บทที่ 2
การตรวจเอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ในกระบวนการผลิตของภาคอุตสาหกรรมและการใช้สารเคมีในการปราบศัตรูพืชของภาคเกษตรกรรม ก่อให้เกิดการภาวะสารเคมีตกค้างในสิ่งแวดล้อม เนื่องจากสารเคมีเหล่านี้ส่วนใหญ่มักเป็นอินทรียสารที่มีสูตรโครงสร้างซับซ้อน จุลินทรีย์ในธรรมชาติซึ่งมีบทบาทสำคัญในการย่อยสลายสารต่าง ๆกลับไปเป็นธาตุอาหารไม่สามารถใช้ประโยชน์จากสารเคมีที่มีโครงสร้างซับซ้อนดังกล่าวได้ทันที อย่างไรก็ตาม ในช่วงเวลาที่สารเคมีเหล่านั้นตกค้างอยู่ในสิ่งแวดล้อม จุลินทรีย์ในธรรมชาติได้พัฒนากระบวนการทางชีววิทยาขึ้น เพื่อให้สามารถเปลี่ยนแปลงความซับซ้อนของโครงสร้างสารเคมีให้อยู่ในรูปใหม่ที่มีโครงสร้างลดความซับซ้อนลง กระทั่งในที่สุดสารเคมีตั้งต้นดังกล่าวถูกเปลี่ยนกลับไปเป็นธาตุอาหารสำหรับใช้ประโยชน์ในการเจริญเติบโต ได้แก่ คาร์บอน ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส ซัลเฟอร์ และธาตุอาหารอื่น ๆ กลไกตามธรรมชาติที่กล่าวมานี้เรียกว่า "การย่อยสลายทางชีวภาพ" (biodegradation) โดยจุลินทรีย์ที่อยู่ในดิน ตะกอน และแหล่งน้ำ ทำหน้าที่ย่อยสลายอินทรียสารในภาวะที่มีการใช้ออกซิเจน (aerobic) และภาวะที่ไม่มีการใช้ออกซิเจน (anaerobic) ในภาวะที่มีการใช้ออกซิเจน อินทรียสารถูกย่อยสลายจนหมด ไม่เกิดกาซที่เป็นพิษหรือมีกลิ่นเหม็น ส่วนภาวะที่ไม่มีการใช้ออกซิเจน อินทรียสารไม่ถูกย่อยสลายไปจนหมด เกิดเป็นกาซพิษที่มีกลิ่นเหม็น เช่น มีเธน แอมโมเนีย และไฮโดรเจนซัลไฟด์ (Alexander, 1994; Medsen, 1998)

สำหรับการบำบัดด้วยวิธีทางชีวภาพ (bioremediation) เป็นแนวทางในการจัดการสารปนเปื้อนโดยนำความสามารถของจุลินทรีย์ในการย่อยสลายทางชีวภาพมาพัฒนาเป็นวิธีการบำบัดสารปนเปื้อนต่าง ๆ ให้อยู่ในระดับความเข้มข้นที่ปลอดภัยต่อสิ่งมีชีวิตและอยู่ในระดับที่ต่ำกว่าเกณฑ์มาตรฐานที่กำหนดไว้โดยหน่วยงานด้านสิ่งแวดล้อมต่าง ๆ การบำบัดด้วยวิธีการทางชีวภาพแบ่งได้ 2 ประเภท ดังนี้

1. การบำบัดด้วยวิธีทางชีวภาพโดยจุลินทรีย์ที่เจริญในสิ่งแวดล้อมที่มีการปนเปื้อน (intricsic bioremediation)

การบำบัดประเภทนี้ดำเนินการในพื้นที่ที่มีการปนเปื้อน(In situ) โดยไม่มีการนำกระบวนการทางวิศวกรรมมาเร่งให้เกิดการย่อยสลาย แต่เป็นการใช้ความสามารถในการย่อยสลายตามธรรมชาติของจุลินทรีย์ การตรวจสอบประสิทธิภาพของการย่อยสลายโดยจุลินทรีย์สามารถทำได้โดยการเก็บตัวอย่างดิน น้ำ หรือตะกอน เพื่อติดตามการลดลงของปริมาณสาร

ปนเปื้อนในช่วงเวลาที่ผ่านไป หรือติดตามหาชนิดและปริมาณของสารที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาการย่อยสลาย ประสิทธิภาพของการบำบัดประเภทนี้ขึ้นอยู่กับชนิดของสารปนเปื้อน ชนิดของจุลินทรีย์ สภาพภูมิอากาศและภูมิประเทศที่มีการปนเปื้อนสารเคมี (Medsen, 1998)

2. การบำบัดโดยวิธีทางชีวภาพในเชิงวิศวกรรม (engineered bioremediation)

การบำบัดประเภทนี้จะมีการลำเลียงของเสียออกมาบำบัดในพื้นที่ที่จัดเตรียมไว้(Ex situ) เช่น ระบบบำบัดน้ำเสีย มีการนำกระบวนการในเชิงวิศวกรรมมาใช้ในการบำบัดของเสีย เพื่อเร่งให้เกิดการย่อยสลายสารปนเปื้อนด้วยวิธีทางชีวภาพ (Medsen, 1998) อาทิ จัดทำระบบหมุนเวียนของน้ำ ติดตั้งเครื่องเติมอากาศ เพิ่มปริมาณธาตุอาหาร (Alexander, 1994) เพิ่มไนเตรท ซัลเฟต และคาร์บอเนต เพื่อเป็นตัวรับอิเลกตรอนในปฏิกิริยาการย่อยสลาย (Lynch and Poole, 1993)

ขบวนการย่อยสลายอินทรียสารโดยจุลินทรีย์เฮเทอโรโทรป(heterotrophs)

สำหรับจุลินทรีย์เฮเทอโรโทรปนั้น แหล่งคาร์บอนสำหรับการเจริญเติบโตอยู่ในรูปอินทรียสาร โดยจุลินทรีย์นำอินทรียสารไปใช้ประโยชน์ในการเจริญเติบโตโดยการย่อยสลายด้วยปฏิกิริยาออกซิเดชัน(oxidation)และรีดักชัน(reduction) เพื่อให้ได้มาซึ่งพลังงานและสารตัวกลาง(intermediates)ที่จำเป็นในการสร้างส่วนประกอบของเซลล์ ตัวอย่างของตัวให้อิเล็กตรอน คือ $NADH+H^+$ และ ตัวอย่างของตัวรับอิเล็กตรอนคือ ออกซิเจน โดยปกติขบวนการย่อยสลายเป็นแบบไกลโคไลติก(glycolytic pathway) และวัฐจักรไตรคาบอกซิลิก แอซิด (tricarboxylic acid cycle) ซึ่งขบวนการเหล่านี้จะถูกเร่งปฏิกิริยาโดยเอนไซม์หลาย ๆชนิด เอนไซม์เหล่านี้จะทำหน้าที่ย่อยสลายสารอาหารในขบวนการต่าง ๆ เพื่อให้ได้มาซึ่งพลังงาน เพื่อใช้สร้างส่วนประกอบที่สำคัญของเซลล์ เอนไซม์สำหรับขบวนการต่าง ๆ ดังกล่าว ที่จุลินทรีย์สร้างขึ้นตลอดเวลาเรียกว่า “คอนซิติวดีฟ เอนไซม์” (constitutive enzymes)

จุลินทรีย์เฮเทอโรโทรปสามารถใช้ประโยชน์จากคาร์บอนได้จากหลาย ๆ แหล่ง เช่น จุลินทรีย์บางชนิดสามารถย่อยสลายน้ำตาลแล็กโทสได้ บางชนิดไม่สามารถย่อยสลายได้ หรือจุลินทรีย์บางกลุ่มสามารถย่อยสลายสารประกอบอะโรมาติกได้ ในขณะที่บางชนิดไม่สามารถย่อยสลายสารประกอบนี้ได้ ในการย่อยสลายคาร์บอนจากแหล่งต่าง ๆ จุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการย่อยสลายจะสร้างเอนไซม์ที่มีความจำเพาะต่อแหล่งคาร์บอนนั้นเสริมกับเอนไซม์ชนิดต่าง ๆ ที่มีอยู่แล้วของจุลินทรีย์ มีผลให้จุลินทรีย์เหล่านี้มีความสามารถอย่างกว้างขวางในขบวนการแคททาโบลิก(catabolic pathway) ซึ่งทำให้จุลินทรีย์มีศักยภาพในการย่อยสลายอินทรียสารได้หลายประเภทเพื่อนำมาผลิตพลังงาน อิเล็กตรอนและสารตัวกลางเพื่อใช้ในการเจริญต่อไป

จุลินทรีย์ชนิดที่สามารถสร้างเอนไซม์เพื่อย่อยสลายอินทรียสาร มักจะสร้างเอนไซม์ดังกล่าวขึ้นเมื่อมีการปนเปื้อนสารชนิดนั้น ๆในสภาวะที่จุลินทรีย์เจริญพันธุ์อยู่ ส่วนในสภาวะที่ไม่มีการปนเปื้อน จุลินทรีย์จะไม่สร้างเอนไซม์จำเพาะขึ้นมา เอนไซม์จำเพาะที่กล่าวมานี้ เรียกว่า "อินดิวซิเบิล เอนไซม์" (inducible enzyme) ในการสร้างเอนไซม์ประเภทนี้จุลินทรีย์จำเป็นที่จะต้องได้รับอินทรียสารในระยะแรกเพื่อกระตุ้นให้เกิดการย่อยสลาย หรือที่เรียกว่า "อินดิวเซอร์" (inducer) อินดิวเซอร์มักจะเป็นสารตั้งต้นหรืออนุพันธ์ของสารตั้งต้นที่ต้องการให้จุลินทรีย์เหล่านั้นย่อยสลาย

อนึ่ง ขบวนการต่าง ๆที่แบคทีเรียสามารถใช้ในการสร้างพลังงานจากแหล่งสารอาหารหรือแหล่งพลังงานนั้น แบ่งออกได้เป็น 3 ขบวนการ ได้แก่ ขบวนการย่อยสลายแบบต้องการออกซิเจน (aerobic respiration) ขบวนการย่อยสลายแบบไร้ออกซิเจน (anarobic respiration) และขบวนการย่อยสลายแบบหมัก (fermentation) ในขบวนการย่อยสลายแบบต้องการออกซิเจน อินทรียสารที่ใช้เป็นแหล่งอาหารและแหล่งพลังงานจะถูกย่อยสลายโดยปฏิกิริยาเคมีต่าง ๆภายในเซลล์จุลินทรีย์ จนกระทั่งถึงขบวนการสุดท้ายที่มีออกซิเจนเป็นตัวรับอิเล็กตรอนตัวสุดท้าย ขบวนการส่งถ่ายอิเล็กตรอนของแบคทีเรียอยู่บนเยื่อหุ้มเซลล์ซึ่งแตกต่างจากแบบไร้ออกซิเจนที่ใช้อนินทรียสารอื่น เช่น ไนเตรตเป็นตัวรับอิเลกตรอน และแบบหมักซึ่งใช้อนินทรียสารที่เป็นตัวกลางอันเกิดจากขบวนการย่อยสลาย เช่น กรดไพรูริกเป็นตัวรับอิเลกตรอน (อมเรศ ภูมิรัตน, 2536)

การย่อยสลายสารประกอบไนโตรฟีนอลด้วยวิธีทางชีวภาพ

สารประกอบไนโตรอะโรมาติกเป็นสารเคมีที่ใช้ในกระบวนการผลิตทั้งภาคอุตสาหกรรมและภาคเกษตรกรรมเมื่อสารเคมีในกลุ่มไนโตรอะโรมาติกตกค้างอยู่ในสิ่งแวดล้อม ส่วนใหญ่จะเป็นพิษต่อสิ่งมีชีวิต โดยเฉพาะอย่างยิ่งสารประกอบประเภทไนโตรฟีนอล (Spain and Gibson, 1991) US. Environmental Protection Agency (1996) ระบุว่าสารเคมีในกลุ่มของสารประกอบไนโตรฟีนอล 4 ชนิด ได้แก่ พาราไนโตรฟีนอล (4-nitrophenol) ออโทรไนโตรฟีนอล (2-nitrophenol) แอลฟาไดไนโตรฟีนอล (2,4 Dinitrophenol) และ 2,4,6 ไตรไนโตรฟีนอล (2,4,6 Trinitrophenol) เป็นสารพิษ สารเคมีทั้ง 4 ชนิดนี้ ใช้ในกระบวนการผลิตของอุตสาหกรรมประเภทเดียวกัน ได้แก่ การผลิตสีย้อม การผลิตสารปราบศัตรูพืช การผลิตวัตถุระเบิด ตลอดจนใช้ในการรักษาคุณภาพหนังสัตว์และคุณภาพเนื้อไม้ ผลของสารประกอบไนโตรฟีนอลที่มีต่อสิ่งมีชีวิตจะคล้ายคลึงกัน กล่าวคือ ลดความสามารถในการจับยึดออกซิเจนโดยเม็ดเลือดแดง ระคายเคืองตา ผิวหนัง ระบบทางเดินหายใจและทางเดินอาหาร รวมทั้งอาจทำลายระบบการทำงานของตับและไตหากได้รับสารประกอบไนโตรฟีนอลเป็นระยะเวลานาน จึงเป็นสารที่ต้องหลีกเลี่ยงในการสัมผัสและสูดดม

ในธรรมชาติมีจุลินทรีย์บางชนิดที่สามารถเปลี่ยนรูปของสารประกอบไนโตรฟีนอลไปเป็นสารเคมีอื่นรวมทั้งมีจุลินทรีย์บางชนิดที่นอกจากจะสามารถเปลี่ยนรูปสารประกอบไนโตรฟีนอลให้อยู่ในลักษณะโครงสร้างเคมีที่ลดความซับซ้อนลงแล้วยังสามารถใช้เป็นแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนสำหรับการเจิญเติบโต (Spain, 1995) เช่น แบคทีเรีย *Desulfovibrio* sp. ที่แยกมาจากระบบบำบัดน้ำเสียแบบไม่ใช้อากาศ มีความสามารถในการย่อยสลายสารประกอบไนโตรอะโรมาติกได้หลายชนิด สารเหล่านั้นประกอบด้วย แอลฟาไดไนโตรฟีนอล, 2,4-ไดไนโตรทูโลอีน และ 2,6-ไดไนโตรทูโลอีน โดย แอลฟา-ไดไนโตรฟีนอล ซึ่งเป็นสารประกอบหนึ่งที่อยู่ในกลุ่มของไนโตรฟีนอล ถูกเปลี่ยนรูปไปเป็น4,6-ไดไนโตรเฮกซาโนเอต (4,6-dinitrohexanoate) ภายใน 6 วันของการบำบัดแบบไม่ใช้อากาศ จากการศึกษาพบว่ากลุ่มไนโตรที่ประกอบในโครงสร้างทางเคมีของแอลฟาไดไนโตรฟีนอลถูกกำจัดออกไปเป็นแอมโมเนียและถูกใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนสำหรับจุลินทรีย์ (Boopathy and Kulpa, 1993)

หากการย่อยสลายสารประกอบไนโตรฟีนอลเกิดขึ้นภายใต้สภาวะไร้อากาศ ตำแหน่งที่กลุ่มไนโตรถูกปลดปล่อยออกไปมีการแทนที่ตำแหน่งนั้นด้วยสารอื่น ๆ และขั้นตอนการย่อยสลายสามารถเกิดขึ้นโดยความสามารถของจุลินทรีย์เพียงสายพันธุ์เดียว (pure culture) หรือเกิดขึ้นโดยความสามารถของกลุ่มจุลินทรีย์ (microbial community) ในน้ำและดิน (Marvin and Bont, 1994) โดยส่วนใหญ่แล้ว ช่วงแรกของการย่อยสลายจะเป็นการย่อยสลายแบบโมโนออกซิจิเนชั่น (monooxygenation)ไนไตรท์ถูกปลดปล่อยออกมาและสารประกอบไนโตรฟีนอลเปลี่ยนรูปไปเป็นสารประกอบไดไฮดรอกซี (dihydroxy compound) (Zeyer and Kearney, 1984; Spain et al., 1991)

การย่อยสลายออโทไนโตรฟีนอล

Zeyer และ Kearney (1984) แยกแบคทีเรีย *Pseudomanas putida* จากดิน แบคทีเรียที่แยกได้นี้สามารถย่อยสลายออโทไนโตรฟีนอลได้ โดยในการย่อยสลายมีการปลดปล่อยไนไตร์ออกมา และออโทไนโตรฟีนอลเปลี่ยนรูปไปเป็นคาทีโคลและ *cis,cis*-muconic ปฏิกิริยาการย่อยสลายเกิดอย่างสมบูรณ์เมื่อมี NADPH เป็นเอนไซม์ที่ให้อิเลคตรอนในปฏิกิริยา และในที่สุดผลผลิตสุดท้ายของขั้นตอนการย่อยสลาย เกิดเป็นเบตาคีโตอะดิพิก

การย่อยสลายแอลฟาไดไนโตรฟีนอล

Lenke และคณะ (1992) แยกแบคทีเรีย *Rhodococus erythropolis* จากดินและตะกอนในแม่น้ำ แบคทีเรียที่แยกได้นี้สามารถใช้แอลฟาไดไนโตรฟีนอลเป็นแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจน ในขั้นตอนการย่อยสลาย ไนไตร์ถูกปลดปล่อยออกมาและแอลฟาไดไนโตรฟีนอลเปลี่ยนรูปไปเป็น 4,6-ไดไนโตรเฮซาโนเอต (4,6-dinitrohexanoate)ขึ้น ต่อมา Blasco และ

คณะ (1999)ศึกษาพบว่าในการย่อยสลายแอลฟาไดไนโตรฟีนอลโดยแบคทีเรีย *Rhodococus* sp. ขั้นตอนการย่อยสลายมี 2 ขั้นตอน โดยขั้นแรกกลุ่มไนโตรถูกปลดปล่อยออกมาและแอลฟาไดไนโตรฟีนอลเปลี่ยนรูปเป็น 3-ไนโตรอะดิเพต(3-nitroadipate) จากนั้น ในขั้นตอนที่สองของการย่อยสลายกลุ่มไนโตรอีกกลุ่มที่เหลืออยู่ถูกปลดปล่อยออก ทำให้ 3-ไนโตรอะดิเพตเปลี่ยนเป็น 4,6-ไดไนโตรเฮซาโนเอต เช่นเดียวกับที่ Lenke และคณะทำการศึกษาไว้

การย่อยสลาย 2,4,6-ไตรไนโตรฟีนอล

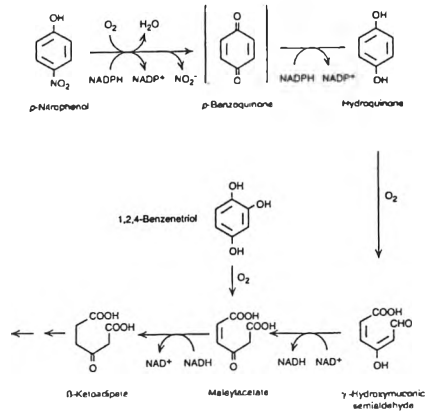
Wyman และคณะ (1979) ศึกษาพบว่าแบคทีเรีย *Pseudomonas aeruginosa* ย่อยสลาย 2,4,6-ไตรไนโตรฟีนอลไปเป็น 2-อะมิโน-4,6-ไดไนโตรฟีนอล ภายใต้ภาวะไม่ใช้ออกซิเจน และต่อมา Rieger และคณะ (1999) แยกแบคทีเรีย *Rhodococcus erythropolis* ที่ใช้ 2,4,6-ไตรไนโตรฟีนอลเพื่อเป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงาน หลังจากขั้นตอนการย่อยสลาย2,4,6-ไตรไนโตรฟีนอล เปลี่ยนรูปเป็นแอลฟาไดไนโตรฟีนอล จากนั้นจึงมีการย่อยสลายแอลฟาไดไนโตรฟีนอลเช่นเดียวกับที่ Lenke และคณะ ศึกษาไว้

การย่อยสลายพาราไนโตรฟีนอล

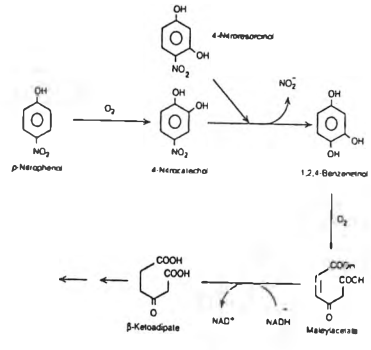
การศึกษาการย่อยสลายพาราไนโตรฟีนอลโดยจุลินทรีย์เริ่มขึ้นตั้งแต่ ปี คศ.1953 โดย Simpson และ Evans แยกจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการย่อยสลายพาราไนโตรฟีนอลจากดิน โดยจุลินทรีย์ที่แยกได้นี้เป็นแบคทีเรีย *Pseudomonas* sp. เมื่อติดตามการย่อยสลายพบว่าในระหว่างที่แบคทีเรียเจริญมีการปลดปล่อยไนไตร์ (nitrite) ออกมาและพาราไนโตรฟีนอลเปลี่ยนรูปไปเป็นไฮโดรควิโนน (hydroquinone) (อ้างถึงใน Spain, 1995) ต่อมา Munnecke และ Heich (1974) แยกแบคทีเรีย *Pseudomonas* sp. ที่สามารถย่อยสลายพาราไนโตรฟีนอลได้จากดินอีกเช่นเดียวกัน เมื่อติดตามกลไกการย่อยสลาย สรุปได้ว่าหลังจากที่พาราไนโตรฟีนอลเปลี่ยนรูปไปเป็นไฮโดรควิโนนแล้วนั้น ไฮโดรควิโนนปลดปล่อยกลุ่มไฮดรอกซิล (hydroxyl group)ออกมาและเปลี่ยนรูปเป็น 1,2,4 เบนซีนทริโอล (1,2,4-benzenetriol)

Sandharar-Barik และ Sethunathan (1978) แยกแบคทีเรียพวก *Pseudomonas* sp. จากดินที่มีการปนเปื้อนพาราไธออนซึ่งเป็นยาปราบวัชพืช แบคทีเรียดังกล่าวย่อยสลายพาราไธออนโดยปฏิกิริยาไฮโดรไลสีส ทำให้พาราไธออนเปลี่ยนรูปเป็นพาราไนโตรฟีนอลอย่างรวดเร็วภายใน 12 ชั่วโมง จากนั้นพาราไนโตรฟีนอลถูกย่อยสลายเปลี่ยนรูปไปตามขั้นตอนการย่อยสลายเช่นเดียวกับรายงานการศึกษาการย่อยสลายพาราไนโตรฟีนอลที่ผ่านมา

Spain และ Gibson (1991) สามารถสกัดเอนไซม์ไนโตรฟีนอลออกซิจิเนส (nitrophenol oxygenase) ได้จากแบคทีเรีย *Moraxella* sp. ที่แยกจากตะกอน(sludge) ในระบบบำบัดน้ำเสียแบบตะกอนเร่ง (activated sludge wastewater treatment plant) เอนไซม์นี้ทำหน้าที่ย่อยสลายพาราไนโตรฟีนอล โดยปฏิกิริยาที่เกิดขึ้น มีออกซิเจนเป็นตัวรับอิเลกตรอน จากการติดตามกลไกการย่อยสลายพาราไนโตรฟีนอลจนกระทั่งเป็นไฮโดรควิโนนพบว่าปฏิกิริยาที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลาย เป็นปฏิกิริยาโมโนออกซีจีเนชั่น (monooxygenation) ที่ต้องการออกซิเจนในขั้นตอนการย่อยสลาย มี NADPH เป็นตัวให้อิเลกตรอน โดยการย่อยสลายต้องการ NADPH 2 โมลในการย่อยสลายพาราไนโตรฟีนอล 1 โมล ในระหว่างการย่อยสลายเกิดพาราเบนโซควิโนนขึ้นเป็นสารตัวกลาง (intermidiate) และพาราเบนโซควิโนนเปลี่ยนรูปเป็นไฮโดรควิโนนอย่างรวดเร็ว ต่อมาปี คศ. 1991 นักวิทยาศาสตร์ทั้งสองท่านทำการศึกษากลไกการย่อยสลายของแบคทีเรีย *Moraxella* sp. อย่างละเอียดและเสนอกลไกการย่อยสลายพาราไนโตรฟีนอลไว้ ดังแสดงในรูปที่ 6 โดยหลังจากที่พาราไนโตรฟีนอลเปลี่ยนรูปเป็นไฮโดรควิโนนแล้ว ขั้นตอนหลังจากนั้น แบคทีเรียใช้ FAD (flavin adenine dinucleotide) เป็นสารเร่ง (catalyse)ในขบวนการย่อยสลาย เป็นผลให้อะโรมาติกริงแตกออกเกิดเป็นสารใหม่ คือ แกมมาไฮดรอกซีมูโคนิกเซมิอัลดิไฮด์ (γ-hydroxymuconic semialdehyde) ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นเป็นปฏิกิริยาไดออกซิจิเนชั่น (dioxygenation) เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องในขั้นนี้ต้องการเฟอรัสอิออน (ferrous ions) เพื่อเร่งการย่อยสลายให้เกิดเป็นสารใหม่ คือ เบตาคีโตอะดิเพต (β-ketoadipate)ต่อไป (Spain and Gipson, 1991) และ Nishino และ Spain (1993) แยกแบคทีเรีย *Pseudomonas putida* จากบึงน้ำจืด ที่มีพาราไนโตรฟีนอล ปนเปื้อนอยู่ เมื่อทำการเลี้ยงบ่มเพาะแบคทีเรียดังกล่าวในอาหารเลี้ยงเชื้อผสมพาราไนโตรฟีนอลแล้วนำเซลล์แบคทีเรียที่ได้จากการบ่มเพาะมาใช้ทดสอบการย่อยสลายพาราไนโตรฟีนอลและไฮโดรควิโนน ผลการทดสอบพบว่าการย่อยสลายสารทั้งสองชนิดดังกล่าวเกิดขึ้นอย่างรวดเร็วและมีเอนไซม์ที่เกี่ยวข้อง 3 ชนิด ได้แก่ พาราไนโตรฟีนอลออกซิจิเนส (*p*-nitrophenol monooxygenase) ไฮโดรควิโนนออกซิจิเนส (hydroquinone oxygenase) และ 1,2,4 เบนซีจิโทรลออกซิจิเนส (1,2,4-benzenetriol oxygenase) ผลที่ได้แสดงว่า แบคทีเรีย *Pseudomonas putida* มีขั้นตอนการย่อยสลายเช่นเดียวกับที่ Spain และ Gibson เสนอไว้ในแบคทีเรียพวก *Moraxella* sp. ขั้นตอนการย่อยสลายพาราไนโตรฟีนอลโดย *Pseudomonas putida* แสดงในรูปที่ 6 Jain และคณะ (1994) ทำการศึกษาขั้นตอนการย่อยสลายพาราไนโตรฟีนอลโดยแบคทีเรียพวก *Arthrobacter* sp. เมื่อติดตามการย่อยสลายพบว่าในช่วงที่แบคทีเรียย่อยสลายในขั้นแรก ปฏิกิริยาที่เกี่ยวข้อง คือ โมโนออกซิจิเนส คะตะไลสด์ ไฮดรอกซิเลชั่น (monooxygenase-catalyzed hadroxylation) โดยปฏิกิริยาดังกล่าวเกิดขึ้นที่ตำแหน่งที่ 2 หรือ 3 ของริง สารที่เกิดขึ้นในขั้นแรกของการย่อยสลาย คือ พาราไนโตรรีซอซินอล (4-nitroresorcinol) หรือพาราไนโตรเคทีโคล (4-nitrocatechol) หลังจากนั้นเกิดปฏิกิริยาออกซิจิเนชั่นกำจัดกลุ่มไนโตร ออกและเกิดเป็น 1,2,4 เบนซีนีโทรล ในขั้นต่อไปออโทริง(ortho ring) แตกออกกลายเป็นกรด มาเลอะซิติก (maleyacetic acid) ที่ย่อยสลายต่อไปเป็นเบตาคีโตอะดิเพต ขั้นตอนการย่อยสลายแสดงในรูปที่ 7



รูปที่ 6 ขั้นตอนการย่อยสลายพาราไนโตรฟีนอลโดยแบคทีเรียพวก *Moraxella* sp. (Spain and Gibson,1991) และแบคทีเรียพวก *Pseudomonas putida* (Nishino and Spain, 1993)



รูปที่ 7 ขั้นตอนการย่อยสลายพาราไนโตรฟีนอลโดยแบคทีเรีย *Arthrobacter* sp. (Jain et al., 1994)

เมื่อเปรียบเทียบขั้นตอนการย่อยสลายพาราไนโตรฟีนอลโดยแบคทีเรีย *Moraxella* sp. และ *Arthrobacter* sp. เห็นได้ว่าในขั้นแรกของการย่อยสลายพาราไนโตรฟีนอลโดยแบคทีเรียทั้งสองชนิดแตกต่างกัน โดย *Moraxella* sp. ย่อยสลายพาราไนโตรฟีนอลเกิดเป็นไฮโดรควิโนนและปลดปล่อยไนไตร์ออกมาก่อนการย่อยสลายในลำดับต่อไป ส่วน *Arthrobacter* sp. ในขั้นแรกของการย่อยสลาย พาราไนโตรฟีนอลเปลี่ยนรูปเป็นพาราไนโตรรีซอซิโนลก่อนปลดปล่อยไนไตร์ออกมาและเกิดเป็น 1,2,4 เบนซีนีโทรล จากนั้นแบคทีเรียทั้งสองชนิดจึงมีการย่อยในลำดับต่อไปจนเป็นสารประกอบ สุดท้ายเช่นเดียวกัน

วิธีการแยกเชื้อจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการย่อยสลายพาราไนโตรฟีนอล

จุลินทรีย์ในธรรมชาติต้องการสารอาหารและพลังงานในการเจริญเติบโต ซึ่งแหล่งอาหารและพลังงานที่จุลินทรีย์นำไปใช้ประโยชน์มีอยู่ในธรรมชาติ นอกจากนี้ยังมีจุลินทรีย์บางชนิดที่สามารถในประโยชน์จากสารสังเคราะห์ต่าง ๆ ที่ปนเปื้อนอยู่ในสภาพแวดล้อมที่เป็นแหล่งอาศัยของจุลินทรีย์เหล่านั้นเพื่อเป็นแหล่งอาหารและพลังงานสำหรับการเจริญเติบโต ซึ่งวิธีการที่ใช้สำหรับการแยกเชื้อจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการย่อยสลายพาราไนโตรฟีนอล ได้นำหลักการที่เรียกว่า “เอนริชเมนท์-คัลเจอร์ เทคนิค” (enrichment-culture technique) มาใช้ โดยนำตัวอย่างดิน น้ำเสียหรือตะกอนต่าง ๆ ที่ต้องการแยกหาเชื้อจุลินทรีย์สายพันธุ์ที่มีความสามารถ

ในการย่อยสลายสารปนเปื้อนชนิดที่สนใจศึกษามาเจือจางและเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่มีสารปนเปื้อนนั้นเป็นแหล่งคาร์บอน จุลินทรีย์ที่สามารถดึงคาร์บอนจากสารปนเปื้อนมาใช้จะเพิ่มจำนวนขึ้นและเป็นสายพันธุ์ที่มีปริมาณสูงสุดในอาหารเลี้ยงเชื้อ จากนั้นจึงถ่ายจุลินทรีย์ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง ชนิดที่มีสารปนเปื้อนที่สนใจเป็นแหล่งคาร์บอนร่วมอยู่กับสารอาหารอื่น ๆ เมื่อทำการถ่ายเชื้อจนได้สายพันธุ์บริสุทธิ์ จึงทำการเก็บรักษาสายพันธุ์นั้นไว้สำหรับการทดสอบการย่อยสลายสารปนเปื้อนดังกล่าวต่อไป (Alexander, 1994)

วิธีการแยกเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ที่มีความสามารถในการย่อยสลายพาราไนโตรฟีนอล ดังแสดงต่อไปนี้

วิธีการของ Munnecke และ Hsieh(1974)

ทำการแยกจุลินทรีย์จากน้ำเสียและดินที่มีการปนเปื้อนพาราไธออนซึ่งเป็นสารปราบศัตรูพืชที่เกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลสีสแล้วเกิดเป็นพาราไนโตรฟีนอล โดยนำตัวอย่างน้ำเสียและดินมาเลี้ยงด้วยอาหารเหลว Burk mineral salt solution ประกอบด้วยสารอาหารต่าง ๆ ได้แก่

K_2HPO_4	0.2	กรัม
KH_2PO_4	0.8	กรัม
$MgSO_4$	0.2	กรัม
$CaSO_4.H_2O$	0.1	กรัม
$Na_2MoO_4.2H_2O$	0.0033	กรัม
$FeSO_4.7H_2O$	0.005	กรัม
$(NH_4)_2SO_4$	1.0	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

ผสมพาราไธออน 1 % และพาราไนโตรฟีนอล 0.005% เพื่อเป็นแหล่งคาร์บอน ปรับค่าความเป็นกรดด่างให้เป็น 7.2 นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

เมื่อมีเชื้อเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว จึงถ่ายเชื้อลงอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง mineral salts ที่มีส่วนผสม ได้แก่

KH_2PO_4	1.0	กรัม
K_2HPO_4	1.0	กรัม
NaCl	1.0	กรัม
$MgSO_4.7H_2O$	0.7	กรัม

$(NH_4)_2SO_4$	4.0	กรัม
Na-Citrate. $2H_2O$	5.0	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร
Agar	15	กรัม

โดยมีพาราไนโตรฟีนอล 0.05% เป็นแหล่งคาร์บอน ปรับค่าความเป็นกรดด่างให้เป็น 7.2 นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

วิธีการของ Spain (1980)

นำตัวอย่างน้ำและตะกอนมาทำให้เจือจาง นำมาลากเขี่ยเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง เลี้ยงบ่มเชื้อเป็นเวลา 5 วัน ที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียสเมื่อมีโคโลนีที่เจริญจึงทำการแยกแบคทีเรียนั้นออก มา โดยใช้ซีเลกทีฟ เอนริชเมนท์(selective enrichment) ที่มีพาราไนโตรฟีนอลผสมอยู่ด้วย เลี้ยงแบบเขย่าที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ตรวจวัดปริมาณพาราไนโตรฟีนอลที่ลดลง

อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ ประกอบด้วย

K_2HPO_4	700	มิลลิกรัม
$MgSO_4.H_2O$	112	มิลลิกรัม
$ZnSO_4$	5	มิลลิกรัม
$NaMoO_4.2H_2O$	2	มิลลิกรัม
$CaCl_2$	14	มิลลิกรัม
NH_4Cl	500	มิลลิกรัม

ผสมน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร เติมพาราไนโตรฟีนอล 50 มิลลิกรัมต่อลิตร และ yeast extract 50 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อเพิ่มจำนวนแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายไนโตรฟีนอล ได้ ปรับค่าความเป็นกรดด่างเป็น 7.4

วิธีการของ Herman และ Costerton(1993)

จุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายพาราไนโตรฟีนอลได้ ถูกแยกมาจากระบบบำบัดน้ำเสียของโรงงานอุตสาหกรรม ตัวอย่างน้ำและตะกอนที่เจือจางแล้วนำมาเพาะในอาหารเลี้ยงเชื้อ Modified Bushnell and Haas (MBH) minimal salts ซึ่งมีส่วนผสมประกอบด้วย

KH_2PO_4	1.0	กรัม
Na_2HPO_4	1.0	กรัม
$MgSO_4.7H_2O$	0.2	กรัม
$CaCl_2.2H_2O$	0.02	กรัม
$MnSO_4.2H_2O$	0.002	กรัม
$FeCl_3$	0.002	กรัม
NH_4NO_3	0.5	กรัม
$(NH_4)_2SO_4$	0.5	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

ผสมพาราไนโตรฟีนอล 20 มิลลิกรัมต่อลิตรเพื่อเป็นแหล่งคาร์บอน ปรับค่าความเป็นกรดด่างให้เป็น 7 นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที เมื่อทำการเพาะเชื้อไนอาหารเลี้ยงเชื้อ MBH แล้ว สังเกตว่าอาหารเลี้ยงเชื้อขุ่น ทำการถ่ายเชื้อลงในอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MBH ที่ผสมเบรน ฮาร์ท อินฟิวชั่น 3.7 กรัมและพาราไนโตรฟีนอล 20 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยเบรน ฮาร์ท อินฟิวชั่น และพาราไนโตรฟีนอล ทำหน้าที่เป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับการเจริญของจุลินทรีย์ เมื่อมีโคโลนีเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อและสังเกตพบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อเปลี่ยนสีจากสีเหลืองเป็นไม่มีสี ทำการแยกเชื้อจนได้เชื้อบริสุทธิ์สำหรับการทดลองในขั้นต่อไป

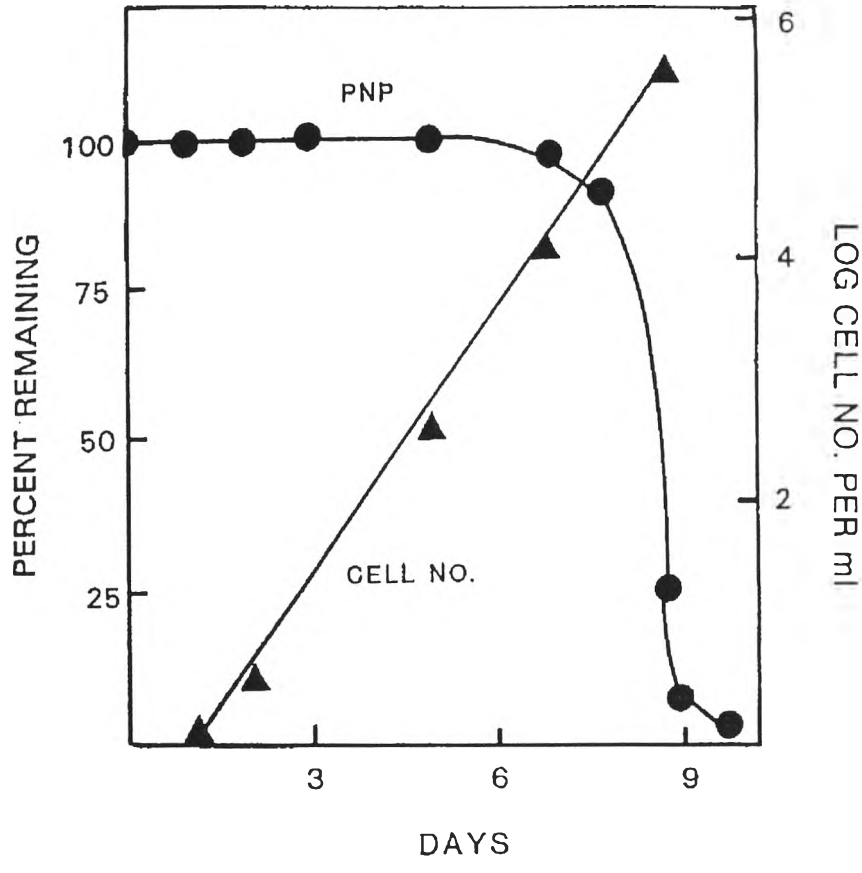
ความสัมพันธ์ระหว่างการย่อยสลายพาราไนโตรฟีนอลกับการเจริญของจุลินทรีย์

การเจริญของจุลินทรีย์จำเป็นต้องมีแหล่งคาร์บอน แหล่งพลังงาน ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส ซัลเฟอร์และธาตุอาหารอื่น ๆที่เหมาะสม ดังนั้น การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างการย่อยสลายทางชีวภาพของอินทรียสารต่าง ๆ กับการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ จึงศึกษาได้จากปริมาณคาร์บอนและพลังงานที่จุลินทรีย์พวกแบคทีเรียและเชื้อราใช้ในการเจริญในระหว่างที่มีการย่อยสลายอินทรียสาร (Medsen, 1998)

การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างการย่อยสลายพาราไนโตรฟีนอลกับการเจริญของจุลินทรีย์ มีรายงานไว้ โดย Wiggins และคณะ (1987) จากการติดตามการเจริญของแบคทีเรียในระบบบำบัดน้ำเสียที่มีการปนเปื้อนของพาราไนโตรฟีนอล พบว่าแบคทีเรียในระบบบำบัดน้ำเสียสามารถย่อยสลายพาราไนโตรฟีนอลได้ และผลการติดตามการเจริญของแบคทีเรียพบว่าจำนวนแบคทีเรียเพิ่มขึ้นหลังจากวันที่ 1 ของการทดสอบและต่อจากนั้นเพิ่มขึ้นเป็นลำดับ โดยแบคทีเรียใช้ธาตุอาหารที่มีอยู่แหล่งน้ำเป็นแหล่งอาหารและพลังงาน ในช่วง 6 วันแรกของการทดสอบ พาราไนโตรฟีนอลในน้ำเสียยังคงอยู่ในปริมาณเท่าเดิม เนื่องจากแบคทีเรียยังมีแหล่งอาหารอื่นและพลังงานที่เพียงพอสำหรับการเจริญเติบโต ประกอบกับพาราไนโตรฟีนอลมีโครงสร้างโมเลกุล ซับซ้อนแบคทีเรียต้องมีระยะเวลาในการปรับตัว (acclimation phase) เพื่อให้สามารถดึงคาร์บอนและไนโตรเจนจากพาราไนโตรฟีนอลมาใช้ จนกระทั่งเมื่อแบคทีเรียเจริญมีจำนวน 10^4 เซลล์ต่อมิลลิลิตร เนื่องจากธาตุอาหารจากแหล่งอื่นในน้ำเสียเริ่มมีไม่เพียงพอต่อความต้องการในการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย แบคทีเรียจึงปรับตัวให้สามารถใช้พาราไนโตรฟีนอลเป็นแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจน พาราไนโตรฟีนอลจึงเริ่มลดลงตั้งแต่วันที่ 6 และลดลงอย่างรวดเร็ว กระทั่งตรวจไม่พบในน้ำเสียในวันที่ 10 ของการทดสอบ (รูปที่ 8)

อย่างไรก็ตาม เมื่อสารเคมีปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อมมีปริมาณน้อยเกินไป จุลินทรีย์จะไม่เลือกใช้สารเคมีนั้นเพื่อประโยชน์ในการเจริญเติบโตแต่จะใช้ประโยชน์แหล่งอาหารอื่น ๆ ที่มีอยู่ในสิ่งแวดล้อม จึงทำให้สารเคมีดังกล่าวตกค้างอยู่เนื่องจากมีปริมาณที่ไม่เพียงพอต่อการใช้ประโยชน์โดยจุลินทรีย์ในธรรมชาติเพื่อเป็นแหล่งอาหารและพลังงานสำหรับการเจริญเติบโต แต่เมื่อสารเคมีปนเปื้อนมีปริมาณมากเกินไปจะเป็นพิษต่อจุลินทรีย์ได้เช่นกันดังนั้นปริมาณการปนเปื้อนที่พอเหมาะ จึงเป็นปัจจัยหนึ่งที่สำคัญต่อการบำบัดสารปนเปื้อนด้วยวิธีทางชีวภาพ (Alexander, 1994)

มีผู้ทำการศึกษาอัตราการเปลี่ยนธาตุคาร์บอนในแหล่งอาหาร(substrate)ไปเป็นเซลล์ของจุลินทรีย์ กล่าวว่า ดังรวบรวมไว้ในตารางที่ 1 โดยเห็นได้ว่าพาราไนโตรฟีนอลเป็นสารเคมีที่จุลินทรีย์นำไปใช้ประโยชน์ในการเจริญของเซลล์ได้น้อยมาก เมื่อเปรียบเทียบกับสารอื่น ๆ



รูปที่ 8 ความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญเติบโตของแบคทีเรียในน้ำเสียกับการย่อยสลายพาราไนโตรฟีนอล (Wiggins et al., 1987)

Spain และ Veld (1983) รายงานว่า จุลินทรีย์มีการปรับตัวให้สามารถย่อยสลายพาราไนโตรฟีนอลได้เร็วขึ้น หลังจากที่มีการเติมสารดังกล่าวลงในตัวอย่างตะกอนและตัวอย่างน้ำจากแม่น้ำเพื่อปรับสภาพให้จุลินทรีย์มีความคุ้นเคยกับการปนเปื้อนของพาราไนโตรฟีนอลก่อนการนำจุลินทรีย์มาทดสอบการย่อยสลาย โดยศึกษาพบว่าจุลินทรีย์ที่แยกมาจากตัวอย่างน้ำจืดที่มีการปนเปื้อนพาราไนโตรฟีนอลจะสามารถย่อยสารดังกล่าวได้อย่างรวดเร็ว ส่วนจุลินทรีย์ที่แยกมาจากตัวอย่างน้ำกร่อยและน้ำทะเลที่มีการเติมพาราไนโตรฟีนอลลงไปในลักษณะเดียวกันกับที่ทำการทดลองในน้ำจืด จุลินทรีย์ไม่มีการปรับตัวให้สามารถย่อยสลายพาราไนโตรฟีนอลได้เร็วขึ้น ระยะเวลาที่จุลินทรีย์ใช้ในการปรับตัวเพื่อให้สามารถย่อยสลายพาราไนโตรฟีนอลได้อยู่ในช่วง 40 ถึง 80 ชั่วโมง

ตารางที่ 1 อัตราการเปลี่ยนคาร์บอนจากแหล่งอาหาร (substrate) ไปเป็นเซลล์จุลินทรีย์

จุลินทรีย์	แหล่งอาหาร	%การเปลี่ยนคาร์บอนจากแหล่งอาหารเป็นเซลล์จุลินทรีย์	รายการอ้างอิง
กลุ่มจุลินทรีย์ในบึง	ฟีนอล	20-25	Chesney และคณะ (1985)
กลุ่มจุลินทรีย์ในทะเลสาบ	อะนีลีน (Aniline)	40-60	Hoover และคณะ (1986)
กลุ่มจุลินทรีย์ในทะเลสาบ	พาราไนโตรฟีนอล	<10	Hoover และคณะ (1986)
กลุ่มจุลินทรีย์ในดิน	2,4-D	19-92	Stott และคณะ (1983)
กลุ่มจุลินทรีย์ในดิน	กลูโคส	17-53	Martin และ Haider (1979)

Nyholm และคณะ (1984) รายงานว่าความเข้มข้นของพาราไนโตรฟีนอลในน้ำเสียมีผลต่อระยะเวลาในการปรับตัวของจุลินทรีย์เพื่อให้สามารถย่อยสลายพาราไนโตรฟีนอลได้ โดยถ้าความเข้มข้นของพาราไนโตรฟีนอลสูง จุลินทรีย์ต้องใช้ระยะเวลาในการปรับตัวนาน จึงทำให้พาราไนโตรฟีนอลตกค้างอยู่ในสิ่งแวดล้อมเป็นระยะเวลานาน นอกจากนี้ ระยะเวลาของการปรับตัวของสารชนิดเดียวกันยังแตกต่างกันไปในแต่ละพื้นที่และมีจุลินทรีย์บางสายพันธุ์สามารถย่อยสลายสารปนเปื้อนได้ทันทีโดยไม่ต้องมีระยะเวลาในการปรับตัวหรือในทางตรงกันข้ามจุลินทรีย์บางชนิดก็ไม่สามารถย่อยสลายสารปนเปื้อนได้เลยแม้จะอยู่ในภาวะที่มีการปนเปื้อนเป็นเวลานาน (Alexander, 1994)

ปัจจัยสิ่งแวดล้อมที่มีผลต่อการย่อยสลายสารปนเปื้อนต่าง ๆ โดยจุลินทรีย์

การศึกษาปัจจัยสิ่งแวดล้อมต่าง ๆ เป็นสิ่งที่จำเป็นสำหรับการควบคุมภาวะที่เหมาะสมสำหรับการย่อยสลายสารปนเปื้อนโดยจุลินทรีย์ ซึ่งจะช่วยให้ความสามารถในการย่อยสลายสารปนเปื้อนเหล่านั้นคงอยู่ได้ โดยอัตราการย่อยสลายสารปนเปื้อนโดยจุลินทรีย์สามารถเพิ่มขึ้นได้หากมีการควบคุมปัจจัยสิ่งแวดล้อมให้เหมาะสม ปัจจัยที่สำคัญ ได้แก่

อุณหภูมิ

อุณหภูมิเป็นปัจจัยที่สำคัญที่สุดในการย่อยสลายสารปนเปื้อนในสภาพธรรมชาติ บริเวณผิวน้ำหรือผิวดิน ในประเทศที่มีอากาศหนาวจัด เช่น ประเทศแถบอเมริกาเหนือและยุโรป เมื่อเข้าสู่ฤดูหนาว อากาศหนาวจัด จนกระทั่งน้ำในดินและน้ำในแหล่งน้ำธรรมชาติกลายเป็นน้ำแข็ง กิจกรรมการย่อยสลายสารปนเปื้อนโดยจุลินทรีย์จะหยุดชะงักลง จนกระทั่งเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นและเข้าสู่ฤดูกาลที่อากาศอบอุ่น จุลินทรีย์จึงเริ่มการย่อยสลายสารที่ตกค้างอยู่ในสิ่งแวดล้อม ซึ่งสะสมมาตั้งแต่ช่วงฤดูหนาว (Alexander, 1995) นอกจากนี้ อุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการย่อยสลายสารปนเปื้อนโดยจุลินทรีย์แต่ละชนิดยังมีความแตกต่างกัน Sarnaik และ Kanekar (1995)ทดสอบการย่อยสลายฟีนอลโดยแบคทีเรียที่แยกจากดินบริเวณโรงงานฟอกย้อมแห่งหนึ่งในประเทศอินเดีย จากการศึกษาพบว่าแบคทีเรีย *Pseudomonas* sp. สายพันธุ์ที่แยกได้ สามารถย่อยสลายฟีนอลในน้ำเสียของโรงงานฟอกย้อมได้มากกว่าร้อยละ 80 ในสภาวะที่อุณหภูมิในการย่อยสลายอยู่ในช่วง 28 ถึง 35 องศาเซลเซียส

ค่าความเป็นกรดด่าง

ในสภาวะการย่อยสลายสารปนเปื้อนทั่วไป ค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมอยู่ในช่วงที่เป็นกลาง การเปลี่ยนแปลงของค่าความเป็นกรดด่างจะส่งผลกระทบต่อการย่อยสลายสารปนเปื้อนที่เกิดขึ้นมาก ถ้าหากการย่อยสลายเกิดขึ้นโดยความสามารถของจุลินทรีย์เพียงชนิดเดียว เนื่องจากในสภาวะที่มีจุลินทรีย์เพียงหนึ่งชนิดสามารถย่อยสลายสารชนิดใดชนิดหนึ่งที่ตกค้างอยู่ในสิ่งแวดล้อมได้ เมื่อค่าความเป็นกรดด่างเปลี่ยนแปลงไปจากสภาวะที่เหมาะสม จุลินทรีย์ชนิดนั้นต้องใช้เวลาในการปรับตัวให้เข้ากับสภาพแวดล้อมใหม่ หรือหากจุลินทรีย์ไม่สามารถปรับตัวให้สามารถดึงสารอาหารและพลังงานจากสารปนเปื้อนมาใช้ประโยชน์ในการเจริญได้ในสภาพค่าความเป็นกรดด่างที่เปลี่ยนแปลงไป จุลินทรีย์ก็จะตายลง ทำให้สารปนเปื้อนชนิดนั้นตกค้างอยู่ในสิ่งแวดล้อม ส่วนสภาวะที่การย่อยสลายสารปนเปื้อนเกิดขึ้นโดยจุลินทรีย์หลายชนิดร่วมกันย่อยสลายสารปนเปื้อนชนิดเดียวกัน ค่าความเป็นกรดด่างในสภาพแวดล้อมที่เปลี่ยนแปลงไปจะไม่มีผลต่อการย่อยสลายสารปนเปื้อนมากนัก เช่น เมื่อค่าความเป็นกรดด่างเปลี่ยนจากระดับที่เป็นกลางไปเป็นกรด จุลินทรีย์ที่ย่อยสลายสารปนเปื้อนได้ดีในสภาวะที่ค่าความเป็นกรดด่างเป็น

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

กลางจะหยุดกิจกรรมการย่อยสลาย และจุลินทรีย์ที่ย่อยสลายสารปนเปื้อนได้ดีในสภาวะที่เป็นกรดจะมีบทบาทสำคัญในการย่อยสลายแทน(Alexander, 1995) ในการย่อยสลายสารปนเปื้อนในอาหารเลี้ยงเชื้อโดยจุลินทรีย์แต่ละสายพันธุ์ที่แยกมาจากที่ต่าง ๆ ค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมมักตรงหรือใกล้เคียงกับค่าความเป็นกรดด่างในสภาพแวดล้อมที่ทำการเก็บตัวอย่างมาทำการแยกจุลินทรีย์ เช่น จุลินทรีย์ที่แยกมาจากระบบบำบัดน้ำเสียจะเจริญและย่อยสลายสารปนเปื้อนได้ดีในช่วงค่าความเป็นกรดด่างที่ตรวจวัดได้ในน้ำเสียของระบบบำบัดน้ำเสียแห่งนั้น (Sarnaik and Kanekar, 1995)

สารอาหารในธรรมชาติ

ความต้องการสารอาหารในการเจริญของจุลินทรีย์แต่ละชนิดมีความแตกต่างกัน จุลินทรีย์ต่างชนิดกันอาจสามารถใช้ประโยชน์ของสารอาหารในธรรมชาติในรูปที่ต่างกันไป เช่น โดยส่วนใหญ่แบคทีเรียใช้ไนโตรเจนในรูปของกรดอะมิโนและนิวคลีโอไทด์ แต่มีแบคทีเรียตรึงไนโตรเจน (nitrogen fixing bacteria) ที่สามารถใช้ไนโตรเจนในรูปกาซไนโตรเจน (N_2) โดยผ่านกระบวนการตรึงไนโตรเจน จากนั้นเปลี่ยนให้อยู่ในรูปแอมโมเนียและในที่สุด เปลี่ยนเป็นกรดอะมิโนและนิวคลีโอไทด์เพื่อนำไปใช้ประโยชน์ต่อไป สารอาหารที่จำเป็นต่อจุลินทรีย์ประกอบด้วย กลูโคส แอมโมเนียมซัลเฟต โปแตสเซียมฟอสเฟต แมกนีเซียมซัลเฟตและไอออนซัลเฟต ธาตุอาหารที่ต้องการในปริมาณน้อย เช่น แมงกานีส แคลเซียม โคบอลต์และซิงค์ (อรษา สุตเธียรกุล และพิมพ์พันธุ์ เลียงพิบูลย์, 2536) ในการย่อยสลายสารปนเปื้อนโดยจุลินทรีย์ เมื่อมีการเติมธาตุอาหารบางชนิดลงไประหว่างการย่อยสลายสารปนเปื้อน อาจทำให้การย่อยสลายสารปนเปื้อนเกิดได้เร็วขึ้น ดังรายงานการศึกษาของ Lewis, Kollig และ Hodson (1985) ที่ระบุว่าแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายพาราครีโซล (*p*-cresol) จะสามารถย่อยสลายพาราครีโซลได้ดีขึ้น เมื่อเติมฟอสฟอรัสลงไปในระหว่างทำการทดสอบการย่อยสลายพาราครีโซลโดยจุลินทรีย์ในทะเลสาบ เมื่อฟอสฟอรัสในน้ำมีปริมาณสูงกว่า 0.01 มิลลิกรัมต่อลิตร จุลินทรีย์สามารถย่อยสลายพาราครีโซลที่ความเข้มข้น 0.01 ไมโครกรัมต่อลิตรได้เร็วขึ้น โดยย่อยสลายพาราครีโซลได้หมดก่อนถึง 20 ชั่วโมง เมื่อเปรียบเทียบกับน้ำที่มีฟอสฟอรัสต่ำกว่า 0.01 มิลลิกรัมต่อลิตร

การใช้ไคเนติกส์ (Kinetics) ในการศึกษาการย่อยสลายสารปนเปื้อนโดยจุลินทรีย์

การนำความรู้ด้านไคเนติกส์มาใช้ในการศึกษาการย่อยสลายสารปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อมมีประโยชน์ต่อการประเมินความรุนแรงของภาวะการตกค้างของสารเคมีในสิ่งแวดล้อม โดยทำการศึกษาใน 2 รูปแบบ ได้แก่ รูปแบบแรกเป็นการศึกษาปัจจัยต่าง ๆ อาทิ อุณหภูมิ ค่าความเป็นกรดต่าง ความชื้นในดิน และแหล่งอาหารอื่นในสิ่งแวดล้อม ที่มีผลต่อการย่อยสลายสารปนเปื้อน และรูปแบบที่สองเป็นการติดตามการลดลงของสารปนเปื้อนต่อระยะเวลาที่ผ่านไป ทั้งในระดับห้องปฏิบัติการและในสถานที่ที่มีการปนเปื้อนจริงเพื่อศึกษารูปแบบการย่อยสลาย

สำหรับการติดตามการย่อยสลายสารปนเปื้อนโดยจุลินทรีย์นั้น จำแนกได้ 2 ประเภท ดังนี้

1. ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างการย่อยสลายสารปนเปื้อนในภาวะที่มีการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ในระหว่างที่มีการย่อยสลาย

การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างการย่อยสลายสารปนเปื้อนและการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ในระหว่างที่มีการย่อยสลายมีสมการหลักที่เกี่ยวข้องคือสมการของโมโนด(monod's equation) ซึ่งเป็นสมการที่แสดงถึงการเจริญของแบคทีเรียโดยใช้ประโยชน์จากสารปนเปื้อน เพื่อเป็นแหล่งอาหารและพลังงาน สมการของโมโนด แสดงดังต่อไปนี้

$$\mu = \frac{\mu_{max} S}{K_s + S}$$

μ คือ อัตราการเจริญของเชื้อแบคทีเรียในระหว่างการย่อยสลายสารปนเปื้อน

μ_{max} คือ อัตราการเจริญสูงสุดของเชื้อแบคทีเรียในระหว่างการย่อยสลายสารปนเปื้อน

K_s คือ ค่าคงที่ที่แสดงความเข้มข้นของสารปนเปื้อนที่ทำให้อัตราการเจริญของแบคทีเรียเป็นครึ่งหนึ่งของอัตราการเจริญสูงสุด

ความสัมพันธ์ระหว่างการย่อยสลายสารปนเปื้อนในภาวะที่มีการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ในระหว่างที่มีการย่อยสลาย สามารถแบ่งได้เป็น 3 ลักษณะ ได้แก่ ภาวะที่การทดลองมีสารอาหารที่เป็นแหล่งคาร์บอน แหล่งพลังงานและแหล่งอาหารอื่น ๆ ร่วมอยู่กับสารปนเปื้อนในปริมาณที่สมบูรณ์สำหรับการเจริญของจุลินทรีย์ ในภาวะเช่นนี้ การย่อยสลายสารปนเปื้อนเป็นไปได้ช้าในช่วงต้น เนื่องจากจุลินทรีย์ยังมีแหล่งอาหารอื่นที่เพียงพอต่อการใช้ประโยชน์ในการ

เพิ่มจำนวน จนกระทั่งเมื่อระยะเวลาผ่านไป จุลินทรีย์เพิ่มจำนวนมากขึ้น ปริมาณอาหารที่มีอยู่มีไม่เพียงพอสำหรับความต้องการในการเจริญ จุลินทรีย์จึงใช้สารปนเปื้อนในการเจริญ ความสัมพันธ์ในลักษณะนี้ เรียกว่า "ลอกาลิทึ่ม ไคเนติกส์" (logarithmic kinetics) (Simkins and Alexander, 1984) ส่วนในภาวะที่ปริมาณความเข้มข้นของสารปนเปื้อนมีน้อยมากและไม่มีแหล่งอาหารและพลังงานอื่นนอกเหนือไปจากสารปนเปื้อนนี้ จุลินทรีย์จึงใช้ประโยชน์จากสารปนเปื้อน เพื่อเป็นแหล่งคาร์บอน พลังงาน หรือสารอาหารอื่นสำหรับการเจริญเติบโต ดังนั้นสารปนเปื้อนจึงมีปริมาณลดลงอย่างรวดเร็ว ตั้งแต่ในช่วงแรกของการทดลอง ความสัมพันธ์ในลักษณะนี้ เรียกว่า "ลอจีสติก ไคเนติกส์"(logistic kenetics) สำหรับในภาวะที่ปริมาณความเข้มข้นของสารปนเปื้อนมีปริมาณที่พอเหมาะ รูปแบบการย่อยสลายสารปนเปื้อนจะเป็นรูปแบบที่ซับซ้อนและคาดหมายการลดลงของสารปนเปื้อนได้ยากขึ้น อัตราการเจริญของจุลินทรีย์ไม่ได้ขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของสารปนเปื้อนแต่เพียงอย่างเดียว ดังเช่นลักษณะของลอจีสติก ไคเนติกส์ แต่จุลินทรีย์จะใช้ประโยชน์สารปนเปื้อนนี้ควบคู่ไปกับแหล่งอาหารอื่นในช่วงแรกของการปนเปื้อน จึงทำให้อัตราการย่อยสลายเป็นไปได้ช้าและอัตราการย่อยสลายเพิ่มขึ้นเมื่อเวลาผ่านไประยะหนึ่ง ความสัมพันธ์ในลักษณะนี้ เรียกว่า "โมโนด ไคเนติกส์ แบบที่มีการเจริญของจุลินทรีย์" (monod with growth kinetics)

อย่างไรก็ตาม ในภาวะที่สารปนเปื้อนมีปริมาณความเข้มข้นสูงมากเกินระดับที่จุลินทรีย์จะสามารถย่อยสลายสารดังกล่าวได้ อัตราการเจริญของจุลินทรีย์จะลดลงและยิ่งเพิ่มความเข้มข้นของสารปนเปื้อนในระดับสูงขึ้น อัตราการเจริญของจุลินทรีย์ก็ยิ่งลดต่ำลงเรื่อย ๆ ลักษณะความสัมพันธ์เช่นนี้ อธิบายได้ด้วยสมการของฮาลเดน(haldane's equation) ดังแสดงในสมการดังต่อไปนี้

$$\mu = \frac{\mu_{max} S}{K_s + S + (S^2/K_i)}$$

μ คือ อัตราการเจริญของเชื้อแบคทีเรียในระหว่างการย่อยสลายสารปนเปื้อน

μ_{max} คือ อัตราการเจริญสูงสุดของเชื้อแบคทีเรียในระหว่างการย่อยสลายสารปนเปื้อน

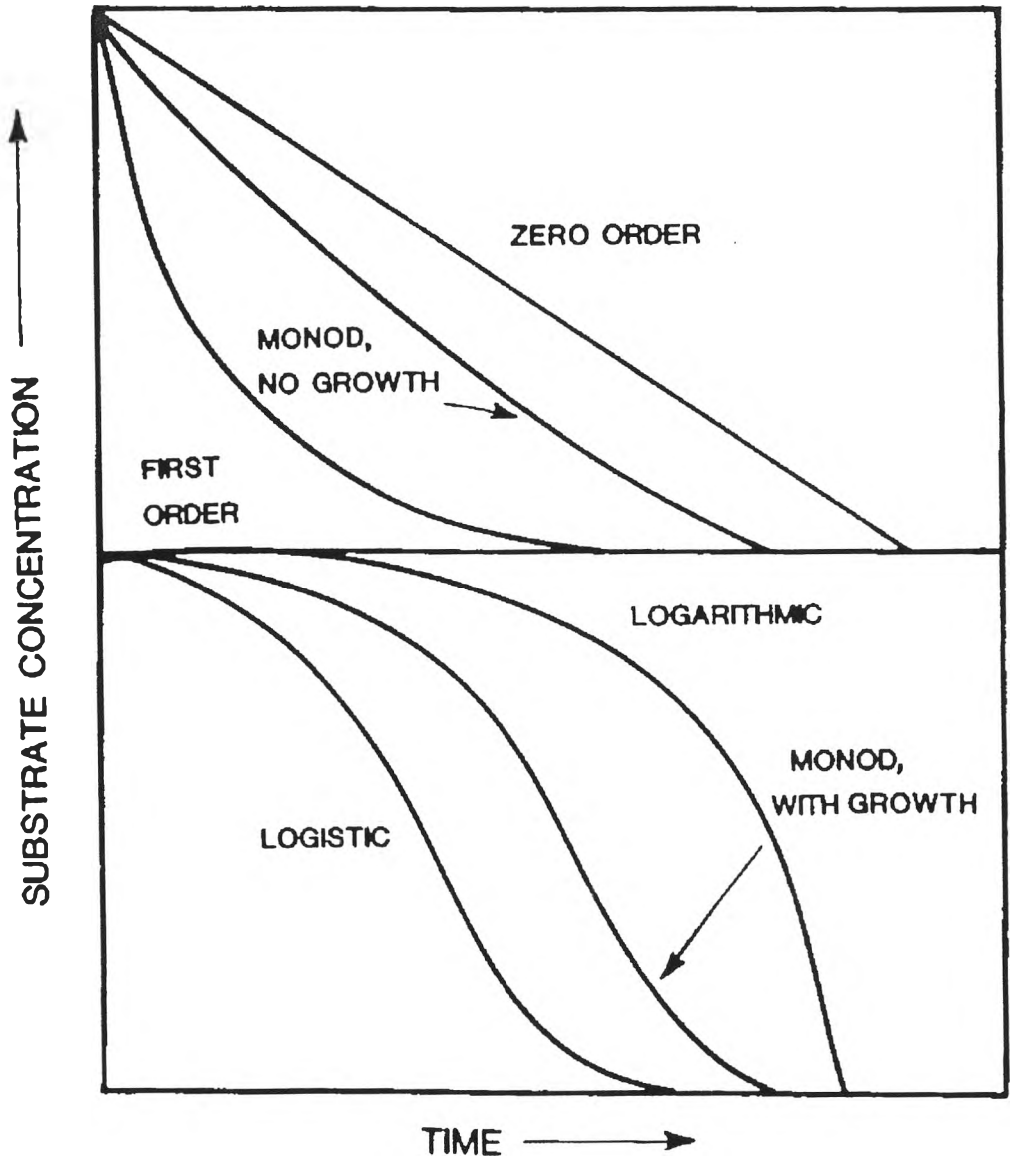
K_s คือ ค่าคงที่ที่แสดงความเข้มข้นของสารปนเปื้อนที่ทำให้อัตราการเจริญของแบคทีเรียเป็นครึ่งหนึ่งของอัตราการเจริญสูงสุด

K คือ ค่าคงที่ที่แสดงความเข้มข้นสูงสุดของสารปนเปื้อนที่เชื้อแบคทีเรียเจริญได้ โดยที่ความเข้มข้นสูงกว่านั้น อัตราการเจริญของแบคทีเรียลดลง

2. ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างการย่อยสลายสารปนเปื้อนในภาวะที่ไม่มีการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ในระหว่างที่มีการย่อยสลาย

ในการศึกษาความสัมพันธ์ในรูปแบบนี้ ตั้งสมมุติฐานไว้ว่าในภาวะนั้นมีจำนวนเซลล์จุลินทรีย์ในปริมาณพอเหมาะและจุลินทรีย์ไม่มีการเพิ่มจำนวนในระหว่างที่มีการย่อยสลายสารปนเปื้อน โดยภาวะการทดลองที่มีสารอาหารที่เป็นแหล่งคาร์บอน แหล่งพลังงานและแหล่งอาหารอื่น ๆ ร่วมอยู่กับสารปนเปื้อนในปริมาณที่สมบูรณ์ เอนไซม์ของจุลินทรีย์จะทำหน้าที่ในขบวนการต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายสารปนเปื้อนได้ในอัตราคงที่ ให้กราฟระหว่างความเข้มข้นของสารปนเปื้อนกับระยะเวลาที่ผ่านไปเป็นเส้นตรง เรียกความสัมพันธ์ในลักษณะนี้ว่า "ซีโร ออเดอร์ ไคเนติกส์"(zero-order kinetics) ส่วนในภาวะที่ปริมาณความเข้มข้นของสารปนเปื้อนมีน้อยมากและไม่มีแหล่งอาหารและพลังงานอื่นนอกเหนือไปจากสารปนเปื้อนนี้ กิจกรรมต่างๆ ที่เกิดขึ้นโดยการทำงานของเอนไซม์ของจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายสารปนเปื้อนแปรผันตามความเข้มข้นของสารปนเปื้อน ในช่วงแรกของการย่อยสลายสารปนเปื้อนอัตราของปฏิกิริยาการทำงานของเอนไซม์สูงมาก จากนั้นอัตราการย่อยสลายจะลดตามปริมาณความเข้มข้นของสารปนเปื้อนที่ลดลงไป ความสัมพันธ์ในลักษณะนี้เรียกว่า "เฟิร์ส- ออเดอร์ ไคเนติกส์" (first-order kenetics) สำหรับในภาวะที่ปริมาณความเข้มข้นของสารปนเปื้อนมีปริมาณที่พอเหมาะ จุลินทรีย์ใช้ประโยชน์สารปนเปื้อนควบคู่ไปกับการใช้ประโยชน์จากแหล่งอาหารอื่น อัตราการย่อยสลายค่อนข้างจะสม่ำเสมอและสามารถย่อยสลายได้อย่างรวดเร็ว เมื่อพลอตเส้นกราฟระหว่างความเข้มข้นที่ลดลงต่อระยะเวลาที่ผ่านไปได้เส้นกราฟในลักษณะใกล้เคียงกับเส้นตรง เรียกความสัมพันธ์นี้ว่า "โมโนด ไคเนติกส์ แบบไม่มีการเจริญของจุลินทรีย์" (monod no growth kinetics))(Alexander, 1994)

รูปที่ 9 แสดงให้เห็นความสัมพันธ์ระหว่างการย่อยสลายสารปนเปื้อนกับการเจริญของเชื้อแบคทีเรียในภาวะต่าง ๆ ดังที่อธิบายไว้ข้างต้น



รูปที่ 9 แสดงการย่อยสลายสารปนเปื้อนในลักษณะไคเนติกส์แบบต่าง ๆ (Alexander, 1994)