่เติมเชื้อ
- ปริมาณอะซีแนฟทอลีนในชุดทดลองที่เติมเชื้อ
- จำนวนแบคทีเรียในชุดทดลองที่เติมเชื้อ

รูปที่ 4.1 ก. การเจริญของสายพันธุ์กลาย *Rhizobium* sp. A8, A18, A35, A49 และ A53 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM ที่มีอะซีแนฟทอลีนเข้มข้น 600 มก.ต่อลิตร เปรียบเทียบกับ *Rhizobium* sp. CU-A1



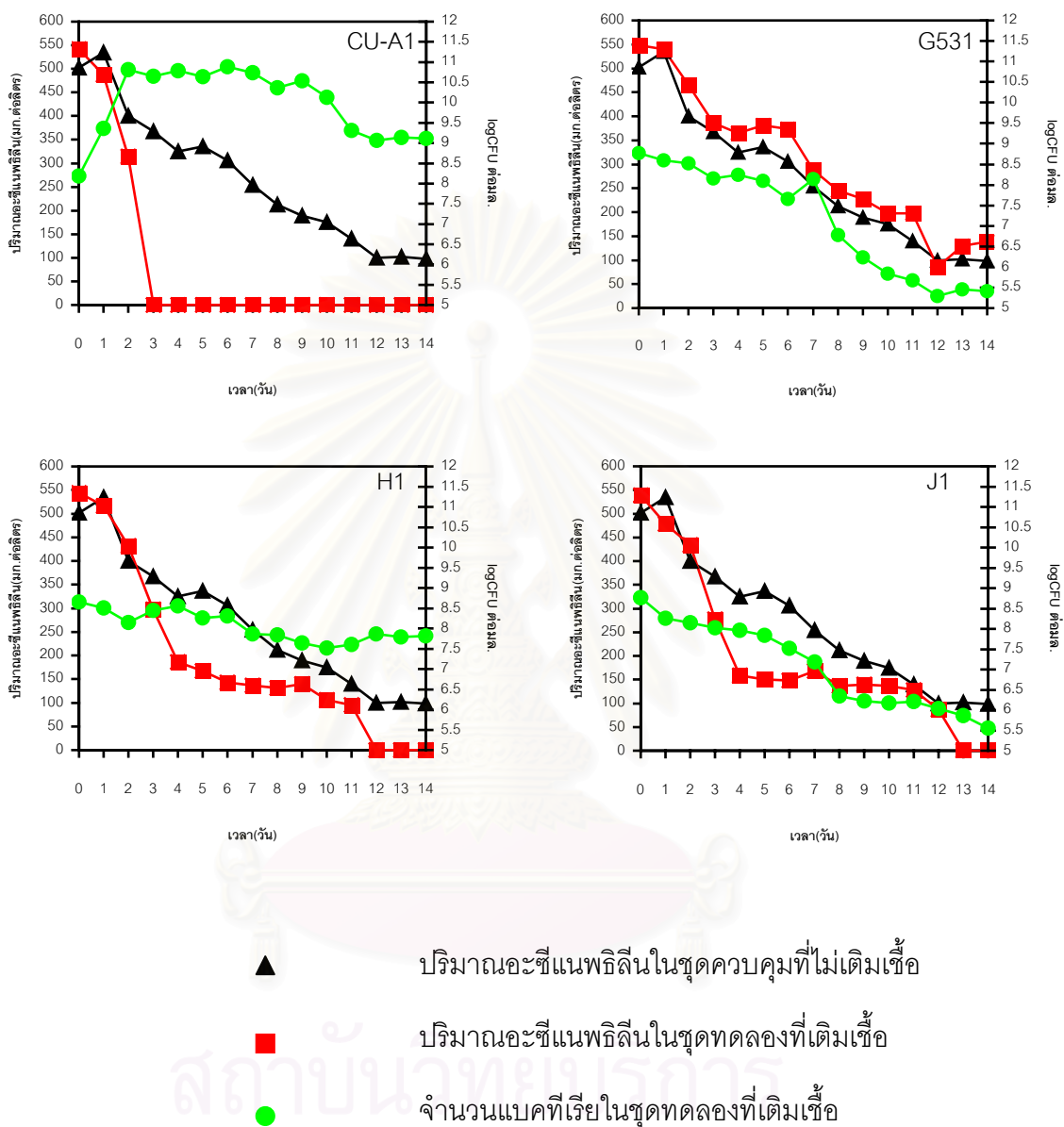
- ▲ ปริมาณอะซีแนฟิดีนในชุดควบคุมที่ไม่เติมเชื้อ
- ปริมาณอะซีแนฟิดีนในชุดทดลองที่เติมเชื้อ
- จำนวนแบคทีเรียในชุดทดลองที่เติมเชื้อ

รูปที่ 4.1 ข. การเจริญของสายพันธุ์กลาย *Rhizobium* sp. B1, B5, D1, D2 และ E11 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM ที่มีอะซีแนฟิดีนเข้มข้น 600 มก.ต่อลิตร เปรียบเทียบกับ *Rhizobium* sp. CU-A1



- ▲ ปริมาณอะซีแนฟิธินในชุดควบคุมที่ไม่เติมเชื้อ
- ปริมาณอะซีแนฟิธินในชุดทดลองที่เติมเชื้อ
- จำนวนแบคทีเรียในชุดทดลองที่เติมเชื้อ

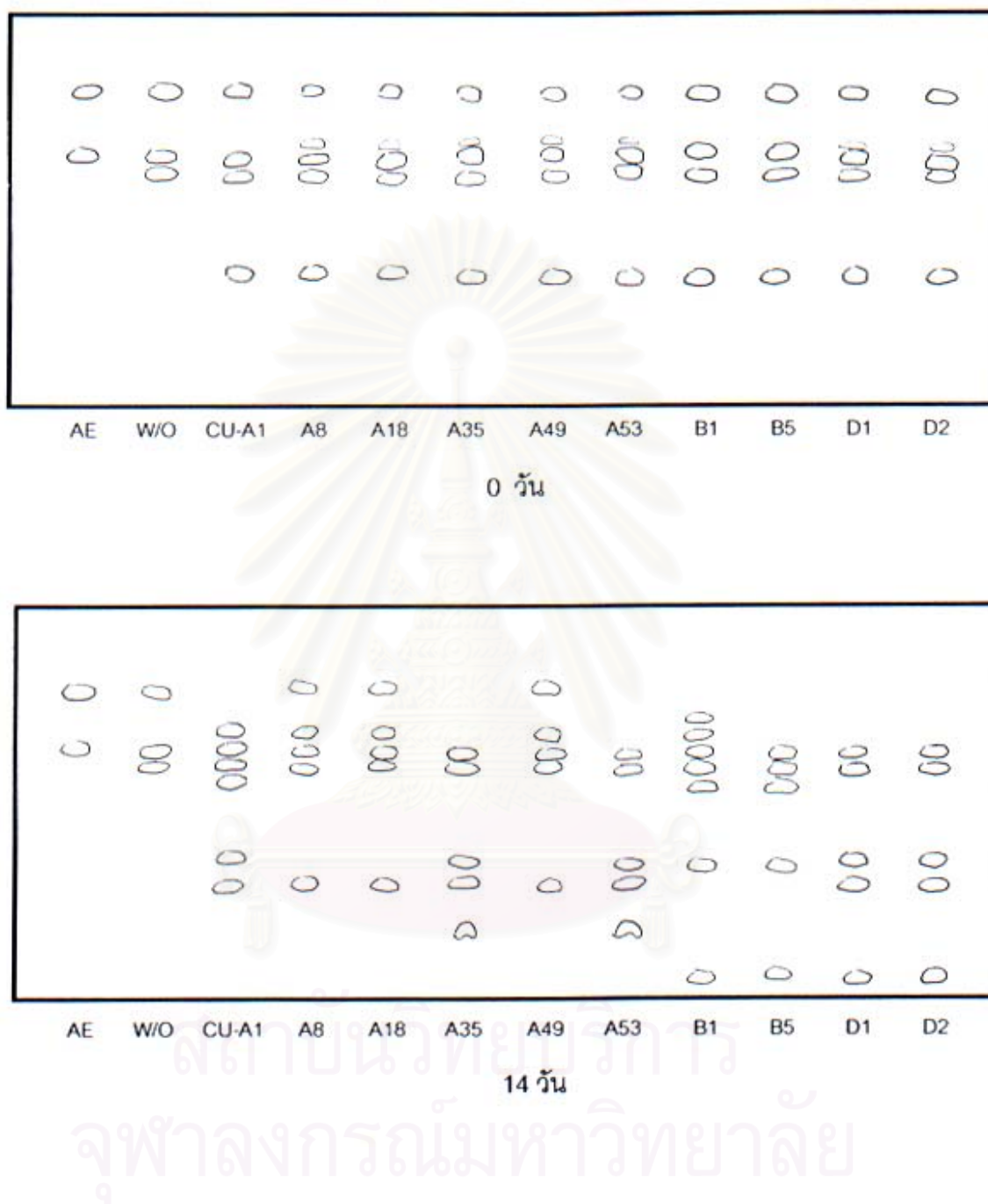
รูปที่ 4.1 ค. การเจริญของสายพันธุ์กลาย *Rhizobium* sp. E32, G12, G39, G62 และ G101 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM ที่มีอะซีแนฟิธินเข้มข้น 600 มก.ต่อลิตร เปรียบเทียบกับ *Rhizobium* sp. CU-A1



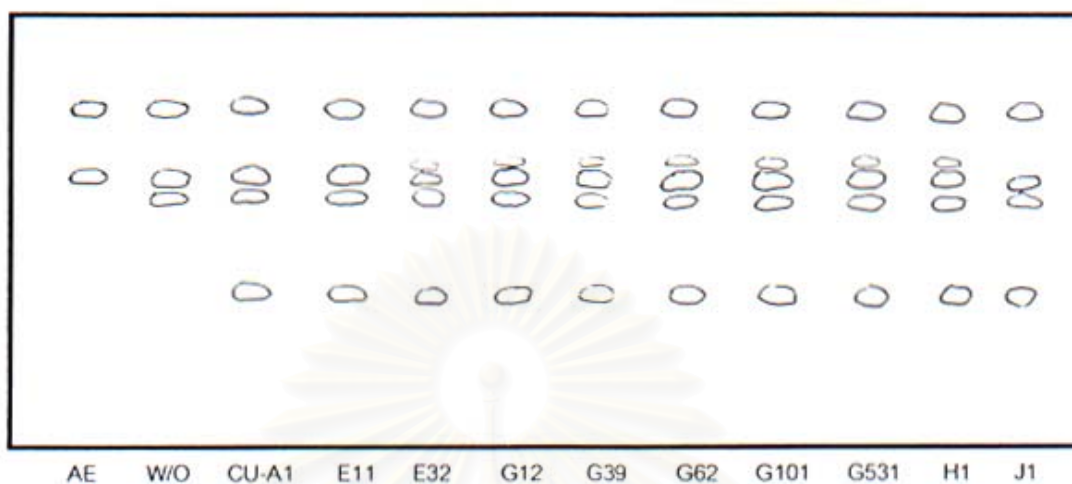
รูปที่ 4.1 ง. การเจริญของสายพันธุ์กลาย *Rhizobium* sp. G531, H1 และ J1 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM ที่มีอะซีแนพิดีนเข้มข้น 600 มก.ต่อลิตร เปรียบเทียบกับ *Rhizobium* sp. CU-A1

งานวิจัยนี้ได้วิเคราะห์สารมัธยันต์ที่สะสมในอาหารเลี้ยงเชื้อเนื่องจากการย่อยสลายอะซีแนพริลีนโดยสายพันธุ์กลายทั้ง 18 สายพันธุ์เปรียบเทียบกับ *Rhizobium* sp. โดยวิธี TLC ตามวิธีการทดลองในข้อ 3.2.5 ได้ข้อมูลดังแสดงในภาคผนวก ง รูปที่ ง.1 ถึงรูปที่ ง.8 และเมื่อเปรียบเทียบ TLC โคโรมาโตแกรมของสารมัธยันต์ที่สะสมโดยสายพันธุ์ CU-A1 กับสายพันธุ์กลายแต่ละสายพันธุ์เมื่อเลี้ยงเป็นเวลา 14 วัน ดังแสดงในรูปที่ 4.2 ก. และ 4.2 ข. พบว่าแต่ละสายพันธุ์กลายมีการสะสมสารมัธยันต์ที่ค่อนข้างแตกต่างกัน และพบว่ามีหลายสารมัธยันต์ที่แตกต่างจากชนิดที่สะสมโดย *Rhizobium* sp. CU-A1

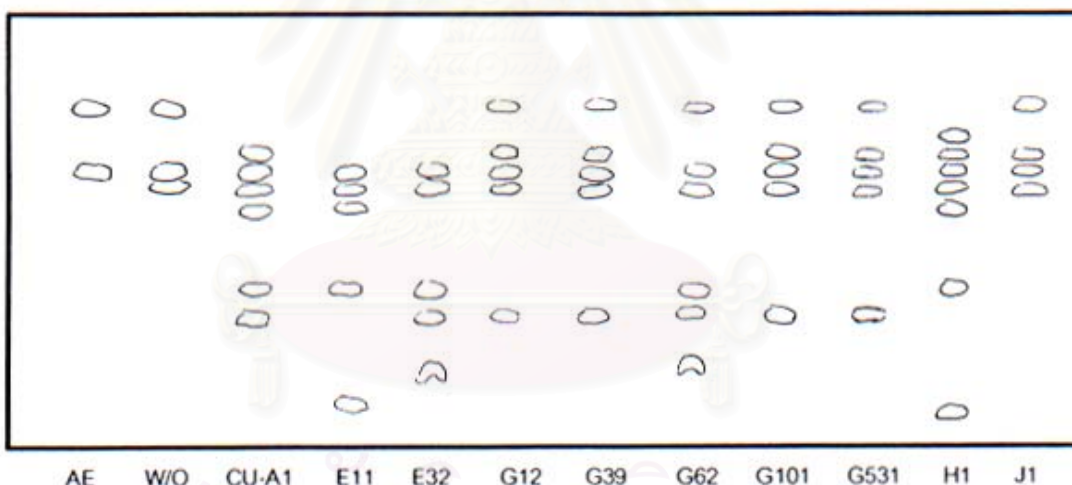
นอกจากนี้ยังได้วิเคราะห์การย่อยสลายอะซีแนพริลีนโดยสายพันธุ์กลายและสายพันธุ์ CU-A1 ด้วยวิธี HPLC ตามวิธีการทดลองในข้อ 3.2.6 ได้โคโรมาโตแกรมแสดงสารมัธยันต์ที่สะสมจากการย่อยสลายอะซีแนพริลีนโดยสายพันธุ์กลายที่ระยะเวลาต่างๆ กัน ดังแสดงในภาคผนวก ง รูปที่ ง. 9 ถึงรูปที่ ง. 26 และเมื่อเปรียบเทียบ HPLC โคโรมาโตแกรมของสารมัธยันต์ที่สะสมจากการย่อยสลายอะซีแนพริลีนโดยสายพันธุ์กลายและสายพันธุ์ CU-A1 ในวันที่ 14 ดังแสดงในรูปที่ 4.3 ก. ถึงรูปที่ 4.3 ค. พบว่าสายพันธุ์ CU-A1 ย่อยอะซีแนพริลีนแล้วปรากฏ peak ของสารมัธยันต์หลายชนิด ขณะที่สายพันธุ์กลายหลายสายพันธุ์ ได้แก่สายพันธุ์ A35, A53, B1, B5, D1, D2, E11, E32, H1, J1 และ G62 สะสมสารมัธยันต์ที่ปรากฏยอดที่ค่า retention time ต่างจากที่พบในสายพันธุ์เดิม



รูปที่ 4.2 ก. TLC โคโรมาโตแกรมของสารมัธยันต์ที่สะสมจากการย่อยสลายอะซีแนพรีลินในวันที่ 0 และวันที่ 14 โดย *Rhizobium* sp. A8, A18, A35, A49, A53, B1, B5, D1 และ D2 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM ที่มีอะซีแนพรีลินความเข้มข้น 600 มก.ต่อลิตร เปรียบเทียบกับ *Rhizobium* sp. CU-A1 (AE คืออะซีแนพรีลิน, W/O คืออาหารเหลวที่ไม่มีการเติมเชื้อ)



0 วัน

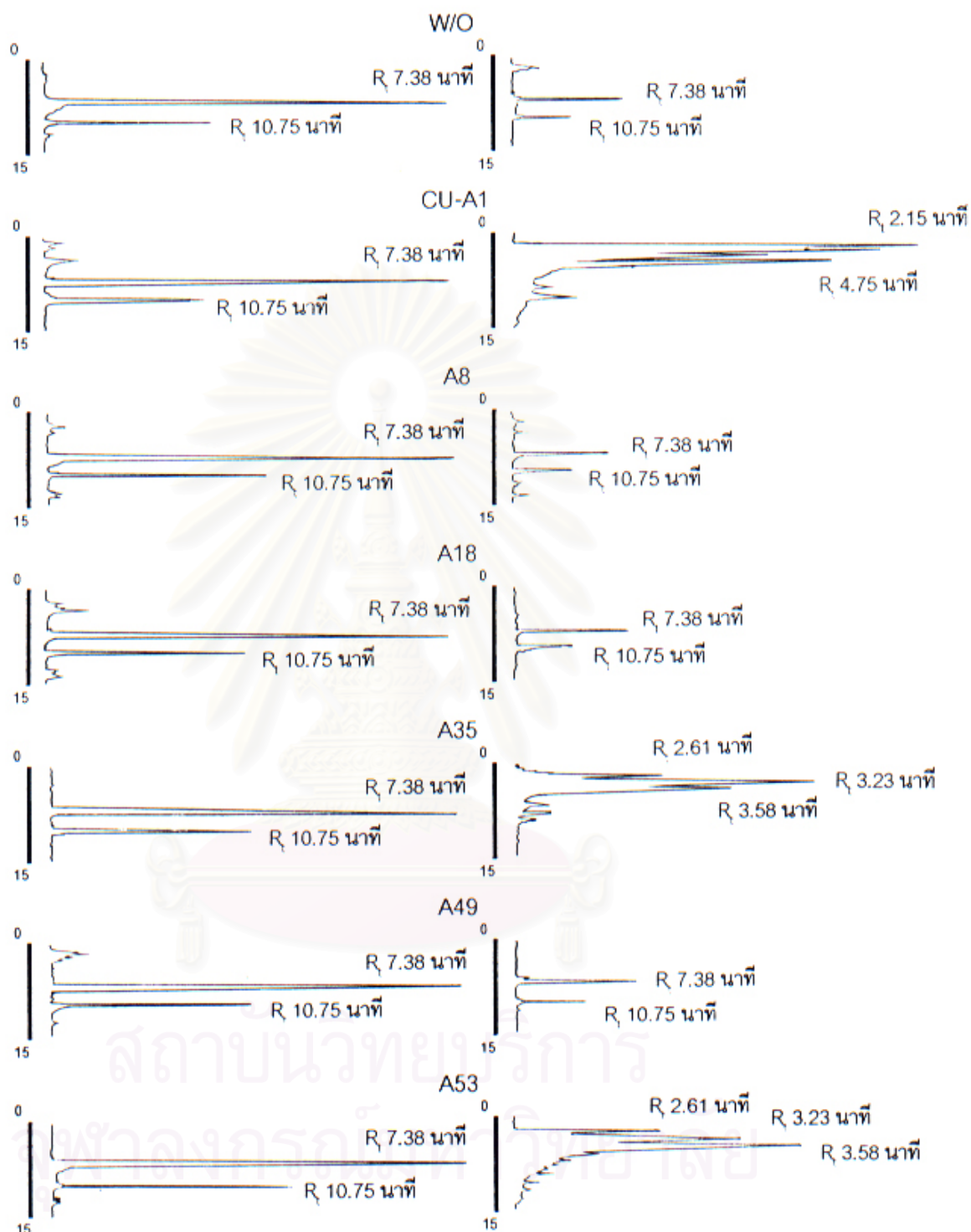


14 วัน

รูปที่ 4.2 ข. TLC โครมาโตแกรมของสารมัธยันต์ที่สะสมจากการย่อยสลายอะซีแนฟธิลีนในวันที่ 0 และวันที่ 14 โดย *Rhizobium* sp. E11, E32, H1, J1, G12, G39, G62, G101 และ G531 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ CFMM ที่มีอะซีแนฟธิลีนความเข้มข้น 600 มก.ต่อลิตร เปรียบเทียบกับ *Rhizobium* sp. CU-A1 (AE คืออะซีแนฟธิลีน, W/O คืออาหารเหลวที่ไม่มีการเติมเชื้อ)

0 วัน

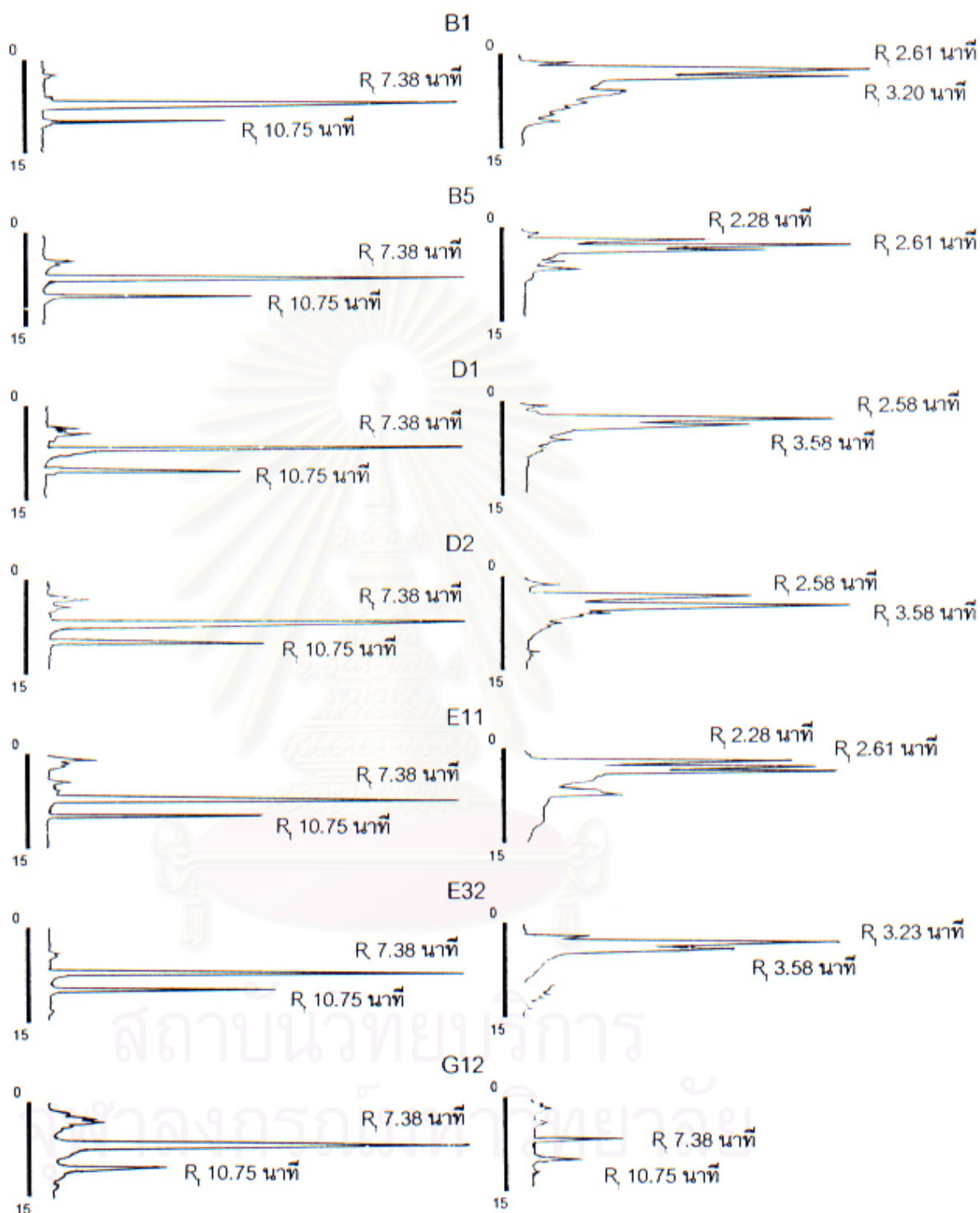
14 วัน



รูปที่ 4.3 ก. HPLC โคโรมาโตแกรมของสารนิจิฟิดีนที่สะสมจากการย่อยสลายอะซีแอฟิธินในวันที่ 0 และวันที่ 14 โดย *Rhizobium* sp. A8, A18, A35, A49 และ A53 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ CFMM ที่มีอะซีแอฟิธินความเข้มข้น 600 มก.ต่อลิตร เปรียบเทียบกับ *Rhizobium* sp. CU-A1 (W/O คืออาหารเหลวที่ไม่มีการเติมเชื้อ, R_t 7.38 นาทีคืออะซีแอฟิธิน)

0 วัน

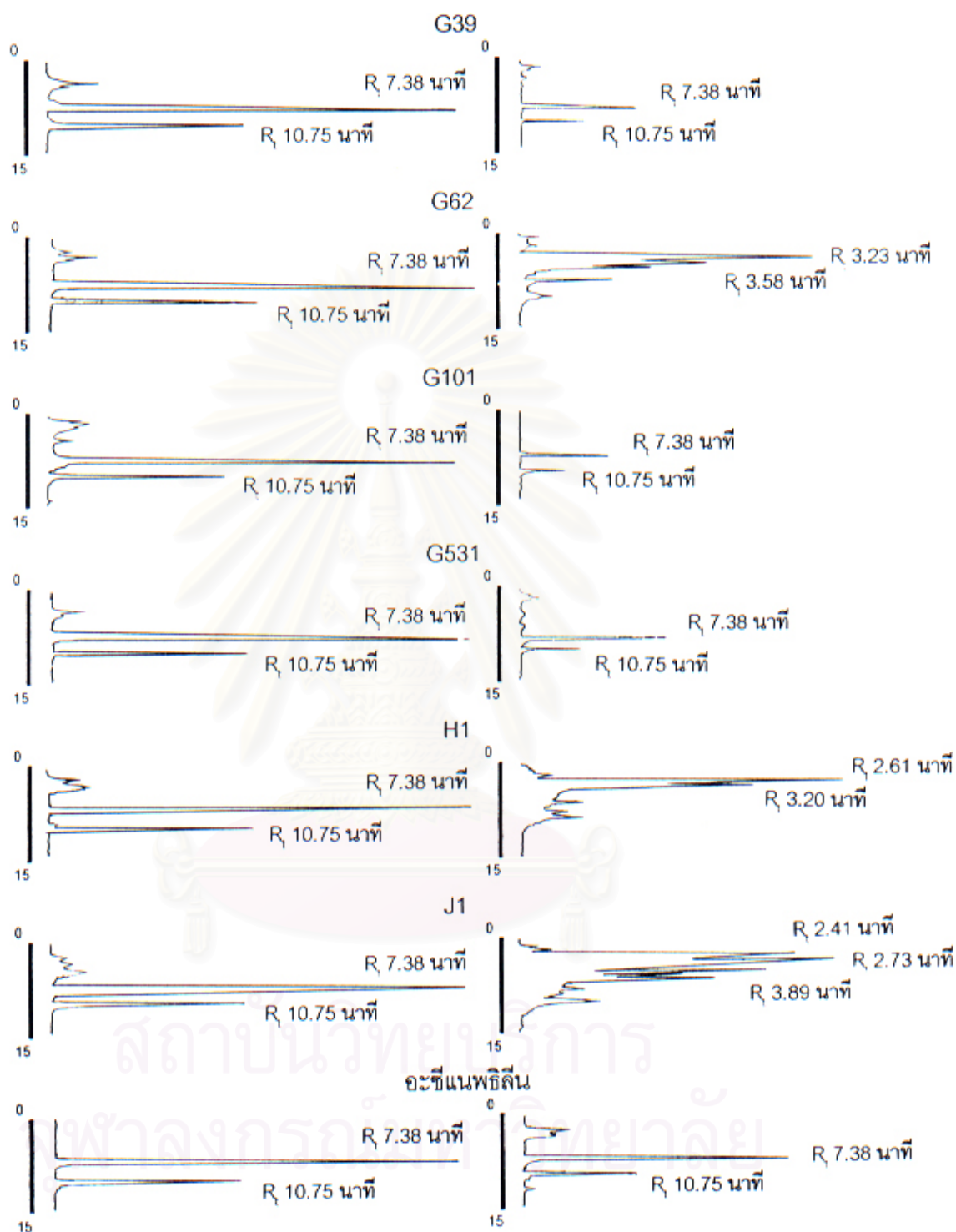
14 วัน



รูปที่ 4.3 ข. HPLC โคโรมาโตแกรมของสารนัฟิเดอีนที่สะสมจากการย่อยสลายอะซีแนฟิเดอีนในวันที่ 0 และวันที่ 14 โดย *Rhizobium* sp. B1, B5, D1, D5, E11, E32 และ G12 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ CFMM ที่มีอะซีแนฟิเดอีนความเข้มข้น 600 มก.ต่อลิตร เปรียบเทียบกับ *Rhizobium* sp. CU-A1 (W/O คืออาหารเหลวที่ไม่มีการเติมเชื้อ, R_t 7.38 นาทีคืออะซีแนฟิเดอีน)

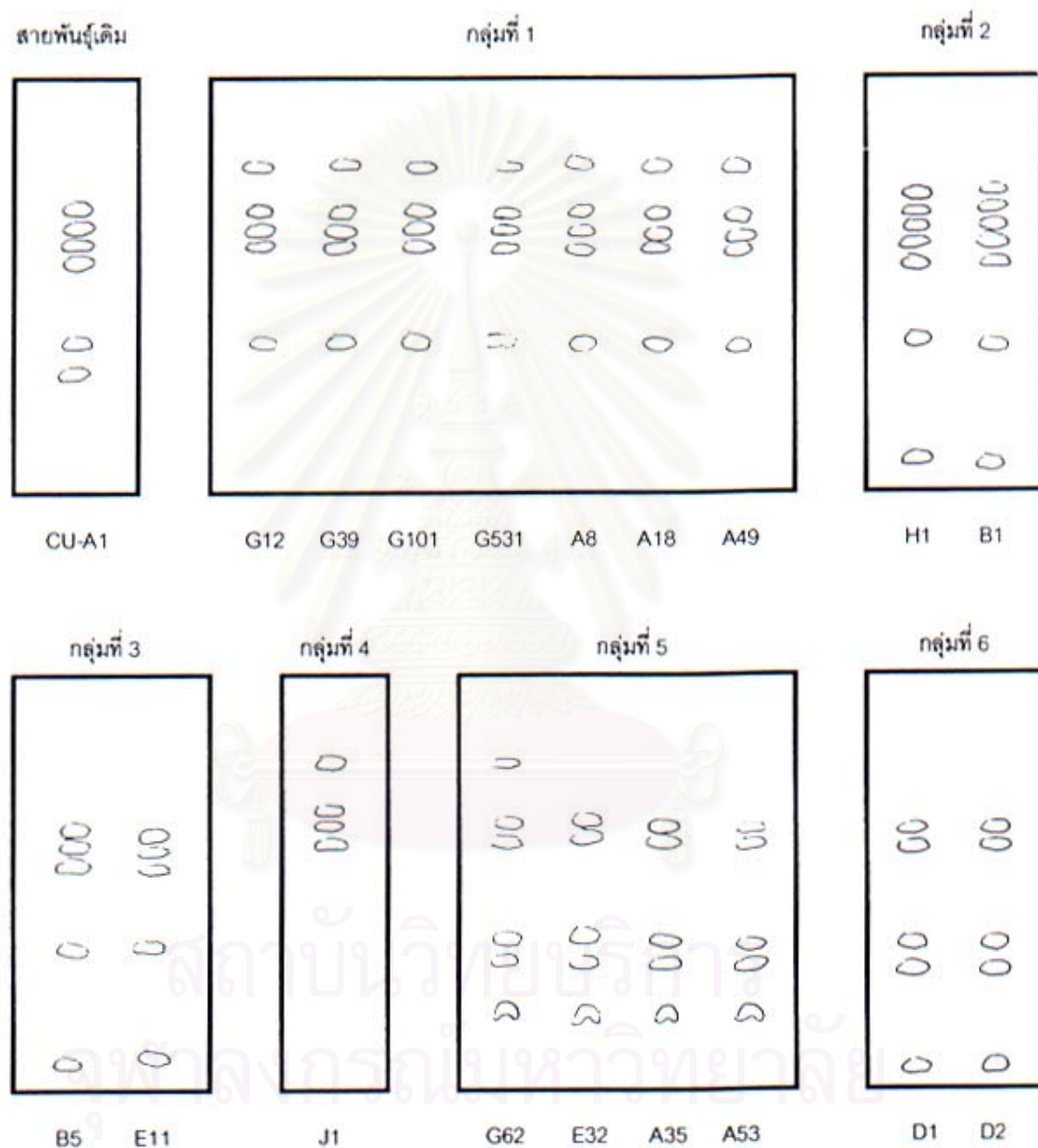
0 วัน

14 วัน



รูปที่ 4.3 ค. HPLC โคโรมาโตแกรมของสารมัธยันต์ที่สะสมจากการย่อยสลายอะซีแนพริดีนในวันที่ 0 และวันที่ 14 โดย *Rhizobium* sp. G39, G62, G101, G531, H1 และ J1 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ CFMM ที่มีอะซีแนพริดีนความเข้มข้น 600 มก.ต่อลิตร เปรียบเทียบกับ *Rhizobium* sp. CU-A1 (W/O คืออาหารเหลวที่ไม่มีการเติมเชื้อ, R_t 7.38 นาทีคืออะซีแนพริดีน)

จากรูปแบบการเจริญและความสามารถในการออกซิไดซ์อะซีแนพทิลีนไปเป็นสารมัธยันต์ชนิดต่างๆ เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM ของสายพันธุ์กลายทั้ง 18 สายพันธุ์ สามารถจำแนกสายพันธุ์กลายทั้งหมดออกได้เป็น 6 กลุ่ม ดังแสดงในตารางที่ 4.1 ตามรูปแบบของการเจริญและผลการวิเคราะห์สารมัธยันต์ที่สะสมโดยวิธี TLC ดังแสดงในรูปที่ 4.4 และวิธี HPLC



รูปที่ 4.4 การจัดกลุ่มสายพันธุ์กลายของ *Rhizobium* sp. 18 สายพันธุ์ ตามรูปแบบ TLC โคโรมาโตแกรมของสารมัธยันต์ที่สะสมจากการย่อยสลายอะซีแนพทิลีนในวันที่ 14 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ CFMM ที่มีอะซีแนพทิลีนความเข้มข้น 600 มก.ต่อลิตร เปรียบเทียบกับ *Rhizobium* sp. CU-A1

ตารางที่ 4.1 การจัดกลุ่มสายพันธุ์กลายของ *Rhizobium* sp. ตามรูปแบบการเจริญและการสะสมสารมัธยันต์ที่เกิดจากการย่อยสลายอะซีแนฟธิลีน

กลุ่มที่	สายพันธุ์กลายของ <i>Rhizobium</i> sp.	ความสามารถในการเจริญในอาหารที่มีอะซีแนฟธิลีนเป็นแหล่งคาร์บอน
1	G12, G39, G101, G531, A8, A18, A49	เจริญไม่ได้
2	H1, B1	เจริญไม่ได้
3	B5, E11	เจริญไม่ได้
4	J1	เจริญไม่ได้
5	G62, E32, A35, A53	เจริญได้
6	D1, D2	เจริญได้

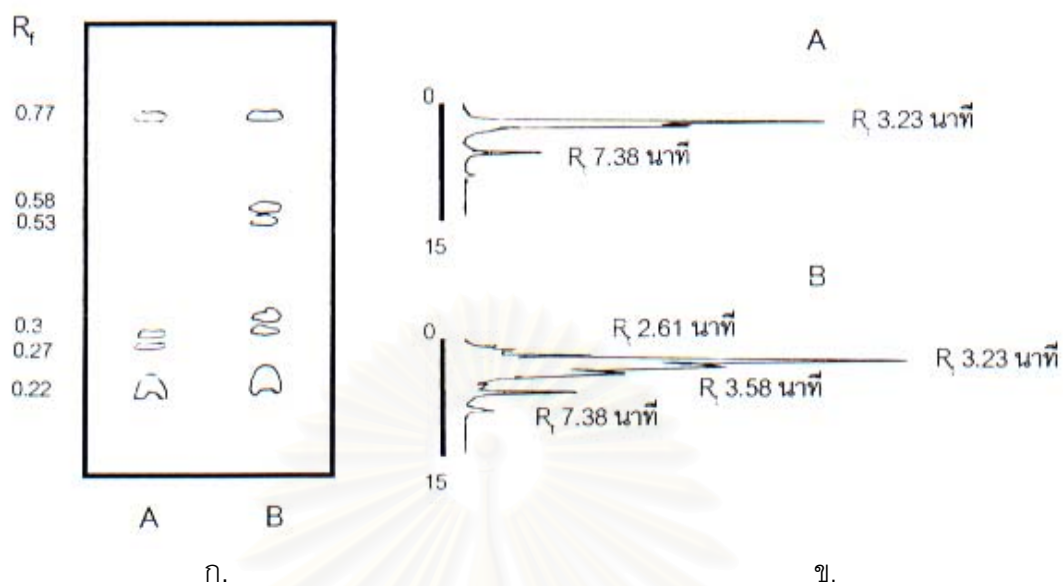
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.2 การแยกสารมัธยันต์ที่สะสมจากการย่อยสลายอะซีแนพทิลีนโดยสายพันธุ์กลายของ *Rhizobium* sp. CU-A1 ให้บริสุทธิ์โดยวิธี preparative TLC และ ซิลิกาเจลคอลัมน์โครมาโตกราฟี

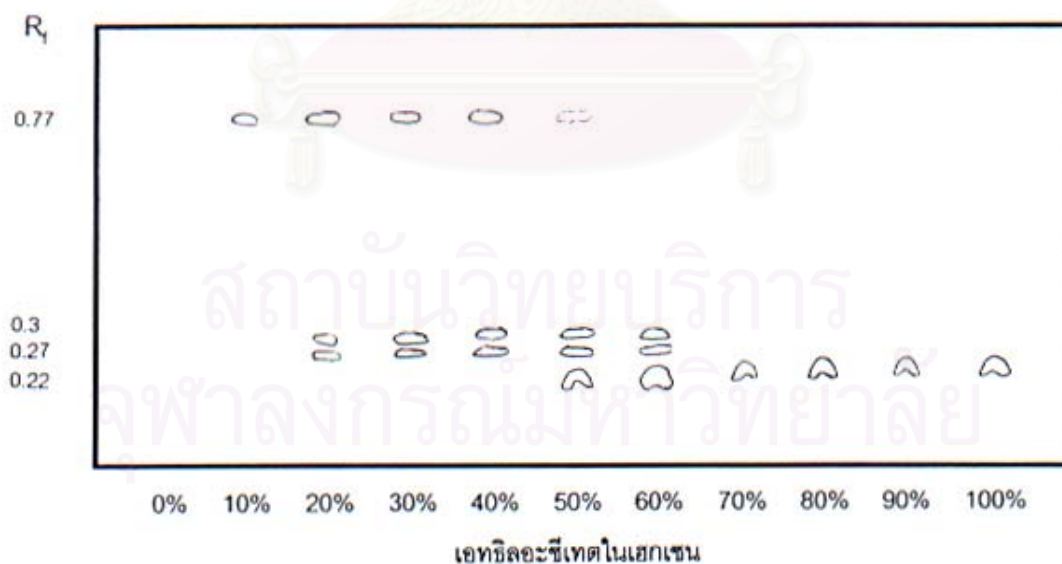
การทดลองในขั้นตอนนี้จะทำการแยกและทำสารมัธยันต์ที่สะสมโดยสายพันธุ์กลายให้บริสุทธิ์โดยวิธี preparative TLC ดังวิธีการทดลองในข้อ 3.3.2 และ ซิลิกาเจลคอลัมน์โครมาโตกราฟีดังวิธีการทดลองในข้อ 3.3.3 เพื่อพิสูจน์เอกลักษณ์และชนิดของสารด้วยวิธีทางเคมี จากการจำแนกสายพันธุ์กลายได้ 6 กลุ่มตามตารางที่ 4.1 ได้เลือกตัวแทนกลุ่ม ได้แก่ A53, B1 และ B5 ซึ่งอยู่ในกลุ่มที่ 5, 2 และ 3 ตามลำดับ ซึ่งสายพันธุ์กลายทั้ง 3 สายพันธุ์นี้สะสมสารมัธยันต์ที่แตกต่างจาก CU-A1 ได้ในปริมาณค่อนข้างสูงมาศึกษาต่อไป

4.2.1 *Rhizobium* sp. A53

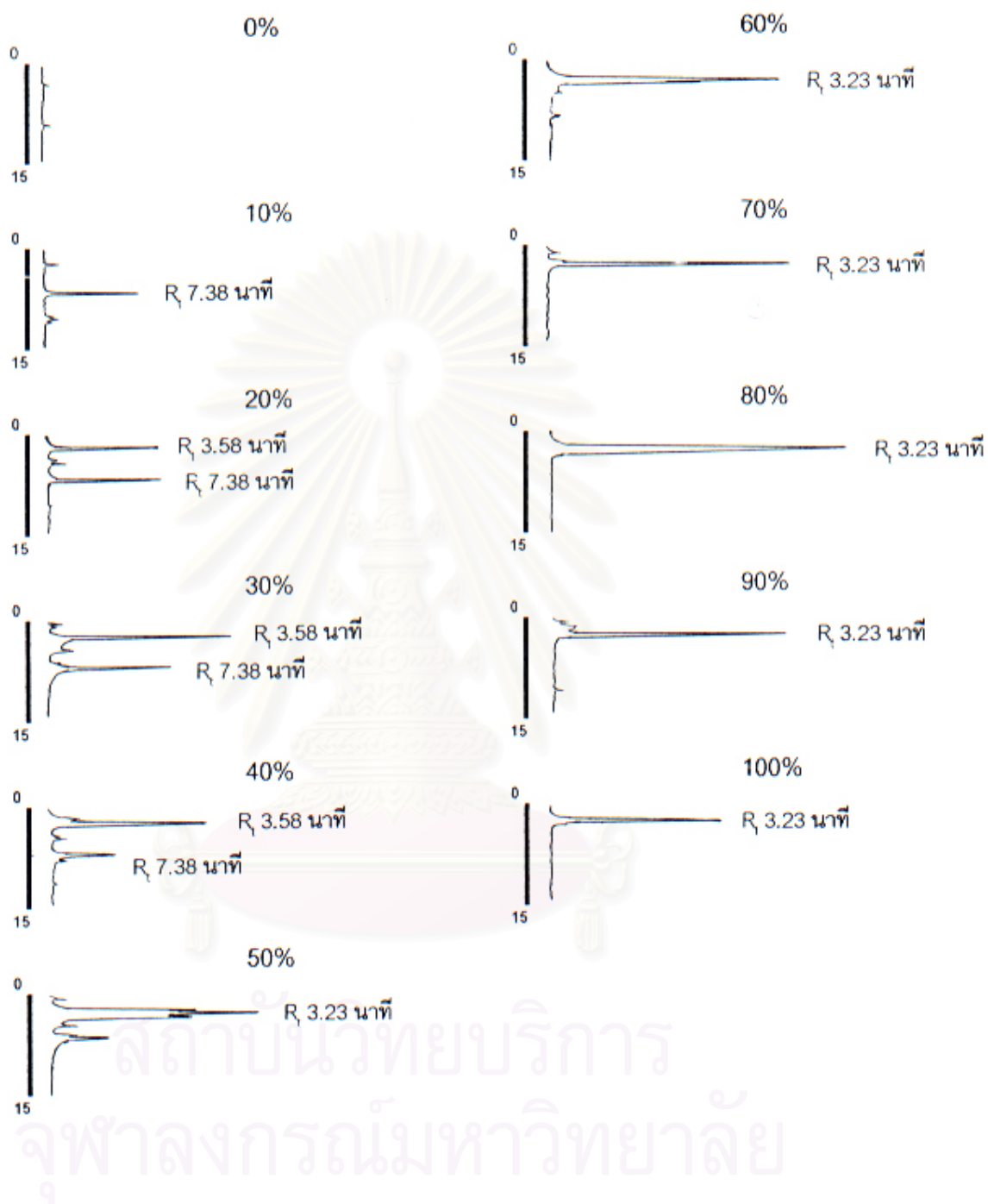
เมื่อเลี้ยง *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ A53 ในอาหารเหลว CFMM ที่มีอะซีแนพทิลีนความเข้มข้น 600 มก.ต่อลิตรเป็นเวลา 5 วัน แล้ววิเคราะห์สารสกัดจากน้ำเลี้ยงเชื้อโดยวิธี TLC พบสารมัธยันต์ชนิดหนึ่งมีค่า R_f เท่ากับ 0.22 ดังแสดงในรูปที่ 4.5 ก). ซึ่งไม่พบว่ามีสารสะสมเมื่อเปรียบเทียบกับ *Rhizobium* sp. CU-A1 โดยสารมัธยันต์นี้เรืองแสงสีฟ้าภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ตช่วงความยาวคลื่น 215-250 นาโนเมตรและมีความเข้มของการเรืองแสงมากกว่าสารมัธยันต์ชนิดอื่นๆ แสดงว่าสายพันธุ์ A53 สะสมสารมัธยันต์นี้ในปริมาณสูงจึงได้นำสารสกัดจากน้ำเลี้ยงเชื้อไปทำการแยกสารมัธยันต์ชนิดนี้ให้บริสุทธิ์โดยวิธี preparative TLC โดยให้ชื่อส่วนที่แยกได้ว่าสารมัธยันต์ I เมื่อนำไปวิเคราะห์ความบริสุทธิ์ด้วยวิธี TLC และวิธี HPLC ดังแสดงผลในรูปที่ 4.5 ก). และ รูปที่ 4.5 ข). ตามลำดับ พบว่าสารมัธยันต์ที่แยกได้ยังไม่บริสุทธิ์จึงได้นำไปทำให้บริสุทธิ์ต่อไปโดยวิธีซิลิกาเจลคอลัมน์โครมาโตกราฟี โดยชะคอลัมน์เป็นลำดับส่วนด้วย 0 ถึง 100% เอทิลอะซีเตตในเฮกเซน เพิ่มความเข้มข้นของเอทิลอะซีเตตลำดับส่วนละ 10% จากนั้นวิเคราะห์แต่ละลำดับส่วนด้วยวิธี TLC และ HPLC ดังแสดงผลในรูปที่ 4.6 และ 4.7 ตามลำดับพบว่าลำดับส่วนที่ชะด้วย 80 – 100% เอทิลอะซีเตต แสดงเพียงจุดเดียวที่ R_f 0.22 เมื่อวิเคราะห์ด้วย TLC แต่ผลการวิเคราะห์ด้วย HPLC พบว่าลำดับส่วนที่ชะด้วย 80% เอทิลอะซีเตตมีความบริสุทธิ์สูงสุดและมีปริมาณมากที่สุดโดยมียอดเดียวที่ R_t 3.23 นาที ดังนั้นจึงเลือกลำดับส่วนที่ชะด้วย 80% เอทิลอะซีเตตมาใช้พิสูจน์เอกลักษณ์ของสารต่อไป และให้ชื่อส่วนนี้ว่า สารมัธยันต์ A53(1)



รูปที่ 4.5 ก.) TLC โคโรมาโตแกรม ข.) HPLC โคโรมาโตแกรมแสดงความบริสุทธิ์ของสารมัธยันต์ **I** จากสายพันธุ์ A53 ที่แยกได้โดยวิธี preparative TLC (A) เปรียบเทียบกับสารสกัดจากน้ำเลี้ยงเชื้อ (B) (R_t 7.38 นาทีคืออะซีแนพทิลีน)



รูปที่ 4.6 TLC โคโรมาโตแกรมของแต่ละลำดับส่วนหลังจากนำสารมัธยันต์ **I** จากสายพันธุ์ A53 มาทำให้บริสุทธิ์ด้วยซิลิกาเจลคอลัมน์โครมาโตกราฟีด้วย 0 – 100% เอทิลอะซิเตตในเฮกเซน

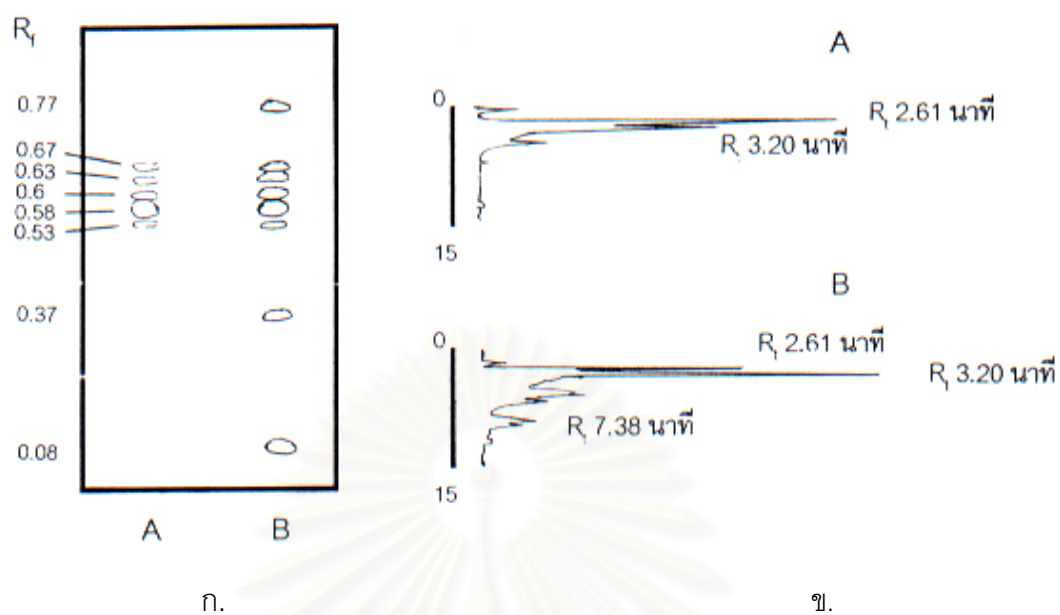


รูปที่ 4.7 HPLC โคโรมาโตแกรมของแต่ละลำดับส่วนหลังจากนำสารมัธยันต์ **I** จากสายพันธุ์ A53 มาทำให้บริสุทธิ์ด้วยซิลิกาเจลคอลัมน์โครมาโตกราฟีชะด้วย 0 – 100% เอทริลอะซีเตตในเฮกเซน (R_t 7.38 นาทีคืออะซีแนพริลีน)

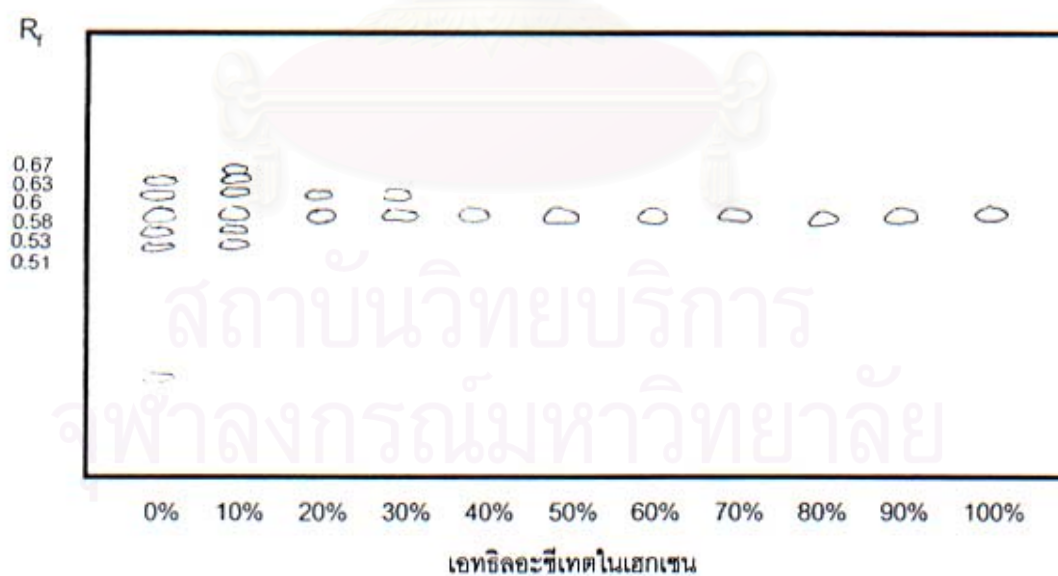
4.2.2 *Rhizobium* sp. B1

เมื่อเลี้ยง *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ B1 ในอาหารเหลว CFMM ที่มีอะซีแนฟลิโนลีนความเข้มข้น 600 มก.ต่อลิตรเป็นเวลา 5 วัน แล้ววิเคราะห์สารสกัดจากน้ำเลี้ยงเชื้อโดยวิธี TLC พบสารมัธยันต์ชนิดหนึ่งมีค่า R_f เท่ากับ 0.58 สะสมอยู่ในปริมาณสูง ดังแสดงในรูปที่ 4.8 ก). โดยสารมัธยันต์นี้เรืองแสงสีม่วงภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ตช่วงความยาวคลื่น 215-250 นาโนเมตรและมีความเข้มของการเรืองแสงมากกว่าสารมัธยันต์ชนิดอื่นๆ ในสารสกัดจากน้ำเลี้ยงเชื้อนี้ แสดงว่า *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ B1 สะสมสารมัธยันต์นี้ในปริมาณสูงจึงนำสารสกัดจากน้ำเลี้ยงเชื้อมาแยกสารมัธยันต์ชนิดนี้ซึ่งให้ชื่อว่า สารมัธยันต์ II ให้บริสุทธิ์โดยวิธี preparative TLC แล้วนำไปวิเคราะห์ความบริสุทธิ์ด้วยวิธี TLC และวิธี HPLC ดังแสดงผลในรูปที่ 4.8 ก). และรูปที่ 4.8 ข). ตามลำดับ พบว่าสารมัธยันต์ที่ได้ยังไม่บริสุทธิ์จึงได้นำสารมัธยันต์นี้ไปทำให้บริสุทธิ์ต่อไปโดยวิธีซิลิกาเจลคอลลัมน์โครมาโตกราฟี ซึ่งจะเป็นลำดับส่วนด้วย 0 ถึง 100% เอทิลอะซีเตตในเฮกเซน โดยการเพิ่มความเข้มข้นของเอทิลอะซีเตตขึ้นลำดับส่วนละ 10% จากนั้นวิเคราะห์แต่ละลำดับส่วนด้วยวิธี TLC และ HPLC ดังแสดงผลในรูปที่ 4.9 และรูปที่ 4.10 ตามลำดับ

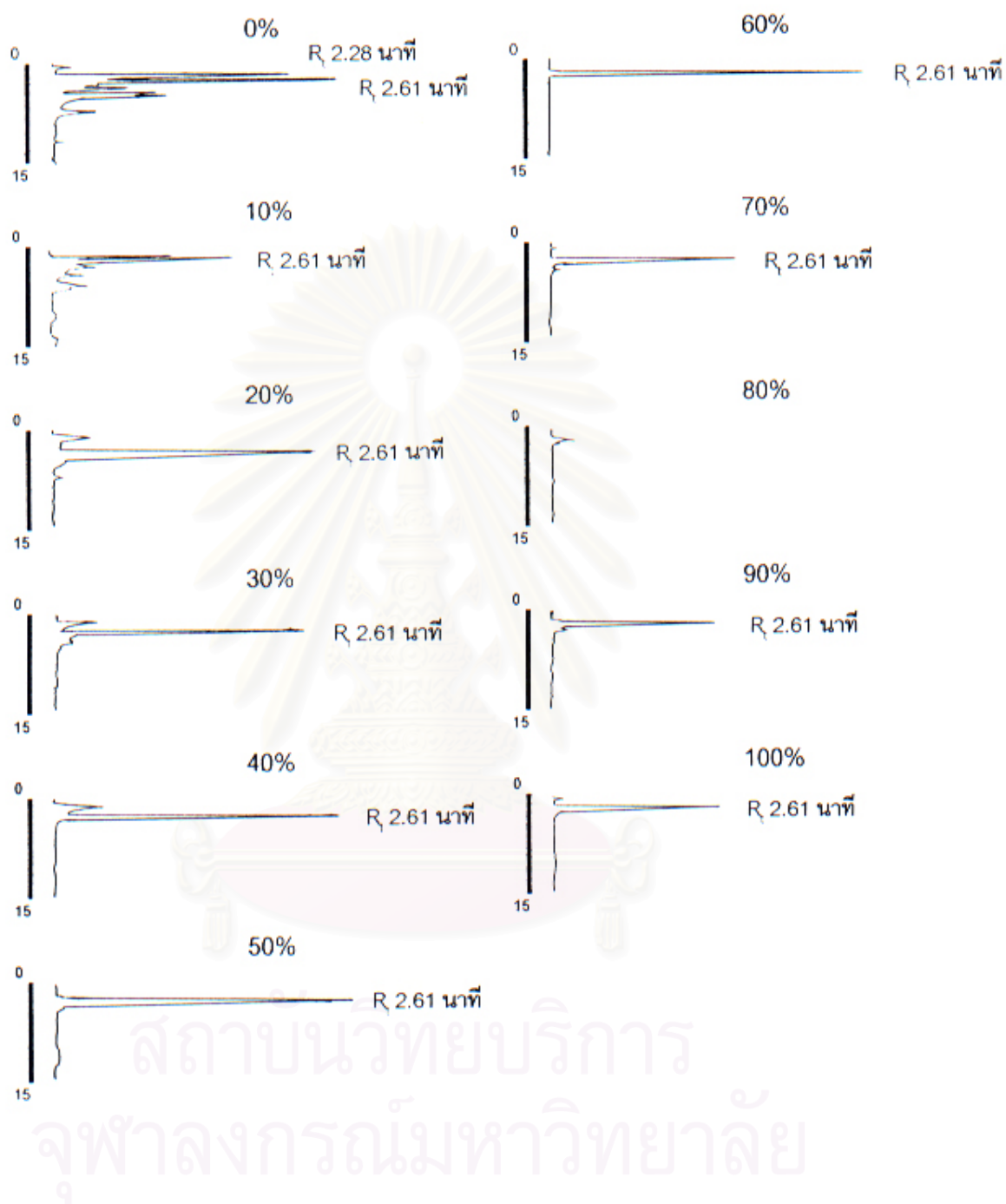
แม้ว่าผลการวิเคราะห์โดย TLC จะปรากฏว่าลำดับส่วนที่ชะด้วย 40 – 100% เอทิลอะซีเตตให้เพียงจุดเดียวที่ R_f เท่ากับ 0.58 แต่ผลการวิเคราะห์โดย HPLC พบว่าลำดับส่วนที่ชะด้วย 60% เอทิลอะซีเตตมีความบริสุทธิ์สูงสุดโดยปรากฏยอดเดียวที่ R_t เท่ากับ 2.61 นาที ดังนั้นจึงเลือกลำดับส่วนนี้มาใช้พิสูจน์เอกลักษณ์ของสารต่อไป โดยให้ชื่อส่วนนี้ว่า สารมัธยันต์ B1(1)



รูปที่ 4.8 ก.) TLC โคโรมาโตแกรม ข.) HPLC โคโรมาโตแกรมแสดงความบริสุทธิ์ของสารมัธยันต์ II จากสายพันธุ์ B1 ที่แยกได้โดยวิธี preparative TLC (A) เปรียบเทียบกับสารสกัดจากน้ำเลี้ยงเชื้อ (B) (R_t 7.38 นาทีคืออะซีแชนพิดิน)



รูปที่ 4.9 TLC โคโรมาโตแกรมของแต่ละลำดับส่วนหลังจากนำสารมัธยันต์ II จากสายพันธุ์ B1 มาทำให้บริสุทธิ์ด้วยซิลิกาเจลคอลัมน์โครมาโตกราฟีด้วย 0 – 100% เอทิลอะซีเตตในเฮกเซน

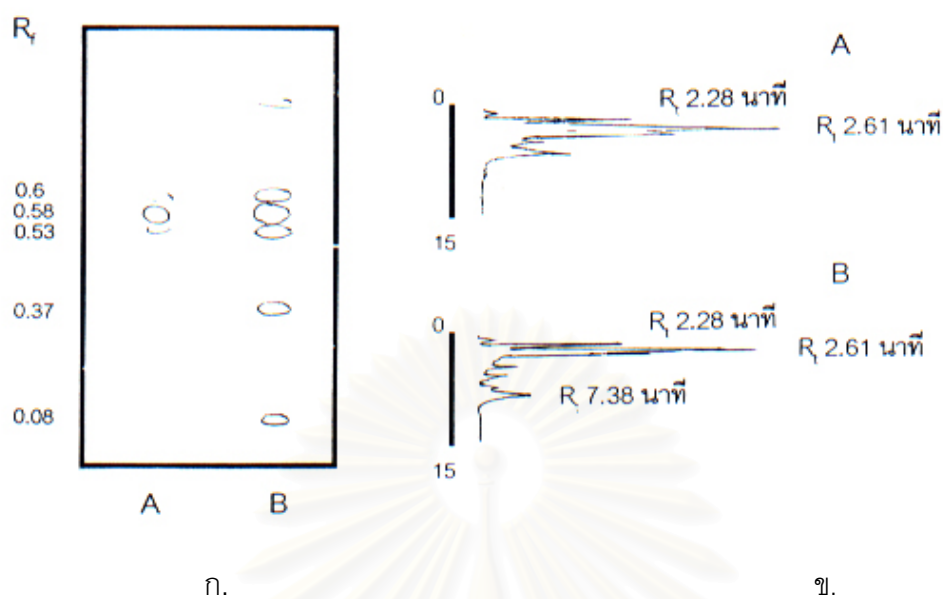


รูปที่ 4.10 HPLC โคโรมาโตแกรมของแต่ละลำดับส่วนหลังจากนำสารมัธยันต์ II จากสายพันธุ์ B1 มาทำให้บริสุทธิ์ด้วยซิลิกาเจลคอลัมน์โครมาโตกราฟีชะด้วย 0 – 100% เอทิลอะซีเตตในเฮกเซน

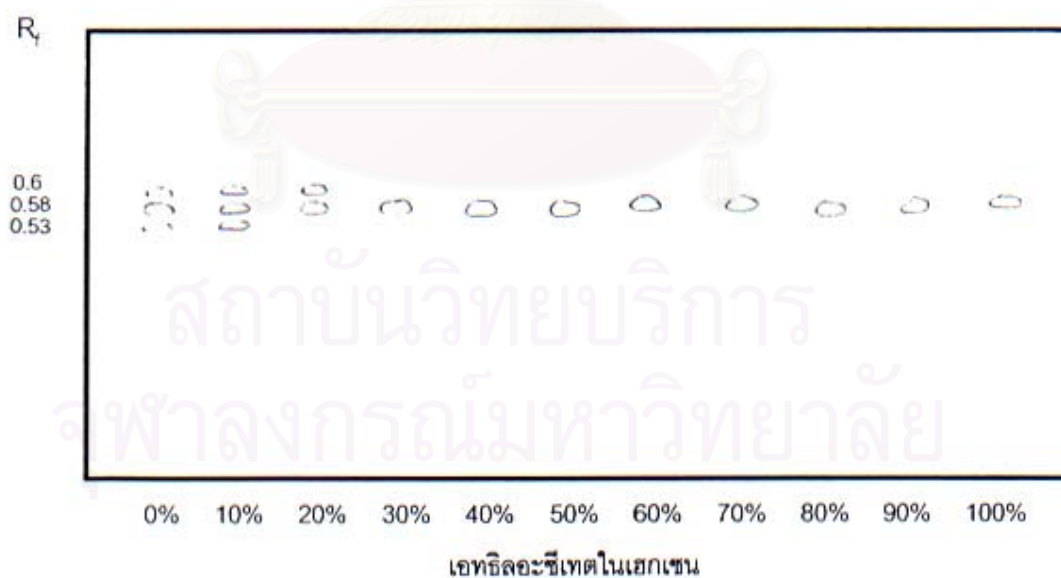
4.2.3 *Rhizobium* sp. B5

เมื่อเลี้ยง *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ B5 ในอาหารเหลว CFMM ที่มีอะซีแนฟธิลีนความเข้มข้น 600 มก.ต่อลิตร เป็นเวลา 7 วัน แล้ววิเคราะห์สารสกัดจากน้ำเลี้ยงเชื้อโดยวิธี TLC พบสารมัธยันต์ชนิดหนึ่งมีค่า R_f เท่ากับ 0.58 สะสมอยู่ในปริมาณสูง ดังแสดงในรูปที่ 4.11 ก). โดยสารมัธยันต์นี้เรืองแสงสีม่วงภายใต้แสงอัลตราไวโอเลตช่วงความยาวคลื่น 215-250 นาโนเมตรและมีความเข้มของการเรืองแสงมากกว่าสารมัธยันต์ชนิดอื่นๆ ในสารสกัดจากน้ำเลี้ยงเชื้อนี้ แสดงว่า *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ B5 สะสมสารมัธยันต์นี้ในปริมาณสูงจึงได้นำสารสกัดจากน้ำเลี้ยงเชื้อมาแยกสารมัธยันต์ชนิดนี้ซึ่งให้ชื่อว่า สารมัธยันต์ III ให้บริสุทธิ์โดยวิธี preparative TLC แล้วนำไปวิเคราะห์ความบริสุทธิ์ด้วยวิธี TLC และวิธี HPLC ดังแสดงผลในรูปที่ 4.11 ก). และรูปที่ 4.11 ข). ตามลำดับ พบว่าสารมัธยันต์ที่ได้ยังไม่บริสุทธิ์จึงได้นำสารมัธยันต์นี้ไปทำให้บริสุทธิ์ต่อไปโดยวิธีซิลิกาเจลคอลัมน์โครมาโตกราฟี ซึ่งจะเป็นลำดับส่วนด้วย 0 ถึง 100% เอทิลอะซีเตตในเฮกเซน โดยการเพิ่มความเข้มข้นของเอทิลอะซีเตตขึ้นลำดับส่วนละ 10% จากนั้นวิเคราะห์แต่ละลำดับส่วนด้วยวิธี TLC และ HPLC ดังแสดงผลในรูปที่ 4.12 และรูปที่ 4.13 ตามลำดับ

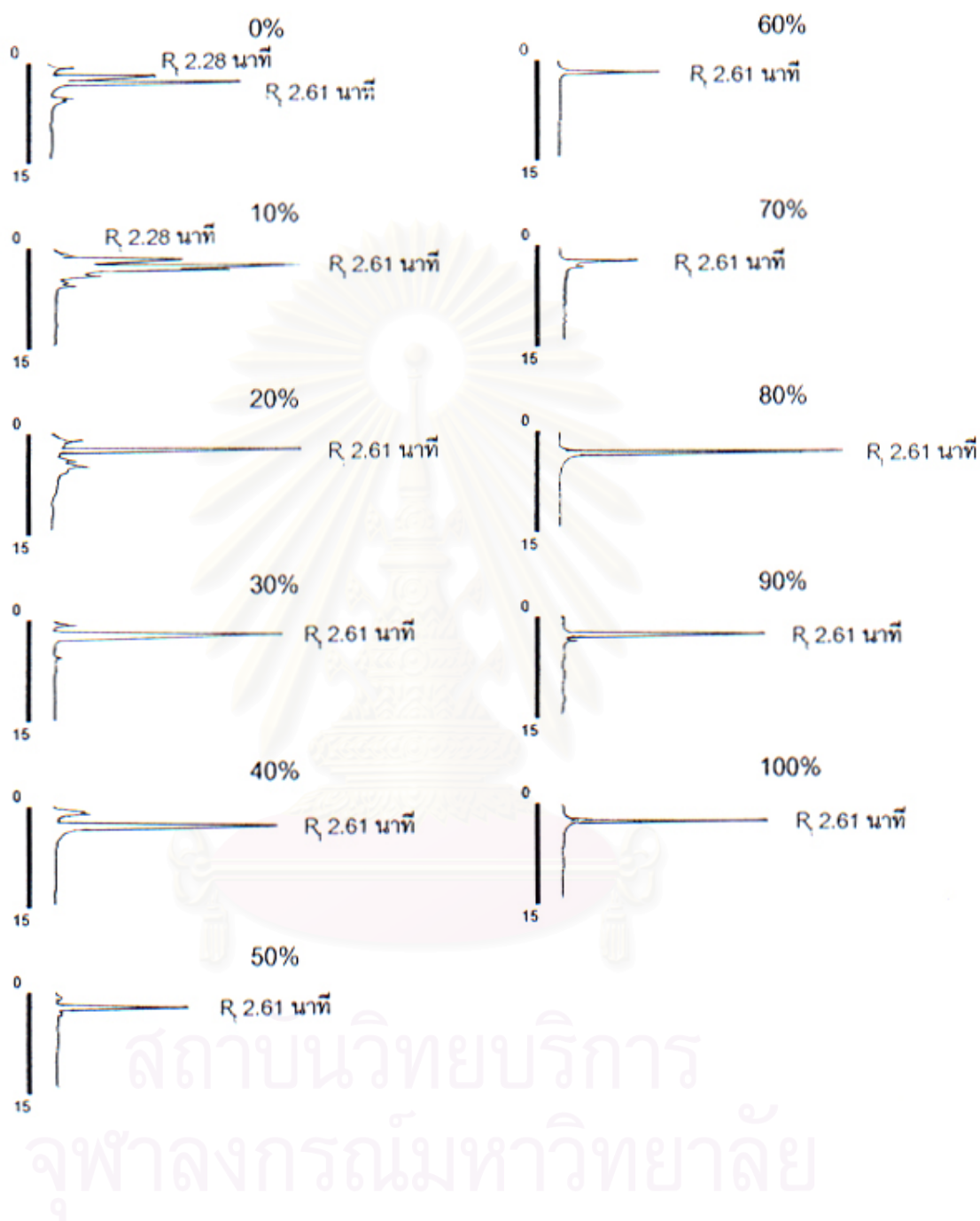
แม้ผลการวิเคราะห์แต่ละลำดับส่วนด้วยวิธี TLC พบว่าตั้งแต่ลำดับส่วนที่ชะด้วย 30 – 100% เอทิลอะซีเตตจะปรากฏเพียงจุดเดียวที่ R_f 0.58 แต่ผลการวิเคราะห์โดย HPLC พบว่าลำดับส่วนที่ชะด้วย 80% เอทิลอะซีเตตมีความบริสุทธิ์สูงสุดโดยปรากฏยอดเดียวที่ R_t เท่ากับ 2.61 นาที ดังนั้นจึงเลือกลำดับส่วนนี้มาพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารต่อไป โดยให้ชื่อส่วนนี้ว่า สารมัธยันต์ B5(1)



รูปที่ 4.11 ก.) TLC โครมาโตแกรม ข.) HPLC โครมาโตแกรมแสดงความบริสุทธิ์ของสารมัธยันต์ III จากสายพันธุ์ B5 ที่แยกได้โดยวิธี preparative TLC (A) เปรียบเทียบกับสารสกัดจากน้ำเลี้ยงเชื้อ (B) (R_t 7.38 นาทีคืออะซีแนพริลิน)



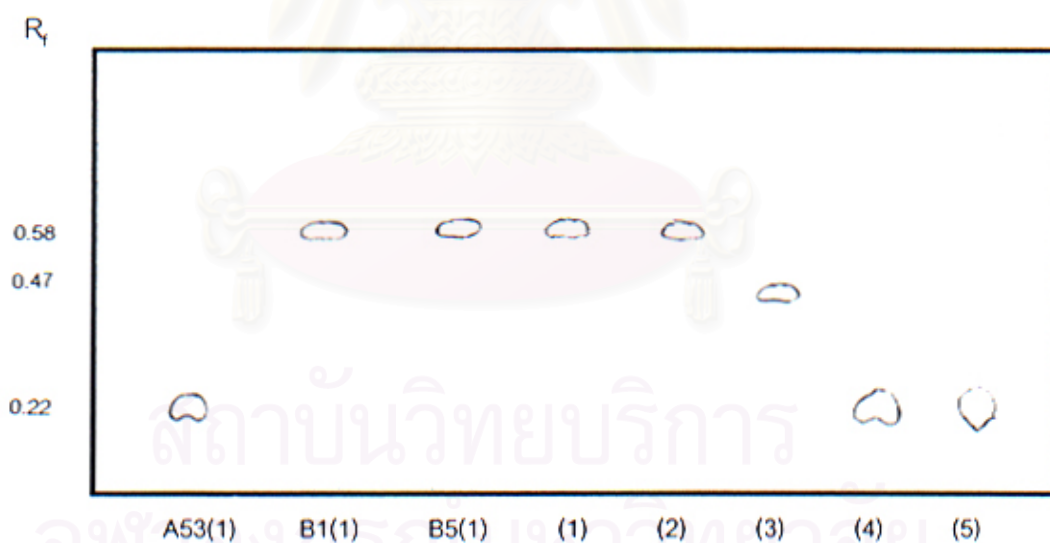
รูปที่ 4.12 TLC โครมาโตแกรมของแต่ละลำดับส่วนหลังจากนำสารมัธยันต์ III จากสายพันธุ์ B5 มาทำให้บริสุทธิ์ด้วยซิลิกาเจลคอลัมน์โครมาโตกราฟีชะด้วย 0 – 100% เอทิลอะซิเตตในเฮกเซน



รูปที่ 4.13 HPLC โคโรมาโตแกรมของแต่ละลำดับส่วนหลังจากนำสารมัธยันต์ III จากสายพันธุ์ B5 มาทำให้บริสุทธิ์ด้วยซิลิกาเจลคอลัมน์โครมาโตกราฟีด้วย 0 – 100% เอทิลอะซิเตตในเฮกเซน

4.3 การตรวจสอบชนิดของสารเบื้องต้นโดยวิธี TLC

TLC เป็นวิธีตรวจสอบชนิดของสารเบื้องต้นวิธีหนึ่งโดยดูจากค่า R_f ซึ่งเป็นค่าเฉพาะของสารแต่ละชนิดเปรียบเทียบกับค่า R_f ของสารมาตรฐาน งานวิจัยนี้จึงได้ทำการเปรียบเทียบค่า R_f บน TLC ของสารมัยยันต์ A53(1), สารมัยยันต์ B1(1) และสารมัยยันต์ B5(1) กับสารอะโรมาติกที่มีรายงานว่าเป็นสารมัยยันต์ที่เกิดจากการย่อยสลายอะซีแนพทีลินและสารพอลิไซคลิกอะโรมาติกชนิดอื่นๆ ที่มีในห้องปฏิบัติการ คือ อะซีแนพทีลินควิโนน, กรดแนพธาไลน์ 1,8-ไดคาร์บอกซิลิก, กรดซาลิไซลิก, กรด 2,5-ไดไฮดรอกซีเบนโซอิก, กรดโปรโตคาทีคูอิก ดังแสดงผลการทดลองในรูปที่ 4.14 และตารางที่ 4.2 พบว่าสารมัยยันต์ A53(1) ซึ่งเรืองแสงสีฟ้าภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ตและมีค่า R_f เท่ากับ 0.22 เช่นเดียวกับกรด 2,5-ไดไฮดรอกซีเบนโซอิก ในขณะที่สารมัยยันต์ B1(1) และสารมัยยันต์ B5(1) เรืองแสงสีม่วงภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต และมีค่า R_f เท่ากับ 0.58 ซึ่งใกล้เคียงกับสารมาตรฐานอะซีแนพทีลินควิโนนและกรดแนพธาไลน์ 1,8-ไดคาร์บอกซิลิกที่เรืองแสงสีม่วงภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต และมีค่า R_f เท่ากับ 0.58 เช่นกัน



รูปที่ 4.14 TLC โคโรมาโตแกรมของสารมัยยันต์ A53(1), B1(1) และ B5(1) เปรียบเทียบกับ (1) อะซีแนพทีลินควิโนน, (2) กรดแนพธาไลน์ 1,8-ไดคาร์บอกซิลิก, (3) กรดซาลิไซลิก, (4) กรด 2,5-ไดไฮดรอกซีเบนโซอิก, (5) กรดโปรโตคาทีคูอิก

ตารางที่ 4.2 ค่า R_f จากการวิเคราะห์ TLC และลักษณะการเรียงแสงของสารมาตรฐาน A53(1), B1(1) และ B5(1) ภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ตช่วงความยาวคลื่น 215 –250 นาโนเมตรเปรียบเทียบกับสารมาตรฐานชนิดต่างๆ

สาร	การเรียงแสง	ค่า R_f
สารมาตรฐาน A53(1)	ฟ้า	0.22
สารมาตรฐาน B1(1)	ม่วง	0.58
สารมาตรฐาน B5(1)	ม่วง	0.58
อะซีแนพธีนควิโนน	ม่วง	0.58
กรดแนพธาไลน์ 1,8-ไดคาร์บอกซิลิก	ม่วง	0.58
กรดซาลิไซลิก	ม่วง	0.47
กรด 2,5-ไดไฮดรอกซีเบนโซอิก	ฟ้า	0.22
กรดโปรโตคาทีคูอิก	ม่วงน้ำตาล	0.20

4.4 การพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารมัธยันต์ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ด้วยแมสสเปกโตรเมทรี (MS) และ นิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์ (NMR)

การทดลองในขั้นตอนนี้จะนำสารมัธยันต์ A53(1), B1(1) และ B5(1) ที่แยกได้จากสายพันธุ์กลาย A53, B1 และ B5 ตามลำดับมาพิสูจน์เอกลักษณ์และชนิดของสารด้วยวิธี MS และ NMR

4.4.1 สารมัธยันต์ A53(1)

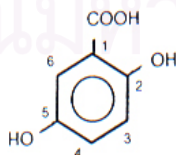
ผลการพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารมัธยันต์ A53(1) ด้วยวิธี MS และวิธี NMR ดังแสดงผลในภาคผนวก ง รูปที่ ง. 27 และรูปที่ ง. 30 ตามลำดับ พบว่าจากการพิสูจน์เอกลักษณ์ด้วยวิธี MS ได้แมสสเปกตรัมของสารมัธยันต์ A53(1) ดังแสดงในรูปที่ ง. 27 (ก.) โดยมีค่า M^+ เท่ากับ 154 แสดงว่าสารนี้มีมวลโมเลกุลเท่ากับ 154 และเมื่อเปรียบเทียบแมสสเปกตรัมของสารมัธยันต์ A53(1) กับแมสสเปกตรัมของสารมาตรฐานกรด 2,5-ไดไฮดรอกซีเบนโซอิก (กรดเจนทิลิก) ดังแสดงในรูปที่ ง. 27 (ข.) พบว่ามีรูปแบบของแมสสเปกตรัมเหมือนกัน นอกจากนี้พบสัญญาณของ $^1\text{H-NMR}$ ของสารมัธยันต์ A53(1) ที่

$$\delta 7.15 (1 \text{ H, d, } J = 4 \text{ Hz, H-6})$$

$$\delta 6.95 (1 \text{ H, dd, } J = 4, 9 \text{ Hz, H-4})$$

$$\delta 6.76 (1 \text{ H, d, } J = 9 \text{ Hz, H-3})$$

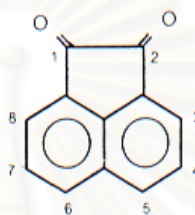
และ $^{13}\text{C-NMR}$, δ 112.5, 114.5, 117.8, 123.7, 149.3, 154.1, 171.7 ซึ่งสอดคล้องกับโครงสร้างของกรด 2,5-ไดไฮดรอกซีเบนโซอิก (กรดเจนทิลิก) ที่มีโครงสร้างโมเลกุลดังแสดงในรูปที่ 4.15



รูปที่ 4.15 โครงสร้างโมเลกุลของกรด 2,5-ไดไฮดรอกซีเบนโซอิก (กรดเจนทิลิก)

4.4.2 สารมัธยันต์ B1(1)

ผลการพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารมัธยันต์ B1(1) ด้วยวิธี MS ดังแสดงผลในภาคผนวก ง รูปที่ ง. 28 พบว่าจากแมสสเปกตรัมของสารมัธยันต์ B1(1) ดังแสดงในรูปที่ ง. 28 (ก.) ได้ค่า M^+ เท่ากับ 182 แสดงว่าสารนี้มีมวลโมเลกุลเท่ากับ 182 และเมื่อเปรียบเทียบแมสสเปกตรัมของสารมัธยันต์ B1(1) กับแมสสเปกตรัมของสารมาตรฐานอะซีแนพทีนควิโนน ดังแสดงในรูปที่ ง. 28 (ข.) พบว่ามีรูปแบบของแมสสเปกตรัมเหมือนกัน แสดงว่าสารมัธยันต์ B1(1) คือ อะซีแนพทีนควิโนน ที่มีโครงสร้างโมเลกุลดังแสดงในรูปที่ 4.16



รูปที่ 4.16 โครงสร้างโมเลกุลของอะซีแนพทีนควิโนน

4.4.3 สารมัธยันต์ B5(1)

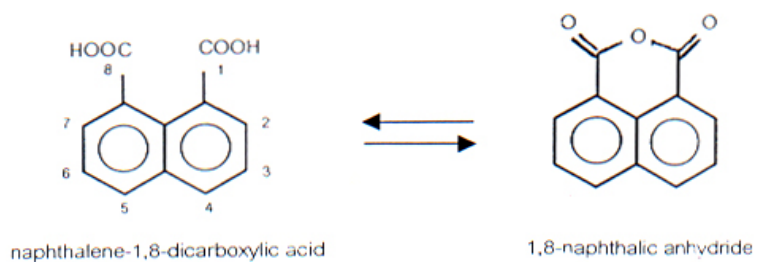
ผลการพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารมัธยันต์ B5(1) ด้วยวิธี MS และวิธี NMR ดังแสดงผลในภาคผนวก ง รูปที่ ง. 29 และรูปที่ ง. 31 ตามลำดับ พบว่าจากการพิสูจน์เอกลักษณ์ด้วยวิธี MS ได้แมสสเปกตรัมของสารมัธยันต์ B5(1) ดังแสดงในรูปที่ ง. 29 (ก.) โดยมีค่า M^+ เท่ากับ 198 แสดงว่าสารนี้มีมวลโมเลกุลเท่ากับ 198 และเมื่อเปรียบเทียบแมสสเปกตรัมของสารมัธยันต์ B5(1) กับแมสสเปกตรัมของสารมาตรฐาน 1,8-แนพทาลิกแอนไฮไดรด์ ดังแสดงในรูปที่ ง. 29 (ข.) พบว่ามีรูปแบบของแมสสเปกตรัมเหมือนกัน นอกจากนี้พบสัญญาณของ $^1\text{H-NMR}$ ของสารมัธยันต์ B5(1) ที่

δ 7.62 (2 H, dd, $J = 7.3, 8.8$ Hz, H-3, H-6)

δ 8.31 (2 H, d, $J = 8.8$ Hz, H-4, H-5)

δ 8.62 (2 H, d, $J = 7.3$ Hz, H-2, H-7)

ซึ่งสอดคล้องกับโครงสร้างของ 1,8-แนพทาลิกแอนไฮไดรด์ ซึ่งเป็นรูปที่สกัดได้ในสภาวะกรดของสารมัธยันต์ กรดแนพทาลีน-1,8-ไดคาร์บอกซิลิก ที่มีโครงสร้างโมเลกุลดังแสดงในรูปที่ 4.17



รูปที่ 4.17 โครงสร้างโมเลกุลของ 1,8-แนพทาลิกแอนไฮไดรด์ และ กรดแนพทาลีน-1,8-ไดคาร์บอกซิลิก



สถาบันวิทยบริการ
 จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.5 ผลของสารมัธยันต์ A53(1), B1(1) และ B5(1) ต่อการเจริญของสายพันธุ์กล้วย สายพันธุ์ต่างๆ ของ *Rhizobium* sp. CU-A1

จากรายงานของธัญชู เกรียงไกรพิพัฒน์ (2544) ถึงการสร้างสายพันธุ์กล้วยของ *Rhizobium* sp. CU-A1 ให้ไม่สามารถย่อยสลายอะซีแนฟธิลีนได้อย่างสมบูรณ์โดยการแทรกสอดทรานสโปลซอนเข้าไปในยีนที่คาดว่าเกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์เอนไซม์ในวิถีการย่อยสลายอะซีแนฟธิลีน ทำให้สายพันธุ์กล้วยเหล่านี้มีการสะสมสารมัธยันต์ที่เกิดจากการย่อยสลายอะซีแนฟธิลีน และงานวิจัยนี้สามารถแยกและทำสารมัธยันต์จากสายพันธุ์กล้วยให้บริสุทธิ์ได้ 3 ชนิด คือ A53 (1) หรือกรด 2,5-ไดไฮดรอกซีเบนโซอิก (กรดเจนทิลิก), B1(1) หรือ อะซีแนฟธิลควิโนน, B5(1) หรือกรดแนพทาลีน-1,8-ไดคาร์บอกซิลิก จากสายพันธุ์กล้วย A53, B1 และ B5 ตามลำดับ

งานวิจัยในขั้นตอนนี้จะทดสอบยืนยันว่า สายพันธุ์กล้วย A53, B1 และ B5 ไม่สามารถใช้สารมัธยันต์ที่แต่ละเชื้อสะสมคือ A53(1), B1(1) และ B5(1) ตามลำดับเป็นแหล่งคาร์บอนในการเจริญได้ โดยทำการวิเคราะห์การเพิ่มจำนวนของเชื้อ การลดลงของปริมาณแหล่งคาร์บอนที่ให้ และการสร้างสารมัธยันต์ชนิดอื่นๆ ถ้ามีการย่อยสลายแหล่งคาร์บอน นอกจากนี้ยังได้ทดสอบการใช้สารมัธยันต์ทั้ง 3 นี้เป็นแหล่งคาร์บอนในการเจริญของสายพันธุ์กล้วยชนิดอื่นๆ ของ *Rhizobium* sp. CU-A1 เปรียบเทียบกับชุดควบคุม เนื่องจากสารมัธยันต์ที่ผ่านขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์แล้วทั้ง 3 ชนิดมีปริมาณค่อนข้างน้อยไม่เพียงพอที่จะทำการทดสอบกับสายพันธุ์กล้วยทั้ง 18 สายพันธุ์ จึงได้คัดเลือกเชื้อสายพันธุ์กล้วยที่เป็นตัวแทนของแต่ละกลุ่ม กลุ่มละ 1 สายพันธุ์มาทำการทดลองในขั้นตอนนี้ ดังแสดงในตารางที่ 4.3

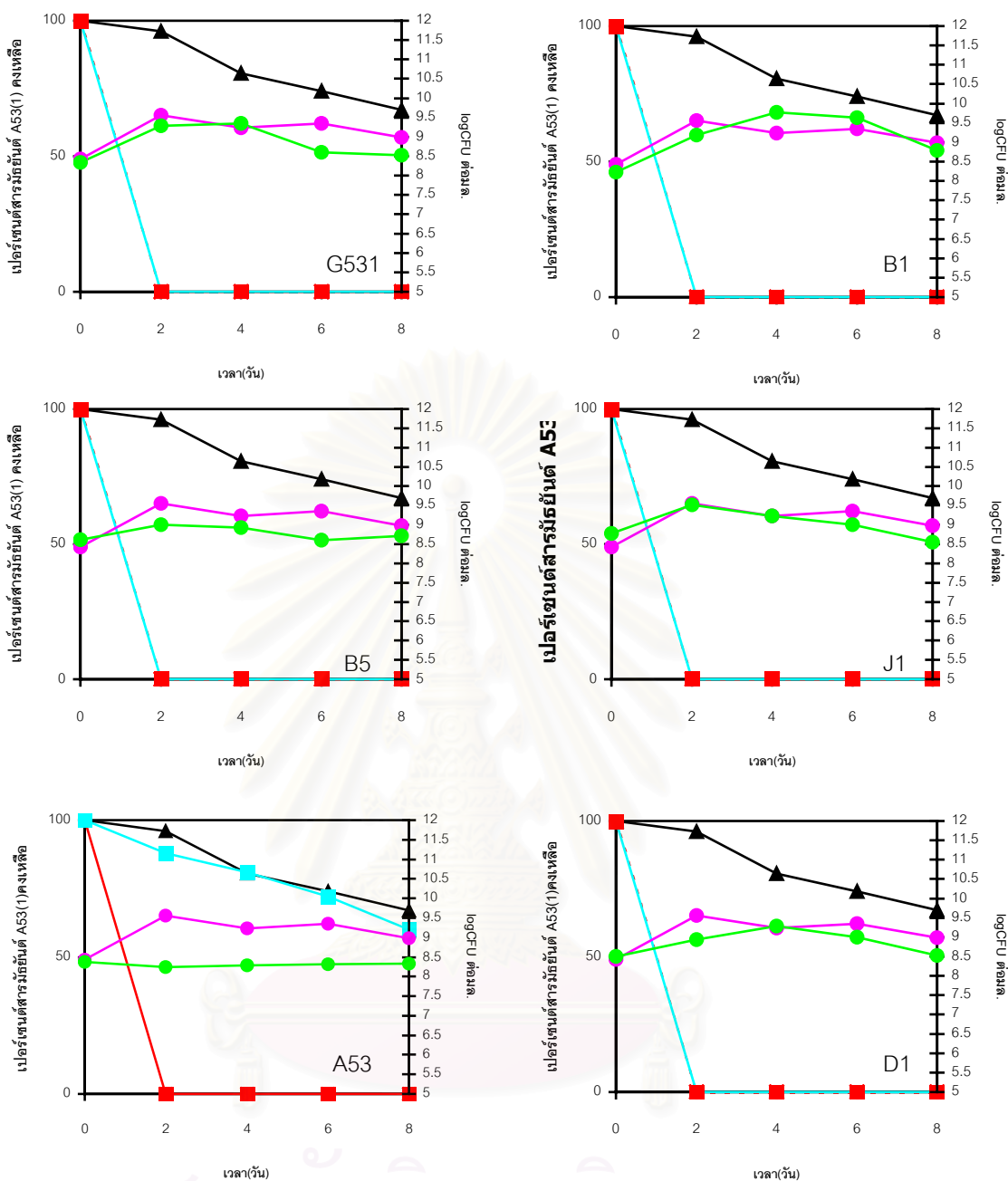
ตารางที่ 4.3 *Rhizobium* sp. สายพันธุ์กล้วยที่เลือกเป็นตัวแทนในแต่ละกลุ่ม

กลุ่มที่	เชื้อสายพันธุ์กล้วยที่คัดเลือก
1	G531
2	B1
3	B5
4	J1
5	A53
6	D1

4.5.1 สารมัยยัณฑ์ A53(1) หรือกรด 2,5-ไดไครบอกลีติก (กรดเจนทีลิก) เป็นแหล่งคาร์บอน

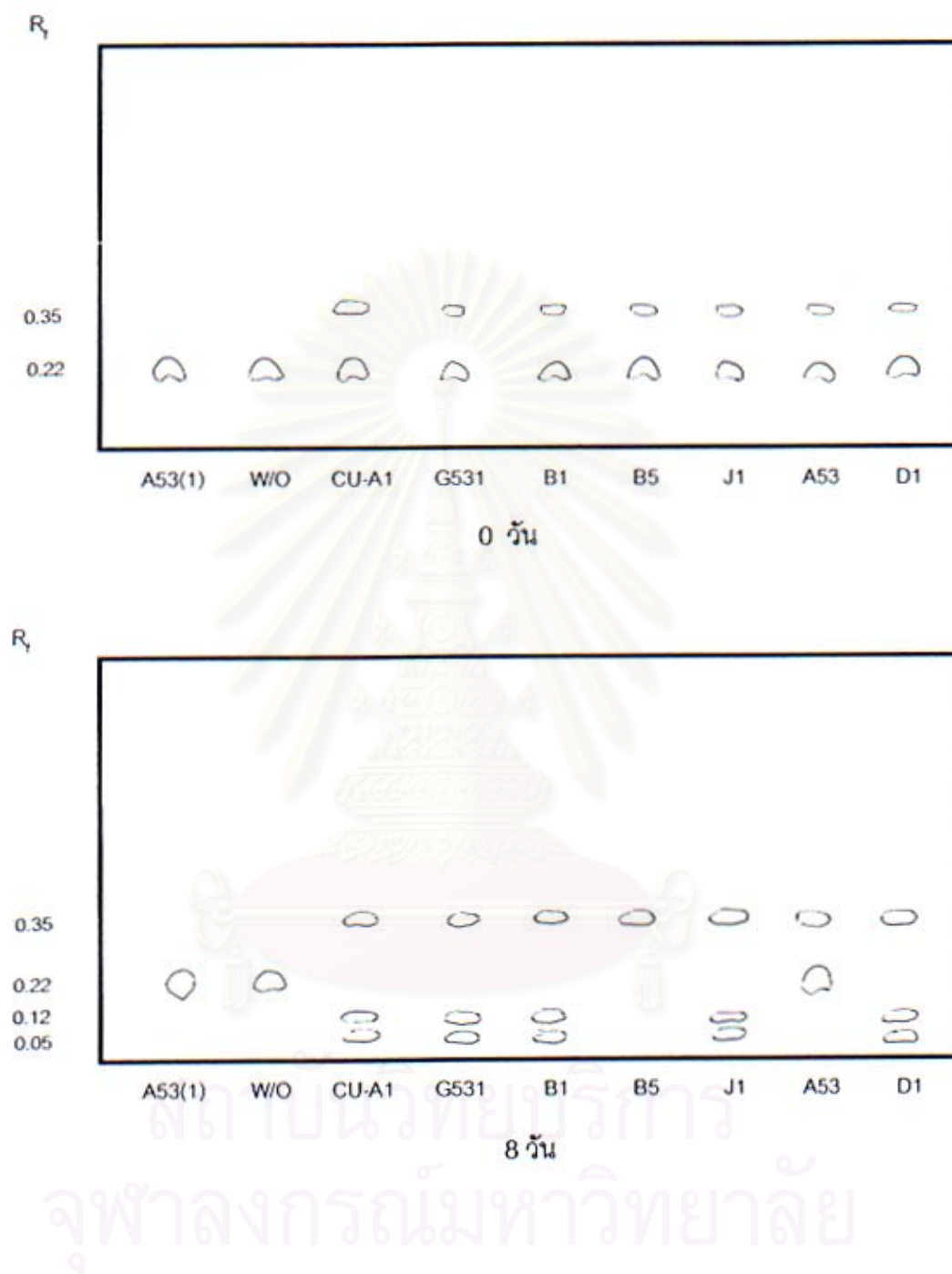
จากการทดลองเลี้ยงสายพันธุ์กลายของ *Rhizobium* sp. CU-A1 จำนวน 6 สายพันธุ์ ได้แก่ G531, B1, B5, D1, J1, และ A53 มาเลี้ยงลงในอาหารเหลว CFMM ที่มีสารมัยยัณฑ์ A53(1) คือ กรด 2,5-ไดไครบอกลีติกเบนโซอิกความเข้มข้น 300 มก.ต่อลิตร เปรียบเทียบรูปแบบการเจริญและความสามารถในการย่อยสลายสารมัยยัณฑ์ชนิดนี้กับ *Rhizobium* sp. CU-A1 ดังแสดงผลการทดลองในรูปที่ 4.18, 4.19 และ 4.20 พบว่าแต่ละสายพันธุ์กลายมีรูปแบบในการเจริญและความสามารถในการออกซิไดซ์กรด 2,5-ไดไครบอกลีติกเบนโซอิกไปเป็นสารมัยยัณฑ์ต่างๆ แตกต่างกันไป เมื่อเทียบกับ *Rhizobium* sp. CU-A1 โดย G531, B1, B5, D1 และ J1 สามารถย่อยสลายกรด 2,5-ไดไครบอกลีติกเบนโซอิกได้พร้อมกับมีการเพิ่มจำนวนเซลล์จนไม่สามารถวิเคราะห์ปริมาณกรด 2,5-ไดไครบอกลีติกเบนโซอิกที่เหลืออยู่ได้ภายในระยะเวลา 2 วันเช่นเดียวกับ *Rhizobium* sp. CU-A1 ในขณะที่ A53 ไม่สามารถย่อยสลายกรด 2,5-ไดไครบอกลีติกเบนโซอิกและไม่มีการเพิ่มจำนวนเซลล์ดังแสดงผลการทดลองในรูปที่ 4.18

ผลการเปรียบเทียบสารมัยยัณฑ์ที่สะสมจากการย่อยสลายกรด 2,5-ไดไครบอกลีติกเบนโซอิก โดยสายพันธุ์กลายแต่ละสายพันธุ์กับ *Rhizobium* sp. CU-A1 ด้วยวิธี TLC ระหว่างวันที่ 0 และ วันที่ 8 แสดงผลในรูปที่ 4.19 พบว่า G531, B1, B5, D1 และ J1 มีการเปลี่ยนกรด 2,5-ไดไครบอกลีติกเบนโซอิกไปเป็นสารมัยยัณฑ์ชนิดอื่นๆ ในขณะที่ A53 ไม่สามารถเปลี่ยนกรด 2,5-ไดไครบอกลีติกเบนโซอิกไปเป็นสารมัยยัณฑ์อื่น แสดงว่าสายพันธุ์กลาย A53 มีความบกพร่องในการย่อยสลายกรด 2,5-ไดไครบอกลีติกเบนโซอิก จึงยืนยันได้ว่ากรด 2,5-ไดไครบอกลีติกเบนโซอิก เป็นสารมัยยัณฑ์ที่สะสมจากการย่อยสลายของอะซีแนพริลีนของสายพันธุ์กลายนี้จริง



- ▲ เปอร์เซ็นต์กรด 2,5-ไดไฮดรอกซีเบนโซอิกคงเหลือในชุดควบคุมที่ไม่เติมเชื้อ
- เปอร์เซ็นต์กรด 2,5-ไดไฮดรอกซีเบนโซอิกคงเหลือในชุดควบคุมที่เติม *Rhizobium* sp. CU-A1
- จำนวนแบคทีเรียในชุดควบคุมที่เติม *Rhizobium* sp. CU-A1
- เปอร์เซ็นต์กรด 2,5-ไดไฮดรอกซีเบนโซอิกคงเหลือในชุดทดลองที่เติม *Rhizobium* sp. สายพันธุ์กัลยา
- จำนวนแบคทีเรียในชุดทดลองที่เติมสายพันธุ์กัลยาต่างๆ ตามที่ระบุ

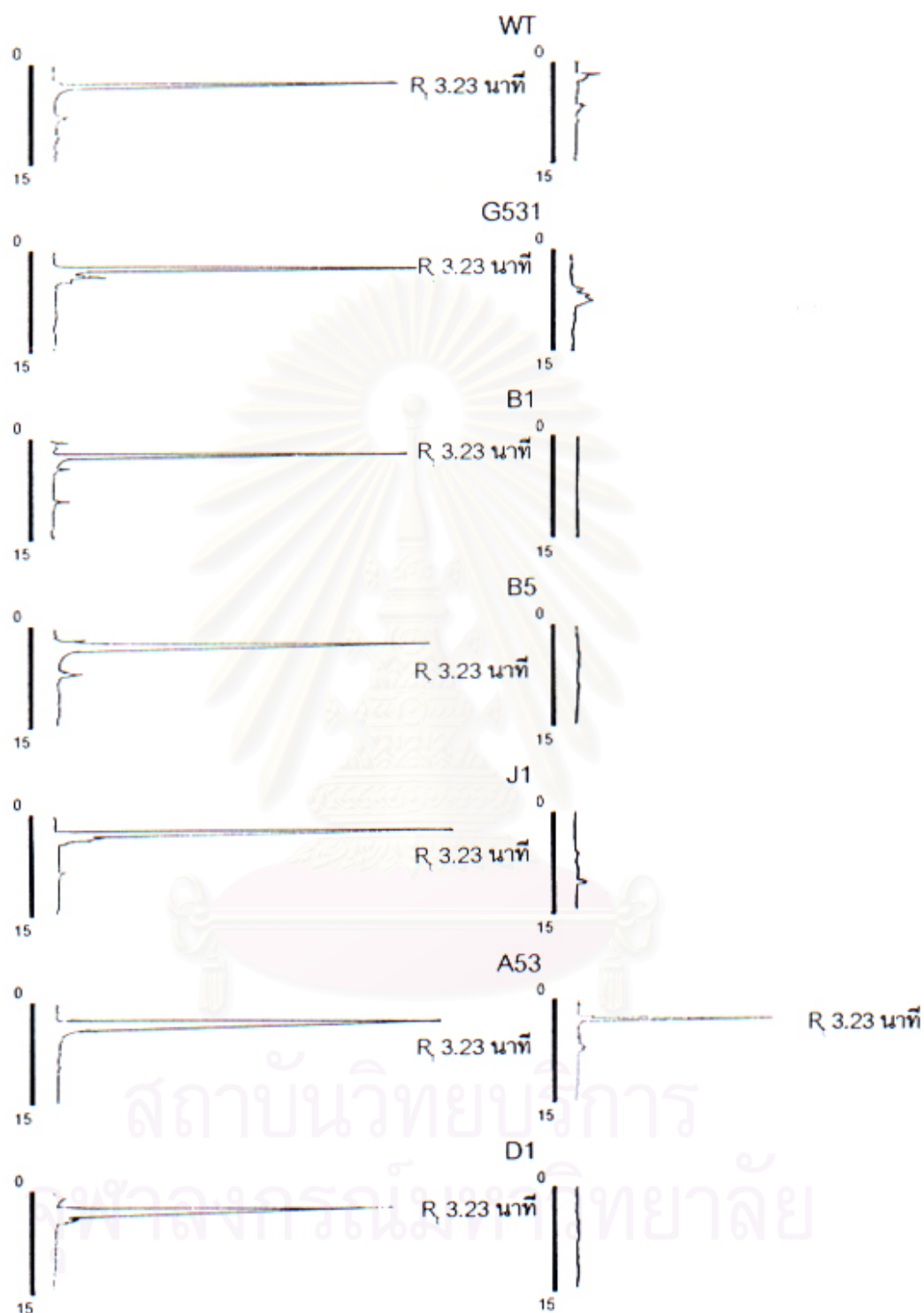
รูปที่ 4.18 การเจริญของเชื้อสายพันธุ์กัลยา G531, B1, B5, J1, A53 และ D1 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM ที่มีสารมัธยันต์ A53(1) หรือกรด 2,5-ไดไฮดรอกซีเบนโซอิกความเข้มข้น 300 มก.ต่อลิตร เปรียบเทียบกับ *Rhizobium* sp. CU-A1



รูปที่ 4.19 TLC โคโรมาโตแกรมสารมัธยันต์ที่สะสมจากการย่อยสลายสารมัธยันต์ A53(1) หรือกรด 2,5-ไดไฮดรอกซีเบนโซอิกในวันที่ 0 และวันที่ 8 โดยสายพันธุ์กลาย G531, H1, B1, B5, A53 และ D1 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ CFMM ที่มีสารมัธยันต์ A53(1) กรด 2,5-ไดไฮดรอกซีเบนโซอิกความเข้มข้น 300 มก.ต่อลิตร (W/O คืออาหารเหลวที่ไม่มีการเติมเชื้อ, R_f 0.22 คือกรด 2,5-ไดไฮดรอกซีเบนโซอิก)

0 วัน

8 วัน



รูปที่ 4.20 HPLC โคโรมาโตแกรมของสารมัธยันต์ที่เกิดขึ้นจากการย่อยสลายสารมัธยันต์ A53(1) หรือกรด 2,5-ไดไฮดรอกซีเบนโซอิกในวันที่ 0 และวันที่ 8 โดยสายพันธุ์กลาย G531, H1, B1, B5, A53 และ D1 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ CFMM ที่มีกรด 2,5-ไดไฮดรอกซีเบนโซอิกความเข้มข้น 300 มก. ต่อลิตร เปรียบเทียบกับ *Rhizobium* sp. CU-A1 (R_{3.23} นาที คือกรด 2,5-ไดไฮดรอกซีเบนโซอิก)

4.5.2 สารมัยยันต์ B1(1) หรืออะซีแอฟีนควิโนนเป็นแหล่งคาร์บอน

เมื่อทำการทดลองตามวิธีการในข้อ 3.5 โดยมีสารมัยยันต์ B1(1) หรืออะซีแอฟีนควิโนน ความเข้มข้น 300 มก.ต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอนพบว่าแต่ละสายพันธุ์กลายมีรูปแบบการเจริญและความสามารถในการออกซิไดซ์อะซีแอฟีนควิโนนไปเป็นสารมัยยันต์อื่นๆ แตกต่างกันไปเมื่อเทียบกับ *Rhizobium* sp. CU-A1 ดังผลการทดลองในรูปที่ 4.21, 4.22 และ 4.23 โดย G531 และ J1 มีรูปแบบในการลดปริมาณของสารมัยยันต์นี้คล้ายคลึงกับ *Rhizobium* sp. CU-A1 โดยสามารถใช้อะซีแอฟีนควิโนนจนเหลือปริมาณต่ำกว่า 30 เปอร์เซ็นต์ของปริมาณเริ่มต้นภายในวันที่ 4 ของการเลี้ยงเชื้อ และมีการเจริญของเชื้อเพิ่มขึ้นตามปริมาณสารที่ลดลง

ในขณะที่ A53 และ D1 ก็สามารถออกซิไดซ์อะซีแอฟีนควิโนนจนเหลือปริมาณต่ำกว่า 30 เปอร์เซ็นต์ของปริมาณเริ่มต้นภายในวันที่ 4 แต่มีการเจริญเพียงเล็กน้อย จากการวิเคราะห์สารมัยยันต์ที่เกิดขึ้นด้วยวิธี TLC แสดงผลการทดลองในรูปที่ 4.22 พบว่า A53 และ D1 มีรูปแบบการสะสมสารมัยยันต์คล้ายคลึงกับเมื่อเจริญโดยมีอะซีแอฟีนควิโนนเป็นแหล่งคาร์บอนดังแสดงผลการทดลองในรูปที่ 4.2 ก.

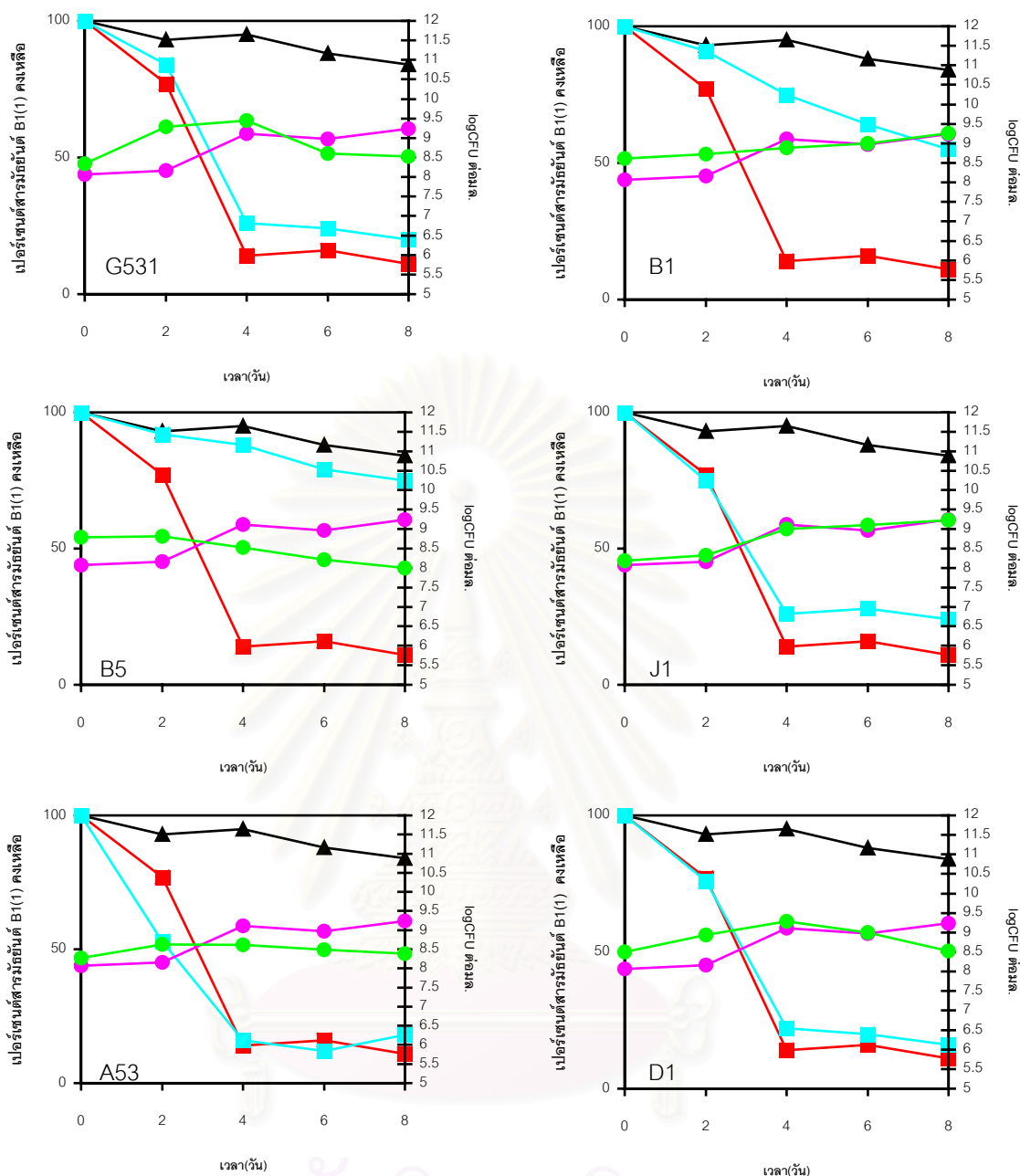
ส่วน B5 พบปริมาณอะซีแอฟีนควิโนนคงเหลือมากกว่า 75 เปอร์เซ็นต์ของปริมาณเริ่มต้นในวันที่ 8 ในส่วนของกาวิเคราะห์สารมัยยันต์ที่เกิดขึ้นจากการย่อยสลายแหล่งคาร์บอนนี้โดยวิธี TLC และ HPLC ดังแสดงผลการทดลองในรูปที่ 4.22 และ 4.23 ไม่พบสารมัยยันต์ชนิดใดเกิดขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม อาจอธิบายได้ว่าปริมาณอะซีแอฟีนควิโนนคงเหลือที่วิเคราะห์ได้ไม่ใช่อะซีแอฟีนควิโนนแต่เป็นปริมาณของกรดแนพธาลีน 1,8-ไดคาร์บอกซิลิกที่เกิดขึ้นทั้งนี้เพราะจากข้อมูลการทดลองที่ผ่านมา (ผลการทดลองข้อ 4.2) ในการทำสารมัยยันต์ที่ B5 สะสมให้บริสุทธิ์พบว่า B5 สะสมกรดแนพธาลีน 1,8-ไดคาร์บอกซิลิกซึ่งมีค่า R_f จากการวิเคราะห์ด้วยวิธี TLC (รูปที่ 4.14) และค่า R_f จากการวิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC (รูปที่ 4.12) ใกล้เคียงกับอะซีแอฟีนควิโนนมาก

สำหรับ B1 ซึ่งเป็นสายพันธุ์กลายที่สะสมอะซีแอฟีนควิโนนจากการย่อยสลายอะซีแอฟีนควิโนน เมื่อวิเคราะห์รูปแบบการเจริญพบว่าสามารถออกซิไดซ์อะซีแอฟีนควิโนนได้ปริมาณเล็กน้อยโดยคงเหลืออะซีแอฟีนควิโนนปริมาณ 55 เปอร์เซ็นต์ของปริมาณเริ่มต้นภายในวันที่ 8 และมีการเจริญเล็กน้อยเมื่อเปรียบเทียบกับสายพันธุ์กลายอื่นๆ อาจอธิบายว่า *Rhizobium* sp. CU-A1 มีเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องในกระบวนการเปลี่ยนอะซีแอฟีนควิโนนไปเป็นกรดแนพธาลีน 1,8-ไดคาร์บอกซิลิกโดยเชื้อสายพันธุ์กลาย B1 เป็นเชื้อสายพันธุ์กลายที่มีความบกพร่องของเอนไซม์ที่ทำหน้าที่นี้ อย่างไรก็ตาม Selifonov และคณะ (1996) รายงานว่าอะซีแอฟีนควิโนนสามารถเกิดการแตกตัวไปเป็นกรดแนพธาลีน 1,8-ไดคาร์บอกซิลิกได้เองโดยปัจจัยทางกายภาพไม่ต้องอาศัยกิจ

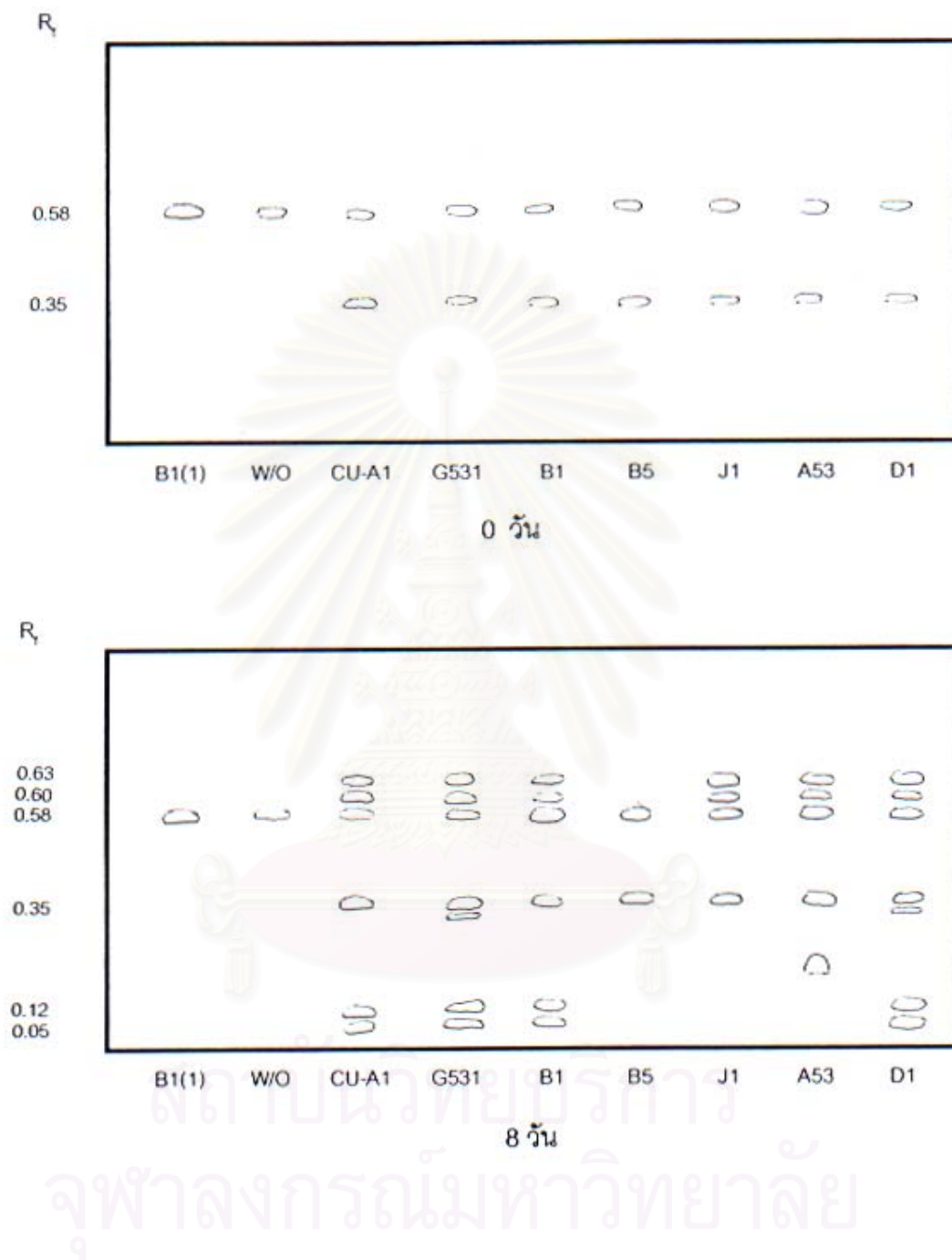
กรรมของเอนไซม์ ดังนั้นสายพันธุ์กลาย B1 อาจได้กรดแอมพลาลีน 1,8-ไดคาร์บอกซิลิกที่ถูกเปลี่ยนจากอะซีแนพธรีนควิโนนบางส่วนด้วยวิธีทางกายภาพสำหรับการเจริญได้ ทำให้ปริมาณอะซีแนพธรีนควิโนนลดลงแต่การเจริญของ B1 ก็ยังต่ำกว่าสายพันธุ์เดิมและสายพันธุ์กลายอื่นๆ ค่อนข้างมากอาจเพราะการเปลี่ยนอะซีแนพธรีนควิโนนไปเป็นกรดแอมพลาลีน 1,8-ไดคาร์บอกซิลิกโดยวิธีทางกายภาพเกิดได้น้อยกว่าเมื่อมีการเร่งของเอนไซม์



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



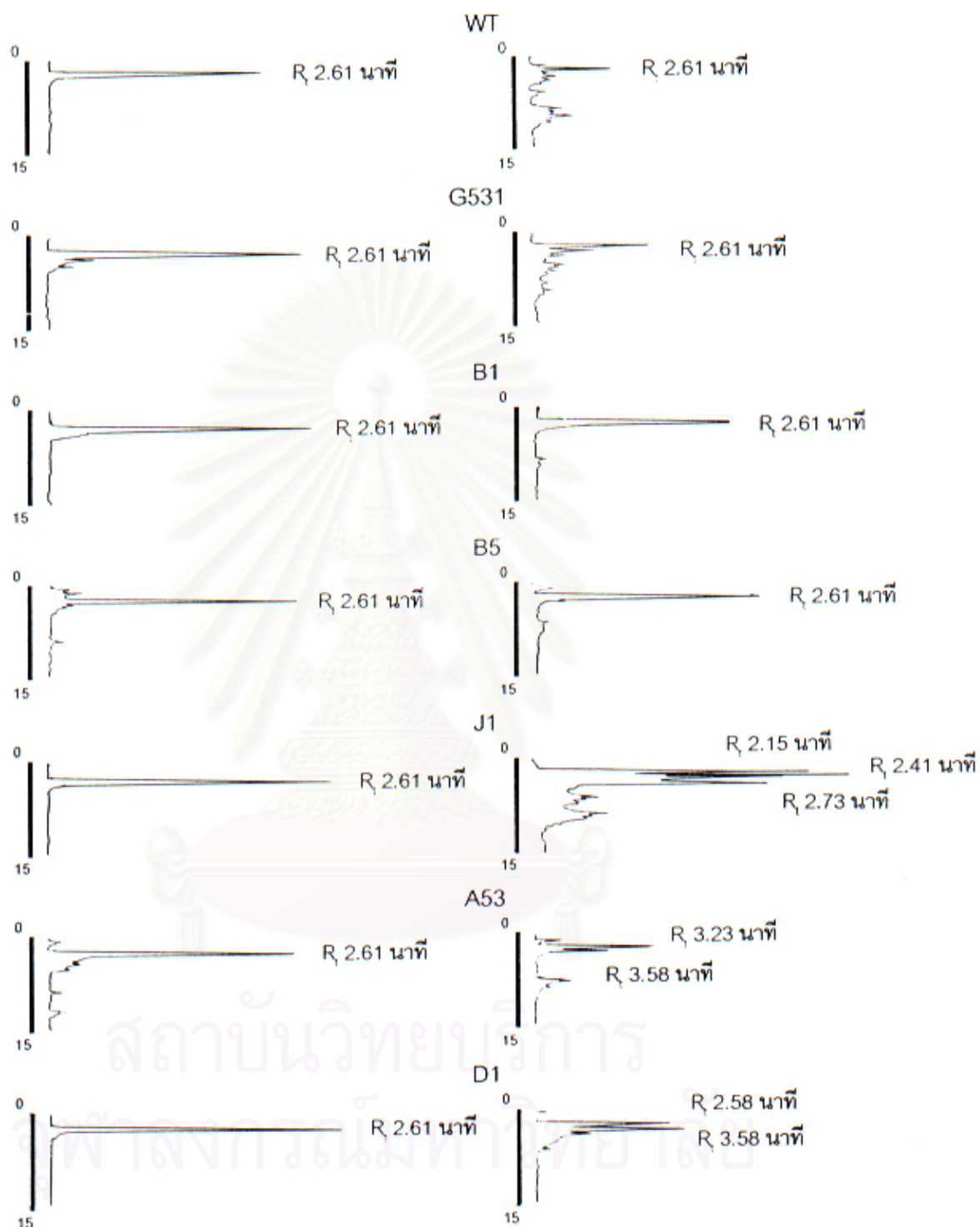
รูปที่ 4.21 การเจริญของเชื้อสายพันธุ์กลาย G531, B1, B5, J1, A53 และ D1 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM ที่มีสารบี (1) หรืออะซีแนพรีนควิโนความเข้มข้น 300 มก.ต่อลิตร เปรียบเทียบกับ *Rhizobium* sp. CU-A1



รูปที่ 4.22 TLC โครมาโตแกรมสารมัธยันต์ที่สะสมจากการย่อยสลายสารมัธยันต์ B1(1) หรืออะซีแนพธินควิโนนในวันที่ 0 และวันที่ 8 โดยสายพันธุ์กลาย G531, H1, B1, B5, A53 และ D1 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ CFMM ที่มีสารมัธยันต์ B1(1) หรืออะซีแนพธินควิโนนความเข้มข้น 300 มก.ต่อลิตร (W/O คืออาหารเหลวที่ไม่มีการเติมเชื้อ, R_f 0.58 คืออะซีแนพธินควิโนน)

0 วัน

8 วัน



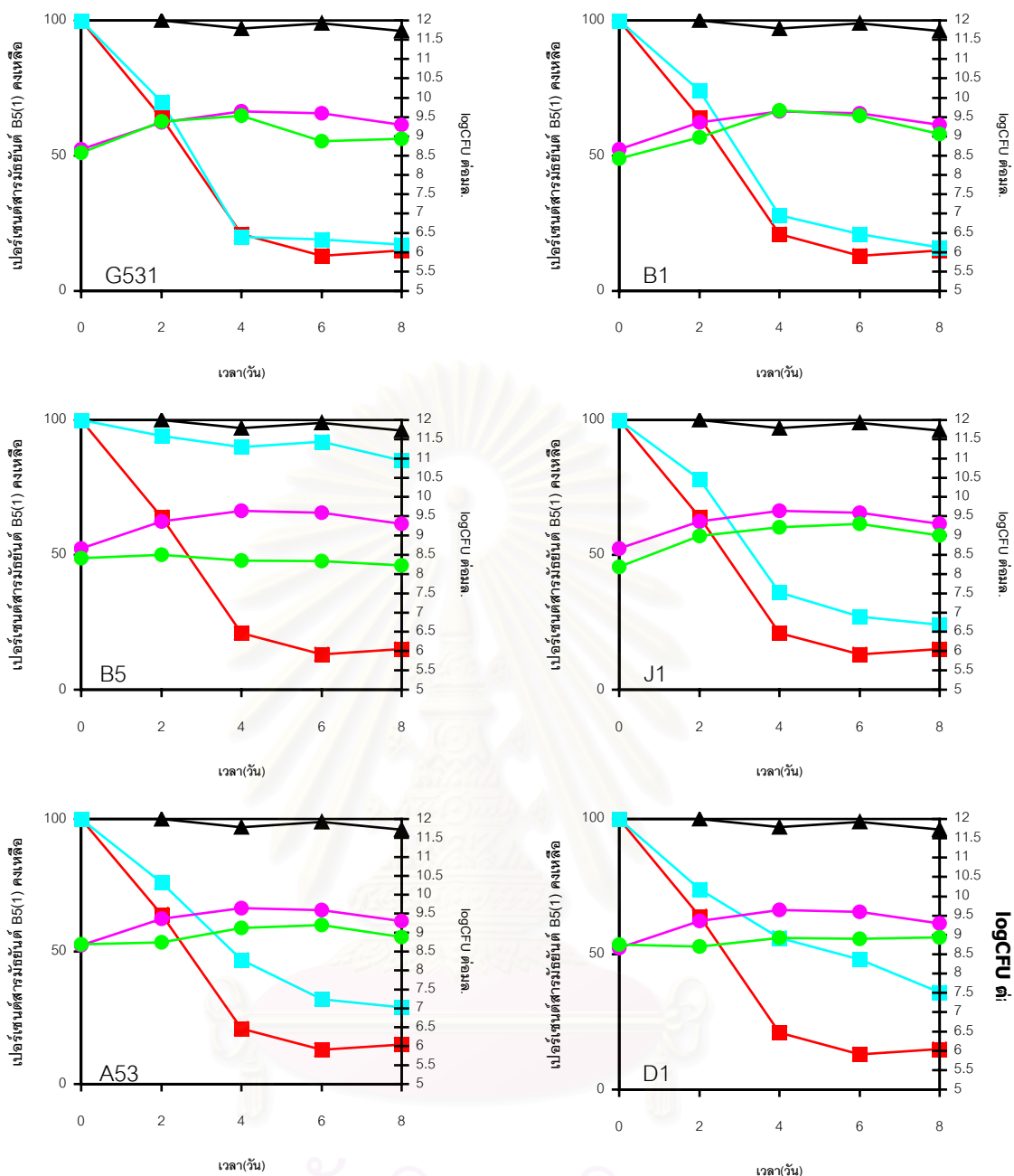
รูปที่ 4.23 HPLC โคโรมาโตแกรมของสารมัธยันต์ที่เกิดขึ้นจากการย่อยสลายสารมัธยันต์ B1(1) หรือ อะซีแนพธินควิโนนในวันที่ 0 และวันที่ 8 โดยสายพันธุ์กลาย G531, H1, B1, B5, A53 และ D1 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ CFMM ที่มีสารมัธยันต์ B1(1) หรืออะซีแนพธินควิโนนความเข้มข้น 300 มก.ต่อลิตร เปรียบเทียบกับ *Rhizobium* sp. CU-A1 (R_t 2.61 คืออะซีแนพธินควิโนน)

4.5.3 สารมัยยันต์ B5(1) หรือกรดแนพธาลีน-1,8-ไดคาร์บอกซิลิกเป็นแหล่งคาร์บอน

จากการทดลองตามวิธีการในข้อ 3.5 โดยมีสารมัยยันต์ B5(1) หรือกรดแนพธาลีน-1,8-ไดคาร์บอกซิลิกความเข้มข้น 300 มก.ต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอนพบว่าแต่ละสายพันธุ์กลายมีรูปแบบการเจริญและความสามารถในการออกซิไดซ์กรดแนพธาลีน-1,8-ไดคาร์บอกซิลิกไปเป็นสารมัยยันต์อื่นๆ แตกต่างกันไปเมื่อเทียบกับ *Rhizobium* sp. CU-A1 ดังผลการทดลองในรูปที่ 4.24, 4.25 และ 4.26 โดย G531, B1 และ J1 มีรูปแบบในการลดปริมาณของสารมัยยันต์นี้คล้ายคลึงกับ *Rhizobium* sp. CU-A1 โดยสามารถใช้กรดแนพธาลีน-1,8-ไดคาร์บอกซิลิกจนเหลือปริมาณต่ำกว่า 40 เปอร์เซ็นต์ของปริมาณเริ่มต้นภายในวันที่ 4 ของการเลี้ยงเชื้อ และมีการเจริญของเชื้อเพิ่มขึ้นตามปริมาณสารที่ลดลง ส่วนผลการวิเคราะห์สารมัยยันต์ชนิดต่างๆ ที่เกิดขึ้นก็มีรูปแบบเช่นเดียวกับ *Rhizobium* sp. CU-A1

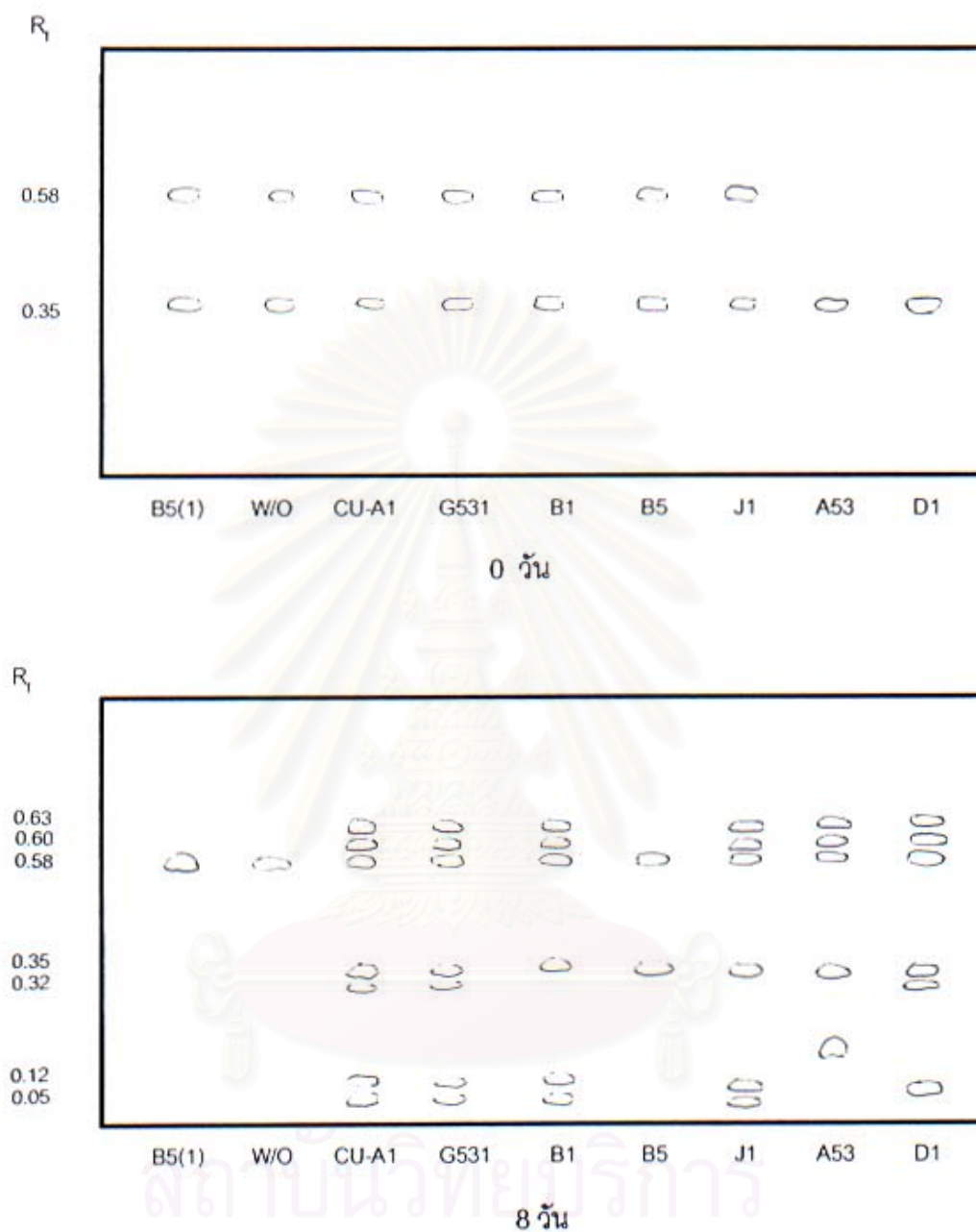
ส่วน A53 และ D1 สามารถออกซิไดซ์กรดแนพธาลีน 1,8-ไดคาร์บอกซิลิกจนเหลือปริมาณต่ำกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ของปริมาณเริ่มต้นภายในวันที่ 8 แต่มีการเจริญเพิ่มจำนวนเพียงเล็กน้อย และผลการวิเคราะห์สารมัยยันต์ด้วยวิธี TLC ดังแสดงในรูปที่ 4.25 พบว่า A53 มีการสะสมของสารมัยยันต์ชนิดหนึ่งเช่นเดียวกับที่พบจากการย่อยสลายอะซีแนพทิลีน ในขณะที่เชื้อสายพันธุ์กลาย D1 ก็มีรูปแบบของสารมัยยันต์ที่สะสมคล้ายคลึงกับที่สะสมจากการย่อยสลายอะซีแนพทิลีน ดังที่แสดงผลการทดลองไว้ในรูปที่ 4.2 ก.

สำหรับ B5 ไม่สามารถย่อยสลายกรดแนพธาลีน 1,8-ไดคาร์บอกซิลิกได้เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมและผลการวิเคราะห์ด้วย TLC และ HPLC ไม่ปรากฏสารมัยยันต์อื่นๆ แสดงว่า B5 มีความบกพร่องในการย่อยสลายกรดแนพธาลีน 1,8-ไดคาร์บอกซิลิกซึ่งยืนยันว่าเป็นสารมัยยันต์ที่สะสมจากการย่อยสลายของอะซีแนพทิลีนโดยสายพันธุ์กลายนี้จริง



- ▲ เปอร์เซ็นต์การรอดแพรพลาติน 1,8-ไดคาร์บอกซิลิกคงเหลือในชุดควบคุมที่ไม่เติมเชื้อ
- เปอร์เซ็นต์การรอดแพรพลาติน 1,8-ไดคาร์บอกซิลิกคงเหลือในชุดควบคุมที่เติม *Rhizobium* sp. CU-A1
- จำนวนแบคทีเรียในชุดควบคุมที่เติม *Rhizobium* sp. CU-A1
- เปอร์เซ็นต์การรอดแพรพลาติน 1,8-ไดคาร์บอกซิลิกคงเหลือในชุดทดลองที่เติม *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ที่กลาย
- จำนวนแบคทีเรียในชุดทดลองที่เติมสายพันธุ์ที่กลายต่างๆ ตามที่ระบุ

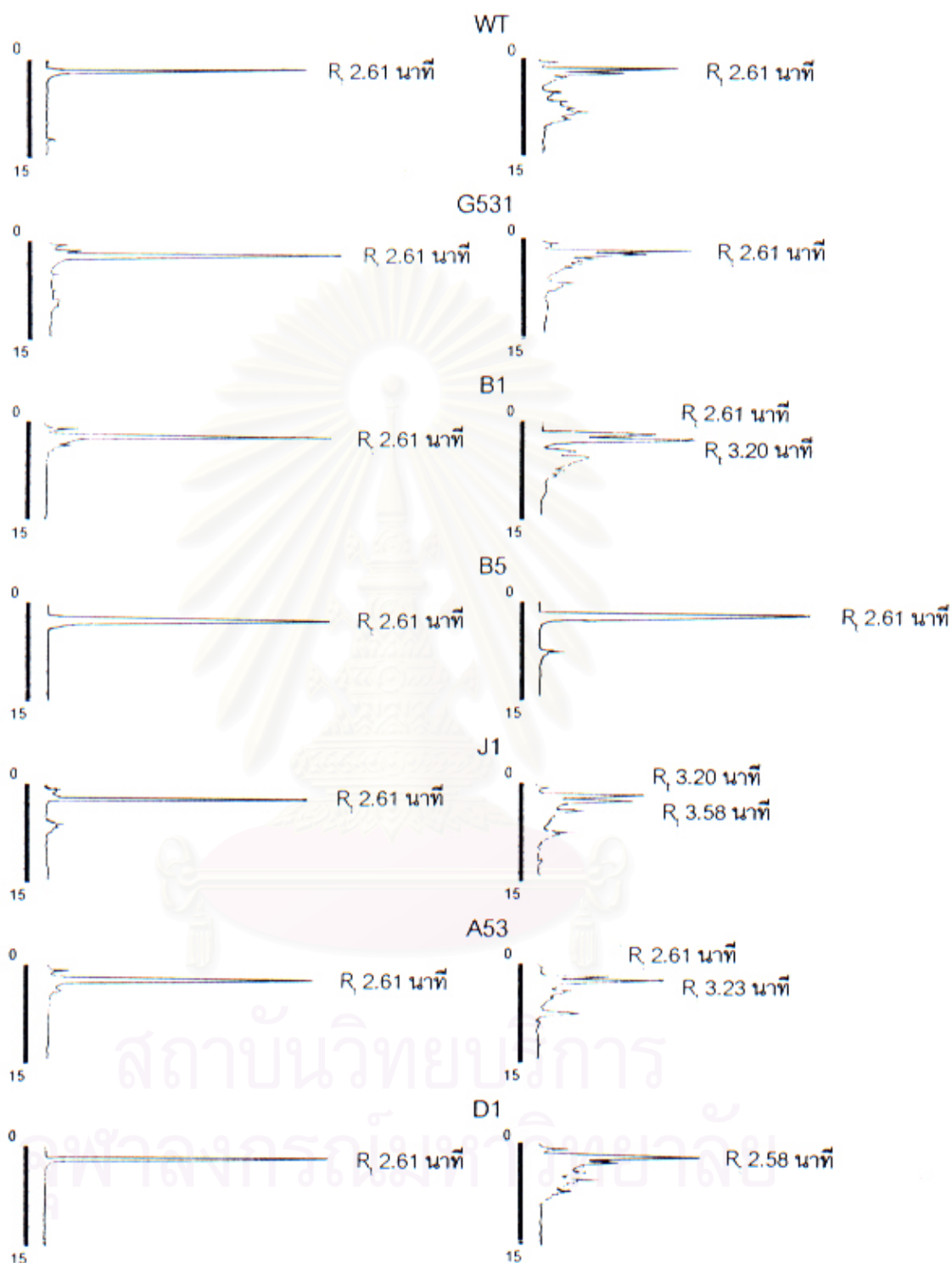
รูปที่ 4.24 การเจริญของเชื้อสายพันธุ์ที่กลาย G531, B1, B5, J1, A53 และ D1 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM ที่มีสารมัยันต์ B5(1) หรือกรดแพรพลาติน 1,8-ไดคาร์บอกซิลิกความเข้มข้น 300 มก. ต่อลิตร เปรียบเทียบกับ *Rhizobium* sp. CU-A1



รูปที่ 4.25 TLC โคโรนาโตแกรมสารมัธยันต์ที่สะสมจากการย่อยสลายสารมัธยันต์ B5(1) หรือกรดแนพทาลีน 1,8-ไดคาร์บอกซิลิกในวันที่ 0 และวันที่ 8 โดยสายพันธุ์กลาย G531, H1, B1, B5, A53 และ D1 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ CFMM ที่มีสารมัธยันต์ B5(1) หรือกรดแนพทาลีน 1,8-ไดคาร์บอกซิลิกความเข้มข้น 300 มก.ต่อลิตร (W/O คืออาหารเหลวที่ไม่มีการเติมเชื้อ, R_f 0.58 คือกรดแนพทาลีน 1,8-ไดคาร์บอกซิลิก)

0 วัน

8 วัน



รูปที่ 4.26 HPLC โคโรมาโตแกรมของสารมัธยันต์ที่เกิดขึ้นจากการย่อยสลายสารมัธยันต์กรดเนฟธาลีน 1,8-ไดคาร์บอกซิลิกต์ในวันที่ 0 และวันที่ 8 โดยสายพันธุ์กลาย G531, H1, B1, B5, A53 และ D1 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ CFMM ที่มีกรดเนฟธาลีน 1,8-ไดคาร์บอกซิลิกความเข้มข้น 300 มก. ต่อลิตร เปรียบเทียบกับ *Rhizobium* sp. CU-A1 (R_t 2.61 คือกรดเนฟธาลีน 1,8-ไดคาร์บอกซิลิก)

สรุปและอภิปรายผลการทดลอง

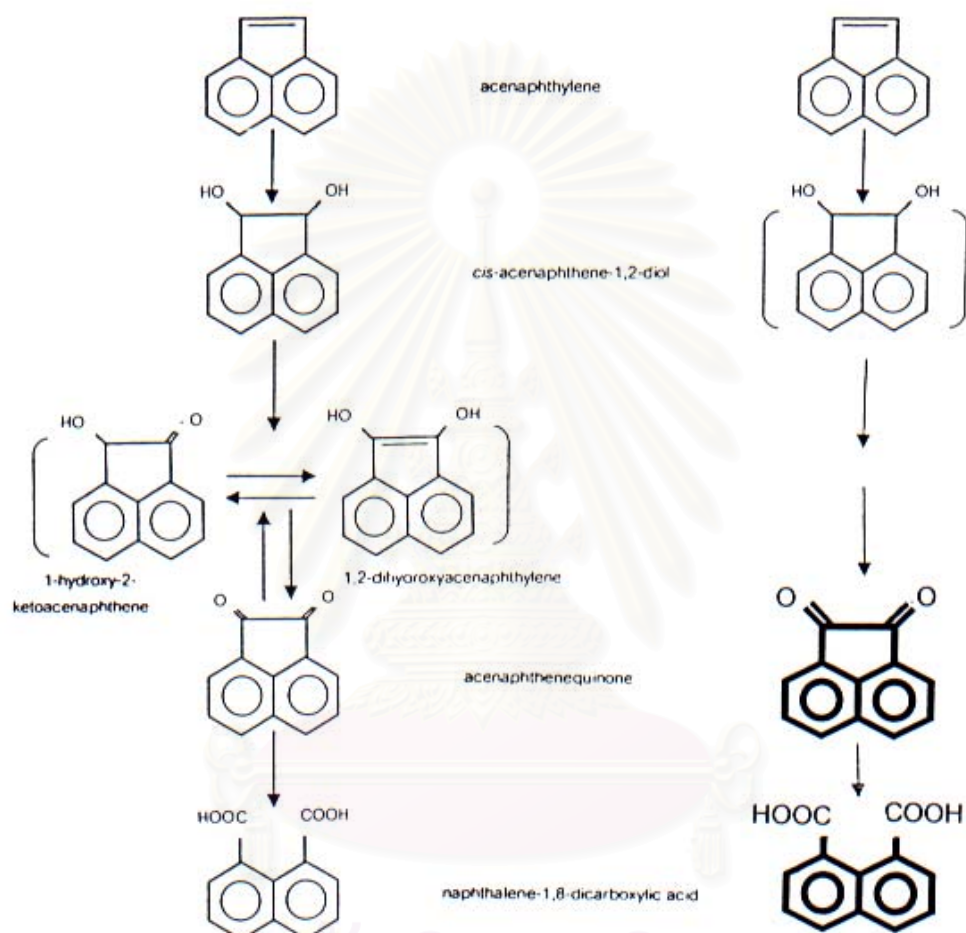
Rhizobium sp. CU-A1 เป็นจุลินทรีย์ที่พบว่าสามารถเจริญโดยใช้อะซีแนพรีลีนเป็นแหล่งคาร์บอนได้ (ศรัลยา แพงไทร, 2543) แต่จากการสืบค้นเอกสารจนถึงปัจจุบัน ยังไม่มีรายงานใดกล่าวถึงการย่อยสลายสาร PAHs โดยเฉพาะอะซีแนพรีลีนในจุลินทรีย์กลุ่ม *Rhizobium* ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงได้ทำการศึกษาเพื่อหาวิธีเมตาบอลิซึมของอะซีแนพรีลีนใน *Rhizobium* sp. CU-A1

จากงานวิจัยของธัญชัช เกรียงไกรพิพัฒน์ (2544) ที่ได้ทำการกลายพันธุ์ *Rhizobium* sp. CU-A1 จนได้สายพันธุ์กลายหลายสายพันธุ์ที่มีความบกพร่องในการย่อยสลายอะซีแนพรีลีนให้สมบูรณ์ งานวิจัยนี้ได้คัดเลือกสายพันธุ์กลายมา 3 สายพันธุ์ คือ A53, B1 และ B5 ซึ่งพบว่ามีการสะสมสารมัธยันต์ที่แตกต่างจากสายพันธุ์ดั้งเดิม CU-A1 เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีอะซีแนพรีลีนเป็นแหล่งคาร์บอน และสารมัธยันต์ที่สะสมมีปริมาณสูง จึงทำให้ง่ายต่อการสกัดแยกและทำให้บริสุทธิ์

ผลการทำสารมัธยันต์ให้บริสุทธิ์และวิเคราะห์โครงสร้างทางเคมี พบว่าสายพันธุ์ A53 สะสมกรด 2,5-ไดไฮดรอกซีเบนโซอิก (กรดเจนทิลิก), สายพันธุ์ B1 สะสมอะซีแนพรีลควิโนน และสายพันธุ์ B5 สะสม กรดแนพธาลิน-1,8-ไดคาร์บอกซิลิก จากผลการวิเคราะห์สารมัธยันต์สามารถอธิบายถึงความสัมพันธ์ของการเจริญของเชื้อ A53, B1 และ B5 กับการสะสมสารมัธยันต์ที่วิเคราะห์ได้ในแต่ละเชื้อ โดย A53 เจริญได้ในอาหารที่มีอะซีแนพรีลีนเป็นแหล่งคาร์บอน (รูปที่ 4.1 ก.) เนื่องจากสลายวงเบนซีนของอะซีแนพรีลีนจนถึงกรด 2,5-ไดไฮดรอกซีเบนโซอิก ในขณะที่ B1 และ B5 เจริญไม่ได้ (รูปที่ 4.1 ข.) เนื่องจากเปลี่ยนอะซีแนพรีลีนไปถึงเพียง อะซีแนพรีลควิโนน และ กรดแนพธาลิน-1,8-ไดคาร์บอกซิลิก เท่านั้น ไม่มีการแตกของวงเบนซีน จึงไม่สามารถใช้เป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงานได้

จากรายงานการย่อยสลายอะซีแนพรีลีนโดย *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 (Selifenov และคณะ, 1996) พบว่าอะซีแนพรีลีนจะถูกออกซิไดซ์ไปเป็น ซิส-1,2-อะซีแนพรีนไดออล, อะซีแนพรีนควิโนน และกรดแนพธาลิน-1,8-ไดคาร์บอกซิลิก ตามลำดับ ซึ่งอะซีแนพรีนควิโนน และกรดแนพธาลิน 1,8-ไดคาร์บอกซิลิก เป็นสารมัธยันต์ที่พบสะสมจากสายพันธุ์กลายของ *Rhizobium* sp. CU-A1 เช่นเดียวกันแสดงว่า *Rhizobium* sp. CU-A1 มีวิธีการย่อยสลายอะซีแนพรีลีนมาเป็นกรดแนพธาลิน-1,8-ไดคาร์บอกซิลิกเช่นเดียวกันกับใน *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 ดังแสดงในรูปที่ 5.1 แต่งานวิจัยนี้ยังไม่พบสายพันธุ์กลายที่มีการสะสมอะซี

แนพรีนไดออกซซึ่งถ้าพบสายพันธุ์กลายดังกล่าวก็สามารถระบุวิธีการย่อยสลายของอะซีแนพรีลินมาเป็นกรดแนพธาไลน์-1,8-ไดคาร์บอกซิลิกได้อย่างชัดเจน



ก.

ข.

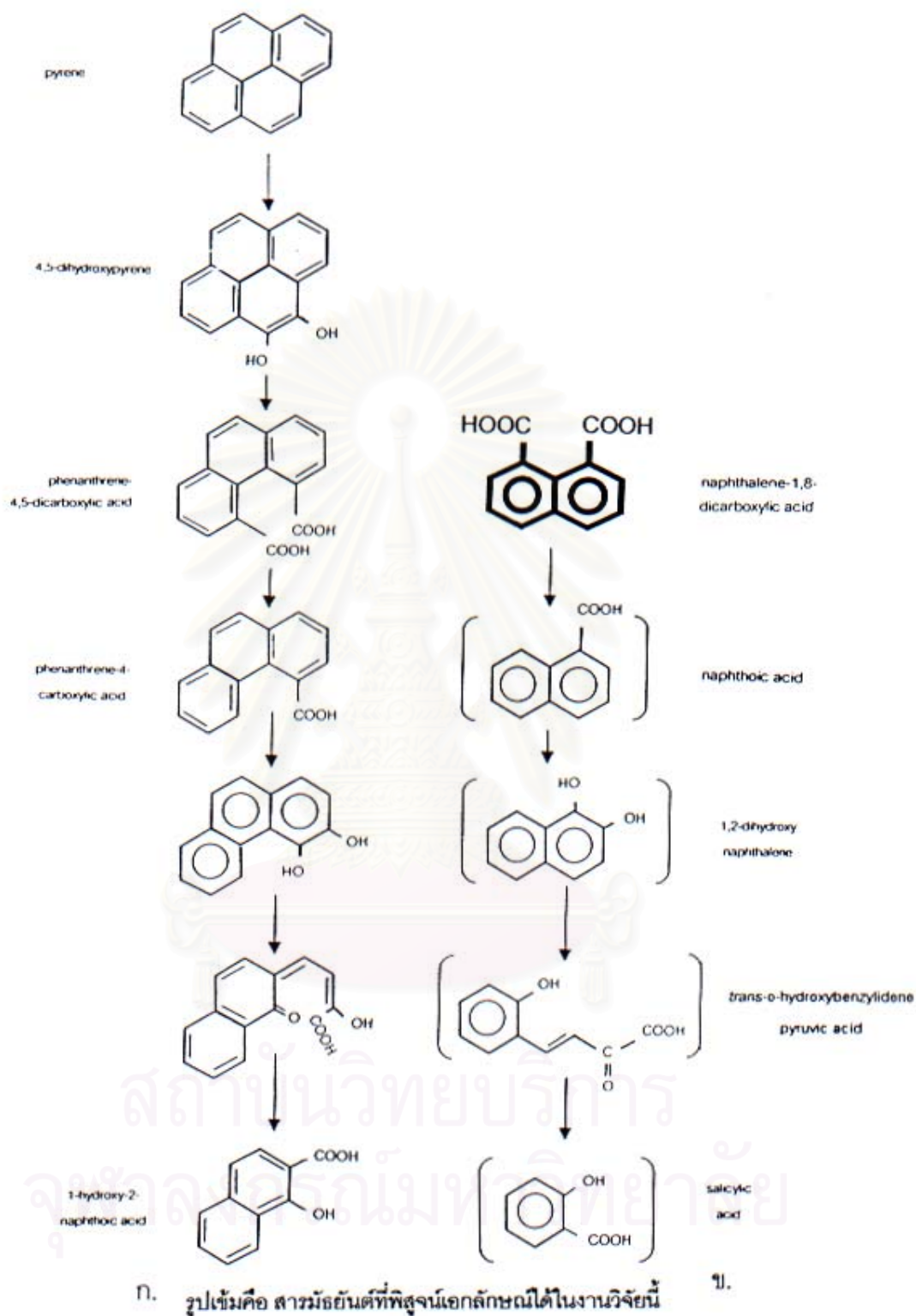
รูปเข้มนคือ สารมัยยันต์ที่พิสูจน์เอกลักษณ์ได้ในงานวิจัยนี้

รูปที่ 5.1 วิธีการย่อยสลายอะซีแนพรีลินมาเป็นกรดแนพธาไลน์-1,8-ไดคาร์บอกซิลิกโดย *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 (Selifenov และคณะ, 1996) (ก.) และไดอะแกรมเสนอวิธีการย่อยสลายอะซีแนพรีลินโดย *Rhizobium* sp. CU-A1

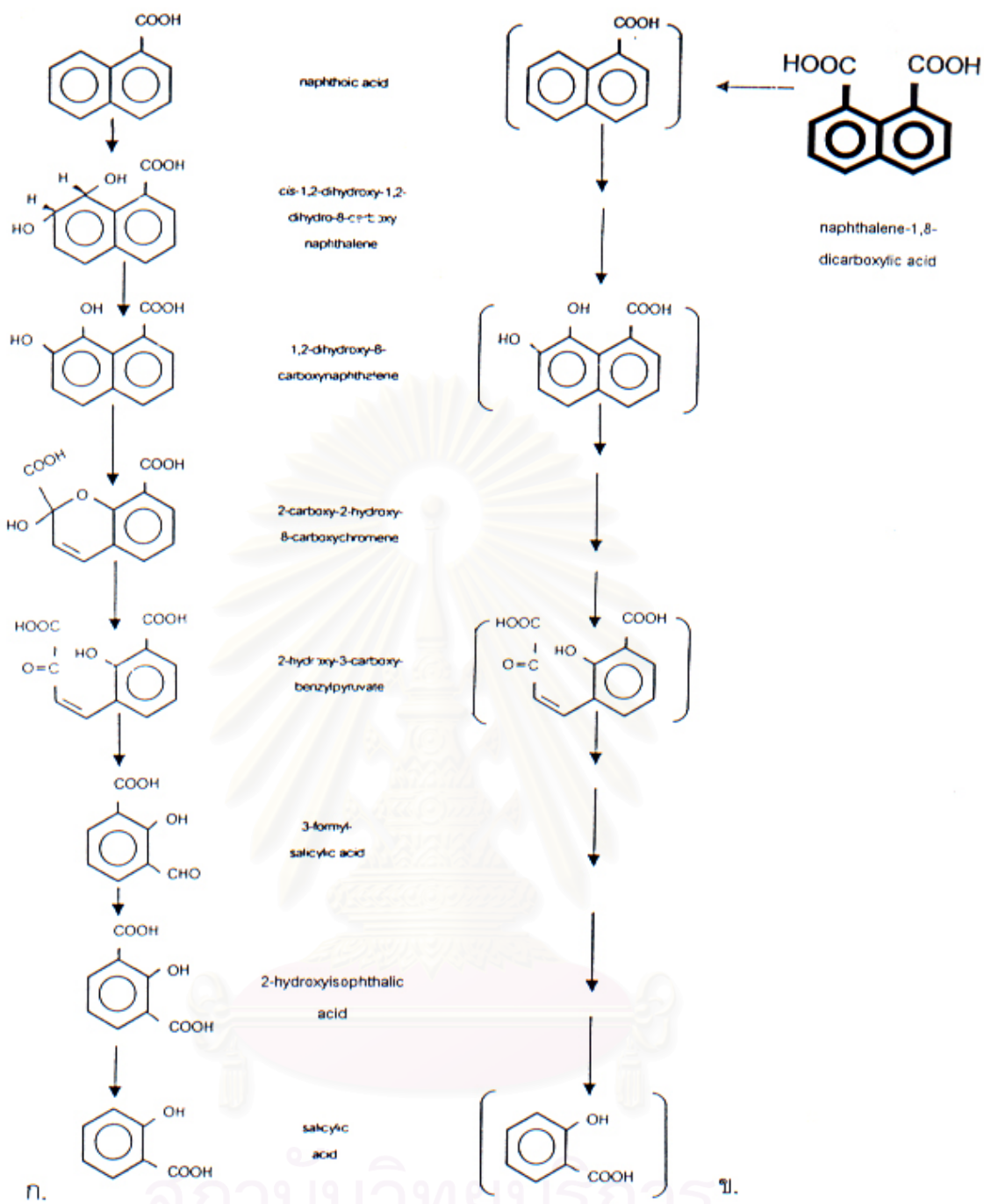
ปัจจุบันยังไม่มีรายงานถึงจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายกรดแนพธาลีน-1,8-ไดคาร์บอกซิลิกได้ แต่งานวิจัยนี้ตรวจพบสายพันธุ์กลายที่สะสม กรด-2,5-ไดไฮดรอกซีเบนโซอิก หรือกรดเจนทิลิก ซึ่งพบว่าเป็นสารมัธยันต์ที่เกิดขึ้นจากการย่อยสลายสาร PAHs หลายชนิด (Starovoitov, 1975 และ Grifoll และคณะ, 1995) ซึ่งแสดงว่า *Rhizobium* sp. CU-A1 สามารถย่อยสลายกรดแนพธาลีน-1,8-ไดคาร์บอกซิลิกมาเป็นกรดเจนทิลิกได้

กรดพีแนนทรีน-4,5-ไดคาร์บอกซิลิกซึ่งเป็นสารมัธยันต์ที่เกิดจากการย่อยสลายไพรีนโดย *Mycobacterium* sp. AP1 (Vila และคณะ, 2001) และ *Mycobacterium* sp. PYR-1 (Young และคณะ, 1995) มีโครงสร้างที่มีหมู่คาร์บอกซิลบนวงอะโรมาติกเบนซีน 2 หมู่ คล้ายคลึงกับกรดแนพธาลีน-1,8-ไดคาร์บอกซิลิก โดยจุลินทรีย์ทั้ง 2 ชนิดจะออกซิไดซ์กรดพีแนนทรีน-4,5-ไดคาร์บอกซิลิกไปเป็นกรดพีแนนทรีน-4-คาร์บอกซิลิกโดยดึงหมู่คาร์บอกซิลบนวงเบนซีนออก 1 หมู่ และหลังจากนั้นจะเกิดการเติมออกซิเจนบนวงเบนซีนที่มีหมู่คาร์บอกซิลอยู่เพื่อแตกวงต่อไป ในทำนองเดียวกันกรดแนพธาลีน-1,8-ไดคาร์บอกซิลิกอาจจะถูกดึงหมู่คาร์บอกซิลบนวงเบนซีนออก 1 หมู่ ทำให้เกิดเป็น กรดแนพโทอิก และเกิดการเติมออกซิเจน 2 อะตอมบนวงเบนซีนที่มีหมู่คาร์บอกซิลของกรดแนพโทอิกเพื่อแตกวงต่อไป เช่นเดียวกับวิธีการย่อยสลายไพรีน ดังแสดงในรูปที่ 5.2 หรือกรดแนพโทอิกจะถูกเติมออกซิเจน 2 อะตอมบนวงเบนซีนที่ไม่มีหมู่คาร์บอกซิลเกิดเป็น 1,2-ไดไฮดรอกซี-8-คาร์บอกซีแนพธาลีน เหมือนเช่นวิธีการย่อยสลายกรดแนพโทอิกของ *Pseudomonas maltophilia* CSV89 (Phale และคณะ, 1995) ดังแสดงในรูปที่ 5.3 ซึ่งทั้ง 2 วิธีจะเปลี่ยนกรดแนพโทอิกไปเป็นกรดซาลิไซลิกเช่นเดียวกัน

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



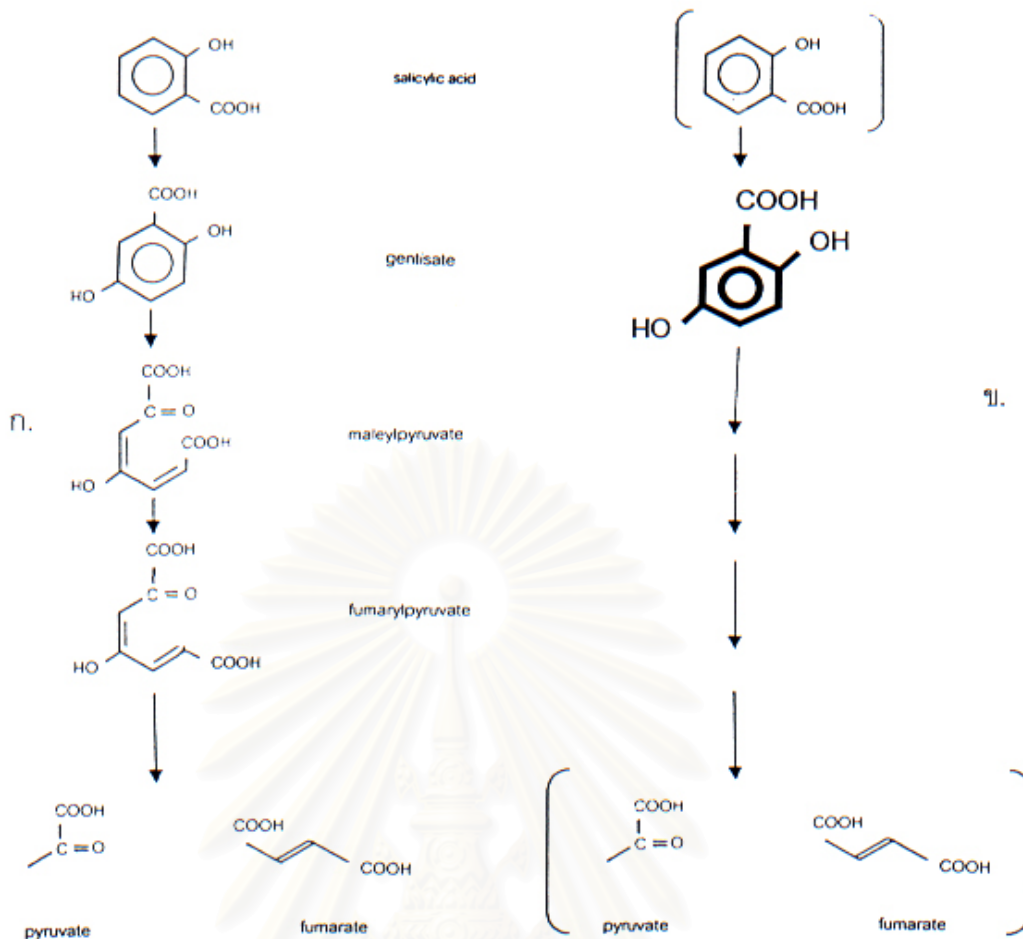
รูปที่ 5.2 วิธีกรยอยสลายไพรีนโดย *Mycobacterium* sp. AP1 (Vila และคณะ, 2001) (ก.) และ ไดอะแกรมเสนอวิธีกรยอยสลายกรดแนพทาลีน-1,8-ไดคาร์บอกซิลิกโดย *Rhizobium* sp. CU-A1 (ข.)



รูปที่ 5.3 สารมัธยันต์ที่พิสูจน์เอกลักษณ์ได้ในงานวิจัยนี้

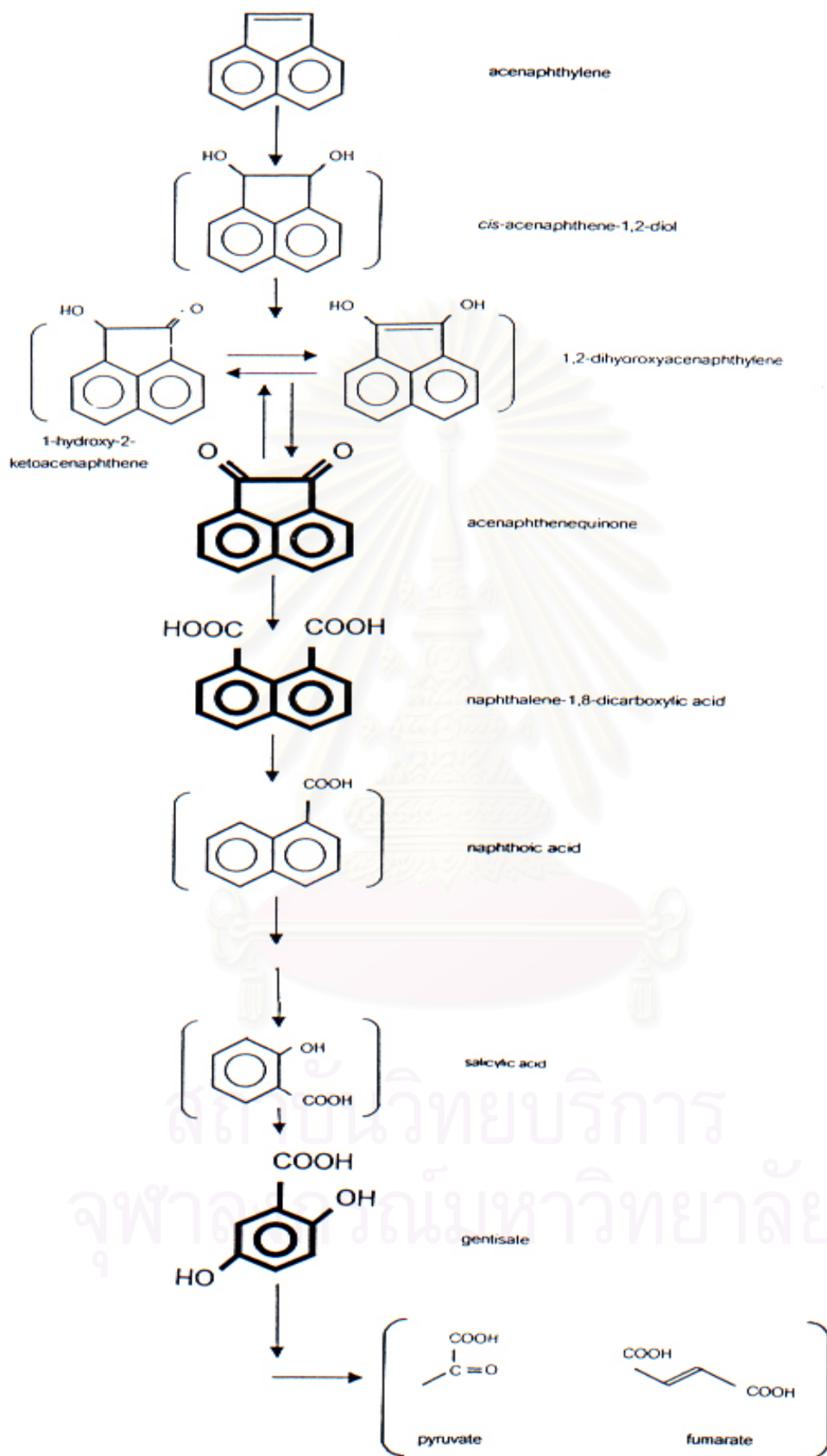
รูปที่ 5.3 วิธีการย่อยสลายกรดแนฟโธอิกโดย *Pseudomonas maltophilia* CSV89 (Phale และคณะ, 1995) (ก.) และไดอะแกรมเสนอวิธีการย่อยสลายกรดแนฟธาลีน-1,8-ไดคาร์บอกซิลิกโดย *Rhizobium* sp. CU-A1 (ข.)

หลังจากนั้นกรดซาลิไซลิกจะเปลี่ยนเป็นกรดเจนทิลิก (Fuenmayor และคณะ, 1998) และเปลี่ยนเป็น มาริลไพรูเวท, พูมาริลไพรูเวท และไพรูเวทกับพูมาเวท ตามลำดับ (Ning และคณะ, 2001) ดังแสดงในรูปที่ 5.4 เพื่อเข้าสู่วัฏจักรเครบส์ต่อไป



รูปที่ 5.4 วิธีการย่อยสลายกรดซาลิไซลิก (Fuenmayor และคณะ, 1998) และกรดเจนทิสิก (Ning และคณะ, 2001) (ก.) และไดอะแกรมเสนอวิธีการย่อยสลายกรดซาลิไซลิกโดย *Rhizobium* sp. CU-A1 (ข.)

จากงานวิจัยนี้พบสารมัธยันต์ที่เกิดจากการย่อยสลายอะซีแนฟธิลีน 3 ชนิดคือ อะซีแนฟธิลีนควิโนน, กรดแนพธาไลน์-1,8-ไดคาร์บอกซิลิก และกรด 2,5-ไดไฮดรอกซีเบนโซอิก ซึ่งสามารถทำนายวิถีเมตาบอลิซึมเบื้องต้นของอะซีแนฟธิลีนใน *Rhizobium* sp. CU-A1 ได้ ดังนั้นคือ อะซีแนฟธิลีนจะถูกเมตาบอลิไทต์ไปเป็น อะซีแนฟธิลีนควิโนน, กรดแนพธาไลน์-1,8-ไดคาร์บอกซิลิก และกรด 2,5-ไดไฮดรอกซีเบนโซอิก ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 5.5 ซึ่งสารมัธยันต์ในวงเล็บเป็นสารมัธยันต์ที่ยังไม่สามารถสกัดแยกและทำให้บริสุทธิ์เพื่อพิสูจน์เอกลักษณ์และโครงสร้างทางเคมีที่แน่นอนได้ในงานวิจัยนี้ ซึ่งจะต้องหาสายพันธุ์กลายที่สะสมสารมัธยันต์ต่างๆ เพิ่มขึ้น รวมทั้งสารมัธยันต์บางชนิด เช่น มาริลไพรูเวทและฟุมาริลไพรูเวท ซึ่งเป็นสารมัธยันต์ที่มีโครงสร้างขนาดเล็กถูกย่อยสลายได้ง่ายและรวดเร็วจึงยากต่อการสกัดแยกและทำให้บริสุทธิ์ จึงอาจต้องนำเทคนิคทางด้านอื่นมาช่วยในการศึกษา เช่น เอนไซม์และยีนที่เกี่ยวข้องในวิถีการย่อยสลายเพื่อยืนยันวิถีการย่อยสลายอะซีแนฟธิลีนโดย *Rhizobium* sp. CU-A1 ที่ถูกต้องต่อไป



รูปที่ 5.5 ไดอะแกรมเสนอวิธีการย่อยสลายอะซีแนฟทีนโดย *Rhizobium* sp. CU-A1

รูปเข้ม คือ สารมัธยันต์ที่พิสูจน์เอกลักษณ์ได้ในงานวิจัยนี้

บทที่ 6

ข้อเสนอแนะในการวิจัย

6.1 อาหาร CFMM ที่มีกรดโปรโตคาที่คูอิกเป็นแหล่งคาร์บอนซึ่งใช้ในการเตรียมหัวเชื้อของสายพันธุ์กลายมีสีม่วงอมน้ำเงิน ควรเตรียมใหม่ทุกครั้งก่อนใช้เนื่องจากกรดโปรโตคาที่คูอิกจะเกิดออกซิเดชันเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลซึ่งแบคทีเรียไม่สามารถใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในการเจริญได้ (D'Argenio และคณะ, 1999)

6.2 ในการเตรียมหัวเชื้อเพื่อใช้ในการย่อยสลายอะซีแนพทีลินควรใช้หัวเชื้อที่เจริญเต็มที่ คือ เปลี่ยนกรดโปรโตคาที่คูอิกในอาหารเลี้ยงเชื้อจากสีม่วงน้ำเงินเป็นสีขาวขุ่น เพราะเนื่องจากถ้าอาหารเลี้ยงเชื้อยังมีสีม่วงอยู่อาจยังมีกรดโปรโตคาที่คูอิกและสารมัธยันต์ต่างๆ เหลืออยู่ซึ่งเป็นพิษต่อเซลล์และส่งผลให้การวิเคราะห์ในขั้นตอนต่อไปผิดพลาดได้

6.3 การวิเคราะห์สารมัธยันต์ที่สะสมจากการย่อยสลายอะซีแนพทีลินด้วยวิธี TLC สายพันธุ์กลายแต่ละชนิดจะพบสารมัธยันต์สะสมอยู่หลายชนิด ทำให้ยากต่อการวิเคราะห์ว่าสารมัธยันต์ชนิดใดน่าจะเป็นสารมัธยันต์สุดท้ายที่สะสมเนื่องจากการบกพร่องของยีนที่ถูกแทรกสอดด้วยทรานสโปซอน รวมทั้งในขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์จะทำให้มีความยุ่งยากมากขึ้นซึ่งอาจจะไม่สามารถแยกสารมัธยันต์ให้บริสุทธิ์ได้ เพราะฉะนั้นอาจมีการเติมแหล่งพลังงานอื่นเพื่อช่วยในการย่อยสลายอะซีแนพทีลินไปเป็นสารมัธยันต์ตัวสุดท้าย เช่น กรดซัคซินิก (Hartnett และคณะ, 1990) และน้ำตาลแมนนิทอล (พัชรวิภา ใจจักรคำ, 2542)

6.4 การวิเคราะห์สารมัธยันต์ด้วยวิธี TLC และวิธี HPLC พบว่าสารมัธยันต์หลายชนิดที่เกิดขึ้นมีค่า R_f และ ค่า R_t ใกล้เคียงกันมากซึ่งยากต่อการจำแนกว่าเป็นสารชนิดใด อาจทำการปรับเปลี่ยนระบบตัวทำละลายที่ใช้ในการชะให้เหมาะสม

6.5 ในขั้นตอนการทำสารมัธยันต์ให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี preparative TLC และซิลิกาเจลคอลัมน์โครมาโตกราฟีควรใช้ปริมาณสารสกัดที่จะผ่านการทำให้บริสุทธิ์ให้เหมาะสมเนื่องจากถ้าใช้สารสกัดมากเกินไปจะทำให้ไม่สามารถแยกสารมัธยันต์แต่ละชนิดออกจากกันได้

6.6 การทดลองนี้สามารถพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารมัธยันต์ที่เกิดขึ้นจากการย่อยสลายอะซีแนพทีลินโดย *Rhizobium* sp. CU-A1 ได้ 3 ชนิด คืออะซีแนพทีนควิโนน, กรดแนพทาลีน-1,8-ไดคาร์บอกซิลิก และ กรด 2,5-ไดไฮดรอกซีเบนโซอิก ซึ่งเป็นข้อมูลเบื้องต้นที่จะใช้ในการทำนายวิถีการย่อยสลาย ควรจะทำการสกัดแยกและพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารมัธยันต์ชนิดอื่นๆ ที่สะสมจากการย่อยสลายอะซีแนพทีลินในสายพันธุ์กลายอื่น ๆ เพิ่มเติม โดยเฉพาะเพื่อพิสูจน์ว่า

กรด 2,5-ไดไฮดรอกซีเบนโซอิกที่พบสะสมนั้นเกิดจากการย่อยสลายมาจากกรดแนพธาลีน-1,8-ไดคาร์บอกซิลิกผ่านทางวิถีใด

6.7 ควรทำการศึกษาในระดับเอนไซม์ต่างๆ และยีนที่เกี่ยวข้องในกระบวนการย่อยสลายอะซีแนพธาลีนร่วมด้วย ซึ่งจะทำให้ได้ข้อมูลที่สามารถระบุวิถีการย่อยสลายอะซีแนพธาลีนโดย *Rhizobium* sp. CU-A1 ที่สมบูรณ์



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

- บุญยงค์ โฉมวิวัฒน์. 2540. อายาทิงขะอันตราย. วารสารโรงงาน. ปีที่ 15. ฉบับที่ 1. ตุลาคม 2539-มกราคม 2540.
- ธัญนุช เกรียงไกรพิพัฒน์. 2544. การสร้างสายพันธุ์กลายที่สะสมสารมีธัยน็ดจากการย่อยสลายอะซีแนพธิลีนและการติดดอกด้วยโปรตีนเรืองแสงสีเขียวของ *Rhizobium* sp. CU-A1. วิทยานิพนธ์ปริญญาามหาบัณฑิต. คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- พัชรวิภา ใจจักรคำ. 2542. การศึกษาลักษณะและการย่อยสลายสาร PAHs ภายใต้สภาวะไร้อ₂ ของแบคทีเรียสายพันธุ์ CU-A1. โครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมสร้างประสบการณ์ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต. ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- พระราชบัญญัติวัดถุอันตราย พ.ศ. 2535.
- ศรัลยา แผงไทร. 2543. การย่อยสลายทางชีวภาพของพอลิไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนโดยแบคทีเรียที่ออกซิไดส์อะซีแนพธิลีน. วิทยานิพนธ์ปริญญาามหาบัณฑิต. คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
- สำนักเทคโนโลยีสิ่งแวดล้อมโรงงาน. 2542. การกำจัดสารพิษอันตรายจากโรงงานอุตสาหกรรม. เอกสารประกอบการศึกษาเผยแพร่โดยสำนักเทคโนโลยีสิ่งแวดล้อมโรงงาน กรมโรงงานอุตสาหกรรม.

ภาษาอังกฤษ

- Alexander, R., Kagi, R. I., Rowland, S. J. Sheppard, P. N., and Chirila, T. V. 1985. The effects of thermal maturity on distribution of dimethylnaphthalenes and trimethylnaphthalenes in some ancient sediments and petroleums. Geochem. Cosmochim. 49: 385-395.
- Baker, K. H., and Herson, D. S. 1994. Biodegradation pathways. In Bioremediation. pp. 21-60. Baker, K. H., and Herson, D. S. (ed.). McGraw-Hill, Inc. New York.

- Botero, L. M., Al-Niemi, T. S., and McDermott, T. R. 2000. Characterization of two inducible phosphate transport systems in *Rhizobium tropici*. Appl. Environ. Microbiol. 66: 15-22.
- Cerniglia, C. E. 1992. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. Biodegradation. 3: 351-368.
- Chapman, P. J. 1979. Degradation mechanism. In Proceeding of the workshop: microbial degradation of pollutants in marine environments. U.S. Environmental Protection Agency. pp. 28-66. Bourquin, A. W. and Pritchard, P. H. (ed.). Gulf Breeze.
- Cockson, J. T. 1995. Application of biological processes. In Bioremediation engineering design and application. p. 9., Cockson, J. T. (ed.). McGraw-Hill, Inc. USA.
- Dean-Raymond, D., and Bartha, R. 1975. Biodegradation of some polynuclear aromatic petroleum components by marine bacteria. Dev. Ind. Microbiol. 16: 97-110.
- Fernandez, P. M., Grifoll, A. M., Solanas, J. M., Bayona, and J., AlBaiges. 1992. Bioassay-directed chemical analysis of genotoxic components in coastal sediments. Environ. Sci. Technol. 26: 817-829.
- Foght, J. M., and Westlake, D. W. 1996. Transposon and spontaneous deletion mutants of plasmid-borne genes encoding polycyclic aromatic hydrocarbon degradation by a strain of *Pseudomonas fluorescens*. Biodegradation 7: 253-366.
- Fuenmayor, S. L., Wild, M., Boyes, A. L., and Williams, P. A. 1998. A gene cluster encoding steps in conversion of naphthalene to gentisate in *Pseudomonas* sp. strain U2. J. Bacteriol. 180: 2522-2530.
- Grifoll, M., Selifenov, S. A., Galtin, C. V., and Chapman, P. J. 1995. Actions of a versatile fluorene-degrading bacterial isolate on polycyclic aromatic compounds. Appl. Environ. Microbiol. 61: 3711-3723.
- Grund, E. 1990. Catabolism of benzoate and monohydroxylated benzoates by *Amycolatopsis* and *Streptomyces* sp. Appl. Environ. Microbiol. 56 : 1459-1464.
- Grund, E., Denecke, B., and Eichenlaub, R. 1992. Naphthalene degradation via salicylate and gentisate by *Rhodococcus* sp. strain B4. Appl. Environ. Microbiol. 58: 1874-1877.

- Hammel, A. K., and Rich J. K. 1986. Effect of veratryl (3,4-dimethoxybenzyl) alcohol in oxidation of benzo[*a*]pyrene by *Phanerochaete chrysosporium*. Appl. Environ. Microbiol. 58: 716-722.
- Hartnett, G. B., Averhoff, B., and Prnston, L. N. 1990. Selection of *Acinetobacter calcoaceticus* mutants deficient in the *p*-hydroxybenzoate hydroxylase gene (*pobA*), a member of a supraoperonic cluster. J. Bacteriol. 172: 6160-6161.
- Harwood, C. R. 1993. Plasmids, transposons and gene flux. In Goodfellow M. and O'Donnell, A., G. (eds.) Handbook of new bacterial systematics. Academic Press, London. : 115-150.
- Hopkins, R. P., Brooks, C. J. W., and Young, L. 1962. Biochemical studies of toxic agents. 13. The metabolism of acenaphthylene. Biochem. J. 82: 457-466.
- Jamison, V. W., Raymond, R. L., and Hudson, J. O. 1971. Hydrocarbon co-oxidation by *Nocardia corallina* strain V-49. Dev. Ind. Microbiol. 12: 99-105.
- Johannes, C., Majcherczyk, A., and Huttermann, A. 1998. Oxidation of acenaphthene and acenaphthylene by laccase of *Trametes versicolor* in a laccase-mediator system. J. Biotechnol. 61: 151-156.
- Jones-D, C. N. and Copper, R. A. 1990. Catabolism of 3-hydroxybenzoate by the gentisate pathway in *Klebsiella pneumoniae*. M5al. Arch. Microbiol. 154 : 489-495
- Kim, E., Zylstra, G. J., Freeman, J. P., Heinze, T. M., Deck, J. and Cerniglia, C. E. 1997, Evidence for the role of 2-hydroxychromene-2-carboxylate isomerase in the degradation of anthracene by *Sphingomonas yanoikuyae*. B1. FEMS. Microbiol. Lett. 153 : 479-484
- Kiyohara, J., Sara, T., and Fuko, J. 1972 Pathway of bacterial metabolism of phenanthrene. Dev. Ind. Microbiol. 14: 198-206.
- Komatsu, T., Omori, T., and Kodama, T. 1993. Microbial degradation of the polycyclic aromatic hydrocarbons acenaphthene and acenaphthylene by a pure bacterial culture. Biosci. Biotech. Biochem. 57: 864-865.
- LaVoie, E. J. and Rice, J. E. 1988. Structure-activity relationships among tricyclic polynuclear aromatic hydrocarbons. In Polycyclic aromatic Hydrocarbon

- Carcinogenesis: Structure-Activity Relationships. Vol. 1. pp. 151-156., Yang, S. K. and Silverman, B. D. (eds.). CRC Press.
- Lederer, W. H. 1985. Acenaphthylene. In Regulatory Chemicals of Health and Environmental Concern. P. 1., Lederer, W. H. (ed.). Van Nostrand Reinhold company.
- Lee, S., and Cutright, T. J. 1996. Nutrient medium for the bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons contaminated soils. Environ. Sci. Technol. 14: 1524-1528.
- Manahan, S. E. 1993. Reduction, Treatment, and Disposal of Hazardous waste. In Fundamentals of Environmental Chemistry. pp. 687-720., Manahan, S. E. (ed.). Lewis Publishers.
- Mattox, C. F., and Humanick, M. J. 1980. Organic groundwater contaminants from UCG. In situ. 4: 129-151.
- Merce, C., Grifoll, M., and Josep, M. B. 1997. New metabolites in the degradation of fluorene by *Arthrobacter* sp. strain F101. Appl. Environ. Microbiol. 63: 819-826.
- Michiel, J. J. Kotterman, Eric, H. VIS, Jim, A. Field. 1998. Successive mineralization and detoxification of Benzo[a]pyrene by the white rot fungus *Bjerkandera* sp. strain BOS55 and indigenous microflora. Appl. Environ. Microbiol. 64: 509-518.
- 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: 3085-3090.
- Neurath, G. B. 1972. Recent advances in knowledge of the chemical composition of tobacco smoke. In The Chemistry of Tobacco and Tobacco smoke. pp. 77-97., Schmeltz, I. (ed.). Plenum Publishing Corp., New York.
- Ning, Y. Z., Fuenmayor, S. L., and Williams, P. A. 2001. *nag* Genes of *Ralstonia* (Formerly *Pseudomonas*) sp. strain U2 encoding enzymes for gentisate catabolism. J. Bacteriol. 183:700-708.
- Ohmoto, T., Sakai, K., Hamada, N., and Ohe, T. 1991. Salicylic acid metabolism through a gentisate pathway by *Pseudomonas* sp. TA-2. Agri. Biol. Chem. 55: 1733-1737

- Phale, P. S., Mahajan, M. C. and Vaidyyanathan, C. S. 1995. A pathway for biodegradation of 1-naphthoic acid by *Pseudomonas maltophilia* CSV89. Arch. Microbiol. 163: 42-47
- Radke, M. 1987. Organic geochemistry of aromatic hydrocarbons. In Advanced in petroleum geochemistry, vol 2. pp. 141-202., J. Brooks and D. Welte. (ed.). Academic Press, London.
- Sack, U. and Gunther, T. 1993. Metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons by fungi and correlation with extracellular enzymatic activities. J. Basic. Microbiol. 33 : 269-277.
- Selifenov, S. A., Grifoll, M., Eaton, R. W., and Chapman, P. J. 1996. Oxidation of naphthenoaromatic and methyl-substituted aromatic compounds by naphthalene 1,2-dioxygenase. Appl. Environ. Microbiol. 62: 507-514.
- Shocken, M. J., and Gibson, D. T. 1984. Bacterial oxidation of the polycyclic aromatic hydrocarbons acenaphthene and acenaphthylene. Appl. Environ. Microbiol. 48: 10-16.
- Simon, R., Priefer, U., and Puehler, A. 1983. A broad host range mobilization system for *in vivo* genetic engineering: transposon mutagenesis in gram negative bacteria. Bio/Technol. 1: 784-791.
- Starovoitov, K. 1975. Properties of salicylate-5-hydroxylase from *Moraxella osloensis*. J. Bacteriol. 121: 86-91
- Sutherland, J. B., Rafii, F., Khan, A. A. and Cerniglia, C. E. 1995. Mechanisms of PAHs degradation. P. 269-306. In Young, L. Y. and Cerniglia, C. E. (ed.). Microbiol transformation and degradation of toxic organic chemicals. Wiley-Liss, Inc., New York.
- Toshiaki, K., Yan, Z., Tohru, K., and Toshio, O., 1996. Isolation and characterization of Tn5-induced mutants deficient in carbazole catabolism. FEMS Microbiol. Lett. 135: 65-70.
- Verschueren, K. 1996. Acenaphthylene. In Handbook of Environmental Data on Organic Chemistry 3rd edition. P. 100., Van Nostrand Reinhold an International Thomson Publishing company.

- Vila, J., Lopez, Z., Sabate, L., Minguillon, C., Solanas, A. M., and Grifoll, M. 2001. Identification of a novel metabolite in the degradation of pyrene by *Mycobacterium* sp. strain AP1 : Action of the isolate on two-and three-rings polycyclic aromatic hydrocarbons. Appl. Environ. Microbiol. 67: 5497-5505.
- Volkering, F. A., Breure, A. M., Sterkenberg, A., and Van An del, J. G. 1992. Microbial degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons; effect of substrate availability on bacterial growth kinetics. Appl. Microbiol Biotechnol. 36: 548-552.
- Watson, R. J., and Rastogi, V. K. 1993. Cloning and nucleotide sequencing of *Rhizobium meliloti* aminotransferase gene: an aspartate aminotransferase required for symbiotic nitrogen fixation is atypical. J. Bacteriol. 175: 1919-1928.
- Wilson, S. C., and Jones, K.C. 1993. Bioremediation of soil contaminated with polynuclear aromatic hydrocarbons (PAHs): A review. Environ. Pollut. 81: 229-249.
- Yen, K.-M., and Gunsalus, I. C. 1982. Plasmid gene organization: Naphthalene/salicylate oxidation. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 79: 847-878.
- Young, L. Y. and Cerniglia, C. R. 1995. Microbial transformation and degradation of toxic organic chemicals. pp. 286-296. Wiley—Liss, Inc. New York.



ภาคผนวก

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ก

สูตรและวิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Carbon Free Mineral Salt Medium (CFMM)

แอมโมเนียมไนเตรด (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
เฟอร์ริกคลอไรด์เฮกซะไฮเดรต ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)	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 °C เป็นเวลา 20 นาที ในส่วนของสารละลายสามชนิดหลังทำการเตรียมแยกแต่ละชนิดแล้วทำให้ปลอดเชื้อโดยการกรองผ่านชุดกรองสำเร็จรูปเซลลูโลสอะซีเตตขนาดรูกว้าง 0.45 ไมโครเมตร แล้วจึงเติมลงในอาหารที่ทำกรนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว

2. อาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง CFMM (CFMM agar)

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

3. 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

4. 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. **สารละลายอะซีแนพทิลีนในไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (acenaphthylene in DMSO solution)**

ชั่งอะซีแนพทิลีน 0.1 กรัม ละลายในไดเมทิลซัลฟอกไซด์ปริมาตร 3.0 มล. ผสมด้วยเครื่องปั่นผสมจนอะซีแนพทิลีนละลายหมด ทำให้ปลอดเชื้อโดยการกรองด้วยชุดกรองสำเร็จรูปชนิด PTFE ที่มีขนาดรูกว้าง 0.20 ไมโครเมตร เก็บรักษาในขวดสีชาหรือห่อให้มิดชิดเก็บที่อุณหภูมิ -20°C เติมนลงในอาหารเหลว CFMM ที่ผ่านการฆ่าเชื้อและเย็นลงที่อุณหภูมิห้องแล้ว

2. **สารละลายกรดโปรโตคาทีคูอิกในเอทานอล**

ชั่งกรดโปรโตคาทีคูอิก 1.0 กรัม ละลายในเอทานอลปริมาตร 4.0 มล. ผสมด้วยเครื่องปั่นผสมจนกรดโปรโตคาทีคูอิกละลายหมด ทำให้ปลอดเชื้อโดยการกรองด้วยชุดกรองสำเร็จรูปชนิด PTFE ที่มีขนาดรูกว้าง 0.20 ไมโครเมตร เก็บรักษาในขวดสีชาหรือห่อให้มิดชิดเก็บที่อุณหภูมิ -20°C เติมนลงในอาหารเหลว CFMM ที่ผ่านการฆ่าเชื้อและเย็นลงที่อุณหภูมิห้องแล้ว

3. **สารละลายมาตรฐานของ PAHs และอนุพันธ์ชนิดต่างๆ ในเมทานอล**

ชั่งสารดังนี้ อะซีแนพทิลีน กรดแนพทาลีน 1,8-ไดคาร์บอกซิลิก กรดซาลิไซลิก กรดโปรโตคาทีคูอิก และกรด 2,5-ไดไฮดรอกซีเบนโซอิก ชนิดละ 0.1 กรัม ละลายสารมาตรฐานแต่ละชนิดในเมทานอลปริมาตร 10 มล. ผสมด้วยเครื่องปั่นผสมจนสารละลายหมด กรองด้วยชุดกรองสำเร็จรูปชนิด PTFE ที่มีขนาดรูกว้าง 0.20 ไมโครเมตร เก็บรักษาในขวดสีชาหรือห่อให้มิดชิดเก็บที่อุณหภูมิ -20°C เพื่อใช้เป็นสารมาตรฐานในการวิเคราะห์สารมัยันต์ด้วยวิธี TLC และ HPLC

4. **สารละลายสารมัยันต์จากการย่อยสลายอะซีแนพทิลีนที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้วในได เมทิลซัลฟอกไซด์**

ซังสารมัธยันต์ 1 กรด 2,5-ไดไฮดรอกซีเบนโซอิก สารมัธยันต์ 2 อะซีแนพธีนควิโนน และ สารมัธยันต์ 3 กรดแนพธาไลน์ 1,8-ไดคาร์บอกซิลิกอย่างละ 25.0 มก. ละลายในไดเมทิลซัลฟอกไซด์ปริมาตร 1.5 มล. ผสมด้วยเครื่องปั่นผสมจนละลายหมด ทำให้ปลอดเชื้อโดยการกรองด้วยชุดกรองสำเร็จรูปชนิด PTFE ที่มีขนาดรูกว้าง 0.20 ไมโครเมตร เก็บรักษาในขวดสีชาหรือห่อให้มิดชิด เก็บที่อุณหภูมิ -20°C เติมนลงในอาหารเหลว CFMM ที่ผ่านการฆ่าเชื้อและเย็นลงที่อุณหภูมิห้องแล้ว

5. สารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.85%

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

6. กลีเซอรอล

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

7. สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 1 นอร์มัล

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

8. สารปฏิชีวนะกานามัยซิน

ซังกานามัยซิน 30 มก. ละลายในน้ำกลั่น 1.0 มล. ทำให้ปลอดเชื้อโดยการกรองผ่านชุดกรองสำเร็จรูปชนิดเซลลูโลสอะซีเตตขนาดรูกว้าง 0.20 ไมโครเมตร เก็บรักษาในขวดสีชาหรือห่อให้มิดชิดเก็บที่อุณหภูมิ -20°C เมื่อนำมาใช้แล้วเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4°C ได้นาน 1 เดือน

9. สารละลายเมทานอลเข้มข้น 80% ในน้ำ (ปริมาตรต่อปริมาตร)

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

10. สารละลายเอทิลอะซีเตตที่อิ่มตัวด้วยน้ำ

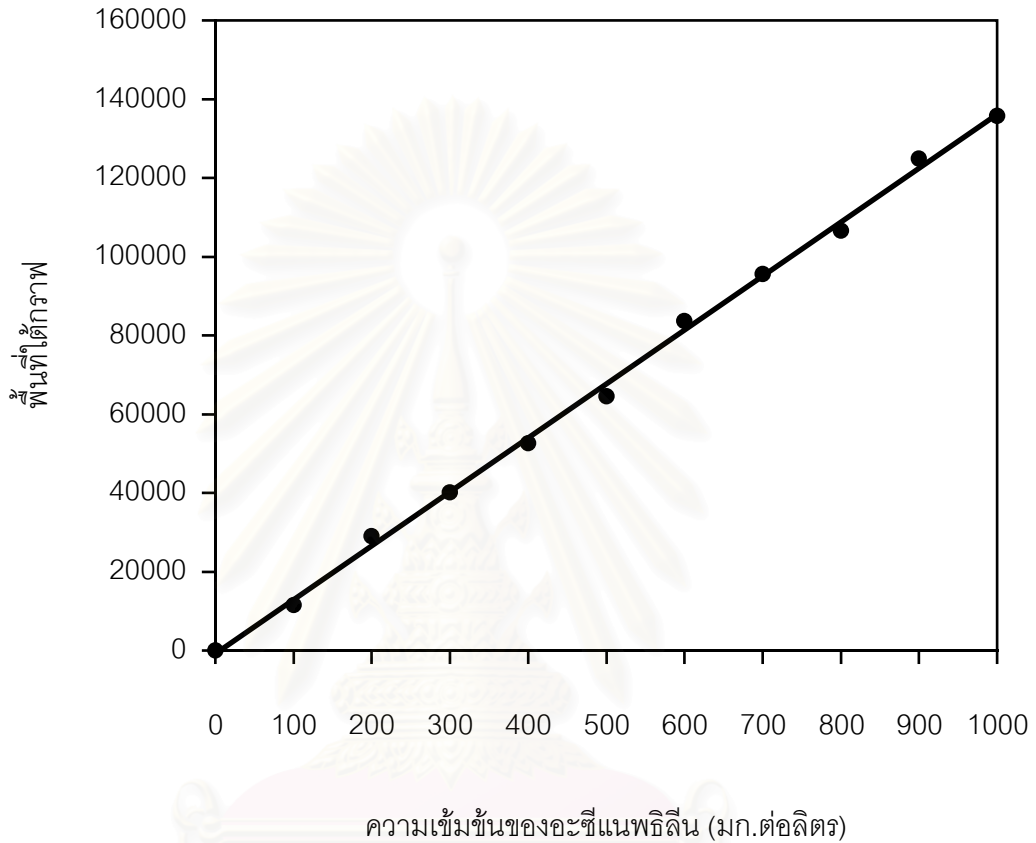
ผสมเอทิลอะซีเตตปริมาตร 150 มล. กับน้ำกรอง ปริมาตร 150 มล. ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 500 มล. ปิดฝาให้แน่นด้วยพาราฟิล์ม เขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ค

กราฟมาตรฐานของอะซีแนพธิลีน



รูปที่ ค. 1 กราฟมาตรฐานระหว่างปริมาณอะซีแนพธิลีนกับพื้นที่ใต้กราฟ ที่ได้จากการวิเคราะห์โดยวิธี HPLC

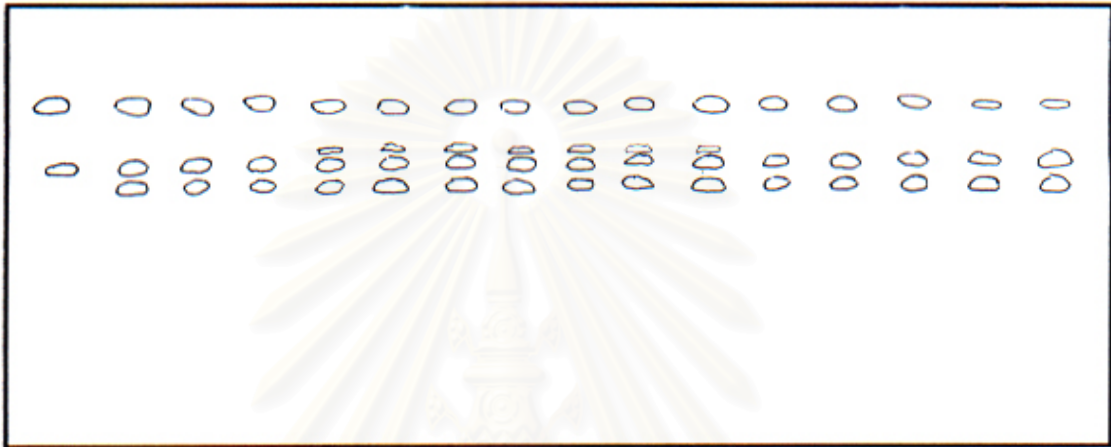
ความเข้มข้นของอะซีแนพธิลีนหาได้จากนำพื้นที่ใต้กราฟที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC มาแทนค่าในสมการเส้นตรงดังนี้

$$\begin{aligned} \text{พื้นที่ใต้กราฟ} &= (\text{ความชันของกราฟมาตรฐาน} \times \text{ปริมาณอะซีแนพธิลีน}) + \text{จุดตัดแกนวาย} \\ \text{โดยที่} \quad \text{ความชันของกราฟมาตรฐาน} &= 136.98 \\ \text{จุดตัดแกนวาย} &= -14535 \end{aligned}$$

ภาคผนวก ง

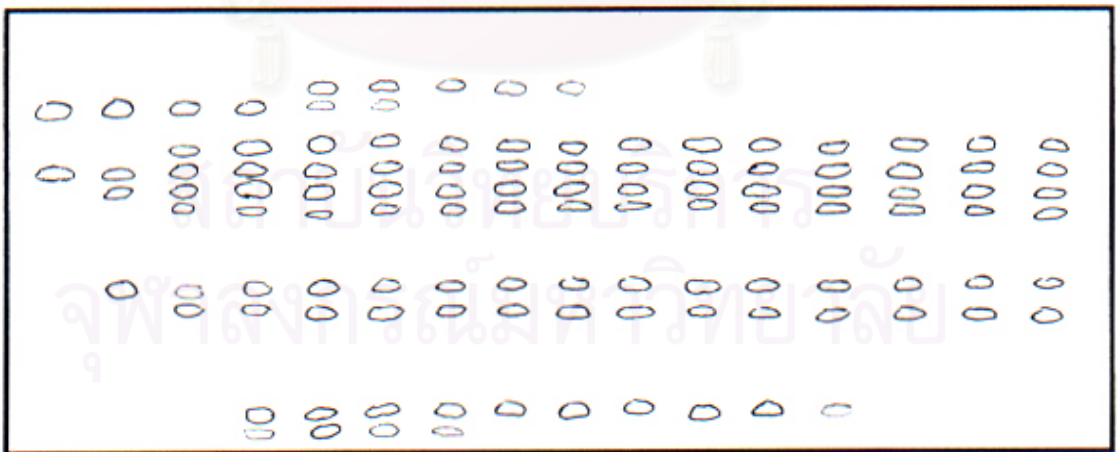
ข้อมูลผลการทดลอง

1. วิเคราะห์สารมัธยันต์ที่สะสมจากการย่อยสลายอะซีแนพทิลีนโดยสายพันธุ์กลายของ *Rhizobium* sp. CU-A1



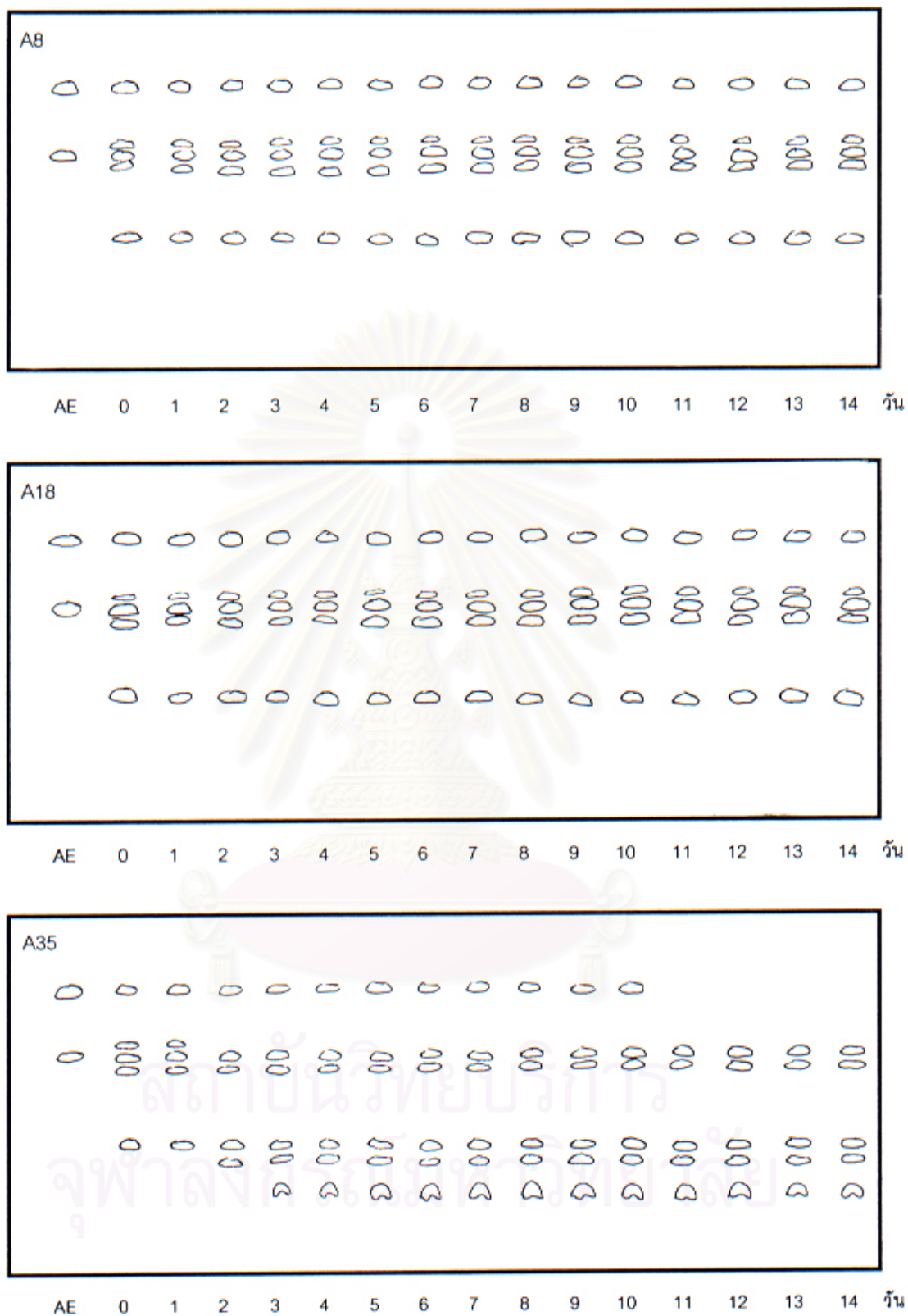
AE 0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 วัน

รูปที่ ง. 1 TLC โครมาโตแกรมของชุดควบคุมซึ่งไม่ได้มีการเติมเชื้อลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ CFMM ที่มีอะซีแนพทิลีนความเข้มข้น 600 มก.ต่อลิตร เพื่อติดตามการย่อยสลายของอะซีแนพทิลีนโดยปัจจัยทางกายภาพ ที่ระยะเวลาต่างๆ กัน (AE คืออะซีแนพทิลีน)

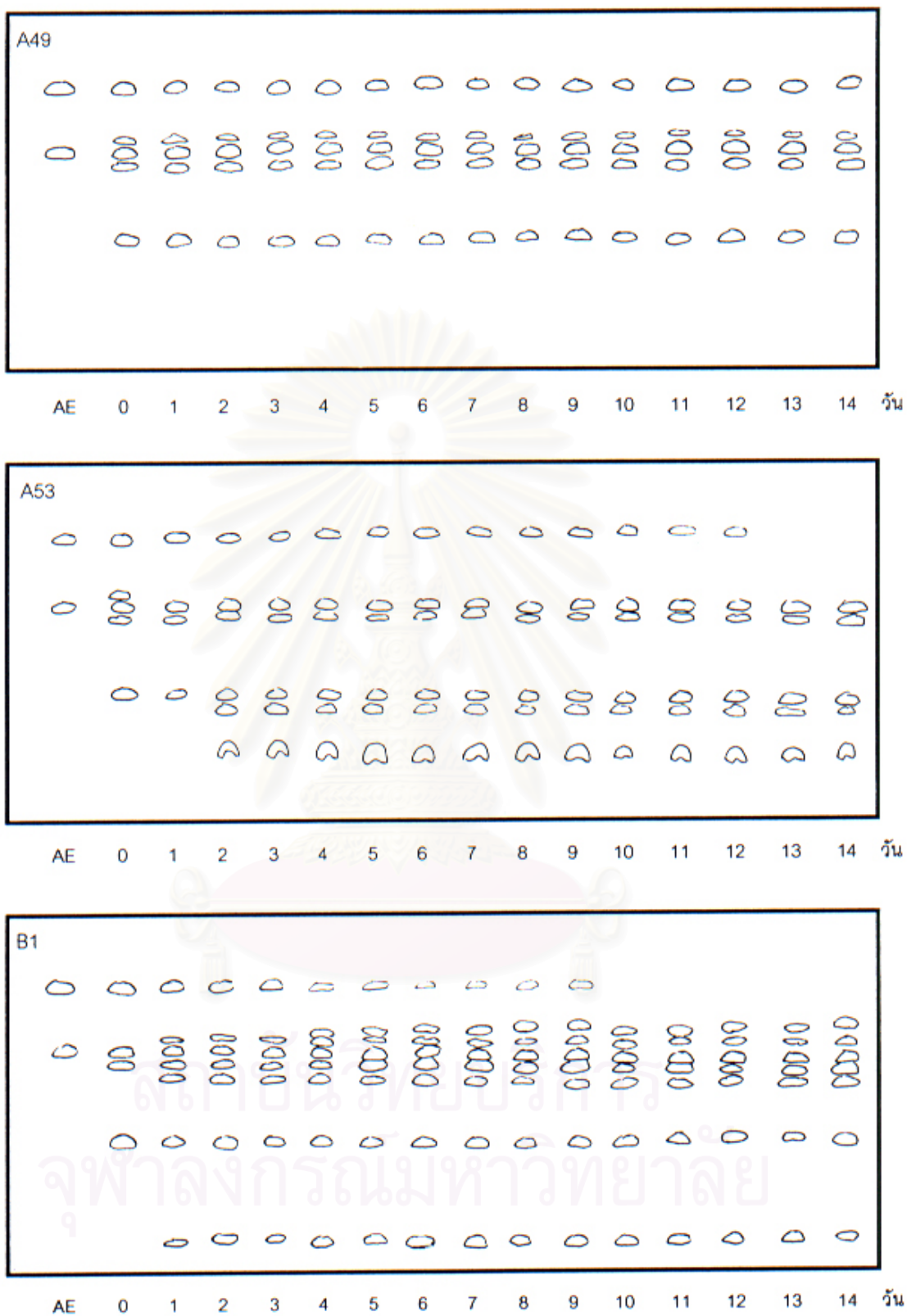


AF 0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 วัน

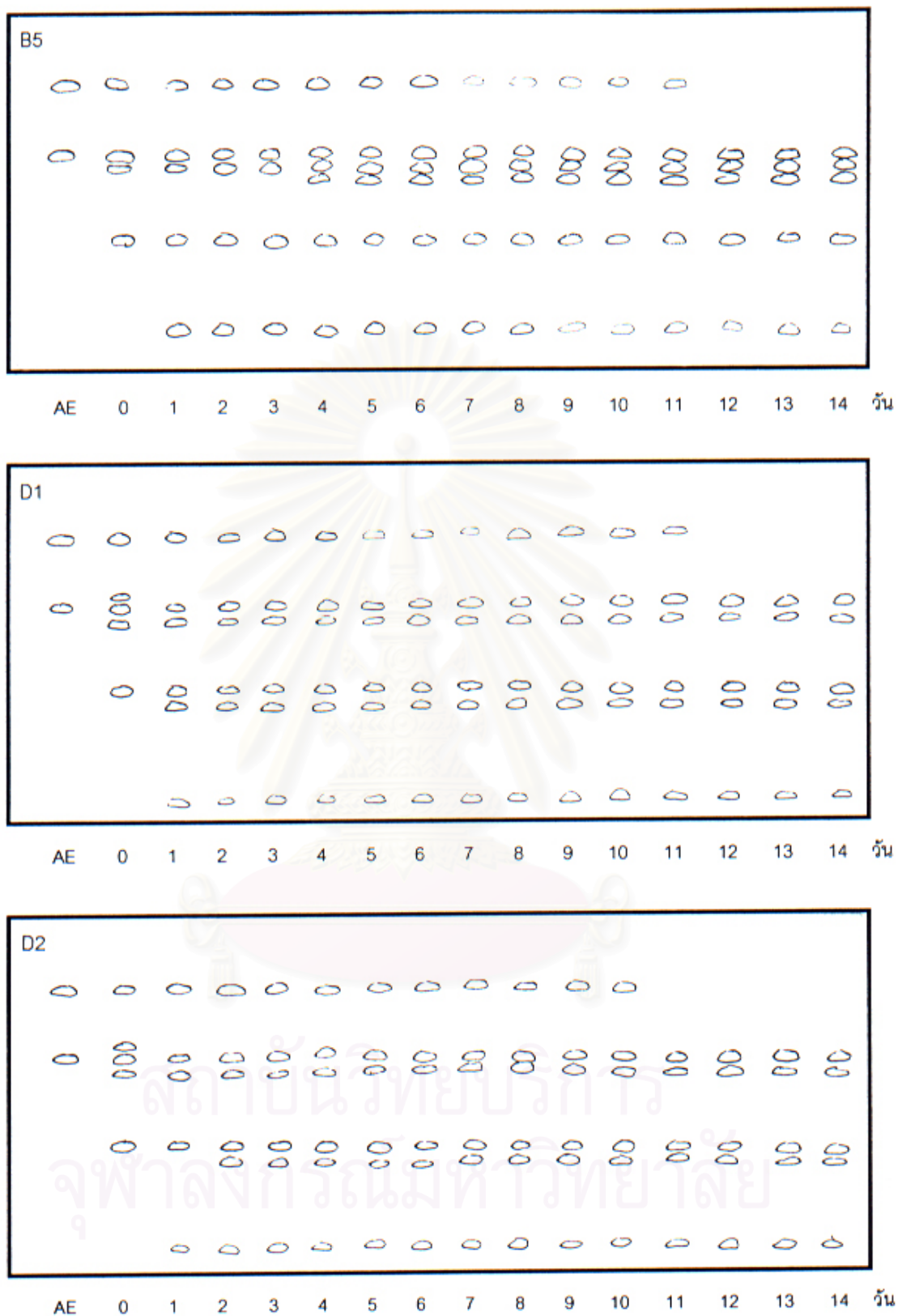
รูปที่ ง. 2 TLC โครมาโตแกรมของสารมัธยันต์ที่สะสมจากการย่อยสลายอะซีแนพทิลีนโดยเชื้อ *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ CFMM ที่มีอะซีแนพทิลีนความเข้มข้น 600 มก.ต่อลิตร ที่ระยะเวลาต่างๆ กัน (AE คืออะซีแนพทิลีน)



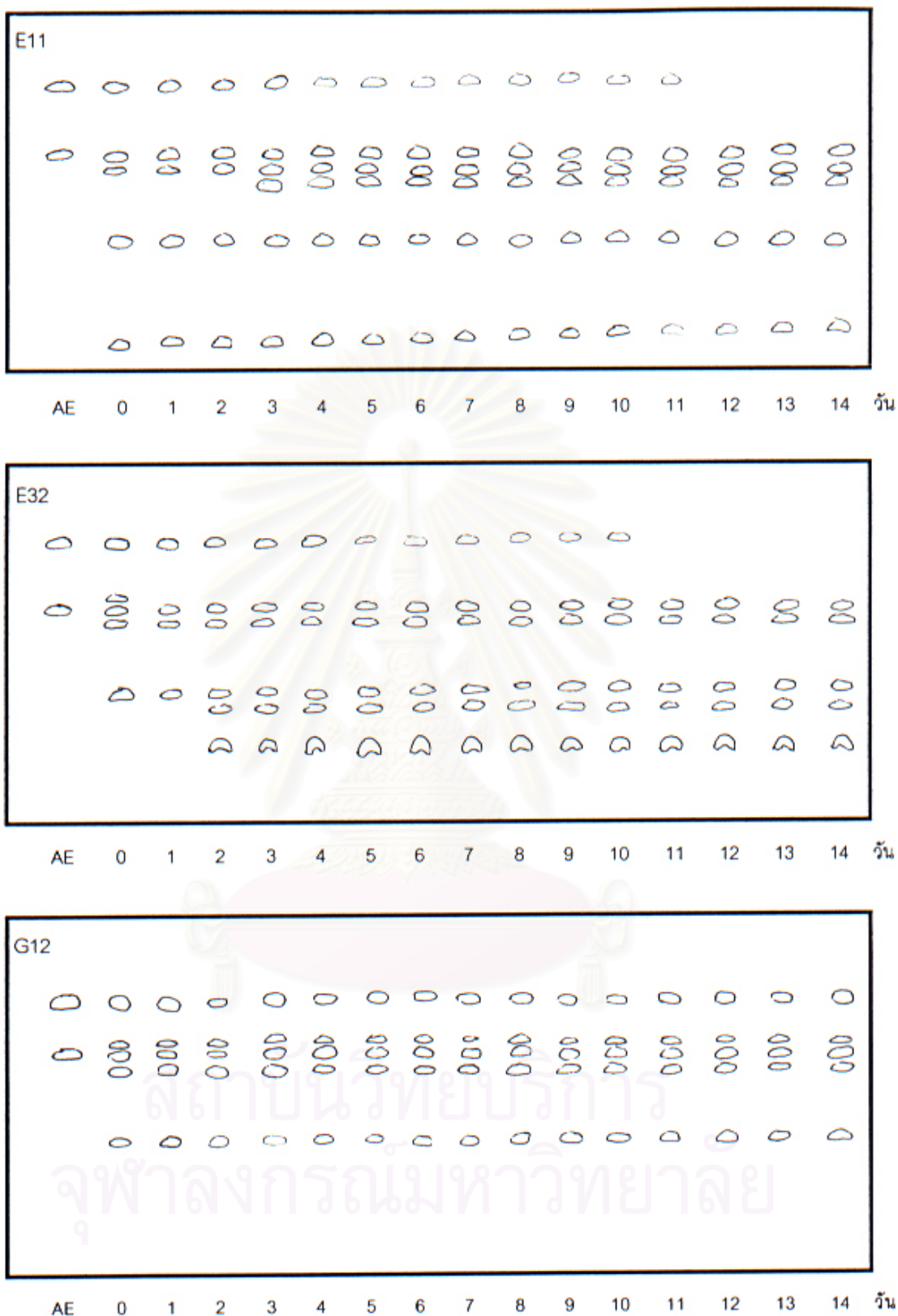
รูปที่ ง. 3 TLC โคโรโตแกรมของสารมััยันต์ที่สะสมจากการย่อยสลายอะซีแนพรีดีนโดยเชื้อ *Rhizobium* sp. A8, A18 และ A35 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ CFMM ที่มีอะซีแนพรีดีนความเข้มข้น 600 มก.ต่อลิตร ที่ระยะเวลาต่างๆ กัน (AE คืออะซีแนพรีดีน)



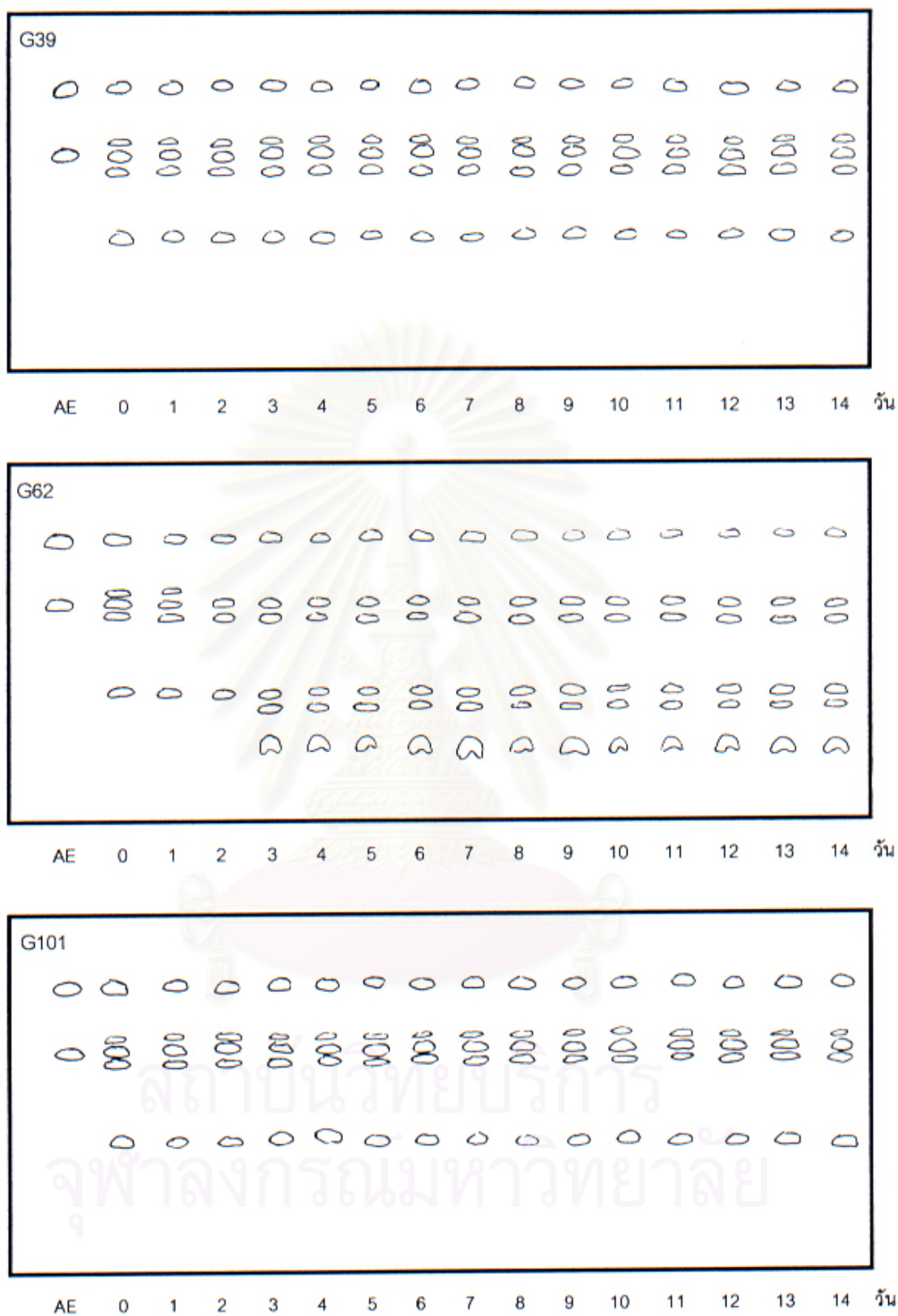
รูปที่ ง. 4 TLC โคโรโตแกรมของสารมัธยันต์ที่สะสมจากการย่อยสลายอะซีแนพรีดีนโดยเชื้อ *Rhizobium* sp. A49, A53 และ B1 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ CFMM ที่มีอะซีแนพรีดีนความเข้มข้น 600 มก.ต่อลิตร ที่ระยะเวลาต่างๆ กัน (AE คืออะซีแนพรีดีน)



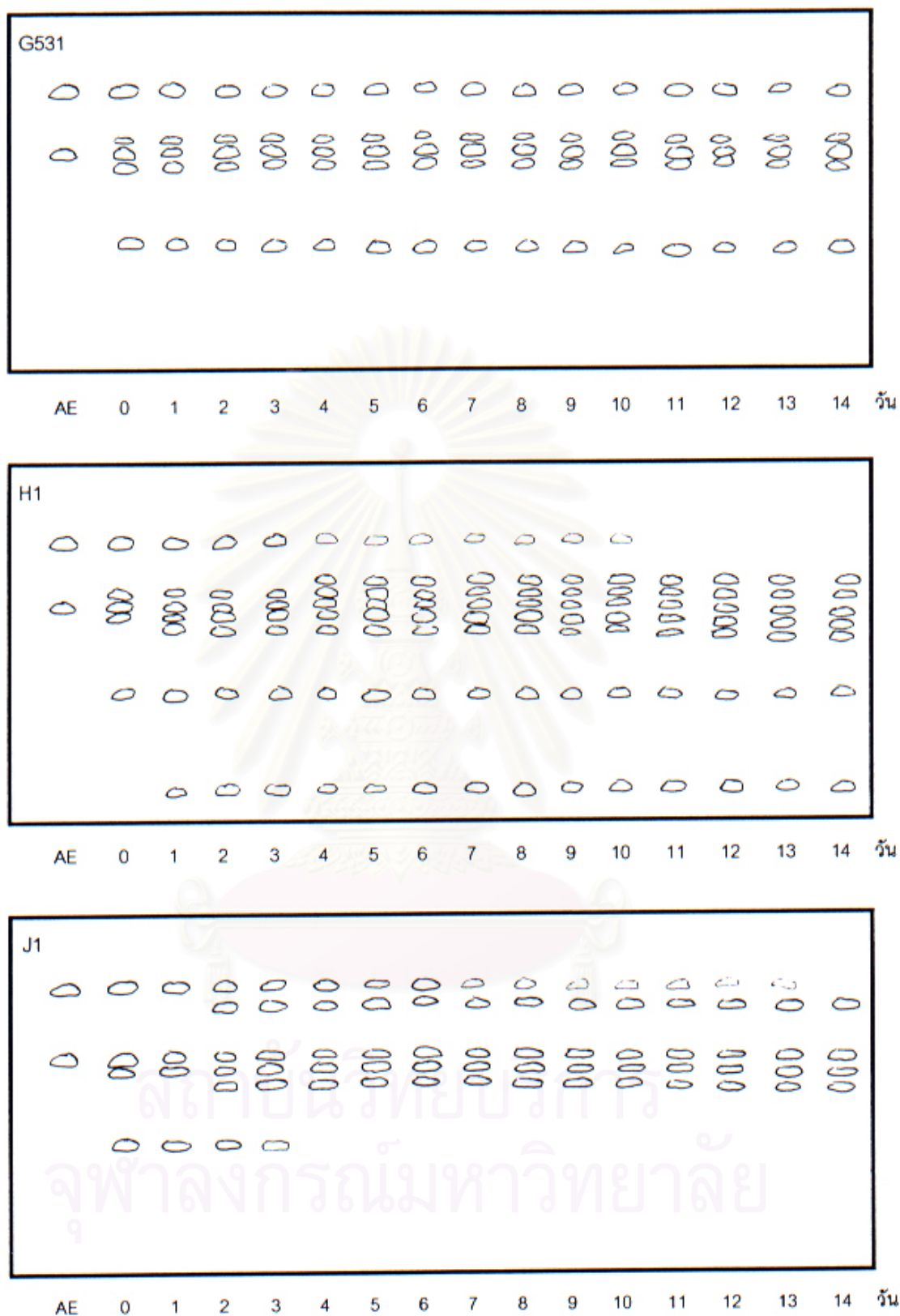
รูปที่ ๕. 5 TLC โคโรโตแกรมของสารมัธยันต์ที่สะสมจากการย่อยสลายอะซีแนฟธิลีนโดยเชื้อ *Rhizobium* sp. B5, D1 และ D2 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ CFMM ที่มีอะซีแนฟธิลีนความเข้มข้น 600 มก.ต่อลิตร ที่ระยะเวลาต่างๆ กัน (AE คืออะซีแนฟธิลีน)



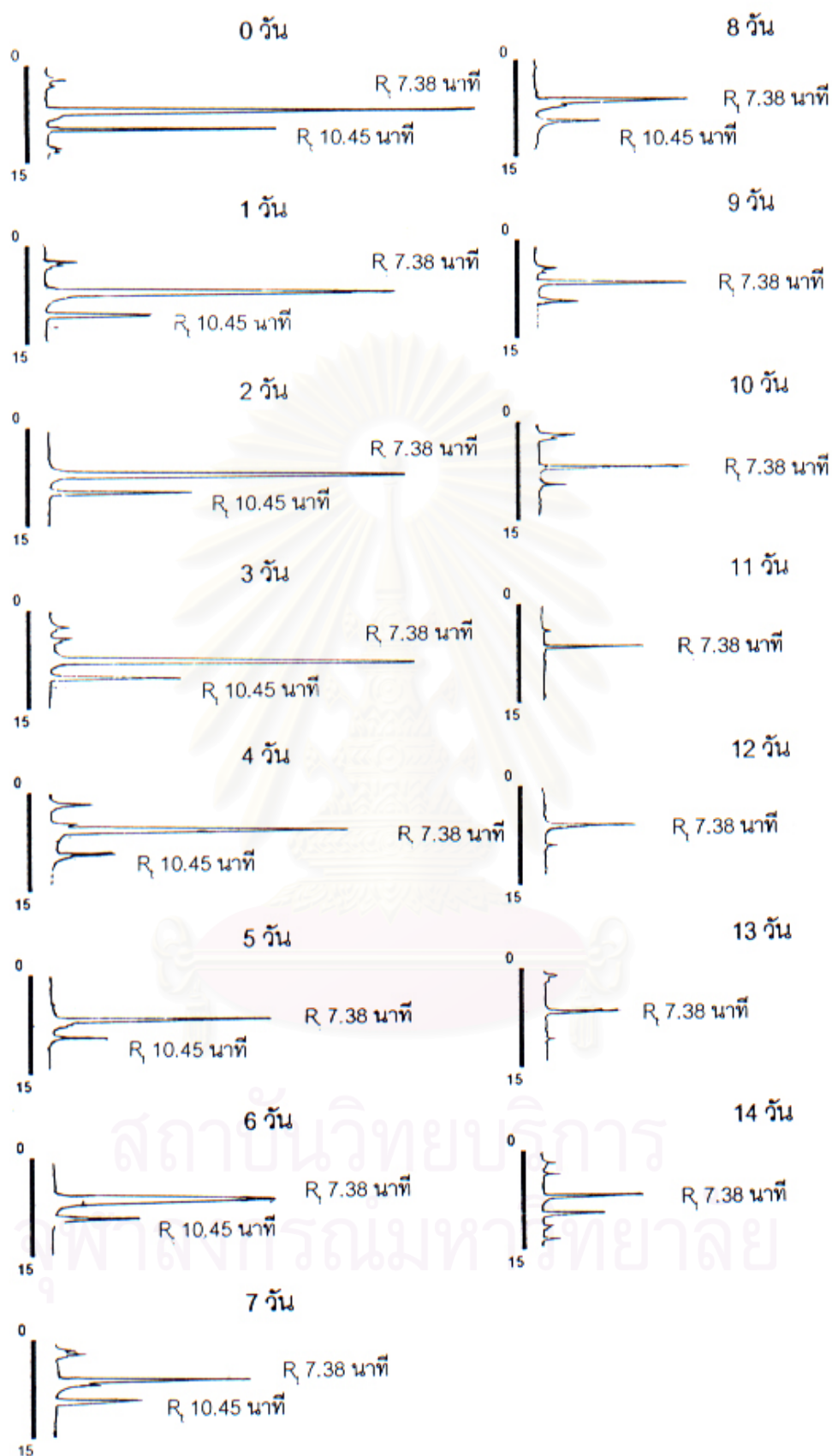
รูปที่ ง. 6 TLC โคโรโตแกรมของสารมัธยันต์ที่สะสมจากการย่อยสลายอะซีแนพริลีนโดยเชื้อ *Rhizobium* sp. E11, E32 และ G12 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ CFMM ที่มีอะซีแนพริลีนความเข้มข้น 600 มก.ต่อลิตร ที่ระยะเวลาต่างๆ กัน (AE คืออะซีแนพริลีน)



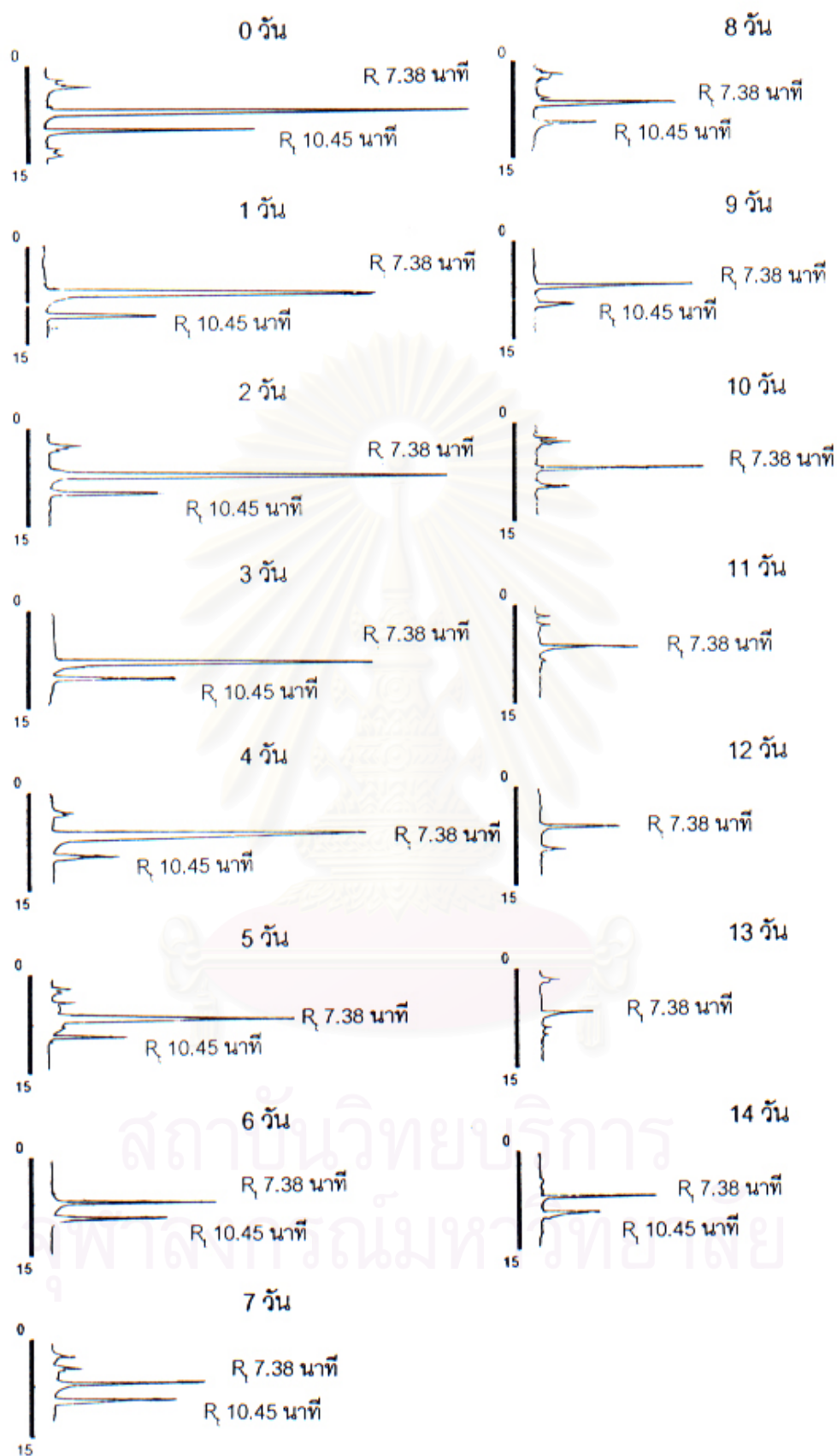
รูปที่ ง. 7 TLC โคโรโตแกรมของสารมั้ยันต์ที่สะสมจากการย่อยสลายอะซีแนพริลีนโดยเชื้อ *Rhizobium* sp. G39, G62 และ G101 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ CFMM ที่มีอะซีแนพริลีนความเข้มข้น 600 มก.ต่อลิตร ที่ระยะเวลาต่างๆ กัน (AE คืออะซีแนพริลีน)



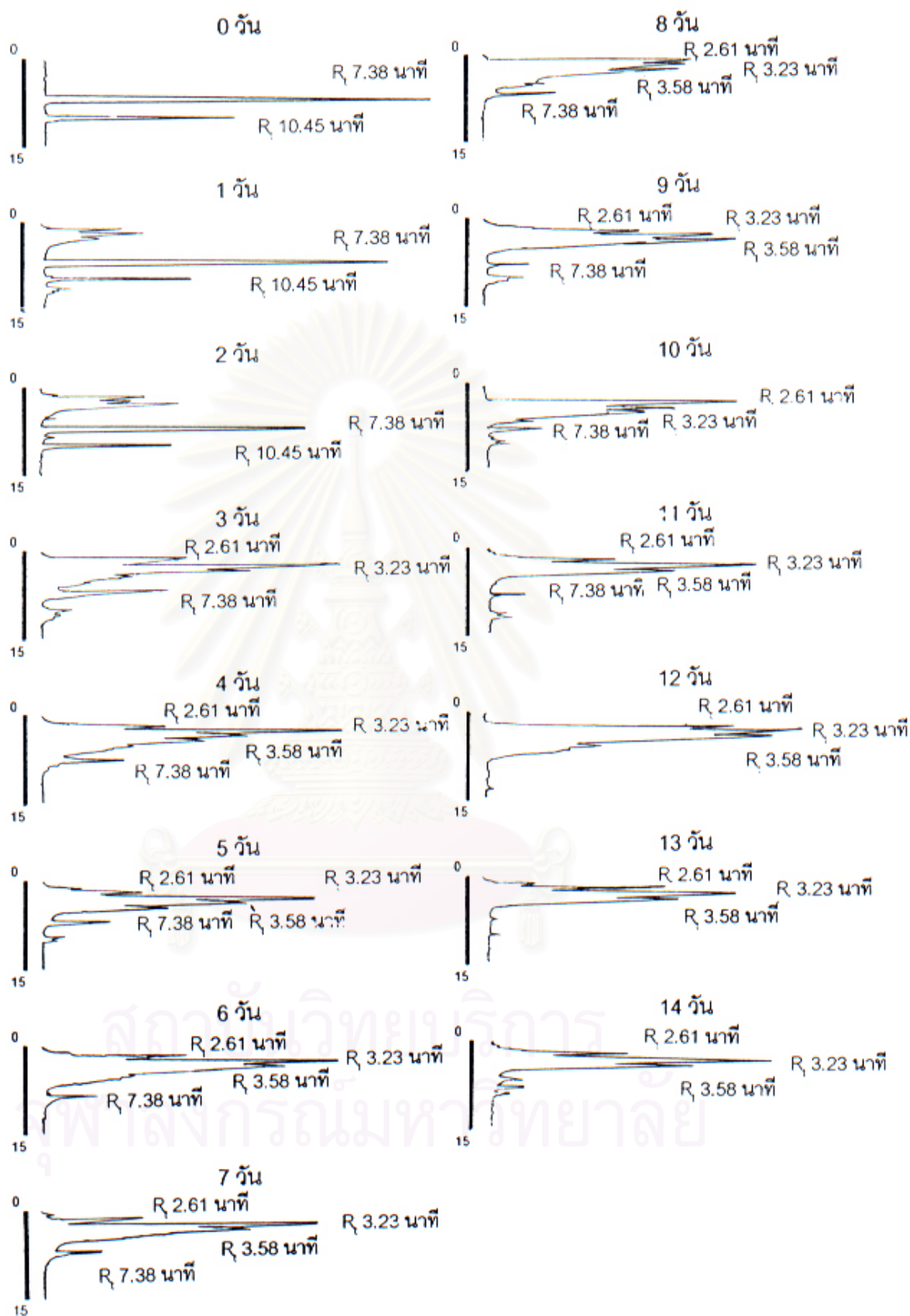
รูปที่ ง. 8 TLC โคโรโตแกรมของสารมัธยันต์ที่สะสมจากการย่อยสลายอะซีแนพรีลีนโดยเชื้อ *Rhizobium* sp. G531, H1 และ J1 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ CFMM ที่มีอะซีแนพรีลีนความเข้มข้น 600 มก.ต่อลิตร ที่ระยะเวลาต่างๆ กัน (AE คืออะซีแนพรีลีน)



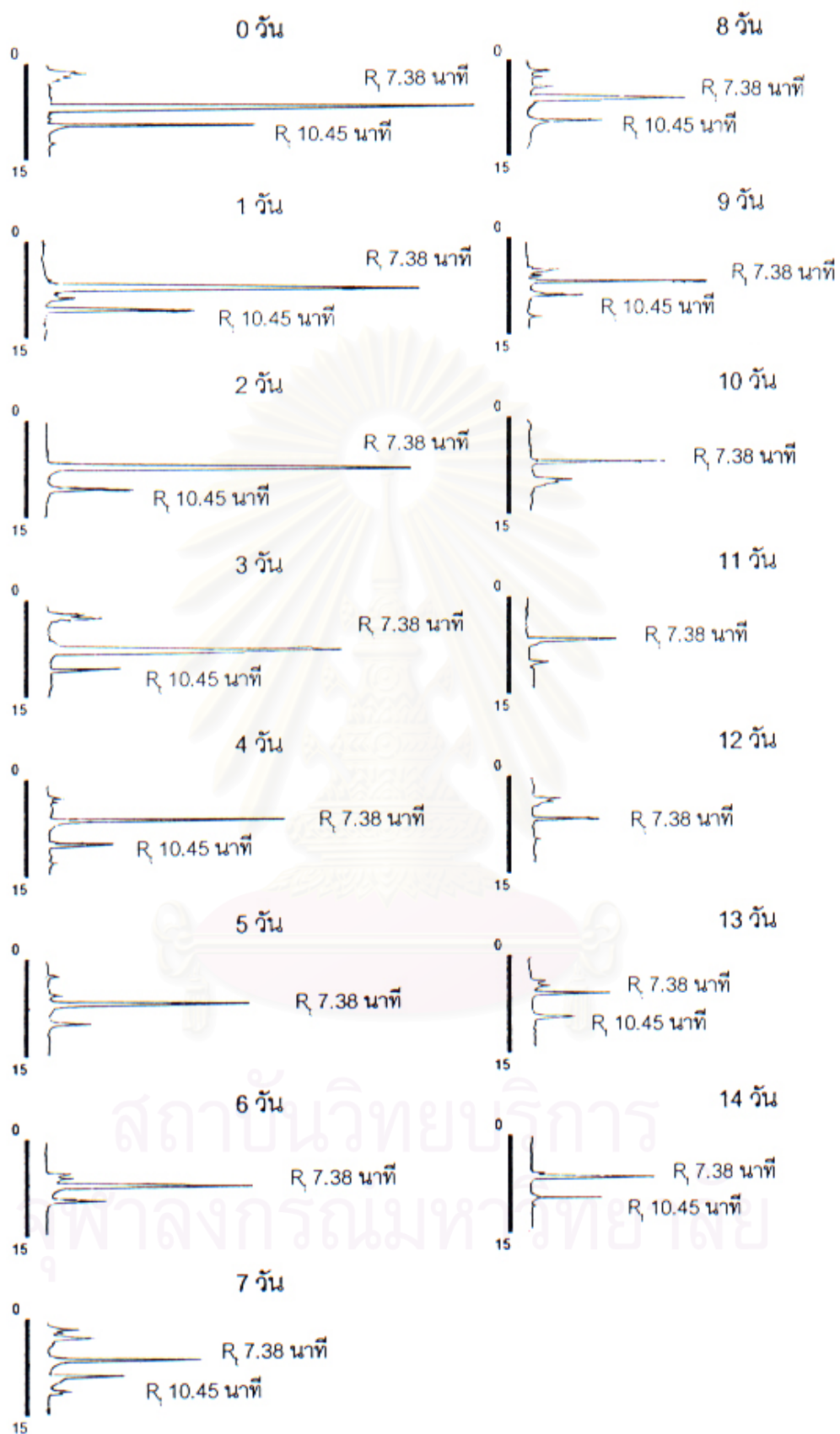
รูปที่ ง. 9 HPLC โครมาโตแกรมของสารมัยยันต์ที่สะสมจากการย่อยสลายอะซีแนพริลีนโดย *Rhizobium* sp. A8 ที่ระยะเวลาต่างๆ กัน (R_t 7.38 คืออะซีแนพริลีน)



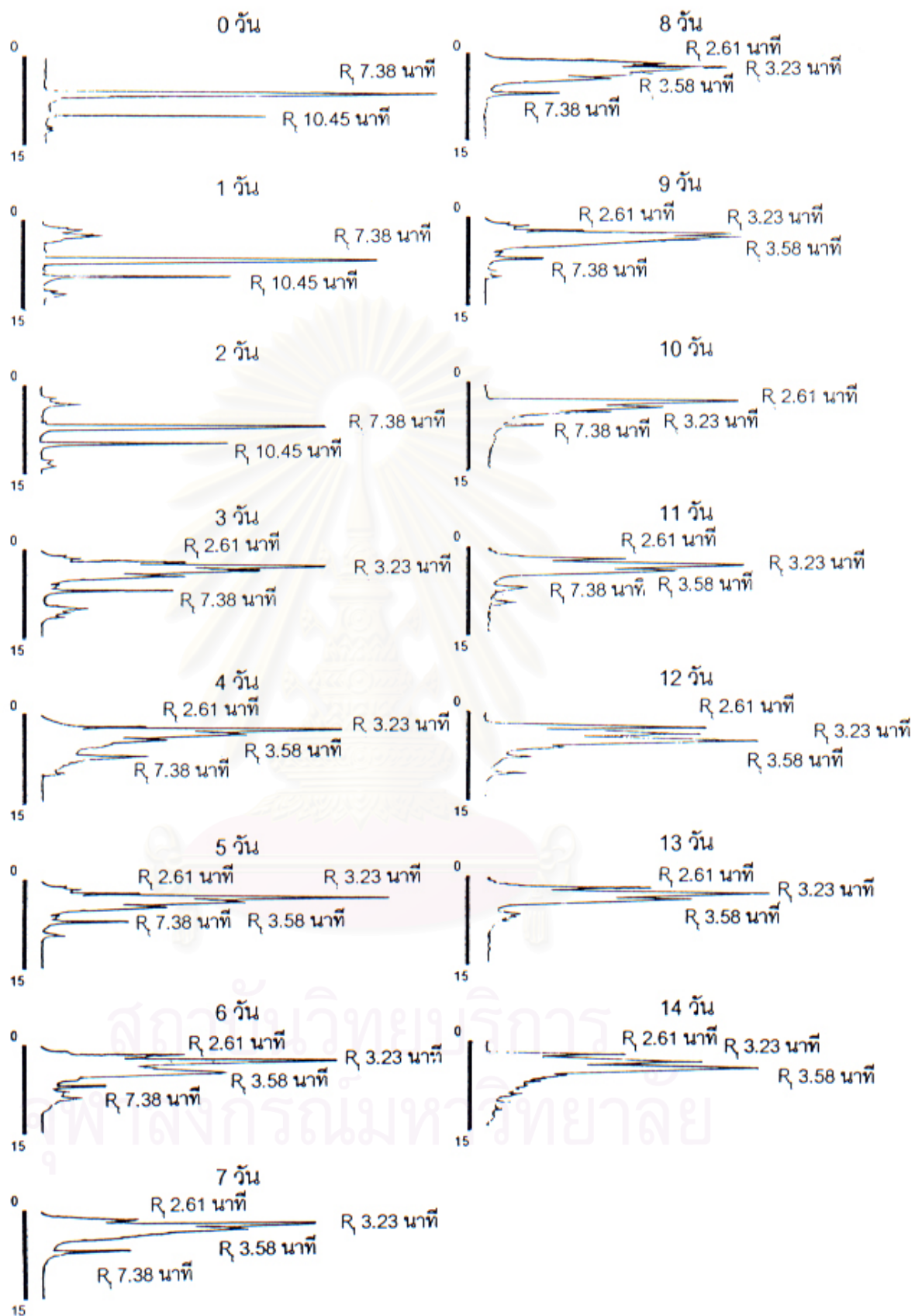
รูปที่ ง. 10 HPLC โคโรมาโตแกรมของสารมัธยันต์ที่สะสมจากการย่อยสลายอะซีแนพทิลีนโดย *Rhizobium* sp. A18 ที่ระยะเวลาต่างๆ กัน (R_t 7.38 คืออะซีแนพทิลีน)



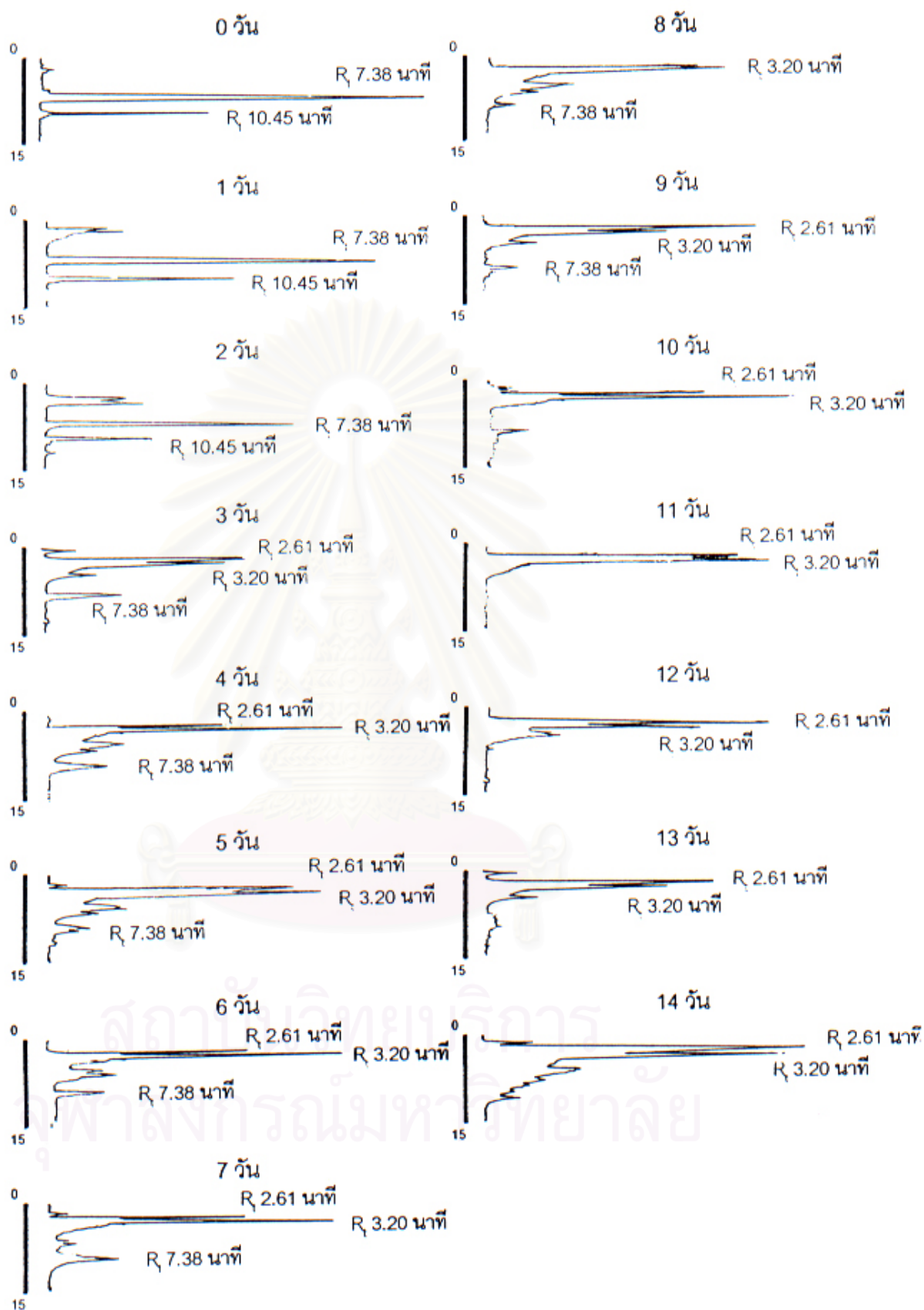
รูปที่ ง. 11 HPLC โคโรมาโตแกรมของสารมัธยันต์ที่สะสมจากการย่อยสลายอะซีแนพทิลีนโดย *Rhizobium* sp. A35 ที่ระยะเวลาต่างๆ กัน (R_t 7.38 คืออะซีแนพทิลีน)



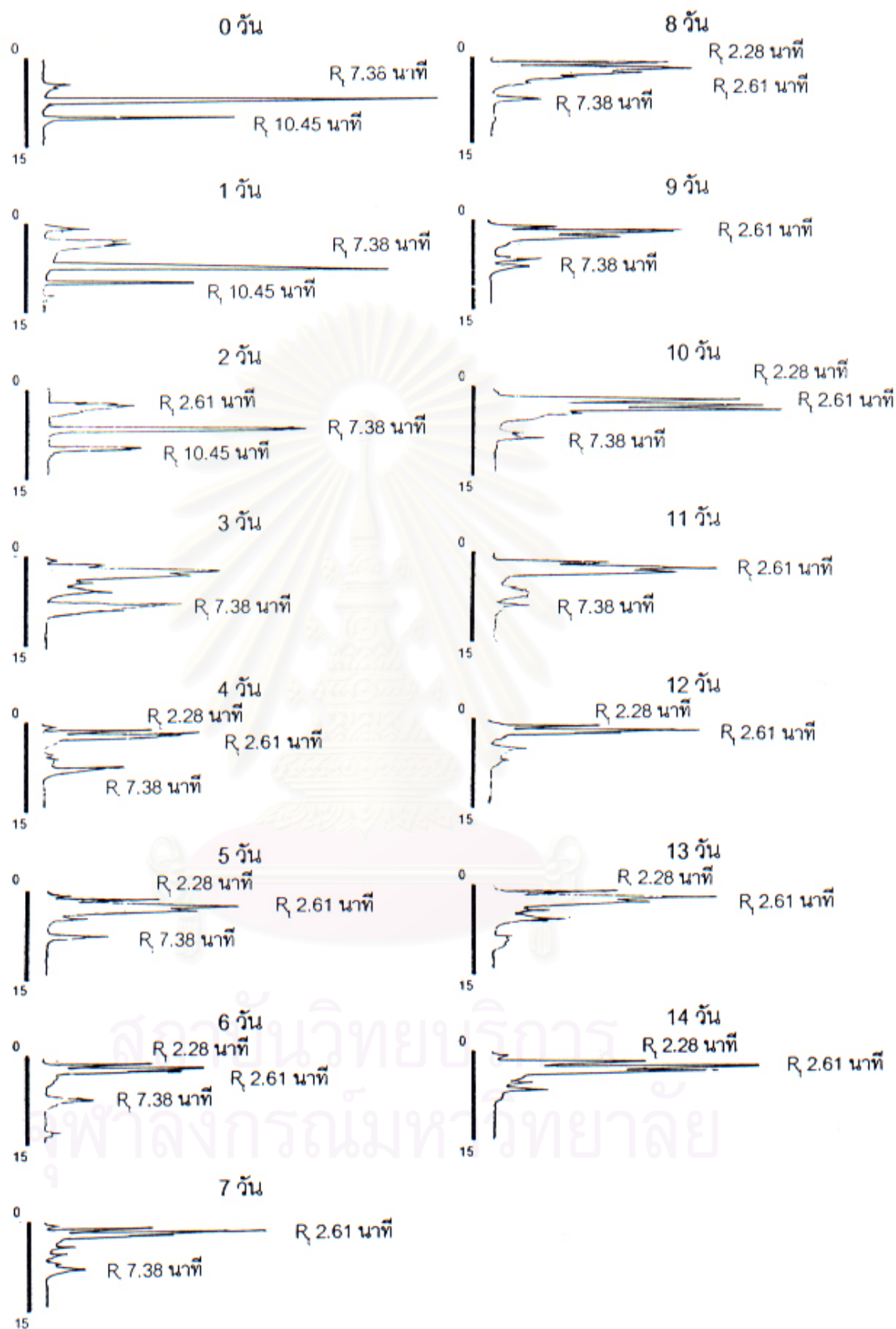
รูปที่ ง. 12 HPLC โคโรมาโตแกรมของสารมัธยันต์ที่สะสมจากการย่อยสลายอะซีแนพริลีนโดย *Rhizobium* sp. A49 ที่ระยะเวลาต่างๆ กัน (R_t 7.38 คืออะซีแนพริลีน)



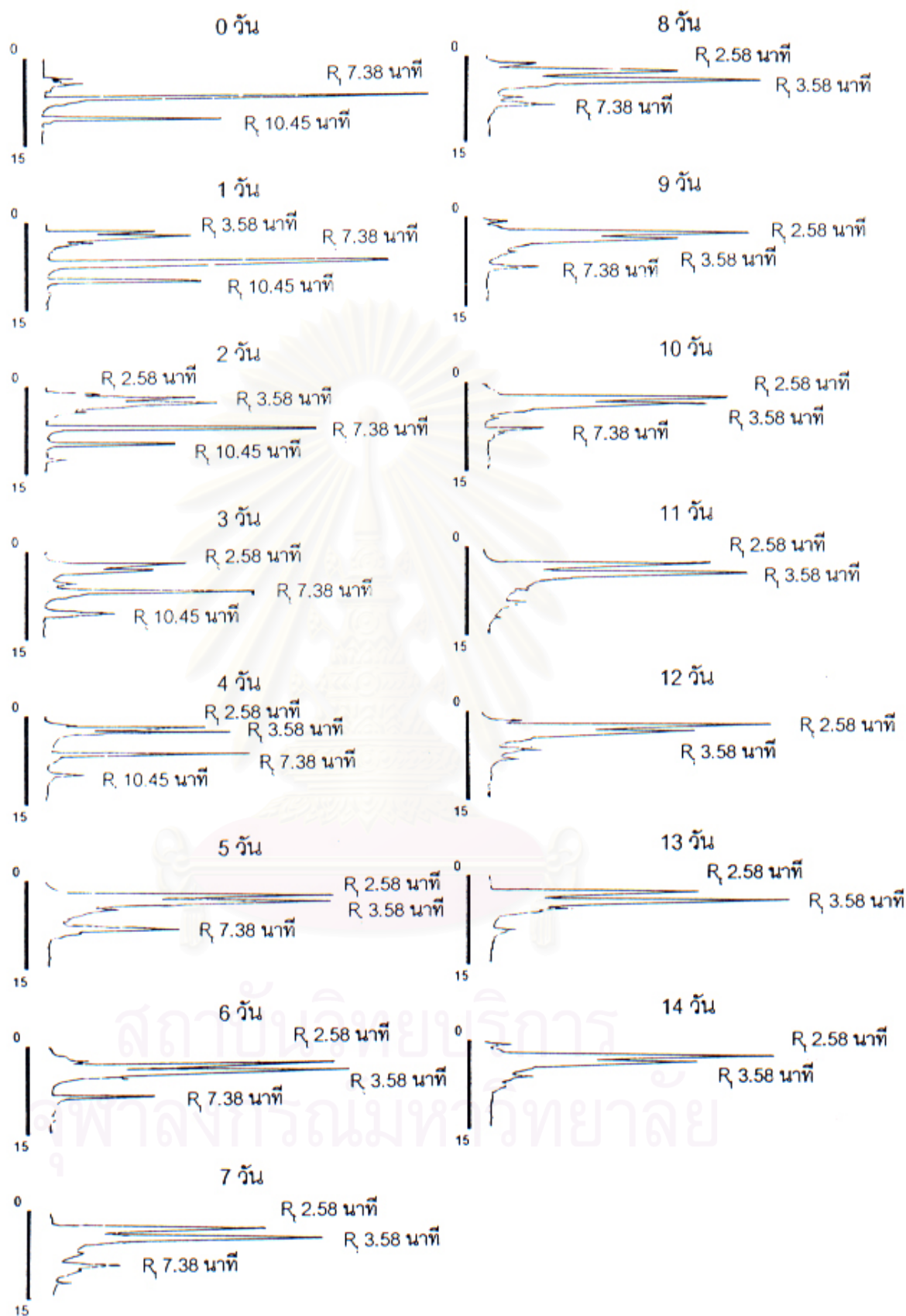
รูปที่ ง. 13 HPLC โคโรมาโตแกรมของสารมัธยันต์ที่สะสมจากการย่อยสลายอะซีแนพทิลีนโดย *Rhizobium* sp. A53 ที่ระยะเวลาต่างๆ กัน (R_t 7.38 คืออะซีแนพทิลีน)



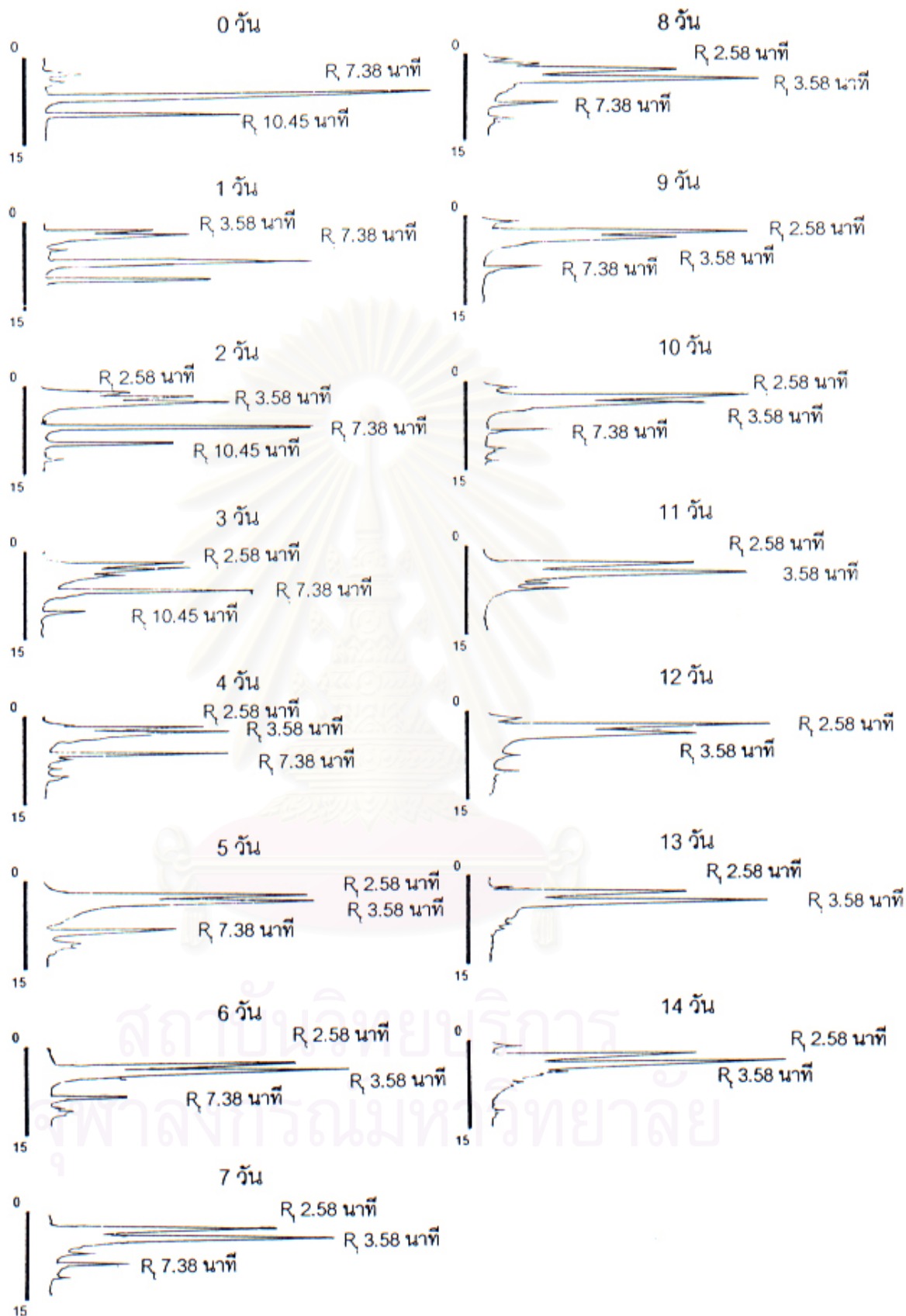
รูปที่ ง. 14 HPLC โคโรมาโตแกรมของสารมัธยันต์ที่สะสมจากการย่อยสลายอะซีแนพริลีนโดย *Rhizobium* sp. B1 ที่ระยะเวลาต่างๆ กัน (R_t 7.38 คืออะซีแนพริลีน)



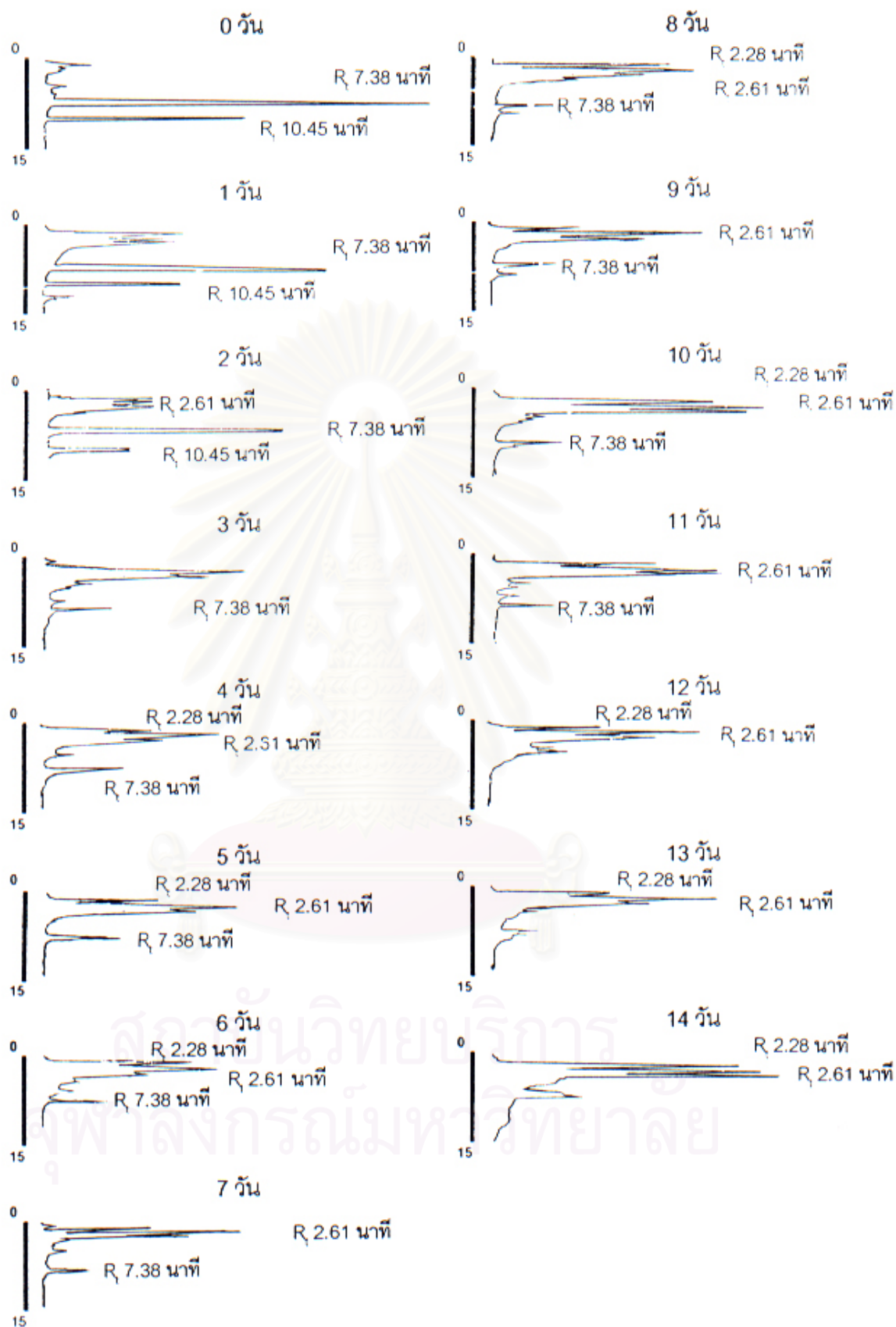
รูปที่ ง. 15 HPLC โคโรมาโตแกรมของสารมัธยันต์ที่สะสมจากการย่อยสลายอะซีแนฟทอลีนโดย *Rhizobium* sp. B5 ที่ระยะเวลาต่างๆ กัน (R_t 7.38 คืออะซีแนฟทอลีน)



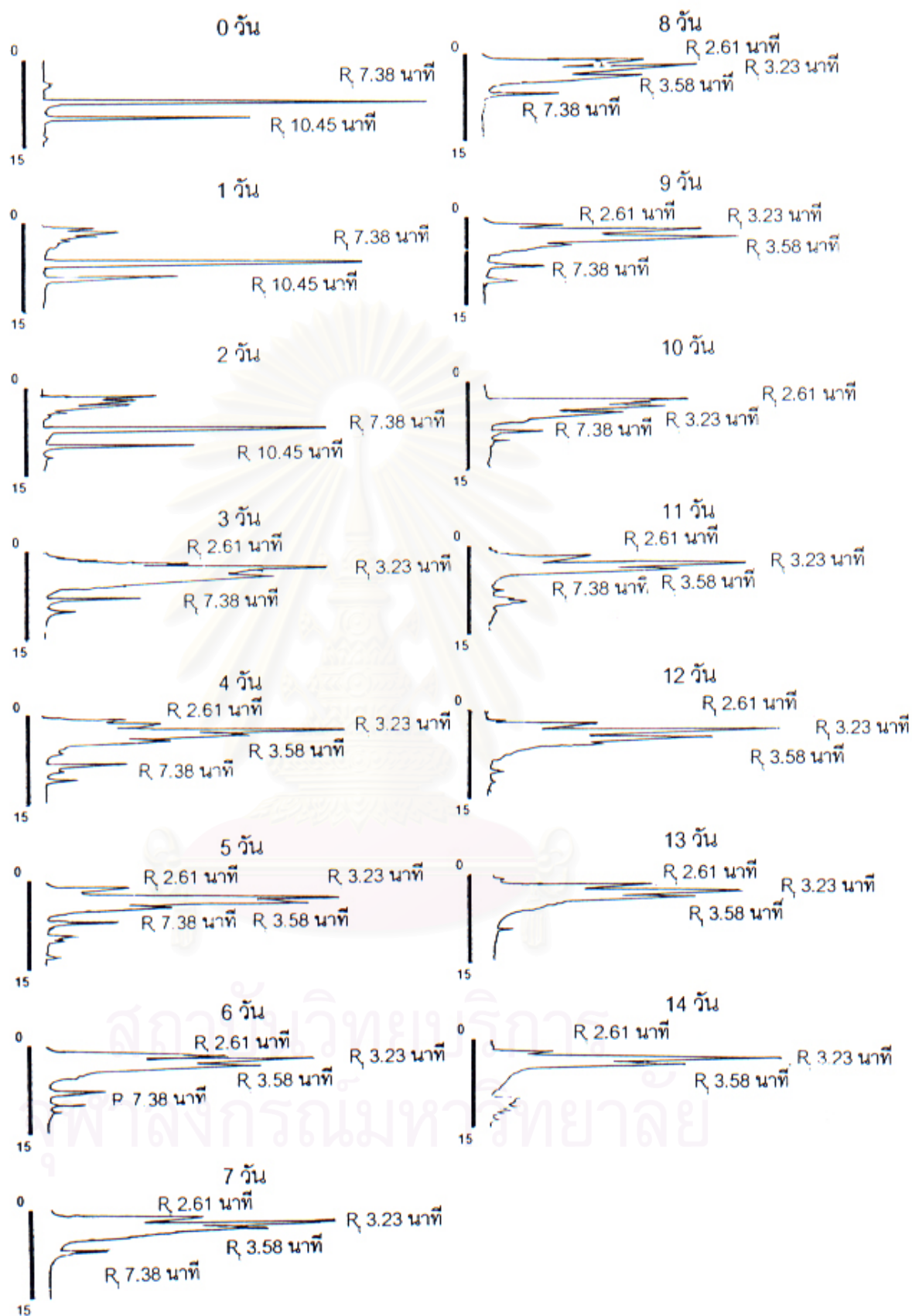
รูปที่ ง. 16 HPLC โคโรมาโตแกรมของสารมัธยันต์ที่สะสมจากการย่อยสลายอะซีแนฟทาลีนโดย *Rhizobium* sp. D1 ที่ระยะเวลาต่างๆ กัน (R_t 7.38 คืออะซีแนฟทาลีน)



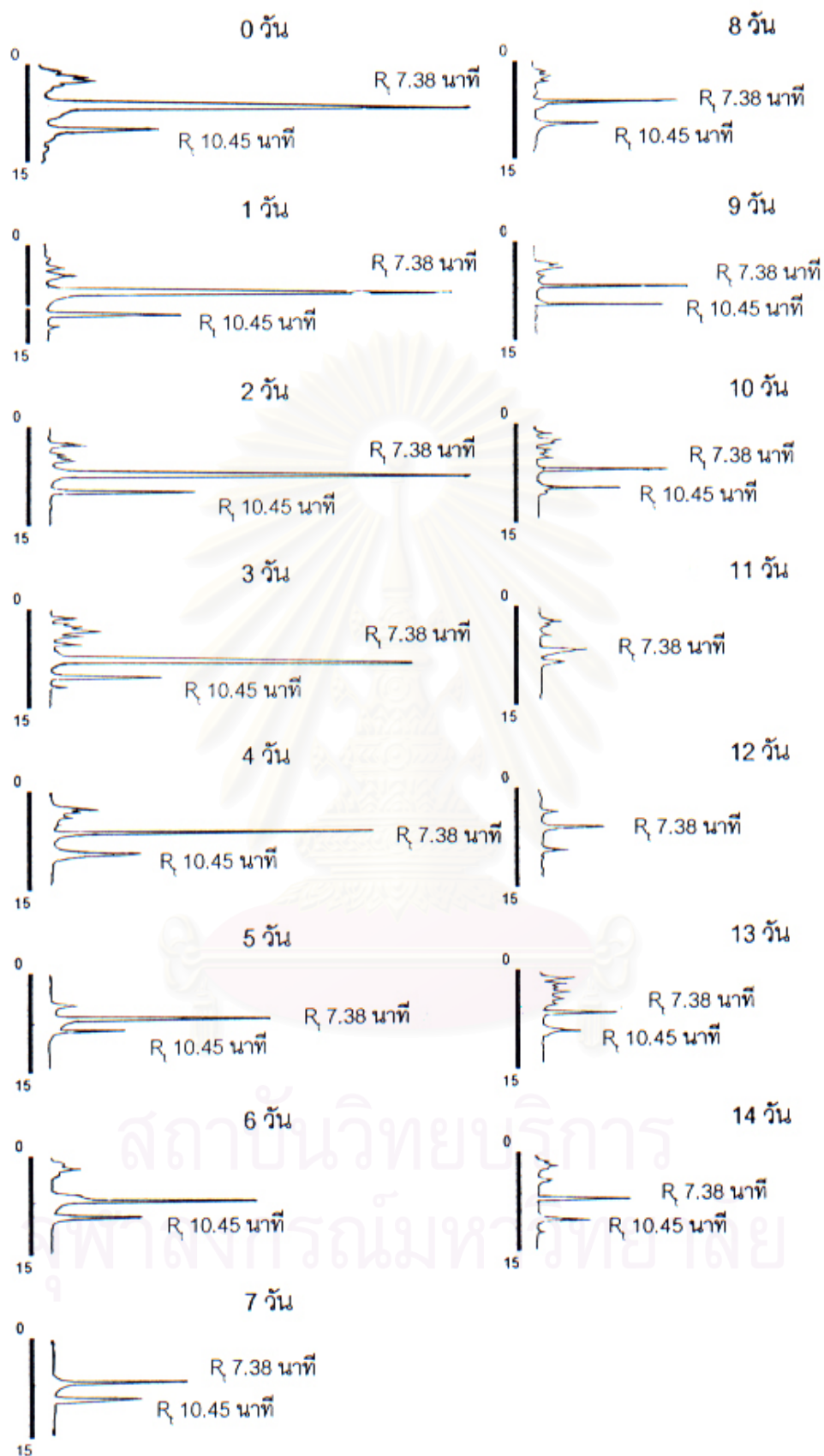
รูปที่ ง. 17 HPLC โคโรมาโตแกรมของสารมัธยันต์ที่สะสมจากการย่อยสลายอะซีแนฟทาลีนโดย *Rhizobium* sp. D2 ที่ระยะเวลาต่างๆ กัน (R_t 7.38 คืออะซีแนฟทาลีน)



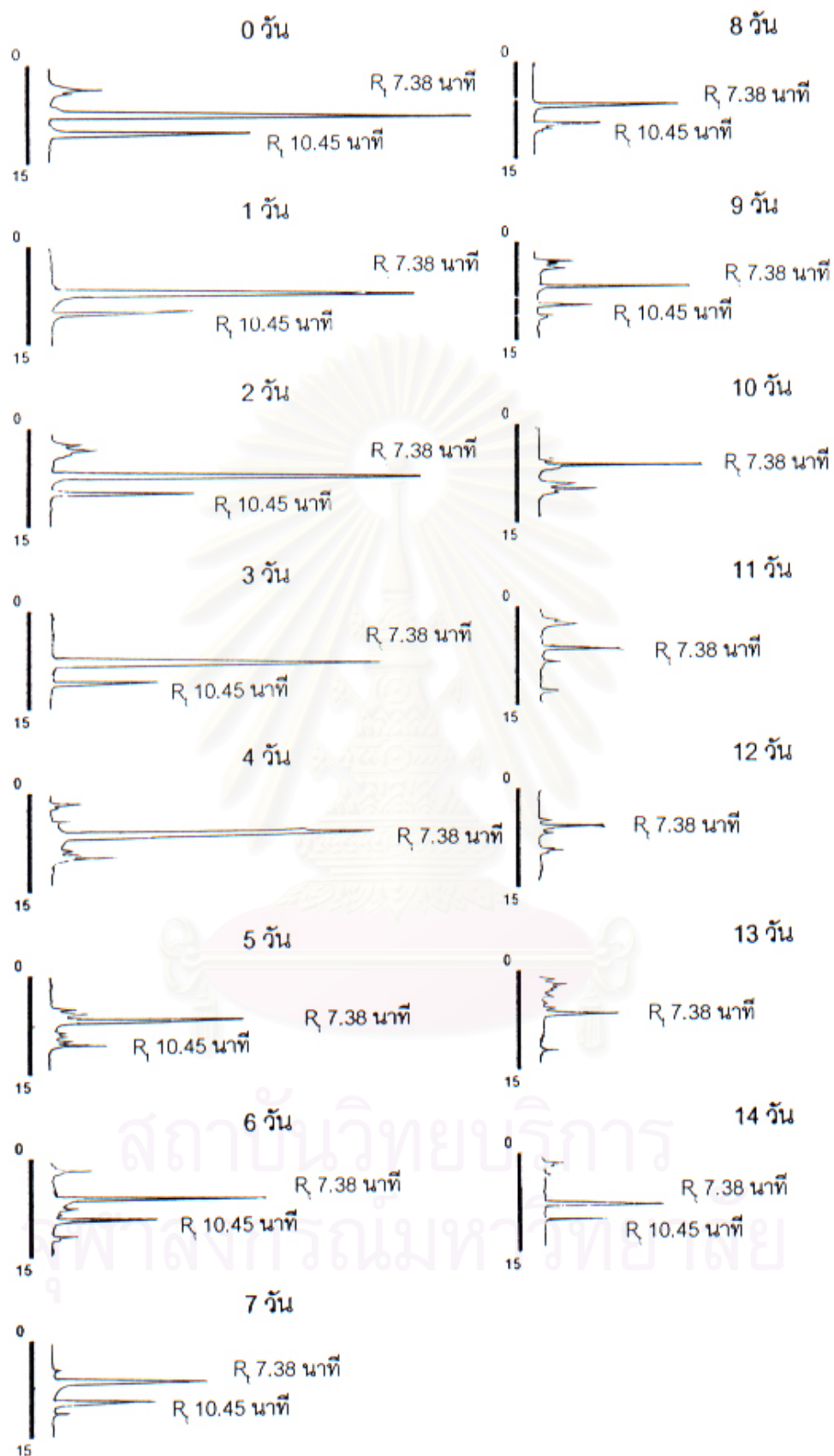
รูปที่ ง. 18 HPLC โคโรมาโตแกรมของสารมัธยันต์ที่สะสมจากการย่อยสลายอะซีแนพริลีนโดย *Rhizobium* sp. E11 ที่ระยะเวลาต่างๆ กัน (R_t 7.38 คืออะซีแนพริลีน)



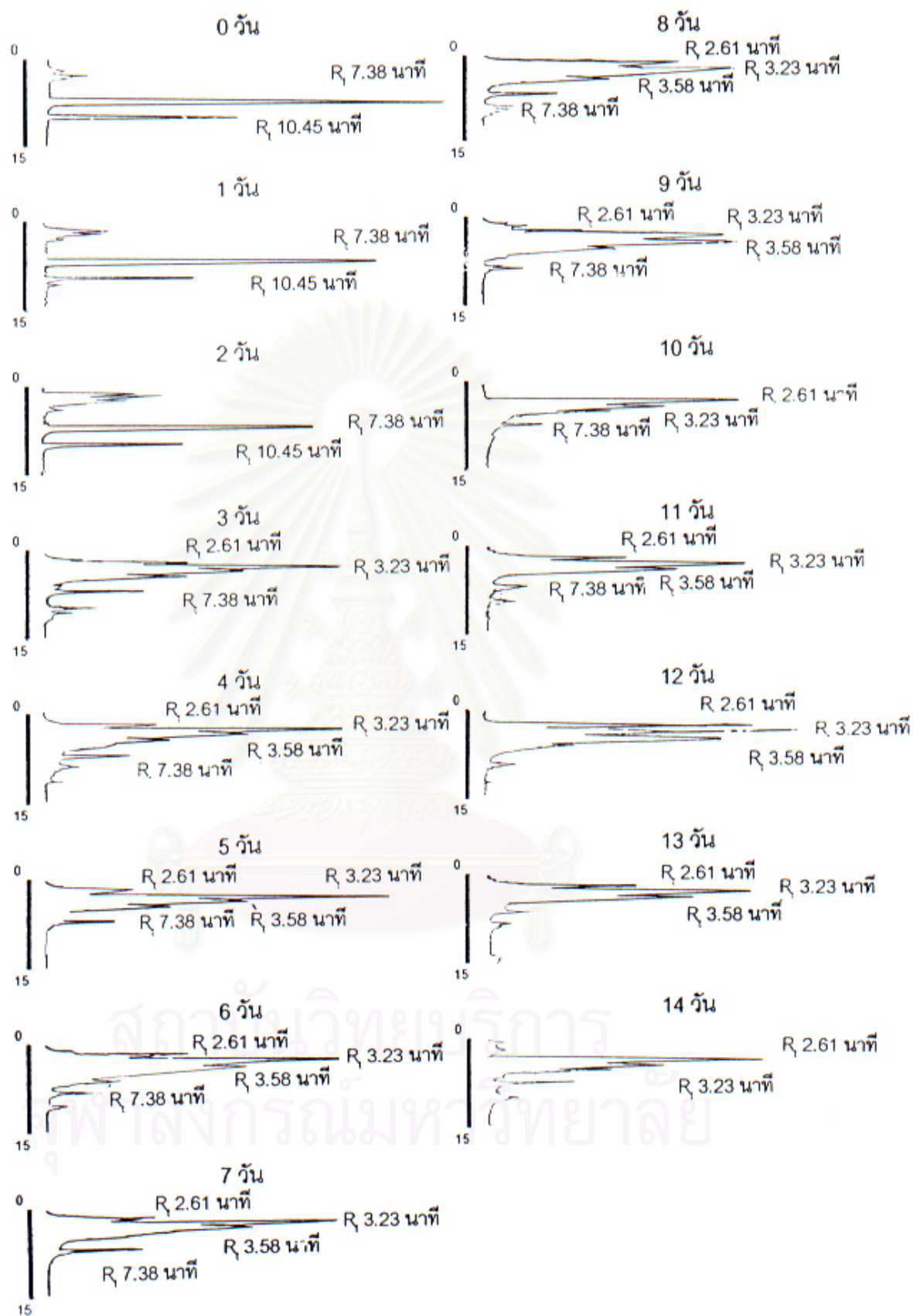
รูปที่ ง. 19 HPLC โคโรมาโตแกรมของสารมัธยันต์ที่สะสมจากการย่อยสลายอะซีแนฟทาลีนโดย *Rhizobium* sp. E32 ที่ระยะเวลาต่างๆ กัน (R_{7.38} คืออะซีแนฟทาลีน)



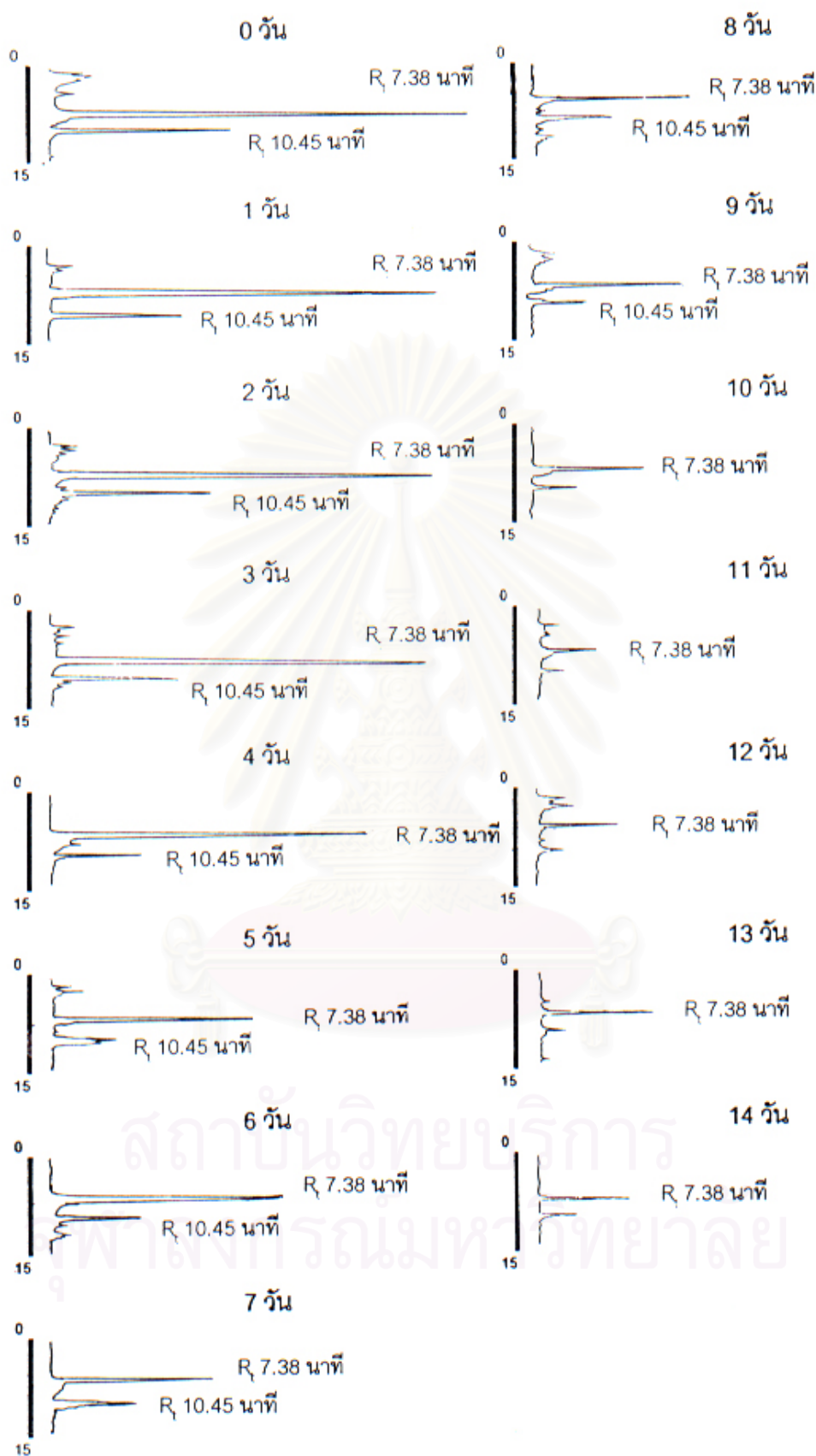
รูปที่ ง. 20 HPLC โคโรมาโตแกรมของสารมัธยันต์ที่สะสมจากการย่อยสลายอะซีแนฟทอลีนโดย *Rhizobium* sp. G12 ที่ระยะเวลาต่างๆ กัน (R_t 7.38 คืออะซีแนฟทอลีน)



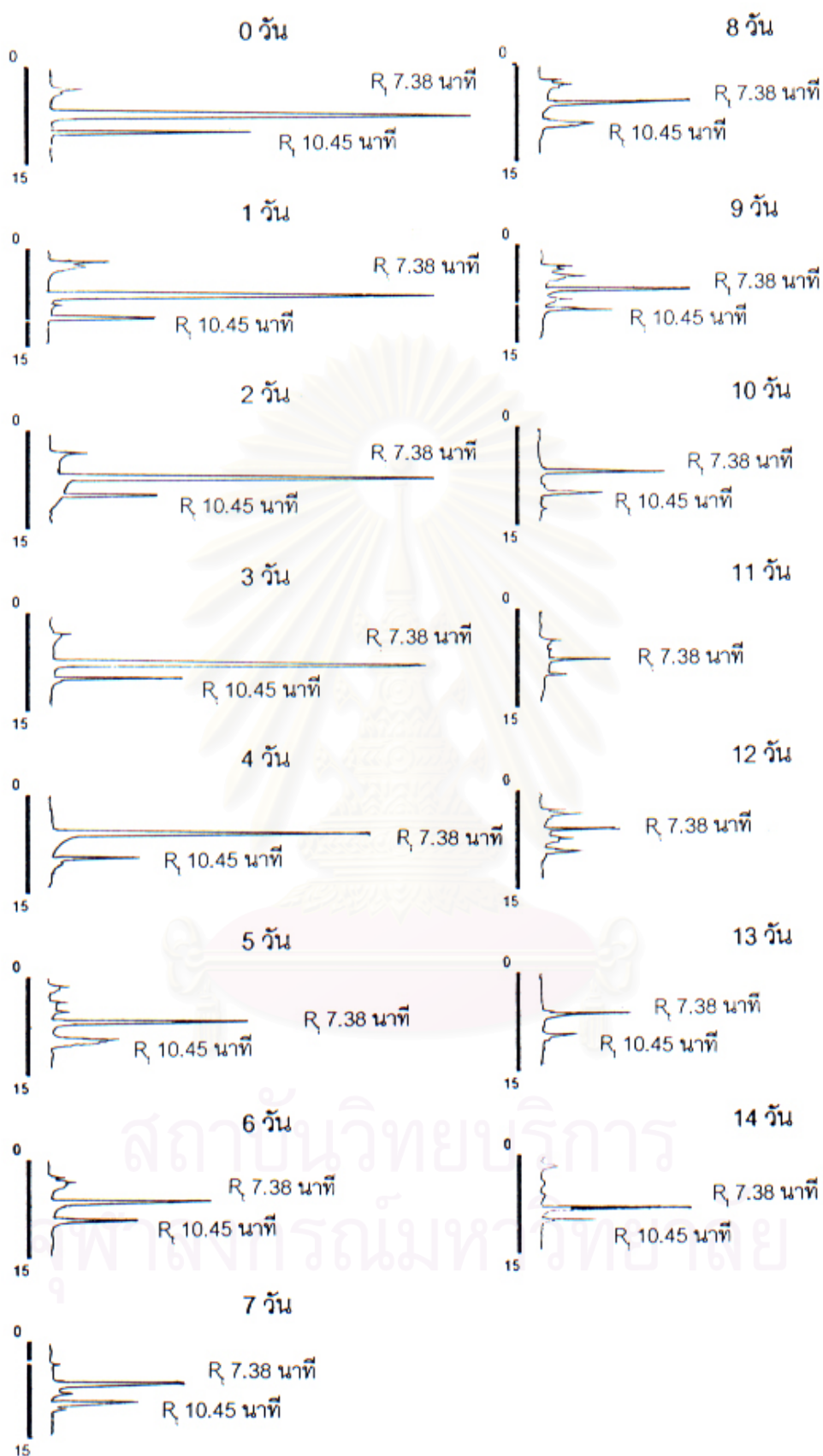
รูปที่ ง. 21 HPLC โคโรมาโตแกรมของสารมัธยันต์ที่สะสมจากการย่อยสลายอะซีแนพทาลีนโดย *Rhizobium* sp. G39 ที่ระยะเวลาต่างๆ กัน (R_t 7.38 คืออะซีแนพทาลีน)



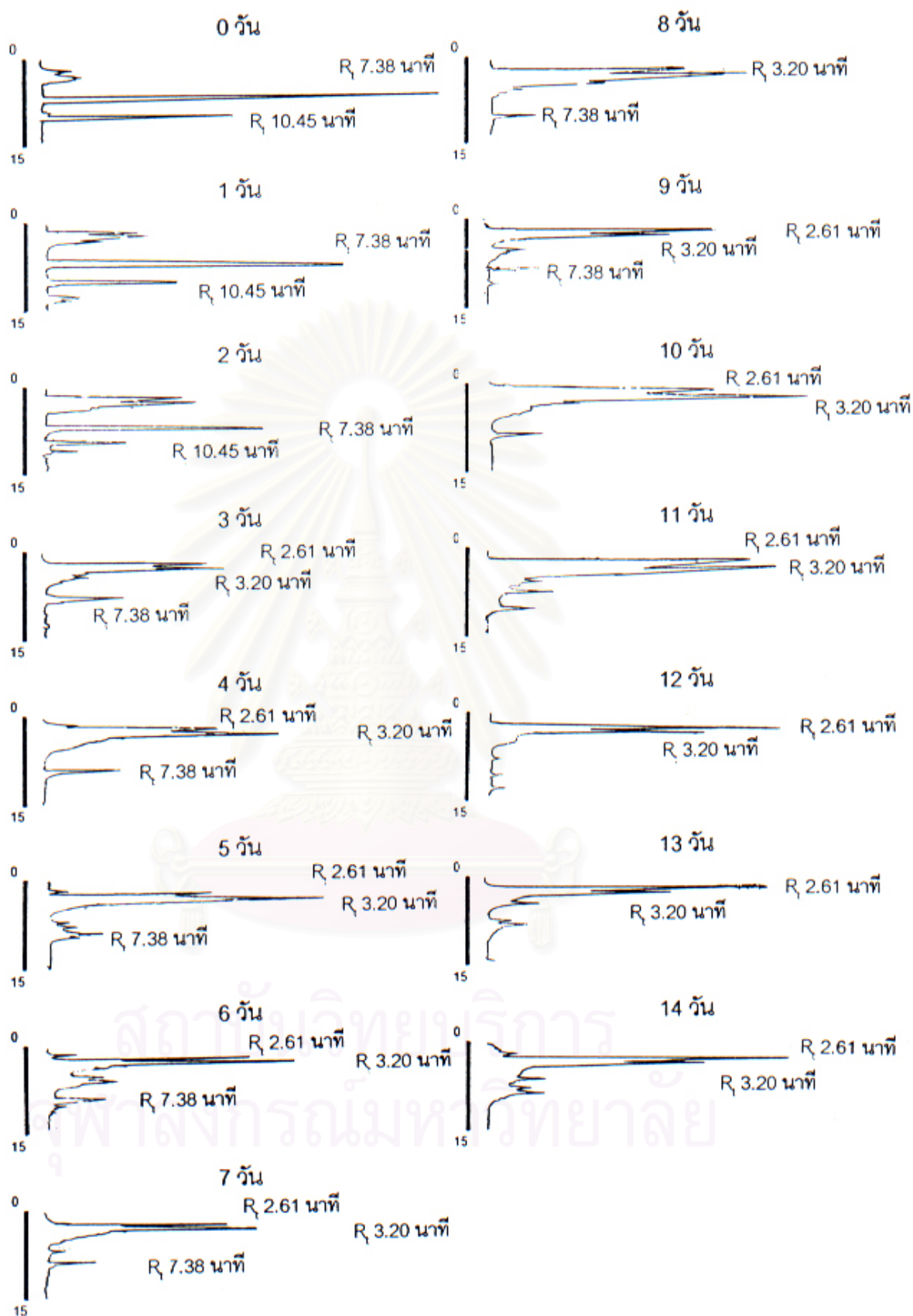
รูปที่ ง. 22 HPLC โคโรมาโตแกรมของสารมัธยันต์ที่สะสมจากการย่อยสลายอะซีแนฟทอลีนโดย *Rhizobium* sp. G62 ที่ระยะเวลาต่างๆ กัน (R_t 7.38 คืออะซีแนฟทอลีน)



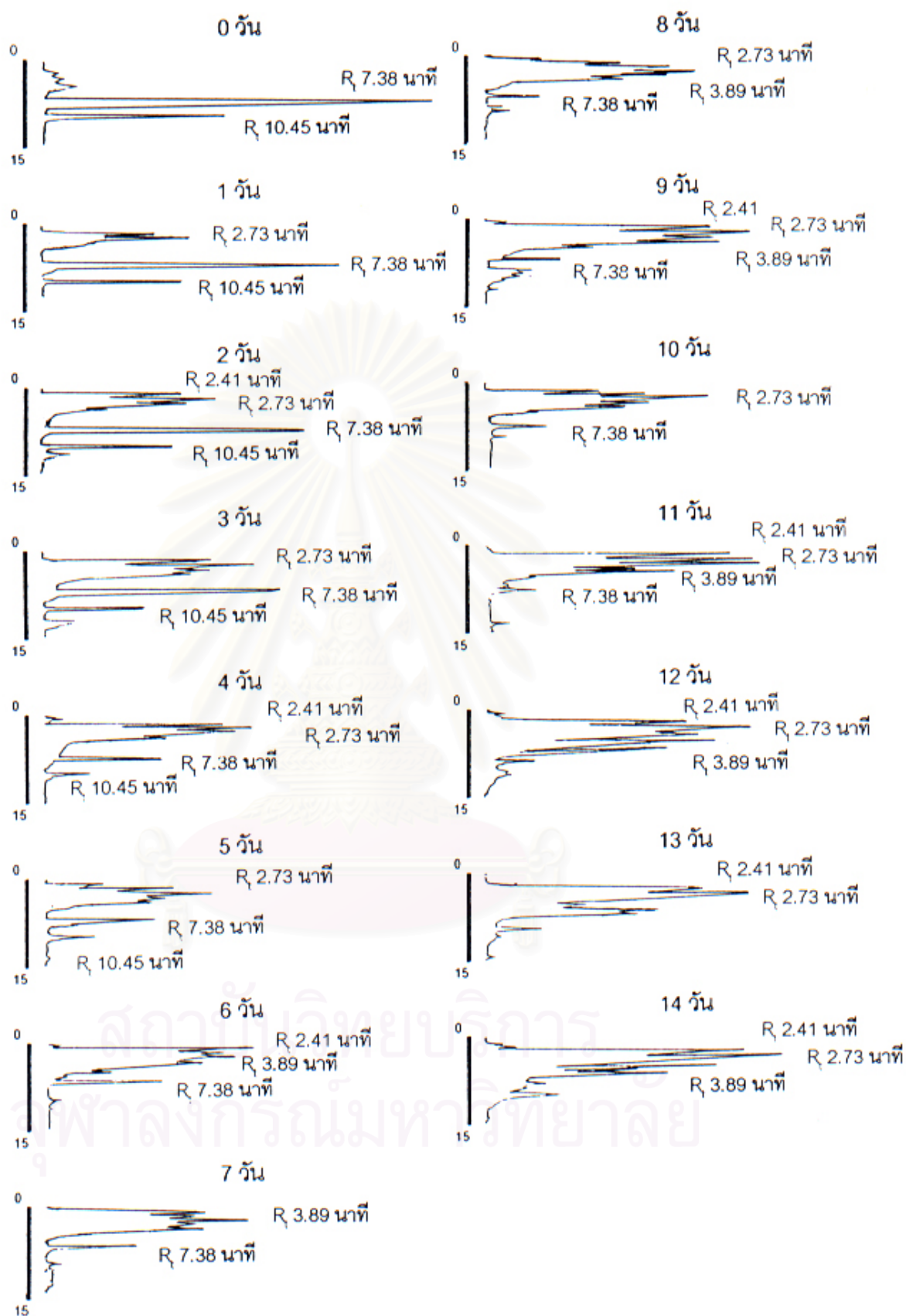
รูปที่ ง. 23 HPLC โคโรมาโตแกรมของสารมัธยันต์ที่สะสมจากการย่อยสลายอะซีแนพริลีนโดย *Rhizobium* sp. G101 ที่ระยะเวลาต่างๆ กัน (R_t 7.38 คืออะซีแนพริลีน)



รูปที่ ง. 24 HPLC โคโรมาโตแกรมของสารมัธยันต์ที่สะสมจากการย่อยสลายอะซีแนพริลีนโดย *Rhizobium* sp. G531 ที่ระยะเวลาต่างๆ กัน (R_t 7.38 คืออะซีแนพริลีน)

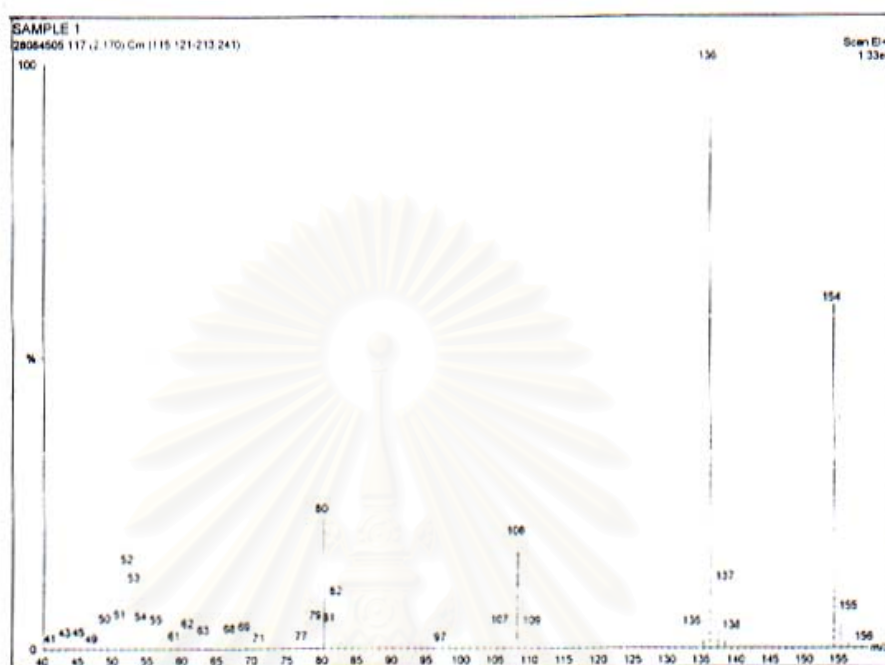


รูปที่ ง. 25 HPLC โคโรมาโตแกรมของสารมัธยันต์ที่สะสมจากการย่อยสลายอะซีแนฟทอลีนโดย *Rhizobium* sp. H1 ที่ระยะเวลาต่างๆ กัน (R_t 7.38 คืออะซีแนฟทอลีน)

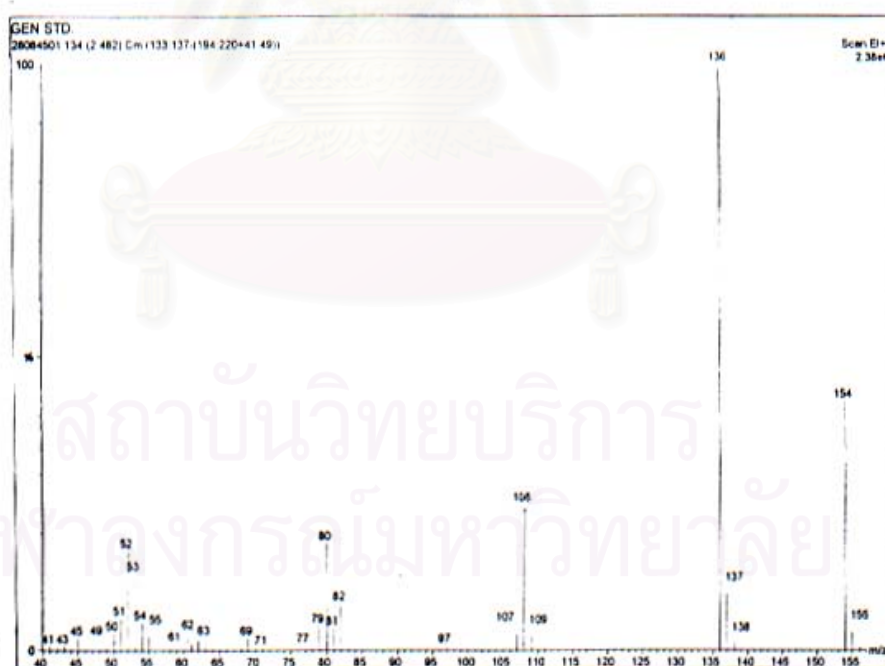


รูปที่ ง. 26 HPLC โคโรมาโตแกรมของสารมัธยันต์ที่สะสมจากการย่อยสลายอะซีแนฟทอลีนโดย *Rhizobium* sp. J1 ที่ระยะเวลาต่างๆ กัน (R_t 7.38 คืออะซีแนฟทอลีน)

2. การพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารมัธยันต์ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ด้วยแก๊สโครมาโตกราฟี-แมสสเปกโตรเมตรีและนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์

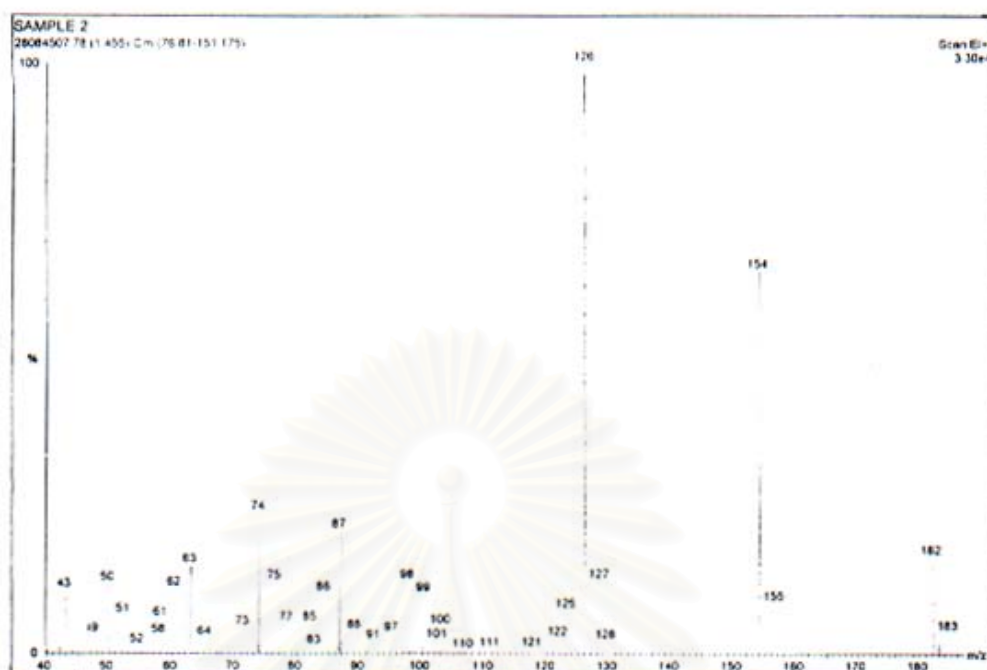


ก.

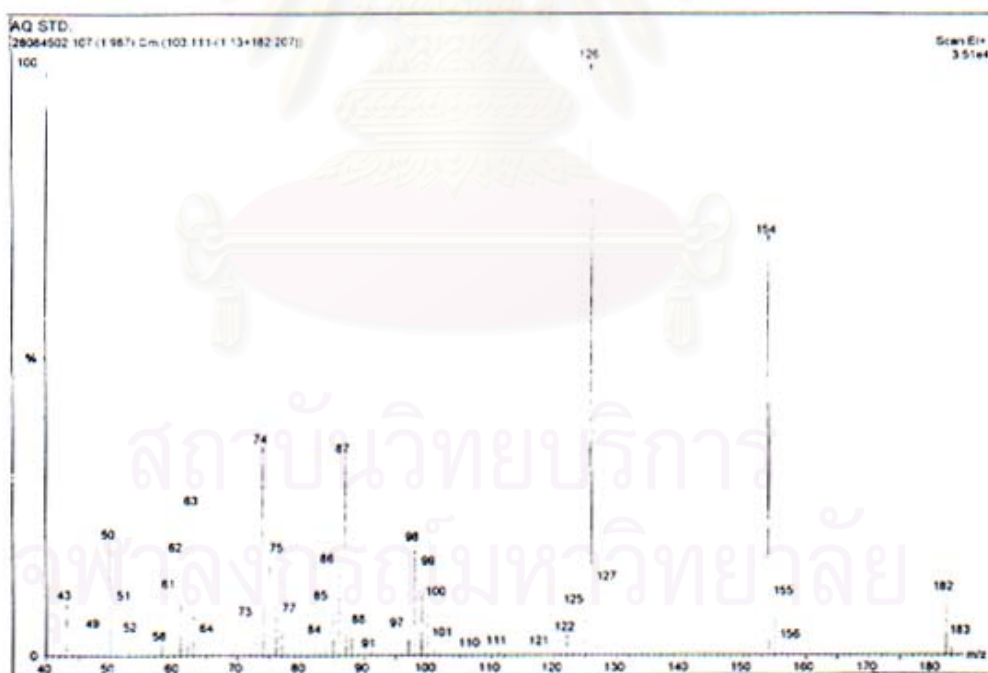


ข.

รูปที่ ง. 27 แมสสเปกตรัมของสารมัธยันต์ A53(1) ที่สะสมจากการย่อยสลายอะซีแนฟริลีนโดยเชื้อสายพันธุ์กลาย A53 (ก.) เปรียบเทียบกับแมสสเปกตรัมของสารมาตรฐานกรด 2,5-ไดไฮดรอกซีเบนโซอิก (ข.)

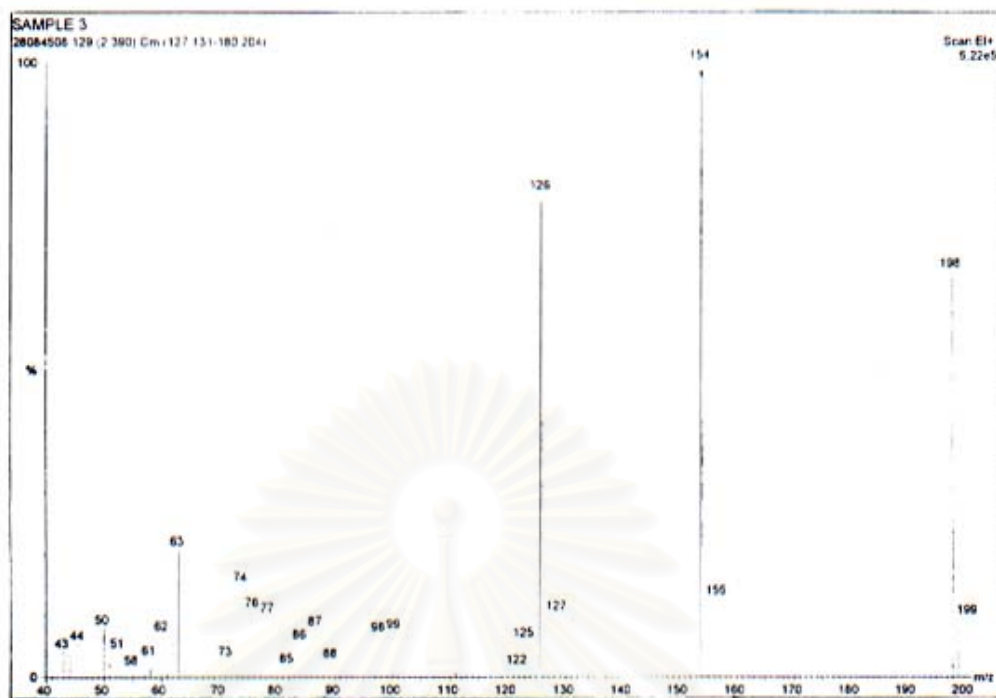


ก.

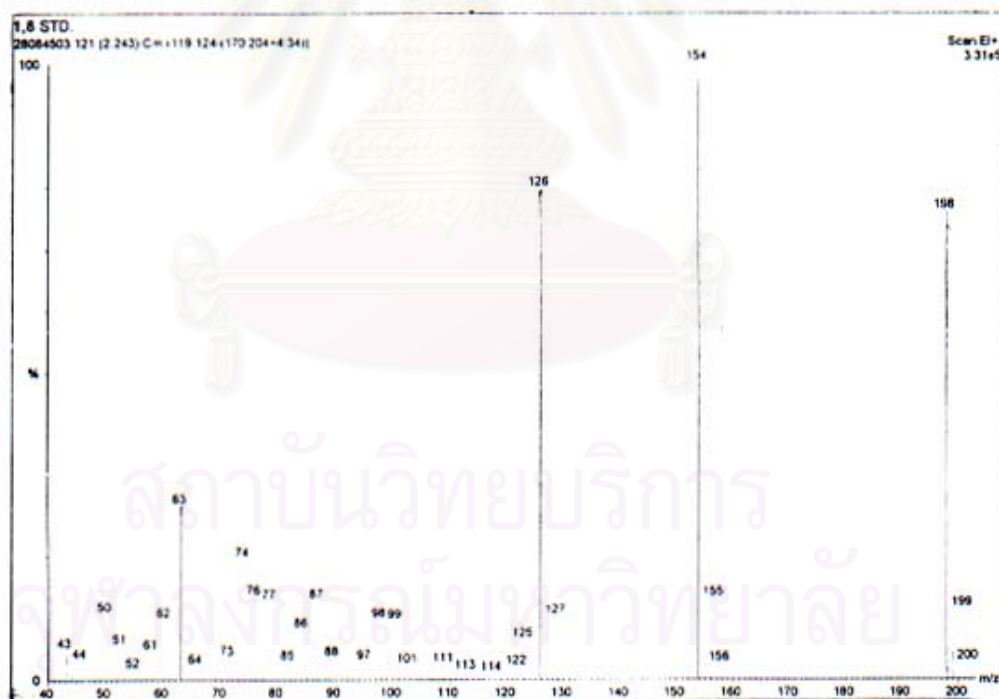


ข.

รูปที่ ง. 28 แมสสเปกตรัมของสารมัยันต์ B1(1) ที่สะสมจากการย่อยสลายอะซีแนฟทีนโดยเชื้อสายพันธุ์กลาย B1 (ก.) เปรียบเทียบกับแมสสเปกตรัมของสารมาตรฐานอะซีแนฟทีนควิโนน (ข.)

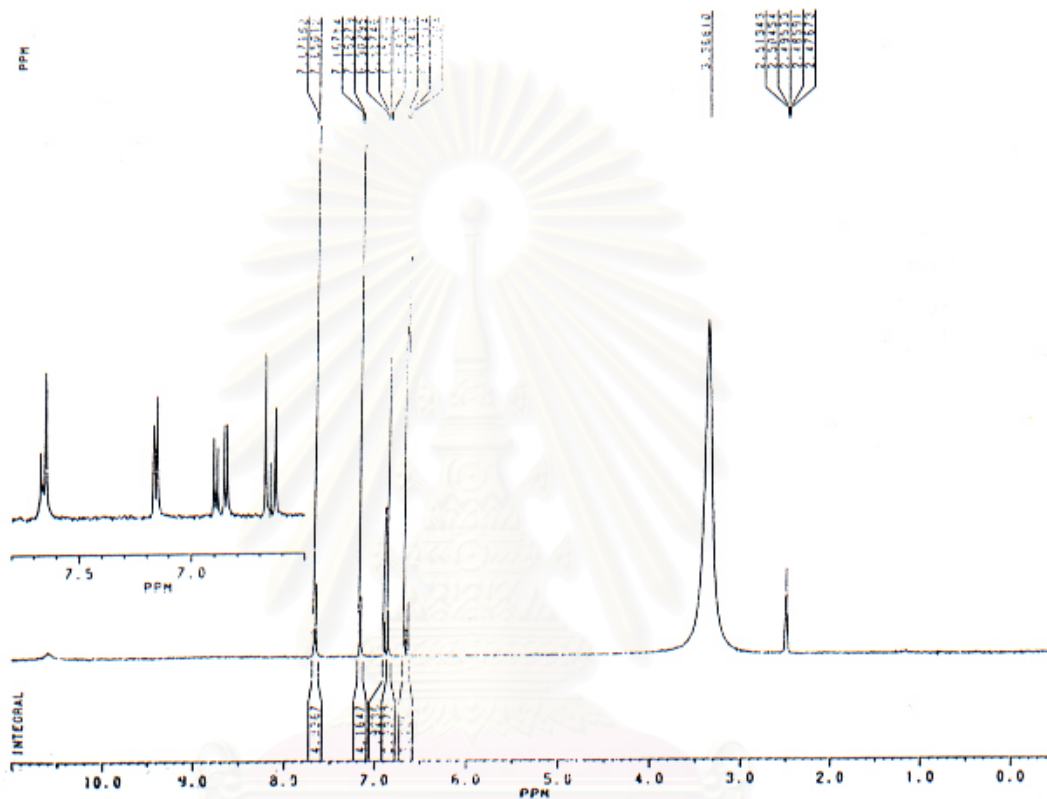


ก.

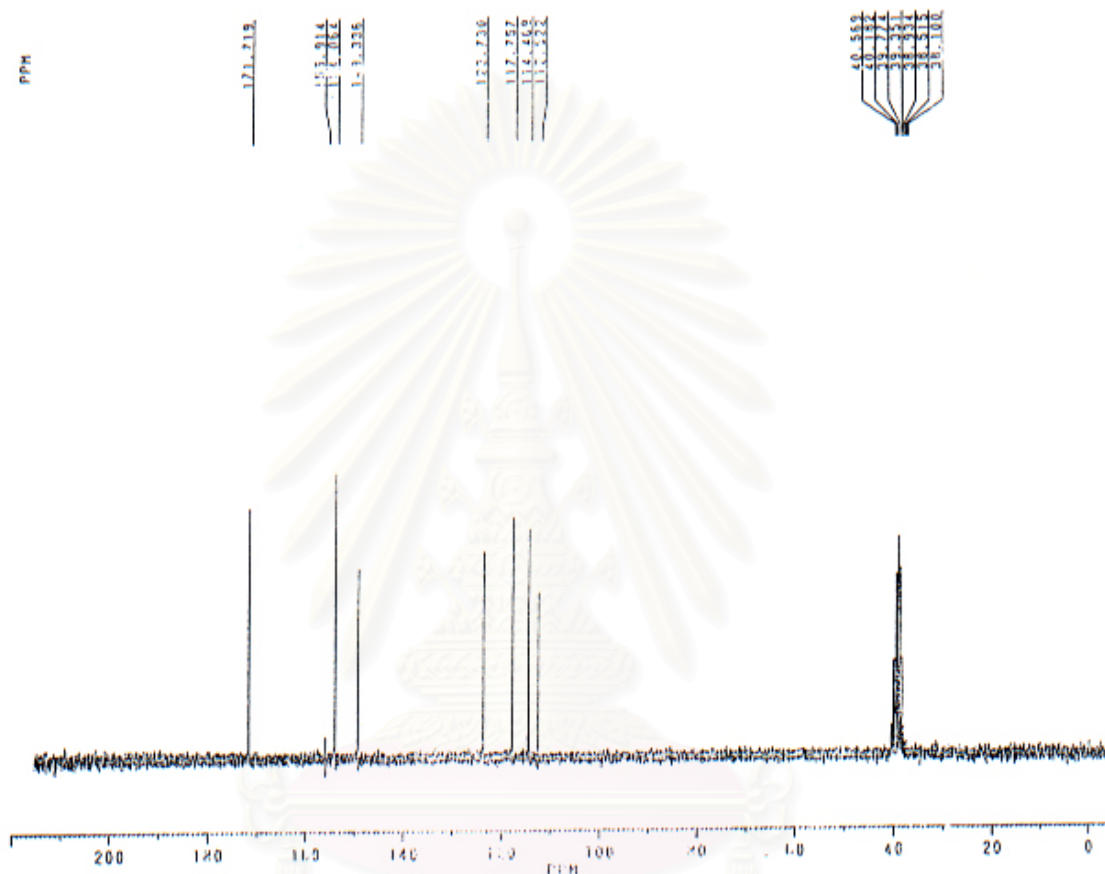


ข.

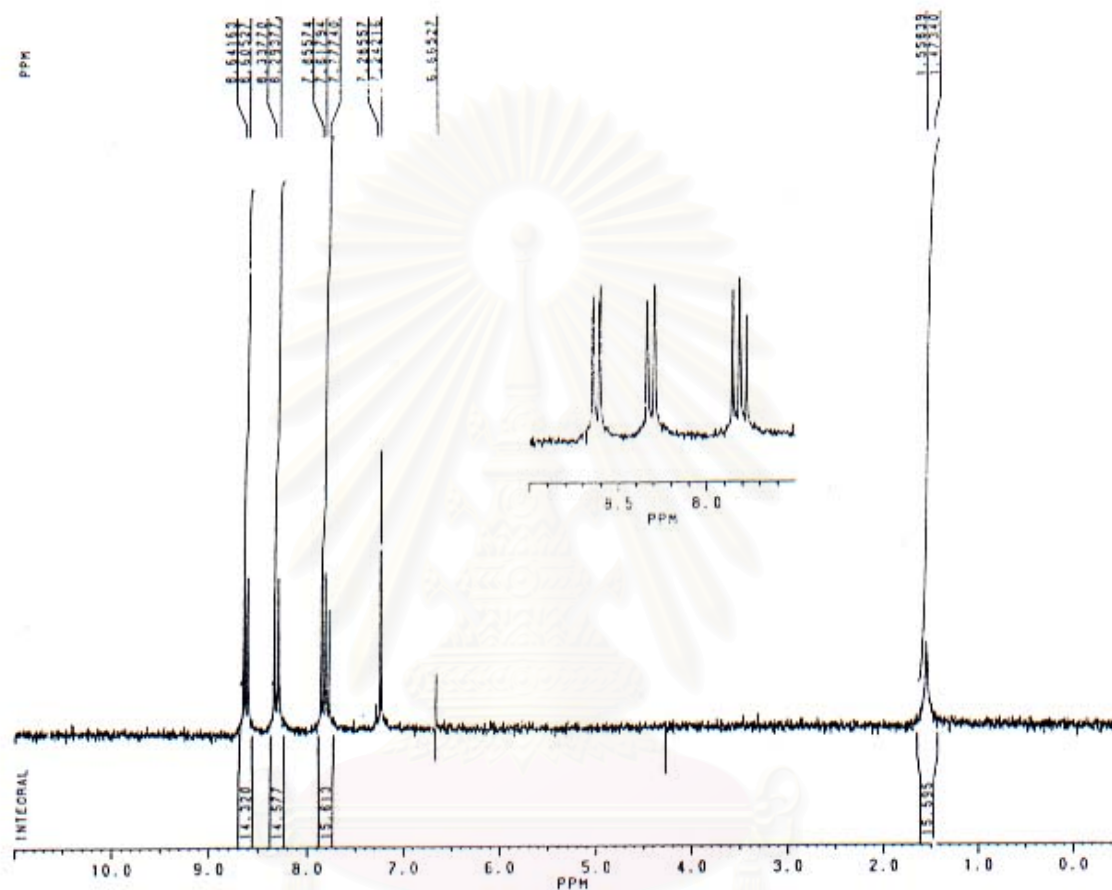
รูปที่ ง. 29 แมสสเปกตรัมของสารมัยันต์ B5(1) ที่สะสมจากการย่อยสลายอะซีแนฟทิลีนโดยเชื้อสายพันธุ์กลาย B5 (ก.) เปรียบเทียบกับแมสสเปกตรัมของสารมาตรฐาน 1,8-แนพทาลิกแอนไฮไดรด์ (ข.)



รูปที่ ๓. 30 ^{1}H NMR สเปกตรัม ของสารมัธยันต์ A53(1) ที่สะสมจากการย่อยสลายอะซีแนพริดีน โดยเชื้อสายพันธุ์กลาย A53



รูปที่ ง. 31 ^{13}C NMR สเปกตรัม ของสารมัยันต์ A53(1) ที่สะสมจากการย่อยสลายอะซีแนพริดีน โดยเชื้อสายพันธุ์กลาย A53



รูปที่ ง. 32 ^1H NMR สเปกตรัม ของสารมัธยันต์ B5(1) ที่สะสมจากการย่อยสลายอะซีแนพริดีน โดยเชื้อสายพันธุ์กลาย B5

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นายศิริวัตร ปุณฺทริกพันธ์ เกิดเมื่อวันที่ 28 กันยายน พ.ศ. 2521 ที่จังหวัดกรุงเทพมหานคร สำเร็จการศึกษาปริญญาตรีวิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาจุลชีววิทยา ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี ในปีการศึกษา 2541 และเข้ารับการศึกษต่อในระดับปริญญาโท สาขาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2542



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย