

บทที่ 4

ผลการทดลอง

4.1 การเพิ่มจำนวนแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายอะซีแนพริลีนจากดินตัวอย่าง

จากการนำดิน 13 ตัวอย่าง มาเพิ่มจำนวนแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายอะซีแนพริลีน โดยนำมาเลี้ยงในอาหารเหลว CFMM ที่มีอะซีแนพริลีนที่ความเข้มข้น 0.06 % (น้ำหนักต่อปริมาตร) อยู่ด้วย ทำการถ่ายเชื้อและสังเกตการเจริญ โดยดูจากความขุ่นที่เพิ่มขึ้นหรือการเปลี่ยนสีของอาหารเหลว เทียบกับหลอดควบคุม หลังการถ่ายเชื้อ 5 ครั้งติดต่อกัน พบว่าอาหารเหลวที่มีดินตัวอย่างที่ 2 มีการเปลี่ยนสีของอาหารเหลวจากสีเหลืองอ่อนไปเป็นสีเหลืองเข้ม ในขณะที่หลอดควบคุมไม่พบการเปลี่ยนแปลงใดๆ Bouchez และคณะ (1995) รายงานว่าจะมีการเจริญ หากมีการเพิ่มขึ้นของมวลชีวภาพและการเปลี่ยนสีของอาหาร ในขณะที่ Mueller และคณะ (1989) รายงานว่าการเปลี่ยนสีของอาหารเลี้ยงเชื้อ อาจเกิดจากการสะสมของสารมัธยันต์ที่เกิดจากการย่อยสลายสาร PAHs โดยจุลินทรีย์ ดังนั้นอาจเป็นไปได้ว่าแบคทีเรียที่แยกได้จากดินตัวอย่างที่ 2 สามารถย่อยสลายอะซีแนพริลีนได้ จึงนำดินตัวอย่างที่ 2 ไปแยกแบคทีเรียที่ย่อยสลายอะซีแนพริลีนต่อไป

4.2 การคัดแยกแบคทีเรียสายพันธุ์บริสุทธิ์ที่สามารถย่อยสลายอะซีแนพริลีน

จากการนำเชื้อในดินตัวอย่างที่ 2 ซึ่งผ่านการถ่ายเชื้อมาแล้ว 5 ครั้ง มาแยกเชื้อแบคทีเรียที่ย่อยสลายอะซีแนพริลีนได้ให้บริสุทธิ์ โดยนำมาเจือจางในสารละลาย 0.85 % โซเดียมคลอไรด์ ให้ได้ค่าความเข้มข้นที่เหมาะสม แล้วนำมาเกลี่ยบนอาหารแข็ง CFMM ที่มีอะซีแนพริลีนวางบนฝาจานอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่ามีแบคทีเรียหลายสายพันธุ์ที่สามารถเจริญได้ จากสายพันธุ์ต่างๆ ที่แยกได้ 6 สายพันธุ์ แบคทีเรียสายพันธุ์ที่มีจำนวนมากที่สุด คือ สายพันธุ์ CU-A1 ซึ่งมีลักษณะดังแสดงในตารางที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 ลักษณะโคโลนีที่เกิดขึ้นบนอาหารแข็ง CFMM ที่มีอะซีแนพริลลินวางบนฝาจานอาหารเลี้ยงเชื้อ

สายพันธุ์แบคทีเรีย	ลักษณะโคโลนีบนอาหารแข็ง CFMM
CU-A1	ขนาดเล็ก กลม ขอบเรียบ สีขาวขุ่น
CU-A2	ขนาดเล็ก กลม ขอบเรียบ สีชมพู
CU-A3	ขนาดเล็ก กลม ขอบเรียบ สีเหลือง
CU-A4	ขนาดปานกลาง กลม ขอบเรียบ สีขาวขุ่น
CU-A5	ขนาดปานกลาง ตรงกลางนูน ขอบบาง สีขาวขุ่น
CU-A6	ขนาดใหญ่ กลม ขอบเรียบ สีขาวขุ่นเป็นมัน

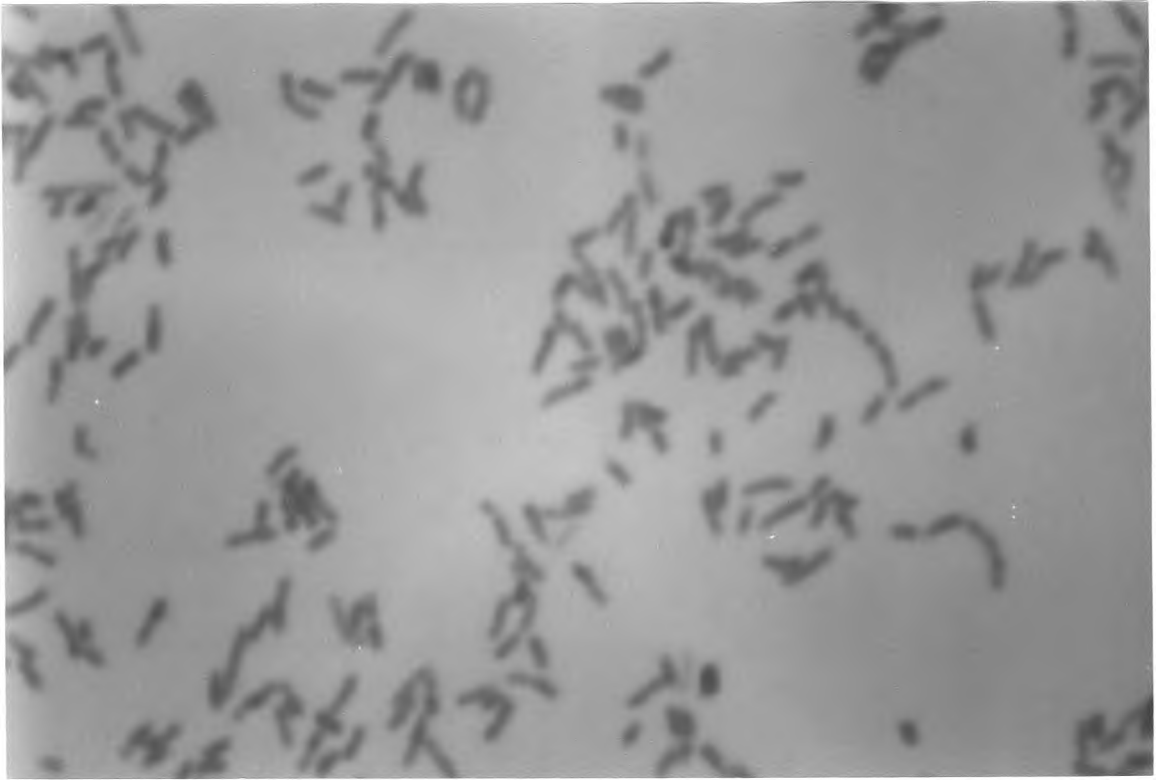
เมื่อนำแต่ละโคโลนีที่แตกต่างกันทั้ง 6 โคโลนีไปเลี้ยงในอาหารเหลว CFMM ที่มีอะซีแนพริลลิน เพื่อยืนยันความสามารถในการย่อยสลายอะซีแนพริลลินอีกครั้ง พบว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ CU-A1 สามารถเปลี่ยนสีของอาหารเหลว CFMM ไปเป็นสีเหลืองเข้มในเวลา 3 วัน แสดงว่าสามารถย่อยสลายอะซีแนพริลลินได้ ขณะที่สายพันธุ์อื่นๆ ไม่พบการเปลี่ยนแปลง จึงนำแบคทีเรียนี้มาทำให้บริสุทธิ์ และนำไปทำการทดลองในขั้นตอนต่อไป

4.3 การศึกษาอนุกรมวิธานของแบคทีเรียสายพันธุ์ CU-A1

เมื่อศึกษาคุณสมบัติของแบคทีเรียสายพันธุ์ CU-A1 ตามลักษณะทางสัณฐานวิทยา พบว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ CU-A1 มีลักษณะโคโลนีบนอาหารแข็ง LB คือ มีขนาดเล็ก กลม ขอบเรียบ สีขาวขุ่น และทึบแสง ดังแสดงในรูปที่ 4.1 และเมื่อศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่าเซลล์ของแบคทีเรียสายพันธุ์ CU-A1 มีลักษณะเป็นแท่ง ติดสีกรัมลบในรูปที่ 4.2 โดยมีลักษณะอื่นๆ ที่ศึกษาได้แสดงไว้ในตารางที่ 4.2 และในตารางที่ 4.3 แสดงลักษณะสมบัติทางชีวเคมีที่ใช้ร่วมในการจำแนกชนิดทางอนุกรมวิธานของเชื้อนี้



รูปที่ 4.1 ลักษณะโคโลนีของแบคทีเรียสายพันธุ์ CU-A1 บนอาหารแข็ง LB



รูปที่ 4.2 ลักษณะรูปร่างของแบคทีเรียสายพันธุ์ CU-A1 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (กำลังขยาย 1000 เท่า)

ตารางที่ 4.2 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียสายพันธุ์ CU-A1

ลักษณะที่ศึกษา	ลักษณะที่สังเกตเห็น
<p><u>ลักษณะของเซลล์</u></p> <p>การติดสีกรัม</p> <p>รูปร่างของเซลล์</p> <p>การติดสีสปอร์</p> <p>การติดสี sudan black</p> <p>* การศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน</p>	<p>กรัมลบ</p> <p>แท่ง</p> <p>ไม่สร้างสปอร์</p> <p>ติดสีดำ (มี poly-β-hydroxybutyrate granule)</p> <p>มีแฟลกเจลลา</p>
<p><u>ลักษณะโคโลนี</u></p> <p>ลักษณะโคโลนีบนอาหารแข็ง LB</p> <p>รูปร่าง</p> <p>สี</p> <p>ขนาด</p> <p>การผ่านของแสง</p> <p>ลักษณะขอบ</p> <p>* ลักษณะโคโลนีบนอาหารแข็ง yeast extract mannitol congo red</p> <p>* ลักษณะโคโลนีบนอาหารแข็ง yeast extract mannitol bromthymol blue</p>	<p>กลม</p> <p>ขาวขุ่น</p> <p>เส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 1-2 มม.</p> <p>ทึบแสง</p> <p>ขอบเรียบ</p> <p>โคโลนีเมือกสร้าง polysaccharide slime, ไม่ดูดซับสี congo red เข้าสู่เซลล์</p> <p>โคโลนีเมือกสร้าง polysaccharide slime, เปลี่ยนสีอาหารจากสีเขียวเป็นสีเหลือง แสดงว่าผลิตกรดได้</p>

หมายเหตุ * ทำการทดลองโดยพัชรวิภา ใจจักรคำ (พัชรวิภา, 2542)

ตารางที่ 4.3 ลักษณะทางชีวเคมีของแบคทีเรียสายพันธุ์ CU-A1

ลักษณะที่ศึกษา	ลักษณะทางชีวเคมี
1. การสร้างเอนไซม์ออกซิเดส (oxidase test)	สร้างได้
2. การสร้างเอนไซม์คะตาเลส (catalase test)	สร้างได้
3. การรีดิวซ์ไนเตรต (nitrate reduction)	เกิดได้
4. การไฮโดรไลซ์เอสคูลิน (esculin hydrolysis)	ไม่เกิด
5. การสร้างเอนไซม์ยูรีเอส (urease test)	สร้างได้
6. การศึกษาความสามารถในการเคลื่อนที่ในอาหารกึ่งเหลว (motility test)*	เคลื่อนที่ได้
7. การเกิดปฏิกิริยาบนอาหารแข็ง TSI (triple sugar iron agar reaction)	K/K
8. การย่อยเจลาติน (gelatin liquefaction)	ไม่เกิด
9. การสร้างไฮโดรเจนซัลไฟด์ (H ₂ S production)	ไม่เกิด
10. การทดสอบเมทิลเรด (methyl red test)	ไม่เกิด
11. การทดสอบ Voges-Proskauer (Voges-Proskauer reaction)	ไม่เกิด
12. การหมักคาร์โบไฮเดรต (carbohydrate fermentation test)	
แมนนิทอล (mannitol)	ไม่เกิดการหมัก และไม่มีก๊าซ
ซูโครส (sucrose)	ไม่เกิดการหมัก และไม่มีก๊าซ
แลคโตส (lactose)	ไม่เกิดการหมัก และไม่มีก๊าซ
กลูโคส (glucose)	ไม่เกิดการหมัก และไม่มีก๊าซ
13. การย่อยสลายเคซีน (casein utilization)	ไม่เกิด
14. การใช้ซิเตรท (citrate utilization)	ไม่เกิด
15. การสร้างปมในพีช Siratro*	ไม่สร้างปม

หมายเหตุ * ทำการทดลองโดยพัชรวิภา ใจจักรคำ (พัชรวิภา, 2542)

K/K หมายถึง alkaline butt และ alkaline slant

จากลักษณะทางสัณฐานวิทยาและลักษณะทางสรีรวิทยาที่แสดงไว้ในตารางที่ 4.2 และ 4.3 ร่วมกับรายงานของพัชรวิภา (2542) ผลการทดลองทั้งหมด เมื่อนำมาเปรียบเทียบกับลักษณะที่รายงานไว้ใน Bergey 's Manual of Systematic Bacteriology ซึ่งรวบรวมไว้โดย Palleroni (1994) พบว่าเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ CU-A1 มีลักษณะและสมบัติตรงกับแบคทีเรียสกุล *Rhizobium*

การวิเคราะห์ 16 เอสโรโบโซมัลดีเอ็นเอ

ลำดับเบสของ 16 เอสโรโบโซมัลดีเอ็นเอของแบคทีเรียสายพันธุ์ CU-A1 ได้แสดงไว้ในรูปที่ 4.3

GGCGCTCGACTTGCATGTGTTAAGCCTGCCGCCAGCGTTCGTTCTGANCCAGGATCAA
NCTGCTCCTTGCGGTTAGCGCACTACCTTCGGGTAAAACCAACTCCCATGGTGTGACG
GGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTCACCGCGGCGTGCTGATCCGCGATTAC
TAGCGATTCCAACCTTCATGCACTCGAGTTGCAGAGTGCAATCCGAAGTGAAGATGGCTTT
TGGAGATTAGCTCGGGATCGCTCNTTCGCTGCCCACTGTCACCACCATTGTAGCACGT
GTGTAGCCCAGCCCCTAAGGGCCATGAGGANNTGACGTCATCCCCACCTTCCTCTCG
GCTTATCACCGGCAGTCCCCTTAGAGTGCCCAACTGAATGCTGGCAACTAAGGGCGA
GGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATNTCACGACACGAGCTGACGACAGC
CATGCAGCACCTGTGTCCCGGCCACCGAAGTGGAAGGTAGATNTNTTTACCGGTCCG
GGCATGTCAAGGGCTGGTAAGGTTTTGCGCGTTGCTTCGAATTAACACATGCTCCA
CCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTTAATCTTGCGACCGTACTCCCCA
GGCGGAATGTTTAATGCGTTAGCTGCGCCACCGACCAGTAAACTGGCCGACGGCTAA
CATTATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGTCCCCACGCTT
TCGCACCTCAGCGTCAGTTGTGGACCAGTAAGCCGCCTTCGCCACTGGTGTTCCTGC
GAATATCTACGAATTTACCTCTACACTCGCAATTCACCTTACCTCTCCACACTCAAGA
CACCCAGTATCAAAGGCAGTTCGCGGGTTGAGCCCCGGGATTTACCCCTGACTTAAA
TGTCCGCCTACGTGCGCTTTACGCCAGTAATTCGAACAACGCTAGCCCCCTTCGTA
TTACCGCGGCTGCTGGCACGAAGTTAGCCGGGGCTTCTTCTCCGGATACCGTCATTAT
CTTCTCCGGTGAAAAAGCTTTACAACCCTAGGGCCTTCATCACTCACGCGGCATGGC
TGGATCAGGCTTGCGCCCATTGTCCAATATTCGCCACTGCTGCCTCCCGTAGGAATTTN
GGGCCGTGTCTCANTCCCAATGTGGCTGATCATCTCTCAAACAGCTATGGATCGTCG
CCTTGGTAGGCCATTACCCACCAACTAGCTAATCCAACGCGGGCCAATCCTTTCCCG
ATAAATCTTTCCCCCGTAGGGCTCATACGGTATTAGCACACGTTTCCATGCGTTAATTCC
GTANAAAAAGGGTATGTTCCACGCGTACTCACCCGTCTGCCGCTCCCCCTTGGCGG

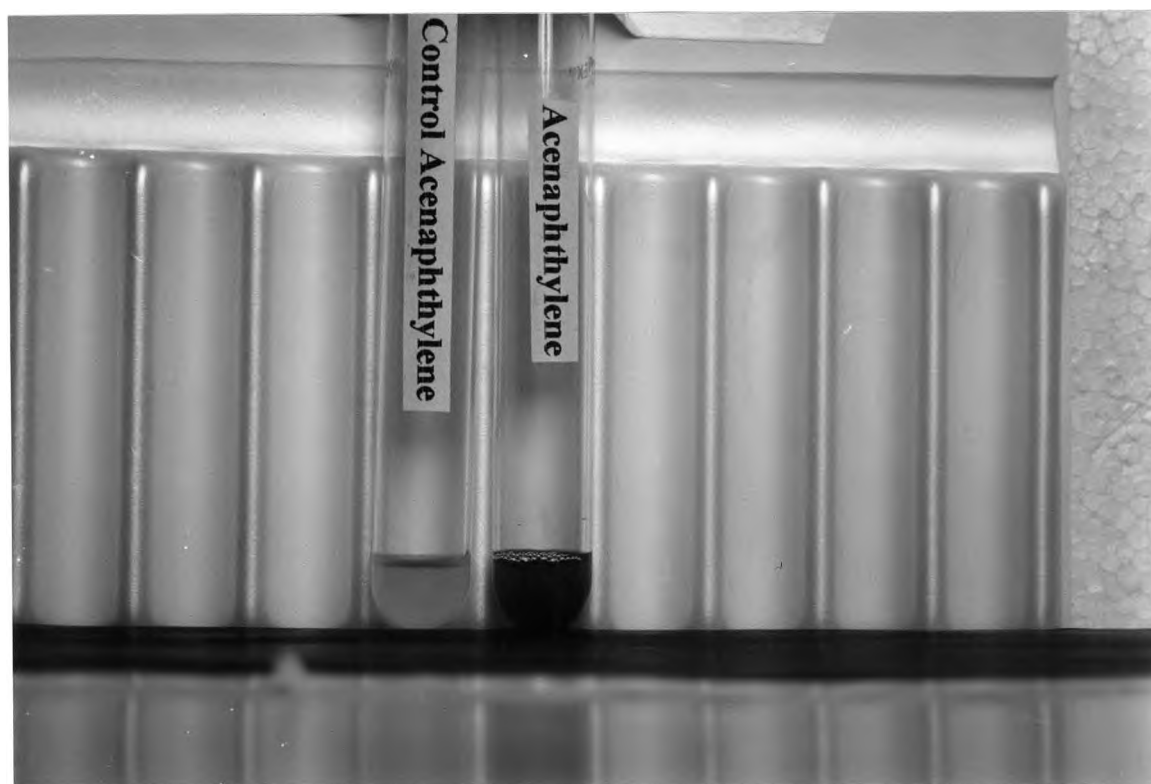
รูปที่ 4.3 ลำดับเบสของ 16 เอสโรโบโซมัลดีเอ็นเอของแบคทีเรียสายพันธุ์ CU-A1

จากการนำลำดับเบสของ 16 เอสโรโบโซมัลดีเอ็นเอของแบคทีเรียสายพันธุ์ CU-A1 เปรียบเทียบกับลำดับเบสของ 16 เอสโรโบโซมัลดีเอ็นเอของจุลินทรีย์ใน GenBank โดยการใช้โปรแกรม BLAST พบว่าลำดับเบสของ 16 เอสโรโบโซมัลดีเอ็นเอของแบคทีเรียสายพันธุ์ CU-A1 คล้ายกับลำดับเบสของ 16 เอสโรโบโซมัลดีเอ็นเอของแบคทีเรียสกุล *Rhizobium* โดยมีความคล้ายคลึง (% homology) เท่ากับ 95 % ดังนั้นเมื่อนำผลการจำแนกแบคทีเรียโดยการทดสอบทางสัณฐานวิทยาและสรีรวิทยา และผลการวิเคราะห์ลำดับเบสของ 16 เอสโรโบโซมัลดีเอ็นเอ สามารถสรุปได้ว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ CU-A1 เป็นแบคทีเรียในสกุล *Rhizobium* และตั้งชื่อเป็น *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1

4.4 การเพิ่มจำนวนและความสามารถในการย่อยสลายอะซีแนพทิลีนและสาร PAHs ชนิดอื่น ของ *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1

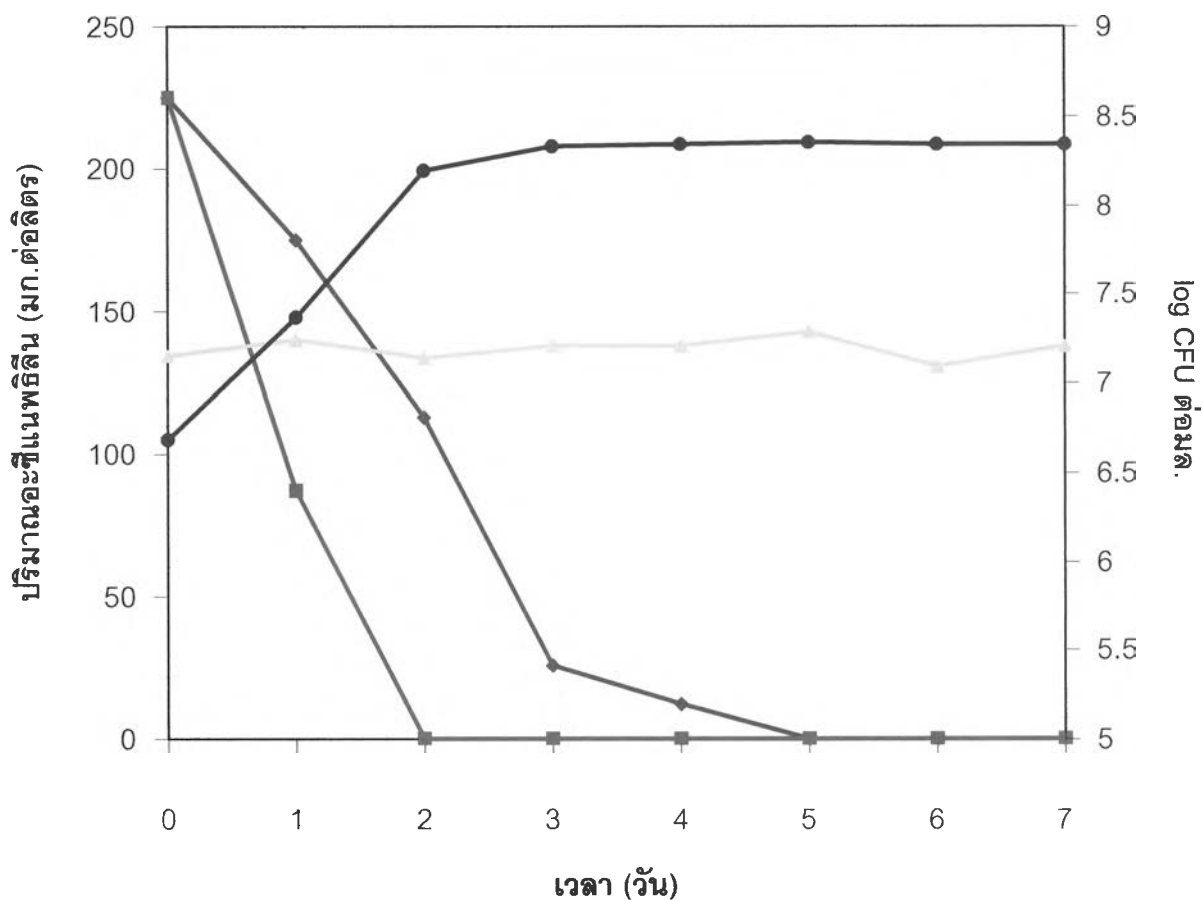
4.4.1 เปรียบเทียบรูปแบบการเจริญของ *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 โดยการใช้อะซีแนพทิลีนเป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงาน ที่ความเข้มข้น 300, 600 และ 900 มก.ต่อลิตร

การศึกษาเบื้องต้นพบว่า *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 สามารถเปลี่ยนสีของอาหารเหลว CFMM ที่มีอะซีแนพทิลีน จากสีเหลืองอ่อนไปเป็นสีเหลืองเข้มได้หลังจากการเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 3 วัน ดังแสดงในรูปที่ 4.4



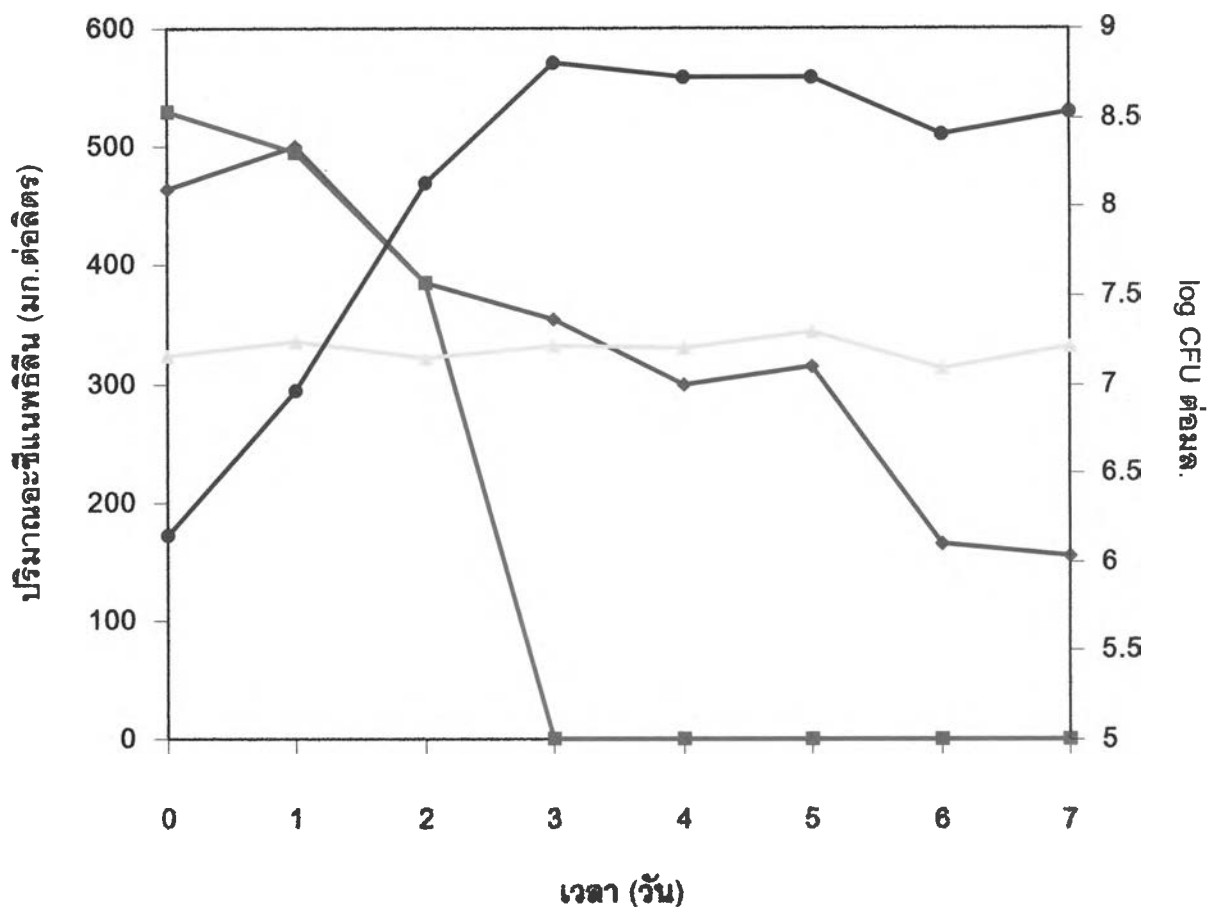
รูปที่ 4.4 ลักษณะของอาหารเหลว CFMM ที่มีอะซีแนพทิลีน หลังการเลี้ยง *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 เป็นเวลา 3 วัน เปรียบเทียบกับหลอดควบคุมที่ไม่เติมเชื้อ

ผลการศึกษารูปแบบการเจริญของเชื้อ *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 โดยการแปรผันความเข้มข้นของอะซีแนพทิสีนที่ใช้เป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงาน ในอาหารเหลว CFMM ปริมาตร 5 มล. ด้วยอะซีแนพทิสีน 300, 600 และ 900 มก.ต่อลิตร และทำการติดตามการเจริญของ *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 ตลอดจนวิเคราะห์ปริมาณอะซีแนพทิสีนที่เหลือทุกวัน ได้ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 4.5 4.6 และ 4.7



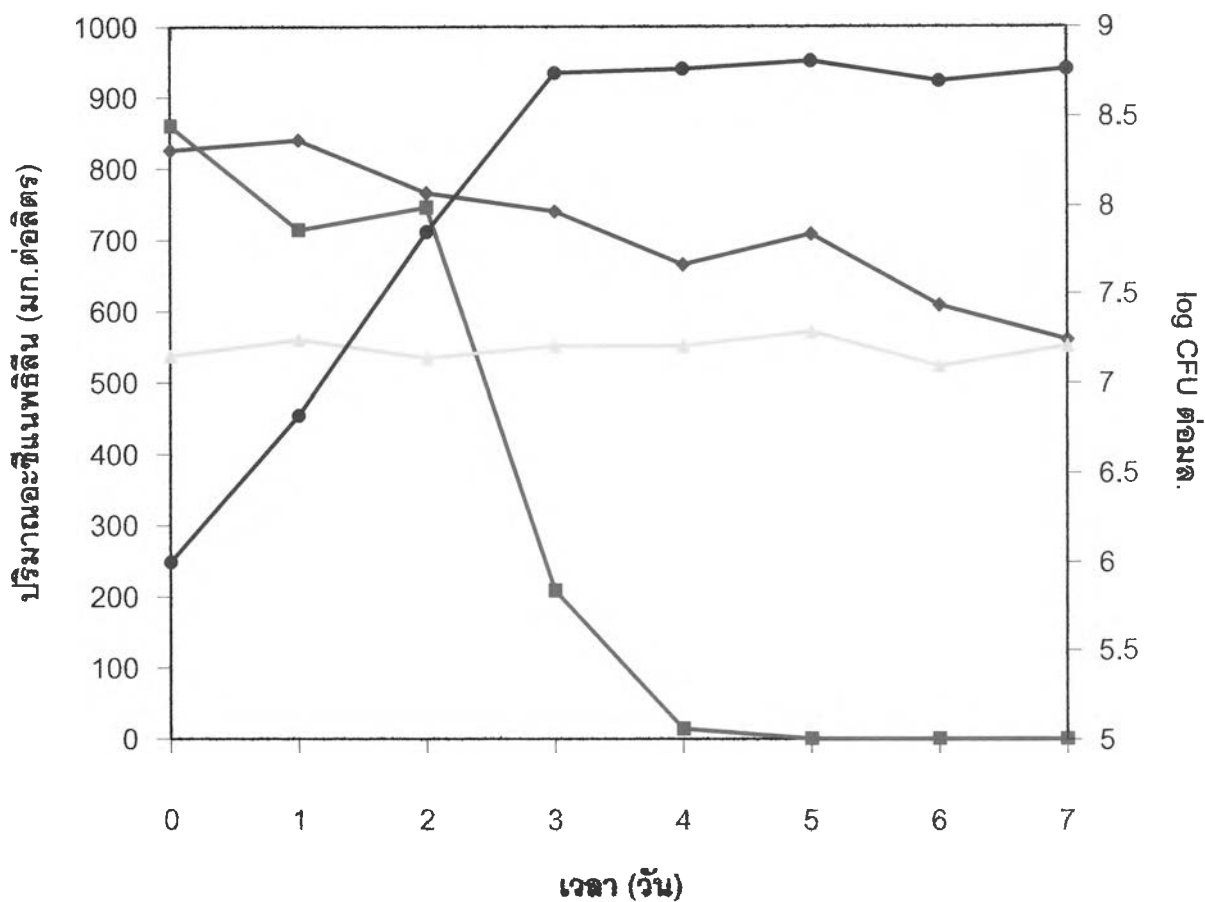
- ◆ ปริมาณอะซีแอสาลิซิลินในชุดทดลองที่ไม่เติมเชื้อ
- ปริมาณอะซีแอสาลิซิลินในชุดทดลองที่เติมเชื้อ
- ▲ จำนวนแบคทีเรียในชุดทดลองที่ไม่มีอะซีแอสาลิซิลิน
- จำนวนแบคทีเรียในชุดทดลองที่เติมอะซีแอสาลิซิลิน

รูปที่ 4.5 กราฟแสดงการเจริญของ *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 ในอาหารเหลว CFMM ที่มีอะซีแอสาลิซิลินเข้มข้น 300 มก.ต่อลิตร



- ◆— ปริมาณอะซีแนพริลีนในชุดทดลองที่ไม่มีเติมเชื้อ
- ปริมาณอะซีแนพริลีนในชุดทดลองที่เติมเชื้อ
- ▲— จำนวนแบคทีเรียในชุดทดลองที่ไม่มีอะซีแนพริลีน
- จำนวนแบคทีเรียในชุดทดลองที่เติมอะซีแนพริลีน

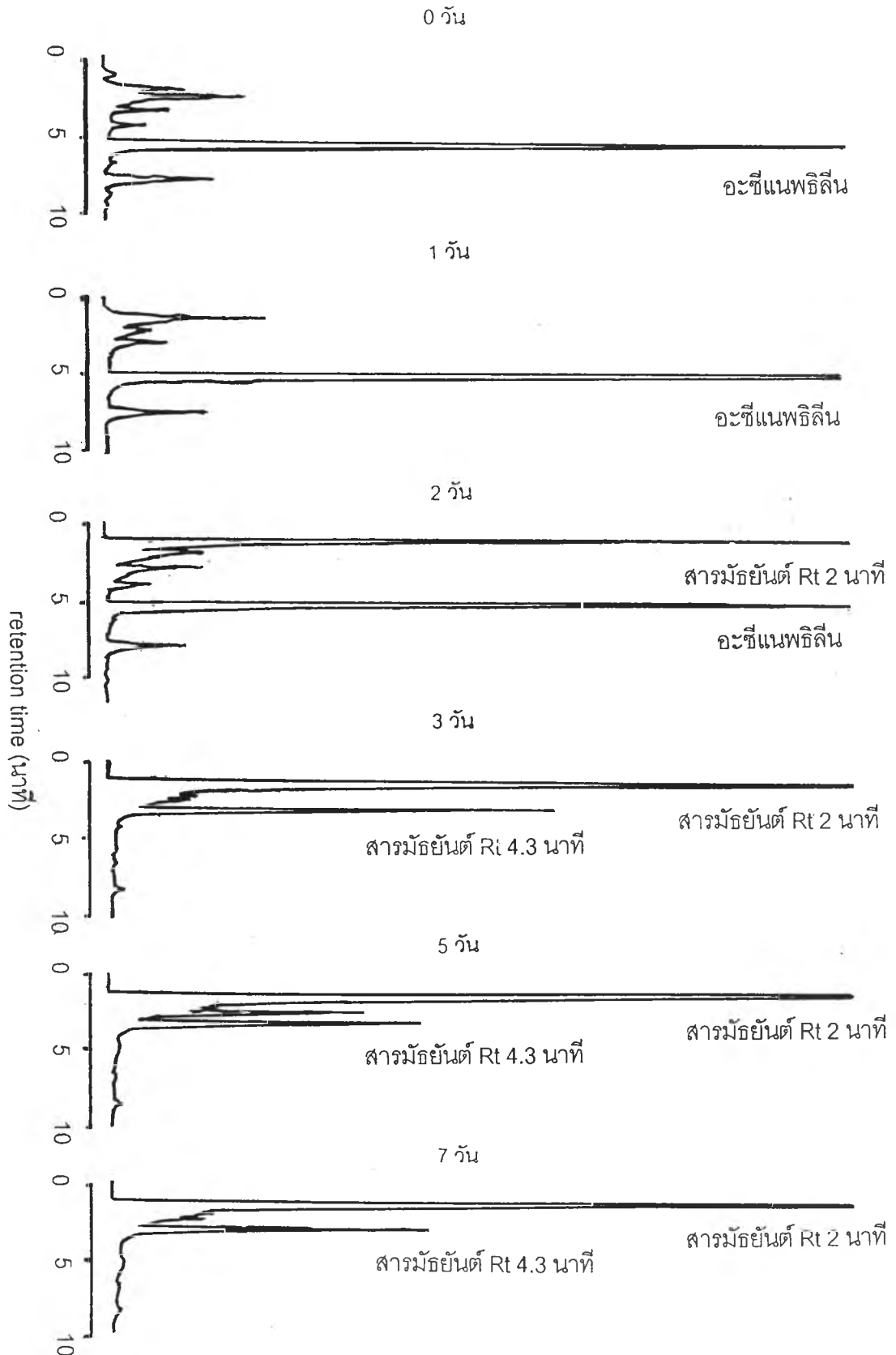
รูปที่ 4.6 กราฟแสดงการเจริญของ *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 ในอาหารเหลว CFMM ที่มีอะซีแนพริลีนเข้มข้น 600 มก.ต่อลิตร



- ปริมาณอะซีแนพริลีนในชุดทดลองที่ไม่เติมเชื้อ
- ปริมาณอะซีแนพริลีนในชุดทดลองที่เติมเชื้อ
- จำนวนแบคทีเรียในชุดทดลองที่ไม่มีอะซีแนพริลีน
- จำนวนแบคทีเรียในชุดทดลองที่เติมอะซีแนพริลีน

รูปที่ 4.7 กราฟแสดงการเจริญของ *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 ในอาหารเหลว CFMM ที่มีอะซีแนพริลีนเข้มข้น 900 มก.ต่อดัชนี

ผลการทดลองพบว่า *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 สามารถย่อยสลายอะซีแนพริลีน เพื่อเป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงาน โดยสังเกตจากการเพิ่มจำนวนของแบคทีเรียควบคู่ไปกับการลดลงของอะซีแนพริลีนในอาหารเหลว CFMM เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมหลังทำการเลี้ยงเชื้อ จากการแปรผันความเข้มข้นของอะซีแนพริลีนเป็น 300, 600 และ 900 มก.ต่อลิตร พบว่า ปริมาณแบคทีเรียเพิ่มจำนวนจาก 5×10^6 CFU ต่อมล. ในตอนเริ่มต้นไปเป็น 1.55×10^8 CFU ต่อมล. ในวันที่ 2 ของการเลี้ยงเชื้อ จาก 1.43×10^6 CFU ต่อมล. ในตอนเริ่มต้นไปเป็น 6.2×10^8 CFU ต่อมล. ในวันที่ 3 ของการเลี้ยงเชื้อ และจาก 1.19×10^6 CFU ต่อมล. ในตอนเริ่มต้นไปเป็น 5.5×10^8 CFU ต่อมล. ในวันที่ 3 ของการเลี้ยงเชื้อ ตามลำดับ โดยไม่มีระยะ lag เกิดขึ้น หลังจากนั้นเชื้อจะหยุดการเจริญ เมื่อทำการวิเคราะห์ปริมาณอะซีแนพริลีนที่เหลือพบว่า หลังการเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 2 วัน 3 วัน และ 4 วัน จะไม่มีอะซีแนพริลีนเหลืออยู่ในอาหารเหลว ตามลำดับ ในขณะที่ชุดควบคุมที่ไม่เติมเชื้อ จะไม่มีอะซีแนพริลีนเหลืออยู่ในอาหารเหลวเลยหลังการทดลองเป็นเวลา 5 วัน ที่ความเข้มข้นของอะซีแนพริลีน 300 มก.ต่อลิตร และที่ความเข้มข้น 600 และ 900 มก.ต่อลิตร จะเหลืออะซีแนพริลีน 155 มก.ต่อลิตร หรือลดลง 66.67 % จากปริมาณสารเริ่มต้น และ 560 มก.ต่อลิตร หรือลดลง 32 % จากปริมาณสารเริ่มต้น หลังการทดลองเป็นเวลา 7 วัน ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบการเจริญของ *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 ในการย่อยสลายอะซีแนพริลีน เพื่อเป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงาน ที่ความเข้มข้นของอะซีแนพริลีนแตกต่างกัน พบว่าการเพิ่มจำนวนของแบคทีเรียและการลดลงของอะซีแนพริลีน จะมีรูปแบบคล้ายคลึงกัน แต่ระยะเวลาที่ใช้แตกต่างกัน ดังนั้นเมื่อดูลักษณะกราฟ จึงเลือกปริมาณอะซีแนพริลีน 600 มก.ต่อลิตร เป็นความเข้มข้นที่เหมาะสมสำหรับใช้ในการศึกษาครั้งนี้ เนื่องจากหลังจาก 7 วัน ของการเลี้ยงเชื้อในชุดควบคุมยังมีอะซีแนพริลีนเหลืออยู่ ทำให้สามารถนำมาเปรียบเทียบกับชุดทดลองได้



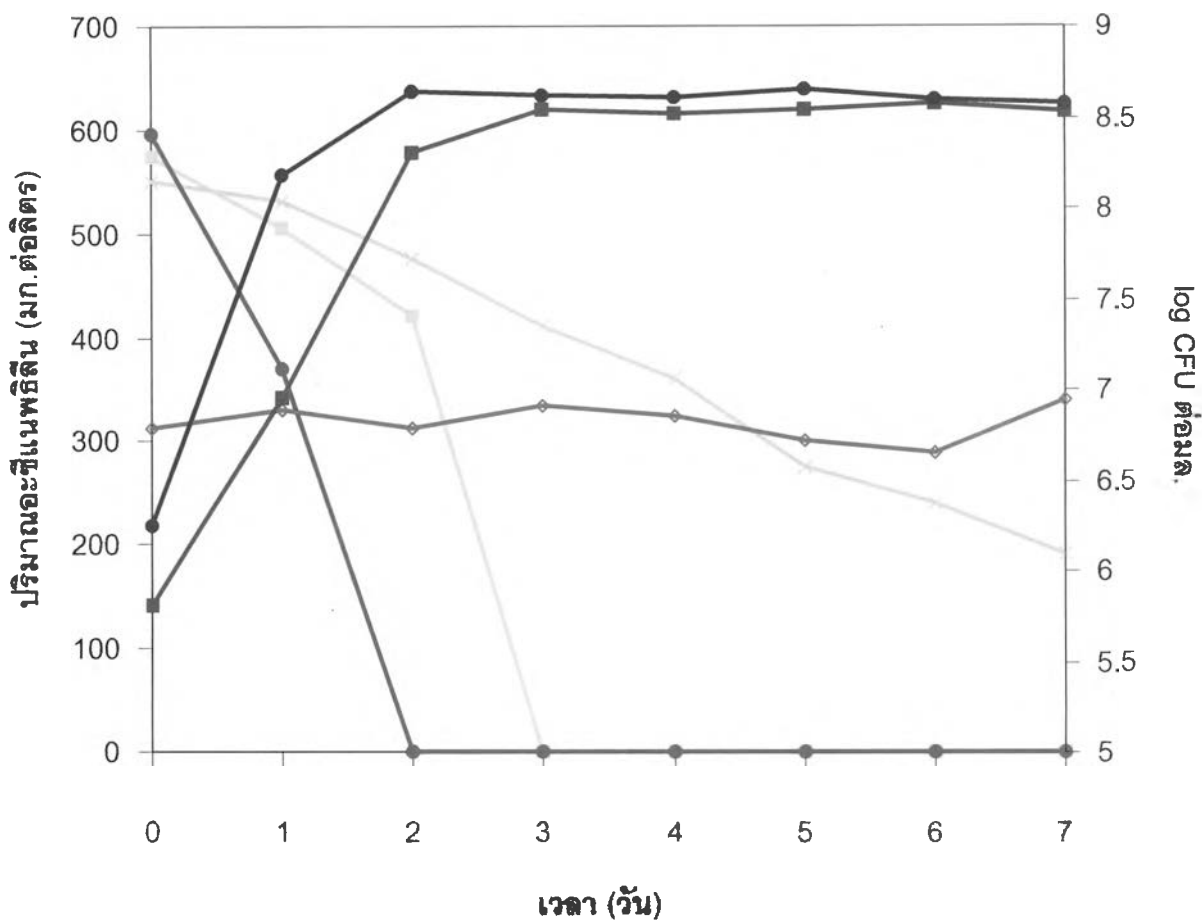
รูปที่ 4.8 โครมาโตแกรมการวิเคราะห์ HPLC เพื่อหาปริมาณอะซีแนพริลีนและสารมัธยันต์ที่เกิดขึ้น จากการย่อยสลายอะซีแนพริลีนความเข้มข้น 600 มก.ต่อลิตร โดย *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 หลังเลี้ยงเชื้อที่เวลาต่างๆ

เมื่อนำส่วนน้ำใสเลี้ยงเชื้อที่วันที่ 0, 1, 2, 3, 5 และ 7 ปริมาณอะซีแนพริลีน 600 มก.ต่อลิตร มาทำการวิเคราะห์โดย HPLC ที่ใช้ Senshu Pak Pegasil ODS เป็นคอลัมน์ และสารละลาย เมทานอลเข้มข้น 80 % เป็นสารละลายตัวพา ให้โครมาโตแกรมดังแสดงไว้ในรูป 4.8 พบว่า *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 จะย่อยสลายอะซีแนพริลีนไปเป็นสารมัธยันต์หลายชนิด โดยส่วนน้ำใสจากวันที่ 2 ให้สารที่มีเวลารีเทนชัน (Rt) ประมาณ 2 นาที ส่วนส่วนน้ำใสจาก วันที่ 3 พบสารมัธยันต์ที่มี Rt ที่ประมาณ 2 และ 4.3 นาที ในขณะที่อะซีแนพริลีนมีปริมาณ ลดลงจนตรวจหาไม่ได้ พบว่าสารมัธยันต์ทั้งสองนี้จะมีการสะสมสูงสุดในวันที่ 3 และคงระดับ ไปตลอดเวลาการทดลอง 7 วัน

4.4.2 ผลของทวิน 80 ต่อรูปแบบการเจริญของเชื้อ *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 โดยการใช้อะซีแนพริลีนเป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงาน

เมื่อเติมทวิน 80 ความเข้มข้น 0.05 % (ปริมาตรต่อปริมาตร) ลงในเซลล์เพาะเลี้ยงของ *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 ที่ใช้อะซีแนพริลีนความเข้มข้น 600 มก.ต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงาน โดยทำการติดตามจำนวนของแบคทีเรียควบคู่ไปกับการลดลงของอะซีแนพริลีนในอาหารเหลว CFMM เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่เติมทวิน 80 ดังแสดงในรูปที่ 4.9 พบว่าปริมาณของแบคทีเรียเพิ่มจาก 6.5×10^5 CFU ต่อมล. ในตอนเริ่มต้นไปเป็น 2.35×10^8 CFU ต่อมล. ในวันที่ 3 ของการเลี้ยงเชื้อ โดยไม่มีระยะ lag เกิดขึ้น หลังจากนั้นการเจริญของแบคทีเรียจะหยุดและคงที่ ในขณะที่เมื่อวิเคราะห์ปริมาณอะซีแนพริลีนที่เหลือพบว่า หลังการเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 3 วัน จะไม่มีอะซีแนพริลีนเหลืออยู่ในอาหารเหลว ในขณะที่ชุดควบคุมที่ไม่เติมเชื้อมีอะซีแนพริลีนเหลืออยู่ในอาหารเหลว 190 มก.ต่อลิตร หรือสูญหายไป 65.45 % ของปริมาณสารเริ่มต้น หลังการทดลองเป็นเวลา 7 วัน ในการทดลองที่เติมทวิน 80 พบว่าปริมาณของแบคทีเรียเพิ่มจำนวนจาก 1.79×10^6 CFU ต่อมล. ในตอนเริ่มต้นไปเป็น 4.4×10^8 CFU ต่อมล. ในวันที่ 2 ของการเลี้ยงเชื้อ โดยไม่มีระยะ lag เช่นกัน หลังจากนั้นการเจริญของแบคทีเรียจะหยุดและคงที่ และตรวจไม่พบอะซีแนพริลีนในอาหารเลี้ยงเชื้อหลังวันที่ 2 ในขณะที่ชุดควบคุมที่ไม่เติมเชื้อมีอะซีแนพริลีนเหลืออยู่ 340 มก.ต่อลิตร หรือสูญหายไป 42.37 % ของปริมาณสารเริ่มต้น หลังการทดลองเป็นเวลา 7 วัน ทั้งนี้เชื้อนี้ไม่สามารถใช้ทวิน 80 เป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงานในการเจริญทั้งในชุดการทดลองที่มีทวิน 80 และไม่มีอะซีแนพริลีนในอาหารเหลว

เมื่อตรวจสอบโครมาโตแกรมหลังจากการวิเคราะห์อาหารเลี้ยงเชื้อด้วยวิธี HPLC ดังแสดงในรูปที่ 4.11 พบว่า *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 ย่อยสลายอะซีแนพริลีนไปเป็นสารมัธยันต์หลายชนิด เช่น สารที่มี Rt ประมาณ 2 นาที และ 4.3 นาที ในการทดลองที่เติมทวิน 80 จะพบสารมัธยันต์ได้ตั้งแต่วันที่ 1 ของการเลี้ยงเชื้อ และมีการสะสมสารมัธยันต์เพิ่มมากขึ้น (ในขณะที่อะซีแนพริลีนลดลงอย่างรวดเร็วจนไม่สามารถวัดปริมาณได้) ในวันที่ 2 จะมากที่สุดและคงที่ไปจนตลอดการทดลองเป็นเวลา 7 วัน ในขณะที่การทดลองที่ไม่เติมทวิน 80 การสะสมสารมัธยันต์จะเกิดขึ้นช้ากว่า เนื่องจากอะซีแนพริลีนถูกย่อยได้ช้ากว่า โดยพบสารมัธยันต์ในวันที่ 2 ของการเลี้ยงเชื้อ และเพิ่มมากขึ้นเรื่อยๆ ในขณะที่อะซีแนพริลีนลดลงอย่างรวดเร็ว และพบสารมัธยันต์มากที่สุดในวันที่ 3 จากนั้นคงที่ไปจนตลอดการทดลองเป็นเวลา 7 วัน



- ปริมาณอะซีแนพริลีนในชุดทดลองที่ไม่เติมเชื้อ
- ปริมาณอะซีแนพริลีนในชุดทดลองที่เติมเชื้อ
- ปริมาณอะซีแนพริลีนในชุดทดลองที่มีทวิน 80 และเติมเชื้อ
- ◇ จำนวนแบคทีเรียในชุดทดลองที่ไม่เติมอะซีแนพริลีน
- จำนวนแบคทีเรียในชุดทดลองที่เติมอะซีแนพริลีน
- จำนวนแบคทีเรียในชุดทดลองที่มีทวิน 80 และมีอะซีแนพริลีน

รูปที่ 4.9 ผลของทวิน 80 ต่อรูปแบบการเจริญของเชื้อ *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 โดยการใช้อะซีแนพริลีนเป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงาน

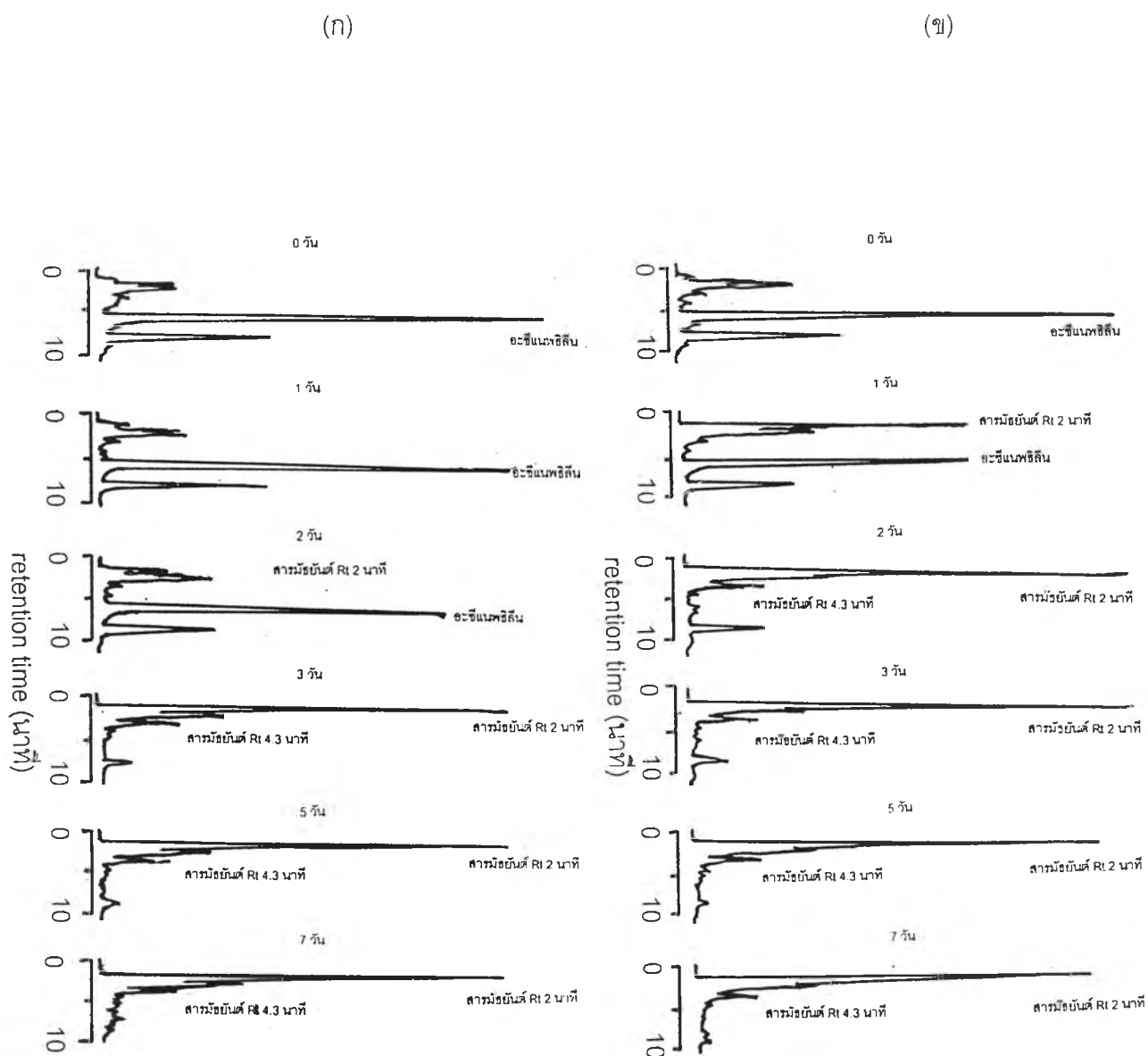
(ก)



(ข)



รูปที่ 4.10 เปรียบเทียบลักษณะของอาหารเหลว CFMM ที่มีอะซีแนฟทีลีนความเข้มข้น 600 มก.ต่อลิตร หลังการเลี้ยงเชื้อ *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 ตั้งแต่ วันที่ 0 ถึงวันที่ 7 เมื่อ (ก) ไม่มี และ (ข) มีการเติมทวิน 80



รูปที่ 4.11 โครมาโตแกรมการวิเคราะห์ HPLC เพื่อหาปริมาณอะซีแนพริลีน และสารมัยอันต์ที่เกิดขึ้น จากการย่อยสลายอะซีแนพริลีน โดย *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 เมื่อ (ก) ไม่มี หรือ (ข) มีการเติมทวิน 80 ที่เวลาเลี้ยงเชื้อต่างๆ

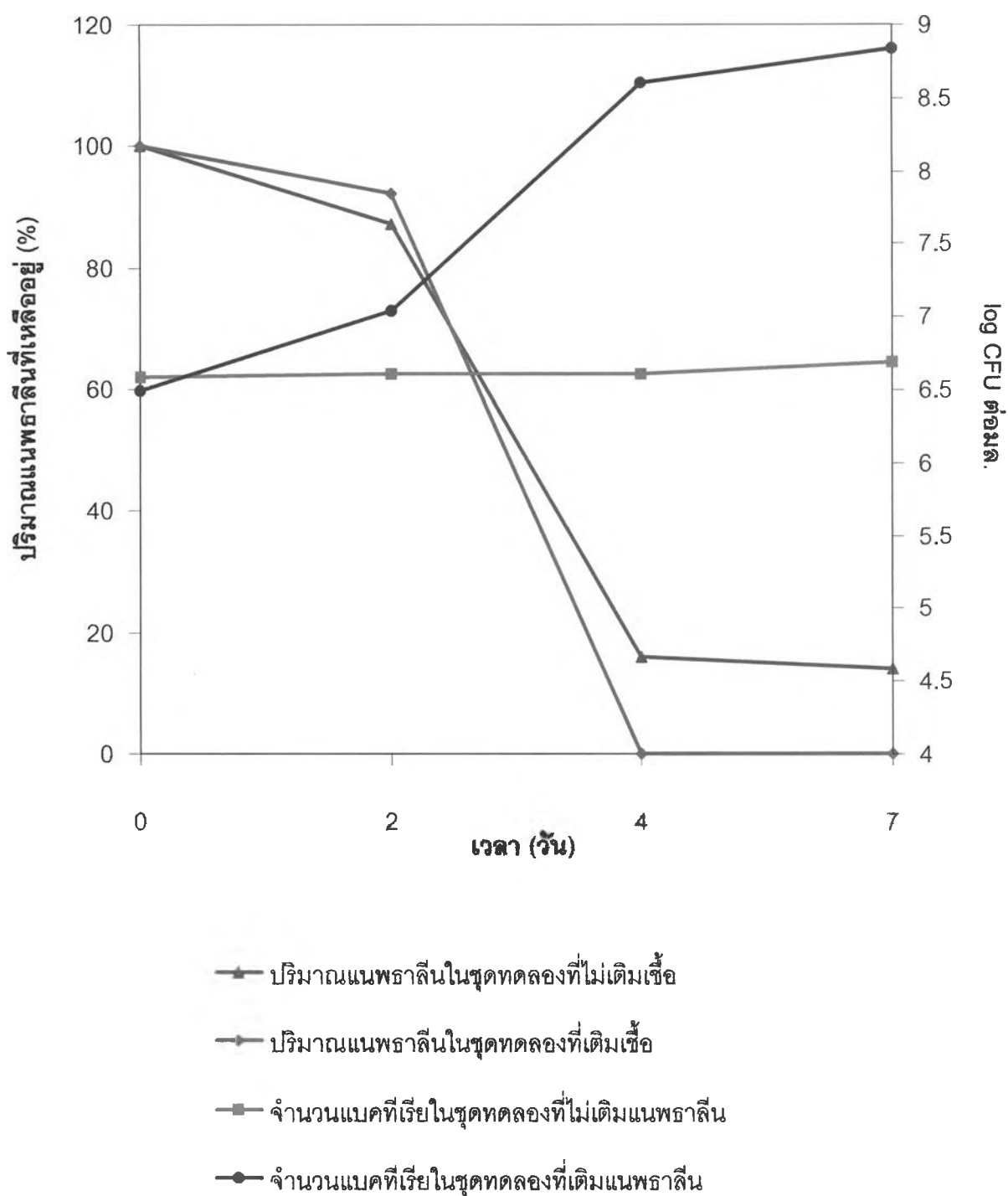
4.4.3 การทดสอบความจำเพาะในการใช้สาร PAHs ชนิดอื่น ในการเจริญของ *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1

เมื่อทดสอบความสามารถของ *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 ในการย่อยสลายสาร PAHs ชนิดอื่น เพื่อใช้เป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงานในการเจริญ โดยใช้แนพธาลีน อะซีแนพทีน ฟลูออรีน ไดเบนโซฟูแรน พีแนนทรีน แอนทราซีน ฟลูออแรนธิน และไพรีน เป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงาน พบว่า *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 สามารถใช้แนพธาลีนในการเจริญเพียงอย่างเดียวให้ความชุ่มชื้นที่เพิ่มขึ้นในอาหารเหลว หลังการเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 7 วัน ขณะที่ PAHs ชนิดอื่นไม่ให้เกิดการเจริญเลย

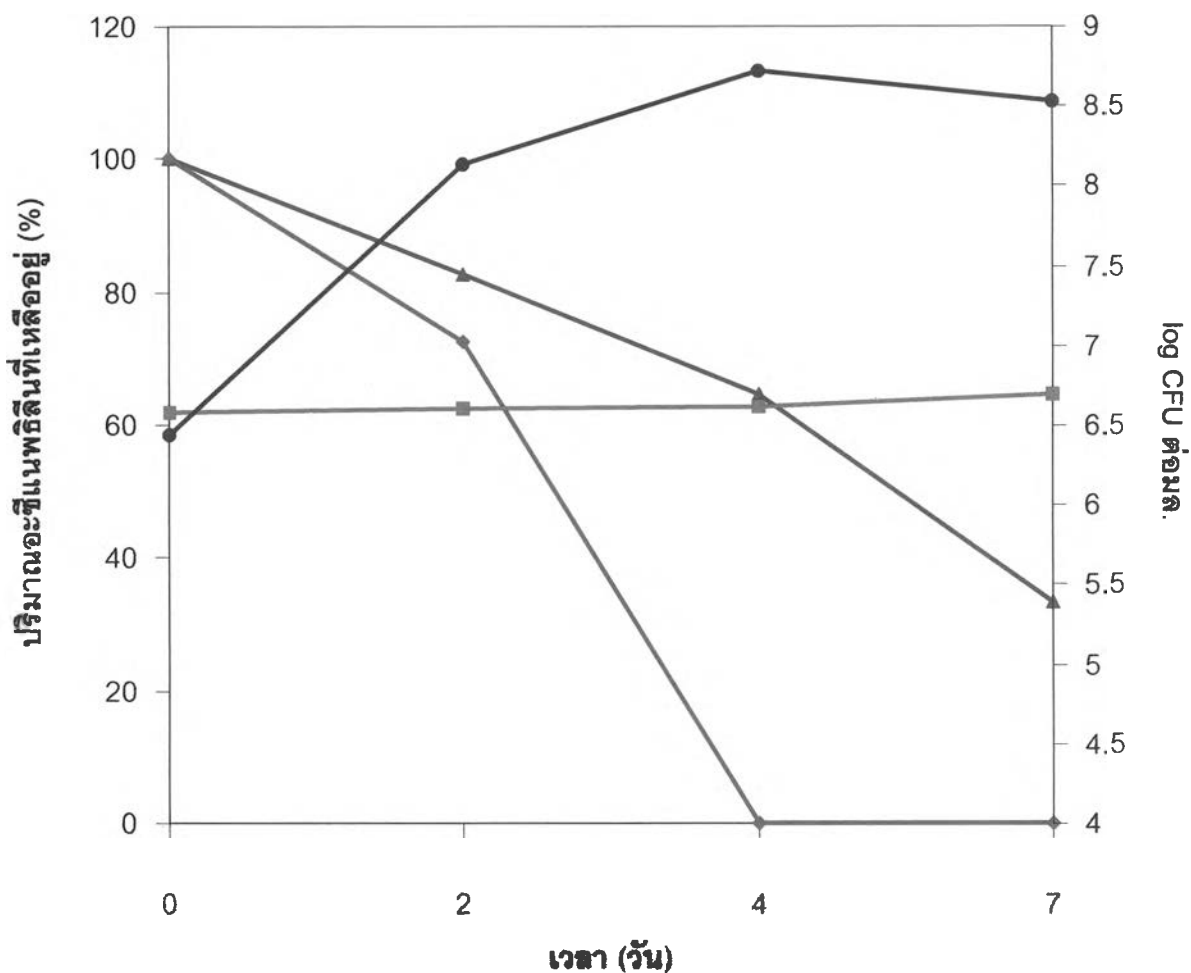
ตารางที่ 4.4 ปริมาณของ PAHs แต่ละชนิดที่เหลือในอาหารเลี้ยงเชื้อ ของ *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 หลังการเลี้ยงในอาหารเหลว CFMM เป็นเวลา 7 วัน

สารทดสอบ	ปริมาณสาร PAHs ที่เหลือ (%)	
	ชุดควบคุม	ชุดทดลอง
แนพธาลีน	9.85	0
อะซีแนพทีน	0	0
อะซีแนพทีลีน	48.15	0
ฟลูออรีน	0	0
ไดเบนโซฟูแรน	0	0
พีแนนทรีน	79.71	40.26
แอนทราซีน	99.86	98.06
ฟลูออแรนธิน	84.06	93.55
ไพรีน	97.52	98.94

จากผลการทดลองพบว่า *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 สามารถเปลี่ยนสีอาหารเหลว CFMM ที่มีอะซีแนพริลีน ได้เพียงชนิดเดียว และสามารถเพิ่มจำนวนได้ในอาหารเหลวที่เติมแนพธาซีนเป็นสารทดสอบ และเมื่อวิเคราะห์ปริมาณสาร PAHs ที่เหลืออยู่ (ดังแสดงในตารางที่ 4.4) พบว่าเชื้อไม่สามารถย่อยสลายสาร PAHs ชนิดอื่นได้นอกจากแนพธาซีนและอะซีแนพริลีน ดังนั้นจึงทดลองหารูปแบบการเจริญของเชื้อนี้ โดยใช้แนพธาซีนและอะซีแนพริลีนเป็นสารทดสอบ โดยการเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว CFMM ปริมาตร 5 มล. ที่มีแนพธาซีนและอะซีแนพริลีนเข้มข้น 200 และ 600 มก.ต่อลิตร ติดตามการเจริญของแบคทีเรีย และวิเคราะห์ปริมาณสารที่เหลืออยู่ ทุก 2 วัน พบว่าได้ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 4.12 และ 4.13



รูปที่ 4.12 จำนวนของ *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 และปริมาณของเนพธาลินที่เหนือหลังการเลี้ยง 7 วัน (โดยใช้เนพธาลินความเข้มข้น 200 มก.ต่อลิตร)



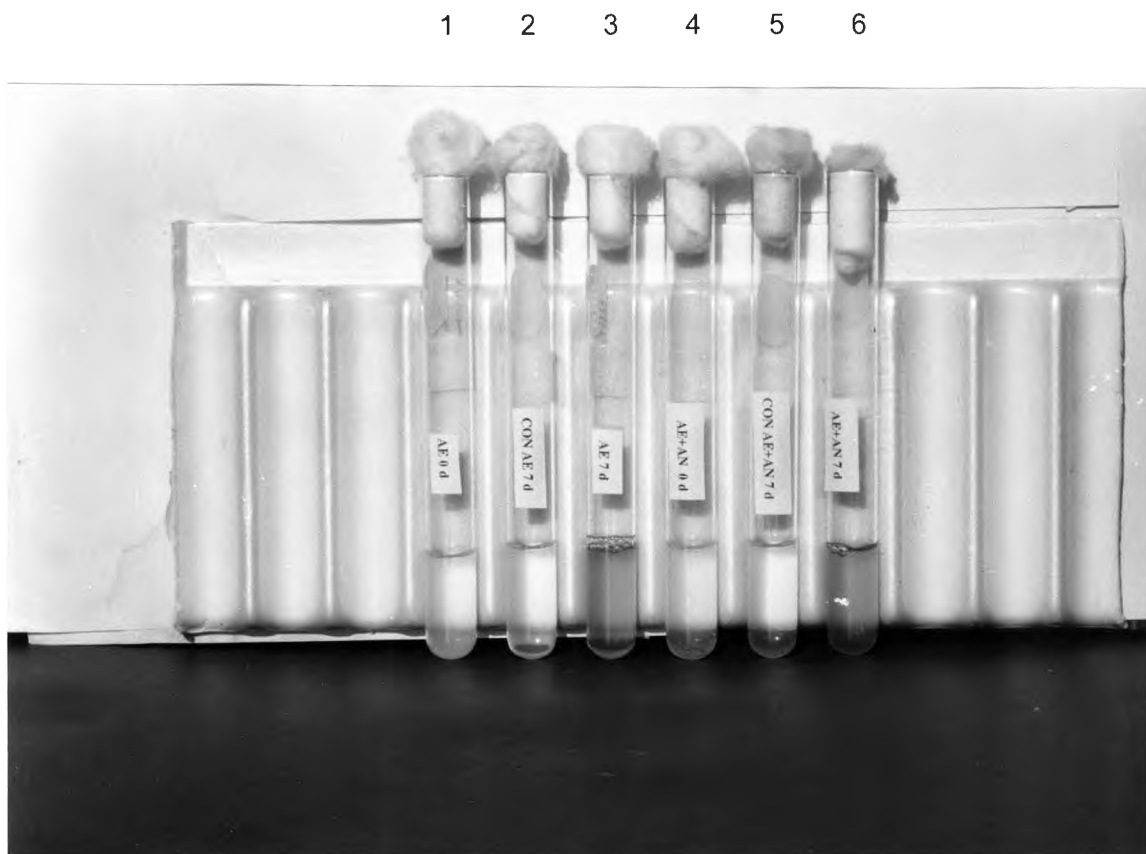
- ▲ ปริมาณอะซีแนพริลินในชุดทดลองที่ไม่เติมเชื้อ
- ◆ ปริมาณอะซีแนพริลินในชุดทดลองที่เติมเชื้อ
- จำนวนแบคทีเรียในชุดทดลองที่ไม่เติมอะซีแนพริลิน
- จำนวนแบคทีเรียในชุดทดลองที่เติมอะซีแนพริลิน

รูปที่ 4.13 จำนวนของ *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 และปริมาณของอะซีแนพริลิน ที่เหลือหลังการเลี้ยง 7 วัน (โดยใช้อะซีแนพริลินความเข้มข้น 600 มก.ต่อลิตร)

4.4.4 การย่อยสลายแบบโคเมตาบอลิซึมของ *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1

จากการที่ *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 ไม่สามารถย่อยสลายสาร PAHs ชนิดอื่นได้นอกจากอะซีแนพริลีนและแนพธาซีน เช่น อะซีแนพรีน ฟลูออรีน ไดเบนโซฟูแรน พีแนนทรีน แอนทราซีน ฟลูออแรนธิน และไพรีน จึงนำ PAHs ชนิดอื่นที่เหลือมาทดสอบการย่อยสลายแบบโคเมตาบอลิซึมโดยแบคทีเรียสายพันธุ์นี้ โดยการเติมอะซีแนพริลีนซึ่งแบคทีเรียสามารถใช้ในการเจริญได้โดยตรงลงในอาหารเหลว CFMM ร่วมกับสาร PAHs ชนิดอื่นแล้วติดตามการเจริญของแบคทีเรียและการย่อยสลายของสาร PAHs แต่ละชนิดที่เติมลงไป

การทดสอบเบื้องต้น พบว่า *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 สามารถเปลี่ยนสีของอาหารเหลวไปเป็นสีเหลืองเข้ม เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารที่เติมอะซีแนพริลีนและสาร PAHs ชนิดอื่นทุกตัว เนื่องจากมีการย่อยสลายอะซีแนพริลีน ทั้งนี้ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่เติมเพิ่มด้วย PAHs จะมีสีแตกต่างกัน ดังแสดงในรูปที่ 4.14-4.17 เมื่อวิเคราะห์ปริมาณอะซีแนพริลีนและสาร PAHs ชนิดอื่นที่เหลืออยู่ (ตารางที่ 4.5) พบว่าเชื้อนี้สามารถเกิดโคเมตาบอลิซึมระหว่างอะซีแนพริลีนร่วมกับพีแนนทรีน ฟลูออรีน และอะซีแนพรีน จึงทำการทดสอบอีกครั้งเพื่อยืนยันสมมติฐานนี้โดยเลี้ยงเชื้อนี้ให้มีโคเมตาบอลิซึมของอะซีแนพริลีน ร่วมกับพีแนนทรีน ฟลูออรีน และอะซีแนพรีน โดยการนำหัวเชื้อมาเลี้ยงในอาหารเหลว CFMM ปริมาตร 5 มล. ที่มีอะซีแนพริลีน (ปริมาณ 300 มก.ต่อลิตร) ร่วมกับพีแนนทรีน ฟลูออรีน และอะซีแนพรีน (ปริมาณ 100 มก.ต่อลิตร) ติดตามการเจริญและวิเคราะห์ปริมาณสาร PAHs ที่เหลืออยู่เป็นเวลาทุก 2 วัน จนครบ 7 วัน ได้ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 4.18 4.19 และ 4.20



รูปที่ 4.14 ลักษณะของอาหารเหลว CFMM จากการเลี้ยงเชื้อ *Rhizobium* sp. สายพันธุ์

CU-A1 เป็นเวลา 7 วัน

หลอดที่ 1 มีแบคทีเรียและมีอะซีแนพิดิน ในวันที่ 0

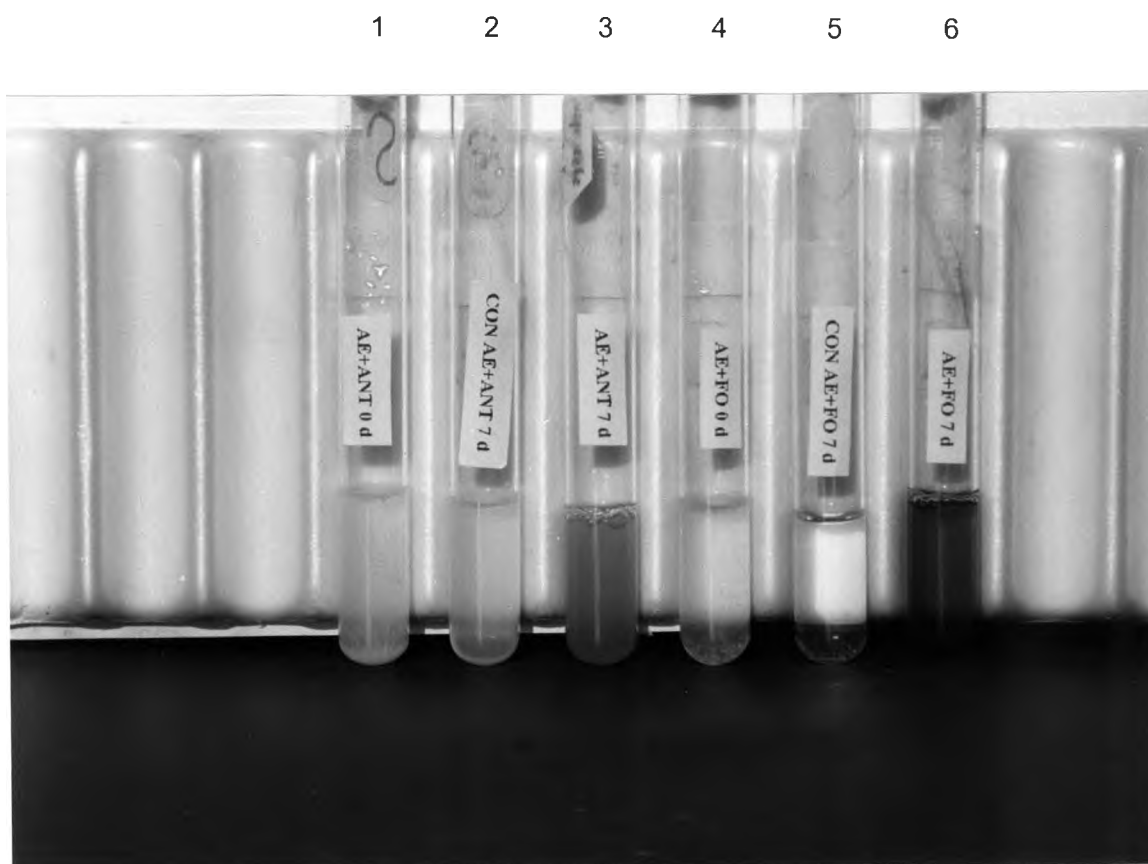
หลอดที่ 2 ไม่มีแบคทีเรียและมีอะซีแนพิดิน ในวันที่ 7

หลอดที่ 3 มีแบคทีเรียและมีอะซีแนพิดิน ในวันที่ 7

หลอดที่ 4 มีแบคทีเรียและมีอะซีแนพิดินร่วมกับอะซีแนพิดิน ในวันที่ 0

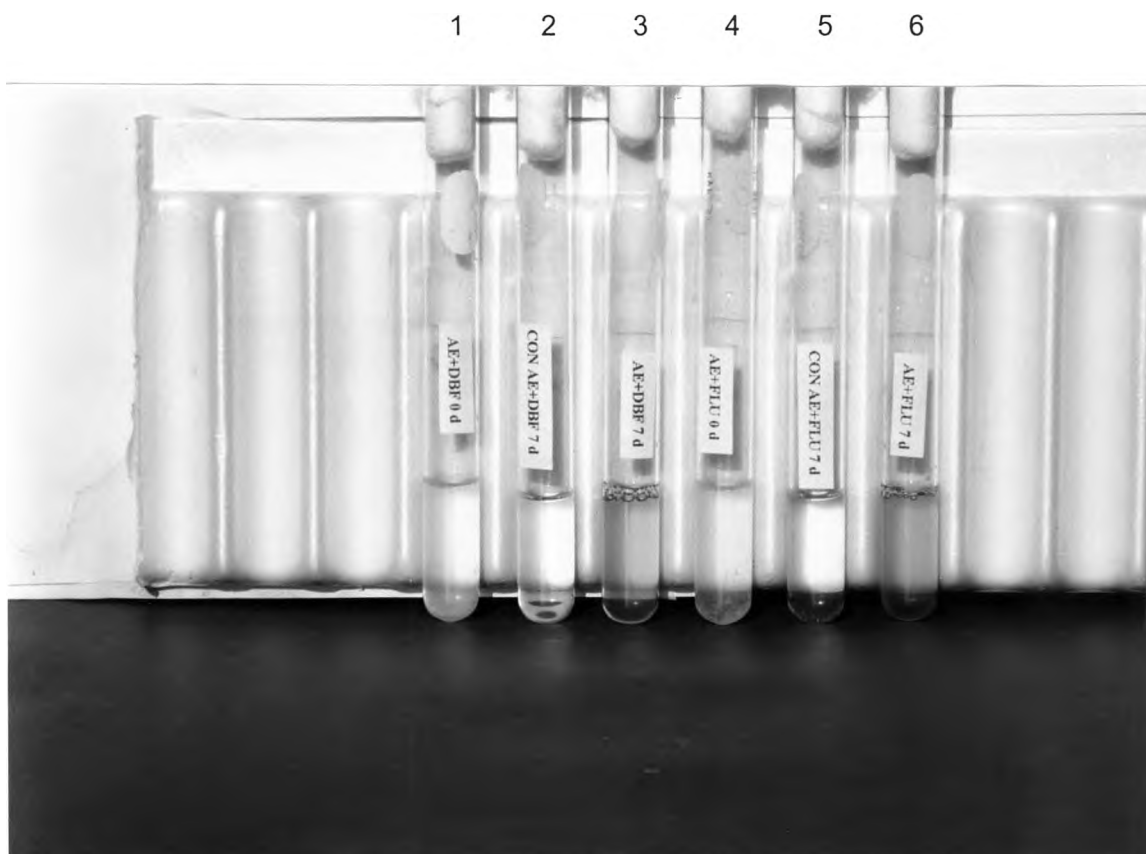
หลอดที่ 5 ไม่มีแบคทีเรียและมีอะซีแนพิดินร่วมกับอะซีแนพิดิน ในวันที่ 7

หลอดที่ 6 มีแบคทีเรียและมีอะซีแนพิดินร่วมกับอะซีแนพิดิน ในวันที่ 7



รูปที่ 4.15 ลักษณะของอาหารเหลว CFMM จากการเลี้ยงเชื้อ *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 เป็นเวลา 7 วัน

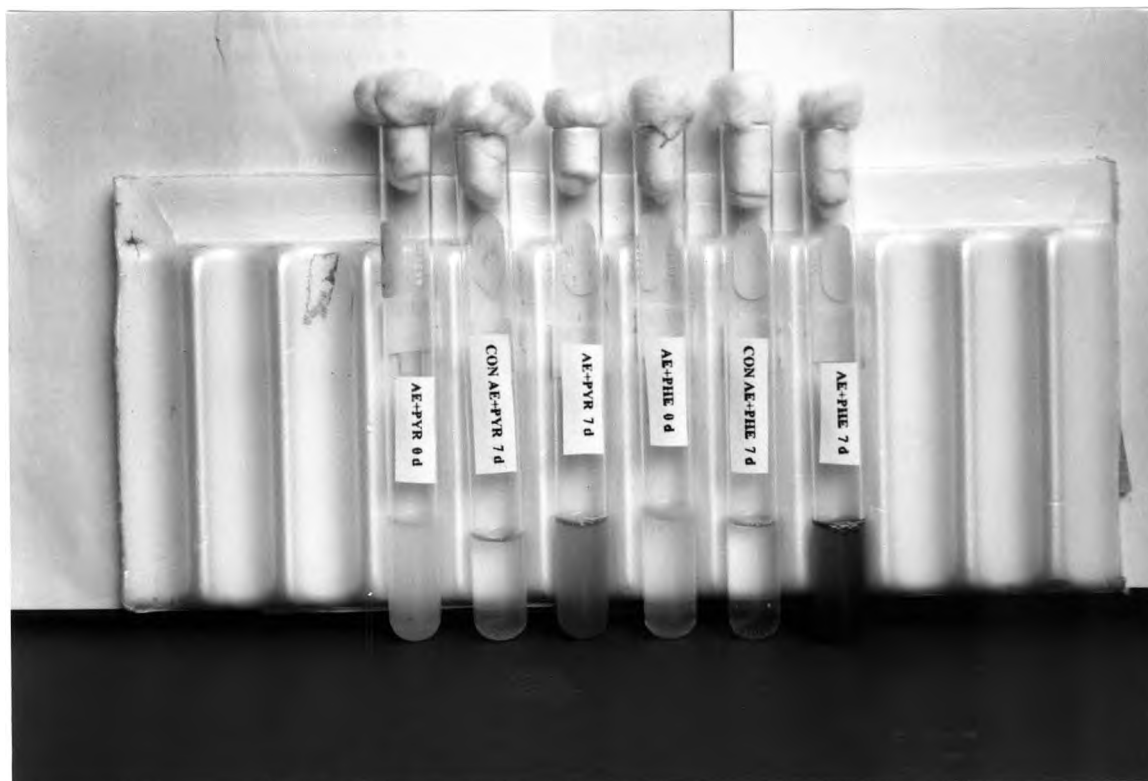
- หลอดที่ 1 มีแบคทีเรียและมีแอนทราซีนร่วมกับอะซีแนพริลีน ในวันที่ 0
 หลอดที่ 2 ไม่มีแบคทีเรียและมีแอนทราซีนร่วมกับอะซีแนพริลีน ในวันที่ 7
 หลอดที่ 3 มีแบคทีเรียและมีแอนทราซีนร่วมกับอะซีแนพริลีน ในวันที่ 7
 หลอดที่ 4 มีแบคทีเรียและมีฟลูออรีนร่วมกับอะซีแนพริลีน ในวันที่ 0
 หลอดที่ 5 ไม่มีแบคทีเรียและมีฟลูออรีนร่วมกับอะซีแนพริลีน ในวันที่ 7
 หลอดที่ 6 มีแบคทีเรียและมีฟลูออรีนร่วมกับอะซีแนพริลีน ในวันที่ 7



รูปที่ 4.16 ลักษณะของอาหารเหลว CFMM จากการเลี้ยงเชื้อ *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 เป็นเวลา 7 วัน

- หลอดที่ 1 มีแบคทีเรียและมีไดเบนโซฟูแรนร่วมกับอะซีแนพริลีน ในวันที่ 0
 หลอดที่ 2 ไม่มีแบคทีเรียและมีไดเบนโซฟูแรนร่วมกับอะซีแนพริลีน ในวันที่ 7
 หลอดที่ 3 มีแบคทีเรียและมีไดเบนโซฟูแรนร่วมกับอะซีแนพริลีน ในวันที่ 7
 หลอดที่ 4 มีแบคทีเรียและมีฟลูออเรนธินร่วมกับอะซีแนพริลีน ในวันที่ 0
 หลอดที่ 5 ไม่มีแบคทีเรียและมีฟลูออเรนธินร่วมกับอะซีแนพริลีน ในวันที่ 7
 หลอดที่ 6 มีแบคทีเรียและมีฟลูออเรนธินร่วมกับอะซีแนพริลีน ในวันที่ 7

1 2 3 4 5 6



รูปที่ 4.17 ลักษณะของอาหารเหลว CFMM จากการเลี้ยงเชื้อ *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 เป็นเวลา 7 วัน

หลอดที่ 1 มีแบคทีเรียและมีไฟรีนร่วมกับอะซีแนพริลีน ในวันที่ 0

หลอดที่ 2 ไม่มีแบคทีเรียและมีไฟรีนร่วมกับอะซีแนพริลีน ในวันที่ 7

หลอดที่ 3 มีแบคทีเรียและมีไฟรีนร่วมกับอะซีแนพริลีน ในวันที่ 7

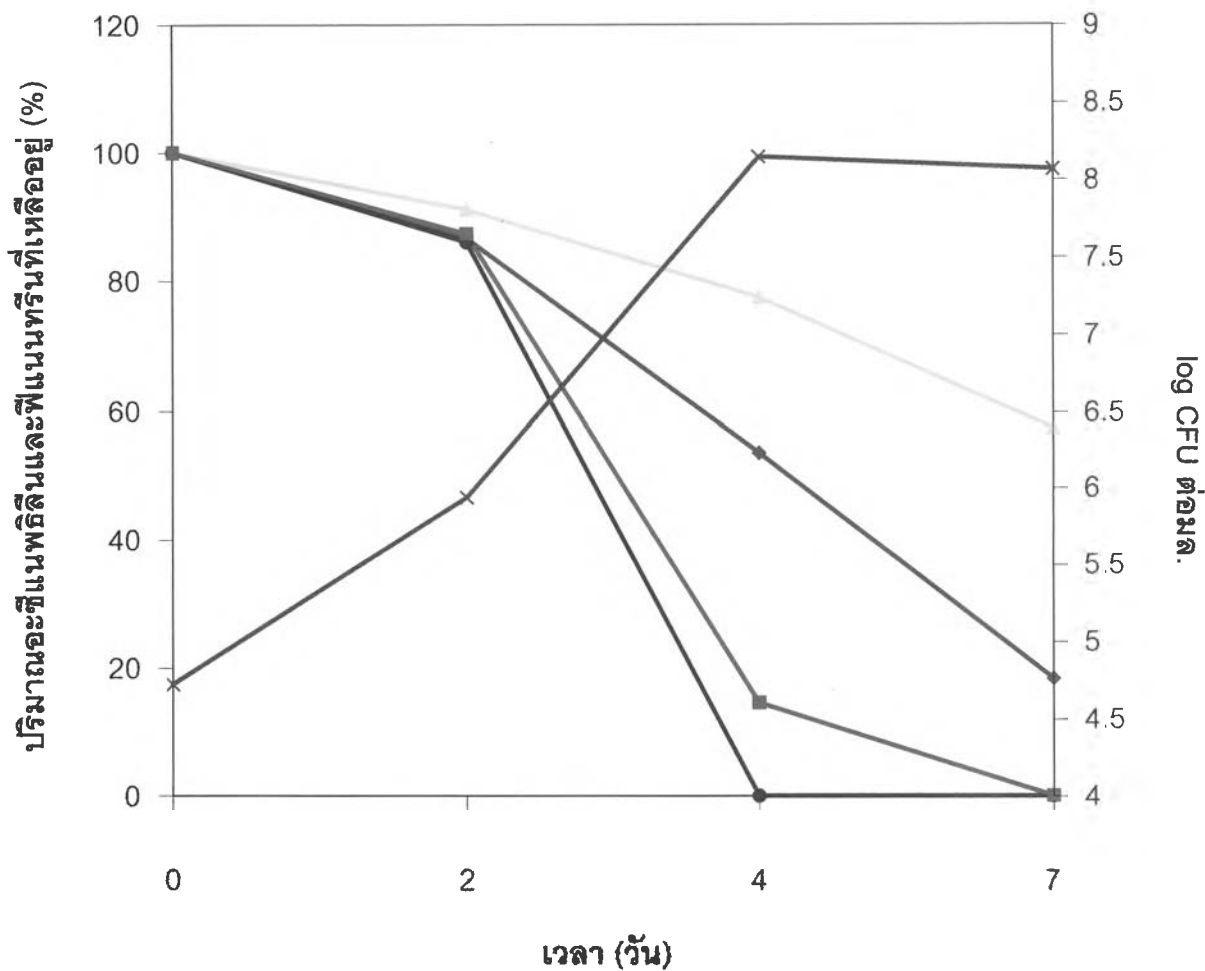
หลอดที่ 4 มีแบคทีเรียและมีฟีแนนทรินร่วมกับอะซีแนพริลีน ในวันที่ 0

หลอดที่ 5 ไม่มีแบคทีเรียและมีฟีแนนทรินร่วมกับอะซีแนพริลีน ในวันที่ 7

หลอดที่ 6 มีแบคทีเรียและมีฟีแนนทรินร่วมกับอะซีแนพริลีน ในวันที่ 7

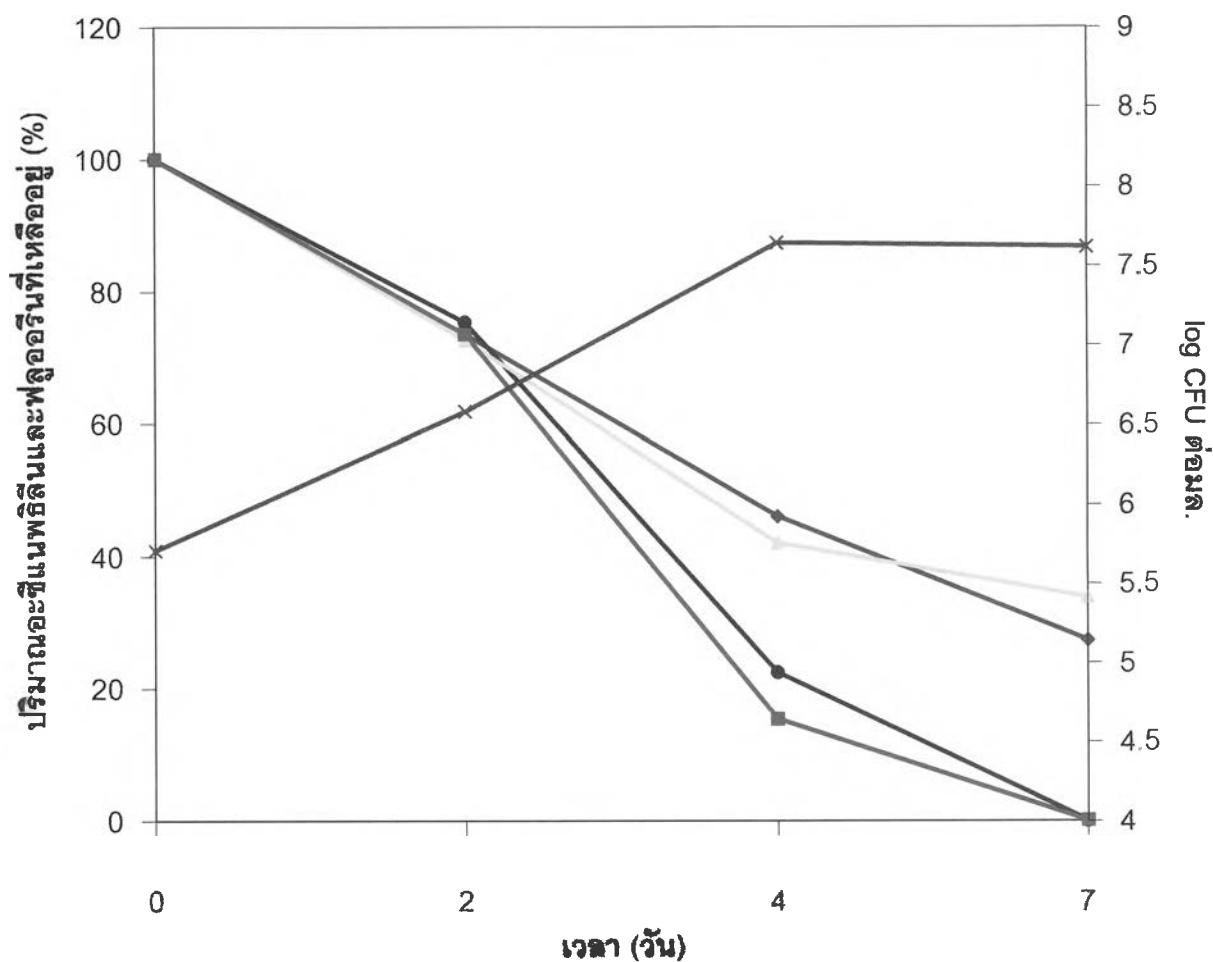
ตารางที่ 4.5 ผลการย่อยสลายแบบโคเมตาบอลิซึมของ PAHs ต่างๆ ร่วมกับอะซีแนพริลีน โดย *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 หลังการเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวเป็นเวลา 7 วัน

PAHs ที่ใช้	ปริมาณ PAHs ที่เหลือในชุดควบคุม (%)		ปริมาณ PAHs ที่เหลือในชุดทดลอง (%)	
	อะซีแนพริลีน	PAHs ที่ใช้	อะซีแนพริลีน	PAHs ที่ใช้
อะซีแนพริลีน	48.85	46.13	0	0
ฟลูออรีน	25.76	25.20	0	0
ไดเบนโซฟิวแรน	42.78	0	0	0
พีแนนทรีน	14.72	62.88	0	5.07
แอนทราซีน	36.29	96.10	0	97.63
ฟลูออแรนทีน	36.75	94.37	0	94.86
ไพรีน	36.47	98.42	0	98.37



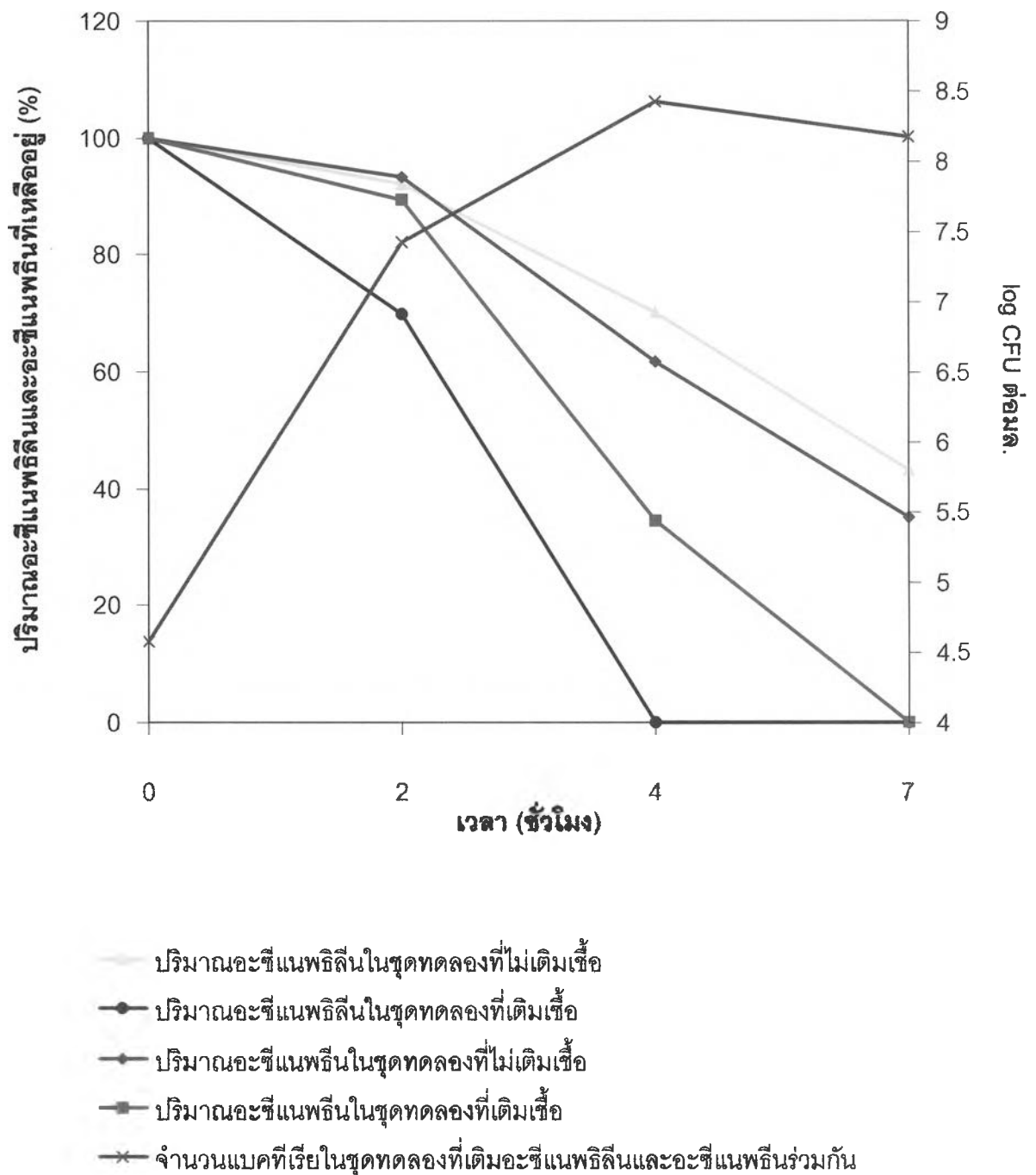
- ◆ ปริมาณอะซิไนด์ในชุดทดลองที่ไม่เติมเชื้อ
- ปริมาณอะซิไนด์ในชุดทดลองที่เติมเชื้อ
- ▲ ปริมาณพีแนทรีนในชุดทดลองที่ไม่เติมเชื้อ
- ปริมาณพีแนทรีนในชุดทดลองที่เติมเชื้อ
- × จำนวนแบคทีเรียในชุดทดลองที่เติมอะซิไนด์และพีแนทรีนร่วมกัน

รูปที่ 4.18 การเจริญ และปริมาณของอะซิไนด์และพีแนทรีนที่ผลิตในอาหารเลี้ยงเชื้อ *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 เมื่อเลี้ยงเป็นเวลา 7 วัน



- ◆ ปริมาณอะซีแนพริลีนในชุดทดลองที่ไม่เติมเชื้อ
- ปริมาณอะซีแนพริลีนในชุดทดลองที่เติมเชื้อ
- ปริมาณฟลูออรีนในชุดทดลองที่ไม่เติมเชื้อ
- ปริมาณฟลูออรีนในชุดทดลองที่เติมเชื้อ
- × จำนวนแบคทีเรียในชุดทดลองที่เติมอะซีแนพริลีนและฟลูออรีนร่วมกัน

รูปที่ 4.19 การเจริญ และปริมาณของอะซีแนพริลีนและฟลูออรีนที่เหลือในอาหารเลี้ยงเชื้อ *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 เมื่อเลี้ยงเป็นเวลา 7 วัน

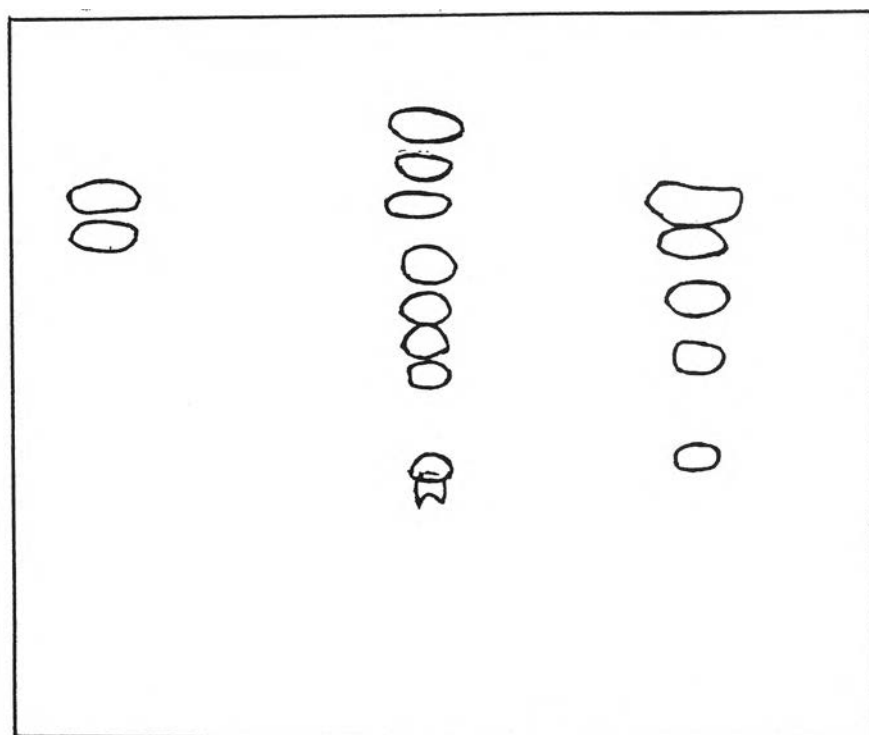


รูปที่ 4.20 การเจริญ และปริมาณของอะซิติกแอซิดและอะซิติกแอซิดที่ผลิตในอาหารเลี้ยงเชื้อ *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 เมื่อเลี้ยงเป็นเวลา 7 วัน

4.5 การแยกสารมัธยันต์ที่เกิดจากการย่อยสลายอะซีแนฟธิลีนโดย สายพันธุ์ CU-A1

Rhizobium sp.

ผลการแยกสารมัธยันต์ที่เกิดจากการย่อยสลายอะซีแนฟธิลีนโดย *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 ทำได้โดยการเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว CFMM ปริมาตร 1 ลิตร ที่มีอะซีแนฟธิลีน ความเข้มข้น 1 กรัมต่อลิตร เป็นเวลา 4 วัน จากนั้นนำอาหารเหลวที่ปั่นแยกเซลล์ออกแล้ว มาสกัดตามวิธีการในข้อ 3.5.1 จะได้สารสกัดเป็น 2 ส่วน คือส่วนสกัดที่เป็นกลางและส่วนสกัดที่เป็นกรด แล้วนำมาวิเคราะห์ด้วยวิธี TLC พบว่ามีสารมัธยันต์เกิดขึ้นหลายชนิดในทั้ง 2 ส่วน โดยในส่วนสกัดที่เป็นกรดพบสาร 8 ชนิด ที่มีค่า Rf ไม่ตรงกับสารมาตรฐานอะซีแนฟธิลีนที่ใช้ เป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงาน พบว่ายังไม่บริสุทธิ์โดยให้ 2 จุด ที่มีค่า Rf เท่ากับ 0.58 และ 0.66 ส่วนส่วนสกัดที่เป็นกลางพบสารที่มีค่า Rf ไม่ตรงกับสารมาตรฐานอะซีแนฟธิลีนที่ใช้เป็น แหล่งคาร์บอนและพลังงาน 3 ชนิด (ตารางที่ 4.6) ซึ่งสารที่มีค่า Rf ไม่ตรงกับสารมาตรฐาน อาจจะเป็นสารมัธยันต์ที่เกิดจากการย่อยสลายอะซีแนฟธิลีน และในส่วนสกัดที่เป็นกรดจะมี สารมัธยันต์จำนวนมากกว่า ดังนั้นจึงนำส่วนนี้มาทำการแยกสารมัธยันต์ให้บริสุทธิ์ต่อไป



สารมาตรฐานอะซีแนฟธิลีน

ส่วนสกัดที่เป็นกรด

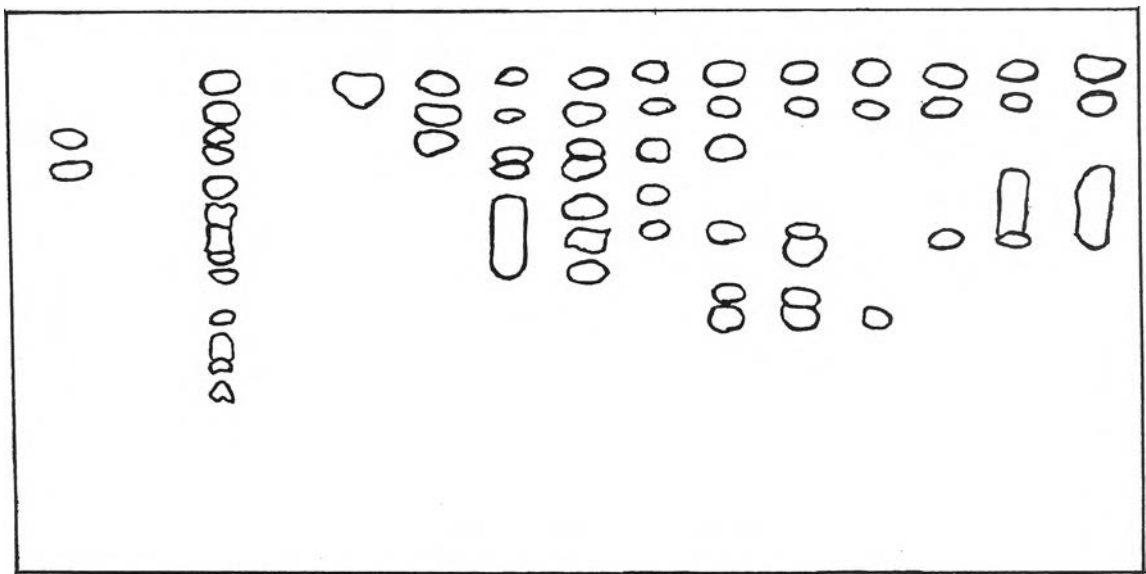
ส่วนสกัดที่เป็นกลาง

รูปที่ 4.21 โครมาโตแกรมของการวิเคราะห์ TLC ของสารประกอบที่เกิดจากการย่อย
สลายอะซีแนฟธิลีน โดย *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1

ตารางที่ 4.6 ค่า Rf ของสารที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยวิธีอินทรีย์โครมาโตกราฟี

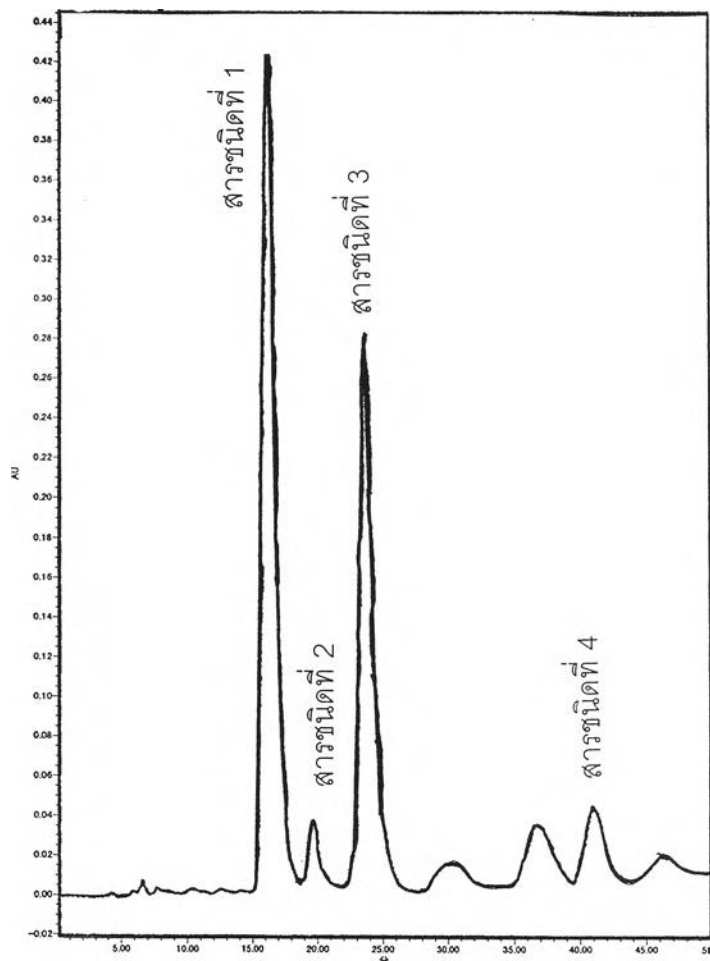
สารที่สังเกตเห็น	ระยะทางที่ตัวทำละลายเคลื่อนที่ (ซ.ม.)	ระยะทางที่สารเคลื่อนที่ (ซ.ม.)	Rf
<u>สารมาตรฐานอะซีแนฟธิลีน</u>			
1	5.30	3.10	0.58
2	5.30	3.50	0.66
<u>ส่วนสกัดที่เป็นกรด</u>			
1	5.30	0.90	0.17
2	5.30	1.05	0.20
3	5.30	1.90	0.36
4	5.30	2.20	0.42
5	5.30	2.50	0.47
6	5.30	2.90	0.55
7	5.30	3.50	0.66
8	5.30	3.80	0.72
9	5.30	4.20	0.79
<u>ส่วนสกัดที่เป็นกลาง</u>			
1	5.30	1.10	0.21
2	5.30	2.00	0.38
3	5.30	2.50	0.47
4	5.30	3.10	0.58
5	5.30	3.50	0.66

จากการนำส่วนสกัดที่เป็นกรดมาทำให้บริสุทธิ์บางส่วนโดยการทำซิลิกาเจลคอลัมน์โครมาโตกราฟี และจะเป็นลำดับส่วนด้วย 0-100 % เอทธิลอะซีเตตในเฮกเซน โดยการเพิ่มความเข้มข้นของเอทธิลอะซีเตตขึ้นลำดับส่วนละ 10 % จากนั้นวิเคราะห์แต่ละลำดับส่วนด้วยวิธี TLC พบว่าสารมัธยันต์ที่มีในแต่ ละลำดับส่วนที่ชะออกมาก็ยังไม่บริสุทธิ์ โดยในแต่ละส่วนยังมีสารมัธยันต์อื่นปนอยู่หลายชนิด ดัง แสดงในรูปที่ 4.22 ในลำดับส่วนที่ชะด้วย 0 % เอทธิลอะซีเตตในเฮกเซน พบว่ามีสารมัธยันต์ สะสมอยู่ 1 ชนิด โดยมีค่า Rf ไม่ตรงกับสารมาตรฐานอะซีแนพทิลีน แต่เมื่อนำมาวิเคราะห์ด้วย HPLC พบว่า ในลำดับส่วนนี้มีสารมัธยันต์สะสมอยู่ 4 ชนิด ดังแสดงในรูปที่ 4.23 จากนั้นจึงแยก สารทั้ง 4 ชนิดให้บริสุทธิ์ และนำสารแต่ละชนิดในลำดับส่วนนี้มาพิสูจน์เอกลักษณ์ต่อไป



สารมาตรฐาน AE ส่วนสกัดที่เป็นกรด 0 % 10 % 20 % 30 % 40 % 50 % 60 % 70 % 80 % 90 % 100 %
(เอทธิลอะซีเตต)

รูปที่ 4.22 TLC โครมาโตแกรม หลังจากการทำให้บริสุทธิ์บางส่วนโดยซิลิกาเจลคอลัมน์โครมาโตกราฟี



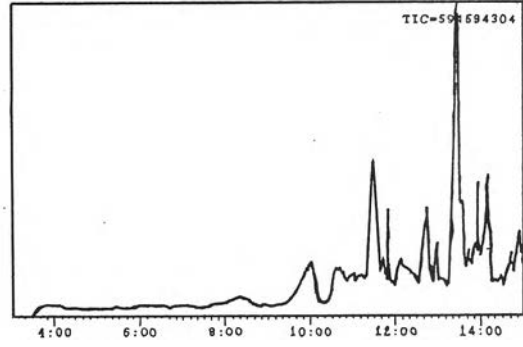
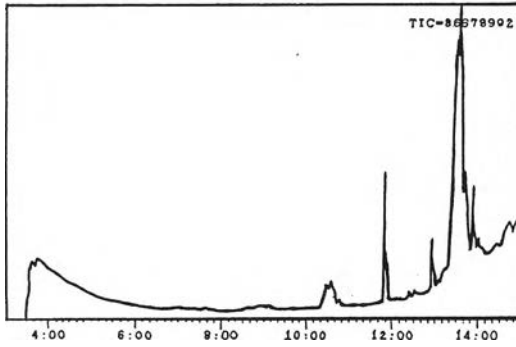
รูปที่ 4.23 HPLC โครมาโตแกรมของลำดับส่วนที่ชะด้วย 0 % เอทิลอะซิเตตในเฮกเซน

การพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารมัธยันต์โดยวิธี GC-MS

จากการพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารมัธยันต์ที่เกิดจากการย่อยสลายอะซีแนพธิลีน โดย *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 ด้วยวิธี GC-MS พบว่าไม่สามารถทำการวิเคราะห์ด้วยวิธีการนี้ได้ เนื่องจากสารมีปริมาณน้อยเกินกว่าที่จะทำการวิเคราะห์ด้วยวิธี GC-MS (ดังรูปที่ 4.24)

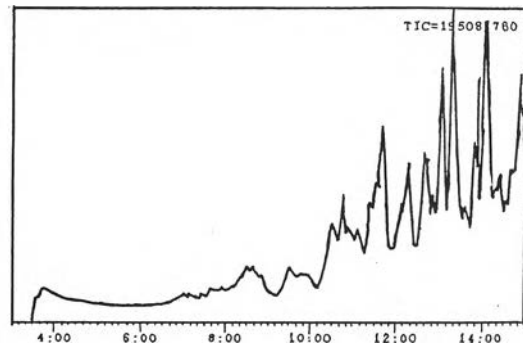
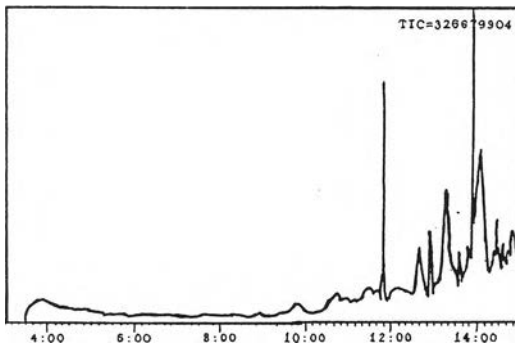
(ก)

(ข)



(ค)

(ง)



รูปที่ 4.24 โครมาโตแกรมของไอออนที่เกิดการแตกตัว (Total Ion Chromatogram, TIC) (ก) สารชนิดที่ 1 (ข) สารชนิดที่ 2 (ค) สารชนิดที่ 3 (ง) สารชนิดที่ 4