หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 1
บทนำ

กระแสไฟฟ้าสามารถผลิตได้จากเชื้อเพลิงและพลังงานหลายรูปแบบ เช่น น้ำมัน แก๊สธรรมชาติ ถ่านหิน พลังแสงอาทิตย์ พลังลม พลังความร้อนจากบ่อน้ำพุร้อน ฯลฯ สำหรับประเทศไทย ได้มีความพยายามที่จะนำเชื้อเพลิงและแหล่งพลังงานซึ่งหาได้ภายในประเทศมาใช้ผลิตกระแสไฟฟ้า ได้แก่ ถ่านหินลิกไนต์ แก๊สธรรมชาติ พลังความร้อนจากบ่อน้ำพุร้อน เป็นต้น โดยเฉพาะถ่านหินลิกไนต์นั้นการไฟฟ้าฝ่ายผลิตแห่งประเทศไทย (กฟผ.) ได้เปิดการทำเหมืองลิกไนต์ขึ้นที่อำเภอแม่เมาะ จังหวัดลำปาง เมื่อ พ.ศ. 2497 เนื่องจากผลการสำรวจพบว่ามีปริมาณลิกไนต์สำรองอยู่มากถึง 1,468 ล้านตัน เพื่อใช้เป็นแหล่งเชื้อเพลิงสำหรับการผลิตกระแสไฟฟ้า ในปัจจุบันเหมืองลิกไนต์แห่งนี้นับได้ว่าเป็นแหล่งเชื้อเพลิงที่สำคัญที่สุดของประเทศไทย และเป็นเหมืองลิกไนต์ที่ใหญ่ที่สุดในภาคพื้นเอเชียอาคเนย์

ถ่านหินเป็นเชื้อเพลิงแข็งธรรมชาติ ซึ่งประกอบด้วยสารอินทรีย์และสารอนินทรีย์หลายชนิด เกิดจากการผุพังหรือการเปลี่ยนแปลงทางเคมีและทางกายภาพของซากพืชที่สะสมกันอยู่เป็นเวลานาน ปฏิกิริยาที่เกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงดังกล่าวนี้ได้แก่ ปฏิกิริยาออกซิเดชัน ปฏิกิริยาดีคาร์บอกซิเลชัน ปฏิกิริยาย่อยสลาย และปฏิกิริยารวมตัว เป็นต้น ปฏิกิริยาเหล่านี้เกิดจากกิจกรรมของจุลินทรีย์ เช่น เชื้อราและแบคทีเรีย ภาวะแวดล้อมทางธรณี เช่น ความร้อน ความดัน การยุบตัวของเปลือกโลก การเปลี่ยนแปลงทางเคมีและทางกายภาพที่แตกต่างกันของซากพืชที่สะสมกันอยู่ในแต่ละแห่ง รวมทั้งระยะเวลาการทับถมกันของซากพืชที่แตกต่างกัน ทำให้ถ่านหินจากต่างแหล่งมีลักษณะและคุณภาพต่างกัน ดัชนีซึ่งใช้บ่งชี้ถึงคุณภาพของถ่านหินแต่ละชนิดและจากแต่ละแหล่งคือการสะท้อนของแสง (reflectance) ปริมาณความชื้น ปริมาณสารระเหย ปริมาณคาร์บอน ปริมาณไฮโดรเจน และค่าความร้อน ถ่านหินที่มีคุณภาพดีจะมีค่าเปอร์เซ็นต์การสะท้อนของแสงสูง ซึ่งหมายถึงเป็นถ่านหินที่มีปริมาณคาร์บอนสูง มีปริมาณสารระเหยต่ำ และมีลักษณะทางกายภาพคือความหนาแน่นสูง ความพรุนต่ำ การสูญเสียหมู่ที่ทำหน้าที่เฉพาะซึ่งมีออกซิเจน กำมะถันซึ่งมักพบอยู่ในรูปของไธออล ซัลไฟด์ ไธโออีเทอร์ และไธโอฟีน และไนโตรเจนซึ่งมักพบอยู่ในรูปของสารประกอบเอมีน ไพริดีน และไพโรลในโครงสร้างของถ่านหินในระหว่างกระบวนการเกิดถ่านหิน จะมีผลทำให้ปริมาณคาร์บอนของถ่านหินเพิ่มมากขึ้นหรือคุณภาพของถ่านหินดีขึ้นนั่นเอง (กัญจนา และคณะ, 2527) นอกจากนั้นเนื่องจากถ่านหินมีโครงสร้างอะโรมาติกเป็นแกนกลางเชื่อมต่ออยู่กับเฮเทอโรอะตอม เช่น เมทีลีน ซึ่งมีหมู่เมทิล ไฮดรอกซิล คาร์บอกซิล คีโตเอมีน หรือหมู่ทำหน้าที่เฉพาะอื่น ๆ คุณภาพของถ่านหินจึงขึ้นอยู่กับความเป็นอะโรมาติกและปริมาณของกลุ่มเฮเทอโรอะตอม กล่าวคือ ถ่านหินที่มีคุณภาพดีจะมีความเป็นอะโรมาติกสูงแต่มีปริมาณของกลุ่มเฮเทอโรอะตอมต่ำ

ถ่านหินแบ่งออกได้เป็น 4 ประเภท เรียงตามอายุและคุณภาพจากน้อยไปหามากดังนี้ ลิกไนต์ ซับบิทู-มินัส บิทูมินัส และแอนทราไซต์ ตามลำดับ

ลิกไนต์ซึ่งเป็นถ่านหินที่มีคุณภาพต่ำที่สุด ลักษณะเป็นสีดำหรือสีน้ำตาล มีความชื้นสูง เปราะแตกร่วนง่าย ลุกไหม้ได้เมื่อทิ้งไว้ในอากาศ การเผาถ่านหินลิกไนต์จะก่อให้เกิดกลิ่นเหม็นของกำมะถัน ทั้งนี้เพราะโดยทั่วไปถ่านหินลิกไนต์จะมีกำมะถันปนเปื้อนอยู่ในปริมาณตั้งแต่น้อยกว่า 0.5 ถึง 6.0 เปอร์เซ็นต์ สำหรับถ่านหินลิกไนต์ที่ขุดได้จากเหมืองแม่เมาะ จังหวัดลำปาง มีปริมาณกำมะถันปนเปื้อนอยู่สูงถึง 6 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้น การเผาถ่านหินลิกไนต์เพื่อผลิตกระแสไฟฟ้าในปริมาณมากถึงวันละ 2 ถึง 5 หมื่นตัน ที่อำเภอแม่เมาะ จังหวัดลำปาง จึงอาจก่อให้เกิดผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม กล่าวคือ ออกไซด์ของกำมะถัน (SO_x) ที่เกิดจากการเผาไหม้ ซึ่งส่วนใหญ่อยู่ในสภาพของแก๊สซัลเฟอร์ไดออกไซด์ (SO_2) ซึ่งเป็นอันตรายต่อสุขภาพของคนและสัตว์ และยังเป็นสาเหตุให้เกิดฝนกรด (acid rain) เนื่องจากฝนที่ตกลงมาผ่านบรรยากาศ จะดูดซับแก๊สชนิดนี้ไว้ แก๊สซัลเฟอร์ไดออกไซด์ที่ละลายอยู่ในน้ำฝนจะอยู่ในรูปไบซัลไฟต์และโปรตอน

$$SO_2 . H_2O \longrightarrow HSO_3^- + H^+$$

ซึ่งไบซัลไฟต์จะเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันต่อไปเป็นซัลเฟต และโปรตอน

$$HSO_3^- \longrightarrow SO_4^{2-} + H^+$$

ปริมาณโปรตอนจำนวนมากในน้ำฝนนี้ทำให้ฝนที่ตกลงมามีความเป็นกรดสูง เรียกว่าฝนกรด ซึ่งฝนกรดนี้ก่อให้เกิดผลเสียต่อระบบนิเวศน์ของโลก ได้แก่ ระบบนิเวศน์ทางน้ำ ดิน พืช และสัตว์ เป็นอันตรายต่อสุขภาพของสิ่งมีชีวิต (Howells, 1995) ด้วยเหตุนี้จึงเป็นความจำเป็นที่การไฟฟ้าฝ่ายผลิตแห่งประเทศไทยจะต้องหาวิธีการกำจัดแก๊สซัลเฟอร์ไดออกไซด์ที่เกิดจากการเผาไหม้ถ่านหินลิกไนต์ในกระบวนการผลิตกระแสไฟฟ้า เพื่อนำถ่านหินลิกไนต์เหล่านี้มาใช้ประโยชน์ให้ได้ เนื่องจากเป็นเชื้อเพลิงราคาถูกที่มีปริมาณมากภายในประเทศโดยต้องไม่ก่อให้เกิดปัญหาภาวะมลพิษติดตามมา

กำมะถันที่ปนเปื้อนอยู่ในถ่านหิน แบ่งออกได้เป็น 2 ประเภท คือ

1. กำมะถันอนินทรีย์ (inorganic sulfur)

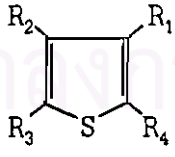
ส่วนใหญ่กำมะถันอนินทรีย์ที่ปนเปื้อนอยู่ในถ่านหินจะอยู่ในสภาพของซัลไฟด์ของเหล็ก (iron sulfide) เช่น ไพไรต์ (FeS_2) มาร์คาไซท์ (FeS_2) ซึ่งทั้งสองนี้มีลักษณะผลึกที่ต่างกัน และซัลเฟต ปริมาณไพไรต์ที่พบจะอยู่ในช่วง 0.5-6.0 เปอร์เซ็นต์ ส่วนปริมาณซัลเฟตพบในปริมาณน้อยมาก คือน้อยกว่า 0.1 เปอร์เซ็นต์ ถ่านหินซึ่งจัดว่ามีคุณภาพดีจะต้องมีปริมาณไพไรต์ปนเปื้อนอยู่ต่ำกว่า 0.5 เปอร์เซ็นต์ อนุภาคของไพไรต์ที่กระจายอยู่ในถ่านหิน มีลักษณะเป็นก้อนกลม จุลินทรีย์สามารถกำจัดไพไรต์ที่ปนเปื้อนอยู่ในถ่านหินได้ โดยการออกซิไดซ์ไปเป็นเฟอร์ริกซัลเฟต ($Fe_2(SO_4)_3$) ดังปฏิกิริยาต่อไปนี้

$$4FeS_2 + 15\ O_2 + 2H_2O \xrightarrow{\text{แบคทีเรีย}} 2Fe_2(SO_4)_3 + 2H_2SO_4$$

ในปฏิกิริยา แบคทีเรียจะทำหน้าที่เป็นเสมือนตัวเร่ง (catalyst) โดยทำให้ปฏิกิริยาออกซิเดชันไพไรต์เกิดได้เร็วขึ้น (Eligwe, 1988) ซึ่งประสิทธิภาพของแบคทีเรียในการกำจัดไพไรต์ออกจากถ่านหินนี้ขึ้นอยู่กับการกระจายตัวของอนุภาคไพไรต์ในก้อนถ่านหิน และความสามารถของแบคทีเรียในการจับ (adsorption) บนพื้นผิวของอนุภาคไพไรต์ ดังนั้นการบดถ่านหินลิกไนต์ให้กลายเป็นอนุภาคขนาดเล็ก คือขนาดประมาณ 75 ไมครอน ในกระบวนการเผาไหม้ถ่านหินลิกไนต์เพื่อการผลิตกระแสไฟฟ้า จึงเป็นการช่วยให้แบคทีเรียสามารถเข้าทำลายไพไรต์ได้ดีขึ้น

2. กำมะถันอินทรีย์ (organic sulfur)

กำมะถันชนิดนี้อยู่ในสภาพที่เป็นส่วนหนึ่งของโครงสร้างของโมเลกุลของถ่านหินซึ่งกำมะถันที่แทรกตัวอยู่ในโมเลกุลของถ่านหินอาจแทรกตัวอยู่ในบริเวณที่เป็นอะโรมาติคหรืออะลิฟาติค การแทรกตัวของกำมะถันในโครงสร้างของถ่านหินบริเวณที่เป็นอะโรมาติคนี้จะมีลักษณะที่ซับซ้อนและเปลี่ยนแปลงไปตามชนิดและแหล่งที่มาของถ่านหิน สารประกอบกำมะถันอินทรีย์ที่สำคัญซึ่งพบทั่วไปในถ่านหิน คือ ซัลไฟด์ (sulfides), ไดซัลไฟด์ (disulfides), ไธออล (thiols) และไธโอฟีน (thiophenes) ดังแสดงในรูปที่ 1 (Kargi, 1986)

ซัลไฟด์	$R_1 - S - R_2$	เช่น	$C_2H_5 - S - C_2H_5$
ไดซัลไฟด์	$R_1 - S - S - R_2$	เช่น	$C_2H_5 - S - S - C_2H_5$
ไธออล	$R - SH$	เช่น	C_2H_5SH
ไธโอฟีน		เช่น	ไดเบนโซไธโอฟีน

เมื่อ R คือ กลุ่มของหมู่ไฮโดรเจน อัลคีล หรืออะโรมาติก

รูปที่ 1 สารประกอบกำมะถันอินทรีย์ชนิดต่าง ๆ ที่พบในถ่านหินลิกไนต์ (Kargi, 1986)

วิธีการวิเคราะห์หาปริมาณกำมะถันชนิดต่าง ๆ ที่ปนเปื้อนอยู่ในถ่านหิน อาจทำได้โดยวิธีการของ American Society of Testing Materials หรือใช้ชื่อย่อว่า ASTM โดยการนำถ่านหินมาวิเคราะห์ทางเคมี เพื่อหาปริมาณกำมะถันรวม (total sulfur) กำมะถันอนินทรีย์คือ ซัลเฟต และไพไรต์ก่อน ส่วนปริมาณกำมะถันอินทรีย์หาได้จากส่วนต่างระหว่างปริมาณกำมะถันรวม และปริมาณกำมะถันอนินทรีย์ที่หาได้

หลักการวิเคราะห์กำมะถันรวม โดยวิธี ASTM D3177 ตามวิธี Eschka คือเมื่อนำถ่านหินมาผสมกับ Eschka mixture (สารประกอบของแมกนีเซียมออกไซด์ และโซเดียมคาร์บอเนต) เผาที่อุณหภูมิประมาณ 800 องศาเซลเซียส ละลายในน้ำร้อน แล้วเมื่อนำมาต้มกับแบเรียมคลอไรด์ ($BaCl_2$) กำมะถันทั้งหมดจะอยู่ในรูปตะกอนของแบเรียมซัลเฟต ($BaSO_4$) ต่อจากนั้นจึงเผาที่อุณหภูมิ 800 องศาเซลเซียสซ้ำอีกครั้ง เพื่อชั่งหาน้ำหนักของแบเรียมซัลเฟตที่เกิดขึ้น

หลักการวิเคราะห์ซัลเฟต โดยวิธี ASTM D2492 คือกรดไฮโดรคลอริกสามารถละลายเฉพาะซัลเฟตออกมาจากถ่านหิน ไม่สามารถละลายไพไรต์และกำมะถันอินทรีย์ออกมาได้

หลักการวิเคราะห์ไพไรต์ โดยวิธี ASTM D2492 คือการนำเอาตะกอนที่เหลือหลังการละลายเอาซัลเฟตออกไปจากถ่านหินแล้วด้วยกรดไฮโดรคลอริก ไปทำการออกซิไดซ์เหล็กที่เป็นองค์ประกอบของไพไรต์ด้วยน้ำโบรมีน (bromine water) แล้วตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ เอาตะกอนที่ได้มาละลายด้วยกรดไนตริก นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 248, 372 หรือ 344 นาโนเมตร ทั้งนี้แล้วแต่ความเข้มข้นของเหล็กในสารละลาย หาปริมาณของเหล็กจากกราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงและความเข้มข้นของเหล็กในสารละลายกรดไนตริก แล้วคำนวณหาปริมาณของไพไรต์จากปริมาณของเหล็กที่หาได้

วิธีการในการกำจัดกำมะถันออกจากถ่านหิน แบ่งออกได้เป็น 2 วิธีใหญ่ คือ

1. กรรมวิธีหลังการเผาถ่านหิน (post-combustion)

กรรมวิธีการนี้จะใช้เครื่องมือที่เรียกว่า Flue Gas Desulfurization หรือ FGD กำจัดแก๊สซัลเฟอร์ไดออกไซด์ทั้งหมดที่เกิดจากกระบวนการเผาไหม้ หลักการของวิธีการนี้คือ ใช้หินปูนบดละเอียดละลายน้ำเป็นน้ำหินปูน แล้วฉีดน้ำหินปูนในลักษณะเป็นละอองฝอยเข้าไปปะทะเพื่อให้ทำปฏิกิริยากับแก๊สซัลเฟอร์ไดออกไซด์ กลายเป็นยิปซั่มเหลวหรือแคลเซียมซัลเฟตตกลงมากับน้ำหินปูน น้ำหินปูนบางส่วนที่ทำปฏิกิริยาไม่หมด จะถูกปั๊มส่งกลับขึ้นไปฉีดเป็นละอองฝอยเพื่อให้เข้าทำปฏิกิริยากับแก๊สซัลเฟอร์ไดออกไซด์ในปฏิกิริยารอบถัดไป เพื่อที่จะกำจัดแก๊สซัลเฟอร์ไดออกไซด์ออกไปให้มากที่สุด วิธีการนี้มีประสิทธิภาพในกำจัดแก๊สซัลเฟอร์ไดออกไซด์สูงถึง 95 เปอร์เซ็นต์ แต่ค่าใช้จ่ายในการลงทุนเริ่มแรกสูงมากคือราคาเครื่อง FGD แต่ละเครื่องสูงกว่า 2,000 ล้านบาท นอกจากนี้ยังมีค่าใช้จ่ายอื่น ๆ อีกในกระบวนการกำจัด

กำมะถันโดยวิธีการนี้ ค่าใช้จ่ายที่ว่านี้สูงถึง 6,500 บาทต่อตันของกำมะถันที่กำจัดออก ปัญหาอีกประการหนึ่งคือ อายุการใช้งานของเครื่อง FGD นั้น พบว่าสั้นกว่าที่ควรจะเป็น ทั้งนี้เพราะเกิดการผุกร่อนของเครื่อง อันเนื่องมาจากกรดกำมะถันที่เกิดขึ้น (การไฟฟ้าฝ่ายผลิตแห่งประเทศไทย, 2538)

2. กรรมวิธีก่อนการเผาถ่านหิน (pre-combustion)

2.1 วิธีทางเคมี

วิธีการนี้อาศัยปฏิกิริยาทางเคมี ซึ่งเกิดที่อุณหภูมิและความดันสูงมาก คือประมาณ 100-400 องศาเซลเซียส และ 100-800 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เนื่องจากต้องมีการให้พลังงานเข้าไปในปริมาณที่สูงมาก เพื่อให้ปฏิกิริยาเกิดขึ้นได้ ต้นทุนของวิธีการทางเคมีนี้จึงสูงมาก นอกจากนี้ยังพบว่า ถ่านหินที่ผ่านกระบวนการทางเคมีแล้วสมบัติความเป็นเชื้อเพลิงของถ่านหินจะถูกทำลายไปด้วย กล่าวคือ พลังงานที่ได้จากการเผาไหม้จะลดลงไปจากที่ควรจะเป็น

2.2 วิธีทางกายภาพ

วิธีการนี้อาศัยความแตกต่างระหว่างความหนาแน่นของอนุภาคถ่านหินและความหนาแน่นของอนุภาคไพไรต์ในกระบวนการตกตะกอนแยกชั้น (flotation) ในน้ำ อนุภาคของไพไรต์จะลอยน้ำ ส่วนอนุภาคของถ่านหินจะตกตะกอนแยกตัวออกมา วิธีนี้สามารถแยกเอาเฉพาะไพไรต์ซึ่งเป็นกำมะถันอนินทรีย์ออกจากถ่านหิน จึงเป็นข้อจำกัดของวิธีนี้ นอกจากนี้ยังประสบปัญหาการสูญเสียอนุภาคถ่านหินขนาดเล็กบางส่วนไปในระหว่างกระบวนการ

2.3 วิธีทางชีวภาพ

วิธีการนี้อาศัยความสามารถของแบคทีเรียบางชนิดในการออกซิไดซ์กำมะถันในถ่านหินไปเป็นกรดกำมะถัน ซึ่งเป็นของเหลวจึงง่ายต่อการกำจัดออกภายหลังมากกว่าการที่จะกำจัดแก๊สซัลเฟอร์ไดออกไซด์ที่เกิดจากกระบวนการเผาไหม้ถ่านหินภายหลัง และเมื่อเปรียบเทียบปริมาตรของกรดกำมะถันซึ่งได้จากกระบวนการออกซิไดซ์กำมะถันในถ่านหินและปริมาตรของแก๊สซัลเฟอร์ไดออกไซด์ ซึ่งได้จากกระบวนการเผาถ่านหิน เมื่อปริมาณถ่านหินเท่ากันแล้ว ปริมาตรของกรดกำมะถันจะน้อยกว่าปริมาตรของแก๊สซัลเฟอร์ไดออกไซด์มาก กระบวนการกำจัดออกภายหลังจึงทำได้ง่ายกว่า และเนื่องจากปฏิกิริยาการออกซิไดซ์กำมะถันในถ่านหินให้กลายไปเป็นกรดกำมะถันโดยกิจกรรมของแบคทีเรียนั้นเกิดขึ้นที่อุณหภูมิและ

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ความดันปกติ ไม่ต้องมีการให้พลังงานเข้าไป ต้นทุนในการดำเนินการจึงต่ำ และไม่ต้องเติมสารเคมีที่เป็นอันตรายอย่างวิธีทางเคมี ดังนั้นวิธีการทางชีวภาพจึงไม่ก่อให้เกิดปัญหาต่อสภาพแวดล้อมอย่างเช่นวิธีทางเคมี ทั้งนี้เพราะของเสียที่เกิดขึ้นมีปริมาตรน้อยกว่าและการกำจัดโดยสมบูรณ์ก็ทำได้โดยใช้ต้นทุนที่ต่ำกว่า นอกจากนั้นยังไม่ทำให้สมบัติความเป็นเชื้อเพลิงของถ่านหินลดลงไปจากเดิม นอกจากนั้นยังเป็นวิธีการที่สามารถกำจัดได้ทั้งกำมะถันอนินทรีย์และกำมะถันอินทรีย์ ซึ่งวิธีทางเคมีและวิธีทางกายภาพไม่สามารถกำจัดกำมะถันอินทรีย์ออกไปได้ (Kargi และ Robinson, 1982) เนื่องจากการกำจัดกำมะถันออกจากถ่านหินโดยอาศัยกิจกรรมของแบคทีเรีย จะมีผลทำให้ถ่านหินที่ผ่านกระบวนการนี้แล้วเปียก ดังนั้นก่อนที่จะนำถ่านหินไปเผาไหม้จะต้องผ่านกระบวนการทำให้ถ่านหินแห้งเสียก่อน จึงเป็นข้อจำกัดของวิธีทางชีวภาพ แต่ปัจจุบันข้อจำกัดหรือปัญหาดังกล่าวนี้ได้หมดไป เพราะถ่านหินที่ผ่านกระบวนการกำจัดกำมะถันออกด้วยวิธีทางชีวภาพแล้วเมื่อนำมาผสมกับสารเติมแต่ง/ปรุงแต่ง (additive) บางชนิด จะสามารถนำมาเผาได้โดยไม่ต้องทำให้แห้งก่อนได้ เรียกกระบวนการเผาถ่านหินนี้ว่ากระบวนการเผาแบบเปียก (Wet burning)(Madgavkar, 1989)

สารที่นำมาผสมกับถ่านหินดังกล่าวนี้คือ

- สารลดแรงตึงผิว (surfactant) ได้แก่ โพลีซัลโฟน (polysulfone) หรือโพลีคาร์บอกซิเลท (polycarboxylate) เพื่อลดความหนืดของส่วนผสมระหว่างถ่านหินกับน้ำ (coal water admixture)
- สารเพิ่มความคงทน (stabilizing agent) ได้แก่ แซนแทน กัม (xanthan gum) เพื่อทำให้ส่วนผสมต่าง ๆ สามารถคงสภาพได้เป็นเวลานาน
- สารลดฟอง (anti-foaming agent) ได้แก่ ซิลิโคน (silicone) เพื่อลดฟองที่อาจเกิดขึ้นจากส่วนผสมข้างต้น
- สารกันเสีย ได้แก่ ไบโอไซด์ (biocide) เพื่อป้องกันการย่อยสลายทางชีวภาพของสารเพิ่มความคงทน เมื่อมีความจำเป็นต้องเก็บส่วนผสมของถ่านหินไว้นานเกินกว่า 5 วัน

ผลจากผลการค้นพบเทคนิคการเผาถ่านหินแบบเปียกนี้เอง ทำให้การกำจัดกำมะถันออกจากถ่านหินโดยกิจกรรมของแบคทีเรีย มีศักยภาพสูงในการที่จะนำมาประยุกต์ใช้งานจริงได้

จุลินทรีย์ที่มีรายงานผลการศึกษาความสามารถในการกำจัดกำมะถันออกจากถ่านหิน

แบ่งออกได้เป็น 3 กลุ่มใหญ่คือ

1. Mesophilic lithoautotrophs

แบคทีเรียในกลุ่มนี้ชนิดที่ใช้ในการกำจัดกำมะถันออกจากถ่านหินเป็นส่วนใหญ่ คือสายพันธุ์ *Thiobacillus ferrooxidans* ที่แยกได้จากเหมืองถ่านหิน เนื่องจากแบคทีเรียสายพันธุ์นี้ใช้สารประกอบกำมะถันรีดิวซ์ (reduced sulfur) เช่น ซัลไฟด์ (sulfide), ธาตุกำมะถัน (sulfur), ไธโอซัลเฟต (thiosulfate),

เตตระไธโอเนต (tetrathionate) ซัลไฟต์ (sulfite) และไพไรต์ (pyrite) ซึ่งเป็นสารประกอบของกำมะถันและธาตุเหล็ก เป็นแหล่งพลังงานเพื่อการดำรงชีวิตโดยกระบวนการออกซิเดชัน ใช้คาร์บอนไดออกไซด์เป็นแหล่งคาร์บอนเพียงอย่างเดียวเพื่อการเจริญ ไม่ต้องการสารอินทรีย์เพื่อการเจริญ ลักษณะพิเศษเฉพาะของสายพันธุ์ *T. ferrooxidans* คือสามารถออกซิไดซ์ธาตุเหล็กได้ จากความสามารถในการออกซิไดซ์ไพไรต์ซึ่งเป็นสารประกอบกำมะถันประเภทอินทรีย์ที่ปนเปื้อนอยู่ในถ่านหิน ให้กลายเป็นกรดกำมะถันได้นี้เอง จึงได้มีการศึกษาแนวทางการนำแบคทีเรีย *T. ferrooxidans* มาใช้กำจัดกำมะถันอนินทรีย์ออกจากถ่านหิน (Kargi, 1986)

สำหรับแบคทีเรีย *Thiobacillus* sp. สายพันธุ์อื่น ๆ ที่มีรายงานความสามารถในการกำจัดกำมะถันอนินทรีย์หรือไพไรต์ออกจากถ่านหิน โดยกระบวนการออกซิเดชันเช่นเดียวกับ *T. ferrooxidans* ได้แก่ *T. perometabolis* และ *T. organoparus* (Kargi, 1986) เนื่องจากอุณหภูมิภายในกองถ่านหินมีค่าค่อนข้างสูง และแบคทีเรียกลุ่ม *Thiobacillus* สามารถเจริญได้ดีที่อุณหภูมิประมาณ 25-30 องศาเซลเซียสเท่านั้น จึงเป็นข้อจำกัดข้อหนึ่งของการนำแบคทีเรีย *Thiobacillus* มาใช้เพื่อกำจัดกำมะถันอนินทรีย์ออกจากถ่านหิน อย่างไรก็ตาม Gokcay และ Yurteri (1983) รายงานว่าสามารถแยก *T. ferrooxidans* TH1 ได้จากน้ำพุร้อนในประเทศตุรกี สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 50-60 องศาเซลเซียส ต้องการสารประกอบอินทรีย์ (organic compound) บางชนิด เช่น สารสกัดจากยีสต์ (yeast extract), กรดอะมิโนซีสเตอีน (cysteine) เพื่อการเจริญ

2. Thermophilic mixotrophs

ปี ค.ศ. 1986 Kargi รายงานว่าที่อุณหภูมิสูง อัตราเร็วของกระบวนการออกซิเดชันของไพไรต์จะสูงขึ้น ดังนั้นแบคทีเรียสายพันธุ์ที่สามารถออกซิไดซ์ไพไรต์ไปเป็นกรดกำมะถันและสามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิสูงน่าจะมีอัตราเร็วในการกำจัดไพไรต์ออกจากถ่านหินได้สูงขึ้น จึงได้มีความพยายามในการแยกแบคทีเรียที่สามารถออกซิไดซ์ไพไรต์ในถ่านหิน และเจริญได้ที่อุณหภูมิสูง ปี ค.ศ. 1982 Kargi และ Robinson (1982) รายงานว่า *Sulfolobus acidocaldarius* ซึ่งจัดเป็นแบคทีเรียในกลุ่ม thermophilic mixotrophs ทั้งนี้เพราะสามารถเจริญได้ดีที่อุณหภูมิสูงคือประมาณ 60-90 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรดด่าง 1.5-4.0 ได้พลังงานเพื่อการดำรงชีวิตจากกระบวนการออกซิไดซ์อนินทรีย์สารคือสารประกอบกำมะถันรีดิวส์ ใช้คาร์บอนไดออกไซด์เป็นแหล่งคาร์บอนเพียงอย่างเดียวเพื่อการสังเคราะห์ แต่ต้องการสารสกัดจากยีสต์เพื่อการเจริญ หรืออาจใช้สารประกอบอินทรีย์เช่นกลูโคส เป็นทั้งแหล่งพลังงานเพื่อการเจริญและแหล่งคาร์บอนเพื่อการสังเคราะห์ สามารถกำจัดไพไรต์และกำมะถันอินทรีย์คือไดเบนโซไธโอฟีนออกจากถ่านหินได้ กลุ่ม thermophilic mixotrophs มีข้อดีกว่าแบคทีเรียกลุ่ม mesophilic lithoautotrophs คือ

- สามารถกำจัดได้ทั้งไพไรต์และกำมะถันอินทรีย์ออกจากถ่านหิน

-กระบวนการกำจัดกำมะถันออกจากถ่านหินสามารถใช้ทั้งถ่านหินและเซลล์ *S. acidocaldarius* ที่มีปริมาณเซลล์สูง ๆ ได้ ทั้งนี้เพราะถึงแม้จะมีปริมาณความร้อนที่เกิดขึ้นทั้งหมดสูง อันเนื่องมาจากปริมาณความร้อนที่เกิดจากกระบวนการเจริญของเซลล์แบคทีเรียจำนวนมาก รวมกับปริมาณความร้อนที่เกิดจากกระบวนการสันดาปของถ่านหินปริมาณสูง แต่ก็ไม่จำเป็นต้องมีกระบวนการควบคุมความร้อน (cooling system) กิจกรรมของแบคทีเรียสามารถดำเนินไปได้ จึงทำให้ต้นทุนในการดำเนินการต่ำ

- ที่อุณหภูมิสูง อัตราเร็วของกระบวนการออกซิเดชันของไพไรต์มีค่าสูงขึ้น

- กิจกรรมการกำจัดกำมะถันออกจากถ่านหินเกิดขึ้นที่อุณหภูมิสูง จึงเป็นการลดโอกาสการปนเปื้อนของจุลินทรีย์อื่น ๆ ลง

3. Heterotrophs

แบคทีเรียกลุ่มนี้ได้พลังงานเพื่อการดำรงชีวิตโดยกระบวนการออกซิเดชัน-รีดักชันของสารอินทรีย์

Yamada และคณะ (1968) รายงานว่า *Pseudomonas* sp. หลายสายพันธุ์ ได้แก่ *P. abikonensis* DDA 109, *P.jianii* DDE 27-1, DDE 27-2 และ DDE 27-3 สามารถกำจัดกำมะถันอินทรีย์ออกจากน้ำมันดิบ

Chandra และคณะ (1979) ได้แยกแบคทีเรียในกลุ่ม heterotroph ที่สามารถเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีไดเบนโซไธโอฟีนเป็นแหล่งกำมะถันเพียงอย่างเดียว และพบว่าแบคทีเรียกลุ่ม heterotroph ที่แยกได้นี้สามารถกำจัดกำมะถันอินทรีย์ออกจากถ่านหินในอินเดียได้ 20 เปอร์เซ็นต์ของปริมาณกำมะถันอินทรีย์ทั้งหมด เมื่อเพาะเลี้ยงไว้ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีถ่านหินเป็นองค์ประกอบบนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 วัน

ในปี ค.ศ. 1987 สถาบัน ARCTECH (Atlantic Research Coropration) ได้แยกแบคทีเรีย *Pseudomonas* ซึ่งสามารถย่อยสลายกำมะถันอินทรีย์คือไดเบนโซไธโอฟีน แล้วนำมาทำการปรับปรุงสายพันธุ์ให้มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายกำมะถันอินทรีย์สูงยิ่งขึ้นด้วยวิธีการทำให้เกิดการกลายพันธุ์ ตั้งชื่อสายพันธุ์กลายพันธุ์ที่ได้ว่า CB1 (Coal Bug 1) Elsawy และ Gray (1991) ได้ทดลองนำ CB1 มาใช้เพื่อการกำจัดกำมะถันอินทรีย์ออกจากถ่านหินหลายชนิด พบว่าสามารถกำจัดกำมะถันอินทรีย์ออกไปได้ 18-47 เปอร์เซ็นต์ ของปริมาณกำมะถันอินทรีย์ทั้งหมด โดยใช้เวลา 9-18 ชั่วโมง ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิด ขนาดของอนุภาคถ่านหิน ปริมาณกำมะถันอินทรีย์ในถ่านหินที่นำมาทำการทดลอง และปัจจัยอื่น ๆ

Rai และ Reyniers (1988) รายงานว่า *Pseudomonas putida* สามารถกำจัดได้ทั้งกำมะถันอินทรีย์และกำมะถันอนินทรีย์ออกจากถ่านหินลิกไนต์ในมลรัฐเท็กซัส สหรัฐอเมริกา

Kibane (1990) รายงานว่า *Rhodococcus rhodochrous* สามารถกำจัดกำมะถันอินทรีย์ออกจากถ่านหินในมลรัฐอิลินอยส์ สหรัฐอเมริกา

ตารางที่ 1 ได้รวบรวมชนิดของแบคทีเรีย และประสิทธิภาพในการกำจัดกำมะถันอินทรีย์และกำมะถันอนินทรีย์ออกจากถ่านหินไว้

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 1 แสดงชนิดของแบคทีเรีย และประสิทธิภาพในการกำจัดกำมะถันออกจากถ่านหิน

แบคทีเรีย	ประสิทธิภาพในการกำจัด (เปอร์เซ็นต์)		เวลา	เอกสารอ้างอิง
	กำมะถันอนินทรีย์	กำมะถันอินทรีย์		
Thiobacillus ferrooxidans	90	-	8-12 วัน	Hoffman และคณะ, 1981
T. ferrooxidans	68	-	5 วัน	Kargi, 1982
T. ferrooxidans TH1	90	50	25 วัน	Gokcay และ Yurteri, 1983
Mixed culture ของ *T. ferrooxidans* และ *T. thiooxidans*	97	-	5 วัน	Dugan และ Apel, 1978
Sulfolobus acidocaldarius	96	-	10 วัน	Kargi และ Robinson, 1982
S. acidocaldarius	-	44	28 วัน	Kargi และ Robinson, 1986
Mixed culture	-	20	10 วัน	Chandra และคณะ,1979
Preudomonas putida ATCC12633	75	37.4	5-7 วัน	Rai และ Reyniers, 1988
Rhodococcus rhodochrous	-	72	24 ชั่วโมง	Kilbane, 1990
Pseudomonas CB1	-	18-47	9-18 ชั่วโมง	Isbister และ Kobylinski, 1985

หมายเหตุ - หมายถึงไม่ได้ทำการศึกษา

การกำจัดกำมะถันอินทรีย์ออกจากถ่านหินโดยแบคทีเรีย

กำมะถันอินทรีย์หรือกำมะถันที่พบอยู่ในโครงสร้างโมเลกุลของถ่านหินนั้น ส่วนใหญ่อยู่ในรูปไดเบนโซไธโอฟีน (dibenzothiophene, DBT) ดังนั้นจึงนิยมใช้ไดเบนโซไธโอฟีนเป็นตัวแทนของกำมะถันอินทรีย์ในกระบวนการคัดแยกสายพันธุ์ของแบคทีเรีย ซึ่งสามารถย่อยสลายกำมะถันอินทรีย์ออกจากถ่านหิน (Chandra และคณะ, 1979; Monticello และคณะ, 1985; Stoner และคณะ, 1990; Omori และคณะ, 1992) เนื่องจากโมเลกุลกำมะถันเชื่อมด้วยพันธะโควาเลนท์อยู่ภายในโครงสร้างโมเลกุลของถ่านหิน หรือโมเลกุลของไดเบนโซไธโอฟีน ดังนั้น เพื่อรักษาสมบัติของถ่านหินในการเป็นเชื้อเพลิง การย่อยสลายหรือดึงโมเลกุลกำมะถันออกจากโมเลกุลของไดเบนโซไธโอฟีนจึงต้องไม่ทำให้โครงสร้างส่วนอื่นของไดเบนโซไธโอฟีนถูกย่อยสลายไปด้วย ในการคัดเลือกหาแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายไดเบนโซไธโอฟีนโดยวัตถุประสงค์ที่จะนำมาใช้ประโยชน์ในกระบวนการกำจัดกำมะถันอินทรีย์ออกจากถ่านหินนั้นจึงต้องคำนึงถึงวิธีในการย่อยสลายของแบคทีเรียแต่ละชนิด กล่าวคือแบคทีเรียนั้น ๆ ต้องย่อยสลายไดเบนโซไธโอฟีนโดยวิธีที่ดึงเอาเฉพาะโมเลกุลของกำมะถันออกมาจากโมเลกุลของไดเบนโซไธโอฟีนเท่านั้น ไม่ย่อยสลายโครงสร้างส่วนอื่น ๆ

กลไกการย่อยสลายไดเบนโซไธโอฟีนโดยแบคทีเรียแบ่งได้ 2 ชนิด (ดังแสดงในรูปที่ 2) (Kilbane, 1990)

1. Sulfoxide-Sulfone-Sulfonate-Sulfate pathway (4S หรือ sulfur-specific metabolic pathway) (Kibane, 1989)

กลไกนี้ย่อยสลายเอาเฉพาะโมเลกุลกำมะถันออกจากโมเลกุลของไดเบนโซไธโอฟีน ไม่ย่อยสลายโครงสร้างส่วนอื่น ๆ ของไดเบนโซไธโอฟีน กล่าวคือย่อยสลายเฉพาะพันธะระหว่างกำมะถันและคาร์บอนในโครงสร้างของไดเบนโซไธโอฟีนเท่านั้น สมบัติของถ่านหินในการเป็นเชื้อเพลิงจึงจะไม่ถูกทำลายไป แบคทีเรียซึ่งจะสามารถนำมาใช้ประโยชน์ในกระบวนการกำจัดกำมะถันอินทรีย์ออกจากถ่านหินได้นั้น ต้องย่อยสลายไดเบนโซไธโอฟีนโดยกลไกนี้เท่านั้น

2. Carbon-destructive metabolic pathway

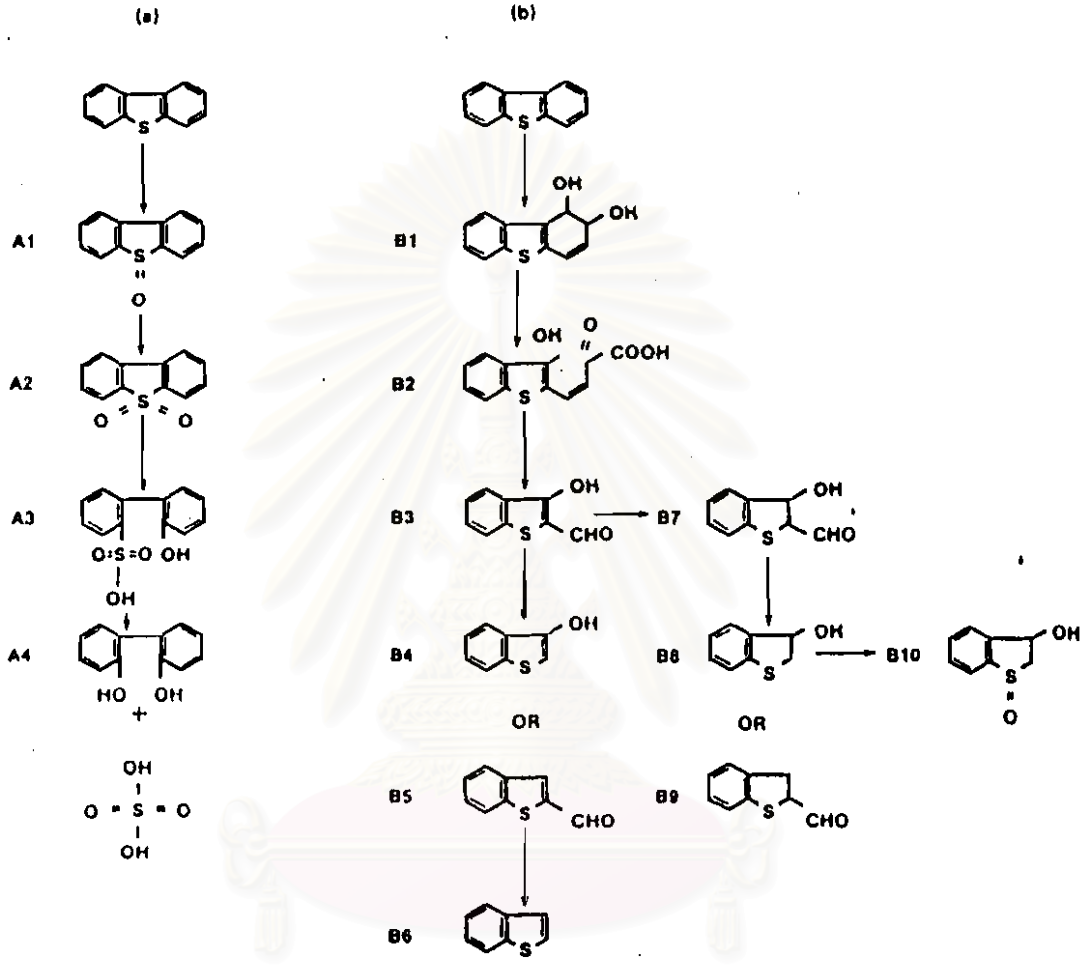
กลไกนี้ย่อยสลายพันธะระหว่างคาร์บอนและคาร์บอนในโครงสร้างของไดเบนโซไธโอฟีน ที่หมู่เบนซีน (benzene ring) ไม่ย่อยสลายกำมะถันออกจากหมู่ไธโอฟีน (thiophene) ทำให้สมบัติของถ่านหินในการเป็นเชื้อเพลิงถูกทำลาย กลไกนี้ค้นพบครั้งแรกโดย Kodama และคณะ ในปี ค.ศ. 1968 โดยพบว่าเมื่อ

โมเลกุลของไดเบนโซไธโอฟีนซึ่งไม่มีสีและไม่ละลายในน้ำถูกย่อยสลายด้วยจุลินทรีย์โดยกลไกนี้ จะได้สารประกอบที่ละลายน้ำได้มีสีเหลือง ส้ม แดง หรือม่วง

เป้าหมายพื้นฐานในกระบวนการกำจัดกำมะถันอินทรีย์ออกจากถ่านหินด้วยวิธีทางชีวภาพ คือต้องการกำจัดกำมะถันในโครงสร้างโมเลกุลของถ่านหินออกไป โดยที่สมบัติในการเป็นเชื้อเพลิงของถ่านหินไม่ถูกทำลายไปด้วย ซึ่งหากใช้ไดเบนโซไธโอฟีนเป็นตัวแทนของกำมะถันอินทรีย์ในการทดสอบกลไกการย่อยสลายกำมะถันอินทรีย์ของแบคทีเรีย กลไก 4S หรือ sulfur specific pathway คือกลไกที่ต้องการ และในการตรวจพิสูจน์ว่าแบคทีเรียย่อยสลายไดเบนโซไธโอฟีนโดยกลไก 4S อาจทำได้โดยการวิเคราะห์หา 2-ไฮดรอกซีไบฟีนิล (2-hydroxybiphenyl, 2-HBP) ในผลิตภัณฑ์สุดท้ายที่ได้จากการย่อยสลายไดเบนโซไธโอฟีน

Kilbane (1990) ได้รวบรวมข้อมูลเกี่ยวกับแบคทีเรียสายพันธุ์ต่าง ๆ ที่มีผู้รายงานว่าสามารถย่อยสลายไดเบนโซไธโอฟีน รวมทั้งจำแนกกลไกการย่อยสลายของแบคทีเรียเหล่านั้น ดังแสดงในตารางที่ 2

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 2 วิถีการย่อยสลายไดเบนโซไธโอฟีน (DBT) โดยแบคทีเรีย (Kilbane, 1990)

(a) Sulfoxide-sulfone-sulfonate-sulfate (4S) pathway

(b) Carbon-destructive metabolic pathway

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 2 แสดงแบคทีเรียสายพันธุ์ต่าง ๆ ที่สามารถย่อยสลายไดเบนโซไธโอฟีน

แบคทีเรีย	กลไกการย่อยสลายไดเบนโซไธฟีน		ผลิตภัณฑ์สุดท้าย	เอกสารอ้างอิง
	sulfur specific	carbon destructive		
Pseudomonas jianii	8	92	A1, B2, B3	Kodama และคณะ (1970,1973)
Acinetobacter sp.	0	100	B2	Malik และ Claus (1976)
Rhizobium sp.				
P. aeroginosa	0	100	B2	Hou และ Laskin (1976)
Beijerinckia sp.	Minor	Major	A1, B3	Laborde และ Gibson (1977)
Pseudomonas sp.	0	100	B3	Monticello และคณะ (1985)
P. putida			A2, B3	Mormile และ Atlas (1988)
Pseudomonas sp. HL7b	0	100	B3	Foght และ Westlake (1988)
Pseudomonas sp. TG 232	32	68	A1, B6, B10	Kilbane (1989)
Mixed culture (IGTS7)	100	0	A4	Kilbane (1990)
Corynebacterium sp. SY1			A4	Omori และคณะ (1992)
Rhodococcus rhodochrous IGTS8			A4	Kilbane และ Jackowski (1992)
Brivibacterium sp. DO	0	100	benzoate	van Afferden และคณะ (1993)
R. erythropolis D-1	100	0	A4	Izumi และคณะ (1994)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การศึกษาสมบัติและกระบวนการควบคุมกิจกรรมของเอนไซม์ย่อยสลายไดเบนโซไธโอฟีนของ *Rhodococcus erythropolis* D-1

Oshiro และคณะ (1994) รายงานว่าเอนไซม์ในสารสกัดจากเซลล์ของ *R. erythropolis* D-1 ซึ่งเพาะเลี้ยงไว้ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีไดเบนโซไธโอฟีนเป็นแหล่งกำมะถันเพียงอย่างเดียว สามารถย่อยสลายไดเบนโซไธโอฟีนไปเป็น 2-ไฮดรอกซีไบฟีนิลนั้นเป็นเอนไซม์ในกลุ่มออกซิโดรีดักเตส (oxidoreductase) และรายงานว่า NADH ซึ่งเป็นโคแฟกเตอร์ (co-factor) ของเอนไซม์ในกลุ่มออกซิโดรีดักเตส จำเป็นต่อกิจกรรมของเอนไซม์ในปฏิกิริยาการย่อยสลายไดเบนโซไธโอฟีน โดยพบว่ากิจกรรมของเอนไซม์จะมีค่าสูงที่สุดเมื่อเติม NADH ลงไปในปฏิกิริยาที่ความเข้มข้นสุดท้าย 5 มิลลิโมลาร์ ในปี ค.ศ. 1995 Oshiro และคณะก็รายงานว่า FAD และ FMN ที่ความเข้มข้นต่ำคือ 10 ไมโครโมล สามารถเพิ่มกิจกรรมของเอนไซม์ย่อยสลายไดเบนโซไธโอฟีนในสารสกัดจากเซลล์ของ *R. erythropolis* D-1 ซึ่งผ่านการทำให้บริสุทธิ์โดยการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตและด้วยคอลัมน์ DEAE-Sepharose แต่ FAD และ FMN ที่ความเข้มข้นสูงคือ 1 มิลลิโมลาร์จะยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ ทั้งนี้สันนิษฐานว่าในขั้นตอนการทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์นั้น เอนไซม์เกิดการสูญเสีย flavin cofactor ไป และเมื่อทำการศึกษากับเอนไซม์ซึ่งผ่านการทำให้บริสุทธิ์เพียงบางส่วนคือผ่านขั้นตอนการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตเท่านั้น พบว่าทั้ง FAD และ FMN ไม่สามารถเพิ่มกิจกรรมของเอนไซม์แต่กลับยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ ซึ่งผลการศึกษาที่ได้นี้สนับสนุนข้อสันนิษฐานข้างต้น เมื่อเปรียบเทียบปริมาณของฟลาวิน โคเอนไซม์ (flavin coenzyme) คือ 10 ไมโครโมล กับปริมาณของ NADH คือ 5 มิลลิโมลาร์ ในการทำให้กิจกรรมของเอนไซม์สูงที่สุด จึงสรุปว่าฟลาวิน โคเอนไซม์ทำหน้าที่เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ในขณะที่ NADH ทำหน้าที่เป็นสารตั้งต้นของปฏิกิริยาคือเป็นสารซึ่งถูกรีดิวซ์ในปฏิกิริยา

ค.ศ. 1996 Oshiro และคณะ รายงานผลการศึกษากระบวนการควบคุมกิจกรรมของเอนไซม์ย่อยสลายไดเบนโซไธโอฟีนของ *R. erythropolis* D-1 พบว่าเซลล์จะผลิตเอนไซม์เมื่อเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีไดเบนโซไธโอฟีน หรือ thioxanthen 9-one หรือไดเบนโซไธโอฟีน ซัลโฟน (dibenzothiophene sulfone) เป็นแหล่งกำมะถันเพียงอย่างเดียว โดยจะผลิตเอนไซม์มากที่สุดเมื่อเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีไดเบนโซไธโอฟีน การเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีไดเบนโซไธโอฟีนเป็นแหล่งกำมะถันร่วมกับกรดมีเธนซัลโฟนิค (methanesulfonic acid) และโซเดียมซัลเฟต พบว่าการผลิตเอนไซม์จะถูกยับยั้งอย่างสมบูรณ์ เมื่อความเข้มข้นของไดเบนโซไธโอฟีนเท่ากับ 0.3 มิลลิโมลาร์ และความเข้มข้นของกรดมีเธนซัลโฟนิค และโซเดียมซัลเฟต เท่ากับ 0.1 และ 0.5 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ ผลการศึกษาผลของผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากปฏิกิริยาการย่อยสลายไดเบนโซไธโอฟีนพบว่า 2-ไฮดรอกซีไบฟีนิล และ 2, 2'-ไดไฮดรอกซีไบฟีนิล สามารถยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ในสารสกัดจากเซลล์ซึ่งเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีไดเบนโซไธโอฟีนเป็นแหล่งกำมะถันเพียงอย่างเดียว โดยพบว่าที่ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ 2-ไฮดรอกซีไบฟีนิล และ 2, 2'-ไดไฮดรอกซีไบฟีนิล สามารถยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ลง 50 และ 70 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ แต่ซัลเฟตไม่สามารถยับยั้งกิจ

กรรมของเอนไซม์ในสารสกัดจากเซลล์ได้ และเมื่อทำการศึกษาผลของ 2-ไฮดรอกซีไบฟีนิล และ 2,2'-ไดไฮดรอกซีไบฟีนิล และไบฟีนิลต่อการเจริญของเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีไดเบนโซไธโอฟีน หรือโซเดียมซัลเฟตเข้มข้น 0.3 มิลลิโมลาร์ เป็นแหล่งกำมะถันเพียงอย่างเดียว พบว่า 2-ไฮดรอกซีไบฟีนิลเข้มข้น 0.5 มิลลิโมลาร์ และ 2, 2'-ไดไฮดรอกซีไบฟีนิลเข้มข้น 1.0 มิลลิโมลาร์ สามารถยับยั้งการเจริญทั้งหมดของเชื้อเฉพาะเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีไดเบนโซไธโอฟีนเป็นแหล่งกำมะถัน และจากผลการทดลองข้างต้น Ohshiro และคณะจึงสันนิษฐานว่าความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีไดเบน-โซไธโอฟีนเป็นแหล่งกำมะถันเพียงอย่างเดียวของ 2-ไฮดรอกซีไบฟีนิล และ 2, 2'-ไดไฮดรอกซีไบฟีนิลนั้นเกิดขึ้นเนื่องจากการที่สารทั้งสองชนิดสามารถยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ย่อยสลายไดเบนโซไธโอฟีน ซึ่งเป็นแหล่งกำมะถันเพื่อการเจริญเพียงอย่างเดียว จึงทำให้เซลล์ขาดกำมะถันเพื่อการเจริญ และจากการที่ไบฟีนิลไม่สามารถยังยั้งทั้งการเจริญและกิจกรรมของเอนไซม์ได้เช่นเดียวกันกับ 2-ไฮดรอกซีไบฟีนิล และ 2, 2'-ไดไฮดรอกซีไบฟีนิล Oshiro และคณะ จึงสรุปว่า หมู่ไฮดรอกซีของสารไบฟีนิลจำเป็นในกระบวนการยับยั้งการเจริญและกระบวนการยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ย่อยสลายไดเบนโซไธโอฟีน

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การสร้างสายพันธุ์แบคทีเรียให้มีประสิทธิภาพสูงในการย่อยสลายกำมะถันอินทรีย์โดยวิธีพันธุวิศวกรรม

Kargi และ Robinson (1982 และ 1986) รายงานว่า *S. acidocaldarius* สามารถกำจัด 96 เปอร์เซ็นต์ของกำมะถันอนินทรีย์ทั้งหมดในถ่านหินได้ภายในเวลา 10 วัน และสามารถกำจัด 44 เปอร์เซ็นต์ของกำมะถันอินทรีย์ทั้งหมดในถ่านหินได้ภายในเวลา 28 วัน ตามลำดับ และ Gokcay และ Yurteri (1983) รายงานว่า *T. ferrooxidans* TH1 สามารถกำจัด 90 และ 50 เปอร์เซ็นต์ของกำมะถันอนินทรีย์และกำมะถันอินทรีย์ทั้งหมดในถ่านหินภายในเวลา 25 วัน แม้ว่าแบคทีเรียทั้งสองสายพันธุ์นี้จะสามารถเจริญได้ดีที่อุณหภูมิสูงแต่ก็ไม่มีศักยภาพในการที่จะนำมาประยุกต์ใช้เพื่อการกำจัดกำมะถันออกจากถ่านหินได้จริง ทั้งนี้เพราะกระบวนการในการกำจัดกำมะถันใช้เวลานานเกินไป จึงเป็นความจำเป็นต้องทำการสร้างสายพันธุ์ของแบคทีเรียให้มีประสิทธิภาพสูงในการย่อยสลายทั้งกำมะถันอนินทรีย์และกำมะถันอินทรีย์โดยวิธีทางพันธุวิศวกรรม

Monticello และคณะ (1985) รายงานว่า *Pseudomonas* 2 สายพันธุ์ คือ *P. alcaligenes* และ *P. putida* ซึ่งแยกได้จากดินบริเวณที่มีน้ำมันปนเปื้อนโดยวิธี enrichment culture โดยใช้ไดเบนโซไธโอฟีนเป็นตัวแทนของแหล่งกำมะถันอินทรีย์ สามารถออกซิไดซ์ไดเบนโซไธโอฟีนไปเป็นสารกำมะถันซึ่งมีสีเหลืองหรือสีส้ม ละลายน้ำได้ ผลการตรวจหาพลาสมิดพบว่า *Pseudomonas* ทั้ง 2 สายพันธุ์ข้างต้นมีพลาสมิด 1 อันขนาด 55 เมกาดาลตัน การเพาะเลี้ยง *Pseudomonas* ทั้ง 2 สายพันธุ์นี้ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมโนโวไบโอซิน (novobiocin) ที่ความเข้มข้นสุดท้าย 30 ไมโครกรัม/มล. มีผลทำให้เซลล์สูญเสียพลาสมิดไปพร้อมกับสูญเสียความสามารถในการออกซิไดซ์ไดเบนโซไธโอฟีน และการใส่พลาสมิดขนาด 55 เมกาดาลตันที่เซลล์ได้สูญเสียไปกลับเข้ามาดังเดิมโดยวิธีคอนจูเกชัน (conjugation) พบว่ามีผลทำให้เซลล์กลับมามีความสามารถในการออกซิไดซ์ไดเบนโซไธโอฟีนได้เช่นเดิม แสดงว่ายีนที่ควบคุมความสามารถในการออกซิไดซ์ไดเบนโซไธโอฟีนของ *Pseudomonas* ทั้ง 2 สายพันธุ์นี้อยู่บนพลาสมิด นับเป็นรายงานแรกที่พบว่ายีนควบคุมความสามารถในการออกซิไดซ์ไดเบนโซไธโอฟีนอยู่บนพลาสมิด *Pseudomonas* ทั้ง 2 สายพันธุ์นี้ไม่สามารถใช้ไดเบนโซไธโอฟีนเป็นทั้งแหล่งพลังงานและแหล่งคาร์บอนแต่เพียงอย่างเดียวเพื่อการเจริญ นอกจากนั้นยังพบว่าผลิตภัณฑ์ที่ได้จากกระบวนการออกซิเดชันของไดเบนโซไธโอฟีนมีผลยับยั้งการเจริญของเซลล์และกระบวนการออกซิไดซ์ไดเบนโซไธโอฟีนเอง ไดเบนโซไธโอฟีน, แนพธาลีน (napthalene) หรือซาลิไซเลท (salicylate) สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดกระบวนการออกซิเดชันของไดเบนโซไธโอฟีน การเติมคลอแรมฟีนิคอล (chloramphenicol) หรือ ซัคซิเนท (succinate) ลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อ สามารถยับยั้งกระบวนการเหนี่ยวนำข้างต้น ซึ่งผลการทดลองที่ได้นี้สอดคล้องกับรายงานของ Clarke และ Omston (1975) ซึ่งทำการศึกษากับ *Pseudomonas* แล้วพบว่าซัคซิเนท สามารถยับยั้งกระบวนการย่อยสลายสารประกอบอะโรมาติก โดยกระบวนการ catabolite repression

Finnerty และ Robinson (1986) ประสบความสำเร็จในการโคลนยีนควบคุมกระบวนการออกซิเดชันของไดเบนโซไธโอฟีนจาก *P. alcaligenes* (Monticello และคณะ, 1985) โดยการสร้าง

ธนาคารยีนของพลาสมิดขนาด 72 กิโลเบสที่พบด้วยการตัดด้วยเอนไซม์เรสทริกชัน *Sau* 3A เลือกชิ้นดีเอ็นเอขนาด 20 กิโลเบส โคลนเข้าสู่คอสมิดพาหะ pIMS 6026 ที่ตัดด้วยเอนไซม์เรสทริกชัน *Bam* HI แล้วนำมาทำทรานเฟกชันเข้าสู่ *E. coli* DH1 subclone เข้าสู่พลาสมิด pRK 2013 แล้วถ่ายพลาสมิดรีคอมบิแนนท์โดยวิธีคอนจูเกชันเข้าสู่ *P. alcaligenes* สายพันธุ์กลายพันธุ์ซึ่งได้ทำให้ไม่สามารถออกซิไดซ์ไดเบนโซไธโอฟีนได้ คัดเลือกทรานคอนจูแกนท์ที่ต้องการจากลักษณะซึ่งกลับมาสามารถออกซิไดซ์ไดเบนโซไธโอฟีนได้อีก แยกพลาสมิดจากทรานคอนจูแกนท์ที่ได้ เรียกพลาสมิด pC1 แล้วทำการทรานฟอร์มเข้าสู่ *E. coli* DH1 พบว่ายีนควบคุมกระบวนการออกซิเดชันไดเบนโซไธโอฟีนของ *P. alcaligenes* ที่โคลนได้ไม่สามารถแสดงออกใน *E. coli* DH1

Foght และ Westlake (1990) ประสบความสำเร็จในการทำให้ยีนควบคุมกระบวนการออกซิเดชันของไดเบนโซไธโอฟีนของ *P. alcaligenes* ซึ่ง Finnerty และ Robinson (1986) โคลนได้แสดงออกโดยการนำ *Pseudomonas* สายพันธุ์ HL7b ซึ่งสามารถออกซิไดซ์ไดเบนโซไธโอฟีน มาคัดเลือกหาสายพันธุ์กลายพันธุ์ที่เกิดขึ้นเอง กล่าวคือไม่สามารถออกซิไดซ์ไดเบนโซไธโอฟีนได้ โดยการเพาะเลี้ยง *Pseudomonas* สายพันธุ์ HL7b ในอาหารเหลวทริปติเคส ซอย บรอท (trypticase soy broth) แล้วถ่ายเชื้อโดยวิธีกระจายเชื้อ (spread plate) ลงบนผิวหน้าอาหารแข็ง BYP หลังการบ่มเชื้อแล้ว นำมาฉีดพ่นด้วยสารละลายไดเบนโซไธโอฟีนเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ ในอีเทอร์ ตรวจหาสายพันธุ์กลายพันธุ์ที่ต้องการ คือโคโลนีที่ไม่เปลี่ยนเป็นสีส้มหลังจากการฉีดพ่นด้วยสารละลายไดเบนโซไธโอฟีนไปแล้วมากกว่า 10 นาที เรียกสายพันธุ์กลายพันธุ์ที่ได้ว่า *Pseudomonas* สายพันธุ์ HL7bR เพื่อใช้เป็นเซลล์ผู้รับในกระบวนการคอนจูเกชัน ทำการถ่ายโอนพลาสมิด pC1 ซึ่งมียีนดื้อต่อยาปฏิชีวนะเตตร้าซัยคลิน โดยวิธีคอนจูเกชัน ใช้ *E. coli* DH1 ซึ่งมีพลาสมิด pC1 เป็นเซลล์ผู้ให้ และใช้ *Pseudomonas* HL7bR ซึ่งมียีนดื้อต่อยาปฏิชีวนะแอมพิซิลิน เป็นเซลล์ผู้รับ คัดเลือกทรานคอนจูแกนท์ คือ *Pseudomonas* HL7bR ที่มีพลาสมิด pC1 จากโคโลนีที่สามารถเจริญได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งที่เติมยาปฏิชีวนะเตตร้าซัยคลินร่วมกับยาปฏิชีวนะแอมพิซิลิน พบว่าทรานคอนจูแกนท์ที่ได้สามารถออกซิไดซ์ไดเบนโซไธโอฟีน กล่าวคือโคโลนีที่เจริญบนอาหารแข็ง BYP จะเปลี่ยนเป็นสีส้มหลังการพ่นด้วยสารละลายไดเบนโซไธโอฟีนเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ ในอีเทอร์ภายในเวลา 10 นาที ผลการนำทรานคอนจูแกนท์มาสกัดเอาพลาสมิด แล้วนำมาวิเคราะห์ด้วยอะกาโรส เจล อิเลคโตรโฟริซิส พบว่ามีพลาสมิด pC1 และเมื่อนำมาพิสูจน์ซ้ำด้วยวิธี DNA-DNA Hybridisation โดยใช้พลาสมิด pC1 ซึ่งติดฉลากด้วย {α-^{32}P}dATP โดยวิธี nick translation เป็นตัวติดตาม พบว่าพลาสมิดที่แยกได้จากทรานคอนจูแกนท์ให้ positive signal

เนื่องจาก *Pseudomonas* ย่อยสลายไดเบนโซไธโอฟีนด้วยวิถีที่ทำลายโครงสร้างทางโมเลกุลของไดเบนโซไธโอฟีน ทำให้คุณค่าความเป็นเชื้อเพลิงของถ่านหินเสียไป ยีนที่โคลนได้จึงไม่มีศักยภาพในการนำมาประยุกต์ใช้เพื่อการเพิ่มประสิทธิภาพของจุลินทรีย์ในการย่อยสลายกำมะถันอินทรีย์ออกจากถ่านหิน

Denome และคณะ (1993) ประสบความสำเร็จในการโคลนยีนที่เป็นรหัสของเอนไซม์ย่อยสลายไดเบนโซไธโอฟีนโดยวิถีโฟเอสของ *Rhodococcus* IGTS8 โดยการสร้างขนาดารยีนของ *Rhodococcus* IGTS8 ด้วยคอสมิดพาหะ pLAFR5 แล้วทรานฟอร์มเข้าสู่ *E. coli* XL1-Blue ไม่พบการแสดงออกของยีน แต่เมื่อนำมาทรานฟอร์มเข้าสู่ *Rhodococcus* UV1 ซึ่งเป็นสายพันธุ์กลายพันธุ์ของ *Rhodococcus* IGTS8 ที่ถูกทำให้ไม่สามารถย่อยสลายไดเบนโซไธโอฟีน ตรวจพบทรานฟอร์แมนท์ที่กลับมามีความสามารถในการย่อยสลายไดเบนโซไธโอฟีนได้ไม่สามารถแยกพลาสมิดรีคอมบิแนนท์อิสระออกมาจากทรานฟอร์แมนท์ที่คัดเลือกไว้ การสอดใส่จุดเริ่มต้นของการแปลรหัสที่มาจากพลาสมิดของ *Rhodococcus* เอง เข้าไปในพลาสมิดรีคอมบิแนนท์ ทำให้พลาสมิดรีคอมบิแนนท์อยู่อย่างเป็นอิสระใน *Rhodococcus* UV1 และสามารถแยกออกมาจากเซลล์ทรานฟอร์แมนท์ได้ จากผลการทำแผนที่เรสทริกชัน และผลการ subclone ทำให้ทราบว่ายีนที่เป็นรหัสของเอนไซม์ย่อยสลายไดเบนโซไธโอฟีนที่โคลนได้นี้ขนาด 4.0 กิโลเบส การทรานฟอร์มพลาสมิดรีคอมบิแนนท์ที่แยกออกมาได้จากเซลล์ *Rhodococcus* UV1 ซึ่งกลับมามีความสามารถในการย่อยสลายไดเบนโซไธโอฟีนเข้าสู่ *R. fascians* D188-5 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่ไม่สามารถย่อยสลายไดเบนโซไธโอฟีนตามธรรมชาติ มีผลทำให้ *R. fascians* D188-5 กลายเป็นสายพันธุ์ที่สามารถย่อยสลายไดเบนโซไธโอฟีนได้ แสดงว่ายีนที่โคลนได้เป็นยีนทั้งหมดที่เกี่ยวข้องในกระบวนการย่อยสลายไดเบนโซไธโอฟีน ปีต่อมา Denome และคณะ (1994) รายงานลำดับเบสของยีนที่เป็นรหัสของเอนไซม์ย่อยสลายไดเบนโซไธโอฟีนของ *Rhodococcus* IGTS8 ขนาด 4.0 กิโลเบสที่เขาโคลนได้ พบว่าประกอบด้วย 3 กรอบรหัส (open reading frame) ตั้งชื่อยีนทั้ง 3 ว่า *sox* A, B, C เมื่อทำการ subclone ยีนทั้ง 3 นี้ทีละ 1 ยีนแยกจากกันเข้าสู่ *E. coli* MZ1 พบว่าเมื่อใช้โปรโมเตอร์ชนิด λp_L และ ribosome binding site ชนิด λcII ยีนแต่ละยีนสามารถแสดงออกได้ โปรตีน SoxC ขนาดประมาณ 45 กิโลดาลตันทำหน้าที่ออกซิไดซ์ไดเบนโซไธโอฟีนไปเป็น DBT-5, 5'-dioxide โปรตีน SoxA ขนาดประมาณ 50 กิโลดาลตัน ทำหน้าที่ย่อยสลาย DBT-5, 5'-dioxide โปรตีน SoxB ขนาดประมาณ 40 กิโลดาลตัน ทำหน้าที่ร่วมกับโปรตีน SoxA ย่อยสลาย DBT-5, 5'-dioxide ไปเป็น 2-ไฮดรอกซีไบฟีนิล

การเพิ่มประสิทธิภาพการย่อยสลายกำมะถันอินทรีย์ของแบคทีเรียหรือการเพิ่มกิจกรรมของเอนไซม์ย่อยสลายกำมะถันอินทรีย์ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ของยีนย่อยสลายกำมะถันอินทรีย์โดยวิธีทางพันธุวิศวกรรม อาจทำได้โดยการเพิ่มจำนวนชุดของยีน และ/หรือการเพิ่มประสิทธิภาพในการแสดงออก (expression) ของยีน เนื่องจากผลิตภัณฑ์สุดท้ายที่ได้จากการย่อยสลายโมเลกุลกำมะถันออกจากโมเลกุลของถ่านหินคือกรดกำมะถัน ซึ่งจะมีผลทำให้ค่าความเป็นกรดด่างลดลง และ *Rhodococcus* เป็นแบคทีเรียที่เจริญได้ดีที่ความเป็นกรดด่าง เป็นกลาง ไม่สามารถเจริญในภาวะที่เป็นกรด ประสิทธิภาพการย่อยสลายกำมะถันอินทรีย์ออกจากถ่านหินของ *Rhodococcus* ในภาวะที่ไม่ควบคุมความเป็นกรดด่าง จึงถูกกำหนดด้วยปริมาณความเข้มข้นของกรดกำมะถันที่เกิดขึ้นหรือความเป็นกรดด่างต่ำสุดที่ *Rhodococcus* สามารถเจริญได้ ดังนั้นกระบวนการเพิ่มประสิทธิภาพการย่อยสลายกำมะถันอินทรีย์ของ *Rhodococcus* โดยวิธีทางพันธุวิศวกรรม

นอกเหนือจากที่กล่าวมาแล้วข้างต้น สิ่งสำคัญที่จะต้องคำนึงถึงคือเซลล์เจ้าบ้านที่ใช้ ต้องเป็นสายพันธุ์ที่ทนกรด สามารถเจริญได้ดีในภาวะที่มีความเป็นกรดสูงด้วย

Acidiphilium เป็นแบคทีเรียทนกรด ดำรงชีวิตแบบคีโมออกาโนโธรพ (chemoorganotrophs) คือใช้สารอินทรีย์เป็นแหล่งพลังงานและแหล่งคาร์บอนเพื่อการเจริญ มักพบอยู่ร่วมกับ *Thiobacillus ferrooxidans* ในน้ำทิ้งจากเหมืองถ่านหิน (Inagaki และคณะ, 1993) ทั้งนี้เนื่องจากแม้ว่า *T. ferrooxidans* จะไม่ต้องการสารอินทรีย์เพื่อการเจริญ แต่ในกระบวนการเจริญจะมีการปล่อยสารอินทรีย์ออกมา ซึ่งสารอินทรีย์นี้เป็นพิษต่อ *T. ferrooxidans* เอง (Roberto และคณะ,1991) การอยู่ร่วมกันระหว่าง *T. ferrooxidans* และ *Acidiphilium* นั้น *Acidiphilium* จะทำหน้าที่ใช้สารอินทรีย์ที่ *T. ferrooxidans* ปล่อยออกมาเพื่อการเจริญ เป็นการลดความเป็นพิษของสารอินทรีย์ต่อ *T. ferrooxidans* Inagaki และคณะ (1993) ได้สร้างพลาสมิดพาหะ pAH 101 ขนาด 8.8 กิโลเบส โดยการเชื่อมพลาสมิด pAH1 ขนาด 6.1 กิโลเบส ซึ่งเป็นพลาสมิดที่ยังไม่ทราบหน้าที่ (cryptic plasmid) แยกได้จาก *Acidiphilium* สายพันธุ์ 42H กับชิ้นยีนที่ตัดด้วยเอนไซม์เรสทริกชัน *Bam* HI ขนาด 1.7 กิโลเบส จากพลาสมิด pUC 19 ซึ่งประกอบด้วยจุดเริ่มต้นของการแปลรหัส (origin of replication) ของเชื้อ *E. coli* และยีนต้านทานต่อยาปฏิชีวนะแอมพิซิลิน แล้วทรานฟอร์มเข้าสู่ *A. facilis* ATCC 35904 โดยวิธีอิเลคโตรพอเรชัน (eletroporation) พบว่าเมื่อให้กระแสไฟฟ้า 10 กิโลโวลท์/ซม ระยะเวลาการให้และการหยุดให้กระแสไฟฟ้าสลับกัน (pulse time) นาน 7.0 มิลลิวินาที ประสิทธิภาพในการรับพลาสมิด pAH 101 ของ *A. facilis* ATCC 35904 เท่ากับ $3x10^3$ ทรานฟอร์แมนท์ต่อไมโครกรัมของพลาสมิด ตรวจพบการแสดงออกของยีนต้านต่อยาปฏิชีวนะแอมพิซิลิน ในทรานฟอร์แมนท์จึงสามารถใช้ยีนต้านต่อยาปฏิชีวนะแอมพิซิลินนี้เป็นยีนติดตาม (marker gene) การถ่ายโอนพลาสมิด pAH 101 ได้ จากผลการวิจัยนี้ *Acidophilium* จึงจัดเป็นแบคทีเรียที่มีความเหมาะสมที่จะนำมาใช้เป็นเซลล์เจ้าบ้านในกระบวนการโคลนยีนย่อยสลายกำมะถันอินทรีย์เพื่อเพิ่มกิจกรรมของเอนไซม์ย่อยสลายกำมะถันอินทรีย์

อย่างไรก็ตาม ดังได้กล่าวแล้วคือกำมะถันที่ปนเปื้อนอยู่ในถ่านหินแบ่งออกได้เป็น 2 ชนิด กำมะถันอนินทรีย์ และกำมะถันอินทรีย์ อัตราส่วนระหว่างกำมะถันอนินทรีย์และกำมะถันอินทรีย์ที่ปนเปื้อนในถ่านหินแต่ละแหล่งแตกต่างกัน แบคทีเรียที่มีผู้รายงานว่าสามารถย่อยสลายกำมะถันอนินทรีย์ได้ดีคือ *T. ferrooxidans* และ *S. acidocaldarius* แต่เนื่องจากได้มีการศึกษาวิธีการปรับปรุงสายพันธุ์ของ *T. ferrooxidans* โดยวิธีทางพันธุวิศวกรรมอย่างกว้างขวาง (Rawlings และ Kusano, 1994) และประสบความสำเร็จแล้ว ดังนั้น *T. ferrooxidans* จึงมีความพร้อมที่จะนำมาทำการปรับปรุงสายพันธุ์โดยวิธีทางพันธุ-วิศวกรรม *T. ferrooxidans* เป็นแบคทีเรียที่พบได้ทั่วไปในทางระบายน้ำจากเหมืองถ่านหิน เป็นแบคทีเรียพวกคีโมลิโธออโตโธรพ กล่าวคือได้พลังงานเพื่อการดำรงชีวิตจากกระบวนการออกซิเดชัน-รีดักชันสารอนินทรีย์ ในที่นี้คือสารประกอบสภาพรีดิวซ์ของเหล็กและกำมะถัน ได้คาร์บอนเพื่อการสังเคราะห์จากกระบวนการตรึงคาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2-fixation) โดยใช้คาร์บอนไดออกไซด์จากบรรยากาศ สามารถ

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เจริญได้ดีในภาวะที่มีความเป็นกรดสูง (acidophiles) พบว่ากระบวนการออกซิไดซ์กำมะถันรีดิวซ์ของ *T. ferrooxidans* อาจทำให้ค่าความเป็นกรดด่างลดลงมาถึง 1.5 แต่แบคทีเรียก็ยังคงเจริญได้

สำหรับแบคทีเรียที่มีผู้รายงานว่าสามารถย่อยสลายกำมะถันอินทรีย์ได้คือ *Acinetobacter, Beijerinckia, Pseudomonas, Corynebacterium, Brevibacterium, Rhodococcus* (Malik และ Claus, 1976; Laborde และ Gibbson, 1977; Monticello และ Finnerty, 1985; Omori และคณะ, 1992; van Afferden และคณะ, 1993; Izumi และคณะ, 1994) แบคทีเรียเหล่านี้จัดเป็นพวก คีโมออกา-โนโธรพ ได้พลังงานเพื่อการดำรงชีวิตโดยกระบวนการออกซิเดชัน-รีดักชันของสารอินทรีย์ ใช้สารอินทรีย์ในบริเวณที่เจริญเป็นแหล่งคาร์บอนเพื่อการสังเคราะห์ เจริญได้ดีที่ความเป็นกรดด่างที่เป็นกลาง

เนื่องจากข้อได้เปรียบของการใช้แบคทีเรียหรือวิธีทางชีวภาพในการกำจัดกำมะถันที่ปนเปื้อนออกจากถ่านหินคือ การที่แบคทีเรียสามารถกำจัดได้ทั้งกำมะถันอนินทรีย์และกำมะถันอินทรีย์ออกจากถ่านหิน แต่จะเห็นว่าการกำจัดกำมะถันอนินทรีย์และกำมะถันอินทรีย์โดยแบคทีเรียนั้นเป็นกิจกรรมของแบคทีเรียต่างกลุ่ม ความต้องการสารอาหารเพื่อใช้เป็นแหล่งพลังงานและแหล่งคาร์บอนต่างกัน ความสามารถในการทนกรดหรือความสามารถในการเจริญที่ความเป็นกรดด่างต่ำ อันเนื่องมาจากกรดกำมะถันซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์สุดท้ายของกระบวนการต่างกัน ดังนั้นการที่จะใช้แบคทีเรียในการกำจัดทั้งกำมะถันอนินทรีย์และกำมะถันอินทรีย์ออกจากถ่านหินในเวลาเดียวกัน จำเป็นต้องทำการถ่ายโอนยีนย่อยสลายกำมะถันอินทรีย์ มาใส่ในเซลล์แบคทีเรียสายพันธุ์ทนกรดที่สามารถย่อยสลายกำมะถันอนินทรีย์ เช่น *T. ferrooxidans* และเนื่องจาก *T. ferrooxidans* เจริญเติบโตช้า ระยะเวลาที่ใช้ในการกำจัดกำมะถันอนินทรีย์ออกจากถ่านหินจึงนาน Hoffman และคณะ (1981) และ Gokcay และ Yurteri (1983) รายงานว่า ต้องใช้เวลานานถึง 12 และ 25 วัน ตามลำดับ ในการกำจัดกำมะถันอนินทรีย์ออกไปได้ 90 เปอร์เซ็นต์ ของกำมะถันอนินทรีย์ทั้งหมด ดังนั้นเพื่อให้ได้ประสิทธิภาพสูงสุดในการกำจัดกำมะถันทั้งชนิดอนินทรีย์และอินทรีย์ออกจากถ่านหินโดยแบคทีเรียนั้น *T. ferrooxidans* ซึ่งจะนำมาใช้เป็นเซลล์เจ้าบ้านรับยีนย่อยสลายกำมะถันอินทรีย์นั้น จึงควรได้รับการปรับปรุงพันธุ์ให้มีประสิทธิภาพสูงในการกำจัดกำมะถันอนินทรีย์โดยวิธีทางพันธุวิศวกรรมมาก่อน และเนื่องจากความร้อนที่เกิดจากปฏิกิริยาสันดาปภายในกองถ่านหิน *T. ferrooxidans* TH1 ซึ่งสามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส (Gokcay และ Yurteri, 1983) จึงมีความเหมาะสมที่จะนำมาใช้เป็นเซลล์เจ้าบ้าน นอกจากนั้นสารอินทรีย์ในปริมาณเล็กน้อยยังไม่เป็นพิษต่อ *T. ferrooxidans* TH1 นี้ด้วย จะเห็นได้ว่าวิธีนี้มีข้อได้เปรียบกว่าการพยายามถ่ายโอนยีนย่อยสลายกำมะถันอินทรีย์จากแบคทีเรียสายพันธุ์ที่เจริญในภาวะเป็นกลาง มาใส่ในแบคทีเรียสายพันธุ์ทนกรด อาทิเช่น *Acidophilium* แม้ว่าจะพบว่าแบคทีเรียนี้มักจะพบอยู่ร่วมกับ *T. ferrooxidans* ก็ตาม ทั้งนี้เพราะ *Acidophilium* เป็นแบคทีเรียกลุ่มคีโมออกาโนโธรพ ต้องการสารอินทรีย์เพื่อการเจริญ ดังนั้นในการใช้เชื้อผสมระหว่าง *Acidophilium* และ *T. ferrooxidans* ในการกำจัดทั้งกำมะถันอินทรีย์และกำมะถันอนินทรีย์ออกจากถ่านหินในเวลาเดียวกัน จะต้องทำการเติมสารอินทรีย์เพื่อการเจริญให้แก่ *Acidophilium* ทำให้ถ่านหินถูกปนเปื้อนด้วยสารอินทรีย์

ปัจจุบันยีนที่เป็นรหัสของเอนไซม์ย่อยสลายไดเบนโซไธโอฟีนโดยวิถี 4S ที่โคลนได้สำเร็จแล้วคือ ยีนของ *Rhodococcus* IGTS8 ได้มีการจดสิทธิบัตรไว้แล้ว (Denome และคณะ, 1993) งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์ที่จะแยกแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายไดเบนโซไธโอฟีนโดยวิถี 4S ในประเทศไทย แล้วนำไปโคลนยีนต่อไป ซึ่งในขั้นตอนการโคลนยีนนั้นต้องการเซลล์ผู้รับยีน ซึ่งก็คือการนำแบคทีเรียที่คัดเลือกไว้ได้มาทำการกลายพันธุ์ ให้ไม่มีความสามารถในการย่อยสลายไดเบนโซไธโอฟีนโดยวิถี 4S และสิ่งที่จะบอกได้ว่าการโคลนยีนที่ต้องการประสบความสำเร็จหรือได้ยีนที่ต้องการแล้วนั้น ยีนดังกล่าวเมื่อถ่ายเข้าสู่เซลล์ผู้รับที่สร้างขึ้นมานี้จะต้องสามารถทำให้กลับกลายมาเป็นสายพันธุ์ที่สามารถย่อยสลายไดเบนโซไธโอฟีนโดยวิถี 4S ได้ดังเดิม ดังนั้นวิธีการในการตรวจหาสายพันธุ์ที่มีสมบัติดังกล่าว ต้องทำได้ง่ายและรวดเร็ว ในที่นี้คือวิธี ทินเลเยอร์ โครมาโตกราฟฟี ซึ่งจากกระบวนการหากการย่อยสลายไดเบนโซไธโอฟีนมี 2-ไฮดรอกซีไบฟีนิลเกิดขึ้นมาก การวิเคราะห์ก็จะยิ่งทำได้ง่าย ดังนั้นหลังจากที่สามารถคัดเลือกแบคทีเรียที่ต้องการไว้ได้แล้ว จึงได้ทำการศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงเพื่อให้ไดเบนโซไธโอฟีนถูกย่อยสลายกลายเป็น 2-ไฮดรอกซีไบฟีนิลในปริมาณสูง และตรวจสอบว่ายีนซึ่งเป็นรหัสของเอนไซม์ย่อยสลายไดเบนโซไธโอฟีนนั้นเป็นยีนที่อยู่บนโครโมโซมอลดีเอ็นเอ หรือพลาสมิดเพื่อประโยชน์ในการโคลนยีนต่อไป

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย