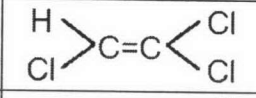
บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ไตรคลอโรเอทธิลีน (Trichloroethylene)

ไตรคลอโรเอทธิลีน (Trichloroethylene) เป็นสารประกอบคลอรีนไฮโดรคาร์บอนชนิดอะลิฟาติก (Chlorinated Aliphatic Hydrocarbons) เป็นของเหลวใส ไม่มีสี มีกลิ่นเฉพาะตัวคล้ายอีเธอร์ ละลายน้ำได้พอสมควร (กรมควบคุมมลพิษ, 2547) คุณสมบัติทางเคมีและทางกายภาพของไตรคลอโรเอทธิลีนแสดงในตารางที่ 2.1

ตารางที่ 2.1 คุณสมบัติของไตรคลอโรเอทธิลีน (กรมควบคุมมลพิษ, 2547)

ชื่อสามัญ	Trichloroethylene
CASRN (Chemical Abstracts Service Registry Number)	79-01-6
สูตรโมเลกุล	C_2HCl_3
สูตรโครงสร้าง	
MCL (Maximum contaminant level) [3]	0.005 มก./ล. [1]
MCLG (Maximum contaminant level goal) [4]	zero [1]
น้ำหนักโมเลกุล	131.39
จุดเดือด	86.9°C
จุดหลอมเหลว	-84.8°C
จุดวาบไฟ	-
อุณหภูมิติดไฟได้เอง	410°C
ช่วงความเข้มข้นที่ติดไฟ	8 - 10.5 %ในอากาศ
ความดันไอ (ที่ 20°C)	57.8 มม.ปรอท
ความสามารถในการละลายน้ำ (ที่ 25°C)	1.1 กรัม/ลิตร
ความหนาแน่นไอ	4.53 กรัม/ลบ.ม.
ความถ่วงจำเพาะ (ที่ 20°C)	1.4642 กรัม/ลบ.ซม.
ค่าคงที่ของเฮนรี่ (ที่ 25°C บรรยากาศ x ลูกบาศก์เมตร / โมล)	1.03×10^{-2} [2]

(1) U.S.EPA, 2002

(2) U.S.EPA, 2000

(3) MCL : The recommended maximum comtaminated level allowed in drinking water.

(4) MCLG : The future goal of recommended maximum comtaminated level allowed in drinking water

2.1.1 การนำไปใช้ประโยชน์ (Uses)

สืบเนื่องจากไม่มีการผลิตไตรคลอโรเอทธิลีนในประเทศไทย ดังนั้นจึงต้องนำเข้าไตรคลอโรเอทธิลีนจากต่างประเทศ ในช่วงปี พ.ศ.2543 และ 2544 ปริมาณการนำเข้าไตรคลอโรเอทธิลีนเท่ากับ 7.12 และ 6.20 ล้านกิโลกรัมตามลำดับ (กรมควบคุมมลพิษ, 2547) การนำเข้าไตรคลอโรเอทธิลีนเพื่อนำมาใช้ในอุตสาหกรรมต่าง ๆ ดังนี้

1. ในทางอุตสาหกรรมประมาณร้อยละ 85 - 90 ใช้ไตรคลอโรเอทธิลีนในการกำจัดคราบทำความสะอาดส่วนประกอบที่เป็นโลหะของอุปกรณ์ต่าง ๆ

2. เป็นตัวทำละลายในผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ เช่น หมึกพิมพ์ สี แลกเกอร์ กาว น้ำยาทำความสะอาดพรม น้ำยากำจัดคราบเปื้อน น้ำยาฆ่าเชื้อ และใช้เป็นตัวทำละลายสำหรับสกัด Oleoresin จากพืช และคาเฟอีนจากกาแฟ

3. เป็นสารสำหรับยุติปฏิกิริยาลูกโซ่ในการผลิต PolyVinyl Chloride (PVC)

2.1.2 อันตรายต่อสุขภาพอนามัย (Health Effects)

การเข้าสู่ร่างกายของสารไตรคลอโรเอทธิลีนในระยะเวลาสั้น ๆ ยังไม่มีการยืนยันว่าถูกสะสมในอวัยวะต่าง ๆ เนื่องจากไตรคลอโรเอทธิลีนถูกขับออกทางลมหายใจและถูกเมทตาโบไลซ์ได้อย่างรวดเร็ว แต่การได้รับไตรคลอโรเอทธิลีนเป็นเวลานานจะมีการสะสมในอวัยวะต่าง ๆ ได้ ส่วนใหญ่ไตรคลอโรเอทธิลีนผ่านเข้าสู่ร่างกายได้โดยการหายใจและผ่านเข้าไปทางผิวหนัง อาการของการได้รับสารไตรคลอโรเอทธิลีนเป็นดังนี้ (กรมควบคุมมลพิษ, 2547)

1. ทางเดินหายใจ การหายใจเข้าไปจะก่อให้เกิดการระคายเคืองต่อทางเดินหายใจ ทำให้เกิดอาการปวดศีรษะ เวียนศีรษะ คลื่นไส้ ไอ หายใจติดขัด หมดสติ เป็นลม และอาจเสียชีวิตได้เมื่อสัมผัสกับไอระเหยที่ความเข้มข้นสูง ๆ

2. ทางผิวหนัง การสัมผัสถูกผิวหนังซ้ำหรือเป็นระยะเวลานาน จะก่อให้เกิดการระคายเคืองและทำให้ผิวหนังอักเสบเนื่องจากการสูญเสียไขมันของชั้นผิวหนังได้ และอาจทำให้เกิดภาวะภูมิแพ้ต่อการสัมผัสผิวหนังได้

3. การกินหรือกลืนเข้าไป จะทำให้เกิดการระคายเคืองต่อทางเดินอาหาร และทำให้เกิดอาการคลื่นไส้ ไอ ปวดท้อง ท้องร่วง และอาจหมดสติได้

4. ไตรคลอโรเอทธิลีนก่อให้เกิดมะเร็งของอวัยวะต่าง ๆ ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม ปัจจุบัน International Agency for Research on Cancer จัดให้ไตรคลอโรเอทธิลีนเป็นสารในกลุ่ม 2A คือ เป็นสารที่ทำให้เกิดมะเร็งในสัตว์ทดลองหลายสปีชีส์ แต่ยังขาดข้อมูลทางระบาดวิทยาในมนุษย์ (probably carcinogenic to humans) (กรมควบคุมมลพิษ, 2547)

2.1.3 การปนเปื้อนสู่สิ่งแวดล้อม (Pathways into the Environment)

ไตรคลอโรเอทธิลีนเข้าสู่สิ่งแวดล้อมได้หลายวิธีดังนี้

1. การผลิตรวมทั้งการแบ่งบรรจุ โรงงานที่ไม่มีระบบการควบคุมที่ดีจะทำให้ไตรคลอโรเอทธิลีนระเหยกลายเป็นไอเข้าสู่บรรยากาศ และถ้าโรงงานไม่มีระบบบำบัดน้ำเสียที่มีประสิทธิภาพดีพอ ไตรคลอโรเอทธิลีนในน้ำทิ้งจากโรงงานจะปนเปื้อนในแหล่งน้ำธรรมชาติได้

2. การเก็บรักษาและการขนส่ง การเข้าสู่สิ่งแวดล้อมของไตรคลอโรเอทธิลีนโดยวิธีนี้ได้แก่ การรั่วไหล หรืออุบัติเหตุ

3. การใช้ ทั้งในอุตสาหกรรม ห้องปฏิบัติการ และบ้านเรือน ทำให้ไตรคลอโรเอทธิลีนเข้าสู่สิ่งแวดล้อม โดยเฉพาะการระเหยเข้าสู่บรรยากาศไตรคลอโรเอทธิลีนในอากาศสามารถถูกชะโดยฝน หรือรวมตัวกับอนุภาคในอากาศตกลงสู่พื้นดินและแหล่งน้ำ

4. การจัดการกากของเสียที่ไม่ถูกต้อง ทำให้ไตรคลอโรเอทธิลีนปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อมได้ เช่น การฝังกลบภาชนะบรรจุที่ยังมีไตรคลอโรเอทธิลีนเหลืออยู่ทำให้ไตรคลอโรเอทธิลีนปนเปื้อนในดินและน้ำใต้ดิน ในห้องปฏิบัติการ การเทไตรคลอโรเอทธิลีนที่เหลือหรือใช้แล้วลงอ่างล้างมือ และบ้านเรือนที่เทผลิตภัณฑ์ที่มีไตรคลอโรเอทธิลีนเป็นส่วนประกอบลงอ่างล้างมือ ก็ทำให้เกิดการปนเปื้อนของแหล่งน้ำได้

การปนเปื้อนหลักมีสาเหตุมาจากการเก็บที่ไม่ดีพอ การรั่วซึมของถังเก็บไตรคลอโรเอทธิลีนใต้ดิน การกำจัดกากของเสียที่ไม่ถูกต้อง การรั่วไหลหรือเกิดอุบัติเหตุขณะขนส่ง ทำให้ไตรคลอโรเอทธิลีนรั่วซึมลงชั้นใต้ดิน เนื่องจากไตรคลอโรเอทธิลีนเป็นตัวทำละลายอินทรีย์ที่มีค่าความถ่วงจำเพาะมากกว่าน้ำทำให้ไตรคลอโรเอทธิลีนซึมลงสู่ชั้นน้ำบาดาลและดูดซับกับตะกอนใต้น้ำ ก่อให้เกิดปัญหาการปนเปื้อนในระยะยาว

สำหรับค่ามาตรฐานความเข้มข้นของไตรคลอโรเอทธิลีนที่ยอมให้ปนเปื้อนในน้ำใต้ดินต้องไม่เกิน 5 ไมโครกรัมต่อลิตร ตามประกาศคณะกรรมการสิ่งแวดล้อมแห่งชาติ ฉบับที่ 20 (พ.ศ. 2543)

ตารางที่ 2.2 ค่าครึ่งชีวิตของไตรคลอโรเอทธิลีนในสิ่งแวดล้อม (กรมควบคุมมลพิษ, 2547)

สิ่งแวดล้อม	ค่าครึ่งชีวิต	คำอธิบาย
อากาศ	1.1 วัน – 11.3 วัน	ค่าครึ่งชีวิตของไตรคลอโรเอทธิลีนในอากาศคำนวณจากปฏิกิริยาออกซิเดชั่นโดยแสงกับอนุมูลอิสระไฮดรอกซิล
น้ำผิวดิน	6 เดือน - 1 ปี	ค่าครึ่งชีวิตของไตรคลอโรเอทธิลีนในน้ำผิวดิน คำนวณจากปฏิกิริยาการย่อยสลายโดยชีวภาพในน้ำแบบใช้ออกซิเจน
น้ำใต้ดิน	10.7 เดือน - 4.5 ปี	ค่าครึ่งชีวิตของไตรคลอโรเอทธิลีนในน้ำใต้ดิน คำนวณจากปฏิกิริยาการแตกสลายด้วยน้ำ (10.7 เดือน) และปฏิกิริยาการย่อยสลายแบบไม่ใช้ออกซิเจนในตะกอนดิน (4.5 ปี)
ดิน	6 เดือน – 1 ปี	ค่าครึ่งชีวิตของไตรคลอโรเอทธิลีนในดิน คำนวณจากปฏิกิริยาการย่อยลลายโดยชีวภาพแบบใช้ออกซิเจน

2.2 วิธีการบำบัดสารประกอบคลอรีนไฮโดรคาร์บอนชนิดอะลิฟาติก (Chlorinated Aliphatic Hydrocarbons ; CAHs) โดยวิธีการทางชีวภาพ

สารประกอบคลอรีนไฮโดรคาร์บอนชนิดอะลิฟาติก (CAHs) เช่น เตตระคลอโรเอทธิลีน (PCE) ไตรคลอโรเอทธิลีน (TCE) 1,1,1-ไตรคลอโรอีเทน (TCA) ใช้กันอย่างกว้างขวางในอุตสาหกรรม โดยใช้เป็นตัวทำละลายในผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ ถ้าโรงงานไม่มีระบบบำบัดที่มีประสิทธิภาพดีพอ CAHs จะปนเปื้อนสู่สิ่งแวดล้อมโดยการระเหยเข้าสู่บรรยากาศและปนเปื้อนในแหล่งน้ำตามธรรมชาติ ดินและน้ำใต้ดินได้ ผลผลิตของการย่อยสลาย CAHs ทางชีวภาพ เช่น 1,1-ไดคลอโรอีเทน (1,1-DCA) 1,1-ไดคลอโรเอทธิลีน (1,1-DCE) ทรานส์-1,2-ไดคลอโรเอทธิลีน (tran-DCE) ซิส-1,2-ไดคลอโรเอทธิลีน (cis-DCE) และไวนิลคลอไรด์ (VC) ก็ปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อมเช่นเดียวกัน ซึ่งสารประกอบคลอรีนไฮโดรคาร์บอนชนิดอะลิฟาติกเหล่านี้เป็นสารก่อมะเร็งและเป็นพิษต่อระบบประสาท จึงควรทำการบำบัด CAHs ที่ปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อม วิธีการบำบัด CAHs โดยกระบวนการทางชีวภาพมี 3 วิธี ดังนี้

2.2.1 **ใช้เป็นซับสเตรตของจุลินทรีย์** (Usage as Primary Substrate) จุลินทรีย์ใช้สารอินทรีย์เป็นซับสเตรตเพื่อเป็นแหล่งสารอินทรีย์คาร์บอนและแหล่งพลังงานสำหรับการเจริญเติบโต การใช้สารอินทรีย์เป็นอาหารนี้พบได้ทั่วไปในธรรมชาติ ในระบบบำบัดน้ำเสียชุมชนและระบบบำบัดน้ำเสียอุตสาหกรรม จากตารางที่ 2.3 พบว่า มีสารประกอบคลอรีนไฮโดรคาร์บอนชนิดอะลิฟาติก (CAHs) เพียงบางตัวเท่านั้นที่ใช้เป็นซับสเตรตของจุลินทรีย์สำหรับการเจริญเติบโตภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจน เช่น ไดคลอโรมีเทน (DCM) 1,2-ไดคลอโรอีเทน

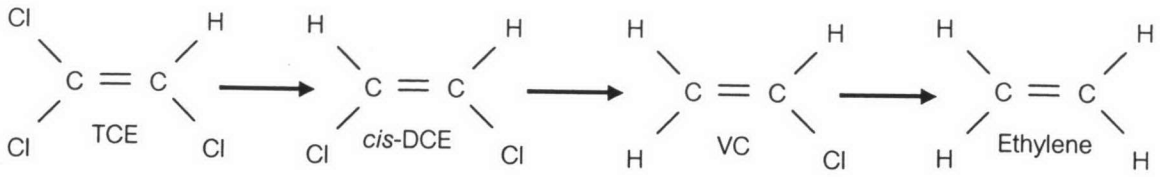
(1,2-DCA) คลอโรอีเทน (CA) และไวนิลคลอไรด์ (VC) สังเกตุได้ว่า CAHs ที่ใช้เป็นซับสเตรตได้นั้นเป็นสารประกอบที่มีจำนวนอะตอมของคลอรีน (Cl) รวมอยู่ในโมเลกุลน้อย แต่จุลินทรีย์ที่ใช้ CAHs เป็นซับสเตรตได้นั้นพบได้น้อยในธรรมชาติ ดังนั้น CAHs ก็จะถูกบำบัดโดยกระบวนการร่วมย่อยสลายแบบใช้ออกซิเจน (Aerobic Cometabolism) และกระบวนการแทนที่ฮาโลเจนอะตอมด้วยไฮโดรเจนอะตอม (Anaerobic Reductive Dehalogenation) (McCarty, 1997)

ตารางที่ 2.3 การบำบัด CAHs ภายใต้สภาวะมีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน (McCarty, 1997)

Compounds	Primary Substrate	Aerobic Cometabolism	Anaerobic Reductive Dehalogenation
CCl_4	-	0	xxxx
$CHCl_3$	-	x	xx
CH_2Cl_2	Yes	xxx	-
CH_3CCl_3	-	x	xxxx
CH_3CHCl_2	-	x	xx
CH_2ClCH_2Cl	Yes	x	x
CH_3CH_2Cl	Yes	xx	-
$CCl_2=CCl_2$	-	0	xxx
$CHCl=CCl_2$	-	xx	xxx
$CHCl=CHCl$	-	xxx	xx
$CH_2=CCl_2$	-	x	xx
$CH_2=CHCl_2$	Yes	xxxx	x

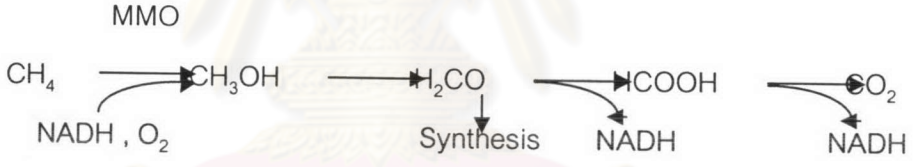
0-very small ; x-some ; xx-fair ; xxx-good ; xxxx-excellent

2.2.2 **การแทนที่ฮาโลเจนอะตอมด้วยไฮโดรเจนอะตอมในสภาวะไร้ออกซิเจน (Anaerobic Reductive Dehalogenation)** ฮาโลเจนอะตอมในสารประกอบคลอรีนไฮโดรคาร์บอนชนิดอะลิฟาติก (CAHs) ก็คือคลอรีน (Cl) อะตอมนั่นเอง กระบวนการนี้เกิดขึ้นในสภาวะไร้ออกซิเจน เป็นการแทนที่คลอรีนอะตอมในสารประกอบด้วยไฮโดรเจนอะตอม (H) ผลผลิตจากการย่อยสลายโดยวิธีนี้ตามลำดับได้แก่ 1,2-ไดคลอโรเอทธิลีน (1,2-DCE) ไวนิล-คลอไรด์ (VC) ซึ่งเป็นสารที่เป็นอันตราย และเอทธิลีน (Ethylene) ซึ่งเป็นสารที่ไม่เป็นอันตราย โดยอัตราการเปลี่ยนรูป CAHs โดยวิธีการแทนที่ฮาโลเจนอะตอมด้วยไฮโดรเจนอะตอมในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจนจะเร็วสำหรับสารประกอบที่มีคลอรีนอะตอมจำนวนมาก และช้าสำหรับสารประกอบที่มีจำนวนคลอรีนอะตอมน้อย ดังนั้นกระบวนการนี้จึงมักจะส่งผลให้เกิดการสะสมของ *cis*-DCE และ VC (Semprini, 1997)

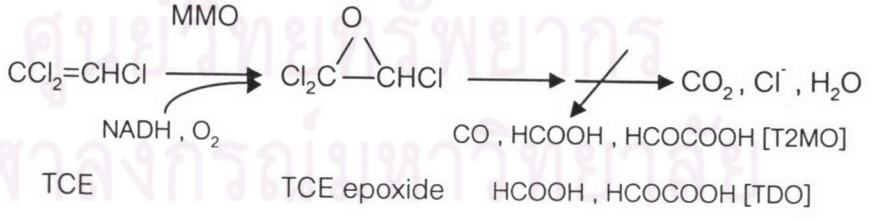


รูปที่ 2.1 กระบวนการแทนที่ฮาโลเจนอะตอมด้วยไฮโดรเจนอะตอมในสภาวะไร้ออกซิเจน

2.2.3 **กระบวนการร่วมย่อยสลายแบบใช้ออกซิเจน** (Aerobic Cometabolism) คือ การที่จุลินทรีย์ได้รับแหล่งอินทรีย์คาร์บอนและแหล่งพลังงานจากซับสเตรตหลัก (Growth substrate) เพื่อใช้ในการเจริญเติบโตและสร้างเอนไซม์ที่ใช้ในการย่อยสลายสารอื่น (Nongrowth substrate) ที่ไม่มีประโยชน์ต่อตัวจุลินทรีย์เองด้วย Wilson และ Wilson (1985) ค้นพบกระบวนการร่วมย่อยสลายไตรคลอโรเอทธิลีนแบบใช้ออกซิเจนเป็นครั้งแรก โดยฉีดก๊าซมีเทนและก๊าซออกซิเจนลงไปในคอลัมน์ดินที่มีไตรคลอโรเอทธิลีนปนเปื้อนอยู่ เพื่อกระตุ้นให้จุลินทรีย์ที่อยู่ในดินสร้างเอนไซม์ในการย่อยสลายไตรคลอโรเอทธิลีน ซึ่งกระบวนการดังกล่าวอธิบายได้ดังรูปที่ 2.2 และ 2.3 เป็นกระบวนการ Aerobic Cometabolism ของไตรคลอโรเอทธิลีนโดยใช้มีเทนเป็นซับสเตรต



รูปที่ 2.2 ปฏิกิริยาออกซิเดชั่นของมีเทน (McCarty, 1997)



รูปที่ 2.3 ปฏิกิริยาการร่วมย่อยสลายไตรคลอโรเอทธิลีนแบบใช้ออกซิเจน (McCarty, 1997)

ในการใช้มีเทนเป็นซับสเตรต จุลินทรีย์ในกลุ่มเมทาโนโทรป (Methanotroph) ใช้เอนไซม์ MMO (methane monooxygenase) และพลังงานในรูปของ NADH (Nicotinamide adenine dinucleotide) เพื่อทำปฏิกิริยาออกซิเดชั่นในการเปลี่ยนรูปมีเทนเป็นเมธานอล ในกระบวนการ Methane Metabolism นี้จะได้ผลผลิตคือเซลล์ เอนไซม์ MMO และพลังงานในรูปของ NADH ที่

สังเคราะห์ขึ้นมาใหม่ เมื่อเมทาโนโทรปใช้มีเทนเป็นซับสเตรตจนหมด เอนไซม์ MMO และพลังงานในรูปของ NADH ที่ได้จากกระบวนการ Methane Metabolism จะออกซิไดซ์ไตรคลอโรเอทธิลีน (TCE) ให้อยู่ในรูปของ TCE epoxide ซึ่งเป็นสารที่ประกอบด้วยอะตอมของออกซิเจน 1 อะตอม และอะตอมของคาร์บอน 2 อะตอมในลักษณะเป็นรูปสามเหลี่ยม ซึ่งจะไม่เสถียรและเปลี่ยนรูปได้เร็วกลายเป็นก๊าซคาร์บอนมอนอกไซด์ (CO) กรดฟอร์มิก (formic acid) กรดไกลออกซิลิก (glyoxylic acid) ก่อนที่จะเปลี่ยนรูปเป็นก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2) คลอไรด์ไอออน (Cl^-) และน้ำ (H_2O)

2.3 ซับสเตรตที่ใช้ในกระบวนการร่วมย่อยสลายแบบใช้ออกซิเจน

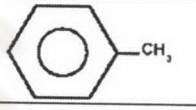
ซับสเตรต (Growth substrate) ที่ให้พลังงานและเป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับการเติบโตของจุลินทรีย์และเป็นตัวเหนี่ยวนำให้จุลินทรีย์สร้างเอนไซม์สำหรับกระบวนการร่วมย่อยสลายแบบใช้ออกซิเจน มีหลายชนิด เช่น มีเทน (Chang และ Alvarez-Cohen, 1996; Semprini และคณะ, 1990) โพรเพน (Wackett และคณะ, 1989a) บิวเทน (Kim และคณะ, 2000) เอทธิลีน (Ensign และคณะ, 1992) โพรพีลีน (Ensign และคณะ, 1992) โทลูอีน (Nelson และคณะ, 1987; Shield และคณะ, 1989; Wackett และ Gibson, 1988) ฟีนอล (Ayoubi และ Harker, 1998; Folsom และคณะ, 1990; Hopkins และคณะ, 1993a) คลีซอล (Folsom และคณะ, 1990; Wackett และ Gibson, 1988; Nelson และคณะ, 1988) แอมโมเนีย (Ely และคณะ, 1997; Arciero และคณะ, 1989) กลูโคส (Ensign, 1996; Gao และ Skeen,1999) และไวนิลคลอไรด์ (Hartmans และ Bony, 1992; Coleman และคณะ, 2002b; Verce และคณะ, 2000) เป็นต้น ซับสเตรตที่กล่าวมานี้มีเทนเป็นซับสเตรตที่มีการศึกษาอย่างกว้างขวาง แต่ Bielefeldt และคณะ (1995) และ Hopkins และคณะ (1993a) รายงานว่าในการนำไปใช้ในงานภาคสนามจริงจุลินทรีย์ที่ใช้ซับสเตรตประเภทอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนเช่นฟีนอลและโทลูอีนสามารถบำบัดไตรคลอโรเอทธิลีนได้ดีกว่าจุลินทรีย์ที่ใช้ซับสเตรตประเภทอะลิฟาติกไฮโดรคาร์บอนเช่นมีเทนเป็นซับสเตรต

2.3.1 โทลูอีน (Toluene)

โทลูอีน (Toluene) เป็นสารประกอบไฮโดรคาร์บอนชนิดอะโรมาติก เป็นของเหลวใส ไม่มีสี มีกลิ่นหอมหวานของอะโรมาติกเหมือนเบนซีน จัดเป็นสารไวไฟ เสี่ยงต่อการติดไฟและการระเบิด สารนี้สามารถลุกติดไฟได้ เมื่อสัมผัสกับความร้อน ประกายไฟ หรือเปลวไฟ โทลูอีนถูกนำไปใช้เป็นตัวทำละลายในอุตสาหกรรมยา เคมี ยาง พลาสติก และใช้ผสมน้ำมันเชื้อเพลิงของเครื่องยนต์

เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการเผาไหม้ของเชื้อเพลิง การเข้าสู่ร่างกายของสารโทลูอีนส่วนใหญ่ผ่านเข้าไปโดยการหายใจและซึมผ่านเข้าไปทางผิวหนัง การหายใจเข้าไปจะเกิดอาการปวดศีรษะ วิงเวียนศีรษะ คลื่นไส้ และมึนงง การสัมผัสถูกผิวหนังจะก่อให้เกิดการระคายเคือง เกิดผื่นแดง การกลืนหรือกินเข้าไปจะทำให้ปวดท้อง (กรมควบคุมมลพิษ, 2545) เมื่อได้รับโทลูอีนสะสมเข้าสู่ร่างกายเป็นเวลานานจะก่อให้เกิดโรคมะเร็ง คุณสมบัติทางเคมีและทางกายภาพของโทลูอีนแสดงในตารางที่ 2.4

ตารางที่ 2.4 คุณสมบัติของโทลูอีน (กรมควบคุมมลพิษ, 2545)

ชื่อสามัญ	Toluene
CASRN (Chemical Abstracts Service Registry Number)	108-88-3
สูตรโมเลกุล	$C_6H_5CH_3$
สูตรโครงสร้าง	
MCL (Maximum contaminant level) [3]	1 มก./ล. [1]
MCLG (Maximum contaminant level goal) [4]	1 มก./ล. [1]
น้ำหนักโมเลกุล	92.13
จุดเดือด	110.4°C
จุดหลอมเหลว	-95°C
จุดวาบไฟ	6 - 10°C
อุณหภูมิติดไฟได้เอง	535°C
ความดันไอ (ที่ 30°C)	36.7มม.ปรอท
ความสามารถในการละลายน้ำ (ที่ 25°C)	0.526 กรัม/ลิตร
ความหนาแน่นไอ	3.2 กรัม/ลบ.ม.
ความถ่วงจำเพาะ (ที่ 20°C)	0.866 กรัม/ลบ.ซม.
ค่าคงที่ของเฮนรี่ (ที่ 25°C บรรยากาศ x ลูกบาศก์เมตร / โมล)	6.64×10^{-3} [2]

(1) U.S.EPA, 2002

(2) U.S.EPA, 2000

(3) MCL : The recommended maximum comtaminated level allowed in drinking water.

(4) MCLG : The future goal of recommended maximum comtaminated level allowed in drinking water.

2.3.1.1 วิถีการย่อยสลายของโทลูอีนทางชีวภาพ (Toluene Degradation Pathways)

โทลูอีนถูกย่อยสลายทางชีวภาพได้หลายวิถีดังรูปที่ 2.4 ดังนี้

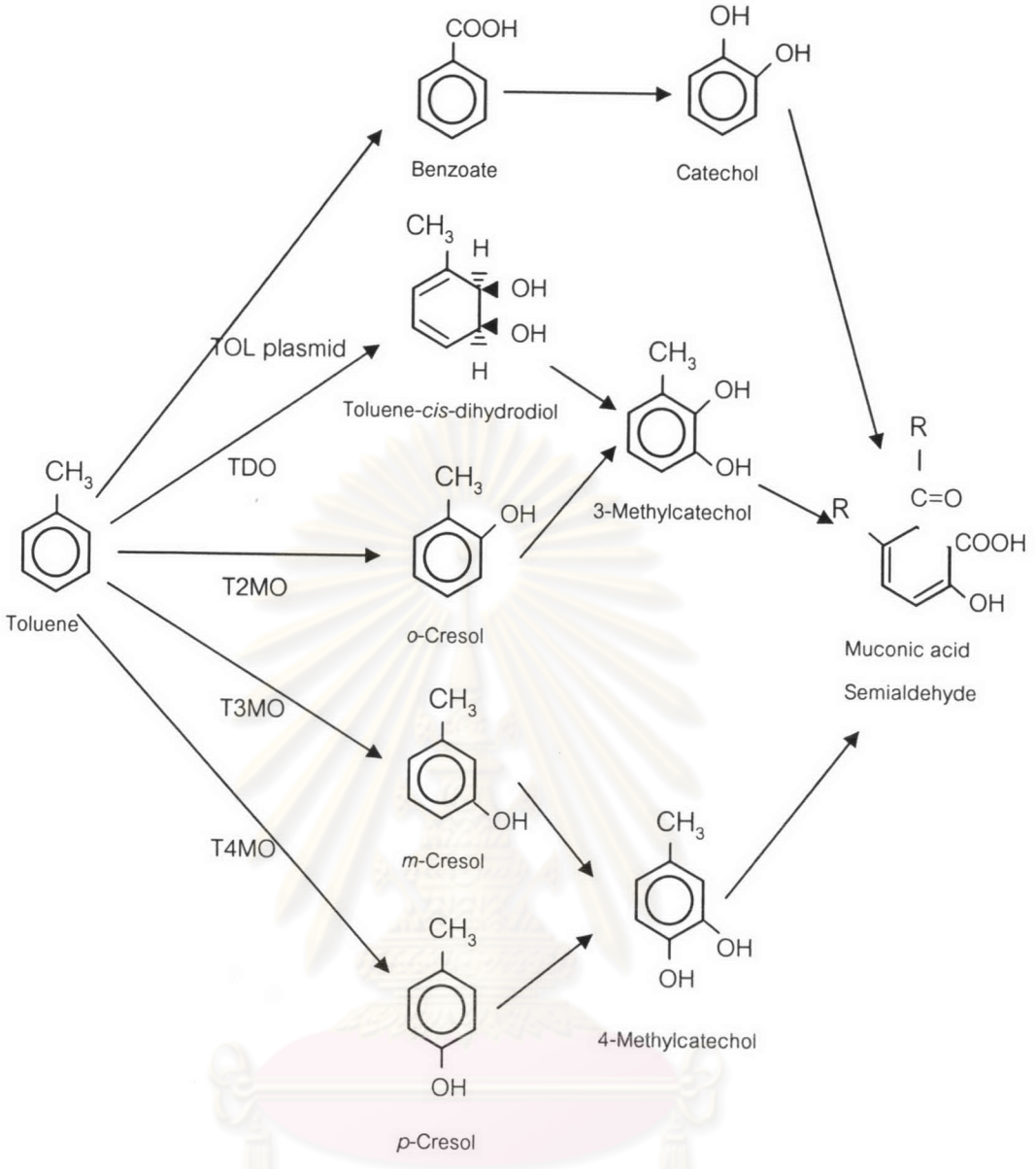
วิถีที่ 1 TOL plasmid *Pseudomonas putida* mt-2 ใช้เอนไซม์ซึ่งสังเคราะห์จากยีนในส่วน TOL plasmid เปลี่ยนรูปโทลูอีนเป็น Benzoate ซึ่งจุลินทรีย์ตัวนี้ออกซิไดซ์โทลูอีนที่ Methyl group (Shield และคณะ, 1989) แต่ไม่สามารถเปลี่ยนรูปไตรคลอโรเอทธิลีนได้ จากนั้น Benzoate ถูกเปลี่ยนรูปเป็น Catechol ก่อนที่จะถูกย่อยสลายต่อไป

วิถีที่ 2 TDO *Pseudomonas putida* F1 ใช้เอนไซม์ Toluene dioxygenase เปลี่ยนรูปโทลูอีนเป็น Toluene-*cis*-dihydrodiol ซึ่งเอนไซม์นี้สามารถเปลี่ยนรูป TCE และ cis-DCE ได้แต่ไม่สามารถเปลี่ยนรูป VC ได้ จากนั้น Toluene-*cis*-dihydrodiol ถูกเปลี่ยนรูปเป็น 3-methylcatechol โดยเอนไซม์ Toluene-*cis*-dihydrodiol dehydrogenase และ 3-methylcatechol ถูกแตกอะโรมาติกโดย meta fission เป็น 2-hydroxy-6-oxohepta-2,4-dienoic acid ต่อไป (Nelson และคณะ, 1987)

วิถีที่ 3 T2MO *Burkholderia cepacia* G4 ใช้เอนไซม์ Toluene-2-monooxygenase เปลี่ยนรูปโทลูอีนเป็น *o*-Cresol ที่ตำแหน่ง *ortho* position จากนั้น *o*-Cresol ถูกเปลี่ยนรูปเป็น 3-methylcatechol โดยเอนไซม์ Toluene monooxygenase และ 3-methylcatechol ถูกแตกอะโรมาติกโดย *meta* fission เป็น Muconic acid Semialdehyde ต่อไป (Nelson และคณะ, 1987)

วิถีที่ 4 T3MO *Ralstonia pickettii* PKO1 ใช้เอนไซม์ Toluene-3-monooxygenase เปลี่ยนรูปโทลูอีนเป็น *m*-Cresol ที่ตำแหน่ง *meta* position จากนั้น *m*-Cresol ถูกเปลี่ยนรูปเป็น 4-methylcatechol โดยเอนไซม์ Toluene monooxygenase และ 3-methylcatechol ถูกแตกอะโรมาติกโดย *meta* fission เป็น Muconic acid Semialdehyde ต่อไป (Nelson และคณะ, 1987)

วิถีที่ 5 T4MO *Pseudomonas mendocina* KR1 ใช้เอนไซม์ Toluene-4-monooxygenase เปลี่ยนรูปโทลูอีนเป็น *p*-Cresol ที่ตำแหน่ง *para* position จากนั้น *p*-Cresol ถูกเปลี่ยนรูปเป็น 4-methylcatechol ต่อไป (Shield และคณะ, 1989)



รูปที่ 2.4 วิถีการย่อยสลายโทลูอีน (Kahng และคณะ, 2001)

2.3.1.2 ข้อดีของการใช้โทลูอีนเป็นซับสเตรต

1. โทลูอีนเป็นซับสเตรตที่มีประสิทธิภาพในการบำบัดไตรคลอโรเอทธิลีนได้ดี (Hopkins และคณะ, 1993a)
2. โทลูอีนมีสถานะเป็นของเหลว สามารถนำมาใช้งานได้สะดวก
3. โทลูอีนมีพิษเฉียบพลันรุนแรงน้อยกว่าฟีนอล

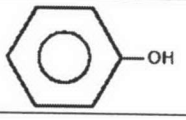
2.3.1.3 ข้อเสียของการใช้โทลูอีนเป็นซับสเตรต

1. โทลูอีนเป็นสารที่เสี่ยงต่อการจุดติดไฟและการระเบิด โดยโทลูอีนสามารถลุกติดไฟได้เมื่อสัมผัสกับความร้อน ประกายไฟ หรือเปลวไฟ ขณะที่นำไปใช้งานถ้ามีคนสูบบุหรี่หรือทิ้งก้นบุหรี่ไว้ ไอระเหยของโทลูอีนอาจจะลุกติดไฟและระเบิดได้
2. โทลูอีนเป็นสารที่ทำให้ผู้สูดหายใจเข้าไปเกิดอาการมึนงง เหนื่อยล้า อ่อนเพลีย ความรุนแรงขึ้นอยู่กับปริมาณความเข้มข้นและระยะเวลาที่สัมผัส เมื่อได้รับโทลูอีนสะสมเข้าสู่ร่างกายเป็นเวลานานจะก่อให้เกิดโรคมะเร็ง
3. เมื่อนำไปใช้ในงานภาคสนามจริง อาจมีโทลูอีนเหลือจากกระบวนการร่วมย่อยสลายไตรคลอโรเอทธิลีนแบบใช้ออกซิเจนปนเปื้อนในน้ำใต้ดินมากกว่าค่ามาตรฐานคุณภาพน้ำใต้ดินที่อนุญาตให้มีโทลูอีนในน้ำใต้ดินไม่เกิน 1000 ไมโครกรัมต่อลิตร (กรมควบคุมมลพิษ, 2543)

2.3.2 ฟีนอล (Phenol)

ฟีนอล (Phenol) เป็นผลึกไม่มีสีหรือสีขาว ถ้าไม่บริสุทธิ์จะมีสีชมพูอ่อน มีกลิ่นฉุนเฉพาะตัว ดูดความชื้น ละลายน้ำได้ดี สารละลายที่ได้มีฤทธิ์เป็นกรดอ่อนจึงมีชื่อเรียกที่รู้จักกันทั่วไปว่ากรดคาร์โบลิก ฟีนอลถูกนำไปใช้ในการผลิตสารเคมีอันตรายหลายชนิด เช่น Cresols, Xylenols, Salicylic acid, Aniline และ Phenolic resins ฟีนอลมีพิษเฉียบพลันต่อมนุษย์ไม่ว่าจะได้รับสารโดยวิธีโดยการรับประทาน สูดดม หรือสัมผัสทางผิวหนัง เนื่องจากฟีนอลมีฤทธิ์กัดกร่อนเนื้อเยื่ออย่างรุนแรง ทำให้เกิดเป็นแผลไหม้บริเวณที่ได้รับการสัมผัสโดยตรง การหายใจเข้าไปจะก่อให้เกิดอาการระคายเคืองต่อระบบทางเดินหายใจ ไอ หายใจติดขัด ปวดศีรษะ คลื่นไส้ อาเจียน การกลืนหรือกินเข้าไปจะไปทำลายเนื้อเยื่อทางเดินอาหาร ทำให้เกิดการทำงานผิดปกติของกระเพาะอาหารและลำไส้ พิษของฟีนอลสามารถก่อให้เกิดผลกระทบต่ออวัยวะแทบทุกส่วน เมื่อได้รับเข้าสู่ร่างกายไม่ว่าโดยวิธีใดก็ตาม (กรมควบคุมมลพิษ, 2542) คุณสมบัติทางเคมีและทางกายภาพของฟีนอลแสดงในตารางที่ 2.5

ตารางที่ 2.5 คุณสมบัติของฟีนอล (กรมควบคุมมลพิษ, 2542)

ชื่อสามัญ	Phenol
CASRN (Chemical Abstracts Service Registry Number)	108-95-2
สูตรโมเลกุล	C_6H_6O
สูตรโครงสร้าง	
MCL (Maximum contaminant level) [2]	-
MCLG (Maximum contaminant level goal) [3]	-
น้ำหนักโมเลกุล	94.11
จุดเดือด	182°C
จุดหลอมเหลว	40.85°C
จุดวาบไฟ	85°C
อุณหภูมิติดไฟได้เอง	715°C
ช่วงความเข้มข้นที่ติดไฟ	3 - 10 %ในอากาศ
ความดันไอ (ที่ 25°C)	0.3513 มม.ปรอท
ความสามารถในการละลายน้ำ (ที่ 16°C)	93 กรัม/ลิตร
ความหนาแน่นไอ	3.24 กรัม/ลบ.ม.
ความถ่วงจำเพาะ (ที่ 20°C)	1.071 กรัม/ลบ.ซม.
ค่าคงที่ของเฮนรี่ (ที่ 25°C บรรยากาศ x ลูกบาศก์เมตร / โมล)	3.97×10^{-7} [1]

(1) U.S.EPA, 2000

(2) MCL : The recommended maximum comtaminated level allowed in drinking water.

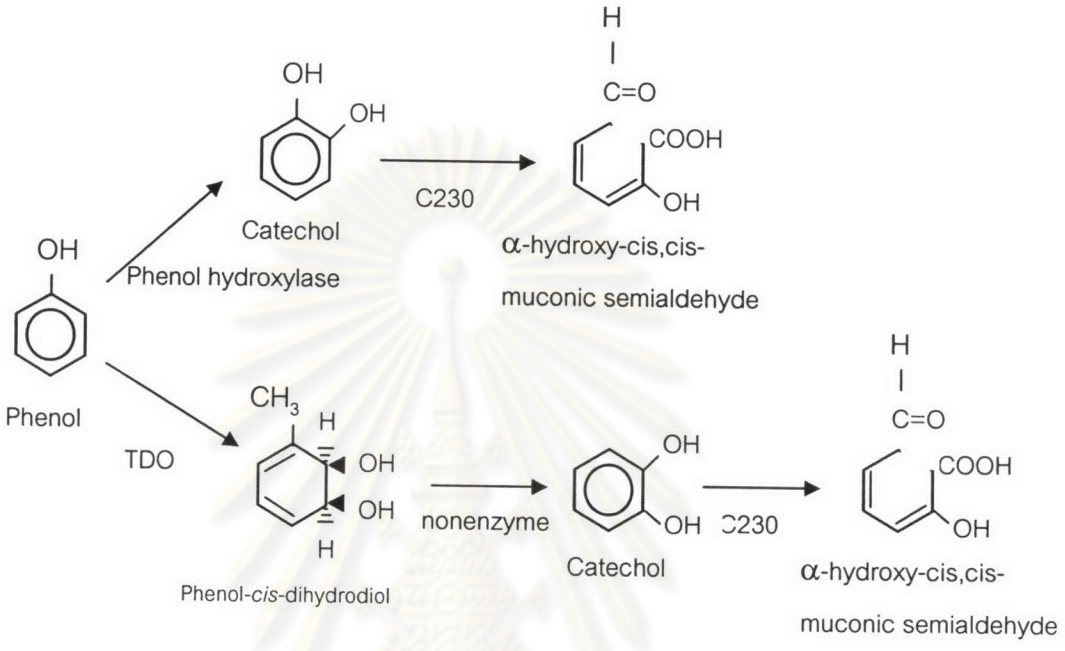
(3) MCLG : The future goal of recommended maximum comtaminated level allowed in drinking water.

2.3.2.1 วิถีการย่อยสลายของฟีนอลทางชีวภาพ (Phenol Degradation Pathways)

ฟีนอลถูกย่อยสลายทางชีวภาพได้ดังรูปที่ 2.5 ซึ่งอธิบายได้ดังนี้

วิถีที่ 1 Phenol hydroxylase ฟีนอลถูกเปลี่ยนรูปไปเป็น Catechol โดยเอนไซม์ Phenol hydroxylase จากนั้น Catechol ถูกเปลี่ยนรูปเป็น α-hydroxy-*cis,cis*-muconic semialdehyde โดยเอนไซม์ Catechol-2,3-dioxygenase

วิถีที่ 2 TDO ฟีนอลถูกเปลี่ยนรูปเป็น Phenol-*cis*-dihydrodiol โดยใช้เอนไซม์ dioxygenase จากนั้น Phenol-*cis*-dihydrodiol ถูกเปลี่ยนรูปเป็น Catechol และ Catechol เปลี่ยนรูปเป็น α-hydroxy-*cis,cis*-muconic semialdehyde โดยเอนไซม์ Catechol-2,3-dioxygenase



รูปที่ 2.5 วิถีการย่อยสลายฟีนอล (ดัดแปลงจาก Nelson และคณะ, 1987)

2.3.2.2 ข้อดีของการใช้ฟีนอลเป็นซับสเตรต

1. เมื่อใช้ฟีนอลเป็นซับสเตรต หลังจากการบำบัด TCE แล้วจะมีฟีนอลเหลือตกค้างอยู่ในน้ำใต้ดินน้อยเพราะฟีนอลสามารถสลายตัวได้อย่างรวดเร็วในอากาศและฟีนอลถูกย่อยสลายทางชีวภาพในน้ำได้อย่างรวดเร็ว ทั้งนี้เนื่องจากค่าครึ่งชีวิตของฟีนอลในสิ่งแวดล้อมมีค่าน้อย (2.28 –22.8 ชม. ในอากาศ 12 – 168 ชม.ในน้ำ)
2. ฟีนอลละลายน้ำได้ดีกว่าโทลูอีนและระเหยกลายเป็นไอได้น้อยกว่าโทลูอีน จึงง่ายที่จะเตรียมเป็น stock solution ไว้สำหรับใช้งานในภาคสนาม (Hopkins, 1993a)

2.3.2.3 ข้อเสียของการใช้ฟีนอลเป็นซับสเตรต

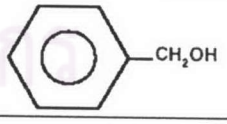
1. ฟีนอลมีลักษณะเป็นผลึกจึงต้องนำมาละลายน้ำก่อนนำไปใช้งาน จะได้ฟีนอลที่มีความเข้มข้นสูงเป็นอันตรายมาก

2. ถ้าในน้ำใต้ดินมีสาร Chlorinated ปนเปื้อนอยู่ เมื่อฉีดฟีนอลลงไปฟีนอลจะทำปฏิกิริยากับสาร Chlorinated ได้เป็นสารประกอบ Chlorophenol ซึ่งเป็นสารที่มีกลิ่นเหม็น เป็นอันตรายและเป็นสารก่อมะเร็ง (Mccarty และคณะ, 1998)

2.3.3 เบนซิลแอลกอฮอล์ (Benzyl alcohol)

เบนซิลแอลกอฮอล์ (Benzyl alcohol) หรือชื่ออื่น ๆ เช่น Benzenemethanol, Phenylcarbinol; Phenylmethyl alcohol, Alpha-Hydroxytoluene, Benzoyl alcohol, Hydroxytoluene, Benzenecarbinol, Alpha-toluenol, (hydroxymethyl)benzene เป็นของเหลวใส ไม่มีสี มีกลิ่นหอมหวานของอะโรมาติก เบนซิลแอลกอฮอล์เป็นสารที่พบได้ในพืชหลายชนิดเช่น ชาเขียวมีเบนซิลแอลกอฮอล์เป็นส่วนประกอบอยู่ 1-30 มก./กก. เบนซิลแอลกอฮอล์ถูกใช้เป็นวัตถุดิบตั้งต้นและเป็นสารตัวกลางที่สำคัญในอุตสาหกรรมสบู่ น้ำหอม ยา เครื่องสำอาง ใช้แต่งรสชาติอาหารเช่นหมากฝรั่งมีเบนซิลแอลกอฮอล์เป็นส่วนผสมอยู่ 1254 มก./กก. เครื่องดื่มบางชนิดมี เบนซิลแอลกอฮอล์เป็นส่วนผสมอยู่ 400 มก./กก. (European Commission, 2002) คุณสมบัติทางเคมีและทางกายภาพของเบนซิลแอลกอฮอล์แสดงในตารางที่ 2.6

ตารางที่ 2.6 คุณสมบัติของเบนซิลแอลกอฮอล์ (Chemical Land21, 2000)

ชื่อสามัญ	Benzyl alcohol
CASRN (Chemical Abstracts Service Registry Number)	100-51-6
สูตรโมเลกุล	$C_6H_5CH_2OH$
สูตรโครงสร้าง	
MCL (Maximum contaminant level) [1]	-
MCLG (Maximum contaminant level goal) [2]	-
น้ำหนักโมเลกุล	108.14
จุดเดือด	205°C
จุดหลอมเหลว	-15°C
จุดวาบไฟ	104°C
อุณหภูมิติดไฟได้เอง	436°C
ความดันไอ (ที่ 20°C)	0.099 มม.ปรอท
ความสามารถในการละลายน้ำ	40 กรัม/ลิตร

ตารางที่ 2.6 (ต่อ) คุณสมบัติของเบนซิลแอลกอฮอล์ (Chemical Land21, 2000)

ความหนาแน่นไอ	3.72 กรัม/ลบ.ม.
ความถ่วงจำเพาะ (ที่ 20°C)	1.046 กรัม/ลบ.ซม.
ค่าคงที่ของเฮนรี่ (ที่ 25°C บรรยากาศ x ลูกบาศก์เมตร / โมล)	3.37×10^{-7}
ความสามารถในการละลายน้ำ	40 กรัม/ลิตร

(1) MCL : The recommended maximum comtaminated level allowed in drinking water.

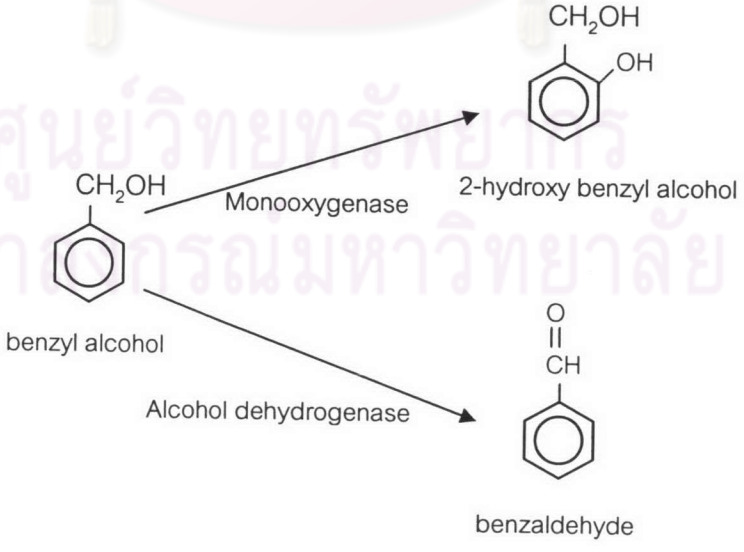
(2) MCLG : The future goal of recommended maximum comtaminated level allowed in drinking water.

2.3.3.1 วิถีการย่อยสลายของเบนซิลแอลกอฮอล์ทางชีวภาพ (Benzyl alcohol Degradation Pathways)

เบนซิลแอลกอฮอล์ถูกย่อยสลายทางชีวภาพได้อย่างน้อย 2 วิถีดังรูปที่ 2.6 ซึ่งอธิบายได้ดังนี้

วิถีที่ 1 Monooxygenase เบนซิลแอลกอฮอล์เปลี่ยนรูปเป็น 2-hydroxy benzyl alcohol โดยใช้เอนไซม์ monooxygenase (Tejasen, 2003)

วิถีที่ 2 Alcohol dehydrogenase เบนซิลแอลกอฮอล์เปลี่ยนรูปได้อีกรูปหนึ่งเป็น benzaldehyde โดยใช้เอนไซม์ Alcohol dehydrogenase (Tejasen, 2003)



รูปที่ 2.6 วิถีการย่อยสลายเบนซิลแอลกอฮอล์ (Tejasen, 2003)

2.3.2.2 **ข้อดีของการใช้เบนซิลแอลกอฮอล์เป็นซับสเตรต**

1. เบนซิลแอลกอฮอล์มีสถานะเป็นของเหลวละลายน้ำได้ดี สามารถนำมาใช้งานได้สะดวก
2. เบนซิลแอลกอฮอล์เป็นสารที่ไม่มีพิษรุนแรง และไม่ก่อให้เกิดมะเร็งของอวัยวะต่าง ๆ ในสัตว์ทดลอง (National Technical Information Service, 1989)

2.3.3.3 **ข้อเสียของการใช้เบนซิลแอลกอฮอล์เป็นซับสเตรต**

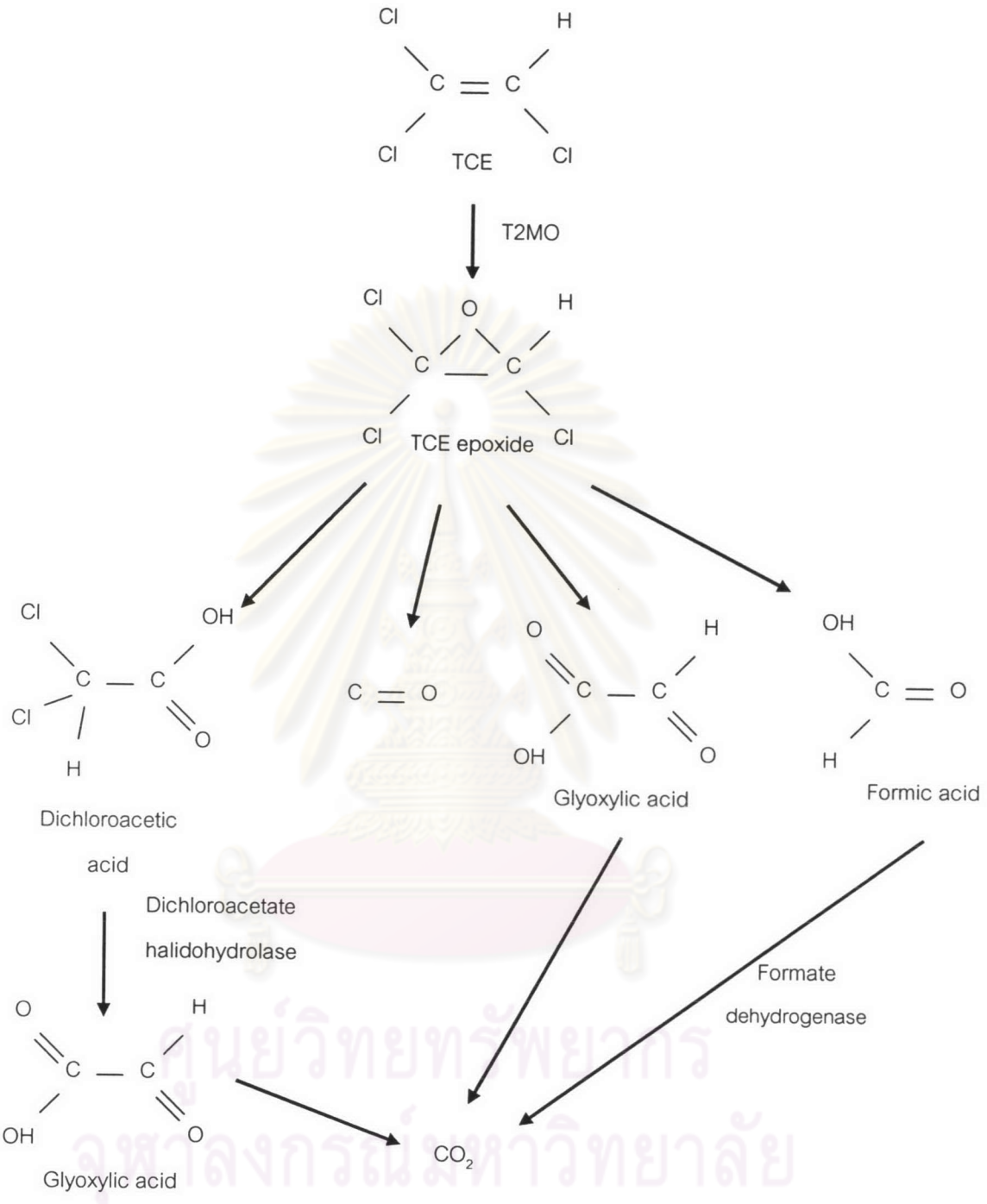
1. เบนซิลแอลกอฮอล์เป็นซับสเตรตที่มีประสิทธิภาพในการบำบัดไตรคลอโรเอทธิลีนต่ำกว่าฟีนอลและโทลูอีน (Tejasen, 2003)

2.4 วิถีการย่อยสลายไตรคลอโรเอทธิลีน (Trichloroethylene Transformation Pathways)

ไตรคลอโรเอทธิลีน (TCE) ถูกออกซิไดซ์ให้อยู่ในรูปของ TCE epoxide โดยเอนไซม์ Toluene-2-monooxygenase (T2MO) ซึ่ง TCE epoxide เป็นสารที่ประกอบด้วยอะตอมของออกซิเจน 1 อะตอมและอะตอมของคาร์บอน 2 อะตอมในลักษณะเป็นรูปสามเหลี่ยม ซึ่งจะไม่เสถียรและเปลี่ยนรูปได้เร็ว กลายเป็นก๊าซคาร์บอนมอนอกไซด์ (CO) กรดฟอร์มิก (formic acid) กรดไกลออกซิลิก (glyoxylic acid) กรดไดคลอโรอะซิติก (Dichloroacetic acid) ก่อนที่จะเปลี่ยนรูปเป็นก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2) คลอไรด์อิออน (Cl^-) และ น้ำ (H_2O) ส่วนไตรคลอโร-เอทธิลีน (TCE) ที่ถูกออกซิไดซ์ให้อยู่ในรูปของ TCE epoxide โดยเอนไซม์ Toluenedioxygenase (TDO) TCE epoxide จะเปลี่ยนรูปเป็นกรดฟอร์มิก (formic acid) กรดไกลออกซิลิก (glyoxylic acid) เท่านั้นไม่มีก๊าซคาร์บอนมอนอกไซด์ (CO) เป็นผลผลิตในการเปลี่ยนรูปไตรคลอโรเอทธิลีนโดยเอนไซม์ Toluenedioxygenase (TDO) (Newman และ Weckett ,1996)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ไตรคลอโรเอทธิลีนถูกย่อยสลายทางชีวภาพได้ดังรูปที่ 2.7 ดังนี้



รูปที่ 2.7 วิถีการย่อยสลายไตรคลอโรเอทธิลีน (ดัดแปลงจาก Whittaker และคณะ, 2003)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.5 คิเนติกส์ของกระบวนการร่วมย่อยสลายแบบใช้ออกซิเจน (Kinetics of Aerobic Cometabolism)

การศึกษาคิเนติกส์ของกระบวนการร่วมย่อยสลายแบบใช้ออกซิเจนนั้นสามารถนำไปประยุกต์ใช้กับงานในภาคสนามในกรณีที่มีการปนเปื้อนเกิดขึ้นได้ โดยสามารถคำนวณปริมาณซับสเตรตที่ใช้ในการเติบโต ปริมาณออกซิเจนที่ใช้ในปฏิกิริยาและระยะเวลาที่จุลินทรีย์ใช้ในการย่อยสลายสารประกอบคลอรีนไฮโดรคาร์บอนชนิดอะลิฟาติก (CAHs) ทำให้ประมาณระยะเวลาและค่าใช้จ่ายในการบำบัดได้ สมการที่ต่าง ๆ ใช้ในกระบวนการร่วมย่อยสลายแบบใช้ออกซิเจนมีดังนี้ (Alvarez-Cohen และ Speitel, 2001)

Michaelis – Menton kinetics

คิเนติกส์ของกระบวนการร่วมย่อยสลายแบบใช้ออกซิเจนดัดแปลงจากสมการ Michaelis-Menton kinetics ดังนี้

$$-r_c = \frac{k_c X S_c}{K_{sc} + S_c} \qquad (2.1)$$

โดยที่

r_c = The rate of cometabolic reaction (mg / l / d)

S_c = The cometabolic substrate concentration (mg / l)

k_c = The maximum specific rate of cometabolic substrate degradation (mg substrate / mg cells / d)

X = The active microbial concentration (mg cells / l)

K_{sc} = The half saturation constant for the cometabolic substrate (mg / l)

Multiple substrate

ในกรณีที่มีสารที่ถูกย่อยสลายได้มากกว่าหนึ่งตัว การทำงานของเอนไซม์อาจถูกยับยั้งทำให้ปฏิกิริยาเกิดช้าลง (Competitive inhibition) เนื่องจากการแย่งเอนไซม์กันของแต่ละสาร ทำให้เอนไซม์ไปทำปฏิกิริยากับซับสเตรตได้น้อยลง สารในที่นี้คือ growth substrate และ cometabolic substrate ตามลำดับ โดย TCE มีลักษณะเป็นสารประกอบไฮโดรคาร์บอนที่ไม่อิ่มตัว (unsaturated hydrocarbon) คล้ายโทลูอีน จึงแย่งเข้าจับที่บริเวณเร่งของเอนไซม์

monooxygenase สมการของ Competitive inhibition ระหว่าง growth substrate และ cometabolic substrate เป็นดังนี้

สำหรับ Growth substrate

$$-r_g = \frac{Xk_gS_g}{K_{sg}\left(1+S_c/K_{isc}\right)+S_g} \qquad (2.2)$$

โดยที่

r_g = The rate of growth reaction (mg / l / d)

S_g = The growth substrate concentration (mg / l)

S_c = The cometabolic substrate concentration (mg / l)

k_g = The maximum specific rate of growth substrate degradation (mg substrate / mg cells / d)

X = The active microbial concentration (mg cells / l)

K_{sg} = The half saturation constant for the growth substrate (mg / l)

K_{isc} = The inhibition coefficient for the cometabolic substrate (mg / l)

Assume $K_{isc} = K_{sc}$

สำหรับ Cometabolic substrate

$$-r_c = \frac{Xk_cS_c}{K_{sc}\left(1+S_g/K_{isg}\right)+S_c} \qquad (2.3)$$

โดยที่

r_c = The rate of cometabolic reaction (mg / l / d)

S_c = The cometabolic substrate concentration (mg / l)

S_g = The growth substrate concentration (mg / l)

k_c = The maximum specific rate of cometabolic substrate degradation (mg substrate / mg cells / d)

X = The active microbial concentration (mg cells / l)

K_{sc} = The half saturation constant for the cometabolic substrate (mg / l)

K_{isg} = The inhibition coefficient for the growth substrate (mg / l)

Assume $K_{isg} = K_{sg}$

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Cells mass production

อัตราการเติบโตของเซลล์ขึ้นอยู่กับการใช้ซับสเตรตของเซลล์ ความเป็นพิษของ cometabolic substrate ต่อเซลล์ และการสลายตัวของเซลล์ ซึ่งเขียนเป็นสมการได้ดังนี้

$$r_x = Yr_g - \frac{1}{T_c} r_c - bX \qquad (2.4)$$

โดยที่

r_x = The net cellular growth rate (mg / l / d)

Y = The cellular yield of growth substrate (mg cells / mg growth substrate)

r_g = The rate of growth reaction (mg / l / d)

r_c = The rate of cometabolic reaction (mg / l / d)

T_c = The transformation capacity for the cometabolic substrate (mg cometabolic substrate / mg cells)

b = The cell decay rate (1 / d)

X = The active microbial concentration (mg cells / l)

Transformation capacity (T_c)

เป็นอัตราส่วนระหว่างมวลของ CAHs ที่ถูกบำบัดต่อมวลของเซลล์ (Active cells) ที่ลดลง แสดงถึงความเป็นพิษของผลผลิต (Transformation product toxicity) จากการบำบัดสารประกอบคลอรีนไฮโดรคาร์บอนชนิดอะลิฟาติก (CAHs) ที่มีต่อเซลล์ ทำให้เกิดการลดลงของเซลล์ (Alvarez-Cohen และ McCarty, 1991)

$$T_c = \frac{dS_c}{dX} \qquad (2.5)$$

โดยที่

T_c = The transformation capacity for the cometabolic substrate (mg cometabolic substrate / mg cells)

dS_c = The change in cometabolic substrate concentration during the reaction (mg / l)

dX = The change in active cell concentration during the cometabolic reaction (mg / l)

Transformation yield (T_y)

เป็นอัตราส่วนระหว่างมวลของ CAHs ที่ถูกบำบัดต่อมวลของซับสเตรตที่ถูกใช้ไป แสดงถึงปริมาณซับสเตรตที่ใช้ในการเติบโต ปริมาณออกซิเจนที่ใช้ในปฏิกิริยา ทำให้ประมาณค่าใช้จ่ายในการบำบัดได้

$$T_y = \frac{dS_c}{dS_g} = YT_c \qquad (2.6)$$

โดยที่

T_y = The transformation yield (mg cometabolic substrate / mg growth substrate)

dS_c = The change in cometabolic substrate concentration during the reaction (mg / l)

dS_g = The change in growth substrate concentration during the reaction (mg / l)

Y = The cellular yield of growth substrate (mg cells / mg growth substrate)

T_c = The transformation capacity for the cometabolic substrate (mg cometabolic substrate / mg cells)

ค่าตัวแปรทางคิเนติกส์จะบ่งบอกถึงความสามารถในการร่วมย่อยสลายได้ รวมทั้งค่าใช้จ่าย ระยะเวลา ลักษณะของระบบ ความเข้มข้น และปริมาณของสารได้ อีกทั้งยังทำนายถึงลักษณะของแบบจำลอง ซึ่งสามารถประเมินความเสี่ยง และสามารถวางแผนการทำงานได้ในงานจริง การศึกษาค่าตัวแปรทางคิเนติกส์ของกระบวนการร่วมย่อยสลายไตรคลอโรเอทธิลีนแบบใช้ออกซิเจนโดยใช้โทลูอีน ฟีนอลและเบนซิลแอลกอฮอล์เป็นซับสเตรต แสดงดังตารางที่ 2.7 และ 2.8

ตารางที่ 2.7 ค่าตัวแปรทางคิเนติกส์ของกระบวนการร่วมย่อยสลายไตรคลอโรเอทธิลีนโดยใช้โทลูอีนเป็นซับสเตรต

Microorganism	Growth Substrate	k_g (1/day)	K_{sg} (mg/l)	k_c (1/day)	K_{sc} (mg/l)	Y (mg-cells/mg-substrate)	Reference
Burkholderia cepacia G4	Toluene	9.29	1.15	0.94	0.79	-	Landa และคณะ(1994)
Pseudomonas putida B2	Toluene	4.0	2.7	1.3	6.4	0.62	Kelly และคณะ(2000)
Mixed culture	Toluene	0.44	1.02	0.17	8.64	0.29	Chang และ Alv. (1995a)
Mixed culture	Toluene	1.5	1.0	0.7	10	0.77	McCarty และคณะ(1998)
Pseudomonas B1	Toluene	13.03	1.96	-	-	1.22	Chang และคณะ(1993)
Pseudomonas X1	Toluene	10.84	1.88	-	-	0.99	Chang และคณะ(1993)
Burkholderia cepacia G4	Toluene	8.68	0.074	3.5	1.58	-	Newman และคณะ (1995)
Pseudomonas putida F1	Toluene	20.60	13.8	-	-	1.28	Reardon และคณะ(2000)
Pseudomonas putida R1	Toluene	12.10	0.1	-	-	1.20	Pedersen และคณะ(1997)
Pseudomonas putida 54G	Toluene	10.08	3.98	-	-	0.90	Mirpuri และคณะ(1997)
Pseudomonas putida O1	Toluene	17.28	15.07	-	-	0.64	Oh และคณะ(1994)
Pseudomonas putida ATCC 23973	Toluene	10.49	6.0	-	-	0.37	Choi และคณะ(1992)
Pseudomonas putida	Toluene	-	-	0.49	10.12		Heald และ Jenkins (1994)
Pseudomonas cepacia G4	Toluene	-	-	1.706	3.81		Sun และคณะ (1996)
Pseudomonas cepacia G4	Toluene	-	-	1.89	1.314		Sun และคณะ (1996)
Pseudomonas putida F1	Toluene	-	-	0.75	0.66		Sun และคณะ (1996)
Ralstonia pickettii PKO1	Toluene	-	-	0.37	9.8		Park และคณะ(2002)

ตารางที่ 2.8 ค่าตัวแปรทางคิเนติกส์ของกระบวนการร่วมย่อยสลายไตรคลอโรเอทธิลีนโดยใช้ฟีนอลและเบนซิลแอลกอฮอล์เป็นซับสเตรต

Microorganism	Growth Substrate	k_g (1/day)	K_{sg} (mg/l)	k_c (1/day)	K_{sc} (mg/l)	Reference
Burkholderia cepacia G4	Phenol	31.5	0.8	1.5	0.39	Folsom และคณะ (1994)
Mixed culture	Phenol	-	-	0.21	2.04	Chang และ Alv. (1995a)
Ralstonia eutropha JMP134	Phenol	-	-	2.14	83	Ayoubi และ Harker(1998)
Mixed culture	Phenol	9.3	<3.3	0.33	11	Shurtliff และคณะ(1996)
Actinomycetes	Phenol	10.2	0.34	0.15	0.14	Lee และคณะ(2000)
Burkholderia cepacia E1	Phenol	3.4	0.05	0.23	3.0	Futamata และคณะ(2001)
Comamonas testosteroni R2	Phenol	8.8	0.08	0.13	4.2	Futamata และคณะ(2001)
Comamonas testosteroni E6	Phenol	2.7	0.01	0.25	4.6	Futamata และคณะ(2001)
Comamonas testosteroni R5	Phenol	18.3	0.04	0.19	1.5	Futamata และคณะ(2001)
Pseudomonas putida P35X	Phenol	6.2	0.34	0.10	15.8	Futamata และคณะ(2001)
Mixed culture	Phenol	-	-	0.18	-	Bielefeldt และคณะ(1994)
Ralstonia eutropha	Phenol	8.6	0.94	-	-	Leonard และ Lindley (1999)
Ralstonia eutropha JMP134	Phenol	9.4	5.55	-	-	Muller และ Babel (1995)
Mixed culture	Phenol	6.0	11	-	-	Goudar และคณะ (2000)
Mixed culture	Phenol	3.5	0.07	0.16	0.3	Tejasen (2003)
Mixed culture	Benzyl Alcohol	1.06	5.29	0.084	0.33	Tejasen (2003)

2.6 ความเป็นพิษของผลผลิตระหว่างกระบวนการย่อยสลาย (Transformation Product Toxicity)

ปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อค่าใช้จ่ายในการบำบัด CAHs คือความเป็นพิษของผลผลิตระหว่างกระบวนการย่อยสลาย CAHs ซึ่งรายงานเป็นครั้งแรกโดย Wackett และ Gibson (1988) พบว่าอัตราการย่อยสลายไตรคลอโรเอทธิลีนทางชีวภาพลดลงอย่างรวดเร็ว เกิดจากผลิตผลระหว่างกระบวนการย่อยสลายไตรคลอโรเอทธิลีน (TCE epoxide) มีความเป็นพิษต่อจุลินทรีย์ เอนไซม์ถูกทำลายและทำให้จุลินทรีย์ตาย ปัญหาดังกล่าวแก้ไขได้โดยต้องทราบปริมาณของซับสเตรตที่ต้องใช้ในการย่อยสลาย CAHs เนื่องจากความเป็นพิษของผลผลิตระหว่างกระบวนการย่อยสลาย CAHs ทำให้จุลินทรีย์ตาย จึงต้องเติมซับสเตรตเพื่อเพิ่มจำนวนจุลินทรีย์ขึ้นมาแทนที่ตัวที่ตาย ปริมาณของซับสเตรตที่ต้องใช้ในการย่อยสลาย CAHs ทราบได้โดยค่า Transformation yield (T_y) ส่วนความเป็นพิษของผลผลิตระหว่างกระบวนการย่อยสลายที่มีต่อจุลินทรีย์วัดได้โดยค่า Transformation capacity (T_c)

ค่า Transformation capacity (T_c) ถือได้ว่าเป็นค่าคงที่โดยไม่ขึ้นกับปริมาณของ CAHs และจุลินทรีย์ที่ต้องใช้ในการย่อยสลาย CAHs (Chang, 1995a)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 2.9 ค่า T_c และ T_y ในการย่อยสลายไตรคลอโรเอทธิลีนทางชีวภาพโดยซับสเตรตชนิดต่าง ๆ

Growth substrate	T_c (mg TCE/mg cells)	T_y (mg TCE/mg growth substrate)	Ref.
Toluene	0.0073	0.0021	a
Toluene	ND	0.014	b
Toluene	0.0052	ND	c
Phenol	0.031	0.017	a
Phenol	0.24	0.11	d
Phenol	0.034	0.02	e
Phenol	0.082	0.05	f
Methane	0.05	0.017	a
Methane	0.043	0.015	g
Methane	0.29	0.15	h
Methane	0.056	0.021	i
Methane	0.025	0.016	j
Propane	0.0065	0.0056	a
Benzyl alcohol	0.03	0.0159	l

a. Chang และ Alvarez-Cohen 1995b; b. Landa และคณะ 1994; c. Heald และ Jenkins 1994; d. Hopkins และคณะ 1993b; e. Folsom และ Chapman 1991; f. Shurtliff และคณะ 1996; g. Alvarez-Cohen และ Mccarty 1991; h. Oldenhuis และคณะ 1991; i. Chu และ Alvarez-Cohen 1996; j. Anderson และ Mccarty 1997; l.Tejasen 2003.

จากตารางที่ 2.9 Hopkins และคณะ (1993b) ทดลองวัดค่า T_c และ T_y โดยใช้ฟีนอลเป็นซับสเตรตในการย่อยสลายไตรคลอโรเอทธิลีนทางชีวภาพ ได้ค่า T_y เท่ากับ 0.11 mg TCE/mg Phenol แสดงว่าในการย่อยสลายไตรคลอโรเอทธิลีน 1 กรัมต้องใช้ฟีนอลประมาณ 9 กรัม

ปัญหาสำคัญของกระบวนการร่วมย่อยสลายไตรคลอโรเอทธิลีนทางชีวภาพคือการที่จุลินทรีย์ที่โดนพิษจากผลิตผลระหว่างกระบวนการ (TCE epoxide) ซึ่งทำลายเอนไซม์ของจุลินทรีย์และทำให้จุลินทรีย์ตาย Bielefeldt และคณะ (1995) พบว่ายิ่งไตรคลอโรเอทธิลีนถูกย่อยสลายได้มาก ความสามารถในการย่อยสลายไตรคลอโรเอทธิลีนของจุลินทรีย์ก็จะลดลงและจุลินทรีย์ก็จะหมดความสามารถในที่สุด ส่งผลให้อัตราการย่อยสลายไตรคลอโรเอทธิลีนลดลง

แนวคิดนี้สอดคล้องกับสมการที่ 2.4 ซึ่ง Chang (1995a) ได้อธิบายไว้ว่า เมื่อซับสเตรตเพื่อการเจริญเติบโต (Growth substrate) หมด ไตรคลอโรเอทธิลีนจะถูกย่อยสลายต่อจนกระทั่ง Active cells mass ลดลงเนื่องจากโดนพิษของ TCE epoxide (Product toxicity) และการสลายตัวของเซลล์จุลินทรีย์ (Cells decay) นอกจากนี้ Bielefeldt และคณะ (1995) ยังได้พบอีกว่าในระยะยาว (Long term) จุลินทรีย์จะยังสามารถย่อยสลายซับสเตรตเพื่อการเจริญเติบโตได้ดีแต่ความสามารถในการย่อยสลายไตรคลอโรเอทธิลีนลดลง เพราะยิ่งจุลินทรีย์ย่อยสลายไตรคลอโร-เอทธิลีนได้น้อยลง TCE epoxide ก็จะลดลงด้วย ทำให้จุลินทรีย์สามารถมีชีวิตอยู่ได้ แสดงให้เห็นว่าจุลินทรีย์มีการปรับตัวเพื่อความอยู่รอดนั่นเอง

ได้มีการศึกษากันอย่างกว้างขวางเกี่ยวกับความเป็นพิษระหว่างผลผลิตของกระบวนการร่วมย่อยสลายไตรคลอโรเอทธิลีนทางชีวภาพ ซึ่งพอจะสรุปได้ดังนี้

Bielefeldt และคณะ (1995) ทำการทดลองใช้จุลินทรีย์ชนิดเส้นใย (Filamentous bacteria) มาย่อยสลายไตรคลอโรเอทธิลีนโดยใช้ฟีนอลเป็นซับสเตรต พบว่า TCE epoxide ไม่เป็นพิษต่อจุลินทรีย์ชนิดนี้ อาจเป็นเพราะจุลินทรีย์ชนิดนี้ทนต่อพิษของ TCE epoxide ได้ หรือกลไกในการขจัดพิษจาก TCE epoxide เกิดขึ้นอย่างรวดเร็วในจุลินทรีย์ชนิดนี้

Chang และคณะ (1995b) ได้ศึกษาหาค่า Transformation Capacity ในการย่อยสลายไตรคลอโรเอทธิลีนของจุลินทรีย์ที่ใช้โทลูอีนและฟีนอลเป็นซับสเตรต พบว่า TCE epoxide มีพิษต่อจุลินทรีย์ที่ใช้ทั้งโทลูอีนและฟีนอลเป็นซับสเตรต ผลการศึกษา T_c มีค่าเท่ากับ 0.0073 และ 0.031 มิลลิกรัม-ทีซีอี / มิลลิกรัม-เซลล์ ตามลำดับ จากค่า T_c ที่ได้ แสดงให้เห็นว่า TCE epoxide มีพิษต่อจุลินทรีย์ที่ใช้โทลูอีนเป็นซับสเตรตมากกว่าจุลินทรีย์ที่ใช้ฟีนอลเป็นซับสเตรต

Wackett และ Householder (1989b) ศึกษาจุลินทรีย์ชนิด *Pseudomonas putida* F1 โดยใช้โทลูอีนเป็นซับสเตรตในการย่อยสลายไตรคลอโรเอทธิลีนโดยเอนไซม์ Toluene dioxygenase พบว่าพิษจาก TCE epoxide ทำให้จุลินทรีย์ย่อยสลายไตรคลอโรเอทธิลีนได้ลดลง และ *Pseudomonas putida* F1 สามารถฟื้นจากพิษของ TCE epoxide ได้โดยนำจุลินทรีย์มาเพาะในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี 0.2% arginine ผสมกับโทลูอีน

Heald และ Jenkins (1994) ทดลองใช้ *Pseudomonas putida* F1 ย่อยสลายไตรคลอโร-เอทธิลีนโดยเอนไซม์ Toluene dioxygenase พบว่าพิษของ TCE epoxide เป็นเหตุให้จุลินทรีย์โตช้า ย่อยสลายไตรคลอโรเอทธิลีนได้ลดลงและตาย นอกจากนี้ยังพบว่าการเติม dithiothreitol เพิ่มความสามารถในการย่อยสลายไตรคลอโรเอทธิลีนได้แต่ไม่ช่วยป้องกันพิษจาก TCE epoxide ค่า T_c ที่ได้จากการศึกษาเท่ากับ 0.0052 มิลลิกรัม-ทีซีอี / มิลลิกรัม-เซลล์

Yeager และคณะ (2001) ศึกษาพิษของ TCE epoxide ที่มีต่อจุลินทรีย์ชนิด *Burkholderia cepacia* G4 พบว่าเซลล์ที่โดนพิษสามารถฟื้นกลับมาได้โดยนำจุลินทรีย์มาเพาะใน

อาหารเลี้ยงเชื้อที่มี แลคเตด หรือ ฟีนอล เป็นซับสเตรต และยังพบว่าเซลล์ที่โดนพิษจาก TCE epoxide เป็นเวลานานจะฟื้นกลับมาได้ช้า

Bielefeldt และคณะ (1995) ได้อธิบายวิธีการแก้ปัญหาดังกล่าวไว้ว่า ควรเติม Growth substrate ในปริมาณที่มากพอ เพื่อเป็นการเพิ่มจำนวนจุลินทรีย์ขึ้นมาแทนที่จุลินทรีย์ตัวที่หมดความสามารถจากพิษของ TCE epoxide นอกจากนี้ Chang และคณะ (1995b) พบว่า TCE epoxide ไม่เป็นพิษต่อ Fresh cells ที่ใส่เพิ่มเข้าไปใหม่ในระบบ สอดคล้องกับสมมุติฐานที่ว่า TCE epoxide ทำลายส่วนประกอบภายในเซลล์ (intracellular) และสลายตัวได้อย่างรวดเร็ว ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Yeager และคณะ (2001) พบว่า TCE epoxide ทำลาย DNA RNA ไขมัน และ โปรตีนที่เป็นส่วนประกอบของเซลล์ ดังนั้นการเติม Fresh cells เข้าไปในระบบก็เป็นอีกวิธีหนึ่งในการแก้ปัญหาดังกล่าว

2.8 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง จำแนกตามซับสเตรต (Growth substrate) ที่ให้พลังงานและเป็นแหล่งคาร์บอน สำหรับการเติบโตของจุลินทรีย์และเป็นตัวเหนี่ยวนำให้จุลินทรีย์สร้างเอนไซม์สำหรับกระบวนการร่วมย่อยสลายแบบใช้ออกซิเจนของไตรคลอโรเอทธิลีนดังนี้

Toluene และ Phenol

Hopkins และคณะ (1993a) ทำการทดลองเพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการใช้โทลูอีน ฟีนอล มีเทน และแอมโมเนียเป็นซับสเตรตในการย่อยสลายไตรคลอโรเอทธิลีน โดยฉีดออกซิเจนและซับสเตรตลงไปในบ่อสังเกตุการณ์ที่ขุดลงไปในน้ำใต้ดินที่ Moffett Field test site (California) เพื่อกระตุ้นให้จุลินทรีย์สร้างเอนไซม์ที่ใช้ในการย่อยสลายไตรคลอโรเอทธิลีน ผลการศึกษาพบว่าจุลินทรีย์ที่ใช้โทลูอีนและฟีนอลเป็นซับสเตรตเพิ่มจำนวนมากกว่าและเร็วกว่าจุลินทรีย์ที่ใช้มีเทนและแอมโมเนียเป็นซับสเตรต ประสิทธิภาพในการบำบัดไตรคลอโรเอทธิลีนร้อยละ 71 58 6 และ 2 เมื่อใช้โทลูอีน ฟีนอล มีเทน และแอมโมเนียเป็นซับสเตรตตามลำดับ จะเห็นว่าโทลูอีนมีประสิทธิภาพในการย่อยสลายไตรคลอโรเอทธิลีนดีที่สุด แต่งานวิจัยในภาคสนามนิยมใช้ฟีนอลเป็นซับสเตรตเพราะว่าฟีนอลมีพิษน้อยกว่าโทลูอีน ฟีนอลละลายน้ำได้ดีกว่าโทลูอีน และระเหยกลายเป็นไอได้น้อยกว่าโทลูอีน จึงง่ายที่จะเตรียมเป็น stock solution ไว้สำหรับใช้งานในภาคสนาม

Hopkins **และคณะ** (1993b) ทำการทดลองต่อเนื่องโดยทำการทดลองในภาคสนามและในห้องปฏิบัติการเพื่อนำข้อมูลที่ได้มาเปรียบเทียบกัน โดยฉีดฟีนอลความเข้มข้น 12.5 มิลลิกรัมต่อลิตรและออกซิเจน 35 มิลลิกรัมต่อลิตรลงไปในบ่อสังเกตุการณ์ที่ขุดลงไปในน้ำใต้ดินที่ Moffett Field test site (California) พบว่าประสิทธิภาพในการย่อยสลายไตรคลอโรเอทธิลีนร้อยละ 88 เมื่อความเข้มข้นของไตรคลอโรเอทธิลีนอยู่ในช่วง 62 – 500 ไมโครกรัม/ลิตร และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของไตรคลอโรเอทธิลีนเป็น 1000 ไมโครกรัม/ลิตร ประสิทธิภาพในการย่อยสลายไตรคลอโรเอทธิลีนลดลงเหลือร้อยละ 77 และประสิทธิภาพในการย่อยสลายไตรคลอโรเอทธิลีนเพิ่มขึ้นเป็นร้อยละ 90 เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของฟีนอลเป็น 25 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อความเข้มข้นของไตรคลอโรเอทธิลีนยังคงเท่าเดิมคือ 1000 ไมโครกรัม/ลิตรส่วนค่า Transformation yield จากการทดลองในห้องปฏิบัติการเป็น 0.11 กรัม-ทีซีอี/กรัม-ฟีนอล และค่า Transformation yield จากการทดลองในภาคสนามเป็น 0.062 กรัม-ทีซีอี/กรัม-ฟีนอล สาเหตุที่ค่า Transformation yield จากการทดลองในภาคสนามมีค่าน้อยกว่าการทดลองในห้องปฏิบัติการอาจเกิดจาก Competitive inhibition ระหว่างไตรคลอโรเอทธิลีนและ ฟีนอล

Hopkins **และ** McCarty (1995) เนื่องจากความสำเร็จในการใช้ฟีนอลเป็นซับสเตรตในงานวิจัยที่ผ่านมา งานวิจัยครั้งนี้จึงทำการศึกษาเพิ่มเติมในการใช้โทลูอีนเป็นซับสเตรตแทนฟีนอลและใช้ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เป็นตัวรับอิเล็กตรอนแทนออกซิเจน จากการศึกษาพบว่าการเปลี่ยนซับสเตรตจากฟีนอลเป็นโทลูอีนในชั่วโมงที่ 980 ของการทดลอง จุลินทรีย์สามารถปรับตัวและย่อยสลายไตรคลอโรเอทธิลีนได้อย่างต่อเนื่อง และมี *o*-cresol เกิดขึ้นในบ่อสังเกตุการณ์ แสดงว่าในน้ำใต้ดินอาจมีจุลินทรีย์ *Pseudomonas cepacia* G4 ใช้ฟีนอลและโทลูอีนเป็นซับสเตรตสร้างเอนไซม์ Toluene *ortho*-monooxygenase ส่วนในชั่วโมงที่ 1680 ของการทดลองได้ใช้ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์แทนออกซิเจน พบว่าไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ใช้เป็นตัวรับอิเล็กตรอนแทนออกซิเจนได้โดยไม่มีผลกระทบต่อการย่อยสลายไตรคลอโรเอทธิลีน

Chang **และ** Alvarez-Cohen (1995b) ทำการทดลองเพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพจุลินทรีย์ที่ใช้ก๊าซมีเทน ก๊าซโพรเพน โทลูอีน และฟีนอล เป็นซับสเตรตในการย่อยสลายไตรคลอโรเอทธิลีน 1,2–ไดคลอโรอีเทน (1,2-DCA) และคลอโรฟอร์ม (CF) โดยนำจุลินทรีย์มาจากดินในหลุมฝังกลบขยะที่ Berkley (California) ใช้ก๊าซมีเทนและก๊าซโพรเพนเป็นซับสเตรต และนำจุลินทรีย์มาจากน้ำใต้ดินที่ Livermore (California) ใช้โทลูอีนและฟีนอลเป็นซับสเตรต ผลการทดลองพบว่าจุลินทรีย์ที่ใช้ก๊าซมีเทนและก๊าซโพรเพนเป็นซับสเตรตสามารถสร้างเอนไซม์ที่ใช้ย่อยสลายสารประกอบคลอรีนที่อิ่มตัวและไม่อิ่มตัว (saturated and unsaturated chlorinated organics)

ได้แก่ไตรคลอโรเอทธิลีน 1,2–ไดคลอโรอีเทนและคลอโรฟอร์ม ส่วนจุลินทรีย์ที่ใช้โทลูอีนและฟีนอลเป็นซับสเตรตสามารถสร้างเอนไซม์ที่ใช้ย่อยสลายสารประกอบคลอรีนที่ไม่อิ่มตัวคือไตรคลอโร-เอทธิลีนได้เท่านั้น ส่วน 1,2–ไดคลอโรอีเทน คลอโรฟอร์ม และสารประกอบคลอรีนที่อิ่มตัวชนิดอื่น จุลินทรีย์ที่ใช้โทลูอีนและฟีนอลเป็น ซับสเตรตไม่สามารถย่อยสลายได้

Fries **และคณะ** (1997b) ทำการทดลองโดยนำจุลินทรีย์มาจากน้ำใต้ดินที่ Moffett Field test site (California) ซึ่งเป็นจุลินทรีย์ที่ใช้โทลูอีนและฟีนอลเป็นซับสเตรต มาทำการทดลองในห้องปฏิบัติการเพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการใช้โทลูอีนและฟีนอลเป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงานในการย่อยสลายสารไตรคลอโรเอทธิลีน ผลการทดลองพบว่าร้อยละ 8 ของจุลินทรีย์ที่นำมานั้นเติบโตได้โดยใช้ โทลูอีนเป็นซับสเตรตเพียงชนิดเดียวร้อยละ 35 ของจุลินทรีย์ที่นำมาเติบโตได้โดยใช้ฟีนอลเป็นซับสเตรตเพียงชนิดเดียว และร้อยละ 57 ของจุลินทรีย์ที่นำมาเติบโตได้โดยใช้ทั้งโทลูอีนและฟีนอลเป็นซับสเตรต จุลินทรีย์ที่เติบโตโดยใช้ฟีนอลเป็นซับสเตรตย่อยสลายไตรคลอโรเอทธิลีนได้ดีกว่าจุลินทรีย์ที่เติบโตโดยใช้โทลูอีนเป็นซับสเตรต โดยจุลินทรีย์ที่เติบโตโดยใช้โทลูอีนและฟีนอลเป็นซับสเตรตใช้เอนไซม์ชนิดเดียวกันในการย่อยสลายไตรคลอโรเอทธิลีนคือเอนไซม์ Toluene *ortho*-monooxygenase

Bielefeldt **และคณะ** (1995) ทำการทดลองใช้จุลินทรีย์ชนิดเส้นใย (Filamentous bacteria) ซึ่งนำมาจากลำธารใน University of Washington ย่อยสลายไตรคลอโรเอทธิลีนและไดคลอโรเอทธิลีน (DCE) โดยใช้ฟีนอลเป็นซับสเตรต ผลการทดลองพบว่าจุลินทรีย์ชนิดเส้นใยสามารถย่อยสลายไตรคลอโรเอทธิลีนได้ในอัตรา 0.28 – 0.51 กรัม-ทีซีอี/กรัม-วีเอสเอส-วัน และย่อยสลายไดคลอโรเอทธิลีนได้ในอัตรา 0.27 – 1.5 กรัม-ดีซีอี/กรัม-วีเอสเอส-วัน แต่ไม่สามารถย่อยสลายเตตระคลอโรเอทธิลีน (PCE) 1,1,1-ไตรคลอโรอีเทน (TCA) และคลอโรฟอร์ม (CF) ได้ โดยผลผลิตจากการย่อยสลายไตรคลอโรเอทธิลีนและไดคลอโรเอทธิลีนไม่เป็นพิษต่อจุลินทรีย์ และเกิดการยับยั้งปฏิกิริยา (Competitive inhibition) ที่ความเข้มข้นของฟีนอลมากกว่า 40 มิลลิกรัมต่อลิตร ความเข้มข้นของไตรคลอโรเอทธิลีนมากกว่า 130 มิลลิกรัมต่อลิตร และความเข้มข้นของไดคลอโรเอทธิลีนมากกว่า 83 มิลลิกรัมต่อลิตร

Futamata **และคณะ** (2001) ศึกษาและเปรียบเทียบการย่อยสลายของไตรคลอโร-เอทธิลีนและการย่อยสลายของฟีนอล พบว่าฟีนอลถูกใช้เป็นซับสเตรตในการย่อยสลายของเอนไซม์มากกว่าไตรคลอโรเอทธิลีนแสดงให้เห็นว่า ไตรคลอโรเอทธิลีนไม่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายฟีนอล และพบว่าความเข้มข้นของฟีนอลจะส่งผลต่อการนำมาใช้ในกระบวนการย่อย

สลาย รวมทั้งศึกษาหาค่าคงที่การอิ่มตัว (Half-saturation concentration) ทางคิเนติกส์ของกระบวนการย่อยสลายของไตรคลอโรเอทธิลีนอยู่ระหว่าง 11 ไมโครกรัมและ 800 ไมโครกรัม

cis-Dichloroethylene

Coleman **และคณะ** (2002a) ได้ทำการทดลองใช้ *c*-DCE เป็นแหล่งพลังงานและคาร์บอนในการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ พบว่าจุลินทรีย์ที่ใช้ *c*-DCE เป็นซับสเตรตได้คือ *Polaromonas vacuolata* strain JS666 โดยใช้เวลาในการเจริญเติบโตประมาณ 73 ชั่วโมง จุลินทรีย์นี้สามารถย่อยสลาย 1,2-ไดคลอโรอีเทน (1,2-DCA) ไตรคลอโรเอทธิลีน ทรานส์-1,2-ไดคลอโรเอทธิลีน (*tran*-DCE) ซิส-1,2-ไดคลอโรเอทธิลีน (*cis*-DCE) และไวนิลคลอไรด์ (VC) ได้ผลผลิตขั้นแรกที่ได้จากการย่อยสลายคือ Epoxyethane ซึ่งเป็นการประหยัดค่าใช้จ่ายในกรณีที่มีซิส-ไดคลอโรเอทธิลีน (*cis*-DCE) ปนเปื้อนและใช้ซิส-ไดคลอโรเอทธิลีน (*cis*-DCE) เป็นซับสเตรตในการบำบัด

VinylChloride

Hartmans **และคณะ** (1992) ได้คัดแยกจุลินทรีย์ *Mycobacterium aurum* L1 จากดินที่มีการปนเปื้อน VC และใช้ VC เป็นซับสเตรต พบว่าจุลินทรีย์ชนิดนี้ย่อยสลาย VC เป็น epoxide-chlorooxirane โดยเอนไซม์ alkene monooxygenase และจุลินทรีย์ชนิดนี้ย่อยสลาย DCE ได้แต่ไม่สามารถเติบโตโดยใช้ DCE เป็นซับสเตรต แต่จุลินทรีย์ชนิดนี้ย่อยสลาย TCE ไม่ได้ ต่อมา Coleman **และคณะ** (2002b) ได้ทำการทดลองใช้ไวนิลคลอไรด์ (VC) เป็นซับสเตรตสำหรับจุลินทรีย์ โดยคัดแยกจุลินทรีย์จากดินที่มีการปนเปื้อนไวนิลคลอไรด์ และน้ำเสียจากระบบเอเอส (Activated sludge) พบว่าจุลินทรีย์ที่ใช้ VC เป็นซับสเตรตได้มี 12 ชนิด คือ *Mycobacterium* strains 11 ชนิด และ *Nocardioides* strain 1 ชนิด ซึ่งจุลินทรีย์ทั้ง 12 ชนิดสามารถใช้ ethene เป็นซับสเตรตได้เช่นกันโดยมี VC เป็นตัวชักนำให้จุลินทรีย์สร้างเอนไซม์ ethene monooxygenase ส่วน Verce **และคณะ** (2000) ได้ทำการทดลองใช้ไวนิลคลอไรด์ (VC) เป็นซับสเตรตสำหรับจุลินทรีย์เช่นเดียวกัน โดยคัดแยกจุลินทรีย์จากน้ำเสียระบบเอเอส (Activated sludge) ที่ Urbana (Illinois) พบว่าจุลินทรีย์ใช้ VC เป็นซับสเตรตได้เช่นกัน โดย VC ถูกย่อยสลายเป็น VC epoxide จุลินทรีย์จะไม่ใช้ VC เป็นซับสเตรต ในกรณีที่มีไนเตรตเป็นตัวรับอิเล็กตรอน และจุลินทรีย์ที่ใช้ ethene เป็นซับสเตรตสามารถปรับตัวได้อย่างต่อเนื่องเมื่อเปลี่ยนซับสเตรตจาก ethene เป็น VC แต่ VC เป็นซับสเตรตที่มีพิษ มีราคาแพงและจุลินทรีย์ที่ใช้ VC เป็นซับสเตรตมีค่า

Y_{obs} ต่ำกว่า ethene ในการทำงานภาคสนามจึงควรใช้ ethene เป็นซับสเตรตเพื่อกระตุ้นให้จุลินทรีย์เพิ่มจำนวนก่อนแล้วตามด้วย VC

Propylene

Ensign และคณะ (1992) ได้ทำการศึกษาจุลินทรีย์ชนิด *Xanthobacter* Strain Py2 ที่ใช้ก๊าซ propylene เป็นซับสเตรตในการย่อยสลายสารประกอบ Chlorinated alkenes ผลปรากฏว่าจุลินทรีย์ได้สร้างเอนไซม์ alkene monooxygenase ย่อยสลายไตรคลอโรเอทธิลีน ทรานส์-1,2-ไดคลอโรเอทธิลีน ซิส-1,2-ไดคลอโรเอทธิลีน 1,3-ไดคลอโรโพรพิลีน 2,3-ไดคลอโรโพรพิลีน และไวนิลคลอไรด์ ได้ ส่วน 1,1-ไดคลอโรเอทธิลีนและเตตระคลอโรเอทธิลีน นั้นจุลินทรีย์ชนิด *Xanthobacter* Strain Py2 ที่ใช้ก๊าซ propylene เป็นซับสเตรตย่อยสลายไม่ได้เลย เป็นที่สังเกตุว่าสารประกอบ Chlorinated alkanes ที่ประกอบด้วยคาร์บอน 2 และ 3 อะตอม (C_2 and C_3 chlorinated alkanes) ไม่สามารถถูกย่อยสลายโดยจุลินทรีย์ที่สร้างเอนไซม์ alkene monooxygenase เนื่องจากสารประกอบ Chlorinated alkanes บางตัวยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ทำให้ปฏิกิริยาเกิดช้าลง

Butane

Kim และคณะ (2000) ทำการทดลองศึกษาประสิทธิภาพในการย่อยสลายสารประกอบ Chlorinated–methane, Chlorinated–ethane และ Chlorinated–ethene โดยใช้ก๊าซบิวเทนเป็นซับสเตรตสำหรับจุลินทรีย์ ผลการศึกษาพบว่าจุลินทรีย์ที่ใช้ก๊าซบิวเทนเป็นซับสเตรตสามารถย่อยสลายสารประกอบคลอโรมีเทน (CM) ไดคลอโรมีเทน (DCM), คลอโรอีเทน (CA) 1,1-ไดคลอโรอีเทน (1,1-DCA) 1,2-ไดคลอโรอีเทน (1,2-DCA) ไวนิลคลอไรด์ (VC) 1,1-ไดคลอโรเอทธิลีน (1,1-DCE) ซิส–ไดคลอโรเอทธิลีน (*cis*-DCE) ได้ และเอนไซม์ที่ถูกสร้างในการย่อยสลายสารประกอบดังกล่าวคือเอนไซม์ Butane monooxygenase แต่จุลินทรีย์ที่ใช้ก๊าซบิวเทนเป็นซับสเตรตไม่สามารถย่อยสลายสารไตรคลอโรเอทธิลีนได้ เป็นที่สังเกตุได้ว่าสารประกอบ Chlorinated-Hydrocarbon ดังกล่าวที่มีคลอรีนประกอบอยู่ในคาร์บอนหนึ่งอะตอม (All chlorines on one carbon) ถูกย่อยสลายได้เร็วกว่าสารประกอบ Chlorinated-Hydrocarbon ที่มีคลอรีนประกอบอยู่ในคาร์บอนทั้งสองอะตอม (Chlorine on both carbons)

Tetrabutoxysilane (TBOS)

Vancheewaran และคณะ (1999) ทำการทดลองใช้ tetrabutoxysilane (TBOS) เป็นซับสเตรตสำหรับจุลินทรีย์เพื่อย่อยสลายไตรคลอโรเอทธิลีนและซิส–ไดคลอโรเอทธิลีน (*cis*-DCE) โดยนำจุลินทรีย์มาจากระบบเอเอส (Activated Sludge) ที่ Corvallis (Oregon) เลี้ยงด้วย TBOS สาร TBOS นี้ชักนำให้จุลินทรีย์สร้างเอนไซม์ monooxygenase ได้แต่เอนไซม์นี้ไม่จำเป็นในการย่อยสลาย TBOS และ TBOS ถูกไฮโดรไลซ์ได้เร็วกลายเป็น 1-butanol ซึ่งใช้เป็นซับสเตรตสำหรับจุลินทรีย์ได้เช่นกัน ผลการทดลองพบว่าจุลินทรีย์สามารถย่อยสลายไตรคลอโรเอทธิลีนและซิส–ไดคลอโรเอทธิลีน (*cis*-DCE) ได้ ผลผลิตจากการย่อยสลาย *cis*-DCE คือ *cis*-DCE epoxide

Glucose

Ensign (1996) ได้ทำการศึกษาจุลินทรีย์ชนิด *Xanthobacter* Strain Py2 ที่ใช้กลูโคสเป็นแหล่งพลังงานและคาร์บอนในการเจริญเติบโต และได้เติมก๊าซ propylene เพื่อเป็นตัวชักนำให้จุลินทรีย์สร้างเอนไซม์ ผลปรากฏว่าจุลินทรีย์ได้สร้างเอนไซม์ alkene monooxygenase ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ใช้ในการย่อยสลายไตรคลอโรเอทธิลีนได้ ต่อมา Gao และ Skeen (1999) ได้ทำการทดลองใช้กลูโคสเป็นซับสเตรตในการบำบัดซิส-ไดคลอโรเอทธิลีน (c-DCE) เนื่องจากกลูโคสสามารถละลายน้ำได้ดี ไม่ลุกติดไฟและไม่เป็นพิษ โดยจุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลองนำมาจากตะกอนของ Yakima River delta (Washington State) , Dover Air Force Base (Delaware) และ Strother Field (Kansas) ผลการทดลองในชุดการทดลองที่เติมทั้งกลูโคสและออกซิเจนพบว่าซิส-ไดคลอโรเอทธิลีน (*c*-DCE) ลดลงคลอไรด์อิออน (Cl^-) เพิ่มขึ้น จึงสรุปได้ว่าสามารถใช้กลูโคสเป็นซับสเตรตในการย่อยสลายซิส-ไดคลอโรเอทธิลีน (*c*-DCE) ได้ ส่วนผลการทดลองในชุดการทดลองที่ไม่เติมกลูโคสแต่เติมออกซิเจนพบว่าในการทดลองที่ใช้ตะกอนจาก Yakima River delta มีซิส-ไดคลอโรเอทธิลีน (*c*-DCE) ลดลง อาจเป็นเพราะว่าตะกอนจาก Yakima River delta มีสารอินทรีย์จำพวก cellulose , mannose , xylose , ribose และ galactose เป็นส่วนประกอบ ซึ่งสารอินทรีย์เหล่านี้สามารถชักนำให้จุลินทรีย์สร้างเอนไซม์ในการย่อยสลายซิส-ไดคลอโรเอทธิลีน (*c*-DCE) ได้

Fructose

Muller และ Babel (1995) คำนวณหาค่าคงที่การอิ่มตัว (Half-saturation concentration ; K_s) ทางคิเนติกส์ของการเจริญเติบโตของ *Alcaligenes eutrophus* บนฟีนอล กรด 2,4-Dichlorophenoxyacetic และฟรุกโตส ในการย่อยสลายไตรคลอโรเอทธิลีนพบว่ามีค่าเท่ากับ 11, 59 และ 14 ไมโครโมลาร์ ตามลำดับและตัวคงที่อัตราการเจริญเติบโตสูงสุด เท่ากับ 0.215, 0.39 และ 0.43 ต่อชั่วโมง ซึ่งค่าทางจลพลศาสตร์บ่งบอกถึงปริมาณความเข้มข้นของซับสเตรตและสามารถทำนายแนวโน้มของกระบวนการได้

Lactate

Munakata-Marr และคณะ (1996) ศึกษาการใช้แลกเตสเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพของการร่วมย่อยสลายใน Moffett Field test site (California) ในชั้นดินและชั้นน้ำใต้ดินที่มีการปนเปื้อนสารไตรคลอโรเอทธิลีนโดยเอนไซม์ *Burkholderia cepacia* G4 และ $PR1_{301}$ แต่ในระยะยาวความสามารถในการย่อยสลายจะลดลง

Terpene

Oramas (2003) ทำการทดลองศึกษานำสารเทอร์ปีน (Terpene) ซึ่งเป็นส่วนประกอบหลักในน้ำมันหอมระเหยของพืชมาเป็นซับสเตรตสำหรับการเจริญเติบโตและชักนำให้จุลินทรีย์สร้างเอนไซม์แทนโทลูอีน ฟีนอลและมีเทน และใช้จุลินทรีย์ *Rhodococcus gordoniae* P3 และ *Pseudomonas* sp.T1 ที่คัดแยกได้จากดินในท้องถิ่นมาย่อยสลายสารไตรคลอโรเอทธิลีนในดินที่ปนเปื้อน สารเทอร์ปีนที่นำมาทดสอบคือคิวมีน ไลโมนีน คาร์โวน และไพนีน ทดสอบที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ผลการทดลองพบว่าสารเทอร์ปีนที่มีประสิทธิภาพดีที่สุดคือ คิวมีน โดยจุลินทรีย์ *Rhodococcus gordoniae* P3 ที่ ชักนำด้วยคิวมีนความเข้มข้น 25 มิลลิกรัมต่อลิตร และจุลินทรีย์ *Pseudomonas* sp.T1 ที่ชักนำด้วยคิวมีนความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถย่อยสลายไตรคลอโรเอทธิลีนที่ความเข้มข้น 10 ส่วนในล้านส่วนได้ร้อยละ 76 และ 61 ตามลำดับภายในเวลา 24 ชั่วโมง

Benzyl alcohol

Tejasen (2003) ได้ศึกษาค้นคว้าหาซับสเตรตชนิดอื่น ๆ มาแทน tetrabutoxysilane สารที่ได้ทำการศึกษาชนิดหนึ่งคือเบนซิลแอลกอฮอล์ซึ่งเป็นสารที่ไม่มีพิษ ผลการวิจัยพบว่าประสิทธิภาพในการบำบัดขึ้นอยู่กับประเภทของซับสเตรต การบำบัดซิส-ไดคลอโรเอทธิลีนมีประสิทธิภาพดีจากการใช้บิวทีเรต 1-บิวทานอล หรือกลูโคสเป็นซับสเตรต ส่วนการบำบัดไตรคลอโรเอทธิลีนมีประสิทธิภาพดีจากการใช้เบนซิลแอลกอฮอล์หรือฟีนอลเป็นซับสเตรต ผลของการบำบัดคิดเป็นอัตราส่วนไวนิลคลอไรด์ ซิส-ไดคลอโรเอทธิลีนและไตรคลอโรเอทธิลีนที่บำบัดได้ต่อปริมาณเบนซิลแอลกอฮอล์ที่ใช้ 0.35 0.25 และ 0.53 มิลลิกรัม/มิลลิกรัม ตามลำดับ เนื่องจากเบนซิลแอลกอฮอล์เป็นสารที่ไม่มีพิษจึงเป็นสารที่น่าสนใจในการบำบัดไตรคลอโรเอทธิลีนในภาคสนามในกรณีที่มีการปนเปื้อนเกิดขึ้น

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย