

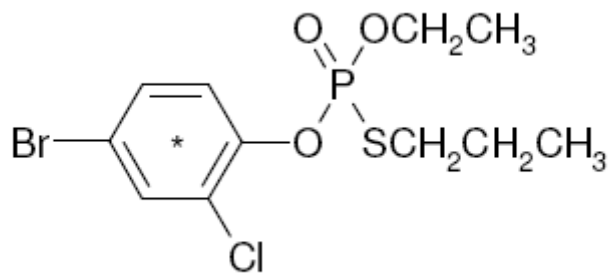
บทที่ 2

ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 สารกำจัดศัตรูพืชโพฟีโนฟอส

2.1.1 สมบัติของสารโพฟีโนฟอส

สารโพฟีโนฟอสมีสูตรโมเลกุล คือ $C_{11}H_{15}BrClO_3PS$ ชื่อทางเคมี คือ O-(4-bromo-2-chlorophenyl) O-ethyl S-propyl phosphorothioate มีลักษณะทางโครงสร้างของสารโพฟีโนฟอสดังภาพที่ 2.1 น้ำหนักโมเลกุล 373.6 มีจุดเดือดที่ $110^{\circ}C$ ที่ 0.001 mmHg ลักษณะทางกายภาพเป็นของเหลวสีเหลืองมีกลิ่นเหม็น ความสามารถในการละลายน้ำ 20 mg/l ที่ $25^{\circ}C$ (Worthing, 1979) สารโพฟีโนฟอสสามารถละลายได้ดีในตัวทำละลาย อาทิ เช่น อะซิโตน เมทานอล ไซลีน มีค่าความหนาแน่นที่ 1.46 g/ml มีความคงตัวในสภาวะเป็นกลางและเป็นกรดอ่อน แต่สามารถถูกไฮโดรไลซิสในสภาวะเป็นด่าง



ภาพที่ 2.1 ลักษณะโครงสร้างของสารโพฟีโนฟอส

2.1.2 การใช้ประโยชน์ของสารโพฟีโนฟอส

สารโพฟีโนฟอสได้นำมาใช้ประโยชน์ในทางการเกษตรเพื่อการควบคุมแมลง ทั้งกลุ่มเพี้ยไฟ ไร หนอน และแมลงต่าง ๆ ที่เป็นศัตรูพืชในพืชไร่ต่าง ๆ เช่น ฝ้าย มันฝรั่ง ผักต่าง ๆ เป็นต้น โดยพบว่ามีหลายประเทศที่ใช้สารโพฟีโนฟอสกันอย่างแพร่หลาย ตัวอย่างเช่น ในปากีสถานมีการใช้สารโพฟีโนฟอส คิดเป็นร้อยละ 80 ของสารกำจัดแมลงทั้งหมดที่ใช้เพื่อควบคุมศัตรูพืชในไร่ฝ้าย ในประเทศอียิปต์สารโพฟีโนฟอสนิยมใช้อย่างแพร่หลายเพื่อควบคุมแมลงศัตรูพืชในพริกไทย ผัก และธัญพืชต่างๆ ในสหรัฐอเมริกากว่าร้อยละ 80 ของรัฐที่มีการเพาะปลูกฝ้ายใช้สารโพฟีโนฟอส (US EPA, 2006)

ส่วนในประเทศไทยสารโพฟีโนฟอสถูกใช้ด้านการเกษตร เช่น การปลูกพริกและผักต่าง ๆ รวมถึงการใช้ในการป้องกันกำจัดแมลงศัตรูฝ้าย เช่น หนอนเจาะสมอฝ้าย หนอนกระทุ้งฝัก หนอนม้วนใบฝ้าย หนอนคืบกินใบ มวนแดงฝ้าย จากการสำรวจข้อมูลสารโพฟีโนฟอสที่ใช้ในทางการค้าพบว่าอัตราส่วนการใช้งานทั่วไป ได้แก่ ปริมาณสารโพฟีโนฟอสเข้มข้น (สารความเข้มข้นร้อยละ 40 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) 80 ลบ.ซม. ผสมน้ำ 20 ลิตร ซึ่งคิดเป็นประมาณ 1.7 กรัมต่อลิตร ฉีดพ่นลงในพืชและดิน

2.1.3 ความเป็นพิษของสารโพรพิโนฟอส

องค์การอนามัยโลก (WHO, World Health Organization) ได้จำแนกสารโพรพิโนฟอสให้อยู่ในกลุ่มสารอันตรายในคลาสที่ 2 (toxicity class II) (WHO, 2004) โพรพิโนฟอสเป็นหนึ่งในสารกลุ่มออร์แกนโนฟอสฟอรัสซึ่งเป็นพิษทั้งต่อสัตว์ที่มีกระดูกสันหลัง และไม่มีกระดูกสันหลัง (Moulton et al., 1996; Fulton and Key, 2001) จากงานวิจัยที่ผ่านมาพบว่ามีข้อมูลการศึกษาถึงผลกระทบของสารโพรพิโนฟอสต่อกระบวนการเปลี่ยนแปลงระบบเมตาบอลิซึม ทั้งในมนุษย์ (Gotoh et al., 2001) และสัตว์ เช่น ปลาแคร์ฟ (Ismail et al., 2009) และหนู (Abass et al., 2007) เป็นต้น โดยสารโพรพิโนฟอสมีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อะซีทิลโคลีนเอสเตอเรสซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่เร่งการสลายตัวของสารอะเซทิลโคลีนซึ่งเป็นสารสื่อประสาทบริเวณรอยต่อของเซลล์ประสาท (Landis and Yu, 1995) ทำให้เกิดการสะสมของอะเซทิลโคลีนซึ่งเป็นสารสื่อประสาทบริเวณรอยต่อของเซลล์ประสาทที่บริเวณต่างๆ จึงเกิดการกระตุ้นเซลล์ประสาทมากและติดต่อกันนาน โดยเฉพาะที่ระบบประสาทอัตโนมัติทำให้กล้ามเนื้อกระตุกและเกร็งและเกิดอาการอ่อนเพลีย หากได้รับในปริมาณมากอาจถึงตายได้ สำหรับในสัตว์พบว่า มีค่า LD_{50} ในหนูเท่ากับ 538 mg/kg (Pope, 1999)

2.1.4 ความคงทนของสารโพรพิโนฟอสในสิ่งแวดล้อม

สารโพรพิโนฟอสมีความคงตัวในสภาวะที่เป็นกลางและเป็นกรดอ่อนๆ แต่จะถูกไฮโดรไลซ์ได้ง่ายในสารละลายที่เป็นด่าง สารโพรพิโนฟอสมีค่าครึ่งชีวิตในน้ำอยู่ที่ประมาณ 0.25 ถึง 93 วัน และมีค่าครึ่งชีวิตในดินอยู่ที่ประมาณ 1 สัปดาห์ (Roberts and Hutson, 1998)

2.2 การฟื้นฟูพื้นที่ปนเปื้อนด้วยวิธีการทางชีวภาพ

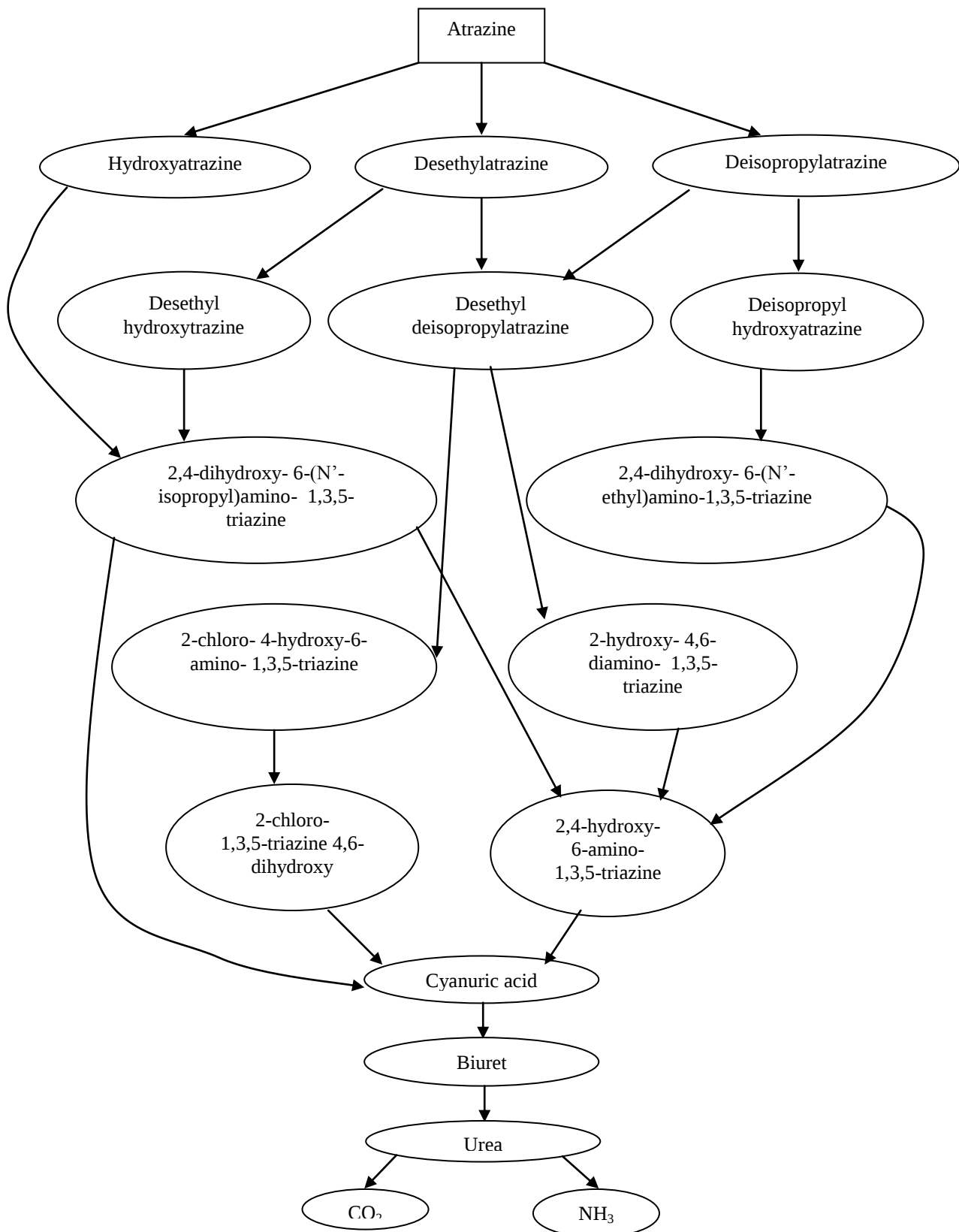
การฟื้นฟูพื้นที่ปนเปื้อนด้วยวิธีการทางชีวภาพ (bioremediation) หมายถึง การกำจัดมลสารโดยการย่อยสลายหรือเปลี่ยนรูปสารให้มีความเป็นพิษลดลงด้วยกระบวนการทางชีวภาพ (Alexander, 1999) โดยทั่วไปเป็นกระบวนการดังกล่าวเป็นการทำงานโดยจุลินทรีย์ การฟื้นฟูพื้นที่ปนเปื้อนด้วยวิธีการทางชีวภาพเป็นการบูรณาการความรู้ทั้งด้านวิศวกรรม จุลชีววิทยา ชีวเคมี นิเวศวิทยา ตลอดจนธรณีวิทยาเพื่อควบคุมให้จุลินทรีย์สามารถย่อยสลายสารพิษเป้าหมายได้ภายใต้สภาวะแวดล้อมต่าง ๆ กระบวนการฟื้นฟูพื้นที่ปนเปื้อนด้วยวิธีการทางชีวภาพเป็นการปรับปรุงอัตราการย่อยสลายมลสารด้วยการเติมสารอาหาร สารคาร์บอน ตลอดจนตัวให้อิเล็กตรอน (electron donor) นอกจากนี้ยังอาจเติมจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการย่อยสลายมลสารเพื่อเพิ่มอัตราการย่อยสลายได้อีกด้วย เป้าหมายของการฟื้นฟูพื้นที่ปนเปื้อนด้วยวิธีการทางชีวภาพ คือ การเปลี่ยนสภาพมลสารให้กลายเป็นแร่ธาตุอย่างสมบูรณ์ (complete mineralization) โดยไม่มีสารมัธยันตร์ (intermediate) สะสมในสิ่งแวดล้อม องค์ประกอบพื้นฐานของการฟื้นฟูพื้นที่ปนเปื้อนด้วยวิธีการทางชีวภาพ ได้แก่ ชนิดและลักษณะสมบัติของจุลินทรีย์ และปัจจัยแวดล้อมที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์และการย่อยสลายมลสาร (Alexander, 1999)

2.2.1 ชนิดและลักษณะสมบัติของจุลินทรีย์ในการย่อยสลายทางชีวภาพ

จุลินทรีย์เป็นองค์ประกอบที่สำคัญที่สุดในกระบวนการการฟื้นฟูพื้นที่ปนเปื้อนด้วยวิธีการทางชีวภาพ กล่าวคือ จุลินทรีย์จะผลิตเอนไซม์ซึ่งเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาชีวภาพ (biocatalyst) เพื่อใช้ในการย่อยสลายมลสาร ดังนั้นสามารถกล่าวได้ว่าความสามารถในการย่อยสลายมลสารและวิธีการย่อยสลาย (degradation pathway) ขึ้นอยู่กับจุลินทรีย์และความสามารถในการผลิตเอนไซม์ ประเภทของจุลินทรีย์สามารถแบ่งออกได้หลายรูปแบบ เช่น แบ่งตามแหล่งของคาร์บอน และแหล่งพลังงานที่ได้รับ โดยมีรายละเอียดดังนี้

1. การแบ่งประเภทของจุลินทรีย์ตามแหล่งของคาร์บอน (carbon source)
 - เฮเทอโรโทรป (heterotroph) คือ จุลินทรีย์ที่ใช้คาร์บอนจากสารอินทรีย์ในการสร้างเซลล์ สามารถกล่าวได้ว่าจุลินทรีย์กลุ่มนี้ใช้สารอินทรีย์เป็นอาหาร ดังนั้นสารอินทรีย์ที่ปนเปื้อนอยู่ในพื้นที่จะถูกกำจัดไป
 - ออโตโทรป (autotroph) คือ จุลินทรีย์ที่ใช้คาร์บอนจากก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2) เพื่อการสร้างเซลล์ โดยทั่วไปกลุ่มจุลินทรีย์นี้มิได้มีบทบาทในการกำจัดสารอินทรีย์ แต่มีบทบาทอื่น ๆ ที่สำคัญ เช่น จุลินทรีย์ที่กำจัดไนโตรเจนด้วยกระบวนการไนตริฟิเคชัน (nitrification) เป็นต้น
2. การแบ่งประเภทของจุลินทรีย์ตามแหล่งของพลังงาน (energy source)
 - โฟโตโทรป (phototroph) คือ จุลินทรีย์ที่ใช้แสงเป็นแหล่งพลังงาน ซึ่งจุลินทรีย์ประเภทนี้สามารถแบ่งย่อยตามแหล่งคาร์บอนที่ใช้ ซึ่งกลุ่มย่อยที่เป็นสารอินทรีย์ที่แหล่งคาร์บอน เรียกว่า โฟโตเฮเทอโรโทรป (photoheterotroph) เช่น แบคทีเรียที่กำจัดซัลเฟอร์ (sulfur-reducing bacteria) เป็นต้น ส่วนจุลินทรีย์ที่ใช้ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์เป็นแหล่งคาร์บอน เรียกว่า โฟโตออโตโทรป (photoautotroph) เช่น สาหร่ายและแบคทีเรียที่สังเคราะห์แสง เป็นต้น
 - เคมีโทรป (chemotroph) คือ จุลินทรีย์ที่ได้แหล่งพลังงานจากปฏิกิริยาออกซิเดชัน-รีดักชัน ซึ่งแบ่งย่อยตามแหล่งคาร์บอนได้เป็น 2 กลุ่มย่อย คือ กลุ่มที่ใช้คาร์บอนจากสารอินทรีย์ เรียกว่า เคมีเฮเทอโรโทรป (chemoheterotroph) เช่น โปโตซัว รา และ แบคทีเรียส่วนใหญ่ ซึ่งจุลินทรีย์ประเภทนี้ได้พลังงานจากปฏิกิริยาออกซิเดชัน-รีดักชันการย่อยสลายสารอินทรีย์ ส่วนจุลินทรีย์ที่ใช้แหล่งคาร์บอนจากก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์เรียกว่า เคมีออโตโทรป (chemoautotroph) เช่น ไนตริไฟอิงแบคทีเรีย (nitrifying bacteria) เป็นต้น สำหรับจุลินทรีย์กลุ่มนี้จะได้พลังงานมาจากปฏิกิริยาออกซิเดชัน-รีดักชัน ของสารอนินทรีย์ เช่น แอมโมเนีย ไนเตรท และซัลไฟด์ เป็นต้น

การย่อยสลายมลสารอินทรีย์เกิดจากการเปลี่ยนรูปมลสาร (biotransformation) เป็นมลสารอินทรีย์ชนิดอื่น ๆ หรืออาจกล่าวได้ว่ากระบวนการย่อยสลายไม่สมบูรณ์ แต่ถ้ากระบวนการย่อยสลายสมบูรณ์สารอินทรีย์จะถูกเปลี่ยนเป็นแร่ธาตุหรือสารอนินทรีย์ (mineralization) จุลินทรีย์ชนิดต่าง ๆ อาจมีความสามารถในการย่อยสลายได้ทั้งมลสารและสารอินทรีย์มัธยันตร์ได้อย่างสมบูรณ์หรือเพียงบางชนิด ตัวอย่างเช่น การย่อยสลายสารกำจัดศัตรูพืชอะทราซีน (atrazine) มีวิธีการย่อยสลายทางชีวภาพสมบูรณ์ดังภาพที่ 2.2 และมีจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการย่อยสลายได้สมบูรณ์และบางส่วนดังตารางที่ 2.1



ภาพที่ 2.2 วิธีการย่อยสลายสารอะทราซีน (Carter, 1996; Sadowsky and Wackett, 2001)

ตารางที่ 2.1 จุลินทรีย์และผลิตภัณฑ์ของการย่อยสลายสารอาหารขึ้น

Microorganisms	Degradation products	References
<i>Pseudomonas</i> ADP	CO ₂	Mandelbaum et al., 1995.
<i>Rhodococcus</i> TE1	DIA, DEA	Shao and Behki, 1995.
<i>Ralstonia</i> M91-3	CO ₂	Radosevich et al., 1995.
<i>Alcaligenes</i> SG1	CO ₂	Boundy et al., 1997.
<i>Rhizobium</i> PATR	CO ₂	Bouquard et al., 1997.
<i>Agrobacterium</i> J14A	CO ₂	Struthers et al., 1998.
Bacterium 38/38	CO ₂	de Souza et al., 1998.
<i>Clavibacter michiganese</i> ATZ1	N-ethylammelide	de Souza et al., 1998.
<i>Arthrobacter aureus</i> TC1	Cyanuric acid	Strong et al., 2002.
<i>Nocardioides</i> sp. SP12	Cyanuric acid	Piutti et al., 2003.
<i>Chelatobacter heintzii</i> Citl	Cyanuric acid	Rousseaux et al., 2003.
<i>Arthrobacter nicotinovorans</i> HIM	Cyanuric acid	Aislabie et al., 2005.

2.2.2 ปฏิกริยาและปัจจัยที่มีผลต่อการย่อยสลายทางชีวภาพ

ประเภทของปฏิกริยาการเปลี่ยนหรือย่อยสลายมลสารด้วยกระบวนการทางชีวภาพสามารถแบ่งออกได้เป็น 6 ประเภท (อลิสตา วังใน, 2553) ดังต่อไปนี้

- ปฏิกริยาไฮโดรไลซิส (hydrolysis)
- ปฏิกริยาการแตกตัว (cleavage)
- ปฏิกริยาออกซิเดชัน-รีดักชัน (oxidation and reduction)
- ปฏิกริยาดีไฮโดรจีเนชัน (dehydrogenation)
- ปฏิกริยาดีไฮโดรฮาโลจีเนชัน (dehydrohalogenation)
- ปฏิกริยาการแทนที่ (substitution)

ปัจจัยที่มีผลต่อกระบวนการย่อยสลายในการฟื้นฟูพื้นที่ปนเปื้อนมีหลายประการ ซึ่งมีรายละเอียด ดังนี้

1. ชนิดและลักษณะสมบัติของจุลินทรีย์ จุลินทรีย์ในธรรมชาติที่มีการปรับตัวให้สามารถทนต่อสารพิษ และมีความสามารถในการย่อยสลายสารพิษนั้นเพื่อใช้เป็นสารอาหารหรือเปลี่ยนรูปสารพิษให้มีความเป็นพิษน้อยลง จากงานวิจัยหลายชิ้นที่ผ่านมา ซึ่งได้มีการคัดแยกจุลินทรีย์เพื่อศึกษาการย่อยสลายสารมลพิษ (Li et al., 2007; Wang et al., 2007; Benimeli et al., 2008; Li et al., 2008; Malghani et al., 2009; Xie et al., 2009) ผลการศึกษาดังกล่าวพบว่า จุลินทรีย์ที่คัดแยกได้สามารถย่อยสลายสารพิษได้อย่างมีประสิทธิภาพ ซึ่งจุลินทรีย์ที่ใช้

สำหรับย่อยสลายสารพิษเป็นจุลินทรีย์ที่มีการคัดแยกได้จากพื้นที่ปนเปื้อนสารพิษนั้น ๆ ที่สามารถปรับตัวทนต่อสารพิษและสามารถย่อยสลายสารพิษนั้นได้

2. แหล่งพลังงาน ในการย่อยสลายสารพิษจะเกิดปฏิกิริยาต่าง ๆ ได้แก่ ปฏิกิริยาออกซิเดชัน-รีดักชัน ซึ่งสุดท้ายจะเป็นการสร้างพลังงานให้แก่เซลล์จุลินทรีย์เพื่อการเจริญเติบโต จากการศึกษาการย่อยสลายสารมลพิษของจุลินทรีย์ เพื่อใช้เป็นแหล่งพลังงาน (Malghani et al., 2009; Xie et al., 2009) พบว่าจุลินทรีย์มีการย่อยสลายสารมลพิษเพื่อใช้เป็นแหล่งพลังงานในการเจริญเติบโต เช่นงานวิจัยในอดีตได้ศึกษาการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ในอาหารเลี้ยงเชื้อเอ็มเอสเอ็ม (Minimal Salt Medium ; MSM) ที่ผสมสารไดอะซินอน (diazinon) ผลการศึกษาการย่อยสลายสารพิษ และผลของการเจริญเติบโตแสดงให้เห็นว่าเชื้อจุลินทรีย์มีการใช้สารพิษเพื่อเป็นแหล่งพลังงานสำหรับการเจริญเติบโต โดยเมื่อเวลาผ่านไปความเข้มข้นของสารลดลงกว่าร้อยละ 80 และจำนวนเซลล์มีการเพิ่มกว่า 3 เท่าในระยะเวลา 14 วัน
3. ความชื้น ความชื้นหรือปริมาณน้ำในสิ่งแวดล้อมเป็นอีกปัจจัยที่มีผลต่อการย่อยสลายสารพิษของจุลินทรีย์ โดยส่งผลต่อการเจริญเติบโตและการเปลี่ยนรูปสารพิษการกระจายตัว และการละลายของก๊าซออกซิเจน และปริมาณของสารพิษที่จุลินทรีย์สามารถนำมาใช้ประโยชน์ได้ ขึ้นอยู่กับสมบัติของสารพิษนั้น ๆ
4. ความเป็นกรดต่าง ความเป็นกรดต่างของสิ่งแวดล้อมมีผลต่อการดูดซึมสารอาหาร การเจริญและการทำงานของจุลินทรีย์ ดังนั้นในการย่อยสลายสารพิษทางชีวภาพจึงจำเป็นต้องมีการควบคุมความเป็นกรดต่างอย่างสม่ำเสมอ จากการศึกษาที่ผ่านมาได้มีการทดลองเพื่อย่อยสลายสารมลพิษในสภาวะของความเป็นกรดต่างที่ต่างกัน ตัวอย่างเช่น จากงานวิจัยที่ผ่านมา (Malghani et al., 2009) ได้ศึกษาความสามารถในการย่อยสลายสารโพर्फิโนฟอสของจุลินทรีย์ที่ผ่านการคัดแยก โดยในการทดลองได้มีการทดสอบผลของความเป็นกรดต่างต่อประสิทธิภาพในการย่อยสลายสารโพर्फิโนฟอส ช่วงพีเอชที่ทดสอบ คือ 5.5-7.2 ผลการทดลองพบว่าจุลินทรีย์สามารถย่อยสลายสารโพर्फิโนฟอสได้ดีที่สุดที่พีเอช 6.5 จากผลดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าสภาวะความเป็นกรดต่างต่างกันมีผลต่อความสามารถในการย่อยสลายสารมลพิษของจุลินทรีย์
5. อุณหภูมิ เป็นปัจจัยที่มีผลต่ออัตราการย่อยสลายสารพิษ โดยอุณหภูมิจะมีผลต่อการเกิดปฏิกิริยาเคมีต่าง ๆ รวมไปถึงการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ที่มีความจำเพาะต่ออุณหภูมิในสภาพแวดล้อมนั้น ๆ จากการวิจัยของ Head and Oleszkiewicz (2004) ได้ศึกษาการย่อยสลายไนโตรเจน โดยทำการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิเพื่อดูการเกิดปฏิกิริยาไนตริฟิเคชัน (nitrification) ของจุลินทรีย์ ทดลองโดยใช้อุณหภูมิเริ่มต้นที่ 20 25 และ 30°C อุณหภูมิสุดท้ายที่ 10°C จากการทดลองพบว่าอุณหภูมิเริ่มต้นที่ 20°C มีการลดลงของแอมโมเนียไนโตรเจน (NH₃-N) มากที่สุดรองลงมาคือที่อุณหภูมิ 25 และ 30°C ซึ่งการลดลงของแอมโมเนียไนโตรเจนแสดงให้เห็นถึงเกิดปฏิกิริยาไนตริฟิเคชันมากที่สุด จากผลดังกล่าวจะเห็นว่าอุณหภูมามีผลต่อการทำงานของจุลินทรีย์และการเกิดปฏิกิริยาเคมีต่าง ๆ

6. สารอาหาร สารอาหารเป็นสิ่งจำเป็นต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ในการเจริญเติบโต โดยสารอาหารหลักได้แก่ คาร์บอน ไนโตรเจน และฟอสฟอรัส รวมไปถึงสารอินทรีย์อื่น ๆ ซึ่งโดยทั่วไปสารพิษที่ปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อมจุลินทรีย์อาจสามารถย่อยสลายและนำสารนั้นมาเป็นสารอาหารได้ โดยได้มีการศึกษาผลของสารอาหารต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ (Xie et al., 2009; Malghani et al., 2009) การศึกษาดังกล่าวเติมสารอาหารนอกเหนือจากสารพิษที่จุลินทรีย์สามารถย่อยสลายเพื่อใช้เป็นแหล่งพลังงานหลักเพิ่มลงไป เช่นในงานวิจัยของ Xie et al. (2009) ได้มีการศึกษาการย่อยสลายสารมาลาไทออน (Malathion) โดยมีการเติมสารอาหารที่นอกเหนือจากสารพิษ ซึ่งผลการทดลองพบว่าจุลินทรีย์สามารถในการย่อยสลายสารพิษเพิ่มมากขึ้นกว่าร้อยละ 60 เมื่อเทียบกับชุดที่ไม่มีการเติมสารอาหาร จากผลดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าสารอาหารมีความจำเป็นต่อการย่อยสลายสารพิษของจุลินทรีย์
7. โครงสร้างของสารพิษ ในการย่อยสลายสารพิษทางชีวภาพโครงสร้างและลักษณะสมบัติของสารพิษ เป็นปัจจัยที่ส่งผลต่อการย่อยสลายสารและการดูดซับนำสารมาใช้เป็นสารอาหารในการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ จากงานวิจัยที่ผ่านมาได้มีการนำจุลินทรีย์มาใช้ย่อยสลายสารอาหารซิน (Li et al., 2008) ผลการศึกษาระบุว่าจุลินทรีย์ใช้สารอาหารซินเป็นแหล่งไนโตรเจน และจากการวิจัย Malghani et al., (2009) ได้คัดแยกเชื้อที่สามารถย่อยสลายสารโพรพิโนฟอส จากการวิจัยระบุได้ว่าจุลินทรีย์ย่อยสลายสารโพรพิโนฟอสเพื่อใช้เป็นแหล่งคาร์บอน จากการวิจัยทั้งสองแสดงให้เห็นว่าเนื่องจากโครงสร้างของสารพิษที่ต่างกัน จุลินทรีย์จึงมีการย่อยสลายสารพิษนั้นเพื่อใช้เป็นแหล่งสารอาหารต่างกัน
8. จำนวนครั้งหรือความถี่ของการปนเปื้อนสารพิษ เมื่อมีการปนเปื้อนของสารพิษในสิ่งแวดล้อม จุลินทรีย์สามารถปรับตัวให้ทนต่อสารหรือมีการย่อยสารพิษนั้น และเมื่อมีการปนเปื้อนสารพิษเดิมหรือสารพิษที่มีโครงสร้างคล้ายกันในครั้งต่อมา จะทำให้จุลินทรีย์ในบริเวณดังกล่าวไม่ต้องใช้เวลาในการปรับตัวนาน ส่งผลต่อความสามารถในการย่อยสลายสารพิษที่ปนเปื้อนสูงขึ้น จากงานวิจัยหลายชิ้นที่ได้มีการศึกษาเกี่ยวกับการคัดแยกจุลินทรีย์จากพื้นที่ปนเปื้อนสารพิษเพื่อใช้สำหรับการย่อยสลายสารพิษ โดยทำการคัดแยกจุลินทรีย์จากพื้นที่ที่มีการปนเปื้อนของสารพิษสะสมเป็นเวลานานเพื่อให้ได้จุลินทรีย์ที่ทนต่อสารพิษ และสามารถสลายสารพิษนั้นได้อย่างมีประสิทธิภาพ (Li et al., 2007; Wang et al., 2007; Benimeli et al., 2008; Li et al., 2008; Xie et al., 2009; Malghani et al., 2009)

2.3 กระบวนการเติมเซลล์

กระบวนการเติมทางชีวภาพ (bioaugmentation) หรือ การเติมสารชีวภาพเป็นกระบวนการที่ใช้ในทางเกษตรมาเป็นเวลานาน (van Veen et al., 1997; Gentry et al., 2004) เช่น การเติมปุ๋ยชีวภาพซึ่งมีจุลินทรีย์ที่ช่วยส่งเสริมการเพาะปลูกพืช การปลูกพืชตระกูลถั่วซึ่งที่รากพืชมีแบคทีเรียที่ช่วยในการตรึงไนโตรเจนส่งผลให้เพิ่มแร่ธาตุในการเพาะปลูก เป็นต้น ในงานสิ่งแวดล้อมการเติมทางชีวภาพเป็นกระบวนการที่ใช้ในการย่อยสลายสารอินทรีย์ในถังเซปติก (septic tank) และการทำปุ๋ยหมักอย่างแพร่หลาย (Fang and Wong, 2001) ต่อมาการเติมทางชีวภาพได้รับการพัฒนาเพื่อใช้ในการฟื้นฟูพื้นที่ปนเปื้อน (van Veen et al., 1997; Devinny and Chang, 2000; Gentry et al., 2004)

2.3.1 ประเภทของการเติมทางชีวภาพ

เทคนิคการเติมทางชีวภาพสามารถจำแนกออกได้เป็น 4 กลุ่ม (Gentry et al., 2004) ดังนี้

- การเติมเซลล์ (cell bioaugmentation) คือ การเติมเซลล์จุลินทรีย์ที่มีชีวิตซึ่งสามารถกำจัดสารปนเปื้อนลงในสิ่งแวดล้อมโดยตรง ซึ่งการเติมเซลล์อาจเติมในรูปแบบเซลล์กระจายอิสระ (suspended cell) หรือเซลล์ตรึง (immobilized cell) (Pepper et al., 2002)
- การเติมยีน (gene bioaugmentation) คือ การเติมยีนที่ส่งเสริมการย่อยสลายสารลงจุลินทรีย์ดั้งเดิม (indigenous microorganism) เพื่อให้จุลินทรีย์ดังกล่าวสามารถย่อยสลายสารปนเปื้อนได้
- การเติมพืช (phytoaugmentation) คือ การเติมยีนดัดแปลงที่ส่งเสริมการย่อยสลายสารลงในพืช เพื่อให้พืชดังกล่าวสามารถย่อยสลายหรือทนสารปนเปื้อนได้
- การเติมไรโซสเฟียร์ทางชีวภาพ (rhizosphere bioaugmentation) คือ การเติมจุลินทรีย์ลงในรากพืช

เทคนิคการเติมทั้งหมดส่วนมากแล้วยังอยู่ในขั้นตอนการศึกษาวิจัย มีเพียงการเติมเซลล์ที่ได้รับการพัฒนาจนกระทั่งประยุกต์ใช้จริง เนื่องจากเป็นวิธีการไม่ซับซ้อนและมีประสิทธิภาพในการฟื้นฟูการปนเปื้อนสูง สาเหตุที่จำเป็นต้องมีการเติมเซลล์เนื่องจากจุลินทรีย์ในธรรมชาติอาจไม่สามารถกำจัดสารพิษหรือใช้เวลานานในการกำจัด ดังนั้นการเติมเซลล์จึงสามารถแก้ปัญหาดังกล่าวได้ โดยปัจจัยพิจารณาในการเติมเซลล์ประกอบด้วย แหล่งที่มาของเซลล์และปัจจัยแวดล้อมที่มีผลต่อเซลล์ที่ถูกเติม

2.3.2 แหล่งที่มาของเซลล์ที่ใช้ในการเติมเซลล์

แหล่งที่มาของเซลล์ที่ใช้ในการเติมเซลล์ ประกอบด้วย แหล่งปนเปื้อนอื่น พื้นที่ศึกษา จุลินทรีย์ทางการค้า และจุลินทรีย์ดัดแปลงพันธุกรรม (Devinny and Chang, 2000) โดยมีรายละเอียดดังนี้

- แหล่งปนเปื้อนอื่น กล่าวคือ แหล่งปนเปื้อนอื่นซึ่งมีสารปนเปื้อนประเภทเดียวกัน ซึ่งได้คัดแยกและระบุสายพันธุ์จุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการกำจัดสารปนเปื้อนแล้ว อาจนำมาใช้ในพื้นที่อื่น ๆ ได้เช่นกัน ตัวอย่างเช่น ในการกำจัดสารอาหารพิษ เมื่อประมาณ 15 ปีที่แล้วได้มีนักวิจัยคัดแยกจุลินทรีย์ *Pseudomonas* sp. ADP ซึ่งมีความสามารถในการกำจัดสารอาหารพิษสูงมาก (Mandelbaum et al., 1995) จากนั้นจึงได้มีการศึกษาวิจัยตลอดจนการประยุกต์ใช้จุลินทรีย์ดังกล่าวในการฟื้นฟูพื้นที่ปนเปื้อนตามมากมายในหลายประเทศ (Katz et al., 2000; Seffernick et al., 2000; Clausen et al., 2002; Gonzalez et al., 2003; Neumann et al., 2004) เป็นต้น
- พื้นที่ศึกษา แหล่งจุลินทรีย์ที่ใช้ในการเติมเซลล์ที่สำคัญคือที่พื้นที่ปนเปื้อน กล่าวคือ ในพื้นที่ปนเปื้อนเองมีความเป็นไปได้ที่จะมีจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการย่อยสลายสารปนเปื้อน ซึ่งสามารถกระทำได้โดยการคัดแยกจุลินทรีย์จากดินหรือน้ำที่ปนเปื้อน จุลินทรีย์ดังกล่าวมีข้อดี คือ ภายหลังจากการคัดแยกจุลินทรีย์ที่ต้องการได้แล้ว เมื่อนำไปใช้จริงจุลินทรีย์ดังกล่าวมีความคุ้นเคยกับสภาพแวดล้อมของพื้นที่ศึกษา ดังนั้นจุลินทรีย์นี้จะสามารถเจริญเติบโตและมีประสิทธิภาพในการกำจัดสารปนเปื้อนสูง (Devinny and Chang, 2000)
- จุลินทรีย์ทางการค้า เป็นอีกทางเลือกของแหล่งจุลินทรีย์ ข้อดีของจุลินทรีย์ประเภทนี้ คือ ความสะดวกในการใช้งาน แต่อย่างไรก็ตามจุลินทรีย์นี้มีข้อเสีย คือ ในบางครั้งข้อมูลของจุลินทรีย์เป็นความลับทางการค้า ส่งผลให้กรณีที่มีปัญหาในขณะใช้งานอาจจัดการแก้ไขเองได้ยาก รวมทั้งจุลินทรีย์ดังกล่าวมิได้นำมาจากพื้นที่ศึกษาโดยตรงอาจมีปัญหากับสภาพกับสิ่งแวดล้อม (Qasim and Stinehelfer, 1982; Devinny and Chang, 2000)
- จุลินทรีย์ดัดแปลงพันธุกรรม จุลินทรีย์ประเภทนี้มีการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมซึ่งอาจเป็นการรวมหรือเคลื่อนย้ายยีนบางอย่างเพื่อการจัดสารปนเปื้อน ซึ่งวิธีการนี้เป็นทางเลือกในการกำจัดสารปนเปื้อนหลายชนิดพร้อมกัน ตัวอย่างเช่น ในงานวิจัยของ Wackett et al. (1995) ได้ดัดแปลงจุลินทรีย์ *Pseudomonas putida* ให้มียีนที่สามารถควบคุมการกำจัดสารที่มีฟลูออรีน คลอรีน และโบรมีนเป็นองค์ประกอบ ดังนั้นจุลินทรีย์ดังกล่าวสามารถกำจัดสารทั้งสามกลุ่มได้ในเวลาเดียวกัน แต่อย่างไรก็ตามวิธีการนี้มีค่าใช้จ่ายสูง มีความยุ่งยากในการปฏิบัติ และยังมีอันตรายอื่น ๆ จากเซลล์ดัดแปลงได้ (Devinny and Chang, 2000)

2.3.3 ปัจจัยแวดล้อมที่มีผลต่อเซลล์ที่ถูกเติม

ปัจจัยแวดล้อมที่มีผลต่อเซลล์ที่ถูกเติมในการฟื้นฟูพื้นที่ปนเปื้อนมีรายละเอียดดังตารางที่ 2.2 (van Veen et al., 1997) ซึ่งปัจจัยแวดล้อมสามารถจำแนกได้เป็น 2 กลุ่ม คือ ปัจจัยทางชีวภาพและปัจจัยอื่น ปัจจัยแวดล้อมนี้ส่งผลต่อจุลินทรีย์แตกต่างกันออกไปตามกรณีศึกษา โดยอาจส่งผลต่อจำนวนจุลินทรีย์หรือกิจกรรมเมตาบอลิซึม (metabolic activity) ซึ่งส่งผลต่อการฟื้นฟูพื้นที่เช่นกัน

ตารางที่ 2.2 ปัจจัยแวดล้อมที่มีผลต่อเซลล์ที่ถูกเติม

Process	Factor	Effect
Biotic	Predation	Population size decrease
	Competition	Population size decrease/ antagonistic effect on plant pathogens
	Root growth	Release of organic compounds, enhancing survival
Abiotic	Clay minerals	Protection against predation
	Water tension	High tension: water shortage, high osmolarity Low tension: anaerobism, increased nutrient availability by diffusion
	Organic carbon	Limited organic carbon results in starvation and reduction in activity
	Inorganic nutrients	Limitation results in starvation
	pH	Selection for species Release of nutrients or toxic compounds
	Temperature	Metabolic activity
	Chemicals (toxic waste)	Inhibition of sensitive organism Selection of biodegradative, resistant, or tolerant chemical compound forms

2.4 กระบวนการกระตุ้นทางชีวภาพ

กระบวนการกระตุ้นทางชีวภาพ (biostimulation) คือ การเติมสารกระตุ้นทางชีวภาพให้จุลินทรีย์ในธรรมชาติ เช่น สารอาหาร สารกระตุ้นสร้างเอนไซม์ สารปรับสภาพแวดล้อมหรือสภาวะให้เหมาะสมต่อจุลินทรีย์ เป็นต้น โดยกระบวนการดังกล่าวมีเป้าหมายเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการย่อยสลายสารปนเปื้อนโดยจุลินทรีย์ในธรรมชาติ ซึ่งอาจเป็นการลดระยะเวลาในการปรับตัวหรือเร่งอัตราการย่อยสลายก็ได้ ปัจจัยที่มีผลต่อการปรับตัวของจุลินทรีย์ ได้แก่ ชนิดและปริมาณสารปนเปื้อน อุณหภูมิ ค่าพีเอช ปริมาณออกซิเจน และปริมาณสารอาหาร เป็นต้น การกระตุ้นทางชีวภาพ

สามารถกระทำได้หลายลักษณะ โดยวิธีการที่นิยม คือ การกระตุ้นโดยการเติมสารอาหารเพื่อช่วยการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ และการกระตุ้นโดยการเติมสารเหนี่ยวนำเอนไซม์หรือเกิดเมตาโบลิซึมร่วม ซึ่งวิธีการทั้งสองมีรายละเอียดดังต่อไปนี้

2.4.1 การกระตุ้นโดยการเติมสารอาหารเพื่อช่วยการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์

การกระตุ้นด้วยการเติมสารอาหารมีวัตถุประสงค์เพื่อเพิ่มจำนวนจุลินทรีย์ ซึ่งจะส่งผลให้ประสิทธิภาพในการกำจัดสารปนเปื้อนเพิ่มตามมาด้วย สารอาหารที่เติมโดยทั่วไป ได้แก่ สารคาร์บอนและสารไนโตรเจนในปริมาณที่เหมาะสมต่อจุลินทรีย์นั้น ๆ เนื่องจากจุลินทรีย์จำเป็นต้องใช้คาร์บอนและไนโตรเจนในการเจริญเติบโตและเพิ่มจำนวน ซึ่งแม้สารปนเปื้อนอาจประกอบด้วยสารอาหารดังกล่าว แต่อาจมีปริมาณไม่เพียงพอส่งผลให้การเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ไม่ดี หรือในทางกลับกันหากมีการเติมสารอาหารในปริมาณไม่เหมาะสม อาจส่งผลในการยับยั้งการทำงานของจุลินทรีย์ได้

ตัวอย่างเช่น ในการย่อยสลายสารอาหารซินซึ่งเป็นสารอินทรีย์ที่มีทั้งไนโตรเจนและคาร์บอนเป็นองค์ประกอบ พบว่าจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการย่อยสลายสารอาหารซินจำเป็นต้องกระตุ้นด้วยการเติมสารไนโตรเจนและคาร์บอนแตกต่างกัน โดยพบว่าแบคทีเรีย *Pseudomonas* sp. ADP และ *Agrobacterium radiobacter* J14a (Mandelbaum et al., 1995; Struthers et al., 1998) จำเป็นต้องเติมสารคาร์บอนอินทรีย์ในการกระตุ้นการย่อยสลายสารอาหารซิน ส่วนการศึกษาของ Gonzalez et al. (2003) พบว่าในการย่อยสลายสารอาหารซินโดยแบคทีเรีย *Pseudomonas* sp. ADP ถูกยับยั้งเมื่อมีการเติมสารไนโตรเจนเพิ่มเข้าไป ในขณะที่แบคทีเรีย *Ralstonia* sp. M91-3 (Radosevich et al., 1995) สามารถใช้สารอาหารซินเป็นทั้งแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนโดยไม่จำเป็นต้องเติมสารอาหารหลักเพิ่ม

นอกจากนี้การกระตุ้นด้วยการเติมสารอาหารยังอาจต้องเติมสารอินทรีย์อื่น ๆ ที่จำเป็น หรือสารปรับสภาวะให้เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ เช่น สารปรับค่าพีเอช ปริมาณอากาศ และความชื้น เป็นต้น ซึ่งปัจจัยเหล่านี้นอกจากจะส่งผลต่อการเจริญเติบโตหรือจำนวนจุลินทรีย์แล้วยังสามารถส่งผลต่ออัตราการย่อยสลายสารปนเปื้อนด้วย กล่าวคือ บางกรณีจุลินทรีย์มีการเจริญเติบโตได้ดีแต่มีอัตราการย่อยสลายต่ำ ซึ่งอาจเกิดจากมีสภาวะแวดล้อมไม่เหมาะสมต่อการย่อยสลายสารปนเปื้อนได้

2.4.2 การกระตุ้นโดยการเติมสารเหนี่ยวนำเอนไซม์หรือเกิดเมตาโบลิซึมร่วม

ตามที่ได้อ้างในเบื้องต้นเกี่ยวกับการย่อยสลายทางชีวภาพว่าเป็นกระบวนการที่เกี่ยวข้องกับการเร่งปฏิกิริยาด้วยเอนไซม์ การสร้างเอนไซม์ของจุลินทรีย์ในบางกรณีเกิดขึ้นได้เอง แต่ในบางครั้งจำเป็นต้องมีการเหนี่ยวนำ (induction) ส่วนมากแล้วการย่อยสลายสารปนเปื้อนเป็นกระบวนการคาตาบอลิก (catabolic) ซึ่งต้องการการเหนี่ยวนำโดยมักจะเกิดขึ้นในระยะปรับตัว (lag phase) ของการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ ตัวอย่างการเติมสารเหนี่ยวนำเช่น ในการศึกษาของ Kaneva et al. (1998) เกี่ยวกับการย่อยสลายสารกำจัดศัตรูพืชพาราไรออนพบว่าสารโคบอลต์คลอไรด์ (cobalt chloride) สามารถเหนี่ยวนำการทำงานของเอนไซม์ออร์แกโนฟอสฟอรัสไฮโดรเลส (organophosphorus hydrolase) ได้

ส่วนการเกิดเมตาโบลิซึมร่วม (co-metabolism) คือ การที่จุลินทรีย์สามารถเปลี่ยนรูปสารหนึ่ง ๆ ที่ไม่ใช่สารอาหาร พร้อมกับการใช้สารอาหารในการเจริญเติบโต โดยสารดังกล่าวอาจมีหรือไม่มีประโยชน์ต่อจุลินทรีย์ก็ได้ หลักการเมตาโบลิซึมร่วมเกิดจากการศึกษาในอดีตพบว่าอัตราการย่อยสลายของสารปนเปื้อนไม่สัมพันธ์กับอัตราการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ โดยในระยะแรกของการศึกษากระบวนการเมตาโบลิซึมร่วมพบว่าการย่อยสลายสารอีเทน โพรเพน และบิวเทนด้วยแบคทีเรีย *Pseudomonas methanica* เกิดขึ้นได้ เมื่อมีการเลี้ยงแบคทีเรียดังกล่าวในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีมีเทนเป็นสารอาหาร ปรากฏการณ์ดังกล่าวสามารถบอกได้ว่าเป็นกระบวนการเมตาโบลิซึมร่วมที่มีมีเทนเป็นสารอาหาร ปัจจุบันหลักการเมตาโบลิซึมร่วมได้รับการพัฒนาและประยุกต์ใช้ในการฟื้นฟูพื้นที่ปนเปื้อนอย่างต่อเนื่อง เช่น การกำจัดสารเพนตะคลอโรฟีนอล (Banerji and Bajpai, 1994) สารคิวโนลีน (Jianlong et al., 2002) และสารกำจัดศัตรูพืชมาลาไธออน (Xie et al., 2009) เป็นต้น