หอสมุดกลาง ศูนย์วิทยทรัพยากร จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 4

ผลการทดลอง

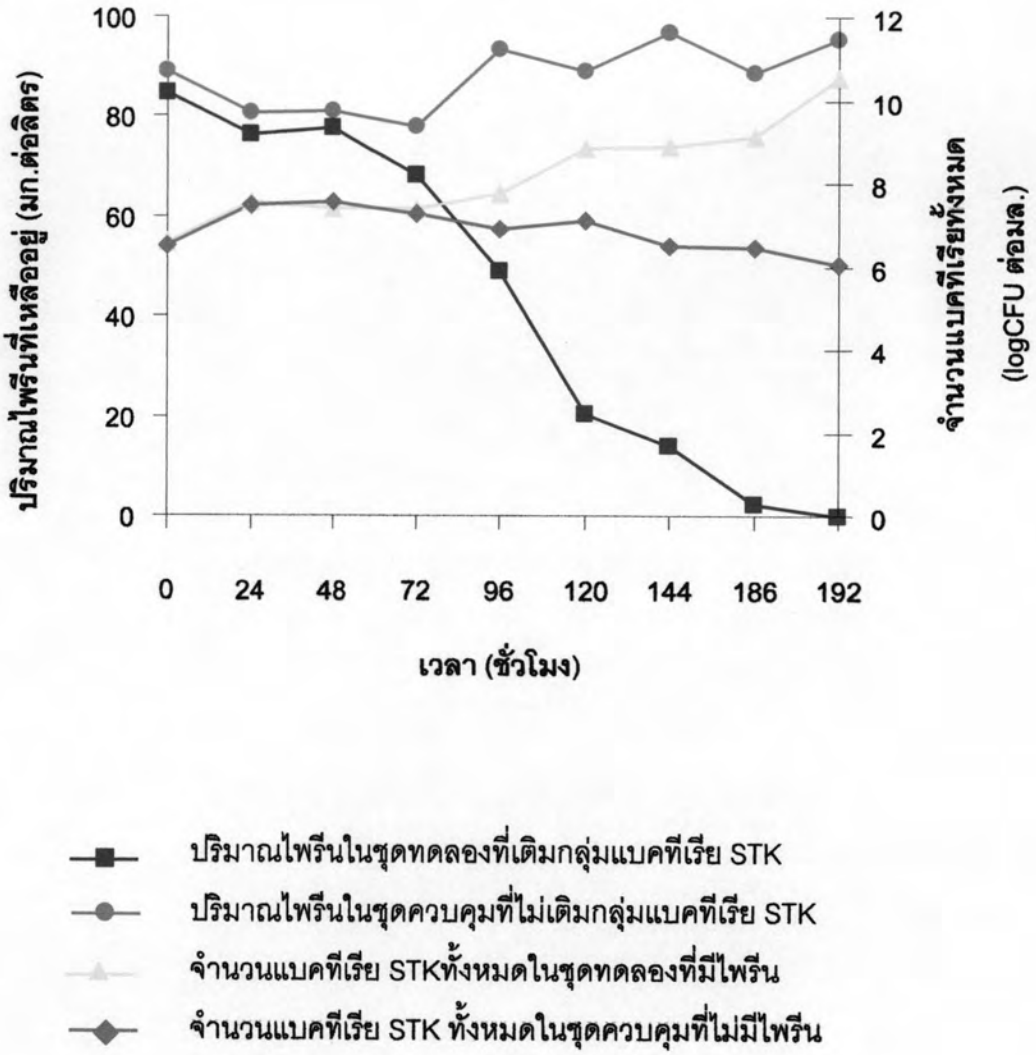
4.1 รูปแบบการเจริญและความสามารถในการย่อยสลายไพรีนโดยกลุ่มแบคทีเรีย STK

จากผลงานวิจัยของทิมากร แสงดำ(2547) ซึ่งคัดแยกกลุ่มแบคทีเรีย STK จากปุ๋ยหมักใบมะขามที่มีไพรีนเป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงาน พบว่ากลุ่มแบคทีเรียนี้สามารถย่อยสลายไพรีนได้อย่างมีประสิทธิภาพ รวมทั้งมีจำนวนเซลล์ของแบคทีเรียเพิ่มขึ้นด้วย โดยจะสังเกตเห็นว่าเมื่อมีการเจริญของแบคทีเรียจะทำให้ผลึกสีขาวที่แขวนลอยอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ CFMM เปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลอ่อนและไม่มีผลึกของไพรีน ทำให้อาหารเลี้ยงเชื้อใสขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับชุดทดลอง รูปที่ 4.1 นอกจากนี้ยังพบว่ามีการสะสมสารมัธยันตร์เกิดขึ้นในระหว่างการย่อยสลายไพรีน

ดังนั้นในเบื้องต้นงานวิจัยนี้จึงศึกษารูปแบบการเจริญและความสามารถในการย่อยสลายไพรีนของกลุ่มแบคทีเรีย STK รวมทั้งวิเคราะห์สารมัธยันตร์ที่เกิดขึ้น โดยเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว CFMM ที่มีไพรีนความเข้มข้น 100 มก.ต่อลิตร และติดตามการเจริญของแบคทีเรียควบคู่ไปกับการวิเคราะห์ปริมาณไพรีนที่เหลือและสารมัธยันตร์ที่เกิดขึ้นด้วย HPLC ทุก 24 ชั่วโมง เป็นเวลา 8 วัน พบว่ารูปแบบการเจริญและความสามารถในการย่อยสลายไพรีนของกลุ่มแบคทีเรีย STK ดังแสดงผลการทดลองในรูปที่ 4.2

Ctrl PYR PYR test

รูปที่ 4.1 ลักษณะอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM เมื่อมีการย่อยสลายไพรีนโดยกลุ่มแบคทีเรีย STK (PYR test) เปรียบเทียบกับชุดควบคุม (PYR Ctrl)



รูปที่ 4.2 ลักษณะการเจริญและการย่อยสลายไพรีนของกลุ่มแบคทีเรีย STK ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM ที่มีไพรีนความเข้มข้น 100 มก.ต่อลิตร

จากรูปที่ 4.2 จะเห็นว่าปริมาณไพรีนลดลงจนไม่สามารถตรวจพบได้ภายในเวลา 8 วัน โดยในช่วง 3 วันแรกของการทดลองปริมาณไพรีนที่เหลืออยู่มีการเปลี่ยนแปลงเพียงเล็กน้อยและแบคทีเรียอยู่ในระยะปรับตัว (lag phase) ซึ่งจำนวนแบคทีเรียเพิ่มขึ้นจาก 6.59 log CFU ต่อมล. เป็น 7.39 log CFU ต่อมล. ในขณะที่ชุดควบคุมจำนวนแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่เติมแหล่งคาร์บอนและพลังงาน พบว่าจำนวนแบคทีเรียเพิ่มขึ้นในช่วงต้นของการทดลอง จากนั้นจึงเข้าสู่ระยะคงที่และลดลงในช่วงปลายของการทดลอง สำหรับชุดควบคุมปริมาณไพรีนซึ่งไม่มีการเติมกลุ่มเชื้อแบคทีเรีย STK นั้น ไม่พบการเปลี่ยนแปลงปริมาณไพรีน

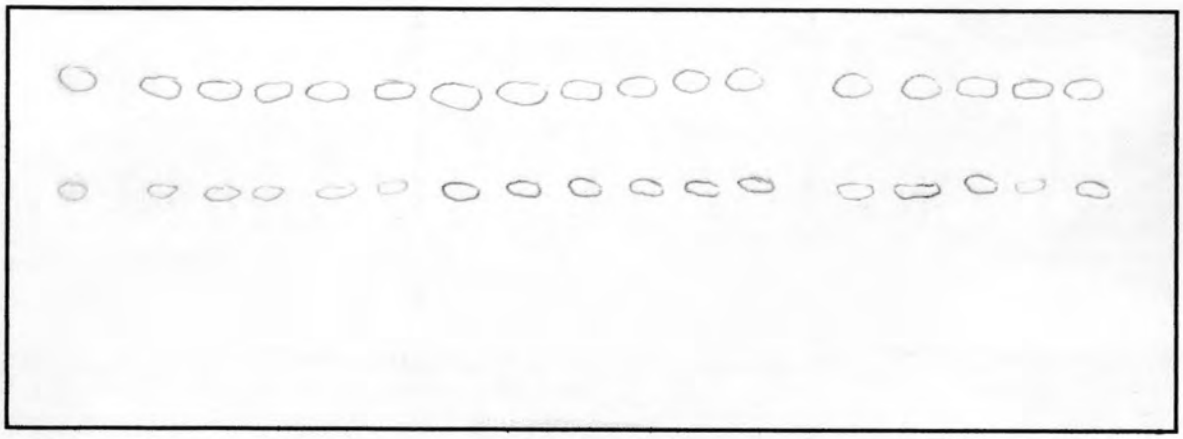
หลังจากวันที่ 3 ของการทดลองพบการย่อยสลายไพรีนเกิดขึ้นอย่างรวดเร็วเมื่อเทียบกับที่เวลาเริ่มต้น ปริมาณไพรีนลดลงเหลือเพียง 20.64 มก.ต่อลิตรและไพรีนที่เหลือจะถูกย่อยสลายต่อไป จนไม่สามารถตรวจพบไพรีนในวันที่ 8 เมื่อพิจารณาการเจริญของกลุ่มแบคทีเรีย STK เห็นได้ว่าการเจริญสอดคล้องกับปริมาณไพรีนที่ลดลง กล่าวคือ การเจริญของกลุ่มแบคทีเรีย STK จะเพิ่มจำนวนอย่างรวดเร็วหลังจากวันที่ 3 ของการทดลอง โดยจำนวนแบคทีเรียเพิ่มจาก 7.39 log CFU ต่อมล.ในวันที่ 4 เป็น 9.53 log CFU ต่อมล.ในวันที่ 8

4.2 วิเคราะห์สารมัธยันตร์ที่สะสมจากการย่อยสลายไพรีนโดยกลุ่มแบคทีเรีย STK ด้วย TLC และ HPLC

คัดเลือกระยะเวลาที่เหมาะสมสำหรับการสกัดสารมัธยันตร์โดยหาระยะเวลาในการเลี้ยงเชื้อที่มีสารมัธยันตร์สะสมปริมาณสูงที่สุด เพื่อใช้ในการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียในระดับขยายส่วนและมีปริมาณเพียงพอสำหรับการแยกสารให้บริสุทธิ์ รวมทั้งการศึกษาลักษณะสมบัติของสารมัธยันตร์ในการทดลองขั้นต่อไป

การศึกษาขั้นตอนนี้ทำโดยติดตามการย่อยสลายไพรีนโดยกลุ่มแบคทีเรีย STK ในอาหารเหลว CFMM แล้วติดตามวิเคราะห์สารมัธยันตร์ที่เกิดขึ้นทุก 12 ชั่วโมง เป็นเวลา 8 วัน ด้วยวิธี TLC และ HPLC ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 4.3 และ 4.4 ตามลำดับ

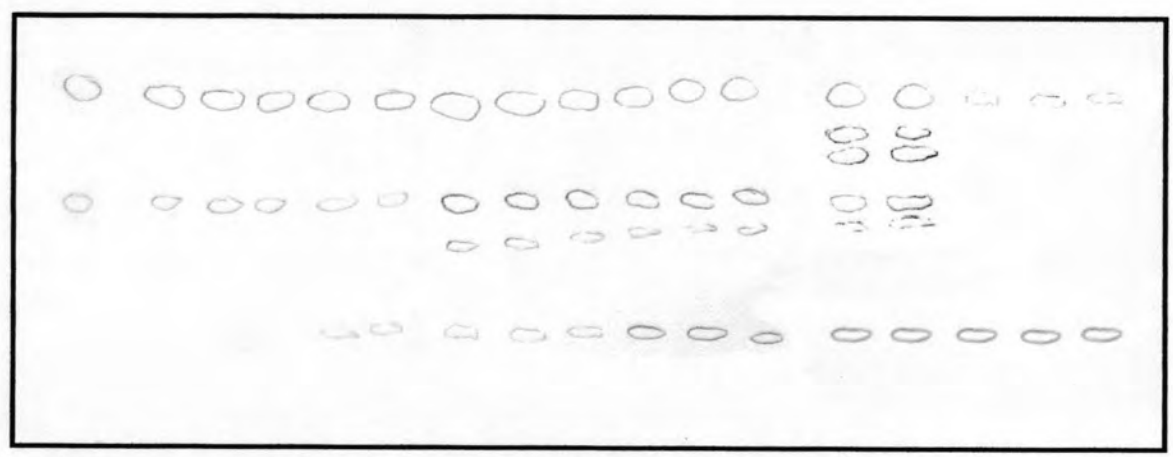
ก.



ไพรีน 0 12 24 36 48 60 72 84 96 108 120 132 144 156 168 192

เวลา (ชั่วโมง)

ข.



ไพรีน 0 12 24 36 48 60 72 84 96 108 120 132 144 156 168 192

เวลา (ชั่วโมง)

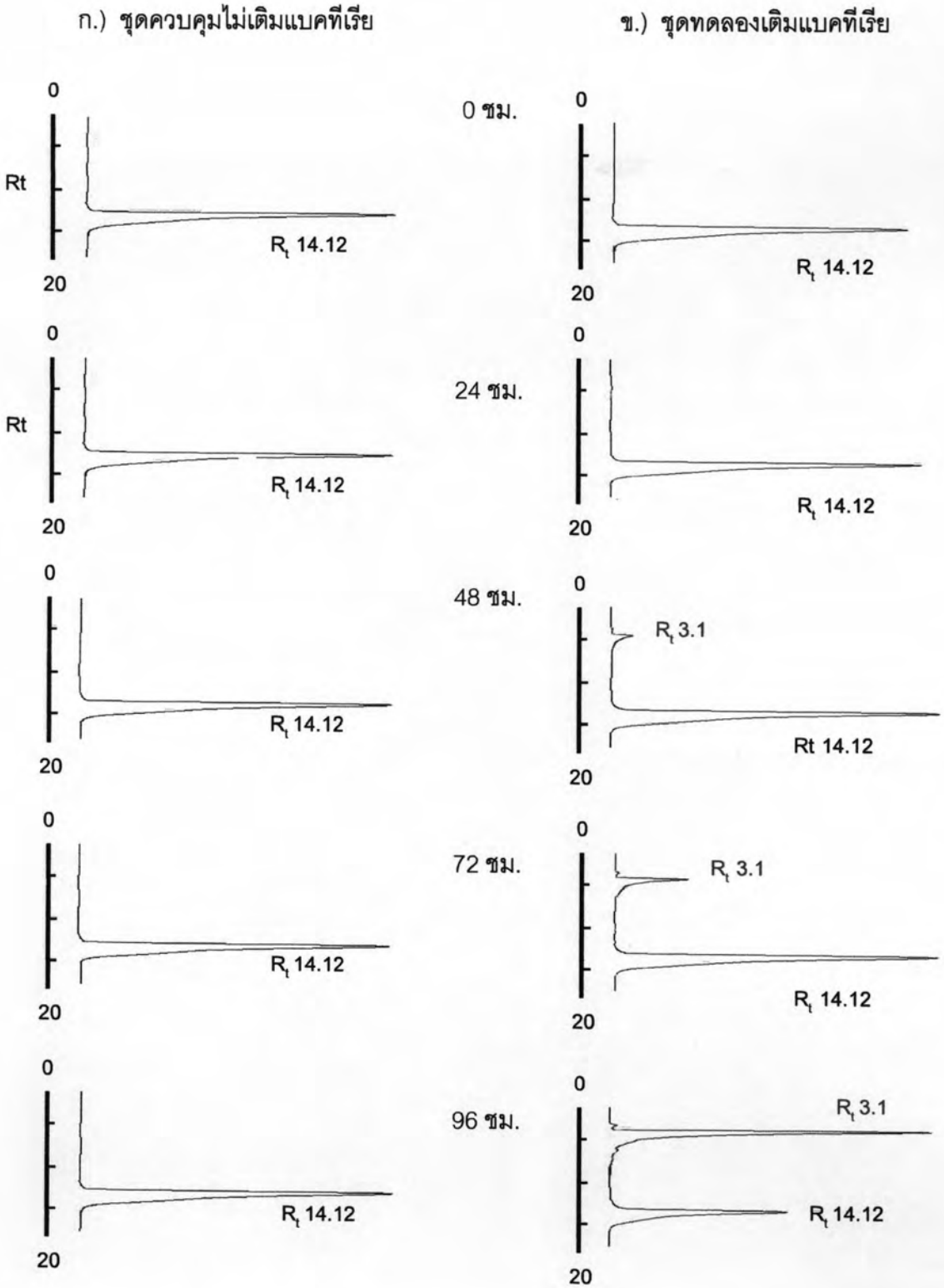
ระบบตัวทำละลาย : โทลูอีน : 1,4-ไดออกเซน : กรดอะซิติกเข้มข้น

: 90 : 25 : 0.4 (ปริมาตรต่อปริมาตร)

รูปที่ 4.3 โครมาโทแกรม TLC ของสารมัธยันตร์ที่สะสมจากการย่อยสลายไพรีนโดยกลุ่มแบคทีเรีย STK ที่เวลาต่างๆ ในอาหารเหลว CFMM

ก. ชุดควบคุมที่เติมไพรีน แต่ไม่เติมแบคทีเรีย

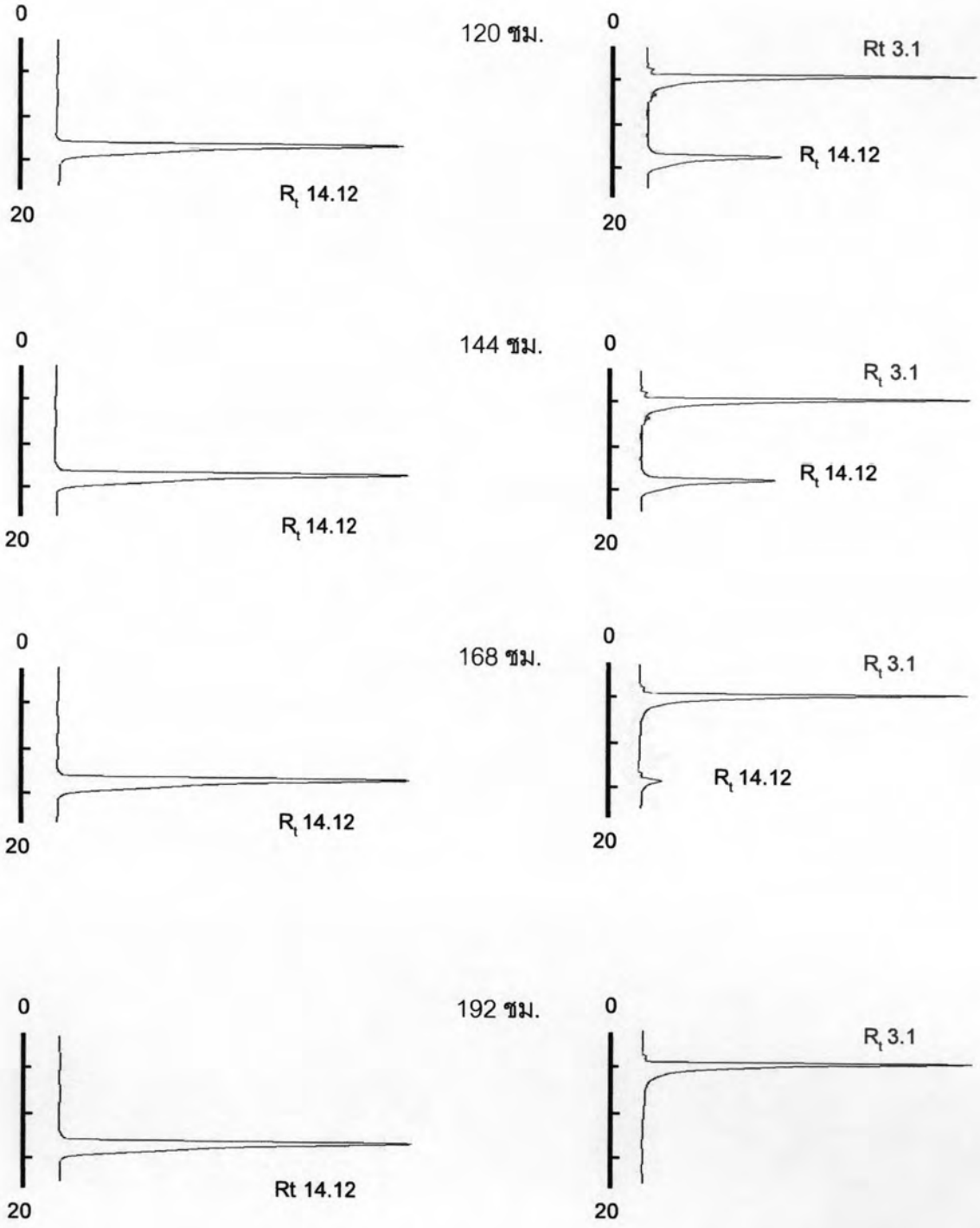
ข. ชุดทดลองเติมไพรีนและแบคทีเรีย



รูปที่ 4.4 โครมาโทแกรม HPLC จากการวิเคราะห์ปริมาณไพรีนและสารมัธยันตร์ที่เกิดขึ้นจากการย่อยสลายไพรีนโดยกลุ่มแบคทีเรีย STK หลังจากเลี้ยงเชื้อที่เวลาต่างๆ (R_t 14.12 นาทีคือไพรีน)

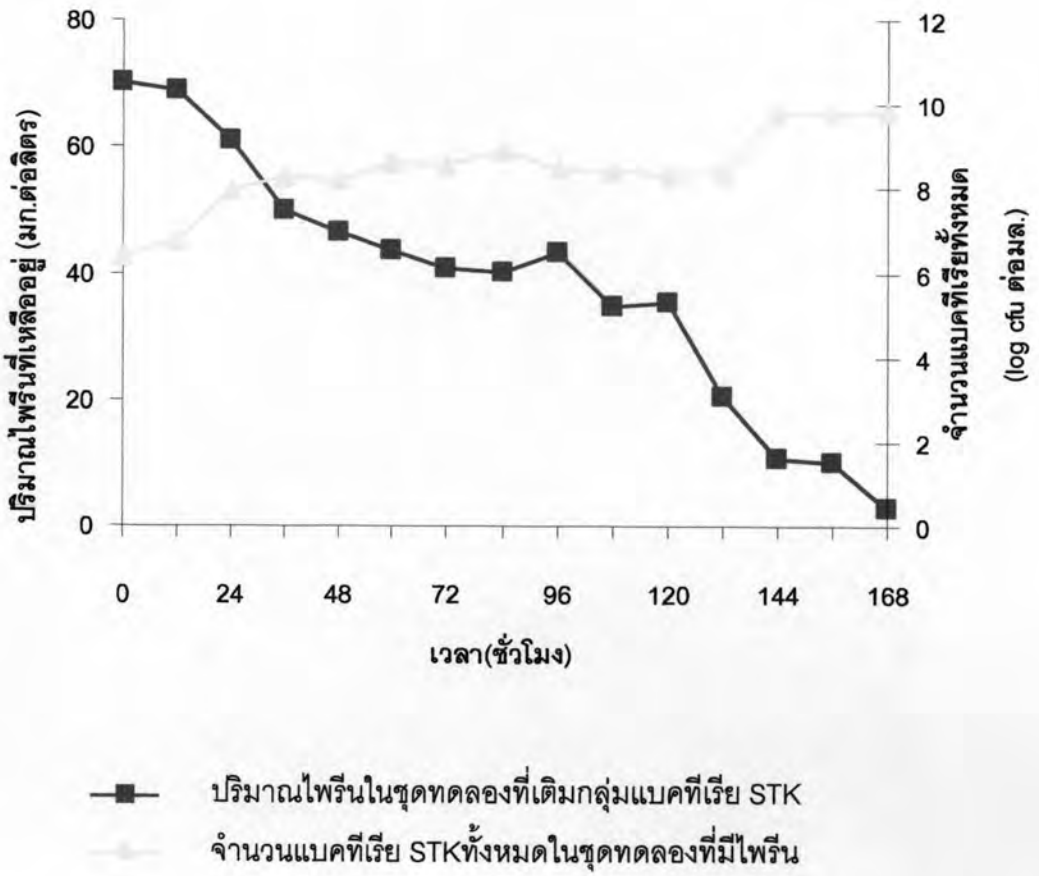
ก.) ชุดควบคุมไม่เติมแบคทีเรีย

ข.) ชุดทดลองเติมแบคทีเรีย

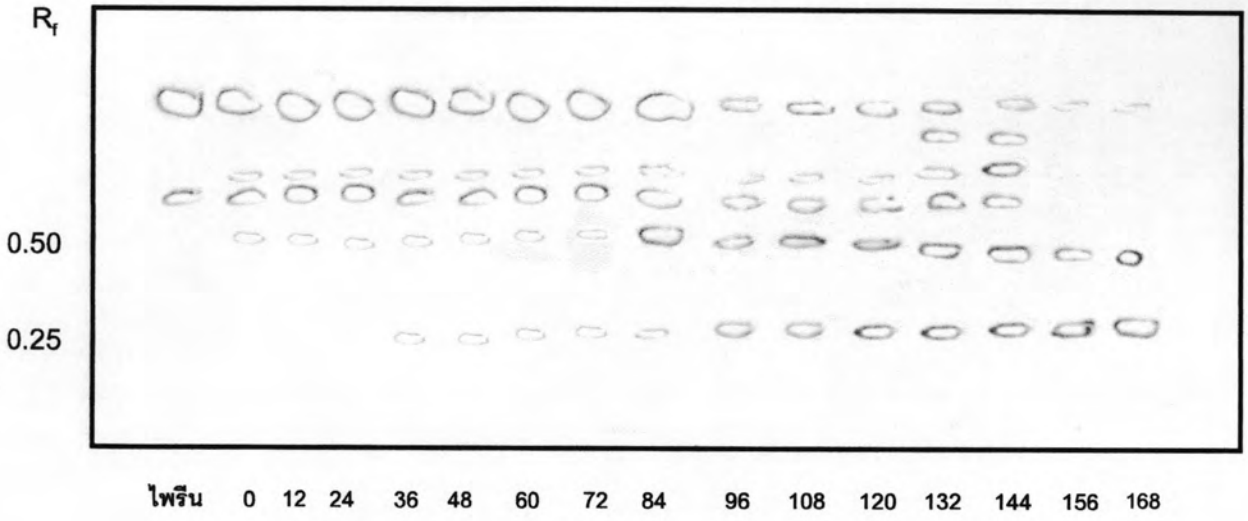


รูปที่ 4.4 (ต่อ) โครมาโทแกรม HPLC จากการวิเคราะห์ปริมาณไพรีนและสารมัธยันตร์ที่เกิดขึ้นจากการย่อยสลายไพรีนโดยกลุ่มแบคทีเรีย STK หลังจากเลี้ยงเชื้อที่เวลาต่าง ๆ (R_t 14.12 นาทีคือไพรีน)

เพื่อให้ได้ปริมาณสารมัธยันตร์ในปริมาณเพียงพอต่อการนำไปวิเคราะห์ในขั้นตอนต่อไปของการทดลอง จึงทำการเลี้ยงเชื้อในถังหมักขนาด 2 ลิตร ที่มีการปรับสภาวะการเจริญของเชื้อตามวิธีการทดลองในข้อ 3.3.1 จากรูปที่ 4.5 จะเห็นว่าการย่อยสลายไพรีนในถังหมักขนาด 2 ลิตร เกิดขึ้นอย่างสมบูรณ์ภายใน 7 วัน ซึ่งการเลี้ยงเชื้อในถังหมักนี้ ไม่พบว่าแบคทีเรียมีช่วงระยะเวลาในการปรับตัว คือจำนวนแบคทีเรียเพิ่มขึ้นจาก 6.38 log CFU ต่อมล. ในวันที่ 0 เป็น 9.80 log CFU ต่อมล. ในวันที่ 7 ของการเลี้ยงเชื้อ และการย่อยสลายก็เกิดขึ้นอย่างต่อเนื่องจนไม่สามารถตรวจพบว่ามีไพรีนเหลืออยู่ได้ในวันที่ 7 ของการเลี้ยงเชื้อ ซึ่งให้ลักษณะการเจริญและการย่อยสลายนี้เป็นไปในทางเดียวกันกับการเลี้ยงเชื้อในขวดชมพู่ขนาด 250 มล. ส่วนผลการวิเคราะห์สารมัธยันตร์ที่เกิดขึ้นภายในถังหมักด้วย TLC และ HPLC แสดงดังรูปที่ 4.6 และ 4.7 ตามลำดับ

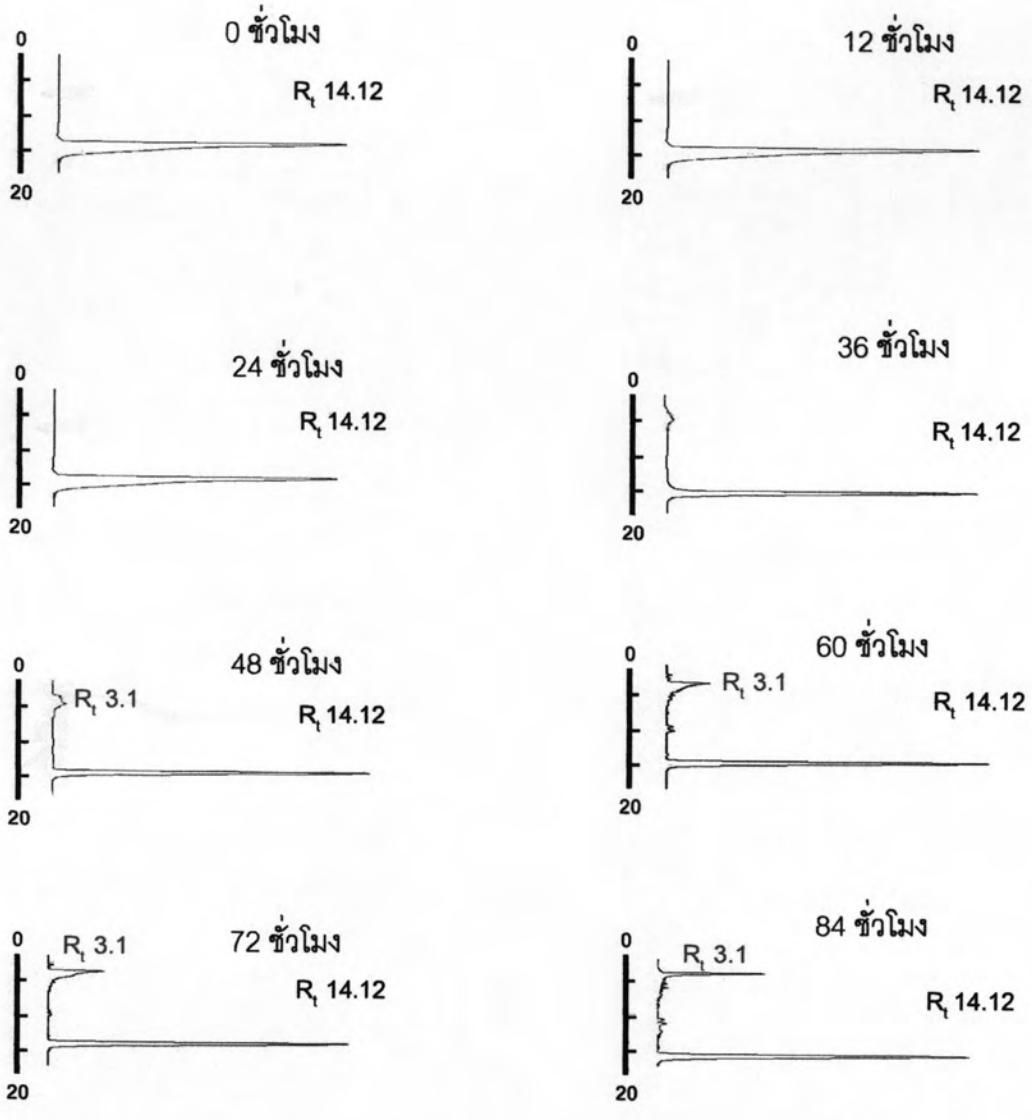


รูปที่ 4.5 ลักษณะการเจริญและการย่อยสลายไพรีนของกลุ่มแบคทีเรีย STK ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM ที่มีไพรีนความเข้มข้น 100 มก.ต่อลิตร ที่เกิดขึ้นในถังหมักขนาด 2 ลิตร

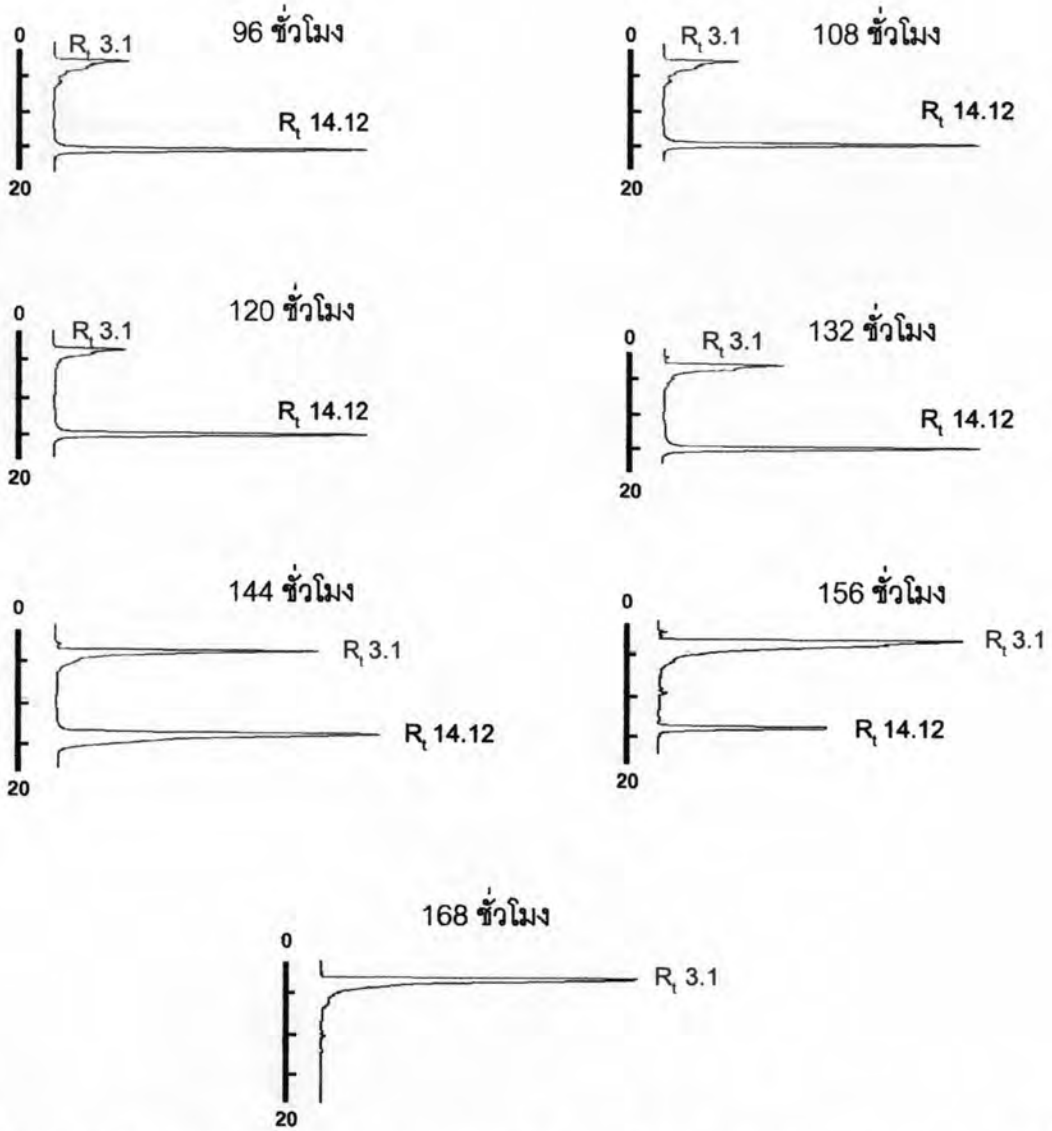


ระบบตัวทำละลาย : โทลูอีน : 1,4-ไดออกเซน : กรดอะซิติกเข้มข้น
: 90 : 25 : 0.4 (ปริมาตรต่อปริมาตร)

รูปที่ 4.6 TLC โครมาโทแกรมของสารมัธยันตร์ที่สะสมจากการย่อยสลายไพรีนโดยกลุ่มแบคทีเรีย STK ที่เวลาต่างๆ ในอาหารเหลว CFMM ที่เกิดขึ้นในถังหมักขนาด 2 ลิตร



รูปที่ 4.7 HPLC โครมาโทแกรมจากการวิเคราะห์ปริมาณไพรีนและสารมัธยันตร์ที่เกิดขึ้นจากการย่อยสลายไพรีนโดยกลุ่มแบคทีเรีย STK ในถังหมักขนาด 2 ลิตร หลังจากเลี้ยงเชื้อที่เวลาต่างๆ (R_t 14.12 นาทีคือไพรีน)



รูปที่ 4.7 (ต่อ) โครมาโทแกรม HPLC จากการวิเคราะห์ปริมาณไพรีนและสารมัธยันตร์ที่เกิดขึ้นจากการย่อยสลายไพรีนโดยกลุ่มแบคทีเรีย STK ในถังหมักขนาด 2 ลิตร หลังจากเลี้ยงเชื้อที่เวลาต่างๆ (R_t 14.12 นาทีคือไพรีน)

จากผลการวิเคราะห์ด้วย TLC และ HPLC จากการเลี้ยงกลุ่มแบคทีเรีย STK ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มล. พบสารหลายชนิดที่สกัดได้จากอาหารเหลว CFMM (รูปที่ 4.3 ข. 4.4 ข.) เมื่อพิจารณา HPLC โครมาโทแกรมพบว่าในชุดทดลอง ไพรีนถูกย่อยสลายอย่างมีประสิทธิภาพ โดยตรวจไม่พบสารดังกล่าวภายหลังจากการเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 192 ชั่วโมง (8 วัน) และในช่วงระยะเวลาดังกล่าวมีสารมัธยันตร์ที่มีค่า R_t เท่ากับ 3.1 นาที ปรากฏขึ้นภายหลังจากการเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 48 ชั่วโมง (2 วัน) และสารดังกล่าวสะสมและเพิ่มปริมาณขึ้นจนกระทั่งมีปริมาณสูงสุดในช่วงเวลาที่

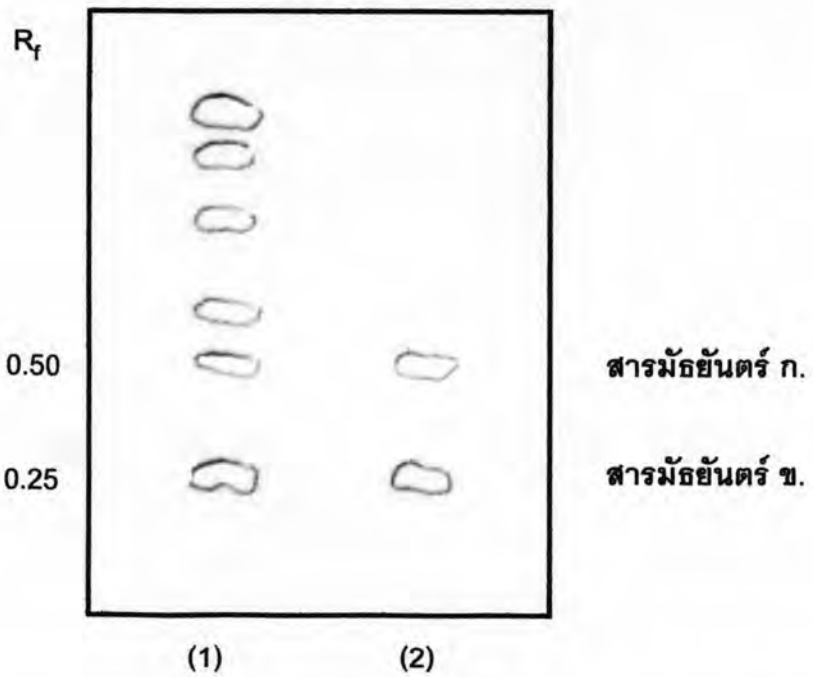
168-192 ชั่วโมง (วันที่ 7-8) ของการทดลอง ซึ่งจะสังเกตเห็นว่าสารนี้จะสะสมในปริมาณมากที่สุดเมื่อปริมาณไพรีนหมด (ไม่สามารถตรวจพบสารดังกล่าวได้) ส่วน TLC โครมาโทแกรม พบสารมัธยันตร์ที่มีค่า R_f เท่ากับ 0.25 โดยเริ่มพบสารดังกล่าวในชั่วโมงที่ 48 (วันที่ 2) ของการทดลอง และความเข้มของจุด (spot) ของสารบน TLC โครมาโทแกรมเพิ่มขึ้นจนถึงชั่วโมงที่ 192 (วันที่ 8 ของการทดลอง) นอกจากนั้นชั่วโมงที่ 60 ของการเลี้ยงเชื้อ ยังพบสารมัธยันตร์ที่มีค่า R_f เท่ากับ 0.50 เกิดขึ้นช่วงระยะเวลาหนึ่งเท่านั้น เนื่องจากหลังจากชั่วโมงที่ 144 จนสิ้นสุดการทดลองตรวจไม่พบสารดังกล่าว จากผลการวิเคราะห์บน TLC โครมาโทแกรม ให้ผลสอดคล้องกับ HPLC โครมาโทแกรมในรูปที่ 4.3 ซึ่งตรวจพบสารมัธยันตร์ชนิดที่มีค่า R_t เท่ากับ 3.1 นาทีปริมาณมากสุดในชั่วโมงที่ 192 ของการเลี้ยงเชื้อเช่นเดียวกัน โดยพิจารณาจากพื้นที่ใต้กราฟ แต่จากผลการวิเคราะห์ด้วย HPLC นั้น ปรากฏพีค (peak) ของสารมัธยันตร์เพียงยอดเดียว ขณะที่ผลจากการวิเคราะห์ด้วย TLC พบสารมากกว่า 1 ชนิด แสดงว่าภาวะที่ใช้แยกสารโดย HPLC ยังไม่เหมาะสม และสารมัธยันตร์ที่ได้จึงยังไม่บริสุทธิ์ ดังนั้นขั้นตอนต่อไปของการทดลองจึงเป็นการทำสารมัธยันตร์ให้บริสุทธิ์บางส่วนเพื่อนำไปพิสูจน์เอกลักษณ์ต่อไป

สำหรับผลการวิเคราะห์ตัวอย่างในถังหมักขนาด 2 ลิตร แสดงในรูปที่ 4.6 และ 4.7 ให้ผลของสารมัธยันตร์ใกล้เคียงกับการเลี้ยงเชื้อในขวดรูปชมพู่ทั้งการวิเคราะห์ด้วย TLC และ HPLC โดยผลจากการวิเคราะห์ด้วย TLC พบสารมัธยันตร์ที่มีค่า R_f เท่ากับ 0.25 และ 0.50 เช่นเดียวกับในขวดรูปชมพู่ นอกจากนั้นยังพบว่าการเลี้ยงเชื้อปริมาณมากในถังหมักยังสามารถตรวจพบสารมัธยันตร์ที่มีค่า R_f เท่ากับ 0.50 แม้จะเลี้ยงเชื้อเป็นเวลามากกว่า 144 ชั่วโมง

4.3 แยกสารมัธยันตร์ที่เกิดจากการย่อยสลายไพรีนโดยกลุ่มแบคทีเรีย STK ให้บริสุทธิ์โดยวิธีทางเคมี

ผลการทดลองในข้อ 4.2 พบว่าภายหลังการเลี้ยงกลุ่มแบคทีเรีย STK ในอาหารเหลว CFMM ที่มีไพรีนเข้มข้น 100 มก.ต่อลิตร เป็นเวลา 168 ชั่วโมง มีการสะสมสารมัธยันตร์ที่มีค่า R_t เท่ากับ 3.1 นาทีในปริมาณมาก (วิเคราะห์ด้วย analytical HPLC โดยใช้ตัวทำละลาย 80% เมธานอลเป็นตัวชะ) จึงนำสารสกัดที่ได้ในช่วงเวลานี้ไปวิเคราะห์ เพื่อแยกสารมัธยันตร์ที่สะสมให้บริสุทธิ์โดยวิธี preparative TLC ดังวิธีการทดลองในข้อ 3.3.2 เพื่อพิสูจน์เอกลักษณ์และชนิดของสารด้วยวิธีทางเคมีต่อไป

นำตัวอย่างที่แยกโดย HPLC ดังรูปที่ 4.7 ที่มีค่า Rt เท่ากับ 3.1 นาที มาแยกให้บริสุทธิ์ต่อด้วยวิธี preparative TLC พบว่าภายหลังจากการแยกสารด้วย preparative TLC แล้วนำมาวิเคราะห์ซ้ำด้วย TLC พบจุดของสารมัธยันตร์ถึง 2 ชนิด ที่มีค่า R_f เท่ากับ 0.50 และ 0.25 ซึ่งให้ชื่อว่าสารมัธยันตร์ ก. และ ข. ตามลำดับ แสดงผลการทดลองในรูปที่ 4.6



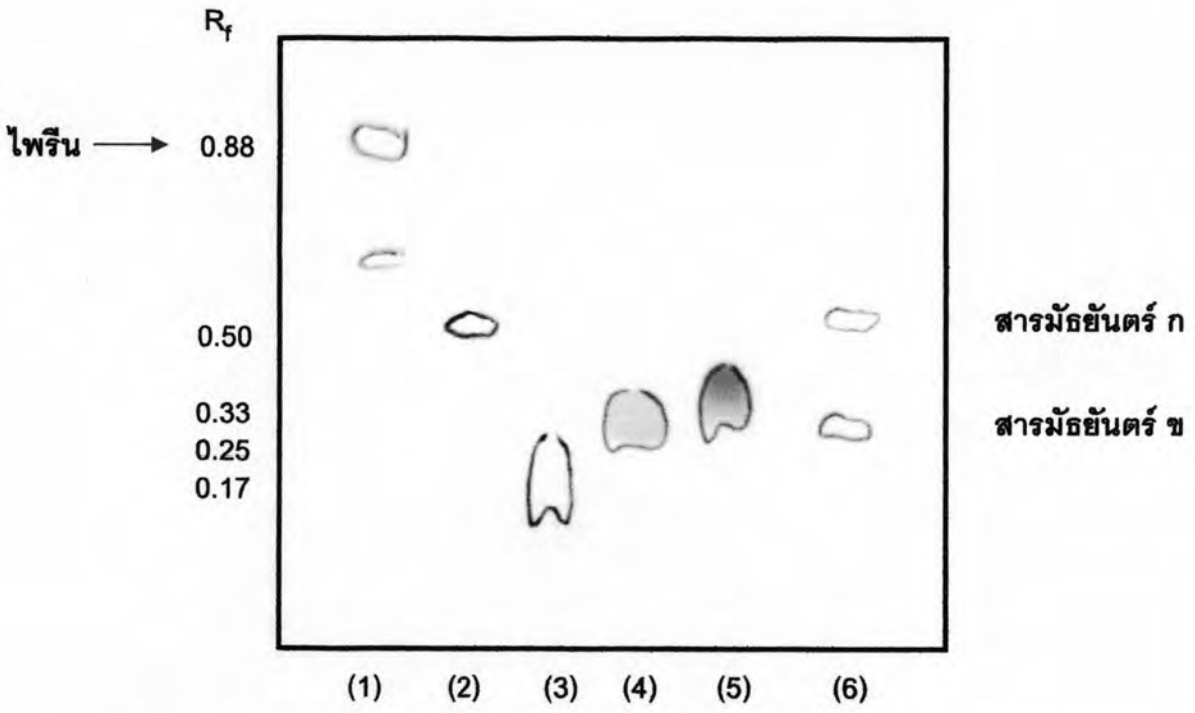
รูปที่ 4.8 TLC โครมาโทแกรมแสดงความบริสุทธิ์ของสารมัธยันตร์จากการย่อยสลายไพรีนโดยกลุ่มแบคทีเรีย STK

(1) สารสกัดจากน้ำเลี้ยงเชื้อ (2) สารมัธยันตร์ที่แยกได้โดยวิธี preparative TLC

4.3.1 การตรวจสอบชนิดของสารมัธยันตร์เบื้องต้นด้วยวิธี TLC และ HPLC

การตรวจสอบชนิดของสารในเบื้องต้นด้วย TLC ทำได้โดยการเปรียบเทียบค่า R_f ซึ่งเป็นค่าเฉพาะตัวของสารแต่ละชนิดกับค่า R_f ของสารมาตรฐาน โดยการนำสารที่มีรายงานว่าเป็นสารมัธยันตร์ที่เกิดจากการย่อยสลายไพรีน ได้แก่ กรด 2,5-ไดไฮดรอกซีเบนโซอิก กรดซาลิไซลิก กรด 2-ไฮดรอกซีเบนโซอิก กรดพธาลิก และกรดโปรโตคาทิคอิกมาวิเคราะห์ด้วย TLC เปรียบเทียบกับสารมัธยันตร์จากการย่อยสลายไพรีนโดยกลุ่มแบคทีเรีย STK ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์บางส่วนในข้อ 4.3 ผลการทดลองดังแสดงในรูป 4.9 และตารางที่ 4.1 พบว่าสารมัธยันตร์ที่ได้จากการย่อยสลายไพรีนโดย

กลุ่มแบคทีเรีย STK ซึ่งมีจุดของสารมัธยันตร์ 2 จุด ได้แก่ จุดที่มีค่า R_f เท่ากับ 0.50 เรืองแสงสีม่วงภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต ตรงกับกรดซาลิไซลิก ให้ชื่อว่าสารมัธยันตร์ ก. ส่วนสารมัธยันตร์ที่มีค่า R_f เท่ากับ 0.25 ซึ่งใกล้เคียงกับกรดโปรโตคาทิคูอิก แต่เรืองแสงสีเขียว ซึ่งไม่พบว่าตรงกับสารมาตรฐานใดเลย ให้ชื่อว่าสารมัธยันตร์ ข. ตามลำดับ

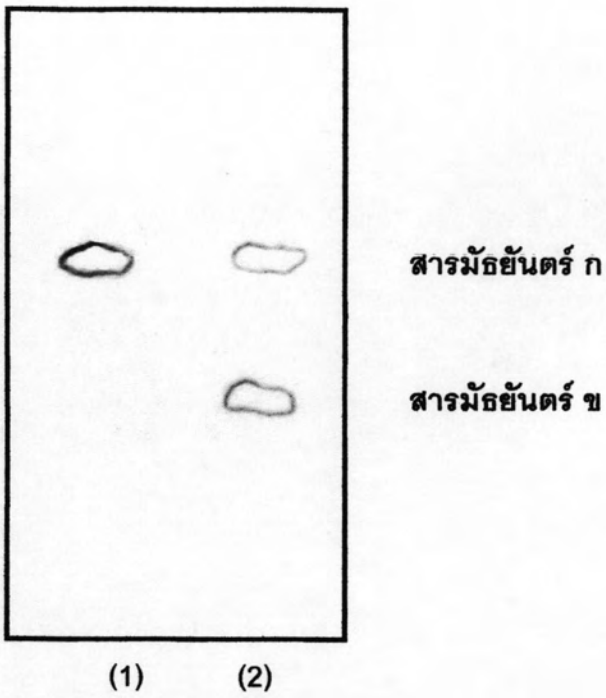


รูปที่ 4.9 TLC **โครมาโทแกรมของสารมัธยันตร์จากการย่อยสลายไพรีนโดยกลุ่มแบคทีเรีย** STK (6) **เปรียบเทียบกับ ไพรีน** (1), **กรดซาลิไซลิก** (2), **กรดพธาลิก** (3), **กรดโปรโตคาทิคูอิก** (4) **กรด** 2,5-**ไดไฮดรอกซีเบนโซอิก** (5)

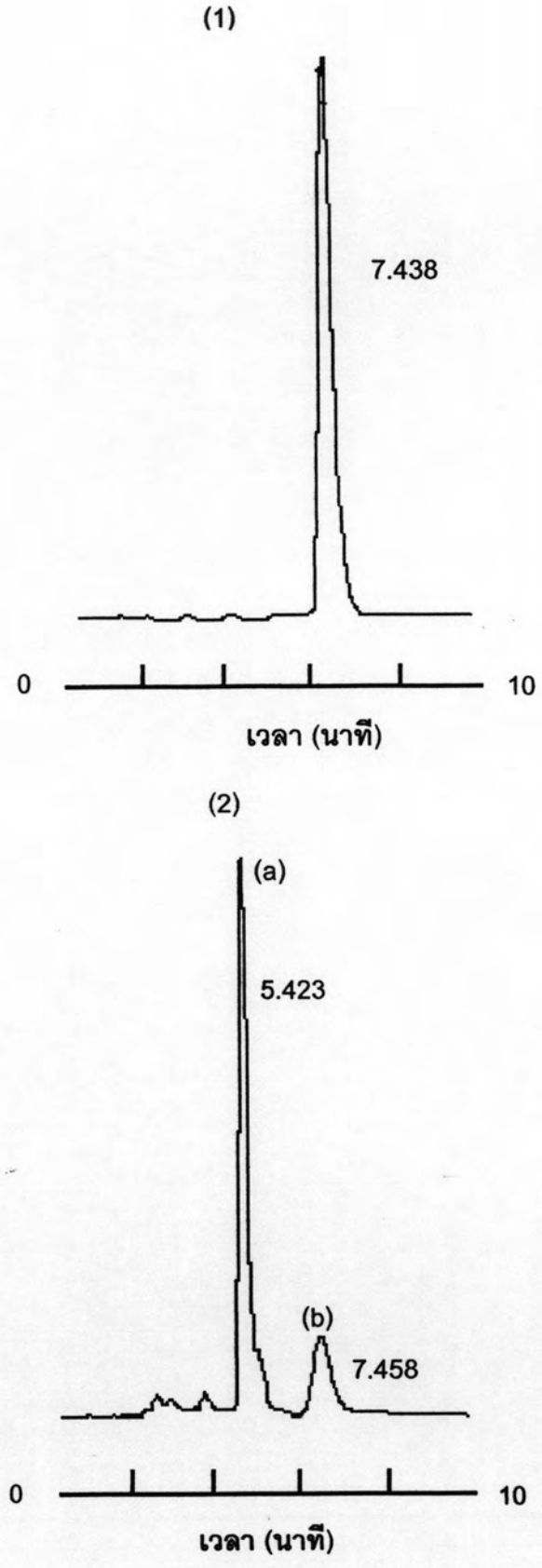
ตารางที่ 4.1 ค่า R_f จากการวิเคราะห์ TLC และลักษณะการเรืองแสงของสารมัธยันตร์จากการย่อยสลายไพรีนโดยกลุ่มแบคทีเรีย STK ภายใต้แสงอัลตราไวโอเลตช่วงความยาวคลื่น 215-250 นาโนเมตรเปรียบเทียบกับสารมาตรฐานชนิดต่างๆ

สาร	การเรืองแสง	ค่า R_f
สารมัธยันตร์ ก	ม่วง	0.50
สารมัธยันตร์ ข	เขียว	0.25
ไพรีน	ม่วง	0.88
กรดซาลิไซลิก	ม่วง	0.50
กรดพธาลิก	เขียว	0.17
กรดโปรโตคาทิคูอิก	ม่วงน้ำตาล	0.25
กรด 2,5-ไดไฮดรอกซีเบนโซอิก	ฟ้า	0.33

จากผลการทดลองจะเห็นได้ว่าสารมัธยันตร์ ก ซึ่งมีค่า R_f เท่ากับ 0.50 และเรืองแสงสีม่วงภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต ซึ่งมีสมบัติเช่นเดียวกันกับ กรดซาลิไซลิก ดังนั้นขั้นตอนต่อไปจึงทำการวิเคราะห์สารมัธยันตร์ ก. เปรียบเทียบกับสารมาตรฐานกรดซาลิไซลิก ด้วยวิธี TLC ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 4.10 ส่วนสารมัธยันตร์ ข. นั้นเมื่อตรวจสอบเบื้องต้นด้วย TLC แล้วไม่พบว่าตรงกับสารมาตรฐานใดๆ เลย

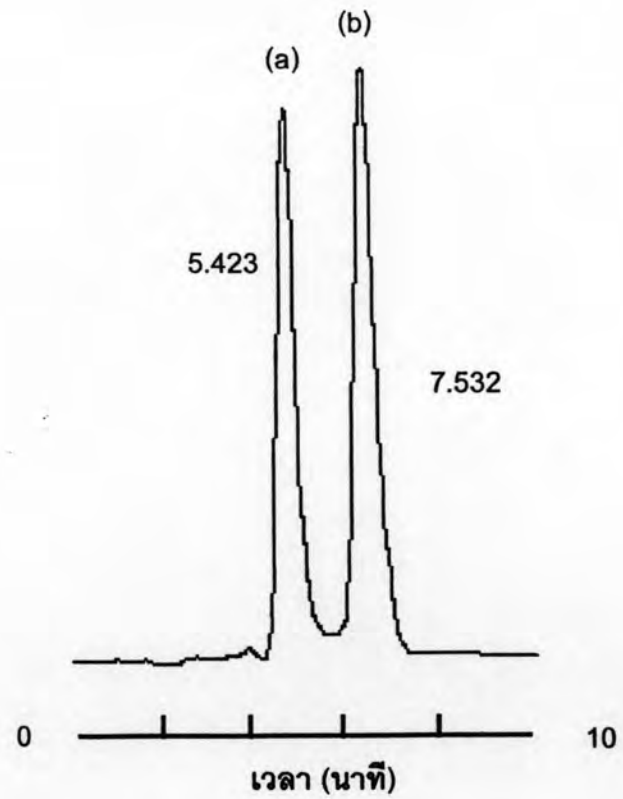


รูปที่ 4.10 TLC **โครมาโทแกรมของกรดซาลิไซลิก** (1) **เปรียบเทียบกับสารมัธยันตร์จากการย่อยสลายไพรีนโดยกลุ่มแบคทีเรีย** STK (2)



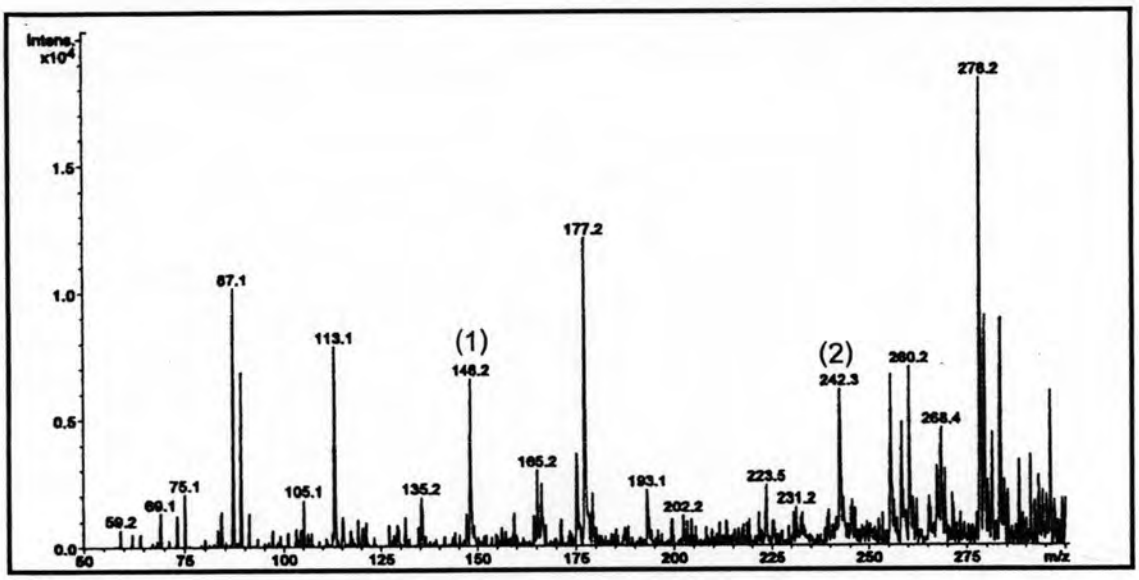
รูปที่ 4.11 HPLC **โครมาโทแกรมของกรดซาลิไซลิก** (1), **เปรียบเทียบกับสารมัธยันตร์จากการย่อยสลายไพรีนโดยกลุ่มแบคทีเรีย** STK (2) **(แยกให้บริสุทธิ์แบบ** linear gradient HPLC **โดยใช้สารละลายเมธานอล** 40-80% **ในน้ำที่มี** pH 2.0-3.0

จากผลการทดลองในรูปที่ 4.9 และ 4.10 แสดงให้เห็นว่า สารมัธยันตร์ ก. จากการย่อยสลายไพรีนโดยกลุ่มแบคทีเรีย STK ซึ่งทำให้บริสุทธิ์บางส่วนด้วย preparative TLC มีลักษณะสมบัติเบื้องต้นตรงกับกรดซาลิไซลิก ซึ่งเป็นสารที่เคยมีรายงานอย่างแพร่หลายว่าเป็นสารมัธยันตร์ที่เกิดจากการย่อยสลาย PAHs โดยแบคทีเรียต่างๆ โดยพบว่าทั้งสารมาตรฐานและสารมัธยันตร์ ก. ที่แยกได้ต่างก็มีค่า R_f เท่ากับ 0.50 แต่เมื่อวิเคราะห์สารมัธยันตร์ ก. ด้วย linear gradient HPLC โดยใช้สารละลายเมธานอล 40 ถึง 80 เปอร์เซ็นต์ ในน้ำที่มีค่า pH 2.0-3.0 อัตราการไหล 1 มล.ต่อนาที เป็นตัวชะ พบสารมัธยันตร์ 2 ชนิด ที่มีค่าค่า R_f เท่ากับ 5.423 ให้ชื่อว่าสาร a และ มีค่า ค่า R_f เท่ากับ 7.532 ให้ชื่อว่าสาร b ตามลำดับ ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับกรดซาลิไซลิก พบว่าสาร b มีค่า retention time ใกล้เคียงกัน ดังแสดงในผลการทดลองรูปที่ 4.11 นอกจากนี้ยังได้ทำการยืนยันผลโดยการนำสารมาตรฐานกรดซาลิไซลิกมาผสมกับสารมัธยันตร์ที่สกัดแยกได้แล้วนำไปวิเคราะห์ด้วย HPLC ผลการทดลองในรูปที่ 4.12 พบว่าพีคของสารมัธยันตร์ b มีพื้นที่ใต้พีคสูงขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับรูปที่ 4.11 (2)



รูปที่ 4.12 HPLC โครมาโทแกรมผสมระหว่างกรดซาลิไซลิกกับสารมัธยันตร์ ก จากการย่อยสลายไพรีนโดยกลุ่มแบคทีเรีย STK, R_f 7.532 คือซาลิไซลิกผสมกับสารมัธยันตร์ b (แยกให้บริสุทธิ์แบบ linear gradient HPLC โดยใช้สารละลายเมธานอล 40-80% ในน้ำที่มี pH 2.0-3.0)

นอกจากนี้ได้ทำการวิเคราะห์สารสกัดจากน้ำเลี้ยงเชื้อด้วยวิธี GC-MS เพื่อดูลักษณะการแตกตัวของสารมัธยันตร์ที่เกิดจากการย่อยสลายไพรีนโดยกลุ่มแบคทีเรีย STK พบพีคของสารมัธยันตร์ชนิดอื่นอีกคือ 2-ไฮดรอกซี-2เอช-เบนโซ[เอช]โครมีน-2-คาร์บอกซิเลต (2-Hydroxy-2*H*-benzo[*h*]chromene-2-carboxylate) และกรดพธาลิก ดังแสดงผลในรูปที่ 4.13



รูปที่ ฉ. 1 แมสสเปกตรัมของสารมัธยันตร์จากการย่อยสลายไพรีนโดยกลุ่มแบคทีเรีย STK ในวันที่ 7 ของการเลี้ยงเชื้อ

(1) กรดพาทิลิก

(2) 2-ไฮดรอกซี-2 เอช-เบนโซ[เอช]โครมีน-2-คาร์บอกซิเลต

4.4 การศึกษาประสิทธิภาพของกลุ่มแบคทีเรีย STK ในการย่อยสลายไพรีนในดิน

4.4.1 ผลการเตรียมดิน การศึกษาลักษณะทางกายภาพ และองค์ประกอบทางเคมีของดิน

ดินที่นำมาใช้ในการทดลองเก็บจากบริเวณสวนผลไม้เขตธนบุรี เป็นลักษณะดินที่มีความอุดมสมบูรณ์ และไม่มีการปนเปื้อนสารเคมีมาก่อน โดยเมื่อนำไปสกัด และวิเคราะห์หาปริมาณ

PAHs พบว่าไม่มีการปนเปื้อนสารดังกล่าว จากนั้นส่งดินไปวิเคราะห์ลักษณะทางกายภาพ และองค์ประกอบทางเคมีของดินที่ฝ่ายวิจัยดิน กองเกษตรเคมี กระทรวงเกษตร และสหกรณ์ ได้ผลวิเคราะห์ดังตาราง 4.2

ตารางที่ 4.2 ลักษณะทางกายภาพ และองค์ประกอบทางเคมีของดิน

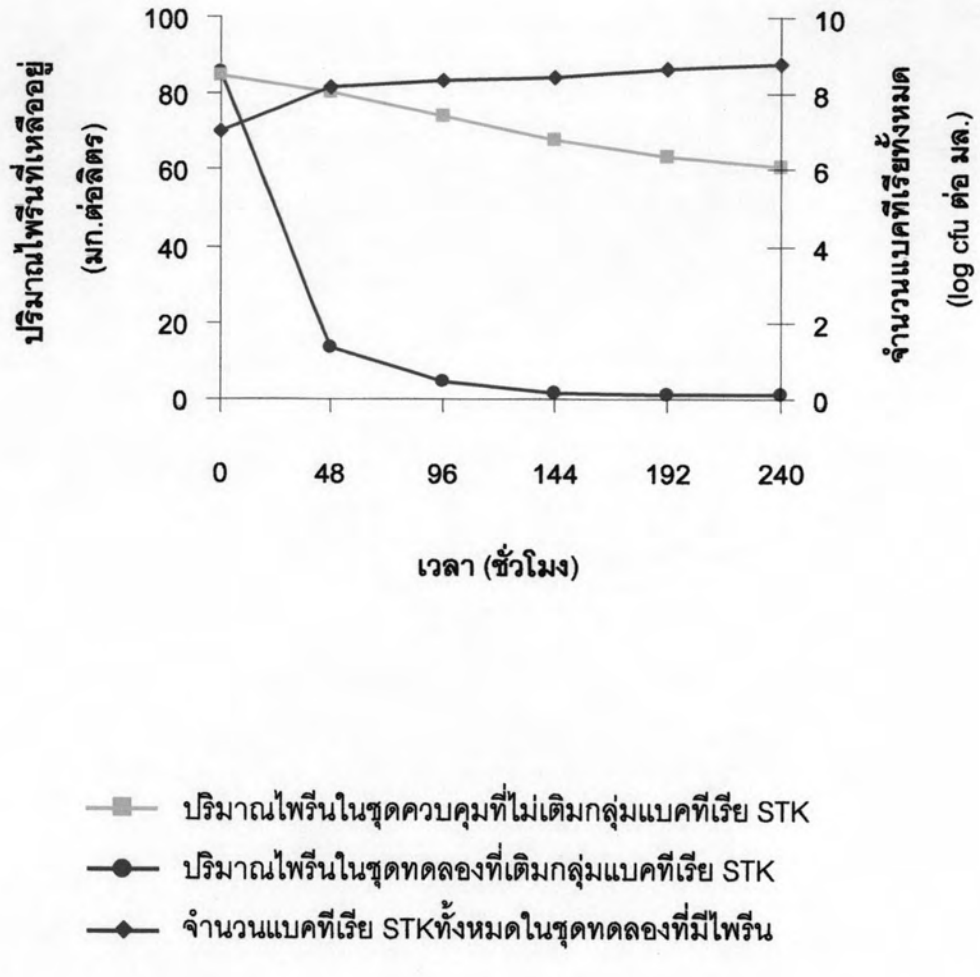
คุณสมบัติ	ค่าการวิเคราะห์
ลักษณะดิน	ดินร่วนปนทราย
ค่าความเป็นกรด ด่าง	7.4
ค่าความจุการอุ้มน้ำ (%)	53.46
ปริมาณสารอินทรีย์ (%)	6.10
ปริมาณคาร์บอน (%)	3.54
ปริมาณไนโตรเจน (%)	0.51
ปริมาณฟอสฟอรัส (%)	0.30
ปริมาณโพแตสเซียม (%)	1.10
อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน	6.94

4.4.2 การศึกษาประสิทธิภาพของกลุ่มแบคทีเรีย STK ในการย่อยสลายไพรีนในดินสภาวะ solid state

จากการทดลองตามวิธีในข้อ 3.5.1 พบว่ากลุ่มเชื้อแบคทีเรีย STK ไม่สามารถย่อยสลายไพรีนได้ในดินสภาวะ solid state โดยพบว่าปริมาณไพรีนไม่ลดลงเมื่อทำการบ่มภายใต้อุณหภูมิ 30 °ซ ในที่มืดเป็นเวลา 30 วัน ดังนั้นจึงทำการทดลองขั้นต่อไปโดยศึกษาการย่อยสลายไพรีนโดยกลุ่มแบคทีเรีย STK ในระบบslurryอัตราส่วนดินต่อน้ำเท่ากับ 1 : 8 (กรัมต่อมล.)

4.4.3 การศึกษาประสิทธิภาพของกลุ่มแบคทีเรีย STK ในการย่อยสลายไพรีนในดินระบบ slurry อัตราส่วนดินต่อน้ำเท่ากับ 1 : 8 (กรัมต่อมล.)

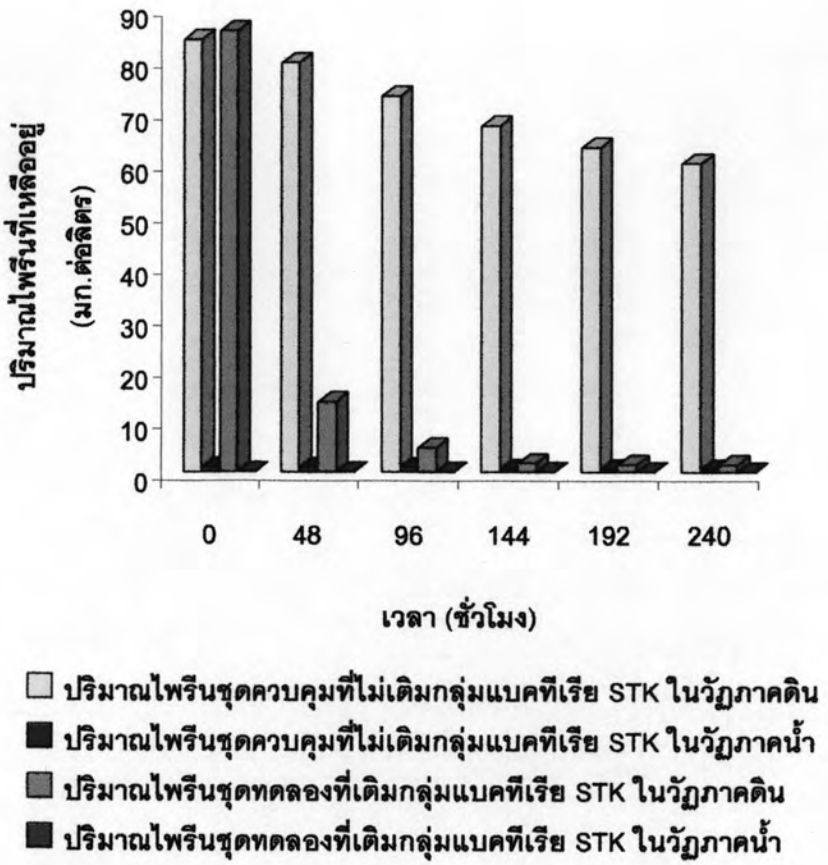
การทดลองขั้นตอนนี้เป็นการศึกษาประสิทธิภาพการย่อยสลายไพรีนในดินระบบ slurry โดยการเติมอัตราส่วนดินต่อน้ำ 1 : 8 (กรัมต่อมล.) พบว่ากลุ่มแบคทีเรีย STK สามารถย่อยสลายไพรีนได้อย่างรวดเร็วโดยพบว่ามีปริมาณไพรีนลดลงเหลือ 13.79 มก.ต่อลิตร ในวันที่ 2 (ชั่วโมงที่ 48) ของการทดลอง และเมื่อทำการบ่มต่อไปถึงวันที่ 10 (ชั่วโมงที่ 240) พบว่ายังมีปริมาณไพรีนเหลืออยู่เพียงเล็กน้อยคือเท่ากับ 1.44 มก.ต่อลิตร ดังแสดงในรูปที่ 4.13 ซึ่งกล่าวได้ว่าการเลี้ยงกลุ่มแบคทีเรีย STK ในดิน slurry มีประสิทธิภาพค่อนข้างดีเมื่อเปรียบเทียบกับการเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว CFMM เนื่องจากสามารถย่อยสลายไพรีนได้อย่างรวดเร็วแค่ภายในระยะเวลา 2 วัน ถึงแม้ว่าจะมีปริมาณไพรีนเหลืออยู่ในวันสุดท้ายของการทดลองก็ตาม แต่ในการเลี้ยงกลุ่มแบคทีเรีย STK ในอาหารเหลว CFMM พบว่าการย่อยสลายจะเกิดขึ้นอย่างรวดเร็วในวันที่ 3 ของการทดลอง ดังแสดงผลในรูปที่ 4.2 และเมื่อพิจารณาการเจริญของกลุ่มแบคทีเรีย STK เห็นได้ว่าการเจริญสอดคล้องกับปริมาณไพรีนที่ลดลง กล่าวคือ การเจริญของกลุ่มแบคทีเรีย STK จะเพิ่มจำนวนอย่างรวดเร็วในวันที่ 2 ของการทดลอง โดยจำนวนแบคทีเรียเพิ่มจาก 7.06 log CFU ต่อมล.ในวันที่ 0 เป็น 8.20 log CFU ต่อมล.ในวันที่ 2 ดังแสดงในรูปที่ 4.13



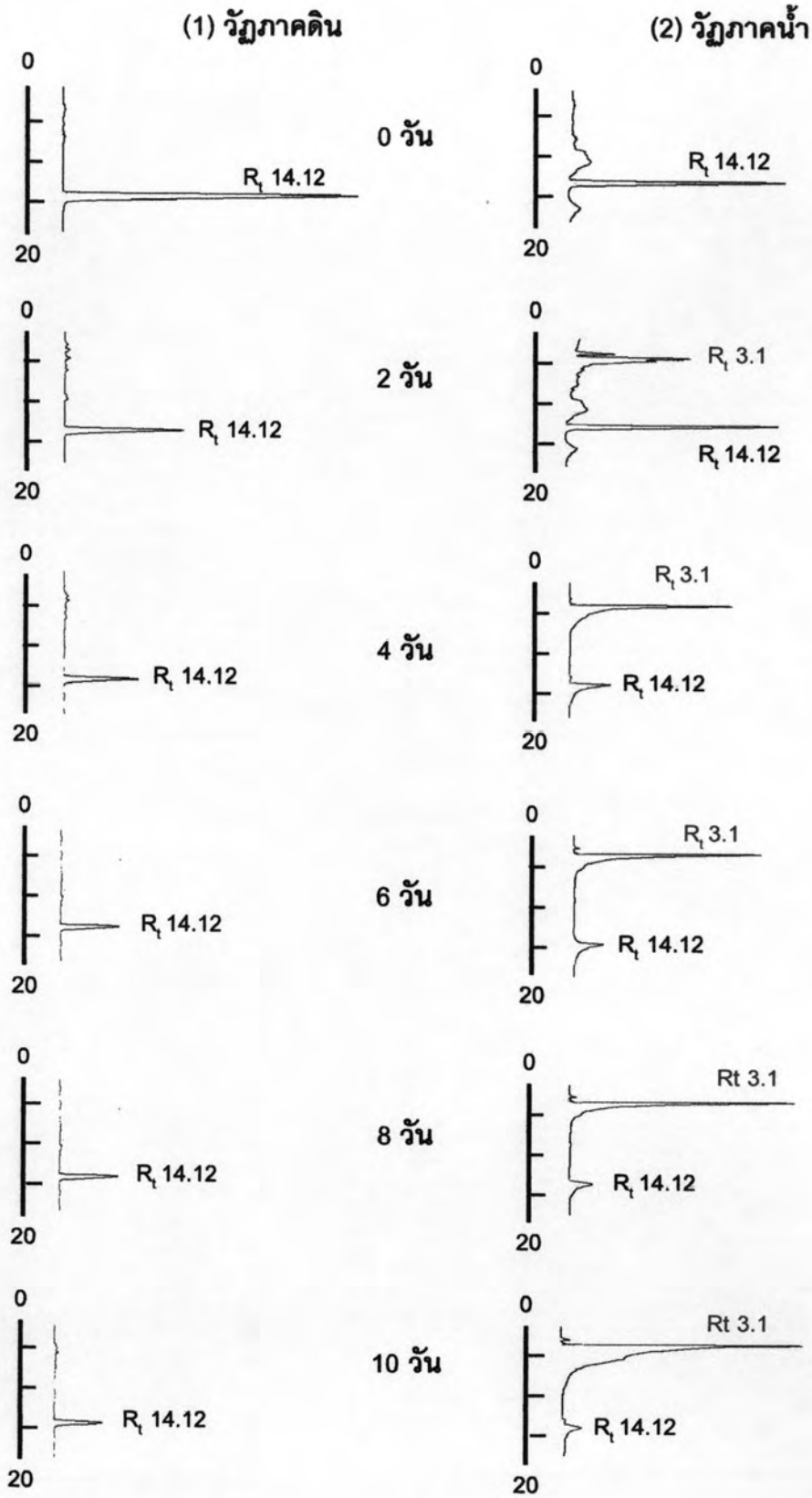
รูปที่ 4.14 **ลักษณะการเจริญและการย่อยสลายไพรีนของกลุ่มแบคทีเรีย** STK **ในดินระบบ** slurry **อัตราส่วนดินต่อน้ำ** 1:8 **(กรัมต่อมล.) ที่มีไพรีนความเข้มข้น** 100 **มก.ต่อลิตร**

จากการศึกษาประสิทธิภาพการย่อยสลายไพรีนโดยกลุ่มแบคทีเรีย STK ในดินระบบ slurry อัตราส่วนดินต่อน้ำ 1:8 (กรัมต่อมล.) (รูปที่ 4.14 และ 4.15) โดยทำการวิเคราะห์แยกส่วนวัฏภาคดินและน้ำด้วย HPLC (รูปที่ 4.16) พบว่า ไพรีนจะติดอยู่ในวัฏภาคดินได้มากกว่าวัฏภาคน้ำโดยดูจากปริมาณไพรีนที่สกัดได้จากส่วนวัฏภาคดินเทียบกับวัฏภาคน้ำทั้งในชุดควบคุมที่ไม่เติมแบคทีเรียและชุดทดลองที่เติมแบคทีเรีย ซึ่งจะเห็นได้ว่าในส่วนวัฏภาคดินชุดทดลองที่มีการเติมกลุ่มแบคทีเรีย STK มีปริมาณไพรีนวันที่ 0 (ชั่วโมงที่ 0) เท่ากับ 85.80 มก.ต่อลิตร ขณะที่ในส่วนวัฏภาคน้ำชุดทดลองที่มีการเติมกลุ่มแบคทีเรีย STK มีปริมาณไพรีนวันที่ 0 เท่ากับ 0.14 มก.ต่อลิตร เมื่อทำการเลี้ยงเชื้อจนถึงวันที่ 10 ของการทดลองพบว่าปริมาณไพรีนในส่วนวัฏภาคดินชุดทดลองที่มีการเติมกลุ่มแบคทีเรีย STK เหลืออยู่เพียง 1.43 มก.ต่อลิตร ส่วนปริมาณไพรีนในส่วนวัฏภาคน้ำชุดทดลองเหลือ 0.008 มก.ต่อลิตร

และเมื่อพิจารณา HPLC โครมาโทแกรม (รูปที่ 4.16) พบว่าสารมัธยันตร์ที่เกิดจากการย่อยสลายไพรีนโดยกลุ่มแบคทีเรีย STK ในดินระบบ slurry อัตราส่วนดินต่อน้ำ 1:8 (กรัมต่อมล.) เป็นสารชนิดเดียวกับสารมัธยันตร์ที่เกิดขึ้นกับการเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว (ดูได้จาก HPLC โครมาโทแกรม ของสารมัธยันตร์มีค่า R_t เท่ากับ 3.1 เหมือนกัน) ซึ่งสารมัธยันตร์ที่เกิดขึ้นนี้ละลายอยู่ในวัฏภาคของน้ำได้จนหมด โดยไม่พบว่ามีสารมัธยันตร์หลงเหลืออยู่ในวัฏภาคของดิน ดังแสดงในรูปที่ 4.16 (1)



รูปที่ 4.15 แผนภูมิแท่งแสดงปริมาณไพรีนของกลุ่มแบคทีเรีย STK ในดินระบบ slurry อัตราส่วนดินต่อน้ำ 1:8 (กรัมต่อมล.) ที่มีไพรีนความเข้มข้น 100 มก.ต่อลิตร



รูปที่ 4.16 HPLC **โครมาโทแกรม จากการวิเคราะห์ปริมาณไพรีนและสารมัธยันตร์ที่เกิดขึ้นจากการย่อยสลายไพรีนโดยกลุ่มแบคทีเรีย** STK **ในดิน** slurry **อัตราส่วนดินต่อน้ำ** 1:8 **(กรัมต่อมล.) หลังจากเลี้ยงเชื้อที่เวลาต่างๆ (**R_t 14.12 **นาทีคือไพรีน,** R_t 3.1 **คือสารมัธยันตร์)**

4.4 การทดสอบความเป็นสารก่อกลายพันธุ์ของสารมัธยันตร์ในแบคทีเรียโดยวิธีของ Ame (Ames' test)

ผลจากการทดสอบความเป็นสารก่อกลายพันธุ์ของสารมัธยันตร์ที่เกิดจากการย่อยสลายไพรีนโดยกลุ่มแบคทีเรีย STK โดยแบคทีเรียที่ใช้ทดสอบคือ *Salmonella typhimurium* TA 98 และ TA 100 ที่มีปริมาณของสารสกัด ตั้งแต่ 2.5 มก.ต่อเพลท ถึง 20 มก.ต่อเพลท พบว่ามีจำนวนโคโลนีกลายพันธุ์จากสารมัธยันตร์ที่มีปริมาณต่างๆ ดังกล่าว ไม่ถึงจำนวนโคโลนีกลายพันธุ์ของสารมาตรฐานที่ให้ผลบวก (positive) ดังแสดงในภาคผนวก ง. และตารางที่ 4.3 แสดงให้เห็นว่าสารมัธยันตร์ที่ได้จากการย่อยสลายไพรีนโดยกลุ่มแบคทีเรีย STK ไม่เป็นสารก่อกลายพันธุ์ทั้งแบบออกฤทธิ์โดยตรงไม่ผ่านการกระตุ้นด้วยเอนไซม์ และแบบออกฤทธิ์โดยผ่านการกระตุ้นด้วยเอนไซม์

ตารางที่ 4.3 จำนวนโคโลนีกลายพันธุ์ของ *Salmonella typhimurium* TA 98 และ TA 100 ที่เกิดจากสารสกัดจากน้ำเลี้ยงเชื้อ

สารสกัดจากน้ำเลี้ยงเชื้อ (mg/plate)	จำนวนโคโลนีกลายพันธุ์ *His+* (Mean ± S.D.)			
	Mutagenicity			
	TA98		TA100	
	-S9	+S9	-S9	+S9
Negative	35 ± 6[a]	43 ± 6[a]	201 ± 59[a]	220 ± 54[a]
2.5	24 ± 1[a]	46 ± 9[a]	156 ± 5[a]	151 ± 29[a]
5.0	38 ± 2[a]	79 ± 26[a]	197 ± 21[a]	174 ± 23[a]
10.0	48 ± 14[a]	44 ± 32[a]	172 ± 35[a]	144 ± 50[a]
20.0	46 ± 19[a]	68 ± 25[a]	200 ± 44[a]	195 ± 44[a]
Positive	664 ± 39[b]	424 ± 28[b]	593 ± 28[b]	1157 ± 121[b]

หมายเหตุ : ค่าที่มีอักษรยกกำลังไม่เหมือนกันแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) โดยใช้ Duncan's multiple range test ผลที่ได้คือ mean $\pm$ S.E.M จากการเฉลี่ยผลการทดลอง 3 ครั้ง

DMSO ใช้เป็นตัวควบคุมลบ AF-2 และ B(a)P ใช้เป็นตัวควบคุมบวกซึ่งใช้เป็นสารก่อกลายพันธุ์ในขณะที่มีและไม่มีเอนไซม์ S9 โคโลนีที่เกิดขึ้นโดยการชักนำด้วย AF-2 ความเข้มข้น 0.1 และ 0.01 ไมโครกรัมต่อเพลท หรือ B(a)P ความเข้มข้น 10 และ 5 ไมโครกรัมต่อเพลท สำหรับเชื้อแบคทีเรีย *Salmonella typhimurium* สายพันธุ์ TA98 และ TA100 ตามลำดับ