

ความสามารถของแบคทีเรียที่คัดแยกได้ในการย่อยสลายแอนทราซีน
และพอลิไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนชนิดอื่น



น.ส.พจนีย์ จันทมาลี

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา


คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2543

ISBN 974-346-542-1

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ABILITY OF ISOLATED BACTERIA IN DEGRADING OF ANTHRACENE
AND OTHER POLYCYCLIC AROMATIC HYDROCARBONS



Miss Poatchanee Chanthamalee

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 2000

ISBN 974-346-542-1

หัวข้อวิทยานิพนธ์	ความสามารถของแบคทีเรียที่คัดแยกได้ในการย่อยสลายแอนทราซีน และพอลิไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนชนิดอื่น
โดย	น.ส.พจนีย์ จันทมาลี
ภาควิชา	จุลชีววิทยา
อาจารย์ที่ปรึกษา	รองศาสตราจารย์ ดร.กาญจนา จันทองจีน
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม (ถ้ามี)	-

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้หัวข้อวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่ง
ของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

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

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุเทพ ธีรียวัน)

.....อาจารย์ที่ปรึกษา
(รองศาสตราจารย์ ดร.กาญจนา จันทองจีน)

.....กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.ไพเราะ ปิ่นพานิชการ)

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

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

พจนีย์ จันทมาลี : ความสามารถของแบคทีเรียที่คัดแยกได้ในการย่อยสลายแอนทราซีนและพอลิไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนชนิดอื่น (ABILITY OF ISOLATED BACTERIA IN DEGRADING OF ANTHRACENE AND OTHER POLYCYCLIC AROMATIC HYDROCARBONS) อ. ที่ปรึกษา : รศ.ดร. กาญจนา จันทองจีน, 164 หน้า. ISBN 974-346-542-1.

แบคทีเรียสายพันธุ์ ANT1 ซึ่งคัดแยกได้จากตัวอย่างดินที่ปนเปื้อนด้วยน้ำมันเครื่อง สามารถย่อยสลายแอนทราซีนเพื่อใช้เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงานได้ จากการจำแนกชนิดโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและสรีรวิทยาพร้อมกับผลการวิเคราะห์ลำดับเบสของ 16 เอส-ไรโบโซมัลดีเอ็นเอ บ่งชี้ว่าจัดอยู่ในสกุล *Sphingomonas* และให้ชื่อว่า *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ ANT1 เชื้อแบคทีเรียนี้สามารถย่อยสลายพอลิไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนอื่นได้อีกหลายชนิด คือ ไดเบนโซฟูแรน ฟลูออรีน แนพทาซีน พีแนนทริน โดยพบการเปลี่ยนแปลงสีของอาหารเหลวที่มีสารประกอบเหล่านี้ภายใน 24 ชั่วโมงหลังการเลี้ยงเชื้อ *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ ANT1 เพิ่มจำนวนได้สูงสุดในอาหาร-เหลวที่มีพีแนนทริน 100 มก.ต่อลิตร ทำให้พีแนนทรินมีปริมาณลดลงเหลือในปริมาณที่ไม่สามารถตรวจวัดได้ด้วยไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโตกราฟีหลังการเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ส่วนอาหารเหลวที่มีไดเบนโซฟูแรนเข้มข้น 300 มก.ต่อลิตร แบคทีเรียสายพันธุ์นี้สามารถทำให้ไดเบนโซฟูแรนลดลงเหลือ 146.78 มก.ต่อลิตรภายหลังการเลี้ยงเชื้อ 7 วัน ในการเลี้ยงแบคทีเรียในอาหารเหลวที่มีแอนทราซีนพบว่าแบคทีเรียนี้มีอัตราการเจริญลดลงภายหลัง 48 ชั่วโมง จากการวิเคราะห์ด้วยโครมาโตกราฟีแบบแผ่นบาง (analytical TLC) พบว่ามีการสะสมของสารมัธยันต์ปริมาณมากที่สุดในวันที่ 3 ของการเลี้ยงเชื้อ จึงได้สกัดแยกสารมัธยันต์ด้วยเอทิลอะซิเตตและทำให้สารบริสุทธิ์ขึ้นโดยใช้โครมาโตกราฟีแบบแผ่นบางชนิดเตรียมสาร (preparative TLC) แล้วนำมาพิสูจน์เอกลักษณ์โดยการวิเคราะห์แมสสเปกตรัมและสเปกตรัมของโปรตอนเอ็นเอ็มอาร์ พบว่าสารชนิดนี้คือ กรด 2-ไฮดรอกซี-3-แนพโทอิก เมื่อทดสอบความเป็นพิษของสารมัธยันต์นี้เปรียบเทียบกับสารมาตรฐานกรด 2-ไฮดรอกซี-3-แนพโทอิก พบว่าสารมาตรฐานและสารมัธยันต์ให้ผลทดสอบเช่นเดียวกันคือมีผลยับยั้งการเพิ่มจำนวนของตัวเชื้อเองและ *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 แต่มีผลน้อยมากต่อรูปแบบการเจริญของ *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ P2 ซึ่งเป็น *Sphingomonas* ที่แยกได้จากแหล่งต่างกัน นอกจากนี้เมื่อเลี้ยงเชื้อในภาวะที่เติมฟลูออรีนก็ทำให้เซลล์ที่มีชีวิตของแบคทีเรียนี้ลดจำนวนลงเช่นเดียวกัน จากการสกัดแยกสารมัธยันต์ที่เกิดขึ้นและทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีโครมาโตกราฟีแบบแผ่นบางชนิดเตรียมสาร พบว่าสารมัธยันต์ที่สร้างขึ้นนี้มีผลยับยั้งการเพิ่มจำนวนของตัวเชื้อเอง

ภาควิชา จุลชีววิทยา

ลายมือชื่อนิสิต.....

สาขาวิชา จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....

ปีการศึกษา 2543

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

4072322023 : MAJOR INDUSTRIAL MICROBIOLOGY

KEY WORD : ANTHRACENE / BIOREMEDIATION / *Sphingomonas* sp. / DEAD – END METABOLITE

POATCHANEE CHANTHAMALEE : ABILITY OF ISOLATED BACTERIA IN DEGRADING OF ANTHRACENE AND OTHER POLYCYCLIC AROMATIC HYDROCARBONS. THESIS

ADVISOR :ASSOC. PROF. KANCHANA JUNTONGJIN, Ph. D. 164 pp. ISBN 974-346-542-1.

A bacterial strain ANT1 isolated from a lubricant-contaminated soil was able to utilize anthracene as a sole carbon and energy source. The strain was classified as *Sphingomonas* sp. via its morphological and biochemical characteristics including 16S rDNA gene sequencing and was designated as *Sphingomonas* sp. ANT1. Apart from anthracene, this strain was able to degrade a wide range of PAHs including dibenzofuran, fluorene, naphthalene and phenanthrene. The maximum growth rate was obtained when grown with phenanthrene as a substrate in which rapid degradation from 100 mg/l down to undetectable amount by HPLC analysis was observed within 24 h of cultivation. When the organism was grown in the presence of dibenzofuran at 300 mg/l, about 146 mg/l was degraded after 7 days of cultivation. After 48 h of culturing, a dead-end metabolite was formed and caused a decline in cell growth when anthracene was used as a substrate. Maximum amount of the metabolite produced by the third-day cultivation was further isolated, purified and identified by mass-spectrometry and proton nuclear magnetic resonance spectral analyses to be 2-hydroxy-3-naphthoic acid. This compound and the authentic 2-hydroxy –3-naphthoic acid were found to similarly inhibit the growth of both itself and *Rhizobium* sp. CU-A1 but not *Sphingomonas* sp. strain P2 which was isolated from another source. Formation of dead-end metabolites causing cellular decrease were also observed in the broth culture containing fluorene as a growth substrate. One major metabolite detected was isolated by preparative TLC. Inhibitory effect to the growth of itself was also demonstrated.

Department Microbiology

Field of study Industrial Microbiology

Academic year 2000

Student's signature

Advisor's signature

Co-advisor's signature.....

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จไปได้ด้วยดีด้วยความช่วยเหลืออย่างดียิ่งของรองศาสตราจารย์ ดร.กาญจนา จันทองจีน อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ที่ได้กรุณาช่วยตรวจแก้ต้นฉบับวิทยานิพนธ์ ให้ความรู้ คำแนะนำ และข้อคิดเห็นต่าง ๆ รวมทั้งช่วยจำแนกชนิดของแบคทีเรียที่ใช้ในงานวิจัยนี้ ด้วยวิธี 16 เอส ไรโบโซมัล ดีเอ็นเอ โดยทำวิจัยที่ Biotechnology Research Center. The University of Tokyo. ซึ่งผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้

ขอกราบขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุเทพ ธานีวัน ที่กรุณารับเป็นประธาน กรรมการในการสอบและให้ความรู้ ตลอดจนคำแนะนำต่าง ๆ แก่ผู้วิจัยตลอดระยะเวลาการศึกษา

ขอกราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร.ไพเราะ ปิ่นพานิชกร และอาจารย์ ดร.กอบชัย ภัทรกุลวณิชย์ ที่กรุณารับเป็นคณะกรรมการในการสอบ ให้ความรู้ คำแนะนำต่าง ๆ ตลอดจนช่วยแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอกราบขอบพระคุณอาจารย์ ดร.สุจิตา รัฟเพิร์ธ ที่ให้ความรู้ ข้อคิดเห็น และคำแนะนำต่าง ๆ แก่ผู้วิจัยในช่วงต้นของการศึกษา

ขอขอบพระคุณสำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ (สวทช) ที่ให้ทุน บัณฑิตศึกษาภายในประเทศระหว่างปีการศึกษา 2540 – 2541

กราบขอบพระคุณอาจารย์ทุกท่านในภาควิชาจุลชีววิทยา และขอขอบคุณอาจารย์อรุณทัย ภิญญาคง ที่ช่วยพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารมัธยันต์ที่ประเทศญี่ปุ่น ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ในภาค วิชาจุลชีววิทยาทุกท่าน ตลอดจนพี่ ๆ เพื่อน ๆ และน้อง ๆ ทุกคนที่มีส่วนช่วยเหลือและให้กำลังใจ ตลอดมา

สุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดา ซึ่งสนับสนุนในด้านการเงินและให้กำลังใจแก่ผู้วิจัยเสมอมาจนสำเร็จการศึกษา

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ

เรื่อง	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ซ
สารบัญรูป.....	ญ
สัญลักษณ์และคำย่อ.....	ท
บทที่	
1. บทนำ.....	1
2. วารสารปริทัศน์.....	4
3. อุปกรณ์และวิธีดำเนินงานวิจัย.....	39
4. ผลการทดลอง.....	54
5. สรุปและอภิปรายผลการทดลอง.....	113
6. ข้อเสนอแนะในการวิจัย.....	126
รายการอ้างอิง.....	128
ภาคผนวก	
ภาคผนวก ก.....	141
ภาคผนวก ข.....	143
ภาคผนวก ค.....	146
ภาคผนวก ง.....	154
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....	164

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
2.1 เปอร์เซ็นต์การแพร่กระจายของแอนทราซีนในสิ่งแวดล้อม.....	8
2.2 ปริมาณแอนทราซีนที่ปนเปื้อนในน้ำดื่มจากแหล่งต่าง ๆ	11
2.3 ปริมาณแอนทราซีนที่ปนเปื้อนในแหล่งน้ำผิวดิน.....	12
2.4 ปริมาณแอนทราซีนที่แพร่กระจายอยู่ในอากาศ.....	14
2.5 ระดับปริมาณสูงสุดของแอนทราซีน และ PAHs บางชนิดที่พบในร่างกายมนุษย์ ซึ่งอยู่ในระดับที่ยอมรับได้.....	21
2.6 ชนิดของแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายแอนทราซีนได้.....	25
2.7 ชนิดของราที่สามารถย่อยสลายแอนทราซีนได้.....	26
2.8 ชนิดของราที่สามารถย่อยสลายแอนทราซีน 0.1 กรัมต่อลิตร ได้มากกว่า 50 % โดย จำแนกตามสกุล.....	27
3.1 แหล่งที่มาของตัวอย่างดินที่ใช้ในการคัดแยกแบคทีเรียที่ย่อยสลายแอนทราซีน.....	42
4.1 ผลการเพิ่มจำนวนแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายแอนทราซีนในแต่ละตัวอย่างดิน หลังการถ่ายเชื้อ 5 ครั้งติดต่อกัน.....	54
4.2 ลักษณะโคโลนีของแบคทีเรีย 3 สายพันธุ์ที่คัดแยกได้จากตัวอย่างดินที่ 4.....	56
4.3 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียสายพันธุ์ ANT1.....	57
4.4 ลักษณะทางสรีรวิทยาของแบคทีเรียสายพันธุ์ ANT1.....	59
4.5 ผลการเปลี่ยนสีอาหารเหลว CFMM ที่มีสารทดสอบแต่ละชนิดในการเลี้ยงเชื้อ <i>Sphingomonas</i> sp. สายพันธุ์ ANT1.....	64
4.6 ค่า retention time ของสารมัธยันต์ที่เกิดจากการย่อยสลายแอนทราซีนเทียบกับสาร มาตรฐานกรด 2-ไฮดรอกซี-3-แนฟโธอิก.....	101
5.1 รายงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายสารประกอบอะโรมาติกของแบคทีเรียในสกุล <i>Sphingomonas</i>	114
5.2 ผลการเจริญโดยการย่อยสลาย PAHs แต่ละชนิดของแบคทีเรียสายพันธุ์ ANT1.....	116
5.3 ชนิดของแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายแอนทราซีนไปเป็นกรด 2-ไฮดรอกซี-3-แนฟโธอิก.....	123
ง.1 ปริมาณ PAHs ในอาหารชนิดต่าง ๆ	154
ง.2 ปริมาณแอนทราซีนและ PAHs ชนิดอื่น ๆ ในเนื้อสัตว์ที่ทำให้สุกด้วยการย่าง.....	155

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่

หน้า

ง.3 ชนิดของ PAHs ที่มีความเป็นพิษเพิ่มขึ้นเมื่อถูกแสง และชนิดของ PAHs ที่แสงไม่มีผลเพิ่มความเป็นพิษ..... 159

ง.4 ปริมาณกากของเสียอันตรายในเขตกรุงเทพมหานครและปริมาณมลพิษระหว่างปี พ.ศ. 2532-2536.....160



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
2.1 โครงสร้างโมเลกุลของ PAHs ทั้ง 16 ชนิดตามรายงานของ U.S. EPA.....	5
2.2 โครงสร้างโมเลกุลของแอนทราซีน.....	6
2.3 โครงสร้างทางเคมีของสารก่อมะเร็งที่เป็นอนุพันธ์ของแอนทราซีน.....	15
2.4 การแปรสภาพของสารก่อมะเร็งไปเป็นสารอนุพันธ์.....	16
2.5 โครงสร้างของแอนทราซีน 9,10-ไดเมทิลแอนทราซีน และแอนทราลิน.....	20
2.6 การแตกวงแคทรีคอลแบบออกโธและแบบเมตา.....	24
2.7 วิธีเมตาบอลิสมที่ <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ใช้ในการย่อยสลายแอนทราซีน.....	29
2.8 ตำแหน่งที่มีความหนาแน่นอิเล็กตรอนสูงสุดในโครงสร้างโมเลกุลของแอนทราซีน ฟีแนนทรีน และแนพทาลีน.....	30
2.9 วิธีเมตาบอลิสมในการย่อยสลายแอนทราซีนโดย <i>Sphingomonas yanoikuyae</i> B1.....	31
2.10 กระบวนการย่อยสลายแอนทราซีนโดย <i>Phanerochaete chrysosporium</i>	33
4.1 ลักษณะโคโลนีของแบคทีเรียสายพันธุ์ ANT1 บนอาหารแข็ง LB.....	57
4.2 ลักษณะรูปร่างของแบคทีเรียสายพันธุ์ ANT1 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์.....	58
4.3 ลักษณะเซลล์ของแบคทีเรียสายพันธุ์ ANT1 ที่ต่อกันเป็นสายยาว.....	58
4.4 ลำดับเบสของ 16 เอสโรโบไซม์ดีเอ็นเอของแบคทีเรียสายพันธุ์ ANT1.....	60
4.5 ลักษณะของอาหารเหลว CFMM ที่มีไดเบนโซฟูแรน แอนทราซีน และฟลูออรีนเป็นแหล่ง คาร์บอนในการเลี้ยงเชื้อ <i>Sphingomonas</i> sp. สายพันธุ์ ANT1 เป็นเวลา 3 วัน.....	62
4.6 ลักษณะของอาหารเหลว CFMM ในการเลี้ยงเชื้อ <i>Sphingomonas</i> sp. สายพันธุ์ ANT1 เป็นเวลา 7 วัน เมื่อมีฟลูออแรนีนเป็นแหล่งคาร์บอน และ 3 วันในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ เติมแนพทาลีนและฟีแนนทรีน.....	63
4.7 ลักษณะของอาหารเหลว CFMM ที่มีอะซีแนพทาลีน อะซีแนพทรีน และไพรีนเป็นแหล่ง คาร์บอนในการเลี้ยงเชื้อ <i>Sphingomonas</i> sp. สายพันธุ์ ANT1 เป็นเวลา 7 วัน.....	63
4.8 ลักษณะของอาหารเหลว CFMM ที่มีสารทดสอบแต่ละชนิดหลังการเลี้ยงเชื้อ <i>Sphingomonas</i> sp. สายพันธุ์ ANT1 เป็นเวลา 7 วัน.....	65
4.9 ลักษณะของอาหารเหลว CFMM ในการเลี้ยงเชื้อ <i>Sphingomonas</i> sp. สายพันธุ์ ANT1 ที่ระยะเวลา 1-7 วันโดยมีแอนทราซีนเป็นสารทดสอบ.....	66

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่

หน้า

- 4.10 รูปแบบการเพิ่มจำนวนและปริมาณแอนทราซีนที่เหลืออยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ CFMM ของ *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ ANT1 ในระยะเวลา 1-7 วัน.....67
- 4.11 ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณแอนทราซีนและจำนวนเซลล์ *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ ANT1 กับปริมาณของสารมัธยันต์ที่เกิดขึ้นจากการย่อยสลายแอนทราซีน.....68
- 4.12 โคโรมาโตแกรมการวิเคราะห์ HPLC ในการหาปริมาณแอนทราซีนและสารมัธยันต์ที่เกิดจากการย่อยสลายแอนทราซีนโดย *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ ANT1.....70
- 4.13 ลักษณะของอาหารเหลว CFMM ที่มีฟลูออรีนเข้มข้น 0.1 มก.ต่อมล. ในการเลี้ยงเชื้อ *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ ANT1 ที่ระยะเวลา 1-7 วัน.....71
- 4.14 รูปแบบการเพิ่มจำนวนและปริมาณฟลูออรีนที่เหลือจากการย่อยสลายของ *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ ANT1 หลังการเลี้ยงเชื้อที่เวลาต่าง ๆ.....72
- 4.15 โคโรมาโตแกรมการวิเคราะห์ HPLC ในการหาปริมาณฟลูออรีนและสารมัธยันต์ที่เกิดจากการย่อยสลายแอนทราซีนของ *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ ANT173
- 4.16 ลักษณะของอาหารเหลว CFMM ที่เกิดจากการย่อยสลายฟลูออรีนเข้มข้น 0.1 มก.ต่อมล. ของ *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ ANT1 ในการเลี้ยงเชื้อที่ระยะเวลา 1-7 วัน.....75
- 4.17 รูปแบบการเพิ่มจำนวนและปริมาณพีแนนทรีนที่เหลือจากการย่อยสลายของ *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ ANT1 ในการเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 7 วัน.....76
- 4.18 โคโรมาโตแกรมการวิเคราะห์ HPLC ในการหาปริมาณพีแนนทรีนและสารมัธยันต์ที่เกิดจากการย่อยสลายพีแนนทรีนโดย *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ ANT1.....77
- 4.19 ลักษณะของอาหารเหลว CFMM ที่เกิดจากการย่อยสลายไดเบนโซฟูแรนโดย *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ ANT1 ในการเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 7 วัน.....79
- 4.20 รูปแบบการเพิ่มจำนวนและปริมาณไดเบนโซฟูแรนที่เหลือจากการย่อยสลายโดย *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ ANT1 ในการเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 7 วัน.....80
- 4.21 โคโรมาโตแกรมจากการวิเคราะห์ HPLC ในการหาปริมาณไดเบนโซฟูแรนและสารมัธยันต์ที่เกิดจากการย่อยสลายไดเบนโซฟูแรนโดย *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ ANT1.....81
- 4.22 ลักษณะของอาหารเหลว CFMM ที่เกิดจากการย่อยสลายแนพธาซีนโดย *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ ANT1 ในวันที่ 3 ของการเลี้ยงเชื้อ.....83
- 4.23 ปริมาณแนพธาซีนที่ถูกย่อยสลายโดย *Sphingomonas* sp. ANT1.....84

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่

หน้า

- 4.24 โคโรมาโตแกรมจากการวิเคราะห์ HPLC ในการหาปริมาณแนพธาลีนและสารมัธยันต์
ที่เกิดจากการย่อยสลายแนพธาลีนโดย *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ ANT1.....85
- 4.25 โคโรมาโตแกรมจากการวิเคราะห์ปริมาณแนพธาลีนด้วย HPLC ในชุดควบคุมที่ระยะเวลา
เวลาต่าง ๆ ของการทดลอง.....86
- 4.26 ลักษณะของอาหารเหลว CFMM ที่เกิดจากการย่อยสลายแอนทราซีนผสมกับพีแนนทรีน
ความเข้มข้นสารละ 0.1 มก.ต่อมล.โดย *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ ANT1 ในการ
เชื้อเป็นเวลา 7 วัน.....88
- 4.27 รูปแบบการเพิ่มจำนวน รวมทั้งปริมาณแอนทราซีนและพีแนนทรีนที่เหลือจากการย่อย
สลายของ *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ ANT1 ในการเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 7 วัน.....89
- 4.28 โคโรมาโตแกรมจากการวิเคราะห์ปริมาณแอนทราซีนและพีแนนทรีนรวมทั้งสารมัธยันต์
ที่เกิดจากการย่อยสลายสารทดสอบทั้งสองชนิดด้วย HPLC.....90
- 4.29 โคโรมาโตแกรม TLC แสดงการวิเคราะห์สารมัธยันต์ที่เกิดจากการย่อยสลายแอนทราซีน
โดย *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ ANT1.....92
- 4.30 ลักษณะของอาหารเหลว CFMM ที่เติมแอนทราซีน 0.1 มก.ต่อมล.หลังการเลี้ยงเชื้อ
Sphingomonas sp. สายพันธุ์ ANT1 เป็นเวลา 3 วันก่อนที่จะนำมาสกัดสารมัธยันต์.....94
- 4.31 โคโรมาโตแกรมจากการวิเคราะห์ TLC แสดงการเปรียบเทียบปริมาณสารมัธยันต์ที่เกิด
จากการย่อยสลายแอนทราซีนซึ่งสะสมอยู่ใน (2) ส่วนสกัดที่เป็นกลาง และ (3) ส่วนสกัด
ที่เป็นกรดเทียบกับ (1) สารมาตรฐานแอนทราซีน.....94
- 4.32 (ก) โคโรมาโตแกรม TLC และ (ข) โคโรมาโตแกรม HPLC ของสารมัธยันต์ที่ผ่านการทำให้
บริสุทธิ์โดยวิธี Preparative TLC.....95
- 4.33 ¹H-NMR สเปกตรัมของสารมัธยันต์ที่เกิดจากการย่อยสลายแอนทราซีนโดย (ก) แบคทีเรีย
สายพันธุ์ ANT1 เปรียบเทียบกับ (ข) สารมาตรฐานกรด 2-ไฮดรอกซี-3-แนพโทอิก.....97
- 4.34 (ก) โคโรมาโตแกรมของไอออนทั้งหมดที่เกิดการแตกตัว และ (ข) แมสสเปกตรัมของสาร
มัธยันต์ที่เกิดจากการย่อยสลายแอนทราซีนโดย *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ ANT1..99
- 4.35 (ก) โคโรมาโตแกรมของไอออนทั้งหมดที่เกิดการแตกตัว และ(ข)แมสสเปกตรัมของสาร
สารมาตรฐานกรด 2-ไฮดรอกซี-3-แนพโทอิก.....100
- 4.36 ผลของกรด 2-ไฮดรอกซี-3-แนพโทอิกที่สกัดได้จากการย่อยสลายแอนทราซีนเทียบกับสาร
มาตรฐานของกรด 2-ไฮดรอกซี-3-แนพโทอิกต่อการเจริญของแบคทีเรียสายพันธุ์ANT1..103

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่

หน้า

4.37	ผลของสารมัยยัคส์ที่สกัดได้จากการย่อยสลายแอนทราซีนเทียบกับสารมาตรฐานกรด 2-ไฮดรอกซี-3-แนฟโธอิกต่อการเจริญของ <i>Rhizobium</i> sp. สายพันธุ์ Cu-A1.....	104
4.38	ผลของกรด 2-ไฮดรอกซี-3-แนฟโธอิกที่สกัดได้จากการย่อยสลายแอนทราซีนเทียบกับสารมาตรฐานของกรดนี้ ต่อการเจริญของ <i>Sphingomonas</i> sp. สายพันธุ์ P2.....	105
4.39	โครมาโตแกรมของการวิเคราะห์สารมัยยัคส์ที่เกิดจากการย่อยสลายฟลูออรีนด้วย TLC	107
4.40	ลักษณะของอาหารเหลว CFMM ที่เกิดจากการย่อยสลายฟลูออรีนโดยแบคทีเรียสายพันธุ์ ANT1 ใน (ก)วันที่ 2 และ (ข) วันที่ 5 ของการเลี้ยงเชื้อ.....	108
4.41	โครมาโตแกรมการวิเคราะห์ TLC แสดงการเปรียบเทียบปริมาณของสารมัยยัคส์ที่เกิดจากการย่อยสลายฟลูออรีนโดย <i>Sphingomonas</i> sp. สายพันธุ์ ANT1.....	109
4.42	โครมาโตแกรม TLC ของสารมัยยัคส์ที่เกิดจากการย่อยสลายฟลูออรีน ซึ่งสารนี้ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี preparative TLC.....	110
4.43	ผลของสารมัยยัคส์ที่สกัดได้จากการย่อยสลายฟลูออรีนต่อการเจริญของ <i>Sphingomonas</i> sp. สายพันธุ์ ANT1.....	111
5.1	วิธีการย่อยสลายฟลูออรีนของ <i>Arthrobacter</i> sp. สายพันธุ์ F101.....	122
5.2	วิธีเมตาบอลิซึมที่แบคทีเรียส่วนใหญ่ใช้ในการย่อยสลายแอนทราซีน.....	123
ค.1	กราฟมาตรฐานระหว่างปริมาณแอนทราซีนกับพื้นที่ใต้กราฟที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC.....	146
ค.2	กราฟมาตรฐานระหว่างปริมาณไดเบนไซฟูแรนกับพื้นที่ใต้กราฟที่ได้จากการวิเคราะห์วิธี HPLC.....	147
ค.3	กราฟมาตรฐานระหว่างปริมาณฟีแนนทรีนกับพื้นที่ใต้กราฟที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC.....	148
ค.4	กราฟมาตรฐานระหว่างปริมาณฟลูออรีนกับพื้นที่ใต้กราฟที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC.....	149
ค.5	กราฟมาตรฐานระหว่างปริมาณแนพธาซีนกับพื้นที่ใต้กราฟที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC.....	150
ค.6	กราฟมาตรฐานระหว่างปริมาณกรด 2-ไฮดรอกซี-3-แนฟโธอิกกับพื้นที่ใต้กราฟที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC.....	151

สัญลักษณ์และคำย่อ

กก.	=	กิโลกรัม
ลบ.ม.	=	ลูกบาศก์เมตร
มก.	=	มิลลิกรัม
มล.	=	มิลลิลิตร
°ซ	=	องศาเซลเซียส
%	=	เปอร์เซ็นต์
m/z	=	มวลต่อประจุ
ppm	=	หนึ่งส่วนในล้านส่วน (part per million)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 1

บทนำ

ในปัจจุบันผลกระทบจากสิ่งแวดล้อมเป็นพิษได้แพร่ขยายมากขึ้น เนื่องมาจากการขยายตัวของการผลิตในภาคอุตสาหกรรมเพื่อตอบสนองต่อความต้องการของประชากรโลกที่เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว ประเทศไทยก็ประสบปัญหาดังกล่าวเนื่องจากการนำสารเคมีเข้ามาใช้ประโยชน์ในการพัฒนาด้านการเกษตร อุตสาหกรรม สาธารณสุข และอื่น ๆ มากขึ้นทั้งชนิดและปริมาณ โดยในปี พ.ศ.2537 ปริมาณนำเข้าสารเคมีทั้งที่เป็นสารอินทรีย์และสารอนินทรีย์มีจำนวนสูงถึง 2.2 ล้านตัน คิดเป็นมูลค่าประมาณ 8,615 ล้านบาท (สำนักนโยบายและวางแผนสิ่งแวดล้อม, 2537) สารเคมีดังกล่าวบางชนิดเป็นสารที่มีพิษอันตรายซึ่งเมื่อนำมาใช้อย่างไม่ถูกต้อง ขาดการควบคุม การจัดการให้ครบวงจรตั้งแต่การนำเข้า การส่งออก การผลิต การจำหน่าย การเก็บรักษา การขนส่ง การใช้และการกำจัดกากของเสียแล้ว ทำให้มีสารพิษแพร่กระจายออกสู่สิ่งแวดล้อม สารเคมีนี้จะสะสมในเนื้อเยื่อของสิ่งมีชีวิตโดยผ่านทางห่วงโซ่อาหาร การหายใจและการสัมผัสที่ผิวหนัง และจะเกิดผลกระทบรุนแรงมากถ้าถ่ายเทเข้าสู่มนุษย์ซึ่งเป็นผู้บริโภคขั้นสุดท้าย

จากการศึกษาปริมาณกากของเสียอันตรายที่เกิดจากทุกกิจการทั่วประเทศไทย พบว่าในปี พ.ศ. 2534 ประเทศไทยมีกากของเสียอันตรายที่แยกตามกลุ่มแหล่งกำเนิดเกิดขึ้น 0.93 ล้านตัน เพิ่มขึ้นเป็น 1.6 ล้านตันในปี พ.ศ. 2539 และคาดว่าในปี พ.ศ. 2544 จะมีของเสียอันตรายเกิดขึ้นประมาณ 2.8 ล้านตัน โดยในจำนวนนี้เป็นของเสียอันตรายจากกิจการปิโตรเลียม 11,813 ตันต่อปี (บุญยงค์ โล่ห้วงศ์วัฒน์, 2540)

การบำบัดโดยการย่อยสลายทางชีวภาพ (bioremediation) เป็นวิธีการนำสิ่งมีชีวิตรวมถึงจุลินทรีย์มาใช้ประโยชน์ในการย่อยสลายสารพิษอันตรายในสิ่งแวดล้อมให้ความเป็นพิษลดลงหรือหมดไปเนื่องจากถูกย่อยสลายและเปลี่ยนโครงสร้างไป วิธีการนี้มีประสิทธิภาพในการบำบัดดินและแหล่งน้ำที่ปนเปื้อนจากสารอันตรายหลายชนิด ซึ่งได้เปรียบกว่าวิธีบำบัดทางเคมีหรือวิธีการเผา เนื่องจากไม่ก่อให้เกิดสารพิษชนิดใหม่ จึงปลอดภัยต่อสิ่งแวดล้อมและมีค่าใช้จ่ายต่ำ ในขณะที่การใช้วิธีกลหรือเคมีไม่สามารถกำจัดสารพิษตกค้างได้หมด และยังคงต้องเสียค่าใช้จ่ายสูงอีกด้วย (Wilson and Jones, 1993) การย่อยสลายทางชีวภาพมีประสิทธิภาพสูงในการบำบัดการปนเปื้อนของสารอันตรายในสิ่งแวดล้อม เนื่องจากจุลินทรีย์สามารถใช้สารประกอบอินทรีย์ในกลุ่มนี้เป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงานได้ โดยการย่อยสลายสารพิษดังกล่าวไปเป็นน้ำและคาร์บอนไดออกไซด์ (Baker and Herson, 1994)

ในปัจจุบันประเทศต่าง ๆ ทั่วโลกต่างให้ความสำคัญกับปัญหาสิ่งแวดล้อมที่เกิดจากการปนเปื้อนของสารพิษในดิน น้ำ และอากาศ ดังจะเห็นได้จากการกำหนด ISO 14000 ซึ่งเป็นมาตรฐานระบบการจัดการสิ่งแวดล้อม ครอบคลุมตั้งแต่การออกแบบ การตลาด การผลิต และการบริการ ซึ่งกลายเป็นเงื่อนไขทางการค้าด้วยเหตุผลเพื่อการอนุรักษ์สิ่งแวดล้อม (บุญยงค์ โล่ห้วงศ์วัฒน์, 2540) หากผู้ประกอบการส่วนใหญ่ในประเทศไทยได้รับการรับรอง ISO 14000 จะเป็นการยกระดับมาตรฐานสิ่งแวดล้อมของประเทศ และป้องกันประเทศอื่นนำเงื่อนไขสิ่งแวดล้อมมาเป็นข้ออ้างเพื่อการกีดกันทางการค้า แต่ปัญหาที่พบในปัจจุบันคือยังขาดบุคลากรที่มีทั้งความรู้และความชำนาญในด้านการแก้ไขสิ่งแวดล้อมที่ปนเปื้อนด้วยสารพิษถึงแม้ว่าในต่างประเทศจะมีการวิจัยและนำเทคนิคการบำบัดด้วยวิธีชีวภาพมาใช้ในภาคปฏิบัติแล้วก็ตาม การนำเทคนิคบำบัดสิ่งแวดล้อมที่ปนเปื้อนด้วยวิธีชีวภาพมาใช้โดยการใช้จุลินทรีย์อย่างมีแบบแผน จะนำไปสู่ประสิทธิภาพในการบำบัดที่ดี (Claxton *et al.* , 1991) อีกปัญหาหนึ่งก็คือเชื้อจากต่างประเทศที่มีประสิทธิภาพสูงในการลดปริมาณสารพิษต่าง ๆ ในดินเมื่อนำมาบำบัดดินที่ปนเปื้อนต่างท้องถิ่นอาจให้ผลในการบำบัดไม่ดีเท่าที่ควร เนื่องจากข้อจำกัดเรื่องสภาวะแวดล้อมที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อ

แอนทราซีน (anthracene) เป็นสารประกอบอินทรีย์ชนิดหนึ่งในกลุ่มพอลิไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน (Polycyclic Aromatic Hydrocarbons, PAHs) มีโครงสร้างทางเคมีประกอบด้วยวงเบนซีน 3 วงเชื่อมต่อกันเป็นเส้นตรง พบเป็นองค์ประกอบหลักในผลิตภัณฑ์ถนอมรักษาเนื้อไม้ (11 % โดยน้ำหนักของสาร PAHs ทั้งหมด) (Mueller *et al.* , 1989) และเป็นองค์ประกอบส่วนน้อยในน้ำมันดีเซล (100 – 300 มก.ต่อลิตร) ดินที่ปนเปื้อนด้วยน้ำมันหรือผลิตภัณฑ์ถนอมรักษาเนื้อไม้ก่อให้เกิดทั้งปัญหาสิ่งแวดล้อมและปัญหาต่อสุขภาพของมนุษย์ เพราะสารประกอบหลายชนิดในน้ำมันมีสมบัติในการก่อให้เกิดมะเร็ง และการเปลี่ยนแปลงของยีน (Tongpim and Pickard, 1996) ถึงแม้ว่าแอนทราซีนจะไม่มีสมบัติในการเป็นสารก่อมะเร็ง แต่มักจะใช้เป็นสารควบคุมในการทดสอบการก่อกลายพันธุ์ของสารในหลอดทดลอง โดยแอนทราซีนให้ผลลบในการทดสอบ ในขณะที่เมื่อเติมหมู่เมทิลที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 9 และ 10 ในโครงสร้างของสารแอนทราซีนจะเกิดสารอนุพันธ์คือ 9,10-ไดเมทิลแอนทราซีน (9,10-dimethylanthracene) ที่มีสมบัติเป็นสารก่อมะเร็งอย่างอ่อน (LaVoie and Rice, 1988) นอกจากนี้แอนทราซีนยังเป็นโครงสร้างพื้นฐานของ PAHs ที่เป็นสารก่อมะเร็งหลายชนิด เช่น เบนโซ[เอ]แอนทราซีน (benzo[a]anthracene) , เบนโซ[เอ]ไพรีน (benzo[a]pyrene) และ ไดเบนซี [เอ,เอช]แอนทราซีน (dibenz[a,h]anthracene) การนำแอนทราซีนมาใช้ในอุตสาหกรรมหลายชนิดทำให้เกิดการแพร่กระจายของสารดังกล่าวในสิ่งแวดล้อม ดังนั้นจึงควรมีการวิจัยเพื่อคัดแยกจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพสูงในการย่อยสลายแอนทราซีนจากแหล่งดินภายในประเทศ รวมทั้งศึกษา

ถึงความเป็นไปได้และข้อจำกัดต่าง ๆ ก่อนที่จะนำไปใช้บำบัดในพื้นที่ปนเปื้อน และเนื่องจากข้อกำหนด ISO 14000 งานวิจัยดังกล่าวจะตอบสนองต่อความต้องการของภาคอุตสาหกรรมในอนาคต

วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

คัดแยกแบคทีเรียที่มีความสามารถสูงในการย่อยสลายแอนทราซีน และจำแนกชนิดของแบคทีเรียที่คัดแยกได้ ศึกษารูปแบบการเพิ่มจำนวนและความสามารถของแบคทีเรียสายพันธุ์ดังกล่าวในการย่อยสลายแอนทราซีน และ PAHs ชนิดอื่น สกัดแยกและพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารมัธยันต์ที่เกิดขึ้นจากการย่อยสลายของแอนทราซีน รวมทั้งทดสอบพิษของสารต่อการเจริญของแบคทีเรียที่คัดแยกได้และต่อแบคทีเรียชนิดอื่น

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ทราบข้อมูลเกี่ยวกับความสามารถของแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากแหล่งดินภายในประเทศไทยในการย่อยสลายแอนทราซีน และ PAHs ชนิดอื่น รวมทั้งวิธีการที่เหมาะสมในการคัดแยกและทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อ เพื่อนำมาใช้เป็นแนวทางในการบำบัดดินที่ปนเปื้อนสารพิษต่าง ๆ โดยเฉพาะ PAHs จากแหล่งอุตสาหกรรมภายในประเทศ

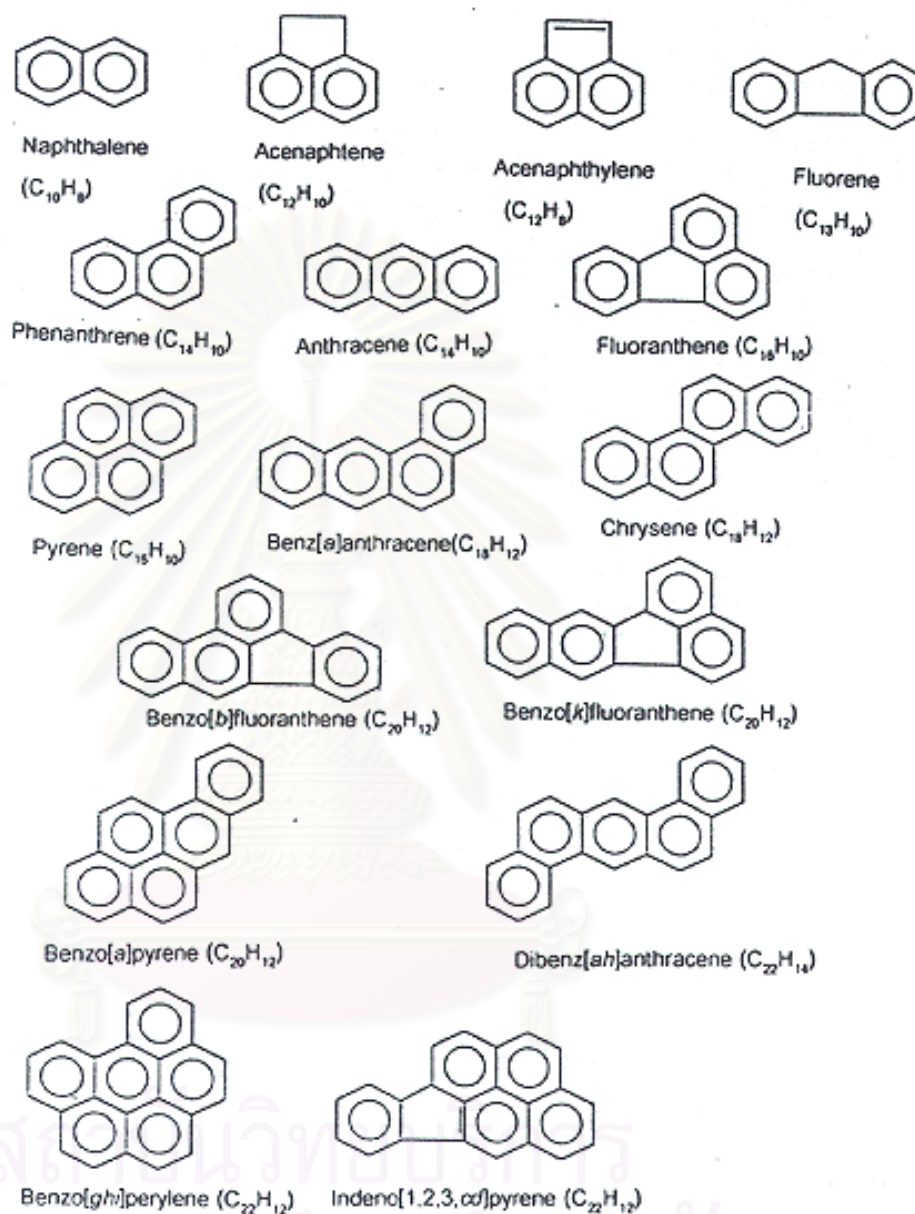
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 2

วารสารปริทัศน์

พอลิไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน (Polycyclic Aromatic Hydrocarbons, PAHs) เป็นสารประกอบอินทรีย์ชนิดหนึ่งที่เป็นองค์ประกอบหลักในน้ำมัน ประกอบด้วยคาร์บอนและไฮโดรเจนที่รวมกันเป็นอะโรมาติกเบนซีนหลายวงเชื่อมกันเป็นเส้นตรง มุมงอ หรือต่อกันเป็นกลุ่ม (Cerniglia *et al.*, 1992) การย่อยสลาย PAHs และคุณสมบัติในการละลายน้ำของสารจะยากขึ้นตามค่าความถ่วงจำเพาะที่เพิ่มขึ้น เนื่องจาก PAHs ที่มีมวลโมเลกุลสูงจะดูดซับน้ำได้ช้า PAHs มีอยู่ทั่วไปในสิ่งแวดล้อม และพบว่ามีความเข้มข้นสูงในแหล่งอุตสาหกรรมหลายประเภท โดยเฉพาะอุตสาหกรรมที่เกี่ยวข้องกับปิโตรเลียม การผลิตแก๊ส และในครีโอสท (creosote) ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ถนอมและรักษาเนื้อไม้ที่มี PAHs เป็นองค์ประกอบอยู่ถึง 85 % โดยน้ำหนัก การปนเปื้อนของ PAHs เกิดขึ้นในระหว่างกระบวนการผลิต การใช้ การขนส่ง และการกำจัดกากของเสียจากอุตสาหกรรมดังกล่าว นอกจากนี้จะเกิดขึ้นจากกิจกรรมของมนุษย์แล้ว PAHs ยังมีแหล่งที่มาจากธรรมชาติ เช่นเกิดจากไฟไหม้ป่า ภูเขาไฟระเบิด การรั่วซึมของน้ำมันที่เกิดขึ้นเองตามธรรมชาติ (Cerniglia *et al.*, 1992) การปนเปื้อนของสาร PAHs ในดินจะทำให้เกิดการสะสมของสารดังกล่าวในเนื้อเยื่อพืชและสัตว์ รวมไปถึงปนเปื้อนในแหล่งน้ำอันเนื่องมาจากการชะล้างจากแหล่งดินสู่แหล่งน้ำ Putcha และ Domach ได้รายงานในปี 1993 ถึงการสะสมของสาร PAHs ในสิ่งมีชีวิตซึ่งมีปริมาณสูงกว่าที่พบในแหล่งธรรมชาติหลายเท่า แสดงว่ามีการถ่ายทอดของสารดังกล่าวไปตามห่วงโซ่อาหาร และอาจส่งผลกระทบต่อมนุษย์ซึ่งเป็นผู้บริโภคขั้นสุดท้าย โดยเหตุที่สาร PAHs เป็นสารอันตรายร้ายแรงซึ่งก่อให้เกิดมะเร็ง (carcinogen) การเปลี่ยนแปลงของยีน (mutagen) และเกิดทารกในครรภ์ที่มีรูปวิปริต (teratogen) หน่วยงานคุ้มครองสิ่งแวดล้อมของประเทศสหรัฐอเมริกา (The U.S. Environmental Protection Agency, EPA) จึงกำหนดให้แอนทราซีนและสาร PAHs รวมทั้ง 16 ชนิด เป็นสารพิษที่ควรให้ความสำคัญในอันดับต้น ในอันที่จะป้องกันการปนเปื้อนของสารดังกล่าวในสิ่งแวดล้อม (องค์การอนามัยโลก, 1983 อ้างถึงโดย Wilson and Jones, 1993) สาร PAHs ทั้ง 16 ชนิดดังกล่าวได้แก่ แนพทาลีน (naphthalene), อะซีแนพทีน (acenaphthene), อะซีแนพทิลีน (acynaphthylene), ฟลูออรีน (fluorene), ฟีนแอนทรีน (phenanthrene), แอนทราซีน (anthracene), ฟลูออแรนทีน (fluoranthene), เบนซ์[เอ]แอนทราซีน (benz[a]anthracene), ไครซีน (chrysene), ไพรีน (pyrene), เบนโซ[บี]ฟลูออแรนทีน (benzo[b]fluoranthene), เบนโซ[เค]ฟลูออแรนทีน (benzo[k]fluoranthene), เบนโซ[เอ]ไพรีน (benzo[a]pyrene), ไดเบนซ์[เอ,เอช]แอนทราซีน (dibenz[ah]

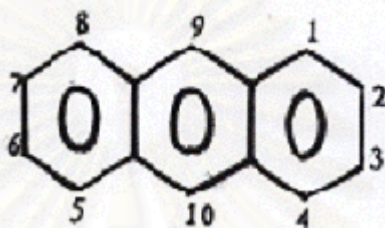
anthracene), เบนโซ[จี,เอช,ไอ]เพอริลีน (benzo[*g,h,l*]perylene) และ อินดีโน-[1,2,3,ซีดี]ไพรีน (indeno[1,2,3,cd]pyrene) ดังแสดงโครงสร้างโมเลกุลในรูปที่ 2.1



รูปที่ 2.1 โครงสร้างโมเลกุลของ PAHs ทั้งหมด 16 ชนิดตามรายงานของ U.S.EPA (Wilson and Jones, 1993)

แอนทราซีน (Anthracene)

แอนทราซีนเป็นสารประกอบอินทรีย์ชนิดหนึ่งในกลุ่มพอลิไซคลิกอะโรมาติก-ไฮโดรคาร์บอน มีโครงสร้างโมเลกุลประกอบด้วยคาร์บอนและไฮโดรเจนที่รวมกันเป็นอะโรมาติกเบนซีน 3 วงเชื่อมต่อกันเป็นเส้นตรง (linear arrangement) ดังแสดงในรูปที่ 2.2



รูปที่ 2.2 โครงสร้างโมเลกุลของแอนทราซีน

สมบัติของแอนทราซีน

สูตรโมเลกุล	$C_{14}H_{10}$; $C_6H_4(CH_2)_2C_6H_4$
น้ำหนักโมเลกุล	178.23
ชื่อสามัญ	แอนทราซีน(anthracin) พาราแนพทาลีน (paranaphthalene)
ความถ่วงจำเพาะ	1.25
จุดหลอมเหลว	216.2 – 216.4 °ซ
จุดหลอมกลายเป็นไอ	340 °ซ
หมายเลขสากลทางเคมี (Cas Number)	120-12-7
พลังงานไอออไนเซชัน	1.606 อิเล็กตรอนโวลต์ (eV)
ความดันไอ	1.9×10^{-7} ทอร์ (torr) ที่ 25 °ซ
การละลาย	1.29 มก.ต่อลิตร ในน้ำกลั่นที่อุณหภูมิ 25 °ซ 0.6 มก.ต่อลิตร ในน้ำเกลือที่อุณหภูมิ 25 °ซ 0.075มก.ต่อลิตร ที่อุณหภูมิ 15 °ซ แอนทราซีนปริมาณ 1 กรัมละลายได้ดีในอีเธอร์ (200

มล.) และ โทลูอิน (125 มล.) แอนทราซีนปริมาณ
1 กรัมละลายได้ปานกลางในเมทานอล
(70 มล.) เบนซีน (62 มล.) คลอโรฟอร์ม (85 มล.)
คาร์บอน-เตตระคลอไรด์ (86 มล.) และคาร์บอนได
ซัลไฟด์ (31 มล.)

ลักษณะปรากฏ

ลักษณะเป็นผลึกสีเหลืองซีด เรืองแสงฟลูออเรสเซนซ์สีฟ้า
เมื่อบริสุทธิ์จะไม่มีสี มีคุณสมบัติเรืองแสงฟลูออเรสเซนซ์
สีม่วง

ประโยชน์ของแอนทราซีน

ใช้ในอุตสาหกรรมสี โดยเป็นองค์ประกอบของสารที่ใช้ในการทำสีอะลิซาริน (alizarin) คาร์บาซอล (carbazole) หมึกพิมพ์คาลิโก (calico printing) และใช้เป็นสารตั้งต้นในการผลิต แอนทราควิโนน (anthraquinone) ซึ่งใช้เป็นวัตถุดิบสำหรับการผลิตสีย้อม รวมทั้งเป็นส่วนประกอบในครีโอลิธ (11 % โดยน้ำหนัก) และมีการนำมาใช้ในอุตสาหกรรมปิโตรเคมีโดยเป็นองค์ประกอบในน้ำมันดีเซลและน้ำมันเบนซิน เป็นส่วนประกอบในการผลิตปรมาณู ใช้ในการศึกษาเกี่ยวกับสารอินทรีย์กึ่งตัวนำไฟฟ้า (organic semiconductor) นอกจากนี้ยังใช้ในอุตสาหกรรมผลิตพลาสติกและเส้นใยสังเคราะห์ รวมทั้งเป็นส่วนประกอบของยาฆ่าแมลง (ASTDR, 1998 ; Tri database, 1998)

แหล่งกำเนิดแอนทราซีน

แอนทราซีนมีอยู่ทั่วไปในธรรมชาติ โดยพบในน้ำมันดำจากถ่านหิน (coal tar) ปริมาณที่พบเท่ากับ 12 กรัม/กก. นอกจากนี้ยังเกิดขึ้นในระหว่างการเผาไหม้ที่ไม่สมบูรณ์ของสารประกอบอินทรีย์ ซึ่งแอนทราซีนจะถูกปล่อยออกมาในรูปไอเสียดังจากเครื่องยนต์ที่ใช้น้ำมันเบนซินและน้ำมันดีเซลเป็นเชื้อเพลิง ปกติน้ำมันเบนซินจะมีแอนทราซีนเป็นองค์ประกอบ 1.55 มก./ลิตร ส่วนในน้ำมันเบนซินที่มีค่าออกเทนสูงปริมาณแอนทราซีนจะเพิ่มเป็น 2.6 มก./ลิตร ส่วนในน้ำมันดีเซลมีแอนทราซีน 100-300 มก./ลิตร นอกจากนี้ Charles และ Bonnie ได้รายงานในปี 1992 เกี่ยวกับปริมาณแอนทราซีนที่ถูกปล่อยออกมาจากรถที่ใช้น้ำมันเบนซินซึ่งมีอากาศและน้ำเป็นตัวหล่อเย็นในระบบเครื่องยนต์ โดยมีปริมาณแอนทราซีนเท่ากับ 634 และ 642 ไมโครกรัม/ลิตรของเชื้อเพลิงตามลำดับ

จากการตรวจหาชนิดและปริมาณของ PAHs ในควันบุหรี่ พบว่าประกอบด้วยแอนทราซีน และ PAHs ชนิดอื่นดังนี้ เบนซ์[เอ]แอนทราซีน , เบนซ์[บี]ฟลูออแรนธิน, เบนซ์[เค]ฟลูออแรนธิน,

เบนซ์ [จี,เอช,ไอ]เพอร์ลี้น , ฟลูออเรนธิน และไพรีน โดยมีปริมาณแอนทราซีนในควันบุหรี่แต่ละชนิดแตกต่างกันดังนี้

ควันจากบุหรี่	2.3 – 23.5	กรัมต่อ 100 มวน
ควันจากซิการ์	11.9	ไมโครกรัมต่อ 100 กรัม
ควันจากกล้องยาสูบ	110.0	ไมโครกรัมต่อ 100 กรัม

(Kiryn and Kuratsune, 1992 อ้างถึงโดย Boonyatumanond, 1999)

นอกจากนี้ในน้ำทิ้งของโรงงานอุตสาหกรรมที่ใช้น้ำมันเป็นเชื้อเพลิง โรงงานทำสี และในน้ำมันที่รั่วไหลออกมาในระหว่างการขนส่งทางเรือ ก็เป็นสาเหตุที่ทำให้มีการปนเปื้อนของแอนทราซีนในแหล่งน้ำ ส่วนในดินก็สามารถพบการปนเปื้อนของสารดังกล่าวได้เช่นกัน โดยเฉพาะอย่างยิ่งในเขตอุตสาหกรรม ซึ่งอาจมีการรั่วซึมหรือการปล่อยสารต่าง ๆ ที่มีแอนทราซีนเป็นองค์ประกอบลงดิน

แหล่งแพร่กระจายของแอนทราซีนในสิ่งแวดล้อม

แอนทราซีนเมื่อถูกนำมาใช้หรือเกิดขึ้นเนื่องจากกระบวนการผลิตในอุตสาหกรรม อาจมีโอกาสแพร่กระจายไปสู่สิ่งแวดล้อม โดยที่สารดังกล่าวเป็นสารพิษที่สลายตัวได้ยากเนื่องจากมีโครงสร้างโมเลกุลที่เสถียร จึงมีฤทธิ์ตกค้างนานและสะสมตัวอยู่ในสิ่งแวดล้อม ก่อให้เกิดปัญหาภาวะมลพิษจากสารพิษขึ้น แอนทราซีนแพร่กระจายและตกค้างอยู่ในแหล่งต่าง ๆ ดังแสดงในตารางที่ 2.1

ตารางที่ 2.1 เปอร์เซ็นต์การแพร่กระจายในสิ่งแวดล้อมของแอนทราซีน

แหล่งที่เกิดการแพร่กระจาย	เปอร์เซ็นต์
อากาศ	77.5
ดิน	9.5
ตะกอนในน้ำ	9
น้ำ	4

แหล่งที่มา : The New Jersey Department of Health and Senior Services, 1998 :

Tri database

การแพร่กระจายของแอนทราซีนในดิน (The Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ASTDR), 1996)

แอนทราซีนที่แพร่กระจายในดิน อนุภาคดินและสารอินทรีย์ในดินจะดูดซับสารนี้ไว้ในปริมาณมาก และจะไม่ถูกชะล้างสู่แหล่งน้ำใต้ดิน แอนทราซีนมีครึ่งชีวิตต่อการถูกย่อยสลายในตะกอนดินประมาณ 3.3 - 139 วัน นอกจากนี้แอนทราซีนอาจสลายตัวไปโดยการระเหยจากผิวหน้าดิน การถูกดูดซับโดยสารอินทรีย์และสารอนินทรีย์ต่าง ๆ ในดินมีผลให้กระบวนการย่อยสลายทางชีวภาพและการสลายตัวโดยการระเหยของแอนทราซีนเกิดขึ้นช้ามาก

ปริมาณแอนทราซีนที่มีการปนเปื้อนในดิน (ASTDR, 1996)

ตัวอย่างดินบริเวณรอบ ๆ บ่อบำบัดน้ำเสียจากกระบวนการผลิตแก๊สธรรมชาติ มีปริมาณแอนทราซีนระหว่าง 260-670 ไมโครกรัม/กก. ของดิน ตัวอย่างน้ำจากบริเวณเดียวกันนี้มีปริมาณแอนทราซีนตั้งแต่ในระดับที่ไม่สามารถตรวจวัดได้ จนถึง 2200 ไมโครกรัม/ลิตร นอกจากนี้จากการตรวจสอบในกระบวนการหล่ออลูมิเนียมและเหล็ก พบว่าทำให้เกิดแอนทราซีน 240 และ 140 ไมโครกรัม/กก. ตามลำดับ

การแพร่กระจายของแอนทราซีนในน้ำ (ASTDR, 1996)

น้ำเป็นแหล่งที่มีสารพิษต่าง ๆ รวมทั้งแอนทราซีนแพร่กระจายและสะสมตกค้างอยู่มากมาย สาเหตุหนึ่งเกิดจากน้ำทิ้งจากการอุปโภคบริโภคในชุมชน จากพื้นที่เกษตรกรรมและการเลี้ยงสัตว์ รวมทั้งน้ำทิ้งจากเขตอุตสาหกรรมที่ถูกระบายลงสู่แหล่งน้ำ แอนทราซีนและ PAHs ชนิดต่าง ๆ จะสะสมตกค้างในตะกอนดินและอนุภาคต่างๆ ในน้ำ นอกจากนี้ยังพบการสะสมของแอนทราซีนในสิ่งมีชีวิตในน้ำซึ่งขาดเอนไซม์ไมโครโซมัลออกซิเดส (microsomal oxidase) โดยที่เอนไซม์ดังกล่าวเร่งปฏิกิริยาย่อยสลายของแอนทราซีนและ PAHs ชนิดต่างๆ ได้อย่างรวดเร็ว ที่ระดับใกล้ผิวน้ำแอนทราซีนจะเกิดการสลายตัวได้โดยแสง (photolysis) และต่ำลงไปจากผิวน้ำ 1 เมตร แอนทราซีนจะมีครึ่งชีวิตของการสลายตัวประมาณ 4.3 - 5.9 วัน การถูกดูดซับโดยอนุภาคแขวนลอยหรือสารอินทรีย์ในน้ำมีผลทำให้กระบวนการย่อยสลายทางชีวภาพ การสลายตัวโดยแสงและการระเหยของแอนทราซีนเกิดขึ้นช้ามาก การกระจายตัวและการสลายตัวของแอนทราซีนในแหล่งน้ำต่าง ๆ จะขึ้นอยู่กับธรรมชาติของแหล่งน้ำนั้น ๆ ส่วนใหญ่การสลายตัวของสารชนิดนี้เกิดขึ้นเนื่องจากแสงและการย่อยสลายทางชีวภาพ แต่อย่างไรก็ตามในแหล่งน้ำตื้นที่อัตราการไหลของน้ำเกิดขึ้นอย่างรวดเร็วแอนทราซีนมักสลายตัวโดยแสง และการระเหยเป็นส่วนใหญ่

ในปี 1999 Wang และคณะ รายงานการปนเปื้อนของแอนทราซีนและ PAHs ในแหล่งน้ำ โดยกล่าวว่าเกิดจากน้ำทิ้งในกระบวนการผลิตน้ำมันเชื้อเพลิง (Sorrell *et al.*, 1980 อ้างถึงโดย Wang *et al.*, 1999) สารพิษดังกล่าวมักจะสลายตัวโดยการทำปฏิกิริยากับแสง (Kong, 1986 อ้างถึงโดย Wang *et al.*, 1999) และอัตราการเกิดปฏิกิริยาจะเพิ่มขึ้นเมื่อมีการเพิ่มของอุณหภูมิ และปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำ

การปนเปื้อนของแอนทราซีนในน้ำทะเล

มีรายงานการปนเปื้อนของแอนทราซีนและ PAHs ในน้ำทะเล ซึ่งเกิดจากการเผาไหม้ที่ไม่สมบูรณ์ของสารอินทรีย์ รวมทั้งน้ำมันเชื้อเพลิง เศษไม้ และขยะ โดยถูกปล่อยออกมาในรูปแบบม่าควัน จากการเผาไหม้ในเครื่องยนต์ โรงงาน ไฟป่า เต่าเผาขยะ และกระบวนการผลิตในโรงงานอุตสาหกรรม (Lane, 1991 อ้างถึงโดย McKinney *et al.*, 1999) การปนเปื้อนของแอนทราซีนและ PAHs ในสิ่งแวดล้อมทางทะเลเกิดขึ้นได้ 2 ทางคือการปล่อยน้ำทิ้งจากชุมชน และน้ำเสียจากโรงงานอุตสาหกรรม การรั่วไหลของน้ำมัน อีกสาเหตุหนึ่งเกิดจากฝนตกทำให้อนุภาคที่แขวนลอยในบรรยากาศซึ่งมีแอนทราซีนและ PAHs เกาะติดอยู่ ถูกชะล้างสู่แหล่งน้ำทะเล ซึ่งในที่สุดสารพิษดังกล่าวจะถูกดูดซับโดยตะกอนที่อยู่บริเวณก้นทะเล (Behymer and Hites, 1985)

Fox และ Olive (1979) รายงานการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของแอนทราซีนที่ถูกดูดซับอยู่บนอนุภาคที่แขวนลอยในอากาศโดยแอนทราซีนเปลี่ยนโครงสร้างไปเป็นแอนทราควิโนน (anthraquinone) ซึ่งสารดังกล่าวมีปริมาณมากและเกาะติดอยู่กับอนุภาคที่แขวนลอยในบรรยากาศ เมื่ออนุภาคนั้นถูกฝนตกชะล้างสู่ทะเลก็จะทำให้มีการปนเปื้อนของทั้งแอนทราซีนและแอนทราควิโนนในน้ำทะเลโดยถูกดูดซับอยู่กับตะกอนก้นทะเล

McKinney และคณะ (1999) รายงานว่าอัตราส่วนความเข้มข้นของแอนทราควิโนนต่อแอนทราซีนมีค่า 0.317 ในเขตอุตสาหกรรม ในขณะที่เขตชนบทมีค่าเท่ากับ 2.81 โดยตั้งสมมติฐานว่าอัตราส่วนที่ต่างกันนี้เกิดจากความแตกต่างของแหล่งกำเนิดแอนทราซีน โดยแหล่งหนึ่งมาจากเขตชนบท ซึ่งการปนเปื้อนเกิดจากอนุภาคแขวนลอยในบรรยากาศที่มีแอนทราซีนและแอนทราควิโนนเกาะติดอยู่ถูกพัดพาลงสู่น้ำทะเล เนื่องจากแอนทราควิโนนมีความเข้มข้นสูงกว่า จึงทำให้อัตราส่วนดังกล่าวมีค่าสูงกว่า 1 อีกแหล่งหนึ่งที่ทำให้เกิดการปนเปื้อนเป็นเขตอุตสาหกรรมซึ่งมีการรั่วไหลของน้ำมัน จึงมีแอนทราซีนปนเปื้อนในน้ำทะเลโดยตรง ทำให้อัตราส่วนความเข้มข้นของแอนทราควิโนนต่อแอนทราซีนน้อยกว่า 1 เพื่อที่จะทดสอบสมมติฐานดังกล่าวจึงติดตามการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของแอนทราซีนไปเป็นแอนทราควิโนน เมื่อแอนทราซีนถูกดูดซับโดยตะกอนจะทำให้ไม่มีการเปลี่ยนรูปของสารดังกล่าว จากการทดลองทั้งในสภาวะที่เหมือนสภาพแวดล้อมในทะเลและในสภาวะที่มีการฉายแสงอุลตราไวโอเล็ต พบว่าภายใต้สภาวะปกติในทะเล แอนทราซีนที่เกาะติดอยู่กับตะกอนจะไม่เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันไปเป็นแอนทราควิ

โนนได้โดยง่าย ซึ่งลักษณะและสมบัติของตะกอนจะมีผลต่อการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันด้วย กล่าวคือขึ้นกับเปอร์เซ็นต์สารอินทรีย์คาร์บอนและปริมาณกรดฮิวมิก (humic acid) แต่ในสภาวะที่ถูกฉายแสงอุลตราไวโอเลตแอนทราซีนจะถูกออกซิไดซ์โดยแสง ผลการทดลองดังกล่าวทำให้การระบุนถึงแหล่งที่ทำให้เกิดการปนเปื้อนของแอนทราซีนในน้ำทะเลโดยใช้อัตราส่วนความเข้มข้นของแอนทราควิโนนต่อแอนทราซีนมีความน่าเชื่อถือมากขึ้น

ปริมาณการปนเปื้อนของแอนทราซีนในแหล่งน้ำ (ASTDR, 1996)

จากการตรวจคุณภาพน้ำดื่ม และแหล่งน้ำในพื้นที่ต่าง ๆ พบปริมาณแอนทราซีนดังนี้

ตารางที่ 2.2 ปริมาณแอนทราซีนที่ปนเปื้อนในน้ำดื่มจากแหล่งต่าง ๆ

ตัวอย่างที่	แหล่งที่ตรวจสอบ
1	น้ำประปาใน 9 เมืองของสหรัฐอเมริกาปริมาณแอนทราซีน 1.1 - 59.7 ส่วนในล้านล้านส่วน (parts per trillion, ppt)
2	แหล่งน้ำดื่มในมลรัฐนิวยอร์ก ค.ศ. 1979 พบสารแอนทราซีนและฟิแนนทรีนในแหล่งน้ำ 39 แหล่ง
3	ตรวจสอบคุณภาพน้ำดื่มในประเทศฟินแลนด์ เดนมาร์ก นอร์เวย์ และสวีเดนในช่วงเดือนพฤษภาคม - กรกฎาคม ค.ศ.1980 มีปริมาณแอนทราซีน 0.04 - 9.7 ppt
4	น้ำดื่มจาก Bankfiltered Rhine ประเทศเนเธอร์แลนด์ มีปริมาณแอนทราซีน 30 ppt
5	ตรวจสอบในเมือง Ottawa ประเทศแคนาดา ในช่วงเดือนมกราคม - กุมภาพันธ์ ปี 1978 มีปริมาณแอนทราซีน 0.52 - 2.2 ส่วนในพันล้านส่วน (part per billion,ppb)
6	ตรวจสอบปริมาณแอนทราซีนในตัวอย่างน้ำดื่มจากเมืองฟิลาเดลเฟีย รัฐนิวยอร์ก พบว่าตัวอย่างน้ำ 7 ใน 39 ตัวอย่างมีสารดังกล่าวปนเปื้อน โดยมีความเข้มข้นสูงสุด 21 ไมโครกรัม/ลิตร
7	น้ำดื่มจากเมือง Kitakyushu ประเทศญี่ปุ่น มีปริมาณแอนทราซีน 1.7 ส่วนในล้านส่วน (part per million, ppm)

ตารางที่ 2.3 ปริมาณแอนทราซีนที่ปนเปื้อนในแหล่งน้ำผิวดิน

ตัวอย่างที่	แหล่งน้ำผิวดิน
1	ตรวจสอบในน้ำทิ้งจากโรงงาน 5 แห่ง ในเมือง Eastern Ontario ประเทศแคนาดา พบว่ามีปริมาณแอนทราซีน 0.1 – 4.8 ppt โดยมีค่าเฉลี่ย 1.6 ppt
2	น้ำและตะกอนใต้น้ำของแม่น้ำ Lower Tennessee มีปริมาณแอนทราซีน 12.1 ppb
3	ตรวจสอบคุณภาพแหล่งน้ำผิวดินในเมือง Tamar Estuary ประเทศอังกฤษ มีปริมาณแอนทราซีน 4.9 ppt
4	แม่น้ำไรน์ (Rhine) ปี 1981 มีปริมาณแอนทราซีน 15 ppt และในปี 1982 มีปริมาณสารดังกล่าวเท่ากับ 13 ppt
5	ในแม่น้ำมิสซิสซิปปี (Mississippi) มีแอนทราซีนเข้มข้น 3 และ 4 นาโนกรัม/ลิตร ในตัวอย่างน้ำ 2 ตัวอย่าง
6	ในน้ำทิ้งของโรงงานผลิตแก๊สจากถ่านหินมีแอนทราซีน 0.2 มก./ลิตร
7	ตรวจพบการปนเปื้อนของแอนทราซีนในทะเลบอลติก นอกชายฝั่งโปแลนด์ และในแม่น้ำเหลือง สาธารณรัฐประชาชนจีน ในเดือนมีนาคม สิงหาคม และตุลาคม มีความเข้มข้น 7.7, 0.8 และ 9.5 นาโนกรัม/ลิตร ตามลำดับ

แหล่งน้ำใต้ดิน

พบปริมาณแอนทราซีนในแหล่งน้ำใต้ดินที่อยู่ใกล้กับโรงกลั่นน้ำมันดำจากถ่านหินและโรงงานผลิตครีโอสเฟท เมืองเซนต์หลุยส์ (St. Louis) มีแอนทราซีนเข้มข้น 68 ppb

น้ำฝน

ตรวจสอบปริมาณแอนทราซีนในเมืองพอร์ตแลนด์ (Portland) ช่วงเดือนกุมภาพันธ์-เมษายน

จากตัวอย่างน้ำ 7 ตัวอย่าง ค.ศ. 1984 ในระยะเวลา 2 – 5 วัน พบว่ามีแอนทราซีนในน้ำฝน 2.0 – 7.9 ppt โดยเฉลี่ย 5.1 ppt และความเข้มข้นของแอนทราซีนที่ถูกดูดซับอยู่กับอนุภาคที่อยู่ในน้ำฝนมีค่าเท่ากับ 1.3 – 10.0 ppt

โดยทั่วไปแอนทราซีนจะถูกดูดซับอยู่ในละอองน้ำในชั้นบรรยากาศประมาณ 4 % โดยมีความเข้มข้นน้อยกว่า 10 ไมโครกรัม / ลิตร จากการตรวจสอบปริมาณแอนทราซีนในแหล่งน้ำทิ้งที่มีครีโอสเฟทปนเปื้อนในเมือง Conrone พบว่ามีปริมาณแอนทราซีนสูงกว่า 168.6 ไมโครกรัม / ลิตร มีรายงานการปนเปื้อนสารแอนทราซีนในน้ำดื่มจากหลายประเทศทั่วโลก รายงานจากประเทศ

สหรัฐอเมริกาในการตรวจสอบคุณภาพน้ำดื่มจาก 13 แหล่ง พบว่ามีแอนทราซีนและพีแนนทรีน ในน้ำดื่มมีความเข้มข้นสูงสุดรวมกันถึง 1,269 นาโนกรัม/ลิตร

มีรายงานเกี่ยวกับปริมาณแอนทราซีนในน้ำที่ไหลออกจากโรงงานบำบัดน้ำทิ้ง ประเทศ นอร์เวย์ โดยมีความเข้มข้นน้อยกว่า 13 – 105 ไมโครกรัม/ลิตร น้ำมันดำจากถ่านหินซึ่งมีสาร ผสมของแอนทราซีนและพีแนนทรีน ที่ความเข้มข้นเฉลี่ย 25 มิลลิกรัม/กรัม มักนำมาใช้เป็นวัตถุ เคลือบผิวบนอกถังในระบบกระจายน้ำของรัฐนิวยอร์กเพื่อป้องกันการเป็นสนิมของถัง ในการตรวจ สอบน้ำที่เข้าออกจากถังจำนวน 125 ถังของระบบดังกล่าว พบปริมาณแอนทราซีนและพี แนนทรีนเข้มข้น 0.019 และ 0.210 ไมโครกรัม/ลิตร ตามลำดับ มีรายงานการปนเปื้อนของสาร แอนทราซีนในตะกอนถ่านหินโดยมีความเข้มข้น 2,571 – 16,231 นาโนกรัม/กรัม และมีความ เข้มข้นเฉลี่ย 8,169 นาโนกรัม/กรัม

ในปี 1976 สำนักงานคุ้มครองสิ่งแวดล้อมแห่งสหรัฐอเมริกา จำกัดปริมาณความเข้มข้นสูง สุดของแอนทราซีนและ PAHs ชนิดอื่นรวมทั้งหมด 16 ชนิด ในน้ำทิ้งที่ออกจากแหล่งอุตสาหกรรม ภายในประเทศ โดยกำหนดให้มีปริมาณแอนทราซีนไม่เกิน 8.8 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร (U.S.EPA, 1996 อ้างถึงโดย Boonyatumanond, 1999)

ในปี 1996 ประเทศแคนาดา กำหนดค่าความเข้มข้นวิกฤตของแอนทราซีน และ PAHs ชนิดอื่นรวมทั้งหมด 9 ชนิด ที่ก่อให้เกิดพิษต่อสัตว์น้ำ โดยความเข้มข้นวิกฤตของแอนทราซีนมีค่า เท่ากับ 1 ไมโครกรัม/ลิตร (Ministry of Environment, Canada, 1996 อ้างถึงโดย Boonyatuma- nond, 1999)

การแพร่กระจายของแอนทราซีนในอากาศ (ASTDR, 1996)

แอนทราซีนและสารพิษชนิดอื่นที่แพร่กระจายอยู่ในอากาศ ส่วนใหญ่เกิดจากการเผา- ผลาญของเชื้อเพลิงต่าง ๆ ทั้งจากยานยนต์ที่ใช้ในการคมนาคมขนส่ง เตาเผาเชื้อเพลิงในโรงงาน อุตสาหกรรม โรงไฟฟ้า และเตาเผาขยะ แอนทราซีนและสาร PAHs ในชั้นบรรยากาศสามารถอยู่ ในสถานะที่เป็นไอ หรืออาจพบเกาะติดอยู่กับอนุภาคแขวนลอยที่มีขนาดของอนุภาคเล็กกว่า 1 ไมครอน จากการตรวจสอบสภาพอากาศที่กรุง Antwerp ประเทศเบลเยียม โดย Baeker และ คณะ ในปี 1991 ได้รายงานอัตราส่วนของสารแอนทราซีนที่เกาะติดอยู่กับอนุภาคแขวนลอยต่อ สารแอนทราซีนที่อยู่ในสถานะก๊าซมีค่าเท่ากับ 0.03 สารแอนทราซีนและ PAHs ชนิดต่าง ๆ เมื่อ แพร่กระจายอยู่ในบรรยากาศอาจเกิดการเปลี่ยนแปลงทางเคมีเมื่อถูกแสง (direct photolysis) หรืออาจเกิดปฏิกิริยากับสารออกซิไดซ์ เปลี่ยนไปอยู่ในรูปไอระเหยโดยมีครึ่งชีวิตประมาณ 1.67 วัน การถูกดูดซับโดยอนุภาคแขวนลอยในชั้นบรรยากาศ จะทำให้การเปลี่ยนแปลงทางเคมีเนื่อง จากแสงและการทำปฏิกิริยากับสารออกซิไดซ์ของแอนทราซีนเกิดได้น้อยลง

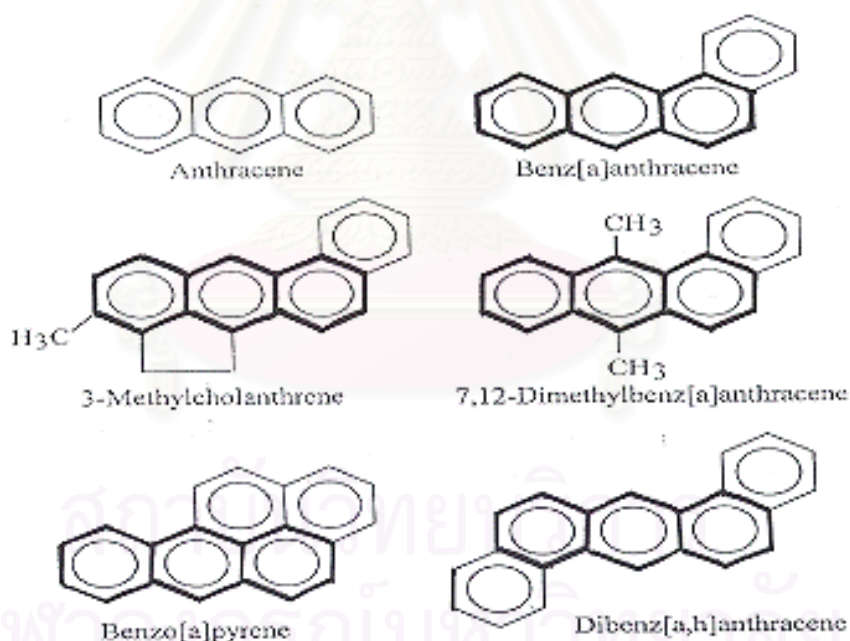
โดยทั่วไปแอนทราซีนที่แพร่กระจายอยู่ในอากาศมักจะอยู่ในสถานะที่เป็นไอ ซึ่งมีอยู่มากกว่า 78 % การสลายตัวของสารเกิดขึ้นได้ทั้งกระบวนการทางเคมี (ทำปฏิกิริยากับสารออกซิไดซ์) และเกิดการสลายตัวโดยแสง ซึ่งแอนทราซีนที่อยู่ในสถานะไอจะสลายตัวได้เร็วกว่าสารที่เกาะติดอยู่กับอนุภาคแขวนลอยในอากาศ ครึ่งชีวิตต่อการสลายตัวของแอนทราซีนมีค่าต่างกันตั้งแต่หลายชั่วโมงจนถึงหลายวัน การที่สารดังกล่าวมีครึ่งชีวิตในการสลายตัวเป็นระยะเวลาหลายวัน แสดงว่าเกาะติดอยู่กับอนุภาคแขวนลอยในอากาศที่มีขนาดใหญ่กว่า 1 ไมครอน และแพร่กระจายไปได้เป็นระยะทางไกล ๆ

ตารางที่ 2.4 ปริมาณแอนทราซีนที่แพร่กระจายอยู่ในอากาศ (ASTDR , 1996)

ตัวอย่าง	แหล่งกำเนิดแอนทราซีน
1	โรงงานผลิตเชื้อเพลิงจากถ่านหินปล่อยสารแอนทราซีนออกสู่บรรยากาศโดยมีความเข้มข้นในช่วง 0.4 – 100 นาโนกรัม/ลบ.ม.
2	สลัดจ์จากเตาเผาขยะปล่อยสารแอนทราซีนออกสู่บรรยากาศ โดยมีความเข้มข้นในช่วง 7.7 ไมโครกรัมต่อตัวอย่าง
3	ขี้เถ้าจากเตาเผาขยะมีสารแอนทราซีนในช่วงความเข้มข้น 10 – 500 นาโนกรัม/กรัม และค่าเฉลี่ยจาก 5 ตัวอย่างมีความเข้มข้นของสารดังกล่าว 146 นาโนกรัม/กรัม
4	กังหันน้ำมันที่ใช้ น้ำมันเบนซินเป็นเชื้อเพลิงจะปล่อยสารผสมของแอนทราซีนและพี-แนทรีนในช่วงความเข้มข้น 0.53 – 106 นาโนกรัม/ลบ.ม. ค่าเฉลี่ยความเข้มข้นของสารผสมทั้งสองชนิดดังกล่าวจาก 8 ตัวอย่างมีค่าเท่ากับ 17.31 นาโนกรัม/ลบ.ม.
5	จากการตรวจสอบปริมาณแอนทราซีนในตัวอย่างน้ำมันเบนซิน 4 ตัวอย่าง พบว่ามีความเข้มข้นในระดับที่ไม่สามารถตรวจวัดได้ 1 ตัวอย่าง ส่วนอีก 3 ตัวอย่างมีความเข้มข้นสารเท่ากับ 0.33, 2.6 และ 2.7 มก./ลิตร ตามลำดับ และถูกปล่อยสู่บรรยากาศในสถานะก๊าซจากรถยนต์ที่ใช้ น้ำมันเบนซิน โดยมีความเข้มข้นเฉลี่ย 5.3, 12, 21 และ 28 ไมโครกรัม/ลบ.ม.
6	กระบวนการเผาไหม้ยางทำให้เกิดสารแอนทราซีนที่มีความเข้มข้น 85,000 ไมโครกรัม/กก. ของยาง

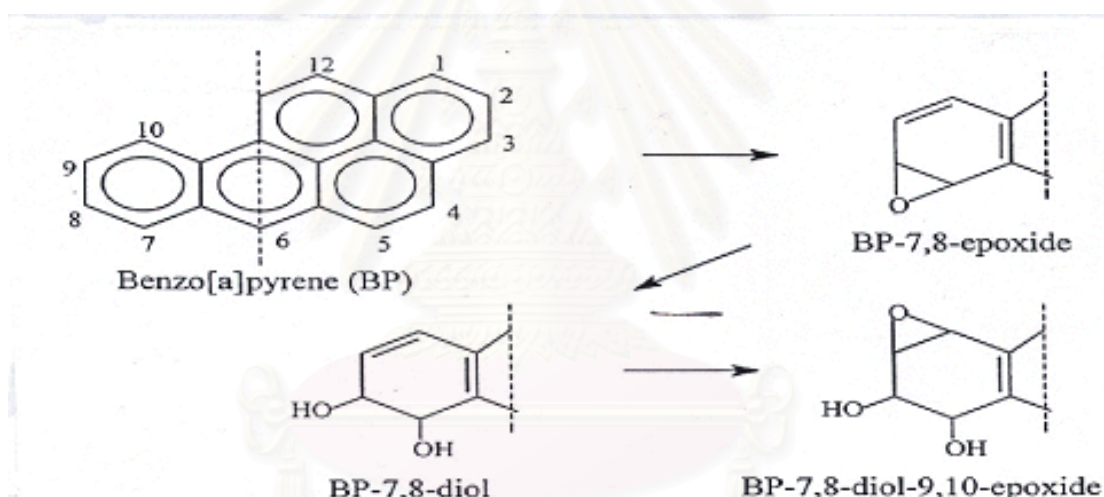
กลไกการเกิดพิษของแอนทราซีนและ PAHs ชนิดอื่น

มีรายงานว่า 80 % ของมะเร็งที่เกิดขึ้นในมนุษย์มีสาเหตุมาจากปัจจัยทางสิ่งแวดล้อม โดยเฉพาะอย่างยิ่งการสัมผัสกับสารเคมีต่าง ๆ ซึ่งแตกต่างกันในแต่ละบุคคล โดยขึ้นอยู่กับอาชีพและวิถีการดำรงชีวิต ถึงแม้ว่ายังไม่มีรายงานเกี่ยวกับสมบัติในการเป็นสารก่อมะเร็งของแอนทราซีน แต่สารนี้ก็มีความสำคัญในแง่ที่เป็นโครงสร้างพื้นฐานของ PAHs ที่เป็นสารก่อมะเร็งหลายชนิด เช่นเมื่อมีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างทางเคมีของแอนทราซีนโดยเติมวงเบนซีน 1 วง จะเกิดเป็นสารเบนซ์[เอ]แอนทราซีนซึ่งเป็นสารพื้นฐานที่ก่อให้เกิดโรคมะเร็ง เมื่อทำการเพิ่มวงเบนซีนที่โครงสร้างของสารเบนซ์[เอ]แอนทราซีน จะได้สารใหม่เป็นไดเบนซ์[เอ, เอช]แอนทราซีน และเบนโซ[เอ]ไพรีน ที่เป็นพิษและก่อให้เกิดโรคมะเร็งอย่างร้ายแรง นอกจากนี้สารก่อมะเร็งที่เป็นอนุพันธ์ของสารแอนทราซีนยังประกอบด้วย 3-เมทิลโคลันทรีน (3-methylcholanthrene), 7,12-ไดเมทิลเบนซ์[เอ]แอนทราซีน (7,12-dimethylbenz[a]anthracene) (Vo-Dinh, 1989) ดังแสดงโครงสร้างทางเคมีของสารต่าง ๆ ดังกล่าวในรูปที่ 2.3



รูปที่ 2.3 โครงสร้างทางเคมีของสารก่อมะเร็งที่เป็นอนุพันธ์ของสารแอนทราซีน (Vo-Dinh, 1989)

PAHs บางชนิดเมื่อเข้าสู่ร่างกายของสิ่งมีชีวิตจะถูกเมตาบอลิซึม (metabolize) โดยเอนไซม์ไซโตโครมพี 450 (cytochrome P450) ทำให้เกิดการเติมหมู่ไฮดรอกซี (-OH) ที่วงเบนซีนได้เป็นสารอนุพันธ์อีพอกไซด์ (epoxide) ของ PAHs ซึ่งเป็นสารตัวกลางที่มีพิษมากขึ้น และเป็นกลไกของการเกิดโรคมะเร็ง อนุพันธ์อีพอกไซด์ของสาร PAHs เป็นสารที่ว่องไวมาก สามารถสร้างพันธะโควาเลนต์ได้ดีกับสารพวกโปรตีนและกรดนิวคลีอิก จากการศึกษาตำแหน่งบนโครงสร้างของดีเอ็นเอ (DNA) พบว่าเบสและหมู่ฟอสเฟต (PO_4^-) เป็นตำแหน่งที่สร้างพันธะโควาเลนต์กับสารก่อมะเร็ง โดยเบสกวีนีนมีศักยภาพในการจับกับสารก่อมะเร็งได้ดีที่สุด (Vo-Dinh, 1989) รูปที่ 2.4 แสดงการเปลี่ยนโครงสร้างของสารเบนโซ[เอ]ไพรีนไปเป็นสารอีพอกไซด์และไดออล (diol) โดยการถูกออกซิไดซ์ด้วยเอนไซม์ในขบวนการทางชีวภาพ



รูปที่ 2.4 แสดงการแปรสภาพของสารก่อมะเร็งไปเป็นสารอนุพันธ์ (Vo-Dinh, 1989)

เมื่อเกิดปฏิกิริยาระหว่างอนุพันธ์ของ PAHs กับดีเอ็นเอ มีผลทำให้บางส่วนของดีเอ็นเอเสียหาย ภายในเซลล์จะมีระบบซ่อมแซมดีเอ็นเอโดยตัดส่วนที่เสียหายทิ้งไป และเสริมสร้างส่วนที่ดีเข้ามาแทนให้เหมือนเดิม ถ้าการซ่อมแซมนี้เป็นไปตามปกติเซลล์ก็จะเจริญได้ตามปกติเหมือนเซลล์เดิม แต่ถ้าการซ่อมแซมผิดไปจากเดิมหรือไม่มีการซ่อมแซมเกิดขึ้น ดีเอ็นเอนั้นก็ยังคงเสียหายหรือมีลำดับเบสผิดไปจากเดิม เมื่อเซลล์นั้นแบ่งตัวจะได้เซลล์ใหม่ที่มีดีเอ็นเอต่างไปจากเซลล์เดิม คือเป็นเซลล์ที่เกิดการกลายพันธุ์ขึ้น โดยการกลายพันธุ์ที่เกิดขึ้นกับเซลล์ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมนี้เกิดขึ้นได้กับทั้งเซลล์สืบพันธุ์และเซลล์ร่างกาย (Vo-Dinh, 1989)

การทดสอบการกลายพันธุ์ (Ames et al. , 1975)

ในการทดสอบการกลายพันธุ์กับสิ่งมีชีวิต มีวิธีการทดสอบระยะสั้นภายนอกร่างกายของสิ่งมีชีวิต (short term test *in vitro*) ที่นิยมกันมากคือการทดสอบเอมส์ (Ames test) โดยใช้เชื้อกลายพันธุ์ของ *Salmonella typhimurium* ชนิดที่ไม่สามารถเจริญได้ในอาหารที่ไม่เติมฮิสทีดีน (his⁻) และเมื่อสารเคมีที่สนใจเข้าไปจับที่ตำแหน่งยีนดังกล่าว จะทำให้เกิดกลายพันธุ์ซ้ำ กล่าวคือเชื้อซาลโมเนลลารุ่นต่อมาจะสามารถสังเคราะห์ฮิสทีดีนได้เอง (his⁺) จึงเจริญในอาหารที่ไม่เติมฮิสทีดีนได้

สารพิษบางชนิดไม่ก่อให้เกิดการกลายพันธุ์จนกว่าจะเกิดการแปรสภาพทางชีวภาพโดยเอนไซม์โมโนออกซีจีเนส (monooxygenase) เสียก่อน เอนไซม์ชนิดนี้พบเฉพาะในสิ่งมีชีวิตจำพวกยูคาริโอต (eukaryote) เท่านั้น ดังนั้นในการทดสอบการกลายพันธุ์แบบเอมส์จึงมักเติมไมโครโซมของสัตว์ทดลองชนิดยูคาริโอตลงในหลอดทดสอบที่มีเชื้อซาลโมเนลลาชนิดกลายพันธุ์ รวมทั้งสารที่ต้องการทดสอบ แล้วมีการวิเคราะห์ประสิทธิภาพในการกลายพันธุ์ของสารตามจำนวนโคโลนีของเชื้อที่เจริญได้ในอาหารที่ไม่เติมฮิสทีดีน

ประมาณ 90 % ของสารก่อมะเร็งที่รู้จักกันทั่วไปใช้การทดสอบแบบเอมส์ สารเคมีที่ถูกสังเคราะห์ขึ้นใหม่ โดยเฉพาะอย่างยิ่งสารที่จะนำไปใช้ในวงการค้าและอุตสาหกรรมจะต้องผ่านการทดสอบโดยวิธีดังกล่าวนี้ สารที่ให้ผลบวกในการทดสอบจะต้องมีการวิจัยในขั้นต่อไปเพื่อประเมินถึงผลที่จะเกิดต่อสุขภาพของมนุษย์

สารเคมีบางชนิดไม่มีสมบัติในการเป็นสารก่อมะเร็งโดยตรง แต่ถ้าสารดังกล่าวเข้าสู่ร่างกายของสิ่งมีชีวิตในกลุ่มยูคาริโอต แล้วถูกเมตาบอลิซึมโดยเอนไซม์ไซโตโครมพี 450 จะทำให้โครงสร้างบางส่วนของสารเปลี่ยนไป กลายเป็นสารก่อมะเร็งได้ ซึ่งการถูกกระตุ้นโดยเอนไซม์นี้ขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายอย่าง เช่น ชนิดของสิ่งมีชีวิต ระดับพันธุกรรม อายุ และเพศ จากรายงานวิจัยต่าง ๆ ซึ่งทดสอบการเป็นสารก่อกลายพันธุ์ภายในหลอดทดลองของสารเคมี พบว่ามีสารเคมีหลายชนิดในธรรมชาติที่มีสมบัติในการลดศักยภาพในการก่อกลายพันธุ์ของสารทดสอบ แต่อย่างไรก็ตามมีรายงานวิจัยน้อยมากที่ทำการทดลองในระบบเซลล์ของสิ่งมีชีวิตโดยตรง ในปี 1994 Bu-Abbas และคณะได้รายงานถึงศักยภาพของแอนทราซีนในการต้านการกลายพันธุ์ของสารก่อมะเร็ง 2-อะมิโน-3-เมทิลอิมิดาโซ[4,5-เอฟ]ควิโนลีน (2-amino-3-methylimidazo[4,5,f]quinoline) ซึ่งเรียกชื่อในงานวิจัยนี้ว่า สาร IQ โดยจะพบการปะปนของสารดังกล่าวในอาหาร เหตุที่ผู้วิจัยเลือกใช้แอนทราซีนในการศึกษาก็ด้วยเหตุผล 3 ประการคือ

1. แอนทราซีนไม่มีสมบัติเป็นสารก่อมะเร็ง และให้ผลลบในการทดสอบพิษในระดับ

พันธุกรรมในการทดสอบระยะสั้น

2. โครงสร้างโมเลกุลของแอนทราซีนประกอบด้วยเบนซีน 3 วงเรียงกันเป็นเส้นตรงในแนวระนาบ จะเข้าไปทำปฏิกิริยากับโปรตีน CYP1 ซึ่งเป็นแฟมิลีหนึ่งของไซโตโครมพี 450 โดยแฟมิลี CYP1 เกี่ยวข้องมากที่สุดกับกลไกการเกิดมะเร็งของสารเคมี (Ioannides and Parke, 1975 อ้างถึงโดย Bu-Abbas *et al.* , 1994)

3. จากการศึกษาในเบื้องต้นพบว่า สารแอนทราซีนที่ฉีดเข้าทางเส้นเลือดของหนูทดลอง ไม่มีผลไปชักนำกิจกรรมของเอนไซม์ CYP1 (Ayrton *et al.* , 1987 อ้างถึงโดย Bu-Abbas *et al.* , 1994)

ผลจากการทดลองเติมแอนทราซีนลงในหลอดทดลองของสาร IQ ที่ผ่านการกระตุ้นด้วยเอนไซม์ CYP1 โดยตรง (*in vitro*) กับการฉีดแอนทราซีนเข้าไปทางเส้นเลือดปริมาณ 20 มก./กก. ของน้ำหนักหนูทดลองแล้วจึงกระตุ้นสาร IQ ด้วยเอนไซม์จากไมโครโซมของหนูดังกล่าว ติดตามศักยภาพในการกลายพันธุ์ของสาร IQ โดยใช้การทดสอบแบบแอมส์ พบว่าแอนทราซีนมีสมบัติในการต้านการกลายพันธุ์ของสาร IQ เฉพาะกรณีที่เติมแอนทราซีนลงในหลอดทดลองโดยตรง ซึ่งสารนี้จะไปมีผลยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ไซโตโครมพี 450 แฟมิลี 1 และเข้าไปทำปฏิกิริยากับอนุพันธ์ของสาร IQ โดยอนุพันธ์ดังกล่าวเกิดจากสาร IQ ถูกแปรสภาพทางชีวภาพด้วยเอนไซม์ไซโต-โครม พี 450 แฟมิลี 1 ทำให้อนุพันธ์นี้ไม่มีความไวในการเป็นสารก่อกลายพันธุ์ ด้วยผลยับยั้งของแอนทราซีนทั้ง 2 ประการดังกล่าว จึงมีผลในการลดการสมมติในการเป็นสารก่อมะเร็งของสาร IQ

แต่จากการทดสอบภายในเซลล์ของสิ่งมีชีวิตโดยฉีดแอนทราซีนเข้าไปทางเส้นเลือดของหนูทดลอง พบว่าสารนี้ไม่มีผลต่อระดับเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการแปรสภาพทางชีวภาพของสาร IQ ดังนั้นจากการเปรียบเทียบผลการทดลองสรุปได้ว่าแอนทราซีนมีศักยภาพต่อต้านการกลายพันธุ์ของสาร IQ เฉพาะภายนอกเซลล์ของสิ่งมีชีวิตเท่านั้น (Bu-Abbas *et al.* , 1994)

ความเป็นพิษ (toxicity) ของสารอนุพันธ์ของแอนทราซีน

จากรายงานวิจัยต่าง ๆ มีการศึกษาถึงความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างโมเลกุลของสาร PAHs กับสมบัติในการเป็นสารก่อมะเร็ง พบว่าเฉพาะสาร PAHs ที่มีวงเบนซีนตั้งแต่ 4 วงขึ้นไปเท่านั้นที่มีผลในการก่อมะเร็ง นอกจากนี้ยังพบว่าการเติมหมู่เมทิลที่ตำแหน่งจำเพาะในโครงสร้างโมเลกุลของ PAHs จะมีผลเพิ่มสมบัติในการก่อมะเร็งของสารดังกล่าว โดยมีรายงานที่กล่าวถึงการเป็นสารก่อมะเร็งของสารอนุพันธ์จากแอนทราซีนและพีแนนทีน (LaVoie and Rice, 1988)

พิษต่อพืชและสัตว์ในน้ำ

พิษแบบเฉียบพลันของสารแอนทราซีนหมายถึงปริมาณสารที่ทำให้สัตว์บก นก หรือปลาตาย และทำให้พืชมีอัตราการเจริญลดลงหรือตาย การเกิดพิษดังกล่าวจะเห็นได้จากการตายของพืชหรือสัตว์ภายใน 2-4 วัน หลังจากสัมผัสกับสารพิษ ส่วนความเป็นพิษของแอนทราซีนต่อพืช โดยทดสอบกับข้าวโพด พบว่าสารนี้ไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงขนาดของราก หรือต่ออัตราการหายใจของข้าวโพด (The New Jersey Department of Health and Senior Services, 1998)

Campanella และ Perrin (1997) รายงานการทดลองเกี่ยวกับพิษของสารแอนทราซีนต่อพืชโดยอาศัยผลทดสอบทางชีวภาพ ใช้วิธีวัดค่าการดูดซับสารที่รากของพืช 2 ชนิด คือ *Calystegia sepium* และ *Medicago sativa* ใช้สารแอนทราซีนที่ติดฉลากกัมมันตภาพรังสีของ ^{14}C ผสมสารดังกล่าวในอาหารเหลวและอาหารชนิดเจล กำหนดความเข้มข้นสารในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวเท่ากับ 0, 5, 10 และ 100 ppb และในอาหารชนิดเจลมีความเข้มข้นแอนทราซีนเป็น 0, 10 และ 100 ppb จากผลการทดลองพบว่า รากพืชที่ดูดซับสารแอนทราซีนจากอาหารเหลวมีความเข้มข้นของแอนทราซีนสูงกว่าสารอาหารที่พืชใช้ในการเจริญ 50 – 60 เท่า และทุกความเข้มข้นของแอนทราซีนที่ใช้ในการทดลองไม่มีผลเป็นพิษต่อการเจริญของพืช (no phytotoxic) ในกรณีที่รากดูดซับสารแอนทราซีนจากอาหารชนิดเจล ที่ทุกระดับความเข้มข้นของสารก็ไม่มีผลเป็นพิษต่อพืชเช่นเดียวกัน

นอกจากจะพบความเป็นพิษแบบเฉียบพลันของแอนทราซีนต่อสัตว์น้ำและต่อคนแล้ว ยังได้มีการศึกษาถึงผลกระทบระยะยาวของสารดังกล่าวต่อสิ่งมีชีวิต โดยแอนทราซีนและ PAHs ชนิดอื่นมีโอกาสเข้าไปสะสมในเนื้อเยื่อของสิ่งมีชีวิต จากกรกินอาหาร ดื่มน้ำ และหายใจเอาอากาศที่มีสารพิษปนเปื้อนเข้าไป ซึ่งสารพิษกลุ่มนี้จะสะสมในเนื้อเยื่อและอวัยวะภายในต่าง ๆ ทั้งของคนและสัตว์ นอกจากนี้ยังพบว่าแอนทราซีนมีผลทำให้เกิดพิษเรื้อรังต่อสัตว์น้ำ โดยคาดว่าความเข้มข้นของสารดังกล่าวในเนื้อเยื่อของปลาสูงกว่าในน้ำที่ปลาอาศัยอยู่ และพบการสะสมทางชีวภาพ (bioaccumulation) ของสารแอนทราซีนใน polychaete worms ชนิดที่เป็นอาหารของสัตว์ในทะเลทรายทั้งชนิดที่มีกระดูกสันหลังและไม่มีกระดูกสันหลัง (Venchueren, 1996) มีการศึกษาความเป็นพิษของแอนทราซีนต่อจุลินทรีย์ พบว่าที่ระดับความเข้มข้นมากกว่า 0.075 มก./ลิตร จะมีผลต่อจุลินทรีย์ถึง 50 % จากทั้งหมด และมีผลยับยั้งการสังเคราะห์แสงของ *Selenastrum capricornutum* (Venchueren, 1996)

Krivobok และคณะ (1998) รายงานว่า แอนทราซีนปริมาณ 0.1 กรัม/ลิตร ไม่มีผลเป็นพิษต่อราทั้ง 39 สายพันธุ์ที่นำมาทดสอบ แต่พบว่าที่ระดับความเข้มข้นต่ำกว่า 100 มก./ลิตร สารทดสอบมีผลยับยั้งการเจริญของ *Deratomyces stemonitis* และ *Cylindrocarpon destructans*

นอกจากนี้แอนทราซีนปริมาณ 0.1 และ 1 กรัม/ลิตร จะมีผลอย่างมากในการยับยั้งการสร้างเส้นใยของ *Sporormiella australis* และ *Sporothrix cyanescens* ตามลำดับ

พิษต่อสัตว์ทดลอง

ค่า LD₅₀ เมื่อฉีดเข้าเส้นเลือดหนู (mice) มีค่าเท่ากับ 430 มก./กก.

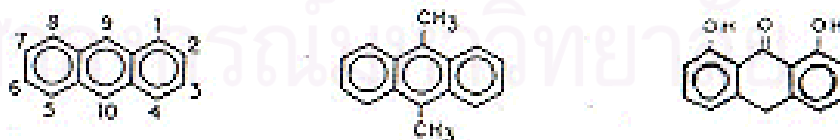
ความสามารถในการเป็นสารก่อกลายพันธุ์ (mutagenicity) (LaVoie and Rice, 1988)

เมื่อทดสอบคุณสมบัติในการเป็นสารก่อกลายพันธุ์ทั้งของแอนทราซีนและสารอนุพันธ์ซึ่งเกิดจากการแทนที่คาร์บอนในโครงสร้างโมเลกุลของแอนทราซีน ใช้การทดสอบแบบแอมส์โดยเติมสารปริมาณ 5 – 200 ไมโครกรัม/จานอาหารเลี้ยงเชื้อ ติดตามการเพิ่มจำนวนของ *Salmonella typhimurium* สายพันธุ์ TA98 และ TA100 ที่เพิ่มขึ้นเป็น 2 เท่า พบว่าที่ความเข้มข้นที่กำหนดสารแอนทราซีนไม่มีคุณสมบัติในการเป็นสารก่อกลายพันธุ์ ส่วนอนุพันธ์ของแอนทราซีนที่มีคุณสมบัติดังกล่าวคือ 9,10-ไดเมทิลแอนทราซีน (9,10-dimethylanthracene) และ 2,3,9,10-ไตรเมทิลแอนทราซีน (2,3,9,10-trimethylanthracene)

การเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันเนื่องจากแสงของ 9,10-ไดเมทิลแอนทราซีน ทำให้เกิดสารเปอร์ออกไซด์ (peroxide) ซึ่งสารดังกล่าวมีความเสถียรและมีส่วนเกี่ยวข้องในการกระตุ้นให้ 9,10-ไดเมทิลแอนทราซีนกลายเป็นสารก่อกลายพันธุ์ โดยพบว่าทำให้เกิดการกลายพันธุ์ใน *Drosophila melanogaster* และชักนำให้เกิดความผิดปกติในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอในเซลล์ของหนู

2-เมทิลแอนทราซีน (2-methylanthracene) และ 9-เมทิลแอนทราซีน (9-methylanthracene) เป็นสารก่อกลายพันธุ์ในเซลล์ lymphoblast ในคน

แอนทราลีน (anthralin) เป็นสารเริ่มต้นในการก่อมะเร็งจากการทดสอบบนผิวหนังของหนูทดลอง รูปที่ 2.5 แสดงโครงสร้างของแอนทราซีนเปรียบเทียบกับ 9,10-ไดเมทิลแอนทราซีนและแอนทราลีน



anthracene 9,10-dimethylanthracene anthralin

รูปที่ 2.5 โครงสร้างของแอนทราซีน , 9,10-ไดเมทิลแอนทราซีน และแอนทราลีน (LaVoie and Rice, 1988)

ความสามารถในการเป็นสารก่อมะเร็ง (carcinogenicity) (LaVoie and Rice, 1988)

ยังไม่มีรายงานเกี่ยวกับการเป็นสารก่อมะเร็งของแอนทราซีนในคน แต่ที่ความเข้มข้นสูง ๆ แอนทราซีนก่อให้เกิดมะเร็งในสัตว์ทดลองได้ เช่นเมื่อทดสอบที่ผิวหนังของหนูสายพันธุ์ Swiss Millerton ปริมาณแอนทราซีน 150 มก./กรัม มีความสามารถในการชักนำให้เกิดมะเร็งได้อย่างสมบูรณ์

เมื่อทดสอบความสามารถในการเป็นสารก่อมะเร็งของอนุพันธ์ของแอนทราซีนโดยทดสอบที่ผิวหนังของหนูสายพันธุ์ CDI พบว่า 9,10-ไดเมทิลแอนทราซีน, 2,9,10-ไตรเมทิลแอนทราซีน และ 2,3,9,10-เตตระเมทิลแอนทราซีน (2,3,9,10-tetramethylanthracene) ปริมาณ 1 มก./กก. เป็นสารชักนำให้เกิดเนื้องอก (tumor initiator)

มีรายงานเกี่ยวกับการเป็นสารก่อมะเร็งของแอนทราลิน และเมื่อทดสอบสารดังกล่าวร่วมกับเบนโซ[เอ]ไพรีน มีผลทำให้เกิดมะเร็งที่ผิวหนังของหนูทดลอง

สำนักงานคุ้มครองสิ่งแวดล้อมสหรัฐอเมริการะบุปริมาณสารแอนทราซีนและ PAHs บางชนิดที่ยอมรับได้ ซึ่งถ้าพบสาร PAHs เกินกว่าปริมาณที่กำหนดจะเป็นอันตรายต่อสุขภาพ ดังแสดงในตารางที่ 2.5

ตารางที่ 2.5 ระดับปริมาณสูงสุดของแอนทราซีนและ PAHs บางชนิดที่พบในร่างกายของมนุษย์ ซึ่งอยู่ในระดับที่ยอมรับได้ (จินตนา สายวรรณ, 2541)

ชนิดของสาร PAHs	ระดับที่ยอมรับ (มก./กก.ของน้ำหนักตัว)
แอนทราซีน	0.3
อะซีแนพรีน	0.06
ฟลูออแรนทีน	0.04
ฟลูออรีน	0.04
ไพรีน	0.03

วิธีการทำลายแอนทราซีนและ PAHs ชนิดอื่น

แอนทราซีน และสารพิษต่าง ๆ ที่อยู่ในดินอาจเกิดการเปลี่ยนแปลงได้หลายลักษณะดังนี้

1. สลายตัวโดยปฏิกิริยาเคมี (chemical decomposition)
2. สลายตัวโดยแสง (photooxidation)
3. ระเหยจากดินสู่บรรยากาศ (volatization)
4. เคลื่อนย้ายไปสู่แหล่งน้ำ (movement by runoff and watertable)
5. เข้าสู่สิ่งมีชีวิต (bioaccumulation)

6. จุลินทรีย์ย่อยสลาย (microbial degradation)

การเปลี่ยนแปลงในลักษณะดังกล่าวทำให้สารพิษส่วนหนึ่งลดปริมาณลง แต่อย่างไรก็ตาม ปริมาณการปนเปื้อนของสารเคมีอันตรายต่าง ๆ ในสิ่งแวดล้อมยังคงมีปริมาณสูง โดยเฉพาะอย่างยิ่งสาร PAHs ที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงก็ยังคงตกค้างในสิ่งแวดล้อม เนื่องจากละลายน้ำได้น้อยมาก และถูกดูดซับโดยอนุภาคที่อยู่ในดิน จึงยากต่อการถูกทำลาย (Cerniglia, 1992)

ขั้นตอนของการบำบัดสารพิษจะต้องทราบถึงองค์ประกอบของสาร เพื่อให้สามารถคัดเลือก และกำหนดวิธีการที่เหมาะสมในการจัดการ โดยอาจใช้วิธีการทำลายฤทธิ์ด้วยระบบเคมี-ฟิสิกส์ (chemical-physical treatment) การเผาที่อุณหภูมิสูง (incineration) และกำจัดกากที่เหลือโดยวิธีฝังกลบ (land disposal) ในที่สุด แต่อาจมีมลพิษบางตัวที่เกิดขึ้นจากการทำลายสารซึ่งต้องมีการกำจัดในขั้นตอนต่อไป วิธีลดการปนเปื้อนของแอนทราซีนและสารพิษดังกล่าวมีข้อดีคือ ใช้ประโยชน์ในกรณีที่สารเคมีแพร่กระจายไปสู่บริเวณข้างเคียงอย่างรวดเร็ว แต่มีข้อเสียคืออาจก่อให้เกิดสารพิษชนิดใหม่ขึ้นได้ และขั้นตอนการบำบัดยังเสียค่าใช้จ่ายสูงอีกด้วย (Lee, 1995)

การบำบัดโดยวิธีชีวภาพ (bioremediation)

เป็นทางเลือกหนึ่งในการช่วยลดความเป็นพิษของแอนทราซีน และ PAHs รวมทั้งกากของเสียอันตรายชนิดอื่น ๆ มีรายงานวิจัยพบว่า การย่อยสลายสารพิษโดยจุลินทรีย์เป็นกระบวนการหลักที่มีผลลดการปนเปื้อนของดินและตะกอนดิน โดย PAHs บางชนิดจะถูกย่อยสลายได้อย่างสมบูรณ์ (mineralization) ได้เป็นคาร์บอนไดออกไซด์ น้ำ และพลังงานในการเจริญของเชื้อ หรือ PAHs บางชนิดอาจเกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างบางส่วน (partially transformed) กระบวนการทั้งสองชนิดดังกล่าวอาจเกิดโดยเชื้อเพียงชนิดเดียว หรือโดยกลุ่มจุลินทรีย์ (Cerniglia, 1992)

ข้อได้เปรียบของวิธีบำบัดการปนเปื้อนของแอนทราซีน และ PAHs อื่น ๆ โดยใช้การย่อยสลายด้วยวิธีชีวภาพ คือ สามารถปฏิบัติได้ในพื้นที่ที่เกิดการปนเปื้อนและทำให้พื้นที่ดังกล่าวเกิดความเสียหายน้อยที่สุด ช่วยลดค่าใช้จ่ายในการขนส่งและค่าแรงงาน สามารถกำจัดสารพิษได้อย่างถาวร และยังสามารถควบคุมคู่ไปกับวิธีทางเคมี เพื่อให้สามารถทำลายสารพิษได้อย่างสมบูรณ์

แต่อย่างไรก็ตามการย่อยสลายโดยวิธีชีวภาพก็มีข้อเสีย คือ สารที่มีคลอรีนหรือโลหะเป็นองค์ประกอบในปริมาณสูงจะไม่ถูกทำลาย หรืออาจมีการผลิตสารตัวกลางที่มีความเป็นพิษสูงกว่าสารตั้งต้น และเสียค่าใช้จ่ายสูงกว่าวิธีอื่น ๆ สำหรับขั้นแรกของการปฏิบัติงาน รวมทั้งต้องมีการควบคุมปัจจัยต่าง ๆ ทั้งทางชีวภาพและกายภาพ

การบำบัดทางชีวภาพสามารถปฏิบัติได้ทั้งในพื้นที่ที่มีการปนเปื้อน (*in situ*) หรือขนย้าย

สารพิษไปบำบัดนอกพื้นที่ (*ex situ*) โดย Marks และคณะ รายงานในปี 1992 ถึงการพัฒนาวิธีบำบัด PAHs ในขั้นแรกใช้เชื้อย่อยสลายสารพิษเพื่อให้โครงสร้างบางส่วนถูกทำลาย ขั้นต่อมาก็นำวิธีการบำบัดดิน (*land treatment*) เข้ามาช่วย เพื่อให้สารตัวกลางที่เกิดขึ้นถูกกำจัดอย่างสมบูรณ์ วิธีการดังกล่าวช่วยลดค่าใช้จ่ายเมื่อเทียบกับการทำลาย PAHs โดยการเผาที่อุณหภูมิสูงได้ถึง 3 เท่า

การย่อยสลาย PAHs โดยเชื้อจุลินทรีย์บริสุทธิ์และกระบวนการโคเมตาบอลิซึมร่วมของกลุ่มเชื้อจุลินทรีย์มีการศึกษามาประมาณ 80 ปีแล้ว (Cerniglia, 1992) แต่การจะนำวิธีดังกล่าวมาใช้ลดการปนเปื้อนของแอนทราซีน และ PAHs ได้อย่างมีประสิทธิภาพนั้น จำเป็นจะต้องทำความเข้าใจเกี่ยวกับเชื้อจุลินทรีย์ ระบบเอนไซม์และสภาพแวดล้อมที่จำเป็นต่อการเจริญของจุลินทรีย์ เพื่อให้เกิดการย่อยสลายได้มากที่สุด โดย PAHs ที่มีมวลโมเลกุลต่ำจะถูกย่อยสลายได้เร็วกว่า PAHs ชนิดที่มีมวลโมเลกุลสูงกว่า

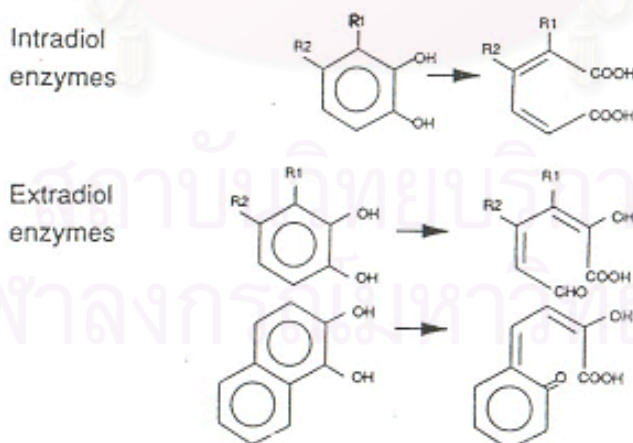
ข้อได้เปรียบของแบคทีเรียต่อการนำมาใช้ในเทคนิคการย่อยสลายทางชีวภาพ

รายงานวิจัยต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายของสารเคมีอันตรายโดยใช้วิธีบำบัดทางชีวภาพ มักจะมุ่งเน้นไปที่การใช้แบคทีเรียเป็นตัวย่อยสลายมากกว่ารา ทั้งนี้เนื่องมาจากการเลี้ยงเชื้อทำได้ง่าย เจริญเติบโตได้เร็วและเหมาะสมกับการศึกษาในระดับพันธุกรรม รวมทั้งมีความสามารถในการย่อยสลายแอนทราซีนและสารเคมีปนเปื้อนอื่น ๆ เพื่อนำมาใช้เป็นแหล่งคาร์บอนหรือแหล่งพลังงานได้ดีกว่า (Bouwer and Zehnder, 1993)

สาร PAHs บางชนิดจะถูกย่อยสลายบางส่วนโดยระบบเอนไซม์ย่อยสลายลิกนินของรา-ไวท์โรท (*white rot fungi*) ซึ่งประกอบด้วยเอนไซม์ลิกนินเปอร์ออกซิเดส (*lignin peroxidase*) และแมงกานีสเปอร์ออกซิเดส (*manganese peroxidase*) แต่ต้องใช้สภาวะโคเมตาบอลิซึม (*co-metabolism*) ในการย่อยสลายร่วมกับสารอินทรีย์ชนิดอื่น (*secondary substrate*) ที่ย่อยได้ง่ายกว่า เช่น เซลลูโลส กลูโคส ในกระบวนการโคเมตาบอลิซึมร่วมของสารเคมีอันตรายสารดังกล่าวจะถูกเปลี่ยนรูปไปเพียงบางส่วนเท่านั้น ซึ่งการเปลี่ยนแปลงนี้อาจไม่มีผลในการลดความเป็นพิษของสาร ดังนั้นจึงควรมีการใช้เชื้อผสมระหว่างแบคทีเรียและราในการย่อยสลายสารพิษเพื่อให้กระบวนการดังกล่าวเกิดขึ้นอย่างสมบูรณ์ ตัวอย่างเช่นรายงานวิจัยของ Boonchan, Britz และ Stanley (2000) ซึ่งกล่าวถึงประสิทธิภาพของเชื้อผสมระหว่างรา *Penicillium janthinellum* VUO 10201 กับแบคทีเรีย *Stenotrophomonas maltophilia* VUN 10010 หรือรากับกลุ่มแบคทีเรีย (*consortium*) VUN 10009 ในการย่อยสลาย PAHs ที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงซึ่งปนเปื้อนอยู่ในดิน มีผลทำให้ 53 % ของเบนโซ[เอ]ไพรีน เกิดการย่อยสลายอย่างสมบูรณ์ได้เป็นคาร์บอนไดออกไซด์

ซึ่งกลุ่มเชื่อมสมระหว่างแบคทีเรียกับรานี้จะลดประสิทธิภาพในการเป็นสารก่อกลายพันธุ์ของสาร PAHs ที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงได้ดีกว่าการใช้เชื้อจุลินทรีย์เพียงเชื้อเดียว

ราย่อยแอนทราซีนและ PAHs ชนิดอื่นโดยเติมหมู่ไฮดรอกซี (-OH) ที่วงเบนซีน ในขณะที่แบคทีเรียออกซิไดซ์สารดังกล่าวโดยการเติมออกซิเจนที่วงเบนซีน โดยอาศัยกลไกของระบบเอนไซม์ไดออกซีจีเนส ซึ่งออกซิเจนจะเข้าไปทำปฏิกิริยากับสารโดยตรง หรือไปทำหน้าที่เป็นตัวรับอิเล็กตรอนในปฏิกิริยาออกซิเดชัน-รีดักชันเพื่อสร้างพลังงานและวัตถุดิบในการสังเคราะห์เซลล์ของจุลินทรีย์ โดยได้แคทีกอล (catechol) เป็นผลิตภัณฑ์สุดท้ายก่อนที่ PAHs จะถูกย่อยสลายอย่างสมบูรณ์ได้เป็นน้ำและคาร์บอนไดออกไซด์ (CO₂) สำหรับกรณีที่แบคทีเรียใช้ PAHs ชนิดนั้น ๆ เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงานได้อย่างสมบูรณ์ ซึ่งแคทีกอลจะเกิดการแตกวงได้ 2 แบบขึ้นกับสายพันธุ์แบคทีเรีย คือการแตกวงแบบอโธ (ortho cleavage) ที่เกิดระหว่างพันธะคาร์บอนของหมู่ไฮดรอกซี 2 หมู่ ส่วนการแตกวงแบบเมตา (meta cleavage) จะเกิดในตำแหน่งพันธะคาร์บอนที่อยู่ใกล้เคียงกับหมู่ไฮดรอกซีหมู่ใดหมู่หนึ่ง โดยอาศัยกิจกรรมของเอนไซม์ไดออกซีจีเนสเช่นเดียวกัน แบคทีเรียที่สามารถออกซิไดซ์อินโดล (indole) เป็นอินดิโก (indigo) จะสังเกตได้จากโคโลนีของแบคทีเรียที่เปลี่ยนเป็นสีน้ำเงินหลังจากได้รับไฮระเหยของอินโดล แสดงว่ามีการแตกวงแบบอโธเกิดขึ้น ส่วนการแตกวงแบบเมตาสังเกตได้จากโคโลนีของแบคทีเรียที่เปลี่ยนเป็นสีเหลืองไข่แดงภายหลังพ้นทับผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งด้วย 2,3-ไดไฮดรอกซีไบฟีนิล (2,3-dihydroxy biphenyl) ที่ละลายในไดเอทิลอีเทอร์ (diethylether) (Dagher *et al.* , 1997)



รูปที่ 2.6 การแตกวงแคทีกอลแบบอโธ (intradiol enzymes) และแบบเมตา (extradiol enzymes) (Cerniglia, 1992)

การย่อยสลายแอมโมเนียไนโตรเจนโดยจุลินทรีย์

จุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายแอมโมเนียไนโตรเจนได้มีทั้งแบคทีเรีย และราดังสรุปไว้ในตารางที่ 2.6, 2.7 และ 2.8 ตามลำดับ

ตารางที่ 2.6 ชนิดของแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายแอมโมเนียไนโตรเจนได้

สายพันธุ์แบคทีเรีย	เอกสารอ้างอิง
<i>Alcaligenes denitrificans</i> WW1	Weissenfels <i>et al.</i> , 1991
<i>Alcaligenes faecalis</i> AEK2	Kiyohara, Nagao and Yana, 1982
<i>Arthorbacter</i> sp.	Savino and Lollini, 1977
<i>Bacillus phenanthrenicus bakiensis</i>	Evans <i>et al.</i> , 1965
<i>Bacillus phenanthrenicus guricus</i>	Evans <i>et al.</i> , 1965
<i>Bacillus phenanthreicum</i>	Evans <i>et al.</i> , 1965
<i>Bijerinckia</i> sp.	Evans <i>et al.</i> , 1965
<i>Bijerinckia</i> sp. B – 836	Akhtar, Boyd and Thompson, 1975
<i>Comamonas testosteroni</i>	Dagher <i>et al.</i> , 1997
<i>Coryneform bacillus</i> SantMu 3	Bouchez, Blanchet and Vandecasteele, 1995
<i>Flavobacterium</i> sp.	Mueller <i>et al.</i> , 1990
<i>Mycobacterium</i> sp.	Akhtar <i>et al.</i> , 1975
<i>Mycobacterium</i> sp. Strain S1	Tongpim and Pickard, 1999
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Evans <i>et al.</i> , 1965
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> stain 57	Dagher <i>et al.</i> , 1997
<i>Pseudomonas cepacia</i>	Ellis, Harold and Klongerg, 1991
<i>Pseudomonas cepacia</i> strain F297	Grifoll <i>et al.</i> , 1995
<i>Pseudomonas fluorescens</i> strain 62	Dagher <i>et al.</i> , 1997
<i>Pseudomonas fluorescens</i> LP6a	Tongpim and Pickard, 1999
<i>Pseudomonas paucimobilis</i>	Evans <i>et al.</i> , 1965
<i>Pseudomonas paucimobilis</i> EPA505	Mueller <i>et al.</i> , 1990
<i>Pseudomonas putida</i>	Jerina <i>et al.</i> , 1976
<i>Pseudomonas putida</i> strain GZ44	Goyal and Zylstra, 1996

ตารางที่ 2.6 (ต่อ)

สายพันธุ์แบคทีเรีย	เอกสารอ้างอิง
<i>Pseudomonas putida</i> strain 34	Dagher <i>et al.</i> , 1997
<i>Rhodococcus</i> sp.	Bouchez, Blanchet and Vandecasteele, 1996
<i>Rhodococcus</i> sp. strain UW1	Walter <i>et al.</i> , 1991
<i>Sphingomonas</i> sp. Strain P2	ณัฐพันธุ์ ศุภกา, 2542
<i>Sphingomonas</i> sp. Strain 107	Dagher <i>et al.</i> , 1997
<i>Sphingomonas paucimobilis</i>	Kastner <i>et al.</i> , 1999
<i>Sphingomonas yanoikuyae</i> B1	Kim <i>et al.</i> , 1997

ตารางที่ 2.7 ชนิดของราที่สามารถย่อยแอมโมเนียได้

สายพันธุ์รา	เอกสารอ้างอิง
<i>Bjerkandera</i> sp.	Cerniglia, 1992
<i>Bjerkandera</i> sp. strain BOS65	Field <i>et al.</i> , 1995
<i>Cunninghamella elegans</i>	Cerniglia , 1992
<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	Hammel, Green and Gai, 1991
<i>Ramaria</i> sp.	Sutherland <i>et al.</i> , 1995
<i>Rhizoctonia solani</i>	Field <i>et al.</i> , 1995
<i>Trametes versicolor</i>	Collins <i>et al.</i> , 1996

ตารางที่ 2.8 ชนิดของราที่สามารถย่อยแอนทราซีนปริมาณ 0.1 กรัม/ลิตร ได้มากกว่า 50 % โดยจำแนกตามสกุล (Kribobok *et al.* , 1998)

สายพันธุ์รา	ปริมาณแอนทราซีน(%)
Agonomycetes	
<i>Rhizoctonia solani</i>	86
Ascomycetes	
<i>Cryphonectria parasitica</i>	96
Basidiomycetes	
<i>Ceriporiopsis subremispora</i>	88
<i>Oxysporus</i> sp.	94
<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	58
Dematiaceae	
<i>Cladosporium herbarum</i>	85
<i>Drechslera spicifera</i>	79
Mucedinaceae	
<i>Verticillium lecanii</i>	77
Sphaeropsidales	
<i>Coniothyrium sporulosum</i>	57
<i>Phoma herbarum</i>	60
Stillbellales	
<i>Doratomyces stemonitis</i>	71
Tuberculariales	
<i>Fusarium moniliforme</i> var. <i>subglutinans</i>	77
Zygomycetes	
<i>Cunninghamella blakesleeana</i>	82
<i>Cunninghamella echinulate</i>	87
<i>Cunninghamella elegans</i>	79
<i>Mortierella ramanniana</i>	67
<i>Rhizopus arrhizus</i>	95

วิธีเมตาบอลิซึมที่จุลินทรีย์แต่ละกลุ่มใช้ในกระบวนการย่อยสลายแอนทราซีน

กระบวนการย่อยสลายแอนทราซีนของจุลินทรีย์แต่ละกลุ่มอาศัยกิจกรรมของเอนไซม์ที่แตกต่างกัน และผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นก็จะถูกย่อยสลายต่อไปโดยวิธีเมตาบอลิซึมที่ต่างกันตามชนิดของจุลินทรีย์ โดยสามารถแยกออกเป็นกลุ่มต่าง ๆ กันคือ

กระบวนการย่อยสลายแอนทราซีนโดยแบคทีเรีย

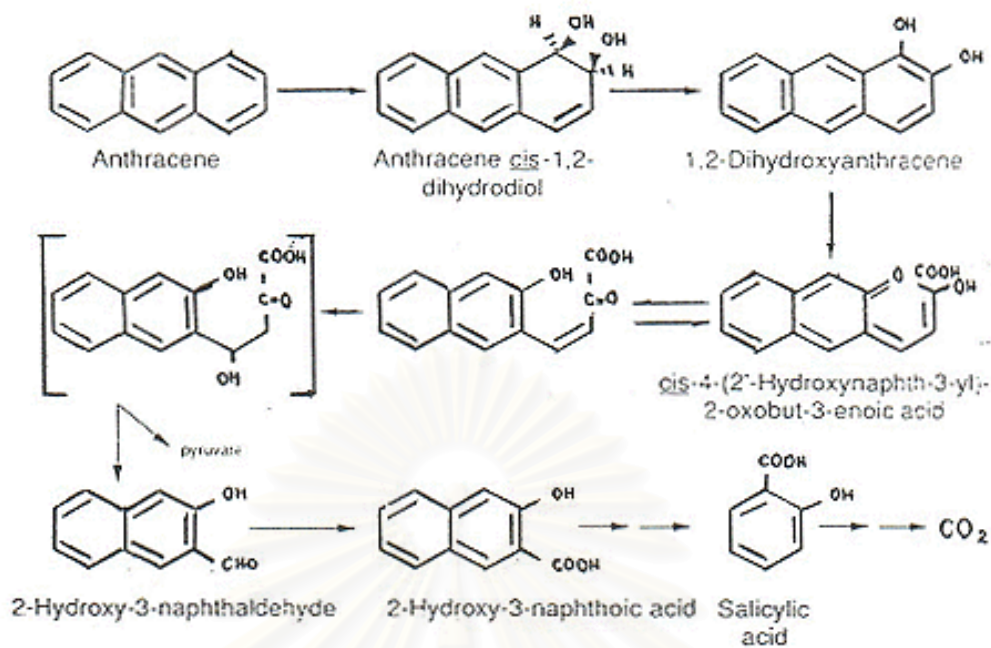
กระบวนการย่อยสลายแอนทราซีนโดยราขาวหรือท (white rot fungi)

กระบวนการย่อยสลายแอนทราซีนโดยรา และสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม

กระบวนการย่อยสลายแอนทราซีนโดยแบคทีเรีย

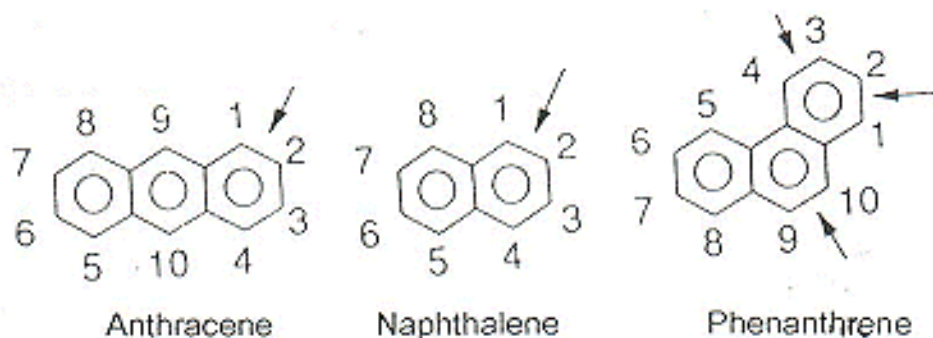
Evans และคณะ (1965) รายงานว่า *Pseudomonas* sp. จะออกซิไดซ์ (oxidize) วงอะโรมาติกของแอนทราซีนโดยอาศัยกิจกรรมของเอนไซม์ไดออกซีจีเนส (dioxygenase) เปลี่ยนแอนทราซีนไปเป็นแอนทราซีน ซิส-1,2-ไดไฮโดรไดออล (anthracene *cis*-1,2-dihydrodiol) และผลิตภัณฑ์นี้จะถูกเปลี่ยนต่อไปเป็น 1,2-ไดไฮดรอกซีแอนทราซีน (1,2-dihydroxyanthracene) โดยอาศัยกิจกรรมของเอนไซม์ดีไฮโดรจีเนส (dehydrogenase) และโดยกิจกรรมของเอนไซม์ออกซีจีเนส (oxygenase) ผลิตภัณฑ์ดังกล่าวจะถูกเปลี่ยนเป็น กรดซิส-4-(2'-ไฮดรอกซีแนฟท์-3-อิล)-2-ออกโซบิวท์-3-อิกโนอิก (*cis*-4-(2'-hydroxynaphth-3-yl)-2-oxobut-3-enoic acid) ซึ่งกรดนี้จะแตกตัวต่อไปทำให้วงอะโรมาติกแตกออกเป็น 2-ไฮดรอกซี-3-แนฟทาลดีไฮด์ (2-hydroxy-3-naphthaldehyde) สารดังกล่าวจะถูกเปลี่ยนต่อไปเป็น กรด 2-ไฮดรอกซี-3-แนฟโทอิก (2-hydroxy-3-naphthoic acid) โดยเอนไซม์ดีไฮโดรจีเนส และเกิดปฏิกิริยาดึงหมู่คาร์บอกซิลออกจากกรดได้ผลิตภัณฑ์เป็น 2,3 - ไดไฮดรอกซีแนฟทาลีน (2,3-dihydroxynaphthalene) ส่วนวิธีในการย่อยสลาย 2,3-ไดไฮดรอกซีแนฟทาลีนเป็นกรดซาลิไซลิก (salicylic acid) และแคทีคอลล ใช้วิธีเมตาบอลิซึมเดียวกันกับการย่อยสลายแนฟทาลีน (Evans *et al.* ,1965 ; Jerina *et al.* , 1976)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



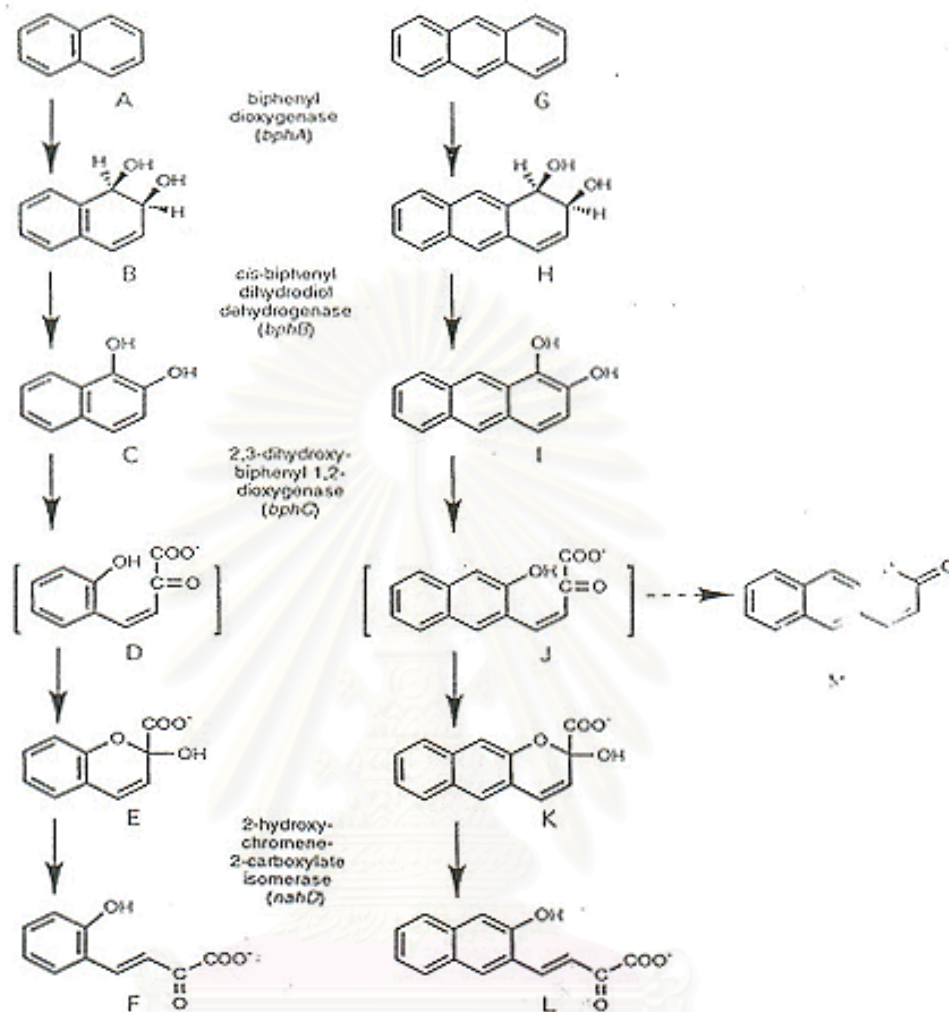
รูปที่ 2.7 วิธีเมตาบอลิซึมที่ *Pseudomonas aeruginosa* ใช้ในการย่อยสลายแอนทราซีน (Evans *et al.* , 1965 อ้างถึงโดย Sutherland *et al.* , 1995)

รูปที่ 2.8 แสดงตำแหน่งที่มีความหนาแน่นของอิเล็กตรอนสูงสุด ซึ่งเรียกว่าบริเวณเค (K regions) ในพันธะระหว่างคาร์บอนในโครงสร้างของแอนทราซีน แนพธาดีน และฟีนานทรีน ตำแหน่งดังกล่าวจะแตกต่างกันขึ้นอยู่กับโครงสร้างโมเลกุล โดยแอนทราซีนและแนพธาดีนซึ่งประกอบด้วยวงเบนซีนเรียงตัวกันเป็นเส้นตรง จะมีบริเวณเคอยู่ที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 1 และ 2 ส่วนฟีนานทรีนซึ่งมีโครงสร้างโมเลกุลเป็นมุมจะมีบริเวณเคอยู่ที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 9 และ 10 เอนไซม์ที่ทำให้เกิดการย่อยสลายจะเข้าทำปฏิกิริยาที่บริเวณเคในโครงสร้างโมเลกุลของสารดังกล่าว แต่การแตกวงของเบนซีนอาจจะไม่เกิดขึ้นที่บริเวณเค (Rogoff, 1962 อ้างถึงโดย Evans *et al.* , 1965)



รูปที่ 2.8 แสดงตำแหน่งที่มีความหนาแน่นอิเล็กตรอนสูงสุดในโครงสร้างโมเลกุลของแอนทราซีน เปรียบเทียบกับแนพทาลีนและฟีนแอนทริน

Sphingomonas yanoikuyae B1 ออกซิไดซ์แอนทราซีนโดยอาศัยกิจกรรมของเอนไซม์ไบฟีนีลไดออกซีจีเนส (biphenyl dioxygenase) ได้เป็น ซิส-ไดไฮดรอกซี-1,2-ไดไฮโดรแอนทราซีน (cis-dihydroxy-1,2-dihydroanthracene) และเอนไซม์ ซิส-ไบฟีนีล ไดไฮโดรไดออกซีดีไฮโดรจีเนส (cis-biphenyl dihydrodiol dehydrogenase) จะเปลี่ยนผลิตภัณฑ์ดังกล่าวไปเป็น 1,2-ไดไฮดรอกซีแอนทราซีน และโดยกิจกรรมของเอนไซม์ 2,3-ไดไฮดรอกซีไบฟีนีล 1,2-ไดออกซีจีเนส (2,3-dihydroxybiphenyl 1,2-dioxygenase) จะเปลี่ยน 1,2-ไดไฮดรอกซีแอนทราซีนไปเป็น ซิส-4-(2'-ไฮดรอกซีแนพ-3-อิล)2-ออกโซบัท-3-อีโนเอต (*cis*-4-(2'-hydroxynaph-3-yl)-2-oxobut-3-enoate) ผลิตภัณฑ์นี้ส่วนหนึ่งจะถูกเปลี่ยนเป็น 6,7-เบนโซคูมาริน (6,7-benzocoumarin) ซึ่งจะไม่ถูกย่อยสลายต่อไป (dead end metabolite) และอีกส่วนหนึ่งจะถูกเปลี่ยนเป็น 2-ไฮดรอกซีเบนโซโครมีน-2-คาร์บอกซีเลท (2-hydroxybenzochromene-2-carboxylate) และโดยกิจกรรมของเอนไซม์ 2-ไฮดรอกซี-โครมีน-2-คาร์บอกซีเลท-ไอโซเมอเรส (2-hydroxy-chromene-2-carboxylate-isomerase) จะเปลี่ยน 2-ไฮดรอกซีเบนโซโครมีน-2-คาร์บอกซีเลท ไปเป็น ทรานส์ (2'-ไฮดรอกซีแนพ-3-อิล)-2-ออกโซบัท-3-อีโนเอต (*trans*-4-(2'-hydroxynaph-3-yl)-2-oxobut-3-enoate) (Kim *et al.* , 1997)



รูปที่ 2.9 วิถีเมตาบอลิซึมในการย่อยสลายแอนทราซีนโดย *Spingomonas yanoikuyae* B1 และความสัมพันธ์กับวิถีเมตาบอลิซึมในการย่อยสลายแนพทาลีน (Kim *et al.* , 1997) A:แนพทาลีน ,B:ซิส -1,2-ไดไฮดรอกซี-1,2-ไดไฮโดรแนพทาลีน (*cis*-1,2-dihydroxy-1,2-dihydronaphthalene),C : 1,2-ไดไฮดรอกซีนแนพทาลีน (1,2-dihydroxynaphthalene), D:ซิส-ไฮดรอกซีเบนซิลไอดีนไพรูเวท (*cis*-*o*-hydroxybenzylidenepyruvate),E:2-ไฮดรอกซีโครมีน-2-คาร์บอกซีเลท (2-hydroxychromene-2-carboxylate),F:ทรานส์-ไฮดรอกซีเบนซิลไอดีนไพรูเวท (*trans*-*o*-hydroxybenzylidenepyruvate), G:แอนทราซีน , H:ซิส-ไดไฮดรอกซี-1,2-ไดไฮโดรแอนทราซีน, I:1,2-ไดไฮดรอกซีแอนทราซีน (1,2-dihydroxyanthracene), J:ซิส-4-(2'-ไฮดรอกซีแนพท์-3-อิล)-2-ออกซิบัท-3-อีโนเอท, K:2-ไฮดรอกซีเบนโซโครมีน-2-คาร์บอกซีเลท, L:ทรานส์-4-(2'-ไฮดรอกซีแนพ-3-อิล)-2-ออกซิบัท-3-อีโนเอท, M:6,7-เบนโซคูมาริน

Tongpim และ Pickard (1996) รายงานการแยกเชื้อจากดินที่มีครีโอลิโทปนเปื้อนโดยใช้แอนทราซีนเป็นแหล่งคาร์บอน และจำแนกแบคทีเรียดังกล่าวอยู่ในสกุล *Rhodococcus* สายพันธุ์ S1 แต่จากผลวิเคราะห์ลำดับเบสของ 16 เอสไรโบโซมัลอาร์เอ็นเอ (16s rRNA) ของ Tongpim และ Pickard ในปี 1999 สามารถยืนยันได้ชัดเจนว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ S1 จัดอยู่ในสกุล *Mycobacterium* โดยเพิ่มจำนวนได้น้อยมากในอาหารเหลวที่มีแอนทราซีนเป็นแหล่งคาร์บอน ส่วนใหญ่เชื้อจะเกาะอยู่เฉพาะบริเวณผิวด้านนอกของผลึกแอนทราซีน เนื่องจากสารนี้จะละลายได้น้อยมาก (0.07 มก./ลิตร) จากการทดสอบความสามารถของเชื้อในการย่อยสลาย PAHs ทั้งหมด 10 ชนิด พบว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ S1 ไม่สามารถใช้ สาร PAHs ชนิดอื่น ๆ เป็นแหล่งคาร์บอนได้นอกเหนือจากแอนทราซีน แสดงว่าระบบเอนไซม์ไดออกซิจีเนสที่เกี่ยวข้องกับปฏิกิริยาแรกในการย่อยสลายแอนทราซีนโดย *Mycobacterium* sp. สายพันธุ์ S1 มีความจำเพาะสูง เพราะโดยปกติระบบเอนไซม์ดังกล่าวจะมีความจำเพาะต่อชนิดของสารตั้งต้นที่เข้าทำปฏิกิริยา

Weissenfels และคณะ (1991) รายงานว่า *Alcaligenes denitrificans* WW1 สามารถย่อยสลายแอนทราซีนไปเป็น 1,2-ไดไฮดรอกซีแอนทราซีนซึ่งจะถูกเปลี่ยนต่อไปเป็นกรด2-ไฮดรอกซี-3-แนฟโธอิก ตามลำดับ

Jerina และคณะ รายงานในปี 1976 ถึงความสามารถของ *Flavobacterium* sp. ในการย่อยสลายแอนทราซีนไปเป็น แอนทราซีน 1,2-ไดไฮโดรไดออล

Beijerinckia sp. B-836 ออกซิไดส์แอนทราซีนไปเป็น 1,2-ไดไฮโดรแอนทราซีน-ซิส-1,2-ไดออล (1,2-dihydroanthracene-*cis*-1,2-diol) (Akhtar *et al.* , 1975)

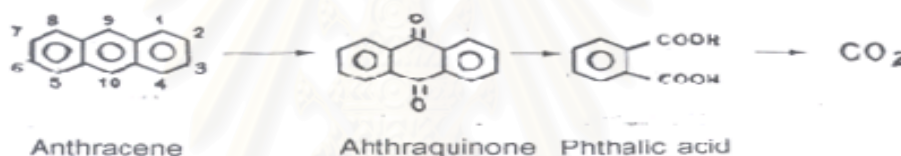
มีรายงานเกี่ยวกับการย่อยสลายแอนทราซีนโดย coryneform bacillus สายพันธุ์ SantMu 3 ได้ผลิตภัณฑ์เป็นมวลเซลล์ 25 % สารมัธยันต์ 7 % และคาร์บอนไดออกไซด์ 65 % โดยที่ไม่มีสารทดสอบเหลืออยู่ จำนวนโมลออกซิเจนที่ใช้ในการย่อยสลายแอนทราซีนและการสร้างมวลเซลล์ต่อจำนวนโมลตั้งต้นของสารทดสอบ มีค่าเท่ากับ 10.9 และ 0.5 ตามลำดับ (Bouchez, Blanchet and Vandecasteele, 1996)

กระบวนการย่อยสลายแอนทราซีนโดยราไวท์รอก

กลุ่มราไวท์รอกสามารถย่อยสลายลิกนิน (lignin) และสารตั้งต้นอื่น ๆ อีกหลายชนิด รวมทั้งแอนทราซีนและ PAHs โดยอาศัยกิจกรรมของระบบเอนไซม์เพอออกซิเดส (peroxidase) ซึ่งประกอบด้วยเอนไซม์ลิกนินเพอออกซิเดส แมงกานีสเพอออกซิเดส และเอนไซม์แลคเคส (laccase) โดยระบบเอนไซม์ของราไวท์รอกซึ่งถูกหลั่งออกมาออกเซลล์จะไม่จำเพาะต่อชนิดของสารตั้งต้น กลไกการย่อยสลายรวมทั้งระบบเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนโครงสร้างของ

แอนทราซีน และ PAHs มีความซับซ้อน เนื่องจากการสังเคราะห์เอนไซม์ลิกันินเพอออกซิเดส และแมงกานีสเพอออกซิเดสจะขึ้นอยู่กับปริมาณไนโตรเจนภายในเซลล์ ความเข้มข้นของออกซิเจน และความเข้มข้นของไอออนแมงกานีส (Mn^{2+}) ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Kotterman และคณะ (1994) รายงานว่าระบบเอนไซม์เพอออกซิเดสใน *Phanerochaete chrysosporium* จะถูกชักนำก็ต่อเมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารที่จำกัดปริมาณคาร์บอน ไนโตรเจน หรือ ซัลเฟอร์ แต่โดยทั่วไปมักจะใช้การจำกัดปริมาณไนโตรเจนเพื่อชักนำการสังเคราะห์ระบบเอนไซม์ดังกล่าว นอกจากนี้ยังพบว่าออกซิเจนในปริมาณสูงจะเพิ่มอัตราการสังเคราะห์เอนไซม์ภายในเซลล์ และเพิ่มกิจกรรมการย่อยสลาย PAHs อีกด้วย ราไวท์รอกแต่ละสกุลจะใช้วิถีเมตาบอลิซึมในการย่อยสลายแอนทราซีนแตกต่างกัน

Hammel, Green และ Gai (1991) รายงานว่าราไวท์รอก *Panerochaete chrysosporium* ใช้วิถีเมตาบอลิซึมในการเปลี่ยนแอนทราซีนไปเป็น 9,10-แอนทราควิโนน (9,10-anthraquinone) ซึ่งจะถูกลดสลายต่อไปเป็นกรดฟทาลิก (phthalic acid) และคาร์บอนไดออกไซด์ ดังแสดงในรูปที่ 2.10



รูปที่ 2.10 กระบวนการย่อยสลายแอนทราซีนโดย *Phanerochaete chrysosporium* (Hammel Green and Gai, 1991)

Collins และคณะ (1996) รายงานว่าการเปลี่ยนโครงสร้างของแอนทราซีนไปเป็นแอนทราควิโนนเกิดขึ้นโดยกิจกรรมของเอนไซม์ลิกันินเพอออกซิเดส หรือทั้งเอนไซม์ลิกันินเพอออกซิเดสร่วมกับแมงกานีสเพอออกซิเดส อัตราส่วนโดยโมลของแอนทราควิโนนต่อจำนวนโมลของแอนทราซีนที่ถูกลดสลาย ซึ่งเกิดจากกิจกรรมของเอนไซม์ลิกันินเพอออกซิเดสและแมงกานีสเพอออกซิเดส มีค่าเท่ากับ 0.35 และ 0.44 ตามลำดับ

Bezalels และคณะ (1996) รายงานว่าราไวท์รอก *Pleurotus ostreatus* ใช้วิถีเมตาบอลิซึมในการเปลี่ยนแอนทราซีนไปเป็น 9,10-แอนทราควิโนน และแอนทราซีน ทรานส์-1,2-ไดไฮโดรไดออล (anthracene *trans*-1,2-dihydrodiols)

Sack และ Gunther (1993) รายงานว่าราไวท์รอก *Bjerkandera* sp. และสกุลอื่น ๆ ใช้วิถีเมตาบอลิซึมในการเปลี่ยนแอนทราซีน ไปเป็น 9,10-แอนทราควิโนน และสารตัวกลางดังกล่าวจะไม่ถูกลดสลายต่อไป (dead end intermediate)

Collins และคณะ รายงานในปี 1996 ถึงความสามารถของราไวท์รอต *Trametes* sp. ในการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของแอนทราซีน เกิดเป็น 9,10-แอนทราควิโนน โดยอาศัยกิจกรรมของเอนไซม์แลคเคส อัตราส่วนโดยโมลของแอนทราควิโนนต่อโมลของแอนทราซีนที่ถูกเปลี่ยนโครงสร้างมีค่าเท่ากับ 1.0

กระบวนการย่อยสลายแอนทราซีนโดยราและสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม

จากข้อมูลข้างต้นจะเห็นได้ว่าราที่ย่อยแอนทราซีนได้มีทั้งชนิดที่ย่อยลิกนินได้ และชนิดที่ไม่สามารถย่อยลิกนินได้ Cerniglia และคณะ (1992) รายงานว่ารา *Cunninghamella elegans* ซึ่งไม่สามารถย่อยลิกนินได้ จะอาศัยกิจกรรมของเอนไซม์ไซโตโครมพี-450 โมโนออกซีจีเนส (cytochrome P-450 monooxygenase) ในการเปลี่ยนแอนทราซีนไปเป็นแอรินออกไซด์ (arene oxide) และแอรินออกไซด์อาจจะถูกเปลี่ยนไปเป็นแอนทราซีน ทรานส์-1,2-ไดไฮโดรไดออล (anthracene *trans*-1,2-dihydrodiol) และ 1-แอนทริลซัลเฟต (1-anthryl sulfate) โดยกิจกรรมของเอนไซม์อีพอกไซด์ ไฮโดรเลส (epoxide hydrolase) หรืออีกวิธีหนึ่งแอรินออกไซด์อาจเกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างโดยไม่เกี่ยวข้องกับเอนไซม์ได้สารประกอบพีนอล และสารดังกล่าวอาจเกิดการรวมตัวกับซัลเฟตและไซโลไซด์ (xyloside) โดยที่สารมัธยันต์ที่เกิดขึ้นจากการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของแอนทราซีนโดย *C. elegans* มีคุณสมบัติในการก่อกลายพันธุน้อยกว่าแอนทราซีน ดังนั้นรากุลดังกล่าวจึงมีความสามารถในการลดความเป็นพิษของแอนทราซีนได้ (detoxification)

Sutherland และคณะ (1995) รายงานว่า *Rhizoctonia solani* ใช้วิถีเมตาบอลิซึมในการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของแอนทราซีนไปเป็น แอนทราซีน ทรานส์-1,2-ไดไฮโดรไดออล หรือรวมตัวกับไซโลไซด์ได้สารประกอบใหม่อีก 3 ชนิด การเกิดสารประกอบของไซโลไซด์แสดงว่า *R. solani* มีประสิทธิภาพในการลดความเป็นพิษของแอนทราซีนได้เช่นเดียวกัน

Sack และ Gunther (1993) รายงานว่า *Penicillium* sp. ใช้วิถีเมตาบอลิซึมในการเปลี่ยนแอนทราซีนไปเป็นผลิตภัณฑ์ที่ยังไม่ทราบชนิด

สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมย่อยสลายแอนทราซีนโดยอาศัยกิจกรรมของเอนไซม์โมโนออกซีจีเนส เช่นเดียวกับรา ได้ผลิตภัณฑ์คือ แอนทราซีน ทรานส์-1,2-ไดไฮโดรไดออล เกิดขึ้นเช่นเดียวกัน แต่รูปแบบของสเตอริโอไอโซเมอร์ (stereoisomers) จากระบบเอนไซม์ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมเกิด อาร์,อาร์-ไดไฮโดรไดออล (*R,R*-dihydrodiol) ส่วนในระบบเอนไซม์ของราจะได้ เอส,เอส-ไดไฮโดรไดออล (*S,S*-dihydrodiol) (Akhtar, Boyd and Thompson, 1975)

Akhtar, Boyd และ Thompson (1975) รายงานการตรวจพบไดไฮโดรแอนทราซีน *ทรานส์* 1,2-ไดโอด (dihydroanthracene *trans* 1,2-diols) ในปัสสาวะของกระต่ายที่ได้รับสารแอนทราซีน

Rosazza และ Smith (1979) รายงานว่าการศึกษากายวิภาคศาสตร์ของโครงสร้างทางเคมีของสารพิษในสิ่งแวดล้อมโดยจุลินทรีย์ชนิดยูคาริโอต (eukaryote) สามารถนำมาใช้ประโยชน์ในการเป็นแบบจำลองและช่วยเพิ่มข้อมูลเกี่ยวกับกระบวนการเมตาบอลิซึมของยาภายในร่างกายของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมได้

กลไกที่เกี่ยวข้องกับความเป็นพิษของสารประกอบไฮโดรคาร์บอนต่อรูปแบบการเจริญของจุลินทรีย์

เป็นที่ทราบกันดีว่าสารประกอบไฮโดรคาร์บอนโดยเฉพาะ PAHs จะเกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างทางเคมีได้โดยจุลินทรีย์ ซึ่งอาจนำไปสู่การย่อยสลายอย่างสมบูรณ์ของ PAHs บางชนิดได้เป็นคาร์บอนไดออกไซด์และน้ำ แต่ PAHs บางชนิดจะถูกเปลี่ยนแปลงโครงสร้างเพียงบางส่วน นอกจากนี้ยังมีหลายรายงานวิจัยที่สังเกตพบความเป็นพิษของสารดังกล่าวต่อจุลินทรีย์ (Gibsons *et al.*, 1970 ; Jenkins, Slephens and Dalton, 1987; Shirai, 1987 ; Sikkema and de Bont, 1991 อ้างถึงโดย Sikkema, de Bont and Poolman, 1995) โดยกลไกที่เกี่ยวข้องกับพิษของสารมีรายงานน้อยมาก จากข้อมูลที่มีอยู่สามารถยืนยันได้ว่าความเป็นพิษของสารประกอบไฮโดรคาร์บอนต่อจุลินทรีย์ เกิดจากการทำปฏิกิริยาระหว่างสารกับโครงสร้างของเซลล์ในส่วนที่ไม่ชอบน้ำ สมบัติในการละลายได้ดีในไขมัน (lipophilicity) ของสารประกอบไฮโดรคาร์บอนขึ้นอยู่ กับลักษณะทางกายภาพและทางเคมีของสาร เช่น พื้นที่ผิวและปริมาตรของโมเลกุล รวมทั้งความมีขั้วของสาร (polarity)

รายงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับความเป็นพิษของสารประกอบไฮโดรคาร์บอนต่อการเจริญของจุลินทรีย์ที่ย่อยสลายสารนั้น ๆ

เบนซีน (อ้างถึงโดย Sikkema, de Bont and Poolman, 1995)

Gibsons และคณะ (1970) รายงานว่าเบนซีนมีพิษต่อ *Pseudomonas putida* โดยสังเกตพบว่าเมื่อเติมเบนซีนในอาหารเหลวโดยตรงเชื้อจะไม่สามารถเจริญได้ แต่ถ้าแบคทีเรียได้รับไอระเหยของเบนซีนจะเจริญได้ตามปกติ

Van den Tweel และคณะ (1988) รายงานว่าการเปลี่ยนเบนซีนไปเป็น ซิส-3,5-ไซโคลเฮกซะไดอิน-1,2-ไดออล (*cis*-3,5-cyclohexadiene-1,2-diol) มีอัตราลดลง เมื่อเพิ่มปริมาณเบนซีน โดยสอดคล้องกับรายงานของ Yarmoff และคณะ (1988) ที่พบว่าเบนซีนมีผลทำให้เชื้อลดจำนวนลง และ ซิส-3,5-ไซโคลเฮกซะไดอิน-1,2-ไดออล ซึ่งเป็นสารตัวกลางที่เกิดขึ้นจากการเปลี่ยนโครงสร้างของเบนซีนก็มีปริมาณลดลงด้วย

Shirai (1987) รายงานว่าเบนซีนที่มีความเข้มข้นมากกว่า 0.15 % โดยน้ำหนักต่อปริมาตร จะมีผลยับยั้งการเจริญและการสร้างแคปซูลของเชื้อ *Pseudomonas* ชนิดกลายพันธุ์ ซึ่งมีซัคซิเนต (succinate) เป็นแหล่งคาร์บอน

โทลูอิน (toluene) (อ้างถึงโดย Sikkema, de Bont and Poolman, 1995)

Jackson และ Demoss (1965) รายงานความเป็นพิษของโทลูอินต่อการเจริญของ *E. coli* มีผลให้โมเลกุลต่าง ๆ เช่น อาร์เอ็นเอและโปรตีนรั่วออกมาภายนอก ทำให้โครงสร้างของเซลล์เกิดการเปลี่ยนแปลง ภาพจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแสดงให้เห็นว่าการแตกของเซลล์ไม่ได้เกิดขึ้นอย่างสมบูรณ์

De Smet, Kingma และ Witholt (1978) รายงานว่าโทลูอินเพิ่มการซึมผ่านเข้าออกของสารผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ของ *E. coli* และจากการศึกษาโดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนจะพบการถูกทำลายของเยื่อหุ้มเซลล์

สาร PAHs (อ้างถึงโดย Sikkema, de Bont and Poolman, 1995)

Cerniglia และคณะ (1952) ศึกษาความเป็นพิษของแนพธาซีน, 1-เมทิลแนพธาซีน (1-methylnaphthalene) และ 2-เมทิลแนพธาซีน (2-methylnaphthalene) ต่อไซยาโนแบคทีเรียสกุล *Agmenellum quadruplicatum* พบว่าสารต่าง ๆ ดังกล่าวไม่มีผลยับยั้งการเจริญของไซยาโนแบคทีเรีย ในขณะที่อนุพันธ์ฟีนอลิก (phenolic) และควิโนอิก (quinoic) ของแนพธาซีน มีผลยับยั้งการเจริญของเซลล์ โดยที่ฟีนอลและควิโนอิกมีค่าการละลายในน้ำสูงกว่าอนุพันธ์ของแนพธาซีนที่ไม่มีผลยับยั้งการเจริญของไซยาโนแบคทีเรีย

Sikkema, de Bont และ Poolman (1994) รายงานว่า แนพธาซีน, ไบฟีนีล (biphenyl), แอนทราซีน และฟิแนนทรีนในรูปผลึกของแข็งมีความเป็นพิษต่อเซลล์ โดยมีผลต่อระบบการส่งผ่านพลังงานในไลโปโซม (liposome) เมื่อเลี้ยงเชื้อเป็นระยะเวลานาน แต่ถ้าให้เชื้อสัมผัสกับสารที่ละลายอยู่ในตัวทำละลายไดเมทิลฟอมาไมด์ (dimethyl formamide) PAHs จะมีผลเป็นพิษต่อเซลล์ทันที

Cerniglia และ Lader (1976) รายงานว่าการเพิ่มปริมาณแนพทาลีน, 2-เมทิลแนพทาลีน และไพรีน มีผลยืระยะเวลาในการปรับตัวของเซลล์ก่อนที่จะเพิ่มจำนวน (lag phase) และลดอัตราการเจริญของแบคทีเรียที่ใช้สารดังกล่าวเป็นแหล่งคาร์บอน

Brodkorb และ Legge (1992) รายงานว่าพีแนทรีนมีผลยับยั้งการเจริญของราไวท์รอกสกุล *Phanerochaete chrysosporium*

Swoboda - colberg (1995) รายงานว่าการย่อยสลายของสารเคมีโดยเชื้อจุลินทรีย์ประกอบด้วยปฏิกิริยาการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของสารตั้งต้นหลายปฏิกิริยา จนกว่าจะเกิดการเปลี่ยนแปลงอย่างสมบูรณ์ได้ผลิตภัณฑ์สุดท้ายเป็นน้ำ และคาร์บอนไดออกไซด์ แต่ในบางกรณีการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นอาจไม่สมบูรณ์ โดยมีการสะสมของสารตัวกลางที่มีความเป็นพิษสูงกว่าสารตั้งต้น เช่น 7,8-ไดไฮโดรไดออกอล-9,10-เอปออกไซด์ (7,8-dihydrodilo-9,10-epoxide) ซึ่งเป็นสารก่อมะเร็งชนิดรุนแรงจากการถูกย่อยสลายของเบนโซ[เอ]ไพรีน (Marks *et al.*, 1992 อ้างถึงโดย Swoboda-colberg, 1995) และไดออกซินที่เกิดขึ้นจากการเผาไหม้ของสารประกอบอินทรีย์ (Choudhary *et al.* , 1983 อ้างถึงโดย Swoboda-colberg, 1995)

Heitzer และ Saylor (1993) รายงานว่าการย่อยสลายของสารเคมีอันตรายหลายชนิดที่เกิดขึ้นไม่สมบูรณ์อาจเกิดจากสภาวะแวดล้อมหรือสายพันธุ์ของจุลินทรีย์ สารมัธยันต์ที่เกิดขึ้นเนื่องจากปฏิกิริยาการเติมหมู่ไฮดรอกซี (hydroxylation) จะมีขั้วเพิ่มขึ้น และอาจมีความเป็นพิษสูงกว่าสารตั้งต้น เช่น 1-แนพทอล (1-naphthol) ที่เกิดจากการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของแนพทาลีนในสภาวะที่มีออกซิเจน (Cerniglia, 1984 ; Sutherland, 1992 อ้างถึงโดย Heitzer and Saylor, 1993) และไวนิลคลอไรด์ (vinylchloride) ที่เกิดจากการย่อยสลายของไตรคลอโรเอทิลีน (trichloro ethylene) ภายใต้สภาวะไร้อากาศ (Vogel and AmMcrtty, 1985 อ้างถึงโดย Heitzer and Saylor, 1993)

เป็นที่ทราบกันดีว่า PAHs มีความเป็นพิษต่อเซลล์ของจุลินทรีย์ในระดับต่ำเมื่อเทียบกับอนุพันธ์ของสารดังกล่าวที่อยู่ในสภาวะถูกออกซิไดซ์ จากการศึกษาพิษของแนพทาลีน, ไบฟีเนล, แอนทราซีน, พีแนทรีน และ PAHs ชนิดอื่น ๆ พบว่าในสภาวะที่ไม่จำกัดการถ่ายเทมวลเซลล์ PAHs จะมีผลต่อกลไกการถ่ายเทพลังงานผ่านเยื่อหุ้มเซลล์

ผลของการสะสมสารพิษต่อการเปลี่ยนแปลงในเซลล์ของจุลินทรีย์

Sikkema และคณะ (1992) รายงานว่าการสะสมสารที่ขอบไขมัน ซึ่งรวมถึงแอนทราซีน และ PAHs ชนิดอื่น มีผลเปลี่ยนแปลงโครงสร้างและหน้าที่ของเยื่อหุ้มเซลล์ รวมทั้งกิจกรรมของเอนไซม์

Sikkema, de Bont และ Poolman (1995) พบว่าสารประกอบไฮโดรคาร์บอนจะเข้าไปสะสมที่ชั้นไขมันในโครงสร้างของเยื่อหุ้มเซลล์ โดยจะทำปฏิกิริยากับทั้งไขมันและโปรตีนซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ฝังตัวอยู่ในชั้นไขมัน ทำให้หน้าที่และโครงสร้างของเซลล์เปลี่ยนไป

การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของเยื่อหุ้มเซลล์ (Sikkema, de Bont and Poolman, 1995)

การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของเยื่อหุ้มเซลล์มีความรุนแรงต่างกัน ขึ้นอยู่กับระดับความเข้มข้นของสาร และตำแหน่งของชั้นไขมันที่สารเข้าไปทำปฏิกิริยา โดยการสะสมของ PAHs ในส่วนของเยื่อหุ้มเซลล์ที่ไม่ชอบน้ำ PAHs จะไปรบกวนปฏิกิริยาระหว่างโซ่เอซิล (acyl chains) ของฟอสโฟลิปิด (phospholipid) ส่งผลให้ของเหลวที่อยู่ในเยื่อหุ้มเซลล์มีการปรับตัว และในที่สุดจะเกิดการบวมพองของเนื้อเยื่อ ทำให้เกิดรอยร้าวขึ้นที่เยื่อหุ้มเซลล์ ยิ่งไปกว่านั้นยังเกิดผลกระทบต่อโปรตีนที่ฝังตัวอยู่ในชั้นไขมัน เนื่องจากเนื้อเยื่อไขมันโดยรอบเกิดการเปลี่ยนแปลง

การเปลี่ยนแปลงหน้าที่ของเยื่อหุ้มเซลล์ (Sikkema, de Bont and Poolman, 1995)

รอยร้าวที่เกิดขึ้นบนเยื่อหุ้มเซลล์จะทำให้สมดุลของไอออนเปลี่ยนแปลงไป (H^+ และ Na^+) จึงมีผลต่อระบบการขนส่งสารเข้าและออกจากเซลล์ โดยอาศัยแรงขับเคลื่อนจากผลต่างของปริมาณไอออนระหว่างภายนอกและภายใน (proton motive force, Na^+ motive force) หน้าที่ที่บกพร่องของเยื่อหุ้มเซลล์ในการควบคุมสารที่ผ่านเข้าและออก นอกจากจะมีผลต่อระบบการส่งผ่านพลังงานแล้ว ยังทำให้ค่าความเป็นกรดต่างภายในเซลล์เกิดการเปลี่ยนแปลง เนื่องจากมีโปรตอนมากเกินไป จึงส่งผลต่อกิจกรรมของเอนไซม์ด้วยเช่นเดียวกัน

บทที่ 3

อุปกรณ์ เคมีภัณฑ์ และวิธีดำเนินการวิจัย

อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

1. กล้องจุลทรรศน์ รุ่น CHK ของบริษัท Olympus, Japan.
2. ไมโครปิเปต (micropipette) ขนาด 5,20,100,200,1000 และ 5000 ไมโครลิตร ของบริษัท Drummond Scientific, USA.
3. กรวยแยก (separatory funnel) ขนาด 1000 มล. ของบริษัท Weteg Wehtheim, Germany.
4. ปิเปต (pipette) ขนาด 100, 1000, และ 5000 มล. ของบริษัท Gilson, France.
5. ทีแอลซีแชมเบอร์ (TLC chamber) ของบริษัท Desaga Heidelberg, Germany.
6. หลอดแสงอัลตราไวโอเล็ต (ultraviolet lamp) รุ่น UVGL-15 ของบริษัท UVP, USA.
7. กระบอกฉีดยาพลาสติก ขนาด 1 มล. ของบริษัท Nissho Nipro, Japan.
8. ชุดกรองสำร็จรูป ชนิด PTFE ขนาดความกว้างของรู 0.20 และ 0.45 ไมโครเมตร รุ่น DISCMIC-13JP ของบริษัท Tokyo Roshi Kaisha, Japan.
9. แผ่นอะลูมิเนียมทีแอลซี (TLC aluminium sheet) เคลือบด้วย silica gel F₂₅₄ ขนาด 20 × 20 ซม. ของบริษัท E. Merck, Germany.
10. ตู้บ่มเชื้อ (incubator) รุ่น Hereaus type B 5050 E ของบริษัท Hereaus, Germany.
11. เครื่องกำเนิดเสียงความถี่สูง (ultrasonicator) ชนิดอ่าง รุ่น FS4000 ของบริษัท Decan Ultrasonics, England.
12. เครื่องปั่นผสม (vortex mixer) รุ่น G-560E ของบริษัท Scientific Industries, USA.
13. ตู้เขี่ยเชื้อแบบ "ISSCO" laminar flow รุ่น BVT-124 ของบริษัท International Scientific supply, USA.
14. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (waterbath) ของบริษัท Tokyo Rikakikai, Japan.
15. เครื่องนึ่งอบฆ่าเชื้อ (autoclave) ของบริษัท Kakusan, Japan.
16. เครื่องระเหยแห้งสูญญากาศแบบปั่นเหวี่ยง (centrifuge evaporator) ของบริษัท EYELA, Japan.
17. เครื่องระเหยแห้งแบบสูญญากาศ (rotary vacuum evaporator) รุ่น N ของบริษัท Tokyo Rikakikai, Japan.

18. เครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดควบคุมอุณหภูมิ (refrigerated centrifuge) รุ่น JS-21 ของบริษัท Beckman Instrument Inc., USA.
19. เครื่องชั่ง รุ่น L2200P และ A200S ของบริษัท Sartorius, USA.
20. เครื่องวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH meter) รุ่น 240 ของบริษัท Corning, USA.
21. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) รุ่น Spectronic 21 ของบริษัท Bausch & Lomb, USA.
22. เครื่องเขย่าชนิดควบคุมอุณหภูมิ (controlled environment incubators shaker) รุ่น G-27 ของบริษัท New Brunswick Scientific, USA.
23. ชุดไฮเพอร์ฟอแมนซ์ลิควิดโครมาโตกราฟี (high performance liquid chromatography, HPLC) สำหรับตรวจสอบปริมาณของ PAHs
 - ลิควิดโครมาโตกราฟี (liquid chromatography) รุ่น LC-3A ของบริษัท Shimadzu, Japan
 - คอลัมน์ (column) : Senshu Pak Pegasil ODS ขนาด 4.6 × 150 มล. ของบริษัท Senshu Scientific, Japan.
 - เครื่องตรวจสอบ (UV-visible detector) รุ่น SPD-2A ของบริษัท Shimadzu, Japan.
 - เครื่องบันทึก (recorder) Chromatopac รุ่น C-R5A ของบริษัท Shimadzu, Japan.
 - กระบอกฉีดยาขนาดเล็ก (microsyringe) รุ่น MS-R50 ของบริษัท Exmire, USA.
24. ชุดเครื่องมือทำแก๊สโครมาโตกราฟี-แมสสเปกโตรเมตรี (gas chromatography – mass spectrometry, GC-MS) สำหรับพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารมัยยันต์
 - เครื่องแก๊สโครมาโตกราฟี-แมสสเปกโตรเมตรี รุ่น JMS-Automass 150 ของบริษัท JEOL, Japan.
 - คอลัมน์ (column) : DB-5 ขนาด 2.5 มม.×15 ม.; ชั้นฟิล์มหนา 0.25 ไมโครเมตร ของบริษัท J & W Scientific, Germany.
 - กระบอกฉีดยาขนาดเล็ก (microsyringe) รุ่น MS-10 ของบริษัท Ecmire, USA.
25. เครื่องมือทำโปรตอนนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์ (proton nuclear magnetic resonance, ¹H-NMR) สำหรับพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารมัยยันต์ รุ่น JMN-A5000 ของบริษัท JEOL, Japan.

เคมีภัณฑ์

1. แอนทราซีน (anthracene) ของบริษัท Kanto Chemical, Japan.
2. แนพทาลีน (naphthalene) ของบริษัท Sigma, USA.
3. ฟีนแอนทรีน (phenanthrene) ของบริษัท Sigma, USA.
4. ฟลูออรีน (fluorene) ของบริษัท Kanto Chemical, Japan.
5. ไดเบนโซฟูแรน (dibenzofuran) ของบริษัท Kanto Chemical, Japan.
6. อะซีแนพทีน (acenaphthene) ของบริษัท Sigma, USA.
7. อะซีแนพทีลีน (acenaphthylene) ของบริษัท Kanto Chemical, Japan.
8. ไพรีน (pyrene) ของบริษัท Kanto Chemical, Japan.
9. ฟลูออแรนทีน (fluoranthene) ของบริษัท Kanto Chemical, Japan.
10. แอมโมเนียมไนเตรต (NH_4NO_3) ของบริษัท BDH Chemicals, Australia.
11. ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟตโดเดคาไฮเดรต ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)
12. โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) ของบริษัท AJEX Chemicals, Australia.
13. แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตาไฮเดรต ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) ของบริษัท Carlo ERBA, France.
14. เฟอริกคลอไรด์เฮกซะไฮเดรต ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) ของบริษัท May & Baker, England.
15. แคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรต ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) ของบริษัท AJEX Chemicals, Australia.
16. ผงสกัดจากยีสต์ (yeast extract) ของบริษัท Difco Laboratories, USA.
17. ทริปโตเนน (tryptone) ของบริษัท Difco Laboratories, USA.
18. โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ของบริษัท E. Merck, Germany.
19. แบคโตเอการ์ (bacto agar) ของบริษัท Difco, USA.
20. โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ของบริษัท E Merck, Germany.
21. นอร์มัลเฮกเซน (C_6H_{14}) ของบริษัท J.T. Baker, USA.
22. เอทิลอะซิเตต ($\text{CH}_3\text{COOC}_2\text{H}_5$) ของบริษัท E Merck, Germany.
23. เมทานอล (CH_3OH) ของบริษัท E Merck, Germany.
24. ไซโคลเฮกซามีน (cyclohexamine) ของบริษัท Sigma Chemical, USA.
25. โซเดียมซัลเฟตแอนไฮเดรต (anhydrous Na_2SO_4) ของบริษัท E Merck, Germany.
26. ดิวเทอเรียม เมทานอล (CD_3OD) ของบริษัท E Merck, Germany.
27. อะซีโตน (CH_3COCH_3) ของบริษัท E Merck, Germany.
28. ไดเอทิลอีเทอร์ ($(\text{C}_2\text{H}_5)_2\text{O}$) ของบริษัท E Merck, Germany.

29. ไดมethylซัลฟอกไซด์ (CH₃SOCH₃) ของบริษัท Carlo ERBA, France.
30. กรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น (conc. HCl) ของบริษัท BDH Chemicals, Australia.
31. กรดอะซิติกเข้มข้น (glacial CH₃COOH) ของบริษัท E Merck, Germany.
32. 1,4 ไดออกเซน (OCH₂CH₂OCH₂CH₂) ของบริษัท Carlo ERBA, France.
33. โทลูอิน (C₆H₅CH₃) ของบริษัท Carlo ERBA, France.
34. ไดคลอโรมีเทน (CH₂Cl₂) ของบริษัท Malinckrodt, France.

3.1 การคัดแยกแบคทีเรียสายพันธุ์ที่สามารถย่อยสลายแอนทราซีน

3.1.1 การเก็บตัวอย่างดิน

เก็บตัวอย่างดินสำหรับการแยกเชื้อจุลินทรีย์จากแหล่งดินต่าง ๆ ที่มีการสะสมของสารปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอน เช่น น้ำมันเครื่อง น้ำมันเบนซิน น้ำมันดีเซล หรือแหล่งดินที่มีการปนเปื้อนของสารเคมีอันตราย จำพวก ยาปราบศัตรูพืช เลือกแหล่งดินบริเวณที่มีความอุดมสมบูรณ์ โดยสังเกตจากความชื้น รวมทั้งลักษณะการเจริญเติบโตของพืชในบริเวณดังกล่าว ซึ่งใช้เป็นข้อบ่งชี้เบื้องต้นถึงความเป็นไปได้ที่จะมีจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายแอนทราซีนและ PAHs ชนิดอื่น ๆ อยู่ในแหล่งดินนั้น ๆ เก็บดินที่ความลึกประมาณ 3-5 ซม.จากผิวหน้าดิน ตีฉลากระบุแหล่งดินให้ชัดเจน เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C จนกว่าจะทำการแยกเชื้อ

ตารางที่ 3.1 แหล่งที่มาของตัวอย่างดินที่ใช้ในการคัดแยกแบคทีเรียที่ย่อยสลายแอนทราซีนได้

ตัวอย่างดิน	สถานที่เก็บ
1	ดินปนเปื้อนยาปราบศัตรูพืช จากสวนผลไม้ จ.จันทบุรี
2	ดินปนเปื้อนยาปราบศัตรูพืช จากสวนผลไม้ จ.จันทบุรี
3	ดินปนเปื้อนน้ำมันเครื่องข้างโรงซ่อมรถยนต์ จุฬา ฯ กรุงเทพฯ ฯ
4	ดินปนเปื้อนน้ำมันเครื่องข้างโรงซ่อมรถยนต์ จุฬา ฯ กรุงเทพฯ ฯ
5	ดินปนเปื้อนน้ำมันเครื่องข้างโรงซ่อมรถยนต์ จุฬา ฯ กรุงเทพฯ ฯ
6	ดินปนเปื้อนยาปราบศัตรูพืช จากสวนผัก จ.ราชบุรี
7	ดินปนเปื้อนยาปราบศัตรูพืช จากสวนผัก จ.ราชบุรี
8	ดินปนเปื้อนยาปราบศัตรูพืช จากสวนผัก จ.ราชบุรี
9	ดินบริเวณใต้ต้นกล้วยข้างโรงซ่อมหัวรถจักร จากสถานีรถไฟบางกอกน้อย
10	ดินที่ปนเปื้อนน้ำมันข้างโรงซ่อม จากสถานีรถไฟบางกอกน้อย กรุงเทพฯ ฯ

3.1.2 การเพิ่มจำนวนแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายแอนทราซิน

นำตัวอย่างดินที่ต้องการแยกเชื้อจุลินทรีย์ปริมาณ 1 กรัม ใส่ลงในหลอดทดลองที่บรรจุอาหารเหลว Carbon – Free Mineral Medium (CFMM) (ภาคผนวก ก หมายเลข 1) ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วปริมาตร 5 มล. นำไปเขย่าบนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิ 30 ° ซ ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 วัน หลังจากนั้นนำส่วนน้ำใสซึ่งใช้เป็นหัวเชื้อปริมาตร 50 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลอดทดลองที่บรรจุอาหารเหลว CFMM ปริมาตร 5 มล. ซึ่งมีแอนทราซินเข้มข้น 0.1 มก.ต่อมล. เป็นแหล่งคาร์บอน โดยเติมสารดังกล่าวในรูปของสารละลายแอนทราซินในไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (dimethyl sulfoxide, DMSO) (ภาคผนวก ข หมายเลข 1) เลี้ยงเชื้อที่สภาวะเดิม เป็นเวลา 7 วัน ตรวจสอบการเจริญของแบคทีเรียโดยสังเกตจากความขุ่นที่เกิดขึ้น และการเปลี่ยนสีของอาหารเหลว CFMM เทียบกับชุดควบคุมซึ่งเติมเฉพาะแอนทราซิน ถ้าพบว่าหลอดใดมีการเจริญของเชื้อในลักษณะดังกล่าวก็ถ่ายเชื้อลงในอาหารใหม่ ทำซ้ำในขั้นตอนนี้ทั้งหมด 5 ครั้ง เพื่อเพิ่มจำนวนแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลายแอนทราซิน

3.1.3 การคัดแยกแบคทีเรียสายพันธุ์ที่สามารถย่อยสลายแอนทราซิน

นำเชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถเจริญได้ดีในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแอนทราซินเป็นแหล่งคาร์บอน มาทำการเจือจางด้วยสารละลาย 0.85 % โซเดียมคลอไรด์ เลือกความเข้มข้นที่เหมาะสมมาเกลี่ยบนผิวหน้าอาหารแข็ง CFMM (ภาคผนวก ก หมายเลข 2) โดยวางผลึกแอนทราซินที่ฝ้าเพลทรวมทั้งเกลี่ยเชื้อบนผิวหน้าอาหารแข็ง Luria Bertani (LB) (ภาคผนวก ก หมายเลข 4) บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 ° ซ จนกระทั่งพบการเจริญของแบคทีเรีย นำโคโลนีเดียวของแบคทีเรียที่มีลักษณะต่างกันมาเลี้ยงในอาหารเหลว CFMM ที่มีแอนทราซินเข้มข้น 0.1 มก.ต่อมล. สังเกตการเจริญของแต่ละเชื้อในอาหารเหลว CFMM เทียบกับชุดควบคุม นำเชื้อจากหลอดทดลองที่สังเกตพบการเปลี่ยนสีของอาหารเหลว มาทดสอบความบริสุทธิ์โดยการศึกษากายใต้กล้องจุลทรรศน์ (กำลังขยาย 1000 เท่า) เทียบกับลักษณะโคโลนีบนอาหารแข็ง LB

เมื่อได้แบคทีเรียสายพันธุ์บริสุทธิ์ที่สามารถย่อยสลายแอนทราซินแล้ว จึงทำการเก็บเชื้อโดยเลี้ยงแบคทีเรียในอาหารเหลว CFMM ที่มีแอนทราซินเข้มข้น 0.1 มก.ต่อมล. นำเชื้อที่เจริญอยู่ในอาหารเหลวมาบรรจุในหลอดแช่แข็ง (cryotube) และเติมกลีเซอรอลปลอดเชื้อ ซึ่งผ่านการฆ่าเชื้อ 3 ครั้งที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 ° ซ เป็นเวลา 20 นาที สำหรับการเก็บเชื้อที่อุณหภูมิ -20 ° ซ และ -70 ° ซ ใช้อัตราส่วนระหว่างปริมาตรเชื้อในอาหารเหลวต่อปริมาตรกลีเซอรอล เป็น 50 : 50 และ 70 : 30 ตามลำดับ

3.1.4 การจำแนกชนิดทางอนุกรมวิธานของแบคทีเรียที่คัดแยกได้

ก. ทดสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียที่คัดแยกได้ โดยดูจากลักษณะโคโลนีของเชื้อบนอาหารแข็ง LB และตรวจสอบลักษณะเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ร่วมกับผลทดสอบทางชีวเคมีตามที่รายงานไว้ใน Burgey's Manual of Systematic Bacteriology (Palleroni, 1984)

ข. จำแนกชนิดทางอนุกรมวิธานของแบคทีเรียที่คัดแยกได้โดยการวิเคราะห์ลำดับเบสของ 16 เอสโรโบโซมัลดีเอ็นเอ (16 s rDNA) (Amann, Ludwig and Schleifer, 1995)

3.2 ทดสอบความจำเพาะในการใช้ PAHs ชนิดอื่นในการเจริญของแบคทีเรียที่คัดแยกได้

เตรียมหัวเชื้อแบคทีเรียโดยเชื้อโคโลนีเดี่ยวของแบคทีเรียที่คัดแยกได้ ลงในอาหารเหลว CFMM ปริมาตร 50 มล. ที่มีเบนโซเอทเป็นแหล่งคาร์บอน (ภาคผนวก ก หมายเลข 5) ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มล. เลี้ยงเชื้อบนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิ 30 ° ซ ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำการปั่นแยกเซลล์ด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 ° ซ เป็นเวลา 10 นาที ล้างเซลล์แบคทีเรียในสารละลาย 0.85 % โซเดียมคลอไรด์ และทำการปั่นเหวี่ยงที่สภาวะเดิม ทำขั้นตอนนี้ซ้ำ 3 ครั้งเพื่อล้างเซลล์ จากนั้นเติมสารละลาย 0.85 % โซเดียมคลอไรด์ จะได้สารละลายเซลล์นำมาวัดความขุ่น (turbidity) ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร เจือจางสารละลายเซลล์ให้มีค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 1.0 และนำไปเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 ° ซ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อให้แบคทีเรียใช้อาหารสะสมที่เหลืออยู่ในเซลล์ให้หมดไป

ทดสอบความสามารถของแบคทีเรียที่คัดแยกได้ในการย่อยสลาย PAHs ชนิดอื่นนอกเหนือจากแอนทราซีน ซึ่งได้แก่ แนพทาซีน* ฟิเนนทรีน ฟลูออรีน ไดเบนโซฟูแรน อะซีแนพทีน อะซีแนพทีลิน* ฟลูออแรนทีน และไพรีน (ภาคผนวก ข หมายเลข 2) โดยการเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว CFMM ปริมาตร 5 มล. ที่เติมสารทดสอบแต่ละชนิดเข้มข้น 0.1 มก.ต่อมล. ตามวิธีของ Grifoll และคณะ (1995) เติมหหัวเชื้อปริมาตร 50 ไมโครลิตร ใช้สภาวะเดิมในการเลี้ยงเชื้อ สังเกตความขุ่นและการเปลี่ยนสีของอาหารเหลว CFMM ในหลอดทดลองที่เติมหหัวเชื้อ เปรียบเทียบกับชุดควบคุม

หมายเหตุ * เนื่องจากแนพธาลีนและอะซีแนพธาลีนมีค่าความดันไอสูง จึงระเหยได้ง่ายมาก ดังนั้นในการทดสอบความสามารถของแบคทีเรียสายพันธุ์ที่คัดแยกได้ในการย่อยสลาย PAHs ทั้งสองชนิดดังกล่าว จึงจำเป็นต้องเพิ่มความเข้มข้นของสารทดสอบเป็น 0.6 มก.ต่อมล. และ 1.0 มก.ต่อมล. สำหรับอะซีแนพธาลีน และแนพธาลีน ตามลำดับ และปิดฝีนึกจุกลำไส้ด้วย เทปขาวเพื่อป้องกันการระเหยของสาร

3.3 ศึกษารูปแบบการเพิ่มจำนวนและความสามารถในการย่อยสลาย แอนทราซีน และ PAHs ชนิดอื่นของแบคทีเรียสายพันธุ์ที่คัดแยกได้

3.3.1 ศึกษารูปแบบในการเพิ่มจำนวนโดยใช้แอนทราซีนเป็นแหล่งคาร์บอน และพลังงาน

เติมหัวเชื้อปริมาตร 50 ไมโครลิตร ซึ่งเตรียมโดยใช้วิธีเดียวกับการทดลองในข้อ 3.2 ลงในหลอดทดลองที่มีอาหารเหลว CFMM ปริมาตร 5 มล. และมีแอนทราซีนเข้มข้น 0.1 มก.ต่อมล. เลี้ยงเชื้อบนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิ 30 ° C ด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างทุก 24 ชั่วโมง ทั้งหมด 7 ครั้ง โดยที่แต่ละเวลาจะมีชุดควบคุม 2 ชุด คือชุดควบคุมที่ไม่เติมเชื้อเพื่อดูผลทางกายภาพต่อการลดลงของแอนทราซีน และชุดควบคุมที่ไม่เติมแอนทราซีนแต่เติมเฉพาะหัวเชื้อ เพื่อศึกษารูปแบบการเจริญของเชื้อในภาวะที่ไม่มีแหล่งคาร์บอน ชุดควบคุมทั้ง 2 ชุดดังกล่าวจะทำการทดลองควบคู่ไปกับชุดทดลองซึ่งเติมหัวเชื้อและมีแอนทราซีนเป็นแหล่งคาร์บอน ทำการทดลอง 3 ซ้ำสำหรับชุดทดลองและชุดควบคุม รูปแบบการเพิ่มจำนวนของแบคทีเรียในชุดทดลองเทียบกับชุดควบคุมที่เติมเฉพาะหัวเชื้อ โดยใช้วิธี viable plate count คือนำเชื้อที่อยู่ในอาหารเหลวมาเจือจางด้วยสารละลาย 0.85 % โซเดียมคลอไรด์ ให้มีความเข้มข้นที่เหมาะสม และนำมาเกลี่ยบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง LB ป่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 ° C เป็นเวลา 3 วัน นับจำนวนเชื้อ ณ ค่าการเจือจางที่เหมาะสม วิเคราะห์ปริมาณแอนทราซีนที่อยู่ในอาหารเหลวตามวิธีของ Grifoll และคณะ (1992) ซึ่งมีวิธีทดลองดังนี้

ปรับค่าความเป็นกรดต่างของอาหารเหลวให้อยู่ในช่วง 2-3 ด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริก 1 นอร์มัล (Normal, N) (ภาคผนวก ข หมายเลข 3) จากนั้นเติมเอทิลอะซีเตตปริมาตร 5 มล. ลงไปในอาหารเหลว ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องปั่นผสม โดยใช้ความเร็วสูงเป็นเวลา 1 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้แยกชั้น แยกส่วนเอทิลอะซีเตตเก็บไว้ จากนั้นเติมเอทิลอะซีเตตลงในอาหารเหลวหลอดเดิม และทำการสกัดซ้ำอีก 1 ครั้ง รวมเอทิลอะซีเตตที่สกัดได้ทั้งหมดเข้าด้วยกัน เติม

โซเดียมซัลเฟตแอนไฮดรัสเพื่อกำจัดน้ำที่เหลืออยู่ จากนั้นทำให้เอทิลอะซีเตตระเหยหมดไป โดยใช้เครื่องระเหยแห้งสูญญากาศแบบหมุน เติมน้ำมันอลปริมาตร 6 มล. ลงไปละลายแอนทราซีน กรองสารละลายแอนทราซีนในเมทานอลผ่านชุดกรองสำเร็จรูปชนิด PTFE ที่มีขนาดรูกว้าง 0.20 ไมโครเมตร เก็บในขวดแก้วขนาดเล็กที่หุ้มกระดาษฟอยด์เพื่อป้องกันสารถูกทำลายโดยแสง ที่อุณหภูมิ -20°C จนกว่าจะทำการวิเคราะห์ปริมาณแอนทราซีนที่เหลือด้วยวิธี HPLC

การวิเคราะห์ปริมาณแอนทราซีนและ PAHs ชนิดอื่นโดยวิธี HPLC

เตรียมสร้างกราฟมาตรฐานของแอนทราซีน โดยเติมสารละลายแอนทราซีนในไดเมทิลซัลฟอกไซด์ ลงในอาหารเหลว CFMM ให้มีความเข้มข้น 0, 10, 20, 40, 60, 80 และ 100 มก.ต่อลิตรของอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM ตามลำดับ ทำการสกัดด้วยเอทิลอะซีเตตโดยใช้วิธีการเดียวกับการสกัดแอนทราซีนในชุดทดลอง และนำไปวิเคราะห์ปริมาณสารโดยใช้วิธี HPLC ซึ่งมีส่วนประกอบต่าง ๆ ดังนี้

เครื่องลิควิดโครมาโตกราฟี ใช้คอลัมน์ Senshu Pak Pegasil ขนาด 4.6×150 มม. ตั้งอุณหภูมิคอลัมน์ที่ 40°C ใช้สารละลาย 80 % เมทานอล (ภาคผนวก ข หมายเลข 4) เป็นสารละลายตัวพา และใช้อัตราการไหลเท่ากับ 1.0 มล.ต่อนาที ตรวจสอบค่าการดูดกลืนแสงของแอนทราซีนและ PAHs ที่ความยาวคลื่น 275 นาโนเมตร

ฉีดสารละลายที่ต้องการหาปริมาณสาร โดยใช้กระบอกฉีดขนาดเล็กรุ่น MS-R50 หาปริมาณแอนทราซีนที่เหลืออยู่จากการย่อยสลายของแบคทีเรียในชุดทดลอง โดยการเปรียบเทียบพื้นที่ใต้กราฟที่ได้จากการวิเคราะห์กับกราฟมาตรฐานของแอนทราซีน (ภาคผนวก ค หมายเลข 1)

หมายเหตุ ก่อนฉีดสารตัวอย่างที่ต้องการหาปริมาณแอนทราซีน ต้องฉีดสารมาตรฐานของแอนทราซีนที่ละลายในเมทานอล (ภาคผนวก ค หมายเลข 5) จนกว่าจะได้ค่า retention time ที่คงที่เสียก่อน

3.3.2 ศึกษาแบบการเพิ่มจำนวนของแบคทีเรียที่คัดแยกได้ โดยใช้ PAHs ชนิดอื่นเป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงาน

ทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 3.3.1 แต่เปลี่ยนชนิดของ PAHs จากแอนทราซีนเป็น PAHs ชนิดอื่นที่แบคทีเรียสามารถใช้เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงานได้เช่นเดียวกัน จากผลการทดลองในข้อ 3.2 พบว่าแบคทีเรียสามารถย่อยสลาย พีแนนทรีน, ฟลูออรีน, ไดเบนโซฟูแรน และ แนพทาลีน ได้

หาปริมาณ PAHs ที่เหลืออยู่จากการย่อยสลายของแบคทีเรียในชุดทดลองและในชุดควบคุมที่ไม่เติมเชื้อ โดยการเปรียบเทียบพื้นที่ใต้กราฟที่ได้จากการวิเคราะห์กับกราฟมาตรฐานของของพีแนนทรีนและฟลูออรีน (ภาคผนวก ค หมายเลข 3 และ 4)

หมายเหตุ

เนื่องจากพีแนนทรีน ฟลูออรีน และ แนพทาลีน ละลายได้ดีในเมทานอล ดังนั้นหลังจากระเหยเอทิลอะซีเตตด้วยเครื่องระเหยแห้งสุญญากาศแบบหมุน ใช้เมทานอลปริมาตร 0.5 มล. ในการละลาย PAHs

จากการศึกษาแบบการเพิ่มจำนวนของแบคทีเรียโดยใช้ไดเบนโซฟูแรนเข้มข้น 0.1 มก. ต่อมล.ของอาหารเหลว CFMM และวิเคราะห์ปริมาณสารที่เหลืออยู่ด้วย HPLC พบว่ามีการลดลงของไดเบนโซฟูแรนในชุดควบคุมใกล้เคียงกับชุดทดลอง ดังนั้นจึงเพิ่มความเข้มข้นของสารดังกล่าวเป็น 0.3 มก.ต่อมล. และใช้สภาวะเดิมในการเลี้ยงเชื้อ สร้างกราฟมาตรฐานของไดเบนโซฟูแรนโดยเติมสารละลายของสารดังกล่าวในไดเมทิลซัลโฟลไซด์ ลงในอาหารเหลว CFMM ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0, 50, 100, 150, 200, 250 และ 300 มก.ต่อลิตรของอาหารเหลว CFMM (ภาคผนวก ค หมายเลข 2) และใช้เมทานอลปริมาตร 1.0 มล.ในการละลายสาร หลังจากระเหยของเอทิลอะซีเตต

เนื่องจากแนพทาลีนระเหยได้ง่ายมาก จึงทำการทดลองโดยใช้สภาวะในการบ่มเชื้อแตกต่างจากการเลี้ยงเชื้อเมื่อใช้แอนทราซีนเป็นแหล่งคาร์บอน ดังการทดลองในข้อ 3.3.3

3.3.3 การศึกษาความสามารถของแบคทีเรียที่คัดแยกได้ในการย่อยสลาย แนพทาลีน

เนื่องจากแนพทาลีนมีค่าความดันไอสูง จึงระเหยได้ง่าย ดังนั้นในการศึกษาประสิทธิภาพของแบคทีเรียสายพันธุ์ที่คัดแยกได้ในการย่อยสลายแนพทาลีน จึงจำเป็นต้องเพิ่มความเข้มข้นของสารทดสอบเป็น 1.0 มก.ต่อมล.ของอาหารเหลว CFMM และปิดฉีกจุกสำลีด้วยเทปกาว

เพื่อป้องกันการระเหยของสาร จึงทำให้สภาวะในการเลี้ยงเชื้อมีการจำกัดปริมาณออกซิเจน นอกจากนี้การเติมสารตั้งต้นที่มากเกินไปจะมีผลเป็นพิษต่อเซลล์ตามรายงานของ Sikkema, de Bont และ Poolman (1995) ดังนั้นในการทดลองนี้จึงศึกษาเฉพาะประสิทธิภาพของเชื้อในการย่อยสลายเนพธาลีนในวันที่ 0, 1, 3, 5 และ 7 ของการทดลอง เปรียบเทียบกับชุดควบคุม

เตรียมสร้างกราฟมาตรฐานของเนพธาลีน โดยเติมสารละลายของเนพธาลีนในได-เมทิลซัลฟอกไซด์ลงในหลอดทดลองที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM ปริมาตร 5 มล. กำหนดความเข้มข้นของเนพธาลีนเป็น 0, 200, 400, 600, 800 และ 1,000 มก.ต่อลิตร ทำการสกัดด้วยเอทิลอะซิเตต และใช้เมทานอลปริมาตร 0.5 มล. เพื่อละลายเนพธาลีน หลังจากการระเหยเอทิลอะซิเตต

หาปริมาณสารที่เหลืออยู่จากการย่อยสลายของเนพธาลีนในชุดทดลอง และในชุดควบคุม โดยเปรียบเทียบพื้นที่ใต้กราฟที่ได้จากการวิเคราะห์กับกราฟมาตรฐานของเนพธาลีน (ภาคผนวก ค หมายเลข 5)

3.3.4 ศึกษารูปแบบในการเพิ่มจำนวนรวมทั้งความสามารถในการย่อยสลายแอนทราซินผสมกับพีแนนทรินของแบคทีเรียที่คัดแยกได้

จากผลการทดลองในข้อ 3.3.2 พบว่าเมื่อใช้พีแนนทรินเป็นแหล่งคาร์บอน จะทำให้เชื้อมีอัตราการเจริญสูงสุด ในขณะที่การย่อยสลายแอนทราซินกลับมีผลลดจำนวนของแบคทีเรียภายหลังที่เพิ่มจำนวนได้สูงสุด ดังนั้นจึงทำการทดลองเพื่อศึกษารูปแบบการเพิ่มจำนวน และความสามารถในการย่อยสลาย PAHs ทั้งสองชนิดของแบคทีเรียที่คัดแยกได้ เมื่อเติมแอนทราซินและพีแนนทรินเข้มข้นสารละ 0.1 มก.ต่อมล. ลงในหลอดทดลองที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM ปริมาตร 5 มล. โดยใช้วิธีการเตรียมหัวเชื้อเช่นเดียวกับการทดลองในข้อ 3.2 เลี้ยงเชื้อบนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิ 30 °C ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างทุก 24 ชั่วโมง นำมาวัดการเจริญของแบคทีเรียเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่เติมแหล่งคาร์บอน โดยใช้วิธี viable plate count และวิเคราะห์ปริมาณสารทดสอบแต่ละชนิดด้วยวิธี HPLC ใช้วิธีการสกัดเช่นเดียวกับการทดลองในข้อ 3.3.1 โดยคิดเทียบปริมาณ PAHs ทั้งสองชนิดในวันที่ 0 ของการทดลองเป็น 100 %

3.4 การวิเคราะห์สารมัธยันต์ที่เกิดจากการย่อยสลายแอนทราซีน

3.4.1 การเลือกระยะเวลาที่เหมาะสมสำหรับการสกัดสารมัธยันต์

นำสารละลายของแอนทราซีนในเมทานอล ซึ่งสกัดได้จากการเลี้ยงเชื้อที่ระยะเวลาต่าง ๆ กันในการทดลองข้อ 3.3.1 มาหระยะเวลาที่เหมาะสมสำหรับการศึกษาสารมัธยันต์ที่เกิดจากการย่อยสลายแอนทราซีนโดยแบคทีเรียสายพันธุ์ที่คัดแยกได้ โดยการจุด (spot) สารบนแผ่นที่แอลซี (TLC sheet) ขนาดกว้าง 8 × 8 ซม. ระบบตัวทำละลาย (solvent system) ประกอบด้วย โทลูอีน : 1,4-ไดออกเซน : กรดอะซิติกเข้มข้น ในอัตราส่วน 90 : 25 : 4 (ปริมาตรต่อปริมาตร) ดูสเปกตรัมของแอนทราซีนและสารมัธยันต์ภายใต้แสงอุลตราไวโอเล็ต เปรียบเทียบการลดลงของแอนทราซีนและสารมัธยันต์ที่เกิดขึ้นกับสเปกตรัมของสารมาตรฐานแอนทราซีน แถบ (band) ของสารมัธยันต์ที่มีความกว้างมากที่สุด ณ เวลาใด (สารที่นำมาทดลอง สกัดได้จากการเลี้ยงเชื้อทุกระยะเวลา 24 ชั่วโมง เป็นเวลา 7 วัน) จะเป็นระยะเวลาที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการเลี้ยงเชื้อในระดับขยายส่วน เพื่อให้สารตัวกลางที่สกัดได้มีปริมาณมากที่สุด

3.4.2 การแยกสารมัธยันต์ให้บริสุทธิ์

เติมหัวเชื้อแบคทีเรียซึ่งเตรียมโดยใช้วิธีการเช่นเดียวกับการทดลองในข้อ 3.2 ลงในอาหารเหลว CFMM ปริมาตร 250 มล. ที่มีแอนทราซีนเข้มข้น 0.1 มก.ต่อมล. ในขวดรูปชมพู่ขนาด 500 มล. จำนวน 4 ขวด เลี้ยงเชื้อบนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิ 30 ° ซ ด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที ใช้ระยะเวลาที่เหมาะสมจากการทดลองในข้อ 3.4.1 เมื่อครบกำหนดเวลา แยกเซลล์แบคทีเรียออกจากอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวโดยใช้เครื่องปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4° ซ เป็นเวลา 10 นาที นำส่วนน้ำใสที่ได้มาทำการสกัดสารมัธยันต์ที่เกิดขึ้นจากการย่อยสลายของแอนทราซีนด้วยเอทิลอะซิเตต ซึ่งแสดงแผนผังการสกัดในภาคผนวก ค หมายเลข 7

นำส่วนสกัดที่เป็นกลางและส่วนสกัดที่เป็นกรดมาเติมโซเดียมซัลเฟตแอนไฮดรัสเพื่อกำจัดน้ำ แล้วจึงนำไปลดปริมาตรโดยใช้เครื่องระเหยแห้งสูญญากาศแบบหมุนให้เหลือปริมาตรส่วนสกัดละประมาณ 1 มล. จากนั้นนำแต่ละส่วนมาจุดลงบนแผ่น TLC (analytical TLC) ขนาดกว้าง 8 × 8 ซม. โดยใช้ระบบตัวทำละลายซึ่งประกอบด้วย โทลูอีน : 1,4 ไดออกเซน : กรดอะซิติกเข้มข้น ในอัตราส่วน 90 : 25 : 4 (ปริมาตรต่อปริมาตร) ตรวจสอบสารมัธยันต์ในแต่ละส่วน

ภายใต้แสงอุลตราไวโอเล็ต คัดเลือกส่วนสกัดที่มีสารมัธยันต์สะสมอยู่มากที่สุดมาทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ preparative TLC

3.4.3 การทำสารมัธยันต์ให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี preparative TLC

นำส่วนสกัดที่พบการสะสมของสารมัธยันต์อยู่มากที่สุด มาจุดให้เป็นแนวตรงบนแผ่นอลูมิเนียมที่แอลซีทีเคลือบด้วยซิลิกาเจล ขนาด 20 × 20 ซม. หนา 1 มม. โดยใช้กระบอกลดขนาดเล็ก รุ่น MS-200 ใช้ระบบตัวทำละลายซึ่งประกอบด้วย เฮกเซน : เอทิลอะซีเตต : กรดอะซีติกเข้มข้น ในอัตราส่วน 10: 10 : 1 (ปริมาตรต่อปริมาตร) ตรวจหาแถบของสารมัธยันต์ภายใต้แสงอุลตราไวโอเล็ต และจุดซิลิกาเจลจากแถบบังกล่าวมาทำการสกัดด้วยเอทิลอะซีเตตที่อุณหภูมิห้องด้วยน้ำ (ภาคผนวก ข หมายเลข 7) ปริมาตร 200 มล. เขย่าเป็นเวลา 10 นาที นำส่วนสกัดดังกล่าวมาผ่านคอลัมน์ของไซเดียมซัลเฟตแอนไฮดรัสเพื่อขจัดน้ำ จากนั้นนำไปลดปริมาตรโดยใช้เครื่องระเหยแห้งสูญญากาศแบบหมุน จนกระทั่งเหลือผลิตภัณฑ์ของสารเกาะติดอยู่ ซึ่งหาน้ำหนักแห้งของสารดังกล่าว และตรวจสอบความบริสุทธิ์ของสารซ้ำอีกครั้งหนึ่งโดยการนำสารละลายในเมทานอลของสารมัธยันต์ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์มาฉีด HPLC และตรวจสอบโครมาโตแกรมที่เกิดขึ้น

3.4.5 การพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารมัธยันต์

ทำการพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารมัธยันต์โดยวิธีแก๊สโครมาโตกราฟี-แมสสเปกโตรเมตรี (gas chromatography- mass spectrometry, GC-MS) ซึ่งให้ข้อมูลเกี่ยวกับโครงสร้างและมวลโมเลกุลของสาร และวิธีโปรตอนนิวเคลียร์ แมกเนติกเรโซแนนซ์ (proton nuclear magnetic resonances, ¹H-NMR) ซึ่งเป็นการวัดระดับพลังงานที่แตกต่างกันของนิวเคลียส ที่อยู่ภายใต้อิทธิพลของสนามแม่เหล็ก และให้ข้อมูลเกี่ยวกับสูตรโครงสร้างของสาร

3.4.6 แก๊สโครมาโตกราฟี-แมสสเปกโตรเมตรี (gas chromatography- mass spectrometry, GC-MS)

ละลายสารมัธยันต์ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้วด้วยเอทิลอะซีเตต (10 ไมโครกรัม/100 ไมโครลิตร) และนำไปทำปฏิกิริยากับสารละลายไดอะโซมีเทน (diazomethane) (ภาคผนวก ข หมายเลข 8) ปริมาณ 1-2 หยด ในหลอดแก้วขนาดเล็ก ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 นาที จากนั้น

ทำให้แห้งโดยเครื่องระเหยแห้งสูญญากาศแบบปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 20 °C ขั้นตอนดังกล่าวเป็นการนำสารมัธยันต์มาทำเป็นอนุพันธ์เมทิล (methylation) ละลายสารนี้ด้วยเอทิลอะซิเตตให้ได้ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัม/50 ไมโครลิตร วิเคราะห์หามวลโมเลกุลและรูปแบบการแตกตัว (fragmentation pattern) ของอนุพันธ์แบบเมทิลของสารมัธยันต์โดย GC-MS ดังนี้

ใช้คอลัมน์ชนิด DB-5 ขนาด 2.5 มม. × 15 ม. มีชั้นฟิล์มหนา 0.25 ไมโครเมตร ใช้ก๊าซฮีเลียมเป็นตัวพา ตั้งโปรแกรมของอุณหภูมิไว้ดังนี้

อุณหภูมิขณะฉีด (injection temperature)	230 °C.
อุณหภูมิกอลัมน์ (column temperature)	
เริ่มต้น (initial)	80 °C. (2 นาที)
อัตราการเพิ่ม (flow rate)	16 °C. ต่อนาที
สุดท้าย (final)	280 °C. (5 นาที)

เปรียบเทียบมวลโมเลกุลและรูปแบบในการแตกตัวของสารมัธยันต์ที่เกิดจากการย่อยสลายแอนทราซีนของแบบที่เรียกที่ตัดแยกได้ กับสารมัธยันต์มาตรฐานชนิดต่าง ๆ

3.4.7 โปรตอนนิวเคลียร์ แมกเนติกเรโซแนนซ์ (proton nuclear magnetic resonances, ^1H - NMR)

นำสารมัธยันต์ 1 มก. มาละลายใน 10% ดิวเทอริอุมเมทานอล (CD_3OD) ในดิวเทอริอุมคลอโรฟอร์ม (CD_2Cl_2) ปริมาตร 600 ไมโครลิตร กรองผ่านใยแก้วก่อนบรรจุในหลอดตัวอย่างสำหรับวิเคราะห์ NMR ขนาดความสูง 8 นิ้ว รุ่น 50Z-PP หลังจากนั้นปรับปริมาตรของสารละลายด้วยดิวเทอริอุมคลอโรฟอร์ม ให้สารละลายในหลอดตัวอย่างมีความสูงประมาณ 4 ซม. ผึ่งฝาหลอดให้สนิทและปิดทับด้วยเทปพาราฟิล์ม นำไปพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารมัธยันต์ด้วยเครื่อง NMR โดยใช้เตตระเมทิลซิลีน (tetramethyl silane) เป็น internal standard

3.5 การทดสอบพิษ (toxicity) ของสารมัธยันต์ที่เกิดจากการย่อยสลาย แอนทราซีนโดยแบคทีเรียสายพันธุ์ที่คัดแยกได้

เตรียมหัวเชื้อแบคทีเรียโดยเชื้อโคโคไลนีเดียวของแบคทีเรียที่คัดแยกได้ ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM ปริมาตร 25 มล. ที่มีเบนโซเอทเป็นแหล่งคาร์บอน (ภาคผนวก ก หมายเลข 5) เลี้ยงเชื้อบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 24 ชม. หลังจากปั่นแยกเซลล์แล้ว ทำการเจือจางเซลล์ด้วยสารละลาย 0.85 % โซเดียมคลอไรด์ให้ได้ค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตรเท่ากับ 0.02 นำไปเขย่าที่สภาวะเดิมในการเลี้ยงเชื้อ เป็นเวลา 24 ชม. เพื่อให้แบคทีเรียใช้อาหารสะสมที่เหลืออยู่ในเซลล์ให้หมดไป

เติมอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB (ภาคผนวก ก หมายเลข 3) ปริมาตร 0.5 มล.ลงในหลอดทดลองขนาดเล็ก จากนั้นเติมสารมัธยันต์ที่เกิดจากการย่อยสลายของแอนทราซีน (ภาคผนวก ข หมายเลข 9) ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0, 200, 400, 600, 800 และ 1,000 ไมโครกรัม ต่อ มล. (ทำการทดลอง 3 ซ้ำ) แล้วจึงเติมหัวเชื้อปริมาณ 0.5 มล. เลี้ยงเชื้อบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 24 ชม. วัดความขุ่นของเซลล์ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB ที่เติมสารมัธยันต์ ณ ความเข้มข้นต่าง ๆ ที่ใช้ในการทดลองเป็น blank

เปรียบเทียบความเป็นพิษของสารมัธยันต์มาตรฐานกับสารมัธยันต์ที่สกัดได้จากการย่อยสลายของแอนทราซีนโดยแบคทีเรียสายพันธุ์ที่คัดแยกได้ ทั้งต่อการเจริญของตัวเชื้อเอง รวมทั้งต่อ *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ P2 (ณัฐพันธุ์ ศุภกา, 2542) และ *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 (ศรัลยา แพงไทร, 2543) โดยวิธีการเตรียมหัวเชื้อสำหรับ *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 ใช้ซัคซิเนท (succinate) เป็นแหล่งคาร์บอน (ภาคผนวก ก หมายเลข 6) ส่วน *Sphingomonas* sp.สายพันธุ์ P2 ใช้สภาวะและวิธีการเช่นเดียวกับแบคทีเรียสายพันธุ์ที่คัดแยกได้

เนื่องจากสารมัธยันต์ที่สกัดได้จากการย่อยสลายแอนทราซีน ไม่สามารถกำจัดน้ำได้หมด ดังนั้นในการรายงานปริมาณสารที่ได้จากการสกัดซึ่งมีผลเป็นพิษต่อการเจริญของแบคทีเรีย จึงใช้ปริมาณที่เทียบจากกราฟมาตรฐานของสารมัธยันต์มาตรฐาน (ภาคผนวก ค หมายเลข 6) เพื่อให้ผลทดสอบความเป็นพิษที่ได้มีค่าใกล้เคียงกับผลที่เกิดจากความเป็นพิษของสารมัธยันต์มาตรฐานมากที่สุด เมื่อทำการทดสอบสารทั้งสองประเภทในปริมาณเท่ากัน

3.6 การวิเคราะห์สารมัธยันต์ที่เกิดจากการย่อยสลายฟลูออรีนโดยแบคทีเรียสายพันธุ์ที่คัดแยกได้

คัดเลือกระยะเวลาที่เหมาะสมและสกัดแยกสารมัธยันต์ที่เกิดจากการย่อยสลายฟลูออรีนโดยใช้วิธีการเช่นเดียวกับการทดลองในข้อ 3.4.1 และ 3.4.2 จากนั้นนำสารมาทำให้บริสุทธิ์โดยวิธี preparative TLC รวมทั้งทดสอบพิษของสารมัธยันต์ดังกล่าวต่อการเจริญของแบคทีเรียสายพันธุ์ที่คัดแยกได้ โดยใช้วิธีการทดลองในข้อ 3.5



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 4

ผลการทดลอง

4.1 การเพิ่มจำนวนแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายแอนทราซีนในตัวอย่างดินแต่ละชนิด

จากการนำตัวอย่างดิน 10 ตัวอย่าง มาทำการเพิ่มจำนวนแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายแอนทราซีนได้ โดยเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว CFMM ที่มีแอนทราซีนเข้มข้น 0.1 มก.ต่อมล. และถ่ายเชื้อเมื่อพบการเจริญของแบคทีเรีย ซึ่งสังเกตจากความขุ่นที่เกิดขึ้นและการเปลี่ยนสีของอาหารเหลว CFMM เทียบกับชุดควบคุม เมื่อทำการถ่ายเชื้อ 5 ครั้งติดต่อกัน ได้ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 การเพิ่มจำนวนแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายแอนทราซีนในแต่ละตัวอย่างดินหลังการถ่ายเชื้อ 5 ครั้งติดต่อกัน

ตัวอย่างดิน	มีความขุ่นเกิดขึ้น	การเปลี่ยนสีของอาหารเลี้ยงเชื้อ
1	-	-
2	-	-
3	-	-
4	+	เปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล
5	-	-
6	-	-
7	-	-
8	-	-
9	+	เปลี่ยนเป็นสีเหลืองอ่อน
10	-	-

หมายเหตุ + หมายถึง มีการเจริญในอาหารเหลวโดยมีความขุ่นเกิดขึ้น

- หมายถึง ไม่มีการเจริญในอาหารเหลว

จากการเพิ่มจำนวนแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายแอนทราซีน พบว่าอาหารเหลว CFMM ที่เติมตัวอย่างดินที่ 4 และ 9 ซึ่งมีแอนทราซีนเข้มข้น 0.1 มก.ต่อมล. เกิดการเปลี่ยนสีจากไม่มีสีเป็นสีน้ำตาลและสีเหลืองอ่อนตามลำดับ รวมทั้งมีความขุ่นเพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมดังนั้นจึงอาจเป็นไปได้ว่าเชื้อแบคทีเรียในตัวอย่างดินที่ 4 และ 9 สามารถย่อยสลายแอนทราซีนได้จึงนำเชื้อในตัวอย่างดินทั้ง 2 แห่งไปทำการศึกษาระดับต่อไป

ในระหว่างการเพิ่มจำนวนแบคทีเรียที่ย่อยสลายแอนทราซีนในตัวอย่างดินที่ 4 และ 9 สังเกตพบระยะเวลาที่ลดลงในการเปลี่ยนสีของอาหารเหลว CFMM แสดงว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ที่สามารถย่อยสลายแอนทราซีนในตัวอย่างดินทั้ง 2 แห่งมีการเพิ่มจำนวนขึ้น โดยในการถ่ายเชื้อครั้งที่ 5 แบคทีเรียในตัวอย่างดินที่ 4 สามารถเปลี่ยนสีของอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวจากไม่มีสีเป็นสีน้ำตาลได้ภายใน 48 ชั่วโมงหลังการถ่ายเชื้อ ในขณะที่พบการเจริญของเชื้อจากตัวอย่างดินที่ 9 ภายในวันที่ 4 ของการถ่ายเชื้อ โดยมีการเปลี่ยนสีอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวเป็นสีเหลืองอ่อน แสดงว่าเชื้อแบคทีเรียในตัวอย่างดินที่ 4 สามารถเพิ่มจำนวนโดยการย่อยสลายแอนทราซีนไปเป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงานได้ดีกว่าเชื้อในตัวอย่างดินที่ 9 ดังนั้นจึงนำเชื้อในตัวอย่างดินที่ 4 มาทำให้แบคทีเรียที่ย่อยสลายแอนทราซีนได้เป็นเชื้อบริสุทธิ์ในระดับต่อไป

4.2 การคัดแยกแบคทีเรียสายพันธุ์บริสุทธิ์ที่สามารถย่อยสลายแอนทราซีน

จากการนำตัวอย่างดินที่ 4 มาทำการแยกเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์บริสุทธิ์ที่สามารถย่อยสลายแอนทราซีนบนผิวหน้าอาหารแข็ง CFMM และอาหารแข็ง LB พบลักษณะโคโลนีที่ต่างกันของแบคทีเรีย 3 ชนิดซึ่งเจริญบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อภายในวันที่ 3 และ 5 ของการบ่มเชื้อบนอาหารแข็ง LB และอาหารแข็ง CFMM ตามลำดับ โดยเชื่อดังกล่าวมีลักษณะโคโลนีที่แตกต่างกันชัดเจนเมื่อเจริญบนผิวหน้าอาหารแข็ง LB จึงให้ชื่อเชื้อทั้งสามชนิดว่า ANT1 ANT2 และ ANT3 ดังแสดงรายละเอียดในตารางที่ 4.2

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

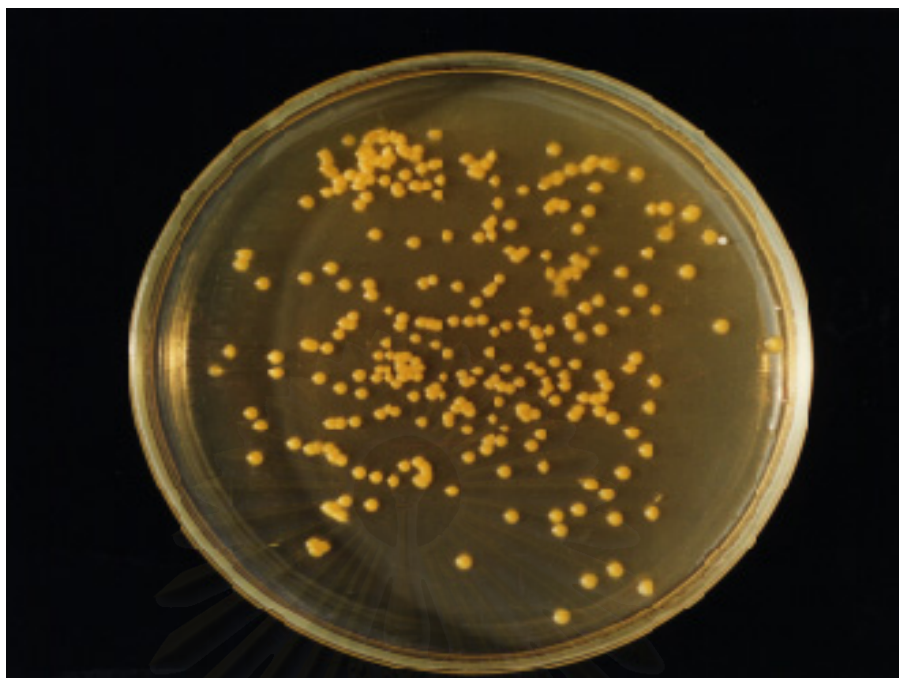
ตารางที่ 4.2 ลักษณะโคโลนีของเชื้อแบคทีเรีย 3 สายพันธุ์ซึ่งคัดแยกได้จากตัวอย่างดินที่ 4

สายพันธุ์แบคทีเรีย	ลักษณะโคโลนีบนอาหารแข็ง LB
ANT 1	โคโลนีกลม ขอบเรียบ ทึบแสง มีสีเหลือง
ANT 2	โคโลนีกลม ขอบเรียบ ทึบแสง มีสีขาว
ANT 3	รูปร่างโคโลนีไม่แน่นอน ขอบไม่เรียบ สีเหลือง มีลักษณะเป็นฝ้าบาง ๆ

นำแบคทีเรียทั้ง 3 สายพันธุ์มาเลี้ยงในอาหารเหลว CFMM ที่มีแอนทราซินเข้มข้น 0.1 มก. ต่อมล. พบว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ ANT1 สามารถเปลี่ยนสีของอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM จากไม่มีสีไปเป็นสีน้ำตาลได้ภายใน 48 ชั่วโมง แบคทีเรียสายพันธุ์ ANT2 ไม่สามารถเพิ่มจำนวนได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแอนทราซินเป็นแหล่งคาร์บอน โดยไม่พบทั้งความขุ่นที่เพิ่มขึ้นหรือการเปลี่ยนสีของอาหารเลี้ยงเชื้อเมื่อเทียบกับชุดควบคุมภายในระยะเวลา 7 วัน ในขณะที่แบคทีเรียสายพันธุ์ ANT3 สามารถเพิ่มจำนวนได้เล็กน้อย โดยพบการเปลี่ยนสีของอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM จากไม่มีสีไปเป็นสีเหลืองอ่อนภายใน 4 วันของการบ่มเชื้อ จากผลการทดลองนี้จึงเลือกแบคทีเรียสายพันธุ์ ANT1 ที่มีความสามารถสูงสุดในการย่อยสลายแอนทราซินและนำไปจำแนกชนิดทางอนุกรมวิธานในขั้นต่อไป

4.3 การจำแนกชนิดทางอนุกรมวิธานของแบคทีเรียสายพันธุ์ ANT1

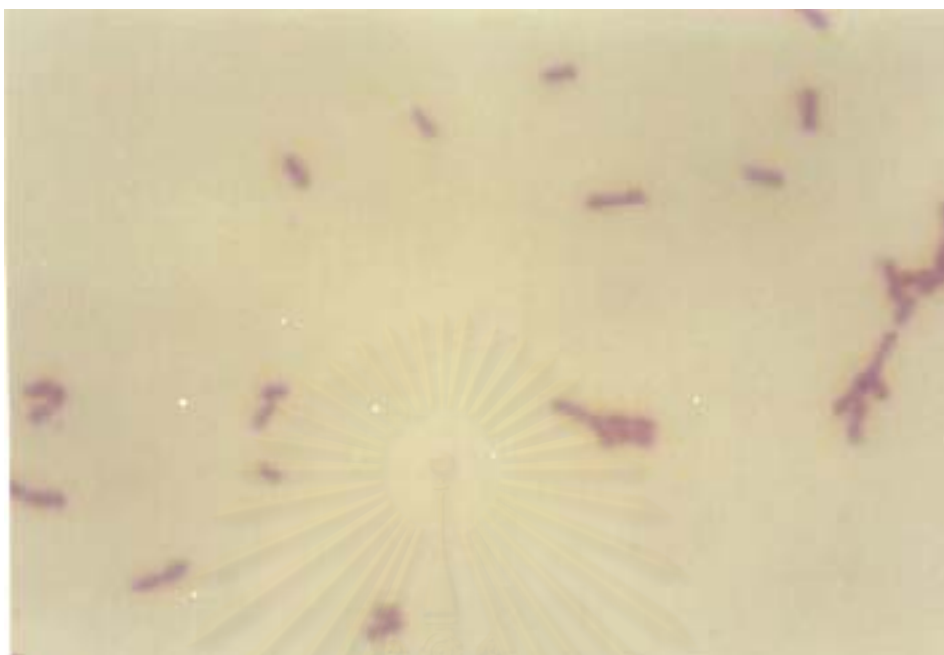
จากการสังเกตลักษณะโคโลนีของแบคทีเรียสายพันธุ์ ANT1 ที่เจริญบนอาหารแข็ง LB มีลักษณะโคโลนีกลม สีเหลือง ขอบเรียบ ทึบแสง ดังแสดงในรูปที่ 4.1 และเมื่อศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์พบว่าเซลล์ของแบคทีเรียสายพันธุ์ ANT1 มีลักษณะเป็นแท่ง ติดสีกักลม ดังแสดงในรูปที่ 4.2 และเซลล์บางส่วนมักจะต่อกันเป็นสายยาวดังแสดงในรูปที่ 4.3 ส่วนลักษณะทางสัณฐานวิทยาและผลทดสอบทางชีวเคมีของแบคทีเรียได้แสดงไว้ในตารางที่ 4.3 และ 4.4 ตามลำดับ



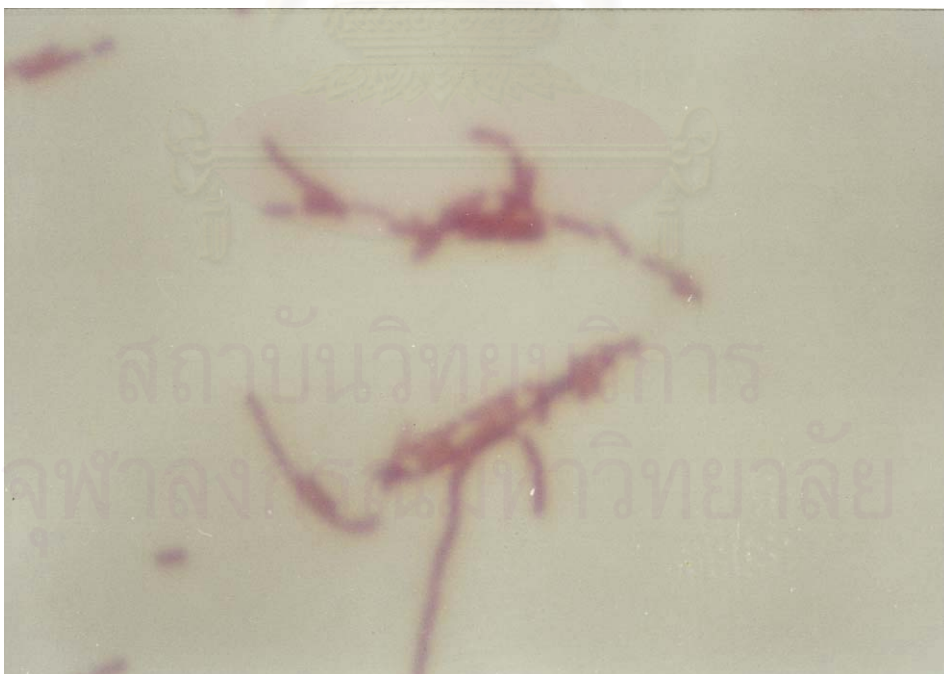
รูปที่ 4.1 ลักษณะโคโลนีของแบคทีเรียสายพันธุ์ ANT1 บนอาหารแข็ง LB

ตารางที่ 4.3 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียสายพันธุ์ ANT1

ลักษณะที่ศึกษา	ลักษณะที่สังเกตเห็น
<u>ลักษณะของเซลล์</u>	
การติดสีกรัม	กรัมลบ
รูปร่างของเซลล์	แท่ง
การติดสี acid - fast	ไม่ติดสี
<u>ลักษณะของโคโลนี</u>	
รูปร่าง	กลม
สี	เหลือง
การผ่านของแสง	ทึบแสง
ลักษณะขอบ	ขอบเรียบ



รูปที่ 4.2 ลักษณะรูปร่างของแบคทีเรียสายพันธุ์ ANT1 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (กำลังขยาย 1000 เท่า)



รูปที่ 4.3 ลักษณะเชลของแบคทีเรียสายพันธุ์ ANT1 ที่ต่อกันเป็นสายยาว (กำลังขยาย 1000 เท่า)

ตารางที่ 4.4 ลักษณะทางสรีรวิทยาของแบคทีเรียสายพันธุ์ ANT 1

ลักษณะที่ศึกษา	ลักษณะทางสรีรวิทยา
1. การทดสอบเอนไซม์ออกซิเดส (oxidase test)	-
2. การทดสอบเอนไซม์คาตาเลส (catalase test)	+
3. การรีดิวซ์ไนเตรต (nitrate reduction)	+
4. การไฮโดรไลซ์เอสคูลิน (esculin hydrolysis)	-
5. การทดสอบเอนไซม์ยูรีเอส (urease)	+
6. การเกิดปฏิกิริยาบนอาหารแข็งทริปเปิลไอออน (triple sugar iron agar reaction)	K/-
7. การเจริญบนอาหารแมคคองกี (MacConkey medium)	+
8. การไฮโดรไลซ์เจลาติน (gelatin hydrolysis)	-
9. การสร้างไฮโดรเจนซัลไฟด์ (H ₂ S production)	-
10. ปฏิกิริยาออกซิเดทีฟ/เฟออร์เมนเตชัน (oxidative/fermentation)	-
11. การสร้างอินโดล (indole production)	-
12. การทดสอบเมทิลเรด (methyl red test)	-
13. การทดสอบ Vogas-Proskauer (Vogas-Proskauer reaction)	-
14. การเคลื่อนที่ (motility)	-
15. การใช้แหล่งคาร์บอน	
ดี - กลูโคส (D - glucose)	-
ดี - มอลโตส (D - maltose)	-
ดี - กาแลคโตส (D - galactose)	-
ดี - ฟรุคโตส (D - fructose)	-
ดี - แมนนิทอล (D - mannitol)	-
ซิมมอน ซีเตรต (Simmon citrate)	+

หมายเหตุ + : เชื้อมีเอนไซม์ชนิดที่ทดสอบ หรือเจริญได้ในแหล่งคาร์บอนนั้น

- : เชื้อไม่มีเอนไซม์ชนิดที่ทดสอบ หรือไม่มีการเจริญในสารตั้งต้นนั้น

K : อาหารแข็ง TSI ที่อยู่ก้นหลอด (butt) มีสมบัติเป็นเบสหรือเป็นกลาง

ทำการเปรียบเทียบลักษณะทางสัณฐานวิทยาและผลทดสอบทางชีวเคมี ที่แสดงไว้ใน ตารางที่ 4.3 และ 4.4 กับข้อมูลที่รายงานโดย Palleroni (1984) ใน Burgey's Manual of Systematic Bacteriology พบว่าตรงกับลักษณะของแบคทีเรียในสกุล *Sphingomonas* และจาก ผลการวิเคราะห์หาลำดับเบสของ 16 เอส ไรโบโซมัลดีเอ็นเอของแบคทีเรียสายพันธุ์ ANT1 ได้ผล การทดลองดังแสดงในรูปที่ 4.4

```

TCGCCTGCTCCTTACGGTTAGTCAACGCCTTCGAGTGAATCCAACCTCCCATGGTGTGA
CGGGCCGGTGTGTACAAGGCCTGGGAACGTATTACCCGCGGCATGCTGATCCGCGATT
ACTAGCGATTCCGCCTTACGCTCTCGAGTTGCAGAGAACGATCCGAACCTGAGACGA
CTTTTGGAGATTAGCTCCCTCTCGCGAGGTGGNTGCCCACTGTAGTCGCCATTGTAGC
ACGTGTGTAGCCCAACGCGTAAGGGCCATGAGGACTTGACGTATCCCACTTCTCT
CCGGCTTATCACCGCGGTTCTTTAGAGTACCCAACTAAATGCTGGCAACTAAAGGC
GAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACA
GCCATGCAGCACCTGTACCTATCCAGCCGAACCTGAAGGAAAGTGTNTCCACGATCC
GCGATAGGGATGTCAAACGTTGGTAAGGTTTTGCGCGTTGCTTCGAATTAACACATG
CTCCACCGCTTGTGCAGGCCCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTTAATTTGCGACCGTACT
CCCCAGGCGGATAACTTAATGCGTTAGCTGCGCCACCAAAACACCATGTGCCCTGAC
AGCTAGTTATCATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGCTCCCC
ACGCTTTGCGACCTCAGCGTCAATACCAGTCCAGTGAAGCCGCTTCGCCACTGGTGTT
CTTCCGAATATCTACGAATTTACCTCTACACTCGGAATTCACCTCAGCTCTCCTGGATT
CAAGCTATCTAGTTTCAAAGGCAGTTCGGGGTTGAGCCCCGGGCTTTACCTCTGAC
TTGAATAGCCGCCTACGTGCGCTTACGCCAGTAATCCGAACAACGCTAGCTCCCT
CCGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGGGAGTTAGCCGGAGCTTATTCTCCCGGTACTGT
CATTATCATCCCGGTAAGAGCTTTACAACCCTAAGGCCTTCATCACTCACGCGGC
ATTGCTGGATCAGGCTTTGCCCCATTGTCCAATATTCCCTACTGCTGCCTCCCGTAGGA
GTCTGGGCCGTGTCTCAGTCCCAGTGTGGCTGATCATCTCTCAGACCAGCTAAGGAT
CGTGCCTTGGTGAAGCTTTACCTCACCAACTAGCTAATCCTACGCGGGCTCATCCTT
GGGCGATAAATCTTTGGACTTACGTATCATCCGGTATTAGCTTCGTTTCCAGAAGTTA
TTCCGAACCAAGGGCAGATTCACCGCGTTACGCACCCGTGCGCCACTAGATCCGA
AGATCTCGTTGACTTGCATGTATTAAGGCATGCCGCCAGCGTTGCTTCTGAGCCA

```

รูปที่ 4.4 ลำดับเบสของ 16 เอส ไรโบโซมัลดีเอ็นเอของแบคทีเรียสายพันธุ์ ANT1

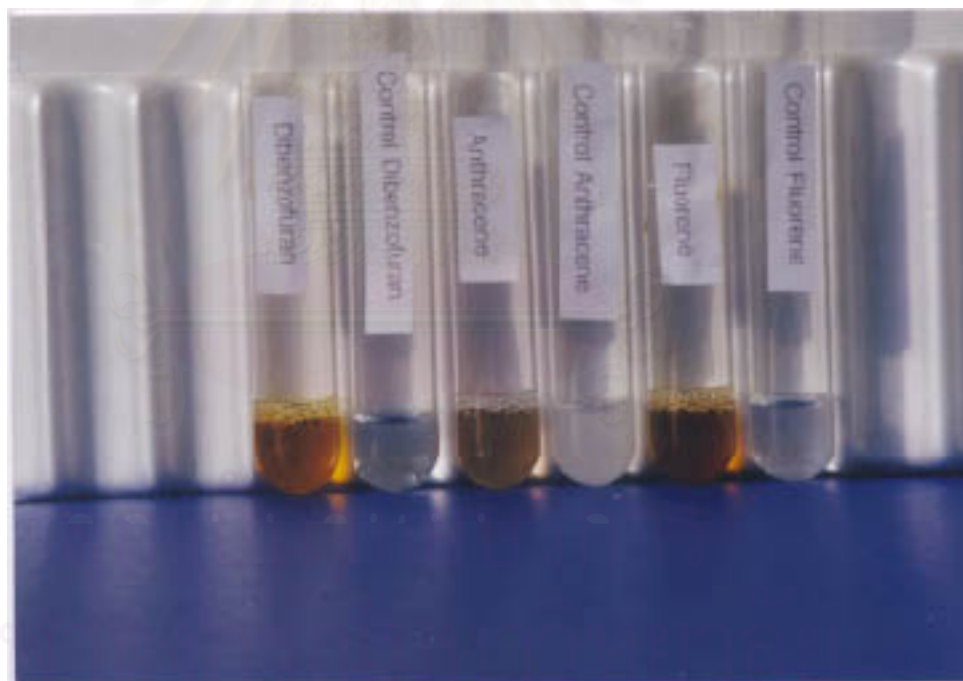
จากการนำลำดับเบสของ 16 เอส ไรโบโซมัลดีเอ็นเอของแบคทีเรียสายพันธุ์ ANT1 มาเปรียบเทียบกับลำดับเบสของ 16 เอส ไรโบโซมัลดีเอ็นเอของจุลินทรีย์ชนิดต่าง ๆ ในฐานข้อมูล GenBank โดยใช้โปรแกรม BLAST (Altschul *et al.*, 1997) พบว่าลำดับเบสของ 16 เอส ไรโบโซมัลดีเอ็นเอของแบคทีเรียสายพันธุ์ ANT1 คล้ายกับลำดับเบส 16 เอส ไรโบโซมัลดีเอ็นเอของ *Sphingomonas* sp. โดยมีความคล้ายคลึง (% homology) เท่ากับ 99 % ดังนั้นจากผลการทดสอบทางสรีรวิทยาและทางสัณฐานวิทยาร่วมกับการวิเคราะห์ลำดับเบสของ 16 เอส ไรโบโซมัลดีเอ็นเอ สามารถยืนยันได้ชัดเจนว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ ANT1 เป็นแบคทีเรียในสกุล *Sphingomonas*

นอกจากนี้พบว่า *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ ANT1 ให้ผลบวกในการทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์ไดออกซีจีเนส โดยสังเกตจากโคโลนีของแบคทีเรียเปลี่ยนเป็นสีน้ำเงินหลังจากได้รับไฮระเหยของอินโดล ซึ่งแสดงว่ามีการแตกวงแบบออโรเกิดขึ้น ส่วนแคทิลคอลที่แตกวงแบบเมตาสังเกตจากโคโลนีของแบคทีเรียที่เปลี่ยนเป็นสีเหลืองไข่แดงภายหลังพันทับผิวหน้าอาหารแข็ง CFMM ด้วย 2,3-ไดไฮดรอกซีไบฟีนิลที่ละลายในไดเอทิลอีเทอร์

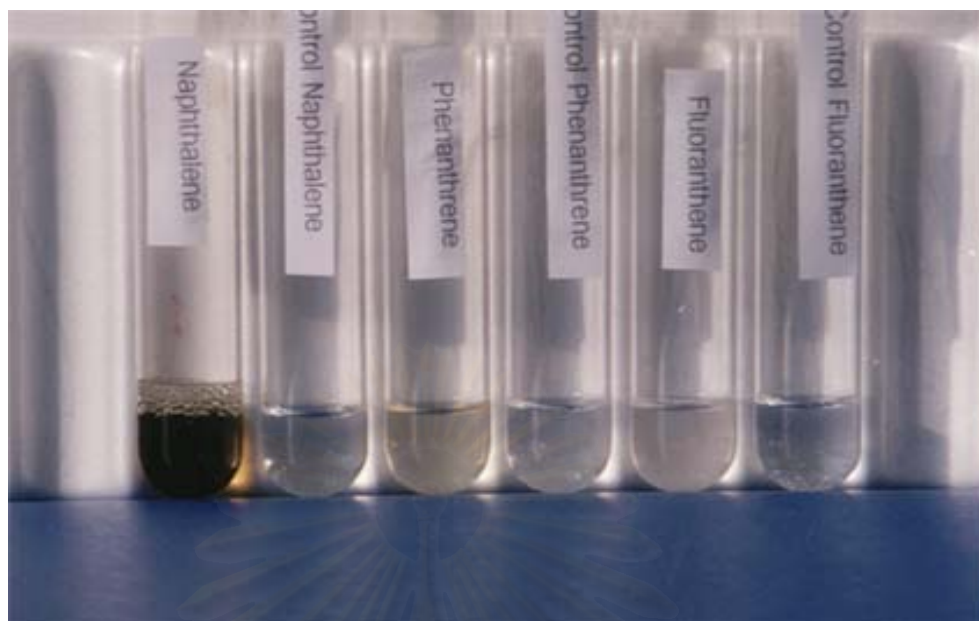
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.4 ความจำเพาะในการใช้ PAHs ชนิดอื่นในการเจริญของ *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ ANT1

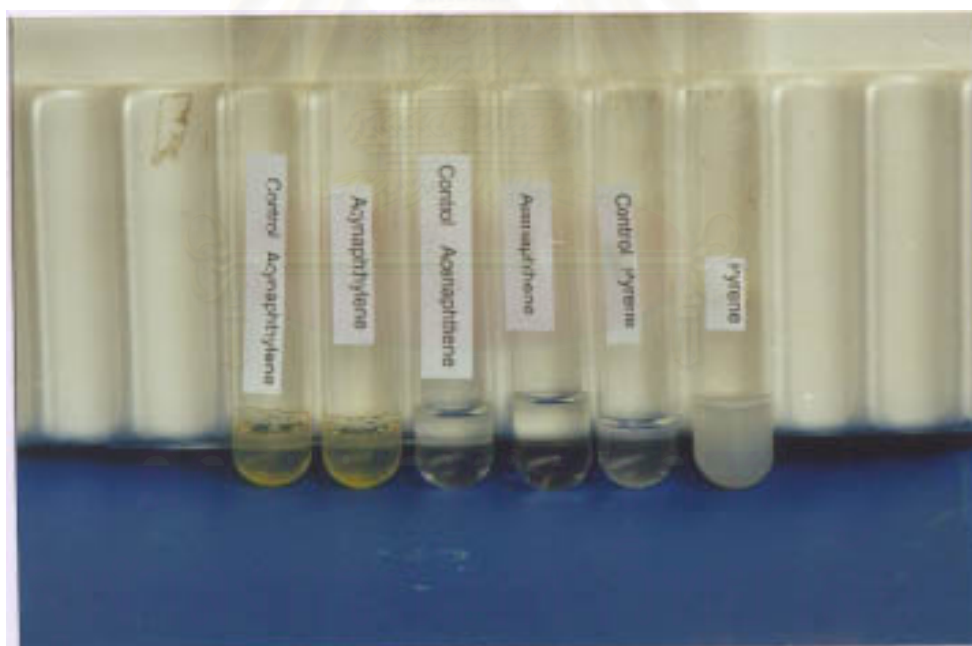
จากการทดสอบความสามารถในการย่อยสลาย PAHs ชนิดอื่น นอกเหนือจากแอนทราซีนของ *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ ANT1 เพื่อใช้เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงานในการเจริญ โดยชนิดของ PAHs ที่นำมาทดสอบคือ ไดเบนโซฟูแรน, ฟลูออรีน, ฟลูออแรนธิน, แนพทาลีน, พีแนทรีน, อะซีแนพทิลีน, อะซีแนพทีน และไพรีน ผลการทดสอบในเบื้องต้นพบว่า *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ ANT1 สามารถเพิ่มจำนวนในอาหารเหลว CFMM ที่มี PAHs เป็นแหล่งคาร์บอนได้หลายชนิด โดยสังเกตจากการเปลี่ยนสีของอาหารเหลว CFMM เนื่องจากการย่อยสลาย PAHs ไปเป็นสีต่าง ๆ กันขึ้นกับชนิดของ PAHs และสารมัธยันต์ที่เกิดขึ้น ดังแสดงผลการทดลองในรูปที่ 4.5, 4.6 และ 4.7 รวมทั้งสรุปผลการทดสอบไว้ในตารางที่ 4.5



รูปที่ 4.5 ลักษณะของอาหารเหลว CFMM ที่มีไดเบนโซฟูแรน, แอนทราซีน และ ฟลูออรีนเป็นแหล่งคาร์บอน ในการเลี้ยงเชื้อ *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ ANT1 เป็นเวลา 3 วัน มีสีต่าง ๆ เกิดขึ้นเปรียบเทียบกับชุดควบคุม



รูปที่ 4.6 ลักษณะของอาหารเหลว CFMM ในการเลี้ยงเชื้อ *Spingomonas* sp. สายพันธุ์ ANT1 เป็นเวลา 7 วัน เมื่อมีฟลูออแรนทินเป็นแหล่งคาร์บอน และ 3 วันในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมแนพทาไลน์ และฟิแนนทรีน เปรียบเทียบกับชุดควบคุม



รูปที่ 4.7 ลักษณะของอาหารเหลว CFMM ที่มีอะซีแนพทิลีน, อะซีแนพทีน และไพรีนเป็นแหล่งคาร์บอน ในการเลี้ยงเชื้อ *Spingomonas* sp. สายพันธุ์ ANT1 เป็นเวลา 7 วัน

ตารางที่ 4.5 ผลการเปลี่ยนสีอาหารเหลว CFMM ที่เติม PAHs แต่ละชนิดในการเลี้ยงเชื้อ *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ ANT1

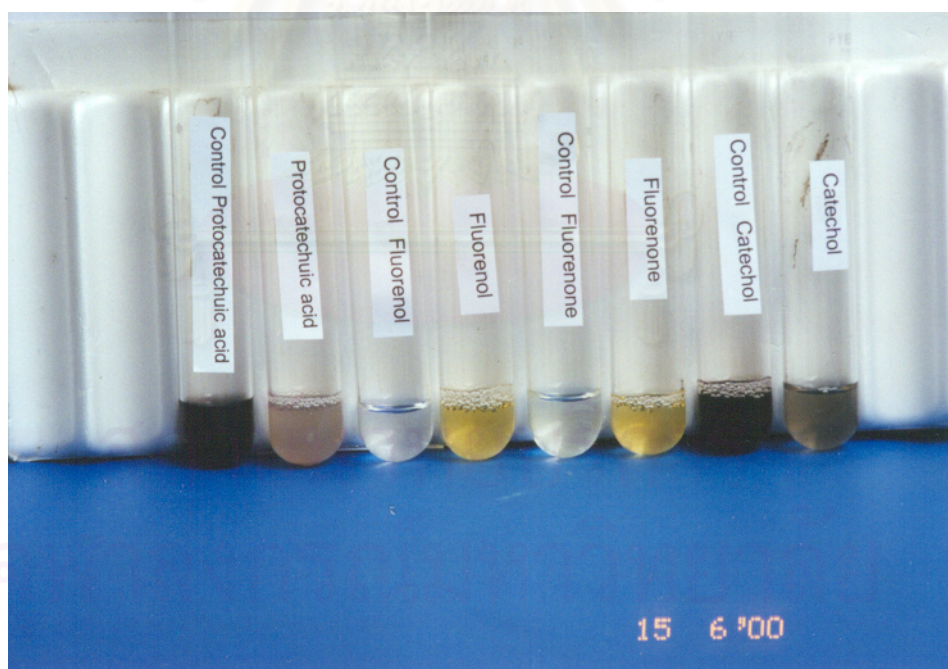
ชนิดของ PAHs	การเปลี่ยนสีของอาหารเหลว CFMM
ไดเบนโซฟูแรน	เหลืองเข้มออกส้ม
แอนทราซีน	น้ำตาล
ฟลูออรีน	เหลืองเข้มออกน้ำตาล
ฟลูออแรนธิน*	ขาวขุ่นออกส้ม
แนพธาซีน	น้ำตาลเข้ม
ฟีนแอนทรีน	เหลืองอ่อน
อะซีแนพทีน*	ไม่เปลี่ยนสี
อะซีแนพทีน*	ไม่เปลี่ยนสี
ไพรีน*	ขาวขุ่น

หมายเหตุ * กรณีที่มีฟลูออแรนธิน, อะซีแนพทีน, อะซีแนพทีน และ ไพรีน เป็นแหล่งคาร์บอน ใช้ระยะเวลา 7 วันในการเลี้ยงเชื้อ ส่วนไดเบนโซฟูแรน, แอนทราซีน, ฟลูออรีน, แนพธาซีน และฟีนแอนทรีน ใช้เวลาในการเลี้ยงเชื้อ 3 วัน

ผลการทดลองในเบื้องต้นพบว่า *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ ANT1 สามารถเพิ่มจำนวนในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมสารทดสอบได้หลายชนิด โดยเริ่มสังเกตพบการเปลี่ยนสีของอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM ที่มีไดเบนโซฟูแรน, แอนทราซีน, ฟลูออรีน, แนพธาซีน และฟีนแอนทรีนเป็นแหล่งคาร์บอนเพียง 24 ชั่วโมงของการเลี้ยงเชื้อ แสดงว่า PAHs ชนิดต่าง ๆ ดังกล่าวมีแนวโน้มที่จะเป็นแหล่งพลังงานและแหล่งคาร์บอนที่ดีสำหรับการเจริญของเชื้อ *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ ANT1 ดังนั้นงานวิจัยในขั้นต่อไปจึงทดลองหารูปแบบการเพิ่มจำนวนของเชื้อในอาหารเหลว CFMM ที่เติม PAHs แต่ละชนิดและติดตามประสิทธิภาพของเชื้อในการย่อยสลายสารทดสอบโดยการวิเคราะห์ปริมาณที่เหลือของสารดังกล่าวทุก 24 ชั่วโมง

ส่วนใน CFMM ที่เติมไพรีนและฟลูออแรนธินพบว่า *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ ANT1 สามารถเพิ่มจำนวนได้เล็กน้อย โดยเริ่มสังเกตพบการเปลี่ยนสีของอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวภายหลังการเลี้ยงเชื้อเป็นเวลานานถึง 7 วัน แสดงว่าเชื้อมีประสิทธิภาพต่ำในการย่อยสลาย PAHs ทั้งสองชนิดดังกล่าว ดังนั้นจึงไม่ศึกษารูปแบบการเพิ่มจำนวนของเชื้อในอาหารเหลวที่มีไพรีนและฟลูออแรนธินเป็นแหล่งคาร์บอน

จากการทดสอบด้วยวิธีการเดียวกันพบว่า *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ ANT1 ยังสามารถเปลี่ยนสีของอาหารเหลว CFMM ที่มีสารทดสอบชนิดอื่นอีกหลายชนิด ได้แก่ กรดโปรโตคาเทคิสิก (protocatechuic acid), ฟลูออรีนอล (fluorenol), ฟลูออรีโนน (fluorenone) และแคทเชคอลล เป็นสีต่าง ๆ กันตามชนิดของเมตาบอไลต์ที่เกิดขึ้นจากสารทดสอบ ดังแสดงในรูปที่ 4.8



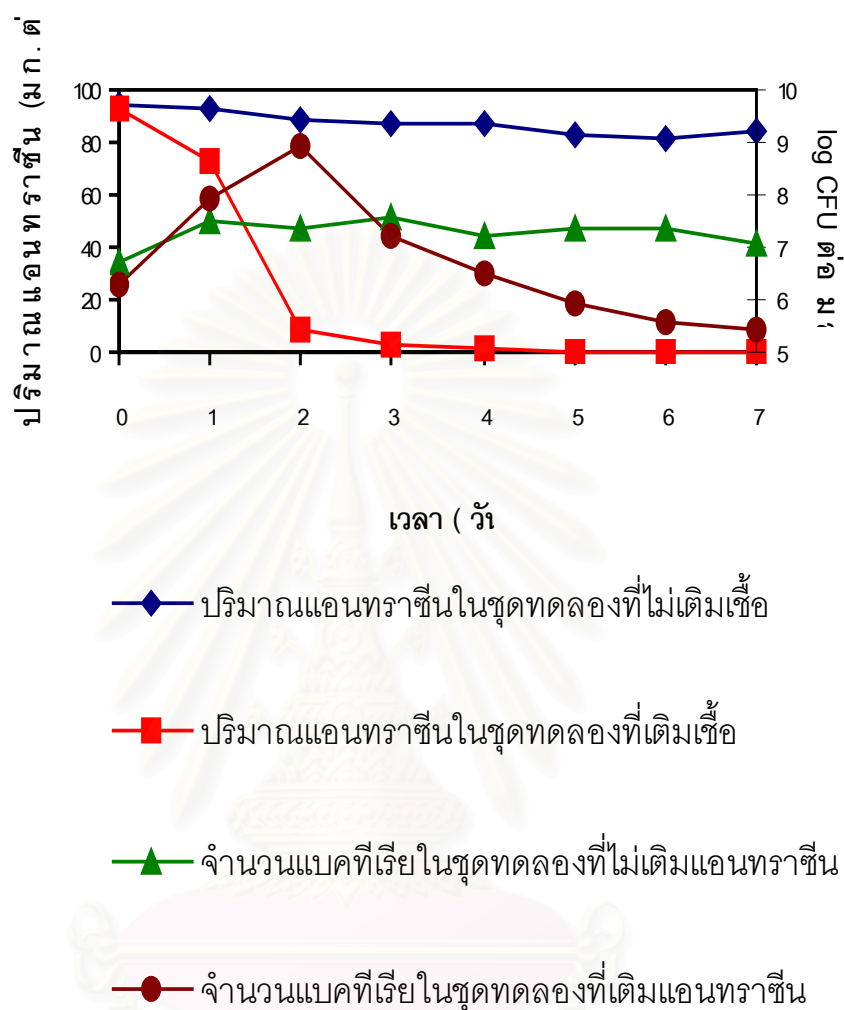
รูปที่ 4.8 ลักษณะของอาหารเหลว CFMM ที่มีสารทดสอบแต่ละชนิดหลังการเลี้ยงเชื้อ *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ ANT1 เป็นเวลา 7 วัน

4.5 รูปแบบการเจริญของ ของ *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ ANT1 เมื่อใช้ แอนทราซีนเป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงาน

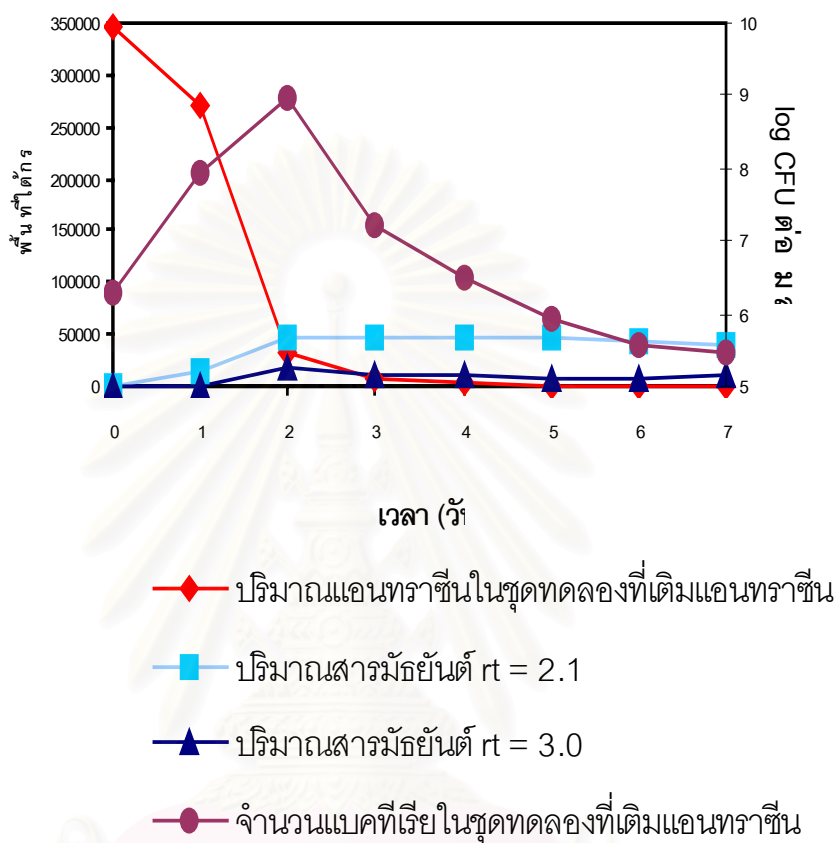
ผลการศึกษารูปแบบการเพิ่มจำนวนของ *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ ANT1 ในการย่อยสลายแอนทราซีน โดยนำหัวเชื้อมาเลี้ยงในอาหารเหลว CFMM ปริมาตร 5 มล. ที่มีแอนทราซีนเข้มข้น 0.1 มก.ต่อมล. ติดตามการเจริญของแบคทีเรียในชุดทดลอง รวมทั้งศึกษาประสิทธิภาพของเชื้อในการย่อยสลายแอนทราซีน โดยการวิเคราะห์ปริมาณที่เหลือของสารดังกล่าวทุก 24 ชั่วโมง ได้ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 4.9, 4.10 และ 4.11 ตามลำดับ



รูปที่ 4.9 ลักษณะของอาหารเหลว CFMM ในการเลี้ยงเชื้อ *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ ANT1 ที่ระยะเวลา 1-7 วัน โดยมีแอนทราซีนเป็นสารทดสอบ



รูปที่ 4.10 รูปแบบการเพิ่มจำนวน และปริมาณแอนทราซีนที่เหลืออยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ CFMM ของ *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ ANT1 ในระยะเวลา 1-7 วัน เปรียบเทียบกับชุดควบคุม



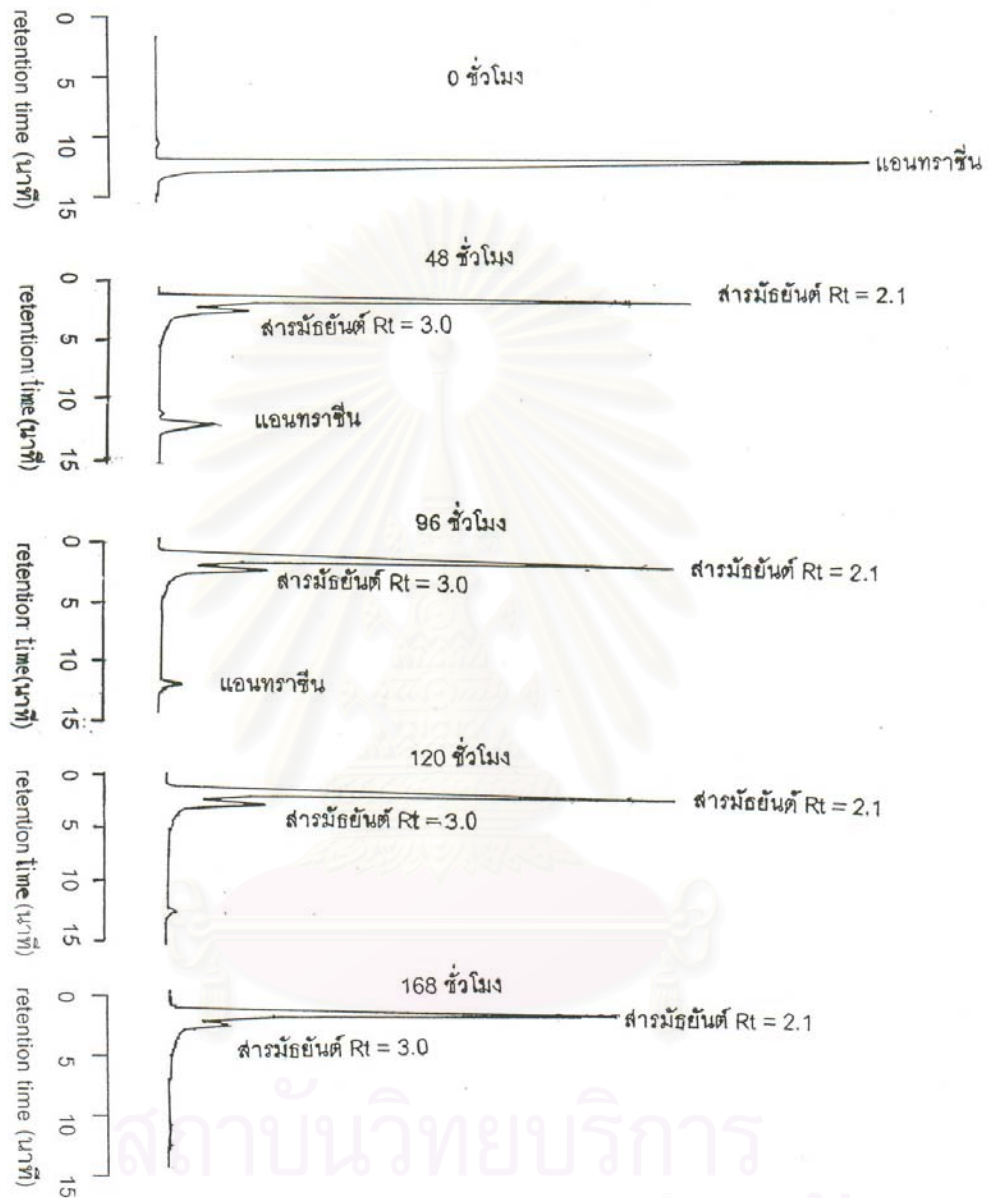
รูปที่ 4.11 ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณแอนทราซีนและจำนวนเซลล์ *Spingomonas* sp. สายพันธุ์ ANT1 กับปริมาณของสารมัธยันต์ที่เกิดจากการย่อยสลายแอนทราซีน โดยการเปรียบเทียบกับพื้นที่ที่ได้กราฟที่ได้จากการวิเคราะห์ HPLC

จากผลการทดลองพบว่าใน 48 ชั่วโมงแรกของการเลี้ยงเชื้อ *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ ANT1 มีประสิทธิภาพสูงสุดในการย่อยสลายแอนทราซีน โดยสังเกตได้จากการเพิ่มจำนวนขึ้นอย่างมากของแบคทีเรียควบคู่ไปกับการลดลงอย่างรวดเร็วของแอนทราซีนเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม โดยปริมาณแบคทีเรียเพิ่มจำนวนจาก 2.04×10^6 CFU ต่อมล. ในตอนเริ่มต้นไปเป็น 9.1×10^8 CFU ต่อมล. ในวันที่ 2 ของการเลี้ยงเชื้อโดยไม่มี lag phase เกิดขึ้น หลังจากนั้นการเจริญของแบคทีเรียสายพันธุ์ ANT1 จะมีอัตราการลดลงอย่างรวดเร็ว โดยในวันที่ 3 ของการเลี้ยงเชื้อพบว่าสารมัธยันต์ชนิดแรกซึ่งมี retention time เท่ากับ 2.1 มีพื้นที่ใต้กราฟจากการวิเคราะห์โครมาโตแกรมของ HPLC เท่ากับ 48456 และสารมัธยันต์ชนิดที่สองซึ่งมี retention time 3 นาที มีพื้นที่ใต้กราฟ 10326 (รูปที่ 4.11)

จากการวิเคราะห์ปริมาณแอนทราซีนที่เหลือในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM (รูปที่ 4.10) พบว่าหลังการเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 48 ชั่วโมง จะมีปริมาณแอนทราซีนเหลืออยู่น้อยมากประมาณ 9.15 มก.ต่อลิตร และไม่มีแอนทราซีนเหลืออยู่ในอาหารเหลวหลังการเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 120 ชั่วโมง ในขณะที่ชุดควบคุมที่ไม่เติม *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ ANT1 มีแอนทราซีนเหลืออยู่ในอาหารเหลวประมาณ 83.63 มก.ต่อลิตร หลังจากการทดลองเป็นเวลา 7 วัน โดยปริมาณแอนทราซีนที่หายไปเกิดจากปัจจัยทางกายภาพ

ผลการติดตามโครมาโตแกรมจากการวิเคราะห์ปริมาณแอนทราซีนและสารมัธยันต์ที่เกิดขึ้นจากการย่อยสลายแอนทราซีนโดย *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ ANT1 ด้วย HPLC หลังการเลี้ยงเชื้อที่เวลาต่าง ๆ ดังแสดงในรูปที่ 4.12 พบว่าแอนทราซีนมีปริมาณลดลงอย่างรวดเร็วและเมื่อเลี้ยงเชื้อต่อไปเป็นเวลา 5 วัน พบว่าไม่มีแอนทราซีนเหลืออยู่ในอาหารเหลว ในขณะที่สารมัธยันต์ชนิดแรกซึ่งมี retention time เท่ากับ 2.1 นาที มีปริมาณค่อนข้างคงที่ตลอดการทดลอง ส่วนสารชนิดที่สองที่มี retention time 3.0 นาที มีปริมาณน้อยลงหลังการเลี้ยงเชื้อ 7 วัน

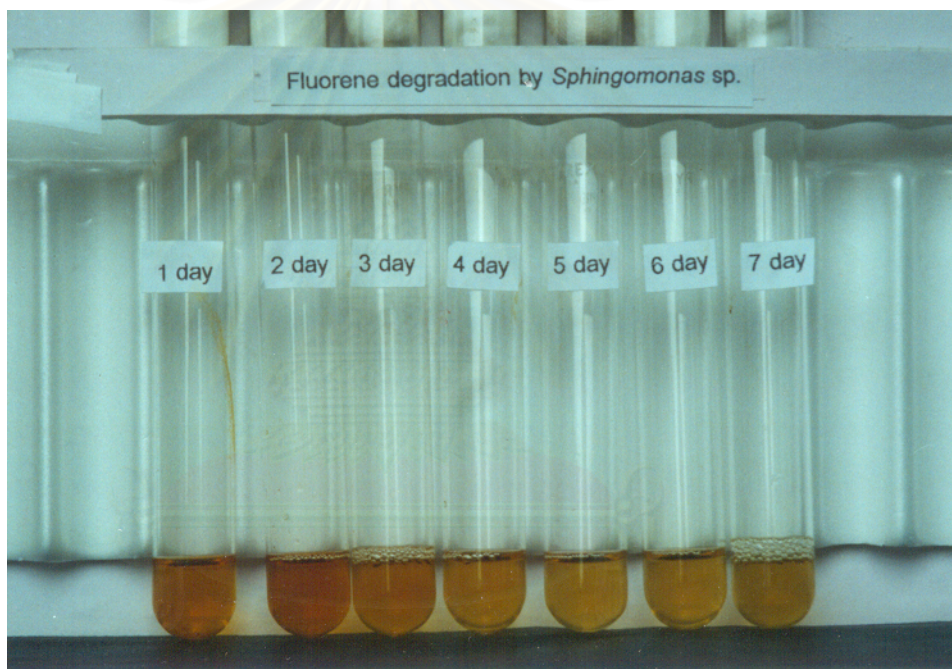
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



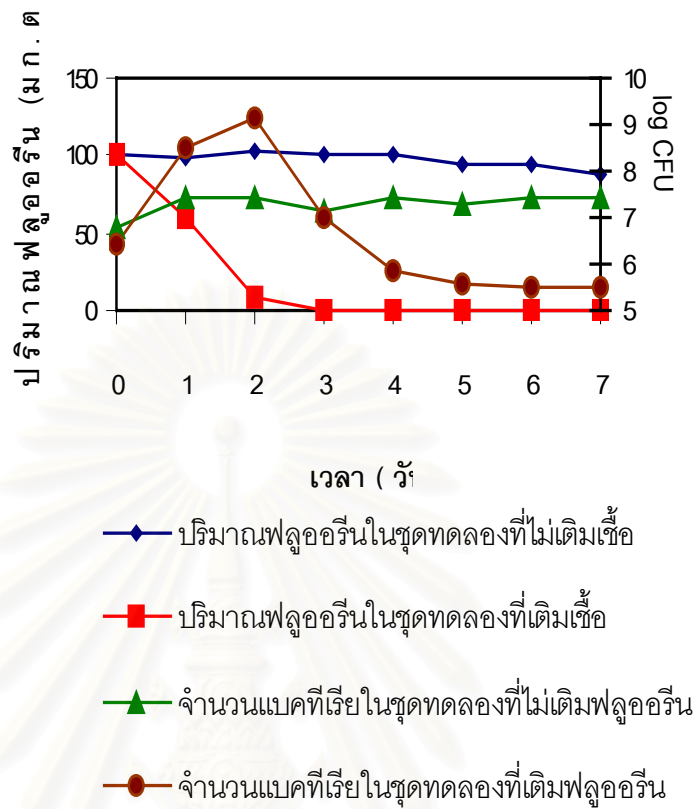
รูปที่ 4.12 โครมาโตแกรมการวิเคราะห์ HPLC เพื่อหาปริมาณแอนทราซีนและสารมัธยันต์ที่เกิดจากการย่อยสลายแอนทราซีนโดย *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ ANT1 หลังการเลี้ยงเชื้อที่เวลาต่าง ๆ

4.6 รูปแบบการเจริญของ *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ ANT1 เมื่อใช้ฟลูออรีนเป็นแหล่งคาร์บอน

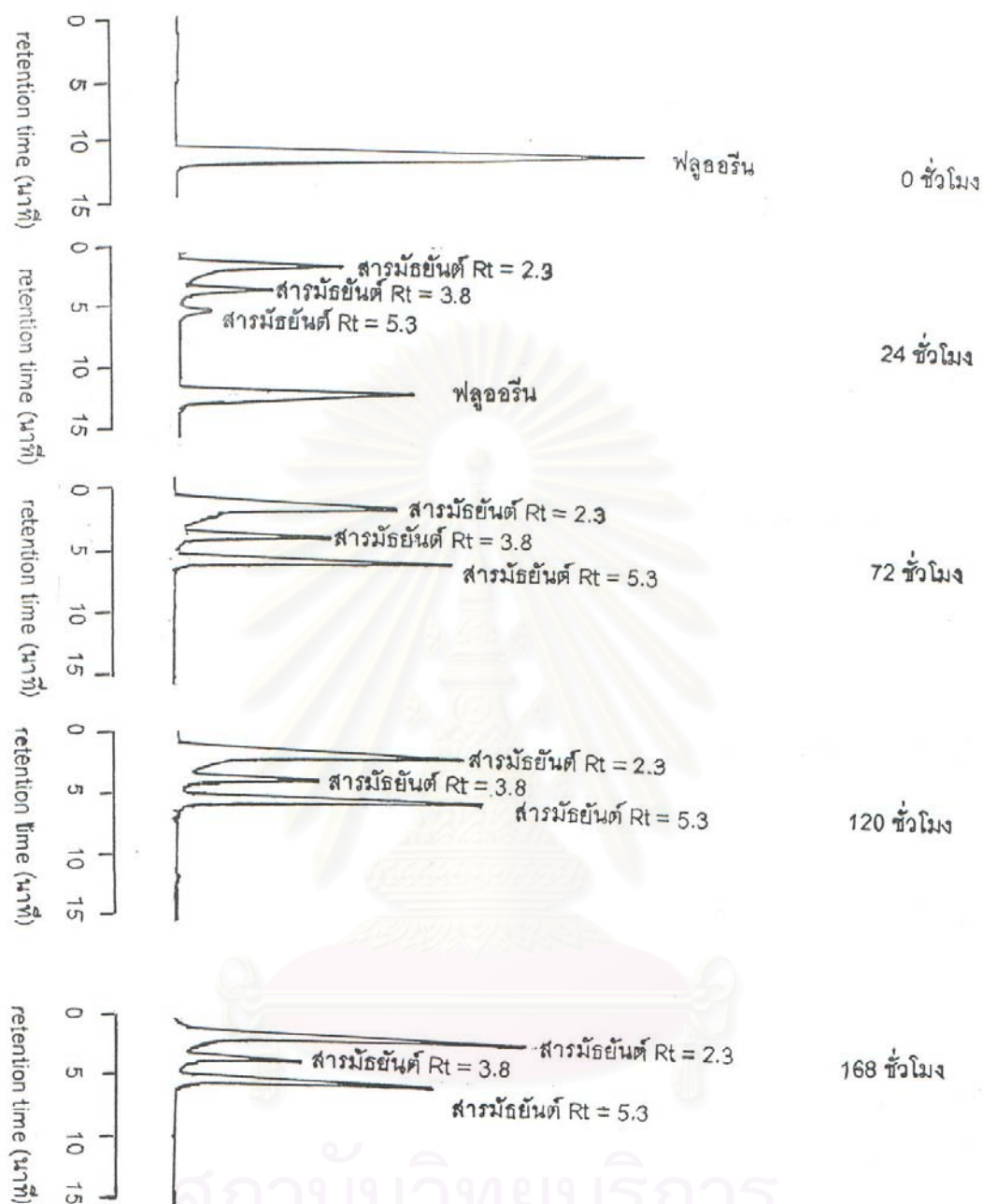
จากการศึกษาในเบื้องต้นพบว่า *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ ANT1 สามารถเปลี่ยนสีของอาหารเหลวที่เติมฟลูออรีน จากไม่มีสีเป็นสีเหลืองเข้มได้หลังการเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 24 ชั่วโมง และการศึกษาในรูปแบบในการเจริญโดยใช้ฟลูออรีนเป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงาน โดยนำหัวเชื้อมาเลี้ยงในอาหารเหลว CFMM ปริมาตร 5 มล. ที่มีฟลูออรีนเข้มข้น 0.1 มก.ต่อมล.ติดตามการเจริญและวิเคราะห์ปริมาณฟลูออรีนที่เหลือทุก 24 ชั่วโมง ได้ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 4.13, 4.14 และ 4.15



รูปที่ 4.13 ลักษณะของอาหารเหลว CFMM ที่มีฟลูออรีนเข้มข้น 0.1 มก.ต่อมล. ในการเลี้ยงเชื้อ *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ ANT1 ที่ระยะเวลา 1-7 วัน



รูปที่ 4.14 รูปแบบการเพิ่มจำนวนและปริมาณฟลูออรีนที่เหลือจากการย่อยสลายของ *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ ANT1 หลังการเลี้ยงเชื้อที่เวลาต่าง ๆ



รูปที่ 4.15 โครมาโตแกรมการวิเคราะห์ HPLC เพื่อหาปริมาณฟลูออรีนและสารมัธยันต์ที่เกิดจากการย่อยสลายฟลูออรีนโดย *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ ANT1 หลังการเลี้ยงเชื้อที่เวลาต่าง ๆ

จากการทดลองพบว่าใน 48 ชั่วโมงแรกของการเลี้ยงเชื้อ *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ ANT1 สามารถย่อยสลายฟลูออรีนไปเป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงานสำหรับการเจริญได้ดีที่สุด โดยเชื้อเพิ่มจำนวนจาก 2.88×10^6 CFU ต่อมล. ในตอนเริ่มต้นไปเป็น 2.51×10^9 CFU ต่อมล. ในวันที่ 2 ของการทดลอง ในขณะที่เดียวกันปริมาณฟลูออรีนก็ลดลงจาก 100 มก.ต่อลิตร มาเป็น 8 มก.ต่อลิตร และไม่มีฟลูออรีนเหลืออยู่ในอาหารเหลวหลังการเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 72 ชั่วโมง ในขณะที่หลังจากการทดลองเป็นเวลา 7 วัน ชุดควบคุมที่ไม่เติมเชื้อมีฟลูออรีนเหลืออยู่ในอาหารเหลวประมาณ 87 มก.ต่อลิตร

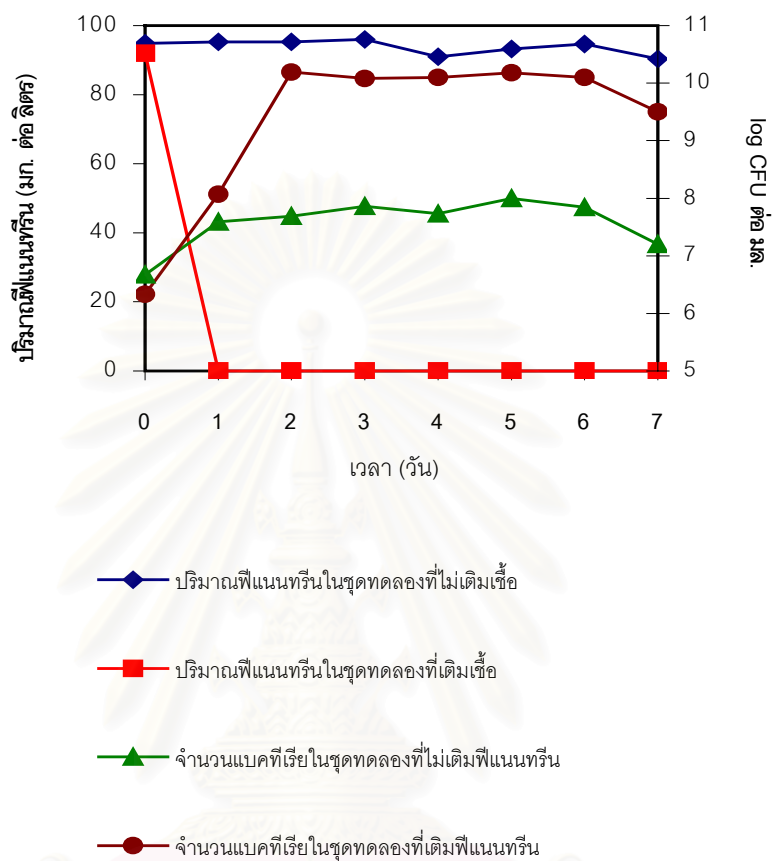
ผลการทดลองในรูปที่ 4.15 แสดงให้เห็นว่า *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ ANT1 จะย่อยสลายฟลูออรีนไปเป็นสารมัธยันต์ 3 ชนิดที่มี retention time ต่างกันเป็น 2.3, 3.8 และ 5.3 นาทีตามลำดับ โดยเริ่มพบการสะสมของสารตัวกลางทั้งสามชนิดหลังการเลี้ยงเชื้อที่เวลา 24 ชั่วโมง และในวันที่ 3 ของการทดลอง สารทั้ง 3 ชนิดมีปริมาณเพิ่มขึ้น ในขณะที่ไม่มีฟลูออรีนเหลืออยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ การเพิ่มปริมาณของสารในลักษณะดังกล่าวยังคงเกิดขึ้นอย่างต่อเนื่องจนถึงวันที่ 7 ของการทดลอง โดยสารมัธยันต์ที่มี retention time 2.3 นาที มีปริมาณมากที่สุด จากผลการทดลองจะเห็นได้ว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ ANT1 ไม่สามารถย่อยสลายสารมัธยันต์ทั้งสามชนิดได้ การทดลองในขั้นต่อไปจึงทำการสกัดสารดังกล่าว เพื่อนำมาทดสอบพิษต่อการเจริญของ *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ ANT1

4.7 รูปแบบการเจริญของ *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ ANT1 เมื่อใช้ฟิแนนทรีนเป็นแหล่งคาร์บอน

จากการศึกษาในเบื้องต้นพบว่า *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ ANT1 สามารถเปลี่ยนสีของอาหารเหลว CFMM ที่เติมฟิแนนทรีน จากไม่มีสีไปเป็นสีเหลืองได้ภายในเวลา 24 ชั่วโมงแรกของการเลี้ยงเชื้อ และผลการศึกษารูปแบบในการเพิ่มจำนวนของแบคทีเรียสายพันธุ์ ANT1 โดยการย่อยสลายฟิแนนทรีนไปเป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงาน ติดตามการเจริญของแบคทีเรียในชุดทดลอง เทียบกับชุดควบคุมที่ไม่เติมฟิแนนทรีนเข้มข้น 0.1 มก.ต่อมล. และวิเคราะห์ปริมาณสารดังกล่าวทุก 24 ชั่วโมง ได้ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 4.16, 4.17 และ 4.18 ตามลำดับ

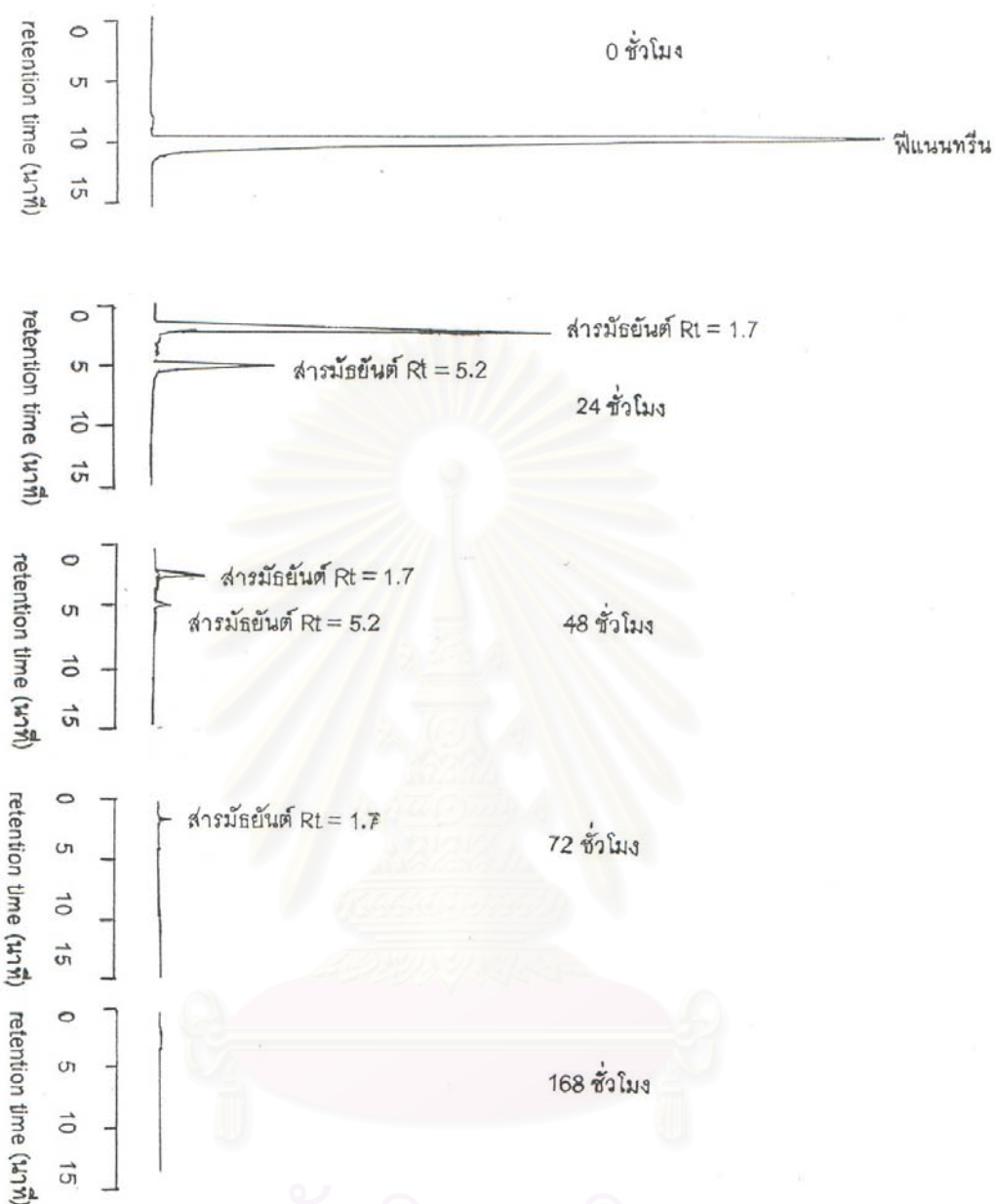


รูปที่ 4.16 ลักษณะของอาหารเหลว CFMM ที่เกิดจากการย่อยสลายฟิแนนทรีนเข้มข้น 0.1 มก.ต่อมล. ของ *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ ANT1 ในการเลี้ยงเชื้อที่ระยะเวลา 1 - 7 วัน



สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 4.17 รูปแบบการเพิ่มจำนวนและปริมาณพืชเนนทรีนที่เหลือจากการย่อยสลายของ *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ ANT1 ในการเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 7 วัน



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 4.18 โครมาโตแกรมการวิเคราะห์ HPLC เพื่อหาปริมาณฟีนานทรีน และสารมัธยันต์ที่เกิดจากการย่อยสลายฟีนานทรีนโดย *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ ANT1 หลังการเลี้ยงเชื้อที่เวลาต่าง ๆ

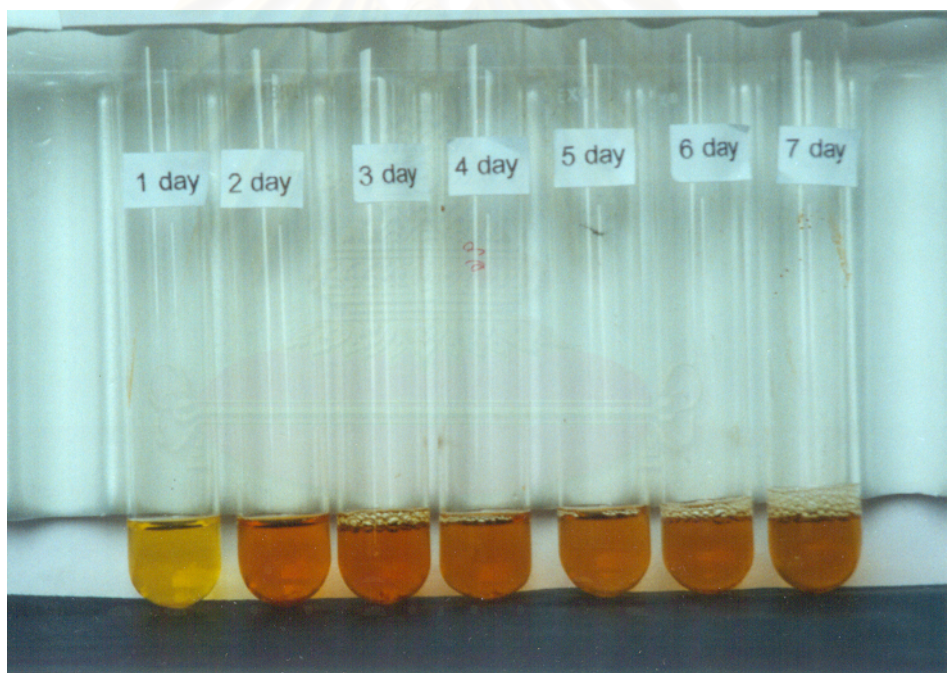
จากการทดลองพบว่า *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ ANT1 สามารถย่อยสลายพีแนนนทรีนเพื่อใช้เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงานได้โดยสมบูรณ์ โดยสังเกตได้จากการเพิ่มจำนวนของแบคทีเรียอย่างรวดเร็ว ควบคู่ไปกับการลดลงอย่างรวดเร็วของพีแนนนทรีนในอาหารเหลว CFMM เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม โดยแบคทีเรียเพิ่มจำนวนจาก 2.13×10^6 CFU ต่อมล. ในตอนเริ่มต้นไปเป็น 1.55×10^{10} CFU ต่อมล. ในวันที่ 2 ของการเลี้ยงเชื้อโดยไม่มี lag phase เกิดขึ้น แบคทีเรียสายพันธุ์ ANT1 จะหยุดการเจริญและมีจำนวนคงที่หลังการเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 2 วัน โดยที่ปริมาณพีแนนนทรีนในอาหารเหลวหมดไปหลังการเลี้ยงเชื้อเพียง 24 ชั่วโมง

ผลการติดตามโครมาโตแกรมจากการวิเคราะห์ปริมาณพีแนนนทรีนที่เหลือในอาหารเหลว ด้วยวิธี HPLC ดังแสดงในรูปที่ 4.18 พบว่า *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ ANT1 จะย่อยสลายพีแนนนทรีนไปเป็นสารมัธยันต์ที่มี retention time 1.7 นาที และ 5.2 นาที ได้อย่างรวดเร็วภายในเวลา 24 ชั่วโมงหลังการเลี้ยงเชื้อ โดยพบการสะสมของสารมัธยันต์ชนิดที่มี retention time เท่ากับ 1.7 นาทีในปริมาณสูงกว่า ในขณะที่ไม่มีพีแนนนทรีนเหลืออยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว และเมื่อทำการเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบว่าสารมัธยันต์ทั้งสองชนิดดังกล่าวมีปริมาณลดลงอย่างรวดเร็ว ที่เวลา 72 ชั่วโมง สารมัธยันต์ที่มี retention time 5.2 นาทีจะถูกย่อยสลายหมดไป ส่วนสารมัธยันต์ที่มี retention time 1.7 นาทีเหลืออยู่ปริมาณน้อยมาก จากผลการทดลองจะเห็นได้ว่า *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ ANT1 สามารถย่อยสลายพีแนนนทรีนไปเป็นสารมัธยันต์ได้อย่างรวดเร็ว โดยพีแนนนทรีนถูกใช้หมดไปภายในระยะเวลาเพียง 24 ชั่วโมงของการเลี้ยงเชื้อ และสารมัธยันต์ที่เกิดขึ้นก็จะถูกย่อยสลายจนหมดไปหลังสิ้นสุดการทดลองเป็นเวลา 7 วัน

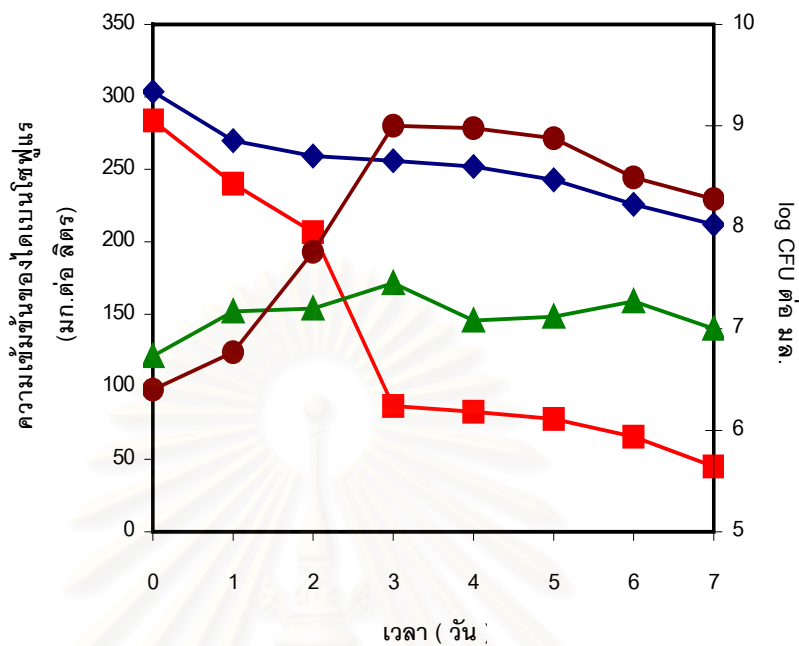
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.8 รูปแบบการเจริญของ *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ ANT1 เมื่อใช้ ไคเบนโซฟูแรนเป็นแหล่งคาร์บอน

จากการศึกษาในเบื้องต้นพบว่า *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ ANT1 สามารถเปลี่ยนสีของอาหารเหลวที่เติมไคเบนโซฟูแรน จากไม่มีสีไปเป็นสีเหลืองเข้มออกส้มได้ภายใน 48 ชั่วโมงแรกของการทดลอง และผลการศึกษารูปแบบในการเพิ่มจำนวนโดยใช้ไคเบนโซฟูแรนเป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงานสำหรับการเจริญของ *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ ANT1 โดยนำหัวเชื้อมาเลี้ยงในอาหารเหลว CFMM ปริมาตร 5 มล. ที่มีไคเบนโซฟูแรนเข้มข้น 0.3 มก.ต่อมล. และติดตามการเจริญของเชื้อ รวมทั้งวิเคราะห์ปริมาณที่เหลือของสารทดสอบทุก 24 ชั่วโมง ได้ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 4.19, 4.20 และ 4.21 ตามลำดับ



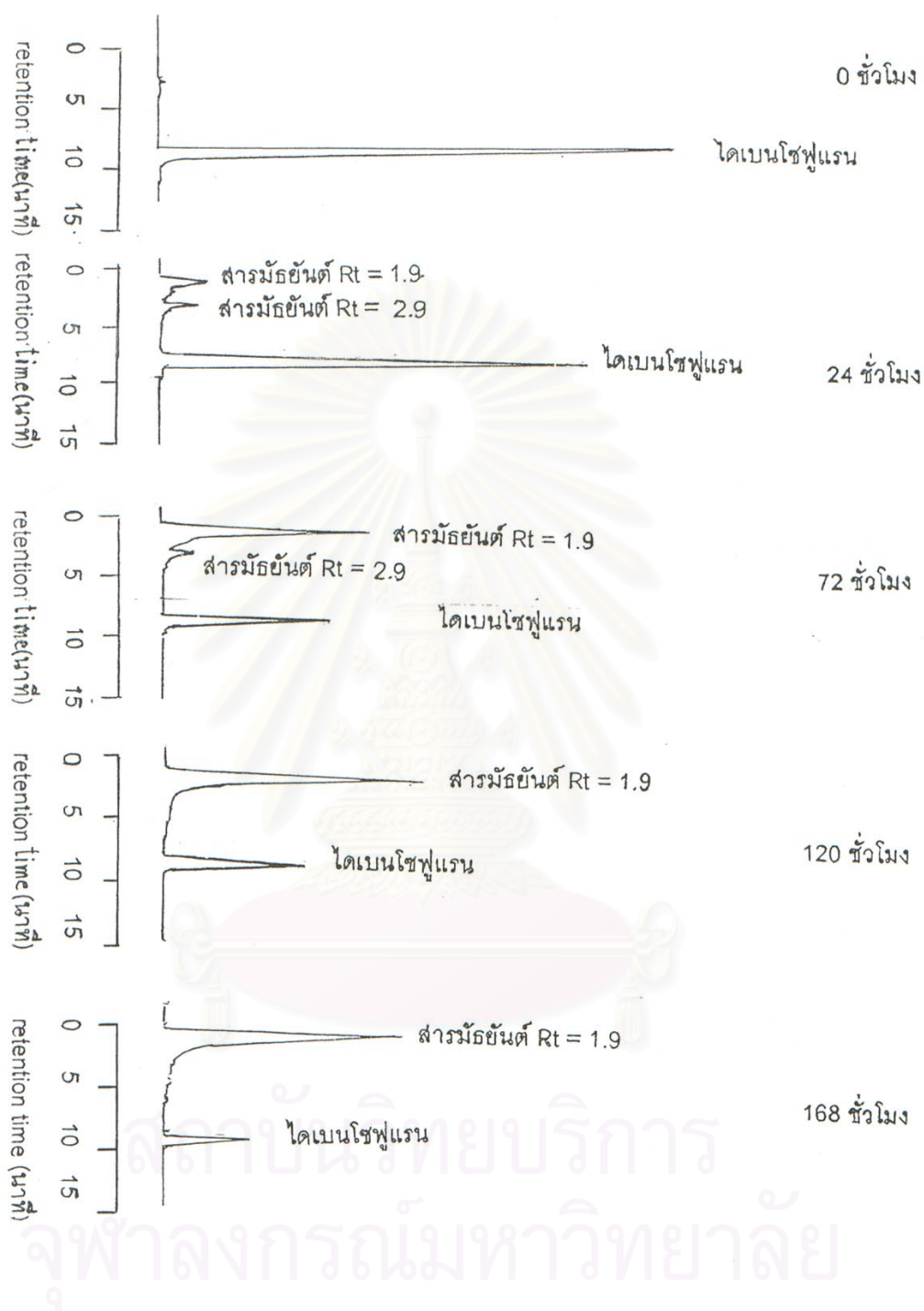
รูปที่ 4.19 ลักษณะของอาหารเหลว CFMM ที่เกิดจากการย่อยสลายไคเบนโซฟูแรนของเชื้อ *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ ANT1 ในการเลี้ยงเชื้อที่ระยะเวลา 1 - 7 วัน



- ◆ ปริมาณไคเบนโซฟูแรนในชุดทดลองที่ไม่เติมเชื้อ
- ปริมาณไคเบนโซฟูแรนในชุดทดลองที่เติมเชื้อ
- ▲ จำนวนแบคทีเรียในชุดทดลองที่ไม่เติมไคเบนโซฟูแรน
- จำนวนแบคทีเรียในชุดทดลองที่เติมไคเบนโซฟูแรน

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 4.20 รูปแบบการเพิ่มจำนวน และปริมาณไคเบนโซฟูแรนที่เหลือจากการย่อยสลายโดย *Spingomonas* sp. สายพันธุ์ ANT1 ในการเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 7 วัน



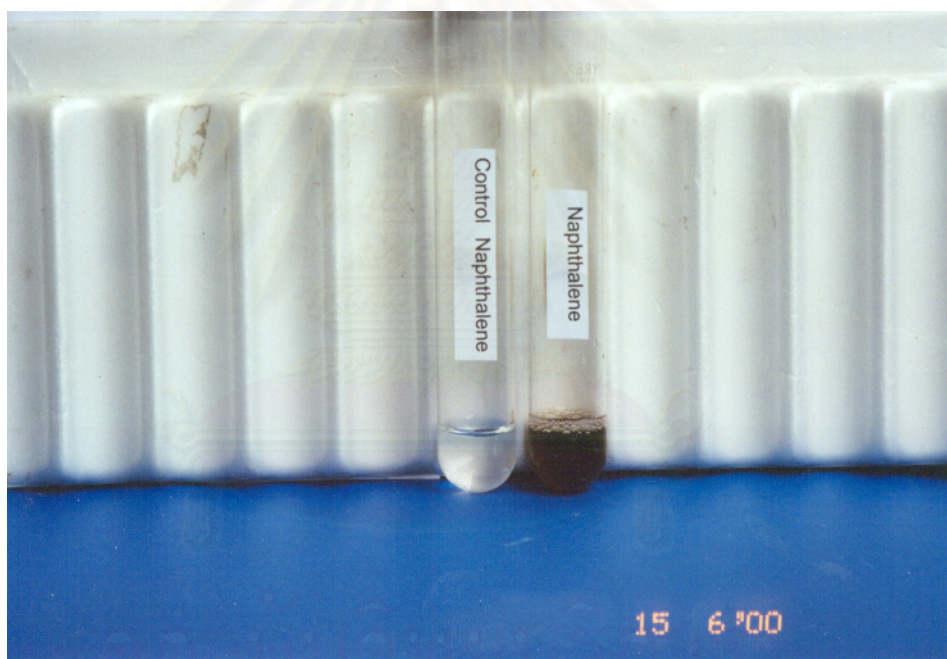
รูปที่ 4.21 โครมาโตแกรมจากการวิเคราะห์ HPLC เพื่อหาปริมาณโดเบนไซฟูแรนและสารมัธยันต์ที่เกิดจากการย่อยสลายโดเบนไซฟูแรนโดย *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ ANT1 หลังการเลี้ยงเชื้อที่เวลาต่าง ๆ

จากผลการทดลองในรูปที่ 4.20 พบว่า ภายใน 24 ชั่วโมงแรก รูปแบบการเพิ่มจำนวนของ *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ ANT1 มี lag phase เกิดขึ้น โดยเชื้อเพิ่มจำนวนจาก 2.51×10^6 CFU ต่อมล. ไปเป็น 5.8×10^6 CFU ต่อมล. หลังจากนั้นเชื้อจะเพิ่มจำนวนขึ้นอย่างรวดเร็ว จนถึงจำนวนสูงสุดเท่ากับ 1.0×10^9 CFU ต่อมล. ในวันที่ 3 ของการทดลอง ซึ่งสอดคล้องกับ ปริมาณไคเบนโซฟูแรนที่ลดลงจาก 283.63 มก.ต่อลิตร ในตอนเริ่มต้นไปเป็น 86.86 มก.ต่อลิตร ในวันที่ 3 และปริมาณสารทดสอบที่เหลือในอาหารเลี้ยงเชื้อจะลดลงเพียงเล็กน้อย โดยในวันที่ 7 ของการทดลองมีปริมาณเท่ากับ 45.16 มก.ต่อลิตร สาเหตุดังกล่าวอาจเกิดจากแบคทีเรียสายพันธุ์ ANT1 หยุดการเจริญ โดยเริ่มมีจำนวนคงที่หลังจากวันที่ 3 ของการเลี้ยงเชื้อ

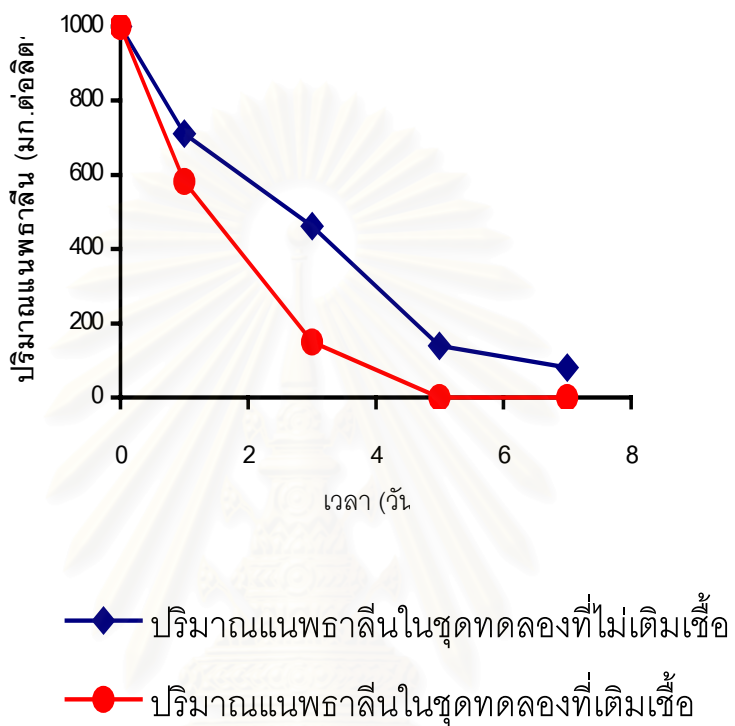
ผลการติดตามโครมาโตแกรมจากการวิเคราะห์ปริมาณไคเบนโซฟูแรนที่เหลือในอาหารเลี้ยงเชื้อด้วย HPLC ดังแสดงในรูปที่ 4.21 พบว่า *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ ANT1 จะย่อยสลายไคเบนโซฟูแรนไปเป็นสารมัธยันต์ 2 ชนิด ที่มี retention time เท่ากับ 1.9 นาที และ 2.9 นาที โดยที่เริ่มพบการสะสมของสารมัธยันต์ทั้งสองชนิดใน 24 ชั่วโมงแรกของการเลี้ยงเชื้อ ในวันที่ 3 พบว่าสารมัธยันต์ชนิดที่มี retention time 1.9 นาทีมีปริมาณสูงขึ้น และค่อนข้างคงที่จนถึงวันที่ 7 ของการเลี้ยงเชื้อ ส่วนสารมัธยันต์ชนิดที่มี retention time 2.9 นาที มีปริมาณลดลงในวันที่ 3 และไม่พบการสะสมของสารชนิดนี้ในวันที่ 5 ของการทดลอง ในขณะที่ไคเบนโซฟูแรนมีปริมาณลดลงอย่างมากในวันที่ 3 ของการเลี้ยงเชื้อ และยังคงพบสารดังกล่าวได้ในวันที่ 7 แต่มีปริมาณต่ำ จากผลการทดลองจะเห็นได้ว่า *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ ANT1 สามารถย่อยสลายไคเบนโซฟูแรนเข้มข้น 0.3 มก.ต่อมล. เกิดเป็นสารมัธยันต์ 2 ชนิด โดยสารหนึ่งถูกย่อยสลายไป ส่วนอีกสารหนึ่งยังคงพบสะสมอยู่ในอาหารเหลว แต่ไม่มีผลลดอัตราการเจริญของเชื้อ โดยที่ไคเบนโซฟูแรนไม่ถูกย่อยสลายจนหมดไปเนื่องจากมีปริมาณเริ่มต้นสูงถึง 0.3 มก.ต่อมล. และสารทดสอบปริมาณหนึ่งจะสูญเสียไปจากการระเหยของสารในระหว่างการทดลอง

4.9 ความสามารถของ *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ ANT1 ในการย่อยสลาย แนพทาซีน

จากการทดลองในเบื้องต้นพบว่าแนพทาซีนมีค่าความดันไอสูง จึงระเหยได้ง่ายมาก ดังนั้นในการศึกษาประสิทธิภาพของ *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ ANT1 ในการย่อยสลาย PAHs ชนิดดังกล่าว จึงเพิ่มความเข้มข้นของสารทดสอบเป็น 1,000 มก.ต่อลิตร และปิดผนึกจุก ล้างด้วยเทปกาวเพื่อป้องกันการระเหยของสาร วิเคราะห์ปริมาณที่เหลือของแนพทาซีนในวันที่ 0, 1, 3, 5 และ 7 ของการทดลอง เปรียบเทียบกับชุดควบคุม ได้ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 4.22, 4.23, 4.24 และ 4.25 ตามลำดับ

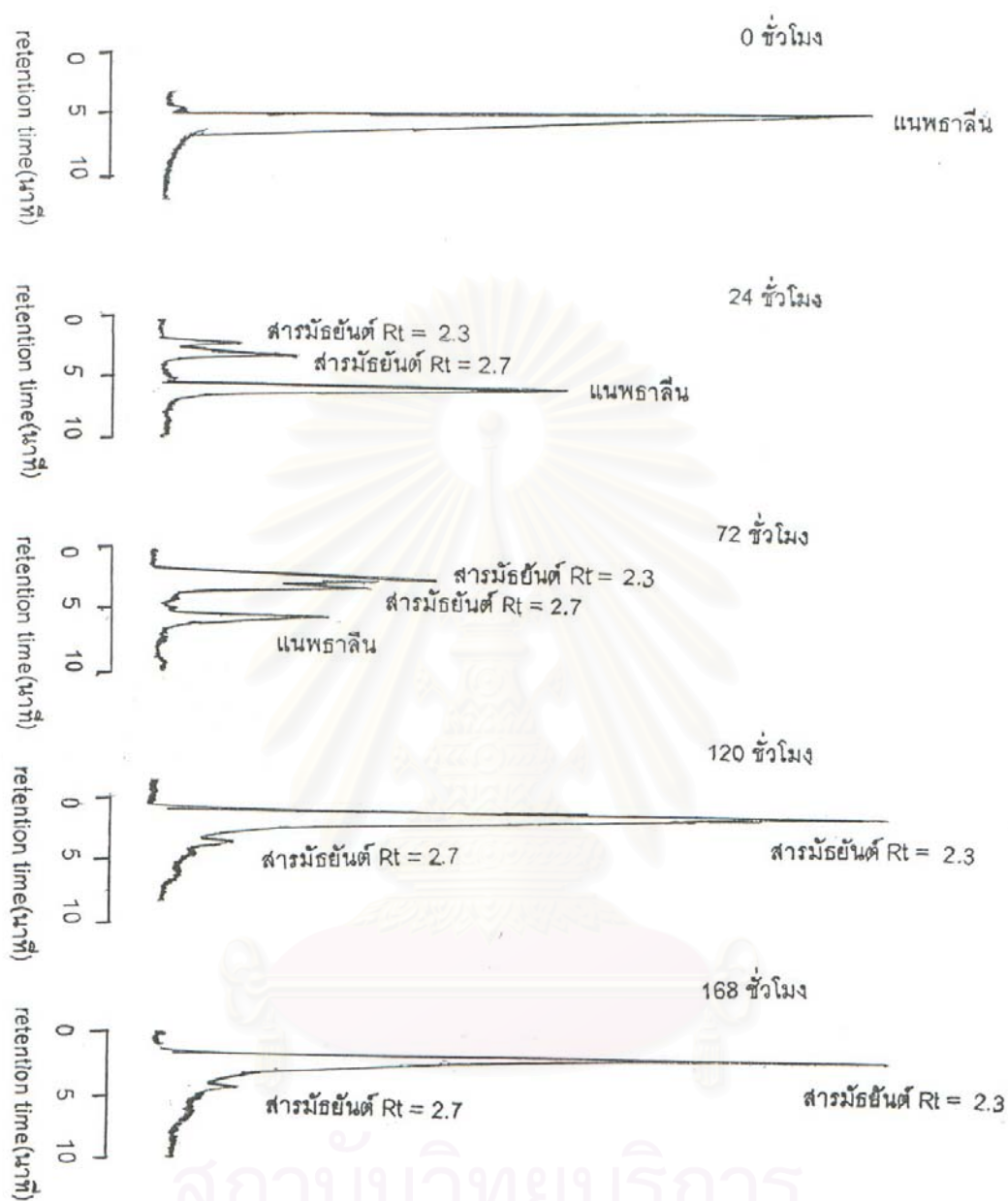


รูปที่ 4.22 ลักษณะของอาหารเหลว CFMM ที่เกิดจากการย่อยสลายแนพทาซีน โดย *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ ANT1 ในวันที่ 3 ของการเลี้ยงเชื้อ

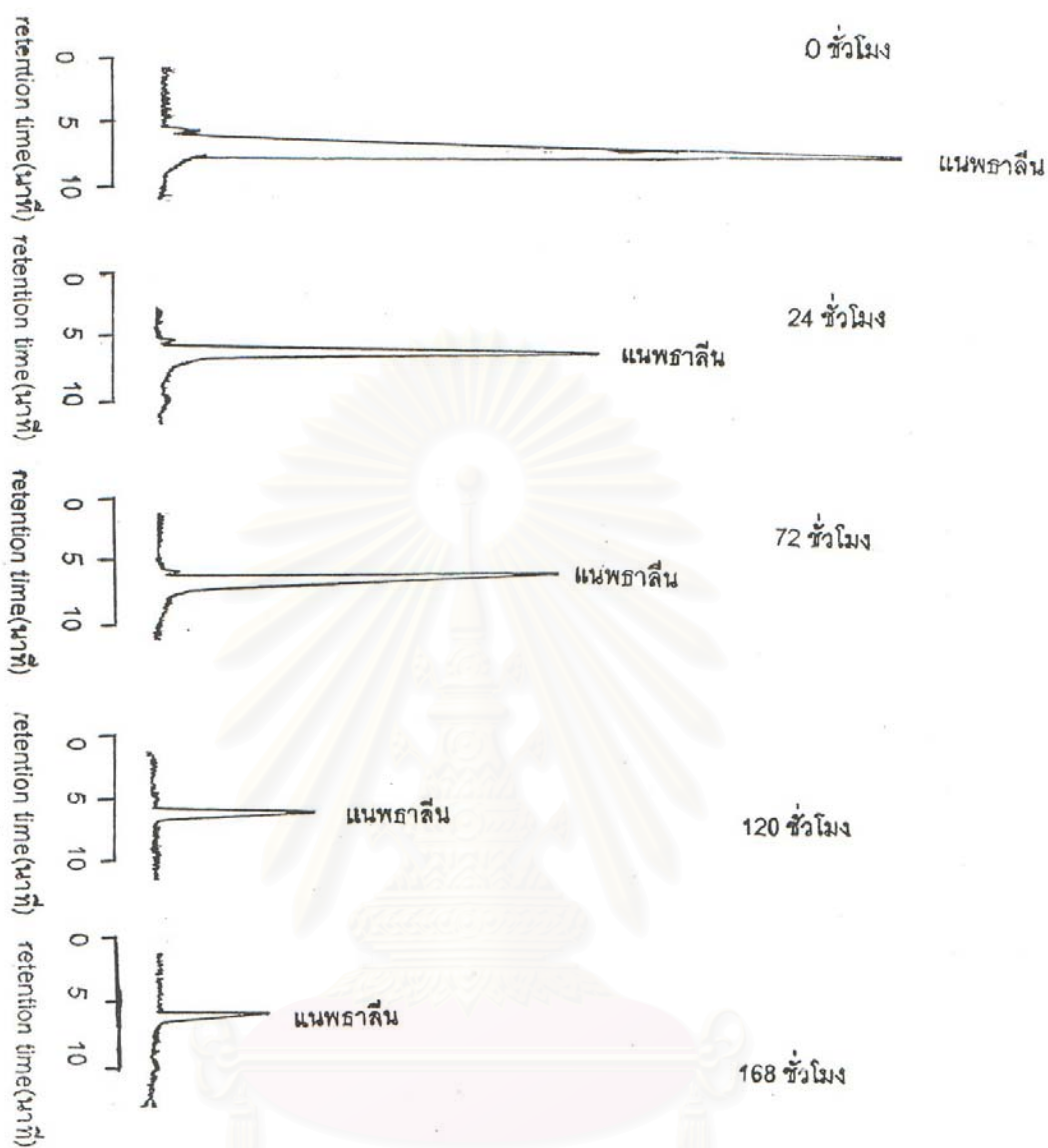


สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 4.23 ปริมาณแวนพิลาลินที่ถูกย่อยสลายโดย *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ ANT1
เปรียบเทียบกับชุดควบคุม



รูปที่ 4.24 โคโรมาโตแกรมจากการวิเคราะห์ HPLC เพื่อหาปริมาณแชนพธาลีนและสารมัธยันต์ที่เกิดจากการย่อยสลายแชนพธาลีนโดย *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ ANT1 หลังการเลี้ยงเชื้อที่เวลาต่าง ๆ



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 4.25 โคโรมาโตแกรมจากการวิเคราะห์ปริมาณแคโรทีนด้วย HPLC ในชุดควบคุมที่ระยะเวลาต่าง ๆ ของการทดลอง

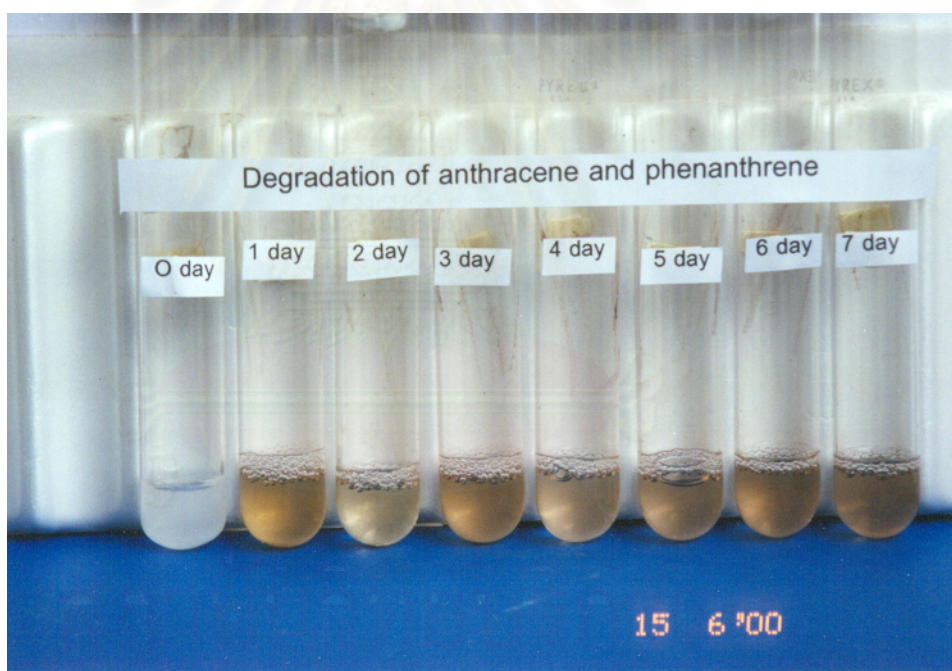
จากผลการทดลองพบว่า *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ ANT1 สามารถย่อยสลาย แนนพธาลีนปริมาณ 1,000 มก.ต่อลิตร เหลือเพียง 149.92 มก.ต่อลิตร ในวันที่ 3 ของการเลี้ยง เชื้อ ในขณะที่มีปริมาณแนนพธาลีนในชุดควบคุมเหลือเท่ากับ 462 มก.ต่อลิตร แสดงว่าแนนพธาลีนที่สูญหายไปเนื่องจากการย่อยสลายของเชื้อที่มีปริมาณเท่ากับ 312 มก.ต่อลิตร โดยสาร ทดสอบที่ระเหยไปมีปริมาณสูงถึง 537 มก.ต่อลิตร ในวันที่ 5 และ 7 ไม่มีแนนพธาลีนเหลืออยู่ใน ชุดทดลอง ส่วนในชุดควบคุมที่ไม่เติมเชื้อมีปริมาณสารดังกล่าวเหลืออยู่ 139 และ 80 มก.ต่อ ลิตร ตามลำดับ

แต่อย่างไรก็ตามสามารถยืนยันได้อย่างชัดเจนว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ ANT1 ทำให้เกิดการ ย่อยสลายของแนนพธาลีนไปเป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงานได้ โดยดูจากการเปลี่ยนสีของ อาหารเหลว CFMM ไปเป็นสีน้ำตาลเข้ม ในวันที่ 3 ของการเลี้ยงเชื้อ ดังแสดงในรูปที่ 4.22 ร่วมกับผลการติดตามโครมาโตแกรมจากการวิเคราะห์ปริมาณแนนพธาลีนที่เหลือในอาหารเลี้ยงเชื้อ ด้วย HPLC ดังแสดงในรูปที่ 4.24 เทียบกับชุดควบคุมในรูปที่ 4.25 พบว่า *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ ANT1 ทำให้เกิดการเปลี่ยนโครงสร้างของแนนพธาลีนไปเป็นสารมัธยันต์ 2 ชนิดที่มี retention time เท่ากับ 2.3 และ 2.7 นาที โดยเริ่มมีการสะสมของสารทั้งสองชนิดภายใน 24 ชั่วโมงของการเลี้ยงเชื้อ และมีปริมาณเพิ่มสูงขึ้นในวันที่ 3 สารมัธยันต์ชนิดที่มี retention time 2.3 นาทียังคงมีปริมาณเพิ่มขึ้นตลอดระยะเวลาการทดลอง ในขณะที่สารมัธยันต์ชนิดที่มี retention time 2.7 นาทีเริ่มมีปริมาณลดลงหลังวันที่ 3 ของการเลี้ยงเชื้อ ส่วนการตรวจวัด ปริมาณแนนพธาลีนในชุดควบคุมยังสามารถพบได้ในวันที่ 5 และ 7 ของการทดลอง แต่ไม่พบ สารดังกล่าวในชุดทดลองที่เติมเชื้อ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

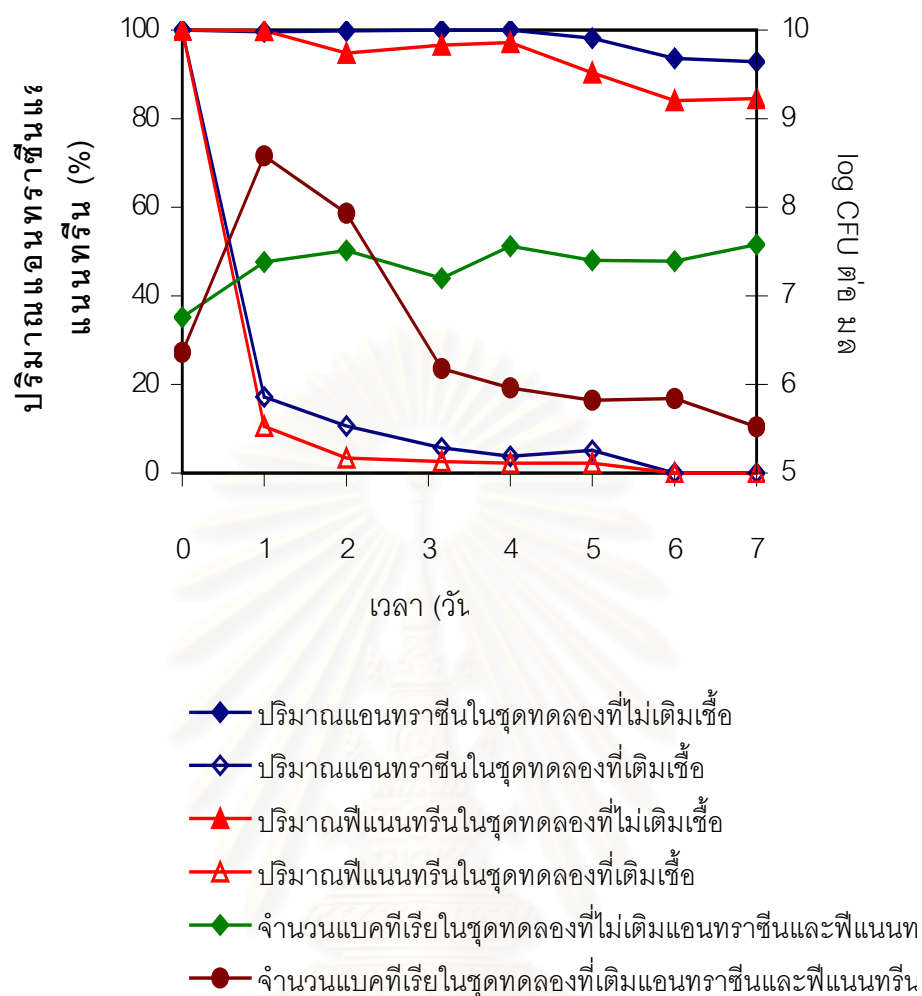
4.10 รูปแบบการเจริญของ *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ ANT1 และความสามารถในการย่อยสลายแอนทราซีนร่วมกับฟีนแอนทรีน

จากการทดลองในข้อ 4.7 พบว่าฟีนแอนทรีนเป็นแหล่งคาร์บอนที่ดีที่สุดในการเจริญของ *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ ANT1 โดยทำให้เกิดการเพิ่มจำนวนของเชื้อถึง 7.2×10^3 CFU ต่อมล. ในวันที่ 2 ของการเลี้ยงเชื้อ ในขณะที่การทดลองในข้อ 4.5 ทำให้ทราบว่าสารมัธยันต์ที่เกิดจากการเปลี่ยนโครงสร้างของแอนทราซีนมีผลลดจำนวนแบคทีเรียสายพันธุ์ ANT1 ถึง 3.1×10^3 CFU ต่อมล. ดังนั้นจึงทำการทดสอบเพื่อหารูปแบบการเพิ่มจำนวนของเชื้อในภาวะที่มีทั้งแอนทราซีนและฟีนแอนทรีนอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ ได้ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 4.26, 4.27 และ 4.28 ตามลำดับ



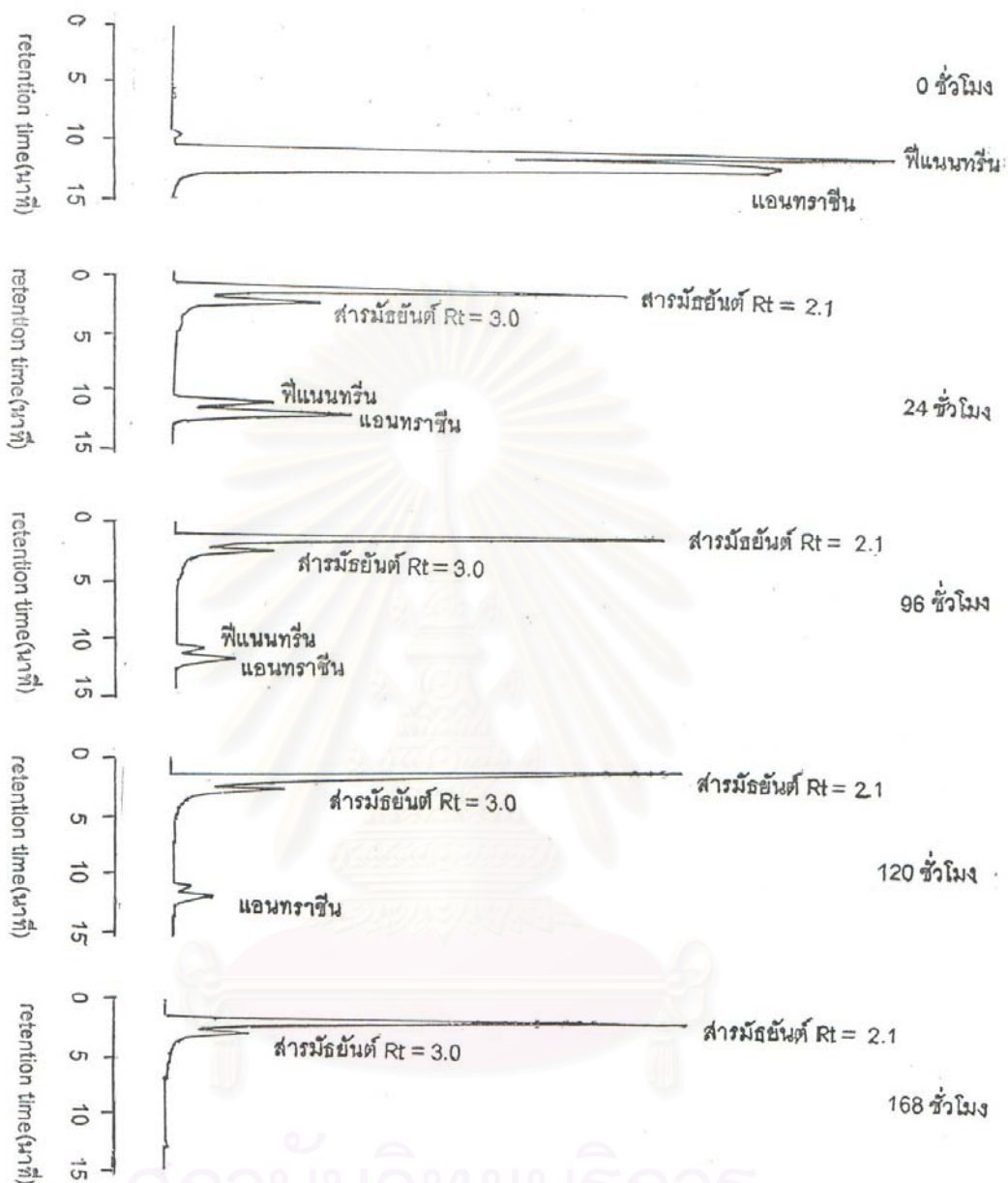
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 4.26 ลักษณะของอาหารเหลว CFMM ที่เกิดจากการย่อยสลายแอนทราซีนและฟีนแอนทรีน เข้มข้นชนิดละ 0.1 มก.ต่อมล. โดย *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ ANT1 ในการเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 7 วัน



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 4.27 รูปแบบการเพิ่มจำนวน รวมทั้งปริมาณแอนโทราซีนและพีแวนทรินที่เหลือจากการย่อยสลายของ *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ ANT1 ในการเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 7 วัน



รูปที่ 4.28 โครมาโตแกรมจากการวิเคราะห์ HPLC เพื่อหาปริมาณแอนทราซีนและฟีนเนทรีน รวมทั้งสารมัยซินที่เกิดจากการย่อยสลายสารทดสอบทั้งสองชนิดดังกล่าวโดย *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ ANT1 หลังการเลี้ยงเชื้อเวลาต่าง ๆ

จากการทดลองพบว่า *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ ANT1 เพิ่มจำนวนขึ้นอย่างรวดเร็ว จาก 2.79×10^6 CFU ต่อมล. ไปเป็น 3.8×10^8 CFU ต่อมล. ภายในเวลา 24 ชม. โดยที่ ปริมาณของแอนทราซีนเหลือเพียง 17.2 % ในขณะที่มีปริมาณพีแนนทรีนเหลืออยู่ในอาหารเลี้ยง เชื้อเหลว CFMM 10.54 % และไม่พบสารทดสอบทั้งสองชนิดดังกล่าวเหลืออยู่ในอาหารเหลว ในวันที่ 6 ของการเลี้ยงเชื้อ เมื่อเปรียบเทียบรูปแบบการเพิ่มจำนวนของแบคทีเรียในชุดทดลองที่มี สารทดสอบแต่ละชนิดเพียงสารเดียวเป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงาน เทียบกับสถานะที่ใช้ PAHs ทั้งสองชนิดร่วมกัน พบว่ารูปแบบการเพิ่มจำนวนของเชื้อในอาหารเหลวที่มีทั้งแอนทราซีนและพีแนนทรีน จะมีลักษณะคล้ายกับชุดทดลองที่เติมแอนทราซีนเพียงสารเดียว แต่ระยะเวลาที่ใช้ในการเพิ่มจำนวนได้สูงสุดของเชื้อลดลงจาก 48 ชั่วโมง มาเป็น 24 ชั่วโมง หลังจากนั้น แบคทีเรียจะมีจำนวนลดลง จนถึงวันที่ 7 ของการเลี้ยงเชื้อเหลือเพียง 3.3×10^5 CFU ต่อมล. หรือมีจำนวนแบคทีเรียลดลง 1.14×10^3 CFU ต่อมล. ในขณะที่เมื่อใช้แอนทราซีนเป็นแหล่ง คาร์บอนเพียงชนิดเดียวจะมีผลลดจำนวนแบคทีเรีย 3.1×10^3 CFU ต่อมล. โดยที่การลดลงของ แอนทราซีนในชุดทดลองก็เกิดได้เร็วขึ้น สอดคล้องกับอัตราการเพิ่มจำนวนของแบคทีเรียสายพันธุ์ ANT1 ส่วนการถูกย่อยสลายของพีแนนทรีนเกิดได้ช้าลงเมื่อเทียบกับการเติมพีแนนทรีน เพียงชนิดเดียวในชุดทดลอง ซึ่งพีแนนทรีนจะถูกย่อยสลายหมดไปภายใน 24 ชั่วโมง

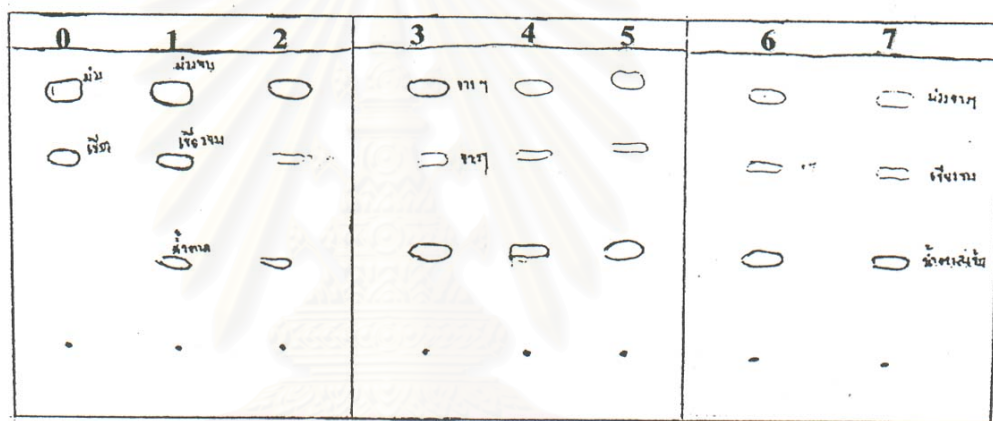
ผลการติดตามโครมาโตแกรมจากการวิเคราะห์ปริมาณแอนทราซีนและพีแนนทรีนที่เหลือ ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวด้วย HPLC ดังแสดงในรูปที่ 4.28 พบว่าระหว่างการย่อยสลาย PAHs ทั้ง สองชนิดของ *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ ANT1 จะเกิดสารมัธยันต์ที่มี retention time 2.1 และ 3.0 นาที ซึ่งมีค่า retention time เท่ากับสารที่พบจากการย่อยสลายแอนทราซีนเพียงชนิด เดียว และมีรูปแบบการสะสมของสารในลักษณะเดียวกันอีกด้วย ดังนั้นจึงอาจเป็นไปได้ว่าสาร มัธยันต์ดังกล่าวมีผลในการลดจำนวนของแบคทีเรียสายพันธุ์ ANT1 ถึงแม้ว่าจะทำการทดสอบ ในสถานะที่เติมพีแนนทรีนร่วมกับแอนทราซีนก็ตาม

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.11 การพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารมัธยันต์ที่เกิดจากการย่อยสลาย แอนทราซีนโดย *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ ANT1

4.11.1 การคัดเลือกระยะเวลาที่เหมาะสมสำหรับการสกัดสารมัธยันต์

ในการคัดเลือกระยะเวลาที่เหมาะสมสำหรับการสกัดสารมัธยันต์ ทำโดยนำสารละลายของแอนทราซีนในเมทานอล ซึ่งได้จากการสกัดแอนทราซีนที่เหลือจากการย่อยสลายของเชื้อในการเก็บตัวอย่างทุก 24 ชั่วโมง มาทดสอบหาระยะเวลาที่มีการสะสมของสารตัวกลางปริมาณมากที่สุด ได้ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 4.29



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

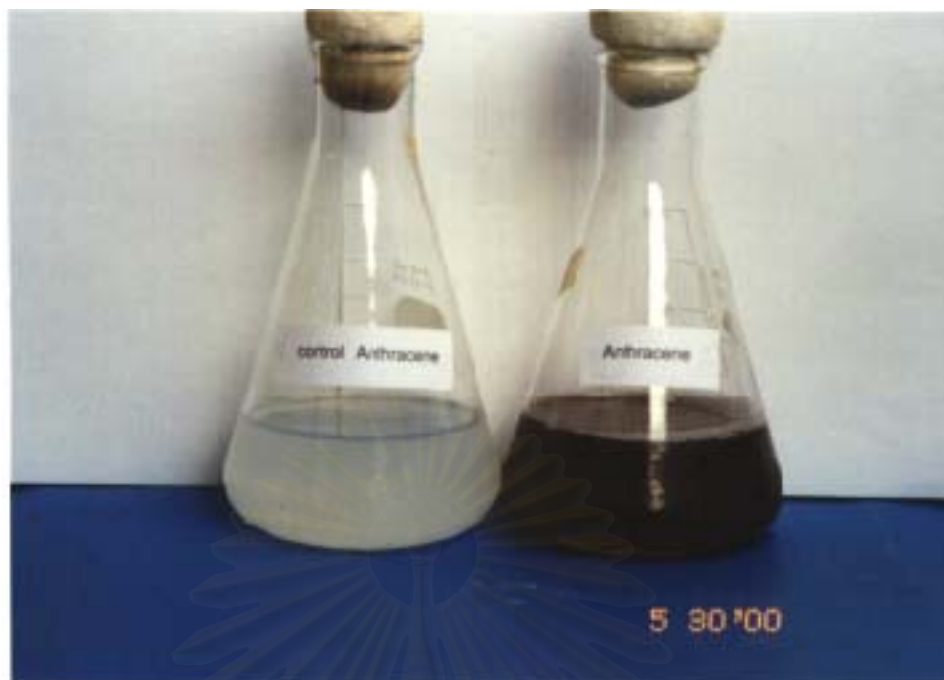
รูปที่ 4.29 โคโรมาโตแกรม TLC ของการวิเคราะห์สารมัธยันต์ที่เกิดจากการย่อยสลายแอนทราซีนโดย *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ ANT1

0 = สารมาตรฐานแอนทราซีน
1-7 = สารสกัดแอนทราซีนจากน้ำเลี้ยงเชื้อที่เวลา 1 – 7 วันตามลำดับ

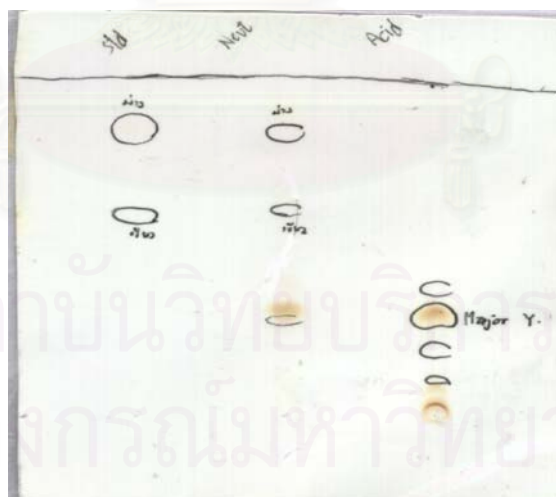
ผลการทดลองพบว่าระยะเวลาที่เหมาะสมสำหรับการเลี้ยงเชื้อในระดับขยายส่วน เพื่อนำมาสกัดสารตัวกลางที่เกิดขึ้นจากการย่อยสลายแอนทราซินโดย *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ ANT1 คือในวันที่ 3 ของการเลี้ยงเชื้อ ซึ่งมีความกว้างของแถบ (band) สารมัธยันต์บนโครมาโตแกรมจากการวิเคราะห์ด้วย TLC มากที่สุด และให้ผลสอดคล้องกับผลการทดลองในรูปที่ 4.11 ซึ่งตรวจพบการสะสมของสารมัธยันต์ชนิดที่มี retention time 2.1 นาที มีปริมาณมากที่สุดในวันที่ 3 ของการเลี้ยงเชื้อ โดยมีพื้นที่ใต้กราฟจากการวิเคราะห์ HPLC เท่ากับ 48456

4.11.2 การสกัดสารมัธยันต์และความบริสุทธิ์ของสารที่ได้จากการสกัด

ในการเตรียมสารมัธยันต์ให้บริสุทธิ์เพื่อพิสูจน์เอกลักษณ์ โดยเลี้ยง *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ ANT1 ในอาหารเหลว CFMM ปริมาตร 1,000 มล. ที่เติมแอนทราซินเข้มข้น 0.1 มก.ต่อ มล. เป็นเวลา 3 วัน (รูปที่ 4.30) จากนั้นนำอาหารเหลวที่ปั่นแยกเซลล์ที่เรียบร้อยแล้วมาสกัดสารมัธยันต์ตามวิธีการสกัดที่แสดงไว้ในภาคผนวก ค หมายเลข 7 จะได้สารสกัด 2 ส่วน คือ ส่วนที่มีสมบัติเป็นกลางและส่วนที่มีสมบัติเป็นกรด จากการวิเคราะห์เบื้องต้นเพื่อตรวจสอบการสะสมของสารมัธยันต์ในส่วนสกัดทั้งสองส่วนโดยวิธี TLC ดังแสดงในรูปที่ 4.31 โดยใช้ระบบตัวทำละลายที่ประกอบด้วย โทลูอิน : 1,4-ไดออกเซน : กรดอะซิติกเข้มข้น อัตราส่วน 90 : 25 : 4 (ปริมาตรต่อปริมาตร) จะพบว่าสารมัธยันต์ส่วนมากสะสมอยู่ในส่วนสกัดที่เป็นกรดมากกว่าในส่วนสกัดที่เป็นกลาง โดยยังมีแอนทราซินเหลืออยู่ปริมาณมากในส่วนสกัดที่เป็นกลาง ดังนั้นจึงนำแต่ส่วนสกัดที่เป็นกรดมาทำการแยกสารมัธยันต์เพื่อพิสูจน์เอกลักษณ์ในขั้นตอนต่อไป

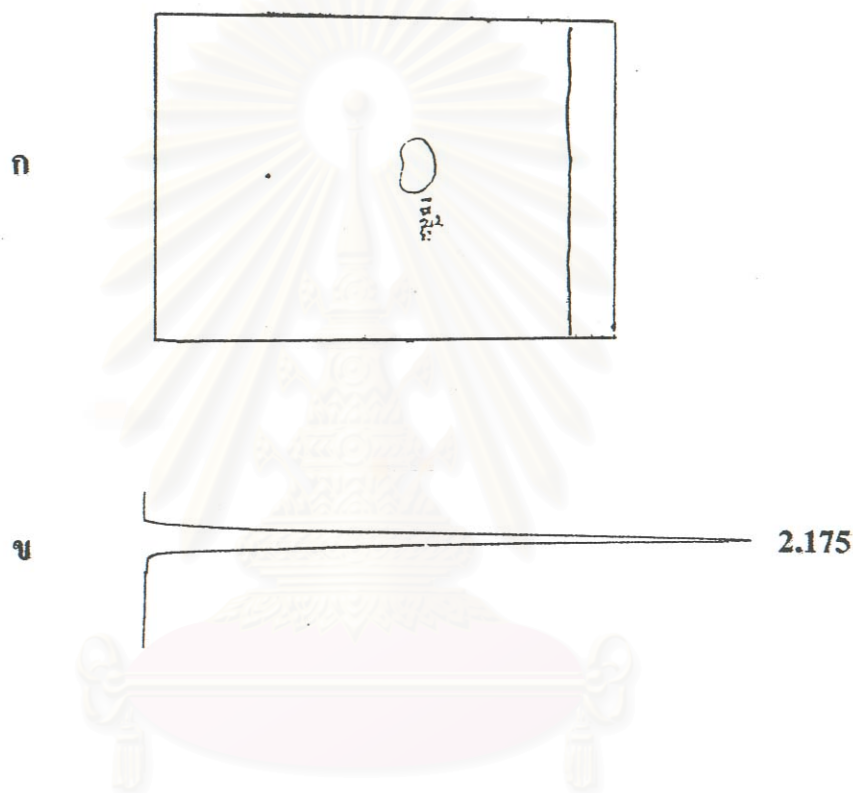


รูปที่ 4.30 ลักษณะของอาหารเหลว CFMM ที่เติมแอนทราซีน 0.1 มก.ต่อมล. หลังการเลี้ยงเชื้อ *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ ANT1 เป็นเวลา 3 วัน ก่อนที่จะนำมาสกัดสารมัธยันต์



รูปที่ 4.31 โคโรมาโตแกรมจากการวิเคราะห์ TLC แสดงการเปรียบเทียบปริมาณของสารมัธยันต์ที่เกิดขึ้นจากการย่อยสลายแอนทราซีนซึ่งสะสมอยู่ใน (2) ส่วนสกัดที่เป็นกลาง และ (3) ส่วนสกัดที่เป็นกรด เทียบกับ (1) สารมาตรฐานแอนทราซีน

จากการนำสารมัธยันต์ในส่วนสกัดที่เป็นกรดมาทำให้บริสุทธิ์โดยวิธี preparative TLC ซึ่งใช้ระบบตัวทำละลายที่ประกอบด้วย เฮกเซน : เอทิลอะซิเตต : กรดอะซิติกเข้มข้น ในอัตราส่วน 10 : 10 : 1 (ปริมาตรต่อปริมาตร) พบว่าได้สารซึ่งมีคุณสมบัติที่บริสุทธิ์ จากการตรวจสอบโครมาโตแกรม TLC และ โครมาโตแกรมจากการวิเคราะห์ HPLC ดังแสดงในรูปที่ 4.32 และ สารมัธยันต์ชนิดนี้มาพิสูจน์เอกลักษณ์โดย $^1\text{H NMR}$ และ GC-MS ในขั้นต่อไป



ระบบตัวทำละลายสำหรับ analytical TLC : โทลูอีน : 1,4-ไดออกเซน : กรดอะซิติกเข้มข้น
90 : 25 : 4 (ปริมาตรต่อปริมาตร)

รูปที่ 4.32 (ก) โครมาโตแกรม TLC และ (ข) โครมาโตแกรม HPLC ของสารมัธยันต์ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์โดยวิธี preparative TLC

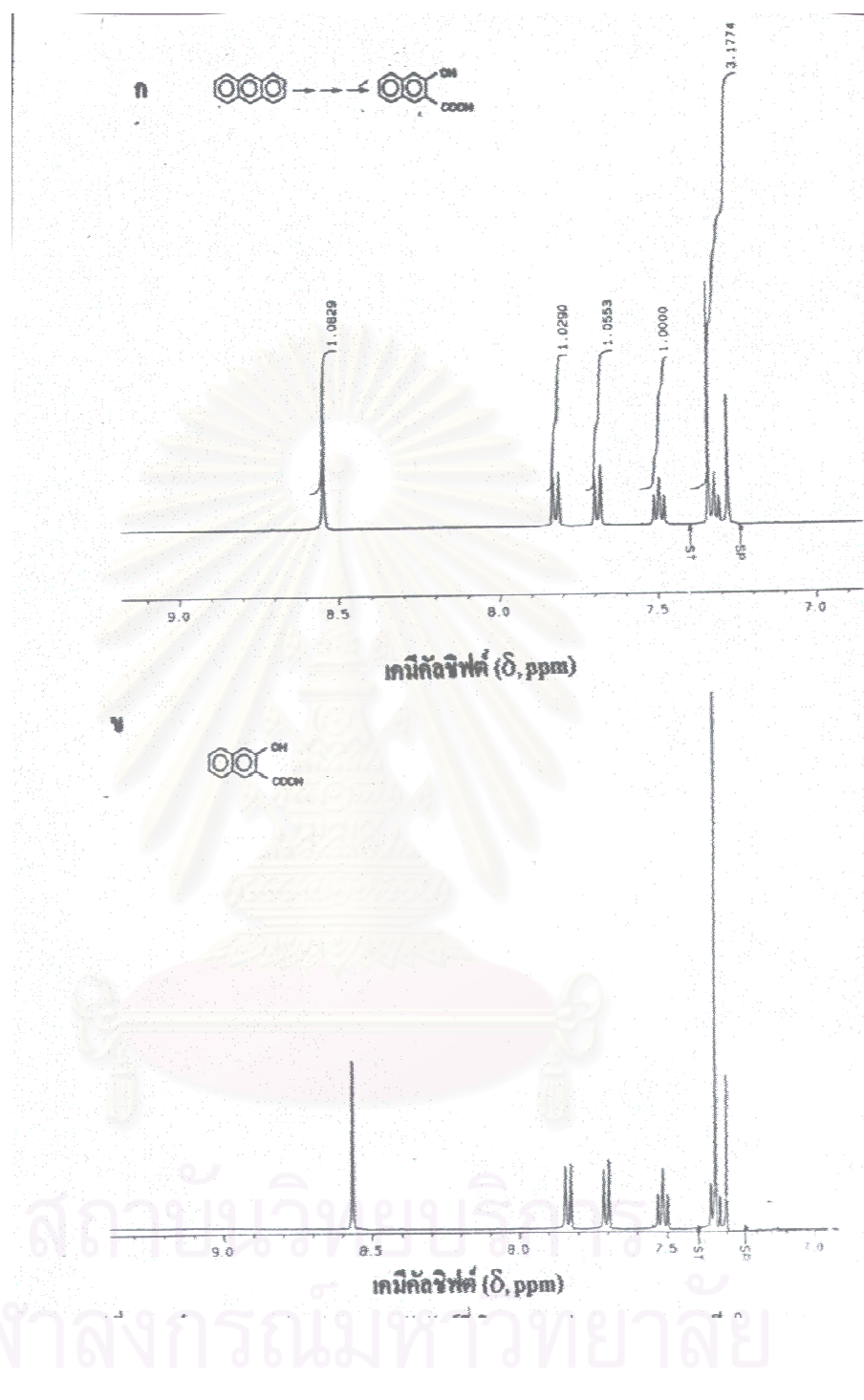
4.11.3 การพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารมัธยันต์ด้วยวิธี ^1H NMR

จากการวิเคราะห์สเปกตรัม ^1H NMR ของสารมัธยันต์พบว่ามีคล้ายคลึงกับสเปกตรัม ^1H NMR ของสารมาตรฐานกรด 2-ไฮดรอกซี-3-แนฟโธอิก (2-hydroxy-3-naphthoic acid) ดังแสดงในรูปที่ 4.33 ก. และ 4.33 ข. ตามลำดับ

และจากการตรวจสอบค่าเคมีคัลชิฟต์ (chemical shift) โดยใช้เตตระเมทิลซิลิโคนซึ่งมีค่าเคมีคัลชิฟต์เท่ากับ 0 เป็นสารมาตรฐาน พบว่าสารมัธยันต์ที่เกิดจากการย่อยสลายแอนทราซีนมีค่าเคมีคัลชิฟต์ใกล้เคียงกับสารมาตรฐานกรด 2-ไฮดรอกซี-3-แนฟโธอิก ดังนั้นจึงอาจเป็นไปได้ว่า สารมัธยันต์ดังกล่าวคือ กรด 2-ไฮดรอกซี-3-แนฟโธอิก ซึ่งเป็นสารมัธยันต์ที่เกิดจากการย่อยสลายแอนทราซีนของแบคทีเรียหลายชนิด (Evans *et al.*, 1965 ; Rogoff and Wender, 1957; Menn *et al.*, 1993; Weissenfels *et al.*, 1991; Grifoll *et al.*, 1995)



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



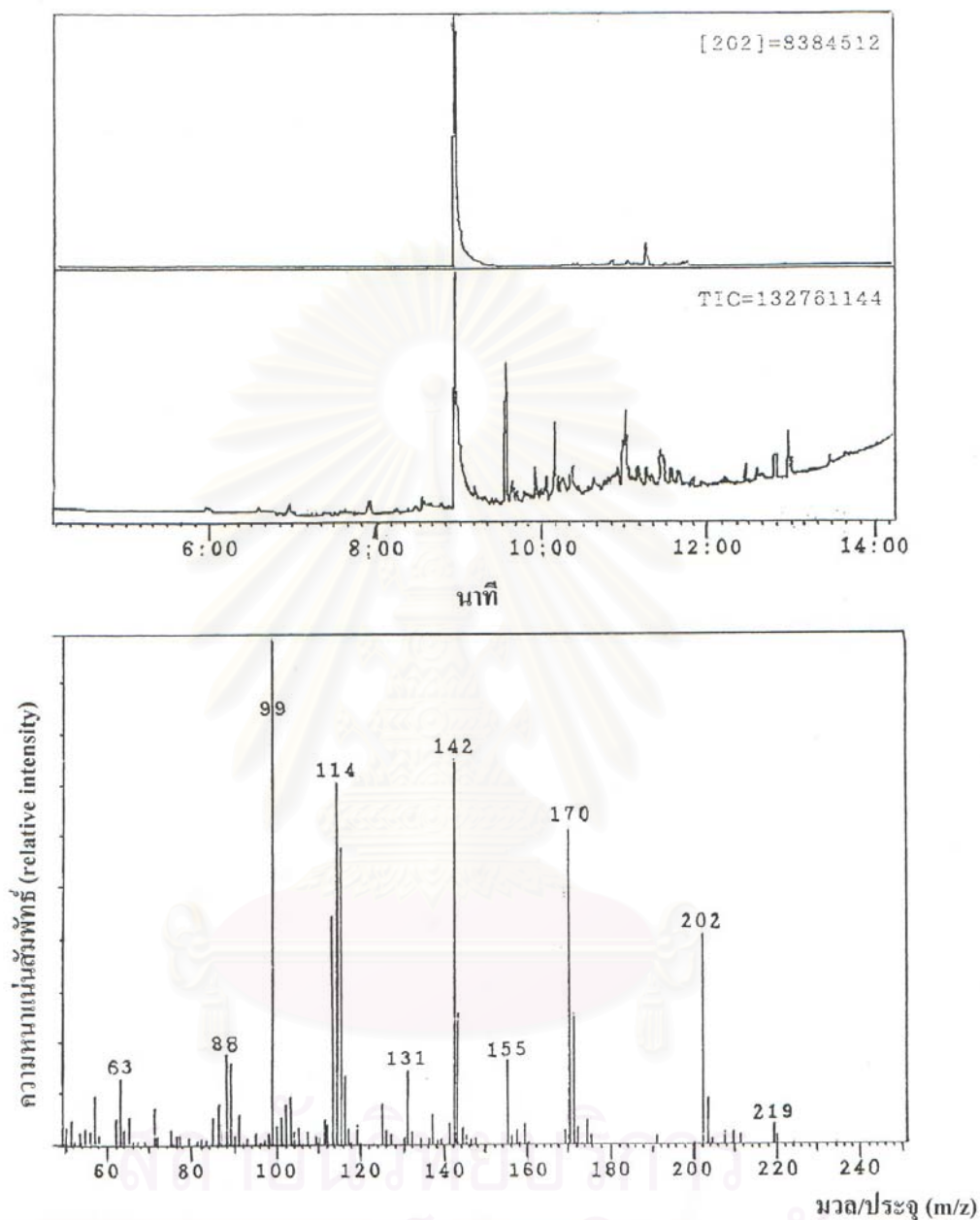
รูปที่ 4.33 ^1H NMR สเปกตรัมของสารมัธยันต์ที่เกิดจากการย่อยสลายแอนทราซีนโดย (ก) *Spingomonas* sp. สายพันธุ์ ANT1 เปรียบเทียบกับ (ข) สารมาตรฐานกรด-2-ไฮดรอกซี-3-แนฟโธอิก

4.11.4 ผลการพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารมัธยันต์ด้วยวิธี GC-MS

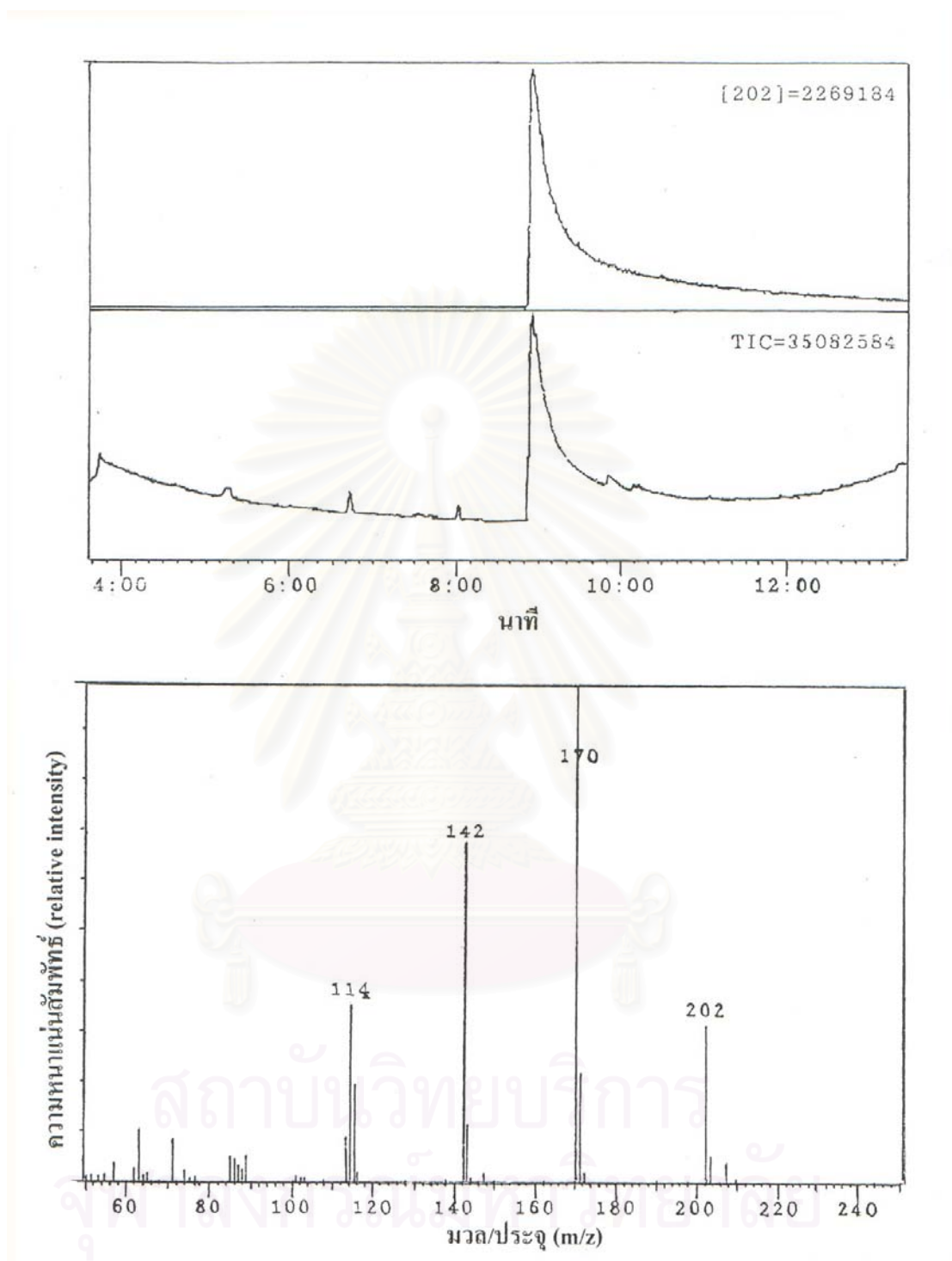
จากการพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารมัธยันต์ที่เกิดจากการย่อยสลายของแอนทราซีนโดย *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ ANT1 ด้วยวิธี GC-MS พบว่าแมสสเปกตรัมของสารมัธยันต์ดังกล่าวมีรูปแบบในการแตกตัว (fragmentation patterns) ของ fragments ที่มีค่า m/z ดังแสดงไว้ในรูปที่ 4.34 ดังนี้

parent อีออน	=	202 (M^+)
fragment อีออน	=	170 ($M^+ - CH_3OH$)
	=	142 ($M^+ - CH_3COOH$)
	=	114 ($M^+ - CH_3COCOOH$)

ซึ่งจากการพิสูจน์เอกลักษณ์ที่ได้พบว่าค่า m/z (M^+) และรูปแบบในการแตกตัวของสารมัธยันต์เป็นลักษณะเฉพาะตัวของสารมาตรฐานกรด 2-ไฮดรอกซี-3-แนฟโธอิก ดังแสดงในรูปที่ 4.35 ดังนั้นจึงสามารถยืนยันได้ว่าสารมัธยันต์ที่เกิดจากการย่อยสลายแอนทราซีนของ *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ ANT1 คือ กรด 2-ไฮดรอกซี-3-แนฟโธอิก



รูปที่ 4.34 (ก) โครมาโตแกรมของไอออนทั้งหมดที่เกิดการแตกตัว (Total Ion Chromatogram, TIC) และ (ข) แมสสเปกตรัมของสารมัธยันต์ที่เกิดจากการย่อยสลายแอนทราซีนโดย *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ ANT1



รูปที่ 4.35 (ก) โครมาโตแกรมของไอออนทั้งหมดที่เกิดการแตกตัว (TIC) และ (ข) แมสสเปกตรัมของสารมาตรฐานกรด 2-ไฮดรอกซี-3-แนฟโธลิก

นอกจากนี้จากการตรวจสอบค่า retention time ของสารมัธยันต์และสารมาตรฐานกรด 2-ไฮดรอกซี-3-แนฟโธอิกด้วยวิธีต่าง ๆ ได้ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 4.6

ตารางที่ 4.6 ค่า retention time ของสารมัธยันต์ที่เกิดจากการย่อยสลายแอนทราซีนเทียบกับสารมาตรฐานกรด 2-ไฮดรอกซี-3-แนฟโธอิก

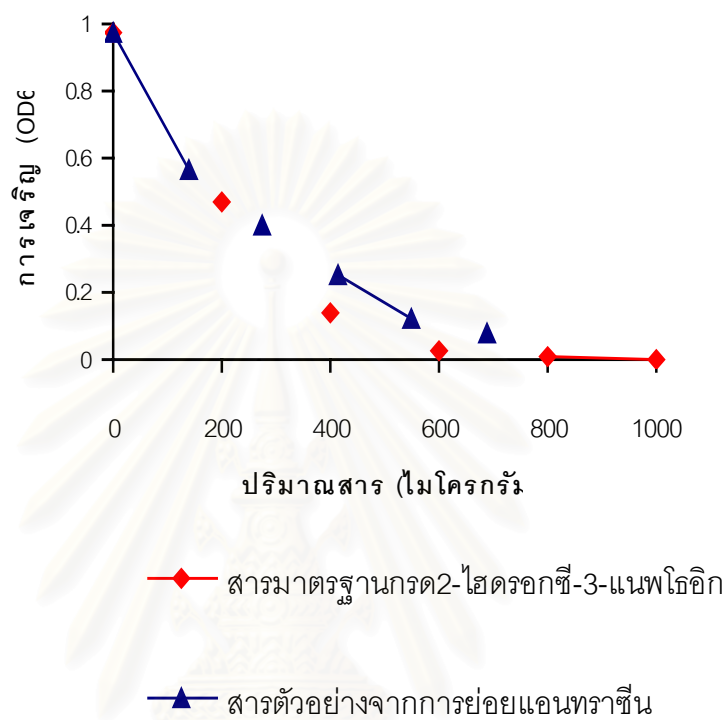
วิธีทดลอง	Retention time (Rt) (นาที)	
	สารมัธยันต์	สารมาตรฐานกรด 2-ไฮดรอกซี-3-แนฟโธอิก
Reversed phase HPLC	2.137	2.175
Reversed phase HPLC	16.78	17.08
GC-MS	9.0	8.59

จากการทดสอบพบว่าค่า retention time ของสารมัธยันต์มีค่าใกล้เคียงกับสารมาตรฐานกรด 2-ไฮดรอกซี-3-แนฟโธอิก สำหรับทุกวิธีที่ทำการทดลอง จึงเป็นข้อสนับสนุนผลการพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารมัธยันต์ด้วยวิธี $^1\text{H NMR}$ และ GC-MS ที่ว่าสารมัธยันต์ที่เกิดจากการย่อยสลายแอนทราซีนโดย *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ ANT1 คือ กรด 2-ไฮดรอกซี-3-แนฟโธอิก

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

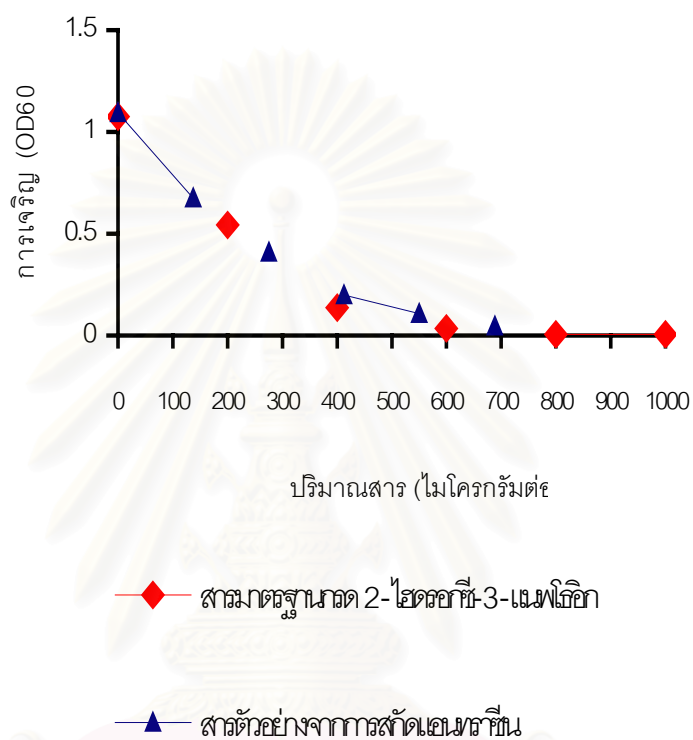
4.11.5 ความเป็นพิษ (toxicity) ของกรด 2-ไฮดรอกซี-3-แนฟโธอิกที่เกิดจากการย่อยสลาย แอนทราซีนของ *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ ANT1 เทียบกับสารมาตรฐานกรด 2-ไฮดรอกซี-3-แนฟโธอิก ต่อการเจริญของตัวเชื้อเอง, *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ P2 และ *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1

จากการสกัดกรด 2-ไฮดรอกซี-3-แนฟโธอิก ที่เกิดจากการย่อยสลายแอนทราซีนโดยแบคทีเรียสายพันธุ์ ANT1 ด้วยวิธี preparative TLC ได้ปริมาณสารเท่ากับ 53.2 มก.ต่อน้ำเลี้ยงเชื้อ (culture broth) 1,000 มล. นำมาทดสอบความเป็นพิษต่อการเจริญของตัวเชื้อเอง *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ P2 และ *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 โดยแปรความเข้มข้นของสารเป็น 0, 200, 400, 600, 800 และ 1,000 ไมโครกรัมต่อมล. แต่เนื่องจากไม่สามารถกำจัดน้ำได้หมดในสารมัธยันต์ที่สกัดได้ เมื่อเทียบปริมาณจากกราฟมาตรฐานของกรด 2-ไฮดรอกซี-3-แนฟโธอิก ปริมาณสารมัธยันต์ดังกล่าวจะมีเนื้อสารจริง 68.83 % (ภาคผนวก ค หมายเลข 6) ดังนั้นการรายงานความเป็นพิษของกรด 2-ไฮดรอกซี-3-แนฟโธอิกที่ได้จากการสกัด จึงเป็นค่าที่คิดเทียบจากกราฟมาตรฐานแล้ว โดยมีปริมาณเป็น 0, 137.66, 275.32, 412.98, 550.64 และ 688.3 ไมโครกรัมต่อมล. ตามลำดับ เปรียบเทียบความเป็นพิษของสารสกัดกับกรด 2-ไฮดรอกซี-3-แนฟโธอิก มาตรฐาน โดยแปรปริมาณของสารมาตรฐานเป็น 0, 200, 400, 600, 800 และ 1,000 ไมโครกรัมต่อมล. ได้ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 4.36, 4.37 และ 4.38 ตามลำดับ



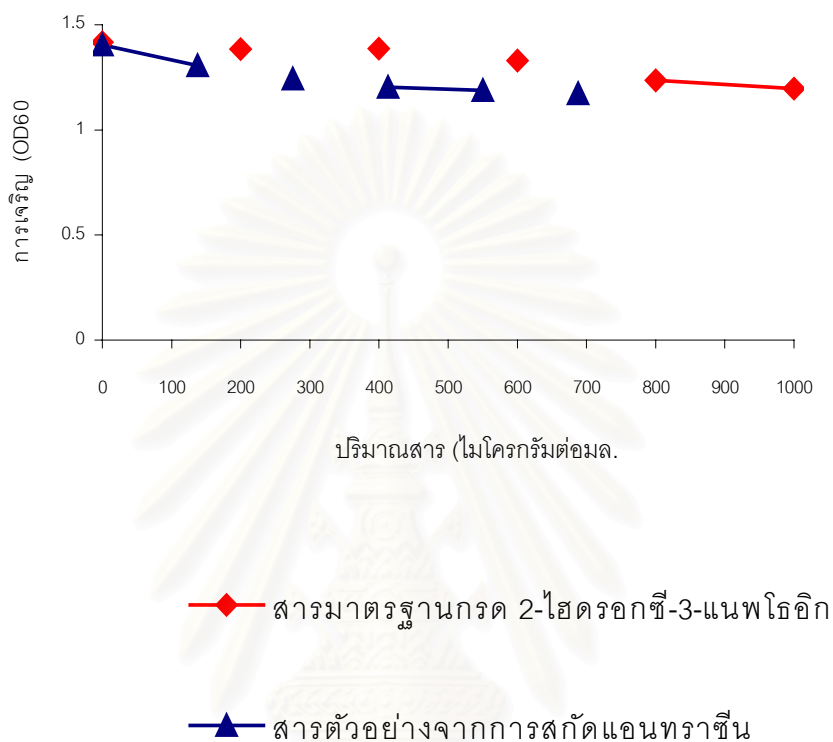
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 4.36 ผลของกรด 2-ไฮดรอกซี-3-แนฟโธอิก ที่สกัดได้จากการย่อยสลายแอนทราซีนโดย *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ ANT1 เทียบกับสารมาตรฐานของกรด 2-ไฮดรอกซี-3-แนฟโธอิก ต่อการเจริญของแบคทีเรียสายพันธุ์ ANT1 ที่เลี้ยงในอาหารเหลว LB



สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 4.37 ผลของกรด 2-ไฮดรอกซี-3-แนฟโธอิก ที่สกัดได้จากการย่อยสลายแอนทราซีนโดย *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ ANT1 เทียบกับสารมาตรฐานของกรด 2-ไฮดรอกซี-3-แนฟโธอิก ต่อการเจริญของ *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 ที่เลี้ยงในอาหารเหลว LB



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 4.38 ผลของกรด 2-ไฮดรอกซี-3-แนพโทอิก ที่สกัดได้จากการย่อยสลายแอนทราซีนโดย *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ ANT1 เทียบกับสารมาตรฐานของกรด 2-ไฮดรอกซี-3-แนพโทอิก ต่อการเจริญของ *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ P2 ที่เลี้ยงในอาหารเหลว LB

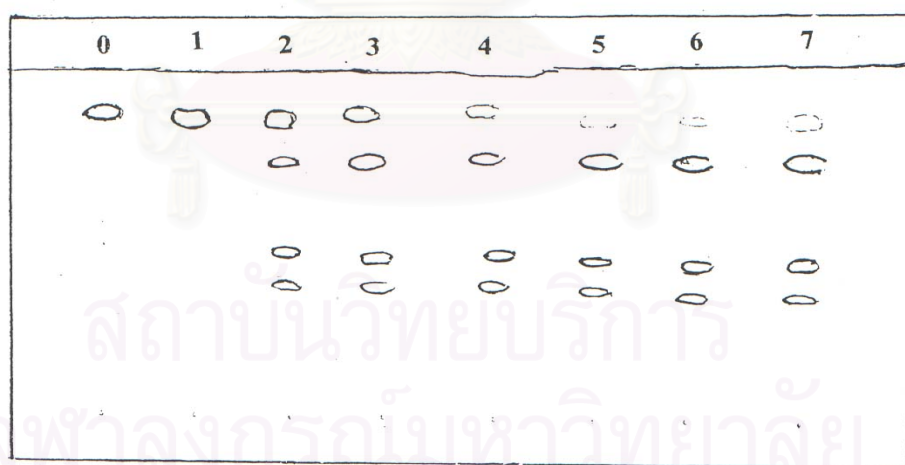
จากผลการทดลองจะเห็นได้ว่า กรด 2-ไฮดรอกซี-3-แนฟโธอิก ที่สกัดได้จากการย่อยสลายแอนทราซีนโดย *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ ANT1 มีผลยับยั้งการเจริญของตัวเชื้อเองและต่อ *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB ซึ่งสารมาตรฐานกรด 2-ไฮดรอกซี-3-แนฟโธอิกก็ให้ผลในลักษณะเดียวกัน โดยสารทดสอบที่มีผลยับยั้งการเจริญของ *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ ANT1 และ *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 มีปริมาณเท่ากับ 1,000 และ 800 ไมโครกรัมต่อมล.ตามลำดับ โดยวัดความขุ่นของเชื้อในรูปของค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ซึ่งมีค่า OD₆₀₀ เท่ากับ 0

จากผลการทดลองในรูปที่ 4.38 พบว่าสารมาตรฐานกรด 2-ไฮดรอกซี-3-แนฟโธอิกไม่มีผลยับยั้ง หรือมีผลน้อยมากต่อการเจริญของ *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ P2 ในหลอดทดลองที่ไม่เติมสารทดสอบมีความขุ่นของเซลล์ซึ่งวัดในรูปของค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตรเท่ากับ 1.417 เมื่อเพิ่มปริมาณกรด 2-ไฮดรอกซี-3-แนฟโธอิก มีผลทำให้รูปแบบการเจริญของเชื้อเปลี่ยนแปลงเพียงเล็กน้อย โดยความขุ่นของเซลล์เมื่อใช้ปริมาณสารทดสอบ 1,000 ไมโครกรัม ต่อมล. มีค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตรเป็น 1.197 ซึ่งกรด 2-ไฮดรอกซี-3-แนฟโธอิกที่สกัดได้จากการย่อยสลายแอนทราซีนของ *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ ANT1 ก็ให้ผลทดสอบในลักษณะเดียวกัน

4.12 ความเป็นพิษของสารมัธยันต์ที่เกิดจากการย่อยสลายฟลูออรีนโดย *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ ANT1 ต่อการเจริญของตัวเชื้อเอง

ในการเตรียมสารมัธยันต์ชนิดต่าง ๆ ที่เกิดจากการย่อยสลายของฟลูออรีน ให้มีปริมาณมากเพื่อที่จะสกัดมาทดสอบความเป็นพิษของสาร โดยการเลี้ยง *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ ANT1 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM ปริมาตร 1,000 มล. ที่เติมฟลูออรีนเข้มข้น 0.1 มก./ต่อมล. เปรียบเทียบลักษณะการเปลี่ยนแปลงในอาหารเหลวที่ใช้ระยะเวลาเลี้ยงเชื้อ 2 วัน และ 5 วัน พบว่าในวันที่ 2 อาหารเหลวมีความขุ่นและมีสีเหลืองเข้มมากกว่าในวันที่ 5 ซึ่งเปลี่ยนเป็นสีเหลืองซีด (รูปที่ 4.40) แสดงว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ ANT1 มีจำนวนลดลง ซึ่งอาจเป็นผลยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียโดยสารมัธยันต์ที่เกิดจากการเปลี่ยนโครงสร้างของฟลูออรีน

ในการคัดเลือกระยะเวลาที่เหมาะสมสำหรับการสกัดสารมัธยันต์ โดยวิเคราะห์ปริมาณฟลูออรีนและสารมัธยันต์ที่เกิดขึ้นจากการย่อยสลายของแบคทีเรียสายพันธุ์ ANT1 จากการเก็บตัวอย่างทุก 24 ชั่วโมง นำสารละลายของฟลูออรีนในเมทธานอลมาจุด (spot) บนแผ่น TLC ซึ่งใช้ระบบตัวทำละลายที่ประกอบด้วย โทลูอีน : 1,4-ไดออกเซน : กรดอะซิติกเข้มข้น ในอัตราส่วน 90 : 25 : 4 (ปริมาตรต่อปริมาตร) เพื่อหาระยะเวลาที่มีการสะสมของสารตัวกลางในปริมาณมากที่สุด ได้ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 4.39

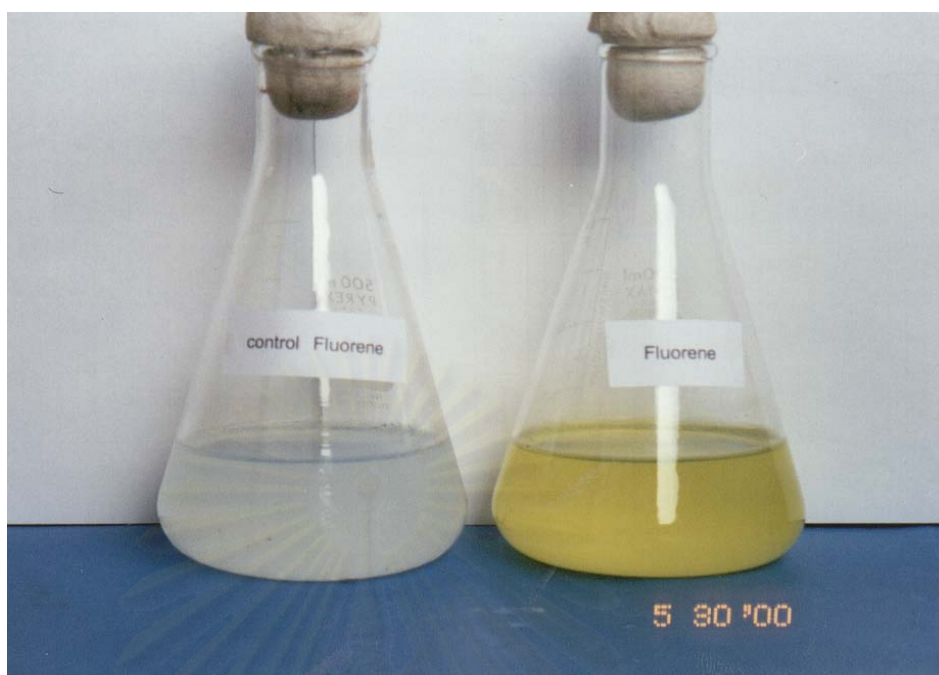


รูปที่ 4.39 โคโรมาโตแกรมของ TLC จากการวิเคราะห์สารมัธยันต์ที่เกิดจากการย่อยสลายฟลูออรีน

0 : สารมาตรฐานฟลูออรีน

1-7 : สารสกัดฟลูออรีนจากน้ำเลี้ยงเชื้อที่เวลา 1-7 วันตามลำดับ

ก



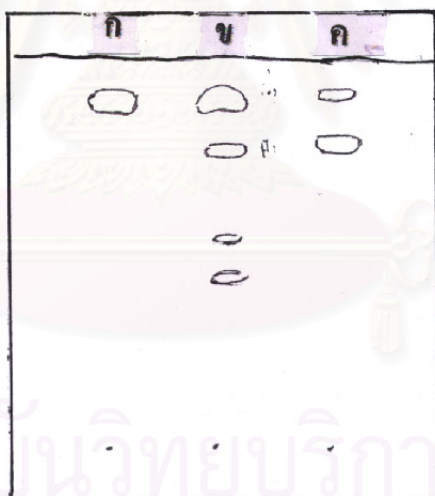
ข



รูปที่ 4.40 ลักษณะของอาหารเหลว CFMM ที่เกิดจากการย่อยสลายฟลูออรีนโดยแบคทีเรียสายพันธุ์ ANT1 ใน (ก) วันที่ 2 และ (ข) วันที่ 5 ของการเลี้ยงเชื้อ

ผลการทดลองในรูปที่ 4.39 พบว่าระยะเวลาที่เหมาะสมสำหรับการเลี้ยงเชื้อในระดับขยาย ส่วน เพื่อนำมาสกัดสารมัธยันต์ที่เกิดขึ้นจากการย่อยสลายฟลูออรีน คือในวันที่ 5 ของการเลี้ยงเชื้อ โดยพิจารณาจากพื้นที่แถบ (band) ที่มากที่สุดของสารมัธยันต์บนโครมาโตแกรมการวิเคราะห์ด้วย TLC ร่วมกับพื้นที่ได้กราฟของโครมาโตแกรม HPLC จากการทดลองในข้อ 4.6 ซึ่งมีปริมาณสารมัธยันต์ชนิดต่าง ๆ สะสมอยู่มากที่สุดในวันที่ 5 ของการเลี้ยงเชื้อเช่นเดียวกัน

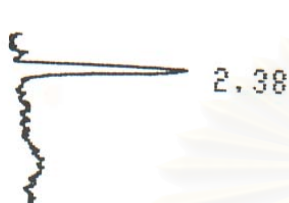
ในการสกัดสารมัธยันต์ที่เกิดจากการย่อยสลายฟลูออรีน ตามวิธีการสกัดในภาคผนวก ค หมายเลข 7 จะได้สารสกัด 2 ส่วนที่มีสมบัติเป็นกลางและเป็นกรด นำมาวิเคราะห์โดยวิธี TLC เพื่อตรวจสอบการสะสมของสารมัธยันต์ในส่วนสกัดทั้ง 2 ส่วน ดังแสดงในรูปที่ 4.41 พบว่ามีสารมัธยันต์เพียงชนิดเดียวสะสมอยู่ในส่วนสกัดที่เป็นกรด ส่วนในส่วนสกัดที่เป็นกลางพบการสะสมของสารมัธยันต์ 3 ชนิด โดยสารหลักที่พบปริมาณมากเป็นชนิดเดียวกับในส่วนสกัดที่เป็นกรด ซึ่งสารนี้มีสมบัติเรืองแสงฟลูออเรสเซนส์สีฟ้า ดังนั้นจึงเลือกส่วนสกัดที่เป็นกรดมาทำการแยกสารมัธยันต์ชนิดดังกล่าวให้บริสุทธิ์



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

รูปที่ 4.41 โครมาโตแกรมการวิเคราะห์ TLC แสดงการเปรียบเทียบปริมาณของสารมัธยันต์ที่เกิดจากการย่อยสลายฟลูออรีนโดย *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ ANT1 ที่สะสมอยู่ใน (ข) ส่วนสกัดที่เป็นกลาง และ (ค) ส่วนสกัดที่เป็นกรด เปรียบเทียบกับ (ก) สารมาตรฐานของฟลูออรีน

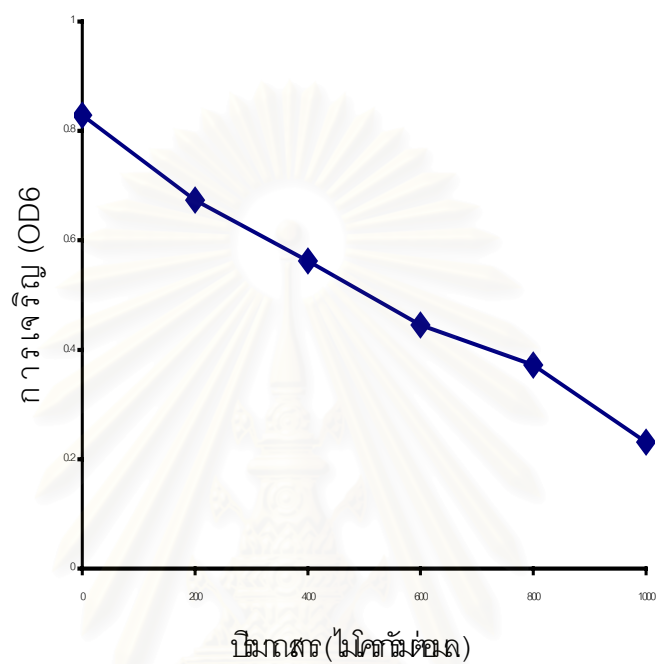
จากการนำสารมัธยันต์ในส่วนสกัดที่เป็นกรดมาทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี preparative TLC โดยใช้ระบบตัวทำละลายที่ประกอบด้วย เฮกเซน : เอทิลอะซิเตต : กรดอะซิติกเข้มข้น ในอัตราส่วน 10 : 10 : 1 (ปริมาตรต่อปริมาตร) จะได้สารมัธยันต์ปริมาณ 30.1 มก.ต่อ 1,000 มล.ของน้ำเลี้ยงเชื้อที่ใช้สกัด จากการตรวจสอบโครมาโตแกรมของ HPLC พบว่าสารนี้มีความบริสุทธิ์ในระดับหนึ่ง ดังแสดงในรูปที่ 4.42



รูปที่ 4.42 โครมาโตแกรม HPLC ของสารมัธยันต์ที่เกิดจากการย่อยสลายฟลูออรีน โดยสารดังกล่าวผ่านการทำให้บริสุทธิ์โดยวิธี preparative TLC

ในการทดสอบความเป็นพิษของสารมัธยันต์ที่เกิดจากการย่อยสลายฟลูออรีน ต่อการเจริญของ *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ ANT1 โดยแปรปริมาณของสารมัธยันต์ในอาหารเหลวเป็น 0, 200, 400, 600, 800 และ 1,000 ไมโครกรัมต่อมล. ได้ผลการทดลองดังแสดงใน รูปที่ 4.43

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 4.43 ผลของสารมัธยันต์ที่สกัดได้จากการย่อยสลายฟลูออรีน ต่อการเจริญของ *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ ANT1 ที่เลี้ยงในอาหารเหลว LB

จากผลการทดลองในรูปที่ 4.43 พบว่าสารมัธยันต์ที่สกัดได้จากการย่อยสลายฟลูออรีน โดย *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ ANT1 มีผลยับยั้งการเจริญของตัวเชื้อเอง โดยในหลอดทดลองที่ไม่เติมสารทดสอบมีความขุ่นของเซลล์ 0.829 ซึ่งวัดในรูปค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร เมื่อเพิ่มปริมาณสารความขุ่นของเชื้อจะลดลง โดยความขุ่นของเชื้อเมื่อใช้ปริมาณสารมัธยันต์ 1,000 ไมโครกรัมต่อมล. จะมีค่าเท่ากับ 0.231



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 5

สรุปและอภิปรายผลการทดลอง

ในการคัดเลือกแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายแอนทราซีนและพอลิไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนชนิดอื่น ควรใช้แหล่งดินที่มีการปนเปื้อนของสารประกอบอินทรีย์ในกลุ่มนี้มาก่อน เพื่อเป็นการคัดเลือกและเพิ่มจำนวนเชื้อที่สามารถใช้สารดังกล่าวเป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงานได้ (Heitkamp and Cerniglia, 1988) ซึ่งผลการคัดเลือกแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายแอนทราซีนโดยใช้ดินที่มีน้ำมันเครื่องปนเปื้อนจากแหล่งดินบริเวณหน่วยยานยนต์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ได้แบคทีเรีย 2 สายพันธุ์ที่สามารถใช้แอนทราซีนเป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงาน ระหว่างการถ่ายเชื้อ 5 ครั้งติดต่อกันเพื่อเพิ่มจำนวนเซลล์ของแบคทีเรียพบว่าระยะเวลาที่สังเกตเห็นการเจริญของแบคทีเรียและการเปลี่ยนสีของอาหารเหลว CFMM ในการถ่ายเชื้อแต่ละครั้งจะใช้เวลาดำเนินตามลำดับครั้งของการถ่ายเชื้อ แสดงว่าแบคทีเรียมีการปรับตัวโดยสร้างความคุ้นเคย (acclimatisation) ในการย่อยสลายแอนทราซีนเพื่อใช้เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงานในการเจริญได้มากขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Sutherland และคณะ (1995) ที่พบว่าอัตราการย่อยสลาย PAHs ในดินหรือในตะกอนที่ปนเปื้อนด้วยสารประกอบอินทรีย์ในกลุ่มนี้จะเพิ่มขึ้นเมื่อจุลินทรีย์ในดินถูกทำให้คุ้นเคยกับสาร PAHs จากการเปรียบเทียบความสามารถในการย่อยสลายแอนทราซีนของเชื้อที่คัดเลือกได้ พบว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ ANT1 เท่านั้นที่มีประสิทธิภาพสูงสุดในการย่อยสลายสารทดสอบโดยสังเกตจากการใช้ระยะเวลาสั้นที่สุดในการเปลี่ยนสีของอาหารเหลว CFMM ที่เติมแอนทราซีนเข้มข้น 0.1 มก.ต่อมล. กล่าวคือแบคทีเรียสามารถเปลี่ยนสีของอาหารเลี้ยงเชื้อจากไม่มีสีไปเป็นสีน้ำตาลภายใน 48 ชั่วโมงแรกของการเลี้ยงเชื้อ

จากการจำแนกชนิดทางอนุกรมวิธานของแบคทีเรียสายพันธุ์ ANT1 โดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและผลทดสอบทางชีวเคมี เปรียบเทียบกับข้อมูลที่รายงานใน Burgey's Manual of Systematic Bacteriology (Palleroni, 1984) ร่วมกับผลการวิเคราะห์ลำดับเบสของ 16 เอส - ไรบิโอไซม์ดีเอ็นเอสามารถยืนยันได้อย่างชัดเจนว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ดังกล่าวจัดอยู่ในสกุล *Sphingomonas* รายงานวิจัยที่กล่าวถึงการย่อยสลายสารพิษอันตรายโดย *Sphingomonas* sp. สรุปไว้ในตารางที่ 5.1

ตารางที่ 5.1 รายงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายสารประกอบอะโรมาติกของแบคทีเรียในสกุล *Sphingomonas*

สายพันธุ์แบคทีเรียและเอกสารอ้างอิง	สารประกอบอะโรมาติก
B1 (Eaton, Resnick and Gibson, 1996)	ไบฟีนิล แนพทาลีน แอนทราซีน พีแนนทรีน เบนซ์-[เอ]แอนทราซีน เบนซ์[เอ]ไพรีน อะซีแนพทีลีน ไดเบนโซไพโรฟีน ไดเบนโซฟูแรน
HH19 (Harms <i>et al.</i> , 1995)	ไดเบนโซฟูแรน และสารอนุพันธ์ของไดเบนโซฟูแรน
107 (Dagher <i>et al.</i> , 1997)	แอนทราซีน แนพทาลีน ไดเบนโซไพโรฟีน ฟลูออรีน พีแนนทรีน ฟลูออแรนธิน เบนซ์[เอ]แอนทราซีน ไพรีน ไบฟีนิล อะซีแนพทีน อะซีแนพทีลีน ไดเบนโซฟูแรน
F199 (Stillwell <i>et al.</i> , 1995)	โทลูอีน ไอโซเมอร์ของไซลีน (xylene) พารา-ครีซอล (p-cresol) แนพทาลีน ซาลิไซเลท เบนโซเอท
Lep1 (Fredrick <i>et al.</i> , 1995)	4-เมทิลควิโนลีน (4-methylquinoline)
P2 (ณัฐพันธุ์ ศุภกา, 2542)	พีแนนทรีน แนพทาลีน อะซีแนพทีน อะซีแนพทีลีน ฟลูออรีน แอนทราซีน ไดเบนโซฟูแรน
RW1 (Bunz <i>et al.</i> , 1992)	ไดเบนโซฟูแรน ไดเบนโซ-พารา-ไดออกซิน

จากงานวิจัยต่างๆข้างต้นสามารถยืนยันได้ถึงศักยภาพและบทบาทของแบคทีเรียสกุล *Sphingomonas* ในการย่อยสลายสารพิษในสิ่งแวดล้อม การมีสฟิงโกลิปิด (sphingolipid) ซึ่งโครงสร้างประกอบด้วยน้ำตาลกรดกลูคูโรนิก (glucuronic acid) และกรดไขมัน 2-ไฮดรอกซีไมริสติก (2-hydroxymyristic) อยู่ในส่วนของชั้นเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรียสกุล *Sphingomonas* อาจเกี่ยวข้องกับการดูดซับสารพิษที่ไม่ละลายน้ำเข้าสู่เซลล์ได้ดีกว่าแบคทีเรียชนิดอื่น เพราะโดยปกติจะพบสฟิงโกลิปิดในสิ่งมีชีวิตจำพวกยูคาริโอทเท่านั้น ดังนั้นแบคทีเรียในสกุลนี้จึงสามารถใช้วิถีเมตาบอลิซึมในการย่อยสลายสารพิษได้ดีกว่าแบคทีเรียชนิดอื่น (Yabuchi *et al.* , 1990)

นอกจากใช้แอนทราซีนเป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงานในการเจริญได้แล้ว *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ ANT1 ยังสามารถย่อยสลาย PAHs และสารอินทรีย์ที่มีวงเบนซีนชนิดอื่นได้อีกหลายชนิด ซึ่งประกอบไปด้วย ไดเบนโซฟูแรน ฟลูออรีน ฟลูออแรนธิน แนพทาลีน พีแนนทรีน กรดโปรโตคาทีคูอิก ฟลูออรีนอล ฟลูออรีโนน และแคทีคอลล โดยเชื้อจะย่อยสลาย

สารทดสอบเหล่านี้ไปเป็นสารมัธยันต์ที่ให้สีน้ำตาล ส้ม หรือสีเหลืองในอาหารเหลว CFMM ซึ่งสารตัวกลางดังกล่าวอาจเป็นสารที่มีโครงสร้างคล้ายคลึงกับแคทีกอล (catechol - like compounds) และผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากแคทีกอลแตกวงแบบเมตา (Mueller *et al.* , 1989 ; Grifoll *et al.* , 1992 ;) หรือแบบออโร (Civilini, de Bertoldi and Tell, 1999) ขึ้นอยู่กับสายพันธุ์แบคทีเรียที่ทำให้เกิดการย่อยสลายและชนิดของสารอินทรีย์ แต่จากรายงานของ Matthew Cindy และ Loring (2000) พบว่าเอนไซม์ แคทีกอล-2,3-ไดออกซีจีเนส (catechol-2,3-dioxygenase) ซึ่งทำให้แคทีกอลแตกวงแบบเมตามีประสิทธิภาพสูงกว่า และพบได้บ่อยกว่า เอนไซม์แคทีกอล-1,2-ไดออกซีจีเนส (catechol-1,2-dioxygenase) ในแบคทีเรียที่มีผลให้แคทีกอลแตกวงแบบออโร หลังจากนั้นสารมัธยันต์เหล่านี้จะถูกเปลี่ยนโครงสร้างต่อไปเป็นสารตัวกลางชนิดต่าง ๆ ที่อยู่ในวิถีเมตาบอลิซึมหลักเพื่อการสร้างพลังงาน

การเลี้ยงเชื้อ *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ ANT1 ในอาหารเหลว CFMM ที่มีฟลูออแรนธิน และไพรีนเข้มข้น 0.1 มก.ต่อมล. เป็นเวลา 7 วัน พบว่าเชื้อสามารถใช้วิถีเมตาบอลิซึมในการย่อยสลายสารทดสอบทั้งสองชนิดได้ โดยสังเกตจากความขุ่นที่เกิดขึ้นและลักษณะการเปลี่ยนสีของอาหารเหลวในชุดทดลองเทียบกับชุดควบคุม แม้ว่าการเปลี่ยนแปลงนี้จะใช้เวลาถึง 7 วัน และยังไม่เด่นชัดมากก็ตาม แต่ก็มีที่น่าสนใจเนื่องจาก PAHs ทั้งสองชนิดดังกล่าวมีน้ำหนักโมเลกุลสูงจึงถูกย่อยสลายได้ยาก เพราะโดยทั่วไปการเพิ่มจำนวนเซลล์มักเกิดจากการย่อยสลายของ PAHs ที่มีวงเบนซีนน้อยกว่าหรือเท่ากับ 3 วงเท่านั้น (Wiesel, Wiibker and Rehm, 1993)

ประสิทธิภาพในการย่อยสลาย PAHs ชนิดต่าง ๆ ในงานวิจัยนี้ ของ *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ ANT1 สรุปไว้ในตารางที่ 5.2

ตารางที่ 5.2 การย่อยสลาย PAHs แต่ละชนิดในช่วงที่มีการเจริญสูงสุดของแบคทีเรียสายพันธุ์ ANT1

PAHS	ระยะเวลาที่เลี้ยงเชื้อ (วัน)	% PAHs ที่ลดลง
แอนทราซีน	2	84.64
ฟลูออรีน	2	91.81
ฟีนแอนทรีน	1	100
ไดเบนโซฟิวแรน*	7	61.51
แนพทาลีน*	3	31.2
ฟีนแอนทรีน (เมื่อผสมกับแอนทราซีน)	1	89.36
แอนทราซีน (เมื่อผสมกับฟีนแอนทรีน)	1	82.43

หมายเหตุ * ปริมาณเริ่มต้นของไดเบนโซฟิวแรนและแนพทาลีนเท่ากับ 300 มก.ต่อลิตร และ 1,000 มก.ต่อลิตร ตามลำดับ ส่วน PAHs ชนิดอื่นมีปริมาณเริ่มต้น 100 มก.ต่อลิตร และเปอร์เซ็นต์ PAHs ที่แสดงในตารางเป็นค่าที่ได้ลบเปอร์เซ็นต์การสูญเสียของสารทดสอบแต่ละชนิดเนื่องจากปัจจัยทางกายภาพออกแล้ว

Fredrickson และคณะ (1995) รายงานว่าแบคทีเรียในสกุล *Sphingomonas* ซึ่งมีอยู่ทั่วไปในสิ่งแวดล้อม สามารถผลิตเอนไซม์ที่ย่อยสลายสารประกอบไฮโดรคาร์บอน PAHs และอนุพันธ์ของสารทั้งสองกลุ่มได้เป็นจำนวนมาก (broad catabolic capabilities) ซึ่งอาจใช้เป็นข้อบ่งชี้ถึงความคล้ายคลึงของวิถีเมตาบอลิซึมทั้งระบบเอนไซม์ที่ทำให้เกิดการย่อยสลาย (Evans *et al.* , 1965) คุณสมบัตินี้เป็นข้อดีอย่างมากต่อการนำแบคทีเรียในสกุลดังกล่าวมาใช้บำบัดสิ่งแวดล้อมที่ปนเปื้อนสารเคมีอันตรายในธรรมชาติซึ่งตามปกติมักจะมีสารผสมหลายชนิดรวมกันอยู่

เมื่อเลี้ยงเชื้อ *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ ANT1 ในอาหารเหลว CFMM ที่เติมแอนทราซีนพบว่าเชื้อมีจำนวนลดลงอย่างรวดเร็วภายหลังการเพิ่มจำนวนภายใน 48 ชั่วโมงแรกของการทดลอง ซึ่งอาจเกิดจากความเป็นพิษของสารมัธยันต์ที่เกิดจากการเปลี่ยนโครงสร้างของแอนทราซีน โดยในรูปที่ 4.10 พบการสะสมของสารมัธยันต์ 2 ชนิดที่เกิดขึ้นพร้อมกับการลดลงของแอนทราซีนและจำนวนแบคทีเรีย เมื่อพิจารณารูปแบบการสะสมของสารทั้งสองชนิดดังกล่าวตลอดระยะเวลา 7 วันของการเลี้ยงเชื้อ พบว่าสารมัธยันต์ชนิดแรก (retention time 2.1 นาที) มี

ปริมาณค่อนข้างคงที่ แสดงว่า *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ ANT1 ไม่สามารถย่อยสลายสารชนิดนี้ได้ซึ่งอาจมีผลทำให้จำนวนเชื้อลดลง โดยในวันที่ 7 มีจำนวนเชื้อเพียง 2.88×10^5 CFU ต่อมล. สอดคล้องกับรายงานของ Timmis และ Pieper (1999) ซึ่งกล่าวว่าในวิธีการย่อยสลายของสารพิษอันตรายของจุลินทรีย์บางชนิดอาจไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงอย่างสมบูรณ์ กล่าวคือสารตั้งต้นเกิดการเปลี่ยนโครงสร้างเพียงบางส่วนเท่านั้น และในบางกรณีสารมัธยันต์ที่เกิดขึ้นอาจมีความเป็นพิษสูงกว่าสารตั้งต้น โดยมีผลยับยั้งการเจริญทั้งต่อจุลินทรีย์ที่ย่อยสลายสารพิษนั้นหรือต่อจุลินทรีย์ชนิดอื่น (toxic metabolite) เช่น เชื้อที่ย่อยสลายโพลีคลอริเนทไบฟีนิล (polychlorinatedbiphenyl, PCB) ทำให้เกิดสารตัวกลางคือ 3-คลอโรเบนโซเอต (3-chlorobenzoate) สะสมอยู่ในอาหารเหลว เนื่องจากสารดังกล่าวมีผลยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ 2,3-ไดไฮดรอกซีไบฟีนิล ไดออกซีจีเนส (2,3-dihydroxybiphenyl dioxygenase) 3-คลอโรเบนโซเอตจึงไม่ถูกย่อยสลายต่อไปเป็น 3-คลอโรแคททีคอล (3-chlorocatechol) หรืออีกวิธีหนึ่ง 3-คลอโรเบนโซเอตอาจใช้วิถีเมตาบอลิซึมของ 3-ออกโซอะดิเพต (3-oxoadipate) เกิดเป็นโปรโตอะนีโมนิน (protoanemonin) ที่มีผลในการลดจำนวนเซลล์อย่างรวดเร็ว และมีสมบัติเป็นยาปฏิชีวนะที่ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ได้หลายชนิด (Blasco et al. , 1997)

นอกจากนี้ยังมีรายงานวิจัยอีกจำนวนมากที่กล่าวถึงการสะสมของสารมัธยันต์ที่คงทนต่อการถูกย่อยสลายไปเป็นสารอื่น (dead end metabolite) เช่น

Weissenfels, Behyer และ Klein (1990) พบว่ามีการสะสมของสารตัวกลางที่เกิดจากการย่อยสลายฟลูออรีนโดย *Pseudomonas vesicularis* และการเปลี่ยนโครงสร้างของแอนทราซีนโดย *Pseudomonas paucimobilis* รวมทั้งในระหว่างการย่อยสลายฟลูออแรนธรีนของ *Alcaligenes denitrificans*

Tongpim และ Pickard (1999) รายงานการสะสมของฟีแนนทรินทรานส์ -9,10-ไดไฮโดรไดโอดอล (phenanthrene trans-9,10-dihydrodiol) ซึ่งเกิดจากการเปลี่ยนโครงสร้างของฟีแนนทรินในภาวะโคเมตาบอลิซึมกับแอนทราซีนโดยเชื้อ *Mycobacterium* sp. สายพันธุ์ S1

Rao รายงานในปี 1996 ว่าสารพิษที่เกิดจากการเปลี่ยนโครงสร้างของเบนซีน คือ ไฮโดรควิโนน 1,4-เบนโซควิโนน และ กลูตาไธโอนิลไฮโดรควิโนน (glutathionylhydroquinone) มีผลในการทำลายดีเอ็นเอ

Calder และ Lader (1976) รายงานว่าไดไฮดรอกซีแนพธาซีน (dihydroxynaphthalene) ที่เกิดจากการย่อยสลายของแนพธาซีนโดย marine bacteria มีผลลดอัตราการเจริญของเชื้อได้มากกว่าแนพธาซีนเมื่อใช้ความเข้มข้นของสารทดสอบเท่ากัน เนื่องจากสารมัธยันต์ดังกล่าวมีโครงสร้างเป็นสารประกอบไฮดรอกซีซึ่งมีขั้วสูงกว่าแนพธาซีน จึงมีผลยับยั้งการเพิ่มจำนวนของแบคทีเรียได้อย่างสมบูรณ์

Bartels,Knackmuss และ Reineke (1984) รายงานว่าฮาโลแคททีคอล (halocatechol) เป็นสารพิษสำคัญที่เกิดจากการเปลี่ยนโครงสร้างของสารประกอบฮาโลอะโรมาติก โดยสารพิษดังกล่าวทำให้ระบบเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการแตกวงอะโรมาติกเกิดการเสียสภาพ (suicide enzyme inactivation)

จากรายงานวิจัยต่าง ๆ ข้างต้นจะเห็นได้ว่าในระหว่างการย่อยสลายของสารประกอบอะโรมาติกชนิดต่าง ๆ โดยแบคทีเรีย อาจพบการสะสมของสารมัธยันต์บางชนิดที่มีผลยับยั้งการเจริญของเชื้อ ดังนั้นผลการลดจำนวนของเชื้อ *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ ANT1 ที่มีแอนทราซีนเป็นแหล่งคาร์บอนก็น่าจะเกิดจากความเป็นพิษของสารมัธยันต์ที่เกิดขึ้นในวิถีย่อยสลายแอนทราซีนเช่นเดียวกัน

ผลการศึกษารูปแบบการเจริญโดยใช้พีแนทรีนเป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงาน สำหรับการเจริญของ *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ ANT1 พบว่ากระบวนการดังกล่าวเกิดขึ้นได้อย่างสมบูรณ์ ซึ่งเป็นไปตามรายงานของ Foght, Fedorak และ Westlake (1990) ในงานวิจัยนี้เชื้อมีการเพิ่มจำนวนได้สูงสุดภายในวันที่ 2 ของการทดลองโดยไม่มี lag phase เกิดขึ้น ในขณะที่พีแนทรีนถูกย่อยสลายหมดไปอย่างรวดเร็วภายใน 24 ชั่วโมง พร้อมกับที่อาหารเหลว CFMM เปลี่ยนไปเป็นสีเหลือง แสดงว่ามีสารตัวกลางเกิดขึ้นและแบคทีเรียสายพันธุ์ ANT1 สามารถใช้สารดังกล่าวเป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับการเจริญในภาวะที่ไม่มีพีแนทรีนได้ จากรายงานของ Mueller และคณะ (1989) เกี่ยวกับการย่อยสลายพีแนทรีนโดย *Pseudomonas cepacia* ก็ได้ผลเช่นเดียวกันคือสารทดสอบถูกเปลี่ยนเป็นสารมัธยันต์ที่ละลายน้ำได้ ทำให้อาหารเลี้ยงเชื้อเปลี่ยนจากไม่มีสีเป็นสีเหลือง โดยสารดังกล่าวเกิดจากแคททีคอลมีการแตกวงแบบเมตาแบคทีเรียสายพันธุ์ ANT1 เริ่มมีจำนวนคงที่และหยุดการเจริญภายหลัง 48 ชั่วโมง เนื่องจากแหล่งคาร์บอนมีปริมาณลดลงหรือหมดไป นอกจากนี้ที่สภาวะดังกล่าวเริ่มมีปริมาณออกซิเจนเป็นปัจจัยจำกัดเนื่องจากการเพิ่มจำนวนเซลล์ (Stucki and Alexander, 1987)

เมื่อเลี้ยงเชื้อ *Sphingomonas* sp.สายพันธุ์ ANT1 ในอาหารเหลว CFMM ที่มีโดเบนโซฟูแรนเข้มข้น 300 มก.ต่อลิตร พบว่าใน 24 ชั่วโมงแรกแบคทีเรียมีการเพิ่มจำนวนได้น้อยมาก ส่วนสารทดสอบก็มีปริมาณลดลงเพียงเล็กน้อย ภาวะดังกล่าวอาจเกิดจากการปรับตัวของเชื้อเนื่องจากมีสารตั้งต้นในปริมาณมาก ดังเช่นรายงานวิจัยของ Wiggins และ Alexander ในปี 1988 ซึ่งพบว่าระยะเวลาที่ PAHs ไม่ถูกย่อยสลายโดยจุลินทรีย์ (acclimation period) จะเพิ่มขึ้นเมื่อมีการเพิ่มปริมาณ PAHs หลังจาก 24 ชั่วโมงพบว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ ANT1 มีการเพิ่มจำนวนอย่างรวดเร็วจนถึง 1.0×10^9 CFU ต่อมล.ในวันที่ 3 ของการทดลอง โดยที่อาหารเหลว CFMM เปลี่ยนเป็นสีเหลืองออกส้ม ซึ่งอาจเป็นผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากการแตกวงแบบเมตาของแคททีคอล ซึ่งพบลักษณะการเปลี่ยนแปลงนี้ในระหว่างการย่อยสลายโดเบนโซฟูแรนโดย

Terrabacter sp. สายพันธุ์ DBF63 (Kasuga et al., 1997) นอกจากนี้จากรายงานวิจัยของ Cerniglia, Morgan และ Gibson (1979) ก็พบว่า *Beijerinckia* sp. ย่อยสลายไดเบนโซฟูแรนไปเป็นสารผสมของ 1,2-ไดไฮดรอกซี-1,2-ไดไฮโดรไดเบนโซฟูแรน (1,2-dihydroxy-1,2-dihydrodibenzofuran) และ 2,3-ไดไฮดรอกซี-2,3-ไดไฮโดรไดเบนโซฟูแรน (2,3-dihydroxy-2,3-dihydrodibenzofuran) ทำให้อาหารเลี้ยงเชื้อเปลี่ยนเป็นสีเหลืองภายใน 17 ชั่วโมงหลังการเลี้ยงเชื้อ

โดยเหตุที่สารดังกล่าวเกิดการระเหยได้ง่าย ดังนั้นปริมาณไดเบนโซฟูแรนที่สูญหายไปในหลอดทดลองที่เดิมเชื้อ จึงไม่ได้เกิดจากการย่อยสลายของเชื้อแต่เพียงอย่างเดียว โดยปริมาณหนึ่งเกิดการสูญหายไปเนื่องจากการระเหยของสาร ดังนั้นจึงกล่าวได้ว่าไดเบนโซฟูแรนเข้มข้น 300 มก.ต่อลิตร ที่เกิดการย่อยสลายโดย *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ ANT1 ภายหลังจากการเลี้ยงเชื้อ 7 วัน มีปริมาณเท่ากับ 146 มก.ต่อลิตร โดยมีสารตกค้างอยู่ในอาหารเหลว 45.16 มก.ต่อลิตร และเกิดการระเหยไป 91.69 มก.ต่อลิตร

ผลการติดตามโครมาโตแกรมของ TLC และ HPLC เพื่อวิเคราะห์ปริมาณไดเบนโซฟูแรนและการสะสมของสารมัธยันต์ พบว่ามีสารตัวกลาง 2 ชนิดเกิดขึ้นซึ่งมี retention time ต่างกันเป็น 1.9 และ 2.9 นาที โดยสารชนิดที่สองถูกย่อยสลายต่อได้ ในขณะที่ยังพบการสะสมของสารชนิดแรก และสังเกตได้จากลักษณะการเปลี่ยนสีของอาหารเหลวที่เปลี่ยนจากสีเหลืองอ่อนเป็นสีเหลืองส้มในวันที่ 3 ที่เชื้อมีการเพิ่มจำนวนได้สูงสุด หลังจากนั้นลักษณะสีและความขุ่นจะค่อนข้างคงที่ตลอดการทดลอง แสดงว่ามีการสะสมของสารตัวกลางที่ไม่เป็นพิษเนื่องจากไม่พบการลดจำนวนของแบคทีเรียสายพันธุ์ ANT1

ผลการศึกษาความสามารถของ *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ ANT1 ในการย่อยสลายแวนทาลีนปริมาณ 1000 มก.ต่อลิตร ในภาวะที่มีการจำกัดปริมาณออกซิเจนโดยปิดผนึกจุกสำลีเพื่อป้องกันการระเหยของสาร พบว่าเชื้อสามารถใช้แวนทาลีนเป็นแหล่งคาร์บอนในการเจริญได้ โดยสังเกตจากการเปลี่ยนสีของอาหารเหลวไปเป็นสีน้ำตาลเข้มในวันที่ 3 ของการทดลองทำให้แวนทาลีนมีปริมาณลดลงได้มากที่สุดเมื่อเทียบกับชุดควบคุม ควบคู่ไปกับการสะสมของสารมัธยันต์ 2 ชนิดที่มี retention time 2.3 และ 2.7 นาที โดยสารชนิดแรกมีปริมาณเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องและมีความคงทนต่อการถูกย่อยสลายไปเป็นสารอื่นจากการติดตามโครมาโตแกรมของ TLC และ HPLC แต่อย่างไรก็ตามวิธีป้องกันการระเหยของสารไม่สามารถกระทำได้อย่างมีประสิทธิภาพโดยพบว่าแวนทาลีนในชุดควบคุมมีปริมาณลดลงอย่างต่อเนื่องตลอดการทดลองในทำนองเดียวกับชุดทดลอง ถ้าต้องการควบคุมมิให้มีการลดลงของแวนทาลีนในชุดควบคุม ควรทำการทดลองภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจน ดังเช่นรายงานวิจัยของ Rockne และคณะ (2000) ที่กล่าวถึงการย่อยสลายแวนทาลีนในสภาวะไร้อากาศโดยมีไนเตรท (NO_3^-) ทำหน้าที่เป็นตัวรับ

อิเล็กทรอนิกส์ในปฏิกิริยาออกซิเดชัน-รีดักชันเพื่อการสร้างพลังงานของเชื้อ ผลการทดลองพบว่า ภายใน 60 วันเชื้อบริสุทธิ์สายพันธุ์ NAP-4 และ NAP-3-1 สามารถย่อยสลายเนฟทาลินได้ 70 % และ 90 % ตามลำดับ ส่วนในชุดควบคุมที่ไม่เติมเชื้อมีปริมาณเนฟทาลินลดลงเพียงเล็กน้อย

จากการทดลองเบื้องต้นในงานวิจัยนี้พบว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ ANT1 เพิ่มจำนวนได้น้อยมาก (ไม่ได้แสดงข้อมูล) ซึ่งน่าจะเกิดจากปัจจัยต่าง ๆ ประกอบกัน เช่น ความเข้มข้นเริ่มต้นของเนฟทาลินมีค่าสูงเกินไป (Wiggins and Alexander, 1988) ออกซิเจนและหัวเชื้อเริ่มต้นมีปริมาณต่ำ หรือการเติมเนฟทาลินลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวโดยตรงอาจมีผลยับยั้งการเจริญของเชื้อได้มากกว่าให้เชื้อได้รับไอระเหยของสารดังกล่าว เพราะเนฟทาลินมีค่าการละลายในน้ำสูงถึง 30 ppm (Mueller *et al.*, 1990 ; Weissenfels *et al.*, 1991)

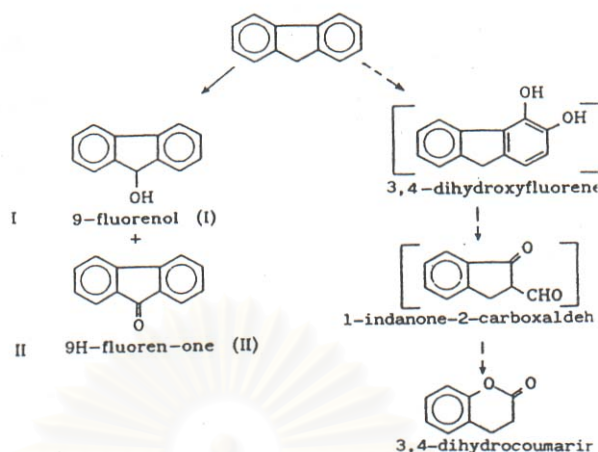
การศึกษารูปแบบการเพิ่มจำนวนรวมทั้งประสิทธิภาพในการย่อยสลายแอนทราซีนและฟีแนนทรีนของ *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ ANT1 พบว่ารูปแบบการเจริญของเชื้อมีลักษณะเหมือนกับชุดทดลองที่เติมแอนทราซีนเพียงสารเดียว แสดงว่ากรด 2-ไฮดรอกซี-3-เนฟโธอิกที่เกิดจากการเปลี่ยนโครงสร้างของแอนทราซีนมีผลยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเชื้อได้อย่างมีประสิทธิภาพ แม้แต่ในภาวะที่เติมฟีแนนทรีนซึ่งเป็นแหล่งคาร์บอนที่แบคทีเรียมีการเพิ่มจำนวนได้สูงสุดก็ตาม นอกจากนี้ยังพบด้วยว่าระยะเวลาที่แบคทีเรียสายพันธุ์ ANT1 ใช้ในการเพิ่มจำนวนได้สูงสุดลดลงจาก 48 ชั่วโมงในกรณีที่มีแอนทราซีนเพียงสารเดียวมาเป็น 24 ชั่วโมง นั่นคือฟีแนนทรีนมีผลลด acclimation period ที่เชื้อใช้ในการย่อยสลายแอนทราซีน (Wiggins and Alexander, 1988) ส่วนประสิทธิภาพในการย่อยสลายฟีแนนทรีนของแบคทีเรียมีค่าลดลงเล็กน้อยเมื่อเทียบกับการเติมฟีแนนทรีนเพียงสารเดียว

Bouchez, Blanchet และ Vandecasteele (1995) เสนอว่าความเข้าใจเกี่ยวกับผลลัพท์ของปฏิสัมพันธ์ระหว่างสาร PAHs เป็นสิ่งจำเป็นเพื่อให้การย่อยสลายสารผสมของ PAHs ในสิ่งแวดล้อมเกิดขึ้นอย่างสมบูรณ์ รายงานวิจัยส่วนใหญ่จะมุ่งไปที่การย่อยสลาย PAHs ที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง โดยการกระตุ้นระบบเอนไซม์ของเชื้อด้วย PAHs ที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำซึ่งจะถูกย่อยสลายได้ง่ายกว่า และนับเป็นผลบวกในเชิงปฏิสัมพันธ์ (synergistic) แต่อย่างไรก็ตามจากการศึกษาโดยเติม PAHs 2 ชนิด และติดตามประสิทธิภาพในการย่อยสลายของเชื้อ พบว่าผลลัพท์ของปฏิสัมพันธ์ดังกล่าวขึ้นอยู่กับชนิดของแบคทีเรียและ PAHs ซึ่งในงานวิจัยนี้พบว่าเป็นแบบ preferential substrate degradation กล่าวคือพบว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ ANT1 ย่อยสลายแอนทราซีนได้เร็วขึ้น ซึ่งอาจเป็นผลมาจากการแข่งขันระหว่างแอนทราซีนและฟีแนนทรีนที่บริเวณ active site ของเอนไซม์ไดออกซีจีเนส

จากการศึกษารูปแบบในการเจริญของ *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ ANT1 โดยใช้ฟลูออรีนเป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงาน พบว่าฟลูออรีนเข้มข้น 100 มก.ต่อลิตรถูกย่อย

สลายหมดไปจากอาหารเลี้ยงเชื้อที่เวลา 72 ชั่วโมง ควบคู่ไปกับการเพิ่มจำนวนของเชื้อ รวมทั้งมีการสะสมสารมัธยันต์ที่เกิดจากการย่อยสลายฟลูออรีน ทำให้มีการเปลี่ยนสีของอาหารเหลว CFMM เป็นสีเหลือง ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Grifoll และคณะในปี 1992 เกี่ยวกับการย่อยสลายฟลูออรีนของ *Arthrobacter* sp. สายพันธุ์ F101 เกิดเป็นสารมัธยันต์สะสมอยู่ทำให้อาหารเลี้ยงเชื้อเปลี่ยนเป็นสีเหลือง การที่น้ำเลี้ยงเชื้อเกิดการเปลี่ยนแปลงในลักษณะนี้แสดงว่ามีการสะสมสารมัธยันต์ที่เกิดจากการสลายประกอบอะโรมาติกแตกวงแบบเมตา

เมื่อพิจารณารูปแบบการเจริญของแบคทีเรียสายพันธุ์ ANT1 ที่มีฟลูออรีนเป็นแหล่งคาร์บอน (รูปที่ 4.14) จะพบว่ามีลักษณะคล้ายกับรูปแบบการเพิ่มจำนวนของเชื้อในการย่อยสลายแอนทราซีน คือเมื่อเชื้อมีอัตราการเจริญสูงสุดแล้ว ในวันที่ 3 ของการทดลอง ปริมาณเชื้อกลับลดลงเป็น 1.04×10^7 CFU ต่อมล. จนถึงปริมาณต่ำสุดเท่ากับ 3.31×10^5 CFU ต่อมล. ในวันที่ 7 ของการเลี้ยงเชื้อ สาเหตุที่ทำให้แบคทีเรียสายพันธุ์ ANT1 มีจำนวนลดลง อาจเกิดจากความเป็นพิษของสารตัวกลางที่เกิดขึ้นเนื่องจากฟลูออรีนถูกเปลี่ยนโครงสร้าง เพื่อที่จะทดสอบสมมติฐานดังกล่าวจึงทำการสกัดสารตัวกลางด้วยเอทิลอะซิเตตในวันที่ 5 ของการเลี้ยงเชื้อ นำมาวิเคราะห์ด้วย TLC พบการสะสมของสารตัวกลางเพียงชนิดเดียวในส่วนสกัดที่เป็นกรด ดังนั้นจึงแยกสารดังกล่าวให้บริสุทธิ์โดยวิธี preparative TLC ได้สารปริมาณ 30.1 มก.ต่อลิตร ของน้ำเลี้ยงเชื้อที่ใช้สกัด เมื่อทดสอบความเป็นพิษของสารต่อการเจริญของแบคทีเรียสายพันธุ์ ANT1 พบว่ามีผลยับยั้งการเจริญของเชื้อได้จริง ผลทดสอบดังกล่าวสามารถนำมาใช้อธิบายผลการทดลองในข้อ 4.6 ได้อย่างชัดเจนถึงสาเหตุที่แบคทีเรียสายพันธุ์ ANT1 มีอัตราการเจริญลดลง โดยเป็นผลจากความเป็นพิษของสารมัธยันต์ 1 ใน 3 ชนิดที่เกิดขึ้นจากการเปลี่ยนโครงสร้างของฟลูออรีน ซึ่งสารดังกล่าวมีค่า retention time 2.38 นาที และพบการสะสมปริมาณมากที่สุดในวันที่ 5 ของการเลี้ยงเชื้อ ทั้งนี้จากรายงานการย่อยสลายฟลูออรีนของ *Arthrobacter* sp. สายพันธุ์ F101 ที่เสนอโดย Grifoll และคณะในปี 1992 ก็พบการสะสมของสารมัธยันต์ 2 ชนิดที่คงทนต่อการย่อยสลายไปเป็นสารอื่น โดยสารทั้งสองชนิดดังกล่าวคือ 9-ฟลูออรีนอล (9-fluorenone) และ 9H-ฟลูออรีโนน (9H-fluorenone) จากผลติดตามการเปลี่ยนแปลงของมวลเซลล์เปรียบเทียบกับชุดควบคุมพบว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ F101 ไม่สามารถใช้สารมัธยันต์ทั้งสองชนิดนี้เป็นแหล่งคาร์บอนได้ในทุกระดับความเข้มข้นที่ทำการทดลอง (0.01, 0.001, 0.005 %) จากผลการย่อยสลายฟลูออรีนโดยแบคทีเรียสายพันธุ์ F101 Grifoll และคณะจึงเสนอวิถีเมตาบอลิสมดังแสดงในรูปที่ 5.1 โดยวิถีหนึ่งฟลูออรีนถูกเปลี่ยนโครงสร้างไปเป็น 3,4-ไดไฮโดรคูมาริน (3,4-dihydrocoumarin) ซึ่งทำให้เกิดการเพิ่มจำนวนเซลล์ ส่วนอีกวิถีหนึ่งมีการสะสม 9-ฟลูออรีนอล และ 9H-ฟลูออรีโนน ซึ่งคงทนต่อการถูกย่อยสลายไปเป็นสารอื่น (dead end route)



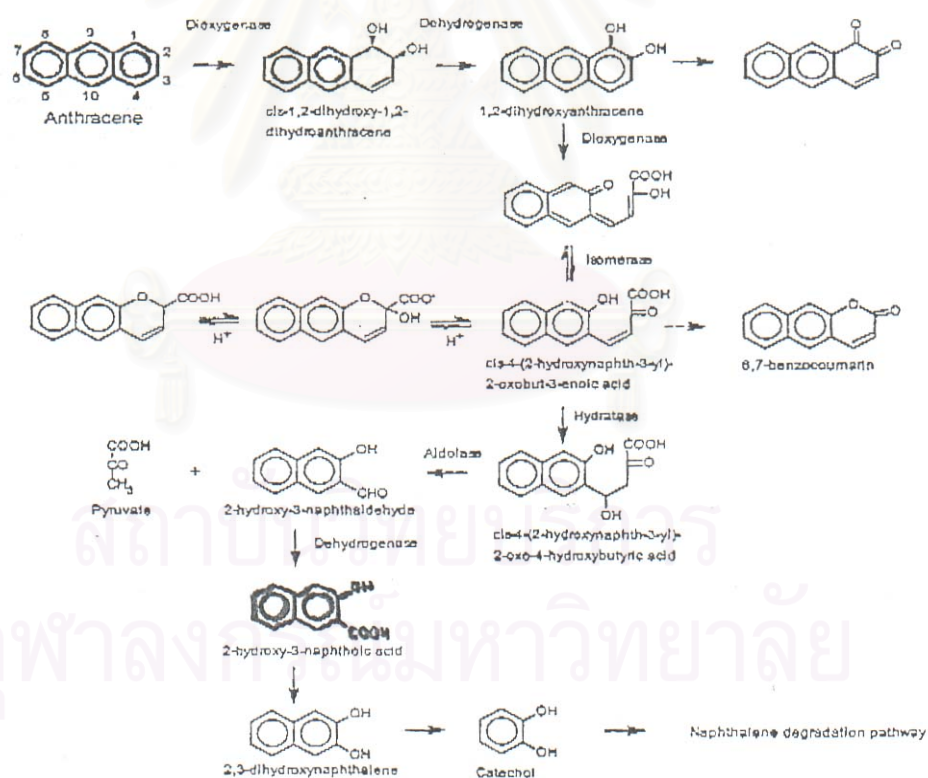
รูปที่ 5.1 วิธีการย่อยสลายฟลูออรีนของ *Arthrobacter* sp. สายพันธุ์ F101 (Grifoll *et al.*, 1992)

จากการพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารมัธยันต์ที่เกิดจากการย่อยสลายแอนทราซีนของแบคทีเรียสายพันธุ์ ANT1 โดยการวิเคราะห์ด้วย GC – MS และ ^1H – NMR ทำให้ทราบว่าสารดังกล่าวคือ กรด 2-ไฮดรอกซี-3-แนฟโธอิก แสดงว่าการย่อยสลายแอนทราซีนของแบคทีเรียสายพันธุ์ ANT1 จึงน่าจะเริ่มต้นจากการเติมออกซิเจนโดยเติมหมู่ไฮดรอกซี 2 หมู่ (dioxygenation) เข้าที่วงอะโรมาติกของแอนทราซีนในตำแหน่ง C1 และ C2 และเปลี่ยนแอนทราซีนไปเป็นแอนทราซีน ซิส -1,2-ไดไฮโดรไดออกอล ซึ่งจะถูกลดต่อไปเป็นกรด 2-ไฮดรอกซี-3-แนฟโธอิก (Rogoff and Wender, 1957 ; Evans *et al.* , 1965)

กรด 2-ไฮดรอกซี-3-แนฟโธอิกจัดเป็นสารมัธยันต์ที่สำคัญในกระบวนการย่อยสลายแอนทราซีนของแบคทีเรียโดยทั่วไป โดยมีรายงานวิจัยจำนวนมากที่ตรวจพบกรดชนิดนี้เกิดขึ้นระหว่างการย่อยสลายแอนทราซีนหลายชนิดดังสรุปไว้ในตารางที่ 5.3 และรูปที่ 5.2 แสดงวิถีเมตาบอลิซึมที่แบคทีเรียส่วนใหญ่ใช้ในการย่อยสลายแอนทราซีน ซึ่งอาจพบการสะสมของกรด 2-ไฮดรอกซี-3-แนฟโธอิก

ตารางที่ 5.3 ชนิดของแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายแอนทราซีนไปเป็นกรด 2-ไฮดรอกซี-3-แนฟโธอิก

สายพันธุ์แบคทีเรีย	เอกสารอ้างอิง
<i>Sphingomonas</i> sp. ANT1	งานวิจัยนี้
<i>Alcaligenes denitrificans</i> WW1	Weissenfesl <i>et al.</i> , 1991
Soil pseudomonad	Evans <i>et al.</i> , 1965
<i>Psseudomonas aeruginosa</i> PG	Evans <i>et al.</i> , 1965
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Rogoff and Wender, 1957
<i>Pseudomonas fluorescens</i> 5R	Menn <i>et al.</i> , 1993
<i>Pseudomonas fluorescens</i> 5RL	Sanseverino <i>et al.</i> , 1991
<i>Bacillus phenanthrenicus</i> guricus	Evans <i>et al.</i> , 1965
<i>Burkholderia cepacia</i> F279	Grifoll <i>et al.</i> , 1995



รูปที่ 5.2 วิธีเมตาบอลิซึมที่แบคทีเรียส่วนใหญ่ใช้ในการย่อยสลายแอนทราซีน (Evans *et al.*, 1965)

ผลทดสอบความเป็นพิษของกรด 2-ไฮดรอกซี -3-แนฟโธอิกต่อการเจริญของแบคทีเรียทั้ง 3 สายพันธุ์ เปรียบเทียบระหว่างสารสกัดกับสารมาตรฐานของกรด 2-ไฮดรอกซี -3-แนฟโธอิกพบว่าให้ผลเช่นเดียวกัน โดยสารพิษดังกล่าวมีผลยับยั้งการเพิ่มจำนวนของ *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ ANT1 และ *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 แต่มีผลน้อยมากต่อรูปแบบการเจริญของ *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ P2 จากงานวิจัยของ Heipieper, Diefenbach และ Keweloh (1992) ก็ได้ผลในลักษณะดังกล่าว โดยพบว่าสารประกอบฟีนอลมีผลทำให้เยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรียทำหน้าที่บกพร่องในการควบคุมสารผ่านเข้าและออกจากเซลล์ ส่งผลต่อความมีชีวิต (viability) ของเซลล์ แต่ *Pseudomonas* sp. สายพันธุ์ P8 ยังคงเพิ่มจำนวนได้อย่างจำกัดในภาวะที่เติมคลอโรฟีนอลเข้มข้น 300 มก.ต่อลิตร เนื่องจากกลไกการปรับตัวของเชื้อโดยการเปลี่ยนรูปแบบไอโซเมอร์ของกรดไขมันที่อยู่ในชั้นเยื่อหุ้มเซลล์จาก ซีส เป็น ทรานส์ ซึ่งมีการเรียงตัวของกรดไขมันที่เป็นระเบียบกว่า มีผลลดการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเยื่อหุ้มเซลล์ ดังนั้นหน้าที่ของเยื่อหุ้มเซลล์จึงมีความผิดพลาดน้อยลง ซึ่งความสามารถของเชื้อต่อการปรับตัวเพื่อรักษาความมีชีวิตของเซลล์ในภาวะที่มีสารพิษนี้ จะมีความแตกต่างกันขึ้นอยู่กับประเภทของกรดไขมันที่เป็นองค์ประกอบของไขมันในชั้นเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์

จากการทดสอบความเป็นพิษของกรด 2-ไฮดรอกซี-3-แนฟโธอิกต่อการเจริญของแบคทีเรียสายพันธุ์ ANT1 พบว่าสารดังกล่าวยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเชื้อได้อย่างสมบูรณ์ จึงสามารถอธิบายผลการทดลองที่พบการลดจำนวนของแบคทีเรียสายพันธุ์ ANT1 ภายหลัง 48 ชั่วโมงที่เชื้อมีการเพิ่มจำนวนเซลล์ในอาหารเหลวที่มีแอนทราซีนเข้มข้น 100 มก.ต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน แสดงว่ากรด 2-ไฮดรอกซี-3-แนฟโธอิกเป็นสารมัธยันต์ชนิดมีพิษที่คงทนต่อการถูกย่อยสลายต่อไปเป็นสารอื่น (dead end metabolite) ในวิธีการย่อยสลายแอนทราซีนของ *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ ANT1 ซึ่งมีรายงานการสะสมของสารชนิดนี้ในวิถีเมตาบอลิซึมของแอนทราซีนโดย *Alcaligenes denitrificans* สายพันธุ์ WW1 (Weissenfels et al. , 1991) ในระหว่างการย่อยสลายแอนทราซีนโดย *Pseudomonas fluorescens* สายพันธุ์ 5RL (Sanseverino et al. , 1993) และในวิถีเมตาบอลิซึมที่ *Burkholderia cepacia* สายพันธุ์ F279 ใช้ในการย่อยสลายแอนทราซีน (Grifoll et al., 1995)

อย่างไรก็ตามมีแบคทีเรียบางสายพันธุ์ที่สามารถย่อยสลายกรด 2-ไฮดรอกซี-3-แนฟโธอิกได้ เช่นการเลี้ยงเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* ในภาวะที่มีแอนทราซีนเป็นแหล่งคาร์บอน โดยเชื้อดังกล่าวมีระบบเอนไซม์ที่จำเป็นในการออกซิไดส์กรด 2-ไฮดรอกซี-3-แนฟโธอิกไปเป็นกรดซาลิไซลิกและแคทีคอลลซึ่งจะถูกย่อยสลายต่อไปเป็นน้ำและคาร์บอนไดออกไซด์ตามลำดับ (Rogoff and Wender, 1957)

ในงานวิจัยนี้สามารถคัดแยกแบคทีเรียในสกุล *Sphingomonas* sp. ได้จากแหล่งดินภายในประเทศไทย โดยเชื้อนี้มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายแอนทราซีนและ PAHs ชนิดอื่น ๆ ได้หลายชนิด นับเป็นข้อได้เปรียบอย่างมากต่อการนำแบคทีเรียสายพันธุ์ ANT1 ไปใช้บำบัดดินที่ปนเปื้อน PAHs และสารพิษชนิดต่าง ๆ ในสิ่งแวดล้อม แต่จะต้องศึกษาถึงปัจจัยต่างๆ ที่มีผลต่อประสิทธิภาพในการย่อยสลายสารพิษและการอยู่รอดของแบคทีเรียสายพันธุ์ ANT1 ในระบบจำลองขนาดเล็ก (microcosm) ในระดับห้องปฏิบัติการก่อนที่จะนำไปใช้ในสิ่งแวดล้อมจริง แต่อย่างไรก็ตามจากการศึกษารูปแบบการเพิ่มจำนวนของเชื้อในสภาวะที่มีแอนทราซีนหรือฟลูออรีนเป็นแหล่งคาร์บอนพบการสะสมของสารมัธยันต์ 2 ชนิดที่มีผลยับยั้งการเพิ่มจำนวนของแบคทีเรียสายพันธุ์ ANT1 โดยสารตัวกลางที่พบในวิถีเมตาบอลิซึมของแอนทราซีนคือ กรด 2-ไฮดรอกซี-3-แนฟโธอิก ดังนั้นจึงควรมีการศึกษาเพิ่มเติมเพื่อให้สารตัวกลางทั้ง 2 ชนิดดังกล่าวถูกย่อยสลายต่อไปได้ โดยอาจใช้เชื้อที่อยู่ในรูปผสมระหว่างแบคทีเรียสายพันธุ์ ANT1 กับเชื้อที่สามารถย่อยสลายสารพิษที่เกิดจากการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของแอนทราซีนหรือฟลูออรีนได้ เพื่อให้วิถีเมตาบอลิซึมของ PAHs ทั้งสองชนิดดังกล่าวโดย *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ ANT1 เกิดได้อย่างสมบูรณ์

บทที่ 6

ข้อเสนอแนะในการวิจัย

6.1 การเตรียมหัวเชื้อโดยใช้เบนโซเอทเป็นแหล่งคาร์บอน ถ้าต้องการลดปริมาณเบนโซเอทภายในเซลล์ให้เหลือน้อยที่สุดหรือหมดไปก่อนที่จะนำสารละลายเซลล์มาใช้ศึกษารูปแบบการเพิ่มจำนวนของเชื้อในภาวะที่มี PAHs ชนิดต่าง ๆ เป็นแหล่งคาร์บอน ควรมีการปั่นแยกเซลล์ 2 ครั้ง ในขั้นแรกเพื่อแยกเซลล์ออกจากเบนโซเอท ล้างเซลล์แบคทีเรียด้วยสารละลาย 0.85 % โซเดียมคลอไรด์ นำมาปั่นเหวี่ยง 2 รอบ แขนวนลอยเซลล์ในสารละลาย 0.85 % โซเดียมคลอไรด์ ให้อากาศโดยนำมาวางบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 ° ซ เป็นเวลา 3 ชั่วโมงเพื่อให้แบคทีเรียใช้อาหารสะสมที่เหลืออยู่ภายในเซลล์ให้หมดไป แล้วจึงปั่นแยกเซลล์อีกครั้งในขั้นตอนสุดท้าย ก่อนที่จะเจือจางสารละลายเซลล์ให้มีค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร เท่ากับ 1.0 นำไปเขย่าบนเครื่องเขย่าด้วยอัตราเร็วเท่าเดิม เป็นเวลา 24 ชั่วโมงเพื่อให้แน่ใจว่าไม่มีอาหารสะสมอยู่ภายในเซลล์ของเชื้อ

6.2 เพื่อลดความเป็นพิษของกรด 2-ไฮดรอกซี-3-แนฟโธอิกต่อการเจริญของแบคทีเรียสายพันธุ์ ANT1 เมื่อมีแอนทราซีนเป็นแหล่งคาร์บอน ควรทดลองใช้เชื้อผสมระหว่าง *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ ANT1 และ สายพันธุ์ P2 ซึ่งอาจทำให้สารมัธยันต์นี้ถูกย่อยสลายต่อไปได้ เนื่องจากกรด 2-ไฮดรอกซี-3-แนฟโธอิกมีผลน้อยมากในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียสายพันธุ์ P2 มีรายงานวิจัยที่สนับสนุนข้อเสนอแนะดังกล่าว เช่น รายงานการทดลองของ Blasco และคณะ (1997) ซึ่งพบว่าการย่อยสลายโพลีคลอริเนทไบฟีนิลในดินปราศจากเชื้อที่มีเฉพาะ *Pseudomonas* sp. สายพันธุ์ LB400 ทำให้เกิดโปรโตอะนิโมนินซึ่งเป็นสารพิษที่มีผลลดจำนวนเชื้ออย่างรุนแรง (ประมาณ 1,000 เซลล์ต่อกรัมของดิน) เมื่อเปรียบเทียบกับ การทดลองในภาวะที่เติม *Pseudomonas* sp. สายพันธุ์ LB400 ลงในดินที่ไม่ได้ฆ่าเชื้อ พบว่าสารมัธยันต์ชนิดนี้มีผลน้อยมากในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียสายพันธุ์ LB400 แสดงว่าสารตัวกลางดังกล่าวถูกย่อยสลายต่อไปโดยเชื้อที่อยู่ในดิน

6.3 จากการศึกษาเบื้องต้นถึงความสามารถของ *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ ANT1 ในการย่อยสลายแอนทราซีนและ PAHs ชนิดอื่น พบว่านอกจากเชื้อจะใช้พีแนนทรีน ไดเบนโซฟูแรน ฟลูออรีน และแนพทาลีนในการเจริญได้แล้ว ยังสามารถใช้ไพรีนและฟลูออแรนีนซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลสูงได้ แต่กระบวนการย่อยสลายเกิดได้ช้ามากเนื่องจากพบลักษณะการเปลี่ยนสีของอาหารเหลวในวันที่ 7 ของการเลี้ยงเชื้อ ถ้าต้องการเพิ่มประสิทธิภาพในการย่อยสลาย PAHs ทั้งสองชนิดดังกล่าวของแบคทีเรียสายพันธุ์ ANT1 ควรใช้ประโยชน์จากกระบวนการโคเมตาบอลิซึม

เพื่อให้เกิดการย่อยสลายของสารที่ถูกย่อยสลายได้ยากโดยมีสารอื่นเป็นแหล่งคาร์บอนในการเจริญของเชื้อ เช่นเติมฟลูออแรนธินหรือไพรีนร่วมกับพีแนนทรินซึ่งเชื้อใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในการเพิ่มจำนวนได้ดีที่สุด ศึกษารูปแบบการเพิ่มจำนวนและประสิทธิภาพของเชื้อในการย่อยสลายสารทดสอบเปรียบเทียบกับชุดควบคุม

6.4 มีตัวอย่างรายงานวิจัยที่เสนอวิธีทดสอบความเป็นพิษของสารมัธยันต์ต่อการเจริญของเชื้อ ซึ่งอาจนำมาใช้ทดสอบความเป็นพิษของสารมัธยันต์ที่เกิดจากการย่อยสลายแอนทรา-ซีนหรือฟลูออรีนต่อการเจริญของแบคทีเรียชนิดต่าง ๆ ได้ เช่นงานวิจัยที่เสนอโดย Schmidt และ Fortnagel ในปี 1998 เกี่ยวกับความเป็นพิษของ 1,2,4- ไตรไฮดรอกซีเบนซีน (1,2,4-trihydroxybenzene) ซึ่งเกิดจากการย่อยสลายของ 4-ไฮดรอกซีไดฟีนิลอีเธอร์ (4-hydroxydiphenylether) หรือ 4,4'-ไดไฮดรอกซีไดฟีนิลอีเธอร์ (4,4'-dihydroxydiphenyl ether) โดย *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ SS3 สาร 1,2,4-ไตรไฮดรอกซีเบนซีนที่มีความเข้มข้นสูงกว่า 88 ไมโครโมลาร์มีผลยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียสายพันธุ์ SS3 ได้อย่างสมบูรณ์ ติดตามการเจริญของเชื้อโดยดูผลจากปฏิกิริยารีดักชันของเมทิลีนบลู (methylene blue) เปรียบเทียบระหว่างหลอดทดลองที่เติม 1,2,4-ไตรไฮดรอกซีเบนซีนกับชุดควบคุมที่ไม่เติมสารทดสอบ นำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร พบว่าในหลอดทดลองที่เติม 1,2,4-ไตรไฮดรอกซีเบนซีนมีค่า OD₆₆₀ ค่อนข้างคงที่ตลอดระยะเวลา 20 นาทีที่ทดสอบแสดงว่าสารชนิดนี้มีผลยับยั้งการเพิ่มจำนวนเซลล์ของ *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ SS3 ทำให้ไม่เกิดปฏิกิริยารีดักชันของเมทิลีนบลู ส่วนในหลอดทดลองที่ไม่เติมสารทดสอบมีค่า OD₆₆₀ ลดลงจาก 0.6 เป็น 0.1 ในช่วงเวลา 10 – 15 นาทีของการทดลอง แสดงว่ามีการเพิ่มจำนวนเซลล์ของเชื้อภายใน 10 นาที มีผลให้เมทิลีนบลูเกิดรีดักชันไปเป็นสารที่ไม่มีสี ค่าการดูดกลืนแสงจึงมีค่าลดลง การที่ไม่สามารถตรวจพบเอนไซม์ NAD(P)H – dependent reductase (เกี่ยวข้องกับกลไกการลดความเป็นพิษของสารไฮดรอกซีไฮโครควิโนน) แสดงว่า 1,2,4-ไตรไฮดรอกซีเบนซีนหรือไฮดรอกซีควิโนนที่เกิดจากปฏิกิริยา autooxidation ของสารดังกล่าวจะไม่ถูกย่อยสลายได้ต่อไปและมีผลยับยั้งการเจริญของ *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ SS3 โดยมีผลทำลายดีเอ็นเอ (Li and Trush, 1993 ; Zhang *et al.* , 1993 อ้างถึงโดย Schmidt and Fortnagel, 1998) หรือมีผลทำลายเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรีย (Smith, 1988 อ้างถึงโดย Schmidt and Fortnagel, 1998) แต่คาดว่า 1,2,4-ไตรไฮดรอกซีเบนซีนน่าจะมีผลในการทำลายเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรียสายพันธุ์ SS3 ได้มากกว่าทำลายดีเอ็นเอ เนื่องจากพบว่าสารทดสอบในปริมาณต่ำเพียง 20 ไมโครโมลาร์ก็มีผลยับยั้งปฏิกิริยารีดักชันของเมทิลีนบลูได้ค่อนข้างสมบูรณ์

รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

- จินตนา สายวรรณ, ผศ.ดร. 2541. การศึกษาพอลิไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนจากอนุภาคไอเสียรถยนต์ที่อยู่ในอากาศในกรุงเทพมหานคร. ในรายงานฉบับสมบูรณ์. วิทยาลัยปิโตรเลียมและปิโตรเคมี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- บุญยง โฉ่ห้วงศ์วัฒน์. 2540. ออย่าทิ้งขยะอันตราย. วารสารโรงงาน. ปีที่ 15. ฉบับที่ 1. ตุลาคม 2539-มกราคม 2540.
- นราธิป เลหาดีรานนท์. 1997. ฐานข้อมูลกากของเสียอันตรายในเขตกรุงเทพมหานคร Thai Environment Engineering J. 10 : 26 – 30.
- ณัฐพันธ์ สุภกา. 2542. ความสามารถของแบคทีเรียดินที่คัดเลือกได้ในการย่อยสลายพีแนทรีนและพอลิไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนชนิดอื่น. วิทยานิพนธ์ปริญญาโทมหาบัณฑิต ภาควิชาจุลชีววิทยา บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- พระราชบัญญัติวัตถุอันตราย พ.ศ.2535.
- พระราชบัญญัติส่งเสริมและรักษาคุณภาพสิ่งแวดล้อมแห่งชาติ พ.ศ.2535
- พระราชบัญญัติโรงงาน พ.ศ.2535.
- สำนักนโยบายและวางแผนสิ่งแวดล้อม. 2537. รายงานสถานการณ์คุณภาพสิ่งแวดล้อม. พ.ศ. 2537 : 135-137.
- ศรัลยา แพงไทร. 2543. การย่อยสลายทางชีวภาพของพอลิไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนโดยแบคทีเรียที่ออกซิไดซ์อะซีแนฟลิซีน. วิทยานิพนธ์ปริญญาโทมหาบัณฑิต ภาควิชาจุลชีววิทยา บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- สินธุ์ชัย แก้วกิตชัย, อารี สุขประเสริฐ, วิไลลักษณ์ อิมอุดม, วิทยา จันทสูตร และ พาลภา สิงห์เสนี. 2530. พิษวิทยา เล่ม 1 หลักการทั่วไปและสารพิษ. เรียบเรียงครั้งที่ 1. กรุงเทพมหานคร. คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ภาษาอังกฤษ

- Agency for toxic substances and disease registry (ASTDR). 1996. Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) . Available : [http : //chrom.tutms.tut.ac.ip/JINNO/Database/02 anthracene.html](http://chrom.tutms.tut.ac.ip/JINNO/Database/02 anthracene.html).
- Akhtar, M. N. , Boyd, D. R. and Thompson, N. J. 1975. Absolute stereochemistry of the dihydroanthracene - *cis* - and - *trans* – 1,2 – diols produced from anthracene by mammals and bacteria. J. C. S. Perkin I. p. 2506 – 2511.
- Altschul, S. F. , Madden, T. L. , Schaffer, A. A. , Zhang, J. , Zhang, Z. , Miller, W. and Lipman, D. J. 1997. Gapped Blast and PSI-BLAST : a new generation of protein database search programs. Nucleic Acids Res. 25 : 3398-3402.
- Amagai, T. , Takahashi, Y. , Matsushita, H. , Morknoy, D. , Sukasem, P. and Tabucanon, M. 1999. A survey on polycyclic aromatic hydrocarbon concentrations in soil in Chiang Mai, Thailand. [On line]. Abstracts from : Citation Database
- Amann, R. I. , Ludwig, W. and Schleifer, K. H. 1995. Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells cultivation. Microbiol. Rev. 59 : 143-169.
- Ames, N. B. , McCann, J. and Yamasaki, E. 1975. Methods for detecting carcinogens and mutagens with *Salmonella*/mammalian – microsome mutagenicity test. Mutation Research. 31 : 347 – 364.
- Baeker, S. O. , Field, R. A. , Goldstone, M. E. , Kirk, P. W. , Lester, J. N. and Perry, R. 1991. A review of atmospheric polycyclic aromatic hydrocarbons, sources, fate and behavior. Water, Air and Soil Pollute. 60 : 279 - 300.
- Baker, K. H. and Herson, D. S. 1994. Microbiology and biodegradation in : Baker, K. H. and Herson, D. S. Bioremediation. Chapter 2. New York : McGraw-Hill, Inc.
- Bartels, I. , Knackmuss, H. J. and Reineke, W. 1984. Suicide inactivation of catechol-2,3 dioxxygenase from *Pseudomonas putida* mt-2 by 3-chlorocatechols. Appl. and Environ. Microbiol. vol. 47. 3 : 500 – 505.
- Bauer, J. E. and Capone, D. G. 1986. Degradation and mineralization of the polycyclic

- aromatic hydrocarbons anthracene and naphthalene in intertidal marine sediments. Appl. and Environ. Microbiol. 50 : 81 – 90.
- Bauer, J. E. and Capone, D. G. 1988. Effect of co – occurring aromatic hydrocarbons on degradation of individual polycyclic aromatic hydrocarbons in marine sediment slurries. Appl. and Environ. Microbiol. 54 : 1649 – 1655.
- Behymer, T. D. and Hites, R. A. 1985. Photolysis of polycyclic aromatic hydrocarbons adsorbed on stimulated atmosphere particles. Environ. Sci. Technology. 19 : 1004 – 1006.
- Bennet, D. , Girling, A. E. and Bounds, A. 1990. Ecotoxicology of oil products : preparation and characterization of aqueous test media. Chemosphere. 21 : 659 – 669.
- Bezalels, L. , Hadar, Y. , Fu, P. P. , Freeman, J. P. and Cerniglia, C. E. 1996. Initial oxidation products in the metabolism of pyrene, anthracene, fluorene and dibenzothiophene by the white rot fungus *Pleurotus ostreatus*. Appl. Environ. Microbiol. 62 : 2554 – 2559.
- Blasco, R. , Mallararapu, M. , Wittich, R. , Timmis, K. N. and Pieper, D. H. 1997. Evidence that formation of protoanemonin from metabolites of 4-chlorobiphenyl degradation negatively effect the survival of 4-chlorobiphenyl – cometabolizing microorganisms. Appl. and Environ. Microbiol. vol. 63. 2 : 427 – 434.
- Boese, B. L. , Ozretich, R. J. , Lamberson, J. O. , Cole, P. A. , Swartz, R. C. and Ferraro, S. D. 2000. Phototoxic evaluation of marine sediments collected from a polycyclic aromatic hydrocarbons – contaminated site. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 38 : 274 – 282.
- Boonchan, S. , Britz, M. L. and Stanley, G. A. 2000. Degradation and mineralization of high – molecular – weight PAHs by defined fungal – bacterial cocultures. Appl. and Environ. Microbiol. 66 : 1007 – 1019.
- Boonyatumanond, R. 1999. Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in water samples by using high performance liquid chromatography. Master's thesis. Department of Applied Analytical and Organic Chemistry. Faculty of Graduate

Studies. Mahidol University.

- 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 co – metabolism. Appl. Microbiol. and Biotechnol. 43 : 156 – 164.
- Bouchez, M. , Blanchet, D. and Vandecasteele. 1996. The microbiological fate of PAHs : carbon and oxygen balances for bacterial degradation of model compounds. Appl. Microbiol. Biotechnol. 45 : 556 – 561.
- Bouwer, E. J. and Zehnder, A. J. B. 1993. Bioremediation of organic compounds – putting microbial metabolism to work. Tibtech. vol. 11.
- Bu – Abbas, A. , Ioannides, C. and Walker, R. 1994. Evaluation of the antimutagenic potential of anthracene : *in vitro* and *ex vivo* studies. Mutation Research. 309 : 101 – 107.
- Bunz, P. V. , Buck, M. , Hebenbrock, S. and Fortnagel, P. 1999. Stability of mutations in a *Sphingomonas* strain. Can. J. Microbiol. 45 : 404 – 407.
- Calder, J. A. and Lader, J. H. 1976. Effect of dissolved aromatic hydrocarbons on the growth of marine bacteria in batch culture. Appl. and Environ. Microbiol. vol. 32. 1 : 95 – 101.
- Campanella, B. and Perrin, D. 1997. Evaluation of anthracene toxicity on plants. Development of two biotests to measure the absorption of anthracene by transformed roots of *Calystegia sepium* (L) Brown and *Medicago sativa*.
[On line]. available : [http : // www.bib.fsagx.ac.be](http://www.bib.fsagx.ac.be)
- Cerniglia, C. E. 1992. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. Biodegradation. 3 : 351 – 368.
- Cerniglia, C. E. , Morgan, J. C. and Gibson, D. T. 1979. Bacterial and fungal oxidation of dibenzofuran. Biochem. J. 180 : 175 – 185.
- Charles. A. M. , Bonnie, B. P. 1992. Exposure to the carcinogenic polynuclear aromatic hydrocarbon in the environment. Environ. Sci. Technol. 26(7).
- Civilini, M. , de Bertoldi, M. and Tell, G. 1999. Molecular characterization of

- Pseudomonas auruginosa* 2NR degrading naphthalene. Let. In Appl. Microbiol. 29 : 181 – 186.
- Claxton, L. D. , Huck, V. S. , Williams, R. and Kremer, P. 1991. Effect of bioremediation on the mutagenicity of oil spill in Prince William Sound, Alaska. Chemosphere. 23 : 647 – 650.
- Collins, P. J. , Kotterman, M. J. J. , Field, J. A. and Dobson, A. D. W. 1996. Oxidation of anthracene and benzo[a]pyrene by laccases from *Trametes versicolor*. Appl. Microbiol. Biotech. 62 : 4563 – 4567.
- Dasappa, S. M. and Loch, R. C. 1991. Toxicity reduction in contaminated soil bioremediation process. Water Research. 25 : 1121 – 1130.
- Dagher, F. , Deziel. E. , Lirette, PI , Daguette, G. , Bisailon, J – G. and Villemur, R. 1997. Comparative study of five polycyclic aromatic hydrocarbon degrading bacterial strains isolated from contaminated soils. Can. J. Microbiol. 43 : 368 – 377.
- Eaton, S. L. , Resnick, S. M. and Gibson, D. T. 1996. Initial reactions in the oxidation of 1,2 – dihydroxynaphthalene by *Sphingomonas yanoikuyae* strains. Appl and Environ. Microbiol. vol 62. 12 : 4385 – 4394.
- Ellis, B. , Harold, P. and Kronberg, H. 1991. Bioremediation of a creosote contaminated site. Environ. Technol. 12 : 447 – 459.
- Evans, W. C. , Fernley, H. N. and Giffiths, E. 1965. Oxidative metabolism of phenanthrene and anthracene by soil *pseudomonas* : the ring fission mechanisms. Biochem.J. 95 : 819 – 831.
- Field, J. A. , Boelsma, F. , Baten, H. and Rulkens, W. H. 1995. Oxidation of anthracene in water / solvent mixtures by the white – rot fungus, *Bjerrinckia* sp. strain BOS55. Appl. Microbiol. Biotech. 144 : 234 – 240.
- Foght, J. M. , Fedorak, P. M. and Westlake, D. W. S. 1990. Mineralization of [¹⁴C] naphthalene and [¹⁴C]phenanthrene in crude oil : specificity among bacterial isolates. Can. J. Microbiol. 36 : 169-175.

- Fox, M. A. and Olive, S. 1979. Photooxidation of anthracene on atmospheric particulate matter. Science. 205 : 582 – 583.
- Fredrickson, J. K. , Balkwill, D. L. , Drake, G. R. , Rominine, M. F. , Ringelberg, D. B. and White, D. C. 1995. Aromatic – degrading *Sphingomonas* isolates from the deep subsurface. Appl and Environ. Microbiol. vol 61. 5 : 1917 – 1922.
- Goyal. A. K. and Zylstra, G. J. 1996. Molecular cloning of novel genes for polycyclic aromatic hydrocarbon degradation from *Comamonas testosteroni*. Appl. Env. Microbiol. 62 : 230 – 236.
- Grifoll, M. , Cadellas, M. , Bayona, M. J. and Solanas, A. M. 1992. Isolation and characterization of fluorene – degrading bacteria : identification of ring oxidation and ring fission products. Appl. Environ. Microbiol. 58 : 2910 – 2917.
- Grifoll, M. , Selifonov, S. A. , Gatlin, C. V. and Chapman, P. J. 1995. Action of versatile fluorene – degrading bacterial isolated on polycyclic aromatic compounds. Appl. Environ. Microbiol. 61 : 3711 – 3723.
- Hammel, K. E. , Green, B. and Gai, W. Z. 1991. Ring fission of anthracene by a eukaryote. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 88 : 10605 – 10608.
- Harms, H. , Wilkes, H. I. , Wittich, R-M. and Fortnagel, P. 1995. Metabolism of hydroxydibenzofurans , methoxydibenzofurans, acetoxydibenzofurans and nitrodibenzofurans by *Sphingomonas* sp. strain HH69. Appl. Environ. Microbiol. 61 : 2409 – 2505.
- Heipieper, H. , Diefenbach, R. and Keweloh, H. 1992. Conversion of *cis* unsaturated fatty acid to *trans*, a possible mechanism for the protection of phenol–degrading *Pseudomonas putida* P8 from substrate toxicity. Appl. and Environ. Microbiol. vol. 58. 6 : 1847 – 1852.
- Heitkamp, M. A. and Cerniglia, C. E. 1988. Mineralisation of polycyclic aromatic hydrocarbons by a bacterium from sediment below an oil field. Appl. and Environ. Microbiol. 54 : 1612 – 1614.
- Heitzer, A. and Sayler, G. S. 1993. Monitoring the efficacy of bioremediation. Tibtech. vol. 11. P.334- 343.

- Jerina, D. M. , Selander, H. , Yani, H. , Wells, M. C. , Davey, J. F. , Mahadevan, V. and Gibson, D. T. 1976. Dihydrodiols from anthracene and phenanthrene. J. Am. Chem. Soc. 98 : 5988 – 5996.
- Juhasz, A. L. , Britz, M. L. and Stanley, G. A. 1997. Degradation of fluoranthene, pyrene, benz[*a*]anthracene and dibenz[*a,h*]anthracene by *Borkholderia cepacia*. J. of Appl. Microbiol. 83 : 189 – 198.
- Kastner, M. , Streibich, S. , Beyrer, M. , Richnow, H. H. and Fritsche, W. 1999. Formation of bound residues during microbial degradation of [¹⁴C]anthracene in soil. Appl. and Environ. Microbiol. 65 : 1834 – 1842.
- Kasuga, K. , Nojiri, H. , Yamane, H. , Kodama, T. and Omori, T. 1997. Cloning and characterization of the genes involved in the degradation of dibenzofuran by *Terrabacter* sp. strain DBF63. J. of Fer. and Bioeng. 84(5) : 387 – 399.
- 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, H. , Nagao, K. and Yana, K. 1982. Rapid screen for bacteria degrading water-insoluble solid hydrocarbons on agar plates. Appl and Environ. Microbiol. 43 : 454 – 457.
- Kotterman, M. J. J. , Heessels, E. , Jong, E. and Field. J. A. 1994. The physiology of anthracene biodegradation by the white - rot fungus *Bjerkandera* sp. strain BOS55. Appl. Microbiol. Biotech. 42 : 179 – 186.
- Krivobok, S. , Miriouchkine, R. , Murandi, F. S. and Benoit – Guyod, J. L. 1998. Biodegradation of anthracene by soil fungi. Chemosphere. Vol. 37. 3 : 523 – 530.
- LaVoie, E. J. and Rice, J. E. 1988. Structure – activity relationships among tricyclic polynuclear aromatic hydrocarbons. p. 151 – 170. In Yang, S. K. and Silverman, B. D. Polycyclic aromatic hydrocarbon carcinogenesis : structure – activity relationships. vol. I. Florida : CRC Press, Inc.
- Lee, S. 1995. Bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbon – contaminated soil.

United States Patent. Patent No. : 5, 427,944.

- Lewis, R. J. 1991. Evaluation of implanted materials for carcinogenic potential. in Carcinogenically active chemically : a reference guide. Copyright 1991. Van Nostrand Reinhold. U.S.A.
- Lijinsky, W. and Shubik, P. 1964. Benzo[a]pyrene and other polycyclic hydrocarbons in charcoal – broiled meat. Science. 145 : 53 – 55.
- Mahaffey, W. R. , Gibson, D. T. and Cerniglia, C. E. 1988. Bacterial oxidation of chemical carcinogens : formation of polycyclic aromatic acids from benz[a]anthracene. Appl. and Environ. Microbiol. vol. 54. 10 : 2415 – 2423.
- Marks, R. E. , Field, S. D. , Wojtanowicz. and Britenbeck, G. A.1992. Biological treatment of petrochemical wastes for removal of hazardous polynuclear aromatic hydrocarbon constituents. Water Sci. Tech. 3 : 213 – 220.
- Matthew, B. M. , Cindy, H. N. and Loring, N. 2000. Development of catechol 2,3-dioxygenase-specific primers for monitoring bioremediation by competitive quantitative PCR. Appl. and Environ. Microbiol. p. 678-683.
- McKinney, R. A. , Pruell, R. J. and Burgess, R. M. 1999. Ratio of the concentration of anthraquinone to anthracene in coastal marine sediments. Chemosphere. vol. 38. 10 : 2415 – 2430.
- Menn, F. M. , Applegate, B. M. , Saylor, G. S. 1993. Nah - plasmid – mediated catabolism of anthracene and phenanthrene to naphthoic acids. Appl. and Environ. Microbiol. 59 : 1938 – 1942.
- Moretti, C. J. and Neufeld, R. D. 1989. Polycyclic aromatic hydrocarbons partitioning mechanisms with activated sludge. Water. Res. vol. 23. 93 – 102.
- Mueller, J. G. , Chapman, P. J. , Blattmann, B. O. and Pritchard, P. H. 1989. Action of a fluoranthene-utilizing bacterial community on polycyclic aromatic hydrocarbon components of creosote. Appl. and Environ. Microbiol. 55 : 3085 – 3090.
- Mueller, J. G. , Chapman, P. J. , Blattmann, B. O. and Pritchard, P. H. 1990. Isolation and characterization of a fluoranthene-utilizing strain of *Pseudomonas paucimobilis*. Appl. and Environ. Microbiol. 56 : 1079 – 1086.

- Palleroni, N. J. 1984. Gram-negative aerobic rod and cocci, p 140-199. in. N. R. Krieg and J. G. Hott(ed.). Burgey's Manual of Systematic Bacteriology. vd. 1. The William & Wikins Co. , Baltimore, Md.
- Putcha, R. V. and Domach, M. M. 1993. Fluorescence monitoring of polycyclic aromatic hydrocarbon degradation and effect of surfactants. Environmental Progress. 12 (2) : 81 – 85.
- Rao, G. S. 1996. Glutathionyl hydroquinone : a potent pro-oxidant and a possible toxic of benzene. Toxicology. 106 : 49 – 54.
- Rockne, K. J. , Chee-Sanford, J. C. , Sandford , R. A. , Hedlund, B. P. , Staley, J. T. and Strand, S. E. 2000. Anaerobic naphthalene degradation by microbial pure cultures under nitrate-reducing conditions. Appl. and Environ. Microbiol. 66 (4) : 1595 – 1601.
- Rogoff. M. H. and Wender, I. 1957. 3-Hydroxy-2-naphthoic acid as an intermediate in bacterial dissimilation of anthracene. J. Bacteriol. 74 : 108 –109.
- Rosazza, J. P. and Smith, R. V. 1979. Microbial models for drug metabolism. Adv. Appl. Microbiol. 25 : 169 – 208.
- Sack, U. and Gunther. T. 1993. Metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons by fungi and correlation with extracellular enzymatic activities. J. Basic. Microbiol. 33 : 269 – 277.
- Sanseverino, J. , Applegate, B. M. , Kina, J. M. H. and Sayler, G. S. 1993. Plasmid-mediated mineralization of naphthalene, phenanthrene and anthracene. Appl. and Environ. Microbiol. 59 : 1931 –1937.
- Savino. A. and Lollini, M. N. 1977. Identification of some fermentation products of phenanthrene in microorganisms of the genus *Arthrobacter*. Bull. Soc. Ital. Biol. Sper. 53 : 916 – 921.
- Schmidt, S. and Fortnagel. P. 1998. Catabolism of 4-hydroxy – and 4,4'-dihydroxydiphenyl ether by *Sphingomonas* sp. strain SS3 leads to the production of a toxic metabolite. Microbiol. Res. 153. 331 – 335.
- Selifonov, S. A. , Slep'en'kin, A. V. , Adanin, V. M. , Nefedova, M. Y. and Starovoitov, I. I.

1991. Oxidation of dibenzofuran by pseudomonads harboring plasmids for naphthalene degradation. Microbiology. 60 : 714 –717.
- Sikkema, J. , Poolman, B. , Jonings, W. W. and de Bont, J. A. M. 1992. Effects of the membrane action of tetralin on the functional and structural properties of artificial and bacterial membranes. J. Bacteriol. 174 : 2986 – 2997.
- Sikkema, J. , de Bont, J. A. M. and Poolman, B. 1995. Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. Microbiological Reviews. Vol. 59. 2 : 201 – 222.
- Stillwell, L. C. , Thurston, S. J. , Schneider, R. P. , Romine, M. F. , Fredrickson, J. K. and Salfev, J. D. 1995. Physical mapping and characterization of a catabolic plasmid from the deep-subsurface bacterium *Sphingomonas* sp. strain F119. J. Bacteriol. 177 : 4537 – 4539.
- Stucki, G. and Alexander. 1987. Role of dissolution rate and solubility in biodegradation of aromatic compounds. Appl. and Environ. Microbiol. 53 (2) : 292 – 297.
- Sutherland, J. B. , Rafii, F. , Khan, A. A. and Cerniglia, C. E. 1995. Mechanisms of PAHs degradation. P. 269 – 306. in Young, L. Y. and Cerniglia, C. E. (ed.). Microbial transformation and degradation of toxic organic chemicals. Wiley-Liss, Inc. , New York, N. Y.
- Swartz, R. C. , Schulls, D. W. , Ozretich, R. J. , Lamberson, J. O. , Cole, F. A. , DeWitt, T. H. , Redmond, R. S. and Ferraro, S. P. 1995. Σ PAH : a model to predict the toxicity of polynuclear aromatic hydrocarbons mixtures in field-collected sediments. Environ. Toxicol. Chem. 14 : 1977 – 1987.
- Swoboda-colberg, N. G. 1995. Chemical contamination of the environment : sources, types and fate of synthetic organic chemicals. p. 27 – 74. in. Yong, L. Y. and Cerniglia, C. E. Microbial transformation and degradation of toxic organic chemicals. A John Wiley & Sons, INC. Publication.
- The New Jersey State Department of Health and Senior Service.1998.
- RTK-HARZADOUS SUBSTANCE FACTSHEET (Tri database). Available from www.rtk.net ; INTERNET.
- Timmis, K. N. and Pieper, D. H. 1999. Bacteria designed for bioremediation. Tibtech.

17 : 201 – 204.

- Tongpim, S. and Pickard, M. A. 1996. Growth of *Rhodococcus* S1 on anthracene. Can. J. Microbiol. 42 : 289 – 294.
- Tongpim, S. and Pickard, M. A. 1999. Cometabolic oxidation of phenanthrene to phenanthrene *trans*-9,10-dihydrodiol by *Mycobacterium* strain S1 growing on anthracene in the presence of phenanthrene. Can. J. Microbiol. 45 : 369 – 376.
- Venchueren, K. 1996. Handbook of environmental data on organic chemicals. 3rd ed. New York : Van Nostrand Reinhold.
- Vo-Dinh, T. 1989. Chemical analysis of polycyclic aromatic compounds. John Wiley & Sons, Inc.
- Walter, V. , Beyer, M. , Klein, J. and Rehm, H. J. 1991. Degradation of pyrene by *Rhodococcus* sp. UW1. Appl. Microbiol. Biotechnol. 34 : 671 – 676.
- Wang, Y. , Fengkai, L. , Zhulu, L. , Zheng, X. and Yubin, T.1999. Photolysis of anthracene and chrysene in aquatic systems. Chemosphere. 38 : 1273 – 1278.
- Weissenfels, W. D. , Beyer, M. and Klein, J. 1990. Degradation of phenanthrene, fluorene and fluoranthene by pure bacterial cultures. Appl. Microbiol. Biotech. 32 : 479 – 484.
- Weissenfels, W. D. , Beyer, M. , Klein, J. and Rehm, H. J. 1991. Microbial metabolism of fluoranthene : isolation and identification of ring fission products. Appl Microbiol. Biotech. 34 : 528 – 535.
- Wiesel, I. , Wiibker, J. M. and Rehm. H. J. 1993. Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by an immobilized mixed bacterial culture. Appl. Microbiol. Biotech. 39 : 110 – 116.
- Wiggins, B.A. and Alexander, M. 1988. Role of chemical concentration and second carbon sources in acclimation of microbial communities for biodegradation. Appl. and Environ. Microbiol. 54 (11) : 2803 – 2807.
- Wilson, S. C. and Jones, K. C. 1993. Bioremediation of soil contaminated with polynuclear aromatic hydrocarbons (PAHs) : a review. Environmental Pollution. 81 : 229 – 249.

Yabuchi, E. , Yano, I. , Oyaizu, H. . Hashimoto, Y. , Ezaki, T. and Yamamoto, H. 1990.

Proposals of *Sphingomonas paucimobilis* gen.nov and comb.nov.

Sphingomonas parapaucimobilis sp. nov. , *Sphingomonas yanoikuyae* sp. nov.,

Sphingomonas adhaesiva sp. nov. , *Sphingomonas capsulata* comb. nov. , and

two genospecies of the genus *Sphingomonas*. Microbiol. Immunol. 2 : 99-119.



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาคผนวก

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ก

สูตร และวิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Carbon-Free Mineral Medium (CFMM medium)

A)	ไดโซเดียมฟอสเฟตโดเดคาไฮเดรต ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)	5.5	กรัม
	โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)	0.8	กรัม
	แอมโมเนียมไนเตรต (NH_4NO_3)	3.0	กรัม

ละลายสารทั้ง 3 ชนิดในน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มล. ปรับความเป็นกรดต่าง (pH) เท่ากับ 7.6 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว (อุณหภูมิ 121°C) เป็นเวลา 20 นาที

B)	แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตาไฮเดรต ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	0.1	กรัม
	เฟอร์ริกคลอไรด์เฮกซะไฮเดรต ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)	0.05	กรัม
	แคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรต ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	0.05	กรัม

ละลายสารแต่ละชนิดในน้ำกลั่นปริมาตร 1 มล. และกรองผ่านแผ่นกรองที่ปราศจากเชื้อขนาด 0.22 ไมครอนเมตร สามารถเตรียมไว้ในรูปสารละลายที่มีความเข้มข้นสูง และเก็บที่อุณหภูมิ 4°C .

ผสมสารแต่ละชนิดในส่วน A และ B เขย่าให้เข้ากัน

2. อาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง Carbon-Free Mineral Medium (CFMM agar)

CFMM medium ส่วน A	1,000	มล.
แบคทีโอ อการ์ (bacto agar)	15	กรัม

นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว (อุณหภูมิ 121°C) เป็นเวลา 20 นาที และนำมาผสมกับ CFMM ส่วน B

3. อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Luria Bertani (LB medium)

ประกอบด้วย	ทริปโตน	10	กรัม
	สารสกัดจากยีสต์	5	กรัม
	โซเดียมคลอไรด์	5	กรัม

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่นปริมาตร 1 ลิตร ปรับ pH เป็น 7.2 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว (อุณหภูมิ 121 ° ซ) เป็นเวลา 20 นาที

4. อาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง Luria Bertani (LB agar)

ละลายวุ้นผง 15 – 20 กรัม ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB ปริมาตร 1 ลิตร ที่ปรับ pH เป็น 7.2 แล้วนำไปต้มให้ละลาย และนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว (อุณหภูมิ 121 ° ซ) เป็นเวลา 20 นาที

5. อาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับเตรียมหัวเชื้อของแบคทีเรียสายพันธุ์ ANT1 และ *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ P2

CFMM ส่วน A	1	ลิตร
เบนโซเอท	1	กรัม

นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว (อุณหภูมิ 121 ° ซ) เป็นเวลา 20 นาที และนำมาเติม CFMM ส่วน B เขย่าให้เข้ากัน

6. อาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับเตรียมหัวเชื้อของ *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1

CFMM ส่วน A	1	ลิตร
ซัคซิเนท	1	กรัม

นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว (อุณหภูมิ 121 ° ซ) เป็นเวลา 20 นาที และนำมาเติม CFMM ส่วน B เขย่าให้เข้ากัน

ภาคผนวก ข

สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

1. สารละลายแอนทราซีนในไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (anthracene in DMSO solution)

ชั่งแอนทราซีน 0.01 กรัม ละลายในไดเมทิลซัลฟอกไซด์ปริมาตร 1 มล. ผสมด้วยเครื่องปั่นผสมจนกระทั่งแอนทราซีนละลายหมด นำมากรองผ่านชุดกรองสำเร็จรูปปราศจากเชื้อแบบ PTFE * ที่มีขนาดรูกว้าง 0.20 ไมโครเมตร เก็บไว้ในขวดสีเข้มหรือหุ้มด้วยกระดาษฟอยด์ที่อุณหภูมิ -20° ซ. เพื่อป้องกันมิให้แอนทราซีนเกิดการสลายตัวโดยแสง

หมายเหตุ* นำหัวกรองที่หุ้มกระดาษฟอยด์และขวดทดลองที่จะใช้บรรจุสารละลายแอนทราซีนในไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (คล้ายเกลียวที่ฝาหลอด) ไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121° ซ. เป็นเวลา 20 นาที

2. สารละลาย PAHs ชนิดอื่น ในไดเมทิลซัลฟอกไซด์

สารละลายของ PAHs ชนิดอื่นนอกเหนือจากแอนทราซีน ที่ละลายในไดเมทิลซัลฟอกไซด์ ใช้วิธีเตรียมเช่นเดียวกับ ข้อ 1 แต่เพิ่มปริมาณสารเป็น 0.1 กรัมต่อมล. ของตัวทำละลาย เนื่องจากสารชนิดต่าง ๆ ดังกล่าวละลายได้ดีในไดเมทิลซัลฟอกไซด์

3. การเตรียมสารละลายไฮโดรคลอริกเข้มข้น 1 นอร์มัล (normal, N)]

$$\text{ใช้สูตร} \quad (Mm \div pd) \times 100 = x$$

M = ความเข้มข้นที่ต้องการ

m = มวลโมเลกุล

p = จำนวนเปอร์เซ็นต์ของสาร

d = ความหนาแน่นของสาร

x = ปริมาตร (มล.) ที่ได้ของสาร

และเติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 1,000 มล.(1,000 – x)

ต้องการเตรียมสารละลายกรดไฮโดรคลอริกที่มี M = 1 นอร์มัล, m = 36.5, p = 37%, d = 1.19

$$[(1 \times 36.5) \div (1.19 \times 37)] \times 100 = x$$

$$82.89 = x$$

เมื่อเติมน้ำกลั่น 1,000 – 82.89 = 917.11 มล. จะได้สารละลายของกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 1 นอร์มัล

4. สารละลายเมทานอลเข้มข้น 80 % (ปริมาตรต่อปริมาตร)

กรองเมทานอลผ่านแผ่นกรองชนิด FH ขนาดความกว้างของรู 0.5 ไมโครเมตร ดูดอากาศ (degas) ครั้งละ 15 นาที จำนวน 2 ครั้ง โดยใช้เครื่องกำเนิดเสียงความถี่สูง ร่วมกับเครื่องสูบลมอากาศ (pump) วัดปริมาตรของเมทานอล

กรองน้ำกลั่นชนิด DDW (Deionized Distillated Water) ผ่านแผ่นกรองที่มีขนาดความกว้างของรู 0.22 ไมโครเมตร ทำการดูดอากาศ 2 ครั้ง

ผสมเมทานอลและน้ำกลั่นที่ผ่านการดูดอากาศแล้วเข้าด้วยกัน โดยใช้อัตราส่วนของเมทานอลต่อน้ำเป็น 80 : 20 (ปริมาตรต่อปริมาตร) ดูดอากาศสารละลายเมทานอล 80 % ซ้ำอีกครั้งหนึ่ง หรือจนกว่าไม่สังเกตพบฟองอากาศ ปิดผนึกภาชนะที่บรรจุสารละลายดังกล่าวด้วยพาราฟิล์ม

5. สารมาตรฐาน PAHs สำหรับฉีด HPLC

ชั่ง PAHs 1 มก. ละลายในเมทานอลปริมาตร 1 มล. ผสมด้วยเครื่องปั่นผสมจน PAHs ละลายหมด นำมากรองผ่านชุดกรองสำเร็จรูปแบบ PTFE ที่มีขนาดรูกว้าง 0.20 ไมโครเมตร ปิดผนึกด้วยพาราฟิล์มและห่อด้วยกระดาษฟอยด์เพื่อป้องกันมิให้ PAHs เกิดการสลายตัวโดยแสง เก็บที่อุณหภูมิ -20° ซ.

6. สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ (10 mM NaOH)

ซิงโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.4 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 900 มล. ในขวดวัดปริมาตรขนาด 1 ลิตร เติมน้ำกลั่นให้ครบ 1 ลิตร

7. เอทิลอะซิเตตที่อิ่มตัวด้วยน้ำ (saturated ethylacetate)

ผสมเอทิลอะซิเตตและน้ำกลั่นเข้าด้วยกันในอัตราส่วน 100 : 100 (ปริมาตรต่อปริมาตร) ปิดด้วยกระดาษฟอยด์ นำไปเขย่าบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

8. สารละลายไดอะโซมีเทน (diazomethane)

ละลาย พารา-โทลูอินซัลโฟนิล-เอ็น-เมทิล-เอ็น-ไนโตรซามิด (*p*-toluenesulfonyl-*N*-methyl-*N*-nitrosamide) 5 กรัม ด้วยไดเอทิลอีเทอร์ปริมาตร 5 มล. โดยที่สารละลายดังกล่าวอยู่ในขวดทำปฏิกิริยาเคมีชนิดมีท่อระบายก๊าซ เช่ขวดทำปฏิกิริยาในอ่างน้ำแข็ง 5 นาที จากนั้นเติมสารละลายอิ่มตัวของโพแทสเซียมในเอทานอล 4 – 5 หยด ก๊าซที่เกิดขึ้นจากการทำปฏิกิริยาจะออกจากขวดทางท่อระบายก๊าซ ไปสะสมอยู่ในไดเอทิลอีเทอร์ซึ่งถูกบรรจุอยู่ในขวดสีเข้มและแช่อยู่ในอ่างน้ำแข็ง สามารถเก็บสารละลายนี้ไว้ได้ที่อุณหภูมิ -20°C . (ไม่เกิน 1 สัปดาห์)

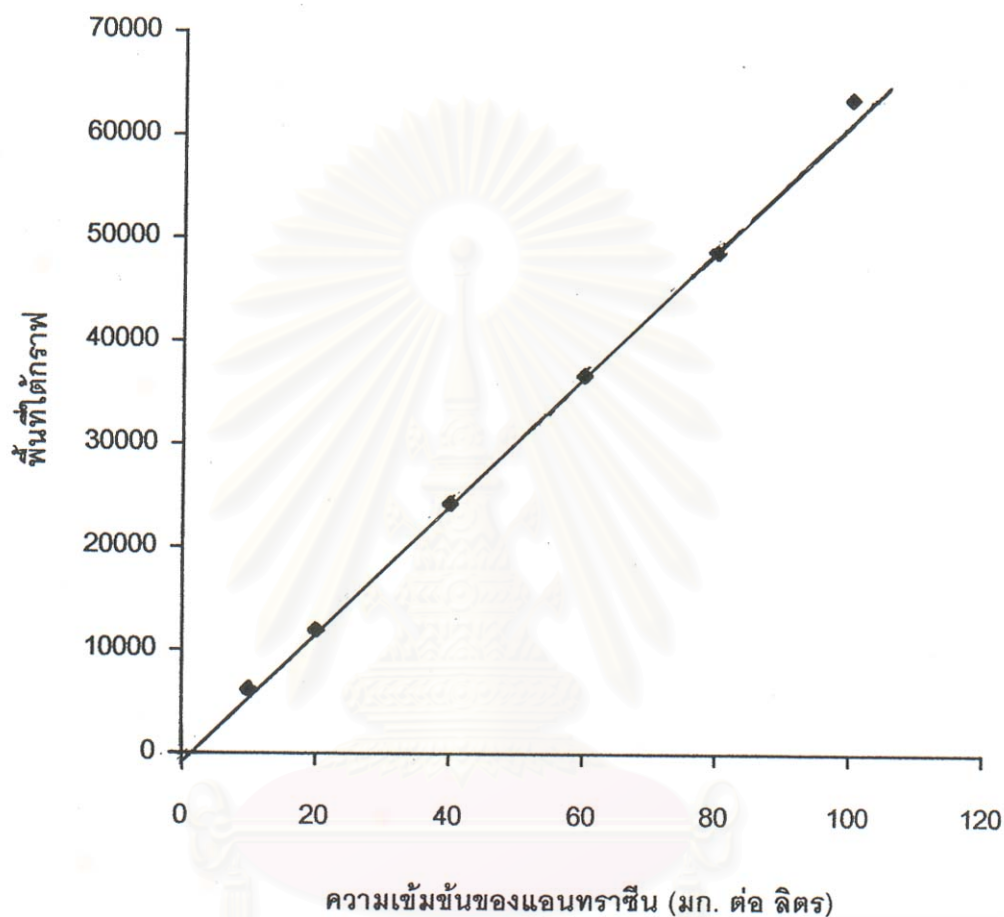
9. สารละลายของสารมัธยันต์ในไดเมทิลซัลฟอกไซด์

เติมสารละลายของสารมัธยันต์ในไดเมทิลซัลฟอกไซด์ ที่มีความเข้มข้น 0.1 กรัมต่อมล. ลงในหลอดทดลอง โดยที่ต้องการปริมาณสารเท่ากับ 0, 200, 400, 600, 800 และ 1,000 ไมโครกรัมต่อมล. ดังนั้นจะต้องดูดสารจาก stock solution เข้มข้น 0.1 กรัมต่อมล. ปริมาตร 0, 2, 4, 6, 8 และ 10 ไมโครลิตร ตามลำดับ

หมายเหตุ การเก็บสารละลายของสารมัธยันต์ในไดเมทิลซัลฟอกไซด์ไว้ที่อุณหภูมิ -20°C . จะทำให้สารดังกล่าวเกิดการสลายตัวด้วยแสง ดังนั้นจึงควรเตรียมสารใหม่ทุกครั้งที่ทำการศึกษาทดลอง

ภาคผนวก ค

1. กราฟมาตรฐานของแอนทราซีน



รูปที่ ค.1 กราฟมาตรฐานระหว่างปริมาณแอนทราซีนกับพื้นที่ใต้กราฟที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC

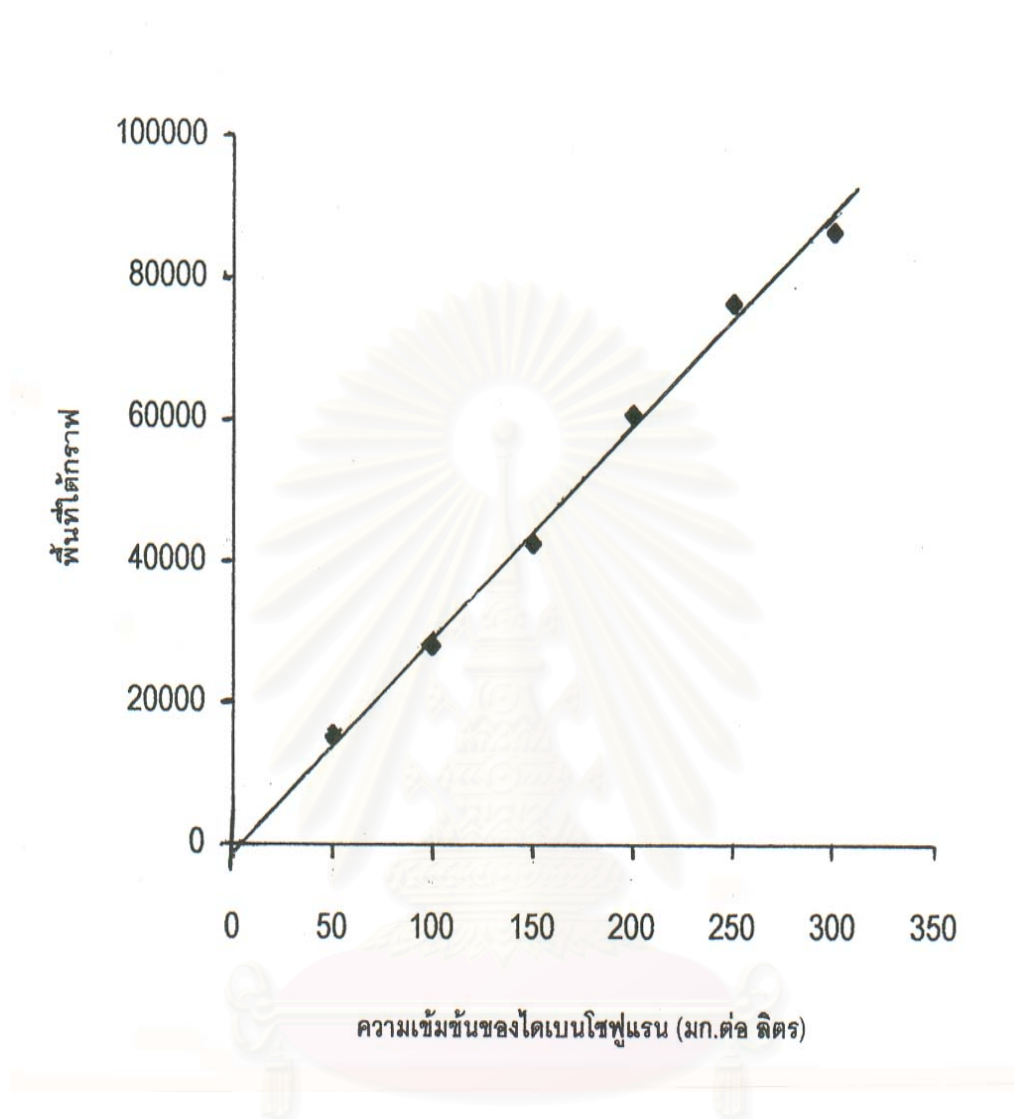
หาความเข้มข้นของแอนทราซีนได้จากการนำพื้นที่ใต้กราฟที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วย HPLC มาแทนค่าในสมการเส้นตรงดังนี้

$$\text{พื้นที่ใต้กราฟ} = (\text{ความชันของกราฟมาตรฐาน} \times \text{ปริมาณแอนทราซีน}) + \text{จุดตัดแกน Y}$$

$$\text{โดยที่} \quad \text{ความชันของกราฟมาตรฐาน} = 627.355$$

$$\text{จุดตัดแกน Y} = -415.599$$

2. กราฟมาตรฐานของไดเบนไซฟูแรน



รูปที่ ค.2 กราฟมาตรฐานระหว่างปริมาณไดเบนไซฟูแรนกับพื้นที่ใต้กราฟที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC

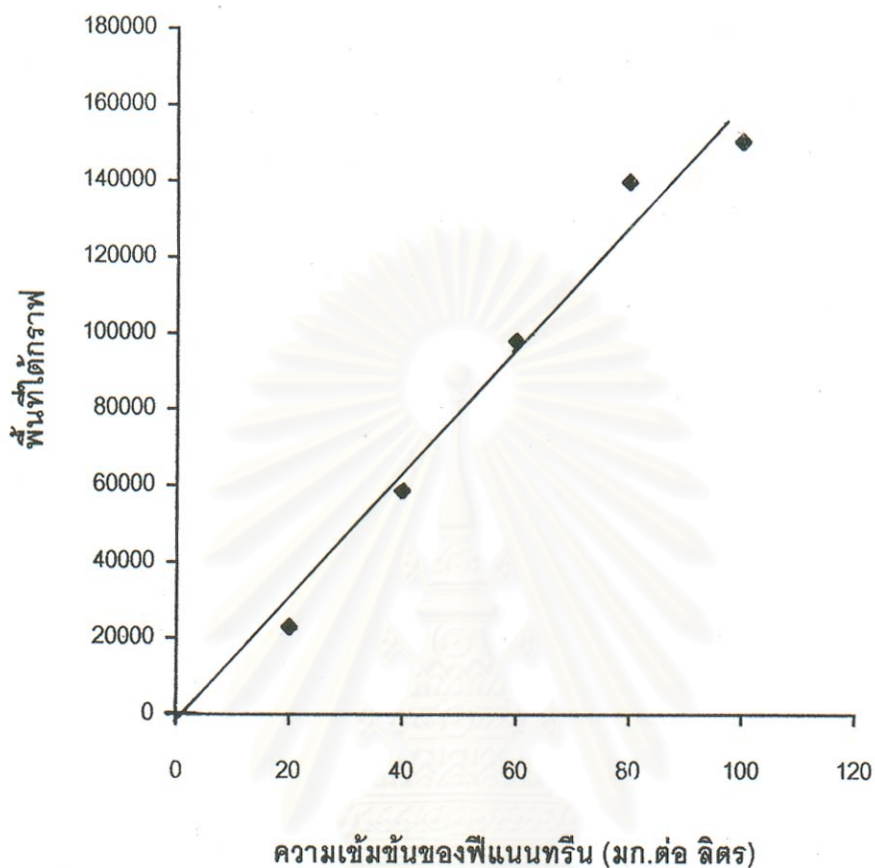
หาความเข้มข้นของไดเบนไซฟูแรนได้จากการนำพื้นที่ใต้กราฟที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วย HPLC มาแทนค่าในสมการเส้นตรงดังนี้

$$\text{พื้นที่ใต้กราฟ} = (\text{ความชันของกราฟมาตรฐาน} \times \text{ปริมาณไดเบนไซฟูแรน}) + \text{จุดตัดแกน Y}$$

$$\text{โดยที่} \quad \text{ความชันของกราฟมาตรฐาน} = 295.7207$$

$$\text{จุดตัดแกน Y} = -114.536$$

3. กราฟมาตรฐานของพีแนทรีน



รูปที่ ค.3 กราฟมาตรฐานระหว่างปริมาณพีแนทรีนกับพื้นที่ใต้กราฟที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC

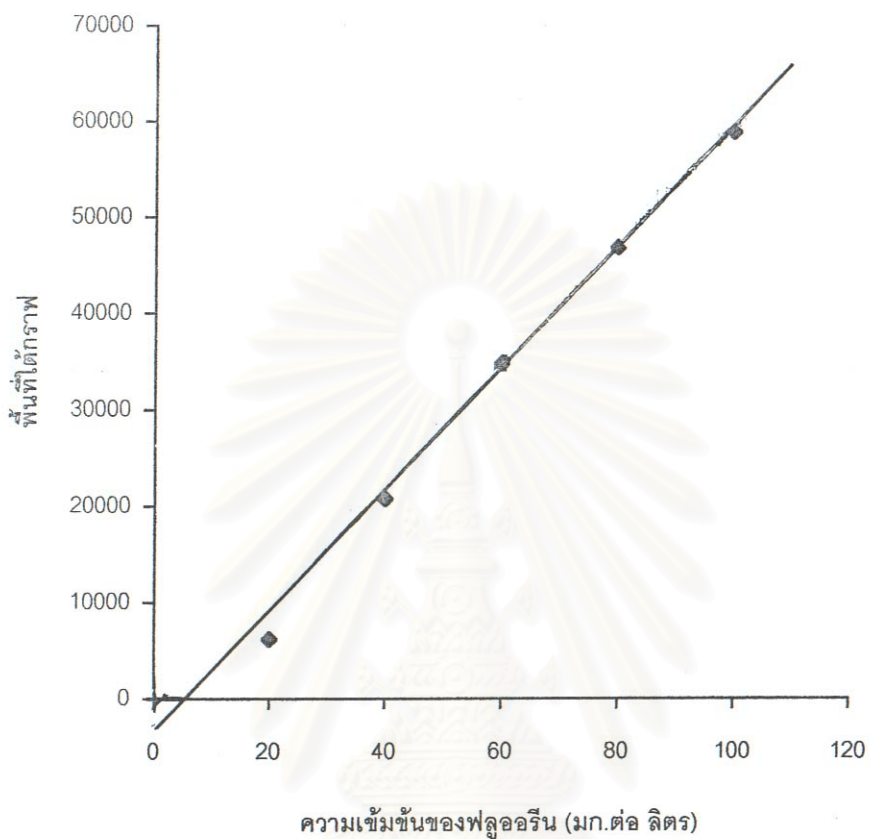
หาความเข้มข้นของพีแนทรีนได้จากการนำพื้นที่ใต้กราฟที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วย HPLC มาแทนค่าในสมการเส้นตรงดังนี้

$$\text{พื้นที่ใต้กราฟ} = (\text{ความชันของกราฟมาตรฐาน} \times \text{ปริมาณพีแนทรีน}) + \text{จุดตัดแกน Y}$$

$$\text{โดยที่} \quad \text{ความชันของกราฟมาตรฐาน} = 1631.816$$

$$\text{จุดตัดแกน Y} = -3225.95$$

4. กราฟมาตรฐานของฟลูออรีน



รูปที่ ค.4 กราฟมาตรฐานระหว่างปริมาณฟลูออรีนกับพื้นที่ใต้กราฟที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC

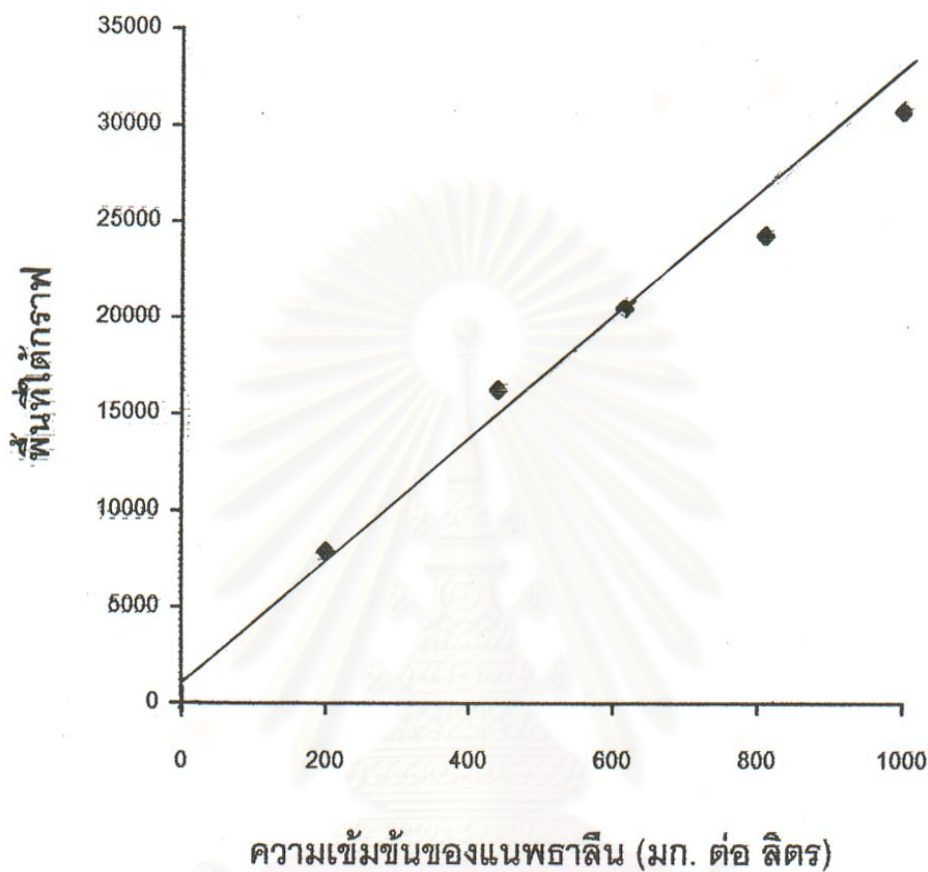
หาความเข้มข้นของฟลูออรีนได้จากการนำพื้นที่ใต้กราฟที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วย HPLC มาแทนค่าในสมการเส้นตรงดังนี้

$$\text{พื้นที่ใต้กราฟ} = (\text{ความชันของกราฟมาตรฐาน} \times \text{ปริมาณฟลูออรีน}) + \text{จุดตัดแกน Y}$$

$$\text{โดยที่} \quad \text{ความชันของกราฟมาตรฐาน} = 615.1886$$

$$\text{จุดตัดแกน Y} = -2822.93$$

5. กราฟมาตรฐานของแนพธาลีน



รูปที่ ค.5 กราฟมาตรฐานระหว่างปริมาณแนพธาลีนกับพื้นที่ใต้กราฟที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC

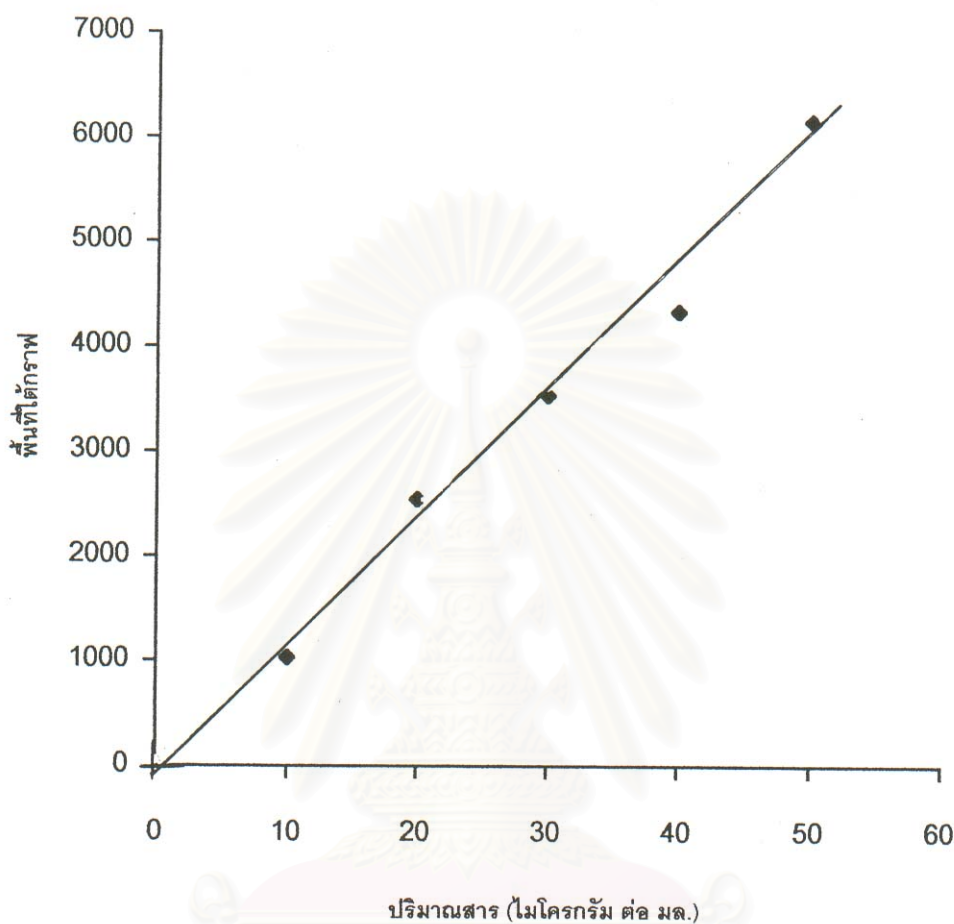
หาความเข้มข้นของแนพธาลีนได้จากการนำพื้นที่ใต้กราฟที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วย HPLC มาแทนค่าในสมการเส้นตรงดังนี้

$$\text{พื้นที่ใต้กราฟ} = (\text{ความชันของกราฟมาตรฐาน} \times \text{ปริมาณแนพธาลีน}) + \text{จุดตัดแกน Y}$$

$$\text{โดยที่} \quad \text{ความชันของกราฟมาตรฐาน} = 26.68891$$

$$\text{จุดตัดแกน Y} = 1453.414$$

6. กราฟมาตรฐานของกรด 2-ไฮดรอกซี-3-แนฟโธอิก



รูปที่ ค.6 กราฟมาตรฐานระหว่างปริมาณกรด 2-ไฮดรอกซี-3-แนฟโธอิก กับพื้นที่ใต้กราฟที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC

หาความเข้มข้นของกรด 2-ไฮดรอกซี-3-แนฟโธอิก ได้จากการนำพื้นที่ใต้กราฟที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วย HPLC มาแทนค่าในสมการเส้นตรงดังนี้

$$\text{พื้นที่ใต้กราฟ} = (\text{ความชันของกราฟมาตรฐาน} \times \text{ปริมาณกรด 2-ไฮดรอกซี-3-แนฟโธอิก}) + \text{จุดตัดแกน Y}$$

โดยที่	ความชันของกราฟมาตรฐาน	=	113.6657
	จุดตัดแกน Y	=	-41.9524

คิดเทียบน้ำหนักของสารมัธยันต์ที่สกัดได้จากการย่อยสลายของแอนทราซีนจากน้ำหนัก
 แห่งที่ถูกต้องของสารมาตรฐานกรด 2-ไฮดรอกซี-3-แนฟโธอิก โดยฉีดสารละลายของสารที่สกัด
 ในเมทธานอลจาก stock solution เข้มข้น 0.1 กรัมต่อมล. ปริมาณ 100 ไมโครกรัม ได้พื้นที่ได้
 กราฟเท่ากับ 7782 เทียบหาปริมาณสารจากกราฟมาตรฐานของกรด 2-ไฮดรอกซี-3-แนฟโธอิก

$$\text{ปริมาณกรด 2-ไฮดรอกซี-3-แนฟโธอิก} = (7782 + 41.9524) \div 113.6657$$

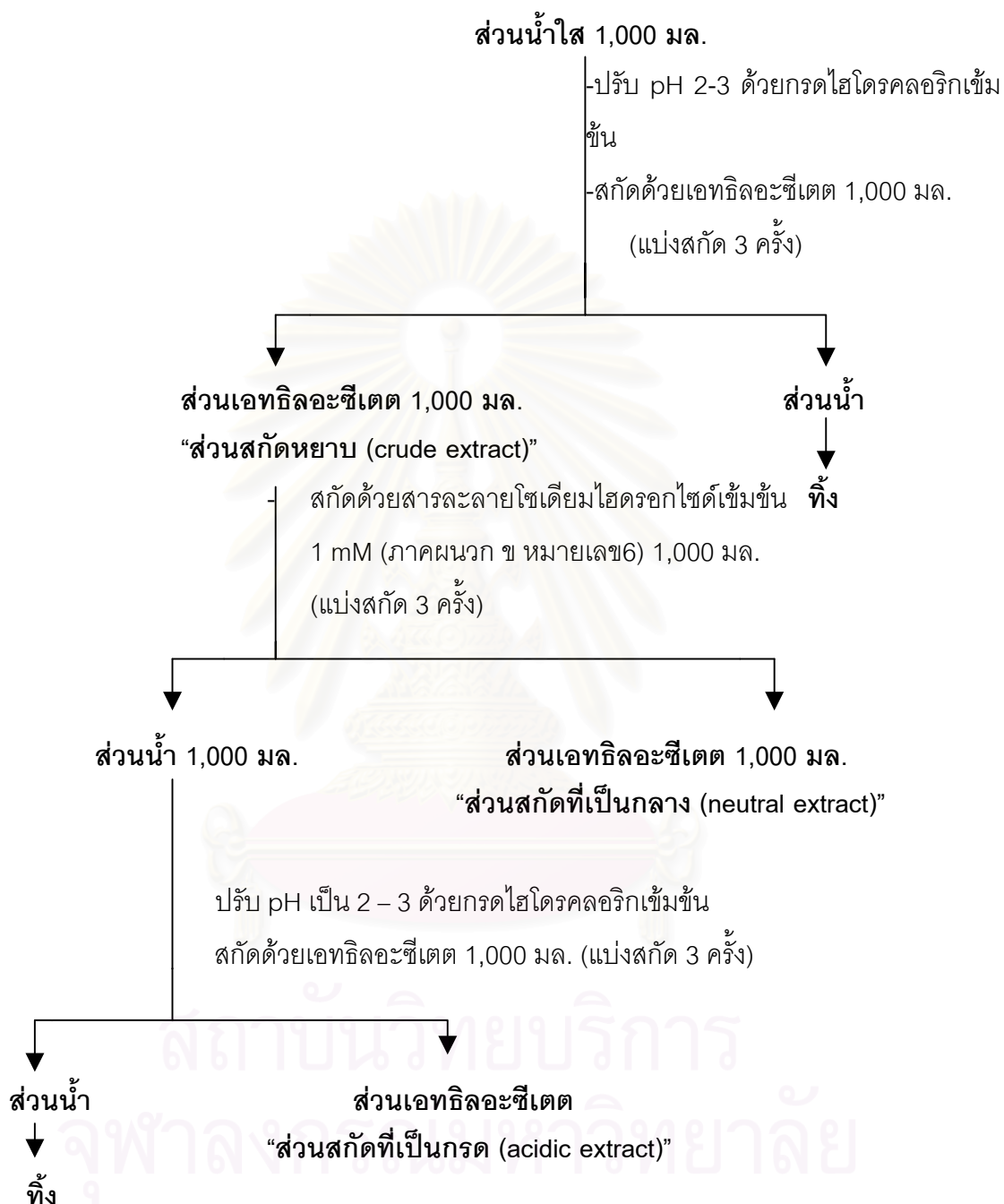
$$= 68.83 \text{ ไมโครกรัม}$$

ดังนั้นค่าที่ถูกต้องของ กรด 2-ไฮดรอกซี-3-แนฟโธอิก ที่ใช้จาก stock solution ของสาร
 มัธยันต์ที่สกัดได้จากการสกัด มีค่าเท่ากับ 68.83 %



สถาบันวิทยบริการ
 จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

7. แผนผังแสดงวิธีการสกัดสารมัธยันต์จากอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวก่อนที่จะนำไปทำให้บริสุทธิ์ (Grifoll *et al.*, 1995)



ภาคผนวก ง

แอนทราซีนและ PAHs ชนิดอื่น ๆ ในอาหาร

แอนทราซีนและ PAHs ชนิดอื่น ๆ เป็นสารพิษที่เกิดขึ้นได้จากกระบวนการปรุงอาหาร โดยพบในอาหารประเภทที่ทำให้สุกด้วยการปิ้ง ย่าง หรือการรมควัน เกิดเนื่องจากปฏิกิริยาที่ไขมันในอาหารได้รับความร้อน จะเกิดการหลอมเหลวหยดลงไปบนถ่านที่ร้อนแดง และเกิดปฏิกิริยาไพโรไลซิส (pyrolysis) เปลี่ยนสารไฮโดรคาร์บอนให้ขดม้วนเป็นวงระเหยขึ้นไปกับควันดำจับตัวสะสมอยู่บนผิวอาหาร เกิดเป็นสารกลุ่ม PAHs ติดปนอยู่กับอาหารที่นำมาบริโภค PAHs ที่เกิดขึ้นจะมีปริมาณมากหรือน้อยแตกต่างกันขึ้นอยู่กับปริมาณไขมันในอาหารและความร้อนที่ใช้ปรุงอาหาร

ตัวอย่างอาหารที่มีสารจำพวก PAHs ปนอยู่ เช่น อาหารรมควัน อาหารทอดเกรียม อาหารที่ทำให้แห้งด้วยเชื้อเพลิงจากน้ำมัน (สินธุ์ชัย แก้วกิตชัย และคณะ, 2530)

การตรวจหาปริมาณ PAHs ที่เกิดขึ้นเนื่องจากการปิ้ง ย่าง และรมควันพบว่าปริมาณที่แตกต่างกันขึ้นกับกรรมวิธีในการปรุงและชนิดของอาหาร ดังแสดงในตารางที่ ง.1

ตารางที่ ง.1 ปริมาณ PAHs ในอาหารชนิดต่าง ๆ

ชนิดอาหาร	ปริมาณ PAHs (ไมโครกรัม/กก.)
ไส้กรอก และปลา	1.0-10.5
ปลาและเนื้อแกะ	0.3-2.1
ปลาแซลมอน	2.6-3.0
หมูเบคอน	1.6-4.0
ไส้กรอกซาลามิ	2.0-2.8
ปลาซาดีน	1.8
ปลาทอด	4.5
เนย	0.5
หมูสด	25.8-31.6

ที่มา : สินธุ์ชัย แก้วกิตชัย และคณะ, 2530

ในปี 1964 มีรายงานของ Linjinsky และ Shubik ถึงการตรวจพบสารก่อมะเร็ง คือ เบนโซ[เอ]ไพรีนบนผิวหน้าของเนื้อที่ปิ้งด้วยถ่านไม้ เนื้อหนักประมาณ 1 กก. เมื่ออย่างสุกแล้วตรวจพบเบนโซ[เอ]ไพรีนในปริมาณที่เท่ากับการเผาไหม้บุหรืถึง 600 มวน นอกจากนี้ยังได้รายงานปริมาณแอนทราซีน และ PAHs ชนิดอื่นที่ตรวจพบในเนื้อสัตว์ที่ทำให้สุกด้วยการย่าง ดังแสดงในตารางที่ ง.2

ตารางที่ ง.2 ปริมาณแอนทราซีนและ PAHs ชนิดอื่นในเนื้อสัตว์ที่ทำให้สุกด้วยการย่าง

ชนิดของ PAHs	ความเข้มข้น (ไมโครกรัม/กก.)
แอนทราซีน	4.5
เบนโซ[เอ]แอนทราซีน	4.5
เบนโซ[จี,เอช,ไอ]เพอริลีน	4.5
เบนโซ[เอ]ไพรีน	8.0
โครซีน	1.4
โคโรนีน (coronene)	2.3
ฟลูออแรนทีน	20
ไพรีน	18
ไดเบนโซ[เอ,เอช]แอนทราซีน	0.2
พีแนนทรีน	11
เบนโซ[อี]ไพรีน (benzo[e]pyrene)	6
เพอริลีน	2

ที่มา : Lijinsky และ Shubik , 1964

พิษของแอนทราซีนและ PAHs ต่อมมนุษย์ (The New Jersey Department of Health and Senior Services, 1998 : TRI database)

แอนทราซีนและ PAHs ชนิดต่าง ๆ จะเข้าสู่ร่างกายมนุษย์ได้โดยการหายใจเอาอากาศและฝุ่นละอองที่ปนเปื้อนสารพิษเหล่านี้เข้าไปหรือโดยการทานอาหารประเภทที่ทำให้สุกด้วยการย่าง ปิ้ง หรือรมควัน ดื่มน้ำที่มีสาร PAHs ปนเปื้อน รวมทั้งการดูดซึมผ่านทางผิวหนังจากการสัมผัสโดยตรง ในการสำรวจสิ่งแวดล้อมโดยสำนักงานคุ้มครองสิ่งแวดล้อม (Environmental

Protection Agency, EPA) พบการปนเปื้อนของ PAHs ถึง 600 แห่งจากแหล่งสำรวจทั้งหมด 1,430 แห่ง ส่วนใหญ่เป็นบริเวณที่อยู่ใกล้แหล่งที่มีกากของเสียอันตราย

อัตราการเข้าสู่ร่างกายของ PAHs จะเพิ่มขึ้นเมื่ออยู่ในรูปสารผสมในน้ำมัน โดยสารดังกล่าวจะไปสะสมในชั้นเนื้อเยื่อไขมัน ซึ่งส่วนใหญ่จะอยู่ในตับ ไต และส่วนน้อยในม้าม ต่อมควบคุมเกลือและน้ำ (adrenal glands) และรังไข่ สาร PAHs ที่อยู่ในเนื้อเยื่อไขมันจะไม่นับเป็นพิษต่อร่างกาย จนกว่าจะเข้าไปสู่เซลล์ ผลจากการศึกษาในสัตว์ทดลองแสดงให้เห็นว่าสาร PAHs อาจถูกขับออกจากร่างกายภายใน 2-3 วัน ผ่านทางอุจจาระและปัสสาวะ

กระทรวงสาธารณสุข ของประเทศสหรัฐอเมริกา ทดสอบพิษของสารก่อมะเร็งในสัตว์ทดลอง พบว่า PAHs ที่เป็นสารคาร์ซิโนเจน คือ เบนซ์[เอ]แอนทราซีน, เบนโซ[เอ]ไพรีน, เบนโซ[บี]ฟลูออแรนทีน, เบนโซ[เค]ฟลูออแรนทีน, ไครซีน, ไดเบนซี[เอ,เอช]แอนทราซีน และ อินดิโน-[1,2,3 cd]ไพรีน ซึ่งทำให้เกิดเนื้องอกในสัตว์ทดลองที่กินสารดังกล่าว เมื่อให้สัตว์ทดลองสัมผัสสาร PAHs โดยตรง และหายใจเอาไอระเหยของสารเข้าร่างกายเป็นระยะเวลาสั้นก็ทำให้เกิดเนื้องอกในสัตว์ทดลองได้เช่นเดียวกัน รายงานการทดลองกับมนุษย์พบว่า การหายใจหรือสัมผัสกับสารผสมคาร์ซิโนเจนโดยการดูดซึมผ่านทางผิวหนังเป็นเวลานาน มีผลทำให้เกิดมะเร็งได้

เมื่อให้หนูท้องกินเบนโซ[เอ]ไพรีน พบว่าลูกหนูที่เกิดมามากจะไม่สมบูรณ์ และมีน้ำหนักตัวต่ำ ผลการศึกษานี้สามารถเกิดกับหญิงมีครรภ์ได้เช่นเดียวกัน แต่ยังไม่มีความเกี่ยวข้องกับผลดังกล่าว

จากการศึกษาถึงพิษแบบเฉียบพลัน และพิษแบบเรื้อรังของ PAHs ในร่างกายของสัตว์ทดลอง ทำให้ทราบว่าสารในกลุ่มนี้มีอันตรายร้ายแรงต่อผิวหนัง รวมทั้งระบบของเหลวและระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย แต่ไม่มีรายงานถึงผลดังกล่าวในมนุษย์

สำหรับสารแอนทราซีนจะเป็นอันตรายต่อผู้ใช้งานโดยการหายใจเข้าไป และโดยการดูดซึมผ่านทางผิวหนังเป็นส่วนใหญ่ การที่ได้รับในปริมาณมากเกินพออาจทำให้เกิดการกลายพันธุ์ได้

มีผลระคายเคืองต่อผิวหนัง และจะมีอันตรายเพิ่มขึ้นถ้าบริเวณผิวหนังที่สัมผัสกับแอนทราซีนถูกแสง ถ้าเกิดการสัมผัสซ้ำจะทำให้ผิวหนังซีด บาง หรือบวมหนา เปลี่ยนเป็นสีคล้ำ และอาจพัฒนาเป็นมะเร็งผิวหนังได้

การหายใจเอาไอสารเข้าไป

ผลกระทบของผู้ป่วยที่สำคัญในการได้รับสารแอนทราซีน คือ เกิดการระคายเคืองต่อจมูก ลำคอ และหลอดลม ถ้าสัมผัสเป็นระยะเวลานาน (โดยเฉพาะไอระเหยจากแอนทราซีนที่ถูกทำให้อุ่น) จะมีผลเรื้อรังต่อหลอดลม ทำให้เกิดอาการไอ และมีเสมหะ

การสัมผัสทางตา

เกิดขึ้นจากการสัมผัสแอนทราซีนหรือไอระเหยของสาร จะทำให้เกิดอาการระคายเคือง ซึ่งอาการดังกล่าวจะรุนแรงขึ้นถ้าถูกแสงแดด

ระยะเวลาที่เหมาะสมในการทำงานเกี่ยวข้องกับแอนทราซีน

การสัมผัสหรืออยู่ในบริเวณที่มีสารอันตรายจะต้องมีการตรวจสอบเป็นประจำ ทั้งโดยการสู่มตัวอย่างจากบุคคลและสภาพแวดล้อม ไม่มีการจำกัดระยะเวลาสำหรับผู้ที่ต้องทำงานเกี่ยวข้องกับสารแอนทราซีน แต่ก็มิได้หมายความว่าสารนี้ไม่มีอันตราย เนื่องจากแอนทราซีนถูกดูดซึมได้ทางผิวหนัง ซึ่งจะเป็นการเพิ่มปริมาณสารนี้ในร่างกาย แต่อย่างไรก็ตาม The National Institute for Occupational Safety and Health (NIOSH) ได้สรุปถึงระยะเวลาที่ปลอดภัยในการทำงานเกี่ยวข้องกับผลิตภัณฑ์จากถ่านหิน โดยกำหนดให้ไม่เกิน 0.1 มก./ลบม.ของอากาศ สำหรับระยะเวลาการทำงาน 10 ชม./วัน และ 40 ชม./สัปดาห์ ถ้าเกินข้อกำหนดนี้ผู้ที่เกี่ยวข้องจะมีความเสี่ยงสูงต่อการเป็นมะเร็งปอดและมะเร็งผิวหนัง นอกจากนี้ The Occupational Safety and Health Administration (OSHA) ยังได้จำกัดปริมาณ PAHs ทุกชนิดไม่ให้เกิน 0.2 มก./ลบม. ของอากาศ ซึ่งข้อกำหนดนี้มีผลบังคับทางกฎหมาย

วิธีการสัมผัสกับแอนทราซีน

1. จัดให้มีระบบระบายอากาศในบริเวณที่มีสารแอนทราซีน
2. สวมเสื้อผ้าป้องกันให้มิดชิดในขณะทำงาน
3. หลังการปฏิบัติงานที่เกี่ยวข้องกับแอนทราซีน รีบล้างมือด้วยสบู่ทันที
4. ติดตามเตือนถึงอันตรายของแอนทราซีนในที่ทำงาน รวมไปถึงการให้ข้อมูลและฝึกอบรมเกี่ยวกับสุขภาพและความปลอดภัยแก่ผู้ที่ต้องปฏิบัติงานเกี่ยวข้องกับแอนทราซีน

การเกิดพิษอย่างเฉียบพลันของแอนทราซีน

การเกิดพิษเฉียบพลันจากแอนทราซีน อาจเกิดขึ้นทันทีหรือภายในระยะเวลาไม่นานภายหลังจากสัมผัสกับสาร ซึ่งการสัมผัสกับแอนทราซีนโดยตรงทำให้เกิดอาการระคายเคืองต่อตา หลอดลม จมูก ลำคอ และผิวหนัง

การเกิดพิษแบบเรื้อรังของแอนทราซีน

เป็นการเกิดพิษในระยะยาวหรือพิษเรื้อรังต่อสุขภาพซึ่งอาจเกิดขึ้นภายหลังจากสัมผัสแอนทราซีนเป็นระยะเวลาหลายเดือนหรือหลาย ๆ ปี

การทดสอบการเปลี่ยนแปลงของร่างกายภายหลังจากการทำงานเกี่ยวข้องกับแอนทราซีน

ตรวจสอบผิวหนังเป็นประจำ เพื่อตรวจการเปลี่ยนแปลงที่ผิดปกติ มะเร็งผิวหนังสามารถรักษาได้ง่ายถ้าตรวจพบในเบื้องต้น รวมทั้งตรวจสอบการทำงานของปอด

สารผสมของแอนทราซีนและอะครีดีน(acridine)

มักพบการปนเปื้อนของแอนทราซีนร่วมกับอะครีดีน ซึ่งอะครีดีนก็เป็นสาเหตุของการระคายเคืองของผิวหนังและตาเช่นเดียวกับแอนทราซีน

ผลจากการสูบบุหรี่ทำให้เกิดโรคหัวใจ มะเร็งปอด รวมทั้งปัญหาอื่น ๆ เกี่ยวกับระบบทางเดินหายใจ และโรคต่าง ๆ เหล่านี้จะทวีความรุนแรงยิ่งขึ้นถ้าผู้ป่วยสัมผัสหรืออยู่ในบริเวณที่มีสารเคมีปนเปื้อน

ถ้าสัมผัสกับสารเคมีทางผิวหนังแล้วต้องระวังมิให้บริเวณดังกล่าวสัมผัสกับแสงแดด ต้องรีบล้างทำความสะอาดบริเวณผิวหนังที่ปนเปื้อนอย่างเร่งด่วน

เพื่อลดอันตรายจากแอนทราซีนในขณะทำงานมีข้อควรปฏิบัติดังนี้

1. เสื้อผ้าของผู้ปฏิบัติงานที่มีแอนทราซีนปนเปื้อนควรรีบซักทันที
2. การทำความสะอาดเสื้อผ้าที่ปนเปื้อนแอนทราซีนและสารเคมีอันตรายชนิดอื่น ๆ ควรกระทำโดยผู้ชำนาญการที่ทราบถึงอันตรายของแอนทราซีนสารเคมีนั้น ๆ เป็นอย่างดี
3. ผิวหนังที่สัมผัสแอนทราซีน ต้องรีบล้างหลาย ๆ ครั้ง และภายหลังปฏิบัติงานต้องรีบทำความสะอาดร่างกาย
4. ไม่ควรกิน สูบบุหรี่ หรือดื่ม ในบริเวณที่มีการปฏิบัติงานเกี่ยวข้องกับแอนทราซีน

การใช้งานและการเก็บรักษาแอนทราซีน

1. ควรเก็บในที่เย็น มีด แห้ง และมีอากาศถ่ายเท และเก็บแยกต่างหากจากสารออกซิไดซ์ชนิดรุนแรง เช่น คลอรีน, โบรมีน และฟลูออรีน กรดโครมิก และแคลเซียมไฮโปคลอไรท์
2. ป้องกันการเปลี่ยนแปลงสภาพของสารโดยมีการตรวจสอบภาชนะบรรจุอย่างสม่ำเสมอ เพื่อป้องกันการรั่วไหล
3. ห้ามมิให้มีการจุดไฟ หรือนำวัตถุไวไฟ เข้าไปในสถานที่ซึ่งมีการใช้งานและสถานที่เก็บแอนทราซีน เนื่องจากอาจทำให้เกิดไฟไหม้ หรือเกิดการระเบิดที่รุนแรงขึ้นได้

การปฐมพยาบาลเบื้องต้น

เข้าตา : ล้างด้วยน้ำไหล 15 นาที

ถูกผิวหนัง : ถอดเครื่องนุ่งห่มที่เปื้อนออก ล้างบริเวณผิวหนังด้วยสบู่และน้ำ

นอกจากนี้การใช้ครีมกันแดดที่มีประสิทธิภาพป้องกันแสงอัลตราไวโอเล็ตได้สูงจะช่วยป้องกันอันตรายของแอนทราซีนจากการระคายเคืองต่อผิวหนังได้ และการสวมแว่นป้องกันแสงอัลตราไวโอเล็ตก็มีผลลดการระคายเคืองของแอนทราซีนต่อตาได้เช่นเดียวกัน

PAHsที่ถูกดูดซับอยู่กับตะกอน (bioaccumulation) จะมีความเป็นพิษสูงขึ้น(phototoxic) ถ้าได้รับการกระตุ้นด้วยแสงอัลตราไวโอเล็ต (photoactivation) (Ankley *et al.*, 1995 อ้างถึงโดย Boese *et al.*, 2000) มีรายงานผลวิจัยโดย Swartz และคณะ (1995) เกี่ยวกับความเป็นพิษของ

PAHs และอนุพันธ์ของ PAHs ที่เกิดจากการเติมหมู่อัลคิลต่อ *Rhepoxynius abronius* (marine amphipod) ภายหลังจากการสัมผัสกับ PAHs และอนุพันธ์เป็นเวลา 10 วัน หลังจากนั้นนำมาฉายรังสียูวี 1 ชั่วโมง ตรวจพบระดับความเป็นพิษของ PAHs และอนุพันธ์มีค่าเพิ่มขึ้นประมาณ 5 เท่า นอกจากนี้ยังมีความเป็นไปได้ในการประเมินศักยภาพของแสงต่อการเพิ่มความเป็พิษของ PAHs ในตะกอนที่มีสารดังกล่าวเป็นองค์ประกอบ โดยใช้รูปแบบผลรวมความเข้มข้นทั้งหมดของสาร (Σ PAH) ซึ่งแสงอาจมีผลเพิ่มความเป็พิษของ PAHs (phototoxic) หรืออาจไม่มีผลก็ได้ (nonphototoxic) ขึ้นอยู่กับชนิดของสารดังกล่าว

ตารางที่ ๓.3 ชนิดของ PAHs ที่มีความเป็พิษเพิ่มขึ้นเมื่อถูกแสง(phototoxic) และชนิดของ PAHs ที่แสงไม่มีผลเพิ่มความเป็พิษ (nonphototoxic)

ชนิดของสาร PAHs	ผลของแสงต่อการเพิ่มความเป็พิษของPAHs
แนพทาลีน	-
อะซีแนพทิลีน	-
อะซีแนพทีน	-
ฟลูออรีน	-
พีแนนทีน	-
แอนทราซีน	+
ฟลูออแรนทีน	+
ไพรีน	+
เบนซ์[เอ]แอนทราซีน	-
โครซีน	-
เบนซ์[บี]ฟลูออแรนทีน	+
เบนซ์[เค]ฟลูออแรนทีน	+
เบนโซ[เอ]ไพรีน	-

ที่มา : Boese *et al.*, 2000

หมายเหตุ : + หมายถึง PAHs ชนิดที่แสงมีผลเพิ่มความเป็พิษ (phototoxic)

: - หมายถึง PAHs ชนิดที่แสงไม่มีผลเพิ่มความเป็พิษ (nonphototoxic)

โดยทั่วไปสิ่งมีชีวิต (test organisms) ที่ยังไม่ตายภายในระยะเวลา 10 วัน ในการทดสอบพิษของ PAHs ก็ยังคงรอดชีวิตภายหลังจากถูกรังสียูวี 1 ชั่วโมง แต่ถ้าสิ่งมีชีวิตนั้นสะสม PAHs ชนิดที่มีความเป็พิษเพิ่มขึ้นเมื่อถูกแสงในปริมาณมากพอ จะทำให้เกิดการตายของสิ่งมีชีวิต

ชีวิตภายใน 24 ชั่วโมง หรือสิ่งมีชีวิตนั้น ๆ จะไม่สามารถกลับเข้าไปฝังตัวในตะกอนดินได้อีกและจะถูกจับกินโดยสิ่งมีชีวิตอื่น (Boses *et al.*, 1998 อ้างถึงโดย Boses *et al.*, 2000)

สถานการณ์และมาตรการในการควบคุมแอนทราซีนและ PAHs ชนิดอื่นในประเทศไทย

ข้อมูลจากการดำเนินกิจการโรงงานบำบัดและกำจัดกากของเสียอุตสาหกรรมบางขุนเทียน ที่รับบริการโรงงานอุตสาหกรรมในเขตกรุงเทพมหานครและปริมณฑล ทำให้ทราบปริมาณกากของเสียอันตรายระหว่างปี พ.ศ. 2532-2536 ดังแสดงในตารางที่ 4.4

ตารางที่ 4 ปริมาณกากของเสียอันตรายในเขตกรุงเทพมหานครและปริมณฑลระหว่างปี พ.ศ.2532-2536

พ.ศ.	ปริมาณ (ตัน)
2532	29499.530
2533	45851.660
2534	74628.251
2535	113946.491
2536	140394.650

ที่มา : นราธิป เลหาติรานนท์ (2540)

ข้อมูลจากตารางจะเห็นได้ว่า ปริมาณกากของเสียอันตรายในเขตกรุงเทพมหานครและปริมณฑลมีปริมาณเพิ่มขึ้นทุกปี จาก -30,000 ตัน ในปี พ.ศ.2532 จนสูงสุดถึง 140,000 ตัน/ปี ในพ.ศ.2536

กฎหมายและพระราชบัญญัติที่เกี่ยวข้องกับการจัดการกากของเสียอันตรายในประเทศไทยที่สำคัญมีหลายฉบับด้วยกันคือ

พระราชบัญญัติโรงงานพ.ศ. 2535

ได้กำหนดหลักเกณฑ์ให้ผู้รับใบอนุญาตประกอบกิจการโรงงานอุตสาหกรรมทำการเก็บรวบรวม ทำลายฤทธิ์ กำจัด ฝังทิ้งและเคลื่อนย้ายตามวิธีการที่กำหนดไว้สำหรับสิ่งปฏิกูล หรือวัสดุไม่ใช่แล้ว ซึ่งมีคุณสมบัติเป็นสารไวไฟ สารกัดกร่อน สารเกิดปฏิกิริยาได้ง่าย และสารมีพิษ

พระราชบัญญัติวัตถุอันตราย พ.ศ. 2535

ได้กำหนดขึ้นเพื่อควบคุมการนำเข้า ส่งออก การผลิต การจำหน่าย การครอบครอง การขนส่ง และการใช้สารอันตราย ตลอดจนการตั้งศูนย์ข้อมูลวัตถุอันตรายขึ้นในกระทรวงอุตสาหกรรม

พระราชบัญญัติส่งเสริมและรักษาคุณภาพสิ่งแวดล้อมแห่งชาติ พ.ศ. 2535

เป็นกฎหมายหลักซึ่งได้กำหนดขึ้นเพื่อดูแลสภาวะแวดล้อมและควบคุมมลพิษ การอนุรักษ์ทรัพยากรธรรมชาติ รวมทั้งส่งเสริมและสนับสนุนกิจกรรมด้านสิ่งแวดล้อม

มีรายงานเกี่ยวกับการปนเปื้อนของ PAHs ในสิ่งแวดล้อมของประเทศไทย ดังเช่นรายงานของจินตนา สายวรรณ (2541) ถึงการตรวจพบ PAHs ในอากาศเสียในเขตกรุงเทพมหานคร โดยเก็บตัวอย่างจากอนุภาคไอเสียรถยนต์ที่อยู่ในอากาศบริเวณที่มีการจราจรแออัดย่านประตูน้ำเยาวราช บางยี่ขัน สำนักงานสถิติแห่งชาติ เปรียบเทียบกับบริเวณที่อยู่ห่างถนนคือภายในสถาบันราชภัฏวิทยาเขตบ้านสมเด็จเจ้าพระยา ตรวจวัดปริมาณและชนิดของ PAHs โดยใช้เครื่องจีซีเอ็มเอส(GC-MS) พบสาร PAHs ทั้งหมด 13 สาร แต่หาปริมาณได้เพียง 3 ชนิดคือ ฟิแนนทรีน, ฟลูออแรนทีน และ ไพรีน ปริมาณรวมของ PAHs อยู่ในช่วง 114-97.78 มก./ลบ.ม. และพบว่าปริมาณเฉลี่ยของสาร PAHs ในอากาศบริเวณริมถนนมีค่าสูงกว่าบริเวณห่างไกลจากถนน

นอกจากนี้ยังมีรายงานเกี่ยวกับความเข้มข้นของสาร PAHs ที่อยู่ในดิน ในเขตพื้นที่ จ. เชียงใหม่ ประเทศไทย จากงานวิจัยของ Amagai และคณะ (1999) ซึ่งเก็บตัวอย่างดินจากข้างถนนในตัวเมืองเชียงใหม่จำนวน 30 แหล่งดิน และนำมาตรวจวัดความเข้มข้นของสาร PAHs 16 ชนิด พบว่าสาร PAHs ที่มีความเข้มข้นสูงสุดคือ ไพรีน และ ฟลูออแรนทีน โดยมีค่าเท่ากับ 526 นาโนกรัม/กรัมของดิน และ 418 นาโนกรัม/กรัมของดิน ตามลำดับ สารที่มีความเข้มข้นรองลงมาคือ เบนโซ[จี้,เอช,ไอ]เพอร์ลิซีน และโคโรนีน ซึ่งมีค่า 251 และ 202 นาโนกรัม/กรัมของดิน ตามลำดับ ความเข้มข้นของ PAHs ที่มีค่าสูงดังกล่าวมาจากตัวอย่างดินที่อยู่ข้างถนนซึ่งมีการจราจรหนาแน่น ยานพาหนะเป็นแหล่งสำคัญที่ปล่อย PAHs ออกสู่สิ่งแวดล้อมในรูปไอเสียจากการเผาไหม้ของเครื่องยนต์ รูปแบบการกระจายตัวและความเข้มข้นของ PAHs ในอากาศแตกต่างจากในดิน ตัวอย่างเช่น ความเข้มข้นของเบนโซ[เอ]ไพรีนที่อยู่ในดินมีค่าต่ำกว่าในอากาศ แต่ความเข้มข้นของฟลูออรีน ไพรีน ไครซีน และโคโรนีนในดินมีค่าสูงกว่าในอากาศ ซึ่งความแตกต่างของค่าความเข้มข้นสารดังกล่าวน่าจะเกิดจากข้อแตกต่างในแหล่งกำเนิด PAHs และปฏิกิริยาการสลายตัวของสารเนื่องจากแสง การเก็บตัวอย่างดินเพื่อตรวจสอบความเข้มข้นและการกระจายตัวของสาร PAHs มีข้อได้เปรียบเมื่อเทียบกับการตรวจวัดสาร PAHs จากอากาศ คือ การเก็บตัวอย่างดินทำได้ง่าย และไม่ต้องใช้เครื่องมือพิเศษ ใช้ระยะเวลาสั้น และจะสุ่มเก็บตัวอย่างดินจากบริเวณใด

ก็ได้ ดังนั้นการวัดความเข้มข้นของสาร PAHs ที่อยู่ในดิน จึงสามารถนำมาใช้ประโยชน์ในการบอกระดับมลพิษในอากาศได้ แต่ต้องคำนึงถึงองค์ประกอบที่แตกต่างกันของตัวอย่างจากดินและอากาศด้วย

ปัจจัยทางสิ่งแวดล้อมที่มีผลต่อการบำบัดด้วยวิธีชีวภาพ (Bouwer, Alexander and Zehnder, 1993)

ปัจจัยทางสิ่งแวดล้อมที่สำคัญซึ่งมีผลต่อการบำบัดการปนเปื้อนของแอนทราซีน และ สาร PAHs ในสภาพแวดล้อมธรรมชาติประกอบด้วย ค่าความเป็นกรดต่าง (pH), อุณหภูมิ, ความเข้มข้นของสาร รวมทั้งสภาวะรีดอกซ์ (redox condition)

ค่าความเป็นกรด-ต่าง

โดยทั่วไปค่า pH ในดินจะอยู่ในช่วง 5-9 ซึ่งเป็นค่าที่เหมาะสมต่อการเจริญของจุลินทรีย์ทั่วไป เชื้อส่วนใหญ่เจริญได้ดีในช่วง pH 6.5-7.5 แต่อาจมีเชื้อบางชนิดสามารถเจริญได้ที่ค่า pH ต่ำกว่า 2 หรือสูงกว่า 10

อุณหภูมิ

มีผลต่อการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ อุณหภูมิที่เพิ่มขึ้น 10°C จะทำให้อัตราเร็วในการเกิดปฏิกิริยาเพิ่มขึ้นเป็น 2 เท่า ส่วนอุณหภูมิที่สูงเกินไปจะมีผลให้องค์ประกอบต่าง ๆ ภายในเซลล์อยู่ในสภาวะที่ไม่สามารถถูกกระตุ้นได้ และที่อุณหภูมิต่ำกว่า 10°C ปฏิกิริยาเคมีต่าง ๆ ภายในเซลล์จุลินทรีย์จะเกิดขึ้นช้ามาก ซึ่งจะเป็นการยืดระยะเวลาการบำบัดการปนเปื้อนของแอนทราซีน และ PAHs ในสิ่งแวดล้อม

ความเข้มข้นของสารพิษ

สารเคมีบางชนิดที่มีความเข้มข้นสูงจะมีความเป็นพิษต่อจุลินทรีย์ แต่สารเคมีที่มีความเข้มข้นต่ำในหน่วย ไมโครกรัม – นาโนกรัม /ลิตร จะทำให้มีปริมาณคาร์บอนและพลังงานไม่พอที่เซลล์จะนำไปใช้ในการเจริญและรักษาสมดุลภายในเซลล์ ดังนั้นในการศึกษารูปแบบการเพิ่มจำนวนของเซลล์โดยใช้แอนทราซีน หรือ PAHs ชนิดอื่น เป็นแหล่งคาร์บอน ควรใช้ความเข้มข้นสารทั้งในช่วงความเข้มข้นสูงและต่ำ

สภาวะรีดอกซ์

จุลินทรีย์มักจะใช้ตัวรับอิเล็กตรอนที่จำเพาะ ซึ่งตัวรับอิเล็กตรอนที่มีอยู่ในสิ่งแวดล้อมจะเป็นตัวกำหนดว่าเชื้อใดจะสามารถเจริญได้ และในทางกลับกันจะเป็นตัวตัดสินว่าสารใดจะถูกย่อยสลาย การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของสารเคมีบางชนิด เช่น PAHs และผลิตภัณฑ์ปิโตรเลียมโดยเชื้อจุลินทรีย์ จะเกิดภายใต้สภาวะมีออกซิเจนเท่านั้น

อย่างไรก็ดีประสิทธิภาพในการย่อยสลายแอนทราซีนและ PAHs ชนิดอื่นๆ โดยเชื้อจุลินทรีย์ในระบบนิเวศน์ทั้งบนบกและในน้ำ ยังขึ้นอยู่กับปัจจัยอื่น ๆ ซึ่งรวมทั้ง ชนิดของดิน อากาศ สารอาหาร ความลึกของชั้นดิน การปรับตัวของจุลินทรีย์ สารเคมีที่ปนเปื้อนมาก่อน คุณสมบัติทางกายภาพและทางเคมีของสารพิษ รวมทั้งการเปลี่ยนแปลงของฤดูกาล



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

น.ส.พจนีย์ จันทมาลี เกิดเมื่อวันที่ 26 เมษายน พ.ศ.2518 ที่จังหวัดจันทบุรี ได้รับปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิตเกียรตินิยมอันดับที่ 2 จากภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยในปีการศึกษา 2539 และเข้ารับการศึกษาคู่ในระดับปริญญา มหาบัณฑิต สาขาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2540



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย