

บทที่ 4

ผลการทดลอง

4.1 ผลการเพิ่มจำนวนแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายฟิแทนทรินในแต่ละตัวอย่างดิน

จากการนำตัวอย่างดิน 11 ตัวอย่างมาทำการเพิ่มจำนวนแบคทีเรียที่ย่อยสลายฟิแทนทรินได้ โดยเลี้ยงในอาหารเหลว MM ที่มีฟิแทนทรินเข้มข้น 0.1 มก. มล. และถ่ายเชื้อเมื่อพบการเจริญโดยการสังเกตจากความขุ่นที่เพิ่มขึ้นและการเปลี่ยนสีของอาหารเหลวหลังจากทำการถ่ายเชื้อ 5 ครั้งติดต่อกัน ดังแสดงผลการทดลองในตารางที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 การเจริญของเชื้อในแต่ละตัวอย่างดินหลังการเพิ่มจำนวนแบคทีเรียที่ย่อยสลายฟิแทนทรินได้ให้อาหารเหลวโดยการถ่ายเชื้อ 5 ครั้งติดต่อกัน

ตัวอย่างดิน	ลักษณะการเจริญในอาหารเหลวมีความขุ่นเกิดขึ้น	การเปลี่ยนสีของอาหารเลี้ยงเชื้อ
1	-	-
2	-	-
3	-	-
4	+	เปลี่ยนเป็นสีเหลืองอ่อน
5	+	เปลี่ยนเป็นสีเหลืองอ่อน
6	-	-
7	-	-
8	+	เปลี่ยนเป็นสีเหลืองเข้ม
9	-	-
10	-	-
11	-	-

หมายเหตุ + หมายถึง การเปลี่ยนแปลงตามลักษณะนั้น

- หมายถึง ไม่มีการเปลี่ยนแปลงตามลักษณะนั้น

จากการเพิ่มจำนวนแบคทีเรียย่อยสลายพีแนนทริน พบว่าอาหารเหลวที่เดิมตัวอย่างคินที่ 4 5 และ 8 มีความขุ่นเพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบกับชุดควบคุม รวมทั้งมีการเปลี่ยนสีของอาหารเหลวจากไม่มีสีไปเป็นสีเหลือง

มีรายงานว่า การเปลี่ยนสีของอาหารเลี้ยงเชื้อไปเป็นสีเหลืองหรือส้ม อาจเกิดจากการสะสมของสารมีซันด์ชนิด ring cleavage compounds ที่เกิดจากการย่อยสลาย PAHs โดยจุลินทรีย์ (Mueller et al., 1989) ดังนั้นอาจเป็นไปได้ว่าเชื้อแบคทีเรียในตัวอย่างคินที่ 4 5 และ 8 สามารถย่อยสลายพีแนนทรินได้ จึงนำตัวอย่างคินทั้ง 3 ตัวอย่างไปทำการแยกเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ที่ย่อยสลายพีแนนทรินได้ในขั้นตอนต่อไป

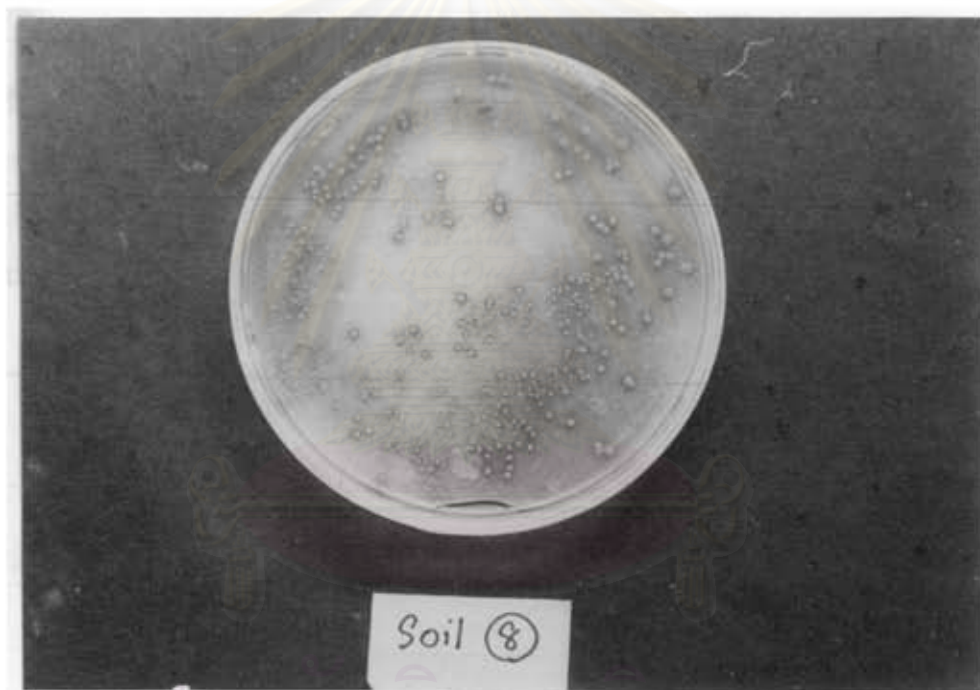
เมื่อพิจารณาจากระยะเวลาที่พบการเจริญในการถ่ายเชื้อแต่ละครั้งระหว่างการเพิ่มจำนวนแบคทีเรียที่ย่อยสลายพีแนนทรินจากตัวอย่างคินที่ 4 5 และ 8 ดังแสดงรายละเอียดในตารางที่ 4.2 จะพบว่าเชื้อแบคทีเรียในตัวอย่างคินที่ 8 ใช้ระยะเวลาที่พบการเจริญระหว่างการถ่ายเชื้อแต่ละครั้งสั้นกว่าเชื้อแบคทีเรียในตัวอย่างคินที่ 4 และ 5 ตามลำดับ โดยหลังจากการถ่ายเชื้อเป็นเวลา 5 ครั้ง พบว่าเชื้อแบคทีเรียในตัวอย่างคินที่ 8 สามารถเปลี่ยนสีอาหารเหลวจากไม่มีสีเป็นสีเหลืองเข้มหลังเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 48 ชั่วโมง ผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียในตัวอย่างคินที่ 8 สามารถเจริญโดยการย่อยสลายพีแนนทรินเป็นแหล่งพลังงานและแหล่งคาร์บอนได้ดีกว่าแบคทีเรียในตัวอย่างคินที่ 4 และ 5 ดังนั้นจึงนำตัวอย่างคินที่ 8 ที่ผ่านการเพิ่มจำนวนแบคทีเรียที่ย่อยสลายพีแนนทรินได้มาทำการแยกแบคทีเรียสายพันธุ์ที่ย่อยสลายพีแนนทรินให้บริสุทธิ์ในขั้นตอนต่อไป

ตารางที่ 4.2 ระยะเวลาที่พบการเจริญของแบคทีเรียในแต่ละตัวอย่างคินระหว่างการถ่ายเชื้อ

ครั้งที่ของการถ่ายเชื้อ	ระยะเวลาที่พบการเจริญของแบคทีเรียในการถ่ายเชื้อแต่ละครั้ง (วัน)		
	ตัวอย่างคินที่ 4	ตัวอย่างคินที่ 5	ตัวอย่างคินที่ 8
1	15	12	8
2	12	9	7
3	8	8	5
4	7	6	3
5	5	4	2

4.2 ผลการคัดแยกแบคทีเรียสายพันธุ์ที่ย่อยสลายฟิเนนทรินให้บริสุทธิ์

จากการนำเชื้อแบคทีเรียในตัวอย่างดินที่ 8 ซึ่งผ่านการถ่ายเชื้อมาแล้ว 5 ครั้ง มาทำการแยกเชื้อแบคทีเรียที่ย่อยสลายฟิเนนทรินให้บริสุทธิ์ โดยการนำมาเจือจางในสารละลาย 0.85% โซเดียมคลอไรด์ให้ได้ความเข้มข้นที่เหมาะสม จากนั้นนำมาเกลี่ยบนอาหารแข็ง MM แล้วพ่นทับผิวหน้าอาหารแข็งด้วยฟิเนนทริน พบว่ามีแบคทีเรียหลายสายพันธุ์ที่สามารถสร้างบริเวณใสรอบโคโลนีบนอาหารแข็งที่ถูกพ่นทับผิวหน้าด้วยฟิเนนทรินได้ ดังแสดงลักษณะโคโลนีของแบคทีเรียเหล่านี้ในรูปที่ 4.1



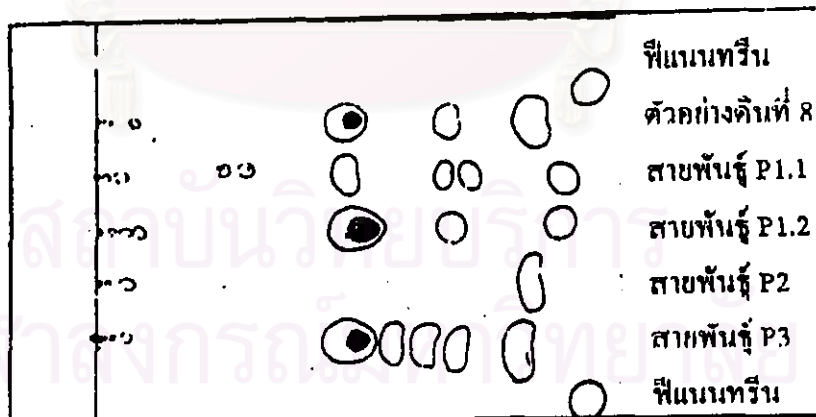
รูปที่ 4.1 ลักษณะบริเวณใสรอบโคโลนีของแบคทีเรียที่พบในตัวอย่างดินที่ 8 เมื่อเกลี่ยบนอาหารแข็ง MM ที่พ่นทับผิวหน้าด้วยฟิเนนทรินเป็นเวลา 4 วัน

จากการตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาเบื้องต้น โดยพิจารณาจากลักษณะโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียบนอาหารแข็ง MM ที่พ่นทับผิวหน้าด้วยฟิเนนทริน พบว่ามีแบคทีเรียสายพันธุ์เด่นทั้งหมด 4 สายพันธุ์ คือ P1.1 P1.2 P2 และ P3 ดังแสดงรายละเอียดในตารางที่ 4.3

ตารางที่ 4.3 ลักษณะโคโลนิของเชื้อแบคทีเรีย 4 สายพันธุ์ที่คัดแยกได้จากตัวอย่างดินที่ 8 บนอาหารแข็ง MM ที่พ่นทับผิวหน้าด้วยฟิแนนทริน

สายพันธุ์แบคทีเรีย	ลักษณะโคโลนิบนอาหารแข็ง MM
P1.1	ขอบไม่เรียบสีเหลืองลักษณะเป็นฝ้ายบาง ๆ รูปร่างไม่แน่นอน
P1.2	ขอบไม่เรียบสีเหลืองลักษณะเป็นฝ้ายบาง ๆ รูปร่างไม่แน่นอน
P2	ขอบเรียบสีเหลือง มีรูปร่างกลม โปร่งแสง
P3	ขอบไม่เรียบสีเหลือง เป็นฝ้ายบาง ๆ รูปร่างไม่แน่นอน

นำเชื้อแบคทีเรียทั้ง 4 สายพันธุ์มาทำให้บริสุทธิ์โดยการเช็ดเช็บบนอาหารแข็ง LB และเปรียบเทียบความสามารถในการย่อยสลายฟิแนนทรินโดยการนำแบคทีเรียทั้ง 4 สายพันธุ์มาเลี้ยงในอาหารเหลว MM ที่มีฟิแนนทรินเข้มข้น 0.1 มก.ต่อ มล. เป็นเวลา 2 วัน จากนั้นเติมเอทิลอะซิเตดลงไปสกัดฟิแนนทรินและสารมัธยันต์ที่เหลืออยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ ตรวจสอบปริมาณฟิแนนทรินและสารมัธยันต์ที่เหลืออยู่ด้วยวิธี TLC ดังแสดงผลการตรวจสอบในรูปที่ 4.2

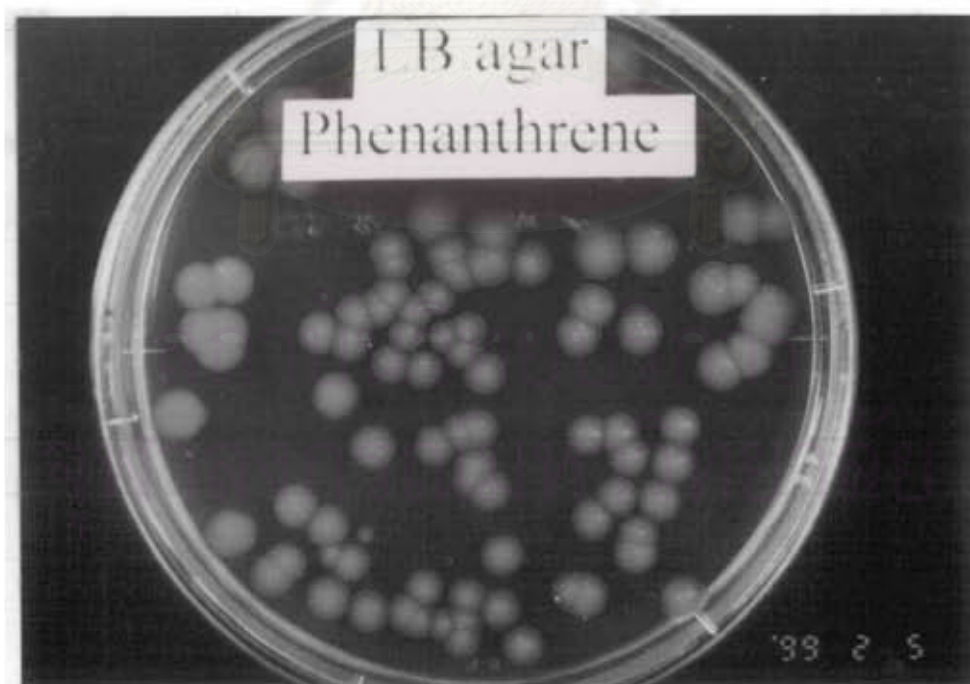


รูปที่ 4.2 โครมาโตแกรม TLC แสดงผลการเปรียบเทียบปริมาณฟิแนนทรินและสารมัธยันต์ชนิดต่างๆ ที่เกิดจากการย่อยสลายฟิแนนทรินโดยแบคทีเรียสายพันธุ์ P1.1 P1.2 P2 และ P3

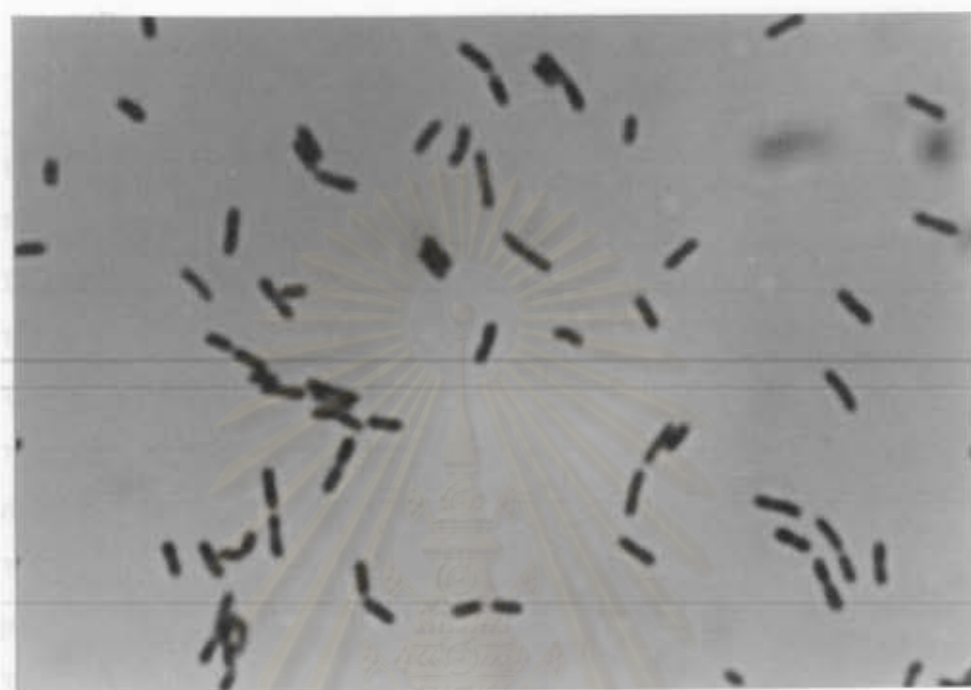
ผลการตรวจสอบด้วยวิธี TLC พบว่า แบคทีเรียสายพันธุ์ P2 สามารถย่อยสลายฟีนแอนทรีนได้อย่างรวดเร็วและมีสารมัธยันต์เหลืออยู่น้อยมากเมื่อเปรียบเทียบกับแบคทีเรียสายพันธุ์อื่น นอกจากนี้ยังพบว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ P2 สามารถเปลี่ยนสีของอาหารเหลว MM ไปเป็นสีเหลืองเข้มได้เร็วที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับสายพันธุ์อื่น จากผลการทดลองทั้งหมดแสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ P2 มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายฟีนแอนทรีนสูงสุดจึงได้นำแบคทีเรียสายพันธุ์นี้ไปทำการทดลองในขั้นตอนต่อไป

4.3 ผลการจำแนกชนิดทางอนุกรมวิธานของแบคทีเรียสายพันธุ์ P2

จากการศึกษาสมบัติของแบคทีเรียสายพันธุ์ P2 พบว่าลักษณะโคโลนีบนอาหารแข็ง LB มีรูปร่างกลม สีเหลืองเข้ม และโปร่งแสง ดังแสดงในรูปที่ 4.3 และเมื่อศึกษาได้กล้องจุลทรรศน์พบว่าเซลล์ของแบคทีเรียสายพันธุ์ P2 มีลักษณะเป็นแท่ง คีดติกรวมตบ ดังแสดงในรูปที่ 4.4 ส่วนลักษณะต่าง ๆ ที่ใช้ในการจำแนกชนิดทางอนุกรมวิธาน คือ ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและลักษณะทางสรีระวิทยาได้แสดงไว้ในตารางที่ 4.4 และ 4.5 ตามลำดับ



รูปที่ 4.3 ลักษณะโคโลนีของแบคทีเรียสายพันธุ์ P2 บนอาหารแข็ง LB



รูปที่ 4.4 ลักษณะรูปร่างของแบคทีเรียสายพันธุ์ P2 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (กำลังขยาย 100x10)

ตารางที่ 4.4 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียสายพันธุ์ P2

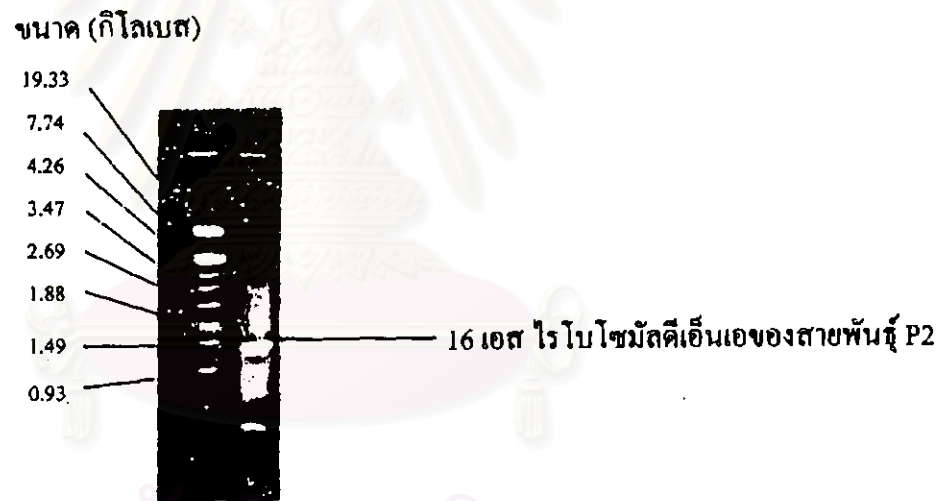
ลักษณะที่ศึกษา	ลักษณะที่สังเกตเห็น
ลักษณะของเซลล์	
การติดสีแกรม	แกรมลบ
รูปร่างของเซลล์	แท่ง
การติดสี acid-fast	ไม่ติดสี
ลักษณะของโคโลนี	
รูปร่าง	กลม
สี	เหลืองเข้ม
ขนาด	เส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 1-2 มม.
การผ่านของแสง	โปร่งแสง
ลักษณะขอบ	ขอบเรียบ

ตารางที่ 4.5 ลักษณะทางสรีระวิทยาของแบคทีเรียสายพันธุ์ P2

ลักษณะที่ศึกษา	ลักษณะทางสรีระวิทยา
1. การสร้างเอนไซม์ออกซิเดส (oxidase test)	สร้างได้
2. การสร้างเอนไซม์คาตาเลส (catalase test)	สร้างได้
3. การรีดิวซ์ไนเตรด (nitrate reduction)	ไม่เกิด
4. การไฮโดรไลซ์ เอสคูลิน (esculin hydrolysis)	เกิดได้
5. การสร้างเอนไซม์ยูรีเอส (urease)	สร้างได้
6. การเกิดปฏิกิริยาบนอาหารแข็งทริปเปิลไอรอน (triple sugar iron agar reaction)	K/K
7. การเจริญบนอาหารแข็งแมคคองกี (growth on MacConkey medium)	ไม่เจริญ
8. การไฮโดรไลซ์เจลาติน (gelatin hydrolysis)	ไม่เกิด
9. การสร้างไฮโดรเจนซัลไฟด์ (H ₂ S production)	ไม่สร้าง
10. ปฏิกิริยาออกซิเดทีฟ/เฟอร์เมนเตชัน (oxidative/fermentation)	ออกซิเดทีฟ
11. การสร้างอินโดล (indole production)	ไม่สร้าง
12. การดีคาร์บอกซิเลชันของไลซีน (lysine decarboxylation)	เกิดได้
13. การเคลื่อนที่ (motility)	ไม่เคลื่อนที่
14. การทดสอบเมทิลเรด (methyl red test)	ไม่เกิด
15. การทดสอบ Vogas-Proskauer (Vogas-Proskauer reaction)	ไม่เกิด
16. การใช้แหล่งคาร์บอน	
ดี - กลูโคส (D - glucose)	ไม่เจริญ
ดี - กาแลกโตส (D - galactose)	ไม่เจริญ
ดี - ฟรุคโตส (D - fructose)	ไม่เจริญ
ดี - แมนนิทอล (D - mannitol)	ไม่เจริญ
ซิมมอน ซิเตรด (Simmon citrate)	เจริญได้

จากลักษณะทางสัณฐานวิทยาและลักษณะทางสรีระวิทยาที่แสดงไว้ในตารางที่ 4.4 และ 4.5 เมื่อทำการเปรียบเทียบกับลักษณะที่รายงานไว้ใน Bergey's manual of systematic bacteriology ซึ่งรวมแบคทีเรียไว้โดย Palleroni (1984) พบว่าลักษณะทั้งสัณฐานวิทยาและสรีระวิทยาของแบคทีเรียสายพันธุ์ P2 ตรงกับแบคทีเรียในสกุล *Sphingomonas*

จากผลการวิเคราะห์หาลำดับเบสของ 16 เอส ไรโบโซมัลดีเอ็นเอของแบคทีเรียสายพันธุ์ P2 พบว่าจีโนม 16 เอส ไรโบโซมัลดีเอ็นเอของแบคทีเรียสายพันธุ์นี้มีขนาดประมาณ 1.49 กิโลเบส (kb) โดยสามารถเปรียบเทียบกับ marker 6 ดังแสดงขนาดชิ้นดีเอ็นเอในรูปที่ 4.5



รูปที่ 4.5 ขนาดของชิ้นดีเอ็นเอของ 16 เอส ไรโบโซมัลดีเอ็นเอ ของแบคทีเรียสายพันธุ์ P2

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

S. sp. P2 : -----GATCCTGGCTCAGAACGAACGCTGGCGGCATGCCTAATACATGCAAGTCGAACGAGATCTTCGGATCTAGTGG : 73
S. yanoikuyae : AGAGTTTGATCCTGGCTCAGAACGAACGCTGGCGGCATGCCTAATACATGCAAGTCGAACGAGATCTTCGGATCTAGTGG : 80

S. sp. P2 : CGCACGGGTGCCATAACCGGTGGGAATCTGCCCTTGGTTCGGAATAACTCTGGAAACGGAAGCTAATACCGGATGATGA : 153
S. yanoikuyae : CGCACGGGTGCCATAACCGGTGGGAATCTGCCCTTGGTTCGGAATAACTCTGGAAACGGAAGCTAATACCGGATGATGA : 160

S. sp. P2 : CGTAAGTCCAAAGATTTATCGCCCAAGGATGAGCCCGCTAGGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAAGGCACCAAGGCCA : 233
S. yanoikuyae : CGTAAGTCCAAAGATTTATCGCCCAAGGATGAGCCCGCTAGGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAAGGCACCAAGGCCA : 240

S. sp. P2 : CGATCCTTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTA : 313
S. yanoikuyae : CGATCCTTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTA : 320

S. sp. P2 : GGGAAATTTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCAATGCCCGTGAGTGATGAAGGCCCTTAGGGTGTAAAGCTCTTT : 393
S. yanoikuyae : GGGAAATTTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCAATGCCCGTGAGTGATGAAGGCCCTTAGGGTGTAAAGCTCTTT : 400

S. sp. P2 : TACCCGGGATGATAATGACAGTACCGGGAGAATAAGCTCCGGTAACCTCCGTGCCAGCAGCCGCGTANTACGGAGGGAG : 473
S. yanoikuyae : TACCCGGGATGATAATGACAGTACCGGGAGAATAAGCTCCGGTAACCTCCGTGCCAGCAGCCGCGTANTACGGAGGGAG : 480

S. sp. P2 : CTAGCGTTGTTCCGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGTAGGCGGCTATCAAGTCAGAGGTGAAGCCGGGGCTCAACC : 553
S. yanoikuyae : CTAGCGTTGTTCCGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGTAGGCGGCTATCAAGTCAGAGGTGAAGCCGGGGCTCAACC : 560

S. sp. P2 : CCGGAACAGCCTTTGAAACTAGATAGCTTGAATCCAGGAGAGGTGAGTGAATCCGAGTGTAGAGGTGAAATTCGTAGA : 633
S. yanoikuyae : CCGGAACAGCCTTTGAAACTAGATAGCTTGAATCCAGGAGAGGTGAGTGAATCCGAGTGTAGAGGTGAAATTCGTAGA : 640

S. sp. P2 : TATTCGGAAGAACACCCAGTGGCGAAGGCGGCTCACTGGACTGGTATTGACGCTGAGGTGCGAAAGCCTGGGGAGCAAACA : 713
S. yanoikuyae : TATTCGGAAGAACACCCAGTGGCGAAGGCGGCTCACTGGACTGGTATTGACGCTGAGGTGCGAAAGCCTGGGGAGCAAACA : 720

S. sp. P2 : GGATTAGATACCCCTGGTAGTCCACGCCGTAACAGATGATAACTAGCTGTCAGGGCACATGGTGTGTTTGGTGGCCAGCTA : 793
S. yanoikuyae : GGATTAGATACCCCTGGTAGTCCACGCCGTAACAGATGATAACTAGCTGTCAGGGCACATGGTGTGTTTGGTGGCCAGCTA : 800

S. sp. P2 : CGCATTAAAGTTATCCGCCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGATTAATAACTCAAAGGAATTGACGGGGCCCTGCACAAGCGGT : 873
S. yanoikuyae : ACGCATTAAAGTTATCCGCCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGATTAATAACTCAAAGGAATTGACGGGGCCCTGCACAAGCGGT : 879

S. sp. P2 : GGAGCATGTGTTAATTGGAAGCAACGGCAAACTTACCAACGTTTGACATCCCTATCGCGGATCGTGGAGACACTT : 953
S. yanoikuyae : GGAGCATGTGTTAATTGGAAGCAACGGCAAACTTACCAACGTTTGACATCCCTATCGCGGATCGTGGAGACACTT : 959

S. sp. P2 : TCCTTCAGTTCGGCTGGATAGGTGACAGGTGCTGCATGGCTGCTGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCC : 1033
S. yanoikuyae : TCCTTCAGTTCGGCTGGATAGGTGACAGGTGCTGCATGGCTGCTGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCC : 1039

S. sp. P2 : CAACGAGCGCAACCCTCGCCTTTAGTTGCCAGCATTAGTTGGTACTCTAAAGGAACCGCCGGTGATAAGCCGGAGGAA : 1113
S. yanoikuyae : CAACGAGCGCAACCCTCGCCTTTAGTTGCCAGCATTAGTTGGTACTCTAAAGGAACCGCCGGTGATAAGCCGGAGGAA : 1119

S. sp. P2 : GGTGGGATGACGTCAAGTCTCATGGCCCTTACGCGTTGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGACTACAGTGGGCAGCC : 1193
S. yanoikuyae : GGTGGGATGACGTCAAGTCTCATGGCCCTTACGCGTTGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGACTACAGTGGGCAGCC : 1199

S. sp. P2 : ACCTCGGAGAGGGAGCTAATCTCCAAAAGTCTGCTCAGTTCGGATCGTCTCTGCAACTCGAGAGCGTGAAGCGGGAAT : 1273
S. yanoikuyae : ACCTCGGAGAGGGAGCTAATCTCCAAAAGTCTGCTCAGTTCGGATCGTCTCTGCAACTCGAGAGCGTGAAGCGGGAAT : 1279

S. sp. P2 : CGTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCAGGCCTGTACACACCGCCCGTACACCATGGGAGTT : 1353
S. yanoikuyae : CGTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCAGGCCTGTACACACCGCCCGTACACCATGGGAGTT : 1359

S. sp. P2 : GGATCACTCGAAGGCGTTGACTAACCCTAAAGAGC----- : 1391
S. yanoikuyae : GGATCACTCGAAGGCGTTGACTAACCCTAAAGAGC----- : 1430

รูปที่ 4.6 ลำดับเบสของ 16 เอส โรโบ โชนิม์ลึคีนเอของแบคทีเรียสายพันธุ์ P2 เปรียบเทียบกับ

Sphingomonas yanoikuyae

หลังจากนำลำดับเบสของ 16 เอส ไรโบโซมัลดีเอ็นเอของแบคทีเรียสายพันธุ์ P2 เปรียบเทียบกับลำดับเบสของ 16 เอส ไรโบโซมัลดีเอ็นเอของจุลินทรีย์ชนิดอื่นที่มีบันทึกและรวบรวมไว้ในโปรแกรม BLAST พบว่า ลำดับเบสของ 16 เอส ไรโบโซมัลดีเอ็นเอของแบคทีเรียสายพันธุ์ P2 คล้ายกับลำดับเบส 16 เอส ไรโบโซมัลดีเอ็นเอของแบคทีเรียสายพันธุ์ *Sphingomonas yanoikuyae* สายพันธุ์ B1 โดยมีความคล้ายคลึง (% homology) เท่ากับ 99% ดังที่แสดงไว้ในรูปที่ 4.6 และจากรายงานพบว่า *Sphingomonas yanoikuyae* สายพันธุ์ B1 เป็นแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายสารพิษอันตรายได้หลายชนิดคือ ไซลีน (xylene) ไบฟีนีล (biphenyl) แนพทาลีน แอนทราซีน และพีแนนทริน (Khan et al., 1996) ดังนั้นจากผลการทดสอบทางสรีระวิทยาและทางสัณฐานวิทยา ร่วมกับการวิเคราะห์ลำดับเบสของ 16 เอส ไรโบโซมัลดีเอ็นเอสามารถยืนยันได้ชัดเจนว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ P2 เป็นแบคทีเรียในสกุล *Sphingomonas*.



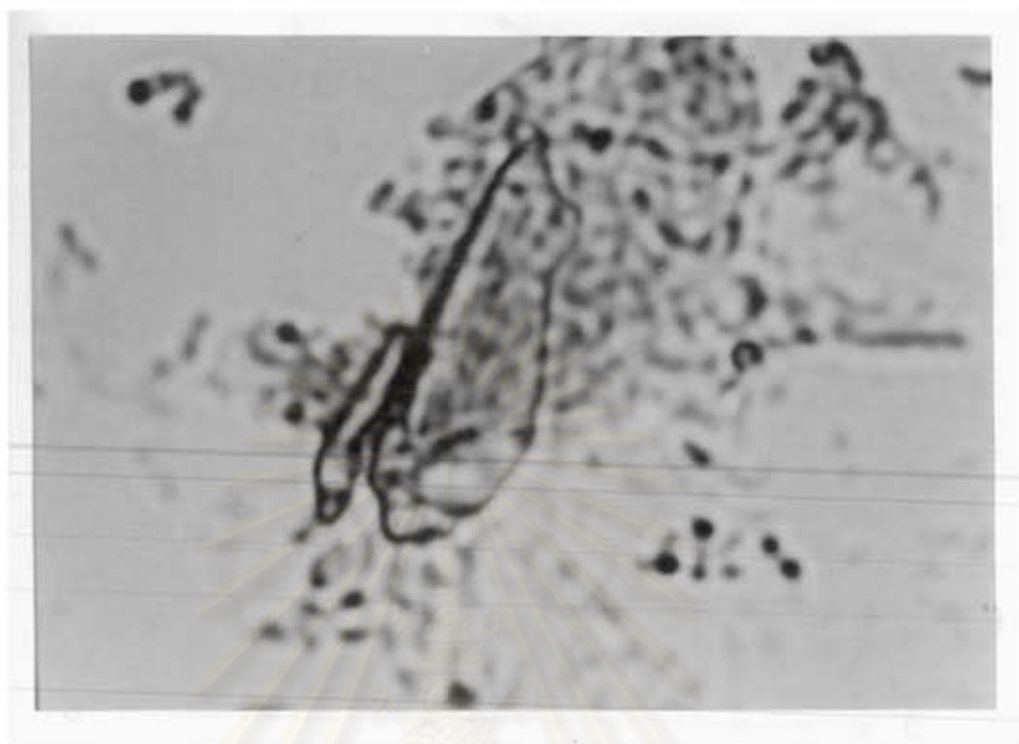
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.4 ผลการศึกษารูปแบบในการเจริญโดยการใช้ฟีนแอนทรินเป็นแหล่งพลังงานและแหล่งคาร์บอนของ *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ P2

จากการศึกษาในเบื้องต้นพบว่า *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ P2 สามารถเปลี่ยนสีของอาหารเหลว MM จากไม่มีสีเป็นสีเหลืองเข้มได้หลังจากการเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ดังแสดงในรูปที่ 4.7 และจากการติดตามการย่อยสลายฟีนแอนทรินภายใต้กล้องจุลทรรศน์พบว่าเซลล์ของแบคทีเรียสายพันธุ์นี้จะติดแน่น (attachment) อยู่กับผลึกของฟีนแอนทรินจนกลายเป็นกลุ่มเซลล์ขนาดใหญ่ซึ่งห่อหุ้มผลึกฟีนแอนทรินไว้ดังแสดงในรูปที่ 4.8



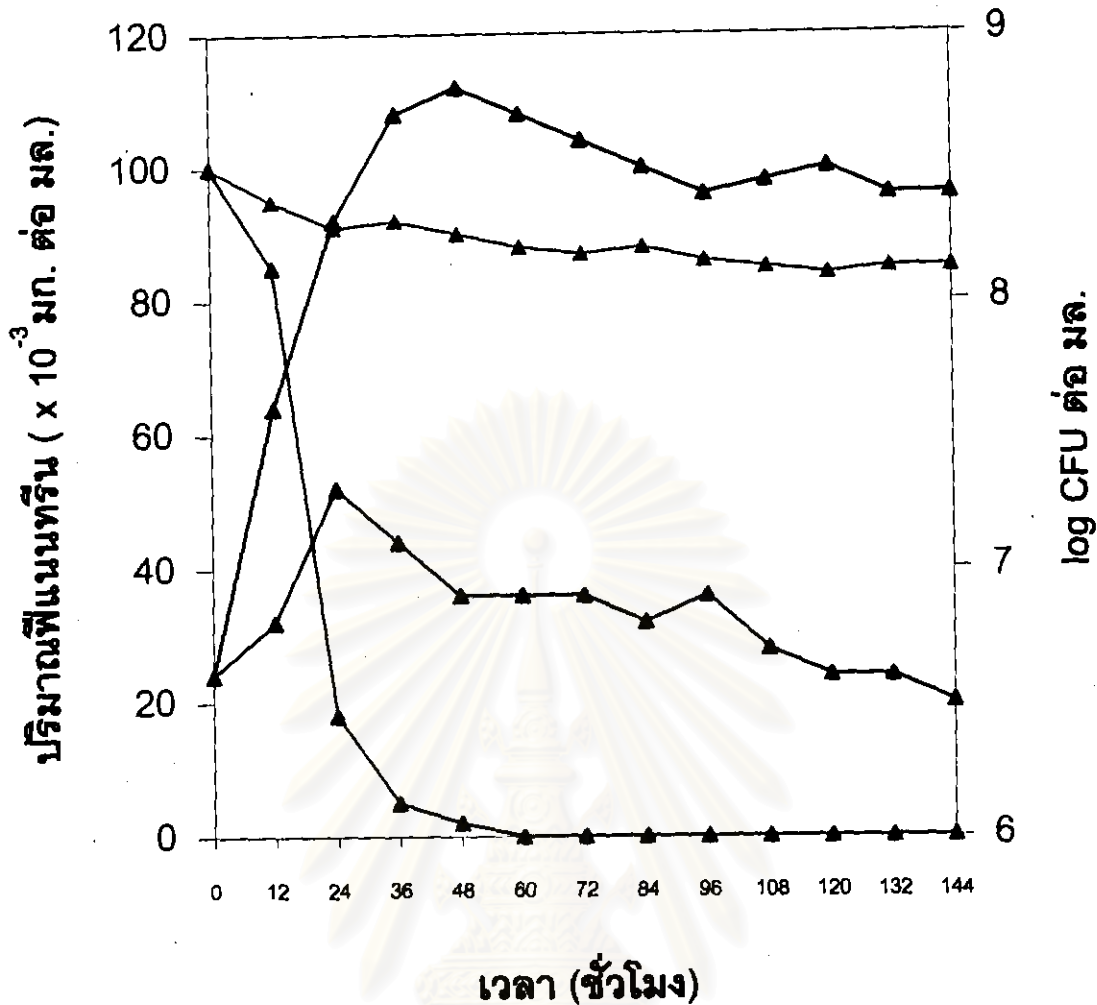
รูปที่ 4.7 ลักษณะของอาหารเหลว MM ที่มีฟีนแอนทรินหลังเลี้ยง *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ P2 เป็นเวลา 24 ชั่วโมงเปรียบเทียบกับชุดควบคุม



รูปที่ 4.8 ลักษณะกลุ่มเซลล์ของ *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ P2 ที่ติดแน่นอยู่กับผลิตภัณฑ์เนนทรินจากการศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (กำลังขยาย 10x40 เท่า)

ผลการศึกษารูปแบบในการเจริญโดยใช้ฟีนเนนทรินเป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงานของ *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ P2 โดยการนำหัวเชื้อมาเลี้ยงในอาหารเหลว MM ปริมาตร 5 มล. ที่มีฟีนเนนทรินเข้มข้น 0.1 มก.ต่อ มล. และทำการติดตามการเจริญของ *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ P2 และวิเคราะห์ปริมาณฟีนเนนทรินที่เหลือเป็นเวลาทุก 12 ชั่วโมง พบว่าได้ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 4.9

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



▲ ปริมาณฟีนแอนทรีนในชุดทดลองที่ไม่เติมเชื้อ

▲ ปริมาณฟีนแอนทรีนในชุดทดลองที่เติมเชื้อ

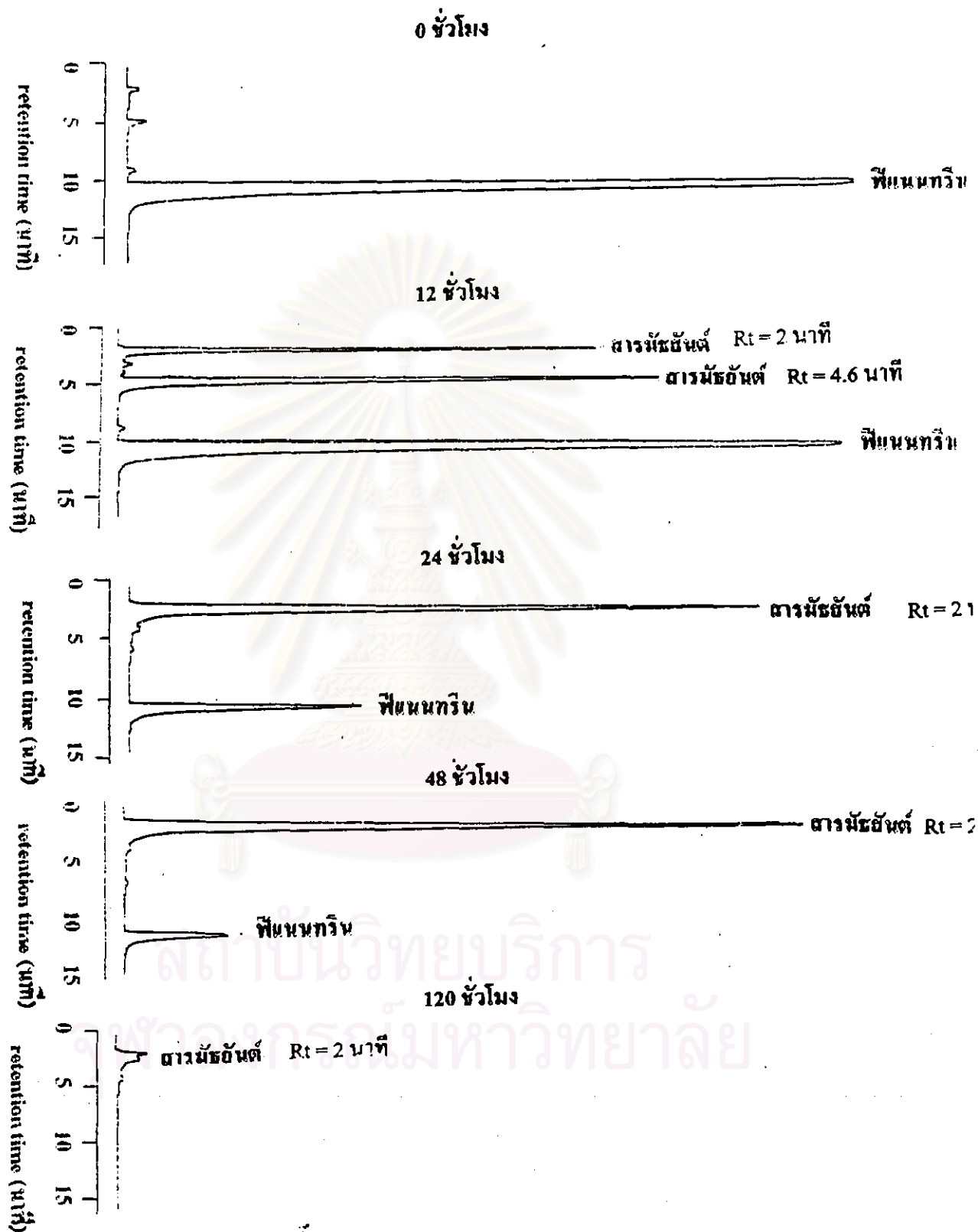
▲ จำนวนแบคทีเรียในชุดทดลองที่เติมฟีนแอนทรีน

▲ จำนวนแบคทีเรียในชุดทดลองที่ไม่เติมฟีนแอนทรีน

รูปที่ 4.9 การเจริญของ *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ P2 ในอาหารเหลว MM ที่มีฟีนแอนทรีน เป็นแหล่งพลังงานและแหล่งคาร์บอน

จากผลการทดลองพบว่า *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ P2 สามารถย่อยสลายพีแนนทรินเพื่อใช้เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงานได้โดยสมบูรณ์ โดยสังเกตได้จากการเพิ่มจำนวนของแบคทีเรียอย่างรวดเร็วควบคู่ไปกับการลดลงอย่างรวดเร็วของพีแนนทรินในอาหารเหลว MM เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมหลังจากทำการเลี้ยงเชื้อ โดยปริมาณของแบคทีเรียเพิ่มจำนวนจาก 5.9×10^5 CFU ต่อมล. ในตอนเริ่มต้นไปเป็น 7.0×10^8 CFU ต่อมล. ในวันที่ 3 ของการเลี้ยงเชื้อโดยไม่มี lag phase เกิดขึ้น การเจริญของแบคทีเรียสายพันธุ์นี้จะหยุดและคงที่เมื่อปริมาณพีแนนทรินในอาหารเหลวหมดไปหลังการเลี้ยงเป็นเวลา 3 วัน จากการวิเคราะห์ปริมาณพีแนนทรินที่เหลือพบว่า หลังการเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 36 ชั่วโมงจะมีพีแนนทรินเหลืออยู่น้อยมากประมาณ 0.009 มก. ต่อ มล. หรือถูกย่อยสลายไป 91 % ของปริมาณเริ่มต้นและไม่มีพีแนนทรินเหลืออยู่ในอาหารเหลว หลังเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 72 ชั่วโมง ในขณะที่ชุดควบคุมที่ไม่เติม *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ P2 มีพีแนนทรินเหลืออยู่ในอาหารเหลวประมาณ 0.085 มก. ต่อ มล. หรือสูญหายไป 15 % ของปริมาณเริ่มต้นหลังจากการทดลองเป็นเวลา 7 วัน ซึ่งส่วนที่หายไปอาจเกิดจากการระเหยของพีแนนทริน

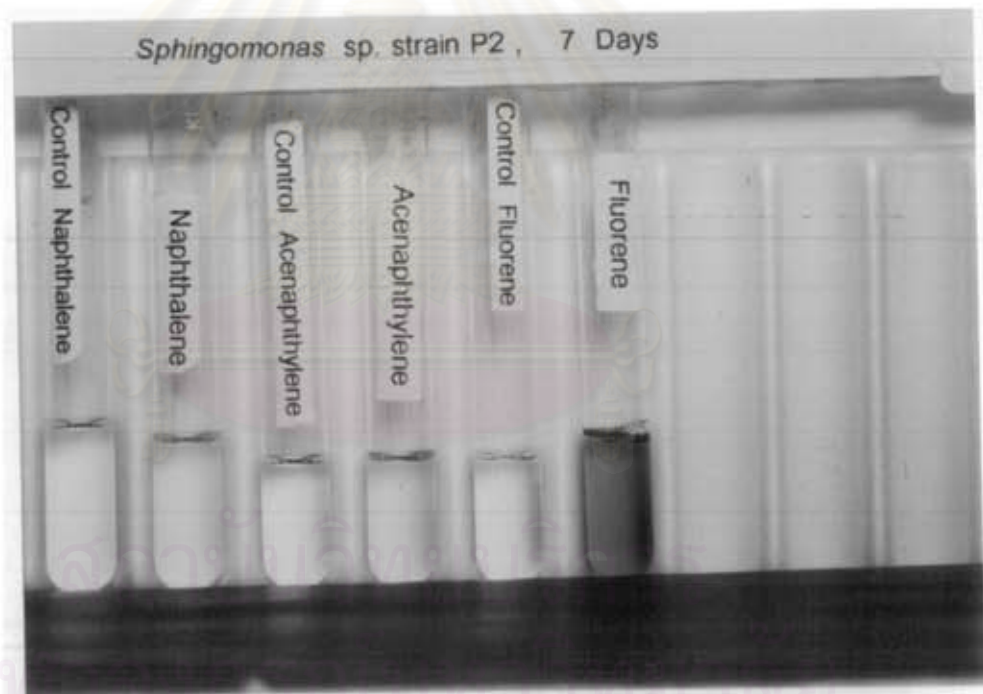
ผลการติดตามโครมาโตแกรมจากการวิเคราะห์ด้วย HPLC เพื่อใช้ในการหาปริมาณพีแนนทรินที่เหลือในอาหารเลี้ยงเชื้อ ดังแสดงในรูปที่ 4.10 พบว่า *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ P2 จะย่อยสลายพีแนนทรินไปเป็นสารมัธยันต์หลายชนิดเช่นสารที่มี retention time (Rt) เท่ากับ 2 นาที และ 4.6 นาทีได้อย่างรวดเร็วภายในเวลา 12 ชั่วโมงหลังการเลี้ยงเชื้อ และหลังเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 1 วัน พบว่ามีสารมัธยันต์ที่มี Rt เท่ากับ 2 นาที สะสมอยู่เป็นจำนวนมาก ในขณะที่ไม่พบสารมัธยันต์ที่มี Rt เท่ากับ 4.6 นาที และพีแนนทรินมีปริมาณลดลงอย่างรวดเร็ว เมื่อทำการเลี้ยงเชื้อต่อไปเป็นเวลา 5 วัน พบว่าไม่มีพีแนนทรินเหลืออยู่ในอาหารเหลวและมีสารมัธยันต์เหลืออยู่น้อยมาก จากผลการทดลองจะเห็นได้ว่า *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ P2 สามารถย่อยสลายพีแนนทรินไปเป็นสารมัธยันต์ได้อย่างรวดเร็ว ก่อนที่จะย่อยสลายสารมัธยันต์ที่เกิดขึ้นต่อไปจนมีปริมาณเหลืออยู่น้อยมากหลังสิ้นสุดการทดลองเป็นเวลา 5 วัน



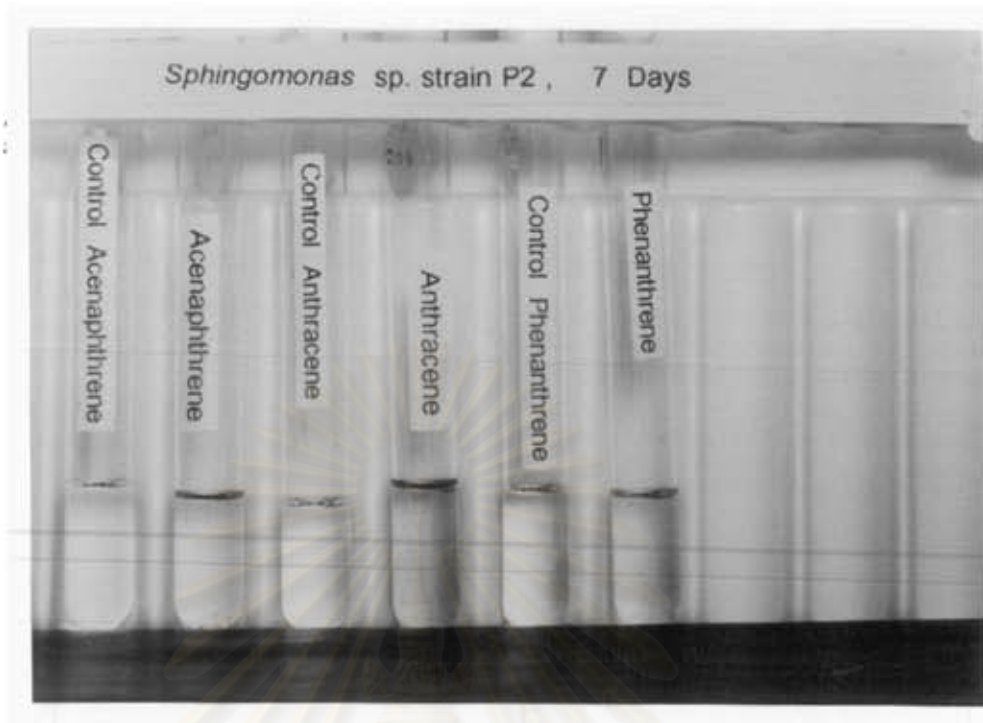
รูปที่ 4.10 HPLC โครมาโตแกรมจากการวิเคราะห์ปริมาณพินนทรีนและสารมัธยันต์ที่เกิดขึ้นจากการย่อยสลายพินนทรีนโดย *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ P2 หลังเลี้ยงเชื้อที่เวลาต่างๆ

4.5 ผลการทดสอบความจำเพาะในการใช้ PAHs ชนิดอื่นในการเจริญของ *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ P2

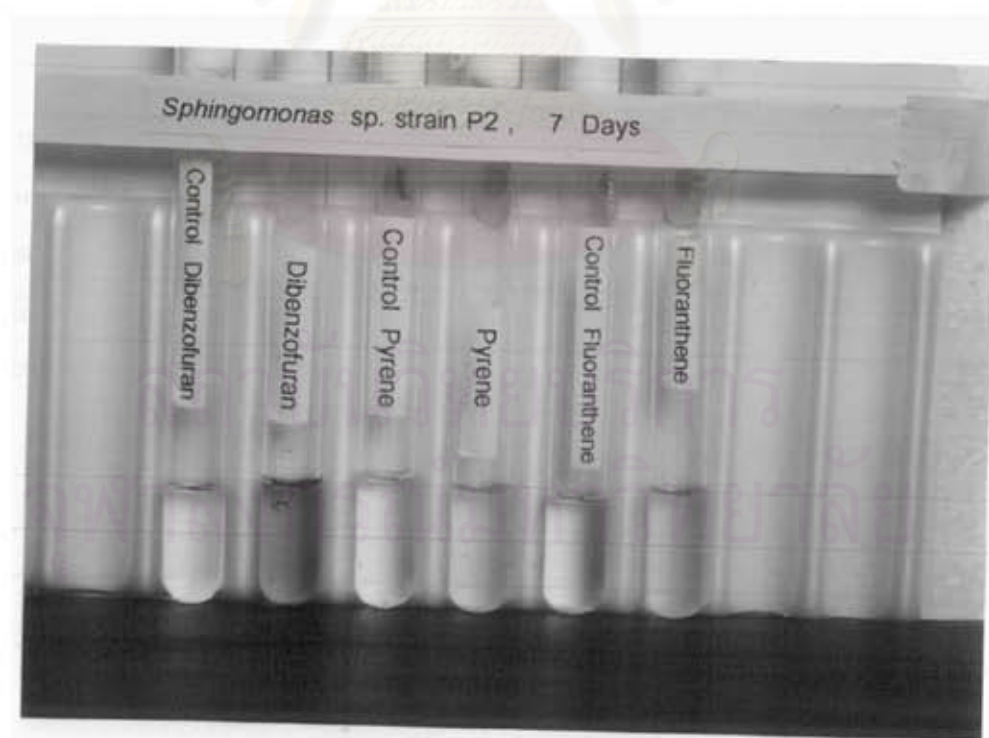
จากการทดสอบความสามารถของ *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ P2 ในการย่อยสลาย PAHs ชนิดอื่นนอกเหนือจากพีแนมทรินเพื่อใช้เป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงานในการเจริญโดย PAHs ที่นำมาทดสอบคือ แนพทาลีน อะซีแนพทิลีน อะซีแนพทีน ฟลูออรีน แอนทราซีน ไดเบนโซฟูแรน ฟลูออแรนธิน และไพรีน พบว่า *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ P2 สามารถเปลี่ยนสีของอาหารเหลวที่เติม PAHs แต่ละชนิดจากไม่มีสีไปเป็นสีต่าง ๆ กันหลังการเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 7 วัน ดังแสดงผลการทดลองในรูปที่ 4.11 4.12 และ 4.13 ตามลำดับ และสรุปผลการทดสอบไว้ในตารางที่ 4.6



รูปที่ 4.11 ลักษณะของอาหารเหลว MM ที่มีแนพทาลีน อะซีแนพทิลีน และฟลูออรีน หลังการเลี้ยงเชื้อ *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ P2 เป็นเวลา 7 วัน เปรียบเทียบกับชุดควบคุม



รูปที่ 4.12 ลักษณะของอาหารเหลว MM ที่มีอะซีแนพทีน แอนทราซีน และฟีแนนทรีน หลังการเลี้ยงเชื้อ *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ P2 เป็นเวลา 7 วัน เปรียบเทียบกับชุดควบคุม



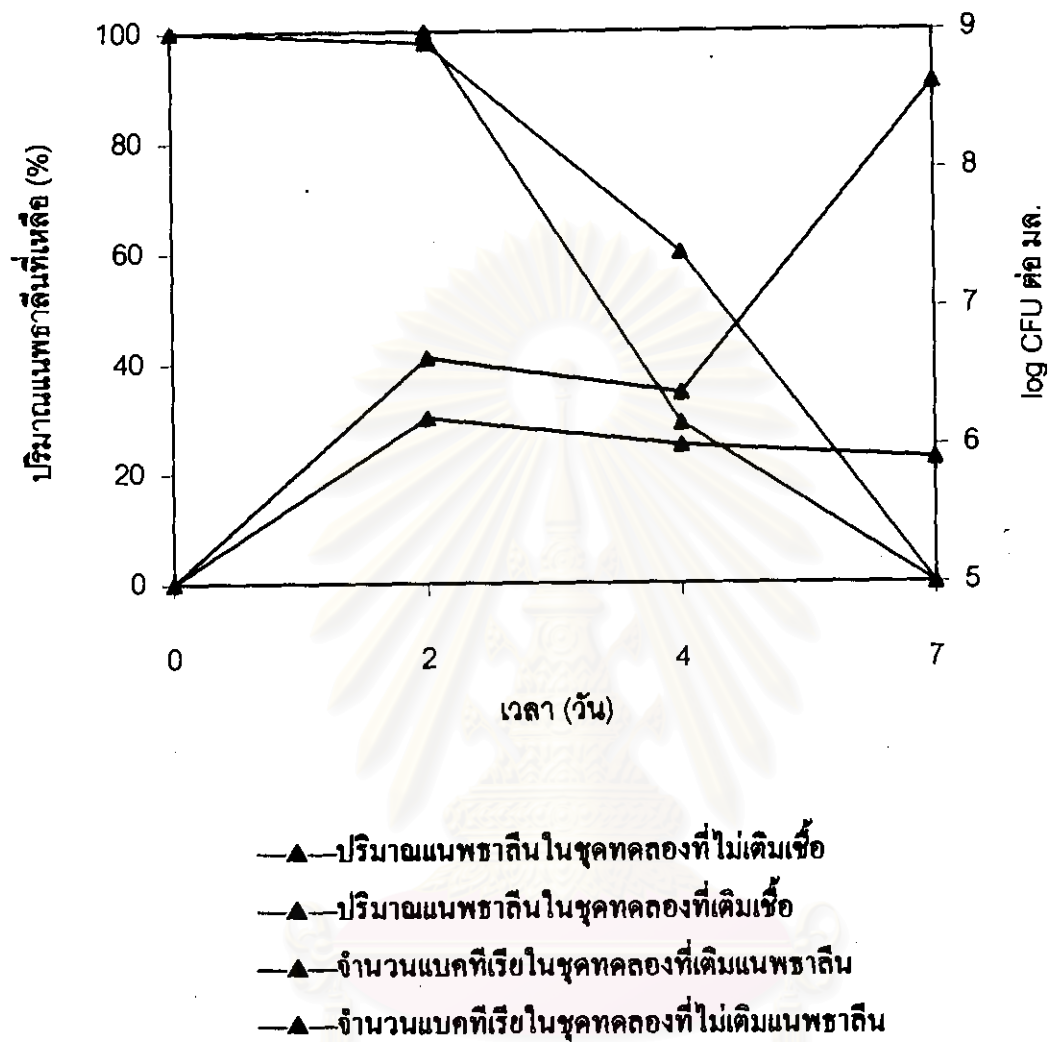
รูปที่ 4.13 ลักษณะของอาหารเหลว MM ที่มีไดเบนโซฟูแรน ฟลูออแรนทีน และไพรีน หลังการเลี้ยงเชื้อ *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ P2 เป็นเวลา 7 วัน เปรียบเทียบกับชุดควบคุม

ตารางที่ 4.6 ผลการเปลี่ยนสีอาหารเหลวที่มีสารทดสอบแต่ละชนิดหลังการเลี้ยงเชื้อ
Sphingomonas sp. สายพันธุ์ P2 เป็นเวลา 7 วัน

สารทดสอบ	การเปลี่ยนสีอาหารเหลว
แอสพาทีน	เหลืองอ่อน
อะซีแอสพาทีน	เหลืองอ่อน
อะซีแอสพาทีน	เหลืองอ่อน
ฟลูออรีน	เหลืองเข้มออกส้ม
โคเบนโซฟูแรน	เหลืองเข้มออกส้ม
แอนทราซีน	เหลืองปนน้ำตาลอ่อน
ฟีแนนทริน	เหลือง
ฟลูออแรนธิน	ไม่เปลี่ยนสี
ไพรีน	ไม่เปลี่ยนสี

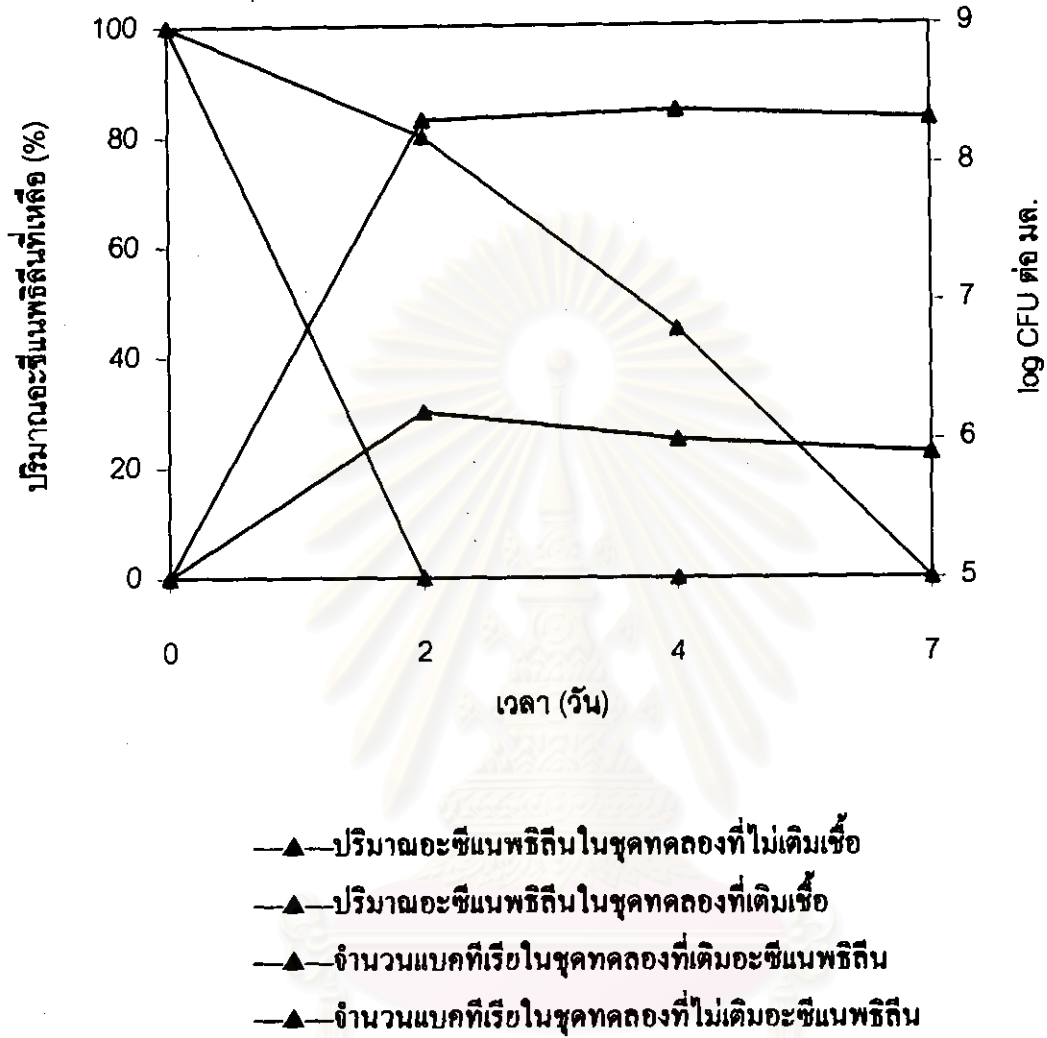
จากผลการทดสอบในเบื้องต้นพบว่า *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ P2 สามารถเปลี่ยนสีของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมสารทดสอบแต่ละชนิดจากไม่มีสีไปเป็นสีต่าง ๆ ได้หลายชนิด ดังนั้นจึงทดลองหารูปแบบการเจริญโดยใช้สารทดสอบแต่ละชนิดเป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงานของแบคทีเรียสายพันธุ์นี้ โดยเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว MM ปริมาตร 5 มล. ที่มีสารทดสอบแต่ละชนิดเข้มข้น 0.1 มก.ต่อ มล. ติดตามการเจริญของแบคทีเรียและวิเคราะห์หาปริมาณสารทดสอบแต่ละชนิดที่เหลืออยู่ทุก 2 วัน พบว่าได้ผลการทดลองดังแสดงไว้ในรูปที่ 4.14-4.22

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



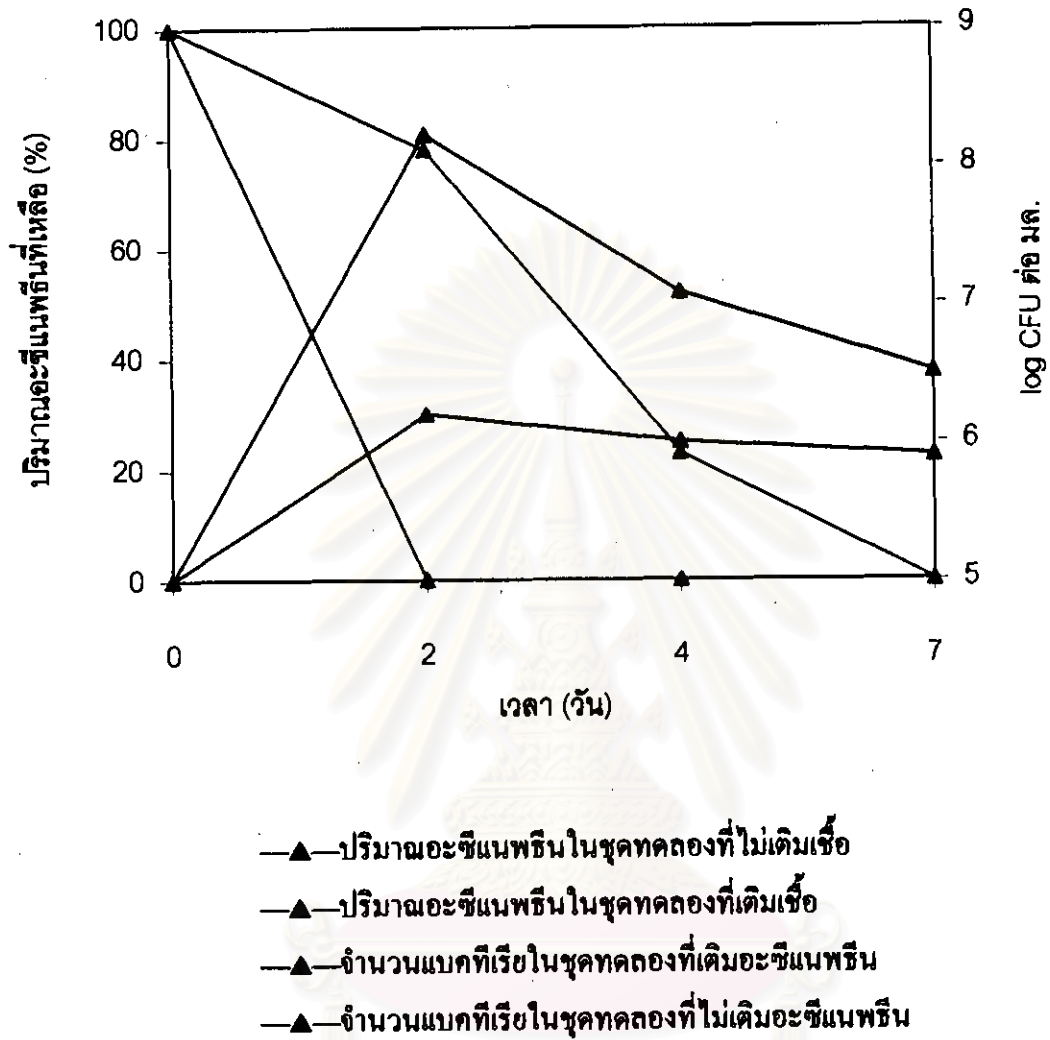
รูปที่ 4.14 การเจริญของ *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ P2 โดยการใช้แอมพราทินเป็นแหล่งคาร์บอน และพลังงาน

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



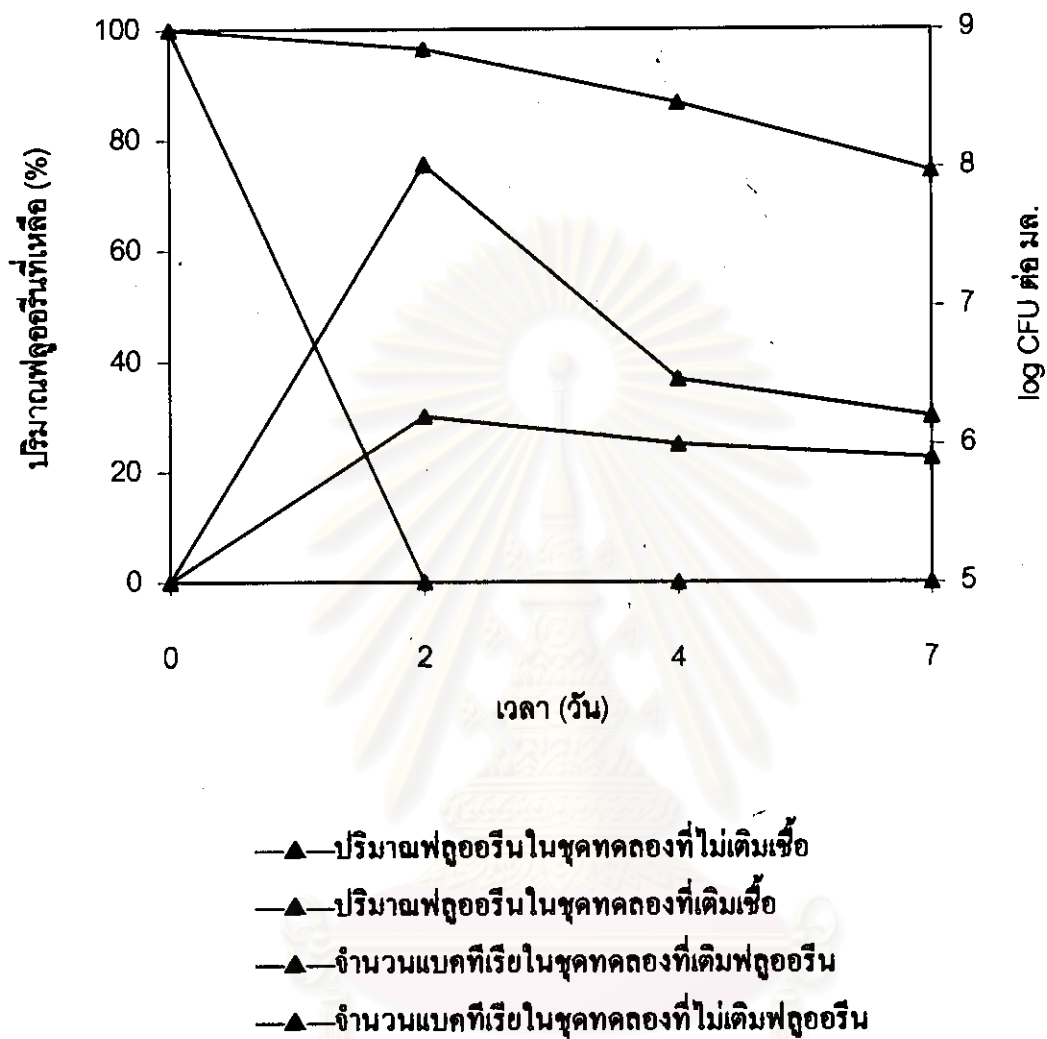
รูปที่ 4.15 การเจริญของ *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ P2 โดยใช้อะซิแนพริทีนเป็นแหล่งคาร์บอน และพลังงาน

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



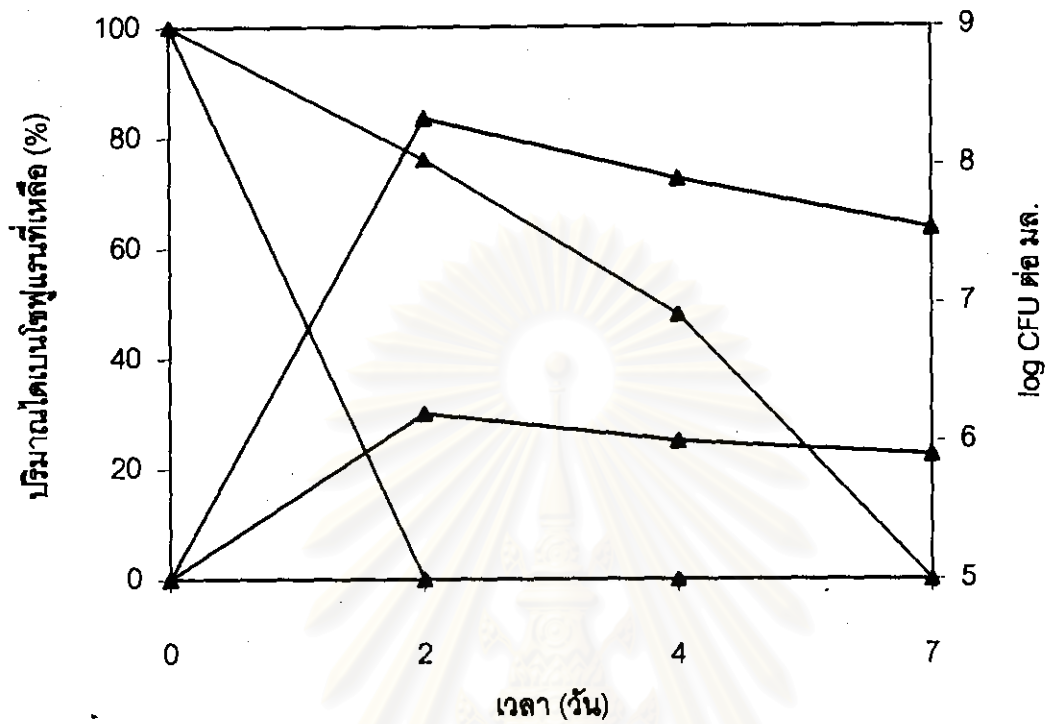
รูปที่ 4.16 การเจริญของ *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ P2 โดยใช้อะซิแนพรีนเป็นแหล่งคาร์บอน และพลังงาน

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 4.17 การเจริญของ *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ P2 โดยใช้ฟลูออรีนเป็นแหล่งคาร์บอน และพลังงาน

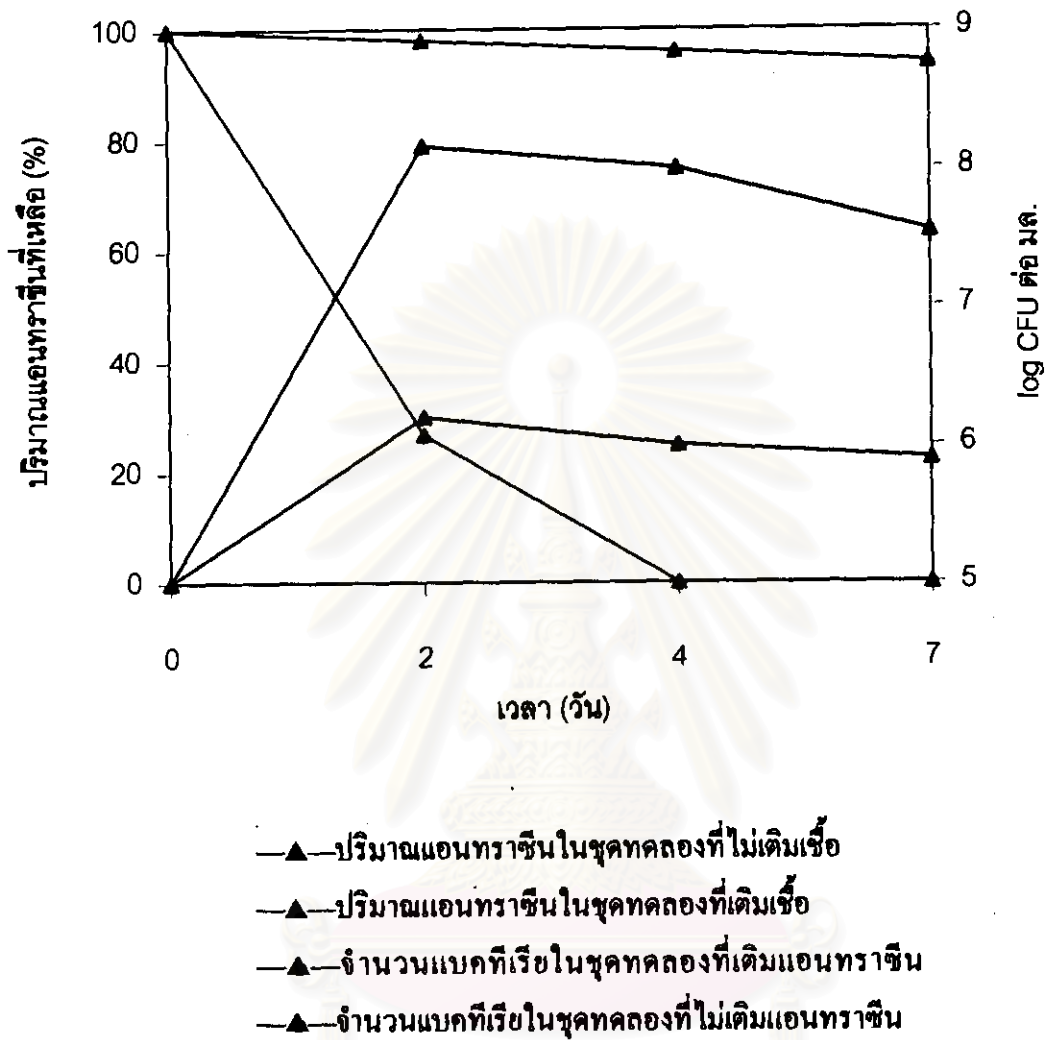
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



- ▲— ปริมาณไดเบนไซฟูแรนในชุดทดลองที่ไม่เติมเชื้อ
- ▲— ปริมาณไดเบนไซฟูแรนในชุดทดลองที่เติมเชื้อ
- ▲— จำนวนแบคทีเรียในชุดทดลองที่เติมไดเบนไซฟูแรน
- ▲— จำนวนแบคทีเรียในชุดทดลองที่ไม่เติมไดเบนไซฟูแรน

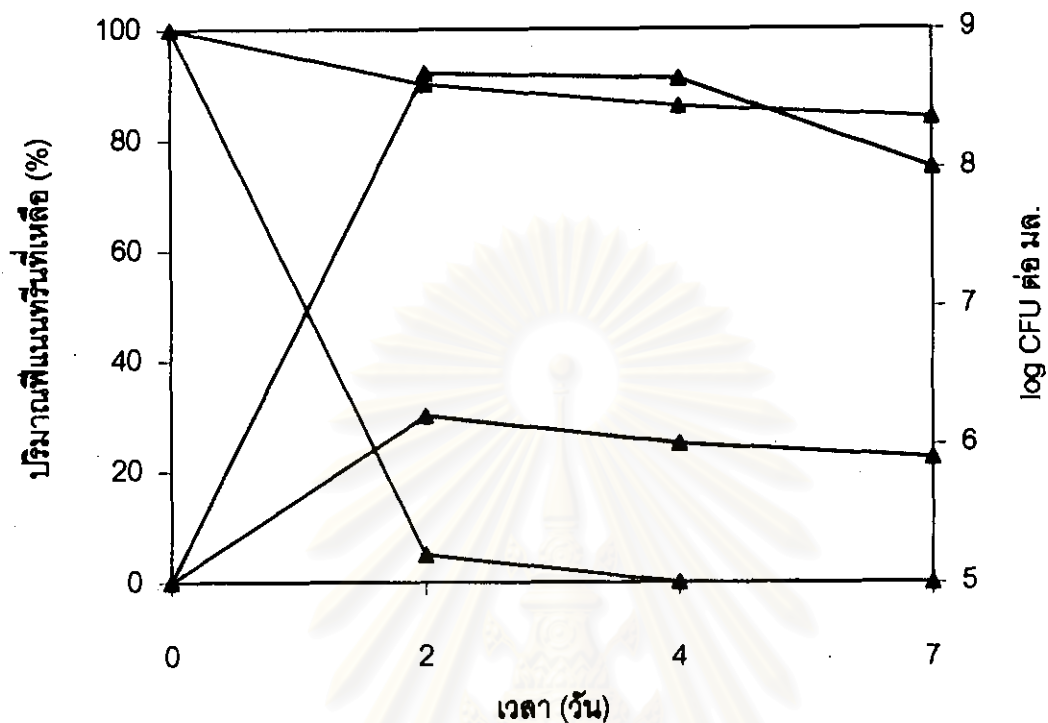
รูปที่ 4.18 แสดงการเจริญของ *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ P2 โดยใช้ไดเบนไซฟูแรนเป็นแหล่งคาร์บอนพลังงาน

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 4.19 การเจริญของ *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ P2 โดยใช้แอนทราซีนเป็นแหล่งคาร์บอน และพลังงาน

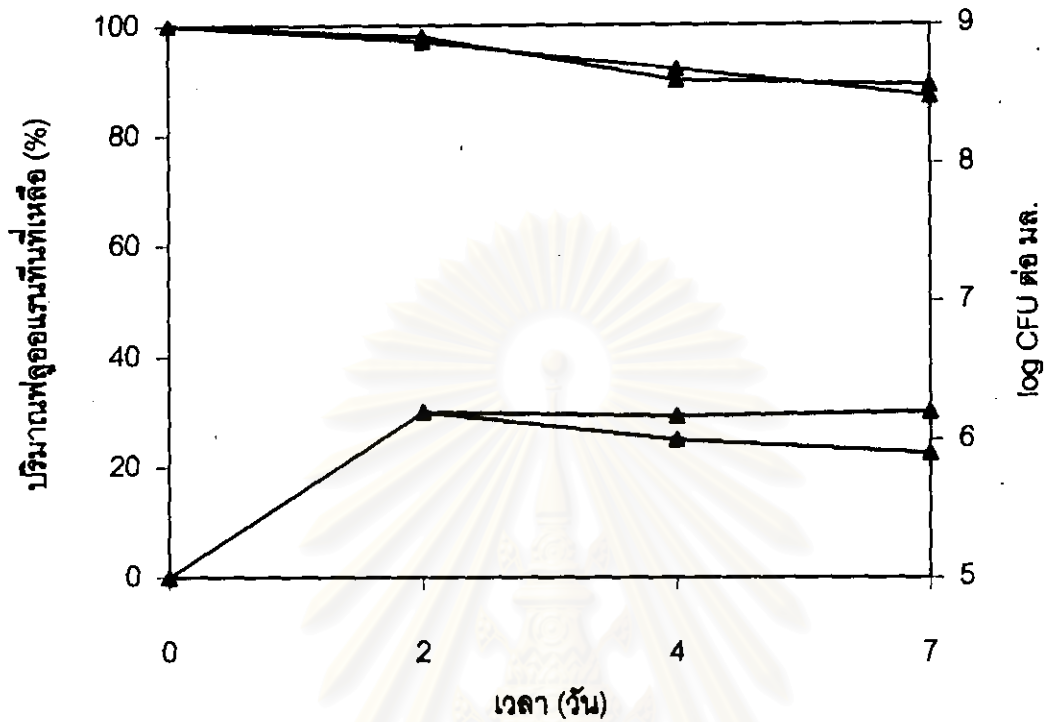
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



- ▲— ปริมาณฟีนอลในชุดทดลองที่ไม่เติมเชื้อ
- ▲— ปริมาณฟีนอลในชุดทดลองที่เติมเชื้อ
- ▲— จำนวนแบคทีเรียในชุดทดลองที่เติมฟีนอล
- ▲— จำนวนแบคทีเรียในชุดทดลองที่ไม่เติมฟีนอล

รูปที่ 4.20 การเจริญของ *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ P2 โดยใช้ฟีนอลเป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงาน

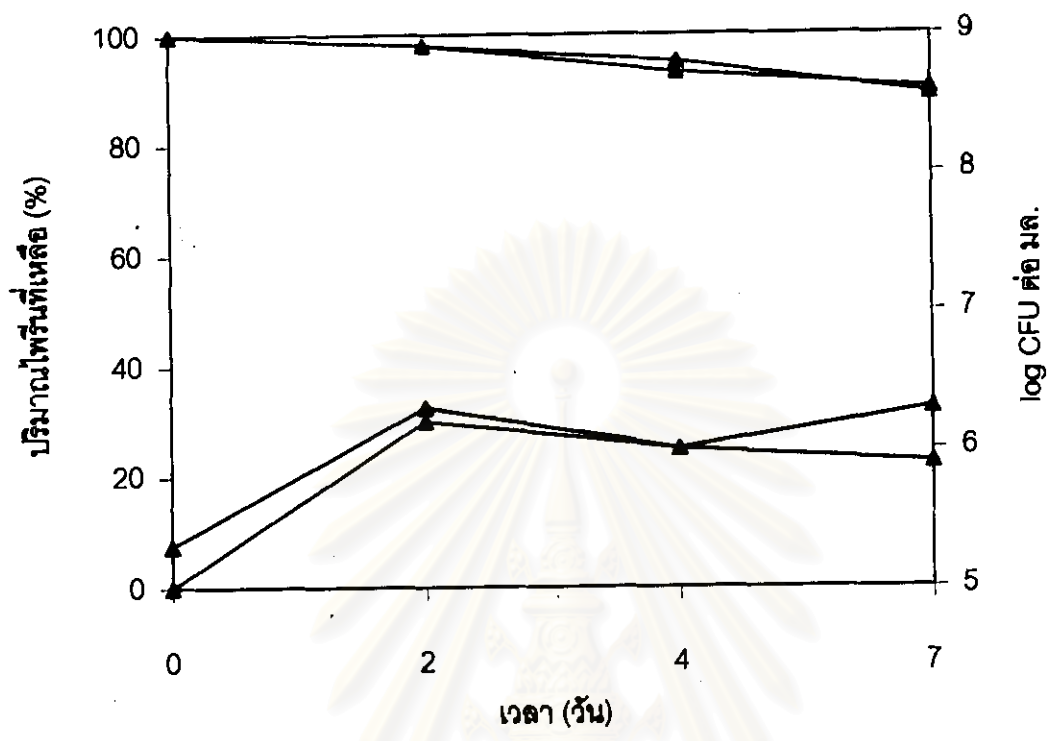
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



- ▲—ปริมาณฟลูออแรนซินในชุดทดลองที่ไม่เค็มเชื้อ
- ▲—ปริมาณฟลูออแรนซินในชุดทดลองที่เค็มเชื้อ
- ▲—จำนวนแบคทีเรียในชุดทดลองที่เค็มฟลูออแรนซิน
- ▲—จำนวนแบคทีเรียในชุดทดลองที่ไม่เค็มฟลูออแรนซิน

รูปที่ 4.21 การเจริญของ *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ P2 โดยใช้ฟลูออแรนซินเป็นแหล่งคาร์บอน และพลังงาน

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



- ▲— ปริมาณไพรีนในซุคทดลองที่ไม่เติมเชื้อ
- ▲— ปริมาณไพรีนในซุคทดลองที่เติมเชื้อ
- ▲— จำนวนแบคทีเรียในซุคทดลองที่เติมไพรีน
- ▲— จำนวนแบคทีเรียในซุคทดลองที่ไม่เติมไพรีน

รูปที่ 4.22 การเจริญของ *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ P2 โดยใช้ไพรีนเป็นแหล่งคาร์บอน และพลังงาน

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

จากผลการหารูปแบบการเจริญของ *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ P2 ในอาหารเหลว MM ที่มีสารทดสอบแต่ละชนิดเป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงานเป็นเวลา 7 วัน เมื่อนำมาเปรียบเทียบกับผลการทดลองในชุดควบคุม พบว่าได้ผลการทดลองดังแสดงไว้ในตารางที่ 4.7

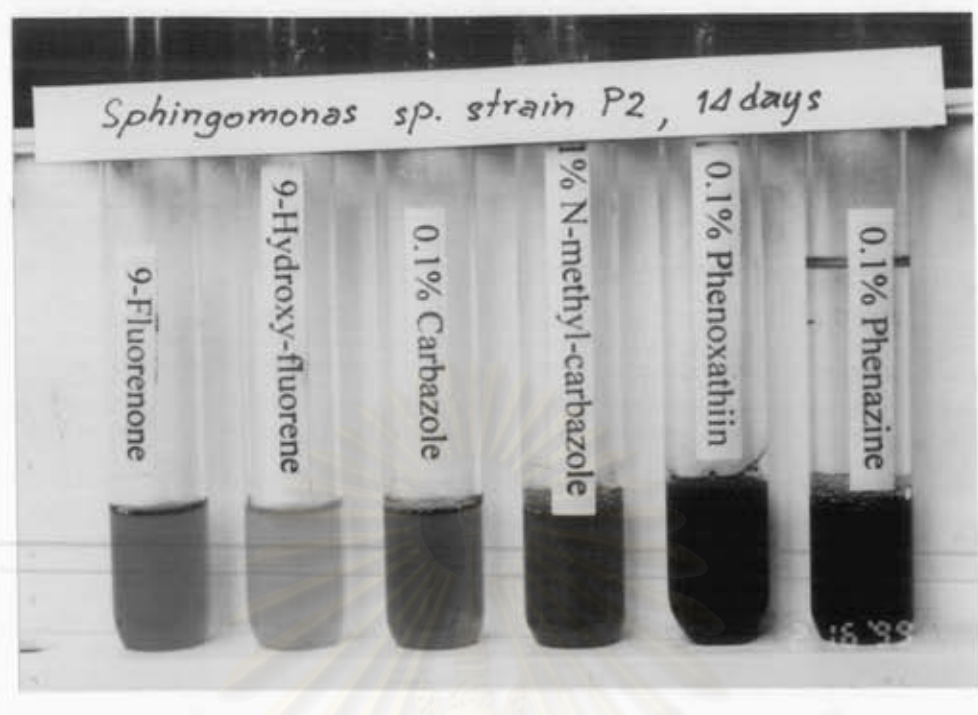
ตารางที่ 4.7 ผลการเจริญโดยการย่อยสลาย PAHs แต่ละชนิดของ *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ P2

PAHs	ระยะเวลาที่ใช้ในการย่อยสลาย PAHs จนเหลือ 0%	ปริมาณ PAHs ที่เหลือหลังการเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 7 วัน (%)
แนพทาลีน	ภายใน 7 วัน	0
อะซีแนพทิลีน	ภายใน 2 วัน	0
อะซีแนพทีน	ภายใน 2 วัน	0
ฟลูออรีน	ภายใน 2 วัน	0
โคเบนโซฟูแรน	ภายใน 2 วัน	0
แอนทราซีน	ภายใน 4 วัน	0
ฟิแนนทรีน	ภายใน 4 วัน	0
ฟลูออแรนซีน	-	38 ¹
ไพรีน	-	93 ²

หมายเหตุ ¹ ปริมาณฟลูออแรนซีนที่เหลืออยู่ในหลอดควบคุมที่ไม่ได้เติมหัวเชื้อหลังการทดลองเป็นเวลา 7 วัน เท่ากับ 43 %

² ปริมาณไพรีนที่เหลืออยู่ในหลอดควบคุมที่ไม่ได้เติมหัวเชื้อหลังการทดลองเป็นเวลา 7 วัน เท่ากับ 94 %

จากการทดสอบด้วยวิธีการเดียวกันพบว่า *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ P2 ยังสามารถเปลี่ยนสีของอาหารเหลว MM ที่มีสารทดสอบชนิดอื่นหลายชนิด ได้แก่ 9-ฟลูออรีโนน (9-fluorenone) 9-ไฮดรอกซี-ฟลูออรีน (9-hydroxy-fluorene) เอ็น-เมทิลคาร์บาโซล (N-methyl-carbazole) คาร์บาโซล (carbazole) ฟีนอกซาทีอิน (phenoxathiin) ฟีนาซีน (phenazine) จากไม่มีสีไปเป็นสีต่าง ๆ กันตามชนิดของสารทดสอบดังแสดงในรูปที่ 4.23



รูปที่ 4.23 ลักษณะของอาหารเหลว MM ที่มีสารทดสอบแต่ละชนิดหลังการเลี้ยงเชื้อ *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ P2 เป็นเวลา 14 วัน

หมายเหตุ ผลการทดสอบการเจริญของ *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ P2 ในการใช้ไบฟีนิล (biphenyl) เป็นสารทดสอบไม่ได้แสดงไว้ในรูปที่ 4.23 แต่จากการตรวจสอบพบว่าสายพันธุ์ P2 สามารถเปลี่ยนดีของอาหารเหลว MM ที่มีไบฟีนิลจากไม่มีสีเป็นสีเหลืองเข้มได้

นอกจากนี้จากการนำสารมัธยันต์ที่เกิดขึ้นระหว่างกระบวนการย่อยพีแนทรีนของแบคทีเรียสกุล Pseudomonads (Evans, et al., 1965) ได้แก่

คาทาคอล (catechol)

กรดซาลิไซลิก (salicylic acid)

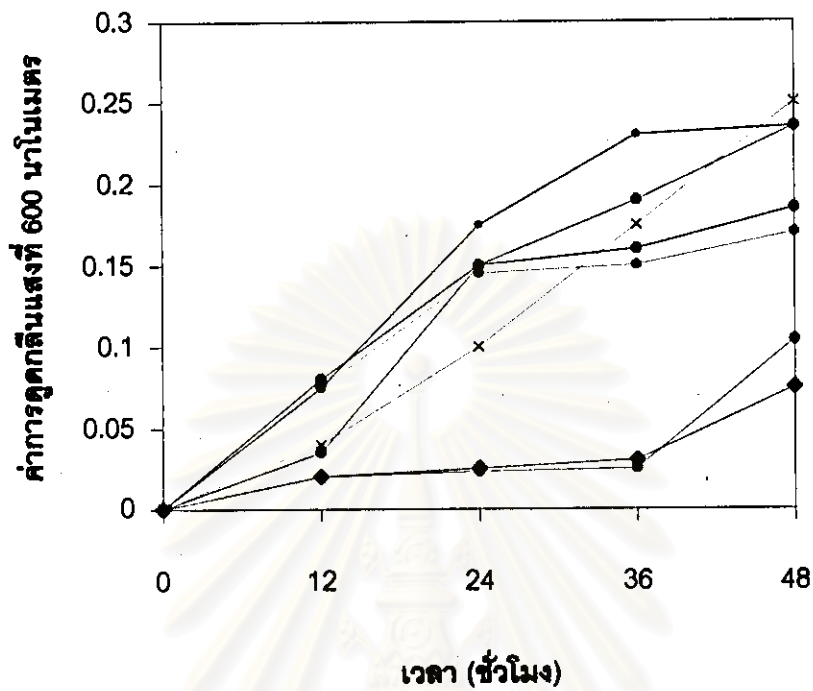
กรด 1-ไฮดรอกซี-2-แนฟโธอิก (1-hydroxy-2-naphthoic acid)

กรด 2-ไฮดรอกซี-1-แนฟโธอิก (2-hydroxy-1-naphthoic acid)

กรดพะธาติก (phthalic acid)

กรดโปรโตคาเทอชัวอิก (protocatechuic acid)

มาใช้ในการทดสอบการเจริญของ *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ P2 พบว่าแบคทีเรียสายพันธุ์นี้สามารถเจริญได้โดยการใช้สารมัธยันต์เหล่านี้เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงานดังแสดงในรูปที่ 4.24



- กรดโปรโตคาที่ซูอิก
- คาทีคอล
- × กรดซาลิไซลิก
- กรดพะธาลิก
- กรด 1-ไฮดรอกซี-2-แนพโซอิก
- กรด 2-ไฮดรอกซี-1-แนพโซอิก
- ฟีนานทริน

รูปที่ 4.24 การเจริญของ *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ P2 โดยการใช้สารมัธยันต์ชนิดต่างๆ ที่เกิดจากการย่อยสลายฟีนานทริน โดยแบคทีเรียสกุล *Pseudomonads*

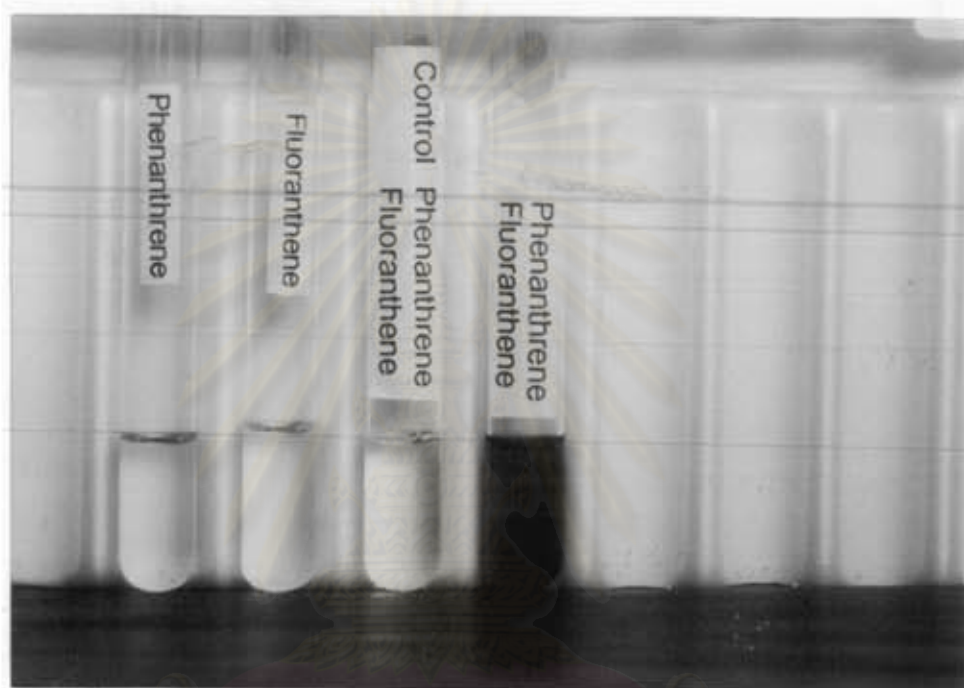
(Evans, et al., 1965)

4.6 ผลการย่อยสลายแบบโคเมตาบอติสมของ *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ P2

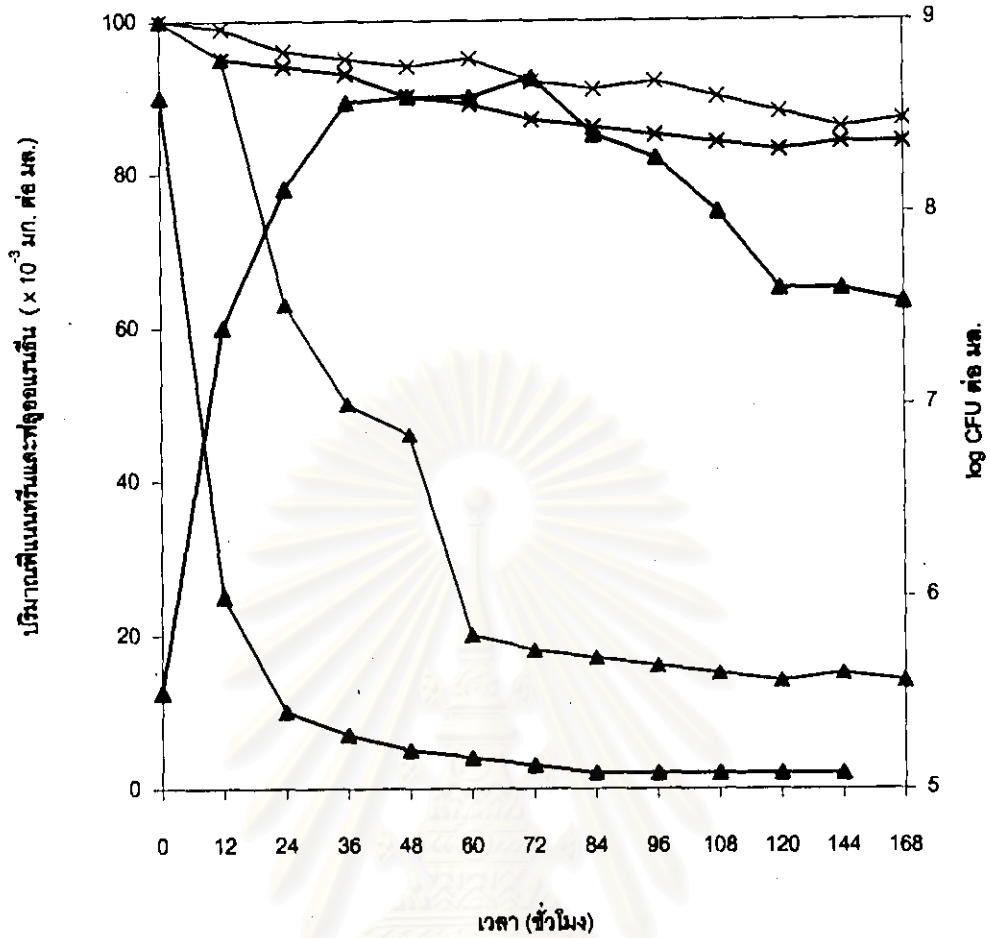
ผลที่ได้จากการทดสอบความจำเพาะของ *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ P2 ในการใช้ PAHs ชนิดอื่น ๆ เป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงานดังการทดลองในข้อ 4.5 พบว่าแบคทีเรียสายพันธุ์นี้ไม่สามารถย่อยสลายฟลูออแรนธิน และไพรีนซึ่งเป็นสาร PAHs ที่มีมวลโมเลกุลสูงเพื่อใช้ในการเจริญได้ ดังนั้นจึงนำ PAHs ทั้งสองชนิดมาทดสอบการย่อยสลายแบบโคเมตาบอติสมของแบคทีเรียสายพันธุ์นี้โดยการเติมพีแนนทรินซึ่งแบคทีเรียนี้สามารถใช้ในการเจริญได้โดยตรงลงไปอาหารเหลว MM ร่วมกับฟลูออแรนธินหรือไพรีน แล้วติดตามการเจริญของแบคทีเรียและการย่อยสลายของ PAHs แต่ละชนิดที่เติมลงไป

4.6.1 การย่อยสลายแบบโคเมตาบอติสมของฟลูออแรนธินร่วมกับพีแนนทริน

จากการทดสอบในเบื้องต้น พบว่า *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ P2 ไม่สามารถเจริญได้เมื่อมีฟลูออแรนธินเป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงานเพียงสารเดียว โดยสังเกตได้จากการที่อาหารเลี้ยงเชื้อในหลอดที่เติมฟลูออแรนธินเพียงชนิดเดียวไม่มีการเปลี่ยนสีและไม่มีความขุ่นเพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่ได้เติมหัวเชื้อ ในขณะที่อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีทั้งพีแนนทรินกับฟลูออแรนธินจะเปลี่ยนสีอาหารเลี้ยงเชื้อจากไม่มีสีไปเป็นสีแดงเข้มและมีความขุ่นเพิ่มขึ้น ส่วนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีพีแนนทรินเป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงานเพียงชนิดเดียวจะเปลี่ยนเป็นสีเหลือง ดังแสดงผลการทดสอบในรูปที่ 4.25 จึงเป็นไปได้ว่าการที่อาหารเลี้ยงเชื้อเปลี่ยนเป็นสีแดงเข้มอาจมีสาเหตุมาจากการสะสมของสารมีรขันธ์ที่เกิดขึ้นระหว่างการย่อยสลายของฟลูออแรนธินแบบโคเมตาบอติสมร่วมกับพีแนนทริน ดังนั้นจึงทำการทดสอบเพื่อยืนยันสมมุติฐานนี้โดยการศึกษารูปแบบในการเจริญของ *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ P2 ที่เกิดจากการย่อยสลายแบบโคเมตาบอติสมของฟลูออแรนธินร่วมกับพีแนนทริน โดยการนำหัวเชื้อมาเลี้ยงในอาหารเหลว MM ปริมาตร 5 มล. ที่มีฟลูออแรนธินและพีแนนทรินเข้มข้นสารละ 0.1 มก. ต่อ มล. ติดตามการเจริญและวิเคราะห์ปริมาณ PAHs ที่เหลืออยู่เป็นเวลาทุก 12 ชั่วโมง ได้ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 4.26



รูปที่ 4.25 ลักษณะของอาหารเหลว MM ที่มีฟีนแอนทรีนและฟลูออแรนซีนเป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงานเพียงชนิดเดียวเปรียบเทียบกับอาหารเหลวที่มีฟีนแอนทรีนและฟลูออแรนซีนเป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงานร่วมกันหลังการเลี้ยง *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ P2 เป็นเวลา 7 วัน



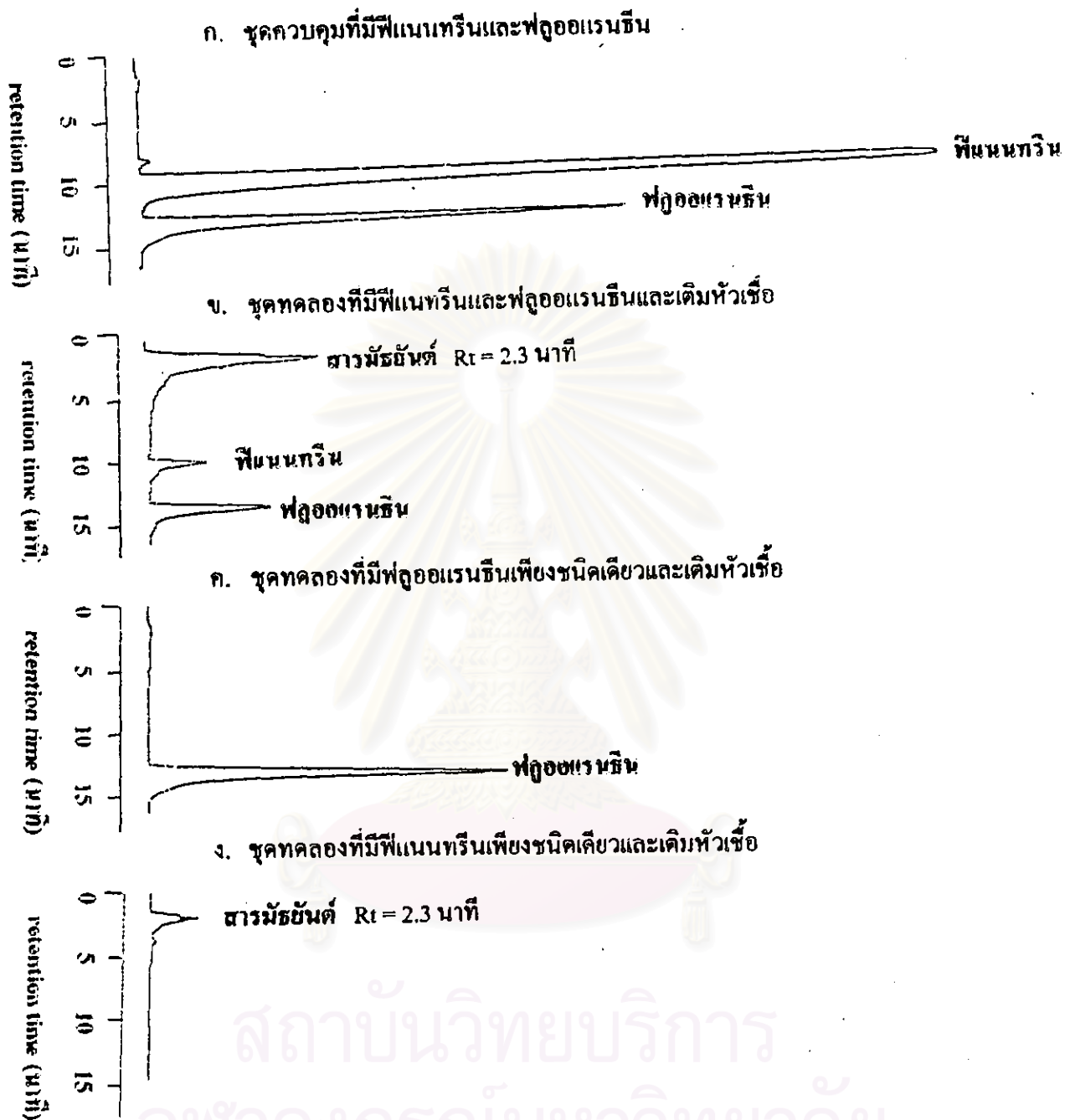
- x— ปริมาณพีแนนทรีนในชุดทดลองที่ไม่เติมเชื้อ
- ▲— ปริมาณพีแนนทรีนในชุดทดลองที่เติมเชื้อ
- x— ปริมาณฟลูออแรนธินในชุดทดลองที่ไม่เติมเชื้อ
- ▲— ปริมาณฟลูออแรนธินในชุดทดลองที่เติมเชื้อ
- ▲— จำนวนแบคทีเรียในชุดทดลองที่เติมพีแนนทรีนและฟลูออแรนธิน

รูปที่ 4.26 การเจริญของ *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ P2 โดยใช้พีแนนทรีนและฟลูออแรนธินเป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงานร่วมกัน

จากผลการทดลองพบว่า *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ P2 เพิ่มจำนวนอย่างรวดเร็วจากจำนวนเริ่มต้น 3.2×10^5 CFU ต่อ มล. ไปเป็น 5.0×10^5 CFU ต่อ มล. ภายในเวลา 3 วัน โดยที่ปริมาณของฟิแนนทรินจะลดลงจาก 0.1 มก. ต่อ มล. เหลือเพียง 0.002 มก. ต่อ มล. หรือถูกย่อยสลายไป 98% และฟลูออแรนธินจาก 0.1 มก. ต่อ มล. ลดลงเหลือ 0.014 มก. ต่อ มล. หรือถูกย่อยสลายไป 86% หลังสิ้นสุดการทดลองเป็นเวลา 7 วัน เมื่อเปรียบเทียบจำนวนแบคทีเรียในชุดทดลองที่มีฟิแนนทรินเพียงสารเดียวเป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงานพบว่าจำนวนแบคทีเรียในชุดทดลองที่มีทั้งฟิแนนทรินกับฟลูออแรนธินจะลดลงเล็กน้อยหลังเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 72 ชั่วโมง

จากการวิเคราะห์น้ำเลี้ยงเชื้อด้วย HPLC ดังแสดงในรูปที่ 4.27 พบว่า *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ P2 สามารถย่อยสลายฟลูออแรนธินได้ในปริมาณหนึ่งเมื่อทำการเลี้ยงเชื้อร่วมกับฟิแนนทริน โดยระหว่างการย่อยสลายฟลูออแรนธินร่วมกับฟิแนนทรินจะเกิดสารมีร้นซ์ที่มี retention time (Rt) 2.1 นาที และ 2.3 นาทีเกิดขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับโครมาโตแกรมที่ได้จากการย่อยสลายฟิแนนทรินเพียงชนิดเดียวจะพบว่า การย่อยสลายฟลูออแรนธินแบบโคเมตาบอติสมมีสารมีร้นซ์เหลืออยู่หลังสิ้นสุดการทดลองเป็นเวลา 7 วัน ในปริมาณที่สูงกว่าที่พบในการย่อยสลายฟิแนนทรินเพียงชนิดเดียว (โดยการพิจารณาจากพื้นที่ใต้กราฟ) ดังนั้นจึงอาจเป็นไปได้ว่าสารมีร้นซ์เหล่านี้เกิดจากการย่อยสลายฟลูออแรนธินแบบโคเมตาบอติสมของ *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ P2

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

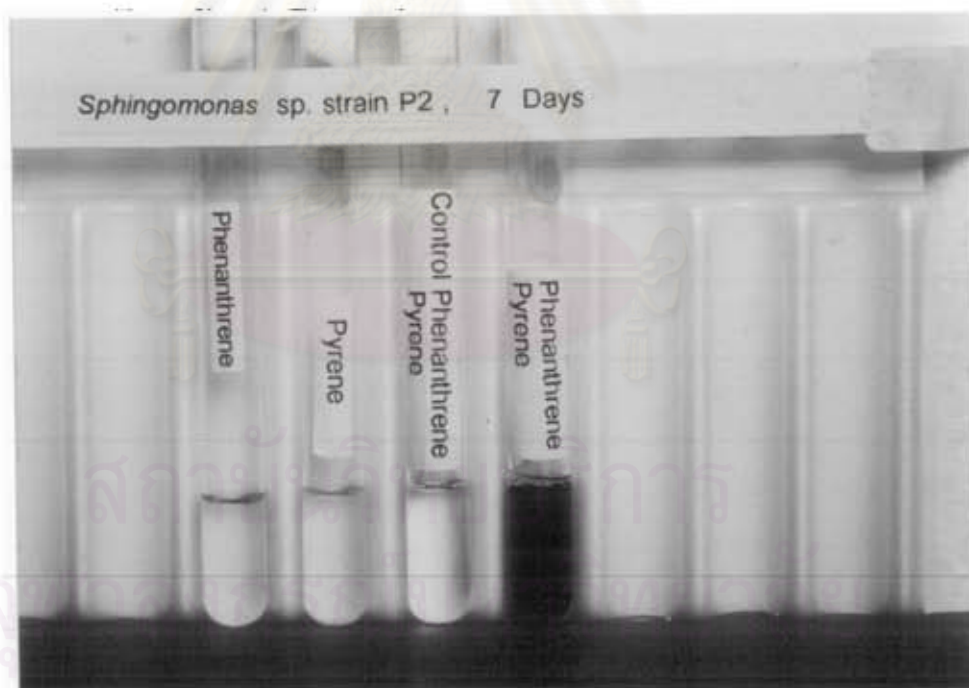


รูปที่ 4.27 HPLC โครมาโตแกรมของการวิเคราะห์ที่ได้จากชุดควบคุมและชุดทดลองการ

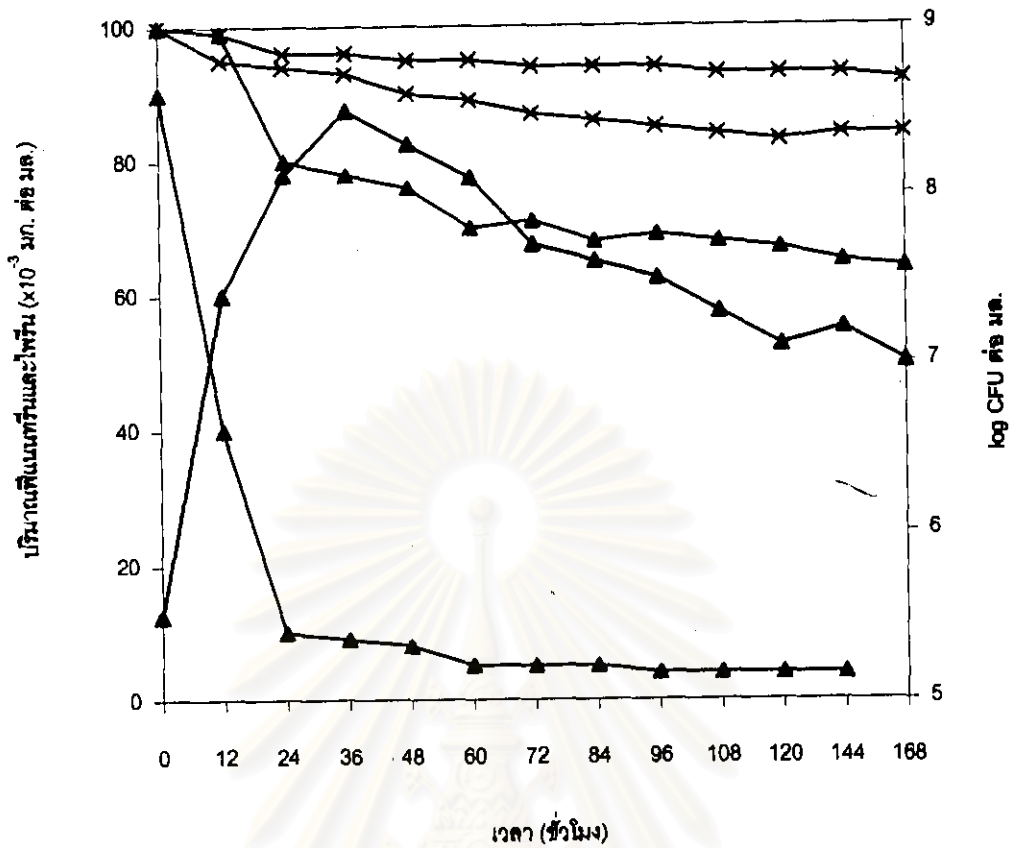
ย่อยสลายพีแนทรีนและฟลูออเรนซีนหลังการเลี้ยง *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ P2
เป็นเวลา 7 วัน

4.6.2 การย่อยสลายแบบโคเมตาบอลิซึมของไพรีนร่วมกับพีแนนทริน

จากการทดสอบในเบื้องต้นดังที่แสดงในรูปที่ 4.28 พบว่า *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ P2 ไม่สามารถเจริญได้เมื่อใช้ไพรีนเป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงานเพียงสารเดียว โดยสังเกตได้จากการที่อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีไพรีนเพียงสารเดียวไม่มีการเปลี่ยนสีและไม่มีความขุ่นเพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่ได้เติมหัวเชื้อ ในขณะที่อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีทั้งพีแนนทรินกับไพรีนจะเปลี่ยนสีจากไม่มีสีไปเป็นสีเขียวแก่และมีความขุ่นเพิ่มขึ้น ซึ่งแตกต่างจากอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีพีแนนทรินเพียงสารเดียวเป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงานที่เปลี่ยนสีอาหารเป็นสีเหลือง จึงเป็นไปได้ว่าสารสีเขียวนี้อาจเป็นสารมัธยันต์ที่เกิดจากการย่อยสลายไพรีนแบบ โคเมตาบอลิซึม ดังนั้นจึงทำการทดลองเพื่อยืนยันสมมุติฐานนี้โดยใช้วิธีเดียวกับการศึกษารูปแบบการเจริญของแบคทีเรียสายพันธุ์นี้โดยการย่อยสลายแบบ โคเมตาบอลิซึมของฟลูออแรนธินกับพีแนนทรินซึ่งได้ผลการทดลองดังแสดงไว้ในรูปที่ 4.29



รูปที่ 4.28 ลักษณะของอาหารเหลว MM ที่มีพีแนนทรินและไพรีนเป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงานเพียงชนิดเดียว เปรียบเทียบกับอาหารเหลวที่มีพีแนนทรินและไพรีนเป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงานร่วมกัน หลังจากการเลี้ยงเชื้อ *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ P2 เป็นเวลา 7 วัน



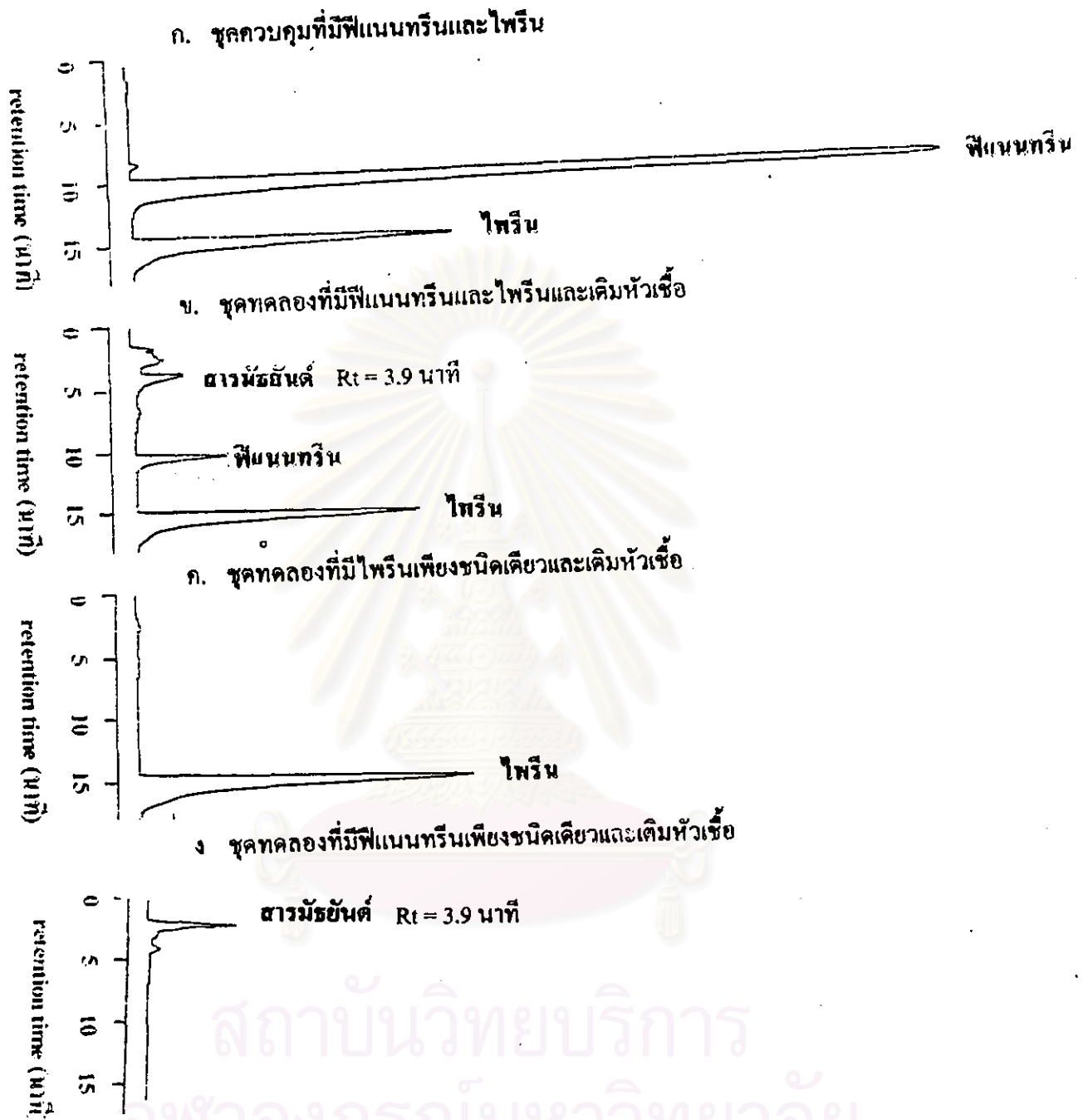
- x— ปริมาณฟิแนนทรีนในซุคทคดองที่ไม่เติมเชื้อ
- ▲— ปริมาณฟิแนนทรีนในซุคทคดองที่เติมเชื้อ
- x— ปริมาณไพรีนในซุคทคดองที่ไม่เติมเชื้อ
- ▲— ปริมาณไพรีนในซุคทคดองที่เติมเชื้อ
- ▲— จำนวนแบคทีเรียในซุคทคดองที่เติมฟิแนนทรีนและไพรีน

รูปที่ 4.29 การเจริญของ *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ P2 ในการใช้ฟิแนนทรีนและไพรีนเป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงานร่วมกัน

จากผลการทดลองในรูปที่ 4.29 พบว่า *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ P2 เพิ่มจำนวนได้อย่างรวดเร็วจากจำนวนเริ่มต้น 3.9×10^7 CFU ต่อ มล. ไปเป็น 3.2×10^8 CFU ต่อ มล. ภายในเวลา 36 ชั่วโมง โดยที่พีแนมทรินจะลดลงจาก 0.1 มก. ต่อ มล. เหลือ 0.004 มก. ต่อ มล. หรือถูกย่อยสลายไป 96 % และไพรีนเหลืออยู่ 64 มก. ต่อ มล. หรือถูกย่อยสลายไป 36 % หลังสิ้นสุดการทดลองเป็นเวลา 7 วัน เมื่อเปรียบเทียบจำนวนของแบคทีเรียในชุดทดลองที่มีพีแนมทรินเป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงานเพียงสารเดียว พบว่าจำนวนของแบคทีเรียจะลดลงอย่างมีนัยสำคัญภายหลังจากเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 36 ชั่วโมง

จากการตรวจสอบโครมาโตแกรมที่ได้จาก HPLC ดังแสดงในรูปที่ 4.30 แสดงให้เห็นว่า *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ P2 สามารถย่อยสลายไพรีนได้ในปริมาณหนึ่งเมื่อทำการเลี้ยงเชื้อร่วมกับพีแนมทริน โดยระหว่างการย่อยสลายไพรีนร่วมกับพีแนมทรินจะเกิดสารมัธยันต์ที่มี R_t 3.9 นาที ซึ่งไม่พบสารประกอบนี้ในโครมาโตแกรมของ HPLC ที่วิเคราะห์จากชุดทดลองที่ใช้พีแนมทรินเป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงานเพียงชนิดเดียว ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้ที่สารมัธยันต์ชนิดนี้อาจเป็นสารมัธยันต์ที่เกิดจากการย่อยสลายไพรีนแบบโคเมตาบอลิซึม โดยที่สารมัธยันต์นี้จะสะสมอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อในปริมาณที่คงที่ไปจนสิ้นสุดการทดลองเป็นเวลา 7 วัน

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 4.30 HPLCโครมาโตแกรมที่ได้จากการวิเคราะห์ชุดควบคุมและชุดทดลองการย่อยสลาย ไลพินและพีแชนทรินหลังการเลี้ยง *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ P2 เป็นเวลา 7 วัน

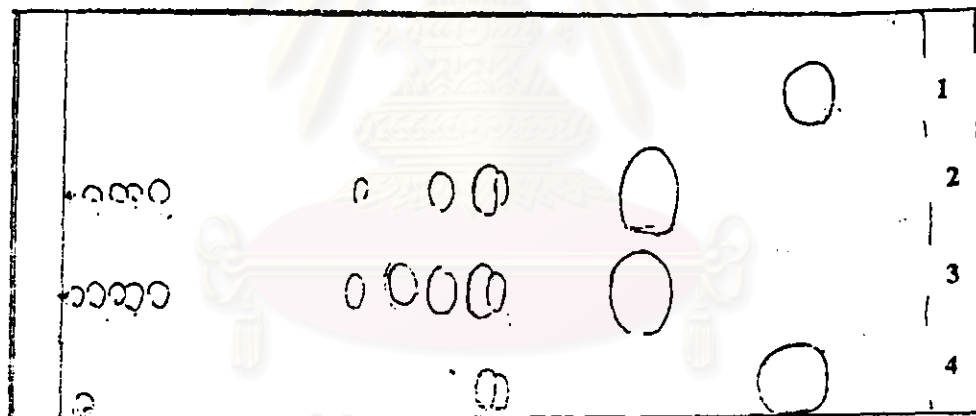
4.7 ผลการพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารมัธยันต์ที่เกิดจากการย่อยสลายพีแนนทรินโดย

Sphingomonas sp. สายพันธุ์ P2

4.7.1 ผลการแยกสารมัธยันต์ที่เกิดจากการย่อยสลายพีแนนทรินโดย *Sphingomonas* sp.

สายพันธุ์ P2

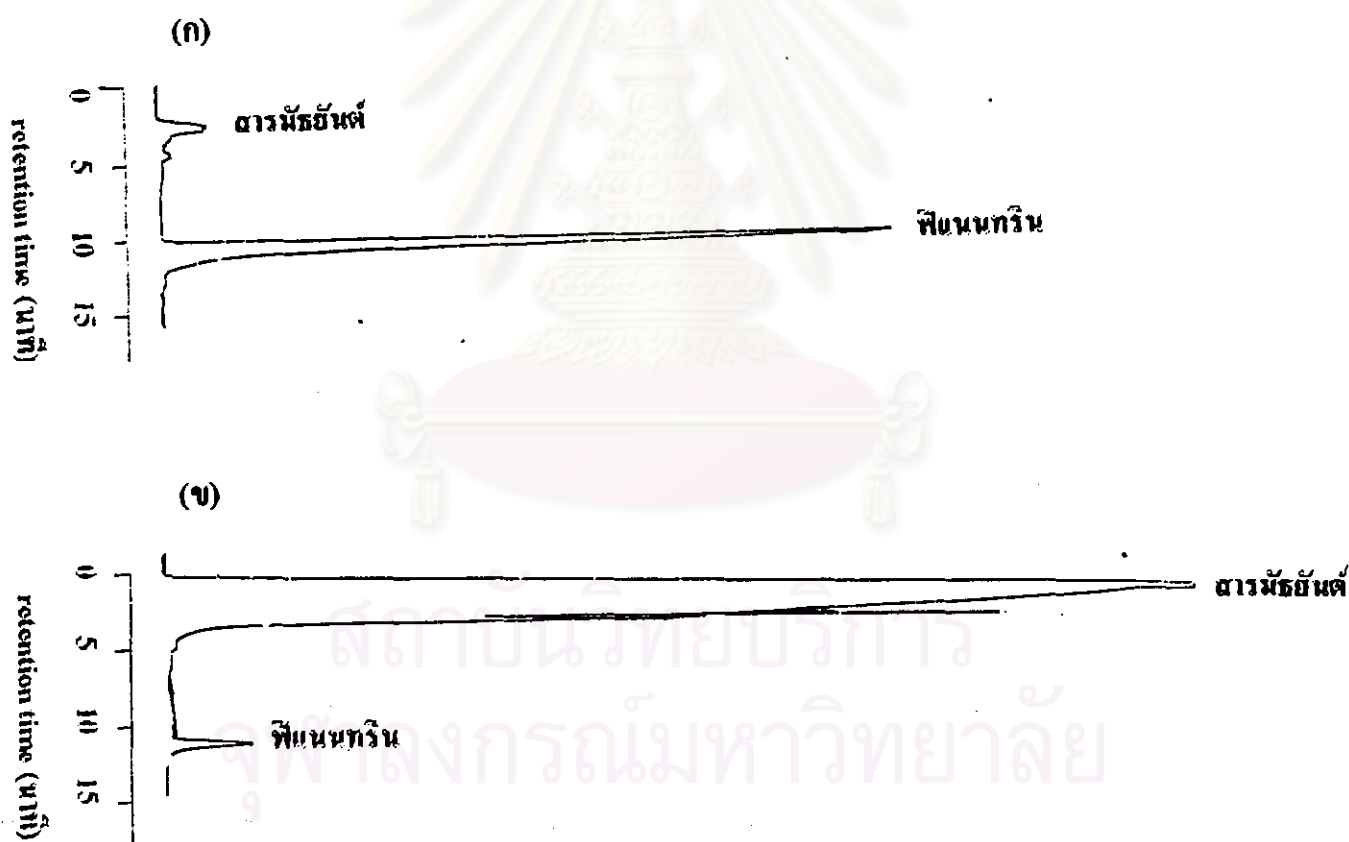
ผลทดลองสารประกอบที่ได้จากการย่อยสลายของพีแนนทรินโดยเชื้อ *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ P2 ด้วยวิธี TLC ดังแสดงในรูปที่ 4.31 พบว่ามีสารมัธยันต์จำนวนมากเกิดขึ้น และสะสมอยู่ในส่วนของน้ำเลี้ยงเชื้อมากกว่าในส่วนของเซลล์ ดังนั้นในขั้นตอนต่อไปจึงนำแค่ส่วนน้ำที่ปั่นแยกเซลล์แบคทีเรียออกแล้วมาสกัดแยกสารมัธยันต์เพื่อทำให้บริสุทธิ์และพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารมัธยันต์บริสุทธิ์ต่อไป



รูปที่ 4.31 TLC โครมาโตแกรมของการวิเคราะห์สารประกอบที่เกิดจากการย่อยสลายพีแนนทริน โดย *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ P2

1. สารมาตรฐานพีแนนทริน
2. สารสกัดจากน้ำเลี้ยงเชื้อที่ยังคงมีเซลล์แบคทีเรีย
3. สารสกัดจากส่วนของน้ำเลี้ยงเชื้อ
4. สารสกัดจากส่วนของเซลล์แบคทีเรีย

ในการเตรียมสารมาตรฐานบริสุทธิ์เพื่อพิสูจน์เอกลักษณ์ทำโดยเลี้ยงเซลล์ในปริมาณมาก โดยเลี้ยง *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ P2 ในอาหารเหลว MM ปริมาตร 1,000 มล. ที่มีฟิแนทรีน เข้มข้น 1 มก. ต่อ มล. เป็นเวลา 2 วัน จากนั้นนำอาหารเหลวที่ปั่นแยกเซลล์แบบที่เรียวออกแล้วมา สกัดสารมาตรฐานด้วยการเติมเอทิลอะซิเตตตามวิธีการสกัดที่แสดงไว้ในภาคผนวก ก.หมายเลข 5 จะได้สารสกัด 2 ส่วน คือ ส่วนที่มีสมบัติเป็นกลางและส่วนที่มีสมบัติเป็นกรด จากการวิเคราะห์ ชนิดและปริมาณของสารมาตรฐานที่สะสมอยู่ในแต่ละส่วนด้วยวิธี HPLC ดังแสดงในรูปที่ 4.32 จะ พบว่าสารมาตรฐานส่วนมากสะสมอยู่ในส่วนที่เป็นกรดมากกว่าในส่วนที่เป็นกลาง โดยยังมี ฟิแนทรีนเหลืออยู่ปริมาณมากในส่วนที่เป็นกลาง ดังนั้นจึงนำแค่ส่วนที่เป็นกรดมาทำการแยกสาร มาตรฐานแต่ละชนิดเพื่อทำการพิสูจน์เอกลักษณ์ในขั้นตอนต่อไป

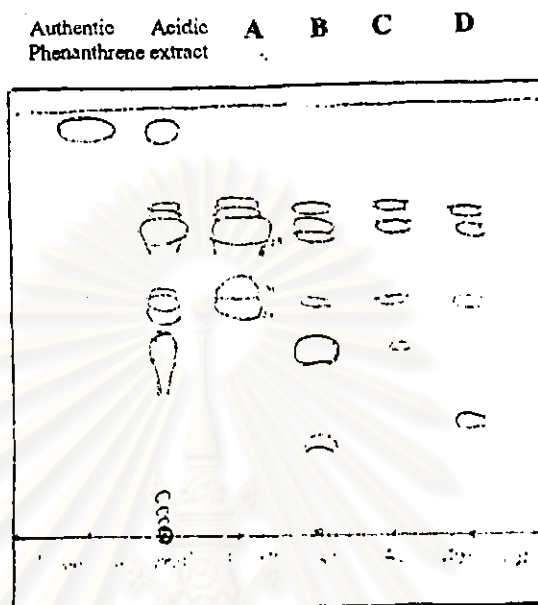


รูปที่ 4.32 HPLC โครมาโตแกรมแสดงการเปรียบเทียบชนิดและปริมาณของสารมาตรฐานที่เกิด จากการย่อยสลายฟิแนทรีนที่สะสมอยู่ใน (ก) ส่วนที่เป็นกลางและ (ข) ส่วนที่เป็นกรด

จากการนำส่วนที่มีสมบัติเป็นกรดมาทำให้บริสุทธิ์ขึ้นบางส่วนโดยการทำให้กรดมาโคกรากฟีบนซิติกาเจลคอลลัมน์และหะเป็นลำดับส่วนด้วย 0-100 % เอทิลอะซีเตตในเฮกเซนโดยเพิ่มความเข้มข้นของเอทิลอะซีเตตขึ้นลำดับส่วนละ 10% ดังที่แสดงในตารางที่ 4.8 จากนั้นวิเคราะห์แต่ละลำดับส่วนด้วยวิธี TLC จากการวิเคราะห์ชนิดของสารมัธยันต์ที่พบในแต่ละลำดับส่วน พบว่าลำดับส่วนที่หะด้วย 20 % เอทิลอะซีเตต และ 30% เอทิลอะซีเตตมีสารมัธยันต์คล้ายกันสะสมอยู่ จึงรวมทั้งสองลำดับส่วนเข้าด้วยกันเช่นเดียวกันกับลำดับส่วนที่หะด้วย 60% เอทิลอะซีเตต และ 70 % เอทิลอะซีเตต มีสารมัธยันต์คล้ายกันสะสมอยู่ จึงรวมทั้งสองลำดับส่วนเข้าด้วยกัน ดังแสดงชนิดและปริมาณของสารมัธยันต์ที่สะสมอยู่ในรูปที่ 4.33

ตารางที่ 4.8 ลำดับส่วนของตัวทำละลายที่ใช้ในการหะสารมัธยันต์ออกจากซิติกาเจลคอลลัมน์

ลำดับส่วนที่	ตัวทำละลาย (เอทิลอะซีเตตในเฮกเซน)
1	0 % เอทิลอะซีเตต
2	10 % เอทิลอะซีเตต
3	20 % เอทิลอะซีเตต
4	30 % เอทิลอะซีเตต
5	40 % เอทิลอะซีเตต
6	50 % เอทิลอะซีเตต
7	60 % เอทิลอะซีเตต
8	70 % เอทิลอะซีเตต
9	80 % เอทิลอะซีเตต
10	90 % เอทิลอะซีเตต
11	100% เอทิลอะซีเตต



- A ลำดับส่วนที่ชะด้วย 20 % และ 30 % เอทิลอะซิเตต
- B ลำดับส่วนที่ชะด้วย 40 % เอทิลอะซิเตต
- C ลำดับส่วนที่ชะด้วย 50 % เอทิลอะซิเตต
- D ลำดับส่วนที่ชะด้วย 60 % และ 70 % เอทิลอะซิเตต

รูปที่ 4.33 โครมาโตแกรมการวิเคราะห์ TLC แสดงชนิดและจำนวนของสารมัธยันต์ที่สะสมอยู่ในแต่ละลำดับส่วนที่ผ่านออกมาจากซิลิกาเจลคอลัมน์

เมื่อนำลำดับส่วนที่ได้จากการทำโครมาโตกราฟีบนซิลิกาเจลคอลัมน์มาวิเคราะห์โดย HPLC ดังแสดงในรูปที่ 4.34 พบว่าลำดับส่วน A (รวมส่วนที่ชะด้วย 20 % และ 30 % เอทิลอะซิเตต) มีสารมัธยันต์หลายชนิดที่มีค่า R_t แตกต่างกันและเมื่อพิจารณาจากพื้นที่ใต้พีคจัดได้ว่ามีสารมัธยันต์ปริมาณมากจึงได้แบ่งออกเป็น 4 กลุ่มและให้ชื่อว่า product 1, product 2, product 3, และ product 4 ตามลำดับ

ส่วนลำดับส่วน B (ส่วนที่ชะด้วย 40 % เอทธิลอะซีเตต) พบสารมีรยัณฑ์ปริมาณน้อยมาก ขณะที่ส่วนลำดับส่วน C (รวมส่วนที่ชะด้วย 50 % เอทธิลอะซีเตต) และลำดับส่วน D (รวมส่วนที่ชะด้วย 60 % และ 70 % เอทธิลอะซีเตต) ไม่สามารถวิเคราะห์หาสารมีรยัณฑ์ได้ ดังนั้นในขั้นตอนต่อไปจึงนำลำดับส่วน A (รวมส่วนที่ชะด้วย 20 % และ 30 % เอทธิลอะซีเตต) มาทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี HPLC โดยเก็บเป็นลำดับส่วนทั้งหมด 30 ส่วน ๆ ละ 3 มล. (เวลาทุก 1 นาที) และนำแต่ละส่วนมาทำการวิเคราะห์ด้วย TLC ได้ผลดังแสดงในรูปที่ 4.35

จากการนำสารมีรยัณฑ์ทั้ง 4 กลุ่มที่สะสมอยู่ในลำดับส่วน A มาทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี HPLC และวิเคราะห์ด้วย TLC พบว่าสารมีรยัณฑ์ทั้ง 4 กลุ่มมีค่า R_f ที่แตกต่างกันออกไปดังแสดงในตารางที่ 4.9

ตารางที่ 4.9 รายละเอียดของสารมีรยัณฑ์ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี HPLC

สารมีรยัณฑ์	ค่า R_f ¹	ลำดับส่วนที่พบสารมีรยัณฑ์สะสมอยู่ ²
Product 1	9.5	11
Product 2	12.0	16
Product 3	17.0	17-18
Product 4	19.3	20-21

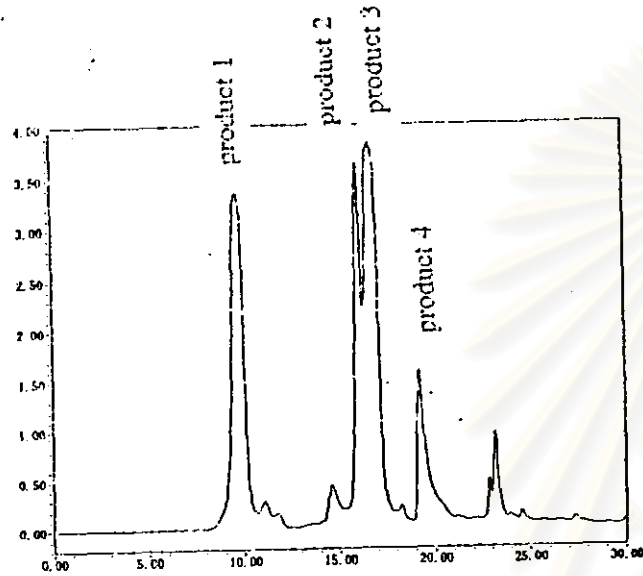
หมายเหตุ ¹ retention time (R_f) ได้จากการวิเคราะห์สารมีรยัณฑ์ด้วย HPLC ตามวิธีการดำเนินการวิจัย

การวิจัย ข้อ 3.31

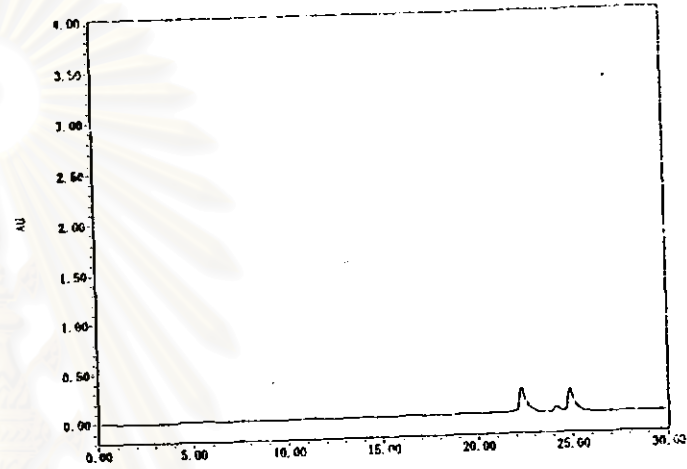
² ลำดับส่วนที่พบสารมีรยัณฑ์แต่ละชนิดสะสมอยู่จากการวิเคราะห์ด้วยวิธี TLC

จากการตรวจสอบของตัวทำละลายที่ผ่านออกจากคอลัมน์ของ HPLC ด้วยวิธี TLC พบว่าสารมีรยัณฑ์ทั้ง 4 กลุ่มจะแยกออกจากกันและสะสมอยู่ในส่วนต่างๆกัน ดังที่แสดงในรูปที่ 4.35 รวมแต่ละส่วนที่ผ่านออกมาจากคอลัมน์ของ HPLC ที่มีค่า R_f เท่ากันเข้าด้วยกันและนำไปพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารมีรยัณฑ์แต่ละชนิดโดย ¹H NMR และ GC-MS

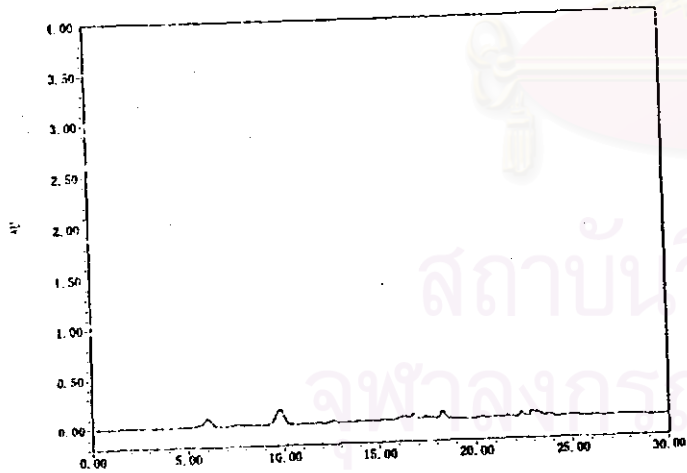
ก.



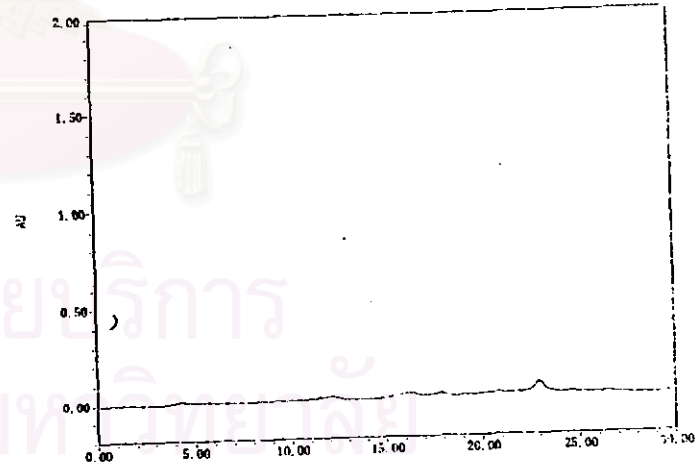
ข.



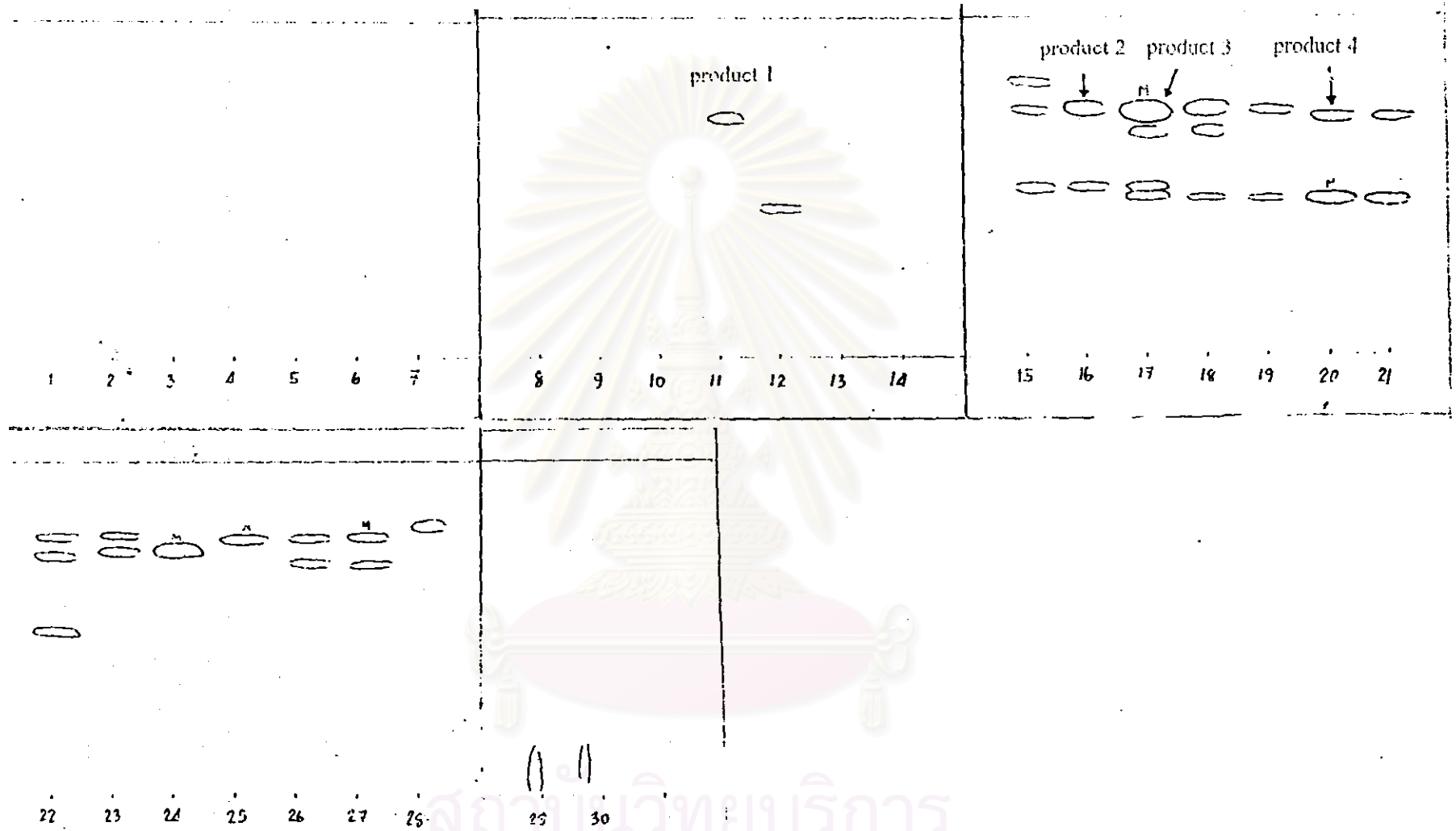
ค.



ง.



รูปที่ 4.34 HPLC โครมาโตแกรมของลำดับส่วนที่ชะออกจากชิลิกาเจล (ก) ลำดับส่วนที่ชะด้วย 20 % และ 30 % เอทิลอะซิเตต (ข) ลำดับส่วนที่ชะด้วย 40 % เอทิลอะซิเตต (ค) ลำดับส่วนที่ชะด้วย 50 % เอทิลอะซิเตต (ง) ลำดับส่วนที่ชะด้วย 60 % และ 70 % เอทิลอะซิเตต



รูปที่ 4.35 TLC โครมาโตแกรมจากการวิเคราะห์ชนิดและปริมาณของสารมัธยงค์ที่พบอยู่ในลำดับส่วน A ที่ใช้ 20% กับ 30% เอทิลอะซิเตตเป็นตัว
ชะล้างหลังทำให้บริสุทธิ์ ด้วยวิธี HPLC

4.7.2 ผลการพิสูจน์เอกลักษณ์สารมัธยันต์ทั้ง 4 ชนิดด้วยวิธี $^1\text{H NMR}$

จากการวิเคราะห์สารมัธยันต์ทั้ง 4 ชนิดด้วย $^1\text{H NMR}$ ไม่สามารถพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารมัธยันต์ที่พบในกลุ่ม product 1 product 2 และ product 3 ได้ เนื่องจากสารมัธยันต์ที่พบมีปริมาณต่ำเกินกว่าที่จะทำการวิเคราะห์ได้ ในขณะที่สเปกตรัมของ $^1\text{H NMR}$ ของสารมัธยันต์ที่พบในกลุ่ม product 4 มีความคล้ายคลึงกับสเปกตรัม $^1\text{H NMR}$ ของสารมาตรฐาน กรด 1-ไฮดรอกซี-2-แนฟโธอิก ดังที่แสดงในรูปที่ 4.36 ก. และ 4.36 ข. ตามลำดับ

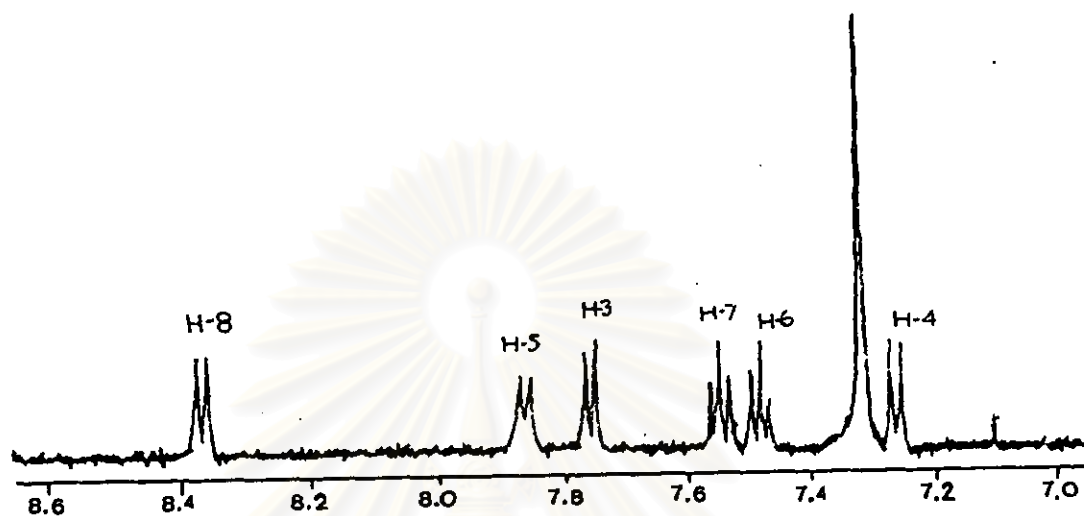
และจากการตรวจสอบค่าเคมีคัลชิฟต์ (chemical shift) โดยใช้เตตราเมทิลซิลิเทน (tetramethyl silane) เป็นสารมาตรฐาน (เคมีคัลชิฟต์=0) พบว่าสารมัธยันต์ที่พบในกลุ่ม product 4 มีค่าเคมีคัลชิฟต์ของโปรตอนทั้ง 6 โปรตอนใกล้เคียงกับสารมาตรฐาน กรด 1-ไฮดรอกซี-2-แนฟโธอิก ดังแสดงในตารางที่ 4.10

ตารางที่ 4.10 ค่าพารามิเตอร์ที่ได้จากสเปกตรัมของ $^1\text{H NMR}$ ขนาดความถี่ 500 เมกกะเฮิร์ตซ์ของสารมัธยันต์ที่พบในกลุ่ม product 4 เปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน กรด 1-ไฮดรอกซี-2-แนฟโธอิก

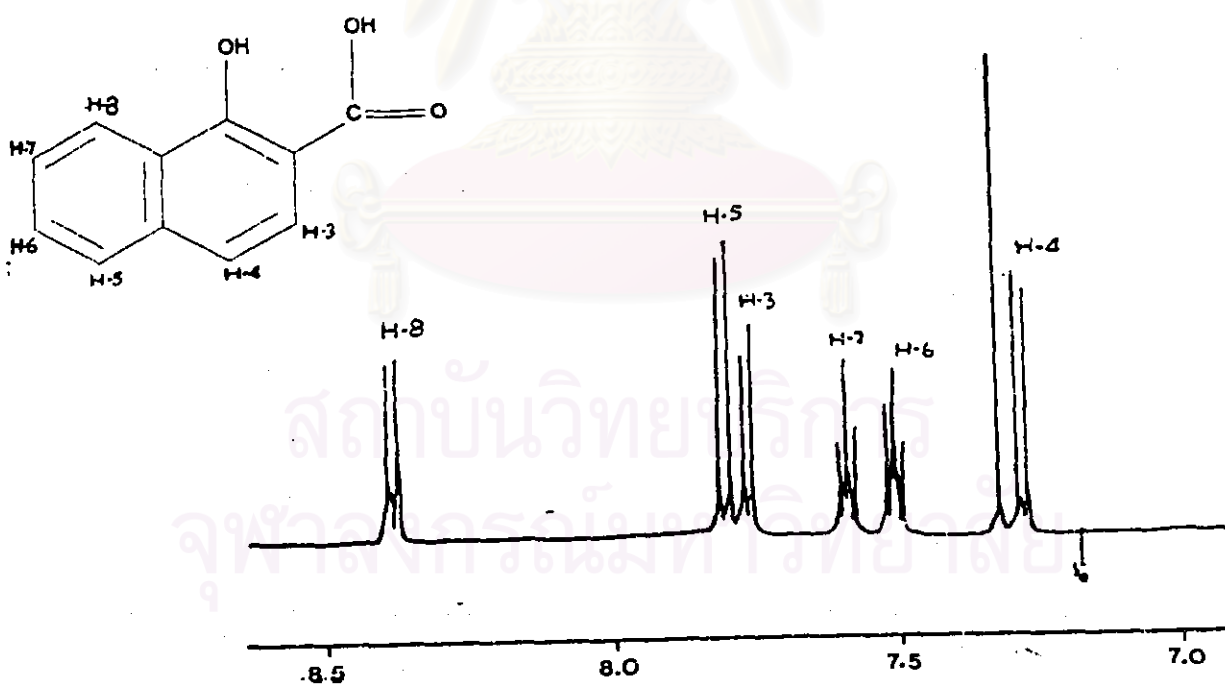
สาร	ค่าเคมีคัลชิฟต์ของโปรตอน (ppm)					
	H-3	H-4	H-5	H-6	H-7	H-8
Product 4	7.69	7.20	7.80	7.42	7.48	8.30
สารมาตรฐานกรด 1-ไฮดรอกซี-2-แนฟโธอิก	7.8	7.42	7.93	7.62	7.67	8.33

จากผลการตรวจสอบดังกล่าว อาจเป็นไปได้ว่าสารมัธยันต์ที่พบในกลุ่ม product 4 คือ กรด 1-ไฮดรอกซี-2-แนฟโธอิก ซึ่งเป็นสารมัธยันต์ที่เกิดจากการย่อยสลายพีนานทรินของแบคทีเรียหลายสกุล (Evans *et al.*, 1965; Kiyohara *et al.*, 1976)

(ก) สารมัธยันต์ที่พบในกลุ่ม product 4



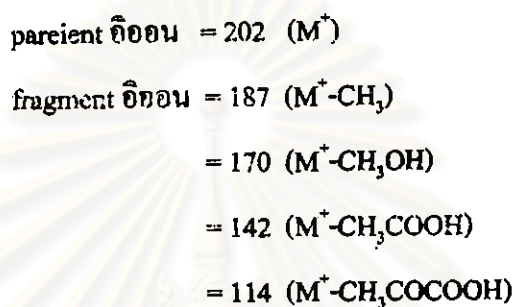
(ข) สารมาตรฐานกรด 1-ไฮดรอกซี-2-แนฟโธอิก



รูปที่ 4.36 $^1\text{H NMR}$ สเปกตรัมของสารมัธยันต์ที่พบในกลุ่ม product 4 ที่เกิดจากการย่อยสลาย ฟีนานทริน โดย *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ P2 (ก) เปรียบเทียบกับ สารมาตรฐานกรด 1-ไฮดรอกซี-2-แนฟโธอิก (ข)

4.7.3 ผลการพิสูจน์เอกลักษณ์สารมัธยันต์ด้วยวิธี GC-MS

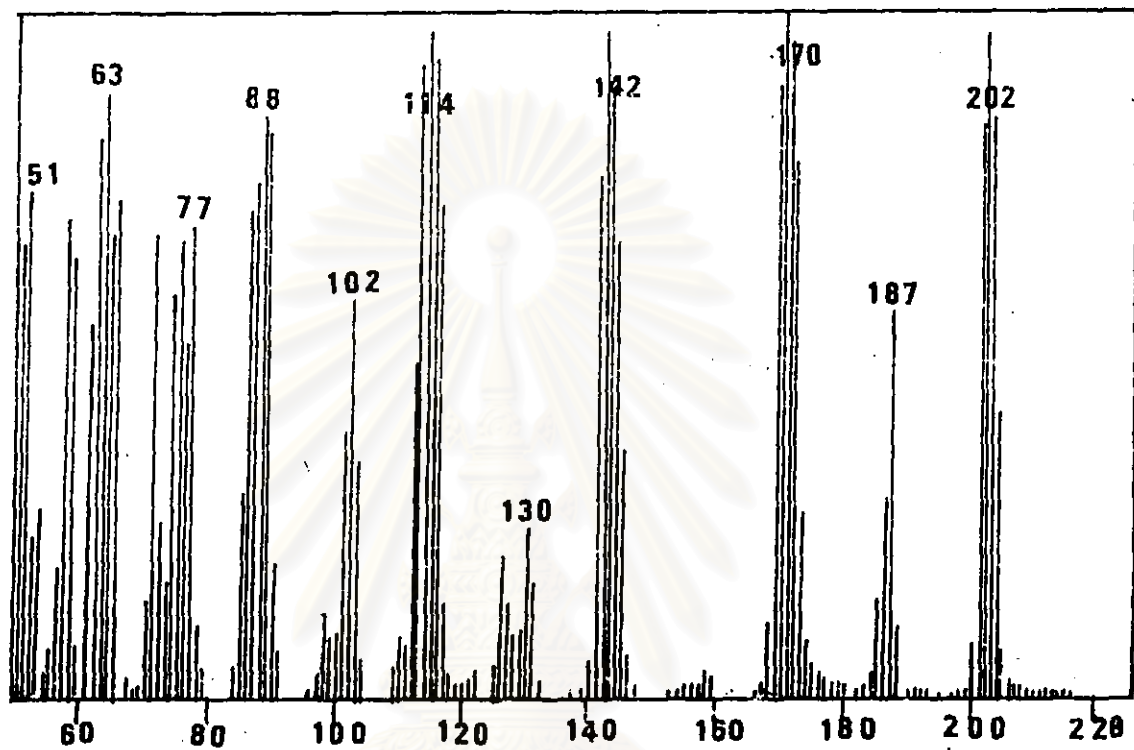
จากการพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารมัธยันต์ที่พบในกลุ่ม product 4 ด้วย GC-MS พบว่าแมสสเปกตรัมของสารมัธยันต์ที่พบในกลุ่ม product 4 มีรูปแบบในการแตกตัว (fragmentation patterns) ของ fragment ที่มีค่า m/z ดังแสดงไว้ในรูปที่ 4.37 ดังนี้



ซึ่งจากการพิสูจน์เอกลักษณ์ที่ได้พบว่ามีค่า m/z (M^+) และรูปแบบในการแตกตัวของ product 4 เป็นลักษณะเฉพาะตัวของสารมาตรฐานกรด 1-ไฮดรอกซี-2-เนฟโรอิก ที่รายงานไว้โดย Grifoll และคณะ (1995) ดังนั้นจึงสามารถยืนยันได้ว่าสารมัธยันต์ที่พบในกลุ่ม product 4 ที่เกิดจากการย่อยสลายฟิแนนทรินโดย *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ P2 คือกรด 1-ไฮดรอกซี-2-เนฟโรอิก

หมายเหตุ สำหรับสารมัธยันต์ในกลุ่ม product 1 product 2 และ product 3 ไม่สามารถทำการวิเคราะห์ด้วย GC MS ได้เนื่องจากมีปริมาณของสารน้อยเกินกว่าที่จะทำการวิเคราะห์ด้วยวิธีนี้ได้

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 4.37 แมสสเปกตรัมของสารมีรขันธ์ที่พบในกลุ่ม product 4 ที่ได้จากการย่อยสลายฟีนนทรีน

โดย *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ P2

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.8 ผลการศึกษาการย่อยสลายฟีนแอนทรินของ *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ P2 ในดิน

ดินที่นำมาใช้ในการทดลองเก็บมาจากบริเวณทุ่งนา อ.ท่าช้าง จ.เพชรบุรี โดยที่แหล่งดินนี้ไม่มีประวัติการปนเปื้อนจากสารเคมีมาก่อน ผลการวิเคราะห์ลักษณะทางกายภาพและองค์ประกอบทางเคมีของดินที่นำมาใช้ในการทดลองนี้ซึ่งทำการวิเคราะห์โดยฝ่ายวิจัยดิน กองเกษตรเคมี กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ บางเขน กรุงเทพฯ ได้แสดงไว้ในตารางที่ 4.11

ตารางที่ 4.11 ลักษณะทางกายภาพและองค์ประกอบทางเคมีของดินที่นำมาใช้ในการทดลองการย่อยสลายฟีนแอนทรินของ *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ P2 ในดิน

พารามิเตอร์	ผลการวิเคราะห์*
ลักษณะเนื้อดิน	ดินร่วนเหนียว (clay loam)
ทราย	32%
โคลน	38%
ดินเหนียว	30%
ปริมาณสารอินทรีย์	4.03%
ปริมาณสารอินทรีย์คาร์บอน	2.34%
ปริมาณไนโตรเจน	0.20%
ปริมาณฟอสเฟต	66 (ppm)
ความเป็นกรดค่า	6.9
ความสามารถในการแลกเปลี่ยนประจุและอออน	13.0 me/100 กรัม
ความจุสูงสุดในการอุ้มน้ำ	50.18%

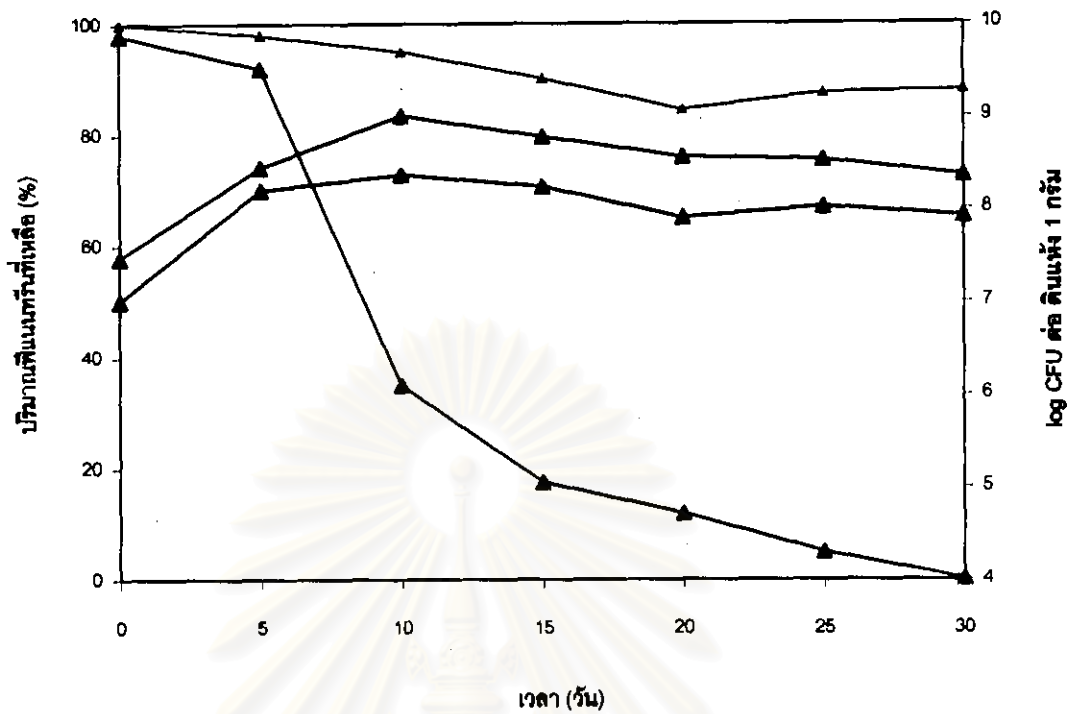
หมายเหตุ : **ทำการวิเคราะห์โดยฝ่ายวิจัยดิน กองเกษตรเคมี กระทรวงเกษตรและสหกรณ์

4.8.1 รูปแบบในการย่อยสลายฟิเนนทรินของ *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ P2 ในชุดดินปลอดเชื้อ

Sphingomonas sp. สายพันธุ์ P2 สามารถเพิ่มจำนวนจาก 2.9×10^7 CFU ต่อดิน 1 กรัม ไปเป็น 1.0×10^8 CFU ต่อดิน 1 กรัม หลังจากการทดลองเป็นเวลา 10 วันและจากการนับจำนวนแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายฟิเนนทรินได้โดยการนับจำนวนโคโลนีที่มีบริเวณใสล้อมรอบบนอาหารแข็ง MM ที่ปนทับผิวหน้าด้วยฟิเนนทรินพบว่ามีความเพิ่มขึ้นจาก 1×10^7 CFU ต่อดิน 1 กรัม ในวันแรกของการทดลองเพิ่มจำนวนเป็น 2.4×10^8 CFU ต่อดิน 1 กรัม ดังแสดงในรูปที่ 4.38 สำหรับการหาปริมาณฟิเนนทรินที่เหลืออยู่ในดินพบว่าปริมาณฟิเนนทรินในชุดควบคุมที่ไม่มีการเติมเชื้อจะลดลงเหลือประมาณ 88% หลังสิ้นสุดการทดลองเป็นเวลา 30 วัน ในขณะที่ชุดทดลองที่เติม *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ P2 ลงไปจะพบว่าปริมาณฟิเนนทรินลดลงอย่างรวดเร็วโดยจะเหลืออยู่เพียง 0.15% หลังจกสิ้นสุดการทดลองเป็นเวลา 30 วัน

หมายเหตุ ปริมาณโคเอทธิลอีเทอร์มีผลต่อจำนวน *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ P2 โดยเมื่อหลังการปนทับหน้าอาหารแข็งด้วยสารละลายฟิเนนทรินในเอทธิลอีเทอร์ จำนวนแบคทีเรียจะลดลงโดยเฉลี่ยประมาณ 5 % ของจำนวนแบคทีเรียทั้งหมด

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



- ▲— ปริมาณฟิแชนทรินควบคุม
- ▲— ปริมาณฟิแชนทรินเดิมนำเข้า
- ▲— จำนวนแบคทีเรียทั้งหมด
- ▲— จำนวนแบคทีเรียที่ย่อยสลายฟิแชนทริน

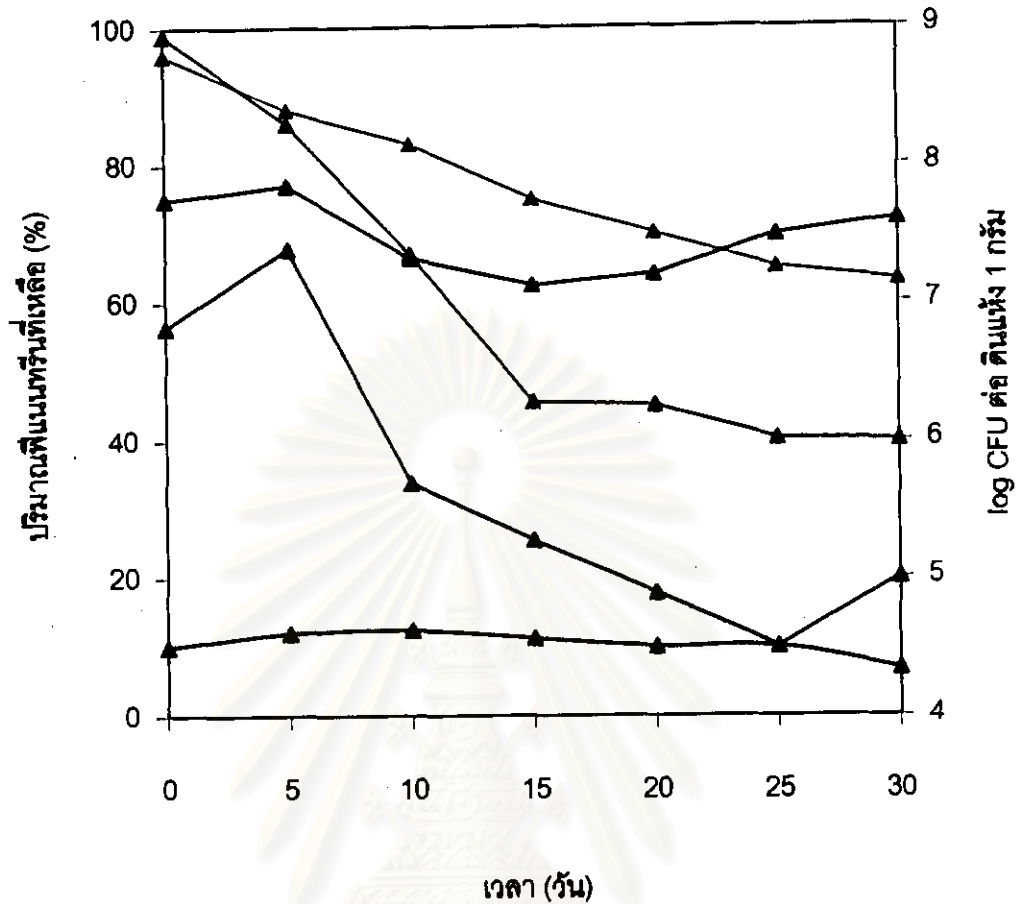
สถาบันวิทยบริการ

รูปที่ 4.38 รูปแบบในการย่อยสลายฟิแชนทรินของ *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ P2 ในดินปลูกเชื้อ

4.8.2 รูปแบบในการย่อยสลายฟิแนนทรินของ *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ P2 ในชุดดินไม่ปลอดเชื้อ

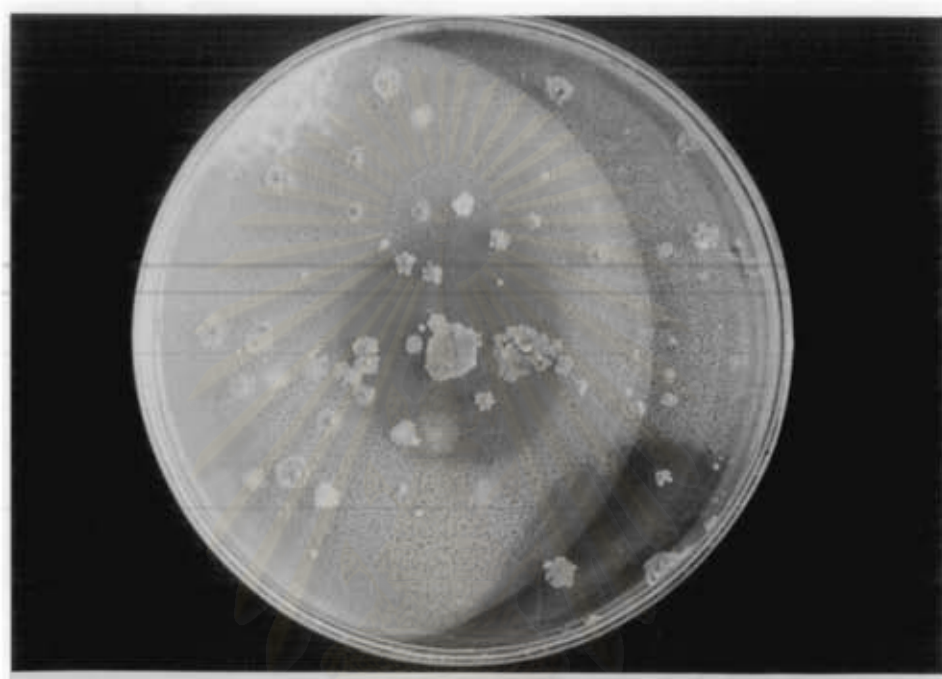
จากการนับจำนวนเชื้อทั้งหมดที่เจริญบนอาหารแข็ง LB พบว่าแบคทีเรียจะมีจำนวนค่อนข้างคงที่โดยที่มีจำนวนเริ่มต้น 5.7×10^7 CFU ต่อดิน 1 กรัม และเมื่อสิ้นสุดการทดลองเป็นเวลา 30 วันจะมีจำนวนแบคทีเรียทั้งหมด 4×10^7 CFU ต่อดิน 1 กรัม ในขณะที่จำนวนแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายฟิแนนทรินได้ซึ่งนับจากจำนวนโคโลนีที่มีบริเวณไฮบนอาหารแข็ง MM ที่พื้นที่ผิวหน้าด้วยฟิแนนทรินจะมีจำนวนลดลงอย่างรวดเร็วจาก 6.5×10^6 CFU ต่อดิน 1 กรัม เหลือ 1.0×10^5 CFU ต่อดิน 1 กรัม เมื่อสิ้นสุดการทดลองเป็นเวลา 30 วัน โดยพบว่าจำนวนจะลดลงต่ำที่สุดประมาณ 3.2×10^4 CFU ต่อดิน 1 กรัม ดังแสดงในรูปที่ 4.39 แต่อย่างไรก็ตามสำหรับการตรวจหาปริมาณฟิแนนทรินที่อยู่ในดินพบว่าในชุดการทดลองที่ใช้ดินไม่ปลอดเชื้อและไม่เติม *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ P2 ลงไปจะมีฟิแนนทรินเหลืออยู่ประมาณ 63.1% ในขณะที่ชุดการทดลองที่ใช้ดินไม่ปลอดเชื้อที่เติม *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ P2 ลงไปมีฟิแนนทรินเหลืออยู่ 40.0% หลังจากสิ้นสุดการทดลองเป็นเวลา 30 วัน จากผลการทดลองที่ได้แสดงให้เห็นว่า *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ P2 สามารถเพิ่มอัตราการย่อยสลายฟิแนนทรินในดินไม่ปลอดเชื้อให้เพิ่มขึ้นได้ 23.1% เมื่อเปรียบเทียบกับการย่อยสลายฟิแนนทรินของแบคทีเรียท้องถิ่นเพียงอย่างเดียว จากการพิจารณาลักษณะโคโลนีของแบคทีเรียที่สามารถสร้างบริเวณไฮบนอาหารแข็ง MM พบว่ามีโคโลนีจำนวนมากที่มีลักษณะแตกต่างไปจากโคโลนีของ *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ P2 ดังแสดงไว้ในรูปที่ 4.40 เมื่อพิจารณาผลการทดลองที่ได้จากการนับจำนวนแบคทีเรียในชุดการทดลองที่ใช้ดินไม่ปลอดเชื้อและเติม *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ P2 ลงไป พบว่าจำนวนแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายฟิแนนทรินได้จะเพิ่มจำนวนขึ้นอย่างรวดเร็วจากที่ไม่พบเลยในวันแรกของการทดลองเพิ่มขึ้นเป็น 2×10^5 CFU ต่อดิน 1 กรัม หลังจากสิ้นสุดการทดลองเป็นเวลา 30 วัน ดังแสดงผลการทดลองในรูปที่ 4.41

สำหรับการนับจำนวนประชากรเชื้อราจะพบว่าจำนวนประชากรเชื้อราในชุดการทดลองที่ใช้ดินไม่ปลอดเชื้อและเติม *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ P2 จะมีจำนวนคงที่อยู่ระหว่าง 3×10^4 CFU ต่อดิน 1 กรัม และในชุดการทดลองที่ใช้ดินไม่ปลอดเชื้อซึ่งไม่ได้เติม *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ P2 ลงไปจะมีจำนวนเชื้อราคงที่อยู่ระหว่าง 1×10^4 CFU ต่อดิน 1 กรัม ตลอดระยะเวลาการทดลองเป็นเวลา 30 วัน



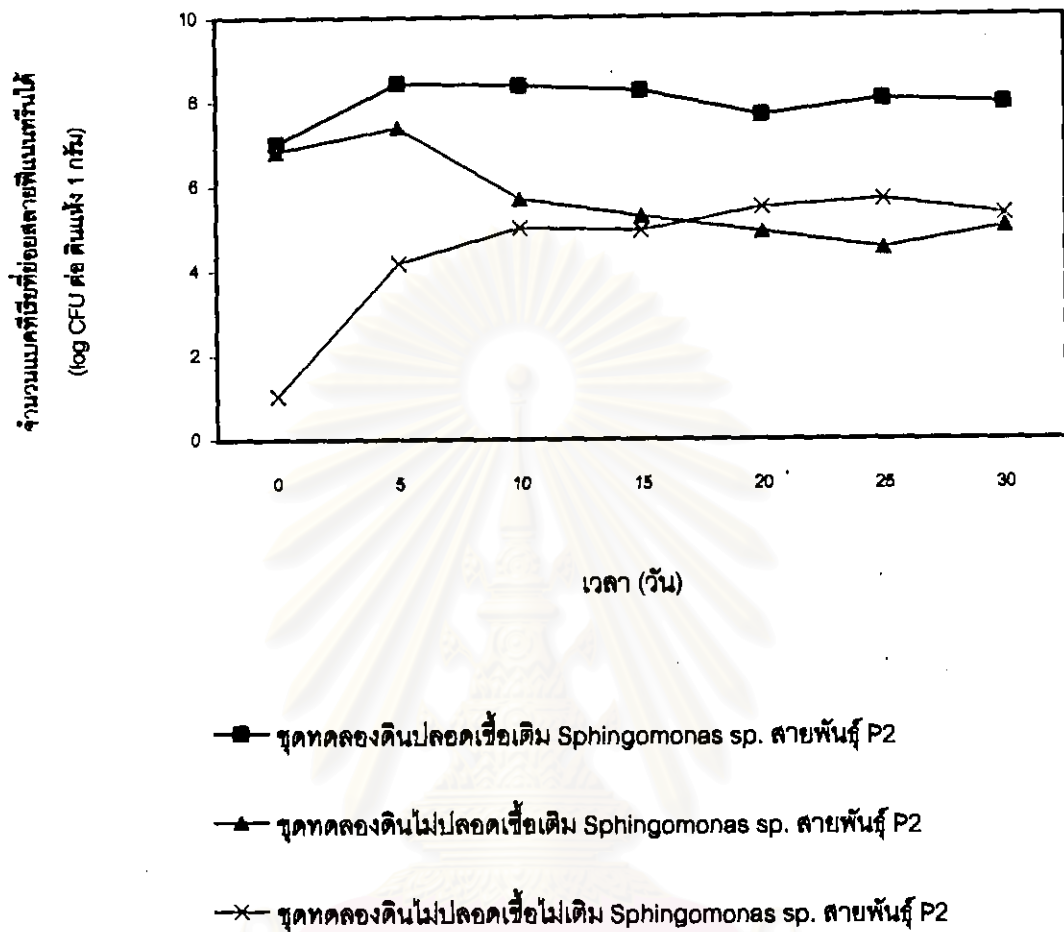
- ▲ ปริมาณพีแนนทรีนควบคุม
- ▲ ปริมาณพีแนนทรีนเดิมเชื้อ
- ▲ จำนวนแบคทีเรียทั้งหมด
- ▲ จำนวนแบคทีเรียที่ย่อยสลายพีแนนทรีน
- ▲ จำนวนเชื้อรา

รูปที่ 4.39 รูปแบบในการย่อยสลายพีแนนทรีนของ *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ P2 ในดินไม่ปลอดเชื้อ



รูปที่ 4.40 ลักษณะ โคลินิจของแบคทีเรียท้องถิ่นบางชนิดที่สร้างบริเวณโทรอบโคโลนิบนอาหารแข็ง MM

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



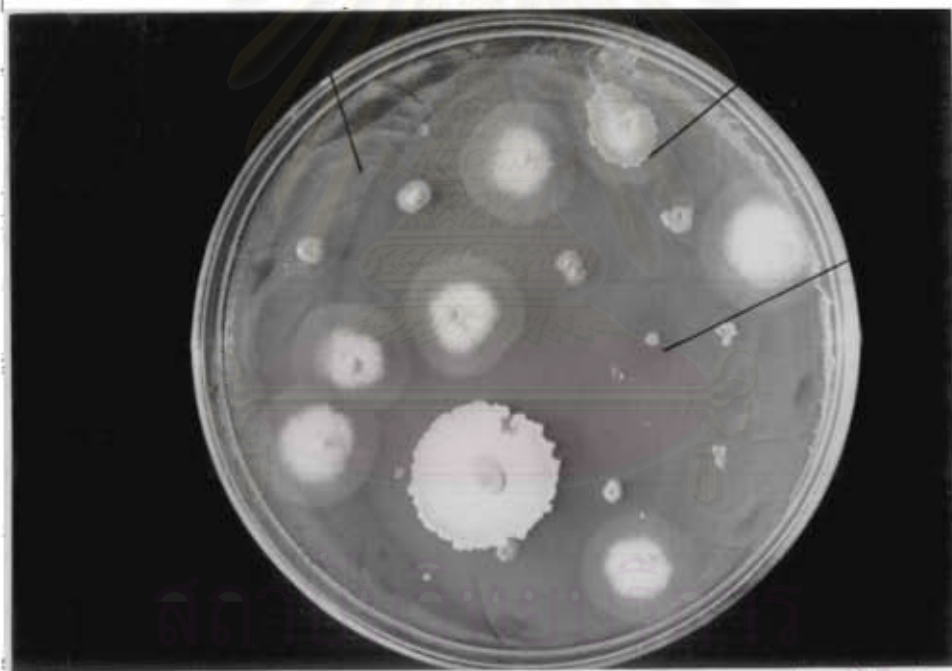
รูปที่ 4.41 จำนวนแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายฟิแนนทรินได้ในชุดการทดลองต่างๆ ระหว่างการทดลองการย่อยสลายฟิแนนทรินในดิน

4.8.3 ผลการคัดแยกแบคทีเรียที่เรืองดินที่ตามมาด้วยการเจริญของ *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ P2 ในดิน

ผลการคัดแยกแบคทีเรียที่เรืองดินพบว่าแบคทีเรียที่เรืองดินบางสายพันธุ์สามารถสร้างบริเวณใสล้อมรอบ โคลีนีนบนผิวหน้าอาหารแข็ง LB ที่เกิดขึ้นด้วย *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ P2 โดยบริเวณใสที่เกิดขึ้นมีบริเวณยับยั้งประมาณ 1-3 มม. ดังแสดงในรูปที่ 4.42

Sphingomonas sp. สายพันธุ์ P2

แบคทีเรียที่เรืองดิน



บริเวณยับยั้ง

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 4.42 ลักษณะ โคลีนีนแบคทีเรียที่สร้างบริเวณใสล้อมรอบ โคลีนีนบนผิวหน้าอาหารแข็ง LB ที่เกิดขึ้นด้วย *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ P2