



วารสารวิชาการ วิศวกรรมศาสตร์ ม.อบ. UBU Engineering Journal

บทความวิจัย

อิทธิพลของความเข้มข้นต่อการกำจัดสารอนิไลน์และจลนพลศาสตร์การย่อยสลาย สารอนิไลน์ด้วยแบคทีเรีย *Pseudomonas fluorescens* MC46

Influence of concentrations on aniline removal and aniline degradation kinetics by *Pseudomonas fluorescens* MC46

ขวัญชนก สอนสุภาพ¹ นครินทร์ เทอดเกียรติกุล¹ สุมนา สิริพัฒนานกุล-ราชบุรุษ^{1,2*}

¹ สาขาวิชาวิศวกรรมสิ่งแวดล้อม คณะวิศวกรรมศาสตร์ และศูนย์วิจัยด้านการจัดการสิ่งแวดล้อมและสารอันตราย มหาวิทยาลัยขอนแก่น อำเภอเมืองขอนแก่น จังหวัดขอนแก่น 40002

² ศูนย์ความเป็นเลิศด้านการจัดการสารและของเสียอันตราย (ศสอ.) กรุงเทพมหานคร 10330

Khuanchanok Sonsuphab¹, Nakharin Therdkiatikul¹, Sumana Siripattanakul-Ratpukdi^{1,2*}

¹ Department of Environmental Engineering, Faculty of Engineering and Research Center for Environmental and Hazardous Substance Management, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002, Thailand

² Center of Excellence on Hazardous Substance Management (HSM), Bangkok 10330, Thailand.

* Corresponding author

E-mail: sumana.r@kku.ac.th; Tel. +668-3419-3993

วันที่รับบทความ 23 มีนาคม 2564; วันที่แก้ไขบทความ ครั้งที่ 1 10 พฤษภาคม 2564; วันที่ตอบรับบทความ 21 พฤษภาคม 2564

บทคัดย่อ

สารอนิไลน์เป็นสารประกอบจำพวกอะโรมาติกเอมีนที่พบการปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อมเป็นวงกว้าง งานวิจัยนี้มีเป้าหมายเพื่อศึกษาอิทธิพลของความเข้มข้นต่อการกำจัดสารอนิไลน์ จลนพลศาสตร์การย่อยสลายสารอนิไลน์ทางชีวภาพ และการตรวจติดตามสารมัธยันตร์ (intermediate product) การศึกษานี้เลือกใช้ *Pseudomonas fluorescens* MC46 (MC46) ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายสารประกอบคลอโรอนิไลน์ได้ ผลการศึกษพบว่า MC46 (10^8 ซีเอฟยูต่อมิลลิลิตร) มีประสิทธิภาพการกำจัดสารอนิไลน์ (1 ถึง 100 มิลลิกรัมต่อลิตร) ประมาณร้อยละ 17 ถึง 43 การทดลองที่ความเข้มข้นของสารอนิไลน์เริ่มต้นน้อย (1 ถึง 10 มิลลิกรัมต่อลิตร) พบว่าประสิทธิภาพการกำจัดสูง ส่วนการทดลองที่ความเข้มข้นสารอนิไลน์เริ่มต้นสูง (30 ถึง 100 มิลลิกรัมต่อลิตร) พบว่าจำนวนเซลล์ MC46 และประสิทธิภาพการกำจัดสารอนิไลน์น้อยกว่าอย่างชัดเจน ผลการวิเคราะห์จลนพลศาสตร์ของการกำจัดสารอนิไลน์แบบมีการยับยั้งเป็นไปตามแบบจำลองของ Andrews โดยมีอัตราการกำจัดสารอนิไลน์จำเพาะสูงสุด (q_{max}) เท่ากับ 1.68×10^{-4} มิลลิกรัมต่อลิตร/ซีเอฟยูต่อลิตร-วัน ค่าคงที่ครึ่งอิ่มตัว (K_s) เท่ากับ 9.7 มิลลิกรัมต่อลิตร และค่าคงที่การยับยั้งสาร (K_i) เท่ากับ 13.9 มิลลิกรัมต่อลิตร จากผลการตรวจติดตามสารมัธยันตร์พบว่าเกิดสารแคทีคอลในระหว่างการทดลองแต่ MC46 สามารถย่อยสลายสารแคทีคอลได้เช่นกัน จากผลการศึกษานี้ชี้ให้เห็นความเป็นไปได้ของ MC46 ในการปฏิบัติงานจริงสำหรับการกำจัดสารอนิไลน์และสารมัธยันตร์ที่ปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อมในอนาคต

คำสำคัญ

การฟื้นฟูพื้นที่ปนเปื้อนด้วยวิธีทางชีวภาพ การยับยั้ง แคทีคอล อะโรมาติกเอมีน อนิไลน์

Abstract

Aniline is an aromatic amine widely contaminated in environment. This study aimed to investigate influence of aniline concentrations on aniline removal, aniline biodegradation kinetics, and intermediate product monitoring. *Pseudomonas fluorescens* strain MC46 (MC46), which is a choloaniline-degrading bacterium, was chosen. The result showed that MC46 (10^8 CFU/mL) could remove aniline (1-100 mg/L) for approximately 17-43%. The experiments with low initial aniline

concentrations (1-10 mg/L) well performed while MC46 cell numbers and aniline removal efficiencies were obviously lower during the experiments with high initial aniline concentrations (30-100 mg/L). Inhibitory aniline removal kinetic analysis followed Andrews model with maximum specific aniline removal rate (q_{max}) of 1.68×10^{-4} mg/L/CFU/L-d, half-saturation coefficient (K_s) of 9.7 mg/L, and Inhibition constant (K_i) 13.9 mg/L. From the intermediate product monitoring, catechol occurred during the experiment but MC46 could degrade catechol as well. The result from this study indicated possibility of MC46 for aniline and intermediate product removal practice in the future.

Keywords

bioremediation; inhibition; catechol; aromatic amine; aniline

1. บทนำ

สารอนิลิน (Aniline; AN) ซึ่งมีสูตรโครงสร้าง คือ $C_6H_5NH_2$ เป็นหนึ่งในสารประกอบไฮโดรคาร์บอนจำพวกเอมีน ที่นิยมใช้เป็นสารตั้งต้นในการผลิตผลิตภัณฑ์หลายชนิด เช่น สี ย้อม ยาง พลาสติก และสารปราบวัชพืชศัตรูพืช [1] สารอนิลิน มีการใช้งานแพร่หลายในหลายประเทศ ได้แก่ จีน อินเดีย เวียดนาม และประเทศไทย จึงเป็นเหตุให้พบสารอนิลินตกค้าง ในสิ่งแวดล้อมผ่านจากกระบวนการผลิตหรือจากการใช้งาน ผลิตภัณฑ์ได้ นอกจากนี้สารอนิลินที่ตกค้างในสิ่งแวดล้อมอาจ เกิดจากกระบวนการย่อยสลายสารประกอบไนโตรอะโรมาติก ซึ่งเป็นส่วนประกอบในสารตั้งต้นในกระบวนการอุตสาหกรรม หรือผลิตภัณฑ์ใช้งานส่วนบุคคล [2] ประกอบกับคุณสมบัติ ของสารอนิลินที่มีความสามารถในการละลายน้ำสูงถึง 35,000 มิลลิกรัมต่อลิตร [3] จึงทำให้เกิดการปนเปื้อนและ แพร่กระจายของสารอนิลินในสิ่งแวดล้อมเป็นวงกว้าง โดยเฉพาะแหล่งน้ำผิวดินและน้ำใต้ดิน สารอนิลินสามารถ สะสมในแหล่งน้ำและห่วงโซ่อาหารส่งผลให้เกิดอันตรายต่อ สิ่งมีชีวิตในน้ำและมนุษย์ [1] สารดังกล่าวมีความเป็นพิษต่อ ผิวหนังและระบบหายใจของสิ่งมีชีวิต รวมทั้งยังจัดเป็นสารก่อ มะเร็งในมนุษย์ จากงานวิจัยที่ผ่านมารายงานการปนเปื้อน ของอนิลินในแหล่งน้ำสูงที่สุดถึง 60 มิลลิกรัมต่อลิตร ในประเทศ จีนและอเมริกา [4,5] ทั้งนี้ค่าการปนเปื้อนของสารอนิลินที่ ยอมรับให้มีในน้ำได้กำหนดไว้ไม่เกิน 0.262 มิลลิกรัมต่อลิตร [6] จากการปนเปื้อนของสารอนิลินที่สูงกว่าค่าที่ยอมรับได้ ประกอบกับความเป็นพิษของสาร ดังนั้นจึงเป็นสิ่งจำเป็นต้อง มีการพัฒนาเทคโนโลยีสำหรับกำจัดสารอนิลินจากสิ่งแวดล้อม

การฟื้นฟูพื้นที่ปนเปื้อนด้วยกระบวนการทางชีวภาพโดยใช้ จุลินทรีย์ (Microbial remediation) เป็นวิธีที่ใช้จุลินทรีย์ย่อย สลายมลสารในพื้นที่ปนเปื้อนให้มีความเป็นพิษลดลงหรือไม่มี

พิษ ซึ่งวิธีดังกล่าวเป็นหนึ่งในวิธีที่นิยมใช้อย่างแพร่หลายทั่วไป เนื่องจากเป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพสูง สามารถประยุกต์ใช้ สำหรับการกำจัดสารอินทรีย์ได้หลากหลายชนิด และเป็นมิตร ต่อสิ่งแวดล้อม อีกทั้งยังทำได้ไม่ยากและค่าใช้จ่ายไม่สูงมาก [7]

จากงานวิจัยที่ผ่านมาได้มีการคัดแยกจุลินทรีย์ที่สามารถ ย่อยสลายสารจำพวกไนโตรอะโรมาติก หนึ่งในจุลินทรีย์ที่มี ประสิทธิภาพในการกำจัดสารสูง ได้แก่ *Pseudomonas fluorescen* strain MC46 (MC46) โดยในงานวิจัยที่ผ่านมา ศึกษาการย่อยสลายสารคลอโรอนิลิน (Chloroaniline) ด้วย MC46 และจากวิถี (Pathway) การย่อยสลายสารดังกล่าว พบว่า MC46 สามารถย่อยสลายสารอนิลินรวมกันไปกับสารตั้ง ต้นและสารมัธยันตร์ (Intermediate) อื่นได้ [8,9]

แต่อย่างไรก็ตามในงานที่ผ่านมา ยังไม่มีการศึกษาการ กำจัดสารอนิลินด้วย MC46 โดยตรง ในการปฏิบัติงานจริง กระบวนการทางชีวภาพมีปัจจัยที่มีผลต่อประสิทธิภาพการ กำจัดสารปนเปื้อนหลายอย่าง โดยเฉพาะความเข้มข้นของสาร เป็นหนึ่งในปัจจัยที่สำคัญประกอบกับสารอนิลินที่พบการ ปนเปื้อนในธรรมชาติมีความเข้มข้นแตกต่างกันมาก ด้วย เหตุผลข้างต้นนี้จึงจำเป็นต้องมีการศึกษาอิทธิพลของความ เข้มข้นต่อการกำจัดสารอนิลินด้วยกระบวนการย่อยสลายโดยใช้ MC46 งานวิจัยนี้มีจุดมุ่งหมายหลักเพื่อศึกษาอิทธิพลของความ เข้มข้นต่อประสิทธิภาพการกำจัดสารอนิลินและการหา จลนพลศาสตร์การกำจัดสารอนิลินด้วย MC46 นอกจากนี้ การศึกษานี้ยังมีการตรวจติดตามสารมัธยันตร์จากการย่อย สลายสารอนิลิน ซึ่งได้แก่ สารแคทีคอล (Catechol) ผลที่ได้ จากงานวิจัยนี้สามารถบ่งชี้ความเป็นไปได้ในการย่อยสลายสา รอนิลินในสิ่งแวดล้อม อีกทั้งองค์ความรู้จากการศึกษานี้ยัง

สามารถใช้เป็นแนวทางเบื้องต้นสำหรับการออกแบบและควบคุมการฟื้นฟูพื้นที่ปนเปื้อนสารอนินทรีย์ได้ในอนาคต

2. ระเบียบวิธีวิจัย

2.1 แบคทีเรียและการเพาะเลี้ยง

การเพาะเลี้ยง MC46 ดัดแปลงจากงานวิจัยที่ผ่านมา [9] ขั้นตอนการเพาะเลี้ยง MC46 ประกอบด้วย 1) การขยายเซลล์ (Cell enrichment) และ 2) การเร่งการทำงานของเซลล์ (Cell activation) โดยขั้นตอนการขยายเซลล์ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ Lysogeny broth medium (LB) ซึ่งประกอบด้วย Tryptone 10 กรัม NaCl 10 กรัม และ Yeast extract 5 กรัม ละลายในน้ำจากระบบรีเวอร์สออสโมซิส (Reverse osmosis; RO) 1 ลิตร สำหรับวิธีขยายเซลล์เริ่มจากการเชื่อมเชื้อ MC46 ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB (ที่เติมสารอนินทรีย์) 10 มิลลิลิตร และนำไปบ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง ณ ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 14 ชั่วโมง จากนั้นนำอาหารเลี้ยงเชื้อไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 6,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เพื่อให้ได้เซลล์เข้มข้น

ส่วนขั้นตอนการเร่งการทำงานของเซลล์ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ Minimal salt medium (MSM) ซึ่งประกอบด้วย $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.66 กรัม Na_2HPO_4 0.58 กรัม NaCl 0.5 กรัม NH_4Cl 2 กรัม KH_2PO_4 3 กรัม และ $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.25 กรัม ละลายในน้ำ RO 1 ลิตร อาหารเลี้ยงเชื้อทั้งสองนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 นาที แล้วจึงเติมอนินทรีย์ 30 มิลลิกรัมต่อลิตร สำหรับขั้นตอนการเร่งการทำงานของเซลล์เริ่มจากการนำเซลล์เข้มข้นจากขั้นตอนแรกมาเติมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ MSM ร้อยละ 10 โดยปริมาตร และนำไปบ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง ณ ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 12 ชั่วโมง จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 6,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที และล้างเซลล์ด้วยสารละลาย NaCl ร้อยละ 0.85 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร จำนวน 2 ครั้ง หลังจากนั้นเติมอาหารเลี้ยงเชื้อ MSM 10 มิลลิลิตร เพื่อให้ได้เซลล์เข้มข้นสำหรับใช้งานในขั้นตอนถัดไป

2.2 การศึกษาอิทธิพลของความเข้มข้นสารอนินทรีย์ต่อการกำจัดสารอนินทรีย์และการตรวจติดตามสารมัธยันตร์

สำหรับขั้นตอนนี้เป็นศึกษาด้วยระบบแบบดิสก์ซึ่งทดลองในขวดรูปชมพู่ที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ MSM 100 มิลลิลิตร การทดลองศึกษา ณ ความเข้มข้นสารอนินทรีย์แตกต่างกัน (1 3 5 10 30 และ 100 มิลลิกรัมต่อลิตร) ส่วนจำนวนเซลล์เริ่มต้นประมาณ 10^8 ซีเอฟยูต่อมิลลิลิตร

การทดลองเริ่มต้นจากการเติม MC46 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ MSM จากนั้นบ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง ณ ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที จากนั้นเก็บตัวอย่างน้ำ (1 มิลลิลิตร) ทุกวันต่อเนื่องเป็นเวลา 5 วัน เพื่อวิเคราะห์ปริมาณสารอนินทรีย์เหลือและตรวจติดตามสารมัธยันตร์ (Catechol) นอกจากนี้ในระหว่างการทดลองได้ตรวจวัดการเจริญของเซลล์ด้วยวิธีการนับจำนวนเซลล์ (Total plate count technique) ในการทดลองมีชุดทดลองเปรียบเทียบ (ชุดควบคุม) ได้แก่ ชุดทดลองที่ไม่มีการเติมเซลล์ MC46

2.3 การวิเคราะห์จลนพลศาสตร์ของการย่อยสลายสารอนินทรีย์ด้วย MC46

การศึกษาจลนพลศาสตร์ทางด้านสิ่งแวดล้อมโดยทั่วไปนิยมวิเคราะห์ด้วยสมการโมนอด (Monod equation) แต่ในการศึกษานี้ไม่สามารถใช้สมการโมนอดได้โดยตรงเนื่องจากในระหว่างการทดลองจำนวนเซลล์ไม่มีการเปลี่ยนแปลงอย่างชัดเจน ดังนั้นในการศึกษานี้จึงเลือกใช้สมการโมนอดดัดแปร (Modified Monod equation) โดยพิจารณาอัตราการกำจัดสารอนินทรีย์จำเพาะ (Specific aniline removal rate; q) แทนการหาอัตราการเจริญของ MC46 สำหรับ q สามารถคำนวณได้จากสมการที่ (1) โดยกำหนดให้ X คือ จำนวนเซลล์แบคทีเรียเริ่มต้น (ซีเอฟยูต่อลิตร) และ ds/dt คือ สัดส่วนปริมาณสารอนินทรีย์ต่อเวลา (มิลลิกรัมต่อลิตรต่อวัน) [10]

$$q = \frac{1}{X} \times \frac{ds}{dt} \quad (1)$$

ส่วนสมการโมนอดดัดแปรเป็นไปตามสมการที่ (2) นอกจากนี้ผลการทดลองพบว่าในการย่อยสลายสารอนินทรีย์ ความเข้มข้นสูงเกิดปรากฏการณ์การยับยั้งด้วยซับสเตรตเอง (Self-substrate inhibition) ดังนั้นในการศึกษานี้จึงได้วิเคราะห์หาค่าพารามิเตอร์ทางจลนพลศาสตร์แบบยับยั้ง ตาม

แบบจำลองของ Haldane Andrews Edwards และ Aiba [10,11] ซึ่งได้แก่ สมการที่ (3) ถึง (6) ตามลำดับ

$$q = \frac{q_{\max} S}{K_s + S} \quad (2)$$

$$q = \frac{q_{\max} S}{S + \frac{S^2}{K_i} + K_s + \frac{SK_s}{K_i}} \quad (3)$$

$$q = \frac{q_{\max}}{1 + \frac{K_s}{S} + \frac{S}{K_i}} \quad (4)$$

$$q = q_{\max} \left(\exp^{-\frac{S}{K_i}} - \exp^{-\frac{S}{K_s}} \right) \quad (5)$$

$$q = \frac{q_{\max} S}{S + K_s} \left(\exp^{-\frac{S}{K_i}} \right) \quad (6)$$

โดย q คือ อัตราการกำจัดสารอนิลินจำเพาะ (มิลลิกรัมต่อลิตร/ซีเอฟยูต่อลิตร-วัน) ส่วน $q_{\max}$ คือ อัตราการกำจัดสารอนิลินจำเพาะสูงสุด (Maximum specific aniline removal rate) (มิลลิกรัมต่อลิตร/ซีเอฟยูต่อลิตร-วัน) S คือ ค่าความเข้มข้นของสารอนิลิน (มิลลิกรัมต่อลิตร) K_s คือ ค่าคงที่ครึ่งอิ่มตัว (Half-saturation coefficient) (มิลลิกรัมต่อลิตร) และ K_i คือ ค่าคงที่การยับยั้งสาร (Inhibition constant) (มิลลิกรัมต่อลิตร)

2.4 การวิเคราะห์สารอนิลิน สารมัยันตร์ และการวัดการเจริญของแบคทีเรีย MC46

การหาปริมาณสารอนิลินและสารแคทีคอลในน้ำตัวอย่าง วิเคราะห์ด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (High-performance liquid chromatography; HPLC) (LC-20A, Shimadzu, Japan) ที่ติดตั้งคอลัมน์ชนิด C18 (ขนาด 5 ไมโครเมตร, 250 มิลลิเมตรx4.6 มิลลิเมตร) (Hyperclone, Phenomenex, USA) ตัวตรวจวัดของ HPLC เป็นชนิดตรวจวัดด้วยแสงอัลตราไวโอเลต ณ ความยาวคลื่น 265 นาโนเมตร

การเตรียมตัวอย่างสำหรับการวิเคราะห์เริ่มต้นจากการนำน้ำตัวอย่าง 0.5 มิลลิลิตร ผสมกับสารอะซีโตไนไตรล์

(Acetonitrile) 0.5 มิลลิลิตร จากนั้นนำสารผสมดังกล่าวกรองผ่านตัวอย่างชุดกรองแบบเข็มฉีดยา (Syringe filter) ซึ่งวัสดุกรองทำจากไนลอนที่มีขนาดรูพรุน 0.22 ไมโครเมตร ตัวอย่างที่ผ่านการกรองแล้ว 20 ไมโครลิตร ถูกนำมาวิเคราะห์หาปริมาณสารอนิลินและสารมัยันตร์ด้วยเครื่อง HPLC สภาวะของการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC เป็นแบบไอโซเครติก (Isocratic) โดยมีสารอะซีโตไนไตรล์ผสมกับน้ำปราศจากไอออน (De-ionized water) ในอัตราส่วน 70:30 (โดยปริมาตร) เป็นเฟสเคลื่อนที่ อัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่เท่ากับ 1 มิลลิลิตรต่อนาที เวลาทั้งหมดที่ใช้ในการวิเคราะห์คือ 7 นาที โดยสารอนิลินและสารแคทีคอลปรากฏที่เวลา 3.77 และ 3.18 นาที ตามลำดับ ความเข้มข้นจำกัดของการตรวจวัด (Detection limit) คือ 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร

สำหรับการวัดการเจริญของเซลล์ใช้วิธีการเพาะเลี้ยงบนจานเพาะเชื้อแบบเกลี่ยเชื้อ (Spread plate technique) ฐานอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ คือ LB สภาวะการบ่ม ณ อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

3. ผลการวิจัย

3.1 อิทธิพลของความเข้มข้นเริ่มต้นต่อประสิทธิภาพการกำจัดสารอนิลินและการเจริญของ MC46

การกำจัดสารอนิลินโดย MC46 ณ ความเข้มข้นเริ่มต้น 1 3 5 10 30 และ 100 มิลลิกรัมต่อลิตร (กำหนดชื่อชุดทดลองเป็น AN1 AN3 AN5 AN10 AN30 และ AN100 ตามความเข้มข้นของสาร ตามลำดับ) ซึ่งช่วงความเข้มข้นที่ทดลองในการศึกษานี้อ้างอิงจากความเข้มข้นของสารอนิลินที่ตกค้างในสิ่งแวดล้อม [4,5] ผลการศึกษาในชุดควบคุมซึ่งเป็นการทดลองติดตามการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของสารอนิลินตามธรรมชาติ (ไม่มี MC46) พบว่าสารอนิลินมีการย่อยสลายในธรรมชาติบ้าง (มีค่าระหว่างร้อยละ 7 ถึง 18)

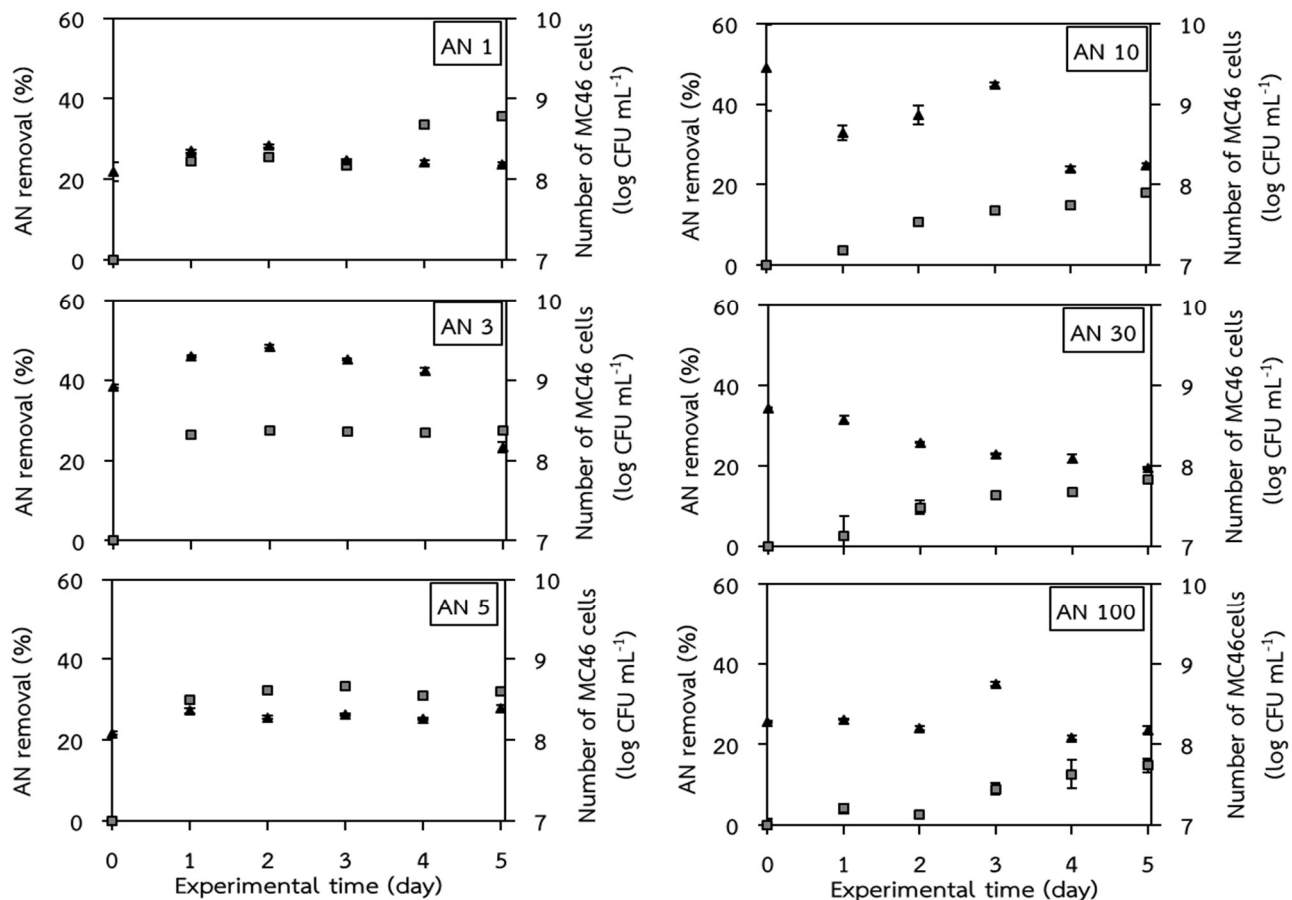
ส่วนผลการทดลองประสิทธิภาพการกำจัดสารอนิลิน และการเจริญของ MC46 แสดงดังรูปที่ 1 โดยภาพรวมพบว่าชุดการทดลองที่มี MC46 มีประสิทธิภาพการกำจัดสารอนิลินร้อยละ 16.9 ถึง 43.4 ซึ่งการย่อยสลายสารดังกล่าวอาจเกิดจากทั้งการทำงานของ MC46 และการย่อยสลายได้เองตามธรรมชาติ ดังที่ระบุในชุดควบคุม ทั้งนี้หากพิจารณาหักผลร้อยละการลดลงของสารอนิลินในชุดทดลอง MC46 และชุดควบคุม

สามารถกล่าวได้ว่าการย่อยสลายสารอนิไลน์ของ MC46 มีประสิทธิภาพมากกว่าร้อยละ 10 ในการทดลองทุกชุด (ความเข้มข้นของสารอนิไลน์ 1 ถึง 100 มิลลิกรัมต่อลิตร) แนวโน้มประสิทธิภาพการกำจัดลดลงเมื่อความเข้มข้นสารอนิไลน์เพิ่มขึ้น ส่วนการเจริญของเซลล์ที่ความเข้มข้นน้อย (1 ถึง 5 มิลลิกรัมต่อลิตร) จำนวนเซลล์ MC46 เพิ่มขึ้นเล็กน้อยหรือคงที่ ในขณะที่ชุดทดลองที่สารอนิไลน์ความเข้มข้นสูง (10 ถึง 100 มิลลิกรัมต่อลิตร) จำนวนเซลล์ MC46 ลดลงเล็กน้อยอย่างชัดเจน (จาก 10^8 ซีเอฟยูต่อมิลลิลิตร เหลือ 10^7 ซีเอฟยูต่อมิลลิลิตร) ในวันที่ 4 ถึง 5 ของการทดลอง

ผลการทดลองชี้ให้เห็นว่า MC46 มีความสามารถในการกำจัดสารอนิไลน์ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยในอดีตที่ระบุถึงการกำจัดสารอนิไลน์ซึ่งเป็นสารมัธยันตร์ของสารไตรโคลคาร์บาน และสารคลอโรนิไลน์ได้ [10,12] จากผลการเจริญของเซลล์ในการศึกษานี้พบว่าจำนวน MC46 ค่อนข้างคงที่ในชุดการทดลองที่มีประสิทธิภาพการกำจัดสารอนิไลน์น้อย (1 ถึง 5 มิลลิกรัมต่อ

ลิตร) ประกอบกับอาหารเลี้ยงเชื้อ MSM มีเพียง อนิไลน์เป็นสารประกอบคาร์บอนอินทรีย์ ดังนั้นสามารถกล่าวได้ว่า MC46 ใช้สารอนิไลน์ได้เป็นแหล่งคาร์บอนในกระบวนการเมตาบอลิซึมได้ แต่อย่างไรก็ตามสารอนิไลน์ก็มีความเป็นพิษต่อเซลล์ส่งผลให้เกิดการยับยั้งการเจริญของเซลล์เป็นเหตุให้จำนวน MC46 ค่อนข้างคงที่ นอกจากนี้นงานในอดีตยังได้คาดการณ์กลไกการกำจัดสารอนิไลน์ด้วย MC46 เกิดจากกิจกรรมเอนไซม์ (enzymatic activity) งานวิจัยในอดีตระบุว่าเอนไซม์ที่ย่อยสลายสารอนิไลน์ คือ ไดออกซิจีเนส (dioxxygenase) ซึ่งพบในแบคทีเรียหลายสายพันธุ์ [12,13]

สำหรับผลการทดลองในชุดทดลองที่สารอนิไลน์ความเข้มข้นสูง (10 ถึง 100 มิลลิกรัมต่อลิตร) พบว่าจำนวนเซลล์ MC46 และประสิทธิภาพการกำจัดสารลดลงอย่างชัดเจนเนื่องจากสารอนิไลน์ยับยั้งทั้งการเจริญเซลล์และกิจกรรมเอนไซม์ (enzymatic activity)



รูปที่ 1 ประสิทธิภาพการกำจัดสารอนิไลน์โดยแบคทีเรีย MC46 และการเจริญของเซลล์ในชุดทดลอง AN 1 AN 3 AN 5 AN 10 AN 30 และ AN 100 ตามลำดับ (■ Aniline removal ▲ Cell number)

3.2 จลนพลศาสตร์การย่อยสลายสารอนิลินด้วย MC46

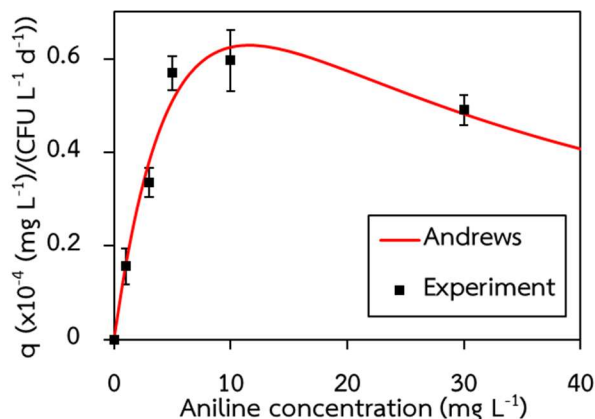
การศึกษาจลนพลศาสตร์การย่อยสลายสารอนิลินด้วย MC46 พบว่าในการคำนวณสามารถหา q จากการทดลองที่มีสารอนิลิน 1 3 5 10 และ 30 มิลลิกรัมต่อลิตร (มีค่าเท่ากับ 0.16 0.33 0.57 0.60 และ 0.49×10^{-4} มิลลิกรัมต่อลิตรต่อซีเอฟยูต่อลิตรต่อวัน ตามลำดับ) สำหรับผลการทดลองที่มีสารอนิลิน 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ไม่สามารถนำมาใช้วิเคราะห์จลนพลศาสตร์ได้ เนื่องจากไม่พบการย่อยสลายอนิลินโดย MC46

เมื่อนำค่าผลการทดลองมาวิเคราะห์ด้วยสมการโมนอดัดแปรพบว่า $q_{\max}$ และ K_s มีค่าเท่ากับ 0.62×10^{-4} มิลลิกรัมต่อลิตรต่อซีเอฟยูต่อลิตรต่อวัน และ 1.82 มิลลิกรัมต่อลิตรตามลำดับ (ตารางที่ 1) แต่จากผลการทดลองในรูปที่ 2 ชี้ให้เห็นอย่างชัดเจนได้ว่าการกำจัดสารอนิลินด้วย MC46 เกิดการยับยั้งด้วยซับสเตรตเองที่ความเข้มข้นสารอนิลินมากกว่า 10 มิลลิกรัมต่อลิตร

ดังนั้นจึงทำนายพารามิเตอร์จลนพลศาสตร์ของการกำจัดสารอนิลินแบบมีการยับยั้งตามแบบจำลองต่าง ๆ (ตารางที่ 1) เมื่อหาค่าความคลาดเคลื่อน (Root mean squared error; RMSE) จากการทำนายแล้วพบว่าผลการทดลองสอดคล้องกับแบบจำลองของ Andrews มากที่สุด โดยมีค่าความคลาดเคลื่อนเพียง 0.0357 (ตารางที่ 1 และ รูปที่ 2) โดยทั่วไปแล้วแบบจำลองของ Andrews สามารถอธิบายได้ว่าซับสเตรตที่ความเข้มข้นสูงส่งผลต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ [14] และส่งผลยับยั้งการย่อยสลายซับสเตรต แบบจำลองดังกล่าวเป็นที่ยอมรับและนิยมใช้งานทางสิ่งแวดล้อม เช่น การศึกษาการยับยั้งการเจริญเติบโตและประสิทธิภาพในการกำจัดสารพิษ อาทิ ฟีนอล ไชนาไนต์ และแอมโมเนีย [15,16,17] ผลจากแบบจำลองสามารถระบุได้ว่าสารอนิลินที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 13.9 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่งผลให้เกิดการยับยั้งการย่อยสลายสารอนิลินด้วย MC46

ทั้งนี้จากงานวิจัยที่ศึกษาการย่อยสลายไตรโคลคาร์บานด้วย MC46 พบว่าพฤติกรรมของการย่อยสลายไตรโคลคาร์บานเป็นไปตามแบบจำลองของ Edwards [10] แบบจำลองดังกล่าวมีระบุลักษณะการยับยั้งว่านอกจากสารตั้งต้น ซึ่งได้แก่สารไตรโคลคาร์บาน แล้วสารมัธยันต์ (เช่น คลอโรอนิลินและ

อนิลิน) ก็ส่งผลยับยั้งการย่อยสลายทางชีวภาพด้วยผลการศึกษานี้ชี้ให้เห็นว่าแม้จุลินทรีย์ชนิดเดียวกันแต่การย่อยสลายซับสเตรตต่างชนิด โดยเฉพาะสารที่มีความเป็นพิษส่งผลต่อลักษณะการยับยั้งได้



รูปที่ 2 จลนพลศาสตร์การย่อยสลายสารอนิลินด้วย MC46

3.3 การติดตามสารมัธยันต์จากการย่อยสลายสารอนิลินและวิธีการย่อยสลายสารอนิลิน

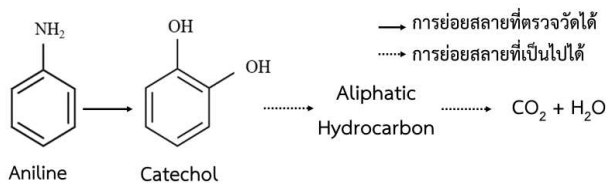
การทดลองการกำจัดสารอนิลินโดย MC46 ในความเข้มข้นที่แตกต่างกัน โดยในระหว่างการทดลองได้มีการตรวจพบสารแคทีคอลที่เกิดขึ้นในการทดลองย่อยสลายสารอนิลิน ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาก่อนหน้านี้พบว่า MC46 สามารถเปลี่ยนสารอนิลินไปเป็นแคทีคอล [10,12]

ผลการติดตามสารแคทีคอลทั้งในชุดควบคุมและชุดทดลองพบว่าสามารถตรวจพบแคทีคอลต่อเนื่องตั้งแต่เริ่มต้นจนถึงสิ้นสุดการทดลอง แต่แนวโน้มพบว่ามีสารแคทีคอลมีปริมาณลดลง โดยในชุดควบคุมและชุดทดลองมีสารแคทีคอลลดลงร้อยละ 52.57 ถึง 98.07 ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบว่าชุดทดลองที่มีสารอนิลินสูง (10 ถึง 100 มิลลิกรัมต่อลิตร) ปริมาณสารแคทีคอลที่ติดตามได้มีแนวโน้มใกล้เคียงกับชุดควบคุม ผลการติดตามสารแคทีคอลสอดคล้องกับผลการกำจัดสารอนิลินข้างต้น กล่าวคือ ในสถานะที่มีสารอนิลินความเข้มข้นสูง กระบวนการทางชีวภาพมีการยับยั้งจากความเป็นพิษของสาร ดังนั้นแนวโน้มของสารแคทีคอลด้วยชุดทดลองจึงใกล้เคียงกับชุดควบคุม

ตารางที่ 1 พารามิเตอร์จลนพลศาสตร์ของการกำจัดสารอนิไลน์ด้วย MC46

แบบจำลอง	พารามิเตอร์			RMSE
	Q_{max} (มิลลิกรัมต่อลิตรต่อซีเอฟยูต่อลิตรต่อวัน)	K_s (มิลลิกรัมต่อลิตร)	K_i (มิลลิกรัมต่อลิตร)	
Modified-monod	0.6200×10^{-4}	1.820	-	-
Haldane	2.733×10^{-4}	13.598	10.911	0.0388
Andrews	1.680×10^{-4}	9.676	13.904	0.0357
Edwards	0.824×10^{-4}	4.154	57.390	0.0362
Aiba	1.560×10^{-4}	8.301	32.488	0.0382

สำหรับกลไกการย่อยสลายสารแคทีคอลคาดว่าเกิดจากการทำงานของเอนไซม์ไดออกซิจีเนสเช่นเดียวกับอนิไลน์ [18] ซึ่งกลไกดังกล่าวเป็นการย่อยสลายวงเบนซีน (Benzene ring cleavage) จากนั้นสารแคทีคอลซึ่งมีโครงสร้างเป็นไฮโดรคาร์บอนแบบอะโรมาติก (Aromatic hydrocarbon) จึงเปลี่ยนเป็นไฮโดรคาร์บอนแบบอะลิฟาติก (Aliphatic hydrocarbon) แล้วสุดท้ายกลายเป็นธาตุอย่างสมบูรณ์ (Complete mineralization) ต่อไป การคาดการณ์วิถีของการย่อยสลายสารอนิไลน์ด้วย MC46 แสดงดังรูปที่ 3



รูปที่ 3 การคาดการณ์วิถีของการย่อยสลายสารอนิไลน์ด้วย MC46

จากผลการทดลองทั้งหมดพบว่า MC46 สามารถกำจัดและลดความเป็นพิษของสารอนิไลน์และสารมัธยันตร์ได้ การศึกษานี้ชี้ให้เห็นความเป็นไปได้ในการใช้งาน MC46 สำหรับกำจัดสารอนิไลน์ที่ปนเปื้อนในน้ำเสียและพื้นฟูพื้นที่ปนเปื้อนสารอนิไลน์ในสิ่งแวดล้อม แต่ทั้งนี้ก่อนการประยุกต์ใช้งานจริงควรมีการทดสอบในระดับนาร่อง ณ พื้นที่ปนเปื้อนเพื่อศึกษาอิทธิพลของสภาวะแวดล้อมจริงต่อการเจริญเติบโตและความสามารถในการกำจัดสารอนิไลน์ของ MC46 ตลอดจนการเปรียบเทียบสภาวะการทำงานของ MC46 เพื่อให้เหมาะสมต่อการใช้งานในพื้นที่จริงต่อไป

4. สรุปผลการศึกษา

จุลินทรีย์ *Pseudomonas fluorescens* สายพันธุ์ MC46 สามารถกำจัดสารอนิไลน์ที่ปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อมสูงสุดร้อยละ 43.4 แต่ก็พบว่าประสิทธิภาพการกำจัดสารอนิไลน์ลดลงเมื่อความเข้มข้นสารอนิไลน์เพิ่มสูงขึ้น ซึ่งคาดว่าเกิดจากความเป็นพิษของสารอนิไลน์ยับยั้งการเจริญของเซลล์และส่งผลต่อประสิทธิภาพการกำจัดสาร เมื่อวิเคราะห์จลนพลศาสตร์แล้วพบว่ากำจัดสารอนิไลน์เป็นไปตามแบบจำลอง Andrews นอกจากนี้ผลการศึกษพบว่า MC46 สามารถกำจัดสารแคทีคอล ซึ่งเป็นสารมัธยันตร์จากการย่อยสลายอนิไลน์ได้เช่นกัน ทั้งนี้ควรมีการศึกษาเพิ่มเติมปัจจัยที่มีผลต่อประสิทธิภาพการกำจัดสารอนิไลน์อื่น ๆ เช่น สภาวะแวดล้อม ตลอดจนควรมีการวิจัยต่อเนื่องเพื่อหาแนวทางในการเพิ่มประสิทธิภาพการกำจัดสารอนิไลน์ต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนบางส่วนและความอนุเคราะห์สถานที่และเครื่องมือต่าง ๆ จากคณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ศูนย์วิจัยด้านการจัดการสิ่งแวดล้อมและสารอันตราย มหาวิทยาลัยขอนแก่น และศูนย์ความเป็นเลิศด้านการจัดการสารและของเสียอันตราย (ศสอ.) แต่อย่างไรก็ตามความคิดเห็น ผลการศึกษา การสรุปผล และข้อเสนอแนะในเอกสารนี้ไม่เกี่ยวข้องกับผู้ให้ทุน

เอกสารอ้างอิง

- [1] Cui D, Shen D, Wu C, Li C, Leng D, Zhao M. Biodegradation of aniline by a novel bacterial mixed culture AC. *International Biodeterioration and Biodegradation*. 2017; 125: 86-96.
- [2] Bose RS, Dey S, Saha S, Ghosh CK, Chaudhuri MG. Enhanced removal of dissolved aniline from

- water under combined system of nano zero-valent iron and *Pseudomonas putida*. *Sustainable Water Resources Management*. 2016; 2(2): 143-159.
- [3] Northcott J. *Kirk- Othmer Encyclopaedia of Chemical Technology*. 3rd. Volume 2. Ontario (Canada): John Wiley & Sons publishers; 1978. 309.
- [4] Zakari S, Liu H, Zhou H. Transport velocities of aniline and nitrobenzene in sandy sediment. *Journal of Soils and Sediments*. 2019; 19(5): 2570-2579.
- [5] Sun W, Li Y, McGuinness LR, Luo S, Huang W, Kerkhof LJ, Mack EE, Haggblom MM, Fennell DE. Identification of anaerobic aniline- degrading bacteria at a contaminated industrial site. *Environmental Science and Technology*. 2015; 49(18): 11079-11088.
- [6] Dewage NB, Liyanage AS, Smith Q, Pittman J, Charles U, Perez F, Hassan EB, Mohan D, Mlsna T. Fast aniline and nitrobenzene remediation from water on magnetized and nonmagnetized Douglas fir biochar. *Chemosphere*. 2019; 255: 943-953.
- [7] Siripattanakul-Ratpukdi S, Vangnai AS, Sangthean P, Singkibut S. Profenofos insecticide degradation by novel microbial consortium and isolates enriched from contaminated chili farm soil. *Environmental Science and Pollution Research*. 2015; 22(1): 320-328.
- [8] Vangnai AS, Petchkroh W. Biodegradation of 4-chloroaniline by bacteria enriched from soil. *Federation of European Microbiological Societies*. 2007; 268(2): 209-216.
- [9] Sipahutar MK, Piapukiew J, Vangnai AS. Efficiency of the formulated plant- growth promoting *Pseudomonas fluorescens* MC46 Inoculant on triclocarban treatment in soil and its effect on *Vigna radiata* growth and soil enzyme activities. *Journal of Hazardous Materials*. 2018; 344: 883-92.
- [10] Taweetanawanit P, Ratpukdi T, Siripattanakul-Ratpukdi S. Performance and kinetics of triclocarban removal by entrapped *Pseudomonas fluorescens* strain MC46. *Bioresource Technology*. 2019; 274: 113-119.
- [11] Sahoo NK, Panigrahy N. Biodegradation and kinetic study of 4- chlorophenol in bioreactor packed with stabilized bacteria entrapped in calcium alginate beads system. *Environmental Processes*. 2018; 5(2): 287-302.
- [12] Hongsawat P, Vangnai AS. Biodegradation pathways of chloroanilines by *Acinetobacter baylyi* strain GFJ2. *Journal of Hazardous Materials*. 2011; 186(2-3): 1300-1307.
- [13] Ji J, Zhang J, Liu Y. The substrate specificity of aniline dioxygenase is mainly determined by two of its components: glutamine synthetase- like enzyme and oxygenase. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2019; 103: 6333-6344.
- [14] Andrews JF. A mathematical model for the continuous culture of microorganisms utilizing inhibitory substrates. *Biotechnology and Bioengineering*. 1968; 10(6): 707-723.
- [15] Goudar CT, Ganji SH, Pujar BG, Strevett KA. Substrate inhibition kinetics of phenol biodegradation. *Water Environment Research*. 2000; 72(1): 50-55.
- [16] Polymenakou PN, Stephanou EG. Effect of temperature and additional carbon sources on phenol degradation by an indigenous soil *Pseudomonad*. *Biodegradation*. 2005; 16(15): 403-413.
- [17] Mpongwana N, Ntwampe SKO, Omodanisi EI, Chidi BS, Razanamahandry LC, Dlangamandla C, Mukandi MR. Bio- Kinetics of simultaneous nitrification and aerobic denitrification (SNaD) by a cyanide-degrading bacterium under cyanide-

laden conditions. *Applied Sciences*. 2020; 10(14): 4823.

- [18] Ladino-Orjuela G, Gomes E, da Silva R, Salt C, Parsons JR. Metabolic for pathways degradation of aromatic hydrocarbons by bacteria. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*. 2016; 237: 105-121.