

การตรึงกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ในอัลจินตเพื่อการย่อยสลายไพลีน/พีแนนทริน



นางสาวอภิรดี ประเวศจรรยา

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2552

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



IMMOBILIZATION OF BACTERIAL CONSORTIUM RRM-V3 IN ALGINATE FOR
PYRENE/ PHENANTHRENE DEGRADATION

Miss Apiradee Prawetchanya

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

Department of Microbiology

Faculty of Science

Chulalongkorn University

Academic Year 2009

Copyright of Chulalongkorn University

อภิชาติ ประเวศจรรยา : การตรึงกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ในอัลจิเนตเพื่อการย่อยสลายไพรีน/
ฟีแนนทรีน (IMMOBILIZATION OF BACTERIAL CONSORTIUM RRM-V3 IN ALGINATE
FOR PYRENE/ PHENANTHRENE DEGRADATION) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก : ผศ.ดร.
กอบชัย ภัทรกุลวณิชย์, 90 หน้า.

กระบวนการเติมสิ่งมีชีวิตเพื่อการบำบัดสารพิษในสิ่งแวดล้อมส่วนใหญ่ไม่ประสบความสำเร็จ
เนื่องจาก อัตราการรอดชีวิตที่น้อยของจุลชีพที่เติมลงไป และการสูญเสียความสามารถในการย่อย
สลาย ดังนั้นในงานวิจัยนี้มุ่งที่จะตรึงกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 โดยใช้อัลจิเนตเพื่อใช้ในการบำบัดน้ำเสีย
ที่ปนเปื้อนไพรีนและฟีแนนทรีน ภาวะที่เหมาะสมสำหรับการตรึงในอัลจิเนตคือ สารละลายไฮเดียมอัล
จิเนต 4% น้ำหนักต่อปริมาตร แคลเซียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ และจำนวนเซลล์แบคทีเรีย
เริ่มต้นประมาณ 8 log CFU/มิลลิลิตร RRM-V3 ที่ตรึงในอัลจิเนตย่อยสลายไพรีนและฟีแนนทรีนที่
ความเข้มข้น 0.05, 0.5 และ 1 กรัม/ลิตร ด้วยอัตราที่ไม่แตกต่างจากเซลล์ RRM-V3 อิสระ เซลล์ RRM-
V3 ที่ตรึงมีชีวิตรอดหลังการเก็บที่ 4°C ใน 0.85% ไฮเดียมคลอไรด์ เป็นเวลาอย่างน้อย 3 เดือนและยัง
สามารถย่อยสลายไพรีนและฟีแนนทรีนได้ เซลล์ตรึงสามารถใช้ซ้ำอย่างต่อเนื่องอย่างน้อย 4 รอบ
ในขณะที่ความสามารถในการย่อยสลาย PAHs ทั้งสองชนิดยังคงไม่เปลี่ยนแปลง การบำบัดน้ำเสีย
จากห้องปฏิบัติการที่ปนเปื้อนด้วย PAHs โดย RRM-V3 ที่ตรึงในอัลจิเนต พบว่าฟีแนนทรีนและไพรีน
ในน้ำเสียที่ความเข้มข้น 13.61 และ 13.96 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับหลังจากย่อยสลาย 1 วันเหลือ
ประมาณ 49.09 % และ 74.59 % ตามลำดับ อย่างไรก็ตาม เซลล์ตรึงในเม็ดอัลจิเนตได้ลดลงอย่าง
รวดเร็วภายในหนึ่งวัน สิ่งนี้อาจเนื่องมาจากน้ำเสียยังมีสารอื่นซึ่งมีผลกระทบต่อโครงสร้างของอัลจิเนต

ภาควิชา.....จุลชีววิทยา.....ลายมือชื่อนิสิต.....อภิชาติ ประเวศจรรยา.....
สาขาวิชา.....จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม.....ลายมือชื่ออ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก.....
ปีการศึกษา.....2552.....

5172540923 : MAJOR INDUSTRIAL MICROBIOLOGY

KEYWORDS: Pyrene/Phenanthrene, Alginate, Immobilization

APIRADEE PRAWETCHANYA: IMMOBILIZATION OF BACTERIAL CONSORTIUM RRM-V3 IN ALGINATE FOR PYRENE/ PHENANTHRENE DEGRADATION. THESIS ADVISOR: ASSIST. PROF. KOBCHAI PATTARAGULWANIT, Dr. rer. nat., 90 pp.

Bioaugmentation process for treatment toxic substances in environmental were mostly unsuccessful because of lower survival rate of added microorganisms and loss of degrading capability. Therefore, this research aimed to immobilize a bacterial consortium RRM-V3 using alginate for remediation wastewater contaminated with pyrene and phenanthrene. The optimal conditions for immobilization in alginate were 4%(w/v) sodium alginate, 0.1 M calcium chloride and the initial bacterial cell number about 8 log CFU/ml. RRM-V3 immobilized in alginate degraded pyrene/phenanthrene at the concentration of 0.05, 0.5 and 1g/l at the same rate with those of free RRM-V3 cells. Immobilized RRM-V3 cells could survive after storage at 4°C in 0.85% sodium chloride for at least 3 months and were capable of pyrene/phenanthrene degradation. Immobilized cells could be reused continuously at least 4 cycles whereas the ability to degrade both PAHs remained unchanged. The treatment of PAHs-contaminated laboratory wastewater by alginate-immobilized RRM-V3 revealed that after one day phenanthrene and pyrene at the initial concentration of 13.61 and 13.96 mg/l were degraded to about 49.09 % and 74.59 %, respectively. However, immobilized cells in alginate decreased rapidly within one day. This may be due to the presence of other substances in wastewater which affected alginate structure.

Department Microbiology Student' Signature *Apiradee*
 Field of Study Industrial Microbiology Advisor's Signature *K. Pattaragulwanit*
 Academic Year 2009

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จเสร็จสมบูรณ์ได้ด้วยดีด้วยความช่วยเหลืออย่างดียิ่งของผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. กอบชัย ภัทรกุลวณิชย์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก ที่ได้กรุณาถ่ายทอดความรู้ คำแนะนำ และข้อคิดเห็นต่างๆ ในการแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้ถูกต้องครบถ้วนสมบูรณ์ ตลอดจนความช่วยเหลือในด้านอื่นๆ ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้

กราบขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ สุเทพ ธนียวัน ที่กรุณาให้เกียรติรับเป็นประธานกรรมการในการสอบป้องกันวิทยานิพนธ์ และให้ความรู้ คำแนะนำต่างๆ แก่ผู้วิจัย ตลอดจนช่วยตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้มีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอกราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร.กาญจนา จันทองจีน ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. เอกวัล ลือพร้อมชัย และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อรุณทัย ภิญญาคง เป็นอย่างสูงที่กรุณารับเป็นกรรมการในการสอบป้องกันวิทยานิพนธ์ ตลอดจนให้ความรู้ คำแนะนำต่างๆ และตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้มีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอกราบขอบพระคุณคณาจารย์ทุกท่านในภาควิชาจุลชีววิทยา ที่กรุณาให้ความรู้ และคำแนะนำต่างๆ แก่ผู้วิจัยในการดำเนินงานวิจัย จนสำเร็จลุล่วงด้วยดี

ขอขอบคุณทุนอุดหนุนและส่งเสริมวิทยานิพนธ์ระดับปริญญาโท-เอก ที่ให้ทุนอุดหนุนสำหรับการวิจัย

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ในภาควิชาจุลชีววิทยาทุกท่าน ที่ให้ความช่วยเหลือ ที่อำนวยความสะดวก และให้คำแนะนำต่างๆ ตลอดมา

ขอขอบคุณเพื่อนๆ ร่วมรุ่นทุกคน และพี่ๆ น้องๆ ทุกคน ที่มีส่วนช่วยเหลือในหลายๆ ด้าน ตลอดจนให้คำแนะนำ และข้อคิดต่างๆ ที่มีประโยชน์ต่องานวิจัย

สุดท้ายขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดา และครอบครัวที่ให้การสนับสนุนในการศึกษา และความช่วยเหลือตลอดจนกำลังใจแก่ผู้วิจัยในการศึกษาตลอดมา

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ญ
สารบัญภาพ.....	ฎ
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ.....	ท
บทที่	
1. บทนำ.....	1
2. ปรีทัศน์วรรณกรรม.....	5
2.1 พอลิไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน.....	5
2.2 การสลายตัวและการบำบัดสารประกอบ PAHs ในสิ่งแวดล้อม.....	9
2.3 การย่อยสลายสารประกอบ PAHs โดยจุลินทรีย์.....	10
2.4 วิธีการบำบัดด้วยกระบวนการทางชีวภาพ.....	13
2.5 การตรึงเซลล์รูปเซลล์จุลินทรีย์.....	14
2.6 อัลจิเนต.....	19
3. อุปกรณ์ เคมีภัณฑ์ และวิธีดำเนินการทดลอง.....	24
อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง.....	24
เคมีภัณฑ์ที่ใช้ในการทดลอง.....	25
วิธีดำเนินการวิจัย.....	27
3.1 วิธีดำเนินการทดลอง	
3.1 การเพาะเลี้ยงกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3.....	27
3.2 ตรึงกลุ่มแบคทีเรียด้วยอัลจิเนต.....	27
3.2.1 การเตรียมอัลจิเนต.....	27
3.2.2 การตรึงเซลล์ในอัลจิเนต.....	28
3.3 ภาวะที่เหมาะสมในการตรึงเซลล์.....	28
3.3.1 ความเข้มข้นของโซเดียมอัลจิเนตเท่ากับ 2% น้ำหนักต่อ ปริมาตร และ 4% น้ำหนักต่อปริมาตร.....	28

3.3.2 ความเข้มข้นของแคลเซียมคลอไรด์ เท่ากับ 0.05, 0.1 และ 0.2 โมลาร์.....	28
3.3.3 ปริมาณเซลล์เริ่มต้น เท่ากับ 8 และ 10 log C มิลลิลิตร.....	28
3.4 การคงอยู่ของกลุ่มแบคทีเรียในเม็ดอัลจิเนตและเสถียรภาพ (Stability) ของกลุ่มแบคทีเรียตรึง.....	28
3.4.1 การคงอยู่ของกลุ่มแบคทีเรียในเม็ดอัลจิเนต.....	28
3.4.2 เสถียรภาพของกลุ่มแบคทีเรียตรึง.....	29
3.5 การย่อยสลายไฟรีน/พีแนทรีนด้วยกลุ่มแบคทีเรียตรึง.....	29
3.6 การใช้ซ้ำกลุ่มแบคทีเรียตรึง.....	30
3.7 การศึกษาเซลล์แบคทีเรียตรึงในเม็ดอัลจิเนต.....	30
3.8 การบำบัดน้ำเสียจากห้องปฏิบัติการ.....	31
3.9 การวิเคราะห์.....	31
3.9.1 วิเคราะห์จำนวนแบคทีเรียด้วยวิธี viable plate count.....	31
3.9.2 วิเคราะห์ปริมาณไฟรีนและพีแนทรีน.....	32
4. ผลการทดลอง.....	33
4.1 ความสามารถในการย่อยสลายไฟรีนและพีแนทรีนของกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ในอาหารเหลว CFMM.....	33
4.2 การตรึงกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ด้วยอัลจิเนต.....	37
4.3 การแปรผันปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการขึ้นรูปเจล.....	37
4.3.1 ความเข้มข้นสารละลายแคลเซียมคลอไรด์.....	37
4.3.2 ความเข้มข้นสารละลายโซเดียมอัลจิเนต.....	40
4.3.3 จำนวนเซลล์ที่ใช้ตรึง.....	41
4.4 การย่อยสลายไฟรีน/พีแนทรีนของกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่ตรึงในอัลจิเนต.....	43
4.4.1 ความสามารถในการย่อยสลายไฟรีนและพีแนทรีนความเข้มข้นชนิดละ 0.5 กรัมต่อลิตร โดยกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ตรึงและเซลล์อิสระในอาหารเหลว CFMM.....	48
4.4.2 ความสามารถในการย่อยสลายไฟรีนและพีแนทรีนความเข้มข้นชนิดละ 1 กรัมต่อลิตร โดยกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3	

ตริงและเซลล์อิสระในอาหารเหลว CFMM.....	51
4.5 ความสามารถย่อยสลายไฟรีน/พีแนทรีนโดยกลุ่มแบคทีเรียที่เก็บที่	
เวลาต่างๆ (Stability).....	54
4.6 การใช้กลุ่มแบคทีเรียตริงซ้ำ.....	56
4.7 การบำบัดในน้ำเสียจากห้องปฏิบัติการ.....	58
5. สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง.....	63
รายการอ้างอิง.....	71
ภาคผนวก.....	81
ภาคผนวก ก.....	82
ภาคผนวก ข.....	84
ภาคผนวก ค.....	86
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....	90

สารบัญตาราง

ตาราง		หน้า
2.1	สูตรโครงสร้างและสมบัติทางเคมี-กายภาพของสารประกอบ PAHs.....	7
2.2	ตัวอย่างจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายพีแนทรีนและไพรีน.....	12
2.3	ตัวอย่างเซลล์จุลินทรีย์ตรึงเพื่อสำหรับใช้ในงานด้านสิ่งแวดล้อม	18
4.1	จำนวนกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่เวลาต่างๆ เมื่อใช้กลุ่มแบคทีเรียเริ่มต้นจำนวน 8 และ 10 log CFU ต่อมิลลิลิตร.....	42
4.2	ปริมาณไพรีน/พีแนทรีนในส่วนของอาหารเหลว CFMM ที่เติมเมดิอัลจินต์.....	46
4.3	ลักษณะทางกายภาพ - เคมีของน้ำเสียห้องปฏิบัติการ.....	58

สารบัญภาพ

รูปที่	หน้า
2.1	โครงสร้างโมเลกุลของพีแนทรีน..... 8
2.2	โครงสร้างโมเลกุลของไฟรีน..... 9
2.3	การย่อยสารประกอบ PAHs ด้วยจุลินทรีย์..... 11
2.4	การใช้พันธะโควาเลนต์ (Covalent binding method)..... 15
2.5	การเกาะหรือดูดซับ (Adsorption method)..... 15
2.6	การเชื่อมขวาง (Cross-linking method) 16
2.7	การกักขัง (Entrapment and Encapsulation method)..... 17
2.8	โครงสร้างทางเคมีของอัลจินตประกอบด้วย G-blocks, M-blocks และ MG-blocks G: guluronic acid , M: manuronic acid..... 20
2.9	การก่อรูปเจลเรียกโครงสร้างลักษณะนี้ว่า "กล่องไข่" หรือ egg-box..... 21
4.1	การย่อยสลายไฟรีนและพีแนทรีนในอาหารเหลว CFMM โดยกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3..... 34
4.2	ลักษณะของเม็ดอัลจินตที่ไม่มีกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 (A) และเม็ดอัลจินตที่มี กลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 (B)..... 36
4.3	ลักษณะภายนอกของอัลจินต (A) และโครงสร้างภายในอัลจินต (B) ไม่มี แบคทีเรียตรึง (กำลังขยาย 3,500 เท่า) และโครงสร้างภายนอกของอัลจินต (C) และโครงสร้างภายในของอัลจินต (D) มีแบคทีเรียตรึง (กำลังขยาย 10,000 เท่า)..... 36
4.4	จำนวนกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ในเม็ดอัลจินต เมื่อใช้ความเข้มข้นแคลเซียม คลอไรด์ที่ 0.05 , 0.1 และ 0.2 โมลาร์ ในการขึ้นรูปเม็ดอัลจินต..... 38
4.5	จำนวนกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ในเม็ดอัลจินต หลังการเก็บที่เวลา 0 , 1 และ 3 เดือน..... 39
4.6	ลักษณะของผงโซเดียมอัลจินต..... 40
4.7	ลักษณะสารละลายโซเดียมอัลจินต..... 40
4.8	ลักษณะของเม็ดอัลจินตที่มีกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 เมื่อใช้ความเข้มข้น โซเดียมอัลจินต 2% น้ำหนักต่อปริมาตร..... 41
4.9	ลักษณะของเม็ดอัลจินตที่มีกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ความเข้มข้น ประมาณ 10 log CFU ต่อกรัมเม็ดอัลจินต..... 42

4.10	การย่อยไพรีน/พีแนทรีนที่ความเข้มข้น 0.05 กรัมต่อลิตรโดยกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 เซลล์ตรึง.....	45
4.11	การย่อยไพรีน/พีแนทรีนที่ความเข้มข้น 0.05 กรัมต่อลิตรโดยกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 เซลล์อิสระ.....	45
4.12	ลักษณะโครงสร้างผิวภายนอกของอัลจิเนต (A) ก่อนใช้งาน และ (B) ผ่านการใช้งานแล้วเป็นเวลา 5 วัน (กำลังขยาย 3,500 เท่า).....	47
4.13	ลักษณะโครงสร้างภายในอัลจิเนต (A) ก่อนใช้งาน และ (B) ผ่านการใช้งานแล้วเป็นเวลา 5 วัน (กำลังขยาย 3,500 เท่า).....	47
4.14	การย่อยไพรีน/พีแนทรีนที่ความเข้มข้น 0.5 กรัมต่อลิตรโดยกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 เซลล์ตรึง.....	50
4.15	การย่อยไพรีน/พีแนทรีนที่ความเข้มข้น 0.5 กรัมต่อลิตรโดยกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 เซลล์อิสระ.....	50
4.16	การย่อยไพรีน/พีแนทรีนที่ความเข้มข้น 1 กรัมต่อลิตรโดยกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 เซลล์ตรึง.....	53
4.17	การย่อยไพรีน/พีแนทรีนที่ความเข้มข้น 1 กรัมต่อลิตรโดยกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 เซลล์อิสระ.....	53
4.18	ปริมาณไพรีน/พีแนทรีนที่เหลืออยู่และจำนวนกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ตรึงที่เก็บเป็นเวลา 0 เดือน (A) 1 เดือน (B) และ 3 เดือน (C).....	55
4.19	การย่อยไพรีน/พีแนทรีนความเข้มข้น 0.05 กรัมต่อลิตรโดยกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ตรึงที่ใช้ซ้ำ.....	57
4.20	ปริมาณไพรีนและพีแนทรีนที่เหลืออยู่และจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดในน้ำเสียห้องปฏิบัติการที่เติมกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ตรึงด้วยอัลจิเนต (ชุดทดลองที่ 1).....	60
4.21	ปริมาณไพรีนและพีแนทรีนที่เหลืออยู่และจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดในน้ำเสียห้องปฏิบัติการที่เติมกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 เติรมสด (ชุดทดลองที่ 2).....	61
4.22	ลักษณะโครงสร้างภายนอกอัลจิเนต ก่อนใช้บำบัดน้ำเสียห้องปฏิบัติการ (A) และ วันที่ 3 หลังการบำบัด (B) (กำลังขยาย 3,500 เท่า).....	62
4.23	ลักษณะโครงสร้างภายในอัลจิเนต ก่อนใช้บำบัดน้ำเสียห้องปฏิบัติการ (A) และ วันที่ 3 หลังการบำบัด (B) (กำลังขยาย 3,500 เท่า).....	62

	หน้า
5.1 ลักษณะโคโคโคนี้ในตัวอย่างน้ำเสียห้องปฏิบัติการทดสอบบนจานอาหาร LB	68
ค. 1 กราฟมาตรฐานระหว่างปริมาณพีแนทรีนกับพื้นที่ใต้กราฟที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟี.....	86
ค. 2 กราฟมาตรฐานระหว่างปริมาณไพรีนกับพื้นที่ใต้กราฟที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟี.....	87
ค. 3 โครมาโตแกรมพีแนทรีนและไพรีนที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟี (Retention time ของพีแนทรีนประมาณ 9.973 นาที และRetention time ของไพรีนประมาณ 15.629นาที).....	88
ค. 4 โครมาโตแกรมของตัวอย่างน้ำเสียห้องปฏิบัติการที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟี (Retention time ของพีแนทรีนประมาณ 9.934 นาที และ Retention time ของไพรีนประมาณ 15.547 นาที).....	89

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

CFU = colony forming unit

% = เปอร์เซ็นต์

% w/v = เปอร์เซ็นต์น้ำหนักต่อปริมาตร

มล. = มิลลิลิตร

มก. = มิลลิกรัม

°ซ = องศาเซลเซียส

: = อัตราส่วน