ผลของสารลดแรงตึงผิวต่อการย่อยสลายทางชีวภาพของพอลิไซคลิกแอโรแมติกไฮโดรคาร์บอนในดิน

นางสาวรุจา สารคุณ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2548

ISBN 974-14-2876-6

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

EFFECT OF SURFACTANTS ON BIODEGRADATION OF POLYCYCLIC AROMATIC HYDROCARBONS IN SOIL

Miss Rutjar Sarakhun

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Sciences Program in Industrial Microbiology

Department of Microbiology

Faculty of Science

Chulalongkorn University

Academic Year 2005

ISBN 974-14-2876-6

หัวข้อวิทยานิพนธ์	ผลของสารลดแรงตึงผิวต่อการย่อยสลายทางชีวภาพของพอลิไซคลิกแอโรแมติกไฮโดรคาร์บอนในดิน
โดย	นางสาวรุจา สารคุณ
สาขาวิชา	จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุเทพ ธนียวัน

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

.... คณบดีคณะวิทยาศาสตร์

(ศาสตราจารย์ ดร.เปี่ยมศักดิ์ เมนะเศวต)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.... ประธานกรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร.ไพเราะ ปิ่นพานิชการ)

.... อาจารย์ที่ปรึกษา

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุเทพ ธนียวัน)

.... กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร.กาญจณา จันทองจีน)

.... กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.กอบชัย ภัทรกุลวณิชย์)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รุจา สารคุณ : ผลของสารลดแรงตึงผิวต่อการย่อยสลายทางชีวภาพของพอลิไซคลิกแอโรแมติกไฮโดรคาร์บอนในดิน (EFFECT OF SURFACTANTS ON BIODEGRADATION OF POLYCYCLIC AROMATIC HYDROCARBONS IN SOIL) อ. ที่ปรึกษา : ผศ. ดร. สุเทพ ธนียวัน, 109 หน้า. ISBN 974-14-2876-6.

งานวิจัยนี้ศึกษาผลของสารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์ (Brij 35 และ SDS) สารลดแรงตึงผิวชีวภาพ (แรมโนลิปิดที่ผลิตโดย *Pseudomonas aeruginosa* สายพันธุ์ A41 และเซอร์แฟคติน ที่ผลิตโดย *Bacillus subtilis* สายพันธุ์ BBK1) และแบคทีเรียที่สามารถสร้างสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ (*P. aeruginosa* สายพันธุ์ A41 และ *B. subtilis* สายพันธุ์ BBK1) ต่อการย่อยสลายฟลูออรีน ฟีแนนทรีน และไพรีน โดยกลุ่มแบคทีเรีย STK ในระบบสเลอรีที่มีอัตราส่วนดินต่อน้ำ 1:8 (กรัม/มล.) พบว่าการเติม Brij 35 ที่มีความเข้มข้น 15 เท่า ของค่า Apparent Critical Micelle Concentration (ACMC) ซึ่งค่า ACMC นี้เป็นความเข้มข้นที่น้อยที่สุดที่ก่อให้เกิดไมเซลล์ในสารละลายดิน โดยเติมร่วมกับกลุ่มแบคทีเรีย STK พบว่าสามารถเพิ่มการย่อยสลายฟลูออรีนได้ดีกว่าการไม่เติมสารนี้ และมีประสิทธิภาพมากกว่าการเติม SDS แรมโนลิปิด เซอร์แฟคติน *P. aeruginosa* สายพันธุ์ A41 และ *B. subtilis* สายพันธุ์ BBK1 ทั้งนี้ความสามารถในการย่อยสลายดังกล่าวสอดคล้องกับการเจริญของกลุ่มแบคทีเรีย STK นอกจากนี้ยังพบว่าการเติม SDS แรมโนลิปิด เซอร์แฟคติน *P. aeruginosa* สายพันธุ์ A41 และ *B. subtilis* สายพันธุ์ BBK1 ไม่ส่งเสริมการย่อยสลายฟีแนนทรีน และไพรีนอีกด้วย ในแง่ของความสามารถในการชะ PAHs ออกจากดิน พบว่าสารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์ Brij 35 และ SDS สามารถชะฟลูออรีน ฟีแนนทรีน และไพรีนออกจากดินสู่วัฏภาคน้ำได้มากกว่าสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ สำหรับการเติม *P. aeruginosa* สายพันธุ์ A41 และ *B. subtilis* สายพันธุ์ BBK1 ลงในระบบ พบว่าสามารถสร้างสารลดแรงตึงผิวได้เล็กน้อยระหว่างการทดลอง โดยทำให้มีค่าแรงตึงผิวของสารละลายดินลดลงจาก 60 มิลลินิวตันต่อเมตร เป็น 47 และ 45 มิลลินิวตันต่อเมตร ตามลำดับ ทำให้มีการชะฟลูออรีน ฟีแนนทรีน และไพรีนออกจากดินสู่วัฏภาคน้ำได้

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาควิชา จุลชีววิทยา ลายมือชื่อนิสิต ....
สาขาวิชา จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา ....
ปีการศึกษา 2548

4572454723 : MAJOR INDUSTRIAL MICROBIOLOGY

KEYWORD: ACMC/ BIODEGRADATION/ BIOSURFACTANT /FLUORENE/ PHENANTHRENE/ PYRENE/ SLURRY

RUTJAR SARAKHUN : EFFECT OF SURFACTANTS ON BIODEGRADATION OF POLYCYCLIC AROMATIC HYDROCARBONS IN SOIL. THESIS ADVISOR: ASST.PROF.SUTHEP THANIYAVARN, Ph.D. 109 pp. ISBN 974-14-2876-6.

The present study was conducted to pursue the effects of synthetic surfactants (Brij 35 and sodium dodecyl sulfate or SDS), biosurfactants (rhamnolipid from *Pseudomonas aeruginosa* strain A41 and surfactin from *Bacillus subtilis* strain BBK1) on fluorene phenanthrene and pyrene degradation by STK consortium in soil slurry (ratio of soil 1 g: water 8 ml.). Brij 35 was employed at concentration 15 times of apparent critical micelle concentration or ACMC value (critical micelle concentration of soil suspension) along with STK consortium. The results indicated that Brij 35 could enhance biodegradation of fluorene better than SDS, rhamnolipid, surfactin, *P. aeruginosa* strain A41 and *B. subtilis* strain BBK1, all of which did not promote on phenanthrene and pyrene degradation. Moreover, SDS and Brij 35 could solubilized PAHs from soil to aqueous phase better than biosurfactants in which surface tension in soil slurry was reduced from 60 to 47 in case of *P. aeruginosa* strain A41 and 60 to 45 in case of *B. subtilis* strain BBK1. The results indicated that biosurfactant-producers were able to release biosurfactants into aqueous phase according to solubilized PAHs from soil to aqueous phase.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Department ....Microbiology........ Student's signature....S. Rutjar.....

Field of study Industrial Microbiology Advisor's signature.....Suthep Thaniyavarn.....

Academic year........2005

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงด้วยความกรุณาอย่างยิ่งของ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุเทพ ธนียวัน อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่ได้ให้วิชาการความรู้ คำแนะนำและข้อคิดเห็นต่างๆ ตลอดจนตรวจแก้ไขต้นฉบับวิทยานิพนธ์ ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้

ขอกราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร.ไพเราะ ปิ่นพานิชการ ที่กรุณารับเป็นประธานกรรมการในการสอบ ขอกราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร. กาญจณา จันทองจีน และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.กอบชัย ภัทรกุลวณิชย์ ที่กรุณารับเป็นกรรมการในการสอบ ตลอดจนให้ความรู้คำแนะนำต่างๆ และช่วยกรุณาตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้มีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. กาญจณา จันทองจีน เป็นอย่างสูง และขอขอบคุณ คุณทิมากร แสงดำ ที่ให้ความอนุเคราะห์กลุ่มแบคทีเรีย STK สำหรับงานวิจัยนี้

ขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ จิราภรณ์ ธนียวัน เป็นอย่างสูง ที่ให้ความอนุเคราะห์ *P. aeruginosa* สายพันธุ์ A41 และ *B. subtilis* สายพันธุ์ BBK1 สำหรับงานวิจัยนี้

ขอกราบขอบพระคุณคณาจารย์ทุกท่านในภาควิชาจุลชีววิทยาฯ กรุณาให้ความรู้ และคำแนะนำต่างๆ แก่ผู้วิจัยในการดำเนินการวิจัย จนสำเร็จลุล่วงด้วยดี

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ในภาควิชาจุลชีววิทยาทุกท่าน ตลอดจนพี่ๆ เพื่อนๆ และน้องๆ ทุกคนที่มีส่วนช่วยเหลือและให้กำลังใจตลอดมา

ขอกราบขอบพระคุณ ทุนโนวาติส เฉลิมพระเกียรติ 72 พรรษา ที่ให้การสนับสนุนเงินทุนการศึกษา

ขอกราบขอบพระคุณ คุณแก้วขวัญ วัชโรทัย ผู้อำนวยการโครงการส่วนพระองค์ สวนจิตรลดา คุณรสริน สมิตะพินทุ รองผู้อำนวยการโครงการส่วนพระองค์ สวนจิตรลดาที่กรุณาสนับสนุนให้ผู้วิจัยได้มีโอกาสเข้ารับการศึกษาที่สูงขึ้น

สุดท้ายขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดา และพันโท ณัฐพงศ์ ภูริปรีชา ที่ให้การสนับสนุนและความช่วยเหลือตลอดจนกำลังใจแก่ผู้วิจัยเสมอมา

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย... ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ... จ

กิตติกรรมประกาศ .... ฉ

สารบัญ .... ช

สารบัญตาราง .... ญ

สารบัญรูป .... ฏ

สัญลักษณ์ และคำย่อ .... ฒ

บทที่ 1 บทนำ 1

1.1 ความสำคัญของปัญหา.. 1

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย... 4

1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.. 4

บทที่ 2 ปริทัศน์วรรณกรรม... 5

บทที่ 3 อุปกรณ์ เคมีภัณฑ์ และวิธีดำเนินการวิจัย... 32

3.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย.. 32

3.2 เคมีภัณฑ์.. 33

3.3 จุลินทรีย์... 34

3.4 วิธีดำเนินการวิจัย.. 35

3.4.1 การเตรียมดิน ศึกษาลักษณะทางกายภาพและองค์ประกอบทางเคมีของดิน........ 35

3.4.2 การผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ.. 35

3.4.2.1 การผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพแรมโนลิปิด.. 35

3.4.2.2 การผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพเซอร์แฟคติน.. 36

3.4.3 การทดสอบประสิทธิภาพของสารลดแรงตึงผิว.. 37

3.4.3.1 การหาจุดวิกฤตของการเกิดไมเซลล์.. 37

3.4.3.2 การหาจุดวิกฤตของการเกิดไมเซลล์ในสารละลายดิน................................ 37

3.4.4 ทดสอบการชะ PAHs ออกจากดินเมื่อมีการเติมสารลดแรงตึงผิวที่มีความเข้มข้นต่างๆ........ 37

บทที่ **หน้า**

3.4.5 ศึกษาผลของสารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์ต่อกลุ่มแบคทีเรีย STK 38
3.4.6 ศึกษาผลการเติมสารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์ที่คัดเลือกได้ต่อความสามารถในการย่อยสลาย PAHs ในระบบสเลอรีโดยกลุ่มแบคทีเรีย STK อัตราส่วนดินต่อน้ำเท่ากับ 1:8 (กรัม/มล.)…………………………… 39
3.4.7 ศึกษาผลการเติมแบคทีเรียที่สร้างสารลดแรงตึงผิวต่อความสามารถในการย่อยสลายสาร PAHs โดยกลุ่มแบคทีเรีย STK และเปรียบเทียบกับการเติมสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในระบบสเลอรี อัตราส่วนดินต่อน้ำเท่ากับ 1:8 (กรัม/มล.)………………………………………………………….. 40
บทที่ 4 ผลการวิจัย…………………………………………………………………………….. 42
4.1 ผลการเตรียมดิน การศึกษาลักษณะทางกายภาพ และองค์ประกอบทางเคมีของดิน…………………………………………………………………………………… 42
4.2 ผลการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ……….. 43
4.2.1 ผลการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพแรมโนลิปิด...................................... 43
4.2.1 ผลการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพเซอร์แฟคติน…………………….......... 43
4.3 ผลการทดสอบประสิทธิภาพของสารลดแรงตึงผิว……………………………….. 44
4.3.1 ผลการหาจุดวิกฤตของการเกิดไมเซลล์...................................…........ 44
4.3.2 ผลการหาจุดวิกฤตของการเกิดไมเซลล์ในสารละลายดิน……................... 45
4.4 ผลทดสอบความสามารถในการชะ PAHs จากดินของสารลดแรงตึงผิวที่มีความเข้มข้นต่างๆ………………………………………………………………………… 45
4.5 ผลของสารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์ต่อกลุ่มแบคทีเรีย STK................................ 49
4.6 ผลการเติมสารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์ที่คัดเลือกได้ต่อความสามารถในการย่อยสลาย PAHs ในระบบสเลอรีโดยกลุ่มแบคทีเรีย STK อัตราส่วนดินต่อน้ำเท่ากับ 1:8 (กรัม/มล.)………….....................…………………......................... 51
4.7 ผลการเติมแบคทีเรียที่สร้างสารลดแรงตึงผิวต่อความสามารถในการย่อยสลายสาร PAHs โดยกลุ่มแบคทีเรีย STK และเปรียบเทียบกับการเติมสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในระบบสเลอรี อัตราส่วนดินต่อน้ำเท่ากับ 1:8 (กรัม/มล)…………..... 60
บทที่ 5 สรุปและอภิปรายผลการวิจัย ……………….................…………………........... 74
รายการอ้างอิง …………………….....………………………..............……............... 81

หน้า

ภาคผนวก 94
ภาคผนวก ก 95
ภาคผนวก ข 98
ภาคผนวก ค 99
ภาคผนวก ง.. 101
ภาคผนวก จ 108
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์ 109

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
2.1	โครงสร้างและสมบัติทางเคมีของสาร PAHs 16 ชนิด…………………………….….	7
2.2	ค่าแรงตึงผิวของของเหลวชนิดต่างๆ..	19
2.3	สมบัติของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพและสารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์......................	25
2.4	ความเป็นพิษ (Toxicity) ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพและสารลดแรงตึงผิว สังเคราะห์……..	26
4.1	ลักษณะทางกายภาพ และองค์ประกอบทางเคมีของดิน.....................................	42
4.2	สมบัติของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพแรมโนลิปิดและเซอร์แฟคติน..........................	44
4.3	สรุปสมบัติของสารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์ และชีวภาพ......................................	44
4.4	ค่า CMC และ ACMC ของสารลดแรงตึงผิวชนิดต่างๆ……………………………..	45
4.5	ปริมาณฟลูออรีนที่เหลืออยู่ (%) ในสเลอรีเมื่อเติม Brij 35 ร่วมกับกลุ่มแบคทีเรีย STK…………………………………………………………………….………………..	52
4.6	ปริมาณฟีแนนทรีนที่เหลืออยู่ (%) ในสเลอรีเมื่อเติม Brij 35 ร่วมกับกลุ่มแบคทีเรีย STK…………………………………………………………………………………	53
4.7	ปริมาณไพรีนที่เหลืออยู่ (%) ในสเลอรีเมื่อเติม Brij 35 ร่วมกับกลุ่มแบคทีเรีย STK..	54
4.8	ปริมาณฟลูออรีนที่เหลืออยู่ (%) ในสเลอรีเมื่อเติม SDS ร่วมกับกลุ่มแบคทีเรีย STK…………………………………………………………..…………………..	56
4.9	ปริมาณฟีแนนทรีนที่เหลืออยู่ (%) ในสเลอรีเมื่อเติม SDS ร่วมกับกลุ่มแบคทีเรีย STK…………………………………………………………………………………	57
4.10	ปริมาณไพรีนที่เหลืออยู่ (%) ในสเลอรีเมื่อเติม SDS ร่วมกับกลุ่มแบคทีเรีย STK…..	58
4.11	ปริมาณฟลูออรีนที่เหลืออยู่ (%) ในสเลอรีเมื่อเติมแรมโนลิปิดหรือ *P.aeruginosa* สายพันธุ์ A41 ร่วมกับกลุ่มแบคทีเรีย STK…………………………………….....	61
4.12	ปริมาณฟีแนนทรีนที่เหลืออยู่ (%) ในสเลอรีเมื่อเติมแรมโนลิปิดหรือ *P.aeruginosa* สายพันธุ์ A41 ร่วมกับกลุ่มแบคทีเรีย STK……………………………………	62
4.13	ปริมาณไพรีนที่เหลืออยู่ (%) ในสเลอรีเมื่อเติมแรมโนลิปิดหรือ *P.aeruginosa* สายพันธุ์ A41 ร่วมกับกลุ่มแบคทีเรีย STK……………………………………	63
4.14	ปริมาณฟลูออรีนที่เหลืออยู่ (%) ในสเลอรีเมื่อเติมเซอร์แฟคตินหรือ *B.subtilis* สายพันธุ์ BBK1 ร่วมกับกลุ่มแบคทีเรีย STK…………………………………..	68

ตารางที่ **หน้า**
4.15 ปริมาณฟีแนนทรีนที่เหลืออยู่ (%) ในสเลอรีเมื่อเติมเซอร์แฟคตินหรือ *B.subtilis* สายพันธุ์ BBK1 ร่วมกับกลุ่มแบคทีเรีย STK... 69
4.16 ปริมาณไพรีนที่เหลืออยู่ (%) ในสเลอรีเมื่อเติมเซอร์แฟคตินหรือ *B.subtilis* สายพันธุ์ BBK1 ร่วมกับกลุ่มแบคทีเรีย STK... 70

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
2.1	แสดงการย่อยสลายสาร PAHs โดยจุลินทรีย์	13
2.2	แสดงลักษณะโครงสร้างโดยทั่วไปของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ	16
2.3	การหาค่าความเข้มข้นของจุดวิกฤตของการเกิดไมเซลล์	18
2.4	แสดงการหาค่าแรงตึงผิวของของเหลว	18
2.5	สูตรโครงสร้างแรมโนลิปิด ชนิดต่างๆที่ผลิตได้โดย *P. aeruginosa*	23
2.6	สูตรโครงสร้างเซอร์แฟคติน	24
2.7	การย่อยสลาย PAHs โดยแบคทีเรีย	28
4.1	สารลดแรงตึงผิวชีวภาพแรมโนลิปิดและเซอร์แฟคติน	43
4.2	แสดงสาร PAHs ถูกชะออกจากดินเมื่อเติม Triton X-100 ที่ความเข้มข้นต่างๆ	46
4.3	แสดงสาร PAHs ถูกชะออกจากดินเมื่อเติม Tween 80 ที่ความเข้มข้นต่างๆ	46
4.4	แสดงสาร PAHs ถูกชะออกจากดินเติม Brij 35 ที่ความเข้มข้นต่างๆ	47
4.5	แสดงสาร PAHs ถูกชะออกจากดินเมื่อเติม CTAB ที่ความเข้มข้นต่างๆ	47
4.6	แสดงสาร PAHs ถูกชะออกจากดินเมื่อเติม SDS ที่ความเข้มข้นต่างๆ	48
4.7	แสดงสาร PAHs ถูกชะออกจากดินเมื่อมีการเติมแรมโนลิปิดที่ความเข้มข้นต่างๆ	48
4.8	แสดงสาร PAHs ถูกชะออกจากดินเมื่อมีการเติมเซอร์แฟคตินที่ความเข้มข้นต่างๆ	49
4.9	ผลของ Triton X-100 ความเข้มข้นต่างๆที่มีต่อกลุ่มแบคทีเรีย STK	49
4.10	ผลของ Tween 80 ความเข้มข้นต่างๆที่มีต่อกลุ่มแบคทีเรีย STK	50
4.11	ผลของ Brij 35 ความเข้มข้นต่างๆที่มีต่อกลุ่มแบคทีเรีย STK	50
4.12	ผลของ SDS ความเข้มข้นต่างๆที่มีต่อกลุ่มแบคทีเรีย STK	51
4.13	การเจริญและการย่อยสลายฟลูออรีนเมื่อเติม Brij 35 ร่วมกับกลุ่มแบคทีเรีย STK	52
4.14	การเจริญและการย่อยสลายฟีแนนทรีนเมื่อเติม Brij 35 ร่วมกับกลุ่มแบคทีเรีย STK	53
4.15	การเจริญและการย่อยสลายไพรีนเมื่อเติม Brij 35 ร่วมกับกลุ่มแบคทีเรีย STK	54
4.16	ผลของ Brij 35 ที่มีต่อการชะสาร PAHs ออกจากดินสู่วัฏภาคน้ำ	55
4.17	การเจริญและการย่อยสลายฟลูออรีนเมื่อเติม SDS ร่วมกับกลุ่มแบคทีเรีย STK	56
4.18	การเจริญและการย่อยสลายฟีแนนทรีนเมื่อเติม SDS ร่วมกับกลุ่มแบคทีเรีย STK	57
4.19	การเจริญและการย่อยสลายไพรีนเมื่อเติม SDS ร่วมกับกลุ่มแบคทีเรีย STK	58
4.20	ผลของ SDS ที่มีต่อการการชะสาร PAHs ออกจากดินสู่วัฏภาคน้ำ	59

รูปที่ **หน้า**

4.21 การเจริญและการย่อยสลายฟลูออรีนเมื่อเติมแรมโนลิปิดหรือ *P.aeruginosa* . สายพันธุ์ A41 ร่วมกับกลุ่มแบคทีเรีย STK.......... 61
4.22 การเจริญและการย่อยสลายฟีแนนทรีนเมื่อเติมแรมโนลิปิดหรือ *P.aeruginosa* สายพันธุ์ A41 ร่วมกับกลุ่มแบคทีเรีย STK.......... 62
4.23 การเจริญและการย่อยสลายไพรีนเมื่อเติมแรมโนลิปิดหรือ *P.aeruginosa* สายพันธุ์ A41 ร่วมกับกลุ่มแบคทีเรีย STK.......... 63
4.24 ผลของ *P. aeruginosa* สายพันธุ์ A41ที่มีต่อค่าแรงตึงผิวในวัฏภาคน้ำ.......... 64
4.25 ผลของแรมโนลิปิดที่มีต่อการชะสาร PAHs ออกจากดินสู่วัฏภาคน้ำ.......... 65
4.26 ผลของ *P .aeruginosa* สายพันธุ์ A41 ที่มีต่อการชะสาร PAHs ออกจากดินสู่วัฏภาคน้ำ.......... 66
4.27 การเจริญและการย่อยสลายฟลูออรีนเมื่อเติมเซอร์แฟคตินหรือ *B.subtilis* สายพันธุ์ BBK1 ร่วมกับกลุ่มแบคทีเรีย STK.......... 68
4.28 การเจริญและการย่อยสลายฟีแนนทรีนเมื่อเติมเซอร์แฟคตินหรือ *B.subtilis* สายพันธุ์ BBK1 ร่วมกับกลุ่มแบคทีเรีย STK.......... 69
4.29 การเจริญและการย่อยสลายไพรีนเมื่อเติมเซอร์แฟคตินหรือ *B.subtilis* สายพันธุ์ BBK1 ร่วมกับกลุ่มแบคทีเรีย STK.......... 70
4.30 ผลของ *B. subtilis* สายพันธุ์ BBK1 ที่มีต่อค่าแรงตึงผิวในวัฏภาคน้ำ.......... 71
4.31 ผลของเซอร์แฟคตินที่มีต่อการชะสาร PAHs ออกจากดินสู่วัฏภาคน้ำ.......... 72
4.32 ผลของ *B.subtilis* สายพันธุ์ BBK1 ที่มีต่อการชะสาร PAHs ออกจากดินสู่วัฏภาคน้ำ.......... 73
5.1 แสดงแบคทีเรียใช้ PAHs ที่ละลายอยู่กึ่งกลาไมเซลล์ของสารลดแรงตึงผิว.......... 78
5.2 แสดงแบคทีเรียใช้ PAHs ที่ถูกปล่อยออกจากไมเซลล์ และอยู่ในวัฏภาคน้ำ.......... 79
5.3 แสดงแบคทีเรียใช้สาร PAHs ได้โดยตรงในรูปแบบของ cell-surfactant-PAH-contact.......... 79
5.4 แสดงแบคทีเรียใช้สาร PAHs ที่จับกับสารลดแรงตึวผิวชีวภาพที่ไม่ก่อตัวเป็นไมเซลล์.......... 80
ค.1 กราฟมาตรฐานระหว่างปริมาณฟลูออรีนและพื้นที่ใต้พีคที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วย GC-FID.......... 99

รูปที่ **หน้า**

ค.2 กราฟมาตรฐานระหว่างปริมาณฟีแนนทรีนและพื้นที่ใต้พีคที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วย GC-FID…………………………………………………………………………….. 99
ค.3 กราฟมาตรฐานระหว่างปริมาณไพรีนและพื้นที่ใต้พีคที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วย GCFID.. 100
ง.1 แสดงค่า CMC สารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์ Triton X-100…...……………………… 101
ง.2 แสดงค่า CMC สารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์ Tween 80………….……….……….. 101
ง.3 แสดงค่า CMC สารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์ Brij 35…………………………...….. 102
ง.4 แสดงค่า CMC สารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์ CTAB…...…………………….....…… 102
ง.5 แสดงค่า CMC สารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์ SDS…………………………....……... 103
ง.6 แสดงค่า CMC สารลดแรงตึงผิวชีวภาพแรมโนลิปิด…………………………...…… 103
ง.7 แสดงค่า CMC สารลดแรงตึงผิวชีวภาพเซอร์แฟคติน…………………………..…... 104
ง.8 เปรียบเทียบค่า CMC และ ACMC ของสารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์ Triton X – 100 104
ง.9 เปรียบเทียบค่า CMC และ ACMC ของสารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์ Tween 80..….. 105
ง.10 เปรียบเทียบค่า CMC และ ACMC ของสารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์ Brij 35………... 105
ง.11 เปรียบเทียบค่า CMC และ ACMC ของสารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์ CTAB………… 106
ง.12 เปรียบเทียบค่า CMC และ ACMC ของสารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์ SDS……...…… 106
ง.13 เปรียบเทียบค่า CMC และ ACMC ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพแรมโนลิปิด……….. 107
ง.14 เปรียบเทียบค่า CMC และ ACMC ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพเซอร์แฟคติน……… 107
จ.1 เครื่องวัดค่าแรงตึงผิว………………………………………………………………… 108

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สัญลักษณ์ และคำย่อ

°ซ = องศาเซลเซียส

% = เปอร์เซ็นต์

มก. = มิลลิกรัม

มล. = มิลลิลิตร

มม. = มิลลิเมตร

ซม. = เซนติเมตร

ชม. = ชั่วโมง

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความสำคัญของปัญหา

ปัจจุบันการเพิ่มของประชากร การขยายตัวทางเศรษฐกิจ การพัฒนาด้านอุตสาหกรรม เทคโนโลยี และการเกษตรของประเทศไทยมีอย่างต่อเนื่อง การใช้เทคโนโลยีสมัยใหม่ในการดำเนินชีวิตก่อให้เกิดการเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วของปริมาณ จำนวน และชนิดของของเสียอันตราย ตลอดจนการกระจัดกระจายของของเสียอันตราย ซึ่งรวมถึงสารเคมีที่มีบทบาทสำคัญในชีวิตประจำวันของมนุษย์ในด้านต่างๆ ไม่ว่าจะเป็นสารปรุงแต่งอาหาร เครื่องสำอาง ยารักษาโรค และยาฆ่าแมลง ดังนั้นปัญหาหนึ่งที่หลีกเลี่ยงไม่ได้คือการเพิ่มขึ้นของอุบัติภัยจากสารเคมีทั้งจากในกระบวนการผลิต การจัดเก็บ และการขนส่ง (กรมควบคุมมลพิษ, 2545) สารอันตรายดังกล่าวบางชนิดสามารถก่อผลกระทบต่อสุขอนามัยของมนุษย์ ทั้งในภาคเกษตร และอุตสาหกรรมโดยพบการปนเปื้อนของสารดังกล่าวในสิ่งแวดล้อม (กรมควบคุมมลพิษ, 2548)

ของเสียอันตราย หมายถึง ของเสียใดๆที่มีองค์ประกอบหรือปนเปื้อนวัตถุอันตรายชนิดต่างๆ ได้แก่ วัตถุมีพิษ วัตถุที่ทำให้เกิดโรค วัตถุกัมมันตรังสี วัตถุที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรม วัตถุกัดกร่อน วัตถุที่ก่อให้เกิดการระคายเคือง ซึ่งอาจเป็นสาเหตุหรือมีส่วนทำให้เกิดการตาย การเจ็บป่วยรุนแรงที่รักษาไม่ได้ และมีแนวโน้มจะก่อให้เกิดอันตรายต่อสุขภาพอนามัยของมนุษย์หรือสิ่งแวดล้อม (กรมควบคุมมลพิษ, 2545) ปัญหามลพิษจากของเสียอันตรายดังกล่าว เป็นปัญหาสำคัญที่ต้องดำเนินการแก้ไข เนื่องจากปัจจุบันมีของเสียอันตรายเพิ่มมากขึ้นเป็นจำนวนมาก แต่ยังมีการจัดการที่ไม่เหมาะสม โดยมีการทิ้งรวมไปกับขยะมูลฝอย รวมทั้งปัญหาปริมาณของเสียที่ส่งเข้ากำจัดที่ศูนย์บริการกำจัดกากอุตสาหกรรมน้อยกว่าปริมาณของเสียที่เกิดขึ้นจริง (กรมควบคุมมลพิษ, 2545)

กรมควบคุมมลพิษ (2548) พบว่าสถานการณ์มลพิษด้านของเสียอันตรายในปี 2548 คาดว่ามีปริมาณของเสียอันตรายจากชุมชนเกิดขึ้นประมาณ 0.4 ล้านตัน ร้อยละ 34 เกิดในเขตกรุงเทพมหานคร และปริมลฑล พบได้มากในดิน โดยแหล่งกำเนิดที่สำคัญ ได้แก่ อู่ซ่อมรถ สถานบริการน้ำมัน และบ้านเรือน สำหรับแนวโน้มของของเสียอันตรายปี 2549 คาดว่ายังคงมีปริมาณใกล้เคียงกับปี 2548 ซึ่งในจำนวนนี้มีของเสียที่จัดเป็นของเสียอันตราย และปิโตรเลียมรวมอยู่ด้วย ของเสียประเภทนี้มีส่วนประกอบของสารอินทรีย์หลายชนิด โดยเฉพาะสารประกอบกลุ่ม

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

พอลิไซคลิกแอโรแมติกไฮโดรคาร์บอน (Polycyclic Aromatic Hydrocarbons, PAHs) ตัวอย่าง PAHs ได้แก่ ฟีแนนทรีน ฟลูออรีน อะซีแนพธีน และไพรีน เป็นต้น

PAHs เป็นสารประกอบอินทรีย์ที่มีโครงสร้างของอะตอมคาร์บอน และไฮโดรเจนรวมกันเป็นวงแหวนแอโรแมติกเบนซีน มีหลายรูปแบบทั้งเรียงกันเป็นแนวตรง (linear) เป็นมุม (angular) หรือเกาะกันเป็นกลุ่ม (cluster) ซึ่งโครงสร้างดังกล่าวมีส่วนทำให้สารประกอบแต่ละชนิดมีความคงทนแตกต่างกันไป ซึ่งความคงทนของ PAHs ที่เรียงตัวเป็นเส้นตรง จะน้อยกว่าชนิดที่เรียงตัวเป็นมุมหรือกลุ่มก้อน โดยสามารถก่อให้เกิดความเป็นพิษอย่างเฉียบพลัน (acute toxic) หรือเป็นสารที่ก่อให้เกิดการกลายพันธุ์ (mutagen) และสามารถทำให้เกิดความผิดปกติต่อทารกในครรภ์ (teratogen) (Wilson และ Jones, 1993) ปกติ PAHs จะละลายน้ำได้น้อยมาก โดยพบว่าความสามารถในการละลายจะลดลงเมื่อมีจำนวนวงแหวนที่เชื่อมต่อกันเพิ่มขึ้นหรือมีน้ำหนักโมเลกุลเพิ่มขึ้น มีความสามารถในการยึดเกาะกับอนุภาคตะกอนดินในสิ่งแวดล้อมของสารได้ดี ทำให้สารดังกล่าวมีความคงทนสูงดังนั้นเมื่อสารเหล่านี้ปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อมจึงเกิดการตกค้างหรือสะสมอยู่ในสิ่งแวดล้อมได้นาน (Rockne และคณะ, 2002)

การบำบัดสารเคมีอันตรายในประเทศไทยมีวิธีหลัก 3 วิธี ได้แก่ การฝังกลบแบบปลอดภัย (secured landfill) การใช้กระบวนการทางกายภาพ-เคมี (physical-chemical process) และการเผา (incineration) อย่างไรก็ตามวิธีดังกล่าวไม่เหมาะสำหรับกรณีที่เกิดการปนเปื้อนสารเคมีอันตรายในพื้นที่ขนาดใหญ่ เนื่องจากต้องใช้ค่าใช้จ่ายสูง และบางครั้งอาจก่อให้เกิดปัญหามลภาวะเพิ่มขึ้น ปัจจุบันได้มีการนำเทคโนโลยีด้านชีวภาพมาใช้บำบัดสารเคมีอันตรายซึ่งเป็นแนวทางใหม่ที่เกิดจากการผสมผสานความรู้ทางชีวเคมี จุลชีววิทยา นิเวศวิทยา ปฐพีวิทยา พิษวิทยา และวิศวกรรมศาสตร์เข้าด้วยกัน วิธีทางชีวภาพมีข้อดีคือราคาถูก เป็นกระบวนการทางธรรมชาติ มีผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมน้อย และสามารถใช้บำบัดในพื้นที่ได้โดยตรง แต่การบำบัดสารเคมีอันตรายดังกล่าวด้วยวิธีนี้มีข้อจำกัดคือ ใช้ระยะเวลาในการบำบัดนาน และจะต้องรักษาสภาพของจุลินทรีย์หรือพืชให้มีชีวิตอยู่รอดในระหว่างการบำบัด ซึ่งเป็นปัญหาสำคัญในกรณีที่มีระยะเวลาการบำบัดค่อนข้างสั้น พื้นที่ปนเปื้อนมีปริมาณสารพิษสูง หรือลักษณะทางกายภาพของพื้นที่ไม่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของสิ่งมีชีวิต (เอกวัลย์ ลือพร้อมชัย, 2546)

Bioremediation เป็นการกำจัดสารประกอบอินทรีย์ที่เป็นอันตรายต่อสิ่งแวดล้อมด้วยวิธีทางชีวภาพ โดยจุลินทรีย์จะย่อยสลายสารให้มีความเป็นพิษ หรืออันตรายน้อยลง (Wilson และ Jones, 1993) วิธีนี้ได้ประสบความสำเร็จเป็นอย่างมาก เนื่องจากปลอดภัยต่อสิ่งแวดล้อม

ค่าใช้จ่ายในการดำเนินการต่ำ สามารถทำได้โดยการอาศัยการกระตุ้นการทำงานของจุลินทรีย์บริเวณที่มีการปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อม (biostimulation) หรือการเติมจุลินทรีย์ภายนอกที่สามารถย่อยสลาย PAHs ลงไปในดิน (bioaugmentation) ที่มีการปนเปื้อน PAHs เพื่อส่งเสริมให้เกิดการย่อยสลายได้ดียิ่งขึ้น (Watanabe, 2001) ข้อจำกัดของการบำบัดโดยวิธีนี้คือ จุลินทรีย์สามารถนำสารเหล่านั้นไปใช้ประโยชน์ได้น้อย เนื่องจาก PAHs มีปริมาณที่สามารถนำไปใช้ประโยชน์ในทางชีวภาพ (bioavailability) ได้ต่ำ เป็นสารที่ละลายน้ำได้น้อย และมีการยึดติดกับอนุภาคต่างๆของสารอินทรีย์ได้ดี (Prince, 1997; Rouse และคณะ, 1994) Ressler และคณะ(1999) รายงานว่าการย่อยสลาย PAHs โดยแบคทีเรียจะได้สารเมแทบอไลท์ซึ่งคล้ายกับสารประกอบพวกกรดฮิวมิค (humic acid) ซึ่งมีทั้งอินทรียวัตถุที่ละลาย และอินทรียวัตถุที่เป็นอนุภาค โดยสารเหล่านี้จะถูกปล่อยออกมาในระหว่างการเผาผลาญ และสามารถยึดเกาะกับอนุภาคดิน ทำให้แบคทีเรียไม่สามารถนำสารดังกล่าวไปใช้ได้ การควบคุมสภาวะแวดล้อมในดิน สามารถเพิ่มประสิทธิภาพการย่อยสลาย PAHs ได้ เพื่อให้เกิดสภาวะที่เหมาะสมต่อการย่อยสลายรวมถึงการเติมสารลดแรงตึงผิวจะช่วยเพิ่มการละลายของ PAHs ทำให้แบคทีเรียสามารถย่อยสลายได้ง่ายขึ้น (Aronstein และคณะ, 1991; Aronstein และ Alexander, 1993)

สารลดแรงตึงผิว (surfactant) เป็นสารที่มีสมบัติลดแรงตึงผิวได้ มีโครงสร้างชนิดแอมฟิพาติก (amphipatic structure) ประกอบด้วยส่วนที่ชอบน้ำ (hydrophilic portion) และส่วนที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic portion) แบ่งออกได้เป็น 3 ชนิดได้แก่ สารลดแรงตึงสังเคราะห์ ที่ผลิตได้โดยกระบวนการทางเคมี สารลดแรงตึงผิวธรรมชาติ และสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตโดยสิ่งมีชีวิต เช่น แบคทีเรีย รา และยีสต์บางชนิด (Cooper และ Zajic, 1980) เมื่อสารลดแรงตึงผิวละลายอยู่ในตัวทำละลายเช่นน้ำ และหากมีความเข้มข้นแบบ critical micelle ก็จะก่อโครงสร้างที่เรียกว่า ไมเซลล์ (micelle) โดยหันเอาส่วนที่ชอบน้ำไว้ด้านนอก และส่วนที่ชอบไขมันไว้ด้านในสารลดแรงตึงผิวสามารถเพิ่มอัตราการละลายของ PAHs ในดินได้ โดยจะช่วยให้แบคทีเรียยึดเกาะกับอนุภาคดินที่มี PAHs ได้ ทำให้ระยะทางการแพร่ของ PAHs กับเซลล์แบคทีเรียสั้นลง (Tang และคณะ, 1998; Poeton และคณะ, 1999) แบคทีเรียสามารถนำ PAHs เข้าสู่เซลล์ได้ง่ายและมีประสิทธิภาพมากกว่าแบคทีเรียที่อยู่ในรูปอิสระ (Bastiean และคณะ, 2000)

ตัวอย่างของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตจากแบคทีเรียสามารถเพิ่มการละลายของ PAHs ได้เช่น แรมโนลิปิด (rhamonlipid) ที่ผลิตโดย *Pseudomonas aeruginosa* (Deschênes และคณะ, 1996; Noordman และคณะ, 1998; Mulligan และคณะ, 2001) bioemulsifier alasan ที่ผลิตโดย *Acinetobacter radioresisten* KA 53 พบว่าสามารถเพิ่มการละลาย ฟีแนนทรีน

ฟลูออแรนทีน และไพรีน ได้ 6, 25.7 และ 19.8 เท่าตามลำดับ (Barkay และคณะ, 1999) สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตโดย *Rhodococcus* strain H13-A มีประสิทธิภาพในการชะ PAHs ไปสู่วัฏภาคน้ำได้ดีกว่า Tween 80 ถึง 35 เท่า (Page และคณะ, 1999) ดังนั้นการใช้สารลดแรงตึงผิวอาจเป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการเพิ่มประสิทธิภาพการบำบัดดินที่ปนเปื้อน PAHs โดยวิธีชีวภาพและสามารถนำไปประยุกต์ใช้เพื่อแก้ปัญหาในสิ่งแวดล้อมได้ต่อไป

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

ศึกษาการเพิ่มประสิทธิภาพการย่อยสลายสาร PAHs ด้วยวิธีชีวภาพในดินที่ปนเปื้อน โดยการเติมสารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์ และชีวภาพ

1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

การใช้สารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์ สารลดแรงตึงผิวชีวภาพ และแบคทีเรียที่สามารถสร้างสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการย่อยสลายสาร PAHs ในดินปนเปื้อน เพื่อใช้เป็นแนวทางในการนำไปประยุกต์บำบัดสาร PAHs ที่ปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อมได้ต่อไป

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 2

ปริทัศน์วรรณกรรม

สารประกอบพอลิไซคลิกแอโรแมติกไฮโดรคาร์บอน (Polycyclic Aromatic Hydrocarbons, PAHs) จัดเป็นกลุ่มของมลพิษที่พบมากในดิน บริเวณแหล่งที่ปนเปื้อนจากโรงงานอุตสาหกรรมหลายๆชนิด พบมากบริเวณโรงงานอุตสาหกรรม โดยเฉพาะ อุตสาหกรรมน้ำมันปิโตรเลียม การผลิตแก๊ส อุตสาหกรรมที่ผลิตสารรักษาเนื้อไม้ (Cerniglia, 1992) ซึ่งสารเหล่านี้จะเป็นมลพิษต่อสิ่งแวดล้อม เนื่องจากเป็นสารก่อมะเร็ง และเป็นสารที่ก่อให้เกิดการกลายพันธุ์

แหล่งกำเนิดสาร PAHs

1.สิ่งแวดล้อมตามธรรมชาติ เกิดจากปฏิกิริยาการเผาไหม้ของกระบวนการไพโรไลซิส (pyrolysis) ภายใต้พื้นโลกจากความร้อนสูงของลาวาและแมกมาในใจกลางโลกที่ยังไม่เย็นตัว ซึ่งทำให้สารประกอบไฮโดรคาร์บอนเกิดไพโรไลซิสอย่างช้าๆ โดยมีการเรียงตัวใหม่จากสายไฮโดรคาร์บอนได้เป็นวงเบนซีนจาก 1 เป็น 2 และ 3 วง ไปเรื่อยๆ จนทำให้เกิดเป็นน้ำมันดิบและถ่านกัมมันต์ ซึ่งได้จากซากพืช ต้นไม้ในป่า รวมถึงปฏิกิริยาการสร้างสีในพืชและแบคทีเรียบางชนิด (Blumer, 1976)

2. กิจกรรมของมนุษย์ การเผาทำลายสิ่งต่าง ๆ ของมนุษย์เอง เป็นต้นกำเนิดอันสำคัญของสารเหล่านี้ โดยเฉพาะการใช้น้ำมันดิบ เชื้อเพลิงฟอสซิล การกลั่นน้ำมันปิโตรเลียม และผลิตภัณฑ์ต่างๆ ที่ได้จากน้ำมันดิบ เช่น โคลทาร์ คาร์บอนแบล็ค โดยถูกใช้เป็นเชื้อเพลิงหลักของโลกปัจจุบัน (Jones และคณะ, 1989) ไอเสียรถยนต์ (Grimmer และคณะ, 1977) รวมถึงการเผาไหม้วัสดุต่าง ๆ เช่น ธูป (Lin และคณะ, 2001) บุหรี่ซิการ์ (Neurath, 1972) ซึ่งเกิดจากการเผาไหม้ของกรดอะมิโนฟีนิลอะลานีน (Wang และคณะ, 2004) ที่เป็นองค์ประกอบหลักในบุหรี่ และชาที่ใช้ดื่ม (Fiedler และคณะ, 2002)

3. กิจกรรมต่างๆของโรงงานอุตสาหกรรมที่เกี่ยวข้องกับการผลิต การใช้ และการกำจัดสารที่มี PAHs เป็นส่วนประกอบ (Wilson และJones,1993)

สมบัติทางกายภาพ และเคมีของสาร PAHs

PAHs เป็นสารประกอบไฮโดรคาร์บอนที่ประกอบด้วยวงเบนซินตั้งแต่ 2 วงขึ้นไปมาจับกันในโมเลกุลของสารประกอบ ประกอบด้วยอะตอมของคาร์บอน และไฮโดรเจน อย่างไรก็ตามบางครั้งพบว่าในโมเลกุลของสารประกอบกลุ่มนี้อาจมีอะตอมของไนโตรเจน ออกซิเจน และซัลเฟอร์ เข้ามาแทรกในวงเบนซีนด้วย ซึ่งเรียกว่า Hetrocyclic aromatic (Blumer, 1976) สาร PAHs แบ่งเป็น 2 ชนิด (Kanaly และ Harayama, 2000) ตามโครงสร้างทางเคมี คือ

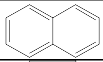
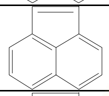
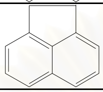
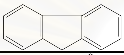
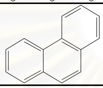
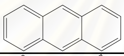
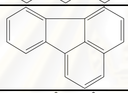
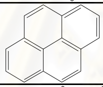
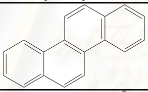
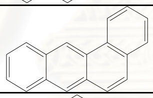
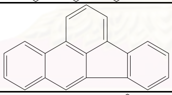
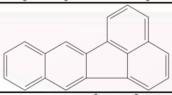
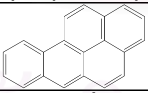
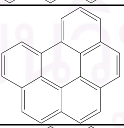
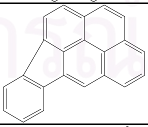
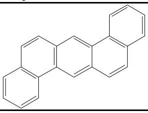
1 สาร PAHs ที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ (low molecular weight PAHs) โมเลกุลประกอบด้วยวงเบนซีน 2-3 วง เช่น แนพธาลีน ฟีแนนทรีน อะซีแนพธีน ฟลูออรีน เป็นต้น

2 สาร PAHs ที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง (high molecular weight PAHs) โมเลกุลประกอบด้วยวงเบนซีนเรียงต่อกันมากกว่า 4 วงขึ้นไป เช่น ไพรีน เบนโซ[เอ]แอนทราซีน และเบนโซ[เอ]ไพรีน เป็นต้น

การจัดเรียงตัวของวงเบนซีนในโครงสร้างทางเคมีของ PAHs มีหลายรูปแบบทั้งเรียงกันเป็นแนวตรง (linear) เป็นมุม (anngular) หรือเกาะกันเป็นกลุ่ม (cluster) ดังแสดงในตารางที่ 2.1 ซึ่งโครงสร้างดังกล่าวมีส่วนทำให้สารประกอบแต่ละชนิดมีความคงทนแตกต่างกันไป ซึ่งความคงทนของสาร PAHs ที่เรียงตัวเป็นเส้นตรง จะมีความคงทนน้อยกว่าสาร PAHs ที่เรียงตัวเป็นมุมหรือกลุ่มก้อน (Blumer, 1976)

โดยปกติความสามารถในการละลายหรือรวมตัวกับน้ำ (solubility) ของสารประกอบจะเกิดได้น้อยมาก ซึ่งพบว่าความสามารถในการละลายจะลดลงเมื่อมีจำนวนวงแหวนที่เชื่อมต่อกันเพิ่มขึ้นหรือมีน้ำหนักโมเลกุลเพิ่มขึ้น (Sims และ Overcash, 1983) สาร PAHs นี้มีความสามารถในการยึดเกาะกับอนุภาคตะกอนดินในสิ่งแวดล้อมของสารได้ดี จึงยิ่งทำให้สารดังกล่าวมีความคงทนสูง การย่อยสลายทางชีวภาพเกิดขึ้นได้ยากหรือเกิดขึ้นได้ในอัตราที่ต่ำมาก เนื่องจากถูกจำกัดโดยปริมาณของสาร PAHs ที่จุลินทรีย์สามารถนำไปใช้หรือย่อยสลายได้ (bioavailability) ดังนั้นเมื่อสารเหล่านี้ปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อม จึงทำให้เกิดการตกค้างหรือสะสมอยู่ในสิ่งแวดล้อมเป็นเวลานาน (Rockne และคณะ, 2002)

ตารางที่ 2.1 โครงสร้างและสมบัติทางเคมีของสาร PAHs 16 ชนิด (Schirmer และคณะ, 1998)

สาร PAHs	โครงสร้าง	น้ำหนักโมเลกุล	การละลายในน้ำที่อุณหภูมิ 25^{O}ซ (มก.ต่อลิตร)
แนพธาลีน		128.18	31
อะซีแนพธิลีน		152.20	4.3
อะซีแนพธีน		154.22	3.9
ฟลูออรีน		166.23	1.9
ฟีแนนทรีน		178.24	1.1
แอนทราซีน		178.24	0.05
ฟลูออแรนธีน		178.24	0.26
ไพรีน		202.26	0.13
ไครซีน		228.30	0.002
เบนซ์[*เอ*]แอนทราซีน		228.30	0.002
เบนซ์[*บี*]ฟลูออแรนธีน		252.32	0.0015
เบนซ์[*เค*]ฟลูออแรนธีน		252.32	0.0008
เบนโซ[*เอ*]ไพรีน		252.32	0.003
เบนโซ[*จี,เอช,ไอ*]เพอริลีน		276.34	0.0003
อินดิโน[1,2,3-*ซีดี*]ไพรีน		276.34	0.062
ไดเบนซ์[*เอ,เอช*]แอนทราซีน		278.36	0.0003

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ความเป็นพิษของสาร PAHs

สาร PAHs กลุ่มที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ เป็นสารที่มีความคงทนสูง ดังนั้นเมื่อปนเปื้อนสู่สิ่งแวดล้อม จึงเกิดปัญหาต่างๆตามมา นอกจากนี้ยังเป็นสารที่มีการละลายน้ำได้ดี และระเหยได้เร็ว สามารถก่อให้เกิดความเป็นพิษแบบเฉียบพลัน (acute toxicity) (Sims และ Overcash, 1983) ส่วนสาร PAHs ที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงจะละลายน้ำได้น้อยและมีความสามารถในการระเหยต่ำ ส่วนใหญ่ก่อให้เกิดความเป็นพิษแบบเรื้อรัง (chronic toxicity) โดยอาจเป็นสารที่ก่อให้เกิดการกลายพันธุ์ (mutagens) หรือ สารก่อมะเร็ง (carcinogen) และทำให้ทารกในครรภ์มีรูปร่างผิดปกติ (teratogen) (Narro และคณะ,1992) นอกจากนี้สารประกอบกลุ่มนี้ยังมีการสะสม (bioaccumulation) และเพิ่มปริมาณ (biomagnification) ในสิ่งมีชีวิตซึ่งจะเพิ่มขึ้นเป็นลำดับขั้นของผู้บริโภคในห่วงโซ่อาหาร

สำนักงานวิจัยมะเร็งนานาชาติ (The International Agency for Research Cancer; IARC) ได้แบ่งกลุ่มสาร PAHs ออกเป็น 3 กลุ่มตามการออกฤทธิ์ในการก่อมะเร็ง (Sul และคณะ, 2003) ดังนี้

กลุ่ม 2A สารที่น่าจะก่อมะเร็งในมนุษย์ได้สูงกว่ากลุ่มอื่นๆ มี 3 ชนิด ได้แก่ เบนโซ[*เอ*]แอนทราซีน เบนโซ[*เอ*]ไพรีน และไดเบนซ์[*เอ,เอช*]แอนทราซีน

กลุ่ม 2B สารที่อาจจะก่อมะเร็งในมนุษย์มี 11 ชนิด ได้แก่ แนพธาลีน เบนโซ[*บี*]ฟลูออแรนธีน เบนโซ[*เค*]ฟลูออแรนธีน เบนโซ[*เจ*]ฟลูออแรนธีน ไดเบนโซ[*เอ,เอช*]ไพรีน ไดเบนโซ[*เอ,แอล*]ไพรีน ไดเบนโซ[*เอ,อี*]ไพรีน ไดเบนโซ[*เอ,ไอ*]ไพรีน ไดเบนโซ[*เอ,เอช*]อะคริดีน ไดเบนโซ[*เอ,เจ*]อะคริดีน และอินดีโน[1,2,3-*ซีดี*]ไพรีน

กลุ่ม 3 สารที่ไม่ก่อมะเร็งในมนุษย์มี 23 ชนิด ได้แก่ ไตรฟีนิลีน ฟีแนนทรีน แอนทราซีน ฟลูออรีน ฟลูออแรนธีน ไพรีน ไครซีน โคโรนีน เพอริลีน เบนโซ[*เอ*]อะคริดีน เบนโซ[*ซี*]อะคริดีน เบนโซ [*จี,เอช,ไอ*]ฟลูออแรนธีน เบนโซ [*เอ*]ฟลูออรีน เบนโซ [*บี*]ฟลูออรีน เบนโซ[*ซี*]ฟลูออรีน เบนโซ [*จี,เอช,ไอ*]เพอริลีน เบนโซ [*ซี*]ฟีแนนทรีน เบนโซ[*อี*]ไพรีน ไซโคลเพนทะ[*ซี,ดี*]ไพรีน ไดเบนซ์[*เอ,ซี*]แอนทราซีน ไดเบนโซ[*เอ,เจ*]แอนทราซีน ไดเบนโซ[*เอ,อี*]ฟลูออแรนธีน และไดเบนโซ[*เอช,อาร์,เอส,ที*]เพนทะฟีน

การปนเปื้อน PAHs ในประเทศไทย

ในประเทศไทย สาเหตุการปนเปื้อนของสาร PAHs ในสิ่งแวดล้อม พบว่ากว่า 91% เกิดจากกระบวนการสันดาปของน้ำมันเชื้อเพลิงที่ไม่สมบูรณ์ สาร PAHs กระจายอยู่ในอากาศได้โดยสามารถรวมตัวกับฝุ่นละออง เขม่าควัน และสะสมอยู่ในอนุภาคดิน โดยเฉพาะบริเวณที่มีการจราจรหนาแน่น ย่านธุรกิจการค้าและอุตสาหกรรม จากการศึกษาตัวอย่างดินบริเวณริมถนนในตัวเมืองจังหวัดเชียงใหม่ ในปี 1999 สามารถตรวจวัดปริมาณไพรีนได้ที่ความเข้มข้น 168 นาโนกรัมในดิน 1 กรัม นอกจากนี้ยังพบฟลูออแรนทีน เบนโซ[จี,*เอช,ไอ*]เพอริลีน และโคโรนีน ได้ที่ความเข้มข้น 146, 97.7 และ 93.8 นาโนกรัมในดิน 1กรัม ตามลำดับ แต่ปริมาณสาร PAHs ในดินที่พบแตกต่างจากที่พบในอากาศ กล่าวคือ ปริมาณฟลูออแรนทีน ไพรีน ไครซีนและโคโรนีนที่พบในดินมีสูงกว่าในอากาศ ทั้งนี้เนื่องจากความแตกต่างในการเกิด photochemical reactivity และแหล่งกำเนิดของสาร PAHs (Amagai และคณะ, 1999)

มีรายงานว่าตัวอย่างอากาศที่เก็บบริเวณจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพฯ ในเดือนมีนาคม พ.ศ.2536 ถึง มีนาคม พ.ศ.2537 สามารถตรวจพบไพรีนเฉลี่ย 0.55 นาโนกรัมต่อลูกบาศก์เมตร และสาร PAHs ชนิดอื่นอีก 19 ชนิดแตกต่างกัน มีความเข้มข้นเฉลี่ย 0.125 – 1.875 นาโนกรัมต่อลบ.ม. โดยพบ เบนโซ[*เอ*]ไพรีน อะซีแนพธิลีน อะซีแนพธีน และเบนโซ[จี,*เอช, ไอ*] เพอริลีน มีปริมาณเข้มข้นมากที่สุด (Panther และคณะ, 1996)

Garivait และคณะ (2002) พบว่าสาร PAHs น้ำหนักโมเลกุลต่ำกว่า 252 ดาลตัน เช่น ไพรีน เบนโซ[*อี*]ไพรีน และ เบนโซ[*เอ*]ไพรีน จะอยู่ในรูปของก๊าซเป็นส่วนใหญ่ คิดเป็น 80 40 และ 24 % โดยน้ำหนักตามลำดับ ในขณะที่สาร PAHs น้ำหนักโมเลกุลสูงกว่า จะอยู่ในรูปของฝุ่นละอองเกือบทั้งหมด ซึ่ง 30 – 60 % โดยน้ำหนักของสาร คณะผู้วิจัยคิดว่าแหล่งที่มาของสาร PAHs ในบรรยากาศนั้นเกิดจากควันที่ปล่อยออกมาจากเครื่องยนต์บนเส้นทางจราจร

Wilcke และคณะ (1999) พบสาร PAHs จำนวน 20 ชนิดในตัวอย่างดินบริเวณถนนในกรุงเทพมหานคร ที่มีความเข้มข้นตั้งแต่ 12-380 ไมโครกรัมในตัวอย่างดิน 1 กิโลกรัม โดยพบแนพธาลีนในปริมาณสูงสุด (145.2 ไมโครกรัมในตัวอย่างดิน 1 กิโลกรัม) รองลงมาได้แก่ เพอริลีน (136.4 ไมโครกรัมในตัวอย่างดิน 1 กิโลกรัม) เบนโซ[จี,*เอช,ไอ*]เพอริลีน (58.9 ไมโครกรัมในตัวอย่างดิน 1 กิโลกรัม) ฟีแนนทรีน (60.8 ไมโครกรัมในตัวอย่างดิน 1 กิโลกรัม) และไพรีน (48.3 ไมโครกรัมในตัวอย่างดิน 1 กิโลกรัม)

การปนเปื้อนสาร PAHs ในดิน

ดินเป็นสารที่มีความซับซ้อนและมีความหลากหลายทางด้านเคมี และกายภาพ ซึ่งมีผลต่อการนำสารประกอบอินทรีย์ที่มีสมบัติไฮโดรโฟบิกไปใช้ประโยชน์โดยจุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่ในดิน (Straube และคณะ, 1999) การปนเปื้อนของสาร PAHs หรือสารประกอบอินทรีย์ในดินมีรูปแบบการอยู่ร่วมกันภายในอนุภาคดินหรือฮิวมัสที่แตกต่างกันออกไป การปนเปื้อนในอนุภาคดินอาจเกิดจากสมบัติทางกายภาพ เช่น ส่วนที่เป็นของแข็งปะปนในอนุภาคดิน หรือการที่อนุภาคดินถูกเคลือบด้วยของเหลว หรือดูดซับอยู่กับอนุภาคดิน ซึ่งสารปนเปื้อนจะสามารถถูกชะออกจากอนุภาคดินได้ง่ายโดยอาศัยตัวทำละลายอินทรีย์

สาร PAHs ถ้ามีการปนเปื้อนในดินเป็นเวลานาน ดินจะสามารถดูดซับสารปนเปื้อนนั้นไว้และแทรกอยู่ระหว่างชั้นน้ำตามช่องว่างภายในอนุภาคดิน ทำให้สารปนเปื้อนถูกชะละลายออกมาได้น้อย และหากสารปนเปื้อนจับกับอนุภาคดินโดยอาศัยพันธะทางเคมี จะทำให้สารถูกชะออกมาได้ยากยิ่งขึ้น เนื่องจากอาจเกิดการเปลี่ยนแปลงลักษณะโครงสร้าง สมบัติทางเคมีของโมเลกุลสาร ทำให้สารอยู่ในรูป bound residue หรืออาจเกิดจากสารประกอบหรือสารที่ได้จากกระบวนการย่อยสลายรวมตัวกับสารที่เกิดจากกระบวนการภายในดินโดยกระบวนทางเคมีกายภาพ ซึ่ง bound residue ที่เกิดขึ้นนี้ทำให้จุลินทรีย์หรือสิ่งมีชีวิตในดินนำไปใช้ประโยชน์ได้น้อยกว่าในรูปแบบอื่นๆ (Verstraete และ Devliegher, 1996) แสดงให้เห็นว่ารูปแบบการปนเปื้อนของสาร PAHs มีผลต่อการบำบัดสาร PAHs โดยวิธีทางชีวภาพ Kästner และคณะ (1999) สรุปสาเหตุการเกิด bound residues ไว้ดังนี้

1. สารเมแทบอไลท์ที่เกิดจากการย่อยสลายจะถูกออกซิไดส์และเข้ารวมตัวกับสารประกอบฟีนอลิก เกิดเป็นสารที่มีโมเลกุลขนาดใหญ่คล้ายกับกรดฮิวมิกในดิน
2. คาร์บอนไดออกไซด์ที่เกิดจากการย่อยสลายสาร PAHs อย่างสมบูรณ์เนื่องจากกิจกรรมของจุลินทรีย์ในดินอาจถูกตรึงอยู่ในอนุภาคดิน
3. สาร PAHs ที่ปนเปื้อนตั้งแต่เริ่มต้นจะถูกเกาะติดอยู่ในอนุภาคดิน

สาร PAHs ส่วนใหญ่สามารถดูดซับกับอินทรียวัตถุที่อยู่ในดิน ทำให้สาร PAHs ไม่ถูกย่อยสลายโดยกระบวนการทางชีวภาพ การดูดซับระหว่างสาร PAHs และอินทรียวัตถุจะเพิ่มขึ้น เมื่อวงแอโรแมติกของโมเลกุลสาร PAHs มีจำนวนมากขึ้น ทำให้โมเลกุลดังกล่าวมีสมบัติไลโปฟิลิกเพิ่มขึ้น นอกจากนี้ความสามารถในการถูกย่อยสลายและสกัดสาร PAHs ออกจากอินทรียวัตถุใน

ดินเกิดยากขึ้น สาร PAHs จึงมีโอกาสสัมผัสกับอนุภาคดินได้นานขึ้น โดยสาร PAHs จะแพร่เข้าสู่อินทรียวัตถุอย่างช้าๆ และทำให้ถูกดูดซับกับอนุภาคดินได้แน่นขึ้น อาจเกิด bound residues และการตรึงสาร PAHs ภายในรูพรุนขนาดเล็กของอนุภาคดินหรืออินทรียวัตถุได้ ซึ่งเป็นเหตุผลที่ทำให้สาร PAHs ถูกสะสมอยู่ในสิ่งแวดล้อมได้เป็นเวลานาน (Wiessenfels และคณะ, 1992; Lundstedt, 2003) เมื่อไพรีนและสาร PAHs เข้าสู่สิ่งแวดล้อม อาจเกิดการเปลี่ยนแปลงโดยกระบวนการต่างๆ ทั้งทางด้านเคมีและกายภาพ ได้แก่ การระเหยเป็นไอ (volatilization) การเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของแสง (photo-oxidation) การเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันทางเคมี (chemical oxidation) การสะสมสารอยู่ภายในสิ่งมีชีวิต (bioaccumulation) หรือการดูดซับโดยอนุภาคของดิน (adsorption) เป็นต้น (Cerniglia, 1992) ซึ่งสมบัติของดินที่แตกต่างกันเป็นปัจจัยสำคัญในการบำบัดสาร PAHs ที่ปนเปื้อนในดินด้วยวิธีทางชีวภาพ สมบัติดังกล่าวได้แก่องค์ประกอบของอินทรียวัตถุในดิน โครงสร้างและอนุภาคของดิน ซึ่งมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงสาร PAHs ในสิ่งแวดล้อมและอัตราการย่อยสลายโดยจุลินทรีย์ (Wilson และ Jones, 1993)

Bollag และLoll (1983) กล่าวว่าการย่อยสลายสารอินทรีย์สังเคราะห์โดยแบคทีเรีย จะได้สารเมแทโบไลท์ซึ่งมีลักษณะคล้ายกับกรดฮิวมิค (humic acid) และสามารถจับกับอินทรียวัตถุที่มีอยู่ในดินได้ดีกว่าสารตั้งต้นเดิม (parent chemical) ซึ่งการดูดซับระหว่างสารอินทรีย์สังเคราะห์กับอินทรียวัตถุในดินทำให้แบคทีเรียไม่สามารถนำสารดังกล่าวไปใช้ได้ (Ressler และคณะ, 1999)

Nieman และคณะ (1998) รายงานว่าไพรีนและผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการเปลี่ยนรูปของไพรีน จะรวมตัวกับอนุภาคของสารอินทรีย์เกิดกระบวนการสร้างสารฮิวมิกในดิน ทำให้ไพรีนถูกดูดซับอยู่ในดิน ส่งผลให้จุลินทรีย์ย่อยสลายได้ยากขึ้น นอกจากจะคำนึงถึงชนิดและความสามารถของจุลินทรีย์ที่นำมาใช้ในการบำบัดแล้ว ยังต้องคำนึงถึงระยะเวลาที่ไพรีนอยู่ในแหล่งปนเปื้อนนั้นด้วยเพราะหากปล่อยไว้นานก็จะทำให้การบำบัดยากขึ้น เนื่องจากไพรีนจะจับกับอนุภาคอินทรียวัตถุในดิน ด้วยพันธะโควาเลนซ์ได้แน่นยิ่งขึ้นตามเวลา (270 วัน) ทำให้สกัดออกมายากขึ้นและถูกย่อยสลายโดยจุลินทรีย์ได้น้อยลง เพราะโอกาสสัมผัสกันระหว่างจุลินทรีย์และไพรีนก็ลดลงตามเวลา รวมถึงสารมัธยันต์ที่เกิดจากการย่อยสลายไพรีนด้วยเช่นกัน (Gothrie และ Pfaender, 1998)

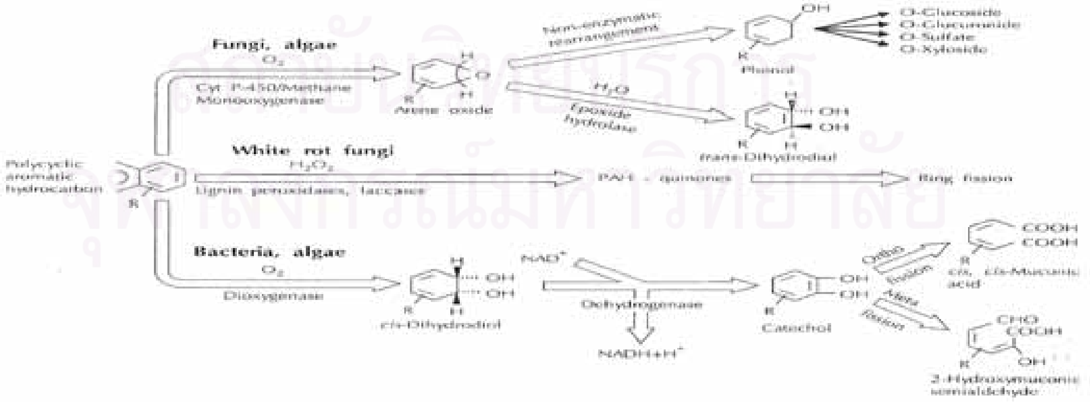
การบำบัดทางชีวภาพ (Bioremediation) (Wilson และ Jones,1993)

เป็นวิธีการใช้จุลินทรีย์ในการกำจัดสารประกอบอินทรีย์ที่เป็นอันตรายในสิ่งแวดล้อม เช่น ดินที่ปนเปื้อนด้วยสารประกอบอินทรีย์ รวมถึงสาร PAHs ให้มีความเป็นพิษน้อยลง หรืออันตรายน้อยลง เช่นทำให้กลายเป็นคาร์บอนไดออกไซด์ และน้ำ วิธีการบำบัดสิ่งแวดล้อมทางชีวภาพนั้นประกอบด้วย 2 วิธีการหลัก (Suthersan, 1999) ได้แก่ Biostimulation ซึ่งเป็นการกระตุ้นเสริมให้จุลินทรีย์ที่มีอยู่ในดินนั้นมีการเจริญ และมีความสามารถในการสลายสารพิษได้ดีขึ้น ได้แก่การเติมสารอาหาร เช่น ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส การให้ออกซิเจน ลงในบริเวณที่มีการปนเปื้อน รวมถึงการเติมสารลดแรงตึงผิว จะช่วยเพิ่มการละลายสารไฮโดรคาร์บอน ทำให้แบคทีเรียสามารถย่อยสลายได้ง่ายขึ้น (Haigh, 1996) ในบางกรณีการเติมเศษวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร มูลสัตว์ จึงเป็นการเพิ่มปริมาณสารอาหารและปริมาณออกซิเจน ทำให้เกิดการถ่ายเทอากาศ ปรับสภาวะให้เหมาะสมต่อการดำรงชีวิตของสิ่งมีชีวิตบริเวณนั้น อีกทั้งยังช่วยลดความสามารถของสาร PAHs ในการเข้าจับกับอนุภาคดิน ทำให้สาร PAHs เคลื่อนที่แทรกเข้าสู่อนุภาคดินได้ช้าลง จุลินทรีย์จึงนำไปใช้ประโยชน์ได้รวดเร็ว (Kästner และ Mahro, 1996) และการปนเปื้อนของสารเคมีในดินเป็นเวลานานจะทำให้จุลินทรีย์ประจำถิ่นมีประสิทธิภาพในการย่อยสลายสารปนเปื้อนนั้นๆ ได้ หากมีระบบการจัดการที่ดี (Vidali, 2001)

อีกวิธีการหนึ่งที่ช่วยส่งเสริมหรือเพิ่มประสิทธิภาพในการย่อยสลายสารพิษที่ปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อมคือ วิธีที่เรียกว่า Bioaugmentation ซึ่งเป็นการเติมจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการเปลี่ยนโครงสร้าง (biotransformation) หรือย่อยสลายสารพิษ (biodegradation) ลงในบริเวณที่มีการปนเปื้อนสารนั้นๆ ซึ่งในบริเวณดังกล่าวอาจไม่พบจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพหรือจุลินทรีย์ที่ได้รับการปรับปรุงสายพันธุ์โดยใช้เทคโนโลยีทางพันธุวิศวกรรม (genetically engineered microorganism, GEM) ในการย่อยสลายสารในพื้นที่บำบัด จึงจำเป็นต้องอาศัยกิจกรรมของจุลินทรีย์ต่างถิ่น (exogenous microorganisms) เพื่อกระตุ้นให้เกิดกระบวนการย่อยสลาย (Watanabe, 2001) โดยวิธีการนี้มีปัจจัยข้อจำกัดที่ควรคำนึงถึงสำหรับการนำจุลินทรีย์ดังกล่าวไปใช้ในสิ่งแวดล้อมจริง ได้แก่ จุลินทรีย์ที่จะนำไปใช้นั้นอาจไม่ใช่จุลินทรีย์ที่มีอยู่ในบริเวณที่ต้องการกำจัดสารพิษ ทำให้เกิดภาวะการแข่งขันระหว่างจุลินทรีย์ต่างถิ่นกับจุลินทรีย์ที่อยู่ประจำถิ่น (indigenous microorganisms) ดังนั้นจุลินทรีย์ต่างถิ่นจะต้องสามารถเพิ่มจำนวนและอยู่รอดได้ในสิ่งแวดล้อมนั้นๆ (Vidali, 2001)

การย่อยสลายสาร PAHs ที่มีโครงสร้าง saturated-aromatic ring จะขึ้นกับความสามารถของจุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์สลายสารพิษได้ การบำบัดโดย aerobic bioremediation เป็นที่นิยมใช้ในการบำบัดดินที่ปนเปื้อน สำหรับเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องในการสลายสาร PAHs คือเอนไซม์ในกลุ่ม oxygenase ซึ่งแบ่งได้เป็น 2 กลุ่มคือ monooxygenase และ dioxygenase (รูปที่ 2.1) โดยทั้งแบคทีเรียและราสามารถย่อยสลาย PAHs ได้โดยแบคทีเรียย่อยสลาย PAHs ได้เป็น *ซีส*-ไดไฮโดรไดออล (*cis*-dihydrodiol) โดยเอนไซม์ไดออกซิจีเนส (dioxygenase) แล้ว *ซีส*-ไดไฮโดรไดออล จึงถูกสลายต่อได้เป็น คาทีคอล (catechol) โดยเอนไซม์ดีไฮโดรจีเนส (dihydrogenase) ปฏิกิริยาการเติมหมู่ไฮดรอกซี (hydroxylation) ทั้งสองให้กับ PAHs ถือเป็นปฏิกิริยาขั้นต้นของการเปิดวงแอโรแมติก (cleavage of the aromatic ring) ปฏิกิริยานี้ก็ยังถูกแคตาไลซ์โดยเอนไซม์ไดออกซิจีเนส การเปิดวงแอโรแมติกออกเกิดขึ้นได้ 2 วิถี คือ วิถีเมตา (*meta* pathway) และวิถีออโธ (*ortho* pathway) (Juhasz และ Naidu, 2000)

สำหรับการย่อยสลายสาร PAHs โดยรานั้น สาร PAHs จะถูกแคตาไลซ์โดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์ไซโตโครม พี-450 (cytochrome P-450) เปลี่ยนเป็นอีพ็อกไซด์ (epoxide) หรือ แอรีน ออกไซด์ (arene oxide) จากนั้นจะถูกย่อยสลายต่อด้วยเอนไซม์อีพ็อกไซด์ ไฮโดรเลส (epoxide hydrolase) ได้เป็น *ทรานซ์*-ไดไฮโดรไดออล (*trans*-dihydrodiol) ผลของปฏิกิริยาที่ได้นี้ตรงข้ามกับการย่อยสลายโดยแบคทีเรีย ซึ่งได้ *ซีส*-ไดไฮโดรไดออล อีพ็อกไซด์ที่เกิดอาจจัดเรียงตัวภายในโมเลกุลโดยไม่ต้องอาศัยการทำงานของเอนไซม์ได้เป็นสารประกอบฟีนอล (phenol) จากนั้นจะจึงถูกกำจัดออกจากเซลล์ของรา ในรูปของ *0*-กลูโคไซด์ (*0*-glucoside), *0*-กลูคูโรไนด์ (*0*-glucuronide) หรือ *0*-ซัลเฟต (*0*-sulfate) ดังแสดงในรูปที่ 2.1



รูปที่ 2.1 แสดงการย่อยสลายสาร PAHs โดยจุลินทรีย์ (Cerniglia, 1993)

จุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการย่อยสลายสาร PAHs พบได้ในบริเวณที่มีการปนเปื้อนสารดังกล่าวโดยจุลินทรีย์ที่อยู่ประจำถิ่นในบริเวณนั้นมีการปรับตัวเพื่อให้อยู่รอดในสภาวะที่มีการปนเปื้อนสารดังกล่าวทั้งทางด้านขนาด โครงสร้าง สรีระวิทยาและพันธุกรรม (Ridgeway และคณะ, 1990) การปรับตัวดังกล่าวอาจมีส่วนช่วยให้จุลินทรีย์เหล่านี้สามารถย่อยสลายสารประกอบ PAHs ได้ โดยกลไกการย่อยสลายอาจเป็นการย่อยสลายเพื่อนำมาใช้เป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงานในการเจริญของเซลล์ หรือการย่อยสลายแบบไม่สมบูรณ์ โดยอาศัยกลไกการเกิด catabolism (Bastiaens และคณะ, 2000)

Leahy และ Colwell (1990) รายงานว่าการปรับตัวของจุลินทรีย์เพื่อให้มีศักยภาพในการย่อยสลาย หรือความสามารถในการออกซิไดซ์สารประกอบไฮโดรคาร์บอนที่เพิ่มขึ้นของจุลินทรีย์เกี่ยวข้องกับ 3 กลไกหลักที่ใช้ในการปรับตัวคือ

1. การชักนำ (induce) ให้มีการแสดงออกของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการย่อยสลาย
2. การเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมเป็นผลทำให้เกิดความสามารถในการย่อยสลาย
3. การคัดเลือกและเพิ่มปริมาณของจุลินทรีย์ชนิดที่มีความสามารถในการย่อยสลาย

จำนวนของแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลายสารประกอบ PAHs มีมากกว่าพวกยีสต์และราสาย (filamentous fungi) ถึง 10 เท่า ซึ่งแสดงให้เห็นว่าในธรรมชาติมีแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายสารประกอบ PAHs เป็นจำนวนมากจึงทำให้สะดวกในการที่จะศึกษาเกี่ยวกับการย่อยสลายสารประกอบ PAHs โดยแบคทีเรีย และความสามารถของจุลินทรีย์ในการใช้เอนไซม์ในการย่อยสลายสารมลพิษซึ่งขึ้นอยู่กับระดับของสารมลพิษที่มากพอที่จะชักนำเอนไซม์ที่สำคัญในจุลินทรีย์ การย่อยสลายโดยจุลินทรีย์เป็นปัจจัยหลักที่มีผลต่อการมีอยู่ของสาร PAHs ในสิ่งแวดล้อม ซึ่งความสามารถในการย่อยสลายสารประกอบนี้ ขึ้นอยู่กับความซับซ้อนของโครงสร้างทางเคมี และการปรับตัวของเอนไซม์ที่ตอบสนองต่อสารประกอบ aromatic hydrocarbon (Šepic และคณะ, 1997)

การบำบัดดินที่ปนเปื้อนสาร PAHs (Wilson และ Jones, 1993) สามารถบำบัดดินที่ปนเปื้อนด้วยสาร PAHs โดยวิธีการต่างๆ ดังนี้

1.*In-situ* treatment

เป็นการบำบัดโดยการขุดบ่อ หลุมผ่านตลอดแนวที่ปนเปื้อนแล้วฉีด พ่นสารละลายที่มีอาหารพร้อมจุลินทรีย์ที่ใช้ในการย่อยสลายสาร PAHs ลงไปให้ซึมผ่านตามชั้นดิน แต่มีข้อจำกัดคือทำการควบคุมอุณหภูมิได้ยาก และมีข้อจำกัดเรื่องชนิดของดิน

2.*ex-situ* treatment

เป็นการบำบัดดินที่ปนเปื้อนด้วยการนำดินปนเปื้อนออกมาบำบัดนอกแหล่งที่ปนเปื้อน ด้วยการเติมอาหาร และจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายสาร PAHs ได้

3. Bioreactor

เป็นการบำบัดโดยนำดินที่ปนเปื้อนมาบำบัดในปฏิกรณ์ โดยวิธีนี้สามารถสลายสาร PAHs ได้ผลดีเนื่องจากสารมารถกำหนดสภาวะที่เหมาะสมต่อการย่อยสลาย และสามารถผสมดินที่มีการเติมสารอาหารที่จำเป็น และสารลดแรงตึงผิว ให้เข้ากับจุลินทรีย์ที่ใช้ย่อยสลายได้ดีใน bioreactor แต่มีข้อจำกัดคือต้องใช้ค่าใช้จ่ายสูงกว่าสองวิธีแรก สำหรับ bioreactor ที่นิยมใช้คือแบบ slurry-phase drum หรือ แบบ airlift

ข้อจำกัดของการบำบัดสาร PAHs ในดิน

เนื่องจากสาร PAHs มักเป็นสารที่ไม่มีขั้วจึงสามารถละลายน้ำได้น้อยมาก ทำให้จุลินทรีย์นำไปใช้ในการเจริญได้ต่ำ อีกทั้งยังสามารถยึดติดกับสารประกอบอินทรีย์ในดินได้ดี ทำให้แบคทีเรียไม่สามารถนำสารดังกล่าวไปใช้ได้ อย่างไรก็ตามจากการศึกษาพบว่า จุลินทรีย์ที่ย่อยสลายสารประกอบประเภทไม่ชอบน้ำได้มักจะมีสมบัติบางประการที่เกี่ยวข้องกับความสามารถในการนำสารประกอบดังกล่าวเข้าสู่เซลล์ได้ดีขึ้น จึงได้มีการศึกษาถึงสมบัติทางด้านสรีรวิทยาของจุลินทรีย์ที่มีความเกี่ยวข้องกับการสลายสารประกอบที่ละลายน้ำได้น้อยเพื่อเพิ่มหรือเสริมในการนำสารเหล่านั้นไปใช้ได้ด้วยกลไกการขนส่งสารเข้าสู่เซลล์ของจุลินทรีย์ได้แก่

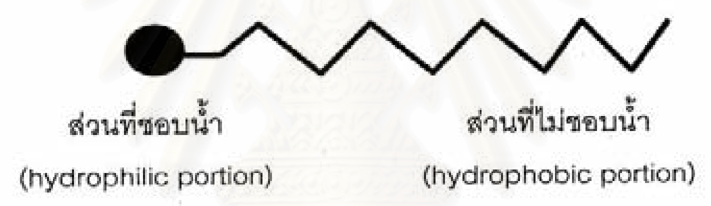
- การสร้างสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ หรือใช้สารประกอบที่บริเวณผิวหน้าเซลล์ (cell surface) ที่มีสมบัติเป็นสารอีมัลสิไฟเออร์ (Desai และ Banat, 1997)
- นำสารเข้าสู่เซลล์โดยสารที่นำเข้าสู่เซลล์มีสัมพรรคภาคสูง มีประสิทธิภาพในการลดความเข้มข้นของซับสเตรทให้มีค่าใกล้เคียงกับผิวหน้าเซลล์ด้วยการลด flux การแพร่ของซับเสตรท
- ลดระยะทางระหว่างเซลล์และซับสเตรทโดยอาศัยโครงสร้างของผิวหน้าเซลล์ที่ช่วยส่งเสริมการยึดเกาะผิวหน้าของสารไม่ชอบน้ำ โดยกลไกนี้แบคทีเรียสามารถยึดเกาะกับสาร PAHs หรือพื้นที่ผิวในดิน ทำให้มีโอกาสที่จะนำสารดังกล่าวเข้าสู่เซลล์ได้อย่างมีประสิทธิภาพมากกว่าแบคทีเรียที่อยู่ในรูปอิสระ (Bastiaensและคณะ, 2000)

นอกจากนี้ยังมีปัจจัยทางสิ่งแวดล้อมที่มีผลต่อการย่อยสลายโดยชีวภาพด้วยการควบคุมสภาวะแวดล้อมในดิน สามารถเพิ่มประสิทธิภาพการย่อยสลายสาร PAHs ได้ เพื่อให้เกิดสภาวะที่เหมาะสมต่อการย่อยสลายอาจทำได้โดยการควบคุม pH และอัตราส่วน C: N: P การเติมปูนขาว สารอาหาร หรือปุ๋ยตามความเหมาะสม การควบคุมความชื้นในดิน การให้อากาศการควบคุม

อุณหภูมิ และการรักษาระดับของอุณหภูมิให้คงที่ รวมถึงการเติมสารลดแรงตึงผิว เพื่อช่วยเพิ่มการละลายสารไฮโดรคาร์บอนเพื่อที่แบคทีเรียสามารถจะย่อยสลายได้ง่ายขึ้น (Zhang และ Miller, 1992; Shreve และคณะ, 1995)

สารลดแรงตึงผิว (surfactants)

สารลดแรงตึงผิวหมายถึงสารที่มีสมบัติลดแรงตึงผิว มีโครงสร้างเป็นแบบแอมฟิพาติก (amphipatic structure) ซึ่งประกอบด้วยส่วนที่มีขั้ว หรือส่วนที่ชอบน้ำ (hydrophilic portion) ส่วนใหญ่ได้แก่ โปรตีน และน้ำตาลซึ่งจะเป็นโมเลกุลที่มีหมู่คาร์บอกซิลิก หมู่ไฮดรอกซิล หมู่อะมิโน หมู่ฟอสเฟต เป็นต้น กับส่วนที่ไม่มีขั้วเป็นส่วนที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic portion) หรือส่วนที่ชอบไขมัน (lipophilic portion) เป็นโมเลกุลพวกไฮโดรคาร์บอน เช่น กรดไขมันทั้งชนิดอิ่มตัว (saturated fatty acid) และไม่อิ่มตัว (unsaturated fatty acid) มีทั้งโมเลกุลใหญ่และโมเลกุลเล็ก ซึ่งจะทำให้ประสิทธิภาพของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพแตกต่างกันไป ดังรูปที่ 2.2



รูปที่ 2.2 แสดงลักษณะโครงสร้างโดยทั่วไปของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ (Fiechter, 1992)

ค่าความเข้มข้นของจุดวิกฤตของการเกิดไมเซลล์ (Cretical Micelle Concentration, CMC)

เมื่อสารลดแรงตึงผิวละลายอยู่ในตัวทำละลายไม่ว่าจะเป็นสารที่มีขั้วหรือไม่มีขั้ว จะเกิดโครงสร้างที่เรียกว่าไมเซลล์ (micelle) และสารลดแรงตึงผิวต่างชนิดกันจะให้ค่าของความเข้มข้นที่น้อยที่สุด ที่ก่อให้เกิดไมเซลล์ ซึ่งเรียกว่าจุดวิกฤตของการเกิดไมเซลล์ หรือ CMC ที่แตกต่างกัน ค่า CMC นี้แสดงประสิทธิภาพการละลายของสารลดแรงตึงผิวในตัวทำละลาย หรือความเข้มข้นที่น้อยที่สุด ซึ่งทำให้ค่าแรงตึงผิวต่ำที่สุด (Lin, 1996) เมื่อความเข้มข้นเพิ่มขึ้น ก็ไม่สามารถลดแรงตึงผิวของสารละลายได้อีก โดย CMC มีหน่วยเป็นความเข้มข้นของสาร เช่น มิลลิกรัมต่อลิตร (mg/l) โมลาร์ (M) และเปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร (%v/v) ซึ่งถ้าสารลดแรงตึงผิวใดมีค่า CMC ต่ำๆ แสดงว่านำสารไปใช้เพียงเล็กน้อยก็สามารถลดแรงตึงผิวของสารละลายได้ ดังนั้นค่า CMC จึงสามารถบอกประสิทธิภาพของสารลดแรงตึงผิวได้ว่ามีประสิทธิภาพดีหรือไม่

นอกจากนี้ในระบบสเลอรี ที่ประกอบด้วยดิน และน้ำ สารลดแรงตึงผิวบางส่วนจะถูกดูดซับไว้ในอนุภาคดิน ทำให้ประสิทธิภาพในการลดแรงตึงผิวน้อยลง ทำให้ต้องใช้ปริมาณสารลดแรงตึงผิวมากขึ้นจึงจะก่อให้เกิดไมเซลล์ได้ในระบบ ซึ่งเรียกจุดวิกฤตของการเกิดไมเซลล์ในระบบสเลอรีนี้ว่า (Apparent Critical Micelle Concentration, ACMC) (Sun และ Puri, 1997; Chu, 2003)

ปัจจัยที่มีผลต่อค่า CMC ของสารลดแรงตึงผิว (Clint,1992)

พบว่าค่า CMC ของสารลดแรงตึงผิวมีผลกระทบจากปัจจัยต่างๆ ดังนี้

1. ขนาดของความเป็นขั้วหรือขนาดของส่วนที่ละลายน้ำ เช่น ถ้าในโมเลกุลของสารมีหมู่ฟอสเฟตจะมีค่า CMC สูง ถ้ามีกลุ่ม non-ionic จะทำให้มีค่า CMC ต่ำ

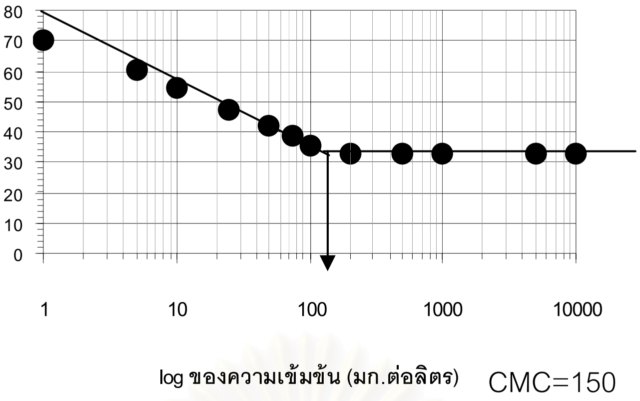
2. อิทธิพลของ counterions ถ้ามีสารที่มีประจุตรงข้ามในสารละลายมาก ค่า CMC จะลดลง เช่น เกลือแคลเซียมของสารซัลโฟเนต (sulphonate) จะมีค่าน้อยกว่าเมื่อเป็นเกลือโซเดียม

3. การเติมสารละลายอิเล็กโทรไลท์ เช่น โซเดียมคลอไรด์ โปแทสเซียมคลอไรด์ ลงในสารลดแรงตึงผิว จะทำให้ค่า CMC ที่ได้ต่ำลง

4. ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ของสารละลาย จะมีผลต่อสารลดแรงตึงผิวที่มีหมู่ที่มีขั้วในโมเลกุลเช่น $-NH_2$และ –COOH ค่า CMC จะมีค่าสูง เมื่อในสารละลายมีค่าความเป็นกรด-ด่างตรงกับหมู่ที่มีขั้วของสารลดแรงตึงผิว เช่น ค่าความเป็นกรด-ด่าง ต่ำๆ สารลดแรงตึงผิวที่มีหมู่$-NH_2$ จะมีค่า CMC สูง และ ที่ค่าความเป็นกรด-ด่างสูงๆ สารลดแรงตึงผิวที่มีหมู่ –COOH มีค่า CMC สูง เป็นต้น และค่า CMC จะต่ำเมื่ออยู่ในสารละลายเป็นกลาง

5. ความยาวโซ่ของสารประกอบไฮโดรคาร์บอน ความยาวของโซ่กิ่งหรือหมู่อัลคิลในโมเลกุลส่วนที่ไม่ละลายน้ำ ถ้ามีจำนวนหมู่อัลคิล ($-CH_2$) หรือจำนวนคาร์บอนอะตอมมากจะมีผลทำให้มีค่า CMC ต่ำ

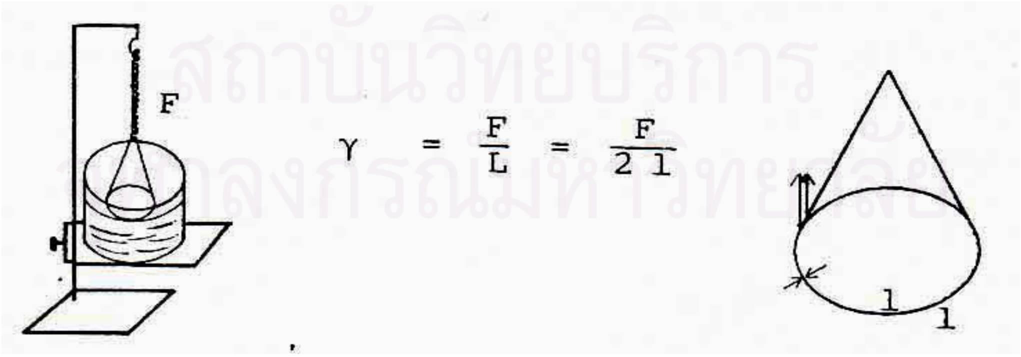
6. ผลของอุณหภูมิต่อสารลดแรงตึงผิวจากพวก non-ionic ถ้าอุณหภูมิสูงขึ้น ค่า CMC ของสารลดแรงตึงผิวของพวก non-ionic จะลดลง



รูปที่ 2.3 การหาค่าความเข้มข้นของจุดวิกฤตของการเกิดไมเซลล์ (Critical Micelle Concentration, CMC) (Duvnjak และคณะ, 1982)

ค่าที่แสดงถึงประสิทธิภาพของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ นอกจากค่า CMC ที่กล่าวข้างต้นแล้วยังมีอีกหลายค่าได้แก่

1. ค่าแรงตึงผิว (surfactant tension) หมายถึง แรงที่กระทำระหว่างของเหลวและอากาศ มีหน่วยเป็น มิลลินิวตันต่อเมตร หรือ dyne ต่อเมตร ซึ่งค่าแรงตึงผิวของน้ำบริสุทธิ์เท่ากับ 72 มิลลินิวตันต่อเมตร และสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ถือว่ามีประสิทธิภาพดีจะทำให้ค่าแรงตึงผิวลดลงเหลือ 35 มิลลินิวตันต่อเมตร (Kosaric, 1993) สามารถหาค่าแรงตึงผิวได้โดยใช้ เครื่องวัดแรงตึงผิว (Ring Tensiometer) ดังรูปที่ 2.4



รูปที่ 2.4 แสดงการหาค่าแรงตึงผิวของของเหลว

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

กำหนดให้ L = ความยาวของเส้นลวด เนื่องจากผิวฟิล์มทั้งสองผิว ดังนั้นความยาวของผิวที่ถูกแรงกระทำ จึงเป็น 2 เท่าของความยาวลวดคือ 2L

ถ้า γ = แรงตึงผิว ตามนิยามของแรงตึงผิว จะได้ $\gamma = \frac{F}{2L}$

แรงตึงผิวของของเหลวเกี่ยวข้องกับอุณหภูมิของของเหลวคือ ถ้าอุณหภูมิสูงขึ้น ค่าแรงตึงผิวจะลดลง เช่น ถ้าเราต้มผ้าในน้ำเดือดก็สามารถจะทำความสะอาดเสื้อผ้าได้ดีขึ้นเพราะน้ำมีแรงตึงผิวลดลง ดังแสดงในตารางที่ 2.2

ตารางที่ 2.2 ค่าแรงตึงผิวของของเหลวชนิดต่างๆ

ชนิดของเหลว ที่สัมผัสอากาศ	อุณหภูมิ (°ซ.)	ความตึงผิว (มิลลินิวตันต่อเมตร)
น้ำ	0	75.6
น้ำ	20	72.8
น้ำ	60	66.2
น้ำ	100	58.9
น้ำสบู่	20	25.0
เอทิลแอลกอฮอล์	20	22.3
กลีเซอรีน	20	63.1
เบนซีน	20	28.9
คาร์บอนเตตระคลอไรด์	20	26.8
ปรอท	20	46.5

2. ค่าแรงตึงระหว่างผิวประจัน (interfacial tension) หมายถึง แรงที่กระทำระหว่างของเหลวกับของเหลวที่มีวัฏภาคต่างกัน มีหน่วยเป็นมิลลินิวตันต่อเมตร การวัดแรงตึงผิวระหว่างผิวประจันจะวัดระหว่างน้ำและสารประกอบไฮโดรคาร์บอน เช่น น้ำมัน เฮกซาเด็กเคน (hexacane) หรือ น้ำมันก๊าด (kerosene) โดยทั่วไปค่าแรงตึงระหว่างผิวที่ประจันของน้ำกับเฮกซาเด็กเคนมีค่าเท่ากับ 50 มิลลินิวตันต่อเมตร และค่าแรงตึงระหว่างผิวประจันของน้ำกับน้ำมันก๊าดมีค่าเท่ากับ 30-40 มิลลินิวตันต่อเมตร ซึ่งเมื่อเติมสารลดแรงตึงผิวชีวภาพสามารถลดแรงตึงระหว่างผิวประจันลงเหลือ 0.1-1.0 มิลลินิวตันต่อเมตร (Gerson, 1993)

3. ค่าอิมัลชันอินเด็กซ์ การเกิดอิมัลชัน (emulsification) คือความสามารถในการทำให้น้ำและสารประกอบไฮโดรคาร์บอน เช่น น้ำมันปิโตรเลียม สารละลายอินทรีย์ และน้ำมันพืชชนิดต่างๆ รวมตัวเป็นเนื้อเดียวกัน ซึ่งสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจะทำให้เกิดอิมัลชันระหว่างน้ำกับสารประกอบไฮโดรคาร์บอน เป็นผลทำให้น้ำมันมีสภาพเป็นหยดเล็กๆ อยู่ในน้ำเป็นอิมัลชันชนิดน้ำมันในน้ำ (oil/water) เป็นการเพิ่มพื้นที่ผิวระหว่างน้ำและสารประกอบไฮโดรคาร์บอน (Cooper และ Zajic, 1980) การวัดประสิทธิภาพในการเกิดอิมัลชัน อาจทำด้วยการวัดค่าดัชนีอิมัลชัน เป็นการวัดอัตราส่วนระหว่างความสูงของอิมัลชันและความสูงของของเหลวในหลอดทั้งหมด เมื่อเวลาผ่านไป 24 ชั่วโมง (Patel และ Desai, 1997) และอาจวัดความเสถียรของอิมัลชันที่เกิดขึ้นโดยวัดค่าดัชนีอิมัลชันในระยะเวลาที่นานออกไป

ชนิดสารลดแรงตึงผิว สามารถแบ่งสารลดแรงตึงผิวเป็น 3 กลุ่ม ได้แก่

1 สารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์ (Synthetic surfactants)

เป็นสารลดแรงตึงผิวที่สังเคราะห์ขึ้นทางเคมี ตามปกติกิจกรรม และกระบวนการต่างๆ ทั้งในโรงงานอุตสาหกรรม และบ้านเรือนต้องอาศัยสารลดแรงตึงผิว ซึ่งเป็นสารลดแรงตึงผิวที่ได้จากการสังเคราะห์มากกว่าสารลดแรงตึงผิวที่ได้จากธรรมชาติ สารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์ที่ผลิตได้จากปิโตรเลียม เช่น แอกอฮอล์ อัลคิลเบนซีน อัลคิลฟีนอล หรือผลิตจากวัตถุดิบธรรมชาติ เช่น ได้จากน้ำมันพืช น้ำมันสัตว์ ไขมัน กรดไขมัน และแอลกอฮอล์ คาร์โบไฮเดรต เป็นต้น โดยผ่านกระบวนการเปลี่ยนแปลงทางเคมี ตัวอย่างของสารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์ที่ดีที่สุดคือ ดีเทอร์เจนท์ (detergent) ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ที่ใช้ในการทำความสะอาด โดยมีส่วนประกอบหลักเป็นสารลดแรงตึงผิว (Clint, 1992)

ชนิดของสารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์ (Clint, 1992) สามารถจำแนกชนิดของสารลดแรงตึงผิว โดยอาศัยความแตกต่างในโครงสร้างของโมเลกุล ได้ดังนี้

1.1 Anionic surfactants (สารลดแรงตึงผิวประจุลบ) ตัวอย่างของสารลดแรงตึงผิวกลุ่มนี้ประกอบด้วยสบู่ และสารดีเทอร์เจนท์สังเคราะห์ในยุคต้นๆ ซึ่งประกอบด้วยซัลโฟเนต (sulphonates ($-SO_3$)) และซัลเฟต (sulphates ($-SO_4$)) ทั้งหมดยังคงเป็นสารลดแรงตึงผิวที่นิยมใช้ในงานทำความสะอาด โดยที่ซัลโฟเนต และซัลเฟต มีสมบัติเหนือกว่าคาร์บอกซิเลต (Carboxylates) โดยสามารถทนต่ออิออนของโลหะในน้ำกระด้างได้ดีมาก

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

1.2 Cationic surfactants (สารลดแรงตึงผิวประจุบวก) มักจะเป็นพวกควอเทอร์นารีแอมโมเนียม (quatermary ammonium) อิมมิดาโซลิเนียม (imidazolinium) หรือสารประกอบ อัลคิลไพริดิเนียม (alkyl pyridinium) ในทางปฏิบัติประจุบวกที่กลุ่มหัว (head group) ของมันจะทำให้สามารถจับกับประจุลบบนเส้นใย เช่น ฝ้าย และผมได้แน่นมาก จึงนิยมใช้ในงานที่เกี่ยวกับผ้า และในครีมนวดผม

1.3 Zwitterionic surfactants หรือ Amphoteric surfactants เป็นสารลดแรงตึงผิวที่โครงสร้างโมเลกุลประกอบด้วยทั้งประจุลบ และประจุบวก มีโครงสร้างของบีเทน (betaines ($-N^+(CH_3)_2CH_2SO_3^-$)) หรือ ซัลโฟบีเทน (sulphobetaines ($-N^+(CH_3)_2CH_2SO_3^-$)) สารประกอบกลุ่มนี้ให้ความละมุนต่อผิวหนังมากกว่าสารลดแรงตึงผิวประจุลบ และระคายเคืองตาน้อยมาก จึงนิยมใช้กับแชมพูเด็ก

1.4 Non-ionic surfactants เป็นสารลดแรงตึงผิวที่ไร้ประจุ ตัวอย่างที่สำคัญ ได้แก่ เอทอกซิเลต (ethoxylate ($(OCH_2CH_2)_n OH$)) ที่ใช้งานอย่างกว้างขวางสำหรับการชะล้างโดยสามารถทำให้เกิดอีมัลชั่นที่อุณหภูมิต่ำ สารลดแรงตึงผิวในกลุ่มนี้ เรียกอีกอย่างว่าสารประกอบเซมิโพลาร์ (semi-polar) เช่น amine oxides, sulphoxide และ phosphine oxides โครงสร้างของโมเลกุลส่วนใหญ่มักจะประกอบด้วยเอธิลีนออกไซด์ (ethylene oxide chain) ซึ่งเป็นส่วนที่ละลายน้ำ (hydrophilic part) ข้อดีของสารกลุ่มนี้คือ ไม่เป็นพิษสามารถใช้ได้กับค่าความเป็นกรด-ด่างในช่วงกว้าง

1.5 Combination surfactants คือสารลดแรงตึงผิวที่รวมเอา non-ionic และกลุ่ม anionic เข้าไว้ด้วยกันเช่น alkyl ethoxy sulphate

2 สารลดแรงตึงผิวธรรมชาติ (natural surfactant)

สารลดแรงตึงผิวสามารถพบได้ในธรรมชาติ ในสิ่งมีชีวิตทั่วไป และมีความสำคัญต่อสิ่งมีชีวิต เช่น ในเยื่อหุ้มเซลล์ที่มีฟอสโฟลิปิด (phospholipid) ฟอสโฟลิปิดนี้จะทำหน้าที่เป็นสารลดแรงตึงผิวในเยื่อเซลล์ ในน้ำนมไขมันส่วนใหญ่จะอยู่ในรูปไตรกลีเซอไรด์ แต่มีจำนวนน้อยที่อยู่ในรูปฟอสโฟลิปิด และ ไดกลีเซอไรด์ ซึ่งเป็นสารลดแรงตึงผิวที่ช่วยให้อีมัลชั่นในนมเสถียร ในระหว่างกระบวนการย่อยอาหารจำพวกไขมันจะถูกทำให้เป็นอีมัลชั่น โดยฟอสโฟลิปิด หรือโมโนกลีเซอไรด์ จากนั้นเอนไซม์ไลเปส (lipase) จากตับอ่อนจะย่อยไตรกลีเซอรไรด์ ที่อยู่ในรูปของ

อิมัลชันน้ำมันในน้ำ (oil/water) อิมัลชันนี้จะถูกเปลี่ยนให้เป็นไขมันอิสระและไมโนกลีเซอไรด์ ซึ่งทั้งสองเป็นสารลดแรงตึงผิวที่แรง และสามารถเกิดไมเซลล์ร่วมกับเกลือน้ำดี ได้เป็นไขมันละลายง่าย (solubilised fat) ที่จำเป็นซึ่งสามารถผ่านผนังลำไส้ได้ เกลือน้ำดี ซึ่งเป็นสารลดแรงตึงผิวนี้จะผลิตขึ้นในตับและนำไปเก็บไว้ในถุงน้ำดี สารลดแรงตึงผิวที่พบในระบบเลือด ได้แก่ ซีรัมอัลบูมินซึ่งมีคุณสมบัติเป็นสารก่ออีมัลชั่นที่ดี สารลดแรงตึงผิวที่ได้จากธรรมชาติอื่นๆ เช่น อคาเซีย(acacia) เจลาติน (gelatin) ลาโนลิน (lanolin) ขี้ผึ้ง (beewax) เลซิติน (lecithin) ไซโคลเดกซ์ตริน (cyclodextrin) และแซพโพนิน (saponin) เป็นต้น (Clint, 1992)

3 สารลดแรงตึงผิวชีวภาพ (Biosurfactant)

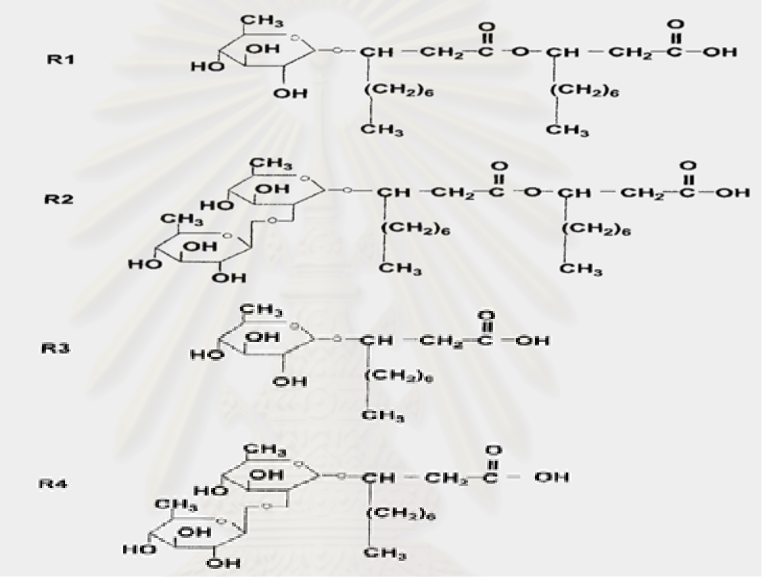
จุลชีพทั้งโปรคาริโอต และยูคาริโอต สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวได้ (Lang, 2002) สารลดแรงตึงผิวที่ผลิตโดยจุลินทรีย์ มักจะเป็นพวกไขมัน (lipids) สมบัติของสาร ลดแรงตึงผิวเหล่านี้ เป็นผลมาจากการรวมกันของความมีขั้วไว้ในโมเลกุลเดียวกับความไม่มีขั้วหรือส่วนที่ไม่ละลายน้ำจะเป็นสารประกอบไฮโดรคาร์บอนทั่วไปตัวอย่างเช่น สายโซ่ไฮโดรคาร์บอนของกรดไขมัน ความมีขั้วหรือกลุ่มที่ละลายน้ำ ได้แก่ กลุ่มที่ทำหน้าที่เอสเทอร์ และแอลกอฮอล์ของไขมันฟอสเฟตที่ส่วนประกอบของฟอสโฟลิปิด และน้ำตาลของไกลโคลิปิด (Cooper และ Zajic,1980)

จุลินทรีย์สามารถผลิตได้ทั้งสารลดแรงตึงผิวที่มีน้ำหนักโมเลกุลมากและน้อย ชนิดที่มีน้ำหนักโมเลกุลน้อยจะเป็นพวกไกลโคลิปิด หรือ เพพติดิลลิปิด (ไลโพเพพไทด์) สารพวกไกลโคลิปิด ได้แก่ ทรีฮาโลส และ ไดโครีนโนมัยคอเลต ซอโฟโรลิปิด และ แรมโนลิปิด สารพวกเพพติดิลลิปิด ได้แก่ เซอแฟคติน วิสคอซิน และ พอลิมิกซิน ที่มีคุณสมบัติยับยั้งแบคทีเรียได้ สำหรับสารลดแรงตึงผิวที่มีน้ำหนักโมเลกุลมาก จะเป็นสารพวก แอมพิฟิลิก ไลโพพอลิแซคคาไรด์ ไลโพโปรตีน หรือเป็นสารประกอบเหล่านี้รวมกัน (combination) (Rosenberg และ Ron, 1999)

สารลดแรงตึงผิวชีวภาพจำแนกตามส่วนประกอบทางเคมี และชนิดของจุลินทรีย์ที่สร้างสารลดแรงตึงผิวนั้นๆ ซึ่งโครงสร้างทางเคมีของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพประกอบด้วยส่วนที่ชอบน้ำ (hydrophilic moeity) อันได้แก่ กรดอะมิโนหรือเพพไทด์ที่เป็นประจุบวกหรือลบ น้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวหรือโมเลกุลคู่หรือเป็นสายยาว และส่วนที่ไม่ชอบน้ำ ได้แก่ สารประกอบของไขมันทั้งไขมันอิ่มตัวและไขมันไม่อิ่มตัว ซึ่งสามารถจัดจำแนกสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้เป็น 5 ประเภท ดังต่อไปนี้ (Banat, 1995; Catherine, 2005)

1. ไกลโคลิปิด (Glycolipids) เป็นสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ประกอบด้วยคาร์โบไฮเดรต หรือน้ำตาลเชื่อมต่อกับไขมัน เช่น

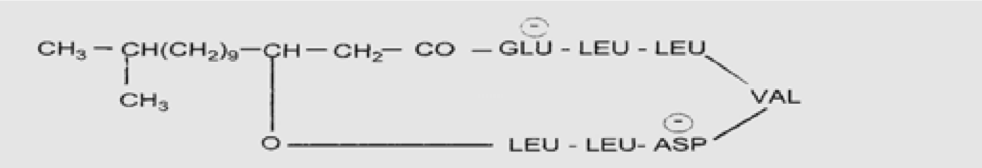
- แรมโนลิปิด (Rhamnolipids) ผลิตโดย *Pseudomonas aeruginosa*
- ซอโฟโรลิปิด (Sophorolipids) ผลิตโดย *Torulopsis* sp.
- ทรีฮาโลลิปิด (Trehalolipids) ผลิตโดย *Rhodococcus erythropolis*
- ไกลโคลิปิด (Glycolipids) ผลิตโดย *Alcanivorax borkumensis*



รูปที่ 2.5 สูตรโครงสร้างแรมโนลิปิด ชนิดต่างๆที่ผลิตได้โดย *P. aeruginosa* (Mulligan, 2005)

2. ไลโพเพพไทด์ (lipopeptides) และ ไลโพโปรตีน (lipoproteins) ประกอบด้วยกรดอะมิโนเชื่อมต่อกับไขมัน เช่น

- ไลเคนนิซิน (lichenysin) ผลิตโดย *Bacillus lichenformis*
- เซอร์แฟคติน (surfactin) ผลิตโดย *B. subtilis*
- ซับทิลิซิน (subtilisin) ผลิตโดย *B. subtilis*
- เซอร์ราเวตติน (serrawettin) ผลิตโดย *Serratia marcescens*
- อาร์โทรแฟคติน (arthrofactin) ผลิตโดย *Arthrobacter* sp.
- สเตรปโตแฟคติน (streptofactin) ผลิตโดย *Streptomyces tendae*



รูปที่ 2.6 สูตรโครงสร้างเซอร์แฟคติน (Mulligan, 2005)

3. กรดไขมัน (Fatty acids) และ ไขมัน (Neutral lipids) เช่น

- รูบิเวตติน R1 (rubiwettin R1) ผลิตโดย *Serratia rubidaea*
- ออร์นิธีนลิปิด (ornithinelipids) ผลิตโดย *Pseudomonas rubescens*

4. ฟอสโฟลิพิด (phospholipisds) ประกอบด้วยฟอสเฟต เชื่อมต่อกับกรดไขมัน และกลีเซอรอล เช่น

- ฟอสฟาทิดิลกลีเซอรอล (phosphatidylglycerol) ผลิตโดย *Thiobacillus thioxidans*
- ฟอสฟาทิดิลไลโนซิทอล (phosphatidylinositol) ผลิตโดย *T. thioxidans*
- ฟอสฟาทิดิก แอซิด (phosphatidic acid) ผลิตโดย *T. thioxidans*

5. สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่มีโครงสร้างเป็นพอลิเมอร์ (polymeric biosurfactants) เป็นสารประกอบโปรตีนของโพลีแซกคาไรด์อื่นๆ (polysaccharide-protein complexs) เช่น

- อิมัลซาน (emulsan) ผลิตโดย *Acinetobacter calcoaceticus*
- อลาซาน (alasan) ผลิตโดย *A. radioresistaens*
- ไบโอดิสเพอร์ซาน (biodispersan) ผลิตโดย *A. calcoaceticus*

6. สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่มีลักษณะเป็นอนุภาค (Particulate biosurfactants) ประกอบด้วยโปรตีน ฟอสโฟลิปิด และ ไลโพพอลิแซกคาไรด์ ที่สะสมอยู่บนเซลล์ของจุลินทรีย์ (extracellular membrare vesicles) แล้วเปลี่ยนรูปเป็น microemulsion มีส่วนช่วยในการนำสารจำพวกไฮโดรคาร์บอนเข้าสู่เซลล์ เช่น vesicle และ fimbriae ที่ผลิตจาก *A. calcoaceticus*

สามารถเปรียบเทียบสมบัติของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพและสารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์ได้ดังตารางที่ 2.3

ตารางที่ 2.3 สมบัติของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพและสารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์ (Kosaric, 1993)

ชนิดของสารลดแรงตึงผิว	จุลินทรีย์	ค่าแรงตึงผิว (มิลลินิวตัน/เมตร)	ค่าCMC (มก.ต่อลิตร)
Rhamnolipids	*Pseudomonas aeruginosa*	29	50-240
	Rhodococcus erythropolis	30	20
Treharolipids	*Nocardia erythropolis*	30	20
	Mycobacterium sp.	38	0.3
	Torulopsis bombicola	33	-
Sophorolipids	*T. apiclola*	30	-
	Rhodococcus ruber	26.8	54
Glycolipids	*Bacillus licheniformis*	27	12-20
Peptide lipid	*Serratia marcescens*	28-33	-
Serrawettin	*Pseudomonas fluorescens*	26.5	150
Vicosin	*Bacillus subtills*	27-32	23-160
Surfactin	*Arthrobacter sp.*	24	-
Arthrofactin			
		37	2,120
Sodium dodecyl			
sulfate (SDS)		30	1,300
Cetyltrimethyl		30	600
ammonium Bromide		47	590
(CTAB)		31	120
Tween 20			
Linear alkylbenzene			
suffonate			
Triton X-100			

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารลดแรงตึงผิวมีความเป็นพิษมากหรือน้อยขึ้นกับชนิดของสารลดแรงตึงผิว สามารถเปรียบเทียบความเป็นพิษของสารลดแรงตึงผิวได้ดังตารางที่ 2.4

ตารางที่ 2.4 ความเป็นพิษ (Toxicity) ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพและสารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์ (Ivshina และคณะ 1998)

ชนิดของสารลดแรงตึงผิว (Surfactant)	ค่าความเป็นพิษ IC_{50} of *Vibrio fischeri* (mg/l)
Rhodococcus ruber Glycolipid complex	650
Rhodococcus erythropolis Trehalose tetraester	286
Nonylphenol- $(ethylenoxide)_9$- acetate (EQ 9)	78
Sucrose stearate (DK50)	67
Finasol OSR-5	7
Corexit 9597	5
Inipol EAP 22	0.4

สารลดแรงตึงผิวชีวภาพสามารถนำไปใช้ประโยชน์ และประยุกต์ใช้ได้ ดังนี้

1. สารก่อเกิดอิมัลชัน (emulsifier) เป็นสารที่ช่วยทำให้เกิดอิมัลชันหรือทำให้สารที่มีขั้วต่างกันผสมกันได้ดีขึ้น
2. สารแยกวัฏภาค (phase separation) เป็นสารที่ช่วยแยกวัฏภาคสองวัฏภาคที่ต่างกันแยกออกจากกัน
3. สารเปียก (wetting agent) ที่เป็นสารที่ช่วยทำให้มีความเปียกชื้นอยู่เสมอ
4. สารช่วยเพิ่มการละลาย (solubilisation) เป็นสารที่ช่วยทำให้สารบางชนิดเกิดการละลายได้ดีขึ้น
5. สารก่อฟอง (foaming agent) เป็นสารที่ช่วยทำให้เกิดฟองในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางค์
6. สารลดการเกิดสนิม (corrosion-inhibition) เป็นสารที่ช่วยยับยั้งการกัดกร่อนที่เกิดจากสนิม
7. สารลดความหนืด (viscosity-reduction) เป็นสารที่ช่วยลดความหนืดของสาร

สารลดแรงตึงผิวชีวภาพมีข้อเสียคือราคาสูงเนื่องจากกระบวนการผลิต และการทำให้บริสุทธิ์ ถึงแม้ว่าสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจะมีราคาสูง แต่ก็มีข้อดีหลายอย่างคือ สามารถย่อยสลายได้โดยธรรมชาติ (biodegradability) และมีความเป็นพิษน้อย (low toxic) (Poremba และ

คณะ, 1991; Munstermann และคณะ, 1992) นอกจากนี้ในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพสามารถลดต้นทุนการผลิตลงได้โดยการคัดเลือกจุลินทรีย์ที่สามารถใช้ซับสเตรทที่มีราคาถูกได้ เช่นของเสียจากโรงงานอุตสาหกรรม (oils/fats) (Makkar และ Cameotra, 1999; Haba และคณะ , 2000; Veenanadig และคณะ, 2000) สามารถสรุปข้อดีของการใช้สารลดแรงตึงผิวได้ดังนี้

1. สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตโดยจุลินทรีย์มีโครงสร้างหลากหลายสามารถเลือกนำไปใช้ให้เหมาะสมกับงาน

2. สารลดแรงตึงผิวชีวภาพสามารถผลิตจากสารตั้งต้นที่นำกลับมาใช้ใหม่ได้ (renewable substrate)

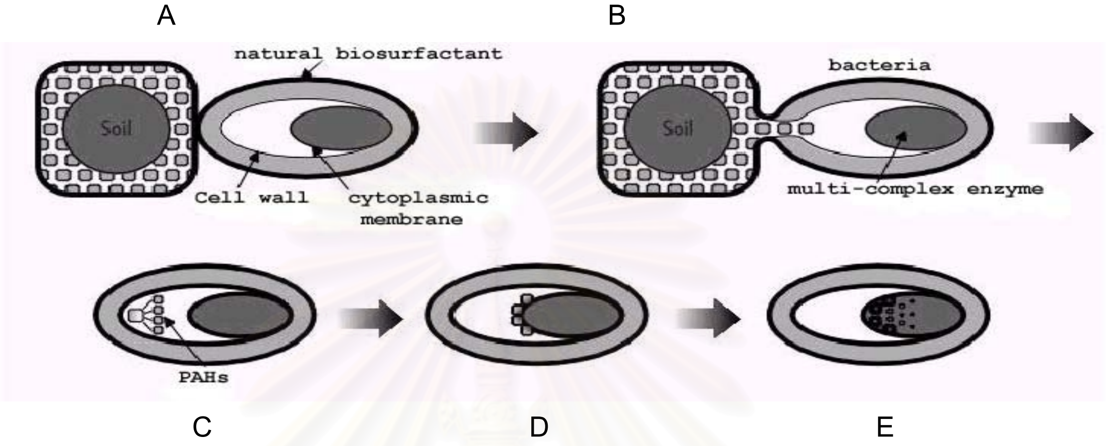
3. สามารถปรับปรุงสายพันธุ์ของจุลินทรีย์โดยใช้เทคนิคทางพันธุวิศวกรรมศาสตร์ (genetic engineering) หรือเทคนิคทางเคมี เพื่อให้เชื้อมีความสามารถในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพให้มีประสิทธิภาพดียิ่งขึ้น

4. สารลดแรงตึงผิวชีวภาพสลายตัวได้ง่ายไม่ตกค้างอยู่ในสิ่งแวดล้อม และมีความเป็นพิษต่อสิ่งมีชีวิตต่ำ และผลิตภัณฑ์ที่นำไปใช้ในกระบวนการผลิต ซึ่งถ้าเป็นสารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์นี้จะสลายตัวยากจึงอาจเกิดปัญหาเป็นพิษต่อสิ่งแวดล้อมได้ในอนาคตสมบัติของแบคทีเรียที่มีผลต่อการย่อยสลายสาร PAHs ในสิ่งแวดล้อม

มีรายงานจำนวนมาก บ่งชี้ว่าแบคทีเรียหลายชนิดมีความสามารถในการปรับตัวให้เข้ากับสิ่งแวดล้อมที่มีสารเคมีที่มีสมบัติไฮโดรโฟบิก ซึ่งโดยทั่วไปการนำสารประกอบเหล่านี้ไปใช้ในการเจริญอาจจะไม่เหมาะสมหรือง่ายนัก จากหลักฐานทางการทดลองและทฤษฎีแสดงให้เห็นว่า การย่อยสลายสาร PAHs จำเป็นต้องอาศัยกลไกต่างๆ ของแบคทีเรียเพื่อช่วยส่งเสริมการนำสารไปใช้ประโยชน์ (Wick และคณะ, 2002) ได้แก่ระบบการนำสารผ่านเข้าเซลล์ที่มีสัมพรรคภาพสูง (high-affinity uptake systems) ความสามารถในการยึดเกาะกับซับสเตรทที่เป็นของแข็ง การสร้างและปลดปล่อยสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพ โดยสารลดแรงตึงผิวชีวภาพเหล่านี้สามารถทำให้เกิดอิมัลชันที่เสถียร ซึ่งเป็นที่น่าสนใจว่าการเกิดอิมัลชันที่เสถียรนั้นจะทำให้แบคทีเรียสามารถยึดเกาะติดกับพื้นผิวของสารประกอบสารไม่ชอบน้ำได้อย่างแข็งแรง ทำให้เพิ่มความสามารถในการบำบัดสารโดยชีวภาพได้ (Rosenberg และ Rosenberg, 1981; Neu และคณะ, 1992)

จากกลไกดังกล่าวสามารถเพิ่มการละลายน้ำของสาร PAHs โดยช่วยให้แบคทีเรียสัมผัสกับสาร PAHs ได้ง่าย ปฏิกิริยาจะเกิดขึ้นที่ผนังเซลล์ จากนั้นสาร PAHs จะถูกส่งผ่านผนังเซลล์โดยการแพร่ (passive diffusion) โดยไม่ใช้พลังงานจากเซลล์ (Bugg และคณะ, 2000) เนื่องจาก

ผนังเซลล์ของแบคทีเรียประกอบด้วยชั้นฟอสโฟลิปิด เมื่อสาร PAHs เข้าสู่เซลล์ เอนไซม์ตัวแรกที่เริ่มการย่อยสลายคือ ออกซิจีเนส กระบวนต่างๆ จะดำเนินอย่างต่อเนื่องจนได้คาร์บอนไดออกไซด์ น้ำ และพลังงานที่ใช้ในการเจริญของแบคทีเรียโดยดังที่กล่าวมาข้างต้น โดยกระบวนการดังกล่าวจะเกิดอย่างสมบูรณ์ ต้องอาศัยกิจกรรมของเอนไซม์หลายชนิด (รูปที่ 2.9)



รูปที่ 2.7 การย่อยสลาย PAHs โดยแบคทีเรีย (Enzymetech, 2001)

(A คือ PAHs ถูกละลายโดยสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่แบคทีเรียสร้างขึ้น, B คือ PAHs แพร่ผ่านผนังเซลล์ของแบคทีเรีย, C คือ PAHs ถูกย่อยสลายโดยเอนไซม์ในกระบวนการย่อยสลายขั้นแรกภายในเซลล์แบคทีเรีย, D คือ PAHs แพร่ผ่านไซโตพลาสมิกเมมเบรนของแบคทีเรีย, E คือ การย่อยสลาย PAHs อย่างสมบูรณ์โดยเอนไซม์หลายชนิด)

Tiehm (1994) พบว่าความสามารถในการละลายของ PAHs จะขึ้นกับส่วนที่ไม่ชอบน้ำของสารลดแรงตึงผิว โดยสารลดแรงตึงผิวที่มีส่วนที่ไม่ชอบน้ำมากกว่าจะมีความสามารถในการละลายได้มากกว่าสารลดแรงตึงผิวที่มีส่วนที่ไม่ชอบน้ำน้อยกว่า และการทดลองของ Liu และคณะ (1995) พบว่า Brij 30 จะถูกย่อยสลายไปพร้อมๆ กับการสลายของแนพธาลีน แต่ Triton X-100 จะไม่ถูกสลายไปด้วย

พบว่าการเติมสารลดแรงตึงผิวชนิดไร้ประจุ และประจุบวก สามารถเพิ่มการย่อยสลายสารประกอบประเภท xenobiotic โดยวิธีทางชีวภาพในดินรวมถึง ฟีแนนทรีน ไบฟีนิล และไฮโดรคาร์บอนอื่นๆ (Aronstein และคณะ, 1991; Bury และ Miller, 1993; Bruheim และคณะ, 1999; Margesin และ Schinner, 1999) แต่พบว่าการใช้สารลดแรงตึงผิวชนิด nonionic ที่มีความเข้มข้นสูงกว่าค่า CMC จะยับยั้งกระบวนการย่อยสลายทางชีวภาพ (Aronstein และคณะ, 1991; Laha และ Luthy, 1992; Willumsen และคณะ, 1998)

สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตโดยแบคทีเรียสามารถช่วยให้การละลายของ PAHs ดีขึ้น เช่น แรมโนลิปิด ที่ผลิตโดย *Pseudomonas aeruginosa* (Deschênes และคณะ, 1996; Mulligan และคณะ, 2001; Noordman และคณะ, 1998) ไบโออิมัลซิฟายเออร์ อลาซาน ที่ผลิตโดย *Acinetobacter radioresisten* KA 53 พบว่าสามารถเพิ่มการละลายฟีแนนทรีน ได้ 6 เท่า ฟลูออแรนทีนได้ 25.7 เท่า และ ไพรีน ได้ 19.8 เท่า (Barkay และคณะ, 1999) และสารลดแรงตึงผิวชีวภาพผลิตโดย *Rhodococcus* strain H13-A มีประสิทธิภาพในการละลาย PAHs ไปสู่วัฏภาคน้ำได้ดีกว่า Tween 80 ถึง 35 เท่า (Page และคณะ, 1999)

Vipulanandan และ Ren (2000) เปรียบเทียบการใช้สารลดแรงตึงผิวในการละลายสาร PAHs ด้วยแรมโนลิปิด โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต (SDS) และ Triton X-100 พบว่าแรมโนลิปิด (10 มก./ลิตร) สามารถเพิ่มการละลายแนพธาลีน (30 มก./ลิตร) ได้มากกว่า SDS 30 เท่า แต่จะใช้เวลาในการย่อยสลายโดยวิธีชีวภาพเป็นเวลา 40 วัน ในขณะที่ Triton X-100 (10มก./ลิตร) ใช้เวลาในการย่อยสลาย 100 ชั่วโมง เนื่องจากสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจะถูกใช้เป็นแหล่งคาร์บอนก่อนจะเกิดการย่อยสลายแนพธาลีน

Deschênes และคณะ (1994) พบว่า แรมโนลิปิดที่ผลิตโดย *Pseudomonas aeruginosa* UG2 มีประสิทธิภาพในการสลายสาร PAHs ที่มีวงแหวนอะโรมาติก 4 วง ได้ดีกว่า SDS มากกว่า 5 เท่า

Providenti และคณะ (1995) ศึกษาผลของ *Pseudomonas aeruginosa* UG2 ที่มีต่อการย่อยสลายฟีแนนทรีน ในระบบสเลอรี (soil slurries) พบว่าสามารถลดระยะเวลาในช่วง lag phase ให้สั้นลง และเพิ่มอัตราการย่อยสลายฟีแนนทรีนได้มากขึ้น

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Rahman และคณะ (2002) พบว่าการเติมแรมโนลิปิด ที่ผลิตโดย *Pseudomonas* sp. DS10-129 ร่วมกับการเติมมูลสัตว์ปีก สามารถเพิ่มประสิทธิภาพการบำบัดดินที่ปนเปื้อนน้ำมันก๊าด (gasoline) ได้

Garcia-Junco และคณะ (2001) พบว่าการเติมแรมโนลิปิด ที่ผลิตโดย *Pseudomonas aeruginosa* สามารถทำให้จุลินทรีย์นำฟีแนนทรีนไปใช้ในการเจริญได้มากขึ้น (bioavailability) และส่งเสริมการย่อยสลายได้ดีขึ้น

Straube และคณะ (2003) ใช้แบคทีเรีย *Pseudomonas aeruginosa* strain 64 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่ไม่สามารถย่อยสลายสาร PAHs ร่วมกับการเติมสารอาหาร (biostimulation/bioaugmentation) เพื่อเพิ่มอัตราการย่อยสลายสาร PAHs ที่ปนเปื้อนในดิน พบว่าสาร PAHs ลดลง 87% และ เบนโซ[เอ]ไพรีน ลดลง 67% และเมื่อขยายขนาดการทดลอง พบว่าสาร PAHs ลดลง 86% และ เบนโซ[เอ]ไพรีน ลดลง 87% ในเวลา 16 เดือน เนื่องจากแบคทีเรียสายพันธุ์นี้มีการสร้างสารลดแรงตึงผิว ก่อให้เกิดการย่อยสลายสาร PAHs โดยชีวภาพขึ้น

จากสมบัติของสาร PAHs ที่มีความสามารถละลายน้ำได้น้อย และมีการเกาะตัวอย่างรวดเร็วกับตะกอนที่ถูกฝังอยู่ภายในดิน ทำให้ยากต่อการที่จุลินทรีย์เข้าไปสัมผัสและนำมาใช้ในการเจริญ ซึ่งเป็นข้อจำกัดในการบำบัดสารนี้ในดิน การเติมสารลดแรงตึงผิวสามารถเพิ่มการละลายของสาร PAHs ในน้ำ และทำให้มีอัตราการย่อยสลายเพิ่มขึ้น (Guerin และ Jones, 1988a, 1988b; Arostein และ Alexander, 1993; Tiehm, 1994; Jimenez และ Bartha, 1996; Cuny และคณะ, 1999; Van Hamme และ Ward, 1999) โดยมีรายงานว่า Tween 80 Triton X-100 สามารถชะ PAHs ไปยังวัฏภาคน้ำได้ (Grasso และคณะ, 2001; Cuypers และคณะ, 2002; Prak และ Prichard, 2002)

Pinto และ Moore (2000) พบว่า Tween 80 สามารถชะ PAHs ที่มีวงแหวน 4-5วง ออกจากดินได้ และส่งเสริมให้มีการย่อยสลายในวัฏภาคน้ำโดยจุลินทรีย์ และมีรายงานว่า เมื่อเติมเซอร์แฟคตินที่ยังไม่ผ่านการทำบริสุทธิ์ (crude surfactin) ที่มีความเข้มข้นมากกว่าค่า CMC สามารถส่งเสริมการย่อยสลายสารประกอบแอโรแมติกไฮโดรคาร์บอนได้ 41% (Olivera และคณะ, 2000)

Labare และ Alexander (1995) ทดลองบำบัดดินปนเปื้อน PAHs แบบสเลอรีด้วยอัตราส่วนดินต่อน้ำ 1:1 (กรัม/มล.) พบว่าสามารถส่งเสริมการเจริญ และการย่อยสลายฟีแนนทรีนได้ดีขึ้นจาก 4.4% เป็น 36.9% เนื่องจากน้ำจะช่วยเพิ่มพื้นที่ผิวสัมผัสระหว่างจุลินทรีย์ และฟีแนนทรีน การเพิ่มพื้นที่ผิวสัมผัสดังกล่าวเกิดจากดินแตกตัว ทำให้ PAHs เคลื่อนไปยังวัฏภาคน้ำอย่างรวดเร็ว รวมทั้งเพิ่มการเคลื่อนที่ของจุลินทรีย์ด้วย (Doick และ Semple, 2003) เช่นเดียวกับรายงานของ Fu และ Alexander (1995) ที่ทำการบำบัด PAHs ในสเลอรีดินด้วยอัตราส่วน 1:10

นภดล สว่างนาวิน (2547) ทดลองเติมแบคทีเรียที่สามารถสร้างสารลดแรงตึงผิว *P. aeruginosa* สายพันธุ์ A 41 และ *B. subtilis* สายพันธุ์ BBK1 ในการย่อยสลายน้ำมันดิบในอาหารเหลว BH sea ที่มีน้ำมันดิบ 1% ด้วย *Brevundimonas* sp. สายพันธุ์ HU2 พบว่า *P. aeruginosa* สายพันธุ์ A 41 และ *B. subtilis* สายพันธุ์ BBK1 สามารถส่งเสริมการเจริญและการย่อยสลายน้ำมันดิบโดย *Brevundimonas* sp. สายพันธุ์ HU2 ได้หมดภายในระยะเวลา 3 วัน สำหรับการเติมแรมโนลิปิด และเซอร์แฟคติน พบว่ามีประสิทธิภาพในการส่งเสริมย่อยสลายน้ำมันดิบใกล้เคียงกันที่ความเข้มข้นสูงกว่า เท่ากับและน้อยกว่าค่า CMC และมีประสิทธิภาพในการส่งเสริมการย่อยสลายน้ำมันดิบโดยแบคทีเรียสูงกว่า TritonX-100 และ เคมเทค 307 ตามลำดับ

ทิมากร แสงดำ (2547) ได้คัดแยกกลุ่มแบคทีเรีย STK จากปุ๋ยหมักใบมะขามใช้แผ่นโพลิเตตระฟลูออโรเอทธิลีน (PTFE) โดยกลุ่มแบคทีเรียประกอบด้วยแบคทีเรีย STK1 STK2 และ STK3 มีความคล้ายคลึงกับแบคทีเรียที่จัดอยู่ในจีนัส *Zoogloea* sp., *Stenotrophomonas* sp. และ *Mesorhizobium* sp. โดยมีเปอร์เซ็นต์ความคล้ายคลึง (%homology) เท่ากับ 99% สามารถย่อยสลายไพรีนได้หมดภายในเวลา 8 วัน ที่ความเข้มข้นของไพรีนเริ่มต้น 100 มก.ต่อลิตร และสามารถใช้สาร PAHs อื่นได้อีกหลายชนิด ได้แก่ ฟีแนนทรีน ไดเบนโซฟูแรน อะซีแนพธีน อะซีแนพธิลีน รวมทั้งสามารถย่อยสลายแอนทราซีน และฟลูออรีนได้เล็กน้อย ด้วยความสามารถในการย่อยสลาย PAHs ดังกล่าว ในการศึกษานี้ได้นำกลุ่มแบคทีเรีย STK มาใช้ในการบำบัดดินปนเปื้อนฟลูออรีน ฟีแนนทรีน และไพรีน ร่วมกับการเติมสารลดแรงตึงผิว และแบคทีเรียที่สามารถสร้างสารลดแรงตึงผิว ได้แก่ *P. aeruginosa* สายพันธุ์ A 41 (นิรันดร์ รุ่งสว่าง, 2542) และ *B. subtilis* สายพันธุ์ BBK1 (นพรัตน์ วานิชสุขสมบัติ, 2545) ในระบบสเลอรีอัตราส่วนดินต่อน้ำเท่ากับ 1:8 (กรัม/มล.)

บทที่ 3

อุปกรณ์ เคมีภัณฑ์ และวิธีดำเนินการวิจัย

3.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย

1. เครื่องชั่งรุ่น L2200P และA200S ของบริษัท Sartorious, USA
2. เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH meter) รุ่น 240 ของบริษัท Corning,USA
3. เครื่องนึ่งอบฆ่าเชื้อ (autoclave) ของบริษัท KaKusan, Japan
4. ตู้เขี่ยเชื้อแบบ ISSCO Laminar flow รุ่น BVT-124 ของบริษัท International Sciencetific Supply,USA
5. ไมโครปิเปต (micropipette) ขนาด 200 และ 1000 ไมโครลิตร ของบริษัท Drummond Scientific, USA
6. หัวกรอง ชนิด PTFE ขนาดความกว้างของรู 0.20 รุ่น DISMIC 13JP ขอบริษัท Tokyo Roshi Kaisha,japan
7. กระบอกฉีดยาพลาสติก ขนาด 1 มิลลิลิตร ของบริษัท Nissho Nipro,Japan
8. เครื่องปั่นผสม (vortex mixture) รุ่น G-560E ของบริษัท Scientific Industrie,USA
9. เครื่องกำเนิดเสียงความถี่สูง (sonicator) ชนิดอ่าง รุ่น FS400ของบริษัท Decan Ultrasonics,England10.
10. ตู้บ่มเชื้อ (incubator) รุ่น Hereaus type B 5050 E ของบริษัท Hereaus, Germany
11. เครื่องคัดกรองขนาดดิน ขนาดความกว้างของรู 1.18 มิลลิเมตร รุ่น O.S.K. 119 standard Sieve ของบริษัท Okawa Seiki,Japan.
12. เครื่องเขย่า (shaker) รุ่น Innova 2300 บริษัท New Brunswick Scientific, USA.
13. ตู้แช่แข็งจุดเยือกแข็งต่ำ อุณหภูมิ –20 ^{o}ซ บริษัท Sanyo Electric, Japan.
14. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) รุ่น Genesys20 บริษัท Thermo spectonic, Japan.
15. เครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดควบคุมอุณหภูมิ (refrigerated centrifuge) รุ่น Sorvall® Biofuge Stratos บริษัท Heraeus., Japan.
16. เครื่องระเหยแห้งแบบสุญญากาศ (rotary vacuum evaporator) รุ่น N-100 บริษัท Eyela, Japan.

17. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath) รุ่น digital water bath SB-1000 บริษัท Eyela, Japan.

18. เครื่องทำความเย็น (cooling) รุ่น CCA-1110 บริษัท Eyela, Japan.

19. เครื่องดูดอากาศ (aspirator) รุ่น A3-S บริษัท Eyela, Japan.

20. เครื่องวัดแรงตึงผิว (ring tensiometer) รุ่น K6 ของบริษัท Krüss, Germany

21. ชุดเครื่องแก๊สโครมาโตรกราฟี (Gas Chromatography, GC)

- เครื่องแก๊สโครมาโตรกราฟี รุ่น 6890N ของบริษัท Agilent Technologies, USA.
- เครื่องตรวจวัด (detector) ชนิด Flame Ionization Detector (FID)
- คอลัมน์ (column) ชนิด HP-5 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 320 ไมโครเมตร ยาว 30 เมตร หนา 0.25 ไมโครเมตร ภายในเคลือบด้วย เฟนนิล เมทิล ไซโลเซน ความเข้มข้น 5 % (5%-Phenyl)-methylpolysiloxane
- เข็มฉีดยาขนาดเล็ก (microsyrings) ขนาด 10 ไมโครลิตร
- แก๊สไฮโดรเจนชนิด ultra high purity ของบริษัท Thai Industrial Gas (TIG)
- แก๊สไนโตรเจนชนิด ultra high purity บริษัท Thai Industrial Gas (TIG)
- แก๊สฮีเลียมชนิด ultra high purity บริษัท Thai Industrial Gas (TIG)
- อากาศ (air zero) ชนิด ultra high purity บริษัท Thai Industrial Gas (TIG)

3.2 เคมีภัณฑ์

1. ฟีแนนทรีน (phenanthrene) บริษัท Sigma Chemical.USA
2. ฟลูออรีน (fluorene) บริษัท Sigma Chemical, USA
3. ไพรีน (pyrene) บริษัท Sigma Chemical, USA
4. ผงสกัดจากยีสต์ (yeast extract) บริษัท Difco Laboratories, USA
5. ทริปโตน (tryptone) บริษัท Difco Laboratories, USA
6. โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) บริษัท Merck, Germany
7. แอมโมเนียมไนเตรท (NH_4NO_3) บริษัท BDH Chemicals, Australia
8. ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ($Na_2HPO_4.12H_2O$) บริษัท Carlo ERBA, France
9. โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) บริษัท AJEX Chemicals, Australia
10. แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4.7H_2O$) บริษัท Carlo ERBA, France
11. โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) บริษัท Merck, Germany
12. เมทานอล (CH_3OH) บริษัท Merck, Germany

13. เอธิลอะซีเตต ($CH_3COO_2H_5$) บริษัท Merck, Germany
14. ไดคลอโรมีเทน (CH_2Cl_2) บริษัท Merck, Germany
15. ไดเอธิลอีเทอร์ ($(C_2H_5)_2O$) บริษัท Merck, Germany
16. อะซีโตน (CH_3COCH_3) บริษัท Merck, Germany
17. โซเดียมซัลเฟตแอนไฮดรัส (Anhydrous Na_2SO_4) บริษัท Merck, Germany
18. ไซโคลเฮกซามีด (Cyclohexamide) บริษัท Sigma Chemical, USA
19. เฟอริกคลอไรด์ ($FeCl_3.6H_2O$) บริษัท May & Baker, England
20. แคลเซียมคลอไรด์ ($CaCl_2.2H_2O$) บริษัท AJEX Chemicals, Australia
21. Triton X-100 บริษัท Sigma Chemical.USA
22. Brij 35 บริษัท Sigma Chemical.USA
23. Sodium Dodecyl Sulfate (SDS) บริษัท Sigma Chemical.USA
24. Cetyldimethylammoniumbromide (CTAB) บริษัท Sigma Chemical.USA
25. Tween 80 บริษัท Sigma Chemical.USA

3.3 จุลินทรีย์

ในงานวิจัยนี้มีการใช้กลุ่มแบคทีเรีย และแบคทีเรีย ดังนี้

แบคทีเรีย	เอกสารอ้างอิง
กลุ่มแบคทีเรีย STK	ทิมากร แสงดำ (2547)
Pseudomonas aeruginosa สายพันธุ์ A41	อารีย์ ก๋งฉิน (2542)
Bacillus subtilis สายพันธุ์ BBK1	นิรันดร์ รุ่งสว่าง (2542)

3.4 วิธีดำเนินการวิจัย

3.4.1 การเตรียมดิน ศึกษาลักษณะทางกายภาพและองค์ประกอบทางเคมีของดิน

เก็บตัวอย่างดินที่อุดมสมบูรณ์จากบริเวณริมคลองภาษีเจริญ เขตภาษีเจริญ กรุงเทพมหานคร โดยดูได้จากการเจริญเติบโตของพืชในดินบริเวณดังกล่าว และไม่มีการปนเปื้อนสารเคมีมาก่อน (สุพินดา ศิริวราศิลป์, 2545) ขุดดินลึกจากผิวหน้าดินประมาณ 15 ซม. แยกเศษใบไม้และหินออก ตรวจสอบการปนเปื้อนสาร PAHs โดยการสกัดและวิเคราะห์ด้วย GC-FID นำดินหนึ่งส่วนไปวิเคราะห์ลักษณะทางกายภาพ และองค์ประกอบทางเคมีของตัวอย่างดิน ส่งวิเคราะห์ที่ฝ่ายวิจัยดิน กองเกษตรเคมี กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ มีรายละเอียดในการวิเคราะห์ดังนี้ วิเคราะห์ลักษณะเนื้อดิน ค่าความเป็นกรดด่าง ปริมาณไนโตรเจน ฟอสฟอรัส สารอินทรีย์ (organic matter) และความจุสูงสุดในการอุ้มน้ำ (maximum water holding capacity) ส่วนดินที่เหลือนำมาคัดกรอง โดยใช้เครื่องคัดกรองขนาดดินเส้นผ่านศูนย์กลาง 1.18 มิลลิเมตร แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จนกว่าจะทำการทดลอง และเมื่อเริ่มต้นทดลองจะนำออกมาไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 สัปดาห์ ก่อนที่จะนำมาใช้ในการทดลอง

3.4.2 การผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

3.4.2.1 การผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพแรมโนลิปิด (Rhamnolipid)

ผลิตแรมโนลิปิด (นพรัตน์ วานิชสุขสมบัติ, 2545) ด้วยการเตรียมหัวเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* สายพันธุ์ A41 ลงบนอาหารแข็ง NA เพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 30 ^{o}ซ. เป็นเวลา 24 ช.ม. แล้วเขี่ยเชื้อ 1 โคโลนี ลงในอาหารเหลว difined medium ที่มีน้ำมันปาล์ม 2% เป็นแหล่งคาร์บอน ปริมาตร 50 มล. ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มล.นำไปเขย่าบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 ^{o}ซ. เป็นเวลา 16 ชม. แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโมเมตร มีค่าประมาณ 1 แล้วถ่ายเชื้อ 4% (ปริมาตรต่อปริมาตร) ลงในอาหารเหลว difined medium ที่เตรียมไว้ 3 ลิตร นำไปเขย่าบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 ^{o}ซ. เป็นเวลา 72 ชม. จากนั้นทำให้บริสุทธิ์บางส่วน โดยเก็บน้ำเลี้ยงเชื้อที่เวลา 72 ชม. นำมาปั่นแยกเซลล์ที่ ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที ได้ส่วนน้ำใสที่ปลอดเซลล์ ไปทดสอบค่าแรงตึงผิวด้วยเครื่องวัดแรงตึงผิว (ring tensiometer) (ภาคผนวก จ.) จากนั้นนำส่วนน้ำใสนี้ มาตกตะกอนด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 6 นอร์มัล จนมีความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 2 ทิ้งไว้ข้ามคืนที่อุณหภูมิ 4 ^{o}ซ. แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว

10,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 °ซ. นาน 30 นาที จากนั้นนำส่วนตะกอนที่ได้ล้างในน้ำกลั่นที่มีความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 2 แล้วปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 °ซ. เป็นเวลา 30 นาที ทำการปั่นเหวี่ยงซ้ำอีก 2 ครั้ง แล้วนำส่วนตะกอนมาละลายในบัฟเฟอร์ทริส ไฮโดรคลอไรด์ความเข้มข้น 1 โมลาร์ ที่มีค่าความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 8 จนตะกอนละลายหมดพอดี นำมาสกัดโดยใช้กรวยแยกด้วยสารละลายคลอโรฟอร์ม และเอทานอล อัตราส่วน 2:1 เขย่าเป็นเวลา 3 นาที ทิ้งไว้ให้แยกชั้น ทำการสกัดซ้ำอีก 2 ครั้ง แล้วจึงนำชั้นตัวทำละลายอินทรีย์มากำจัดน้ำออกโดยใช้โซเดียมซัลเฟตแอนไฮดรัส จนได้ตะกอนสีขาว (น้ำออกจากตัวทำละลายอินทรีย์หมด) กรองแยกตะกอนโซเดียมซัลเฟต นำตัวทำละลายอินทรีย์ที่ปราศจากน้ำ ไประเหยแห้งสุญญากาศ ควบคุมอุณหภูมิที่ 40 °ซ. จะได้สารซึ่งมีลักษณะเหนียวหนืด มีสีน้ำตาลไหม้ จากนั้นจึงนำไประเหยแห้งที่อุณหภูมิห้อง ในโถดูดความชื้น เป็นเวลา 4-5 วัน จะได้แรมโนลิปิดที่บริสุทธิ์บางส่วน (patially purified) มีสีน้ำตาลไหม้

3.4.2.2 **การผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพเซอร์แฟคติน** (Surfactin)

เตรียมหัวเชื้อ *Bacillus subtilis* สายพันธุ์ BBK-1 (นิรันดร์ รุ่งสว่าง, 2542) ลงบนอาหารแข็ง NA เพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 30 °ซ. เป็นเวลา 24 ชม. เขี่ยเชื้อ 1 โคโลนี ลงในอาหารเหลว LB ดัดแปลง (ภาคผนวก ก.) ที่มีโซเดียมคลอไรด์ 3% ปริมาตร 50 มล. ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มล. นำไปเขย่าบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 °ซ. เป็นเวลา 13 ช.ม แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร มีค่าประมาณ 2.5 ถ่ายเชื้อ 4% (ปริมาตรต่อปริมาตร) ลงในอาหารเหลว LB ที่มีโซเดียมคลอไรด์ 3% ที่เตรียมไว้ 3 ลิตร แล้วนำไปเขย่าบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 °ซ เป็นเวลา 48 ชม. จากนั้นทำให้บริสุทธิ์บางส่วน โดยเก็บน้ำเลี้ยงเชื้อที่เวลา 48 ชม. นำมาปั่นแยกเซลล์ที่ ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที ได้ส่วนน้ำใสที่ปลอดเซลล์ นำไปทดสอบค่าแรงตึงผิวด้วยเครื่องวัดแรงตึงผิว จากนั้นนำส่วนน้ำใสนี้ มาตกตะกอนด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 6 นอร์มัล จนมีความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 2 ทิ้งไว้ข้ามคืนที่อุณหภูมิ 4 °ซ. นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 °ซ. เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำส่วนตะกอนที่ได้ล้างในน้ำกลั่นที่มีความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 2 โดยปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 °ซ. เป็นเวลา 30 นาที ทำการปั่นเหวี่ยงซ้ำอีก 2 ครั้ง จากนั้นนำส่วนตะกอนมาสกัด โดยใช้กรวยแยกด้วยเมธานอล เขย่าเป็นเวลา 3 นาที ทิ้งไว้ให้แยกชั้น ทำการสกัดซ้ำอีก 2 ครั้ง แล้วจึงนำชั้นตัวทำละลายอินทรีย์มากำจัดน้ำออกโดยใช้โซเดียมซัลเฟตแอนไฮดรัส นำตัวทำละลายอินทรีย์ที่

ปราศจากน้ำ ไประเหยแห้งสุญญากาศ ควบคุมอุณหภูมิที่ 65 °ซ. จะได้สารซึ่งมีลักษณะเหนียวหนืด มีสีเหลืองน้ำตาล จากนั้นจึงนำไประเหยแห้งที่อุณหภูมิห้อง ในโถดูดความชื้น เป็นเวลา 4-5 วัน จะได้เซอร์แฟคตินที่บริสุทธิ์บางส่วนมีสีเหลือง

3.4.3 การทดสอบประสิทธิภาพของสารลดแรงตึงผิว

3.4.3.1 **หาจุดวิกฤตของการเกิดไมเซลล์** (Critical Micelle Concentration, CMC) นำสารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์ ชนิดละ 10 มล. ส่วนแรมโน ลิปิด และเซอร์แฟคติน ที่ผลิตได้ จากข้อ 3.4.2.1 และ 3.4.2.2 ชั่งน้ำหนักอย่างละ 5 มก. ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 10 มล. ปั่นผสมสารให้เข้ากัน หาค่า CMC ด้วยการเจือจางสารลดแรงตึงผิวในน้ำกลั่นที่ความเข้มข้นต่างๆ นำไปวัดค่าแรงตึงผิวด้วยเครื่องวัดค่าแรงตึงผิว นำค่าที่ได้ไปเขียนกราฟระหว่างค่าแรงตึงผิวกับค่า log ของเปอร์เซ็นต์ความเจือจาง (log percent dilution) เพื่อหาค่า CMC (Duvnjak และคณะ, 1982)

3.4.3.2 **หาจุดวิกฤตของการเกิดไมเซลล์ในสารละลายดิน** (Apparent Critical Micelle Concentration ,ACMC) ดัดแปลงจากวิธีของ Sun และ Puri (1997) โดยเติมสารละลายเจือจางสารลดแรงตึงผิวในน้ำกลั่นปลอดเชื้อที่ความเข้มข้นต่างๆ ชนิดละ 8 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดบรรจุดินปลอดเชื้อที่ไม่มีสาร PAHs 1 กรัม (อัตราส่วนดินต่อน้ำ 1:8) เขย่า 24 ชั่วโมง ปั่นเหวี่ยงเพื่อให้ดินตกตะกอนที่ความเร็ว 15,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที นำส่วนน้ำใสไปวัดค่าแรงตึงผิวด้วยเครื่องวัดแรงตึงผิว นำค่าที่ได้ไปเขียนกราฟระหว่างค่าแรงตึงผิวกับค่า log ของเปอร์เซ็นต์ความเจือจาง (log percent dilution) เพื่อหาค่า ACMC

3.4.4 **ทดสอบการชะ PAHs ออกจากดินเมื่อมีการเติมสารลดแรงตึงผิวที่มีความเข้มข้นต่าง ๆ** โดยการเติมสารลดแรงตึงผิวที่มีความเข้มข้นเท่ากับ 0.5, 1, 5, 10, 15 และ 20 เท่าของค่า ACMC ที่หาได้จากข้อ 3.4.3.2 ลงในดินปลอดเชื้อที่เติม PAHs 3 ชนิดได้แก่ ฟีแนนทรีน ฟลูออรีน และ ไพรีน โดยให้มีความเข้มข้นสุดท้ายของ PAHs ชนิดละ 0.1 มิลลิกรัมต่อดินแห้ง 1 กรัม และให้มีอัตราส่วนน้ำหนักดิน (กรัม) ต่อปริมาตรสารละลาย (มิลลิลิตร) เท่ากับ 1 ต่อ 8 (Laha และ Luthy, 1992) เขย่า 24 ชั่วโมง ทำการสกัดและวิเคราะห์หาปริมาณ PAHs ที่ถูกชะออกมาด้วย GC-FID โดยเก็บตัวอย่างดินเหลว นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 15,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที (Sun และ Puri, 1997) แยกส่วนน้ำออกจากดิน นำดิน 2 กรัมใส่ในขวดแก้ว เติมนอร์มอล-เฮกเซน 4 มล. และ Triton X-100 ความเข้มข้น 15% ปริมาตร 1.5 มล. วางใน

เครื่องเขย่าด้วยอัตราการเขย่า 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 6 ชั่วโมง และเก็บในตู้แช่เย็นอุณหภูมิ -4 องศาเซลเซียส ข้ามคืนเพื่อให้ดินเกาะตัว จากนั้นเติมโซเดียมซัลเฟตแอนไฮดรัส เพื่อกำจัดน้ำ และนำมากรองเก็บสารละลายโดยกรองผ่านโซเดียมซัลเฟตแอนไฮดรัส กรองด้วยหัวกรอง PTFE เก็บใส่หลอด GC นำส่วนน้ำ 2 มล. เติมนอร์มอล-เฮกเซน 2 มล.และ Triton X-100 ความเข้มข้น 15% ปริมาตร 0.4 มล. วางในเครื่องเขย่าด้วยอัตราการเขย่า 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 6 ชั่วโมง และเก็บในตู้แช่เย็นอุณหภูมิ -4 องศาเซลเซียส ข้ามคืนจากนั้นนำออกมาตั้งทิ้งให้แยกชั้น แยกส่วนเฮกเซนใส่หลอดใหม่ เติมโซเดียมซัลเฟตแอนไฮดรัส เพื่อกำจัดน้ำที่เหลืออยู่ ตั้งทิ้งให้ตกตะกอน แล้วกรองสารละลายด้วยหัวกรอง PTFE ใส่หลอด GC เก็บตัวอย่างที่สกัดได้ไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะทำการวิเคราะห์ปริมาณสารด้วย Gas Chromatography (GC) ที่มี detector ชนิด Flame Ionized Detector (FID) โดยกำหนดสภาวะดังนี้

อุณหภูมิของคอลัมน์	80	องศาเซลเซียส
อุณหภูมิของ Injector	280	องศาเซลเซียส
อุณหภูมิของ Detector	250	องศาเซลเซียส
อัตราการไหลเท่ากับ	9.52	psi
ปริมาณสารที่ฉีด	1	ไมโครลิตร

3.4.5 ศึกษาผลของสารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์ต่อกลุ่มแบคทีเรีย STK

เลี้ยงเชื้อกลุ่มแบคทีเรีย STK ในอาหารเหลว CFMM ปริมาตร 50 มล. ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มล. และเติมสารลดแรงตึงผิวชนิดต่างๆ ในแต่ละความเข้มข้น โดยให้มีความเข้มข้นสุดท้ายมากกว่า ACMC 0.5, 1, 5, 10, 15 และ 20 เท่าตามลำดับ เลี้ยงเชื้อบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เก็บตัวอย่างทุกวันตั้งแต่วันที่ 0 ถึงวันที่ 9 ศึกษาการเจริญของกลุ่มแบคทีเรียโดยวิธี viable plate count ด้วยการนำตัวอย่างมาเจือจางให้เหมาะสมด้วย โซเดียมคลอไรด์ 0.85 % นำมา 100 ไมโครลิตร เกลี่ยบนอาหารแข็ง LB บ่มเชื้อ 30 ^{o}ซ เป็นเวลา 5 วันแล้วนับจำนวนโคโลนี

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.4.6 ศึกษาผลการเติมสารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์ที่คัดเลือกได้ต่อความสามารถในการย่อยสลาย PAHs ในระบบสเลอรีโดยกลุ่มแบคทีเรีย STK อัตราส่วนดินต่อน้ำเท่ากับ 1 : 8 (กรัม/มล.)

3.4.6.1 เตรียมหัวเชื้อกลุ่มแบคทีเรีย STK ในอาหารเหลว CFMM ที่เติมไพรีน เลี้ยงเชื้อบนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ30 ^{o}ซ เป็นเวลา 8 วัน หลังจากนั้นนำมาปั่นแยกเซลล์แบคทีเรียด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาทีที่อุณหภูมิ 4 ^{o}ซ นาน 10 นาที นำส่วนเซลล์แบคทีเรียมาล้างในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.85 % ทำการปั่นเหวี่ยงในสภาวะเดิม โดยทำตามขั้นตอนนี้ 2 ซ้ำ นำส่วนเซลล์มาแขวนลอยในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.85 % นำเซลล์แขวนลอยมาวัดความขุ่นที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร และเจือจางให้มีค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 1.0 นำเซลล์แขวนลอยที่ปรับความเข้มข้นแล้วมาเขย่าบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชม. เพื่อให้แบคทีเรียใช้อาหารสะสมที่เหลืออยู่ในเซลล์ให้หมดไป

3.4.6.2 ชั่งดินน้ำหนัก 12 กรัม ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มล. นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส 45 นาที 3 ครั้ง ห่างกัน 1 คืน ทดสอบการปลอดเชื้อของดินก่อนนำมาใช้ในการทดลองด้วยการนำสารละลายดินเกลี่ยลงบนอาหารแข็ง LB นำดินที่เตรียมไว้เติมสาร PAHs ได้แก่ ฟลูออรีน ฟีแนนทรีน และไพรีน ที่ละลายในอะซีโตนกรองผ่านชุดกรองสำเร็จรูปชนิด PTFE ที่มีขนาดรูกรอง 0.2 ไมโครเมตร โดยให้มีความเข้มข้นสุดท้ายของ PAHs ชนิดละ 0.2 มิลลิกรัมต่อดินแห้ง 1 กรัม ผสมให้เข้ากัน คลายฝาออกตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 16 ชั่วโมงเพื่อให้อะซีโตนระเหย (Brinch และคณะ, 2002)

3.4.6.3 เตรียมสารลดแรงตึงผิวที่คัดเลือกได้แบบปลอดเชื้อ ด้วยความเข้มข้นที่คัดเลือกจากข้อ 3.4.4 โดยคำนวณเพื่อใช้สำหรับเติมลงในน้ำกลั่น ปริมาตร 96 มล. ที่มีดินปลอดเชื้อ 12 กรัม และมีการเติม PAHs เรียบร้อยแล้วจากข้อ 3.4.6.2. จากนั้นเติมหัวเชื้อกลุ่มแบคทีเรีย STK (resting cell) ปริมาตร 2 มล.(เชื้อเริ่มต้นประมาณ 10^{6} CFU ต่อดินเหลว 1 มล.) จะได้ปริมาตรสุทธิ 96 มล. (อัตราส่วนดิน:น้ำ เท่ากับ 1:8) นำไปเขย่าบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 ^{o}ซ. เป็นเวลา 9 วัน ทุกชุดทำการทดลอง 2 ซ้ำ เก็บตัวอย่างทุกวันตั้งแต่วันที่ 0, 1, 3, 5, 7 และ 9 ทำการสกัดและวิเคราะห์หาปริมาณ PAHs ที่เหลืออยู่ในวัฏภาคดินและน้ำด้วย GC-FID เช่นเดียวกับข้อ 3.4.4 แต่ละเวลาจะมีชุดการทดลองดังนี้

ชุดทดลอง เป็นชุดที่เติมสารละลายสารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์ต่างๆในดินที่มีสาร PAHs และเติมกลุ่มแบคทีเรีย STK

ชุดควบคุมที่ 1 เป็นชุดควบคุมการย่อยสลายสาร PAHs เนื่องจากปัจจัยทางกายภาพ (abiotic degradation) ที่มีการเติมสารละลายสารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์ แต่ไม่เติมกลุ่มแบคทีเรีย STK

ชุดควบคุมที่ 2 เป็นชุดควบคุมการย่อยสลายสาร PAHs เนื่องจากปัจจัยทางกายภาพ(abiotic degradation) ที่ไม่มีการเติมทั้งสารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์ และกลุ่มแบคทีเรีย STK

ชุดควบคุมที่ 3 เป็นชุดควบคุมการเพาะเลี้ยงกลุ่มแบคทีเรียที่ไม่มีการเติมสารลดแรงตึงผิว

3.4.6.4 ศึกษาการเจริญของกลุ่มแบคทีเรียโดยวิธี viable plate count โดยนำตัวอย่างมาเจือจางให้เหมาะสมด้วย โซเดียมคลอไรด์ 0.85 % นำมา 100 ไมโครลิตรเกลี่ยบนอาหารแข็ง LB บ่มเชื้อ 30 ^{O}ซ เป็นเวลา 5 วันแล้วนับจำนวนโคโลนี

3.4.7 ศึกษาผลของการเติมแบคทีเรียที่สร้างสารลดแรงตึงผิวต่อความสามารถในการย่อยสลายสาร PAHs โดยกลุ่มแบคทีเรีย STK และเปรียบเทียบกับการเติมสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในระบบสเลอรี อัตราส่วนดินต่อน้ำเท่ากับ 1:8 (กรัม/มล.)

เตรียมหัวเชื้อกลุ่มแบคทีเรีย STK ลงในอาหารตามข้อ 3.4.6.1 จากนั้นเติมหัวเชื้อของแบคทีเรียที่สร้างสารลดแรงตึงผิว *P.aeruginosa* สายพันธุ์ A41 หรือ *B. subtilis* สายพันธุ์ BBK1 ที่มีเชื้อเริ่มต้นประมาณ 10^{6} CFU ต่อ มล. ปริมาตร 400 ไมโครลิตร (20%) ลงไปแทนการเติมสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ เปรียบเทียบกับผลการเจริญของกลุ่มแบคทีเรีย และความสามารถในการย่อยสลาย PAHs เมื่อเติมสารลดแรงตึงผิวชีวภาพลงไป เตรียมการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 3.4.6 มีชุดการทดลองดังนี้

ชุดทดลองที่ 1 เป็นชุดเติมสารละลายสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ แรมโนลิปิด หรือเซอร์แฟคติน ร่วมกับกลุ่มแบคทีเรีย STK

ชุดทดลองที่ 2 เป็นชุดที่เติมแบคทีเรียที่สร้างสารลดแรงตึงผิว *P.aeruginosa* สายพันธุ์ A41 หรือ *B. subtilis* สายพันธุ์ BBK1 ร่วมกับกลุ่มแบคทีเรีย STK

ชุดควบคุมที่ 1 เป็นชุดควบคุมการย่อยสลายสาร PAHs เนื่องจากปัจจัยทางกายภาพ ที่เติมสารละลายสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ แต่ไม่เติมกลุ่มแบคทีเรีย STK

ชุดควบคุมที่ 2 เป็นชุดควบคุมการสลายสาร PAHs เนื่องจากปัจจัยทางกายภาพที่ไม่เติมทั้งสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ และแบคทีเรีย

ชุดควบคุมที่ 3 เป็นชุดควบคุมการเพาะเลี้ยงกลุ่มแบคทีเรีย STK ที่ไม่เติมสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

ชุดควบคุมที่ 4 เป็นชุดควบคุมทางชีวภาพ ที่เติมแบคทีเรียที่สร้างสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ *P.aeruginosa* สายพันธุ์ A41 หรือ *B. subtilis* สายพันธุ์ BBK1แต่ไม่เติมกลุ่มแบคทีเรีย STK

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 4

ผลการวิจัย

4.1 ผลการเตรียมดิน การศึกษาลักษณะทางกายภาพ และองค์ประกอบทางเคมีของดิน

ดินที่นำมาใช้ในการทดลองเก็บจากบริเวณริมคลองภาษีเจริญ เขตภาษีเจริญ จังหวัดกรุงเทพมหานคร เป็นลักษณะดินที่มีความอุดมสมบูรณ์ และไม่มีการปนเปื้อนสารเคมีมาก่อน โดยเมื่อนำไปสกัด และวิเคราะห์หาปริมาณ PAHs พบว่าไม่มีการปนเปื้อนสารดังกล่าว จากนั้นส่งดินไปวิเคราะห์ลักษณะทางกายภาพ และองค์ประกอบทางเคมีของดินที่ฝ่ายวิจัยดิน กองเกษตรเคมี กระทรวงเกษตร และสหกรณ์ ได้ผลวิเคราะห์ดังตาราง 4.1

ตารางที่ 4.1 ลักษณะทางกายภาพ และองค์ประกอบทางเคมีของดิน

คุณสมบัติ	ค่าการวิเคราะห์
ลักษณะดิน	ดินร่วนปนทราย
ค่าความเป็นกรด ด่าง	6.2
ค่าความจุการอุ้มน้ำ (%)	33.74
ปริมาณความชื้น (%)	2.77
ปริมาณสารอินทรีย์ (%)	11.68
ปริมาณคาร์บอน (%)	1.23
ปริมาณไนโตรเจน (%)	0.10
ปริมาณฟอสฟอรัส (ppm)	180
ปริมาณโพแตสเซียม (ppm)	102
ปริมาณแคลเซียม (ppm)	2365
ปริมาณแมกนีเซียม (ppm)	456

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.2 ผลการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

4.2.1 ผลการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพแรมโนลิปิด (Rhamnolipid)

ผลการผลิต และสมบัติของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพแรมโนลิปิด ที่ผลิตโดย *P.aeruginosa* สายพันธุ์ A41 ตามวิธีของนพรัตน์ วานิชสุขสมบัติ (2545) สามารถผลิตได้ 1.51 กรัมต่อลิตรของอาหารเลี้ยงเชื้อ น้ำเลี้ยงเชื้อมีค่าแรงตึงผิว 30.0 มิลลินิวตันต่อเมตร และแรมโนลิปิดกึ่งบริสุทธิ์ มีค่าแรงตึงผิว 32.0 มิลลินิวตันต่อเมตร โดยแรมโนลิปิดกึ่งบริสุทธิ์ที่ได้มีสีน้ำตาลเข้ม ดังรูป 4.1

4.2.2 ผลการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพเซอร์แฟคติน (Surfactin)

ผลิตเซอร์แฟคตินโดย *B.subtilis* สายพันธุ์ BBK1 ตามวิธีของนิรันดร์ รุ่งสว่าง (2542) สามารถผลิตได้ 1.37 กรัมต่อลิตรของอาหารเลี้ยงเชื้อ น้ำเลี้ยงเชื้อมีค่าแรงตึงผิว 29.5 มิลลินิวตันต่อเมตร และเซอร์แฟคตินกึ่งบริสุทธิ์มีค่าแรงตึงผิว 31.9 มิลลินิวตันต่อเมตร เซอร์แฟคตินที่ได้มีสีเหลือง ดังรูป 4.1 และสามารถเปรียบเทียบสมบัติสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้ดังแสดงในตารางที่ 4.2

รูปที่ 4.1 สารลดแรงตึงผิวชีวภาพแรมโนลิปิดและเซอร์แฟคติน

ตารางที่ 4.2 สมบัติของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพแรมโนลิปิดและเซอร์แฟคติน

สมบัติของสาร	แรมโนลิปิด (Rhamnolipid)	เซอร์แฟคติน (Surfactin)
1.ผลผลิต (กรัมต่อลิตร) (น้ำหนักสารต่อปริมาตรน้ำเลี้ยงเชื้อ)	1.51	1.37
2.ค่าแรงตึงผิวของน้ำเลี้ยงเชื้อ (มิลลินิวตันต่อเมตร)	30.0	29.5
3.ค่าแรงตึงผิวของสารกึ่งบริสุทธิ์ (มิลลินิวตันต่อเมตร)	32.0	31.9

4.3 ผลการทดสอบประสิทธิภาพของสารลดแรงตึงผิว

4.3.1 ผลการหาจุดวิกฤตของการเกิดไมเซลล์ (Critical Micelle Concentration,CMC)

สารลดแรงตึงผิวที่นำมาใช้ในการวิจัยนี้มีทั้งสิ้น 7 ชนิด ได้แก่ Triton X-100 Tween 80 Brij 35 SDS CTAB แรมโนลิปิด และเซอร์แฟคติน นำไปวัดค่าแรงตึงผิวด้วยการเจือจางสารลดแรงตึงผิวในน้ำกลั่นที่ความเข้มข้นต่างๆ และวัดค่าแรงตึงผิวด้วยเครื่องวัดแรงตึงผิว นำค่าที่ได้ไปเขียนกราฟระหว่างค่าแรงตึงผิว และค่า log ของเปอร์เซ็นต์ความเจือจาง (log percent dilution) จากนั้นหาค่า CMC ได้จากกราฟ (Duvnjak และคณะ, 1982) ผลการวัดค่า CMC ของสารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์ และชีวภาพ ดังแสดงในภาคผนวก ง. และสามารถสรุปสมบัติของสารลดแรงตึงผิวดังตาราง 4.3

ตารางที่ 4.3 สรุปสมบัติของสารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์ และชีวภาพ

สารลดแรงตึงผิว	ค่าแรงตึงผิว (มิลลินิวตันต่อเมตร)	ค่า CMC (มก.ต่อลิตร)
Triton X-100	31.9	250
Tween 80	44	22
Brij-35	44.2	160
SDS	36	1600
CTAB	34	320
แรมโนลิปิด	32	280
เซอร์แฟคติน	31.9	180

สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.3.2 ผลการหาจุดวิกฤตของการเกิดไมเซลล์ในสารละลายดิน (Apparent Critical Micelle Concentration, ACMC)

โดยดัดแปลงจากวิธีของ Sun และ Puri (1997) สามารถหาค่า ACMC ได้จากกราฟดังแสดงในภาคผนวก ง. และสามารถเปรียบเทียบค่า ACMC และค่า CMC ของสารลดแรงตึงผิว ดังแสดงในตารางที่ 4.4

ตารางที่ 4.4 ค่า CMC และ ACMC ของสารลดแรงตึงผิวชนิดต่างๆ

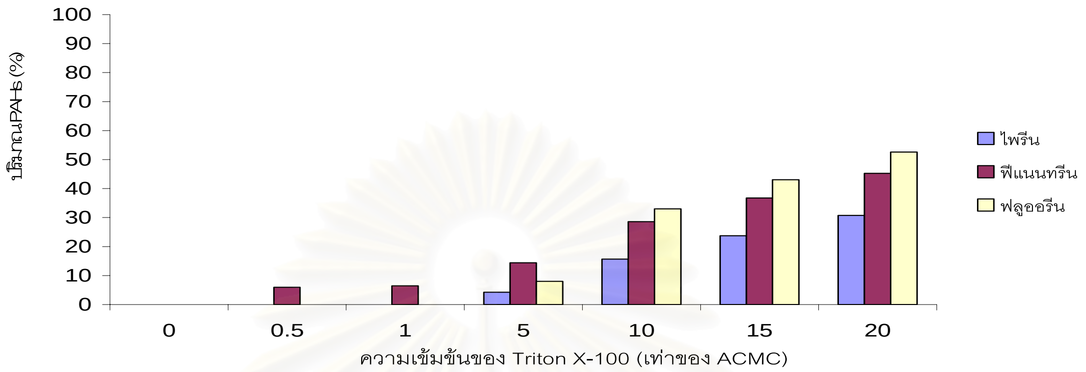
สารลดแรงตึงผิว	ค่า CMC (มก.ต่อลิตร)	ค่า ACMC (มก.ต่อลิตร)	ACMC/CMC (เท่า)
Triton X-100	250	350	1.4
Tween 80	22	40	1.81
Brij 35	160	300	1.88
SDS	1600	4200	2.62
CTAB	320	6000	18.75
แรมโนลิปิด	280	500	1.78
เซอร์แฟคติน	180	300	1.66

จากการศึกษาพบว่าค่า ACMC จะมีค่ามากกว่าค่า CMC โดยกลุ่มของสารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์ชนิดไร้ประจุ ได้แก่ Triton X-100 Tween 80 และ Brij 35 มีค่า ACMC มากกว่าค่า CMC 1.4 1.81 และ 1.88 เท่าตามลำดับ สำหรับ SDS ซึ่งเป็นสารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์ประจุลบ มีค่า ACMC มากกว่าค่า CMC 2.62 เท่า และ CTAB ซึ่งเป็นสารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์ประจุบวกมีค่า ACMC มากกว่าค่า CMC 18.75 เท่า สำหรับสารลดแรงตึงผิวชีวภาพแรมโนลิปิด และเซอร์แฟคติน มีค่า ACMC มากกว่าค่า CMC 1.78 และ 1.66 เท่าตามลำดับ

4.4 ผลทดสอบความสามารถในการชะ PAHs จากดินของสารลดแรงตึงผิวที่มีความเข้มข้นต่างๆ

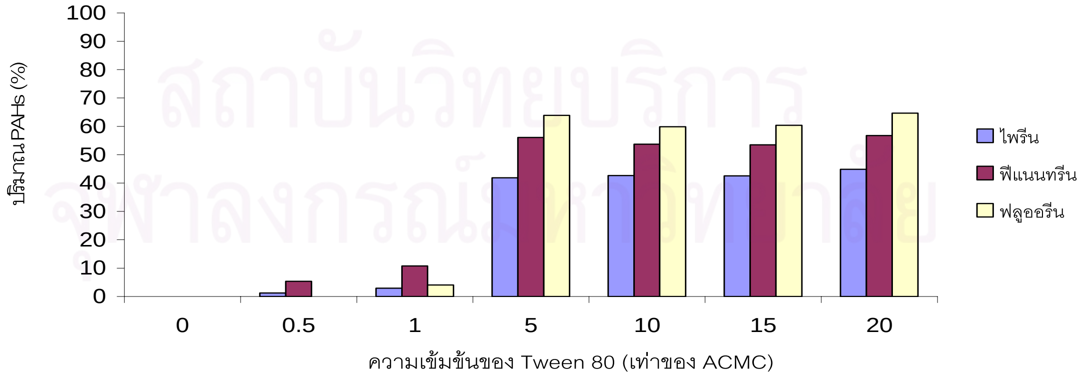
เมื่อเติมสารลดแรงตึงผิวที่มีความเข้มข้นมากกว่าค่า ACMC 0.5, 1, 5, 10, 15 และ 20 เท่า (ข้อ 4.3.2) ลงในดินปลอดเชื้อที่เติม PAHs 3 ชนิดได้แก่ ฟลูออรีน ฟีแนนทรีน และ ไพรีน โดยมีอัตราส่วนน้ำหนักดิน (กรัม) ต่อปริมาตรสารละลาย (มิลลิลิตร) เท่ากับ 1 ต่อ 8 พบว่า

Triton X–100 สามารถชะ PAHs ออกจากดินได้เพิ่มมากขึ้นแปรผันตามกับความเข้มข้น และที่ความเข้มข้นมากกว่า ACMC 20 เท่า ไพรีน ฟีแนนทรีน และฟลูออรีน ถูกชะออกมาอยู่ในวัฏภาคน้ำได้ 30.73% 45.27% และ 52.56% ตามลำดับ (รูปที่ 4.2)



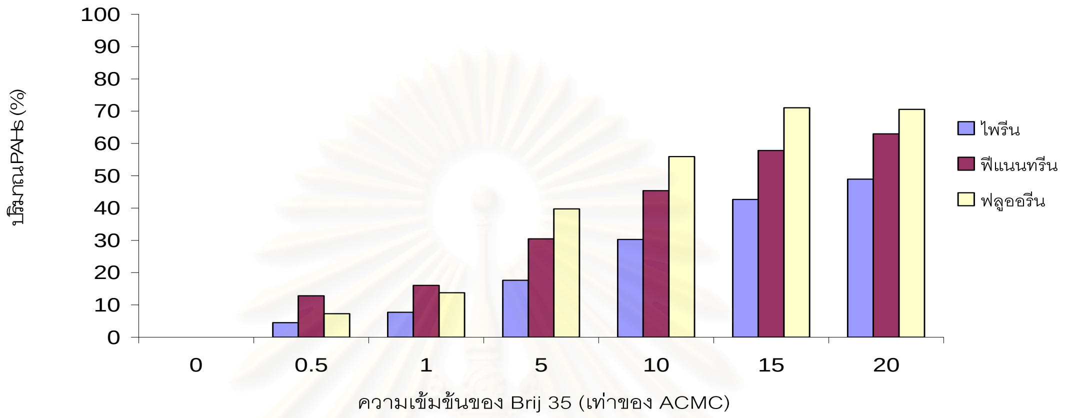
รูปที่ 4.2 แสดงสาร PAHs ถูกชะออกจากดินเมื่อเติม Triton X-100 ที่ความเข้มข้นต่างๆ

ความเข้มข้นของ Tween 80 ที่มากกว่าค่า ACMC 5 เท่า สามารถชะ ไพรีน ฟีแนนทรีน และฟลูออรีน ออกมาสู่วัฏภาคน้ำได้ 41.86% 56.05% และ 63.90% ตามลำดับ โดยการชะมีค่าคงที่และเพิ่มขึ้นเล็กน้อย ค่าการชะออกสูงสุดที่ความเข้มข้นมากกว่าค่า ACMC 20 เท่า คือ ไพรีน ฟีแนนทรีน และฟลูออรีน ถูกชะออกสู่วัฏภาคน้ำได้ 44.85% 56.75% และ 64.56% ตามลำดับ (รูปที่ 4.3)



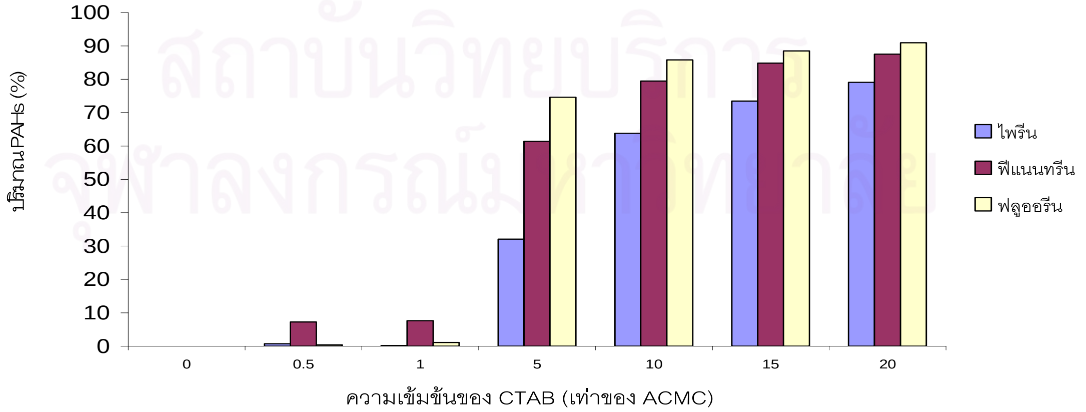
รูปที่ 4.3 แสดงสาร PAHs ถูกชะออกจากดินเมื่อเติม Tween 80 ที่ความเข้มข้นต่างๆ

สำหรับBrij 35 สามารถชะ PAHs ออกสู่วัฏภาคน้ำได้แปรผันตามความเข้มข้นโดย ไพรีน และฟีแนนทรีนถูกชะสูงสุดที่ความเข้มข้นมากกว่าค่า ACMC 20 เท่า คือ 48.96% และ 62.96% ตามลำดับ แต่ฟลูออรีนจะมีการชะออกมาน้อยลง 0.48 % โดยมีค่าสูงสุด 71.03% ที่ความเข้มข้นมากกว่าค่า ACMC 15 เท่า (รูปที่ 4.4)

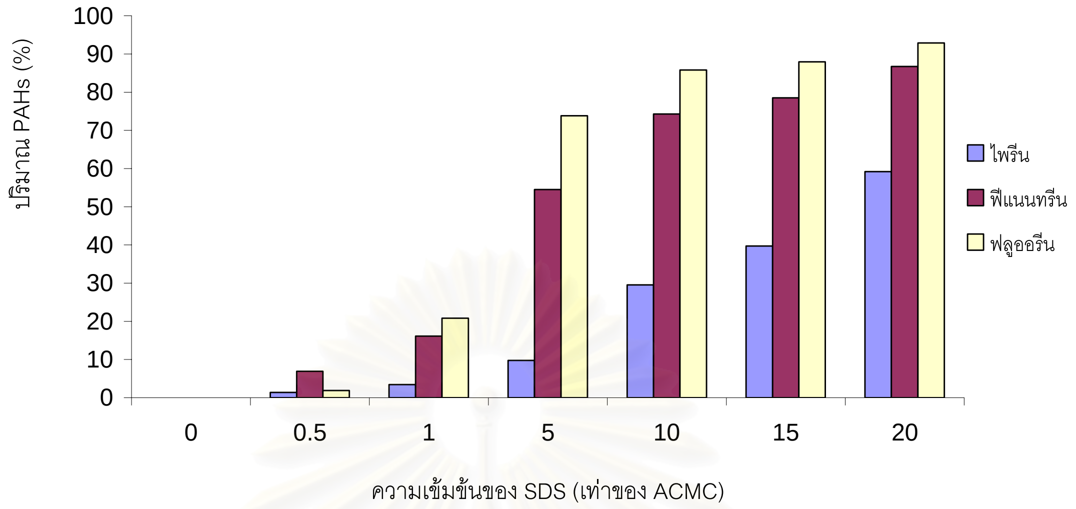


รูปที่ 4.4 แสดงสาร PAHs ถูกชะออกจากดินเมื่อเติม Brij 35 ที่ความเข้มข้นต่างๆ

CTAB และ SDS ที่มีความเข้มข้นระหว่าง 5-20 เท่าของค่า ACMC สามารถชะ PAHs สู่วัฏภาคน้ำ ได้โดย CTAB ที่ความเข้มข้นมากกว่าค่า ACMC 20 เท่า สามารถชะ ไพรีน ฟีแนนทรีน และฟลูออรีนได้สูงสุด 79% 87.54% และ 90.96% ตามลำดับ (รูปที่ 4.5) สำหรับ SDS ที่มีความเข้มข้นมากกว่า ACMC 20 เท่า สามารถชะ ไพรีน ฟีแนนทรีน และฟลูออรีนได้สูงสุด 59.18% 86.72% และ 92.90% ตามลำดับ (รูปที่ 4.6)

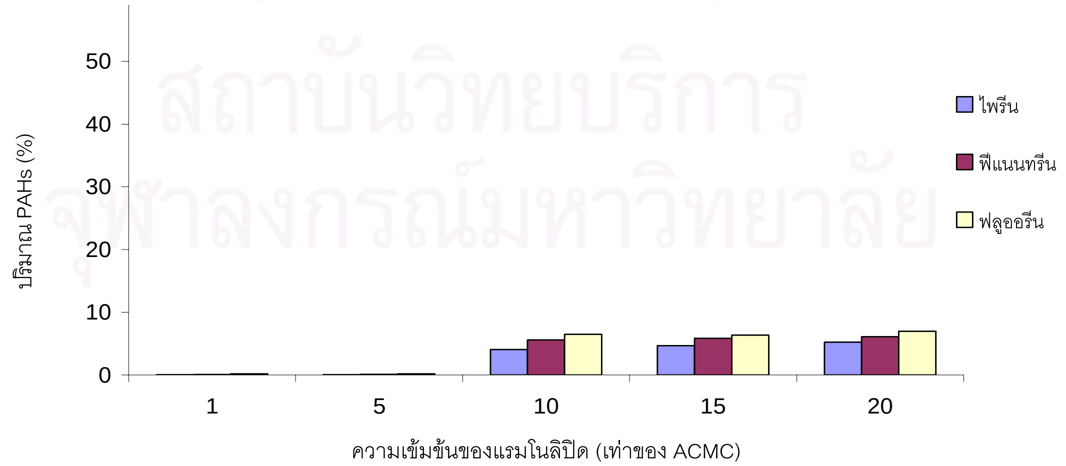


รูปที่ 4.5 แสดงสาร PAHs ถูกชะออกจากดินเมื่อเติม CTAB ที่ความเข้มข้นต่างๆ

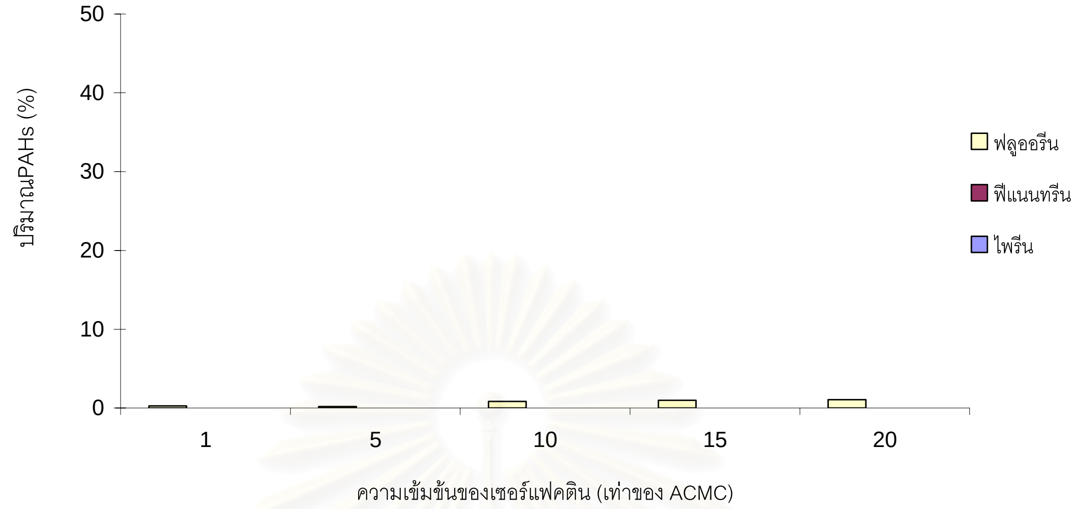


รูปที่ 4.6 แสดงสาร PAHs ถูกชะออกจากดินเมื่อเติม SDS ที่ความเข้มข้นต่างๆ

สารลดแรงตึงผิวชีวภาพแรมโนลิปิดสามารถชะ PAHs ออกสู่วัฏภาคน้ำได้เพียงเล็กน้อย โดยที่มีความเข้มข้นมากกว่า ACMC 10 เท่า ไพรีน ฟีแนนทรีน และฟลูออรีน ถูกชะออกมา 4.04% 5.59% และ 6.48% ตามลำดับ และการชะจะคงที่เมื่อมีความเข้มข้นสูงขึ้น (รูปที่ 4.7) สำหรับเซอร์แฟคตินพบว่า PAHs ถูกชะออกมาได้น้อยมาก โดยฟลูออรีนถูกชะได้สูงสุดเพียง 1.05% ที่ความเข้มข้นมากกว่า ACMC 20 เท่า ในขณะที่ฟีแนนทรีน และไพรีนไม่ถูกชะออกมาเลย (รูปที่ 4.8)



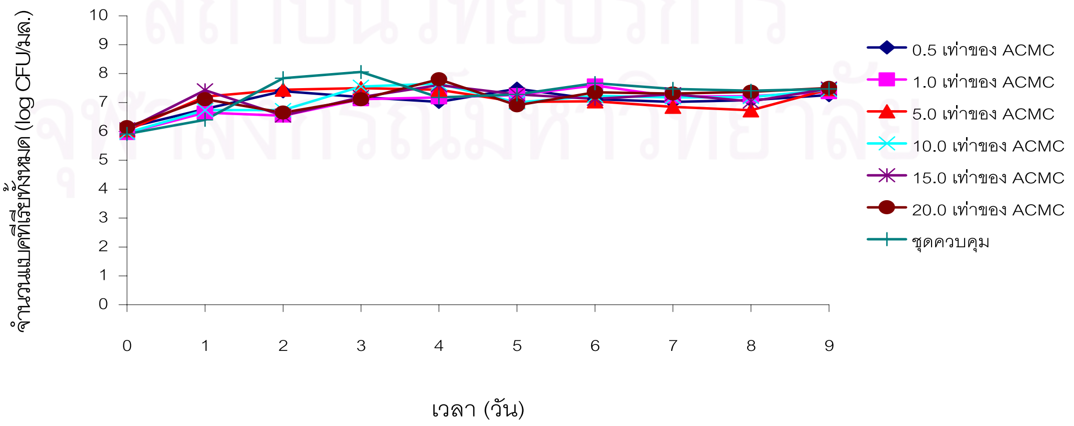
รูปที่ 4.7 แสดงสาร PAHs ถูกชะออกจากดินเมื่อเติมแรมโนลิปิดที่ความเข้มข้นต่างๆ



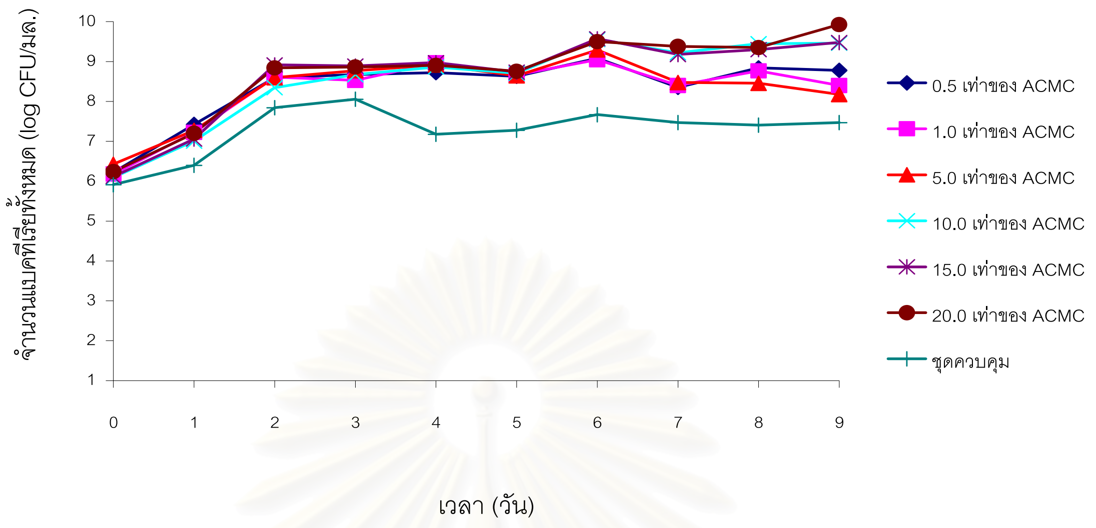
รูปที่ 4.8 แสดงสาร PAHs ถูกชะออกจากดินเมื่อเติมเซอร์แฟคตินที่ความเข้มข้นต่างๆ

4.5 ผลของสารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์ที่มีต่อกลุ่มแบคทีเรีย STK

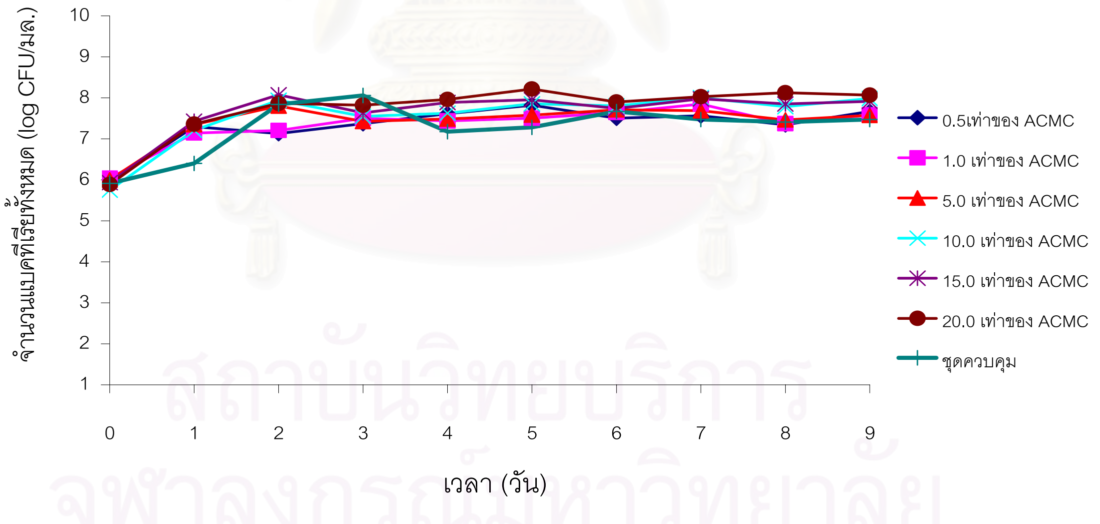
จากผลการศึกษาพบว่าสารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์ชนิดไร้ประจุ Brij 35 Tween 80 และ Triton X-100 ไม่มีผลกระทบด้านลบต่อการเจริญของกลุ่มแบคทีเรีย STK เนื่องจากสามารถทำให้กลุ่มแบคทีเรีย STK เจริญได้ดีเมื่อเปรียบเทียบกับชุดทดลองที่ไม่มีการเติมสารลดแรงตึงผิว โดยเฉพาะ Tween 80 ทำให้กลุ่มแบคทีเรีย STK เจริญได้มากกว่าชุดควบคุม และยังพบอีกว่าเมื่อความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวเพิ่มขึ้นจะยิ่งทำให้กลุ่มแบคทีเรียมีการเจริญได้ดียิ่งขึ้น (รูปที่ 4.9-4.11)



รูปที่ 4.9 ผลของ Triton X-100 ความเข้มข้นต่างๆที่มีต่อกลุ่มแบคทีเรีย STK



รูปที่ 4.10 ผลของ Tween 80 ความเข้มข้นต่างๆที่มีต่อกลุ่มแบคทีเรีย STK

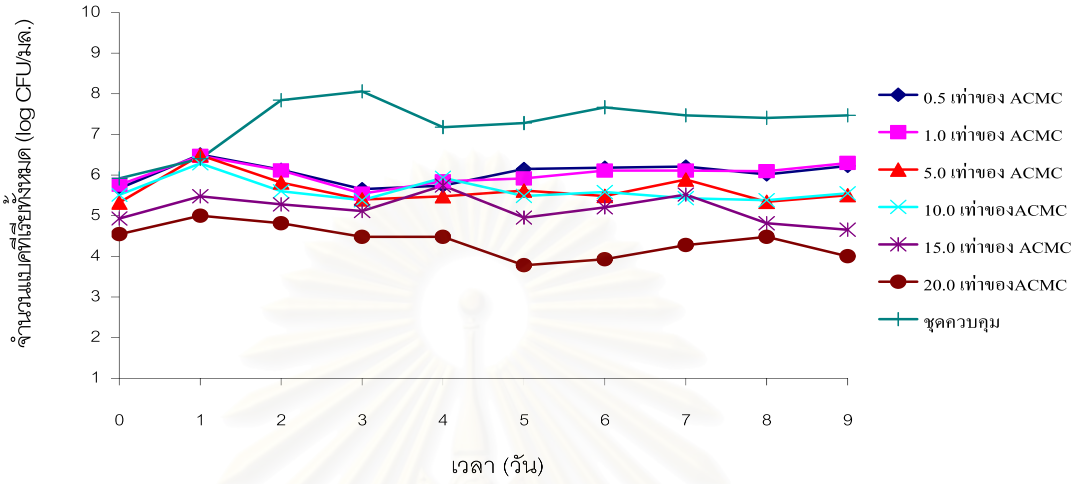


รูปที่ 4.11 ผลของ Brij 35 ความเข้มข้นต่างๆที่มีต่อกลุ่มแบคทีเรีย STK

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สำหรับสารลดแรงตึงผิวชนิดมีประจุได้แก่ SDS (ประจุลบ) และ CTAB (ประจุบวก) จากการศึกษาพบว่า SDS มีผลต่อการเจริญของกลุ่มแบคทีเรีย STK เล็กน้อยโดยสังเกตว่ากลุ่มแบคทีเรียสามารถเจริญได้เมื่อมีการเติม SDS แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ SDS มากขึ้น โดยเฉพาะที่ความเข้มข้นมากกว่า ACMC 20 เท่า จะทำให้กลุ่มแบคทีเรีย STK เจริญได้น้อยลงเมื่อเปรียบเทียบกับชุด

ควบคุมที่ไม่เติม SDS (รูปที่ 4.12) และพบว่า CTAB มีความเป็นพิษต่อกลุ่มแบคทีเรีย STK เนื่องจากกลุ่มแบคทีเรีย STK ไม่สามารถเจริญได้เมื่อมีการเติม CTAB ในทุกความเข้มข้น (ไม่แสดงรูป)



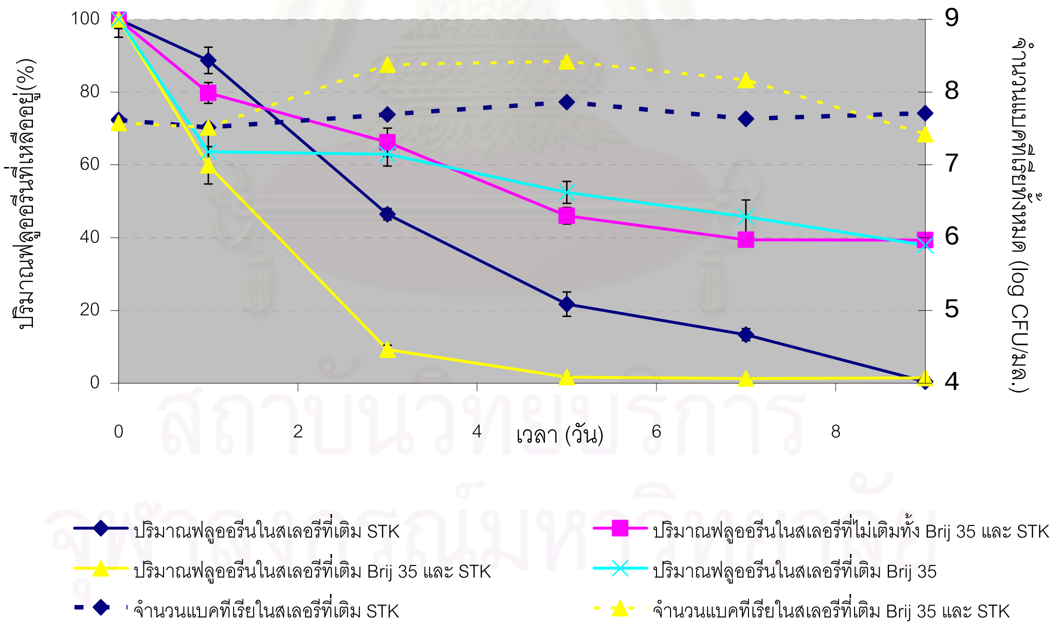
รูปที่ 4.12 ผลของ SDS ความเข้มข้นต่างๆที่มีต่อกลุ่มแบคทีเรีย STK

4.6 ผลการเติมสารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์ที่คัดเลือกได้ต่อความสามารถในการย่อยสลาย PAHs ในระบบสเลอรีโดยกลุ่มแบคทีเรีย STK อัตราส่วนดินต่อน้ำเท่ากับ 1 : 8 (กรัม/มล.)

จากผลการทดลองข้อ 4.4 และ 4.5 ได้คัดเลือกสารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์ชนิดไร้ประจุ ได้แก่ Brij 35 และสารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์ประจุลบ ได้แก่ SDS ที่ความเข้มข้นมากกว่า ACMC 15 เท่า และ 10 เท่า ตามลำดับ มาทำการทดลอง โดยพิจารณาจากความสามารถในการชะ PAHs ออกสู่วัฏภาคน้ำ และความสามารถในการเจริญของกลุ่มแบคทีเรีย STK ที่ใกล้เคียงกับชุดควบคุม เมื่อเติม Brij 35 พบว่าในวันที่ 3 ของการทดลอง มีปริมาณฟลูออรีน และฟีแนนทรีนลดลงอย่างรวดเร็ว (รูปที่ 4.13-4.14) โดยวันที่ 3 ของการทดลอง มีปริมาณฟลูออรีน และฟีแนนทรีนเหลืออยู่ 9.27% และ 4.64% ตามลำดับ ในขณะที่ชุดควบคุมปัจจัยทางกายภาพที่เติมบริจ 35 มีปริมาณเหลืออยู่ 62.93% และ 60.04% ตามลำดับ และชุดที่เติมกลุ่มแบคทีเรีย STK เพียงอย่างเดียว มีปริมาณเหลืออยู่ 21.75% และ 1.32% ตามลำดับ ดังตารางที่ 4.5-4.6 และการย่อยสลายฟลูออรีนในชุดที่เติม Brij 35 ร่วมกับกลุ่มแบคทีเรีย STK ให้ผลการย่อยสลายดีกว่าชุดควบคุมที่ไม่เติม Brij 35 แต่สำหรับฟีแนนทรีน พบว่าให้ผลการย่อยสลายใกล้เคียงกับชุดควบคุม

ตารางที่ 4.5 ปริมาณฟลูออรีนที่เหลืออยู่ (%) ในสเลอรีเมื่อเติม Brij 35 ร่วมกับกลุ่มแบคทีเรีย STK

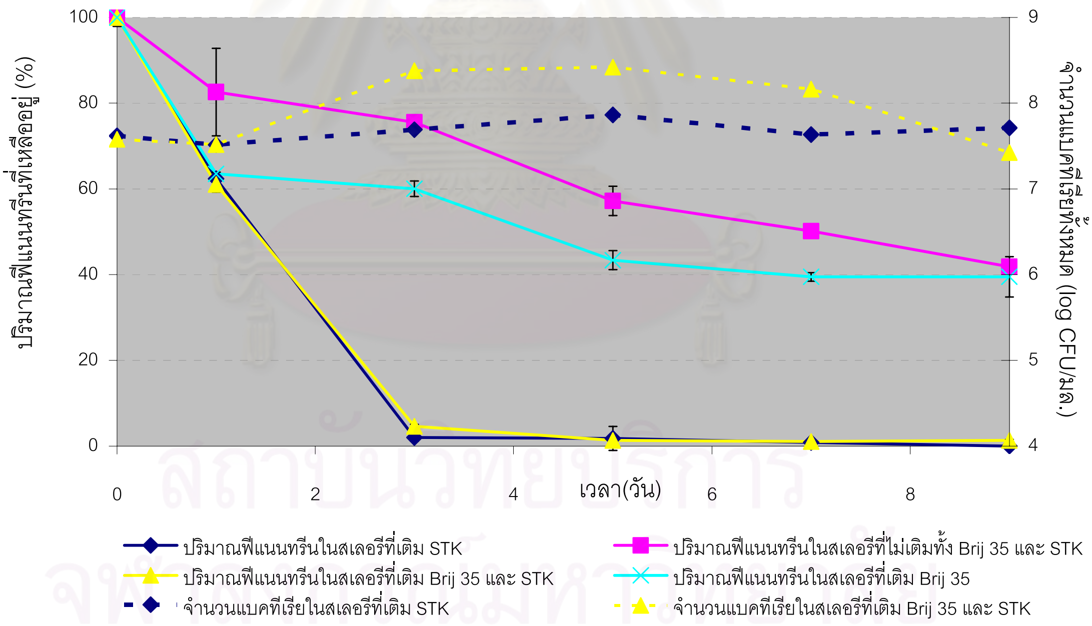
วันที่	ชุดที่ไม่เติมทั้ง Brij 35 และ STK	ชุดที่เติม STK	ชุดที่เติมBrij 35	ชุดที่เติม Brij 35+STK
0	100	100	100	100
1	79.77	88.73	63.64	59.88
3	66.21	46.44	62.93	9.27
5	46.03	21.75	52.45	1.68
7	39.45	13.36	45.73	1.32
9	39.32	0.44	37.91	1.47



รูปที่ 4.13 การเจริญและการย่อยสลายฟลูออรีนเมื่อเติม Brij 35 ร่วมกับกลุ่มแบคทีเรีย STK

ตารางที่ 4.6 ปริมาณฟีแนนทรีนที่เหลืออยู่ (%) ในสเลอรีเมื่อเติม Brij 35 ร่วมกับกลุ่มแบคทีเรีย STK

วันที่	ชุดที่ไม่เติมทั้ง Brij 35 และ STK	ชุดที่เติม STK	ชุดที่เติมBrij 35	ชุดที่เติม Brij 35+STK
0	100.00	100.00	100.00	100.00
1	82.59	62.36	63.53	61.07
3	75.57	2.01	60.04	4.64
5	57.21	1.32	43.38	1.31
7	50.16	0.84	39.48	1.06
9	41.84	0.00	39.50	1.33



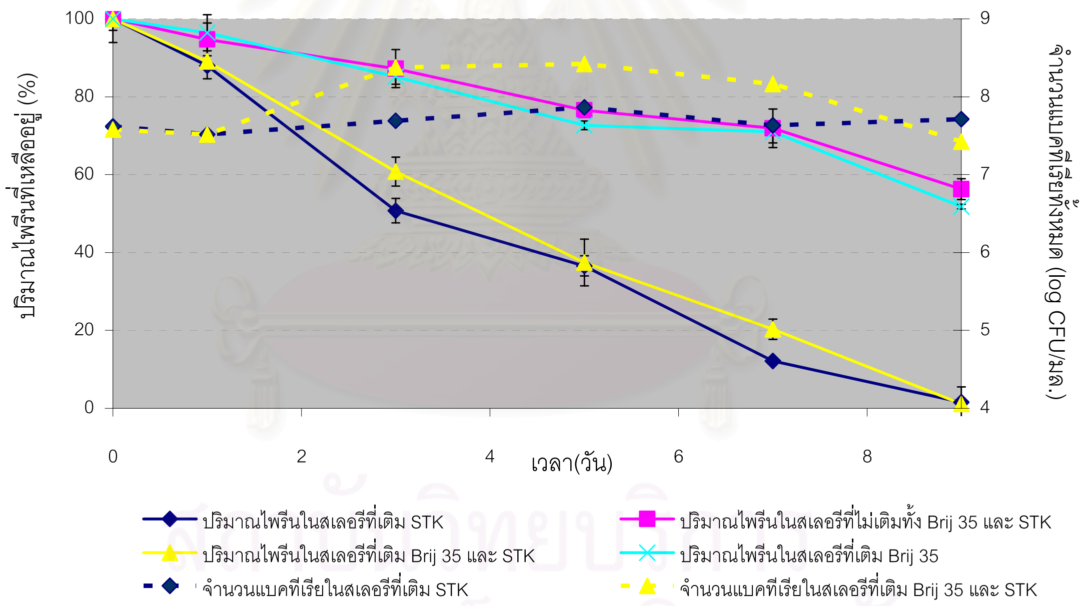
รูปที่ 4.14 การเจริญและการย่อยสลายฟีแนนทรีนเมื่อเติม Brij 35 ร่วมกับกลุ่มแบคทีเรีย STK

สำหรับไพรีน จากการทดลองพบว่าเมื่อเติม Brij 35 ปริมาณไพรีนที่เหลืออยู่มีค่าใกล้เคียงกับชุดควบคุมที่เติมกลุ่มแบคทีเรีย STK เพียงอย่างเดียว ดังตารางที่ 4.7 และรูปที่ 4.15 เมื่อพิจารณาการเจริญของกลุ่มแบคทีเรีย STK พบว่าหลังจากวันที่ 1 ของการทดลอง ชุดทดลองที่เติม

Brij 35 จะเพิ่มจำนวนมากกว่าชุดควบคุม หลังจากนั้นจะคงที่ และค่อยๆลดลงเมื่อสิ้นสุดการทดลอง ซึ่งการเจริญดังกล่าวสอดคล้องกับปริมาณ PAHs ที่ลดลง (รูปที่ 4.13-4.15)

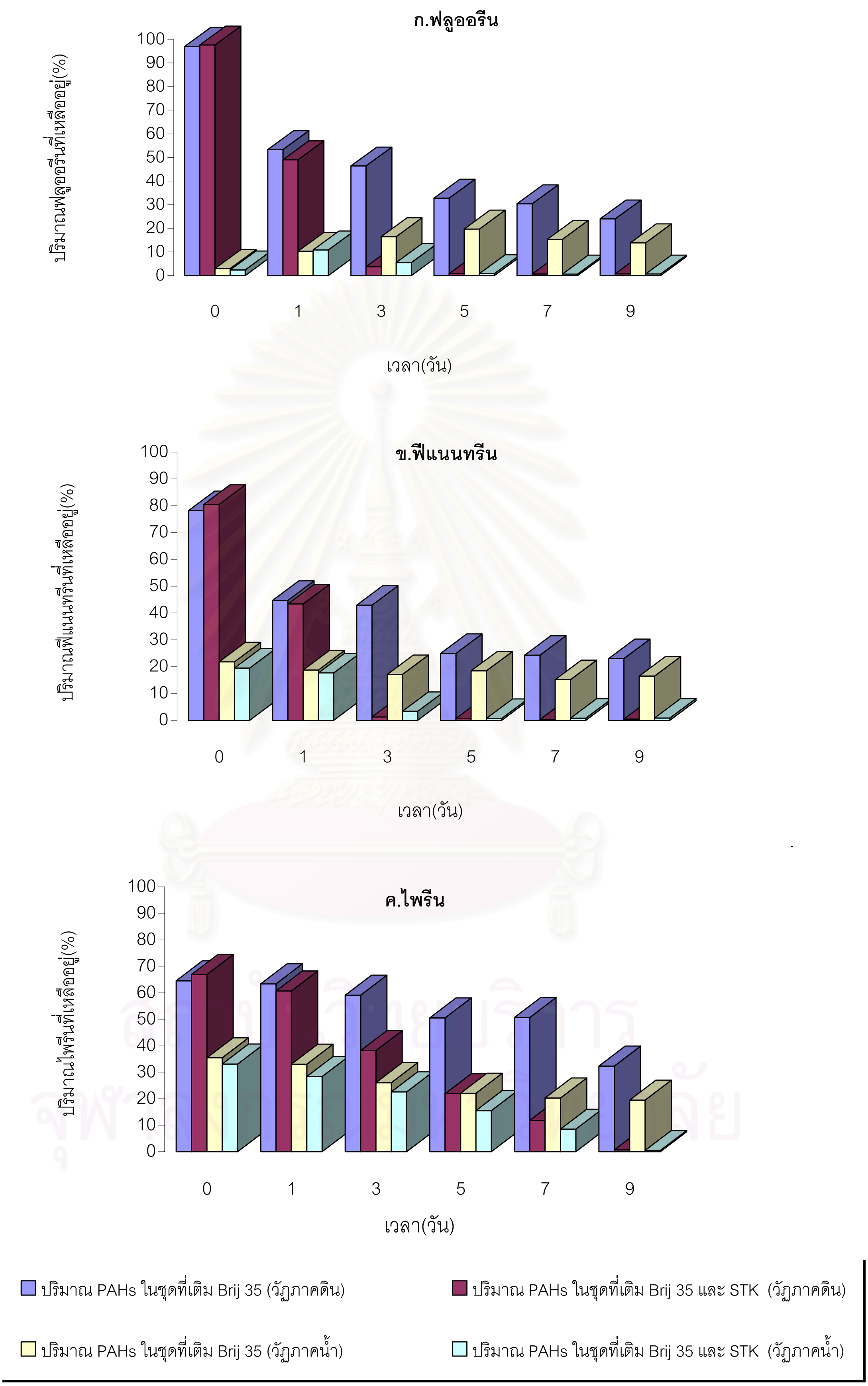
ตารางที่ 4.7 ปริมาณไพรีนที่เหลืออยู่ (%) ในสเลอรีเมื่อเติม Brij 35 ร่วมกับกลุ่มแบคทีเรีย STK

วันที่	ชุดที่ไม่เติมทั้ง Brij 35 และ STK	ชุดที่เติม STK	ชุดที่เติมBrij 35	ชุดที่เติม Brij 35+STK
0	100.00	100.00	100.00	100.00
1	91.80	83.18	96.43	89.07
3	78.48	51.06	85.16	60.78
5	53.88	32.54	72.65	37.44
7	39.73	11.69	70.96	20.29
9	37.70	1.05	51.79	1.13



รูปที่ 4.15 การเจริญและการย่อยสลายไพรีนเมื่อเติม Brij 35 ร่วมกับกลุ่มแบคทีเรีย STK

จากผลการสกัดสาร PAHs ในวัฏภาคดิน และน้ำสามารถแสดงให้เห็นว่าในชุดทดลองที่เติม Brij 35 สามารถชะฟลูออรีน ฟีแนนทรีน และไพรีน ออกสู่วัฏภาคน้ำได้ โดยเฉลี่ย 13.10% 17.97% และ 26.07% ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 4.16 ก.-ค. โดยพบว่าเริ่มมีการย่อยสลายสาร PAHs ทั้งในวัฏภาคดิน และน้ำ ในวันที่ 3 ของการทดลอง โดยเฉพาะ ฟลูออรีน และฟีแนนทรีน โดยการย่อยสลายเพิ่มมากขึ้นจนกระทั่งสิ้นสุดการทดลองเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม

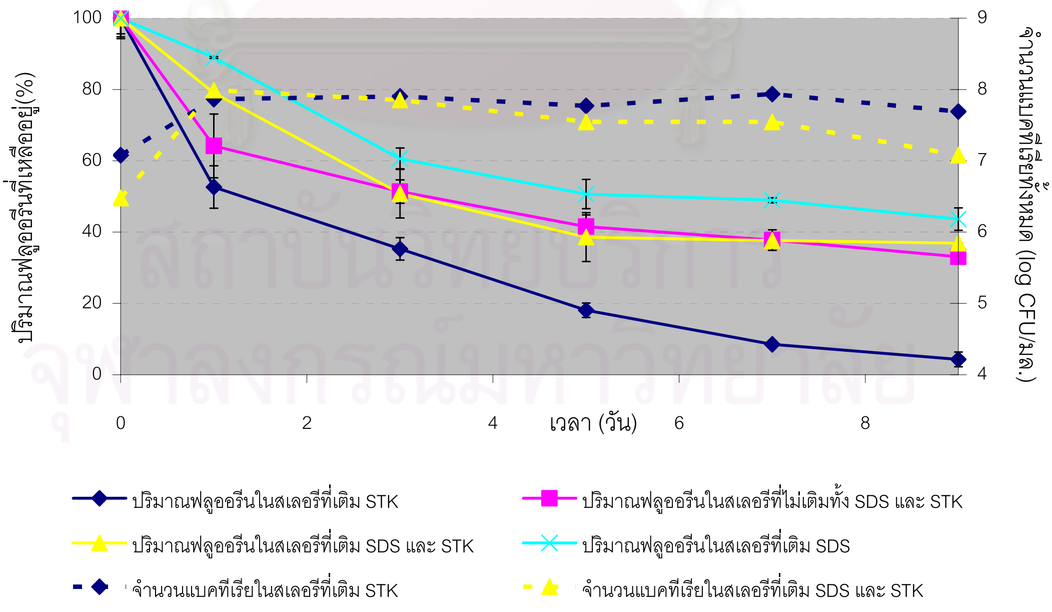


รูปที่ 4.16 ผลของ Brij 35 ที่มีต่อการชะสาร PAHs ออกจากดินสู่วัฏภาคน้ำ

สำหรับการเติม SDS พบว่าเมื่อสิ้นสุดการทดลอง มีปริมาณฟลูออรีน ฟีแนนทรีน และไพรีน เหลืออยู่ 36.90% 39.70% และ15.18% ตามลำดับ ในขณะที่ชุดควบคุมที่เติมกลุ่มแบคทีเรีย STK เพียงอย่างเดียว มีปริมาณ ฟลูออรีน และไพรีน เหลืออยู่ 4.31% และ 1.86% ตามลำดับ และไม่สามารถวิเคราะห์ฟีแนนทรีนได้ด้วย GC-FID (ตารางที่ 4.8-4.10) และพบการเจริญของกลุ่มแบคทีเรีย STK น้อยกว่าชุดควบคุมเล็กน้อย โดยวันสุดท้ายของการทดลองมีจำนวนแบคทีเรียทั้งหมด 7.08 log ของ CFUต่อมล. ในขณะที่ชุดที่เติมกลุ่มแบคทีเรีย STK เพียงอย่างเดียวมีจำนวนแบคทีเรียทั้งหมด 7.69 log ของ CFUต่อมล.(รูปที่ 4.17-4.19)

ตารางที่ 4.8 ปริมาณฟลูออรีนที่เหลืออยู่ (%) ในสเลอรีเมื่อเติม SDS ร่วมกับกลุ่มแบคทีเรีย STK

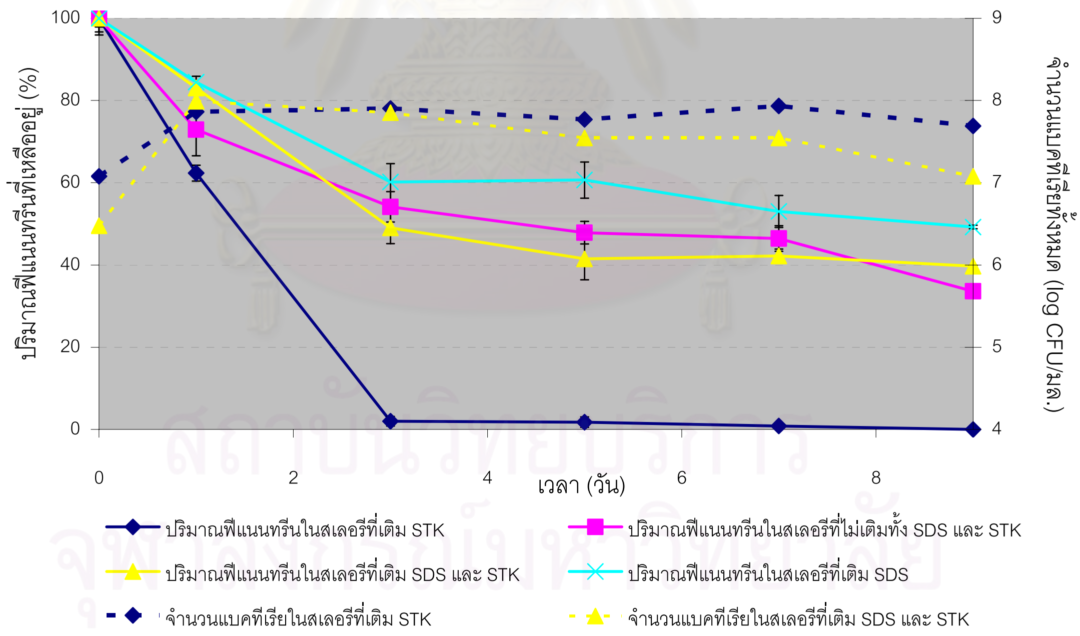
วันที่	ชุดที่ไม่เติมทั้ง SDS และ STK	ชุดที่เติม STK	ชุดที่เติม SDS	ชุดที่เติม SDS+STK
0	100.00	100.00	100.00	100.00
1	64.15	52.65	88.96	79.01
3	51.38	35.29	60.62	50.85
5	41.54	18.08	50.66	38.59
7	37.75	8.52	48.94	37.64
9	33.10	4.31	43.63	36.90



รูปที่ 4.17 การเจริญและการย่อยสลายฟลูออรีนเมื่อเติม SDS ร่วมกับกลุ่มแบคทีเรีย STK

ตารางที่ 4.9 ปริมาณฟีแนนทรีนที่เหลืออยู่ (%) ในสเลอรีดินเมื่อเติม SDS ร่วมกับกลุ่มแบคทีเรีย STK

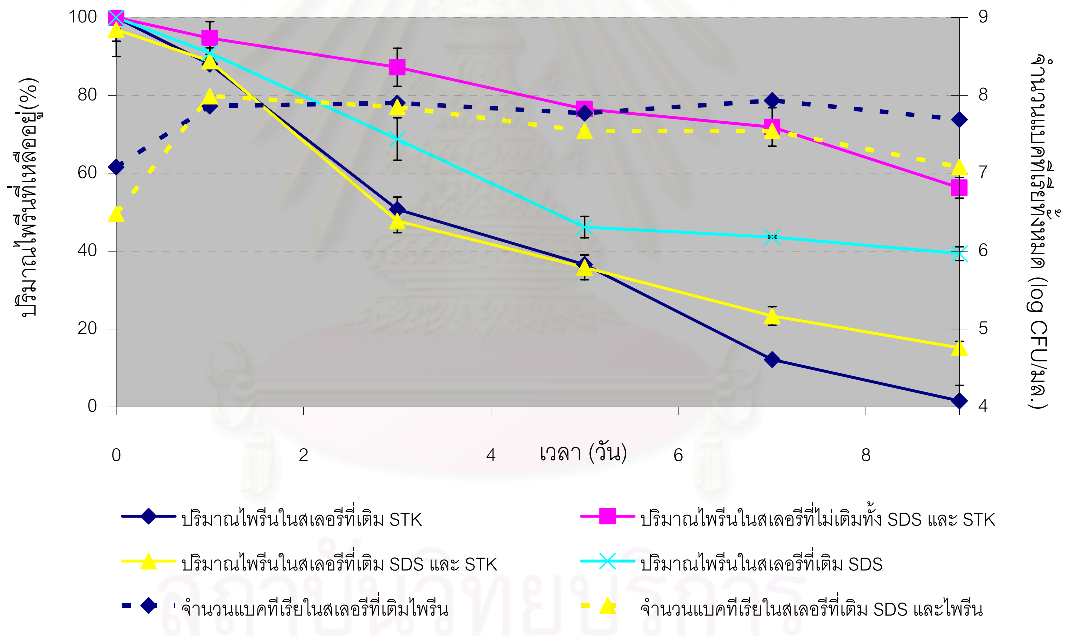
วันที่	ชุดที่ไม่เติมทั้ง SDS และ STK	ชุดที่เติม STK	ชุดที่เติม SDS	ชุดที่เติม SDS+STK
0	100.00	100.00	100.00	100.00
1	72.94	62.36	84.49	83.05
3	54.15	2.01	60.18	49.03
5	47.85	1.32	60.66	41.48
7	46.44	0.84	53.04	42.18
9	33.63	0.00	49.24	39.70



รูปที่ 4.18 การเจริญและการย่อยสลายฟีแนนทรีนเมื่อเติม SDS ร่วมกับกลุ่มแบคทีเรีย STK

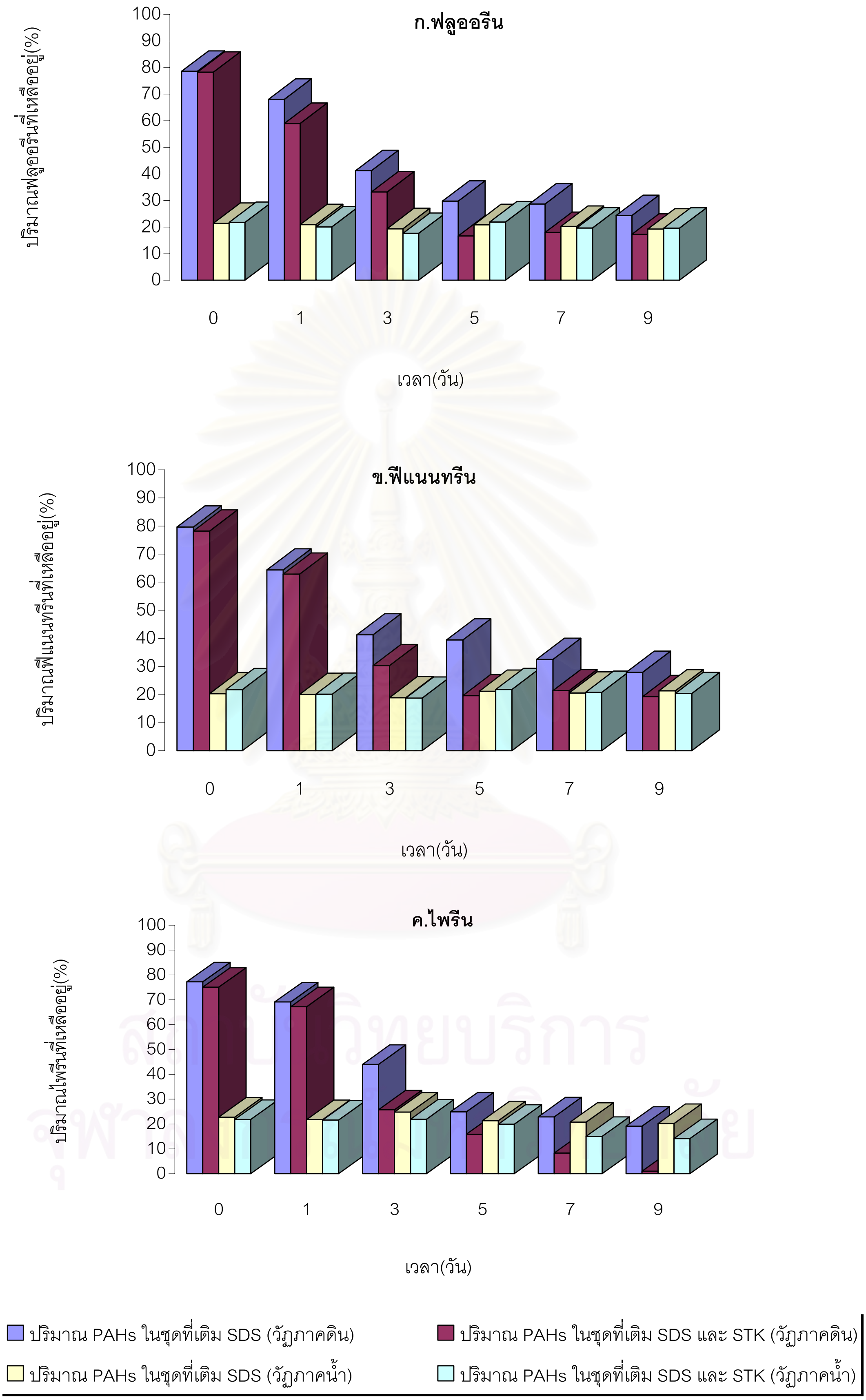
ตารางที่ 4.10 ปริมาณไพรีนที่เหลืออยู่ (%) ในสเลอรีเมื่อเติม SDS ร่วมกับกลุ่มแบคทีเรีย STK

วันที่	ชุดที่ไม่เติมทั้ง SDS และ STK	ชุดที่เติม STK	ชุดที่เติม SDS	ชุดที่เติม SDS+STK
0	100.00	100.00	100.00	100.00
1	94.73	83.72	90.88	88.82
3	87.23	53.13	68.81	47.71
5	76.53	38.44	46.20	35.82
7	71.90	12.11	43.65	23.34
9	56.27	1.86	39.36	15.18



รูปที่ 4.19 การเจริญและการย่อยสลายไพรีนเมื่อเติม SDS ร่วมกับกลุ่มแบคทีเรีย STK

จากการทดลองพบว่า SDS สามารถชะ ฟลูออรีน ฟีแนนทรีน และไพรีน จากดินสู่วัฏภาคน้ำได้โดยเฉลี่ย 19.65% 19.94% และ 21.94% ตามลำดับ โดยมีการย่อยสลายฟลูออรีน ฟีแนนทรีน และไพรีน โดยกลุ่มแบคทีเรีย STK ในวัฏภาคดินมากกว่าวัฏภาคน้ำดังแสดงในรูปที่ 4.20 ก.-ค.



รูปที่ 4.20 ผลของ SDS ที่มีต่อการการชะสาร PAHs ออกจากดินสู่วัฏภาคน้ำ

4.7 ผลของการเติมแบคทีเรียที่สร้างสารลดแรงตึงผิวต่อความสามารถในการย่อยสลายสาร PAHs โดยกลุ่มแบคทีเรีย STK และเปรียบเทียบกับการเติมสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในระบบสเลอรี อัตราส่วนดินต่อน้ำเท่ากับ 1 : 8 (กรัม/มล.)

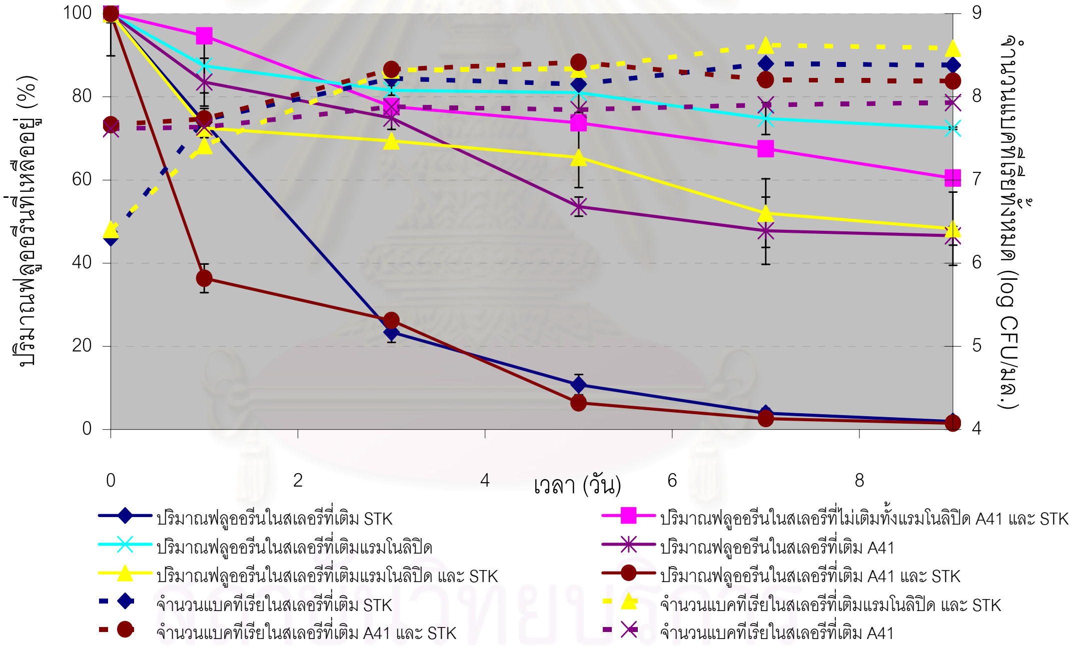
4.7.1 การเติมแบคทีเรียที่สร้างสารลดแรงตึงผิว *P.aeruginosa* สายพันธุ์ A41 เปรียบเทียบกับการเติมแรมโนลิปิด ร่วมกับกลุ่มแบคทีเรีย STK

พบว่าเมื่อเติม *P.aeruginosa* สายพันธุ์ A41 ร่วมกับกลุ่มแบคทีเรีย STK เปรียบเทียบกับการเติมแรมโนลิปิดที่ผลิตโดย *P.aeruginosa* สายพันธุ์ A41ที่มีความเข้มข้นมากกว่า ACMC 10 เท่า พบว่าในวันที่ 1 ของการทดลอง ปริมาณฟลูออรีนลดลงอย่างรวดเร็ว (รูปที่ 4.21) โดยเหลืออยู่ 36.34% ในขณะที่ชุดที่ไม่เติมทั้งแรมโนลิปิด *P.aeruginosa* สายพันธุ์ A41 และ กลุ่มแบคทีเรีย STK มีปริมาณฟลูออรีนเหลืออยู่ 94.66% ชุดควบคุมที่เติมกลุ่มแบคทีเรีย STK มีปริมาณฟลูออรีนเหลืออยู่ 73.93% และชุดทดลองที่เติมแรมโนลิปิดร่วมกับกลุ่มแบคทีเรีย STK มีปริมาณฟลูออรีนเหลืออยู่ 72.54% ในขณะที่ชุดควบคุมที่เติมแรมโนลิปิดมีปริมาณฟลูออรีนเหลืออยู่ 87.43% ในวันสุดท้ายของการทดลองพบว่า ปริมาณฟลูออรีนในชุดทดลองที่เติม *P.aeruginosa* สายพันธุ์ A41 ร่วมกับกลุ่มแบคทีเรีย STK และในชุดควบคุมที่เติมกลุ่มแบคทีเรีย STK มีปริมาณลดลงเหลือ 1.54% และ 1.93% ตามลำดับ สำหรับชุดทดลองที่เติมแรมโนลิปิดร่วมกับกลุ่มแบคทีเรีย STK มีปริมาณฟลูออรีนเหลืออยู่ 48.29% และชุดควบคุมที่เติมแรมโนลิปิดเพียงอย่างเดียวมีปริมาณฟลูออรีนเหลืออยู่ 72.45% ดังตารางที่ 4.11

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4.11 ปริมาณฟลูออรีนที่เหลืออยู่ (%) ในสเลอรีเมื่อเติมแรมโนลิปิดหรือ *P.aeruginosa* สายพันธุ์ A41 ร่วมกับกลุ่มแบคทีเรีย STK

วันที่	ชุดที่ไม่เติมทั้งแรมโนลิปิด A41 และ STK	ชุดที่เติมแรมโนลิปิด	ชุดที่เติม A41	ชุดที่เติม STK	ชุดที่เติมแรมโนลิปิด และ STK	ชุดที่เติม A41 และ STK
0	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
1	94.66	87.43	83.53	73.93	72.54	36.34
3	77.63	81.57	74.87	23.39	69.41	26.22
5	73.73	81.02	53.60	10.79	65.42	6.39
7	67.58	74.77	47.81	3.92	52.02	2.63
9	60.45	72.45	46.61	1.93	48.29	1.54

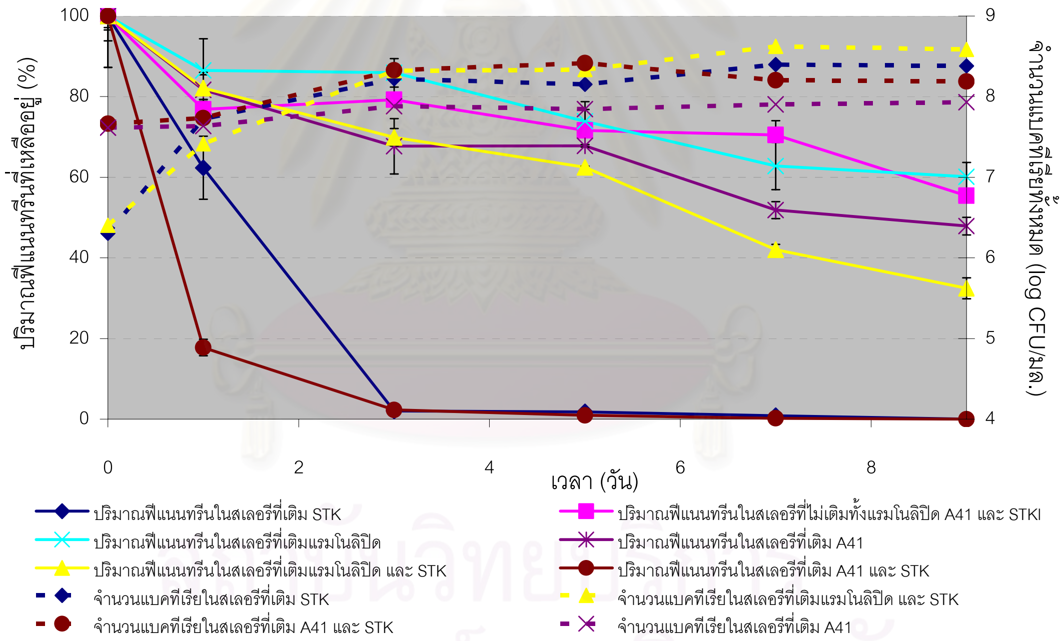


รูปที่ 4.21 การเจริญและการย่อยสลายฟลูออรีนเมื่อเติมแรมโนลิปิดหรือ *P.aeruginosa* สายพันธุ์ A41ร่วมกับกลุ่มแบคทีเรีย STK

ปริมาณฟีแนนทรีนในชุดทดลองที่เติม *P.aeruginosa* สายพันธุ์ A41 ร่วมกับกลุ่มแบคทีเรีย STK ลดลงอย่างรวดเร็วในวันแรกของการทดลอง (รูปที่ 4.22) จากนั้นจะลดลงจนไม่สามารถวิเคราะห์ได้ด้วยเครื่อง GC-FID เมื่อสิ้นสุดการทดลอง โดยให้ผลการย่อยสลายใกล้เคียงกับชุดควบคุมที่เติมกลุ่มแบคทีเรีย STK เพียงอย่างเดียว ในขณะที่ชุดทดลองที่เติมแรมโนลิปิดร่วมกับกลุ่มแบคทีเรีย STK มีปริมาณฟีแนนทรีนเหลืออยู่ 32.46% (ตารางที่ 4.12)

ตารางที่ 4.12 ปริมาณฟีแนนทรีนที่เหลืออยู่ (%) ในสเลอรีเมื่อเติมแรมโนลิปิดหรือ *P.aeruginosa* สายพันธุ์ A41 ร่วมกับกลุ่มแบคทีเรีย STK

วันที่	ชุดที่ไม่เติมทั้งแรมโนลิปิด A41 และ STK	ชุดที่เติมแรมโนลิปิด	ชุดที่เติม A41	ชุดที่เติม STK	ชุดที่เติมแรมโนลิปิด และ STK	ชุดที่เติม A41 และ STK
0	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
1	76.88	86.53	81.70	62.36	82.14	17.77
3	79.26	85.92	67.69	2.01	69.89	2.31
5	71.63	73.89	67.80	1.32	62.45	0.93
7	70.52	62.78	51.85	0.84	42.04	0.21
9	55.44	60.13	47.89	0.00	32.46	0.00



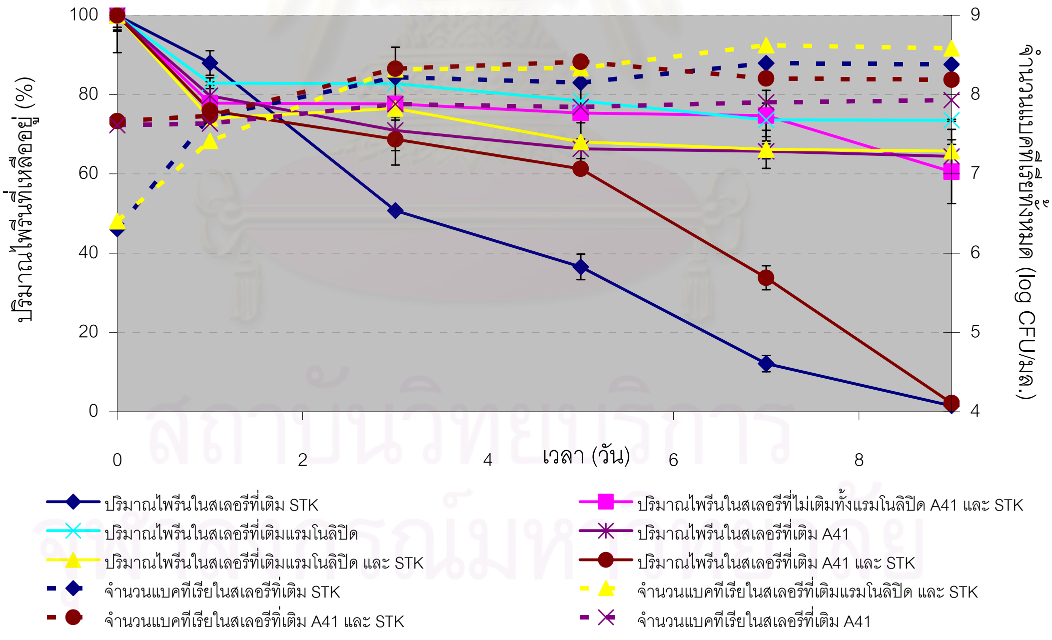
รูปที่ 4.22 การเจริญและการย่อยสลายฟีแนนทรีนเมื่อเติมแรมโนลิปิดหรือ *P.aeruginosa* สายพันธุ์ A41ร่วมกับกลุ่มแบคทีเรีย STK

สำหรับไพรีน พบว่าเมื่อเติม *P .aeruginosa* สายพันธุ์ A41 ร่วมกับกลุ่มแบคทีเรีย STK ไพรีนถูกสลายได้ไม่มากนักในระหว่างการทดลองเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่เติมกลุ่มแบคทีเรีย STK เพียงอย่างเดียว แต่ปริมาณไพรีนเริ่มลดลงอย่างรวดเร็วในวันที่ 5 ของการทดลองจนกระทั่งสิ้นสุดการทดลอง (รูปที่ 4.23) โดยพบว่ามีปริมาณไพรีนเหลืออยู่ 2.20% ในขณะที่ชุด

ควบคุมที่เติมกลุ่มแบคทีเรีย STK เพียงอย่างเดียวมีปริมาณไพรีนเหลืออยู่ 1.53% และชุดทดลองที่เติมแรมโนลิปิด ร่วมกับกลุ่มแบคทีเรีย STK มีปริมาณไพรีนเหลืออยู่ 65.73% ดังตารางที่ 4.13

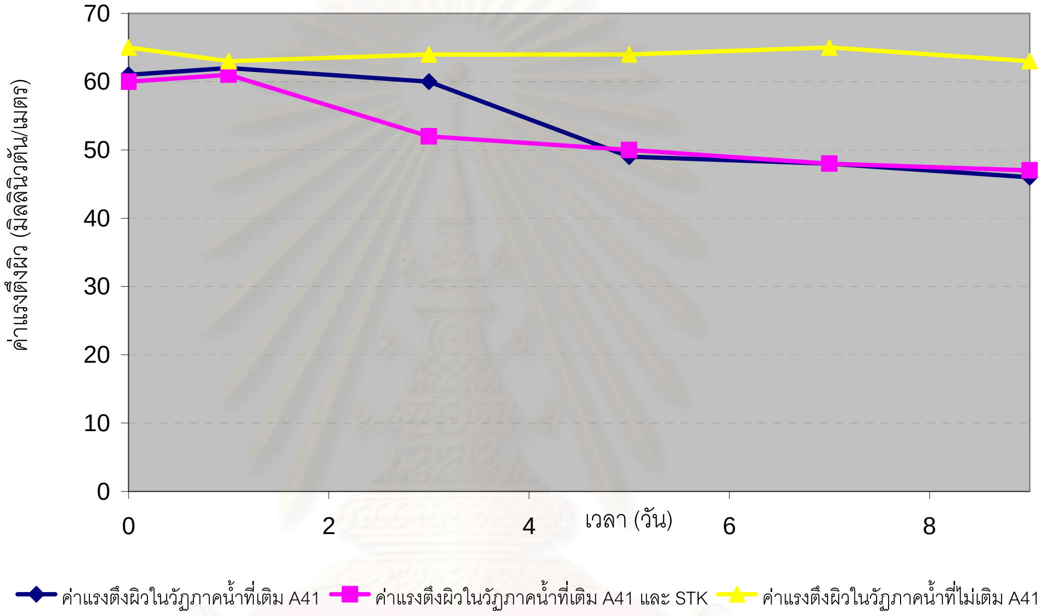
ตารางที่ 4.13 ปริมาณไพรีนที่เหลืออยู่ (%) ในสเลอรีเมื่อเติมแรมโนลิปิดหรือ *P.aeruginosa* สายพันธุ์ A41 ร่วมกับกลุ่มแบคทีเรีย STK

วันที่	ชุดที่ไม่เติมทั้งแรมโนลิปิด A41 และ STK	ชุดที่เติมแรมโนลิปิด	ชุดที่เติม A41	ชุดที่เติม STK	ชุดที่เติมแรมโนลิปิด และ STK	ชุดที่เติม A41 และ STK
0	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
1	77.98	82.88	79.74	88.79	74.06	75.98
3	77.69	82.79	70.99	52.04	76.54	68.72
5	75.37	78.45	66.34	33.36	68.08	61.30
7	74.72	73.64	65.71	10.19	66.21	33.80
9	60.59	73.52	64.43	1.53	65.73	2.20



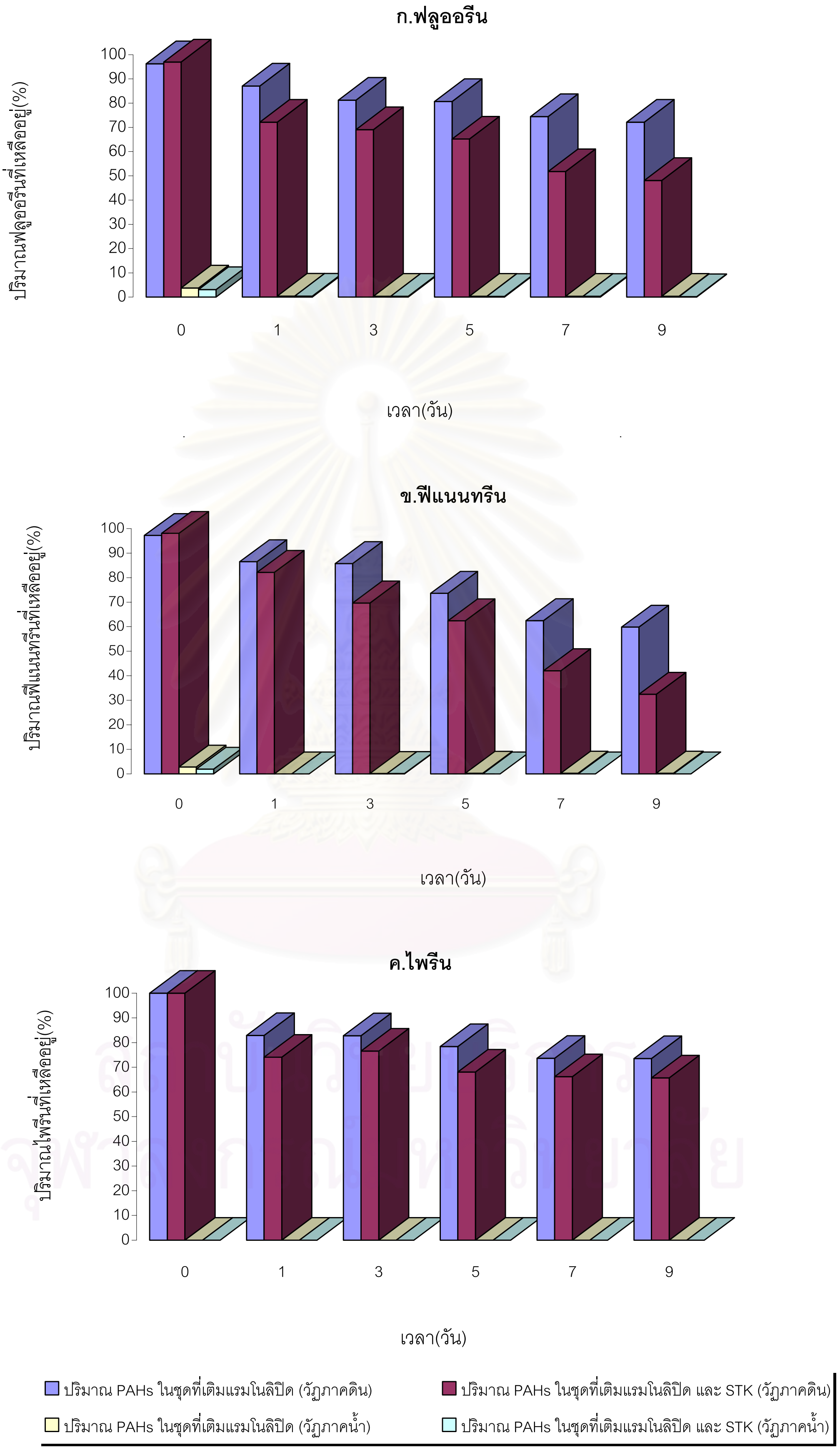
รูปที่ 4.23 การเจริญและการย่อยสลายไพรีนเมื่อเติมแรมโนลิปิดหรือ *P.aeruginosa* สายพันธุ์ A41ร่วมกับกลุ่มแบคทีเรีย STK

เมื่อเปรียบเทียบจำนวนแบคทีเรียในชุดทดลองที่เติม *P .aeruginosa* สายพันธุ์ A41 ร่วมกับกลุ่มแบคทีเรีย STK มีจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดเริ่มต้น 7.66 log CFUต่อมล. จากนั้นจะเพิ่มจำนวนเป็น 8.41 log CFUต่อมล. ในวันที่ 5 ของการทดลอง และลดลงเล็กน้อยเมื่อสิ้นสุดการทดลองคือมีจำนวน 8.19 log CFUต่อมล. และยังพบว่าค่าแรงตึงผิวในชุดที่เติม *P .aeruginosa* สายพันธุ์ A41 เพียงอย่างเดียว และชุดที่เติม *P .aeruginosa* สายพันธุ์ A41 ร่วมกับกลุ่มแบคทีเรีย STK มีค่าลดลงจาก 60 มิลลินิวตันต่อเมตร เป็น 46 และ 47 มิลลินิวตันต่อเมตร ตามลำดับ (รูปที่ 4.24)



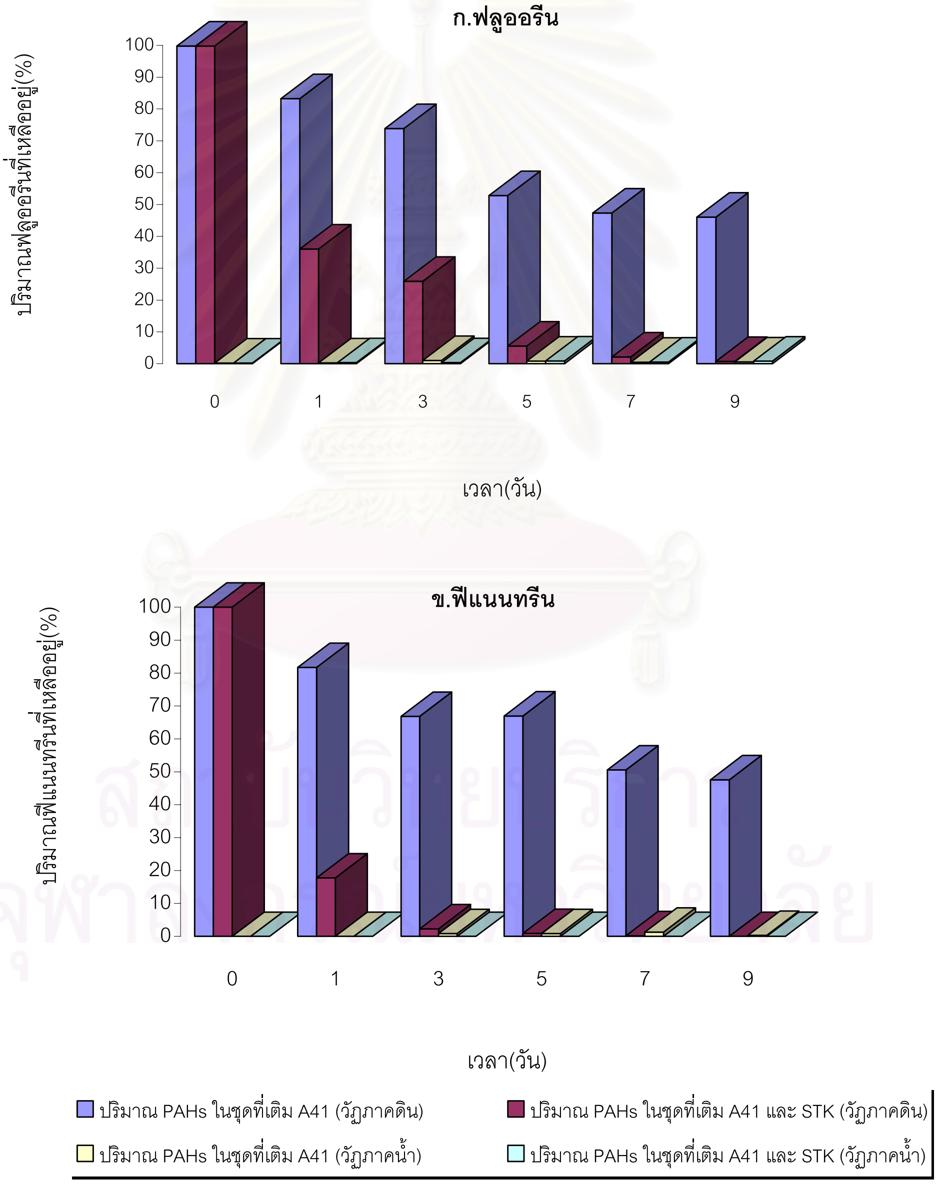
รูปที่ 4.24 ผลของ *P. aeruginosa* สายพันธุ์ A41ที่มีต่อค่าแรงตึงผิวในวัฏภาคน้ำ

เมื่อพิจารณาความสามารถในการชะ PAHs ออกสู่วัฏภาคน้ำของแรมโนลิปิดพบว่า ทั้งฟลูออรีน และฟีแนนทรีนถูกชะออกสู่วัฏภาคน้ำได้เพียงเล็กน้อย แต่ไม่สามารถชะไพรีนออกมาได้เลย (รูปที่ 4.25 ก.-ค.) โดยในวันที่ 0 ของการทดลอง ทั้งฟลูออรีน และฟีแนนทรีนถูกชะอยู่ในวัฏภาคน้ำ เป็นจำนวน 3.75% และ 2.80% ตามลำดับ สำหรับการย่อยสลายของ PAHs ในส่วนวัฏภาคดินนั้น พบว่าถูกย่อยสลายโดยกลุ่มแบคทีเรีย STK ได้เพียงเล็กน้อยเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่เติมแรมโนลิปิดเพียงอย่างเดียว ดังรูป 4.25-ค.

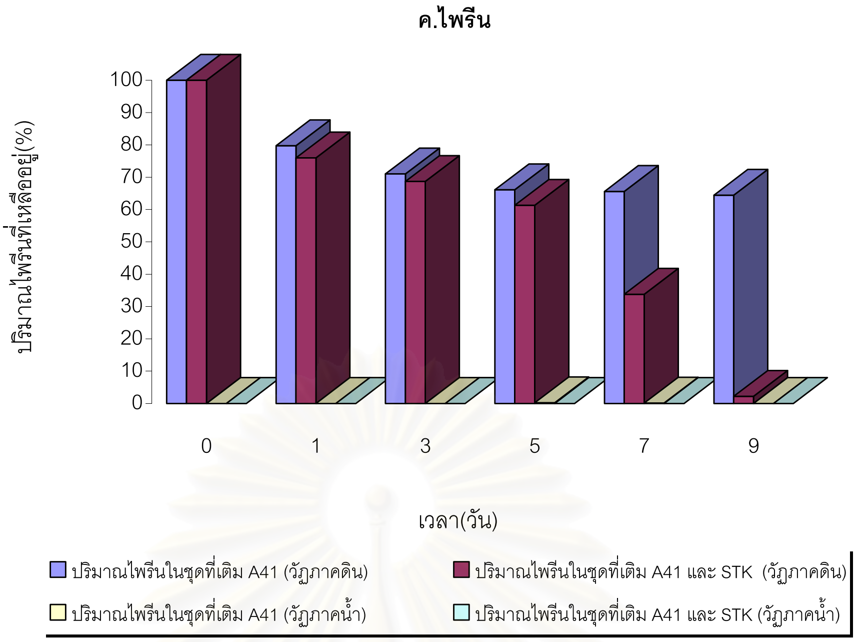


รูปที่ 4.25 ผลของแรมโนลิปิดที่มีต่อการชะสาร PAHs ออกจากดินสู่วัฏภาคน้ำ

ในกรณีที่เติม *P .aeruginosa* สายพันธุ์ A41 ร่วมกับกลุ่มแบคทีเรีย STK จะไม่พบ ฟลูออรีน ฟีแนนทรีน และไพรีน ถูกชะออกมาในช่วงแรกของการทดลอง แต่พบว่า ในวันที่ 3 ของการทดลอง ฟลูออรีน และฟีแนนทรีนถูกชะสู่วัฏภาคน้ำได้เล็กน้อยเป็นจำนวน 1.01% และ 0.84% ตามลำดับ สำหรับไพรีนถูกชะสู่วัฏภาคน้ำได้เล็กน้อยในวันที่ 4 ของการทดลองเป็นจำนวน 0.24% โดยสังเกตได้ว่า PAHs ถูกชะออกมาได้มากขึ้นหลังจากวันที่ 3 ของการทดลอง ซึ่งสอดคล้องกับค่าแรงตึงผิวที่ลดลง (รูปที่ 2.24) สำหรับการย่อยสลายของ PAHs โดยกลุ่มแบคทีเรีย STK ในวัฏภาคดินนั้นพบได้มากกว่าการเติมแรมโนลิปิดร่วมกับกลุ่มแบคทีเรีย STK (รูปที่ 4.26 ก.-ค.)



รูปที่ 4.26 ผลของ *P .aeruginosa* สายพันธุ์ A41 ที่มีต่อการชะสาร PAHs ออกจากดินสู่วัฏภาคน้ำ



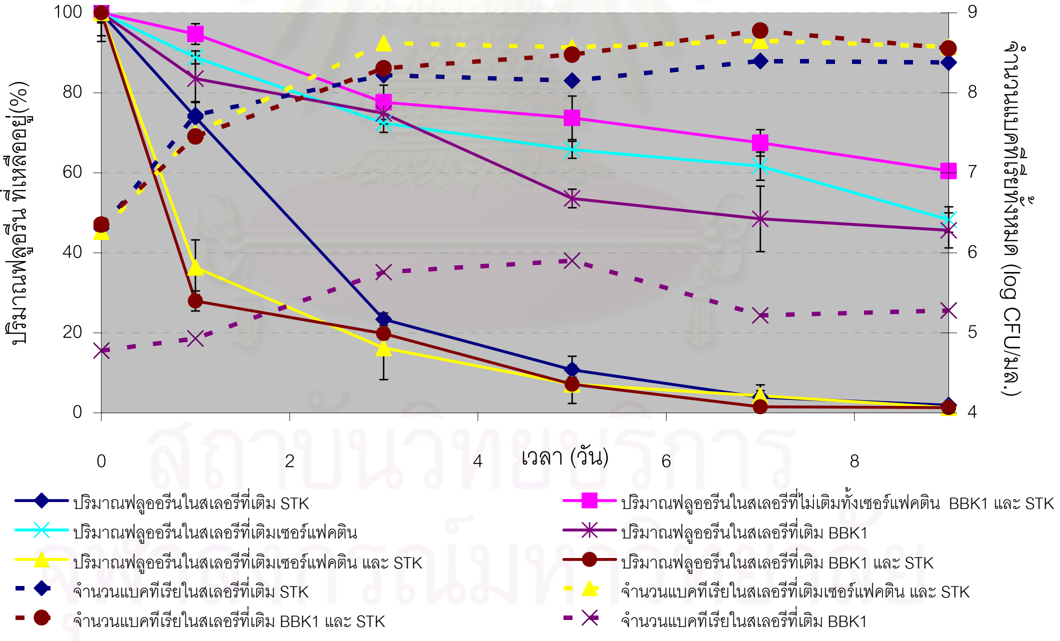
รูปที่ 4.26 (ต่อ) ผลของ *P .aeruginosa* สายพันธุ์ A41 ที่มีต่อการชะสาร PAHs ออกจากดินสู่วัฏภาคน้ำ

4.7.2 การเติมแบคทีเรียที่สร้างสารลดแรงตึงผิว *B.subtilis* สายพันธุ์ BBK1 เปรียบเทียบกับการเติมเซอร์แฟคติน ร่วมกับกลุ่มแบคทีเรีย STK

ในการทดลองนี้พบว่าเมื่อเติม *B.subtilis* สายพันธุ์ BBK1 ร่วมกับกลุ่มแบคทีเรีย STK มีประสิทธิภาพในการย่อยสลาย ฟลูออรีน และฟีแนนทรีนได้ใกล้เคียงกับการเติมเซอร์แฟคตินร่วมกับกลุ่มแบคทีเรีย STK และชุดควบคุมที่เติมกลุ่มแบคทีเรีย STK เพียงอย่างเดียว ดังแสดงในรูปที่ 4.27-4.28 เมื่อสิ้นสุดการทดลองมีปริมาณฟลูออรีนเหลืออยู่ในชุดทดลองที่เติม *B.subtilis* สายพันธุ์ BBK1 1.32% ในชุดทดลองที่เติมเซอร์แฟคตินร่วมกับกลุ่มแบคทีเรีย STK 1.33% และชุดควบคุมที่เติมกลุ่มแบคทีเรีย STK เพียงอย่างเดียว มีปริมาณฟลูออรีนเหลืออยู่ 1.93% (ตารางที่ 4.14)

ตารางที่ 4.14 ปริมาณฟลูออรีนที่เหลืออยู่ (%) ในสเลอรีเมื่อเติมเซอร์แฟคตินหรือ *B.subtilis* สายพันธุ์ BBK1 ร่วมกับกลุ่มแบคทีเรีย STK

วันที่	ชุดที่ไม่เติมทั้งเซอร์แฟคติน BBK1 และ STK	ชุดที่เติมเซอร์แฟคติน	ชุดที่เติม BBK1	ชุดที่เติม STK	ชุดที่เติมเซอร์แฟคติน และ STK	ชุดที่เติม BBK1 และ STK
0	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
1	96.14	88.86	83.53	73.93	36.36	27.95
3	78.50	72.41	74.87	23.39	16.22	19.82
5	74.31	65.77	53.60	10.79	7.13	7.12
7	67.90	61.67	48.49	3.92	4.28	1.51
9	62.43	48.31	45.62	1.93	1.33	1.32

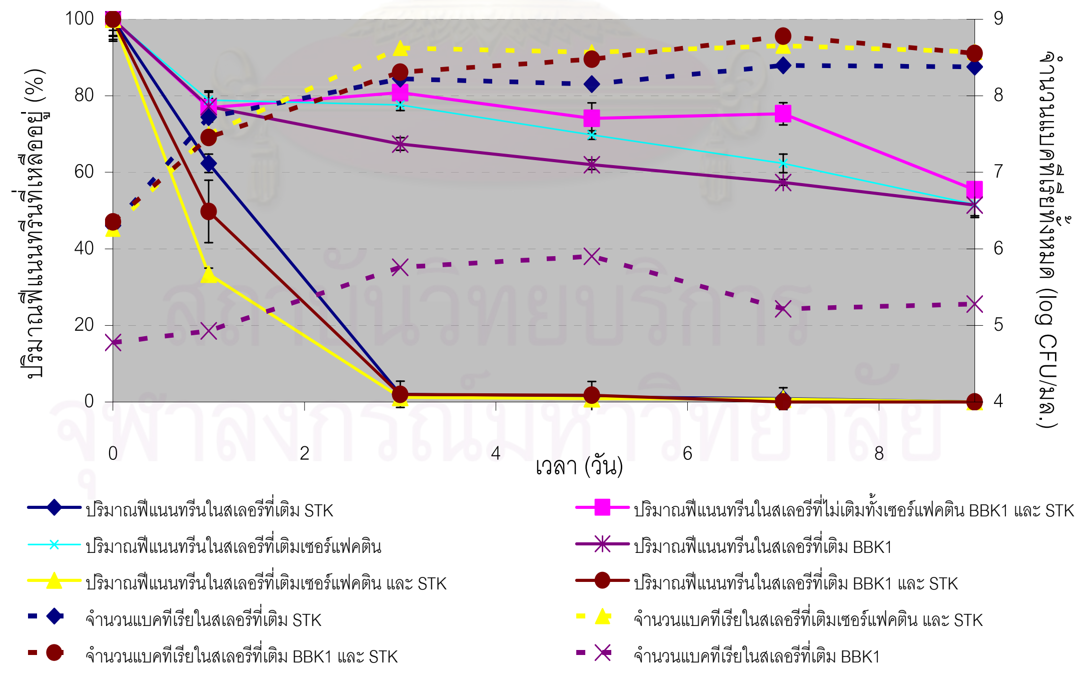


รูปที่ 4.27 การเจริญและการย่อยสลายฟลูออรีนเมื่อเติมเซอร์แฟคตินหรือ *B.subtilis* สายพันธุ์ BBK1ร่วมกับกลุ่มแบคทีเรีย STK

ในวันที่ 7 ของการทดลองพบว่าฟีแนนทรีนในชุดทดลองที่เติม *B.subtilis* สายพันธุ์ BBK1 ไม่สามารถตรวจพบได้ด้วย GC-FID (รูปที่ 4.28) สำหรับชุดทดลองที่เติมเซอร์แฟคตินร่วมกับกลุ่มแบคทีเรีย STK มีปริมาณฟีแนนทรีนเหลืออยู่ 0.73% ชุดควบคุมที่เติมกลุ่มแบคทีเรีย STK เพียงอย่างเดียว มีปริมาณเหลืออยู่ 0.84% (ตารางที่ 4.15)

ตารางที่ 4.15 ปริมาณฟีแนนทรีนที่เหลืออยู่ (%) ในสเลอรีดินเมื่อเติมเซอร์แฟคตินหรือ *B.subtilis* สายพันธุ์ BBK1 ร่วมกับกลุ่มแบคทีเรีย STK

วันที่	ชุดที่ไม่เติมทั้งเซอร์แฟคติน BBK1 และ STK	ชุดที่เติมเซอร์แฟคติน	ชุดที่เติม BBK1	ชุดที่เติม STK	ชุดที่เติมเซอร์แฟคติน และ STK	ชุดที่เติม BBK1 และ STK
0	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
1	76.88	78.83	77.21	62.36	33.43	49.78
3	80.81	77.57	67.41	2.01	1.22	1.96
5	74.09	69.74	62.00	1.32	0.83	1.74
7	75.29	62.32	57.36	0.84	0.73	0.00
9	55.44	51.66	51.44	0.00	0.00	0.00



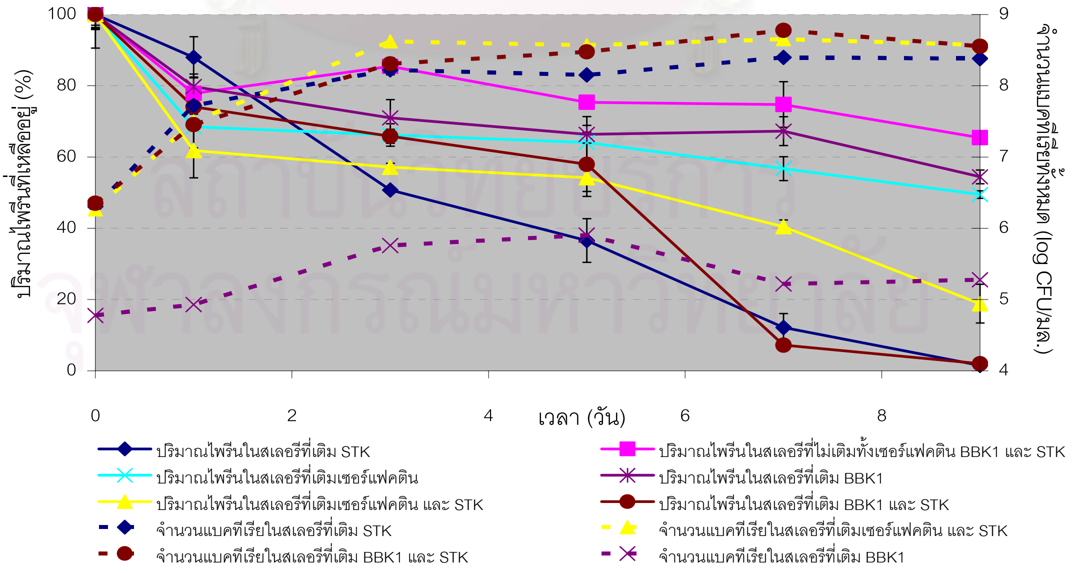
รูปที่ 4.28 การเจริญและการย่อยสลายฟีแนนทรีนเมื่อเติมเซอร์แฟคตินหรือ *B.subtilis* สายพันธุ์ BBK1ร่วมกับกลุ่มแบคทีเรีย STK

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สำหรับการย่อยสลายของไพรีนเมื่อเติม *B.subtilis* สายพันธุ์ BBK1 ร่วมกับกลุ่มแบคทีเรีย STK พบว่า ใน 5 วันแรกของการทดลองมีปริมาณไพรีนเหลืออยู่ 37.42% ชุดควบคุมที่เติมกลุ่มแบคทีเรีย STK เพียงอย่างเดียวมีปริมาณไพรีนเหลืออยู่ 57.96% แต่หลังจากวันที่ 5 ปริมาณไพรีนในชุดทดลองจะลดลงอย่างรวดเร็วจนกระทั่งสิ้นสุดการทดลอง (รูปที่ 4.29) โดยจะมีปริมาณไพรีนเหลืออยู่ 1.44% ซึ่งให้ผลการย่อยสลายใกล้เคียงกับชุดควบคุมที่เติมกลุ่มแบคทีเรีย STK เพียงอย่างเดียวที่มีไพรีนเหลืออยู่ 1.99% (ตารางที่ 4.16)

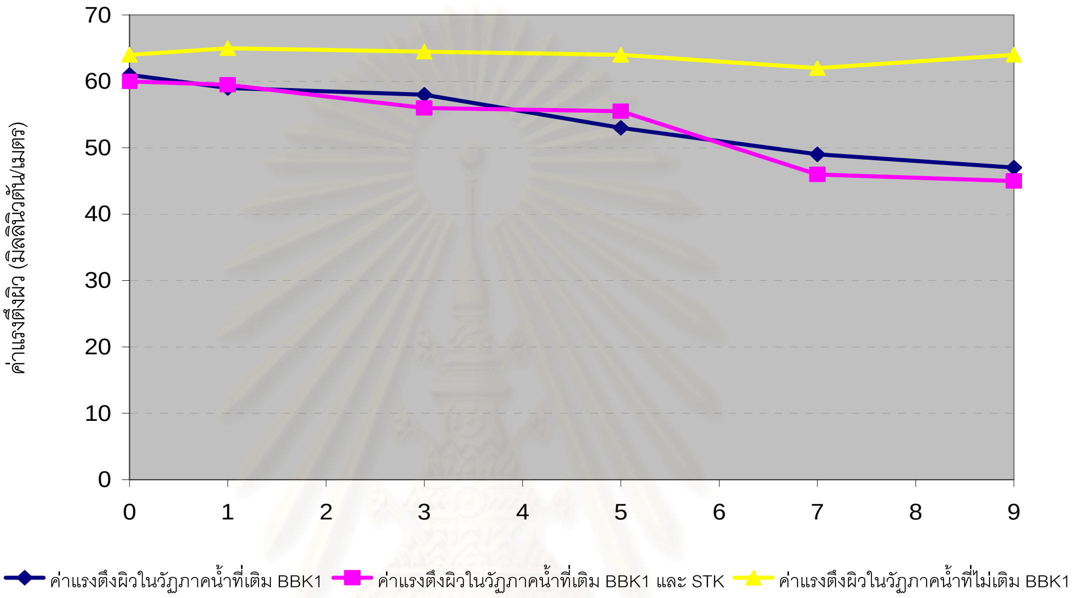
ตารางที่ 4.16 ปริมาณไพรีนที่เหลืออยู่ (%) ในสเลอรีดินเมื่อเติมเซอร์แฟคตินหรือ *B.subtilis* สายพันธุ์ BBK1 ร่วมกับกลุ่มแบคทีเรีย STK

วันที่	ชุดที่ไม่เติมทั้งเซอร์แฟคติน BBK1 และ STK	ชุดที่เติมเซอร์แฟคติน	ชุดที่เติม BBK1	ชุดที่เติม STK	ชุดที่เติมเซอร์แฟคติน และ STK	ชุดที่เติม BBK1 และ STK
0	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
1	78.05	68.46	79.74	74.07	61.81	89.18
3	85.43	66.17	70.99	65.80	57.16	51.76
5	75.37	64.07	66.34	57.96	54.18	37.42
7	74.72	56.73	67.25	7.20	40.44	13.47
9	65.42	49.45	54.41	1.99	18.84	1.44



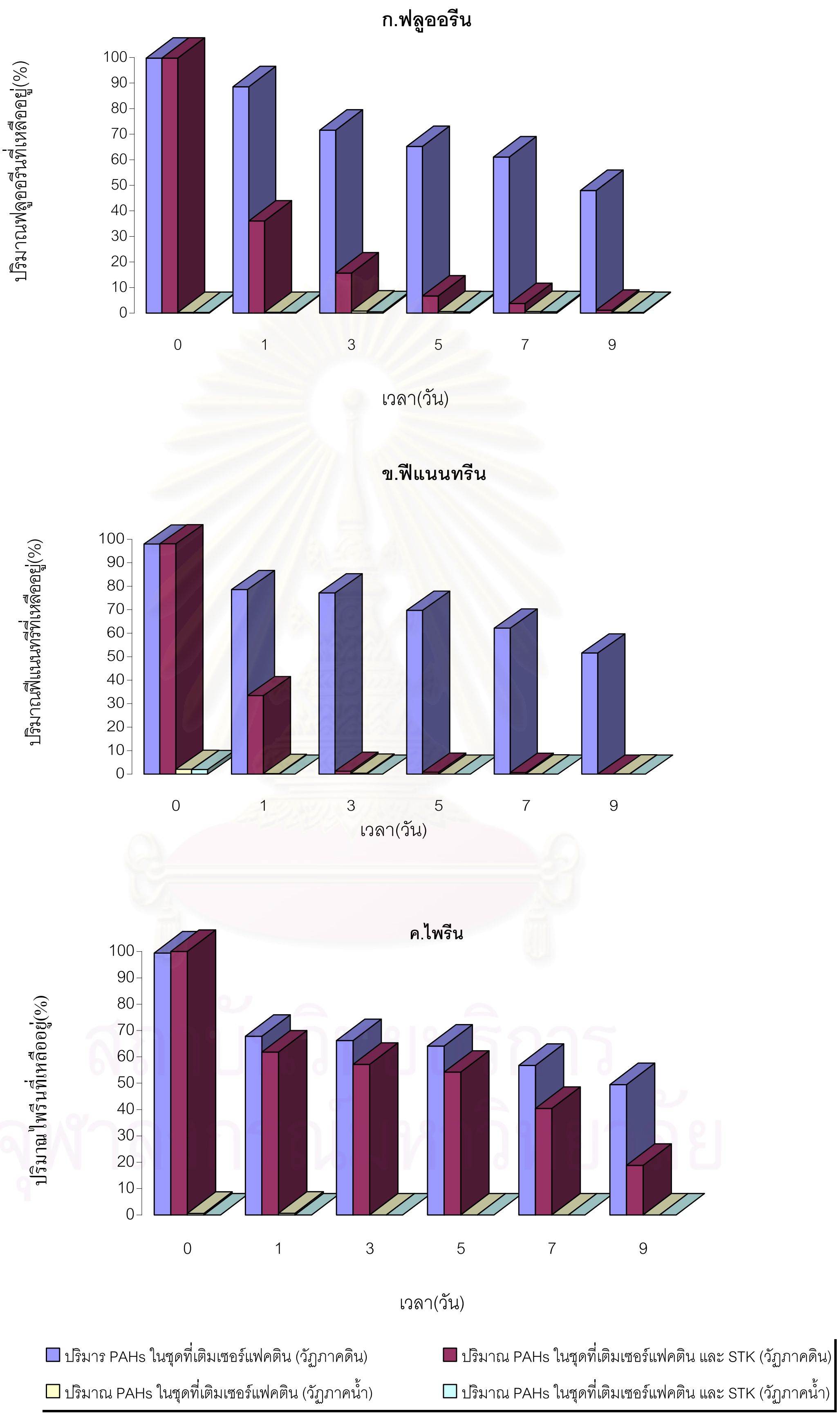
รูปที่ 4.29 การเจริญและการย่อยสลายไพรีนเมื่อเติมเซอร์แฟคตินหรือ *B.subtilis* สายพันธุ์ BBK1 ร่วมกับกลุ่มแบคทีเรีย STK

ปริมาณที่ลดลงของ PAHs จะสอดคล้องกับจำนวนแบคทีเรียที่เพิ่มขึ้นทั้งในชุดทดลองที่เติมเซอร์แฟคติน และ *B.subtilis* สายพันธุ์ BBK1 และสอดคล้องกับค่าแรงตึงผิวที่ลดลง โดยค่าแรงตึงผิวในชุดที่เติม *B.subtilis* สายพันธุ์ BBK1 และชุดทดลองที่เติม *B.subtilis* สายพันธุ์ BBK1 ร่วมกับกลุ่มแบคทีเรีย STK มีค่าลดลงจาก 60 เป็น 46 และ 45 มิลลินิวตันต่อเมตร ตามลำดับ (รูปที่ 4.30)

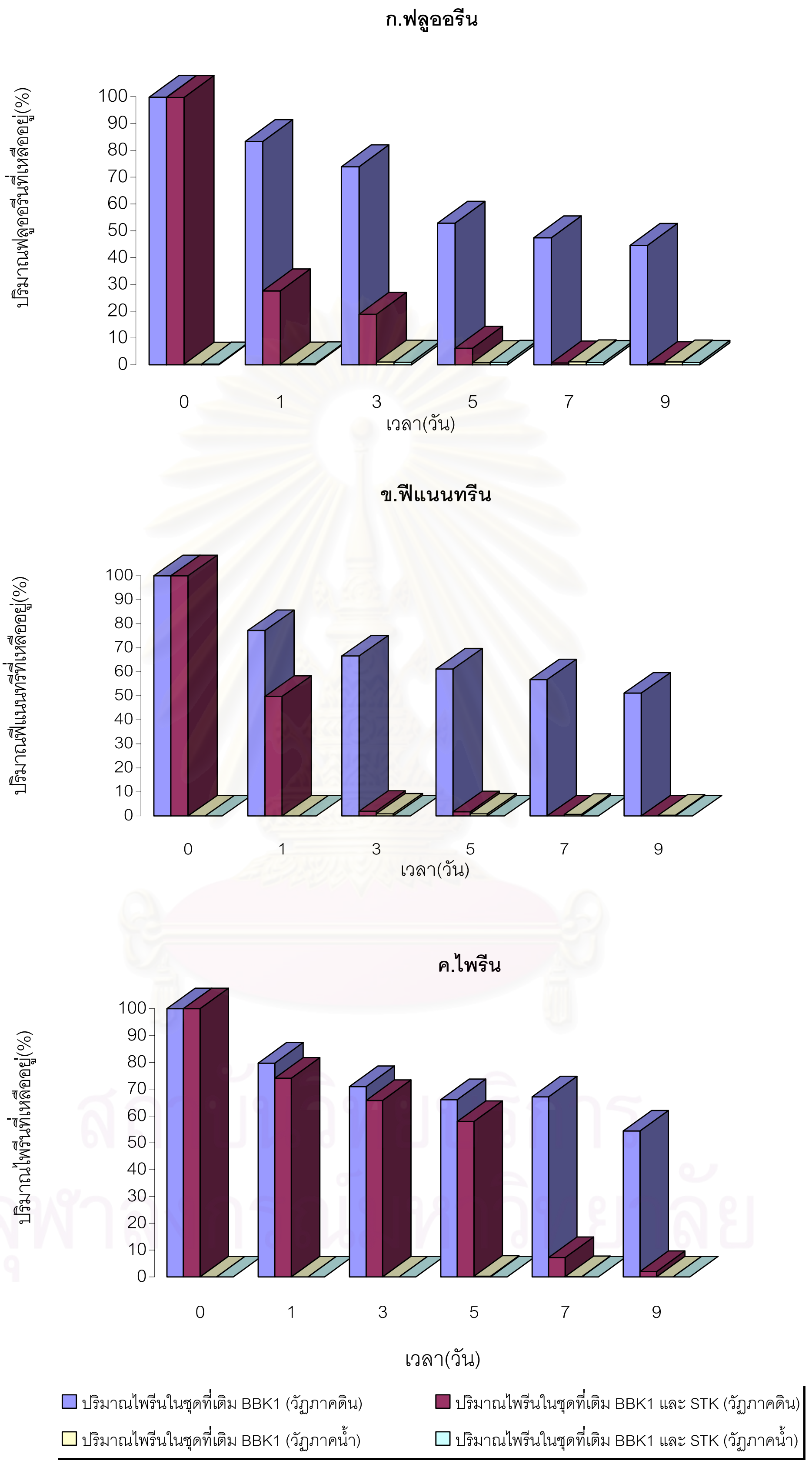


รูปที่ 4.30 ผลของ *B. subtilis* สายพันธุ์ BBK1 ที่มีต่อค่าแรงตึงผิวในวัฏภาคน้ำ

เมื่อเติมเซอร์แฟคติน และ *B. subtilis* สายพันธุ์ BBK1 ร่วมกับกลุ่มแบคทีเรีย STK พบว่าฟลูออรีน ฟีแนนทรีน และไพรีน ถูกชะออกจากวัฏภาคดินสู่วัฏภาคน้ำได้น้อยมาก (รูปที่ 4.31 ก.-ค. และรูปที่ 4.32 ก.-ค.) แต่พบว่าการเติม *B.subtilis* สายพันธุ์ BBK1 ฟลูออรีน และฟีแนนทรีนเริ่มถูกชะออกจากดินได้มากหลังจากวันที่ 3 ของการทดลอง ซึ่งสอดคล้องกับค่าแรงตึงผิวที่ลดลง นอกจากนี้ในวัฏภาคดินยังมีการย่อยสลายฟลูออรีน และฟีแนนทรีนโดยจุลินทรีย์เป็นปริมาณมากเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมทั้งในชุดทดลองที่เติมเซอร์แฟคติน และ *B.subtilis* สายพันธุ์ BBK1 ในขณะที่ในชุดทดลองที่เติมเซอร์แฟคติน ร่วมกับกลุ่มแบคทีเรีย STK ไพรีนถูกย่อยสลายได้น้อยกว่า (รูปที่ 4.31- ค.)



รูปที่ 4.31 ผลของเซอร์แฟคตินที่มีต่อการชะสาร PAHs ออกจากดินสู่วัฏภาคน้ำ



รูปที่ 4.32 ผลของ *B.subtilis* สายพันธุ์ BBK1 ที่มีต่อการชะสาร PAHs ออกจากดินสู่วัฎภาคน้ำ

บทที่ 5

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

ในงานวิจัยนี้ศึกษาการเติมสารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์ และชีวภาพเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการย่อยสลายสาร PAHs ในดิน สำหรับดินที่นำมาใช้ในการทดลองนั้นไม่มีประวัติการปนเปื้อน PAHs มาก่อน เมื่อทดสอบด้วย GC-FID แล้วไม่พบสาร PAHs และเมื่อวิเคราะห์ลักษณะเนื้อดินเป็นดินร่วนปนทราย มีอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนต่อฟอสฟอรัส (C:N:P) เท่ากับ 123: 10: 2 ซึ่งเป็นอัตราส่วนที่เหมาะสมของการบำบัด PAHs ในดินใกล้เคียงกับรายงานของ Hupe และคณะ (2001) ที่มีอัตราส่วนเท่ากับ 100: 8: 2 โดยนำดินนี้มาทำให้ปนเปื้อน ฟลูออรีน ฟีแนนทรีน และไพรีน เพื่อนำไปใช้ในการทดลองต่อไป

เมื่อทดสอบประสิทธิภาพของสารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์ (Tween 80 Triton X-100 Brij 35 SDS และ CTAB) และสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ (แรมโนลิปิดที่ผลิตโดย *P. aeruginosa* สายพันธุ์ A41 และเซอร์แฟคติน ที่ผลิตโดย *B. subtilis* สายพันธุ์ BBK1) โดยวัดค่า CMC และ ACMC (CMC ในสารละลายดิน) พบว่าค่า ACMC ของสารลดแรงตึงผิวทุกชนิด จะมีค่ามากกว่าค่า CMC ซึ่งความแตกต่างดังกล่าวเกิดจากในระบบสเลอรีดิน สารลดแรงตึงผิวจะถูกดูดซับไว้ในอนุภาคดิน โดยเฉพาะ CTAB ที่เป็นสารลดแรงตึงผิวชนิดประจุบวก จะถูกดูดซับไว้เป็นปริมาณมากในอนุภาคดิน (Irkhin และคณะ, 1989) ทำให้ประสิทธิภาพของสารลดแรงตึงผิวลดลง เป็นเหตุให้ค่าความเข้มข้นที่ก่อให้เกิดไมเซลล์มีค่าสูงขึ้น (Lui และคณะ,1992 ; Uram และ Pekdemir, 2004) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Sun และ Puri (1997) ที่รายงานว่าเมื่อเติมสารลดแรงตึงผิวลงไปในดิน สารลดแรงตึงผิวจะถูกดูดซับไว้ในดิน ทั้งนี้จะขึ้นอยู่กับลักษณะเฉพาะของดินด้วย

Zhou และ Zhu (2005) รายงานว่า การเติมสารลดแรงตึงผิวลงไปในปริมาณน้อยๆจะยิ่งทำให้ PAHs ยึดติดกับดินได้แน่นขึ้นเนื่องจากดินจะดูดซับสารลดแรงตึงผิวไว้ในอนุภาคดิน ดังนั้นการบำบัดทางชีวภาพจำเป็นต้องใช้ปริมาณสารลดแรงตึงผิวในปริมาณมากพอที่จะเพิ่มประสิทธิภาพการบำบัดได้ และควรจะมีค่ามากกว่า CMC

จากการทดสอบความสามารถของสารลดแรงตึงผิวในการชะ PAHs ออกจากดินในระบบสเลอรีอัตราส่วน 1:8 (กรัม/มล.) พบว่าสารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์ CTAB SDS Brij 35 Tween 80 และ Triton X100 ที่มีความเข้มข้นมากกว่าค่า ACMC สามารถชะไพรีน ฟีแนนทรีน และ

ฟลูออรีนออกจากดินสู่วัฏภาคน้ำได้แปรตามความเข้มข้น สอดคล้องกับรายงานของ Edward และคณะ (1991) ที่รายงานว่า Brij 30 Triton X-100 Tergitol NP-10 และ Igepal CA-270 ที่มีความเข้มข้นมากกว่าค่า CMC สามารถเพิ่มการละลายแนพธาลีน ฟีแนนทรีน และไพรีนได้

Cheng และ Wong (2006) รายงานว่า Tween 80 ที่มีความเข้มข้น 150 มก./ลิตร (มากกว่าค่า CMC) สามารถชะฟีแนนทรีน และไพรีนออกจากดินสู่วัฏภาคน้ำได้ 5.8% และ 2.1% ตามลำดับ ซึ่งความสามารถในการชะขึ้นอยู่กับปริมาณของสารลดแรงตึงผิวที่ใช้ และประสิทธิภาพของสารลดแรงตึงผิว โดย Pinto และ Moore (2000) รายงานว่า Tween 80 ที่มีความเข้มข้นมากกว่าค่า CMC 1000 เท่า สามารถชะไพรีน ไครซีน และเบนโซ[เอ]ไพรีนออกจากดินได้มากกว่า 50%

ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าแรมโนลิปิดที่มีความเข้มข้นมากกว่าค่า ACMC 10 เท่า สามารถชะ PAHs ออกจากดินได้เพียงเล็กน้อย ในขณะที่เซอร์แฟคตินที่มีความเข้มข้น 10 เท่าของ ACMC สามารถชะฟลูออรีนได้เล็กน้อย แต่ไม่สามารถชะฟีแนนทรีน และไพรีนได้เลย มีรายงานว่าแรมโนลิปิดที่ผลิตโดย *P. aeruginosa* UG2 มีประสิทธิภาพในการชะสารประกอบไฮโดรคาร์บอนออกจากดินได้ ซึ่งความสามารถดังกล่าวขึ้นอยู่กับชนิดของไฮโดรคาร์บอน และความเข้มข้นสารลดแรงตึงผิวที่ใช้ด้วย (Scheibenbogen และคณะ, 1994)

จากการทดลองผลกระทบด้านการเจริญของกลุ่มแบคทีเรีย STK พบว่า Brij 35 Tween 80 และTriton X-100 ไม่มีผลด้านลบต่อกลุ่มแบคทีเรีย STK สำหรับ SDS มีผลด้านลบต่อการเจริญเล็กน้อย เนื่องจากเมื่อใช้ความเข้มข้นที่สูงขึ้นกลุ่มแบคทีเรียมีการเจริญลดลง ในขณะที่ CTAB ซึ่งเป็นสารลดแรงตึงผิวประจุบวก กลุ่มแบคทีเรีย STK ไม่สามารถเจริญได้ในทุกความเข้มข้น อาจเกิดจากค่า ACMC ของ CTAB สูงกว่าค่า CMC ถึง 18.75 เท่า จึงต้องใช้ CTAB ในปริมาณมาก ก่อให้เกิดความเป็นพิษต่อกลุ่มแบคทีเรีย STK โดยมีรายงานว่า CTAB เป็นพิษต่อแบคทีเรียทั้งแกรมบวก และแกรมลบ (Irkhin และคณะ, 1989) บางรายงานกล่าวว่าสารลดแรงตึงผิวอาจเป็นพิษต่อแบคทีเรียโดยทำให้เซลล์เมมเบรนแตกเนื่องจากเซลล์มี permeabilization เพิ่มขึ้น (Heipieper และคณะ, 1994)

หลังจากคัดเลือกสารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์ Brij 35 เป็นตัวแทนสารลดแรงตึงผิวชนิดไร้ประจุ และ SDS เป็นตัวแทนสารลดแรงตึงผิวประจุลบ ที่มีความเข้มข้นมากกว่าค่า ACMC 15 และ 10 เท่า ตามลำดับ แรมโนลิปิด และ เซอร์แฟคติน ที่มีความเข้มข้นมากกว่าค่า ACMC 10

เท่า รวมทั้งการเติม *P. aeruginosa* สายพันธุ์ A41และ *B. subtilis* สายพันธุ์ BBK1 ร่วมกับกลุ่มแบคทีเรีย STK เพื่อศึกษาผลที่มีต่อการย่อยสลายฟลูออรีน ฟีแนนทรีน และไพรีน ในระบบสเลอรีดินอัตราส่วน 1:8 พบว่าการเติม Brij 35 สามารถเพิ่มการย่อยสลายฟลูออรีนได้ดีกว่าการไม่เติมสารนี้ 2.85 เท่า และมีประสิทธิภาพมากกว่าการเติม SDS แรมโนลิปิด เซอร์แฟคติน *P. aeruginosa* สายพันธุ์ A41 และ *B. subtilis* สายพันธุ์ BBK1 ทั้งนี้การย่อยสลายดังกล่าวสอดคล้องกับการเจริญของกลุ่มแบคทีเรีย STK Labare และ Alexander (1995) พบว่าเมื่อทดลองบำบัดดินปนเปื้อน PAHs แบบสเลอรีด้วยอัตราส่วนดินต่อน้ำ 1:1 (กรัม/มล.) สามารถส่งเสริมการเจริญ และการย่อยสลายฟีแนนทรีนได้ดีขึ้นจาก 4.4% เป็น 36.9% เนื่องจากน้ำจะช่วยเพิ่มพื้นที่ผิวสัมผัสระหว่างจุลินทรีย์ และฟีแนนทรีน การเพิ่มพื้นที่ผิวสัมผัสดังกล่าวเกิดจากดินแตกตัวทำให้ PAHs เคลื่อนไปยังวัฏภาคน้ำอย่างรวดเร็ว รวมทั้งยังเพิ่มการเคลื่อนที่ของจุลินทรีย์อีกด้วย (Doick และ Semple, 2003) เช่นเดียวกับรายงานของ Fu และ Alexander (1995) ที่ทำการบำบัด PAHs ในสเลอรีดินด้วยอัตราส่วน 1:10 พบว่าสามารถเพิ่มการย่อยสลายฟีแนนทรีนได้

จากสมบัติของสาร PAHs ที่มีความสามารถละลายน้ำได้น้อย จึงทำให้จุลินทรีย์เข้าไปสัมผัสและนำสาร PAHs มาใช้ในการเจริญได้ยาก ซึ่งเป็นข้อจำกัดในการบำบัดสารนี้ในดิน ดังนั้นการเติมสารลดแรงตึงผิวสามารถเพิ่มการละลายของสาร PAHs ในน้ำ ส่งผลให้จุลินทรีย์สามารถนำไปใช้ในการเจริญได้ง่ายขึ้น และทำให้มีอัตราการย่อยสลายเพิ่มขึ้น (Guerin และ Jones, 1988a, 1988b; Arostein และ Alexander, 1993; Tiehm, 1994; Jimenez และ Bartha, 1996; Cuny และคณะ, 1999; Van Hamme และ Ward, 1999)

สำหรับการเติม SDS พบว่ามีการยับยั้งการย่อยสลายฟลูออรีน ฟีแนนทรีน และไพรีน อาจเกิดจากการใช้ปริมาณ SDS มากเกินไป จึงเกิดการยับยั้งการย่อยสลาย (Laha และ Luthy, 1992; Arostein และ Alexander, 1993) ซึ่งสอดคล้องกับจำนวนแบคทีเรียในชุดทดลองที่เติม SDS ซึ่งมีจำนวนแบคทีเรียน้อยกว่าชุดควบคุม

การใช้สารลดแรงตึงผิวเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการบำบัดสาร PAHs นั้น บางครั้งพบว่าเกิดการยับยั้งการย่อยสลายเนื่องจากสารลดแรงตึงผิวเป็นพิษต่อจุลินทรีย์ (Tiehm, 1994; Roch และ Alexander, 1995; Tsomides และ คณะ, 1995) หรือบางชนิดถูกใช้เป็นแหล่งคาร์บอนได้ดีกว่า (Deschênes และคณะ, 1996; Tiehm และคณะ, 1997) บางกรณีเกิดการยับยั้งเนื่องจากคุณสมบัติของสารลดแรงตึงผิวเอง ที่มีโครงสร้างเป็นแบบแอมฟิพาติก (amphipatic structure) ซึ่งประกอบด้วยส่วนที่มีขั้ว และไม่มีขั้ว จึงทำให้สารลดแรงตึงผิวรวมตัวอยู่บริเวณผิวประจัน

ระหว่างวัฏภาคน้ำ และวัฏภาคสาร PAHs (West และ Harwell, 1992) ทำให้จุลินทรีย์เข้าไปสัมผัสกับ PAHs ได้ยากขึ้น ส่งผลให้มีการย่อยสลายได้น้อยลง (Ortega-Calvo และ Alexander, 1994)

การเติม *P.aeruginosa* สายพันธุ์ A41 หรือ *B. subtilis* สายพันธุ์ BBK1 ร่วมกับกลุ่มแบคทีเรีย STK ไม่ส่งเสริมการย่อยสลาย ฟลูออรีน ฟีแนนทรีน และไพรีน โดยให้ผลการย่อยสลายใกล้เคียงกับชุดควบคุม แต่พบว่าค่าแรงตึงผิวของสารละลายดินลดลงในช่วงหลังของการทดลอง อาจเป็นไปได้ว่า แบคทีเรียทั้ง 2 สายพันธุ์นี้สามารถสร้างสารลดแรงตึงผิวจากการใช้ PAHs ในการเจริญได้เล็กน้อย เนื่องจากเมื่อพิจารณาการเจริญของแบคทีเรียในชุดทดลองที่เติม *P. aeruginosa* สายพันธุ์ A41 หรือ *B. subtilis* สายพันธุ์ BBK1 เพียงอย่างเดียว พบว่ามีจำนวนเพิ่มขึ้นในวันที่ 3 ของการทดลองซึ่งสอดคล้องกับค่าแรงตึงผิวที่เริ่มลดลง โดยเมื่อสิ้นสุดการทดลองค่าแรงตึงผิวในวัฏภาคน้ำลดลงจาก 60 มิลลินิวตันต่อเมตร เป็น 47 และ 45 มิลลินิวตันต่อเมตร ตามลำดับ ซึ่งส่งผลให้มีการชะฟลูออรีน ฟีแนนทรีน และไพรีนสู่วัฏภาคน้ำได้เล็กน้อย อีกทั้งปริมาณฟลูออรีน ฟีแนนทรีน และไพรีนลดลงเล็กน้อยเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม Déziel และคณะ (1996) รายงานว่า *P. aeruginosa* สายพันธุ์19Sj สามารถสร้างแรมโนลิปิด ด้วยการใช้แนพธาลีน และฟีแนนทรีนในการเจริญได้ ส่งผลให้มีค่าแรงตึงผิวลดลง ทำให้แนพธาลีนละลายออกสู่วัฏภาคน้ำได้

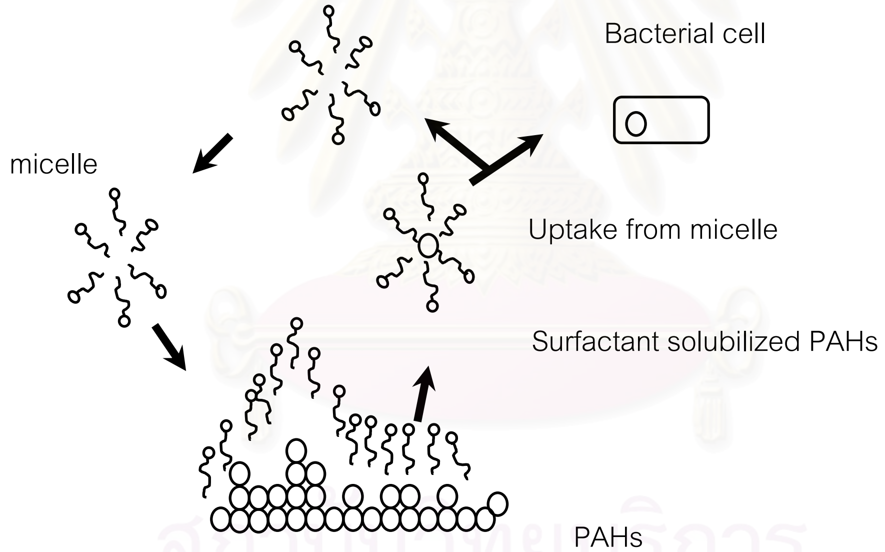
จากการทดลองพบว่าเมื่อเติมแรมโนลิปิดลงไปในระบบเกิดการยับยั้งการย่อยสลายฟลูออรีน ฟีแนนทรีน และไพรีน แต่พบว่ามีการเจริญของกลุ่มแบคทีเรีย STK ใกล้เคียงกับชุดควบคุม เป็นไปได้ว่ากลุ่มแบคทีเรีย STK อาจใช้แรมโนลิปิด และสารอาหารที่มีอยู่ในดินเป็นแหล่งพลังงาน และคาร์บอนแทนการใช้ PAHs (Marcoux และคณะ, 2000; Maslin และ Maier, 2000)

เมื่อพิจารณาปริมาณ PAHs ในวัฏภาคดิน และน้ำพบว่า Brij 35 และ SDS สามารถชะฟลูออรีน ฟีแนนทรีน และไพรีน ออกจากดินสู่วัฏภาคน้ำได้เป็นปริมาณมาก โดยในชุดทดลองที่เติมสารลดแรงตึงผิวเพียงอย่างเดียว Brij 35 สามารถชะฟลูออรีน ฟีแนนทรีน และไพรีนออกสู่วัฏภาคน้ำได้โดยเฉลี่ย 13.10% 17.97% 26.07% ตามลำดับ และ SDS สามารถชะฟลูออรีน ฟีแนนทรีน และไพรีนออกสู่วัฏภาคน้ำได้โดยเฉลี่ย 19.65% 19.94% และ 21.94% ตามลำดับ อย่างไรก็ตามการย่อยสลายโดยจุลินทรีย์ในชุดทดลองที่เติมสารลดแรงตึงผิวร่วมกับกลุ่มแบคทีเรีย STK พบว่ามีการย่อยสลาย PAHs ในวัฏภาคดินมากกว่าวัฏภาคน้ำ ซึ่งอาจเกิดจากสารลดแรงตึงผิวช่วยให้แบคทีเรียยึดติดกับอนุภาคดินที่มี PAHs ทำให้ลดระยะทางการแพร่ของ PAHs ให้สั้นลง โดยทำให้เซลล์ของแบคทีเรียมีสมบัติไม่ชอบน้ำ (Tang และคณะ, 1998; Poeton และคณะ,

1999) และทำให้แบคทีเรียนำสารเข้าสู่เซลล์ได้ดีกว่าแบคทีเรียที่อยู่ในรูปอิสระ (Bastiean และคณะ, 2000) หรือการสัมผัสกับไมเซลล์โดยตรงด้วย cell envelope ร่วมกับการเกิด membrane fusion (Miller และ Bartha, 1989) รวมทั้งการที่กลุ่มแบคทีเรีย STK มีสมบัติไม่ชอบน้ำสูง จึงคาดว่ามีบทบาทสำคัญในการนำสารประกอบที่มีสมบัติไม่ชอบน้ำเข้าสู่เซลล์ได้ (ทิมากร แสงดำ, 2547)

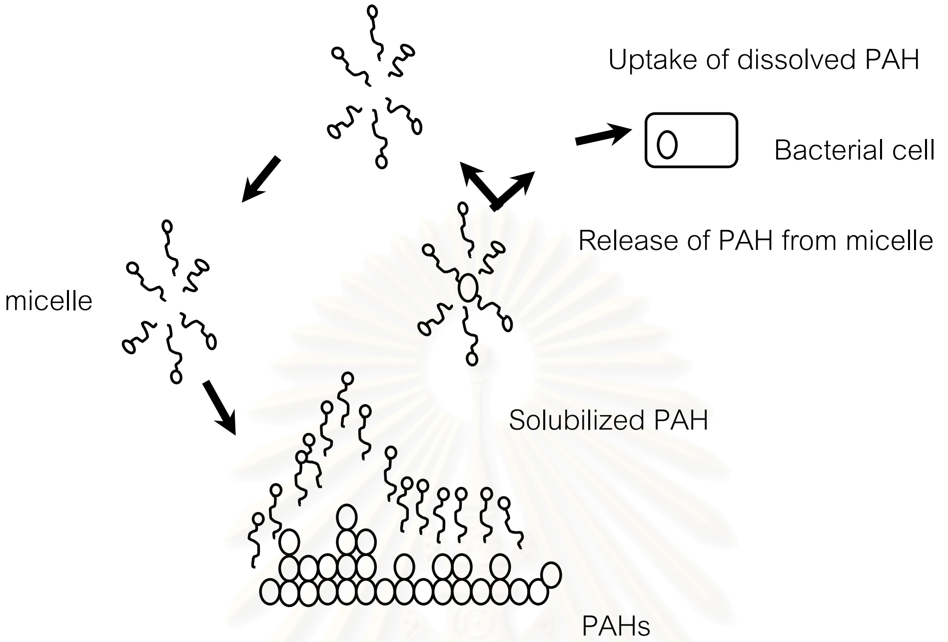
Schippers และคณะ, 2000 รายงานว่าการเติมสารลดแรงตึงผิวเพื่อส่งเสริมให้แบคทีเรียนำ PAHs ไปใช้ได้นั้น (bioavailability) สามารถอธิบายได้ด้วยกลไกดังนี้

1. สาร PAHs จะละลายอยู่ตรงกึ่งกลางของไมเซลล์ จากนั้นจะเกิดการเคลื่อนที่ของไมเซลล์ไปยังวัฏภาคน้ำอย่างรวดเร็ว ทำให้แบคทีเรียสามารถนำ PAHs ไปใช้ได้ (รูปที่ 5.1) (Miller และ Bartha, 1989)



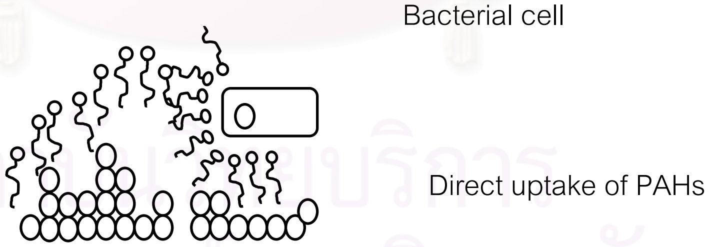
รูปที่ 5.1 แสดงแบคทีเรียใช้ PAHs ที่ละลายอยู่กึ่งกลางไมเซลล์ของสารลดแรงตึงผิว

2. สารลดแรงตึงผิวจะไปเพิ่มการขนส่งโมเลกุลของ PAHs ไปยังวัฏภาคน้ำ ทำให้แบคทีเรียสามารถนำไปใช้ได้ โดยแบคทีเรียจะใช้สาร PAHs ที่อยู่ในวัฏภาคน้ำหลังจากที่สาร PAHs ถูกปล่อยออกจากไมเซลล์ (รูปที่ 5.2)



รูปที่ 5.2 แสดงแบคทีเรียใช้ PAHs ที่ถูกปล่อยออกจากไมเซลล์ และอยู่ในวัฏภาคน้ำ

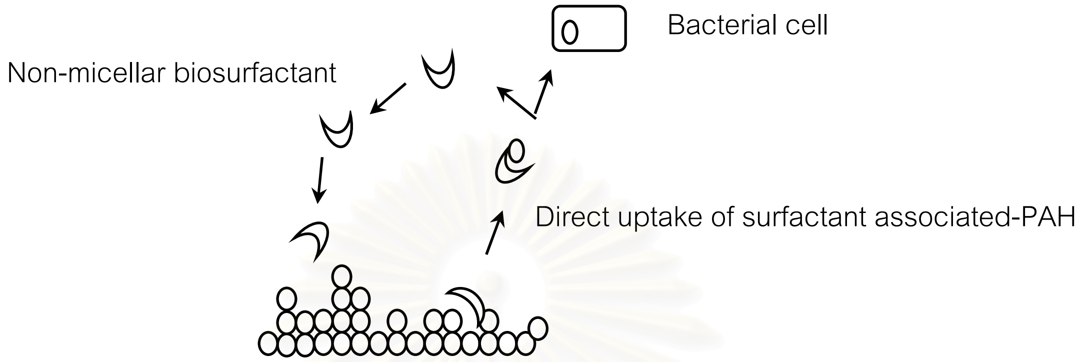
3. สารลดแรงตึงผิวจะทำให้เซลล์ของแบคทีเรียมีสภาวะไม่ชอบน้ำ ดังนั้นเซลล์แบคทีเรียจึงสามารถใช้สาร PAHs ได้โดยตรงด้วยรูปแบบของ cell-surfactant-PAH-contact



รูปที่ 5.3 แสดงแบคทีเรียใช้สาร PAHs ได้โดยตรงในรูปแบบของ cell-surfactant-PAH-contact

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4. สารลดแรงตึงผิวชีวภาพบางชนิดจะไม่ก่อตัวเป็นไมเซลล์ แต่ยังสามารถจับกับสาร PAHs ได้ และส่งผลให้แบคทีเรียนำ PAHs ไปใช้ในการเจริญได้โดยตรง



รูปที่ 5.4 แสดงแบคทีเรียใช้สาร PAHs ที่จับกับสารลดแรงตึวผิวชีวภาพที่ไม่ก่อตัวเป็นไมเซลล์

จะเห็นได้ว่าการเติมสารลดแรงตึงผิวเพื่อส่งเสริมการย่อยสลายสาร PAHs ทางชีวภาพนั้นมักมีความแปรผันสูง ซึ่งขึ้นอยู่กับหลายปัจจัย ไม่ว่าจะเป็น ชนิดของสารลดแรงตึงผิว ความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิว ปริมาณการปนเปื้อน และจุลินทรีย์ที่ใช้ในการบำบัด (Köhler และคณะ, 1994; Fu และ Alexander, 1995) รวมทั้งสมบัติของดินที่แตกต่างกันเป็นปัจจัยสำคัญในการบำบัดสาร PAHs ที่ปนเปื้อนในดินด้วยวิธีทางชีวภาพ สมบัติดังกล่าวได้แก่ องค์ประกอบของอินทรียวัตถุในดิน โครงสร้างและอนุภาคของดิน ซึ่งมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงสาร PAHs ในสิ่งแวดล้อมและอัตราการย่อยสลายโดยจุลินทรีย์ (Wilson และ Jones, 1993) ดังนั้นการบำบัดสาร PAHs ในสิ่งแวดล้อมนั้นต้องคำนึงถึงปัจจัยต่างๆเหล่านี้ ในงานวิจัยนี้จึงเป็นแนวทางเบื้องต้นสำหรับศึกษาชนิด และความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวที่เหมาะสม รวมทั้งการใช้แบคทีเรียที่สามารถสร้างสารลดแรงตึงผิว เพื่อเป็นแนวทางในการนำไปประยุกต์ใช้ให้เกิดประโยชน์ และเพิ่มประสิทธิภาพการบำบัดสาร PAHs ในดินได้ต่อไปในอนาคต

รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

กรมควบคุมมลพิษ. 2545. รายงานสถานการณ์คุณภาพสิ่งแวดล้อม; บทสรุปสำหรับผู้บริหาร. สำนักงานนโยบายและแผนสิ่งแวดล้อม กระทรวงวิทยาศาสตร์ เทคโนโลยีและสิ่งแวดล้อม.

กรมควบคุมมลพิษ. 2548. ของเสียอันตราย. สรุปสถานการณ์มลพิษของประเทศไทย พ.ศ. 2548. กรุงเทพมหานคร. ที พริ้นติ้ง กรุ๊ป.

ทิมากร แสงดำ. 2547. การแยกและลักษณะสมบัติของแบคทีเรียที่มีสมบัติในการเกาะติดและย่อยสลายไพรีนจากปุ๋ยหมักใบพืชตระกูลถั่ว. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต. ภาควิชาจุลชีววิทยา จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

นภดล สว่างนาวิน, เรือเอก. 2547. ผลของสารลดแรงตึงผิวต่อการย่อยสลายน้ำมันดิบโดยจุลินทรีย์ที่แยกได้จากทรายทะเลที่ปนเปื้อนคราบน้ำมัน. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต. ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

นพรัตน์ วานิชสุขสมบัติ. 2545. การผลิตและลักษณะสมบัติของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตจาก *Pseudomonas* sp.สายพันธุ์ A 41 โดยใช้น้ำมันปาล์มเป็นแหล่งคาร์บอน. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต. ภาควิชาจุลชีววิทยา บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

นิรันดร์ รุ่งสว่าง. 2542. การผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ จาก *Bacillus subtilis* BBK1. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต. ภาควิชาจุลชีววิทยา บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

สุพินดา ศิริวราศิลป์. 2545. การใช้ใบพืชตระกูลถั่วและพารามิเตอร์บางประการในการเสริมการย่อยสลายไพรีนในดิน. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต. ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

อารีย์ กิ่งฉิน. 2542. การแยกจุลินทรีย์ ที่ผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพและการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ. ภาควิชาจุลชีววิทยา บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

เอกวัล ลือพร้อมชัย. 2546. เทคโนโลยีชีวภาพกับการบำบัดสารเคมีอันตราย. *ว. สิ่งแวดล้อม* 8(10): 8-11.

ภาษาอังกฤษ

Amagai, T., Takaharashi, Y., Mutsushita, H., Morkjoy, D., Sukasem, P., and Tabucanon, M. 1999. A survey on polycyclic aromatic hydrocarbon concentrations in soil in Chiang-Mai, Thailand. Environ. International. 25: 593-572.

Aronstein, B. N., Calvillo, Y. M., and Alexander, M. 1991. Effects of surfactants at low concentration on the desorption and biodegradation of sorbed aromatic compounds in soil. Environ. Sci. Technol. 25: 1728-1731.

Arostein, B. N., and Alexander, M. 1993. Effect of a non-ionic surfactant added to the soil surface on the biodegradation of aromatic hydrocarbons within the soil. Appl. Environ. Microbiol. 39: 386-390.

Banat, I. M. 1995. Biosurfactants production and possible uses in microbial enhanced oil recovery and oil pollution remediation. Bioresour. Technol. 51: 1-12.

Barkay, T., Navon-Venezia, S., Ron, E. Z., and Tosnberg, E. 1999. Enhancement of solubilisation and biodegradation of polyaromatic hydrocarbons by the bioemulsifier alasan. Appl. Environ. Microbiol. 65: 2697-22702.

Bastiaens, L., Springeal, D., Wattiau, P., Harms, H., de Wachter, R., Verachtert, H., and Diels, L. 2000. Isolation of adherent polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) - degrading bacteria using PAH-sorbing carriers. Appl. Environ. Microbiol. 66(5): 1834-1843.

Blumer, M. 1976. Polycyclic aromatic compounds in nature. Sci. Am. 234(3): 34-45.

Bollag, J. M., and Loll, M. J. 1983. Incorporation of xenobiotics into soil humus. Experientia. 39: 1221-1230.

Brinch, U. C., Ekelund, F., and Jacobsen, C. S. 2002. Method for spiking soil sample with organic compounds. Appl. Environ. Microbiol. 68: 1808-1816.

Bruheim, P., Bredholt, H., and Eimhfillin, K. 1999. Effect of surfactant mixtures, including corexit 9527, on bacterial oxidation of acetate and alkanes in crude oil. Appl. Environ. Microbiol. 65: 1658-1661.

Bugg, T., Foght, J. M., Pickard, M. A., and Gray, M. R. 2000. Uptake and active efflux of polycyclic aromatic hydrocarbons by *Pseudomonas fluorescens* LP6a. Appl. Environ. Microbiol. 66: 5387-5392.

Bury, S. F., and Miller, C. A. 1993. Effect of micellar solubilisation on biodegradation rates of hydrocarbons. Environ. Sci. Tech. 27: 104-110.

Catherine, N. M. 2005. Environmental applications for biosurfactants. Environ. Pollut. 133: 183-198.

Cerniglia, C. E. 1992. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. Biodegradation. 3: 351-368.

Cerniglia, C . E. 1993. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. Curr. Opin. Biotechnol. 4: 331-338.

Cheng, K. Y., and Wong, J. W. C. 2006. Combined effect of nonionic surfactant Tween 80 and DOM on the behaviors of PAHs in soil-water system. Chemosphere. 62 (11): 1907-1916.

Chu, W. 2003. Remediation of contaminated soils by surfactant-aided soil washing. Pract. Periodical of Haz. Toxic, and Radioactive Waste Mgmt. 7(1): 19-24.

Clint, J. H. 1992. Micelle formation. Surfactant aggregation, pp. 82-129. New York: Chapman and Hall.

Cooper, D.G., and Zajic, J. E. 1980. Surface active compounds from microorganisms. Adv. Appl. Microbiol. 26: 229-256.

Cuny, P., Faucet, J., Acquaviva, M., Bertrand, J.-C., and Gilewicz, M. 1999. Enhanced biodegradation of phenanthrene by a marine bacterium in the presence of a synthetic surfactant. Lett. Appl. Microbiol. 29: 242-245.

Cuypers, C., Pancras, T., Grotenhuis, T., and Rulkens, W. 2002. The estimation of PAH bioavailability in contaminated sediments using hydroxypropyl-beta-cyclodextrin and Triton X-100 extraction techniques. Chemosphere. 46: 1235-1245.

Desai, I. D., and Banat, I. M. 1997. Microbial production of surfactants and their commercial potential. Microbiol. Micromol. Biol. Rev. 61: 47-64.

Deschênes, L., Lafrance, P., Villeneuve, J. -P., and Samson, R. 1994. The impact of a biological and chemical anionic surfactans on the biodegradation and solubilization of PAHs in a creosote contaminated soil. Presented at the Fourth

Annual Symposium on Groundwater and Soil Remediation. Sept. 21-23. Calgary, Alberta.

Deschênes, L., Lafrance, P., Villeneuve, J. -P., and Samson, R. 1996. Adding SDS and *Pseudomonas aeruginosa* UG2 biosurfactants inhibits PAH biodegradation in a weathered creosote-contaminated soil. Appl. Environ. Microbiol. 46: 368-646.

Déziel, É., Paquette, G., Villemur, R., Lépine, F., and Bisaillon, J. -G. 1996. Biosurfactant production by a soil *Pseudomonas* strain growing on polycyclic aromatic hydrocarbons. Appl. Environ. Microbiol. 62(6): 1908-1912.

Doick, K. J., and Semple, K. T. 2003. The effect of soil: water ratios on the mineralization of phenanthrene: LNAPL mixtures in soil. FEMS Microbiol. Lett. 220: 29-33.

Duvnjak, Z., Cooper, D. G., and Kosaric, N. 1982. Production of surfactant by *Arthrobacter paraffineus* ATCC19558. Biotechnol. Bioeng. 24: 165-175.

Edward, D. A., Liu, Z., and Luthy, R. G. 1994. Surfactant solubilization of organic compounds in soil/aqueous systems. J. Environ. Eng. 120(1): 5-22.

Edward, D. A., Luthy, R. G., and Lui, Z. 1991. Solubilization of polycyclic aromatic hydrocarbons in micellar nonionic surfactant solutions. Environ. Sci. Technol. 25: 127-133.

Enzymetech, Inc. 2001. PAHs: Creosote and coal tar [On line]. Available from: http://www.enzymetech.com/knowledge/pahs-cre-coal [August 16, 2004]

Fiechter, A. 1992. Biosurfactants: moving towards industrial application. Trends Biotechnol.10: 208-217.

Fiedler, H., Cheung, C. K., and Wong, M. H. 2002. PCDD/PCDF, chlorinated pesticides and PAH in Chinese teas. Chemosphere. 46: 1429-1433.

Fu, M. H., and Alexander, M. 1995. Use of surfactants and slurrying to enhance the biodegradation in soil of compounds initially dissolved in nonaqueous-phase liquids. Appl. Microbiol. Biotechnol. 43: 551-558.

Garcia-Junco, M., De Olmedo, E., and Ortego-Calvo, J.-J. 2001. Bioavailability of solid and non-aqueous phase liquid-dissolved phenanthrene to the biosurfactant-

producing bacterium *Pseudomonas aeruginosa* 19SJ. Environ. Microbiol. 3: 561-569.

Garivait, H., Laowagul, W., Sukasem, P., Ngod-Ngam, S., Polprasert, C., and Reutergardh, L. B. 2002. Airborne polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) in Bangkok urban air II. Level and distribution. ใน รายงานผลงานวิจัย พ.ศ.2537-2545 ศูนย์วิจัยและฝึกอบรมด้านสิ่งแวดล้อม . หน้า ค57-73. กรมส่งเสริมคุณภาพสิ่งแวดล้อม, กทม : ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย.

Gerson, D.F. 1993. The biophysics of microbial surfactants:growth on insoluble substrates. In Surfactant Science Series, Vol.48, Biosurfactants: Production, Properties, Applications Kosaric, N., ed. pp. 269-286. New York, USA: Marcel Dekker.

Gothrie, E. A., and Pfaender, F. K. 1998. Reduces pyrene bioavailability in microbially active soils. Environ. Sci.Technol. 32(4): 501-508.

Grimmer, G. H., Bohnke, A., and Glaser. A. 1977. Investigation on the carcinogenic burden by air pollution in marine polycyclic aromatic hydrocarbons in automobile exhaust gas-an inventory. Zentralb I. Bakteriol. Abt. I Orig. Reihe B.164: 218-234.

Grasso, D., Subramaniam, K., Pignatello, J. J., Yang, Y., and Ratte, D. 2001. Micellar desorption of polynuclear aromatic hydrocarbons from contaminated soil. Colloids Surfaces A. Physiochem. Eng. 194: 65-74.

Guerin, W. F. and Jones, G. E. 1988a. Two-stage mineralization of phenanthrene by estuarine enrichment cultures. Appl. Environ. Microbiol. 54: 929-936.

Guerin, W. F. and Jones, G. E. 1988b. Mineralization of phenanthrene by *Mycobacterium* sp. Appl. Environ. Microbiol. 54: 937-944.

Haba, E., Espuny, M. J., Busquets, M., and Manresa, A. 2000. Screening and production of rhamnolipids by *Pseudomonas aerugiosa* 47TN NCIB 40044 from waste frying oils. J. Appl. Microbiol. 88: 379-387.

Haigh, S. D. 1996. A review of the interaction of surfactants with organic contaminants in soil. Sci. Environ. 185: 161-170.

Heipieper, H. J., Weber, F. J., Sikkema, H., and de Bont, J. A. M. 1994. Mechanisms of resistance of whole cells to toxic organic solvent. Trends in Biotechnol. 12: 409-415.

Hupe, K., Koning, M., Luth, J.-C., Heerenklage, J., and Stegmann, R. 2001. Optimisation of microbial soil treatment. In: R. Stegmann, G. Brunner, W. Calmono and G. Matz, (eds.), Treatment of contaminated soil, pp. 342-353. New York: Springer-Verlag Berlin Heidelberg.

Irkhin, A. I., Kondrashenko, T. N., and Puchkov, E. O. 1989. Sensitivity of *Escherichia coli* cell membrane to different classes of detergents (in Russian). Microbiol. 58: 217-221.

Ivshina, I.B., Kuyukina, M. S., Philp, J. C., and Chistofi, N. 1998. Oil desorption from mineral and organic materials using biosurfactant complexes produced by *Rhodococcus* species. World.J. Microbiol. Biotechnol. 14: 711-717.

Jimenez, I. Y., and Bartha, R. 1996. Solvent-augmented mineralization of pyrene by *Mycobacterium* sp. Appl. Environ. Microbiol. 62: 2311-2316.

Jones, K. C., Stratford, J. A., Waterhouse, K. S., and Vogt, N. B. 1989. Organic contaminants in welsh soils: polynuclear aromatic hydrocarbons. Environ. Sci. Technol. 23: 540-550.

Juhasz, A. L., and Naidu, R. 2000. Bioremediation of high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons: a review of the microbial degradation of benzo[a]pyrene. International Biodeterioration & Biodegradation. 45: 57-88.

Kanaly, R. A., and Harayama, S. 2000. Biodegradation of high- molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons by Bacteria. Bacteriol. J. 182: 2059- 2097.

Kästner, M., and Mahro, B. 1996. Microbial degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in soils affected by the organic matrix of compost. Appl. Microbiol. Biotechnol. 44: 668-675.

Kästner, M., Streibich, S., Beyrer, M., Richnow, H. H., and Fretsche, W. 1999. Formation of bound residues during microbial degradation of (^{14}C) anthracene in soil. Appl.Environ. Microbiol. 65: 1834-1842.

Köhler, A., Schüttoff, M., Bryniok, D., and Knackmuss, H. –J. 1994. Enhanced biodegradation of phenanthrene in a biphasic culture system. Biodegradation. 5: 93-103.

Kosaric, N., ed. 1993. Biosurfactants production property application. Surfactant Science Series. vol. 48. New York: Marcel Dekker, Inc.

Labare, M. P., and Alexander, M. 1995. Enhanced mineralization of organic compounds in non-aqueous phase liquids. Environ. Toxicol. Chem. 14: 257-265.

Laha, S., and Luthy, R. G. 1992. Effects of nonionic surfactants on the solubilization and mineralization of phenanthrene in soil water system. Biotechnol. Bioeng. 40: 1367-1380.

Lang, S. 2002. Biological amphiphiles (microbial biosurfactants). Curr. Opin. Coll. Interface. Sci. 7: 12-20.

Leahy, J. G., and Colwell, R. R. 1990. Microbial degradation of hydrocarbons in the environment. Microbiol. Rev. 54: 305-315.

Lin, S. C. 1996. Biosurfactant recent advances. J. Chem. Tech. Biotechnol. 66: 109-120.

Lin, T. C., Chang, F. H., Hsieh, J. H., Chao, H. R., and Chao, M. R. 2001. Environmental exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons and total suspended particulates in a Taiwanese temple. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 67: 332-338.

Lui, Z., Edward, D. A., and Luthy, R. G. 1992. Sorption of nonionic surfactants onto soil. Water Res. 26(10): 1337-1345.

Lui, Z., Jacobson, A. M., and Luthy, R. G. 1995. Biodegradation of naphthalene in aqueous nonionic surfactant systems. Appl. Environ. Microbiol. 61(1): 145-151.

Lundstedt, S. 2003. Analysis of PAHs and their transformation products in contaminated soil and remediation process. University of Amsterdam, the Netherlands.

Makkar, R. S., and Cameotra, S. S. 1999. Biosurfactant production by microorganisms on unconventional carbon sources: A review. J. Surf. Det. 2: 237-241.

Marcoux, J., Deziel, E., Villemur, R., Lepine, F., Bisaillon, J. –G., and Beaudet, R. 2000. Optimization of high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons' degradation in two-liquid-phase bioreactor. J. Appl. Microbiol. 88: 655-662.

Maslin, P., and Maier, R. M. 2000. Rhamnolipid-enhanced mineralization of phenanthrene by indigenous microbial populations in organic-metal co-contaminated soils. Bioremed. J. 4: 295-308.

Miller, R. M., and Bartha, R. 1989. Evidence from liposome encapsulation for transport-limited microbial metabolism of solid alkanes. Appl. Environ. Microbiol. 55: 269-274.

Mulligan, C. N., Yong, R. N., and Gibbs, B. F. 2001. Surfactant remediation of contaminated soil: A review. Eng. Geo. 60: 371-380.

Mulligan, C. N. 2005. Environmental applications for biosurfactants. Environ. Pollut. 133: 183-198.

Munstermann, B., Poremba, K., Lang, S., and Wagner, F. 1992. Studies on environmental compatibility: Influence of (bio)surfactants on marine microbial and enzymatic system. In Proceedings of the International Symposium on Soil Decontamination Using Biological Process. pp. 414-420, 6-9 December, 1992. Karlsruhe, Germany. Frankfurt: Dechema.

Narro, M. L., Cerniglia, C. E., Balen, C. and Gibson, D. T. 1992. Metabolism of phenanthrene on the marine cyanobactrium *Agmellum quadruplicatum* PR-6. Appl. Environ. Microbiol. 58: 1351-1359.

Neu, T. R., Dengler, T., Jahn, B., and Poralla, K. 1992. Structural studies of an emulsion-stabilizing exopolysaccharide produced by an adhesive, hydrophobic *Rhodococcus* strain. J. Microbiol. 138: 2531-2537.

Neurath, G. B. 1972. Recent advances in knowledge of the chemical composition of tobacco smoke. In The Chemistry of Tobacco and Tobacco smoke. pp. 77-97., Schmeltz, I. (ed.). New York : Plenum Publishing Corp.

Nieman, J. K. C., Kimball, D. O., McLean, J. E., Sims, R. C., Sims, J. L., Sorensen, D. L., and Rice, J. A. 1998. Humification of pyrene in contaminated soil during landfarming. Proceedings of the 1998 conference on Hazardous waste research, pp. 252-260.

Noordman, W. H., Ji, W., Brusseau, M. L., and Janssen, D. B. 1998. Effect of rhamnolipid biosurfactant on removal of phenanthrene from soil. Environ. Sci. Technol. 32: 1806-1812.

Olivera, N. L., Commendatore, M. G., Moran, A. C., and Esteves, J. L. 2000. Biosurfactant enhanced degradation of residual hydrocarbons from ship bilge wastes. J. Ind. Microbiol.Biotechnol. 25: 70-73.

Ortega-Calvo, J. -J., and Alexander, M. 1994. Roles of bacterial attachment and spontaneous partitioning in the biodegradation of naphthalene initially present in non-aqueous-phase liquids. Appl. Environ. Microbiol. 60: 2643-2646.

Page, C. A., Bonner, J. S., Kanga, S. A., Mills, M. A., and Autenrieth, R. L. 1999. Biosurfactant solubilization of PAHs. Environ. Eng. Sci. 16: 465-474.

Panther, B., Hooper, M., Limpaseni, W., and Hooper, B. 1996. Polycyclic aromatic hydrocarbons as environmental contaminants: some results from Bangkok. In: Proceedings of the Third International Symposium of ETER NET-APR: Conservation of the Hydrospheric Environment. 178-181.

Patel, R. M., and Desai, A. J. 1997. Biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* GS3 from molasses. Lett. Appl. Microbiol. 25: 91-94

Pinto, L., and Moore, M. 2000. Release of polycyclic aromatic hydrocarbons from contaminated soils by surfactant and remediation of this effluent by *Penicillium* sp. Environ. Toxicol. Chem. 19: 1741-1748.

Poeton, T. Stensel, H., and Strand, S. 1999. Biodegradation of polyaromatic hydrocarbons by marine bacteria: Effects of solid phase on degradation kinetics. Water. Res. 33: 868-880.

Poremba, K., Gunkel, W., Lang, S., and Wagner, F. 1991. Marine biosurfactants III. Toxicity testing with marine microorganisms and comparison with synthetic surfactants. Z. Naturforsch. 46: 210-216.

Prak, D. J. L., and Pritchard, P. H. 2002. Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons dissolved in Tween 80 surfactant solutions by *Sphingomonas paucimobilis* EPA 505. Can. J. Microbiol. 48:151-158.

Prince, R. 1997. Bioremediation of marine oil spills. Trends Biotechnol. 15: 158-160.

Providenti, M. A., Fleming, C. A., Lee, H., and Trevors, J. T. 1995. Effect of addition of rhamnolipid biosurfactants or rhamnolipid producing *Pseudomonas aeruginosa* on phenanthrene mineralization in soil slurries. FEMS. Microbiol. Ecol. 17(1): 15-26.

Rahman, K. S. M., Banat, I. M., Rahman, T. J., Thayumanavan, T., and Lakshmanaperumalsamy, P. 2002. Bioremediation of gasoline contaminated soil by a bacterial consortium amended with poutry litter coir and rhamnolipid biosurfactant. Biores. Technol. 81: 25-32.

Ressler, B. B., Kneifel. H., and Winter. J. 1999. Bioavailability of polycyclic aromatic hydrocarbon and formation of humic acid like residues during bacterial PAH degradation. Appl. Microbiol. Biotechnol. 52: 85-91.

Ridgeway, H. F., Safarik, J., Phipps, D., Carl, P., and Clark, D. 1990 Identification and catabolic activity of well-derived gasoline-degrading bacteria from a contaminated aquifer. Appl. Environ. Microbiol. 56: 3565-3575.

Roch, F., and Alexander, M. 1995. Biodegradation of hydrophobic compounds in the presence of surfactants. Environ. Technol. Chem. 14: 1151-1158.

Rockne, K. J., Shor, L. M., Young, L. Y., Tanghon, G. L., and Kosson, D. S. 2002. Distributed sequestration and release of PAHs in weathered sediment:The role of sediment structure and organic carbon properties. Environ. Sci. Technol. 36: 2636-2644.

Rosenberg, E., and Ron, E. Z. 1999. High- and low-molecular-mass microbial surfactants. Appl. Microbiol. Biotechnol. 52: 154-162.

Rosenberg, M., and Rosenberg, E. 1981. Role of adherence in growth of *Acinetobacter calcoaceticus* RAG-1 on hexadecane. J. Bacteriol. 148: 51-57.

Rouse, J. D., Sabatini, D. A., Sulflita, J. M., and Harwell, J. H. 1994. Influence of surfactants on microbial degradation of organic compounds. Crit. Rev. Environ. Sci. Technol. 24: 325-370.

Scheibenbogen, K., Zytner, R. G., Lee, H., and Trevors, J. T. 1994. Enhanced removal of selected hydrocarbons from soil by *Pseudomonas aeruginosa* UG2 biosurfactants and some chemical surfactants. J. Chem. Tech. Biotechnol. 59: 53-59.

Schippers, C., Gessner, K., Muller, T., and Scheper, T. 2000. Microbial degradation of phenanthrene by addition of a sophorolipid mixture. J. Biotechnol. 83: 189-198.

Schirmer, K., Dixon, D. G., Greenberg, B. M., and Bols, N.C. 1998. Ability of 16 priority PAHs to be directly cytotoxic to a cell line from the rainbow trout gill. Toxicol. 127: 129-141.

Šepic, E., Bricelj, M. and Leskovšek, H. 1997. Biodegradation studies of polyaromatic hydrocarbons in aqueous media. J. Appl. Microbiol. 83: 561-568.

Shreve, G. S., Inguva, S., and Gunnam, S. 1995. Rhamnolipid biosurfactant enhancement of hexadecane biodegradation by *Pseudomonas aeruginosa*. Mol. Mar. Biol. Biotechnol. 4: 331-337.

Sims, R. C., and Overcash, M. R. 1983. Fate of polynuclear aromatic compounds (PNAs) in soil-plant systems. Res. Rev. 88: 1-68.

Straube, W. L., Jones-Meehan, J., Pritchard, P. H., and Jones, W. R. 1999. Bench-scale optimization of bioaugmentation strategies for treatment of soils contaminated with high molecular weight polyaromatic hydrocarbons. Resour. Conserv. Recycling. 27: 27-37.

Straube, W. L.,Nestler, C. C., Hansen, L. D., Ringleberg, D., Pritchard, P. J., and Jones-Meehan, J. 2003. Remediation of polyaromatic hydrocarbons (PAHs) through landfarming with biostimulation and bioaugmentation. Acta Biotechnol. 2-3: 179-196.

Sul, D., Oh, E., Im, H., Yang, M,. Kim, C-W., and Lee, E., 2003. DNA damage in T-and B-lymphocytes and granulocytes in emission in section and incineration workers exposed to polycyclic aromatic hydrocarbons. Mutat. res. 583: 109-119.

Sun, X., and Puri, R. K. 1997. Surfactant-enhanced solubility and mobility of polycyclic aromatic hydrocarbon in soil. Proceedings of the 12th Annual Conference on Hazardous Waste Reseach, pp. 140-157. USA.

Suthersan, S. S. 1999. In *situ* Bioremediation. Remediation engineering: design concepts. CRC Press LLC, Boca Raton.

Tang, W., White, J., and Alexander, M. 1998. Utilization of sorbed compounds by microorganisms specifically isolated for that purpose. Appl. Microbiol. Biotechnol. 49: 117-121.

Tiehm, A. 1994. Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in the presence of synthetic surfactants. Appl. Environ. Microbiol. 60: 258-263.

Tiehm, A., Stieber, M., Werner, P., and Frimmel, F. H. 1997. Surfactant-enhanced mobilization and biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in manufactured gas plant soil. Environ. Sci. Technol. 31: 2570-2576.

Tsomides, H. J., Hughes, J. B., Thomas, J. M., and Ward, C. H. 1995. Effect of surfactant addition on phenanthrene biodegradation in sediments. Environ. Toxicol. Chem. 14: 953-959.

Urum, K., Pekdemir, T. 2004. Evaluation of biosurfactants for crude oil contaminated soil washing. Chemosphere. 57: 1139-1150.

Van, Hamme, J. D., and Ward, O. P. 1999. Influence of chemical surfactants on the biodegradation of crude oil by a mixed bacterial culture. Can. J. Microbiol. 45: 130-137.

Veenanadig, N. K., Gowthaman, M. K., and Karanth, N. G. K. 2000. Scale up studies for the production of biosurfactant in packed column bioreactor. Bioproc. Biosyst. Eng. 22: 95-99.

Verstraete, W., and Devlieghor, W. 1996. Formation of non-bioavailable organic residues in soil: Perspectives for site remediation. Biodegradation.7: 471-485.

Vidali, M. 2001. Bioremediation. An overview. Pure Appl. Chem. 73(7): 1163–1172.

Vipulanandan, C., and Ren, X. 2000. Enhanced solubility and biodegradation of naphthalene with biosurfactant. J. Environ. Engineer. 126: 629-634.

Wang, S., Liu, B., Sun, K., and Su, Q. 2004. Gas chromatographic-mass spectrometric determination of polycyclic aromatic hydrocarbons formed during the pyrolysis of phenylalanine. J. Chromatogr. A. 1025: 255-261.

Watanabe, K. 2001. Microorganisms relevant to bioremediation. Curr. Opin. Biotechnol. 12: 2637-2641.

Weissenfels, W. D., Klewer, H.-J., and Langhoff, J. 1992. Adsorption of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by soil particle: influence on biodegradability and biotoxicity. Appl Microbiol Biotechnol. 36: 686-696.

West, C. C., and Harwell, J. H. 1992. Surfactants and subsurface remediation. Environ. Sci. Technol. 26: 2324-2330.

Wick, L. Y., de Munain, A. R., Springael, D., and Harms, H. 2002. Responses of *Mycobacterium* sp. LB501T to the low bioavailability of solid antracene. Appl. Microbiol. Biotechnol. 58: 378-385.

Wilcke, W., Müller, S., Kanchanakool, N., Niamskul, C., and Zech, W. 1999. Polycyclic aromatic hydrocarbons in hydromorphic soils of the tropical metropolis Bangkok. Geoderma 91: 297-309.

Willumsen, P. A., Karlson, U., and Pritchard, P. H. 1998. Response of fluoranthene-degrading bacteria to surfactants. Appl. Microbiol. Biotechnol. 50: 475-483.

Wilson, S. C., and Jones, K. C. 1993. Bioremediation of soil contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). a review. Environ Pollut. 81: 229-249.

Zhang, Y., and Miller, R. M. 1992. Enhanced octadecane dispersion and biodegradation by a *Pseudomonas* rhamnolipid surfactant (biosurfactant). Appl. Environ. Microbiol. 58: 3276-3282.

Zhou, W., Zhu, L. 2005. Distribution of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil-water system containing a nonionic surfactant. Chemosphere. 60(9): 1237-1245.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ก

สูตรและวิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

อาหารเลี้ยงเชื้อ Carbon Free Mineral Salt Medium (CFMM)

ก.	แอมโมเนียมไนเตรต (NH_4NO_3)	3.0	กรัม
	ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟตเดคะไฮเดรต ($Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$)	5.5	กรัม
	โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)	0.8	กรัม
ข.	แมกนีเซียมซัลเฟตเฮพทะไฮเดรต ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)	0.01	กรัม
	เฟอริกคลอไรด์เฮกซะไฮเดรต ($FeCl_3 \cdot 6H_2O$)	0.005	กรัม
	แคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรต ($CaCl_2 \cdot 2H_2O$)	0.005	กรัม

ชั่งสารส่วน ก. ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มล. ปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 1 นอร์มัล ให้เป็น 7.5 จากนั้นนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 ^{o}ซ เป็นเวลา 20 นาที เติมสารละลายในส่วน ข. ที่ทำการเตรียมแยกแต่ละชนิดและทำให้ปราศจากเชื้อโดยกรองผ่านชุดกรองสำเร็จรูปเซลลูโลสอะซีเตท ขนาดรู 0.45 ไมโครเมตร ลงในอาหารที่ทำการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว

อาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง CFMM (CFMM agar)

เตรียมอาหารด้วยวิธีเช่นเดียวกับการเตรียมอาหารเหลว CFMM ละลายผงวุ้น 15 กรัม ต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ 1,000 มล. ลงไปในสารละลายส่วน ก. ปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 1 นอร์มัล ให้เป็น 7.5 ก่อนนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 ^{o}ซ เป็นเวลา 20 นาที ทิ้งไว้จนได้อุณหภูมิ 50-60^{o}ซ จึงเติมสารละลายในส่วน ข. ที่ปราศจากเชื้อแล้วก่อนนำไปใช้

อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Luria-Bertani (LB broth)

ทริปโตน (tryptone)	10.0	กรัม
ผงสกัดจากยีสต์ (yeast extract)	5.0	กรัม
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	5.0	กรัม

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่นปริมาตร 800 มล. ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 1 นอร์มัล ให้เป็น 7.0 ปรับปริมาตรให้เป็น 1,000 มล. นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 ^{o}ซ เป็นเวลา 15 นาที

อาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง Luria-Bertani (LB agar)

เตรียมอาหารด้วยวิธีเช่นเดียวกับการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB แต่ละลายผงวุ้น 15 กรัมต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ 1,000 มล. ลงไปในอาหารก่อนนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 ^{o}ซ เป็นเวลา 20 นาที

อาหารเหลวกำหนดสูตร (Define medium) 1 ลิตร

น้ำมันปาล์ม	20.0	มล.
แอมโมเนียมไนเตรท ($NH_4 NO_3$)	4.0	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4 .7H_2O$)	0.4	กรัม
โปตัสเซียมคลอไรด์ (KCl)	0.2	กรัม
แคลเซียมคลอไรด์ ($CaCl_2 .2H_2O$)	0.1	กรัม
กรดฟอสฟอริก (H_3PO_4)	0.5	กรัม
กรดบอริก (H_3BO_3)	1.53	มก.
คอปเปอร์ซัลเฟต ($CuSO_4 .5H_2O$)	0.284	มก.
แมงกานีสซัลเฟต ($MnSO_4 .H_2O$)	1.71	มก.
โซเดียมโมลิบเดต ($Na_2 MoO_4 .2H_2O$)	0.7	มก.
ซิงค์ซัลเฟต ($ZnSO_4 .7H_2O$)	2.9	มก.
เฟอรัสซัลเฟต ($FeSO_4 .7H_2O$)	4.3	มก.
โคบอลคลอไรด์ ($CoCl_2 . 6H_2O$)	0.1	มก.
อีดีทีเอ (EDTA)	200.0	มก.
แคลเซียม-แพนโททีเนต (Calcium Pantothenate)	1. 176	มก.

ไบโอทิน (Biotin)	5.88	ไมโครกรัม
กรดโฟลิก (Folic acid)	5.88	ไมโครกรัม
อินโนซิทอล (Inositol)	0.588	ไมโครกรัม
ไนอาซิล (Niacin)	1.176	ไมโครกรัม
กรดพาราอะมิโนเบนโซอิก (*p*-Aminobenzoic acid)	0.588	มก.
ไพโรดอกซิน-ไฮโดรคลอไรด์ (Pyrodoxine-HCl)	1.176	มก.
โรโบฟลาวิน (Riboflavin)	0.588	มก.
ไทอามีน-ไฮโดรคลอไรด์ (Thiamine-HCl)	1.176	มก.
ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ($Na_2HPO_4 .12H_2O$)	14.0	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มล.

ปรับค่าความเป็นกรดด่างให้ได้ 7.5 แล้วนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิและความดันมาตรฐาน สำหรับสารละลายวิตามินได้แก่ แคลเซียม-แพนโททีเนต ไบโอติน กรดโฟลิก อินโนซิทอล ไนอาซิน กรดพาราอะมิโนเบนโซอิก โพโรดอกซิน-ไฮโดรคลอไรด์ โรโบฟลาวิน ไทอามิน-ไฮโดรคลอไรด์ แต่ละสารแยกกัน ทำให้ปราศจากเชื้อด้วยการกรอง

อาหารเหลว LB ดัดแปลงสำหรับ *Bacillus subtilis* BBK 1 1 ลิตร

แอมโมเนียมไนเตรต (NH_4NO_3)	2.0	กรัม
ซูโครส (Sucrose)	5.0	กรัมสารสกัด
จากยีสต์ (Yeast extract)	5.0	กรัม
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	30.0	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มล .

ปรับค่าความเป็นกรดด่างให้เป็น 7.5 นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิและความดันมาตรฐาน

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ข

สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

สารละลาย PAHs ในไดเมทธิลซัลฟอกไซด์

ชั่งไพรีน 0.1 กรัมละลายในไดเมทธิลซัลฟอกไซด์ปริมาตร1.0 มล.ผสมด้วยเครื่องปั่นผสมจนผลึก PAHs ละลายหมด ทำให้ปราศจากเชื้อโดยกรองด้วยชุดกรองสำเร็จรูปชนิด PTFE ที่มีขนาดรูกว้าง 0.20 ไมโครเมตร เก็บรักษาในขวดสีชาหรือห่อให้มิดชิดเก็บที่อุณหภูมิ –20 ^{o}ซ เติมลงในอาหารเหลว CFMM ที่ผ่านการฆ่าเชื้อและเย็นลงที่อุณหภูมิห้องแล้ว

สารละลายมาตรฐานของ PAHs ในเฮกเซน

ชั่งสาร PAHs ที่ต้องการเตรียม ชนิดละ 0.1 กรัม ละลายสารมาตรฐานแต่ละชนิดในเฮกเซนปริมาตร 10 มล. ผสมจนสารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน กรองด้วยชุดกรองสำเร็จรูปชนิด PTFE ที่มีขนาดรูกว้าง 0.20 ไมโครเมตร เก็บรักษาในขวดสีชาหรือห่อให้มิดชิดเก็บที่อุณหภูมิ 4 ^{o}ซ เพื่อใช้เป็นสารมาตรฐานในการวิเคราะห์ปริมาณ PAHs ด้วยวิธี GC-FID

บัฟเฟอร์ TE ความเป็นกรด-ด่างเป็น 8.0

Tris-HCl	10.0	มิลลิโมลาร์
EDTA	1.0	มิลลิโมลาร์

ผสมสารละลาย Tris-HCl เข้มข้น 1.0 โมลาร์ ความเป็นกรด-ด่างเป็น 8.0 ปริมาตร 10 มล. เข้ากับสารละลาย EDTA เข้มข้น 0.5 โมลาร์ ความเป็นกรด-ด่างเป็น 8.0 ปริมาตร 2 มล. เติมน้ำปลอดประจุจนเป็นปริมาตร 1,000 มล. นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 ^{o}ซ. เป็นเวลา 20 นาที

สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 1 นอร์มัล

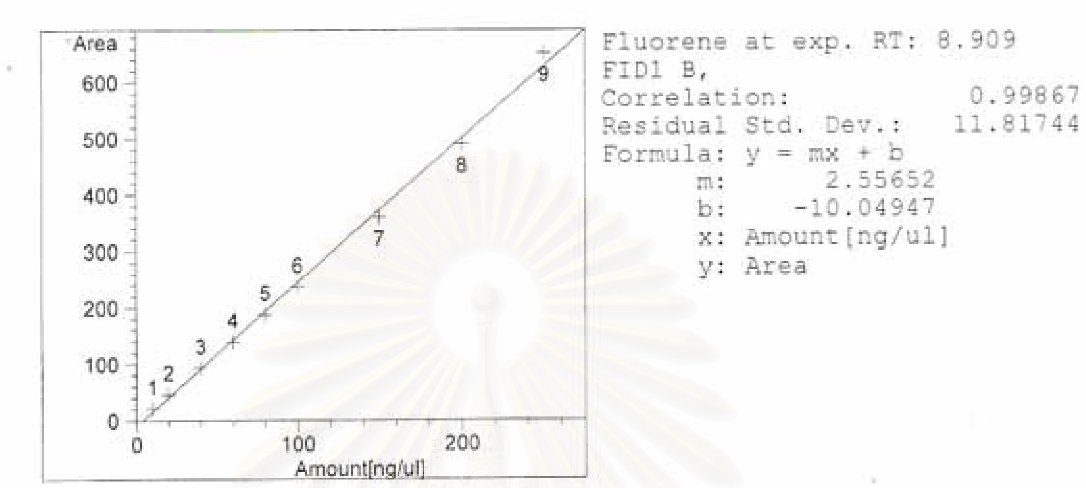
ชั่งโซเดียมไฮดรอกไซด์ 40 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 900 มล. ในขวดวัดปริมาตรขนาด 1,000 มล. ปรับปริมาตรให้ครบ 1,000 มล. ด้วยน้ำกลั่น

สารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.85%

ชั่งโซเดียมคลอไรด์ 0.85 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 100 มล. นึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 ^{o}ซ เป็นเวลา 20 นาที

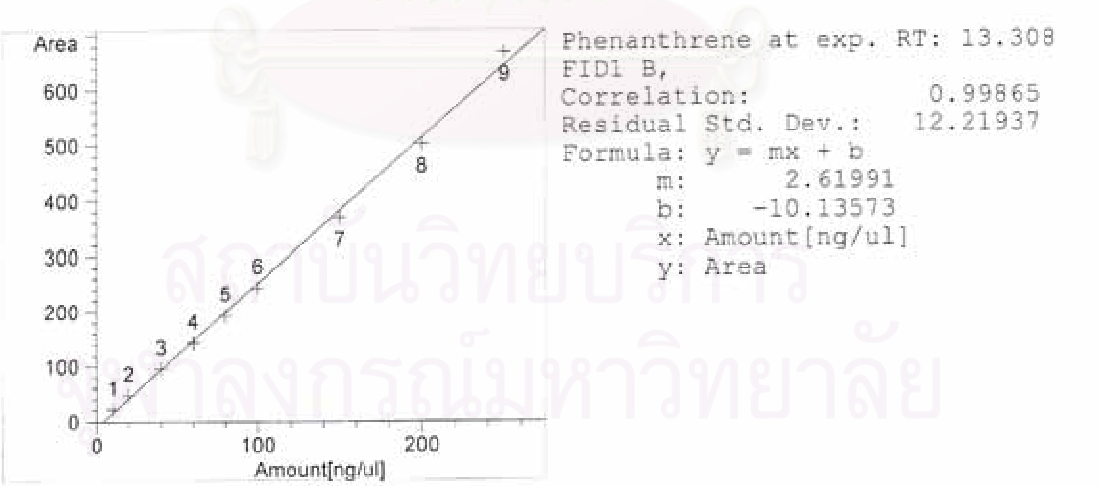
ภาคผนวก ค

กราฟมาตรฐานของฟลูออรีน



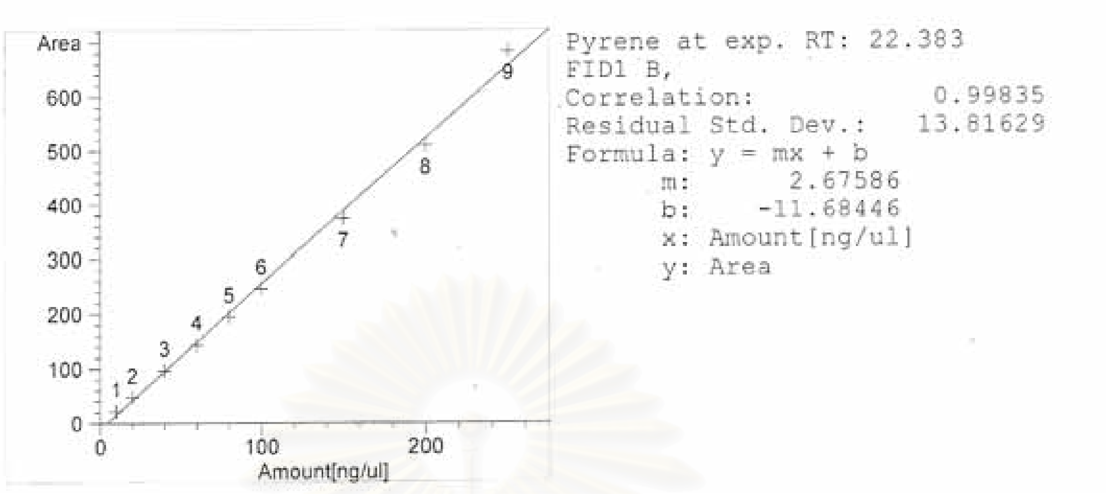
รูปที่ ค.1 กราฟมาตรฐานระหว่างปริมาณฟลูออรีนและพื้นที่ใต้พีคที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วย GC-FID

กราฟมาตรฐานฟีแนนทรีน



รูปที่ ค.2 กราฟมาตรฐานระหว่างปริมาณฟีแนนทรีนและพื้นที่ใต้พีคที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วย GC-FID

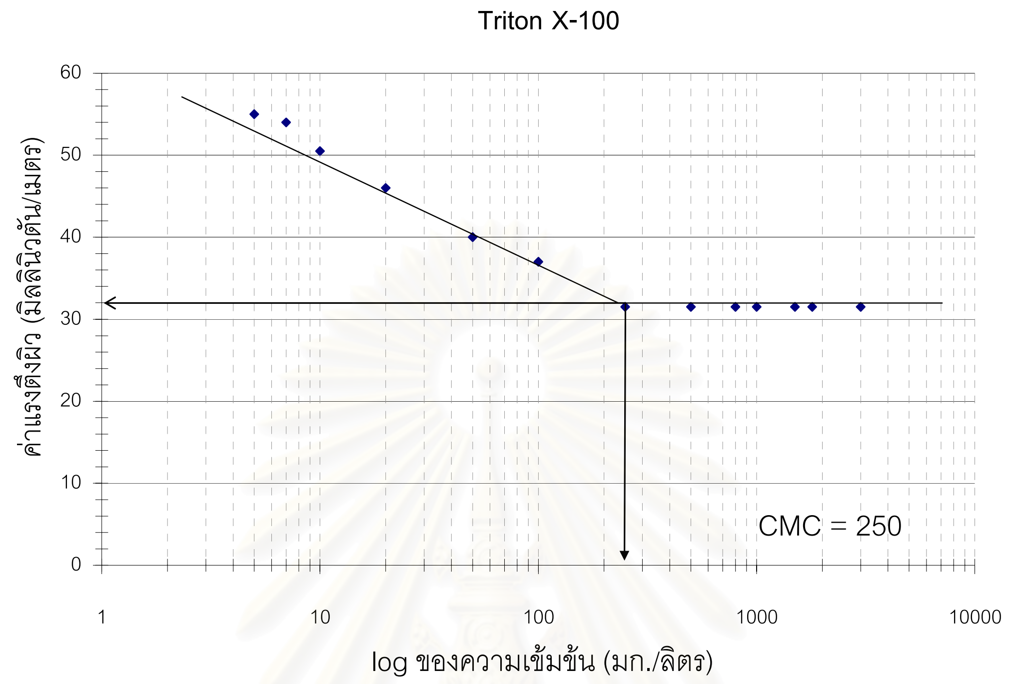
กราฟมาตรฐานไพรีน



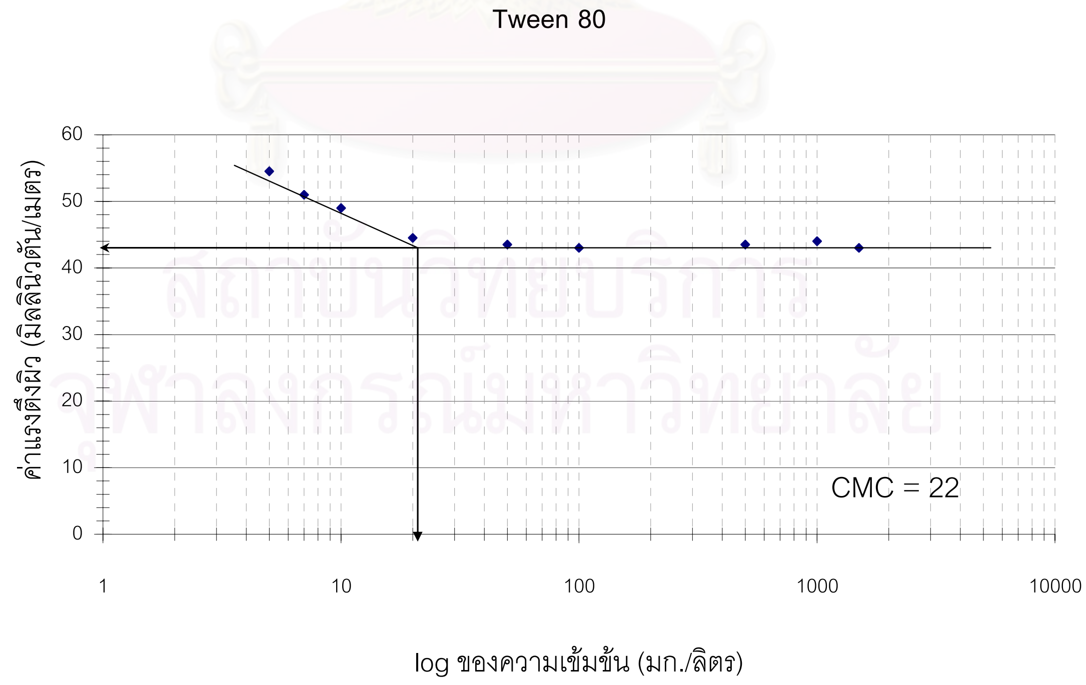
รูปที่ ค.3 กราฟมาตรฐานระหว่างปริมาณไพรีนและพื้นที่ใต้พีคที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยGC-FID

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ง

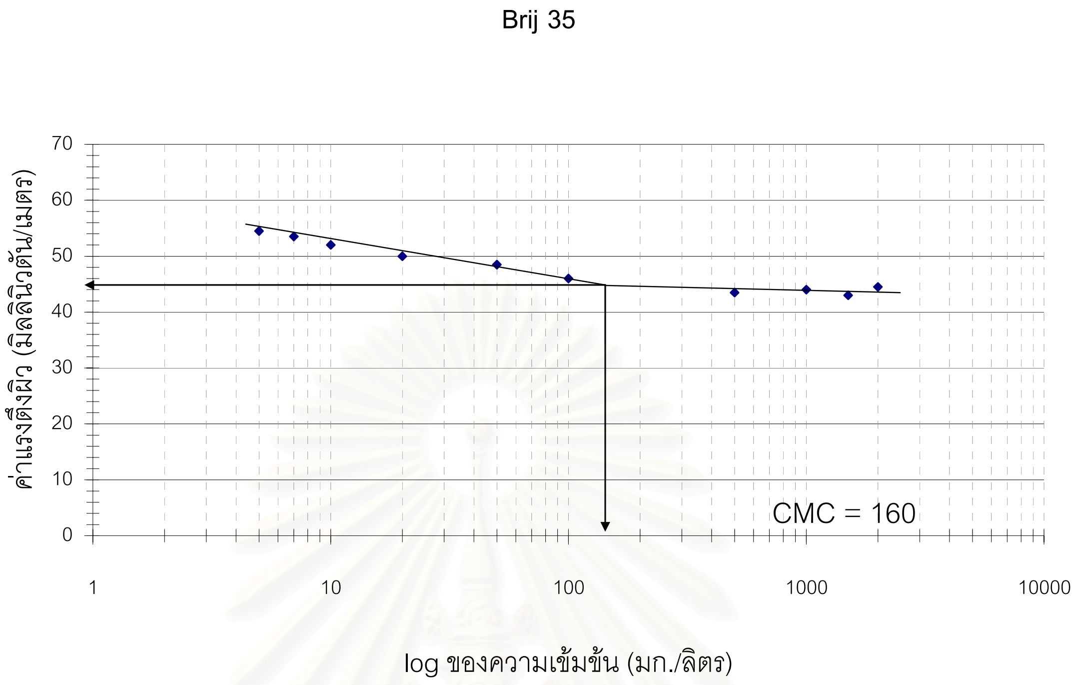


รูปที่ ง.1 แสดงค่า CMC สารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์ Triton X-100

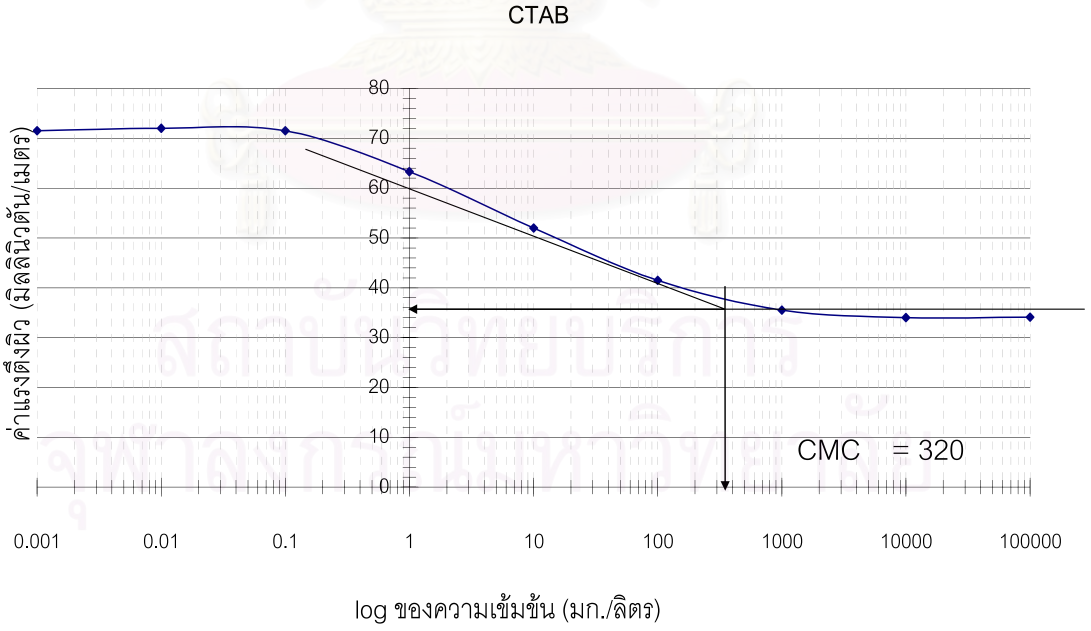


รูปที่ ง.2 แสดงค่า CMC สารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์ Tween 80

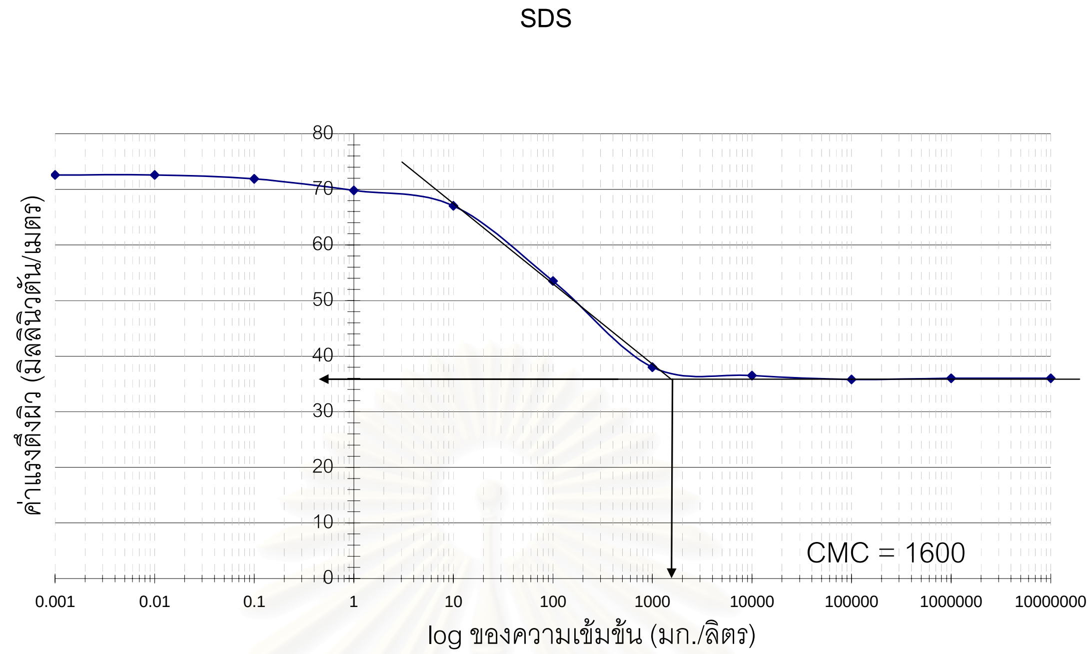
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



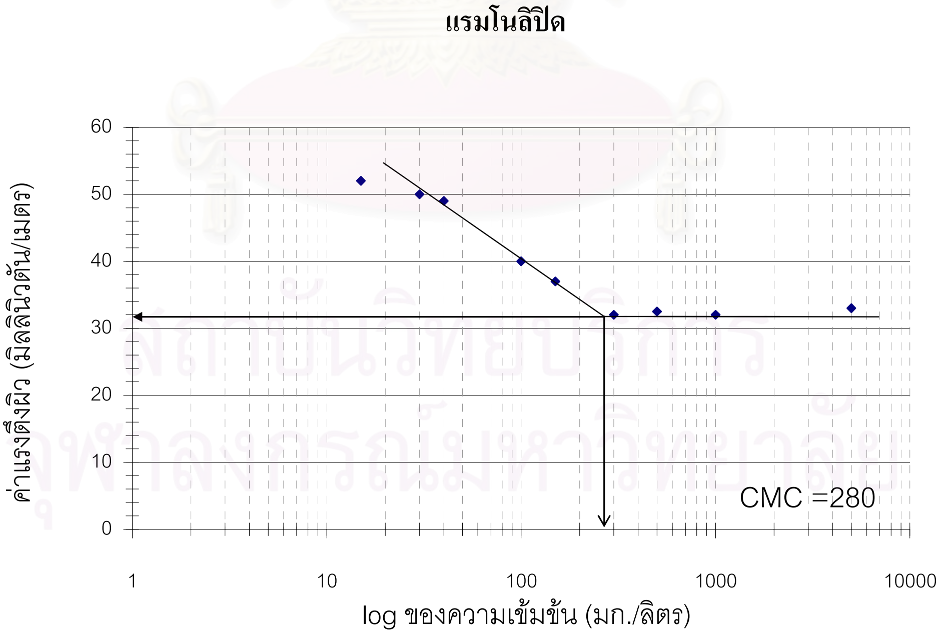
รูปที่ ง.3 แสดงค่า CMC สารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์ Brij 35



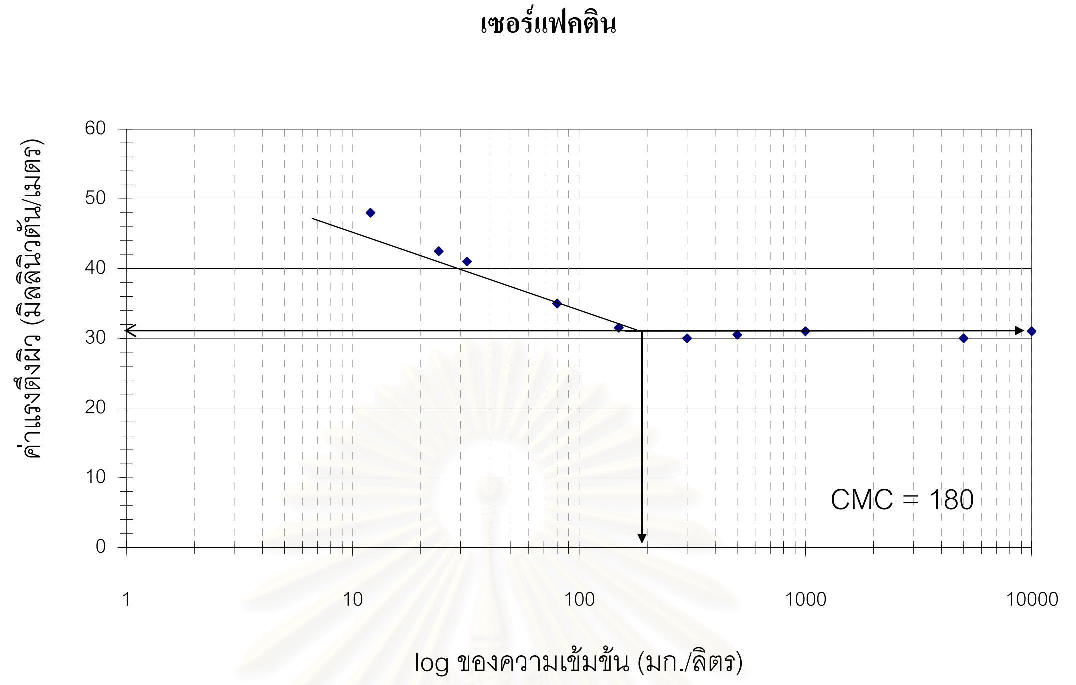
รูปที่ ง.4 แสดงค่า CMC สารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์ CTAB



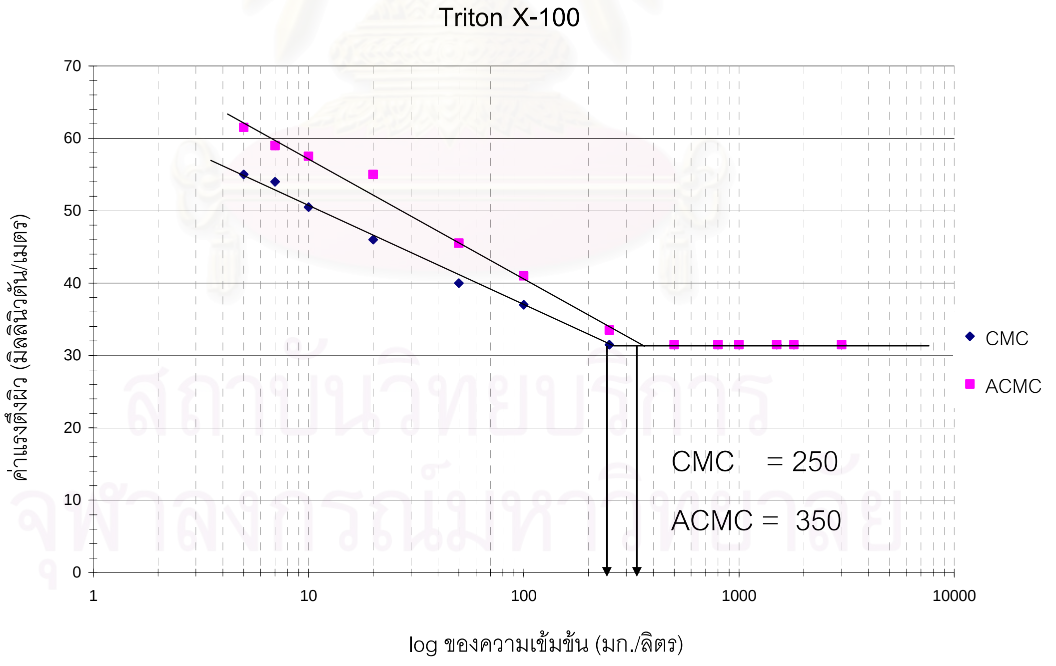
รูปที่ ง.5 แสดงค่า CMC สารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์ SDS



รูปที่ ง.6 แสดงค่า CMC สารลดแรงตึงผิวชีวภาพแรมโนลิปิด

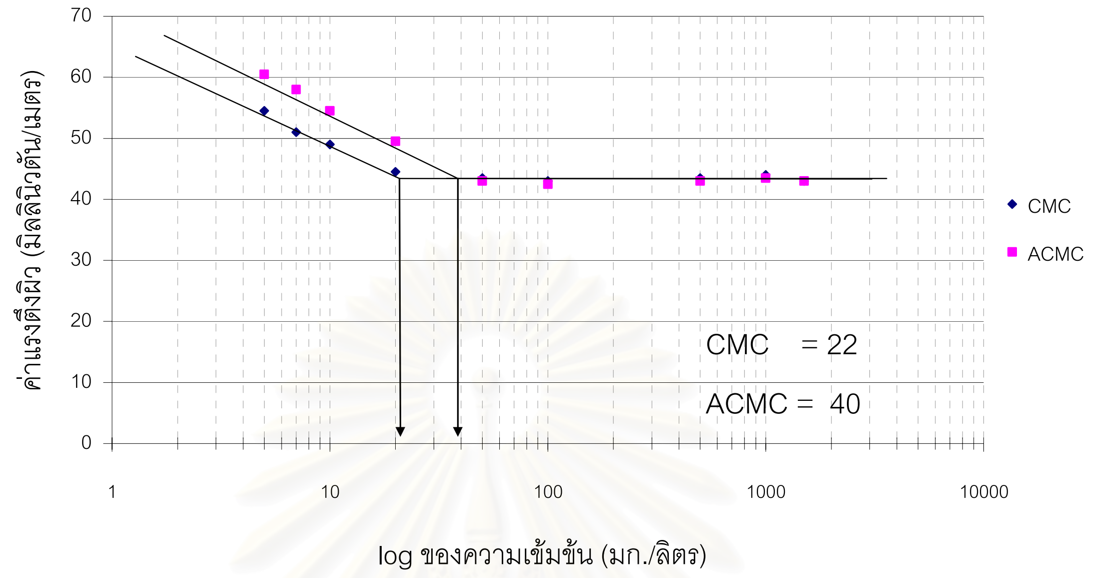


รูปที่ ง.7 แสดงค่า CMC สารลดแรงตึงผิวชีวภาพเซอร์แฟคติน



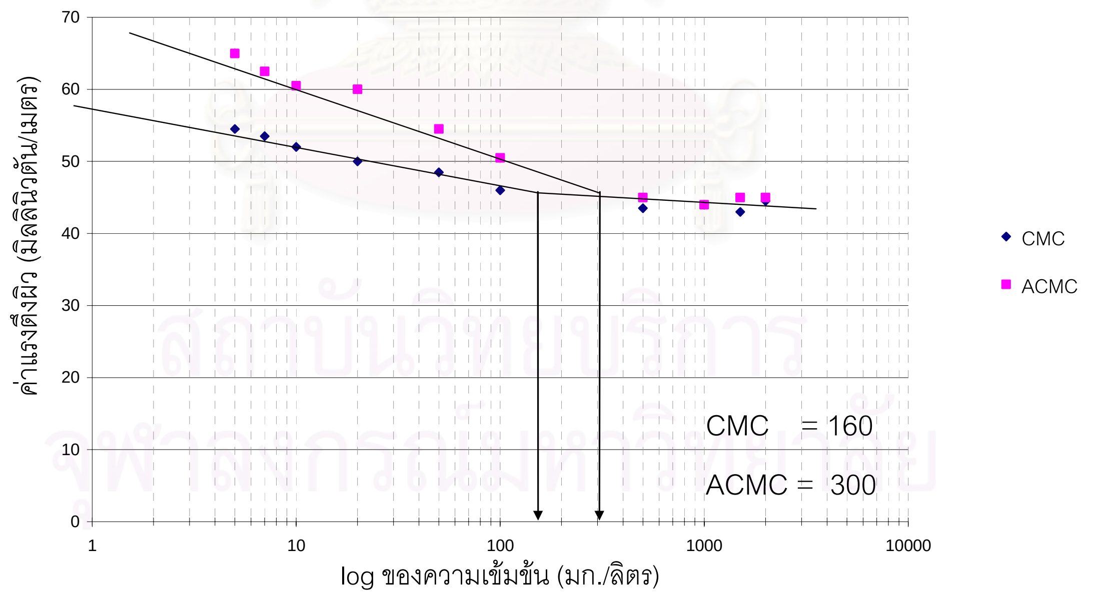
รูปที่ ง.8 เปรียบเทียบค่า CMC และ ACMC ของสารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์ Triton X - 100

Tween 80



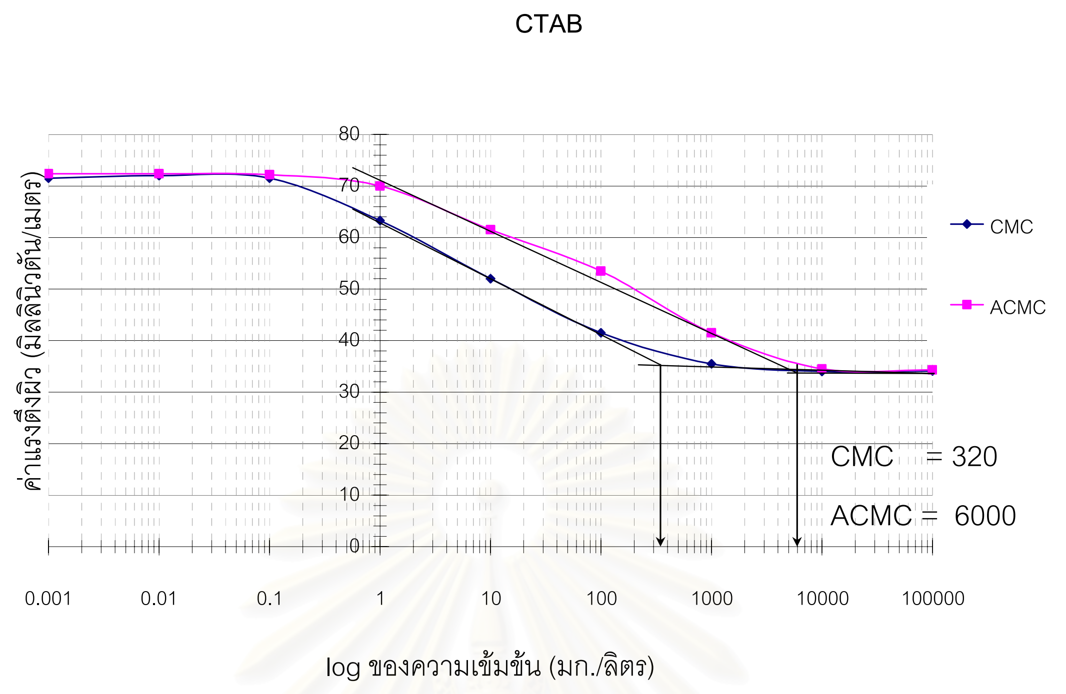
รูปที่ ง.9 เปรียบเทียบค่า CMC และ ACMC ของสารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์ Tween 80

Brij 35

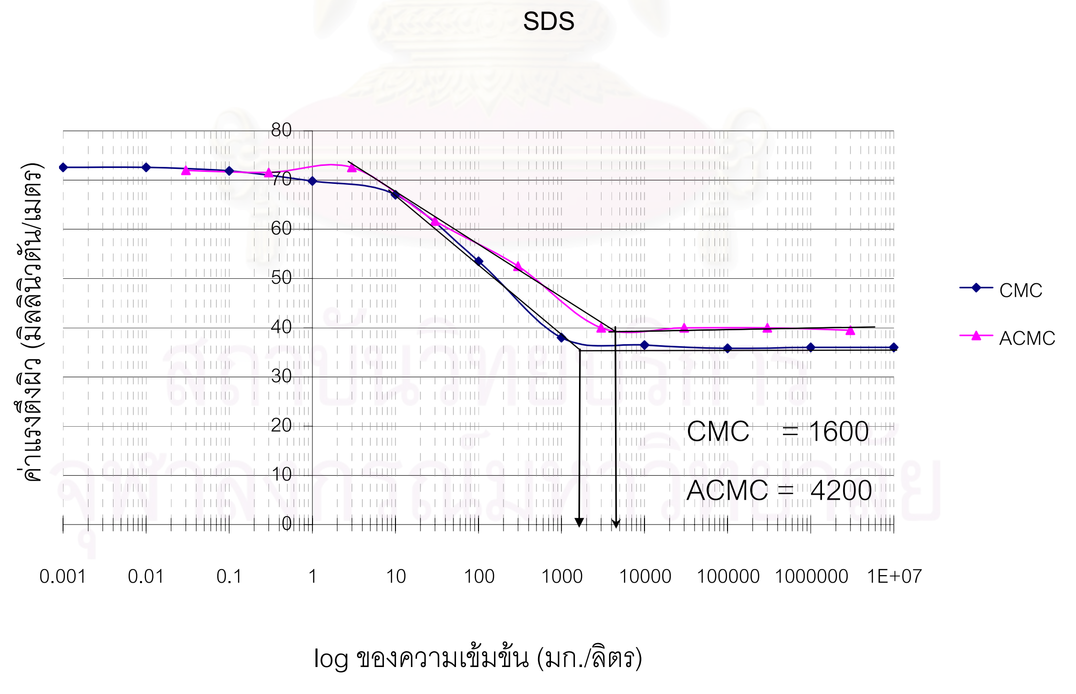


รูปที่ ง.10 เปรียบเทียบค่า CMC และ ACMC ของสารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์ Brij 35

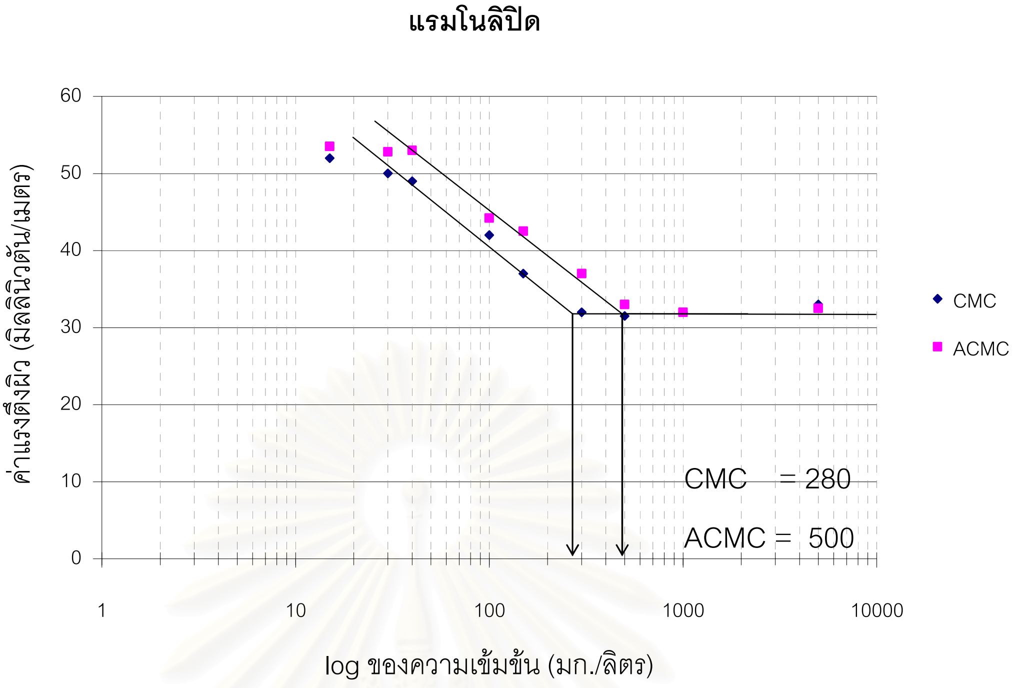
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



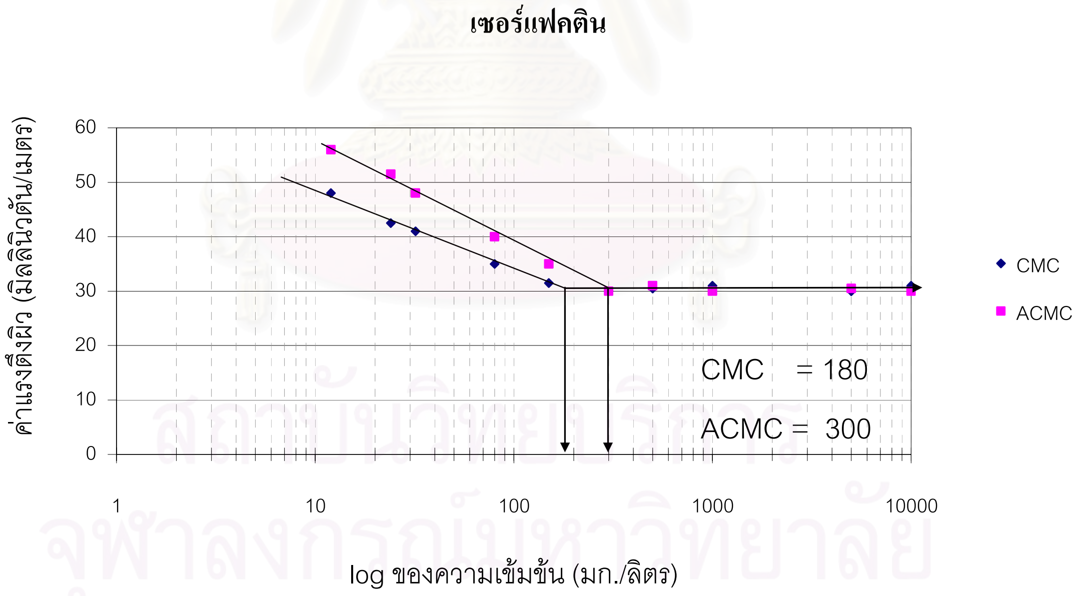
รูปที่ ง.11 เปรียบเทียบค่า CMC และ ACMC ของสารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์ CTAB



รูปที่ ง.12 เปรียบเทียบค่า CMC และ ACMC ของสารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์ SDS

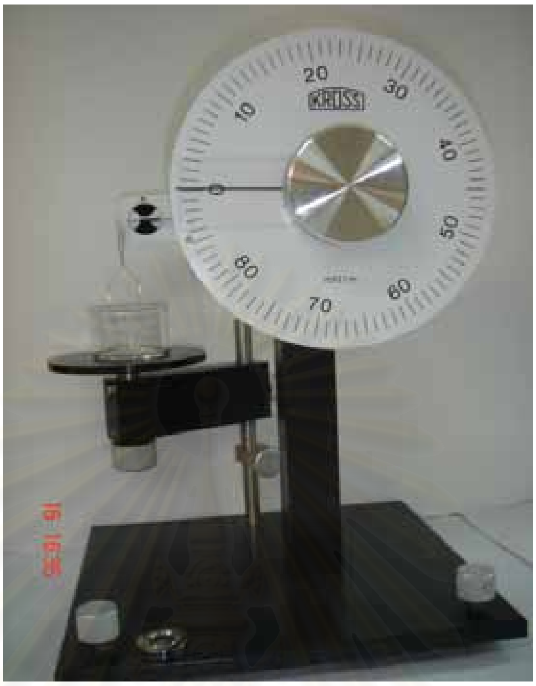


รูปที่ ง.13 เปรียบเทียบค่า CMC และ ACMC ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพแรมโนลิปิด



รูปที่ ง.14 เปรียบเทียบค่า CMC และ ACMC ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพเซอร์แฟคติน

ภาคผนวก จ



รูปที่ จ.1 เครื่องวัดค่าแรงตึงผิว (ring tensiometer)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวรุจา สารคุณ เกิดเมื่อวันที่ 20 ตุลาคม พ.ศ. 2517 สำเร็จการศึกษาปริญญาตรีวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ในปีการศึกษา 2539 เข้ารับราชการที่โครงการส่วนพระองค์ สวนจิตรลดา ในปี 2541 และเข้ากับการศึกษาต่อในระดับปริญญามหาบัณฑิต สาขาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2545

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย