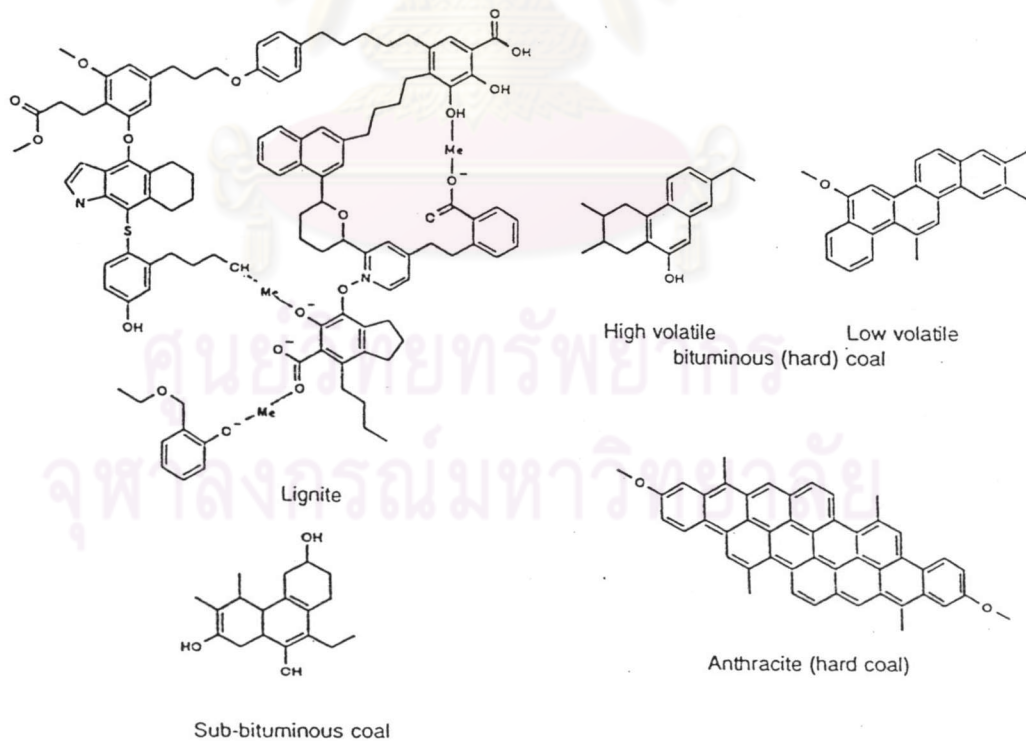


ประเทศไทยมีลิกไนท์ปริมาณมากทางภาคเหนือ เหมือนลิกไนท์ที่ อ.แม่เมาะ จ.ลำปาง จัดได้ว่าเป็นเหมืองลิกไนท์ที่ใหญ่ที่สุดในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ดังนั้นจึงได้มีความพยายามที่จะนำลิกไนท์เหล่านี้มาใช้ประโยชน์โดยไม่ก่อให้เกิดปัญหามลพิษ ลิกไนท์เป็นถ่านหินชนิดหนึ่งซึ่งเกิดจากการผุพังและการเปลี่ยนแปลงทางเคมีและทางกายภาพของซากพืชที่สะสมเป็นเวลานานภายใต้ความดันและความร้อนของเปลือกโลก สามารถแบ่งถ่านหินตามลำดับขั้นพัฒนาการ (rank of coal หรือ coalification) เรียงลำดับจากต่ำไปสูงได้ 4 ชนิด คือ ลิกไนท์ หรือ brown coal, ซับบิทูมินัส (sub-bituminous coal), บิทูมินัส (bituminous coal) และแอนทราไซต์ (anthracite) ลำดับขั้นพัฒนาการของถ่านหินจะสูงหรือต่ำนั้นขึ้นกับปริมาณความร้อนและความดันที่ซากพืชได้รับ ถ่านหินที่มีพัฒนาการสูงขึ้น ปริมาณน้ำ ปริมาณออกซิเจน ปริมาณไฮโดรเจน ขนาดรูพรุน และ reactivity ลดลง ในขณะที่ปริมาณคาร์บอน เปอร์เซ็นต์การสะท้อนแสง และความแข็งเพิ่มขึ้น ลิกไนท์เป็นถ่านหินที่มีพัฒนาการหรือคุณภาพต่ำที่สุด มีสีน้ำตาล น้ำตาล เพราะแตกร่วนง่าย มีความชื้นสูง ลูกไหม้ได้เมื่อทิ้งไว้ในอากาศ ลักษณะโครงสร้างทางเคมีของถ่านหิน (Wise 1990) ดังแสดงในภาพที่ 1.1



ภาพที่ 1.1 โครงสร้างทางเคมีของถ่านหินชนิดต่างๆ

สมบัติบางประการของถ่านหินชนิดต่างๆ (Diessel 1992) ดังแสดงในตารางที่ 1.1

ตารางที่ 1.1 สมบัติบางประการของถ่านหินชนิดต่างๆ

ลำดับขั้นพัฒนา ของถ่านหิน (จากต่ำไปสูง)	% อะโรมาติก คาร์บอน	% คาร์บอน	% สสาร ระเหย	พลังงานจำเพาะ (เมกกะจูล/กิโลกรัม)	% ความชื้น	% การสะท้อนแสง	
						ค่าจาก การสุ่ม	ค่า สูงสุด
ลิกไนท์	30-50	71	52	23	30	0.40	0.42
ซับบิทูมินัส	60	80	40	33.5	5	0.60	0.63
บิทูมินัส (การระเหยสูง)	70	86	31	35.6	3	0.97	1.03
บิทูมินัส (การระเหย ปานกลาง)	ND	90	22	36	<1	1.47	1.58
บิทูมินัส (การระเหยต่ำ)	75-80	91	14	36.4	1	1.85	1.97
แอนทราไซต์	95	95	2	35.2	2	6.55	7

หมายเหตุ ND คือ ไม่ได้แสดงข้อมูลไว้

ถ่านหินเป็นสารอินทรีย์เชิงซ้อน องค์ประกอบหลักคือ คาร์บอน ไฮโดรเจน ออกซิเจน ธาตุอื่นๆ ที่พบเจือปนได้แก่ ซิลิกอน, อลูมิเนียม, แคลเซียม, ไนโตรเจน, กำมะถัน และเหล็ก เป็นต้น

กำมะถันที่ปนเปื้อนอยู่ในถ่านหิน แบ่งออกเป็น 2 ชนิด คือ

1. กำมะถันอินทรีย์ (organic sulfur)

พบกระจายอยู่ทั่วไปในโมเลกุลของถ่านหิน มีโครงสร้างพันธะทางเคมีหลายรูปแบบ ได้แก่ เฮเทอโรไซคลิก (heterocyclic, = CH - S - CH =), ซัลไฟด์ (sulfide, R - S - R'), ไดซัลไฟด์ (disulfide, R - S - S - R'), เมอแคปแทน (mercaptan, R - S - H) และไทโอฟีนอล (thiophenol, C - S - H) พันธะเหล่านี้มีความเสถียรมาก พบกำมะถันอินทรีย์ในรูปของสารประกอบเฮเทอโรไซคลิกมากที่สุด กำมะถันอินทรีย์สร้างพันธะเคมีกับคาร์บอนซึ่งเป็นองค์ประกอบในโครงสร้างของถ่านหิน ดังนั้นการขจัดกำมะถันอินทรีย์ออกจากถ่านหินจึงอาจทำลายโครงสร้างทางเคมีของถ่านหินและอาจทำให้เสียสมบัติบางส่วน ของถ่านหินไป (Dugan 1986, Klein และคณะ 1994)

2. กำมะถันอนินทรีย์ (inorganic sulfur) แบ่งเป็น 2 ชนิด คือ

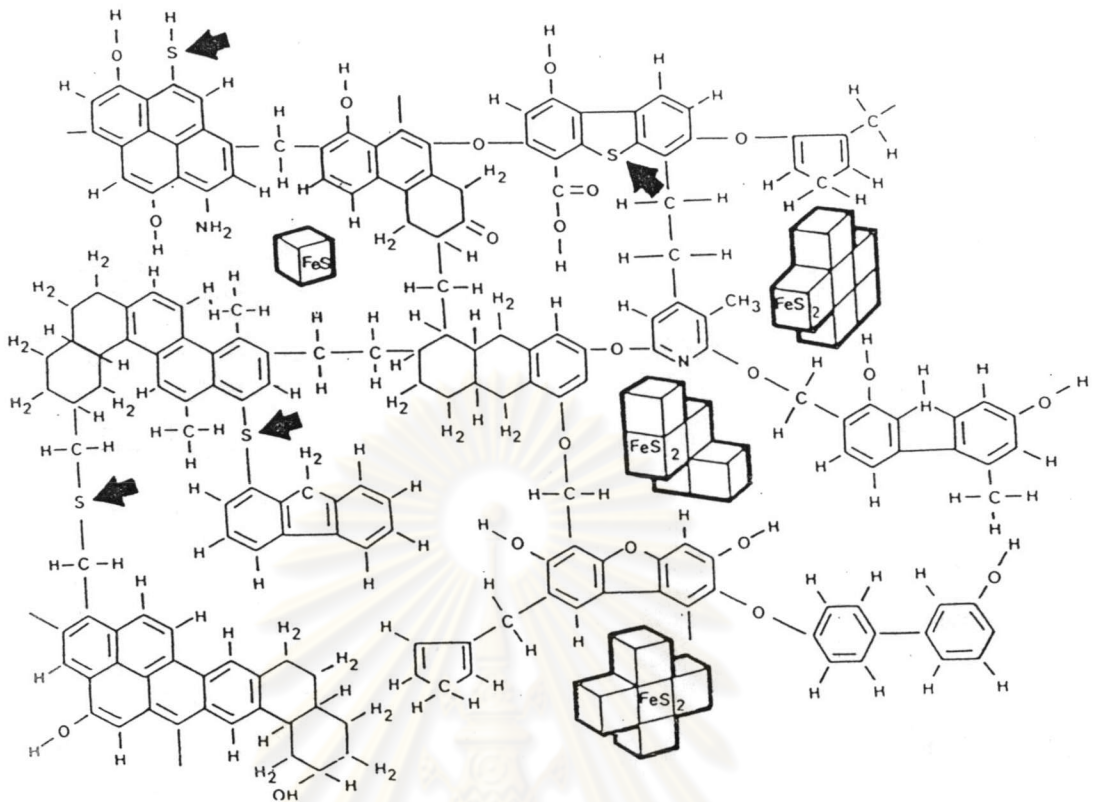
2.1 กำมะถันไพไรต์ (pyritic sulfur)

อยู่ในรูปของสารประกอบโลหะซัลไฟด์ แร่ที่พบมากที่สุดคือ แร่ไพไรต์ (pyrite) และแร่มาร์คาไซต์ (marcasite) แร่ทั้งสองชนิดมีสูตรทางเคมีเหมือนกันคือ FeS_2 แต่มีโครงสร้างผลึกและสมบัติทางกายภาพต่างกัน ผลึกของไพไรต์มีรูปร่างเป็นสี่เหลี่ยมลูกบาศก์ (cubic) แต่ผลึกของมาร์คาไซต์มีรูปร่างเป็น romboid มาร์คาไซต์มีความเสถียรน้อยกว่าไพไรต์ โดยทั่วไปมักเรียกโลหะซัลไฟด์ที่พบในถ่านหินรวมๆว่า "ไพไรต์" ไพไรต์เกิดขึ้นจากการทำปฏิกิริยาระหว่างเฟอร์รัสซัลไฟด์ (FeS) กับไฮโดรเจนซัลไฟด์ ภายใต้ภาวะที่ไม่มีอากาศ (Brock และ Gustafson 1976) ดังสมการที่ 1



มักพบไพไรต์เป็นผลึกหรือกลุ่มของผลึก (fromboid) กระจายอยู่ในถ่านหิน การขจัดกำมะถันไพไรต์ออกจากถ่านหินจึงสามารถทำได้หลายวิธีโดยไม่ทำลายโครงสร้างของถ่านหิน

โครงสร้างทางเคมีของถ่านหินที่มีกำมะถันไพไรต์และกำมะถันอินทรีย์ปนเปื้อน (Klein และคณะ 1994) ดังแสดงในภาพที่ 1.2



ภาพที่ 1.2 โครงสร้างทางเคมีของถ่านหิน (ลูกศรแสดงกำมะถันอินทรีย์ และสี่เหลี่ยมลูกบาศก์แสดงกำมะถันไพไรต์)

2.2 กำมะถันซัลเฟต (sulfate sulfur)

พบในลักษณะของโลหะซัลเฟต เช่น แคลเซียมซัลเฟต(CaSO_4), เฟอร์รัสซัลเฟต(FeSO_4), คอปเปอร์ซัลเฟต (CuSO_4) และแมกนีเซียมซัลเฟต (MgSO_4) เป็นต้น หรืออาจพบในลักษณะแร่ เช่น ยิปซัม (gypsum) เป็นต้น โดยปกติจะพบกำมะถันซัลเฟตในปริมาณน้อยมากเมื่อเทียบกับกำมะถันไพไรต์ และกำมะถันอินทรีย์

เนื่องจากลิแกนด์ที่มีกำมะถันปนเปื้อน ดังนั้นการเผาถ่านหินเพื่อใช้เป็นเชื้อเพลิงเพื่อการผลิตกระแสไฟฟ้าในปริมาณวันละหลายหมื่นตันย่อมก่อให้เกิดปัญหาการปนเปื้อนของก๊าซซัลเฟอร์ไดออกไซด์ในอากาศ ซึ่งเป็นพิษต่อคน สัตว์ และพืช ก่อให้เกิดฝนกรด สร้างความเสียหายต่ออาคารบ้านเรือน และหากแพร่กระจายลงสู่แหล่งน้ำก็จะส่งผลเสียต่อไปยังระบบนิเวศน์วิทยาของแหล่งน้ำ ปัจจุบันการไฟฟ้าฝ่ายผลิตแห่งประเทศไทยจึงใช้เครื่อง Flue gas desulfurization ดักจับก๊าซซัลเฟอร์ไดออกไซด์ที่เกิดจากการเผาถ่านหินไว้ในสภาพแคลเซียมซัลเฟต (CaSO_4) อย่างไรก็ตามพบว่าเครื่อง Flue gas

desulfurization ซึ่งมีราคาแพงมากนี้ อายุการใช้งานสั้นกว่าที่ควรจะเป็นมาก ทั้งนี้เพราะกรดกำมะถันที่เกิดขึ้นก่อให้เกิดการผุกร่อน ฉะนั้นหากสามารถลดปริมาณกำมะถันที่ปนเปื้อนอยู่ในลิแกนด์ออกก่อนการนำลิแกนด์มาเผา จะเป็นการลดทั้งปริมาณก๊าซซัลเฟอร์ไดออกไซด์และกรดกำมะถันที่จะเกิดขึ้น จึงเป็นการยืดอายุการใช้งานของเครื่อง Flue gas desulfurization

จุลินทรีย์บางชนิดสามารถย่อยสลายกำมะถันอินทรีย์และกำมะถันอนินทรีย์ไปเป็นกรดกำมะถันหรือซัลเฟต (soluble sulfate) ซึ่งเป็นของเหลวจึงง่ายต่อการกำจัด เมื่อเปรียบเทียบกับกรดกำมะถันที่กำจัดก๊าซซัลเฟอร์ไดออกไซด์ นอกจากนี้ปฏิกิริยาการขจัดกำมะถันออกจากถ่านหินโดยจุลินทรีย์เกิดที่อุณหภูมิและความดันปกติ ต้นทุนการดำเนินการจึงต่ำ สมบัติความเป็นเชื้อเพลิงของถ่านหินไม่ถูกทำลาย ไม่มีการใช้สารเคมีที่เป็นอันตราย จึงไม่ก่อให้เกิดปัญหาแก๊สแวลลุ่ม (Fakoussa และ Hofrichter 1999) ปัจจุบันถ่านหินที่ผ่านกระบวนการขจัดกำมะถันโดยจุลินทรีย์สามารถนำไปใช้เป็นเชื้อเพลิงเผาไหม้ตามกระบวนการเผาแบบเปียก (Madgurkar, 1989) ได้ จึงทำให้การขจัดกำมะถันออกจากถ่านหินโดยวิธีนี้เป็นวิธีที่มีศักยภาพสูงที่จะนำไปประยุกต์ใช้งานได้จริง เรียกกระบวนการขจัดกำมะถันออกจากถ่านหินโดยอาศัยกิจกรรมของจุลินทรีย์อีกอย่างหนึ่งว่า “กระบวนการไบโอลิซซิง”

จุลินทรีย์ที่มีบทบาทสำคัญต่อกระบวนการไบโอลิซซิงแบ่งออกได้เป็นกลุ่มๆ ดังนี้ (Bosecker 1997)

1. *Thiobacillus*

แบคทีเรียกลุ่มนี้เจริญภายใต้ภาวะที่มีอากาศ ส่วนใหญ่จัดอยู่ในกลุ่ม คีโมลิโธออโตโทรฟ (chemolithoautotrophs) ใช้คาร์บอนไดออกไซด์จากบรรยากาศเป็นแหล่งคาร์บอนเพื่อการเจริญสังเคราะห์พลังงานจากกระบวนการออกซิเดชันสารประกอบกำมะถันรีดิวส์ เช่น ซัลไฟด์, elemental sulfur ได้ซัลเฟตเป็นผลิตภัณฑ์สุดท้าย

กระบวนการไบโอลิซซิงโดยแบคทีเรียกลุ่มนี้เกิดในภาวะแวลลุ่มที่เป็นกรด ค่าความเป็นกรด-ด่างช่วง 1.5-3 ซึ่งเป็นภาวะที่ไอออนของโลหะละลายน้ำได้ ดังนั้นแบคทีเรียกลุ่ม *Thiobacilli* ซึ่งเจริญได้ดีในภาวะที่มีความเป็นกรดสูง (acidophilic) ได้แก่ *Thiobacillus ferrooxidans* และ *Thiobacillus thiooxidans* จึงเป็นแบคทีเรียสำคัญที่ก่อให้เกิดกระบวนการ แบคทีเรียกลุ่ม *Thiobacilli* อื่น แม้ว่าจะสามารถออกซิไดส์กำมะถันรีดิวส์และซัลไฟด์ได้ แต่ไม่สามารถเจริญได้ในภาวะที่เป็นกรด นอกจากนั้นที่ค่าความเป็นกรด-ด่างสูงไอออนของโลหะไม่สามารถละลายน้ำได้

T. thiooxidans แยกได้ครั้งแรกในปี ค.ศ.1922 โดย Waksman และ Joffe (Bosecker 1997) พบว่าสามารถออกซิไดส์ elemental sulfur รวมทั้งสารประกอบกำมะถันรีดิคัล ได้ผลิตภัณฑ์สุดท้ายเป็นกรดซัลฟูริก สำหรับ *T. ferrooxidans* แยกได้ครั้งแรกในปี ค.ศ.1947 โดย Colmer และ Hinkle (Bosecker 1997) มีลักษณะทางกายภาพเหมือนกับ *T. thiooxidans* แต่กระบวนการออกซิเดชัน elemental sulfur ของ *T. ferrooxidans* เกิดขึ้นเร็วกว่าและสามารถออกซิไดส์เฟอร์รัสไอออน

2. *Leptospirillum*

Leptospirillum ferrooxidans แยกได้ครั้งแรกในปี ค.ศ. 1972 โดย Markosyan (Bosecker 1997) จัดอยู่ในกลุ่ม acidophilic obligately chemolithotrophs สามารถออกซิไดส์เฟอร์รัสไอออนได้ ทนต่อภาวะที่เป็นกรดสูง และทนต่อความเข้มข้นของยูเรเนียม, โมลิบดีนัม และซิลเวอร์ ได้สูงกว่า *T. ferrooxidans* แต่ไม่สามารถออกซิไดส์สารประกอบกำมะถันได้ จึงต้องใช้ร่วมกับ *T. thiooxidans* หรือ *T. ferrooxidans* ในกระบวนการไบโโอลิชซิง

T. thiooxidans, *T. ferrooxidans* และ *L. ferrooxidans* เป็นแบคทีเรียกลุ่ม mesophile สามารถเจริญได้ดีที่อุณหภูมิช่วง 25-35 °C

3. Thermophilic bacteria แบ่งเป็น 2 กลุ่มย่อย คือ

1. moderately thermophilic bacteria แบคทีเรียกลุ่มนี้เจริญที่อุณหภูมิประมาณ 50°C สามารถออกซิไดส์ไพไรต์, เพนต์แลนไดต์ (pentlandite หรือ iron nickel sulfide, $(\text{Fe,Ni})_9\text{S}_8$) และ แชลโคไพไรต์ (chalcopyrite หรือ copper iron sulfide, (CuFeS_2)) ใช้เฟอร์รัสไอออนเป็นแหล่งพลังงานเพื่อการเจริญ

2. extremely thermophilic bacteria แบคทีเรียกลุ่มนี้เจริญที่อุณหภูมิสูงกว่า 60°C เช่น - *Acidianus brierleyi* เป็นแบคทีเรียกลุ่มคีโมลิโธออโตโทรฟ, facultatively anaerobes สามารถออกซิไดส์เฟอร์รัสไอออน, elemental sulfur และโลหะซัลไฟด์ ในภาวะที่ไม่มีอากาศจะใช้ elemental sulfur เป็นตัวรับอิเล็กตรอนตัวสุดท้ายได้ไฮโดรเจนซัลไฟด์เป็นผลิตภัณฑ์สุดท้าย

- *Sulfolobus* sp. เป็นแบคทีเรียกลุ่ม aerobic, facultatively chemolithotrophs สามารถออกซิไดส์เฟอร์รัสไอออน, elemental sulfur และแร่ซัลไฟด์

อย่างไรก็ตามแบคทีเรียทั้งสองกลุ่มนี้สามารถเจริญได้เฉพาะในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติม สารสกัดจากยีสต์เท่านั้น

4. Heterotrophic microorganisms

แบคทีเรียกลุ่ม Heterotrophs เช่น *Bacillus* sp. และรา เช่น *Aspergillus* sp. และ *Penicillium* sp. ซึ่งต้องการสารอินทรีย์เป็นแหล่งพลังงานเพื่อการเจริญ ก่อให้เกิดกระบวนการลิซซิงโลหะโดยใช้เอนไซม์หรือใช้กรดอินทรีย์ที่ผลิต เช่น กรดแลคติก, กรดออกซาลิก, กรดซิตริก และกรดกลูโคนิก เป็นต้น ละลายโลหะ โดยการแทนที่ไอออนของโลหะโดยตรงด้วยไฮโดรเจนไอออน และโดยการเข้าทำปฏิกิริยาได้เป็นสารประกอบของโลหะที่ละลายน้ำได้ จุลินทรีย์กลุ่มนี้ไม่ได้รับประโยชน์จากกระบวนการลิซซิงโลหะ

ประสิทธิภาพของกระบวนการไบโอลิซซิงขึ้นกับประสิทธิภาพของจุลินทรีย์ องค์ประกอบทางเคมี และแร่ธาตุในถ่านหิน กระบวนการไบโอลิซซิงจะมีประสิทธิภาพสูงสุดเมื่อภาวะที่ใช้สอดคล้องกับภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของจุลินทรีย์ ปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อกระบวนการไบโอลิซซิง (Bosecker 1997) ได้แก่

1. สารอาหาร

แบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพของกระบวนการไบโอลิซซิงสูงคือกลุ่ม chemolithoautotrophs สารอาหารที่แบคทีเรียกลุ่มนี้ต้องการเพื่อการเจริญคือสารประกอบอนินทรีย์ ได้แก่ สารประกอบเหล็ก และกำมะถัน การเติมเกลือของแอมโมเนียม, ฟอสเฟต และแมกนีเซียม ร่วมด้วยอาจทำให้การเจริญดีขึ้น

2. ก๊าซออกซิเจนและคาร์บอนไดออกไซด์

การให้ก๊าซออกซิเจนอย่างเพียงพอต่อการเจริญของแบคทีเรียจะทำให้ประสิทธิภาพของกระบวนการไบโอลิซซิงสูงขึ้น การให้ก๊าซออกซิเจนทำได้โดยการให้อากาศ การกวน หรือการเขย่า แต่กระบวนการไบโอลิซซิงโดยวิธี heap หรือ dump leaching (กระบวนการไบโอลิซซิงถ่านหิน โดยการกองผงถ่านหินแล้วเติมจุลินทรีย์ที่เจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวลงไป โดยผ่านตามท่อที่ฝังอยู่ในกองถ่านหินหรือโปรยลงบนกองถ่านหิน)การให้ออกซิเจนอย่างเพียงพอนั้นทำได้ยากแม้ว่าจุลินทรีย์กลุ่ม chemolithoautotrophs จะใช้ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์เป็นแหล่งคาร์บอนเพื่อการเจริญเพียงอย่างเดียว แต่พบว่าไม่จำเป็นต้องเติมก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์

3. ค่าความเป็นกรดต่าง

ค่าความเป็นกรดต่างที่เหมาะสมต่อกระบวนการออกซิเดชันเฟอร์รัสไอออนและซัลไฟด์ โดยแบคทีเรียคือ 2.0-2.5

4. อุณหภูมิ

อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อกระบวนการออกซิเดชันเฟอร์รัสไอออนและซัลไฟด์โดย *T. ferrooxidans* คือ 28-30°C สำหรับที่อุณหภูมิสูงประมาณ 50-80°C แบคทีเรียที่ก่อให้เกิดกระบวนการไบโอไลซิซิงคือกลุ่ม Thermophiles

5. ชนิดและสมบัติของถ่านหิน

- ถ่านหินที่มีปริมาณคาร์บอนสูง ค่าความเป็นกรด-ต่างของสารละลายที่ได้จะสูง ซึ่งยับยั้งประสิทธิภาพของกระบวนการไบโอไลซิซิงโดยแบคทีเรีย วิธีการแก้ปัญหาโดยการเติมกรดจะก่อให้เกิดการตกตะกอนของแร่ยับยั้ง รวมทั้งทำให้ต้นทุนการดำเนินการสูงขึ้น
- อัตราเร็วของกระบวนการไบโอไลซิซิงขึ้นกับพื้นที่ผิวของถ่านหิน ถ่านหินน้ำหนักเท่ากัน อัตราเร็วของกระบวนการไบโอไลซิซิงสูงขึ้นเมื่อพื้นที่ผิวของถ่านหินมากขึ้น พื้นที่ผิวมากขึ้นเมื่อขนาดของอนุภาคเล็กลง ดังนั้นการลดขนาดอนุภาคจึงเป็นการเพิ่มพื้นที่ผิวของถ่านหินและเพิ่มอัตราเร็วของกระบวนการไบโอไลซิซิงด้วย ขนาดอนุภาคของถ่านหินที่เหมาะสมต่อกระบวนการไบโอไลซิซิงคือ ประมาณ 42 ไมครอน นอกจากนี้การเพิ่มพื้นที่ผิวอาจทำได้โดยการเพิ่มปริมาณ pulp density (ปริมาณผงถ่านหินที่แขวนลอยในของเหลว) แต่การเพิ่มปริมาณ pulp density อาจทำให้ปริมาณสารพิษที่ปนเปื้อนอยู่กับถ่านหินและที่เกิดจากการย่อยสลายสารประกอบในถ่านหินเพิ่มขึ้นซึ่งมีผลไปยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย
- ปริมาณกำมะถันที่เป็นองค์ประกอบในถ่านหิน อัตราเร็วของกระบวนการไบโอไลซิซิงถ่านหินสูง เมื่อถ่านหินมีกำมะถันปนเปื้อนในปริมาณสูง (Kargi และ Robinson 1982)

6. โลหะหนัก

กระบวนการไบโอไลซิซิงโลหะซัลไฟด์มีผลทำให้ความเข้มข้นของโลหะในสารละลายเพิ่มขึ้น ดังนั้นแบคทีเรียที่มีความสำคัญในกระบวนการไบโอไลซิซิง เช่น *Thiobacilli* จึงต้องสามารถทนต่อโลหะไอออนได้ในปริมาณสูง เช่น ทนต่อนิเกิล, ทองแดง หรือสังกะสี ที่ความเข้มข้น 50, 55 หรือ 112

กรัม/ลิตร ตามลำดับ (Bosecker 1977) ความเข้มข้นสูงสุดของโลหะไอออนที่ *Thiobacilli* แต่ละสายพันธุ์ทนได้ต่างกัน นอกจากนั้นบางสายพันธุ์ยังปรับตัวโดยสามารถเจริญได้ในสารละลายที่มีความเข้มข้นของโลหะในปริมาณสูง

มีรายงานการใช้จุลินทรีย์ในกระบวนการไบโอลิชซิงเพื่อขจัดกำมะถันออกจากถ่านหินดังนี้

Hoffmann และคณะ (1981) รายงานว่า *T. ferrooxidans* สามารถขจัดกำมะถันไฟไรต์ออกจากลิกไนต์ได้สูงถึง 90-98% ภายในเวลา 8-12 วัน ลิกไนต์ที่นำมาศึกษามีกำมะถันไฟไรต์ปนเปื้อน 30-40 มก./กรัมลิกไนต์ ผลลิกไนต์มีขนาดอนุภาค ≤ 74 ไมครอน ทำการศึกษาโดยแขวนลอยผลลิกไนต์ $\leq 20\%$ (กรัม/100 มล.อาหารเลี้ยงเชื้อ) ในอาหารเลี้ยงเชื้อซึ่งมีความเข้มข้นของฟอสเฟตต่ำ (0.7 มิลลิโมลาร์) และมีอัตราส่วนของไนโตรเจน (แอมโมเนียม) ต่อฟอสฟอรัส (ฟอสเฟต) สูง คือ 90/1

Kargi และ Robinson (1982) รายงานว่า *Sulfolobus acidocaldarius* ซึ่งเป็นแบคทีเรียกลุ่ม Thermophile เจริญที่อุณหภูมิ 75°C และที่ค่าความเป็นกรดต่าง 2.0 สามารถขจัดกำมะถันอนินทรีย์ออกจากถ่านหินได้ประมาณ 96% ภายในเวลา 10 วัน ถ่านหินที่ศึกษามีปริมาณกำมะถันรวม (total sulfur) 4% และมีปริมาณกำมะถันอนินทรีย์ 2.1% การศึกษาทำโดยแขวนลอยถ่านหินขนาด 104-147 ไมครอน ปริมาณ 5% (กรัม/100 มล.อาหารเลี้ยงเชื้อ) ในอาหารเลี้ยงเชื้อ mineral salts ใช้เชื้อเริ่มต้นที่เจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกำมะถันไฟไรต์ปริมาณ 5% (มล./100 มล.)

Kargi และ Robinson (1985) รายงานภาวะที่เหมาะสมต่อการขจัดกำมะถันไฟไรต์ออกจากถ่านหินชนิดบิทูมินัส (bituminous coal) ซึ่งมีกำมะถันทั้งหมด 4% และมีกำมะถันไฟไรต์ 2.1% โดย *Sulfolobus acidocaldarius* ดังนี้

- อัตราเร็วของการขจัดกำมะถันไฟไรต์เพิ่มขึ้นเมื่อความเข้มข้นของเซลล์เริ่มต้นเพิ่มขึ้นพบว่าความเข้มข้นของเซลล์เริ่มต้นที่เหมาะสมคือ 4×10^{10} เซลล์/กรัมของถ่านหิน

- อัตราเร็วของการขจัดกำมะถันไฟไรต์เพิ่มขึ้นเมื่อปริมาณผงถ่านหินแขวนลอย (% pulp density) เพิ่มขึ้น พบว่า % pulp density ที่เหมาะสมคือ 20% (กรัม/100 มล.ของอาหารเลี้ยงเชื้อ)

- อัตราเร็วของการขจัดกำมะถันไฟไรต์เพิ่มขึ้นเมื่อขนาดอนุภาคของถ่านหินลดลง อัตราเร็วของการขจัดกำมะถันไฟไรต์สูงสุด เมื่อขนาดอนุภาคของถ่านหินเท่ากับ 48 ไมครอน

- การให้ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ไม่มีผลทำให้ประสิทธิภาพการขจัดกำมะถันไฟไรต์เพิ่มขึ้นเมื่อใช้ผงถ่านหิน 10% (กรัม/100 มล.ของอาหารเลี้ยงเชื้อ)

- อุณหภูมิและค่าความเป็นกรดต่างที่เหมาะสมของกระบวนการเท่ากับ 70°C และ 1.5 ตามลำดับ

-อัตราส่วนของไนโตรเจน/ฟอสฟอรัสและไนโตรเจน/แมกนีเซียมในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมคือ 47.5/1 และ 11.5/1 ตามลำดับ ชนิดของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมคือ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

พบว่าที่ภาวะที่เหมาะสม *S. acidocaldarius* สามารถกำจัดกำมะถันไฟไรต์ออกไปได้ 90%

Rai และ Reyniers (1988) ศึกษาการใช้ *Pseudomonas* sp. ในการขจัดกำมะถันออกจากลิกไนท์ พบว่า *P. putida* มีประสิทธิภาพดีกว่า *P. aeruginosa* โดย *P. putida* สามารถขจัดกำมะถันไฟไรต์และกำมะถันอินทรีย์ออกจากลิกไนท์ในมลรัฐเท็กซัส สหรัฐอเมริกาได้ 75% และ 37.4% ตามลำดับ ภายในเวลา 5-7 วัน อนุภาคของลิกไนท์ที่ใช้ขนาด 74-295 ไมครอน

Merrettig และคณะ (1989) ทำการทดลองโดยใช้ *Leptospirillum* - like bacteria ในการขจัดกำมะถันไฟไรต์ออกจากถ่านหิน ในถังหมักขนาด 4.5 ลิตร แบบให้อากาศด้านล่าง (airlift) ค่าความเป็นกรดต่างเริ่มต้น 1.5 ใช้ผงถ่านหิน 10% (กรัม/100 มล.ของอาหารเลี้ยงเชื้อ) สามารถขจัดกำมะถันไฟไรต์ได้ 85% ภายในเวลา 40 วัน โดย 30% ของไฟไรต์ที่ถูกขจัดออกพบว่าถูกออกซิไดส์ไปเป็น elemental sulfur และอีก 55% ที่เหลือถูกเปลี่ยนไปเป็นซัลเฟต (soluble sulfate) ซึ่งปัญหาการสะสมของ elemental sulfur ที่เกิดขึ้นนี้สามารถแก้ไขได้โดยการใช้ *Leptospirillum* - like bacteria ร่วมกับ *T. ferrooxidans* การใช้เชื้อทั้งสองชนิดนี้ร่วมกันไม่มีผลทำให้ประสิทธิภาพการขจัดกำมะถันไฟไรต์เพิ่มขึ้น

Baldi และคณะ (1992) ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างกิจกรรมของ *T. ferrooxidans* ต่อไฟไรต์จากต่างแหล่ง ซึ่งมีรูปร่าง (pyrite morphology) ขนาดพื้นที่ผิว และลักษณะของพื้นผิวต่างกัน และรายงานที่ *T. ferrooxidans* สามารถเร่งกระบวนการไบโอลิซซิงของไฟไรต์ทุกชนิดที่นำมาทดสอบ โดยทำการทดลองในขวดเขย่า แขนวลอยผงไฟไรต์ 0.4% (กรัม/100 มล.อาหารเลี้ยงเชื้อ) ในอาหารเลี้ยงเชื้อ 9K เจือจาง 10 เท่า เมื่อเพิ่มปริมาณผงไฟไรต์แขวนลอยในอาหารเลี้ยงเชื้อข้างต้นเป็น 2% (กรัม/100 มล.อาหารเลี้ยงเชื้อ) *T. ferrooxidans* ไม่สามารถออกซิไดส์ไฟไรต์หรือไม่สามารถก่อให้เกิดกระบวนการไบโอลิซซิงได้ กระบวนการไบโอลิซซิงจะเกิดขึ้นก็ต่อเมื่อลดปริมาณผงไฟไรต์ที่แขวนลอยในอาหารเลี้ยงเชื้อลงหรือเพิ่มจำนวนเซลล์เริ่มต้นของ *T. ferrooxidans* แสดงว่าการที่กระบวนการไบโอลิซซิงไม่เกิดขึ้นนั้น ไม่ใช่เพราะขาดออกซิเจน ผลการตรวจสอบของเหลวที่ได้จากกระบวนการไบโอลิซซิงของไฟไรต์ ไม่พบโลหะหนักใดๆ ในปริมาณที่อาจเป็นพิษต่อ *T. ferrooxidans*

Lindström และคณะ (1993) ศึกษากระบวนการไบโอลิซซิงของ *Sulfolobus acidocaldarius* ในถังหมัก เมื่อใช้ผงไฟไรต์ขนาดอนุภาค 20 ไมครอน แขนวลอยในอาหารเลี้ยงเชื้อ mineral salts 9K (ไม่เติมเฟอร์รัสซัลเฟต) ปริมาณ 6 % (กรัม/100 มล.อาหารเลี้ยงเชื้อ) ค่าความเป็นกรดต่างเท่ากับ 1.5 เฟอรัส

ไอออนออกซิไดส์เป็นเฟอริกไอออน 270 มก./ลิตร/ชม. ผลการทดลองสรุปได้ว่าค่าความเป็นกรด-ด่างเป็นปัจจัยที่สำคัญ ถ้าค่าความเป็นกรด-ด่างมากกว่า 2 การละลายของเฟอริกไอออนลดลง เนื่องจากเฟอริกไอออนมีบทบาทสำคัญต่อกระบวนการไบโโอลิชซิง การควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่างในสารละลายให้ต่ำเท่าที่จะเป็นไปได้ กระบวนการไบโโอลิชซิงเกิดขึ้นเร็วแต่การเจริญของแบคทีเรียช้า

Gómez และคณะ (1999) ศึกษาความหลากหลายทางชีวภาพของจุลินทรีย์จากถ่านหินแหล่งต่างๆในประเทศสเปน โดยคัดแยกแบคทีเรียจากถ่านหิน นำแบคทีเรียที่แยกได้มาศึกษาคุณลักษณะเฉพาะ และศึกษาความสามารถในการขจัดกำมะถันออกจากถ่านหิน พบว่าแบคทีเรียที่แยกได้อยู่ใน Genus *Xanthomonas*, *Pseudomonas*, *Chryseomonas* และ *Moraxella* ผลการศึกษาความสามารถในการขจัดกำมะถันออกจากถ่านหินโดยปลูกเชื้อบริสุทธิ์ที่คัดแยกได้ 1 มล. ลงในแต่ละคอรัมบ์ ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1.5 ซม. ยาว 14 ซม. ซึ่งบรรจุถ่านหิน 2 กรัม หมุนเวียนน้ำ 50 มล. ผ่านคอรัมบ์ บ่มไว้เป็นระยะเวลา 12 วัน ที่อุณหภูมิ 30°C ($\pm 2^{\circ}\text{C}$) ตรวจสอบความสามารถของแบคทีเรียในการขจัดกำมะถันออกจากถ่านหินจากค่าความแตกต่างของปริมาณกำมะถันของถ่านหินก่อนและหลังกระบวนการ พบว่า *P. putrefaciens* (B(30)15) และ *P. cepacia* (T(30)10) สามารถขจัดกำมะถันอินทรีย์ออกจากถ่านหินได้ 70% *X. maltophila* (B(30)7) และ *P. cepacia* (B(30)8) สามารถขจัดกำมะถันอนินทรีย์ออกจากถ่านหินได้มากกว่า 67% *X. maltophila* (B(30)10) สามารถขจัดทั้งกำมะถันอินทรีย์ (69%) และขจัดกำมะถันอนินทรีย์ (68%) ออกจากถ่านหินที่ค่าความเป็นกรด-ด่างเป็นกลาง ผลการศึกษาที่ได้แสดงให้เห็นถึงศักยภาพของการนำแบคทีเรียไปใช้ในการขจัดกำมะถันออกจากถ่านหินในระดับอุตสาหกรรม

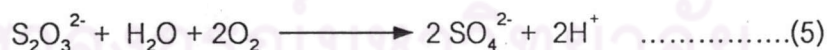
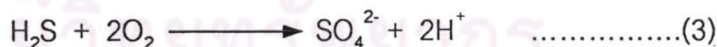
Bacelar-Nicolau และ Johnson (1999) รายงานการใช้แบคทีเรียกลุ่ม Iron-oxidizing acidophilic heterotrophs ที่แยกได้จากเหมืองแร่ในการขจัดกำมะถันไฟไรต์ พบว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ T-24 สามารถขจัดกำมะถันไฟไรต์ได้ 35% ในเวลา 50 วัน (เมื่อแขวนลอยผงไฟไรต์ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่เติมสารสกัดจากยีสต์) ผลการเปรียบเทียบประสิทธิภาพการออกซิไดส์กำมะถันไฟไรต์ พบว่า *T. ferrooxidans* สามารถออกซิไดส์กำมะถันไฟไรต์ได้สูงกว่า 1.5 เท่า การใช้ *T. acidophilus* หรือ *T. thiooxidans* ร่วมกับแบคทีเรียสายพันธุ์ T-23 หรือ T-21 ทำให้ปริมาณกำมะถันไฟไรต์ถูกออกซิไดส์มากขึ้น และเมื่อใช้แบคทีเรียสายพันธุ์ T-21 ร่วมกับ *T. acidophilus* ปริมาณเฟอรัสไอออนออกซิไดส์เป็นเฟอริกไอออนมากกว่าการใช้แบคทีเรียสายพันธุ์ T-21 เพียงอย่างเดียว ผู้วิจัยได้ตั้งสมมติฐานของกระบวนการออกซิเดชันไฟไรต์โดยเชื้อผสม (mix culture) ระหว่างแบคทีเรียสายพันธุ์ T-21 หรือ T-23 กับ *T. thiooxidans* ไว้ดังนี้ ผลการเจริญของ *T. thiooxidans* มีการปลดปล่อยสารประกอบอินทรีย์ลงสู่อาหารเลี้ยงเชื้อ และแบคทีเรียกลุ่ม heterotrophs นำสารประกอบอินทรีย์ดังกล่าวนี้มาใช้ในการเจริญ

ซึ่งสามารถออกซิไดส์เฟอร์รัสไอออนไปเป็นเฟอร์ริกไอออน เฟอร์ริกไอออนที่ได้ทำปฏิกิริยากับไพไรต์ได้เป็นไฮโดรซัลเฟต และในภาวะที่เป็นกรด ไฮโดรซัลเฟตจะถูกไฮโดรไลส์ไปเป็น elemental sulfur, สารประกอบโพลีไธโอเนต (polythionate) และซัลเฟต โดยอาศัยปฏิกิริยาเคมีและกิจกรรมของ *T. thiooxidans* *T. thiooxidans* ใช้สารประกอบต่างๆที่ได้ข้างต้นเป็นแหล่งพลังงาน ใช้ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์จากบรรยากาศเป็นแหล่งคาร์บอนเพื่อการเจริญ และปลดปล่อยสารประกอบคาร์บอนอินทรีย์ (organic carbon) สู่อาหารเลี้ยงเชื้อเป็นวงจร ภาวะที่ใช้ทดลองคือผงไพไรต์ขนาดอนุภาคเล็กกว่า 61 ไมครอน แขนงลอยในอาหารเลี้ยงเชื้อ basal salts ปริมาณ 1% (กรัม/100 มล.อาหารเลี้ยงเชื้อ) ค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้น 2.0 ปริมาณเชื้อเริ่มต้นที่ใช้ 2 % (มล./100 มล.)

T. ferrooxidans เป็นแบคทีเรียที่มีความสำคัญทางอุตสาหกรรมและทางนิเวศวิทยาเพราะ

- (1) สามารถแยกโลหะออกจากสินแร่ เช่น แยกคอปเปอร์ ยูเรเนียม โคบอลต์ และทองคำ เป็นต้น
- (2) สามารถแยกโลหะหนักที่ปนเปื้อนในสิ่งที่ปล่อยออกมาจากโรงงานอุตสาหกรรมและที่ปนเปื้อนในดิน
- (3) สามารถแยกกำมะถันที่ปนเปื้อนในเชื้อเพลิงที่ได้จากซากฟอสซิล เช่น ถ่านหิน น้ำมัน เป็นต้น โดยไม่ทำให้เสียสภาพ (Appia-Ayme และคณะ 1999)

T. ferrooxidans เป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปร่างเป็นแท่ง ขนาด 0.5-1 ไมครอน ไม่สร้างสปอร์ เจริญในภาวะที่มีอากาศ (obligately aerobes) อุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเจริญคือ 30-35°C สามารถเจริญได้ในภาวะที่มีความเป็นกรดสูง ค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมสำหรับการเจริญคือ 2-2.3 (Jensen 1995) ใช้ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์จากบรรยากาศเป็นแหล่งคาร์บอนเพื่อการเจริญ สังเคราะห์พลังงานเพื่อการเจริญโดยกระบวนการออกซิเดชันเฟอร์รัสไอออนและสารประกอบกำมะถันรีดิวส์ (Ehrlich 1990) ดังสมการ



กลไกของกระบวนการออกซิเดชันกำมะถันไพไรต์โดย *T. ferrooxidans* แบ่งออกเป็น 2 ชนิด คือ

1. กลไกทางตรง (direct mechanism)

กลไกนี้ *T. ferrooxidans* ต้องเกาะที่ผิวของไพไรต์ *T. ferrooxidans* ออกซิไดส์เฟอร์รัสไอออน (Fe^{2+}) ไปเป็นเฟอร์ริกไอออน (Fe^{3+}) แล้วใช้เฟอร์ริกไอออนทำปฏิกิริยาทางเคมีกับกำมะถันไพไรต์ (Wise 1990) อธิบายได้ดังนี้

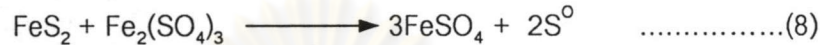
- กำมะถันไพไรต์ถูกออกซิไดส์โดยวิธีทางเคมี ได้เฟอร์รัสไอออนและกรดซัลฟูริก ;



- ในภาวะที่เป็นกรด *T. ferrooxidans* ออกซิไดส์เฟอร์รัสไอออนไปเป็นเฟอร์ริกไอออน (ในภาวะที่เป็นกรด เฟอร์รัสไอออนมีความเสถียรต่อการถูกออกซิไดส์ไปเป็นเฟอร์ริกไอออนโดยวิธีทางเคมี) ;



- เฟอร์ริกไอออนที่ได้จากกิจกรรมของ *T. ferrooxidans* จะทำปฏิกิริยากับกำมะถันไพไรต์ได้เป็นกำมะถัน (elemental sulfur) และเฟอร์รัสไอออน ;



- *T. ferrooxidans* ออกซิไดส์เฟอร์รัสไอออนไปเป็นเฟอร์ริกไอออน และออกซิไดส์กำมะถันไปเป็นกรดซัลฟูริก

- เฟอร์ริกไอออนที่ได้ทำปฏิกิริยากับกำมะถันไพไรต์ (สมการที่ 8) ต่อไปเป็นวงจรต่อเนื่อง

2. กลไกทางอ้อม (indirect mechanism)

กลไกนี้ไพไรต์ถูกออกซิไดส์ด้วยกระบวนการทางเคมีในภาวะที่เป็นกรด โดยสารที่ทำหน้าที่เป็นตัวออกซิไดส์คือ เฟอร์ริกไอออน (Boseker 1997) ดังสมการ



เฟอร์รัสไอออนที่เกิดขึ้นในปฏิกิริยานี้จะถูกออกซิไดส์กลับไปเป็นเฟอร์ริกไอออนโดยกิจกรรมของ *T. ferrooxidans* ดังสมการ

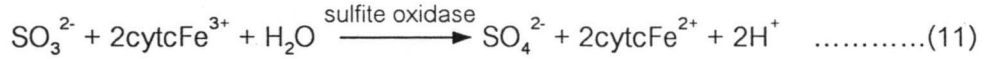


และเฟอร์ริกไอออนที่ได้จะไปออกซิไดส์ไพไรต์อีก (สมการที่ 9) เกิดขึ้นเป็นวงจรรายอย่างต่อเนื่อง กลไกทางอ้อมนี้ *T. ferrooxidans* ไม่จำเป็นต้องเกาะที่ผิวของไพไรต์ *T. ferrooxidans* ทำหน้าที่ออกซิไดส์เฟอร์รัสไอออนไปเป็นเฟอร์ริกไอออนในภาวะที่เป็นกรด หากไม่มีแบคทีเรียกระบวนการออกซิเดชันเฟอร์รัสไอออนเกิดขึ้นเองได้ช้ามาก ที่ค่าความเป็นกรดต่างช่วง 2-3 กระบวนการออกซิเดชันเฟอร์รัสไอออนโดยแบคทีเรียเกิดเร็วกว่าโดยทางเคมีประมาณ 10^5 - 10^6 เท่า (Lacey และ Lowson 1970)

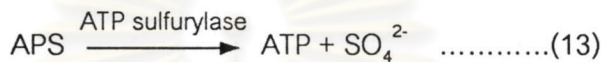
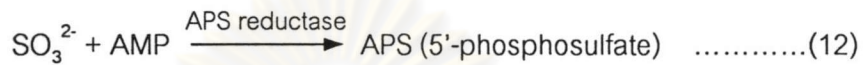
สำหรับกระบวนการออกซิเดชันกำมะถันไปเป็นกรดซัลฟูริกโดย *T. ferrooxidans* นั้นมีรายงานเกี่ยวกับเอนไซม์ที่ใช้ในกระบวนการดังนี้

Vestal และ Lundgren (1971) แยกเอนไซม์ซัลไฟต์ออกซิเดส (Sulfite oxidase หรือ sulfite:cytochrome c oxidoreductase) จาก *T. ferrooxidans* ซึ่งเจริญในภาวะที่มีกำมะถันเป็นแหล่งพลังงาน ทำให้ซัลไฟต์ออกซิเดสที่ได้บริสุทธิ์บางส่วน (partially purified) แล้วศึกษาสมบัติบางประการ

พบว่าซัลไฟต์ออกซิเดสใช้ซัลไฟต์เป็นสารตั้งต้น (substrate) สามารถใช้ทั้ง (horse heart) cytochrome c และ ferricyanide เป็นตัวรับอิเล็กตรอน น้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 41,500 มีค่า Km สำหรับซัลไฟต์เท่ากับ 0.58 มิลลิโมลาร์ เมื่อใช้ ferricyanide หรือ cytochrome c เป็นตัวรับอิเล็กตรอน ซัลไฟต์ออกซิเดสทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยา ดังสมการ

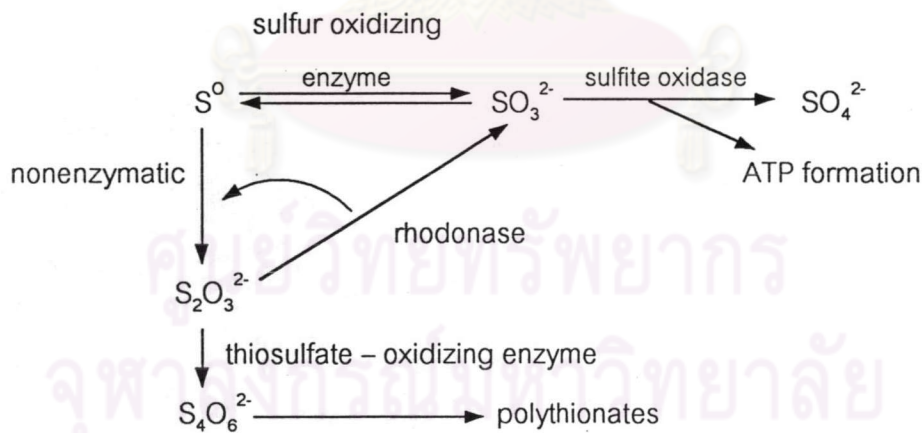


เนื่องด้วยกระบวนการออกซิเดชันของซัลไฟต์อาจเกิดขึ้นโดยวิถี APS reductase (เอพีเอสรีดักเตส) (Peck และคณะ 1965) ดังสมการ



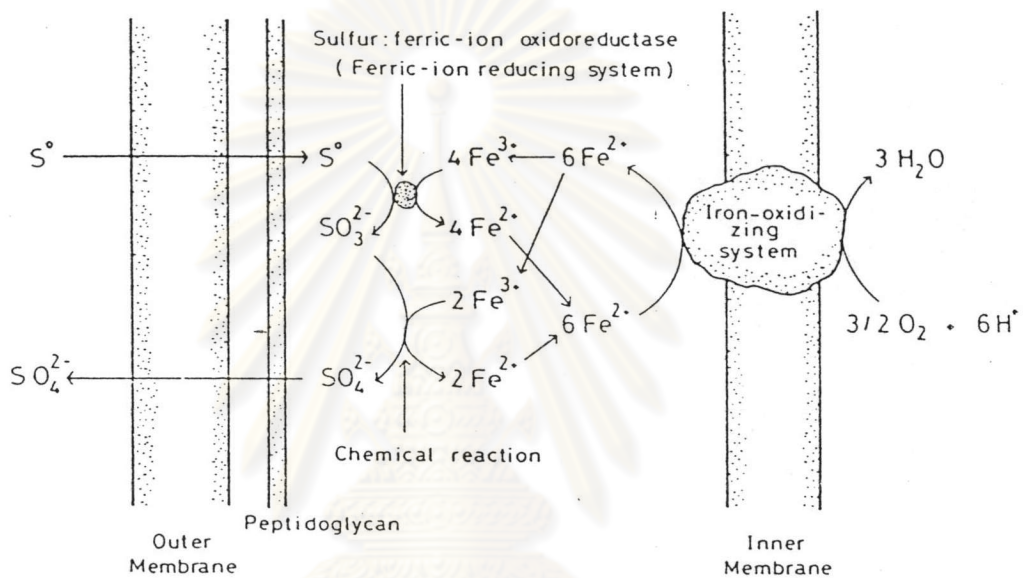
และมีรายงานการพบเอพีเอสรีดักเตส (APS reductase) ใน *T. thioparus* (Peck และคณะ 1965 และ Lyric และ Suzuki 1970) และ *T. denitrificans* (Bowen และคณะ 1966) ผู้วิจัยจึงทำการศึกษาค้นคว้าผลของ 5'-AMP ต่อกิจกรรมของซัลไฟต์ออกซิเดสของ *T. ferrooxidans* ที่บริสุทธิ์ที่ได้ พบว่า 5'-AMP ไม่มีผลต่อกิจกรรมของเอนไซม์ แสดงว่า *T. ferrooxidans* ไม่ได้ออกซิไดส์ซัลไฟต์โดยวิถีเอพีเอสรีดักเตส หรือไม่มีเอพีเอสรีดักเตสนั่นเอง

ผู้วิจัยได้เสนอกระบวนการออกซิเดชันกำมะถันของ *T. ferrooxidans* ดังนี้



กระบวนการออกซิเดชันซัลไฟต์ไปเป็นซัลเฟตโดยซัลไฟต์ออกซิเดสนี้เป็นกระบวนการที่สร้างพลังงาน โดยเมื่อซัลไฟต์ถูกออกซิไดส์ไปเป็นซัลเฟต อิเล็กตรอนที่ได้จะถูกส่งไปยัง cytochrome c ซึ่งจะก่อให้เกิดการสังเคราะห์ ATP ในกระบวนการ electron transport system ต่อไป

Sugio และคณะ (1987) แยกเอนไซม์ซึ่งใช้ในกระบวนการออกซิเดชันกำมะถัน (elemental sulfur) ไปเป็นซัลไฟด์ จาก *T. ferrooxidans* ซึ่งเจริญในภาวะที่มีเหล็กเป็นแหล่งพลังงาน ได้จาก periplasmic space แล้วทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์ เรียกเอนไซม์ที่ได้ว่า sulfur:ferric ion oxidoreductase พบว่าเอนไซม์นี้ใช้เฟอร์ริกไอออนเป็นตัวรับอิเล็กตรอน น้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 46,000 ประกอบด้วย 2 หน่วยย่อยขนาดเท่ากัน ($M_r = 23,000$) มีค่า isoelectric point และ pH optimum เท่ากับ 4.6 และ 6.5 ตามลำดับ ผู้วิจัยได้เสนอกลไกของกระบวนการออกซิเดชันกำมะถันของ *T. ferrooxidans* ดังแสดงในภาพที่ 1.3



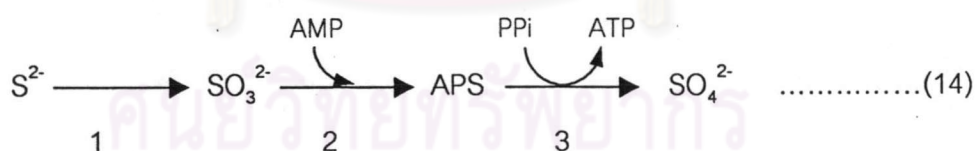
ภาพที่ 1.3 กลไกกระบวนการออกซิเดชันกำมะถันของ *T. ferrooxidans*

Sugio และคณะ (1988) รายงานว่าพบซัลไฟด์ออกซิเดสของ *T. ferrooxidans* ซึ่งเจริญในภาวะที่มีเหล็กเป็นแหล่งพลังงาน ซึ่งต่างจากซัลไฟด์ออกซิเดสที่ Vestal และ Lundgren (1971) เคยรายงานไว้คืออยู่ใน plasma membrane ใช้เฟอร์ริกไอออนเป็นตัวรับอิเล็กตรอน ไม่สามารถใช้ทั้ง cytochrome c หรือ ferricyanide เป็นตัวรับอิเล็กตรอน ผู้วิจัยได้ตั้งข้อสมมติฐานถึงความสำคัญของซัลไฟด์ออกซิเดสที่พบนี้ว่านอกจากทำหน้าที่ลดความเป็นพิษของซัลไฟด์ที่เกิดขึ้นจากกระบวนการออกซิเดชันของกำมะถันโดยการออกซิไดส์ซัลไฟด์ไปเป็นซัลเฟตซึ่งมีความเป็นพิษน้อยกว่าซัลไฟด์แล้ว การที่ซัลไฟด์ออกซิเดสนี้อยู่ใน plasma membrane ยังทำหน้าที่กั้นไม่ให้ซัลไฟด์ที่เกิดจากกระบวนการออกซิเดชันของกำมะถันแพร่เข้าสู่เซลล์ นอกจากนั้นเฟอร์ริกไอออนที่ได้จากกระบวนการ เซลล์ยังสามารถนำมาใช้เป็นแหล่งพลังงานโดยการออกซิไดส์ไปเป็นเฟอร์ริกไอออนโดย iron oxidase

Sugio และคณะ (1992) แยกและทำให้ซัลไฟต์ออกซิเดสที่พบใน plasma membrane และใช้เฟอร์ริกไอออนเป็นตัวรับอิเล็กตรอนของ *T. ferrooxidans* ซึ่งเจริญในภาวะที่มีเหล็กเป็นแหล่งพลังงานบริสุทธิ์ และรายงานสมบัติบางประการของเอนไซม์บริสุทธิ์ดังนี้ น้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 650,000 ประกอบด้วย 2 หน่วยย่อยขนาด (M_r) 61,000 และ 59,000 ค่า Michaelis constants สำหรับเฟอร์ริกไอออนและซัลไฟต์ไอออนเท่ากับ 1.0 และ 0.071 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ กิจกรรมของเอนไซม์ถูกยับยั้งได้อย่างสมบูรณ์ด้วย 1 มิลลิโมลาร์ของเฟอร์รัสไอออน คณะผู้วิจัยเรียกชื่อเอนไซม์นี้ใหม่ว่า sulfite:ferric ion oxidoreductase และได้ตั้งข้อสันนิษฐานว่าเอนไซม์นี้จะควบคุมกระบวนการออกซิเดชันกำมะถัน กล่าวคือ ถ้าเซลล์เจริญในภาวะที่มีเฟอร์รัสไอออนในปริมาณมาก เซลล์จะเลือกใช้เฟอร์รัสไอออนเป็นแหล่งพลังงาน ไม่ใช่กำมะถันทั้งนี้เพราะกิจกรรมของ sulfite:ferric ion oxidoreductase ซึ่งเซลล์ใช้เพื่อลดความเป็นพิษของซัลไฟต์โดยการเปลี่ยนไปเป็นซัลเฟตได้ถูกยับยั้ง

นอกจาก *Thiobacillus* แบคทีเรียอื่นที่สามารถออกซิไดส์กำมะถันได้ เช่น *Desulfovibrio*, *Beggiatoa*, *Thiothrix*, *Thioploca*, *Allochrochromatium*, *Chlorobium*, *Thiocapsa*, *Ectothiorhodospira*, *Rhodobacter* และ *Rhodomicrobium* เป็นต้น (Blankenship และคณะ 1995 : Tortora และคณะ 2001)

Allochrochromatium vinosum เป็นแบคทีเรียสังเคราะห์แสง เจริญในภาวะไร้ออกซิเจน จัดอยู่ใน family Chromatiaceae ใช้กำมะถันรีดิวส์เป็นตัวให้อิเล็กตรอนในกระบวนการสังเคราะห์แสง Holt และคณะ (1994), Dahl และ Trüper (1994) รายงานว่า *A. vinosum* ออกซิไดส์กำมะถัน ดังสมการ



1. reverse seroheme sulfite reductase
2. APS reductase
3. ATP sulfurylase

จากข้อมูลยีนประมวลรหัสเอทีพีซัลฟูรีเลส (*sat*, sulfate adenylyl transferase) และเอพีเอสรีดักเตส (*apr*, adenylyl sulfate reductase) ของ *A. vinosum* strain D (DSMZ 180) ที่ได้จากฐานข้อมูล National Center for Biotechnology Information (NCBI) ซึ่งมีหมายเลขใน GenBank (accession number) คือ U84759 (Hipp และคณะ 1997, Sperling และคณะ 1998) ยีน *sat* มีขนาด 1,206 นิวคลี

โอไทด์ ยีน *apr* มีขนาด 3,227 นิวคลีโอไทด์ ยีน *apr* ประกอบด้วยยีน 3 ชนิด ซึ่งแปลรหัสเป็นโปรตีนแตกต่างกัน ได้แก่ ยีน *aprM* สันนิษฐานว่าประมวลรหัสเอพิเอสรีดักเตสสำหรับยึดเกาะเมมเบรน ขนาด 838 นิวคลีโอไทด์ ยีน *aprB* ประมวลรหัสเอพิเอสรีดักเตสหน่วยย่อยเบตา (β subunit) ขนาด 497 นิวคลีโอไทด์ และยีน *aprA* ประมวลรหัสเอพิเอสรีดักเตสหน่วยย่อยแอลฟา (α subunit) ขนาด 1,881 นิวคลีโอไทด์

T. ferrooxidans เป็นแบคทีเรียซึ่งเหมาะที่จะนำมาประยุกต์ใช้ในกระบวนการขจัดกำมะถันไฟไรต์ออกจากถ่านหิน เนื่องจาก *T. ferrooxidans* เป็นแบคทีเรียกลุ่ม Chemolithoautotrophs ไม่ต้องการสารอินทรีย์เพื่อการเจริญ สามารถใช้คาร์บอนไดออกไซด์ในอากาศเป็นแหล่งคาร์บอนเพื่อการสังเคราะห์ และสามารถเจริญได้ในภาวะที่มีค่าความเป็นกรดสูง อย่างไรก็ตามวิธีทางพันธุวิศวกรรมจะทำให้ได้ *T. ferrooxidans* สายพันธุ์ใหม่ที่มีประสิทธิภาพในการขจัดกำมะถันไฟไรต์ออกจากถ่านหินได้สูงกว่าสายพันธุ์ในธรรมชาติ

Kusano และคณะ (1992) ได้สร้างพลาสมิด pTMZ48 ขนาด 10.7 กิโลเบส ซึ่งเป็นพลาสมิดที่มีจุดเริ่มต้นของการจำลองตัวเอง (origin of replication) จาก *T. ferrooxidans* MA3-3 และมีชุดยีนต้านต่อสารปรอทจาก *T. ferrooxidans* E-15 เชื่อมต่ออยู่กับพลาสมิด pUC18 เพื่อใช้เป็นพลาสมิดพาหะเพื่อการถ่ายโอนยีนที่ต้องการให้แสดงออกใน *T. ferrooxidans* และคัดเลือกทรานสฟอร์มแมนท์โคลนิจากการเจริญบนอาหารที่เติมสารปรอท เนื่องจาก *T. ferrooxidans* เจริญในภาวะที่มีค่าความเป็นกรดสูง จึงไม่สามารถใช้ยีนต้านต่อสารปรอทซึ่งเป็นยีนคัดเลือกทรานสฟอร์มแมนท์ได้ พลาสมิด pTMZ48 สามารถเพิ่มจำนวนได้ทั้งใน *E. coli* และ *T. ferrooxidans* คณะผู้วิจัยได้ทำการคัดเลือก *T. ferrooxidans* สายพันธุ์ซึ่งไม่ทนต่อสารปรอทที่เหมาะสมในการใช้เป็นเซลล์เจ้าบ้านในกระบวนการถ่ายโอนพลาสมิด pTMZ48 โดยวิธีอิเล็กโตรพอเรซิสที่ภาวะดังนี้ ค่า field strength 12.5 กิโลโวลต์/ซม. (kV/cm) ค่าความต้านทานไฟฟ้า 400 โอห์ม ได้ *T. ferrooxidans* Y4-3 เป็นสายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพในการถูกทรานสฟอร์มด้วยพลาสมิด pTMZ48 สูงที่สุด คือให้ทรานสฟอร์มแมนท์โคลนิจาก 168 \pm 23 โคลน/พลาสมิดดีเอ็นเอ 1 ไมโครกรัม *T. ferrooxidans* Y4-3 เป็นแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากเหมืองยานาฮารา (Yanahara) เมืองโอกายามา ประเทศญี่ปุ่น ซึ่งมีไฟไรต์สะสมอยู่ (Shiratori และคณะ 1991) แบคทีเรียสายพันธุ์นี้ ไม่มีพลาสมิด และไวต่อสารละลายเมอคิวริกคลอไรด์ที่ความเข้มข้นน้อยกว่า 0.1 ไมโครกรัม/มล. อัตราการเจริญสูงขึ้นเมื่อเติมกลูโคสความเข้มข้นมากกว่า 0.001% (กรัม/ปริมาตร) ลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวสูตร 9K กลูโคสที่ความเข้มข้นมากกว่า 0.01% (กรัม/ปริมาตร) ยับยั้งการเจริญ (Kusano และคณะ 1992) พลาสมิด pTMZ48 มีความเสถียรในเซลล์ทรานสฟอร์มแมนท์ตลอด 25 วงชีวิตที่ทดสอบ โดยไม่ต้องเติมสารปรอท

Dahl (Personal communication) ได้สร้างพลาสมิด pNTS50 ขนาด 10.7 กิโลเบส โดยสอดแทรกดีเอ็นเอขนาด 8 กิโลเบส ประกอบด้วยยีนประมวลรหัสเอทีพีซิลฟูรีเลส (ยีน *sat*) ของ *A. vinosum* strain D (DSMZ 180) เชื่อมต่อกับยีนประมวลรหัสเอพีเอสรีดักเตส (ยีน *apr*) ของ *A. vinosum* strain D (DSMZ 180) ที่ตำแหน่งเรสทริกชัน *EcoRI* บนพลาสมิด pUC18 ในทิศทางที่ยีนทั้งสองสามารถแสดงออกได้

วัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้เพื่อหาภาวะที่เหมาะสมในการใช้ *T. ferrooxidans* ขจัดกำมะถันไฟไรต์ออกจากลิกไนต์ และเพิ่มประสิทธิภาพของ *T. ferrooxidans* ในการขจัดกำมะถันไฟไรต์ออกจากลิกไนต์ โดยการถ่ายโอนยีนประมวลรหัสเอทีพีซิลฟูรีเลสและเอพีเอสรีดักเตสจาก *A. vinosum* strain D (DSMZ 180) ซึ่งซึบโคลนจากพลาสมิด pNTS50 เข้าสู่ *T. ferrooxidans* ใช้ *T. ferrooxidans* Y4-3 เป็นเซลล์เจ้าบ้าน ใช้พลาสมิด pTMZ48 เป็นพลาสมิดพาหะ



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย