หอสมุดกลาง ศูนย์วิทยทรัพยากร จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 2

วารสารปริทัศน์

สารพอลิไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน (Polycyclic Aromatic Hydrocarbons, PAHs) เป็นสารประกอบไฮโดรคาร์บอนกลุ่มหนึ่งที่ปนเปื้อนอยู่ในสิ่งแวดล้อม ไม่ว่าจะเป็นในดิน น้ำ และอากาศ เกิดจากการใช้เชื้อเพลิงฟอสซิลในอุตสาหกรรม การรั่วไหลของน้ำมันปิโตรเลียม การเผาไหม้อย่างไม่สมบูรณ์ของสารอินทรีย์และน้ำมันเชื้อเพลิง (Cerninglia และคณะ, 1992) ก่อให้เกิดความเป็นพิษแบบเฉียบพลันและแบบเรื้อรัง เป็นสารก่อมะเร็ง (carcinogens) และสารก่อการกลายพันธุ์ (mutagens) ต่อสิ่งมีชีวิตคือทั้งในจุลินทรีย์และสิ่งมีชีวิตชั้นสูง (Wilsonและคณะ ,1993)

สมบัติทางเคมีและทางกายภาพของสารประกอบ PAHs

PAHs จัดอยู่ในกลุ่มสารประกอบอินทรีย์ที่เกิดจากการเชื่อมต่อของวงแหวนเบนซินตั้งแต่ 2 วงขึ้นไป การเชื่อมต่อมีผลต่อโครงสร้างและการจัดเรียงตัวของโมเลกุล อาจเรียงเป็นเส้นตรง (Linear) , มุมงอ (Angular) และเป็นกลุ่ม (Cluster) (Cerninglia และคณะ, 1992)

สารประกอบ PAHs สามารถแบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่ ตามน้ำหนักโมเลกุล คือ

1. PAHs ที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ (Low molecular weight PAHs)
   พบว่า ภายในโมเลกุลจะประกอบด้วยวงแหวนเบนซีน 2-3 วง
2. PAHs ที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง (High molecular weight PAHs)
   พบว่า ภายในโมเลกุลจะประกอบด้วยวงแหวนเบนซีนตั้งแต่ 4 วงขึ้นไป

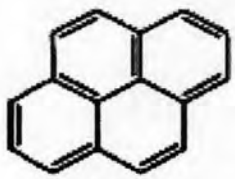
น้ำหนักโมเลกุลที่เพิ่มขึ้นและโครงสร้างของโมเลกุล PAHs ทำให้ความสามารถในการละลายน้ำลดลงหรือทำให้คุณสมบัติความไม่ชอบน้ำสูงขึ้น สิ่งมีชีวิตโดยเฉพาะจุลินทรีย์นำไปใช้ประโยชน์น้อย(low bioavailability) เป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้สาร PAHs ที่ปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อม ไม่ว่าจะเป็นในดิน น้ำ ตะกอนหรือในอากาศ คงตัวอยู่ได้เป็นเวลานานโดยไม่ถูกย่อยสลายโดยวิธีการทางชีวภาพ (Stingfellow และคณะ, 1999)

หอสมุดกลาง ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การบำบัดสาร PAHs โดยวิธีชีวภาพจำเป็นต้องทราบโครงสร้างโมเลกุลและสมบัติทางเคมีของสารที่ต้องการบำบัดเพื่อประเมินการเปลี่ยนแปลงสาร PAHs ในดินและประเมินศักยภาพของการบำบัดโดยวิธีชีวภาพเนื่องจากสาร PAHs แต่ละชนิดมีสมบัติทางเคมีและฟิสิกส์ที่จำเพาะแตกต่างกัน โดยที่จำนวนและการจัดเรียงตัวของวงแหวนเบนซีนมีผลต่อความคงทน การละลายและการระเหยของสารนี้ในสิ่งแวดล้อม รวมทั้งมีผลต่อการย่อยสลายของจุลินทรีย์ (Trejo และ Quentero, 2000) ในการทดลองนี้ได้คัดเลือกไพรีนมาศึกษาการย่อยสลาย จึงมีการศึกษาโครงสร้างโมเลกุลและสมบัติทางเคมีดังต่อไปนี้

ไพรีน (pyrene)

ไพรีน (Pyrene) จัดเป็นสารประกอบอินทรีย์ในกลุ่มสารประกอบพอลิไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน (Polycyclic aromatic hydrocarbon; PAHs) โครงสร้างทางเคมีของไพรีนเกิดจากวงเบนซิน 4 วง เชื่อมต่อกัน การเชื่อมต่อของวงเบนซินมีผลต่อการจัดเรียงตัวของโมเลกุล น้ำหนักโมเลกุลที่เพิ่มขึ้น ทำให้การละลายน้ำลดลงหรือมีคุณสมบัติไฮโดรโฟบิกซิตี้สูง ความสามารถในการละลายน้ำต่ำนี้เองทำให้ไพรีนทนต่อการย่อยสลาย (Trzesicka และ Ward,1996) เนื่องจากจุลินทรีย์ในดินนำไปใช้ประโยชน์ (bioavailability) ได้น้อย ทำให้ไพรีนสะสมและมีความเสถียรอยู่ในสิ่งแวดล้อมได้เป็นเวลานาน



Pyrene

รูปที่ 2.1 แสดงโครงสร้างทางเคมีของไพรีน (Schirmer และคณะ ,1998)

คุณสมบัติของไพรีน (Verschueren,1997)

- สูตรโมเลกุล $C_{16}H_{10}$
- น้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 202.25 g/mol
- การละลายในน้ำ 0.135 มก.ต่อลิตร
- ความถ่วงจำเพาะ 1.271 g/ml ที่ 23 °ซ
- อุณหภูมิหลอมเหลว 145-148 °ซ (418-421 K)

- อุณหภูมิกลายเป็นไอ 404 °ซ (677 K)
- ความดันไอ 6.85×10^{-7} มม.ปรอท ที่อุณหภูมิ 20 ° ซ
- เป็นผลึกสีขาวหรือสีเหลือง

ความเป็นพิษของไพรีน

หน่วยงานคุ้มครองสิ่งแวดล้อมของสหรัฐอเมริกาไม่จัดไพรีนเป็นสารก่อมะเร็งในมนุษย์แต่ทำให้ผิวหนังเกิดการระคายเคืองหากสัมผัสโดยตรง (skin irritant) และมีรายงานถึง ผู้หญิงตั้งครรภ์ที่สูบบุหรี่หรืออยู่ในบริเวณที่มีควันบุหรี่เป็นเวลานาน จะมีผลต่อเด็กทารกโดยผ่านทางการให้นม ทำให้เด็กเกิดการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรม (mutation) ได้ (Zanieri และคณะ, 2007) ส่วนในสัตว์ทดลองยังมีข้อมูลไม่พอที่จะสรุปว่าเป็นสารก่อมะเร็ง พบเพียงว่าหนู mice ที่กินไพรีนจะมีปัญหาของเลือดเล็กน้อย น้ำหนักไตลด น้ำหนักตับเพิ่ม และท่อกรวยไตเสื่อมสภาพ แต่มีบางรายงานที่สามารถพบมะเร็งผิวหนังในหนู mice ได้ (Randerath และคณะ, 1997) มีค่า oral LD_{50} เท่ากับ 800 มก.ต่อกก. (Patnaik, 1992) ซึ่งการได้รับไพรีนนั้นส่วนใหญ่เกิดจากการหายใจเอาควันที่เกิดจากการเผาไหม้เข้าไป การสัมผัสทางผิวหนัง การหายใจเอาอากาศทั่วไปโดยเฉพาะในพื้นที่ที่มีการจราจรแออัดหรือบริเวณใกล้กับแหล่งอุตสาหกรรม และอาจได้จากการปนเปื้อนในอาหารและน้ำดื่ม นอกจากนี้ Faust และคณะ (1998) รายงานว่า ไพรีนสามารถกระตุ้นเบนโซ(เอ)ไพรีนให้ก่อมะเร็งได้

การปนเปื้อนสาร PAHs ในอนุภาคดิน

ดินเป็นแหล่งที่อยู่ของสิ่งมีชีวิตและเป็นที่รองรับของเสีย สิ่งปฏิกูลต่างๆ จากสิ่งมีชีวิต จึงมีความซับซ้อนและมีความหลากหลายทางด้านปัจจัยทางเคมีและกายภาพ ซึ่งมีผลต่อการนำสารประกอบอินทรีย์ที่มีสมบัติไฮโดรโฟบิกไปใช้ประโยชน์โดยจุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่ในดิน (Straube และคณะ, 1999) โดยการปนเปื้อนสาร PAHs หรือสารประกอบอินทรีย์ในดินมีรูปแบบการอยู่ร่วมกันภายในอนุภาคดินหรือฮิวมัสที่แตกต่างกันออกไป การปนเปื้อนในอนุภาคดินอาจเกิดจากสมบัติทางกายภาพ เช่น ส่วนที่เป็นของแข็งปะปนในอนุภาคดินหรือการที่อนุภาคดินถูกเคลือบด้วยของเหลว หรือดูดซับอยู่กับอนุภาคดิน ซึ่งสารปนเปื้อนจะสามารถถูกชะออกจากอนุภาคดินได้ง่ายโดยอาศัยตัวทำละลายอินทรีย์ หากมีการปนเปื้อนของสาร PAHsในดินเป็นเวลานาน ดินจะสามารถดูดซับสารปนเปื้อนนั้นไว้ โดยการดูดซึมและแทรกอยู่ระหว่างชั้นน้ำตามช่องว่างภายในอนุภาคดิน ทำให้สารปนเปื้อนถูกชะละลายออกมาได้น้อยและหากสารปนเปื้อนจับกับอนุภาคดิน

โดยอาศัยพันธะทางเคมี จะทำให้สารถูกชะออกมาได้ยากยิ่งขึ้น เนื่องจากอาจเกิดการเปลี่ยนแปลงลักษณะโครงสร้าง สมบัติทางเคมีของโมเลกุลสาร ทำให้สารอยู่ในรูป bound residue หรืออาจเกิดจากสารประกอบหรือสารที่ได้จากกระบวนการย่อยสลายรวมตัวกับสารที่เกิดจากกระบวนการทางเคมีกายภาพภายในดิน ซึ่ง bound residue ที่เกิดขึ้นนี้ทำให้จุลินทรีย์หรือสิ่งมีชีวิตในดินนำไปใช้ประโยชน์ได้น้อยกว่าในรูปแบบอื่นๆ (Verstraete และ Devliegher, 1996) แสดงให้เห็นว่ารูปแบบการปนเปื้อนของสาร PAHs มีผลต่อการบำบัดสาร PAHs โดยวิธีทางชีวภาพ

Kästner และคณะ (1999) สรุปสาเหตุการเกิด bound residues ไว้ดังนี้

1. สารเมตาบอไลท์ที่เกิดจากการย่อยสลายจะถูกออกซิไดส์และเข้ารวมตัวกับสารประกอบฟีนอลิก เกิดเป็นสารที่มีโมเลกุลขนาดใหญ่คล้ายกับกรดฮิวมิกในดิน
2. คาร์บอนไดออกไซด์ที่เกิดจากการย่อยสลายสาร PAHs อย่างสมบูรณ์เนื่องจากกิจกรรมของจุลินทรีย์ในดินอาจถูกตรึงอยู่ในอนุภาคดิน
3. สาร PAHs ที่ปนเปื้อนตั้งแต่เริ่มต้นจะถูกเกาะติดอยู่ในอนุภาคดิน

สาร PAHs ส่วนใหญ่สามารถดูดซับกับอินทรียวัตถุที่อยู่ในดิน ทำให้สาร PAHs ไม่ถูกย่อยสลายโดยกระบวนการทางชีวภาพ การดูดซับระหว่างสาร PAHs และอินทรียวัตถุจะเพิ่มขึ้น เมื่อวงอะโรมาติกของโมเลกุลสาร PAHs มีจำนวนมากขึ้น ทำให้โมเลกุลดังกล่าวมีสมบัติไลโปฟิลิกเพิ่มขึ้น นอกจากนี้ความสามารถในการถูกย่อยสลายและสกัดสาร PAHs ออกจากอินทรียวัตถุในดินเกิดยากขึ้น สาร PAHs จึงมีโอกาสสัมผัสกับอนุภาคดินได้นานขึ้น โดยสาร PAHs จะแพร่เข้าสู่อินทรียวัตถุอย่างช้าๆ และทำให้ถูกดูดซับกับอนุภาคดินได้แน่นขึ้น อาจเกิด bound residues และการตรึงสาร PAHs ภายในรูพรุนขนาดเล็กของอนุภาคดินหรืออินทรียวัตถุได้ ซึ่งเป็นเหตุผลที่ทำให้สาร PAHs ถูกสะสมอยู่ในสิ่งแวดล้อมได้เป็นเวลานาน (Wiessenfels และคณะ, 1992; Lundstedt, 2003) เมื่อไพรีนและสาร PAHs เข้าสู่สิ่งแวดล้อม อาจเกิดการเปลี่ยนแปลงโดยกระบวนการต่างๆ ทั้งทางด้านเคมีและกายภาพ ได้แก่ การระเหยกลายเป็นไอ (volatilization) การเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของแสง (photo-oxidation) การเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันทางเคมี (chemical oxidation) การสะสมสารอยู่ภายในสิ่งมีชีวิต (bioaccumulation) หรือการดูดซับโดยอนุภาคของดิน (adsorption) เป็นต้น (Cerniglia, 1992) ซึ่งสมบัติของดินที่แตกต่างกันเป็นปัจจัยสำคัญในการบำบัดสาร PAHs ที่ปนเปื้อนในดินด้วยวิธีทางชีวภาพ สมบัติดังกล่าวได้แก่ องค์ประกอบของอินทรียวัตถุในดิน โครงสร้างและอนุภาคของดิน ซึ่งมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงสาร PAHs ในสิ่งแวดล้อมและอัตราการย่อยสลายโดยจุลินทรีย์ (Wilson และ Jones, 1993)

Nieman และคณะ (1998) รายงานว่าไพรีนและผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการเปลี่ยนรูปของไพรีน จะรวมตัวกับอนุภาคของสารอินทรีย์เกิดกระบวนการสร้างสารฮิวมิกในดิน ทำให้ไพรีนถูกดูดซับอยู่ในดินและจุลินทรีย์ย่อยสลายได้ยากขึ้น นอกจากจะคำนึงถึงชนิดและความสามารถของจุลินทรีย์ที่นำมาใช้ในการบำบัดแล้ว ยังต้องคำนึงถึงระยะเวลาที่ไพรีนอยู่ในแหล่งปนเปื้อนนั้นด้วย เพราะหากปล่อยไว้นานก็จะทำให้การบำบัดยากขึ้น เนื่องจากไพรีนจะจับกับอนุภาคอินทรียวัตถุในดิน ด้วยพันธะโควาเลนซ์ได้แน่นยิ่งขึ้นตามเวลา (270 วัน) ทำให้สกัดออกมายากขึ้นและถูกย่อยสลายโดยจุลินทรีย์ได้น้อยลง เพราะโอกาสสัมผัสกันระหว่างจุลินทรีย์และไพรีนก็ลดลงตามเวลา รวมถึงสารมัธยันต์ที่เกิดจากการย่อยสลายไพรีนด้วยเช่นกัน (Gothrie และ Pfaender, 1998)

การบำบัดสาร PAHs โดยวิธีทางชีวภาพ

การบำบัดโดยวิธีทางชีวภาพ (bioremediation) เป็นทางเลือกหนึ่งในการช่วยลดความเป็นพิษของสาร PAHs และกากของเสียอันตรายอื่นๆ โดยการย่อยสลายสารพิษด้วยจุลินทรีย์เป็นกระบวนการหลักที่ลดการปนเปื้อนของดินและตะกอนดิน ซึ่งสาร PAHs บางชนิดจะถูกย่อยสลายอย่างสมบูรณ์ (mineralization) จนได้เป็นคาร์บอนไดออกไซด์ น้ำ และพลังงานในการเจริญของจุลินทรีย์หรือ PAHs บางชนิดอาจเกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างบางส่วน เพื่อไปเป็นสารประกอบที่มีโครงสร้างโมเลกุลเล็กลงและมีความเป็นพิษลดลง สารชนิดนี้เรียกว่า สารมัธยันตร์ (intermediate) ซึ่งกระบวนการข้างต้นนี้อาจเกิดขึ้นโดยจุลินทรีย์ชนิดเดียวหรือโดยกลุ่มจุลินทรีย์ (Cerniglia, 1992)

ข้อดีของวิธีการบำบัดสาร PAHs ทางชีวภาพ (Trejo และ Quintero, 2000) คือ

1. สามารถปฏิบัติได้ในพื้นที่ที่เกิดการปนเปื้อนและทำให้พื้นที่ดังกล่าวเกิดความเสียหายน้อยที่สุด
2. ช่วยลดค่าใช้จ่ายในการขนส่งและค่าแรง
3. สามารถกำจัดพิษได้อย่างถาวร นอกจากนี้การบำบัดควบคู่กับวิธีทางเคมี เพื่อให้สามารถทำลายพิษได้อย่างสมบูรณ์ขึ้น

การกำจัดสารนี้โดยวิธีทางชีวภาพที่มีประสิทธิภาพสูงจะช่วยสลายสารพิษนี้ได้รวดเร็วกว่าการสลายเองโดยธรรมชาติ (Kastner และคณะ,1995) การบำบัดทางชีวภาพที่มีประสิทธิภาพ วิธีหนึ่ง คือ ใช้กระตุ้นให้จุลินทรีย์ท้องถิ่น (indigenous microorganism) ในบริเวณที่มีการปนเปื้อนมีประสิทธิภาพและเพิ่มกิจกรรมในการย่อยสลายสาร PAHs ในบริเวณนั้นได้สูงขึ้น (biostimulation)

โดยการเติมสารอาหารลงไปในดิน เช่น ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส โปรแตสเซียม เป็นต้น (Atlas,1991)

Haderlein และคณะ (2001) เติมปุ๋ยหมักใบเมเปิลและหญ้าอัลฟาฟาอายุ 1 เดือนในดินปนเปื้อนสาร PAHs 630 มก.ต่อกก.ดิน ที่มีไพรีน 130 มก.ต่อกก.ดิน ทิ้งไว้ 3 เดือน พบว่าสามารถลดไพรีนเหลือประมาณ 16 มก.ต่อกก.ดิน และทำให้กรดฮิวมิกเพิ่มขึ้นประมาณ 2 เท่า เมื่อเติมปุ๋ยหมักลงในดินปนเปื้อนไพรีน พบว่าสามารลดไพรีนได้มากกว่า 50 % ภายใน 15 วัน ดีกว่าการเติมกรดฮิวมิกอย่างเดียว ซึ่งคาดว่าน่าจะเกิดจากปัจจัยต่างๆ ที่มีผลต่อการลดไพรีน เช่น การเพิ่มแหล่งอาหาร วิตามิน แร่ธาตุ จุลินทรีย์ประจำถิ่น หรือการเพิ่มอัตราการเคลื่อนที่ของออกซิเจนในระว่างที่เกิดการหมัก

Charoenchang และคณะ (2003) พบว่า การเติมวัสดุทางการเกษตร ได้แก่ เปลือกถั่วลิสงและใบจามจุรี สามารถช่วยเร่งการย่อยสลายสาร PAHs ในดินได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยลดไพรีนจนตรวจไม่พบภายในเวลา 42 วันของการทดลอง ซึ่งคาดว่าเกิดจากการทำงานของแบคทีเรียที่อยู่บนวัสดุทางการเกษตรดังกล่าว

สุพินดา ศิริวราศิลป์ (2545) ใช้ใบไม้ของพืชตระกูลถั่วที่ร่วงหล่น (ใบจามจุรี ใบมะขาม และใบนนทรี) เติมในดินที่ถูกปนเปื้อนด้วยไพรีน พบว่า ใบมะขามสามารถลดไพรีนได้หมด ภายใน 56 วัน รองลงมาคือ ใบจามจุรีและใบนนทรี อาจสรุปได้ว่า การลดลงของไพรีนและสาร PAHs ที่ปนเปื้อนในดินเกิดจากการทำงานของแบคทีเรียที่อยู่บนใบพืชที่เติมลงไป

อีกวิธีการหนึ่งที่ช่วยส่งเสริมหรือเพิ่มประสิทธิภาพในการย่อยสลายสารพิษที่ปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อมคือ วิธีที่เรียกว่า Bioaugmentation ซึ่งเป็นการเติมจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการเปลี่ยนโครงสร้าง (biotransformation) หรือย่อยสลายสารพิษ (biodegradation) ลงในบริเวณที่มีการปนเปื้อนสารนั้นๆ ซึ่งในบริเวณดังกล่าวอาจไม่พบจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพหรือจุลินทรีย์ที่ได้รับการปรับปรุงสายพันธุ์โดยใช้เทคโนโลยีทางพันธุวิศวกรรม (genetically engineered microorganism, GEM) ในการย่อยสลายสารในพื้นที่บำบัด จึงจำเป็นต้องอาศัยกิจกรรมของจุลินทรีย์ต่างถิ่น (exogenous microorganisms) เพื่อกระตุ้นให้เกิดกระบวนการย่อยสลาย (Watanabe, 2001) โดยวิธีการนี้มีปัจจัยข้อจำกัดที่ควรคำนึงถึงสำหรับการนำจุลินทรีย์ดังกล่าวไปใช้ในสิ่งแวดล้อมจริง ได้แก่ จุลินทรีย์ที่จะนำไปใช้นั้นอาจไม่ใช่จุลินทรีย์ที่มีอยู่ในบริเวณที่ต้องการกำจัดสารพิษ ทำให้เกิดภาวะการแข่งขันระหว่างจุลินทรีย์ต่างถิ่นกับจุลินทรีย์ที่อยู่ประจำถิ่น

(indigenous microorganisms) ดังนั้นจุลินทรีย์ต่างถิ่นจะต้องสามารถเพิ่มจำนวนและอยู่รอดได้ในสิ่งแวดล้อมนั้นๆ (Vidali, 2001)

การย่อยสลายไพรีนโดยแบคทีเรีย

แบคทีเรียบริสุทธิ์

จากรายงานวิจัยที่ผ่านมา มีการคัดแยกเชื้อบริสุทธิ์ที่ย่อยสลายสาร PAHs จากตัวอย่างดิน น้ำหรือตะกอนดินในแหล่งน้ำที่มีการปนเปื้อนสารประกอบในกลุ่มนี้ โดยพบว่าแบคทีเรียที่คัดแยกได้ส่วนใหญ่มีทั้งกลุ่มที่เป็นแกรมบวกเช่น *Mycobacterium* sp. *Norcardia* sp.และกลุ่มที่เป็นแกรมลบ เช่น *Burkholderia cepacia*, *Pseudomonas* sp. และ *Sphingomonas* sp.เป็นต้น ตัวอย่างแบคทีเรียบริสุทธิ์ที่สามารถย่อยสลายไพรีนเพื่อใช้เป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงาน (mineralization) สรุปไว้ในตารางที่ 2.1

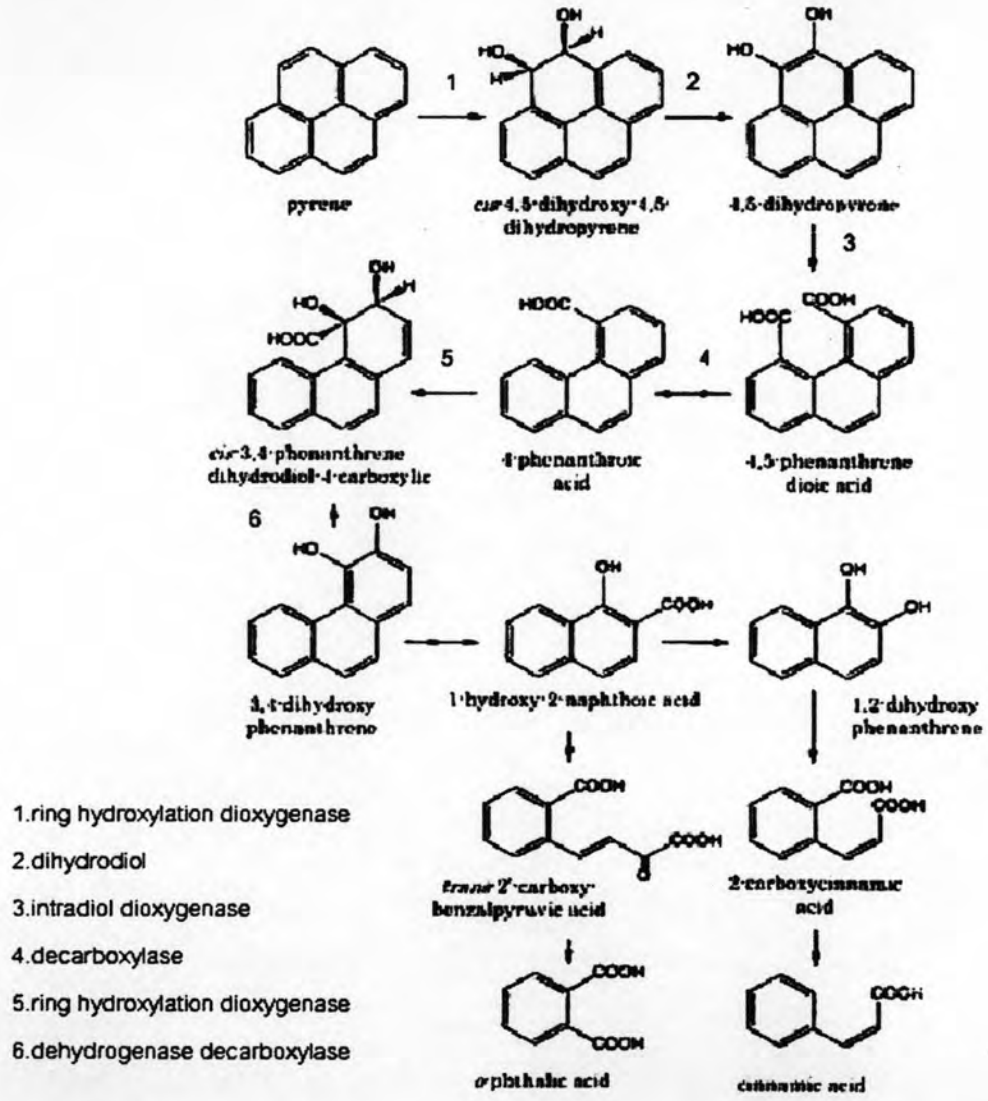
หอสมุดกลาง ศูนย์วิทยทรัพยากร จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 2.1 แบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายไพรีนเพื่อใช้เป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงาน

แบคทีเรีย	เอกสารอ้างอิง
Rhodococcus sp. สายพันธุ์ UW1	Walter และคณะ(1991)
Mycobacterium sp. สายพันธุ์ BB1	Boldrin และคณะ(1993)
Mycobacterium sp. สายพันธุ์ VF1	Kastner และคณะ(1994)
Gordona sp. สายพันธุ์ BP9	Kastner และคณะ(1994)
Rhodococcus sp.สายพันธุ์ S *Pyr Na* 1	Bouchez และคณะ(1995)
Rhodococcus sp.สายพันธุ์ S *Flt Na* 1	Bouchez และคณะ(1995)
Genus *Aureobacterium* สายพันธุ์ S *Ant Mu* 3	Bouchez และคณะ(1995)
Mycobacterium flavescens	Dean-Ross และ Cerniglia (1996)
Burkholderia cepacia สายพันธุ์ VUN10,001	Juhasz และคณะ(1997)
Mycobacterium sp. สายพันธุ์ KR2	Rehmann และคณะ(1998)
Mycobacterium sp. สายพันธุ์ CH1	Churchill และคณะ(1999)
Mycobacterium sp. สายพันธุ์ MR-1	Molina และคณะ(1999)
Mycobacterium sp. สายพันธุ์ LB208	Bastiaens และคณะ(2000)
Stenotrophomonas maltophilia สายพันธุ์ VUN10,010	Boonchan และคณะ(2000)
Stenotrophomonas maltophilia สายพันธุ์ VUN10,003	Juhasz และคณะ(2000)
Mycobacterium sp. สายพันธุ์ AP1	Vila และคณะ(2001)
Mycobacterium gilvum สายพันธุ์ B1	Gauthier และคณะ(2003)
Mycobacterium esteraromaticum สายพันธุ์ B21	Gauthier และคณะ(2003)
Genus *Porphyrobacter* สายพันธุ์ B51	Gauthier และคณะ(2003)

ผลที่ได้จากการย่อยสลายไพรีนที่สมบูรณ์โดยแบคทีเรียบริสุทธิ์ ได้แก่ มวลชีวภาพ น้ำและคาร์บอนไดออกไซด์ (Cerniglia, 1992; Wilson และ Jones, 1993) การย่อยสลายสาร PAHs ซึ่งเป็นสารที่ละลายน้ำได้น้อย แบคทีเรียทั่วไปจะสามารถย่อยสลายสารนี้ได้ยาก แบคทีเรียบางกลุ่มสามารถผลิตเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องในการย่อยสลายสาร PAHs เพื่อจะนำไปใช้เป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงาน ส่วนใหญ่พบว่าแบคทีเรียสายพันธุ์บริสุทธิ์สามารถย่อยสลายสาร PAHs ที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำๆ กลไกนำสาร PAHs ไปใช้ เกิดขึ้นโดยการเข้าไปทำปฏิกิริยากับสารโดยการสัมผัสโดยตรงกับผลึกสาร PAHs แบคทีเรียบางชนิดสามารถสร้างสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ (biosurfactant) ซึ่งมีผลต่อการเพิ่มการละลายน้ำของสาร PAHs จึงทำให้แบคทีเรียเข้าสัมผัสกับ

สาร PAHs ได้ง่าย จากนั้นสาร PAHs จะเข้าสู่เซลล์ผ่านทางผนังเซลล์โดยอาศัยการแพร่ (passive diffusion) โดยไม่ใช้พลังงานจากเซลล์ (Bugg และคณะ, 2000) แบคทีเรียสามารถย่อยสลายสาร PAHs ได้หลายชนิด เนื่องจากออกซิจีเนส เป็นเอนไซม์ที่สามารถย่อยสลายสารสับสเตรตได้หลายชนิด (broad specificity enzyme) ซึ่งถือว่าเป็นลักษณะที่ดี เพราะในสิ่งแวดล้อมมีการปนเปื้อนสาร PAHs หลายชนิด (Baver และ Capone, 1988)(รูปที่ 2.2)

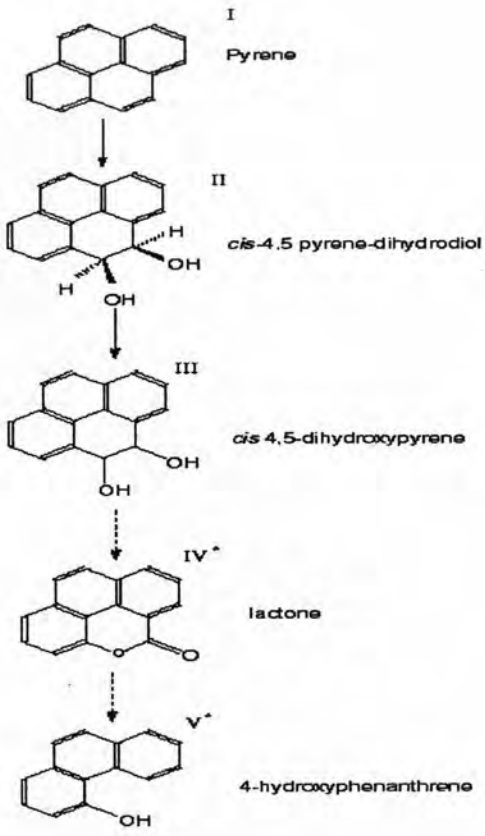


รูปที่ 2.2 วิถีการย่อยสลายไพรีนโดยแบคทีเรียที่ใช้ออกซิเจน
(ที่มา; ดัดแปลงจาก Habe และ Omori, 2003)

กลุ่มแบคทีเรีย(consortium)

โดยทั่วไป จุลินทรีย์มีการปรับตัว(acclimatisation) เพื่อให้สามารถย่อยสลาย PAHs โดยกลุ่มจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายสาร PAHs จะพบจากบริเวณที่มีการปนเปื้อน (Suthersan,1999) การย่อยสลายสาร PAHs ขึ้นอยู่กับความสามารถในการผลิตเอนไซม์ของแบคทีเรีย โดยทั่วไปเอนไซม์จะมีความจำเพาะต่อสารตั้งต้น โดยการย่อยสลายแบบใช้ออกซิเจน (aerobic biodegradation) มีความสำคัญในการบำบัดดินที่ปนเปื้อน PAHs โดยวิธีชีวภาพ ในขั้นแรก จะเกิดการออกซิเดชันของ PAHs โดยใช้เอนไซม์ไดออกซีจีเนส(dioxygenase) ซึ่งจะเร่งปฏิกิริยาการตรึงออกซิเจน ซึ่งมีรายงานว่า แบคทีเรียจะผลิตเอนไซม์ไดออกซีจีเนสทำปฏิกิริยากับออกซิเจน 2 อะตอม เข้าไปในซับสเตรทเพื่อสร้างไดออกซิแทน แล้วถูกออกซิไดส์กลายเป็น ซีส-ไดไฮโดรไดออลและไดไฮดรอกซี ซึ่งการย่อยสลายสาร PAHs อาจมีหรือไม่มีการสะสมสารมัธยันต์ โดยตัวอย่างสารมัธยันต์ได้แก่ คะทีคอล โปรโตคาทิคูอิกและเจนทิสิก (WilsonและJones,1993)

โดยทั่วไปสาร PAHs ที่ปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อมมีด้วยกันหลายชนิด ในบางกรณีการย่อยสลายสาร PAHs จึงจำเป็นต้องอาศัยการทำงานร่วมกันของแบคทีเรียหลายๆชนิด แบคทีเรียเหล่านั้นจะอยู่ร่วมกันแบบ synergism โดยปกติสาร PAHs ที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงจะถูกย่อยสลายได้ยากโดยแบคทีเรียเพียงชนิดเดียว การย่อยสลายโดยกลุ่มแบคทีเรีย(bacteria consortium) จะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการย่อยสลาย PAHsให้ดียิ่งขึ้น ทำให้อัตราเร็วในการย่อยสลายเพิ่มขึ้น ที่สำคัญยังทำให้เกิดการย่อยสลายสาร PAHs ได้อย่างสมบูรณ์ (mineralization) ความสัมพันธ์หรือกลไกที่เกิดขึ้นระหว่างการทำงานร่วมกันของแบคทีเรียต่อการย่อยสลายสาร PAHs นั้น สิ่งที่สำคัญคือ ระบบเอนไซม์ แบคทีเรียชนิดที่ 1 สามารถสร้างเอนไซม์ย่อยสลายสารตั้งต้นได้ แต่เนื่องจากไม่มีระบบเอนไซม์ที่สามารถย่อยสลายสารให้สมบูรณ์ เมื่อแบคทีเรียไม่สามารถย่อยสลายสารมัธยันตร์ที่เกิดขึ้นภายในระบบได้ (dead-end metabolite) จึงทำให้เกิดการสะสมของสารมัธยันตร์ดังกล่าวและอาจเป็นพิษต่อแบคทีเรียชนิดที่ 1 ในขณะที่แบคทีเรียชนิดที่ 2 มีระบบเอนไซม์ที่สามารถย่อยสลายสารมัธยันตร์นั้นได้ อาจมีผลทำให้ความเป็นพิษของสารมัธยันตร์ลดลงหรือสามารถนำสารดังกล่าวมาใช้ในการเจริญได้ ผลจากการเจริญของแบคทีเรียตัวที่ 2 อาจสร้างวิตามิน กรดอะมิโน หรือสารที่ช่วยให้มีการย่อยสลายสารตั้งต้นดีขึ้น เช่น สารลดแรงตึงผิวชีวภาพ (biosurfactant) ซึ่งเป็นปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญและการย่อยสลาย PAHs ของแบคทีเรียชนิดอื่นต่อไป (Muellerและคณะ , 1989)(รูป 2.3)



รูปที่ 2.3 **วิถีการย่อยสลายไพรีนโดยกลุ่มแบคทีเรีย** (bacteria consortium) **ที่ใช้ออกซิเจน** (Luan**และคณะ**, 2006)

Guo และคณะ (2005) พบว่า กลุ่มแบคทีเรียที่แยกได้จากตะกอนดินชายเลน (mangrove sediment) ซึ่งใช้ฟีแนนทรีนเป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงาน สามารถย่อยฟีแนนทรีนและฟลูออแรนทรีนได้ 90% ภายใน 7 วัน ซึ่งกลุ่มแบคทีเรียประกอบด้วยแบคทีเรียในสกุล *Rhodococcus* sp. สายพันธุ์ HCCS ,*Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ MWFG และ *Paracoccus* sp. สายพันธุ์ SPNT

ทิมากร แสงดำ (2547) ได้คัดแยกกลุ่มแบคทีเรีย STK จากปุ๋ยหมักใบมะขามใช้แผ่นโพลิเตตระฟลูออโรเอทธิลีน (PTFE) โดยกลุ่มแบคทีเรียประกอบด้วยแบคทีเรีย STK1 STK2 และ STK3 มีความคล้ายคลึงกับแบคทีเรียที่จัดอยู่ในจีนัส *Zoogloea* sp., *Stenotrophomonas* sp. และ *Mesorhizobium* sp. โดยมีเปอร์เซ็นต์ความคล้ายคลึง (%homology) เท่ากับ 99% แบคทีเรียกลุ่มนี้สามารถใช้ไพรีนเป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงานได้ โดยพบว่า STK มีประสิทธิภาพสูงมากในการย่อยสลายไพรีน ซึ่งสามารถย่อยสลายไพรีนในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวได้หมดในระยะเวลา 8 วัน และสามารถย่อยสลาย PAHs อื่น ได้แก่ ฟีแนนทรีน ไดเบนโซฟูแรน อะซีแนพธีน อะซีแนพธิลีน และยัง

สามารถย่อยสลาย แอนทราซีนกับฟลูออรีนได้เล็กน้อย รวมทั้งเบนโซ(เอ)ไพรีน ในขณะที่มีน้ำมันดีเซลรวมอยู่ด้วย

จิรทีปม์ แสนรัก (2547) ได้คัดแยกกลุ่มจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายไพรีนจากใบจามจุรี ซึ่งเป็นใบไม้ของพืชในวงศ์ Leguminosae (พืชตระกูลถั่ว) พบว่า กลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 มีประสิทธิภาพสูงสุด โดยสามารถย่อยสลายไพรีนได้หมดภายใน 14 วัน แบคทีเรียกลุ่มนี้สามารถแยกเชื้อบริสุทธิ์ได้อย่างน้อย 7 ชนิด โดยจัดอยู่ใน 4 สกุล ได้แก่ *Comamonas*, *Rugamonas*, *Flavimonas*, *Pseudomonas* และส่วนที่เหลือไม่สามารถจำแนกได้ และจากผลวิจัยได้สนับสนุนว่าการย่อยสลาย PAHs จากการเติมใบพืชตระกูลถั่วเกิดจากการทำงานของกลุ่มแบคทีเรียอาศัยอยู่และย่อยสลายบนใบไม้

การบำบัดสาร PAHs ทางชีวภาพโดยการเติมจุลินทรีย์ต่างถิ่น (Bioaugmentation)

การบำบัดทางชีวภาพโดยการเติมจุลินทรีย์ต่างถิ่นที่มีความสามารถในการย่อยสลายสารพิษลงในดิน (bioaugmentation) นั้นต้องคำนึงถึงปัญหาที่สำคัญเกี่ยวกับการรอดชีวิตของจุลินทรีย์ต่างถิ่น การสูญเสียความสามารถในการย่อยสลายสารพิษ โดยมีสาเหตุมาจากปัจจัยทางชีวภาพและปัจจัยทางกายภาพในดินที่แตกต่างกันในแต่ละบริเวณ (Van Veen และคณะ,1995)

แม้ว่าจะมีจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการย่อยสลายสารปนเปื้อนมาช่วยกำจัดบริเวณที่ปนเปื้อนได้ดี แต่ยังมีข้อจำกัดอีกมากมาย โดยทั่วไป จำนวนแบคทีเรียจะลดลงอย่างรวดเร็วเมื่อเติมในดินธรรมชาติ (Van Veen และคณะ,1997) เนื่องจากยังไม่คุ้นเคยกับสภาพดินธรรมชาติ เช่น แหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน แร่ธาตุ วิตามิน เป็นต้น นอกจากนี้ ปัจจัยทางชีวภาพของดิน ปัจจัยทางกายภาพของดิน ก็เป็นส่วนสำคัญต่อการลดลงของจำนวนแบคทีเรีย(ดังตารางที่ 2.2)

ตารางที่ 2.2 ปัจจัยทางชีวภาพและกายภาพที่มีผลต่อการอยู่รอดของแบคทีเรียในดิน (Van Veen **และคณะ**, 1997)

ปัจจัย	ผลกระทบ
ทางชีวภาพ	
สภาวะพรีเดชัน (predation)	การลดลงของประชากรแบคทีเรียเนื่องจากถูกจับกินโดยศัตรูธรรมชาติ ได้แก่ โปรโตซัว
การแก่งแย่ง (competition)	การลดลงของประชากรแบคทีเรียเนื่องจากการแย่งอาหารระหว่างแบคทีเรียที่เติมลงไปกับแบคทีเรียประจำถิ่นในดิน
การเจริญของรากพืช (root growth)	การปลดปล่อยสารอินทรีย์บางชนิดจากรากพืช ซึ่งแบคทีเรียนำไปใช้เพื่อการอยู่รอดในดินได้
ทางกายภาพ	
แร่ธาตุในดินเหนียว(clay minerals)	ป้องกันแบคทีเรียจากการถูกจับกินของโปรโตซัว
ความตึงผิวของน้ำ(water tension)	ความตึงผิวน้ำสูง ทำให้เกิดการขาดน้ำ มีแรงดันออสโมติกสูง ความตึงผิวน้ำต่ำ ทำให้ดินขาดอากาศ แต่ช่วยทำให้การแพร่กระจายสารอาหารในดินดีขึ้น
สารอินทรีย์คาร์บอน (organic carbon)	การขาดสารอินทรีย์คาร์บอนชนิดที่ต้องการจะทำให้การเจริญของแบคทีเรียหยุดชะงักลงและมีกิจกรรมลดลง
สารอาหารอนินทรีย์(inorganic nutrients (N,P))	การขาดไนโตรเจนและฟอสฟอรัส จะทำให้การเจริญของแบคทีเรียหยุดลง

ปัจจัย	ผลกระทบ
ทางกายภาพ(ต่อ)	
ความเป็นกรดด่าง(pH)	ระดับความเป็นกรดด่างสามารถคัดแยกกลุ่มแบคทีเรียได้ รวมทั้งอาจมีผลต่อการปลดปล่อยสารอาหารบางชนิดในดิน เช่น ฟอสฟอรัส หรือปลดปล่อยสารพิษในดิน เช่น อลูมิเนียมอิออน
อุณหภูมิ	มีผลต่อกระบวนการเมตาบอลิซึมและกิจกรรมของแบคทีเรีย
สารเคมีที่เป็นพิษ(toxic waste)	สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ที่ไวต่อสารชนิดนี้ สามารถคัดเลือกกลุ่มจุลินทรีย์ที่มีความต้านทานและย่อยสลายสารเคมีชนิดนี้ได้

ปัจจัยทางกายภาพของดิน เช่น ลักษณะของเนื้อดิน ความตึงผิวของน้ำ โลหะหนัก ความเป็นกรด-ด่าง อุณหภูมิ ความชื้น เป็นต้น ซึ่งมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงจำนวนแบคทีเรียโดยตรง เนื่องจากสภาวะความเครียดต่อเซลล์ ปัจจัยทางชีวภาพ เช่น สภาวะพรีเดชัน (predation) การแก่งแย่ง การเจริญของรากพืช เป็นต้น เนื่องมาจากการถูกจับกินโดยศัตรูธรรมชาติ ได้แก่ โปรโตรซัว และการแย่งอาหารระหว่างแบคทีเรียที่เติมลงไปกับแบคทีเรียประจำถิ่นในดิน ซึ่งอาจมีการสร้างสารพิษออกมาทำลายกันและกัน (Van Veen และคณะ,1997)

สมบัติของดินเป็นปัจจัยหนึ่งที่มีความสำคัญต่อการบำบัดสาร PAHs ที่ปนเปื้อนในดินโดยวิธีทางชีวภาพ ซึ่งคุณสมบัติของดินได้แก่ อินทรียวัตถุ โครงสร้างของดินและอนุภาคดิน ซึ่งจะมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงสาร PAHs ในสิ่งแวดล้อมและอัตราการย่อยสลายโดยจุลินทรีย์ (Wilsonและ Jones, 1993)

การเพิ่มความสามารถในการอยู่รอดของจุลินทรีย์ต่างถิ่น เมื่อนำมาบำบัดในดินปนเปื้อนสาร PAHs

มีงานวิจัยที่ศึกษาถึงการเพิ่มความสามารถในการอยู่รอดของจุลินทรีย์ต่างถิ่น ดังนี้

Megharaj และคณะ (1997) ศึกษาความสามารถในการอยู่รอดและการย่อยสลาย dibenzo-ρ-dioxin (DD) และ dibenzofuran (DF) ในดิน โดยใช้ *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ RW1 ที่ทำให้เคยชิน(acclimatization) กับสภาพดินก่อน โดยเลี้ยง *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ RW1 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมจากน้ำสกัดจากดิน พบว่า *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ RW1 ที่ทำให้เคยชินกับสภาพดิน สามารถอยู่รอดได้นานและย่อยสลายอย่างมีประสิทธิภาพในดินที่ปนเปื้อน DD และ DF

Labare และ Alexander (1995) ทดลองบำบัดดินปนเปื้อน PAHs สภาวะ slurry ด้วยอัตราส่วนดินต่อน้ำ 1:1 (กรัม/มล.) พบว่าสามารถส่งเสริมการเจริญ และการย่อยสลายฟีแนนทรีนได้ดีขึ้นจาก 4.4% เป็น 36.9% เนื่องจากน้ำจะช่วยเพิ่มพื้นที่ผิวสัมผัสระหว่างจุลินทรีย์ และฟีแนนทรีน การเพิ่มพื้นที่ผิวสัมผัสดังกล่าวเกิดจากดินแตกตัว ทำให้ PAHs เคลื่อนไปยังวัฏภาคน้ำอย่างรวดเร็ว รวมทั้งเพิ่มการเคลื่อนที่ของจุลินทรีย์ด้วย (Doick และ Semple, 2003) เช่นเดียวกับรายงานของ Fu และ Alexander (1995) ที่ทำการบำบัด PAHs สภาวะ slurry ด้วยอัตราส่วนดินต่อน้ำ 1:10 (กรัม/มล.) พบว่า สามารถเพิ่มการย่อยสลายฟีแนนทรีนได้

การใช้ประโยชน์จากวัสดุพาหะ(carrier materials) เพื่อเพิ่มการเจริญและการอยู่รอดของแบคทีเรียหลังจากบำบัดลงดิน วัสดุพาหะที่นำมาใช้ได้แก่ วัสดุทางธรรมชาติ (ดิน , เศษใบไม้ชนิดต่างๆ) วัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร (เปลือกถั่ว , ฟางข้าว , รำข้าว , แกลบ) และสารอินทรีย์โพลิเมอร์ ซึ่งมีลักษณะเป็นรูพรุน เพื่อใช้ในการตรึงเซลล์แบคทีเรีย เช่น แคลเซียมอาร์จีเนต อะกาโรส คาร์ราจีแนน

คุณสมบัติของวัสดุพาหะที่เพิ่มการเจริญและการอยู่รอดของแบคทีเรียต่างถิ่นในดิน (Hupe และคณะ, 1996)ได้แก่

1. ช่วยเพิ่มการส่งผ่านออกซิเจนในดิน
2. เป็นแหล่งสารอาหารที่สำคัญและแร่ธาตุที่สำคัญ โดยเฉพาะไนโตรเจนและฟอสฟอรัส
3. ช่วยป้องกันแบคทีเรียจากการถูกจับกินโดยโปรโตซัว

4. ช่วยป้องกันการแก่งแย่งอาหารระหว่างแบคทีเรียท้องถิ่นกับแบคทีเรียต่างถิ่น
5. ช่วยดูดซับ PAHs ในดินได้

จึงมีงานวิจัยที่ศึกษาการใช้ประโยชน์จากวัสดุพาหะ(carrier materials) เพื่อเพิ่มการเจริญและการอยู่รอดของแบคทีเรียหลังจากบำบัดลงดิน ดังนี้

Van Dyke (2000) ได้ศึกษาการสร้างกล้าเชื้อแบคทีเรียในวัสดุพาหะที่เป็นดินปลอดเชื้อ (carrier) ก่อนนำไปบำบัดในดินที่ปนเปื้อน PAHs เพื่อเพิ่มการอยู่รอดของ *Pseudomonas fluorescens* ในดิน ทำการทดลองโดยเลี้ยง *Pseudomonas fluorescens* ในดินปลอดเชื้อเปรียบเทียบกับการเลี้ยง *Pseudomonas fluorescens* ในอาหารเหลวก่อนนำลงดิน พบว่า การเลี้ยงในวัสดุพาหะก่อนนำลงดิน การรอดชีวิตของแบคทีเรียจะสูงกว่าการเลี้ยงในอาหารเหลว เนื่องจากจะช่วยป้องกันการถูกจับกินโดยโปรโตซัว การแก่งแย่งอาหารระหว่างแบคทีเรียท้องถิ่นกับ *Pseudomonas fluorescens* ที่เติมลงไปและเป็นแหล่งอาหารที่สำคัญต่อการเจริญของแบคทีเรีย จากนั้นศึกษาระยะเวลาในการเลี้ยงเชื้อในวัสดุพาหะ ซึ่งมีผลต่อการอยู่รอดของแบคทีเรียเมื่อลงดินเหมือนกัน โดยทำการทดลองเปรียบเทียบการเลี้ยงแบคทีเรียในวัสดุพาหะเป็นเวลา 0 , 7 ,14 วัน ก่อนนำลงดิน พบว่า เมื่อนำมาบำบัดลงดิน แบคทีเรียที่เลี้ยงในวัสดุพาหะเป็นเวลา 14 วัน จะให้การอยู่รอดของแบคทีเรียสูงที่สุด เนื่องจากระยะเวลาที่ยาวนานจะทำให้แบคทีเรียปรับตัวและทนต่อสภาพสิ่งแวดล้อมได้ยิ่งขึ้น

Cunningham และคณะ (2004) ศึกษาศักยภาพของการตรึงจุลินทรีย์(immobilize cell) ที่ย่อยสลายสารไฮโดรคาร์บอนก่อนนำไปกำจัดน้ำมันดีเซลที่ปนเปื้อนในดิน โดยใช้ Polyvinyl alcohol (PVA) เป็นวัสดุพาหะในการจับจุลินทรีย์ที่ย่อยสลายสารไฮโดรคาร์บอน เปรียบเทียบกับการเติมจุลินทรีย์ที่ย่อยสลายไฮโดรคาร์บอน(bioaumentation)โดยตรงและการเติมสารอาหารหรือสร้างสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของจุลินทรีย์(biostimulation) พบว่า การใช้ Polyvinyl alcohol (PVA) เป็นวัสดุพาหะในการจับจุลินทรีย์ที่ย่อยสลายสารไฮโดรคาร์บอน มีประสิทธิภาพในการอยู่รอดของจุลินทรีย์และความสามารถในการย่อยสลายสารไฮโดรคาร์บอนสูงกว่าการเติมจุลินทรีย์ที่ย่อยสลายน้ำมันดีเซลโดยตรงและการเติมสารอาหารหรือสร้างสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของจุลินทรีย์

Deangrueng (2004) ศึกษาความสามารถในการอยู่รอดและการย่อยสลาย PAHsของ *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ P2 ในดินที่ปนเปื้อนด้วยสาร PAHs ภายหลังจากการทำให้เคยชินกับสภาพดิน ทำโดยเลี้ยง *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ P2 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมจากน้ำสกัดจากดินผสมกับน้ำ (1:3) แล้วนำไปเลี้ยงในดินปลอดเชื้อ พบว่า *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ P2 มีการย่อยสลาย PAHs และการอยู่รอดสูงสุดในระบบนิเวศน์จำลองดินที่ปลอดเชื้อเมื่อเทียบกับอาหารเลี้ยงเชื้ออื่น การบำบัดดินที่ปนเปื้อนสาร PAHs มีการศึกษาในระบบนิเวศน์จำลองดินไม่ปลอดเชื้อเพื่อทดสอบความสามารถในการอยู่รอดและการย่อยสลายสาร PAHs ของแบคทีเรียที่ถูกทำให้เคยชินแล้ว พบว่า หัวเชื้อแบคทีเรียจากดินปลอดเชื้อมีความสามารถในการอยู่รอดและการย่อยสลายสาร PAHs ในดินไม่ปลอดเชื้อได้

จากงานวิจัยข้างต้นได้ศึกษาการใช้ประโยชน์จากวัสดุพาหะ(carrier materials) เพื่อเพิ่มการเจริญและการอยู่รอดของแบคทีเรียหลังจากบำบัดลงดิน พบว่า มีกระบวนการคล้ายกับการหมักแบบ solid (solid state fermentation) (Krishna, 2005) เนื่องจากการหมักในอาหารแข็ง (solid state fermentation) เป็นกระบวนการหมักชนิดหนึ่งที่เลี้ยงจุลินทรีย์บนสารตั้งต้น (substrate) หรือวัสดุพาหะที่เป็นของแข็ง(solid material) ปราศจากน้ำ โดยที่จุลินทรีย์จะเจริญอยู่ในรูพรุนที่ซับซ้อนหรือเจริญที่พื้นผิวของวัสดุพาหะที่เป็นของแข็ง วัสดุพาหะที่เป็นของแข็งหรือสารตั้งต้น(substate) ได้แก่ วัสดุทางธรรมชาติ (ดิน , เศษใบไม้ชนิดต่างๆ) วัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร (เปลือกถั่ว , ฟางข้าว , รำข้าว , แกลบ) และสารอินทรีย์โพลิเมอร์ ซึ่งมีลักษณะเป็นรูพรุน เพื่อใช้ในการตรึงเซลล์แบคทีเรีย เช่น แคลเซียมอาร์จีเนต อะกาโรส คาร์ราจีแนน เป็นต้น การหมักในอาหารแข็งที่กล่าวมานี้ สามารถนำไปผลิตผลิตภัณฑ์ต่างๆได้ เช่น เอนไซม์บางชนิด ผลิตภัณฑ์ทางด้านอาหาร การทำปุ๋ยหมัก เป็นต้น

จุลินทรีย์ที่มีบทบาทอย่างมากสำหรับการหมักในอาหารแข็ง คือ ราและแบคทีเรีย โดยเฉพาะราที่สร้างเส้นใย (filamentous fungi) มีความสำคัญที่สุด เนื่องจากสามารถการปรับตัวกับสภาวะที่มีค่า A_w(water activity) ต่ำๆได้และทนต่อสภาวะที่มีความดันออสโมติกสูงได้ เนื่องจากความเข้มข้นของสารอาหารสูง ส่วนแบคทีเรียมักจะมีผลต่อการหมักแบบธรรมชาติ (Krishna, 2005) เช่น การทำปุ๋ยหมัก(compost) การหมักหญ้าในฉาง(ensiling) การผลิตอาหาร การผลิตเอนไซม์บางชนิด เป็นต้น

หอสมุดกลาง ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

แบคทีเรียที่มีบทบาทสำหรับการหมักแบบของแข็ง ได้แก่ *Bacillus* sp. *Pseudomonas* sp. *Serratia* sp. *Streptococus* sp. *Lactobacillus* sp. *Clostridium* sp. เป็นต้น (ดังตารางที่ 2.3)

ตารางที่ 2.3 แบคทีเรียที่มีบทบาทต่อกระบวนการหมักในอาหารแข็ง(solid state fermentation)(Coutoและคณะ, 2006)

ชนิดของแบคทีเรีย	กระบวนการหมักในของแข็ง(solid state fermentation)
Bacillus sp.	การทำปุ๋ยหมัก(compost) , ผลิตเอนไซม์อะไมเลส(amylase)
Pseudomonas sp.	การทำปุ๋ยหมัก(compost)
Serratia sp.	การทำปุ๋ยหมัก(compost)
Streptococus sp.	การทำปุ๋ยหมัก(compost)
Lactobacillus sp.	การหมักหญ้าในฉาง(ensiling), การผลิตอาหาร(food)
Clostridium sp.	การหมักหญ้าในฉาง(ensiling), การผลิตอาหาร(food)

นอกจากปัจจัยทางชีวภาพที่เกิดจากคุณสมบัติของจุลินทรีย์แล้ว การหมักแบบของแข็งจะเกิดประสิทธิภาพสูง (ผลิตภัณฑ์และชีวมวลสูงๆ)ได้นั้น จะต้องอาศัยปัจจัยทางกายภาพร่วมด้วย (Krishna, 2005) ก็คือ สภาวะที่เหมาะสมสำหรับจุลินทรีย์ เช่น ความชื้น อากาศ ความเป็นกรด-ด่าง สารอาหาร เป็นต้น (ดังตารางที่ 2.4)

ตารางที่ 2.4 ปัจจัยที่มีผลต่อกระบวนการหมักแบบอาหารแข็ง (solid state fermentation process)(Krishna, 2005)

พารามิเตอร์	สภาวะที่เหมาะสม
ความชื้น (moisture)	โดยทั่วไป ความชื้นของวัสดุพาหะจะอยู่ในช่วง 30-85% ในแบคทีเรีย ความชื้นของวัสดุพาหะจะมีค่าสูงกว่า 70% ในรา ความชื้นของวัสดุพาหะจะอยู่ในช่วง 20-70%
ออกซิเจน	มากกว่า 1 % ของปริมาตรในดิน การเติมวัสดุที่มีรูพรุนขนาดเล็ก เพื่อเพิ่มช่องว่างในดิน ทำให้มีการระบายน้ำและการถ่ายเทอากาศ
ค่าความเป็นกรดด่าง	ในแบคทีเรีย pH อยู่ในช่วง 6-7.5 ในรา pH อยู่ในช่วง 3.8-6 ในยีสต์ pH อยู่ในช่วง 4-5
สารอาหาร	ประกอบด้วย แหล่งคาร์บอน ,ไนโตรเจน , แร่ธาตุและวิตามินหรือโคแฟกเตอร์ โดยมีคาร์บอน อยู่ในช่วง 40-50% ไนโตรเจน อยู่ในช่วง 3-12%
สารตั้งต้น(substate)	วัสดุทางธรรมชาติ (ดิน , เศษใบไม้ชนิดต่างๆ) วัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร (เปลือกถั่ว , ฟางข้าว , รำข้าว , แกลบ) และสารอินทรีย์โพลิเมอร์(แคลเซียมอาร์จีเนต อะกาโรส คาร์ราจีแนน)การเลือกวัสดุพาหะที่เหมาะสมขึ้นอยู่กับหลายปัจจัย เช่น ราคาถูก มีปริมาณเพียงพอต่อการนำไปใช้ เป็นต้น

พารามิเตอร์	สภาวะที่เหมาะสม
(ต่อ) ขนาดอนุภาคของสารตั้งต้น(particle size)	อนุภาคมีขนาดเล็ก มีข้อดีในการถ่ายเทความร้อน (heat transfer) และมีการแลกเปลี่ยนออกซิเจนและคาร์บอนไดออกไซด์ระหว่างอากาศและพื้นผิวของวัสดุพาหะ อนุภาคมีขนาดใหญ่ จะมีประสิทธิภาพในการหายใจหรือการได้รับอากาศได้ดีกว่า แต่มีพื้นผิวจำกัดสำหรับการทำงานของจุลินทรีย์

จึงมีงานวิจัยที่ศึกษาการหมักแบบของแข็งช่วยเพิ่มการเจริญและการอยู่รอดของจุลินทรีย์

Krishna และคณะ (1997) ได้ศึกษา การย่อยสลาย Dichloro diphenyl trichloroethane (DDT) ในดิน โดย *Bacillus sp.*(HIE 88)และ*Psuedomonas* sp.(HIE64) ในสภาวะการหมักในอาหารแข็ง(solid state fermentation) พบว่า *Bacillus sp.*(HIE 88)และ*Psuedomonas* sp.(HIE64)ที่เลี้ยงในสารตั้งต้นที่เป็นของแข็งสามารถเจริญและและย่อยสลาย Dichloro diphenyl trichloroethane (DDT) ได้ดีกว่าการเลี้ยงในอาหารเหลว(liquid fermentation)

Krishna และคณะ (2005) ได้ทำการศึกษา โดยเลี้ยงเชื้อ *Pseudomonas* sp. บนวัสดุทางการเกษตร ซึ่งเป็นการหมักในอาหารแข็ง พบว่า *Pseudomonas* sp. สามารถเจริญและอยู่รอดได้เมื่อนำไปใช้เป็นปุ๋ยหมักให้กับดิน ช่วยในการปรับปรุงและบำรุงดิน โดยเพิ่มปริมาณแร่ธาตุอาหาร และรักษาความอุดมสมบูรณ์ของดิน

Volke-Sepúlveda และคณะ (2003) ได้ศึกษา การย่อยสลาย Hexadecaneในดิน โดย *Aspergillus niger* ในสภาวะการหมักในอาหารแข็ง (solid state fermentation) และการหมักในอาหารเหลว(liquid fermentation) พบว่า *Aspergillus niger* ที่เลี้ยงในสภาวะการหมักในอาหารแข็ง ซึ่งจับกับสารตั้งต้นที่เป็น Polyurethane form(PUF) จะให้การเจริญและผลิตชีวมวล (biomass yield) ได้สูงกว่าในสภาวะการหมักแบบอาหารเหลว

จากงานวิจัยที่ได้กล่าวมาข้างต้น ที่ศึกษาถึงความสามารถในการอยู่รอดของจุลินทรีย์โดยใช้ประโยชน์จากวัสดุพาหะและการหมักแบบของแข็ง(solid state fermentation)ได้นั้น เพื่อรักษาจุลินทรีย์ให้มีชีวิตรอดได้ยาวนานยิ่งขึ้น โดยยังมีความบริสุทธิ์และไม่เปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรม จึงทำการเก็บจุลินทรีย์เพื่อหยุดหรือลดการเจริญเติบโต โดยควบคุมปัจจัยที่จำเป็นในการเจริญ เช่น การจำกัดอากาศ อุณหภูมิ สารอาหาร น้ำ เป็นต้น การเก็บรักษาจุลินทรีย์แต่ละวิธีต้องทำให้เชื้อยังมีชีวิตอยู่และคงเดิมให้มากที่สุดและไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงลักษณะพันธุกรรม จึงมีงานวิจัยที่ศึกษาถึงการเก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถเจริญละอยู่รอดได้ในสภาวะของแข็ง(solid state)

Trivedi และคณะ (2005) ได้ศึกษาการเตรียม carrier-based สำหรับหัวเชื้อแบคทีเรียที่ส่งเสริมการเจริญของพืช (plant growth-promoting) ที่เหมาะสม สำหรับใช้ในภูมิภาคที่มีอากาศเย็น โดยเตรียม *Bacillus subtilis* และ *Pseudomonas corrugata* ใน carrier-based ทั้ง 5 ชนิด ซึ่งประกอบด้วย Alginate bead , Alginate bead+milk , Alginate-coat seed , charcoal-based และอาหารเหลว(broth) จากนั้นนำมาเลี้ยงในต้นข้าวโพด แล้วคัดเลือก carrier-based ที่ให้การเจริญและการอยู่รอดของแบคทีเรียทั้ง 2 ชนิด ในต้นข้าวโพดได้ดีที่สุด พร้อมกับส่งเสริมการเจริญของต้นข้าวโพดด้วย พบว่า alginate base ให้ผลดีที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับ charcoal-base และอาหารเหลว ศึกษาการมีชีวิตรอดของแบคทีเรียทั้ง 2 ชนิด โดยเปรียบเทียบการเก็บรักษาเชื้อที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสและอุณหภูมิห้อง พบว่า เมื่อเก็บเชื้อที่เตรียมใน alginate base ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จะส่งเสริมการอยู่รอดได้ดีกว่าเก็บเชื้อที่อุณหภูมิห้อง เนื่องจากการเผาผลาญอาหารลดลงและไม่สูญเสียความชื้นในการเก็บรักษา

Pesenti– Barili และคณะ (1991) ได้ศึกษาการอยู่รอดของ *Agrobacterium radiobacter* K84 บนวัสดุหลายชนิดเพื่อนำมาใช้ในการควบคุมโรคพืช คัดเลือกวัสดุพาหะทั้ง 8 ชนิด โดยเลี้ยง *Agrobacterium radiobacter* K84 บนวัสดุพาหะทั้ง 8 ชนิด ซึ่งประกอบด้วย Agriperlite , Expanded clay , Kaolin , Celite , Diatom , Porosil MP , Micro-cel และ Vermiculite บรรจุใส่ถุงแล้วกำจัดอากาศออก จากนั้นเปรียบเทียบการเก็บรักษาเชื้อบนวัสดุพาหะทั้ง 8 ชนิดที่อุณหภูมิ 4 และ 21 องศาเซลเซียส พบว่า *Agrobacterium radiobacter* K84 สามารถเจริญและอยู่รอดได้ในวัสดุพาหะทั้ง 8 ชนิด เมื่อเก็บที่อุณหภูมิ 4 และ 21 องศาเซลเซียสโดยที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส พบว่า *Agrobacterium radiobacter* K84 สามารถเจริญและอยู่รอดบน Vermiculite , Celite , Porosil MP ได้ดีที่สุดและแบคทีเรียสามารถอยู่รอดได้ประมาณ 1-2 ปี และที่อุณหภูมิ 21 องศาเซลเซียส พบว่า *Agrobacterium radiobacter* K84 สามารถเจริญและอยู่รอดบน Kaolin , Expanded clay , Porosil MP ได้ดีและแบคทีเรียสามารถอยู่รอดได้ประมาณ 3-5 เดือน

จากงานวิจัยจะเห็นได้ว่า วัสดุพาหะแต่ละชนิดส่งเสริมการเจริญและรอดชีวิตของแบคทีเรียได้แตกต่างกัน ขึ้นอยู่กับอุณหภูมิในการเก็บรักษาแบคทีเรีย

จากที่กล่าวมาข้างต้นการบำบัดทางชีวภาพโดยการเติมจุลินทรีย์ต่างถิ่นที่มีความสามารถในการย่อยสลาย PAHs ลงในดิน เพื่อให้เกิดการย่อยสลายทางชีวภาพ ต้องคำนึงถึงความอยู่รอดและความสามารถในการย่อยสลายสารพิษของจุลินทรีย์ต่างถิ่นที่เติมลงในดินเป็นสำคัญ

ปิยะวรรณ เพชราภา (2549) ทำการศึกษาประสิทธิภาพการย่อยสลายไพรีนในดินของกลุ่มแบคทีเรีย STK พบว่า กลุ่มแบคทีเรีย STK ไม่สามารถย่อยสลายไพรีนในดินระบบนิเวศน์จำลองแบบ solid state ตลอดระยะเวลาที่บ่มเชื้อเป็นเวลา 1 เดือน พบว่าปริมาณไพรีนยังคงที่ ผู้วิจัยได้เสนอสมมติฐานว่า อาจเกิดจากแบคทีเรีย STK ที่เติมลงไปในดินมีคุณสมบัติไฮโดรโฟบิกสูงเป็นผลให้เชื้อไม่สามารถกระจายตัว เนื่องจากในระบบทดลองในดินเป็นระบบนิ่งไม่ได้มีการเขย่าตลอดเวลาดังเช่นการทดลองเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวที่มีการเขย่าตลอดระยะเวลาของการทดลอง นอกจากนี้การที่ไพรีนอยู่ในดินเป็นระยะเวลานานขึ้น เป็นผลให้มีการติดอยู่กับอนุภาคของดินมากขึ้น ทำให้แบคทีเรียนำไปใช้ได้ยากขึ้น (low availability) (Johnsen และคณะ, 2005)

ดังนั้น ในงานวิจัยนี้จึงมีจุดมุ่งหมายที่จะศึกษาการสร้างกล้าเชื้อในวัสดุพาหะก่อนที่จะเติมลงในดินเพื่อทำให้แบคทีเรียคุ้นเคยและสามารถมีชีวิตรอดขณะที่ใช้บำบัดในดินที่ปนเปื้อนไพรีน