บทที่ 2

ปริทัศน์วรรณกรรม

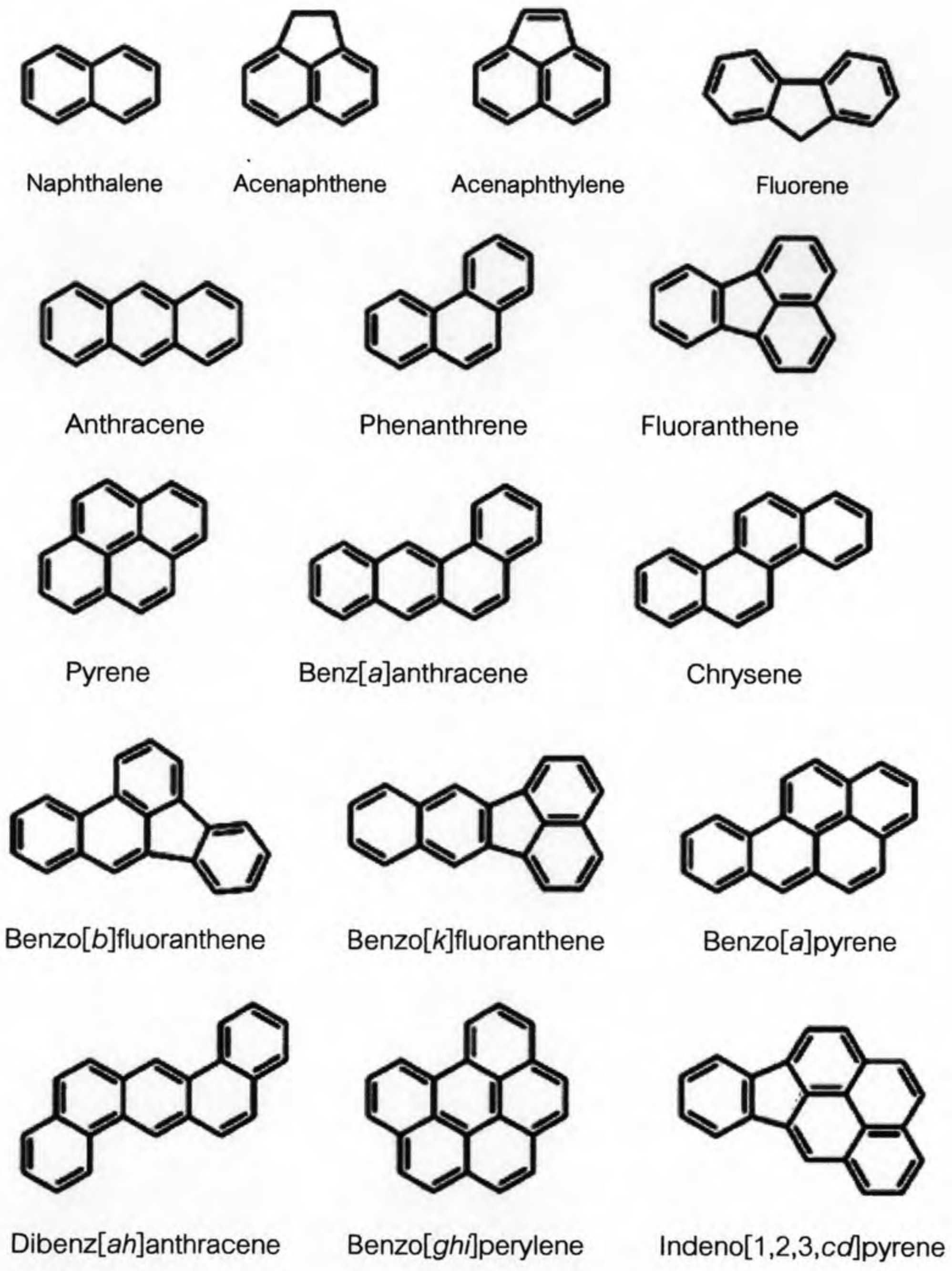
พอลิไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน

พอลิไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน (polycyclic aromatic hydrocarbons, PAHs) เป็นสารประกอบอินทรีย์ที่มีโครงสร้างของอะตอมคาร์บอนและไฮโดรเจน ประกอบกันเป็นวงแหวนอะโรมาติก มีการเรียงตัวเชื่อมต่อกันเป็นเส้นตรง มุมงอ หรือเป็นกลุ่ม ตั้งแต่ 2 วงขึ้นไป (Trzesicka-Mlynarz และ Ward, 1996) พบปนเปื้อนอยู่ทั่วไปในสิ่งแวดล้อมทั้งในแหล่งน้ำ ดิน และอากาศ PAHs เกิดจากกระบวนการสังเคราะห์ตามธรรมชาติ หรือจากกิจกรรมต่างๆ ของมนุษย์ นอกจากนี้ยังพบว่า PAHs เป็นส่วนประกอบของผลิตภัณฑ์น้ำมัน เช่น ดีเซล ปิโตรเลียม น้ำมันหล่อลื่น เป็นต้น

สามารถแบ่ง PAHs ตามโครงสร้างทางเคมีได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่ คือ PAHs ที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ (low molecular weight PAHs, LMW PAHs) ซึ่งเป็นสารที่มีวงแหวนเบนซีนน้อยกว่า 4 วง และ PAHs ที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง (high molecular weight PAHs, HMW PAHs) ซึ่งมีวงแหวนเบนซีนตั้งแต่ 4 วงขึ้นไป (Kanaly และ Harayama, 2000) การจัดเรียงตัวของวงเบนซีนในโครงสร้างทางเคมีของ PAHs มีส่วนทำให้ PAHs แต่ละชนิดมีความคงทนแตกต่างกัน โดยสารที่เรียงตัวเป็นเส้นตรงจะมีความคงทนน้อยกว่าที่เรียงตัวเป็นมุมงอและเรียงตัวเป็นกลุ่ม ตามลำดับ

การปนเปื้อนของ PAHs บริเวณเขตโรงงานอุตสาหกรรมมักเกิดจากสาเหตุการรั่วไหลจากแหล่งเก็บ จากการขนส่ง กระบวนการผลิต การใช้และการกำจัดน้ำมันเชื้อเพลิงที่มี PAHs เป็นองค์ประกอบ จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าสารเหล่านี้มีความเป็นพิษแบบเฉียบพลันและแบบเรื้อรังต่อสิ่งมีชีวิต เป็นสารก่อมะเร็ง สารก่อการกลายพันธุ์ (Wilson และ Jones, 1993) และทำให้ทารกในครรภ์มีรูปร่างผิดปกติ (Narro และคณะ, 1992)

PAHs รวม 16 ชนิด เป็นสารก่อมลพิษที่สำคัญซึ่งหน่วยงานคุ้มครองสิ่งแวดล้อมของสหรัฐอเมริกา (The United State Environment Protection Agency, U.S. EPA) จัดให้อยู่ในกลุ่มของสารก่อมลพิษที่ต้องกำจัดออกจากสิ่งแวดล้อมอย่างเร่งด่วน (Cerniglia, 1992) สารทั้ง 16 ชนิดดังกล่าวมีโครงสร้างดังแสดงในรูปที่ 2.1



รูปที่ 2.1 โครงสร้างโมเลกุลของ PAHs ทั้ง16 ชนิด (Wilson และ Jones, 1993)

แหล่งกำเนิดและวิธีการเข้าสู่สิ่งแวดล้อม

PAHs เกิดจากการเผาไหม้ของสารอินทรีย์แบบไม่สมบูรณ์ ทำให้เกิดการกระจายตัวสู่บริเวณต่างๆ ได้แก่ บรรยากาศ แหล่งน้ำทั้งบริเวณผิวและตะกอน ซึ่งแหล่งกำเนิดของ PAHs มาจาก 2 สาเหตุใหญ่ คือ

1. กระบวนการสังเคราะห์ตามธรรมชาติ โดยเกิดจากปฏิกิริยาการเผาไหม้ของกระบวนการไพโรไลซิส (pyrolysis) ภายใต้พื้นโลกจากความร้อนสูงของลาวาและแมกมาที่ยังไม่เย็นตัวลง ซึ่งทำให้สารประกอบไฮโดรคาร์บอนไพโรไลซิสอย่างช้าๆ จนเกิดการเรียงตัวใหม่ของสายไฮโดรคาร์บอนเป็นวงเบนซีนจาก 1 เป็น 2 และ 3 วง ไปเรื่อยๆ จนทำให้เกิดน้ำมันดิบและถ่านกัมมันต์ซึ่งได้จากซากพืช ต้นไม้ในป่า (Blumer, 1976) นอกจากนี้ยังเกิดจากผลกระทบทางธรรมชาติ เช่น ไฟไหม้ป่า (Chandra และคณะ, 1996) ภูเขาไฟระเบิด และการรั่วซึมของน้ำมันตามธรรมชาติ (Cerniglia, 1992)

2. กิจกรรมของมนุษย์ เกิดจากการเผาทำลายสิ่งต่างๆ การใช้น้ำมันดิบ เชื้อเพลิงฟอสซิล การกลั่นน้ำมันปิโตรเลียมและผลิตภัณฑ์ต่างๆ ที่ได้จากน้ำมันดิบ ซึ่งเป็นเชื้อเพลิงหลักในปัจจุบัน (Jones และคณะ, 1989) เขม่าควันจากท่อไอเสียรถยนต์ นอกจากนี้พบว่าในควันบุหรี่ประกอบด้วย PAHs ที่สำคัญหลายชนิด รวมทั้ง PAHs ที่เป็นสารก่อมะเร็ง ซึ่งเกิดจากการเผาไหม้ของกรดอะมิโนฟีนิลอะลานีนที่เป็นองค์ประกอบหลักในบุหรี่และชาที่ใช้ดื่ม (Grimmer และคณะ, 1977; Neurath, 1972; Wang และคณะ, 2004; Fiedler และคณะ, 2002)

การปนเปื้อนของ PAHs ในสิ่งแวดล้อมเกิดจากหลายสาเหตุ เช่น เกิดจากการรั่วไหลของของเสียในโรงงานอุตสาหกรรม หรืออุบัติเหตุในระหว่างการขนส่ง รวมไปถึงการใช้สารประเภทนี้ในอุตสาหกรรมต่างๆ ซึ่ง Cerniglia (1992) และ Wilson และ Jones (1993) ได้สรุปแหล่งกำเนิดและวิธีการเข้าสู่สิ่งแวดล้อมของ PAHs ไว้ดังนี้

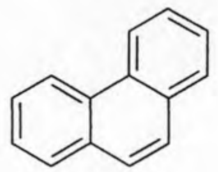
แหล่งกำเนิดและวิธีการเข้าสู่สิ่งแวดล้อมของ PAHs

กระบวนการแยกและแปรสภาพธรรมชาติก๊าซธรรมชาติจากเชื้อเพลิงฟอสซิล
การใช้พลังงานและความร้อนจากเชื้อเพลิงฟอสซิล
กระบวนการกลั่นน้ำมันดิบ และผลิตภัณฑ์ที่ได้จากน้ำมันดิบ
กระบวนการผลิตถ่านโค้ก (coke production)
การผลิตและการใช้คาร์บอนแบล็ค (carbon-black)
การผลิตและการใช้แอสฟัลท์ (asphalt)
กระบวนการรักษาเนื้อไม้ (wood-treatment process)
การผลิตผลิตภัณฑ์ถนอมเนื้อไม้ที่ใช้ครีโอโสท (creosote) เป็นองค์ประกอบหลัก
การเก็บ การขนส่ง กระบวนการผลิต การใช้และการกำจัดน้ำมันเชื้อเพลิง
การกำจัดสิ่งปฏิกูลโดยการฝังดิน (land fill)
การเผาไหม้ของถ่านหินในระบบแบบเปิด
การเผาสิ่งปฏิกูล (incineration)
การซึมของน้ำมันดิบในธรรมชาติ
การรั่วไหลที่เกิดจากอุบัติเหตุจากเรือบรรทุกน้ำมันและเรือชนิดอื่น
การแพร่กระจายของน้ำเสียชุมชนและอุตสาหกรรมปิโตรเคมี
การแพร่กระจายของอนุภาคเถ้าถ่าน และฝุ่นละอองในบรรยากาศ
ควันจากถ่านหุงต้ม และอาหารประเภทปิ้งและย่าง
ควันจากบุหรี่และยาสูบ
ควันจากไอเสียรถยนต์
ไฟป่าและการเผาหญ้า

ที่มา : Cerniglia, 1992; Wilson และ Jones, 1993

ฟีแนนทรีน (Phenanthrene)

ฟีแนนทรีน (phenanthrene) เป็นสารประกอบอินทรีย์ชนิดหนึ่งในกลุ่มพอลิไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน ที่มีโครงสร้างโมเลกุลประกอบด้วยวงเบนซีน 3 วงเชื่อมต่อกันเป็นมุมงอ ดังแสดงในรูปที่ 2.2 และมีสมบัติดังแสดงในตารางที่ 2.1



รูปที่ 2.2 โครงสร้างโมเลกุลของฟีแนนทรีน (Chang และคณะ, 2002)

ตารางที่ 2.1 สมบัติของฟีแนนทรีน

สมบัติ	ลักษณะ
สูตรโมเลกุล	$C_{14}H_{10}$
น้ำหนักโมเลกุล	178.23
ชื่อสามัญ	ฟีแนนเทรน (Phenanthren) ฟีแนนทริน (Phenantrin)
ความถ่วงจำเพาะ	1.025
อุณหภูมิหลอมเหลว	100°ซ
อุณหภูมิกลายเป็นไอ	339°ซ
ความหนาแน่น	1.179 กรัมต่อลูกบาศก์เมตร (ที่ 25°ซ)
ความดันไอ	1 มิลลิเมตรปรอท (ที่ 118.3°ซ)
การละลายน้ำ	ละลายได้น้อย (น้อยกว่า 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่ 26°ซ)

ที่มา : กรมควบคุมมลพิษ, 2546

ประโยชน์ของฟีแนนทรีน

ใช้ในการผลิตสีย้อม วัตถุระเบิด อุตสาหกรรมยา เช่น ใช้ในการสังเคราะห์ phenanthrenequinone รวมถึงใช้ในงานวิจัยด้านชีวเคมี (Sax และ Lewis, 1987) นอกจากนี้ cyclopentenophenanthrene ซึ่งเป็นสารอนุพันธ์ ยังใช้เป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์กรดน้ำดี (bile acids), โคเลสเตอรอล (cholesterol) และสารสเตอรอยด์อื่นๆ (IARC, 1983).

ความเป็นพิษของฟีแนนทรีน

ฟีแนนทรีนมีความเป็นพิษต่อสิ่งมีชีวิตในทะเลบางชนิด เช่น สาหร่าย (algae) และแพลงตอนพืช (phytoplankton) (Kusk, 1981) นอกจากนี้ Pipe และ Moore (1986) รายงานว่าฟีแนนทรีนมีผลต่อเยื่อหุ้มไลโซโซม (lysosomal membranes) และเพิ่มปริมาณเอนไซม์เบต้ากลูคูโรนิเดส (β-glucuronidase) ภายในเซลล์ย่อยอาหาร (digestive cells) ของหอยชนิดไม่มีกาบ *Littorina littorea* และสามารถชักนำกิจกรรมของเอนไซม์แอริลซัลฟาเทส (arylsulphatase) ส่งผลให้เซลล์ที่ใช้ในการย่อยอาหารของหอยทะเล *Mytilus edulis* มีจำนวนลดลง

Schafer และคณะ (1983) รายงานว่าฟีแนนทรีนมีพิษต่อนกดำปีกแดง (red-winged blackbird) ต่ำมาก คือ มีค่า LD_{50} มากกว่า 100 มก. ต่อ กก. น้ำหนักตัว

เมื่อทดลองกับหนู (mouse) พบว่า ค่า LD_{50} เมื่อให้กินมีค่าเท่ากับ 700-1,000 มก. ต่อ กก. น้ำหนักตัว (Montizaan และคณะ, 1989) ค่า LD_{50} เมื่อฉีดเข้าช่องท้อง มีค่าเท่ากับ 700 มก. ต่อ กก. น้ำหนักตัว (Simmon และคณะ, 1979) และค่า LD_{50} เมื่อฉีดเข้าเส้นเลือด มีค่าเท่ากับ 56 มก. ต่อ กก. น้ำหนักตัว (Montizaan และคณะ, 1989)

Samanta และคณะ (2002) รายงานว่า ฟีแนนทรีนเป็นสารที่ทำให้เกิดภูมิแพ้ที่ไม่รุนแรง เหนี่ยวนำให้เกิดการกลายพันธุ์ในแบคทีเรีย และเป็นสารที่ชักนำให้ sister chromatid เกิดการเปลี่ยนแปลงอย่างอ่อน

ฟีแนนทรีนมีความเป็นพิษต่อมนุษย์ต่ำเมื่อให้กินโดยตรง ความเป็นพิษจะแสดงออกเมื่อฉีดเข้าทางเส้นเลือด (intravenous route) ทำให้ผิวหนังมนุษย์มีความไวแสงมากกว่าปกติ (human skin photosensitizer) อาจทำให้เกิดการระคายเคืองต่อผิวหนังและระบบทางเดินหายใจเมื่อสัมผัส โดยไม่มีหลักฐานยืนยันว่ามีสมบัติในการเป็นสารก่อมะเร็งในมนุษย์ (Lewis, 1991)

สำนักงานวิจัยมะเร็งนานาชาติ (The International Agency for Research Cancer; IARC, 1999) ได้แบ่ง PAHs ออกเป็น 3 กลุ่ม ตามการออกฤทธิ์ก่อมะเร็ง ดังนี้ คือ กลุ่ม 2A เป็น

สารที่น่าจะก่อมะเร็งในมนุษย์ได้สูงกว่ากลุ่มอื่นๆ กลุ่ม 2B เป็นสารที่อาจจะก่อมะเร็งในมนุษย์ และกลุ่ม 3 เป็นสารที่ไม่ก่อมะเร็งในมนุษย์ ซึ่งฟีแนนทรีนเป็นสารที่จัดอยู่ในกลุ่มที่ 3 นี้

สำหรับในงานวิจัยนี้ได้เลือกฟีแนนทรีนเป็นสารต้นแบบในการศึกษา เนื่องจากเป็น PAH ที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ และเป็น PAH ขนาดเล็กที่สุดที่มีโครงสร้างโมเลกุลเป็นมุมงอ ซึ่งเป็นการจัดตัวของ PAH ที่มีความเสถียรสูง (Blumer, 1976) นอกจากนี้พบว่าไม่มีสมบัติเป็นสารก่อมะเร็งในมนุษย์ แต่มีโครงสร้างเป็นส่วนประกอบของ PAHs ที่ก่อมะเร็งอื่นๆ รวมทั้งสามารถพบได้ทั่วไปในอุตสาหกรรมหลายประเภท

การปนเปื้อน PAHs ในประเทศไทย

สาเหตุการปนเปื้อน PAHs ในสิ่งแวดล้อมของประเทศไทย พบว่ากว่า 91% เกิดจากกระบวนการสันดาปของน้ำมันเชื้อเพลิงที่ไม่สมบูรณ์ PAHs ปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อมด้วยการกระจายอยู่ในอากาศ โดยรวมตัวกับฝุ่นละออง เขม่าควัน รวมถึงสะสมอยู่ในอนุภาคดิน โดยเฉพาะบริเวณที่มีการจราจรหนาแน่น ย่านธุรกิจการค้าและอุตสาหกรรม

Amagai และคณะ (1999) ศึกษาตัวอย่างดินบริเวณริมถนนในตัวเมืองจังหวัดเชียงใหม่ในเดือนกุมภาพันธ์ ปี 1996 โดยตรวจวัดความเข้มข้นของ PAHs ที่มีวงเบนซีน 4-7 วง พบไพรีนในปริมาณสูงสุด (168 นาโนกรัมในตัวอย่างดิน 1 กรัม) รองลงมาคือ ฟลูออแรนธีน (146 นาโนกรัมในตัวอย่างดิน 1 กรัม) และเบนโซ[จี,*เอช*,*ไอ*]เพอริลีน (97.7 นาโนกรัมในตัวอย่างดิน 1 กรัม)

Wilcke และคณะ (1999) ศึกษาตัวอย่างดินบริเวณถนนสายหลักในเขตกรุงเทพมหานคร พบ PAHs รวมทั้งหมด 20 ชนิด ที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 12-380 ไมโครกรัมในตัวอย่างดิน 1 กิโลกรัม โดยพบแนพธาลีนในปริมาณสูงสุด (145.2 ไมโครกรัมในตัวอย่างดิน 1 กิโลกรัม) รองลงมาได้แก่ เพอริลีน (136.4 ไมโครกรัมในตัวอย่างดิน 1 กิโลกรัม) เบนโซ[จี,*เอช*,*ไอ*]เพอริลีน (58.9 ไมโครกรัมในตัวอย่างดิน 1 กิโลกรัม) ฟีแนนทรีน (60.8 ไมโครกรัมในตัวอย่างดิน 1 กิโลกรัม) และไพรีน (48.3ไมโครกรัมในตัวอย่างดิน 1 กิโลกรัม)

Oanh และคณะ (2000) รายงานว่า PAHs ที่มีมวลโมเลกุลสูง ซึ่งได้แก่ เบนโซ[*เอ*]ไพรีน เบนโซ[*อี*]ไพรีน และเบนโซ[*เอ*]แอนทราซีน ดูดซับกับฝุ่นละอองได้ดี แต่ไม่พบว่า PAHs ที่มีมวลโมเลกุลต่ำซึ่งระเหยได้ง่าย เช่น แนพธาลีน อะซิแนพธิลีน และอะซิแนพธีน มีการดูดซับกับฝุ่นละออง

การเปลี่ยนแปลงของ PAHs ในสิ่งแวดล้อม

เมื่อ PAHs ปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อม อาจเกิดการเปลี่ยนแปลงโดยกระบวนการต่างๆ ทั้งทางกายภาพ เคมี และชีวภาพได้ โดยการกลายเป็นไอ (volatilization) ปฏิกิริยาออกซิเดชันของแสง (photooxidation) ปฏิกิริยาออกซิเดชันทางเคมี (chemicaloxidation) การสะสมอยู่ภายในสิ่งมีชีวิต (bioaccumulation) การดูดซับโดยอนุภาคของดิน (adsorption) การย่อยสลายโดยจุลินทรีย์ (microbial degradation) โดยจะเกิดขึ้นได้มากหรือน้อยเพียงใดขึ้นอยู่กับสมบัติทางกายภาพและทางเคมีของสาร PAHs นั้นๆ รวมทั้งขึ้นอยู่กับปัจจัยต่างๆ ในสิ่งแวดล้อมนั้น (Ashok และ Saxena, 1995)

การบำบัด PAHs โดยวิธีทางชีวภาพ

การบำบัด PAHs โดยวิธีทางชีวภาพ (bioremediation) เป็นวิธีที่อาศัยกิจกรรมของจุลินทรีย์หรือสิ่งมีชีวิตที่มีอยู่ในธรรมชาติหรือมีการตัดแต่งพันธุกรรมแล้ว เพื่อเปลี่ยนโครงสร้างสารอินทรีย์อันตรายที่ปนเปื้อนให้มีระดับความเป็นพิษน้อยลงหรือหมดไป โดยจุลินทรีย์หรือสิ่งมีชีวิตจะสามารถใช้สารปนเปื้อนเป็นแหล่งอาหาร แหล่งคาร์บอนและพลังงานสำหรับใช้ในการเจริญเติบโตและดำรงชีวิต (Maria, 1999; Dua และคณะ, 2002) ซึ่งเป็นวิธีหนึ่งที่ได้รับการยอมรับว่ามีประสิทธิภาพในการกำจัด PAHs และสารพิษอันตรายชนิดอื่นที่ปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อมให้หมดไป หรือลดความเป็นพิษให้น้อยลง

ประกอบด้วย 2 วิธีการหลัก (Suthersan, 1999)

1. Biostimulation เป็นการเติมสารอาหาร เช่น ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส การให้ออกซิเจน รวมถึงการเติมสารลดแรงตึงผิวซึ่งช่วยเพิ่มการละลายสารไฮโดรคาร์บอนลงในบริเวณที่ปนเปื้อนสารพิษ ทำให้แบคทีเรียสามารถย่อยสลายได้ง่ายขึ้น (Haigh, 1996) โดยวิธีนี้ช่วยกระตุ้นให้จุลินทรีย์ประจำถิ่นเจริญเติบโต และเพิ่มความสามารถและประสิทธิภาพในการย่อยสลาย

มีรายงานโดย Cheung และ Kinkle (2005) ซึ่งได้ศึกษาผลกระทบของสารอาหาร KNO_3 และ KH_2PO_4 และสารลดแรงตึงผิว TritonX-100 และ Tergitol NP-10 ต่อการย่อยสลายไพรีนและประชาคม *Mycobacterium* ในดินที่มีการปนเปื้อน พบว่าในดินที่มีการเติมสารอาหารการย่อยสลายไพรีนเกิดขึ้นได้เร็วกว่าในดินที่เติมสารลดแรงตึงผิวเล็กน้อย เมื่อติดตามประชาคม *Mycobacterium* พบว่าในดินที่มีการลดลงของไพรีนมากที่สุดไม่มีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างประชาคม ในขณะที่ในดินที่มีการลดลงของไพรีนช้าที่สุด พบว่าไฟโลไทป์ (phylotype) หายไป

นอกจากนี้ Yu และคณะ (2005) ได้เปรียบเทียบการย่อยสลาย PAHs (ฟลูออรีน ฟีแนนทรีน และไพรีน) ในตัวอย่างตะกอนดินป่าชายเลนโดยวิธีการที่ต่างกันคือ การบำบัดโดยธรรมชาติ (natural attenuation) การเติมสารอาหาร และการเติมกลุ่มจุลินทรีย์ลงไปในการบำบัด พบว่าในการบำบัดโดยธรรมชาติ สัปดาห์ที่ 4 ฟลูออรีนและฟีแนนทรีนถูกย่อยสลายไปมากกว่า 99% แต่ไพรีนถูกย่อยไปเพียง 30% เท่านั้น ในขณะที่การทดลองที่เติมสารอาหารลงไป พบว่า PAHs ทั้ง 3 ชนิดถูกย่อยสลายไปมากกว่า 99% แสดงว่าการเติมสารอาหารช่วยส่งเสริมการย่อยสลายไพรีน ในขณะที่การเติมกลุ่มจุลินทรีย์ที่สามารถย่อย PAHs ที่แยกมาจากตะกอนดินป่าชายเลนนั้น พบว่าผลที่ได้ไม่แตกต่างจากการบำบัดโดยธรรมชาติ ซึ่งน่าจะเกิดจากการแข่งขันกันระหว่างแบคทีเรียประจำถิ่นและแบคทีเรียที่เติมลงไปในระบบ

2. Bioaugmentation เป็นการเติมจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการเปลี่ยนโครงสร้าง (biotransformation) หรือย่อยสลายสารพิษ (biodegradation) หรือเติมจุลินทรีย์ที่ได้รับการปรับปรุงสายพันธุ์โดยใช้เทคโนโลยีทางพันธุวิศวกรรม (genetically engineered microorganism, GEM) ลงในบริเวณที่มีการปนเปื้อนของสารนั้นๆ เพื่อส่งเสริมให้เกิดการย่อยสลายสารปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อม โดยในบริเวณดังกล่าวอาจไม่พบจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายสาร จึงจำเป็นต้องอาศัยกิจกรรมของจุลินทรีย์ต่างถิ่น (exogenous microorganisms) เพื่อกระตุ้นให้เกิดกระบวนการย่อยสลาย (Watanabe, 2001)

มีรายงานโดย Hwang และ Cutright (2002) ซึ่งได้ศึกษาการย่อยสลายไพรีนและฟีแนนทรีนทางชีวภาพที่มีการปนเปื้อนในแหล่งดินเป็นเวลานาน โดยวิธี biostimulation คือเติมสารอาหารที่จำเป็นลงไปในดิน และ bioaugmentation คือเติมจุลินทรีย์ร่วมกับการเติมสารอาหาร พบว่าในการทดลองที่มีการเติมจุลินทรีย์นั้นการย่อยสลายมีประสิทธิภาพดีกว่าการเติมสารอาหารเพียงอย่างเดียว

ปัจจัยที่ส่งผลกระทบต่อการบำบัด PAHs โดยวิธีทางชีวภาพ

การบำบัด PAHs โดยวิธีทางชีวภาพให้ประสบความสำเร็จนั้น ขึ้นอยู่กับหลายปัจจัยที่เกี่ยวข้อง เช่น สมบัติของ PAHs ที่ต้องการย่อยสลาย สมบัติของดินที่ปนเปื้อน ซึ่งได้แก่สารอินทรีย์ในดิน (organic matter) โครงสร้างและขนาดอนุภาคของดิน รวมถึงปัจจัยด้านสิ่งแวดล้อมต่างๆ เช่น อุณหภูมิ ความเป็นกรดด่าง และอากาศภายในดิน โดยสามารถปรับปรุงปัจจัยเหล่านี้เพื่อเพิ่มอัตราการย่อยสลายให้สูงขึ้น นอกจากนี้ยังพบว่าการปนเปื้อนของสารอื่นที่

เป็นพิษต่อจุลินทรีย์ เช่น โลหะและไซยาไนด์ (cyanide) ก็อาจมีผลต่อการย่อยสลายเช่นกัน (Wilson และ Jones, 1993)

Tang และคณะ (2005) ได้สรุปปัจจัยที่มีผลต่ออัตราการย่อยสลายไฮโดรคาร์บอนโดยจุลินทรีย์ไว้ดังนี้

1. ประชากรจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลาย PAHs ได้

จุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลาย PAHs มีอยู่ในปริมาณน้อยเมื่อเทียบกับจำนวนประชากรจุลินทรีย์ทั้งหมดในดิน และสามารถเพิ่มจำนวนประชากรจุลินทรีย์ทั้งหมดได้โดยการเติมสารอาหาร ซึ่งอาจจะช่วยเพิ่มอัตราการย่อยสลายสารได้เล็กน้อย

ระหว่างที่จุลินทรีย์มีการสัมผัสกับ PAHs หรือ โคสับสเตรต (cosubstrates) อื่น เช่น โทลูอีน (toluene) สามารถส่งผลให้เกิดกลไกการปรับตัวทางพันธุกรรม จนทำให้เพิ่มประชากรจุลินทรีย์ที่สามารถย่อย PAH และเพิ่มอัตราการย่อยสลาย PAH ทั้งชนิดที่จุลินทรีย์ได้สัมผัสและ PAH ชนิดอื่นด้วย

ประชากรจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลาย PAH ที่เติมลงไปในการบำบัดมักถูกจำกัดโดยเกิดการแข่งขันระหว่างสปีชีส์ของจุลินทรีย์ประจำถิ่น (Leahy และ Colwell, 1990; Geiselbrecht และคณะ, 1996; Hayes และคณะ, 1999; Lee และ Demora, 1999; Macnaughton และคณะ, 1999; Ortiz และคณะ, 2003)

Charoenchang และคณะ (2003) พบว่าการเติมวัสดุทางการเกษตรได้แก่เปลือกถั่วลิสงและใบจามจุรีช่วยเร่งการย่อยสลาย PAHs ในดินได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยลดไพรีนจนตรวจไม่พบภายในเวลา 42 วัน ซึ่งคาดว่าเกิดจากการทำงานของแบคทีเรียที่อยู่บนวัสดุทางการเกษตรดังกล่าว โดยการเติมจุลินทรีย์ต่างถิ่นที่มีความสามารถในการย่อยสลายสารพิษลงในดินเพื่อกระตุ้นให้เกิดการย่อยสลายสาร (bioaugmentation) นั้น ต้องคำนึงถึงการอยู่รอดของจุลินทรีย์ต่างถิ่น และการสูญเสียความสามารถในการย่อยสลายสารพิษ โดยมีสาเหตุมาจากปัจจัยทางชีวภาพและปัจจัยทางกายภาพในดินที่แตกต่างกัน

2. ตัวรับอิเล็กตรอน

อัตราการย่อยสลายสารโดยมีออกซิเจนเป็นตัวรับอิเล็กตรอน ซึ่งเป็นการย่อยสลายโดยใช้อากาศนั้น เป็นไปอย่างรวดเร็วกว่าการย่อยสลายโดยมีตัวรับอิเล็กตรอนเป็นไนเตรตหรือซัลเฟต ซึ่งเป็นการย่อยสลายโดยไม่ใช้อากาศ (McFarland และ Sims, 1991)

3. ความสามารถที่สารถูกนำไปใช้ได้โดยจุลินทรีย์ (bioavailability)

กระบวนการย่อยสลายสารโดยจุลินทรีย์เกิดขึ้นผ่านทาง PAHs ที่ละลายน้ำ ดังนั้นจุลินทรีย์จะไม่สามารถนำ PAHs ที่ละลายน้ำได้น้อยหรือสามารถยึดเกาะกับรูพรุนและ

สารอินทรีย์ในดินได้สูงออกมาใช้ได้ ซึ่งการเติมสารลดแรงตึงผิวจะช่วยให้การขนส่ง PAHs สู่เซลล์จุลินทรีย์เป็นไปได้ดีขึ้น (Pignatello และ Xing, 1996; Harms และ Bosma, 1997; Guha และคณะ, 1998; Chung และ Alexander, 1999)

มีรายงานว่าสารลดแรงตึงผิวที่ผลิตจากแบคทีเรียสามารถเพิ่มการละลายของ PAHs ได้ เช่น แรมโนลิปิด (rhamnolipid) ที่ผลิตจาก *Pseudomonas aeruginosa* (Deschenes และคณะ, 1996; Mulligan และคณะ, 2001)

Grimberg (1996) รายงานว่าการเติมสารลดแรงตึงผิว Tergitol NP-10 ช่วยเพิ่มการละลายของฟีแนนทรีนส่งผลให้ *Pseudomonas stutzeri* เจริญได้ดีขึ้น ขณะที่การเติม Tween 80 ก็ช่วยให้ *Sphingomonas* สองสายพันธุ์ มีอัตราการย่อยสลายฟลูออแรนธีนเพิ่มขึ้นเป็น 2 เท่า แต่ในทางตรงกันข้าม สารลดแรงตึงผิวทั้ง 2 ชนิดนี้กลับยับยั้งการย่อยสลายฟลูออแรนธีนโดย *Mycobacterium* 2 สายพันธุ์ (Willumsen, 2001)

4. สารอาหาร

การเติมไนเตรตและฟอสเฟตในแหล่งที่มีสารอาหารไม่เพียงพอเท่านั้นจึงจะช่วยเพิ่มอัตราการย่อยสลายสาร แต่ในภาวะที่มีสารอาหารมากเพียงพอ การเติมสารอาหารอาจส่งผลกระทบต่อการย่อยสลายเพียงเล็กน้อย (Libes, 1992; Bragg และคณะ, 1994; Venosa และคณะ, 1996)

Carmichael และ Pfaender (1997) รายงานถึงผลของสารอนินทรีย์และสารอินทรีย์ที่ช่วยเร่งการสลายฟีแนนทรีนและไพรีนโดยจุลินทรีย์ในดิน และพบว่าปัจจัยที่มีผลต่อการเร่งการย่อยสลาย PAHs ขึ้นกับชนิดของสารอนินทรีย์หรือสารอินทรีย์ที่เติมลงไปในดิน สมบัติทางกายภาพของดิน ประวัติการปนเปื้อนและปริมาณ PAHs ในดิน

5. อุณหภูมิ

อุณหภูมิส่งผลกระทบต่อกิจกรรมของเอนไซม์ จึงส่งผลกระทบต่อเนื่องไปยังอัตราการย่อยสลายสาร (Nyer, 2001)

Whyte และคณะ (1998) รายงานว่าอุณหภูมิมีผลต่ออัตราการย่อยสลายสารและธรรมชาติทางฟิสิกส์และเคมีขององค์ประกอบของไฮโดรคาร์บอน ซึ่งถึงแม้ว่ากิจกรรมของเอนไซม์ทั่วไปจะลดลงเมื่ออุณหภูมิต่ำลง แต่พบว่าในแหล่งที่มีอากาศหนาวน้ำมันดิบถูกย่อยสลายได้โดยจุลินทรีย์หลายชนิดที่ชอบอุณหภูมิต่ำ (Gibb และคณะ, 2001; Eckford และคณะ, 2002)

นอกจากนี้พบว่าความสามารถในการละลายน้ำของสารประกอบไม่ชอบน้ำ (hydrophobic substance) เช่น PAHs ขึ้นอยู่กับอุณหภูมิ โดยเมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้นทำให้อัตราการแพร่ของสารอินทรีย์ดีขึ้นเนื่องจากความหนืดของสารลดลง (Northcott และ Jones, 2000)

6. ความดัน

ความดันสูงในทะเลลึกส่งผลให้แอคติวิตีของจุลินทรีย์ลดลง และการย่อยสลายสารประกอบไฮโดรคาร์บอนในทะเลลึกเป็นไปได้อย่างช้าๆ โดยสารกลุ่มนี้สามารถอยู่ได้นานเป็น 10 ปี ในทะเลลึก (Leahy และ Colwell, 1990)

7. ความเป็นกรดด่าง

ความเป็นกรดด่างส่งผลต่อกิจกรรมของเอนไซม์ของจุลินทรีย์ ซึ่งแบคทีเรียในกลุ่ม heterotroph ส่วนใหญ่ชอบความเป็นกรดด่างใกล้เคียงกับความเป็นกลาง (neutral) (Chang และคณะ, 2002)

การย่อยสลายสารพิษโดยวิธีทางชีวภาพนั้น มักเกิดขึ้นในภาวะที่เป็นกลาง โดยทั่วไปจึงมีการปรับ pH ให้เป็นกลางก่อนการย่อยสลาย (Alexander, 1999) แต่อย่างไรก็ตามพบว่ามีการย่อยสลายสารพิษเกิดขึ้นในแหล่งธรรมชาติที่มี pH 4.5 - 5.0 (Norris, 1994) จุลินทรีย์ในกลุ่ม heterotrophic acidophile จึงได้รับความสนใจในการนำมาย่อยสลายสารอินทรีย์และโลหะหนักจากน้ำทิ้งที่ปนเปื้อนด้วยน้ำมันซึ่งมีภาวะเป็นกรดจากเหมืองแร่

Bardgett และ Leemans (1995) รายงานว่าการเพิ่มความเป็นด่างของดินช่วยเพิ่มชีวมวล (biomass) ของจุลินทรีย์และกิจกรรมของเอนไซม์

Bending และคณะ (2001) รายงานว่าความแตกต่างของอัตราการย่อยสลาย isoproturon (IPU) โดย *Sphingomonas* spp. ใน deep slade field เกิดจากผลกระทบโดยตรงของความเป็นกรดด่างของดิน หากความเป็นกรดด่างมากกว่า 7.0 จะทำให้การย่อยสลายเป็นไปอย่างรวดเร็ว

Singh และคณะ (2003) รายงานว่าเมื่อลักษณะทั่วไปของดินคล้ายคลึงกัน ความเป็นกรดด่างของดินจะเป็นปัจจัยสำคัญต่อการย่อยสลายของสาร โดยพบว่าในดินที่เป็นกรดมีอัตราการย่อยสลาย chlorpyrifos ค่อนข้างต่ำ แต่อัตราการย่อยสลายจะเพิ่มขึ้นเมื่อความเป็นด่างสูงขึ้น

มีรายงานว่าความเป็นด่างสูงมีความสัมพันธ์กับการย่อยสลายอย่างรวดเร็วของยาฆ่าแมลง carbamate (Suett และคณะ, 1996) ยาฆ่าเชื้อรา dicarboximide (Walker และคณะ, 1986) ยาปราบวัชพืช substituted urea (Walker และคณะ, 2002) และ triazine (Houot และคณะ, 2000)

นอกจากนี้ Hamamura และคณะ (2005) ศึกษาประชาคมแบคทีเรียในบริเวณดินที่ปนเปื้อนสารไฮโดรคาร์บอนในธรรมชาติที่ Rainbow springs ในอุทยานแห่งชาติ Yellowstone โดยพบว่าดินบริเวณนั้นมีความเข้มข้นของซัลเฟตสูงและมี pH ต่ำ (pH 2.8-3.8) ซึ่งจัดอยู่ในกลุ่ม

ดิน acid sulfate สารไฮโดรคาร์บอนที่พบประกอบด้วยสารในกลุ่มอัลเคน เมื่อติดตามการย่อยสลายไฮโดรคาร์บอนควบคู่กับติดตามประชาคมแบคทีเรียโดยวิธี PCR บริเวณ 16S rDNA ร่วมกับ DGGE พบการย่อยสลายไฮโดรคาร์บอนประมาณ 50% ภายใน 80 วัน โดยมี heterotrophic acidophile เป็นกลุ่มแบคทีเรียเด่นซึ่งมีลำดับนิวคลีโอไทด์ใกล้เคียงกับ heterotrophic acidophile อันประกอบด้วย *Acidisphaera* spp. และ *Acidiphilium* spp. และพบโคลนที่คล้ายกับ iron และ sulfur oxidizing chemolithotroph *Acidithiobacillus* spp.นอกจากนี้ได้แยกแบคทีเรียที่ย่อยอัลเคนได้และนำมาวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rDNA พบว่าตรงกันกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของแถบดีเอ็นเอเด่นที่ได้จากตัวอย่างดิน หลังจากนั้นพบการปรากฏของยีน *alk*B ในแบคทีเรียที่แยกได้ จึงยืนยันได้ว่าแบคทีเรียที่แยกได้มีสมบัติในการย่อยสลายไฮโดรคาร์บอนในภาวะกรด

8. ความเค็ม

ความเค็มส่งผลกระทบต่อความดันออสโมติกในเซลล์แบคทีเรีย โดยมีรายงานว่าจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายฟีแนนทรีนในตะกอนบริเวณปากแม่น้ำที่มีความเค็มต่ำ สามารถทนต่อความเค็มได้ในช่วงกว้าง (Shiaris, 1989)

Mille และคณะ (1991) พบว่าความเค็มมากกว่า 2.4% (w/v) สามารถยับยั้งการย่อยสลายส่วนของอะโรมาติกและส่วนที่มีขั้วของปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนได้ อย่างไรก็ตามมีการศึกษาพบว่าในดินเค็มตามธรรมชาติ จุลินทรีย์ประจำถิ่นสามารถพัฒนาให้ทนต่อความเค็มได้ (Bertrand และคณะ, 1990)

9. โครงสร้างของสารที่ปนเปื้อน

การจัดเรียงตัวของวงเบนซีนในโครงสร้างทางเคมีของ PAHs มีส่วนทำให้ PAHs แต่ละชนิดมีความคงทนแตกต่างกัน โดยสารที่เรียงตัวเป็นเส้นตรงมีความคงทนน้อยกว่าที่เรียงตัวเป็นมุมงอ และเรียงตัวเป็นกลุ่ม ตามลำดับ และสารที่มีมวลโมเลกุลสูงจะมีความทนทานต่อการย่อยสลายเพิ่มขึ้นตามไปด้วย (Trzesicka-Mlynarz และ Ward, 1996)

นอกจากนี้พบว่า PAHs ที่มีโครงสร้างเป็นวงอะโรมาติกเรียงต่อกัน 2-3 วง ย่อยสลายได้ในภาวะไร้ออกซิเจน (anaerobic condition) ในขณะที่ PAHs ที่มีโครงสร้างเป็นวงอะโรมาติกเรียงต่อกัน 4-5 วง ย่อยสลายในภาวะไร้ออกซิเจนได้ยาก (Genthner และคณะ, 1997; Rothermich และคณะ, 2002)

Van Veen และคณะ (1997) ได้รวบรวมปัจจัยทางชีวภาพและกายภาพที่มีผลต่อการดำรงชีวิตของแบคทีเรียในดิน ดังแสดงในตารางที่ 2.2

ตารางที่ 2.2 ปัจจัยทางชีวภาพและกายภาพที่มีผลต่อการดำรงชีวิตของแบคทีเรียในดิน

ปัจจัย	ผลกระทบ
ทางชีวภาพ	
1. การล่า	ประชากรแบคทีเรียมีปริมาณลดลง โดยการจับกินของโปรโตซัว
2. การแก่งแย่ง	การแย่งอาหารระหว่างแบคทีเรียที่เติมลงไปกับแบคทีเรียประจำถิ่น ส่งผลให้ประชากรแบคทีเรียลดลง
3. การเจริญของรากพืช	รากพืชปลดปล่อยสารอินทรีย์บางชนิด ซึ่งแบคทีเรียนำไปใช้ในการเจริญได้ ทำให้ประชากรแบคทีเรียเพิ่มขึ้น
ทางกายภาพ	
1. แร่ธาตุในดินเหนียว	ป้องกันแบคทีเรียจากการถูกจับกินโดยโปรโตซัว
2. ความตึงผิวของน้ำ	ความตึงผิวของน้ำต่ำ ทำให้ดินขาดอากาศ แต่ทำให้การแพร่กระจายสารอาหารในดินดีขึ้น ความตึงผิวของน้ำสูง ทำให้เกิดการขาดแคลนน้ำ และมีความดันออสโมติกสูง
3. สารอินทรีย์คาร์บอน	สามารถใช้ชนิดของสารอินทรีย์คาร์บอนคัดเลือกชนิดของแบคทีเรียที่ต้องการได้ โดยการขาดสารอินทรีย์คาร์บอนชนิดที่ต้องการจะทำให้การเจริญของแบคทีเรียหยุดชะงักและมีกิจกรรมลดลง
4. สารอาหารอนินทรีย์	การขาดไนโตรเจนและฟอสฟอรัส ทำให้การเจริญของแบคทีเรียหยุดชะงัก
5. ความเป็นกรดด่าง	ความเป็นกรดด่างสามารถคัดเลือกกลุ่มของแบคทีเรียได้ และอาจมีผลต่อการปลดปล่อยสารอาหารและสารพิษบางชนิดในดิน
6. อุณหภูมิ	มีผลต่อกระบวนการเมตาบอลิสมและกิจกรรมของแบคทีเรีย
7. สารพิษ	ยับยั้งจุลินทรีย์ที่ไวต่อสารนั้น และคัดเลือกกลุ่มจุลินทรีย์ที่มีความต้านทานและสามารถย่อยสลายสารชนิดนั้นได้

นอกจากนี้ Hupe และคณะ (2001) ได้สรุปภาวะที่เหมาะสมในการบำบัด PAHs ที่ปนเปื้อนในดินให้มีประสิทธิภาพสูง ดังแสดงในตารางที่ 2.3

ตารางที่ 2.3 ภาวะที่เหมาะสมในการบำบัด PAHs ที่ปนเปื้อนในดินให้มีประสิทธิภาพสูง

ปัจจัย	ภาวะที่เหมาะสม
น้ำ	35-65% ของค่าความจุในการอุ้มน้ำสูงสุด (สำหรับการบำบัดที่ไม่มีการกวนผสม) 35-55% ของค่าความจุในการอุ้มน้ำสูงสุด (สำหรับการบำบัดที่มีการกวนผสม)
อุณหภูมิ	10-30°ซ
ออกซิเจน	มากกว่า 1 เปอร์เซนต์ของปริมาตรในดิน
ความเป็นกรดด่าง	6.0-7.5
สารอาหาร	คาร์บอน : ไนโตรเจน : ฟอสฟอรัส (C:N:P) เท่ากับ 100 : 8 : 2
การร่อนและบด	คัดแยกสิ่งแปลกปลอมและวัสดุที่มีขนาดใหญ่กว่า 20 มิลลิเมตรออก
การผสม	การผสมก่อนการบำบัดทำให้การส่งผ่านอากาศดีขึ้น และลดการจับตัวกันเป็นก้อน
การเติมวัสดุ	ช่วยให้การส่งผ่านอากาศดีขึ้น

ดินเปรี้ยวในประเทศไทย

ดินเปรี้ยว คือ ดินที่อาจจะมีหรือมี หรือเคยมีกรดกำมะถันอยู่ในชั้นหน้าตัดของดิน ซึ่งเป็นผลมาจากกระบวนการสร้างดิน และปริมาณของกรดที่เกิดขึ้นนั้นมีมากพอที่จะมีผลต่อการควบคุมการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติของดิน โดยทั่วไปดินจะมีจุดประสีเหลืองฟางข้าวของเฟอร์ริกซัลเฟต (ferric sulfates) ที่เรียกว่าจาโรไซต์ (Jarosite) ดินเปรี้ยวมี pH ที่ต่ำมากและก่อให้เกิดปัญหาต่อการปลูกพืชเนื่องจากธาตุอาหารที่จำเป็นแก่พืชบางอย่างถูกตรึงไว้จนไม่สามารถละลายออกมาเป็นประโยชน์ต่อพืชได้ และสารบางอย่างในดินถูกละลายออกมามากเกินไปจนเกิดเป็นสารพิษ อีกทั้งจุลินทรีย์ประเภทที่เป็นประโยชน์ต่อพืชบางชนิดไม่สามารถทำงานหรือมีชีวิตอยู่ได้ (กรมส่งเสริมการเกษตร, 2550)

นอกจากนี้กรมพัฒนาที่ดิน (2550) ได้อธิบายไว้ว่าดินเปรี้ยว หรือดินกรด (acid soil) หมายถึง ดินที่มีค่า pH วัดได้ต่ำกว่า 7.0 ดังนั้น ดินเปรี้ยวจัด (acid sulfate soil) จึงเป็นดินเปรี้ยวหรือดินกรดชนิดหนึ่ง แต่มีความหมายแตกต่างจากดินกรดโดยทั่วๆ ไป หรือดินกรดธรรมดา ซึ่งหนังสือคำบัญญัติศัพท์ภูมิศาสตร์ฉบับราชบัณฑิตยสถาน (พ.ศ. 2523) ได้ให้ความหมายว่า acid sulfate soil หมายถึง ดินเปรี้ยวจัด ดินกรดจัด หรือดินกรดกำมะถัน โดยดินประเภทนี้จะมีธาตุอาหารของพืชที่อยู่ในระดับต่ำคือ ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส แคลเซียมและแมกนีเซียม ส่วนธาตุอาหารของพืชบางชนิดมีเกินความจำเป็น ซึ่งจะก่อให้เกิดอันตรายต่อการเจริญเติบโตและผลผลิตของพืชที่ปลูก เช่น อะลูมิเนียม เหล็ก แมงกานีส และความเป็นกรดจัดยังมีผลต่อกิจกรรมของจุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่ในดินและมีประโยชน์ต่อพืช โดยพบว่าจุลินทรีย์มีปริมาณลดลง

จากงานวิจัยของสำนักวิทยาศาสตร์เพื่อการพัฒนาที่ดิน (2550) ได้แบ่งดินเปรี้ยวจัดตามระดับความเป็นกรดไว้ดังนี้ เป็นกรดรุนแรงมาก (pH <4.5) กรดจัดมาก (pH 4.6-5.0) กรดจัด (pH 5.1-5.5) กรดปานกลาง (pH 5.6-6.0) กรดเล็กน้อย (pH 6.1-6.5) และเป็นกลาง (pH 6.6-7.3) ซึ่งในประเทศไทยพบพื้นที่ดินเปรี้ยวจัดมีเนื้อที่ประมาณ 9.4 ล้านไร่ ส่วนใหญ่พบในพื้นที่ราบลุ่มภาคกลางตอนใต้ มีเนื้อที่ประมาณ 5.6 ล้านไร่ แถบจังหวัดปทุมธานี นครนายก ปราจีนบุรี ฉะเชิงเทรา ชลบุรี บางส่วนของจังหวัดสระบุรี พระนครศรีอยุธยา นครปฐม สุพรรณบุรี และในแถบบริเวณพื้นที่ชายฝั่งทะเลตะวันออกเฉียงใต้ของประเทศ รวมถึงชายฝั่งทะเลตะวันออกของภาคใต้อีกประมาณ 3.8 ล้านไร่ (กรมส่งเสริมการเกษตร, 2550) โดยพบว่าพื้นที่ในบริเวณจังหวัดดังกล่าวมีการตั้งโรงงานอุตสาหกรรม และจากการขยายตัวของอุตสาหกรรมในประเทศ ทำให้จำนวนโรงงานอุตสาหกรรมเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ จึงมีแนวโน้มอย่างมากที่จะเกิดการรั่วไหลของ PAHs จากโรงงานอุตสาหกรรมสู่บริเวณแหล่งดินเปรี้ยว

วิถีการย่อยสลาย PAHs โดยกระบวนการทางชีวภาพ

กระบวนการย่อยสลาย PAHs เกิดขึ้นได้ทั้งในภาวะที่มีออกซิเจน (aerobic) และไร้ออกซิเจน (anaerobic) แต่เนื่องจากกระบวนการย่อยสลายในภาวะไร้ออกซิเจนเกิดขึ้นได้ช้า (Harayama, 1997) รายงานส่วนใหญ่จึงมุ่งเน้นศึกษากระบวนการย่อยสลายในภาวะที่มีออกซิเจน โดยกระบวนการย่อยสลายของทั้งโปรคาริโอตและยูคาริโอตส่วนมากเริ่มต้นจากการเติมออกซิเจนเข้าที่วงอะโรมาติกโดยอาศัยกิจกรรมของเอนไซม์ที่แตกต่างกันออกไปในจุลินทรีย์แต่ละกลุ่ม หลังจากนั้นผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นจะถูกย่อยสลายต่อไปโดยวิถีการย่อยสลายที่แตกต่างกันออกไปตามแต่ละกลุ่มของจุลินทรีย์ (Cerniglia, 1992) ซึ่งสามารถแยกออกเป็นกลุ่มต่างๆ กันคือ

กระบวนการย่อยสลายโดยแบคทีเรีย กระบวนการย่อยสลายโดยรา และกระบวนการย่อยสลายโดยราไวท์รอท (white rot fungi)

กระบวนการย่อยสลาย PAHs โดยแบคทีเรีย

ขั้นตอนแรกเป็นการนำออกซิเจนเข้ามายังวงอะโรมาติก เกิดจากการเร่งปฏิกิริยาโดยเอนไซม์ออกซิจีเนส (oxygenase) ซึ่งพบว่าแบคทีเรียจะย่อยสลาย PAHs โดยการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ซึ่งจะเกิดได้ทั้งโมโนออกซิจีเนส (monooxygenase) และไดออกซิจีเนส (dioxygenase) จากนั้นเร่งปฏิกิริยาต่อโดยเอนไซม์ดีไฮโดรจีเนส (dehydrogenase) ได้เป็นสารคาทีคอล (catechol) แล้วถูกตัดด้วยการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ออกซิจีเนส (oxygenase) ผ่านทางการแตกวงเบนซีนแบบออโธ (*ortho* pathway) ที่เกิดขึ้นระหว่างอะตอมคาร์บอนที่มีกลุ่มไฮดรอกซิล 2 อะตอมอยู่ติดกัน หรืออีกวิถีหนึ่งผ่านทางการแตกวงเบนซีนแบบเมตา (*meta* pathway) ที่เกิดขึ้นระหว่างอะตอมคาร์บอนที่มีกลุ่มไฮดรอกซิลกับอะตอมคาร์บอนที่อยู่ถัดมา (Cerniglia, 1992) ดังแสดงในรูปที่ 2.3

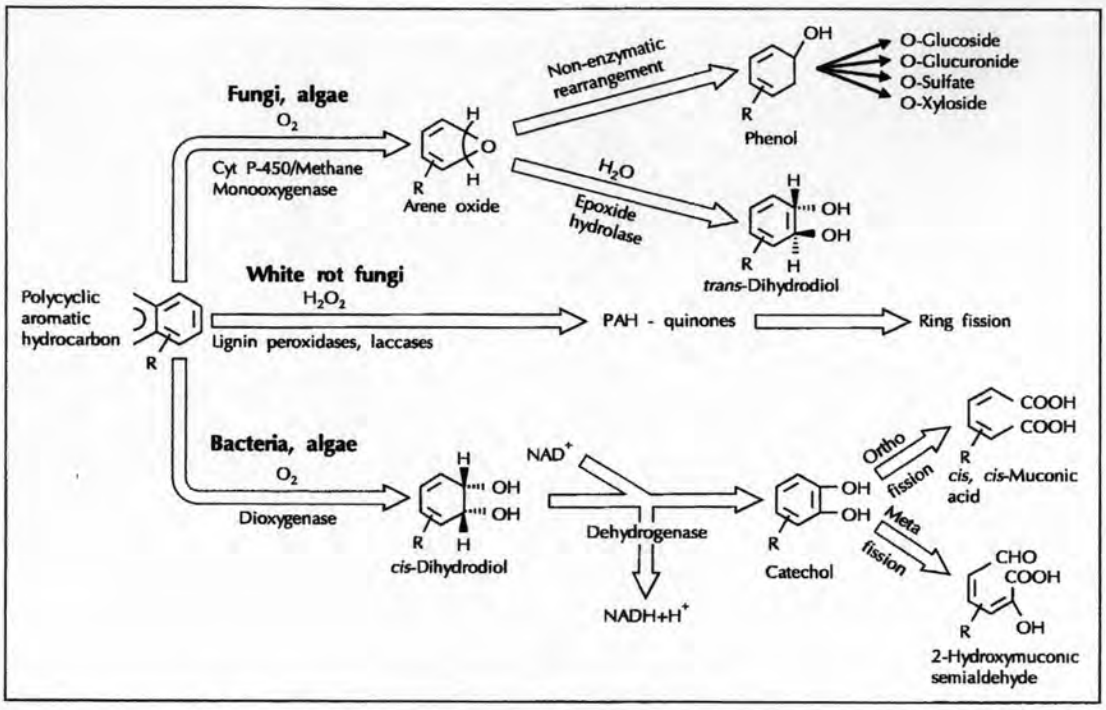
กระบวนการย่อยสลาย PAHs โดยรา

PAHs ถูกคาตะไลซ์ (catalyze) โดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์ไซโตโครม พี-450 (cytochrome P-450) เปลี่ยนเป็นอีพ็อกไซด์ (epoxide) หรือแอรีนออกไซด์ (arene oxide) จากนั้นถูกย่อยสลายต่อด้วยเอนไซม์อีพ็อกไซด์ไฮโดรเลส (epoxide hydrolase) ได้เป็น *ทรานส์*-ไดไฮโดรไดออล (*trans*-dihydrodiol) ผลของปฏิกิริยาที่ได้นี้ตรงกันข้ามกับการย่อยสลายโดยแบคทีเรีย ซึ่งได้ *ซิส*-ไดไฮโดรไดออล อีพ็อกไซด์ที่เกิดอาจจัดเรียงตัวภายในโมเลกุลโดยไม่ต้องอาศัยการทำงานของเอนไซม์ได้เป็นสารประกอบฟีนอล (phenol) จากนั้นจะจึงถูกกำจัดออกจากเซลล์ของราในรูปของ *O*-กลูโคไซด์ (*O*-glucoside) *O*-กลูคูโรไนด์ (*O*-glucuronide) หรือ *O*-ซัลเฟต (*O*-sulfate) ดังแสดงในรูปที่ 2.3

กระบวนการย่อยสลาย PAHs โดยราไวท์รอท

ราไวท์รอทมีเอนไซม์ย่อยสลายลิกนินซึ่งเป็นเอนไซม์ในกลุ่มเปอร์ออกซิเดส (peroxidase) แมงกานีสเปอร์ออกซิเดส (manganese peroxidase) และแลคเคส (laccase) โดยจะผลิตเอนไซม์เหล่านี้เมื่อเข้าสู่ระยะการเจริญเต็มที่หรือในภาวะที่จำกัดปริมาณคาร์บอน ไนโตรเจน หรือซัลเฟอร์ (Kotterman และคณะ, 1994) เอนไซม์ในกลุ่มนี้ไม่มีความจำเพาะต่อสารตั้งต้น ทำให้สามารถย่อยสลายลิกนินที่มีโครงสร้างประกอบด้วยวงอะโรมาติกซับซ้อน และสามารถย่อยสลาย PAHs ที่มี

น้ำหนักโมเลกุลสูงได้ โดยเอนไซม์ย่อยสลายลิกนินต้องการไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เพื่อเริ่มต้นปฏิกิริยาออกซิเดชันสารลิกนิน (Wilson และ Jones, 1993) ดังแสดงในรูปที่ 2.3



รูปที่ 2.3 วิถีการย่อยสลาย PAHs โดยจุลินทรีย์ (Cerniglia, 1993)

วิถีการย่อยสลายฟีแนนทรีนโดยกระบวนการทางชีวภาพ

กระบวนการย่อยสลายฟีแนนทรีนโดยแบคทีเรีย

แบคทีเรียส่วนใหญ่เริ่มจากการนำออกซิเจนเข้ามายังวงอะโรมาติก ซึ่งเกิดจากการเร่งปฏิกิริยาโดยเอนไซม์ไดออกซิจีเนส (dioxygenase) เปลี่ยนฟีแนนทรีนไปเป็น ซิส-3,4-ไดไฮดรอกซี-3,4-ไดไฮโดรฟีแนนทรีน (*cis*-3,4-dihydroxy-3,4-dihydrophenanthrene) จากนั้นเร่งปฏิกิริยาต่อโดยเอนไซม์ดีไฮโดรจีเนส (dehydrogenase) ได้เป็น 3,4-ไดไฮดรอกซีฟีแนนทรีน (3,4-dihydroxyphenanthrene) หลังจากนั้นวงอะโรมาติกของผลิตภัณฑ์จะแตกออกและเปลี่ยนไปเป็นกรด 1-ไฮดรอกซี-2-แนพโธอิก (1-hydroxy-2-naphthoic acid) ซึ่งจะถูกย่อยสลายต่อไปโดยวิถีการย่อยสลายที่แตกต่างกัน 2 วิถี คือวิถีการย่อยสลายโดยใช้กระบวนการย่อยสลายเดียวกันกับที่ใช้ย่อยสลายแนพธาลีน โดยจะได้ผลิตภัณฑ์เป็นสารคาทีคอล (catechol) (Evans และคณะ, 1965) หรือวิถีการย่อยสลายที่ถูกย่อยไปเป็นกรดออโธพะธาลิก (*o*-phthalic acid) และ

เปลี่ยนไปเป็นกรดโปรโตคาทีชูอิก (protocatechuic acid) (Kiyohara และคณะ, 1976) ดังแสดงในรูปที่ 2.4 ซึ่งวิถีการย่อยสลายจะขึ้นอยู่กับสกุลของแบคทีเรีย

Kiyohara และคณะ (1976) ศึกษาในภาวะเป็นด่างพบว่า *Aeromonas* sp. ใช้กระบวนการย่อยสลายฟีแนนทรีนที่แตกต่างจาก *Pseudomonas* sp. โดยย่อยสลายฟีแนนทรีนไปเป็น 1-ไดไฮดรอกซี-2-แนพธาลดีไฮด์ 2-คาร์บอกซีเบนซาลดีไฮด์ กรดออโธพะธาลิก และกรดโปรโตคาทีชูอิค

Jerina และคณะ (1976) ศึกษาในภาวะเป็นกลางพบว่า *Beijerinckia* sp. สามารถย่อยสลายฟีแนนทรีนไปเป็น *ซิส*-1,2-ไดไฮดรอกซี-1,2-ไดไฮโดรไดออลฟีแนนทรีนได้

Moody และคณะ (2001) ศึกษาในภาวะเป็นกลางพบว่า วิถีการย่อยสลายฟีแนนทรีนโดย *Mycobacterium* sp. strain PYR-1 ซึ่งได้ *ซิส*- และ *ทรานส์*-9,10-ไดไฮดรอกซี-9,10-ไดไฮโดรฟีแนนทรีน และ *ซิส*-3,4-ไดไฮดรอกซี-3,4-ไดไฮโดรฟีแนนทรีน 2,2-ไดฟีนิก 1-ไฮดรอกซีแนพโธอิก และกรดพะธาลิกเป็นผลิตภัณฑ์นั้น แสดงให้เห็นว่าวิถีการย่อยสลายใหม่เริ่มจากการเร่งปฏิกิริยาของทั้งเอนไซม์โมโนและไดออกซิจีเนสที่ตำแหน่ง 9,10

อย่างไรก็ตามในภาวะเป็นกรดนั้น ยังไม่พบว่ามีการศึกษาถึงวิถีการย่อยสลายฟีแนนทรีน

กระบวนการย่อยสลายฟีแนนทรีนโดยรา

ราทั่วไปย่อยสลายฟีแนนทรีนโดยการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์โมโนออกซิจีเนสและเอนไซม์อีพ็อกไซด์ไฮโดรเลส ในการย่อยสลายฟีแนนทรีนไปเป็น *ทรานส์*-1,2 -*ทรานส์*-3,4- และ *ทรานส์*-9,10-ไดไฮโดรไดออล หลังจากนั้นจะถูกย่อยสลายตามวิถีที่แตกต่างกันไปตามสกุลของรา ดังแสดงในรูปที่ 2.5

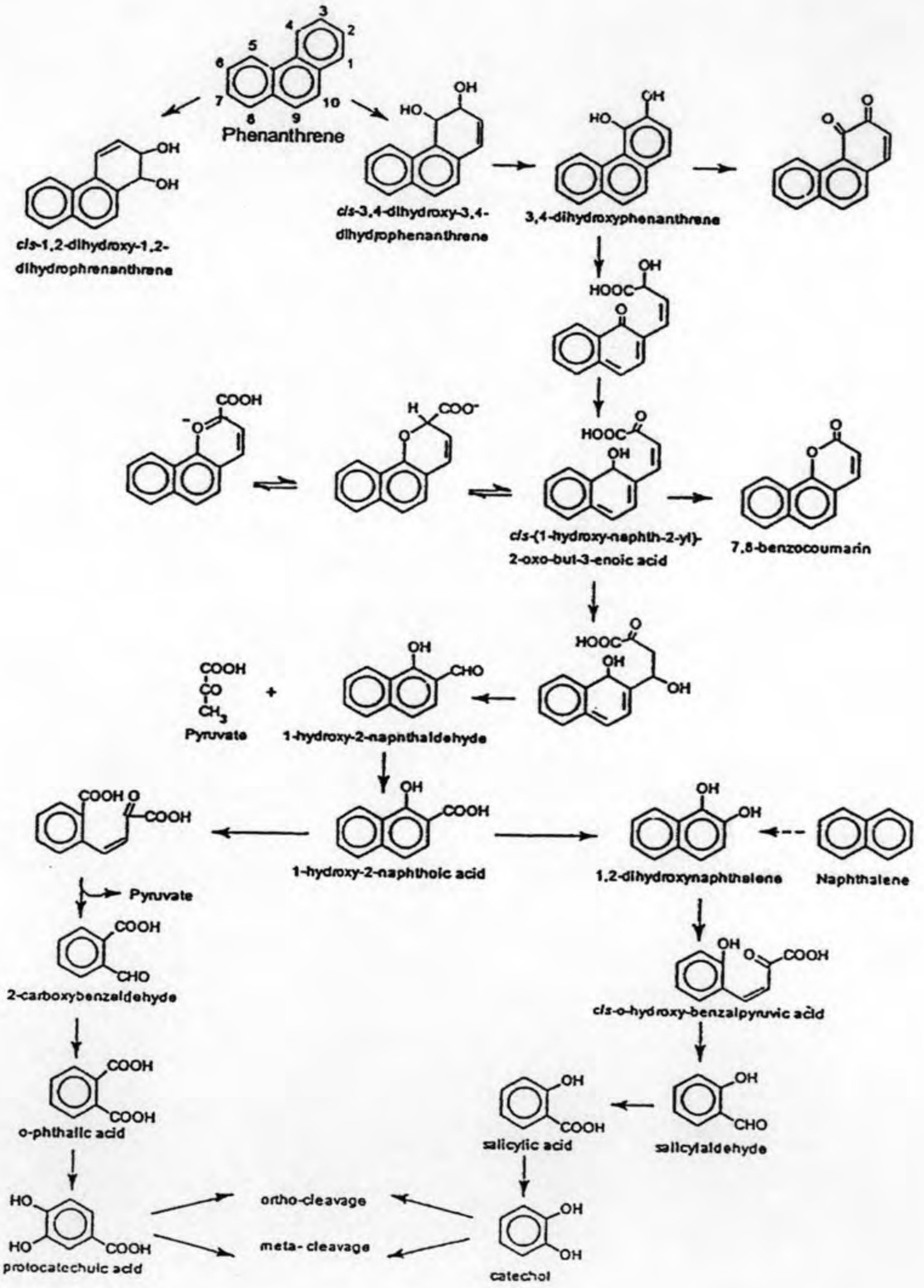
MacGillivray และ Shiaris (1993) พบว่าในภาวะเป็นกรด ยีสต์หลายสกุลสามารถย่อยสลายฟีแนนทรีนได้ โดยสกุลที่พบมากคือ *Lactiporus sulphureus* *Flammulina velutipes* และ *Murasmicllus* sp. สามารถย่อยสลายฟีแนนทรีนไปเป็นผลิตภัณฑ์ที่ยังไม่ทราบชนิด

Sack และ Gunther (1993) รายงานว่าในภาวะเป็นกรด *Penicillium* sp. *Trichosporon penicillatum* และราสกุลอื่นสามารถย่อยสลายฟีแนนทรีนไปเป็นผลิตภัณฑ์ที่ยังไม่ทราบชนิด

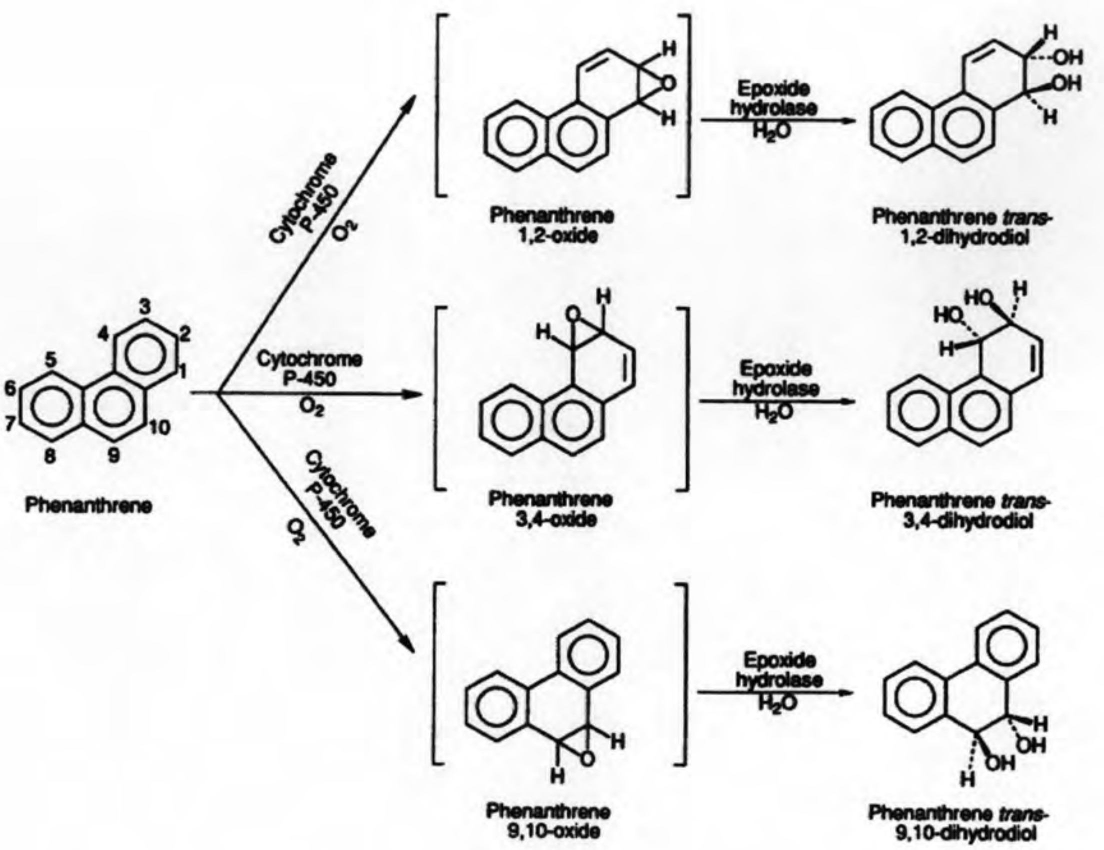
กระบวนการย่อยสลายฟีแนนทรีนโดยราไวท์รอท

กลุ่มราไวท์รอทใช้กิจกรรมของเอนไซม์ลิกนินเปอร์ออกซิเดส แมงกานีสเปอร์ออกซิเดส และแลคเคส ในการย่อยสลายฟีแนนทรีนไปเป็นก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์และผลิตภัณฑ์ที่ละลายน้ำได้ โดยราไวท์รอทแต่ละสกุลจะใช้วิถีการย่อยสลายที่แตกต่างกัน (Harayama, 1997)

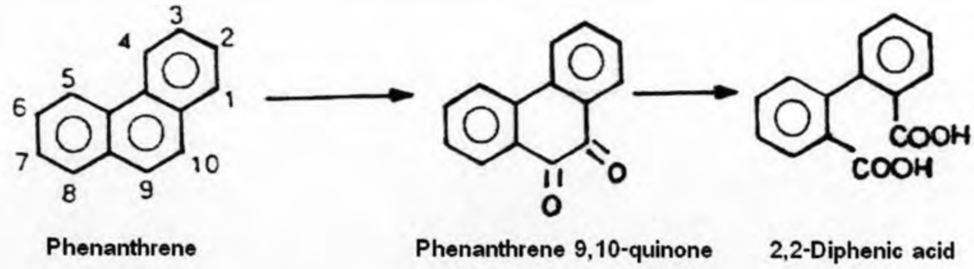
Hammel และคณะ (1992) รายงานว่า *Phanerochaete chrysosporium* สามารถย่อยสลายฟีแนนทรีนไปเป็นฟีแนนทรีน-9,10-ควิโนน (phenanthrene-9,10-quinone) ซึ่งจะถูกย่อยสลายต่อไปเป็นกรด 2,2-ไดฟีนิก (2,2-diphenic acid) ได้ในภาวะเป็นกรด ดังแสดงในรูปที่ 2.6



รูปที่ 2.4 วิถีการย่อยสลายฟีแนนทรีนโดยแบคทีเรีย (Kiyohara และคณะ, 1976)



รูปที่ 2.5 วิถีการย่อยสลายฟีแนนทรีนโดยรา (Sutherland และคณะ, 1993)



รูปที่ 2.6 วิถีการย่อยสลายฟีแนนทรีนโดย *Phanerochaete chrysosporium* (Hammel และคณะ, 1992)

จากรายงานวิถีการย่อยสลายฟีแนนทรีนโดยแบคทีเรีย รา และราไวท์รอท พบว่าในสิ่งมีชีวิตแต่ละกลุ่มอาศัยกิจกรรมของเอนไซม์ที่แตกต่างกันในการย่อยสลายฟีแนนทรีน แต่ผลิตภัณฑ์ส่วนใหญ่ที่เกิดขึ้นจากการย่อยสลายมีความคล้ายคลึงกัน โดยตัวอย่างชนิดของ

แบคทีเรียและราที่มีความสามารถในการย่อยสลายฟีแนนทรีนแสดงไว้ในตารางที่ 2.4 และตารางที่ 2.5 ตามลำดับ

ตารางที่ 2.4 แบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายฟีแนนทรีนได้

สายพันธุ์แบคทีเรีย	ภาวะความเป็นกรดด่างที่ย่อยสลายได้	เอกสารอ้างอิง
Aeromonas sp.	ด่าง	Kiyohara และคณะ, 1976
Alcaligenes denitrificans	pH 7.0	Weissenfels และคณะ, 1992
Burkholderia capacia F297	pH 7.0	Grifoll และคณะ, 1995
Cycloclasticus sp.	ด่าง	Geiselbrecht และคณะ, 1998
Mycobacterium sp.	pH 7.0	Stingley และคณะ, 2004
Pseudomonas aeruginosa	pH 7.0	Romero และคณะ, 1998
Pseudomonas fluoresens 5R	pH 7.0	Menn และคณะ, 1993
Pseudomonas putida	pH 7.0	Evans และคณะ, 1965
Rhodomonas sp.	pH 7.0	Foght และ Westlake, 1988
Sphingomonas sp. P2	pH 7.0	Supaka และคณะ, 2001
Streptomyces griseus	pH 7.0	Trower และ Gilbert, 1988
Acidiphilium sp.	pH 3.0	Stapleton และคณะ, 1998

ตารางที่ 2.5 ราที่สามารถย่อยสลายฟีแนนทรีนได้

สายพันธุ์รา	ภาวะความเป็นกรดด่างที่ย่อยสลายได้	เอกสารอ้างอิง
Cunninghamella elegans	pH 4.0	Cerniglia และ Yang, 1984
Penicillium sp.	pH 4.0	Sack และ Gunther, 1993
Phanerochaete chrysosporium	pH 4.0	Hammel และคณะ, 1992
Trichosporon penicillatum	pH 4.0	Sack และ Gunther, 1993

การติดตามการเปลี่ยนแปลงประชาคมจุลินทรีย์

ในอดีตวิธีการตรวจหาชนิดของจุลินทรีย์ที่อยู่ในแหล่งดินซึ่งมีความหลากหลายสูงนั้น มักใช้วิธีการเลี้ยงเชื้อในห้องปฏิบัติการ อย่างไรก็ตามเทคนิคนี้ไม่สามารถตรวจหาจุลินทรีย์ได้ทุกชนิดที่มีอยู่ในสิ่งแวดล้อม เนื่องจากสัดส่วนของจุลินทรีย์ที่สามารถเลี้ยงในห้องปฏิบัติการได้มีเพียง 0.1-10% ของปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดในสิ่งแวดล้อมเท่านั้น (Amann และคณะ, 1995) จึงทำให้ผลที่ได้ไม่สามารถสะท้อนถึงประชาคมจุลินทรีย์อย่างแท้จริง ซึ่งในปัจจุบันมีเทคนิคทางชีวโมเลกุลเข้ามาแทนที่ โดยเทคนิคนี้ประหยัดเวลากว่าการเลี้ยงเชื้อในห้องปฏิบัติการเป็นอย่างมาก และยังช่วยลดความลำเอียงของผลที่เกิดขึ้นจากการเลี้ยงเชื้อในห้องปฏิบัติการ

วิธีการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอโดยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (Polymerase Chain Reaction, PCR) ร่วมกับวิธี Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) หรือที่เรียกว่า PCR-DGGE เป็นหนึ่งในเทคนิคทางชีวโมเลกุลที่ถูกนำมาใช้ในการวิเคราะห์ประชาคมจุลินทรีย์ในสิ่งแวดล้อม (Rosado และคณะ, 1997) โดยการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสนั้น ในแบคทีเรียนิยมการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอบริเวณ 16S rDNA และรานิยมการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอบริเวณ 18S rDNA หรือ internal transcribed spacer ซึ่งเป็นบริเวณอนุรักษ์ของสิ่งมีชีวิตดังกล่าว หลังจากนั้นนำผลิตภัณฑ์ที่ได้มาตรวจสอบและระบุความหลากหลายของจุลินทรีย์ด้วยวิธี DGGE (Torsvik และคณะ, 2002) ซึ่งเทคนิค DGGE นี้เป็นเทคนิคที่ใช้แยกดีเอ็นเอสายคู่ซึ่งมีความยาวเท่ากันแต่มีลำดับเบสต่างกันโดยใช้เกรเดียนท์ (gradient) ของความเข้มข้นของสารเคมี เช่น ยูเรียและฟอร์มาไมด์ทำลายพันธะไฮโดรเจนระหว่างดีเอ็นเอสายคู่ (Felske และ Akkermans, 1998; Muyzer และคณะ, 1993) ความแตกต่างของลำดับเบสส่งผลให้การสลายพันธะไฮโดรเจนเกิดขึ้นไม่พร้อมกันในขณะที่ดีเอ็นเอเคลื่อนที่อยู่ภายในเจล ทำให้แยกแถบดีเอ็นเอที่มีขนาดเท่ากัน แต่ลำดับเบสต่างกันออกจากกันได้ โดยเมื่อดีเอ็นเอสายคู่ถูกทำลายพันธะไปบางส่วนจะหยุดการเคลื่อนที่เนื่องจาก GC clamp ซึ่งเป็นส่วนที่มีเบส GC อยู่มาก เมื่อสายดีเอ็นเอหยุดเคลื่อนที่จึงเห็นเป็นแถบดีเอ็นเออยู่ภายในเจล โดยความหลากหลายของจุลินทรีย์สามารถสังเกตได้จากจำนวนแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้น (Myer และคณะ, 1985)

Roling และคณะ (2002) ศึกษาผลกระทบของการเติมสารอาหารอนินทรีย์ต่อการย่อยสลายน้ำมัน โดยสร้างระบบนิเวศจำลองดินที่ปนเปื้อนน้ำมัน และตรวจวิเคราะห์องค์ประกอบของน้ำมันที่เปลี่ยนแปลง รวมถึงเพิ่มจำนวน 16S rDNA ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส และติดตามการเปลี่ยนแปลงประชาคมแบคทีเรียโดยใช้เทคนิค DGGE พบว่าการเติมสารอาหารอนินทรีย์

ไนโตรเจนและฟอสฟอรัสทำให้อัตราการย่อยสลายน้ำมันเพิ่มขึ้น และทำให้ได้ประชาคมแบคทีเรียที่ต่างกันออกไปตามความเข้มข้นของสารอาหารที่เติม

Agnelli และคณะ (2004) ใช้เทคนิค DGGE ในการศึกษาการกระจายของแบคทีเรียและราประจำถิ่นในตัวอย่างดินภายในป่า โดยเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอของแบคทีเรียบริเวณ 16S rDNA และเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอของราบริเวณ 18S rDNA ก่อนนำมาวิเคราะห์โดยเทคนิค DGGE จากรูปแบบ DGGE ที่ได้พบว่าประชาคมแบคทีเรียมีมากกว่า และรูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่ความลึกของดินต่างกันมีความแตกต่างกันด้วย

Leys และคณะ (2004) ได้ออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อ 16S rDNA ของ *Sphingomonas* sp. เพื่อติดตามประชาคมของกลุ่มแบคทีเรียดังกล่าวในดินที่มีการปนเปื้อนฟีแนนทรีนด้วยเทคนิค PCR-DGGE พบว่า *Sphingomonas* ในสปีชีส์เดียวกันมีลักษณะรูปแบบของ DGGE เหมือนกัน และพบว่าในดินที่มีการปนเปื้อนฟีแนนทรีนมากที่สุดนั้น มีความหลากหลายของประชาคม *Sphingomonas* ต่ำที่สุด

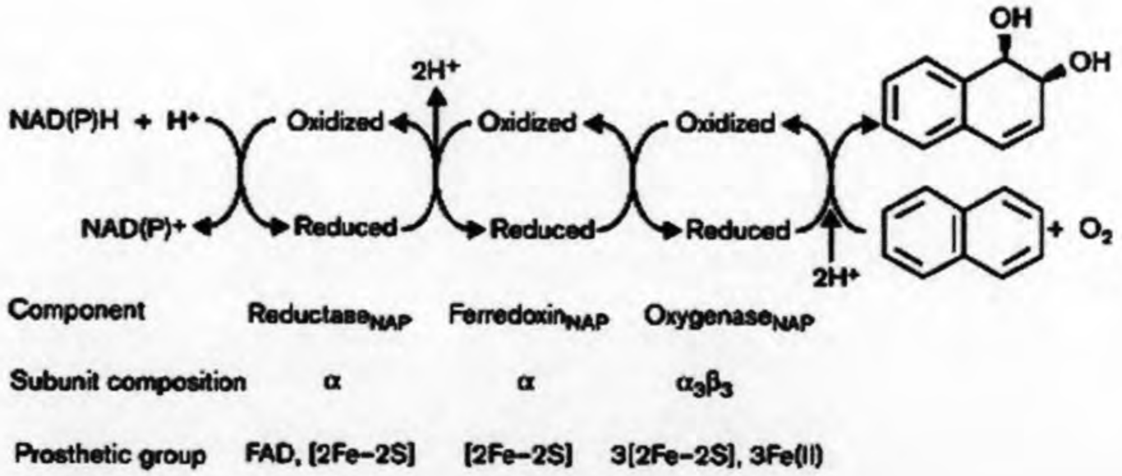
Morimoto และคณะ (2005) ติดตามการเปลี่ยนแปลงประชาคมแบคทีเรียในดินหลังจากเติม 3-คลอโรเบนโซเอต (3CB) โดยใช้เทคนิค PCR-DGGE ติดตามการเปลี่ยนแปลงของ 16S rDNA และ *benA* ซึ่งเป็นยีนส่วนของ 1,2 dioxygenase large subunit พบว่าหลังจากทดลองเป็นเวลา 7 วัน ปริมาณเบนโซเอตลดลงเหลือ 40% และเมื่อนำตัวอย่างดินมาวิเคราะห์ส่วนของ 16S rDNA ด้วยเทคนิค PCR-DGGE พบว่ามีแถบดีเอ็นเอเด่นเกิดขึ้น 4 แถบ แต่พบแถบดีเอ็นเอเด่นเมื่อใช้เทคนิค DGGE วิเคราะห์บริเวณ *benA* เพียง 3 แถบ ซึ่งเมื่อนำแถบดีเอ็นเอที่ได้จากทั้ง 2 การทดลองไปหาลำดับนิวคลีไทด์และนำมาเปรียบเทียบกัน พบว่าได้ผลเช่นเดียวกันคือลำดับนิวคลีโอไทด์มีความคล้ายกับ *Burkholderia* จึงสรุปได้ว่า *Burkholderia* มีบทบาทสำคัญในการย่อยสลายเบนโซเอต

จากรายงานการศึกษาประชาคมจุลินทรีย์ในระหว่างการย่อยสลายสารพิษโดยกระบวนการทางชีวภาพในรูปแบบต่างๆ ซึ่งทำให้ทราบถึงแนวโน้มของจุลินทรีย์ในระบบนั้นๆ ทั้งชนิดและการเพิ่มจำนวนขึ้น จะเป็นข้อมูลเบื้องต้นในการบำบัดสารพิษในภาวะที่คล้ายคลึงกัน หรือเป็นแนวทางในการแก้ไขและปรับปรุงการบำบัดโดยกระบวนการทางชีวภาพได้เป็นอย่างดี

ไดออกซิจีเนส

การย่อยสลาย PAHs โดยแบคทีเรียภายใต้ภาวะมีออกซิเจน เริ่มจากการเติมออกซิเจน 2 อะตอมเข้าสู่วงอะโรมาติกด้วยการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ไดออกซิจีเนส (dioxygenase) ซึ่งไดออกซิจีเนสของแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนได้ เป็นระบบเอนไซม์ที่มีหลายส่วนประกอบกัน (multicomponent) ทำหน้าที่เติมออกซิเจนจำนวน 2 อะตอมเข้าสู่วงอะโรมาติกเพื่อสร้าง arene *cis*-diol โดยในปัจจุบันมีสารที่มีโครงสร้างใกล้เคียงกับ arene *cis*-diol กว่า 300 ชนิด ที่ระบุว่าเป็นผลิตภัณฑ์ในช่วงต้นของการออกซิไดซ์อะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนโดยแบคทีเรีย ซึ่งสารอะโรมาติกเหล่านี้เริ่มตั้งแต่โทลูอีนไปจนถึงเบนโซ[*เอ*]ไพรีน (Resnick และคณะ, 1996; Boyd และ Sheldrake, 1998; Hudlicky และคณะ, 1999)

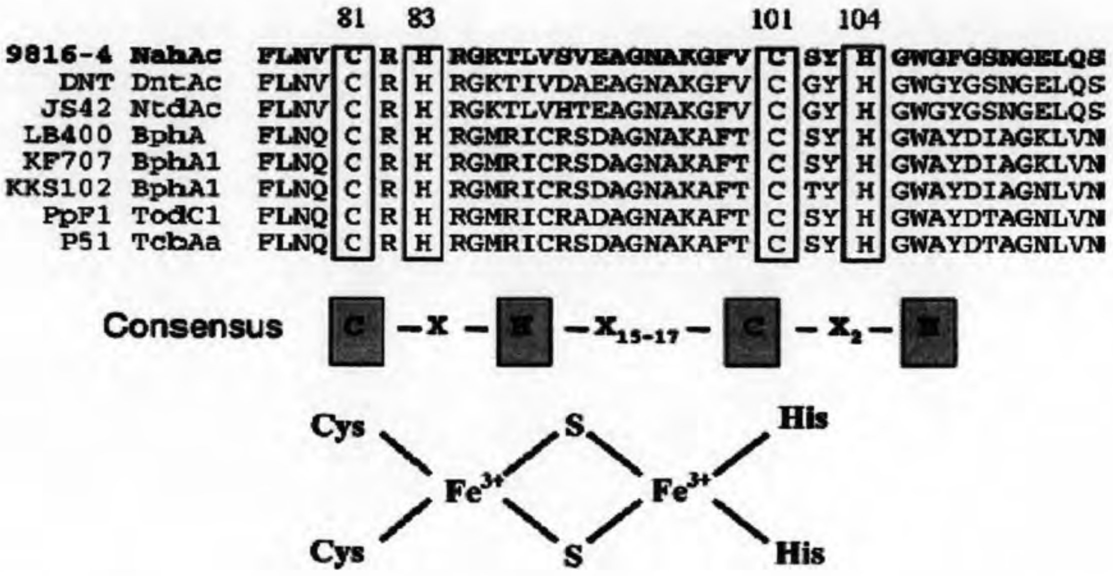
ไดออกซิจีเนสที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนจัดอยู่ในกลุ่ม aromatic ring-hydroxylating dioxygenase (Mason และ Cammack, 1992; Butler และ Mason, 1997) ซึ่งสมาชิกของกลุ่มนี้มี 1 หรือ 2 โปรตีนที่ขนส่งอิเล็กตรอนก่อนหน้าออกซิจีเนส ดังแสดงในรูปที่ 2.7



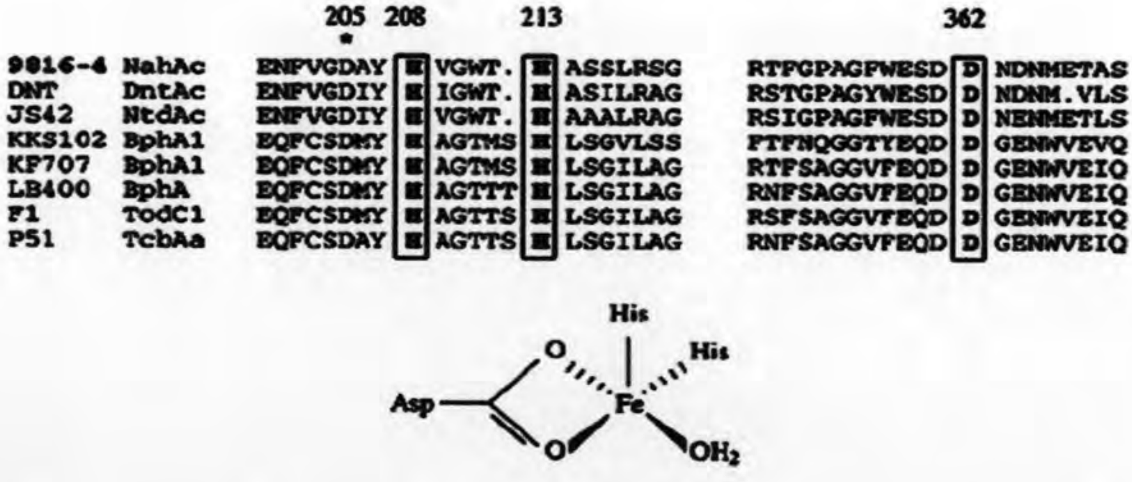
รูปที่ 2.7 แสดงระบบแนพธาลีน 1,2-ไดออกซิจีเนส (NDO) (Gibson และ Parales, 2000)

ในปี 1998 Kauppi และคณะ รายงานถึงโครงสร้างของแนพธาลีน 1,2-ไดออกซิจีเนส (NDO) ซึ่งต่อมาได้ใช้เป็นต้นแบบของระบบเอนไซม์ที่อยู่ในกลุ่มนี้ โครงสร้างของ NDO มีลักษณะเป็น $\alpha_3\beta_3$ hexamer แต่ละหน่วยย่อยแอลฟาประกอบด้วย 2 โดเมน ได้แก่ Rieske โดเมน และ catalytic โดเมน โดย Rieske โดเมน ประกอบด้วย Rieske [2Fe2S] center ที่เชื่อมต่อด้วย

Cys-81 Cys-101 His-83 และ His-104 ดังรูปที่ 2.8 และแต่ละหน่วยย่อยแอลฟามีอะตอมของเหล็กอยู่ที่บริเวณเร่งปฏิกิริยาซึ่งเชื่อมต่อด้วย His-208 His-213 Asp-362 และน้ำ ดังรูปที่ 2.9



รูปที่ 2.8 แสดง Rieske iron-sulfur center ซึ่งเชื่อมต่อกับบริเวณอนุรักษ์ Cysteines และ Histidines (Parales, 2003)



รูปที่ 2.9 แสดงการเชื่อมต่อระหว่างอะตอมเหล็กกับ His-208 His-213 Asp-362 และน้ำ (Parales, 2003)

หน่วยย่อยบีตาใน NDO นั้นยังไม่ทราบหน้าที่แน่ชัด หน้าที่หลักที่ปรากฏคือเป็นโครงสร้างของโปรตีน (Kauppi และคณะ, 1998) และพบว่าการทำบริสุทธิ์หน่วยย่อยแอลฟาทำให้ไม่มีแอคติวิตี แต่จะมีแอคติวิตีเมื่อรวมหน่วยย่อยแอลฟาเข้ากับบีตา (Jiang และคณะ, 1999)

มีรายงานการใช้ส่วนของยีนไดออกซิจีเนสในการติดตามจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลาย PAHs ได้ ตัวอย่างงานวิจัย เช่น

Kim และคณะ (2006) แยกแบคทีเรีย *Pseudomonas rhodesiae* KK1 จากแหล่งดิน ซึ่งสามารถย่อยสลายสารประกอบอะโรมาติกและ PAHs ได้หลายชนิด หลังจากนั้นตรวจหาและเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอบริเวณ Rieske ของยีนไดออกซิจีเนส พบว่าผลการวิเคราะห์กรดอะมิโนจากลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากจำนวน 50 โคลน สามารถแบ่งได้เป็น 5 กลุ่ม โดยลำดับกรดอะมิโนของแต่ละโคลนเป็นส่วนหนึ่งของยีนที่ถอดรหัสเอนไซม์ที่ย่อยสลายเบนโซเอต คาร์บาโซล *p*-คูเมต แนพธาลีน ฟีแนนทรีน ไบฟีนิล หรือวานิเวต และเมื่อวิเคราะห์การย่อยสลาย PAHs พบว่าสามารถย่อยสลายได้หลายชนิด เช่น แอนทราซีน แนพธาลีน และฟีแนนทรีน เป็นต้น แสดงว่า *Pseudomonas rhodesiae* KK1 มีความสามารถในการย่อยสลายอะโรมาติกได้หลายชนิดรวมทั้ง PAHs ด้วย

Chadhain และคณะ (2006) ออกแบบไพรเมอร์ที่มีเป้าหมายคือส่วนของยีนประมวลรหัสของ Rieske iron center ของเอนไซม์ไดออกซิจีเนสที่ย่อยสลาย PAHs ทุกชนิด ซึ่งไพรเมอร์ที่สร้างขึ้นนี้ใช้ในการติดตามการเปลี่ยนแปลงประชาคมของยีนในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ปนเปื้อนด้วยแนพธาลีน ฟีแนนทรีน และไพรีน โดยหลังจากพบว่ามีการย่อยสลาย PAHs ได้สกัดดีเอ็นเอและเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอบริเวณ 16S rDNA และส่วนของ Rieske จากผลการทำ PCR-DGGE ส่วนของ 16S rDNA และทำห้องสมุดของยีนพบว่าแบคทีเรียที่ได้มีความเกี่ยวข้องกับการย่อยสลาย PAH แต่ละชนิด