

การย่อยสลายสารประกอบ Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs)

ด้วยจุลินทรีย์ที่ใช้ Phenol เป็นสารต้นต่อคาร์บอน

ปริญญานิพนธ์

ของ

ประนัญญา พิมพ์ดี

เสนอต่อบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา

ตามหลักสูตรปริญญาการศึกษามหาบัณฑิต สาขาวิชาเคมี

พฤษภาคม 2547

ลิขสิทธิ์เป็นของ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

620.11223

ป 291 ก

ร. 9

การย่อยสลายสารประกอบ Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs)

ด้วยจุลินทรีย์ที่ใช้ Phenol เป็นสารต้นตอคาร์บอน

บทคัดย่อ

ของ

ประนิดภา พิมพ์
/

ร 0 ก.ย. 2547

เสนอต่อบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา

ตามหลักสูตรปริญญาการศึกษามหาบัณฑิต สาขาวิชาเคมี

พฤษภาคม 2547

ร 250644

ประนัฎฐา พิมพ์. (2547). การย่อยสลายสารประกอบ Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) ด้วยจุลินทรีย์ที่ใช้ Phenol เป็นสารตั้งต้นของคาร์บอน. ปริญญาโท กศ.ม (เคมี). กรุงเทพฯ : บัณฑิตวิทยาลัย

มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ. คณะกรรมการควบคุม: รองศาสตราจารย์ ดร.ธารรัตน์ ศุภศิริ, รองศาสตราจารย์ ดร.ยุวดี วัฒนโกศาติน, รองศาสตราจารย์ ดร.สมศักดิ์ สร้างป็น.

จากการคัดแยกจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายสารประกอบ PAHs จากดินตะกอนที่ปนเปื้อนสารประกอบปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอน โดยใช้ Phenol เป็นสารตั้งต้นของคาร์บอนและแหล่งพลังงานเพียงชนิดเดียว ในอาหารสูตรปรับต่ำ (KSN Minimal Medium) เพื่อคัดแยก พบว่าจุลินทรีย์ที่สามารถเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี Phenol ที่อุณหภูมิ 37°C มี 8 ชนิด คือ PHE1, PHE2, PHE3...PHE8 ซึ่ง PHE1 และ PHE8 เจริญได้ทั้งในอุณหภูมิ 37°C และ 50°C โดยเชื้อ PHE1 สามารถเจริญและย่อยสลาย Phenol ได้ดี และเมื่อวัดปริมาณเอนไซม์ Tyrosinase โดยใช้ L-Tyrosine เป็นสับสเตรท พบว่ามีการสร้างเอนไซม์ Tyrosinase ในระหว่างการย่อยสลายสารประกอบดังกล่าว

ยิ่งไปกว่านั้นพบว่าจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้สามารถย่อยสลายสารประกอบ Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) จำนวน 5 ชนิดคือ Anthracene, Dibenzothiophene, Naphthalene, Phenanthrene และ Pyrene โดยจุลินทรีย์จะใช้ PAHs เหล่านี้เป็นสารตั้งต้นของคาร์บอนเพื่อเจริญเติบโตในอาหารที่เพิ่มวิตามินและแร่ธาตุที่จำเป็น (CD Medium) แต่ไม่มีการเจริญในอาหารที่มี Benzothiophene, Carbazole และ Fluorene นอกจากนี้พบว่า เชื้อ PHE1 มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายสูงที่สุด โดยสามารถย่อยสลาย Anthracene, Naphthalene, Phenanthrene ได้ที่อุณหภูมิ 50°C

BIODEGRADATION OF POLYCYCLIC AROMATIC HYDROCARBONS (PAHs) BY
MICROORGANISMS THAT UTILIZE PHENOL AS THE SOLE CARBON SOURCE

AN ABSTRACT
BY
PRANUDDA PIMSEE

Presented in partial of the requirements
for the Master of Education degree in Chemistry
at Srinakharinwirot University
May 2004

Pranudda Pimsee. (2004). *Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by microorganisms that utilize phenol as the sole carbon source*. Master thesis, M.Ed (Chemistry). Bangkok : Graduate School, Srinakharinwirot University. Advisor Committee: Assoc. Prof. Dr. Thararat Supasiri, Assoc. Prof. Dr. Yuwadee Watanapokasin, Assoc. Prof. Dr. Somsak Sarangbin.

Eight types of bacterial strains, PHE1, PHE2, PHE3...PHE8, were isolated from contaminated petroleum hydrocarbon soil. They were able to use phenol as the sole source of carbon and energy in KSN minimal medium at 37°C. In addition, PHE1 and PHE8 can also grow at 50°C, PHE1 showed the highest growth and phenol degradation up to 10 mM. We further assayed the enzyme involved with the degradation of phenol, tyrosinase activity was detected in the culture medium of PHE1 using L-tyrosine as a substrate. Additional degradation analysis, using polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) as the carbon source in complete media with vitamin and metal solution, showed that anthracene, dibenzothiophene, naphthalene, phenanthrene and pyrene can be hydrolyzed by the microorganisms at 37°C but not benzothiophene, carbazole and fluorene. Interestingly, PHE1 was found to have the highest biodegradable efficiency since it can hydrolyze anthracene, naphthalene and phenanthrene at 50°C.

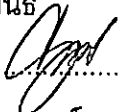
ปริญญานิพนธ์
เรื่อง

การย่อยสลายสารประกอบ Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs)
ด้วยจุลินทรีย์ที่ใช้ Phenol เป็นสารต้นตอคาร์บอน

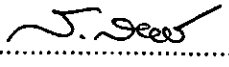
ของ
นางสาวประนัดฎา พิมลี

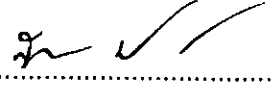
ได้รับอนุมัติจากบัณฑิตวิทยาลัยให้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาการศึกษามหาบัณฑิต สาขาวิชาเคมี
ของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

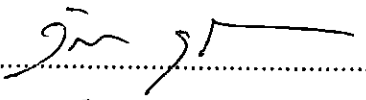

.....คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย
(รองศาสตราจารย์ ดร.นภาพร ณะวานนท์)
วันที่ ๒๑ เดือน พฤษภาคม พ.ศ. ๒๕๕๗

คณะกรรมการสอบปริญญานิพนธ์

.....ประธาน
(รองศาสตราจารย์ ดร. ธารรัตน์ สุขศิริ)


.....กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. ยุวดี วัฒนโกศลสิน)


.....กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. สมศักดิ์ สร้างสิน)


.....กรรมการที่แต่งตั้งเพิ่มเติม
(รองศาสตราจารย์ ดร. สุภาลักษณ์ ปรัชญาสิทธิกุล)


.....กรรมการที่แต่งตั้งเพิ่มเติม
(อาจารย์ ดร. วลัยยา อุทัยสง)

ประกาศคุณูปการ

ปริญญานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี ด้วยความช่วยเหลือ และคำแนะนำอย่างยิ่งจาก รศ.ดร.ยุวดี วัฒนโกศาสิน ,รศ.ดร.สมศักดิ์ สร้างบิน และรศ.ดร.ธารารัตน์ ศุภศิริ ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้

ขอขอบพระคุณ รศ. ดร. สุภาลักษณ์ ปรัชญาสิทธิกุล และ ดร. วลัยยา อุทัยสาข กรรมการสอบปริญญานิพนธ์ รวมทั้งคณาจารย์ และเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการของภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ และห้องปฏิบัติการของภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ที่กรุณาให้ใช้ห้องปฏิบัติการ เครื่องมือวิทยาศาสตร์ และสารเคมี

ขอโน้มรำลึกถึงพระคุณบิดามารดา ครูอาจารย์ ตลอดจนเพื่อน ๆ ทุกคนที่ให้ทั้งกำลังใจ และกำลังใจที่ดีเยี่ยมตลอดระยะเวลาที่ศึกษาและทำงานวิจัย

ประนัฎฐา พิมสี

สารบัญ

บทที่

หน้า

1 บทนำ.....	1
ภูมิหลัง.....	1
ความมุ่งหมายของการวิจัย.....	2
ความสำคัญของการวิจัย.....	2
ขอบเขตของการวิจัย.....	2
2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	4
คุณสมบัติทั่วไปของสารประกอบ Phenol และ PAHs.....	4
งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	11
3 วิธีดำเนินการวิจัย.....	14
อุปกรณ์และสารเคมี.....	14
วิธีการทดลอง.....	15
4 ผลการวิเคราะห์ข้อมูล.....	21
ลักษณะของเชื้อ และการติดสีแกรม.....	21
การทดสอบการย่อยสลายสารประกอบ PAHs.....	22
การทดสอบการย่อยสลาย Phenol.....	36
5 สรุปผล อภิปราย และข้อเสนอแนะ.....	46
สรุปผลการทดลอง.....	46
อภิปรายผลการทดลอง.....	47
ข้อเสนอแนะ.....	49
บรรณานุกรม.....	50
ภาคผนวก.....	54

สารบัญ (ต่อ)

บทที่

หน้า

ประวัติย่อผู้วิจัย.....	77
-------------------------	----

บัญชีตาราง

ตาราง

หน้า

1	ลักษณะของเชื้อและการติดสีแกรม.....	21
2	การเจริญของเชื้อใน CD Medium ที่มี Anthracene 0.2 %.....	57
3	การเจริญของเชื้อใน CD Medium ที่มี Dibenzothiophene 0.2 %.....	58
4	การเจริญของเชื้อใน CD Medium ที่มี Naphthalene 0.2 %.....	58
5	การเจริญของเชื้อใน CD Medium ที่มี Phenanthrene 0.2 %.....	59
6	การเจริญของเชื้อใน CD Medium ที่มี Pyrene 0.2 %.....	59
7	การเจริญของเชื้อใน Anthracene ที่ความเข้มข้นต่างๆ อุณหภูมิ 37°C.....	60
8	การเจริญของเชื้อใน Anthracene ที่ความเข้มข้นต่างๆ อุณหภูมิ 50°C.....	60
9	การเจริญของเชื้อใน Dibenzothiophene ที่ความเข้มข้นต่างๆ อุณหภูมิ 37°C.....	61
10	การเจริญของเชื้อใน Naphthalene ที่ความเข้มข้นต่างๆ อุณหภูมิ 37°C.....	62
11	การเจริญของเชื้อใน Naphthalene ที่ความเข้มข้นต่างๆ อุณหภูมิ 50°C.....	63
12	การเจริญของเชื้อใน Phenanthrene ที่ความเข้มข้นต่างๆ อุณหภูมิ 37°C.....	64
13	การเจริญของเชื้อใน Phenanthrene ที่ความเข้มข้นต่างๆ อุณหภูมิ 50°C.....	65
14	การเจริญของเชื้อใน Pyrene ที่ความเข้มข้นต่างๆ อุณหภูมิ 37°C.....	65
15	การย่อยสลาย Phenol 10 mM ของเชื้อ PHE1 ที่อุณหภูมิ 37°C.....	66
16	การย่อยสลาย Phenol 10 mM ของเชื้อ PHE1 ที่อุณหภูมิ 50°C.....	67
17	การย่อยสลาย Phenol 10 mM ของเชื้อ PHE3 ที่อุณหภูมิ 37°C.....	68
18	การย่อยสลาย Phenol 10 mM ของเชื้อ PHE8 ที่อุณหภูมิ 37°C.....	69
19	การย่อยสลาย Phenol 10 mM ของเชื้อ PHE8 ที่อุณหภูมิ 50°C.....	70
20	การย่อยสลาย Phenol 15 mM ของเชื้อ PHE1 ที่อุณหภูมิ 37°C.....	71
21	การย่อยสลาย Phenol 15 mM ของเชื้อ PHE1 ที่อุณหภูมิ 50°C.....	72
22	การย่อยสลาย Phenol 15 mM ของเชื้อ PHE3 ที่อุณหภูมิ 37°C.....	73
23	การย่อยสลาย Phenol 15 mM ของเชื้อ PHE8 ที่อุณหภูมิ 37°C.....	74
24	การย่อยสลาย Phenol 15 mM ของเชื้อ PHE8 ที่อุณหภูมิ 50°C.....	75

บัญชีภาพประกอบ

ภาพประกอบ

หน้า

1 โครงสร้างของ Phenol และสารประกอบ PAHs บางชนิด.....	7
2 กลไกการย่อยสลาย Phenol ด้วยจุลินทรีย์.....	9
3 กลไกการย่อยสลาย PAHs ด้วยจุลินทรีย์.....	10
4 วิธีดำเนินการวิจัย.....	18
5 การเพิ่มปริมาณเชื้อและการคัดแยกเชื้อจุลินทรีย์ให้บริสุทธิ์.....	19
6 การทดสอบการใช้ Phenol เป็นแหล่งต้นตอคาร์บอน.....	20
7 การเจริญของเชื้อใน Anthracene 0.2 % อุณหภูมิ 37°C.....	22
8 การเจริญของเชื้อใน Dibenzothiophene 0.2 % อุณหภูมิ 37°C.....	23
9 การเจริญของเชื้อใน Naphthalene 0.2 % อุณหภูมิ 37°C.....	24
10 การเจริญของเชื้อใน Phenanthrene 0.2 % อุณหภูมิ 37°C.....	25
11 การเจริญของเชื้อใน Pyrene 0.2 % อุณหภูมิ 37°C.....	26
12 การเจริญของเชื้อใน Anthracene 0.2 %, 0.5 %, 1.0 % อุณหภูมิ 37°C.....	28
13 การเจริญของเชื้อใน Anthracene 0.2 %, 0.5 %, 1.0 % อุณหภูมิ 50°C.....	29
14 การเจริญของเชื้อใน Dibenzothiophene 0.2 %, 0.5 %, 1.0 % อุณหภูมิ 37°C.....	30
15 การเจริญของเชื้อใน Naphthalene 0.2 %, 0.5 %, 1.0 % อุณหภูมิ 37°C.....	31
16 การเจริญของเชื้อใน Naphthalene 0.2 %, 0.5 %, 1.0 % อุณหภูมิ 50°C.....	32
17 การเจริญของเชื้อใน Phenanthrene 0.2 %, 0.5 %, 1.0 % อุณหภูมิ 37°C.....	33
18 การเจริญของเชื้อใน Phenanthrene 0.2 %, 0.5 %, 1.0 % อุณหภูมิ 50°C.....	34
19 การเจริญของเชื้อใน Pyrene 0.2 %, 0.5 %, 1.0 % อุณหภูมิ 50°C.....	35
20 การย่อยสลาย Phenol 10 mM ของเชื้อ PHE1 อุณหภูมิ 37°C.....	36
21 การย่อยสลาย Phenol 10 mM ของเชื้อ PHE1 อุณหภูมิ 50°C.....	37
22 การย่อยสลาย Phenol 10 mM ของเชื้อ PHE3 อุณหภูมิ 37°C.....	38
23 การย่อยสลาย Phenol 10 mM ของเชื้อ PHE8 อุณหภูมิ 37°C.....	39
24 การย่อยสลาย Phenol 10 mM ของเชื้อ PHE8 อุณหภูมิ 50°C.....	40
25 การย่อยสลาย Phenol 15 mM ของเชื้อ PHE1 อุณหภูมิ 37°C.....	41
26 การย่อยสลาย Phenol 15 mM ของเชื้อ PHE1 อุณหภูมิ 50°C.....	42
27 การย่อยสลาย Phenol 15 mM ของเชื้อ PHE3 อุณหภูมิ 37°C.....	43

บัญชีภาพประกอบ (ต่อ)

ภาพประกอบ	หน้า
28 การย่อยสลาย Phenol 15 mM ของเชื้อ PHE8 อุณหภูมิ 37°C.....	44
29 การย่อยสลาย Phenol 15 mM ของเชื้อ PHE8 อุณหภูมิ 50°C.....	45
30 Kinetic ของเอนไซม์ Tyrosinase.....	76

บทที่ 1

บทนำ

ภูมิหลัง

ในปัจจุบันมีการพัฒนาทางอุตสาหกรรมมากขึ้น ทำให้มีการใช้พลังงานจากกลุ่มปิโตรเลียมและน้ำมันเพิ่มขึ้น ดังนั้นปัญหาที่ตามมาคือมีการปล่อยของเสียต่อสิ่งแวดล้อม เช่น สารประกอบ Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) เป็นสารพิษสำคัญในของเสียกลุ่มผลิตภัณฑ์ปิโตรเลียม โดย PAHs จะเข้าสู่สิ่งแวดล้อมโดยตรง จากการเผาไหม้ การรั่วไหลของน้ำมัน น้ำทิ้งจากโรงงานต่างๆ รวมทั้งควันจากท่อไอเสียรถยนต์ ควันบุหรี่ หรือแม้แต่การย่างหรือปิ้งอาหารจนไหม้ (Cerniglia. 1992) นอกจากนี้ PAHs ยังเป็นสารพิษที่ทำให้เกิดอันตรายร้ายแรงต่อมนุษย์ โดยอาจก่อให้เกิดมะเร็ง (Carcinogen) การเปลี่ยนแปลงของยีน (Mutagen) (Wilson & Jones. 1993)

การจัดการสารประกอบ PAHs ด้วยวิธีการทางชีวภาพ โดยใช้จุลินทรีย์ในการย่อยสลายสารประกอบ PAHs มักจะแยกได้จากบริเวณที่มีการปนเปื้อนสารดังกล่าว ซึ่งจุลินทรีย์กลุ่มสำคัญที่สามารถย่อยสลายสารประกอบ PAHs คือ ราและแบคทีเรีย (Wilson & Jones. 1993) โดยจุลินทรีย์จะใช้สารเหล่านี้เป็นแหล่งของพลังงานและคาร์บอน อย่างไรก็ตามการคัดแยกจุลินทรีย์อาจไม่ใช้สารประกอบ PAHs เพื่อคัดแยกโดยตรง แต่อาจใช้สารพิษอื่นที่มีโครงสร้างคล้ายกัน เช่น Phenol เพื่อคัดแยกจุลินทรีย์ก่อน แล้วจึงนำจุลินทรีย์ที่ได้ไปย่อยสลายสารประกอบ PAHs ต่อไป เนื่องจาก Phenol เป็นสาร Aromatic ที่มีวงเบนซีนเพียง 1 วง และ Phenol เป็นสารที่มีอันตรายต่อสิ่งมีชีวิต เช่น มีฤทธิ์กัดกร่อนเนื้อเยื่อรุนแรง ตาบอดหรือเสียชีวิตได้ และยังออกฤทธิ์กดประสาทส่วนกลางของสัตว์ทดลอง นอกจากนี้ยังอาจเป็น Promotor หรือสารก่อมะเร็งที่ผิวหนังอย่างอ่อนๆ ในสัตว์ทดลอง (กรมควบคุมมลพิษ. 2543 ข) ดังนั้นถ้าจุลินทรีย์สามารถใช้ Phenol เป็นแหล่งพลังงานได้ จะเป็นการลดสารที่ก่อมลพิษได้อีกชนิดหนึ่ง เนื่องจากสารประกอบ PAHs ประกอบด้วยวงเบนซีน 2 วงขึ้นไป ดังนั้นถ้าจุลินทรีย์สามารถย่อยสลาย Phenol ได้ โอกาสที่จุลินทรีย์ชนิดนั้นจะย่อยสลายสารประกอบ PAHs จะมีมากขึ้น นอกจากนี้การศึกษาเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลาย Phenol เช่น เอนไซม์ Tyrosinase ที่สามารถเปลี่ยน Phenol ไปเป็น *o*-Quinone (Solomon, E. และคณะ. 1996) จะทำให้ทราบถึงกลไกการย่อยสลาย Phenol และสารประกอบ PAHs ได้ดีขึ้น

ดังนั้นผู้วิจัยจึงต้องการคัดแยกจุลินทรีย์ จากแหล่งที่ปนเปื้อนผลิตภัณฑ์ปิโตรเลียม โดยใช้ Phenol เป็นแหล่งพลังงานและสารต้นต่อคาร์บอน ทดสอบในสภาวะที่ใช้ออกซิเจน ที่อุณหภูมิสูง เพื่อให้ได้จุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพดี เพื่อนำไปย่อยสลายสารประกอบ PAHs ได้ดียิ่งขึ้น

✓ ความมุ่งหมายของการวิจัย วัตถุประสงค์

ในการวิจัยครั้งนี้ผู้วิจัยได้ตั้งความมุ่งหมายดังนี้

1. เพื่อคัดแยกและศึกษาคุณสมบัติของจุลินทรีย์ที่ใช้ Phenol เป็นแหล่งพลังงานและแหล่งคาร์บอน จากดินที่ปนเปื้อนปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอน โดยศึกษาความเข้มข้นของ Phenol และอุณหภูมิที่จุลินทรีย์เจริญเติบโต
2. เพื่อศึกษาการย่อยสลายสารประกอบ Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs)
3. เพื่อศึกษาเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลาย

✓ ความสำคัญของการวิจัย *

เนื่องจากประเทศไทยกำลังมีการพัฒนาไปสู่การเป็นประเทศอุตสาหกรรม เพื่อสร้างความมั่นคงและสร้างงาน ทำให้ประชากรมีคุณภาพชีวิตดีขึ้น แต่ผลที่ตามมาคือ มีการปล่อยของเสียจากแหล่งต่างๆ เช่น ของเสียจากครัวเรือน การเกษตร และโรงงานอุตสาหกรรม ดังนั้นปริมาณของสารพิษจะมีการสะสมมากยิ่งขึ้น จากการศึกษาปริมาณของเสียพบว่าในปี พ.ศ. 2535 มีของเสียอันตรายประเภทน้ำมัน 589,508 ล้านตัน (สำนักเทคโนโลยีสิ่งแวดล้อมโรงงาน, 2542) จึงจำเป็นต้องหาทางป้องกัน เพื่อเตรียมความพร้อมในการกำจัดสารพิษเหล่านี้ โดยการนำจุลินทรีย์ (Microorganisms) มาใช้ในการย่อยสลายสารพิษ ซึ่งจุลินทรีย์ต้องมีความจำเพาะต่อสารพิษนั้นๆ และไม่เกิดมลพิษทับซ้อน เพราะการกำจัดทางเคมี (Chemical Treatment) อาจจะมีมลพิษข้างเคียงเกิดขึ้น ดังนั้นจะเห็นได้ว่าการย่อยสลายทางชีวภาพ (Biodegradation) จะมีผลดีกว่าการกำจัดทางเคมี ซึ่งข้อมูลในการวิจัยครั้งนี้ สามารถใช้เป็นข้อมูลเบื้องต้นในการย่อยสลาย Phenol และสารประกอบ PAHs เพื่อควบคุมปัญหาสิ่งแวดล้อมจากสารพิษกลุ่มนี้ได้ดียิ่งขึ้น

ขอบเขตของการวิจัย

1. คัดแยกจุลินทรีย์ที่ใช้ Phenol เป็นแหล่งพลังงานและสารต้นต่อคาร์บอนจากการปนเปื้อนในดิน 3 แหล่งดังนี้
 - 1.1 บ่อบำบัดน้ำเสีย จังหวัดพะเยา
 - 1.2 เขตอุตสาหกรรม จังหวัดน่าน
 - 1.3 บ่อน้ำพุร้อน จังหวัดเชียงราย

2. ศึกษาการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ที่ใช้ Phenol เป็นแหล่งต้นตอของพลังงาน ซึ่งใช้อุณหภูมิ 37°C และ 50°C ในสภาวะที่ใช้ออกซิเจน โดยวัดปริมาณ Phenol ที่ใช้

3. นำเชื้อที่เจริญได้ดีในข้อ 2 มาทดสอบการย่อยสลายสารประกอบ PAHs บนอาหารแข็ง (Spray Plate) และในอาหารเหลว ซึ่งมี PAHs ดังนี้

3.1 Naphthalene

3.2 Pyrene

3.3 Fluorene

3.4 Anthracene

3.5 Phenanthrene

3.6 Carbazole

3.7 Benzothiophene

3.8 Dibenzothiophene

4. นำเชื้อที่ได้ในข้อ 2 มาศึกษาเอนไซม์ Tyrosinase

นิยามศัพท์เฉพาะ

Biodegradation หมายถึง การย่อยสลายทางชีวภาพ

Clear zones หมายถึง รอยใสรอบๆโคโลนีของเชื้อจุลินทรีย์ ที่สามารถย่อยสลายสารที่คลุมบนผิวหน้าอาหารแข็ง

Cometabolism หมายถึง การเจริญของจุลินทรีย์บนสับสเตรทชนิดหนึ่ง แล้วมีความสามารถในการย่อยสลายสารอีกชนิดหนึ่ง โดยไม่มีการนำสารที่ย่อยสลายมาใช้เป็นองค์ประกอบของเซลล์

LD₅₀ (Median lethal dose) หมายถึง ปริมาณของสารเคมีซึ่งคาดว่าจะทำให้สัตว์ที่ได้รับสารนั้นเพียงครั้งเดียวตายไปเป็นจำนวนครึ่งหนึ่งของจำนวนที่เริ่มต้น

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

คุณสมบัติทั่วไปของสารประกอบ Phenol และ PAHs

ฟีนอล (Phenol)

Phenol มีสูตรโมเลกุลคือ C_6H_5O และสูตรโครงสร้างดังภาพประกอบ 1 น้ำหนักโมเลกุล 94.11 มีชื่ออื่นๆ เช่น Acid Carbolique, Benzenol, Hydrobenzone เป็นต้น Phenol มีลักษณะเป็นผลึกไม่มีสีหรือสีขาว จุดหลอมเหลว $40.85^{\circ}C$ จุดเดือด $182^{\circ}C$ มีกลิ่นฉุนเฉพาะตัว ดูดความชื้นและละลายน้ำได้ดี มีฤทธิ์เป็นกรดอ่อน เป็นสารเคมีที่ไม่สามารถผลิตในประเทศไทยต้องนำเข้าจากต่างประเทศโดยเฉพาะประเทศญี่ปุ่น ประโยชน์ของ Phenol ได้แก่ ใช้เป็นยาฆ่าเชื้อในรูปสารละลายเดี่ยวหรือผสมกับยาฆ่าเชื้ออื่นๆ และใช้ในการผลิตสารเคมีอันตรายหลายชนิด เช่น Cresols, Xylene, Salicylic acid, Aniline และ Phenolic resins การแพร่กระจายของ Phenol สู่สิ่งแวดล้อมมาจากแหล่งต่างๆ คือ อุตสาหกรรมในการผลิตสารเคมีชนิดต่างๆ เช่น อุตสาหกรรมผลิตสี สารเคมีที่ใช้ในบ้านเรือนและห้องปฏิบัติการ และยังพบวารถยนต์และไอเสียของรถยนต์ มี Phenol ผสมอยู่ รวมทั้งมาจากการทำปฏิกิริยาของ Benzene ซึ่งทำปฏิกิริยากับอนุมูลอิสระ Hydroxyl ในอากาศ (กรมควบคุมมลพิษ. 2543 ข)

จากการศึกษาพบว่า Phenol มีพิษปานกลางต่อสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม ค่า LD_{50} ในสัตว์กัดแทะ (Rodent) ที่ได้ Phenol ทางปากมีค่าระหว่าง 300-600 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว โดยสัตว์ทดลองที่เสียชีวิตจากการได้รับ Phenol ที่มีความเข้มข้นสูง มีสาเหตุมาจากฤทธิ์ในการกดประสาทส่วนกลาง และพบว่าลักษณะการเกิดพิษ ไม่ขึ้นอยู่กับวิธีการรับเข้าสู่ร่างกาย สัตว์ทดลองจะมีอาการกล้ามเนื้อกระตุก ชัก อัตราการเต้นของหัวใจไม่สม่ำเสมอ ความดันโลหิตลดลงมาก รวมทั้งมีฤทธิ์ในการกัดเนื้อเยื่อต่างๆ และกระทบต่อการทำงานของปอดและเส้นใยประสาท (Liao & Ohme. 1980) ในมนุษย์พบว่าทำให้เกิดอาการเฉียบพลัน คือมีฤทธิ์กัดกร่อนเนื้อเยื่อรุนแรง เกิดแผลไหม้ ตาบอด และเสียชีวิต หรืออาการเรื้อรัง โดยจะทำให้ท้องเสีย เบื่ออาหาร ตับและไตถูกทำลาย สิวผดผื่น นอกจากนี้ยังมีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ Glucose-6-Phosphatase, Succinate Dehydrogenase และ Cytochrome Oxidase และยังพบว่า Phenol อาจมีคุณสมบัติเป็น Promotor และ/หรือ เป็นสารก่อมะเร็งที่ผิวหนังอย่างอ่อนๆ โดยเฉพาะในหนู (กรมควบคุมมลพิษ. 2543 ข)

Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs)

PAHs หมายถึง สารประกอบไฮโดรคาร์บอนที่ประกอบด้วยวงเบนซีนตั้งแต่สองวงขึ้นไปมาเชื่อมรวมกัน โมเลกุลประกอบด้วยไฮโดรเจนอะตอมและคาร์บอนอะตอม อย่างไรก็ตามสารประกอบ PAHs บางชนิด จะมีอะตอมธาตุอื่นเข้ามาอยู่ในโมเลกุลด้วย เช่น ไนโตรเจน กำมะถัน และออกซิเจน โดยการรวมกันของวงเบนซีน อาจเรียงตัวเป็นเส้นตรง (Linear) มุมงอ (Angular) และเป็นกลุ่มก้อน (Cluster) (Wilson & Jone. 1993) ตัวอย่างของ PAHs บางชนิดได้แก่ Naphthalene ($C_{10}H_8$) Fluorene ($C_{13}H_{10}$) Phenanthrene ($C_{14}H_{10}$) Anthracene ($C_{14}H_{10}$) Pyrene ($C_{16}H_{10}$) (ดังภาพประกอบ 1) PAHs มีแหล่งกำเนิดจากน้ำมันดิบ (Crude Oil) ซึ่งน้ำมันดิบจากแหล่งธรรมชาติที่ต่างกัน จะมีองค์ประกอบของ PAHs ที่แตกต่างกัน โดยทั่วไปน้ำมันดิน (Coal Tar) ที่ได้จากการกลั่นถ่านหินที่มี PAHs เป็นส่วนประกอบมากกว่าน้ำมันดิบจากแหล่งอื่น คือ น้ำมันปิโตรเลียมและถ่านหิน และ PAHs ที่มีการผลิตมากที่สุดคือ Naphthalene, Acenaphthene และ Anthracene (Cerniglia. 1992)

PAHs หลายชนิด มีความสำคัญทางอุตสาหกรรม ส่วนใหญ่จะใช้ผลิตสารเคมี เช่น Acenaphthene ใช้ผลิต Naphthalicanhydride ซึ่งใช้ผลิตสีและเรซิน Anthracene ใช้เป็นสารตรวจวัดกัมมันตรังสี (Scintillant) และใช้ผลิต Anthraquinone ซึ่งใช้ผลิตสี (Dyestuffs) Fluorene ผลิต Fluorenone เป็นสารออกซิไดซ์อย่างอ่อน (Mild Oxidant) Naphthalene ใช้ผลิตสารเคมีต่างๆ เช่น สี สารกำจัดแมลงคาร์บาริล และตัวทำละลาย Phenanthrene ใช้ผลิตสารเคมี Pyrene ใช้ผลิตสีได้ การแพร่กระจายของ PAHs สู่สิ่งแวดล้อมได้หลายทาง ทั้งจากธรรมชาติ เช่น การซึมของน้ำมันดิบจากแหล่งน้ำมันใต้ดิน ทำให้ PAHs ปนเปื้อนในแหล่งน้ำธรรมชาติและดิน ไฟไหม้ป่า ภูเขาไฟระเบิด และจากการกระทำของมนุษย์ คือ การเผาไหม้แบบไม่สมบูรณ์ ซึ่งจะทำให้เกิด PAHs แตกต่างกัน ขึ้นอยู่กับวัตถุที่เผาไหม้ โดยเฉพาะจากรถยนต์ที่เผาไหม้ไม่สมบูรณ์ การเผาขยะรถยนต์ ควันทูบหรี่ ซึ่งความเข้มข้นของ PAHs แต่ละแหล่งจะแตกต่างกันไป (กรมควบคุมมลพิษ. 2543 ก)

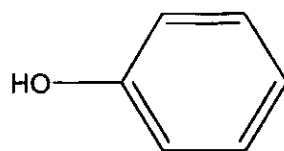
ความเป็นพิษของ PAHs ต่อสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม มักไม่ค่อยพบพิษแบบเฉียบพลัน ยกเว้น Anthracene ซึ่งจะกระตุ้นให้ร่างกายมีความไวต่อแสงมากขึ้น (Photosensitivity) ทำให้ผิวหนังแสบร้อน ระคายเคืองเยื่อเมือกและหลอดลม การทำ Chrysoene บนผิวหนังหนู จะทำให้ผิวหนังมีจำนวนเซลล์สีผิวเพิ่มขึ้น Naphthalene ทำให้เกิดภาวะโลหิตจาง เนื่องจากเม็ดเลือดแดงแตก นอกจากนี้ยังพบว่า PAHs ทำให้เกิดปฏิกิริยาทางชีวเคมีหลายอย่าง โดยออกฤทธิ์ต่อการทำงานของเอนไซม์หลายชนิด ได้แก่ Carboxylesterase ซึ่งเป็นเอนไซม์ใน Microsome ในเซลล์ตับ ไต และเยื่อลำไส้ Aldehyde Dehydrogenase (ADH) ในไซโตพลาสซึม ซึ่งทดลองในหนูพบว่า มีฤทธิ์ทำให้เกิดมะเร็งได้ (Torronen, R. et al. 1981) รวมทั้งเอนไซม์ Aromatic Hydrocarbon

Hydroxylases (AHH) ซึ่งมีหน้าที่เฉพาะเมตาบอลิซึมของ PAHs ทุกชนิด โดยฤทธิ์จะขึ้นอยู่กับชนิดของ PAHs สปีชีส์และสายพันธุ์ของสัตว์ นอกจากนี้ยังพบว่า PAHs ยังเป็นสารก่อเกิดมะเร็ง (Carcinogen) และเป็นสารก่อเกิดการกลายพันธุ์ (Mutagen) ในสัตว์ทดลองอีกด้วย (Wilson & Jone. 1993)

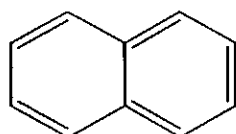
การย่อยสลายสารประกอบ PAHs ด้วยจุลินทรีย์

การปนเปื้อนของสารพิษตกค้างในธรรมชาตินั้นมี 2 ลักษณะใหญ่ๆ คือ การปนเปื้อนแบบจำกัด (Point Contamination) คือ การปนเปื้อนของสารพิษในพื้นที่หรือปริมาตรที่จำกัด แต่มีความเข้มข้นของสารพิษสูง อีกลักษณะหนึ่งคือ การปนเปื้อนแบบกระจาย (Dispersed Contamination) เป็นการปนเปื้อนของสารพิษตามแหล่งธรรมชาติเป็นบริเวณกว้าง มักมีความเป็นพิษต่ำกว่า การกำจัดสารพิษตกค้าง สามารถทำได้หลายวิธี เช่น วิธีทางเคมี วิธีทางกายภาพ และวิธีทางชีวภาพ โดยวิธีทางเคมีมักจะเหมาะกับการปนเปื้อนแบบจำกัด เพราะเสียค่าใช้จ่ายสูง รวมทั้งอาจเกิดปัญหาสารเคมีที่ใช้บำบัดตกค้าง ปัจจุบันจึงมีการให้ความสนใจวิธีกำจัดทางชีวภาพ ที่ประหยัดและเหมาะกับการปนเปื้อนแบบกระจาย ซึ่งการปนเปื้อนของสารประกอบ PAHs มักจะเป็นในลักษณะดังกล่าว

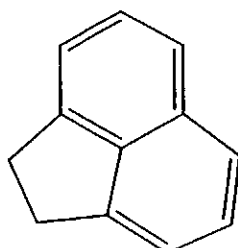
การกำจัดสารพิษตกค้างโดยวิธีทางชีวภาพ หมายถึง การใช้สิ่งมีชีวิตมากำจัดสารพิษตกค้าง โดยสิ่งมีชีวิตดังกล่าวมักเป็นจุลินทรีย์ เช่น แบคทีเรีย รา และสาหร่าย ซึ่งกระบวนการย่อยสลาย PAHs นั้นมีหลายลักษณะด้วยกันได้แก่ Mineralization หมายถึง การย่อยสลาย PAHs จนได้เป็นแร่ธาตุหรือสารที่ไม่เป็นพิษ เช่น คาร์บอนไดออกไซด์ น้ำ และสารอนินทรีย์ Biotransformation เป็นการเปลี่ยนสารประกอบ PAHs หรือสารพิษไปเป็นสารอื่นที่อาจมีพิษมากขึ้นหรือน้อยลง อีกลักษณะคือ Cometabolism ซึ่งหมายถึง การที่จุลินทรีย์เจริญเพิ่มจำนวนบนสับสเตรทชนิดหนึ่ง และมีความสามารถในการย่อยสลายสับสเตรทอีกชนิดหนึ่ง โดยไม่ได้นำมาเป็นองค์ประกอบของเซลล์ (วิมล ชอบชื่นชม. 1998)



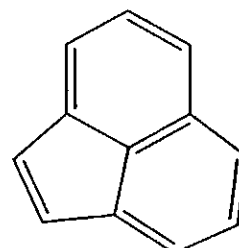
Phenol



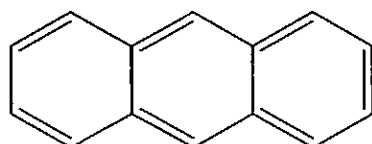
Naphthalene



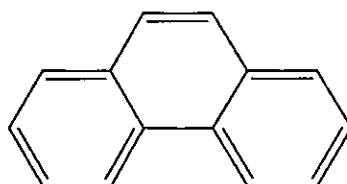
Acenaphthene



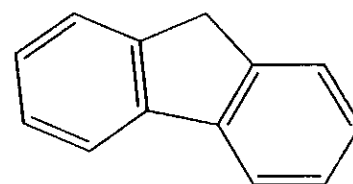
Acenaphthylene



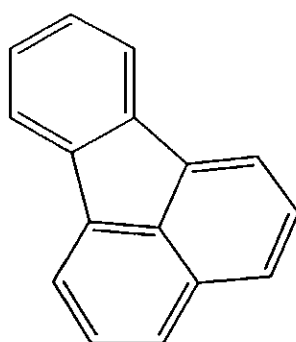
Anthracene



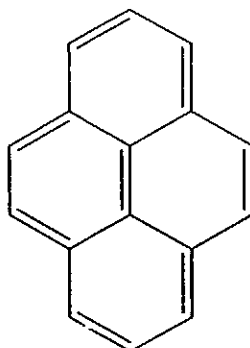
Phenanthrene



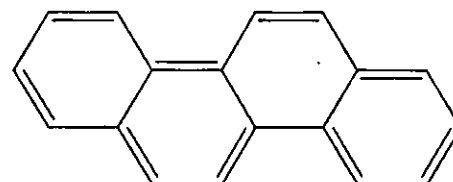
Fluorene



Fluoranthene



Pyrene



Chrysene

ภาพประกอบ 1 โครงสร้างของ Phenol และสารประกอบ PAHs บางชนิด
(Wilson & Jone. 1993)

ปัจจัยที่มีผลต่อการย่อยสลายด้วยจุลินทรีย์

1. การปรับตัวของจุลินทรีย์ จากการศึกษาพบว่า การจัดแยกจุลินทรีย์จากแหล่งที่ปนเปื้อนสารประกอบ PAHs จะทำให้จุลินทรีย์สามารถย่อยสลาย PAHs ได้ดีและเร็วขึ้น (Wilson & Jones. 1993)

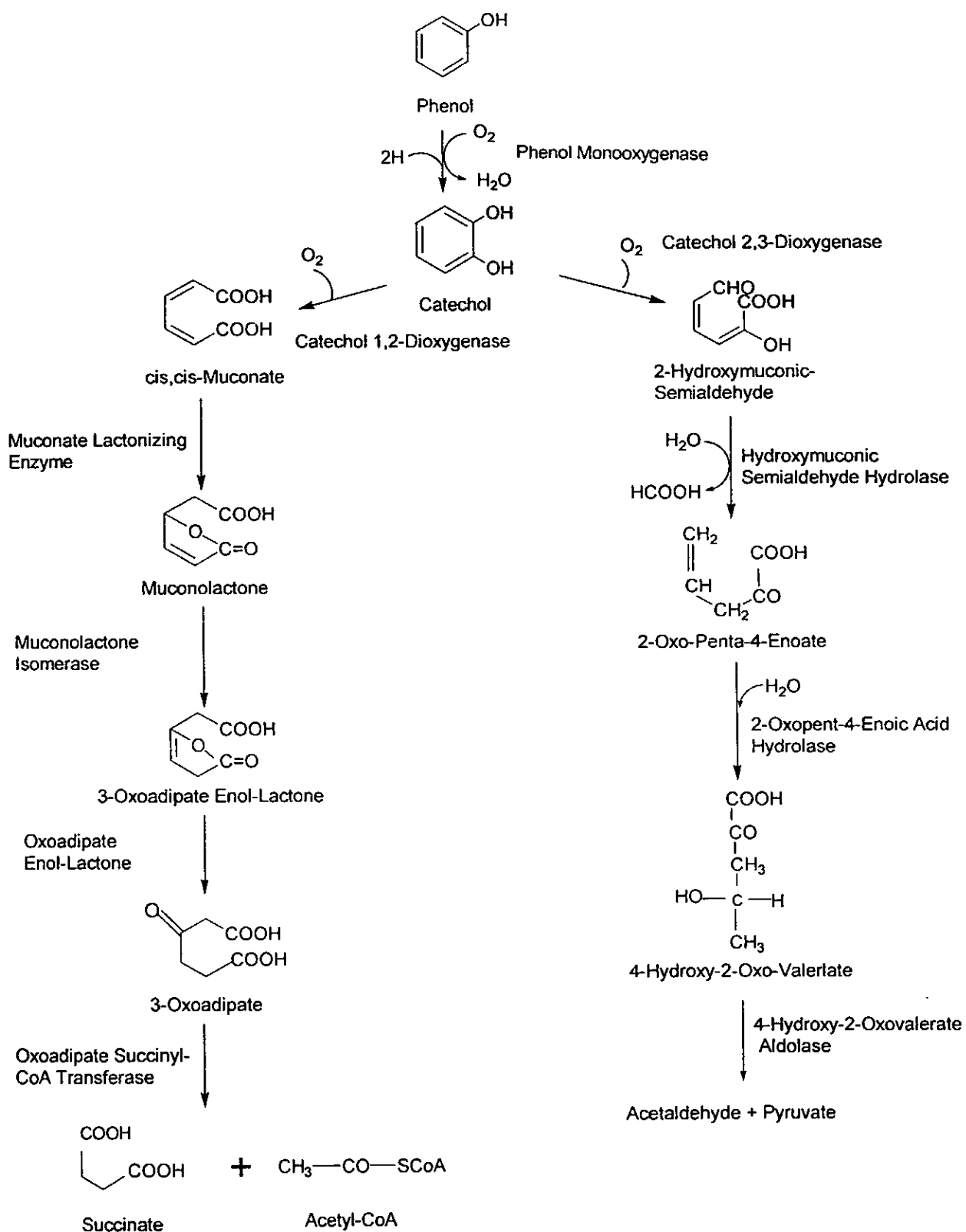
2. โครงสร้างของ PAHs เพราะโครงสร้างของแต่ละสารประกอบจะแสดงถึงคุณสมบัติเฉพาะเช่น ความสามารถในการละลายน้ำ การเรียงตัวของสารประกอบ การกระจายและคงทนในสิ่งแวดล้อม ซึ่งจะทำให้ความยากง่ายในการย่อยสลายแตกต่างกัน (Asoke & Saxena. 1995)

3. ปัจจัยทางสิ่งแวดล้อม ได้แก่ อาหาร (Nutrients) โดยเฉพาะปริมาณไนโตรเจนและฟอสฟอรัส เนื่องจากจุลินทรีย์ต้องใช้เพื่อการเจริญเติบโต อากาศ ซึ่งพบว่าปริมาณของออกซิเจนมีผลต่อการย่อยสลาย โดยเฉพาะแบคทีเรียที่ใช้เอนไซม์ Oxygenase โดยมักจะใช้เพื่อเปลี่ยนโมเลกุลของ PAHs เป็นน้ำ และคาร์บอนไดออกไซด์ นอกจากนี้ อุณหภูมิและความเป็นกรดต่าง (pH) ที่สูงหรือต่ำเกินไป จะทำให้การย่อยสลายลดลง (จิราภรณ์ และคณะ. 2536)

กลไกการย่อยสลาย Phenol และสารประกอบ PAHs

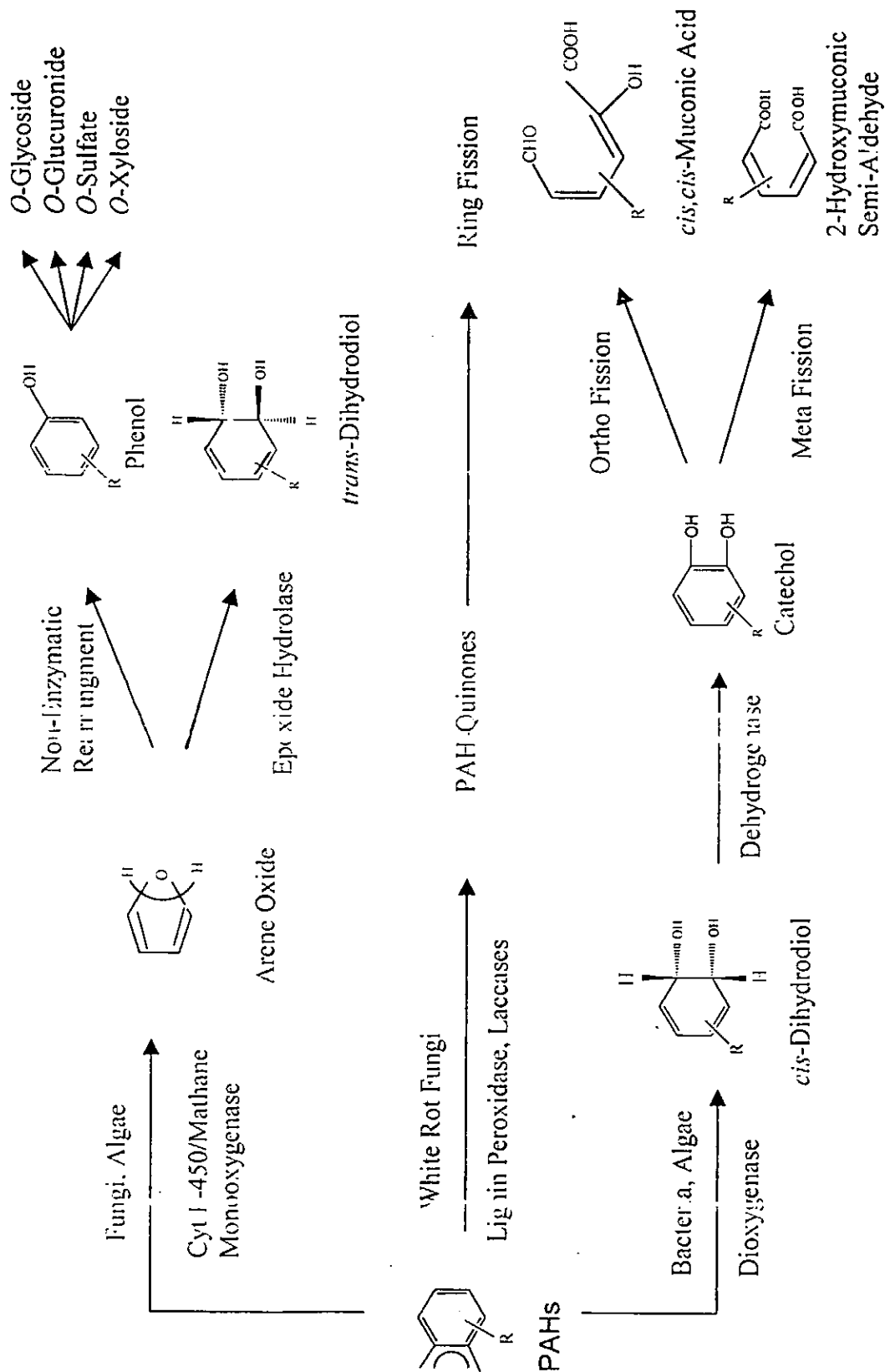
จากการศึกษาการย่อยสลาย Phenol พบว่า Phenol จะเปลี่ยนเป็น Catechol ก่อนแล้วจึงเกิดการออกซิไดซ์ได้ 2 ตำแหน่ง คือตำแหน่งออร์โธ และ ตำแหน่งเมตา ซึ่งที่ตำแหน่งออร์โธ จะได้ผลิตภัณฑ์สุดท้ายเป็น Succinate และ Acetyl-CoA ในขณะที่ตำแหน่งเมตา จะได้ Acetaldehyde และ Pyruvate (ดังภาพประกอบ 2)

การย่อยสลายสารประกอบ PAHs นั้นจะมีกลไกที่แตกต่างกันระหว่างแบคทีเรียและรา โดยแบคทีเรียจะใช้เอนไซม์ Dioxygenase เพื่อเปลี่ยนโมเลกุล PAHs เป็น *cis*-Dihydrodiol แล้วจึงเกิดขบวนการ Dehydrogenation เกิดเป็น Catechol แล้วจึงเกิดการตัดวงอะโรมาติกเช่นเดียวกับ Phenol (ดังภาพประกอบ 3) ในขณะที่เชื้อราในกลุ่ม Non-Lignolytic Fungi จะออกซิไดซ์ PAHs ไปเป็นสารประเภท Arene Oxide แล้วจึงเปลี่ยนเป็น Phenol หรือ *trans*-Dihydrodiol แต่ไม่มีการย่อยสลายต่อ แต่เชื้อราอีกกลุ่มคือ White-Rot Fungi บางชนิดจะย่อยสลายได้สารมัธยันต์พวก Quinones ซึ่งมีการแตกของวงอะโรมาติกต่อไป (Cerniglia. 1993) (ดังภาพประกอบ 3)



ภาพประกอบ 2 กลไกการย่อยสลาย Phenol ด้วยจุลินทรีย์

(Klein, J & Wiley, Vclt. 2000)



ภาพประกอบ 3 กลไกการย่อยสลาย PAHs ด้วยจุลินทรีย์

(Cerniglia. 1993)

งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

จากการศึกษาการย่อยสลายสารประกอบ PAHs พบว่ากลุ่มของจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายสารประกอบ PAHs มีทั้งราและแบคทีเรีย เช่นแบคทีเรีย *Beijerinckia* sp., *Mycobacterium* sp. สามารถย่อยสลาย Anthracene ได้และ *Absidia glauca*, *Aspergillus niger*, *Candida utilis* เป็นเชื้อราที่ย่อยสลาย Naphthalene ได้เช่นกัน (Cerniglia.1992) Michael A. และคณะได้คัดเลือกแบคทีเรียรูปร่างแบบท่อน แกรมบวก จากดินตะกอนที่ปนเปื้อนคราบน้ำมัน ซึ่งสามารถย่อยสลายสารประกอบ PAHs ในอาหารสูตรปรับต่ำและสภาวะที่ใช้ออกซิเจน อุณหภูมิระหว่าง 24–30°C โดยแบคทีเรียดังกล่าวสามารถย่อยสลาย Naphthalene ได้ 59.5% Phenanthrene 50.9%, Fluoranthrene 89.7%, Pyrene 63.0%, 1-Nitropyrene 12.3% และ 6-Nitrochrysene 2.0% ได้ผลิตภัณฑ์เป็นก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ (Michael, A. และคณะ. 1992) ในขณะที่แบคทีเรียรูปร่างแบบท่อน แกรมลบสามารถย่อยสลาย Phenol ในสภาวะที่ไม่ใช้ออกซิเจน พบว่า Phenol ถูกย่อยสลายจนได้ก๊าซเกิดขึ้น (Bechard, G. และคณะ. 1990) ส่วนแบคทีเรีย *Arthrobacter* sp. สายพันธุ์ F101 สามารถใช้ Fluorene เป็นสารต้นตอคาร์บอน โดยคัดเลือกแบคทีเรียดังกล่าวจากดินที่ปนเปื้อนคราบน้ำมัน (Grifoll, M. และคณะ. 1992) การย่อยสลายอาจเกิดในสภาวะที่ไม่ใช้ออกซิเจนได้เช่นกัน จากรายงานของ Bahrami A. และคณะ พบว่าแบคทีเรียที่เจริญเติบโตที่อุณหภูมิ 65°C และไม่มีออกซิเจน สามารถย่อยสลาย Dibenzothiophene ได้ผลิตภัณฑ์เป็นก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์เกิดขึ้น (Bahrami, A. และคณะ. 1992)

ในระหว่างการย่อยสลายของแบคทีเรีย พบว่ามีสารระหว่างปฏิกิริยา (Metabolite) เกิดขึ้น เช่นการย่อยสลาย Phenol ด้วยแบคทีเรียแกรมลบ รูปร่างแบบท่อน ทดสอบในสภาวะที่มีก๊าซออกซิเจน อุณหภูมิ 29°C บ่มเชื้อเป็นเวลา 20 วันพบว่า Phenol ถูกเปลี่ยนไปเป็น Benzoate ก่อนแล้วจึงเปลี่ยนเป็น Acetate และได้ผลิตภัณฑ์ที่เป็นก๊าซเกิดขึ้น (Bechard, G. และคณะ. 1990) ส่วนการย่อยสลาย Fluorene ด้วยแบคทีเรีย *Arthrobacter* sp. สายพันธุ์ F101 ซึ่งทดสอบในสภาวะที่ใช้ออกซิเจน ที่อุณหภูมิ 27°C พบว่ามีสาร Metabolite เกิดขึ้น 4 ชนิดคือ 9-Fluorenol, 9 H-Fluoren-9-one และ 3,4-Dihydrocoumarin ส่วนสาร Metabolite อีกชนิดหนึ่งไม่สามารถบอกรโครงสร้างได้ (Grifoll, M. และคณะ. 1992) ในการย่อยสลาย Pyrene โดยแบคทีเรีย *Pseudomonas Stutzeri* สายพันธุ์ P16 และ *Bacillus cereus* สายพันธุ์ P21 พบว่า Pyrene ถูกเปลี่ยนไปเป็น *Cis*-4,5-Dihydro-4,5-Dihydroxypyrene (PYRdHD) ส่วนแบคทีเรีย *Sphingomonas yanoikuyae* สายพันธุ์ R1 เปลี่ยน Pyrene เป็น PYRdHD และ Pyrene-4,5-Dione (PYRQ) ในขณะที่สายพันธุ์ R1 และ *Pseudomonas saccharophilus* สายพันธุ์ P15 สามารถเปลี่ยน PYRdHD ไปเป็น PYRQ แล้วยังเปลี่ยน PYRdHD ไปเป็น 4,5-Dihydroxypyrene

นอกจากนี้ สายพันธุ์ P16 และ P21 ยังใช้ PYRdHD เป็นสับสเตรทเพื่อย่อยสลาย Phenanthrene ได้อีกด้วย (Chikoma, Kazunga. และคณะ. 2000) สำหรับการย่อยสลาย Fluoranthene ด้วยแบคทีเรีย *Mycobacterium* sp. สายพันธุ์ KR20 โดยให้อุณหภูมิ 20°C พบว่าสาร Metabolite เกิดขึ้น คือ *Cis*-2,3-Fluoranthene Dihydrodiol, *Z*-9-Carboxy Methylene-Fluorene-1-Carboxylic Acid, *Cis*-1,9a-Dihydroxy-1-Hydro-Fluorene-9-one-8-Carboxylic Acid, 4-Hydroxybenzochromene-6-one-7-Carboxylic Acid และ Benzene-1,2,3-Tricarboxylic Acid (Rehmann, Klaus. และคณะ. 2001) การย่อยสลาย Benzothiophene และ Dibenzothiophene โดยแบคทีเรียที่เจริญในสภาวะที่อุณหภูมิสูง คือ *Paenibacillus* sp. สายพันธุ์ A11-2 สามารถเปลี่ยน Dibenzothiophene ไปเป็น *o*-Hydroxystyrene (Konishi, Jin และคณะ. 2000)

การจำแนกสายพันธุ์ของแบคทีเรีย ที่สามารถย่อยสลายสารประกอบ PAHs นั้น จะใช้เทคนิคการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA และเปรียบเทียบข้อมูลจาก GenBank พบว่า แบคทีเรียที่ย่อยสลาย Naphthalene ได้แก่ *Paenibacillus validus* และ *Paenibacillus stutzeri* ส่วนแบคทีเรียที่ย่อยสลาย Phenanthrene ได้แก่ *Paenibacillus validus* และ *Arthrobacter oxydans* (Daane, L.L. และคณะ. 2001) ในขณะที่แบคทีเรีย *Arthrobacter* sp. สายพันธุ์ F101 สามารถย่อยสลาย Fluorene ได้เช่นกัน (Grifoll, M. และคณะ. 1992) *Pseudomonas stutzeri* สามารถย่อยสลาย Naphthalene และ *Rhodococcus equi* ย่อยสลาย Fluorene, Fluoranthene และ Pyrene ได้ (Bouchez, M. 1995) และจากการศึกษาของ สุदारัตน์ สนวนจิตร พบว่า *Acinetobacter* sp. สายพันธุ์ PHEN-1 สามารถย่อยสลาย Phenanthrene ส่วน *Pseudomonas fluorescens* สายพันธุ์ PYR-1 สามารถย่อยสลาย Pyrene ได้เช่นกัน นอกจากนี้ได้นำแบคทีเรียทั้ง 2 ชนิดมาเจริญบนสับสเตรทอื่น ๆ พบว่า *Acinetobacter* sp. สายพันธุ์ PHEN-1 เจริญได้ใน Naphthalene และ Phenanthrene ส่วน *Pseudomonas fluorescens* สายพันธุ์ PYR-1 เจริญได้ใน Naphthalene, Fluorene และ Fluoranthene ได้ดี (สุदारัตน์ สนวนจิตร. 2544)

การย่อยสลาย Phenol และ PAHs มีเอนไซม์หลายชนิดเกี่ยวข้องในการย่อยสลาย ซึ่งจากงานวิจัยที่ศึกษาพบว่า เอนไซม์ Tyrosinase สามารถเปลี่ยน Phenol ไปเป็น *o*-Quinone (Solomon, E. และคณะ. 1996) ส่วน Benzothiophene และ Dibenzothiophene มีเอนไซม์ Monooxygenase จากแบคทีเรีย *Rhodococcus erythropolis* สายพันธุ์ KA2-5-1 และ *Rhodococcus* sp. สายพันธุ์ IGTS8 ที่สามารถย่อยสลาย Benzothiophene และ Dibenzothiophene ได้ตามลำดับ (Kobayashi, Morio. และคณะ. 2000) เช่นเดียวกับ *Paenibacillus* sp. สายพันธุ์ A11-2 ที่มีเอนไซม์ Monooxygenase ที่ทำให้พันธะของคาร์บอนกับ

ซัลเฟอร์ใน Dibenzothiophene และ Alkyl Dibenzothiophene แยกออกได้ (Yoshitaka, Ishii และคณะ. 2000) ในขณะที่แบคทีเรีย *Pseudomonas fluorescens* สายพันธุ์ PYR-1 สามารถสร้างเอนไซม์กลุ่ม Dioxygenase เพื่อย่อยสลาย Pyrene คือเอนไซม์ Catechol-2, 3-Oxygenase (สุदारัตน์ สอนจิตร. 2544)

จากการศึกษาประสิทธิภาพของการย่อยสลายสารประกอบ PAHs พบว่าการย่อยสลายขึ้นอยู่กับโครงสร้างของ PAHs โดย PAHs ที่มีมวลโมเลกุลน้อยคือ มีวงเบนซีน 2-3 วง จะย่อยสลายง่ายกว่า PAHs ที่มีมวลโมเลกุลสูง หรือมีวงเบนซีน 4 วงขึ้นไป (Ashok, BT. & Saxena, S. 1995) Naphthalene จัดเป็น PAHs ที่มีมวลโมเลกุลน้อย เพราะในโครงสร้างประกอบด้วยวงเบนซีนเพียง 2 วง จึงมีแบคทีเรียหลายชนิดที่ย่อยสลายได้ เช่น *Paenibacillus validus*, *Rhodococcus rubber*. Phenanthrene ซึ่งโครงสร้างประกอบด้วยวงเบนซีน 3 วง ถูกย่อยสลายได้เช่นกัน โดย Daane, L. L. และคณะพบว่า แบคทีเรีย *Paenibacillus validus* และ *Aeromonas* sp. สามารถย่อยสลาย Phenanthrene ได้ดี (Daane, L. L. และคณะ. 2001) สำหรับ Pyrene และ Chrycene เป็น PAHs ที่มีมวลโมเลกุลสูงจึงถูกย่อยสลายยากกว่า โดย Pyrene ถูกย่อยสลายด้วยแบคทีเรีย *Stenotrophomonas maltophilia* (Boonchan และคณะ. 1998) Chrycene ถูกย่อยสลายโดย *Rhodococcus* sp. แต่การย่อยสลายจะเกิดขึ้นแบบไม่สมบูรณ์ (Cerniglia. 1993)

บทที่ 3

วิธีดำเนินการศึกษาค้นคว้า

อุปกรณ์และสารเคมี

1. เครื่องมือและอุปกรณ์

- 1.1 เครื่องชั่งทศนิยม 2 และ 4 ตำแหน่ง
- 1.2 pH meter
- 1.3 Spectrophotometer
- 1.4 Centrifuge
- 1.5 Automatic pipet ขนาด 10, 100, 1,000 μL พร้อม tip
- 1.6 Rotary shaker

2. สารเคมี

2.1 Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs)

- 2.1.1 Naphthalene
- 2.1.2 Pyrene
- 2.1.3 Fluorene
- 2.1.4 Anthracene
- 2.1.5 Phenanthrene
- 2.1.6 Carbazole
- 2.1.7 Benzothiophene
- 2.1.8 Dibenzothiophene

2.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ (ภาควิชา)

- 2.2.1 KSN Minimal Medium
- 2.2.2 CD Medium
- 2.2.3 LB Medium

วิธีการทดลอง

1. การเก็บตัวอย่างดิน

เก็บตัวอย่างดินสำหรับการแยกเชื้อจุลินทรีย์จากบริเวณที่มีการปนเปื้อนสารประกอบปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอน เช่น น้ำมัน หรือสารเคมีอันตราย ที่มีการสะสมอยู่เป็นเวลานานในประเทศไทย โดยเก็บลึกจากผิวดินประมาณ 5-10 cm เก็บดินตัวอย่างไว้ที่อุณหภูมิ 4°C จนกว่าจะมีการนำมาแยกเชื้อ สถานที่เก็บตัวอย่างมีดังนี้

1.1 บ่อบำบัดน้ำเสีย จังหวัดพะเยา

1.2 เขตอุตสาหกรรม จังหวัดน่าน

1.3 บ่อน้ำพุร้อน จังหวัดเชียงราย

2. การเพิ่มปริมาณเชื้อจุลินทรีย์จากดินและการแยกเชื้อให้บริสุทธิ์ (Enrichment and Isolation) (ดังภาพประกอบ 5)

2.1 การเพิ่มปริมาณเชื้อจากดิน (Enrichment)

2.1.1 นำตัวอย่างดิน 3 g ใส่ลงในขวดรูปกรวย (Conical flask) ขนาด 250 mL เติมน้ำละลาย 0.85% NaCl 200 mL

2.1.2 เติมน้ำ Phenol 2 mM ในขวดรูปกรวย 250 mL ซึ่งภายในบรรจุอาหารสูตรปรับต่ำ (KSN-Minimal Medium) ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว จำนวน 50 mL จากนั้นเติมน้ำละลายเชื้อ 2 mL ปิดด้วยจุกสำลี นำไปบ่มในตู้เลี้ยงเชื้อแบบเขย่า ด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37°C และ 50°C เป็นเวลา 2 สัปดาห์

2.2 การแยกเชื้อให้บริสุทธิ์ (Isolation)

2.2.1 นำเชื้อที่ได้จากข้อ 2.1 มากระจายลงบนผิวน้ำอาหารสูตรปรับต่ำ ที่มี Phenol 2 mM นำไปบ่มในบ่มตู้เชื้อ ที่อุณหภูมิ 37°C และ 50°C จนมีโคโลนีเกิดขึ้น

2.2.2 ทำการสุ่มตัวอย่างโคโลนีประมาณ 8 โคโลนี โดยคัดเลือกจากระยะเวลาที่เชื้อสามารถเจริญบนอาหารแข็งเร็วที่สุด และมีลักษณะของโคโลนีและสีที่ต่างกัน

2.2.3 ทำการเชยเชื้อ (Streak) ให้บริสุทธิ์บนอาหารแข็งสูตรปรับต่ำที่มี Phenol 10 mM บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37°C และ 50°C

2.2.4 ทดสอบการย้อมสีติดแกรม (Gram Stain Test) และดูรูปร่างเซลล์ด้วยกล้องจุลทรรศน์ ดังนี้

2.2.4.1 ทำความสะอาดแผ่นสไลด์และเช็ดด้วยแอลกอฮอล์

2.2.4.2 เตรียมรอยสเมียร์ของเชื้อ โดยให้เข็มเชยเชื้อแตะเชื้อเกลี่ยบางๆบนแผ่นสไลด์ ตรึงเชื้อให้ติดแผ่นสไลด์โดยผ่านเปลวไฟ 2-3 รอบ

2.2.4.3 หยด Crystal Violet ท่วมรอยสเมียร์ ทิ้งไว้ 1 นาที

2.2.4.4 เท Crystal Violet ทิ้งแล้วชะด้วยน้ำกลั่น หลังจากนั้นหยดสารละลายไอโอดีนให้ท่วมรอยสเมียร์ ทิ้งไว้ 1 นาที

2.2.4.5 เทสารละลายไอโอดีนทิ้ง ชะด้วยเอทานอล 95% 20 วินาที แล้วตามด้วยน้ำกลั่น

2.2.4.6 ชับด้วยกระดาษทิชชู จากนั้นย้อมทับด้วย Safranin ท่วมรอยสเมียร์เป็นเวลา 1 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่น ชับให้แห้ง

2.2.4.7 นำไปตรวจดูรูปร่างและการติดสีแกรมด้วยกล้องจุลทรรศน์

3. การใช้ Phenol เป็นแหล่งต้นตอของพลังงาน (ดังภาพประกอบ 6)

3.1 เลี้ยงเชื้อในอาหารสูตรปรับต่ำที่มี Phenol 10 mM และ 15 mM เป็นแหล่งต้นตอของคาร์บอน นำไปปั่นในตู้เลี้ยงเชื้อแบบเขย่า ด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37°C 1 ชุด และที่อุณหภูมิ 50°C 1 ชุด

3.2 วัดการเจริญของเชื้อ โดยการวัดความขุ่นที่ OD 660 nm ทุกๆ 1 วัน แล้วปิเปตสารละลายบางส่วนไปปั่นแยกตะกอนด้วยความเร็ว 3500 rpm เพื่อนำส่วนใส (Filtrate) ไปวิเคราะห์ปริมาณ Phenol และเอนไซม์ Tyrosinase

3.3 การวัดปริมาณ Phenol ทำได้โดย

3.3.1 เตรียมสารละลาย Phenol ที่ความเข้มข้น 1, 5, 10, 15 และ 20 mM เพื่อทำกราฟมาตรฐาน

3.3.2 ปิเปตสารละลาย Phenol 200 μ L ลงในหลอดทดลอง เติมสารละลาย Sodium Bicarbonate Buffer 0.25 mM pH 8.4 9 mL เติม 4-Aminoantipyrine (4-AAP) 20.8 mM 400 μ L และ Potassium Ferricyanide 83.4 mM 400 μ L ทิ้งไว้ 6 นาที

3.3.3 ปิเปตสารละลายจากข้อ 3.3.2 จำนวน 500 μ L เติมสารละลาย Sodium Bicarbonate Buffer 0.25 mM pH 8.4 4.5 mL วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 510 nm สร้างกราฟมาตรฐาน (Standard Curve) ของ Phenol

3.3.4 ปิเปต Filtrate จากข้อ 3.2 มา 200 μ L ทำการทดลองหาปริมาณ Phenol เช่นเดียวกับข้อ 3.3.2-3.3.3 ตามลำดับ แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 510 nm เพื่อหาความเข้มข้นของ Phenol โดยเทียบกับกราฟมาตรฐานของ Phenol

3.4 วัดปริมาณเอนไซม์ Tyrosinase

3.4.1 วัด Kinetic ของ Tyrosinase ดังนี้

เติม L-Tyrosine 0.01 M 1 mL Phosphate Buffer 0.5 M pH 6.5 1 mL อุณหภูมิ 25°C น้ำกลั่น 0.9 mL ในหลอดทดลองที่เป็น Blank 1 หลอด ส่วนหลอดทดสอบเติมน้ำกลั่น 0.8 mL เขย่าแล้วทิ้งไว้ 5 นาที จากนั้นเติม Phenol 10 mM 0.1 mL ทั้ง 2 หลอด ตามด้วย

เอนไซม์ Tyrosinase ที่เข้มข้น 0.5 mg/mL 0.1 μ L ในหลอดทดสอบ เขย่า แล้ววัดการดูดกลืนแสง ที่ 280 nm ตั้งแต่วันที่ 1-20

3.4.2 วัดปริมาณเอนไซม์ในการย่อยสลาย

ทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 3.4.1 แต่ใช้ Filtrate จากการเลี้ยงเชื้อใน Phenol แทนเอนไซม์ Tyrosinase และวัดการดูดกลืนแสงที่ 280 nm ในเวลาที่ 10 และ 15 แล้วหาผลต่างของค่าการดูดกลืนแสงต่อเวลา ($\Delta A/\text{min}$) ที่ใช้ โดยค่า $\Delta A/\text{min}$ เท่ากับ 0.001 คือปริมาณเอนไซม์ 1 Unit

4. ศึกษาการย่อยสลายสารประกอบ PAHs

4.1 การย่อยสลาย PAHs บนอาหารแข็ง (Spray Plate)

4.1.1 เตรียมอาหารแข็ง CD medium ที่ไม่มีสารต้านต่อคาร์บอน

4.1.2 เตรียม 2 % PAHs โดยชั่ง Naphthalene, Pyrene, Fluorene และ Carbazole ละลายใน Acetone 5 mL : n-hexane 5 mL ส่วน Anthracene และ Phenanthrene ละลายใน Dichloromethane 10 mL

4.1.3 ใช้ไม้จิ้มฟันที่ฆ่าเชื้อแล้วเขี่ยเชื้อลงไปในอาหารแข็ง แล้วพ่นสารละลาย PAHs คลุมผิวหน้าอาหารแข็ง

4.1.4 บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37°C และ 50°C ในตู้บ่มเชื้อ แล้วสังเกตโซนไฮรอปโคโลนีของเชื้อ

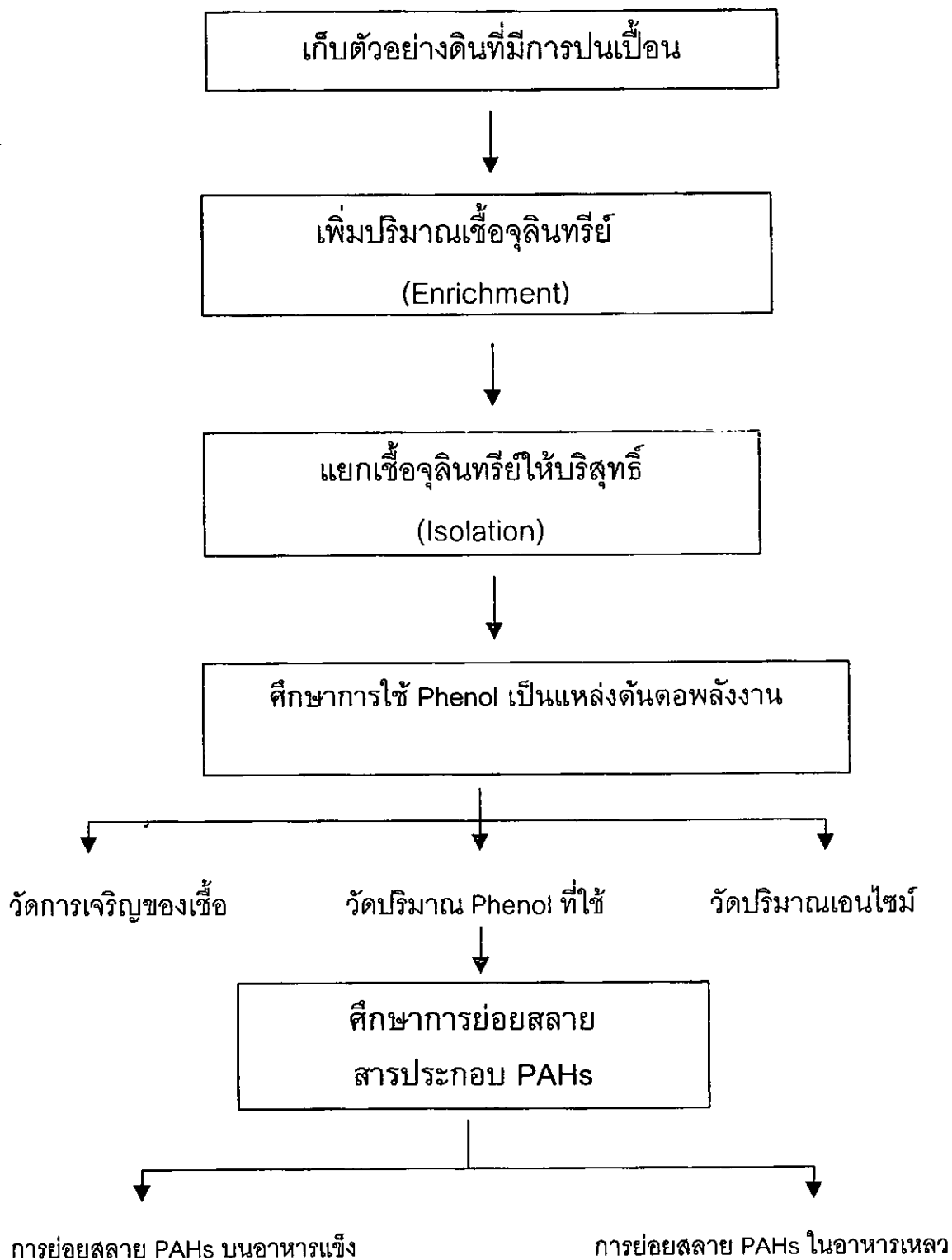
4.2 ทดสอบการย่อยสลาย PAHs ในอาหารเหลว

4.2.1 เตรียม PAHs 0.2% โดยชั่ง PAHs 0.1 g เติมลงในขวดรูปกรวย 250 mL เติม CD medium 50 mL ทำการนึ่งฆ่าเชื้อ

4.2.2 เติมเชื้อลงในอาหารข้อ 4.2.1 แล้ว ปิดจุกลำลิ บ่มในตู้เลี้ยงเชื้อแบบเขย่า ที่อุณหภูมิ 37°C และ 50°C ด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที วัดความขุ่นของเชื้อที่ 660 nm ทุกๆ 2 วัน เป็นเวลา 2 สัปดาห์

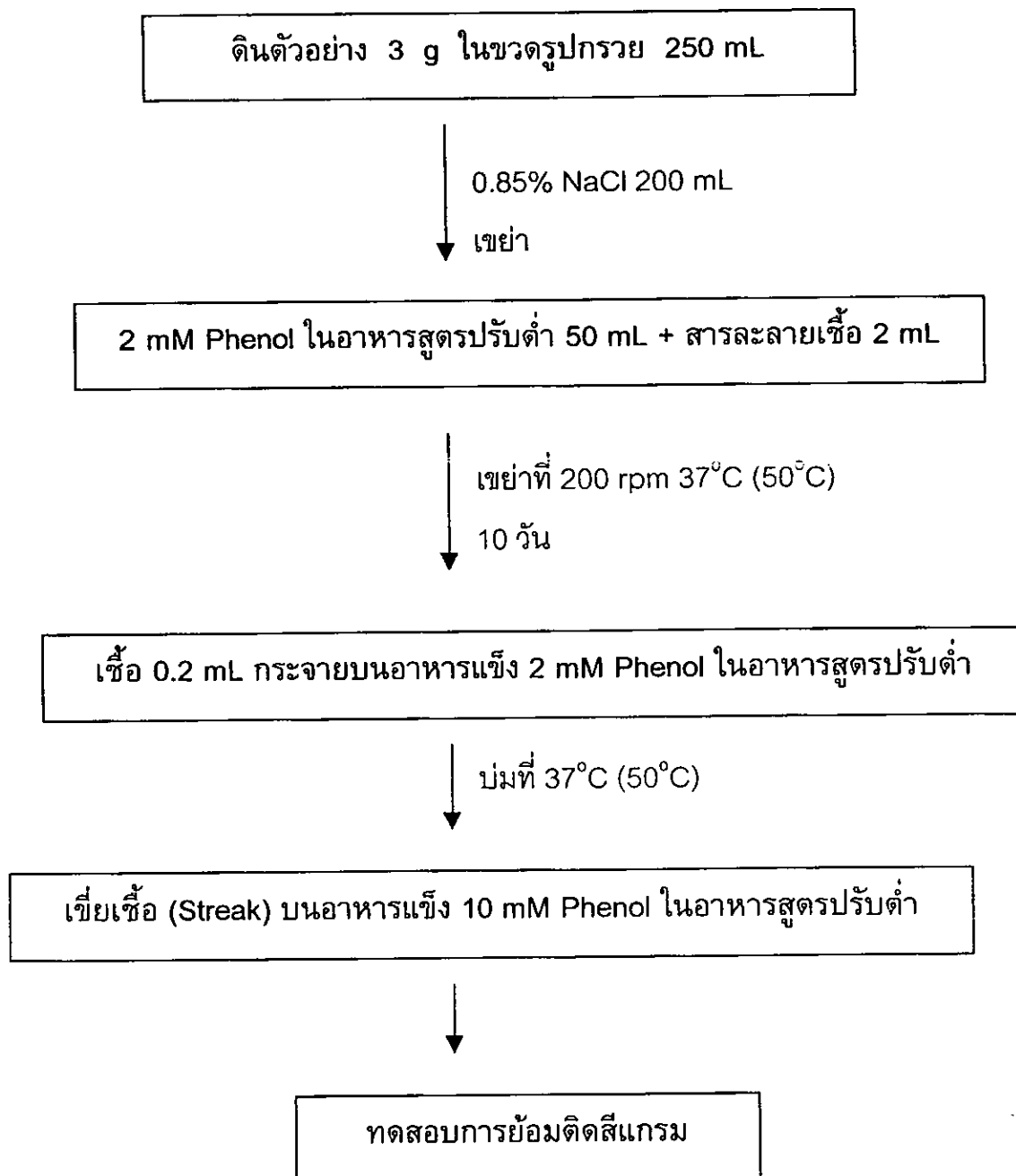
4.2.3 คัดเลือกเชื้อที่เจริญเติบโตได้ดี ใน PAHs แต่ละชนิด มาทำการทดลองวัดการเจริญโตในอาหารที่เพิ่มวิตามินและแร่ธาตุที่จำเป็น (CD medium) ที่ ความเข้มข้นของ PAHs 0.5 และ 1.0% ตามลำดับ โดยทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 4.2.2

วิธีดำเนินการวิจัย



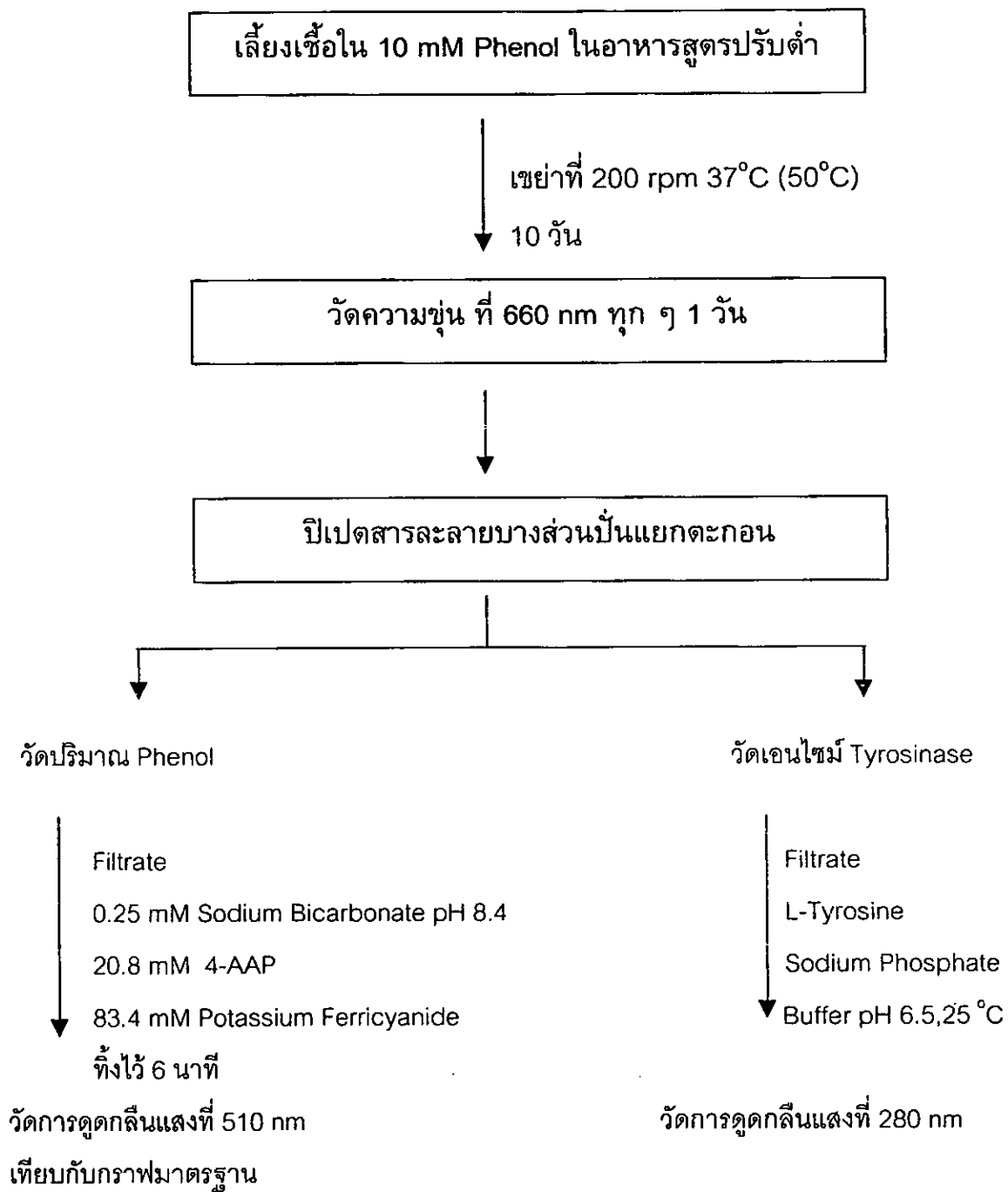
ภาพประกอบ 4 วิธีดำเนินการวิจัย

การเพิ่มปริมาณเชื้อและการคัดแยกเชื้อจุลินทรีย์ให้บริสุทธิ์



ภาพประกอบ 5 การเพิ่มปริมาณเชื้อและการคัดแยกเชื้อจุลินทรีย์ให้บริสุทธิ์

การทดสอบการใช้ Phenol เป็นแหล่งต้นตอพลังงาน



ภาพประกอบ 6 การทดสอบการใช้ Phenol เป็นแหล่งต้นตอพลังงาน

บทที่ 4

ผลการวิเคราะห์ข้อมูล

1. ลักษณะของเชื้อ และการติดสีแกรม

จากการคัดแยกเชื้อจากตัวอย่างดินที่ปนเปื้อนปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอน โดยใช้ Phenol ที่มีความเข้มข้น 2 mM เป็นสารต้นตอของคาร์บอนและพลังงานเพียงชนิดเดียว ในอาหารสูตรปรับต่ำ โดยบ่มในตู้เลี้ยงเชื้อแบบเขย่า ด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที แล้วนำมากระจายบนอาหารแข็งที่มี Phenol เช่นเดียวกัน ได้เชื้อที่เจริญเร็วและมีลักษณะของโคโลนี การติดสีแกรม และรูปร่างที่แตกต่างกัน 8 ชนิด คือ PHE1, PHE2...PHE8 โดยเชื้อ PHE1 และ PHE8 เจริญในอุณหภูมิ 37°C และ 50°C ส่วนอีก 6 ชนิดเจริญที่อุณหภูมิ 37°C เท่านั้น (ดังตาราง 1)

ตาราง 1 ลักษณะของเชื้อ และการติดสีแกรม

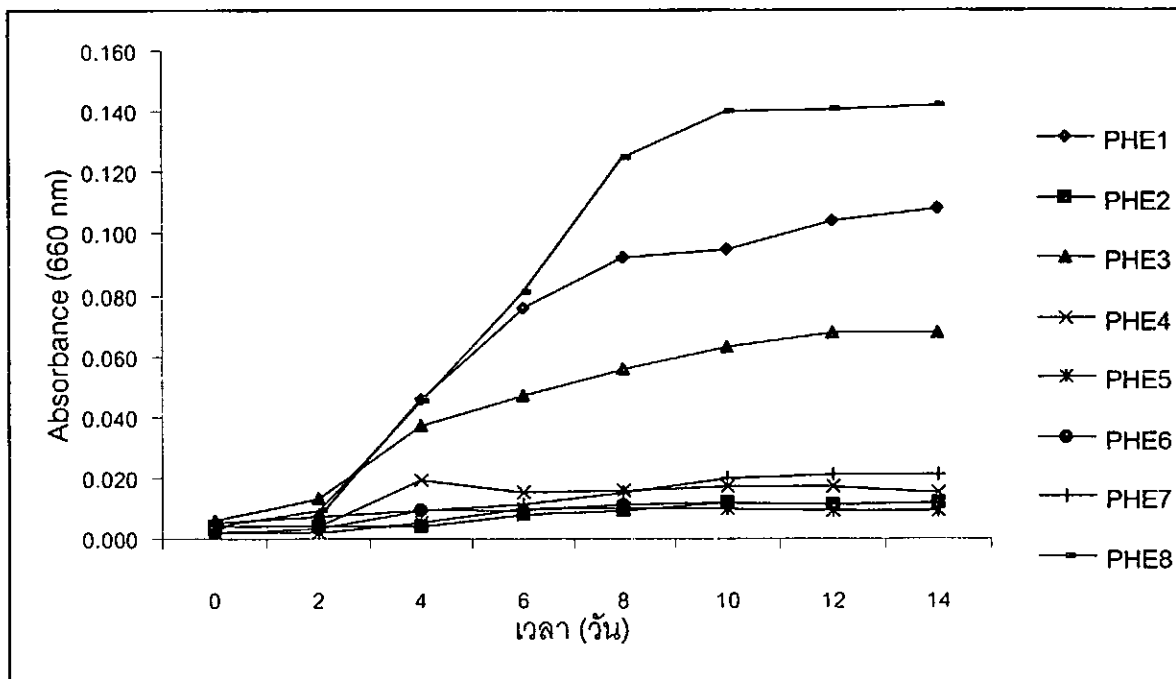
เชื้อ	ลักษณะของโคโลนี	แกรม	รูปร่าง
PHE1	โคโลนีสีขาวขุ่น ผิวหนูนด้าน	+	กลม
PHE2	โคโลนีสีน้ำตาลอ่อนใส ผิวเรียบ	-	ท่อน
PHE3	โคโลนีสีเหลืองอ่อน ผิวเรียบ	+	ท่อน
PHE4	โคโลนีสีเหลืองใส ผิวมันเรียบ	+	ท่อน
PHE5	โคโลนีสีขาวขุ่น ผิวหนูนด้าน	+	ท่อน
PHE6	โคโลนีสีเหลืองอ่อน ผิวหนูน	+	ท่อน
PHE7	โคโลนีสีขาวใส ผิวมันเรียบ	+	ท่อน
PHE8	โคโลนีสีขาวขุ่น ผิวหนูน	+	กลม

2. การย่อยสลายสารประกอบ PAHs

2.1 การย่อยสลายสารประกอบ PAHs ที่อุณหภูมิ 37 °C

2.1.1 การย่อยสลาย Anthracene

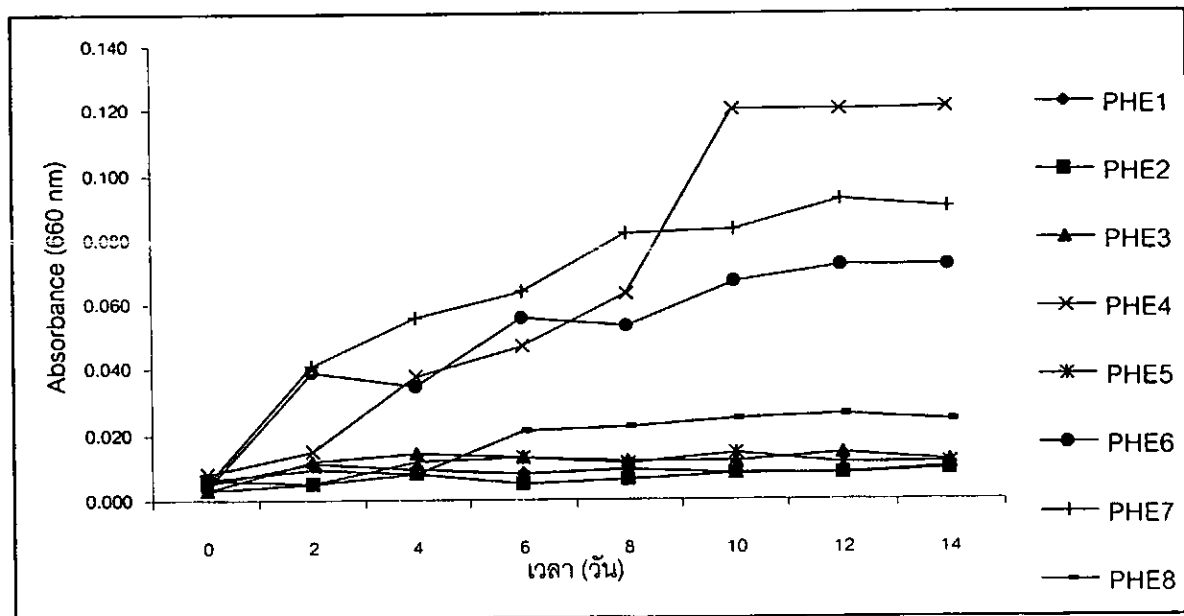
ผลของการศึกษาการย่อยสลายสารประกอบ PAHs เมื่อใช้เชื้อทั้ง 8 ชนิดที่คัดแยกได้ โดยเลี้ยงเชื้อแต่ละชนิดในอาหารที่เพิ่มวิตามินและแร่ธาตุที่จำเป็น (CD medium) ที่มี Anthracene 0.2% เป็นสารตั้งต้นต่อคาร์บอนและพลังงานเพียงแหล่งเดียวในอาหาร บ่มเชื้อในตู้เลี้ยงเชื้อแบบเขย่า ด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37°C วัดการเจริญของเชื้อโดยการวัดความขุ่นที่ OD 660 nm ทุกๆ 2 วัน เป็นเวลา 2 สัปดาห์ พบว่าเชื้อ PHE8 มีการเจริญเติบโตได้ดีที่สุด โดยมีความขุ่นเท่ากับ 0.140 ส่วนเชื้อ PHE1 มีความขุ่น 0.108 และเชื้อ PHE3 มีความขุ่น 0.070 ส่วนเชื้อชนิดอื่นไม่มีการเจริญเติบโต (ดังภาพประกอบ 7)



ภาพประกอบ 7 การเจริญของเชื้อใน Anthracene 0.2% อุณหภูมิ 37°C

2.1.2 การย่อยสลาย Dibenzothiophene

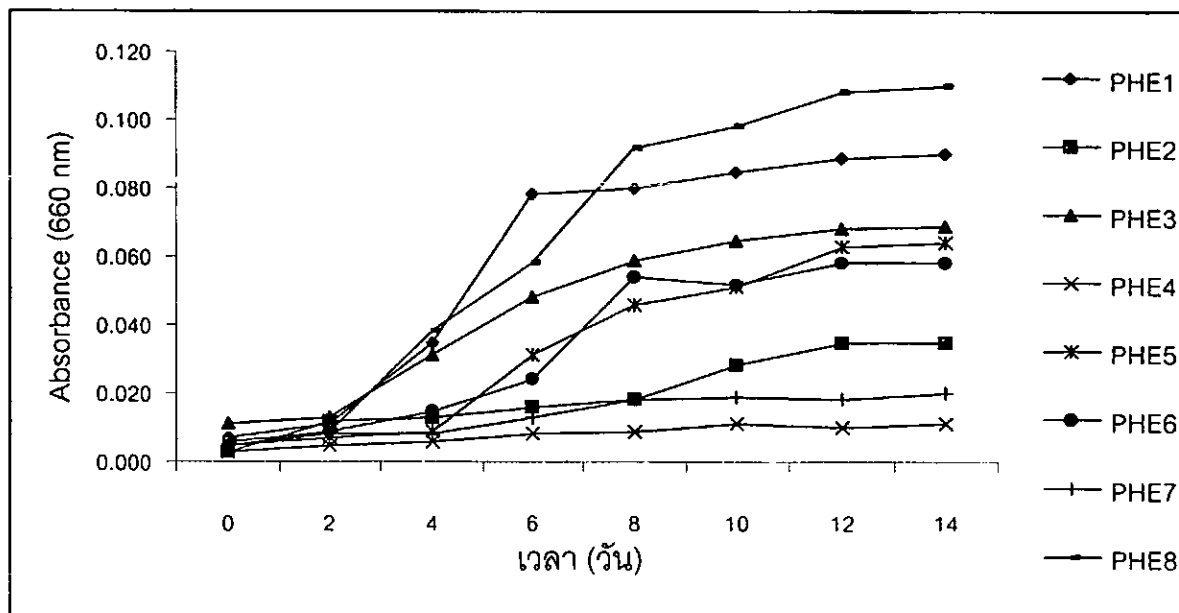
ผลการทดสอบการย่อยสลาย Dibenzothiophene โดยใช้เชื้อทั้ง 8 ชนิดที่คัดแยกได้ ทำการทดลองเช่นเดียวกับการย่อยสลาย Anthracene ในข้อ 2.1.1 พบว่าเชื้อ PHE4 เจริญเติบโตได้ดีที่สุด โดยมีความชุ่มเท่ากับ 0.121 ส่วนเชื้อ PHE6 และ PHE7 มีความชุ่มรองลงมา คือ 0.072 และ 0.090 ตามลำดับ (ดังภาพประกอบ 8)



ภาพประกอบ 8 การเจริญของเชื้อใน Dibenzothiophene 0.2% อุณหภูมิ 37°C

2.1.3 การย่อยสลาย Naphthalene

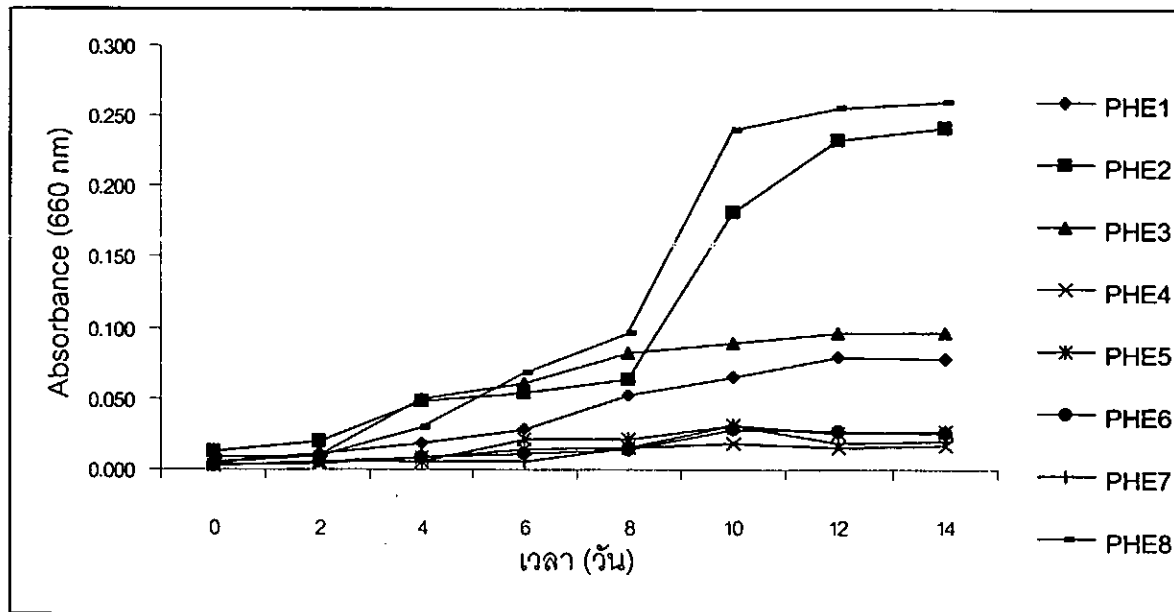
ผลการทดสอบการย่อยสลาย Naphthalene โดยใช้เชื้อทั้ง 8 ชนิดที่คัดแยกได้ ทำการทดลองเช่นเดียวกับการย่อยสลาย Anthracene ในข้อ 2.1.1 พบว่า มีเชื้อหลายชนิดที่สามารถเจริญได้ คือ PHE8 เจริญได้ดีที่สุด โดยมีค่าความขุ่นเท่ากับ 0.110 ส่วนเชื้อ PHE1 มีความขุ่น 0.090 เชื้อ PHE3 มีความขุ่น 0.068 เชื้อ PHE5 มีความขุ่น 0.064 เชื้อ PHE6 มีความขุ่น 0.058 และเชื้อ PHE2 มีความขุ่น 0.035 ในขณะที่เชื้อชนิดอื่นไม่เจริญเติบโต (ดังภาพประกอบ 9)



ภาพประกอบ 9 การเจริญของเชื้อใน Naphthalene 0.2% อุณหภูมิ 37°C

2.1.4 การย่อยสลาย Phenanthrene

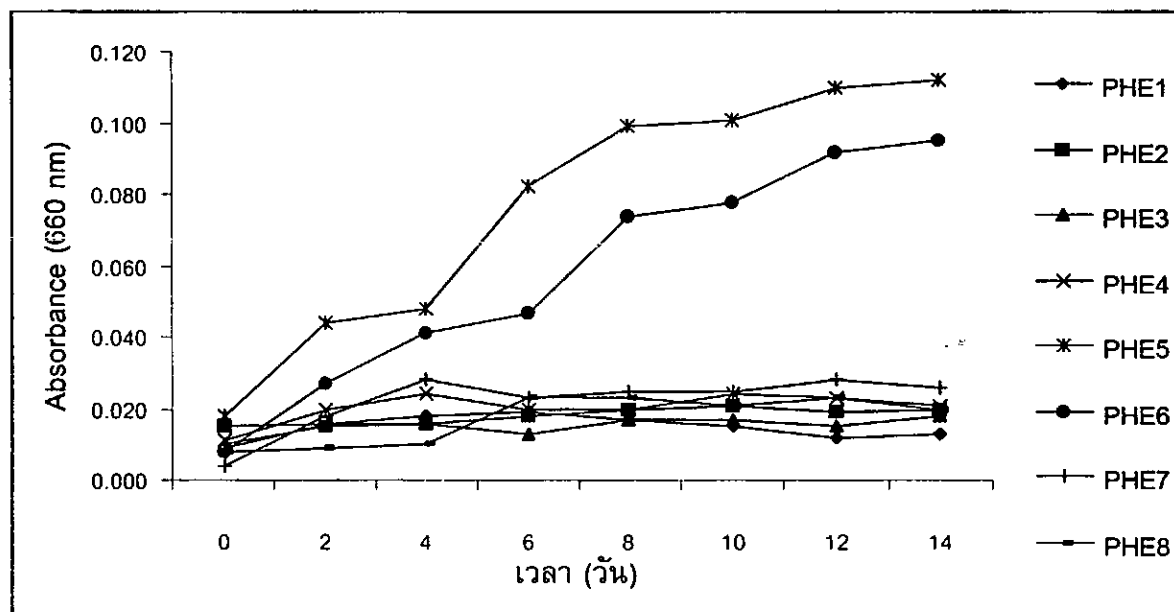
ผลการทดสอบการย่อยสลาย Phenanthrene โดยใช้เชื้อทั้ง 8 ชนิดที่คัดแยกได้ ทำการทดลองเช่นเดียวกับการย่อยสลาย Anthracene ในข้อ 2.1.1 พบเชื้อที่สามารถเจริญได้ดีที่สุดคือ PHE8 ซึ่งมีความชุ่ม 0.260 ส่วนเชื้อ PHE2 มีความชุ่ม 0.241 เชื้อที่เจริญได้บ้างคือ PHE1 มีความชุ่ม 0.078 และ PHE3 มีความชุ่ม 0.096 (ดังภาพประกอบ 10)



ภาพประกอบ 10 การเจริญของเชื้อใน Phenanthrene 0.2% อุณหภูมิ 37°C

2.1.5 การย่อยสลาย Pyrene

ผลการทดสอบการย่อยสลาย Pyrene โดยใช้เชื้อทั้ง 8 ชนิดที่คัดแยกได้ ทำการทดลองเช่นเดียวกับการย่อยสลาย Anthracene ในข้อ 2.1.1 พบว่าเชื้อที่สามารถเจริญได้ดีที่สุดคือ เชื้อ PHE 5 มีความขุ่น 0.112 เชื้อที่เจริญรองลงมาคือ เชื้อ PHE 6 ซึ่งมีความขุ่น 0.095 (ดังภาพประกอบ 11)



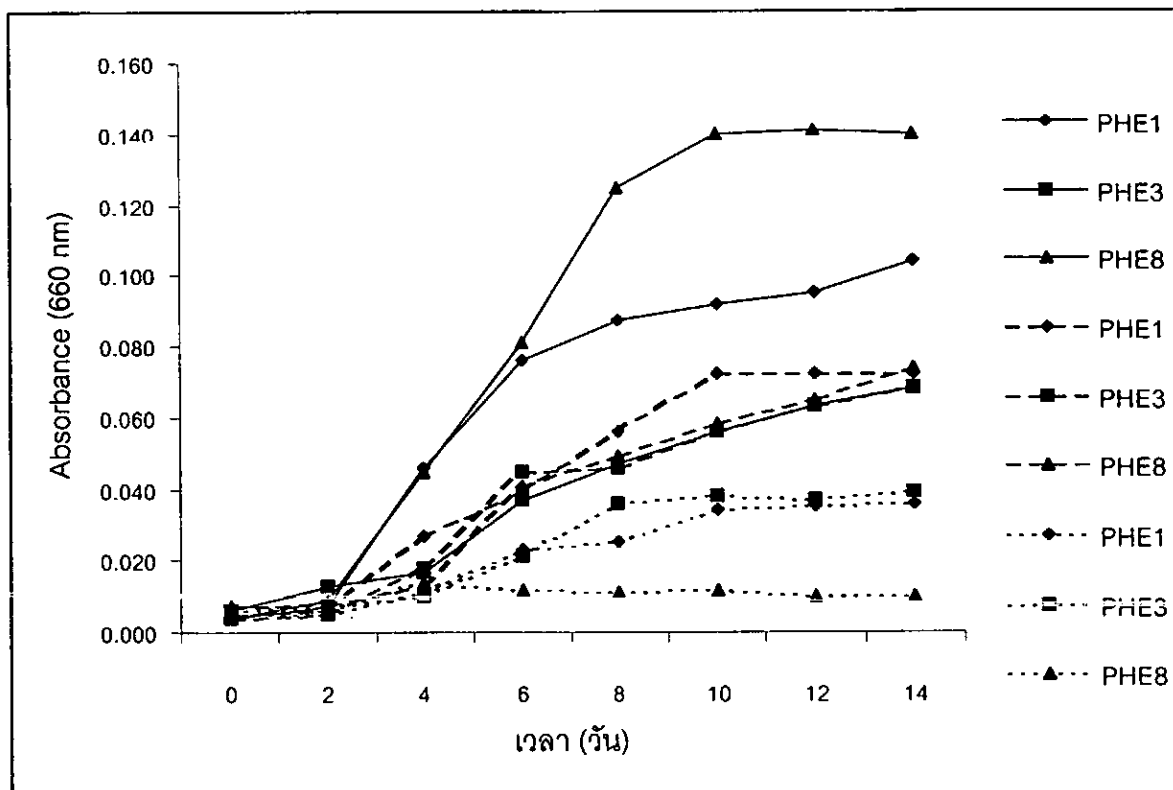
ภาพประกอบ 11 การเจริญของเชื้อใน Pyrene 0.2% อุณหภูมิ 37°C

สำหรับการย่อยสลายสารประกอบ PAHs อีก 3 ชนิดคือ Fluorene, Carbazole และ Benzothiophene พบว่าไม่มีเชื้อชนิดใดที่สามารถเจริญเติบโตในสารประกอบ PAHs ดังกล่าว

2.2 ผลของการแปรเปลี่ยนความเข้มข้นของ PAHs และอุณหภูมิที่ใช้ในการเจริญ

2.2.1 การย่อยสลาย Anthracene ที่อุณหภูมิ 37°C

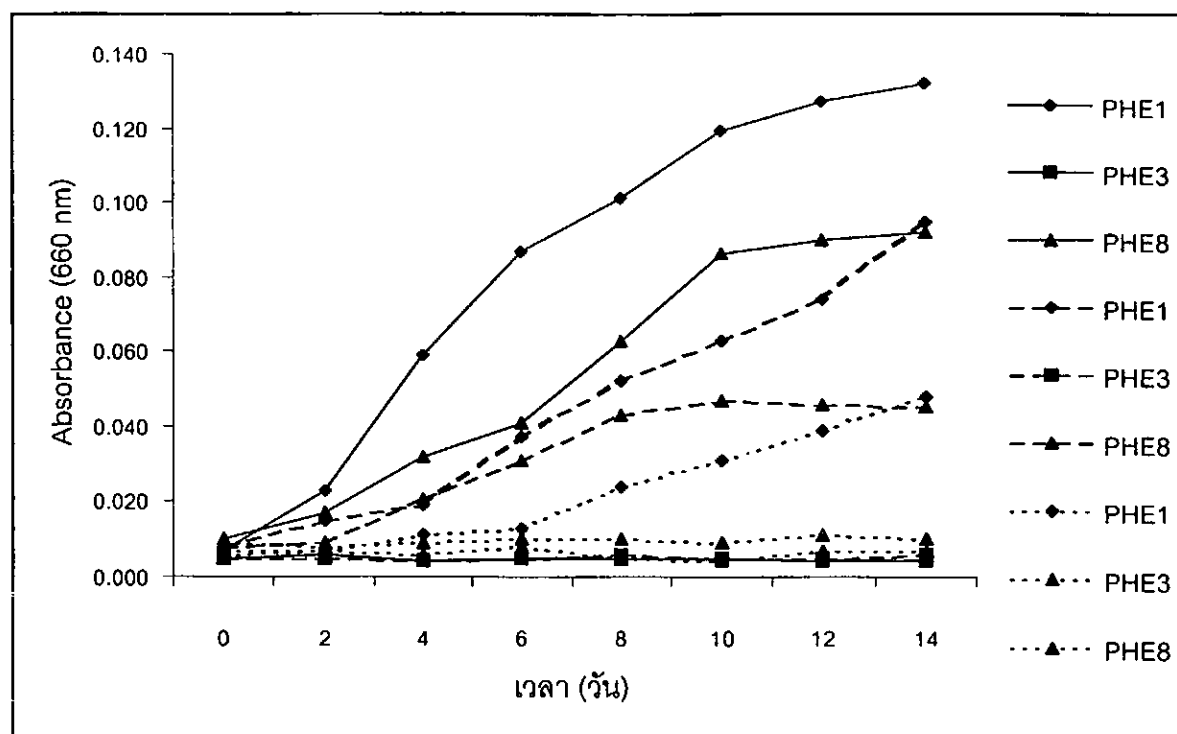
การเจริญเติบโตของเชื้อในอาหารที่เพิ่มวิตามินและแร่ธาตุ (CD medium) ที่มี Anthracene เป็นสารต้นตอของคาร์บอนและพลังงานเพียงแหล่งเดียว โดยนำเชื้อที่สามารถเจริญเจริญใน Anthracene 0.2% อุณหภูมิ 37°C ซึ่งได้แก่ เชื้อ PHE1, PHE3 และ PHE8 แล้วเพิ่มความเข้มข้นของ Anthracene เป็น 0.5 และ 1.0% ตามลำดับ นำไปป้อนในตู้เลี้ยงเชื้อแบบเขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37°C วัดการเจริญของเชื้อโดยการวัดความขุ่นที่ OD 660 nm ทุกๆ 2 วัน เป็นเวลา 2 สัปดาห์ พบว่า เชื้อ PHE8 เจริญได้ดีที่สุดที่ความเข้มข้น 0.2% โดยมีค่าความขุ่น 0.140 เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ Anthracene เป็น 0.5% พบว่าความขุ่นลดลงเป็น 0.074 ส่วนที่ความเข้มข้น 1.0% พบว่าเชื้อไม่มีการเจริญเติบโต ส่วนเชื้อ PHE1 และเชื้อ PHE3 มีการเจริญเติบโตน้อยกว่าเชื้อ PHE8 คือมีความขุ่น 0.104 และ 0.068 ตามลำดับ เมื่อความเข้มข้นของ Anthracene เพิ่มขึ้นเป็น 0.5% ความขุ่นของเชื้อลดลง และที่ความเข้มข้น 1.0% เชื้อไม่มีการเจริญเติบโตเช่นกัน (ดังภาพประกอบ 12)



ภาพประกอบ 12 การเจริญของเชื้อใน Anthracene, (—) 0.2%, (---) 0.5%, (.....) 1.0% ที่อุณหภูมิ 37°C

2.2.2 การย่อยสลาย Anthracene ที่อุณหภูมิ 50 °C

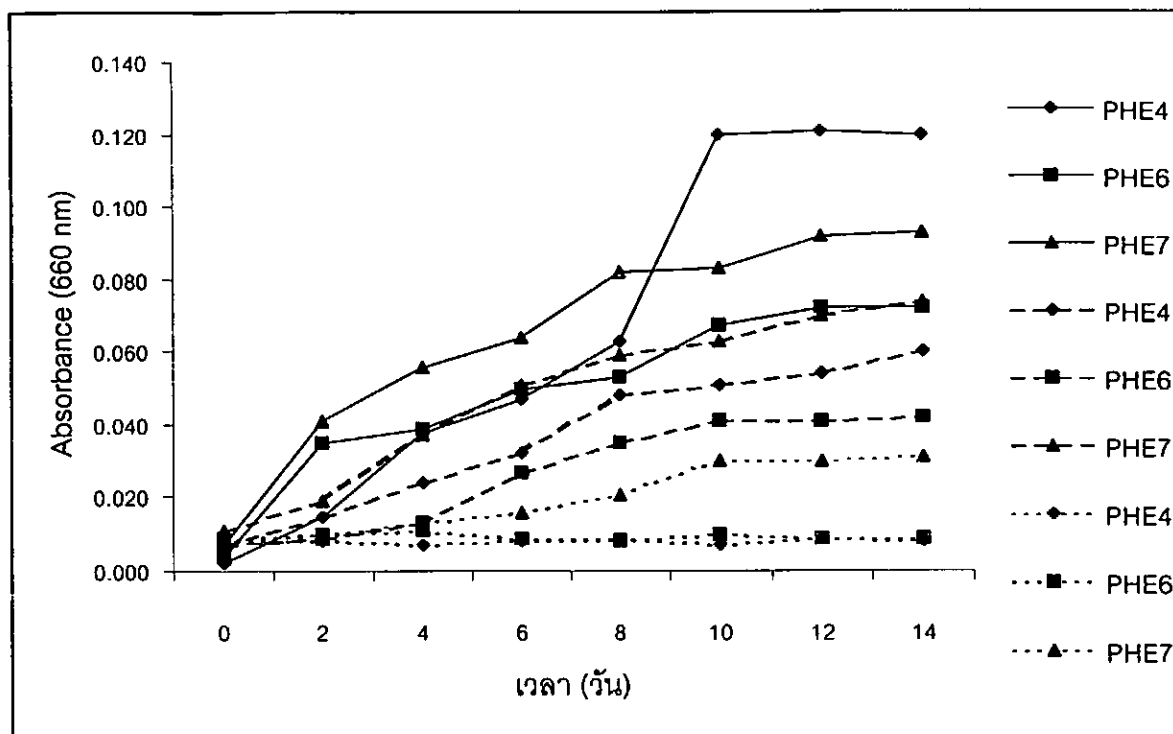
เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของเชื้อที่สามารถย่อยสลาย Anthracene ในสภาวะที่อุณหภูมิสูงขึ้น โดยนำเชื้อ PHE1, PHE3 และ PHE8 มาทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 2.2.1 แต่ใช้ อุณหภูมิ 50°C พบว่าเชื้อที่สามารถเจริญเติบโตได้ดีที่สุดคือ เชื้อ PHE1 โดยมีความขุ่นเท่ากับ 0.132 เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ Anthracene เป็น 0.5% ความขุ่นลดลงเป็น 0.095 ที่ความเข้มข้นของ Anthracene เป็น 1.0% ความขุ่นเท่ากับ 0.048 ส่วนเชื้อที่เจริญรองลงมาคือ เชื้อ PHE8 ที่ความเข้มข้นของ Anthracene เป็น 0.2% ความขุ่นเท่ากับ 0.092 เมื่อเพิ่มความเข้มข้นเป็น 0.5% ความขุ่นลดลงเป็น 0.045 แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นเป็น 1.0% พบว่าเชื้อไม่มีการเจริญเติบโต สำหรับเชื้อ PHE3 ไม่มีการเจริญเติบโตที่อุณหภูมิ 50°C (ดังภาพประกอบ 13)



ภาพประกอบ 13 การเจริญของเชื้อใน Anthracene, (—) 0.2%, (---) 0.5%, (.....) 1.0% ที่อุณหภูมิ 50°C

2.2.3 การย่อยสลาย Dibenzothiophene ที่อุณหภูมิ 37°C

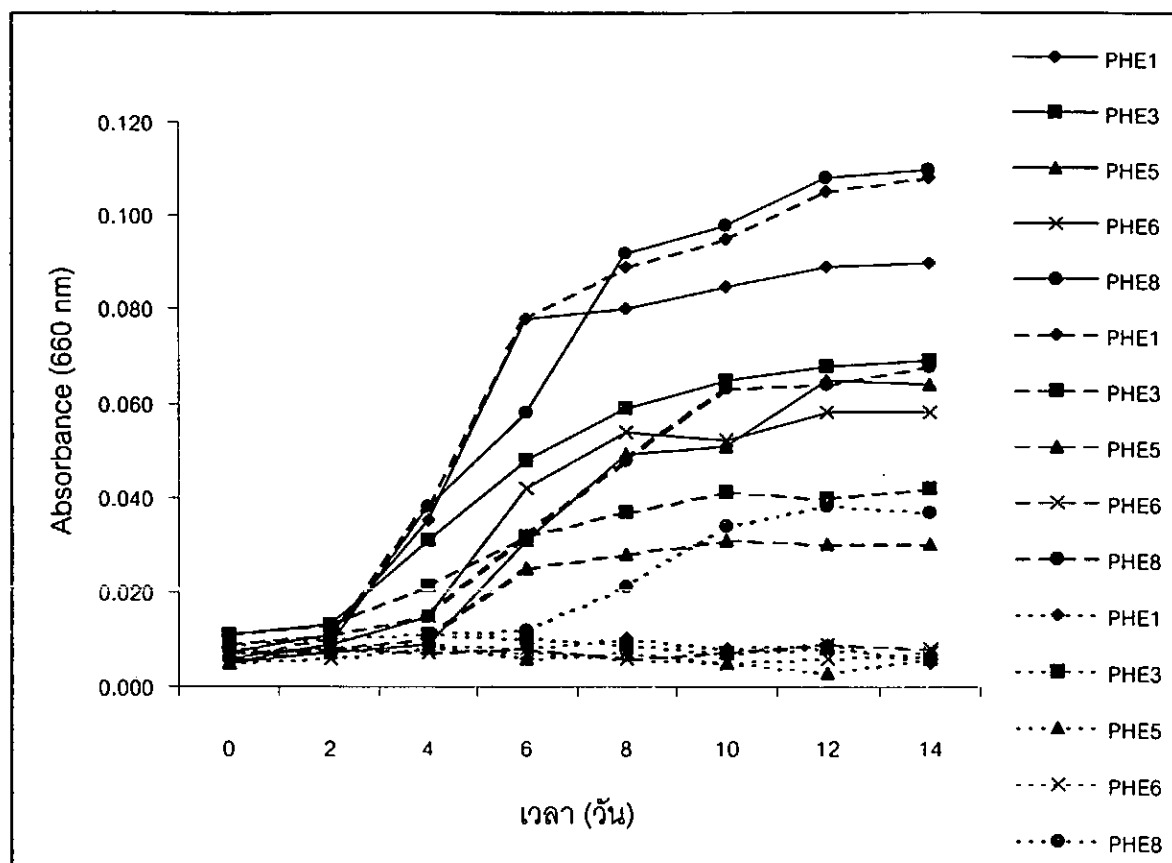
ผลการศึกษาการย่อยสลาย Dibenzothiophene ในอาหารที่เพิ่มวิตามินและแร่ธาตุ โดยมี Dibenzothiophene เป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงานเพียงชนิดเดียว เมื่อใช้เชื้อที่เจริญใน Dibenzothiophene 0.2% คือเชื้อ PHE 4, PHE6 และ PHE7 ทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 2.2.1 พบว่าเชื้อที่สามารถเจริญเติบโตได้ดีที่สุดคือ เชื้อ PHE4 โดยมีความชุ่นเท่ากับ 0.120 เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ Dibenzothiophene เป็น 0.5% การเจริญเติบโตจะลดลงคือมีความชุ่นเท่ากับ 0.060 ส่วนที่ความเข้มข้นของ Dibenzothiophene เป็น 1.0% ไม่มีการเจริญเติบโต ส่วนเชื้อที่เจริญเติบโตได้รองลงมาคือ เชื้อ PHE7 โดยมีความชุ่นเท่ากับ 0.093 % เมื่อความเข้มข้นของ Dibenzothiophene เพิ่มขึ้นเป็น 0.5% เชื้อมีความชุ่นลดลงเป็น 0.074 และเมื่อความเข้มข้นของ Dibenzothiophene เท่ากับ 1.0% ไม่มีการเจริญเติบโต สำหรับเชื้อ PHE6 มีการเจริญเติบโตน้อยที่สุด โดยความชุ่นของเชื้อจะลดลงเมื่อความเข้มข้นของ Dibenzothiophene เพิ่มขึ้น และไม่สามารถเจริญเติบโตได้เมื่อ Dibenzothiophene มีความเข้มข้น 1.0% เช่นเดียวกัน (ดังภาพประกอบ 14) ส่วนที่อุณหภูมิ 50°C เชื้อทั้ง 3 ชนิดไม่สามารถเจริญเติบโตได้



ภาพประกอบ 14 การเจริญของเชื้อใน Dibenzoanthracene, (—) 0.2%, (---) 0.5%, (.....) 1.0% ที่อุณหภูมิ 37°C

2.2.4 การย่อยสลาย Naphthalene ที่อุณหภูมิ 37°C

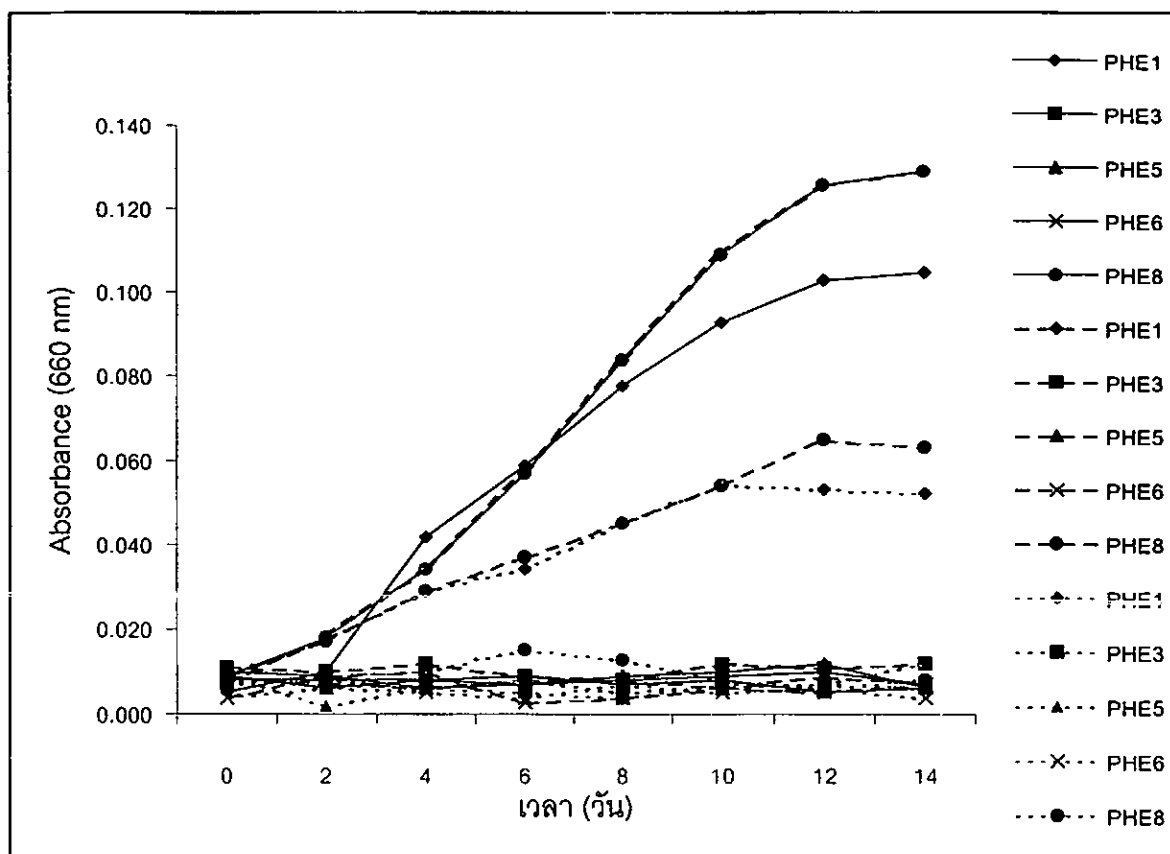
ผลการทดสอบการย่อยสลาย Naphthalene ของเชื้อ PHE1, PHE3, PHE5, PHE6 และ PHE8 เมื่อใช้ Naphthalene ที่เข้มข้นมากขึ้น ทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 2.2.1 พบว่าเชื้อที่สามารถเจริญเติบโตได้ดีที่สุดคือ เชื้อ PHE8 โดยมีความขุ่นเท่ากับ 0.110 เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ Naphthalene เป็น 0.5% การเจริญเติบโตจะลดลงคือมีความขุ่นเท่ากับ 0.068 ส่วนที่ความเข้มข้นของ Naphthalene เป็น 1.0% การเจริญเติบโตจะลดลงอีก โดยมีความขุ่น 0.037 ส่วนเชื้อที่เจริญเติบโตได้รองลงมาคือ เชื้อ PHE1 โดยมีความขุ่นเท่ากับ 0.090 เมื่อความเข้มข้นของ Naphthalene เป็น 0.2% แต่เมื่อความเข้มข้นของ Naphthalene เพิ่มขึ้นเป็น 0.5% เชื้อมีความขุ่นจะเพิ่มขึ้นเป็น 0.108 และเมื่อความเข้มข้นของ Naphthalene เท่ากับ 1.0% ไม่มีการเจริญเติบโต สำหรับเชื้อ PHE3, PHE5 และ PHE6 มีการเจริญเติบโตน้อยกว่าเชื้อ PHE1 และ PHE8 โดยความขุ่นของเชื้อจะลดลง เมื่อความเข้มข้นของ Naphthalene เพิ่มขึ้น และไม่สามารถเจริญเติบโตได้เมื่อ Naphthalene มีความเข้มข้น 1.0% เช่นเดียวกัน (ดังภาพประกอบ 15)



ภาพประกอบ 15 การเจริญของเชื้อใน Naphthalene, (—) 0.2%, (---) 0.5%, (.....) 1.0% ที่อุณหภูมิ 37°C

2.2.5 การย่อยสลาย Naphthalene ที่อุณหภูมิ 50 °C

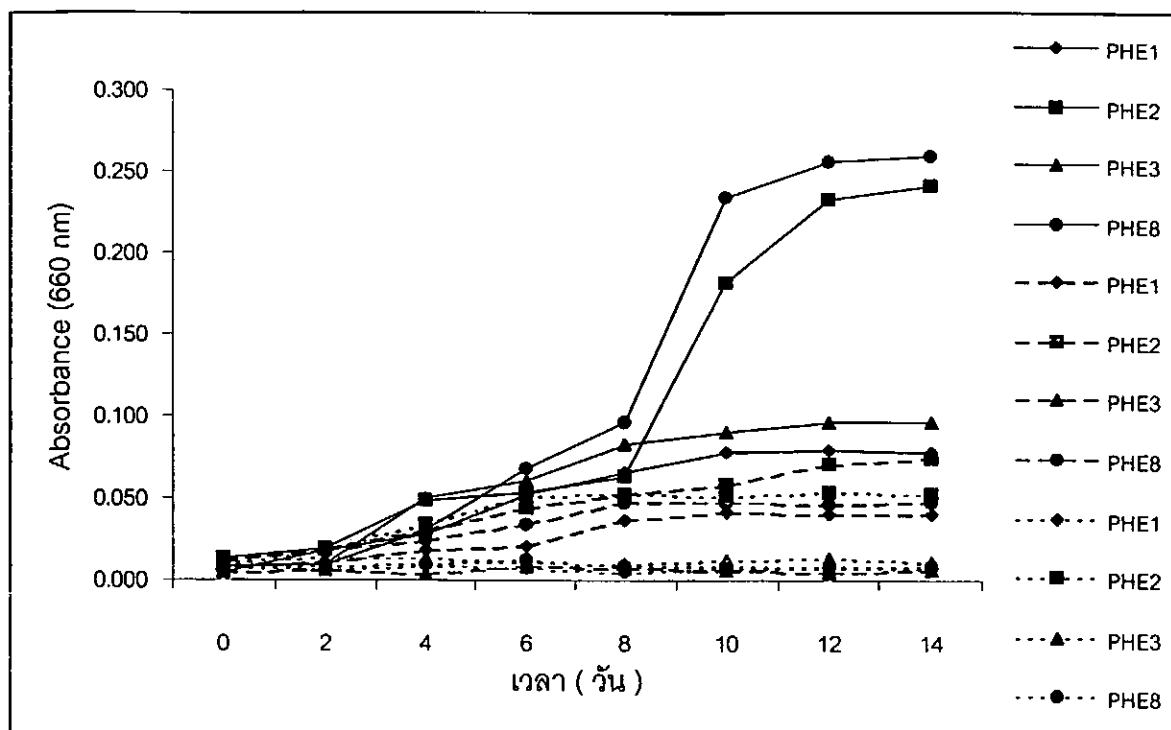
ผลของการเจริญเติบโตของเชื้อ PHE1, PHE3, PHE5, PHE6 และ PHE8 เมื่อใช้ Naphthalene ที่เข้มข้นมากขึ้น และอุณหภูมิสูงขึ้น โดยทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 2.2.1 แต่ใช้ อุณหภูมิ 50°C พบว่าเชื้อที่สามารถเจริญเติบโตได้ดีที่สุดคือ เชื้อ PHE8 โดยมีความขุ่นเท่ากับ 0.129 เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ Naphthalene เป็น 0.5% การเจริญเติบโตจะลดลงคือมีความขุ่นเท่ากับ 0.063 ส่วนที่ความเข้มข้นของ Naphthalene เป็น 1.0% ไม่มีการเจริญเติบโต ส่วนเชื้อที่เจริญเติบโตได้รองลงมาคือ เชื้อ PHE1 โดยมีความขุ่นเท่ากับ 0.105 เมื่อความเข้มข้นของ Naphthalene เป็น 0.2% แต่เมื่อความเข้มข้นของ Naphthalene เพิ่มขึ้นเป็น 0.5% เชื้อมีความขุ่นจะเพิ่มขึ้นเป็น 0.119 และเมื่อความเข้มข้นของ Naphthalene เท่ากับ 1.0% การเจริญเติบโตลดลง โดยมีความขุ่นเท่ากับ 0.052 สำหรับเชื้อ PHE 3, PHE 5 และ PHE 6 ไม่มีการเจริญเติบโตที่อุณหภูมินี้ (ดังภาพประกอบ 16)



ภาพประกอบ 16 การเจริญของเชื้อใน Naphthalene, (—) 0.2%, (---) 0.5%, (.....) 1.0% ที่อุณหภูมิ 50°C

2.2.6 การย่อยสลาย Phenanthrene ที่อุณหภูมิ 37°C

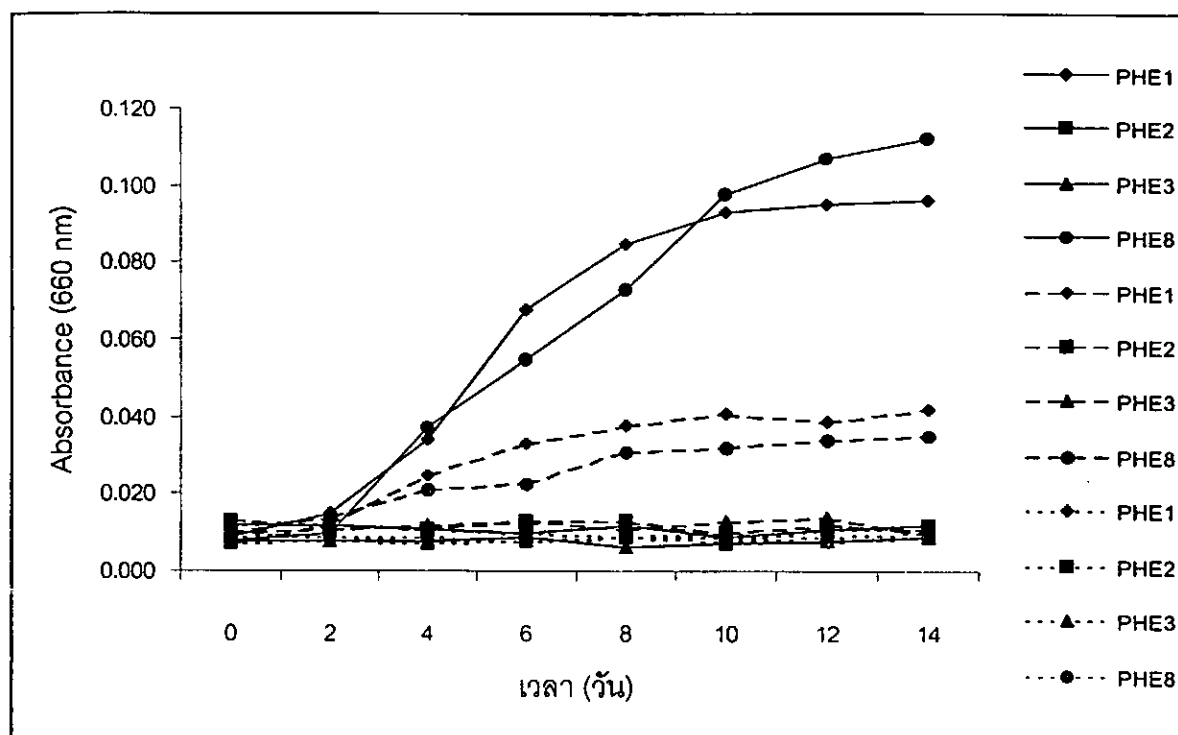
ผลการเจริญของเชื้อ PHE1, PHE2, PHE3 และ PHE8 ใน CD medium ที่มี Phenanthrene เป็นสารตั้งต้นของคาร์บอน ทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 2.2.1 พบว่าเชื้อที่สามารถเจริญเติบโตได้ดีที่สุดคือ เชื้อ PHE8 โดยมีความขุ่นเท่ากับ 0.260 เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ Phenanthrene เป็น 0.5% การเจริญเติบโตจะลดลงคือมีความขุ่นเท่ากับ 0.048 ส่วนที่ความเข้มข้นของ Phenanthrene เป็น 1.0% ไม่มีการเจริญเติบโต ส่วนเชื้อที่เจริญเติบโตได้รองลงมาคือเชื้อ PHE2 โดยมีความขุ่นเท่ากับ 0.241 เมื่อความเข้มข้นของ Phenanthrene เป็น 0.2% เมื่อความเข้มข้นของ Phenanthrene เพิ่มขึ้นเป็น 0.5% เชื้อมีความขุ่นจะลดลงเป็น 0.048 และเมื่อความเข้มข้นของ Phenanthrene เท่ากับ 1.0% การเจริญเติบโตจะลดลง โดยมีความขุ่นเท่ากับ 0.053 สำหรับเชื้อ PHE1 และ PHE3 มีการเจริญเติบโตน้อยกว่าเชื้อ PHE8 และ PHE2 โดยความขุ่นของเชื้อจะลดลง เมื่อความเข้มข้นของ Phenanthrene เพิ่มขึ้น และไม่สามารถเจริญเติบโตได้เมื่อ Phenanthrene มีความเข้มข้น 1.0% เช่นเดียวกัน (ดังภาพประกอบ 17)



ภาพประกอบ 17 การเจริญของเชื้อใน Phenanthrene, (—) 0.2%, (---) 0.5%, (.....) 1.0% ที่อุณหภูมิ 37°C

2.2.7 การย่อยสลาย Phenanthrene ที่อุณหภูมิ 50 °C

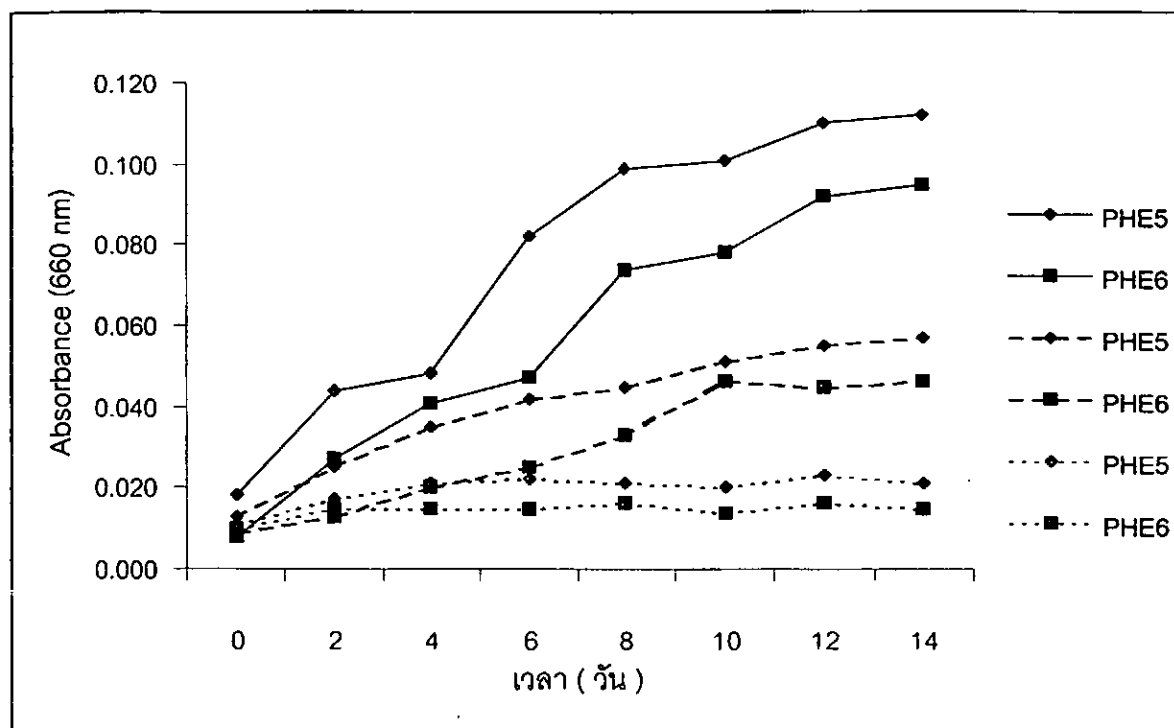
ผลการเจริญของเชื้อ PHE1, PHE2, PHE3 และ PHE8 ใน CD medium ที่มี Phenanthrene เป็นสารตั้งต้นของคาร์บอน ในสภาวะที่อุณหภูมิสูงขึ้น ทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 2.2.1 แต่ใช้อุณหภูมิ 50°C พบว่าเชื้อที่สามารถเจริญเติบโตได้ดีที่สุดคือ เชื้อ PHE8 โดยมีความชุ่นเท่ากับ 0.112 เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ Phenanthrene เป็น 0.5% และ 1.0% ไม่มีการเจริญเติบโต ส่วนเชื้อที่เจริญเติบโตได้รองลงมาคือ เชื้อ PHE1 โดยมีความชุ่นเท่ากับ 0.096 เมื่อความเข้มข้นของ Phenanthrene เป็น 0.2% เมื่อความเข้มข้นของ Phenanthrene เพิ่มขึ้นเป็น 0.5% เชื้อมีความชุ่นจะลดลงเป็น 0.042 และเมื่อความเข้มข้นของ Phenanthrene เท่ากับ 1.0% ไม่มีการเจริญเติบโต สำหรับเชื้อ PHE2 และ PHE3 ไม่มีการเจริญเติบโตที่อุณหภูมินี้ (ดังภาพประกอบ 18)



ภาพประกอบ 18 การเจริญของเชื้อใน Phenanthrene, (—) 0.2%, (---) 0.5%, (.....) 1.0% ที่อุณหภูมิ 50°C

2.2.8 การย่อยสลาย Pyrene ที่อุณหภูมิ 37°C

การเจริญเติบโตของเชื้อ PHE5 และ PHE6 ใน CD medium ที่มี Pyrene เป็นแหล่งต้นตอของคาร์บอน ทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 2.2.1 พบว่าเชื้อที่สามารถเจริญได้ดีที่สุดคือ PHE5 โดยมีความขุ่นเท่ากับ 0.112 เมื่อความเข้มข้นของ Pyrene เป็น 0.2% และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ Pyrene เป็น 0.5% ความขุ่นจะลดลงเป็น 0.057 และความขุ่นลดลงมากขึ้นเป็น 0.021 เมื่อความเข้มข้นของ Pyrene เป็น 1.0% ส่วนเชื้ออีกชนิดหนึ่งที่เจริญเติบโตใน Pyrene คือ PHE6 โดยมีความขุ่นเท่ากับ 0.095 เมื่อความเข้มข้นของ Pyrene เป็น 0.2% และลดลงเป็น 0.046 เมื่อ Pyrene เข้มข้นเพิ่มเป็น 0.5% ส่วนที่ความเข้มข้นของ Pyrene เป็น 1.0% เชื้อไม่มีการเจริญเติบโต (ดังภาพประกอบ 19) สำหรับที่อุณหภูมิ 50 °C เชื้อทั้ง 2 ชนิดไม่มีการเจริญเติบโต



ภาพประกอบ 19 การเจริญของเชื้อใน Pyrene, (—) 0.2%, (---) 0.5%, (.....) 1.0% ที่อุณหภูมิ 37°C

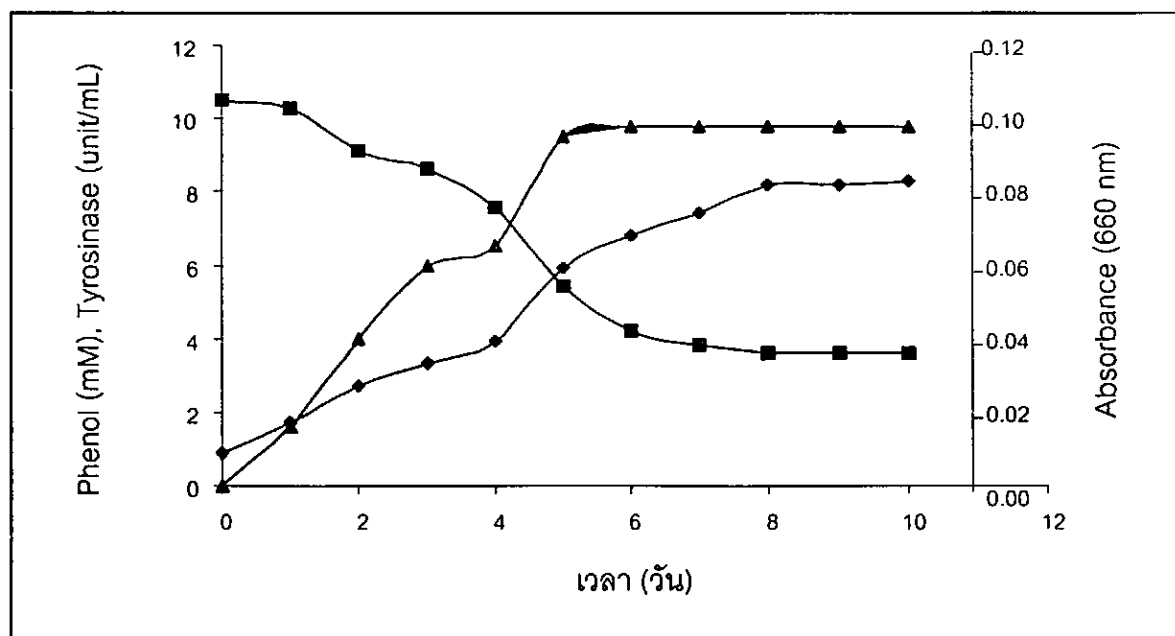
2.3 การย่อยสลายสารประกอบ PAHs บนอาหารแข็ง

ผลของการย่อยสลายสารประกอบ PAHs บนอาหารแข็ง โดยเตรียมอาหารแข็งที่เพิ่มวิตามินและแร่ธาตุที่จำเป็น (CD Medium) ที่ไม่มีสารต้านต่อคาร์บอน ใช้ไม้จิ้มฟันที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วเขี่ยเชื้อลงบนอาหารแข็ง พ่นสารละลาย PAHs คลุมบนผิวหน้าอาหารแข็ง บ่มในตู้เลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 37°C และ 50°C พบว่าเชื้อมีการเจริญบนอาหารแข็ง โดยสังเกตจากโคโลนีของเชื้อที่มีขนาดใหญ่ขึ้น แต่โซนใส (Clear zone) รอบๆโคโลนีของเชื้อมองเห็นไม่ชัดเจน จึงไม่สามารถแสดงรูปโซนใสในผลการทดลองได้

3. การทดสอบการย่อยสลาย Phenol

3.1 การย่อยสลาย Phenol 10 mM ของเชื้อ PHE1 อุณหภูมิ 37°C

จากการทดลอง เลี้ยงเชื้อในอาหารสูตรปรับค่าที่มี Phenol 10 mM เป็นแหล่งต้นตอของพลังงาน โดยบ่มในตู้เลี้ยงเชื้อแบบเขย่า ด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37°C วัดการเจริญเติบโตของเชื้อ โดยการวัดความขุ่นที่ OD 660 nm วัดความเข้มข้นของ Phenol โดยใช้ Filtrate 200 μL เติม Sodium Bicarbonate Buffer 0.25 mM pH 8.4 900 μL ทำปฏิกิริยากับ 4-Aminoantipyrine (4-AAP) 20.8 mM 400 μL และ Potassium Ferricyanide 83.4 mM 400 μL ทั้งไว้ 6 นาที วัดการดูดกลืนแสงที่ 510 nm เทียบกับกราฟมาตรฐานของ Phenol และวัดปริมาณเอนไซม์ Tyrosinase ที่เกิดขึ้น โดยใช้ L-Tyrosine เป็นสับสเตรท วัดการดูดกลืนแสงที่ 280 nm ในนาที่ที่ 10 และ 15 ของปฏิกิริยา เพื่อหาค่า $\Delta A/\text{min}$ ซึ่งค่า $\Delta A/\text{min}$ เท่ากับ 0.001 คือปริมาณเอนไซม์ 1 Unit ซึ่งการวัดผลการทดลองจะวัดทุกๆ 1 วัน เป็นเวลา 10 วัน พบว่า เชื้อ PHE1 สามารถเจริญได้สูงที่สุดในวันที่ 8 ของการทดลอง โดยมีความขุ่น 0.082 และทำให้ปริมาณ Phenol ลดลงจาก 10.5 mM เป็น 3.6 mM พร้อมทั้งมีเอนไซม์ Tyrosinase เกิดขึ้น 9.8 Unit/mL (ดังภาพประกอบ 20)

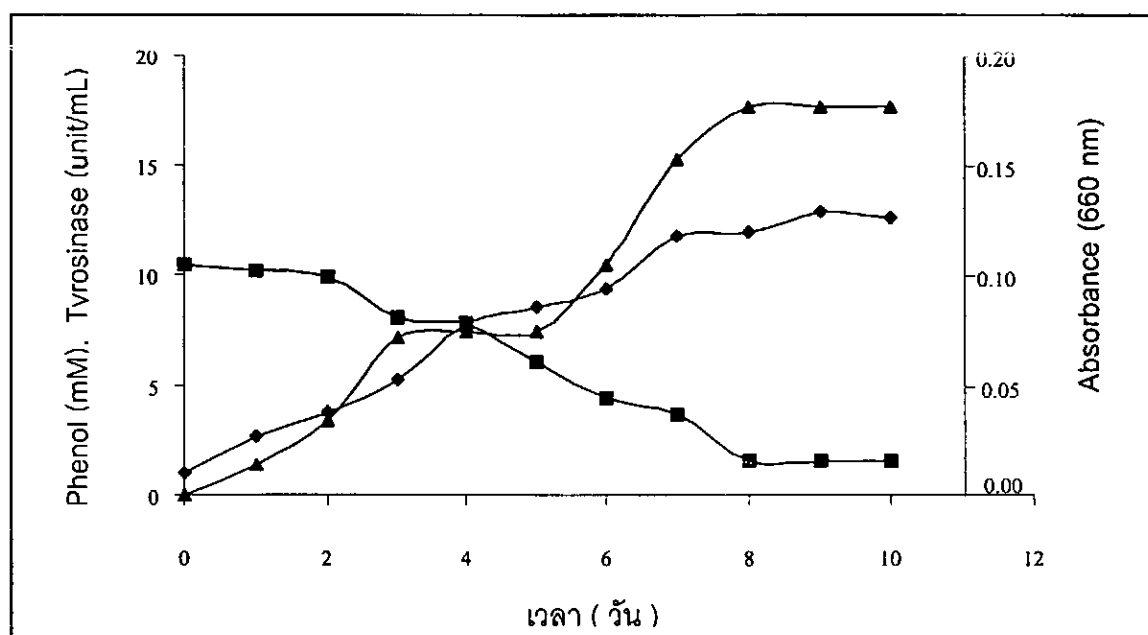


ภาพประกอบ 20 การย่อยสลาย Phenol 10 mM ของเชื้อ PHE1 ที่อุณหภูมิ 37°C

(■) Phenol (mM), (▲) Tyrosinase (Unit/mL), (◆) Absorbance (660 nm)

3.2 การย่อยสลาย Phenol 10 mM ของเชื้อ PHE1 อุณหภูมิ 50°C

จากการทดลองเลี้ยงเชื้อ PHE1 ในอาหารสูตรปรับต่ำที่มี Phenol 10 mM เป็นแหล่งต้นตอของพลังงาน โดยบ่มในตู้เลี้ยงเชื้อแบบเขย่า ด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที ทดลองในสภาวะที่อุณหภูมิสูงขึ้นเป็น 50°C วัดการเจริญเติบโตของเชื้อ ความเข้มข้นของ Phenol และปริมาณเอนไซม์ Tyrosinase ที่เกิดขึ้น ทุกๆ 1 วัน เป็นเวลา 10 วัน โดยทำการวัดเช่นเดียวกับวิธีการในข้อ 3.1 พบว่า เชื้อ PHE1 สามารถเจริญได้สูงที่สุดในวันที่ 9 ของการทดลอง โดยมีความขุ่น 0.128 และทำให้ปริมาณ Phenol ลดลงจาก 10.5 mM เป็น 1.6 mM พร้อมทั้งมีเอนไซม์ Tyrosinase เกิดขึ้น 17.6 Unit/mL (ดังภาพประกอบ 21)

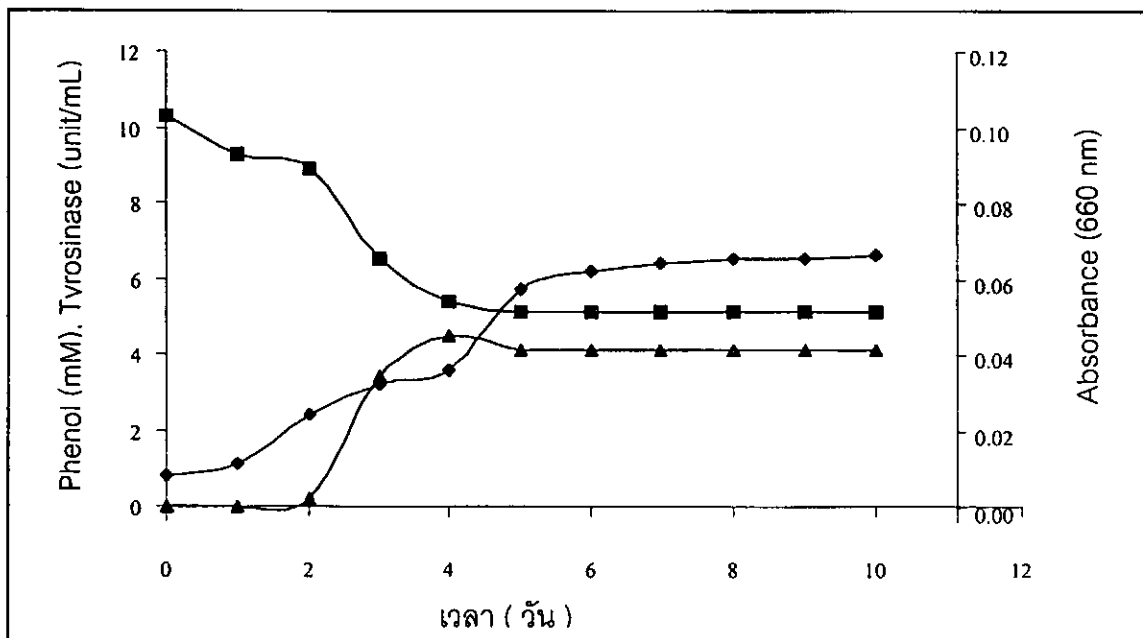


ภาพประกอบ 21 การย่อยสลาย Phenol 10 mM ของเชื้อ PHE1 ที่อุณหภูมิ 50°C

(■) Phenol (mM), (▲) Tyrosinase (Unit/mL), (◆) Absorbance (660 nm)

3.3 การย่อยสลาย Phenol 10 mM ของเชื้อ PHE3 อุณหภูมิ 37°C

จากการทดลองเลี้ยงเชื้อ PHE3 ในอาหารสูตรปรับต่ำที่มี Phenol 10 mM เป็นแหล่งต้นตอของพลังงาน โดยบ่มในตู้เลี้ยงเชื้อแบบเขย่า ด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37°C วัดการเจริญเติบโตของเชื้อที่ OD 660 nm วัดความเข้มข้นของ Phenol และปริมาณเอนไซม์ Tyrosinase ที่เกิดขึ้น ทุกๆ 1 วัน เป็นเวลา 10 วัน โดยทำการวัดเช่นเดียวกับวิธีการในข้อ 3.1 พบว่า เชื้อ PHE3 สามารถเจริญได้สูงที่สุดในวันที่ 8 ของการทดลอง โดยมีความขุ่น 0.066 และทำให้ปริมาณของ Phenol ลดลงจาก 10.3 mM เป็น 5.1 mM และมีเอนไซม์ Tyrosinase 4.1 Unit/mL (ดังภาพประกอบ 22) จะเห็นว่าเชื้อ PHE3 เจริญได้น้อยกว่าเชื้อ PHE1 ที่อุณหภูมิเดียวกัน และเชื้อไม่มีการเมื่อเพิ่มอุณหภูมิเป็น 50°C

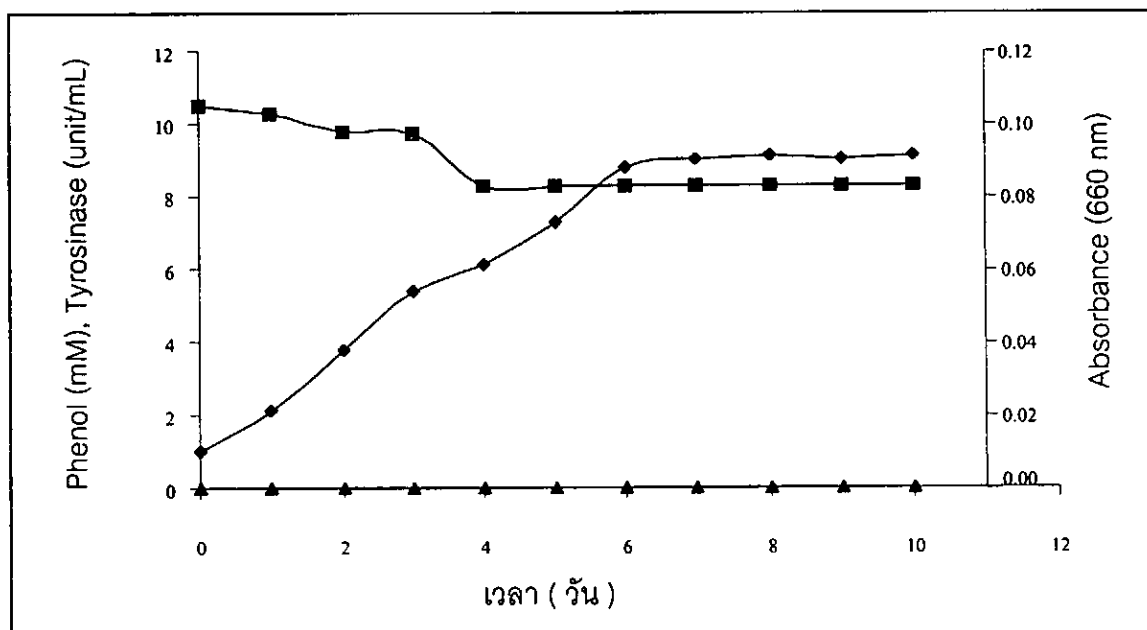


ภาพประกอบ 22 การย่อยสลาย Phenol 10 mM ของเชื้อ PHE3 ที่อุณหภูมิ 37°C

(■) Phenol (mM), (▲) Tyrosinase (Unit/mL), (◆) Absorbance (660 nm)

3.4 การย่อยสลาย Phenol 10 mM ของเชื้อ PHE8 อุณหภูมิ 37°C

จากการทดลอง เลี้ยงเชื้อ PHE8 ในอาหารสูตรปรับต่ำที่มี Phenol 10 mM เป็นสารตั้งต้นของพลังงานเพียงแหล่งเดียวในอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยบ่มในตู้เลี้ยงเชื้อแบบเขย่า ด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37°C วัดการเจริญเติบโตของเชื้อที่ OD 660 nm วัดความเข้มข้นของ Phenol และปริมาณเอนไซม์ Tyrosinase ที่เกิดขึ้น ทุกๆ 1 วัน เป็นเวลา 10 วัน โดยทำการวัดเช่นเดียวกับวิธีการในข้อ 3.1 พบว่า เชื้อ PHE8 สามารถเจริญได้สูงที่สุดในวันที่ 8 ของการทดลอง โดยมีความขุ่น 0.091 และทำให้ปริมาณ Phenol ลดลงจาก 10.5 mM เหลือ 8.3 mM แต่ไม่มีเอนไซม์ Tyrosinase เกิดขึ้นในระหว่างการย่อยสลาย (ดังภาพประกอบ 23) และเชื้อชนิดนี้สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิสูง จึงทดสอบที่อุณหภูมิ 50°C เช่นเดียวกับเชื้อ PHE1

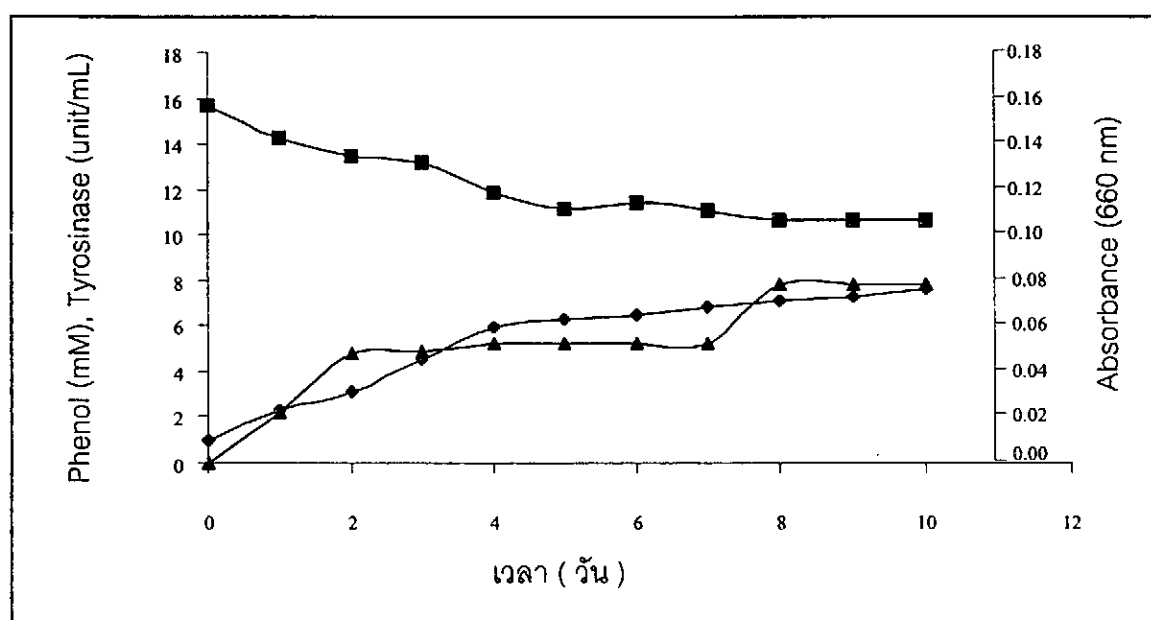


ภาพประกอบ 23 การย่อยสลาย Phenol 10 mM ของเชื้อ PHE8 ที่อุณหภูมิ 37°C

(■) Phenol (mM), (▲) Tyrosinase (Unit/mL), (◆) Absorbance (660 nm)

3.6 การย่อยสลาย Phenol 15 mM ของเชื้อ PHE1 อุณหภูมิ 37°C

เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการย่อยสลาย Phenol ของเชื้อที่ได้ จึงทำการทดลอง เลี้ยงเชื้อ PHE1 ในอาหารสูตรปรับด้าที่มี Phenol เพิ่มขึ้นเป็น 15 mM เพื่อใช้เป็นสารตั้งต้นของแหล่งพลังงานของเชื้อ โดยบ่มในตู้เลี้ยงเชื้อแบบเขย่า ด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37°C วัดการเจริญเติบโตของเชื้อที่ OD 660 nm ความเข้มข้นของ Phenol และปริมาณเอนไซม์ Tyrosinase ที่เกิดขึ้น ทุกๆ 1 วัน เป็นเวลา 10 วัน ทำการวัดเช่นเดียวกับวิธีการในข้อ 3.1 พบว่าเชื้อ PHE1 สามารถเจริญได้สูงที่สุดในวันที่ 10 ของการทดลอง โดยมีความขุ่น 0.076 และทำให้ความเข้มข้นของ Phenol ลดลงจาก 15.7 mM เป็น 10.6 mM และมีเอนไซม์ Tyrosinase 7.8 Unit/mL (ดังภาพประกอบ 25) เมื่อเทียบกับการใช้ Phenol ที่ความเข้มข้น 10 mM จะเห็นว่าเชื้อเจริญได้น้อยลง

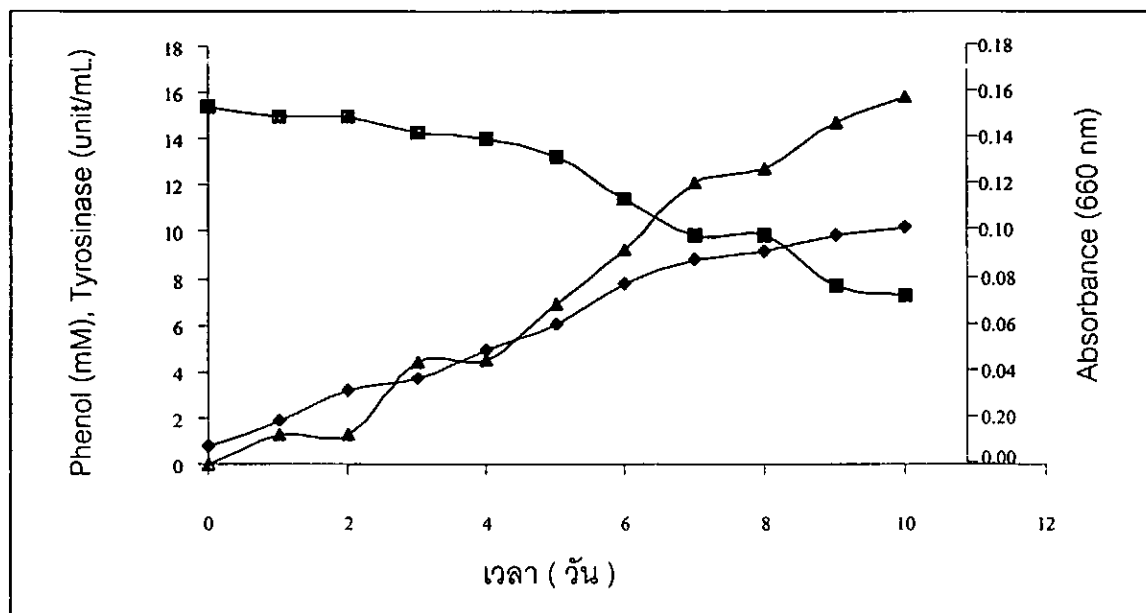


ภาพประกอบ 25 การย่อยสลาย Phenol 15 mM ของเชื้อ PHE 1 ที่อุณหภูมิ 37°C

(■) Phenol (mM), (▲) Tyrosinase (Unit/mL), (◆) Absorbance (660 nm)

3.7 การย่อยสลาย Phenol 15 mM ของเชื้อ PHE1 อุณหภูมิ 50°C

จากการทดลอง เลี้ยงเชื้อ PHE1 ในอาหารสูตรปรับต่ำที่มี Phenol 15 mM โดยบ่มในตู้เลี้ยงเชื้อแบบเขย่า ด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 50°C วัดการเจริญเติบโตของเชื้อที่ OD 660nm ความเข้มข้นของ Phenol และปริมาณเอนไซม์ Tyrosinase ที่เกิดขึ้น ทุกๆ 1 วัน เป็นเวลา 10 วัน ทำการวัดเช่นเดียวกับวิธีการในข้อ 3.1 พบว่า เชื้อ PHE1 สามารถเจริญได้สูงที่สุดในวันที่ 10 ของการทดลอง โดยมีความขุ่น 0.102 และทำให้ความเข้มข้นของ Phenol ลดลงเหลือ 7.3 mM และมีเอนไซม์ Tyrosinase 15.8 Unit/mL (ดังภาพประกอบ 26) จะเห็นว่าเชื้อ PHE1 เจริญได้ดีกว่าเมื่อเทียบกับการใช้สภาวะที่อุณหภูมิ 37°C

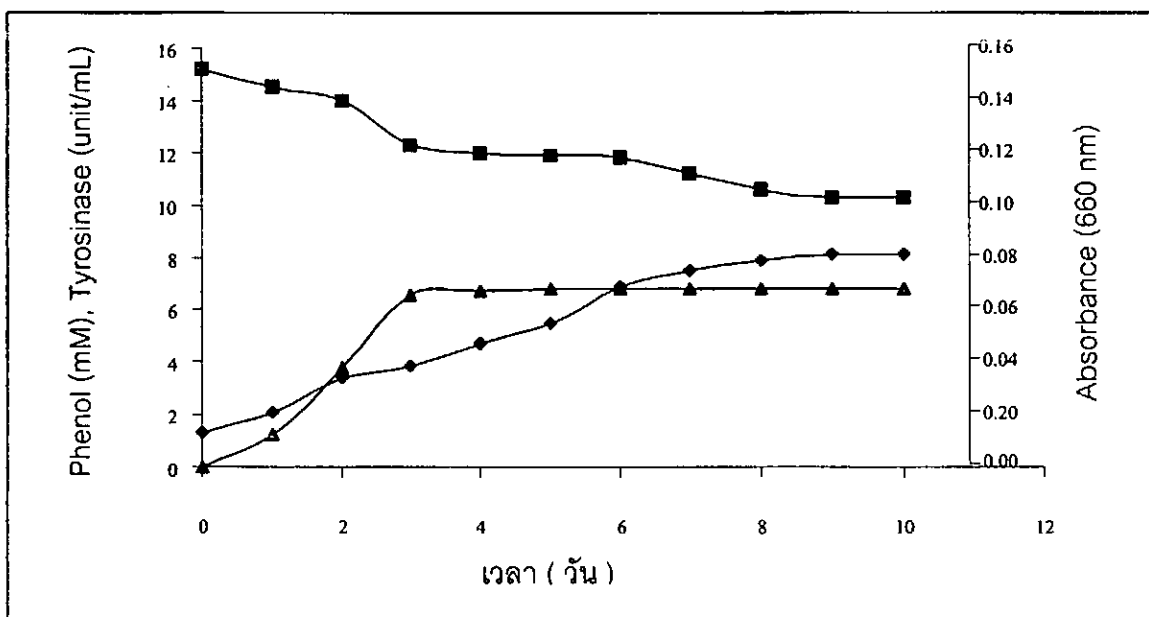


ภาพประกอบ 26 การย่อยสลาย Phenol 15 mM ของเชื้อ PHE1 ที่อุณหภูมิ 50°C

(■) Phenol (mM), (▲) Tyrosinase (Unit/mL), (◆) Absorbance (660 nm)

3.8 การย่อยสลาย Phenol 15 mM ของเชื้อ PHE3 อุณหภูมิ 37°C

จากการทดลองเลี้ยงเชื้อ PHE3 ในอาหารสูตรปรับต่ำที่มี Phenol 15 mM เป็นแหล่งต้นตอของพลังงาน โดยบ่มในตู้เลี้ยงเชื้อแบบเขย่า ด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37°C วัดการเจริญเติบโตของเชื้อที่ OD 660 nm ความเข้มข้นของ Phenol และปริมาณเอนไซม์ Tyrosinase ที่เกิดขึ้น ทุกๆ 1 วัน เป็นเวลา 10 วัน ทำการวัดเช่นเดียวกับวิธีการในข้อ 3.1 พบว่าเชื้อ PHE3 สามารถเจริญได้สูงที่สุดในวันที่ 9 ของการทดลอง โดยมีความขุ่น 0.081 และทำให้ความเข้มข้นของ Phenol ลดลงจาก 15.2 mM เป็น 10.3 mM และมีเอนไซม์ Tyrosinase 6.8 Unit/mL (ดังภาพประกอบ 27)

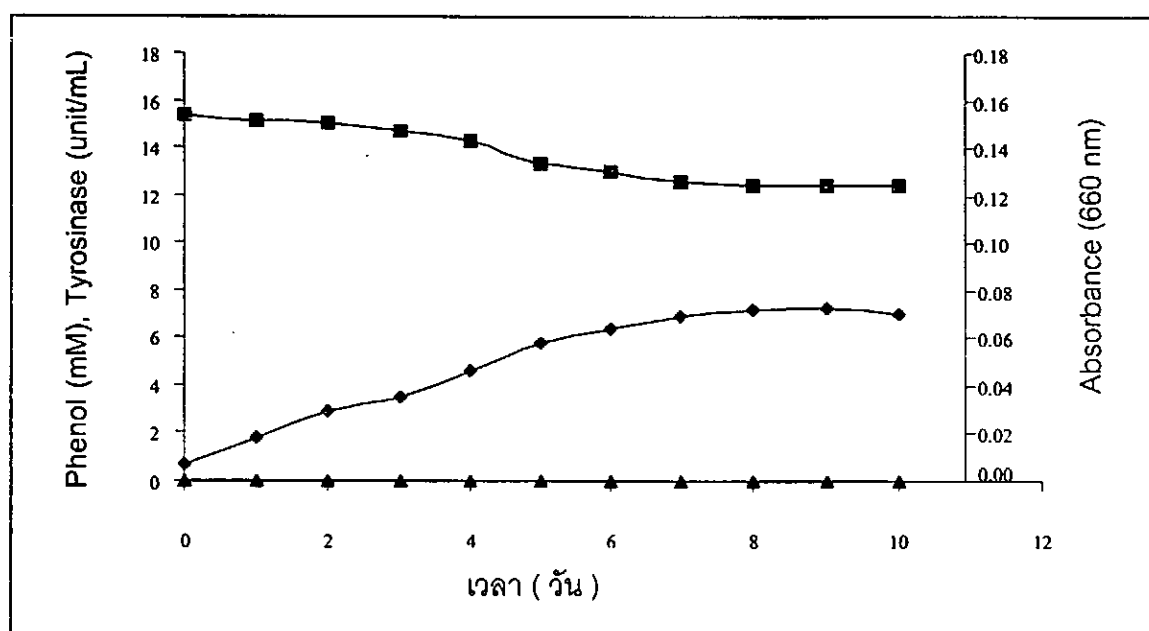


ภาพประกอบ 27 การย่อยสลาย Phenol 15 mM ของเชื้อ PHE3 ที่อุณหภูมิ 37°C

(■) Phenol (mM), (▲) Tyrosinase (Unit/mL), (◆) Absorbance (660 nm)

3.10 การย่อยสลาย Phenol 15 mM ของเชื้อ PHE8 อุณหภูมิ 50°C

ผลการทดลองเมื่อเลี้ยงเชื้อ PHE8 ในอาหารสูตรปรับต่ำที่มี Phenol 15 mM เป็นแหล่งต้นตอของพลังงาน โดยบ่มในตู้เลี้ยงเชื้อแบบเขย่า ด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 50°C วัดการเจริญเติบโตของเชื้อที่ OD 660 nm วัดความเข้มข้นของ Phenol และปริมาณเอนไซม์ Tyrosinase ทุกๆ 1 วัน เป็นเวลา 10 วัน ทำการวัดเช่นเดียวกับวิธีการในข้อ 3.1 พบว่าเชื้อ PHE8 สามารถเจริญได้สูงที่สุดในวันที่ 9 ของการทดลอง โดยมีความขุ่น 0.072 และทำให้ความเข้มข้นของ Phenol ลดลงเหลือ 12.4 mM ไม่มีเอนไซม์ Tyrosinase เกิดขึ้นในระหว่างการเจริญ (ดังภาพประกอบ 29)



ภาพประกอบ 29 การย่อยสลาย Phenol 15 mM ของเชื้อ PHE8 ที่อุณหภูมิ 50°C

(■) Phenol (mM), (▲) Tyrosinase (Unit/mL), (◆) Absorbance (660 nm)

บทที่ 5

สรุปผล อภิปราย และข้อเสนอแนะ

สรุปผลการทดลอง

จากงานวิจัยนี้ สามารถคัดแยกจุลินทรีย์จากดินที่ปนเปื้อนสารปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอน เพื่อย่อยสลายสารประกอบ PAHs โดยใช้ Phenol เป็นสารตั้งต้นของคาร์บอนและพลังงานเพียงชนิดเดียวในอาหารสูตรปรับต่ำเพื่อคัดแยก โดยใช้ Phenol เข้มข้น 2 mM ที่อุณหภูมิ 37°C และ 50°C ได้เชื้อ 8 ชนิด คือ PHE1, PHE2, PHE3,...PHE8 โดยเชื้อ PHE1 และ PHE8 สามารถย่อยสลาย Phenol ที่อุณหภูมิ 37°C และ 50°C ส่วนเชื้ออีก 6 ชนิดสามารถเจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 37°C เท่านั้น เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ Phenol เป็น 10 mM พบว่าเชื้อที่คัดแยกได้สามารถเจริญได้ดี ทั้งนี้เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการย่อยสลายจึงเพิ่มความเข้มข้นของ Phenol เป็น 15 mM และเชื้อ 3 ชนิดคือ PHE1, PHE3 และ PHE8 มีการเจริญที่สภาวะดังกล่าว จึงวัดปริมาณ Phenol ที่ถูกย่อยสลายโดยใช้ Filtrate ทำปฏิกิริยากับ 4-Aminoantipyrine และ Potassium Ferricyanide วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 510 nm เทียบกับกราฟมาตรฐาน รวมทั้งวัดเอนไซม์ Tyrosinase โดยใช้ L-Tyrosine เป็นสับสเตรทพบว่า เชื้อ PHE1 มีการย่อยสลายดีที่สุดทั้งในสภาวะที่อุณหภูมิ 37°C และ 50°C และมีการผลิตเอนไซม์ Tyrosinase ในระหว่างการย่อยสลาย ส่วนเชื้อ PHE8 เจริญได้เช่นกันแต่ไม่มีการผลิตเอนไซม์ Tyrosinase ส่วนเชื้อ PHE3 เจริญที่อุณหภูมิ 37°C เท่านั้น

เมื่อนำจุลินทรีย์เหล่านี้มาทดสอบการย่อยสลายสารประกอบ PAHs 8 ชนิด โดยเลี้ยงเชื้อแต่ละชนิดในอาหารที่เพิ่มวิตามินและแร่ธาตุที่จำเป็น (CD medium) และมี PAHs เป็นแหล่งของพลังงานเพียงชนิดเดียวในอาหารเลี้ยงเชื้อ วัดการเจริญของเชื้อโดยวัดความขุ่นที่ OD 660 nm พบว่า Anthracene, Dibenzothiophene, Naphthalene, Phenanthrene และ Pyrene ถูกย่อยสลายได้ เพราะเชื้อมีการเจริญ แต่ Benzo thiophene, Carbazole และ Fluorene ไม่ถูกการย่อยสลาย และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ PAHs เชื้อเจริญได้น้อยลง โดย Naphthalene ถูกย่อยสลายได้ดีที่สุดทั้งในสภาวะที่อุณหภูมิ 37°C และ 50°C ส่วน Pyrene ถูกย่อยสลายได้น้อยที่สุด และไม่ถูกย่อยสลายที่อุณหภูมิ 50°C

เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพการย่อยสลายของเชื้อพบว่า เชื้อ PHE1 มีความสามารถในการย่อยสลายดีที่สุด เพราะมีการเจริญใน Phenol และ PAHs ที่อุณหภูมิสูง และเชื้อ PHE8 สามารถย่อยสลายได้รองลงมา ส่วนเชื้อชนิดอื่นๆ ไม่มีการเจริญที่อุณหภูมิ 50°C

อภิปรายผลการทดลอง

ในการศึกษาการย่อยสลายสารประกอบ PAHs ขั้นตอนที่สำคัญคือการทำให้ Enrichment เพราะเป็นขั้นตอนที่มีการคัดเลือกเฉพาะจุลินทรีย์ ที่สามารถเจริญในสารที่ต้องการได้ ซึ่งการวิจัยนี้ ใช้ Phenol เข้มข้น 2 mM ในการคัดเลือก เพราะ Phenol มีโครงสร้างที่ประกอบด้วยวงเบนซีน คล้ายสารประกอบ PAHs โดย Phenol จะเป็นแหล่งของสารต้นต่อคาร์บอนและพลังงานเพียง แหล่งเดียวในอาหารสูตรปรับต่ำที่ใช้ จุลินทรีย์ที่เจริญได้จะต้องมีระบบเอนไซม์ที่ย่อย Phenol เพื่อใช้ในการดำรงชีวิต ดินตะกอนที่นำมาคัดเลือก ได้จากแหล่งที่ปนเปื้อนและสะสมของสารประกอบ ไฮโดรคาร์บอนเป็นเวลานาน จุลินทรีย์ที่มาจากบริเวณดังกล่าว จะมีการปรับตัวเพื่อความอยู่รอด และมีระบบเอนไซม์ที่ย่อยสลายสารประกอบไฮโดรคาร์บอนได้ดี (Cerniglia. 1992)

Heitkamp และ Cerniglia คัดแยกเชื้อแบคทีเรียที่ย่อยสลายสารประกอบ PAHs จากดิน ที่ปนเปื้อนคราบน้ำมัน โดยใช้สภาวะการย่อยสลายแบบใช้ออกซิเจน ที่อุณหภูมิ 24–30°C ได้แบคทีเรียแกรมบวกที่ย่อยสลาย Naphthalene, Fluoranthrene และ Pyrene (Heitkamp & Cerniglia. 1998) หรือ *Arthrobacter* sp. สายพันธุ์ F101 ที่สามารถย่อยสลาย Fluorene ได้คัด แยกจากดินตะกอนและน้ำเสียที่ปนเปื้อนน้ำมันดิบเช่นเดียวกัน (Griffoll, M. และคณะ. 1992) งานวิจัยครั้งนี้จึงคัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์จากดินที่ปนเปื้อนสารไฮโดรคาร์บอน ได้จุลินทรีย์ที่มีลักษณะ แตกต่างกัน 8 ชนิดคือ PHE1, PHE2, PHE3...PHE8 ซึ่งสามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 37°C และเชื้อ PHE1 และ PHE8 เจริญที่อุณหภูมิ 50°C ด้วย โดยเชื้อเหล่านี้สามารถเจริญได้เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ Phenol จาก 2 mM เป็น 10 mM และเพื่อศึกษาประสิทธิภาพการย่อยสลาย Phenol ที่ดียิ่งขึ้น จึงเพิ่มความเข้มข้นของ Phenol เป็น 15 mM พบว่าเชื้อ PHE1, PHE3 และ PHE8 เจริญได้ โดยเชื้อ PHE1 มีการเจริญและย่อยสลาย Phenol ที่อุณหภูมิ 37°C และ 50°C สูงที่สุด รองลงมา คือ PHE8 ส่วน PHE3 เจริญได้น้อยที่สุดและเจริญที่อุณหภูมิ 37°C เท่านั้น ซึ่งเชื้อ PHE1 มีการผลิตเอนไซม์ Tyrosinase ในระหว่างการย่อยสลายด้วย โดยปริมาณเอนไซม์เพิ่มขึ้นเมื่อ Phenol ถูกย่อยสลายมากขึ้น เพราะเอนไซม์ Tyrosinase สามารถเปลี่ยน Phenol เป็น Catechol แล้วจึง เปลี่ยนเป็น o-Quinone ตามลำดับ (Solomon, E. และคณะ. 1996) เช่นเดียวกับงานวิจัยของ Ikehata และ Nicell ที่ศึกษาความเป็นพิษของ Phenol พบว่า ปริมาณและความเป็นพิษของ Phenol จะลดลงเมื่อ Phenol ถูกออกซิไดซ์ด้วยเอนไซม์ Tyrosinase ไปเป็น Catechol (Ikehata & Nicell. 2000) ส่วนงานวิจัยของ Bechard และคณะ พบว่าแบคทีเรียแกรมลบ รูปร่างแบบท่อน สามารถเปลี่ยน Phenol เป็น Benzoate ในสภาวะที่ไม่ใช้ออกซิเจน อุณหภูมิ 29°C (Bechard และคณะ. 1990) ในขณะที่แบคทีเรีย *Ralstonia eutropha* สายพันธุ์ E2 ที่ย่อยสลาย Phenol ด้วย เอนไซม์ Phenol Hydroxylase และ Phenol ถูกเปลี่ยนเป็น Catechol ที่อุณหภูมิ 37°C (Freehold, N. J. 1997) จะเห็นว่าในรายงานวิจัยที่ผ่านมา จะใช้สภาวะการทดลองที่อุณหภูมิปกติ

แต่สิ่งแวดล้อมที่มีการปนเปื้อนและสะสมของสารประกอบไฮโดรคาร์บอน มักจะมีความร้อนและแรงดันเกิดขึ้น ทำให้แบคทีเรียที่คัดแยกได้ไม่สามารถเจริญได้ แต่เชื้อ PHE1 และ PHE8 ที่คัดแยกได้ สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิสูง ดังนั้นโอกาสที่เชื้อดังกล่าวจะย่อยสลาย Phenol ที่ปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อมน่าจะมีประสิทธิภาพที่ใกล้เคียงกับการทดลอง

เมื่อนำจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้มาทดสอบการย่อยสลายสารประกอบ PAHs พบว่า PAHs 5 ชนิดถูกย่อยสลายได้ โดย Naphthalene ถูกย่อยสลายได้ดีที่สุด เพราะมีเชื้อที่เจริญได้ 5 ชนิด คือ PHE1, PHE3, PHE5, PHE6 และ PHE8 โดยเชื้อ PHE8 เจริญได้ดีที่สุด ทั้งในอุณหภูมิ 37°C และ 50°C ส่วนเชื้อ PHE1 เจริญรองลงมา ทั้งนี้เนื่องจาก Naphthalene เป็น PAHs ที่มีมวลโมเลกุลต่ำ โครงสร้างประกอบด้วยวงเบนซีน 2 วง จะถูกย่อยสลายได้ง่ายกว่า PAHs ที่มีมวลโมเลกุลสูง (Ashok & Saxena. 1995) ส่วนแบคทีเรียชนิดอื่นที่ย่อยสลาย Naphthalene ได้แก่ *Peaenibacillus validus* และ *Peaenibacillus stutzeri* โดยย่อยสลายอุณหภูมิห้อง และใช้เวลา 14 วัน (Daane, L. L. และคณะ. 2001) *Psuedomonas* spp. ย่อยสลาย Naphthalene ได้เช่นกัน โดยใช้สภาวะที่มีออกซิเจน อุณหภูมิ 37°C ในเวลา 7 วัน (Anderson, S. M. และคณะ. 2001) เมื่อเปรียบเทียบกับเชื้อที่คัดแยกได้พบว่าเชื้อ PHE8 สามารถเจริญใน Naphthalene ที่อุณหภูมิสูงกว่า

Anthracene เป็น PAHs อีกชนิดหนึ่งที่ถูกย่อยสลายได้ดีที่สุดโดยเชื้อ PHE1 ที่อุณหภูมิ 37°C และ 50°C เช่นเดียวกับ Naphthalene โดยเชื้อเจริญได้สูงสุดในวันที่ 12 ของการทดลอง เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ Anthracene การเจริญของเชื้อจะลดลง แบคทีเรียชนิดอื่นที่สามารถย่อยสลาย Anthracene ได้แก่ *Beijerinckia* sp. และ *Mycobacterium* sp. โดยย่อยสลาย Anthracene ที่อุณหภูมิห้อง (Cerniglia. 1992) สำหรับ Phenanthrene ถูกย่อยสลายได้ดีที่สุดโดยเชื้อ PHE8 ที่อุณหภูมิ 37°C และ 50°C ซึ่งคล้ายกับเชื้อ *Acetobacter* sp. สายพันธุ์ PHEN-1 ที่ย่อยสลาย Phenanthrene ในเวลา 7 วัน อุณหภูมิ 30°C (สุดารัตน์ สอนจิตร. 2544) จะเห็นว่าเชื้อชนิดนี้สามารถย่อยสลาย Phenanthrene ได้เร็วกว่าเชื้อ PHE8 แต่ไม่สามารถย่อยสลายได้ที่อุณหภูมิสูง จึงเป็นข้อจำกัดของเชื้อที่ไม่สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้จริง ถ้ามีความร้อนเกิดขึ้นในสิ่งแวดล้อม

Dibenzothiophene ถูกย่อยสลายได้ดีที่สุดโดยเชื้อ PHE4 ซึ่งเจริญได้ในอุณหภูมิ 37°C เท่านั้น คล้ายกับแบคทีเรีย *Rhodococcus erythropolis* สายพันธุ์ KA2-5-1 ซึ่งจะเปลี่ยน Dibenzothiophene ไปเป็น Dibenzothiophenyl Sulfone โดยเอนไซม์ Monooxygenase ที่อุณหภูมิ 37°C เมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นไม่มีการย่อยสลาย (Kobayashi, Morio. และคณะ. 2000) แต่จากงานวิจัยของ Konishi Jin และคณะ พบว่า *Peaenibacillus* sp. สายพันธุ์ A11-2 สามารถย่อยสลาย Dibenzothiophene เป็น 2-Hydroxybiphenyl ที่อุณหภูมิ 50°C ซึ่งเป็นสภาวะที่อุณหภูมิสูงที่สุดสำหรับการย่อยสลาย Dibenzothiophene เช่นเดียวกับ Pyrene ที่ถูกย่อยสลายได้ดีที่สุดที่

อุณหภูมิ 37°C โดยเชื้อ PHE5 และไม่มีการย่อยสลายเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้น เนื่องจาก Pyrene จัดเป็นสารประกอบ PAHs ที่มีมวลโมเลกุลสูง (Ashok & Saxena. 1995) จึงย่อยสลายได้ยาก จากงานวิจัยของ สุดารัตน์ สอนจิตร พบว่า *Pseudomonas fluorescens* สายพันธุ์ PYR-1 ที่สามารถย่อยสลาย Pyrene ที่อุณหภูมิ 30°C ในเวลา 7 วัน และมีเอนไซม์ Dioxygenase เกิดขึ้นในระหว่างการย่อยสลาย (สุดารัตน์ สอนจิตร. 2544) และยังไม่มีรายงานการวิจัยที่พบว่า Pyrene ถูกย่อยสลายที่อุณหภูมิสูง เนื่องจากมีมวลโมเลกุลสูง การย่อยสลายมักจะใช้เชื้อผสมหรือใช้กระบวนการ Cometabolism (Boonchan และคณะ. 2000)

ข้อเสนอแนะ

จากงานวิจัยพบว่าเชื้อจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้มีประสิทธิภาพการย่อยสลายที่ดี ได้แก่ เชื้อ PHE 1 และ PHE 8 สามารถย่อยสลาย Phenol และ PAHs ที่อุณหภูมิสูง และเชื้อชนิดเดียวสามารถย่อยสลาย PAHs ได้หลายชนิด ถ้ามีการทดลองนำไปใช้กับสารมลพิษในสิ่งแวดล้อม เช่น น้ำเสียจากโรงงานอุตสาหกรรมซึ่งสารที่ปนเปื้อนมักจะเป็นของผสม และมีอุณหภูมิสูง โอกาสที่เชื้อจะมีประสิทธิภาพใกล้เคียงกับการทดลองจะมีมากขึ้น และอาจมีการศึกษาถึงกลไกการย่อยสลาย รวมทั้งเอนไซม์ชนิดอื่นนอกเหนือจาก Tyrosinase ที่พบแล้ว เพื่อนำไปสู่การปรับปรุงในระดับโมเลกุลของจุลินทรีย์ เพื่อให้มีประสิทธิภาพการย่อยสลายได้ดีขึ้น

บรรณานุกรม

บรรณานุกรม

- กรมควบคุมมลพิษ. (2543ก). พิษมล. กรุงเทพฯ : ศรีเมืองการพิมพ์.
- (2543ข). โพลีไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน. กรุงเทพฯ : วีรณาเพลส.
- จิราภรณ์ และ คณะ. (2536). การกำจัดคราบน้ำมันโดยจุลินทรีย์. (รายงานการประชุมวิชาการระดับนานาชาติ). กรุงเทพฯ : สมาคมวิศวกรรมสิ่งแวดล้อมแห่งประเทศไทย.
- สุดารัตน์ สอนจิตร. (2544). การย่อยสลายสารประกอบโพลีไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนโดยจุลินทรีย์. ปรินญานินพนวิทยาสตรมหาบัณฑิต. (จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย). ชลบุรี : มหาวิทยาลัยบูรพา. ถ่ายเอกสาร.
- Anderson, S. M., Jorgensen, C. & Jacobsen, C. S. (2001, Springer-Verlag). Development and Utilisation of a Medium to Isolate Phenanthrene-Degrading *Pseudomonas* spp. *App.Microbiol. Biotechnol.* 55 : 112-116.
- Asoke, BT, & Saxena, S. (1995). Degradation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. *J. Sci. Ind. Res.* 54 : 443-451.
- Bahrami, A., Shojaosadati, S. A., & Mohebal, G. (2001, March). Biodegradation of Dibenzothiophene by Thermophilic Bacteria. *Biotechnol. Letters.* 23 : 899-901.
- Baldwin, B. R., Mesarch, M. B., & Nies, L. (2001, Springer-Verlag). Broad Substrate Specificity of Naphthalene and Biphenyl – Utilizing Bacteria. *App. Microbiol. Biotechnol.* 53 : 748-753.
- Bechard, G., Bisailon, G., & Beaudet, R. (1995, March). Degradation of Phenol by a Bacterial Consortium under Methanogenic Conditions. *Can J. Microbiol.* 36 : 573-578.
- Bouchez, M., Blanchet, G. & Vandecasteele, J-P. (1995, March). Degradation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by Pure Strains and by Defined Strain Associations Inhibition Phenomena and Cometabolism. *App. Microbiol. Biotechnol.* 43 : 156-164.
- 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.

- Chikoma, Kazunga. & Micheal, D., Aitken. (2000, May). Products from the Incomplete Metabolism of Pyrene by Polycyclic Aromatic Hydrocarbon – Degrading Bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 66(5) : 1917-1922.
- Chung, W. K. & King, G. M. (2001, December). Isolation, Characterization and Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Degradation Potential of Aerobic Bacteria from Marine Macrofaunal Burrow Sediments and Description of *Lutibacterium anuloederans* gen. nov., sp. nov. and *Cycloclasticus spirillensus* sp. nov. *Appl. Environ. Microbiol.* 67(12) : 5585-5592.
- Daane, L. L. et al. (2001, June). Isolation and Characterization of Polycyclic Aromatic Hydrocarbon – Degrading Bacteria Associated with the Rhizosphere of Salt Marsh Plants. *Appl. Environ. Microbiol.* 67(6) : 2683-2691.
- Freehold, N. J. (1997). Polyphenol Oxidase. *Worthington Enzyme Manual*. P 74-75.
- Grifoll, M. et al. (1992, September). Isolation and Characterization of Fluorene – Degrading Bacterium : Identification of Ring Oxidation and Ring Fission Products. *Appl. Environ. Microbiol.* 58(9) : 2910-2917.
- Hino, Sanae., Watanabe, Kazuya. & Takahashi, Nobuhiro. (1998, March). Phenol Hydroxylase Cloned from *Ralstonia eutropha* Strain E2 Exhibits Novel Kinetic Properties. *Microbiology.* 144 : 1765-1772.
- Ikehata Keisuke. & Nicell, A. James. (2000, August). Color and Toxicity Removal Following Tyrosinase – Catalyzed Oxidation of Phenols. *Biotechnol. Prog.* 16 (4) : 533-540.
- Ishii, Yoshitaka. et al. (2000, February). Operon Structure and Functional Analysis of the Gene Encoding Thermophilic Desulfurizing Enzymes of *Paenibacillus* sp. A11-2. *Biochem and Biophysic Research Communications.* 270 : 81-88.
- Klien, J. & Wiley. Vclt. (2000, May). Aerobic Degradation by Microorganisms. *Biotechnol.* 166 : 151-154.
- Kobayashi, Morio. et al. (2000, April). Desulfurization of Alkylated forms of Both Dibenzothiophene and Benzothiophene by a Single Bacterial Strain. *FEMS Microbiology Letters.* 187 : 123-126.

- Konishi, Jin. et al. (2000, April). Demonstration of the Carbon – Sulfur Bond Targeted Desulfurization of Benzothiophene by the Thermophillic *Paenibacillus* sp. Strain A11-2 Capable of Desulfurizing Dibenzothiophene. *FEMS Microbiology Letters*. 187 : 123-126.
- Leahy, G. Joseph. & Colwell, R. Rito. (1990, September). Microbial Degradation of Hydrocarbons in the Environment. *Appl. Environ. Microbiol.* 54(3) : 305-315.
- Manohar, S., Kim, C. K. & Karegoudar, T. B. (2001, Springer-Verlag). Enhanced Degradation of Naphthalene by Immobilization of *Pseudomonas* sp. Strain NGK1 in Polyurethane Foam. *Appl. Environ. Microbiol.* 55 : 112-116.
- McFarland, L. Beverly. (1999, May). Biodesulfurization. *Curr. Opin. Microbiol.* 2 : 257-264.
- Micheal, A. et al. (1988, June). Mineralization of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by a Bacterium Isolated from Sediment below and Oil Field. *Appl. Environ. Microbiol.* 54(6) : 1612-1614.
- Rehmann, Klaus., Hertkorn, Norbert. & Kettrup, A. Antonius. (2001, June). Fluoranthrene Metabolism in *Mycobacterium* sp. Strain KR20 Identity of Pathway Intermediates During Degradation and Growth. *Microbiology*. 147 : 2783-2794.
- Liao, J. F. C. & Oehme, F. W. (1980). Literature Reviews of Phenolic Compounds and Phenol. *Vet. Hum. Toxicol.* 22 : 160-164.
- Torronen, R. et al. (1981). Induction of Aldehyde Dehydrogenase by Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Rats. *Chem. Biol. Interact.* 36 : 33-34.
- Wilson, S. C. & Jone, K. C. (2000). Bioremediation of Soil Contaminated with Polynuclear Aromatic Hydrocarbons. *Environ. Pol.* 81 : 229-249.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

1. KSN-Minimal Medium

ในสารละลาย 1 L ประกอบด้วย

$K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$	4	g
$NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$	1	g
$(NH_4)_2SO_4$	0.5	g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.15	g
$FeSO_4$	0.01	g

ปรับ pH ให้เป็น 7.0 ถ้าเป็นอาหารแข็งเติม Bacto-Agar 2 %

2. CD Medium

ในสารละลาย 1 L ประกอบด้วย

Na_2HPO_4	1.6	g
KH_2PO_4	1.0	g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.5	g
$NaNO_3$	0.5	g
$(NH_4)_2SO_4$	0.5	g
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	0.025	g
Metal Solution	2	mL
Vitamin Solution	1	mL

ปรับ pH ให้เป็น 7.4 ถ้าเป็นอาหารแข็งให้เติม Bacto-Agar 2 %

Metal Solution

ในสารละลาย 1 L ประกอบด้วย

$FeCl_2 \cdot 4H_2O$	1.5	g
$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	0.19	g
$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	0.1	g
$ZnCl_2$	0.07	g
H_3BO_3	0.062	g

$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.036	g
$\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.024	g
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.017	g
$\text{AlK}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	0.01	g

Vitamin Solution

ในสารละลาย 1 L ประกอบด้วย

Biotin	2	mL
Folic acid	2	mL
Thiamine HCl	5	mL
Riboflavin	5	mL
Pyridoxine HCl	10	mL
Cyanocobalamine	0.1	mL
Nicotinic acid	5	mL
DL-calcium pantothenate	5	mL
p-Aminobenzoic acid	5	mL

3. LB Medium

ในสารละลาย 1 L ประกอบด้วย

Bactotryptone	10	g
Yeast extract	5	g
NaCl	5	g

ถ้าเป็นอาหารแข็งเติม Bacto-Agar 1.5 %

ภาคผนวก ข

ตารางแสดงผลการย่อยสลาย PAHs

1. การย่อยสลายสารประกอบ PAHs ที่เข้มข้น 0.2% อุณหภูมิ 37 °C

ตาราง 2 การเจริญของเชื้อใน CD medium ที่มี Anthracene 0.2%

เชื้อ	เวลา (วัน)							
	0	2	4	6	8	10	12	14
PHE1	0.002	0.007	0.046	0.076	0.092	0.095	0.104	0.106
PHE2	0.002	0.004	0.004	0.008	0.009	0.012	0.011	0.012
PHE3	0.006	0.013	0.017	0.047	0.056	0.063	0.068	0.070
PHE4	0.004	0.005	0.019	0.015	0.016	0.017	0.017	0.018
PHE5	0.002	0.003	0.009	0.009	0.011	0.012	0.011	0.010
PHE6	0.002	0.002	0.005	0.010	0.010	0.010	0.011	0.011
PHE7	0.005	0.007	0.009	0.011	0.020	0.020	0.021	0.019
PHE8	0.004	0.009	0.045	0.081	0.125	0.140	0.141	0.140

ตาราง 3 การเจริญของเชื้อใน CD medium ที่มี Dibenzothiophene 0.2%

เชื้อ	เวลา (วัน)							
	0	2	4	6	8	10	12	14
PHE1	0.005	0.011	0.009	0.008	0.009	0.008	0.008	0.010
PHE2	0.006	0.005	0.008	0.005	0.006	0.008	0.008	0.009
PHE3	0.003	0.012	0.014	0.013	0.012	0.012	0.014	0.012
PHE4	0.008	0.015	0.038	0.047	0.063	0.120	0.120	0.121
PHE5	0.003	0.005	0.012	0.013	0.011	0.014	0.011	0.011
PHE6	0.004	0.039	0.035	0.056	0.053	0.067	0.072	0.072
PHE7	0.005	0.041	0.056	0.064	0.082	0.083	0.092	0.090
PHE8	0.006	0.009	0.008	0.021	0.022	0.025	0.026	0.024

ตาราง 4 การเจริญของเชื้อใน CD medium ที่มี Naphthalene 0.2 %

เชื้อ	เวลา (วัน)							
	0	2	4	6	8	10	12	14
PHE1	0.007	0.011	0.035	0.078	0.080	0.085	0.089	0.090
PHE2	0.003	0.012	0.013	0.016	0.018	0.028	0.035	0.035
PHE3	0.011	0.013	0.031	0.048	0.059	0.065	0.068	0.060
PHE4	0.003	0.005	0.006	0.008	0.009	0.011	0.010	0.011
PHE5	0.005	0.007	0.009	0.031	0.046	0.051	0.063	0.064
PHE6	0.005	0.009	0.015	0.024	0.054	0.052	0.058	0.058
PHE7	0.005	0.008	0.008	0.013	0.018	0.019	0.018	0.020
PHE8	0.006	0.009	0.038	0.092	0.092	0.098	0.108	0.110

ตาราง 5 การเจริญของเชื้อใน CD medium ที่มี Phenanthrene 0.2%

เชื้อ	เวลา (วัน)							
	0	2	4	6	8	10	12	14
PHE1	0.005	0.012	0.018	0.028	0.052	0.066	0.079	0.078
PHE2	0.013	0.020	0.049	0.054	0.064	0.182	0.233	0.241
PHE3	0.004	0.010	0.050	0.061	0.083	0.090	0.096	0.096
PHE4	0.003	0.004	0.009	0.014	0.015	0.019	0.016	0.017
PHE5	0.003	0.005	0.060	0.021	0.022	0.031	0.026	0.027
PHE6	0.003	0.005	0.008	0.011	0.014	0.029	0.027	0.026
PHE7	0.003	0.005	0.005	0.006	0.015	0.031	0.018	0.020
PHE8	0.008	0.010	0.030	0.068	0.096	0.234	0.256	0.260

ตาราง 6 การเจริญเติบโตของเชื้อใน CD medium ที่มี Pyrene 0.2%

เชื้อ	เวลา (วัน)							
	0	2	4	6	8	10	12	14
PHE1	0.009	0.016	0.018	0.019	0.017	0.015	0.012	0.013
PHE2	0.015	0.016	0.016	0.018	0.020	0.021	0.019	0.020
PHE3	0.010	0.035	0.043	0.053	0.078	0.093	0.089	0.098
PHE4	0.011	0.020	0.024	0.020	0.020	0.024	0.023	0.021
PHE5	0.018	0.044	0.048	0.082	0.099	0.101	0.110	0.112
PHE6	0.008	0.027	0.041	0.047	0.074	0.078	0.092	0.095
PHE7	0.004	0.018	0.028	0.023	0.025	0.025	0.028	0.026
PHE8	0.008	0.009	0.010	0.023	0.023	0.021	0.023	0.020

2. ผลของการแปรเปลี่ยนความเข้มข้นของ PAHs และอุณหภูมิที่ใช้ในการเจริญของเชื้อ

ตาราง 7 การเจริญเติบโตของเชื้อใน Anthracene ที่ความเข้มข้นต่างๆ อุณหภูมิ 37°C

ความเข้มข้น (%)	เชื้อ	เวลา (วัน)							
		0	2	4	6	8	10	12	14
0.2	PHE1	0.004	0.007	0.046	0.076	0.087	0.092	0.095	0.104
	PHE3	0.006	0.013	0.017	0.037	0.047	0.056	0.063	0.068
	PHE8	0.004	0.009	0.045	0.081	0.125	0.140	0.141	0.140
0.5	PHE1	0.005	0.006	0.027	0.039	0.056	0.072	0.072	0.072
	PHE3	0.004	0.005	0.018	0.025	0.036	0.046	0.043	0.048
	PHE8	0.007	0.008	0.013	0.041	0.049	0.058	0.065	0.074
1.0	PHE1	0.005	0.005	0.011	0.023	0.025	0.024	0.025	0.026
	PHE3	0.006	0.007	0.010	0.021	0.016	0.018	0.017	0.019
	PHE8	0.006	0.006	0.014	0.012	0.011	0.012	0.010	0.010

ตาราง 8 การเจริญเติบโตของเชื้อใน Anthracene ที่ความเข้มข้นต่างๆ อุณหภูมิ 50°C

ความเข้มข้น (%)	เชื้อ	เวลา (วัน)							
		0	2	4	6	8	10	12	14
0.2	PHE1	0.007	0.023	0.059	0.087	0.101	0.119	0.127	0.132
	PHE3	0.005	0.006	0.004	0.005	0.005	0.005	0.004	0.004
	PHE8	0.010	0.017	0.032	0.041	0.063	0.086	0.090	0.092
0.5	PHE1	0.008	0.015	0.019	0.037	0.052	0.063	0.074	0.095
	PHE3	0.005	0.005	0.004	0.005	0.006	0.005	0.005	0.006
	PHE8	0.008	0.009	0.021	0.031	0.043	0.047	0.046	0.045
1.0	PHE1	0.006	0.007	0.011	0.013	0.024	0.031	0.039	0.048
	PHE3	0.007	0.007	0.006	0.008	0.005	0.004	0.007	0.007
	PHE8	0.009	0.008	0.009	0.010	0.010	0.009	0.011	0.010

ตาราง 9 การเจริญเติบโตของเชื้อใน Dibenzothiophene ที่ความเข้มข้นต่างๆ อุณหภูมิ 37°C

ความเข้มข้น (%)	เชื้อ	เวลา (วัน)							
		0	2	4	6	8	10	12	14
0.2	PHE4	0.002	0.015	0.038	0.047	0.063	0.120	0.121	0.120
	PHE6	0.004	0.035	0.039	0.050	0.053	0.067	0.072	0.072
	PHE7	0.007	0.041	0.056	0.064	0.082	0.083	0.092	0.093
0.5	PHE4	0.007	0.015	0.024	0.032	0.048	0.051	0.054	0.060
	PHE6	0.007	0.009	0.013	0.027	0.035	0.041	0.041	0.042
	PHE7	0.011	0.019	0.037	0.051	0.059	0.063	0.007	0.074
1.0	PHE4	0.008	0.008	0.007	0.008	0.009	0.007	0.009	0.008
	PHE6	0.009	0.010	0.011	0.009	0.008	0.010	0.009	0.009
	PHE7	0.008	0.010	0.013	0.016	0.021	0.030	0.030	0.031

ตาราง 10 การเจริญเติบโตของเชื้อใน Naphthalene ที่ความเข้มข้นต่างๆ อุณหภูมิ 37°C

ความเข้มข้น (%)	เชื้อ	เวลา (วัน)							
		0	2	4	6	8	10	12	14
0.2	PHE1	0.007	0.011	0.035	0.078	0.080	0.085	0.089	0.090
	PHE3	0.011	0.013	0.031	0.048	0.059	0.065	0.068	0.069
	PHE5	0.005	0.007	0.009	0.031	0.049	0.051	0.065	0.064
	PHE6	0.005	0.009	0.015	0.042	0.054	0.052	0.058	0.058
	PHE8	0.066	0.009	0.038	0.058	0.092	0.098	0.108	0.110
0.5	PHE1	0.006	0.010	0.038	0.078	0.089	0.095	0.105	0.108
	PHE3	0.011	0.013	0.021	0.032	0.037	0.041	0.040	0.042
	PHE5	0.005	0.008	0.010	0.025	0.028	0.031	0.030	0.030
	PHE6	0.007	0.008	0.007	0.008	0.006	0.007	0.009	0.008
	PHE8	0.009	0.011	0.015	0.032	0.048	0.063	0.064	0.068
1.0	PHE1	0.008	0.007	0.009	0.008	0.010	0.008	0.009	0.005
	PHE3	0.009	0.010	0.011	0.010	0.009	0.007	0.008	0.006
	PHE5	0.007	0.008	0.009	0.006	0.007	0.005	0.003	0.006
	PHE6	0.005	0.006	0.008	0.007	0.006	0.005	0.006	0.007
	PHE8	0.009	0.010	0.011	0.012	0.021	0.034	0.038	0.037

ตาราง 11 การเจริญเติบโตของเชื้อใน Naphthalene ที่ความเข้มข้นต่างๆ อุณหภูมิ 50°C

ความเข้มข้น (%)	เชื้อ	เวลา (วัน)							
		0	2	4	6	8	10	12	14
0.2	PHE1	0.005	0.010	0.042	0.059	0.078	0.093	0.103	0.105
	PHE3	0.008	0.008	0.008	0.009	0.007	0.008	0.005	0.006
	PHE5	0.009	0.006	0.008	0.007	0.009	0.010	0.012	0.006
	PHE6	0.010	0.009	0.006	0.007	0.008	0.009	0.010	0.007
	PHE8	0.009	0.018	0.034	0.057	0.084	0.109	0.126	0.129
0.5	PHE1	0.007	0.017	0.034	0.052	0.086	0.105	0.116	0.119
	PHE3	0.011	0.010	0.012	0.009	0.008	0.012	0.011	0.012
	PHE5	0.009	0.007	0.006	0.008	0.008	0.006	0.009	0.007
	PHE6	0.102	0.009	0.010	0.003	0.004	0.006	0.005	0.007
	PHE8	0.009	0.017	0.029	0.037	0.045	0.054	0.065	0.063
1.0	PHE1	0.009	0.017	0.029	0.034	0.045	0.054	0.053	0.052
	PHE3	0.007	0.008	0.006	0.005	0.004	0.007	0.007	0.006
	PHE5	0.009	0.002	0.006	0.008	0.005	0.006	0.007	0.012
	PHE6	0.004	0.006	0.005	0.004	0.007	0.005	0.006	0.004
	PHE8	0.007	0.009	0.010	0.015	0.023	0.008	0.006	0.008

ตาราง 12 การเจริญเติบโตของเชื้อใน Phenanthrene ที่ความเข้มข้นต่างๆ อุณหภูมิ 37°C

ความเข้มข้น (%)	เชื้อ	เวลา (วัน)							
		0	2	4	6	8	10	12	14
0.2	PHE1	0.005	0.018	0.028	0.052	0.066	0.078	0.079	0.078
	PHE2	0.013	0.020	0.049	0.054	0.064	0.182	0.233	0.241
	PHE3	0.008	0.010	0.050	0.061	0.083	0.090	0.096	0.096
	PHE8	0.008	0.010	0.030	0.068	0.096	0.234	0.256	0.260
0.5	PHE1	0.008	0.011	0.018	0.021	0.037	0.041	0.040	0.040
	PHE2	0.011	0.020	0.031	0.044	0.052	0.059	0.071	0.074
	PHE3	0.005	0.006	0.004	0.008	0.007	0.006	0.005	0.006
	PHE8	0.012	0.018	0.025	0.034	0.047	0.048	0.046	0.048
1.0	PHE1	0.008	0.006	0.009	0.007	0.005	0.007	0.008	0.007
	PHE2	0.009	0.018	0.034	0.051	0.052	0.051	0.054	0.053
	PHE3	0.011	0.013	0.014	0.011	0.010	0.012	0.013	0.011
	PHE8	0.007	0.009	0.010	0.012	0.008	0.009	0.007	0.009

ตาราง 13 การเจริญเติบโตของเชื้อใน Phenanthrene ที่ความเข้มข้นต่างๆ อุณหภูมิ 50°C

ความเข้มข้น (%)	เชื้อ	เวลา (วัน)							
		0	2	4	6	8	10	12	14
0.2	PHE1	0.009	0.015	0.034	0.068	0.085	0.093	0.095	0.096
	PHE2	0.012	0.012	0.011	0.010	0.012	0.009	0.011	0.012
	PHE3	0.008	0.008	0.008	0.009	0.006	0.007	0.008	0.009
	PHE8	0.008	0.010	0.037	0.055	0.073	0.098	0.107	0.112
0.5	PHE1	0.007	0.012	0.025	0.033	0.038	0.041	0.039	0.042
	PHE2	0.013	0.012	0.011	0.013	0.013	0.010	0.012	0.010
	PHE3	0.010	0.011	0.012	0.013	0.011	0.013	0.014	0.010
	PHE8	0.010	0.014	0.021	0.023	0.031	0.032	0.034	0.005
1.0	PHE1	0.010	0.009	0.008	0.008	0.009	0.010	0.009	0.010
	PHE2	0.012	0.012	0.011	0.010	0.009	0.008	0.011	0.011
	PHE3	0.007	0.008	0.007	0.008	0.009	0.009	0.008	0.009
	PHE8	0.009	0.009	0.009	0.008	0.009	0.008	0.008	0.009

ตาราง 14 การเจริญเติบโตของเชื้อใน Pyrene ที่ความเข้มข้นต่างๆ อุณหภูมิ 37°C

ความเข้มข้น (%)	เชื้อ	เวลา (วัน)							
		0	2	4	6	8	10	12	14
0.2	PHE5	0.018	0.044	0.048	0.082	0.099	0.101	0.110	0.112
	PHE6	0.008	0.027	0.041	0.047	0.074	0.078	0.092	0.095
0.5	PHE5	0.013	0.025	0.035	0.042	0.045	0.051	0.055	0.057
	PHE6	0.009	0.013	0.020	0.025	0.033	0.046	0.045	0.046
1.0	PHE5	0.011	0.017	0.021	0.022	0.021	0.020	0.023	0.021
	PHE6	0.010	0.015	0.015	0.015	0.016	0.014	0.016	0.015

ตารางแสดงผลการย่อยสลาย Phenol

ตาราง 15 การย่อยสลาย Phenol 10mM ของเชื้อ PHE1 อุณหภูมิ 37 °C

วันที่	Absorbance (660nm)	ความเข้มข้นของ Phenol (mM)	ปริมาณเอนไซม์ (Unit/mL)
0	0.009	10.5	0.0
1	0.017	10.3	1.6
2	0.027	9.1	4.0
3	0.033	8.6	6.0
4	0.039	7.6	6.5
5	0.059	5.4	7.2
6	0.068	4.2	9.5
7	0.074	3.8	9.8
8	0.082	3.6	9.8
9	0.082	3.6	9.8
10	0.083	3.6	9.8

ตาราง 16 การย่อยสลาย Phenol 10mM ของเชื้อ PHE1 อุณหภูมิ 50°C

วันที่	Absorbance (660nm)	ความเข้มข้นของ Phenol (mM)	ปริมาณเอนไซม์ (Unit/mL)
0	0.010	10.5	0.0
1	0.027	10.2	1.4
2	0.038	9.9	3.4
3	0.052	8.1	7.2
4	0.078	7.8	7.4
5	0.085	6.1	7.4
6	0.094	4.4	10.5
7	0.117	3.7	15.2
8	0.119	1.6	17.6
9	0.128	1.6	17.6
10	0.126	1.6	17.6

ตาราง 17 การย่อยสลาย Phenol 10mM ของเชื้อ PHE3 อุณหภูมิ 37°C

วันที่	Absorbance (660nm)	ความเข้มข้นของ Phenol (mM)	ปริมาณเอนไซม์ (Unit/mL)
0	0.008	10.3	0.0
1	0.011	9.3	0.0
2	0.024	8.9	0.2
3	0.032	6.5	3.4
4	0.036	5.9	4.5
5	0.057	5.1	4.1
6	0.062	5.1	4.1
7	0.064	5.1	4.1
8	0.065	5.1	4.1
9	0.065	5.1	4.1
10	0.066	5.1	4.1

ตาราง 18 การย่อยสลาย Phenol 10mM ของเชื้อ PHE8 อุณหภูมิ 37°C

วันที่	Absorbance (660nm)	ความเข้มข้นของ Phenol (mM)	ปริมาณเอนไซม์ (Unit/mL)
0	0.010	10.5	0.0
1	0.021	10.3	0.0
2	0.038	9.8	0.0
3	0.054	9.7	0.0
4	0.061	8.3	0.0
5	0.073	8.3	0.0
6	0.088	8.3	0.0
7	0.090	8.3	0.0
8	0.091	8.3	0.0
9	0.090	8.3	0.0
10	0.091	8.3	0.0

ตาราง 19 การย่อยสลาย Phenol 10 mM ของเชื้อ PHE8 อุณหภูมิ 50°C

วันที่	Absorbance (660nm)	ความเข้มข้นของ Phenol (mM)	ปริมาณเอนไซม์ (Unit/mL)
0	0.009	10.6	0.0
1	0.013	9.2	0.0
2	0.037	8.5	0.0
3	0.046	8.1	0.0
4	0.061	7.9	0.0
5	0.072	7.4	0.0
6	0.094	7.3	0.0
7	0.092	7.3	0.0
8	0.094	7.1	0.0
9	0.093	7.1	0.0
10	0.093	7.1	0.0

ตาราง 20 การย่อยสลาย Phenol 15 mM ของเชื้อ PHE1 อุณหภูมิ 37°C

วันที่	Absorbance (660nm)	ความเข้มข้นของ Phenol (mM)	ปริมาณเอนไซม์ (Unit/mL)
0	0.010	15.7	0.0
1	0.023	14.3	2.2
2	0.031	13.5	4.8
3	0.045	13.2	4.9
4	0.059	11.9	5.2
5	0.063	11.2	5.2
6	0.065	11.4	5.2
7	0.068	11.1	5.2
8	0.071	10.6	7.8
9	0.073	10.6	7.8
10	0.076	10.6	7.8

ตาราง 21 การย่อยสลาย Phenol 10 mM ของเชื้อ PHE1 อุณหภูมิ 50°C

วันที่	Absorbance (660nm)	ความเข้มข้นของ Phenol (mM)	ปริมาณเอนไซม์ (Unit/mL)
0	0.008	15.4	0.0
1	0.019	15.0	1.3
2	0.032	15.0	1.3
3	0.037	14.3	4.4
4	0.049	14.0	4.5
5	0.061	13.2	6.9
6	0.078	11.4	6.3
7	0.088	9.9	12.1
8	0.092	9.9	12.7
9	0.099	7.7	14.7
10	0.102	7.3	15.8

ตาราง 22 การย่อยสลาย Phenol 10 mM ของเชื้อ PHE3 อุณหภูมิ 37°C

วันที่	Absorbance (660nm)	ความเข้มข้นของ Phenol (mM)	ปริมาณเอนไซม์ (Unit/mL)
0	0.013	15.2	0.0
1	0.021	14.5	1.2
2	0.034	14.0	3.8
3	0.039	12.3	6.6
4	0.047	12.0	6.7
5	0.055	11.9	6.8
6	0.069	11.8	6.8
7	0.075	11.2	6.8
8	0.079	10.6	6.8
9	0.081	10.3	6.8
10	0.080	10.3	6.8

ตาราง 23 การย่อยสลาย Phenol 15 mM ของเชื้อ PHE8 อุณหภูมิ 37°C

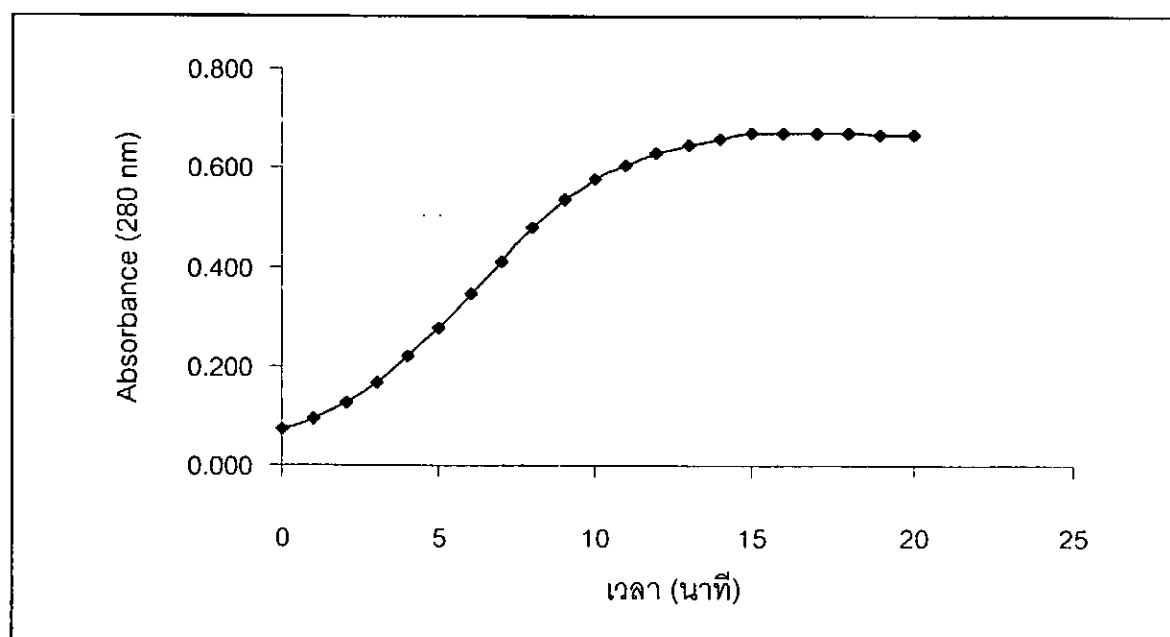
วันที่	Absorbance (660nm)	ความเข้มข้นของ Phenol (mM)	ปริมาณเอนไซม์ (Unit/mL)
0	0.012	15.4	0.0
1	0.019	14.5	0.0
2	0.027	14.4	0.0
3	0.032	13.7	0.0
4	0.043	13.2	0.0
5	0.051	13.1	0.0
6	0.054	13.1	0.0
7	0.055	13.0	0.0
8	0.057	13.0	0.0
9	0.059	13.0	0.0
10	0.057	13.0	0.0

ตาราง 24 การย่อยสลาย Phenol 15 mM ของเชื้อ PHE8 อุณหภูมิ 50°C

วันที่	Absorbance (660nm)	ความเข้มข้นของ Phenol (mM)	ปริมาณเอนไซม์ (Unit/mL)
0	0.007	15.4	0.0
1	0.018	15.1	0.0
2	0.029	15.0	0.0
3	0.035	14.7	0.0
4	0.046	14.3	0.0
5	0.058	13.3	0.0
6	0.064	13.0	0.0
7	0.069	12.6	0.0
8	0.071	12.4	0.0
9	0.072	12.4	0.0
10	0.070	12.4	0.0

ผลการวัด Kinetic ของเอนไซม์ Tyrosinase

การทดลองวัด Kinetic ของเอนไซม์ Tyrosinase ที่มี L-Tyrosine 0.001 M ใน Phosphate Buffer 0.5 M, pH 6.5 เป็นสับสเตรท ทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 25°C วัดค่า Absorbance ที่ 280 nm พบว่าค่า Absorbance จะสูงขึ้นเมื่อเวลาผ่านไป และสูงสุดในนาที่ที่ 15 ของปฏิกิริยา (ดังภาพประกอบ 30)



ภาพประกอบ 30 Kinetic ของเอนไซม์ Tyrosinase

ประวัติย่อผู้วิจัย

ประวัติย่อผู้วิจัย

ชื่อ ชื่อสกุล	นางสาวประนัดฎา พิมสี
วันเดือนปีเกิด	วันที่ 28 เมษายน 2520
สถานที่เกิด	อำเภอจตุรพักตรพิมาน จังหวัดร้อยเอ็ด
สถานที่อยู่ปัจจุบัน	23 หมู่ 9 ตำบลดงกลาง อำเภอจตุรพักตรพิมาน จังหวัดร้อยเอ็ด รหัสไปรษณีย์ 45180
ประวัติการศึกษา	
พ.ศ. 2539	มัธยมศึกษาตอนปลาย โรงเรียนจตุรพักตรพิมานรัชดาภิเษก
พ.ศ. 2543	การศึกษามหาบัณฑิต เอกเคมี มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ
พ.ศ. 2546	การศึกษามหาบัณฑิต เอกเคมี มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ