การย่อยสลายพอลิไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนโดยแบคทีเรียที่ย่อยสลายอะซีแนพธีน

นางสาวอรสุภาว์ สายเพชร

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2545

ISBN 974-17-3202-3

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

BIODEGRADATION OF POLYCYCLIC AROMATIC HYDROCARBONS BY ACENAPHTHENE DEGRADING BACTERIA

Miss Aornsupa Saiphet

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science in Industrial Microbiology
Department of Microbiology
Faculty of Science
Chulalongkorn University
Academic Year 2002
ISBN 974-17-3202-3

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การย่อยสลายพอลิไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนโดยแบคทีเรียที่ย่อยสลายอะซีแนพธีน
โดย	นางสาวอรสุภาว์ สายเพชร
สาขาวิชา	จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุเทพ ธนียวัน

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

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

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.... ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.ไพเราะ ปิ่นพานิชการ)

.... อาจารย์ที่ปรึกษา
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุเทพ ธนียวัน)

....กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.กาญจณา จันทองจีน)

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

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

อรสุภาว์ สายเพชร : การย่อยสลายพอลิไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนโดยแบคทีเรียที่ย่อยสลายอะซีแนพธีน (BIODEGRADATION OF POLYCYCLIC AROMATIC HYDROCARBONS BY ACENAPHTHENE DEGRADING BACTERIA) อาจารย์ที่ปรึกษา : ผู้ช่วยศาสตราจารย์.ดร. สุเทพ ธนียวัน, จำนวนหน้า 104 หน้า. ISBN 974-17-3202-3.

กลุ่มแบคทีเรีย ซึ่งคัดแยกได้จากตัวอย่างน้ำเสียที่ปนเปื้อนจากน้ำมัน น้ำมันเครื่อง สามารถย่อยสลายอะซีแนพธีน ฟีแนนทรีน ฟลูออรีน และฟลูออแรนธีน เพื่อใช้เป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงานได้ กลุ่มแบคทีเรียดังกล่าวประกอบด้วยแบคทีเรีย 3 สายพันธุ์ *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ SP2 เป็นหนึ่งในแบคทีเรียที่คัดแยกจากกลุ่มแบคทีเรีย จำแนกชนิดโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและชีวเคมี ร่วมกับการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16 เอสไรโบโซมัลดีเอ็นเอ *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ SP2 สามารถย่อยสลายอะซีแนพธีน เพื่อใช้เป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงานได้ แต่ไม่สามารถย่อยสลายแนพธาลีน, อะซีแนพธิลีน, ไดเบนโซฟูแรน, ฟีแนนทรีน, แอนทราซีน, ฟลูออรีน, ฟลูออแรนธีน และไพรีนได้ โดยสามารถย่อยสลายอะซีแนพธีนความเข้มข้น 900 มก.ต่อลิตร ได้ภายใน 6 วัน ตรวจสอบปริมาณอะซีแนพธีนที่ลดลงโดยไฮเพอร์ฟอร์มานซ์ลิควิดโครมาโตกราฟี การย่อยสลายอะซีแนพธีนโดย *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ SP2 พบสารมัธยันตร์ทั้งหมด 6 ชนิด ภายหลังจากการเลี้ยงเชื้อ 54 ชั่วโมง และตรวจสอบชนิดของสารมัธยันตร์หลัก 3 ชนิด โดยโครมาโตกราฟีแบบแผ่นบาง และไฮเพอร์ฟอร์มานซ์ลิควิดโครมาโตกราฟี พบสารมัธยันตร์ที่มีลักษณะคล้ายกับอะซีแนพธีนควิโนน และกรดแนพธาลีน 1,8-ไดคาร์บอกซิลิก โดยเทียบกับสารมาตรฐาน *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ SP2 ถูกยับยั้งการเจริญ และการย่อยสลายอะซีแนพธีน เมื่อโคเมตาบอลิสมร่วมกับ แนพธาลีน อะซีแนพธิลีน และไดเบนโซฟูแรน แต่ละชนิด ที่ความเข้มข้น 200, 75 และ75 มก.ต่อลิตร ตามลำดับ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาควิชา ...จุลชีววิทยา.........................ลายมือชื่อนิสิต...

สาขาวิชา... จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม......ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา............................

ปีการศึกษา ..2545.............

4372520223: MAJOR INDUSTRAIL MICROBIOLOGY

KEY WORD: *Sphingomonas* sp./ acenaphthene/ biodegradation/ cometabolism

AORNSUPA SAIPHET : BIODEGRADATION OF POLYCYCLIC AROMATIC HYDROCARBONS BY ACENAPHTHENE DEGRADING BACTERIA. THESIS ADVISOR: ASSIST. PROF. SUTHEP THANIYAVAN, 104 pp. ISBN 974-17-3202-3.

A bacteria consortium, isolated from waste water contaminated with gas and oil , was found capable of degrading a range of PAHs including phenanthrene, acenaphthene, fluorene and fluoranthene. The consortium contains three predominant isolates, one of which was identified as *Sphingomonas* sp. via its morphological and biochemical characteristics along with 16S rDNA gene sequencing and consequently designated as *Sphingomanas* sp. SP2 . The organism was able to use acenaphthene as carbon and energy source but unable to use naphthalene, acenaphthylene, dibenzofuran, phenanthrene, anthracene, fluorene, fluoranthene and pyrene. Cultivation of the organism in minimum medium supplemented with acenaphthene, revealed that the organism could utilize 900 mg/L acenaphthene down to undetectable amount via HPLC within 6 days of which six metabolic products were detected by TLC after 54 h of cultivation. The three major metabolites were further isolated, purified and identified by TLC and HLPC with reference to standard compounds, one of which was likely either acenaphthenequinone or naphthalene 1,8-dicarboxylic acid. It was also found that growth and degradative ability toward acenaphthene of *Sphingomanas* sp. SP2 was inhibited during cometabolism with 75 mg/L acenaphthene, 200 mg/L naphthalene or 75 mg/L dibenzofuran.

Department.... Microbiology................ Student's Signature...................................

Field of study ..Industrail Microbiology.... Advisor's signature...................................

Academic year 2002

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จไปได้ด้วยดีด้วยความช่วยเหลืออย่างดียิ่งของผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุเทพ ธนียวัน อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่ได้กรุณาให้ความรู้ คำแนะนำและข้อคิดเห็นต่างๆ ตลอดจนตรวจแก้ต้นฉบับวิทยานิพนธ์ ซึ่งผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้ด้วย

ขอกราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ดร.ไพเราะ ปิ่นพานิชการ ที่กรุณารับเป็นประธานกรรมการในการสอบ ตลอดจนให้ความรู้ คำแนะนำต่างๆ แก่ผู้วิจัยตลอดระยะเวลาการศึกษา ขอกราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร. กาญจณา จันทองจีน และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. กอบชัย ภัทรกุลวณิชย์ ที่กรุณารับเป็นกรรมการในการสอบ และให้ความรู้ คำแนะนำต่างๆ ตลอดจนช่วยแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

กราบขอบพระคุณอาจารย์ ดร. สุพัฒน์ เจริญพรวัฒนา ที่กรุณาให้ความรู้ และคำแนะนำต่างๆ เกี่ยวกับการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16 เอส ไรโบโซมัลดีเอ็นเอ แก่ผู้วิจัย

กราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร. กาญจนา ชาญสง่าเวช ที่กรุณาให้สารเคมีและไพรเมอร์ สำหรับการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส และ การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16 เอส ไรโบโซมัลดีเอ็นเอ แก่ผู้วิจัย

กราบขอบพระคุณอาจารย์ทุกท่านในภาควิชาจุลชีววิทยาที่กรุณาให้ความรู้ และคำแนะนำต่างๆ แก่ผู้วิจัย

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ในภาควิชาจุลชีววิทยาทุกท่าน ตลอดจนพี่ๆ เพื่อนๆ และน้องๆ ทุกคนที่มีส่วนช่วยเหลือและให้กำลังใจตลอดมา

สุดท้ายขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดา และพี่ ที่ให้การสนับสนุนและความช่วยเหลือตลอดจนกำลังใจแก่ผู้วิจัยเสมอมา

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย...ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ..จ

กิตติกรรมประกาศ...ฉ

สารบัญ..ช

สารบัญตาราง...ซ

สารบัญรูป...ฌ

บทที่

1. บทนำ...1

2. วารสารปริทัศน์...4

3. อุปกรณ์และวิธีดำเนินงานวิจัย...25

4. ผลการทดลอง 43

5. สรุปและอภิปรายผลการทดลอง..79

6. ข้อเสนอแนะในการวิจัย..86

รายการอ้างอิง..87

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก...96

ภาคผนวก ข...98

ภาคผนวก ค...102

ภาคผนวก ง...103

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์...104

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
2.1	โครงสร้างและสมบัติทางเคมีของสาร PAHs 16 ชนิด (Schirmer และคณะ, 1998)..	5
2.2	จุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายอะซีแนพธีน...	20
3.1	แหล่งตัวอย่างน้ำที่ใช้ในกการคัดเลือกแบคทีเรียที่ย่อยสลายสาร PAHs ได้.....	29
3.2	โอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์ที่ใช้สำหรับหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16 เอสไรโซมัลดีเอ็นเอของแบคทีเรียสายพันธุ์ SP2………………………………………..	35
4.1	การย่อยสลายสาร PAHs ของจุลินทรีย์ในตัวอย่างน้ำ.................................	44
4.2	ลักษณะของอาหารเลี้ยงเชื้อเมื่อเติมกลุ่มแบคทีเรียจากตัวอย่างน้ำที่ 6 หลังการถ่ายเชื้อ 5 ครั้ง...	45
4.3	ลักษณะโคโลนีของแบคทีเรียซึ่งคัดแยกได้จากตัวอย่างน้ำที่ 6.......................	47
4.4	ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียสายพันธุ์ SP2………………………	49
4.5	ลักษณะทางชีวเคมีของแบคทีเรียสายพันธุ์ SP2……………………………...	51
4.6	ลักษณะการเรืองแสงอัลตราไวโอเลตของสารมัธยันตร์ที่เกิดจากการย่อยสลายอะซีแนพธีนโดย *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ SP2……………..…....	61

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญรูป

รูปที่ **หน้า**

2.1 โครงสร้างโมเลกุลของอะซีแนพธีน.. 6

2.2 การย่อยสลายสาร PAHs โดยแบคทีเรีย.. 11

2.3 วิถีการย่อยสลายสาร PAHs ทั่วไปโดยแบคทีเรีย (Cerniglia, 1992)................ 15

2.4 วิถีการย่อยสลายแนพธาลีนในส่วน upper pathway (Eaton และChapman, 1992)……………………………………………………………………… 16

2.5 วิถีการย่อยสลายกรดซาลิไซลิก (Yen และ Gunsalus, 1982)) (*nahG* คือซาลิไซเลส ไฮดรอกซีเลส, *nahH* คือคาทีคอล-2,3-ไดออกซีจีเนส, *nahI* คือ 2-ไฮดรอกซีมิวโคนิกเซมิอัลดีไฮด์ ดีไฮโดรจีเนส, *nahJ* คือ 2-ไฮดรอกซีมิวโคเนท ดีไฮโดรจีเนส, *nahK* คือ 4-ออกซาโลโครโตเนท ดีคาร์บอกซิเลส, *nahL* คือ 2-ออกโซเพนท์-4-อีโนเอท ไฮดราเทส, *nahM* คือ 4-ไฮดรอกซี-2-คีโตวาเลเรท อัลโดเรส, *nahN* คือ 2-ไฮดรอกซีมิวโคนิกเซมิอัลดีไฮด์ ไฮโดรเลส)………………... 18

2.6 วิถีการย่อยสลายกรดซาลิไซลิกโดย *Rhodococcus* sp. สายพันธุ์ B4 (Grund และคณะ, 1992)…………………………………………………………….. 19

2.7 วิถีการย่อยสลายกรดเจนทิสิทโดย *Pseudomonas* sp. สายพันธุ์ U2 (Ning และคณะ, 2001) (NagI คือเจนทิเสท-1,2-ไดออกซีจีเนส, NagL คือมาริลไพรูเวท ไอโซเมอเรส, NagK คือ ฟูมาริลไพรูเวท ไฮโดรเลส………………………… 19

2.8 วิถีการย่อยสลายอะซีแนพธีน โดย *Alcaligenes eutrophus* และ*A.paradoxus* (Selifonov และคณะ, 1991)……………………………..…………………. 22

2.9 วิถีการย่อยสลายอะซีแนพธีน โดย*Cunninghamella elegans* (Pothuluri และคณะ, 1992)………………………………………………..………… 24

4.1 ลักษณะของอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM ที่มีฟลูออแรนธีน (1)อะซีแนพธีน (2) ฟีแนนทรีน (3)และฟลูออรีน(4) หลังการเลี้ยงเชื้อจากแหล่งน้ำที่ 6 เป็นเวลา 7 วัน หลังจากการถ่ายเชื้อ 5 ครั้งเปรียบเทียบกับชุดควบคุม............................... 45

4.2 ลักษณะโคโลนีแบคทีเรียสายพันธุ์ SP1, SP2 และ SP3 ที่เจริญบนอาหารแข็ง LB เป็นเวลา 3 วัน ที่อุณหภูมิ 30 ^{o}ซ.. 47

4.3 ลักษณะโคโลนีแบคทีเรียสายพันธุ์ SP2 ที่เจริญบนอาหารแข็ง LB เป็นเวลา 3 วัน ที่อุณหภูมิ 30 ^{o}ซ.. 49

4.4 ลักษณะการติสีย้อมของแบคทีเรียสายพันธุ์ SP2 ภายใต้กล้องจุลทรรศ์............ 50

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.5 ลักษณะรูปร่างของแบคทีเรียสายพันธุ์ SP2 ภายใต้กล้องจุลทรรศ์สเตอริโอ....... 50

4.6 ขนาดชิ้นยีน 16 เอสไรโบโซมัลดีเอ็นเอ ของแบคทีเรียสายพันธุ์ SP2…………… 52

4.7 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16 เอสไรโบโซมัลดีเอ็นเอ ของแบคทีเรียสายพันธุ์ SP2 เปรียบเทียบกับ *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ D16………………………….. 54

4.8 ลักษณะอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM ที่เกิดจากการย่อยสลายอะซีแนพธีน ความเข้มข้น 100 มก.ต่อลิตร โดย *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ SP2 เป็นเวลา 7 วัน 56

4.9 ก. การเจริญของแบคทีเรีย *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ SP2 ในการย่อยสลายอะซีแนพธีนความเข้มข้น 100 มก.ต่อลิตร
ข. การเจริญของแบคทีเรีย *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ SP2 ในการย่อยสลายอะซีแนพธีนความเข้มข้น 300 มก.ต่อลิตร
ค. การเจริญของแบคทีเรีย *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ SP2 ในการย่อยสลายอะซีแนพธีนความเข้มข้น 500 มก.ต่อลิตร
ง. การเจริญของแบคทีเรีย *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ SP2 ในการย่อยสลายอะซีแนพธีนความเข้มข้น 700 มก.ต่อลิตร
จ. การเจริญของแบคทีเรีย *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ SP2 ในการย่อยสลายอะซีแนพธีนความเข้มข้น 900 มก.ต่อลิตร.. 57

4.10 ก. TLC โครมาโตแกรม สารมัธยันตร์ที่เกิดจากการย่อยสลายอะซีแนพธีนที่ความเข้มข้น 100 มก.ต่อลิตร
ข. TLC โครมาโตแกรม สารมัธยันตร์ที่เกิดจากการย่อยสลายอะซีแนพธีนที่ความเข้มข้น 300 มก.ต่อลิตร
ค. TLC โครมาโตแกรม สารมัธยันตร์ที่เกิดจากการย่อยสลายอะซีแนพธีนที่ความเข้มข้น 500 มก.ต่อลิตร
ง. TLC โครมาโตแกรม สารมัธยันตร์ที่เกิดจากการย่อยสลายอะซีแนพธีนที่ความเข้มข้น 700 มก.ต่อลิตร
จ. TLC โครมาโตแกรม สารมัธยันตร์ที่เกิดจากการย่อยสลายอะซีแนพธีนที่ความเข้มข้น 900 มก.ต่อลิตร... 58

4.11 ก. HPLCโครมาโตแกรม ชนิดและปริมาณของสารมัธยันตร์ที่เกิดจากการย่อยสลายอะซีแนพธีนความเข้มข้น 500 มก.ต่อลิตร ที่เวลา 0 วัน
ข. HPLCโครมาโตแกรม ชนิดและปริมาณของสารมัธยันตร์ที่เกิดจากการย่อยสลายอะซีแนพธีนความเข้มข้น 500 มก.ต่อลิตร ที่เวลา 1 วัน

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

	ค. HPLCโครมาโตแกรม ชนิดและปริมาณของสารมัธยันตร์ที่เกิดจากการย่อยสลายอะซีแนพธีนความเข้มข้น 500 มก.ต่อลิตร ที่เวลา 2 วัน	
	ง. HPLCโครมาโตแกรม ชนิดและปริมาณของสารมัธยันตร์ที่เกิดจากการย่อยสลายอะซีแนพธีนความเข้มข้น 500 มก.ต่อลิตร ที่เวลา 3 วัน	
	จ.HPLC โครมาโตแกรม ชนิดและปริมาณของสารมัธยันตร์ที่เกิดจากการย่อยสลายอะซีแนพธีนความเข้มข้น 500 มก.ต่อลิตร ที่เวลา 4 วัน	
	ฉ. HPLCโครมาโตแกรม ชนิดและปริมาณของสารมัธยันตร์ที่เกิดจากการย่อยสลายอะซีแนพธีนความเข้มข้น 500 มก.ต่อลิตร ที่เวลา 5 วัน	
	ช. HPLCโครมาโตแกรม ชนิดและปริมาณของสารมัธยันตร์ที่เกิดจากการย่อยสลายอะซีแนพธีนความเข้มข้น 500 มก.ต่อลิตร ที่เวลา 6 วัน	
	ซ. HPLCโครมาโตแกรม ชนิดและปริมาณของสารมัธยันตร์ที่เกิดจากการย่อยสลายอะซีแนพธีนความเข้มข้น 500 มก.ต่อลิตร ที่เวลา 7 วัน..........................	59
4.12	TLC โครมาโตแกรมแสดงสารมัธยันตร์ที่เกิดจากการย่อยสลายอะซีแนพธีนความเข้มข้น 500มก.ต่อลิตร เป็นเวลา 7 วัน..	60
4.13	ก. TLCโครมาโตแกรม สารมัธยันตร์ในสารสกัดที่เป็นกลางและกรดที่ได้จากการย่อยสลายอะซีแนพธีน เป็นเวลา 54 ชม. ที่วิเคราะห์ด้วยวิธีanalytical TLC ข. TLCโครมาโตแกรม สารมัธยันตร์ในสารสกัดที่เป็นกลางและกรดที่ได้จากการย่อยสลายอะซีแนพธีน เป็นเวลา 54 ชม. ที่วิเคราะห์ด้วยวิธีpreparative TLC…	62
4.14	ก. HPLCโครมาโตแกรม สารมัธยันตร์บริสุทธิ์ A ที่มีค่าR_f เท่ากับ 0.63 ที่เกิดจากการย่อยสลายอะซีแนพธีน ข. HPLCโครมาโตแกรม สารมัธยันตร์บริสุทธิ์ A ที่มีค่าR_f เท่ากับ 0.41 ที่เกิดจากการย่อยสลายอะซีแนพธีน ค. HPLCโครมาโตแกรม สารมัธยันตร์บริสุทธิ์ A ที่มีค่าR_f เท่ากับ 0.25 ที่เกิดจากการย่อยสลายอะซีแนพธีน...	62
4.15	TLC โครมาโตแกรมของสารมัธยันตร์ A B C เปรียบเทียบกับอะซีแนพธีนควิโนน กรดแนพธาลีน 1,8 –ไดคาร์บอกซิลิก กรดซาลิไซลิก 2,5 ไดไฮดรอกซีเบนโซอิก และ กรดโปรโตคาทีคูอิก..	63
4.16	ก. HPLCโครมาโตแกรม สารมัธยันตร์ A ร่วมกับอะซีแนพธีนควิโนน ข. HPLCโครมาโตแกรม สารมัธยันตร์ A ร่วมกับกรดแนพธาลีน 1,8 –ไดคาร์บอกซิกลิก..	64
4.17	ก. การย่อยสลายแนพธาลีนโดย *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ SP2	

ข. การย่อยสลายไดเบนโซฟูแรนโดย *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ SP2
ค. การย่อยสลายไพรีนโดย *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ SP2
ง. การย่อยสลายอะซีแนพธิลีนโดย*Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ SP2……… 65
จ. การย่อยสลายแอนทราซีนโดย *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ SP2
ฉ. การย่อยสลายฟีแนนทรีนโดย *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ SP2
ช. การย่อยสลายฟลูออรีนโดย *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ SP2
ซ. การย่อยสลายฟลูออแรนธีนโดย *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ SP2………. 66

4.18 ก.การย่อยสลายแนพธาลีนแบบโคเมตาบอลิสมโดย *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ SP2
ข.การย่อยสลายแอนทราซีนแบบโคเมตาบอลิสมโดย*Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ SP2
ค.การย่อยสลายไดเบนโซฟูแรนแบบโคเมตาบอลิสมโดย*Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ SP2………………………………………………………………………. 68
ง.การย่อยสลายฟลูออแรนธีนแบบโคเมตาบอลิสมโดย*Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ SP2
จ.การย่อยสลายไพรีนแบบโคเมตาบอลิสมโดย*Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ SP2
ฉ.การย่อยสลายอะซีแนพธิลีนแบบโคเมตาบอลิสมโดย*Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ SP2…………………………………………………………………….. 69
ช.การย่อยสลายฟลูออรีนแบบโคเมตาบอลิสมโดย*Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ SP2
ซ.การย่อยสลายฟีแนนทรีนแบบโคเมตาบอลิสมโดย*Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ SP2………………………………………………………………………… 70

4.19 ก. การเจริญของ *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ SP2 ย่อยสลายอะซีแนพธิลีนแบบโคเมตาบอลิสม
ข.การเจริญของ *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ SP2 เมื่อย่อยสลายไดเบนโซฟูแรนแบบโคเมตาบอลิสม
ค. การเจริญของ *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ SP2 เมื่อย่อยสลายแนพธาลีนแบบโคเมตาบอลิสม... 72

4.20 ก. การเจริญของ *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ SP2 เมื่อย่อยสลายอะซีแนพธิลีนความเข้มข้น 75 มก.ต่อลิตรแบบโคเมตาบอลิสม

	ข. การเจริญของ *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ SP2 เมื่อย่อยสลายอะซีแนพธิลีน ความเข้มข้น 50 มก.ต่อลิตรแบบโคเมตาบอลิสม	
	ค. การเจริญของ *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ SP2 เมื่อย่อยสลายอะซีแนพธิลีน ความเข้มข้น 25 มก.ต่อลิตรแบบโคเมตาบอลิสม....................................	74
4.21	ก.การเจริญของ *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ SP2 เมื่อย่อยสลายแนพธาลีน ความเข้มข้น 250 มก.ต่อลิตรแบบโคเมตาบอลิสม	
	ข.การเจริญของ *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ SP2 เมื่อย่อยสลายแนพธาลีน ความเข้มข้น 200 มก.ต่อลิตรแบบโคเมตาบอลิสม	
	ค.การเจริญของ *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ SP2 เมื่อย่อยสลายแนพธาลีน ความเข้มข้น 150 มก.ต่อลิตรแบบโคเมตาบอลิสม	
	ง.การเจริญของ *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ SP2 เมื่อย่อยสลายแนพธาลีน ความเข้มข้น 100 มก.ต่อลิตรแบบโคเมตาบอลิสม...	75
4.22	ก.การเจริญของ *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ SP2 เมื่อย่อยสลายไดเบนโซฟูแรนความเข้มข้น 75 มก.ต่อลิตรแบบโคเมตาบอลิสม	
	ข.การเจริญของ *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ SP2 เมื่อย่อยสลายไดเบนโซฟูแรนความเข้มข้น 50 มก.ต่อลิตรแบบโคเมตาบอลิสม	
	ค.การเจริญของ *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ SP2 เมื่อย่อยสลายไดเบนโซฟูแรนความเข้มข้น 25 มก.ต่อลิตรแบบโคเมตาบอลิสม	76
4.23	ก. การเจริญของ *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ SP2 แบบโคเมตาบอลิสมโดยเติมแนพธาลีนภายหลังการเจริญของแบคทีเรีย	
	ข. การเจริญของ *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ SP2 แบบโคเมตาบอลิสมโดยเติมไดเบนโซฟูแรนภายหลังการเจริญของแบคทีเรีย	
	ค. การเจริญของ *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ SP2 แบบโคเมตาบอลิสมโดยเติมอะซีแนพธิลีนภายหลังการเจริญของแบคทีเรีย..	78

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 1

บทนำ

ปัจจุบันเป็นที่ยอมรับกันโดยทั่วไปว่าภาคอุตสาหกรรมจัดเป็นแหล่งสำคัญของมลพิษที่ปล่อยออกสู่สิ่งแวดล้อม ด้วยการพัฒนาเศรษฐกิจของประเทศจากระบบเกษตรกรรมสู่ระบบอุตสาหกรรมทำให้เกิดการขยายตัวของอุตสาหกรรมเป็นอย่างมากในช่วงระยะ 10 ปีที่ผ่านมา โดยมีอัตราการขยายตัวของภาคอุตสาหกรรมโดยเฉลี่ยเพิ่มสูงขึ้นร้อยละ 13.7 ต่อปี (เครือข่ายความร่วมมือมหาวิทยาลัยไทยด้านการจัดการสิ่งแวดล้อม, 2545) ผลที่ติดตามมาคือการใช้เชื้อเพลิงเพิ่มมากขึ้น โดยส่วนใหญ่อยู่ในภาคการขนส่ง ในรูปยานพาหนะ และภาคการผลิต ในรูปเครื่องจักรกลสำหรับการผลิตสินค้า แม้ว่าการพัฒนาทางอุตสาหกรรมจะทำให้เกิดความมั่นคงทางเศรษฐกิจ เกิดการสร้างงานในชุมชนและทำให้คุณภาพชีวิตของประชากรดีขึ้นก็ตามแต่ผลเสียที่ตามมาคือปัญหาสิ่งแวดล้อมเป็นพิษ ทั้งในดิน แหล่งน้ำ และอากาศ อันเนื่องมาจากการปล่อยของเสียมีพิษจากแหล่งต่างๆทั้งจากบ้านเรือนและโรงงานอุตสาหกรรมออกสู่สิ่งแวดล้อม จากข้อมูลการสำรวจของกรมควบคุมมลพิษ กระทรวงวิทยาศาสตร์ เทคโนโลยีและสิ่งแวดล้อม ในปี พ.ศ. 2539 พบว่าปริมาณกากของเสียอันตรายที่เกิดขึ้นทั่วประเทศมีทั้งสิ้น 1.6 ล้านตัน ในจำนวนนี้เป็นกากของเสียอันตรายที่เกิดจากโรงงานอุตสาหกรรมประมาณ 1.2 ล้านตัน หรือคิดเป็นร้อยละ 73.3 ของกากของเสียอันตรายที่เกิดขึ้นทั้งหมด ทั้งนี้จากจำนวนโรงงานอุตสาหกรรมทั่วประเทศประมาณ 104,000 โรงงาน มีโรงงานอุตสาหกรรมที่ก่อให้เกิดของเสียอันตรายอันมีผลต่อสุขภาพร่างกายของมนุษย์และคุณภาพสิ่งแวดล้อมอยู่ประมาณ 16,000 โรงงาน เช่น อุตสาหกรรมปิโตรเลียม อุตสาหกรรมเคมี อุตสาหกรรมพลาสติก อุตสาหกรรมแบตเตอรี่ อุตสาหกรรมถลุงโลหะ อุตสาหกรรมกำจัดศัตรูพืช เป็นต้น (กรมควบคุมมลพิษ, 2541) ในจำนวนนี้มีของเสียที่จัดเป็นของเสียอันตรายประเภทน้ำมันและปิโตรเลียมด้วย โดยของเสียประเภทนี้มีส่วนประกอบสารอินทรีย์หลายชนิดและที่สำคัญคือ สารในกลุ่มพอลิไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน (Polycyclic Aromatic Hydrocarbons, PAHs)

สาร PAHs เป็นสารประกอบอินทรีย์ที่มีโครงสร้างของคาร์บอนและไฮโดรเจนรวมกันเป็นวงอะโรมาติกเบนซีนมาเชื่อมต่อกันเป็นเส้นตรง (linear) เป็นมุมงอ (angular) หรือเป็นกลุ่ม (cluster) ตั้งแต่ 2 วงขึ้นไป จัดเป็นสารที่ก่อให้เกิดอันตรายร้ายแรงต่อสิ่งมีชีวิตเนื่องจากความเป็นพิษของตัวมัน เป็นสารซึ่งก่อให้เกิดมะเร็ง (carcinogen) เป็นสารที่ก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของยีน (mutagen) และเป็นสารที่ก่อให้เกิดลักษณะทารกในครรภ์มีรูปร่างวิปริต (teratogen) (WHO, 1983 อ้างถึงโดย Wilson และ Jones, 1993) โดยสารเหล่านี้มีแหล่งกำเนิดมาจากกระบวนการ

ผลิตในภาคอุตสาหกรรม น้ำมัน ถ่านหิน กระบวนการเผาไหม้ที่ไม่สมบูรณ์ของเชื้อเพลิงฟอสซิล (Volkering และคณะ, 1992) นอกจากนี้สาร PAHs ยังสามารถเกิดขึ้นได้เองตามธรรมชาติจากการรั่วซึมของน้ำมันตามธรรมชาติ ไฟไหม้ป่า และภูเขาไฟระเบิด (Cerniglia, 1992)

อะซีแนพธีน เป็นหนึ่งในสารประกอบในกลุ่มสาร PAHs ที่มีวงเบนซีน 2 วงเชื่อมต่อกับวงแหวน ไซโคลเพนเทน 1 วง มีการเรียงตัวเป็นกลุ่ม พบเป็นส่วนประกอบของสารครีโอโสต (creosote) (Mueller และคณะ, 1989) น้ำมันดำจาก ถ่านหิน (coal tar) และในควันบุหรี่ (Neurath, 1972) ก่อให้เกิดความเป็นพิษทั้งแบบเฉียบพลันและแบบเรื้อรัง ทำให้สัตว์น้ำตาย (Holcomb และคณะ, 1983) และเกิดกลายพันธุ์ของแมลง *Candida scothii* (Imshenetskii และคณะ , 1985) The United State Environmental Protection Agency (USEPA) จัดอะซีแนพธีน (acenaphthene) และสาร PAHs รวมทั้งหมด 16 ชนิด อยู่ในกลุ่มของสารก่อมลพิษที่ต้องป้องกันการปนเปื้อนและกำจัดออกจากสิ่งแวดล้อมอย่างเร่งด่วน (WHO, 1983 อ้างถึงโดย Wilson และ Jones, 1993)

ปัญหามลพิษในสิ่งแวดล้อมที่เกิดขึ้นในปัจจุบัน นักวิทยาศาสตร์ได้พยายามหาแนวทางที่มีประสิทธิภาพในการกำจัดสารพิษกลุ่มนี้ หนึ่งในวิธีการที่ใช้คือกระบวนการย่อยสลายทางชีวภาพ (bioremediation) โดยการใช้ประโยชน์จากความสามารถของจุลินทรีย์มาสลายสารพิษให้มีความเป็นพิษลดลงหรือหมดไป (Mueller และคณะ, 1989) ซึ่งเป็นวิธีที่ดีกว่าการบำบัดทางเคมี การฝังกลบ และการเผาที่อุณหภูมิสูง เนื่องจากปลอดภัยต่อสิ่งแวดล้อม ค่าใช้จ่ายต่ำ (Lee และ Cutright, 1996) และไม่ก่อให้เกิดสารพิษชนิดใหม่ที่มีอันตรายมากกว่าเดิม เนื่องจากจุลินทรีย์ใช้สารพิษเป็นแหล่งพลังงานและคาร์บอน

อย่างไรก็ตามการย่อยสลายสาร PAHs ทางชีวภาพนั้น ยังมีข้อจำกัดอยู่บ้างเช่น จุลินทรีย์ส่วนใหญ่ไม่สามารถย่อยสลายสาร PAHs ที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง ซึ่งมีความเป็นพิษสูง ละลายน้ำได้ต่ำ และมีความคงตัวมาก จึงยากต่อการย่อยสลายโดยจุลินทรีย์ได้ (Wilson และ Jone, 1993) แต่การย่อยสลายโดยกลุ่มจุลินทรีย์ (consortium) (Bouchez และคณะ,1995) และโคเมตาบอลิสม (co–metabolism) (Wilson และ Jones, 1993) เป็นกระบวนการที่ทำให้การย่อยสลายสาร PAHs มีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น ดังนั้นการคัดแยกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลายสาร PAHs จึงเป็นสิ่งที่สำคัญ อีกทั้งประเทศไทยตั้งอยู่ในพื้นที่ภูมิอากาศแบบร้อนชื้น ทำให้มีความหลากหลายทางชีวภาพสูงรวมถึงจุลินทรีย์ด้วย จึงมีความเป็นไปได้ที่จะสามารถคัดแยกจุลินทรีย์ท้องถิ่นที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายสารกลุ่มนี้ โดยมีข้อดีที่จุลินทรีย์ที่คัดแยกได้ย่อมสามารถปรับตัวได้ดีกับสภาพดินฟ้าอากาศท้องถิ่น (Wilson และ Jone, 1993) ซึ่งคาดว่าจะสามารถนำไปใช้เพื่อการบำบัดหรือกำจัดสารกลุ่มนี้จากสิ่งแวดล้อมที่มีการปนเปื้อนสาร PAHs ในประเทศไทยได้

วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

คัดแยก และจำแนกชนิดแบคทีเรียสายพันธุ์ใหม่ ที่สามารถย่อยสลายสารพอลิไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน รวมไปถึงศึกษาการเจริญ และความสามารถในการย่อยสลายสารพอลิไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน ของแบคทีเรียที่คัดแยกได้

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

แยกแบคทีเรียได้จากน้ำเสียที่ปนเปื้อนสารปิโตรเคมี ที่สามารถย่อยสลายสารพอลิไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนได้ และทราบลักษณะการย่อยสลายสารพอลิไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน เพื่อเป็นข้อมูลเบื้องต้นต่อการนำจุลินทรีย์นี้ไปใช้ประโยชน์ในการบำบัดปัญหาสิ่งแวดล้อมต่อไป

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 2

วารสารปริทัศน์

สารพอลิไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน (Polycyclic Aromatic Hydrocarbons, PAHs) เป็นสารประกอบอินทรีย์ที่พบปนเปื้อนอยู่ทั่วไปในสิ่งแวดล้อมทั้งในแหล่งน้ำ ดิน และอากาศ สาร PAHs เกิดจากกระบวนการสังเคราะห์ตามธรรมชาติ หรือจากกิจกรรมต่างๆของมนุษย์ เช่น การเผาไหม้เชื้อเพลิงในชีวิตประจำวัน การติดเครื่องยนต์ การประกอบอาหารในครัวเรือน และจากควันบุหรี่ โดยบริเวณแหล่งโรงงานอุตสาหกรรมปิโตรเคมี อุตสาหกรรมการผลิตและใช้สารเคลือบเนื้อไม้เป็นต้น จะพบการปนเปื้อนของสาร PAHs ในปริมาณสูง เมื่อสาร PAHs ปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อม จะตกค้างอยู่ในสิ่งแวดล้อมเป็นเวลานาน เนื่องจากมีโครงสร้างโมเลกุลที่เสถียร โดยปกติในธรรมชาติจะเป็นของแข็ง และละลายน้ำได้น้อยมาก รวมทั้งถูกดูดซับโดยสารอินทรีย์ได้อย่างรวดเร็ว ทำให้สาร PAHs สลายตัวได้ช้ามาก (Grosser และคณะ, 1991) PAHs สามารถเข้าสู่วงจรอาหารได้ โดยการสะสมอยู่ในพืชที่ขึ้นบนดินและน้ำที่ปนเปื้อนและเข้าสู่สัตว์ผ่านทางห่วงโซ่อาหารทำให้เข้าสู่มนุษย์ได้ในที่สุด (Means และคณะ, 1980) สาร PAHs เข้าสู่ร่างกายมนุษย์ได้ทั้งทางหายใจ รับประทาน และสัมผัสโดยตรงทางผิวหนัง

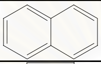
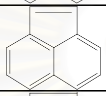
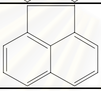
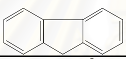
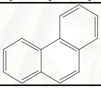
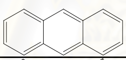
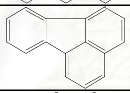
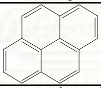
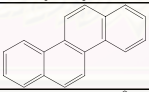
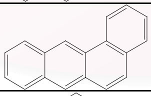
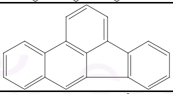
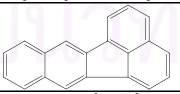
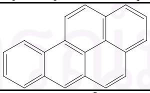
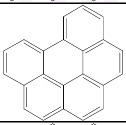
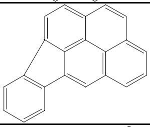
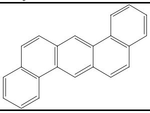
สาร PAHs รวม16 ชนิดเป็นสารก่อมลพิษที่สำคัญซึ่งทาง The United State Environment Protection Agency (USEPA) จัดให้อยู่ในกลุ่มของสารก่อมลพิษที่ต้องกำจัดออกจากสิ่งแวดล้อมอย่างเร่งด่วน (Cerniglia, 1992) ดังแสดงในตารางที่ 2.1 เนื่องจากพบว่าสาร PAHs หลายชนิดมีความเป็นพิษต่อสิ่งมีชีวิตเป็น สารก่อมะเร็ง (carcinogen) ก่อการกลายพันธุ์ (mutagen) และทำให้ทารกในครรภ์มีรูปร่างผิดปกติ (teratogen) อีกด้วย (Narro และคณะ, 1992)

เมื่อสารเหล่านี้ปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อม อาจเกิดการเปลี่ยนแปลงไปโดยกระบวนการต่างๆ ทั้งทางกายภาพ เคมีและชีวภาพ (Ashok และ Saxena ,1995) การย่อยสลายโดยจุลินทรีย์เป็นกระบวนการสำคัญในการกำจัดหรือลดความเป็นพิษของสาร PAHs ความสามารถในการย่อยสลายสาร PAHs พบในจุลินทรีย์ทุกกลุ่มทั้ง แบคทีเรีย รา ไซยาโนแบคทีเรีย และสาหร่ายเซลล์เดียว โดยจุลินทรีย์แต่ละกลุ่มจะมีกลไกเฉพาะและแตกต่างกันในการย่อยสลายสาร PAHs

การย่อยสลายสาร PAHs ที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำเกิดขึ้นได้ง่ายกว่ากลุ่มที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง ดังนั้นจุลินทรีย์อาจต้องอาศัยกิจกรรมร่วมกัน (synergism) หรือกระบวนการโคเมตาบอลิสมในการย่อยสลายสาร PAHs ที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง (Bouchez และคณะ, 1995) การศึกษาถึงกลไกต่างๆ ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการย่อยสลาย PAHs จึงมีความสำคัญต่อการใช้เป็นข้อมูลพื้น

ฐานสำหรับการนำเอาจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพมาใช้ในกระบวนการเร่งการย่อยสลายตามธรรมชาติ (bioremediation) เพื่อกำจัดสาร PAHs ออกจากสิ่งแวดล้อม

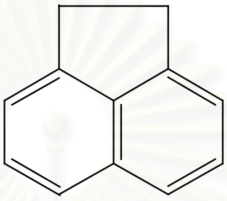
ตารางที่ 2.1 โครงสร้างและสมบัติทางเคมีของสาร PAHs 16 ชนิด
(Schirmer **และคณะ**, 1998)

สาร PAHs	**โครงสร้าง**	**น้ำหนักโมเลกุล**	**การละลายในน้ำที่อุณหภูมิ 25°ซ (มก.ต่อลิตร)**
แนพธาลีน		128.18	31
อะซีแนพธิลีน		152.20	4.3
อะซีแนพธีน		154.22	3.9
ฟลูออรีน		166.23	1.9
ฟีแนนทรีน		178.24	1.1
แอนทราซีน		178.24	0.05
ฟลูออแรนธีน		178.24	0.26
ไพรีน		202.26	0.13
ไครซีน		228.30	0.002
เบนซ์[*เอ*]แอนทราซีน		228.30	0.002
เบนซ์[*บี*]ฟลูออแรนธีน		252.32	0.0015
เบนซ์[*เค*]ฟลูออแรนธีน		252.32	0.0008
เบนโซ[*เอ*]ไพรีน		252.32	0.003
เบนโซ[จี,*เอช*,*ไอ*]เพอริลีน		276.34	0.0003
อินดิโน[1,2,3-*ซีดี*]ไพรีน		276.34	0.062
ไดเบนซ์[*เอ*,*เอช*]แอนทราซีน		278.36	0.0003

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

อะซีแนพธีน

อะซีแนพธีนเป็นสารประกอบอินทรีย์ชนิดหนึ่งในกลุ่มพอลิไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน มีโครงสร้างโมเลกุลประกอบด้วยคาร์บอน และไฮโดรเจนที่รวมกันเป็นอะโรมาติกเบนซีน 2 วงเชื่อมกับวงไซโคลเพนเทน 1 วง มีการเรียงตัวเป็นกลุ่ม (cluster arrangement) ดังแสดงในรูปที่ 2.1



รูปที่ 2.1 โครงสร้างโมเลกุลของอะซีแนพธีน

สมบัติของอะซีแนพธีน

สูตรโมเลกุล	$C_{12}H_{10}$
น้ำหนักโมเลกุล	154.22
ชื่อสามัญ	อะซีแนฟีโน (acenafeno)
ความถ่วงจำเพาะ	0.983
อุณหภูมิหลอมเหลว	95-97 ^{o}ซ
อุณหภูมิกลายเป็นไอ	279 ^{o}ซ
หมายเลขสากลทางเคมี (Cas Number)	83-32-9
พลังงานเรโซแนนซ์	7.76
ความดันไอ	3 มม. ปรอท ที่อุณหภูมิ 25 ^{o}ซ
การละลาย	4.3 มก.ต่อลิตรของน้ำ ที่อุณหภูมิ 25 ^{o}ซ ละลายได้ดีใน 95% เอทธานอล อีเธอร์ เบนซีน เมทธานอล อะซีโตน โทลูอีน
ลักษณะปรากฏ	เป็นผลึกสีขาว

แหล่งกำเนิดอะซีแนพธีน

อะซีแนพธีนพบเป็นส่วนประกอบของน้ำมันดิบ, น้ำมันดำจากถ่านหิน, ควันบุหรี่ (Neurath, 1972) ผลิตภัณฑ์ปิโตรเคมี ผลิตภัณฑ์จากถ่านหิน และเกิดจากการเผาไหม้หรือกระบวนการไพโรไลซิสของเชื้อเพลิงฟอสซิล (Jones และคณะ, 1989) ไอเสียรถยนต์ (Grimmer และคณะ, 1977) นอกจากนี้พบอะซีแนพธีนจากของเสียที่ปล่อยออกมาจากโรงงานอุตสาหกรรมที่เกี่ยวกับผลิตภัณฑ์ถนอมและรักษาเนื้อไม้ (Wilson และ Jones, 1993) ปิโตรเคมี ยาฆ่าแมลง เนื่องจากใช้อะซีแนพธีนในการสังเคราะห์สีย้อม พลาสติกและ ยาฆ่าแมลง (U.S. Environmental protection agency อ้างโดย Pothuluri และคณะ, 1992) จากการรั่วไหลของผลิตภัณฑ์ดังกล่าว จากการนำไปใช้ในกระบวนการอุตสาหกรรม รวมทั้งการขนส่ง การดูแลเก็บรักษา ตลอดจนการกำจัดกากของเสียจากอุตสาหกรรมดังกล่าว ทำให้อะซีแนพธีนปนเปื้อนในอากาศ พื้นดิน แหล่งน้ำใต้ดิน และแหล่งน้ำบนดิน (Mattox และ Humenick, 1980) ในประเทศไทย พบการปนเปื้อนอะซีแนพธีน และสาร PAHs ชนิดอื่น ในน้ำทะเลบริเวณอุตสาหกรรมแปรสภาพเรือเหล็กเก่ามาบตาพุด จังหวัดระยอง (พรศรี, 2533) และในอากาศเขตกรุงเทพมหานคร พบปริมาณสูงในบริเวณเส้นทางการจราจร โดยสาร PAHs จะเกาะติดกับฝุ่นละอองขนาดเล็ก (กรมควบคุมมลพิษ, 2541)

ความเป็นพิษของอะซีแนพธีน

อะซีแนพธีน จัดเป็นสารที่มีผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมก่อให้เกิดความเป็นพิษทั้งแบบเฉียบพลันและแบบเรื้อรัง โดยที่ความเข้มข้น 970 ไมโครกรัมต่อลิตร ทำให้สัตว์น้ำตาย (Holcomb และคณะ, 1983) และที่ความเข้มข้น 413 ไมโครกรัมต่อลิตร ทำให้ตัวอ่อนของปลา *Pimephales promelas* มีพฤติกรรมเฉื่อยชา (Cairns และ Nebeker, 1982) อะซีแนพธีนเป็นสารที่ก่อให้เกิดมะเร็ง (Leaderer, 1985) และก่อให้เกิดการกลายพันธุ์ โดยจะมีผลต่อเซลล์ตับและไตของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม, เกิดกลายพันธุ์ในแมลง *Candida scothii* (Imshenetskii และคณะ , 1985) ถ้าได้รับอะซีแนพธีนติดต่อกันเป็นเวลานานจะก่อให้เกิดโรคระบบทางเดินหายใจและยังสามารถกระตุ้นให้นิวเคลียส และกระบวนการที่เกี่ยวกับเซลล์ในพืชและจุลินทรีย์เปลี่ยน โดยทำให้มีขนาดเซลล์และปริมาณดีเอ็นเอเพิ่มขึ้น

การเปลี่ยนแปลงอะซีแนพธีนและสาร PAHs ในสิ่งแวดล้อม

เมื่อเข้าสู่สิ่งแวดล้อม สาร PAHs มักจะสะสมอยู่ในดิน และอากาศ โดยจะเกาะติดอยู่ในอนุภาคของดิน ตะกอน หรือฝุ่น ซึ่งสามารถเกิดการเปลี่ยนแปลงได้โดยขบวนการต่างๆ ทั้งทางด้านกายภาพ เคมีและชีวภาพ การเปลี่ยนแปลงของสาร PAHs เป็นไปได้หลายวิธี โดยจะเกิดขึ้นได้มากหรือน้อยเพียงใดขึ้นอยู่กับสมบัติทางกายภาพและทางเคมีของสาร PAHs นั้นๆ รวมทั้งขึ้นกับปัจจัยสิ่งแวดล้อมต่างๆ ด้วย (Ashok และ Saxena, 1995)

1. การดูดซับ (Sorption)

จากสมบัติที่สาร PAHs เป็นสารที่มีความสามารถในการละลายน้ำได้ต่ำ จึงถูกดูดซับติดกับอนุภาคของดินหรือตะกอนได้มาก โดยเฉพาะในดินที่ประกอบด้วยสารอินทรีย์มากจะถูกดูดซับไว้ได้ดี การถูกดูดซับให้ติดกับอนุภาคของดินหรือตะกอนได้อย่างเหนียวแน่นนั้นขึ้นอยู่กับความไม่มีขั้วของสาร PAHs ดังนั้นจึงทำให้สาร PAHs ที่มีมวลโมเลกุลสูงถูกเกาะติดแน่นเป็นเวลานานกว่าสาร PAHs ที่มีมวลโมเลกุลต่ำ

2. การระเหย (Volatillization)

ส่วนใหญ่สาร PAHs ที่ปนเปื้อนในดิน ระเหยได้ช้าและน้อยมาก เนื่องจากสาร PAHs เกาะติดแน่นอยู่ในอนุภาคดิน การระเหยของสาร PAHs เกิดจากการรวมตัวกับโครงสร้างของน้ำแล้วระเหยไป ซึ่งสาร PAHs ที่ปนเปื้อนในน้ำและอยู่ผิวน้ำจะมีอัตราการระเหยสูงกว่าสาร PAHs ที่อยู่ผิวดิน จากการศึกษาพบว่าสาร PAHs ที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ เช่น แนพธาลีน จะมีอัตราการระเหยได้สูงกว่าสาร PAHs ที่มีมวลโมเลกุลสูง

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3. การย่อยสลายโดยใช้แสง (Photochemical degradation)

การย่อยสลายสาร PAHs โดยใช้แสงนั้นเป็นกระบวนการย่อยสลายทางเคมี ซึ่งจะมีออกซิเจนเป็นตัวสำคัญที่ทำให้เกิดปฏิกิริยา กลไกการย่อยสลายจะขึ้นอยู่กับปริมาณออกซิเจน อุณหภูมิ และปริมาณความเข้มข้นของแสง อะซีแนพธีนถูกย่อยสลายโดยเกิดปฏิกิริยากับแสงได้ 1-อะซีแนพธีนอล และอะซีแนพธีโนน (Reyes และคณะ, 1998)

4. การย่อยสลายโดยจุลินทรีย์ (Microbial degradation)

จุลินทรีย์ในธรรมชาติใช้กระบวนการเมตาบอลิสมหลายแบบในการย่อยสลายสารประกอบทางธรรมชาติและสารสังเคราะห์ที่มนุษย์สร้างขึ้น ในขณะที่ภาคอุตสาหกรรมมีการพัฒนาอย่างรวดเร็ว จุลินทรีย์ก็มีวิวัฒนาการให้มีความสามารถย่อยสลายสารสังเคราะห์ชนิดต่างๆที่ปนเปื้อนเข้ามาในสิ่งแวดล้อมตาม ซึ่งก็รวมทั้งสาร PAHs ด้วย การปรับตัวของจุลินทรีย์เพื่อให้มีความสามารถในการย่อยสลายสารดังกล่าวได้อาจเกิดขึ้นโดยมีการชักนำให้สร้างเอนไซม์ที่จำเป็นหรือการเปลี่ยนแปลงในระดับยีนซึ่งเป็นผลทำให้จุลินทรีย์สามารถพัฒนาวิถีเมตาบอลิสมขึ้นมาใหม่เพื่อใช้ในการย่อยสลายสาร PAHs ได้ จุลินทรีย์แต่ละกลุ่มจะมีกลไกการย่อยสลายสาร PAHs แตกต่างกันไป อย่างไรก็ตามพบว่าการย่อยสลายสาร PAHs โดยจุลินทรีย์เป็นกระบวนการสำคัญในการทำให้เกิดการลดลงหรือกำจัดสาร PAHs ให้หมดไปจากสิ่งแวดล้อมได้ (Ashok และ Saxena, 1995)

การย่อยสลายอะซีแนพธีนและสาร PAHs โดยวิธีทางชีวภาพ

การย่อยสลายอะซีแนพธีนและสาร PAHs ชนิดอื่นๆโดยอาศัยกิจกรรมของจุลินทรีย์นั้นเป็นวิธีหนึ่งที่ได้รับการยอมรับว่ามีประสิทธิภาพในการกำจัดสาร PAHs และสารพิษอันตรายชนิดอื่น ที่ปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อมให้หมดไป หรือลดความเป็นพิษให้น้อยลง มีงานวิจัยพบว่าการย่อยสลายสารพิษโดยจุลินทรีย์เป็นกระบวนการหลักที่เกิดขึ้นในสิ่งแวดล้อม และมีผลลดการปนเปื้อนในดินและตะกอนดิน โดยสาร PAHs บางชนิดจะถูกแบคทีเรียย่อยสลายได้อย่างสมบูรณ์ (mineralization) ได้เป็นคาร์บอนไดออกไซด์ น้ำ และพลังงานที่ใช้ในการเจริญของเชื้อ หรือสาร PAHs บางชนิดอาจเกิดการเปลี่ยงแปลงโครงสร้างบางส่วน (partially transformed) กระบวนการทั้ง 2 ชนิด อาจเกิดโดยจุลินทรีย์เพียงชนิดเดียว หรือโดยกลุ่มจุลินทรีย์ (Cerniglia, 1992)

ข้อได้เปรียบของวิธีบำบัดการปนเปื้อนของอะซีแนพธีนและสาร PAHs อื่น โดยใช้การย่อยสลายด้วยวิธีชีวภาพคือ สามารถปฏิบัติได้ในพื้นที่ที่มีการปนเปื้อน โดยไม่ก่อให้เกิดความเสียหาย ช่วยลดค่าใช้จ่ายในการขนส่งและค่าแรงงาน สามารถกำจัดสารพิษได้อย่างถาวรและยังทำการบำบัดควบคู่ไปกับวิธีทางเคมี เพื่อให้สามารถทำลายสารพิษได้อย่างสมบูรณ์ แต่อย่างไรก็ตาม การย่อยสลายโดยวิธีทางชีวภาพก็มีข้อเสียคือ สารที่มีคลอรีนหรือโลหะเป็นองค์ประกอบในปริมาณสูงจะไม่ถูกทำลาย หรืออาจมีการผลิตสารตัวกลางที่มีความเป็นพิษสูงกว่าสารตั้งต้น และเสียค่าใช้จ่ายสูงกว่าวิธีการอื่นๆสำหรับขั้นแรกของการปฏิบัติงาน รวมทั้งต้องมีการควบคุมปัจจัยต่างๆ ทั้งทางชีวภาพและกายภาพ การบำบัดทางชีวภาพสามารถปฏิบัติได้ทั้งในพื้นที่ที่มีการ

ปนเปื้อน (in situ) หรือขนย้ายสารพิษไปบำบัดนอกพื้นที่ (ex situ) โดย Mark และคณะ (1992) รายงานถึงการพัฒนาวิธีบำบัดสาร PAHs ในขั้นแรก โดยใช้จุลินทรีย์ย่อยสลายสารพิษเพื่อให้โครงสร้างบางส่วนถูกทำลาย ขั้นต่อมาก็นำวิธีการบำบัด (land treatment) เข้ามาช่วย เพื่อให้สารตัวกลางที่เกิดขึ้นถูกกำจัดอย่างสมบูรณ์ วิธีการดังกล่าวช่วยลดค่าใช้จ่ายเมื่อเทียบกับการทำลายสาร PAHs โดยการเผาที่อุณหภูมิสูง ได้ถึง 3 เท่า

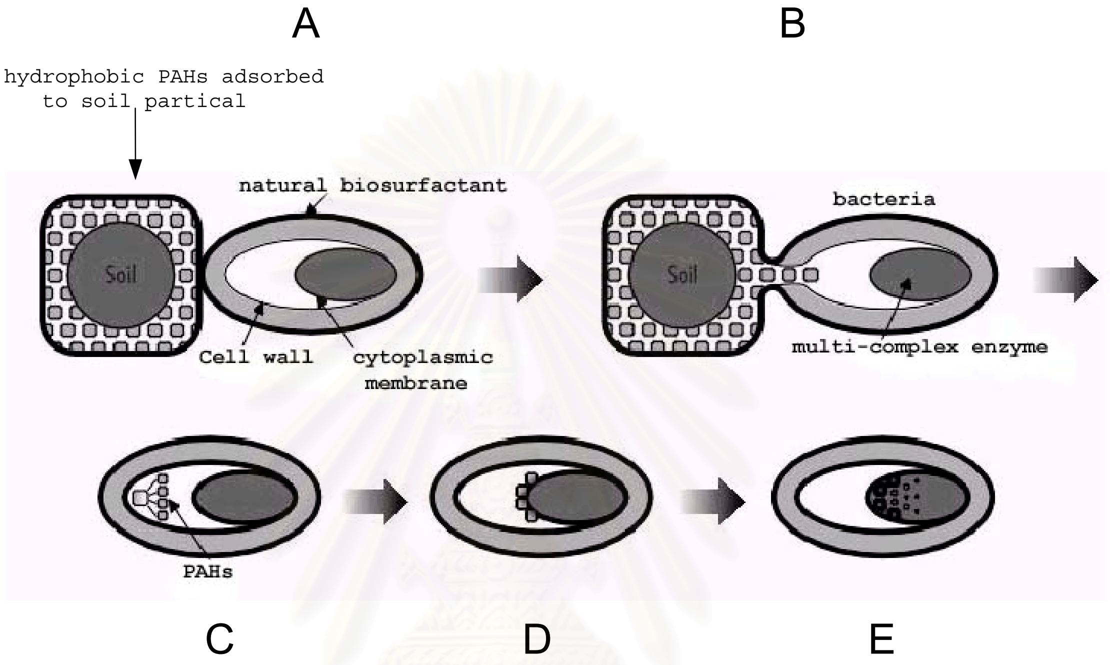
การย่อยสลายสาร PAHs โดยจุลินทรีย์บริสุทธิ์, กลุ่มจุลินทรีย์ และกระบวนการโคเมตาบอลิสมมีการศึกษามากว่า 80 ปีแล้ว (Cerniglia, 1992) แต่การนำวิธีดังกล่าวมาใช้ลดการปนเปื้อนของอะซีแนพธีนและสาร PAHs ได้อย่างมีประสิทธิภาพนั้น จำเป็นต้องทำความเข้าใจเกี่ยวกับจุลินทรีย์ ระบบเอนไซม์และสภาพแวดล้อมที่จำเป็นต่อการเจริญของจุลินทรีย์เพื่อให้เกิดการย่อยสลายได้มากที่สุด

การย่อยสลายสาร PAHs โดยจุลินทรีย์บริสุทธิ์

การย่อยสลายสาร PAHs สามารถเกิดขึ้นได้ทั้งในแบคทีเรีย รา ยีสต์ และสาหร่ายสีเขียวแกรมน้ำเงิน แต่นักวิจัยส่วนใหญ่ให้ความสำคัญกับการย่อยสลายโดยแบคทีเรียเนื่องจาก การย่อยสลายโดยเชื้อรา ยีสต์ และสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน (Cerniglia, 1992) จะทำให้สาร PAHs บางชนิดเกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างเพียงบางส่วน (partially transformed) ถึงแม้ว่าจะสามารถเปลี่ยนโครงสร้างได้สารมัธยันตร์ที่มีความเป็นพิษลดลงก็ตาม (Sutherland, 1992) แต่กระบวนการดังกล่าวจะเกิดขึ้นช้าเมื่อเทียบกับแบคทีเรีย นอกจากนี้แบคทีเรียยังสะดวกสำหรับการศึกษาวิวัฒนาการ วิถีการย่อยสลาย ตลอดจนถึงระดับพันธุศาสตร์ เพื่อนำข้อมูลไปพัฒนาสายพันธุ์ให้ได้แบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพต่อไป

โดยปกติแบคทีเรียจะย่อยสลายสารที่ละลายน้ำได้ง่ายกว่าสารที่ไม่ละลายน้ำ ดังนั้นการย่อยสลายสาร PAHs ซึ่งเป็นสารที่มีความสามารถในการละลายน้ำต่ำ แบคทีเรียทั่วไปจะไม่สามารถย่อยสลายสารนี้ได้ แต่มีแบคทีเรียบางชนิดเท่านั้นที่สามารถสร้างเอนไซม์ต่างๆ ที่ใช้ในการย่อยสลายสาร PAHs เพื่อจะนำไปใช้เป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงาน ส่วนใหญ่แบคทีเรียสายพันธุ์เดี่ยวจะสามารถย่อยสลายสาร PAHs น้ำหนักโมเลกุลต่ำ ที่ประกอบไปด้วยวงเบนซีน 2-3 วง แบคทีเรียมีกลไกนำสาร PAHs ไปใช้ โดยเข้าไปทำปฏิกิริยากับสารโดยการสัมผัสโดยตรงกับผลึกสาร PAHs แบคทีเรียบางชนิดสามารถสร้างสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ (biosurfactant) ซึ่งจะเพิ่มการละลายน้ำของสาร PAHs ช่วยให้แบคทีเรียสัมผัสกับสาร PAHs ได้ง่าย ปฏิกิริยาจะเกิดขึ้นที่ผนังเซลล์ จากนั้นสาร PAHs จะถูกส่งผ่านผนังเซลล์โดยการแพร่ (passive diffusion) โดยไม่ใช้พลังงานจากเซลล์ (Bugg และคณะ, 2000) เนื่องจากผนังเซลล์ของแบคทีเรียประกอบด้วย

ชั้นฟอสโฟไลปิด เมื่อสาร PAHs เข้าสู่เซลล์ เอนไซม์ตัวแรกที่เริ่มการย่อยสลายคือ ออกซิจีเนส กระบวนต่างๆจะดำเนินอย่างต่อเนื่องจนได้คาร์บอนไดออกไซด์ น้ำ และพลังงานที่ใช้ในการเจริญของแบคทีเรียโดย กระบวนการดังกล่าวจะเกิดอย่างสมบูรณ์ ต้องอาศัยกิจกรรมของเอนไซม์หลายชนิด ดังแสดงในรูปที่ 2.2



รูปที่ 2.2 **การย่อยสลาย** PAHs **โดยแบคทีเรีย** (www.enzymetech.com/knowledge/pahs-cre-coal.) (A **คือ** PAHs **ถูกละลายโดยสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่แบคทีเรียสร้างขึ้น**, B **คือ** PAHs **แพร่ผ่านผนังเซลล์ของแบคทีเรีย**, C **คือ** PAHs **ถูกย่อยสลายโดยเอนไซม์ในกระบวนการย่อยสลายขั้นแรก ภายในเซลล์แบคทีเรีย**, D **คือ** PAHs **แพร่ผ่านไซโตพลาสมิกเมมเบรนของแบคทีเรีย**, E **คือการย่อยสลาย** PAHs **อย่างสมบูรณ์โดยเอนไซม์หลายชนิด**)

พบว่าแบคทีเรียที่มีความสามารถดังกล่าว จะสามารถย่อยสลายสาร PAHs ได้หลายชนิด เนื่องจากออกซิจีเนส เป็นเอนไซม์ที่สามารถย่อยสลายสับสเตรตได้หลายชนิด (broad specificity enzyme) ซึ่งถือว่าเป็นลักษณะที่ดี เพราะในสิ่งแวดล้อมมีการปนเปื้อนสาร PAHs หลายชนิด (Baver และ Capone, 1988, Stringfellow และ Aitken, 1995)

แต่การย่อยสลายสาร PAHs ที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง ที่ประกอบด้วยวงเบนซีนตั้งแต่ 4 วง ขึ้นไป มีความคงตัวมาก ยากต่อการย่อยสลาย ดังนั้นแบคทีเรียเดี่ยวส่วนใหญ่ไม่สามารถย่อย

สลายสารดังกล่าวได้อย่างสมบูรณ์ ส่วนใหญ่การย่อยสลายสาร PAHs ที่มีโครงสร้างซับซ้อนนั้น ต้องอาศัยกระบวนการย่อยสลายแบบโคเมตาบอลิสม หรือ การย่อยสลายโดยกลุ่มจุลินทรีย์ (Wilson และ Jones, 1993)

การย่อยสลายสาร PAHs โดยกลุ่มจุลินทรีย์

มีการรายงานจำนวนมากเกี่ยวกับการย่อยสลายสาร PAHs ที่ต้องอาศัยการทำงานร่วมกันของจุลินทรีย์หลายชนิด (synergism) โดยจุลินทรีย์เหล่านั้นจะอยู่ร่วมกันแบบพึ่งพาอาศัยกัน ปกติสาร PAHs ที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงมีโครงสร้างซับซ้อน และถูกย่อยสลายได้ยากโดยจุลินทรีย์เพียงชนิดเดียว การย่อยสลายโดยกลุ่มจุลินทรีย์จะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการย่อยสลาย PAHs ได้ดียิ่งขึ้น โดยทำให้การย่อยสลายมีอัตราเร็วขึ้น และที่สำคัญยังทำให้เกิดการย่อยสลายสาร PAHs ได้อย่างสมบูรณ์ (mineralization) ความสัมพันธ์ หรือกลไกที่เกิดขึ้นในการทำงานร่วมกันของจุลินทรีย์ต่อการย่อยสลายสาร PAHs นั้น สิ่งที่สำคัญคือระบบเอนไซม์ จุลินทรีย์ชนิดที่1 สามารถสร้างเอนไซม์ที่สามารถย่อยสลายสารตั้งต้นได้ แต่ไม่มีระบบเอนไซม์ที่จะสามารถย่อยสารจนสมบูรณ์ เนื่องจากสารมัธยันตร์ที่เกิดขึ้นเป็นสารที่จุลินทรีย์นั้นไม่สามารถย่อยสลาย (dead-end metabolite) หรืออาจเป็นสารที่มีความเป็นพิษต่อจุลินทรีย์ชนิดที่ 1 ในขณะที่จุลินทรีย์ชนิดที่ 2 มีระบบเอนไซม์ที่สามารถย่อยสลายสารดังกล่าวได้ อาจทำให้สารมีความเป็นพิษลดลงหรือนำสารดังกล่าวใช้ในการเจริญได้ ผลจากการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดที่ 2 อาจสร้างวิตามิน กรดอะมิโน หรือสารที่ช่วยให้มีการย่อยสลายสารตั้งต้นดีขึ้นเช่น สารลดแรงตึงผิวชีวภาพ (biosurfactant) ซึ่งเป็นปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญและการย่อยสลายสาร PAHs ของแบคทีเรียชนิดอื่น (Mueller และคณะ, 1989)

การทดลองในห้องปฏิบัติการแสดงให้เห็นว่ากระบวนการย่อยสลายโดยกลุ่มจุลินทรีย์ มีความสำคัญต่อการย่อยสลายสาร PAHs ที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง ดังต่อไปนี้

Cerniglia และคณะ (1979) รายงานว่า *Beijerinckia* สายพันธุ์กลาย และ *Cunningnamella elegans* ร่วมกันย่อยสลายไดเบนโซฟูแรน โดยราย่อยสลายไดเบนโซฟูแรนได้*ทรานส์*-ไดไฮโดรไดออล แล้วแบคทีเรียจะย่อยสลายต่อจนได้คาทิคอล

ในปี 1996 Juhasz และคณะ รายงานว่า *Pseudomonas cepacia* สายพันธุ์ VUN 10001 VUN 10002 และVUN 10003 สามารถย่อยสลายเบนโซ[*เอ*]ไพรีน ไดเบนซ์ [*เอ,เอช*] แอนทราซีน และไครซีน ที่มีโครงสร้างประกอบด้วยวงเบนซีน 5, 6 และ4 ตามลำดับ เป็นแหล่งคาร์บอน และพลังงานได้

การศึกษาของ Boonchan และคณะ (2000) ใช้รา *Penicillium janthinellum* สายพันธุ์ VUO10004 ย่อยสลายเบนโซ[*เอ*]ไพรีน ได้เป็นสารมัธยันตร์ที่ไม่ถูกย่อยสลายต่อ (dead -end metabolites) เมื่อนำ *Stenotrophomonas maltophilia* สายพันธุ์ VUN10010 มาเลี้ยงร่วมกันกับราชนิดนี้ในอาหาร BSM เพื่อทำการย่อยสลายเบนโซ[*เอ*]ไพรีน พบการเจริญของแบคทีเรียและเกิดการย่อยสลาย เบนโซ[*เอ*]ไพรีนได้อย่างสมบูรณ์

การย่อยสลายสาร PAHs โดยกระบวนการโคเมตาบอลิสม (co-metabolism)

มีการรายงานเกี่ยวกับกระบวนการโคเมตาบอลิสมมาเป็นเวลานาน โดยส่วนใหญ่ให้การยอมรับว่าเป็นกระบวนการที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายสารพิษอันตรายในสิ่งแวดล้อม ซึ่งมีผู้ให้คำจำกัดความของกระบวนการนี้มากมายได้แก่

Alexander (1967) ให้คำจำกัดความว่า “โคเมตาบอลิสมคือการเปลี่ยนโครงสร้างสารอินทรีย์โดยจุลินทรีย์ ซึ่งจุลินทรีย์ไม่สามารถนำสารอินทรีย์นี้มาเป็นแหล่งพลังงานหรือเป็นองค์ประกอบสำคัญของเซลล์”

Dalton (1982) “โคเมตาบอลิสมคือการเปลี่ยนโครงสร้างสับสเตรตที่จุลินทรีย์ไม่สามารถนำไปใช้ในการเจริญ โดยจะเกิดขึ้นในสภาวะที่มีสับสเตรตในการเจริญหรือสารอื่นที่จุลินทรีย์สามารถเปลี่ยนโครงสร้างได้”

โคเมตาบอลิสมไม่ใช่กระบวนการเมตาบอลิสมแต่เป็นกระบวนการเปลี่ยนโครงสร้างของสับสเตรต ซึ่งจุลินทรีย์จำเป็นต้องได้พลังงานจากการย่อยสลายสับสเตรตที่สามารถใช้ในการเจริญ โดยเอนไซม์ที่เกิดขึ้นในขั้นตอนนี้สามารถเปลี่ยนโครงสร้างสับสเตรตที่แตกต่างกัน ผลจากการเปลี่ยนโครงสร้างสับสเตรตนี้จะไม่มีผลต่อจุลินทรีย์ไม่ว่าจะเป็นแหล่งพลังงาน แหล่งคาร์บอน หรือกระบวนการอื่นๆที่ใช้ในการเจริญ (John และ Cookson, 1995)

นอกจากนี้พบการใช้คำศัพท์อื่นที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการโคเมตาบอลิสมคือ โค-ออกซิเดชั่น (co-oxidation) ซึ่งมีความหมายเหมือนกันแต่จะเน้นหนักหรือมีความจำเพาะว่าเกิดจากกระบวนการออกซิเดชั่นเท่านั้น (Alexander, 1994) แต่ในปัจจุบันถือว่าคำนี้ให้ความหมายไม่เพียงพอเนื่องจากจำกัดที่ว่าต้องเกิดจากการออกซิเดชั่นเท่านั้น ซึ่งไม่ครอบคุมถึงปฏิกิริยาอื่นๆที่ไม่ใช่การออกซิเดชั่น ซึ่งปัจจุบันมีการศึกษาการย่อยสลายสารแบบโคเมตาบอลิสมในสภาวะไร้ออกซิเจน (Annweiler และคณะ, 2001)

เมื่อนำกระบวนการนี้มาประยุกต์ใช้ในการบำบัดสาร PAHs ที่ปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อม ซึ่งเชื่อว่าในสิ่งแวดล้อมกระบวนการนี้น่าจะเกิดขึ้นอยู่แล้ว เนื่องจากในสิ่งแวดล้อมมีการปนเปื้อนสาร PAHs หลายชนิด ถึงแม้ว่าจุลินทรีย์จะไม่สามารถนำสาร ที่เกิดจากกระบวนการ

โคเมตาบอลิสมไปใช้ในการเจริญ แต่อาจมีจุลินทรีย์ชนิดอื่นในสิ่งแวดล้อมนำเอาสารดังกล่าวเป็นแหล่งคาร์บอน และพลังงานก็เป็นได้ ซึ่งมีรายงานเกี่ยวกับประสิทธิภาพการย่อยสลายสาร PAHs แบบโคเมตาบอลิสมมากมาย โดยสามารถทำให้ย่อยสลายสาร PAHs ได้หลายชนิด และที่สำคัญสามารถย่อยสลายสาร PAHs ที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง ซึ่งยากต่อการย่อยสลายโดยจุลินทรีย์เพียงชนิดเดียว สับสเตรตที่จุลินทรีย์ใช้ในการเจริญอาจเป็นสารอินทรีย์ชนิดต่างๆที่อยู่ในบริเวณนั้นหรืออาจเป็นสาร PAHs ที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ ซึ่งจุลินทรีย์จะเจริญและเพิ่มจำนวนมากขึ้นแล้วเข้าไปย่อยสลายสาร PAHs ที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง

จากการศึกษาของ Walter และคณะ (1991) พบว่า *Rhodococcus* sp. สายพันธุ์ UW1 ที่แยกได้จากดินที่ปนเปื้อนสาร PAHs มีความสามารถในการเจริญบน ไพรีน ฟีแนนทรีน แอนทราซีน ฟลูออแรนธีน และไครซีน และมีความสามารถในการย่อยสลายแนพธาลีน ไดเบนโซฟูแรน ฟลูออรีน และ ไดเบนโซไธโอฟีน แบบโคเมตาบอลิสม โดยใช้ไพรีนเป็นแหล่งของการเจริญ

Boldrin และคณะ (1993) พบว่า *Mycobacterium* sp. สายพันธุ์ BB1 สามารถใช้ฟีแนนทรีน ไพรีน และฟลูออแรนธีน เป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงาน มีอัตราการย่อยสลายฟีแนนทรีนสูงสุด เมื่อนำสาร PAHs ทั้ง 3 ชนิดมาทดสอบประสิทธิภาพในการย่อยสลายฟลูออรีนแบบโคเมตาบอลิสม พบว่าเมื่อใช้ฟีแนนทรีนเป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงาน แบคทีเรียสามารถย่อยสลายฟลูออรีนแบบโคเมตาบอลิสมได้เร็วกว่าใช้ไพรีน และฟลูออแรนธีน เป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงานของแบคทีเรีย ดังนั้นการย่อยสลายแบบโคเมตาบอลิสมให้ได้ประสิทธิภาพจำเป็นต้องให้แบคทีเรียเจริญในสับสเตรตที่ใช้เป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงานได้ง่าย

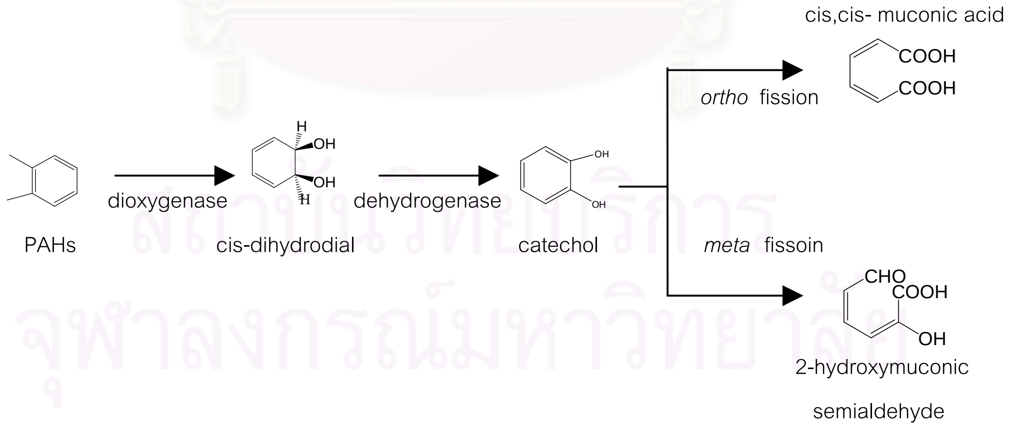
Ye และคณะ (1996) พบว่า *Sphingomonas paucimobilis* ซึ่งได้แยกจากดินที่มีการปนเปื้อนสารครีโอโสต มีความสามารถในการย่อยสลายไพรีนได้ เมื่อใช้ฟลูออแรนธีนเป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงาน

Juhasz และคณะ (1997) คัดแยกแบคทีเรียจากดินจากแหล่งปนเปื้อนสาร PAHs ได้กลุ่มแบคทีเรียประกอบด้วย แบคทีเรีย 5 สายพันธุ์ แต่คัดเลือกแบคทีเรียเพียง 3 สายพันธุ์ ได้แก่*Burkholderia cepacia* สายพันธุ์ VUN10001 VUN10002 และVUN10003มารวมกันเป็นกลุ่มแบคทีเรีย พบว่าสามารถใช้ไพรีน ฟลูออรีน และฟีแนนทรีน เป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงาน นอกจากนี้ยังสามารถย่อยสลายฟลูออแรนธีน เบนโซ [*เอ*] ไพรีน ไดเบนซ์[*เอ,เอช*] แอนทราซีน ซึ่งมีโครงสร้างประกอบด้วยวงเบนซีน 5 วง แบบโคเมตาบอลิสม โดยมีฟีแนนทรีนเป็นสับสเตรตเพื่อการเจริญของแบคทีเรีย

วิถีการย่อยสลายสารอะซีแนพธีนและ PAHs โดยกระบวนการทางชีวภาพ

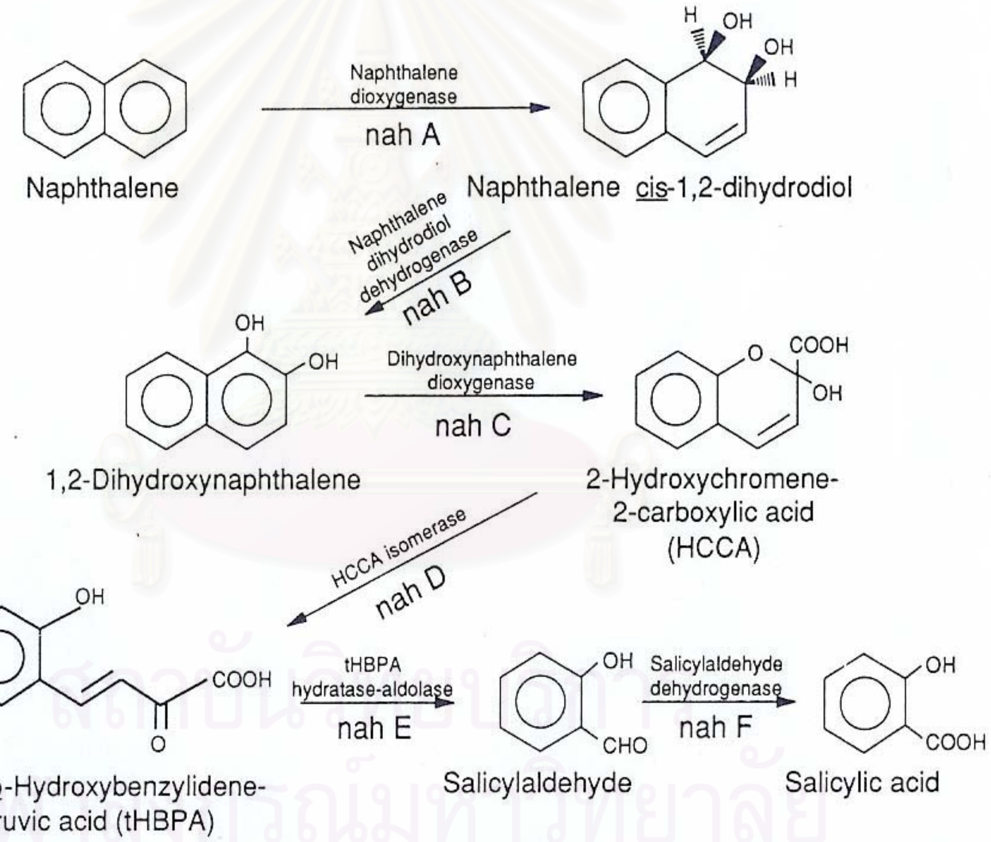
กระบวนการย่อยสลายสาร PAHs เกิดขึ้นได้ทั้งในสภาวะที่มีออกซิเจน (aerobic) และไร้ออกซิเจน (anaerobic) แต่เนื่องจากกระบวนการย่อยสลายในสภาวะไร้ออกซิเจนเกิดขึ้นได้ช้า (Harayama, 1997) รายงานส่วนใหญ่จึงมุ่งเน้นศึกษากระบวนการย่อยสลายในสภาวะที่มีออกซิเจน

กระบวนการย่อยสลายสาร PAHs โดยจุลินทรีย์ จะเริ่มจากการนำออกซิเจน 1 อะตอม หรือ 2 อะตอมเข้ายังวงอะโรมาติก ได้เป็น ซิส-ไดไฮโดรไดออล ซึ่งเกิดจากการเร่งปฏิกิริยาโดยระบบออกซิจีเนส คือ โมโนออกซิจีเนส และไดออกซิจีเนส ตามลำดับ พบว่าแบคทีเรียจะย่อยสลายสาร PAHs โดยการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ซึ่งจะเกิดได้ทั้งโมโนออกซิจีเนส และไดออกซิจีเนส แต่ราและสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม จะเกิดย่อยสลายโดยโมโนออกซิจีเนส จากนั้นเร่งปฏิกิริยาต่อโดย ซิส- ไดไฮโดรไดออลดีไฮโดรจีเนส ได้ป็นสารอนุพันธุ์ประเภทไดไฮดรอกซิล แล้วสับสเตรตที่คล้ายกับคาทีคอลก็จะถูกตัดด้วยออกซิจีเนสผ่านทางการแตกวงเบนซีนแบบออโธ (intradiol pathway) ที่เกิดขึ้นระหว่างอะตอมคาร์บอนที่มีกลุ่มไฮดรอกซิล 2 อะตอม อยู่ติดกันได้เป็น กรด *ซิส, ทรานส์* มิวโคนิก หรือวิถีหนึ่งผ่านทางการแตกวงเบนซีนแบบ เมตา (extradiol pathway) ที่เกิดขึ้นระหว่างอะตอมคาร์บอนที่มีกลุ่มไฮดรอกซิลกับอะตอมคาร์บอนที่อยู่ถัดมา (Cerniglia, 1992) ดังแสดงในรูปที่ 2.3



รูปที่ 2.3 วิถีการย่อยสลายสาร PAHs ทั่วไปโดยแบคทีเรีย (Cerniglia, 1992)

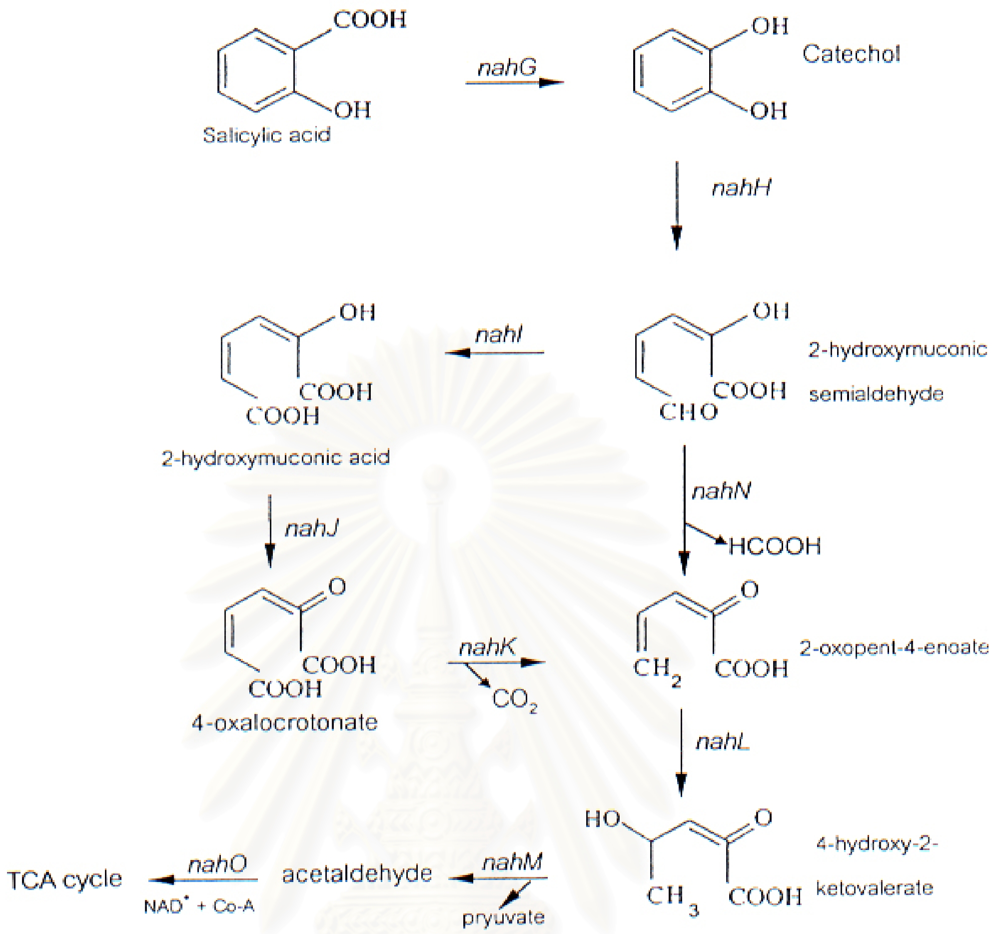
มีการรายงานเกี่ยวกับวิถีการย่อยสลาย PAHs โดยใช้แนพธาลีนเป็นต้นแบบในการศึกษาวิถีการย่อยสลายรวมทั้งยีนที่เกี่ยวข้องในวิถีการย่อยสลายสาร PAHs ชนิดอื่น เนื่องจากแนพธาลีนเป็นสารที่มีโครงสร้างง่าย ที่ประกอบด้วยวงเบนซีน 2 วง เชื่อมต่อกัน Yen และ Serdar (1988) ได้ศึกษาการย่อยสลายแนพธาลีนรวมทั้งยีนที่เกี่ยวข้องกับวิถีการย่อยสลายโดยเชื้อ *Pseudomonas putida* สายพันธุ์ G7 พบว่ามีวิถีการย่อยสลาย 2 ทาง คือ upper pathway ทำหน้าที่เปลี่ยนแนพธาลีนไปเป็นกรดซาลิไซลิก และ lower pathway ที่ย่อยสลายกรดซาลิไซลิกจนกระทั่งได้สารมัธยันตร์ที่พร้อมเข้าสู่วัฏจักรทีซีเอ (TCA cycle) ได้แก่ ไพรูเวต และ อะซีทัลดีไฮด์ ซึ่งในแต่ละวิถีการย่อยสลายต้องอาศัยการทำงานร่วมกันของเอนไซม์หลายชนิดที่ประมวลรหัสมาจากยีนต่างๆ ดังแสดงในรูปที่ 2.4



รูปที่ 2.4 **วิถีการย่อยสลายแนพธาลีนในส่วน** upper pathway **และยีนที่เกี่ยวข้อง** (Eaton **และ** Chapman, 1992)

นอกจากนี้ยังมีการรายงานเกี่ยวกับวิถีการย่อยสลายแนพธาลีนโดย *Sphingomonas yanoikuyae* B1 (Kim และคณะ, 1997) ซึ่งมีความคล้ายคลึงกับการย่อยสลายแนพธาลีนไปเป็นกรดซาลิไซลิกโดย *Pseudomonas putida* G7 (Yen และ Serdar, 1988) แนพธาลีนจะถูกเติมออกซิเจน 2 อะตอมกลายเป็น แนพธาลีน *ซิส*-1,2-ไดไฮโดรไดออล (naphthalene *cis*-1,2-dihydrodiol) จากการทำงานของแนพธาลีนไดออกซีจีเนส จากนั้นจะเปลี่ยนเป็น 1,2-ไดไฮดรอกซีแนพธาลีน (1,2-dihydroxynaphthalene) จากกิจกรรมของแนพธาลีนไดไฮโดรไดออลดีไฮโดรจีเนส จากนั้นไดไฮดรอกซีแนพธาลีนดีไฮโดรจีเนสจะออกซิไดซ์1,2-ไดไฮดรอกซีแนพธาลีนไปเป็นกรด 2-ไฮดรอกซีโครมีน-2-คาร์บอกซิลิก (2-hydroxychromene -2-carboxylic acid: HCCA) จากนั้นจะถูกเปลี่ยนเป็น กรด *ทรานส์*-โอ-ไฮดรอกซีเบนซิลิดีนไพรูวิก (*trans*-0-hydroxybenzylidenepyruvic acid: tHBPA) จากกิจกรรมของ HCCAไอโซเมอเรส จากนั้นเปลี่ยนเป็นซาลิไซรัลดีไฮด์ (salicylaldehyde) และกรดซาลิไซลิก (salicylic acid) จากการทำงานของไฮดราเทส-อัลโดเลส และซาลิไซรัลดีไฮด์ดีไฮโดรจีเนส ตามลำดับ จากนั้นจุลินทรีย์ส่วนใหญ่จะเปลี่ยนกรดซาลิไซลิกไปเป็นคาทีคอลโดยซาลิไซเลสไฮดรอกซีเลส (salicylate hydroxylase) เพื่อแตกวงและเข้าสู่วัฏจักรเครบส์ต่อไป ดังแสดงในรูปที่ 2.5

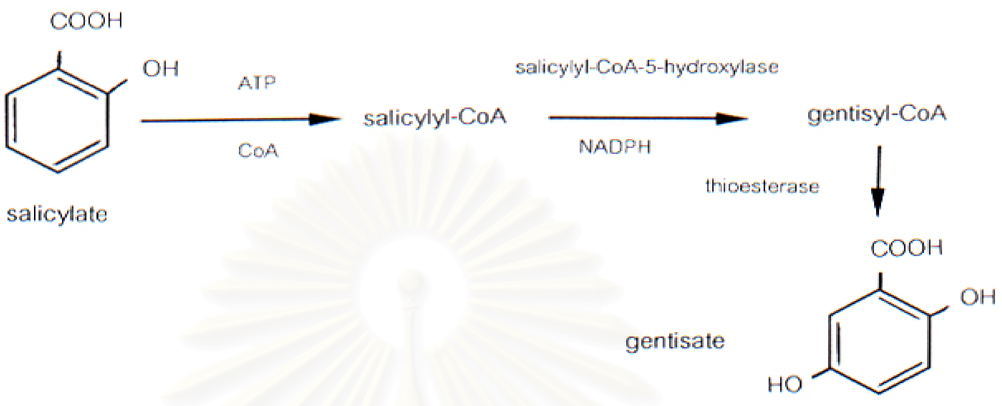
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



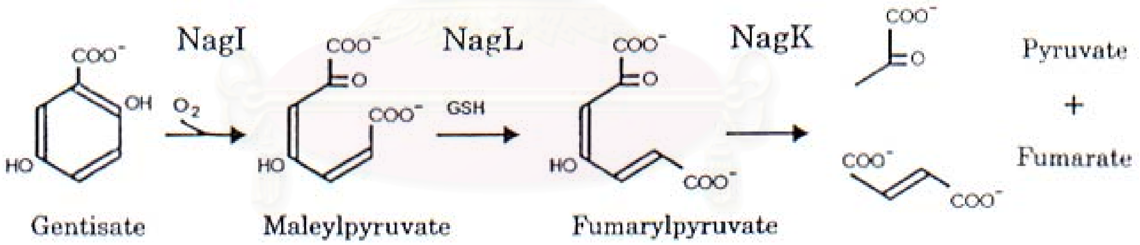
รูปที่ 2.5 วิถีการย่อยสลายกรดซาลิไซลิก (Yen และ Gunsalus, 1982) (*nahG* คือซาลิไซเลส ไฮดรอกซีเลส, *nahH* คือคาทีคอล-2,3-ไดออกซีจีเนส, *nahI* คือ 2-ไฮดรอกซีมิวโคนิกเซมิอัลดีไฮด์ ดีไฮโดรจีเนส, *nahJ* คือ 2-ไฮดรอกซีมิวโคเนท ดีไฮโดรจีเนส, *nahK* คือ 4-ออกซาโลโครโตเนท ดีคาร์บอกซิเลส, *nahL* คือ 2-ออกโซเพนท์- 4-อีโนเอท ไฮดราเทส, *nahM* คือ 4-ไฮดรอกซี-2-คีโตวาเลเรท อัลโดเรส, *nahN* คือ 2-ไฮดรอกซีมิวโคนิกเซมิอัลดีไฮด์ ไฮโดรเลส)

มีรายงานว่าการย่อยสลายเบนซีนโดยกระบวนการทางชีวภาพในสภาวะที่มีออกซิเจน (Baker และคณะ, 1994) เบนซีนไม่ได้ถูกย่อยสลายผ่านทางคาทีคอลแต่เพียงวิถีเดียว อาจจะถูกย่อยสลายผ่านทางกรดโปรโตคาทีคูอิก ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Kiyohara และคณะ (1972) ที่พบการย่อยสลายฟีแนนทรีนผ่านกรดโปรโตคาทีคูอิก นอกจากนี้ยังมีรายงานการย่อยสลายกรดซาลิไซลิกที่ไม่ผ่านทางคาทีคอล แต่ย่อยสลายกรดซาลิไซลิกเป็นกรดเจนทิสิก เช่น การย่อยสลายกรดซาลิไซลิกโดย *Rhodococcus* sp. สายพันธุ์ B4 ดังแสดงในรูปที่ 2.6 (Grund และคณะ,

1992) และกรดเจนทิสิกจะถูกออกซิไดซ์เป็นมาริลไพรูเวท (maleylpyruvate) โดยเจนทิเสท-1,2-ไดออกซีจีเนส (gentisate-1,2-dioxygenase) จากนั้นจะถูกเปลี่ยนเป็น ไพรูเวทและฟูมาเรท (Ning และคณะ, 2001) ดังแสดงในรูปที่ 2.7



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



รูปที่ 2.7 **วิถีการย่อยสลายเจนทิเสทโดย** *Pseudomonas* sp. **สายพันธุ์** U2 (Ning **และคณะ**, 2001) (NagI **คือเจนทิเสท**-1,2-**ไดออกซีจีเนส**, NagL **คือมาริลไพรูเวทไอโซเมอเรส**, NagK **คือฟูมาริลไพรูเวท ไฮโดรเลส**)

การย่อยสลายอะซีแนพธีนโดยกระบวนการชีวภาพ

การย่อยสลายอะซีแนพธีนมีรายงานการศึกษามาเป็นเวลานาน ทั้งในแบคทีเรีย ราและสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม สามารถย่อยสลายอะซีแนพธีนได้ ดังสรุปไว้ในตารางที่ 2.2 โดยส่วนใหญ่เป็นการย่อยสลายแบบเปลี่ยนแปลงโครงสร้างโมเลกุลให้เป็นสารมัธยันตร์ชนิดต่างๆ (biotransformation) มีแบคทีเรียบางชนิดเท่านั้นที่สามารถย่อยสลายอะซีแนพธิลีนเพื่อใช้เป็นแหล่งพลังงาน และคาร์บอนได้ ถึงแม้ว่าสิ่งมีชีวิตแต่ละกลุ่มอาศัยกิจกรรมของเอนไซม์ที่แตกต่างกันไปในการย่อยสลายอะซีแนพธีน แต่ได้ผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากกระบวนการย่อยสลายความคล้ายคลึงกัน

ตารางที่ 2.2 จุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายอะซีแนพธีน

สายพันธุ์แบคทีเรีย	เอกสารอ้างอิง
แบคทีเรีย	
Beijerinckia sp.	Schocken และ Gibson (1984)
Beijerinckia sp. B8/36	Schocken และ Gibson (1984)
Alcaligenes eutrophus	Selifonov และคณะ (1993)
Alcaligenes paradoxus	Selifonov และคณะ (1993)
Pseudomonas sp. A4	Komatsu และคณะ (1993)
Pseudomonas aeruginosa PAO1	Selifonov และคณะ (1996)
Pseudomonas sp. A2279	Selifonov และคณะ (1996)
Pseudomonas sp. BR	Selifonov และคณะ (1998)
Pseudomonas sp. BC	Selifonov และคณะ (1998)
Sphingomonas sp.	Hormishch และคณะ (2000)
Sphingomonas aromaticivorans	Shi และคณะ (2001)
รา	
Cunninghamella elegans	Pothuluri และคณะ 1992

วิถีเมตาบอลิสมการย่อยสลายอะซีแนพธีนโดยแบคทีเรีย

ในอดีตมีการศึกษาการย่อยสลายอะซีแนพธีนอย่างจำกัด ส่วนใหญ่เป็นการย่อยสลายแบบเปลี่ยนแปลงโครงสร้างโมเลกุลของอะซีแนพธีนให้เป็นสารมัธยันตร์ชนิดต่างๆ (biotransformation) (Pothuluri และคณะ, 1992) ได้แก่

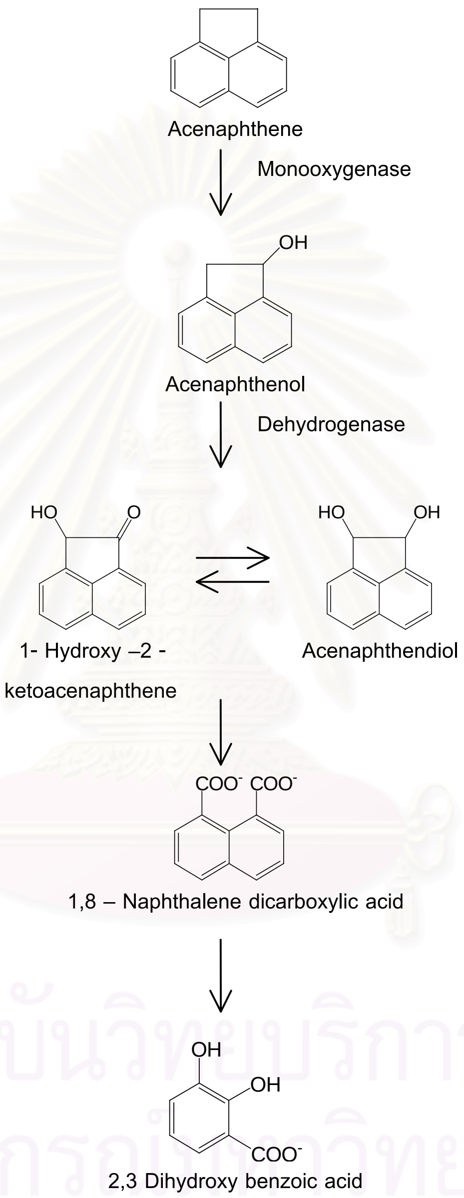
Schocken และ Gibson (1984) ศึกษาการย่อยสลายอะซีแนพธีนแบบโคเมตาบอลิสมโดย *Beijerinckia* sp. ที่ใช้ไบเฟเนล (biphenyl) เป็นแหล่งคาร์บอน และพลังงาน พบว่าสามารถเปลี่ยนโครงสร้างอะซีแนพธีนเป็น อะซีแนพธีนอล โดยอาศัยกิจกรรมของโมโนออกซิจีเนส และเกิดกระบวนการไฮดรอกซีเลชั่นได้ อะซีแนพธีโนน หลังจากนั้นจะถูกออกซิไดซ์ด้วยดีไฮโดรจีเนส เป็น 1-ไฮดรอกซี-2-คีโตอะซีแนพธีน และ1-2-ไดไฮดรอกซีอะซีแนพธิลีน ซึ่งเป็น tautomer และจะถูกออกซิไดซ์ หรือรีดิวซ์ด้วยดีไฮโดรจีเนส และรีดักเทส จนกลายเป็น อะซีแนพธีนควิโนน เป็นผลิตภัณฑ์สุดท้าย แสดงว่า *Beijerinckia* sp.ไม่สามารถแตกวงไซโคลเพนเทนได้

Selifonov และคณะ (1996) ศึกษาการย่อยสลายอะซีแนพธีนโดย *Pseudomonas* sp. สายพันธุ์ PAO1 ที่มียีนแนพธาลีนไดออกซีจีเนสบน พลาสมิด NAH 7 พบว่าสามารถเปลี่ยนโครงสร้างอะซีแนพธีนเป็น อะซีแนพธีนอล และอะซีแนพธีโนน โดยการเติมออกซิเจน 1 อะตอมเข้าที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 1 ของกลุ่มเมทิเลนิก (methylenic group) โดยเอนไซม์โมโนออกซิจีเนส หลังจากนั้นดีไฮเดรสได้ *ซิส*-หรือ *ทรานส์*- อะซีแนพธีน -1, 2- ไดออล แต่ส่วนใหญ่มักพบเป็น *ซิส*- และจะถูกออกซิไดซ์ หรือรีดิวซ์ด้วยดีไฮโดรจีเนส และรีดักเทสจนกลายเป็น อะซีแนพธีนควิโนน และจะแตกตัวได้เองเป็น กรดแนพธาลีน 1, 8- ไดคาร์บอกซิลิก ซึ่งพบในรูปแอนไฮไดรด์ เป็นผลิตภัณฑ์สุดท้าย

Selifonov และคณะ (1998) ศึกษาการย่อยสลายอะซีแนพธีนศึกษาการย่อยสลายอะซีแนพธีนแบบโคเมตาบอลิสมโดย *Pseudomonas* sp. ที่ใช้แนพธาลีน เป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงาน และติดตามการเปลี่ยนโครงสร้างโดยติดฉลากด้วย ^{13}C ที่คาร์บอนตำแหน่ง ที่ 1 พบว่าสามารถเปลี่ยนโครงสร้างอะซีแนพธีนเป็น อะซีแนพธีนอล อะซีแนพธีโนน อะซีแนพธีน -1, 2- ไดออล และกรดแนพธาลีน 1, 8- ไดคาร์บอกซิลิก ตามลำดับ โดยอาศัยกิจกรรมของยีน แนพธาลีน 1,2-ไดออกซิจีเนส ที่เร่งให้เกิดปฏิกิริยาโมโนออกซิเดสในขั้นตอนแรก

แต่ในปี 1993 Selifonov และคณะ รายงานการย่อยสลายอะซีแนพธีนโดย *Alcaligenes eutrophus* และ *A. paradoxus* ที่สามารถใช้ อะซีแนพธีน ซาลิไซเลท และ เจนทิเสท (2,5- ไดไฮดรอกซีเบนโซเอท) เป็นแหล่งคาร์บอน และพลังงาน พบว่า อะซีแนพธีนจะถูกเติมออกซิเจน 1 อะตอมลงบนวงไซโคลเพนเทนได้ผลิตภัณฑ์เป็น อะซีแนพธีนอล จากกิจกรรมของโมโนออกซีจีเนส หลังจากนั้นจะถูกออกซิไดซ์ด้วยไดออลดีไฮโดรจีเนส ไปเป็น 1-ไฮดรอกซี-2-คีโตอะซีแนพธีน และ

อะซีแนพธีนไดออล ซึ่งเป็น tautomer และจะถูกออกซิไดซ์ หรือรีดิวซ์ และแตกตัวได้เอง ทำให้วงไซโคลเพนเทนแตกออกจนได้ผลิตภัณฑ์เป็น กรด1,8-แนพธาลีนไดคาร์บอกซิลิก และกรด 3-ไฮดรอกซีเจนซีน-1,2-ไดคาร์บอกซีลิก ดังแสดงในรูปที่ 2.8



รูปที่ 2.8 **วิถีการย่อยสลายอะซีแนพธีนโดย** *Alcaligenes eutrophus* **และ** *Alcaligenes paradoxus* (Selifonov **และคณะ**, 1991)

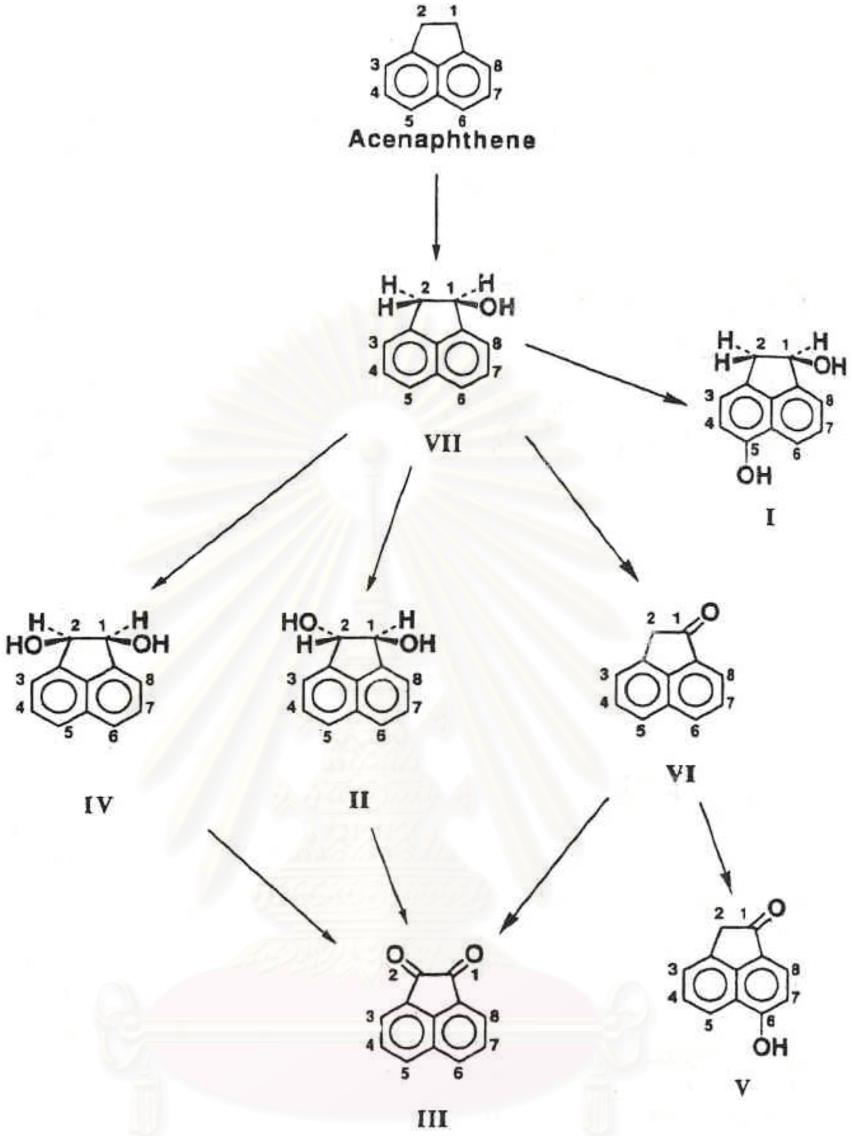
การย่อยสลายอะซีแนพธีนโดยรา

การย่อยสลายอะซีแนพธีนแบบโคเมตาบอลิสม โดย *Cunninghamella elegans* ที่ใช้แนพธาลีนเป็นแหล่งคาร์บอน และพลังงาน *Cunninghamella elegans* สามารถเปลี่ยนโครงสร้างของอะซีแนพธีนเป็น สารฟีนอล ควิโนน *ทรานส์* ไดไฮโดรไดออล และอีปอกไซด์ ซึ่งมีความเป็นพิษลดลง โดย*Cunninghamella elegans* จะใช้ไซโทโครม พี-450 โมโนออกซิจีเนส ในการออกซิไดซ์โมเลกุลของอะซีแนพธีน โดยเข้าจับที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 1 ทำให้เกิด 1-อะซีแนพธีนอล ซึ่งวิถีการย่อยสลายนี้คล้ายคลึงกับการย่อยสลายอะซีแนพธีนโดยแบคทีเรีย ดังแสดงในรูปที่ 2.9 ต่อจากนั้นจะถูกออกซิไดซ์ โดยเกิดกระบวนการไฮดรอกซิเลชั่นได้ *ซิส,ทรานส์*, 1,2-ไดไฮดรอกซีอะซีแนพธีน 1,5-ไดไฮดรอกซีอะซีแนพธีน และ 1-อะซีแนพธีโนน โดย1,5-ไดไฮดรอกซีอะซีแนพธีน และ 6-ไฮดรอกซีอะซีแนพธีโนน เป็นสารที่ถูกออกซิไดซ์ที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 5 และ 6 ซึ่งผลที่ได้นี้คล้ายคลึงกับการออกซิไดซ์ แนพธาลีนซึ่งชี้ว่าสารทั้ง 2 ชนิดนี้ เป็น isomerize spontaneously กัน (Pothuluri และคณะ, 1992)

การย่อยสลายอะซีแนพธีนโดยสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม

วิถีการย่อยสลายอะซีแนพธีนในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมพบว่า อะซีแนพธีนจะถูกออกซิไดซ์เป็นอะซีแนพธีนอีพอกไซด์จากกิจกรรมของเอนไซม์ไซโทโครม P_{450} จากนั้นอีพอกไซด์ไฮโดรเลสจะเติมไฮโดรเจนและหมู่ไฮดรอกซิลลงในโมเลกุลเกิดเป็น *ซิส*- และ*ทรานส์*-1,2-อะซีแนพธีนไดออล, อะซีแนพธีนควิโนน และกรดแนพธาลิก (Hopskins และคณะ, 1962) ซึ่งมีวิถีการย่อยสลายคล้ายคลึงกับในแบคทีเรีย

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 2.9 วิถีการย่อยสลายอะซีแนพธีนโดย *Cunninghamella elegans* (Pothuluri **และคณะ**, 1992)

I 1,5 dihydroxyacenaphthene **II** *trans*-1,2-dihydroxyacenaphthene

III 1,2-acenaphthenedione **IV** *cis*-1,2-dihydroxyacenaphthene

V 6-hydroxyacenaphthenone **VI** 1-acenaphthenone

VII 1-acenaphthenol)

บทที่ 3

อุปกรณ์ เคมีภัณฑ์ และวิธีดำเนินงานวิจัย

3.1 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. ตู้แช่แข็งจุดเยือกแข็งต่ำ (deep freeze) อุณหภูมิ –70 $^{\circ}$ ซ ของบริษัท Forma Scientific, USA.
7. ตู้แช่แข็งจุดเยือกแข็งต่ำ (deep freeze) อุณหภูมิ –20 $^{\circ}$ ซ ของบริษัท Sanyo Electric, Japan
8. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) รุ่น UV-160A ของบริษัท Shimadzu, Japan.
9. ตู้บ่มเชื้อ (contherm digital series cooled incubator) ของบริษัท Contherm Scientific, New Zealand.
10. ตู้บ่มเชื้อ (Incubator) ของบริษัท Memmert, Germany.
11. เครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดควบคุมอุณหภูมิ (refrigerated centrifuge) รุ่น J2-21 ของบริษัท Beckman Instrument Inc., USA.
12. เครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดตั้งโต๊ะ (bench-top centrifuge) รุ่น KM-15200 ของบริษัท Kubota, Japan.
13. เครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดตั้งพื้น (centrifuge) รุ่น ของบริษัท Kubota, Japan.
14. ตู้อบแห้ง (Contherm digital series oven) ของบริษัท Contherm Scientific, New Zealand.
15. ไมโครปิเปต (micropipette) ขนาด 20, 100, 200, 1000 และ 5000 ไมโครลิตร ของบริษัท Gilson, France.
16. เครื่องปั่นผสม (vortex mixer) รุ่น G-560E ของบริษัท Scientific Industries, USA.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

17. เครื่องระเหยแห้งแบบสูญญากาศ (rotary vacuum evaporator) รุ่น N ของบริษัท Tokyo Rikakikai, Japan.
18. เครื่องระเหยแห้งแบบสูญญากาศ (rotary vacuum evaporator) รุ่น N-N ของบริษัท Tokyo Rikakikai, Japan.
19. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (waterbath) ของบริษัท Tokyo Rikakikai, Japan.
20. กรวยแยก (seporatory funnel) ขนาด 500 มล. ของบริษัท Sibata, Japan.
21. กระบอกฉีดยาพลาสติกขนาด 1, 5 และ 10 มล. ของบริษัท Nissho Nipro, Japan.
22. ชุดกรองสำเร็จรูปชนิด PTFE ขนาด 0.2 ไมโครเมตร รุ่น DISMIC-13JP ของบริษัท Tokyo Roshi Kaisha, Japan.
23. ชุดกรองสำเร็จรูปชนิดเซลลูโลสอะซีเตต ขนาด 0.45 ไมโครเมตร รุ่น DISMIC-25CS ของบริษัท Tokyo Roshi Kaisha, Japan.
24. แผ่นกรองชนิด FH ขนาด 0.5 ไมโครเมตร ของบริษัท Tokyo Roshi Kaisha, Japan.Disposable micropipette. ของบริษัท E. Merck, Germany.
25. แผ่นอลูมิเนียมทีแอลซี (TLC aluminium sheet) เคลือบด้วย silica gel 60 F_{254} ขนาด 20 $\times$20 ซม. ของบริษัท E. Merck, Germany.
26. หลอดแสงอัลตราไวโอเลตช่วงความยาวคลื่น 215-250 นาโนเมตร (ultraviolet lamp) รุ่น UVGL-15 ของบริษัท UVP, USA.
27. เครื่องกำเนิดเสียงความถี่สูง (ultrasonicator) ชนิดอ่าง รุ่น FS4000 ของบริษัท Decan Ultrasonics, England.
28. ชุดเครื่องมือไฮเพอร์ฟอร์มานซ์ลิควิดโครมาโตกราฟี (high performance liquid chromatography, HPLC) (สำหรับตรวจสอบปริมาณ PAHs ที่เหลือและตรวจสอบสารมัธยันตร์)
    - ลิควิดโครมาโตกราฟี (liquid chromatography) รุ่น LC-3A ของบริษัท Shimadzu, Japan.
    - คอลัมน์ (column) : Senshu Pak Pegasil ODS ขนาด 4.6 $\times$ 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.
29. ชุดเครื่องมือไฮเพอร์ฟอร์มานซ์ลิควิดโครมาโตกราฟี (high performance liquid chromatography, HPLC) (สำหรับคัดแยกสารมัธยันตร์)

- ลิควิดโครมาโตกราฟี (liquid chromatography) รุ่น LC-10AD ของบริษัท Shimadzu, Japan.
- คอลัมน์ (column) : intersill PREP-ODS ขนาด 10 × 250 มม. ของบริษัท Senshu Scientific, Japan
- เครื่องตรวจสอบ (UV-visible detector) รุ่น SPD-10A ของบริษัท Shimadzu, Japan.

30. กระบอกฉีดยาขนาดเล็ก (microsyringe) รุ่น MS-R50 ของบริษัท Exmire, USA.
31. ชุดเครื่องมือ Mini Sub-Cell GT agarose gel eletrophoresis system ของบริษัท Bio-Rad, USA.
32. เครื่องควบคุมอุณหภูมิและระเหยแห้งแบบให้ความร้อน (thermo-block) รุ่น MylabTH Thermo- Block SLTDB-120 ของบริษัท SeouLin Bioscience, Korea.
33. หลอดเก็บเชื้อแช่แข็ง (cryotube) ของบริษัท Nalgene, USA.
34. เครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (DNA Thermal Cycle) รุ่น 2400 ของบริษัท Perkin Elmer, USA.
35. อุปกรณ์สำหรับถ่ายภาพ
    - กล้องถ่ายภาพโพลารอยด์ ของบริษัท Polaroid, USA
    - แผ่นกรองสีแดง
    - ฟิล์มโพรารอยด์ขาวดำ ความไวแสง 3000 (ISO 3000)

3.2 เคมีภัณฑ์

1. อะซีแนพธิลีน (acenaphthylene) ของบริษัท Kanto Chemical, Japan
2. อะซีแนพธีน (acenaphthene) ของบริษัท Sigma, USA.
3. อะซีแนพธีนควิโนน (acenaphthenequinone) ของบริษัท Kanto Chemical, Japan
4. กรด แนพธาลีน1,8-ไดคาร์บอกซิลิก (naphthalene-1,8-dicarboxylic acid) ของบริษัท Kanto Chemical, Japan
5. กรด 2,5-ไดไฮดรอกซีเบนโซอิก (2,5-dihydroxybenzoic acid) ของบริษัท Kanto Chemical, Japan
6. กรดโปรโตคาทีคูอิก (protocatechuic acid) ของบริษัท Kanto Chemical, Japan
7. กรดซาลิไซลิก (salicylic acid) ของบริษัท Kanto Chemical, Japan
8. แนพธาลีน (naphthalene) ของบริษัท Sigma, USA.
9. ฟีแนนทรีน (phenanthrene) ของบริษัท Sigma, USA.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

10. ฟลูออรีน (fluorene) ของบริษัท Kanto Chemical, Japan
11. ฟลูออแรนธีน (fluoranthene) ของบริษัท Kanto Chemical, Japan
12. ไดเบนโซฟูแรน (dibenzofuran) ของบริษัท Kanto Chemical, Japan
13. ไพรีน (pyrene) ของบริษัท Kanto Chemical, Japan
14. แอนทราซีน (antracene) ของบริษัท Kanto Chemical, Japan
15. กลีเซอรอล (glycerol) ของบริษัท Carlo ERBA, Italy.
16. ไดเมทธิลซัลฟอกไซด์ (CH_3SOCH_3) ของบริษัท Carlo ERBA, Italy.
17. แบคโตอะการ์ (bacto agar) ของบริษัท Difco Laboratories, USA.
18. โซเดียมซักซิเนส ($NaC_4 H_9$) ของบริษัท AJEX Chemicals, Australia.
19. แอมโมเนียมไนเตรต (NH_4NO_3) ของบริษัท BDH Chemicals, Australia.
20. ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟตโดเดคคะไฮเดรต ($Na_2HPO_4{\bullet}12H_2O$) ของบริษัท Carlo ERBA, Italy.
21. โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) ของบริษัท AJEX Chemicals, Australia.
22. แมกนีเซียมซัลเฟตเฮพทะไฮเดรต ($MgSO_4{\bullet}7H_2O$) ของบริษัท Carlo ERBA, Italy.
23. เฟอริกคลอไรด์เฮกซะไฮเดรต ($FeCl_3{\bullet}6H_2O$) ของบริษัท May & Baker, England.
24. แคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรต ($CaCl_2{\bullet}2H_2O$) ของบริษัท AJEX Chemicals, Australia.
25. ทริปโตน (tryptone) ของบริษัท Difco Laboratories, USA.
26. ผงสกัดจากยีสต์ (yeast extract) ของบริษัท Difco Laboratories, USA.
27. โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ของบริษัท E. Merck, Germany.
28. โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ของบริษัท E. Merck, Germany.
29. กรดไฮโดรคลอริก (HCl) ของบริษัท BDH Chemicals, Australia.
30. เมทธานอล (CH_3OH) ของบริษัท E. Merck, Germany.
31. เอทธิลอะซีเตท ($CH_3COOC_2H_5$) ของบริษัท E. Merck, Germany.
32. โซเดียมซัลเฟตแอนไฮดรัส (anhydrous Na_2SO_4) ของบริษัท E. Merck, Germany.
33. นอร์มัลเฮกเซน (C_6H_{14}) ของบริษัท J.T. Baker, USA.
34. โทลูอีน ($C_6H_5CH_3$) ของบริษัท Carlo ERBA, Italy.
35. 1,4-ไดออกเซน ($OCH_2CH_2OCH_2CH_2$) Carlo ERBA, France.
36. กรดอะซีติกเข้มข้น (glacial CH_3COOH) ของบริษัท BDH Chemicals, Australia.
37. ฟีนอล (phenol) ของบริษัท E. Merck, Germany
38. สีบรอมฟีนอลบลู (bromphenolblue) ของบริษัท Fluka, Germany.

39. EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid), ($C_{10}H_{14}N_2O_8 \bullet 2H_2O$) ของบริษัท Sigma, USA.
40. SDS (sodium dodecyl sulfate), ($C_{12}H_{25}OSO_3$) ของบริษัท Nacalai Tesque, Japan.
41. CTAB (cetyltrimethylammonium bromide), [($C_{16}H_{32}N(CH_3)_3$)Br)] ของบริษัท TCI-EP, Japan
42. 1 kb DNA ladder ของบริษัท Promega, USA.
43. *Taq* DNA polymerase ของบริษัท Promega, USA.
44. Ribonuclease A (Rnase A) ของบริษัท Sigma, USA.
45. Proteinase K ของบริษัท Sigma, USA.

วิธีการดำเนินงาน

3.1. การเก็บตัวอย่างน้ำ

เก็บตัวอย่างน้ำจากบริเวณที่มีการปนเปื้อนสารปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอน เช่น น้ำมัน น้ำมันเครื่อง ที่มีการสะสมอยู่เป็นเวลานาน เพื่อนำมาคัดแยกเชื้อแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลายสาร PAHs โดยเก็บลึกจากผิวน้ำประมาณ 50 ซม. เก็บน้ำตัวอย่างไว้ที่อุณหภูมิ 4^{o}ซ จนกว่าจะนำมาแยกเชื้อ สถานที่เก็บตัวอย่างน้ำแต่ละตัวอย่างได้แสดงไว้ในตารางที่ 3.1

ตารางที่ 3.1 แหล่งตัวอย่างน้ำที่ใช้ในการคัดแยกแบคทีเรียที่ย่อยสลายสาร PAHs ได้

ตัวอย่าง	สถานที่เก็บ
1	น้ำเสียจากบ่อก่อนบำบัดในระบบบำบัดน้ำเสีย อู่ทหารเรือพระจุลจอมเกล้า จ.สมุทรปราการ
2	น้ำเสียจากบ่อเติมอากาศ 1 ในระบบบำบัดน้ำเสีย อู่ทหารเรือพระจุลจอมเกล้า จ.สมุทรปราการ
3	น้ำเสียจากบ่อเติมอากาศ 2 ในระบบบำบัดน้ำเสีย อู่ทหารเรือพระจุลจอมเกล้า จ.สมุทรปราการ
4	น้ำเสียจากบ่อตกตะกอน ในระบบบำบัดน้ำเสีย อู่ทหารเรือพระจุลจอมเกล้า จ.สมุทรปราการ
5	น้ำเสียจากบ่อหลังบำบัด ในระบบบำบัดน้ำเสีย อู่ทหารเรือพระจุลจอมเกล้า จ.สมุทรปราการ
6	น้ำเสียจากบ่อซ่อมบำรุงเรือ (บ่อลอย 1) ในอู่ทหารเรือพระจุลจอมเกล้า จ.สมุทรปราการ
7	น้ำเสียจากบ่อซ่อมบำรุงเรือ (บ่อลอย 2) ในอู่ทหารเรือพระจุลจอมเกล้า จ.สมุทรปราการ

3.2. การคัดแยกแบคทีเรียสายพันธุ์บริสุทธิ์จากตัวอย่างน้ำ ที่มีความสามารถย่อยสลายสารประกอบพอลิไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน

3.2.1 การเพิ่มจำนวนแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายสารประกอบพอลิไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน

เตรียมหัวเชื้อของแบคทีเรียโดยการนำตัวอย่างน้ำแต่ละแหล่งที่ต้องการแยกแบคทีเรียปริมาตร 10 มล.ใส่ในขวดรูปชมพู่ที่บรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวปราศจากแหล่งคาร์บอน (carbon-free mineral salt medium, CFMM) (Omori และคณะ, 1992) ที่ผ่านการฆ่าเชื้อปริมาตร 40 มล. นำไปเขย่าบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชม. เพื่อให้แบคทีเรียในตัวอย่างน้ำปรับตัวกับสภาวะที่ใช้ในการทดลอง หลังจากนั้นถ่ายน้ำตัวอย่างปริมาตร 1 มล. ใส่ลงในแต่ละหลอดทดลองที่บรรจุอาหารเลี้ยงเหลว CFMM ปริมาตร 4 มล. เติมสาร PAHs อันได้แก่ แนพธาลีน อะซีแนพธีน อะซีแนพธิลีน ฟีแนนทรีน แอนทราซีน ไดเบนโซฟูแรน ฟลูออรีน ฟลูออแรนธีน และ ไพรีน ในรูปสารละลายในไดเมทธิลซัลฟอกไซด์ ลงในหลอด ชนิดละหลอดที่ความเข้มข้น 100 มก.ต่อลิตร เพื่อใช้เป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงานของแบคทีเรีย นำไปเลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง สังเกตการเจริญของแบคทีเรียโดยดูจากความขุ่นที่เพิ่มขึ้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวและ/หรือการเปลี่ยนสีของอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว เปรียบเทียบกับหลอดควบคุม หลอดทดลองใดที่มีการเจริญของแบคทีเรียในลักษณะดังกล่าว จะได้รับการถ่ายเชื้อลงในอาหารเหลวใหม่ โดยปรับปริมาตรหัวเชื้อและอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM เป็น 50 ไมโครลิตรและ 5 มล. ตามลำดับ โดยใช้ขั้นตอนต่างๆที่กล่าวมาข้างต้น ทำเช่นนี้ซ้ำ 5 ครั้ง เพื่อให้แบคทีเรียมีความคุ้นเคยและเพิ่มจำนวนแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลายสาร PAHs

หมายเหตุ แนพธาลีน อะซีแนพธิลีน และอะซีแนพธีน มีค่าความดันไอสูง จึงระเหยได้ง่าย ดังนั้นในการทดสอบจะปิดผนึกจุกสำลีด้วยพาราฟิล์ม หรือเทปกาว เพื่อป้องกันการระเหย

3.2.2 การคัดแยกแบคทีเรียสายพันธุ์บริสุทธิ์ที่สามารถย่อยสลายสาร PAHs

เนื่องจากแบคทีเรียในตัวอย่างน้ำที่ 6 มีความสามารถในการย่อยสลายสาร PAHs ได้หลายชนิด โดยเฉพาะสามารถย่อยสลายฟลูออแรนธีน ซึ่งเป็นสาร PAHs ที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง จุลินทรีย์ส่วนใหญ่ไม่สามารถย่อยสลายได้ จึงทำการเพิ่มจำนวนแบคทีเรียดังกล่าว ในอาหารที่มีฟลูออแรนธีน เพื่อให้แบคทีเรียคุ้นเคย และปรับตัวให้สามารถย่อยสลายและนำฟลูออแรนธีนไปใช้ในการเจริญ โดยการถ่ายเชื้อ 5 ครั้ง หลังจากนั้นนำอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM ที่มีแบคทีเรียที่

เจริญบนฟลูออแรนธีน มาทำการเจือจางในสารละลาย 0.85% โซเดียมคลอไรด์ เลือกความเข้มข้นที่เหมาะสม มาเกลี่ยบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง CFMM ที่มีฟลูออแรนธีนวางบนฝาจานอาหารเลี้ยงเชื้อ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 °ซ จนพบการเจริญของแบคทีเรีย นำแบคทีเรียที่เจริญบนจานอาหารมายืนยันความสามารถในการย่อยสลายฟลูออแรนธีนอีกครั้ง โดยถ่ายเชื้อลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM ที่มีฟลูออแรนธีนความเข้มข้น 0.1 มก.ต่อมล. เลี้ยงบนเครื่องเขย่า 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง สังเกตการเจริญของเชื้อ เทียบกับชุดควบคุม นำเชื้อจากหลอดทดลองที่สังเกตว่าขุ่นและมีการเปลี่ยนสีของอาหารมาตรวจสอบความบริสุทธิ์ โดยนำมาเจือจางในสารละลาย 0.85% โซเดียมคลอไรด์ เลือกความเข้มข้นที่เหมาะสมมาเกลี่ยบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง LB (Luria Bertani agar) สังเกตดูลักษณะโคโลนีที่เจริญบนอาหารจนกระทั่งได้เชื้อบริสุทธิ์ หลังจากนั้นนำแบคทีเรียสายพันธุ์บริสุทธิ์ที่แยกได้ไปเขี่ยเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง CFMM ที่มีฟลูออแรนธีน ฟีแนนทรีน ฟลูออรีน และอะซีแนพธีน วางบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดละจาน นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 °ซ เป็นเวลา 7 วัน สังเกตดูการเจริญของแบคทีเรียบนอาหาร

3.2.3 การเก็บเชื้อ

นำแบคทีเรียสายพันธุ์ SP2 ซึ่งเป็นเชื้อบริสุทธิ์ ที่คัดแยกได้จากตัวอย่างน้ำ ในบ่อซ่อมบำรุงเรือ (บ่อลอย 1) ซึ่งมีความสามารถในการเจริญและย่อยสลายอะซีแนพธีน มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM ที่มีอะซีแนพธีน 0.1 มก.ต่อมล. เมื่อแบคทีเรียมีการเจริญอยู่ในช่วงสเตชันนารี นำอาหารเหลวที่มีเชื้อเจริญบรรจุลงในหลอดแช่แข็ง (cryotube) และเติมกลีเซอรอลที่ผ่านการฆ่าเชื้อ ซึ่งผ่านการฆ่าเชื้อ 3 ครั้งที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 °ซ เป็นเวลา 20 นาที โดยใช้อัตราส่วนระหว่างปริมาตรเชื้อในอาหารเหลวต่อปริมาตรกลีเซอรอลเป็น 50 : 50 และ 70 : 30 ปริมาตรต่อปริมาตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องปั่นผสม เก็บเชื้อที่อุณหภูมิ -20 °ซ หรือ -70 °ซ ตามลำดับ

3.3 จำแนกชนิดทางอนุกรมวิธานของแบคทีเรียสายพันธุ์ SP2

3.3.1 ทดสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยา (morphological characteristics)

นำแบคทีเรียสายพันธุ์ SP2 มาศึกษาลักษณะโคโลนีบนอาหารแข็งและลักษณะเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ร่วมกับสมบัติทางสรีรวิทยา (physiological characteristics) และสมบัติทางชีวเคมีวิทยา (biochemical characteristics) ตามที่รายงานไว้ใน Burgey's Manual of Systematic Bacterialogy (Palleroni, 1984)

3.3.2 วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ 16 เอสไรโบโซมัลดีเอ็นเอ (16S ribosomal DNA)

3.3.2.1 การสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอของแบคทีเรีย สายพันธุ์ SP2

สกัดจีโนมิกดีเอ็นเอของแบคทีเรีย สายพันธุ์ SP2 ตามวิธีของ Ausubel และคณะ (1999) โดยเขี่ยโคโลนีเดี่ยวของเชื้อลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB ปริมาตร 5 มล. แล้วนำไปเขย่าที่อุณหภูมิห้อง นาน 24 ชม. ถ่ายเชื้อลงในหลอดไมโครฟิวจ์ นำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกเซลล์ด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 นาที แขวนลอยเซลล์ด้วยบัฟเฟอร์ TE (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 567 ไมโครลิตร เติมสารละลาย SDS เข้มข้น 10% ปริมาตร 30 ไมโครลิตร ผสมโดยการกลับหลอดเบาๆ จนเห็นสารแขวนลอยเริ่มหนืดและใสขึ้น เติมสารละลายโปรตีเนสเค (Proteinase K) เข้มข้น 20 มก.ต่อมล. (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 3 ไมโครลิตร (ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 100 ไมโครกรัมต่อมล. ของโปรตีเนสเคใน 0.5 % SDS) ผสมให้เข้ากันโดยการกลับหลอด นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 ^{o}ซ นาน 1 ชั่วโมง กลับหลอดเบาๆ ทุก 10 นาที แล้วเติมสารละลายเกลือโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 5 โมลาร์ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยการกลับหลอด จากนั้นเติมสารละลาย CTAB/NaCl (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 80 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยการกลับหลอด นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 65 ^{o}ซ เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเติมสารละลายคลอโรฟอร์ม/ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ (ภาคผนวก ข) (อัตราส่วนปริมาตรเท่ากับปริมาตรของสารละลายสุดท้าย) ปริมาตร 700 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันจนกระทั่งกลายเป็นอิมัลชั่น นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 นาที ถ่ายส่วนน้ำใสชั้นบนใส่หลอดไมโครฟิวจ์อันใหม่ เติมสารละลายฟีนอล/คลอโรฟอร์ม/ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 800 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันจนกระทั่งกลายเป็นอิมัลชั่น นำไปปั่นเหวี่ยงให้แยกชั้นด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที ถ่ายส่วนน้ำใสชั้นบนใส่หลอดไมโครฟิวจ์อันใหม่ เติมไอโซโปรพานอลปริมาตร 0.6 เท่าของน้ำส่วนใสที่ได้ ผสมให้เข้ากันโดยการกลับหลอดไปมาจนกระทั่งเห็นตะกอนสีขาวของดีเอ็นเอปรากฏ นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที นาน 15 นาที นำตะกอนดีเอ็นเอที่ได้มาล้างด้วยสารละลายเอทธานอล 70 % ที่เย็นจัด ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ทำซ้ำ 2 ครั้ง โดยการปั่นล้างเก็บตะกอนที่อุณหภูมิห้อง นาน 5 นาที เทส่วนน้ำใสทิ้ง สุดท้ายนำตะกอนดีเอ็นเอที่ได้ไปประเหยให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง แขวนลอยตะกอนดีเอ็นเอที่ได้ด้วยบัฟเฟอร์ TE ปริมาตร 50 ไมโครลิตร เติมสารละลาย RNase เข้มข้น 10 มก.ต่อมล. (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 2 ไมโครลิตร เพื่อกำจัดอาร์เอ็นเอ เก็บที่อุณหภูมิ 4 ^{o}ซ

การวิเคราะห์ความบริสุทธิ์และความเข้มข้นของดีเอ็นเอ

นำสารละลายดีเอ็นเอไปวัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร (A_{260} และ A_{280}) คำนวณค่า A_{260} ต่อ A_{280} โดยหากอัตราส่วนที่ได้มีค่าน้อยกว่า 1.8 แสดงว่ามีโปรตีนปนเปื้อนสูง แต่ถ้าค่าสูงกว่า 2.0 แสดงว่ามีอาร์เอ็นเอปนเปื้อนสูง

คำนวณหาความเข้มข้นของดีเอ็นเอจากสมการ

ดีเอ็นเอสายคู่ (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) = A_{260} x 50 x dilution factor

3.3.2.2 **การเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอโดยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส**
(Polymerase Chain Reduction ,PCR)

นำดีเอ็นเอ ที่สกัดตามวิธีในข้อ 3.3.2.1 ไปทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส โดยใช้ส่วนผสมของสารในปฏิกิริยา และโอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์ที่ออกแบบตามวิธีของ Blackall (1999) โดยที่ความเข้มข้นสุดท้ายในปฏิกิริยาของสารแต่ละชนิดเป็นดังนี้

สารละลายแมกนีเซียมคลอไรด์ ($MgCl_2$) ความเข้มข้น1.5 มิลลิโมลาร์ สารละลาย dNTP ความเข้มข้น 0.2 มิลลิโมลาร์ 1x *Taq* DNA polymerase buffer *Taq* DNA polymerase ปริมาณ 2.5 หน่วย สารละลายไพรเมอร์ที่จำเพาะกับบริเวณปลายทั้ง 2 ด้านของสายดีเอ็นเอแม่แบบ forward primer 27f 5’-CATTGTAGCACGTGTGTAGC-3’ และ reverse primer 1492r 5’-TTTCCTTAGAGTGCCCAACC -3’ ความเข้มข้น 200 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร (ของแต่ละตัว) ดีเอ็นเอแม่แบบ ที่เตรียมไว้ในข้อ 3.3.2.1 ปริมาณ 1 พิโคกรัม - 1 ไมโครกรัม ปรับปริมาตรด้วยน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อ รวมส่วนผสมทั้งหมดมีปริมาตรสุทธิ 50 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน ระวังอย่าให้เกิดฟองอากาศและควรเก็บส่วนผสมทั้งหมดในน้ำแข็ง หลังจากนั้นดำเนินปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสด้วยเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (DNA Thermol Cycler) (Perkin Elmer, USA) โดยตั้งโปรแกรมดังนี้

hot start	ที่อุณหภูมิ 95 °ซ	เป็นเวลา 30 นาที		
denaturation	ที่อุณหภูมิ 94 °ซ	เป็นเวลา	1 นาที	30 รอบ
annealing	ที่อุณหภูมิ 48 °ซ	เป็นเวลา	1 นาที	
extension	ที่อุณหภูมิ 72 °ซ	เป็นเวลา	2 นาที	
extension	ที่อุณหภูมิ 72 °ซ	เป็นเวลา	2 นาที	1 รอบ
annealing	ที่อุณหภูมิ 48 °ซ	เป็นเวลา	1 นาที	
final extension	ที่อุณหภูมิ 72 °ซ	เป็นเวลา	5 นาที	

ตรวจสอบผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นโดยวิธีอะกาโรสเจลอีเลคโทรโฟเรซิส ในขั้นต่อไป

3.3.2.3 การแยกดีเอ็นเอด้วยวิธีอะกาโรสเจลอีเลคโทรโฟเรซิส

นำผลิตภัณฑ์ปฏิกิริยาลูกโซ่ที่ได้จากข้อ 3.3.2.2 มาตรวจสอบความบริสุทธิ์ของสายดีเอ็นเอ ด้วยวิธีอะกาโรสเจลอีเลคโทรโฟเรซิส โดยเตรียมอะกาโรสเจลเข้มข้น 1.0 % ที่หลอมในบัฟเฟอร์ TAE (ภาคผนวก ข) เทลงในแบบพิมพ์ซึ่งมีหวีเสียบอยู่ ระวังอย่าให้มีฟองอากาศ ปล่อยให้อะกาโรสเจลแข็งตัวประมาณ 20 นาที วางชิ้นอะกาโรสเจลที่ได้ลงในแชมเบอร์ เทบัฟเฟอร์ TAE ให้ท่วมเหนืออะกาโรสเจล 2-3 มม. ผสมสารละลายดีเอ็นเอกับสีติดตาม หยอดลงในช่องวิ่ง โดยช่องวิ่งแรกจะหยดด้วยดีเอ็นเอมาตรฐานที่ผสมกับสีติดตามแล้วปริมาตร 3 ไมโครลิตร จากนั้นทำอีเลคโตรโฟเรซิส โดยใช้ชุดทำอะกาโรสเจลอีเลคโทรโฟเรซิสรุ่น Mini sub-cell GT ใช้ความต่างศักย์ 75 โวลต์ จนกระทั่งสีน้ำเงินของบรอมฟีนอลบลู เคลื่อนที่มาเกือบถึงขอบอะกาโรสเจลอีกด้าน ย้อมอะกาโรสเจลด้วยสารละลายเอธิเดียมโบรไมด์เข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรในบัฟเฟอร์ TAE เป็นเวลา 10 นาที ตรวจดูแถบดีเอ็นเอด้วยแสงอัลตราไวโอเลตความยาวคลื่น 312 นาโนเมตร

3.3.2.4 การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16 เอสไรโบโซมัลดีเอ็นเอ

ส่งผลิตภัณฑ์ปฏิกิริยาลูกโซ่ที่ได้จากข้อ 3.3.2.2 ไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16 เอส ไรโบโซมัลดีเอ็นเอ และสังเคราะห์โอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์โดยเครื่องสังเคราะห์ดีเอ็นเออัตโนมัติ โดยหน่วยบริการชีวภาพ (BIOSERVICE UNIT, BSU) สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ (สวทช.) ในการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16 เอสไรโบโซมัลดีเอ็นเอ ของ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

แบคทีเรียสายพันธุ์ SP2 ได้ใช้โอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์ forward และ reverse ดังแสดงในตารางที่ 3.2 เพื่ออ่านลำดับเบสของ 16 เอสไรโบโซมัลดีเอ็นเอ จนครบ 1,500 คู่เบส

ตารางที่ 3.2 โอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์ที่ใช้สำหรับหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16 เอสไรโบโซมัลดีเอ็นเอ ของแบคทีเรีย สายพันธุ์ SP2

โอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์	เอกสารอ้างอิง
Reverse primer1492r	5'-TTTCCTTAGAGTGCCCAACC -3'	Blackall L.L.(1999)
Forward primer 27f	5'-CATTGTAGCACGTGTGTAGC -3'	Blackall L.L. (1999)
Reverse primer 340r1	5'-TTTCCTTAGAGTGCCCAACC -3'	สร้างในการทดลองนี้
Forward primer 250f1	5'-CATTGTAGCACGTGTGTAGC -3'	สร้างในการทดลองนี้
Reverse primer 320r2	5'-TCATCGTTTACGGCGTGGAC-3'	สร้างในการทดลองนี้
Forward primer 280f2	5'-CCACATGCTCCACCGCTTGT-3'	สร้างในการทดลองนี้

รวบรวมและวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ด้วยโปรแกรม Bioedit และนำไปเปรียบเทียบกับข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีการรายงานไว้ใน Gen Bank. โดยใช้โปรแกรม Blast

3.4. การเจริญและความสามารถในการย่อยสลายอะซีแนพธีนของแบคทีเรียที่คัดแยกได้

3.4.1 ศึกษารูปแบบการเจริญและความสามารถของแบคทีเรียที่คัดแยกได้ในการใช้อะซีแนพธีนเป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงาน

เตรียมหัวเชื้อแบคทีเรีย โดยเขี่ยโคโลนีของแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากจานอาหารแข็ง CFMM ที่วางอะซีแนพธีนบนฝาจานอาหารเลี้ยงเชื้อ นำมาถ่ายลงในอาหารเหลว CFMM ปริมาตร 50 มล. ที่มีโซเดียมซักซิเนต (sodium succinate) เข้มข้น 1 กรัมต่อลิตร ในขวดรูปชมพูขนาด 250 มล. เลี้ยงเชื้อบนเครื่องเขย่าที่มีความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชม. หลังจากนั้น นำมาปั่นแยกเซลล์แบคทีเรียด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 ^{o}ซ เป็นเวลา 10 นาที นำส่วนเซลล์แบคทีเรียมาล้างในสารละลาย 0.85% โซเดียมคลอไรด์ ทำการปั่นเหวี่ยงที่สภาวะเดิม โดยทำตามขั้นตอนนี้ 2 ซ้ำ นำส่วนเซลล์มาแขวนลอยในสารละลาย 0.85% โซเดียมคลอไรด์ นำเซลล์แขวนลอยมาวัดความขุ่น (turbidity) ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร และเจือจางให้มีค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 1.0 นำเซลล์แขวนลอย

ที่ปรับความเข้มข้นแล้วมาเขย่าบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชม. เพื่อให้แบคทีเรียใช้อาหารสะสมที่เหลืออยู่ในเซลล์ให้หมดไป หลังจากนั้นนำหัวเชื้อปริมาตร 50 ไมโครลิตร ลงในหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM ปริมาตร 5 มล. ที่มีอะซีแนพธีนที่ความ เข้มข้น 100 300 500 700 และ 900 มก.ต่อลิตร เลี้ยงเชื้อบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เก็บตัวอย่างทุกวัน เป็นเวลา 7 วัน โดยแต่ละเวลามีชุดควบคุม 2 ชุด คือ ชุดควบคุมสำหรับศึกษาการเจริญของแบคทีเรียที่ไม่ได้เกิดการย่อยสลายอะซีแนพธีน ซึ่งเตรียมโดยการเติมหัวเชื้อลงในอาหารเหลว CFMM ที่ไม่มีอะซีแนพธีน และชุดควบคุมสำหรับตรวจการลดลงของอะซีแนพธีนที่ไม่ได้เกิดจากการย่อยสลายของแบคทีเรีย ซึ่งเตรียมโดยการใช้อาหารเหลว CFMM ที่มีอะซีแนพธีนแต่ไม่เติมหัวเชื้อ วัดการเจริญของแบคทีเรียด้วยวิธี viable plate count โดยนำอาหารมาเจือจางด้วยสารละลาย 0.85% โซเดียมคลอไรด์ ให้มีความเข้มข้นที่เหมาะสม นำมาเกลี่ยบนอาหารแข็ง LB บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 $^{\circ}$ซ เป็นเวลา 2 วัน และวัดปริมาณอะซีแนพธีนที่เหลืออยู่ โดยการสกัดด้วยเอทธิลอะซีเตท ตามวิธีการของ Grifoll และคณะ (1992) นำสารสกัดที่ได้ไปวิเคราะห์ปริมาณอะซีแนพธีนที่เหลือ และวิเคราะห์สารมัธยันตร์ที่เกิดจากการย่อยสลายอะซีแนพธีนด้วยวิธี HPLC ควบคู่กับวิธี TLC

การสกัดสาร PAHs และสารมัธยันตร์ตามวิธีของ Grifoll และคณะ (1992)

นำอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวมาปรับค่าความเป็นกรดเป็นด่างให้เท่ากับ 2.0-3.0 โดยการเติมกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น จากนั้นเติมเอทธิลอะซีเตทปริมาตร 1 เท่าของน้ำเลี้ยงเชื้อ ผสมให้เข้ากันโดยใช้เครื่องปั่นผสมด้วยความเร็วสูงเป็นเวลา 1-2 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้แยกชั้น แยกส่วนเอทธิลอะซีเตทเก็บไว้ สกัดซ้ำด้วยเอทธิลอะซีเตทปริมาตร 1 เท่าของน้ำเลี้ยงเชื้อตามวิธีเดิม รวมส่วนเอทธิลอะซีเตทที่ได้ เติมแอนไฮดรัสโซเดียมซัลเฟตเพื่อกำจัดน้ำที่เหลืออยู่ จากนั้นแยกส่วนเอทธิลอะซีเตท โดยนำไประเหยให้แห้งด้วยเครื่องระเหยแห้งสูญญากาศแบบหมุนจนได้สารที่แห้งสนิท เติมเมทธานอลปริมาตร 1 มล. ลงไปละลายสารในขวดลดปริมาตร กรองสารละลายที่ได้ผ่านชุดกรองสำเร็จรูปชนิด PTFE ที่มีขนาดรูกรอง 0.20 ไมโครเมตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 $^{\circ}$ซ จนกว่าจะทำการวิเคราะห์

การวิเคราะห์สารมัธยันตร์ที่เกิดจากการย่อยสลายอะซีแนพธีนด้วยวิธี analytical Thin Layer Chromatography (TLC)

นำสารสกัดที่ละลายในเมทธานอล ปริมาตร 5 ไมโครลิตร มาจุดบนแผ่น TLC กว้าง 8x8 ซม. โดยใช้ระบบตัวทำละลายประกอบด้วย โทลูอีน : 1,4-ไดออกเซน : กรดอะซีติกเข้มข้น ในอัตราส่วน 90 : 25 : 4 (ปริมาตรต่อปริมาตร) ตรวจดูสเปกตรัมของอะซีแนพธีนและสารมัธยันตร์ที่เกิดขึ้นภายใต้แสงอุลตราไวโอเลตช่วงความยาวคลื่น 215-250 นาโนเมตร

การวิเคราะห์ปริมาณอะซีแนพธีน และสารมัธยันตร์โดยวิธี HPLC

เตรียมสร้างกราฟมาตรฐานของอะซีแนพธีน โดยเติมสารอะซีแนพธีนในไดเมทธิลซัลฟอกไซด์ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM ให้มีความเข้มข้น 0 100 200 300 400 500 600 700 800 900 และ1,000 มก.ต่อลิตร ของอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM ตามลำดับ ทำการสกัดด้วยเอทธิลอะซีเตท โดยใช้วิธีการเดียวกับการสกัดอะซีแนพธีนในชุดทดลอง และนำไปวิเคราะห์ปริมาณสารโดยใช้วิธี HPLC ซึ่งมีส่วนประกอบต่างๆดังนี้

เครื่องลิควิดโครมาโตรกราฟี รุ่นLC-3A (Shimadzu, Japan) ใช้คอลัมน์ Senshu Pak Pegasil ODS ขนาด 4.6x150 มม. ตั้งอุณหภูมิคอลัมน์ที่ 40 $^{\circ}$ซ ใช้สารละลาย 80%เมทธานอลเป็นสารละลายตัวพา และใช้อัตราการไหลเท่ากับ 1.0 มล.ต่อนาที ตรวจสอบค่าการดูดกลืนแสงของอะซีแนพธีน และ PAHs ที่ความยาวคลื่น 275 นาโนเมตร ฉีดสารละลายที่ต้องการหาปริมาณสาร 60 ไมโครลิตร โดยใช้กระบอกฉีดยาขนาดเล็กรุ่น MS-R50 หาปริมาณอะซีแนพธีนที่เหลืออยู่จากการย่อยสลายของแบคทีเรียในชุดทดลอง โดยเปรียบเทียบพื้นที่ใต้กราฟที่ได้จากการวิเคราะห์กับกราฟมาตรฐานของอะซีแนพธีน

3.4.2 การวิเคราะห์สารมัธยันตร์ที่เกิดจากการย่อยสลายอะซีแนพธีน

3.4.2.1 เลือกระยะเวลาที่เหมาะสมสำหรับการสกัดสารมัธยันตร์

เติมหัวเชื้อแบคทีเรียที่เตรียมวิธีเช่นเดียวกับการทดลอง 3.4.1 ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM ปริมาตร 10 มล. อะซีแนพธีน ความเข้มข้น 500 มก.ต่อลิตร เลี้ยงเชื้อบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 $^{\circ}$ซ นาน 7 วัน โดยนำอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่มีแบคทีเรียเจริญที่เวลา 0 12 24 30 36 42 48 54 60 66 72 78 84 90 96 108 120 132 144 และ 158 ชม. มาสกัดสารมัธยันตร์ที่เกิดจากการย่อยสลายอะซีแนพธีน

ตามวิธีการของ Grifoll และคณะ 1992 และนำสารสกัดที่ได้ไปวิเคราะห์สารมัธยันตร์ด้วยวิธี analytical TLC

3.4.2.2 การแยกสารมัธยันตร์ให้บริสุทธิ์

เติมหัวเชื้อแบคทีเรียที่เตรียมโดยวิธีเช่นเดียวกับการทดลอง 3.4.1 ปริมาตร 2.5 มล. ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 500 มล. ที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM ปริมาตร 250 มล. อะซีแนพธีนความเข้มข้น 500 มก.ต่อลิตร จำนวน 4 ขวด เลี้ยงเชื้อบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง ใช้ระยะเวลาที่เหมาะสมจากการทดลองในข้อ 3.4.2.1 เมื่อครบกำหนด แยกเซลล์แบคทีเรียออกจากอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว โดยใช้เครื่องปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 ^{o}ซ เป็นเวลา 10 นาที นำส่วนใสที่ได้มาทำการสกัดสารมัธยันตร์ที่เกิดขึ้นจากการย่อยสลายอะซีแนพธีนด้วยเอทธิลอะซีเตทตามวิธีของ Grifoll และคณะ 1992

การสกัดสารมัธยันตร์ตามวิธีของ Grifoll และคณะ (1992)

ใส่อาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่ปรับค่าความเป็นกรดเป็นด่างให้เท่ากับ 2.0-3.0 ด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 5,000 มล.จากนั้นเติมเอทธิลอะซีเตทปริมาตร 1,000 มล. โดยแบ่งสกัด 3 ครั้ง เขย่าผสมให้เข้ากัน นาน 5 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้แยกชั้น แยกส่วนเอทธิลอะซีเตทเก็บไว้ สกัดซ้ำจนครบ 3 ครั้ง รวมเอาส่วนเอทธิลอะซีเตทเข้าด้วยกัน จากนั้นนำส่วนดังกล่าวมา สกัดด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 1,000 มล. โดยแบ่งสกัด 3 ครั้ง เขย่าผสมให้เข้ากัน นาน 5 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้แยกชั้น แยกส่วนเอทธิลอะซีเตทเก็บไว้ สกัดซ้ำจนครบ 3 ครั้ง แยกส่วนน้ำและส่วนเอทธิลอะซีเตทออกจากกันโดยนำส่วนเอทธิลอะซีเตตไปเติมแอนไฮดรัสโซเดียมซัลเฟตเพื่อกำจัดน้ำที่เหลืออยู่ เรียกส่วนที่ได้นี้ว่า ส่วนสกัดที่เป็นกลาง (neutral extract) ส่วนน้ำที่ได้จะนำมาสกัดซ้ำด้วยเอทธิลอะซีเตทอีกครั้ง โดยปรับค่าความเป็นกรดเป็นด่างให้เท่ากับ 2.0-3.0 โดยการเติมกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น จากนั้นเติมเอทธิลอะซีเตทปริมาตร 1,000 มล โดยแบ่งสกัด 3 ครั้ง เขย่าผสมให้เข้ากัน นาน 5 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้แยกชั้น แยกส่วนเอทธิลอะซีเตทเก็บไว้ สกัดซ้ำจนครบ 3 ครั้ง ร่วมเอาส่วนเอทธิลอะซีเตทเข้าด้วยกัน เติมแอนไฮดรัสโซเดียมซัลเฟตเพื่อกำจัดน้ำที่เหลืออยู่ ซึ่งส่วนที่ได้นี้เรียกว่า ส่วนสกัดที่เป็นกรด (acidic extract) นำส่วนสกัดทั้ง 2 ชนิดไปลดปริมาตรโดยใช้เครื่องระเหยแห้งสูญญากาศแบบหมุนจนได้สารปริมาตร 1 มล. จากนั้นนำแต่ละส่วน ปริมาตร 5 ไมโครลิตร มาจุดบนแผ่น TLC กว้าง 8x8 ซม. โดยใช้ระบบตัวทำละลายประกอบด้วย โทลูอีน : 1,4-ไดออกเซน : กรดอะซีติก

เข้มข้น ในอัตราส่วน 90 : 25 : 4 (ปริมาตรต่อปริมาตร) ตรวจดูสารมัธยันตร์ในแต่ละส่วนที่เกิดขึ้นภายใต้แสงอุลตราไวโอเลตช่วงความยาวคลื่น 215-250 นาโนเมตร คัดเลือกส่วนสกัดที่มีสารมัธยันต์สะสมอยู่มากที่สุด มาทำให้บริสุทธิ์ต่อโดย preparative TLC

การทำสารมัธยันตร์ให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี preparative TLC

นำส่วนสกัดที่พบการสะสมของสารมัธยันตร์อยู่มากที่สุด มาจุดให้เป็นแนวตรงบนแผ่นอลูมิเนียมทีแอลซี ที่เคลือบด้วยซิลิกาเจล ขนาด 20 x 20 ซม. หนา 1 มม. โดยใช้กระบอกฉีดยาขนาดเล็ก รุ่น MS - 200 ใช้ระบบตัวทำละลายที่ประกอบด้วย เฮกเซน : เอทธิลอะซีเตท : กรดอะซิติก ในอัตราส่วน 10:10:1 ปริมาตรต่อปริมาตร ตรวจหาแถบของสารมัธยันตร์ภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต และขูดซิลิกาเจลจากแถบดังกล่าว มาทำการสกัดด้วยเอทธิลอะซีเตทที่อิ่มตัวด้วยน้ำปริมาตร 200 มล. เขย่าบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที นาน 10 นาที นำส่วนสกัดดังกล่าวมาผ่านคอลัมน์ของโซเดียมซัลเฟตแอนไฮดรัสเพื่อกำจัดน้ำ จากนั้นนำไปลดปริมาตรโดยใช้เครื่องระเหยแห้งสูญญากาศแบบหมุน จนกระทั่งเหลือผลึกของสารเกาะติดอยู่ ตรวจสอบความบริสุทธิ์ของสารซ้ำอีกครั้งโดยการนำสารละลายในเมทธานอลของสารมัธยันตร์ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์มาฉีด HPLC และตรวจโครมาโตแกรมที่เกิดขึ้น

การทำสารมัธยันตร์ให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี HPLC

นำสารมัธยันตร์ที่ผ่านการแยกเบื้องต้นด้วยวิธี preparative TLC มาทำให้บริสุทธิ์ยิ่งขึ้นด้วยวิธี HPLC เก็บสารมัธยันตร์ที่แยกออกจากคอลัมน์ที่ค่า Retention time ต่างๆ ด้วยเครื่องลิควิดโครมาโตรกราฟี รุ่น LC-10AD (Shimadzu,Japan) ใช้คอลัมน์ Inertsill PRER-ODS ขนาด 10x250 มม. ตั้งอุณหภูมิคอลัมน์ที่ 40 ^{o}ซ ใช้สารละลาย 80% เมทธานอล เป็นสารละลายตัวพา และใช้อัตราการไหลเท่ากับ 3.0 มล.ต่อนาที ตรวจสอบค่าการดูดกลืนแสง ของสารมัธยันตร์ ที่ความยาวคลื่น 275 นาโนเมตร นำสารมัธยันตร์ที่ได้จาก HPLC มาผ่านคอลัมน์ของโซเดียมซัลเฟตแอนไฮดรัสเพื่อกำจัดน้ำ จากนั้นนำไปลดปริมาตรโดยใช้เครื่องระเหยแห้งสูญญากาศแบบหมุน จนกระทั่งเหลือผลึกของสารเกาะติดอยู่ ตรวจสอบความบริสุทธิ์ของสารซ้ำอีกครั้ง โดยการนำสารละลายในเมทธานอลของสารมัธยันตร์ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์มาฉีด HPLC และตรวจโครมาโตแกรมที่เกิดขึ้น

การตรวจสอบชนิดของสารมัธยันตร์ที่แยกได้

นำสารมัธยันตร์บริสุทธิ์ที่แยกได้ มาตรวจสอบชนิดของสารซึ่งจะตรวจสอบขั้นเบื้องต้นโดยนำสารมัธยันตร์ที่แยกได้มาวิเคราะห์ด้วยวิธี analytical TLC ทำการเปรียบเทียบกับสารมัธยันตร์มาตรฐานที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายอะซีแนพธีน (Schocken และ Gibson, 1984) และสาร PAHs (Grund และคณะ, 1992) ที่มีอยู่ในห้องปฏิบัติการซึ่งได้แก่ อะซีแนพธีนควิโนน กรดแนพธาลีน1, 8-ไดคาร์บอกซิลิก กรดซาลิไซลิก กรด 2,5-ไดไฮดรอกซีเบนโซอิก กรดโปรโตคาทีคูอิก ความเข้มข้น 0.1 มก.ต่อมล. ที่ละลายในเมทธานอล และตรวจสอบความบริสุทธิ์ของสารซ้ำอีกครั้งโดยการนำสารละลายในเมทธานอลของสารมัธยันตร์ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์มาฉีด HPLC และตรวจโครมาโตแกรมที่เกิดขึ้น

3.5 ศึกษาความสามารถของแบคทีเรียที่คัดแยกได้ในการย่อยสลายสาร PAHs ชนิดอื่น

เพื่อทดสอบความจำเพาะในการใช้สารตั้งต้นเพื่อการเจริญของแบคทีเรีย (substrate specificity) โดยนำหัวเชื้อแบคทีเรียที่เตรียมโดยใช้วิธีเช่นเดียวกับการทดลอง 3.4.1 ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM ปริมาตร 5 มล. เติมสาร PAHs ทดสอบ แนพธาลีน อะซีแนพธิลีน ไดเบนโซฟูแรน แอนทราซีน ฟีแนนทรีน ฟลูออรีน ฟลูออแรนธีน และไพรีน ความเข้มข้น 100 มก.ต่อลิตร ลงในหลอด ชนิดละหลอด เลี้ยงเชื้อบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เตรียมชุดควบคุมเช่นเดียวกับข้อ 3.4.1 เก็บตัวอย่างทุก 2 วัน จนครบ 7 วัน วัดการเจริญของแบคทีเรียโดยดูจากความขุ่นที่เพิ่มขึ้นของอาหารเหลวและการเปลี่ยนสีของอาหารเหลว ร่วมกับวัดการเจริญของแบคทีเรียด้วยวิธี viable plate count และปริมาณสาร PAHs ที่เหลือ เช่นเดียวกับข้อ 3.4.1

3.6 ศึกษาการย่อยสลายแบบโคเมตาบอลิสมของแบคทีเรียที่แยกได้

นำ PAHs ที่แบคทีเรียไม่สามารถย่อยสลายได้ ในข้อ 3.5 ทดสอบการย่อยสลายแบบโคเมตาบลิสมร่วมกับอะซีแนพธีน โดยนำแบคทีเรียที่เตรียมโดยใช้วิธีเช่นเดียวกับการทดลอง 3.4.1 ปริมาตร 50 ไมโครลิตร เติมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM ปริมาตร 5 มล.ที่มี PAHs ที่แบคทีเรียไม่สามารถย่อยสลายได้ ความเข้มข้น 100 มก.ต่อลิตร และอะซีแนพธีนที่ความเข้มข้น 100 มก.ต่อลิตร ตามวิธีของ Juhasz และคณะ (1997) เลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เตรียมชุดควบคุม 4 ชุด (1) ชุดควบคุมสำหรับดูการเจริญของแบคทีเรีย

และการลดลงของอะซีแนพธีนที่เกิดจากการย่อยสลายอะซีแนพธีน เตรียมโดยเติมหัวเชื้อลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM ที่มีอะซีแนพธีน (2) ชุดควบคุมสำหรับดูการเจริญของแบคทีเรียที่ไม่ได้เกิดจากการย่อยสลายอะซีแนพธีนและ PAHs ทดสอบ เตรียมโดยเติมหัวเชื้อลงในอาหารเหลว CFMM ที่ไม่มีอะซีแนพธีนและ PAHs ทดสอบ (3) ชุดควบคุมสำหรับตรวจการเจริญของแบคทีเรียและการลดลงของ PAHs ทดสอบที่ไม่ได้เกิดจากการย่อยสลายสาร PAHs ทดสอบ เตรียมโดยเติมหัวเชื้อลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM ที่มี PAHs ทดสอบ และ (4) ชุดควบคุมสำหรับตรวจการลดลงของอะซีแนพธีนและ PAHs ทดสอบ ที่ไม่ได้เกิดจากการย่อยสลายของแบคทีเรีย ซึ่งเตรียมโดยการเติมอะซีแนพธีนและ PAHs ทดสอบ ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM เก็บตัวอย่างทุก 2 วัน จนครบ 7 วัน วัดการเจริญของแบคทีเรีย และปริมาณ PAHs ที่เหลือ เช่นเดียวกับข้อ 3.4.1

3.7 ศึกษาการย่อยสลาย แนพธาลีน, อะซีแนพธิลีน และไดเบนโซฟูแรน แบบโคเมตาบอลิสม โดยแบคทีเรีย *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ SP2

3.7.1 ศึกษาการเจริญของ *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ SP2 เมื่อย่อยสลายแนพธาลีน, อะซีแนพธิลีนและไดเบนโซฟูแรน แบบโคเมตาบอลิสม

เติมหัวเชื้อแบคทีเรียที่เตรียมโดยใช้วิธีเช่นเดียวกับการทดลอง 3.4.1 ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM ปริมาตร 5 มล.ที่มีอะซีแนพธีนความเข้มข้น 100 มก.ต่อลิตร เติมแนพธาลีน ความเข้มข้น 300 มก.ต่อลิตร อะซีแนพธิลีน และไดเบนโซฟูแรน ความเข้มข้น 100 มก.ต่อลิตร ลงในหลอดอาหาร ชนิดละหลอด เลี้ยงเชื้อบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 4 วัน หลังจากนั้น เติมอะซีแนพธีน ที่ความเข้มข้น 100 มก.ต่อลิตร ลงในหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีอะซีแนพธีนและ PAHs ทดสอบ ปริมาณน้อยจนเกือบหมด นำแต่ละหลอดไปเลี้ยงเชื้อบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เตรียมชุดควบคุม 4 ชุด (1) ชุดควบคุมสำหรับตรวจการเจริญของแบคทีเรียและการลดลงของอะซีแนพธีนที่เกิดจากการย่อยสลายอะซีแนพธีน เตรียมโดยการเติมหัวเชื้อลงในอาหารเหลว CFMM ที่มีอะซีแนพธีน (2) ชุดควบคุมสำหรับศึกษาการเจริญของแบคทีเรียที่ไม่ได้เกิดจากการย่อยสลายอะซีแนพธีนและ PAHs ทดสอบ เตรียมโดยเติมหัวเชื้อลงในอาหารเหลว CFMM ที่ไม่มีอะซีแนพธีนและ PAHs (3) ชุดควบคุมสำหรับตรวจดูการเจริญของแบคทีเรีย และการลดลงของอะซีแนพธีนและ PAHs ทดสอบโดยไม่มีการเติมอะซีแนพธีนในวันที่ 4 วันของการทดลอง เตรียมเหมือนชุดทดลองแต่ไม่มีการเติมอะซีแนพธีนในวันที่ 4 วันของการทดลอง (4) ชุดควบคุมเพื่อดูการลดลงของอะซีแนพธีนและ PAHs ทดสอบ ที่ไม่ได้เกิดจากการย่อยสลายของแบคทีเรีย เตรียม

โดยเติมอะซีแนพธีนและ PAHs ทดสอบ ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM เก็บตัวอย่างทุกวัน จนครบ 7 วัน วัดการเจริญของแบคทีเรีย และปริมาณสาร PAHs ที่เหลือ เช่นเดียวกับข้อ 3.4.1

3.7.2 ศึกษาการเจริญของ *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ SP2 เมื่อย่อยสลายแนพธาลีน, อะซีแนพธิลีน และไดเบนโซฟูแรนที่แปรผันความเข้มข้น

นำหัวเชื้อแบคทีเรียที่เตรียมโดยใช้วิธีเช่นเดียวกับการทดลอง 3.4.1 ปริมาตร 50 ไมโครลิตรใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM ปริมาตร 5 มล. ที่มีอะซีแนพธีนที่ความเข้มข้น 100 มก.ต่อลิตร เติมอะซีแนพธิลีน ที่ความเข้มข้น 25 50 และ 75 มก.ต่อลิตร ไดเบนโซฟูแรน ที่ความเข้มข้น 25 50 และ 75 มก.ต่อลิตร และแนพธาลีนที่ความเข้มข้น 100 150 200 และ 250 มก.ต่อลิตร ลงในหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อ ชนิด, ความเข้มข้นละหลอด เลี้ยงเชื้อบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เตรียมชุดควบคุมเช่นเดียวกับข้อ 3.6 เก็บตัวอย่างทุกวัน จนครบ 7 วัน วัดการเจริญของแบคทีเรีย และปริมาณสาร PAHs ที่เหลือ เช่นเดียวกับข้อ 3.4.1

3.7.3 ศึกษาการยับยั้งการเจริญของ *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ SP2 เมื่อย่อยสลายแนพธาลีน อะซีแนพธิลีน และไดเบนโซฟูแรน แบบโคเมตาบอลิสม

เติมหัวเชื้อแบคทีเรียที่เตรียมโดยใช้วิธีเช่นเดียวกับการทดลอง 3.4.1 ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM ปริมาตร 5 มล.ที่มีอะซีแนพธีนความเข้มข้น 100 มก.ต่อลิตรเลี้ยงเชื้อบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชม. จากนั้นเติมแนพธาลีน ความเข้มข้น 300 มก.ต่อลิตร อะซีแนพธิลีน และไดเบนโซฟูแรน ความเข้มข้น 100 มก.ต่อลิตร ลงในแต่ละหลอด ชนิดละหลอด นำแต่ละหลอดไปเลี้ยงเชื้อบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เตรียมชุดควบคุม 3 ชุด (1) ชุดควบคุมเพื่อศึกษาการเจริญของแบคทีเรีย และการลดลงของอะซีแนพธีนที่เกิดจากการย่อยสลายอะซีแนพธีน โดยไม่มีการเติมสาร PAHs ชนิดอื่นที่ใช้ทดสอบ เตรียมเหมือนชุดทดลองแต่ไม่มีการเติม PAHs ชนิดอื่นที่ใช้ทดสอบ (2) ชุดควบคุมเพื่อดูการเจริญของแบคทีเรียที่ไม่ได้เกิดจากการย่อยสลายสารชนิดใด เตรียมโดยการเติมหัวเชื้อลงในอาหารเหลว CFMM ที่ไม่มีสาร PAHs ชนิดใด (3) ชุดควบคุมเพื่อตรวจการลดลงของอะซีแนพธีน และสาร PAHs ทดสอบ ที่เติมลงไปในหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อ ภายหลัง 24 ชม. เตรียมโดยเติมอะซีแนพธีนลงในอาหารเหลว CFMM นำไปเลี้ยงบนเครื่องเขย่า เป็นเวลา 24 ชม. แล้วจึงเติมสาร PAHs ทดสอบลงไป เก็บตัวอย่างทุกวัน จนครบ 7 วัน วัดการเจริญของแบคทีเรีย และปริมาณสารPAHs ที่เหลือ เช่นเดียวกับข้อ 3.4.1

บทที่ 4

ผลการทดลอง

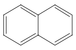
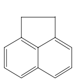
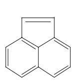
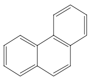
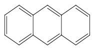
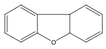
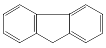
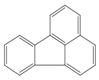
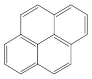
4.1 การคัดแยกเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์บริสุทธิ์ที่สามารถย่อยสลายสารประกอบพอลิไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน

4.1.1 การเพิ่มจำนวนแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายสารพอลิไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนจากตัวอย่างน้ำ

จากการนำตัวอย่างน้ำทั้ง 7 แหล่ง ซึ่งมีการปนเปื้อนของสารปิโตรเคมี น้ำมัน น้ำมันเครื่องเป็นเวลานาน มาคัดแยกและทดสอบความสามารถของแบคทีเรียในการย่อยสลายสาร PAHs ทั้ง 9 ชนิด ได้แก่ แนพธาลีน อะซีแนพธีน อะซีแนพธิลีน แอนทราซีน ฟีแนนทรีน ไดเบนโซฟูแรน ฟลูออรีน ฟลูออแรนธีน และไพรีน โดยนำมาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM ที่เติมสาร PAHs ความเข้มข้น 100 มก.ต่อลิตร ชนิดละหลอด ทำการถ่ายเชื้อและสังเกตการเจริญ โดยดูจากความขุ่นที่เพิ่มขึ้นและการเปลี่ยนสีของอาหารเหลว เทียบกับหลอดควบคุม หลังจากถ่ายเชื้อในครั้งแรก พบว่าในหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่มีตัวอย่างน้ำที่ 1 2 3 6 และ 7 มีการเจริญของแบคทีเรีย โดยพบความขุ่นและการเปลี่ยนสีของอาหารแตกต่างกันตามชนิดของสาร PAHs ดังแสดงผลการทดลองในตารางที่ 4.1

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4.1 การย่อยสลายสาร PAHs ของจุลินทรีย์ในตัวอย่างน้ำ

ตัวอย่างน้ำ	สารพอลิไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน (PAHs)								
	 แนพธาลีน	 อะซีแนพธีน	 อะซีแนพธิลีน	 ฟีแนนทรีน	 แอนทราซีน	 ไดเบนโซฟูแรน	 ฟลูออรีน	 ฟลูออแรนธีน	 ไพรีน
1	-	-	-	+	-	-	-	-	-
2	-	-	-	+	-	-	-	-	-
3	-	-	-	+	-	-	-	-	-
4	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6	-	+	-	+	-	-	+	+	-
7	-	+	-	+	-	-	-	-	-

หมายเหตุ

\+ หมายถึง มีการเจริญในอาหารเหลวโดยมีการเปลี่ยนสีของอาหาร

\- หมายถึง ไม่มีการเจริญในอาหารเหลว

กลุ่มแบคทีเรียจากตัวอย่างน้ำที่ 1 2 3 6 และ 7 สามารถย่อยสลายฟีแนนทรีน โดยเปลี่ยนสีของอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM จากไม่มีสีเป็นสีส้มอ่อน ภายใน 24 ชม. หลังจากการถ่ายเชื้อ 5 ครั้ง กลุ่มแบคทีเรียในตัวอย่างน้ำที่ 6 บ่อซ่อมบำรุงเรือ (บ่อลอย1) มีความสามารถในการย่อยสลายสาร PAHs ได้ 4 ชนิด ได้แก่ ฟีแนนทรีน อะซีแนพธีน ฟลูออรีน และฟลูออแรนธีน ดังจะเห็นการเปลี่ยนสีของอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว ได้ภายใน 24 ชม. หลังจากการถ่ายเชื้อ 5 ครั้ง ดังแสดงในตารางที่ 4.2 และรูปที่ 4.1 มีรายงานว่าการเพิ่มจำนวนของมวลชีวภาพและการเปลี่ยนสีของอาหารนั้น แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียนั้นมีการเจริญ (Bouchez และคณะ, 1995) และการเปลี่ยนสีของอาหารเลี้ยงเชื้อไปเป็นสีเหลือง หรือสีส้มนั้น อาจเกิดจากการสะสมของสารมัธยันตร์ชนิด catechol - like compounds และ meta - ring clevage compounds ที่เกิดจากการย่อยสลายสาร PAHs โดยจุลินทรีย์ (Mueller และคณะ, 1989)

ตารางที่ 4.2 ลักษณะของอาหารเลี้ยงเชื้อเมื่อเติมกลุ่มแบคทีเรียจากตัวอย่างน้ำที่ 6 หลังการถ่ายเชื้อ 5 ครั้ง

สาร PAHs	ลักษณะของอาหารเลี้ยงเชื้อ
ฟลูออแรนธีน	อาหารขุ่น เปลี่ยนสีเป็นสีแดงอิฐ
อะซีแนพธีน	อาหารขุ่น เปลี่ยนสีเป็นสีเหลืองอ่อน
ฟีแนนทรีน	อาหารขุ่น เปลี่ยนสีเป็นสีส้มเข้ม
ฟลูออรีน	อาหารขุ่น เปลี่ยนสีเป็นสีเหลือง

ชุดควบคุม 1 2 3 4

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 4.1 ลักษณะของอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM ที่มีฟลูออแรนธีน (1), อะซีแนพธีน (2), ฟีแนนทรีน (3) และฟลูออรีน (4) หลังการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียจากตัวอย่างน้ำที่ 6 เป็นเวลา 7 วัน หลังจากการถ่ายเชื้อ 5 ครั้ง เปรียบเทียบกับชุดควบคุม

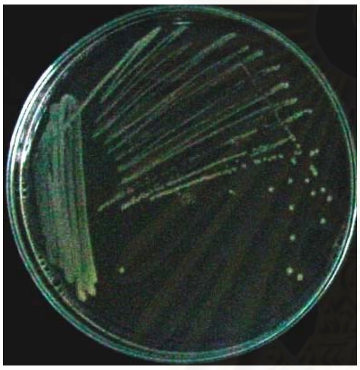
จากผลที่ได้ กลุ่มแบคทีเรียจากตัวอย่างน้ำที่ 6 มีความสามารถในการย่อยสลายสาร PAHs ได้มากชนิดกว่ากลุ่มแบคทีเรียในตัวอย่างน้ำแหล่งอื่น โดยเฉพาะมีความสามารถย่อยสลายฟลูออแรนธีน ซึ่งเป็นสาร PAHs ที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง มีโครงสร้างประกอบด้วยวงเบนซีน 3 วงเชื่อมกับวงไซโคลเพนเทน 1 วง จัดเป็นสารที่ยากต่อการย่อยสลายด้วยจุลินทรีย์ (Kanaly และ Harayama, 2000) จึงได้เพิ่มจำนวนแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM ที่เติมฟลูออแรนธีน เพื่อให้แบคทีเรียได้คุ้นเคยในการที่จะใช้ฟลูออแรนธีนเป็นแหล่งคาร์บอน และพลังงาน

4.1.2 การคัดแยกแบคทีเรียสายพันธุ์บริสุทธิ์ที่สามารถย่อยสลายสาร PAHs

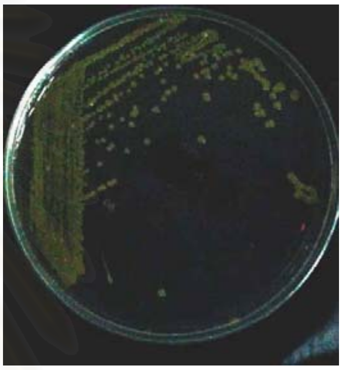
จากการนำเชื้อในน้ำตัวอย่างน้ำที่ 6 ที่ผ่านการถ่ายเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM ที่มีฟลูออแรนธีนมาแล้ว 5 ครั้ง มาแยกเชื้อแบคทีเรียบริสุทธิ์ที่มีความสามารถในการย่อยสลายสาร PAHs โดยนำมาเจือจางในสารละลาย 0.85% โซเดียมคลอไรด์ ให้ได้ค่าความเข้มข้นที่เหมาะสม แล้วนำมาเกลี่ยบนอาหารแข็ง CFMM ที่มีฟลูออแรนธีนวางบนฝาจานอาหาร โดยให้แบคทีเรียใช้ฟลูออแรนธีนในรูปสารระเหยในการเจริญ พบการเจริญของแบคทีเรียโดยเกิดโคโลนีสีขาวบนจานอาหารแข็ง CFMM ภายหลังจากการเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 30° ซ เป็นเวลา 3 วัน เนื่องจากการแยกแบคทีเรียให้ได้สายพันธุ์บริสุทธิ์ อาจทำให้แบคทีเรียไม่สามารถย่อยสลายสารหรือมีความสามารถย่อยสลายสารได้ลดลง (Mlynarz และ Ward, 1995) จึงนำโคโลนีเดี่ยวดังกล่าวมาทดสอบความสามารถในการย่อยสลายฟลูออแรนธีนอีกครั้ง โดยเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM ที่มีฟลูออแรนธีนในรูปสารละลายฟลูออแรนธีนในไดเมทธิลซัลฟอกไซด์ที่ความเข้มข้น 100 มก.ต่อลิตร พบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวขุ่นและเปลี่ยนสี หลังจากการเลี้ยงเชื้อ 2 วัน ส่วนใหญ่จุลินทรีย์ในสิ่งแวดล้อมจะอยู่รวมกันแบบพึ่งพาอาศัย และร่วมกันย่อยสลายสารที่มีโครงสร้างซับซ้อน (Alexander, 1994) จึงทดสอบความบริสุทธิ์ของเชื้ออีกครั้ง โดยนำอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีการเจริญและการย่อยสลายฟลูออแรนธีนของแบคทีเรียจากโคโลนีเดี่ยว มาเจือจางในสารละลาย 0.85% โซเดียมคลอไรด์ ให้ได้ค่าความเข้มข้นที่เหมาะสม แล้วนำมาเกลี่ยบนอาหารแข็ง LB หลังจากการเลี้ยงเชื้อ 3 วัน พบโคโลนีแบคทีเรียที่มีลักษณะที่แตกต่างกัน 3 ชนิด ซึ่งเจริญบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยเชื้อแบคทีเรียทั้ง 3 ชนิด มีลักษณะโคโลนีที่แตกต่างกันชัดเจน จึงให้ชื่อแต่ละโคโลนีว่า SP1 SP2 และ SP3 ดังแสดงรายละเอียดในตารางที่ 4.3 และรูปที่ 4.2

ตารางที่ 4.3 ลักษณะโคโลนีของแบคทีเรียซึ่งคัดแยกได้จากตัวอย่างน้ำที่ 6

สายพันธุ์แบคทีเรีย	ลักษณะโคโลนีบนอาหารแข็ง LB
SP1	โคโลนีกลมเล็ก ขอบเรียบ โปร่งแสง สีเหลืองอ่อน
SP2	โคโลนีกลม ขอบเรียบ โปร่งแสง สีเหลืองเข้ม
SP3	โคโลนีกลมใหญ่ ขอบเรียบ โปร่งแสง สีครีม



ก. แบคทีเรีย สายพันธุ์ SP1



ข. แบคทีเรีย สายพันธุ์ SP2

ค. แบคทีเรีย สายพันธุ์ SP3

รูปที่ 4.2 ลักษณะโคโลนีแบคทีเรียสายพันธุ์ SP1 SP2 และ SP3 ที่เจริญบนอาหารแข็ง LB เป็นเวลา 3 วัน ที่อุณหภูมิ 30 °ซ

การแยกแบคทีเรียสายพันธุ์บริสุทธิ์ อาจทำให้ความสามารถในการย่อยสลายสาร PAHs ของแบคทีเรียนั้นลดลง (Weissenfels และคณะ, 1990) จึงทดสอบความสามารถในการย่อยสลายสาร PAHs ของแบคทีเรียสายพันธุ์บริสุทธิ์ ทั้ง 3 สายพันธุ์ ที่คัดแยกได้ โดยนำแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์ มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง CFMM ที่มีอะซีแนพธีน ฟีแนนทรีน ฟลูออรีน และ ฟลูออแรนธีน วางบนฝาจานอาหาร ชนิดละจาน ซึ่งสารทั้ง 4 ชนิดเป็น PAHs ที่แบคทีเรียทั้ง 3 สายพันธุ์สามารถย่อยสลายได้เมื่ออยู่ร่วมกัน หลังจากการเลี้ยงเชื้อ 7 วัน พบเฉพาะการเจริญของแบคทีเรียสายพันธุ์ SP2 บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง CFMM ที่มีอะซีแนพธีนบนฝาจานอาหารเท่านั้น โดยไม่พบการเจริญของแบคทีเรียสายพันธุ์ SP1 และ SP3 บนจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีสาร PAHs ทดสอบ ชนิดใด จึงได้นำโคโลนีของแบคทีเรียสายพันธุ์ SP2 ที่ได้ เขี่ยลงอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่มีอะซีแนพธีน ความเข้มข้น 100 มก.ต่อลิตร เพื่อทดสอบความสามารถของแบคทีเรียสายพันธุ์ SP2 พบว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ SP2 สามารถย่อยสลายสารอะซีแนพธีนได้โดยเปลี่ยนสีของอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวจากไม่มีสีเป็นสีเหลืองได้ภายใน 48 ชั่วโมง

เนื่องจากยังมีการศึกษาการย่อยสลายอะซีแนพธีน เพียงเล็กน้อย ทั้งในประเทศไทยและต่างประเทศ อีกทั้งในไทยพบการปนเปื้อนอะซีแนพธีน ในอากาศ (กรมควบคุมมลพิษ, 2541) และน้ำทะเล (พรศรี, 2533) จึงเป็นประโยชน์ที่จะศึกษาการย่อยสลายอะซีแนพธีนของแบคทีเรียสายพันธุ์ SP2 ดังนั้นจึงได้เลือกแบคทีเรียสายพันธุ์ SP2 ไปจำแนกชนิดทางอนุกรมวิธาน และศึกษาการย่อยสลายอะซีแนพธีนในขั้นต่อไป

4.2. การจำแนกชนิดทางอนุกรมวิธานของแบคทีเรียสายพันธุ์ SP2

จากการสังเกตลักษณะโคโลนีของแบคทีเรียสายพันธุ์ SP2 ที่เจริญบนอาหารแข็ง LB มีลักษณะโคโลนีกลม ขอบเรียบ โปร่งแสง สีเหลืองเข้ม และสร้างเมือกเหนียว ดังแสดงในรูปที่ 4.3 และเมื่อศึกษาใต้กล้องจุลทรรศน์พบว่าเซลล์ของแบคทีเรียสายพันธุ์ SP2 มีลักษณะเป็นแท่ง เมื่อเซลล์มีอายุมากจะมีลักษณะเป็นแท่งยาว ติดสีแกรมลบ ดังแสดงในรูปที่ 4.4 และ 4.5 ส่วนลักษณะต่างๆ ที่ใช้ในการจำแนกชนิดทางอนุกรมวิธาน คือ ลักษณะทางสัณฐานวิทยา และชีวเคมี ดังแสดงไว้ในตารางที่ 4.4 และ 4.5 ตามลำดับ

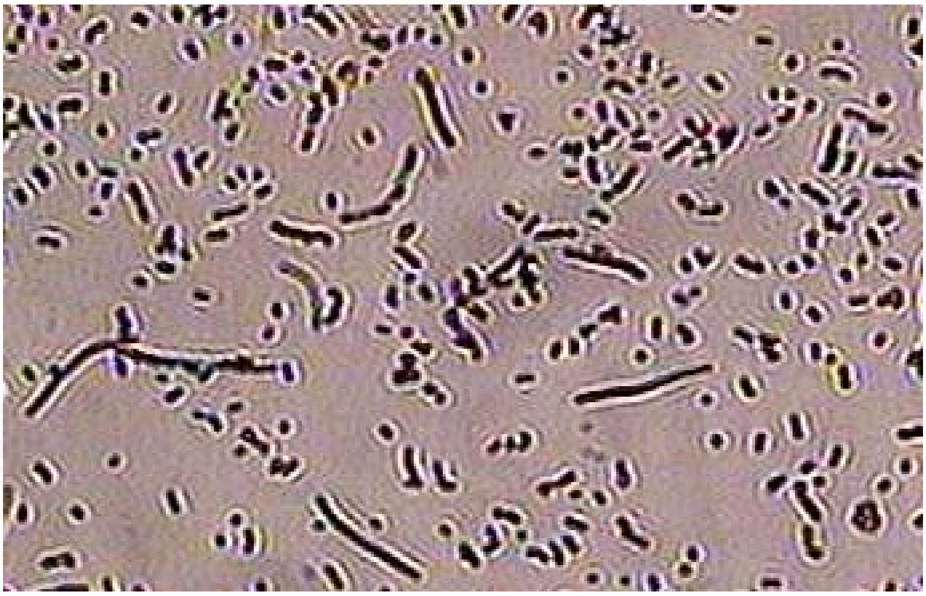
รูปที่ 4.3 ลักษณะโคโลนีของแบคทีเรียสายพันธุ์ SP2 ที่เจริญบนอาหารแข็ง LB เป็นเวลา 3 วัน ที่อุณหภูมิ 30 °ซ

ตารางที่ 4.4 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียสายพันธุ์ SP2

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

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 4.4 ลักษณะการติดสีย้อมแกรมของแบคทีเรียสายพันธุ์ SP2 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์



รูปที่ 4.5 ลักษณะรูปร่างของแบคทีเรียสายพันธุ์ SP2 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์สเตอริโอ

ตารางที่ 4.5 ลักษณะทางชีวเคมีของแบคทีเรียสายพันธุ์ SP2

ลักษณะที่ศึกษา	ลักษณะทางสรีรวิทยา
1. การสร้างเอนไซม์ออกซีเดส	+
2. การสร้างเอนไซม์คาตาเลส	+
3. การรีดิวซ์ไนเตรต	-
4. การไฮโดรไลซ์ เอสคูลิน	-
5. การสร้างเอนไซม์ยูรีเอส	+
6. การเกิดปฏิกิริยาบนอาหารแข็งทริปเปิลไอรอน	K/-
7. การเจริญบนอาหารแข็งแมกคองกี้	-
8. การไฮโดรไลซ์เจลาติน	-
9. การสร้างไฮโดรเจนซัลไฟด์	-
10. ปฏิกิริยาออกซิเดทีฟ/เฟอร์เมนเตชั่น	ออกซิเดทีฟ
11. การสร้างอินโดล	-
12. การดีคาร์บอกซีเลชั่นของไลซีน	-
13. การเคลื่อนที่	-
14. การทดสอบเมทธิลเรด	-
15. การทดสอบ Vogas-Proskauer reaction	-
16. การใช้แหล่งคาร์บอน	
ดี - กลูโคส	-
ดี - กาแลคโตส	-
ดี - ฟรุกโตส	-
ดี - แมนนิทอล	-
ดี - มอลโตส	-
ดี - ซูโครส	-
ซิมมอน ซิเตรต	+

<u>หมายเหตุ</u>

+ : เชื้อมีเอนไซม์ชนิดที่ทดสอบ หรือเจริญได้ในแหล่งคาร์บอนนั้น

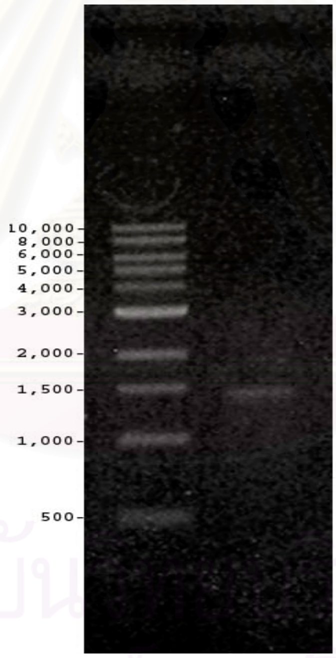
- : เชื้อไม่มีเอนไซม์ชนิดที่ทดสอบ หรือไม่มีการเจริญได้ในแหล่งคาร์บอนนั้น

K : อาหารแข็ง TSI ที่ก้นหลอด (butt) มีสมบัติเป็นเบสหรือเป็นกลาง

จากลักษณะทางสัณฐานวิทยาและลักษณะทางชีวเคมี ที่แสดงไว้ในตารางที่ 4 และ 5 เมื่อทำการเปรียบเทียบกับลักษณะที่รายงานไว้ใน Bergey's Mannual of Systematic Bacteriology ซึ่งรายงานไว้โดย Palleroni (1984) พบว่าลักษณะทั้งสัณฐานวิทยาและชีวเคมีของแบคทีเรียสายพันธุ์ SP2 ตรงกับแบคทีเรียในสกุล *Sphingomonas*

การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ 16 เอสไรโบโซมัลดีเอ็นเอ (16S ribosomal DNA)

เมื่อนำสารละลายดีเอ็นเอที่เพิ่มจำนวนด้วยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส มาตรวจสอบความบริสุทธิ์ด้วยวิธีอะกาโรสเจลอีเลคโทรโฟเรซิสพบชิ้น 16 เอส ไรโบโซมัลดีเอ็นเอ ของแบคทีเรียสายพันธุ์ SP2 มีขนาดประมาณ 1.5 กิโลเบส โดยการเปรียบเทียบกับ ชิ้นดีเอ็นเอมาตรฐาน (1 Kb lader) ดังแสดงในรูปที่ 4.6



รูปที่ 4.6 ขนาดชิ้น 16 เอส ไรโบโซมัลดีเอ็นเอ ของแบคทีเรีย สายพันธุ์ SP2

นำผลิตภัณฑ์ของปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสที่ได้ ไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์โดยหน่วยบริการชีวภาพ (BSU) สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ (สวทช.) และนำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16 เอส ไรโบโซมัลดีเอ็นเอ ของแบคทีเรียสายพันธุ์ SP2 ที่ได้ มาวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม Bioedit แล้วจึงนำไปเปรียบเทียบกับข้อมูลที่มีอยู่ใน Gen Bank ด้วยโปรแกรม BLAST พบว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ SP2 มีลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16 เอส ไรโบโซมัลดีเอ็นเอคล้ายกับลำดับนิวคลีโอไทด์16 เอส ไรโบโซมัลดีเอ็นเอของแบคทีเรีย *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ D16 (Accession number AFO 25352) โดยมีความคล้ายคลึง (% homology) เท่ากับ 99 % ดังแสดงในรูปที่ 4.7 ดังนั้นจากผลการทดสอบทางสรีรวิทยาและชีวเคมีร่วมกับการวิเคราะห์ลำดับเบสของ 16 เอส ไรโบโซมัลดีเอ็นเอ สามารถยืนยันได้ว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ SP2 เป็นแบคทีเรียในสกุล *Sphingomonas*

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

SP2 : ACGATTCACCCCAGTCGCTGATCCCACCGTGGTTAGCTGCCTCCGTTGCCGGTTAGCGCACTACCTTCGGGTGAAACCAACTCCCAT-110
D16 : ACGATTCACCCCAGTCGCTGATCCCACCGTGGTTAGCTGCCTCCGTTGCCGGTTAGCGCACTACCTTCGGGTGAAACCAACTCCCAT

SP2 : GGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCTGGGAACGTATTCACCGCGGCATGCTGATCCGCGATTACTAGCGATTCCGCCTTCATGCTCTC-200
D16 : GGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCTGGGAACGTATTCACCGCGGCATGCTGATCCGCGATTACTAGCGATTCCGCCTTCATGCTCTC

SP2 : GAGTTGCAGAGAACAATCCGAACTGAGACGGCTTTTGGAGATTAGCTTGTGCTCGCGCACTTGCTGCCCACTGTCACCGCCATTGTAGCA-290
D16 : GAGTTGCAGAGAACAATCCGAACTGAGACGGCTTTTGGAGATTAGCTTGTGCTCGCGCACTTGCTGCCCACTGTCACCGCCATTGTAGCA

SP2 : CGTGTGTAGCCCAGCGTGTAAGGGCCATGAGGACTTGACGTCATCCCCACCTTCCTCCGGCTTATCACCGGCAGTTTCCTTAGAGTGCC-380
D16 : CGTGTGTAGCCCAGCGTGTAAGGGCCATGAGGACTTGACGTCATCCCCACCTTCCTCCGGCTTATCACCGGCAGTTTCCTTAGAGTGCC

SP2 : CAACCAAATGATGGCAACTAAGGACGAGGGTTGCGCTCGTTGCGGTACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAGCCATGCA-470
D16 : CAACCAAATGATGGCAACTAAGGACGAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAGCCATGCA

SP2 : GCACCTGTCACTGATCCAGCCGAACTGAAGGAAAAGATCTCTCTAATCCGCGATCAGGATGTCAAACGCTGGTAAGGTTCTGCGCGTTGC-560
D16 : GCACCTGTCACTGATCCAGCCGAACTGAAGGAAAAGATCTCTCTAATCCGCGATCAGGATGTCAAACGCTGGTAAGGTTCTGCGCGTTGC

SP2 : TTCGAATTAAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCAGGCCCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTTAATCTTGCGACCGTACTCCCCAGGCGGATA-650
D16 : TTCGAATTAAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCAGGCCCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTTAATCTTGCGACCGTACTCCCCAGGCGGATA

SP2 : ACTTAATGCGTTAGCTG CGCCACCCAAACACCATGTGCCCGGACAGCTAGTTATCATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAAT-740
D16 : ACTTAATGCGTTAGCTGCGCCACCCAAACACCATGTGCCCGGACAGCTAGTTATCATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAAT

SP2 : CCTGTTTGCTCCCCACGCTTTCGCACCTCAGCGTCAATACTTGTCCAGTCAGTCGCCTTCGCCACTGGTGTTCTTCCGAATATCTACGAA-830
D16 : CCTGTTTGCTCCCCACGCTTTCGCACCTCAGCGTCAATACTTGTCCAGTCAGTCGCCTTCGCCACTGGTGTTCTTCCGAATATCTACGAA

SP2 : TTTCACCTCTACACTCGGAATTCCACTGACCTCTCCAAGATTCTAGTCACCTAGTTTCAAAGGCAGTTCCGGGGTTGAGCCCCGGGCTTT-920
D16 : TTTCACCTCTACACTCGGAATTCCACTGACCTCTCCAAGATTCTAGTCACCTAGTTTCAAAGGCAGTTCCGGGGTTGAGCCCCGGGCTTT

SP2 : CACCTCTGACTTGAGTAACCGCCTACGCGCGCTTTACGCCCAGTAATTCCGAACAACGCTAGCTCCCTCCGTATTACCGCGGCTGCTGGC-1010
D16 : CACCTCTGACTTGAGTAACCGCCTACGCGCGCTTTACGCCCAGTAATTCCGAACAACGCTAGCTCCCTCCGTATTACCGCGGCTGCTGGC

SP2 : ACGGAGTTAGCCGGAGCTTATTCTCCAGGTACTGTCATTATCATCCCTGGTAAAAGAGCTTTACAACCCTAAGGCCTTCATCACTCACGC-1200
D16 : ACGGAGTTAGCCGGAGCTTATTCTCCAGGTACTGTCATTATCATCCCTGGTAAAAGAGCTTTACAACCCTAAGGCCTTCATCACTCACGC

SP2 : GGCAT-GCTGGATCAGGCTTTCGCCCATTGTTCCAATATTCCCCACTGCTGCCCCCGTAGGAGTCTGGGCCGTGTCTCAGTCCCAGTGTG-1290
D16 : GGCATTGCTGGATCAGGCTTTCGCCCATTGT– CCAATATTCCCCACTGCTGCCCCCGTAGGAGTCTGGGCCGTGTCTCAGTCCCAGTGTG

SP2 : GCTGATCATCCTCTCAGACCAGCTAAGGATCGTCGCCTTGGTAGGCCATTACCCCACCAACTAGCTAATCCTACGCGGGCTCATCCCTTG-1380
D16 : GCTGATCATCCTCTCAGACCAGCTAAGGATCGTCGCCTTGGTAGGCCATTACCCCACCAACTAGCTAATCCTACGCGGGCTCATCCCTTG

SP2 : CCGATAA-TCTTTGGTCCGAAGACATCATCCGGTATATAGCAGTAATTTCTCACTGTTATTCCGAAGCAAAGGGCAGATTCCCACGCGTT-1470
D16 : CCGATAAATCTTTGGTCCGAAGACATCATCCGGTAT-TAGCAGTAATTTCTCACTGTTATTCCGAAGCAAAGGGCAGATTCCCACGCGTT

SP2 : ACGCACCCGTGCGCCACTAGACCCGAAGGTCTCGTTCGACTTGCATGTGTTAGGCATGCCGCCAGCGTTCGTT-1452
D16 : ACGCACCCGTGCGCCACTAGACCCGAAGGTCTCGTTCGACTTGCATGTGTTAGGCATGCCGCCAGCGTTCGTT

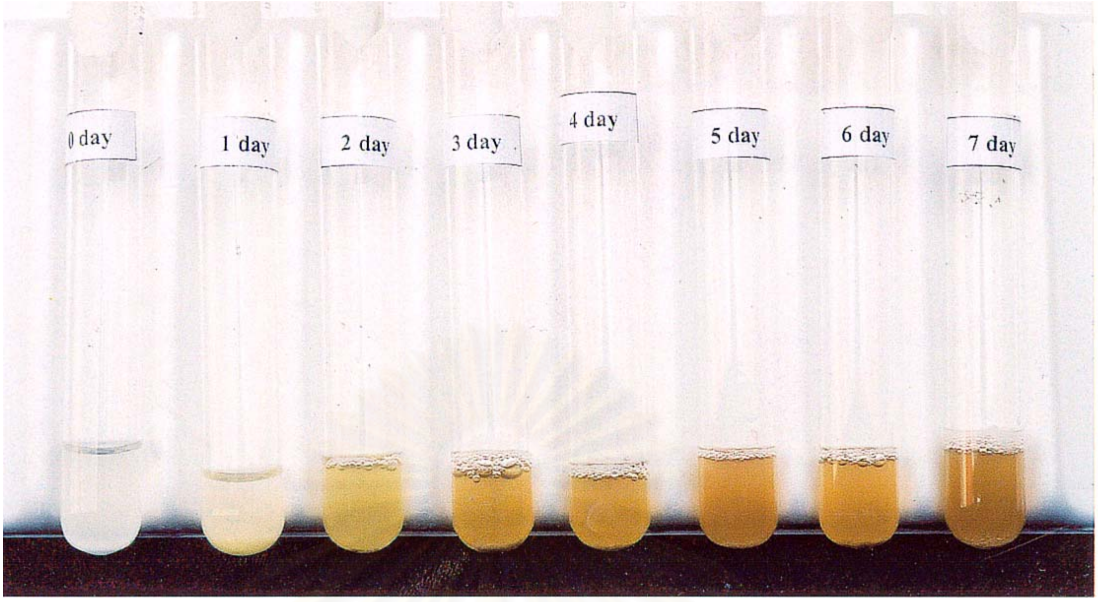
รูปที่ 4.7 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16 เอส ไรโบโซมัลดีเอ็นเอ ของแบคทีเรียสายพันธุ์ SP2 เปรียบเทียบกับ *Sphigomonas* sp. สายพันธุ์ D16

4.3. การเจริญและความสามารถในการย่อยสลายอะซีแนพธีนของแบคทีเรีย *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ SP2

4.3.1 รูปแบบการเจริญและความสามารถของแบคทีเรีย *Sphingomonas* sp.สายพันธุ์ SP2 ในการใช้อะซีแนพธีนเป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงาน

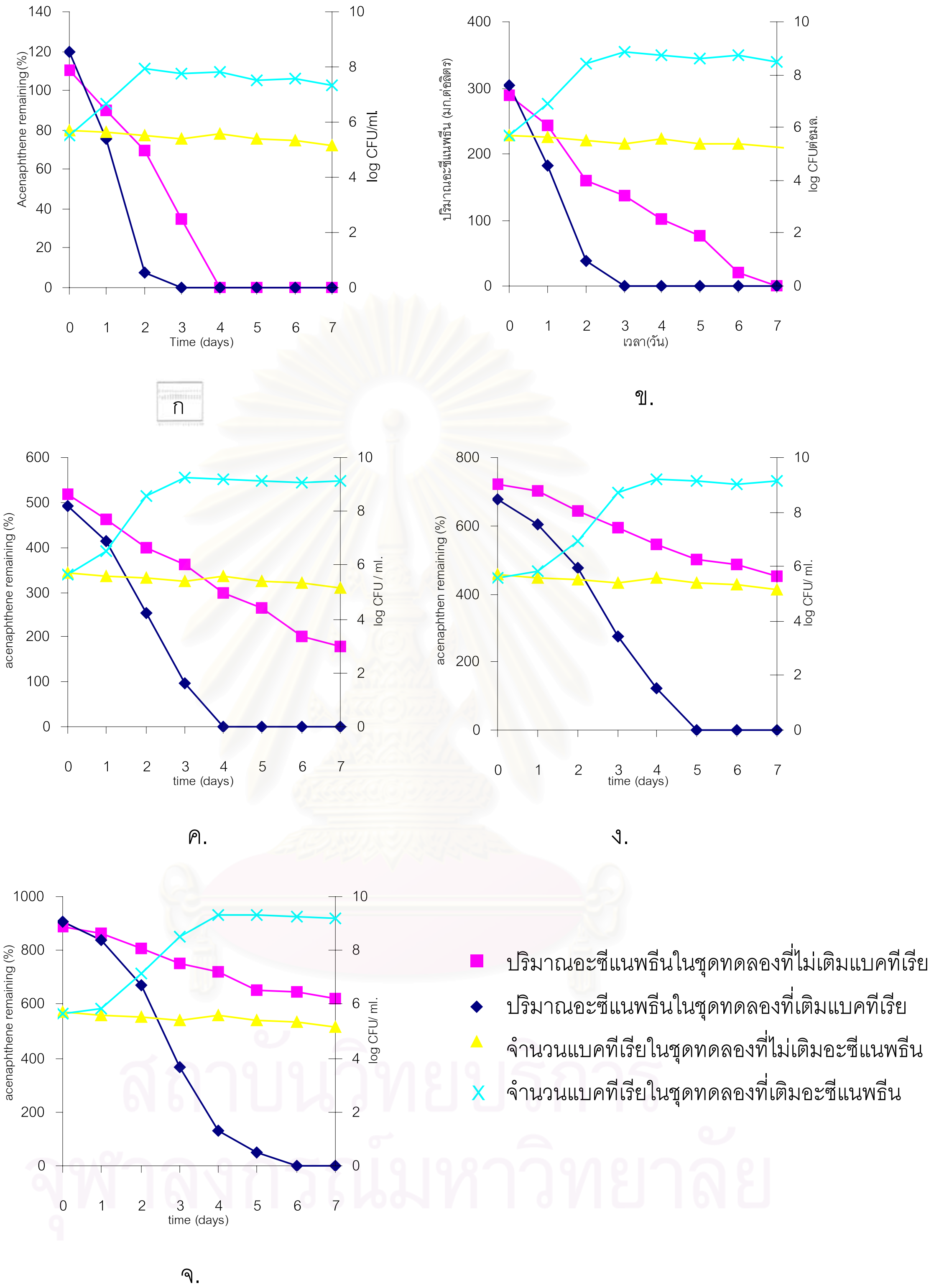
รูปแบบการเจริญของแบคทีเรีย *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ SP2 โดยการแปรผันความเข้มข้นของอะซีแนพธีน 100 300 500 700 และ 900 มก.ต่อลิตร ซึ่งแบคทีเรียใช้เป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงาน ติดตามการเจริญของแบคทีเรีย และวิเคราะห์ปริมาณอะซีแนพธีนที่เหลือทุกวันด้วยวิธี HPLC ได้ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 4.9 *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ SP2 สามารถย่อยสลายอะซีแนพธีน หมดภายในเวลา 3 3 4 5 และ 6 วัน ตามลำดับ และมีการเปลี่ยนสีอาหารจากไม่มีสีเป็นสีเหลือง ดังแสดงในรูปที่ 4.8 แบคทีเรียมีการเจริญและเพิ่มจำนวนอย่างรวดเร็วจากจำนวนเซลล์เริ่มต้น 3.5×10^5 CFU ต่อมล. ไปเป็น 8.7×10^7 CFU ต่อมล., จำนวนเริ่มต้น 5.3×10^5 CFUต่อมล. เป็น 6.9×10^8 CFUต่อมล. และ จาก 4.4×10^5 CFU ต่อมล. เป็น 1.75×10^9 CFUต่อมล. ที่ความเข้มข้นของอะซีแนพธีน 100 300 และ 500 มก.ต่อลิตร ตามลำดับ แต่ที่ความเข้มข้น 700 และ 900 มก.ต่อลิตร พบว่าแบคทีเรียมีการปรับตัวให้เข้ากับสภาวะที่มีปริมาณของสับเสรตมาก ส่งผลให้แบคทีเรียมีช่วงการเจริญ lag phase หลังจากนั้นแบคทีเรียมีการเพิ่มจำนวนจากจำนวนเริ่มต้น 3.7×10^5 CFUต่อมล. เป็น 1.65×10^9 CFU ต่อมล. และ จาก 4.3×10^5 CFUต่อมล. เป็น 2.00×10^9 CFUต่อมล. เมื่อพิจารณาจากผลที่ได้พบว่า อะซีแนพธีนที่ความเข้มข้น 300 มก.ต่อลิตร เป็นความเข้มข้นที่เหมาะสมต่อการเจริญของแบคทีเรีย โดยสามารถย่อยสลายอะซีแนพธีน และเพิ่มจำนวนแบคทีเรียได้อย่างรวดเร็ว โดยไม่มีการเจริญในช่วง lag phase

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 4.8 ลักษณะอาหารเลี้ยงเหลว CFMM ที่เกิดจากการย่อยสลายอะซีแนพธีนความเข้มข้น 100 มก.ต่อ ลิตรโดย *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ SP2 เป็นเวลา 7 วัน

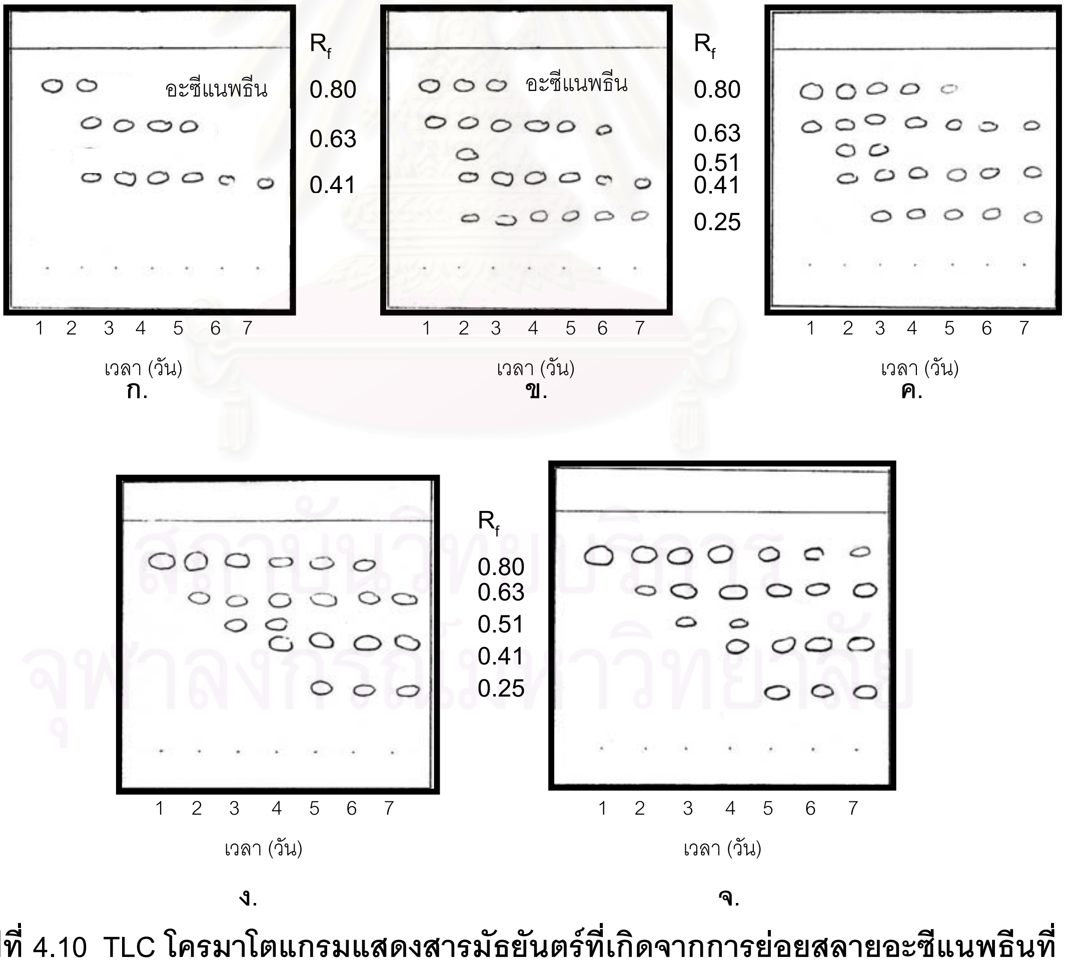
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



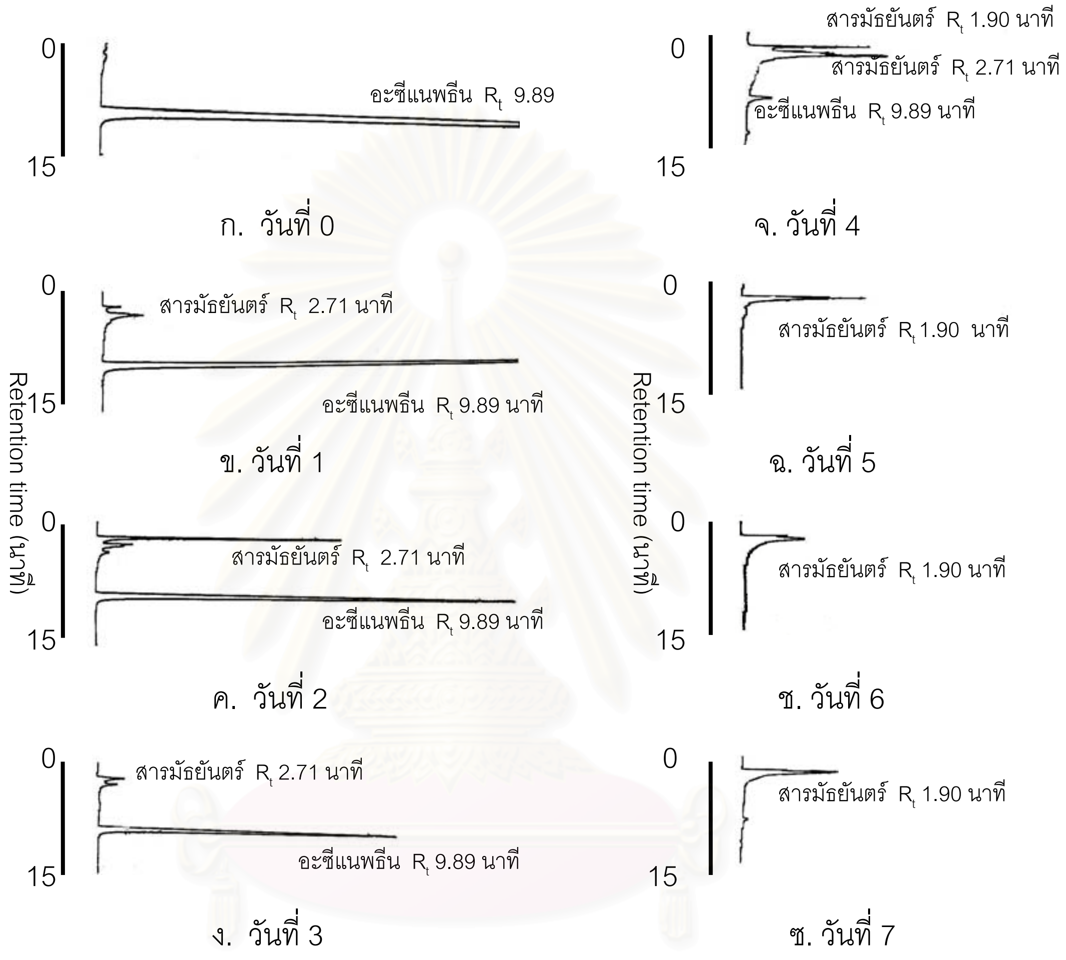
รูปที่ 4.9 การเจริญของ *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ SP2 และการย่อยสลายอะซีแนพธีน ที่ความเข้มข้น 100 (ก.), 300 (ข.), 500 (ค.), 700 (ง.) และ 900(จ.) มก.ต่อลิตร

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เมื่อนำสารสกัดที่ได้จากการย่อยสลายอะซีแนพธีนที่แปรผันความเข้มข้น ในอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาตร 5 มล. ไปวิเคราะห์สารมัธยันตร์ที่เกิดขึ้นจากการย่อยสลายอะซีแนพธีนด้วยวิธี TLC และ HPLC ดังแสดงในรูปที่ 4.10 และ 4.11 ตามลำดับ พบแถบสารที่เรืองแสงอัลตราไวโอเลต 5 แถบ ประกอบด้วยอะซีแนพธีนมีค่า R_f เท่ากับ 0.8 และมีสารมัธยันตร์หลัก 4 ชนิด ซึ่งมีค่า R_f เท่ากับ 0.63 0.51 0.41 และ 0.25 ในวันที่ 2 ของการย่อยสลายอะซีแนพธีนความเข้มข้น 300 มก.ต่อลิตร สารมัธยันตร์ที่ตรวจพบนั้นเกิดจากการย่อยสลายอะซีแนพธีนของ *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ SP2 เมื่อเทียบกับชุดควบคุมการลดลงของอะซีแนพธีนที่ไม่ได้เกิดจากการย่อยสลายของแบคทีเรีย (ภาคผนวก ง.) เมื่อพิจารณาจากผลที่ได้ อะซีแนพธีนที่ความเข้มข้น 500 มก.ต่อ ลิตร จะพบสารมัธยันตร์ครบทั้ง 4 ชนิด หลังจากการเลี้ยงเชื้อ 3 วัน โดยมีแถบของสารมัธยันตร์กว้างและเรืองแสงอัลตราไวโอเลตเข้ม จึงได้ใช้อะซีแนพธีนที่ความเข้มข้นนี้ มาศึกษารูปแบบการเจริญและการย่อยสลายอะซีแนพธีนเป็นแหล่งคาร์บอน และพลังงานของแบคทีเรีย *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ SP2 ในขั้นตอนต่อไป



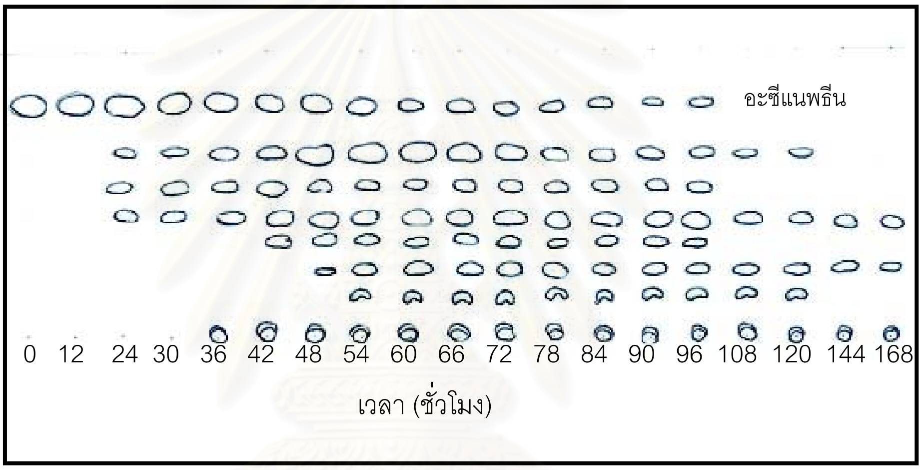
รูปที่ 4.10 TLC โครมาโตแกรมแสดงสารมัธยันตร์ที่เกิดจากการย่อยสลายอะซีแนพธีนที่แปรผันความเข้มข้น 100 (ก.), 300 (ข.), 500 (ค.), 700 (ง.) **และ** 900 (จ.) **มก.ต่อลิตร เป็นเวลา 7 วัน**



รูปที่ 4.11 HPLC โครมาโตแกรม แสดงชนิดและปริมาณของสารมัธยันตร์ที่เกิดจากการย่อยสลายอะซีแนพธีนเข้มข้น 500 มก.ต่อลิตร เป็นเวลา 7 วัน

4.3.2 การวิเคราะห์สารมัธยันตร์ที่เกิดจากการย่อยสลายอะซีแนพธีน

ผลการศึกษารูปแบบในการเจริญใช้อะซีแนพธีนเป็นแหล่งคาร์บอน และพลังงานของแบคทีเรีย *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ SP2 โดยการนำหัวเชื้อแบคทีเรียมาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM ปริมาตร 10 มล.ที่มีอะซีแนพธีนเข้มข้น 500 มก.ต่อลิตร และติดตามการเจริญของแบคทีเรีย *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ SP2 และวิเคราะห์สารมัธยันตร์ที่เกิดขึ้นตามเวลาที่กำหนด นำมาวิเคราะห์ด้วยวิธี analytical TLC ที่มีระบบตัวทำละลายประกอบด้วย โทลูอีน : 1,4-ไดออกเซน : กรดอะซีติก พบสารมัธยันตร์ดังแสดงในรูปที่ 4.12



R_f
0.80
0.63
0.51
0.41
0.33
0.25
0.13

รูปที่ 4.12 TLC โครมาโตแกรม แสดงสารมัธยันตร์ที่เกิดจากการย่อยสลายอะซีแนพธีน ความเข้มข้น 500 มก.ต่อลิตร เป็นเวลา 7 วัน

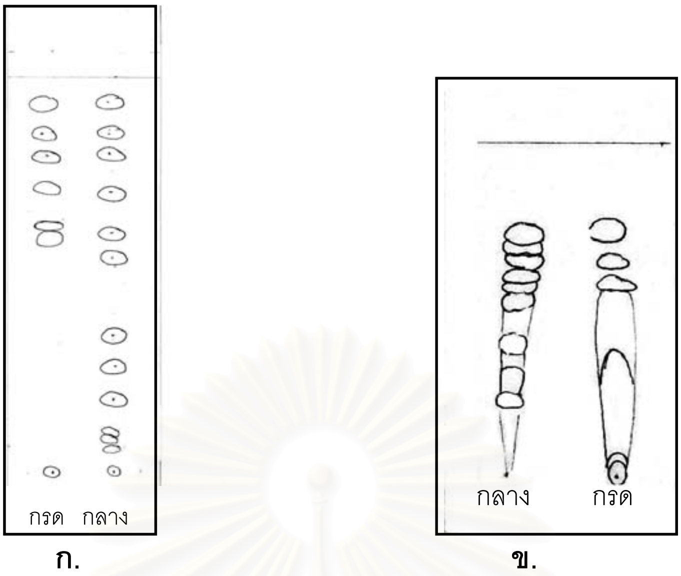
เมื่อเพิ่มปริมาณของอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวเป็น 10 มล. สามารถทำให้พบสารมัธยันตร์เพิ่มขึ้นจาก 4 ชนิดเป็น 6 ชนิดแต่ละชนิดมีค่า R_f เท่ากับ 0.63 0.51 0.41 0.33 0.25 และ 0.13 สารมัธยันตร์แต่ละชนิดจะเรืองแสงอัลตราไวโอเลตแตกต่างกัน ดังแสดงในตาราง ที่ 4.6

ตารางที่ 4.6 ลักษณะการเรืองแสงอัลตราไวโอเลตของสารมัธยันตร์ที่เกิดจากการย่อยสลายอะซีแนพธีนโดย *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ SP2

สารมัธยันตร์ (R_f)	ลักษณะการเรืองแสงอัลตราไวโอเลต
0.63	สีม่วง
0.51	สีม่วง
0.41	สีเหลือง
0.33	สีม่วง
0.25	สีน้ำตาลเหลือง
0.13	สีม่วง

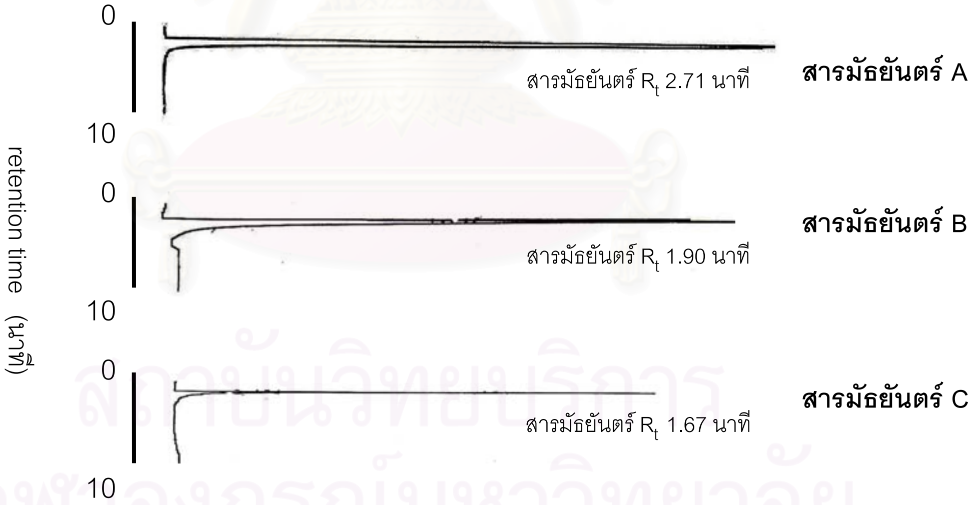
ช่วงเวลา 24 ชม.แรกของการย่อยสลายอะซีแนพธีนจะพบสารมัธยันตร์ที่ค่า R_f เท่ากับ 0.63 0.51 และ 0.41 แต่ที่เวลา 54 ชม. ของการเลี้ยงเชื้อ จะพบสารมัธยันตร์ครบทั้ง 6 ชนิด และพบรูปแบบการเกิดสารมัธยันตร์เช่นนี้จนถึงเวลา 96 ชม. และจะลดลงเหลือเพียงสารมัธยันตร์ 2 ชนิด คือ สารที่ค่า R_f เท่ากับ 0.41 และ 0.25 หลังจากการเลี้ยงเชื้อ 7 วัน

การย่อยสลายอะซีแนพธีนโดย *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ SP2 จะพบสารมัธยันตร์หลัก 3 ชนิด ได้แก่ สารมัธยันตร์ที่ค่า R_f เท่ากับ 0.63 0.41 และ 0.25 ซึ่งมีแถบสารมัธยันตร์กว้างและเรืองแสงอัลตราไวโอเลตเข้ม น่าจะเป็นสารมัธยันตร์ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายอะซีแนพธีน จึงได้แยกสารทั้ง 3 ชนิดให้บริสุทธิ์ โดยเพิ่มขนาดของการทดลอง โดยเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว CFMM ปริมาตร 1,000 มล. ที่มีอะซีแนพธีนความเข้มข้น 500 มก.ต่อลิตร เป็นระยะเวลา 54 ชม. ซึ่งเป็นเวลาที่มีปริมาณสารมัธยันตร์ทั้ง 3 ชนิดสูง นำมาสกัดตามวิธีของ Grifoll และคณะ (1992) ดังแสดงในวิธีการทดลองข้อ 4.2.2 ซึ่งจะได้สารสกัด 2 ชนิด คือ สารสกัดที่เป็นกลาง และสารสกัดที่เป็นกรด และนำสารสกัดทั้ง 2 ชนิดมาวิเคราะห์ด้วยวิธี analytical TLC และ preparative TLC เปรียบเทียบแถบของสารสกัดทั้ง 2 ชนิด ดังแสดงในรูปที่ 4.13 พบว่าสารสกัดที่เป็นกลางจะพบแถบสารมัธยันตร์มากกว่าสารสกัดที่เป็นกรด และพบสารมัธยันตร์ที่สนใจ ทั้ง 3 ชนิด ได้แก่ สารมัธยันตร์ที่มีค่า R_f เท่ากับ 0.63 0.41 และ 0.25 ในสารสกัดส่วนที่เป็นกลาง จึงนำสารสกัดที่เป็นกลางมาแยกสารมัธยันตร์ให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี preparative TLC และ HPLC ซึ่งได้สารมัธยันตร์บริสุทธิ์ โดยสารมัธยันตร์ที่มีค่า R_f เท่ากับ 0.63 0.41 และ 0.25 จะมีค่ารีเทนชั่นไทม์เท่ากับ 2.71 1.90 และ 1.67 นาที ตามลำดับ เมื่อวิเคราะห์ด้วย HPLC ดังแสดงในรูปที่ 4.14 จึงให้ชื่อสารมัธยันตร์ทั้ง 3 ชนิดว่า สารมัธยันตร์ A B และ C ตามลำดับ นำสารมัธยันตร์บริสุทธิ์ที่ได้ไปตรวจสอบชนิดของสารในขั้นต่อไป



รูปที่ 4.13 **TLC โครมาโตแกรมแสดงสารมัธยันตร์ในสารสกัดที่เป็นกลางและกรดที่ได้จากการย่อยสลายอะซีแนพธีน เป็นเวลา 54 ชม.**

ก. วิเคราะห์ด้วยวิธี preparative TLC **ข. วิเคราะห์ด้วยวิธี** analytical TLC



รูปที่ 4.14 **HPLC โครมาโตแกรม แสดงสารมัธยันตร์หลัก 3 ชนิดจากการย่อยสลายอะซีแนพธีน ที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยวิธี** preparative TLC

สารมัธยันตร์ A มีค่า R_f **เท่ากับ** 0.63 **เมื่อวิเคราะห์ด้วยวิธี** analytical TLC

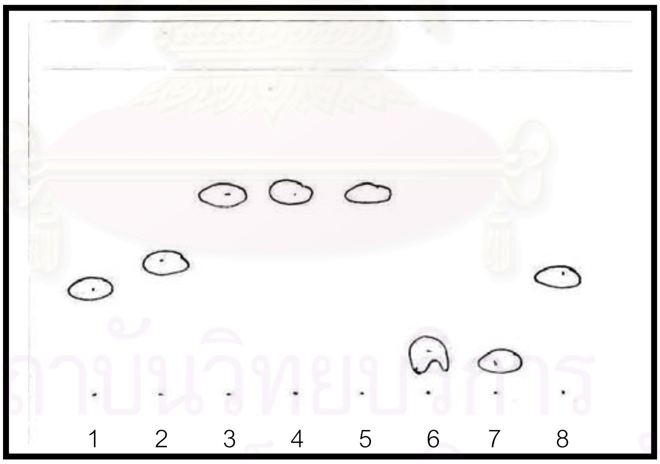
สารมัธยันตร์ B มีค่า R_f **เท่ากับ** 0.41 **เมื่อวิเคราะห์ด้วยวิธี** analytical TLC

สารมัธยันตร์ C มีค่า R_f **เท่ากับ** 0.25 **เมื่อวิเคราะห์ด้วยวิธี** analytical TLC

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

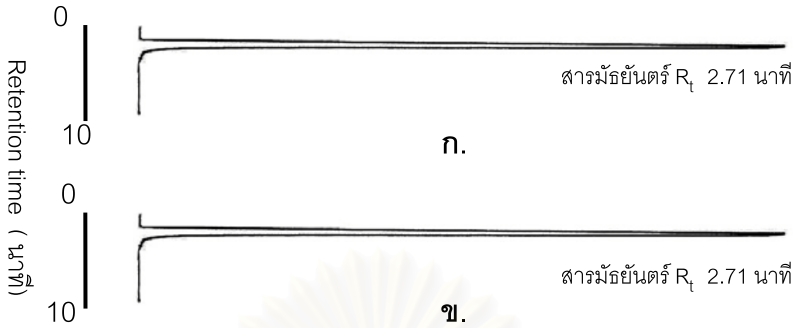
4.3.3 การตรวจสอบชนิดของสารมัธยันตร์

นำสารมัธยันตร์บริสุทธิ์ A B และ C มาตรวจสอบชนิดของสาร ซึ่งจะตรวจสอบด้วยขั้นเบื้องต้น โดยนำสารมัธยันตร์ที่แยกได้มาวิเคราะห์ด้วยวิธี analytical TLC และเปรียบเทียบกับแถบของสารมัธยันตร์มาตรฐานที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายอะซีแนพธีน (Schocken และ Gibson ,1984 และ Selifonov และคณะ, 1993) และสาร PAHs (Grund และคณะ, 1992) ซึ่งมีในห้องปฏิบัติการ ได้แก่ อะซีแนพธีนควิโนน กรดแนพธาลีน 1,8-ไดคาร์บอกซิลิก กรดซาลิไซลิก กรด 2,5-ไดไฮดรอกซีเบนโซอิก กรดโปรโตคาทีคูอิก ที่ละลายในเมทธานอล ความเข้มข้น 0.1 มก. ต่อมล. พบว่าแถบของสารมัธยันต์ A เรืองแสงสีม่วง และมีค่า R_f เท่ากับ 0.63 ซึ่งมีลักษณะตรงกับแถบของอะซีแนพธีนควิโนน และกรดแนพธาลีน 1,8-ไดคาร์บอกซิลิก ดังแสดงในรูปที่ 4.15 และเมื่อนำสารมัธยันตร์ A รวมกับอะซีแนพธีนควิโนน และกรดแนพธาลีน 1,8-ไดคาร์บอกซิลิก ไปวิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC และเปรียบเทียบค่า รีเทนชันไทม์ (R_t) ของสารมัธยันตร์ พบว่า สารทั้ง 3 ชนิด มีค่ารีเทนชั่น ไทม์ เท่ากับ 2.71 นาที เหมือนกันทั้ง 3 ชนิด ดังแสดงในรูปที่ 4.16 จากผลที่ได้เป็นข้อมูลเบื้องต้น ยังไม่สามารถบอกได้ว่าสารมัธยันตร์ A คือ สารชนิดใดจนกว่าจะตรวจสอบโครงสร้างอย่างละเอียดด้วยวิธี NMR



รูปที่ 4.15 TLC **โครมาโตแกรม แสดงสารมัธยันตร์** A (3), B (2) **และ** C (1) **เปรียบเทียบอะซีแนพธีนควิโนน** (4), **กรดแนพธาลีน** 1,8-**ไดคาร์บอกซิลิก** (5), **กรด** 2,5-**ไดไฮดรอกซีเบนโซอิก** (6), **กรดโปรโตคาทีคูอิก** (7), **กรดซาลิไซลิก** (8)

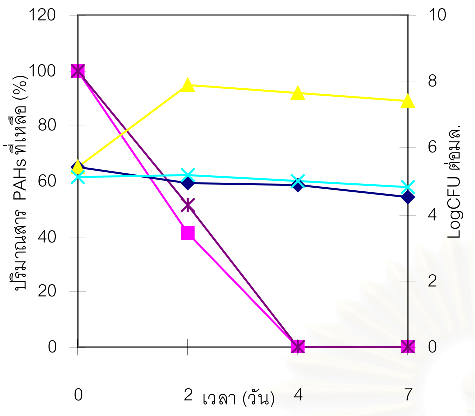
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



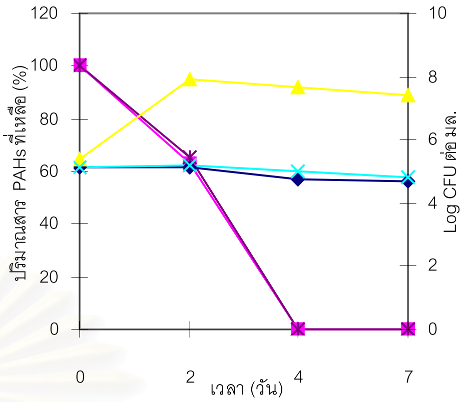
รูปที่ 4.16 HPLC โครมาโตรแกรม สารมัธยันตร์ A เปรียบเทียบกับอะซีแนพธีนควิโนนและกรดแนพธาลีน1,8-ไดคาร์บอกซิลิก
ก. สารมัธยันตร์ A รวมกับอะซีแนพธีนควิโนน
ข. สารมัธยันตร์ A รวมกับกรดแนพธาลีน1,8-ไดคาร์บอกซิลิก

4.4 ศึกษาความสามารถของ *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ SP2 ในการย่อยสลายสาร PAHs ชนิดอื่น

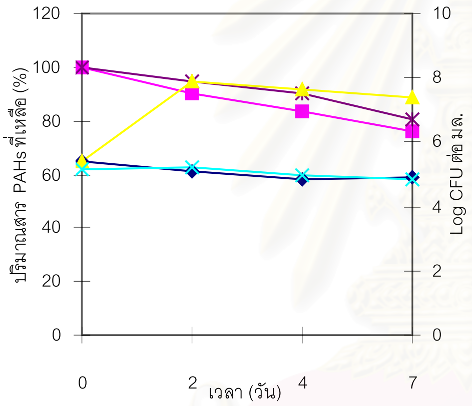
การทดสอบความจำเพาะในการใช้สารตั้งต้นเพื่อการเจริญของ *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ SP2 ในการย่อยสลาย PAHs ชนิดอื่นนอกเหนือจากอะซีแนพธีนเพื่อใช้เป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงานของแบคทีเรีย PAHs ที่ใช้ในการทดสอบได้แก่ แนพธาลีน ฟลูออรีน อะซีแนพธิลีน ฟีแนนทรีน ไดเบนโซฟูแรน แอนทราซีน ฟลูออแรนธีน และไพรีน พบว่า *Sphingomonas* sp.สายพันธุ์ SP2 ไม่สามารถย่อยสลายสาร PAHs ชนิดใดได้เลย โดยไม่มีการเปลี่ยนแปลงทั้งสีและความขุ่นของอาหารเลี้ยงเชื้อ หลังจากการเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 7 วัน ดังแสดงในรูปที่ 4.17



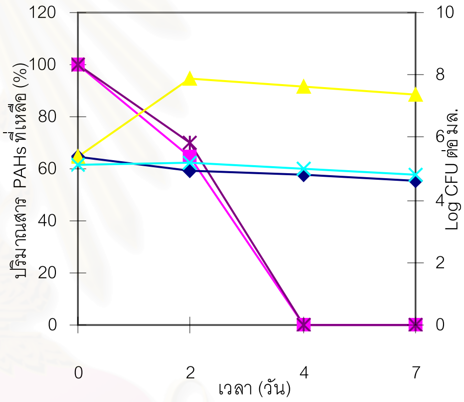
ก. แนพธาลีน



ข. ไดเบนโซฟูแรน



ค. ไพรีน



ง. อะซีแนพธิลีน

■ ปริมาณ PAHs ชนิดที่ทดสอบ ในชุดทดลองที่เติมแบคทีเรีย

✳ ปริมาณ PAHs ชนิดที่ทดสอบ ในชุดควบคุมที่ไม่เติมแบคทีเรีย

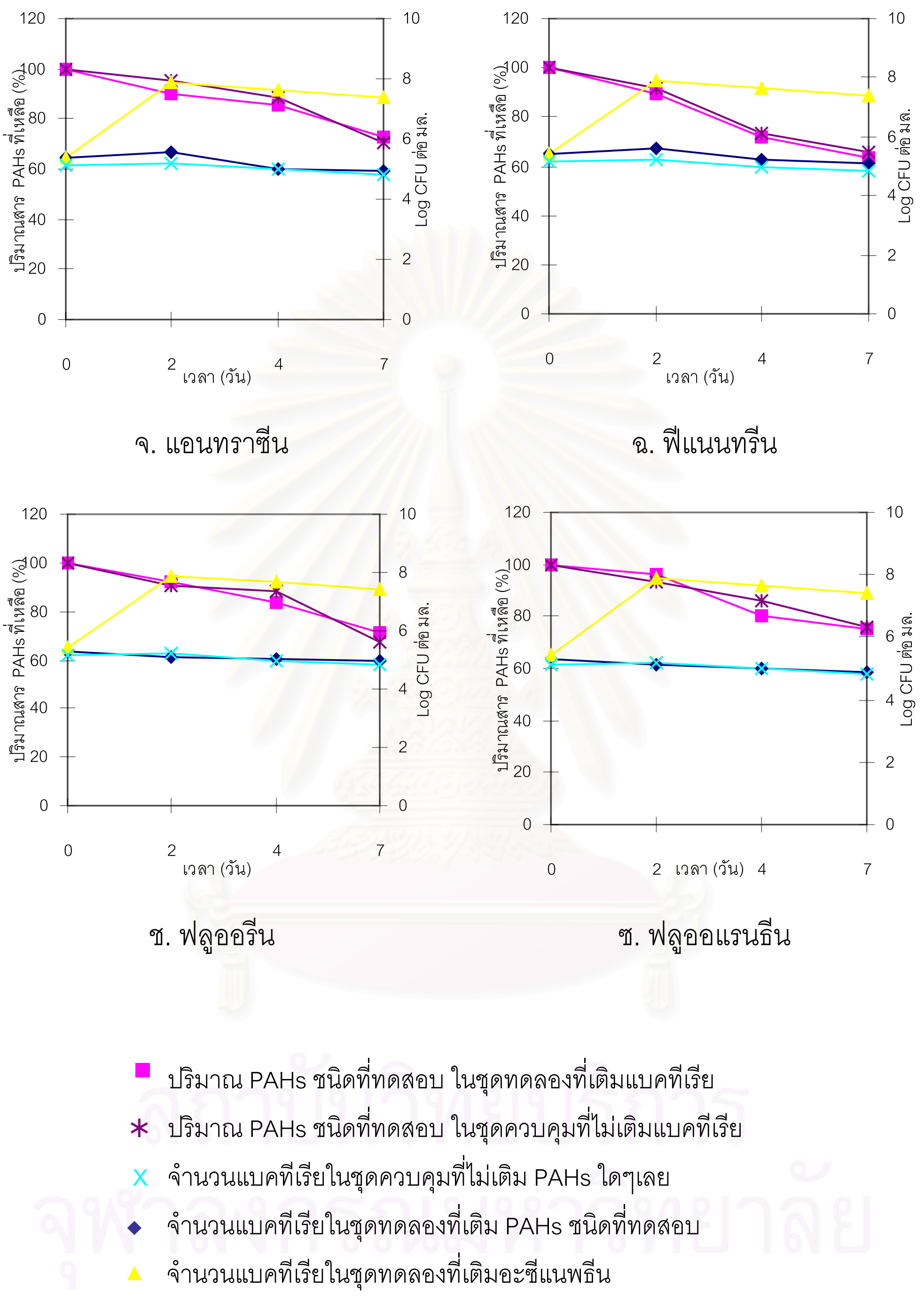
x จำนวนแบคทีเรียในชุดควบคุมที่ไม่เติม PAHs ใดๆเลย

◆ จำนวนแบคทีเรียในชุดทดลองที่เติม PAHs ชนิดที่ทดสอบ

▲ จำนวนแบคทีเรียในชุดทดลองที่เติมอะซีแนพธีน

รูปที่ 4.17 การเจริญของ *Sphingomonas* sp.สายพันธุ์ SP2 ในการย่อยสลายสาร PAHs ชนิดอื่น

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

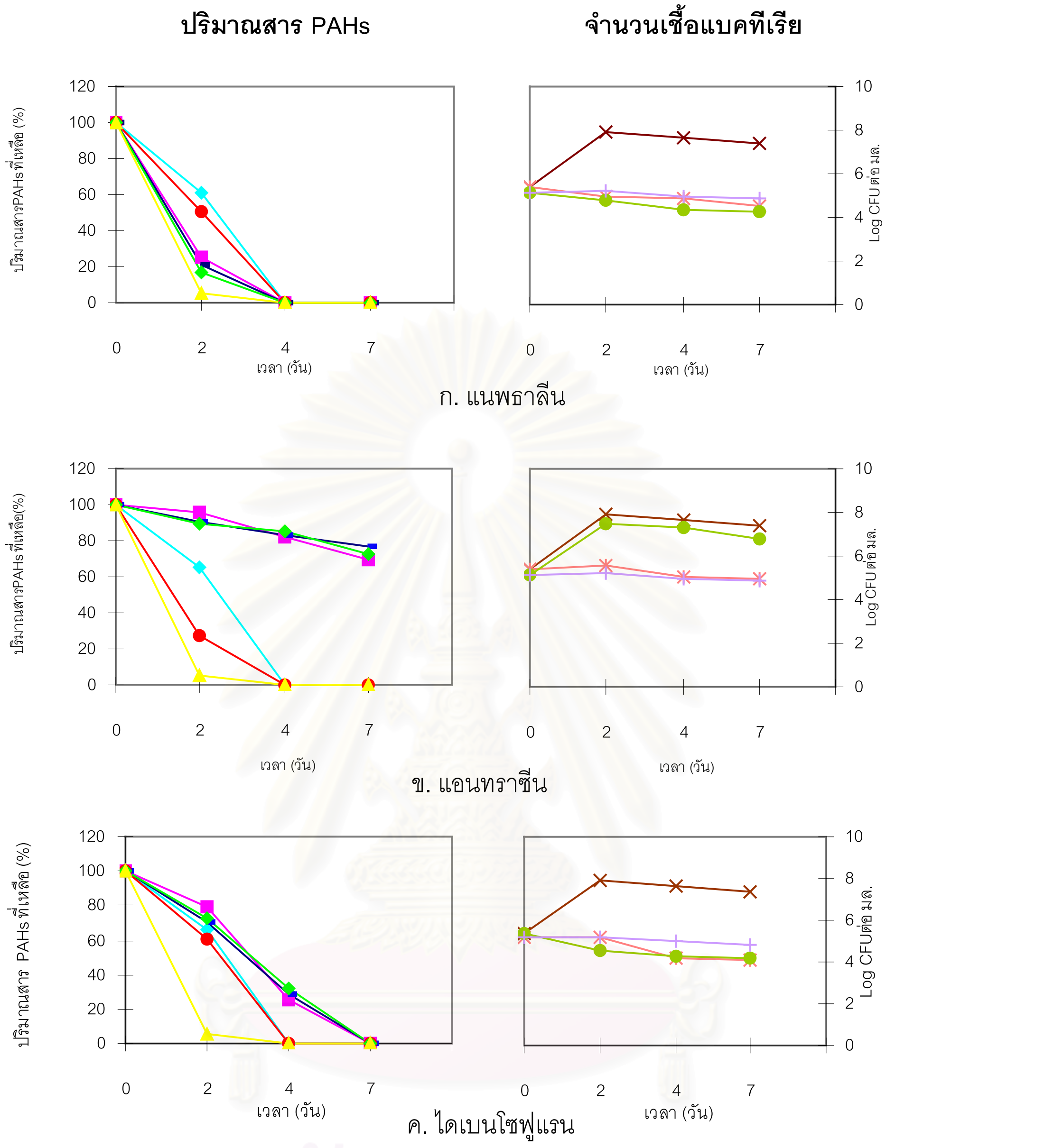


รูปที่ 4.17 (ต่อ) การเจริญของ *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ SP2 ในการย่อยสลายสาร PAHs ชนิดอื่น

4.5 การย่อยสลายแบบโคเมตาบอลิสมของ *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ SP2

เนื่องจาก *Sphingomonas* สายพันธุ์ SP2 ไม่สามารถย่อยสลายแนพธาลีน อะซีแนพธิลีน ฟีแนนทรีน แอนทราซีน ไดเบนโซฟูแรน ฟลูออรีน ฟลูออแรนธีน และ ไพรีน จึงนำสาร PAHs เหล่านี้ มาทดสอบการย่อยสลายแบบโคเมตาบอลิสมโดย *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ SP2 ที่ใช้อะซีแนพธีนในการเจริญ ในการทดลองเบื้องต้น พบว่า *Sphingomonas* สายพันธุ์ SP2 เจริญในอาหารที่มีอะซีแนพธีนความเข้มข้น 100 มก.ต่อ ลิตร ภายใน 2 วัน และสามารถเปลี่ยนสีของอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวไปเป็นสีเหลือง เมื่อทดสอบการย่อยสลายแบบโคเมตาบอลิสม พบว่า *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ SP2 ไม่สามารถเกิดการย่อยสลายสาร PAHs ชนิดอื่น แบบโคเมตาบอลิสม เมื่อเวลาผ่านไป 7 วัน โดยปริมาณสาร PAHs ชนิดทดสอบ ในชุดการทดลองที่มีแบคทีเรีย มีปริมาณลดลงไม่แตกต่างจากชุดควบคุมการลดลงของปริมาณสาร PAHs ชนิดทดสอบ ที่ไม่มีแบคทีเรีย ดังแสดงในรูปที่ 4.18 *Sphingomonas* สายพันธุ์ SP2 สามารถเจริญและย่อยสลายอะซีแนพธีนได้ โดยอาหารเลี้ยงเชื้อขุ่นและเปลี่ยนสีเป็นสีเหลืองภายใน 2 วัน ในชุดทดลองการย่อยสลายแบบโคเมตาบอลิสมที่มี ฟีแนนทรีน แอนทราซีน ฟลูออรีน ฟลูออแรนธีน และไพรีน ร่วม ชนิดละหลอด แต่ชุดทดลองการย่อยสลายแบบโคเมตาบอลิสมที่มี แนพธาลีน อะซีแนพธิลีน และ ไดเบนโซฟูแรน ร่วม ชนิดละหลอด *Sphingomonas* สายพันธุ์ SP2 ไม่สามารถเจริญและย่อยสลายอะซีแนพธีนได้ โดยแบคทีเรียมีจำนวนลดลงจากจำนวนเริ่มต้น 1.43×10^5 CFU ต่อมล. เป็น1.75×10^4 CFU ต่อมล., จากจำนวนเริ่มต้น 1.46×10^5 CFU ต่อมล. เป็น1.27×10^4 CFUต่อมล. และ จากจำนวนเริ่มต้น 1.50×10^5 CFU ต่อมล. เป็น 6.8×10^4 CFUต่อมล. ตามลำดับ จากผลที่ได้ จึงศึกษาผลของแนพธาลีน อะซีแนพธิลีน และ ไดเบนโซฟูแรน ต่อการย่อยสลายแบบโคเมตาบอลิสมของแบคทีเรีย *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ SP2 อย่างไร ในการทดลองขั้นตอนต่อไป

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



■ ปริมาณ PAHs ชนิดอื่นในชุดควบคุมโคเมตาบอลิสม ไม่เติมแบคทีเรีย

◆ ปริมาณอะซีแนพธีนในชุดควบคุมโคเมตาบอลิสมไม่เติมแบคทีเรีย

▬ ปริมาณ PAHs ชนิดอื่นในชุดทดลองโคเมตาบอลิสมที่เติมแบคทีเรีย

● ปริมาณอะซีแนพธีนในชุดทดลองโคเมตาบอลิสมที่มีแบคทีเรีย

◆ ปริมาณ PAHs ชนิดอื่นในชุดควบคุมที่มีแบคทีเรีย

▲ ปริมาณอะซีแนพธีนในชุดควบคุมที่มีแบคทีเรีย

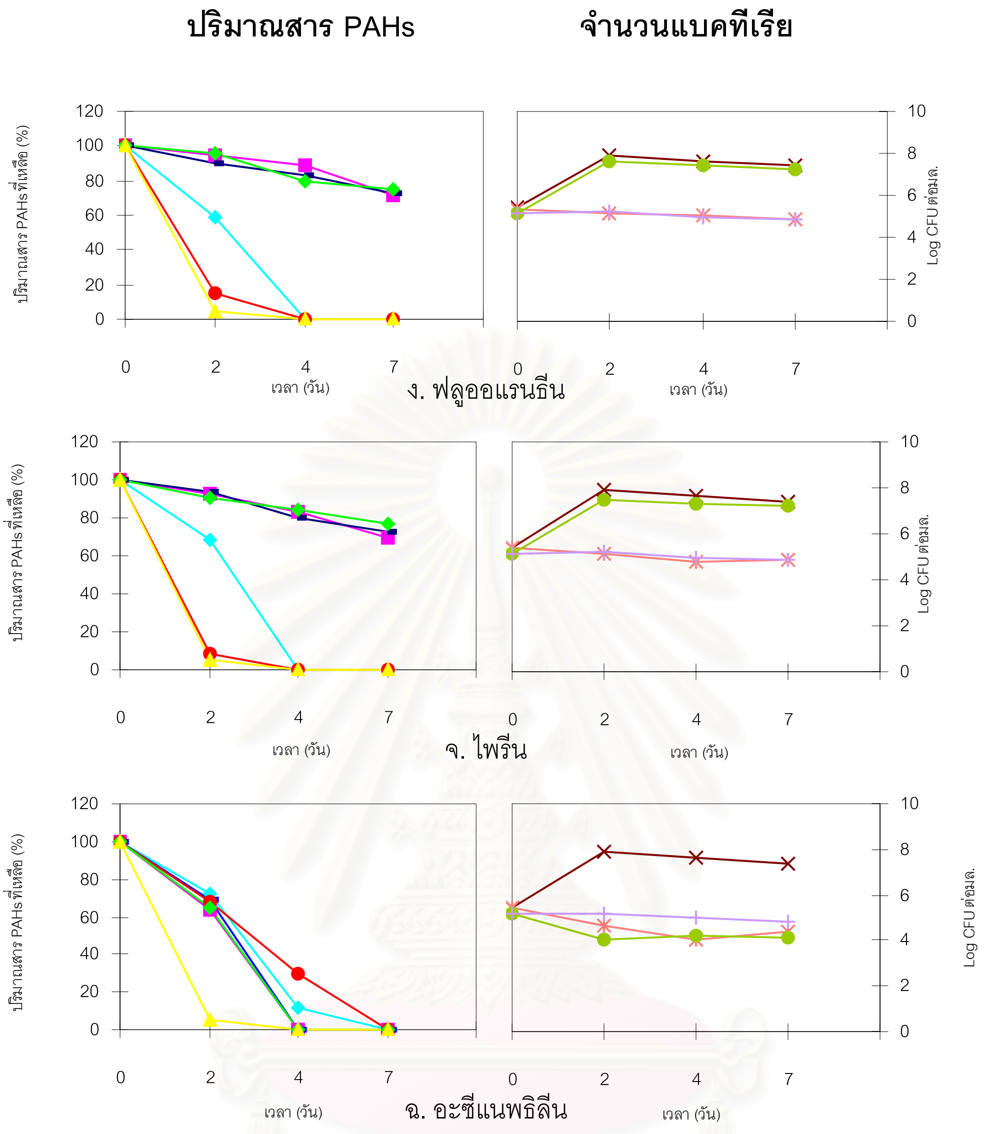
● จำนวนแบคทีเรียในชุดทดลองโคเมตาบอลิสม

X จำนวนแบคทีเรียในชุดควบคุมที่เจริญบนอะซีแนพธีน

✱ จำนวนแบคทีเรียในชุดควบคุมที่มี PAHs ชนิดทดสอบ

\+ จำนวนแบคทีเรียในชุดควบคุมไม่มี PAHs ใดๆเลย

รูปที่ 4.18 การย่อยสลายสาร PAHs แบบโคเมตาบอลิสมของ *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ SP2



■ ปริมาณ PAHs ชนิดอื่นในชุดควบคุมโคเมตาบอลิสม ไม่เติมแบคทีเรีย

◆ ปริมาณอะซีแนพธีนในชุดควบคุมโคเมตาบอลิสมไม่เติม แบคทีเรีย

— ปริมาณ PAHs ชนิดอื่นในชุดทดลองโคเมตาบอลิสมที่เติม แบคทีเรีย

● ปริมาณอะซีแนพธีนในชุดทดลองโคเมตาบอลิสมที่มีแบคทีเรีย

◆ ปริมาณ PAHs ชนิดอื่นในชุดควบคุมที่มีแบคทีเรีย

▲ ปริมาณอะซีแนพธีนในชุดควบคุมที่มีแบคทีเรีย

● จำนวนแบคทีเรียในชุดทดลองโคเมตาบอลิสม

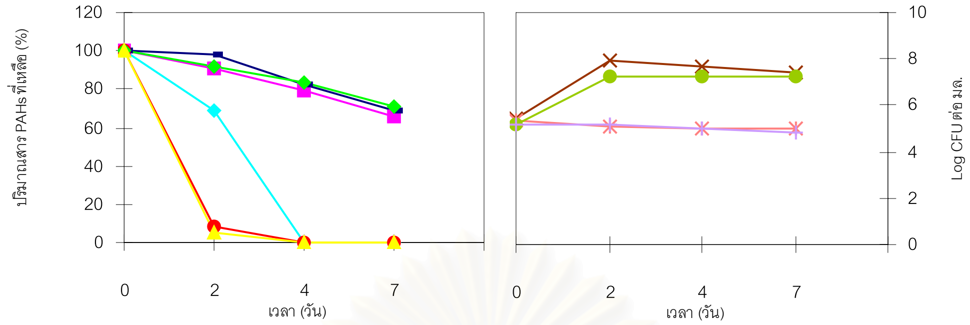
X จำนวนแบคทีเรียในชุดควบคุมที่เจริญบนอะซีแนพธีน

✳ จำนวนแบคทีเรียในชุดควบคุมที่มี PAHs ชนิดทดสอบ

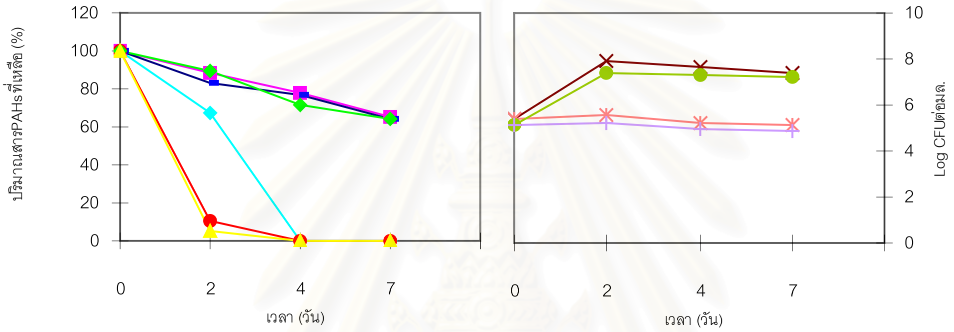
\+ จำนวนแบคทีเรียในชุดควบคุมไม่มี PAHs ใดๆเลย

รูปที่ 4.18(ต่อ) การย่อยสลายสาร PAHs แบบโคเมตาบอลิสมของ *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ SP2

ปริมาณสาร PAHs **จำนวนแบคทีเรีย**



ช. ฟลูออรีน



ซ.ฟีแนนทรีน

- ■ ปริมาณ PAHs ชนิดอื่น ในชุดควบคุมโคเมตาบอลิสมไม่มีแบคทีเรีย
- ◆ ปริมาณอะซีแนพธีนในชุดควบคุมโคเมตาบอลิสมไม่มีแบคทีเรีย
- ― ปริมาณ PAHs ชนิดอื่น ในชุดทดลองโคเมตาบอลิสมที่มีแบคทีเรีย
- ● ปริมาณอะซีแนพธีนในชุดทดลองโคเมตาบอลิสมที่มีแบคทีเรีย
- ◆ ปริมาณ PAHs ชนิดอื่น ในชุดควบคุมที่มีแบคทีเรีย
- ▲ ปริมาณอะซีแนพธีนในชุดควบคุมที่มีแบคทีเรีย
- ● จำนวนแบคทีเรียในชุดทดลองโคเมตาบอลิสม
- X จำนวนแบคทีเรียในชุดควบคุมที่เจริญบนอะซีแนพธีน
- ✳ จำนวนแบคทีเรียในชุดควบคุมที่มี PAHs ชนิดทดสอบ
- \+ จำนวนแบคทีเรียในชุดควบคุมไม่มี PAHs ใดๆเลย

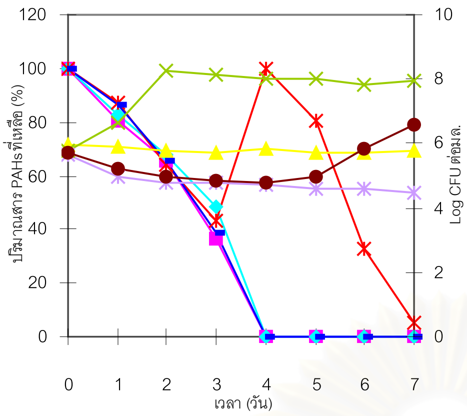
รูปที่ 4.18(ต่อ) การย่อยสลายสาร PAHs แบบโคเมตาบอลิสมของ *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ SP2

4.6 การย่อยสลายแนพธาลีน, อะซีแนพธิลีน และไดเบนโซฟูแรน แบบโคเมตาบอลิสม โดย *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ SP2

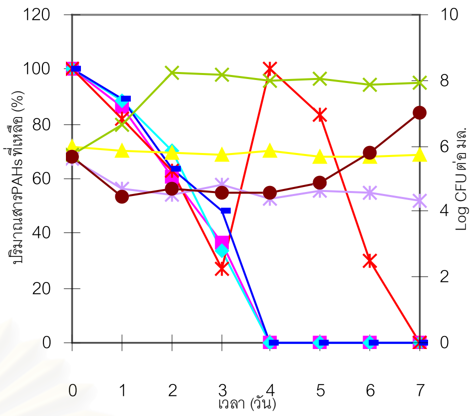
4.6.1 การเจริญของ *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ SP2 เมื่อย่อยสลายแนพธาลีน, อะซีแนพธิลีน และไดเบนโซฟูแรนแบบโคเมตาบอลิสม

จากผลการทดลองในข้อ 4.5 แนพธาลีน อะซีแนพธิลีน และไดเบนโซฟูแรน มีผลทำให้ *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ SP2 ไม่สามารถเจริญและย่อยสลายอะซีแนพธีนได้เมื่อย่อยสลายแบบโคเมตาบอลิสม สาเหตุของปรากฏการณ์นี้ อาจเกิดเนื่องจาก สารเหล่านี้มีความเป็นพิษต่อเซลล์ หรือมีผลยับยั้งต่อเซลล์ จึงนำแบคทีเรียที่เลี้ยงใน สาร PAHs กลุ่มนี้ (แนพธาลีน, อะซีแนพธิลีน และ ไดเบนโซฟูแรน) จากข้อ 4.5 ที่เลี้ยงไว้จนถึงวันที่ 4 ซึ่งไม่ปรากฏการเจริญของเชื้อ และสาร PAHs เหล่านี้ จะลดลงเองจนเกือบหมด มาทดสอบต่อ โดยเติมเพิ่มอะซีแนพธีนที่ความเข้มข้น 100 มก.ต่อลิตร ลงในหลอดทดลอง พบว่าแบคทีเรียมีการเจริญอย่างช้าๆ โดยมีการปรับตัวในช่วง 24 ชม.แรกของการเติมซ้ำ และแบคทีเรียจะมีการเจริญสูงสุดในวันที่ 3 หลังจากการเติมซ้ำ โดยเพิ่มจำนวนขึ้นจาก 1.00×10^5 CFU ต่อมล. เป็น 2.55×10^7 CFU ต่อมล.ในหลอดที่มีแนพธาลีน ส่วนในหลอดที่มี อะซีแนพธิลีน และไดเบนโซฟูแรน ชนิดละหลอด แบคทีเรียเพิ่มจำนวนขึ้นจาก 6.4×10^4 CFU ต่อมล. เป็น 4.00×10^6 CFU ต่อมล.และ จาก 4.0×10^4 CFU ต่อมล. เป็น 1.00×10^7 CFU ต่อมล. ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 4.19 จากผลที่ได้แสดงให้เห็นว่า เมื่อปราศจากกลุ่มสาร PAHs 3 ชนิดนี้ แต่มีอะซีแนพธีน *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ SP2 สามารถกลับมาเจริญได้ แสดงว่า แนพธาลีน อะซีแนพธิลีน และไดเบนโซฟูแรน มีผลต่อ การยับยั้งการเจริญการเจริญของแบคทีเรียนี้

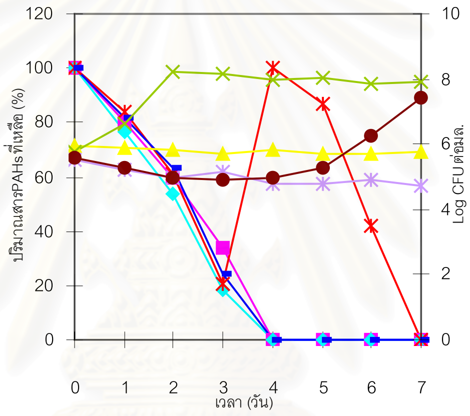
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ก. อะซีแนพธิลีน



ข. ไดเบนโซฟูแรน



ค. แนพธาลีน

■ ปริมาณอะซีแนพธีน ในชุดควบคุมโคเมตาบอลิสมมีแบคทีเรียไม่เติมอะซีแนพธีนซ้ำ

◆ ปริมาณ PAHs ชนิดทดสอบ ในชุดควบคุมโคเมตาบอลิสมมีแบคทีเรียไม่เติมอะซีแนพธีนซ้ำ

✳ ปริมาณอะซีแนพธีนในชุดทดลองโคเมตาบอลิสมมีแบคทีเรีย เติมอะซีแนพธีนซ้ำ

– ปริมาณ PAHs ชนิดทดสอบ ในชุดทดลองโคเมตาบอลิสมมีแบคทีเรีย เติมอะซีแนพธีนซ้ำ

● จำนวนแบคทีเรียในชุดทดลองโคเมตาบอลิสม เติมอะซีแนพธีนซ้ำ

▲ จำนวนแบคทีเรียในชุดควบคุมที่ไม่มี PAHs ใดๆ

X จำนวนแบคทีเรียในชุดควบคุมที่มีอะซีแนพธีน

* จำนวนแบคทีเรียในชุดควบคุมโคเมตาบอลิสมไม่เติมอะซีแนพธีนซ้ำ

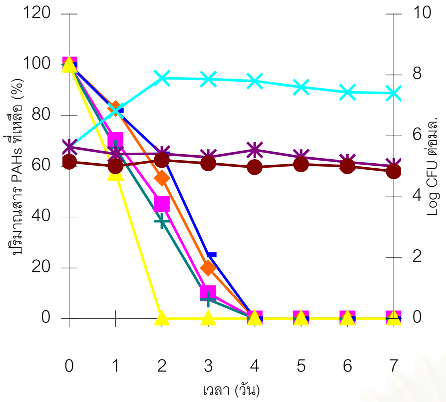
รูปที่ 4.19 การเจริญของ *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ SP2 เมื่อย่อยสลาย แนพธาลีน, ไดเบนโซฟูแรน และ อะซีแนพธิลีน แบบโคเมตาบอลิสม

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

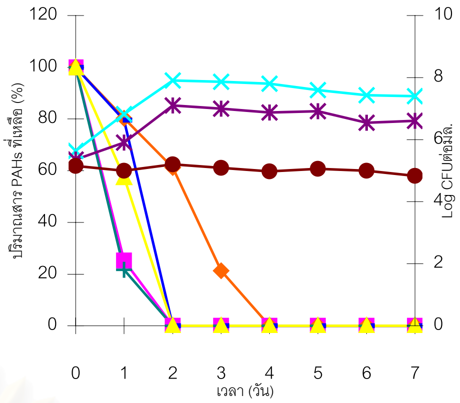
4.6.2 การเจริญของ *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ SP2 เมื่อย่อยสลายแนพธาลีน, อะซีแนพธิลีน และไดเบนโซฟูแรน ที่แปรผันความเข้มข้น

จากผลการทดลองในข้อ 4.6.1 แนพธาลีน, อะซีแนพธิลีน และไดเบนโซฟูแรน ที่ความเข้มข้นเดิม 300 100 และ 100 มก.ต่อลิตร ตามลำดับ มีผลยับยั้งการเจริญของ *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ SP2 เมื่อย่อยสลายแบบโคเมตาบอลิสม จึงได้ทดสอบความเข้มข้นของสาร PAHs ทั้ง 3 ชนิด ต่อการยับยั้งการย่อยสลายอะซีแนพธีนของ *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ SP2 โดยการแปรผันความเข้มข้นของแนพธาลีน อะซีแนพธิลีน และไดเบนโซฟูแรน พบว่าแนพธาลีนที่ความเข้มข้น 250 และ 200 มก.ต่อลิตร อะซีแนพธิลีน และ ไดเบนโซฟูแรน ที่ความเข้มข้น 75 มก.ต่อลิตร มีผลยับยั้งการเจริญ และการย่อยสลายอะซีแนพธีน เมื่อย่อยสลายแบบโคเมตาบอลิสม ดังแสดงในรูป 4.20-22 โดยแนพธาลีนที่ความเข้มข้น 150 และ 100 มก.ต่อลิตร อะซีแนพธิลีน และไดเบนโซฟูแรน ที่ความเข้มข้น 50 และ 25 มก.ต่อลิตร ไม่มีผลต่อการย่อยสลายอะซีแนพธีนของ *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ SP2 เมื่อย่อยสลายแบบโคเมตาบอลิสม โดยมีรูปแบบการเจริญของแบคทีเรียเหมือนกับการเจริญของแบคทีเรียในชุดควบคุม

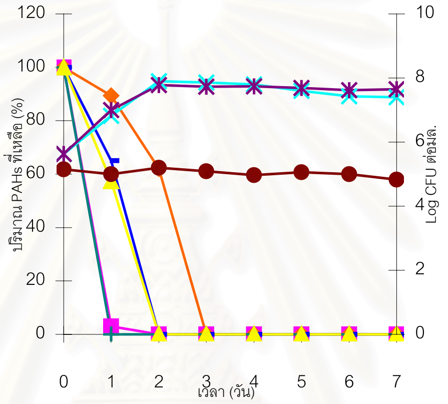
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ก. ความเข้มข้น 75 มก.ต่อลิตร



ข. ความเข้มข้น 50 มก.ต่อลิตร



ค. ความเข้มข้น 25 มก.ต่อลิตร

■ ปริมาณ PAHsชนิดทดสอบ ในชุดควบคุมโคเมตาบอลิสมไม่มีแบคทีเรีย

◆ ปริมาณอะซีแนพธีน ในชุดควบคุมโคเมตาบอลิสมไม่มีแบคทีเรีย

+ ปริมาณ PAHs ชนิดทดสอบ ในชุดทดลองโคเมตาบอลิสมที่มีแบคทีเรีย

– ปริมาณอะซีแนพธีนในชุดทดลองโคเมตาบอลิสมที่มีแบคทีเรีย

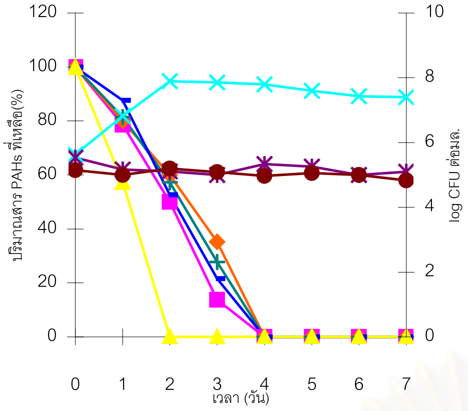
▲ ปริมาณอะซีแนพธีนในชุดควบคุมที่มีแบคทีเรีย

× จำนวนแบคทีเรียในชุดควบคุมที่มีอะซีแนพธีน

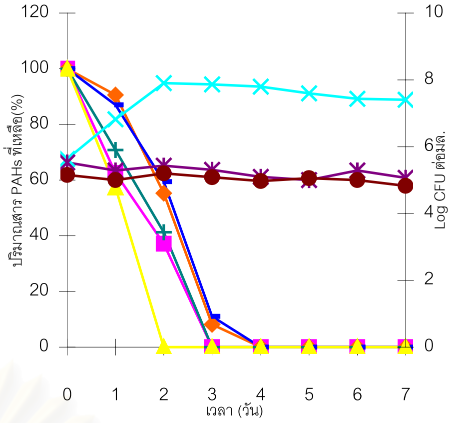
✳ จำนวนแบคทีเรียในชุดทดลองโคเมตาบอลิสม

● จำนวนแบคทีเรียในชุดควบคุมไม่มี PAHs ใดๆ

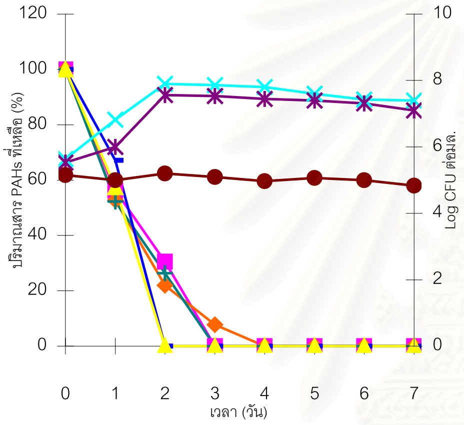
รูปที่ 4.20 การเจริญของ *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ SP2 เมื่อย่อยสลายอะซีแนพธิลีนที่แปรผันความเข้มข้น แบบโคเมตาบอลิสม



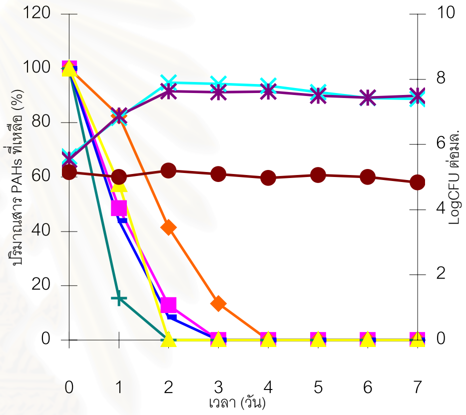
ก. ความเข้มข้น 250 มก.ต่อลิตร



ข. ความเข้มข้น 200 มก.ต่อลิตร



ค. ความเข้มข้น 150 มก.ต่อลิตร



ง. ความเข้มข้น 100 มก.ต่อลิตร

■ ปริมาณ PAHs ชนิดทดสอบ ในชุดควบคุมโคเมตาบอลิสมไม่มีแบคทีเรีย

◆ ปริมาณอะซีแนพธีนในชุดควบคุมโคเมตาบอลิสมไม่มีแบคทีเรีย

\+ ปริมาณ PAHs ชนิดทดสอบ ในชุดทดลองโคเมตาบอลิสมที่มีแบคทีเรีย

– ปริมาณอะซีแนพธีนในชุดทดลองโคเมตาบอลิสมที่มีแบคทีเรีย

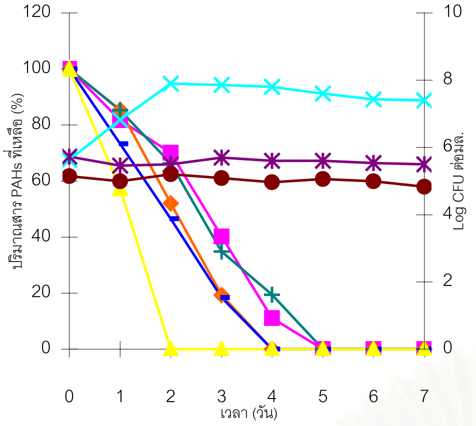
▲ ปริมาณอะซีแนพธีนในชุดควบคุมที่มีแบคทีเรีย

× จำนวนแบคทีเรียในชุดควบคุมที่มีอะซีแนพธีน

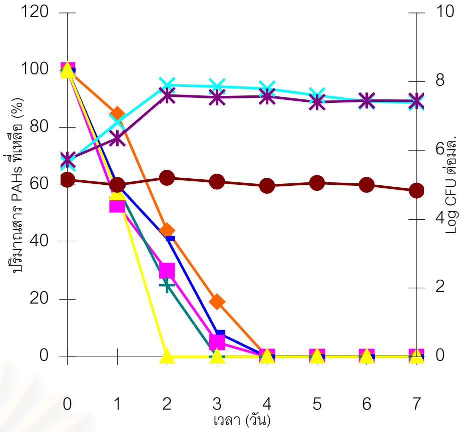
* จำนวนแบคทีเรียในชุดทดลองโคเมตาบอลิสม

● จำนวนแบคทีเรียในชุดควบคุม ไม่มี PAHs ใดๆ

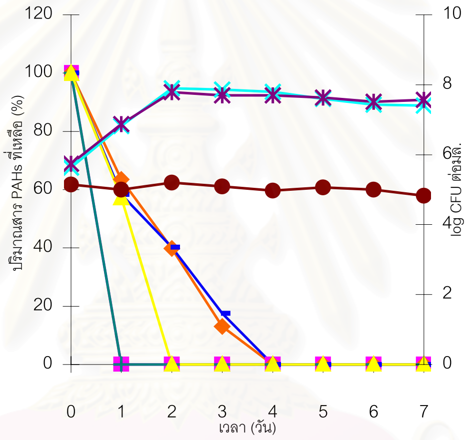
รูปที่ 4.21 การเจริญของ *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ SP2 เมื่อย่อยสลายแนพธาลีนที่แปรผันความเข้มข้น แบบโคเมตาบอลิสม



ก. ความเข้มข้น 75 มก. ต่อลิตร



ข. ความเข้มข้น 50 มก. ต่อลิตร



ค. ความเข้มข้น 25 มก. ต่อลิตร

■ ปริมาณ PAHs ชนิดทดสอบในชุดควบคุมโคเมตาบอลิสมไม่มีแบคทีเรีย

◆ ปริมาณอะซีแนพธีน ในชุดควบคุมโคเมตาบอลิสมไม่มีแบคทีเรีย

\+ ปริมาณ PAHs ชนิดทดสอบ ในชุดทดลองโคเมตาบอลิสมที่มีแบคทีเรีย

— ปริมาณอะซีแนพธีน ในชุดทดลองโคเมตาบอลิสมที่มีแบคทีเรีย

▲ ปริมาณอะซีแนพธีน ในชุดควบคุมที่มีแบคทีเรีย

X จำนวนแบคทีเรียในชุดควบคุมที่มีอะซีแนพธีน

✳ จำนวนแบคทีเรียในชุดทดลองโคเมตาบอลิสม

● จำนวนแบคทีเรียในชุดควบคุม ไม่มี PAHs ใดๆ

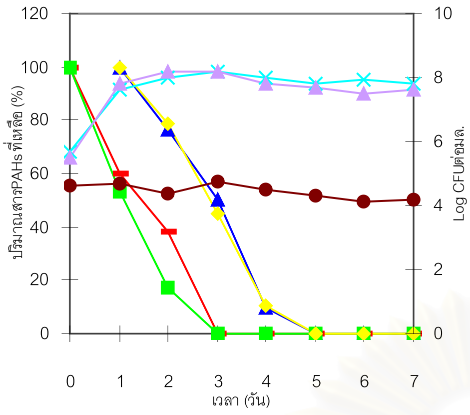
รูปที่ 4.22 การเจริญของ *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ SP2 เมื่อย่อยสลายไดเบนโซฟูแรนที่แปรผันความเข้มข้น แบบโคเมตาบอลิสม

สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

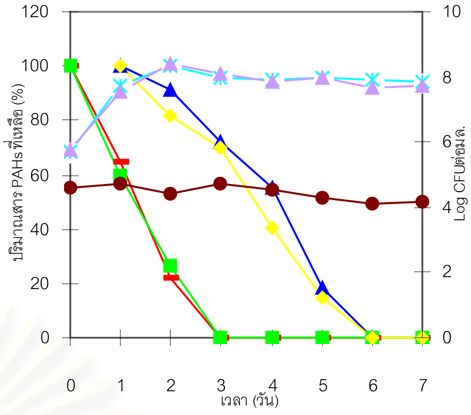
4.6.3 การยับยั้งการเจริญของ *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ SP2 เมื่อย่อยสลายแนพธาลีน อะซีแนพธิลีนและไดเบนโซฟูแรน แบบโคเมตาบอลิสม

จากผลการทดลองข้อ 4.6.2 แนพธาลีน, อะซีแนพธิลีน และไดเบนโซฟูแรน ยับยั้งการใช้อะซีแนพธีนสำหรับการเจริญ ของ *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ SP2 นั้น เพื่อให้ได้ข้อมูลมากยิ่งขึ้น ว่าการยับยั้งเกิดในช่วงใด จึงทดลองโดยเลี้ยง *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ SP2 ที่มีอะซีแนพธีนอยู่ด้วย เป็นเวลา 24 ชม. ซึ่งเป็นช่วง mid log การเจริญของ *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ SP2 ที่มีการสร้างเอนไซม์ที่จำเป็นต่อการเจริญ (Schocken และ Gibson, 1984) จากนั้นเติม แนพธาลีน อะซีแนพธิลีน และไดเบนโซฟูแรน ความเข้มข้น 100 มก.ต่อลิตร แต่ละค่าลงไป และดูการเจริญของเชื้อควบคู่กับการใช้อะซีแนพธีน พบว่าหากเชื้อ *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ SP2 เจริญถึงช่วง mid log ซึ่งมีการสร้างเอนไซม์ต่างๆ ที่จำเป็นแล้ว PAHs ทั้ง 3 ชนิด (แนพธาลีน อะซีแนพธิลีน และ ไดเบนโซฟูแรน) จะไม่สามารถยับยั้งการเจริญและการใช้ อะซีแนพธีนได้ ดังนั้นกลไกการยับยั้งจึงน่าจะอยู่ในระยะต้นของการเจริญ โดยอาจยับยั้งเอนไซม์หลักในช่วงต้นของการย่อยสลายอะซีแนพธีน

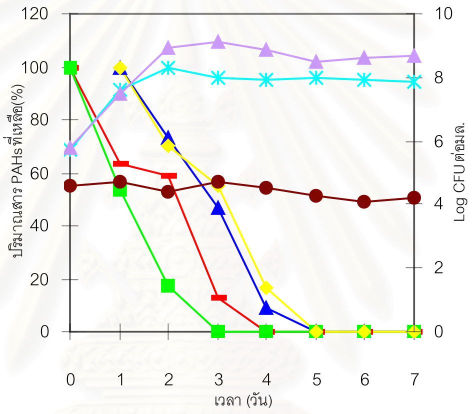
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ก. แนพธาลีน



ข. ไดเบนโซฟูแรน



ค. อะซีแนพธิลีน

▲ ปริมาณ PAHs ชนิดทดสอบ ในชุดทดลองโคเมตาบอลิสม ที่เติมหลังเลี้ยงเชื้อ 24 ชม

– ปริมาณอะซีแนพธีน ในชุดทดลองโคเมตาบอลิสม

■ ปริมาณอะซีแนพธีน ในชุดควบคุม ที่มีแบคทีเรีย ไม่เติม PAHs ชนิดทดสอบ

● ปริมาณ PAHs ชนิดทดสอบ ในชุดควบคุมที่ไม่มีแบคทีเรีย

▲ จำนวนแบคทีเรีย ในชุดควบคุม ไม่เติม PAHs ชนิดทดสอบ

× จำนวนแบคทีเรีย ในชุดทดลอง เติม PAHs ชนิดทดสอบ หลังเลี้ยงเชื้อ 24 ชม.

● จำนวนแบคทีเรีย ในชุดควบคุมไม่มี PAHs ใดๆ

รูปที่ 4.23 **การเจริญของ** *Sphingomonas* sp. **สายพันธุ์** SP2 **แบบโคเมตาบอลิสม โดยเติมแนพธาลีน, ไดเบนโซฟูแรน และ อะซีแนพธิลีน ภายหลังการเจริญของแบคทีเรีย**

บทที่ 5

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

สาร PAHs เป็นสารประกอบอินทรีย์ที่โครงสร้างซับซ้อน ละลายน้ำได้น้อย จุลินทรีย์ทั่วไปจึงไม่สามารถย่อยสลายหรือนำสารดังกล่าวมาเป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงาน ดังนั้นการคัดแยกแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายสาร PAHs ได้ จึงจำเป็นต้องนำแบคทีเรียที่เคยอยู่ในสิ่งแวดล้อมที่มีการปนเปื้อนสารประกอบอินทรีย์ในกลุ่มนี้เป็นเวลานาน ซึ่งแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ในบริเวณนั้นจะมีการปรับตัวเพื่ออยู่รอดและมีกิจกรรมต่าง ๆ โดยเฉพาะการพัฒนาระบบเอนไซม์เพื่อมาย่อยสลายสาร PAHs (Cemiglia, 1992) การคัดแยกเพื่อให้ได้แบคทีเรียที่มีความสามารถสูงในการย่อยสลายสาร PAHs จำต้องมีขั้นตอนการเพิ่มจำนวนแบคทีเรีย (enrichment) (Stringfellow และ Michael, 1995) โดยให้แบคทีเรียมีการปรับตัว (adaptation) หรือสร้างความคุ้นเคย (acclimatisation) ในการย่อยสลายสาร PAHs และใช้เป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงานเพียงแหล่งเดียว (Wilson และ Jones, 1993) การถ่ายเชื้อ 5 ครั้งติดต่อกันเป็นวิธีที่ใช้ในการเพิ่มจำนวนแบคทีเรีย ดังจะเห็นได้จากระยะเวลาการเพิ่มจำนวนของแบคทีเรียและการเปลี่ยนสีของอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM ในการถ่ายเชื้อแต่ละครั้งจะใช้ระยะเวลาสั้นลงตามลำดับครั้งของการถ่ายเชื้อ

จากการคัดแยกแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายสาร PAHs จากน้ำเสียที่มีการปนเปื้อนสารปิโตรเคมี น้ำมัน น้ำมันเครื่อง ในอู่ทหารเรือพระจุลจอมเกล้า จ. สมุทรปราการ กลุ่มแบคทีเรียจากตัวอย่างน้ำทั้ง 7 แหล่ง ส่วนใหญ่สามารถย่อยสลายฟีแนนทรีนได้ เนื่องจากฟีแนนทรีนเป็นสาร PAHs ที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ มีความสามารถในการละลายได้ดี มีโครงสร้างโมเลกุลเป็นมุมงอ ที่มีทั้งบริเวณเบย์ (Bay region)และบริเวณเค (K region) (Narro และคณะ, 1992) ซึ่งเป็นบริเวณที่ออกซีจิเนสเข้าไปจับและเร่งให้เกิดกระบวนการย่อยสลาย จากโครงสร้างดังกล่าวจึงเอื้อต่อการถูกย่อยสลายโดยจุลินทรีย์

กลุ่มแบคทีเรียที่ได้จากน้ำเสียในบ่อซ่อมบำรุงเรือ (บ่อลอย 1) มีความสามารถในการย่อยสลายสาร PAHs ได้ 4 ชนิด ได้แก่ อะซีแนพธีน ฟีแนนทรีน ฟลูออรีนและฟลูออแรนธีน กลุ่มแบคทีเรียดังกล่าวประกอบด้วยแบคทีเรีย 3 สายพันธุ์ SP1 SP2 และ SP3 เป็นแบคทีเรียแกรมลบรูปร่างแท่ง ทั้ง 3 สายพันธุ์ เมื่อนำแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์ ทดสอบการย่อยสลายสาร PAHs อีกครั้ง มีเพียงแบคทีเรียสายพันธุ์ SP2 เท่านั้น ที่สามารถย่อยสลายสาร PAHs ได้ โดยสามารถย่อยสลายอะซีแนพธีนได้เพียงชนิดเดียว ในปี 1996 Tongpim และ Pickard สามารถคัดแยกแบคทีเรีย *Rhodococcus* sp. สายพันธุ์ S1จากดินที่ปนเปื้อนจากครีโอโสต ซึ่งสามารถย่อยสลายแอนทราซีน

ได้เพียงชนิดเดียว ซึ่งแสดงว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ SP2 สามารถสร้างเอนไซม์เริ่มต้นที่ใช้ในกระบวนการย่อยสลายมีความจำเพาะต่ออะซีแนพธีน (narrow substrate specificity enzyme) ซึ่งแตกต่างจากออกซิจีเนสทั่วไป ที่สามารถย่อยสลายสับสเตรตได้หลายชนิด (broad specificity enzyme) (Grifoll และคณะ, 1995) เนื่องจากยังมีการศึกษาการย่อยสลายอะซีแนพธีน เพียงเล็กน้อย ทั้งในประเทศไทยและต่างประเทศ อีกทั้งในไทยพบการปนเปื้อนอะซีแนพธีน ในอากาศ (กรมควบคุมมลพิษ, 2541) และน้ำทะเล (พรศรี, 2533) จึงเป็นประโยชน์ที่จะศึกษาการย่อยสลายอะซีแนพธีนของแบคทีเรียสายพันธุ์ SP2 ดังนั้นจึงได้เลือกแบคทีเรียสายพันธุ์ SP2 ไปจำแนกชนิดทางอนุกรมวิธาน และใช้ในการศึกษาการย่อยสลายอะซีแนพธีน

แบคทีเรียสายพันธุ์ SP2 จัดอยู่ในกลุ่ม *Sphingomonas* เมื่อจำแนกอนุกรมวิธานโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและการทดสอบทางชีวเคมี ร่วมกับการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ 16 เอส ไรโบโซมัลดีเอ็นเอ จากผลการทดสอบทางชีวเคมี *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ SP2 ไม่สามารถเจริญและใช้น้ำตาลชนิดใดเลย Grilfoll และคณะ (1994) คัดแยก *Pseudomonas* sp. สายพันธุ์ F274 จากดินที่มีการปนเปื้อน ครีโอโสต สามารถย่อยสลายฟลูออรีน และใช้เป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงาน แบคทีเรียดังกล่าวไม่สามารถเจริญและใช้น้ำตาล กลูโคส อะราบิโนส แมนโนส แมนนิทอล มอลโตส และ ฟรุกโตสได้

งานวิจัยมากมายที่รายงานว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ *Sphingomonas* สามารถย่อยสลายสาร PAHs ได้หลายชนิด เช่น

Shi และคณะ (2001) รายงานว่า *Sphingomonas aromaticivorans* B0695 สามารถย่อยสลาย อะซีแนพธีน แอนทราซีน ฟีแนนทรีน ฟลูออแรนธีน 2, 3-เบนโซฟลูออรีน 2- เมทิลแนพธาลีนและ 2,3- ไดเมทิลแนพธาลีน เป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงานในการเจริญ

ณัฐพันธุ์ (2542) รายงานว่า *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ P2 สามารถย่อยสลายแอนทราซีน ฟีแนนทรีน ฟลูออแรนธีน อะซีแนพธีน ฟลูออรีน ไดเบนโซฟูแรน และแนพธาลีน เป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงานในการเจริญ

พจนีย์ (2542) รายงานว่า *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ ANT1 สามารถย่อยสลายแอนทราซีน ฟีแนนทรีน ไดเบนโซฟูแรน ฟลูออรีน และแนพธาลีน เป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงานในการเจริญ

Kim และZylstra (1999) รายงานว่า *Sphingomonas yanoikuyae* B1 สามารถย่อยสลาย ไบฟีนิล *เอม*-ไซลีน แอนทราซีน ฟีแนนทรีน และแนพธาลีน เป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงานในการเจริญ

Ye และคณะ (1996)) รายงานว่า *Sphingomonas paucimobilis* EPA 505 สามารถย่อยสลายสาร PAHs ได้หลายชนิดคือ แอนทราซีน ฟีแนนทรีน และแนพธาลีน โดยเฉพาะอย่างยิ่ง

สามารถย่อยสลาย PAHs ที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง ฟลูออแรนธีน และไพรีนเป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงานได้โดยตรง

Bunz และ Cook (1993) รายงานว่า *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ RW1 สามารถย่อยสลายไดเบนโซฟูแรน และไดเบนโซพาราไดออกซิน (dibenzo(*p*)dioxin) เป็นแหล่งคาร์บอน และพลังงานได้โดยตรง

จากการรายงานข้างต้นสามารถกล่าวได้ว่าเชื้อแบคทีเรียสกุล *Sphingomonas* ที่พบได้ในสิ่งแวดล้อม มีบทบาทสำคัญอย่างยิ่งในการย่อยสลายสารพิษอันตรายต่างๆในธรรมชาติ แบคทีเรียสกุลนี้สามารถย่อยสลายสารพิษอันตรายต่างๆได้ดีกว่าแบคทีเรียกลุ่มอื่น อาจมีสาเหตุมาจากแบคทีเรียเป็นแกรมลบ มีผนังเซลล์ (cell wall) 2 ชั้น ชั้นนอก (outer membrane) และ ชั้นใน (inner membrane) ที่ประกอบด้วยไขมัน ไลโปโปรตีน ไลโปพอลิแซคคาไรด์ ฟอสโฟไลปิด ซึ่งเป็นส่วนที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic) และ มีสฟิงโกไลปิด (sphingolipid) ซึ่งมีโครงสร้างประกอบด้วยน้ำตาลกรดกลูคูโรนิก (glucuronic acid) และกรดไขมัน 2 –ไฮดดรอกซีมัยริสติก (2-hydroxymyristic) อยู่ในส่วนไขมันของชั้นเซลล์เมมเบรน (cell membrane) ทำให้แบคทีเรียสามารถจับและดูดซับสารพิษอันตรายที่ไม่ละลายน้ำให้เข้าสู่เซลล์ได้ดีกว่าแบคทีเรียสกุลอื่น (Harayama, 1997) นอกจากนี้ยังสามารถสร้าง bioemulsifer ซึ่งจะเพิ่มพื้นที่ผิวของสาร PAHs ให้แบคทีเรียสัมผัสได้ดีขึ้น (Tiehm และคณะ, 1994)

เมื่อเลี้ยงเชื้อ *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ SP2 ในอาหารเหลว CFMM ที่มีอะซีแนพธีนพบว่าแบคทีเรียนี้สามารถเปลี่ยนสีอาหารเหลวจากไม่มีสีไปเป็นสีเหลืองได้อย่างรวดเร็ว การเปลี่ยนสีของอาหารเลี้ยงเชื้อไปเป็นสีเหลือง แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียสายพันธุ์นี้อาจใช้กระบวนการย่อยสลายอะซีแนพธีนโดยอาศัยกิจกรรมของออกซีจีเนสในการเปลี่ยนอะซีแนพธีนไปเป็นสารมัธยันตร์ที่มีโครงสร้างคล้ายคลึงกับคาทีคอล (catechol, like compounds) หรือสารมัธยันตร์แบบ meta-ring clavage ซึ่งการสะสมของสารมัธยันตร์ทั้ง 2 แบบนี้มักเป็นสาเหตุที่ทำให้อาหารเลี้ยงเชื้อเปลี่ยนไปเป็นสีเหลือง (Mueller และคณะ, 1989)

Sphingomonas sp. สายพันธุ์ SP2 สามารถย่อยสลายอะซีแนพธีนที่ความเข้มข้น 100 300 500 700 และ900 มก.ต่อลิตร ได้ภายใน 3 3 4 5 และ6 วัน ตามลำดับ โดยพบว่า การเจริญที่ความเข้มข้น 500 – 900 มก.ต่อลิตร จำนวนเซลล์ไม่แตกต่างกัน แต่จะพบการเจริญในช่วง lag phase เมื่อเจริญด้วยอะซีแนพธีนที่ความเข้มข้น 700 และ 900 มก.ต่อลิตร

Keuth และ Rehm (1991) รายงานว่า เมื่อเพิ่มปริมาณฟีแนนทรีนในอาหารทำให้เชื้อ *Arthobacter polychromogenes* มีการเจริญและการย่อยสลายเพิ่มขึ้น เนื่องจากปริมาณฟีแนนทรีนในอาหารสูงขึ้น ทำให้มีพื้นที่ผิวมากขึ้นและนำไปใช้ได้ง่าย แต่ Juhasz และคณะ (1997) พบว่าแบคทีเรียที่ย่อยสลายไพรีนสายพันธุ์ VUN 10001 VUN 10002 และ VUN 10003

สามารถเจริญได้ เมื่อความเข้มข้นของไพรีนสูงขึ้น จาก 250-1,000 มก.ต่อลิตร ขณะที่การย่อยสลายไพรีนลดลง โดยเชื้อจะหยุดใช้ไพรีนที่ความเข้มข้นเริ่มต้นประมาณ 400 มก.ต่อลิตร อาจเกิดจากสารมัธยันตร์ที่สะสมอยู่เป็นพิษ สำหรับ *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ SP2 สารมัธยันตร์ที่เกิดจากการย่อยสลายอะซีแนพธีนนั้น ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ ทำให้สามารถย่อยสลายอะซีแนพธีนต่อได้จนหมด และไม่พบการลดลงของเซลล์ในระหว่างการย่อยสลาย

ส่วนการที่พบว่าปริมาณอะซีแนพธีนในชุดควบคุมที่ไม่เติมเชื้อลดลงไปในระหว่างการทดลองนั้นมีผลมาจากการระเหิดกลายเป็นไอได้ โดย Bossert และ Bartha (1986) รายงานว่าอะซีแนพธีนและสาร PAHs ที่มีวงเบนซีน 3 วง จะสูญหายได้อย่างรวดเร็วภายในดินซึ่งจะไม่สามารถวัดปริมาณอะซีแนพธีนในชุดควบคุมที่ไม่เติมเชื้อได้ หลังจากการเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 16 เดือน

การย่อยสลายอะซีแนพธีนที่ความเข้มข้นต่ำ (100 มก.ต่อลิตร) จะพบสารมัธยันตร์เพียง 2 ชนิด แต่เมื่อเพิ่มปริมาตรเป็น 300 และ 500 มก.ต่อลิตร จะพบสารมัธยันตร์เพิ่มขึ้นเป็น 4 ชนิด แสดงว่าการเพิ่มปริมาตรของสับสเตรต มีผลทำให้สามารถพบทั้งปริมาณและชนิดของสารมัธยันตร์เพิ่มมากขึ้น แต่ถ้ามากเกินไป (700 -900 มก.ต่อลิตร) จะทำให้เชื้อใช้สับสเตรตเพียงบางส่วน ดังจะเห็นจากโครมาโตรแกรม TLC จะยังพบแถบอะซีแนพธีนในวันที่ 7 ของการเจริญ และเชื้อจะสร้างสารมัธยันตร์หลักที่จำเป็นต่อการเจริญเท่านั้น นอกจากนี้ ถ้าเพิ่มปริมาณของอาหารเลี้ยงเชื้อ (up scale) จาก 5 มล. จากการทดลองข้อ 3.4.1 เป็น 10 มล.ในการทดลองข้อ 3.4.2 จะพบสารมัธยันตร์เพิ่มขึ้น เป็น 6 ชนิด โดยตลอดระยะเวลาของการทดลอง จะพบสารมัธยันตร์หลัก 3 ชนิดเสมอ ไม่ว่าจะเพิ่มความเข้มข้นของสับสเตรต หรือเพิ่มปริมาณของอาหารเลี้ยงเชื้อ และจะมีปริมาณมากกว่า สารมัธยันตร์ 3 ชนิดที่เหลือ สารมัธยันตร์หลักทั้ง 3 ชนิด ได้แก่ A B และ C ที่มีค่า R_f เท่ากับ 0.63 0.41 และ 0.25 ตามลำดับ จากการวิเคราะห์ด้วย analytical TLC และมีค่ารีเทนชั่นไทม์ (R_t) เท่ากับ 2.71, 1.98 และ 1.63 นาที ตามลำดับ จากการวิเคราะห์ด้วย HPLC

การย่อยสลายอะซีแนพธีน โดยวิธีทางชีวภาพ จุลินทรีย์จะมีวิถีการย่อยสลายคล้ายคลึงกัน โดยอาศัยโมโนออกซีจิเนส เติมออกซิเจน 1 โมเลกุลเข้าที่คาร์บอนตำแหน่งที่1 บนวงไซโคลเพนเทน ได้แอลกอฮอล์และคีโตน ตามลำดับ จากการศึกษาในอดีตแบคทีเรียจะย่อยสลายอะซีแนพธีนได้สารมัธยันตร์ที่ไม่สามารถย่อยสลายได้ต่อ (dead end metabolite) เช่น อะซีแนพธีนควิโนน (Schocken และ Gibson, 1984) หรือ กรดแนพธาลีน 1, 8- ไดคาร์บอกซิลิก (Selifonov และคณะ, 1996) การคัดแยกสารมัธยันตร์ที่เกิดขึ้นระหว่างการย่อยสลายอะซีแนพธีนโดย *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ SP2 นั้น พบสารมัธยันตร์ที่มีค่า R_f และ R_t ตรงกับ อะซีแนพธีนควิโนน และกรดแนพธาลีน 1,8- ไดคาร์บอกซิลิก แต่ถึงแม้ว่าจะยังไม่สามารถบอกชนิดของสาร

มัธยันตร์ดังกล่าวได้ แต่ข้อมูลที่ได้นี้พอจะบอกได้ว่า แบคทีเรีย *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ SP2 มีวิถีการย่อยสลายเหมือนกับการรายงานในอดีต (Selifonov และคณะ, 1996) และมีความเป็นไปได้ที่ *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ SP2 สามารถย่อยสลายและใช้อะซีแนพธีนเป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงานในการเจริญ ซึ่งจำต้องมีการศึกษาวิถีการย่อยสลายอะซีแนพธีน อย่างละเอียดในอนาคตต่อไป โดยมีข้อมูลเบื้องต้นจากการวิเคราะห์สารมัธยันตร์ที่กล่าวมาในช่วงต้น ที่พบสารมัธยันตร์ 6 ชนิด แต่สามารถแยกได้เพียง 3 ชนิด แต่ไม่สามารถบอกชนิดของสารได้ ส่วนสารมัธยันตร์อีก 3 ชนิดที่เหลือ มีปริมาณน้อยมาก จนไม่สามารถคัดแยกออกมาได้ แต่ถ้าจะต้องศึกษาอาจจะเพิ่มปริมาณของอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวมากขึ้น

การย่อยสลายสาร PAHs แบบโคเมตาบอลิสม เป็นกลไกสำคัญที่ช่วยในการย่อยสลายสารได้มากขึ้นหรือสามารถย่อยสลายสารที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง ซึ่งเชื้อไม่สามารถย่อยสลายเพื่อใช้เป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงานได้โดยตรง โดยมีรายงานที่พบว่าการเติมสารตั้งต้นที่จุลินทรีย์ใช้ในการเจริญได้โดยตรงร่วมกับสารที่จุลินทรีย์นั้นย่อยสลายไม่ได้ จะเพิ่มประสิทธิภาพให้จุลินทรีย์นั้นย่อยสลายสาร PAHs ดังกล่าวได้ (Weissenfels และคณะ, 1991)

Jahasz และคณะ (1996) รายงานว่าเชื้อ *Burkholderia cepacia* ที่ปกติไม่สามารถย่อยสลายสารที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง แต่สามารถย่อยสลายไดเบนซ์ [*เอ,เอช*]แอนทราซีน และไดเบนโซ[*เอ*]ไพรีน ได้ เมื่อเติมฟีแนนทรีนลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อร่วมกับสารทั้ง 2 ชนิด

Weissenfels และคณะ (1991) รายงานว่าเชื้อ *Alcaligenes denitrificans* สายพันธุ์ WW1 สามารถย่อยสลายฟลูออแรนธีน แนพธาลีน ฟีแนนทรีน และแอนทราซีน เป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงานได้ และสามารถย่อยสลายไพรีน ฟลูออรีน และเบนโซ[*เอ*]แอนทราซีน เมื่อย่อยสลายแบบโคเมตาบอลิสม โดยมีฟลูออแรนธีนเป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงาน

แต่อย่างไรก็ตาม การย่อยสลายแบบโคเมตาบอลิสมระหว่างสารประกอบในกลุ่ม PAHs อาจไม่ได้ผลดีเสมอไป Bouchez และคณะ (1995) ได้สรุปการย่อยสลาย PAHs ของแบคทีเรียโดยที่มี PAHs 2 ชนิดผสมกันว่าอาจเป็นไปในรูปแบบของการย่อยสลายดังต่อไปนี้

1.การย่อยสลายแบบโคเมตาบอลิสมแบบพึ่งพากัน (synergistic co-metabolism)

2. การย่อยสลายที่ไม่ได้เกิดจากโคเมตาบอลิสม (no co-metabolism)

3. การย่อยสลาย PAHs ทีละชนิด (perferential substrate utilization)

4. การยับยั้งการย่อยสลาย PAHs ชนิดอื่น (inhibition of PAH degradation)

การย่อยสลายแบบโคเมตาบอลิสมทั้ง 4 แบบจะแตกต่างกันไปโดยขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของจุลินทรีย์และชนิดของ PAHs ที่ใช้เป็นสารทดสอบร่วมกัน

Bouchez และคณะ (1995) ได้รายงานความสามารถในการย่อยสลายฟลูออแรนธีนและไพรีนของ *Rhodococcus* sp. จะถูกยับยั้งเมื่อมีการเติมฟีแนนทรีนลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อร่วม

กับฟลูออแรนธีนและไพรีน ซึ่งลักษณะดังกล่าวอาจเป็นผลมาจากการที่ฟีแนนทรีนไปขัดขวางการชักนำกระบวนการสร้างเอนไซม์ที่ใช้ในการย่อยสลายฟลูออแรนธีนหรือไพรีนของแบคทีเรียสายพันธุ์นี้

Tiehm และ Fritzsche (1995) รายงานว่าเชื้อ *Mycobaterium* sp.จะถูกยับยั้งการย่อยสลายไพรีนเมื่อมีฟลูออรีนผสมอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อและอัตราการย่อยสลายฟีแนนทรีนจะลดลงเมื่อมีฟลูออรีน ไพรีน และ ฟลูออแรนธีน แต่ละชนิด ในอาหารเลี้ยงเชื้อ

Sphingomonas sp. สายพันธุ์ SP2 ถูกยับยั้งการเจริญโดย อะซีแนพธิลีน, แนพธาลีน และ ไดเบนโซฟูแรน ที่ความเข้มข้น 75 200 และ 75 มก.ต่อลิตร ตามลำดับ เมื่อย่อยสลายแบบโคเมตาบอลิสมที่มีอะซีแนพธีนเป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงาน โดยอะซีแนพธิลีน แนพธาลีน และไดเบนโซฟูแรน จะยับยั้งหรือขัดขวางการสร้างเอนไซม์เริ่มต้นที่จำเป็นต่อการย่อยสลายอะซีแนพธีน ดังจะเห็นได้จากผลการทดลองในข้อที่ 4.6.3 เมื่อปล่อยให้ *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ SP2 ย่อยสลายและใช้อะซีแนพธีนในการเจริญ นาน 24 ชม. ซึ่งเป็นช่วงการเจริญ mid log phase ของ *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ SP2 ช่วงเวลานี้จะมีการสร้างเอนไซม์ที่จำเป็นต่อการย่อยสลายมากมายแล้ว (Schocken และ Gibson, 1984) เมื่อเติมอะซีแนพธิลีน, แนพธาลีน และ ไดเบนโซฟูแรน ลงในหลอด ชนิดละหลอด พบว่า *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ SP2 ยังสามารถย่อยสลายและใช้อะซีแนพธีนในการเจริญได้ ซึ่งเทียบกับการทดลองที่เติมสารทั้ง 2 ชนิดพร้อมกันตั้งแต่ต้น *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ SP2 จะไม่สามารถย่อยสลายอะซีแนพธีนได้

Stringfellow และ Aitken (1995) รายงานว่าแนพธาลีน ฟลูออรีน 1-เมทธิลแนพธาลีน และ2-เมทธิลแนพธาลีน มีผลยับยั้งแบบแข่งขันการย่อยสลายฟีแนนทรีนของแบคทีเรีย *Pseudomonas saccharophila* สายพันธ์ P15 และ *P. stutzeri* สายพันธุ์ P16 โดยอาศัยหลักการของไลน์วีเวอร์-เบอร์ค ซึ่งสารทั้ง 4 ชนิด มีความสามารถในการละลายน้ำได้ดีกว่าฟีแนนทรีน ซึ่งมีผลต่อการแข่งขันการเข้าจับที่ตำแหน่งเร่ง (active site) ของออกซิจีเนส หรืออาจเกิดจากการไปขัดขวางการสร้างและขนส่งเอนไซม์

นอกจากนี้ยังมีการรายงานว่าแนพธาลีน มีผลยับยั้งการเจริญของ *Acidovorax delafieldii* และ *Sphingomonas paucimobilis* (Shuttleworth และ Cerniglia, 1996) และสาหร่ายสีเขียวแกรมน้ำเงิน *Agmenellum quadruplicatum* (Cerniglia และคณะ, 1993)

การยั้บยังแบบแข่งขัน จะเกิดขึ้นจากตัวยับยั้งไปจับกับเอนไซม์ตรงบริเวณเดียวกันกับที่สับสเตรตจับหรือจับที่คนละบริเวณกับที่สับสเตรตจับ แต่การจับของตัวยับยั้งกับเอนไซม์จะมีผลทำให้เอนไซม์ไม่สามารถจับสับสเตรตได้ ตัวสับสเตรตแบบแข่งขันนี้อาจเป็นสารที่มีโครงสร้างคล้ายกับสับสเตรต หรือเป็นผลิตภัณฑ์ของปฏิกิริยา (พัชรา, 2541)

ดังนั้นการที่อะซีแนพธิลีน แนพธาลีน และ ไดเบนโซฟูแรนมีผลยับยั้งต่อการสร้างเอนไซม์ที่จำเป็นต่อการย่อยสลายอะซีแนพธีน เนื่องมาจากอะซีแนพธิลีน แนพธาลีน และ ไดเบนโซฟูแรนมีโครงสร้างใกล้เคียงกับอะซีแนพธีน โดยเฉพาะอะซีแนพธิลีน นอกจากนี้ยังมีความสามารถในการละลายน้ำได้มากกว่าอะซีแนพธีน โดยเฉพาะแนพธาลีน สารทั้ง 3 ชนิด จึงแข่งขันการเข้าจับกับตำแหน่งเร่งได้ดีกว่าอะซีแนพธีน ส่งผลให้เอนไซม์ไม่สามารถทำงานได้

ผลการศึกษาทั้งหมดนี้ชี้ให้เห็นว่าการย่อยสลายสาร PAHs ในสิ่งแวดล้อม จะต้องมีความเข้าใจอย่างมากต่อการที่จะนำแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากห้องปฏิบัติการไปใช้บำบัดในสิ่งแวดล้อมจริง แบคทีเรีย *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ SP2 มีความสามารถสูงในการย่อยสลายอะซีแนพธีน แต่ไม่มีความสามารถในการย่อยสลายสาร PAHs ชนิดอื่นทั้งโดยตรงและย่อยสลายแบบ โคเมตาบอลิสม อีกทั้งยังถูกยับยั้งการสร้างเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายอะซีแนพธีนโดย อะซีแนพธิลีน แนพธาลีน และ ไดเบนโซฟูแรน ซึ่งเป็นข้อเสียของแบคทีเรียชนิดนี้ แต่เป็นข้อดีในการที่จะนำแบคทีเรียดังกล่าวไปศึกษาในระดับพันธุศาสตร์ เนื่องจากสามารถสร้างออกซิจีเนสที่มีความจำเพาะสูงต่ออะซีแนพธีน ซึ่งแตกต่างจากออกซิจีเนสทั่วไป จากข้อมูลทั้งหมดนี้จะเป็นข้อมูลเบื้องต้นที่ใช้สำหรับแบคทีเรียที่มีศักยภาพในการย่อยสลายสาร PAHs ในประเทศไทย ซึ่งจะใช้พัฒนาไปใช้ในการบำบัดและฟื้นฟูสภาพแวดล้อมที่ปนเปื้อนจากสาร PAHs ต่อไปในอนาคต

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 6

ข้อเสนอแนะในการวิจัย

6.1 แบคทีเรียบางชนิดจะมีความสามารถในการย่อยสลายสาร PAHs เมื่ออยู่ในสภาวะที่มีแบคทีเรียหลายชนิดอยู่ด้วยกัน (consortium) เท่านั้น ในกรณีนี้อาจมีการเติมปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญจากภายนอกลงในอาหารที่ใช้คัดเลือก เช่น วิตามิน เพื่อเร่งการเจริญของแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลายสาร PAHs

6.2 การนำกลุ่มแบคทีเรียซึ่งเจริญด้วยฟลูออแรนธีนที่เก็บอยู่ในอุณหภูมิ –70 หรือ –20 ^{o}ซ มาใช้ ควรกระตุ้นการเจริญโดยให้เจริญด้วยฟีแนนทรีนก่อน แล้วค่อยถ่ายเชื้อลงอาหารที่มีฟลูออแรนธีน

6.3 การวิเคราะห์สารมัธยันตร์ด้วยวิธี TLC และวิธี HPLC พบว่าสารมัธยันตร์หลายชนิดที่เกิดขึ้นมีค่า R_f และ ค่า R_t ใกล้เคียงกันมากซึ่งยากต่อการจำแนกว่าเป็นสารชนิดใด อาจทำการปรับเปลี่ยนระบบตัวทำละลายที่ใช้ในการชะให้เหมาะสม

6.4 การวิเคราะห์สารมัธยันตร์ เพื่อให้ทราบถึงวิถีการย่อยสลายอะซีแนพธีนนั้น ควรเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวปริมาตรมาก จึงจะสามารถคัดแยกสารมัธยันตร์ที่เกี่ยวข้องกับวิถีการย่อยสลายอะซีแนพธีนทั้งหมดได้

6.5 งานวิจัยนี้เป็นการศึกษารายละเอียดที่สำคัญในเบื้องต้นของแบคทีเรีย Sphingomonas sp. สายพันธุ์ SP2 ในการย่อยสลายอะซีแนพธีนและสาร PAHs ชนิดอื่น โดยผลการทดลองและข้อมูลที่ได้ในงานวิจัยนี้สามารถที่จะนำไปประยุกต์ใช้ได้ เช่น การหาวิถีเมตาบอลิสมและสารมัธยันตร์ที่เกิดจากการย่อยสลาย ศึกษาหาแนวทางที่นำไปใช้ได้จริงในสิ่งแวดล้อม โดยการนำเชื้อแบคทีเรียนี้ไปทดสอบประสิทธิภาพในการย่อยสลายจริงในสิ่งแวดล้อม และการปรับปรุงสภาวะที่เหมาะสมเพื่อการอยู่รอดและการย่อยสลาย PAHs ของแบคทีเรียชนิดนี้ก่อนที่จะนำไปใช้จริงในดิน หรือการศึกษาในระดับพันธุศาสตร์และโมเลกุลที่เกี่ยวกับการย่อยสลายอะซีแนพธีนและสาร PAHs ชนิดอื่นของแบคทีเรียสายพันธุ์นี้

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

กรมควบคุมมลพิษ. 2541. ของเสียอันตราย. บันทึกสีน้ำตาล รายงานสถานการณ์คุณภาพสิ่งแวดล้อม พศ. 2539 : 139-141.

กรมควบคุมมลพิษ. 2541. คุณภาพอากาศ. บันทึกสีน้ำตาล รายงานสถานการณ์คุณภาพสิ่งแวดล้อม พศ. 2539 : 2-6.

เครือข่ายความร่วมมือมหาวิทยาลัยไทยด้านการจัดการสิ่งแวดล้อม. 2542. การสำรวจและจัดลำดับความสำคัญของปัญหาสิ่งแวดล้อมจากอุตสาหกรรมที่ควรพัฒนางานวิจัยเพื่อแก้ไข. วารสารสิ่งแวดล้อม. ปีที่ 3. ฉบับที่ 14. (กรกฎาคม-กันยายน).

ณัฐพันธุ์ ศุภกา. 2542. ความสามารถของแบคทีเรียดินที่คัดแยกได้ในการย่อยสลายฟีแนนทรีนและพอลิไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนชนิดอื่น.วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต. คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

พจนีย์ จันทมาลี. 2542. ความสามารถของแบคทีเรียที่คัดแยกได้ในการย่อยสลายแอนทราซีนและพอลิไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนชนิดอื่น.วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต. คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

พรศรี สุทธนารักษ์. 2533. ปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนในสภาวะแวดล้อมทางทะเลบริเวณอุตสาหกรรมแปรสภาพเรือเหล็กเก่า มาบตาพุด จังหวัดระยอง. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต. คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

พัชรา วีระกะลัส. 2541. เอนไซม์. พิมพ์ครั้งที่ 1. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. กรุงเทพฯ : 213-234.

ภาษาอังกฤษ

Alexander, M. 1967. Agriculture and the quality of our environment. American Associatio for the advancement of Science . 331-342.

Alexander, M. 1994. Cometabolism. Biodegradation and Bioremediation. 177-195.

Annweiler E., Michaelis W. and Meckenstock U. 2001. Anaerobic cometabolic conversion of benzothiophene by a sulfate-reducing enrichment culture and in a tar –oil-contaminated aquifer. Appl. Environ. Microbiol. 67: 5077-5083.

Ashok, B. T. and Saxena, S. 1995. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons-a review. J. Sci. Ind. Res. 54 : 443-451.

Ausubel, F. A., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Smith, J. A., and Struhi, K. 1999. Current protocols in molecular biology.4th ed. NewYork, John Wiley& Sons.

Baker, K. H., and Herson, D. S. 1994. Biodegradation pathways. In Bioremediation. pp. 21-60. Baker, K. H., and Herson, D. S. (ed.). New York, Mcgrew-Hill.

Baver, J. E., and Capone, D. G. 1988. Effect of co- occuring aromatic hydrocarbons on degradation of individual polycyclic aromatic hydrocarbons I marine sediment slurries. Appl. Environ. Microbiol. 54:1649-1655.

Blackall, L. L. 1999. Workshop on molecular Biology Techniques. September. 22-24 and 26-28, 1999, Thaksin University, Thailand. p-23, j1-j9.

Boldrin, B., Tiehm, A.,and Fritzsche. C. 1993. Dedgradation of phenanthrene, fluorene, fluoranthene and pyrene by a *Mycobacterium* sp. Appl. Environ. Microbiol. 59: 1927-1930.

Boonchan, S., Britz, M. L., and Stanley, G. A., 2000. Degradation and mineralization of high- molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons by defined fungal-bacterial cocultures. Appl. Environ. Microbiol. 66: 1007-1019.

Bouchez, M., Blanchet, D., and Vandecasteele, J. P.1995. Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by pure strains and by defined strain association: inhibition phenomena and cometabolism. Appl. Microbiol. Biotechnol. 43: 156-164.

Bugg, T., Foght, J. M., Pickard, M. A., and Gray, M. R. 2000. Uptake and active effluk of polycyclic aromatic hydrocarbons by *Pseudomonas fluorescens* LP6a. Appl. Environ. Microbiol. 66 : 5387-5392.

Bunz, P. V., and Cook, A. M. 1993 . Dibenzofuran 4,4a-dioxygenase from *Sphingomonas* sp. Strain RW1: angular dioxygenation by three-component enzyme system . J. Bacteriol. 175: 6467-6475.

Cairns, H., and Nebeker, S. 1982. Toxicity of acenaphthene and isoghorone to early life stages of fathead minnows. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 11: 703-707.

Cerniglia, C. E. 1992. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. Biodegradation. 3: 351-368.Cerniglia, C. E., Freeman, J. R.,and Baulen, C. 1993. Metabolism and toxicity of 1-and 2- methylnaphthalene and their derivatives in cyanobacteria. Arch. Microbiol. 136: 177-183.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Cerniglia, C. E., Morgan, J. C., and Gibson, D. T. 1979. Bacterial and fungal oxidation of dibenzofuran. Biochem.J. 180:175-185.

Dalton, H., and Stirling, D. I. 1982. Cometabolism. Phil. Trans. R. Soc. Lond. Ser.B., 297: 481-496.

Eaton, R. W., and Chapman, P. J. 1992. Bacterial metabolism of naphthalene: construction and use of recombinant bacteria to study ring cleavage of 1,2-dihydroxynaphthalene and subsequent reactions. J. Bacteriol. 174 : 7542-7554.

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., Casellas, M., Bayona, J. M., and Solanas, A. M. 1992. Isolation and characterization of a fluorene-degrading bacterium: identification of ring oxidation and ring fission products. Appl. Environ. Microbiol. 58: 2910-2917.

Grifoll, M., Selifenov, S. A., and Chapman, P. J. 1994. Evidence for a novel pathway in the degradation of fluorene by *Pseudomonas* sp. strain F274. Appl. Environ. Microbiol. 60: 2438-2449.

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.

Grimmer, G. H., Bohnke, A., and Glaser. A.1977. Investigation on the carcinogenic burden by air pollution in marine polycyclic aromatic hydrocarbons in automobile exhaust gas-an inventory. Zentralb I. Barkeriol. Abt. I Orig. Reihe B.164: 218-234.

Grosser, R. J., Warshawsky, D., and Yestal, J. R. 1991. Indigenous ans enhanced minerisation of pyrene, benzo[*a*]pyrene and carbazole in soil. Appl. Environ. Microbiol. 57: 3462-3469.

Grund, E., Denecke, B., and Eichenlaub, R., 1992. Naphthalene degeadation via salicylate and gentisate by *Rhodococcus* sp. strain B4. Appl. Environ. Microbiol. 58: 1874-1877.

Harayama, S. 1997. Polycyclic aromatic hydrocarbon bioremediation design. Curr. Opinion. Biotechnol. 8: 268-273.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Holcombe, G. W., Phipps, G. L., and Fiandt, J. T. 1983. Toxicity of selected priority pullutants to various aquatic organisms. Ecotoxicol. Environ. Saf. 7: 400-409

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.

Hormisch, D., Kkoring, G. W., and Giffhorn, F. 2000. Degradation of acenaphthene and acenaphthylene by isolated bacteria and influence of fertilizers on the PAH degrading population in soil. Proc. Forum. Appl. Biotech. 11 : 157-160.

Imshenetskii, A. A., Kondrateva, T. F., and Linkova, M. A. 1985. Mutagenic action of acenaphthene on haploid and diploid cultures of *Candida scottii*. Microbiol. 54: 360-362

John, T., and Cookson, J. R. 1995., Bioremediation engineering design and application. 57-59.

Jones, K. C., Stratford, J. A., Waterhouse, K. S., and Vogt, N. B. 1989. Organic contaminants in welsh soils : polynuclear aromatic hydrocarbons, Environ. Sci. Technol. 23 : 540-550.

Juhasz, A. L., Britz, M. L., and Stanley, G. A. 1996. Degradation of high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons by *Pseudomonas cepacia*. Biotech. Lett. 18: 577-582.

Juhasz, A. L., Britz, M. L., and Stanley, G. A. 1997. Degradation of fluoranthene, pyrene, benz [*a*] anthracene and dibenz [*a,h*] anthracene by *Burkholderia cepacia*. J. Appl. Microbiol. 83: 189-198.

Jacobson, S. N., OMara, N. L., and Alexander M. 1990. Evidence for cometabolism in sewage . Appl. Environ. Microbiol. 40 :917-921

Kanaly, R. A., and Harayama, S. 2000. Biodegradation of high- molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons by Bacteria. Bacteriol. J. 182 : 2059- 2097.

Keuth, S., and Fehm, H-J. 1991. Biodegradation of phenanthrene by *Arthrobacter polychromogenes* isolated from a contaminated soil. Appl. Micro. Biotec. 34: 804-808.

Kim, E., and Zylstra, G. J. 1999. Functional analysis of genes involed in biphenyl, naphthalene, phenanthrene, and *m*- xylene degradation by *Sphingomonas yanoikuyae* B1. J. Ind. Micobiol. Biotech. 23 : 294-302.

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.

Lederer, W. H.1985. Acenaphthene. 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.

Mark, R. E., Field, S. D., Wojtanowic, and Britenbeck, G. A. 1992. Biological treatment of petrochemical waste for removal of hazardous polynuclear aromatic hydrocabon constituents. Water. Sci. Tech. 3 : 213-220.

Mattox, C. F., and Humanick, M. J. 1980. Organic groundwater contaminants from UCG. In situ. 4: 129-151.

Means, J. C., Ward, S. G., Hassett, J. J., and Banwart, W.L., 1980. Sorption of polynuclear aromatic hydrocarbons by sediments and soil. Environ. Sci. Technol. 14: 1524-1528.

Merce, C., Grifoll, M., and Josep, M. B. 1997. New metabolites in tne degradation of fluorene by *Arthrobacter* sp. strain F101. Appl. Environ. Microbiol. 63: 819-826.

Mlynarz, D.T., and Ward, O.P. 1995. Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by a mixed culture and its component pure cultures, obtained from PAH-contaminated soil. Can. J. Microbiol. 41 : 470-476.

Mueller, J. G., Chapman, P. J., and Pritchard, P. H. 1989. Action of fluoranthene-utilizing bacterial community on polycyclic aromatic hydrocarbon components of creosote. Appl. Environ. Microbiol. 55: 3085-3090.

Mueller, J. G., Chapman, P. J., Blattmann, B. O., and Pritchard P. H. 1990. Isolation and characterization of fluoranthene-utilizing strain of *Pseudomonas paucimobilis*. Appl. Environ. Microbiol. 56: 1079-1086.

Narro, M. L., Cerniglia, C. E., Balen, C. and Gibson, D. T. 1992. Metabolism of phenanthrene on the marine cyanobactrium *Agmellum quadruplicatum* PR-6. Appl. Environ. Microbiol. 58: 1351-1359.

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.). New York . Plenum Publishing Corp.

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.

Omori, T., Monna, L., Saiki, Y., and Kodama, T. 1992. Desulfurization of dibenzothiophene by *Corynebacterium* sp. strain SY1. Appl. Environ. Microbial. 58: 911-915

Palleroni, N. J. 1994. Gram- negative aerobic rods and cocci. In Bergey's Manual of systematic bacteriology 1994, Krieg, N.R. and Hott, J.G. (eds.).The William&Wikins Co., Baltimore, Md: 140-199.

Pothuluri, J. V., Freeman, J. P., Evans, F. E., and Cerniglia, C. E. 1992. Fungal metabolism of acenaphthene by *Cunninghamella elegans*. Appl. Environ. Microbial. 58: 3654-3659

Reyes, C., Sigman, M. E., Arce, R., Barbas, J. T., and Dabestani, R. 1998. Photochemistry of acenaphthene at a silica gel/air interface. J. Photochem. Photobiol. A: Chemistry, 122: 277-283.

Ross, D. D., Moody, J., and Cerniglia, C. E. 2002. Utilization of mixtures of polycyclic aromatic hydrocarbons by bacteria isolated from contaminated sediment. FEMS Microbiol Ecol. 41: 1-7

Schirmer, K., Dixon, D. G., Greenberg, B. M., and Bols, N.C. 1998. Ability of 16 priority PAHs to be directly cytotoxic to a cell line from the rainbow trout gill. Toxicol. 127: 129-141.

Schocken, M. J., and Gibson, D. T. 1984. Bacterial oxidation of the polycyclic aromatic hydrocarbons acenaphthene and acenaphthylene. Appl. Environ. Microbiol. 48: 10-16.

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.

Selifenov, S. A., Chapman, P. J., Akkerman, S. B., Gurst, J. E., Bortiatynski, J. M., Nanny, M. K., and Hatcher, P. T. 1998. Use of ^{13}C nuclear magnetic Resonance to assess fossil fuel biodegradation: fate of [1-^{13}C] acenaphthene in creosote polycyclic aromatic compound mixtures degraded by bacteria. Appl. Environ. Microbiol. 64: 1447-1453.

Selifenov, S. A., Slepenkin, A.V., Adanin, V.M., Grechkina, G.M., and Starovoitov, I.I. 1993. Acenaphthene catabolism by strains of *Alcaligenes eutropus* and *Alcaligenes paradoxus*. Microbiol. 62: 120-128.

Shi, T., Fredrickson, J. K., and Balkwill, D. L. 2001. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by Sphingomonas strain isolated from the terrestrial subsurface. J. Ind. Micro.Biotech. 26 : 283-289.

Shocken, M. J., and Gibson, D.T. 1984. Bacterial oxidation of the polycyclic aromatic hydrocarbons acenaphthene and acenaphthylene. Appl. Environ. Microbiol. 48: 10-16.

Shuttleworth, K. L., and Cerniglia, C. E. 1996. Bacterial degradtion of low concentrations of phenanthrene and inhibitionby naphthalene. Microbiol. Ecol. 31: 305-317

Stringfellow, W., and Aitken, M. D. 1995. Competitive metabolism of naphthalene, methylnaphthalenes, and fluorene by phenanthrene-degrading Psedomonads. Appl. Environ. Microbiol. 61: 357-362.

Sutherland, J. B. 1992. Detoxicification of polycyclic aromatic hydrocarbons by fungi. J.Bacterial. 9: 53-62.

Sutherland, J. B., Rafii, F., Khan, A. A., and Cerniglia, C. E.1995. Mechanisms of PAHs degradation. p. 269-306. In Young, L. Y. andCerniglia, C. E.(ed.). Microbiol transformation and degradation of toxic organic chemicals.New York. Wiley-Liss.

Tiehm, A. 1994. Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in the presence of synthetic surfactant . App. Microbiol. Biotechnol. .60: 258-263.

Tiehm, A., and Fritzsche, C. 1995. Utilization of solubilized and crystalline mixtures of polycyclic aromatic hydrocarbons by a *Mycobacterium* sp. . App. Microbiol. Biotechnol. .42: 964-968

Tongpim, S., and Pickard, M. A. 1996. Growth of *Rhodococcus* S1 on anthracene. Can. J. Microbiol. 42 : 289-294.

Volkering, F. A., Breure, A. M., Sterkenberg, A., and Van Andel, J. G. 1992. Microbial degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons; effect of substrate availability on bacterial growth kinetics. Appl. Microbiol Biotechnol. 36: 548-552.

Walter, U., Beyer, M., Klein, J., and Rehm, H. J. 1991. Degradation of pyrene by *Rhodococcus* sp.UW1. Appl. Microbiol. Biotechnol. 34: 671-676

Weissenfels, W. D., Beyer, M., Klien, J., and Rehm, H. J. 1990. Degradation of phenanthrene, fluorene and fluoranthrene by pure bacterial cultures. . Appl. Microbiol. Biotechnol. 32: 479-484.

Weissenfels, W. D., Beyer, M., and Klien, J. 1991. Microbial metabolism of fluoranthrene: isolate and identification of ring fisson products. Appl. Microbiol. Biotechnol.34: 528-535.

Wilson, S. C., and Jones, K. C. 1993. Bioremediation of soil contaminated with polynuclear aromatic hydrocarbons (PAHs): Environ. Pollut. 81: 229-249.

Ye, D., Siddiqi, M. A., Maccubbin, A. E., Kumar, S., and Sikka, H. C. 1996. Degradation of polynuclear aromatic hydrocarbons by *Sphingomonas paucimobillis*. Environ. Sci. Tech. 30 : 136-142.

Yen, K. M., and Gunsalus, I. C. 1982. Plasmid gene organization: naphthalene/ salicylate oxidation. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 79: 847-878.

Yen, K. M., and Serdar, C. M. 1988. Genetics of naphthene catabolism in *Pseudomonas*. Crit. Rev. Microbiol. 15: 247-268.

ภาคผนวก

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ก

สูตรและวิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Carbon Free Mineral Salt Medium (CFMM)

แอมโมเนียมไนเตรต (NH_4NO_3)	3.0	กรัม
ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟตเดคะไฮเดรต ($Na_2HPO_4 \bullet 12H_2O$)	5.5	กรัม
โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)	0.8	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟตเฮพทะไฮเดรต ($MgSO_4 \bullet 7H_2O$)	0.01	กรัม
เฟอริกคลอไรด์เฮกซะไฮเดรต ($FeCl_3 \bullet 6H_2O$)	0.005	กรัม
แคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรต ($CaCl_2 \bullet 2H_2O$)	0.005	กรัม

ละลายสารสามชนิดแรกในน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มล. ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 1 นอร์มัล ให้เป็น 7.5 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 °ซ เป็นเวลา 20 นาที ในส่วนของสารละลายสามชนิดหลังทำการเตรียมแยกแต่ละชนิดแล้วทำให้ปลอดเชื้อโดยการกรองผ่านชุดกรองสำเร็จรูปเซลลูโลสอะซีเตทขนาดรูกว้าง 0.45 ไมโครเมตร แล้วจึงเติมลงในอาหารที่ทำการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว

อาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง CFMM (CFMM agar)

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

อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Luria-Bertani (LB broth)

ทริปโตน	10.0	กรัม
ผงสกัดจากยีสต์	5.0	กรัม
โซเดียมคลอไรด์	5.0	กรัม

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

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

อาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง Luria-Bertani (LB agar)

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

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ข

สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

สารละลายอะซีแนพธีนในไดเมทธิลซัลฟอกไซด์ (acenaphthene in DMSO solution)

ชั่งอะซีแนพธีน 0.1 กรัม ละลายในไดเมทธิลซัลฟอกไซด์ปริมาตร 1.0 มล. ผสมด้วยเครื่องปั่นผสมจนอะซีแนพธีนละลายหมด ทำให้ปลอดเชื้อโดยกรองด้วยชุดกรองสำเร็จรูปชนิด PTFE ที่มีขนาดรูกว้าง 0.20 ไมโครเมตร เก็บรักษาในขวดสีชาหรือห่อให้มิดชิดเก็บที่อุณหภูมิ –20 $^{\circ}$ซ เติมลงในอาหารเหลว CFMM ที่ผ่านการฆ่าเชื้อและเย็นลงที่อุณหภูมิห้องแล้ว

สารละลาย PAHs ชนิดอื่นในไดเมทธิลซัลฟอกไซด์

ชั่งสาร PAHs ชนิดอื่น 0.1 กรัม ยกเว้น แนพธาลีน 0.3 กรัม ละลายในไดเมทธิลซัลฟอกไซด์ปริมาตร 1.0 มล. ผสมด้วยเครื่องปั่นผสมจนสาร PAHs ละลายหมด ทำให้ปลอดเชื้อโดยกรองด้วยชุดกรองสำเร็จรูปชนิด PTFE ที่มีขนาดรูกว้าง 0.20 ไมโครเมตร เก็บรักษาในขวดสีชาหรือห่อให้มิดชิดเก็บที่อุณหภูมิ –20 $^{\circ}$ซ เติมลงในอาหารเหลว CFMM ที่ผ่านการฆ่าเชื้อและเย็นลงที่อุณหภูมิห้องแล้ว

สารละลายมาตรฐานของ PAHs และอนุพันธ์ชนิดต่างๆ ในเมทธานอล

ชั่งสารดังนี้ อะซีแนพธิลีน กรดแนพธาลีน 1,8-ไดคาร์บอกซิลิก กรดซาลิไซลิก กรดโปรโตคาทีคูอิก และกรด 2,5-ไดไฮดรอกซีเบนโซอิก ชนิดละ 0.1 กรัม ละลายสารมาตรฐานแต่ละชนิดในเมธานอลปริมาตร 10 มล. ผสมด้วยเครื่องปั่นผสมจนสารละลายหมด กรองด้วยชุดกรองสำเร็จรูปชนิด PTFE ที่มีขนาดรูกว้าง 0.20 ไมโครเมตร เก็บรักษาในขวดสีชาหรือห่อให้มิดชิดเก็บที่อุณหภูมิ –20 $^{\circ}$ซ เพื่อใช้เป็นสารมาตรฐานในการวิเคราะห์สารมัธยันตร์ด้วยวิธี TLC และ HPLC

สารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.85%

ชั่งโซเดียมคลอไรด์ 0.85 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 100 มล. นึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 $^{\circ}$ซ เป็นเวลา 20 นาที

กลีเซอรอล

นำกลีเซอรอลมานึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 $^{\circ}$ซ เป็นเวลา 20 นาที ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำมานึ่งฆ่าเชื้อใหม่อีก 2-3 ครั้ง

สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 1 นอร์มัล

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

สารละลายเมทธานอลเข้มข้น 80% ในน้ำ (ปริมาตรต่อปริมาตร)

กรองเมทธานอล 100% ผ่านเยื่อกรองชนิด FH ที่มีขนาดรูกว้าง 0.5 ไมโครเมตร กำจัดอากาศออกด้วยเครื่องกำเนิดเสียงความถี่สูง จากนั้นผสมเมทธานอล 100% ปริมาตร 80 มล. กับน้ำกลั่นที่กรองและกำจัดอากาศออกแล้วปริมาตร 20 มล. นำไปกำจัดอากาศด้วยเครื่องกำเนิดเสียงความถี่สูงอีกครั้งจนไม่เหลือฟองอากาศ

สารละลายเอทธิลอะซีเตทที่อิ่มตัวด้วยน้ำ

ผสมเอทธิลอะซีเตทปริมาตร 150 มล. กับน้ำกรอง ปริมาตร 150 มล. ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 500 มล. ปิดฝาให้แน่นด้วยพาราฟิลม์ เขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

สารละลาย 10 % SDS

Sodium lauryl sulfate น้ำหนัก 10 กรัม ค่อยๆละลายในน้ำปลอดประจุอุณหภูมิ 60 $^{\circ}$ซ ปริมาตร 8 มล. เมื่อละลายหมดเติมน้ำปลอดประจุจนเป็นปริมาตร 100 มล. นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121° ซ เป็นเวลา 20 นาที

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารละลาย EDTA เข้มข้น 0.5 โมลาร์

EDTA ($C_{10}H_{14}O_8Na_2{\bullet}2H_2O$)	186.1 กรัม
โซเดียมไฮดรอกไซด์	20 กรัม

ละลาย EDTA ในน้ำปลอดประจุปริมาตร 800 มล. จากนั้นเติมเกล็ดโซเดียมไฮดรอกไซด์ คนให้เข้ากันรอให้เย็นลงแล้วจึงปรับค่าความเป็นกรด-ด่างเป็น 8.0 เติมน้ำปลอดประจุให้เป็นปริมาตร 1,000 มล. นึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121° ซ เป็นเวลา 20 นาที

บัฟเฟอร์ TE

Tris-HCl	10 มิลลิโมลาร์
EDTA	0.1มิลลิโมลาร์

ผสมสารละลาย Tris-HCl pH 8.0 เข้มข้น 1.0 โมลาร์ pH 8.0 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร กับสารละลาย EDTA pH 8.0 เข้มข้น 0.5 โมลาร์ ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร เติมน้ำปลอดประจุให้เป็นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร นึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121° ซ เป็นเวลา 20 นาที

CTAB/NaCl solution

โซเดียมคลอไรด์	0.7 โมลาร์
CTAB	10 กรัม

ละลาย CTAB ในน้ำปลอดประจุอุณหภูมิ 60 $^{\circ}$ซ ปริมาตร 80 มล. จากนั้นเติมโซเดียมคลอไรด์ เมื่อละลายหมดเติมน้ำปลอดประจุจนเป็นปริมาตร 100 มล. นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121° ซ เป็นเวลา 20 นาที

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารละลายฟีนอล/คลอโรฟอร์ม/ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์

เตรียมสารละลายฟีนอลอิ่มตัวในบัฟเฟอร์ Tris-HCl โดยละลายฟีนอลในอ่างน้ำอุณหภูมิ 68° ซ จากนั้นเติมผง hydroxyquinoline ให้ได้ความเข้มข้น 0.1 % (น้ำหนักต่อน้ำหนัก) เติมสารละลาย Tris-HCl เป็น 8.0 เข้มข้น 0.5 โมลาร์ ปริมาตร 1 เท่า คนด้วยแท่งแม่เหล็กเป็นเวลา 15 นาที ทิ้งให้แยกชั้น ดูดชั้นน้ำส่วนบนออก เติมสารละลาย Tris-HCl เป็น 8.0 เข้มข้น 0.1 โมลาร์ ปริมาตร 1 เท่า คนด้วยแท่งแม่เหล็กเป็นเวลา 15 นาที ทิ้งให้แยกชั้น ดูดชั้นน้ำส่วนบนออก ทำขั้นนี้หลายๆครั้งด้วย Tris-HCl เป็น 8.0 เข้มข้น 0.1 โมลาร์ จนค่าความเป็นกรด-ด่างของฟีนอลมากกว่า 7.8 สุดท้ายเติมสารละลาย Tris-HCl เป็น 8.0 เข้มข้น 0.1 โมลาร์ ที่ผสม β-mercaptoethanol เข้มข้น 0.2 % ปริมาตร 0.1 เท่าของฟีนอลที่เตรียมได้ เก็บในขวดสีชาที่อุณหภูมิ 4° ซ ผสมฟีนอลที่เตรียมได้กับคลอโรฟอร์มและไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ ในอัตราส่วน 25:24:1 (ปริมาตรต่อปริมาตรต่อปริมาตร) เก็บในขวดสีชาที่อุณหภูมิ 4 °ซ

สารละลายคลอโรฟอร์ม/ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์

ผสมคลอโรฟอร์มกับไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ ในอัตราส่วน 24 :1 (ปริมาตรต่อปริมาตร) เก็บที่อุณหภูมิ 4° ซ

บัฟเฟอร์ 50XTAE

Tris-HCl	202 กรัม
สารละลาย EDTA pH 8.0 เข้มข้น 0.5 โมลาร์	100 มิลลิลิตร
กรดอะซีติกเข้มข้น	57.1 มิลลิลิตร

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำปลอดประจุปริมาตร 800 มิลลิลิตร แล้วเติมน้ำปลอดประจุให้เป็นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร นึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121° ซ เป็นเวลา 20 นาที

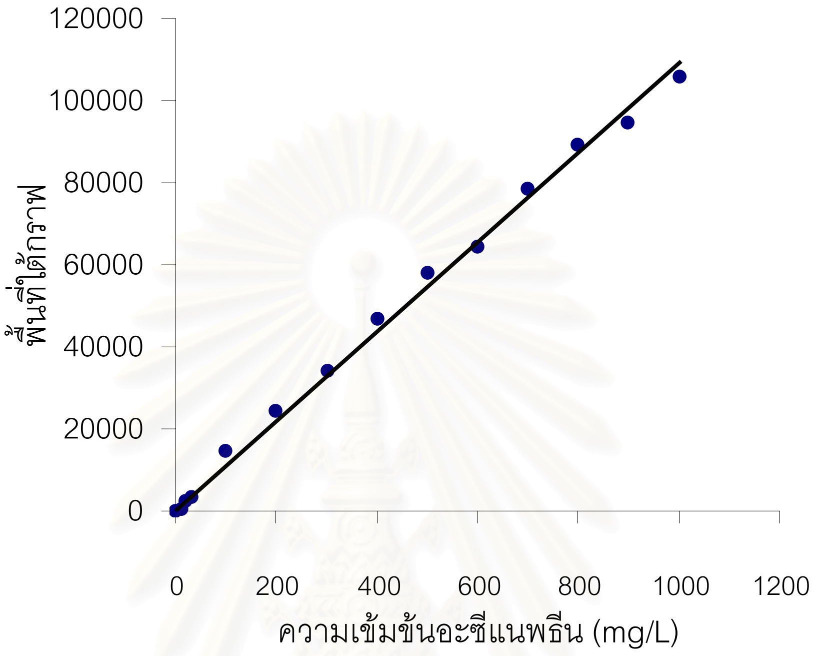
สารละลายเอธิเดียมโบรไมด์ในบัฟเฟอร์ TAE

ละลายผงเอธิเดียมโบรไมด์ในบัฟเฟอร์ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เก็บในภาชนะปิดสนิทในที่มืด

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ค

กราฟมาตรฐานของอะซีแนพธีน



รูปที่ ค.1 กราฟมาตรฐานระหว่างปริมาณอะซีแนพธีนกับพื้นที่ใต้กราฟ ที่ได้จากการวิเคราะห์โดยวิธี HPLC

ความเข้มข้นของอะซีแนพธีนหาได้จากนำพื้นที่ใต้กราฟที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC มาแทนค่าในสมการเส้นตรงดังนี้

พื้นที่ใต้กราฟ = (ความชันของกราฟมาตรฐาน × ปริมาณอะซีแนพธีน) + จุดตัดแกนวาย

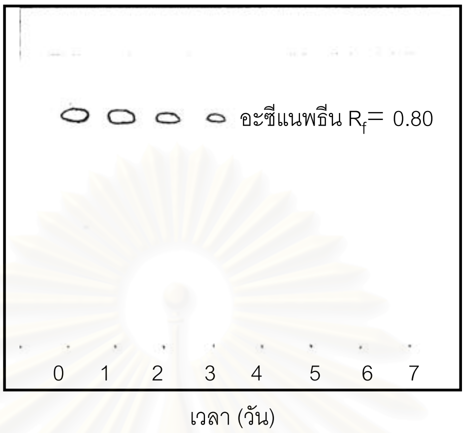
โดยที่ ความชันของกราฟมาตรฐาน = 109.3

จุดตัดแกนวาย = 0

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ง

ข้อมูลผลการทดลอง



รูปที่ ง.1 TLC โครมาโตแกรมของชุดควบคุมซึ่งไม่ได้มีการเติมเชื้อลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ CFMM ที่มีอะซีแนพธีนความเข้มข้น 100 มก.ต่อลิตร เพื่อติดตามการย่อยสลายของอะซีแนพธีนโดยปัจจัยทางกายภาพ ที่ระยะเวลาต่างๆ กัน

รูปที่ ง.2 HPLC โครมาโตแกรมของชุดควบคุมซึ่งไม่ได้มีการเติมเชื้อลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ CFMM ที่มีอะซีแนพธีนความเข้มข้น 100 มก.ต่อลิตร เพื่อติดตามการย่อยสลายของอะซีแนพธีนโดยปัจจัยทางกายภาพ ที่ระยะเวลาต่างๆ กัน

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวอรสุภาว์ สายเพชร เกิดเมื่อวันที่ 29 สิงหาคม พ.ศ. 2520 ที่จังหวัดขอนแก่น สำเร็จการศึกษาปริญญาตรีวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาจุลชีววิทยา ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ในปีการศึกษา 2543 และเข้ารับการศึกษาต่อในระดับปริญญามหาบัณฑิต สาขาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2543

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย