บทที่ 2

ปริทัศน์วรรณกรรม

2.1 น้ำมันดีเซล

น้ำมันดีเซลเป็นผลิตภัณฑ์ปิโตรเลียมที่นำมาใช้เป็นเชื้อเพลิงสำหรับรถยนต์ ได้จากการกลั่นน้ำมันดิบ ซึ่งมีจุดเดือดอยู่ที่ประมาณ 200-350 องศาเซลเซียส น้ำมันดีเซลประกอบด้วยสารประกอบไฮโดรคาร์บอนหลายชนิด โดยสามารถแบ่งเป็น 2 ส่วนหลักคือ สารประกอบไฮโดรคาร์บอนอิ่มตัว 80-90 เปอร์เซ็นต์ (saturated hydrocarbons) และ สารประกอบไฮโดรคาร์บอนที่เป็นวง 10-20 เปอร์เซ็นต์ (aromatic hydrocarbons) โดยมีสารประกอบไฮโดรคาร์บอนผสมรวมกันตั้งแต่ C_{10}-C_{19} (IARC, 1989) การปนเปื้อนของน้ำมันดีเซล สามารถพบได้ทั่วไปทั้งในน้ำ ดิน หรืออากาศ (Bento และคณะ, 2003; Arlt และคณะ, 2005; Ueno และคณะ, 2007; Blanco และคณะ, 2010) แหล่งที่มาของการปนเปื้อนส่วนมากมาจากกิจกรรมของมนุษย์ที่ต้องใช้เครื่องยนต์ที่ใช้น้ำมันดีเซลเป็นเชื้อเพลิง การรั่วไหลจากถังเก็บในสถานบริการน้ำมัน หรือการขนส่งต่างๆ

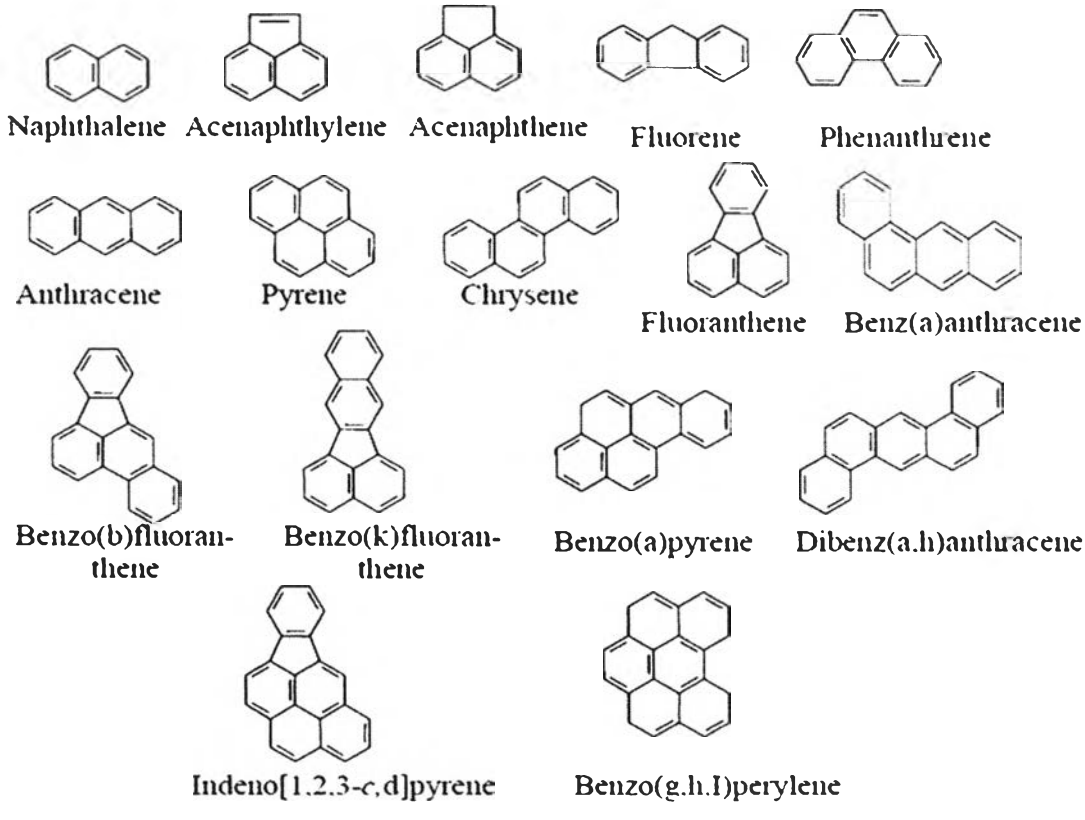
น้ำมันดีเซลสามารถก่อให้เกิดโรคต่อสิ่งมีชีวิต น้ำมันดีเซลสามารถเข้าสู่ร่างกายได้หลายทาง เช่น การสัมผัสกับผิวหนัง การหายใจเอาไอระเหย การรับประทาน ในมนุษย์มีการรายงานว่าการรับเอาน้ำมันดีเซลเข้าไปในร่างกายนั้นก่อให้เกิดโรคเกี่ยวกับระบบทางเดินหายใจ (Blomberg และคณะ, 2005) การรับน้ำมันดีเซลเข้าไปในร่างกายทางการหายใจ พบว่าทำให้เกิดอาการปวดหัว เวียนศีรษะ คลื่นไส้ แน่นบริเวณหน้าอก หายใจลำบาก เกิดการระคายเคืองที่ตา จมูกและภายในลำคอ รวมถึงการรับรสชาติในปากได้ไม่ดี (Rudell และคณะ, 1996) นอกจากพิษต่อมนุษย์แล้วนั้น น้ำมันดีเซลยังเป็นพิษต่อสัตว์อื่น ดังเช่นรายงานของ Ichinose และคณะ (1997) ได้ศึกษาผลของน้ำมันดีเซลในการเกิดเนื้องอกในปอดของหนู mice โดยการฉีด diesel exhaust particle (DEP) ความเข้มข้น 0.05 และ 0.1 มิลลิกรัมต่อสัปดาห์เป็นเวลา 10 สัปดาห์ พบว่าหลังจาก 2 เดือน อัตราการเกิดเนื้องอกในปอดของหนู mice เพิ่มขึ้น 30 และ 31% ตามลำดับ

2.2 สารประกอบพอลิไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน

พอลิไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน (Polycyclic Aromatic Hydrocarbons, PAHs) เป็นสารประกอบอินทรีย์ที่โครงสร้างประกอบด้วย วงเบนซีนตั้งแต่ 2 วงขึ้นไปรวมตัวกัน มีลักษณะเป็นแนว

ตรง มุมงอ หรือกลุ่มก้อน สามารถพบ PAHs ได้โดยทั่วไปทั้งในน้ำ อากาศ และดิน PAHs เกิดจากการเผาเศษวัสดุต่างๆ การเกิดไฟไหม้ การเผาไหม้ที่ไม่สมบูรณ์ของเครื่องยนต์ โรงงานน้ำมัน การผลิตสารเคลือบรักษาเนื้อไม้ โรงงานถ่านหิน การสูบบุหรี่ ซึ่งปลดปล่อย PAHs หลายชนิดออกสู่สิ่งแวดล้อม (Cerniglia, 1992) PAHs สามารถแบ่งได้เป็น 2 กลุ่ม ได้แก่ PAHs ที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำคือ PAHs ที่โครงสร้างประกอบด้วยวงเบนซีนน้อยกว่า 4 วง และ PAHs ที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงคือ PAHs ที่ประกอบด้วยวงเบนซีนตั้งแต่ 4 วงขึ้นไป สมบัติสำคัญที่ทำให้ PAHs ตกค้างอยู่ในสิ่งแวดล้อมได้นาน คือความสามารถในการละลายน้ำที่ต่ำ และสามารถดูดซับไว้โดยอนุภาคของดินได้ (Labana และคณะ, 2007) จึงทำให้เกิดการย่อยสลายได้ยาก

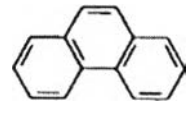
PAHs นั้นมีหลายชนิด สำนักงานคุ้มครองสิ่งแวดล้อมของสหรัฐอเมริกา (The U.S. Environmental Protection Agency, US-EPA) ได้ให้ความสำคัญในการบำบัดเมื่อพบในสิ่งแวดล้อม 16 ชนิด ดังรูปที่ 2.1



รูปที่ 2.1 โครงสร้างโมเลกุล PAHs ที่สำคัญ 16 ชนิด ในรายงานสำนักงานคุ้มครองสิ่งแวดล้อมของสหรัฐอเมริกา (The U.S. Environmental Protection Agency, EPA) (Labana และคณะ, 2007)

PAHs สามารถเข้าสู่ร่างกายได้หลายวิธี ทั้งสูดดมไอระเหย หรือเขม่าควันจากการสูบบุหรี่ การกินอาหารที่ปนเปื้อน PAHs หรือโดยการสัมผัสทางผิวหนัง PAHs สามารถเข้าสู่ร่างกายโดยการสูดดม ข้อมูลจากกรมควบคุมมลพิษ พบว่าสารเมแทบอไลต์ของเบนโซ(เอ)ไพรีนในปัสสาวะของอาสาสมัครชายที่สูบบุหรี่ ปริมาณ 15 -20 มวนต่อวัน เป็นเวลากว่า 10 ปี โดยอาสาสมัครที่ยังสุขภาพดีมีค่าเบนโซ(เอ)ไพรีนในปัสสาวะสูงกว่าในอาสาสมัครที่เป็นมะเร็งปอด รวมไปถึงอาสามัครที่กินเนื้อย่างที่มีการปนเปื้อนด้วยเบนโซเอไพรีนซึ่งจะสามารถตรวจพบเบนโซเอไพรีนได้ในอุจจาระ PAHs จัดเป็นสารที่ก่อให้เกิดมะเร็ง (carcinogen) สารก่อการกลายพันธุ์ (mutagen) ในสิ่งมีชีวิต ในกลุ่มยูคาริโอท เมื่อรับ PAHs เข้าจะเปลี่ยนรูปเป็นอนุพันธ์อีปอกไซด์ ซึ่งจะเข้าไปยึดเกาะกับดีเอ็นเอ โดยการเปลี่ยนรูปนั้นเกิดจากเอนไซม์ในกลุ่มไซโตโครม พี-450 ได้สารเมแทบอไลต์ชนิดต่างๆ ตามชนิดของ PAHs ที่รับเข้าไป ซึ่งสารเมแทบอไลต์บางชนิดที่เกิดขึ้นเป็นพิษและก่อมะเร็งได้ เช่น 3,4-ไดออล-1,2, อีปอกไซด์ เป็นเมแทบอไลต์ของเบนโซ(เอ)แอนทราซีน (Mahadevan และคณะ, 2005) มีรายงานว่าการที่มนุษย์อยู่ในสภาวะ หรือการประกอบอาชีพที่เกี่ยวข้องกับงานพิมพ์ที่สัมผัสกับหมึกพิมพ์ งานที่ต้องสัมผัสเขม่าน้ำมัน เขม่าจากการเผาไหม้ ควันไอเสีย มีความเสี่ยงต่อการเกิดมะเร็งปอดได้ (นฤมล ศิลารักษ์ และสมชัย บวรกิตติ, 2542) มี PAHs หลายชนิด เช่น เบนซ์(เอ)แอนทราซีน เบนโซ(เอ)ไพรีน เบนโซ(บี)ฟลูโอแรนธีน เบนโซ(ไอ)ฟลูโอแรนธีน เบนโซ(เค)ฟลูโอแรนธีน ไครซีน ไดเบนซ์(เอ,เอช)แอนทราซีน และ อินดิโน(1,2,3-ซี,ดี)ไพรีน ที่มีรายงานในห้องปฏิบัติการว่าสามารถก่อให้เกิดเนื้องอกในสัตว์ทดลอง โดยการรับเข้าทางการหายใจ การกิน หรือการสัมผัสกับผิวหนัง (ATSDR, 1995)

2.2.1 **ฟีแนนทรีน**

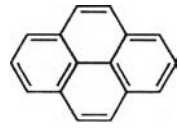


รูปที่ 2.2 โครงสร้างโมเลกุลของฟีแนนทรีน (Labana และคณะ, 2007)

ฟีแนนทรีนเป็นสารประกอบอินทรีย์ที่ประกอบด้วยวงแบนซีน 3 วงเชื่อมกันเป็นมุมงอดังรูปที่ 2.2 มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 178.23 กรัมต่อโมล สูตรทางเคมีคือ $C_{14}H_{10}$ จัดเป็น PAHs ที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ ระเหยและย่อยสลายได้ง่ายกว่า PAHs น้ำหนักโมเลกุลสูง ฟีแนนทรีนบริสุทธิ์จะเป็นผลึก

แข็งสีขาว ละลายน้ำได้น้อยแต่สามารถละลายได้ดีในตัวทำละลายอินทรีย์เช่น คลอโรฟอร์ม เบนซีน โทลูอีน อีเทอร์ คาร์บอนไดซัลไฟด์ และกรดอะซีติก (Verschueren, 1977) แหล่งที่มาของฟีแนนทรีน มาจากการเผาไหม้ที่ไม่สมบูรณ์ของเชื้อเพลิง และถ่านหิน และกระจายอยู่ในสิ่งแวดล้อมทั้งน้ำ อากาศ หรือดิน ซึ่งสามารถเข้าสู่ร่างกายได้โดยการสัมผัส การหายใจ หรือการรับประทานอาหารที่มีการปนเปื้อนฟีแนนทรีน

2.2.2 ไพรีน



รูปที่ 2.3 โครงสร้างโมเลกุลของไพรีน (Labana และคณะ, 2007)

ไพรีน (Pyrene) หรือ ชื่อทางเคมี เบนโซ (ดี,อี,เอฟ)ฟีแนนทรีน เป็นสารประกอบอินทรีย์ที่ประกอบด้วยวงเบนซีน 4 เชื่อมกันเป็นกลุ่มดังรูปที่ 2.3 มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 202.26 กรัมต่อโมล สูตรทางเคมี $C_{16}H_{10}$ จัดเป็น PAHs ที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง ไพรีนที่บริสุทธิ์เป็นผลึกแข็งสีขาว ถ้าไม่บริสุทธิ์จะมีสีเหลือง ละลายน้ำได้น้อยมีค่าการละลายน้ำเท่ากับ 0.135 มิลลิกรัมต่อลิตร (National Institute of Standards and Technology) ทำให้เกิดการตกค้างในสิ่งแวดล้อมได้นานและยากต่อการย่อยสลาย แต่สามารถละลายในตัวทำละลายอินทรีย์ เช่น เมทานอล อะซิโตน เฮกเซน (Patnaik, 1992) ไพรีนเป็นตัวแทน PAHs ที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง เพื่อใช้ศึกษาการบำบัด PAH ในสิ่งแวดล้อม (Heitkamp และคณะ, 1988) ไพรีนสามารถเข้าสู่ร่างกายได้โดยการสัมผัส การหายใจ หรือการรับประทานอาหารที่มีการปนเปื้อนไพรีน

2.3 การบำบัดน้ำมันดีเซล และ PAHs ในสิ่งแวดล้อม

การตกค้างของน้ำมันดีเซล และ PAHs ในสิ่งแวดล้อมขึ้นกับปัจจัยหลายประการ โดยเฉพาะความเสถียรของสารแต่ละชนิดที่ขึ้นอยู่กับโครงสร้างการจัดเรียงตัวของวงเบนซีนที่เป็นองค์ประกอบ ซึ่งการจัดเรียงเป็นเส้นตรงจะเสถียรน้อยกว่าการจัดเรียงตัวเป็นแบบมุมงอ (Wilson และ Jones, 1993)

การบำบัดน้ำมันดีเซลและ PAHs ในสิ่งแวดล้อม ทำได้หลายวิธี ทั้งวิธีทางกายภาพ เคมี และชีวภาพ (Cerniglia, 1992)

2.3.1 การบำบัดน้ำมันดีเซลและ PAHs ทางกายภาพ

น้ำมันดีเซล และPAHs มักเกิดการรวมตัวอยู่กับอนุภาคของดิน โดยถูกดูดซับ (Adsorption) ไว้ในเม็ดดิน ซึ่งการดูดซับระหว่าง น้ำมันดีเซล และPAHs กับอนุภาคของดินขึ้นอยู่กับน้ำหนักโมเลกุลของ PAHs ถ้าน้ำหนักโมเลกุลสูงจะดูดซับแน่นกว่าน้ำหนักโมเลกุลต่ำ (Pignatello และ Xing, 1996) การดูดซับกับอนุภาคของดินได้ดีจะทำให้ยากต่อการย่อยสลายมากขึ้น (Kästner และ Mahro, 1996) หรือสลายโดยแสง (Photodegradation) โดยใช้รังสี UV ร่วมกับออกซิเจน เป็นต้น (Lehto และคณะ, 2003)

2.3.2 การบำบัดน้ำมันดีเซลและ PAHs ทางเคมี

การย่อยสลายน้ำมันดีเซล และ PAHs ในน้ำมันดีเซลโดยวิธีทางเคมี ทำได้โดยอาศัยสารที่มีสมบัติในการออกซิไดซ์ เช่น ออกซิเจน ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ หรือไทเทเนียมไดออกไซด์ (Venkatadri และ Peters, 1993) การใช้แก๊สโอโซนเป็นตัวออกซิไดซ์เพื่อสลาย PAHs ให้แตกตัวเป็นโมเลกุลที่เล็กสามารถใช้ได้ดีเฉพาะ PAHs ที่มีมวลโมเลกุลต่ำ (Nam และ Kukor, 2000) วิธีการใช้สารเคมีในการย่อยสลายน้ำมันดีเซล และ PAHs ควรใช้เมื่อพบว่าการปนเปื้อนมีการกระจายตัวที่รวดเร็ว แต่อาจก่อให้เกิดสารพิษชนิดใหม่ขึ้นได้จากการสลายตัวของ PAHs (Lee, 1995)

2.3.3 การบำบัดน้ำมันดีเซลและ PAHs ทางชีวภาพ

การบำบัดทางชีวภาพ (Bioremediation) เป็นวิธีที่อาศัยกิจกรรมของจุลินทรีย์ ที่มีความสามารถในการย่อยสลายน้ำมันดีเซล และ PAHs ที่ปนเปื้อนอยู่ในสิ่งแวดล้อม หลักการในการบำบัดสารประกอบเหล่านี้เกิดจากการที่จุลินทรีย์ต้องการแหล่งคาร์บอนในการเจริญ (Dua และคณะ, 2002) จุลินทรีย์จะย่อยสลายน้ำมันดีเซล และ PAHs เพื่อใช้ในการเจริญของจุลินทรีย์ (mineralization) วิธีการบำบัดสิ่งแวดล้อมที่ปนเปื้อนน้ำมันดีเซล และPAHs นั้นมีหลายวิธี (Samanta และคณะ, 2002) แต่ที่มีความนิยมคือ 2 วิธีหลักดังนี้

Biostimulation เป็นวิธีการบำบัดโดยการเติมสารอาหารที่จำเป็นในการเจริญของจุลินทรีย์เพิ่มลงในพื้นที่ที่มีการปนเปื้อน ธาตุอาหารที่จำเป็นได้แก่ ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส เพื่อเพิ่มจำนวนจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายน้ำมันดีเซล และPAHs ให้มากขึ้นและลดระยะเวลาในการบำบัดให้น้อยลง แต่มีค่าใช้จ่ายในการเติมสารอาหารที่เติมลงไป (Seklemova และคณะ, 2001)

Bioaugmentation เป็นวิธีการบำบัดโดยการเติมจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการย่อยสลายน้ำมันดีเซลและ PAHs ลงในพื้นที่ที่ปนเปื้อน แต่เนื่องจากไม่ใช่ภาวะที่เคยอาศัยของจุลินทรีย์ มีปัจจัยอื่น เช่น อุณหภูมิ ความชื้น สภาพพื้นที่ หรือการแข่งกันกับจุลินทรีย์ประจำถิ่น จึงทำให้จุลินทรีย์ที่เติมลงไปมีการรอดชีวิตที่ต่ำ (Margesin และ Schinner, 2001)

งานวิจัยที่ใช้จุลินทรีย์หรือกลุ่มจุลินทรีย์ในการย่อยสลายน้ำมันดีเซลในสิ่งแวดล้อม ยกตัวอย่างเช่น

Márquez-Rocha และคณะ (2001) ใช้กลุ่มแบคทีเรียที่มีความสามาถในการย่อยสลายน้ำมันจาก Mexican Institute of Petroleum เพื่อย่อยสลายน้ำมันดีเซลในระดับห้องปฏิบัติการและระดับโรงงาน พบว่ากลุ่มแบคทีเรียสามารถย่อยสลายน้ำมันดีเซลเหลือน้อยกว่า 15% ในเวลา 5 สัปดาห์ เมื่อเทียบกับชุดควบคุมที่มีการลดลงของน้ำมันดีเซล 5 และ 15% ตามลำดับ

Wongsa และคณะ (2004) ได้คัดแยกจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายน้ำมัน เคโรซีน น้ำมันดีเซล และน้ำมันหล่อลื่นจากเกาะฮอกไกโด *Pseudomonas aeruginosa* สายพันธุ์ WatG สามารถย่อยสลายน้ำมันดีเซล และเคโรซีน ได้สูงถึง 90-95% ในเวลา 2 และ 3 สัปดาห์ ตามลำดับ รวมถึงย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นได้สูงถึง 60% ใน 2 สัปดาห์ ส่วน *Serratia marcescens* สายพันธุ์ HokM สามารถย่อยสลายเคโรซีน น้ำมันดีเซล และน้ำมันหล่อลื่นได้สูงถึง 50-60% ใน 2 สัปดาห์

Ozaki และคณะ (2007) สามารถคัดแยกกลุ่มแบคทีเรียที่ประกอบด้วย *Pandoraea* sp., *Hyphomicrobium facile* Y3, *Burkholderia multivorans* Y4 และ *Brachymonas* sp. F จากดินที่มีการปนเปื้อนน้ำมัน ซึ่งมีความสามารถในการย่อยสลายน้ำมันดิบที่ความเข้นข้น 4 กรัมต่อลิตร 65% ในระยะเวลา 14 วันของการทดลอง

Miranda และคณะ (2007) ใช้ยีสต์ *Rhodotorula aurantiaca* UFPEDA 845 และ *Candida ernobii* UFPEDA 862 ในการย่อยสลายน้ำมันดีเซลความเข้มข้น 12% พบว่า *C. ernobii* สามารถย่อยสลายเตตตะดีเคน 5-เมธิล-ออกเทน และ ออกตะดีเคน ได้หมดและ ดีเคน 60.8% โนเนน 21.4% ส่วน *R. aurantiaca* สามารถย่อยสลายดีเคนได้ 93% โนเนน 38.4% และ โดดีเคน 22.9% ในเวลา 15 วัน

Nwaogu และคณะ (2008) ได้คัดแยกแบคทีเรีย *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Trichoderma harzanium* และ *Trichothercium roseum* โดยใช้น้ำมันดีเซลเป็นแหล่งอาหารในการคัดเลือก พบว่า *B. subtilis* สามารถย่อยสลายน้ำมันดีเซลในดินความเข้มข้น 5% (ปริมาตรต่อน้ำหนักดิน) ได้สูงกว่าแบคทีเรียชนิดอื่น โดยอัตราการย่อยสลายวันที่ 1, 12 และ 24 เท่ากับ $5.8x10^{-4}$, $1.83x10^{-3}$ และ $1.05x10^{-3}$ กรัมต่อชั่วโมง ตามลำดับ

งานวิจัยที่ใช้จุลินทรีย์หรือกลุ่มจุลิทรีย์ในการย่อยสลาย PAHs ในสิ่งแวดล้อมยกตัวอย่างเช่น

Moody และคณะ (2001) ใช้แบคทีเรีย *Mycobacterium* sp. สายพันธุ์ PYR-1 ย่อยสลายฟีแนนทรีนและแอนทราซีนความเข้มข้น 0.15 และ 0.075 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ หลังจาก 14 วันพบการย่อยสลายฟีแนนทรีนและแอนทราซีน เท่ากับ 90 และ 92% ตามลำดับ

Wong และคณะ (2002) ได้คัดแยกแบคทีเรีย *Burkholderia cocovenenans* สายพันธุ์ BU-3 ได้จากดินปนเปื้อนน้ำมัน ซึ่งสามารถย่อยสลายฟีแนนทรีนความเข้มข้น 100 และ 500 มิลลิกรัมต่อลิตรในอาหารเลี้ยงเชื้อ ได้สูงถึง 95% และฟีแนนทรีนความเข้มข้น 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตรในอาหารเลี้ยงเชื้อ ได้ 65% ในเวลา 16 วัน

Potin และคณะ (2004) ทำการย่อยสลาย 16 EPA-PAH โดยใช้รา *Coniothyrium* sp. และ *Fusarium* sp. คัดแยกจากดินปนเปื้อน PAHs เป็นระยะเวลานาน สามารถย่อยสลาย 16 EPA-PAH ได้ 26.5% และ 27.5% ตามลำดับ ในเวลา 30 วัน

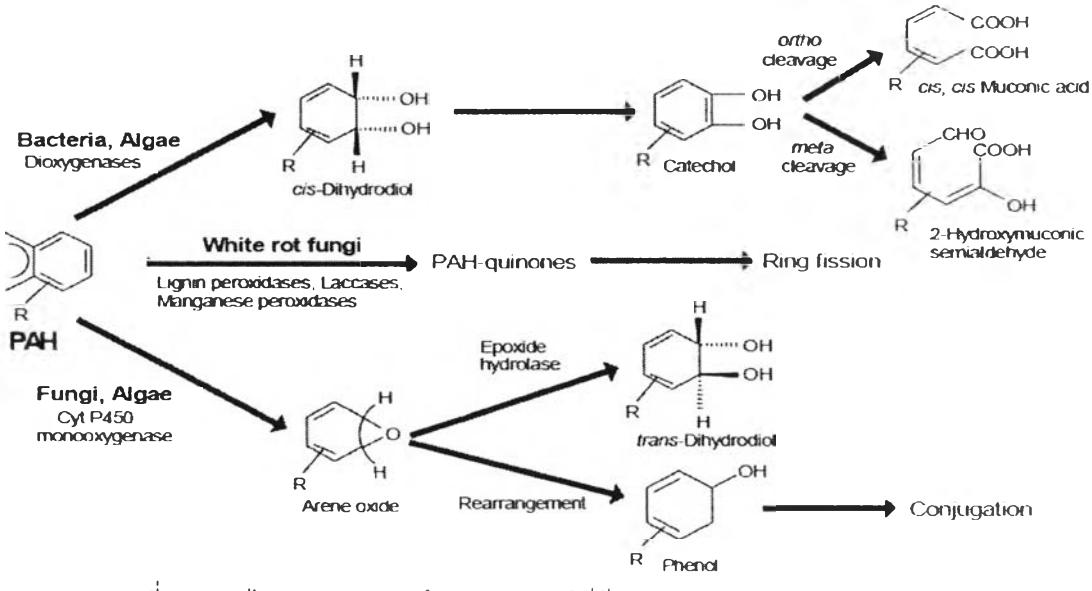
Yu และคณะ (2005) ได้คัดแยกกลุ่มแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายฟีแนนทรีน ฟลูออรีน และไพรีน จากดินตะกอนป่าชายเลน กลุ่มแบคทีเรียนี้ประกอบด้วยแบคทีเรีย 3 ชนิด คือ *Rhodococcus* sp., *Acinetobacter* sp. และ *Pseudomonas* sp. ซึ่งสามารถย่อยสลายฟีแนนทรีน ฟลูออรีน และไพรีน ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร ได้หมดในระยะเวลา 1 เดือน

Ruberto และคณะ (2006) ใช้การเติมกลุ่มแบคทีเรียแอนตากติก (Bioaugmentation) ร่วมกับการเติมสารอาหาร (Biostimulation) ในการย่อยสลายฟีแนนทรีนในดินความเข้มข้น 1744 ppm พบว่าสามารถย่อยสลายฟีแนนทรีนได้สูงถึง 46.6% ในเวลา 56 วัน

2.4 กลไกการย่อยสลายน้ำมันดีเซลและ PAHs

กลไกในการย่อยสลายน้ำมันดีเซล และPAHs มีได้หลากหลายกลไล ซึ่งแล้วแต่ชนิดของสาร การย่อยสลายในขั้นแรกต้องอาศัยการเกิดปฏิกิริยา ออกซิเดชันโดยการทำงานของเอนไซม์ไดออกซิจิเนสสำหรับแบคทีเรีย ซึ่งมีกลไกการย่อยสลายโดยดูจากตำแหน่งที่เกิดการเติมออกซิเจนคือ *meta*-

และ *ortho*-clevavage เอนไซม์โมโนออกซิจิเนส พบในราและสาหร่าย และเอนไซม์ลิกนินเปอร์ออกซิเดส แลคเคส และแมงกานีสเปอร์ออกซิเดส พบใน รา write rot ดังแสดงในรูปที่ 2.3 (Labana และคณะ, 2007)



รูปที่ 2.4 กลไกหลักของการบำบัด PAHs วิธีชีวภาพ (Labana และคณะ, 2007)

อย่างไรก็ตามการใช้จุลินทรีย์ในการย่อยสลายน้ำมันดีเซล และ PAHs ดังที่กล่าวมานั้น จำเป็นต้องใช้จุลินทรีย์ที่เตรียมสดสำหรับการบำบัดในแต่ละครั้ง ซึ่งไม่สะดวกเมื่อต้องการนำไปใช้ในพื้นที่จริง เนื่องจากต้องต่อเชื้อต่อเนื่องเป็นระยะเวลานาน ซึ่งการต่อเชื้อหลายๆครั้งอาจทำให้เกิดการปนเปื้อนของจุลินทรีย์และอาจเปลี่ยนแปลงกิจกรรมดั้งเดิมของจุลินทรีย์ (Kim และคณะ, 2002) การเก็บรักษาจุลินทรีย์จึงเป็นวิธีการที่น่าสนใจที่จะสามารถทำให้จุลินทรีย์รอดชีวิตและคงกิจกรรมดั้งเดิมโดยไม่มีการเปลี่ยนแปลง วิธีที่ใช้ในการเก็บรักษาจุลินทรีย์ที่นิยมใช้ทั่วไปคือ การไลโอฟิไลเซชัน (Morgan และคณะ, 2006)

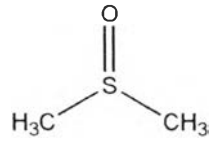
2.5 **ไลโอฟิไลเซชัน** (Lyophilization)

ไลโอฟิไลเซชัน หรือ การทำแห้งแบบเยือกแข็ง (Freeze Drying) เป็นกระบวนการทำแห้งภายใต้ภาวะอุณหภูมิและความดันต่ำ หลักการในการทำแห้งคือการระเหิดน้ำออกจากสารแขวนลอยจุลินทรีย์ ในสภาพที่เป็นสุญญากาศ โดยที่การระเหิดน้ำจะแบ่งออกเป็น 2 ช่วง คือ การทำแห้งขั้นแรก สารแขวนลอยจุลินทรีย์จะถูกทำให้แข็งตัวและอยู่ในภาวะที่เป็นสุญญากาศ ก่อนเริ่มการระเหิดเอาน้ำ

ในส่วนที่อยู่เป็นอิสระ ขั้นที่สอง เป็นการระเหิดเอาน้ำที่สร้างพันธะกับสารอื่นในเซลล์จุลินทรีย์ออกไป ก่อนเก็บจุลินทรีย์ที่ไลโอฟิไลเซชันในภาวะที่เป็นสุญญากาศ (Flink และ Knudsen, 1983) เนื่องจากมีขั้นตอนที่ทำให้เกิดผลึกน้ำแข็งในกระบวนการไลโอฟิไลเซชันจึงจำเป็นต้องมีสารป้องกันความเย็น (Cryoprotectant) ที่ทำหน้าที่ในการป้องกันการถูกทำลายของเซลล์จุลินทรีย์จากผลึกน้ำแข็งที่เกิดขึ้น สารป้องกันความเย็นมีหลายชนิดที่มีสมบัติในการละลายน้ำได้ดี (Brand และ Diller, 2004) สารป้องกันความเย็นที่นิยมใช้สามารถแบ่งออกได้เป็นสองชนิดคือ สารป้องกันความเย็นชนิดที่สามารถซึมผ่านผนังเซลล์ได้โดยตรง (penetrating agents) และสารป้องกันความเย็นชนิดที่ไม่สามารถซึมเข้าสู่เซลล์ได้ (nonpenetrating agents)

2.5.1 **สารป้องกันความเย็นชนิดที่สามารถซึมผ่านเยื่อหุ้มเซลล์**

สารป้องกันความเย็นที่สามารถซึมผ่านเยื้อหุ้มเซลล์ได้นั้น ต้องเป็นสารที่มีขนาดโมเลกุลที่เล็กกว่า 100 ดาลตัน จึงจะสามารถรอดผ่านรูของเยื้อหุ้มเซลล์ หน้าที่ของสารป้องกันความเย็นชนิดนี้มีหน้าที่ในการลดขนาดของผลึกน้ำแข็งรวมถึงการช่วยลดการขาดน้ำของเซลล์จุลินทรีย์ (McGann, 1978) ตัวอย่างเช่น ไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (DMSO) มีสูตรโครงสร้างดังรูปที่ 2.5 สูตรโมเลกุล C_2H_6SO เป็นของเหลวใสไม่มีสี สามารถละลายได้ในน้ำและสารอินทรีย์อื่นๆได้ดี



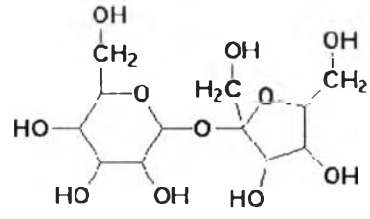
รูปที่ 2.5 โครงสร้างโมเลกุลของไดเมทิลซัลฟอกไซด์

2.5.2 **สารป้องกันความเย็นชนิดที่ไม่สามารถซึมผ่านเยื่อหุ้มเซลล์**

สารป้องกันความเย็นชนิดนี้จะมีขนาดโมเลกุลที่ใหญ่กว่าขนาดรูของเยื้อหุ้มเซลล์ ทำให้ไม่สามารถซึมผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ได้ จึงเคลือบอยู่ที่ผิวภายนอกเซลล์จุลินทรีย์ และทำหน้าที่ยับยั้งการเกิดผลึกน้ำแข็งรวมถึงการลดการขาดน้ำของจุลินทรีย์เช่นเดียวกันกับสารป้องกันความเย็นชนิดที่สามารถซึมผ่านเยื้อหุ้มเซลล์ได้ ตัวอย่างของสารป้องกันชนิดนี้ที่นิยมใช้คือ ซูโครส และนมปลอดมันเนย (skim milk)

ซูโครส สูตรเคมี $C_{12}H_{22}O_{11}$ เป็นน้ำตาลโมเลกุลคู่ที่ประกอบด้วย น้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว 2 ชนิด คือ กลูโคสและฟรุคโตสที่เชื่อมกันด้วยพันธะไกโคซิดิก ซูโครสช่วยในการคงสภาพของเยื้อหุ้มเซลล์

และทำหน้าที่ควบคุมแรงดันออสโมติก ทำให้เซลล์จุลินทรีย์ยังคงสภาพเดิม (Liebermann และคณะ, 2003)



รูปที่ 2.6 โครงสร้างโมเลกุลของน้ำตาลซูโครส

นมปลอดมันเนย (skim milk) เป็นนมที่ทำการแยกมันเนยออกจนเกือบหมด เป็นวัตถุดิบในการนำไปดัดแปลงเป็นผลิตภัณฑ์ชนิดอื่น องค์ประกอบจึงเหมือนนมทั่วไปแต่มีปริมาณมันเนยที่น้อยกว่ามาก องค์ประกอบคือคาร์โบไฮเดรต ไขมัน โปรตีน ซึ่งยึดเกาะกับเยื่อหุ้มเซลล์ได้ดี อีกทั้งยังใช้เป็นแหล่งอาหารของเซลล์จุลินทรีย์ได้

งานวิจัยที่ใช้จุลินทรีย์ที่ผ่านการไลโอฟิไลเซชันในการบำบัดสารพิษต่างๆในสิ่งแวดล้อม ดังตัวอย่างเช่น

Sembries และ Crawford (1997) ใช้สปอร์ของ *Clostridium bifermentans* ที่ผ่านการทำแห้งเยือกแข็งด้วย 10% นมปลอดมันเนยเป็นสารป้องกันความเย็น บำบัด 2,4,6-ไตรไนโตรโทลูอีน (TNT) ความเข้มข้น 50 ppm หลังจากเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 4 เดือน พบว่าสามารถย่อยสลาย TNT และ 4-อะมิโน-2,6-ไดไนโตรโทลูอีน ซึ่งเป็นเมแทบอไลต์ของ TNT เหลือ 7 และ 10 ppm ตามลำดับ ในเวลา 50 ชั่วโมง

Matsunaga และคณะ (1999) คัดแยกสาหร่ายทะเลขนาดเล็กที่สามารถกำจัดแคดเมียมได้ พบว่า *Chlorella* sp. NKG16014 สามารถกำจัดแคดเมียมได้มากกว่า 10% จากความเข้มข้นเริ่มต้น 50 μM *Chlorella* sp. NKG16014 ที่ผ่านการไลโอฟิไลเซชัน พบว่าสามารถดูดซับแคดเมียมได้สูงถึง 91.0 มิลลิกรัมแคดเมียมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ในเวลา 12 วัน

Weekers และคณะ (1998) ได้คัดเลือกแบคทีเรียที่สามารถย่อยน้ำมันดีเซลได้จากตัวอย่างดินปนเปื้อนน้ำมันดีเซลจำนวน 10 สายพันธุ์ ทดสอบการเจริญของแบคทีเรียที่ผ่านกระบวนการไลโอฟิไลเซชันทันที พบว่าสามารถเจริญได้โดยใช้ 1% น้ำมันดีเซล (หรือสารไฮโดรคาร์บอนอื่นๆ)

แบคทีเรียที่ผ่านกระบวนการไลโอฟิไลเซชันยังคงความสามารถในการย่อยสลายน้ำมันดีเซลได้และเจริญได้ดี เมื่อเก็บที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส นาน 15 วัน

Sar และ Souza (2002) ใช้ไลโอฟิไลซ์ *Pseudomonas* sp. ที่คัดแยกจากดิน เพื่อใช้ในการดูดซับ (Biosorption) ทอเรียม (IV) ความเข้มข้น 430 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ที่ pH 4 พบว่าสามารถดูดซับ ทอเรียม (IV) ได้สูงสุด 91% ในระยะเวลา 24 ชั่วโมง

Sar และคณะ (2004) ใช้ไลโอฟิไลซ์ *Pseudomonas* sp. ในการดูดซับยูเรเนียม (VI) และทอเรียม (IV) ที่ปนเปื้อนมากับไอของเสียนิวเคลียร์ โดยสามารถย่อยสลายที่ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตรได้มากกว่า 90% ในเวลา 1-10 นาที เมื่อ pH เท่ากับ 4.0-5.0 จะทำให้การดูดซับเพิ่มขึ้นสูงถึง 541 มิลลิกรัมของยูเรเนียมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง และ 430 มิลลิกรัมของทอเรียมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง

Juhasz และคณะ (2005) บำบัดดินที่มีการปนเปื้อนสารเคลือบเนื้อไม้ที่มีความเข้มข้นของ PAHs สูงถึง 7767 ± 1286 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ของ PAHs ทั้ง16 ชนิดที่กำหนดโดย U.S.EPA โดยวิธีการเติมไนเตรตและฟอสเฟตเทียบกับการใช้ *Mycobacterium* sp. สายพันธุ์ 1B ที่สามารถย่อย PAHs ได้ เตรียมสดหรือผ่านการทำแห้งเยือกแข็ง พบว่าหลังจาก 182 วัน พบการลดลงจาก 7767 ± 1286 เหลือ 5579 ± 321 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม 2250 ± 71 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม 2050 ± 354 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม 1950 ± 70 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ของชุดที่ไม่เติมอาหารและแบคทีเรีย ชุดที่เติมไนเตรต ชุดที่เติมแบคทีเรียที่เตรียมสด และชุดที่เติมแบคทีเรียที่ทำแห้งเยือกแข็ง ตามลำดับ และพบการย่อยสลายของ PAHs ที่มวลโมเลกุลต่ำ 82% - 99% ส่วน PAHs ที่มวลโมเลกุลสูงมีการย่อยสลาย 33% - 81%.

ประภัสสร ปานมีทรัพย์ (2550) ได้ศึกษาการทำแห้งเยือกแข็งกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 พบว่าเมื่อทำแห้งเยือกแข็งกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 โดยใช้ 12% ซูโครสเป็นสารป้องกันความเย็น กลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 จะรอดชีวิตมากถึง 99.54% และยังคงประสิทธิภาพการย่อยสลาย ไพรีน/ฟีแนนทรีน อย่างไรก็ตาม เนื่องจากในกระบวนการทำแห้งเยือกแข็งได้ทำในหลอดฝาเกลียว จึงทำให้มีความชื้นเกิดขึ้น จึงจำเป็นต้องเก็บรักษากลุ่มแบคทีเรียที่ผ่านกระบวนการทำแห้งเยือกแข็งไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส ซึ่งสามารถเก็บได้นาน 6 เดือนและมีชีวิตรอด 83.38%

Oh และคณะ (2009) ใช้ไลโอฟิไลซ์ *Pseudomonas stutzeri* ในการดูดซับโลหะหนักได้แก่ Pb(II), Cd(II) และ Cu(II) ที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 300 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าที่ pH 5.0 Pb(II) และ

Cd(II) ถูกดูดซับโดยไลโอฟิไลซ์ *P. stutzeri* ได้สูงถึง 153.3 และ 43.86 มิลลิกรัมต่อกรัม ตามลำดับ และที่ pH 6.0 Cu(II) ถูกดูดซับ 33.16 มิลลิกรัมต่อกรัม ในเวลา 60 นาที

2.6 กลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 และ PDE4

จีรทีปฆ์ แสนรัก (2547) ได้ทำการคัดแยกกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 จากใบจามจุรีซึ่งเป็นพืชในวงศ์ Leguminosae (พืชตระกูลถั่ว) เพื่อนำมาทดสอบความสามารถในการย่อยสลายไพรีน ความเข้มข้น 0.1 กรัมต่อลิตร หมดภายในเวลา 14 วันของการทดลอง นอกจากนี้กลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ยังสามารถย่อยสลาย อะซีแนพธีน ฟลูออรีน ฟีแนนทรีนและฟลูออแรนทีนได้ พบว่าในเวลา 14 วัน กลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 สามารถย่อยสลายได้เท่ากับ 100, 98, 99 และ 34% ตามลำดับ

ภัทราพร กวีสุทธิกุล (2550) ทำการคัดแยกกลุ่มแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลายน้ำมันดีเซลความเข้มข้น 1% (ปริมาตรต่อปริมาตร) จากดินที่มีการปนเปื้อนน้ำมันดีเซล และแยกได้กลุ่มแบคทีเรีย PDE4 ที่สามารถย่อยสลายน้ำมันดีเซล เหลือเพียง 10.47% ในเวลา 14 วันของการทดลอง

ดังนั้นงานวิจัยนี้ จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อใช้กลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 และ PDE4 ที่ผ่านกระบวนการไลโอฟิไลเซชันในการบำบัดทางชีวภาพดินที่ปนเปื้อนไพรีน/ฟีแนนทรีนและ น้ำมันดีเซล