

ดีไนทรีฟิอิงแบคทีเรียและบทบาท ในการแก้ปัญหามลภาวะในสภาพแวดล้อม

Denitrifying Bacteria and the Roles in Problem Solving of Environmental Pollution

ชมนุช วิรุณานนท์¹ จิราพร พวงแก้ว¹ และวรวิทย์ จุฬาลักษณานุกุล¹
Chompunuch Virunanon¹, Jiraporn Puangkaew¹, and Warawut Chulalaksananukul¹

Abstract: Agriculture in the ancient time was focused on cultivation for food resources and to the produces were used for exchange. The cultivating process depends on nature more than chemical agent. Currently, agriculture adapts technology and chemical agents to increase yields and reduce production time. However, technology builds up environmental pollution extensively especially the contamination of chemical reagent to the living habitat. This review article focused on microbes related to environmental sciences which play important roles on chemical pollution removal process specifically denitrifying bacteria. They can be found both in agricultural area and in the forest. These bacteria play an exceptional role in saprophyte in nitrogen cycle. This review targets to 4 main topics, Denitrification process and denitrifying bacteria, stress condition that switch bacteria to use NO_3^- as electron acceptor, and application of denitrifying bacteria in hazardous waste removal in environmental science task.

Keywords: Denitrifying bacteria, environmental science, hazardous wastes

¹หน่วยวิจัยเชื้อเพลิงชีวภาพด้วยตัวเร่งชีวภาพ ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพฯ 10330

¹Biofuels by Biocatalysts Research Unit, Department of Botany, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok 10330

บทคัดย่อ: เกษตรกรรมในยุคโบราณเป็นการเพาะปลูกเพื่อให้ผลผลิตเป็นแหล่งอาหารและเป็นสิ่งแลกเปลี่ยนแทนเงินตรา การผลิตอาศัยธรรมชาติมากกว่าสารเคมี ในปัจจุบัน การเพาะปลูกอาศัยเทคโนโลยีและสารเคมีเป็นสิ่งช่วยเพิ่มผลผลิตและประหยัดเวลา อย่างไรก็ตามเทคโนโลยีทางการเกษตรโดยเฉพาะการใช้ปุ๋ยเคมีก่อให้เกิดมลภาวะต่อสิ่งแวดล้อมเป็นอันมาก โดยเฉพาะการปนเปื้อนสารเคมีลงสู่สิ่งแวดล้อม ในบทความนี้ได้กล่าวถึงจุลชีพกลุ่มที่มีบทบาทต่อการบำบัดการตกค้างของสารเคมีในสิ่งแวดล้อม โดยเฉพาะอย่างยิ่งกลุ่มดีไนทริไฟอิงแบคทีเรีย ซึ่งสามารถพบได้ทั้งพื้นที่เกษตรกรรมและในป่าไม้ และมีบทบาทเป็นผู้ย่อยสลายในวัฏจักรไนโตรเจน โดยเน้นไปที่หัวข้อหลักสี่หัวข้อคือ กระบวนการดีไนทริฟิเคชันและดีไนทริไฟอิงแบคทีเรีย สภาวะที่ทำให้แบคทีเรียเกิดกลไกที่จะหันมาใช้ไนเตรต เป็นตัวรับอิเล็กตรอน และการประยุกต์ใช้ดีไนทริไฟอิงแบคทีเรียในการกำจัดของเสียอันตรายในงานวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม

คำสำคัญ: ดีไนทริไฟอิงแบคทีเรีย วิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม ของเสียอันตราย

บทนำ

ปัญหามลภาวะสิ่งแวดล้อมเป็นเรื่องเร่งด่วนที่จำเป็นต้องหาทางแก้ไข โดยเฉพาะอย่างยิ่งการใช้ปุ๋ยและสารเคมีที่มีเพิ่มขึ้นในปัจจุบันถือเป็นอีกหนึ่งปัจจัยที่ก่อให้เกิดปัญหามลภาวะทั้งทางดินและน้ำ ซึ่งการเกษตรในยุคประมาณช่วง 100 ปีก่อนหน้า ล้วนแต่เป็นการเกษตรที่เน้นการใช้สารเคมีเพื่อเพิ่มผลผลิต กำจัดศัตรูพืช ซึ่งให้ผลดีในการเพิ่มผลผลิตเพียงระยะสั้น สิ่งตามมาของการใช้สารเคมีเพื่อเพิ่มผลผลิตทางการเกษตรจะสะสมทีละน้อยแต่มีผลระยะยาวต่อสิ่งแวดล้อมและมนุษย์อย่างรุนแรงและก่อปัญหาตามมาอย่างคาดไม่ถึง ส่งผลทำให้แมลง โรคพืชมีความต้านทานเพิ่มขึ้น เกษตรกรยังใช้สารเคมีมากขึ้นและในที่สุดก็ทำลายระบบนิเวศใกล้เคียงแหล่งเกษตรกรรม ทำให้เกิดการตกค้างของสารที่มีความเป็นพิษ เช่น โพลีไซคลิก อะโรมาติก ไฮโดรคาร์บอน หรือ พีเอเอช (PAHs) เมธิลโบรไมด์ (CH_3Br) โพแทสเซียมไนเตรต (KNO_3) แอมโมเนียมไนเตรต (NH_4NO_3) เป็นต้น การมีสารเหล่านี้ปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อมจะส่งผลกระทบต่อสิ่งมีชีวิตที่อาศัยอยู่ร่วมกันในระบบนิเวศวิทยา โดยเฉพาะอย่างยิ่งการปนเปื้อนของไนเตรต (NO_3^-) ไนเตรตที่ปนเปื้อนและอาจส่งผลกระทบต่อร่างกายสามารถมาได้จากหลายแหล่ง เช่น ในดินประสิทธิ์ที่ทำเนื้อเค็ม หรือจากปุ๋ยเคมีที่ปนเปื้อนมากับผักสด ตลอดจนการปนเปื้อนในแหล่งน้ำธรรมชาติที่ใกล้กับแหล่งเกษตรกรรม เมื่อมีการรับเข้าสู่ร่างกายจะสามารถเปลี่ยนเป็นไนไตรต์ (NO_2^-) มีผลต่อร่างกายทำให้

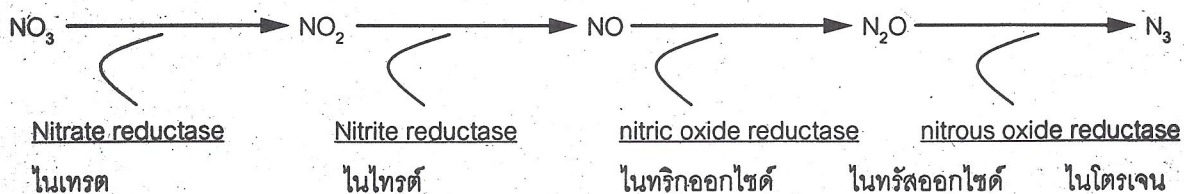
เกิดอาการปวดท้อง คลื่นไส้ อาเจียน หมดสติ นอกจากนี้ยังมีผลทำให้ตับไม่สามารถสะสมวิตามินเอได้ตามปกติ ในเด็กและทารกหากไนไตรต์ถูกดูดซึมเข้าสู่กระแสเลือดจะมีผลต่อการพาออกซิเจน โดยไนไตรต์จะไปแย่งจับกับฮีโมโกลบินเกิดเป็นเมทีโมโกลบิน (Methemoglobin) ทำให้เกิดโรคบลูเบบี้ (Blue baby syndrome) หรือโรคเมทีโมโกลบินเมีย (Methemoglobinemia) ทำให้เด็กมีอาการตัวเขียวคล้ำ สมองขาดออกซิเจน เป็นลมหมดสติ และอาจถึงแก่ชีวิตได้ นอกจากนี้หากไนไตรต์ทำปฏิกิริยากับเอมีน (Amine) ในร่างกาย อาจทำให้เกิดสารไนโตรซามีน (Nitrosamine) ซึ่งเป็นสารก่อมะเร็งได้อีกด้วย ดังจะเห็นได้ว่าปัจจุบันในแต่ละปีเต็มไปด้วยผู้ป่วยมะเร็ง คร่าชีวิตทรัพยากรมนุษย์ไปเป็นปีละจำนวนมาก (เก็จากญจน์, 2546) อย่างไรก็ตามการเป็นมะเร็งนั้นยังมีปัจจัยเหนี่ยวนำอื่นอีกมาก เช่น พันธุกรรมพฤติกรรมการใช้ชีวิต และสารเคมีหรือรังสีอื่นๆที่มีผลต่อการแบ่งเซลล์ มิใช่มาจากการปนเปื้อนของไนเตรตในสิ่งแวดล้อมเพียงอย่างเดียว

การจัดการของเสียอันตรายและสารพิษจึงเป็นศาสตร์อีกแขนงหนึ่งที่นำมาใช้ควบคู่กับการเกษตรอินทรีย์เพื่อบำบัดและลดปริมาณสารเคมีและของเสียที่เกิดจากการเกษตรเคมี โดยเฉพาะการปนเปื้อนของไนเตรตจากปุ๋ยเคมี แม้ว่าในปัจจุบันจะมีการใช้ปุ๋ยไนเตรตเพื่อเพิ่มธาตุอาหารให้พืช และพืชมีการตอบสนองต่อปุ๋ยได้ดี ซึ่งแสดงว่าดินยังมีการขาดแร่ธาตุไนโตรเจนอยู่ อย่างไรก็ตาม มีรายงานการปนเปื้อนของไนเตรตและฟอสเฟตในน้ำ โดยเฉพาะแหล่งน้ำในบริเวณใกล้เคียงกับพื้นที่การเกษตร

(กรมควบคุมมลพิษ, 2546) สำหรับในต่างประเทศได้มีการศึกษาผลกระทบดังกล่าวมาเป็นเวลานาน ในสหรัฐอเมริกา World Resources Institute ได้มีการประมาณการปริมาณไนเตรตที่จะมีตกค้างในธรรมชาติโดยคำนวณจากปริมาณปุ๋ยที่จะใช้ในการเกษตร ระหว่างปี 1960-2020 พบว่าในประเทศกำลังพัฒนามีแนวโน้มที่จะมีการใช้ปุ๋ยในการเกษตรเพิ่มขึ้นมากที่สุดในปี 2020 เมื่อเทียบกับภูมิภาคอื่นๆของโลกคือ ประเทศกลุ่มยุโรป ประเทศในทวีปแอฟริกา อเมริกาใต้ และเอเชีย ในประเทศไทยก็มีการศึกษาผลกระทบดังกล่าว และพบการปนเปื้อนของไนเตรตในพืชผักและในน้ำใต้ดินมากกว่าการปนเปื้อนในดิน โดยในปี 2536 ฉันทนา ได้ศึกษาการปนเปื้อนของตะกอนในแหล่งน้ำใกล้กับบริเวณสนามกอล์ฟติดกับอ่างเก็บน้ำกลางดง จังหวัดชลบุรี พบว่าปริมาณไนเตรตเฉลี่ยในน้ำสูงกว่าในดินและในตะกอน แต่ต่ำกว่าคุณภาพน้ำผิวดินของ WHO. (45 มิลลิกรัมต่อลิตร) (World Health Organization, 2011) อย่างไรก็ตามปริมาณดังกล่าวพบว่าเป็นปริมาณที่สูงมากเมื่อเทียบกับค่า maximum contamination level (MCL) ที่กำหนดไว้ในน้ำดื่มคือ 10 ส่วนต่อล้าน (ppm) โดย United State Environmental Protection Agency (1991) และยังพบการตกค้างของไนเตรตอยู่ในผักกึ๋นใบจากการศึกษาของ อัมพิกา (2548) รายงานว่าปริมาณไนเตรตในผักทุกชนิดมีค่าสูงกว่าไนไตรต์มาก ผักใบเป็นผักที่มีปริมาณไนเตรตสูง ส่วนใหญ่มีค่าสูงกว่าเกณฑ์กำหนดปริมาณไนเตรตในอาหารตามประกาศกระทรวงสาธารณสุขแต่มีค่าต่ำกว่ามาตรฐานปริมาณไนเตรตในผักของสหภาพยุโรป โดยผักใบ ได้แก่ กวางตุ้งฮ่องเต้ ผักกาดเขียว กวางตุ้ง ผักบุ้งจีน กวางตุ้งดอก กุยช่ายใบ ผักกาดหอม และต้นหอม พบค่าเฉลี่ยปริมาณไนเตรตอยู่ระหว่าง 505.1-1573.4 มก./กก. และมีการศึกษาการปนเปื้อนในน้ำใต้ดินเช่นกันในรายงานของ Wongsanit (2009) โดยพบว่าน้ำใต้ดินที่ปนเปื้อนอยู่

ในพื้นที่การเพาะปลูกอ้อยมีการปนเปื้อนในระดับสูง 5.41% ในประเทศไทย ปัจจุบันปัญหาการขาดธาตุไนโตรเจนในดินยังคงมีอยู่ ทำให้การใช้ปุ๋ยไนโตรเจนยังคงมีอย่างต่อเนื่อง และพืชมีการตอบสนองต่อปุ๋ยได้ดี ดังนั้นประเด็นปัญหาคือปุ๋ยที่ไม่ได้รับการดูดซึมแต่ถูกน้ำชะล้างลงไปได้ดินจึงเป็นส่วนที่เป็นส่วนที่มักก่อปัญหาการปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อม การกำจัดและบำบัดไนเตรตมีอยู่ด้วยกันหลายกระบวนการ เช่น กระบวนการแลกเปลี่ยนไอออน (ion exchange) กระบวนการรีเวิร์สออสโมซิส (reverse osmosis) กระบวนการแยกไอออนผ่านเยื่อด้วยไฟฟ้า (electrodialysis) กระบวนการกลั่น (distillation) กระบวนการรีดักชันทางเคมี (chemical reduction) และกระบวนการดีไนตริฟิเคชัน (denitrification) เป็นต้น (Gómez *et al.*, 2002) ซึ่งแต่ละกระบวนการก็มีประสิทธิภาพในการทำที่แตกต่างกันออกไป แต่สำหรับกระบวนการดีไนตริฟิเคชันเป็นกระบวนการที่นิยมใช้ เนื่องจากสามารถประยุกต์ได้หลากหลาย มีความจำเพาะ มีความคุ้มค่า และสามารถเปลี่ยนไนเตรตให้อยู่ในรูปของแก๊สไนโตรเจนได้ด้วยวิธีทางชีวภาพ โดยอาศัยการทำงานของดีไนโตรไฟลิ่งแบคทีเรีย และสามารถเปลี่ยนสารประกอบไนเตรตให้อยู่ในรูปของแก๊สไนโตรเจนได้

ในทางชีววิทยาสามารถพบไนเตรตเป็นสารตัวกลางในกระบวนการหลักอยู่ 2 กระบวนการ (Zhou *et al.*, 2001; Zhou *et al.*, 2007; Zhou *et al.*, 2011) กระบวนการแรกคือ กระบวนการไนตริฟิเคชัน และกระบวนการที่สองคือ กระบวนการดีไนตริฟิเคชัน ในกระบวนการไนตริฟิเคชัน แอมโมเนียจะถูกเปลี่ยนเป็นไนไตรต์และถูกออกซิไดซ์ต่อไปเป็นไนเตรต ส่วนกระบวนการดีไนตริฟิเคชันไนเตรตจะถูกรีดิวซ์เป็นไนไตรต์ ไนตริกออกไซด์ ไนตรัสออกไซด์ และไนโตรเจนตามลำดับการ และอาศัยการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์ 4 ชนิด ดังนี้



กระบวนการดีไนทริฟิเคชัน (Denitrification) และดีไนทริไฟอิงแบคทีเรีย (Denitrifying bacteria)

เป็นกระบวนการทางชีวภาพที่สามารถเปลี่ยนไนเตรตไปเป็นแก๊สไนโตรเจนได้ ทำให้เกิดการสูญเสียไนโตรเจนจากดินและน้ำ มีผลต่อการเกษตรกรรมทำให้ผลผลิตทางการเกษตรเป็นไปได้น้อยกว่าที่ควร นอกจากนี้ด้วยความสามารถเปลี่ยนไนเตรตให้เป็นไนตริกออกไซด์และไนตรัสออกไซด์ซึ่งมีความเป็นพิษ ทำลายโอโซน จึงส่งผลกระทบต่อปัญหาภาวะโลกร้อน แต่อย่างไรก็ตามงานวิจัยหลายชิ้นได้มีการศึกษาเพื่อนำกระบวนการดีไนทริฟิเคชันไปใช้ประโยชน์เพื่อกำจัดและลดปัญหาการปนเปื้อนของสารประกอบไนโตรเจนในสิ่งแวดล้อม โดยไนทริไฟอิงแบคทีเรียที่มีความสามารถในการเปลี่ยนไนเตรตให้เป็นแก๊สไนโตรเจน ซึ่งเป็นแก๊สที่สามารถละลายในน้ำได้น้อยและระเหยสู่อากาศได้ดี จึงทำให้สามารถกำจัดไนเตรตหรือสารประกอบไนโตรเจนออกจากระบบได้ (เก็จกาญจน์, 2546)

ดีไนทริไฟเออร์คือจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการรีดิวซ์สารประกอบไนเตรตให้อยู่ในรูปของแก๊สไนโตรเจนได้ พบในแบคทีเรียและรา แต่โดยส่วนมากเป็นพวกแบคทีเรีย มีทั้งแบคทีเรียที่เจริญในสภาพไม่ใช้ออกซิเจน (anaerobe) เช่น *Paracoccus denitrificans*, *Thiobacillus denitrificans*, *Ps. denitrificans*, *Alcaligene* spp., *Azospirillum* spp., *Rhodopseudomonas* spp., *Propionibacterium* spp. และแบคทีเรียที่ใช้ ออกซิเจน (aerobe) เช่น *Thiosphaera pantotropha*, *Pseudomonas* spp., *Rhizobium* spp. และ *Bacillus* spp. อย่างไรก็ตาม พบว่า ทั้งสองกลุ่มล้วนมีแบคทีเรียที่น่าสนใจ มีศักยภาพมาใช้ในการกำจัดของเสียทางการเกษตรได้ดี โดยแบคทีเรียที่นำมาประยุกต์ใช้ควรมีศักยภาพอย่างน้อย 2 ประการแรกคือ มีความสามารถเป็นดีไนทริไฟเออร์ ทำให้กำจัดไนเตรตได้ ประการที่สองสามารถย่อยสลายสารอะโรมาติกซึ่งเป็นสารพิษ ตัวอย่างแบคทีเรียที่มีความสามารถเหล่านี้ ได้แก่ *Spirillum* spp. ซึ่งมีความสามารถในการสลายสารประเภทฟีนอล (Shinoda et al., 2000) *Hyphomicrobium* spp. ที่พบในกากตะกอนการบำบัดน้ำเสียที่ปนเปื้อนไปด้วยไนเตรตในสภาพที่มีเมทานอลสูง

(Timmermans and Van Haute, 1983) *Agrobacterium* spp. ที่แยกได้โดย Knight et al. (2009) มีความสามารถในการย่อยสลายโบรโมไซนิล (Bromoxynil) ซึ่งเป็นสารพิษประเภทฆ่าวัชพืชไบกวางทั่วไปที่เป็นสารประกอบอะโรมาติกไนไตรด์ (halogenated aromatic nitrile herbicide) *Acinetobacter* spp. ซึ่งพบในของเหลวที่ประกอบด้วยสารประกอบที่เป็นอันตรายที่ซึมออกจากบ่อฝังกลบสารประกอบมีพิษ (landfill leachate) ในรายงานก่อนหน้าของ Trois et al. (2010) แบคทีเรียอื่นที่พบความสามารถในลักษณะนี้และมีแนวโน้มในการประยุกต์ใช้ได้แก่ *Propionobacterium* spp., *Rhizobium* spp., *Corynebacterium* spp., *Cytophaga* spp., *Thiobacillus* spp.

ดีไนทริไฟอิงแบคทีเรียส่วนมากที่พบเป็นได้ทั้งพวกแอนแอโรบิคออโตโทรฟ (anaerobic autotroph) และ แอนแอโรบิคเฮเทอโรโทรฟ (anaerobic heterotrophs) ในธรรมชาติ ดีไนทริไฟอิงแบคทีเรียมีการอยู่อาศัยและทำงานร่วมกันกับจุลชีพและสิ่งมีชีวิตอื่นในดิน ในสภาพที่สมดุลในธรรมชาติที่ปราศจากการรบกวนของสารเคมีทางการเกษตร เช่น ในป่าไม้ จะพบว่า แม้ว่ากระบวนการดีไนทริฟิเคชันในแบคทีเรียบางชนิดจะมีการเกิดขึ้นเพียงบางขั้นตอนหรือบางส่วน แต่ด้วยการทำงานร่วมกันของแบคทีเรียและจุลชีพอื่นในดินก็สามารถทำให้เกิดกระบวนการดีไนทริฟิเคชันทั้งหมดอย่างสมบูรณ์ได้ แบคทีเรียที่มีความสามารถทำให้เกิดกระบวนการดีไนทริฟิเคชันบางส่วนนี้เรียกว่า partial denitrifying bacteria และสามารถจำแนกตามความหลากหลายทางความสามารถทางชีวเคมีได้เป็นสี่กลุ่มใหญ่ดังนี้

1. กลุ่มที่มีความสามารถรีดิวซ์ไนเตรตเป็นไนไตรต์ได้เท่านั้น เนื่องจากแบคทีเรียในกลุ่มนี้ขาดเอนไซม์ไนไตรรีดักเทส ไนตริกออกไซด์รีดักเทส และไนตรัสออกไซด์รีดักเทส ยกตัวอย่างแบคทีเรียในกลุ่มนี้เช่น *Agrobacterium* spp., *Arthobacter* spp., *Pseudomonas* spp., *Rhizobium* spp. (Delwiche, 1981)

2. กลุ่มที่มีความสามารถรีดิวซ์ไนเตรตเป็นไนตรัสออกไซด์ได้เท่านั้น เนื่องจากขาดเอนไซม์ไนตรัสออกไซด์รีดักเทส จึงทำให้ไม่สามารถเปลี่ยนไนตรัสออก

ไซต์ไปเป็นแก๊สไนโตรเจนได้ ตัวอย่างแบคทีเรียในกลุ่มนี้ เช่น *Bacillus pyocyaneus* (*Pseudomonas aeruginosa*), *Bacillus subtilis*, *Thiobacillus denitrificans*, *Micrococcus denitrificans* (สมศักดิ์, 2524)

3. กลุ่มที่มีความสามารถรีดิวซ์ไนไตรต์แต่ไม่สามารถรีดิวซ์ไนเตรตเป็นแก๊สไนโตรเจนได้ แบคทีเรียในกลุ่มนี้ขาดเอนไซม์ไนโตรรีดักเทส ทำให้ไม่สามารถใช้ไนเตรตเป็นสารตั้งต้นในการเปลี่ยนให้เป็นแก๊สไนโตรเจนได้ ตัวอย่างแบคทีเรียในกลุ่มนี้ *Pseudomonas* sp. บางสายพันธุ์ (Roger, 1982)

4. กลุ่มที่มีสามารถรีดิวซ์ไนเตรตเป็นไนไตรต์และรีดิวซ์ไนทริกออกไซด์เป็นไนตรัสออกไซด์ได้ แบคทีเรียในกลุ่มนี้ขาดเอนไซม์ไนโตรรีดักเทส และไนตรัสออกไซด์รีดักเทส ซึ่งกระบวนการในลักษณะเช่นนี้พบได้น้อยและไม่มีนัยสำคัญทางนิเวศวิทยา เนื่องจากเมื่อมีการอาศัยและทำงานร่วมกันกับแบคทีเรียอื่นจะทำให้กระบวนการในลักษณะนี้สามารถเกิดปฏิกิริยาต่อไปได้ จนเกิดดีไนทรีฟิเคชันได้อย่างสมบูรณ์ในที่สุด ตัวอย่างแบคทีเรียในกลุ่มนี้ได้แก่ *Bacillus licheniformis* (เก็จกาญจน์, 2546)

สภาวะที่ทำให้แบคทีเรียเกิดกลไกที่จะหันมาใช้ไนเตรตเป็นตัวรับอิเล็กตรอนได้

กระบวนการหายใจ (Respiration) เป็นกระบวนการทางชีวเคมีเพื่อสลายสารให้เกิดพลังงานที่เซลล์สามารถนำไปใช้ได้ กระบวนการหายใจระดับเซลล์มี 2 แบบคือ การหายใจแบบใช้ออกซิเจน (aerobic respiration) ซึ่งมีการใช้ออกซิเจนเป็นตัวรับอิเล็กตรอนตัวสุดท้าย ส่วนการหายใจแบบไม่ใช้ออกซิเจน (anaerobic respiration) เป็นการใช้อิเล็กตรอนตัวอื่นนอกเหนือจากออกซิเจน เช่น ไนเตรต ซัลเฟต ซัลเฟอร์มาเป็นตัวรับอิเล็กตรอนตัวสุดท้าย

ดีไนทรีฟอยิ่งแบคทีเรียโดยส่วนมากมักเป็นพวกสามารถใช้ออกซิเจนเป็นตัวรับอิเล็กตรอนตัวสุดท้ายได้ในกรณีที่มีออกซิเจน แต่เมื่ออยู่ในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจนก็สามารถใช้ไนเตรต ซัลเฟต เหล็ก มาเป็นตัวรับอิเล็กตรอนตัวสุดท้ายได้เช่นกัน เรียกว่า แพคัลเททีฟ แอโรบ

(Facultative aerobes) (กรมควบคุมมลพิษ, 2546) ดังนั้นการควบคุมให้เกิดภาวะแอนอกสิกจะทำให้ดีไนทรีฟอยิ่งแบคทีเรียสามารถนำไนเตรตไปใช้เป็นตัวรับอิเล็กตรอนแทนออกซิเจน ซึ่งสามารถนำไปประยุกต์ใช้เพื่อบำบัดไนเตรตและฟอสฟอรัสได้ (Hu et al., 2003; Wachtmeister et al., 1997)

เทคนิคการระบุสายพันธุ์และการวัดอัตราการเกิดกระบวนการดีไนทรีฟิเคชันและการวัดกิจกรรมของเอนไซม์ (Denitrifying enzyme activity assay) ของแบคทีเรีย

การศึกษาในงานวิจัยของสิรินันท์ (2552) ซึ่งศึกษาวิธีการคัดเลือกดีไนทรีฟอยิ่งแบคทีเรียและการทดสอบความสามารถในการรีดิวซ์ไนเตรตเป็นไนไตรต์โดยใช้เทคนิคทางจุลชีววิทยา เลี้ยงแบคทีเรียให้มีการเจริญแล้วจึงทำการแยกมาเลี้ยงในอาหารเหลวที่มีส่วนผสมของไนเตรต ในสภาพไร้ออกซิเจน จากนั้นทำการเก็บตัวอย่างอาหารเหลวในวันที่แรก และวันที่ 7 มาทดสอบความสามารถในการรีดิวซ์ไนเตรตด้วยวิธี แอลฟา-เมธิลลาไมน์ (alpha-methylamine method) แบคทีเรียที่มีความสามารถเป็นดีไนทรีฟิเคชันแบคทีเรียสามารถทดสอบได้โดยใช้ชุดทดสอบของ API (Analytical Profile Index, Biomeriecs Inc.) ซึ่งเมื่อได้โคโณนิของดีไนทรีฟอยิ่งแบคทีเรียแล้วจะนำไปทดสอบความสามารถในการรีดิวซ์ไนเตรต-ไนโตรเจน และไนไตรต์-ไนโตรเจน ขั้นตอนหลังจากนั้นคือ การระบุสายพันธุ์ การระบุสายพันธุ์ของดีไนทรีฟอยิ่งแบคทีเรียจะยึดลำดับของยีน 16S rDNA เป็นหลัก โดยใช้ Genomics DNA Purification Kit เพื่อแยกดีเอ็นเอออกจากโครโมโซม ทำให้ได้ไพรเมอร์ที่ถูกตัดในตำแหน่ง 27F และ 1492R เพื่อนำไปใช้ในเทคนิคพีซีอาร์เพื่อตรวจสอบชิ้นดีเอ็นเอที่มีขนาด 1500 คู่เบส แล้วทำบริสุทธิ์โดยใช้ Viogene's Gel Extraction System จนได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่มีความบริสุทธิ์แล้วจึงนำไปเชื่อมกับเวกเตอร์เพื่อใช้เป็นพาหะเข้าสู่ *E. coli* ทำการสกัดพลาสมิดแล้วนำไปเปรียบเทียบกับตารางข้อมูลของ NCBI (Shi and Lee, 2006) ปัจจุบันเทคนิคดังกล่าวเป็นเทคนิคที่ใช้กันอย่างแพร่หลายในการบ่งชี้ชนิดของดีไนทรีฟอยิ่งแบคทีเรีย และยังมีอื่นที่นำมาใช้ในการบ่งชี้และ

จัดจำแนกกลุ่มของดีไนทริไฟอิงแบคทีเรียอีกด้วย เช่น *nirS* (Falk *et al.*, 2007) ซึ่งพบว่ามียีนนี้ปรากฏในดีไนทริไฟอิงแบคทีเรียในก้นตะกอนทะเลบอลติก และ *nirK* (Theerachat *et al.*, 2011) ซึ่งได้ทำการแยกดีไนทริไฟอิงแบคทีเรียในประเทศไทย และพบว่าปกติแล้วเมื่อใช้ลำดับของนิวคลีโอไทด์ของยีนที่แตกต่างกันดังนี้ จะทำให้ผลในการจัดกลุ่มของจุลินทรีย์มีความแตกต่างกันไป การใช้ชุดตรวจระบุปีชีส์ของจุลินทรีย์ควบคุมไปด้วย เช่น ชุดทดสอบของ API และการหาลำดับของ 16S rDNA ควบคุมกันไปจะทำให้ได้ผลการจัดจำแนกกลุ่มแบคทีเรียที่มีความใกล้เคียงกับความเป็นจริงมากที่สุด

Song *et al.* (2011) ได้ใช้วิธีการวัดอัตราการเกิดกระบวนการดีไนทริฟิเคชันจากตัวอย่างดินด้วยวิธีอะเซทิลีนบล็อกกิง (acetylene blocking assay) แล้วนำไปวิเคราะห์เพื่อหาความเข้มข้นของไนตรัสออกไซด์โดยใช้แก๊สโครมาโตกราฟี ทำการหาค่าความชันของกราฟเพื่อนำไปคำนวณหาอัตราการเกิดปฏิกิริยาดีไนทริฟิเคชัน

ส่วนค่ากิจกรรมดีไนทริไฟอิงเอนไซม์สามารถทำการวัดได้โดยใช้สารละลายของตัวอย่างดินที่มีการผสมไนเทรต แล้วใช้วิธีการทดลองเช่นเดียวกับวิธีการวัดอัตราการเกิดกระบวนการดีไนทริฟิเคชัน

การประยุกต์ใช้ในการเกษตรและสิ่งแวดล้อม

มีงานวิจัยหลายชิ้นที่นำกระบวนการดีไนทริฟิเคชันมาประยุกต์ใช้ในการแก้ไขและบำบัดปัญหาสิ่งแวดล้อม Gómez *et al.* (2005) ได้ทำงานวิจัยเกี่ยวกับผลของความเข้มข้นของออกซิเจนที่มีต่อการกำจัดไนเทรตในน้ำใต้ดินโดยใช้ตัวกรองแบบดีไนทริไฟอิงซับเมอร์จ (denitrifying submerg) และได้ออกแบบอุปกรณ์เพื่อใช้ในการกรองกำจัดไนเทรตที่มีการปนเปื้อนอยู่ในน้ำใต้ดิน โดยในการทดลองจะทำการบำบัดน้ำใต้ดินและวัดค่า ไนเทรต, ไนไทรต์, ฟอสเฟต, ซัลเฟต, ออกซิเจน, ซีโอดี และพีเอชทุกวันเป็นระยะเวลา 1 เดือน

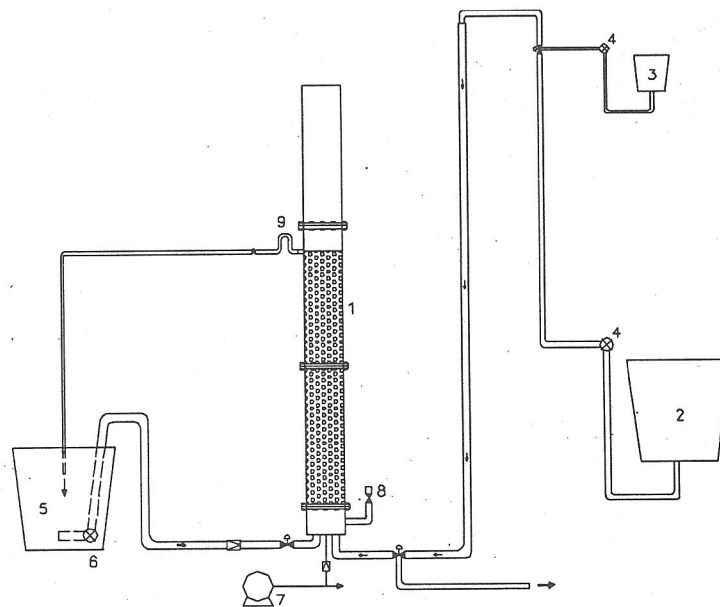


Figure 1 Pilot scale plant setting described in Gómez *et al.* (2005)

(1) Submerged filter ($V = 0.21 \text{ m}^3$) (2) Influent tank ($V = 1.7 \text{ m}^3$) (3) carbon source tank ($V = 0.03 \text{ m}^3$) (4) piston pump (5) effluent tank ($V = 0.5 \text{ m}^3$) (6) rinsing pump (7) air compressor (8) safety valve (9) U-bend

ผลการทดลองพบว่าไบโอฟิล์มที่มีดีโนทรีไฟอิงแบคทีเรียเจริญอยู่บนตัวกรองชีวภาพมีคุณสมบัติในการบำบัดและกำจัดไนเตรตที่ปนเปื้อนในน้ำใต้ดินจนสามารถนำมาใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตน้ำสะอาดที่สามารถดื่มได้โดยไม่ส่งผลกระทบต่อปัญหาทางด้านสาธารณสุขที่มาจากผลของแอมโมเนียม ในขณะที่เดียวกันยังพบว่าความเข้มข้นของแก๊สออกซิเจนที่ละลายอยู่ในน้ำมีผลให้กลุ่มของดีโนทรีไฟอิงแบคทีเรียในไบโอฟิล์มมีการเจริญน้อยลงและส่งผลให้ไนโตรเจนปรากฏขึ้นมาในระบบในรูปของไนไตรต์ ซึ่งส่งผลต่อประสิทธิภาพในการบำบัดน้ำใต้ดินได้

งานวิจัยของอาภาวรรณ (2552) ได้ศึกษาประสิทธิภาพของการเกิดกระบวนการดีโนทรีฟิเคชันจากถังเพาะเลี้ยงกล้าเชื้อดีโนทรีไฟอิงแบคทีเรีย ซึ่งใช้เมทานอลและอาหารปลาหมักเป็นแหล่งคาร์บอนที่ระดับความเค็ม 25 ส่วนต่อพัน (part per thousand, ppt) และมีการตรวจสอบแบคทีเรียที่เกี่ยวข้อง ด้วยเทคนิคฟลูออเรสเซนส์ อินซิติว ไฮบริไดเซชัน (Fluorescence *In Situ* Hybridization, FISH) ซึ่งเป็นวิธีที่มีความจำเพาะในการตรวจสอบกลุ่มดีโนทรีไฟอิงแบคทีเรีย จากการทดลองในห้องปฏิบัติการพบว่า เมื่อทำการเปลี่ยนอาหารใหม่ทุก 3 วันในช่วงแรก พบว่าการบำบัดไนเตรตมีประสิทธิภาพน้อย แต่เมื่อเพิ่มเวลาในการเติมอาหารให้นานขึ้นในช่วงที่สองเป็น 5 วัน/ครั้ง พบว่าในช่วงที่สองภายในถังเพาะกล้าเชื้อของดีโนทรีไฟอิงมีความสามารถในการบำบัดไนเตรตดีขึ้น และเมื่อเพิ่มระยะเวลาการเติมอาหารเป็น 7 วัน/ครั้งในช่วงที่สาม พบว่าภายในถังเพาะกล้าเชื้อดีโนทรีไฟอิงแบคทีเรีย มีการบำบัดไนเตรตได้เกือบสมบูรณ์ ซึ่งเมื่อนำแบคทีเรียในถังเพาะไปตรวจสอบด้วยเทคนิค ฟลูออเรสเซนส์ อินซิติว ไฮบริไดเซชัน ทำให้พบแบคทีเรียในจิ้นัส *Methalophaga* sp. และแบคทีเรีย *Methalophaga marina* ซึ่งเป็นแบคทีเรียในกลุ่มเด่นของดีโนทรีไฟอิงแบคทีเรียที่พบในปลาหมัก และสามารถสรุปผลการทดลองได้ว่าระยะเวลาในการเติมอาหารมีผลต่อการบำบัดไนเตรตภายในถังเพาะกล้าเชื้อของดีโนทรีไฟอิงแบคทีเรียอย่างมีนัยสำคัญ

นอกจากการนำดีโนทรีไฟอิงแบคทีเรียมาประยุกต์ใช้เพื่อการบำบัดไนเตรตโดยตรงแล้ว ยังมีการใช้

ประโยชน์เพื่อบำบัดสารปนเปื้อนอื่นๆ อีกด้วย เช่น ใช้ในการกำจัดฟอสฟอรัส ได้มีผู้ทำการวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการบำบัดและกำจัดฟอสฟอรัสโดยใช้ไนเตรตเป็นตัวรับอิเล็กตรอนภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจน และได้ข้อสรุปไปในทางเดียวกันว่าไนไตรต์ไม่มีผลเป็นตัวยับยั้งกระบวนการกำจัดฟอสฟอรัส แต่ไนไตรต์ยังมีความสามารถในการเป็นตัวรับอิเล็กตรอนจากฟอสฟอรัสได้เมื่อนไนไตรต์มีความเข้มข้นต่ำกว่าระดับที่จะไม่เป็นพิษและไม่ยับยั้งระบบ (Wachtmeister *et al.*, 1997; Hu *et al.*, 2003; Shi and Lee, 2006; Zhou *et al.*, 2011)

แนวโน้มของการประยุกต์ใช้ดีโนทรีไฟอิงแบคทีเรียในด้านสิ่งแวดล้อมในอนาคต

จากงานวิจัยเกือบทั้งหมดที่เกี่ยวข้องกับการประยุกต์ใช้กระบวนการดีโนทรีฟิเคชันพบว่า จุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการใช้กระบวนการดีโนทรีฟิเคชันนั้นมีความสำคัญในการนำมาใช้เพื่อบำบัดและแก้ไขปัญหาสิ่งแวดล้อมซึ่งเกิดจากการปนเปื้อนของสารประกอบไนโตรเจน ฟอสฟอรัส พอลิไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน (polycyclic aromatic hydrocarbon; PAH) ฯลฯ โดยเฉพาะอย่างยิ่งการปนเปื้อนของไนเตรตในอาหารและน้ำดื่มซึ่งจะส่งต่อความสบายใจของผู้บริโภคตลอดจนต่อสุขภาพ ซึ่งมีความกังวลกันว่าหากได้รับไนเตรตหรือไนไตรต์อาจมีผลทำให้เกิดการเจ็บป่วยหรือเสียชีวิตได้หากได้รับเข้าสู่ร่างกายในปริมาณมาก อย่างไรก็ตามในส่วนนี้ยังไม่มีผลยืนยันที่ชัดเจนว่าการบริโภคหรือได้รับอาหารที่มีไนเตรตปนเปื้อนเป็นปริมาณมากจะส่งผลกระทบต่อการป่วยเป็นมะเร็งหรือเกี่ยวข้องกับความเสี่ยงต่อการเป็นมะเร็งหรือไม่ จากการศึกษาของ Ward *et al.* (2005) ในผู้ป่วยที่เป็นโรคเมทีโมโกลบินเมีย พบว่าผลที่ได้ไม่แสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณไนเตรตกับการเป็นโรคเขาได้วิจารณ์ผลดังกล่าวไว้ว่าการได้รับไนเตรตจากการกินมีผลต่อร่างกายน้อยกว่ากระบวนการไนโตรเซชัน (nitrosation) และนอกจากนี้ในพืชผักก็มีสารยับยั้งกระบวนการไนโตรเซชันทำให้การได้รับผักที่มีการปนเปื้อนของไนเตรตมีอันตรายน้อยลง อย่างไรก็ตาม L'hirondel *et al.* (2006) ได้อธิบายเพิ่มเติมผลการวิจัยดังกล่าวว่าอาจมีผลเกี่ยวเนื่องกับกระบวนการ

เมแทบอลิซึมของไนเตรดในร่างกายมนุษย์ โดยเฉพาะเมื่อได้รับไนเตรดจากการกิน โดยเขาได้อธิบายไว้ว่า ไนเตรดเมื่อเข้าสู่ร่างกายแล้วโดยผ่านทางปากซึ่งมีน้ำลายจะถูกเปลี่ยนเป็นไนไตรต์ และไนไตรต์จะคงอยู่ในร่างกายในความเข้มข้นสูงเป็นเวลานานประมาณ 20-60 นาที จากนั้นจะค่อยๆ ลดปริมาณลง เนื่องมาจากความเป็นกรดในน้ำย่อย (gastric juice) ในกระเพาะอาหาร การประยุกต์ใช้ดีไนทริฟิเอชันแบคทีเรียจึงเน้นไปที่ด้านสิ่งแวดล้อมมากกว่าที่จะใช้ทางการแพทย์หรือการเกษตร ปัจจุบันการกำจัดไนเตรดในสิ่งแวดล้อมโดยการใช้นิตริไฟเอชันแบคทีเรียจะเป็นวิธีทางเลือกหนึ่งเพื่อช่วยกำจัดไนเตรดและไนไตรต์ออกจากระบบได้โดยไม่เป็นอันตรายต่อสิ่งมีชีวิตในระบบนั้นๆ นอกจากนี้ยังมีค่าใช้จ่ายที่น้อยกว่า ไม่เพิ่มปัญหามลภาวะ และประหยัดพลังงาน ในปี 1975 การรั่วไหลของน้ำมันของเครื่องบินทหารปริมาณราว 83,000 แกลลอนทำให้เกิดการปนเปื้อนใกล้กับ North Charleston South California เป็น บริเวณกว้าง ทำให้เกิดการวิจัยเพื่อแก้ปัญหามลภาวะที่เกิดจากอุบัติเหตุตามมา ดังเช่นในงานวิจัยของ Bradley *et al.* (1992) ศึกษาปัจจัยที่จะส่งผลกระทบต่อจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการดีไนทริฟิเคชัน ปริมาณไนเตรดค่าความเป็นกรดต่าง และปริมาณฟอสเฟต ที่มีผลต่อกระบวนการดีไนทริฟิเคชัน พร้อมกับการย่อยสลายสารประกอบไฮโดรคาร์บอน ต่อมาในปี 1995 Hess *et al.* คัดแยกจุลินทรีย์จากแหล่งที่มีการปนเปื้อนน้ำมัน (diesel fuel-contaminated source) พบว่าจุลินทรีย์มีความสามารถเจริญบนพี-ไซลีน (p-xylene) การออกซิเดชันของพี-ไซลีน ควบคู่ไปกับคาร์บอนไดออกไซด์แสดงให้เห็นว่าสามารถลดปริมาณไนเตรดได้สำเร็จ การเพิ่มปริมาณเชื้อในการเจริญบนโทลูอีน (toluene) และเอ็ม-ไซลีน (m-xylene) สามารถตรวจพบได้ อย่างไรก็ตามพบว่าเชื้อไม่สามารถย่อยเบนซีน (benzene) เอทิลเบนซีน (ethylbenzene) และโอ-ไซลีน (o-xylene) ได้ ในรายงานของ Fukui *et al.* (1999) กล่าวถึงการสำรวจการย่อยสลายสารประกอบอะโรมาติก-ไฮโดรคาร์บอน (aromatic hydrocarbon) ในน้ำมันดิบที่ภาวะไร้ออกซิเจน พบว่าแบคทีเรียที่มีความสามารถดังกล่าวอยู่ในกลุ่มที่เป็นซัลไฟด์รีดิวซิงแบคทีเรีย (sulfite-reducing bacteria) สารประกอบ

แอลคิล-เบนซีน (alkyl-benzene) และ เอ็น-แอลเคน (n-alkane) ถูกพบว่ามีกรย่อยสลายได้ไปพร้อมกับการเปลี่ยนซัลเฟต ไปเป็นซัลไฟต์ ซึ่งนับเป็น 10% อะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน น้ำมันดิบ และจึงเป็นคำอธิบายที่ว่าทำไมแบคทีเรียโบราณบางชนิดจึงสามารถพบว่ามีชีวิตในแหล่งน้ำมันดิบซึ่งมีกำมะถันอยู่ด้วย ในปี 2004 Rakhimova *et al.* รายงานประสิทธิภาพของจุลินทรีย์ที่ใช้ในการย่อยสลายน้ำมันในการทำไบโอรีมีเดียชันของดินที่ปนเปื้อนน้ำมันถูกทำในห้องปฏิบัติการ ภาวะที่ใช้ในการศึกษาความสามารถในการออกซิไดซ์มีทั้งภาวะไร้ออกซิเจน และภาวะแอกซิก ความสามารถในการย่อยสลายน้ำมันที่เป็นสารไฮโดรคาร์บอน มีลำดับของประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันดังนี้ การปล่อยให้เกิดไบโอรีมีเดียชันขึ้นเอง (self-remediation) 40% < เมื่อมีการประยุกต์ใช้ไนเตรด 42% < ระบบ denitrifying oil-oxidizing 50% ระบบที่ใช้ร่วมกันระหว่างกระบวนการดีไนทริฟิเคชันพร้อมกับเติมไนเตรด 60% อย่างไรก็ตามกระบวนการดีไนทริฟิเคชันก็อาจเกิดการยับยั้งได้ถ้ามีปริมาณของสารไฮโดรคาร์บอนสูงมากเกินไป ดังเช่นในรายงานของ Mille *et al.* (2007) ที่ศึกษาประสิทธิภาพการเกิดดีไนทริฟิเคชันที่บริเวณทะเลเมดิเตอร์เรเนียนอ่าวฟอส ประเทศฝรั่งเศส (Mediterranean sea, Gulf of Fos-area, France) ทั้งหมดนี้แสดงให้เห็นถึงความพยายามของนักวิทยาศาสตร์ที่จะประยุกต์ใช้แบคทีเรียให้เกิดประโยชน์สูงสุด มันคงจะเป็นการดีที่ในอนาคตสามารถลดการใช้สารเคมีอันตรายในการเกษตรและการบำบัดสิ่งแวดล้อมอย่างน้อยเพื่อให้เกิดความยั่งยืนต่อมนุษย์และสภาพแวดล้อมที่สามารถอิงอาศัยกันได้อย่างสมดุลในอนาคต

เอกสารอ้างอิง

เก็จากัญจน์ สมาริวุฒิคุณ. 2546. การตรวจสอบยีนไนโตรรีดักเทสในดีไนทริฟิเอชันแบคทีเรียโดยเทคนิคพีซีอาร์-อาร์เอฟแอลพี. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพฯ. 119 หน้า.

- กรมควบคุมมลพิษ. 2546. คู่มือวิชาการระบบบำบัด
น้ำเสียแบบไม่ใช้อากาศ เล่มที่ 1. ศูนย์บริการ
วิชาการแห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
กรุงเทพฯ. 161 หน้า.
- ฉันทนา จิบบอกห้วย. 2536. การปนเปื้อนของไนเตรด
และฟอสเฟตในดิน น้ำ และตะกอนบริเวณ
สนามกอล์ฟติดกับอ่างเก็บน้ำหนองกลางดง
จังหวัดชลบุรี. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์
มหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์สภาวะ
แวดล้อม. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. กรุงเทพฯ.
193 หน้า.
- สมศักดิ์ วังโน. 2524. จุลินทรีย์และกิจกรรมในดิน.
ภาควิชาปฐพีวิทยา คณะเกษตร มหาวิทยาลัย
เกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ. 193 หน้า.
- สิรินันท์ ศรีดำ. 2552. การคัดเลือกแบคทีเรียดีไนริไฟอิง
ที่มีประสิทธิภาพเพื่อกำจัดไนเตรดในน้ำทิ้ง
จากการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง. (ระบบ
ออนไลน์). แหล่งข้อมูล: <http://www.pt.tsu.ac.th/rdi/ConAll/POSTER19/P17.pdf> (2 มิถุนายน 2554)
- อภาวรรณ พอด้า. 2552. การตรวจสอบแบคทีเรียดีไนริไฟอิง
ในหัวเชื้อจุลินทรีย์ผสมสำหรับการบำบัด
ไนเตรดด้วยเทคนิค Fluorescent *In Situ*
Hybridization (FISH). (ระบบออนไลน์). แหล่ง
ข้อมูล: <http://www.pt.tsu.ac.th/rdi/ConAll/POSTER19/P19.pdf> (2 มิถุนายน 2554)
- อัมพิกา ภูวนะเสถียรฐ์. 2548. การตกค้างของสารไนเตรด
และไนไตรต์ ในผักต่างชนิด ที่เพาะปลูกแบบ
เคมี แบบปลอดภัยจากสารพิษและแบบอินทรีย์.
วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต.
มหาวิทยาลัยมหิดล. กรุงเทพฯ. 152 หน้า.
- Bradley, P.M., C.M. Aelion and D.A. Vroblecky. 1992.
Influence of Environmental factors on
denitrification in sediment contaminated
with JP-4 Jet Fuel. *Ground Water* 30: 843–
848.
- Delwiche, C.C. 1981. Denitrification, Nitrification, and
Atmospheric Nitrous Oxide. New York: John
Wiley and Sons, Inc. 298 p.
- Falk, S., M. Hannig, C. Gilesche, R. Wardenga, M.
Köster, K. Jürgens and G. Braker. 2007.
nirS-containing denitrifier communities in the
water column and sediment of Baltic Sea.
Biogeosciences 4: 255-268.
- Fukui, M., G. Harms, R. Rabus, A. Schramm, F.
Widdel, K. Zengler, C. Boreham and H.
Wilkes. 1999. Anaerobic degradation of oil
hydrocarbons by sulfate-reducing and
nitrate-reducing bacteria. *Microbial
Biosystems* (Online): New Frontiers
Proceedings of the 8th International
Symposium on Microbial Ecology Bel.
Available: [http://plato.acadiau.ca/isme/
Symposium12/fukui.PDF](http://plato.acadiau.ca/isme/Symposium12/fukui.PDF) (June 3, 2011).
- Gómez, M.A., E. Hontoria and J. González-López.
2002. Effect of dissolved oxygen
concentration on nitrate removal from
groundwater using a denitrifying
submerged filter. *Journal of Hazardous
Materials* 90: 267–278.
- Gómez, M.A., B. Rodelas, F. Saez, C. Pozo, M.
Victoria, M. Toledo, E. Hontoria and J.G.
López. 2005. Denitrifying activity of
Xanthobacter autotrophicus strains isolated
from a submerged fixed-film reactor.
Applied Microbiology and Biotechnology
68: 680-685.
- Hess, A., P. Höhener, D. Hunkeler and J. Zeyer.
1995. Bioremediation of a diesel fuel
contaminated aquifer: simulation studies in
laboratory aquifer columns. *Journal of
Contaminant Hydrology* 23: 329-345.
- Hu, J.Y., S.L. Ong, W.J. Ng, F. Lu and X.J. Fan. 2003.
A new method for characterizing denitrifying

- phosphorus removal bacteria by using three different types of electron acceptors. *Water Research* 37: 3463-3471.
- Knight, V.K., H.B. Mitchell and M.M. Häggblom. 2009. Biotransformation of 3,5-dibromo-4-hydroxybenzonitrile under denitrifying, Fe(III)-reducing, sulfidogenic, and methanogenic conditions. *Environmental Toxicology and Chemistry* 22: 540-544.
- L'hirondel, J.-L., A.A. Avery and T. Addiscott. 2006. Dietary Nitrate: Where is the risk? *Environmental Health Perspectives* 114: A458-A459.
- Mille, G., L. Asia, M. Guiliano, L. Malleret and P. Doumenq. 2007. Hydrocarbons in coastal sediments from the Mediterranean sea (Gulf of Fos area, France). *Marine Pollution Bulletin* 54: 566-575.
- Rakhimova, E.R., A.L. Osipova and S.K. Zaripova. 2004. Purification of soil from oil pollutants with the use of denitrifying hydrocarbon-oxidizing microorganisms. *Applied Biochemistry and Microbiology* 40: 563-567.
- Roger, K. 1982. Denitrification. *Microbiological Reviews* 46: 43-70.
- Shi, H.P. and C.M. Lee. 2006. Combining anoxic denitrifying ability with aerobic-anoxic phosphorus-removal. examinations to screen denitrifying phosphorus-removing bacteria. *International Biodeterioration and Biodegradation* 57: 121-128.
- Shinoda, Y., Y. Sakai, M. Ué, A. Hiraishi and N. Kato. 2000. Isolation and characterization of a new denitrifying spirillum capable of anaerobic degradation of phenol. *Applied Environmental Microbiology* 66: 1286-1291.
- Song, K., S.-H. Lee and H. Kang. 2011. Denitrification rates and community structure of denitrifying bacteria in newly constructed wetland. *European Journal of Soil Biology* 47: 24-29.
- Theerachai, M., C. Virunanon, S. Chulalaksananukul, N. Sinbuthong and W. Chulalaksananukul. 2011. *NirK* and *nirS* nitrite reductase genes from non-agricultural forest soil bacteria in Thailand. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 27: 999-1003.
- Timmermans, P. and A. Van Haute. 1983. Denitrification with methanol: fundamental study of the growth and denitrification capacity of *Hyphomicrobium* sp. *Water Research* 17: 1249-1255.
- Trois, C., F. Coulon, C. Polge de Combret, J.M.F. Martins and L. Oxarango. 2010. Effect of pine bark and compost on the biological denitrification process of non-hazardous landfill leachate: focus on the microbiology. *Journal of Hazardous Materials* 181: 1163-1169.
- United State Environmental Protection Agency. 1991. Basic Information about Nitrate in Drinking Water (Online). Available: <http://water.epa.gov/drink/contaminants/basicinformation/nitrate.cfm> (June 1, 2011)
- Wachtmeister, A., T. Kuba, M.C.M. van Loosdrecht and J.J. Heijnen. 1997. Development of a sludge characterization assay for aerobic and denitrifying phosphorus removing sludge. *Water Research* 31: 471-478.
- Ward, M.H., T.M. deKok, O. Levallois, J. Brender, G. Gulis and B.T. Nolan. 2005. Workgroup report: drinking water nitrate and health-recent findings and research needs.

- Environmental Health Perspective 113: 1607-1614.
- Wongsanit, J. 2009. Risk Assessment of Nitrate Contamination in Groundwater Using Geoinformatics. Dissertation for the Degree of Master of Science. Faculty of Science. Mahidol University. Nakhonpathom. 69 p.
- World Health Organization. 2011. Water sanitation and health (Online). Available: http://www.who.int/water_sanitation_health/publications/en/index.html (June 1, 2011).
- Zhou, Z., N. Takaya, M. Antonina, C. Sakairi and H. Shoun. 2001. Oxygen requirement for denitrification by the fungus *Fusarium oxysporum*. Archives Microbiology 175:19-25.
- Zhou, Y., M. Pijuan and Z.G. Yuan. 2007. Free nitrous acid inhibition on anoxic phosphorus uptake and denitrification by polyphosphate accumulating organisms. Biotechnology and Bioengineering 98: 903-912.
- Zhou, X., C. Chen, A. Wang, L.-H. K.-L. Liu Ho, N. Ren, and D.- J. Lee. 2011. Rapid acclimation of methanogenic granular sludge into denitrifying sulfide removal granules. Bioresource Technology (in press).
-