บทที่ 5

สรุปผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

ปี ค.ศ. 1981 Hoffmann และคณะรายงานว่า *T. ferrooxidans* ATCC19859 สามารถขจัดกำมะถันไพไรต์ออกจากลิกไนท์ได้ 90-98% ภายในเวลา 8-12 วัน ผงลิกไนท์ที่นำมาศึกษามีกำมะถันไพไรต์ปนเปื้อน 30-40 มก./กรัมลิกไนท์ มีขนาดอนุภาค ≤ 74 ไมครอน ทำการศึกษาโดยแขวนลอยผงลิกไนท์ ≤ 20% (กรัม/100 มล.อาหารเลี้ยงเชื้อ) อาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่ใช้มีความเข้มข้นของฟอสเฟตต่ำ (0.7 มิลลิโมลาร์) และมีอัตราส่วนของไนโตรเจน (แอมโมเนียม) ต่อฟอสฟอรัส (ฟอสเฟต) ที่สูงคือ 90:1 จึงได้ทำการศึกษาเปรียบเทียบประสิทธิภาพการขจัดกำมะถันไพไรต์ออกจากลิกไนท์ระหว่าง *T. ferrooxidans* ATCC19859 และ *T. ferrooxidans* Y4-3 โดยเพาะเลี้ยงเชื้อทั้งสองในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวสูตร 9K ให้อากาศโดยการเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30°ซ เป็นเวลา 10 วัน ถ่ายเชื้อเริ่มต้นที่ได้ 10% (มล./100 มล.ผงลิกไนท์แขวนลอยในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว) ลงในผงลิกไนท์ขนาดอนุภาค 45 ไมครอน แขวนลอยในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวสูตร 9K ที่ไม่เติมเฟอรัสซัลเฟต ปริมาณ 10% (กรัม/100 มล.ของสารแขวนลอย) ให้อากาศโดยการเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30°ซ เป็นเวลา 10 วัน ผลการศึกษาพบว่า *T. ferrooxidans* Y4-3 สามารถขจัดกำมะถันไพไรต์ออกจากลิกไนท์ได้มากกว่า *T. ferrooxidans* ATCC19859 โดย *T. ferrooxidans* Y4-3 และ *T. ferrooxidans* ATCC19859 สามารถขจัดกำมะถันไพไรต์ออกจากลิกไนท์ในภาวะที่ทดลองเท่ากับ 1.32% และ 0.76% ตามลำดับ จึงเลือกใช้ *T. ferrooxidans* Y4-3 ในการทดลองต่อไป

เนื่องจากปัจจัยที่มีผลต่อการขจัดกำมะถันไพไรต์ออกจากลิกไนท์โดย *T. ferrooxidans* (Hoffmann และคณะ 1981) คือ

1. ตัวอย่างลิกไนท์ที่นำมาศึกษา เพราะองค์ประกอบและสมบัติของลิกไนท์จากแต่ละแหล่งต่างกัน อัตราเร็วของการขจัดกำมะถันไพไรต์ออกจากลิกไนท์สูง เมื่อลิกไนท์มีกำมะถันไพไรต์ปนเปื้อนในปริมาณสูง แต่มีสารปนเปื้อนซึ่งสามารถยับยั้งประสิทธิภาพการขจัดกำมะถันไพไรต์โดย *T. ferrooxidans* เช่น แคดเมียม โครเมียม โบรอน เป็นต้น ในปริมาณที่ต่ำ

2. อัตราส่วนระหว่างแอมโมเนียม/ฟอสเฟต *T. ferrooxidans* ต้องการแอมโมเนียมเพื่อการเจริญ อัตราเร็วของการขจัดกำมะถันไพไรต์สูง เมื่ออัตราส่วนระหว่างแอมโมเนียม/ฟอสเฟตมีค่าสูง

3. พื้นที่ผิวของกำมะถันไพไรต์ อัตราเร็วของการขจัดกำมะถันไพไรต์สูงเมื่อพื้นที่ผิวของกำมะถันไพไรต์มีค่าสูง กำมะถันไพไรต์น้ำหนักเท่ากัน จะมีพื้นที่ผิวมากขึ้นเมื่อขนาดของอนุภาคเล็กลง และกำมะถันไพไรต์ขนาดอนุภาคเท่ากัน พื้นที่ผิวของกำมะถันไพไรต์จะมากขึ้น เมื่อปริมาณผงไพไรต์คิดเป็นเปอร์เซ็นต์ (กรัม/100 มล.ของสารแขวนลอย) มีค่าสูงขึ้น

ดังนั้นผลการทดลองของ Hoffmann และคณะซึ่งรายงานว่า *T. ferrooxidans* ATCC19859 สามารถขจัดกำมะถันไพไต์ออกจากลิกไนท์ได้สูงถึง 90-98% ภายในเวลา 8-12 วัน นั้น น่าจะเป็นผลมาจากองค์ประกอบและสมบัติของลิกไนท์ที่นำมาศึกษา (ตัวอย่างลิกไนท์ที่ Hoffmann และคณะนำมาทดสอบ มีกำมะถันไพไรต์ปนเปื้อนสูงถึง 30-40 มก./กรัมลิกไนท์) ภาวะที่ศึกษาคือแขวนลอยผงลิกไนท์ 20% (กรัม/100 มล.อาหารเลี้ยงเชื้อ) และอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่ใช้มีอัตราส่วนของไนโตรเจน (แอมโมเนียม) ต่อฟอสฟอรัส (ฟอสเฟต) สูง คือสูงถึง 90:1

ผลการเปรียบเทียบประสิทธิภาพของ *T. ferrooxidans* Y4-3 ในการขจัดกำมะถันไพไรต์ออกจากลิกไนท์ เมื่อแขวนลอยผงลิกไนท์ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวสูตร 9K ที่ปราศจากเฟอรัสซัลเฟต และแขวนลอยผงลิกไนท์ในน้ำกลั่น พบว่าใกล้เคียงกันคือ สามารถขจัดกำมะถันไพไรต์ออกไปได้ 1.32 และ 1.37% ตามลำดับ เพื่อเป็นการลดต้นทุนของการนำไปประยุกต์ใช้งานจริง จึงเลือกแขวนลอยผงลิกไนท์ในน้ำกลั่น

ค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นของผงลิกไนท์แขวนลอยในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวสูตร 9K ที่ปราศจากเฟอรัสซัลเฟต และที่แขวนลอยในน้ำกลั่นเท่ากับ 2.78 และ 5.1 ตามลำดับ และเนื่องจากค่าความเป็นกรด-ด่าง ซึ่งเหมาะสมต่อการเจริญของ *T. ferrooxidans* และเหมาะสมต่อกระบวนการออกซิเดชันแร่ซัลไฟด์โดย *T. ferrooxidans* เท่ากับ 2.0-2.3 (Jensen และ Webb 1995) และ 1.0-2.5 (Bos และคณะ 1992) ตามลำดับ จึงได้ศึกษาผลของค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นต่อประสิทธิภาพการขจัดกำมะถันไพไรต์ออกจากลิกไนท์โดย *T. ferrooxidans* Y4-3 โดยแปรผันค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นเท่ากับ 1.5-3.0 พบว่าได้ประสิทธิภาพสูงสุด เมื่อค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นเท่ากับ 2.0 โดยสามารถขจัดกำมะถันไพไรต์ออกไปได้ 5.45%

ผลการเปรียบเทียบประสิทธิภาพของเชื้อเริ่มต้น (*T. ferrooxidans* Y4-3) ซึ่งเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวสูตร 9K และอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวสูตร 9K ที่ปราศจากเฟอรัสซัลเฟต แต่เติมผงลิกไนท์ 5% (กรัม/100 มล.ของสารแขวนลอย) พบว่าเชื้อเริ่มต้นที่เจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวสูตร 9K สามารถขจัดกำมะถันไพไรต์ออกจากลิกไนท์ได้มากกว่า คือเท่ากับ 5.45 และ 4.40% ตามลำดับ น่าจะเป็นผลมาจากจำนวนเซลล์ของเชื้อเริ่มต้นที่เจริญในผงลิกไนท์แขวนลอยในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวสูตร 9K ที่ปราศจากเฟอรัสซัลเฟตน้อยกว่าที่เจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวสูตร 9K เนื่องจากผงลิกไนท์ที่นำมาศึกษามีกำมะถันไพไรต์เป็นองค์ประกอบ 10 มก./กรัมลิกไนท์ ดังนั้นผงลิกไนท์ 5% (กรัม/100 มล.ของสารแขวนลอย) จึงมีเฟอรัสไอออนและกำมะถันเพื่อการเจริญ 23 และ 27 มก. ตามลำดับ ในขณะที่อาหารเลี้ยงเชื้อเหลวสูตร 9K มีเฟอรัสไอออนเป็นองค์ประกอบสูงถึง 1,000 มก. เนื่องจากในภาวะที่มีเฟอรัสไอออนสูง *T. ferrooxidans* จะเลือกใช้เฟอรัสไอออนเป็นแหล่งพลังงานเพื่อการเจริญ ไม่ใช้กำมะถัน (Sugio และคณะ 1992) ดังนั้นหากต้องการศึกษาว่าเชื้อเริ่มต้นซึ่งเจริญโดยใช้กำมะถันไพไรต์เป็นแหล่งพลังงานมีประสิทธิภาพในการขจัดกำมะถันไพไรต์ออกจากลิกไนท์ได้สูงกว่าเชื้อเริ่มต้นที่เจริญโดยใช้

เฟอรัสไอออนเป็นแหล่งพลังงานหรือไม่ ควรใช้กำมะถันไพไรต์บริสุทธิ์แทนเฟอรัสซัลเฟตในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวสูตร 9K โดยควบคุมให้ปริมาณเฟอรัสไอออนเท่ากัน ซึ่งไม่สามารถทำได้เมื่อใช้ผงลิกไนท์ เพราะกำมะถันไพไรต์เป็นเพียงสิ่งปนเปื้อนในลิกไนท์ และหากต้องการให้กำมะถันไพไรต์มีปริมาณเฟอรัสไอออนเทียบเท่ากับในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวสูตร 9K จะต้องใช้ผงลิกไนท์ปริมาณมาก การใช้ผงลิกไนท์ปริมาณมากจะทำให้ปริมาณออกซิเจนเพื่อการเจริญของเชื้อลดลง และอาจมีสารยับยั้งการเจริญของ *T. ferrooxidans* Y4-3 และสารยับยั้งกระบวนการออกซิเดชันของกำมะถันปนเปื้อนในปริมาณสูงด้วย

จากการศึกษาผลของอุณหภูมิต่อประสิทธิภาพการขจัดกำมะถันไพไรต์ออกจากลิกไนท์โดย *T. ferrooxidans* Y4-3 ที่อุณหภูมิ 30, 30-32 (อุณหภูมิห้อง), 35 และ 37°ซ พบว่า *T. ferrooxidans* Y4-3 ขจัดกำมะถันไพไรต์ออกจากลิกไนท์ได้สูงที่สุดเท่ากับ 5.45% เมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 30°ซ ซึ่งตรงกับที่ Bosecker (1997) รายงานว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อกระบวนการออกซิเดชันเฟอรัสและซัลไฟด์โดย *T. ferrooxidans* คือ 28-30°ซ ประสิทธิภาพการขจัดกำมะถันไพไรต์ลดลงเมื่อบ่มที่อุณหภูมิสูงขึ้น ไม่ทำการทดลองที่อุณหภูมิต่ำกว่า 30°ซ เพราะการนำไปประยุกต์ใช้งานจริงโดยวิธี heap leaching (กองผงลิกไนท์) ซึ่งมีต้นทุนต่ำนั้นไม่ควบคุมอุณหภูมิของการบ่ม อุณหภูมิต่ำสุดที่เป็นได้คืออุณหภูมิประมาณ 30°ซ ซึ่งการกวนผสมกองผงลิกไนท์และการพ่นละอองน้ำเพื่อควบคุมความชื้นของผงลิกไนท์จะช่วยให้อุณหภูมิของกองผงถ่านลิกไนท์ลดลงได้บ้าง

ผงลิกไนท์ที่นำมาศึกษามีขนาด 45 ไมครอน ดังนั้นพื้นที่ผิวของอนุภาคกำมะถันไพไรต์ซึ่งมีผลต่ออัตราเร็วในการขจัดกำมะถันไพไรต์ออกจากผงลิกไนท์โดย *T. ferrooxidans* Y4-3 คือ จำนวนผงลิกไนท์ในสารแขวนลอย (กรัม/100 มล.ของสารแขวนลอย) จึงทำการแปรผันปริมาณผงลิกไนท์ในสารแขวนลอยเป็น 5, 10, 20 และ 30% (กรัม/100 มล.) พบว่าประสิทธิภาพการขจัดกำมะถันไพไรต์โดย *T. ferrooxidans* Y4-3 สูงสุดเมื่อใช้ผงลิกไนท์ 10% (กรัม/100 มล.) ผงลิกไนท์ 5% (กรัม/100 มล.) อาจมีจำนวนกำมะถันไพไรต์ไม่เพียงพอต่อการเจริญ ในขณะที่ผงลิกไนท์ 20 และ 30% (กรัม/100 มล.) อาจมีปริมาณออกซิเจนไม่เพียงพอต่อการเจริญของเชื้อและต่อกระบวนการออกซิเดชันกำมะถันไพไรต์ นอกจากนั้นในผงลิกไนท์อาจมีสารยับยั้งการเจริญและยับยั้งกระบวนการออกซิเดชันกำมะถันปนเปื้อนเมื่อปริมาณผงลิกไนท์ที่ใช้เพิ่มมากขึ้น ปริมาณสารยับยั้งที่ปนเปื้อนเพิ่มมากขึ้นด้วย

ผลการศึกษาปริมาณของเชื้อเริ่มต้นที่เหมาะสม โดยแปรผันปริมาณของเชื้อเริ่มต้นที่ใช้เป็น 1, 5, 10, 15 และ 20% (มล./100 มล.ผงลิกไนท์แขวนลอยในน้ำกลั่น) พบว่าเมื่อใช้ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 10, 15 และ 20% ประสิทธิภาพในการขจัดกำมะถันไพไรต์ใกล้เคียงกัน แสดงว่ามีพื้นที่ผิวของกำมะถันไพไรต์ให้ *T. ferrooxidans* Y4-3 ปริมาณสูงสุด 10% เท่านั้นเกาะได้ และที่ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 15 และ 20% ยังมีออกซิเจนเพียงพอเพื่อการเจริญและเพียงพอสำหรับกระบวนการออกซิเดชันกำมะถันไพไรต์ จึงเลือกใช้เชื้อเริ่มต้น 10% ซึ่งให้ประสิทธิภาพในการขจัดกำมะถันไพไรต์เท่ากับ 6.99% ในการทดลองต่อไป

ผลการศึกษาอายุของเชื้อเริ่มต้น โดยแปรผันอายุของเชื้อเริ่มต้นเป็น 5, 7 และ 10 วัน พบว่าเชื้อเริ่มต้นอายุ 7 วัน ให้ประสิทธิภาพในการขจัดกำมะถันไพไรต์สูงสุดคือ 10.13% แสดงว่าที่ 7 วัน มีปริมาณของเชื้อที่มีกิจกรรมการออกซิไดส์กำมะถันไพไรต์สูงอยู่มากที่สุด Sugio และคณะ (1987) รายงานว่า *T. ferrooxidans* ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวสูตร 9K เป็นเวลา 6 วัน เป็นเชื้อที่มีกิจกรรมสูงที่สุด

ผลการศึกษาระยะเวลาการบ่ม โดยแปรผันระยะเวลาการบ่มเป็น 2, 4, 6, 8, 10 และ 12 วัน พบว่าประสิทธิภาพการขจัดกำมะถันไพไรต์สูงสุดเท่ากับ 11.52% เมื่อบ่มไว้เป็นระยะเวลา 8 วัน การขจัดกำมะถันไพไรต์ออกจากลิกไนท์ของ *T. ferrooxidans* Y4-3 อาศัยความสามารถในการใช้เฟอรัสไอออนและซัลไฟด์เป็นแหล่งพลังงานเพื่อการเจริญ โดยการออกซิไดส์เฟอรัสไอออนเป็นเฟอริกไอออน และการออกซิไดส์ซัลไฟด์เป็นซัลเฟต เมื่อเฟอรัสไอออนถูกออกซิไดส์เป็นเฟอริกไอออนมากขึ้น ค่าความเป็นกรด-ด่างของปฏิกิริยาจะสูงขึ้น เฟอริกไอออนจะตกตะกอนเป็น $Fe(OH)_3$ และ $MFe_2(SO_4)_3$ เกาะที่ผิวของกำมะถันไพไรต์ทำให้ประสิทธิภาพการออกซิไดส์เฟอรัสไอออนและซัลไฟด์ของ *T. ferrooxidans* ลดลง (Jensen และ Webb 1995)

จากผลการทดลองข้างต้นสรุปได้ว่า ภาวะที่เหมาะสมสำหรับ *T. ferrooxidans* Y4-3 ในการขจัดกำมะถันไพไรต์ออกจากลิกไนท์คือ เลี้ยง *T. ferrooxidans* Y4-3 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวสูตร 9K ที่อุณหภูมิ 30°ซ ให้อากาศโดยการเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 7 วัน เพื่อใช้เป็นเชื้อเริ่มต้นปลูกเชื้อเริ่มต้น 10% (มล./100 มล.ผงลิกไนท์แขวนลอยในน้ำกลั่น) ลงในผงลิกไนท์แขวนลอยในน้ำกลั่น 10% (กรัม/100 มล.) ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นเป็น 2.0 บ่มที่ภาวะเดิมต่ออีกเป็นเวลา 8 วัน ที่ภาวะที่เหมาะสมนี้ *T. ferrooxidans* Y4-3 สามารถขจัดกำมะถันไพไรต์ออกจากลิกไนท์ได้ 11.52%

เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพของ *T. ferrooxidans* Y4-3 กับ *T. ferrooxidans* สายพันธุ์อื่นซึ่งมีผู้รายงานไว้ในการขจัดกำมะถันไพไรต์ออกจากลิกไนท์พบว่าต่ำกว่ามาก กล่าวคือ Silverman และคณะ (1963) รายงานว่า *T. ferrooxidans* สามารถขจัดกำมะถันไพไรต์ออกจากถ่านหินได้ 60% ภายในเวลา 8 วัน Hoffmann และคณะ (1981) รายงานว่า *T. ferrooxidans* สามารถขจัดกำมะถันไพไรต์ออกจากลิกไนท์ได้ 90-98% ภายในเวลา 8-12 วัน ทั้งนี้น่าจะเป็นผลเนื่องมาจาก

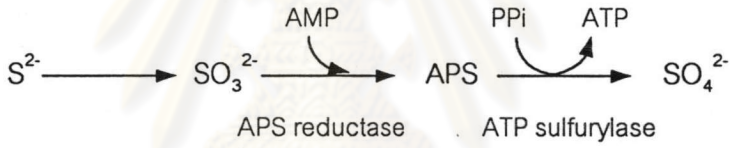
1. งานวิจัยนี้แขวนลอยผงลิกไนท์ในน้ำกลั่น ไม่ใช่อาหารเลี้ยงเชื้อเหลวซึ่งมีปริมาณสารอาหารสำหรับการเจริญของจุลินทรีย์มาก นอกจากนั้นผู้วิจัยอื่นยังได้แปรผันปริมาณแอมโมเนียม ฟอสเฟต และแมกนีเซียม ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวให้เหมาะสมสำหรับการเจริญและกระบวนการไบโอลิชชิงยิ่งขึ้นด้วย

2. ผงลิกไนท์แขวนลอยในน้ำกลั่นไม่สามารถควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่างได้ ในขณะที่ผงลิกไนท์แขวนลอยในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว ค่าความเป็นกรด-ด่างไม่เปลี่ยนแปลงมากนัก เนื่องจากในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวมีสารละลายบัฟเฟอร์เป็นองค์ประกอบ ค่าความเป็นกรด-ด่างที่ลดลงเนื่องจากซัลเฟตที่เกิดขึ้นจากกระบวนการ มีผลยับยั้งการเจริญและยับยั้งกระบวนการไบโอลิชชิง

3. ตัวอย่างลิกไนท์ที่นำมาศึกษา อาจมีกำมะถันไพไรต์ปนเปื้อนในปริมาณต่ำเมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างลิกไนท์ที่ผู้วิจัยอื่นใช้ และนอกจากนั้นยังอาจมีสารยับยั้งการเจริญหรือยับยั้งกระบวนการไบโอลิชชิง ดังจะเห็นได้จากผลการทดลองที่พบว่า *T. ferrooxidans* ATCC19859 ซึ่ง Hoffmann และคณะ (1981) เคยรายงานว่าสามารถขจัดกำมะถันไพไรต์ออกจากลิกไนท์ได้ 90-98% ภายในเวลา 8-12 วัน แต่สามารถขจัดกำมะถันไพไรต์ออกจากตัวอย่างลิกไนท์ที่นำมาศึกษาที่ภาวะที่ทดสอบเพียง 0.76% เท่านั้น

เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพของ *T. ferrooxidans* Y4-3 ในการขจัดกำมะถันไพไรต์ออกจากลิกไนท์ จึงได้ทำการถ่ายโอนยีนประมวลรหัสเอทีพีซัลฟูรีเลสและเอพีเอสรีดักเตสจาก *A. vinosum* strain D (DSMZ 180) โดยใช้พลาสมิดพาหะpTMZ48 เข้าสู่ *T. ferrooxidans* Y4-3 ทั้งนี้เพราะ Kusano และคณะ (1992) รายงานว่า *T. ferrooxidans* Y4-3 เป็นสายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพสูงที่สุดในการถูกทรานสฟอร์มด้วยพลาสมิด pTMZ48 และพลาสมิด pTMZ48 มีจุดเริ่มต้นของการถอดรหัสของ *T. ferrooxidans* และมีชุดยีนต้านต่อสารปรอทซึ่งสามารถใช้เป็นยีนเพื่อการคัดเลือกทรานสฟอร์แมนท์โคโลนี ในภาวะที่ T. ferrooxidans เจริญซึ่งมีความเป็นกรดสูง

Dahl และ Trüper (1994) รายงานว่า *A. vinosum* ออกซิไดส์ซัลไฟด์ไปเป็นซัลเฟต ดังสมการ



สำหรับ *T. ferrooxidans* นั้นมีรายงานเกี่ยวกับเอนไซม์ซึ่งใช้ในกระบวนการออกซิเดชันกำมะถันดังนี้ พบ sulfur (sulfide): ferric ion oxidoreductase ทำหน้าที่ออกซิไดส์กำมะถันหรือซัลไฟด์ไปเป็นซัลไฟต์ใน periplasmic space (Sugio และคณะ 1987, 1989), sulfite: ferric ion oxidoreductase ทำหน้าที่ออกซิไดส์ซัลไฟต์ไปเป็นซัลเฟตใน periplasmic space (Sugio และคณะ 1992), sulfite oxidase ทำหน้าที่ออกซิไดส์ซัลไฟต์ไปเป็นซัลเฟตในไซโตพลาสซึม (Vestal และคณะ 1971) นอกจากนั้น Vestal และคณะ (1971) ยังรายงานว่าไม่พบ APS reductase ในสารสกัดจากเซลล์ *T. ferrooxidans*

เมื่อถ่ายโอนรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่มียีนประมวลรหัสเอทีพีซัลฟูรีเลสและเอพีเอสรีดักเตสของ *A. vinosum* strain D (DSMZ 180) เชื่อมต่อกับพลาสมิด pTMZ48 เข้าสู่ *T. ferrooxidans* Y4-3 พบว่าทรานสฟอร์แมนท์ที่ได้มีกิจกรรมของเอทีพีซัลฟูรีเลส 0.034 หน่วย/มก.โปรตีน และไม่พบกิจกรรมของเอทีพีซัลฟูรีเลสในสารสกัดจากเซลล์ของ *T. ferrooxidans* Y4-3 ที่ภาวะที่เหมาะสมต่อการขจัดกำมะถันไพไรต์ออกจากลิกไนท์ของ *T. ferrooxidans* Y4-3 พบว่าทรานสฟอร์แมนท์ *T. ferrooxidans* Y4-3 สามารถขจัดกำมะถันไพไรต์ออกจากลิกไนท์ได้ 43.49% ซึ่งมากกว่า *T. ferrooxidans* Y4-3 สายพันธุ์เดิมประมาณ 3.8 เท่า

มีรายงานการค้นพบเอทีพีซัลฟูรีเลสและเอพีเอสรีดักเตสในจุลินทรีย์ต่างๆ ดังนี้

<u>เอทีพีซัลฟูรีเลส</u> :

จุลินทรีย์	กิจกรรมจำเพาะ หน่วย/มก.โปรตีน	แหล่งของเอนไซม์ที่วิเคราะห์	วารสารอ้างอิง
Chlorobium limicola f. thiosulfatophilum	0.35	ส่วนน้ำใส[a]	Dahl และ Trüper (1994)
Beggiatoa strain MS-81-10	0.996	ส่วนของของเหลวในเซลล์ที่ละลายได้[b] (soluble fraction)	Hagen และ Nelson (1997)
C. limicola	0.289	"	Bias และ Trüper (1987)
Desulfovibrio desulfuricans	0.84	"	Kramer และ Cypionka (1989)
T. denitrificans	3.9	"	Segal (Personal Communication)
Sulfide oxidizing bacteria ที่พบในเนื้อเยื่อโทรโฟโซมของหนอนตัวกลมชนิด *Riftia pachytila*	1	ส่วนน้ำใส[c]	Renosto และคณะ (1991)

<u>หมายเหตุ</u> a = ได้จากการทำให้เซลล์แตกด้วยคลื่นเสียง (sonicate) และปั่นเหวี่ยงแยกเซลล์ที่ความเร็ว 27,000x*g* , 10 นาที

b = ได้จากการนำส่วนน้ำใสมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วสูงด้วยเครื่องอัลตราเซนตริฟิวจ์โดยใช้ความ เร็ว165,000x*g* , 30 นาที

c = ได้จากการทำให้เซลล์แตกโดยบดด้วยโฮโมจีไนซ์เซอร์ และปั่นเหวี่ยงแยกเซลล์ที่ความเร็ว 15,000x*g* , 10 นาที

เอพีเอสรีดักเตส :

จุลินทรีย์	กิจกรรมจำเพาะ หน่วย/มก.โปรตีน	แหล่งของเอนไซม์ที่วิเคราะห์	วารสารอ้างอิง
T. denitrificans	0.52	ส่วนน้ำใส[d]	Bowen และคณะ (1966)
T. thioparus	0.14	ของเหลว[e]	Lyric และ Suzuki (1970)
C. limicola	0.4	ส่วนน้ำใส[f]	Kirchhoff และ Trüper (1974)
Thiocapsa roseopersicina DSM 219	0.4	ส่วนน้ำใส[g]	Dahl และ Trüper (1994)
Thiocapsa roseopersicina SMG 219	0.157	ส่วนน้ำใส[f]	Trüper และ Rogers (1971)
A. vinosum SM 50	0.028	ส่วนน้ำใส[g]	Dahl (1996)

หมายเหตุ d = ได้จากการทำให้เซลล์แตกด้วยวิธีของ Hughes (1951) และปั่นเหวี่ยงแยกเซลล์ที่ความเร็ว 29,000x*g* , 3 ชั่วโมง

e = ได้จากการทำให้เซลล์แตกด้วยคลื่นเสียงโดยไม่ได้ปั่นเหวี่ยงแยกเซลล์ออก

f = ได้จากการทำให้เซลล์แตกด้วยคลื่นเสียง และปั่นเหวี่ยงแยกเซลล์ที่ความเร็ว 105,000x*g* , 2 ชั่วโมง

g = ได้จากการทำให้เซลล์แตกด้วยคลื่นเสียงอัตราโซนิก และปั่นเหวี่ยงแยกเซลล์ที่ความเร็ว 25,000x*g* , 30 นาที

จากตารางข้างต้นพบว่าทรานสฟอร์แมนท์ *T. ferrooxidans* Y4-3 หรือ *T. ferrooxidans* sat-apr มีกิจกรรมจำเพาะของเอทีพีซัลฟูรีเลสในปริมาณน้อยมากเมื่อเปรียบเทียบกับจุลินทรีย์อื่นๆ ทั้งนี้อาจเป็นเพราะพลาสมิด pTMZ48 ซึ่งใช้เป็นพลาสมิดพาหะเพื่อการถ่ายโอนยีนประมวลรหัสเอทีพีซัลฟูรีเลสของ *A. vinosum* strain D (DSMZ 180) เข้าสู่ *T. ferrooxidans* Y4-3 นั้น เป็นพลาสมิดที่มีจำนวนชุดต่อเซลล์ต่ำ (Kusano และคณะ 1992) จึงทำให้มีจำนวนรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pFS24 ต่อทรานสฟอร์แมนท์เซลล์ต่ำ *T. ferrooxidans* sat-apr จึงมีกิจกรรมของเอทีพีซัลฟูรีเลสต่ำ หรืออาจเป็นเพราะมีปริมาณซัลไฟต์ที่สามารถผ่านเข้าสู่ไซโตพลาสซึมได้ในปริมาณจำกัด เนื่องจากซัลไฟต์เป็นพิษต่อเซลล์ เซลล์จึงออกซิไดส์ซัลไฟต์ไปเป็นซัลเฟตซึ่งมีความเป็นพิษน้อยกว่าที่บริเวณ periplasmic space

(Sugio และคณะ 1989) ซัลไฟต์ปริมาณเล็กน้อยที่ผ่านเข้าสู่ไซโตพลาสซึมได้เท่านั้นที่ทำหน้าที่เป็นสารตั้งต้นของกิจกรรมเอทีพีซัลฟูรีเลส สำหรับการทดลองนี้ไม่ได้วิเคราะห์กิจกรรมของเอพีเอสรีดักเตส เนื่องจากกระบวนการออกซิเดชันกำมะถันโดยวิถีเอพีเอส เอทีพีซัลฟูรีเลสจะทำงานได้ต้องมีเอพีเอสซึ่งเกิดจากกิจกรรมของเอพีเอสรีดักเตส เอพีเอสรีดักเตสทำหน้าที่ออกซิไดส์ซัลไฟต์ไปเป็นเอพีเอส แล้วเอทีพีซัลฟูรีเลสจึงออกซิไดส์เอพีเอสที่ได้ไปเป็นซัลเฟต ดังนั้นถ้าสามารถวิเคราะห์กิจกรรมของเอทีพีซัลฟูรีเลสใน *T. ferrooxidans* sat-apr ได้ ก็แสดงว่ามีกิจกรรมของเอพีเอสรีดักเตสด้วยเช่นกัน นอกจากนี้เอทีพีซัลฟูรีเลสยังเป็นเอนไซม์ซึ่งทำหน้าที่สังเคราะห์ซัลเฟตโดยตรงในกระบวนการออกซิเดชันกำมะถันไปเป็นซัลเฟตของแบคทีเรียกลุ่มคีโมออโตโทรฟ ด้วยเหตุผลนี้จึงเลือกวิเคราะห์เฉพาะกิจกรรมของเอทีพีซัลฟูรีเลสของ *T. ferrooxidans* sat-apr ว่าสอดคล้องกับประสิทธิภาพการขจัดกำมะถันไพไรต์ที่เพิ่มขึ้นหรือไม่

การทดลองไม่พบกิจกรรมของเอทีพีซัลฟูรีเลสในสารสกัดจากเซลล์ของ *T. ferrooxidans* Y4-3 การที่ *T. ferrooxidans* Y4-3 สามารถขจัดกำมะถันไพไรต์ออกจากลิกไนท์ได้ 11.52% นั้นเพราะ *T. ferrooxidans* สามารถออกซิไดส์ซัลไฟต์ไปเป็นซัลเฟตโดยเอนไซม์ sulfide:ferric ion oxidoreductase, sulfite:ferric ion oxidoreductase ซึ่งอยู่ที่ periplasmic space (Sugio และคณะ 1987, 1989, 1992) และโดยการใช้เอนไซม์ sulfite oxidase ซึ่งอยู่ในไซโตพลาสซึม (Vestal และคณะ 1971)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย