

การตรึงเชื้อผสมระหว่าง *Methylobacterium* sp. NP3 และ *Acinetobacter* sp. PK1 บนซิลิกา
เพื่อใช้ย่อยสลายฟีนอล



นางสาวปิยะมาศ คงแถม

ศูนย์วิทยทรัพยากร จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2552

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

IMMOBILIZATION OF *Methylobacterium* sp. NP3 AND *Acinetobacter* sp. PK1
CO-CULTURE ON SILICA FOR PHENOL DEGRADATION



Miss Piyamart Khongkhaem

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Industrial Microbiology

Department of Microbiology

Faculty of Science

Chulalongkorn University

Academic Year 2009

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์

การตรึงเชื้อผสมระหว่าง *Methylobacterium* sp. NP3 และ *Acinetobacter* sp. PK1 บนซิลิกาเพื่อให้อายุสลายพืชนอล

โดย

นางสาวปิยะมาศ คงแถม

สาขาวิชา

จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. เอกวัล ลือพร้อมชัย

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

อาจารย์ ดร.อมรราวรณ อินทศิริ

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่ง
ของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

..... คณบดีคณะวิทยาศาสตร์

(ศาสตราจารย์ ดร. สุเทพ นารหนองบัว)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร. กาญจนา จันทองจีน)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. เอกวัล ลือพร้อมชัย)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(อาจารย์ ดร.อมรราวรณ อินทศิริ)

..... กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. กอบชัย ภัทรกุลวานิชย์)

..... กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อรอุทัย พิทยาคง)

..... กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย

(อาจารย์ ดร. คัมภีร์ พรหมพราย)

ปิยะมาศ คงแถม : การตรึงเชื้อผสมระหว่าง *Methylobacterium* sp. NP3 และ *Acinetobacter* sp. PK1 บนซิลิกาเพื่อใช้อย่อยสลายฟีนอล (IMMOBILIZATION OF *Methylobacterium* sp. NP3 AND *Acinetobacter* sp. PK1 CO-CULTURE ON SILICA FOR PHENOL DEGRADATION) อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก : ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. เอกวัล ลือพร้อมชัย, อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม : อาจารย์ ดร. อมราวรรณ อินทศิริ, 119 หน้า.

ฟีนอลถูกนำมาใช้อย่างกว้างขวางในอุตสาหกรรม ส่งผลให้เกิดการปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อม และก่อให้เกิดอันตรายต่อสุขภาพ งานวิจัยนี้มีจุดมุ่งหมายเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการย่อยสลายฟีนอลของเชื้อผสมระหว่าง *Methylobacterium* sp. NP3 และ *Acinetobacter* sp. PK1 โดยใช้วิธีตรึงเซลล์บนซิลิกาที่สังเคราะห์ขึ้นใหม่ โดยทั่วไปการสังเคราะห์ซิลิกาใช้กระบวนการโซล-เจล ที่มี TEOS เป็นสารตั้งต้น และใช้กรดหรือเบสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ผู้วิจัยสามารถสังเคราะห์ซิลิกาได้ทั้งหมด 9 ชนิด และคัดเลือกซิลิกา 6 ชนิด มาใช้ตรึงเชื้อผสมโดยวิธียึดเกาะหรือวิธีกักขัง ผลการทดลองพบว่าซิลิกาที่สังเคราะห์ขึ้น 2 ชนิด คือ KAb และ EntA สามารถตรึงเซลล์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยมีจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดในซิลิกาประมาณ 4.33×10^6 และ 9.33×10^6 CFU ต่อกรัมซิลิกา ตามลำดับ ต่อมาศึกษาเปรียบเทียบการย่อยสลายฟีนอลโดยเซลล์อิสระและเซลล์ตรึงในระบบขวดเขย่าเป็นเวลา 10 วัน เซลล์อิสระสามารถย่อยสลายฟีนอลเกือบ 100% เมื่อความเข้มข้นฟีนอลเริ่มต้นน้อยกว่า 2,500 มิลลิกรัมต่อลิตร อย่างไรก็ตามแบคทีเรียตรึงบนซิลิกา KAb และ EntA สามารถย่อยสลายฟีนอลที่ความเข้มข้นฟีนอลเริ่มต้น 5,000 มิลลิกรัมต่อลิตร ได้ถึง 80-85% ในขณะที่ซิลิกาที่ไม่มีแบคทีเรียสามารถลดปริมาณฟีนอลได้เพียง 20% เท่านั้น จากผลการทดลองเซลล์ตรึงช่วยป้องกันแบคทีเรียจากฟีนอลที่มีความเข้มข้นสูง นอกจากนี้สามารถนำเซลล์ตรึงบนซิลิกา KAb และ EntA กลับมาใช้อย่างต่อเนื่องที่ความเข้มข้นฟีนอลเริ่มต้น 5,000 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยเมื่อเริ่มการทดลองแบคทีเรียตรึงสามารถย่อยสลายฟีนอลได้ 100% ภายใน 15 วัน และระยะเวลาการย่อยสลายฟีนอลลดลงเหลือเพียง 10 วัน หลังจากเติมฟีนอลในปริมาณเท่าเดิมลงในชุดทดลองอย่างสม่ำเสมอ ทั้งนี้ซิลิกา EntA มีราคาถูกและมีความเสถียรมากกว่า ซิลิกา KAb นอกจากนี้ขั้นตอนการเตรียมและการตรึงเซลล์ก็ไม่ยุ่งยาก จึงเหมาะสมกับการนำมาใช้ตรึงเซลล์แบคทีเรีย และเซลล์ตรึงสามารถนำมาประยุกต์ใช้ในระบบบำบัดน้ำเสียเพื่อกำจัดฟีนอลต่อไป

ภาควิชา..... จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย..... ลายมือชื่อนักศึกษา..... ปิยะมาศ คงแถม.....
 สาขาวิชา..... จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยทางอุตสาหกรรม..... ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก..... *lonsa*.....
 ปีการศึกษา..... 2552..... ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม..... *Dr. A.*.....

5072650123 : MAJOR INDUSTRIAL MICROBIOLOGY

KEYWORDS : Phenol/ Co-culture/ Sol-gel/ Silica/ Immobilization

PIYAMART KHONGKHAEM : IMMOBILIZATION OF *Methylobacterium* sp. NP3 AND *Acinetobacter* sp. PK1 CO-CULTURE ON SILICA FOR PHENOL DEGRADATION. THESIS ADVISOR: ASST. PROF. EKAWAN LUEPROMCHAI, Ph.D., THESIS CO-ADVISOR: AMARAWAN INTASIRI, Ph.D., 119 pp.

Phenol has been used extensively in industries, thus resulted in widespread contamination and posed potential health threats. This research aimed to increase phenol degrading efficiency of *Methylobacterium* sp. NP3 and *Acinetobacter* sp. PK1 co-culture by immobilized on newly synthesized silica. In general, the silica was synthesized by sol-gel process with TEOS as silica precursor and either acid or base as catalyst. Nine types of silica were synthesized and then 6 of them were selected for immobilization of bacteria by attachment or entrapment approaches. The results showed that two types of silica, KAb and EntA were effectively immobilized bacteria, in which the total amounts of bacteria were around 4.33×10^6 and 9.33×10^6 CFU/g silica, respectively. The degradation of phenol by free and immobilized cells was later compared in batch cultures for 10 days. Free cells degraded almost 100% of phenol when the initial concentrations were less than 2,500 mg/L. However, bacteria immobilized on KAb and EntA silica could degrade 80-85% of 5,000 mg/L phenol and only 20% of phenol was removed by uninoculated silica. The results indicated that the immobilized cells were protected from high phenol concentrations. Repeating use of cell-immobilized KAb and EntA silica were later examined with 5,000 mg/L phenol. The bacteria could degrade 100% phenol within 15 days and the degradation periods were reduced to 10 day after repeatedly added equal amount of phenol. EntA silica was cheaper and more stable than KAb silica. In addition, the preparation and immobilization process of this silica was not complicated. Consequently, EntA silica was suitable for bacterial immobilization and could be further applied in wastewater treatment system for removal of phenol.

Department Microbiology Student's Signature..... Piyamart K.....
Field of Study Industrial Microbiology Advisor's Signature..... Ekawan
Academic Year 2009 Co-advisor's signature..... Amaran A.I.

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จเสร็จสิ้นอย่างสมบูรณ์ด้วยดี โดยความช่วยเหลืออย่างยิ่งของผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เอกวิทย์ ลือพร้อมชัย อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก ที่ได้กรุณาถ่ายทอดความรู้ คำแนะนำ และข้อคิดเห็นต่างๆ ในการแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้ถูกต้องครบถ้วนสมบูรณ์ ตลอดจนความช่วยเหลือในด้านอื่นๆ ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้

ขอกราบขอบพระคุณอาจารย์ ดร.อมรवारณ อินทศิริ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่ได้กรุณาให้คำปรึกษา คำแนะนำ และข้อคิดเห็นต่างๆ ตลอดจนความช่วยเหลือในด้านอื่นๆ เพื่อให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้เสร็จสมบูรณ์ไปด้วยดี

ขอกราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร.กาญจนา จันทองจีน ที่ให้เกียรติเป็นประธานกรรมการสอบป้องกันวิทยานิพนธ์ ตลอดจนให้ความรู้ คำแนะนำต่างๆ และตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้มีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอกราบขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.กอบชัย ภัทรกุลวณิชย์ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อรรถทัย ภิญญาคง และอาจารย์ ดร.คัมภีร์ พรหมพราย เป็นอย่างสูงที่กรุณารับเป็นกรรมการในการสอบป้องกันวิทยานิพนธ์ ตลอดจนให้ความรู้ คำแนะนำต่างๆ และตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้มีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอกราบขอบพระคุณคณาจารย์ทุกท่านในภาควิชาจุลชีววิทยา ที่กรุณาให้ความรู้ และคำแนะนำต่างๆ แก่ผู้วิจัยในการดำเนินงานวิจัย จนสำเร็จลุล่วงด้วยดี

ขอขอบคุณหน่วยปฏิบัติการวิจัยการบำบัดมลพิษทางสิ่งแวดล้อมโดยชีววิธี สถาบันวิจัยแห่งชาติ และศูนย์ความเป็นเลิศแห่งชาติด้านการจัดการสิ่งแวดล้อมและของเสียอันตราย ที่ให้ความช่วยเหลือในหลายๆ ด้าน

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ในภาควิชาจุลชีววิทยาทุกท่าน ที่ให้ความช่วยเหลือ และคำแนะนำต่างๆ ตลอดมา

ขอขอบคุณเพื่อนๆ ร่วมรุ่นทุกคน และพี่ๆ น้องๆ ทุกคน ที่มีส่วนช่วยเหลือในหลายๆ ด้าน สุดท้ายขอกราบขอบพระคุณบิดาและมารดาที่เป็นแรงบันดาลใจ และกำลังใจในการศึกษาตลอดมา รวมถึงคอยสนับสนุน ให้ความช่วยเหลือในด้านต่างๆ และให้กำลังใจแก่ผู้วิจัยเสมอมา

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ญ
สารบัญภาพ.....	ฐ
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ.....	ณ
บทที่	
1. บทนำ.....	1
2. ปรีทัศน์วรรณกรรม.....	4
2.1 ปัญหาของฟีนอลที่ปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อม.....	4
2.2 จุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายฟีนอล.....	6
2.3 การตรึงเซลล์แบคทีเรีย.....	12
2.4 ซิลิกา (Silica).....	16
2.5 ตัวอย่างงานวิจัยที่ศึกษาการตรึงเซลล์จุลินทรีย์บนซิลิกา.....	21
3. อุปกรณ์ เคมีภัณฑ์และวิธีดำเนินงานวิจัย.....	25
อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง.....	25
เคมีภัณฑ์.....	26
วิธีดำเนินงานวิจัย.....	27
3.1 การเพาะเลี้ยง <i>Methylobacterium</i> sp.NP3 และ <i>Acinetobacter</i> sp. PK1.....	27
3.1.1 จุลินทรีย์.....	27
3.1.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ.....	27
3.1.3 การเตรียมหัวเชื้อ.....	27
3.2 การสังเคราะห์ซิลิกา.....	28
3.2.1 การสังเคราะห์ซิลิกาโดยใช้กรดเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา.....	28
3.2.2 การสังเคราะห์ซิลิกาโดยใช้เบสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา.....	31
3.2.3 การกำจัดสารลดแรงตึงผิวออกจากซิลิกา.....	32

3.3 การศึกษาลักษณะทางกายภาพของซีลีกา.....	34
3.3.1 สัณฐานวิทยา (Morphology) โดยใช้เทคนิค Scanning Electron Microscopy (SEM).....	34
3.3.2 การศึกษาลักษณะการจัดเรียงตัวของซีลีกาโดยใช้เทคนิค X-ray diffraction (XRD).....	34
3.3.3 การทดสอบความเป็นพิษของซีลีกาต่อการเจริญของแบคทีเรีย.....	35
3.4 การตรึง <i>Methylobacterium</i> sp.NP3 และ <i>Acinetobacter</i> sp. PK1 บนซีลีกา.....	35
3.4.1 การตรึงแบคทีเรียโดยวิธีการยึดเกาะบนซีลีกา (Attachment).....	35
3.4.2 การตรึงแบคทีเรียโดยวิธีการกักขังในซีลีกา (Encapsulation).....	35
3.5 การศึกษาประสิทธิภาพการย่อยสลายฟีนอล.....	36
3.5.1 การย่อยสลายฟีนอลของ <i>Methylobacterium</i> sp. NP3 และ <i>Acinetobacter</i> sp. PK1 แบบเซลล์อิสระ.....	36
3.5.2 การย่อยสลายฟีนอลของ <i>Methylobacterium</i> sp. NP3 และ <i>Acinetobacter</i> sp. PK1 ที่ตรึงบนซีลีกา.....	36
3.5.3 การศึกษาประสิทธิภาพการนำเซลล์ตรึงกลับมาใช้ อย่างต่อเนื่อง.....	37
3.6 การวิเคราะห์.....	37
3.6.1 การวิเคราะห์จำนวนของแบคทีเรีย.....	37
3.6.2 การวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลด้วยเทคนิค colorimetric method.....	37
4 ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง.....	39
4.1 การศึกษาประสิทธิภาพการย่อยสลายฟีนอลของเซลล์อิสระ.....	39
4.2 การสังเคราะห์ซีลีกา.....	42
4.2.1 การสังเคราะห์ซีลีกาเมื่อใช้ตัวเร่งปฏิกิริยาเป็นกรด.....	42
4.2.2 การสังเคราะห์ซีลีกาเมื่อใช้ตัวเร่งปฏิกิริยาเป็นเบส.....	44
4.2.3 สรุปลักษณะที่สังเคราะห์ได้.....	45
4.3 การจำแนกลักษณะทางกายภาพ และชีวภาพของซีลีกาที่สังเคราะห์.....	47
4.3.1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยา (Morphology).....	47
4.3.2 ลักษณะการจัดเรียงตัวของซีลีกา โดยใช้เทคนิค XRD.....	48

4.3.3 การทดสอบความเป็นพิษของซิลิกาต่อการเจริญของแบคทีเรีย.....	50
4.3.4 การเปรียบเทียบลักษณะของซิลิกา.....	51
4.4 การศึกษาประสิทธิภาพการตรึงเชื้อผสมบนซิลิกา.....	52
4.4.1 การตรึงเชื้อผสมด้วยวิธีการยึดเกาะบนซิลิกา (Attachment).....	52
4.4.2 การตรึงเชื้อผสมด้วยวิธีการกักขังในซิลิกา (Encapsulation).....	56
4.5 การศึกษาประสิทธิภาพการย่อยสลายฟีนอล.....	58
4.5.1 เปรียบเทียบการย่อยสลายฟีนอลของเซลล์อิสระ	
เซลล์ตรึงแบบยึดเกาะบนซิลิกา และเซลล์ตรึงแบบกักขังในซิลิกา.....	58
4.5.2 การย่อยสลายฟีนอลของเชื้อผสมที่ตรึงบนซิลิกา KAb.....	61
4.5.3 การย่อยสลายฟีนอลของเชื้อผสมที่ตรึงในซิลิกา EntA.....	63
4.6 การศึกษาประสิทธิภาพการนำเซลล์ตรึงมาใช้ย่อยสลายฟีนอล	
อย่างต่อเนื่อง.....	66
4.6.1 การย่อยสลายฟีนอลที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 500 มิลลิกรัมต่อลิตร.....	66
4.6.2 การย่อยสลายฟีนอลที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 5,000 มิลลิกรัมต่อลิตร.....	67
4.6.3 ลักษณะทางกายภาพของเซลล์ตรึงบนซิลิกาที่ผ่านการบำบัด	
ฟีนอลโดยใช้เทคนิค Scanning Electron Microscopy (SEM).....	70
5 สรุปผลการทดลอง.....	71
รายการอ้างอิง.....	77
ภาคผนวก	
ภาคผนวก ก.....	83
ภาคผนวก ข.....	85
ภาคผนวก ค.....	88
ภาคผนวก ง.....	91
ภาคผนวก จ.....	105
ภาคผนวก ฉ.....	117
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....	119

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
2.1	5
2.2	7
2.3	8
2.4	9
2.5	15
2.6	23
4.1	46
4.2	50
4.3	51
4.4	52
5.1	72
5.2	73
5.3	75
ค.1	88
ค.2	89
ค.3	90
ง.1	91
ง.2	93
ง.3	95

ง.4 ปริมาณฟีนอลที่เหลืออยู่ (มิลลิกรัมต่อลิตร) ของเซลล์ตรึงบนซีลิกา KAb ในการย่อยสลาย ฟีนอลที่ความเข้มข้น 625-10,000 มิลลิกรัมต่อลิตร.....	97
ง.5 ปริมาณฟีนอลที่เหลืออยู่ (มิลลิกรัมต่อลิตร) ของชุดควบคุม ซีลิกา EntA ในการย่อยสลายฟีนอลที่ความเข้มข้น 625-10,000 มิลลิกรัมต่อลิตร.....	98
ง.6 ปริมาณฟีนอลที่เหลืออยู่ (มิลลิกรัมต่อลิตร) ของเซลล์ตรึงในซีลิกา EntA ในการย่อยสลายฟีนอลที่ความเข้มข้น 625-10,000 มิลลิกรัมต่อลิตร.....	100
ง.7 ปริมาณฟีนอลที่เหลืออยู่ (มิลลิกรัมต่อลิตร) ของเซลล์ตรึงบนซีลิกา KAb เมื่อใช้ในการย่อยสลายฟีนอลอย่างต่อเนื่อง.....	102
ง.8 ปริมาณฟีนอลที่เหลืออยู่ (มิลลิกรัมต่อลิตร) ของเซลล์ตรึงในซีลิกา EntA เมื่อใช้ในการย่อยสลายฟีนอลอย่างต่อเนื่อง.....	102
ง.9 ปริมาณฟีนอลที่เหลืออยู่ (มิลลิกรัมต่อลิตร) ของเซลล์ตรึงบนซีลิกา KAb เมื่อใช้ในการย่อยสลายฟีนอลอย่างต่อเนื่อง.....	103
ง.10 ปริมาณฟีนอลที่เหลืออยู่ (มิลลิกรัมต่อลิตร) ของเซลล์ตรึงในซีลิกา EntA เมื่อใช้ในการย่อยสลายฟีนอลอย่างต่อเนื่อง.....	104
จ.1 จำนวนแบคทีเรียระหว่างการย่อยสลายฟีนอลของเซลล์อิสระที่ความเข้มข้น 625-20,000 มิลลิกรัมต่อลิตร.....	105
จ.2 จำนวนแบคทีเรียที่ถูกตรึงบนซีลิกา KAa.....	107
จ.3 จำนวนแบคทีเรียที่ถูกตรึงบนซีลิกา KAac.....	107
จ.4 จำนวนแบคทีเรียที่ถูกตรึงบนซีลิกา KAb.....	108
จ.5 จำนวนแบคทีเรียที่ถูกตรึงบนซีลิกา KAbb.....	108
จ.6 จำนวนแบคทีเรียที่ถูกตรึงในซีลิกา KBaE.....	108
จ.7 จำนวนแบคทีเรียที่ถูกตรึงในซีลิกา EntA.....	109
จ.8 จำนวนแบคทีเรียระหว่างการย่อยสลายฟีนอลของเซลล์ตรึงบนซีลิกา KAb ที่ความเข้มข้น 625-10,000 มิลลิกรัมต่อลิตร.....	109
จ.9 จำนวนแบคทีเรียระหว่างการย่อยสลายฟีนอลของเซลล์ตรึงในซีลิกา EntA ที่ความเข้มข้น 625-10,000 มิลลิกรัมต่อลิตร.....	112
จ.10 จำนวนแบคทีเรียระหว่างการทดลองของซีลิกา KAb เมื่อใช้ในการย่อยสลาย ฟีนอลอย่างต่อเนื่อง.....	114
จ.11 จำนวนแบคทีเรียระหว่างการทดลองของซีลิกา EntA เมื่อใช้ในการย่อยสลาย ฟีนอลอย่างต่อเนื่อง.....	115

ตารางที่

หน้า

จ.12 จำนวนแบคทีเรีย ณ วันที่ 0 และ 55 ของเซลล์ตรึงบนซิลิกา KAb.....	115
จ.13 จำนวนแบคทีเรีย ณ วันที่ 0 และ 55 ของเซลล์ตรึงในซิลิกา EntA.....	116
ฉ.1 อัตราการย่อยสลายฟีนอลที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 625-10,000 มิลลิกรัมต่อลิตร.....	117



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญภาพ

รูปที่	หน้า
2.1 <i>Methylobacterium populi</i> sp. nov.	9
2.2 แผนภาพการย่อยสลายพีนอลแบบใช้ออกซิเจน.....	11
2.3 การใช้พันธะโควาเลนต์ (Covalent binding method)	12
2.4 การเกาะหรือดูดซับ (Adsorption method)	13
2.5 การเชื่อมขวาง (Cross-linking method)	13
2.6 การกักขัง (Entrapment and Encapsulation method)	14
2.7 ลักษณะโครงสร้างของซิติลิกา.....	17
2.8 กลไกในการเกิดโครงสร้างของเมโซพอร์ซิติลิกา.....	20
3.1 อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM ที่เลี้ยงกลุ่มแบคทีเรียเป็นเวลา 5 วัน เมื่อเปรียบเทียบกับที่เวลา 0 วัน.....	27
3.2 การสังเคราะห์ซิติลิกา KAa และ KAac	28
3.3 การสังเคราะห์ซิติลิกา KBa.....	29
3.4 การสังเคราะห์ซิติลิกา EntA.....	30
3.5 การสังเคราะห์ซิติลิกา KAb, KAac, KAbb และ KAabc.....	31
3.6 การสังเคราะห์ซิติลิกา KBaE.....	32
3.7 การกำจัดสารลดแรงตึงผิวออกจากซิติลิกาโดยใช้สารละลายผสมระหว่าง น้ำกับเอทานอล (1:4,v/v)	33
3.8 การกำจัดสารลดแรงตึงผิวออกจากซิติลิกา KBa.....	34
4.1 ปริมาณพีนอลที่เหลืออยู่ (%) ของเซลล์อิสระในการย่อยสลายพีนอล ที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 625-20,000 มิลลิกรัมต่อลิตร.....	40
4.2 ปริมาณพีนอลที่เหลืออยู่ (%) ของชุดควบคุมในการย่อยสลายพีนอล ที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 625- 20,000 มิลลิกรัมต่อลิตร.....	40
4.3 จำนวนแบคทีเรียระหว่างการย่อยสลายพีนอลของเซลล์อิสระ.....	41
4.4 ลักษณะของซิติลิกา KAa และ KAac.....	42
4.5 ลักษณะของซิติลิกา KBa.....	43
4.6 ลักษณะของซิติลิกา EntA ที่ไม่มีแบคทีเรีย.....	43
4.7 ลักษณะของซิติลิกา KAb และ KAbb (a) และซิติลิกา KAac และ KAabc (b).....	44
4.8 ลักษณะของซิติลิกา KBaE ที่ไม่มีแบคทีเรีย.....	45

รูปที่	หน้า
4.9 ลักษณะพื้นผิวภายนอกของซีลิกาที่ได้จากการสังเคราะห์ (As-synthesized) (a) KAa, (b) KAac, (c) KAb, (d) KAbb, (e) EntA และ (f) KBaE ที่กำลังขยาย 5,000 เท่า.....	47
4.10 รูปแบบการเบี่ยงเบนรังสีเอ็กซ์ของซีลิกาที่สังเคราะห์ขึ้นโดยใช้สารตั้งต้น ซีลิกาที่ไม่ผ่านการเผา (เส้นที่บ) และซีลิกาที่ผ่านการเผา (เส้นประ).....	49
4.11 ลักษณะของซีลิกาที่ถูกตรึงแบบคทีเรีย ดังรูป (a) KAa (b) KAac (c) KAb และ (d) KAbb.....	53
4.12 จำนวนแบคทีเรียที่ถูกตรึงบนซีลิกา KAa, KAac, KAb และ KAbb.....	54
4.13 ลักษณะของซีลิกา (a) KAa, (c) KAac, (e) KAb และ (g) KAbb ก่อนตรึงเซลล์ และ (b) KAa, (d) KAac, (f) KAb และ (h) KAbb ที่ผ่านการตรึงเซลล์โดยวิธีการ สังเคราะห์แบบยัดเกาะ กำลังขยาย 5,000 เท่า.....	55
4.14 ลักษณะของเซลล์ตรึงด้วยวิธีการกักขังในซีลิกา (a) EntA (b) KBaE.....	56
4.15 จำนวนแบคทีเรียที่ถูกตรึงบนซีลิกา EntA และ KBaE	57
4.16 ลักษณะของซีลิกา (a) EntA และ (c) KBaE ก่อนตรึงเซลล์ และ (b) EntA และ (d) KBaE ที่ผ่านการตรึงเซลล์โดยวิธีการสังเคราะห์แบบการกักขัง (a) EntA และ (b) KBaE กำลังขยาย 5,000 เท่า.....	58
4.17 ปริมาณฟีนอลที่ถูกกำจัดเมื่อเวลาผ่านไป 10 วัน ที่ความเข้มข้นฟีนอล เริ่มต้น 5,000 มิลลิกรัมต่อลิตร.....	60
4.18 ปริมาณฟีนอลที่ถูกดูดซับโดยซีลิกาเมื่อเวลาผ่านไป 10 วัน ที่ความเข้มข้นฟีนอล เริ่มต้น 5,000 มิลลิกรัมต่อลิตร.....	60
4.19 ปริมาณฟีนอลที่เหลืออยู่ (%) ของเซลล์ตรึงบนซีลิกา KAb ในการย่อยสลายฟีนอล ที่ความเข้มข้น 625-10,000 มิลลิกรัมต่อลิตร.....	61
4.20 ปริมาณฟีนอลที่เหลืออยู่ (%) ของชุดควบคุม ซีลิกา KAb ในการย่อยสลายฟีนอล ที่ความเข้มข้น 625-10,000 มิลลิกรัมต่อลิตร.....	62
4.21 จำนวนแบคทีเรียระหว่างการย่อยสลายฟีนอลของเซลล์ตรึงบนซีลิกา KAb.....	63
4.22 ปริมาณฟีนอลที่เหลืออยู่ (%) ของเซลล์ตรึงในซีลิกา EntA ในการย่อยสลายฟีนอล ที่ความเข้มข้น 625-10,000 มิลลิกรัมต่อลิตร.....	64
4.23 ปริมาณฟีนอลที่เหลืออยู่ (%) ของชุดควบคุม ซีลิกา EntA ในการย่อยสลายฟีนอล ที่ความเข้มข้น 625-10,000 มิลลิกรัมต่อลิตร.....	64
4.24 จำนวนแบคทีเรียระหว่างการย่อยสลายฟีนอลของเซลล์ตรึงในซีลิกา EntA.....	65

รูปที่	หน้า
4.25 การนำเซลล์ตรึงบนซิลิกา KAb มาใช้ในการย่อยสลายฟีนอลอย่างต่อเนื่อง (a) และปริมาณเซลล์ระหว่างการทดลอง (b) ถูกตรวจวัดการเติมฟีนอล 500 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อเซลล์ตรึงย่อยสลายฟีนอลหมด.....	66
4.26 การนำเซลล์ตรึงในซิลิกา EntA มาใช้ในการย่อยสลายฟีนอลอย่างต่อเนื่อง (a) และปริมาณเซลล์ระหว่างการทดลอง (b) ถูกตรวจวัดการเติมฟีนอล 500 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อเซลล์ตรึงย่อยสลายฟีนอลหมด.....	67
4.27 การนำเซลล์ตรึงบนซิลิกา KAb มาใช้ในการย่อยสลายฟีนอลอย่างต่อเนื่อง ที่ความเข้มข้น 5,000 มิลลิกรัมต่อลิตร ถูกตรวจวัดการเติมฟีนอล 5,000 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อเซลล์ตรึงย่อยสลายฟีนอลหมด.....	68
4.28 การนำเซลล์ตรึงในซิลิกา EntA มาใช้ในการย่อยสลายฟีนอลอย่างต่อเนื่อง ที่ความเข้มข้น 5,000 มิลลิกรัมต่อลิตร ถูกตรวจวัดการเติมฟีนอล 5,000 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อเซลล์ตรึงย่อยสลายฟีนอลหมด.....	68
4.29 จำนวนแบคทีเรีย ณ วันที่ 0 และ 55 ของเซลล์ตรึงบนซิลิกา KAb และ EntA.....	69
4.30 ลักษณะของเซลล์ตรึงเมื่อใช้อย่างต่อเนื่องเป็นเวลา 55 วัน ดังรูป (a) KAb และ (b) EntA.....	70
4.31 ลักษณะของเซลล์ตรึงบนซิลิกา KAb (a) และ EntA (b) ที่ผ่านการบำบัดฟีนอล ที่กำลังขยาย 5,000 เท่า.....	70
ค.1 กราฟมาตรฐานความเข้มข้นของฟีนอลที่ความเจือจาง 10,000 เท่า สำหรับเซลล์อิสระ.....	88
ค.1 กราฟมาตรฐานความเข้มข้นของฟีนอลที่ความเจือจาง 1,000 เท่า สำหรับเซลล์ตรึง.....	89
ค.1 กราฟมาตรฐานความเข้มข้นของฟีนอลที่ความเจือจาง 10,000 เท่า สำหรับเซลล์ตรึง.....	90
ข.1 กราฟอัตราการย่อยสลายฟีนอลที่ความเข้มข้นต่างๆ ที่ลดลงต่อเวลาของเซลล์อิสระ เซลล์ตรึง KAb และเซลล์ตรึง EntA	118

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

OD_{500} = ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 500 นาโนเมตร
 OD_{578} = ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 578 นาโนเมตร



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ฟินอลเป็นสารที่มีความเป็นพิษต่อสิ่งมีชีวิตทุกชนิดในสิ่งแวดล้อม หากมนุษย์หรือสัตว์ได้รับสารเหล่านี้เข้าไป แม้เพียงแค่การสัมผัสภายนอกหรือหายใจจะทำให้เกิดการระคายเคืองในบริเวณที่สัมผัสทั้งผิวหนังและเยื่อเมือกต่างๆ ได้ และถ้าได้รับในปริมาณที่สูงจะเกิดการสะสมในร่างกาย ซึ่งส่งผลให้เกิดความผิดปกติที่ระบบหมุนเวียนโลหิต (สุชาติา ชินะจิตร์, 2006) ฟินอลและอนุพันธ์ของฟินอลเป็นสารตั้งต้นในอุตสาหกรรมเคมีหลายชนิด โดยถูกใช้เป็นส่วนผสมในเคมีภัณฑ์ชนิดต่างๆ เช่น สี ยาคับกลิ่น และยาฆ่าแมลง จะเห็นได้ว่าการนำเอาผลิตภัณฑ์เหล่านี้มาใช้ในชีวิตประจำวันอย่างแพร่หลายจึงมีโอกาที่สารเหล่านี้จะเกิดการปนเปื้อนสู่ดินและแหล่งน้ำได้ เนื่องจากสารเหล่านี้มีความเป็นขั้วสูงละลายน้ำได้ดี โดยทางองค์การอนามัยโลก (WHO) ได้มีการกำหนดให้มีความเข้มข้นของฟินอลอยู่ในน้ำดื่มได้ในปริมาณไม่เกิน 1.0 ไมโครกรัมต่อลิตร นอกจากนี้ฟินอลยังจัดเป็นสารมลพิษที่มีอันตรายมากที่สุดประเภทหนึ่งที่ US Environment Protection Agency (EPA) ได้เสนอให้มีการควบคุมคุณภาพของน้ำโดยมีปริมาณฟินอลได้สูงสุดไม่เกิน 1.0 ไมโครกรัมต่อลิตร และกระทรวงวิทยาศาสตร์ เทคโนโลยีและสิ่งแวดล้อม ประเทศไทย ฉบับที่ 3 (พ.ศ.2539) ได้กำหนดมาตรฐานควบคุมการระบายน้ำทิ้งจากแหล่งกำเนิดประเภทโรงงานอุตสาหกรรม และนิคมอุตสาหกรรมให้มีปริมาณฟินอลไม่เกิน 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ก่อนปล่อยออกสู่แหล่งน้ำ ธรรมชาติ ดังนั้นจึงมีความพยายามพัฒนาเทคโนโลยีที่มีประสิทธิภาพสำหรับการกำจัดฟินอลและสารที่เป็นอนุพันธ์ของฟินอลออกจากแหล่งน้ำธรรมชาติ

จากการศึกษาที่ผ่านมามีรายงานว่าจุลินทรีย์หลายชนิดที่สามารถย่อยสลายฟินอลที่ปนเปื้อนในธรรมชาติ เช่น แบคทีเรีย รา และยีสต์ เป็นต้น โดยเฉพาะในกลุ่มของแบคทีเรียนั้นมีการศึกษากันอย่างกว้างขวาง ซึ่งจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายฟินอล ได้แก่ *Acinetobacter* sp., *Alcaligenese eutrophus*, *Bacillus stearothermophilus*, *Candida* spp., *Nocardia* sp., *Pseudomonas* sp., และ *Rhodococcus* sp. เป็นต้น (Hsieh และคณะ, 2008) ต่อมาได้มีงานวิจัยเกี่ยวกับการตรึงเซลล์จุลินทรีย์บนวัสดุต่างๆ เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการย่อยสลายฟินอลของจุลินทรีย์เหล่านี้ เช่น Ehrhardt และ Rehm (1985) ศึกษาการย่อยฟินอลโดยการตรึงเซลล์จุลินทรีย์บนถ่านกัมมันต์ พบว่าจุลินทรีย์ที่ไม่ได้ตรึงบนถ่านกัมมันต์ไม่สามารถทนต่อความเข้มข้นของฟินอลที่สูงกว่า 1.5 กรัมต่อลิตร แต่ *Candida* sp. และ *Pseudomonas* sp. ที่ตรึงบนถ่านกัมมันต์ สามารถมีชีวิตรอดที่ความเข้มข้นของฟินอลสูงประมาณ 15.0 กรัมต่อลิตร Wang และคณะ

(2007) ได้นำแบคทีเรียมาทำการตรึงเซลล์บนพอลิไวนิลแอลกอฮอล์ (Polyvinyl alcohol) พบว่าทำให้ทนต่อความเข้มข้นของฟีนอลได้สูงประมาณ 500 มิลลิกรัมต่อลิตร ภายในเวลา 9 ชั่วโมง และช่วยป้องกันแบคทีเรียเมื่อมีการเปลี่ยนอุณหภูมิ ความเป็นกรด-ด่าง และสามารถเก็บที่ 4 องศาเซลเซียส ได้นาน 50 วัน Santos และคณะ (2008) ศึกษาการย่อยสลายฟีนอลโดย *Aureobasidium pullulans* FE13 ที่ได้จากการคัดแยกเชื้อจากน้ำเสียที่ปล่อยจากโรงงานอุตสาหกรรมพบว่าการตรึงเซลล์บนอัลจิเนต ทำให้แบคทีเรียมีอัตราการย่อยสลายฟีนอลได้สูงสุดประมาณ 18.35 มิลลิกรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง โดยเซลล์ที่ไม่ถูกตรึงจะทนและย่อยฟีนอลได้น้อยกว่าเซลล์ที่ถูกตรึงบนอัลจิเนต และจาก Pazarlioglu และคณะ (2005) ศึกษาการย่อยสลายฟีนอลโดย *Pseudomonas putida* ที่ถูกตรึงบนหินพัมมิช พบว่า *P. putida* ที่ถูกตรึงเซลล์บนหินพัมมิชสามารถย่อยสลายฟีนอลได้ประมาณ 1.0 กรัมต่อลิตร ในเวลา 22 ชั่วโมง และสามารถใช้เซลล์ตรึงซ้ำได้

การตรึงเซลล์ถูกดัดแปลงมาจากการตรึงเอนไซม์ โดยเป็นการจำกัดขอบเขตหรือสถานที่ทางกายภาพของเซลล์ให้อยู่ในบริเวณที่กำหนด แต่เซลล์ยังคงรักษาสมบัติในการเป็นแหล่งผลิตเอนไซม์ให้มีความสามารถในการเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ซึ่งสามารถใช้เซลล์ตรึงนี้ซ้ำและใช้อย่างต่อเนื่องได้ โดยเซลล์ที่ถูกตรึงนี้อาจอยู่ในสถานะเซลล์ที่กำลังเจริญ เซลล์ระยะพัก หรือเซลล์ที่ตายแล้ว ซึ่งเทคนิคในการตรึงเซลล์มี 3 วิธี คือ การยัดด้วยตัวนำ (carrier-binding method) การเชื่อมขวาง (cross-linking method) และการกักขัง (entrapment method) เนื่องจากการตรึงเซลล์ต้องทำในภาวะปลอดเชื้อ ต้องเลือกสารพาหะที่ทนต่อความร้อนและความดันได้สูง สารพาหะไม่ควรเป็นอันตรายต่อเซลล์และสิ่งแวดล้อม และไม่ควรกระทบกระเทือนต่อระบบเมแทบอลิซึมของจุลินทรีย์ นอกจากนี้ยังพิจารณาในด้านราคา การยอมรับและความสามารถในการนำกลับมาใช้ได้อีก (Chibata และ Wingard, 1983)

ปัจจุบันมีการศึกษาเกี่ยวกับการตรึงแบคทีเรียบนซิลิกา โดยซิลิกาเป็นสารดูดซับที่ได้รับค่านิยมมากที่สุดในงานด้านการวิเคราะห์ เนื่องจากซิลิกาเป็นวัสดุที่มีความเสถียรสูง ทนต่อแรงกระทำทางกายภาพและทางเคมี สามารถใช้งานได้ในช่วง pH ที่กว้าง และมีสมบัติเป็นไฮโดรฟิลิก (hydrophilic) ไม่บวมน้ำ จึงสามารถใช้กับสารตัวอย่างที่มีน้ำเป็นตัวทำละลายได้ดี การสังเคราะห์ซิลิกาด้วยกระบวนการโซล-เจล จะได้ซิลิกาที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของรูพรุนต่างๆ เช่น ไมโครพอร์ซิลิกา (< 2 nm) เมโซพอร์ซิลิกา (2-50 nm) และแมโครพอร์ซิลิกา (> 50 nm) สำหรับสารตั้งต้นที่นิยมใช้ในการสังเคราะห์ซิลิกา ได้แก่ เทตระอัลคอกซีไฮโดรเจน เช่น เทตระเอทอกซีไฮโดรเจน (tetraethoxysilane, TEOS) โดยมีตัวทำละลาย ได้แก่ เมทานอลหรือเอทานอล เพื่อให้ซิลิกอนอัลคอกซีไฮดรอกไซด์รวมเป็นเนื้อเดียวกับน้ำได้ดีขึ้น ส่วนตัวเร่งปฏิกิริยาที่ใช้ อาจเป็นกรดหรือเบสก็ได้ นอกจากนี้ อาจมีการเติมสารต้นแบบลงไปด้วยเพื่อช่วยป้องกันการแตกของซิลิกาในขั้นตอนการ

ทำให้แห้ง (Boos และคณะ, 2002) จากการศึกษาของ Nassif และคณะ (2002) และ Alvarez และคณะ (2007) พบว่าการตรึงเซลล์แบคทีเรียในซิลิกาที่มีขนาดของรูพรุนเป็นไมโครพอร์ซิลิกาสามารถเก็บเซลล์ที่ถูกตรึงในซิลิกาได้นาน ข้อดีของซิลิกาเมื่อใช้ตรึงเซลล์จะช่วยให้แบคทีเรียทนต่อสภาพแวดล้อมที่มีการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิ ความเป็นกรด-เบส และสามารถเก็บแบคทีเรียที่ตรึงบนซิลิกาไว้ได้เป็นเวลานาน รวมทั้งอาจช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการย่อยสลายสารพิษ

นอกจากนี้ยังมีรายงานเกี่ยวกับการนำซิลิกามาใช้ตรึงแบคทีเรียสำหรับย่อยสลายฟีนอล ดังเช่นงานวิจัยของ Branyik และคณะ (1998) ศึกษาการตรึงจุลินทรีย์เพื่อย่อยสลายฟีนอล โดยเปรียบเทียบระหว่างการตรึงเซลล์ในซิลิกาเจลชนิด prepolymerized TEOS กับการตรึงเซลล์ในพอลิยูริเทนโฟม พบว่าประสิทธิภาพในการย่อยสลายฟีนอลเป็นดังนี้ เซลล์อิสระ < เซลล์ตรึงในพอลิยูริเทนโฟม < เซลล์ตรึงในซิลิกา แสดงว่าการตรึงเซลล์ในซิลิกาเจลสามารถนำไปบำบัดฟีนอลได้ แต่ซิลิกาดังกล่าวมีวิธีการเตรียมที่ยุ่งยาก และใช้ระยะเวลาในการสังเคราะห์นาน ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีจุดมุ่งหมายเพื่อพัฒนาวิธีการสังเคราะห์ซิลิกาที่ใช้วิธีการสังเคราะห์ สารเคมี และระยะเวลาในการสังเคราะห์ให้น้อยลง แล้วนำซิลิกามาตรึงเชื่อมผสมระหว่าง *Methylobacterium* sp. NP3 และ *Acinetobacter* sp. PK1 ที่สามารถย่อยสลายฟีนอล จากการศึกษาของ นันท์ธรรภากราช (2550) พบว่า *Methylobacterium* sp. NP3 สามารถเจริญได้อย่างช้าๆ ในสภาวะที่มีฟีนอลความเข้มข้นสูง การตรึงเซลล์บนซิลิกาจะช่วยเพิ่มความอยู่รอดของแบคทีเรียเมื่อนำไปใช้ย่อยสลายฟีนอลที่ความเข้มข้นสูง และสามารถนำแบคทีเรียที่ถูกตรึงกลับมาใช้ซ้ำได้ งานวิจัยนี้เริ่มจากการสังเคราะห์ซิลิกาทั้งหมด 9 ชนิด แล้วนำมาตรึงแบคทีเรียด้วยวิธีที่แตกต่างกัน 2 วิธี คือ การตรึงเซลล์แบบยึดเกาะ (Attachment) และการตรึงเซลล์แบบกักขัง (Encapsulation) หลังจากนั้นศึกษาเปรียบเทียบประสิทธิภาพการย่อยฟีนอลของเชื่อมผสมทั้งแบบเซลล์ตรึงและเซลล์อิสระ โดยใช้ฟีนอลที่ความเข้มข้น 625-10,000 มิลลิกรัมต่อลิตร ทำยที่สุดคัดเลือกเซลล์ตรึงที่มีประสิทธิภาพการย่อยสลายฟีนอลความเข้มข้นสูง มาศึกษาความเป็นไปได้ในการนำเซลล์ตรึงกลับมาใช้ซ้ำอย่างต่อเนื่อง

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

เพื่อเตรียมซิลิกาสำหรับตรึงเชื่อมผสมระหว่าง *Methylobacterium* sp. NP3 และ *Acinetobacter* sp. PK1 และศึกษาประสิทธิภาพการย่อยฟีนอลของเชื่อมผสมที่ตรึงบนซิลิกา

1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ได้แบคทีเรียที่ตรึงบนซิลิกาสำหรับย่อยสลายฟีนอลที่มีความเข้มข้นสูงในน้ำ และสามารถนำเซลล์ที่ตรึงแล้วกลับมาใช้ซ้ำได้

บทที่ 2

ปรีทัศน์วรรณกรรม

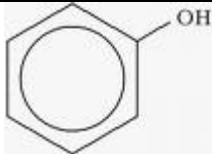
2.1 ปัญหาของฟีนอลที่ปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อม

ปัจจุบันปัญหาด้านมลพิษในสิ่งแวดล้อมได้ทวีความรุนแรงอย่างเห็นได้ชัด อันเป็นผลมาจากการขยายตัวทางการผลิตทั้งภาคเกษตรกรรมและอุตสาหกรรม ฟีนอลและอนุพันธ์ของฟีนอลเป็นสารตั้งต้นในอุตสาหกรรมเคมีหลายชนิด โดยถูกใช้เป็นส่วนผสมในเคมีภัณฑ์ชนิดต่างๆ เช่น สี ยาดับกลิ่น และยาฆ่าแมลง จะเห็นได้ว่าการนำเอาผลิตภัณฑ์เหล่านี้มาใช้ในชีวิตประจำวันอย่างแพร่หลายจึงมีโอกาที่สารเหล่านี้จะเกิดการปนเปื้อนสู่ดินและแหล่งน้ำได้ ทางองค์การอนามัยโลก (WHO) จึงได้มีการกำหนดให้ฟีนอลอยู่ในน้ำดื่มได้ในปริมาณไม่เกิน 1.0 ไมโครกรัมต่อลิตร นอกจากนี้ฟีนอลยังจัดเป็นสารมลพิษที่มีอันตรายมากที่สุดประเภทหนึ่งที่ US Environment Protection Agency (EPA) ได้เสนอให้มีการควบคุมคุณภาพของน้ำ โดยมีปริมาณฟีนอลได้สูงสุดไม่เกิน 1.0 ไมโครกรัมต่อลิตร และกระทรวงวิทยาศาสตร์ เทคโนโลยีและสิ่งแวดล้อม ประเทศไทย ฉบับที่ 3 (พ.ศ.2539) ได้กำหนดมาตรฐานควบคุมการระบายน้ำทิ้งจากแหล่งกำเนิดประเภทโรงงาน อุตสาหกรรมและนิคมอุตสาหกรรมให้มีปริมาณฟีนอลไม่เกิน 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ก่อนปล่อยออกสู่แหล่งน้ำธรรมชาติ ดังนั้นจึงมีความพยายามพัฒนาเทคโนโลยีที่มีประสิทธิภาพสำหรับการกำจัดฟีนอล และสารที่เป็นอนุพันธ์ของฟีนอล เช่น การสกัดด้วยตัวทำละลาย การดูดซับด้วยถ่านกัมมันต์ และการย่อยสลายทางชีวภาพ

2.1.1 ฟีนอล (phenol)

ฟีนอล คือ สารประกอบที่มีโครงสร้างเป็นวงแหวนโรมาติกและมีหมู่แทนที่ที่สำคัญ คือ หมู่ไฮดรอกซิล ซึ่งต่ออยู่กับคาร์บอนที่มีไฮบริดเซชันเป็น sp^2 บนวงแหวนโรมาติก ฟีนอลเป็นของแข็งไม่มีสี ถ้าบริสุทธิ์จะขาวขุ่น สูตรโครงสร้างและสมบัติทางกายภาพของฟีนอลแสดงในตารางที่ 2.1

ตารางที่ 2.1 สูตรโครงสร้างและสมบัติทางกายภาพของฟีนอล

ชื่อเรียก	Benzenol, hydroxybenzene, monophenol, oxybenzene, phenyl alcohol, phenyl hydrate, phenyl hydroxide Carbollic acid, phenic acid, phenic alcohol
โครงสร้างทางเคมี	
จุดหลอมเหลว °C	43
จุดเดือด °C	181.8
ความดันไอที่ 25 °C	0.3513
ความหนาแน่นที่ 20 °C	1.0576
ค่าการละลายในน้ำ g/L ที่ 25 °C	87
Log KOW	1.46
น้ำหนักโมเลกุล	94.12
สูตรอย่างง่าย	C ₆ H ₆ O

(ที่มา: Toxicological review of phenol (CAS No. 108-95-2))

2.1.2 ความเป็นพิษของฟีนอล

ฟีนอลจัดเป็นสารที่มีความเป็นพิษต่อสิ่งมีชีวิตทุกชนิดในระบบ การสัมผัสฟีนอลภายนอก ร่างกายหรือหายใจ จะทำให้เกิดการระคายเคืองในบริเวณที่สัมผัสทั้งผิวหนังและเยื่อบุอวัยวะต่างๆได้ หากได้รับเข้าสู่ร่างกาย จะเกิดการระคายเคืองบริเวณเยื่อต่างๆ ในระบบทางเดินอาหาร และถ้าได้รับในปริมาณที่สูง จะเกิดการสะสมในร่างกาย ทำให้เกิดความผิดปกติที่ระบบหมุนเวียนโลหิต เกิดอาการโลหิตจาง ความดันโลหิต และการเต้นของหัวใจผิดปกติ นอกจากนั้นยังมีผลต่อการทำงานของระบบทางเดินหายใจ ทำให้หายใจลำบาก เกิดอาการชักกระตุก ส่งผลต่อการทำงานของระบบประสาท อาจทำให้ตับและไตถูกทำลาย และเสียชีวิตได้ในที่สุด (สุชาติตา ชินะจิตร , 2006)

2.1.3 แหล่งที่มาของน้ำเสียปนเปื้อนฟีนอล

ฟีนอลและอนุพันธ์ของฟีนอลเป็นสารตั้งต้นในอุตสาหกรรมเคมีหลายชนิด โดยถูกใช้เป็นส่วนผสมในเคมีภัณฑ์ชนิดต่างๆ เช่น สี ยาดับกลิ่น และยาฆ่าแมลง เป็นต้น จะเห็นได้ว่าการนำเอาผลิตภัณฑ์เหล่านี้มาใช้ในชีวิตประจำวันอย่างแพร่หลาย จึงมีโอกาที่สารเหล่านี้จะเกิดการปนเปื้อนสู่ดินและแหล่งน้ำได้ เนื่องจากฟีนอลและอนุพันธ์ของฟีนอลมีความเป็นขั้วสูงละลายน้ำได้ดี ตัวอย่างแหล่งที่มีน้ำเสียปนเปื้อนฟีนอล ได้แก่ โรงงานอุตสาหกรรมยางไม้ โรงงานถ่านหิน โรงกลั่น น้ำมันปิโตรเลียม เป็นต้น (Pazarlioglu และคณะ, 2005)

2.1.4 การจัดการน้ำเสียที่ปนเปื้อนฟีนอล

การกำจัดฟีนอลและสารที่เป็นอนุพันธ์ของฟีนอลออกจากน้ำที่ปนเปื้อน สามารถใช้วิธีการดั้งเดิม เช่น การสกัดด้วยตัวทำละลาย การดูดซับด้วยถ่านกัมมันต์ หรือการออกซิไดซ์ด้วยสารเคมี เป็นต้น (Godjevargova และคณะ, 2006) กระบวนการบำบัดน้ำเสียที่ปนเปื้อนฟีนอลในปริมาณสูง สามารถบำบัดโดยวิธีทางกายภาพ เช่น การสกัดด้วยตัวทำละลาย หรือวิธีทางชีวภาพ เช่น การใช้ตะกอนสลัดจ์ หรือหิวเชื้อผสมที่ไม่ต้องการอากาศ แต่วิธีดังกล่าวมีข้อเสียคือค่าใช้จ่ายสูง และเกิดผลิตภัณฑ์ที่มีอันตราย (Pazarlioglu และคณะ, 2005) นอกจากนี้แบคทีเรียส่วนใหญ่ไม่สามารถทนต่อฟีนอลความเข้มข้นสูงได้ ดังนั้นจึงเกิดแนวคิดที่จะพัฒนาวิธีการตรึงเซลล์แบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายฟีนอลดังกล่าวลงบนซิลิกา เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพให้เซลล์สามารถย่อยสลายฟีนอลที่ความเข้มข้นสูงได้ และไม่เกิดเป็นผลิตภัณฑ์ที่เป็นอันตราย

2.2 จุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายฟีนอล

จุลินทรีย์จำนวนมาก สามารถย่อยสลายฟีนอลโดยใช้ออกซิเจน เพื่อเป็นแหล่งคาร์บอน และแหล่งพลังงานสำหรับการเจริญ ตัวอย่างของจุลินทรีย์ ดังกล่าว ได้แก่ *Acinetobacter calcoaceticus*, *Alcaligenes eutrophus*, *Bacillus stearothermophilus*, *Burkholderia cepacia* G4, *Nocardia* sp., *Nocardioides* sp., *Pseudomonas pickettii*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas resinovorans*, *Ralstonia eutropha*, *Rhodococcus* sp., *Candida* spp., *Fusarium* sp. และ *Trichosporon cutaneum* (Shalaby, 2003) โดยเฉพาะอย่างยิ่ง *Pseudomonas putida* ได้ถูกนำมาใช้อย่างกว้างขวางในการย่อยสลายฟีนอล เนื่องจากเป็นแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพสูงในการย่อยสลายฟีนอล (Hannaford และ Kuek, 1999 : Barron และคณะ, 2000 : Banerjee และคณะ, 2001 : Chung และคณะ, 2003) ตัวอย่างจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการย่อยสลายฟีนอลแสดงดังตารางที่ 2.2

ตารางที่ 2.2 จุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการย่อยสลายฟีนอล

ลักษณะของเซลล์	จุลินทรีย์	แหล่งที่มาของจุลินทรีย์	ความเข้มข้นเริ่มต้นของฟีนอล (กรัมต่อลิตร)	ความสามารถในการย่อยสลายฟีนอล (%)	เอกสารอ้างอิง
- เซลล์อิสระ - เซลล์ตรึงบนถ่านกัมมันต์	- <i>Candida</i> sp. - <i>Pseudomonas</i> sp.	น้ำเสีย	1.5 15.0	100% 90%	Ehrhardt และ Rehm (1985)
- เซลล์อิสระ - เซลล์ตรึงบนอัลจิเนต	<i>Pseudomonas putida</i> ATCC11172	ATCC, ประเทศสหรัฐอเมริกา	0.5 1.5	100% 100%	Hannaford และ Kuek (1999)
- เซลล์อิสระ - เซลล์ตรึงบนอัลจิเนต	<i>Pseudomonas putida</i> CCRC14365	Food Industry Research and Development Institute ประเทศไต้หวัน	0.6 1.0	59.5% 75%	Chung และคณะ (2003)
-เซลล์อิสระ -เซลล์ตรึงบนหินพัมมิช	<i>Pseudomonas putida</i> 50026	DSMZ ประเทศเยอรมัน	1.0 1.0	100% 100%	Pazarlioglu และคณะ (2005)
-เซลล์อิสระ -เซลล์ตรึงบน Polyvinyl alcohol (PVA)	<i>Acinetobacter</i> sp. PD12	Activated sludge	0.5 0.5	100% 100%	Wang และคณะ (2007)
-เซลล์อิสระ -เซลล์ตรึงบนไคโตซาน	<i>Pseudomonas putida</i> BCRC14349	Bioresource Collection and Research Center ประเทศไต้หวัน	0.1 0.1	40% 100%	Hsieh และคณะ (2008)

2.2.1 แบคทีเรียย่อยสลายฟีนอลที่ใช้ในการศึกษานี้

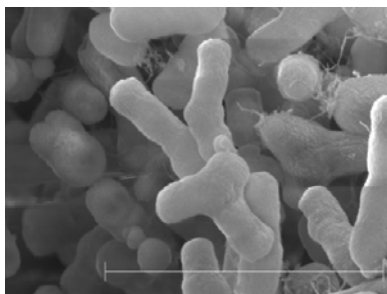
จากงานวิจัยที่ผ่านมาพบว่าแบคทีเรียส่วนใหญ่ที่นำมาใช้ในการย่อยสลายฟีนอลนั้นสามารถย่อยสลายฟีนอลได้สูงสุดที่ความเข้มข้น 1.5 กรัมต่อลิตรเท่านั้น ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงสนใจที่จะพัฒนาวิธีที่ทำให้แบคทีเรียสามารถย่อยสลายฟีนอลที่มีความเข้มข้นสูงมากขึ้นได้ โดยเน้นศึกษาแบคทีเรีย 2 ชนิด ได้แก่ *Methylobacterium* sp. NP3 และ *Acinetobacter* sp. PK1

2.2.1.1 *Methylobacterium* sp. NP3

โดยทั่วไป *Methylobacterium* เป็นแบคทีเรียจำพวก facultative methylotroph หมายถึงเป็นแบคทีเรียที่สามารถใช้สารประกอบที่มีคาร์บอนหนึ่งตัว เช่น มีเทน หรือที่มีคาร์บอนมากกว่าได้ (Chistoserdova และคณะ, 2003) เป็นแบคทีเรียที่เคลื่อนที่ได้ มีรูปร่างเป็นแท่ง และเป็น obligately aerobic สามารถเรียกได้ว่า PPFMs ซึ่งย่อมาจาก pink-pigmented facultative methylotrophs เนื่องจากสายพันธุ์ส่วนใหญ่ของ *Methylobacterium* จะผลิตรงควัตถุสีชมพู อนุกรมวิธานของ *Methylobacterium* sp. แสดงดังตารางที่ 2.3 ลักษณะของโคโลนี คือ สีชมพู กลม และนูน จัดอยู่ในกลุ่มของแบคทีเรียแกรมลบ มีแฟลกเจลล่าที่ขั้ว เจริญได้ค่อนข้างช้า ในบางครั้งอาจใช้ในการกระตุ้นการงอกของเมล็ดและการเจริญเติบโตของพืชได้ เนื่องจากสามารถผลิตสาร phytohormones และในบางสายพันธุ์ถูกพบว่าเป็นหนึ่งในเชื้อท้องถิ่นบริเวณเท้าของมนุษย์ (Zhang, 2004)

ตารางที่ 2.3 Taxonomy of *Methylobacterium* sp.

Kingdom	Bacteria
Phylum	Proteobacteria
Class	Alpha Proteobacteria
Order	Rhizobiales
Family	Methylobacteriaceae
Genus	Methylobacterium



รูปที่ 2.1 *Methylobacterium populi* sp. nov.

(ที่มา: van Aken และคณะ, 2004)

Methylobacterium sp. NP3 เป็นแบคทีเรียที่คัดแยกจากดิน สามารถย่อยสลายฟีนอลอย่างมีประสิทธิภาพ แต่เจริญช้า (นันทธร เกียรราช, 2550) ยังไม่มีรายงานการใช้ *Methylobacterium* sp. ในการย่อยสลายฟีนอล แต่นำไปใช้ในการย่อยสลายไดคลอโรมีเทน (Roche, 1963) และการย่อยสลายไดเมทิล ไอโซทาเลท (Li และ Gu, 2007) ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงสนใจที่จะนำ *Methylobacterium* sp. NP3 มาตรึงบนซิลิกา เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการย่อยสลายฟีนอล

2.2.1.2 *Acinetobacter* sp. PK1

แบคทีเรียในสกุล *Acinetobacter* sp. มีลักษณะสำคัญ คือเป็นแบบที่เรียกรูปร่างกลม-แท่งประเภทแกรมลบที่ไม่เคลื่อนที่ (non-motile Gram-negative coccobacilli) ซึ่งบางครั้งอาจติดสปีด้ายแบคทีเรียแกรมบวกได้ รูปร่างของเชื้ออาจเป็นได้ทั้งรูปร่างแบบกลมหรือแบบแท่ง แต่มักจะพบแบบกลมในอาหารเลี้ยงเชื้อแบบเหลว และในช่วงแรกของการเจริญเติบโต นอกจากนี้ อาจมีรูปร่างที่แตกต่างกันออกไป ทำให้สามารถจำแนกเชื้อชนิดนี้ออกจากเชื้ออื่นๆ ที่ก่อโรคในสิ่งส่งตรวจได้ยาก การเจริญเติบโตของเชื้อนี้เป็นแบบอาศัยออกซิเจนเท่านั้น (Surasarang และคณะ, 2007) ตามอนุกรมวิธาน *Acinetobacter* sp. เป็นสกุลหนึ่งในวงศ์ *Moraxellaceae* ซึ่งประกอบด้วยแบคทีเรียในสกุล *Moraxella*, *Acinetobacter* และ *Psychrobacter* รวมทั้งเชื้ออื่นที่มีความสัมพันธ์กับเชื้อเหล่านี้ แสดงดังตารางที่ 2.4

ตารางที่ 2.4 Taxonomy of *Acinetobacter* sp.

Kingdom	Bacteria
Phylum	Proteobacteria
Class	Gamma Proteobacteria
Order	Pseudomonadales
Family	Moraxellaceae
Genus	<i>Acinetobacter</i>

Paller และคณะ (1995) ศึกษาการย่อยสลายฟีนอลโดย *Acinetobacter calcoaceticus* NCIB 8250 พบว่าสามารถใช้ฟีนอลเป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงานโดยวิธีการตัดที่ตำแหน่งออร์โท และสามารถย่อยสลายฟีนอลได้สูงสุดที่ 150 มิลลิกรัมต่อชั่วโมง ในระบบแบบกึ่งต่อเนื่อง (fed batch) และพบว่าแบคทีเรียนี้สามารถถูกชักนำโดยฟีนอลให้สร้างเอนไซม์ฟีนอลไฮโดรซิเลส (phenol hydroxylase) และแคตาคอล 1,2 ไดออกซิจีเนส (catechol-1,2-dioxygenase)

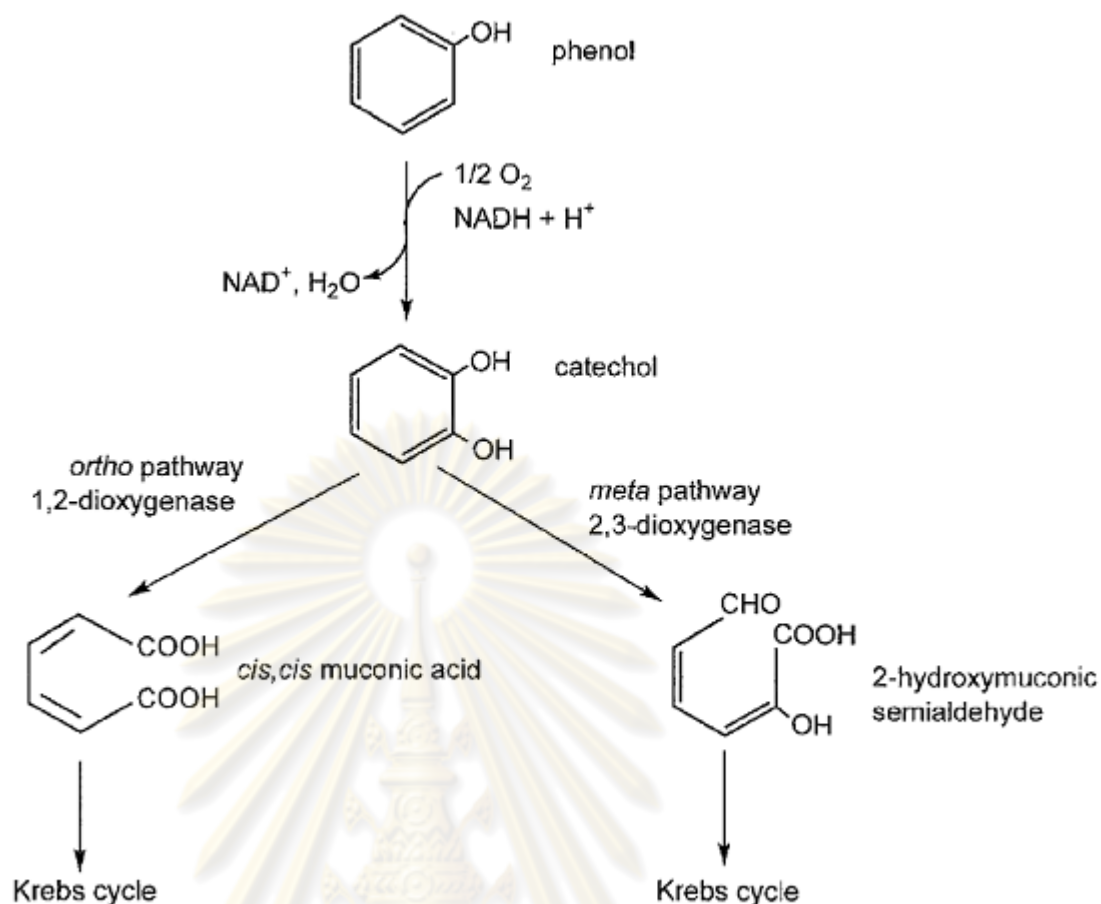
Acinetobacter sp. PK1 ที่ใช้ในงานวิจัยนี้ถูกคัดแยกจากอาหารที่มีการเจริญของ *Methylobacterium* sp. NP3 เนื่องจากแบคทีเรียทั้ง 2 ชนิด มีการเจริญร่วมกันในระหว่างการเพาะเลี้ยงจึงเรียกว่าเชื้อผสม

2.2.2 วิธีการย่อยสลายฟีนอล

จากการศึกษาก่อนหน้านี้พบว่าฟีนอลสามารถย่อยสลายได้ทั้งแบบอาศัยออกซิเจน และแบบไม่อาศัยออกซิเจน ทั้งนี้งานวิจัยส่วนใหญ่สนใจการย่อยสลายฟีนอลในภาวะที่มีออกซิเจน ดังเช่นงานวิจัยของ Varga และ Neujahr (1970) คัดแยกเชื้อจากดิน เพื่อศึกษาวิธีการย่อยสลายฟีนอล พบว่าจากการคัดแยกเชื้อจากดินจีนัส *Pseudomonas* และ *Moraxella* สามารถย่อยสลายฟีนอลโดยผลิตเอนไซม์ที่สามารถเปลี่ยนฟีนอลให้เป็นแคตาคอล (catechol) ซึ่งเป็นสารตัวกลางของการย่อยสลาย และเปลี่ยนแคตาคอลไปเป็น *cis,cis*-muconate โดย intradiol cleavage และสามารถเปลี่ยนแคตาคอลไปเป็น α -hydroxy muconic semi-aldehyde โดย extradiol cleavage จากนั้นก็จะเข้าสู่ key metabolites เพื่อเข้าสู่วัฏจักรเครปต่อไป

Dong และคณะ (1992) ศึกษาขึ้นของ *Bacillus stearothermophilus* FDTP-3 และ *Escherichia coli* ที่สามารถย่อยสลายฟีนอล พบว่ามีขึ้นสำหรับการย่อยสลายของฟีนอลแบบอาศัยออกซิเจนเริ่มต้นจากการเติมออกซิเจนเข้าไปในโมเลกุล โดยใช้เอนไซม์ฟีนอลไฮโดรซิเลส เพื่อเปลี่ยนแปลงโครงสร้างเกิดเป็นแคตาคอล ต่อมาก็เกิดการแตกวงของสารแคตาคอล ซึ่งสามารถเกิดได้ 2 ตำแหน่ง คือ ตำแหน่งออร์โทและตำแหน่งเมตา ซึ่งการแตกวงของแคตาคอลที่ตำแหน่งต่างกันนั้น ส่งผลให้เกิดสารผลิตภัณฑ์ที่แตกต่างกัน ซึ่งสารต่างๆ ที่เกิดขึ้นจะเข้าสู่วัฏจักรเครปต่อไป

ซึ่งคาดว่า *Methylobacterium* sp. NP3 และ *Acinetobacter* sp. PK1 อาจจะมีการย่อยสลายฟีนอลแบบใช้ออกซิเจน แสดงดังรูปที่ 2.2 เนื่องจากเป็นแบคทีเรียที่ต้องการออกซิเจนในการเจริญ ซึ่งจากวิธีการย่อยสลายฟีนอลคาดว่าจะไม่มีผลิตภัณฑ์ที่มีพิษมากขึ้นจากกระบวนการย่อยสลายทางชีวภาพ



รูปที่ 2.2 การย่อยสลายฟีนอลแบบใช้ออกซิเจน

(ที่มา: van Schie และคณะ, 2000)

2.2.3 ปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายฟีนอล

โดยทั่วไปแบคทีเรียที่เป็นเซลล์อิสระมีความสามารถในการย่อยสลายฟีนอลได้ในระดับที่มีความเข้มข้นฟีนอลต่ำๆ เนื่องจากฟีนอลเป็นสารเคมีอันตรายที่มีผลต่อเซลล์แบคทีเรียโดยจะทำให้สูญเสียความสมบูรณ์ของเยื่อเซลล์ และรบกวนการทำงานของ membrane barrier รวมทั้งยับยั้งการทำหน้าที่ของ membrane protein ส่งผลให้แบคทีเรียตายเมื่อความเข้มข้นของฟีนอลสูง (Keweloh และคณะ, 1990 และ Heipieper และคณะ, 1992) และปัจจัยที่มีผลต่อการย่อยสลายฟีนอลอย่างมีประสิทธิภาพ ได้แก่ pH ความเข้มข้นของฟีนอล และอุณหภูมิ

Hannaford และ Kuek (1999) ศึกษาการย่อยสลายฟีนอลโดยเซลล์ตรึงบนอัลจิเจต ควบคู่กับการศึกษาปัจจัยที่เกี่ยวข้อง เช่น pH และอุณหภูมิ จากการศึกษพบว่าที่ pH ระหว่าง 6.5 ถึง 7.0 และอุณหภูมิประมาณ 30 ถึง 34 องศาเซลเซียส ทำให้เพิ่มประสิทธิภาพในการย่อยสลายฟีนอล

Khleifat (2006) ศึกษาผลของแหล่งคาร์บอนเสริม (ฟรุกโตส แลคโตส กลูโคส มอลโตส ซูโครส กรดซัคซินิก และแมนนิทอล) แหล่งไนโตรเจน และภาวะสำหรับการเจริญต่อการย่อยสลายฟีนอล (ความเข้มข้นฟีนอล ค่า pH อุณหภูมิที่ใช้บ่ม และอัตราการเติมอากาศ) โดย *Ewingella americana* พบว่าแบคทีเรียนี้สามารถใช้ฟีนอลอย่างเดี่ยวเป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงาน แต่ฟีนอลมีผลในการยับยั้งอัตราการเจริญเมื่อความเข้มข้นของฟีนอลสูงสุดประมาณ 1,000 ppm โดยอัตราการเจริญของ *Ewingella americana* สูงสุดที่ความเข้มข้นของฟีนอลประมาณ 300 ppm สำหรับเซลล์ที่ขาดแคลนและไม่ขาดแคลนแหล่งคาร์บอนเสริม โดยมีอัตราการย่อยสลายประมาณ 0.32 และ 0.29 ppm ต่อชั่วโมง ตามลำดับ ซึ่งภาวะที่เหมาะสมต่อการย่อยสลายฟีนอล คือ การบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส pH 7.5 และการเขย่าที่ 200 รอบต่อนาที

2.3 การตรึงเซลล์แบคทีเรีย

2.3.1 กระบวนการตรึงเซลล์ (Cell immobilization process)

เทคนิคในการตรึงเซลล์มี 3 วิธี คือ การยึดด้วยตัวนำ (carrier-binding method) การเชื่อมขวาง (cross-linking method) และการกักขัง (entrapment method) (Chibata และคณะ, 1978)

1. การยึดด้วยตัวนำ (Carrier-binding method) หมายถึง การเชื่อมเซลล์จุลินทรีย์กับสารพาหะโดยตรง แบ่งได้ 2 วิธี คือ

1.1 การใช้พันธะโควาเลนต์ (Covalent binding method) เป็นวิธีการเชื่อมเซลล์โดยตรงกับสารพาหะ โดยสารที่ใช้เชื่อมนั้นสามารถต่อกับส่วนประกอบที่ยึดเซลล์ ได้แก่ กลุ่มอะมิโน กลุ่มคาร์บอกซิล กลุ่มซัลไฟดริล กลุ่มไฮดรอกซิล กลุ่มอิมิดาโซล หรือกลุ่มฟีนอลของโปรตีน วิธีนี้มีข้อดีคือ เซลล์เชื่อมอยู่ผิวหน้าของตัวอย่างอย่างสม่ำเสมอ มีความคงตัวดี และการรั่วไหลของเซลล์น้อย (Cheetham, 1980) แต่มีข้อเสีย เนื่องจากการตรึงเซลล์ด้วยวิธีนี้ค่อนข้างรุนแรง และความเป็นพิษของสารที่ใช้อาจทำให้เซลล์สูญเสียความสามารถได้ ตัวกลางที่นิยมใช้คือ เซลลูโลส เด็กซ์ทราน แป้ง กลูโคส ซิลิกาที่มีรูพรุน และแก้วที่มีรูพรุน เป็นต้น (รูปที่ 2.3)

. Covalent bonding to carrier

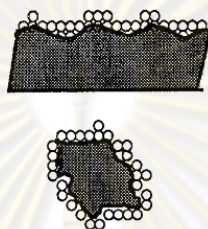


รูปที่ 2.3 การใช้พันธะโควาเลนต์ (Covalent binding method)

(ที่มา: Cassidy และคณะ, 1996)

1.2 การเกาะหรือดูดซับ (Adsorption method) เป็นวิธีการตรึงเซลล์โดยให้เซลล์ดูดซับกับสารที่เป็นตัวนำด้วยพันธะไอออนิก หรือพันธะไฮโดรเจน (Cheetham, 1980) โดยอาศัยหลักการทางธรรมชาติเคมี เนื่องจากผนังของเซลล์ประกอบด้วย diaminopimelic acid และ hexosamines ซึ่งสามารถเกิดพันธะไอออนิกกับตัวนำได้ (Koshcheenko, 1981) การตรึงวิธีนี้เป็นวิธีที่ง่าย แต่แรงดูดซับค่อนข้างอ่อนแอก่อนและมีการสูญเสียเซลล์ได้ง่าย เมื่อมีการเปลี่ยนแปลงค่า pH การไหลของน้ำ การเกิดฟองอากาศ และเมื่อมีการแบ่งเซลล์ (รูปที่ 2.4)

. Adsorption to surfaces



รูปที่ 2.4 การเกาะหรือดูดซับ (Adsorption method)

(ที่มา: Cassidy และคณะ, 1996)

2. การเชื่อมขวาง (Cross-linking method) หมายถึง การเชื่อมเซลล์เข้าด้วยกัน โดยใช้สารพวไก (bi-) หรือมัลติฟังก์ชันนอลรีเอเจนต์ (multifunctional reagent) เช่น กลูทาร์ลดีไฮด์ และโกลูอิน ไดไฮโซไซยานต (Chibata และคณะ, 1978) เป็นต้น วิธีนี้จะใช้สารเคมีภายใต้ภาวะที่ค่อนข้างจะรุนแรง ทำให้เซลล์สูญเสียความสามารถในการดำรงชีวิตได้ (รูปที่ 2.5)

Cross-linking of cells



รูปที่ 2.5 การเชื่อมขวาง (Cross-linking method)

(ที่มา: Cassidy และคณะ, 1996)

3. การกักขัง (Entrapment method)

การตรึงเซลล์ด้วยวิธีนี้จะต่างจากการตรึงเซลล์ด้วยวิธีทางเคมีโดยที่ไม่ได้มีการเชื่อมติดหรือไม่มีพันธะเกิดขึ้นระหว่างเซลล์กับสารพาหะ ดังนั้นจึงสามารถใช้ได้กับเซลล์ทุกชนิด การตรึงเซลล์ด้วยวิธีนี้แบ่งได้เป็น 2 วิธี (รูปที่ 2.6) คือ

3.1 การตรึงแบบไมโครแคปซูล (Microencapsulation) หมายถึง การกักขังเซลล์ไว้ในเยื่อผ่านได้ (semipermeable membrane) เช่น collodian หรือ silicone ซึ่งป้องกันการซึมผ่านของเซลล์ได้ แต่ยอมให้สารตั้งต้นและผลิตภัณฑ์ที่ซึมผ่านได้อย่างอิสระ การตรึงด้วยวิธีนี้เป็นวิธีที่ง่ายแต่ไม่แข็งแรงพอที่จะใช้ในอุตสาหกรรม และอาจมีปัญหากการตกตะกอนของเซลล์เกิดขึ้นด้วย (Cheetham, 1980)

3.2 การตรึงเซลล์แบบแลตทิซ (Lattice type) หมายถึง การตรึงเซลล์โดยการกักขังไว้ในช่องว่าง 3 มิติ ในเจลของสารพอลิเมอร์ การตรึงเซลล์ด้วยวิธีกักขังทั่วไปจะหมายถึง แบบแลตทิซ ซึ่งเป็นวิธีที่ได้รับความนิยมและประสบความสำเร็จมากที่สุด เนื่องจากใช้ได้กับเซลล์ทุกชนิด (Cheetham, 1980)



Entrapment

Encapsulation

รูปที่ 2.6 การกักขัง (Entrapment and Encapsulation method)

(ที่มา: Cassidy และคณะ, 1996)

การตรึงเซลล์ด้วยวิธีการกักขังนี้นิยมใช้สารพวก biochemically inert hydrogel เป็นตัวกักขัง โดยให้หลักการเกิดเจลซึ่งให้เกิดโครงสร้าง 3 มิติ ที่มีลักษณะเป็นรูพรุน โดยกลไกในการเกิดเจลขึ้นกับสารพาหะที่ใช้ ดังแสดงในตารางที่ 2.5 (ภาวินี คณาสวัสดิ์, 2537)

เนื่องจากการเตรียมเซลล์ที่ถูกตรึงมีหลายวิธี ดังนั้นสมบัติของสารพาหะที่เหมาะสมในการตรึงเซลล์แต่ละวิธีอาจมีข้อปลีกย่อยที่แตกต่างกันไป แต่โดยทั่วไปแล้วปัจจัยที่สำคัญในการพิจารณาจะคล้ายคลึงกันคือ สมบัติเชิงกล (mechanical properties) สมบัติทางกายภาพ (physical properties) ความแข็งแรง ความชอบน้ำ (hydrophilicity) สภาพให้ซึมผ่านได้ (permeability) ความทนต่อสภาวะแวดล้อมทางกายภาพ สารเคมี การย่อยสลายโดยจุลินทรีย์

และแรงกระทบ เนื่องจากการตรึงเซลล์ต้องทำในภาวะปลอดเชื้อ จึงต้องเลือกสารพาหะที่ทนต่อความร้อนและความดันได้สูง สารพาหะไม่ควรเป็นอันตรายต่อเซลล์และสิ่งแวดล้อม และไม่ควรถูกกระทบกระเทือนต่อระบบเมตาบอลิซึม นอกจากนี้อาจพิจารณาในด้านราคา การยอมรับ และความสามารถในการนำกลับมาใช้ได้อีก (วิเชียร ลีลาวัชรมาศ, 2524 และ ภรณ์ ลิ้มปิสุต, 2538)

ตารางที่ 2.5 วิธีกักขังเซลล์ด้วยวิธีการทำให้เกิดเจลโดยพอลิเมอร์ของสารอินทรีย์ (ที่มา: ภาวินี คณาสวัสดิ์, 2537)

กลไกการเกิดเจล	สารพาหะ
พอลิเมอไรเซชัน (Polymerization)	พอลิอะคริลาไมด์ พอลิเมทาคริเลต
การเชื่อมขวาง (Cross-linking)	พรีพอลิเมอร์ โปรตีน
พอลิคอนเดนเซชัน (Polycondensation)	พอลิยูริเทน เอพอกซีเรซิน
การเกิดเจลเนื่องจากความร้อน (Thermal gelation)	คอลลาเจน เจลลาติน เอการ์ เอกาโรส แคมป์ปาคาร์ราจีแนน
การเกิดเจลแบบไอโอโนโทรปิก (Ionotropic gelation)	อัลจิเนต ชิโทซาน
การตกตะกอน (Precipitation)	เซลลูโลส เซลลูโลสไตรอะซิเตต

ในการทดลองนี้ได้เลือกใช้วิธีการตรึงเซลล์แบบยึดเกาะ (Attachment) และแบบกักขัง (Encapsulation) บนซิลิกา เนื่องจากทั้ง 2 วิธีนี้มีข้อดีในเรื่องของการเพิ่มกิจกรรมทางเมแทบอลิซึม เพิ่มปริมาณการสร้างสารเมแทบอลิท์ ปกป้องเซลล์จากสารที่มีความเป็นพิษ และปัจจัยภายนอกทั้งทางกายภาพ และทางชีวภาพ เช่น bacteriophage และ protozoa เพิ่มอัตราการอยู่รอดของเซลล์ให้สูงยิ่งขึ้น เพิ่มความหนาแน่นของเซลล์ส่งเสริมการเจริญของเซลล์ สามารถนำมาใช้ได้หลายครั้งและสามารถใช้อย่างต่อเนื่องได้ (Wang และคณะ, 2007)

2.3.2 การตรึงเซลล์เพื่อย่อยสลายฟีนอล

ตัวอย่างงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการตรึงเซลล์บนวัสดุต่างๆ อาทิเช่น อัลจิเนต พอลิไวนิลแอลกอฮอล์ (PVA) ไคโตซาน ถ่านกัมมันต์ เป็นต้น เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการย่อยสลายฟีนอลของจุลินทรีย์ ได้แก่

Ehrhardt และ Rehm (1985) ศึกษาการย่อยฟีนอลโดยการตรึงเซลล์จุลินทรีย์บนถ่านกัมมันต์ พบว่าจุลินทรีย์ที่ไม่ได้ตรึงบนถ่านกัมมันต์ไม่สามารถทนต่อความเข้มข้นของฟีนอลที่สูงกว่า

1.5 กรัมต่อลิตร แต่ *Candida* sp. และ *Pseudomonas* sp. ที่ตรึงบนถ่านกัมมันต์สามารถมีชีวิตรอดที่ความเข้มข้นของฟีนอลสูงประมาณ 15.0 กรัมต่อลิตร

Pazarlioglu และคณะ (2005) ศึกษาการย่อยสลายฟีนอลโดย *P. putida* ที่ถูกตรึงบนหินพัมมิช พบว่า *P. putida* ที่ถูกตรึงเซลล์บนหินพัมมิชสามารถย่อยสลายฟีนอลได้ประมาณ 1.0 กรัมต่อลิตร ในเวลา 22 ชั่วโมง และสามารถใช้เซลล์ตรึงซ้ำได้

Wang และคณะ (2007) ได้นำแบคทีเรียมาทำการตรึงเซลล์บน Polyvinyl alcohol (PVA) พบว่าทำให้ทนต่อความเข้มข้นของฟีนอลได้สูงประมาณ 500 มิลลิกรัมต่อลิตร ภายในเวลา 9 ชั่วโมง และช่วยป้องกันแบคทีเรียเมื่อมีการเปลี่ยนอุณหภูมิ pH และสามารถเก็บที่ 4 องศาเซลเซียส ได้นาน 50 วัน จากผลการทดลองพบว่าเซลล์ตรึงของ *Acinetobacter* sp. เป็นการนำมาประยุกต์ใช้ได้ดีในการแก้ปัญหาการปนเปื้อนของฟีนอลในแหล่งน้ำ

Santos และคณะ (2008) ศึกษาการย่อยสลายฟีนอลโดย *Aureobasidium pullulans* FE13 ที่ได้จากการคัดแยกเชื้อจากน้ำเสียที่ปล่อยจากโรงงานอุตสาหกรรมพบว่าการตรึงเซลล์บนอัลจิเนต ทำให้แบคทีเรียมีอัตราการย่อยสลายฟีนอลได้สูงสุดประมาณ 20.45 มิลลิกรัมต่อลิตร ต่อชั่วโมง โดยเซลล์ที่ไม่ถูกตรึงจะทนและย่อยฟีนอลได้น้อยกว่าเซลล์ที่ถูกตรึงบนอัลจิเนต

Hsieh และคณะ (2008) ศึกษา sodium tripolyphosphate-crosslinked chitosan beads ตรึงด้วย *P. putida* สำหรับการย่อยสลายฟีนอล จากการศึกษาเพื่อทดสอบประสิทธิภาพของการย่อยสลายฟีนอลโดย *P. putida* ถูกตรึงภายในเม็ดปิดซึ่งเตรียมโดยการนำโคโตซานมาเชื่อมขวางด้วย sodium tripolyphosphate ทำให้เซลล์ตรึงในโคโตซานมีประสิทธิภาพสูงในการย่อยสลายฟีนอลเพื่อแก้ปัญหาหามลภาวะและน้ำเสียในสิ่งแวดล้อม

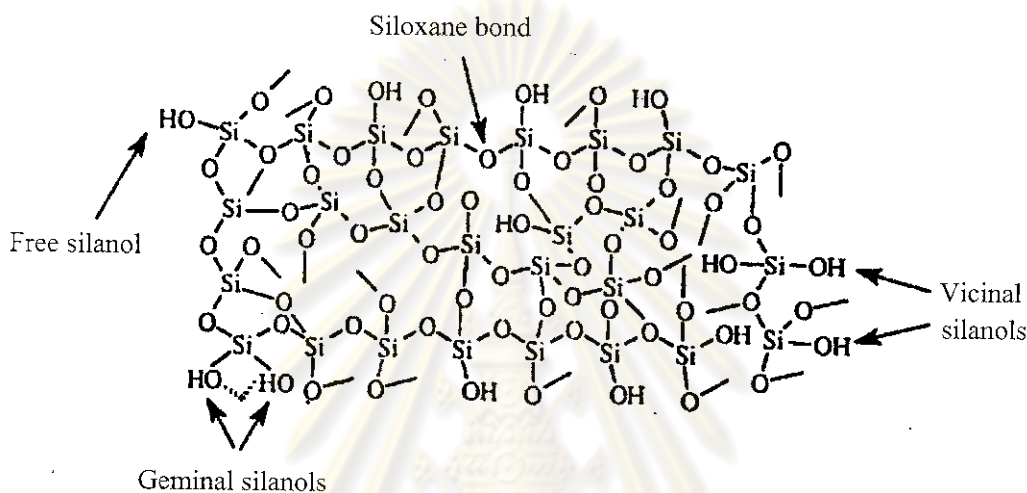
จากงานวิจัยที่กล่าวมาข้างต้น พบว่าการเซลล์ตรึงที่ผลิตขึ้นส่วนใหญ่ยังมีประสิทธิภาพในการย่อยสลายฟีนอลต่ำ (0.1-1.0 กรัมต่อลิตร) นอกจากนี้วัสดุบางชนิดที่ใช้มีความคงทนต่ำ เช่น อัลจิเนต แบคทีเรียตรึงไม่สามารถนำกลับมาใช้ซ้ำได้ เช่น อัลจิเนต รวมทั้งวัสดุส่วนใหญ่ที่ใช้มีราคาแพง เช่น พอลิไวนิลแอลกอฮอล์ (PVA) หรือดูดซับฟีนอลได้ดีเกินไป ทำให้แบคทีเรียไม่สามารถย่อยสลายฟีนอลได้ เช่น ถ่านกัมมันต์ เราจึงสนใจตรึงแบคทีเรียบนซิลิกา เนื่องจากซิลิกามีราคาไม่แพง ทนต่อแรงกระทำทางกายภาพและทางเคมี และไม่บวมน้ำ และสามารถนำกลับมาใช้ซ้ำได้

2.4 ซิลิกา (Silica)

2.4.1 ความรู้ทั่วไปเกี่ยวกับซิลิกา

ซิลิกา (SiO_2) ประกอบด้วยซิลิกอนและออกซิเจนจัดเรียงตัวในรูปแบบเตตระฮีดรัล (tetrahedral) แผ่ขยายออกไป 3 มิติ จนเกิดเป็นโครงร่างตาข่ายที่แข็งแรง มีลักษณะเป็นของแข็งที่

มีรูพรุน (pore) โดยซิลิกาจัดเป็นสารดูดซับที่ได้รับความนิยมมากที่สุดในงานด้านการวิเคราะห์ เนื่องจากซิลิกาเป็นวัสดุที่มีความเสถียรสูง ทนต่อแรงกระทำทางกายภาพและทางเคมี ไม่บวมน้ำ จึงสามารถใช้กับสารตัวอย่างที่มีน้ำเป็นตัวทำละลายได้ดี ซิลิกาประกอบด้วยหมู่ฟังก์ชันที่สำคัญ 2 หมู่ ได้แก่ พันธะซิลอกเซน (siloxane bond, Si-O-Si) และ หมู่ซิลานอล (silanol group, Si-OH) ซึ่งเป็นหมู่ที่ว่องไวต่อการเกิดปฏิกิริยามากกว่าพันธะซิลอกเซน เนื่องจากมีสมบัติเป็นกรดอ่อนๆ ซิลานอลมี 3 แบบ ได้แก่ free silanol, geminal silanol และ vicinal silanol (รูปที่ 2.7)



รูปที่ 2.7 ลักษณะโครงสร้างของซิลิกา (ที่มา: Nigel, 2000)

ซิลิกาสามารถแบ่งออกเป็นประเภทต่างๆ ได้โดยขึ้นกับเกณฑ์ที่ใช้แบ่ง เช่น

1. แบ่งตามขนาดรูพรุน (pore size) ซึ่งเป็นการแบ่งตาม IUPAC ได้แก่
 - 1.1 ไมโครพอร์ซิลิกา (microporous silica) คือ ซิลิกาที่มีขนาดของเส้นผ่านศูนย์กลางของรูพรุนน้อยกว่า 2 นาโนเมตร
 - 1.2 เมโซพอร์ซิลิกา (mesoporous silica) คือ ซิลิกาที่มีขนาดของเส้นผ่านศูนย์กลางของรูพรุนอยู่ระหว่าง 2 นาโนเมตร ถึง 50 นาโนเมตร
 - 1.3 แมโครพอร์ซิลิกา (macroporous silica) คือ ซิลิกาที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของรูพรุนมากกว่า 50 นาโนเมตร
2. แบ่งตามลักษณะการจัดเรียงตัวของโครงสร้าง ได้แก่
 - 2.1 Amorphous silica คือ ซิลิกาที่มีโครงสร้างแบบอสัณฐาน (ไม่เป็นระเบียบ)
 - 2.2 Crystalline silica คือ ซิลิกาที่มีการจัดเรียงตัวกันอย่างเป็นระเบียบ

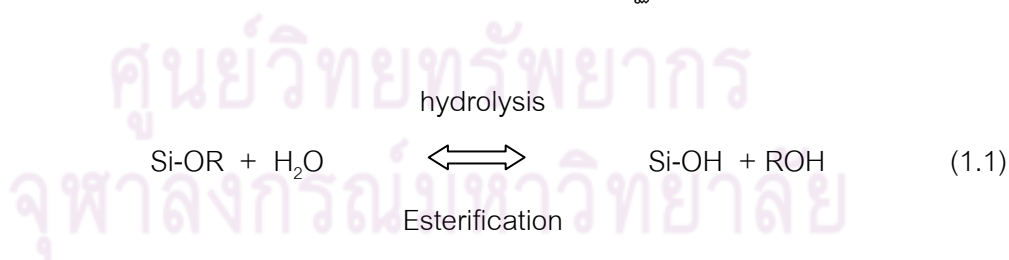
ข้อดี ข้อเสียของซิลิกา

ซิลิกามีความเสถียรสูง ทนต่อแรงกระทำทางกายภาพและทางเคมี สามารถใช้งานได้ในช่วง pH ที่กว้าง มีสมบัติเป็นไฮโดรฟิลิก (hydrophilic) และไม่บวมน้ำ จึงสามารถใช้กับสารตัวอย่างที่มีน้ำเป็นตัวทำละลายได้ดี อย่างไรก็ตาม ซิลิกาที่มีขายในเชิงการค้ายังขาดความจำเพาะเจาะจง โดยเฉพาะอย่างยิ่งสำหรับใช้ในการนำไปประยุกต์ใช้ทางด้านสกัดโลหะ ดังนั้นการเพิ่มความจำเพาะเจาะจงให้กับซิลิกาจึงเป็นสิ่งจำเป็น (Iller, 1979 และ Brinker และคณะ, 1990)

2.4.2 การสังเคราะห์ซิลิกา

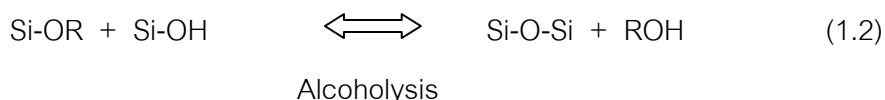
การสังเคราะห์ซิลิกาสามารถทำได้หลายวิธี เช่น การสังเคราะห์ซิลิกาในทางอุตสาหกรรม (Berthod, 1991) ทำโดยนำทรายมาหลอมรวมกับโซเดียมคาร์บอเนต เพื่อให้เกิดเป็นโซเดียมซิลิเกตซึ่งละลายน้ำได้ หลังจากนั้น จึงทำสารละลายดังกล่าวให้เป็นกรดด้วยกรดซัลฟิวริกเพื่อให้ได้ผง ซิลิกา หรือการสังเคราะห์ซิลิกาจากกรดซิลิซิก (silicic acid) โดยผ่านกระบวนการพอลิเมอไรเซชัน นอกจากนี้ซิลิกายังสามารถเตรียมผ่านกระบวนการโซล-เจล ซึ่งใช้ภาวะในการสังเคราะห์ไม่รุนแรงในการควบคุมปัจจัยต่างๆ (Nassif และคณะ, 2002) เพื่อให้ได้ซิลิกาที่มีสมบัติตามต้องการจึงทำได้ง่าย การสังเคราะห์ซิลิกาด้วยวิธีนี้มักใช้ซิลิกอนอัลคอกไซด์เป็นสารตั้งต้น เช่น tetramethoxysilane (TMOS) และ tetraethoxysilane (TEOS) ใช้แอลกอฮอล์เป็นตัวทำละลายที่นิยมได้แก่ เมทานอล เอทานอล และใช้ตัวเร่งปฏิกิริยาซึ่งอาจเป็นกรดหรือเบส โดยมีปฏิกิริยาเคมีที่เกี่ยวข้อง ดังนี้

1. ปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส (hydrolysis reaction) เป็นปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นระหว่างน้ำกับซิลิกอนอัลคอกไซด์เพื่อให้ได้หมูซิลานอลและมีแอลกอฮอล์เป็นผลิตภัณฑ์ร่วม (สมการที่ 1.1) ปฏิกิริยานี้สามารถเกิดได้เร็วขึ้นโดยใช้กรดหรือเบสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา



2. ปฏิกิริยาคอนเดนเซชัน (condensation reaction) เป็นปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นต่อเนื่องกันที่จากปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส โดยหมูซิลานอลจะทำปฏิกิริยากับซิลิกอนอัลคอกไซด์ (สมการที่ 1.2) หรือทำปฏิกิริยากันเอง (สมการที่ 1.3) ทำให้ได้พันธะซิลอกเซนเกิดขึ้น

Alcohol condensation

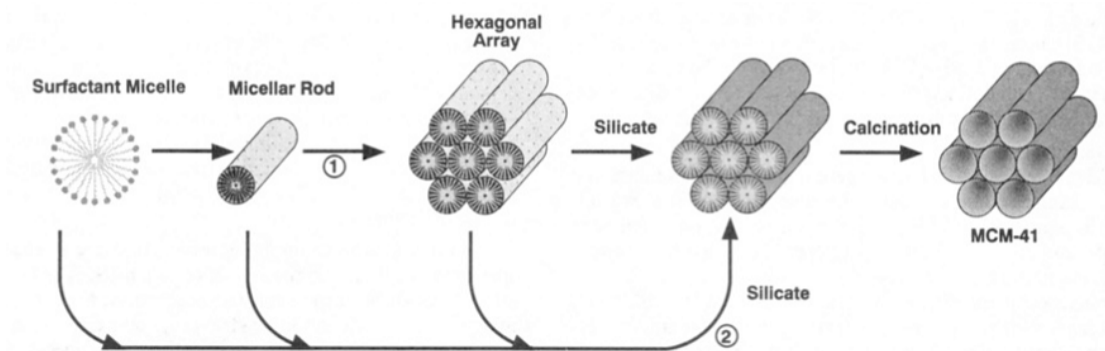


Water condensation



สำหรับสารตั้งต้นที่นิยมใช้ในการสังเคราะห์ซิลิกา ได้แก่ tetraethoxysilane (TEOS) โดยมีตัวทำละลาย ได้แก่ เมทานอลหรือเอทานอล ซึ่งช่วยให้ซิลิกอนอัลคอกไซด์รวมเป็นเนื้อเดียวกับน้ำ ได้ดีขึ้น ส่วนตัวเร่งปฏิกิริยาที่ใช้อาจเป็นกรดหรือเบสก็ได้ การสังเคราะห์แบบนี้ทำให้ได้ไมโครพอร์ซิลิกาที่มีพื้นที่ผิวน้อย นอกจากนี้ อาจมีการเติมสารลดแรงตึงผิว (surfactant) ลงไปด้วย เพื่อช่วยป้องกันการแตก (cracking) ของซิลิกาในขั้นตอนการทำให้แห้ง (drying) ถ้าเติมสารลดแรงตึงผิวในปริมาณที่มากกว่าค่า Critical Micellar Concentration (CMC) ของสารลดแรงตึงผิวชนิดนั้นๆ จะทำให้ซิลิกาที่สังเคราะห์ได้เป็นเมโซพอร์ซิลิกาที่มีพื้นที่ผิวสูง และมีการจัดเรียงตัวอย่างเป็นระเบียบ เนื่องจากสารลดแรงตึงผิวจะทำหน้าที่เป็นสารต้นแบบ (template) ให้กับซิลิกาด้วย ในขณะที่มีการสร้างโครงร่างตาข่ายของซิลิกา โดยชนิดของสารลดแรงตึงผิวที่ใช้ อาจเป็น cationic surfactant เช่น cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) หรือ anionic surfactant เช่น sodium dodecyl sulfate หรือ nonionic surfactant เช่น hexadecyl eicosane เป็นต้น (Boos และคณะ, 2002 ; Antonietti และคณะ, 1999 ; Yi และคณะ, 1998)

การสังเคราะห์ซิลิกาตามปฏิกิริยาข้างต้นมักได้ไมโครพอร์ซิลิกา ที่มีการจัดเรียงโครงสร้างอย่างไม่เป็นระเบียบ ต่อมาในปี 1992 Beck และคณะ ได้ค้นพบวิธีการสังเคราะห์เมโซพอร์ซิลิกาที่มีการจัดเรียงโครงสร้างอย่างเป็นระเบียบโดยใช้สารลดแรงตึงผิวชนิดแคตไออนที่มีหมู่ quaternary ammonium ทำหน้าที่เป็นสารต้นแบบ (template) โดยเมโซพอร์ซิลิกาที่เตรียมได้มีการจัดเรียงโครงสร้างเป็นแถวเรียงกันเป็นรูปทรงหกเหลี่ยม (hexagonal array) มีพื้นที่ผิวสูง (มากกว่า 1000 m²/g) และมีขนาดรูพรุนตั้งแต่ 85 Å– 120 Å จากข้อได้เปรียบนี้ จึงได้มีงานวิจัยจำนวนมากที่ศึกษาเกี่ยวกับการพัฒนาวิธีการเตรียมเมโซพอร์ซิลิกาเพื่อใช้ประโยชน์ด้านต่างๆ เช่น ใช้เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา หรือใช้เป็นสารดูดซับ เป็นต้น (Beck และคณะ, 1992) ดังรูปที่ 2.8



รูปที่ 2.8 กลไกในการเกิดโครงสร้างของเมโซพอร์ซิลิกาตามการเสนอของ Beck และคณะ (1992)

2.4.3 การศึกษาลักษณะทางกายภาพของซิลิกา

พื้นที่ผิวและขนาดรูพรุน

รูพรุนสามารถแบ่งออกได้หลายชนิดขึ้นอยู่กับเกณฑ์ที่ใช้แบ่ง เช่น แบ่งตามรูปร่างทางเรขาคณิต ได้แก่ รูพรุนที่เกิดจากแผ่นบาง (slits shape pore) ซึ่งพบมากใน activated clay รูพรุนที่มีรูปทรงกระบอก (cylinder shape pore) ซึ่งพบในออกไซด์บางประเภท เช่น อลูมินา, แมกนีเซียม เป็นต้น และรูพรุนที่เกิดจากช่องว่าง (void) ระหว่างอนุภาค เช่น ซิลิกา เป็นต้น

รูพรุนอาจมีลักษณะเดียวกันตลอด (uniform size) หรืออาจมีลักษณะเหมือนอุโมงค์ (funnel shape) หรือมีลักษณะคล้ายขวดหมึก (ink bottle shape) โดยรูพรุนดังกล่าวอาจเป็นรูปิด (close pore) รูเปิดเพียงรูเดียว (blind pore) หรือรูเปิดผ่านตลอด (through pore) ซึ่งรูพรุนเหล่านี้ อาจแยกออกเป็นอิสระจากรูพรุนอื่น (isolate pore) หรืออาจมีการเชื่อมโยงติดต่อกับรูพรุนข้างเคียงเกิดเป็น pore network ขึ้น

2.4.4 เทคนิคที่ใช้ในการบอกลักษณะ และขนาดของรูพรุน รวมทั้งการหาพื้นที่ผิวจำเพาะของซิลิกา (Sing และคณะ, 1958 และ Leofanti และคณะ, 1998)

ก. การหาพื้นที่ผิว และขนาดรูพรุนของสาร

เทคนิคที่เป็นที่นิยมใช้ในการบอกลักษณะ และขนาดของรูพรุน รวมทั้งการหาพื้นที่ผิวจำเพาะของซิลิกา ได้แก่ เทคนิค Nitrogen sorption analysis โดยลักษณะของรูพรุนสามารถพิจารณาได้จากรูปแบบของ N_2 adsorption-desorption isotherm พื้นที่ผิวของซิลิกาหาได้โดยอาศัย BET equation และขนาดรูพรุนคำนวณจาก BJH equation

ข. ความเป็นผลึก

การศึกษาลักษณะความเป็นผลึกของเมโซพอร์ซซิลิกา นั้นทำได้โดยใช้เทคนิคเอกซเรย์พาวเดอร์ดิฟแฟรคชัน (X-ray powder diffraction หรือ XRD) ซึ่งเป็นเทคนิคพื้นฐานที่ใช้ในการวิเคราะห์วัสดุโดยไม่ทำลายวัสดุนั้น เทคนิคนี้นิยมใช้เพื่อศึกษาเกี่ยวกับโครงสร้างผลึก การจัดเรียงตัวของอะตอมในโมเลกุลของสารประกอบต่างๆ ทั้งในเชิงคุณภาพและเชิงปริมาณโดยอาศัยหลักการเลี้ยวเบนและการกระเจิงของรังสีเอ็กซ์

ในงานวิจัยนี้ได้นำเทคนิค XRD มาใช้ในการตรวจสอบลักษณะเฉพาะของเมโซพอร์ซซิลิกา เพื่อพิสูจน์ว่าเมโซพอร์ซซิลิกาที่สังเคราะห์ได้นั้นเป็นผลึก (crystalline) หรือเป็นวัสดุอสัณฐาน (amorphous) โดยทั่วไปถ้าเป็นวัสดุอสัณฐานจะไม่ปรากฏพีกใดๆ ในเอกซเรย์ดิฟแฟรคโตแกรม ถ้าสารมีโครงสร้างเป็นผลึกจะพบพีกปรากฏในเอกซเรย์ดิฟแฟรคโตแกรมที่มีลักษณะต่างๆ กันอันเป็นลักษณะเฉพาะของโครงสร้างในสารแต่ละชนิด

2.5 ตัวอย่างงานวิจัยที่ศึกษาการตรึงเซลล์จุลินทรีย์บนซิลิกา

ในปัจจุบันมีการนำซิลิกามาใช้ตรึงเซลล์เพื่อการเก็บรักษาเชื้อ และการย่อยสลายสารเคมีอันตราย (ตารางที่ 2.6) ซิลิกามีข้อดีคือ ซิลิกามีความเสถียรสูง ทนต่อแรงกระทำทางกายภาพและทางเคมี สามารถใช้งานได้ในช่วง pH ที่กว้าง และมีสมบัติเป็นไฮโดรฟิลิก (hydrophilic) ไม่บวมน้ำ จึงสามารถใช้กับสารตัวอย่างที่มีน้ำเป็นตัวทำละลายได้ดี และที่สำคัญ ค่าใช้จ่ายในการสังเคราะห์ไม่แพง เมื่อนำซิลิกามาตรึงเซลล์จุลินทรีย์ จะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการทำงานของเซลล์ ช่วยเก็บรักษาเซลล์และเอนไซม์ในซิลิกาได้เป็นระยะเวลาสั้น และปราศจากการปนเปื้อน ป้องกันเซลล์จากสิ่งแวดล้อมภายนอก และสามารถนำวัสดุกลับมาใช้ใหม่ได้ (Alvarez และคณะ, 2007)

2.5.1 การตรึงเซลล์บนซิลิกาเพื่อเก็บรักษาเชื้อ

Fennouh และคณะ (2000) ตรึง *Escherichia coli* K12 ภายในซิลิกาด้วยวิธีการโซล-เจล พบว่าการตรึงเซลล์สามารถรักษากิจกรรมของเอนไซม์ได้ และเซลล์สามารถดำรงชีพอยู่ในซิลิกาได้มากกว่า 1 สัปดาห์ ที่อุณหภูมิห้อง

Nassif และคณะ (2002a) ศึกษาการมีชีวิตรอดของ *Escherichia coli* B (CIP-54125) ในซิลิกา โดยการตรึงเซลล์ในซิลิกา ซึ่งใช้สารตั้งต้นเป็นโซเดียมซิลิเกตในการสังเคราะห์ซิลิกาเพื่อใช้ตรึงแบคทีเรีย พบว่าการตรึงเซลล์ในซิลิกาสามารถเก็บรักษาเชื้อได้ดีกว่าเก็บในกลีเซอรอล

Nassif และคณะ (2002b) เก็บรักษา *Escherichia coli* B (CIP-54125) ในซิลิกา โดยวิธีการโซล-เจล พบว่า การตรึงเซลล์สามารถเก็บรักษาเชื้อใน wet gels ได้หลายสัปดาห์ ที่อุณหภูมิห้อง โดยปราศจากอาหาร ซึ่งสารเคมีไม่มีผลต่อเซลล์ของจุลินทรีย์

Desimone และคณะ (2005) ตีพิมพ์ *Escherichia coli* ในซิลิกาออกไซด์ เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการเก็บรักษา พบว่าการตรึง *Escherichia coli* สามารถเก็บรักษาเชื้อที่อุณหภูมิ 4 และ 20 องศาเซลเซียส ได้เป็นเวลา 60 วัน

2.5.2 การตรึงเซลล์บนซิลิกาเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพของเซลล์ในการย่อยสลายสารเคมีอันตราย

จากงานวิจัยที่ผ่านมาการตรึงเซลล์บนวัสดุต่างๆ เช่น อัลจิเนต ไคโตซาน ถ่านกัมมันต์ เป็นต้น สามารถช่วยเพิ่มประสิทธิภาพของเซลล์ในการย่อยสลายสารเคมีอันตรายได้ แต่ถ่านกัมมันต์มักจะดูดซับสารเคมีอันตราย ทำให้มีผลต่อการอยู่รอดของเซลล์ ส่วนไคโตซานบางชนิดก็มีราคาแพง จึงทำให้เกิดความสนใจที่จะใช้ซิลิกาเพื่อเป็นวัสดุในการตรึงเซลล์สำหรับย่อยสลายสารเคมีอันตราย ดังเช่นงานวิจัยดังต่อไปนี้

Branyik และคณะ (1998) ศึกษาการตรึงจุลินทรีย์ในซิลิกาเจล เพื่อย่อยสลายฟีนอลโดยการเปรียบเทียบระหว่างการตรึงเซลล์ในซิลิกาเจลกับการตรึงเซลล์ใน organic polyurethane ซึ่งประสิทธิภาพในการย่อยสลายฟีนอลเป็นดังนี้ เซลล์อิสระ < เซลล์ตรึงในพอลิยูรีเทนโฟม < เซลล์ตรึงในซิลิกา ซึ่งการตรึงเซลล์ในซิลิกาเจล สามารถนำไปบำบัดฟีนอลได้

Branyik และคณะ (2000) ศึกษาการย่อยสลายฟีนอลที่ความเข้มข้น 150 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยการตรึงเซลล์ด้วยวิธี sol-gel ในซิลิกา (SG) และตรึงแบบยึดเกาะบนโพลียูรีเทนโฟม (PU) และเซรามิกโฟม (C) พบว่าเซลล์ตรึงมีอัตราการย่อยสลายฟีนอลโดยเรียงลำดับจากมากไปน้อย ดังนี้ packed-bed reactor with ceramic form (PBRC) 598 > PBR (PU) 471 > PBR (SG) 394 > fluidized-bed reactor with PU (FBRPU) 161 > FBR (SG) 91 มิลลิกรัม ต่อลิตร ต่อชั่วโมง ตามลำดับ แต่ SG biocatalyst มีความหนาแน่นของเซลล์สูงที่พื้นผิวของซิลิกา ทำให้ใช้ในการย่อยสลายฟีนอลในระบบต่อเนื่องได้นานกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับวัสดุอื่น สำหรับ FBR มีช่องว่างบนพื้นผิวน้อยทำให้การย่อยสลายฟีนอลต่ำ ส่วน PBRC มีการคลุมเซรามิกโฟมด้วยเซลล์ตรึงในซิลิกาจึงช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการย่อยสลาย

จากงานวิจัยข้างต้น จะเห็นว่าประสิทธิภาพของเซลล์ตรึงบนซิลิกามีความแตกต่างกันตามวิธีการสังเคราะห์ซิลิกา สารตั้งต้นที่ใช้ และเทคนิคการนำเซลล์ตรึงไปใช้ประโยชน์ งานวิจัยนี้จึงมีจุดมุ่งหมายเพื่อผลิตซิลิกาโดยใช้ระบบที่ง่ายไม่ซับซ้อน แล้วนำมาตรึงแบคทีเรีย เพื่อไปใช้สำหรับการย่อยสลายฟีนอลต่อไป

ตารางที่ 2.6 สรุปงานวิจัยที่ใช้เซลล์ตรึงบนซิลิกาสำหรับบำบัดฟีนอล และใช้ในการเก็บรักษาเชื้อ

ชนิดของซิลิกา	สารเคมี	จุลินทรีย์	วิธีการตรึงเซลล์	การประยุกต์ใช้	เอกสารอ้างอิง
Prepolymerized TEOS	TEOS + Slightly acid + KOH	<i>Candida tropicalis</i> <i>Pseudomonas</i> sp. 2	การตรึงแบบกักขัง	ย่อยสลายฟีนอล	Branyik และคณะ (1998)
Sol-gel silica glasses	TMOS + H ₂ O + HCl	<i>Escherichia coli</i> K12	การตรึงแบบกักขัง	ตรึงเซลล์ในซิลิกาเพื่อ รักษากิจกรรมของ เอนไซม์	Fennouh และคณะ (2000)
Silica gel	TEOS + Slightly acid + ethanol	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> , <i>Ochrobactrum anthropi</i> and <i>Moraxella</i> sp.	การตรึงแบบกักขัง	ย่อยสลายฟีนอล	Branyik และคณะ (2000)
Silica gel	SiNa + LUDOX + Hydrochloric acid + PB or WCS solution	<i>Escherichia coli</i> B (CIP-54125)	การตรึงแบบกักขัง	เก็บรักษาเชื้อโดยการตรึง เซลล์แบบกักขัง	Nassif และคณะ (2002a)
Silica gel	Sodium silicate + LUDOX HS-40	<i>Escherichia coli</i> B (CIP-54125)	การตรึงแบบกักขัง	ตรึงเอนไซม์ไว้ในซิลิกา เจล	Nassif และคณะ (2002b)

ชนิดของซิลิกา	สารเคมี	จุลินทรีย์	วิธีการตรึงเซลล์	การประยุกต์ใช้	เอกสารอ้างอิง
Silicon oxide matrix - TEOS - SiO ₂	TEOS + HCl + H ₂ O and Sodium silicate (SiO ₂ + NaOH)	<i>Escherichia coli</i> BL21	การตรึงแบบกักขัง	เพิ่มประสิทธิภาพการ เก็บรักษาเชื้อใน Silicon oxide matrix	Desimone และคณะ (2005)



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 3

อุปกรณ์ เคมีภัณฑ์ และวิธีดำเนินงานวิจัย

อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

1. เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH meter) รุ่น 240 ของบริษัท Corning, USA
2. เครื่องชั่ง รุ่น L2200P และ A200S ของบริษัท Sartorius, USA
3. เครื่องนึ่งอบฆ่าเชื้อ (autoclave) ของบริษัท Kakusan, Japan
4. ตู้เขี่ยเชื้อแบบ “ISSCO” laminar flow รุ่น BVT – 124 ของบริษัท International Scientetific Supply, USA
5. เครื่องเขย่า รุ่น Innova 2300 บริษัท New Brunswick Scientific, USA
6. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) รุ่น Genesys20 บริษัท Thermospectonic, Japan
7. เครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดควบคุมอุณหภูมิ (refrigerated centrifuge) รุ่น Sorvall® Biofuge Stratos บริษัท Heraeus, Germany
8. เครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดตั้งโต๊ะ (bench-top centrifuge) รุ่น KM-15200 บริษัท Kubota, Japan
9. ตู้อบแห้ง บริษัท Contherm Scientific, New Zealand
10. เครื่องกำเนิดเสียงความถี่สูง (sonicator) ชนิดอ่าง รุ่น FS400 ของบริษัท Decan Ultrasonics, England
11. ตู้บ่มเชื้อ รุ่น Heraeus type B 5050 E ของบริษัท Heraeus, Germany
12. โกร่งบด (mortar/pestle) ขนาด 100 มิลลิเมตร ของบริษัท Thomas Scientific
13. เครื่องปั่นผสม (vortex mixer) รุ่น G-560E ของบริษัท Scientific Industries, USA
14. ไมโครปิเปต ขนาด 100 200 และ 1000 ไมโครลิตร ของบริษัท Drummond Scientific, USA
15. กระจกชีดยาพลาสติก ขนาด 1 มิลลิลิตร ของบริษัท Nissho Nipro, Japan
16. ปิเปต (pipette) ขนาด 1 5 และ 10 มิลลิลิตร ของบริษัท Gilson, France
17. ขวดแก้วฝาเกลียว (vial) ขนาด 22 มิลลิลิตร (Screw Cap with Teflon Liner) ของบริษัท Lab System, Thailand
18. ตู้แช่แข็งจุดเยือกแข็งต่ำ (Deep freezer) อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ของบริษัท Sanyo Electric, Japan

19. ตู้แช่แข็งจุดเยือกแข็งต่ำ (Deep freezer) อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส รุ่น ULT178 ของบริษัท Forma Scientific, USA
20. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิพร้อมเครื่องเขย่า (waterbath shaker) รุ่น WB 14 ของบริษัท Memmert, Germany
21. เครื่องคนแม่เหล็กชนิดให้ความร้อน
22. เครื่องคนแม่เหล็ก
23. เครื่องทำน้ำขจัดไอออน (Millipore ZMQS5V00Y)

เคมีภัณฑ์

1. ฟีนอล (Phenol) ของบริษัท Merck, Germany
2. เททระเอทอกซิไซเลน (TEOS) ของบริษัท Fluka
3. เฮกซะอะดีซิลไตรเมทิลแอมโมเนียม โบรไมด์ (CTAB) ของบริษัท Fluka
4. โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ของบริษัท Merck, Germany
5. แอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ (NH_4OH) ของบริษัท Merck, Germany
6. กรดไฮโดรคลอริก (HCl) ของบริษัท Merck, Germany
7. เมทานอล (Methanol) ของบริษัท Fisher scientific
8. ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟตเดคะไฮเดรต ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$) ของบริษัท Carlo ERBA, France
9. โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) ของบริษัท AJEX Chemicals, Australia
10. แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) ของบริษัท Carlo ERBA, France
11. เฟอริกคลอไรด์เฮกซะไฮเดรต ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) ของบริษัท May & Baker, England
12. แคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรต ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) ของบริษัท AJEX Chemicals, Australia
13. 4-อะมิโนแอนติไพรีน (4-Aminoantipyrine, 4-AAP) ของบริษัท Merck, Germany
14. แอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ (NH_4OH) ของบริษัท Merck, Germany
15. โมโนเบสิก โซเดียมฟอสเฟต (NaH_2PO_4) ของบริษัท Merck, Germany
16. ไดเบสิก โซเดียมฟอสเฟต (Na_2HPO_4) ของบริษัท Merck, Germany
17. เฟอริกไซยาไนด์ ($\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$) ของบริษัท May and Baker LID Dagenham, England
18. โพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ (KOH) ของบริษัท Merck, Germany
19. กรดซิตริก (Citric acid) ของบริษัท Asia Pacific Specialty Chemicals Limited

วิธีดำเนินงานวิจัย

3.1 การเพาะเลี้ยงเชื้อผสมระหว่าง *Methylobacterium* sp.NP3 และ *Acinetobacter* sp. PK1

3.1.1 จุลินทรีย์

จุลินทรีย์ที่ใช้เป็นเชื้อผสมระหว่าง *Methylobacterium* sp. NP3 และ *Acinetobacter* sp. PK1 ซึ่งได้คัดแยกจากดินที่ปนเปื้อนน้ำมันโดย นางสาวนันทพร เการาช โดย *Methylobacterium* sp. NP3 สามารถย่อยสลายฟีนอลได้สูงสุดที่ความเข้มข้น 5,000 มิลลิกรัมต่อลิตร (นันทพร เการาช, 2550) มีลักษณะของโคโลนีกลมขนาดเล็ก สีชมพู บนอาหารแข็ง LB ส่วน *Acinetobacter* sp. PK1 มีลักษณะของโคโลนีกลมขนาดเล็ก สีขาวขุ่น บนอาหารแข็ง LB ทำให้สามารถแยกความแตกต่างของแบคทีเรียที่อาจปนเปื้อนได้

3.1.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ

อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเชื้อผสมระหว่าง *Methylobacterium* sp. NP3 และ *Acinetobacter* sp. PK1 คือ อาหารเหลว Carbon Free Mineral Medium (CFMM) (ภาคผนวก) โดยมีการเติมฟีนอลที่ความเข้มข้น 0.01 กรัมต่อลิตร ลงในอาหารเหลว CFMM เพื่อเป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับการเจริญของ *Methylobacterium* sp. NP3 และ *Acinetobacter* sp. PK1

3.1.3 การเตรียมหัวเชื้อ

เลี้ยงเชื้อผสมระหว่าง *Methylobacterium* sp. NP3 และ *Acinetobacter* sp. PK1 ในอาหารเหลว CFMM เติมฟีนอลที่ความเข้มข้น 0.01 กรัมต่อลิตร บ่มเชื้อโดยเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3-4 วัน ที่อุณหภูมิห้อง เพื่อทำการบ่มเชื้อ จากนั้นนำมาปั่นแยกเซลล์ด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที แยกส่วนน้ำใสทิ้ง แล้วล้างเซลล์ ด้วย อาหารเหลว CFMM นำเซลล์ที่ได้ไปวัดค่า OD₅₇₈ โดยอ้างอิงจากงานวิจัยของ Laukel และคณะ (2003) ให้ได้ค่า OD เท่ากับ 1.0 เพื่อให้มีจำนวนเซลล์แบคทีเรีย 10⁸ CFU ต่อมิลลิลิตร เพื่อนำหัวเชื้อที่ได้ไปใช้ในการตรึงบนซิลิกาต่อไป ดังรูปที่ 3.1



รูปที่ 3.1 อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM ที่เลี้ยงกลุ่มแบคทีเรียเป็นเวลา 5 วัน เมื่อเปรียบเทียบกับที่เวลา 0 วัน

3.2 การสังเคราะห์ซิลิกา

การสังเคราะห์ซิลิกาในงานวิจัยนี้แบ่งออกเป็น 2 รูปแบบ ได้แก่

3.2.1 การสังเคราะห์ซิลิกาโดยใช้กรดเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา

การสังเคราะห์ซิลิกาโดยมีกรดเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาสามารถทำได้โดยใช้หรือไม่ใช้สารลดแรงตึงผิวเป็นสารต้นแบบ มีวิธีการสังเคราะห์โดยทั่วไปดังนี้

(a) ซิลิกา KAa และ KAac

การสังเคราะห์ซิลิกาโดยใช้หรือไม่ใช้สารลดแรงตึงผิวเป็นสารต้นแบบทำตามวิธีของ Intasiri (2000) โดยมีอัตราส่วนโดยโมลของสารเป็น 1 TEOS : 4 H₂O (0.1 M HCl): 1 DMF : 4 MeOH สำหรับซิลิกา KAa ไม่ใช้สารลดแรงตึงผิวเป็นสารต้นแบบ แต่ซิลิกา KAac ใช้สารลดแรงตึงผิวซึ่งได้แก่ CTAB เข้มข้น 0.06 M ในสารละลาย 0.1 M HCl เป็นสารต้นแบบในการสังเคราะห์ ซึ่งมีวิธีการสังเคราะห์โดยทั่วไปดังนี้

ผสม TEOS, สารละลาย 0.06 M CTAB ในสารละลาย 0.1 M HCl, DMF และ MeOH เข้าด้วยกันในขวดสังเคราะห์ขนาด 50 มิลลิลิตร แล้วนำไปอบในตู้อบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง จากนั้นเปิดฝาขวดสังเคราะห์เพื่อปล่อยให้ซิลิกาแห้งที่อุณหภูมิห้องจนซิลิกาที่ได้มีน้ำหนักคงที่ แล้วนำซิลิกา KAa และ KAac ไปใช้ตรึงแบคทีเรียในขั้นตอนต่อไป ซึ่งวิธีการสังเคราะห์ซิลิกาตามที่กล่าวมาสามารถสรุปเป็นแผนผังได้ดังรูปที่ 3.2

TEOS + 0.06 M CTAB ใน 0.1 M HCl + DMF + MeOH



ใส่ตู้อบที่ 60 องศาเซลเซียส 72 ชั่วโมง



เปิดฝาขวดสังเคราะห์เพื่อปล่อยให้ซิลิกาแห้งที่อุณหภูมิห้อง



นำซิลิกา KAa และ KAac ไปใช้ตรึงแบคทีเรีย

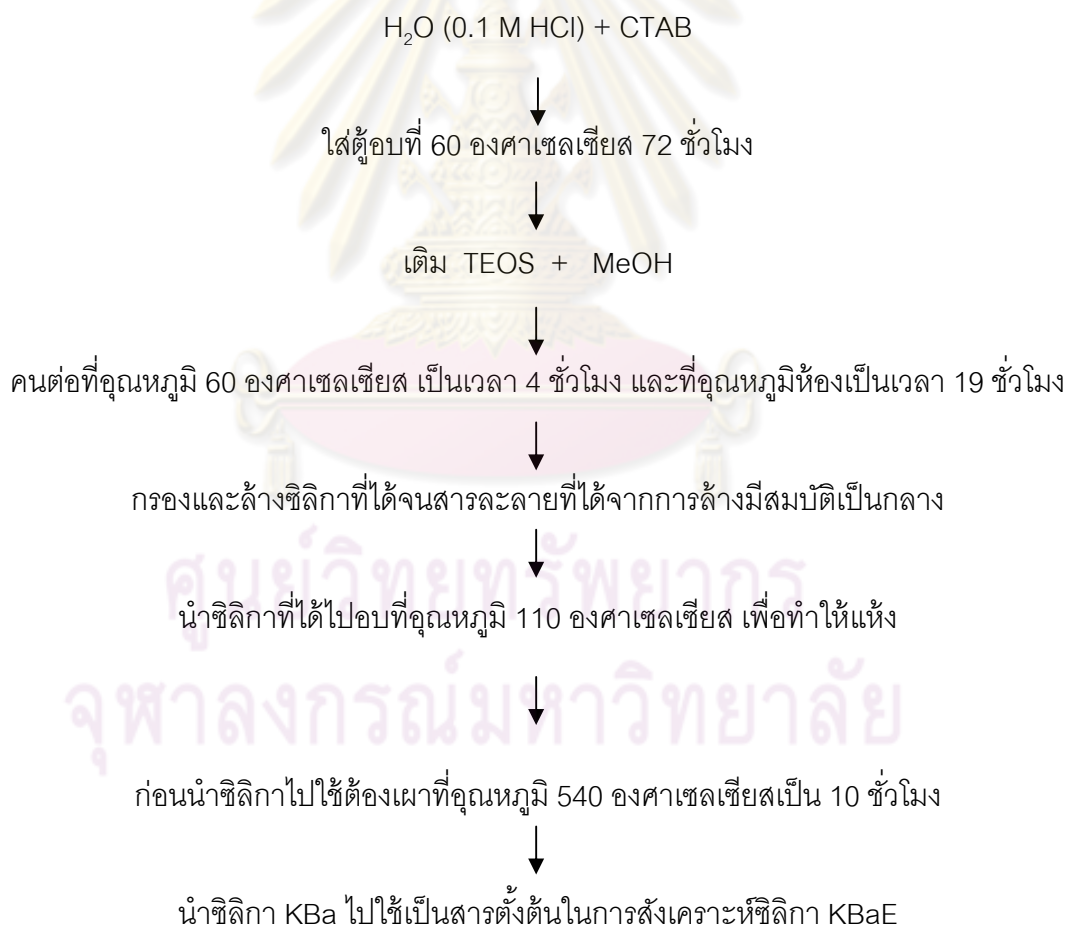
รูปที่ 3.2 การสังเคราะห์ซิลิกา KAa และ KAac

นำซิลิกาที่ได้จากการสังเคราะห์ทั้งแบบใช้ (KAa) และไม่ใช้สารลดแรงตึงผิว (KAac) ไปทำการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของซิลิกาต่อไปตามวิธีข้อ 3.3.1

(b) ซิลิกา KBa

การสังเคราะห์ซิลิกาโดยใช้สารลดแรงตึงผิวเป็นสารต้นแบบทำตามวิธีของ Boos และคณะ (2002) โดยชนิดของสารลดแรงตึงผิวที่ใช้ ได้แก่ CTAB และมีอัตราส่วนโดยโมลของสารเป็น 1 TEOS : 140 H₂O : 0.18 CTAB : 13 MeOH มีวิธีการสังเคราะห์โดยทั่วไปดังนี้

ผสม CTAB และตัวเร่งปฏิกิริยาลงในขวดสังเคราะห์ขนาด 50 มิลลิลิตร คนเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส จากนั้นเติม MeOH และ TEOS ลงในขวดดังกล่าว คนต่อที่อุณหภูมิเดียวกันเป็นเวลา 4 ชั่วโมง และที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 19 ชั่วโมง จากนั้นทำการกรองและล้างซิลิกาที่ได้จนสารละลายที่ได้จากการล้างมีสมบัติเป็นกลาง แล้วนำซิลิกาที่ได้ไปอบที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เพื่อให้แห้ง นำซิลิกาไปเผาที่อุณหภูมิ 540 องศาเซลเซียสเป็น 10 ชั่วโมง ก่อนนำไปใช้เป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์ซิลิกา KBaE ในขั้นตอนต่อไป ซึ่งวิธีการสังเคราะห์ซิลิกาตามที่กล่าวมาสามารถสรุปเป็นแผนผังได้ดังรูปที่ 3.3



รูปที่ 3.3 การสังเคราะห์ซิลิกา KBa

(c) ซิลิกา EntA

การสังเคราะห์ซิลิกาสำหรับตรึงเซลล์แบบกักขัง วิธีการตรึงแบคทีเรียแบบนี้ดัดแปลงจากวิธีของ Branyik และคณะ (1998) โดยมีวิธีการสังเคราะห์โดยทั่วไปดังนี้

ผสม TEOS และตัวเร่งปฏิกิริยาลงในขวดสังเคราะห์ขนาด 15 มิลลิลิตร คนแรงๆ ด้วยแท่งแม่เหล็กจนได้สารละลายใส บ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง เมื่อครบ 72 ชั่วโมง เติม KOH ให้ค่ากรด-เบสเป็นกลาง จะสังเกตเห็นว่าสารละลายมีความหนืดเพิ่มขึ้น เรียกของเหลวหนืดนี้ว่า “ส่วนผสม A” เทส่วนผสม A ลงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ จากนั้นเติมหัวเชื้อแบคทีเรียที่เตรียมไว้ลงในส่วนผสม A ที่อยู่ในจานอาหารเลี้ยงเชื้อผสมให้เข้ากันจะเกิดเป็นเจลภายใน 2-3 นาที เปิดฝาจานอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อทำให้ซิลิกาแห้ง เรียกซิลิกาที่มีแบคทีเรียอยู่นี้ว่าซิลิกา EntA สังเคราะห์ซิลิกาตามที่กล่าวมาสามารถสรุปเป็นแผนผังได้ดังรูปที่ 3.4



รูปที่ 3.4 การสังเคราะห์ซิลิกา EntA

นำซิลิกา EntA ที่สังเคราะห์ได้ไปทำการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของซิลิกาต่อไปตามวิธีข้อ 3.3.1

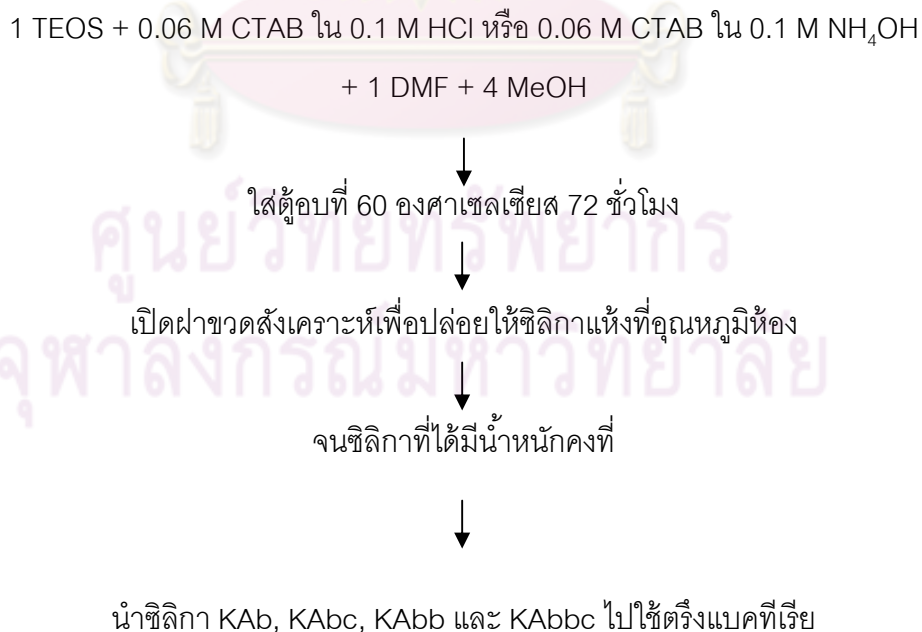
3.2.2 การสังเคราะห์ซิลิกาโดยใช้เบสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา

การสังเคราะห์ซิลิกาโดยมีเบสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาสามารถทำได้โดยใช้หรือไม่ใช้สารลดแรงตึงผิวเป็นสารต้นแบบ มีวิธีการสังเคราะห์โดยทั่วไปดังนี้

(a) ซิลิกา KAb, KAbc, KAbb และ KAbbc

การสังเคราะห์ซิลิกาโดยใช้หรือไม่ใช้สารลดแรงตึงผิวเป็นสารต้นแบบทำตามวิธีของ Intasiri (2000) โดยมีอัตราส่วนโดยโมลของสารเป็น 1 TEOS : 4 H₂O (0.1 M NaOH หรือ 0.1 M NH₄OH) : 1 DMF : 4 MeOH สำหรับซิลิกา KAb และ KAbc ใช้ 0.1 M NaOH เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา โดยซิลิกา KAb ไม่ใช้สารลดแรงตึงผิวเป็นสารต้นแบบ แต่ซิลิกา KAbc ใช้สารลดแรงตึงผิวซึ่งได้แก่ CTAB เข้มข้น 0.06 M ในสารละลาย 0.1 M NaOH เป็นสารต้นแบบในการสังเคราะห์ ส่วนซิลิกา KAbb และ KAbbc ใช้ 0.1 M NH₄OH เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา โดยซิลิกา KAbb ไม่ใช้สารลดแรงตึงผิวเป็นสารต้นแบบ แต่ซิลิกา KAbbc ใช้สารลดแรงตึงผิวซึ่งได้แก่ CTAB เข้มข้น 0.06 M ในสารละลาย 0.1 M NH₄OH เป็นสารต้นแบบในการสังเคราะห์ ซึ่งมีวิธีการสังเคราะห์โดยทั่วไปดังนี้

ผสม TEOS ตัวเร่งปฏิกิริยา DMF และ MeOH เข้าด้วยกันในขวดสังเคราะห์ขนาด 50 มิลลิลิตร แล้วนำไปอบในตู้อบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง จากนั้นเปิดฝาขวดสังเคราะห์เพื่อปล่อยให้ซิลิกาแห้งที่อุณหภูมิห้องจนซิลิกาที่ได้มีน้ำหนักคงที่ แล้วนำซิลิกา KAb, KAbc, KAbb และ KAbbc ไปใช้ตริงแบบคทีเรียในขั้นตอนต่อไป ซึ่งวิธีการสังเคราะห์ซิลิกาตามที่กล่าวมาสามารถสรุปเป็นแผนผังได้ดังรูปที่ 3.5



รูปที่ 3.5 การสังเคราะห์ซิลิกา KAb, KAbc, KAbb และ KAbbc

นำซีลีกา KAb และ KAbbc ไปทำการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของซีลีกาต่อไปตามวิธีข้อ 3.3.1

(b) ซีลีกา KBaE

การสังเคราะห์ซีลีกาสำหรับตรึงเซลล์แบบกักขัง วิธีการตรึงแบบที่เรียบแบบนี้ได้ดัดแปลงจากวิธีของ Branyik และคณะ (1998) โดยมีวิธีการสังเคราะห์โดยทั่วไปดังนี้

ผสมซีลีกาที่ผ่านการเผาที่อุณหภูมิสูง (ซีลีกา KBa) กับตัวเร่งปฏิกิริยา (2 M NaOH) ลงในขวดสังเคราะห์ขนาด 50 มิลลิลิตร คนจนได้สารละลายใส เติม 0.75 M citric acid ให้ค่ากรด-เบสเป็นกลาง แล้วเติมหัวเชื้อแบคทีเรีย พบว่าเกิด gelation ขึ้นทันที บ่มเจลที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 วัน แล้วเปิดฝาขวดสังเคราะห์เพื่อให้เจลแห้ง ซึ่งวิธีการสังเคราะห์ซีลีกาตามที่กล่าวมาสามารถสรุปเป็นแผนผังได้ดังรูปที่ 3.6

KBa 0.5 กรัม + 2 M NaOH 2.8 มิลลิลิตร



คนจนเจลละลาย



เติม 0.75 M citric acid



เติม cell suspension 4 มิลลิลิตร



เกิดเจลขึ้นทันที



KBaE

รูปที่ 3.6 การสังเคราะห์ซีลีกา KBaE

นำซีลีกา KBaE ที่สังเคราะห์ได้ไปทำการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของซีลีกาต่อไปตามวิธีข้อ 3.3.1

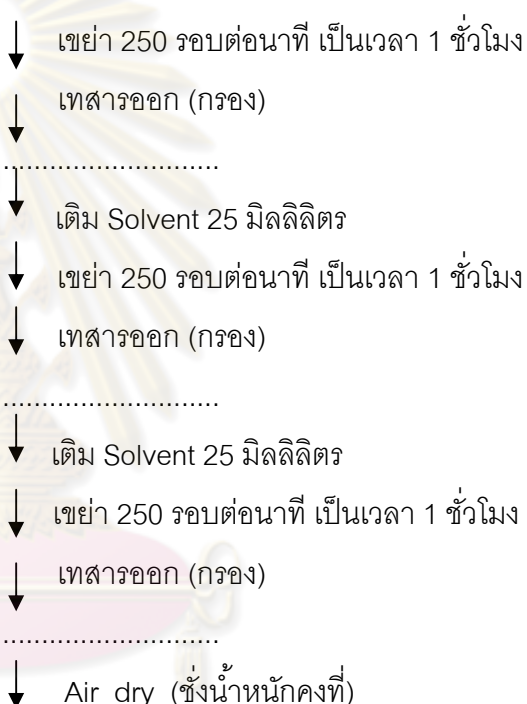
3.2.3 การกำจัดสารลดแรงตึงผิวออกจากซีลีกา

การกำจัดสารลดแรงตึงผิว (CTAB) ออกจากซีลีกา KAac, KAbc, KAbbc และ KBa เพื่อลดความเป็นพิษต่อแบคทีเรีย และเตรียมซีลีกาสำหรับตรึงแบคทีเรีย มีวิธีการกำจัดสารลดแรงตึงผิวออกจากซีลีกาดังนี้

(a) การกำจัดสารลดแรงตึงผิวออกจากซิลิกา KAac, KAbc และ KABbc

ทำได้โดยใช้ตัวทำละลายผสมระหว่างน้ำกับเอทานอล (1:4,v/v) ซึ่งมีวิธีการดังนี้ เติมตัวทำละลายผสมลงในภาชนะที่บรรจุซิลิกาจำนวน 2 กรัม เขย่าเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง ด้วยความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาที จากนั้นกรองซิลิกาที่ได้ด้วยกระดาษกรองเบอร์ 5 แล้วสกัดซ้ำอีก 2 รอบ ด้วยสารละลายผสมเดิม จากนั้นอบซิลิกาที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วจึงนำซิลิกาที่ได้ไปศึกษาต่อไป ซึ่งวิธีการกำจัด CTAB ออกจากซิลิกาตามที่กล่าวมาสามารถสรุปเป็นแผนผังได้ดังรูปที่ 3.7

Silica + Solvent 25 มิลลิลิตร

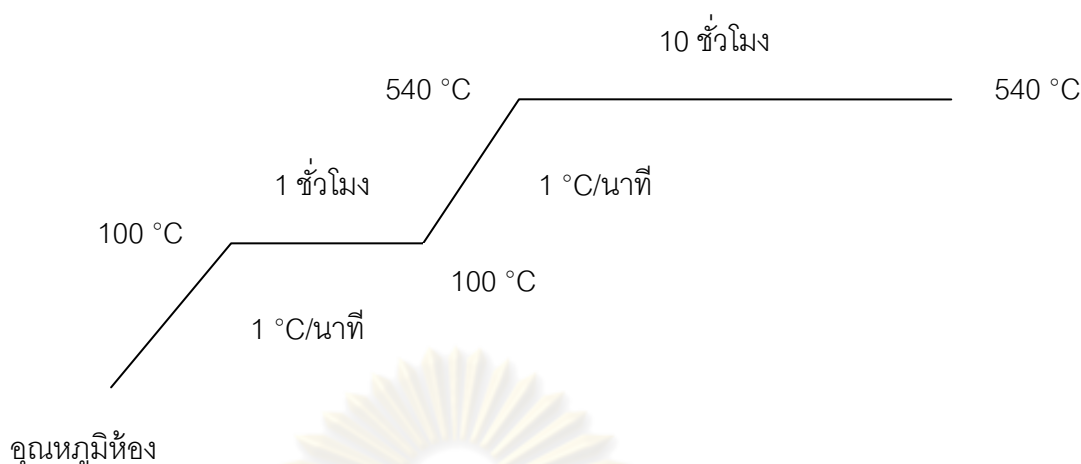


รูปที่ 3.7 การกำจัดสารลดแรงตึงผิวออกจากซิลิกาโดยใช้สารละลายผสมระหว่างน้ำกับเอทานอล (1:4,v/v)

(b) การกำจัดสารลดแรงตึงผิวออกจากซิลิกา KBa

การกำจัดสารลดแรงตึงผิวออกจากซิลิกา KBa ทำได้โดยอาศัยวิธีการเผาที่อุณหภูมิสูง (calcination) ซึ่งมีวิธีการดังนี้

ซึ่งซิลิกาที่อบที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส จนน้ำหนักคงที่แล้ว 0.1 กรัม ใส่ในถ้วยครุชิลเบลสำหรับเผาสาร จากนั้นนำไปเผาที่อุณหภูมิ 540 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 ชั่วโมง โดยมีรูปแบบการเพิ่มอุณหภูมิ ตามรูปที่ 3.8 หลังจากนั้นซึ่งน้ำหนักของสารที่เหลืออยู่หลังการเผา



รูปที่ 3.8 การกำจัดสารลดแรงตึงผิวออกจากซีลิกา KBr

3.3 การศึกษาลักษณะทางกายภาพของซีลิกา

3.3.1 สัณฐานวิทยา (Morphology) โดยใช้เทคนิค Scanning Electron Microscopy (SEM)

นำซีลิกาที่มีแบคทีเรียตรง และซีลิกาที่ไม่มีแบคทีเรียตรง ในการเตรียมตัวอย่างที่มีแบคทีเรียตรงมีวิธีการดังนี้ ตีตัวอย่างด้วย 2.5% กลูตาราลดีไฮด์ ใน 0.1 M ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.2 เป็นเวลา 2 ชั่วโมง เมื่อครบ 2 ชั่วโมง ล้างด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์เป็นเวลา 10 นาที และล้างด้วยน้ำกลั่นเป็นเวลา 10 นาที ขจัดน้ำออกด้วยเอทานอลเป็นเวลา 10 นาที 3 ครั้ง ทำให้แห้งด้วยเครื่อง Balzers model CPD 020 จากนั้นนำตัวอย่างมาติดที่แท่นทองด้วยน้ำยาทาเล็บ แล้วตัวอย่างไปเคลือบด้วยทองคำ และนำตัวอย่างที่ได้ไปถ่ายภาพโดยใช้เครื่อง Scanning Electron Microscope รุ่น JEOL, model JSM-5410LV เพื่อดูการเกาะของแบคทีเรียบนซีลิกา ณ ศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.3.2 การศึกษาลักษณะการจัดเรียงตัวของซีลิกาโดยใช้เทคนิค X-ray diffraction (XRD)

การศึกษาความเป็นผลึกของซีลิกาทำโดยใช้เทคนิคเอ็กซ์เรย์ดิฟแฟรกชัน โดยนำสารตัวอย่างอัดใส่แผ่นกระจกแล้วนำไปสแกนตั้งแต่ 1° ถึง 10° โดยใช้ความเร็วรอบในการสแกนเป็น 0.02° ต่อนาที ด้วยเครื่อง Rigaku X-ray diffractometer ของภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย (ธนาวดี ธารารัตน์ภาพ, 2547)

3.3.3 การทดสอบความเป็นพิษของซิลิกาต่อการเจริญของแบคทีเรีย

ทดสอบความเป็นพิษของซิลิกาต่อการเจริญของ co-culture บนซิลิกาทุกชนิด นำแบคทีเรียจากข้อ 3.1.3 ที่มีเซลล์เริ่มต้นประมาณ 10^8 CFU ต่อมิลลิลิตร ปริมาณ 100 มิลลิลิตร เติมซิลิกาที่สังเคราะห์ได้จากข้อ 3.2 ปริมาณ 250-500 กรัมต่อลิตร เขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 วัน ที่อุณหภูมิห้อง โดยทำการเก็บตัวอย่างแบคทีเรียที่ตรึงบนซิลิกาในวันที่ 10 แล้วนำไปตรวจหาจำนวนของแบคทีเรียที่ตรึงบนซิลิกาโดยใช้เทคนิค total plate count (CFU ต่อกรัม) ตามวิธีข้อ 3.6.1 เพื่อดูว่าซิลิกาเป็นพิษต่อการเจริญของแบคทีเรียหรือไม่ ชุดควบคุมประกอบด้วยอาหารเหลว CFMM และแบคทีเรีย จากนั้นจะเลือกเฉพาะซิลิกาที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์มาใช้ตรึงเซลล์ในขั้นตอนต่อไป

3.4 การตรึงเชื้อผสมระหว่าง *Methylobacterium* sp.NP3 และ *Acinetobacter* sp. PK1 บนซิลิกา

3.4.1 การตรึงแบคทีเรียโดยวิธีการยึดเกาะบนซิลิกา (Attachment)

นำแบคทีเรียจากข้อ 3.1.3 ที่มีเซลล์เริ่มต้นประมาณ 10^8 CFU ต่อมิลลิลิตร ปริมาณ 100 มิลลิลิตร มาตรึงบนซิลิกา โดยเติมฟีนอล 0.01 กรัมต่อลิตร จากนั้นเติมซิลิกา 500 กรัมต่อลิตร เขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 วัน ที่อุณหภูมิห้อง เพื่อบ่มเชื้อ จะได้เซลล์ตรึงบนซิลิกา และนำไปตรวจหาจำนวนของแบคทีเรียเริ่มต้นที่ตรึงบนซิลิกาโดยใช้เทคนิค total plate count (CFU ต่อกรัม) ตามวิธีข้อ 3.6.1 โดยมีปริมาณเซลล์สุดท้ายบนซิลิกาประมาณ 10^5 - 10^6 CFU ต่อกรัมซิลิกา จากนั้นศึกษาปริมาณแบคทีเรียที่ถูกตรึงในซิลิกาที่เวลาต่างๆ โดยนำเซลล์ตรึง 50 กรัม เติมลงในอาหารเหลว CFMM 100 มิลลิลิตร เติมฟีนอล 0.01 กรัมต่อลิตร เขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 วัน ที่อุณหภูมิห้อง เก็บตัวอย่างแบคทีเรียที่ตรึงบนซิลิกาในวันที่ 0, 2, 4, 6, 8 และ 10 แล้วนำไปตรวจหาจำนวนของแบคทีเรียที่ตรึงบนซิลิกาโดยใช้เทคนิค total plate count (CFU ต่อกรัมซิลิกา) ตามวิธีข้อ 3.6.1

3.4.2 การตรึงแบคทีเรียโดยวิธีการกักขังในซิลิกา (Encapsulation)

การตรึงแบคทีเรียในซิลิกา EntA และ KBaE มีวิธีการสังเคราะห์ดังข้อ 3.2.1 (a) และ 3.2.2 (b) โดยวิธีการดังกล่าวจะทำการเติมแบคทีเรียที่มีเซลล์เริ่มต้นประมาณ 10^8 CFU ต่อมิลลิลิตร ลงในส่วนผสมระหว่างการสังเคราะห์ โดยมีปริมาณเซลล์สุดท้ายในซิลิกาประมาณ 10^6 CFU ต่อกรัมซิลิกา การตรวจสอบการเกาะของแบคทีเรียบนซิลิกาทำโดยนำแบคทีเรียถูกตรึงอยู่ในซิลิกา EntA และ KBaE 250 กรัมต่อลิตร เติมในอาหารเหลว CFMM 100 มิลลิลิตร ที่มีฟีนอล 0.01 กรัมต่อลิตร เขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 วัน ที่อุณหภูมิห้อง เพื่อทำการบ่มเชื้อ หลังจากนั้นเก็บตัวอย่างแบคทีเรียที่ตรึงในซิลิกาในวันที่ 0, 2, 4, 6, 8 และ 10

แล้วนำไปตรวจหาจำนวนของแบคทีเรียที่ตรึงบนซิลิกาโดยใช้เทคนิค total plate count (CFU ต่อกรัมซิลิกา) ตามวิธีข้อ 3.6.1 เพื่อศึกษาปริมาณแบคทีเรียที่ถูกตรึงในซิลิกาที่เวลาต่างๆ

3.5 การศึกษาประสิทธิภาพการย่อยสลายฟีนอล

3.5.1 การย่อยสลายฟีนอลของเชื้อผสมระหว่าง *Methylobacterium* sp. NP3 และ *Acinetobacter* sp. PK1 แบบเซลล์อิสระ

นำแบคทีเรียจากข้อ 3.1.3 ที่มีเซลล์เริ่มต้นประมาณ 10^8 CFU ต่อมิลลิลิตร ปริมาณ 100 มิลลิลิตร มาทดสอบในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร และเติมฟีนอลปริมาณตั้งแต่ 625-20,000 มิลลิกรัมต่อลิตร เขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เก็บตัวอย่างในวันที่ 0, 2, 4, 6, 8 และ 10 ปริมาณ 1.0 มิลลิลิตร จากนั้นทำการวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลด้วยเทคนิค Colorimetric method ตามวิธีการของ Greenberg และคณะ (1992) ตามวิธีข้อ 3.6.2 และหาจำนวนของแบคทีเรียในอาหารโดยใช้เทคนิค total plate count (CFU ต่อมิลลิลิตร) ตามวิธีข้อ 3.6.1 ซึ่งทำการทดลองทั้งหมด 6 ซ้ำ

ชุดควบคุมเพื่อศึกษาผลของกระบวนการทางกายภาพต่อการลดลงของฟีนอล ประกอบด้วย อาหารเลี้ยงเชื้อ CFMM และฟีนอลที่ความเข้มข้น 625-20,000 มิลลิกรัมต่อลิตร

3.5.2 การย่อยสลายฟีนอลของเชื้อผสมระหว่าง *Methylobacterium* sp. NP3 และ *Acinetobacter* sp. PK1 ที่ตรึงบนซิลิกา

นำแบคทีเรียที่ตรึงบนซิลิกาจากข้อ 3.4.1 และข้อ 3.4.2 เซลล์ตรึงแบบยึดเกาะบนซิลิกา KAb ประมาณ 500 กรัมต่อลิตร และเซลล์ตรึงแบบกักขังในซิลิกา EntA ประมาณ 250 กรัมต่อลิตร ซึ่งใช้ปริมาณเซลล์ตรึงไม่เท่ากันเพราะจำนวนเซลล์ต่อกรัมไม่เท่ากัน มาเติมในอาหารเหลว CFMM 100 มิลลิลิตร พร้อมกับเติมฟีนอลปริมาณตั้งแต่ 625-10,000 มิลลิกรัมต่อลิตร เขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เก็บตัวอย่างในวันที่ 0, 2, 4, 6, 8 และ 10 ปริมาณ 1.0 มิลลิลิตร จากนั้นทำการวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลด้วยเทคนิค Colorimetric method ตามวิธีการของ Greenberg และคณะ (1992) ตามวิธีข้อ 3.6.2 และหาจำนวนของแบคทีเรียในอาหารและแบคทีเรียที่ตรึงบนซิลิกาโดยใช้เทคนิค total plate count (CFU ต่อชุดทดลอง) ตามวิธีข้อ 3.6.1 เพื่อหาเวลาที่เหมาะสมสำหรับการย่อยสลายฟีนอลของแบคทีเรียที่ตรึงบนซิลิกา คือเวลาที่ปริมาณฟีนอลลดต่ำที่สุด ซึ่งได้ทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ

ชุดควบคุมเพื่อศึกษาผลของกระบวนการทางกายภาพต่อการลดลงของฟีนอล ประกอบด้วย อาหารเลี้ยงเชื้อ CFMM และฟีนอล

ชุดควบคุมเพื่อศึกษาการดูดซับฟีนอลโดยซิลิกา ประกอบด้วย อาหารเลี้ยงเชื้อ CFMM ซิลิกา KAb 500 กรัมต่อลิตร และซิลิกา EntA 250 กรัมต่อลิตร ที่ไม่มีแบคทีเรียตรึงอยู่ และฟีนอล

3.5.3 การศึกษาประสิทธิภาพการนำเซลล์ตรึงกลับมาใช้อย่างต่อเนื่อง

นำเซลล์ที่ตรึงบนซีดิกาจากข้อ 3.4.1 และข้อ 3.4.2 มาทดสอบการย่อยสลายฟีนอล โดยเลือกมาเพียง 2 ความเข้มข้น คือ 500 มิลลิกรัมต่อลิตร และ 5,000 มิลลิกรัมต่อลิตร เติมเซลล์ตรึงแบบยัดเกาะบนซีดิกา KAb ประมาณ 500 กรัมต่อลิตร และเซลล์ตรึงแบบกักขังในซีดิกา EntA ประมาณ 250 กรัมต่อลิตร ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเหลว CFMM 100 มิลลิลิตร พร้อมกับเติมฟีนอล เขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เก็บตัวอย่างทุกวันที่มีความเข้มข้นฟีนอล 500 มิลลิกรัมต่อลิตร และเก็บตัวอย่างทุกๆ 5 วัน ที่ความเข้มข้นฟีนอล 5,000 มิลลิกรัมต่อลิตร จากนั้นทำการวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลด้วยเทคนิค Colorimetric method ตามวิธีการของ Greenberg และคณะ (1992) ตามวิธีข้อ 3.6.2 และหาจำนวนของแบคทีเรียในอาหาร และแบคทีเรียที่ตรึงบนซีดิกาโดยใช้เทคนิค total plate count (CFU ต่อชุดทดลอง) ตามวิธีข้อ 3.6.1 เมื่อพบว่าเซลล์ตรึงใช้ฟีนอลหมด ให้เติมฟีนอลเพิ่มให้ได้ความเข้มข้นเท่ากับเมื่อเริ่มต้น การทดลอง ทำซ้ำหลายๆ ครั้ง เพื่อหาประสิทธิภาพของเซลล์ที่ตรึงบนซีดิกาสามารถนำกลับมาใช้ซ้ำได้กี่ครั้ง ทั้งนี้พิจารณาจากเวลาที่ใช้ย่อยสลายฟีนอลจนหมด และจำนวนแบคทีเรียที่เหลือบนซีดิกาหลังจากการใช้งาน ซึ่งได้ทำการทดลองทั้งหมด 6 ซ้ำ สำหรับฟีนอลที่ความเข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อลิตร และทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ ที่ความเข้มข้น 5,000 มิลลิกรัมต่อลิตร

3.6 การวิเคราะห์

3.6.1 การวิเคราะห์จำนวนของแบคทีเรีย

วิเคราะห์จำนวนของแบคทีเรียบนซีดิกาและแบคทีเรียในอาหารเหลว CFMM โดยใช้เทคนิค total plate count สำหรับแบคทีเรียที่ถูกตรึงบนซีดิกาจะนำซีดิกาที่มีแบคทีเรียตรึงอยู่มา sonicate ด้วยเครื่องกำเนิดเสียงความถี่สูง เป็นเวลา 2 นาที แล้วนำไปเขย่าด้วยเครื่อง vortex ประมาณ 3 นาที จากนั้นทำซ้ำหลายๆ ครั้ง เพื่อให้แน่ใจว่าเซลล์ที่อยู่ในซีดิกาหลุดออกมาจนหมด และนำเชื้อแบคทีเรียที่หลุดออกจากซีดิกาและแบคทีเรียในอาหารเหลว CFMM มาทำการเจือจางเชื้อแบคทีเรียโดยวิธี 10-fold dilution และนำความเจือจางที่ 10^{-5} - 10^{-8} มาเกลี่ยให้ทั่วผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง LB บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3-5 วัน จากนั้นนับจำนวนโคโลนีในช่วง 30-300 โคโลนี แล้วคำนวณค่า CFU ต่อกรัมมิลลิลิตร หรือ CFU ต่อกรัมซีดิกา หรือ CFU ต่อชุดทดลอง = (CFU ต่อกรัมซีดิกา x น้ำหนักซีดิกา) + (CFU ต่อมิลลิลิตร x 100 มิลลิลิตร)

3.6.2 การวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลด้วยเทคนิค colorimetric method

โดยใช้วิธีของ Greenberg และคณะ (1992) โดยเติมสารดังต่อไปนี้ 0.5 N สารละลายแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ 2.5 มิลลิลิตร ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 2.5 มิลลิลิตร 4-อะมิโนแอนติไพรีน 1

มิลลิลิตร และ โปแตสเซียมเพอริกไซยาไนด์ 1 มิลลิลิตร ลงในตัวอย่างที่มีฟีนอล โดยนำตัวอย่างที่มีฟีนอลมาเจือจางที่ 1,000 เท่า ด้วยอาหารเหลว CFMM สำหรับตัวอย่างที่เป็นเซลล์อิสระ และ เซลล์ตรึง ต้องตกตะกอนเซลล์ด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที แล้วนำส่วนใสไปวิเคราะห์ฟีนอล แล้วตั้งทิ้งไว้ 15 นาที โดยจะเกิดปฏิกิริยาระหว่าง ฟีนอล และ 4-อะมิโนแอนติไพรีน ซึ่งเป็น color reagent ในสภาวะที่มีโปแตสเซียมเพอริกไซยาไนด์ ได้ผลิตภัณฑ์เป็น antipyrine dye ที่มีสีแดง แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 500 นาโนเมตร เพื่อหาเปอร์เซ็นต์ฟีนอลที่เหลือเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของฟีนอลที่ความเข้มข้นต่างๆ (ภาคผนวก)



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

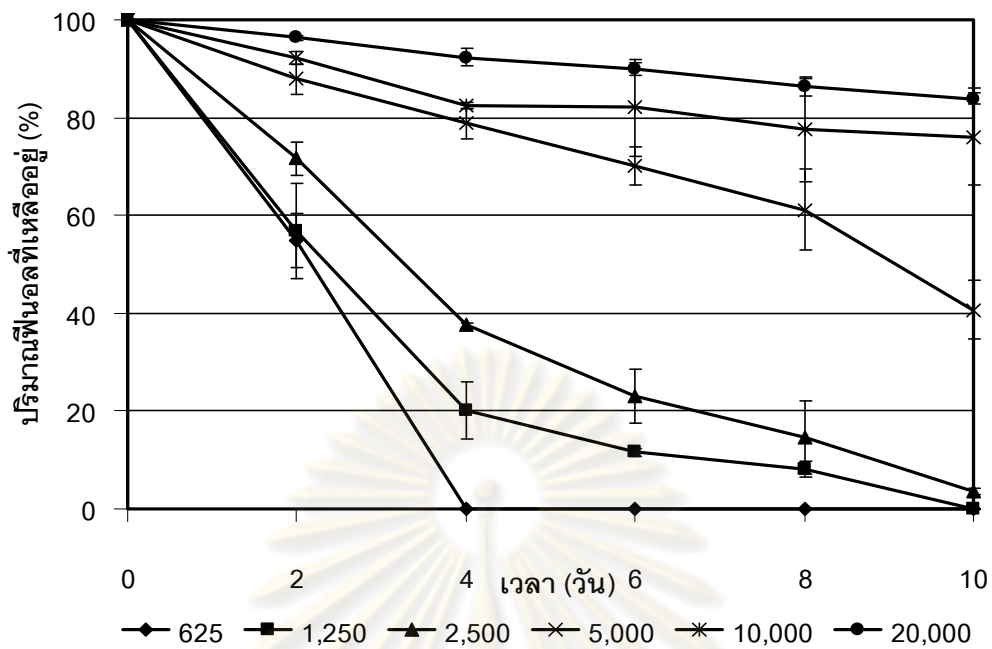
บทที่ 4

ผลการทดลอง และวิจารณ์ผลการทดลอง

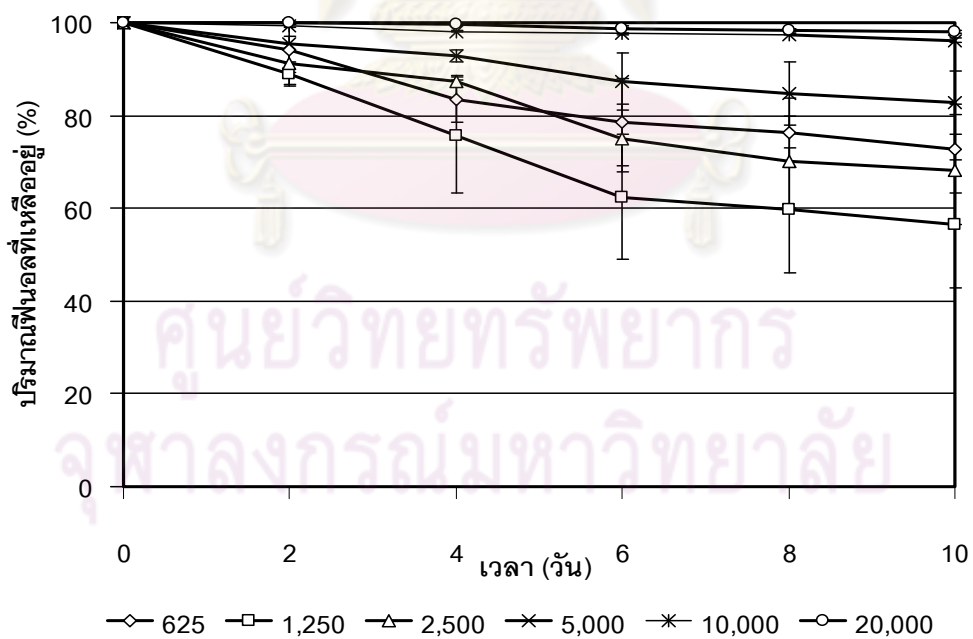
4.1 การศึกษาประสิทธิภาพการย่อยสลายฟีนอลของเซลล์อิสระ

ศึกษาประสิทธิภาพการย่อยสลายฟีนอลที่มีความเข้มข้นของฟีนอล 625-20,000 มิลลิกรัมต่อลิตรของเชื้อผสมแบบเซลล์อิสระ โดยเก็บตัวอย่างวันที่ 0, 2, 4, 6, 8 และ 10 จากนั้นนำไปวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลด้วยเทคนิค Colorimetric method ตามวิธีการของ Greenberg และคณะ (1992) ตามวิธีในข้อ 3.6.2 ผลการวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลที่เหลืออยู่โดยคิดเป็นเปอร์เซ็นต์เปรียบเทียบกับวันที่ 0 ซึ่งคิดเป็น 100 เปอร์เซ็นต์ และหาจำนวนของแบคทีเรียทั้งหมดตามวิธีในข้อ 3.6.1 โดยคำนวณเป็น CFU ต่อชุดทดลอง = CFU ต่อมิลลิลิตร x 100 มิลลิลิตร

พบว่าเชื้อผสมสามารถย่อยสลายฟีนอลได้ดีที่ความเข้มข้น 625 – 2,500 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยที่ 625 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถย่อยสลายฟีนอลได้มากกว่า 50% ในวันที่ 2 และสามารถย่อยสลายฟีนอลได้ 100% ในวันที่ 4 ส่วนที่ความเข้มข้น 1,250 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถย่อยสลายฟีนอลได้มากกว่า 80% ในวันที่ 4 และสามารถย่อยสลายฟีนอลได้ 100% ในวันที่ 10 ที่ความเข้มข้น 2,500 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถย่อยสลายฟีนอลได้เกือบหมดในวันที่ 10 ทั้งนี้เชื้อผสมไม่สามารถย่อยสลายฟีนอลที่มีความเข้มข้นสูง โดยที่ความเข้มข้น 5,000 มิลลิกรัมต่อลิตร แบคทีเรียสามารถย่อยสลายฟีนอลได้เพียง 60% ในวันที่ 10 และที่ความเข้มข้น 10,000 และ 20,000 มิลลิกรัมต่อลิตร แบคทีเรียสามารถย่อยสลายฟีนอลได้น้อยกว่า 50 % ดังรูปที่ 4.1 ในขณะเดียวกันชุดควบคุมซึ่งประกอบด้วยอาหารเหลว CFMM และฟีนอล แต่ไม่มีเชื้อ พบว่าเมื่อเวลาผ่านไป 10 วัน ที่ความเข้มข้นต่างๆ ฟีนอลมีปริมาณลดลงเพียงเล็กน้อย ซึ่งน่าจะเกิดจากกระบวนการทางกายภาพ เช่น การระเหยของฟีนอล และเกิดจากการย่อยสลายโดยแสงในธรรมชาติ (รูปที่ 4.2) ซึ่งเซลล์อิสระให้ผลการย่อยสลายฟีนอลใกล้เคียงกับงานวิจัยของ Adav และคณะ (2007) ศึกษาการย่อยสลายฟีนอลโดย *Acinetobacter* sp. พบว่าเซลล์อิสระสามารถย่อยสลายฟีนอล 100% ที่ความเข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อลิตร ภายใน 24 ชั่วโมง และงานวิจัยของ Wang และคณะ (2007) ศึกษาการย่อยสลายฟีนอลโดย *Acinetobacter* sp. PD12 พบว่าเซลล์อิสระสามารถย่อยสลายฟีนอลได้เพียง 99.6% ที่ความเข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อลิตร ภายใน 9 ชั่วโมง จากงานวิจัยข้างต้นแสดงว่าแบคทีเรียอิสระสามารถย่อยสลายฟีนอลได้ดี เมื่อฟีนอลมีความเข้มข้นประมาณ 500 มิลลิกรัมต่อลิตร จึงจำเป็นต้องพัฒนาวิธีเพื่อเพิ่มความสามารถของแบคทีเรียในการย่อยสลายฟีนอลความเข้มข้นสูงต่อไป

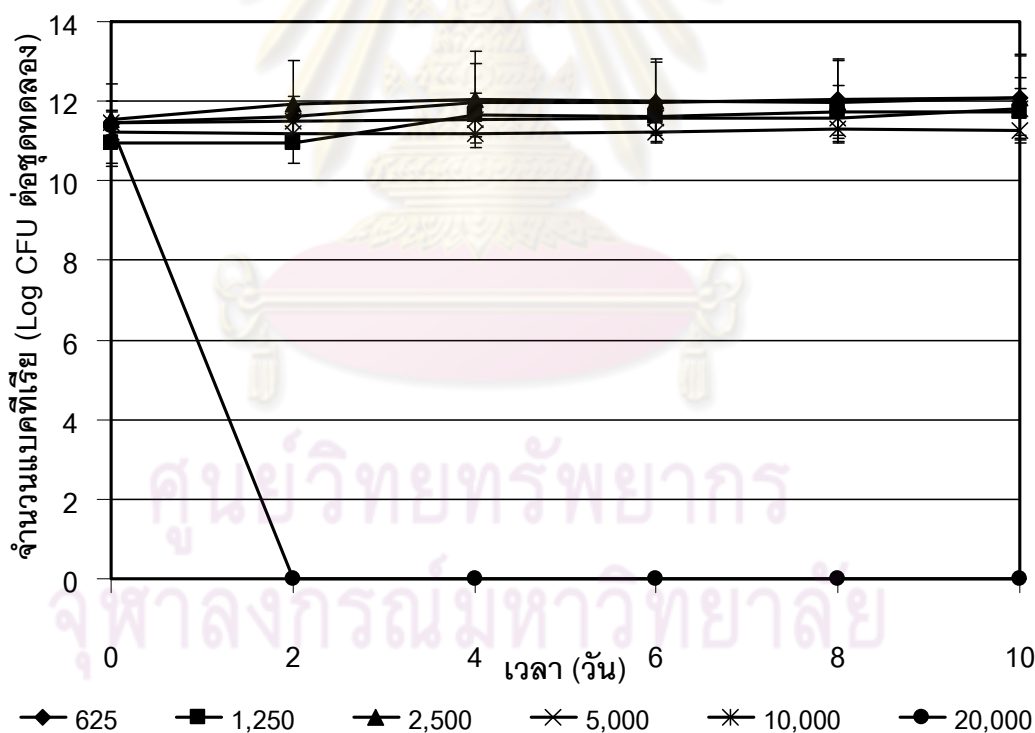


รูปที่ 4.1 ปริมาณฟีนอลที่เหลืออยู่ (%) ของเซลล์อิสระในการย่อยสลายฟีนอลที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 625-20,000 มิลลิกรัมต่อลิตร



รูปที่ 4.2 ปริมาณฟีนอลที่เหลืออยู่ (%) ของชุดควบคุมในการย่อยสลายฟีนอลที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 625-20,000 มิลลิกรัมต่อลิตร

ผลการศึกษากการเจริญของเชื้อผสมพบว่าในวันที่ 0 ของการทดลอง จำนวนแบคทีเรียทั้งหมดที่ความเข้มข้นฟีนอล 625, 1,250, 2,500, 5,000, 10,000 และ 20,000 มิลลิกรัมต่อลิตร มีค่าเริ่มต้นประมาณ 11.46, 10.95, 11.55, 11.44, 11.22 และ 11.38 Log CFU ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ เมื่อเวลาผ่านไป 10 วัน พบว่าจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดมีจำนวนเป็น 12.07, 11.72, 12.07, 11.83, 11.24 และ 0 Log CFU ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ที่ความเข้มข้นฟีนอล 625- 2,500 มิลลิกรัมต่อลิตรเชื้อผสมมีจำนวนเพิ่มขึ้นอย่างชัดเจน สอดคล้องกับปริมาณฟีนอลที่ลดลงอย่างรวดเร็ว แสดงให้เห็นว่า Co-culture สามารถใช้ฟีนอลเป็นแหล่งพลังงาน และแหล่งคาร์บอนในการเจริญ (รูปที่ 4.3) ในกรณีความเข้มข้นฟีนอลสูงกว่า 2,500 มิลลิกรัมต่อลิตร แบคทีเรียมีการเจริญน้อย และที่ฟีนอล 20,000 มิลลิกรัมต่อลิตร แบคทีเรียไม่สามารถเจริญได้ แสดงว่าฟีนอลที่ความเข้มข้นสูงมีพิษต่อแบคทีเรีย ดังงานวิจัยของ Heipieper และคณะ (1992) และ Keweloh และคณะ (1990) รายงานว่าฟีนอลเป็นสารเคมีอันตรายที่มีผลต่อเซลล์แบคทีเรียโดยจะทำให้สูญเสียความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้มเซลล์ และรบกวนการทำงานของ membrane barrier รวมทั้งยับยั้งการทำหน้าที่ของ membrane protein ส่งผลให้แบคทีเรียตายเมื่อความเข้มข้นของฟีนอลสูง



รูปที่ 4.3 จำนวนแบคทีเรียระหว่างการย่อยสลายฟีนอลของเซลล์อิสระ

4.2 การสังเคราะห์ซิลิกา

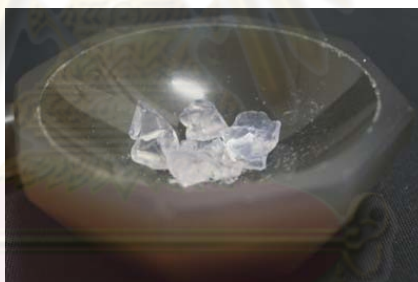
การสังเคราะห์ซิลิกาสำหรับใช้สร้างแบคทีเรียในงานวิจัยนี้ ใช้ตัวเร่งปฏิกิริยา 2 ประเภท ได้แก่ ตัวเร่งปฏิกิริยาที่เป็นกรด และตัวเร่งปฏิกิริยาที่เป็นเบส

4.2.1 การสังเคราะห์ซิลิกาเมื่อใช้ตัวเร่งปฏิกิริยาเป็นกรด

การสังเคราะห์ซิลิกาเมื่อใช้สารละลาย 0.1 M HCl เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา

(a) ซิลิกา KAa และ KAac

การสังเคราะห์ซิลิกาโดยใช้และไม่ใช้สารลดแรงตึงผิว (CTAB) เป็นสารต้นแบบ ด้วยอัตราส่วนโดยโมลของสารตั้งต้นเป็น 1 TEOS : 4 (0.1 M HCl) : 1 DMF : 4 MeOH ผลการศึกษาพบว่าเมื่อผสม TEOS ตัวเร่งปฏิกิริยา DMF และ MeOH เข้าด้วยกัน จะสังเกตเห็นสารละลายใสแยกเป็นชั้นๆ จากนั้นนำไปอบในตู้อบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ซิลิกาจะเกิดเป็นเจล หลังจากนั้นทำให้ซิลิกาแห้งที่อุณหภูมิห้อง สุดท้ายจะได้ซิลิกา KAa (ไม่มีสารลดแรงตึงผิว) และ KAac (ใช้สารลดแรงตึงผิวเป็นสารต้นแบบในการสังเคราะห์) ที่มีลักษณะเป็นก้อนใส ซิลิกาที่สังเคราะห์ได้มีขนาดประมาณ $0.5 \times 0.5 \times 0.5$ ซม.³ ต่อก้อน หรือขนาดของซิลิกาที่สังเคราะห์ได้ขึ้นอยู่กับภาชนะที่ใช้ในการสังเคราะห์ซิลิกา ดังรูปที่ 4.4



รูปที่ 4.4 ลักษณะของซิลิกา KAa และ KAac

(b) ซิลิกา KBa

การสังเคราะห์ซิลิกาโดยใช้สารลดแรงตึงผิว (CTAB) เป็นสารต้นแบบ และใช้อัตราส่วนโดยโมลของสารในการสังเคราะห์เป็น 1 TEOS : 140 H₂O : 0.18 CTAB : 13 MeOH ผลการศึกษาพบว่าเมื่อผสม CTAB และสารละลายกรดลงในขวดสังเคราะห์ขนาด 50 มิลลิลิตร คนเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส จะสังเกตเห็นเป็นสารละลายใส จากนั้นเติม MeOH และ TEOS ลงในขวดดังกล่าว สารละลายจะมีความหนืด และมีสีขาวขุ่น คนต่อที่อุณหภูมิเดียวกันเป็นเวลา 4 ชั่วโมง และที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 19 ชั่วโมง จากนั้นกรองและล้างซิลิกาที่ได้ด้วย 1 mM HNO₃ จนสารละลายที่ได้จากการล้างมีสมบัติเป็นกลาง แล้วนำซิลิกาที่ได้ไปอบที่

อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง เพื่อให้แห้งสุดท้ายจะได้ซิลิกา KBa ที่มีลักษณะเป็นผงสีขาว ที่มีขนาดประมาณ 0.75-1.25 ไมโครเมตร ดังรูปที่ 4.5



รูปที่ 4.5 ลักษณะของซิลิกา KBa

(c) ซิลิกา EntA

ซิลิกา EntA เป็นซิลิกาสำหรับตรึงเซลล์แบบกักขัง ผลการศึกษาพบว่าเมื่อผสม TEOS และตัวเร่งปฏิกิริยาลงในขวดสังเคราะห์ขนาด 15 มิลลิลิตร จะสังเกตเห็นสารละลายใสแยกเป็นชั้น จากนั้นคนแรงๆ จนสารละลายใสกลายเป็นเนื้อเดียวกัน บ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง เมื่อครบ 72 ชั่วโมง จะสังเกตเห็นว่าสารละลายมีความหนืดเพิ่มขึ้นจะได้ส่วนผสม A เทส่วนผสม A ลงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ จากนั้นนำหัวเชื้อแบคทีเรียที่เตรียมไว้ผสมกับ KOH สำหรับชุดควบคุมจะใช้อาหารเหลว CFMM แทนหัวเชื้อแบคทีเรียในปริมาณที่เท่ากัน แล้วเติมลงในส่วนผสม A จะเกิดเป็นเจลภายใน 2-3 นาที ทำการเปิดฝาจานอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อให้เจลแห้ง สุดท้ายจะได้ซิลิกา EntA จะมีลักษณะเป็นของแข็งคล้ายแก้ว ใสไม่มีสีถ้าไม่เติมแบคทีเรีย ดังรูปที่ 4.6 แต่ถ้าเติมแบคทีเรียจะมีสีตามสีของ *Methylobacterium* sp. NP3 และซิลิกา EntA ที่สังเคราะห์ได้มีขนาดขึ้นอยู่กับภาชนะที่ใช้ในการสังเคราะห์ซิลิกา



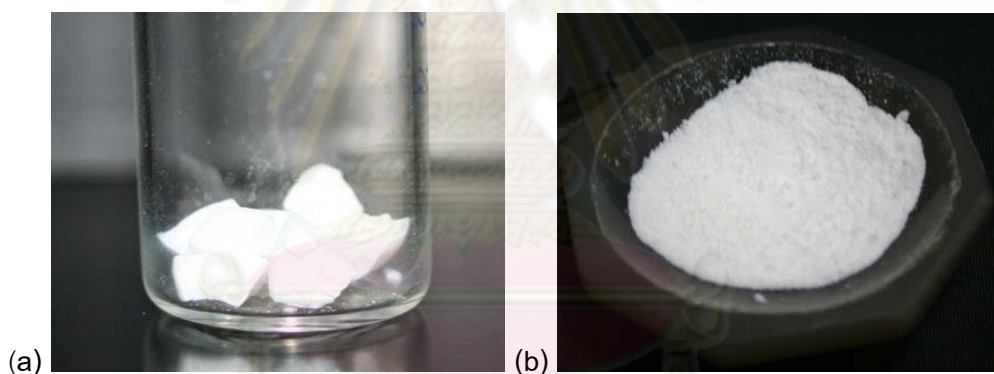
รูปที่ 4.6 ลักษณะของซิลิกา EntA ที่ไม่มีแบคทีเรีย

4.2.2 การสังเคราะห์ซิลิกาเมื่อใช้ตัวเร่งปฏิกิริยาเป็นเบส

การสังเคราะห์ซิลิกาเมื่อใช้ 0.1 M NaOH หรือ 0.1 M NH_4OH เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา

(a) ซิลิกา KAb, KAbb, KAbc และ KAbbc

การสังเคราะห์ซิลิกาโดยใช้ และไม่ใช้สารลดแรงตึงผิว (CTAB) เป็นสารต้นแบบ และใช้อัตราส่วนโดยโมลของสารในการสังเคราะห์เป็น 1 TEOS : 4 (0.1 M NaOH หรือ 0.1 M NH_4OH) : 1 DMF : 4 MeOH ผลการศึกษาพบว่าเมื่อผสม TEOS ตัวเร่งปฏิกิริยา DMF และ MeOH เข้าด้วยกัน จะสังเกตเห็นสารละลายแยกเป็นชั้นๆ และมีสีขาวขุ่น จากนั้นนำไปอบในตู้อบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ซิลิกาจะเกิดเป็นเจล หลังจากนั้นทำให้ซิลิกาแห้งที่อุณหภูมิห้อง สุดท้ายจะได้ซิลิกา KAb และ KAbb มีลักษณะเป็นก้อนขาวขุ่น เนื่องจากไม่มีสารลดแรงตึงผิวเป็นสารต้นแบบ โดยซิลิกาที่สังเคราะห์ได้มีขนาดประมาณ $0.5 \times 0.5 \times 0.5$ ซม.³ ต่อก้อน หรือขนาดของซิลิกาที่สังเคราะห์ได้ขึ้นอยู่กับภาชนะที่ใช้ในการสังเคราะห์ซิลิกา แต่ซิลิกา KAbc และ KAbbc มีลักษณะเป็นผงสีขาวคล้ายแป้ง มีขนาดประมาณ 0.75-1.25 ไมโครเมตร เนื่องจากมีสารลดแรงตึงผิวเป็นสารต้นแบบ ดังรูปที่ 4.7



รูปที่ 4.7 ลักษณะของซิลิกา KAb และ KAbb (a) และซิลิกา KAbc และ KAbbc (b)

(b) ซิลิกา KBaE

ซิลิกา KBaE เป็นซิลิกาสำหรับตรึงเซลล์แบบกักขัง ผลการศึกษาพบว่าเมื่อผสมซิลิกา KBa และตัวเร่งปฏิกิริยา (2 M NaOH) ลงในขวดสังเคราะห์ขนาด 50 มิลลิลิตร แล้วคนจนเจลละลาย แล้วจึงเติม 0.75 M citric acid และเติมหัวเชื้อแบคทีเรียจะเกิด gelation ทันที สำหรับชุดควบคุมใช้อาหารเหลว CFMM แทนหัวเชื้อแบคทีเรียในปริมาณที่เท่ากัน จึงเก็บเจลที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 วัน เมื่อครบ 3 วัน ทำการเปิดฝาขวดสังเคราะห์เพื่อทำให้เจลแห้ง สุดท้ายจะได้ซิลิกา KBaE ที่มีลักษณะคล้ายแก้วสีขาวใสถ้าไม่เติมแบคทีเรีย ดังรูปที่ 4.8 แต่ถ้าเติมแบคทีเรียจะมีสี

ตามสีของ *Methylobacterium* sp. NP3 และซิดิกา KBaE ที่สังเคราะห์ได้มีขนาดขึ้นอยู่กับภาวะที่ใช้ในการสังเคราะห์ซิดิกา



รูปที่ 4.8 ลักษณะของซิดิกา KBaE ที่ไม่มีแบคทีเรีย

4.2.3 สรุปลักษณะที่สังเคราะห์ได้

การสังเคราะห์ซิดิกาแบบต่างๆ ข้างต้น ทำให้ได้ซิดิกาทั้งหมด 9 ชนิด ที่มีลักษณะแสดงดังตารางที่ 4.1 โดยงานวิจัยนี้จะเลือกซิดิกาที่มีลักษณะเป็นก้อนได้แก่ KAa, KAac, KAb, KAbb, EntA และ KBaE ไปทำการตรึงด้วยเชื้อผสมในขั้นตอนต่อไป เนื่องจากซิดิกาที่มีลักษณะเป็นผงเมื่อนำไปตรึงเซลล์ ซิดิกาบางส่วนจะเกาะที่ข้างขวด ทำให้ลื่นเป็ลื่องซิดิกา

เมื่อเปรียบเทียบวิธีการ และสารเคมีที่ใช้ในการสังเคราะห์ซิดิกาในงานวิจัยนี้กับงานวิจัยของ Branyik และคณะ (1998) พบว่าวิธีการ และสารเคมีที่ใช้ในการสังเคราะห์ไม่แตกต่างกัน เนื่องจากทำการดัดแปลงวิธีการสังเคราะห์ สำหรับสังเคราะห์ซิดิกา EntA และ KBaE แต่เวลาที่ใช้ในการสังเคราะห์ซิดิกาทั้ง 2 ชนิดจะสั้นกว่า และเมื่อเปรียบเทียบกับงานวิจัยของ Nassif และคณะ (2002) พบว่าใช้สารเคมีในการสังเคราะห์ที่มีราคาแพง แสดงให้เห็นว่าซิดิกาที่สังเคราะห์ขึ้นในงานวิจัยนี้มีวิธีการสังเคราะห์ที่ไม่ยุ่งยาก ใช้สารเคมีน้อย และราคาถูก

ตารางที่ 4.1 การเปรียบเทียบลักษณะของซิลิกาที่สังเคราะห์ได้จากซิลิกาจากงานวิจัยอื่น

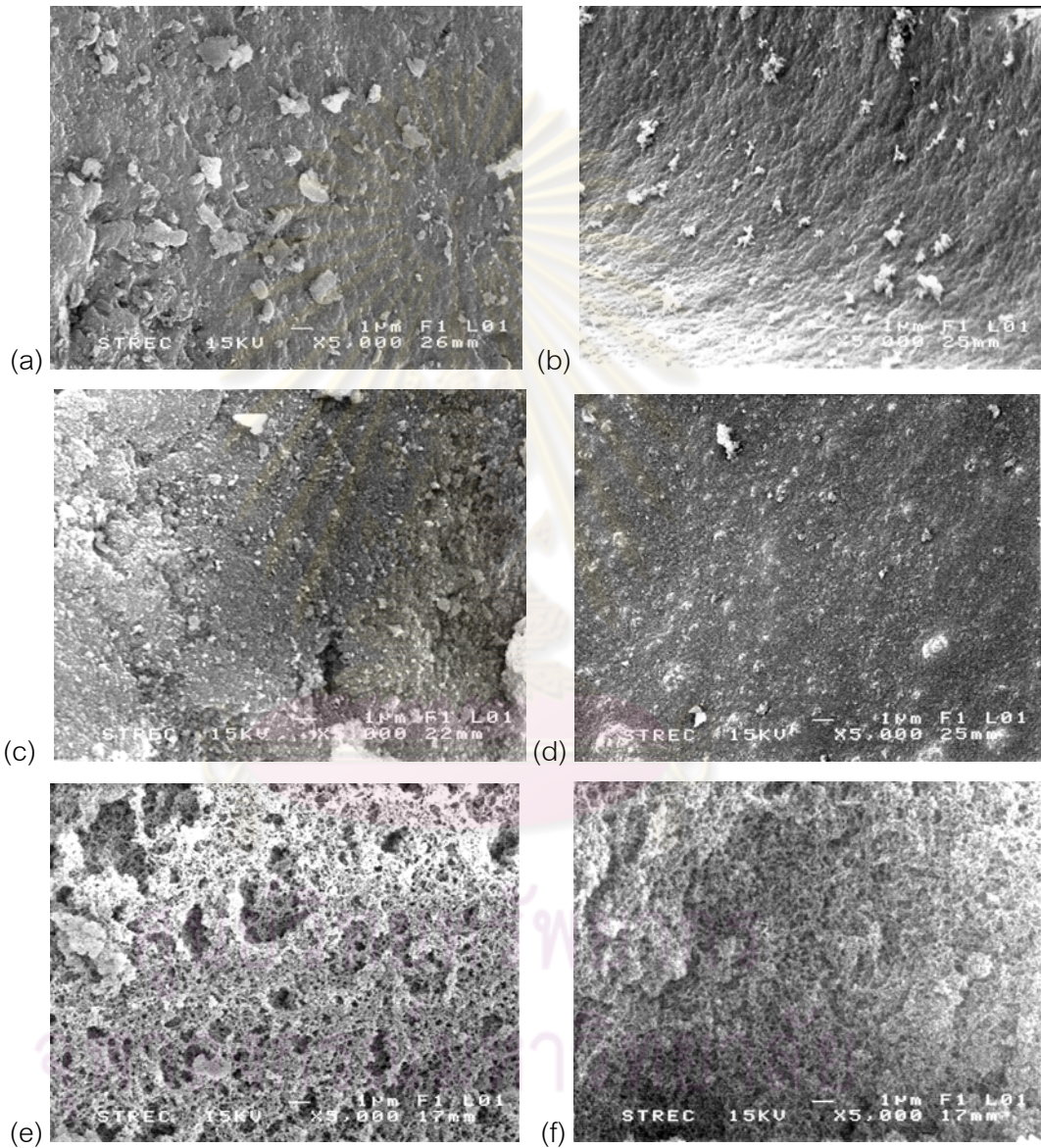
ชนิดของซิลิกา	อัตราส่วนโดยโมลขององค์ประกอบของสาร	เวลาที่ใช้ในการสังเคราะห์ (ชั่วโมง)	ลักษณะเจลที่สังเคราะห์ได้
KAa	TEOS : HCl : DMF : MeOH	144	ก้อนใส
KAac	TEOS : CTAB 0.06 M ใน HCl : DMF : MeOH	144	ก้อนใส
KAb	TEOS : NaOH : DMF : MeOH	144	ก้อนขาวขุ่น
KAbc	TEOS : CTAB 0.06 M ใน NaOH : DMF : MeOH	144	ผงสีขาว
KAbb	TEOS : NH ₄ OH : DMF : MeOH	144	ก้อนขาวขุ่น
KAbbc	TEOS : CTAB 0.06 M ใน NH ₄ OH : DMF : MeOH	144	ผงสีขาว
KBa	TEOS : HCl : CTAB : MeOH	48	ผงสีขาว
KBaE	KBa : NaOH : citric acid	84	ก้อน
EntA	TEOS : HCl : KOH	84	ก้อน
Branyik และคณะ (1998)	TEOS : slightly acid : KOH	96	ก้อน
Nassif และคณะ (2002)	Sodium silicate (27wt% SiO ₂ ,10wt% NaOH) : Ludox HS-40	2	ก้อน

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.3 การจำแนกลักษณะทางกายภาพ และชีวภาพของซิลิกาที่สังเคราะห์

4.3.1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยา (Morphology)

จากการนำซิลิกาก่อนตรึงแบคทีเรียไปศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา โดยใช้เครื่อง Scanning Electron Microscope พบว่า KAa และ KAac มีพื้นที่ผิวภายนอกค่อนข้างเรียบ ส่วน KAb และ KAbb มีพื้นที่ผิวภายนอกขรุขระ และ EntA และ KBaE มีรูพรุนเห็นได้ชัดเจน (รูปที่ 4.9)

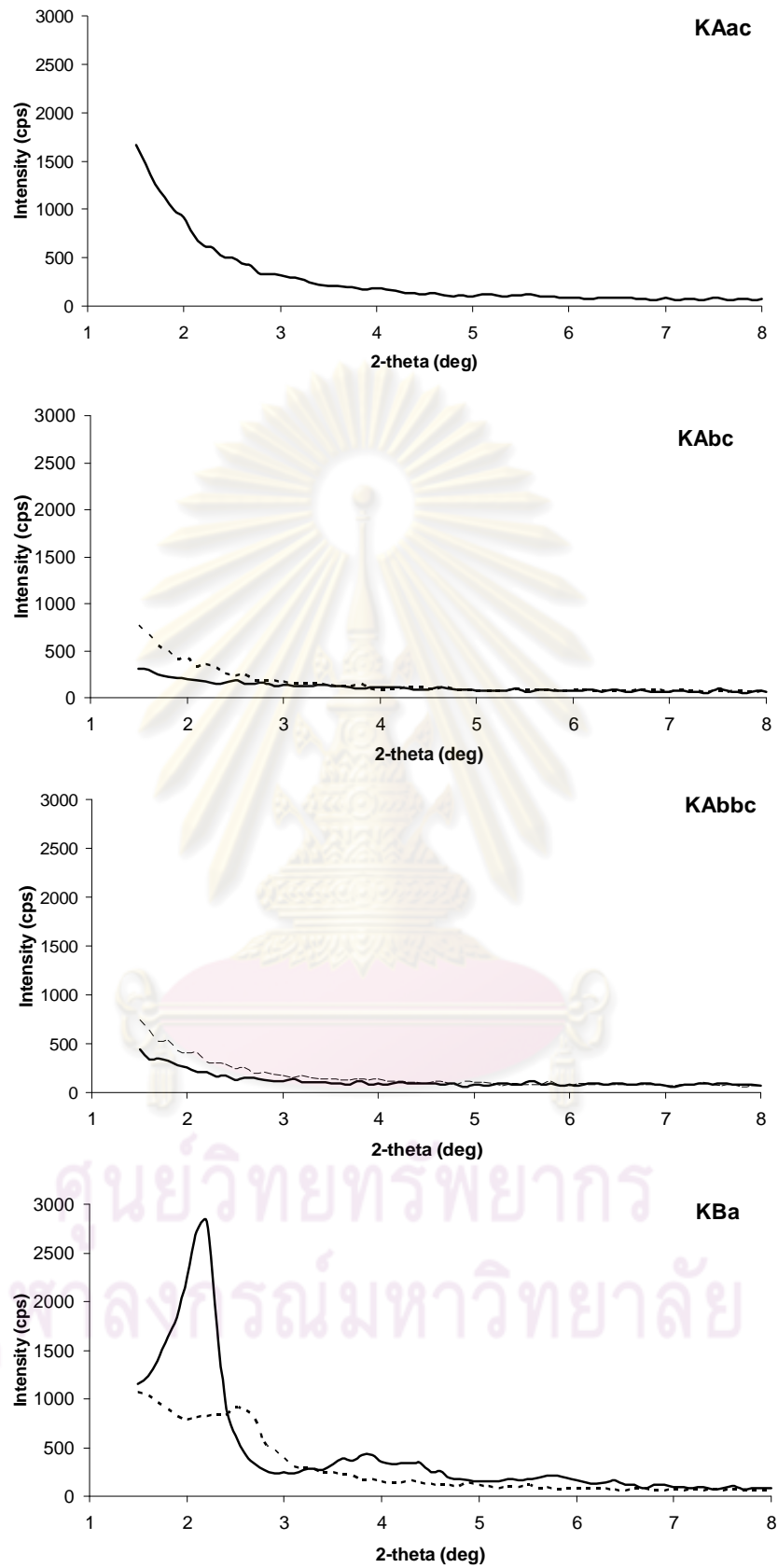


รูปที่ 4.9 ลักษณะพื้นผิวภายนอกของซิลิกาที่ได้จากการสังเคราะห์ (As-synthesized) (a) KAa, (b) KAac, (c) KAb, (d) KAbb, (e) EntA และ (f) KBaE ที่กำลังขยาย 5,000 เท่า

4.3.2 ลักษณะการจัดเรียงตัวของซิลิกา โดยใช้เทคนิค XRD

งานวิจัยนี้ได้ทำการศึกษาลักษณะความเป็นผลึกของซิลิกา KAac, KAbc, KAbbc, และ KBa ที่สังเคราะห์ขึ้น เนื่องจากซิลิกาทั้ง 4 ชนิดนี้มีสารลดแรงตึงผิวเป็นสารต้นแบบ เมื่อใช้เทคนิค X-ray diffraction ตรวจสอบความเป็นผลึกของซิลิกาที่สังเคราะห์ได้ (as-synthesized silica) เปรียบเทียบกับซิลิกาชนิดเดียวกันที่นำไปเผาที่อุณหภูมิสูง (calcined silica) ของซิลิกาทั้ง 4 ชนิด เพื่อศึกษาโครงสร้างของซิลิกา ผลที่ได้แสดงดังรูปที่ 4.10 และเมื่อนำรูปแบบการเบี่ยงเบนรังสีเอ็กซ์ที่ได้ไปคำนวณหาระยะห่างระหว่างระนาบ (interplanar distance) ของซิลิกาเพื่อศึกษาลักษณะการจัดเรียงตัวของซิลิกา (ตารางที่ 4.2)

จากรูปที่ 4.10 และตารางที่ 4.2 จะเห็นได้ว่ารูปแบบการเบี่ยงเบนรังสีเอ็กซ์ของซิลิกา KBa ปรากฏพีกให้เห็นที่ 2-theta เท่ากับ $2.1-2.5^{\circ}$ แสดงว่าซิลิกาเหล่านี้มีโครงสร้างบางส่วนที่จัดเรียงตัวอย่างเป็นระเบียบ และยังคงความเป็นระเบียบอยู่บ้างแม้ว่าจะได้รับการเผาที่อุณหภูมิสูง นอกจากนั้นยังพบว่า calcined silica มีขนาดรูพรุนเล็กลงเมื่อเทียบกับ as-synthesized silica ชนิดเดียวกัน แสดงว่าการเผาที่อุณหภูมิสูงทำให้เกิดการหดตัวของขนาดรูพรุนเช่นกัน สำหรับในกรณีของซิลิกา KAac, KAbc และ KAbbc จากรูปแบบการเบี่ยงเบนรังสีเอ็กซ์ของซิลิกาทั้งก่อนและหลังการเผาซึ่งไม่ปรากฏพีกใดๆ ให้เห็นเลย แสดงว่าซิลิกาน่าจะมีโครงสร้างเป็นแบบอสัณฐาน



รูปที่ 4.10 รูปแบบการเบี่ยงเบนรังสีเอ็กซ์ของซิลิกาที่สังเคราะห์ขึ้นโดยใช้สารตั้งต้นซิลิกาที่ไม่ผ่านการเผา (เส้นทึบ) และซิลิกาที่ผ่านการเผา (เส้นประ)

ตารางที่ 4.2 ระยะห่างระหว่างระนาบ (d) ที่คำนวณได้จากการตรวจสอบความเป็นผลึกของซิลิกา

ชนิดของซิลิกา	as-synthesized silica		calcined silica	
	2-theta	d(Å)	2-theta	d(Å)
KAac	-	-	-	-
KAbc	-	-	-	-
KAbbc	-	-	-	-
KBa	2.18	40.50	2.52	35.03

4.3.3 การทดสอบความเป็นพิษของซิลิกาต่อการเจริญของแบคทีเรีย

การทดสอบความเป็นพิษของซิลิกาต่อการเจริญของแบคทีเรีย โดยการนำซิลิกาที่สังเคราะห์ได้เติมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีหัวเชื้อแบคทีเรีย แล้วเขย่าเป็นเวลา 10 วัน ผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่า เมื่อนำซิลิกาทั้ง 9 ชนิด ที่สังเคราะห์ได้มาใช้โดยไม่ล้างซิลิกา ซิลิกาที่สังเคราะห์ได้เป็นพิษต่อแบคทีเรีย ยกเว้น ซิลิกา KAbb, KBaE และ EntA ดังนั้นจึงนำซิลิกา 3 ชนิด คือ KAa, KAb และ KAbb มาล้างด้วยน้ำ Milli-Q และซิลิกา KAac, KAbc และ KAbbc มาล้างด้วยสารละลายเอทานอล พบว่าซิลิกาที่ผ่านการล้างแล้ว (As-removed) มีเพียง 2 ชนิดเท่านั้นที่มีพิษต่อแบคทีเรีย คือ ซิลิกา KAbc และ KAbbc จากนั้นนำซิลิกา KAbc, KAbbc และ KBa ไปเผาที่อุณหภูมิสูง (calcined) เพื่อกำจัดสารลดแรงตึงผิวออก พบว่าซิลิกา KAbc และ KAbbc ยังคงมีความเป็นพิษต่อแบคทีเรีย แต่ซิลิกา KBa ไม่มีความเป็นพิษต่อแบคทีเรีย แสดงว่าถ้านำซิลิกาที่สังเคราะห์ได้มาใช้โดยที่ไม่ล้างหรือกำจัดสารลดแรงตึงผิวออกก่อน จะทำให้แบคทีเรียไม่สามารถเจริญได้ เพราะที่ผิวของซิลิกายังมีความเป็นกรดหรือเบสมากเกินไป ดังนั้นก่อนที่จะนำซิลิกามาใช้ต้องล้างซิลิกา และกำจัดสารลดแรงตึงผิวออกก่อน เพื่อให้ผิวของซิลิกามีค่ากรด-เบสเป็นกลาง จากผลการศึกษาดังกล่าวจึงเลือกซิลิกา KAa, KAac, KAb, KAbb, EntA และ KBaE ไปทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายฟีนอลในขั้นตอนต่อไป สำหรับ KBa มีลักษณะเป็นผงจึงนำมาใช้เป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์ KBaE แสดงให้เห็นความเป็นพิษของซิลิกาต่อการเจริญของแบคทีเรียดังตารางที่ 4.3

ตารางที่ 4.3 ความเป็นพิษของซิลิกาต่อการเจริญของแบคทีเรีย

ชนิดซิลิกา	ความเป็นพิษต่อแบคทีเรีย			
	As-synthesized (ไม่ได้ล้างซิลิกา)	ล้างซิลิกาด้วย Milli-Q	ล้างซิลิกาด้วย สารละลาย เอทานอล (As-removed)	เผาที่ อุณหภูมิสูง (Calcined)
KAa	+	-	NA	NA
KAac	+	NA	-	NA
KAb	+	-	NA	NA
KAbc	+	NA	+	+
KAbb	-	-	NA	NA
KAbbc	+	NA	+	+
KBa	+	NA	NA	-
KBaE	-	NA	NA	NA
EntA	-	NA	NA	NA

* เครื่องหมาย (-) หมายถึง ไม่พบว่ามีพิษต่อ Co-culture

(+) หมายถึง พบว่ามีพิษต่อ Co-culture

NA หมายถึง Not applicable

4.3.4 การเปรียบเทียบลักษณะของซิลิกา

จากการจำแนกลักษณะของซิลิกาที่สังเคราะห์ข้างต้น ประกอบด้วย ลักษณะทางสัณฐานวิทยา ลักษณะการจัดเรียงตัวของซิลิกา และการทดสอบความเป็นพิษของซิลิกาต่อการเจริญของแบคทีเรีย พบว่าวิธีการสังเคราะห์ และองค์ประกอบของสารตั้งต้นที่ใช้แตกต่างกัน ทำให้ได้ลักษณะของซิลิกาที่ต่างกัน ผลการศึกษาแสดงดังตารางที่ 4.4

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4.4 เปรียบเทียบลักษณะของซิดิกา

ชนิดซิดิกา	สัณฐานวิทยา	XRD	ความเป็นพิษต่อแบคทีเรีย
KAa	ผิวภายนอกเรียบ	NA	-
KAac	ผิวภายนอกเรียบ	อสัณฐาน	-
KAb	ผิวภายนอกเรียบ	NA	-
KAbc	NA	อสัณฐาน	+
KAbb	ผิวภายนอกเรียบ	NA	-
KAbbc	NA	อสัณฐาน	+
KBa	NA	ผลึก	-
KBaE	ผิวภายนอกขรุขระ เห็นรูพรุน	NA	-
EntA	ผิวภายนอกขรุขระ เห็นรูพรุน	NA	-

* เครื่องหมาย (-) หมายถึง ไม่พบว่ามีพิษต่อ Co-culture เมื่อล้างและกำจัด surfactant ออกจากซิดิกาแล้ว

(+) หมายถึง พบว่ามีพิษต่อ Co-culture เมื่อล้างและกำจัด surfactant ออกจากซิดิกาแล้ว

NA หมายถึง Not applicable

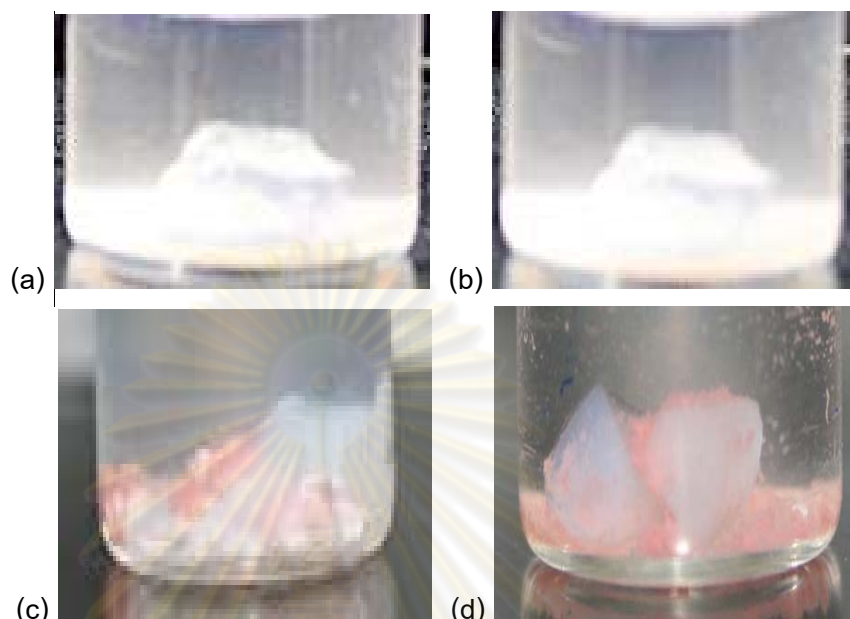
4.4 การศึกษาประสิทธิภาพการตรึงเชื้อผสมบนซิดิกา

4.4.1 การตรึงเชื้อผสมด้วยวิธีการยึดเกาะบนซิดิกา (Attachment)

การตรึงเซลล์บนซิดิกาชนิดต่างๆ ได้แก่ KAa, KAac, KAb และ KAbb ทำโดยนำแบคทีเรียจากข้อ 3.1.3 ที่มีเซลล์เริ่มต้นประมาณ 10^8 CFU ต่อมิลลิลิตร ปริมาณ 100 มิลลิลิตร และเติมฟีนอล 0.01 กรัมต่อลิตร จากนั้นเติมซิดิกา 500 กรัมต่อลิตร เขย่าด้วยความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 วัน ที่อุณหภูมิห้อง จะได้เซลล์ตรึงที่ต้องการ

ซิดิกาก่อนตรึงจะมีลักษณะเป็นของแข็งคล้ายแก้ว ใสไม่มีสี เมื่อสังเคราะห์โดยใช้ตัวเร่งปฏิกิริยาเป็นกรด และซิดิกาสีขาวขุ่นเมื่อสังเคราะห์โดยใช้ตัวเร่งปฏิกิริยาเป็นเบส ซึ่งลักษณะของซิดิกาจะขึ้นอยู่กับองค์ประกอบที่ใช้ในการสังเคราะห์ซิดิกา แต่เมื่อเราทำการตรึงเชื้อผสมบนซิดิกา

พบว่าเซลล์ที่ได้อาจจะเป็นสีชมพูอ่อนตามสีของ *Methylobacterium* sp. NP3 โดยเกาะอยู่บริเวณพื้นผิวด้านนอกของซีลิกา ดังรูปที่ 4.11

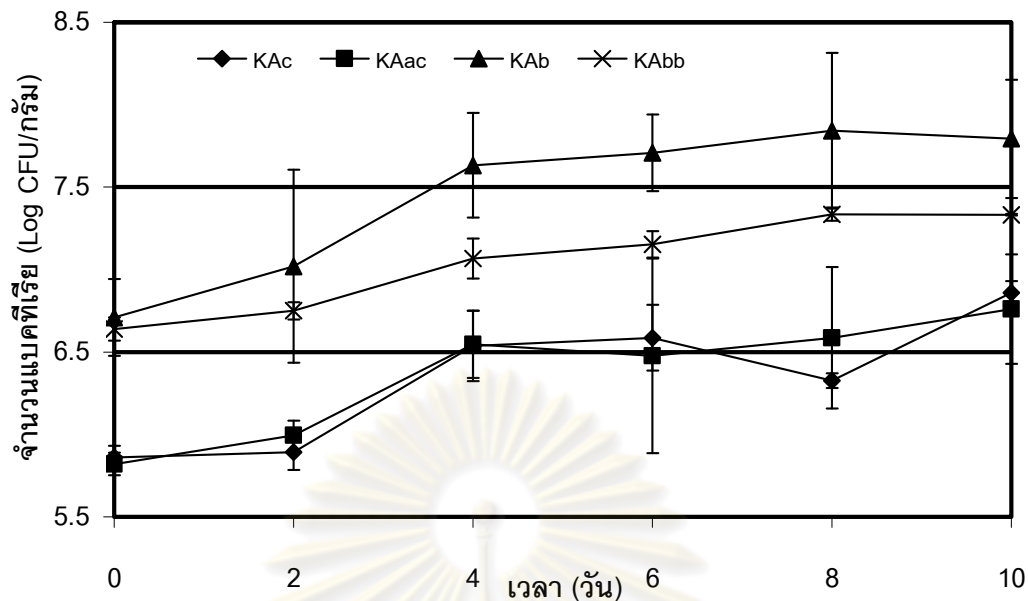


รูปที่ 4.11 ลักษณะของซีลิกาที่ถูกตรึงแบคทีเรีย ดังรูป (a) KAA (b) KAAC (c) KAB และ (d) KABB

4.4.1.1 ปริมาณเซลล์ที่ถูกตรึงบนซีลิกา KAA, KAAC, KAB และ KABB

การศึกษาปริมาณแบคทีเรียที่เกาะบนซีลิกา นำเซลล์ตรึงทั้ง 4 ชนิดที่ทำการตรึงเป็นเวลา 5 วัน ปริมาณ 50 กรัม เติมนลงในอาหารเหลว CFMM 100 มิลลิลิตร ที่มีฟินอล 0.01 กรัมต่อลิตร ทำโดยเก็บตัวอย่างในวันที่ 0, 2, 4, 6, 8 และ 10 จากนั้นวิเคราะห์จำนวนของแบคทีเรียทั้งหมดตามวิธีในข้อ 3.6.1

ผลการศึกษาปริมาณแบคทีเรียบนซีลิกา แสดงดังรูปที่ 4.12 พบว่าจำนวนแบคทีเรียที่ถูกตรึงบนซีลิกาชนิดต่างๆ มีปริมาณแตกต่างกัน พบว่าในวันที่ 0 ของการทดลอง จำนวนแบคทีเรียทั้งหมดที่ถูกตรึงบนซีลิกา KAA, KAAC, KAB และ KABB มีค่าเริ่มต้นเท่ากับ 5.86, 5.82, 6.71 และ 6.64 Log CFU ต่อกรัมซีลิกา ตามลำดับ เมื่อเวลาผ่านไป 10 วัน พบว่าแบคทีเรียมีจำนวนเพิ่มขึ้นซึ่งมีจำนวนเท่ากับ 6.86, 6.76, 7.79 และ 7.33 Log CFU ต่อกรัมซีลิกา ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียบนซีลิกามีการเจริญได้ และเซลล์ตรึงบนซีลิกา KAB มีจำนวนสูงสุด แต่ซีลิกาบางส่วนแตกเมื่อกระทบกับขวดในระหว่างที่เขย่า ทำให้เซลล์แบคทีเรียหลุดออกจากซีลิกา

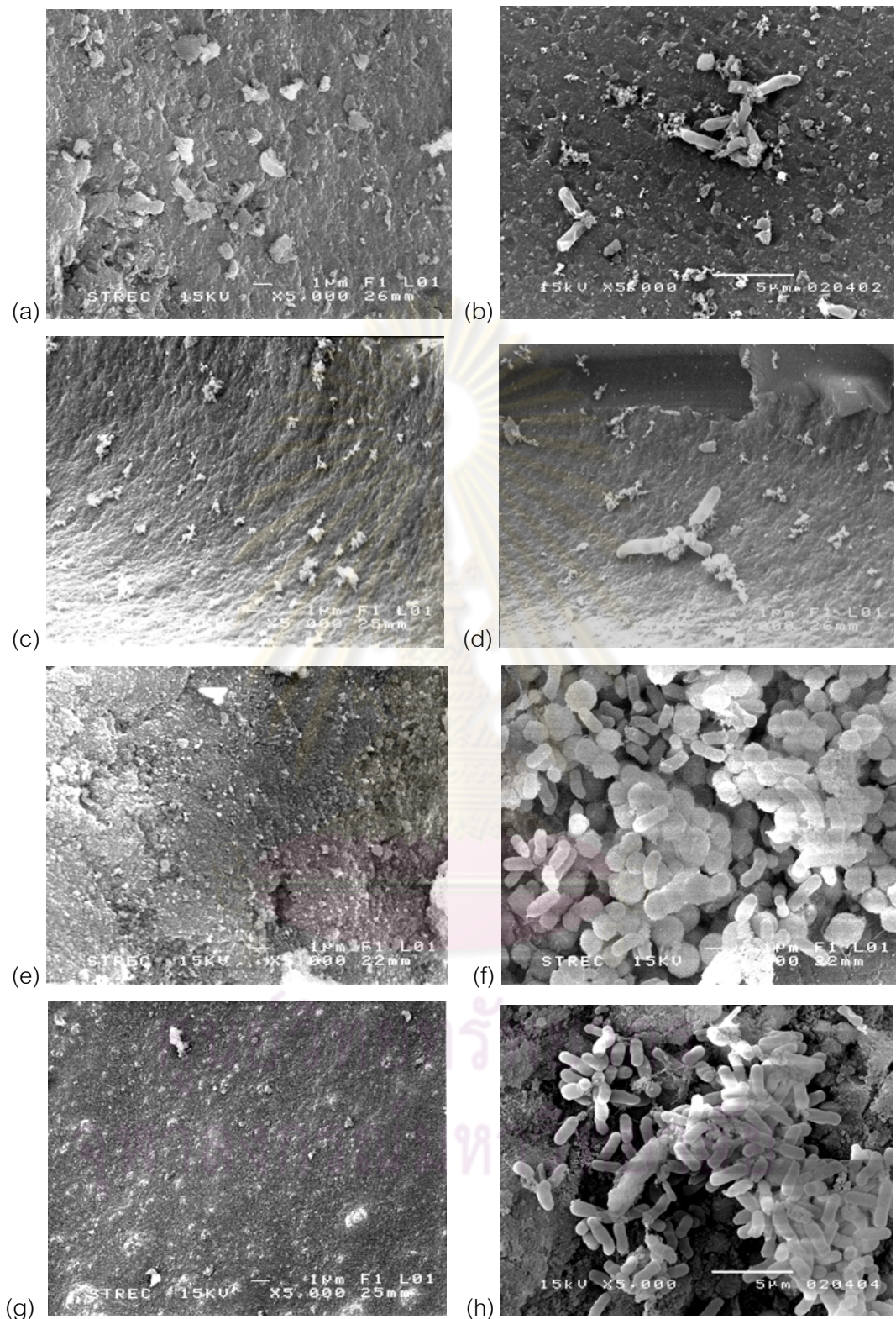


รูปที่ 4.12 จำนวนแบคทีเรียที่ถูกตรึงบนซิลิกา KAa, KAac, KAb และ KAbb

4.4.1.2 ลักษณะทางกายภาพของซิลิกา KAa, KAac, KAb และ KAbb ที่ผ่านการตรึงเซลล์โดยใช้เทคนิค Scanning Electron Microscopy (SEM)

จากการนำซิลิกาที่ผ่านการตรึงเซลล์ไปศึกษาลักษณะทางกายภาพโดยใช้เครื่อง Scanning Electron Microscope เปรียบเทียบกับซิลิกาก่อนตรึงเซลล์ ผลการศึกษาพบว่า KAa และ KAac ซึ่งมีพื้นที่ผิวด้านนอกค่อนข้างเรียบ จะมีแบคทีเรียเกาะอยู่บนผิวของซิลิกาน้อยกว่า KAb และ KAbb ซึ่งมีพื้นที่ผิวด้านนอกขรุขระ ทำให้แบคทีเรียสามารถเกาะบนผิวของซิลิกาได้ดีกว่า (4.13) นอกจากนี้พบว่าซิลิกาทั้ง 4 ชนิด มีขนาดรูพรุนเล็กกว่าขนาดของแบคทีเรีย ทำให้แบคทีเรียไม่สามารถเข้าไปอยู่ภายในโครงสร้างของซิลิกาได้ จึงส่งผลให้แบคทีเรียถูกตรึงบนซิลิกาแบบยึดเกาะ

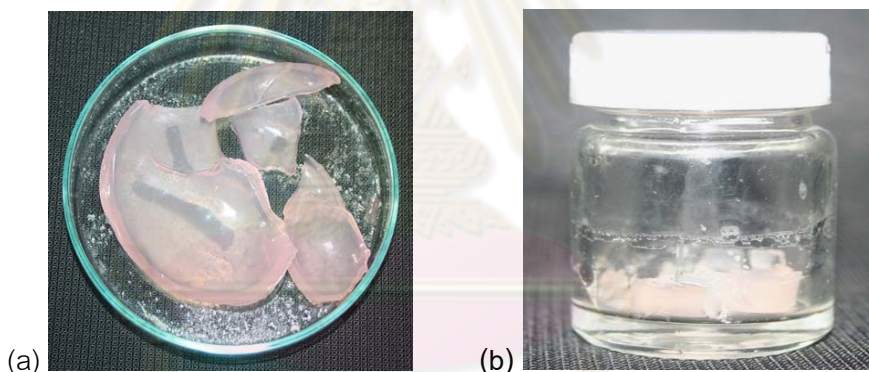
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 4.13 ลักษณะของขีลิก้า (a) KAA, (c) KAac, (e) KAb และ (g) KAbb ก่อนตรึงเซลล์ และ (b) KAA, (d) KAac, (f) KAb และ (h) KAbb ที่ผ่านการตรึงเซลล์โดยวิธีการสังเคราะห์แบบยัดเกาะ ที่กำลังขยาย 5,000 เท่า

4.4.2 การตรึงเชื้อผสมด้วยวิธีการกักขังในซิลิกา (Encapsulation)

การสังเคราะห์ซิลิกาโดยการตรึงแบคทีเรียด้วยวิธีการกักขังในซิลิกาที่ดัดแปลงจากวิธีของ Branyik และคณะ (1998) ทำให้ได้ซิลิกา 2 ชนิด คือ EntA และ KBaE ซึ่งจะมีเซลล์ฝังอยู่ในเนื้อซิลิกา ซิลิกาที่ไม่มีเชื้อจะมีลักษณะเป็นของแข็งคล้ายแก้วใสไม่มีสี แต่เมื่อเราใส่เชื้อผสมระหว่างสังเคราะห์ จะพบว่าซิลิกาที่ได้จะเป็นสีชมพูอ่อนตามสีของ *Methylobacterium* sp. NP3 ดังรูปที่ 4.14 (a) และ (b) ซึ่งขนาดของซิลิกาที่ได้ขึ้นอยู่กับภาชนะที่ใช้ในการสังเคราะห์ซิลิกา ทั้งนี้เมื่อนำมาใช้งานจะตัดซิลิกาเป็นชิ้นขนาด $1.0 \times 1.0 \times 0.5$ ซม.³ ต่อก่อน เมื่อเปรียบเทียบกับงานวิจัยของ Branyik และคณะ (1998) ซึ่งทำการสังเคราะห์ซิลิกาโดยใช้สารตั้งต้นเป็น TEOS เมื่อสังเคราะห์เสร็จจะได้ซิลิกาที่มีลักษณะเป็นเจลขนาดประมาณ $30.0 \times 30.0 \times 40.0$ เซนติเมตรต่อก่อน และเมื่อเปรียบเทียบกับงานวิจัยของ Nassif และคณะ (2002) ที่ทำการสังเคราะห์ซิลิกาโดยใช้สารตั้งต้นเป็นโซเดียมซิลิเกต เมื่อสังเคราะห์เสร็จจะได้ซิลิกาที่มีลักษณะเป็นเจลเช่นกัน โดยกระบวนการสังเคราะห์ของงานวิจัยข้างต้นคล้ายกับการสังเคราะห์ซิลิกาสำหรับการตรึงเซลล์แบบกักขังของงานวิจัยนี้ จึงมีลักษณะของซิลิกาที่สังเคราะห์คล้ายคลึงกัน



รูปที่ 4.14 ลักษณะของเซลล์ตรึงด้วยวิธีการกักขังในซิลิกา (a) EntA (b) KBaE

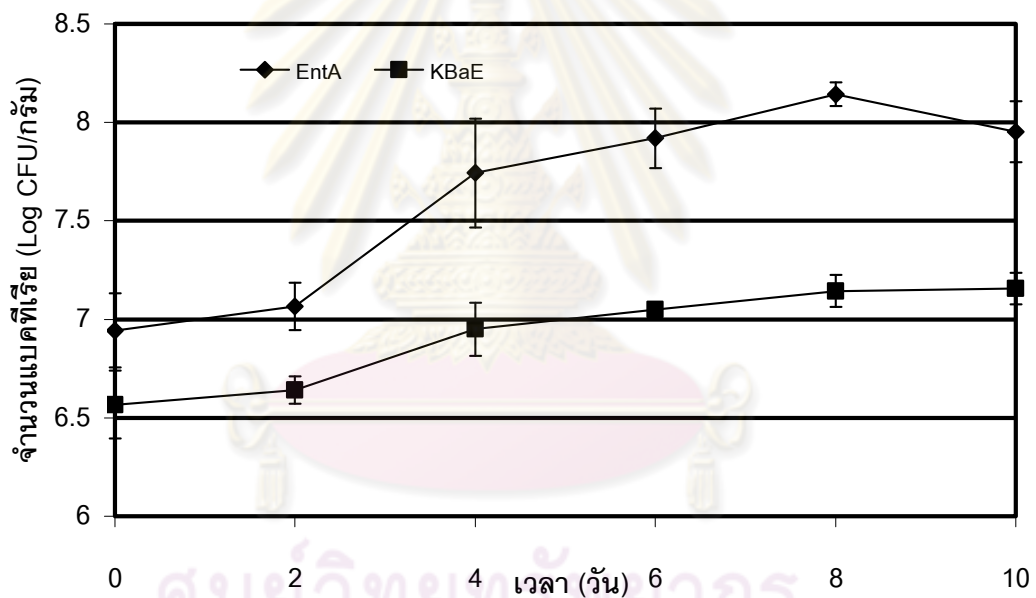
4.4.2.1 ปริมาณเซลล์ที่ถูกตรึงในซิลิกา EntA และ KBaE

การศึกษาปริมาณแบคทีเรียที่ถูกตรึงในซิลิกา นำเซลล์ตรึงทั้ง 2 ชนิด ปริมาณ 25 กรัม เติมนลงในอาหารเหลว CFMM 100 มิลลิลิตร ที่มีฟีนอล 0.01 กรัมต่อลิตร ทำโดยเก็บตัวอย่างในวันที่ 0, 2, 4, 6, 8 และ 10 จากนั้นวิเคราะห์จำนวนของแบคทีเรียทั้งหมดตามวิธีในข้อ 3.6.1

ผลการศึกษาปริมาณแบคทีเรียในซิลิกา แสดงดังรูปที่ 4.15 พบว่าจำนวนแบคทีเรียที่ถูกตรึงบนซิลิกาทั้ง 2 ชนิดมีปริมาณแตกต่างกัน พบว่าในวันที่ 0 ของการทดลอง จำนวนแบคทีเรียทั้งหมดที่ถูกตรึงในซิลิกา EntA และ KBaE มีค่าเริ่มต้นประมาณ 6.94 และ 6.57 Log CFU ต่อกรัมซิลิกา ตามลำดับ เมื่อเวลาผ่านไป 10 วัน พบว่าจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดที่ถูกตรึงในซิลิกามี

จำนวนเพิ่มขึ้น ซึ่งมีจำนวนเท่ากับ 7.95 และ 7.16 Log CFU ต่อกรัมซีลีกา แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียในซีลีกามีการเจริญได้ และเซลล์ตรึงในซีลีกา EntA มีจำนวนสูงสุด ในการทดลองต่อไปจึงเลือกเฉพาะซีลีกา EntA ไปทดสอบ

เมื่อนำจำนวนเซลล์ตรึงที่ได้มาเปรียบเทียบกับงานวิจัยของ Alvarez และคณะ (2007) ที่ทำการตรึงแบคทีเรียในซีลีกา โดยใช้สารตั้งต้นเป็นซีลีกอนไดออกไซด์ และไซเดียมซัลไฟด์ พบว่ามีจำนวนเซลล์ตรึงเริ่มต้นประมาณ 8.0-10.0 Log CFU ต่อมิลลิลิตร และงานวิจัยของ Nassif และคณะ (2002) ทำการตรึงเซลล์โดยการกักขังในซีลีกา โดยใช้สารตั้งต้นเป็น SiNa เพื่อการเก็บรักษาเซลล์ พบว่ามีจำนวนเซลล์เริ่มต้นประมาณ 8.52 Log CFU ต่อมิลลิลิตร ทั้งนี้จำนวนเซลล์ในซีลีกาแตกต่างกันเกิดจากวิธีการสังเคราะห์ และสารตั้งต้นที่ใช้ในการสังเคราะห์แตกต่างกัน รวมทั้งวัตถุประสงค์ในการนำไปใช้งาน



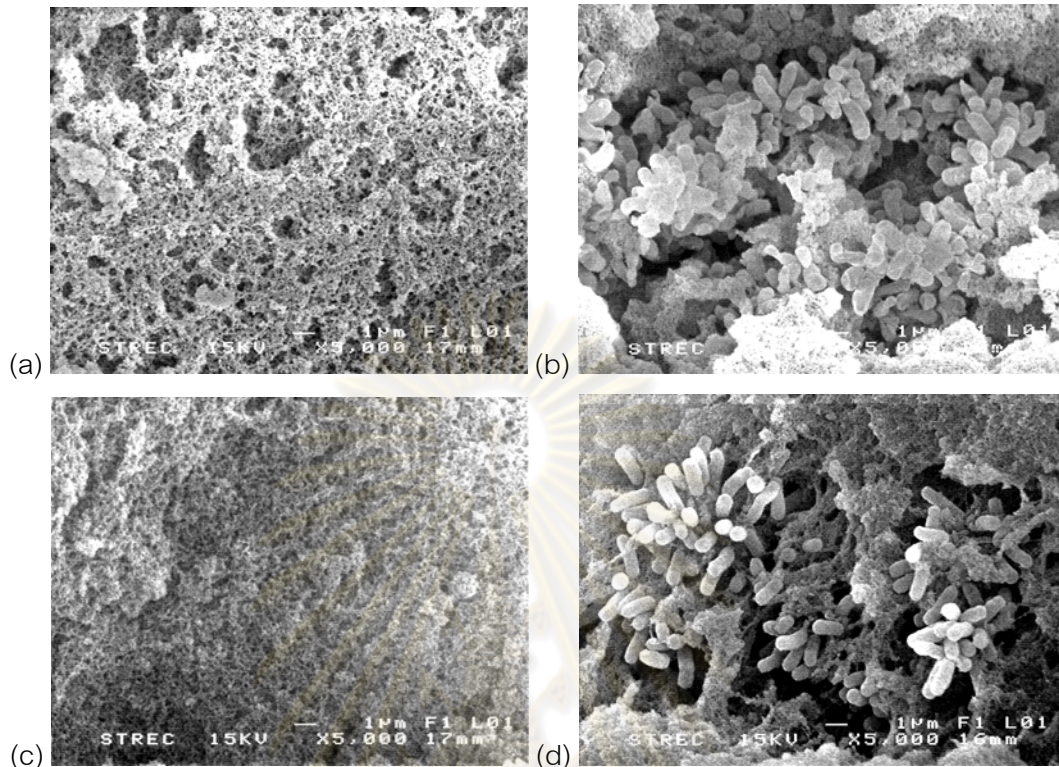
รูปที่ 4.15 จำนวนแบคทีเรียที่ถูกตรึงในซีลีกา EntA และ KBaE

ณ วันที่ 0, 2, 4, 6, 8 และ 10

4.4.2.2 ลักษณะทางกายภาพของซีลีกา EntA และ KBaE ที่ผ่านการตรึงเซลล์แบบการกักขังโดยใช้เทคนิค Scanning Electron Microscopy (SEM)

จากการนำซีลีกาที่ผ่านการตรึงเซลล์ไปศึกษาลักษณะทางกายภาพโดยใช้เครื่อง Scanning Electron Microscope เปรียบเทียบกับซีลีกาที่ก่อนตรึงเซลล์ ผลการศึกษาพบว่าซีลีกา EntA และ KBaE มีแบคทีเรียอยู่ในซีลีกาเป็นจำนวนมาก นอกจากนี้พบว่าซีลีกาทั้ง 2 ชนิด มีขนาดรูพรุนเล็กกว่าขนาดของแบคทีเรีย ทำให้แบคทีเรียไม่สามารถเข้าไปอยู่ภายในโครงสร้างของซีลีกา

ได้ แต่ในระหว่างการสังเคราะห์ได้ทำการเติมแบคทีเรียก่อนซิลิกาจะแข็งตัว จึงส่งผลให้แบคทีเรียถูกตรึงอยู่ในซิลิกาแบบกักขัง ดังรูปที่ 4.16



รูปที่ 4.16 ลักษณะของซิลิกา (a) EntA และ (c) KBaE ก่อนตรึงเซลล์ และ (b) EntA และ (d) KBaE ที่ผ่านการตรึงเซลล์โดยวิธีการสังเคราะห์แบบการกักขังที่กำลังขยาย 5,000 เท่า

4.5 การศึกษาประสิทธิภาพการย่อยสลายฟีนอล

4.5.1 เปรียบเทียบการย่อยสลายฟีนอลของเซลล์อิสระ เซลล์ตรึงแบบยึดเกาะบนซิลิกา และเซลล์ตรึงแบบกักขังในซิลิกา

เมื่อเปรียบเทียบการย่อยสลายฟีนอลที่ความเข้มข้น 5,000 มิลลิกรัมต่อลิตร ของเซลล์อิสระ เซลล์ตรึงแบบยึดเกาะ และเซลล์ตรึงแบบกักขัง โดยวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลที่ลดลงหลังจากบ่มเป็นเวลา 10 วัน แล้วคิดเป็นเปอร์เซ็นต์เปรียบเทียบกับวันที่ 0 (การย่อยสลายเป็น 0 เปอร์เซ็นต์) (รูปที่ 4.17) พบว่าเซลล์อิสระสามารถย่อยสลายฟีนอลได้ประมาณ 60% ส่วนเซลล์ตรึงบนซิลิกาแบบกักขังทั้งหมด (ยกเว้นซิลิกา KAa) ย่อยสลายฟีนอลได้มากกว่า 70% โดยเซลล์ตรึง KAb สามารถย่อยสลายฟีนอลได้ดีที่สุด ที่มากกว่า 80% ส่วนเซลล์ตรึงบนซิลิกา KAbb สามารถย่อยสลายฟีนอลได้ดีเป็นอันดับสอง การที่ซิลิกา KAb และ KAbb สามารถย่อยสลายฟีนอลได้ดีอาจเกิดจากซิลิกาทั้ง 2 ชนิด มีพื้นที่ผิวภายนอกขรุขระทำให้แบคทีเรียสามารถเกาะที่พื้นผิวด้านนอกได้มากกว่าซิลิกา KAa และ KAac สำหรับเซลล์ตรึงที่ตรึงด้วยวิธีกักขังในซิลิกา

พบว่าเซลล์ตรึงในซีลิกา EntA สามารถย่อยสลายฟีนอลได้มากกว่า 85% เมื่อเทียบกับเซลล์อิสระ และเซลล์ตรึงชนิดอื่นๆ เมื่อทำการเรียงลำดับการย่อยสลายฟีนอลจากน้อยไปมาก $KAa < Free\ cells < KAac < KAab < KAb < EntA$ ตามลำดับ ประสิทธิภาพการย่อยสลายฟีนอลที่สูงขึ้นของเซลล์ตรึงมีความสอดคล้องกับงานวิจัยก่อนหน้านี้ เช่น Ehrhardt และ Rehm (1985) พบว่าเซลล์อิสระสามารถย่อยสลายฟีนอลได้ 100% ที่ความเข้มข้น 1,000-1,500 มิลลิกรัมต่อลิตร แต่เซลล์ตรึงบนถ่านกัมมันต์ สามารถย่อยสลายฟีนอลได้ 90% ที่ความเข้มข้นฟีนอลสูงถึง 15,000 มิลลิกรัมต่อลิตร

Chen และคณะ (2002) พบว่าเซลล์อิสระสามารถย่อยสลายฟีนอลได้ 100 % ที่ความเข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่วนเซลล์ตรึงบน PAA gel beads สามารถย่อยสลายฟีนอลได้ 95 % ที่ความเข้มข้น 5,000 มิลลิกรัมต่อลิตร

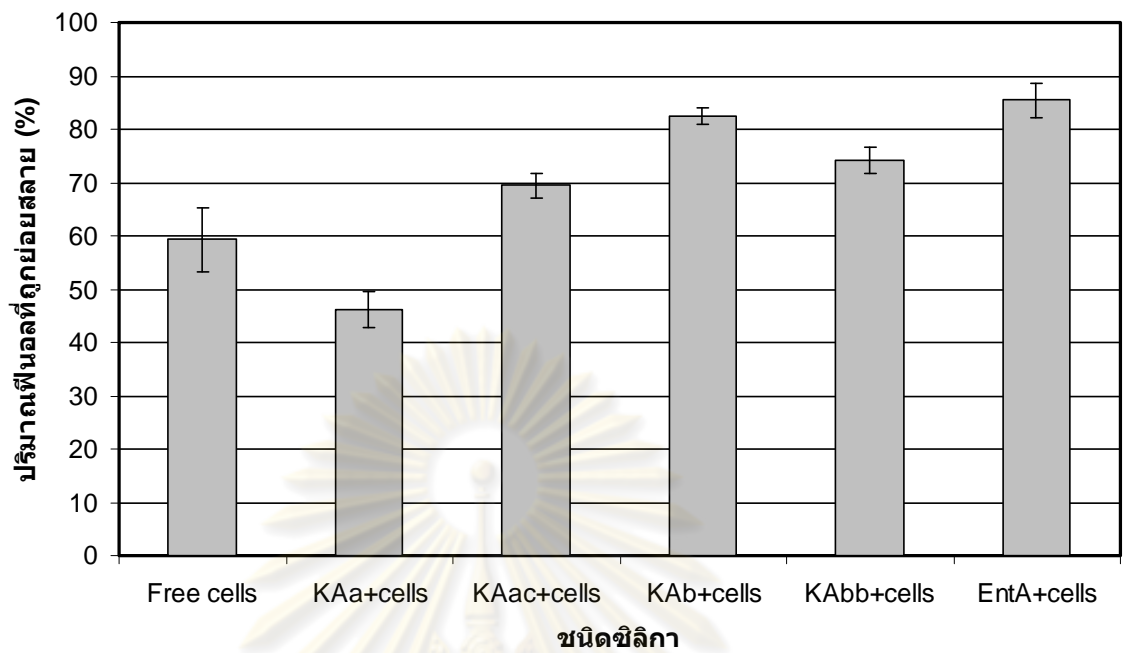
Chung และคณะ(2003) พบว่าเซลล์อิสระ และเซลล์ตรึงบนอัลจิเนต สามารถย่อยสลายฟีนอลที่ความเข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อลิตร ได้ 59.5% และ 75% ตามลำดับ

Wang และคณะ (2007) พบว่าเซลล์อิสระ และเซลล์ตรึงบน PVA ที่ความเข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถย่อยสลายฟีนอลได้ 99.6% และ 100% ตามลำดับ

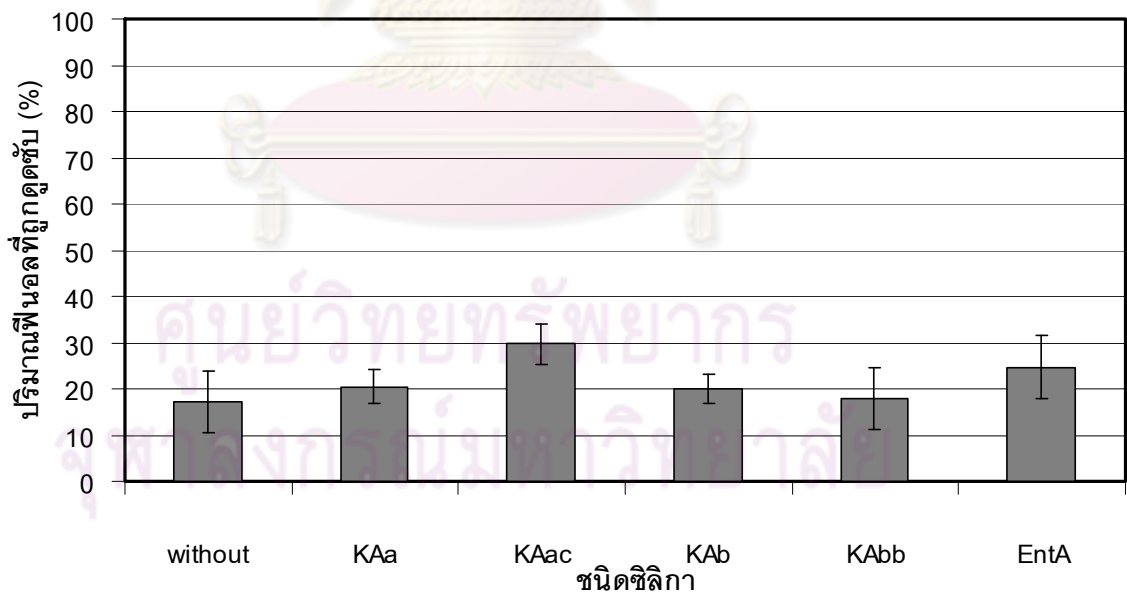
Hsieh และคณะ (2008) พบว่าเซลล์อิสระ และเซลล์ตรึงบนไคโตซาน ที่ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถย่อยสลายฟีนอลได้ 40% และ 100% ตามลำดับ

ข้อมูลดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าการตรึงเซลล์บนซีลิกาที่สังเคราะห์ได้ ช่วยให้แบคทีเรียสามารถย่อยสลายฟีนอลได้สูงขึ้นกว่าการใช้วัสดุตรึงอื่นๆ เช่น อัลจิเนต PVA ไคโตซาน และหินพัมมิช และความสามารถในการย่อยสลายฟีนอลของเซลล์ตรึงบนซีลิกามีค่าใกล้เคียงกับการใช้เซลล์ตรึงบน PAA gel beads แต่ยังต่ำกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ตรึงบนถ่านกัมมันต์

ในขณะที่ชุดควบคุมที่ไม่ใส่แบคทีเรีย ซึ่งประกอบด้วยระบบที่ปราศจากเซลล์ (without) และ ซีลิกา KAa, KAac, KAb, KAab และ EntA ที่ปราศจากเซลล์ ตามลำดับ สามารถลดปริมาณฟีนอลได้ประมาณ 15%, 20%, 30%, 20%, 18% และ 25% ตามลำดับ (รูปที่ 4.18) ซึ่งชุดทดลองที่ไม่เติมซีลิกา การลดลงของฟีนอลอาจเกิดจากการย่อยสลายทางกายภาพโดยแสงในธรรมชาติ และการระเหยของฟีนอล ส่วนชุดทดลองที่เติมซีลิกาจะมีการดูดซับฟีนอลโดยซีลิการ่วมด้วย การดูดซับฟีนอลโดยซีลิกา อาจจะเป็นข้อดีต่อแบคทีเรียคือฟีนอลในน้ำจะมีความเข้มข้นลดลง จึงทำอันตรายต่อแบคทีเรียได้น้อย และในขณะเดียวกันฟีนอลที่ดูดซับจะไม่ก่ออันตรายต่อแบคทีเรียที่เกาะอยู่ เพราะอยู่ในรูป non-bioavailable เนื่องจากที่ความเข้มข้นฟีนอล 5,000 มิลลิกรัมต่อลิตร เซลล์ตรึงบนซีลิกา KAb และ EntA สามารถย่อยสลายฟีนอลได้ดีที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์อิสระ และเซลล์ตรึงบนซีลิกาชนิดอื่น ดังนั้นเราจึงเลือกเซลล์ตรึงบนซีลิกา KAb และ EntA มาทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายฟีนอลต่อไป



รูปที่ 4.17 ปริมาณฟินอลที่ถูกกำจัดเมื่อเวลาผ่านไป 10 วัน ที่ความเข้มข้นฟินอลเริ่มต้น 5,000 มิลลิกรัมต่อลิตร

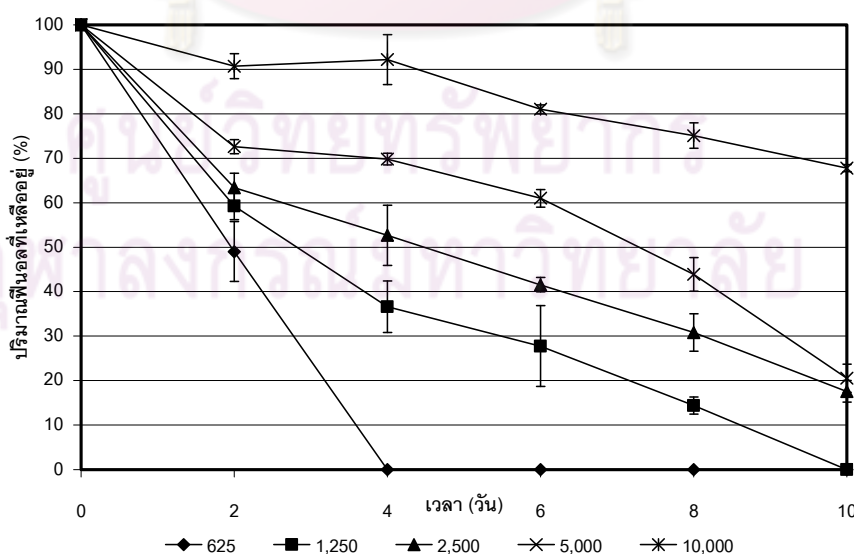


รูปที่ 4.18 ปริมาณฟินอลที่ถูกดูดซับโดยซิลิกาเมื่อเวลาผ่านไป 10 วัน ที่ความเข้มข้นฟินอลเริ่มต้น 5,000 มิลลิกรัมต่อลิตร

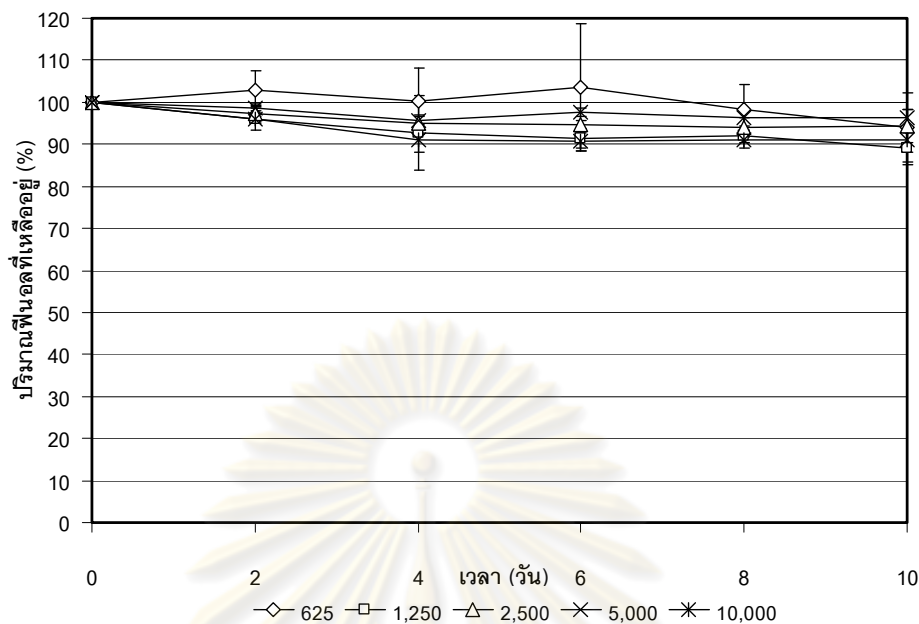
4.5.2 การย่อยสลายฟีนอลของเชื้อผสมที่ตรึงบนซิลิกา KAb

ศึกษาประสิทธิภาพการย่อยสลายฟีนอลที่มีความเข้มข้นของฟีนอล 625-10,000 มิลลิกรัมต่อลิตรของเชื้อผสมที่ตรึงโดยวิธีการยึดเกาะบนซิลิกา KAb ในระดับขวดเขย่า โดยเก็บตัวอย่างวันที่ 0, 2, 4, 6, 8 และ 10 จากนั้นนำไปวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลด้วยเทคนิค Colorimetric method ตามวิธีการของ Greenberg และคณะ (1992) ตามวิธีในข้อ 3.6.2 ผลการวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลที่เหลืออยู่โดยคิดเป็นเปอร์เซ็นต์ เปรียบเทียบกับวันที่ 0 ซึ่งคิดเป็น 100 เปอร์เซ็นต์ และหาจำนวนของแบคทีเรียทั้งหมดตามวิธีในข้อ 3.6.1 โดยคำนวณเป็น CFU ต่อชุดทดลอง = (CFU ต่อกรัมซิลิกา x 50 กรัม) + (CFU ต่อมิลลิลิตร x 100 มิลลิลิตร)

พบว่าเซลล์ตรึงสามารถย่อยสลายฟีนอลได้ดีที่ความเข้มข้น 625–5,000 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยที่ 625 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถย่อยสลายฟีนอลได้มากกว่า 50% ในวันที่ 2 และสามารถย่อยสลายฟีนอลได้ 100% ในวันที่ 4 ส่วนที่ความเข้มข้น 1,250 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถย่อยสลายฟีนอลได้มากกว่า 80% ในวันที่ 8 และสามารถย่อยสลายฟีนอลได้ 100% ในวันที่ 10 ที่ความเข้มข้น 2,500 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถย่อยสลายฟีนอลได้เกือบ 83% ในวันที่ 10 โดยที่ความเข้มข้น 5,000 มิลลิกรัมต่อลิตร เซลล์ตรึงสามารถย่อยสลายฟีนอลได้ประมาณ 80% ในวันที่ 10 และที่ความเข้มข้น 10,000 มิลลิกรัมต่อลิตร เซลล์ตรึงสามารถย่อยสลายฟีนอลได้ประมาณ 30% ดังรูปที่ 4.19 ในขณะที่เดียวกันชุดควบคุมซึ่งประกอบด้วยอาหารเหลว CFMM ซิลิกา และฟีนอล แต่ไม่มีเชื้อ พบว่าเมื่อเวลาผ่านไป 10 วัน ที่ความเข้มข้นต่างๆ ฟีนอลมีปริมาณลดลงเพียงเล็กน้อย ซึ่งน่าจะเกิดจากกระบวนการทางกายภาพ เช่น การระเหยของฟีนอล และเกิดจากการย่อยสลายโดยแสงในธรรมชาติ (รูปที่ 4.20)

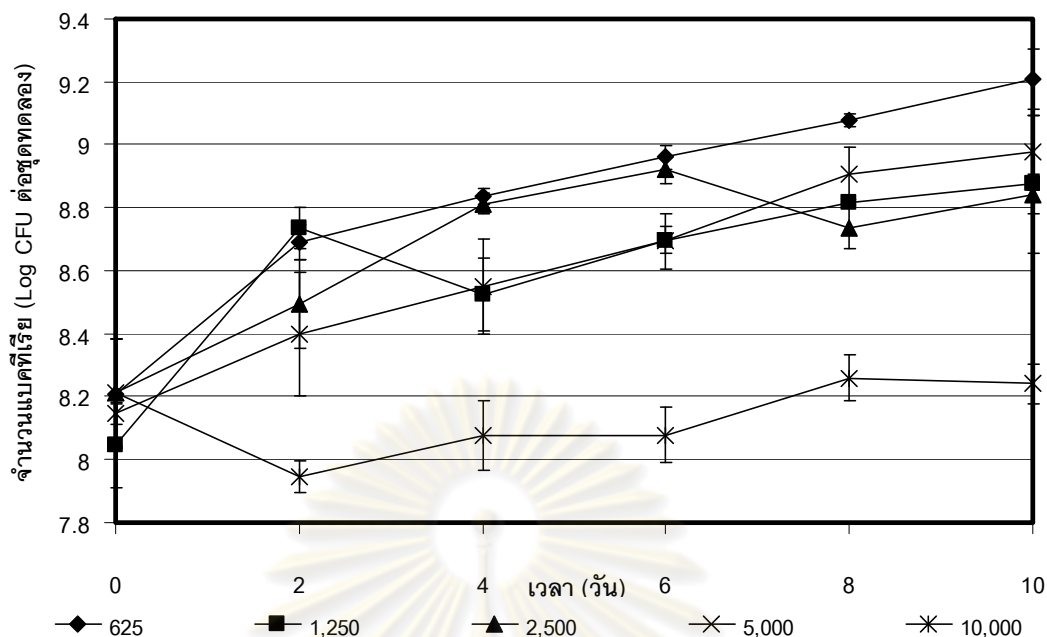


รูปที่ 4.19 ปริมาณฟีนอลที่เหลืออยู่ (%) ของเซลล์ตรึงบนซิลิกา KAb ในการย่อยสลายฟีนอลที่ความเข้มข้น 625-10,000 มิลลิกรัมต่อลิตร



รูปที่ 4.20 ปริมาณฟีนอลที่เหลืออยู่ (%) ของชุดควบคุม ซิลิกา KAb ในการย่อยสลาย ฟีนอลที่ความเข้มข้น 625-10,000 มิลลิกรัมต่อลิตร

ผลการศึกษาการเจริญของเซลล์ตรึง พบว่าในวันที่ 0 ของการทดลอง จำนวนแบคทีเรียทั้งหมดที่ความเข้มข้นฟีนอล 625, 1,250, 2,500, 5,000 และ 10,000 มิลลิกรัมต่อลิตร มีค่าเริ่มต้นประมาณ 8.21, 8.05, 8.21, 8.15 และ 7.95 Log CFU ต่อชุดทดลอง ตามลำดับ เมื่อเวลาผ่านไป 10 วัน พบว่าจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดมีจำนวนเป็น 9.21, 8.87, 8.84, 8.97 และ 8.24 Log CFU ต่อชุดทดลอง ตามลำดับ ผลการเจริญของเซลล์ตรึง ในช่วงวันที่ 0 ถึงวันที่ 10 พบว่ามีจำนวนเพิ่มขึ้นทำให้ปริมาณฟีนอลลดลงอย่างรวดเร็ว และหมดภายใน 4 และ 10 วัน รวมทั้งเกือบหมดที่ความเข้มข้นฟีนอล 2,500 - 5,000 มิลลิกรัมต่อลิตร แสดงให้เห็นว่าเซลล์ตรึงสามารถย่อยสลายฟีนอลโดยใช้ฟีนอลเป็นแหล่งพลังงานและแหล่งคาร์บอนในการเจริญ (รูปที่ 4.21) ในกรณีความเข้มข้นฟีนอลสูง แบคทีเรียมีการเจริญน้อย แสดงว่าฟีนอลที่ความเข้มข้นสูงมีพิษต่อแบคทีเรีย แต่เซลล์ตรึงแบบยึดเกาะบนซิลิกา KAb สามารถย่อยสลายฟีนอลได้ดีกว่าเซลล์อิสระที่ความเข้มข้นฟีนอลสูง เนื่องจากเซลล์ที่อยู่บนซิลิกาได้รับการปกป้องจากภาวะภายนอกดีกว่าเซลล์อิสระจึงสามารถที่จะอยู่รอด และเกิดการย่อยสลายฟีนอลได้ดีกว่า



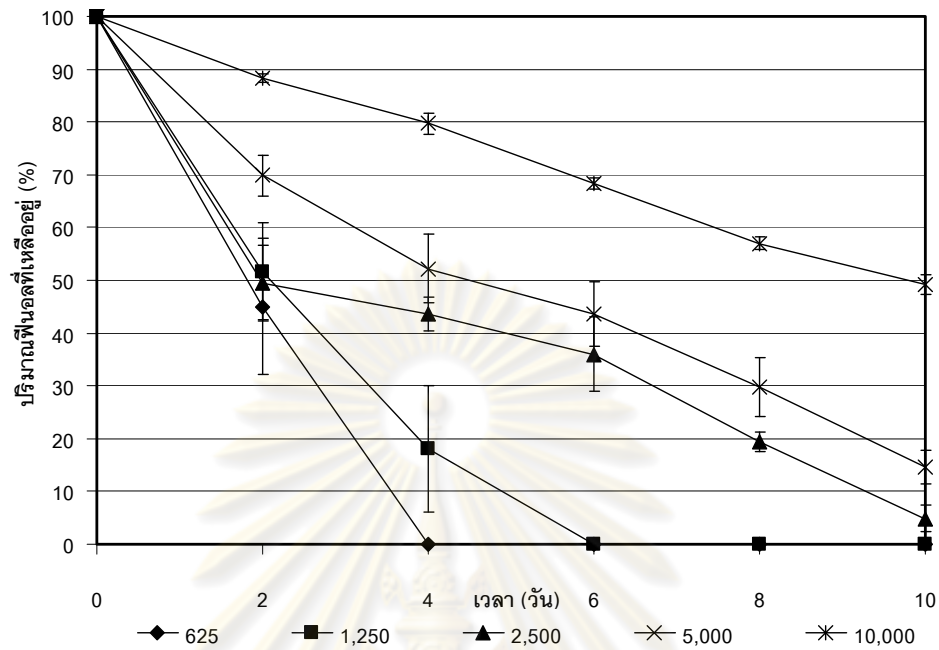
รูปที่ 4.21 จำนวนแบคทีเรียระหว่างการย่อยสลายฟีนอลของเซลล์ตรึงบนซิลิกา KAb

4.5.3 การย่อยสลายฟีนอลของเชื้อผสมที่ตรึงในซิลิกา EntA

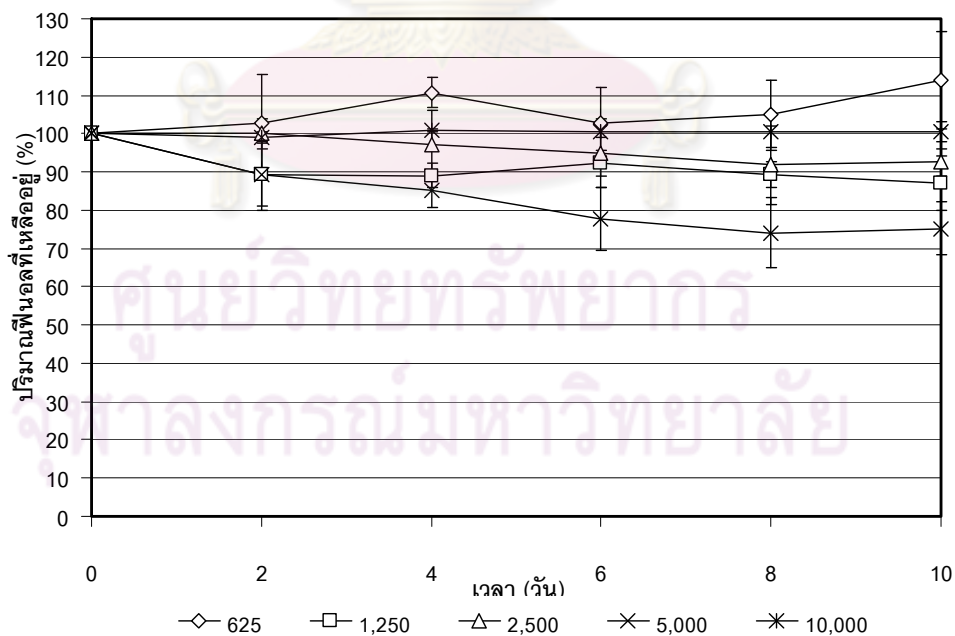
ศึกษาประสิทธิภาพการย่อยสลายฟีนอลที่มีความเข้มข้นของฟีนอล 625-10,000 มิลลิกรัมต่อลิตรของเชื้อผสมที่ตรึงโดยวิธีการกักขังในซิลิกา EntA ในระดับขวดเขย่า โดยเก็บตัวอย่างวันที่ 0, 2, 4, 6, 8 และ 10 จากนั้นนำไปวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลด้วยเทคนิค Colorimetric method ตามวิธีการของ Greenberg และคณะ (1992) ตามวิธีในข้อ 3.6.2 ผลการวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลที่เหลืออยู่โดยคิดเป็นเปอร์เซ็นต์ เปรียบเทียบกับวันที่ 0 ซึ่งคิดเป็น 100 เปอร์เซ็นต์ และหาจำนวนของแบคทีเรียทั้งหมดตามวิธีในข้อ 3.6.1 โดยคำนวณเป็น CFU ต่อชุดทดลอง = (CFU ต่อกรัมซิลิกา x 25 กรัม) + (CFU ต่อมิลลิลิตร x 100 มิลลิลิตร)

พบว่าเซลล์ตรึงสามารถย่อยสลายฟีนอลได้ดี โดยที่ความเข้มข้น 625 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถย่อยสลายฟีนอลได้มากกว่า 50% ในวันที่ 2 และสามารถย่อยสลายฟีนอลได้ 100% ในวันที่ 4 ส่วนที่ความเข้มข้น 1,250 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถย่อยสลายฟีนอลได้มากกว่า 80% ในวันที่ 4 และสามารถย่อยสลายฟีนอลได้ 100% ในวันที่ 6 ที่ความเข้มข้น 2,500 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถย่อยสลายฟีนอลได้เกือบ 100% ในวันที่ 10 ที่ความเข้มข้น 5,000 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถย่อยสลายฟีนอลได้ 85% ในวันที่ 10 และที่ความเข้มข้น 10,000 มิลลิกรัมต่อลิตร เซลล์ตรึงสามารถย่อยสลายฟีนอลได้ประมาณ 50% ในวันที่ 10 ดังรูปที่ 4.22 ในขณะที่เดียวกันชุดควบคุมซึ่งประกอบด้วยอาหารเหลว CFMM ซิลิกาปราศจากแบคทีเรีย และฟีนอล พบว่าเมื่อเวลาผ่านไป 10 วัน ที่ความเข้มข้นต่างๆ ฟีนอลมีปริมาณลดลงเพียงเล็กน้อย ซึ่งน่าจะเกิดจาก

กระบวนการทางกายภาพ เช่น การระเหยของฟีนอล และเกิดจากการย่อยสลายโดยแสงในธรรมชาติ (รูปที่ 4.23)

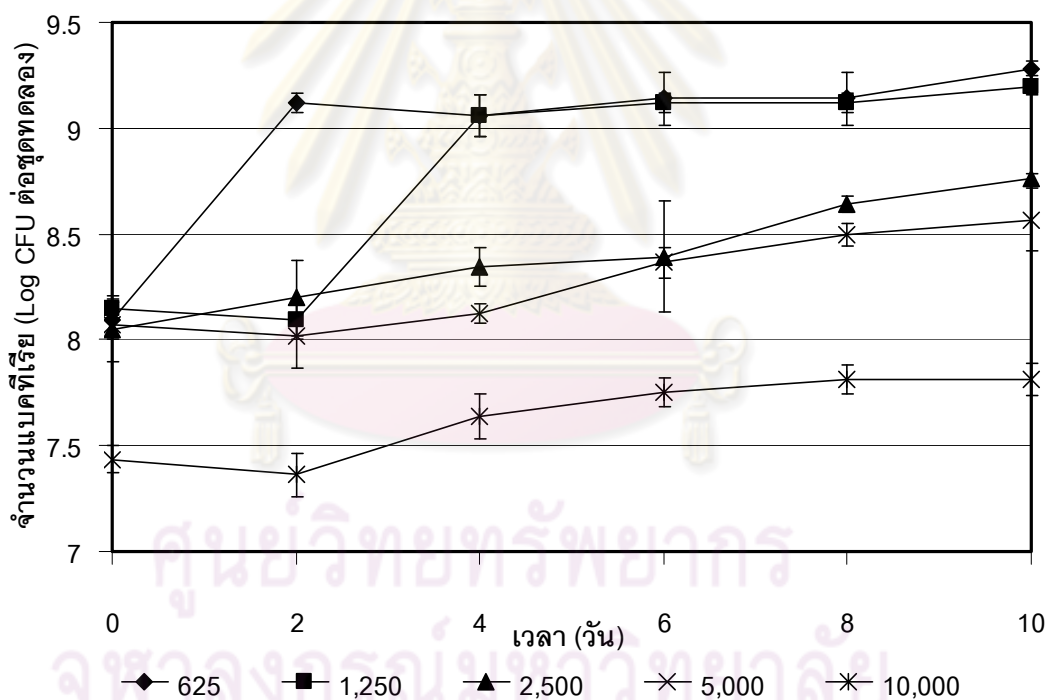


รูปที่ 4.22 ปริมาณฟีนอลที่เหลืออยู่ (%) ของเซลล์ตรึงในซิลิกา EntA ในการย่อยสลายฟีนอลที่ความเข้มข้น 625-10,000 มิลลิกรัมต่อลิตร



รูปที่ 4.23 ปริมาณฟีนอลที่เหลืออยู่ (%) ของชุดควบคุม ซิลิกา EntA ในการย่อยสลายฟีนอลที่ความเข้มข้น 625-10,000 มิลลิกรัมต่อลิตร

ผลการศึกษาการเจริญของเซลล์ตรึง พบว่าในวันที่ 0 ของการทดลอง จำนวนแบคทีเรียทั้งหมดที่ความเข้มข้นฟีนอล 625, 1,250, 2,500, 5,000 และ 10,000 มิลลิกรัมต่อลิตร มีค่าเริ่มต้นประมาณ 8.10, 8.15, 8.05, 8.07 และ 7.44 Log CFU ต่อชุดทดลอง ตามลำดับ เมื่อเวลาผ่านไป 10 วัน พบว่าจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดมีจำนวนเป็น 9.28, 9.20, 8.77, 8.57 และ 7.81 Log CFU ต่อชุดทดลอง ตามลำดับ ผลการเจริญของเซลล์ตรึง ในช่วงวันที่ 0 ถึงวันที่ 10 พบว่ามีจำนวนเพิ่มขึ้นทำให้ปริมาณฟีนอลลดลงอย่างรวดเร็ว และหมดภายใน 4 และ 6 วัน รวมทั้งเกือบหมดที่ความเข้มข้นฟีนอล 2,500 - 5,000 มิลลิกรัมต่อลิตร แสดงให้เห็นว่าเซลล์ตรึงสามารถย่อยสลายฟีนอลโดยใช้ฟีนอลเป็นแหล่งพลังงาน และแหล่งคาร์บอนในการเจริญ (รูปที่ 4.24) ในกรณีความเข้มข้นฟีนอลสูง แบคทีเรียมีการเจริญน้อย แสดงว่าฟีนอลที่ความเข้มข้นสูงมีพิษต่อแบคทีเรีย แต่เซลล์ตรึงแบบกักขังในซิติกา EntA สามารถย่อยสลายฟีนอลได้ดีกว่าเซลล์อิสระ และเซลล์ตรึงบนซิติกา KAb เนื่องจากเซลล์ฝังอยู่ในซิติกา จึงสามารถที่จะอยู่รอด และเกิดการย่อยสลายฟีนอลได้ดีกว่า



รูปที่ 4.24 จำนวนแบคทีเรียระหว่างการย่อยสลายฟีนอลของเซลล์ตรึงในซิติกา EntA

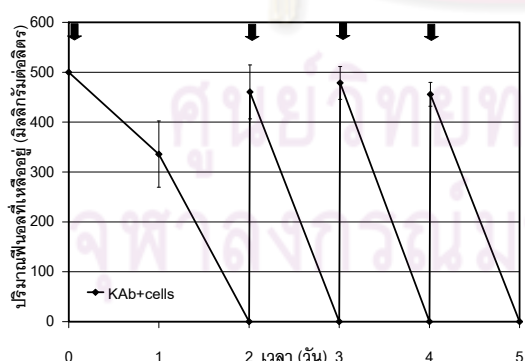
4.6 การศึกษาประสิทธิภาพการนำเซลล์ตรึงมาใช้ย่อยสลายฟีนอลอย่างต่อเนื่อง

4.6.1 การย่อยสลายฟีนอลที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 500 มิลลิกรัมต่อลิตร

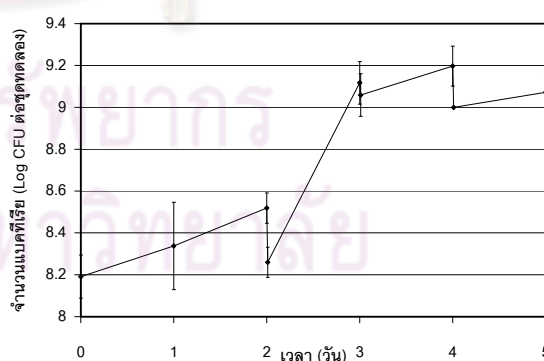
ในขั้นแรกได้เลือกความเข้มข้นของฟีนอลมา 1 ความเข้มข้น คือ 500 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยทดสอบในระดับขวดเขย่า และในวันที่ 0 ได้เติมฟีนอลที่ความเข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าเซลล์ตรึงบนซิลิกา KAb และ EntA ใช้เวลา 2 วัน ในการย่อยสลายฟีนอลได้ 100% (รูปที่ 4.25 (a) และ 4.26 (a)) จากนั้นทำการเติมฟีนอลใหม่อีกครั้งที่ความเข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อลิตร แต่ครั้งนี้เซลล์ตรึงใช้เวลาสั้นลงในการย่อยสลายฟีนอล โดยใช้เวลาเพียง 1 วันเท่านั้น แสดงว่าเมื่อนำเซลล์ตรึงมาใช้อย่างต่อเนื่อง ทำให้ย่อยสลายฟีนอลได้โดยใช้เวลาน้อยลง และแบคทีเรียที่ถูกตรึงอยู่สามารถปรับตัวกับภาวะแวดล้อมที่มีฟีนอล จึงทำให้ใช้เวลาน้อยลงในการย่อยสลายฟีนอล

ผลการศึกษาการเจริญของเซลล์ตรึง พบว่าในวันที่ 0 ของการทดลอง จำนวนแบคทีเรียทั้งหมดที่ความเข้มข้นของฟีนอล 500 มิลลิกรัมต่อลิตร ในวันที่ 0 ของการทดลอง จำนวนแบคทีเรียทั้งหมดในชุดทดลองของเซลล์ตรึงบนซิลิกา KAb และ EntA มีค่าเริ่มต้นประมาณ 8.10 และ 8.13 Log CFU ต่อชุดทดลองตามลำดับ เมื่อเวลาผ่านไป 5 วัน พบว่าจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดมีจำนวนเพิ่มขึ้น ซึ่งมีจำนวนเท่ากับ 9.04 และ 9.27 Log CFU ต่อชุดทดลอง ตามลำดับ (รูปที่ 4.25 (b) และ 4.26 (b))

จะเห็นได้ว่าผลของการเจริญและการย่อยสลายฟีนอลของเซลล์ตรึงมีความสอดคล้องกัน ดังนี้ ในช่วงวันที่ 0 ถึง วันที่ 5 เซลล์ตรึงมีจำนวนเพิ่มขึ้น ทำให้ปริมาณฟีนอลลดลงอย่างรวดเร็ว และหมดภายใน 1 ถึง 2 วัน แสดงให้เห็นว่าเซลล์ตรึงสามารถย่อยสลายฟีนอลโดยใช้ฟีนอลเป็นแหล่งพลังงาน และแหล่งคาร์บอนในการเจริญ

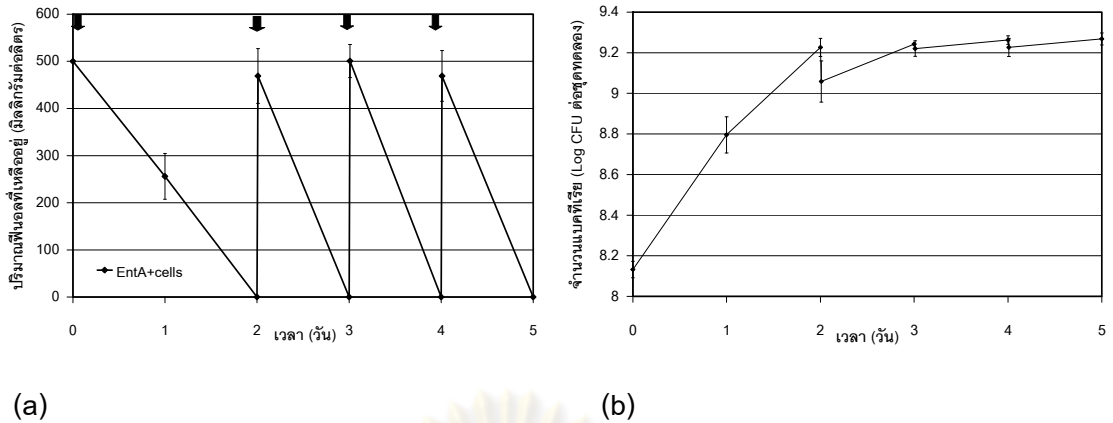


(a)



(b)

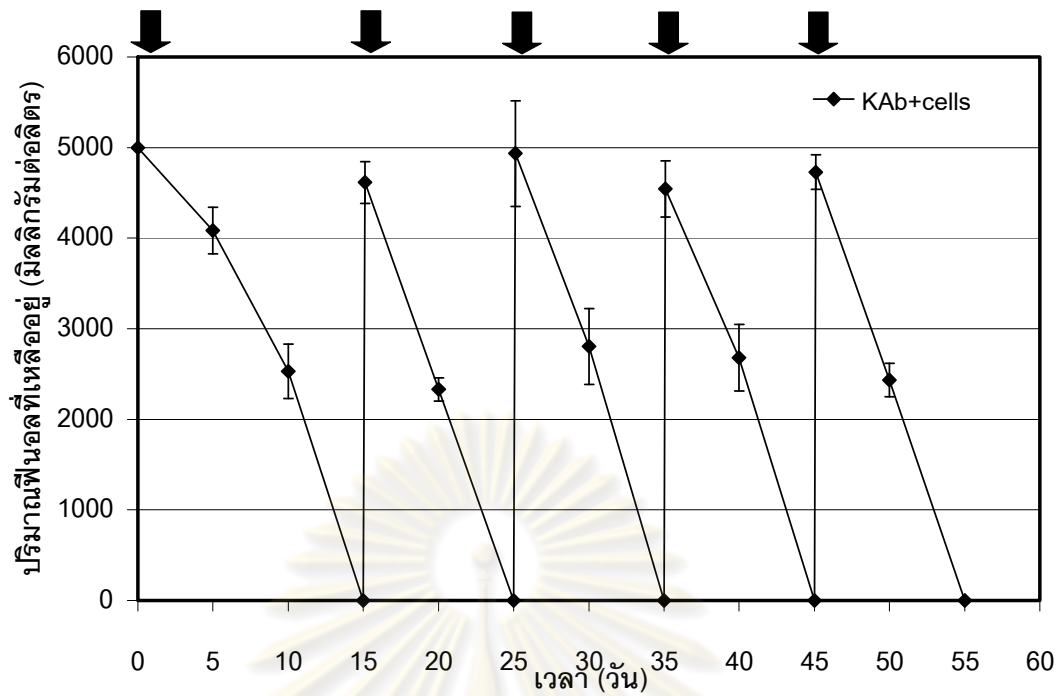
รูปที่ 4.25 การนำเซลล์ตรึงบนซิลิกา KAb มาใช้ในการย่อยสลายฟีนอลอย่างต่อเนื่อง (a) และปริมาณเซลล์ระหว่างการทดลอง (b) ลูกศรแสดงการเติมฟีนอล 500 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อเซลล์ตรึงย่อยสลายฟีนอลหมด



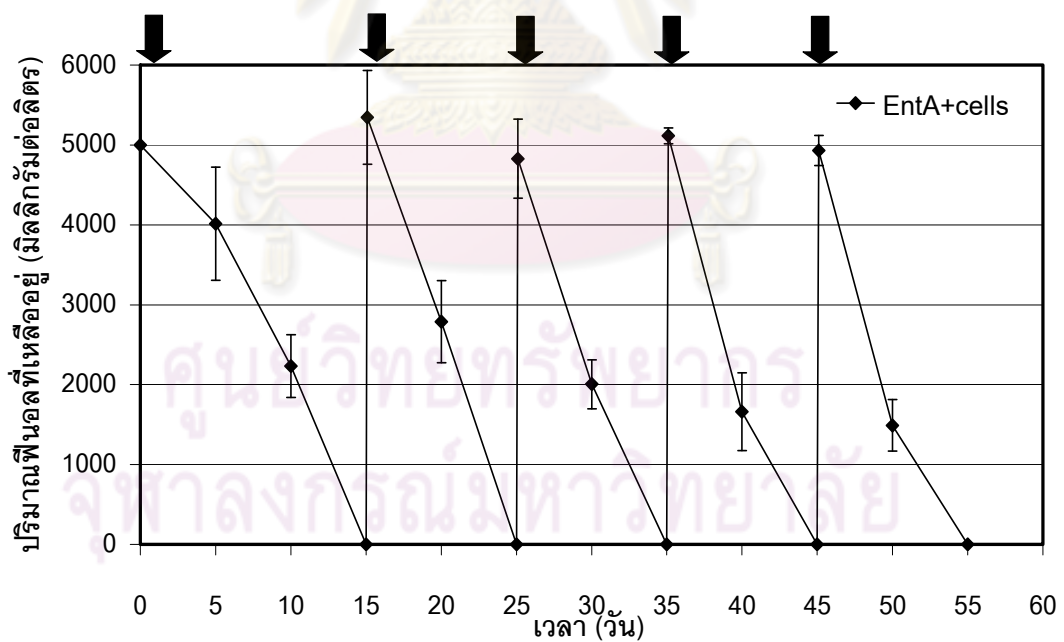
รูปที่ 4.26 การนำเซลล์ตรึงในซิลิกา EntA มาใช้ในการย่อยสลายฟีนอลอย่างต่อเนื่อง (a) และปริมาณเซลล์ระหว่างการทดลอง (b) ลูกศรแสดงการเติมฟีนอล 500 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อเซลล์ตรึงย่อยสลายฟีนอลหมด

4.6.2 การย่อยสลายฟีนอลที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 5,000 มิลลิกรัมต่อลิตร

ต่อมาได้เพิ่มปริมาณฟีนอลเป็น 5,000 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าเซลล์ตรึงทั้ง KAb และ EntA ใช้เวลา 15 วัน ในการย่อยสลายฟีนอลได้ 100% จากนั้นทำการเติมฟีนอลใหม่อีกครั้งที่ความเข้มข้น 5,000 มิลลิกรัมต่อลิตร แต่ครั้งนี้เซลล์ตรึงใช้เวลาอันน้อยลงในการย่อยสลายฟีนอล โดยใช้เวลาเพียง 10 วันเท่านั้น สำหรับ EntA เมื่อใช้ซ้ำหลายครั้งจะสังเกตเห็นว่าเซลล์ตรึงใช้เวลาอันน้อยกว่า 10 วัน ในการย่อยสลายฟีนอลจนหมด (รูปที่ 4.27 และ 4.28) แสดงว่าเมื่อนำเซลล์ตรึงมาใช้อย่างต่อเนื่องทำให้ย่อยสลายฟีนอลได้โดยใช้เวลาอันน้อยลง ผลการศึกษามีความสอดคล้องกับงานวิจัยของ Hsieh และคณะ (2008) ซึ่งได้นำเซลล์ตรึงบนโคโคซานกลับมาใช้อย่างต่อเนื่องในการย่อยสลายฟีนอล พบว่าในวันที่ 0 ได้เติมฟีนอลที่ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าเซลล์ตรึงใช้เวลา 8.5 ชั่วโมง ในการย่อยสลายฟีนอลได้ 100% จากนั้นทำการเติมฟีนอลใหม่อีกครั้งที่ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร แต่ครั้งนี้เซลล์ตรึงใช้เวลาอันน้อยลงในการย่อยสลายฟีนอล โดยใช้เวลาเพียง 1 ชั่วโมงเท่านั้น แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียที่ถูกตรึงอยู่บนซิลิกาสามารถปรับตัวกับภาวะแวดล้อมที่มีฟีนอลสูง จึงทำให้ใช้เวลาอันน้อยลงในการย่อยสลายฟีนอล

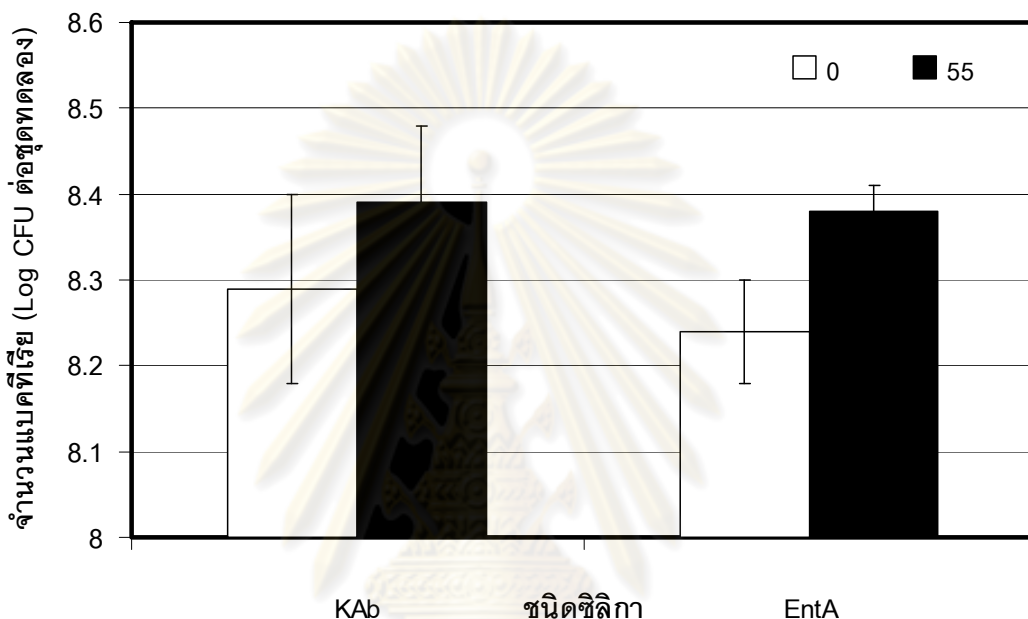


รูปที่ 4.27 การนำเซลล์ตรึงบนซิลิกา KAb มาใช้ในการย่อยสลายฟีนอลอย่างต่อเนื่อง ที่ความเข้มข้น 5,000 มิลลิกรัมต่อลิตร ลูกศรแสดงการเติมฟีนอล 5,000 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อเซลล์ตรึงย่อยสลายฟีนอลหมด



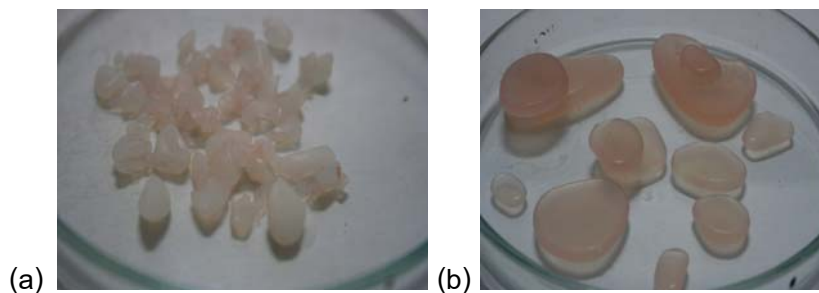
รูปที่ 4.28 การนำเซลล์ตรึงในซิลิกา EntA มาใช้ในการย่อยสลายฟีนอลอย่างต่อเนื่อง ที่ความเข้มข้น 5,000 มิลลิกรัมต่อลิตร ลูกศรแสดงการเติมฟีนอล 5,000 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อเซลล์ตรึงย่อยสลายฟีนอลหมด

ผลการศึกษาระเบิดของเซลล์ตรึง พบว่าในวันที่ 0 ของการทดลอง จำนวนแบคทีเรียทั้งหมดที่ความเข้มข้นของฟีนอล 5,000 มิลลิกรัมต่อลิตร ในวันที่ 0 ของการทดลอง จำนวนแบคทีเรียทั้งหมดในชุดทดลองของเซลล์ตรึงบนซิลิกา KAb และ EntA มีค่าเริ่มต้นประมาณ 8.29 และ 8.24 Log CFU ต่อชุดทดลอง ตามลำดับ เมื่อเวลาผ่านไป 55 วัน พบว่าจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดมีจำนวนเพิ่มขึ้น ซึ่งมีจำนวนเท่ากับ 8.39 และ 8.38 Log CFU ต่อชุดทดลอง ตามลำดับ (รูปที่ 4.29)



รูปที่ 4.29 จำนวนแบคทีเรีย ณ วันที่ 0 และ 55 ของเซลล์ตรึงบนซิลิกา KAb และ EntA

จากผลการทดลองจะเห็นได้ว่าแบคทีเรียมีการเจริญเพียงเล็กน้อย แม้ว่าจะมีการบ่มเป็นระยะเวลาถึง 55 วัน เมื่อเปรียบเทียบผลการทดลองกับข้อ 4.6.1 ซึ่งใช้ความเข้มข้นฟีนอล 500 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าที่ความเข้มข้นฟีนอลสูงน่าจะมีพิษต่อแบคทีเรียที่ตรึงอยู่ ทำให้เซลล์เพิ่มจำนวนได้น้อยกว่าที่ความเข้มข้นฟีนอลต่ำ โดยเซลล์ตรึงสามารถทำงานได้อย่างต่อเนื่องถึง 55 วัน และอาจทำงานได้นานกว่านี้ถ้าศึกษาต่อไป เมื่อเขย่าเซลล์ตรึงเป็นเวลานานๆ เซลล์ตรึงยังใช้งานได้ดี เนื่องจากมีการเติมอาหารเหลว CFMM ปริมาณเท่ากับตัวอย่างที่ถูกเก็บไปทำการวิเคราะห์ ดังรูปที่ 4.30 จะสังเกตเห็นว่าเซลล์ตรึงบนซิลิกา KAb (a) จะมีซิลิกาบางส่วนแตกออกอย่างเห็นได้ชัด ทำให้ซิลิกามีขนาดเล็กลง สำหรับเซลล์ตรึงในซิลิกา EntA (b) ยังคงมีลักษณะไม่เปลี่ยนแปลงไปมากนัก แต่ก็มีซิลิกาบางส่วนแตก เนื่องจากการเขย่าขวดเป็นเวลานาน ทำให้ซิลิกากระทบกับขวด

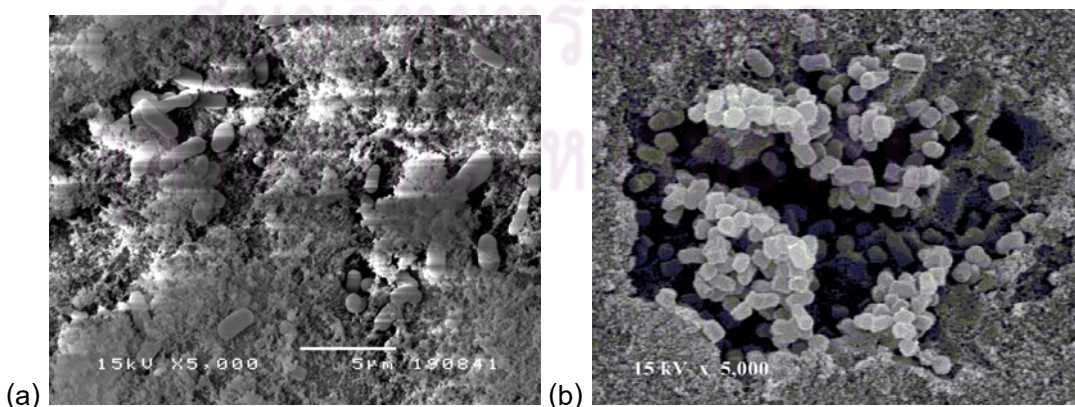


รูปที่ 4.30 ลักษณะของเซลล์ตรึงเมื่อใช้อย่างต่อเนื่องเป็นเวลา 55 วัน
 ดังรูป (a) KAb และ (b) EntA

4.6.3 ลักษณะทางกายภาพของเซลล์ตรึงบนซิลิกาที่ผ่านการบำบัดฟีนอลโดยใช้เทคนิค Scanning Electron Microscopy (SEM)

ลักษณะทางกายภาพของเซลล์ตรึงที่ใช้อยู่สลายฟีนอลอย่างต่อเนื่องเป็นเวลา 45 วัน ซึ่งได้จากการสังเคราะห์ด้วยวิธีการยัดเกาะบนซิลิกา และวิธีการกักขังในซิลิกา เมื่อทำการวิเคราะห์ด้วย Scanning Electron Microscopy (SEM) ดังปรากฏผลดังรูปที่ 4.31

จากการนำเซลล์ตรึงบนซิลิกาที่ผ่านการบำบัดฟีนอลไปศึกษาลักษณะทางกายภาพโดยใช้เครื่อง Scanning Electron Microscope จากรูปที่ 4.31 (a) KAb และ (b) EntA สังเกตเห็นแบคทีเรียบนพื้นผิวซิลิกา KAb และบางบริเวณพบไบโอฟิล์มปกคลุมจนไม่สามารถมองเห็นพื้นผิวของซิลิกา สำหรับเซลล์ตรึงในซิลิกา EntA สังเกตเห็นแบคทีเรียอยู่ภายในซิลิกา ซึ่งมีความสอดคล้องกับงานวิจัยของ Hsieh และคณะ (2008) พบว่าเมื่อใช้เซลล์ตรึงบนโคโคซานอย่างต่อเนื่อง จะสังเกตเห็นแบคทีเรียสร้างไบโอฟิล์มออกมาปกคลุมเซลล์ เพื่อป้องกันแบคทีเรียจากฟีนอล



รูปที่ 4.31 ลักษณะของเซลล์ตรึงบนซิลิกา KAb (a) และ EntA (b) ที่ผ่านการบำบัดฟีนอลที่กำลังขยาย 5,000 เท่า

บทที่ 5

สรุปผลการทดลอง

5.1 การสังเคราะห์ซิลิกา และการตรึงเซลล์

งานวิจัยนี้ได้สังเคราะห์ซิลิกาทั้งหมด 9 ชนิด และต่อมาคัดเลือกซิลิกามาใช้ตรึงเซลล์แบบยึดเกาะ 4 ชนิด และแบบกักขัง 2 ชนิด โดยคำนึงถึงวิธีการสังเคราะห์ ลักษณะทางสัณฐานวิทยา ลักษณะการจัดเรียงตัวของซิลิกา ความเป็นพิษของซิลิกาต่อการเจริญของแบคทีเรีย และราคาสารเคมี

การสังเคราะห์ซิลิกาสำหรับการตรึงเซลล์แบบยึดเกาะ เมื่อใช้ตัวเร่งปฏิกิริยาเป็นกรด โดยใช้สารตั้งต้นเป็น TEOS ได้ซิลิกา KAa และ KAac ที่มีลักษณะเป็นก้อนใสคล้ายแก้ว ผิวเรียบ สำหรับซิลิกา KAa ไม่ใช้สารลดแรงตึงผิวเป็นสารต้นแบบ แต่ซิลิกา KAac ใช้สารลดแรงตึงผิวเป็นสารต้นแบบในการสังเคราะห์ ส่วนซิลิกาที่สังเคราะห์เมื่อใช้ตัวเร่งปฏิกิริยาเป็นเบส โดยใช้สารตั้งต้นเป็น TEOS และไม่ใช้สารลดแรงตึงผิวเป็นสารต้นแบบ จะได้ซิลิกา KAb และ KAbb ที่มีลักษณะเป็นก้อนขาวขุ่นคล้ายแก้ว ผิวเรียบ

การสังเคราะห์ซิลิกาสำหรับการตรึงเซลล์แบบกักขังโดยใช้สารตั้งต้นเป็น TEOS และใช้ตัวเร่งปฏิกิริยาเป็นกรดจะได้ซิลิกา EntA แต่ถ้าใช้สารตั้งต้นเป็นซิลิกา KBa และใช้ตัวเร่งปฏิกิริยาเป็นเบสจะได้ซิลิกา KBaE ที่มีลักษณะคล้ายแก้วใส และขนาดของซิลิกาที่สังเคราะห์ได้เปลี่ยนแปลงตามภาวะที่ใช้ในการสังเคราะห์ซิลิกา ดังนั้น เมื่อนำมาใช้งานจะตัดซิลิกาเป็นชิ้นขนาดประมาณ $1.0 \times 1.0 \times 0.5$ ซม.³ ต่อก้อน ซึ่งลักษณะของซิลิกาที่ได้คล้ายกับงานวิจัยของ Branyik และคณะ (1998) และ Nassif และคณะ (2002)

ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของซิลิกา KAa และ KAac มีพื้นที่ผิวภายนอกค่อนข้างเรียบ ส่วนซิลิกา KAb และ KAbb มีพื้นที่ผิวภายนอกขรุขระ โดยเมื่อนำไปตรึงเซลล์พบแบคทีเรียเกาะอยู่บริเวณพื้นผิวด้านนอกของซิลิกา และบริเวณรอยแตกของซิลิกา และเซลล์ตรึงบนซิลิกา KAb มีจำนวนสูงสุดประมาณ 6.64 CFU ต่อกรัมซิลิกา ส่วนซิลิกา EntA และ KBaE มีรูปทรงเห็นได้ชัดเจน แต่จะเห็นแต่ลักษณะพื้นผิวด้านนอกของซิลิกานั้น เมื่อใส่เซลล์ลงไประหว่างการสังเคราะห์ พบ

แบคทีเรียที่เรียกชั่งไว้ภายในช่องว่าง 3 มิติ ของซีดิกา และเซลล์ตรึงในซีดิกา EntA มีจำนวนสูงสุด ประมาณ 6.94 Log CFU ต่อกรัมซีดิกา

ขั้นตอนที่ใช้สังเคราะห์ซีดิกาและการตรึงเซลล์ทั้งหมดพบว่าง่าย และสะดวก เมื่อเปรียบเทียบกับงานวิจัยก่อนหน้านี้ สำหรับราคาของสารเคมีที่ใช้ในการสังเคราะห์ขึ้นอยู่กับอัตราส่วนโดยโมลของสาร และวิธีการสังเคราะห์ โดยราคาของซีดิกาที่สังเคราะห์ได้มีน้ำหนัก 1.0 กรัม แสดงดังตารางที่ 5.1

ตารางที่ 5.1 ราคาของสารเคมีที่ใช้ในการสังเคราะห์ซีดิกาแต่ละชนิด

สารเคมี	ราคา (บาท) ต่อซีดิกา 1.0 กรัม						
	KAa	KAac	KAb	KAbb	KBa	EntA	KBaE
TEOS	3.125	12.49	2.918	2.918	45.5	0.817	5.688
MeOH	0.13	0.52	0.102	0.102	5.2	-	-
HCl	0.003	0.08	-	-	0.109	0.042	-
NaOH	-	-	0.12	-	-	-	2.625
KOH	-	-	-	-	-	0.03	-
รวม	3.258	13.09	3.14	3.02	50.809	0.889	8.313

สำหรับการย่อยสลายฟีนอลเราได้ใช้ซีดิกา KAa, KAac, KAb และ KAbb ประมาณ 500 กรัม ต่อ 1,000 มิลลิลิตร CFMM และซีดิกา EntA และ KBaE ประมาณ 250 กรัม ต่อ 1,000 มิลลิลิตร CFMM เพื่อให้มีจำนวนเซลล์ตรึงประมาณ 10^7 CFU ต่อกรัม ซีดิกา เมื่อคิดเป็นราคาของสารเคมีทั้งหมดที่ใช้ผลิตเซลล์ตรึงสำหรับการบำบัดน้ำปนเปื้อนฟีนอลปริมาตร 1 ลิตร แสดงดังตารางที่ 5.2

ตารางที่ 5.2 ราคาของสารเคมีที่ใช้ในการสังเคราะห์ซัลฟิคา K_{Aa}, K_{Aac}, K_{Ab} และ K_{Abb} ในการบำบัดน้ำปนเปื้อน 1 ลิตร

ชนิดของซัลฟิคา	ปริมาณที่ใช้ (กรัมต่อลิตร)	ราคา (บาท)
K _{Aa}	500	1629
K _{Aac}	500	6545
K _{Ab}	500	1570
K _{Abb}	500	1510
EntA	250	222.25
K _{BaE}	250	2078.25

5.2 การย่อยสลายฟีนอลของเชื้อผสมที่ตรึงบนซัลฟิคา

เชื้อผสมแบบเซลล์อิสระ สามารถย่อยสลายฟีนอลได้ 100% ที่ความเข้มข้น 625 – 2,500 มิลลิกรัมต่อลิตร และที่ความเข้มข้น 5,000 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถย่อยสลายฟีนอลได้ประมาณ 55% สำหรับจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดของเซลล์อิสระ พบว่ามีจำนวนแบคทีเรียสูงสุดประมาณ 9.66 Log CFU ต่อมิลลิลิตร เมื่อความเข้มข้นของฟีนอลอยู่ระหว่าง 625-5,000 มิลลิกรัมต่อลิตร แต่ที่ความเข้มข้นฟีนอลสูง แบคทีเรียมีการเจริญน้อย และที่ความเข้มข้นฟีนอล 20,000 มิลลิกรัมต่อลิตร แบคทีเรียไม่สามารถเจริญได้ แสดงว่าฟีนอลที่ความเข้มข้นสูงมีพิษต่อแบคทีเรีย

เมื่อเปรียบเทียบการย่อยสลายฟีนอลของเซลล์อิสระ เซลล์ตรึงแบบยึดเกาะ และเซลล์ตรึงแบบกักขัง เมื่อเวลาผ่านไป 10 วัน ที่ความเข้มข้นฟีนอล 5,000 มิลลิกรัมต่อลิตร ผลจากการศึกษาแสดงให้เห็นว่าการย่อยสลายฟีนอลโดยเรียงลำดับจากน้อยไปมาก K_{Aa} < Free cells < K_{Aac} < K_{Abb} < K_{Ab} < EntA ตามลำดับ ดังนั้นจึงเลือกเซลล์ตรึงบนซัลฟิคา K_{Ab} และ EntA มาทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายฟีนอลที่ความเข้มข้นสูงขึ้น ผลจากการศึกษาแสดงให้เห็นว่าเซลล์ตรึงแบบกักขังในซัลฟิคา EntA สามารถย่อยสลายฟีนอลได้ดีกว่าเซลล์ตรึงแบบยึดเกาะบนซัลฟิคา K_{Ab} ที่

ความเข้มข้นฟีนอล 10,000 มิลลิกรัมต่อลิตร เนื่องจากเซลล์ที่อยู่ในซีลิกา EntA ได้รับการปกป้องจากภาวะภายนอกดีกว่าจึงสามารถที่จะอยู่รอดและเกิดการย่อยสลายฟีนอลได้ดีกว่า ทั้งนี้ที่ความเข้มข้นฟีนอลเริ่มต้น 5,000 มิลลิกรัมต่อลิตร เซลล์อิสระ เซลล์ตรึงแบบยึดเกาะบนซีลิกา KAb และ เซลล์ตรึงแบบกักขังในซีลิกา EntA มีอัตราการย่อยสลายฟีนอลประมาณ 15.09, 21.08 และ 24.91 มิลลิกรัม ฟีนอล ต่อลิตร ต่อชั่วโมง ตามลำดับ

นอกจากนี้พบว่าสามารถนำเซลล์ตรึงบนซีลิกา KAb และ EntA มาใช้อย่างต่อเนื่องในการย่อยสลายฟีนอล ผลจากการศึกษาแสดงให้เห็นว่าเมื่อเติมฟีนอลที่ความเข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าจำนวนเซลล์ตรึงเพิ่มขึ้นทำให้ปริมาณฟีนอลลดลงอย่างรวดเร็ว และหมดภายใน 1 ถึง 2 วัน ส่วนที่ฟีนอลความเข้มข้น 5,000 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าปริมาณฟีนอลลดลงอย่างรวดเร็ว และหมดภายใน 10 ถึง 15 วัน เมื่อใช้ซ้ำหลายๆ ครั้ง เซลล์ตรึงในซีลิกา EntA จะสามารถย่อยสลายฟีนอลโดยใช้เวลาน้อยกว่า 10 วัน แสดงว่าการใช้เซลล์ตรึงอย่างต่อเนื่องจะช่วยให้แบคทีเรียสามารถปรับตัวกับภาวะที่มีฟีนอลได้ดีขึ้น

จากผลการย่อยสลายฟีนอลของเชื้อผสมที่ตรึงในซีลิกา พบว่าเซลล์ตรึงในซีลิกา EntA ดีที่สุด เพราะประสิทธิภาพการย่อยสลายฟีนอลสูงสุด ราคาถูกที่สุด ขั้นตอนการสังเคราะห์ไม่ยุ่งยาก สามารถตรึงเซลล์พร้อมกับการสังเคราะห์ ทนต่อภาวะแวดล้อมได้ดี และสามารถนำแบคทีเรียที่ถูกรังกลับมาใช้อย่างต่อเนื่องได้ เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพการย่อยสลายฟีนอลที่ความเข้มข้น 5,000 มิลลิกรัมต่อลิตร กับงานวิจัยของ Chen และคณะ (2002) พบว่าเซลล์ตรึงบน PAA gel beads สามารถย่อยสลายฟีนอลได้ 16.67 มิลลิกรัม ฟีนอล ต่อลิตร ต่อชั่วโมง ซึ่งมีประสิทธิภาพการย่อยสลายฟีนอลต่ำกว่าเซลล์ตรึงบนซีลิกา KAb และเซลล์ตรึงในซีลิกา EntA ดังตารางที่ 5.3 ดังนั้นในอนาคตเราควรเลือกใช้ซีลิกา EntA ไปใช้สำหรับตรึงเซลล์เพื่อย่อยสลายฟีนอล

ตารางที่ 5.3 การเปรียบเทียบประสิทธิภาพของซีลีกา KAb และซีลีกา EntA

รายละเอียด	ซีลีกา KAb	ซีลีกา EntA
ราคาต่อซีลีกา 1.0 กรัม (บาท)	8.313	0.889
ราคาต่อการบำบัดน้ำปนเปื้อน 1.0 ลิตร (บาท)	1,570	222.25
เวลาที่ใช้ในการสังเคราะห์ (ชม.)	84	84
เวลาที่ใช้ในการตรึงเซลล์ (ชม.)	120	12
ความเสถียร	เสถียรน้อย	เสถียรมาก
ประสิทธิภาพสูงสุดในการย่อยสลายฟีนอล (มิลลิกรัม ฟีนอล ต่อลิตร ต่อชั่วโมง)	21.08	24.91

5.3 ข้อเสนอแนะสำหรับงานวิจัยต่อไป

1. งานวิจัยนี้ทำการบำบัดฟีนอลในน้ำสังเคราะห์ พบว่ากลุ่มแบคทีเรียสามารถย่อยสลายฟีนอลในน้ำได้ผลดี ดังนั้นในการศึกษาขั้นต่อไปจึงควรศึกษาการบำบัดฟีนอลจากน้ำเสียจริง โดยเริ่มจากศึกษาในระบบขวดเขย่าก่อน แล้วจึงพัฒนาไปเป็นระบบต่อเนื่อง แต่ต้องศึกษาปัจจัยอื่นๆ ที่มีผลต่อการย่อยสลายฟีนอลของกลุ่มแบคทีเรีย เช่น ความเป็นกรด-ด่าง อุณหภูมิ สารอาหาร เป็นต้น เพื่อให้การย่อยสลายมีประสิทธิภาพมากขึ้น

2. ในการเปรียบเทียบอัตราการย่อยสลายฟีนอล ควรใช้ปริมาณเซลล์เริ่มต้นของเซลล์อิสระ และเซลล์ตรึงในปริมาณที่เท่ากัน เนื่องจากถ้าเราใช้ปริมาณเซลล์เริ่มต้นที่แตกต่างกันเราจะไม่สามารถบอกความแตกต่างของอัตราการย่อยสลายฟีนอลได้

3. จากงานวิจัยนี้ได้ทำการทดลองในระบบขวดเขย่าเท่านั้น เราควรเพิ่มการทดลองในระบบ reactor เพื่อศึกษาและพัฒนาประสิทธิภาพของเซลล์ตรึงในการย่อยสลายฟีนอลต่อไป

4. ควรศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเก็บรักษาเซลล์ตรึง เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสม และวิธีการเก็บรักษาเซลล์ตรึง สำหรับนำไปใช้งานในอนาคต



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

ภรณ์ ลิ้มปิสุต. 2538. การตรึงเซลล์ *Candida oleophila* C-73 เพื่อการผลิตกรดมะนาว.

วิทยานิพนธ์ปริญญาามหาบัณฑิต ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ภาวิณี คณาสวัสดิ์. 2537. การตรึงเอนไซม์และเซลล์. ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

นันทธร เภราราช. 2550. การคัดแยกและศึกษาลักษณะของแบคทีเรียทนต่อตัวทำละลายจากดิน.
โครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์. วิทยานิพนธ์ปริญญาบัณฑิต ภาควิชา
จุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ธนาวดี ธาราธิรภาพ. 2547. การสกัดโลหะในน้ำด้วยเมโซพอร์ซิลิกาที่มีหมู่ฟังก์ชันซิฟเบส.

วิทยานิพนธ์ปริญญาามหาบัณฑิต สหสาขาวิชาวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม คณะ
วิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

วิเชียร ลีลาวัชรมาศ. 2524. การใช้เอนไซม์ไม่ละลายน้ำและเซลล์ที่ถูกตรึงในอุตสาหกรรม.

ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สุชาติา ชินะจิตร. 2006. พินอลน้ำยาฆ่าเชื้อ [online]. แหล่งที่มา:

<http://www.chemtrack.org> [9 ธันวาคม 2551]

ภาษาอังกฤษ

Antonietti, M., Berton, B., Christine, G., and Hentze, H. P. 1998. Synthesis of
mesoporous silica with large pore and bimodal pore size distribution by
templating of polymer lattices. *Advance Materials* 10: 154-160.

Alvarez, G. S., Desimone, M. F., and Diaz, L. E. 2007. Immobilization of bacteria in silica
matrices using citric acid in the sol-gel process. *Applied Microbiology and
Biotechnology* 73: 1059-1064.

Banerjee, I., Modak, J. M., Bandopadhyay, K., Das, D., and Maiti, B. R. 2001.

Mathematical model for evaluation of mass transfer limitations in phenol
biodegradation by immobilized *Pseudomonas putida*. *Journal of Biotechnology*
87: 211-223.

- Barron, M. A., Haber, L., Maier, A., Zhao, J., and Dourson, M. 2002. Toxicological review of phenol. U.S. Environmental Protection Agency, Washington D.C.
- Beck, J. S., Vartuli, J. C., Roth, W. J., Leonowicz, M. E., Kresge, C. T., Schmitt, K. D., Chu, C. T. W., Olson, D. H., Sheppard, E. W., MaCullen, S. B., Higgins, J. B., and Schlenker, J. L. 1992. A new family of mesoporous molecular sieves prepared with liquid crystal templates. *Journal of the American Chemical Society* 114: 10834-10843.
- Berthod, A. 1991. Silica: Backbone material of liquid chromatographic column packing. *Journal of Chromatography* 549: 1-28.
- Boos, A., Intasiri, A., Brunette, J. P. and Leroy, M. J. F. 2002. Surfactant-templated silica doped with 1-phenyl-3-methyl-4-stearoylpyrazol-5-one (HPMSP) as a new sorbent. *Journal of Materials Chemistry* 12: 886-889.
- Branyik, T., Kuncova, G., Paca, J., and Demnerova, K. 1998. Encapsulation of microbial cells into silica gel. *Journal of Sol-Gel Science and Technology* 13: 283-287.
- Branyik, T. and Kuncova, G. 2000. The use of silica gel prepare by sol-gel method and polyurethane foam as microbial carriers in the continuous degradation of phenol. *Applied Microbiology and Biotechnology* 54: 168-172.
- Brinker, C. J. and Scherer, G. W. 1990. Sol-Gel Science. London: Academic Press.
- Cassidy, M. B., Lee, H., and Trevors, J. T. 1996. Environmental applications of immobilized microbial cells:a review. *Journal of Industrial Microbiology* 16: 79-101.
- Cheetham, P. S. J., Blunt, K. W., and Bucke, C. 1980. Physical studies on cell immobilization using calcium alginate gel. *Biotechnology and Bioengineering* 21: 2155-2618.
- Chen, Y.-M., Lin, T.-F., Huang, C., Lin, J.-C., and Hsieh F.-M. 2007. Degradation of phenol and TCE using suspended and chitosan-bead immobilized *Pseudomonas putida*. *Journal of Hazardous Materials* 148: 660-670.
- Chibata, I. 1978. Immobilized Enzymes. Tokyo : Kadansha Ltd.
- Chibata, I. and Wingard Jr, L. B. 1983. Immobilized microbial cells. *Applied Biochemistry and Bioengineering* 4: 189-280.

- Chistoserdova, L., Chen, S.-W., Lapidus, A., and Lidstrom, M. E. 2003. Methylo trophy in *Methylobacterium extorquens* AM1 from a genomic point of view. *Science* 281: 99-102.
- Chung, T. P., Tseng, H. Y., and Juang, R. S. 2003. Mass transfer effect and intermediate detection for phenol degradation in immobilized *Pseudomonas putida* systems. *Process Biochemistry* 38: 1497–1507.
- Desimone, M. F., De Marzi, M. C., Copello, G. J., Fernandez, M. M., Malchiodi, E. L., and Diaz, L. E. 2005. Efficient preservation in a silicon oxide matrix of *Escherichia coli*, producer of recombinant proteins. *Applied Microbiology and Biotechnology* 68: 747-752.
- Dong, F. M., Wang, L. L., Wang, C. M., Cheng, J. P., He, Z. Q., Sheng, Z. J., and Shen, R. Q. 1992. Molecular cloning and mapping o phenol degradation genes from *Bacillus stearothermophilus* FDTP-3 and their expression in *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology* 58: 2531-2535.
- Ehrhardt, H. M. and Rehm, H. J. 1985. Phenol degradation by microorganisms adsorbed on activated carbon. *Applied Microbiology and Biotechnology* 21: 32-36.
- Fennouh, S., Guyon, S., Livage, J., and Roux, C. 2000. Sol-gel entrapment of *Escherichia coli*. *Journal of Sol-Gel Science and Technology* 19: 647-649.
- Folsom, B. R., Chapman, P. J., and Pritchard, P. H. 1990. Phenol and trichloroethylene degradation by *Pseudomonas cepacia* G4: kinetics and interactions between substrates. *Applied and Environmental Microbiology* 56: 1279-2285.
- Godjevargova, T., Ivanova, D., Aleksieva, Z., and Burdelova, G. 2006. Biodegradation of phenol by immobilized *Trichosporon cutaneum* R57 on modified polymer membranes. *Process Biochemistry* 41: 2342-2346.
- Greenberg, A. E., Classceri, L. S., and Eaton, A. D. 1992. Phenols. Standard methods for the determination of water and wastewater, American Public Health Association, Washington DC, pp. 5.30-5.33.
- Hannaford, A. M. and Kuek, C. 1999. Aerobic batch degradation of phenol using immobilized *Pseudomonas putida*. *Journal Industrial Microbiology Biotechnology* 22: 121–126.

- Heipieper, H. J., Keweloh, H., and Rehm, H. J. 1991. Influence of phenols on growth and membrane permeability of free and immobilized *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology* 57: 1213-1217.
- Heipieper, H. J., Diefenbach, R., and Keweloh, H. 1992. Conversion of cis unsaturated fatty acids to trans, a possible mechanism for the protection of phenol-degrading *Pseudomonas putida* P8 from substrate toxicity. *Applied and Environmental Microbiology* 58: 1847-1852.
- Hsieh, F.-M., Huang, C., Lin, T.-F., Chen, Y.-M., and Lin, J.-C. 2008. Study of sodium tripolyphosphate-crosslinked chitosan beads entrapped with *Pseudomonas putida* for phenol degradation. *Process Biochemistry* 43: 83-92.
- Intasiri, A. 2000. 4-Acylpyrazolone doped silica: synthesis, characterization, transition metal complexation and applications for preconcentration. Ph.D. dissertation, Ecole Europeenne de Chimie, Polymeres et Materiaux de Strasbourg (ECPM) University Louis Pasteur Strasbourg I, France.
- Iller, R. K. 1979. The chemistry of silica. New York: Wiley.
- Keweloh, H. and Heipieper, H. J. 1990. Phenol induced membrane changes in free and immobilized *Escherichia coli*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 33: 66-71.
- Khleifat, K. M. 2006. Biodegradation of phenol by *Ewingella americana*: effect of carbon starvation and some growth conditions. *Process Biochemistry* 41: 2010-2016.
- Leofanti, G., Padovan, M., Tozzola, G., and Venturelli B. 1998. Surface area and pore texture of catalysts. *Catalysis Today* 41: 207-219.
- Li, J., and Gu, J. D. 2007. Complete degradation of dimethyl isophthalate requires the biochemical cooperation between *Klebsiella oxytoca* Sc and *Methylobacterium mesophilicum* Sr isolated from Wetland sediment. *Science of the Total Environment* 380: 181-187.
- Nassif, N., Roux, C., Coradin, T., Rager, M.-N., Bouvet, O., and Livage, J. 2002a. A sol-gel matrix to preserve the viability of encapsulated bacteria. *Journal of Materials Chemistry* 13: 203-208.

- Nassif, N., Bouvet, O., Rager, M. N., Roux, C., Coradin, T., and Livage, J. 2002b. Living bacteria in silica gels. *Nature Materials* 1: 42-44.
- Nigel, J. K. Simpson. 2000. Solid-phase extraction. New York: Marcel Dekker 29: 4-12.
- Pazarlioglu, N. K. and Telefoncu, A. 2005. Biodegradation of phenol by *Pseudomonas putida* immobilized on activated pumice particles. *Process Biochemistry* 40: 1807-1814.
- Paller, G., Hommel, R. K., Kleber, H. P. 1995. Phenol degradation by *Acinetobacter calcoaceticus* NCIB 8250. *Journal of Basic Microbiology* 35: 325-35.
- Roche, S. D. 1963. Genetics of dichloromethane degradation in *Methylobacterium* sp. DM4. Ph.D. dissertation, Natural sciences, Swiss Federal Institute of Technology, Zuerich.
- Santos, V. L., Monteiro, A. S., Braga, D. T., and Santoro, M. M. 2008. Phenol degradation by *Aureobasidium pullulans* FE13 isolated from industrial effluents. *Journal of Hazardous Materials* 161: 1413–1420.
- Surasarang, K., Narksawat, K., Danchaivijitr, S., Siripanichgon, K., Sujirarat, D., Rongrungrueng, Y., and Kiratisin, P. 2007. Risk factors for multi-drug resistant *Acinetobacter baumannii* nosocomial infection. *Journal of the Medical Association of Thailand* 90: 1633-1639.
- Shalaby, M.-S.-H. 2003. Biological degradation of substrate mixtures composed of phenol, benzoate and acetate by *Burkholderia cepacia* G4. PhD thesis, Technische University Carolo-Wilhelmina, Germany.
- Sing, K. S. W., Everett, D. H., Haul, R. A. W., Moscou, L., Pierotti, R. A., Rouquerol, J., and Siemieniewska, T. 1985. Reporting physisorption data for gas/solid systems with special reference to the determination of surface area and porosity. *Pure Applied Chemistry* 57: 603-619.
- Wang, Y., Tian, Y., Han, B., Zhao, H.-B., Bi, J.-N., and Cai, B.-L. 2007. Biodegradation of phenol by free and immobilized *Acinetobacter* sp. strain PD12. *Journal of Environmental Sciences* 19: 222-225.
- Watanabe, K., Hino, S., Takahashi, N. 1996. Responses of activated sludge to an increase in phenol loading. *Journal Fermentation Bioengineering* 82: 522–4.

van Aken, B., Peres, C. M., Doty, S. L., Yoon, J. M. and Schnoor, J. L. 2004.

Methylobacterium populi sp. nov., a novel aerobic, pink-pigmented, facultatively methylotrophic, methane-utilizing bacterium isolated from poplar trees (*Populus deltoides* DN34). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 54: 1191–1196.

van Schie, P. M. and Young, R. J. 2000. Biodegradation of phenol: mechanisms and applications. *Bioremediation Journal* 4: 1-18.

Varga, J. M. and Neujahr, H. Y. 1970. Isolation from soil of phenol-utilizing organisms and metabolic studies on the pathways of phenol degradation. *Plant and Soil* 33: 565-571.

Yi, G. R., and Yang, S. M. 1999. Microstructure of porous silica prepared in aqueous and nonaqueous emulsion templates. *Chemical and Material Engineering* 11: 2322-2325.

Zhang, M. 2004. Regulation of methanol oxidation genes in *Methylobacterium extorquens* AM1. Ph.D. dissertation, Department of Chemical Engineering, University of Washington, America.



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาคผนวก

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ก

สูตรและวิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Carbon Free Mineral Medium (CFMM)

ก. แอมโมเนียมไนเตรต (NH_4NO_3)	3.0	กรัม
ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟตเดคะไฮเดรต ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)	5.5	กรัม
โปแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)	0.8	กรัม
ข. แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	0.01	กรัม
เฟอริกคลอไรด์เฮกซะไฮเดรต ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)	0.005	กรัม
แคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรต ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	0.005	กรัม

ซึ่งสารส่วน ก. ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร ปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 1 นอร์มัล ให้เป็น 7.5 จากนั้นนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที เติมสารละลายในส่วน ข. ที่ทำการเตรียมแยกแต่ละชนิดและทำให้ปราศจากเชื้อโดยการกรองผ่านชุดกรองสำเร็จรูปเซลลูโลสอะซีเตท ขนาดรู 0.45 ไมโครเมตร ลงในอาหารที่ทำการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว

2. อาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง CFMM (CFMM agar)

เตรียมอาหารด้วยวิธีเช่นเดียวกับการเตรียมอาหารเหลว CFMM ละลายผงวุ้น 15 กรัม ต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ 1,000 มิลลิลิตร ลงไปในสารละลาย ก. ปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 1 นอร์มัล ให้เป็น 7.5 จากนั้นนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 20 นาที ทิ้งไว้จนได้อุณหภูมิ 50-60 องศาเซลเซียส จึงเติมสารละลายในส่วน ข. ที่ปราศจากเชื้อแล้วก่อนนำไปใช้

3. อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Luria-Bertani (LB broth)

ทริปโตเนน (tryptone)	10.0	กรัม
สารสกัดจากยีสต์ (yeast extract)	5.0	กรัม
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	5.0	กรัม

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่นปริมาตร 800 มิลลิลิตร ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 1 นอร์มัล ให้เป็น 7.0 ปรับปริมาตรให้เป็น 1,000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

4. อาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง Luria-Bertani (LB agar)

เตรียมอาหารด้วยวิธีเช่นเดียวกับการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB แต่ละลายผงวุ้น 15 กรัมต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ 1,000 มิลลิลิตร ลงไปในอาหารก่อนนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 20 นาที

ภาคผนวก ข

สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

1. สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์

ชั่งโซเดียมไฮดรอกไซด์ 3.9996 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร ในขวดวัดปริมาตรขนาด 1,000 มิลลิลิตร สุดท้ายจะได้สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์

2. สารละลายไฮโดรเจนคลอไรด์ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์

ชั่งกรดไฮโดรคลอริก 3.646 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร ในขวดวัดปริมาตรขนาด 1,000 มิลลิลิตร สุดท้ายจะได้สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์

3. สารละลายแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์

ชั่งแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ 3.5048 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร ในขวดวัดปริมาตรขนาด 1,000 มิลลิลิตร สุดท้ายจะได้สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์

4. สารละลายเฮกซะอะดีซิลไตรเมทิลแอมโมเนียม โบรไมด์ความเข้มข้น 0.06 โมลาร์

ชั่งเฮกซะอะดีซิลไตรเมทิลแอมโมเนียม โบรไมด์ 21.8676 กรัม ละลายในสารละลายไฮโดรเจนคลอไรด์ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ 1,000 มิลลิลิตร ในขวดวัดปริมาตรขนาด 1,000 มิลลิลิตร สุดท้ายจะได้สารละลายเฮกซะอะดีซิลไตรเมทิลแอมโมเนียม โบรไมด์ความเข้มข้น 0.06 โมลาร์

5. สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 2 โมลาร์

ชั่งโซเดียมไฮดรอกไซด์ 79.994 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร ในขวดวัดปริมาตรขนาด 1,000 มิลลิลิตร สุดท้ายจะได้สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 2 โมลาร์

6. สารละลายกรดซัลฟิวริกความเข้มข้น 0.75 โมลาร์

ชั่งกรดซัลฟิวริก 157.605 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร ในขวดวัดปริมาตรขนาด 1,000 มิลลิลิตร สุดท้ายจะได้สารละลายกรดซัลฟิวริกความเข้มข้น 0.75 โมลาร์

7. สารละลายโปแทสเซียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 0.0168 โมลาร์

ชั่งโปแทสเซียมไฮดรอกไซด์ 0.94 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร ในขวดวัดปริมาตรขนาด 1,000 มิลลิลิตร สุดท้ายจะได้สารละลายโปแทสเซียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 0.0168 โมลาร์

8. สารละลาย 4-อะมิโนแอนติไพรีน

ชั่ง 4-อะมิโนแอนติไพรีน 2.0 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร ในขวดวัดปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร

9. สารละลายเฟอร์ริกไซยาไนด์

ชั่ง เฟอร์ริกไซยาไนด์ 8.0 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร ในขวดวัดปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร

10. สารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.85%

ชั่งโซเดียมคลอไรด์ 0.85 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 100 มล. ให้นำเช็ดด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที

11. 70% เอทานอล

ละลายเอทานอลสัมบูรณ์ ปริมาตร 700 มิลลิลิตร ในน้ำกลั่นปลอดประจุปริมาตร 300 มิลลิลิตร

12. ฟอสเฟตบัฟเฟอร์

ก. โมโนเบสิก โซเดียมฟอสเฟต (NaH_2PO_4)	23.87 กรัม
ข. ไดเบสิก โซเดียมฟอสเฟต (Na_2HPO_4)	42.74 กรัม

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่นปริมาตร 1000 มิลลิลิตร ปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง ให้เป็น 7.4 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

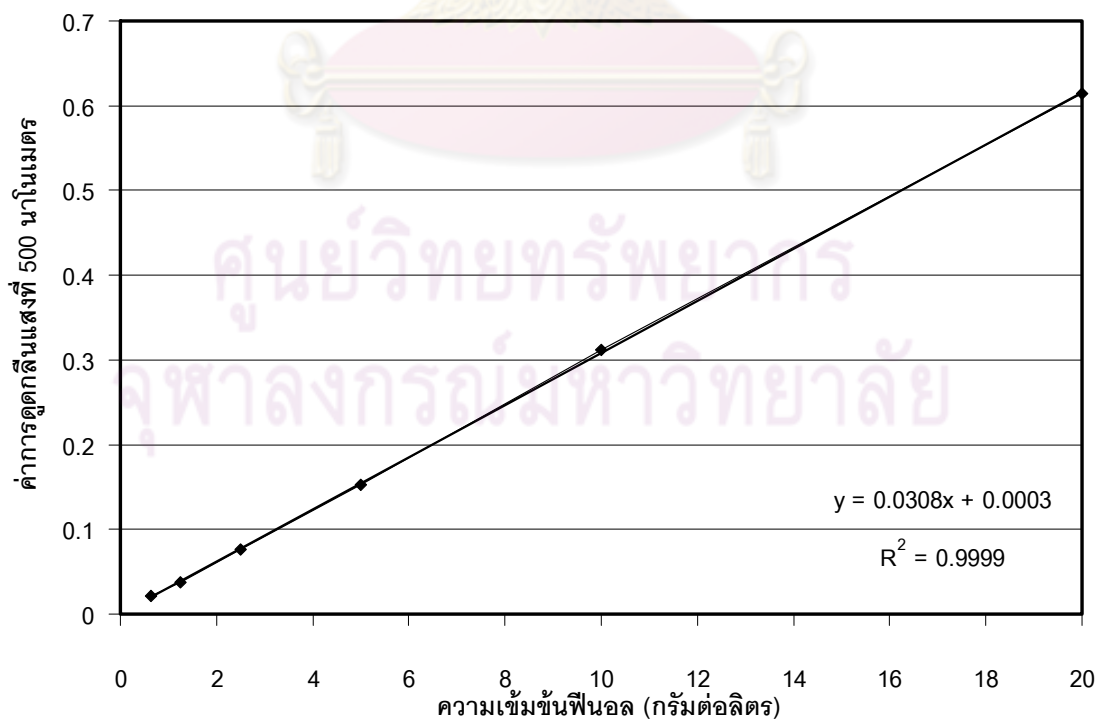
ภาคผนวก ค

กราฟมาตรฐาน

ตารางที่ ค.1 ความเข้มข้นของฟีนอลที่ความเจือจาง 10,000 เท่า สำหรับเซลล์อิสระ

ความเข้มข้นฟีนอล (มิลลิกรัมต่อลิตร)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 500 นาโนเมตร			ค่าเฉลี่ย	ค่าเบี่ยงเบน มาตรฐาน
	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3		
625	0.021	0.019	0.024	0.021	0.003
1250	0.038	0.041	0.034	0.038	0.004
2500	0.076	0.08	0.071	0.076	0.005
5000	0.152	0.156	0.149	0.152	0.004
10000	0.312	0.315	0.309	0.312	0.003
20000	0.614	0.617	0.612	0.614	0.003

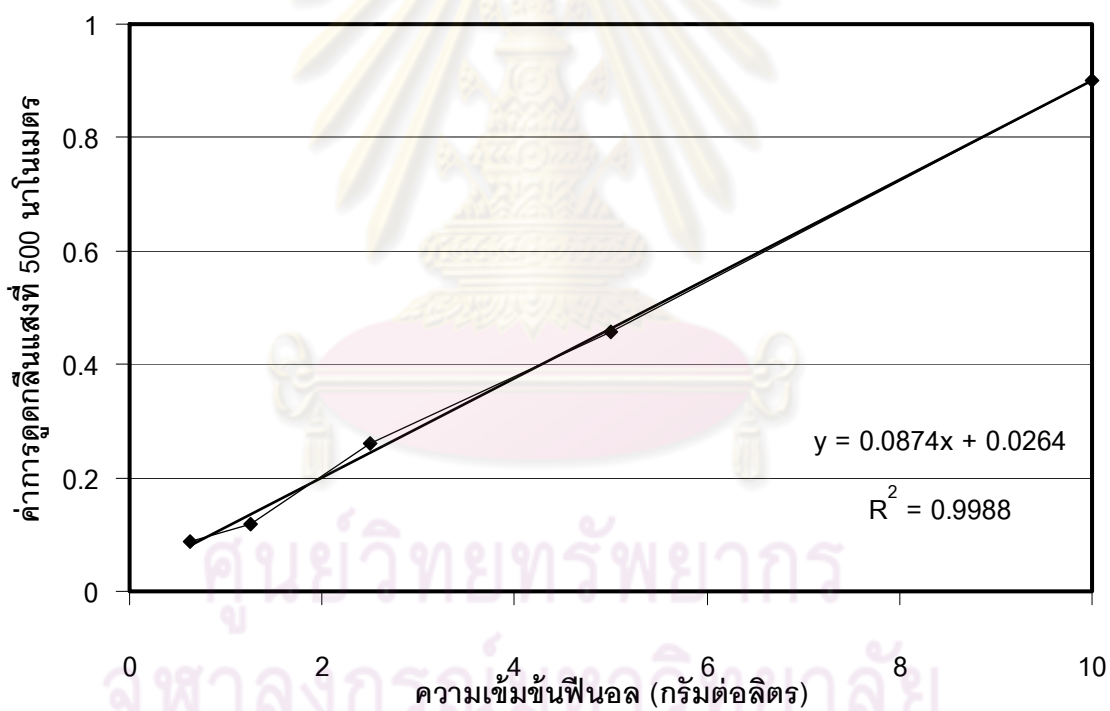
รูปที่ ค.1 กราฟมาตรฐานความเข้มข้นของฟีนอลที่ความเจือจาง 10,000 เท่า สำหรับเซลล์อิสระ



ตารางที่ ค.2 ความเข้มข้นของฟีนอลที่ความเจือจาง 1,000 เท่า สำหรับเซลล์ตริง

ความเข้มข้นฟีนอล (มิลลิกรัมต่อลิตร)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 500 นาโนเมตร			ค่าเฉลี่ย	ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน
	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3		
625	0.098	0.086	0.076	0.087	0.011
1250	0.116	0.122	0.121	0.120	0.003
2500	0.261	0.255	0.264	0.260	0.005
5000	0.457	0.463	0.455	0.458	0.004
10000	0.884	0.891	0.928	0.901	0.024

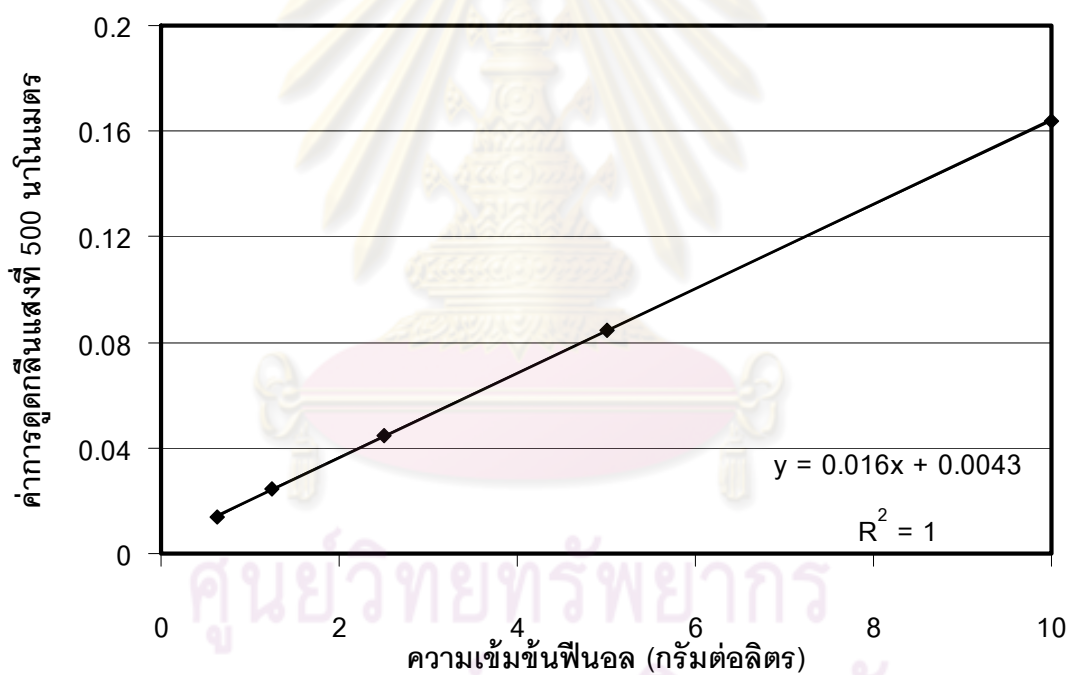
รูปที่ ค.2 กราฟมาตรฐานความเข้มข้นของฟีนอลที่เจือจาง 1,000 เท่า สำหรับเซลล์ตริง



ตารางที่ ค.3 ความเข้มข้นของฟีนอลที่ความเจือจาง 10,000 เท่า สำหรับเซลล์ตริง

ความเข้มข้นฟีนอล (มิลลิกรัมต่อลิตร)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 500 นาโนเมตร			ค่าเฉลี่ย	ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน
	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3		
625	0.016	0.013	0.012	0.014	0.002
1250	0.025	0.021	0.028	0.025	0.004
2500	0.044	0.045	0.045	0.044	0.001
5000	0.081	0.087	0.085	0.084	0.003
10000	0.164	0.167	0.161	0.164	0.003

รูปที่ ค.3 กราฟมาตรฐานความเข้มข้นของฟีนอลที่เจือจาง 10,000 เท่า สำหรับเซลล์ตริง



ภาคผนวก ง

ปริมาณฟีนอลที่เหลืออยู่

ตารางที่ ง.1 ปริมาณฟีนอลที่เหลืออยู่ (มิลลิกรัมต่อลิตร) ของชุดควบคุม (เซลล์อิสระ) ในการย่อยสลายฟีนอลที่ความเข้มข้น 625-20,000 มิลลิกรัมต่อลิตร

เวลา (วัน)	ฟีนอลที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 625 มิลลิกรัมต่อลิตร						ค่าเฉลี่ย	ค่าเบี่ยงเบน มาตรฐาน
	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	ซ้ำที่ 4	ซ้ำที่ 5	ซ้ำที่ 6		
0	682	812	617	596	497	695	649.83	106.49
2	617	649	682	629	530	563	611.66	56.04
4	487	617	584	464	497	596	540.83	65.46
6	455	519	552	430	563	530	508.16	53.77
8	455	487	552	497	530	430	491.83	45.40
10	422	455	519	563	397	464	470	61.55
เวลา (วัน)	ฟีนอลที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 1,250 มิลลิกรัมต่อลิตร						ค่าเฉลี่ย	ค่าเบี่ยงเบน มาตรฐาน
	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	ซ้ำที่ 4	ซ้ำที่ 5	ซ้ำที่ 6		
0	1234	1266	1201	861	1490	1192	1207.33	202.12
2	1071	974	1169	1126	1192	894	1071.00	116.62
4	779	844	877	1159	1060	762	913.50	160.58
6	649	649	682	1026	861	662	754.83	155.64
8	682	519	649	828	894	728	716.66	133.28
10	584	552	617	993	695	662	683.83	159.99

เวลา (วัน)	ฟินอลที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 2,500 มิลลิกรัมต่อลิตร						ค่าเฉลี่ย	ค่าเบี่ยงเบน มาตรฐาน
	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	ซ้ำที่ 4	ซ้ำที่ 5	ซ้ำที่ 6		
0	2435	2500	2468	2649	3411	3013	2746	389.21
2	2045	2273	2208	2483	3212	2848	2511.5	440.76
4	2240	2078	2175	2417	2881	2583	2395.66	298.30
6	1656	1818	1688	2285	2450	2550	2074.5	400.43
8	1429	1558	1656	2152	2517	2318	1938.33	449.09
10	1396	1526	1558	2219	2483	2252	1905.66	463.94
เวลา (วัน)	ฟินอลที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 5,000 มิลลิกรัมต่อลิตร						ค่าเฉลี่ย	ค่าเบี่ยงเบน มาตรฐาน
	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	ซ้ำที่ 4	ซ้ำที่ 5	ซ้ำที่ 6		
0	5227	4935	4675	5265	4735	5000	4972.83	243.88
2	4351	4740	4448	5099	5033	4768	4739.83	300.69
4	4610	4513	4545	4702	4834	4536	4623.33	123.84
6	4318	4123	3929	4503	4603	4636	4352	282.48
8	4026	3863	3961	4404	4470	4570	4215.66	300.30
10	3929	3831	3766	4338	4536	4272	4112	312.60
เวลา (วัน)	ฟินอลที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 10,000 มิลลิกรัมต่อลิตร						ค่าเฉลี่ย	ค่าเบี่ยงเบน มาตรฐาน
	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	ซ้ำที่ 4	ซ้ำที่ 5	ซ้ำที่ 6		
0	10129	10032	10227	10364	10099	10629	10246	220.02
2	10194	10129	9838	10331	10232	10431	10192	203.63
4	9805	9935	10032	10265	10232	10033	10050	175.05
6	9903	9935	9773	10000	10166	10232	10001	171.19
8	9773	9935	9968	10099	10132	10066	9995	132.84
10	9838	9773	9545	9967	10033	10000	9859	183.44

เวลา (วัน)	ฟีนอลที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 2,500 มิลลิกรัมต่อลิตร						ค่าเฉลี่ย	ค่าเบี่ยงเบน มาตรฐาน
	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	ซ้ำที่ 4	ซ้ำที่ 5	ซ้ำที่ 6		
0	2435	2500	2468	2649	2748	2682	2580.33	129.11
2	1851	1883	1721	2119	1854	1623	1841.83	168.06
4	942	909	974	1060	1026	927	973	59.24
6	487	682	844	530	563	464	595	143.97
8	390	584	519	265	298	199	375.83	150.76
10	97	130	15	66	166	99	95.5	52.01
เวลา (วัน)	ฟีนอลที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 5,000 มิลลิกรัมต่อลิตร						ค่าเฉลี่ย	ค่าเบี่ยงเบน มาตรฐาน
	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	ซ้ำที่ 4	ซ้ำที่ 5	ซ้ำที่ 6		
0	5227	4905	4675	4934	4868	5000	4934.83	180.26
2	4318	4513	4513	4073	4338	4272	4337.83	165.06
4	3961	3929	4188	3609	3808	3907	3900.33	190.10
6	3831	3604	3442	3146	3444	3377	3474	229.46
8	3377	3279	3312	2616	2715	2848	3024.5	336.30
10	2403	2338	2013	2119	1722	1556	2025.17	335.14
เวลา (วัน)	ฟีนอลที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 10,000 มิลลิกรัมต่อลิตร						ค่าเฉลี่ย	ค่าเบี่ยงเบน มาตรฐาน
	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	ซ้ำที่ 4	ซ้ำที่ 5	ซ้ำที่ 6		
0	10129	10032	10227	10033	10099	10166	10114.33	76.429
2	9513	9188	9610	9371	9106	9172	9326.66	204.35
4	8214	8052	8701	8377	8179	8543	8344.33	243.93
6	7273	7597	7987	7417	7450	7815	7589.83	267.69
8	7110	7175	7078	6921	6987	7219	7081.67	112.39
10	6981	6948	7045	6424	6722	6126	6707.67	364.76

เวลา (วัน)	ฟินอลที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 20,000 มิลลิกรัมต่อลิตร						ค่าเฉลี่ย	ค่าเบี่ยงเบน มาตรฐาน
	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	ซ้ำที่ 4	ซ้ำที่ 5	ซ้ำที่ 6		
0	19935	19870	20032	20066	19901	19834	19939.67	91.67
2	19286	18929	19351	19338	19437	19073	19235.67	193.57
4	17890	18409	18247	18576	18775	18609	18417.67	315.27
6	16916	18409	18019	17583	18411	18278	17936	589.61
8	16786	16623	17273	17450	17318	17682	17188.67	404.38
10	16493	16558	16591	16921	16821	16954	16723	199.85

ตารางที่ ง.3 ปริมาณฟินอลที่เหลืออยู่ (มิลลิกรัมต่อลิตร) ของชุดควบคุม ซิลิกา KAb ในการย่อยสลาย ฟินอลที่ความเข้มข้น 625-10,000 มิลลิกรัมต่อลิตร

เวลา (วัน)	ฟินอลที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 625 มิลลิกรัมต่อลิตร			ค่าเฉลี่ย	ค่าเบี่ยงเบน มาตรฐาน
	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3		
0	625	625	625	625	0
2	612.17	654.21	665.94	644.11	28.27
4	574.26	631.98	673.85	626.70	50.00
6	561.44	631.98	747.84	647.09	94.11
8	574.26	618.01	649.42	613.90	37.74
10	529.66	625	608.47	587.71	50.94
เวลา (วัน)	ฟินอลที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 1,250 มิลลิกรัมต่อลิตร			ค่าเฉลี่ย	ค่าเบี่ยงเบน มาตรฐาน
	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3		
0	1250	1250	1250	1250	0
2	1239.63	1188.21	1177.74	1201.86	33.12
4	1282.96	1075.39	1116.32	1158.23	109.94
6	1174.64	1137.17	1116.32	1142.71	29.54
8	1131.31	1147.02	1167.81	1148.71	18.30
10	1164.28	1095.98	1074.78	1111.68	46.76

เวลา (วัน)	ฟินอลที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 2,500 มิลลิกรัมต่อลิตร			ค่าเฉลี่ย	ค่าเบี่ยงเบน มาตรฐาน
	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3		
0	2500	2500	2500	2500	0
2	2480.74	2431.46	2376.69	2429.63	52.04
4	2337.57	2421.17	2376.69	2378.48	41.831
6	2337.57	2381.76	2376.69	2365.34	24.183
8	2289.85	2401.47	2357.66	2349.66	56.23
10	2308.27	2470.01	2300.56	2359.61	95.68
เวลา (วัน)	ฟินอลที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 5,000 มิลลิกรัมต่อลิตร			ค่าเฉลี่ย	ค่าเบี่ยงเบน มาตรฐาน
	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3		
0	5000	5000	5000	5000	0
2	4923.50	4906.49	4977.91	4935.97	37.30
4	4857.52	4765.77	4747.40	4790.23	58.99
6	4934.02	4851.71	4846.33	4877.35	49.14
8	4934.02	4765.77	4747.40	4815.73	102.85
10	4934.02	4765.77	4747.40	4815.73	102.85
เวลา (วัน)	ฟินอลที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 10,000 มิลลิกรัมต่อลิตร			ค่าเฉลี่ย	ค่าเบี่ยงเบน มาตรฐาน
	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3		
0	10000	10000	10000	10000	0
2	9536.28	9674.35	9568.65	9593.09	72.20
4	9242.63	9258.46	8771.89	9090.99	276.46
6	9186.27	9202.55	8825.57	9071.46	213.10
8	9209.01	9190.78	8879.26	9093.02	185.34
10	9298.99	9191.76	8782.25	9091.00	272.70

ตารางที่ ง.4 ปริมาณฟีนอลที่เหลืออยู่ (มิลลิกรัมต่อลิตร) ของเซลล์ตรึงบนซิลิกา KAb ในการย่อยสลาย ฟีนอลที่ความเข้มข้น 625-10,000 มิลลิกรัมต่อลิตร

เวลา (วัน)	ฟีนอลที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 625 มิลลิกรัมต่อลิตร			ค่าเฉลี่ย	ค่าเบี่ยงเบน มาตรฐาน
	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3		
0	625	625	625	625	0
2	351	268	300	306.33	41.86
4	0	0	0	0	0
6	0	0	0	0	0
8	0	0	0	0	0
10	0	0	0	0	0
เวลา (วัน)	ฟีนอลที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 1,250 มิลลิกรัมต่อลิตร			ค่าเฉลี่ย	ค่าเบี่ยงเบน มาตรฐาน
	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3		
0	1250	1250	1250	1250	0
2	713	724	784	740	38.21
4	406	427	540	457	72.07
6	230	356	456	347	113.24
8	208	163	169	180	24.43
10	0	0	0	0	0
เวลา (วัน)	ฟีนอลที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 2,500 มิลลิกรัมต่อลิตร			ค่าเฉลี่ย	ค่าเบี่ยงเบน มาตรฐาน
	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3		
0	2500	2500	2500	2500	0
2	1502	1595	1660	1585	79.41
4	1192	1250	1508	1316	168.21
6	1056	992	1069	1039	41.21
8	649	833	830	770	105.37
10	504	386	430	440	59.63

เวลา (วัน)	ฟินอลที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 5,000 มิลลิกรัมต่อลิตร			ค่าเฉลี่ย	ค่าเบี่ยงเบน มาตรฐาน
	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3		
0	5000	5000	5000	5000	0
2	3560	3611	3716	3629	79.54
4	3483	3430	3561	3491	65.89
6	2945	3141	3064	3050	98.74
8	1989	2244	2357	2196	188.51
10	956	1206	916	1026	157.16
เวลา (วัน)	ฟินอลที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 10,000 มิลลิกรัมต่อลิตร			ค่าเฉลี่ย	ค่าเบี่ยงเบน มาตรฐาน
	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3		
0	10000	10000	10000	10000	0
2	9308	9148	8759	9071	282.34
4	9143	9819	8703	9221	562.14
6	8217	8030	8059	8102	100.64
8	7807	7489	7235	7510	286.59
10	6717	6752	6863	6777	76.22

ตารางที่ ง.5 ปริมาณฟินอลที่เหลืออยู่ (มิลลิกรัมต่อลิตร) ของชุดควบคุม ซิลิกา EntA ในการย่อยสลายฟินอลที่ความเข้มข้น 625-10,000 มิลลิกรัมต่อลิตร

เวลา (วัน)	ฟินอลที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 625 มิลลิกรัมต่อลิตร			ค่าเฉลี่ย	ค่าเบี่ยงเบน มาตรฐาน
	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3		
0	625	625	625	625	0
2	572	625	729	642	79.46
4	677	721	678	692.	25.09
6	677	673	573	641	58.75
8	625	721	625	657	55.42
10	729	625	782	712	79.88

เวลา (วัน)	ฟินอลที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 1,250 มิลลิกรัมต่อลิตร			ค่าเฉลี่ย	ค่าเบี่ยงเบน มาตรฐาน
	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3		
0	1250	1250	1250	1250	0
2	1000	1190	1161	1117	102.35
4	1150	1071	1116	1112	39.62
6	1200	1150	1116	1155	42.25
8	1150	1131	1071	1117	41.23
10	1050	1190	1027	1089	88.22
เวลา (วัน)	ฟินอลที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 2,500 มิลลิกรัมต่อลิตร			ค่าเฉลี่ย	ค่าเบี่ยงเบน มาตรฐาน
	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3		
0	2500	2500	2500	2500	0
2	2614	2444	2444	2500	98.14
4	2557	2167	2555	2426	224.59
6	2500	2111	2500	2370	224.58
8	2444	2444	2000	2296	256.34
10	2216	2389	2333	2312.	88.27
เวลา (วัน)	ฟินอลที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 5,000 มิลลิกรัมต่อลิตร			ค่าเฉลี่ย	ค่าเบี่ยงเบน มาตรฐาน
	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3		
0	5000	5000	5000	5000	0
2	4877	3966	4530	4457	459.78
4	4506	4138	4117	4253	218.77
6	4259	3448	3941	3882	408.63
8	4197	3276	3647	3706	463.39
10	4136	3448	3706	3763	347.56

เวลา (วัน)	ฟีนอลที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 10,000 มิลลิกรัมต่อลิตร			ค่าเฉลี่ย	ค่าเบี่ยงเบน มาตรฐาน
	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3		
0	10000	10000	10000	10000	0
2	10000	10000	9752	9917	143.18
4	10061	10120	10124	10101	35.27
6	10122	9880	10124	10042	140.29
8	10183	9521	10434	10046	471.66
10	10122	9761	10248	10043	252.77

ตารางที่ ง.6 ปริมาณฟีนอลที่เหลืออยู่ (มิลลิกรัมต่อลิตร) ของเซลล์ตรึงในซิลิกา EntA ในการย่อยสลายฟีนอลที่ความเข้มข้น 625-10,000 มิลลิกรัมต่อลิตร

เวลา (วัน)	ฟีนอลที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 625 มิลลิกรัมต่อลิตร			ค่าเฉลี่ย	ค่าเบี่ยงเบน มาตรฐาน
	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3		
0	625	625	625	625	0
2	196	291	357	281	80.93
4	0	0	0	0	0
6	0	0	0	0	0
8	0	0	0	0	0
10	0	0	0	0	0
เวลา (วัน)	ฟีนอลที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 1,250 มิลลิกรัมต่อลิตร			ค่าเฉลี่ย	ค่าเบี่ยงเบน มาตรฐาน
	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3		
0	1250	1250	1250	1250	0
2	759	529	650	646	115.05
4	134	145	400	226	150.50
6	0	0	0	0	0
8	0	0	0	0	0
10	0	0	0	0	0

เวลา (วัน)	ฟินอลที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 2,500 มิลลิกรัมต่อลิตร			ค่าเฉลี่ย	ค่าเบี่ยงเบน มาตรฐาน
	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3		
0	2500	2500	2500	2500	0
2	1142	1447	1125	1238	181.19
4	1033	1184	1063	1093	79.93
6	707	1053	938	899	176.21
8	490	526	438	484	44.24
10	109	66	188	121	61.87
เวลา (วัน)	ฟินอลที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 5,000 มิลลิกรัมต่อลิตร			ค่าเฉลี่ย	ค่าเบี่ยงเบน มาตรฐาน
	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3		
0	5000	5000	5000	5000	0
2	3333	3438	3706	3492	192.34
4	2778	2813	2235	2608	324.07
6	2345	2375	1824	2181	309.82
8	1790	1438	1236	1488	280.36
10	556	750	883	730	164.44
เวลา (วัน)	ฟินอลที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 10,000 มิลลิกรัมต่อลิตร			ค่าเฉลี่ย	ค่าเบี่ยงเบน มาตรฐาน
	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3		
0	10000	10000	10000	10000	0
2	8750	8832	8924	8835	87.04
4	7775	7949	8182	7968	204.21
6	6725	6879	6902	6835	96.24
8	5688	5585	5830	5701	123.01
10	4763	4859	5125	4915	187.53

ตารางที่ ง.7 ปริมาณฟีนอลที่เหลืออยู่ (มิลลิกรัมต่อลิตร) ของเซลล์ตรึงบนซิลิกา KAb เมื่อใช้ในการย่อยสลายฟีนอลอย่างต่อเนื่อง

เวลา (วัน)	ฟีนอลที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 500 มิลลิกรัมต่อลิตร						ค่าเฉลี่ย	ค่าเบี่ยงเบน มาตรฐาน
	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	ซ้ำที่ 4	ซ้ำที่ 5	ซ้ำที่ 6		
0	373	360	365	375	355	353	363	9.05
1	178	253	238	313	205	278	243	48.93
2	0	0	0	0	0	0	0	0
2	350	378	328	300	285	365	334	36.72
3	0	0	0	0	0	0	0	0
3	323	338	363	340	373	348	347	18.09
4	0	0	0	0	0	0	0	0
4	333	338	315	320	345	333	330	11.21
5	0	0	0	0	0	0	0	0

ตารางที่ ง.8 ปริมาณฟีนอลที่เหลืออยู่ (มิลลิกรัมต่อลิตร) ของเซลล์ตรึงในซิลิกา EntA เมื่อใช้ในการย่อยสลายฟีนอลอย่างต่อเนื่อง

เวลา (วัน)	ฟีนอลที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 500 มิลลิกรัมต่อลิตร			ค่าเฉลี่ย	ค่าเบี่ยงเบน มาตรฐาน
	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3		
0	500	500	500	500	0
1	282	200	286	256	48.53
2	0	0	0	0	0
2	438	433	536	469	58.07
3	0	0	0	0	0
3	500	466	536	500	35.01
4	0	0	0	0	0
4	407	500	500	469	53.69
5	0	0	0	0	0

ตารางที่ ง.9 ปริมาณฟีนอลที่เหลืออยู่ (มิลลิกรัมต่อลิตร) ของเซลล์ตรึงบนซิลิกา KAb เมื่อใช้
ในการย่อยสลายฟีนอลอย่างต่อเนื่อง

เวลา (วัน)	ฟีนอลที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 5,000 มิลลิกรัมต่อลิตร			ค่าเฉลี่ย	ค่าเบี่ยงเบน มาตรฐาน
	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3		
0	5000	5000	5000	5000	0
5	4141	4306	3802	4083	257
10	2878	2376.	2343	2532	299
15	0	0	0	0	0
15	4797	4356	4687	4613	229
20	2474	2227	2291	2331	128
25	0	0	0	0	0
25	4343	5511	4947	4934	584
30	2323	3019	3072	2805	418
35	0	0	0	0	0
35	4898	4356	4375	4543	308
40	2727	3019	2291	2679	366
45	0	0	0	0	0
45	4949	4603	4635	4729	191
50	2575	2227	2500	2434	183
55	0	0	0	0	0

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ ง.10 ปริมาณฟีนอลที่เหลืออยู่ (มิลลิกรัมต่อลิตร) ของเซลล์ตรึงในซีกา EntA เมื่อใช้
ในการย่อยสลายฟีนอลอย่างต่อเนื่อง

เวลา (วัน)	ฟีนอลที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 5,000 มิลลิกรัมต่อลิตร			ค่าเฉลี่ย	ค่าเบี่ยงเบน มาตรฐาน
	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3		
0	5000	5000	5000	5000	0
5	4827	3651	3563	4014	706
10	2643	2191	1861	2232	393
15	0	0	0	0	0
15	5402	5898	4734	5345	585
20	2758	3314	2287	2786	514
25	0	0	0	0	0
25	5114	5112	4255	4827	496
30	2356	1797	1861	2005	306
35	0	0	0	0	0
35	5172	5168	5000	5113	98
40	2183	1573	1223	1660	486
45	0	0	0	0	0
45	4942	5112.36	4734.04	4929	189
50	1666	1685.39	1117.02	1489	323
55	0	0	0	0	0

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก จ

จำนวนแบคทีเรียบนซีลิกา และในอาหารเลี้ยงเชื้อ

ตารางที่ จ.1 จำนวนแบคทีเรียระหว่างการย่อยสลายฟีนอลของเซลล์อิสระที่ความเข้มข้น 625-20,000 มิลลิกรัมต่อลิตร

เวลา (วัน)	ฟีนอลที่ความเข้มข้น 625 มิลลิกรัมต่อลิตร					
	จำนวนแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อ (CFU ต่อมิลลิลิตร)					
	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	ซ้ำที่ 4	ซ้ำที่ 5	ซ้ำที่ 6
0	6.0×10^9	7.0×10^9	11.0×10^9	20.0×10^8	18.0×10^8	15.0×10^8
2	20.0×10^9	18.0×10^9	22.0×10^9	22.0×10^8	18.0×10^8	17.0×10^8
4	19.0×10^{10}	17.0×10^{10}	21.0×10^{10}	22.0×10^8	19.0×10^8	19.0×10^8
6	17.0×10^{10}	19.0×10^{10}	23.0×10^{10}	24.0×10^8	21.0×10^8	20.0×10^8
8	25.0×10^{10}	23.0×10^{10}	29.0×10^{10}	26.0×10^8	21.0×10^8	21.0×10^8
10	28.0×10^{10}	25.0×10^{10}	26.0×10^{10}	27.0×10^8	24.0×10^8	24.0×10^8
เวลา (วัน)	ฟีนอลที่ความเข้มข้น 1,250 มิลลิกรัมต่อลิตร					
	จำนวนแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อ (CFU ต่อมิลลิลิตร)					
	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	ซ้ำที่ 4	ซ้ำที่ 5	ซ้ำที่ 6
0	4.0×10^8	11.0×10^7	9.0×10^8	20.0×10^8	18.0×10^8	15.0×10^8
2	18.0×10^7	21.0×10^7	27.0×10^7	22.0×10^8	19.0×10^8	18.0×10^8
4	28.0×10^9	18.0×10^9	24.0×10^9	22.0×10^8	19.0×10^8	18.0×10^8
6	9.0×10^{10}	12.0×10^{10}	20.0×10^9	23.0×10^8	21.0×10^8	19.0×10^8
8	9.0×10^{10}	13.0×10^{10}	6.0×10^{10}	24.0×10^8	19.0×10^8	18.0×10^8
10	6.0×10^9	11.0×10^{10}	6.0×10^{10}	25.0×10^8	23.0×10^8	21.0×10^8

เวลา (วัน)	ฟินอลที่ความเข้มข้น 2,500 มิลลิกรัมต่อลิตร					
	จำนวนแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อ (CFU ต่อมิลลิลิตร)					
	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	ซ้ำที่ 4	ซ้ำที่ 5	ซ้ำที่ 6
0	9.0×10^{10}	12.0×10^{10}	9.0×10^9	20.0×10^8	18.0×10^8	15.0×10^8
2	23.0×10^{10}	18.0×10^{10}	14.0×10^{10}	20.0×10^8	17.0×10^8	17.0×10^8
4	28.0×10^{10}	6.0×10^{11}	11.0×10^{10}	21.0×10^8	18.0×10^8	17.0×10^8
6	19.0×10^{10}	26.0×10^{10}	29.0×10^{10}	23.0×10^8	19.0×10^8	19.0×10^8
8	9.0×10^{11}	27.0×10^9	13.0×10^{11}	22.0×10^8	18.0×10^8	21.0×10^8
10	1.0×10^{11}	9.0×10^{11}	7.0×10^{11}	24.0×10^8	22.0×10^8	22.0×10^8
เวลา (วัน)	ฟินอลที่ความเข้มข้น 5,000 มิลลิกรัมต่อลิตร					
	จำนวนแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อ (CFU ต่อมิลลิลิตร)					
	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	ซ้ำที่ 4	ซ้ำที่ 5	ซ้ำที่ 6
0	9.0×10^9	6.0×10^9	12.0×10^{10}	20.0×10^8	18.0×10^8	15.0×10^8
2	11.0×10^{10}	9.0×10^9	18.0×10^9	19.0×10^8	15.0×10^8	15.0×10^8
4	15.0×10^9	11.0×10^9	13.0×10^9	20.0×10^8	17.0×10^8	17.0×10^8
6	13.0×10^9	14.0×10^9	12.0×10^9	21.0×10^8	18.0×10^8	18.0×10^8
8	12.0×10^9	18.0×10^9	9.0×10^9	22.0×10^8	18.0×10^8	19.0×10^8
10	6.0×10^9	7.0×10^9	6.0×10^9	24.0×10^8	19.0×10^8	20.0×10^8
เวลา (วัน)	ฟินอลที่ความเข้มข้น 10,000 มิลลิกรัมต่อลิตร					
	จำนวนแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อ (CFU ต่อมิลลิลิตร)					
	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	ซ้ำที่ 4	ซ้ำที่ 5	ซ้ำที่ 6
0	6.0×10^8	28.0×10^8	11.0×10^8	20.0×10^8	18.0×10^8	15.0×10^8
2	3.0×10^9	6.0×10^8	11.0×10^8	18.0×10^8	15.0×10^8	9.0×10^8
4	15.0×10^8	11.0×10^8	13.0×10^8	18.0×10^8	17.0×10^8	15.0×10^8
6	13.0×10^8	14.0×10^8	12.0×10^8	18.0×10^8	17.0×10^8	17.0×10^8
8	6.0×10^7	13.0×10^{11}	6.0×10^8	20.0×10^8	18.0×10^8	17.0×10^8
10	12.0×10^8	18.0×10^8	9.0×10^8	19.0×10^8	20.0×10^8	18.0×10^8

เวลา (วัน)	ฟินอลที่ความเข้มข้น 20,000 มิลลิกรัมต่อลิตร					
	จำนวนแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อ (CFU ต่อมิลลิลิตร)					
	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	ซ้ำที่ 4	ซ้ำที่ 5	ซ้ำที่ 6
0	1.0×10^8	9.0×10^8	9.0×10^8	20.0×10^8	18.0×10^8	15.0×10^8
2	0	0	0	0	0	0
4	0	0	0	0	0	0
6	0	0	0	0	0	0
8	0	0	0	0	0	0
10	0	0	0	0	0	0

ตารางที่ ๑.2 จำนวนแบคทีเรียที่ถูกตรึงบนซิลิกา KAa

เวลา (วัน)	จำนวนแบคทีเรียบนซิลิกา (CFU ต่อกรัมซิลิกา)		
	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3
0	8.0×10^5	6.0×10^5	8.0×10^5
2	10.0×10^5	6.0×10^5	8.0×10^5
4	28.0×10^5	24.0×10^5	6.0×10^6
6	40.0×10^5	24.0×10^5	6.0×10^6
8	20.0×10^5	24.0×10^5	20.0×10^5
10	8.0×10^6	8.0×10^6	6.0×10^6

ตารางที่ ๑.3 จำนวนแบคทีเรียที่ถูกตรึงบนซิลิกา KAac

เวลา (วัน)	จำนวนแบคทีเรียบนซิลิกา (CFU ต่อกรัมซิลิกา)		
	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3
0	6.0×10^5	8.0×10^5	6.0×10^5
2	10.0×10^5	8.0×10^5	12.0×10^5
4	2.8×10^6	6.0×10^6	2.6×10^6
6	12.0×10^6	8.0×10^6	2.8×10^6
8	2.0×10^6	12.0×10^6	2.4×10^6
10	2.4×10^6	10.0×10^6	8.0×10^6

ตารางที่ ๑.4 จำนวนแบคทีเรียที่ถูกตรึงบนซิลิกา KAb

เวลา (วัน)	จำนวนแบคทีเรียบนซิลิกา (CFU ต่อกรัมซิลิกา)		
	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3
0	8.0×10^6	6.0×10^6	28.0×10^5
2	14.0×10^6	3.4×10^6	2.4×10^6
4	10.0×10^7	2.8×10^7	2.8×10^7
6	2.8×10^7	8.0×10^7	6.0×10^7
8	14.0×10^7	12.0×10^7	2.0×10^7
10	10.0×10^7	10.0×10^7	2.4×10^7

ตารางที่ ๑.5 จำนวนแบคทีเรียที่ถูกตรึงบนซิลิกา KAbb

เวลา (วัน)	จำนวนแบคทีเรียบนซิลิกา (CFU ต่อกรัมซิลิกา)		
	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3
0	4.0×10^6	5.2×10^6	4.0×10^6
2	5.2×10^6	6.4×10^6	5.2×10^6
4	15.2×10^6	12.0×10^6	8.8×10^6
6	16.0×10^6	16.0×10^6	11.6×10^6
8	21.2×10^6	24.0×10^6	20.0×10^6
10	21.2×10^6	22.0×10^6	21.2×10^6

ตารางที่ ๑.6 จำนวนแบคทีเรียที่ถูกตรึงในซิลิกา KBaE

เวลา (วัน)	จำนวนแบคทีเรียในซิลิกา (CFU ต่อกรัมซิลิกา)		
	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3
0	24.0×10^5	5.2×10^6	4.0×10^6
2	4.0×10^6	5.2×10^6	4.0×10^6
4	12.0×10^6	6.4×10^6	9.2×10^6
6	12.0×10^6	10.4×10^6	11.2×10^6
8	16.0×10^6	11.2×10^6	15.2×10^6
10	17.2×10^6	12.0×10^6	14.0×10^6

ตารางที่ ๑.7 จำนวนแบคทีเรียที่ถูกตรึงในซาลิคา EntA

เวลา (วัน)	จำนวนแบคทีเรียในซาลิคา (CFU ต่อกรัมซาลิคา)		
	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3
0	14.0×10^6	8.0×10^6	6.0×10^6
2	15.2×10^6	12.0×10^6	8.8×10^6
4	6.0×10^7	10.0×10^7	2.8×10^7
6	12.0×10^7	6.0×10^7	8.0×10^7
8	16.0×10^7	14.0×10^7	12.0×10^7
10	12.0×10^7	6.0×10^7	10.0×10^7

ตารางที่ ๑.8 จำนวนแบคทีเรียระหว่างการย่อยสลายฟีนอลของเซลล์ตรึงบนซาลิคา KAb ที่ความเข้มข้น 625-10,000 มิลลิกรัมต่อลิตร

เวลา (วัน)	ฟีนอลที่ความเข้มข้น 625 มิลลิกรัมต่อลิตร					
	ซ้ำที่ 1		ซ้ำที่ 2		ซ้ำที่ 3	
	จำนวนแบคทีเรียบนซาลิคา (CFU/กรัม)	จำนวนแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อ (CFU/มล.)	จำนวนแบคทีเรียบนซาลิคา (CFU/กรัม)	จำนวนแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อ (CFU/มล.)	จำนวนแบคทีเรียบนซาลิคา (CFU/กรัม)	จำนวนแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อ (CFU/มล.)
0	3.0×10^6	-	5.0×10^6	-	2.3×10^6	-
2	8.6×10^6	1.0×10^2	10.0×10^6	2.3×10^3	11.0×10^6	2.6×10^3
4	14.0×10^6	1.3×10^3	13.0×10^6	2.0×10^3	14.0×10^6	2.0×10^3
6	18.0×10^6	1.6×10^2	20.0×10^6	1.0×10^2	17.0×10^6	1.0×10^2
8	24.0×10^6	2.6×10^4	23.0×10^6	2.3×10^4	25.0×10^6	2.0×10^2
10	4.0×10^7	1.0×10^4	3.3×10^7	1.0×10^3	2.6×10^7	1.0×10^4

เวลา (วัน)	ฟินอลที่ความเข้มข้น 1,250 มิลลิกรัมต่อลิตร					
	ซ้ำที่ 1		ซ้ำที่ 2		ซ้ำที่ 3	
	จำนวน แบคทีเรีย บนชิลิกา (CFU/กรัม)	จำนวน แบคทีเรีย ในอาหาร เลี้ยงเชื้อ (CFU/มล.)	จำนวน แบคทีเรีย บนชิลิกา (CFU/กรัม)	จำนวน แบคทีเรียใน อาหารเลี้ยง เชื้อ (CFU/มล.)	จำนวน แบคทีเรีย บนชิลิกา (CFU/กรัม)	จำนวน แบคทีเรียใน อาหารเลี้ยง เชื้อ (CFU/มล.)
0	3.0×10^6	-	1.6×10^6	-	2.3×10^6	-
2	1.0×10^6	0.2×10^3	10.0×10^6	2.0×10^3	13.0×10^6	1.3×10^2
4	5.3×10^6	1.0×10^2	6.3×10^6	1.7×10^2	9.0×10^6	2.0×10^3
6	8.0×10^6	1.6×10^3	10.0×10^6	2.3×10^3	12.0×10^6	1.6×10^3
8	13.0×10^6	2.3×10^3	13.4×10^6	1.6×10^3	13.0×10^3	3.0×10^2
10	8.3×10^6	2.0×10^4	20.4×10^4	2.2×10^4	20.0×10^4	4.3×10^4
เวลา (วัน)	ฟินอลที่ความเข้มข้น 2,500 มิลลิกรัมต่อลิตร					
	ซ้ำที่ 1		ซ้ำที่ 2		ซ้ำที่ 3	
	จำนวน แบคทีเรีย บนชิลิกา (CFU/กรัม)	จำนวน แบคทีเรีย ในอาหาร เลี้ยงเชื้อ (CFU/มล.)	จำนวน แบคทีเรีย บนชิลิกา (CFU/กรัม)	จำนวน แบคทีเรียใน อาหารเลี้ยง เชื้อ (CFU/มล.)	จำนวน แบคทีเรีย บนชิลิกา (CFU/กรัม)	จำนวน แบคทีเรียใน อาหารเลี้ยง เชื้อ (CFU/มล.)
0	3.0×10^6	-	5.0×10^6	-	2.3×10^6	-
2	4.3×10^6	2.0×10^2	7.0×10^6	2.0×10^3	8.0×10^6	3.0×10^3
4	12.0×10^6	3.3×10^3	13.0×10^6	2.0×10^2	14.0×10^6	2.0×10^2
6	17.0×10^6	2.6×10^3	18.0×10^6	3.0×10^3	15.0×10^6	3.0×10^3
8	12.0×10^6	3.3×10^3	15.0×10^6	5.0×10^4	12.0×10^6	2.0×10^3
10	14.0×10^6	2.0×10^4	16.0×10^6	3.0×10^3	12.0×10^6	3.0×10^3

เวลา (วัน)	ฟินอลที่ความเข้มข้น 5,000 มิลลิกรัมต่อลิตร					
	ซ้ำที่ 1		ซ้ำที่ 2		ซ้ำที่ 3	
	จำนวน แบคทีเรีย บนชิลิกา (CFU/กรัม)	จำนวน แบคทีเรีย ในอาหาร เลี้ยงเชื้อ (CFU/มล.)	จำนวน แบคทีเรีย บนชิลิกา (CFU/กรัม)	จำนวน แบคทีเรียใน อาหารเลี้ยง เชื้อ (CFU/มล.)	จำนวน แบคทีเรีย บนชิลิกา (CFU/กรัม)	จำนวน แบคทีเรียใน อาหารเลี้ยง เชื้อ (CFU/มล.)
0	3.0×10^6	-	2.6×10^6	-	2.8×10^6	-
2	6.0×10^6	2.0×10^3	3.0×10^6	2.0×10^2	7.0×10^6	2.0×10^3
4	7.0×10^6	3.0×10^3	5.0×10^6	3.0×10^3	10.0×10^6	1.0×10^4
6	10.0×10^6	2.0×10^2	9.0×10^6	2.0×10^3	11.0×10^6	3.0×10^2
8	15.0×10^6	3.0×10^2	14.0×10^6	2.0×10^3	20.0×10^6	4.0×10^4
10	20.0×10^6	4.0×10^4	14.0×10^6	3.0×10^3	24.0×10^6	3.0×10^3
เวลา (วัน)	ฟินอลที่ความเข้มข้น 10,000 มิลลิกรัมต่อลิตร					
	ซ้ำที่ 1		ซ้ำที่ 2		ซ้ำที่ 3	
	จำนวน แบคทีเรีย บนชิลิกา (CFU/กรัม)	จำนวน แบคทีเรีย ในอาหาร เลี้ยงเชื้อ (CFU/มล.)	จำนวน แบคทีเรีย บนชิลิกา (CFU/กรัม)	จำนวน แบคทีเรียใน อาหารเลี้ยง เชื้อ (CFU/มล.)	จำนวน แบคทีเรีย บนชิลิกา (CFU/กรัม)	จำนวน แบคทีเรียใน อาหารเลี้ยง เชื้อ (CFU/มล.)
0	3.0×10^6	-	5.0×10^6	-	2.3×10^6	-
2	2.0×10^6	1.0×10^2	1.6×10^6	1.0×10^3	1.7×10^6	1.1×10^3
4	3.0×10^6	1.0×10^3	1.8×10^6	1.0×10^3	2.5×10^6	1.3×10^2
6	3.0×10^6	1.3×10^3	2.0×10^6	1.0×10^2	2.3×10^6	1.2×10^2
8	4.0×10^6	1.3×10^2	4.0×10^6	2.0×10^3	3.0×10^6	2.0×10^2
10	3.0×10^6	2.3×10^3	3.5×10^6	2.0×10^3	4.0×10^6	1.3×10^3

ตารางที่ ๑.9 จำนวนแบคทีเรียระหว่างการย่อยสลายฟีนอลของเซลล์ตรึงในซิลิกา EntA ที่ความเข้มข้น 625-10,000 มิลลิกรัมต่อลิตร

เวลา (วัน)	ฟีนอลที่ความเข้มข้น 625 มิลลิกรัมต่อลิตร					
	ซ้ำที่ 1		ซ้ำที่ 2		ซ้ำที่ 3	
	จำนวน แบคทีเรีย ในซิลิกา (CFU/กรัม)	จำนวน แบคทีเรีย ในอาหาร เลี้ยงเชื้อ (CFU/มล.)	จำนวน แบคทีเรีย ในซิลิกา (CFU/กรัม)	จำนวน แบคทีเรียใน อาหารเลี้ยง เชื้อ (CFU/มล.)	จำนวน แบคทีเรีย ในซิลิกา (CFU/กรัม)	จำนวน แบคทีเรียใน อาหารเลี้ยง เชื้อ (CFU/มล.)
0	6.0×10^6	-	5.0×10^6	-	4.0×10^6	-
2	5.0×10^7	1.4×10^2	6.0×10^7	1.6×10^2	5.0×10^7	1.5×10^2
4	6.0×10^7	1.0×10^3	4.0×10^7	1.2×10^2	4.0×10^7	1.0×10^2
6	7.0×10^7	2.0×10^3	6.0×10^7	1.3×10^3	4.0×10^7	1.6×10^2
8	4.0×10^7	1.6×10^2	6.0×10^7	2.0×10^3	7.0×10^7	1.7×10^2
10	7.0×10^7	2.3×10^3	8.0×10^7	1.0×10^2	8.0×10^7	1.5×10^3
เวลา (วัน)	ฟีนอลที่ความเข้มข้น 1,250 มิลลิกรัมต่อลิตร					
	ซ้ำที่ 1		ซ้ำที่ 2		ซ้ำที่ 3	
	จำนวน แบคทีเรีย ในซิลิกา (CFU/กรัม)	จำนวน แบคทีเรีย ในอาหาร เลี้ยงเชื้อ (CFU/มล.)	จำนวน แบคทีเรีย ในซิลิกา (CFU/กรัม)	จำนวน แบคทีเรียใน อาหารเลี้ยง เชื้อ (CFU/มล.)	จำนวน แบคทีเรีย ในซิลิกา (CFU/กรัม)	จำนวน แบคทีเรียใน อาหารเลี้ยง เชื้อ (CFU/มล.)
0	6.0×10^6	-	6.0×10^6	-	5.0×10^6	-
2	6.0×10^6	1.0×10^2	4.0×10^6	1.2×10^2	5.0×10^6	1.0×10^2
4	4.0×10^7	1.1×10^2	6.0×10^7	1.2×10^2	4.0×10^7	1.0×10^3
6	6.0×10^7	1.7×10^3	5.0×10^7	1.0×10^2	5.0×10^7	1.4×10^2
8	5.0×10^7	1.5×10^3	6.0×10^7	1.5×10^3	5.0×10^7	1.3×10^2
10	6.0×10^7	1.3×10^3	7.0×10^7	1.0×10^3	6.0×10^7	1.0×10^3

เวลา (วัน)	ฟินอลที่ความเข้มข้น 2,500 มิลลิกรัมต่อลิตร					
	ซ้ำที่ 1		ซ้ำที่ 2		ซ้ำที่ 3	
	จำนวน แบคทีเรีย ในซาลิกา (CFU/กรัม)	จำนวน แบคทีเรีย ในอาหาร เลี้ยงเชื้อ (CFU/มล.)	จำนวน แบคทีเรีย ในซาลิกา (CFU/กรัม)	จำนวน แบคทีเรียใน อาหารเลี้ยง เชื้อ (CFU/มล.)	จำนวน แบคทีเรีย ในซาลิกา (CFU/กรัม)	จำนวน แบคทีเรียใน อาหารเลี้ยง เชื้อ (CFU/มล.)
0	3.0×10^6	-	6.0×10^6	-	5.0×10^6	-
2	4.0×10^6	1.4×10^2	7×10^6	1.4×10^2	9.0×10^6	2.0×10^2
4	7.0×10^6	2.0×10^2	10.0×10^6	2.3×10^2	10.0×10^6	3.6×10^2
6	12.0×10^6	2.5×10^2	13×10^6	1.5×10^2	15×10^6	1.5×10^2
8	19.0×10^6	1.6×10^3	18×10^6	1.8×10^2	16×10^6	2.0×10^2
10	24.0×10^6	2.3×10^2	22×10^6	3.3×10^2	24×10^6	3.0×10^2
เวลา (วัน)	ฟินอลที่ความเข้มข้น 5,000 มิลลิกรัมต่อลิตร					
	ซ้ำที่ 1		ซ้ำที่ 2		ซ้ำที่ 3	
	จำนวน แบคทีเรีย ในซาลิกา (CFU/กรัม)	จำนวน แบคทีเรีย ในอาหาร เลี้ยงเชื้อ (CFU/มล.)	จำนวน แบคทีเรีย ในซาลิกา (CFU/กรัม)	จำนวน แบคทีเรียใน อาหารเลี้ยง เชื้อ (CFU/มล.)	จำนวน แบคทีเรีย ในซาลิกา (CFU/กรัม)	จำนวน แบคทีเรียใน อาหารเลี้ยง เชื้อ (CFU/มล.)
0	5.0×10^6	-	5.3×10^6	-	4.0×10^6	-
2	6.0×10^6	1.3×10^2	4.0×10^6	1.6×10^2	3.0×10^6	1.3×10^2
4	6.0×10^6	1.6×10^3	5.0×10^6	3.0×10^2	5.0×10^6	1.0×10^2
6	9.0×10^6	2.0×10^2	8.0×10^6	2.0×10^2	11.0×10^6	3.3×10^2
8	13.0×10^6	2.3×10^3	14.0×10^6	6.0×10^2	11.0×10^6	3.0×10^2
10	10.0×10^6	5.3×10^3	17.0×10^6	5.6×10^2	19.0×10^6	5.3×10^2

เวลา (วัน)	ฟินอลที่ความเข้มข้น 10,000 มิลลิกรัมต่อลิตร					
	ซ้ำที่ 1		ซ้ำที่ 2		ซ้ำที่ 3	
	จำนวน แบคทีเรีย ในซีลิกา (CFU/กรัม)	จำนวน แบคทีเรีย ในอาหาร เลี้ยงเชื้อ (CFU/มล.)	จำนวน แบคทีเรียใน ซีลิกา (CFU/กรัม)	จำนวน แบคทีเรีย ในอาหาร เลี้ยงเชื้อ (CFU/มล.)	จำนวน แบคทีเรีย ในซีลิกา (CFU/กรัม)	จำนวน แบคทีเรียใน อาหารเลี้ยง เชื้อ (CFU/มล.)
0	10.0×10^5	-	13.0×10^5	-	10.0×10^5	-
2	8.0×10^5	2.0×10^3	12×10^5	1.0×10^2	8.0×10^5	2.0×10^2
4	2.0×10^6	1.0×10^2	1.3×10^6	3.0×10^2	2.0×10^6	3.0×10^2
6	2.3×10^6	1.3×10^2	1.9×10^6	4.0×10^2	2.6×10^6	4.0×10^2
8	3.0×10^6	1.3×10^3	2.2×10^6	1.1×10^2	2.7×10^6	1.0×10^2
10	3.2×10^6	1.1×10^2	2.4×10^6	0.6×10^2	2.3×10^6	1.0×10^3

ตารางที่ จ.10 จำนวนแบคทีเรียระหว่างการทดลองของซีลิกา KAb เมื่อใช้ในการย่อยสลายฟินอลอย่างต่อเนื่อง

เวลา (วัน)	ฟินอลที่ความเข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อลิตร					
	ซ้ำที่ 1		ซ้ำที่ 2		ซ้ำที่ 3	
	จำนวน แบคทีเรีย บนซีลิกา (CFU/กรัม)	จำนวน แบคทีเรีย ในอาหาร เลี้ยงเชื้อ (CFU/มล.)	จำนวน แบคทีเรีย บนซีลิกา (CFU/กรัม)	จำนวน แบคทีเรียใน อาหารเลี้ยง เชื้อ (CFU/มล.)	จำนวน แบคทีเรีย บนซีลิกา (CFU/กรัม)	จำนวน แบคทีเรียใน อาหารเลี้ยง เชื้อ (CFU/มล.)
0	3.0×10^6	-	4.0×10^6	-	5.0×10^6	-
1	5.0×10^6	1.1×10^2	5.0×10^6	1.3×10^2	5.0×10^6	1.0×10^2
2	6.0×10^6	1.3×10^2	6.0×10^6	2.0×10^2	8.0×10^6	2.0×10^2
2	4.0×10^6	1.3×10^2	3.0×10^6	1.0×10^2	4.0×10^6	1.6×10^2
3	3.0×10^7	1.0×10^2	3.0×10^7	1.7×10^3	2.0×10^7	1.6×10^2
3	2.0×10^7	1.5×10^3	3.0×10^7	1.2×10^3	2.0×10^7	1.0×10^2
4	4.0×10^7	1.4×10^3	3.0×10^7	1.0×10^3	2.6×10^7	1.0×10^2
4	2.0×10^7	1.0×10^3	2.0×10^7	1.0×10^3	2.0×10^7	1.3×10^2
5	2.0×10^7	1.0×10^4	3.0×10^7	1.5×10^3	2.2×10^7	1.4×10^2

ตารางที่ จ.11 จำนวนแบคทีเรียระหว่างการทดลองของซิดิกา EntA เมื่อใช้ในการย่อยสลายพื
นอลอย่างต่อเนื่อง

เวลา (วัน)	พินอลที่ความเข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อลิตร					
	ซ้ำที่ 1		ซ้ำที่ 2		ซ้ำที่ 3	
	จำนวน แบคทีเรีย ในซิดิกา (CFU/กรัม)	จำนวน แบคทีเรีย ในอาหาร เลี้ยงเชื้อ (CFU/มล.)	จำนวน แบคทีเรีย ในซิดิกา (CFU/กรัม)	จำนวน แบคทีเรียใน อาหารเลี้ยง เชื้อ (CFU/มล.)	จำนวน แบคทีเรีย ในซิดิกา (CFU/กรัม)	จำนวน แบคทีเรียใน อาหารเลี้ยง เชื้อ (CFU/มล.)
0	5.3×10^6	-	6.0×10^6	-	5.0×10^6	-
1	2.0×10^7	1.0×10^2	3.0×10^7	1.0×10^2	2.6×10^7	1.6×10^2
2	7.0×10^7	1.0×10^2	6.0×10^7	1.3×10^2	7.3×10^7	1.0×10^2
2	6.0×10^7	1.0×10^2	4.0×10^7	1.0×10^2	4.0×10^7	1.6×10^2
3	7.0×10^7	1.3×10^2	7.0×10^7	1.3×10^2	7.0×10^7	2.0×10^2
3	7.0×10^7	1.3×10^2	6.0×10^7	2.0×10^2	7.0×10^7	1.7×10^2
4	7.3×10^7	1.0×10^2	7.0×10^7	1.0×10^2	7.7×10^7	1.0×10^3
4	7.0×10^7	1.0×10^2	6.0×10^7	1.3×10^2	7.3×10^7	1.0×10^3
5	7.3×10^7	1.0×10^2	7.0×10^7	1.3×10^3	8.0×10^7	1.0×10^3

ตารางที่ จ.12 จำนวนแบคทีเรีย ณ วันที่ 0 และ 55 ของเซลล์ตรึงบนซิดิกา KAb

เวลา (วัน)	พินอลที่ความเข้มข้น 5,000 มิลลิกรัมต่อลิตร					
	ซ้ำที่ 1		ซ้ำที่ 2		ซ้ำที่ 3	
	จำนวน แบคทีเรีย บนซิดิกา (CFU/กรัม)	จำนวน แบคทีเรีย ในอาหาร เลี้ยงเชื้อ (CFU/มล.)	จำนวน แบคทีเรีย บนซิดิกา (CFU/กรัม)	จำนวน แบคทีเรียใน อาหารเลี้ยง เชื้อ (CFU/มล.)	จำนวน แบคทีเรีย บนซิดิกา (CFU/กรัม)	จำนวน แบคทีเรียใน อาหารเลี้ยง เชื้อ (CFU/มล.)
0	3.0×10^6	-	5.0×10^6	-	4.0×10^6	-
55	4.0×10^6	1.7×10^3	6.0×10^6	1.6×10^3	5.0×10^6	1.1×10^4

ตารางที่ จ.13 จำนวนแบคทีเรีย ณ วันที่ 0 และ 55 ของเซลล์ตรึงในซิลิกา EntA

เวลา (วัน)	พินอลที่ความเข้มข้น 5,000 มิลลิกรัมต่อลิตร					
	ซ้ำที่ 1		ซ้ำที่ 2		ซ้ำที่ 3	
	จำนวน แบคทีเรีย ในซิลิกา (CFU/กรัม)	จำนวน แบคทีเรีย ในอาหาร เลี้ยงเชื้อ (CFU/มล.)	จำนวน แบคทีเรีย ในซิลิกา (CFU/กรัม)	จำนวน แบคทีเรียใน อาหารเลี้ยง เชื้อ (CFU/มล.)	จำนวน แบคทีเรีย ในซิลิกา (CFU/กรัม)	จำนวน แบคทีเรียใน อาหารเลี้ยง เชื้อ (CFU/มล.)
0	7.0×10^6	-	8.0×10^6	-	6.0×10^6	-
55	10.0×10^6	1.4×10^2	10.0×10^6	1.0×10^2	9.0×10^6	1.2×10^3



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก จ

อัตราการย่อยสลายฟีนอล

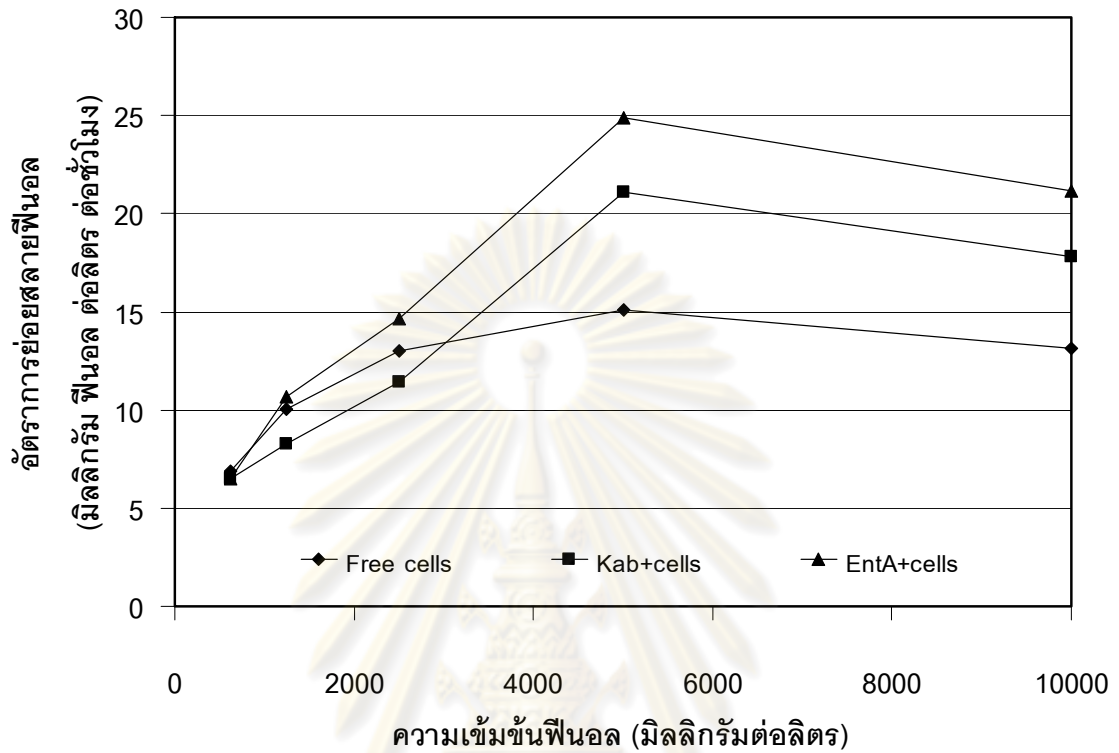
อัตราการย่อยสลายฟีนอลของแบคทีเรีย ศึกษาประสิทธิภาพการย่อยสลายฟีนอลของเซลล์อิสระ เซลล์ตรึงบนซิลิกา KAb และเซลล์ตรึงในซิลิกา EntA โดยเลี้ยงแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีความเข้มข้นของฟีนอลเป็น 625, 1,250, 2,500, 5,000 และ 10,000 มิลลิกรัมต่อลิตร แล้วนำผลที่ได้มาคำนวณหาอัตราการย่อยสลายเปรียบเทียบกับเวลา แสดงดังตารางที่ จ.1

ตารางที่ จ.1 อัตราการย่อยสลายฟีนอลที่ความเข้มข้น 625-10,000 มิลลิกรัมต่อลิตร

ความเข้มข้นฟีนอล (มิลลิกรัมต่อลิตร)	เซลล์อิสระ (มิลลิกรัม ฟีนอล ต่อ ลิตร ต่อชั่วโมง)	เซลล์ตรึงบนซิลิกา KAb (มิลลิกรัม ฟีนอล ต่อ ลิตร ต่อชั่วโมง)	เซลล์ตรึงในซิลิกา EntA (มิลลิกรัม ฟีนอล ต่อ ลิตร ต่อชั่วโมง)
625	6.884	6.510	6.510
1,250	10.07	8.250	10.66
2,500	12.99	11.43	14.65
5,000	15.09	21.08	24.91
10,000	18.44	17.83	21.16

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ ๑.1 กราฟอัตราการย่อยสลายฟีนอลที่ความเข้มข้นต่างๆ ที่ลดลงต่อเวลาของเซลล์อิสระ เซลล์ตรึงบนซิลิกา KAb และเซลล์ตรึงในซิลิกา EntA



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวปิยะมาศ คงแถม เกิดเมื่อวันที่ 17 ธันวาคม พ.ศ.2527 ที่จังหวัดชัยนาท สำเร็จการศึกษาปริญญาตรีวิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาจุลชีววิทยา ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร ในปีการศึกษา 2549 และเข้ารับการศึกษต่อในระดับปริญญาโท สาขาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2550



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย