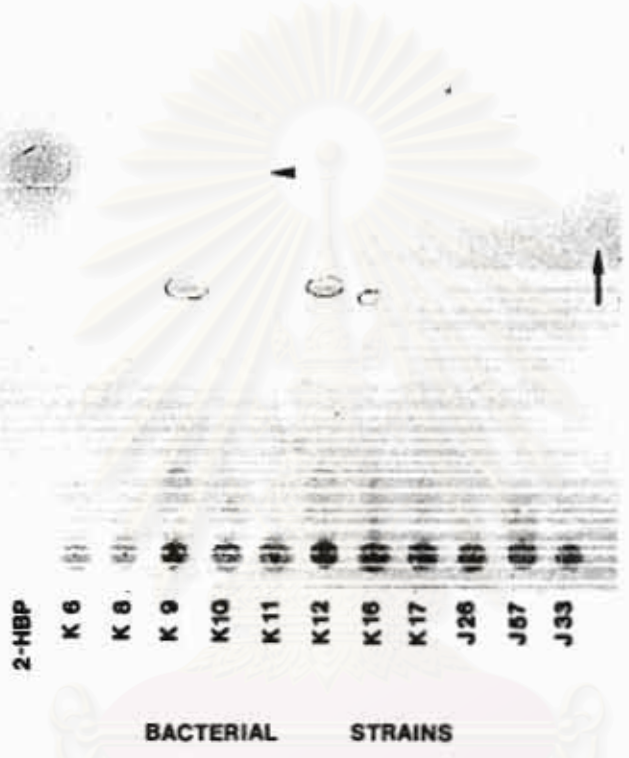
บทที่ 3

ผลการทดลอง

ผลการคัดเลือกแบคทีเรียสายพันธุ์ที่สามารถย่อยสลายไดเบนโซไธโอฟีนโดยวิถี 4S

ผลการคัดแยกแบคทีเรียจากตัวอย่างดินบริเวณแหมืองแม่เมาะ จังหวัดลำปาง จำนวน 55 ตัวอย่าง, บ่อน้ำพุร้อนแจ้ซ้อน จังหวัดลำปาง จำนวน 48 ตัวอย่าง, บ่อน้ำพุร้อนฝาง จังหวัดเชียงใหม่ จำนวน 27 ตัวอย่าง, โป่งเดือด จังหวัดเชียงราย จำนวน 14 ตัวอย่าง และบ่อน้ำพุร้อนแม่ขะจาน จังหวัดเชียงราย จำนวน 4 ตัวอย่าง รวมจำนวนตัวอย่างดินทั้งสิ้น 148 ตัวอย่าง ตามวิธีการในข้อ 1 สามารถคัดแยกแบคทีเรียได้ 342 สายพันธุ์ และเมื่อนำมาทำการคัดเลือกหาแบคทีเรียสายพันธุ์ที่สามารถย่อยสลายไดเบนโซไธโอฟีนด้วยวิถี 4S โดยการวิเคราะห์หา 2-ไฮดรอกซีไบฟีนิล ซึ่งเป็นสารตัวกลางของวิถี 4S ด้วยวิธี ทิน เลเยอร์ โครมาโตกราฟฟี พบว่าจากแบคทีเรียจำนวน 342 สายพันธุ์ที่แยกได้มีเพียงสายพันธุ์เดียวคือสายพันธุ์ K10 ที่แยกได้จากดินบริเวณโป่งเดือด จังหวัดเชียงราย ย่อยสลายไดเบนโซไธโอฟีนด้วยวิถี 4S โดยตรวจพบ 2-ไฮดรอกซีไบฟีนิล ดังแสดงในรูปที่ 3 และเมื่อนำผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากกระบวนการย่อยสลายไดเบนโซไธโอฟีนโดยแบคทีเรียสายพันธุ์ K10 มาวิเคราะห์ซ้ำด้วยวิธีแก๊ส โครมาโตกราฟฟี ยืนยันได้ว่าเป็น 2-ไฮดรอกซีไบฟีนิล จริง ดังแสดงในรูปที่ 4 ดังนั้นจึงเลือกใช้แบคทีเรียสายพันธุ์ K10 ในการศึกษาขั้นต่อไป

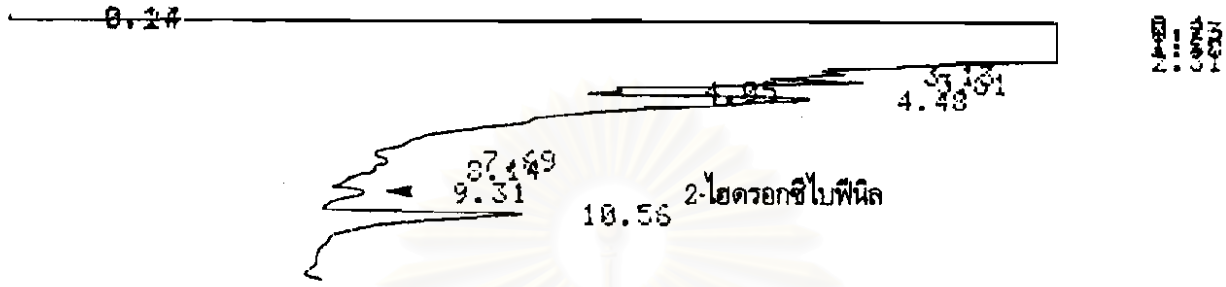
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



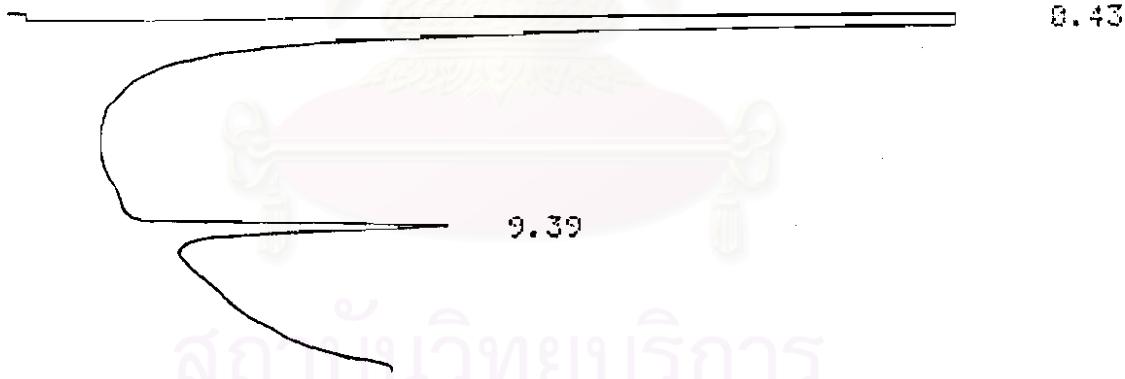
รูปที่ 3 ผลการวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นจากการย่อยสลายไดเบนโซไธโอฟีนโดยวิธีทิน เลเยอร์ โครมาโตกราฟฟี

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

(ก)



(ข)



รูปที่ 4 โครมาโตรแกรมแสดงผลการวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยสลายไดเบนโซโอฟีน โดยแบคทีเรียสายพันธุ์ K10 ด้วยแก๊ส โครมาโตกราฟฟี

(ก) ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยสลายไดเบนโซโอฟีนโดยแบคทีเรียสายพันธุ์ K10 ลูกศรแสดงตำแหน่ง 2-ไฮดรอกซีไบฟีนิลที่ตรวจพบ

(ข) โครมาโตแกรมของสารมาตรฐานของ 2-ไฮดรอกซีไบฟีนิล

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ผลของอุณหภูมิต่อการเจริญของแบคทีเรียสายพันธุ์ K10

เนื่องจากแบคทีเรียสายพันธุ์ K10 เป็นแบคทีเรียที่แยกได้จากดินบริเวณโป่งเดือด ซึ่งเป็นบริเวณที่มีอุณหภูมิสูงมากกว่า 40 องศาเซลเซียส จึงคาดว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ K10 น่าจะเจริญได้ดีที่อุณหภูมิสูงกว่า 25-30 องศาเซลเซียส ซึ่งเป็นอุณหภูมิที่ใช้ในวิธีการคัดแยกเชื้อ ซึ่งหากพบว่าอัตราเร็วของการเจริญของแบคทีเรียสายพันธุ์ K10 สูงขึ้นที่อุณหภูมิสูง ก็จะเป็นการลดระยะเวลาในการเพาะเลี้ยง

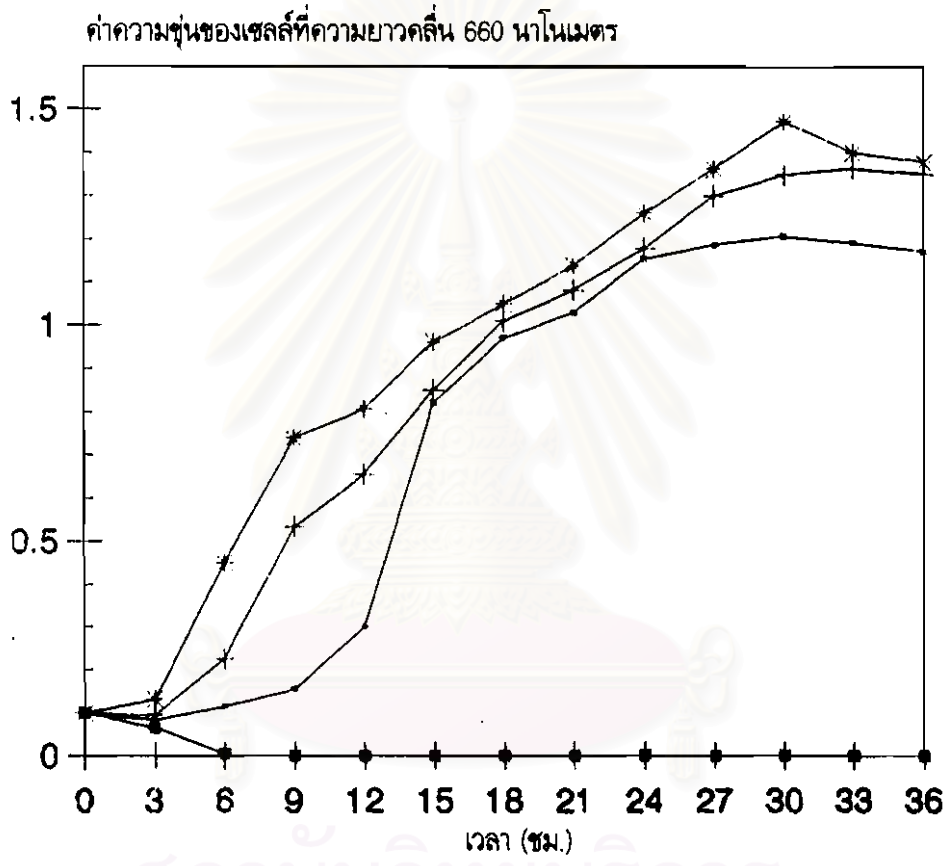
1. เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว NBYE

ผลจากการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียสายพันธุ์ K10 ที่อุณหภูมิ 25-30, 40, 45 และ 50 องศาเซลเซียส ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว NBYE ที่เติมไดเบนโซไธโอฟีน ความเข้มข้นสุดท้าย 0.05 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนัก/ปริมาตร) พบว่าเชื้อสามารถเจริญได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส นอกจากนั้นระยะ lag phase ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ยังสั้นกว่าที่อุณหภูมิ 25-30 องศาเซลเซียส เชื้อไม่สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส การลดลงของค่าความขุ่นของเซลล์ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส อาจเกิดเนื่องจากกระบวนการออโตไลซิส (autolysis) ของเซลล์ (ดังแสดงในรูปที่ 5) ดังนั้น ในการเตรียมหัวเชื้อ (inoculum) ในการอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว NBYE ตามวิธีในข้อ 3.1 จึงบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส

2. เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว SFMM

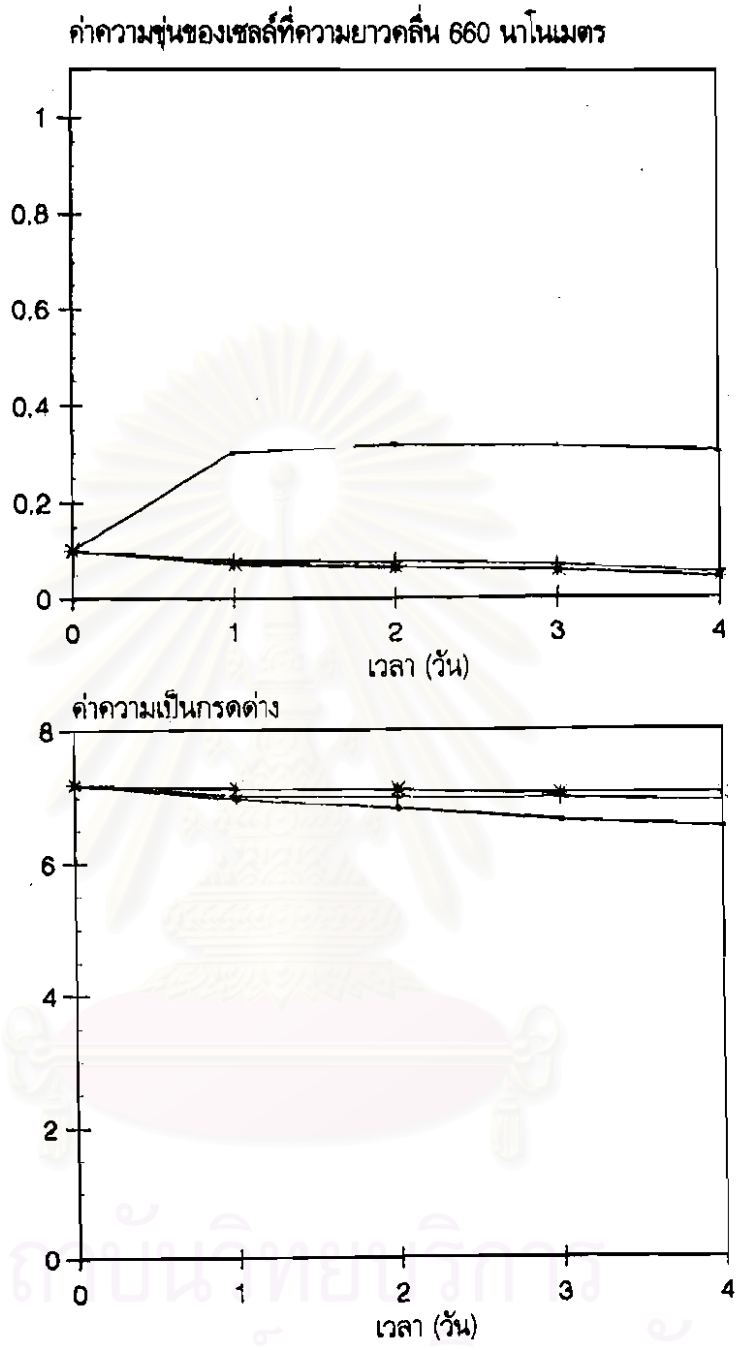
ผลการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียสายพันธุ์ K10 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว SFMM ที่เติมไดเบนโซไธโอฟีน และสารสกัดจากยีสต์ ความเข้มข้นสุดท้าย 0.05 เปอร์เซ็นต์ และ 0.005 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนัก/ปริมาตร) ตามลำดับ ที่อุณหภูมิ 25-30, 40 และ 45 องศาเซลเซียส พบการเจริญของเชื้อเฉพาะที่อุณหภูมิ 25-30 องศาเซลเซียส ในขณะที่ไม่สามารถเจริญที่อุณหภูมิ 40 และ 45 องศาเซลเซียส เชื้อไม่สามารถเจริญได้ (ดังแสดงในรูปที่ 6) เมื่อเปรียบเทียบค่าความขุ่นของเซลล์ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ NBYE และ SFMM ที่อุณหภูมิ 25-30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ค่าความขุ่นของเซลล์ในอาหาร NBYE สูงกว่าค่าความขุ่นของเซลล์ในอาหาร SFMM ถึง 0.852 ดังนั้นในการเตรียมหัวเชื้อตามวิธีการในข้อ 3.1 ในการทดลองต่อไปจึงเลี้ยงโคโลนีเดี่ยวของแบคทีเรียสายพันธุ์ K10 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว NBYE ที่เติมไดเบนโซไธโอฟีน ความเข้มข้นสุดท้าย 0.05 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนัก/ปริมาตร) ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อให้ได้เซลล์ปริมาณมากในระยะเวลาสั้น หลังจากนั้นกำจัดกำมะถันอิน ๆ ในอาหารเลี้ยงเชื้อ NBYE ออกโดยการปั่นแยกเอาเฉพาะเซลล์มาแขวนลอยในอาหาร SFMM ที่เติมไดเบนโซไธโอฟีน ความเข้มข้นสุดท้าย

0.05 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนัก/ปริมาตร) ในปริมาตรเท่ากับน้ำเลี้ยงเชื้อหรือส่วนใสที่ทิ้งไปในขั้นตอนการปั่นแยกเซลล์ เพื่อใช้เป็นหัวเชื้อที่มีค่าความขุ่นของเซลล์สูง



รูปที่ 5 การเจริญของแบคทีเรียสายพันธุ์ K10 เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว NBYE (ภาคผนวก ก หมายเลข 2) โดยแปรผันอุณหภูมิที่ใช้เลี้ยงเป็นอุณหภูมิ 25-30 (—●—), 40 (—+—), 45 (—✳—) และ 50 (—●—) องศาเซลเซียส บ่มเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 36 ชั่วโมง

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



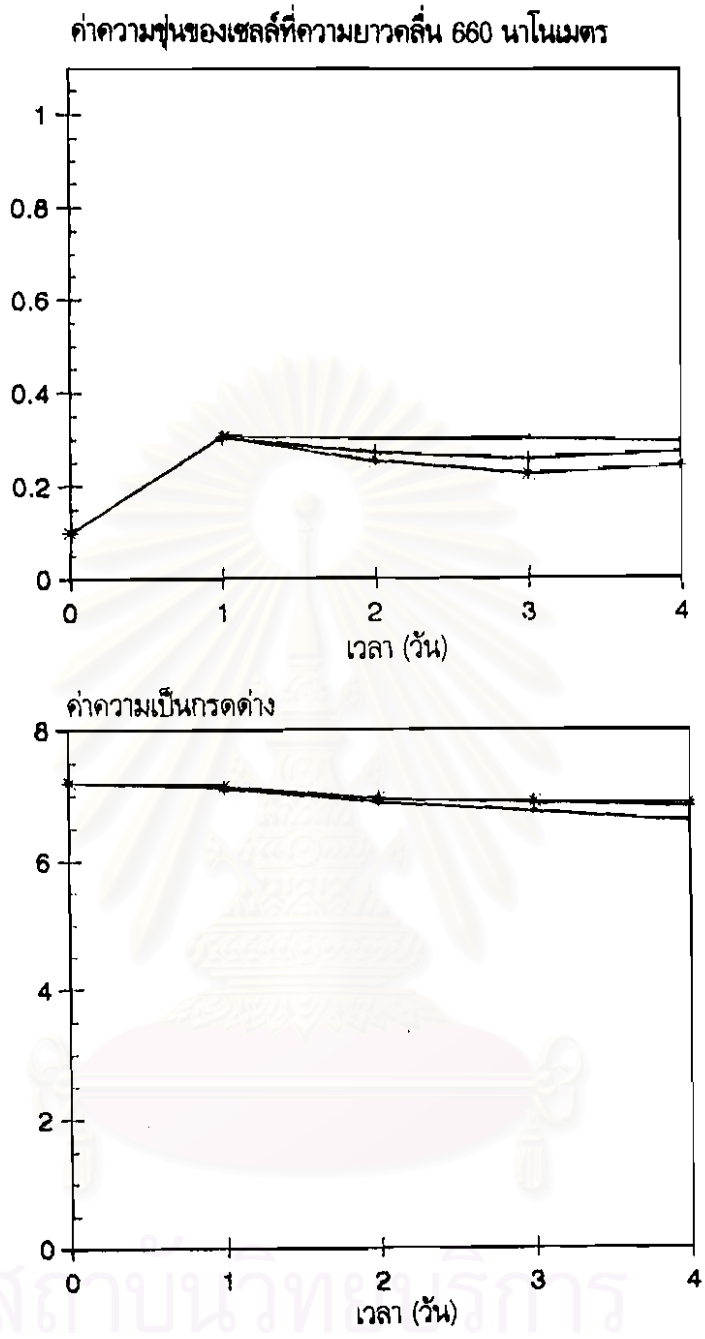
รูปที่ 6 การเจริญของแบคทีเรียสายพันธุ์ K10 เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว SFMM (ภาคผนวก ก หมายเลข 1) ที่เติมไดเบนโซไธโอฟีน ความเข้มข้นสุดท้าย 0.05 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนัก/ปริมาตร) ค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้นเท่ากับ 7.2 โดยแปรผันอุณหภูมิที่ใช้เลี้ยงเป็นอุณหภูมิ 25-30 (—•—), 40 (—+—) และ 45 (—✳—) องศาเซลเซียส บ่มเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 4 วัน

ผลการศึกษาปริมาณความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารอาหารซึ่งเป็นองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว SFMM ต่อการเจริญของแบคทีเรียสายพันธุ์ K10

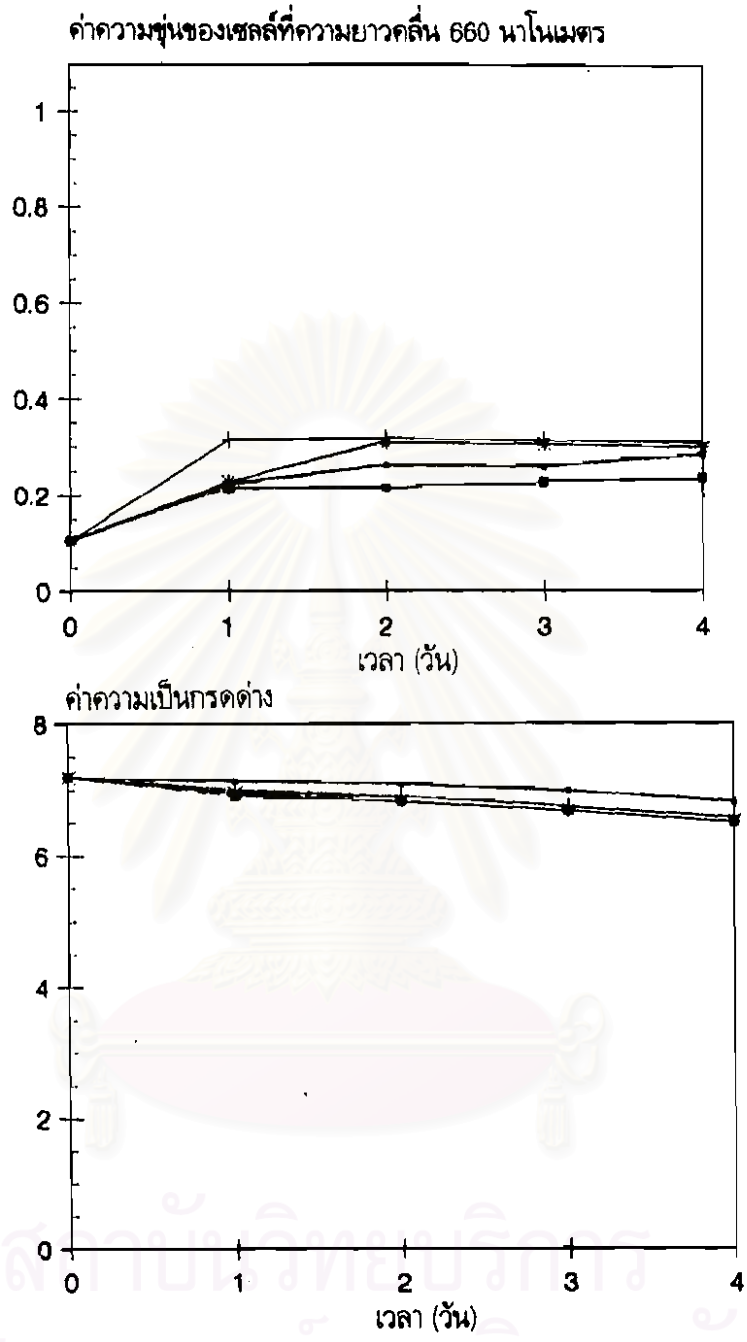
เนื่องจากแบคทีเรียสายพันธุ์ K10 ที่แยกได้มีการเจริญอยู่ในระดับต่ำเมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว SFMM ที่เติมไดเบนโซไธโอฟีน และสารสกัดจากยีสต์ ความเข้มข้นสุดท้าย 0.05 และ 0.005 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนัก/ปริมาตร) ตามลำดับ ซึ่งอาจเป็นสาเหตุทำให้มีการสร้าง 2-ไฮดรอกซีไบฟีนิลได้ในปริมาณน้อย การทดลองนี้จึงต้องการหาปริมาณสารอาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญของแบคทีเรียสายพันธุ์ K10

ผลการแปรผันปริมาณความเข้มข้นของสารอาหารชนิดต่าง ๆ ที่เป็นองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ SFMM ต่อการเจริญของแบคทีเรียสายพันธุ์ K10 โดยการวัดค่าความขุ่นของเซลล์ที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร ดังแสดงในรูปที่ 7-13 รูปที่ 7, 8, 9, 11, 12, 13 พบการเจริญสูงสุดในวันที่ 1 ของการทดลอง ต่อจากนั้นการเจริญจะมีค่าคงที่ตลอด 4 วัน ความเข้มข้นของสารอาหารต่าง ๆ ที่เหมาะสมที่สุดต่อการเจริญเป็นดังนี้ ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.22 เปอร์เซ็นต์ โปแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.08 เปอร์เซ็นต์ แอมโมเนียมไนเตรท 0.3 เปอร์เซ็นต์ เฟอริกคลอไรด์ 0.001 เปอร์เซ็นต์ แคลเซียมคลอไรด์ 0.002 เปอร์เซ็นต์ แมกนีเซียมคลอไรด์ 0.002 เปอร์เซ็นต์ กลูโคส 2.0 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนัก/ปริมาตร) แต่อย่างไรก็ตาม ค่าความขุ่นของเซลล์สูงสุดที่ได้ยังคงมีค่าเท่ากับหรือใกล้เคียงกับค่าความขุ่นของเซลล์ในชุดควบคุมหรืออาหารเลี้ยงเชื้อ SFMM ที่มีปริมาณความเข้มข้นของสารอาหารดังแสดงในภาคผนวก ก หมายเลข 1 เท่านั้น คือมีค่าเท่ากับ 0.362 เฉพาะสารสกัดจากยีสต์ซึ่งเป็นสารอาหารชนิดเดียวที่เป็นองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ SFMM ที่พบว่ามีผลต่อการเจริญของแบคทีเรียสายพันธุ์ K10 กล่าวคือการเจริญของแบคทีเรียสายพันธุ์ K10 แปรผันโดยตรงกับความเข้มข้นของสารสกัดจากยีสต์ที่ความเข้มข้นของสารสกัดจากยีสต์สูงขึ้น เชื้อจะเจริญได้ดีขึ้น และทำให้ค่าความเป็นกรดด่างลดลงอย่างเห็นได้ชัด สำหรับอาหารเลี้ยงเชื้อ SFMM ที่ไม่เติมกลูโคส เชื้อเจริญได้น้อยมากเมื่อเทียบกับชุดควบคุมและการเจริญลดลงในวันที่ 2, 3 และ 4 ของการทดลอง แสดงว่าเชื้อต้องการกลูโคสเพื่อการเจริญ ส่วนการเจริญเล็กน้อยที่พบในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่เติมกลูโคสนั้นอาจเป็นผลมาจากสารอินทรีย์ที่ปนเปื้อนมากับเชื้อเริ่มต้น

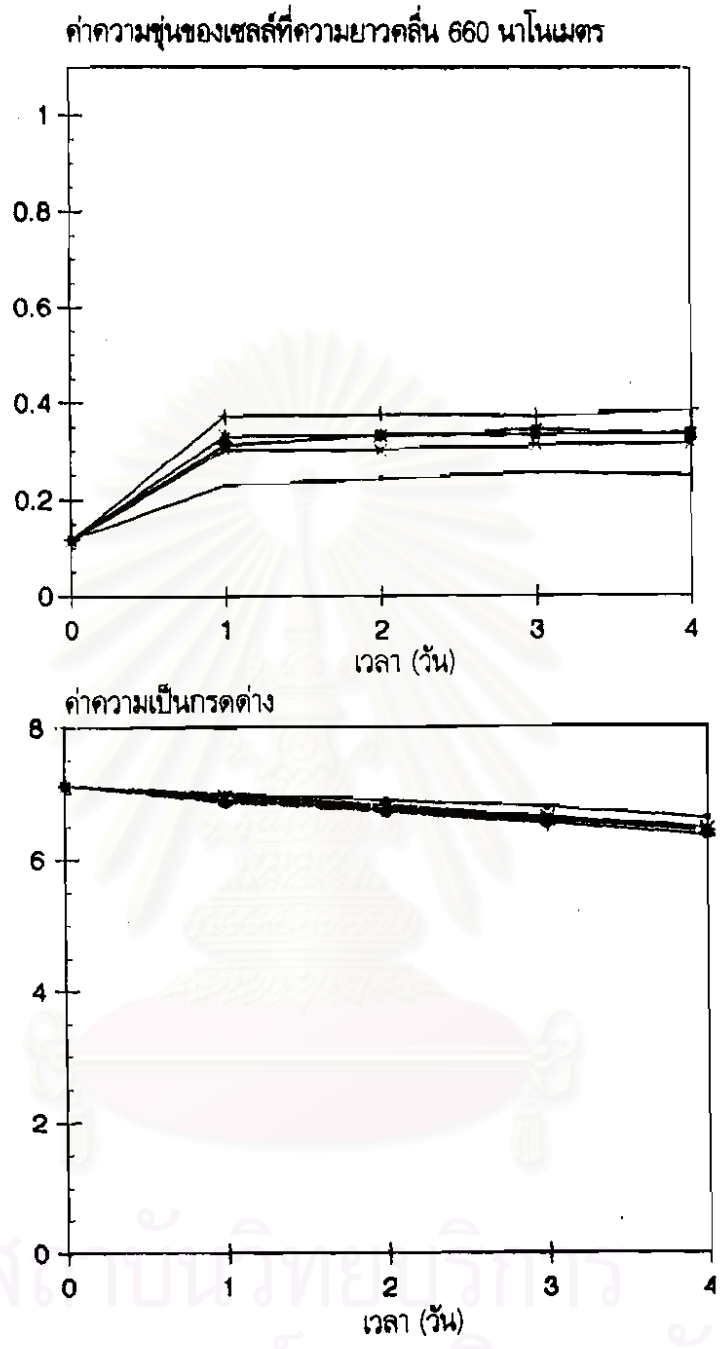
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



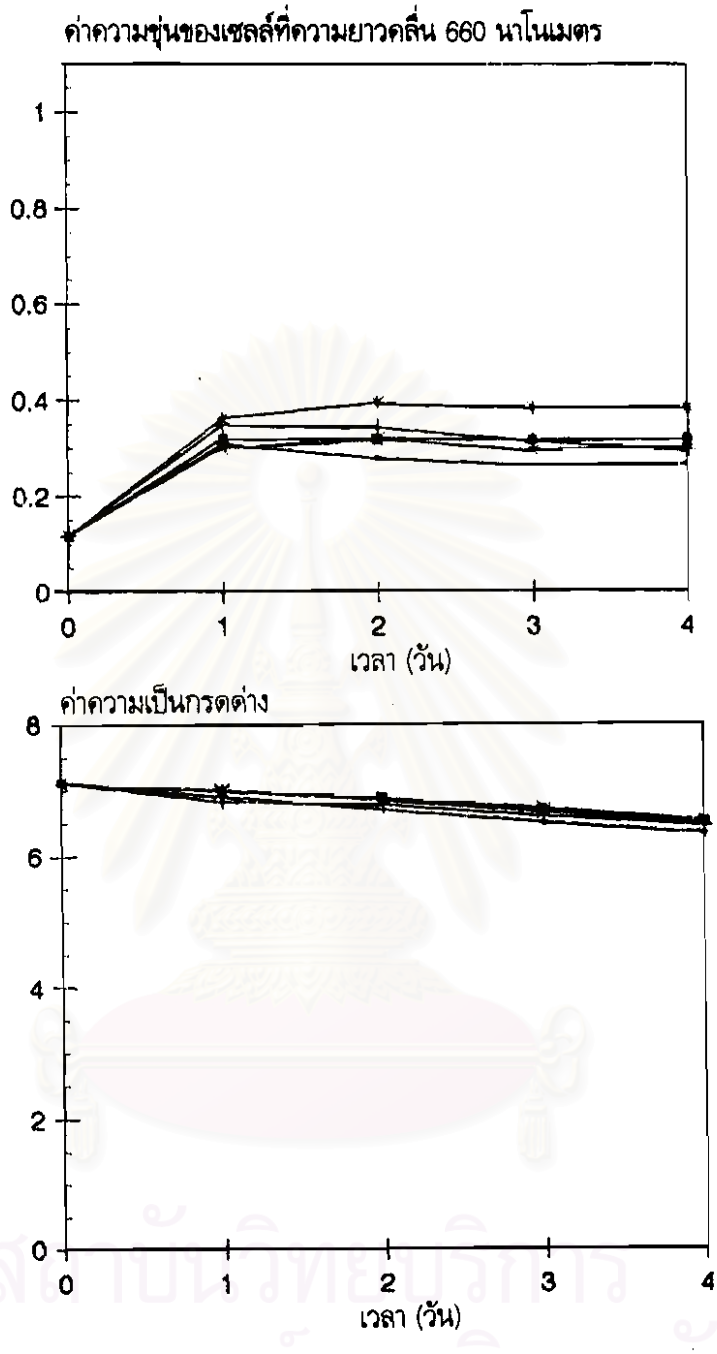
รูปที่ 7 แสดงผลของความเข้มข้นของไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟตและโปแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตต่อการเจริญ และการเปลี่ยนแปลงของค่าความเป็นกรดด่าง เมื่อเลี้ยงแบคทีเรียสายพันธุ์ K10 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว SFMM ที่เติมไดเบนโซไธโอฟีน ความเข้มข้นสุดท้าย 0.05 เปอร์เซ็นต์ ค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้นเท่ากับ 7.2 บ่มเขย่าบนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบ/นาที อุณหภูมิ 25-30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 วัน ชุดควบคุม (-•-) คือความเข้มข้นของไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต/โปแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตในสูตรอาหาร SFMM (ภาคผนวก ก หมายเลข 1) 0.22/0.08 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้ความเข้มข้นของไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต/โปแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตดังนี้ 0.22/0.08 (-•-), 0.44/0.16 (-+-) และ 0.66/0.24 (-*-) เปอร์เซ็นต์



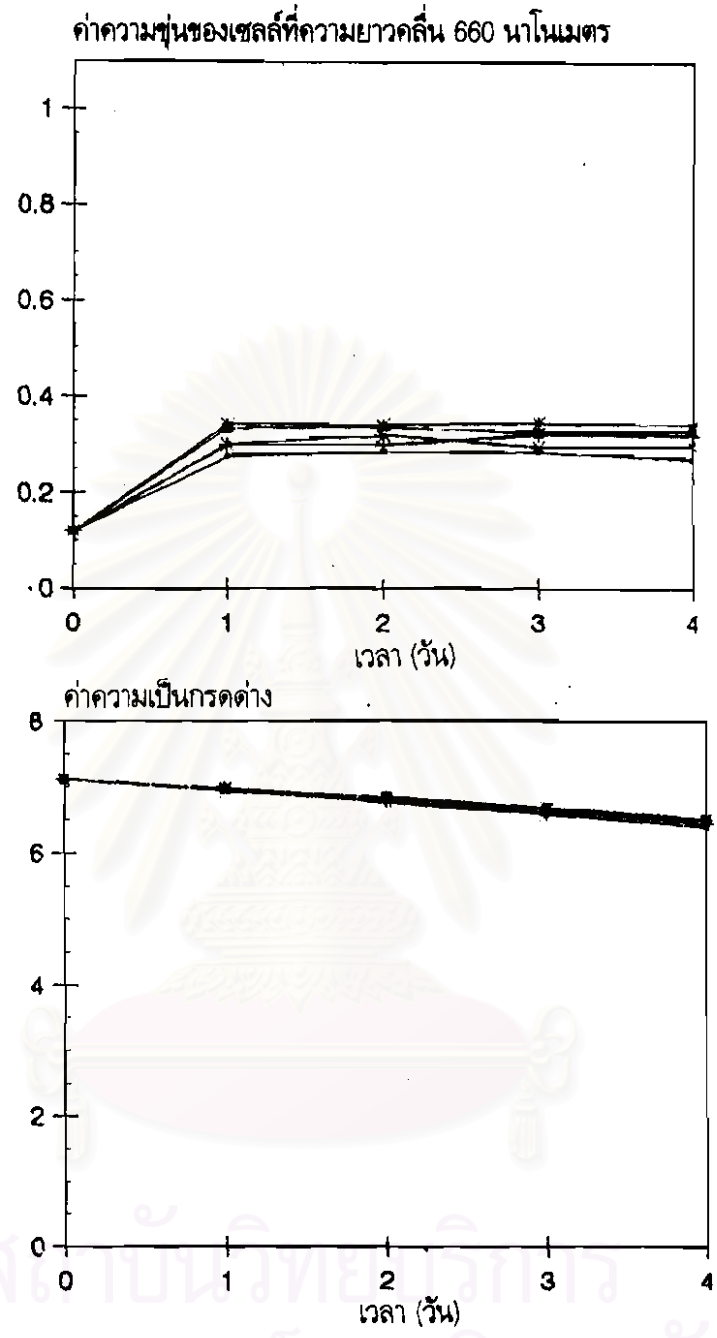
รูปที่ 8 แสดงผลของความเข้มข้นของแอมโมเนียมไนเตรทต่อการเจริญและการเปลี่ยนแปลงของค่าความกรดด่าง เมื่อเลี้ยงแบคทีเรียสายพันธุ์ K10 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว SFMM ที่เติมไดเบนโซไธโอฟีน ความเข้มข้นสุดท้าย 0.05 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนัก/ปริมาตร) ค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้นเท่ากับ 7.2 บ่มเขย่าบนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 25-30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 วัน ชุดควบคุม (⊣) คือความเข้มข้นของแอมโมเนียมไนเตรทในสูตรอาหาร SFMM 0.3 เปอร์เซ็นต์ (ภาคผนวก ก หมายเลข 1) โดยใช้ความเข้มข้นของแอมโมเนียมไนเตรทดังนี้ 0 (—•—), 0.3 (⊣), 0.6 (—*—) และ 1.5 (—•—) เปอร์เซ็นต์



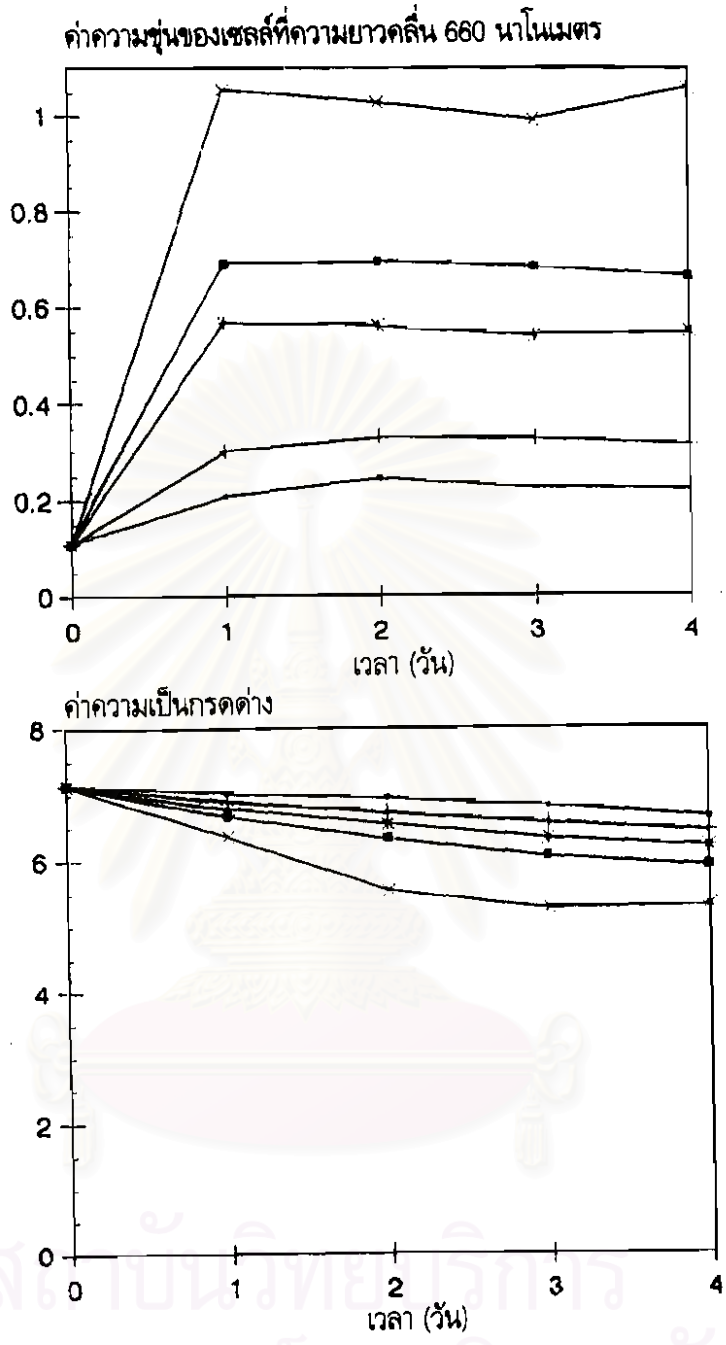
รูปที่ 9 แสดงผลของความเข้มข้นของเฟอริกคลอไรด์ต่อการเจริญและการเปลี่ยนแปลงของค่าความเป็นกรดด่าง เมื่อเลี้ยงแบคทีเรียสายพันธุ์ K10 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว SFMM ที่เติมไดเบนโซไธโอฟีน ความเข้มข้นสุดท้าย 0.06 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนัก/ปริมาตร) ค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้นเท่ากับ 7.2 บ่มเขย่าบนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 25-30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 วัน ชุดควบคุม (-+-) คือความเข้มข้นของเฟอริกคลอไรด์ในสูตรอาหาร SFMM 0.001 เปอร์เซ็นต์ (ภาคผนวก ก หมายเลข 1) โดยใช้ความเข้มข้นของเฟอริกคลอไรด์ดังนี้ 0 (-•-), 0.001 (-+-), 0.002 (-*-), 0.005 (-●-) และ 0.01 (-×-) เปอร์เซ็นต์



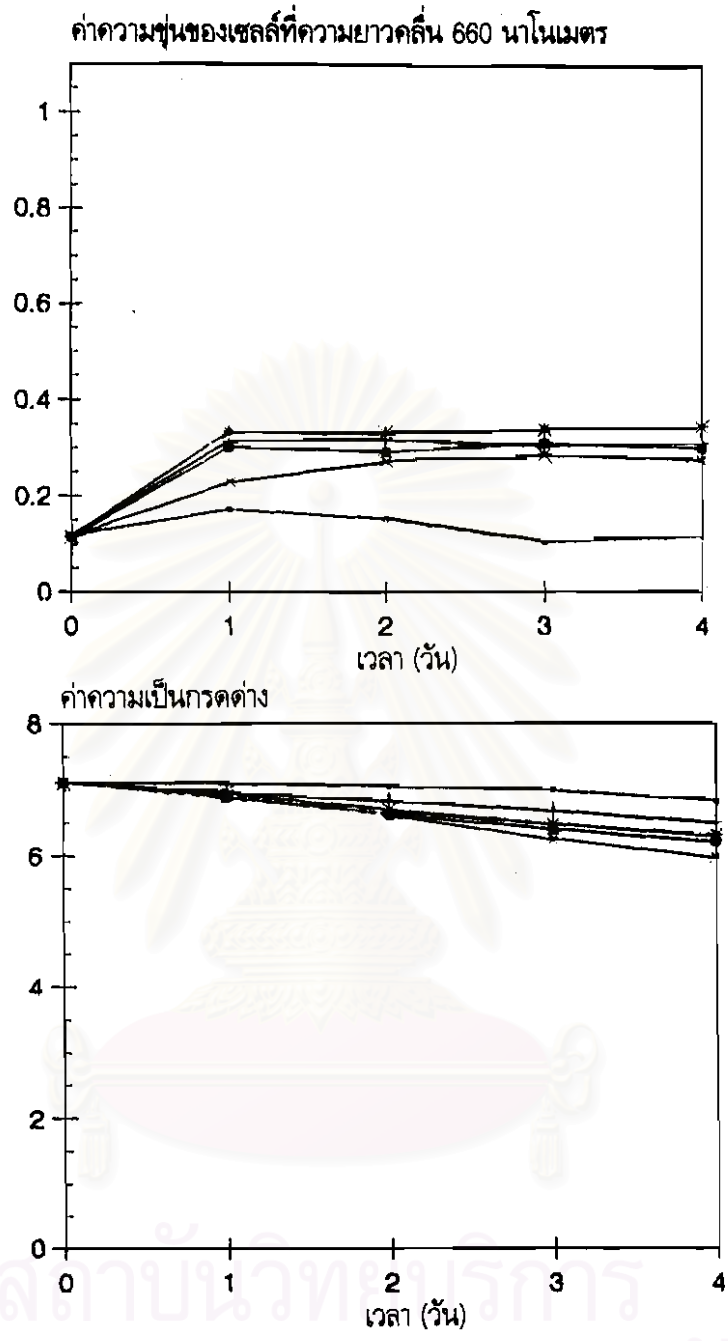
รูปที่ 10 แสดงผลของความเข้มข้นของแคลเซียมคลอไรด์ต่อการเจริญ และการเปลี่ยนแปลงของค่าความเป็นกรดด่าง เมื่อเลี้ยงแบคทีเรียสายพันธุ์ K10 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว SFMM ที่เติมไดเบนโซไธโอฟีน ความเข้มข้นสุดท้าย 0.05 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนัก/ปริมาตร) ค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้นเท่ากับ 7.2 บ่มเขย่า ความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 25-30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 วัน ชุดควบคุม (—+—) คือความเข้มข้นของแคลเซียมคลอไรด์ในสูตรอาหาร SFMM 0.001 เปอร์เซ็นต์ (ภาคผนวก ก หมายเลข 1) โดยใช้ความเข้มข้นของแคลเซียมคลอไรด์ดังนี้ 0 (—•—), 0.001 (—+—), 0.002 (—✳—), 0.005 (—■—) และ 0.01 (—✳—) เปอร์เซ็นต์



รูปที่ 11 แสดงผลของความเข้มข้นของแมกนีเซียมคลอไรด์ต่อการเจริญและการเปลี่ยนแปลงของค่าความเป็นกรดด่างเมื่อเลี้ยงแบคทีเรียสายพันธุ์ K10 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว SFMM ที่เติมไดเบนโซไธโอฟีน ความเข้มข้นสุดท้าย 0.05 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนัก/ปริมาตร) ค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้นเท่ากับ 7.2 บ่มเขย่าบนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 25-30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 วัน ชุดควบคุม (⊣) คือความเข้มข้นของแมกนีเซียมคลอไรด์ ในสูตรอาหาร SFMM 0.001 เปอร์เซ็นต์ (ภาคผนวก ก หมายเลข 1) โดยใช้ความเข้มข้นของแมกนีเซียมคลอไรด์ดังนี้ 0 (⊣), 0.001 (⊣), 0.002 (⊣), 0.005 (⊣) และ 0.01 (⊣) เปอร์เซ็นต์



รูปที่ 12 แสดงผลของความเข้มข้นของสารสกัดจากยีสต์ต่อการเจริญและการเปลี่ยนแปลงของค่าความเป็นกรดด่าง เมื่อเลี้ยงแบคทีเรียสายพันธุ์ K10 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว SFMM ที่เติมไดเบน-โซไธโอฟีน ความเข้มข้นสุดท้าย 0.05 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนัก/ปริมาตร) ค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้นเท่ากับ 7.2 บ่มเขย่าบนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 25-30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 วัน ชุดควบคุม (⊣) คือความเข้มข้นสารสกัดจากยีสต์ในสูตรอาหาร SFMM 0.005 เปอร์เซ็นต์ (ภาคผนวก ก หมายเลข 1) โดยใช้ความเข้มข้นของสารสกัดจากยีสต์ดังนี้ 0 (⊣), 0.005 (⊣), 0.01 (✳), 0.025 (⊣) และ 0.05 (✳) เปอร์เซ็นต์



รูปที่ 13 แสดงผลของความเข้มข้นของกลูโคสต่อการเจริญ และการเปลี่ยนแปลงของค่าความเป็นกรดด่าง เมื่อเลี้ยงแบคทีเรียสายพันธุ์ K10 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว SFMM ที่เติมไดแบนโซไธโอฟีน ความเข้มข้นสุดท้าย 0.05 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนัก/ปริมาตร) ค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้นเท่ากับ 7.2 บ่มเขย่าบนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 25-30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 วัน ชุดควบคุม (-+-) คือความเข้มข้นของกลูโคสในสูตรอาหาร SFMM 1.0 เปอร์เซ็นต์ (ภาคผนวก ก หมายเลข 1) โดยใช้ความเข้มข้นของกลูโคสดังนี้ 0 (-•-), 1.0 (-+-), 2.0 (-*-), 5.0 (-●-) และ 10.0 (-×-) เปอร์เซ็นต์

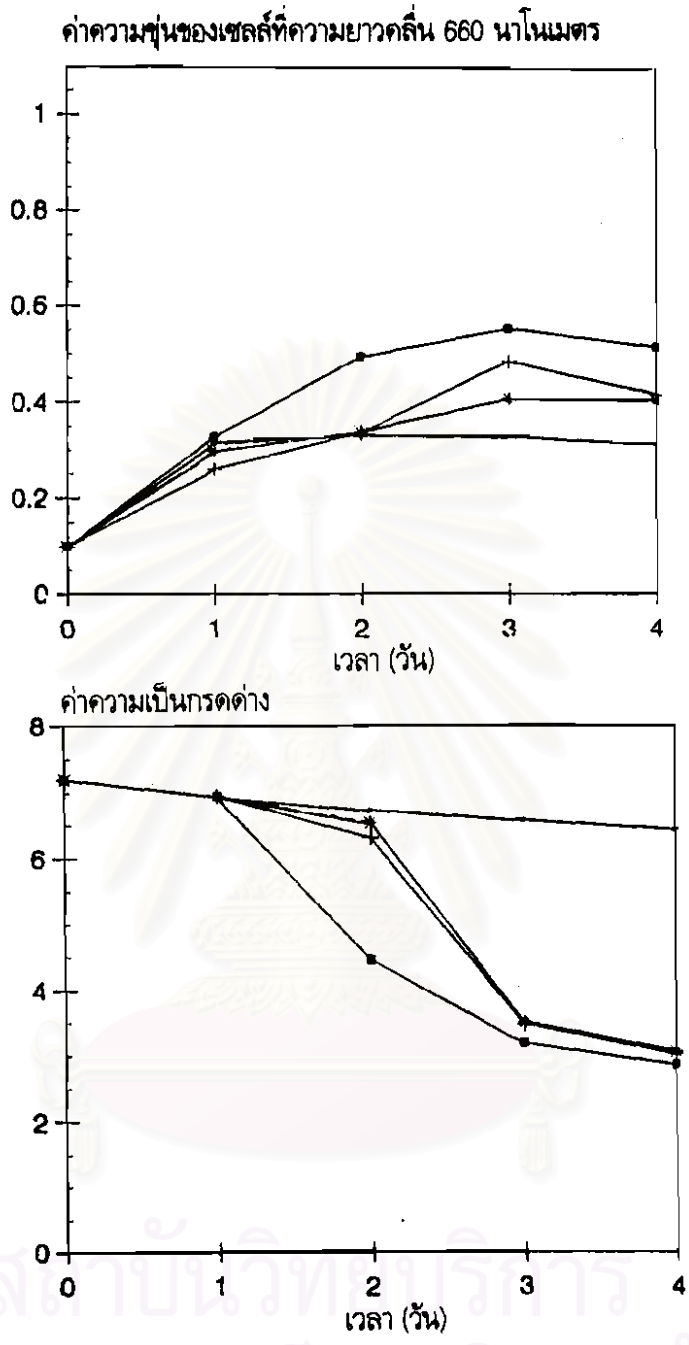
ผลการศึกษาชนิดของแหล่งวิตามินต่อการเจริญของแบคทีเรียสายพันธุ์ K10

การทดลองนี้ต้องการทดสอบว่าสารสกัดจากยีสต์ที่มีผลต่อการเจริญของแบคทีเรียสายพันธุ์ K10 นั้น สามารถทดแทนได้ด้วยวิตามินชนิดใดชนิดหนึ่งหรือวิตามินรวมหรือไม่

ผลการแปรผันชนิดของวิตามินต่าง ๆ ดังนี้ พารา-อะมิโนเบนโซอิค แอซิด, ไบโอติน, แคลเซียม แพนโตธีเนท, กรดโฟลิค, ไอโนซิทอล, กรดนิโคตินิก, ไพริดอกซีน, ไรโบเฟลวิน, ไทอามีน, ไซยาโนโคบาลา-มิน และวิตามินรวม ที่ความเข้มข้นสุดท้าย 10 ไมโครกรัม/ลิตร แทนสารสกัดจากยีสต์ ความเข้มข้นสุดท้าย 0.005 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนัก/ปริมาตร) ในสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว SFMM ที่เติมไดเบนโซไธโอฟีน 0.05 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนัก/ปริมาตร) พบว่าเฉพาะไบโอติน ไซยาโนโคบาลามิน และวิตามินรวมเท่านั้นที่มีผลต่อการเจริญของแบคทีเรียสายพันธุ์ K10 ชุดควบคุมพบการเจริญสูงสุดในวันที่ 1 ของการทดลอง และจะมีค่าคงที่ตลอดการทดลอง ไบโอติน ไซยาโนโคบาลามินและวิตามินรวม พบการเจริญสูงสุดในวันที่ 3 โดยค่าความขุ่นของเซลล์ที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร สูงกว่าค่าความขุ่นของเซลล์ในชุดควบคุมในวันที่ 3 เท่ากับ 0.157, 0.078 และ 0.226 ตามลำดับ อัตราการเจริญของเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมไบโอตินและไซยาโนโค-บาลามินช้ากว่าชุดควบคุม ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมวิตามินรวมแทนสารสกัดจากยีสต์ อัตราเร็วของการเจริญเท่ากับชุดควบคุมโดยเชื้อเจริญสูงสุดในวันที่ 3 ของการทดลอง

การเจริญของเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมไบโอติน ไซยาโนโคบาลามินและวิตามินรวม ค่าความเป็นกรดด่างลดลงอย่างชัดเจน ในวันที่ 3 และ 4 โดยค่าความเป็นกรดด่างลดลงมีค่าประมาณ 3 ในขณะที่ค่าความเป็นกรดด่างในวันที่ 3 และ 4 ของชุดควบคุมมีค่าเท่ากับ 6.0 ผลการวิเคราะห์น้ำเลี้ยงเชื้อที่เติมไบโอติน ไซยาโนโคบาลาติน และวิตามินรวมที่วันที่ 3 ของการทดลองไม่พบซัลเฟต แสดงว่าค่าความเป็นกรดด่างที่ลดลง มิได้เป็นผลมาจากการย่อยสลายไดเบนโซไธโอฟีนไปเป็นกรดกำมะถัน

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 14 แสดงผลของวิตามิน ไบโอติน (-+-), ไซยาโนโคบาลามิน (-*-), วิตามินรวม (-•-) ต่อการเจริญและการเปลี่ยนแปลงของค่าความเป็นกรดด่าง เมื่อเลี้ยงแบคทีเรียสายพันธุ์ K10 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว SFMM ที่เติมไดเบนโซไธโอฟีน ความเข้มข้นสุดท้าย 0.05 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนัก/ปริมาตร) แต่ไม่เติมสารสกัดจากยีสต์ ค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้นเท่ากับ 7.2 บ่มเขย่าบนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 25-30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 วัน ชุดควบคุม (-+-) คืออาหารเลี้ยงเชื้อเหลว SFMM ที่เติมสารสกัดจากยีสต์ ความเข้มข้นสุดท้าย 0.005 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนัก/ปริมาตร)

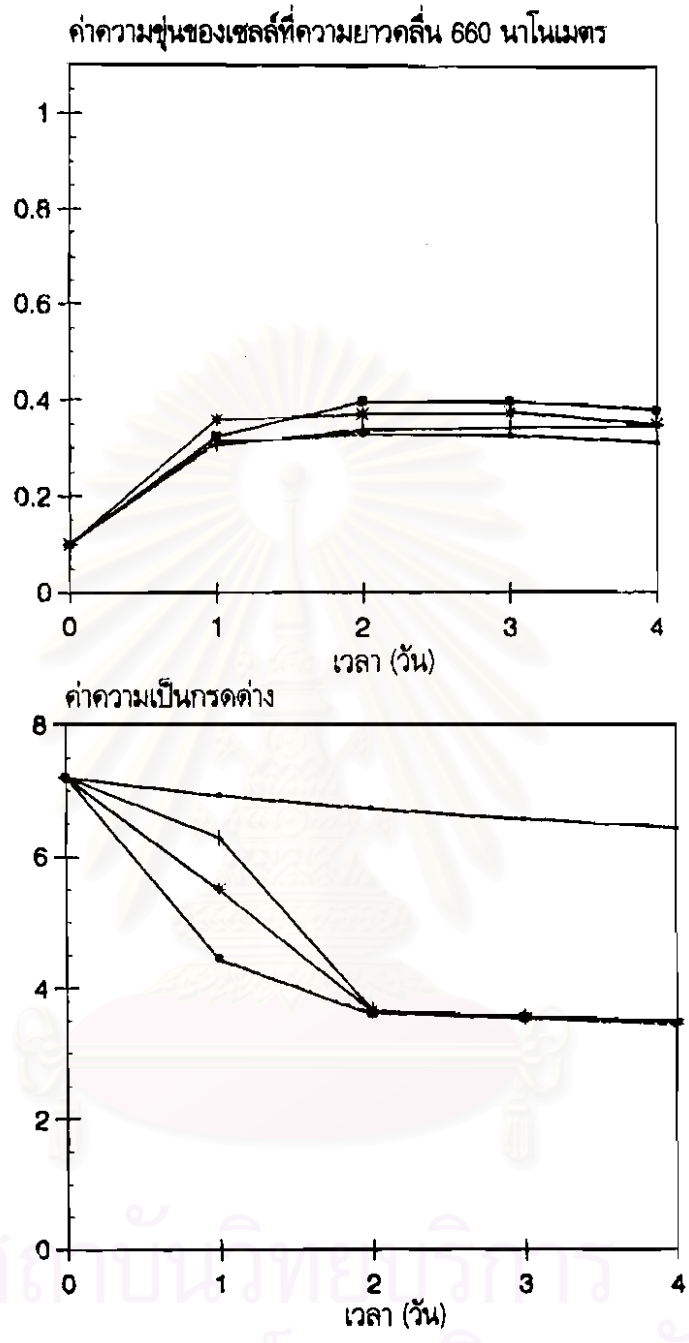
ผลการศึกษาชนิดของกรดอะมิโนต่อการเจริญของแบคทีเรียสายพันธุ์ K10

การทดลองนี้ต้องการทดสอบว่าสารสกัดจากยีสต์ที่มีผลต่อการเจริญของแบคทีเรียสายพันธุ์ K10 นั้น สามารถทดแทนได้ด้วยกรดอะมิโนชนิดใดชนิดหนึ่งหรือกรดอะมิโนรวมได้หรือไม่

ผลการแปรผันชนิดของกรดอะมิโนต่าง ๆ ดังนี้ อะลานีน, อาร์จีนีน, แอสพาร์ติก แอซิด, กลูตามิค แอซิด, ฮิสติดีน, ลิวซีน, ไลซีน ไฮโดรคลอไรด์, เมทไธโอนีน, ฟีนิลอะลานีน, โพลีน, ซีรีน, ทรีโอนีน, ทริปโตเฟน, ไทโรซีน, วาลีน และกรดอะมิโนรวม ที่ความเข้มข้นสุดท้าย 50 ไมโครกรัม/ลิตร แทนสารสกัดจากยีสต์ ความเข้มข้นสุดท้าย 0.005 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนัก/ปริมาตร) ในสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว SFMM ที่เติมไดเบนโซไธโอฟีน 0.05 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนัก/ปริมาตร) พบว่าเฉพาะอะลานีน ทริปโตเฟน และกรดอะมิโนรวมเท่านั้นที่มีผลต่อการเจริญของแบคทีเรียสายพันธุ์ K10 อาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมอะลานีน ทริปโตเฟน และชุดควบคุม พบการเจริญสูงสุดในวันที่ 1 ของการทดลอง อัตราเร็วของการเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมทริปโตเฟนสูงกว่าชุดควบคุม อาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมกรดอะมิโนรวม พบการเจริญสูงสุดในวันที่ 2 ของการทดลอง อัตราเร็วของการเจริญเท่ากับชุดควบคุม ค่าความขุ่นของเซลล์ที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมทริปโตเฟนที่วันที่ 1 ของการทดลอง และในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมกรดอะมิโนรวมที่วันที่ 2 ของการทดลอง ซึ่งเป็นวันที่พบการเจริญสูงสุด สูงกว่าชุดควบคุม 0.041 และ 0.067 ตามลำดับ

ผลการเจริญของเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมอะลานีน ทริปโตเฟนและกรดอะมิโนรวม ค่าความเป็นกรดด่างลดลงอย่างชัดเจน ค่าความเป็นกรดด่างในวันที่ 2 ของการทดลองลดลงเหลือเป็น 3.5 ในขณะที่ค่าความเป็นกรดด่างของชุดควบคุม มีค่าเท่ากับ 6.3 ผลการวิเคราะห์น้ำเลี้ยงเชื้อที่เติมอะลานีน ทริปโตเฟน และกรดอะมิโนรวมที่วันที่ 2 ของการทดลองไม่พบซัลเฟต แสดงว่าค่าความเป็นกรดด่างที่ลดลง มิได้เป็นผลมาจากการย่อยสลายไดเบนโซไธโอฟีนไปเป็นกรดกำมะถัน

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

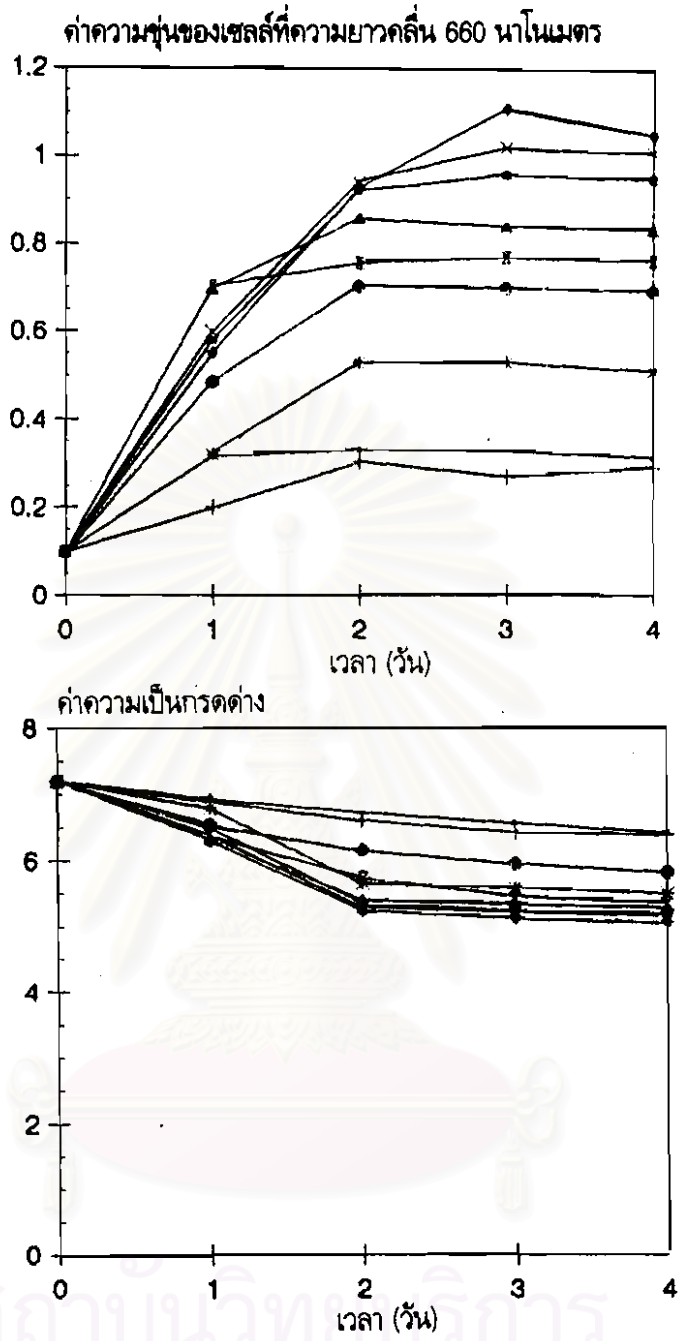


รูปที่ 15 แสดงผลของกรดอะมิโน อะลานีน (-+-), ทริปโตเฟน (-*-), กรดอะมิโนรวม (-●-) ต่อการเจริญและการเปลี่ยนแปลงของค่าความเป็นกรดด่าง เมื่อเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ K10 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว SFMM ที่เติมไดเบนโซไธโอฟีน ความเข้มข้นสุดท้าย 0.05 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนัก/ปริมาตร) แต่ไม่เติมสารสกัดจากยีสต์ ค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้นเท่ากับ 7.2 บ่มเขย่าบนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 25-30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 วัน ชุดควบคุม (-+-) คืออาหารเลี้ยงเชื้อเหลว SFMM ที่เติมสารสกัดจากยีสต์ ความเข้มข้นสุดท้าย 0.005 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนัก/ปริมาตร)

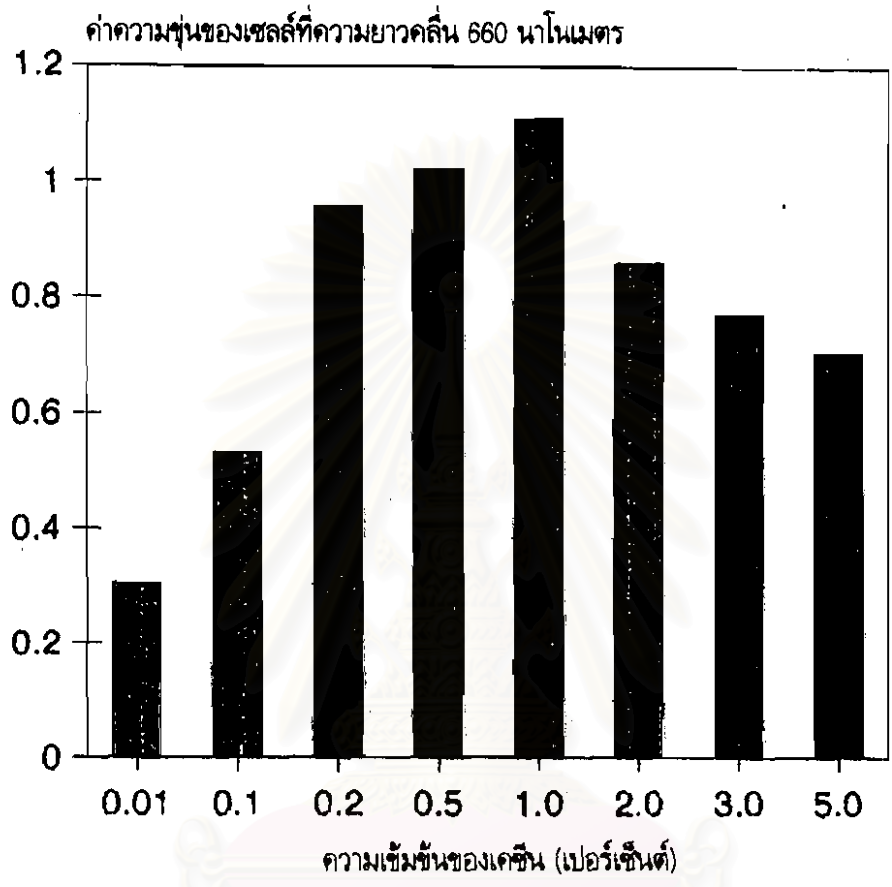
ผลการศึกษาชนิดและความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์ต่อการเจริญของแบคทีเรียสายพันธุ์ K10

ผลการแปรผันชนิดของแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์ได้แก่ เคซีน สารสกัดจากเนื้อ เปปโตน และทริปโตน ในอาหารเลี้ยงเชื้อ SFMM แทนสารสกัดจากยีสต์ จากรูปที่ 16 จะได้ว่าการเจริญของเชื้อสูงขึ้นเมื่อความเข้มข้นของเคซีนสูงขึ้น การเปลี่ยนแปลงของค่าความเป็นกรดด่างแปรผันโดยตรงกับการเจริญ ยิ่งการเจริญมาก ค่าความเป็นกรดด่างจะลดลงมากเช่นเดียวกัน จากรูปที่ 17 ความเข้มข้นของเคซีนที่เหมาะสมที่สุดต่อการเจริญคือ 1.0 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนัก/ปริมาตร) ในวันที่ 3 ของการทดลอง ซึ่งเป็นวันที่การเจริญสูงสุด ค่าความขุ่นของเซลล์ที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตรเท่ากับ 1.1 สูงกว่าค่าความขุ่นของเซลล์ของชุดควบคุม เท่ากับ 0.782 ความเข้มข้นของเคซีนที่สูงกว่า 1.0 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนัก/ปริมาตร) พบการเจริญลดลง แต่อัตราเร็วของการเจริญที่ความเข้มข้น 2.0 และ 3.0 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนัก/ปริมาตร) สูงกว่าอัตราเร็วของการเจริญที่ความเข้มข้น 1.0 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนัก/ปริมาตร) จากรูปที่ 18 เมื่อความเข้มข้นของสารสกัดจากเนื้อสูงขึ้น การเจริญและอัตราการเจริญของเชื้อสูงขึ้น ภาวะที่ทดสอบความเข้มข้นสูงสุดของสารสกัดจากเนื้อที่ใช้เท่ากับ 2.0 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนัก/ปริมาตร) เนื่องจากที่ความเข้มข้นของสารสกัดจากเนื้อสูงกว่านี้ อาหารเลี้ยงเชื้อมีสีเข้มและมีตะกอนแขวนลอยไม่สามารถนำมาทำการวิเคราะห์หา 2-ไฮดรอกซีไบฟีนิลด้วยวิธีแก๊ส โครมาโตกราฟฟีได้ การเจริญของเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมสารสกัดจากเนื้อเข้มข้น 2.0 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนัก/ปริมาตร) ที่วันที่ 3 ของการทดลอง ค่าความขุ่นของเซลล์ที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตรเท่ากับ 1.8 สูงกว่าค่าความขุ่นของเซลล์ของชุดควบคุมเท่ากับ 1.5 และเช่นเดียวกันกับเคซีน การเปลี่ยนแปลงของค่าความเป็นกรดด่างแปรผันโดยตรงกับการเจริญ ยิ่งมีการเจริญมาก ค่าความเป็นกรดด่างจะลดลงมาก จากรูปที่ 19 และรูปที่ 20 เมื่อความเข้มข้นของเปปโตน หรือทริปโตนสูงขึ้น การเจริญและอัตราการเจริญสูงขึ้น ภาวะที่ทดสอบใช้ความเข้มข้นของเปปโตนหรือทริปโตนสูงสุดเพียง 0.1 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนัก/ปริมาตร) ด้วยเหตุผลเช่นเดียวกันกับสารสกัดจากเนื้อ เปปโทนที่ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนัก/ปริมาตร) การเจริญสูงสุดในวันที่ 1 ของการทดลอง หลังจากนั้นการเจริญจะคงที่เช่นเดียวกันกับชุดควบคุม ที่วันที่ 1 ของการทดลอง ค่าความขุ่นของเซลล์ที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร เท่ากับ 0.5 สูงกว่าค่าความขุ่นของเซลล์ของชุดควบคุมเท่ากับ 0.181 ในทริปโตนเชื้อเจริญได้ดี การเจริญสูงสุดในวันที่ 3 ของการทดลอง ค่าความขุ่นของเซลล์ที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร เท่ากับ 1.158 สูงกว่าค่าความขุ่นของเซลล์ของชุดควบคุมเท่ากับ 0.83

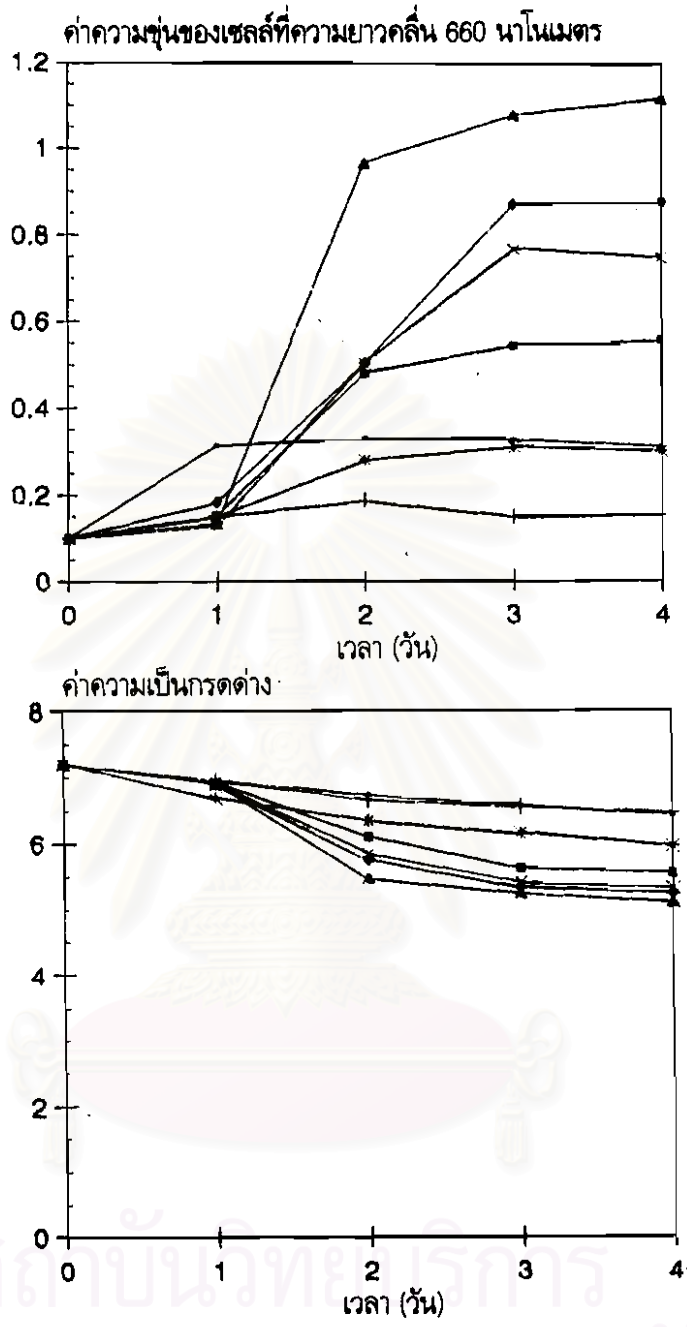
เมื่อเปรียบเทียบผลของชนิดและความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์ที่ทดสอบต่อการเจริญของเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ K10 ทริปโตนเป็นแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์ที่ดีที่สุดสำหรับการเจริญ ทั้งนี้เพราะทริปโตนที่ความเข้มข้นเพียง 0.1 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนัก/ปริมาตร) ได้ค่าความขุ่นของเซลล์ที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร มีค่าเท่ากับประมาณ 1.1 ในขณะที่ต้องใช้เคซีนเข้มข้นถึง 1.0 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนัก/ปริมาตร) หรือ 10 เท่าของความเข้มข้นของทริปโตนจึงจะได้ค่าความขุ่นของเซลล์เท่ากับประมาณ 1.1



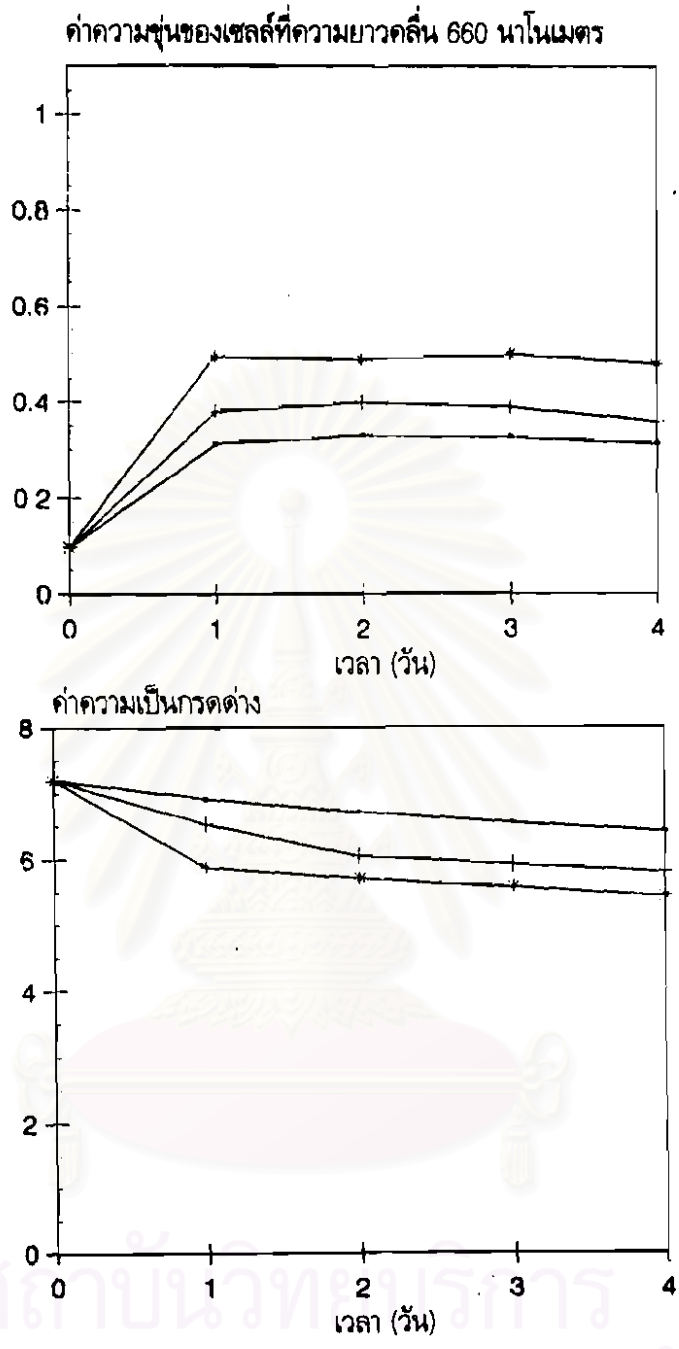
รูปที่ 16 แสดงผลของความเข้มข้นของเคซีนต่อการเจริญและการเปลี่ยนแปลงของค่าความเป็นกรดด่าง เมื่อเลี้ยงแบคทีเรียสายพันธุ์ K10 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ SFMM ที่เติมไดเบนโซไธโอฟีน ความเข้มข้นสุดท้ายเข้มข้นสุดท้าย 0.05 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนัก/ปริมาตร) แต่ไม่เติมสารสกัดจากยีสต์ ค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้นเท่ากับ 7.2 บ่มเขย่าบนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 25-30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 วัน ชุดควบคุม (—•—) คืออาหารเลี้ยงเชื้อเหลว SFMM ที่เติมสารสกัดจากยีสต์ ความเข้มข้นสุดท้าย 0.005 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนัก/ปริมาตร) โดยใช้ความเข้มข้นของเคซีนดังนี้ 0.01 (—+—), 0.1 (—*—), 0.20 (—•—), 0.50 (—×—), 1.0 (—◆—), 2.0 (—◆—), 3.0 (—✳—) และ 5.0 (—●—) เปอร์เซ็นต์



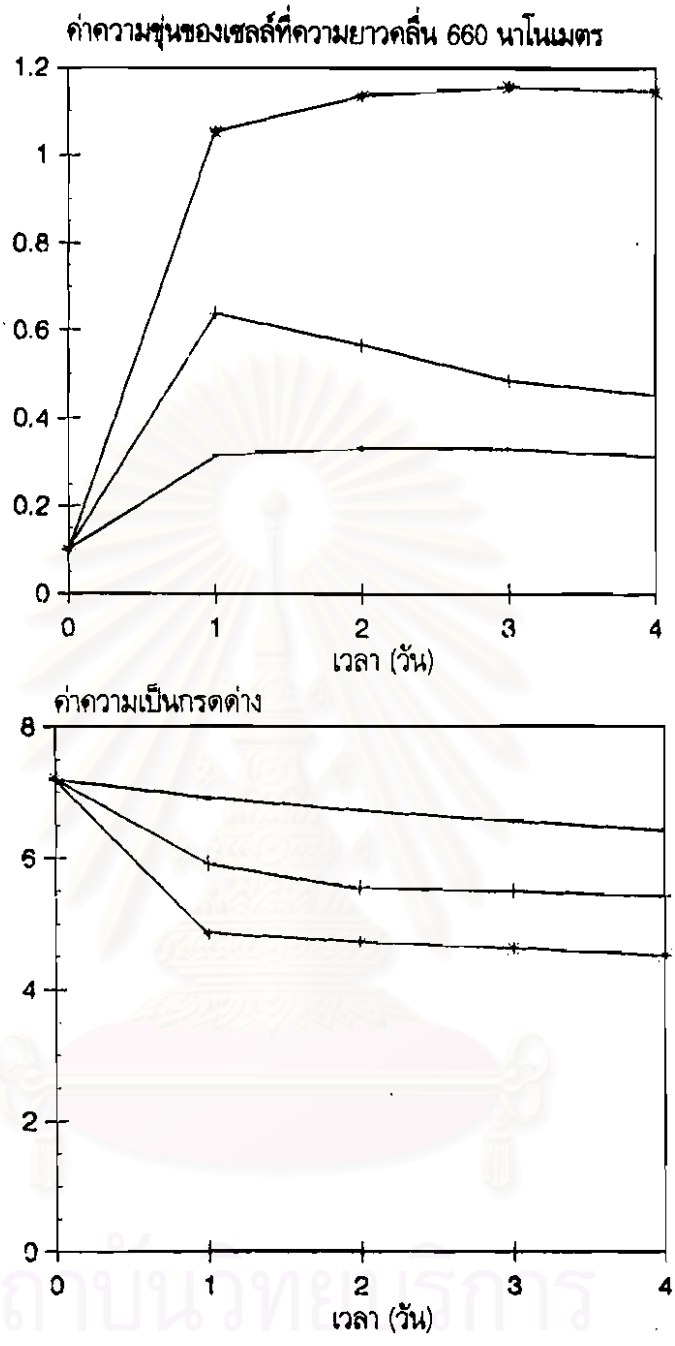
รูปที่ 17 แสดงผลของความเข้มข้นที่เหมาะสมของเคซีนต่อการเจริญ เมื่อเลี้ยงแบคทีเรียสายพันธุ์ K10 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว SFMM ที่เติมไดเบนโซไธโอฟีน ความเข้มข้นสุดท้าย 0.05 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนัก/ปริมาตร) แต่ไม่เติมสารสกัดจากยีสต์ ค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้นเท่ากับ 7.2 บ่มเขย่าบนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 25-30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน



รูปที่ 18 แสดงผลของความเข้มข้นของสารสกัดจากเนื้อต่อการเจริญ และการเปลี่ยนแปลงของค่าความเป็นกรดด่าง เมื่อเลี้ยงแบคทีเรียสายพันธุ์ K10 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ SFMM ที่เติมไดเบนโซไธโอฟีนความเข้มข้นสุดท้าย 0.05 เปอร์เซ็นต์(น้ำหนัก/ปริมาตร)แต่ไม่เติมสารสกัดจากยีสต์ ค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้นเท่ากับ 7.2 บ่มเขย่าบนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 25-30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 วัน ชุดควบคุม (-•-) คืออาหารเลี้ยงเชื้อ SFMM ที่เติมสารสกัดจากยีสต์ความเข้มข้นสุดท้าย 0.005 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนัก/ปริมาตร) โดยใช้ความเข้มข้นของสารสกัดจากเนื้อดังนี้ 0.05 (-+-), 0.10 (-*-), 0.50 (-•-), 1.0 (-*-), 1.5 (-•-) และ 2.0 (-•-) เปอร์เซ็นต์



รูปที่ 19 แสดงผลของความเข้มข้นของเปปโตนต่อการเจริญ และการเปลี่ยนแปลงของค่าความเป็นกรดด่าง เมื่อเลี้ยงแบคทีเรียสายพันธุ์ K10 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว SFMM ที่เติมไดเบนโซไธโอฟีน ความเข้มข้นสุดท้าย 0.05 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนัก/ปริมาตร) แต่ไม่เติมสารสกัดจากยีสต์ ค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้นเท่ากับ 7.2 บ่มเขย่าบนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 25-30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 วัน ชุดควบคุม (-•-) คืออาหารเลี้ยงเชื้อเหลว SFMM ที่เติมสารสกัดจากยีสต์ ความเข้มข้นสุดท้าย 0.005 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนัก/ปริมาตร) โดยใช้ความเข้มข้นของเปปโตนดังนี้ 0.05 (-+-) และ 0.10 (-*-) เปอร์เซ็นต์



รูปที่ 20 แสดงผลของความเข้มข้นของทริปโตนต่อการเจริญ และการเปลี่ยนแปลงของค่าความเป็นกรดด่าง เมื่อเลี้ยงแบคทีเรียสายพันธุ์ K10 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว SFMM ที่เติมไดเบนโซไธโอฟีน ความเข้มข้นสุดท้าย 0.05 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนัก/ปริมาตร) แต่ไม่เติมสารสกัดจากยีสต์ ค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้นเท่ากับ 7.2 บ่มเขย่าบนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 25-30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 วัน ชุดควบคุม (—•—) คืออาหารเลี้ยงเชื้อเหลว SFMM ที่เติมสารสกัดจากยีสต์ ความเข้มข้นสุดท้าย 0.005 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนัก/ปริมาตร) โดยใช้ความเข้มข้นของทริปโตนดังนี้ 0.05 (—+—) และ 0.10 (—*—) เปอร์เซ็นต์

ผลการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญของแบคทีเรียสายพันธุ์ K10 และกระบวนการย่อยสลายไดเบนโซไธโอฟีน

จากรูปที่ 12 พบว่าสารสกัดจากยีสต์เป็นองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ SFMM ที่มีผลต่อการเจริญของแบคทีเรียสายพันธุ์ K10 กล่าวคือเชื้อจะเจริญได้ดีในอาหารเลี้ยงเชื้อ SFMM ที่มีความเข้มข้นของสารสกัดจากยีสต์สูง ภาวะที่ทดสอบความเข้มข้นของสารสกัดจากยีสต์สูงสุดคือ 0.05 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนัก/ปริมาตร) เชื้อเจริญสูงสุดในวันที่ 1 ของการทดลอง โดยค่าความขุ่นของเซลล์ที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร เท่ากับ 1.06 สูงกว่าค่าความขุ่นของเซลล์ เมื่อเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อ SFMM (ภาคผนวก ก หมายเลข 1) ซึ่งมีสารสกัดจากยีสต์ ความเข้มข้นสุดท้าย 0.005 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนัก/ปริมาตร) หรือชุดควบคุมเท่ากับ 0.75 แต่เมื่อน่าน้ำเลี้ยงเชื้อ เมื่อเชื้อเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อ SFMM ที่มีความเข้มข้นของสารสกัดจากยีสต์เท่ากับ 0, 0.005, 0.01, 0.025 และ 0.05 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนัก/ปริมาตร) ทุกวันตลอด 4 วันของการทดลอง มาทำการวิเคราะห์หา 2-ไฮดรอกซีไบฟีนิล ซึ่งเป็นตัวกลางของการย่อยสลายไดเบนโซไธโอฟีนโดยกระบวนการโฟเอสด้วยวิธีแก๊ส โครมาโตกราฟฟี ตามวิธีการในข้อ 3 ตรวจพบ 2-ไฮดรอกซีไบฟีนิลเฉพาะในน้ำเลี้ยงเชื้อ SFMM ที่มีสารสกัดจากยีสต์เข้มข้น 0.005 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนัก/ปริมาตร) เท่านั้นในวันที่ 3 ของการทดลอง การที่ไม่พบ 2-ไฮดรอกซีไบฟีนิล ในน้ำเลี้ยงเชื้อ SFMM ที่ไม่เติมสารสกัดจากยีสต์ แสดงว่าสารสกัดจากยีสต์เป็นองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ SFMM ที่จำเป็นในกระบวนการย่อยสลายไดเบนโซไธโอฟีน และเนื่องจากสารสกัดจากยีสต์มีกำมะถันอินทรีย์เป็นองค์ประกอบ ดังนั้นเมื่อปริมาณความเข้มข้นของสารสกัดจากยีสต์สูงเกินกว่าความต้องการสำหรับกระบวนการย่อยสลายไดเบนโซไธโอฟีน เชื้ออาจจะเลือกใช้สารสกัดจากยีสต์ในการเจริญ โดยใช้สารสกัดจากยีสต์เป็นแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์ วิตามิน แร่ธาตุ growth factor ฯลฯ รวมทั้งแหล่งกำมะถันอินทรีย์ เชื้อจึงเจริญเติบโตได้ดีมาก แต่ไม่ย่อยสลายไดเบนโซไธโอฟีน

การศึกษาผลของการใช้วิตามินและกรดอะมิโนชนิดต่าง ๆ แทนสารสกัดจากยีสต์ ต่อการเจริญของแบคทีเรียสายพันธุ์ K10 พบว่าสามารถทดแทนได้ด้วยไบโอติน ไธยาโนโคบาลามิน วิตามินรวม อะลานีน ทริปโตเฟน กรดอะมิโนรวม รูปที่ 14 และ รูปที่ 15 แต่ผลการวิเคราะห์น้ำเลี้ยงเชื้อโดยวิธีแก๊ส โครมาโตกราฟฟี ตามวิธีการในข้อ 3 ไม่พบ 2-ไฮดรอกซีไบฟีนิล นอกจากนั้นค่าความเป็นกรดด่างของน้ำเลี้ยงเชื้อลดลงอย่างชัดเจนเมื่อเทียบกับน้ำเลี้ยงเชื้อที่เติมสารสกัดจากยีสต์ แต่ผลการวิเคราะห์ไม่พบซัลเฟต แสดงว่าเชื้อใช้ไดเบนโซไธโอฟีนเป็นแหล่งกำมะถันอินทรีย์โดยการย่อยสลายด้วยกระบวนการอื่น

ผลการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญของแบคทีเรียสายพันธุ์ K10 และกระบวนการย่อยสลายไดเบนโซไธโอฟีนในอาหารเลี้ยงเชื้อ SFMM ที่เติมแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์

ผลการนำน้ำเลี้ยงเชื้อที่แปรผันแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์ คือ เคซีน ที่ความเข้มข้น 0.01, 0.10, 0.20, 0.50, 1.0, 2.0, 3.0 และ 5.0 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนัก/ปริมาตร), สารสกัดจากเนื้อที่ความเข้มข้น 0.05, 0.10, 0.50, 1.0, 1.5 และ 2.0 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนัก/ปริมาตร), เปปโตน ที่ความเข้มข้น 0.05 และ 0.10 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนัก/ปริมาตร) และทริปโตน ที่ความเข้มข้น 0.05 และ 0.10 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนัก/ปริมาตร) ในอาหารเลี้ยงเชื้อ SFMM ทดแทนสารสกัดจากยีสต์ มาทำการวิเคราะห์หา 2-ไฮดรอกซีไบฟีนิลด้วยวิธีแก๊ส โครมาโตกราฟฟี ตามวิธีการในข้อ 3 ในน้ำเลี้ยงเชื้อที่เติมเปปโตน และทริปโตน ไม่พบ 2-ไฮดรอกซีไบฟีนิล แต่พบ 2-ไฮดรอกซีไบฟีนิลในน้ำเลี้ยงเชื้อที่เติมสารสกัดจากเนื้อที่ความเข้มข้น 0.05 และ 0.10 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนัก/ปริมาตร) และเคซีน ที่ความเข้มข้น 0.1, 0.2, 0.5, 1.0 และ 2.0 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนัก/ปริมาตร) ดังแสดงปริมาณ 2-ไฮดรอกซีไบฟีนิลที่ตรวจพบในตารางที่ 3

จากตารางที่ 3 ในน้ำเลี้ยงเชื้อ SFMM ที่เติมเคซีน 0.20 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนัก/ปริมาตร) พบ 2-ไฮดรอกซีไบฟีนิลปริมาณสูงสุดเท่ากับ 18.0 ไมโครกรัม/100 มล. ในวันที่ 3 ของการทดลอง นอกจากนี้ในน้ำเลี้ยงเชื้อดังกล่าวนี้ยังสามารถตรวจพบ 2-ไฮดรอกซีไบฟีนิลได้ทุกวันตลอด 3 วันของการทดลองที่ความเข้มข้นของเคซีนมากหรือน้อยกว่า 0.20 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนัก/ปริมาตร) จะไม่พบ 2-ไฮดรอกซีไบฟีนิล ในวันที่ 1 ของการทดลอง ดังนั้นในการทดลองต่อไปจึงเลือกใช้เคซีนความเข้มข้น 0.20 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนัก/ปริมาตร) แทนสารสกัดจากยีสต์

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 3 แสดงปริมาณของ 2-ไฮดรอกซีไบฟีนิลที่ตรวจพบในน้ำเลี้ยงของแบคทีเรียสายพันธุ์ K10 เมื่อแปรผันชนิดของไนโตรเจนอินทรีย์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ SFMM

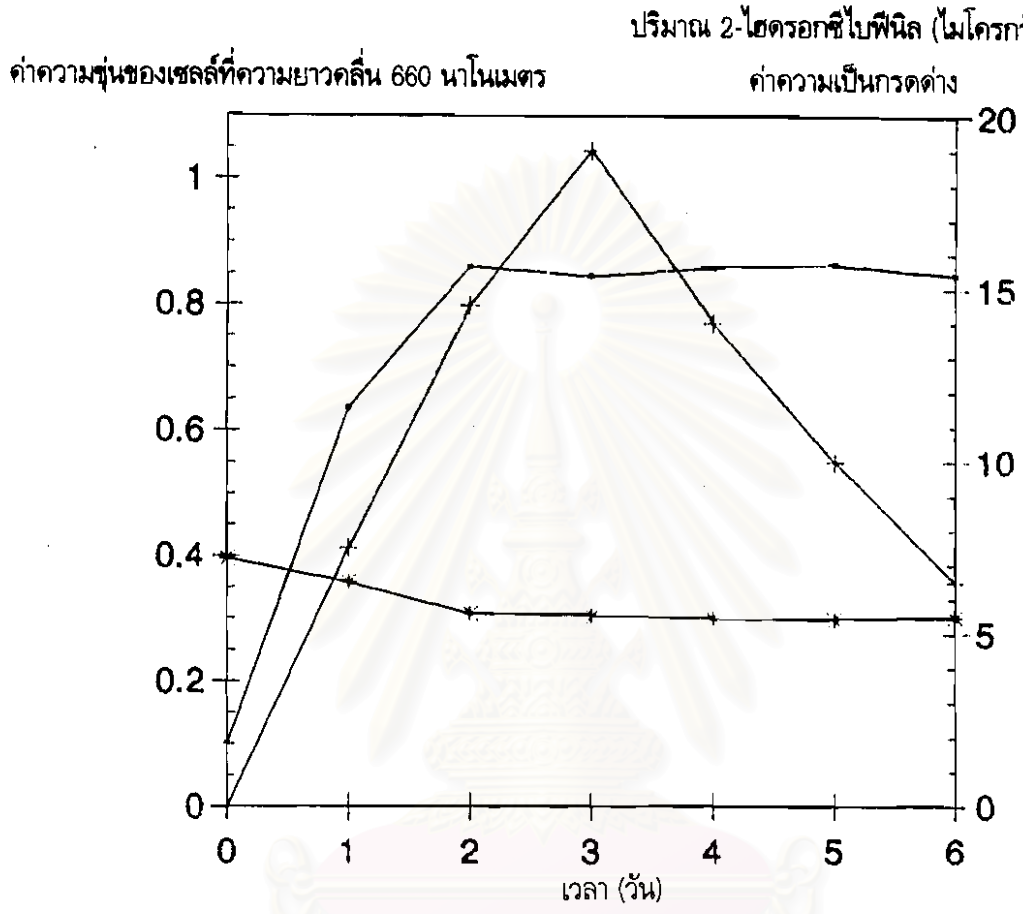
แหล่งไนโตรเจนอินทรีย์	ความเข้มข้น (เปอร์เซ็นต์)	วันที่ตรวจพบ	ปริมาณของ 2-ไฮดรอก-ซีไบฟีนิล (ไมโครกรัม /100 มล.)
สารสกัดจากยีสต์ไนโตรเจนอินทรีย์	0.005		4.0
- เคซีน	0.01		-
	0.01	3	10.0
	0.20	1	6.5
		2	15.5
		3	**18.0**
	0.50	2	10.5
		3	14.5
	1.0	2	9.5
		3	12.5
	2.0	3	9.0
	3.0		-
	5.0		-
- สารสกัดจากเนื้อ	0.05	2	5.0
		3	13.5
	0.10	2	2.5
		3	4.5
	0.50		-
	1.0		-
	1.5		-
	2.0		-
- เปปโตน	0.05		-
	0.10		-
- ทริปโตน	0.05		-
	0.10		-

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ผลการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญ การสร้าง 2-ไฮดรอกซีไบฟีนิล และการเปลี่ยนแปลงของค่าความเป็นกรดด่าง เมื่อเพาะเลี้ยงแบคทีเรียสายพันธุ์ K10 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว SFMM ที่เติมเคซีนแทนสารสกัดจากยีสต์

ผลการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียสายพันธุ์ K10 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว SFMM ที่เติมเคซีน ความเข้มข้นสุดท้าย 0.20 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนัก/ปริมาตร) แทนสารสกัดจากยีสต์ และเติมไดเบนโซไธโอฟีนความเข้มข้นสุดท้าย 0.05 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนัก/ปริมาตร) บนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 25-30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 วัน ทุก ๆ วันทำการวัดการเจริญจากค่าความขุ่นของเซลล์ที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร วิเคราะห์หาปริมาณของ 2-ไฮดรอกซีไบฟีนิลตามวิธีในข้อ 3.2-3.3 และวัดการเปลี่ยนแปลงของค่าความเป็นกรดด่างของน้ำเลี้ยงเชื้อ พบว่าเชื้อเจริญสูงสุดในวันที่ 2 ของการทดลอง ค่าความขุ่นของเซลล์ มีค่าเท่ากับ 0.86 หลังจากนั้นคงที่ตลอดการทดลอง ปริมาณ 2-ไฮดรอกซีไบฟีนิลที่ตรวจพบสูงสุดในวันที่ 3 ของการทดลองเท่ากับ 19.0 ไมโครกรัม/100 มิลลิลิตร ค่าความเป็นกรดด่างของน้ำเลี้ยงเชื้อลดลงจากค่าเริ่มต้นเท่ากับ 7.2 เป็น 5.5 ในวันที่ 2 ของการทดลอง ซึ่งเป็นวันที่พบว่าการเจริญมีค่าสูงสุด หลังจากนั้นจะคงที่ตลอดการทดลอง ดังแสดงในรูปที่ 21 การทดลองนี้ใช้ความเข้มข้นของไดเบนโซไธโอฟีนเริ่มต้นสูงถึง 0.05 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนัก/ปริมาตร) จึงไม่สามารถวิเคราะห์ได้ว่าปริมาณความเข้มข้นของไดเบนโซไธโอฟีนมีการเปลี่ยนแปลงหรือไม่ ดังนั้นในการทดลองต่อไปจึงลดปริมาณความเข้มข้นเริ่มต้นของไดเบนโซไธโอฟีนลง

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 21 แสดงผลการเจริญ ปริมาณ 2-ไฮดรอกซีไบฟีนิล และค่าความเป็นกรดด่างเมื่อเลี้ยงแบคทีเรียสายพันธุ์ K10 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว SFMM ที่เติมไดเบนโซไธโอฟีน ความเข้มสุดท้าย 0.05 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนัก/ปริมาตร) และเติมเคซีนความเข้มข้นสุดท้าย 0.20 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนัก/ปริมาตร) แทนสารสกัดจากยีสต์ ค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 7.2 บ่มเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 25-30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 วัน

—•— ค่าความขุ่นของเซลล์ที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร

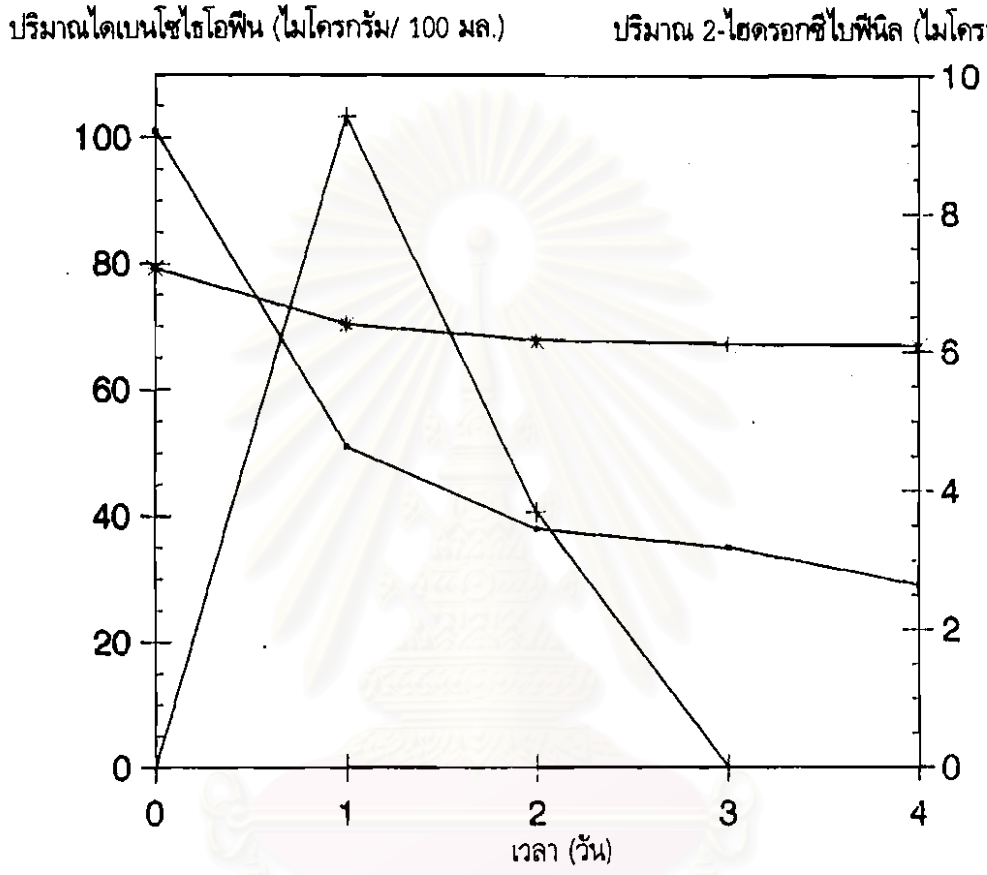
—*— ค่าความเป็นกรดด่าง

—+— ปริมาณ 2-ไฮดรอกซีไบฟีนิล (ไมโครกรัม/100มล.)

ผลการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างการย่อยสลายไดเบนโซไธโอฟีนและการสร้าง 2-ไฮดรอกซีไบฟีนิล

ผลการนำน้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ K10 ซึ่งเลี้ยงไว้ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว SFMM ที่เติมเดซีนและไดเบนโซไธโอฟีน ความเข้มข้นสุดท้าย 0.20 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนัก/ปริมาตร) และ 0.125 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ มาวิเคราะห์หาปริมาณไดเบนโซไธโอฟีน และ 2-ไฮดรอกไบฟีนิล ด้วยวิธีแก๊ส โครมาโตกราฟฟี พบว่า ปริมาณไดเบนโซไธโอฟีน ลดลงอย่างรวดเร็วในวันแรกของการทดลอง จากปริมาณไดเบนโซไธโอฟีนเริ่มต้น 101 ไมโครกรัม/100 มล. ลดลงเหลือเพียง 50 เปอร์เซ็นต์ คือ 51 ไมโครกรัม/100 มล. หลังจากนั้นอัตราการย่อยสลายหรืออัตราการลดลงของไดเบนโซไธโอฟีนจะค่อย ๆ ลดลงในวันที่ 2,3 และ 4 ของการทดลอง ปริมาณไดเบนโซไธโอฟีนมีค่าเท่ากับ 38, 35 และ 29 ไมโครกรัม/100 มล. ตามลำดับ ปริมาณ 2-ไฮดรอกซีไบฟีนิลที่เซลล์สร้างขึ้นสูงสุดในวันที่ 1 ของการทดลอง มีค่าเท่ากับ 9.4 ไมโครกรัม/100 มล. หลังจากนั้นจะลดลงเหลือเพียง 3.7 ไมโครกรัม/100 มล. ในวันที่ 2 ส่วนในวันที่ 3 และ 4 ผลการวิเคราะห์ไม่พบ 2-ไฮดรอกซีไบฟีนิล อาจเนื่องมาจาก 2-ไฮดรอกซีไบฟีนิลที่แบคทีเรียสายพันธุ์ K10 สร้างขึ้นนี้ไม่ได้เป็นผลิตภัณฑ์สุดท้ายจึงถูกย่อยสลายไปเป็นผลิตภัณฑ์อื่นต่อไป จากผลการทดลองที่ได้แสดงว่า 2-ไฮดรอกซีไบฟีนิลที่ตรวจพบในน้ำเลี้ยงเชื้อของแบคทีเรียสายพันธุ์ K10 เป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยสลายไดเบนโซไธโอฟีนจริง (ดังแสดงในรูปที่ 22)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 22 ความสัมพันธ์ระหว่างการย่อยสลายไดเบนโซไธโอฟีน และการสร้าง 2-ไฮดรอกซีไบฟีนิลของแบคทีเรียสายพันธุ์ K10 เมื่อเลี้ยงไว้ในอาหารเลี้ยงเชื้อ SFMM ที่เติมเคซีน ความเข้มข้นสุดท้ายสุดท้าย 0.20 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนัก/ปริมาตร) และเติมไดเบนโซไธโอฟีน ความเข้มข้นสุดท้าย 0.125 มิลลิโมลาร์

—•— ปริมาณไดเบนโซไธโอฟีน (ไมโครกรัม/100 มล.)

—+— ปริมาณ 2-ไฮดรอกซีไบฟีนิล (ไมโครกรัม/100 มล.)

—*— ค่าความเป็นกรดด่าง

ผลของ NADH ต่อกิจกรรมของเอนไซม์ย่อยสลายไดเบนโซไธโอฟีนในสารสกัดจากเซลล์ของแบคทีเรียสายพันธุ์ K10

ผลการศึกษาผลของ NADH ต่อกิจกรรมของเอนไซม์ย่อยสลายไดเบนโซไธโอฟีนในสารสกัดจากเซลล์ของแบคทีเรียสายพันธุ์ K10 ตามวิธีในข้อ 6 ดังแสดงในตารางที่ 4 พบว่า NADH มีผลเร่งกิจกรรมของเอนไซม์ให้สูงขึ้น กล่าวคือ จากปริมาณไดเบนโซไธโอฟีนเริ่มต้น 80.8 ไมโครกรัม/มล. เมื่อบ่มไว้กับเอนไซม์ในสารสกัดจากเซลล์เป็นเวลา 30 นาที ปริมาณไดเบนโซไธโอฟีนลดลงเหลือ 75.2 ไมโครกรัม/มล. หรือคิดเป็น 93.1 เปอร์เซ็นต์ของปริมาณความเข้มข้นเริ่มต้น แต่ในปฏิกิริยาที่มีการเติม NADH ลงไปร่วมด้วยปริมาณไดเบนโซไธโอฟีนจะลดลงเหลือเพียง 9.6 ไมโครกรัม/มล. หรือคิดเป็น 5.9 เปอร์เซ็นต์ของปริมาณความเข้มข้นเริ่มต้น และเมื่อเพิ่มระยะเวลาการบ่มของผสมของปฏิกิริยาเป็น 60 นาที พบว่าปริมาณไดเบนโซไธโอฟีนในของผสมของปฏิกิริยาที่เติมสารสกัดจากเซลล์เพียงอย่างเดียว และที่เติมสารสกัดจากเซลล์ร่วมกับ NADH ลดลงเหลือ 63.2 ไมโครกรัม/มล. และ 1.6 ไมโครกรัม/มล. หรือ 78.2 เปอร์เซ็นต์ และ 2.0 เปอร์เซ็นต์ของปริมาณความเข้มข้นเริ่มต้นตามลำดับ จากผลการทดลองข้างต้น สิ่งที่น่าสนใจคือเมื่อเพิ่มระยะเวลาการบ่มของผสมของปฏิกิริยาจาก 30 นาที เป็น 60 นาที สารสกัดจากเซลล์อย่างเดียวทำให้ไดเบนโซไธโอฟีนลดลงเพียง 1.1 เท่า ในขณะที่เมื่อเติม NADH ลงไป ไดเบนโซไธโอฟีนจะลดลงถึง 3 เท่า แสดงว่า NADH สามารถเร่งกิจกรรมของเอนไซม์ย่อยสลายไดเบนโซไธโอฟีนในสารสกัดจากเซลล์ของแบคทีเรียสายพันธุ์ K10

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4 แสดงผลของ NADH ต่อกิจกรรมของเอนไซม์ย่อยสลายไดเบนโซไธโอฟีนในสารสกัดจากเซลล์ของแบคทีเรียสายพันธุ์ K10

ของผสมของปฏิกิริยา	ระยะเวลาการบ่ม (นาที)	ปริมาณไดเบนโซไธโอฟีน (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)
ชุดควบคุม (ไม่เติมสารสกัดจากเซลล์และ NADH)	0	80.8
	30	80.8
	60	80.8
สารสกัดจากเซลล์	0	80.8
	30	75.2
	60	63.2
สารสกัดจากเซลล์และ NADH 5 มิลลิโมลาร์	0	80.8
	30	4.8
	60	1.6

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ผลการจำแนกชนิดของแบคทีเรียสายพันธุ์ K10 ทางอนุกรมวิธานในระดับจีนัส

ผลการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียสายพันธุ์ K10 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่สามารถย่อยสลายไดเบนโซไธโอฟีน โดยวิถีโฟเอส พบว่า ลักษณะโคโลนีที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งนิวเตรียนท์ มีลักษณะกลม ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง ประมาณ 0.5-1.0 มม. สีขาวขุ่น นูน ขอบโคโลนีเป็นรอยหยัก ผลการนำเซลล์ของแบคทีเรียสายพันธุ์ K10 มาย้อมสีกรัมแล้วตรวจดูลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 1,000 เท่า พบว่าเซลล์มีรูปร่างเป็นท่อน ติดสีน้ำเงิน แสดงว่าเป็นแบคทีเรียชนิดกรัมบวก ผลการนำเซลล์มาย้อมสีแบบ differential stain เพื่อศึกษาว่าเซลล์สร้างสปอร์หรือไม่ พบเอนโดสปอร์ลักษณะรูปไข่อยู่บริเวณปลายเซลล์ (ตารางที่ 5) ปฏิกิริยาทางชีวเคมีดังแสดงผลการทดสอบในตารางที่ 6 จากลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเซลล์และผลการทดสอบปฏิกิริยาทางชีวเคมี (ตารางที่ 5 และ 6) จึงสรุปว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ K10 จัดเป็นแบคทีเรียในจีนัส *Bacillus*

ตารางที่ 5 แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยา (Morphological Characteristics) ของแบคทีเรียสายพันธุ์ K10

ลักษณะที่ศึกษา	ลักษณะทางสัณฐานวิทยา
โคโลนีเจริญบนอาหารแข็งนิวเตรียนท์	กลม: ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.5-1.0 มม. สีขาวขุ่น นูน ขอบหยัก
เซลล์ : รูปร่าง	ท่อนตรง
: ผลการย้อมสีกรัม	ติดสีน้ำเงิน (Gram positive)
เอนโดสปอร์ : รูปร่าง	รูปไข่
: ตำแหน่ง	ปลายเซลล์

ตารางที่ 6 แสดงผลการทดสอบปฏิกิริยาทางชีวเคมี (Biochemical Characteristics)

ปฏิกิริยาที่ทดสอบ	ผลการทดสอบ
การทดสอบคาตาเรส	+
การทดสอบออกซิเดส	-
การทดสอบ OF	+
การทดสอบ phenol red	+

หมายเหตุ - หมายถึง ผลการทดสอบเป็นลบ

\+ หมายถึง ผลการทดสอบเป็นบวก

ผลการตรวจหาพลาสมิดของแบคทีเรียสายพันธุ์ K10

ผลการตรวจหาพลาสมิดในเซลล์ของแบคทีเรียสายพันธุ์ K10 โดยวิธีการสกัดเอาพลาสมิดชนิด covalently-closed circular ออกมาจากเซลล์ ตามวิธีของ Kado และ Liu (1981) แล้วนำมาวิเคราะห์ผลด้วยวิธีอะกาโรส เจล อิเลคโตรโฟรีซิส (agarose gel electrophoresis) โดยใช้พลาสมิดชนิด covalently-closed circular ของ *E. coli* V517 ซึ่งสกัดด้วยวิธีเดียวกัน เป็นพลาสมิดเปรียบเทียบ ไม่พบพลาสมิดใด ๆ ในเซลล์ของแบคทีเรียสายพันธุ์ K10

รูปที่ 23 อะกาโรส เจล อิเลคโตรโฟรีซิสของดีเอ็นเอชนิด covalently-closed circular
แถวที่ 1 สกัดจากเซลล์ของ *E. coli* V517
แถวที่ 2 สกัดจากเซลล์ของแบคทีเรียสายพันธุ์ K10