ดีไนทริไฟอิ้งแบคทีเรียและบทบาทในการแก้ปัญหามลภาวะในสภาพแวดล้อม

Denitrifying Bacteria and the Roles in Problem Solving of Environmental Pollution

ชมภูนุช วิรุณานนท์[1/] จิราพร พวงแก้ว[1/] และวรวุฒิ จุฬาลักษณานุกูล[1/]

Chompunuch Virunanon[1/], Jiraporn Puangkaew[1/], and Warawut Chulalaksananukul[1/]

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 nirogen 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

[1/]หน่วยวิจัยเชื้อเพลิงชีวภาพด้วยตัวเร่งชีวภาพ ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพฯ 10330

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

บทคัดย่อ: เกษตรกรรมในยุคโบราณเป็นการเพาะปลูกเพื่อให้ผลผลิตเป็นแหล่งอาหารและเป็นสิ่งแลกเปลี่ยนแทนเงินตรา การผลิตอาศัยธรรมชาติมากกว่าสารเคมี ในปัจจุบัน การเพาะปลูกอาศัยเทคโนโลยีและสารเคมีเป็นสิ่งช่วยเพิ่มผลผลิตและประหยัดเวลา อย่างไรก็ตามเทคโนโลยีทางการเกษตรโดยเฉพาะการใช้ปุ๋ยเคมีก่อให้เกิดมลภาวะต่อสิ่งแวดล้อมเป็นอันมาก โดยเฉพาะการปนเปื้อนสารเคมีลงสู่สิ่งแวดล้อม ในบทความนี้ได้กล่าวถึงจุลชีพกลุ่มที่มีบทบาทต่อการบำบัดการตกค้างของสารเคมีในสิ่งแวดล้อม โดยเฉพาะอย่างยิ่งกลุ่มดีไนทริไฟอิ้งแบคทีเรีย ซึ่งสามารถพบได้ทั้งพื้นที่เกษตรกรรมและในป่าไม้ และมีบทบาทเป็นผู้ย่อยสลายในวัฏจักรไนโตรเจน โดยเน้นไปที่หัวข้อหลักสี่หัวข้อคือ กระบวนการดีไนทริฟิเคชันและดีไนทริไฟอิ้งแบคทีเรีย สภาวะที่ทำให้แบคทีเรียเกิดกลไกที่จะหันมาใช้ไนเทรต เป็นตัวรับอิเลกตรอน และการประยุกต์ใช้ดีไนทริไฟอิ้งแบคทีเรียในการกำจัดของเสียอันตรายในงานวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม

คำสำคัญ: ดีไนทริไฟอิ้งแบคทีเรีย วิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม ของเสียอันตราย

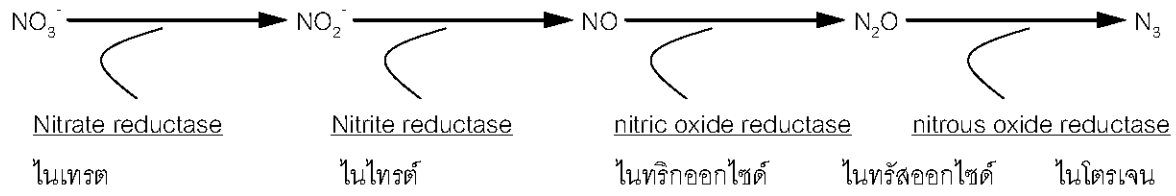
บทนำ

ปัญหามลภาวะสิ่งแวดล้อมเป็นเรื่องเร่งด่วนที่จำเป็นต้องหาทางแก้ไข โดยเฉพาะอย่างยิ่งการใช้ปุ๋ยและสารเคมีที่มีเพิ่มขึ้นในปัจจุบันถือเป็นอีกหนึ่งปัจจัยที่ก่อให้เกิดปัญหามลภาวะทั้งทางดินและน้ำ ซึ่งการเกษตรในยุคประมาณช่วง 100 ปีก่อนหน้า ล้วนแต่เป็นการเกษตรที่เน้นการใช้สารเคมีเพื่อเพิ่มผลผลิต กำจัดศัตรูพืช ซึ่งให้ผลดีในการเพิ่มผลผลิตเพียงระยะสั้น สิ่งที่ตามมาของการใช้สารเคมีเพื่อเพิ่มผลผลิตทางการเกษตรจะสะสมทีละน้อยแต่มีผลระยะยาวต่อสิ่งแวดล้อมและมนุษย์อย่างรุนแรงและก่อปัญหาตามมาอย่างคาดไม่ถึง ส่งผลทำให้แมลง โรคพืชมีความต้านทานเพิ่มขึ้น เกษตรกรยิ่งใช้สารเคมีมากขึ้นและในที่สุดก็ทำลายระบบนิเวศใกล้เคียงแหล่งเกษตรกรรม ทำให้เกิดการตกค้างของสารที่มีความเป็นพิษ เช่น โพลีไซคลิก อะโรมาติก ไฮโดรคาร์บอน หรือ พีเอเอช (PAHs) เมธิลโบรไมด์ (CH_3Br) โพแทสเซียมไนเทรต (KNO_3) แอมโมเนียมไนเทรต (NH_4NO_3) เป็นต้น การมีสารเหล่านี้ปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อมจะส่งผลกระทบโดยตรงต่อสิ่งมีชีวิตที่อาศัยอยู่ร่วมกันในระบบนิเวศวิทยา โดยเฉพาะอย่างยิ่งการปนเปื้อนของไนเทรต (NO_3^-) ไนเทรตที่ปนเปื้อนและอาจส่งผลกระทบกับร่างกายสามารถมาได้จากหลายแหล่ง เช่น ในดินประสิวที่ทำเนื้อเค็ม หรือจากปุ๋ยเคมีที่ปนเปื้อนมากับผักสด ตลอดจนการปนเปื้อนในแหล่งน้ำธรรมชาติที่ใกล้กับแหล่งเกษตรกรรม เมื่อมีการรับเข้าสู่ร่างกายจะสามารถเปลี่ยนเป็นไนไทรต์ (NO_2^-) มีผลต่อร่างกายทำให้เกิดอาการปวดท้อง คลื่นไส้ อาเจียน หมดสติ นอกจากนี้ยังมีผลทำให้ตับไม่สามารถสะสมวิตามินเอได้ตามปกติ ในเด็กและทารกหากไนไทรต์ถูกดูดซึมเข้าสู่กระแสเลือดจะมีผลต่อการพาออกซิเจน โดยไนไทรต์จะไปแย่งจับกับฮีโมโกลบินเกิดเป็นเมทีโมโกลบิน (Methemoglobin) ทำให้เกิดโรคบลูเบบี้ (Blue baby syndrome) หรือโรคเมทีโมโกลบิเนเมีย (Methemoglobinemia) ทำให้เด็กมีอาการตัวเขียวคล้ำ สมองขาดออกซิเจน เป็นลมหมดสติ และอาจถึงแก่ชีวิตได้ นอกจากนี้หากไนไทรต์ทำปฏิกิริยากับเอมีน (Amine) ในร่างกาย อาจทำให้เกิดสารไนโทรซามีน (Nitrosamine) ซึ่งเป็นสารก่อมะเร็งได้อีกด้วย ดังจะเห็นได้ว่าปัจจุบันในแต่ละปีเต็มไปด้วยผู้ป่วยมะเร็ง คร่าชีวิตทรัพยากรมนุษย์ไปเป็นปีละจำนวนมาก (เก็จกาญจน์, 2546) อย่างไรก็ตามการเป็นมะเร็งนั้นยังมีปัจจัยเหนี่ยวนำอื่นอีกมาก เช่น พันธุกรรมพฤติกรรมการใช้ชีวิต และสารเคมีหรือรังสีอื่นๆที่มีผลต่อการแบ่งเซลล์ มิใช่มาจากการปนเปื้อนของไนเทรตในสิ่งแวดล้อมเพียงอย่างเดียว

การจัดการของเสียอันตรายและสารพิษจึงเป็นศาสตร์อีกแขนงหนึ่งที่นำมาใช้ควบคู่กับการเกษตรอินทรีย์เพื่อบำบัดและลดปริมาณสารเคมีและของเสียที่เกิดจากการเกษตรเคมี โดยเฉพาะการปนเปื้อนของไนเทรตจากปุ๋ยเคมี แม้ว่าในปัจจุบันจะมีการใช้ปุ๋ยไนเทรตเพื่อเพิ่มธาตุอาหารให้พืช และพืชมีการตอบสนองต่อปุ๋ยได้ดี ซึ่งแสดงว่าดินยังมีการขาดแร่ธาตุไนโตรเจนอยู่ อย่างไรก็ตาม มีรายงานการปนเปื้อนของไนเทรตและฟอสเฟตในน้ำ โดยเฉพาะแหล่งน้ำในบริเวณใกล้เคียงกับพื้นที่การเกษตร

(กรมควบคุมมลพิษ, 2546) สำหรับในต่างประเทศได้มีการศึกษาผลกระทบดังกล่าวมาเป็นเวลานาน ในสหรัฐอเมริกา World Resources Institute ได้มีการประมาณการปริมาณไนเทรตที่จะมีตกค้างในธรรมชาติโดยคำนวนจากปริมาณปุ๋ยที่จะใช้ในการเกษตร ระหว่างปี 1960-2020 พบว่าในประเทศกำลังพัฒนามีแนวโน้มที่จะมีการใช้ปุ๋ยในการเกษตรเพิ่มขึ้นมากที่สุดในปี 2020 เมื่อเทียบกับภูมิภาคอื่นๆของโลกคือ ประเทศกลุ่มยุโรป ประเทศในทวีปอัฟริกา อเมริกาใต้ และเอเชีย ในประเทศไทยก็มีการศึกษาผลกระทบดังกล่าว และพบการปนเปื้อนของไนเทรตในพืชผักและในน้ำใต้ดินมากกว่าการปนเปื้อนในดิน โดยในปี 2536 ฉันทนา ได้ศึกษาการปนเปื้อนของตะกอนในแหล่งน้ำใกล้กับบริเวณสนามกอล์ฟติดกับอ่างเก็บน้ำกลางดง จังหวัดชลบุรี พบว่าปริมาณไนเทรตเฉลี่ยในน้ำสูงกว่าในดินและในตะกอน แต่ต่ำกว่าคุณภาพน้ำผิวดินของ WHO (45 มิลลิกรัมต่อลิตร) (World Health Organization, 2011) อย่างไรก็ตามปริมาณดังกล่าวพบว่าเป็นปริมาณที่สูงมากเมื่อเทียบกับค่า maximum contamination level (MCL) ที่กำหนดไว้ในน้ำดื่มคือ 10 ส่วนต่อล้าน (ppm) โดย United State Environmental Protection Agency (1991) และยังพบการตกค้างของไนเทรตอยู่ในผักกินใบจากการศึกษาของ อัมพิกา (2548) รายงานว่าปริมาณไนเทรตในผักทุกชนิดมีค่าสูงกว่าไนไทรต์มาก ผักใบเป็นผักที่มีปริมาณไนเทรตสูง ส่วนใหญ่มีค่าสูงกว่าเกณฑ์กำหนดปริมาณไนเทรตในอาหารตามประกาศกระทรวงสาธารณสุขแต่มีค่าต่ำกว่ามาตรฐานปริมาณไนเทรตในผักของสหภาพยุโรป โดยผักใบ ได้แก่ กวางตุ้งฮ่องเต้ ผักกาดเขียว กวางตุ้ง ผักบุ้งจีน กวางตุ้งดอก กุยช่ายใบ ผักกาดหอม และต้นหอม พบค่าเฉลี่ยปริมาณไนเทรตอยู่ระหว่าง 505.1-1573.4 มก./กก. และมีการศึกษาการปนเปื้อนในน้ำใต้ดินเช่นกันในรายงานของ Wongsanit (2009) โดยพบว่าน้ำใต้ดินที่ปนเปื้อนอยู่ในพื้นที่การเพาะปลูกอ้อยมีการปนเปื้อนในระดับสูง 5.41% ในประเทศไทย ปัจจุบันปัญหาการขาดธาตุไนโตรเจนในดินยังคงมีอยู่ ทำให้การใช้ปุ๋ยไนโตรเจนยังคงมีอย่างต่อเนื่อง และพืชมีการตอบสนองต่อปุ๋ยได้ดี ดังนั้นประเด็นปัญหาคือปุ๋ยที่ไม่ได้รับการดูดซึมแต่ถูกน้ำชะล้างลงไปใต้ดินจึงเป็นส่วนที่เป็นส่วนที่มักก่อปัญหาการปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อม การกำจัดและบำบัดไนเทรตมีอยู่ด้วยกันหลายกระบวนการ เช่น กระบวนการแลกเปลี่ยนไอออน (ion exchange) กระบวนการ รีเวิร์สออสโมซิส (reverse osmosis) กระบวนการแยกไอออนผ่านเยื่อด้วยไฟฟ้า (electrodialysis) กระบวนการกลั่น (distillation) กระบวนการรีดักชันทางเคมี (chemical reduction) และกระบวนการดีไนทริฟิเคชัน (denitrification) เป็นต้น (Gómez *et al.*, 2002) ซึ่งแต่ละกระบวนการก็มีประสิทธิภาพในการกำจัดที่แตกต่างกันออกไป แต่สำหรับกระบวนการดีไนทริฟิเคชันเป็นกระบวนการที่นิยมใช้ เนื่องจากสามารถประยุกต์ได้หลากหลาย มีความจำเพาะ มีความคุ้มค่า และสามารถเปลี่ยนไนเทรตให้อยู่ในรูปของแก๊สไนโตรเจนได้ด้วยวิธีทางชีวภาพ โดยอาศัยการทำงานของดีไนทริไฟอิ้งแบคทีเรีย และสามารถเปลี่ยนสารประกอบไนเทรตให้อยู่ในรูปของแก๊สไนโตรเจนได้

ในทางชีววิทยาสามารถพบไนเทรตเป็นสารตัวกลางในกระบวนการหลักอยู่ 2 กระบวนการ (Zhou *et al.*, 2001; Zhou *et al.*, 2007; Zhou *et al.*, 2011) กระบวนการแรกคือ กระบวนการไนทริฟิเคชัน และกระบวนการที่สองคือ กระบวนการดีไนทริฟิเคชัน ในกระบวนการไนทริฟิเคชัน แอมโมเนียจะถูกเปลี่ยนเป็นไนไทรต์และถูกออกซิไดซ์ต่อได้เป็นไนเทรต ส่วนกระบวนการดีไนทริฟิเคชันไนเทรตจะถูกรีดิวซ์เป็นไนไทรต์ ไนทริกออกไซด์ ไนทรัสออกไซด์ และไนโตรเจนตามลำดับการ และอาศัยการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์ 4 ชนิด ดังนี้



กระบวนการดีไนทริฟิเคชัน (Denitrification) **และดีไนทริไฟอิ้งแบคทีเรีย** (Denitrifying bacteria)

เป็นกระบวนการทางชีวภาพที่สามารถเปลี่ยนไนเทรตไปเป็นแก๊สไนโตรเจนได้ ทำให้เกิดการสูญเสียไนโตรเจนจากดินและน้ำ มีผลต่อการเกษตรกรรมทำให้ผลผลิตทางการเกษตรเป็นไปได้ไม่ดีเท่าที่ควร นอกจากนี้ด้วยความสามารถเปลี่ยนไนเทรตให้เป็นไนทริกออกไซด์และไนทรัสออกไซด์ซึ่งมีความเป็นพิษ ทำลายโอโซน จึงส่งผลต่อปัญหาภาวะโลกร้อน แต่อย่างไรก็ตามงานวิจัยหลายชิ้นได้มีการศึกษาเพื่อนำกระบวนการดีไนทริฟิเคชันไปใช้ประโยชน์เพื่อกำจัดและลดปัญหาการปนเปื้อนของสารประกอบไนโตรเจนในสิ่งแวดล้อม โดยไนทริไฟอิ้งแบคทีเรียที่มีความสามารถในการเปลี่ยนไนเทรตให้เป็นแก๊สไนโตรเจน ซึ่งเป็นแก๊สที่สามารถละลายในน้ำได้น้อยและระเหยสู่อากาศได้ดี จึงทำให้สามารถกำจัดไนเทรตหรือสารประกอบไนโตรเจนออกจากระบบได้ (เก็จกาญจน์, 2546)

ดีไนทริไฟเออร์คือจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการรีดิวซ์สารประกอบไนเทรตให้อยู่ในรูปของแก๊สไนโตรเจนได้ พบในแบคทีเรียและรา แต่โดยส่วนมากเป็นพวกแบคทีเรีย มีทั้งแบคทีเรียที่เจริญในสภาพไม่ใช้ออกซิเจน (anaerobe) เช่น *Parococus denitrificans*, *Thiobacillus denitrificans*, *Ps. denitrificans*, *Alcaligene* spp., *Azospirillum* spp., *Rhodopseudomonas* spp., *Propionibacterium* spp. และแบคทีเรียที่ใช้ออกซิเจน (aerobe) เช่น *Thiosphaera pantotropha*, *Pseudomonas* spp., *Rhizobium* spp. และ *Bacillus* spp. อย่างไรก็ตาม พบว่า ทั้งสองกลุ่มล้วนมีแบคทีเรียที่น่าสนใจ มีศักยภาพมาใช้ในการกำจัดของเสียทางการเกษตรได้ดี โดยแบคทีเรียที่นำมาประยุกต์ใช้ควรมีศักยภาพอย่างน้อย 2 ประการแรกคือ มีความสามารถเป็นดีไนทริไฟเออร์ ทำให้กำจัดไนเทรตได้ ประการที่สองสามารถย่อยสลายสารอะโรมาติกซึ่งเป็นสารพิษ ตัวอย่างแบคทีเรียที่มีความสามารถเหล่านี้ได้แก่ *Spirillum* spp. ซึ่งมีความสามารถในการสลายสารประเภทฟีนอล (Shinoda *et al.*, 2000) *Hyphomicrobrium* spp. ที่พบในกากตะกอนการบำบัดน้ำเสียที่ปนเปื้อนไปด้วยไนเทรตในสภาพที่มีเมทานอลสูง (Timmermans and Van Haute, 1983) *Agrobacterium* spp. ที่แยกได้โดย Knight *et al.* (2009) มีความสามารถในการย่อยสลายโบรโมไซนิล (Bromoxynil) ซึ่งเป็นสารพิษประเภทยาฆ่าวัชพืชใบกว้างทั่วไปที่เป็นสารประกอบอะโรมาติกไนไทรต์ (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.

ดีไนทริไฟอิ้งแบคทีเรียส่วนมากที่พบเป็นได้ทั้งพวกแอนแอโรบิคออโตทรอฟ (anaerobic autotroph) และแอนแอโรบิคเฮเทอโรทรอฟ (anaerobic heterotrophs) ในธรรมชาติ ดีไนทริไฟอิ้งแบคทีเรียมีการอยู่อาศัยและทำงานร่วมกันกับจุลชีพและสิ่งมีชีวิตอื่นในดิน ในสภาพที่สมดุลในธรรมชาติที่ปราศจากการรบกวนของสารเคมีทางการเกษตร เช่น ในป่าไม้ จะพบว่า แม้ว่ากระบวนการดีไนทริฟิเคชันในแบคทีเรียบางชนิดจะมีการเกิดขึ้นเพียงบางขั้นตอนหรือบางส่วน แต่ด้วยการทำงานร่วมกันของแบคทีเรียและจุลชีพอื่นๆในดินก็สามารถทำให้เกิดกระบวนการดีไนทริฟิเคชันทั้งหมดอย่างสมบูรณ์ได้ แบคทีเรียที่มีความสามารถทำให้เกิดกระบวนการดีไนทริฟิเคชันบางส่วนนี้เรียกว่า partial denitrifying bacteria และสามารถจำแนกตามตามความหลากหลายทางความสามารถทางชีวเคมีได้เป็นสี่กลุ่มใหญ่ดังนี้

1. **กลุ่มที่มีความสามารถรีดิวซ์ไนเทรตเป็นไนไทรต์ได้เท่านั้น** เนื่องจากแบคทีเรียในกลุ่มนี้ขาดเอนไซม์ไนไทรต์รีดักเทส ไนทริกออกไซด์รีดักเทส และไนทรัสออกไซด์รีดักเทส ยกตัวอย่างแบคทีเรียในกลุ่มนี้เช่น *Agrobacterium* spp., *Arthobacter* spp., *Pseudomonas* spp., *Rhizobium* spp. (Delwiche, 1981)

2. **กลุ่มที่มีความสามารถรีดิวซ์ไนเทรตเป็นไนทรัสออกไซด์ได้เท่านั้น** เนื่องจากขาดเอนไซม์ไนทรัสออกไซด์รีดักเทส จึงทำให้ไม่สามารถเปลี่ยนไนทรัสออก

ไซด์ไปเป็นแก๊สไนโตรเจนได้ ตัวอย่างแบคทีเรียในกลุ่มนี้ เช่น *Bacillus pyocyaneus (Pseudomonas aeruginosa), Bacillus subtillis, Thiobacillus denitrificans, Micrococcus denitrificans* (สมศักดิ์, 2524)

3. กลุ่มที่มีความสามารถรีดิวซ์ไนไทรต์แต่ไม่สามารถรีดิวซ์ไนเทรตเป็นแก๊สไนโตรเจนได้ แบคทีเรียในกลุ่มนี้ขาดเอนไซม์ไนเทรตรีดักเทส ทำให้ไม่สามารถใช้ไนเทรตเป็นสารตั้งต้นในการเปลี่ยนให้เป็นแก๊สไนโตรเจนได้ ตัวอย่างแบคทีเรียในกลุ่มนี้ *Pseudomonas* sp. บางสายพันธุ์ (Roger, 1982)

4. กลุ่มที่มีสามารถรีดิวซ์ไนเทรตเป็นไนไทรต์และรีดิวซ์ไนทริกออกไซด์เป็นไนทรัสออกไซด์ได้ แบคทีเรียในกลุ่มนี้ขาดเอนไซม์ไนไทรต์รีดักเทส และไนทรัสออกไซด์รีดักเทส ซึ่งกระบวนการในลักษณะเช่นนี้พบได้น้อยและไม่มีนัยสำคัญทางนิเวศวิทยา เนื่องจากเมื่อมีการอาศัยและทำงานร่วมกันกับแบคทีเรียอื่นจะทำให้กระบวนการในลักษณะนี้สามารถเกิดปฏิกริยาต่อไปได้จนเกิดดีไนทริฟิเคชันได้อย่างสมบูรณ์ในที่สุด ตัวอย่างแบคทีเรียในกลุ่มนี้ได้แก่ *Bacillus licheniformis* (เก็จกาญจน์, 2546)

สภาวะที่ทำให้แบคทีเรียเกิดกลไกที่จะหันมาใช้ไนเทรตเป็นตัวรับอิเลกตรอนได้

กระบวนการหายใจ (Respiration) เป็นกระบวนการทางชีวเคมีเพื่อสลายสารให้เกิดพลังงานที่เซลล์สามารถนำไปใช้ได้ กระบวนการหายใจระดับเซลล์มี 2 แบบคือ การหายใจแบบใช้ออกซิเจน (aerobic respiration) ซึ่งมีการใช้ออกซิเจนเป็นตัวรับอิเล็กตรอนตัวสุดท้าย ส่วนการหายใจแบบไม่ใช้ออกซิเจน (anaerobic respiration) เป็นการใช้ตัวรับอิเล็กตรอนตัวอื่นนอกเหนือจากออกซิเจน เช่น ไนเทรต ซัลเฟต ซัลเฟอร์มาเป็นตัวรับเล็กตรอนตัวสุดท้าย

ดีไนทริไฟอิ้งแบคทีเรียโดยส่วนมากมักเป็นพวกสามารถใช้ออกซิเจนเป็นตัวรับอิเล็กตรอนสุดท้ายได้ในกรณีที่มีออกซิเจน แต่เมื่ออยู่ในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจนก็สามารถใช้ไนเทรต ซัลเฟต เหล็ก มาเป็นตัวรับอิเล็กตรอนตัวสุดท้ายได้เช่นกัน เรียกว่า แฟคคัลเททีฟ แอโรบ (Facultative aerobes) (กรมควบคุมมลพิษ, 2546) ดังนั้นการควบคุมให้เกิดภาวะแอนอกสิกจะทำให้ดีไนทริไฟอิ้งแบคทีเรียสามารถนำไนเทรตไปใช้เป็นตัวรับอิเล็กตรอนแทนออกซิเจน ซึ่งสามารถนำไปประยุกต์ใช้เพื่อบำบัดไนเทรตและฟอสฟอรัสได้ (Hu *et al.*, 2003; Wachtmeister *et al.*, 1997)

เทคนิคการระบุสายพันธุ์และการวัดอัตราการเกิดกระบวนการดีไนทริฟิเคชันและการวัดกิจกรรมของเอนไซม์ (Denitrifying enzyme activity assay) ของแบคทีเรีย

การศึกษาในงานวิจัยของสิรินันท์ (2552) ซึ่งศึกษาวิธีการคัดเลือกดีไนทริไฟอิ้งแบคทีเรียและการทดสอบความสามารถในการรีดิวซ์ไนเทรตเป็นไนไทรต์โดยใช้เทคนิคทางจุลชีววิทยา เลี้ยงแบคทีเรียให้มีการเจริญแล้วจึงทำการแยกมาเลี้ยงในอาหารเหลวที่มีส่วนผสมของไนเทรต ในสภาพไร้ออกซิเจน จากนั้นทำการเก็บตัวอย่างอาหารเหลวในวันที่แรก และวันที่ 7 มาทดสอบความสามารถในการรีดิวซ์ไนเทรตด้วยวิธี แอลฟา-เมธิลลาไมน์ (alpha-methylamine method) แบคทีเรียที่มีความสามารถเป็นดีไนทริฟิเคชันแบคทีเรียสามารถทดสอบได้โดยใช้ชุดทดสอบของ API (Analytical Profile Index, Biomeriecs Inc.) ซึ่งเมื่อได้โคโลนีของดีไนทริไฟอิ้งแบคทีเรียแล้วจะนำไปทดสอบความสามารถในการรีดิวซ์ไนเทรต-ไนโตรเจน และไนไทรต์-ไนโตรเจน ขั้นตอนหลังจากนั้นคือ การระบุสายพันธุ์ การระบุสายพันธุ์ของดีไนทริไฟอิ้งแบคทีเรียจะยึดลำดับของยีน 16S rDNA เป็นหลัก โดยใช้ Genomics DNA Purification Kit เพื่อแยกดีเอ็นเอออกจากโครโมโซม ทำให้ได้ไพรเมอร์ที่ถูกตัดในตำแหน่ง 27F และ 1492R เพื่อนำไปใช้ในเทคนิคพีซีอาร์เพื่อตรวจสอบชิ้นดีเอ็นเอที่มีขนาด 1500 คู่เบส แล้วทำบริสุทธิ์โดยใช้ Viogene's Gel Extraction System จนได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่มีความบริสุทธิ์แล้วจึงนำไปเชื่อมกับเวคเตอร์ เพื่อใช้เป็นพาหะเข้าสู่ *E. coli* ทำการสกัดพลาสมิดแล้วนำไปเปรียบเทียบกับตารางข้อมูลของ NCBI (Shi and Lee, 2006) ปัจจุบันเทคนิคดังกล่าวเป็นเทคนิคที่ใช้กันอย่างแพร่หลายในการบ่งชี้ชนิดของดีไนทริไฟอิ้งแบคทีเรีย และยังมียีนอื่นที่นำมาใช้ในการบ่งชี้และ

จัดจำแนกกลุ่มของดีไนทริไฟอิ้งแบคทีเรียอีกด้วย เช่น *nirS* (Falk *et al.*, 2007) ซึ่งพบว่ามียีนนี้ปรากฏในดีไนทริไฟอิ้งแบคทีเรียในก้นตะกอนทะเลบอลติก และ *nirK* (Theerachat *et al.*, 2011) ซึ่งได้ทำการแยกดีไนทริไฟอิ้งแบคทีเรียในประเทศไทย และพบว่าปกติแล้วเมื่อใช้ลำดับของนิวคลีโอไทด์ของยีนที่แตกต่างกันดังนี้ จะทำให้ผลในการจัดกลุ่มของจุลินทรีย์มีความแตกต่างกันไป การใช้ชุดตรวจระบุสปีชีส์ของจุลินทรีย์ควบคู่ไปด้วย เช่น ชุดทดสอบของ API และการหาลำดับของ 16S rDNA ควบคู่กันไปจะทำให้ได้ผลการจัดจำแนกกลุ่มแบคทีเรียที่มีความใกล้เคียงกับความเป็นจริงมากที่สุด

Song *et al.* (2011) ได้ใช้วิธีการวัดอัตราการเกิดกระบวนการดีไนทริฟิเคชันจากตัวอย่างดินด้วยวิธีอะเซทิลีนบล็อกกิ้ง (acetylene blocking assay) แล้วนำไปวิเคราะห์เพื่อหาความเข้มข้นของไนทรัสออกไซด์โดยใช้แก๊สโครมาโตกราฟฟี ทำการหาค่าความชันของกราฟเพื่อนำไปคำนวณหาอัตราการเกิดปฏิกิริยาดีไนทริฟิเคชัน ส่วนค่ากิจกรรมดีไนทริไฟอิ้งเอนไซม์สามารถทำการวัดได้โดยใช้สารละลายของตัวอย่างดินที่มีการผสมไนเทรต แล้วใช้วิธีการทดลองเช่นเดียวกับวิธีการวัดอัตราการเกิดกระบวนการดีไนทริฟิเคชัน

การประยุกต์ใช้ในทางการเกษตรและสิ่งแวดล้อม

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

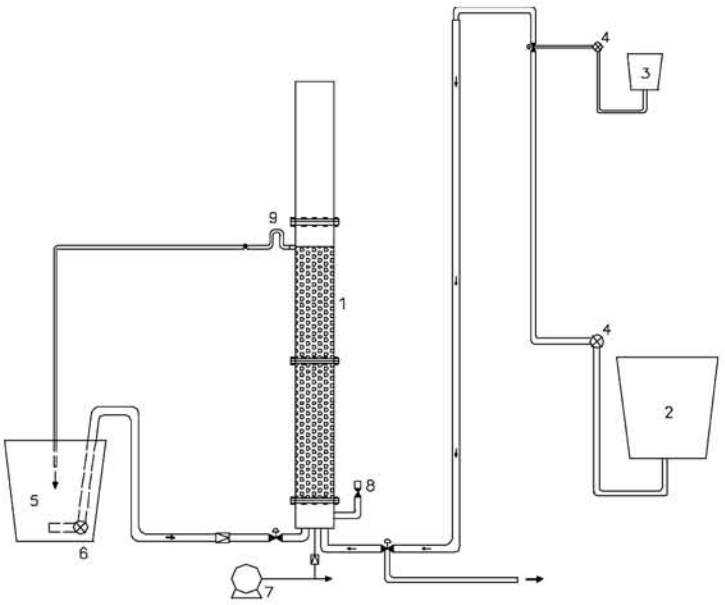


Figure 1 Pilot scale plant setting described in Gómez *et al.* (2005)
(1) Submerged filter (V = 0.21m^3) (2) Influent tank (V = 1.7 m^3) (3) carbon source tank (V = 0.03 m^3) (4) piston pump (5) effluent tank (V = 0.5 m^3) (6) rinsing pump (7) air compressor (8) safety valve (9) U-bend

ผลการทดลองพบว่าไบโอฟิล์มที่มีดีไนทริไฟอิ้งแบคทีเรียเจริญอยู่บนตัวกรองชีวภาพมีคุณสมบัติในการบำบัดและกำจัดไนเทรตที่ปนเปื้อนในน้ำใต้ดินจนสามารถนำมาใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตน้ำสะอาดที่สามารถดื่มได้ โดยไม่ส่งผลต่อปัญหาทางด้านสาธารณสุขที่มาจากผลของแอนไอออน ในขณะเดียวกันยังพบว่าความเข้มข้นของแก๊สออกซิเจนที่ละลายอยู่ในน้ำมีผลให้กลุ่มของดีไนทริไฟอิ้งแบคทีเรียในไบโอฟิล์มมีการเจริญน้อยลง และส่งผลให้ไนโตรเจนปรากฏขึ้นมาในระบบในรูปของไนไทรต์ ซึ่งส่งผลต่อในประสิทธิภาพให้การบำบัดน้ำใต้ดินได้

งานวิจัยของอาภาวรรณ (2552) ได้ศึกษาประสิทธิภาพของการเกิดกระบวนการดีไนทริฟิเคชันจากถังเพาะเลี้ยงกล้าเชื้อดีไนทริไฟอิ้งแบคทีเรีย ซึ่งใช้เมทานอลและอาหารปลาหมักเป็นแหล่งคาร์บอนที่ระดับความเค็ม 25 ส่วนต่อพัน (part per thousand, ppt) และมีการตรวจสอบแบคทีเรียที่เกี่ยวข้อง ด้วยเทคนิคฟลูออเรสเซนส์ อินซิตู ไฮบริไดเซชัน (Fluorescence *In Situ* Hybridization, FISH) ซึ่งเป็นวิธีที่มีความจำเพาะในการตรวจสอบกลุ่มดีไนทริไฟอิ้งแบคทีเรีย จากการทดลองในห้องปฏิบัติการพบว่า เมื่อทำการเปลี่ยนอาหารใหม่ทุก 3 วันในช่วงแรก พบว่าการบำบัดไนเทรตมีประสิทธิภาพน้อย แต่เมื่อเพิ่มช่วงเวลาในการเติมอาหารให้นานขึ้นในช่วงที่สองเป็น 5 วัน/ครั้ง พบว่าในช่วงที่สองภายในถังเพาะกล้าเชื้อของดีไนทริไฟอิ้งมีความสามารถในการบำบัดไนเทรตดีขึ้น และเมื่อเพิ่มระยะเวลาการเติมอาหารเป็น 7 วัน/ครั้งในช่วงที่สาม พบว่าภายในถังเพาะกล้าเชื้อดีไนทริไฟอิ้งแบคทีเรีย มีการบำบัดไนเทรตได้เกือบสมบูรณ์ ซึ่งเมื่อนำแบคทีเรียในถังเพาะไปตรวจสอบด้วยเทคนิค ฟลูออเรส-เซนส์ อินซิตู ไฮบริไดเซชัน ทำให้พบแบคทีเรียในจีนัส *Methalophaga* sp. และแบคทีเรีย *Methalophaga marina* ซึ่งเป็นแบคทีเรียในกลุ่มเด่นของดีไนทริไฟอิ้งแบคทีเรียที่พบในปลาหมัก และสามารถสรุปผลการทดลองได้ว่าระยะเวลาในการเติมอาหารมีผลต่อการบำบัดไนเทรตภายในถังเพาะกล้าเชื้อของดีไนทริไฟอิ้งแบคทีเรียอย่างมีนัยสำคัญ

นอกจากการนำดีไนทริไฟอิ้งแบคทีเรียมาประยุกต์ใช้เพื่อการบำบัดไนเทรตโดยตรงแล้ว ยังมีการใช้ประโยชน์เพื่อบำบัดสารปนเปื้อนอื่นๆ อีกด้วย เช่น ใช้ในการกำจัดฟอสฟอรัส ได้มีผู้ทำการวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการบำบัดและกำจัดฟอสฟอรัสโดยใช้ไนเทรตเป็นตัวรับอิเล็กตรอนภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจน และได้ข้อสรุปไปในทางเดียวกันว่าไนไทรต์ไม่มีผลเป็นตัวยับยั้งกระบวนการกำจัดฟอสฟอรัส แต่ไนไทรต์ยังมีความสามารถในการเป็นตัวรับอิเล็กตรอนจากฟอสฟอรัสได้เมื่อไนไทรต์มีความเข้มข้นต่ำกว่าระดับที่จะไม่เป็นพิษและไม่ยับยั้งระบบ (Wachtmeister *et al.*, 1997; Hu *et al.*, 2003; Shi and Lee, 2006; Zhou *et al.*, 2011)

แนวโน้มของการประยุกต์ใช้ดีไนทริไฟอิ้งแบคทีเรียในด้านสิ่งแวดล้อมในอนาคต

จากงานวิจัยเกือบทั้งหมดที่เกี่ยวข้องกับการประยุกต์ใช้กระบวนการดีไนทริไฟอิ้ง พบว่า จุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการใช้กระบวนการดีไนทริฟิเคชันนั้นมีศักยภาพในการนำมาใช้เพื่อบำบัดและแก้ไขปัญหาสิ่งแวดล้อมซึ่งเกิดจากการปนเปื้อนของสารประกอบไนโตรเจน ฟอสฟอรัส พอลิไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน (polycyclic aromatic hydrocarbon; PAH) ฯลฯ โดยเฉพาะอย่างยิ่งการปนเปื้อนของไนเทรตในอาหารและน้ำดื่มซึ่งจะส่งต่อความสบายใจที่ของผู้บริโภคตลอดจนต่อสุขภาพ ซึ่งมีความกังวลกันว่าหากได้รับไนเทรตหรือไนไทรต์อาจมีผลทำให้เกิดการเจ็บป่วยหรือเสียชีวิตได้หากได้รับเข้าสู่ร่างกายในปริมาณมาก อย่างไรก็ตามในส่วนนี้ยังไม่มีผลยืนยันที่ชัดเจนว่าการบริโภคหรือได้รับอาหารที่มีไนเทรตปนเปื้อนเป็นปริมาณมากจะส่งผลต่อการป่วยเป็นมะเร็งหรือเกี่ยวข้องกับความเสี่ยงต่อการเป็นมะเร็งหรือไม่ จากการศึกษาของ Ward *et al.* (2005) ในผู้ป่วยที่เป็นโรคเมทีโมโกลบิเนเมีย พบว่าผลที่ได้ไม่แสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณไนเทรตกับการเป็นโรค เขาได้วิจารณ์ผลดังกล่าวไว้ว่าการได้รับไนเทรตจากการกินมีผลต่อร่างกายน้อยกว่ากระบวนการไนโทรเซชัน (nitrosation) และนอกจากนี้ในพืชผักก็มีสารยับยั้งกระบวนการไนโทรเซชันทำให้การได้รับผักที่มีการปนเปื้อนของไนเทรตมีอันตรายน้อยลง อย่างไรก็ตาม L'hirondel *et al.* (2006) ได้อธิบายเพิ่มเติมผลการวิจัยดังกล่าวว่าอาจมีผลเกี่ยวเนื่องกับกระบวนการ

เมแทบอลิซึมของไนเทรตในร่างกายมนุษย์ โดยเฉพาะเมื่อได้รับไนเทรตจากการกิน โดยเขาได้อธิบายไว้ว่า ไนเทรตเมื่อเข้าสู่ร่างกายแล้วโดยผ่านทางปากซึ่งมีน้ำลายจะถูกเปลี่ยนเป็นไนไทรต์ และไนไทรต์จะคงอยู่ในร่างกายในความเข้มข้นสูงเป็นเวลานานประมาณ 20-60 นาที จากนั้นจะค่อยๆ ลดปริมาณลง เนื่องมาจากความเป็นกรดในน้ำย่อย (gastric juice) ในกระเพาะอาหาร การประยุกต์ใช้ดีไนทริไฟอิ้งแบคทีเรียจึงเน้นไปที่ด้านสิ่งแวดล้อมมากกว่าที่จะใช้ทางการแพทย์หรือการเกษตร ปัจจุบันการกำจัดไนเทรตในสิ่งแวดล้อมโดยการใช้ดีไนทริฟอิ้งแบคทีเรียจะเป็นวิธีทางเลือกหนึ่งเพื่อช่วยกำจัดไนเทรตและไนไทรต์ออกจากระบบได้โดยไม่เป็นอันตรายต่อสิ่งมีชีวิตในระบบนั้นๆ นอกจากนี้ยังมีค่าใช้จ่ายที่น้อยกว่า ไม่เพิ่มปัญหามลภาวะ และประหยัดพลังงาน ในปี 1975 การรั่วไหลของน้ำมันของเครื่องบินทหารปริมาณราว 83,000 แกลลอนทำให้เกิดการปนเปื้อนใกล้กับ North Charleston South California เป็น บริเวณกว้าง ทำให้เกิดการวิจัยเพื่อแก้ปัญหามลภาวะที่เกิดจากอุบัติเหตุตามมา ดังเช่นในงานวิจัยของ Bradley *et al.* (1992) ศึกษาปัจจัยที่จะส่งผลต่อจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการดีไนทริฟิเคชัน ปริมาณไนเทรตค่าความเป็นกรดด่าง และปริมาณฟอสเฟต ที่มีผลต่อกระบวนการดีไนทริฟิเคชันพร้อมกับการย่อยสลายสารประกอบไฮโดรคาร์บอน ต่อมาในปี 1995 Hess *et al.* คัดแยกจุลินทรีย์จากแหล่งที่มีการปนเปื้อนน้ำมัน (diesel fuel-contaminated source) พบว่าจุลินทรีย์มีความสามารถเจริญบนพี-ไซลีน (p-xylene) การออกซิเดชั่นของพี-ไซลีน ควบคู่ไปกับคาร์บอนไดออกไซด์แสดงให้เห็นว่าสามารถลดปริมาณไนเทรตได้สำเร็จ การเพิ่มปริมาณเชื้อในการเจริญบนโทลูอีน (toluene) และเอ็ม-ไซลีน (m-xylene) สามารถตรวจพบได้ อย่างไรก็ตามพบว่าเชื้อไม่สามารถย่อยเบนซีน (benzene) เอธิลเบนซีน (ethylbenzene) และโอ-ไซลีน (o-xylene)ได้ ในรายงานของ Fukui *et al.* (1999) กล่าวถึงการสำรวจการย่อยสลายสารประกอบอะโรมาติก-ไฮโดรคาร์บอน (aromatic hydrocarbon) ในน้ำมันดิบที่ภาวะไร้ออกซิเจน พบว่าแบคทีเรียที่มีความสามารถดังกล่าวอยู่ในกลุ่มที่เป็นซัลไฟต์ รีดิวซิ่งแบคทีเรีย (sulfite-reducing bacteria) สารประกอบแอลคิล-เบนซีน (alkyl-benzene) และ เอ็น-แอลเคน (n-alkane) ถูกพบว่ามีการย่อยสลายได้ไปพร้อมกับการเปลี่ยนซัลเฟต ไปเป็นซัลไฟต์ ซึ่งนับเป็น 10% อะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน น้ำมันดิบ และจึงเป็นคำอธิบายที่ว่าทำไมแบคทีเรียโบราณบางชนิดจึงสามารถพบว่าเจริญได้ในแหล่งน้ำมันดิบซึ่งมีกำมะถันอยู่ด้วย ในปี 2004 Rakhimova *et al.* รายงานประสิทธิภาพของจุลชีพที่ใช้ในการย่อยสลายน้ำมันในการทำไบโอรีมิดิเอชั่นของดินที่ปนเปื้อนน้ำมันถูกทำในห้องปฏิบัติการ ภาวะที่ใช้ในการศึกษาความสามารถในการออกซิไดซ์มีทั้งภาวะไร้ออกซิเจน และภาวะแอนอกสิก ความสามารถในการย่อยสลายน้ำมันที่เป็นสารไฮโดรคาร์บอน มีลำดับของประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันดังนี้ การปล่อยให้เกิดไบโอรีมิดิเอชั่นขึ้นเอง (self-remediation) 40%< เมื่อมีการประยุกต์ใช้ไนเทรต 42%< ระบบ denitrifying oil-oxidizing 50% ระบบที่ใช้ร่วมกันระหว่างกระบวนการดีไนทริฟิเคชันพร้อมกับเติมไนเทรต 60% อย่างไรก็ตามกระบวนการดีไนทริฟิเคชันก็อาจเกิดการยับยั้งได้ถ้ามีปริมาณของสารไฮโดรคาร์บอนสูงมากเกินไป ดังเช่นในรายงานของ Mille *et al.* (2007) ที่ศึกษาประสิทธิภาพการเกิดดีไนทริฟิเคชันที่บริเวณทะเลเมดิเตอร์เรเนียนอ่าวฟอสประเทศฝรั่งเศส (Mediterranean sea, Gulf of Fos area, France) ทั้งหมดนี้แสดงให้เห็นถึงความพยายามของนักวิทยาศาสตร์ที่จะประยุกต์ใช้แบคทีเรียให้เกิดประโยชน์สูงสุด มันคงจะเป็นการดีที่ในอนาคตสามารถลดการใช้สารเคมีอันตรายในการเกษตรและการบำบัดสิ่งแวดล้อมอย่างน้อยเพื่อให้เกิดความยั่งยืนต่อมนุษย์และสภาพแวดล้อมที่สามารถอิงอาศัยกันได้อย่างสมดุลในอนาคต

เอกสารอ้างอิง

เก็จกาญจน์ สมาธิวุฒิคุณ. 2546. การตรวจสอบยีนไนไทรต์รีดักเทสในดีไนทริไฟอิ้งแบคทีเรียโดยเทคนิคพีซีอาร์-อาร์เอฟแอลพี. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพฯ. 119 หน้า.

กรมควบคุมมลพิษ. 2546. คู่มือวิชาการระบบบำบัดน้ำเสียแบบไม่ใช้อากาศ เล่มที่ 1. ศูนย์บริการวิชาการแห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. กรุงเทพฯ. 161 หน้า.

ฉันทนา จิบโคกหวาย. 2536. การปนเปื้อนของไนเทรตและฟอสเฟตในดิน น้ำ และตะกอนบริเวณสนามกอล์ฟติดกับอ่างเก็บน้ำหนองกลางดง จังหวัดชลบุรี. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์สภาวะแวดล้อม. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. กรุงเทพฯ. 193 หน้า.

สมศักดิ์ วังใน. 2524. จุลินทรีย์และกิจกรรมในดิน. ภาควิชาปฐพีวิทยา คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ. 193 หน้า.

สิรินันท์ ศรีดำ. 2552. การคัดเลือกแบคทีเรียดีไนทริไฟอิงที่มีประสิทธิภาพเพื่อการบำบัดไนเทรตในน้ำทิ้งจากการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง. (ระบบออนไลน์). แหล่งข้อมูล: http://www.pt.tsu.ac.th/rdi/ConAll/POSTER19/P17.pdf (2 มิถุนายน 2554)

อาภาวรรณ พ่อค้า. 2552. การตรวจสอบแบคทีเรียดีไนทริไฟอิงในหัวเชื้อจุลินทรีย์ผสมสำหรับการบำบัดไนเทรตด้วยเทคนิค Fluorescent *In Situ* Hybridization (FISH). (ระบบออนไลน์). แหล่งข้อมูล: http://www.pt.tsu.ac.th/rdi/ConAll/POSTER19/P19.pdf (2 มิถุนายน 2554)

อัมพิกา ภูวนะเสถียรฐ์. 2548. การตกค้างของสารไนเทรตและไนไทรต์ ในผักต่างชนิด ที่เพาะปลูกแบบเคมี แบบปลอดภัยจากสารพิษและแบบอินทรีย์. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. มหาวิทยาลัยมหิดล. กรุงเทพฯ. 152 หน้า.

Bradley, P.M., C.M. Aelion and D.A. Vroblesky. 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 (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.

Theerachat, M., C. Virunanon, S. Chulalaksananukul, N. Sinbuathong and W. Chulalaksananukul. 2011. *Nir*K and *nir*S 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. Biotechnolology 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).