บทที่ 2

ปริทัศน์วรรณกรรม

2.1 พอลิไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน

สารประกอบพอลิไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน (Polycyclic Aromatic Hydrocarbon , PAHs) เป็นสารประกอบที่อยู่ภายใต้การควบคุมของหน่วยงานคุ้มครองสิ่งแวดล้อมของประเทศสหรัฐอเมริกา (The U.S. Environmental Protection Agency, EPA) เนื่องจากมีความเป็นพิษสูง PAHs เป็นส่วนประกอบหนึ่งในน้ำมันดิบ (crude oil) ซึ่งองค์ประกอบหลักประกอบด้วยสารประกอบไฮโดรคาร์บอนมากกว่า 100 ชนิด จำแนกออกเป็นกลุ่มใหญ่ๆได้ 4 กลุ่ม ได้แก่ เรซิน (resin), แอสฟัลทีน (asphaltene), อัลเคน (alkane) และสารประกอบไฮโดรคาร์บอนที่มีวงเบนซีน (aromatic hydrocarbon) (Lal และ Khanna, 1996) ในรายงานของ Thorn และ Aiken (1998) วิเคราะห์องค์ประกอบของน้ำมันดิบบริเวณรัฐมิเนโซต้า ประเทศสหรัฐอเมริกา ด้วยนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโตรสโคปี (NMR) พบว่าสัดส่วนขององค์ประกอบแต่ละชนิดมีค่าแตกต่างกันดังนี้ อัลเคนมีสัดส่วนเท่ากับ 58-61 เปอร์เซ็นต์ และสารประกอบไฮโดรคาร์บอนที่มีวงเบนซีนมีสัดส่วนเท่ากับ 33-36 เปอร์เซ็นต์ ทั้งสององค์ประกอบนี้มีสัดส่วนมากกว่าเรซินและแอสฟัลทีนที่มีสัดส่วนเท่ากับ 4-6 เปอร์เซ็นต์ และ 1-2 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

PAHs มีโครงสร้างเป็นสารอินทรีย์ที่ประกอบด้วยวงแหวนเบนซีน ตั้งแต่ 2 วงขึ้นไปมาจับกัน มีการจัดเรียงตัวของวงแหวนเบนซีนได้หลายรูปแบบ คือ เส้นตรง มุมงอ และจับเป็นกลุ่ม เป็นสารระเหยยากไม่มีขั้ว มีสมบัติละลายน้ำได้น้อย (hydrophobic) แต่ละลายได้ดีในตัวทำละลายอินทรีย์ เช่น แอลกอฮอล์ เบนซีน อีเทอร์ โทลูอีน ไซลีน เมทิลลีนคลอไรด์ คลอโรฟอร์ม และคาร์บอนซัลไฟล์ (ศรัณยา คุ้มวงษา , 2543) ความสามารถในการละลายน้ำจะลดลงเมื่อมีน้ำหนักโมเลกุลมากขึ้น ทำให้มีความทนทานต่อการย่อยสลาย PAHs บริสุทธิ์มักอยู่ในรูปของแข็งเป็นผงหรือผลึก มีทั้งสีขาว เหลือง เขียว หรือไม่มีสี และเป็นสารที่ไม่ติดไฟง่าย (เหมือนดาว คุณณะ, 2544)

สารประกอบ PAHs แบ่งออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ ได้แก่ กลุ่มที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ (low molecular weight , LMW) ซึ่งโครงสร้างประกอบด้วยวงแหวนเบนซีนน้อยกว่า 4 วง และกลุ่มที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง (high molecular weight , HMW) ซึ่งเป็นสารที่มีวงแหวนเบนซีนมากกว่า 4 วงขึ้นไป (Hati, 2009) จัดอยู่ในกลุ่มสารที่มีสมบัติเป็นสารก่อมะเร็ง (carcinogenic) และเป็นสารที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรม (mutagen) เนื่องจากเมื่อเข้าสู่ร่างกาย ร่างกายจะเกิด

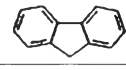
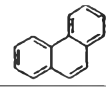
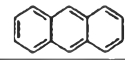
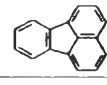
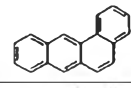
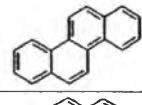
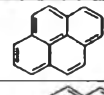
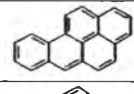
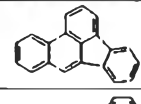
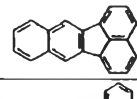
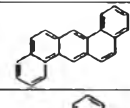
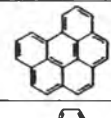
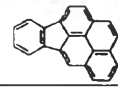
กระบวนการเมแทบอไลซ์ด้วยเอนไซม์เปลี่ยนเป็นสารไดไฮโดรไดออลและอนุพันธ์อีพอกไซด์ ซึ่งจะจับกับดีเอ็นเอรวมทั้งโปรตีนจนนำไปสู่การเปลี่ยนแปลงของเซลล์ในที่สุด (Liguori, 2006) สารประกอบ PAHs บางชนิด เช่น เบนโซ (เอ) แอนทราซีน , เบนโซ [เอ] ไพรีน และไดเบนซ์ (เอ ,เอช) แอนทราซีน จัดเป็นสารปนเปื้อนร้ายแรงเนื่องจากโครงสร้างมีความเสถียรมาก เกิดการย่อยสลายได้ยากและตกค้างในสิ่งแวดล้อมเป็นระยะเวลานาน (ATSDR , 1995) จึงทำให้เกิดความเป็นพิษต่อสิ่งมีชีวิตในระยะยาว มีรายงานพบว่า PAHs ทั้งสามชนิดเป็นสารก่อมะเร็งในสัตว์ทดลองหลายชนิด ในการทดลองเกี่ยวกับผลกระทบด้านอื่นๆต่อมนุษย์ พบว่าสารประกอบ PAHs มีผลทำให้เกิดความผิดปกติต่อระบบไหลเวียนโลหิต ระบบทางเดินอาหาร ผิวหนัง เป็นต้น (ATSDR , 1995) นอกจากผลกระทบต่อมนุษย์แล้วสารประกอบ PAHs อาจสะสมบริเวณตะกอนดินก้นแม่น้ำซึ่งเป็นสาเหตุสำคัญในการแพร่กระจายไปสู่สิ่งมีชีวิตในแหล่งน้ำโดยตรง (Boonyatumanond และคณะ, 2006) จากการศึกษาของ Monteiro และคณะ (2000) พบว่าสารประกอบ PAHs มีผลรบกวนระบบต่อมไร้ท่อในปลา โดยปริมาณที่มีการสะสมจะมากหรือน้อยขึ้นอยู่กับค่า bioavailability ของสารประกอบ PAHs ปริมาณสารมากน้อยเพียงใดและลักษณะทางสรีรวิทยาของสิ่งมีชีวิตชนิดนั้น อัตราการดูดซึมอาหารเข้าสู่ร่างกาย การซึมของน้ำผ่านเนื้อเยื่อ อัตราการแลกเปลี่ยนอากาศ อัตราการเจริญเติบโต ขนาดของสิ่งมีชีวิต ระยะเวลาที่อาหารอยู่ในท่อทางเดินอาหาร และการควบคุมกำกับความเข้มข้นของสารละลายภายนอกและภายในเซลล์ สิ่งเหล่านี้ล้วนเป็นกระบวนการทางชีววิทยาของสิ่งมีชีวิตที่ใช้ในการรับสารประกอบ PAHs เข้ามาสะสมอยู่ในตัว (Meador และคณะ, 1995)

การปนเปื้อนของ PAHs เข้าสู่สิ่งแวดล้อมมีสาเหตุหลักอยู่ 2 ประการ คือ การปนเปื้อนตามธรรมชาติ เช่น การรั่วไหลของแหล่งน้ำมันดิบ การชะผิวดินบริเวณที่เกิดไฟไหม้ป่า ภูเขาไฟระเบิด ฯลฯ และการปนเปื้อนที่เกิดจากการกระทำของมนุษย์ เช่น เกิดจากการเผาไหม้ที่ไม่สมบูรณ์ของสารอินทรีย์และน้ำมันเชื้อเพลิง (Cerniglia, 1992) ควันจากบุหรี่หรือยาสูบ (Gundell และคณะ, 1996 การปิ้งหรือย่างอาหารที่มีไขมันเป็นองค์ประกอบโดยใช้ความร้อนสูง (Boogaard, 2008) เกิดจากการรั่วไหลของถังเก็บหรือท่อส่งน้ำมัน (Wilson และ Jones,1993) น้ำทิ้งในโรงงานกลั่นน้ำมันหรือของเสียที่เกิดจากผลิตภัณฑ์ปิโตรเลียม (Seo และคณะ, 2009) เป็นต้น แหล่งที่พบการปนเปื้อนสามารถพบได้อยู่ทั่วไปในธรรมชาติ ได้แก่ อากาศ ผิวน้ำ ตะกอนดิน อาหาร เนื้อเยื่อชั้นไขมันทั้งสิ่งมีชีวิตที่อาศัยบนบกและในน้ำ (Juhasz และ Naidu, 2000) PAHs จัดเป็นสารที่มีอันตรายต่อสิ่งมีชีวิต เนื่องจาก PAHs บางชนิดมีสมบัติในการเป็นสารก่อมะเร็ง (carcinogens) หรือเป็นสารก่อกลายพันธุ์ (mutagens) (Boonyatumanond และคณะ, 2006) ดังนั้นหน่วยงานคุ้มครองสิ่งแวดล้อมของประเทศสหรัฐอเมริกา (The U.S. Environmental Protection Agency ,

US-EPA) จึงมีการกำหนดให้ PAHs 16 ชนิด เป็นสารพิษที่ควรให้ความสำคัญในอันดับต้น ดังแสดงในตารางที่ 2.1

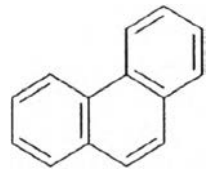
ตารางที่ 2.1 สูตรโครงสร้างและสมบัติทางเคมี-กายภาพของสารประกอบ PAHs

(Bojes และ Pope, 2007)

ชนิดของ PAHs	โครงสร้าง	น้ำหนักโมเลกุล (g/mol)	ค่าการละลายน้ำ(mg/l)	ค่าความดันไอ (mm Hg)
แนพทาลีน		128.17	31	8.89 E-02
อะซีแนพธีน		154.21	3.8	3.75 E-03
อะซีแนพธิลีน		152.20	16.1	2.90 E-02
ฟลูออรีน		178.23	0.045	2.55 E-05
ฟีแนนทรีน		178.23	1.1	6.80 E-04
แอนทราซีน		166.22	1.9	3.24 E-03
ฟลูออแรนธีน		202.26	0.26	8.13 E-06
เบนโซ(เอ)แอนทราซีน		228.29	0.011	1.54 E-07
ไครซีน		228.29	0.0015	7.80 E-09
ไพรีน		202.26	0.132	4.25 E-06
เบนโซ(เอ)ไพรีน		252.32	0.0038	4.89 E-09
เบนโซ(บี)ฟลูออแรนธีน		252.32	0.0015	8.06 E-08
เบนโซ(เค)ฟลูออแรนธีน		252.32	0.0008	9.59 E-11
ไดเบนซ์(เอ,เอช)แอนทราซีน		278.35	0.0005	2.10 E-11
เบนโซ(จี,เอช,ไอ)เพอริลีน		276.34	0.00026	1.00 E-10
อินดิโน-(1,2,3,ซีดี)ไพรีน		276.34	0.062	1.40 E-10

2.1.1 **ฟีแนนทรีน** (Phenanthrene)

ฟีแนนทรีน เป็นสารประกอบอินทรีย์จัดอยู่ในกลุ่มพอลิไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน โครงสร้างโมเลกุลประกอบด้วยวงเบนซีน 3 วงเชื่อมต่อกันเป็นมุม (angular arrangement) ดังแสดงในรูปที่ 2.1

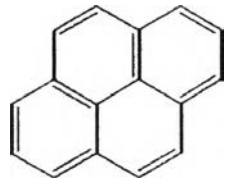


รูปที่ 2.1 **โครงสร้างโมเลกุลของฟีแนนทรีน** (Robin และคณะ, 2004)

สมบัติของฟีแนนทรีนเมื่ออยู่ในสถานะของแข็งจะมีผลึกสีขาว (U.S. EPA, 1987) ละลายน้ำได้น้อย (น้อยกว่า 1 มิลลิกรัมต่อลิตรที่ 26 องศาเซลเซียส) ละลายได้ปานกลางในแอลกอฮอล์ (ละลายในเอทานอลได้มากกว่า 100 มิลลิกรัมต่อลิตรที่ 26 องศาเซลเซียส) ละลายได้ดีในตัวทำละลายอินทรีย์เช่น เบนซีน คลอโรฟอร์ม โทลูอีน อีเทอร์ คาร์บอนไดซัลไฟด์ และกรดอะซีติก (Verschueren, 1977) ฟีแนนทรีนนำไปใช้ในอุตสาหกรรมเกี่ยวกับการผลิตสีย้อม วัตถุระเบิด รวมถึงใช้ในงานวิจัยด้านชีววิทยา มนุษย์สามารถได้รับฟีแนนทรีนจากการหายใจเอาควันจากการเผาไหม้เชื้อเพลิงยานพาหนะ ทางการกินดื่มอาหารที่มีการปนเปื้อน รวมทั้งได้รับจากการสัมผัสโดยตรงผ่านทางผิวหนัง (ATSDR, 1995) มีรายงานว่าฟีแนนทรีนจะถูกดูดซึมเข้าไปในระบบทางเดินอาหาร ปอด และด้วยสมบัติที่ละลายในไขมันได้จึงสามารถผ่านเยื่อบุผนังเซลล์ต่างๆได้ (US-EPA, 1987)

2.1.2 **ไพรีน** (Pyrene)

ไพรีนมีชื่อทางเคมีว่าเบนโซ [ดี,อี,เอฟ] ฟีแนนทรีน (benzo[*d*,e,*f*]phenanthrene) เป็นสารประกอบอินทรีย์จัดอยู่ในกลุ่มพอลิไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน โครงสร้างโมเลกุลประกอบด้วยวงแหวนเบนซีน 4 วงเชื่อมต่อกันเป็นกลุ่ม (cluster) ดังแสดงในรูปที่ 2.2



รูปที่ 2.2 **โครงสร้างโมเลกุลของไพรีน** (Habe และ Omori, 2003)

สมบัติของไพรีนเมื่ออยู่ในสถานะของแข็งจะมีผลึกสีเหลืองอ่อน มีโครงสร้างโมเลกุลที่เสถียร ละลายน้ำได้น้อยมาก จึงทำให้ทนทานต่อการย่อยสลาย ไพรีนจะละลายในน้ำได้ดีในช่วง 2-3 ชั่วโมงแรกและการละลายจะลดลงตามเวลาจนไม่ละลายเมื่อผ่านไปประมาณ 100 วัน (Trzesicka-Mlynarz และ Ward, 1996; Verschueren, 1997) ไพรีนละลายในตัวทำละลายอินทรีย์เช่น เมทานอล เฮกเซน อะซีโตนได้ดีแตกต่างกัน (Patnaik, 1992) ไพรีนเป็นตัวอย่างที่นิยมใช้เป็นตัวแบบสำหรับการศึกษาในกลุ่มสาร PAHs ที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง (High Molecular Weigth : HMW) เนื่องจากไพรีนจะเกาะติดกับอนุภาคของดินได้ดี ดังนั้นจุลินทรีย์ในดินจึงนำไปใช้ประโยชน์ (bioavailability) ได้น้อย ทำให้ไพรีนสะสมและมีความเสถียรอยู่ในสิ่งแวดล้อมได้เป็นเวลานาน (Johnsen และคณะ, 2005)

2.2 การสลายตัวและการบำบัดสารประกอบ PAHs ในสิ่งแวดล้อม

สารประกอบ PAHs อาจพบการปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อมใน ดิน ตะกอนดิน น้ำ ฝุ่นละออง พืช และอากาศ การกำจัดสารพิษตกค้างนั้นสามารถทำได้หลายวิธีเช่นการสลายตามธรรมชาติโดยอาศัยกระบวนการทางกายภาพ ประกอบด้วย การระเหยกลายเป็นไอ (volatization) ปฏิกิริยาการออกซิเดชั่นของแสง (photooxidation) การตกตะกอนและถูกดูดซับในอนุภาคของดิน (adsorption) และการสะสมอยู่ภายในสิ่งมีชีวิต (bioaccumulation) การบำบัดด้วยกระบวนการทางเคมี เช่น การใช้โอโซนและการใช้สารเคมี สารเคมีที่มีสมบัติทำให้เกิดอนุมูลไฮดรอกซิล (hydroxyl radicles : $(OH)^{\cdot}$) ซึ่งจะสามารถแตกสลายสารประกอบ PAHs ได้เช่น ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) (Nadarajah และคณะ, 2002) แต่การใช้วิธีทางเคมีนั้นมีข้อจำกัด คือ การใช้สารเคมีที่มีฤทธิ์ต้านกับสารพิษแล้วให้ทำปฏิกิริยากันเพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่ไม่เป็นอันตรายกับ

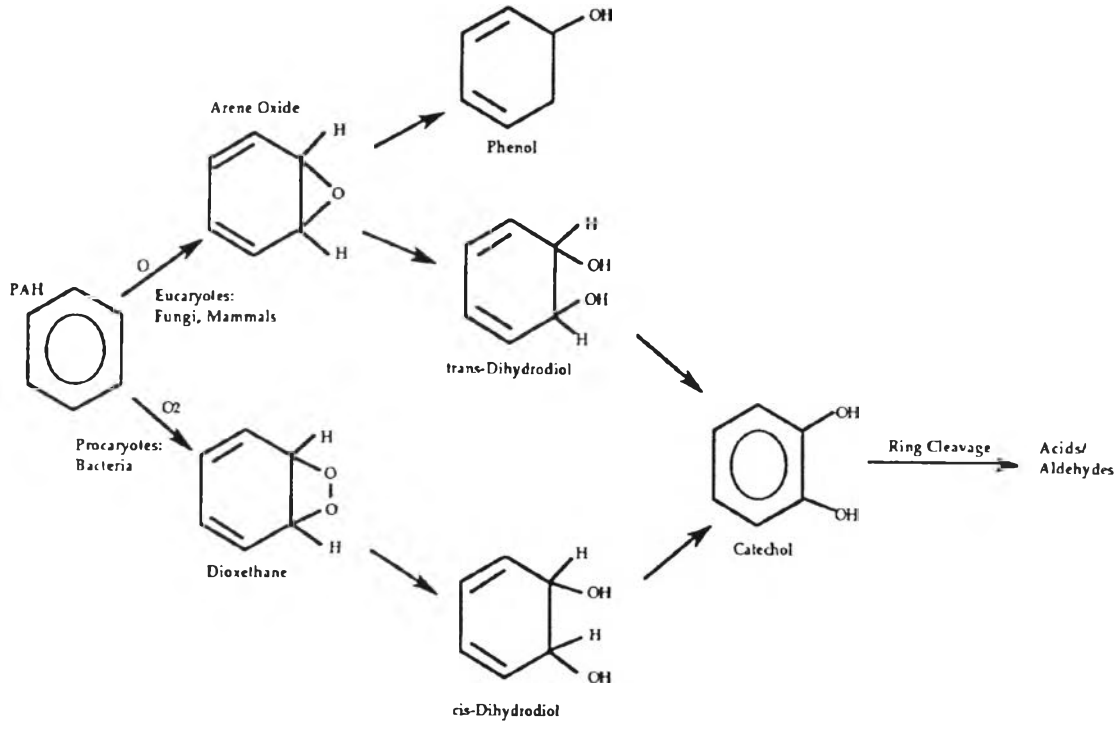
มนุษย์ และไม่มีสารพิษตกค้างอาจจะต้องเสียค่าใช้จ่ายสูงขึ้น ปัจจุบันจึงนิยมใช้การบำบัดด้วยกระบวนย่อยสลายทางชีวภาพ (Bioremediation) เนื่องจากเป็นวิธีที่สะดวก เสียค่าใช้จ่ายน้อย และไม่ก่อให้เกิดปัญหามลพิษตามมา (Alexander,1994)

กระบวนการย่อยสลายทางชีวภาพ (bioremediation) เป็นทางเลือกหนึ่งในการช่วยลดความเป็นพิษของสารประกอบ PAHs และกากของเสียอันตรายอื่นๆโดยการย่อยสลายสารพิษด้วยจุลินทรีย์ มีจุดประสงค์เพื่อต้องการให้จุลินทรีย์ย่อยสลายสารประกอบ PAHs จุลินทรีย์จะสามารถใช้สารปนเปื้อนเป็นแหล่งอาหาร แหล่งคาร์บอนและพลังงานสำหรับใช้ในการเจริญเติบโตและดำรงชีวิต (Maria, 1999; Dua และคณะ, 2002) สารประกอบ PAHs บางชนิดสามารถถูกย่อยได้อย่างสมบูรณ์จนได้คาร์บอนไดออกไซด์ น้ำและพลังงานในการเจริญของจุลินทรีย์เรียกว่า mineralization หรือสารประกอบ PAHs บางชนิดอาจเกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างบางส่วนเพื่อเป็นสารประกอบที่มีโครงสร้างโมเลกุลเล็กลงและมีความเป็นพิษลดลงเรียกว่า biotransformation เป็นพวกที่ได้สารมัธยันตร์ (intermediate) เกิดขึ้นหรือได้สารที่เป็น dead-end เกิดขึ้นก็ได้ ซึ่งกระบวนการข้างต้นนี้อาจเกิดขึ้นโดยจุลินทรีย์ชนิดเดียวหรือโดยกลุ่มจุลินทรีย์ (Gibson และ Subraman, 1984)

2.3 การย่อยสลายสารประกอบ PAHs โดยจุลินทรีย์

จุลินทรีย์หลายชนิดเช่น แบคทีเรีย รา ในธรรมชาติที่มีความสามารถในการย่อยสลายสารประกอบ PAHs ดังแสดงในตารางที่ 2.2 มักจะพบบริเวณที่มีการปนเปื้อนเป็นส่วนมาก เนื่องจากจุลินทรีย์บริเวณนั้นต้องมีการปรับตัวเพื่อให้สามารถย่อยสลายสารดังกล่าวได้ (Wilson และ Jones, 1993) ส่วนใหญ่แล้วจุลินทรีย์เหล่านี้จะมีการย่อยสลายแบบใช้ออกซิเจน (aerobic biodegradation) วิถีการย่อยสลายจะเกิดขึ้นโดยมีการชักนำให้สร้างเอนไซม์ที่จำเพาะต่อสารตั้งต้น วิถีการย่อยสลายสารประกอบ PAHs ในแบคทีเรียและราใช้วิถีการย่อยสลายที่แตกต่างกันดังแสดงในรูปที่ 2.3 จากรูปจะเห็นว่าราใช้เอนไซม์ชนิดโนออกซิจีเนส (monooxygenase) มีการเติมออกซิเจน 1 อะตอมเข้าไปยังวงอะโรมาติกได้เป็นแอรีนออกไซด์ จากนั้นจึงเติมไฮโดรเจนและหมู่ไฮดรอกซิลโดยอีพอกไซด์ไฮโดรเลส ได้เป็นทรานส์ไดไฮโดรไดออล หรืออีกวิถีหนึ่งจัดเรียงเป็นฟีนอล ในขณะที่แบคทีเรียเริ่มต้นโดยการเกิดออกซิเดชันโดยใช้ไดออกซิจีเนส (dioxygenase) ซึ่งเร่งปฏิกิริยาการตรึงออกซิเจน นำออกซิเจนเข้ามายังวงอะโรมาติกได้เป็น ซิส-ไดไฮโดรไดออล แล้วจึงถูกย่อยสลายต่อได้เป็น คะทีคอล โดยเอนไซม์ ซิส-ไดไฮโดรไดออลดีไฮโดรจีเนส ปฏิกิริยาการเติมหมู่ไฮดรอกซิล (hydroxylation) ทั้งสองให้กับสารประกอบ PAHs ถือเป็นปฏิกิริยาขั้นต้นของการเปิดวงอะโรมาติก และการเปิดวงอะโรมาติกเกิดได้ 2 วิถีคือแบบออโธ (intradiol pathway) ที่

เกิดขึ้นระหว่างอะตอมคาร์บอนที่มีกลุ่มไฮดรอกซิล 2 อะตอมที่อยู่ติดกัน ปลี่ยนเป็นกรด ซิส,ซิส-มิวโคนิก หรืออีกวิถีหนึ่งผ่านทางการแตกวงเบนซีนแบบเมตา (extradiol pathway) ที่เกิดขึ้นระหว่างอะตอมคาร์บอนที่มีกลุ่มไฮดรอกซิลและอะตอมคาร์บอนที่มีกลุ่มไฮดรอกซิลอยู่ถัดไป ได้เป็น สอง-ไฮดรอกซีมิวโคนิกเซมิอัลดีไฮด์



รูปที่ 2.3 **การย่อยสารประกอบ PAHs ด้วยจุลินทรีย์** (Wilson และ Jones, 1993)

ตารางที่ 2.2 ตัวอย่างจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายฟีแนนทรีนและไพรีน

สาร PAHs	จุลินทรีย์	เอกสารอ้างอิง
ฟีแนนทรีน	แบคทีเรีย	
	Sphingomonas sp.	(Zhao และคณะ, 2009)
	Pseudomonas mendocina	(Tian และ Zhong, 2002)
	Mycobacterium sp.	(Miller และคณะ, 2004)
	Nocardioides sp.	(Iwabuchi และคณะ, 1998)
	Burkholderia sp.	(Kang และคณะ, 2003)
	Staphylococcus sp.	(Mallick และ Dutta, 2008)
	รา	
	Penicillium sp.	(Leitao, 2009)
ไพรีน	แบคทีเรีย	
	Rhodococcus sp.	(Pizzul และคณะ, 2006)
	Mycobacterium vanbaalenii	(Kim และคณะ, 2004)
	Cycloclasticus sp.	(Wang และคณะ, 2008)
	Sphingomonas sp.	(Mutnuri และคณะ, 2005)
	Burkholdoria cepacia	(Kim และคณะ, 2004)
	รา	
	Trichoderma harzianum	(Ravalet และคณะ, 2000)
	Mucor racemosus	
	Fusarium solani	
	Cylindrocarpon didymium	(Romero และคณะ, 2002)
	Pennicilium sp.	

2.3.3 กลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3

ในงานวิจัยนี้จะใช้กลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ซึ่งจิรทีปฆ์ แสนรัก (2547) คัดแยกกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ได้จากใบจามจุรี ซึ่งเป็นใบไม้ของพืชในวงศ์ Leguminosae (พืชตระกูลถั่ว) และเป็นพืชที่ปลูกมากในประเทศไทย (วรัษยา สุนทรศารทูล, 2542) พบว่ากลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายไพรีนความเข้มข้น 100 มก.ต่อลิตร ได้หมดภายใน 14 วัน โดยย่อยสลายไพรีนเฉลี่ยสูงสุด 14.83 มก.ต่อลิตรต่อวัน นอกจากนี้กลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ยังสามารถย่อยสลายสารประกอบ PAHs ชนิดอื่นได้อีกหลายชนิด โดยสามารถลดปริมาณของอะซีแนพธีน ฟลูออรีน ฟีแนนทรีนและฟลูออแรนทีนได้เป็นจำนวน 100, 98, 99 และ 34 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ภายในเวลา 14 วัน แต่ อะซีแนพธิลีนทำให้กลุ่มแบคทีเรียนี้ตายหมด กลุ่มแบคทีเรียนี้สามารถแยกเชื้อบริสุทธิ์ได้อย่างน้อย 7 ชนิดซึ่งผลทางสัณฐานวิทยาและชีวเคมีสามารถจัดอยู่ใน 4 สกุล ได้แก่ *Comamonas*, *Rugamonas*, *Flavimonas*, *Pseudomonas* และส่วนที่เหลือไม่สามารถจำแนกได้จำนวน 1 ชนิด โดยเป็นแบคทีเรียแกรมลบทั้งหมด

2.4 วิธีการบำบัดด้วยกระบวนการทางชีวภาพ

เทคโนโลยีในการบำบัดทางชีวภาพมีหลายวิธีดังตัวอย่างเช่น (Trejo และ Quintero, 2000)

Bioaugmentation	เป็นวิธีที่มีการเติมจุลินทรีย์ที่ทดสอบแล้วว่ามีประสิทธิภาพในการย่อยสลายสารพิษลงไปในบริเวณที่มีการปนเปื้อน
Biostimulation	เป็นวิธีที่มีการเติมสารอาหารหรือปัจจัยต่างๆที่จำเป็นต่อการเจริญของจุลินทรีย์ลงไปในบริเวณที่มีการปนเปื้อนเพื่อกระตุ้นให้จุลินทรีย์ประจำถิ่นมีการเพิ่มจำนวนและมีกิจกรรมในการย่อยสลายสารพิษได้ดีขึ้น
Biofilters	เป็นวิธีที่มีการใช้คอลัมน์ยาวที่มีจุลินทรีย์อยู่ภายในเพื่อบำบัดสารปนเปื้อนที่กระจายออกสู่บรรยากาศ
Bioreactor	เป็นวิธีการย่อยสลายในถังหมัก
Bioventing	เป็นวิธีการบำบัดแหล่งที่ปนเปื้อนโดยมีการให้อากาศและให้สารอาหารเพื่อกระตุ้นการเจริญและกิจกรรมการย่อยสลายของจุลินทรีย์ประจำถิ่น
Composting	เป็นวิธีการบำบัดโดยใช้ออกซิเจนและอุณหภูมิสูงร่วมกับการเติมปุ๋ยหมักหรือวัสดุทางการเกษตรเพื่อเป็นวัสดุค้ำจุนการเจริญของจุลินทรีย์
Landfarming	เป็นวิธีการบำบัดแหล่งที่มีการปนเปื้อนโดยการขุดดินหรือปั๊มน้ำขึ้นมาแล้วปล่อยให้มีการย่อยสลายของจุลินทรีย์แบบใช้อากาศ (aerobic)

การบำบัดสารประกอบ PAHs ทางชีวภาพด้วยวิธีการเติมสารอาหารลงไป หรือวิธี biostimulation เช่น ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส แหล่งคาร์บอน การให้ออกซิเจน ลงในบริเวณที่ปนเปื้อน เพื่อช่วยกระตุ้นให้จุลินทรีย์ประจำถิ่นเจริญเติบโต นอกจากนี้การเติมสารลดแรงตึงผิว ยังเป็นการเพิ่มการละลายของสารประกอบไฮโดรคาร์บอนลงในบริเวณที่ปนเปื้อนสารพิษ ทำให้จุลินทรีย์สามารถนำไปใช้ได้ง่ายยิ่งขึ้น จึงทำให้อัตราการย่อยสลายสารพิษมีค่าสูงขึ้น (Robles-Gonzalez และคณะ, 2008) แต่วิธีการบำบัดด้วยวิธีนี้มีข้อเสียคือ อาจจะไม่มีจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายสารประกอบ PAHs ในบริเวณที่ต้องการบำบัด หรือจุลินทรีย์ประจำถิ่นเองอาจมีปริมาณน้อยไม่เพียงพอที่จะกำจัดสารพิษให้หมดไปจากสิ่งแวดล้อมได้ (Vidali, 2001) ดังนั้นจึงได้ใช้การบำบัดทางชีวภาพที่มีประสิทธิภาพอีกวิธีหนึ่งคือ การนำเอาจุลินทรีย์ต่างถิ่นที่มีความสามารถในการย่อยสลายสารประกอบ PAHs จากแหล่งอื่นไปใช้บำบัด โดยการเติมลงไปในแหล่งปนเปื้อนอื่นหรือวิธี Bioaugmentation การบำบัดด้วยวิธีนี้จำเป็นต้องคำนึงถึงปัจจัยทางความสมดุลของสภาพแวดล้อมที่เหมาะสมต่อการเจริญและต่อปฏิกิริยาของเอนไซม์ในการย่อยสลาย เช่น สารอาหาร ความเข้มข้นของสารประกอบ PAHs ความชื้น ความเป็นกรด-ด่าง อุณหภูมิ ออกซิเจน การไม่มีสารพิษในระบบที่เกิดจากสารมัธยันต์ที่เกิดขึ้นระหว่างการย่อยสลาย รวมทั้งภาวะการแก่งแย่งแข่งขันของจุลินทรีย์ต่างถิ่นที่เติมลงไปกับจุลินทรีย์ประจำถิ่นมีน้อย (Trejo และ Quintero, 2000)

สภาวะแวดล้อมที่เหมาะสมถือว่าเป็นปัจจัยสำคัญที่สุดในการบำบัดสารประกอบ PAHs ดังนั้นเพื่อให้การบำบัดด้วยวิธีการเติมจุลินทรีย์มีประสิทธิภาพมากขึ้น จึงได้มีการศึกษาหาวิธีที่จะเพิ่มการอยู่รอดและเพิ่มประสิทธิภาพการย่อยสลายสารประกอบ PAHs ของจุลินทรีย์ที่เติมลงไปในระบบบำบัด วิธีหนึ่งคือการตรึงเซลล์หรือเอนไซม์บนวัสดุพาหะ โดยจะสามารถลดปัญหาดังกล่าวได้ (Cassidy และคณะ, 1996)

2.5 การตรึงรูปเซลล์จุลินทรีย์

การตรึงเซลล์จุลินทรีย์ เป็นการประยุกต์มาจากวิธีการตรึงเอนไซม์ โดยเซลล์จุลินทรีย์ถูกตรึงให้อยู่ในขอบเขตที่จัดไว้ (Immobilized cells) เป็นการจำกัดขอบเขตหรือบริเวณของเซลล์ โดยที่เซลล์จุลินทรีย์ยังคงสมบัติในการผลิตเอนไซม์ได้เช่นเดิม และยังสามารถนำเซลล์จุลินทรีย์ที่ถูกตรึงนี้กลับมาใช้ใหม่และใช้ได้อย่างต่อเนื่อง

2.5.1 **วิธีตรึงรูปเซลล์จุลินทรีย์**

การตรึงรูปเซลล์จุลินทรีย์ สามารถจำแนกโดยอาศัยชนิดของปฏิกิริยาระหว่างเซลล์กับตัวพยุง และธรรมชาติของตัวพยุงเอง ทำให้สามารถแบ่งวิธีตรึงรูปเซลล์ออกเป็น 3 วิธี ประกอบด้วย

1. การยึดด้วยตัวนำ (Carrier-binding method)

เป็นการเชื่อมเซลล์จุลินทรีย์กับสารพาหะโดยตรง แบ่งออกเป็น 2 วิธีได้แก่

1.1 การเชื่อมด้วยพันธะโควาเลนต์ (Covalent binding method)

เป็นวิธีการเชื่อมต่อโดยตรงกับสารพาหะด้วยพันธะโควาเลนต์ โดยสารที่ใช้เป็นตัวเชื่อมจะต้องมีส่วนประกอบที่สามารถยึดกับเซลล์ ได้แก่ กลุ่มอะมิโน กลุ่มคาร์บอกซิล กลุ่มไฮดรอกซิล หรือกลุ่มฟีนอลของโปรตีน เป็นต้น วิธีนี้ไม่เป็นที่นิยมใช้ตรึงรูปเซลล์จุลินทรีย์ที่มีชีวิต เนื่องจากความเป็นพิษของสารที่ใช้ จึงส่งผลกระทบต่อเซลล์ที่ถูกตรึงอย่างรุนแรงบางครั้งทำให้เอนไซม์สูญเสียแอกทิวิตีของเอนไซม์และจุลินทรีย์ตาย นอกจากนั้นยังจำเป็นต้องปรับปรุงตัวพยุงก่อนนำมาใช้ตรึงรูปอีกด้วย ข้อดีของวิธีนี้คือ สามารถทำให้เกิดระบบที่ไม่จำกัดการแพร่ผ่านและเซลล์ที่เชื่อมต่อกับตัวพยุงแล้วจะมีเสถียรภาพเป็นระยะเวลานาน มีความคงตัวสูง การรั่วไหลออกของเซลล์มีค่าต่ำ (Cheetham, 1979)

รูปที่ 2.4 **การใช้พันธะโควาเลนต์** (Covalent binding method)

(Bickerstaff, 1997)

1.2 การเชื่อมต่อกับตัวพยุงโดยการดูดซับ (Adsorption method)

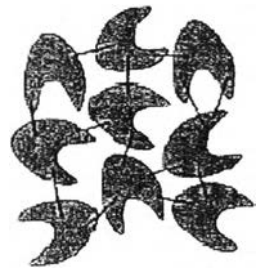
เป็นวิธีการตรึงเซลล์โดยการที่เซลล์ดูดซับกับสารที่เป็นตัวนำด้วยพันธะไอออนิกหรือพันธะไฮโดรเจน เกิดปรากฏการณ์การดูดซับ (adsorption phenomenon) โดยอาศัยหลักการทางเคมี เนื่องจากผนังเซลล์จุลินทรีย์มีองค์ประกอบของกรดไดอะมิโนไพมีลิก (diaminopimelic acid) และเฮกโซซามีน (hexosamines) ซึ่งสามารถเกิดพันธะไอออนิกกับตัวนำได้ การตรึงเซลล์ด้วยวิธีนี้มีกรรมวิธีที่ง่าย การดูดซับไม่รุนแรงต่อเซลล์ จึงมีการสูญเสียเซลล์ได้ง่าย (Cheetham, 1979)

รูปที่ 2.5 **การเกาะหรือดูดซับ** (Adsorption method)

(Bickerstaff, 1997)

2.การเชื่อมขวาง (Cross-linking method)

การตรึงรูปเซลล์ประเภทนี้ไม่ใช้ตัวพยุง เซลล์แต่ละเซลล์จะเชื่อมต่อกันด้วยวิธีทางเคมี โดยอาศัยสารจำพวกไบ (bi-) หรือมัลติฟังก์ชันนอลรีเอเจนต์ (multifunctional reagent) เป็นตัวสร้างพันธะ เช่น กลูทารัลดีไฮด์ (glutaraldehyde) และ โทลูอีนไดไอโซไซยาเนต (toluene diisocyanate) เป็นต้น แต่ความเป็นพิษของสารเคมีที่ใช้สร้างพันธะ เป็นปัจจัยจำกัดการประยุกต์ใช้กับเซลล์ที่มีชีวิต ทำให้เซลล์ที่ถูกตรึงอาจสูญเสียความสามารถในการดำรงชีวิต (Cheetham, 1979)



รูปที่ 2.6 **การเชื่อมขวาง** (Cross-linking method)

(Bickerstaff, 1997)

3. การห่อหุ้มหรือกักขัง (Entrapment method)

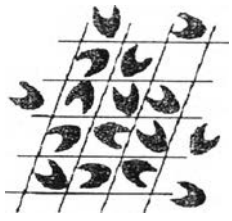
การตรึงเซลล์โดยวิธีการกักขังสามารถแบ่งออกเป็น 2 วิธีดังต่อไปนี้

3.1 การตรึงเซลล์แบบไมโครแคปซูล (Microencapsulation)

เป็นการกักขังเซลล์ไว้ในเยื่อกึ่งเลือกผ่าน (semipermeable membrane) เช่น collodian หรือ silicone โครงสร้างดังกล่าวหนาแน่นเพียงพอที่จะป้องกันเซลล์ไม่ให้หลุดออกมา แต่ปล่อยให้สับสเตรต และผลิตภัณฑ์แทรกผ่านเข้าออกได้ การตรึงรูปวิธีนี้แตกต่างจากวิธีใช้สารเคมี เพราะเซลล์ไม่ต้องเชื่อมอยู่กับเมตริกซ์ของเจลหรือเยื่อบาง และแอคติวิตีของเซลล์ถูกทำลายเพียงเล็กน้อยเท่านั้น (Cheetham, 1979)

3.2 การตรึงเซลล์แบบแลททิซ (Lattice type)

เป็นการตรึงเซลล์โดยการกักขังเซลล์ไว้ภายในที่ว่างของพอลิเมอร์เจล (polymer gel) ซึ่งไม่ละลายน้ำ ที่มีลักษณะเป็นช่องว่างสามมิติ การตรึงเซลล์แบบแลททิซเป็นวิธีที่ประสบความสำเร็จ และได้รับความนิยมมากที่สุด เนื่องจากการตรึงเซลล์จุลินทรีย์ด้วยวิธีนี้สามารถใช้กับเซลล์ได้ทุกชนิด ในขณะที่วิธีอื่นมีข้อจำกัดและข้อเสียเปรียบมากกว่า การตรึงเซลล์ด้วยวิธีการกักขังนิยมใช้สารจำพวก biochemically inert hydrogel เป็นตัวกักขัง โดยใช้หลักการสร้างเจลที่มีโครงสร้าง 3 มิติ ที่มีลักษณะเป็นรูพรุน ทำให้สารอาหารและผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นสามารถผ่านเข้าออกจากเซลล์ตรึงได้ (Cheetham, 1979)



Entrapment

Encapsulation

รูปที่ 2.7 **การกักขัง** (Entrapment and Encapsulation method) (Bickerstaff, 1997)

2.5.2 **สารพาหะที่ใช้ในการตรึงเซลล์จุลินทรีย์**

เนื่องจากการเตรียมเซลล์ตรึงมีหลายวิธี ดังนั้นสมบัติของสารพาหะที่เหมาะสมสำหรับใช้ในการตรึงเซลล์จุลินทรีย์จึงมีความแตกต่างกัน ปัจจัยที่สำคัญในการพิจารณาสารพาหะที่มีคุณสมบัติ มีดังนี้

- สมบัติเชิงกล
- สมบัติทางกายภาพ
- ความแข็งแรง (Strength)
- ความชอบน้ำ (Hydrophilicity)
- สภาพซึมผ่านได้ (Permeability)
- ความทนต่อสภาพแวดล้อมทางกายภาพ
- ความทนต่อสารเคมี
- ความทนต่อการย่อยสลายโดยจุลินทรีย์
- ความทนต่อความร้อน และความกดดัน
- ไม่เป็นอันตรายต่อเซลล์จุลินทรีย์
- ไม่ส่งผลกระทบต่อระบบเมตาบอลิซึมของจุลินทรีย์

ตารางที่ 2.3 ตัวอย่างเซลล์จุลินทรีย์ตรึงเพื่อสำหรับใช้ในงานด้านสิ่งแวดล้อม

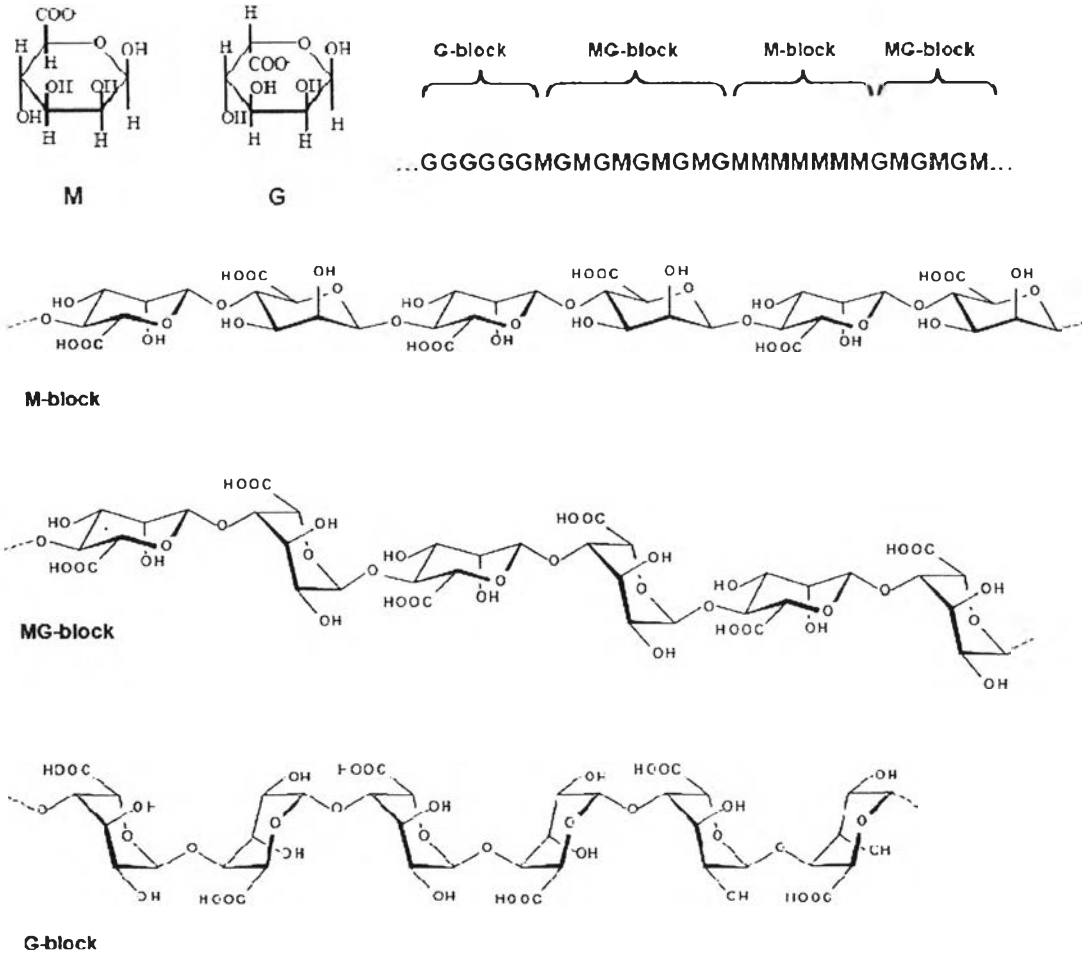
สารที่ใช้บำบัด	จุลินทรีย์	วัสดุตรึง	เอกสารอ้างอิง
ไนโตรเบนซีน	Microbial consortium	พอลิยูริเทน	(Wang และคณะ, 2009)
ไซยาไนด์และ	*Trichoderma koningii*	อัลจิเนต	(Zhou และคณะ, 2007)
เฟอโรไซยาไนด์			
ฟีนอล	*Pseudomonas putida*	แอกทิเวเทต	(Wang และ Li, 2007)
		คาร์บอน	
		ไคโตซาน	(Chen และคณะ, 2007)
	Acinetobacter johnsonii	อการ์-อัลจิเนต	(Salem และ Barakati, 2005)
	Rhodococcus erythropolis	เซรามิก	(Prieto และคณะ, 2002)
คาร์บาโซล	*Sphingomonas* sp.	เจลแลนกัม	(Wang และคณะ, 2007)
		อการ์	
		อัลจิเนต	
		คาราจีแนน	
น้ำมัน	*Yerrowia lipolytica*	พอลิยูริเทนโฟม	(Oh และคณะ, 2000)
		อการ์	(Zinjarde และ Pant, 2000)

ในการทดลองนี้ได้เลือกใช้วิธีการตรึงเซลล์แบบแบบกักขัง (Encapsulation) ด้วยอัลจิเนต เนื่องจากวิธีนี้มีข้อดีคือ วัสดุพาหะจะทำหน้าที่ปกป้องเซลล์จากภาวะรุนแรง เช่น สารที่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ อุณหภูมิ ค่าความเป็นกรด-ด่าง เนื่องจากเซลล์ถูกห่อหุ้มไว้ภายในทำให้อัตราการอยู่รอดของเซลล์เพิ่มสูงยิ่งขึ้น เซลล์ตรึงสามารถนำมาใช้ได้หลายครั้งและใช้อย่างต่อเนื่องได้ ซึ่งจะช่วยลดต้นทุนให้กับกระบวนการ นอกจากนี้การแยกเอาเซลล์ตรึงออกจากระบบสามารถทำได้ง่ายอีกด้วย (Ha, 2009)

2.6 อัลจิเนต

อัลจิเนตจัดเป็นพอลิเมอร์ประเภทพอลิแซคคาไรด์ธรรมชาติ มีสมบัติละลายน้ำได้ อัลจิเนตเป็นสารที่สกัดมาจากสาหร่ายทะเลสีน้ำตาล (Phaeophyceae) ได้แก่ *Laminaria hyperborea* , *Macrocystis pyrifera* , *Laminaria digitata* ,*Ascophyllum nodosum* , *Laminaria japonica* , *Ecklonia maxima* , *Lessonia nigrescens* และ *Durvillaea Antarctica* ปริมาณที่พบจะแตกต่างกันขึ้นกับชนิดของสาหร่าย ฤดูกาล และแหล่งที่สาหร่ายเจริญเติบโต(Rehm, 2009) นอกจากนี้แบคทีเรียแกรมลบในสกุล *Azotobacter* และ *Pseudomonas* พบว่าสามารถผลิตอัลจิเนตได้เช่นกัน (Rehm, 2009) (ตารางที่ 2.4) อัลจิเนตถูกนำไปใช้ในผลิตภัณฑ์อาหารหลายชนิดตั้งแต่ปี ค.ศ. 1920 การนำไปใช้ประโยชน์ทางอุตสาหกรรมอัลจิเนตทำหน้าที่เป็นสารเพิ่มความข้นหนืด (viscosifying), สารเพิ่มความคงตัว (stabilizing) , ทำให้อีมัลชันคงตัวสารทำให้เกิดเจล (gelling properties) (Morch, 2008) (นอกจากนี้สามารถใช้ในทางการแพทย์ โดยใช้เป็นตัวรักษาความชื้นให้กับแผลไฟไหม้ wound dressings ได้อีกด้วย (Rehm, 2009)

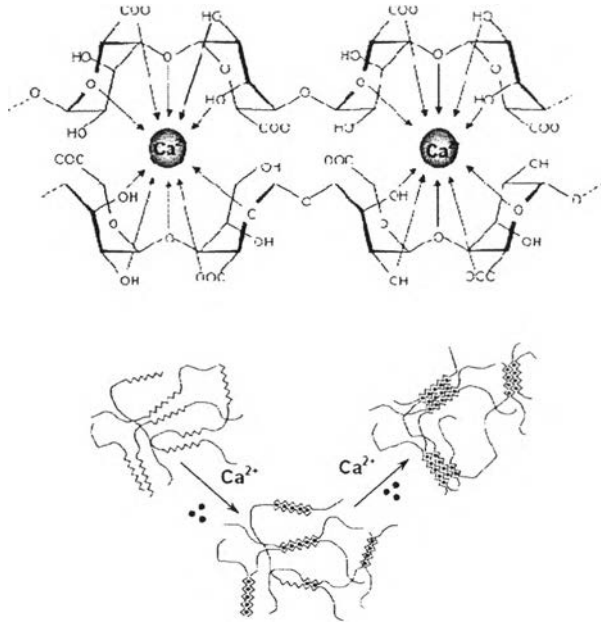
อัลจิเนตมีโครงสร้างที่เชื่อมต่อกันด้วยพันธะไอออนิก 1- แอลฟา , 4- เบตา ระหว่างส่วนของกรดแอล-กลูรูโรนิก (L-guluronic acid, G) และกรดดี-แมนูโรนิก (D-manuronic acid, M) อัลจิเนตจึงเป็นพอลิเมอร์ที่มีประจุเป็นลบ (polyanionic polymer) เมื่อเจลอัลจิเนตได้รับความร้อนเจลจะไม่หลอมเหลวหรือคืนสภาพ ในโมเลกุลประกอบด้วย homopolymeric regions ของ G และ M ที่เรียกว่า G-blocks และ M-blocks ตามลำดับและยังมีบางส่วนของโมเลกุลประกอบเป็น MG-blocks (รูปที่ 2.2) ซึ่งอัตราส่วนของสาร 2 ชนิดและ โครงสารหลักจะเป็นตัวกำหนดสมบัติของสารละลายอัลจิเนตที่ได้ในด้านความแข็งของเจล เช่น ถ้าพอลิเมอร์มีส่วน G ในปริมาณที่สูงจะมีสมบัติเป็นเจลที่แข็งที่ความเข้มข้นของโลหะประจุบวกเฉพาะ (polyvalent metal cation) แต่ถ้าพอลิเมอร์มีส่วน M ปริมาณสูงจะมีแนวโน้มที่จะเกิดเจลที่อ่อนนุ่ม โดยเรียงลำดับความแข็งจากมากไปน้อยได้ดังต่อไปนี้ GG , MM , MG ความหนืดของสารละลายอัลจิเนตที่ได้ขึ้นอยู่กับอุณหภูมิ ความเข้มข้น น้ำหนักโมเลกุล และการมีโลหะประจุบวก



รูปที่ 2.8 **โครงสร้างทางเคมีของอัลจิเนตประกอบด้วย** G-blocks, M-blocks **และ** MG-blocks G: guluronic acid , M: manuronic acid (Morch , 2008)

การก่อรูปเจลของอัลจิเนต (gel formation) สามารถทำได้ภายใต้ภาวะที่ไม่รุนแรงและไม่เกิดสารที่ก่อความเป็นพิษ ส่วนใหญ่จะเกิดปฏิกิริยาการเชื่อมขวาง (cross linking) กับสารที่มีประจุบวกประเภทไดวาเลนท์ ได้แก่ แคลเซียมไอออน (Ca2+) สตอนเซียมไอออน (Sr2+) หรือแบเรียมไอออน (Ba2+) การผสมระหว่างไอออนดังกล่าวกับอัลจิเนต นับว่ามีส่วนสำคัญอย่างยิ่งสำหรับการปรับปรุงและพัฒนาคุณสมบัติของเจลโดยจะมีผลต่อสองปัจจัยได้แก่ สมบัติการบวมน้ำ และความแข็งของเจล กลไกการจับกันของพอลิเมอร์ตั้งแต่ 2 สายขึ้นไปสามารถอธิบายได้ในแบบจำลองรูป "กล่องไข่" (egg box model) (รูปที่ 2.9) เส้นที่งอเป็นลักษณะกล่องไข่ ลูกฟูกรูปทรงสองมิติ จะเป็นช่องให้ประจุบวกบรรจุเข้าไป แล้วประสานสายพอลิเมอร์เข้าด้วยกัน ในการทำปฏิกิริยาระหว่างอัลจิเนตกับประจุชนิด polyvalent (ยกเว้นแมกนีเซียม) จะทำให้เกิดการเชื่อมข้ามขึ้น (cross linking) เมื่อปริมาณประจุ polyvalent เพิ่มขึ้น สารละลายโซเดียมอัลจิเนตจะหนืดขึ้นแล้วกลายเป็นเจล และสุดท้ายตกตะกอนเจลที่มีลักษณะสม่ำเสมอสามารถผลิตได้โดยจัด

ระเบียบการกระจัดกระจายตัวของประจุแคลเซียมในส่วนของของเหลวอย่างสม่ำเสมอก่อนการเข้ารูปจะเริ่มขึ้นแคลเซียมอัลจิเนตที่เกิดขึ้นเป็นโครงร่างตาข่ายพอลิเมอร์ 3 มิติ ที่เฉื่อย และมีช่องว่างขนาดใหญ่อยู่ภายใน ในกรณีที่มีไอออนชนิด non gelling เช่น สารละลายโซเดียมคลอไรด์ ตัวโซเดียมไอออนจะไปมีอิทธิพลส่งผลต่อกระบวนการการจำลองเจล โดยจะไปยับยั้งการส่งผ่านโซเดียมอัลจิเนตเข้าไปยังบริเวณแกนกลางเจล



รูปที่ 2.9 **การก่อรูปเจลเรียกโครงสร้างลักษณะนี้ว่า "กล่องไข่" หรือ** egg-box (Morch, 2008)

อัลจิเนตเป็นวัสดุพอลิเมอร์ที่มีราคาถูกนิยมนำมาใช้ในงานตรึงเซลล์หรือเอนไซม์อย่างกว้างขวางและเป็นสารพอลิแซคคาไรด์ที่ได้จากวิธีทางชีวภาพจึงปราศจากความเป็นพิษซึ่งจะไปรบกวนการเจริญและการอยู่รอดดังนั้นเซลล์ที่ถูกตรึงจึงมีความแข็งแรง ทนต่อภาวะต่างๆได้ดี สามารถนำกลับมาใช้ใหม่ได้หลายครั้ง (Kerrar และคณะ, 2007) ขนาดของเม็ดอัลจิเนตสามารถควบคุมได้ตามที่ต้องการ นอกจากนี้ขั้นตอนในการเตรียมกระทำได้ง่าย วิธีการที่ใช้ไม่รุนแรง (Seoud และ Maachi, 2003 ; Benyahia และ Polomarkaki, 2005) แต่มีข้อควรระวัง คือ ถ้าทิ้งเจลแคลเซียมไว้ในสารละลายที่มีสารจับแคลเซียม (calcium chelating agent) เช่น ฟอสเฟต รวมทั้งอิออนที่มีประจุบวก เช่น อิออนของแมกนีเซียม หรือ อิออนของโปแทสเซียม จะทำให้เจลถูกทำลายเนื่องจากอิออนของแคลเซียมละลายออกมา

2.6.1 งานวิจัยที่ศึกษาการตรึงเซลล์จุลินทรีย์ด้วยอัลจิเนต

Niazi และ Karegoudar (2001) พบว่าการนำ *Bacillus* sp. ที่มีความสามารถในการย่อยสลายไดเมธิลพธาเลต (DMP) สารนี้จัดอยู่ในกลุ่มที่พบเป็นส่วนประกอบในพลาสติก ตรึงด้วยแคลเซียมอัลจิเนตและพอลิยูริเทนโฟม ผลการศึกษาเปรียบเทียบระหว่างเซลล์ตรึงกับเซลล์อิสระ พบว่า ทั้งการตรึงด้วยแคลเซียมอัลจิเนตและพอลิยูริเทนโฟม มีประสิทธิภาพการย่อยสลาย DMP มากกว่าเซลล์อิสระ และการใช้พอลิยูริเทนโฟมนั้นสามารถนำกลับมาใช้ได้มากกว่า 20 ครั้ง

Desouky และคณะ (2002) ศึกษาการย่อยสลายฟีนอลโดยใช้แคลเซียมอัลจิเนตตรึง *Acinetobacter* sp. สายพันธุ์ W-17 โดยศึกษาอิทธิพลของแหล่งไนโตรเจนที่แตกต่างกัน พบว่า *Acinetobacter* sp. สายพันธุ์ W-17 สามารถทนแอมโมเนียมไอออนได้ 63 มิลลิกรัมต่อลิตร และไนเตรตไอออน ได้ 1000 มิลลิกรัมต่อลิตร ทั้งยังใช้ซ้ำได้ 5 ครั้งโดยไม่สูญเสียแอคติวิตี

Idris และ Suzana (2005) พบว่าค่าพารามิเตอร์ต่างๆ ที่ใช้ในการทดลองผลิตกรดแลคติก ได้แก่ ปริมาณความเข้มข้นอัลจิเนต , ขนาดเม็ดบีด , ค่าความเป็นกรด-ด่าง และ อุณหภูมิ ล้วนมีผลต่อการผลิตกรดแลคติกของแบคทีเรีย *Lactobacillus delbrueckii* ตรึงด้วยอัลจิเนต ผลการศึกษาได้ภาวะที่เหมาะสมของเชื้อสำหรับผลิตกรดแลคติก คือภาวะ 2 % โซเดียมอัลจิเนต ขนาดเม็ดอัลจิเนต 1 มิลลิเมตร ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 6.5

Lan และคณะ (2009) ตรวจสอบความสามารถของ *Yarrowia lipolytica* W29 ตรึงด้วยอัลจิเนต โดยตรวจวัดปริมาณการย่อยสลายน้ำมันและค่า chemical oxygen demand (COD) พบว่า มีความสามารถย่อยน้ำมันได้ 2000 มิลลิกรัมต่อลิตร และ COD ไปได้ 2000 มิลลิกรัมต่อลิตรเช่นกันภายในเวลา 50 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เซลล์ตรึงนั้นมีความทนต่ออุณหภูมิได้มากกว่าเซลล์อิสระ นอกจากนี้เซลล์ตรึงมีความเสถียรหลังการเก็บ ที่ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 วัน สามารถนำมาใช้ซ้ำต่อเนื่องได้ 12 ครั้ง อัตราการย่อยสลายโดยตรวจวัดค่า COD ยังคงมีค่า 82 เปอร์เซ็นต์ในรอบการใช้งานครั้งที่หก

Peretz และ Cinteza (2008) ศึกษาการบำบัดความเป็นพิษของสารไนโตรฟีนอลซึ่งปนเปื้อนในแหล่งน้ำด้วยพอลิเมอร์ชีวภาพ ในงานวิจัยนี้ใช้แคลเซียมอัลจิเนตซึ่งทำหน้าที่เป็นตัวดูดซับ โดยศึกษาผลของปัจจัยต่างๆที่มีผลต่อประสิทธิภาพการบำบัดความเป็นพิษได้แก่ การมีหรือไม่มีสารลดแรงตึงผิว , ค่าความเป็นกรด-ด่าง , ความเข้มข้นเริ่มต้นของไนโตรฟีนอลพบว่า การมีหรือไม่มีสารลดแรงตึงผิวนั้นให้ค่าการละลายของเม็ดบีทที่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ และค่า pH ที่เหมาะสมมีค่าระหว่าง 4-7 และทดลองเพิ่มความเข้มข้นเริ่มต้นของไนโตรฟีนอลให้มากขึ้นพบว่าประสิทธิภาพการบำบัดมีค่าลดลง

จากงานวิจัยข้างต้น จะเห็นว่าวิธีการตรึงเซลล์ด้วยอัลจิเนตมีประสิทธิภาพแตกต่างกันไปขึ้นกับปัจจัยต่างๆ เช่น วิธีการเตรียมเจล ปริมาณสารตั้งต้นที่ใช้ เทคนิคการนำเซลล์ตรึงไปใช้ประโยชน์ ดังนั้นในงานวิจัยนี้จะศึกษาหาภาวะที่เหมาะสมของกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ตรึงด้วยอัลจิเนตเพื่อใช้ย่อยสลายไพรีนและฟีแนนทรีน โดยไพรีนจัดเป็นตัวแทนของสารประกอบ PAHs ที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง ซึ่งละลายน้ำได้น้อย ทำให้มีความทนทานต่อการย่อยสลาย (Trzesicka-Mlymarz และ Ward, 1996) และฟีแนนทรีนเป็นตัวแทนสารประกอบ PAHs น้ำหนักโมเลกุลต่ำ