

บทที่ 5

สรุปผลการทดลอง และข้อเสนอแนะ

งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาถึง การแยก การทำให้บริสุทธิ์ และการนำไซเดอโรฟออร์ไปประยุกต์ใช้ในการหาปริมาณของเหล็ก เนื่องจากธาตุเหล็กเป็นธาตุที่มีความจำเป็นต่อกิจกรรมต่างๆ ในการดำรงชีวิตของจุลินทรีย์ ดังนั้นหากจุลินทรีย์เหล่านั้นขาดธาตุเหล็กหรือมีน้อยมากแล้ว จุลินทรีย์เหล่านั้นจะสร้างกลไกพิเศษขึ้นมาเพื่อจับกับเหล็ก และนำธาตุเหล็กมาใช้ ดังนั้นมันจึงจำเป็นต้องผลิตสารเคมีขึ้นมาเพื่อจับกับเหล็ก ซึ่งมีชื่อเรียกว่า ไซเดอโรฟออร์ (siderophores) สารนี้จะทำหน้าที่ในการละลายเหล็ก และนำเหล็กเข้าสู่เซลล์

การทดลองครั้งนี้ได้ทำการเลี้ยงแบคทีเรียสายพันธุ์ต่างๆ คือ *Ps. aeruginosa* , AE_3 , AE_{11} , AE_{14} , AE_{22} , S_2E_5 เป็นเวลา 24 ชั่วโมงในอาหารเหลว SA ได้สารละลายสีเขียวอมเหลืองแล้วเติมเฟอร์ริก คลอไรด์ 1.00 g/L ได้สารละลายสีน้ำตาล หลังจากตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต ปรับ pH 6.00-7.00 แยกเอาโปรตีนและเซลล์ออกไปโดยการหมุนเหวี่ยง แล้วผ่านคอลัมน์ Amberlite XAD-4 resin ซะด้วยเมทานอล : น้ำ ได้แถบเดี่ยว ลดปริมาตรลงเหลือประมาณ 5-10 cm³ ผ่านลงในคอลัมน์ Bio-Gel P-2 ซะด้วยฟิรดิน-อะซีเตด บัฟเฟอร์ (pH 6.02) ได้ 3 แถบเป็นส่วนใหญ่ แสดงว่าเกือบทุกสายพันธุ์ผลิตไซเดอโรฟออร์ได้อย่างน้อย 3 ชนิด ยกเว้น AE_{22} ได้เพียง 2 แถบเท่านั้น เก็บแต่ละแถบแยกกันนำไปทำให้แห้ง โดยวิธี lyophilization พบว่าแถบที่ 1 ซึ่งเป็นแถบที่แยกออกมาก่อนของทุกสายพันธุ์ มีปริมาณโดยเฉลี่ยสูงสุด ส่วนแถบที่ 2, 3 มีปริมาณโดยเฉลี่ยลดลงตามลำดับ และมีสีแตกต่างกันบ้างบางชนิด

ส่วนการศึกษากิจกรรมของไซเดอโรฟออร์ที่อยู่ในรูปลิแกนด์อิสระที่ได้จากแบคทีเรีย *Ps. aeruginosa* ด้วยเทคนิค HPLC โดยนำสารละลายไซเดอโรฟออร์ที่ผ่านคอลัมน์ Bio-Gel P-2 จะได้โครมาโทแกรมดังรูปที่ 4.2 จะเห็นว่ามีการปรากฏมากกว่า 1 พีค แสดงว่าสารละลายไซเดอโรฟออร์ที่นำมาทดสอบมีหลายโครงสร้างซึ่งเกิดการสลายตัวของไซเดอโรฟออร์ที่เป็นผลิตภัณฑ์หลัก

จากนั้นนำไปศึกษาสมบัติทางเคมีของไซเดอโรฟออร์ เพื่อแยกประเภทของ ไซเดอโรฟออร์ ปรากฏว่าเป็นกลุ่ม hydroxamate เนื่องจากให้ผลที่เป็นบวกกับวิธี Triphenyltetrazolium Chloride test และ Berg & Becker

การศึกษาปัจจัยบางประการที่อาจมีผลต่อไฮเดรโอฟอร์ และสารประกอบเชิงซ้อนของ เหล็ก-ไฮเดรโอฟอร์ พบว่าเมื่ออุณหภูมิเพิ่ม $\lambda_{\max}$ ของไฮเดรโอฟอร์ยังคงอยู่ที่ 385 nm แต่ปรากฏ shoulder ที่ 400 nm และสีของสารละลายยังคงเป็นสีเขียวอมเหลือง แสดงว่าโครงสร้างของ ไฮเดรโอฟอร์อาจเกิดการเปลี่ยนแปลงไปบางส่วน แต่อุณหภูมิไม่มีผลต่อ $\lambda_{\max}$ สารประกอบเชิงซ้อนของเหล็ก-ไฮเดรโอฟอร์ และสีของสารละลายยังคงเป็นสีน้ำตาลแดงแสดงว่าสารประกอบเชิงซ้อนมีความเสถียรที่อุณหภูมิไม่เกิน 200 °C

ผลของการคายกลืนแสงจากหลอดไฟ daylight กำลัง 60 W ที่เวลาต่างๆ พบว่ามีผลต่อ $\lambda_{\max}$ ของไฮเดรโอฟอร์ โดยค่าของ $\lambda_{\max}$ ลดลงเพียงเล็กน้อยและปรากฏ shoulder ที่ 360 และ 400 nm สำหรับสารประกอบเชิงซ้อนเหล็ก-ไฮเดรโอฟอร์ พบว่าการคายกลืนแสงนี้ไม่มีผลต่อค่า $\lambda_{\max}$ นอกจากนั้นยังไม่เกิด shoulder เหมือนในไฮเดรโอฟอร์บริสุทธิ์อีกด้วย แสดงว่าเมื่อเกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนเหล็ก-ไฮเดรโอฟอร์แล้วจะมีความเสถียรมากขึ้น

pH มีผลต่อสเปกตรารการดูดกลืนแสงของสารละลายไฮเดรโอฟอร์ โดยที่ pH 1-4 , 5-6 , 7-8 , 9-12 , 13 ค่าของ $\lambda_{\max}$ ปรากฏที่ 370 , 379, 395, 398 , 320 nm ตามลำดับ และเกิด isobestic points ที่ 370 nm และ 375 nm นอกจากนั้นที่ pH 6 และ 13 ยังเกิด shoulder ที่ 398 nm อีกด้วย ส่วนกรณีของสารประกอบเชิงซ้อนเหล็ก-ไฮเดรโอฟอร์ที่ pH 2-12 ค่าของ $\lambda_{\max}$ คงที่ที่ 400 nm ที่ pH 1 และ 13 ค่าของ $\lambda_{\max}$ เป็น 375 nm และ 395 nm แสดงว่าที่ค่า pH ทั้งสองไฮเดรโอฟอร์จะปลดปล่อยเหล็กออกไปซึ่งจะสังเกตเห็นว่า สีของสารละลายจะกลับเป็นสีเขียวเหลืองตามเดิม และมีตะกอนสีน้ำตาลเกิดขึ้นเล็กน้อย แสดงว่าเหล็กบางส่วนเกิดเป็นไฮดรอกไซด์

ผลของอุณหภูมิ 37 ° C ต่อสเปกตรารการดูดกลืนแสงของไฮเดรโอฟอร์ ทั้งกรณีของสารละลายไฮเดรโอฟอร์บริสุทธิ์ และสารประกอบเชิงซ้อนของเหล็ก-ไฮเดรโอฟอร์ พบว่าอุณหภูมิ 37 ° C ไม่มีผลต่อ $\lambda_{\max}$ คือยังปรากฏที่ 380 nm และ 400 nm เช่นเดิม แต่ของสารละลายไฮเดรโอฟอร์บริสุทธิ์ปรากฏ shoulder ที่ 360 nm อาจเนื่องมาจากเก็บสารที่ผลิตได้ไว้นาน

ผลการนำไฮเดรโอฟอร์ไปใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณของเหล็กในน้ำตัวอย่าง โดยอาศัยการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนระหว่างไฮเดรโอฟอร์กับเหล็ก(II) แล้วเกิดสารสีน้ำตาล นำไปสแกนหาค่าการดูดกลืนแสงสูงสุด พบว่า เกิดขึ้นที่ $\lambda_{\max}$ 400 nm แสดงว่าที่ความยาวคลื่นนี้ สามารถวัดปริมาณการดูดกลืนแสงของสารเชิงซ้อนเหล็ก-ไฮเดรโอฟอร์ได้ดีที่สุด โดยมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ เท่ากับ 0.9995 ความชัน เท่ากับ 0.2367 Lmg⁻¹ มีค่าโมลาร์แอบซอร์ปติวิตี เท่ากับ 12.031 Lmole⁻¹cm⁻¹ มีค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์เท่ากับ 0.0024 % และ % R เท่ากับ 108.52

จากการศึกษาปริมาตรของน้ำตัวอย่างที่เหมาะสม ได้ข้อสรุปดังนี้คือ มีความเข้มข้นของเหล็กเฉลี่ยเท่ากับ 0.01, 0.02 และ 0.04 ppm ปริมาตรของน้ำตัวอย่างที่เหมาะสมคือ 5.00 หรือ 10.00 cm³ เพื่อจะได้ค่าการดูดกลืนแสงไม่ต่ำเกินไปอยู่ในช่วง linear range ของกราฟมาตรฐาน

การวิเคราะห์หาปริมาณของเหล็กโดยวิธีฟีนแอนโทรลีน ด้วยการวัดสเปกตรัมการดูดกลืนแสงที่ $\lambda_{\max}$ เท่ากับ 510 nm พบว่า กราฟมาตรฐานมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์เท่ากับ 0.9997 นั่นคือความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสง และความเข้มข้นของเหล็ก มีความสัมพันธ์เป็นเส้นตรงเป็นไปตามกฎของเบียร์ และมีค่าโมลาร์แอบซอร์ปติวิตี เท่ากับ 36.757 L mole⁻¹ cm⁻¹

ข้อเสนอแนะ

เพื่อให้งานวิจัยครั้งต่อไปได้ผลดียิ่งขึ้นควรปรับปรุงในส่วนต่างๆ ดังนี้คือ

1. ควรจะใช้วิธีอื่นทดสอบประเภทของไซเดอโรฟอร์ด้วย เช่น periodic acid test หรือ Ferric perchlorate test รวมทั้งควรจะได้พัฒนาวิธีการที่มีอยู่ให้ดีขึ้น
2. การศึกษาปัจจัยบางประการที่อาจมีผลต่อ $\lambda_{\max}$ ของไซเดอโรฟอร์นั้นควรจะได้หาวิธีการป้องกันการระเหยของตัวทำละลายในระหว่างการทดสอบ
3. pH ควรใช้บัฟเฟอร์ที่เหมาะสม เช่น ซิเดด บัฟเฟอร์ควบคุม pH แทนการปรับด้วยสารละลายของกรดไฮโดรคลอริก และ/หรือ สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ทำให้ไม่เสียเวลา และได้ผลดีกว่า
4. การวิเคราะห์หาปริมาณของเหล็กในน้ำตามธรรมชาติต่างๆ นั้น ควรจะใช้เทคนิคอื่นประกอบด้วย เช่น เทคนิค HPLC