บทที่ 2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ฟอสฟอรัส (phosphorus) เป็นสารอาหารที่จำเป็นต่อสิ่งมีชีวิต เพราะเป็นองค์ประกอบของพลังงานภายในเซลล์ (adenosine triphosphate หรือ ATP), กรดนิวคลีอิก (nucleic acids คือ ดีเอ็นเอ (DNA) และ อาร์เอ็นเอ (RNA)) และ ฟอสโฟลิพิด (phospholipids) ที่บริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ (cell membrane) ของสิ่งมีชีวิต และในสิ่งมีชีวิตจำพวกโพรแคริโอต (prokaryote) และพวกยูแคริโอต (eukaryote) ยังสามารถสะสมฟอสฟอรัสไว้ภายในเซลล์ในรูปของโพลีฟอสเฟต (polyphosphate) ได้อีกด้วย

โดยทั่วไป สามารถพบฟอสฟอรัสอยู่ในแหล่งน้ำได้ 4 กลุ่ม คือ

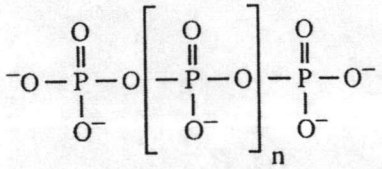
1. สารประกอบอนินทรีย์ฟอสเฟตที่ละลายน้ำ (dissolved inorganic phosphate) คือ ออร์โธฟอสเฟต (orthophosphate หรือ PO_4^{3-}) เป็นรูปที่พร้อมใช้ของพืชและจุลินทรีย์ส่วนใหญ่
2. สารประกอบอนินทรีย์ฟอสฟอรัสที่ดูดซับบนสารแขวนลอย (precipitated inorganic phosphorus) เช่น ฟอสฟอรัสที่ยึดอยู่กับเหล็ก (P-Fe), แคลเซียม (P-Ca) หรืออลูมินัม (P-Al) ซึ่งความสามารถในการละลายจะขึ้นอยู่กับความเป็นกรด-ด่าง (pH) ของแหล่งน้ำ
3. สารประกอบอินทรีย์ฟอสฟอรัสที่ละลายน้ำซึ่งสลายจากเซลล์สิ่งมีชีวิต (dissolved organic phosphorus) เช่น ฟอสโฟโปรตีน (phosphoproteins), ฟอสโฟลิพิด
4. สารอินทรีย์ฟอสฟอรัสที่แขวนลอยในน้ำ (suspended organic phosphorus) คือ สิ่งมีชีวิตที่อาศัยอยู่ หรือสิ่งมีชีวิตที่เพิ่งตายและแขวนลอยอยู่หรือส่วนประกอบภายในเซลล์ที่ออกมาเมื่อเซลล์แตก

ฟอสฟอรัสแต่ละชนิดมีแหล่งกำเนิดแตกต่างกันไป เช่น

- เกิดจากกระบวนการผลิตน้ำประปาซึ่งต้องเติมโพลีฟอสเฟตปริมาณเล็กน้อยลงไปเพื่อใช้ในการปรับสภาพของน้ำประปาไม่ให้กัดกร่อนหรือเกิดตะกรันในท่อ
- เกิดจากผงซักฟอกซึ่งมีฟอสเฟตเป็นส่วนประกอบสำคัญ
- ปุ๋ยต้นไม้ เป็นต้น (มั่นสิน, 2538)

วัฏจักรฟอสฟอรัสในแหล่งน้ำจะอาศัยจุลินทรีย์เป็นตัวเปลี่ยนสถานะ (transformation) โดยจุลินทรีย์บางชนิด เช่น *Bacillus subtilis*, *Arthrobacter*, *Streptomyces*, *Aspergillus* สามารถเปลี่ยนสารประกอบอินทรีย์ฟอสฟอรัส เช่น ไฟติน (phytin) กรดนิวคลีอิก และฟอสโฟลิพิด ให้เป็นออร์โธฟอสเฟตได้โดยอาศัยฟอสฟาเทส (phosphatase) ซึ่งออร์โธฟอสเฟตดังกล่าว จะถูกใช้โดยพืชต่างๆหรือจุลินทรีย์บางชนิดจะดูดซึม (assimilate) เข้าไปเป็นส่วนประกอบของ แมโครโมเลกุล (macromolecules) ภายในเซลล์ และบางชนิดยังมีความสามารถในการเก็บฟอสฟอรัสไว้ในรูปของโพลีฟอสเฟตในโวลูทินแกรนูล (volutin granules) หรือเมตาโครมาติก แกรนูล (metachromatic granules) ภายใต้ภาวะที่สารอาหารไม่สมดุล (nutrient imbalance) ต่อการเจริญ (Harold,1966)

โพลีฟอสเฟต (polyphosphate หรือ poly P) เป็นพอลิเมอร์ (polymer) สายยาวของออร์โธฟอสเฟตหลายสิบหรือหลายร้อยโมเลกุลที่เชื่อมกันด้วยพันธะฟอสโฟแอนไฮไดรด์ (phosphoanhydride bonds) โดยทั่วไปจะเกิดในรูปสารประกอบเชิงซ้อนร่วมกับโปรตีน (protein), ลิพิด (lipids), กรดไรโบนิวคลิอิก (ribonucleic acid หรือ RNA), โปแทสเซียมไอออน (K^+) และแมกนีเซียมไอออน (Mg^{2+}) ซึ่งก่อรูปเป็นโวลูทินแกรนูล สามารถย้อมติดสีได้ด้วย เมธิลีน บลู (methylene blue) และ โทลูอิดีน บลู (toluidine blue)



รูปที่ 2.1 แสดงลักษณะโครงสร้างของโพลีฟอสเฟต (Kornberg และคณะ, 1999)

สามารถพบโพลีฟอสเฟตได้ในสิ่งมีชีวิตทุกชนิดและมีหน้าที่แตกต่างกันไป

- เป็นแหล่งของพลังงาน, ATP และฟอสเฟต
- เป็นตัวคีเลต (chelator) โลหะไอออน (Mn^{2+}, Mg^{2+} และ Ca^{2+})
- เป็นบัฟเฟอร์ต่อต้านแอลคาไล (alkali)
- เป็นแคปซูล (capsule) ของแบคทีเรีย เป็นต้น (Kornberg และคณะ, 1999)

ในปี 1985 Mino และคณะ รายงานว่าพบโพลีฟอสเฟตทั้งชนิดที่มีน้ำหนักโมเลกุล (molecular weight) ต่ำและชนิดที่น้ำหนักโมเลกุลสูงอยู่ในสลัดจ์ (sludge) ของระบบบำบัดน้ำเสีย และได้เสนอแนะไว้ว่า โพลีฟอสเฟตชนิดที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำจะทำหน้าที่เป็นแหล่งของพลังงานภายใต้สภาวะไม่ใช้อากาศ (anaerobic) ส่วนโพลีฟอสเฟตชนิดที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงจะทำหน้าที่เป็นแหล่งของฟอสฟอรัสเพื่อใช้ในการเจริญของจุลินทรีย์ในระบบ (Comeau และคณะ, 1986)

เชื่อกันว่าสารประกอบฟอสฟอรัสเหล่านี้เป็นตัวการที่ทำให้เกิดปัญหาต่อแหล่งน้ำนิ่งต่างๆ เช่น ทะเลสาบ อ่างเก็บน้ำ นั่นคือทำให้แหล่งน้ำมีสีเขียวคล้ำ มีกลิ่นคาวของสาหร่ายหรือปลาตายในช่วงกลางคืนเนื่องจากไม่มีการสังเคราะห์แสงและค่าออกซิเจนละลาย (dissolved oxygen) เป็นศูนย์ หรือเรียกว่าเกิดปรากฏการณ์ยูโทรฟิเคชั่น (eutrophication)

ภาวะยูโทรฟิเคชั่น (ขี้ปลาวาฬ) เกิดเนื่องจาก ฟอสฟอรัสซึ่งเป็นธาตุอาหารจำกัด (limiting nutrient) ชนิดหนึ่งของพืชน้ำ เช่น สาหร่าย (algae) มีอยู่ในแหล่งน้ำปริมาณสูงเกินไป จะทำให้เกิดการเจริญของสาหร่ายมากกว่าปกติ (algal bloom) ทำให้แหล่งน้ำมีสีเขียวหรือแดง (ขึ้นอยู่กับชนิดของสาหร่าย) และเมื่อสาหร่ายเหล่านี้ตายและจมลงสู่ก้นแหล่งน้ำจะถูกแบคทีเรียย่อยสลาย ซึ่งแบคทีเรียเหล่านี้ต้องใช้ออกซิเจน (oxygen) ของแหล่งน้ำนั้นในการย่อยสลายซากสาหร่ายและดำรงชีพ ทำให้ปริมาณออกซิเจนละลายลดลงจนปริมาณออกซิเจนในแหล่งน้ำดังกล่าวจึงเหลืออยู่น้อยจนไม่เพียงพอต่อความต้องการของสิ่งมีชีวิตอื่นๆที่อาศัยอยู่ ทำให้สิ่งมีชีวิตที่ต้องการออกซิเจนส่วนใหญ่ตายไป ส่งผลกระทบต่อระบบนิเวศน์ของแหล่งน้ำและไม่สามารถนำน้ำไปใช้อย่างเต็มศักยภาพ

ภาวะดังกล่าวสามารถควบคุมและป้องกันได้ด้วยการลดปริมาณฟอสฟอรัสที่ปนเปื้อนในแหล่งน้ำก่อนที่จะทิ้งลงในแหล่งน้ำสาธารณะ ซึ่งสามารถกระทำได้หลายวิธี คือ วิธีทางเคมี เช่น การตกตะกอนด้วยสารเคมี และวิธีทางชีวภาพ เช่น การใช้จุลินทรีย์ (Bitton, 1999), การใช้พืชในระบบบึงประดิษฐ์ (Kositanont และคณะ, 1997) เป็นต้น หรือใช้ทั้งสองวิธีร่วมกัน

การตกตะกอนฟอสฟอรัสด้วยสารเคมี (chemical precipitation)

โดยอาศัยการควบคุมสภาพน้ำให้เป็นด่าง แล้วเติมสารแคทไอออน (cations) เช่น แคลเซียม (calcium), เหล็ก (iron) และเกลืออลูมินัม (aluminum salts) เข้าไปทำปฏิกิริยากับฟอสฟอรัสให้เกิดเป็นตะกอนของโลหะฟอสเฟตที่ไม่ละลายน้ำ แล้วจึงแยกออกได้ด้วยการใช้ถังตกตะกอน วิธีนี้สามารถกำจัดฟอสฟอรัสได้ถึง 70-95 เปอร์เซ็นต์ แต่มีข้อเสียคือ สารเคมีมีราคาแพงและก่อให้เกิดกากตะกอนเคมีที่กำจัดยาก (วิโรจน์ ประเทืองสวัสดิ์, 2541)

การกำจัดฟอสฟอรัสทางชีวภาพ (biological phosphorus removal)

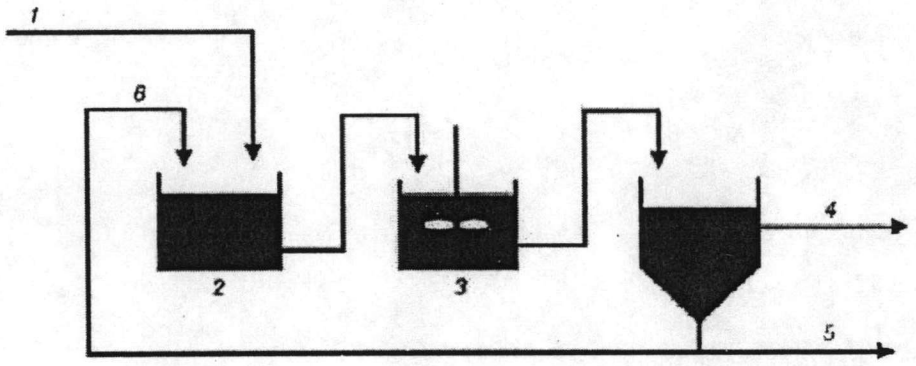
เป็นการกำจัดฟอสฟอรัสโดยอาศัยจุลินทรีย์ ซึ่งเป็นที่นิยมกันมากเพราะให้ปริมาณสลัดจ์ออกจากระบบในปริมาณน้อย,มีสัดส่วนของฟอสฟอรัสอยู่ในสลัดจ์มากจึงใช้เป็นปุ๋ยธรรมชาติหรือปรับสภาพดินได้ และน้ำเสียเองสามารถเป็นวัตถุดิบในการกำจัดฟอสฟอรัสทางชีวภาพได้ (ธงชัย พรรณสวัสดิ์, 2544) กระบวนการที่สามารถกำจัดฟอสฟอรัสทางชีวภาพได้มีอยู่หลายกระบวนการด้วยกัน คือ มีทั้งกระบวนการที่กำจัดได้เฉพาะฟอสฟอรัสอย่างเดียว และกระบวนการที่ใช้กำจัดได้ทั้งไนโตรเจนและฟอสฟอรัสในระบบเดียวกัน

ในช่วงปี 1960 Shapiro และคณะ พบว่าจุลินทรีย์มีบทบาทในการรับและจับใช้ (uptake) ฟอสฟอรัสในระบบสลัดจ์กัมมัน (Shapiro, 1967) จึงมีผู้สนใจศึกษาระบบการกำจัดฟอสฟอรัสทางชีวภาพกันมาก

หลักการของการใช้จุลินทรีย์ในระบบกำจัดฟอสฟอรัสทางชีวภาพ มีดังต่อไปนี้

1. การให้จุลินทรีย์ใช้ฟอสฟอรัสเป็นองค์ประกอบของการสร้างเซลล์ใหม่ และใช้เป็นแหล่งพลังงาน (phosphorus assimilation by microorganisms)
2. การให้จุลินทรีย์สะสมฟอสฟอรัสไว้ภายในเซลล์ ในรูปของโพลีฟอสเฟต (polyphosphate accumulation by microorganisms)
3. การที่จุลินทรีย์ช่วยในกระบวนการตกตะกอนด้วยสารเคมีให้เกิดดีขึ้นเพราะจุลินทรีย์บางชนิดสร้างสารที่ทำให้น้ำมีสภาวะเป็นด่าง (microorganisms-mediated enhanced chemical precipitation)

แม้ปัจจุบันความรู้พื้นฐานของกลไกทางชีวเคมีที่เกิดขึ้นในกระบวนการกำจัดฟอสฟอรัสทางชีวภาพยังไม่เป็นที่เข้าใจกันดีนัก แต่การพัฒนากระบวนการกำจัดด้วยวิธีดังกล่าวนั้น ยังคงเป็นไปอย่างต่อเนื่อง และกระบวนการที่นิยมใช้กันมาก คือ กระบวนการกำจัดฟอสฟอรัสทางชีวภาพอย่างเพิ่มพูน (enhanced biological phosphorus removal) หรืออีบีพีอาร์ (EBPR) เพราะระบบนี้สามารถกำจัดฟอสฟอรัสได้ผลมากกว่าระบบอื่น



รูป 2.2 แผนภาพของระบบอีบีพีอาร์ (Keasling และคณะ, 2000)

1) น้ำเสีย 2) ถังไม่ใช้อากาศ 3) ถังใช้อากาศ
4) น้ำที่ผ่านการบำบัด 5) สลัดจ์ที่ออกจากระบบ 6) สลัดจ์ที่เวียนกลับ

หลักการของระบบอีบีพีอาร์

เพาะเชื้อในถังไม่ใช้อากาศ (anaerobic tank) เพื่อคัดเลือกพันธุ์แบคทีเรียให้ได้แบคทีเรียกลุ่มโพลีฟอสเฟต (polyphosphate bacteria) หรือโพลีพีแบคทีเรีย (polyP bacteria หรือ PP bacteria) ซึ่งแบคทีเรียกลุ่มนี้จะสลายโพลีฟอสเฟตแล้วปล่อยฟอสฟอรัสออกมานอกเซลล์ทำให้เกิด ATP ซึ่งเป็นพลังงานที่แบคทีเรียเหล่านี้จะใช้ในการย่อยสลายสารอินทรีย์ที่อยู่ในรูปของกรดไขมันระเหยง่าย (volatile fatty acid, VFA) ที่มีจำนวนคาร์บอนน้อยกว่า 5 อะตอม เช่น กรดอะซิติก (acetic acid) แล้วจึงดูดซึมกรดไขมันเหล่านี้เข้าสู่เซลล์ สะสมเป็นอาหารสำรองในรูปของโพลี-เบตา-ไฮดรอกซีบิวไทเรต (Poly-β-hydroxybutyrate) หรือ พีเอชบี (PHB) ด้วยคุณสมบัติดังกล่าวทำให้โพลีพีแบคทีเรียสามารถนำสารอาหารเข้าสู่เซลล์ได้มากกว่าแบคทีเรียชนิดอื่นๆ จึงเป็นข้อได้เปรียบจากเจริญในระบบได้ดีกว่า (Cech และคณะ, 1994) และเมื่ออยู่ในถังที่ใช้อากาศ (aerobic tank) โพลีพีแบคทีเรียจะเจริญและแบ่งตัวเพิ่มจำนวนโดยย่อย

สลายพีเอชบีที่สะสมไว้ด้วยการออกซิไดซ์ (oxidize) ของออกซิเจน ได้เป็นพลังงานเพื่อดึงเอาฟอสฟอรัสที่อยู่ในน้ำเสียเข้าไปสะสมไว้ในรูปของโพลีฟอสเฟต จากนั้นเมื่อน้ำเสียที่มีสลัดจ์ที่สะสมฟอสฟอรัสอยู่มากนี้ไหลเข้าสู่ถังตกตะกอน แบคทีเรียจะจมตัวและถูกเวียนกลับเข้าสู่ระบบอีกครั้งโดยส่วนหนึ่งของสลัดจ์จะถูกกำจัดออกจากระบบด้วยการระบายทิ้ง ทำให้ฟอสฟอรัสถูกกำจัดออกไปในเวลาเดียวกัน

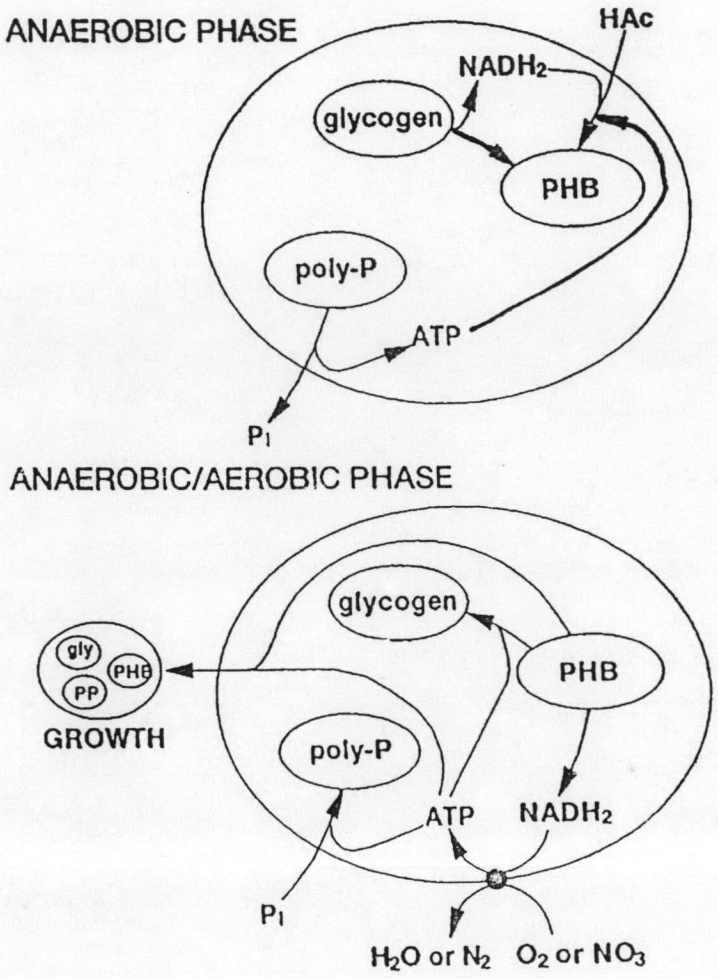
กลไกทางชีวเคมีของระบบอีบีพีอาร์ (Mino, 2000; ธงชัย พรรณสวัสดิ์, 2544)

ภายใต้ภาวะที่ไม่มีการให้อากาศ โพลีพีแบคทีเรียจะใช้โพลีฟอสเฟตที่เก็บสะสมไว้ในเซลล์เป็นแหล่งของพลังงานเพื่อการผลิต ATP โดยอาศัยโพลีฟอสเฟต:เอเอ็มพี ฟอสโฟทรานส์เฟอเรส (polyphosphate: AMP phosphotransferase) ATPที่ถูกสร้างขึ้นนี้จะถูกนำไปใช้ในกระบวนการเปลี่ยนกรดไขมันระเหยง่ายที่ถูกนำเข้าสู่เซลล์ให้กลายเป็นพีเอชบี แต่เนื่องจากพีเอชบีเป็นสารประกอบที่ถูกรีดิวซ์ได้ง่ายกว่ากรดไขมันระเหยง่ายดังกล่าว กระบวนการนี้จึงต้องอาศัยพลังสมมูลรีดิวซ์ (reducing equivalent) คือ เอ็นเอดีเอช (nicotinamide adenine dinucleotide, reduced form หรือ NADH) ซึ่งได้มาจากการสลายไกลโคเจน (glycogen) ไปเป็นกรดไพรูวิก (pyruvic acid) ซึ่งจะถูกเปลี่ยนเป็นอะซิติล-โคเอ (acetyl-CoA) ก่อนที่จะผลิตพีเอชบีได้ต่อไป และจากการสลายของโพลีฟอสเฟตในขั้นตอนแรกทำให้เกิดการปล่อยฟอสเฟตออกนอกเซลล์

ในสภาวะที่มีอากาศ ไม่เพียงแต่จะมีการสร้างเซลล์ใหม่ขึ้นเท่านั้น โพลีพีแบคทีเรียยังเสริมสร้างส่วนที่ขาดหายไปให้กลับคืนมาด้วย ซึ่งคือโพลีฟอสเฟตและไกลโคเจนที่ถูกใช้ไปในกระบวนการไม่มีอากาศนั่นเอง

พีเอชบีจะถูกสลายไปเพื่อกระบวนการแอแนบอลิซึม (anabolism) และกระบวนการแคแทบอลิซึม (catabolism) โดยในกระบวนการแอแนบอลิซึมนั้น พีเอชบีจะถูกใช้ไปเพื่อเป็นแหล่งคาร์บอน (carbon) สำหรับการสังเคราะห์เซลล์ใหม่ที่จะเกิดขึ้น แต่ในส่วนของกระบวนการแคแทบอลิซึมนั้น พีเอชบีจะถูกย่อยให้เล็กลงเป็นอะซิติล-โคเอเข้าสู่วัฏจักรทีซีเอ (TCA cycle) และวัฏจักรไกลออกซิเลต (glyoxylate cycle) ซึ่งพลังสมมูลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นจากวัฏจักรทั้งสองนี้จะถูกออกซิไดซ์ (oxidize) ผ่านวิถีการขนถ่ายอิเล็คตรอน (electron trasfer) และเกิดฟอสโฟรีเลชันแบบออกซิเดทีฟ (oxidative phosphorylation) โดยมีออกซิเจนเป็นตัวรับอิเล็คตรอนทำให้เกิดการสร้าง ATPขึ้นซึ่ง ATPนี้จะถูกนำไปใช้ตามความต้องการต่างๆของเซลล์และใช้เพื่อการเปลี่ยนฟอสเฟตที่ถูกจับเข้าสู่เซลล์ให้กลายเป็นโพลีฟอสเฟตและเก็บสะสมไว้ นอกจากนี้พีเอชบียังถูกนำไปสังเคราะห์เป็นคาร์โบไฮเดรตเพื่อเก็บสะสมไว้ในรูปของไกลโคเจนอีกด้วย ซึ่งทั้งโพลีฟอสเฟต

และไกลโคเจนที่ถูกสะสมไว้นี้จะถูกนำไปใช้ต่อในสภาวะที่ไม่มีอากาศที่ต้องเวียนกลับมาอีกครั้งในระบบของอีบีพีอาร์



รูปที่ 2.3 กระบวนการเมแทบอลิสม (metabolic process) ของโพลีพีแบคทีเรียที่เกิดขึ้นในระบบอีบีพีอาร์ (Van Loosdrecht และคณะ, 1997)

เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการอีบีพีอาร์

ในกลไกทางชีวเคมีของกระบวนการอีบีพีอาร์นั้น สารที่มีหน้าที่สำคัญต่อการเกิดกระบวนการดังกล่าวคือ เอนไซม์ (enzyme) ซึ่งสามารถแบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่ ได้แก่

1. **เอนไซม์ในระบบชีวสังเคราะห์** (biosynthesis) **คือ** โพลีฟอสเฟตไคเนส ซึ่งทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยา (catalyze) โดยถ่ายโอน (transfer) กลุ่มฟอสฟอริลตัวสุดท้าย (terminal phosphoryl group) ของ ATPให้กับโพลีฟอสเฟต โดยอัตราส่วนของ ATP-ADPภายในเซลล์จะเป็นตัวควบคุมระดับของโพลีฟอสเฟตโดยตรง ดังสมการ (Harold, 1966)

$$ATP + (\text{โพลีฟอสเฟต})_n \rightleftharpoons ADP + (\text{โพลีฟอสเฟต})_{n+1} \quad .....(2.1)$$

2. **เอนไซม์ในระบบการทำให้โพลีฟอสเฟตแตกสลาย** (degradation) ซึ่งทำหน้าที่ตรงข้ามกับเอนไซม์กลุ่มแรก ได้แก่

2.1 เอนไซม์กลุ่มฟอสโฟทรานส์เฟอเรส (phosphotransferases) ซึ่งทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาการใช้โพลีฟอสเฟตในการสร้าง ATPหรือสารที่ทำหน้าที่แทน ATP

โดยการทำงานร่วมกันของโพลีฟอสเฟต: เอเอ็มพี ฟอสโฟ ทรานส์เฟอเรส ซึ่งทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาการเติมกลุ่มฟอสฟอริลของโพลีฟอสเฟตให้กับ AMP (adenosine monophosphate) ดังสมการที่ 2.2 กับโพลีฟอสเฟตไคเนสในปฏิกิริยาที่ผันกลับได้ (reversible) ในสมการที่ 2.1 เมื่อมีฟอสเฟตกลูโคไคเนส (polyphosphate glucokinase) ซึ่งทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาการเติมกลุ่มฟอสฟอริลของโพลีฟอสเฟตให้กับกลูโคส (glucose) จะทำให้เกิดการสร้างกลูโคส-6-ฟอสเฟตขึ้น (glucose-6-phosphate) ดังสมการที่ 2.3 โดยที่อะดีนัยเลตไคเนส (adenylate kinase) จะควบคุมสมดุลของ AMP, ADP และ ATP ดังสมการที่ 2.4

$$(\text{โพลีฟอสเฟต})_n + AMP \xrightarrow{Mg^{2+}} (\text{โพลีฟอสเฟต})_{n-1} + ADP \quad ....(2.2)$$

$$\text{กลูโคส} + (\text{โพลีฟอสเฟต})_n \xrightarrow[\text{neutral salts}]{Mg^{2+}} \text{กลูโคส-6-ฟอสเฟต} + (\text{โพลีฟอสเฟต})_{n-1} + ADP \quad ....(2.3)$$

$$2ADP \rightleftharpoons AMP + ATP \quad ....(2.4)$$

2.2 โพลีฟอสฟาเทส (polyphosphatase) ซึ่งทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาการแยกสลายโพลีฟอสเฟตด้วยน้ำ (hydrolysis) ให้เป็นฟอสฟอรัส ด้วยแรงขับของโพลีฟอสเฟตกลูโคไคเนส (Bonting และคณะ, 1991) ดังสมการ

$$(\text{โพลีฟอสเฟต})_n + \text{น้ำ} \longrightarrow (\text{โพลีฟอสเฟต})_{n-1} + \text{ฟอสฟอรัส} \quad \ldots(2.5)$$

จุลชีววิทยาของระบบอีบีพีอาร์

จุลินทรีย์ที่มีคุณสมบัติเป็นโพลีพีแบคทีเรียมีอยู่หลายชนิดด้วยกัน เช่น *Acinetobacter*, *Moraxella*, *Aeromonas*, *Pseudomonas* (Brodisch และ Joyner, 1983), *E. coli*, *Mycobacterium* และ *Beggiatoa* (Bitton, 1999) เป็นต้น แบคทีเรียเหล่านี้สามารถสะสมโพลีฟอสเฟตไว้ภายในเซลล์ประมาณ 12 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมากกว่าที่เซลล์ปกติสามารถสะสมได้นั่นคือประมาณ 3 ถึง 4 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้งของเซลล์ และจะถูกนำไปใช้เป็นพลังงานและเป็นแหล่งของฟอสฟอรัสภายในเซลล์

นอกจากชนิดของแบคทีเรียที่กล่าวข้างต้นแล้ว ยังสามารถพบแบคทีเรียชนิดอื่นๆที่มีคุณสมบัติเป็นโพลีพีแบคทีเรียได้อีก เนื่องจากมีรายงานว่าชนิดของแบคทีเรียที่สะสมฟอสฟอรัสจะขึ้นอยู่กับองค์ประกอบของน้ำเสียและกระบวนการที่กำจัดฟอสฟอรัสออกจากระบบ (Streichan และคณะ, 1990)

จากรูปแบบของการไหลของกระบวนการอีบีพีอาร์ดังที่กล่าวข้างต้น จะเห็นได้ว่าน้ำเสียกับสลัดจ์ที่เวียนกลับจะมาพบกันที่ถังไม่ใช้อากาศ (ดังรูปที่ 2.2) และที่ถังไม่ใช้อากาศนี้จะไม่มีออกซิเจนเป็นตัวรับอิเล็คตรอน (electron acceptor) จุลินทรีย์ที่สามารถจับใช้สารอินทรีย์เข้าสู่เซลล์และสะสมไว้เป็นพลังงานจะได้เปรียบทางด้านการเจริญมากกว่าจุลินทรีย์กลุ่มอื่นๆ แล้วเมื่อไหลเข้าสู่ถังใช้อากาศ จุลินทรีย์เหล่านี้จะเจริญโดยใช้ออกซิเจนเป็นตัวรับอิเล็กตรอนมาออกซิไดซ์สารอินทรีย์คาร์บอนที่อยู่ในรูปพีเอชบีภายในเซลล์ ได้เป็นพลังงานมาใช้ในการดึงฟอสฟอรัสเข้าสู่เซลล์และเนื่องจากการจับใช้ฟอสฟอรัสในขั้นตอนใช้อากาศมากกว่าการปล่อยฟอสฟอรัสในขั้นตอนไม่ใช้อากาศ การกำจัดฟอสฟอรัสสุทธิจึงเกิดขึ้นได้ และจุลินทรีย์ที่สามารถดำเนินกระบวนการดังกล่าวทั้งหมดได้จะกลายเป็นจุลินทรีย์เด่นของระบบ นั้นคือ โพลีพีแบคทีเรียนั่นเอง

ในปี 1975 Fuhs และ Chen ตรวจพบวิธีวิเคราะห์ปริมาณของแบคทีเรียที่มีส่วนเกี่ยวข้องในระบบอีบีพีอาร์ด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงเชื้อ (culture-dependent methods) เช่น การนับปริมาณโคโลนีที่มีชีวิต (viable plate counts) พบว่า *Acinetobacter* spp. เป็นแบคทีเรียหลักที่แยกได้จากตะกอนของระบบ ซึ่งสอดคล้องกับนักวิทยาศาสตร์หลายกลุ่มที่ได้ศึกษาต่อมา เมื่ออาศัยการพิสูจน์เอกลักษณ์ (identify) แบบการเพาะเลี้ยงเชื้อเช่นเดียวกัน เช่น Deinema และคณะ (1980), Lawson กับ Tonhazy (1980) และ Buchan (1981) (Brodisch และ Joyner, 1983; Ohtake และคณะ, 1985) แต่ผลสรุปดังกล่าวนี้ขัดแย้งกับการทดลองต่อๆมาของนักวิทยาศาสตร์คณะอื่นๆ นั่นคือ

Cloete และ Steyn (1987) ได้ใช้เทคนิคการย้อมสีแอนติบอดีแบบเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ (combined fluorescent antibody-membrane filter) เพื่อศึกษาจำนวนของ *Acinetobacter* พบว่าแบคทีเรียดังกล่าวไม่ใช่แบคทีเรียหลักของระบบ เพราะพบในปริมาณไม่ถึง 10 เปอร์เซ็นต์ของแบคทีเรียทั้งหมดที่แยกได้จากตะกอน

Hiraishi และคณะ (1989) ศึกษาปริมาณ *Acinetobacter* ด้วยการวิเคราะห์หาโพรไฟล์ของควิโนน (respiratory quinone profile) ซึ่งเป็นประเภทหนึ่งของตัวรับส่งอิเล็กตรอนในลูกโซ่หายใจ (respiratory chain) โดยควิโนนแต่ละชนิดจะจำเพาะกับสปีชีส์ (species) ของจุลินทรีย์ จากงานวิจัยของ Hiraishi และคณะพบว่า ควิโนนเด่นของการหายใจในสลัดจ์ที่มีโพลีฟีแบคทีเรียอยู่มากจะเป็นควิโนน-8 (Q-8) และเมนาควิโนน-8(H4) (MK-8(H4)) ในขณะที่ของ *Acinetobacter* เป็นควิโนน-9 (Q-9)

Auling และคณะ (1991) ใช้ไดอะมิโนโปรเพน (diaminopropane) หรือดีเอพี (DAP) เป็นเครื่องหมายชีวภาพ (biomarker) ที่จำเพาะต่อ *Acinetobacter* พบว่าในระบบกำจัดฟอสฟอรัสเพียงอย่างเดียวที่มีการนำเข้าของสารอินทรีย์สูงนั้น มีเชื้อ *Acinetobacter* อยู่เพียงเล็กน้อยเท่านั้น

Bond และคณะ (1995) อาศัยวิธีการตรวจ 16S rRNA จากตัวอย่างน้ำเสียที่ได้รับการบำบัดในระดับห้องปฏิบัติการ พบว่ามี *Acinetobacter* อยู่ในระบบเพียง 2 เปอร์เซ็นต์ของแบคทีเรียทั้งหมด

Wagner และคณะ (1993) จึงสรุปว่า *Acinetobacter* ไม่น่าจะเป็นแบคทีเรียหลักของระบบอีบีพีอาร์ นั่นคือการหาปริมาณของ *Acinetobacter* ด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงเชื้อ ทำให้เกิดข้อสรุปที่ผิดพลาด เพราะวิธีนี้ส่งเสริมการเจริญของ *Acinetobacter* และยังพบอีกว่ามีแบคทีเรียอีกหลายชนิดที่ไม่สามารถเพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการได้

จากข้อสรุปดังกล่าวจึงอาจกล่าวได้อีกว่าแบบจำลองกลไกทางชีวเคมีของ Comeau/Wentzel ที่ Wentzel และคณะเป็นผู้ดัดแปลงขึ้นเมื่อปี 1991 ซึ่งได้ทำการทดลองกับ *Acinetobacter* โดยเฉพาะนั้นไม่น่าถูกต้องกับความเป็นจริง แต่อย่างไรก็ตามอาจมีข้อโต้แย้งได้ว่าไม่สามารถใช้จำนวนของแบคทีเรียชี้ถึงประสิทธิภาพการทำงานของระบบหนึ่งๆได้ เพราะสิ่งที่กำหนดน่าจะเป็นกิจกรรม (activity) ของแบคทีเรียมากกว่า ซึ่งทั้งสองสิ่งนี้ไม่จำเป็นต้องสัมพันธ์กันด้วย

ต่อมานักวิทยาศาสตร์ที่ศึกษาจุลินทรีย์ที่มีบทบาทในระบบอีบีพีอาร์ ได้คิดค้นวิธีศึกษาแบคทีเรียดังกล่าวโดยไม่ต้องใช้วิธีการเพาะเลี้ยงเชื้อ (culture-independent methods) ซึ่งได้แก่ การใช้เทคนิคต่างๆ เช่น ใช้แอนติบอดีที่เรืองแสง (fluorescent antibody) และวิธีการไฮบริไดเซชัน (hybridization technique) ในการวิเคราะห์สลัดจ์จากระบบอีบีพีอาร์ขึ้นทดแทน

Wagner และคณะ (1994) ได้ทำการทดลองเปรียบเทียบระหว่างวิธีการใช้ตัวติดตาม 16S rRNA ที่ติดฉลากด้วยสารเรืองแสงของเชื้อ *Acinetobacter* และแบคทีเรียชนิดอื่นๆ กับวิธีการย้อมสีเชื้อที่ได้จากการเพาะเลี้ยงด้วย DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindol dihydrochloride) ซึ่งสามารถย้อมติดโพลีฟอสเฟตแกรนูลได้ จากผลการทดลองพบว่าเมื่อใช้ตัวติดตามจะพบ *Acinetobacter* อยู่น้อยกว่า 10 เปอร์เซ็นต์ และแบคทีเรียเด่นที่พบมากคือ เบต้า ซับคลาส (beta subclass) ของ Proteobacteria และแบคทีเรียแกรมบวกที่มีปริมาณ G+C สูง แต่เมื่อใช้การเพาะเลี้ยงเชื้อพบว่าจะมี แกมมา ซับคลาส (gamma subclass) ของ Proteobacteria อยู่มาก และสามารถบ่งชี้ได้ว่าเป็น *Acinetobacter* ถึง 30 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้น Wagner และคณะจึงสรุปว่าแบคทีเรียที่มีความสำคัญของระบบอีบีพีอาร์ น่าจะเป็นแบคทีเรียในกลุ่มเบต้า ซับคลาส (beta subclass) ของ Proteobacteria และแบคทีเรียแกรมบวกที่มีปริมาณ G+C สูง

ข้อสรุปของ Wagner และคณะนี้ได้รับการยืนยันจากการทดลองของนักวิทยาศาสตร์หลายกลุ่มด้วยกัน ได้แก่

- Wallner และคณะ (1995) ที่ใช้เทคนิค Flow cytometry
- Bond และคณะ (1995) ที่อาศัยวิธีการตรวจ 16S rRNA
- Kämpfer และคณะ (1996) ที่ใช้ 16S rRNA ที่จำเพาะต่อกลุ่มหรือจีนัสของแบคทีเรียที่ติดฉลากด้วยเตตระเมทธิลโรโดเอมีน-5-ไอโซไธโอไซยาเนต (tetramethylrhodoamine-5-isothiocyanate (TRITC)
- Hiraishi และคณะ (1998) ที่ใช้วิธีวิเคราะห์หาโพรไฟล์ของควิโนน
- Bond และคณะ (1999) ที่ใช้การตรวจหาด้วย 16S rRNA โดยใช้เทคนิคที่เรียกว่า FISH (Fluorescence In Situ Hybridization)
- Kawaharasaki และคณะ (1999) ที่ใช้ตัวติดตาม 16S rRNA ที่ติดฉลากด้วย TRITC ร่วมกับการย้อมสีด้วย DAPI
- Crocetti และคณะ (2000) ที่ใช้วิธีการตรวจด้วย 16S rRNA ทั้งตรวจหา (detection) และวัดปริมาณ (quantitation) โดยใช้เทคนิค FISH

อย่างไรก็ตาม ยังไม่สามารถระบุแน่ชัดได้ว่าแบคทีเรียกลุ่มใดเป็นแบคทีเรียเด่นในระบบอีบีพีอาร์ แต่การศึกษาโดยนักวิทยาศาสตร์หลายกลุ่มทำให้ได้ข้อมูลที่เกี่ยวข้องกับความสามารถของจุลินทรีย์ที่สะสมโพลีฟอสเฟตไว้ภายในเซลล์ได้ดังตารางที่ 2.1

ตารางที่ 2.1 จุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการสะสมโพลีฟอสเฟตไว้ภายในเซลล์

จุลินทรีย์	เอกสารอ้างอิง
Corynebacterium xerosis	Muhammed (1961)
Acinetobacter	Fuhs และ Chen (1975)
Moraxella, Aeromonas, Pseudomonas	Brodisch และ Joyner (1983)
Propionibacterium shermanii	Robinson และคณะ (1984)
Curtobacterium, Aureobacterium	Bark และคณะ (1993)
Salmonella minnesota, Neisseria, Sulfolobus acidocaldarius	Tinsley และคณะ (1993)
Microthrix parvicella, Nocardia, Rhodococcus, Arthrobacter	Wagner และคณะ (1994)
Arthrobacter globiformis, Pseudomonas, Microlunatus phosphovorus	Nakamura และคณะ (1995)
Agrobacterium tumefaciens, Agrobacterium radiobacter, Aquaspirillum dispar,Klebsiella	Merzouki และคณะ (1999)
Aerobacter, Escherichia coli, Mycobacterium, Beggiatoa, Azotobacter vinelandii, Neurospora crassa, Micrococcus, Staphylococcus epidermidis, Bacillus cereus, Alcaligenes denitrificans, Enterobacter	Sidat และคณะ (1999)
Tetrasphaera	Maszenan และคณะ (2000)
Candida humicola, Saccharomyces cerevisiae	McGrath และ Quinn (2000)
Lampropedia, Rhodocyclus	Mino (2000)
Hydrogenomonas eutropha, Myxococcus xanthus, Nitrosomonas europeae, Rhodopseudomonas spheroides, Streptococcus SL-1	ธงชัย พรรณสวัสดิ์ (2000)

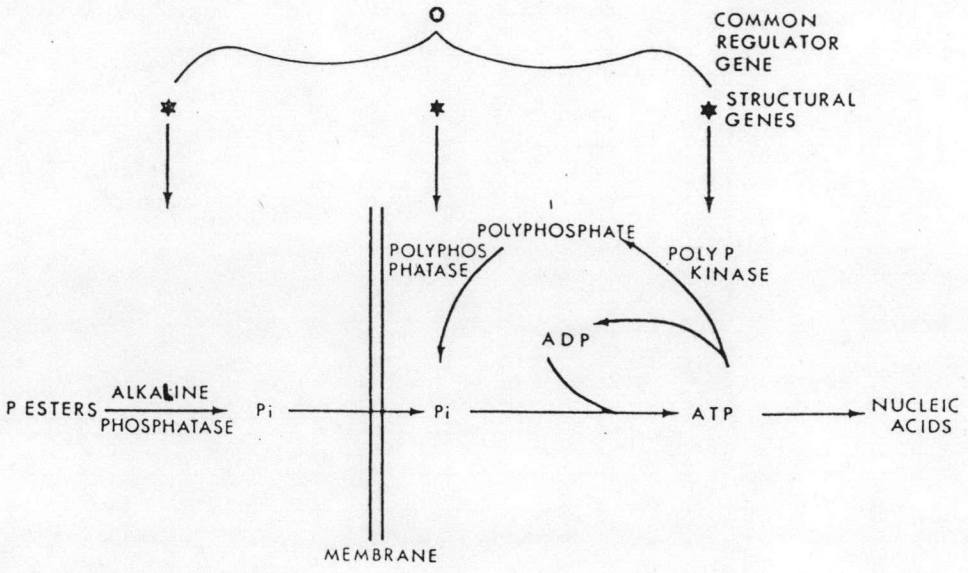
เอนไซม์โพลีฟอสเฟตไคเนส

เอนไซม์นี้สกัดได้ครั้งแรกจากเชื้อ *E. coli* โดย Kornberg และคณะ (1956) ซึ่งทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาในสมการที่ 2.1 ดังกล่าวข้างต้น และจากการที่โพลีฟอสเฟตไคเนสนี้เป็นเอนไซม์ที่มีบทบาทสำคัญในการสะสมโพลีฟอสเฟตไว้ภายในเซลล์ของโพลีพีแบคทีเรีย จึงมีนักวิทยาศาสตร์หลายกลุ่มที่สนใจศึกษา จึงมีรายงานการค้นพบเอนไซม์ดังกล่าวนี้ในจุลินทรีย์อีกหลายชนิดด้วยกัน เช่น *Corynebacterium xerosis*, *Azotobacter vinelandii*, *Salmonella minnesota*, *Arthrobacter atrocyaneus*, *Propionibacterium shermanii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter johnsonii*, *Klebsiella aerogenes* และเชื้อก่อโรคอีกหลายชนิดเป็นต้น (Rashid และคณะ 2000)

ในปี 1964 Harold พบว่ากิจกรรมจำเพาะของโพลีฟอสเฟตไคเนสจะถูกกระตุ้นให้มีมากขึ้นเมื่อ *Aerobacter aerogenes* ถูกเลี้ยงในสภาพที่มีฟอสเฟตจำกัด และยังพบในปี 1965 อีกว่าเอนไซม์ดังกล่าวนี้จำเป็นอย่างยิ่งในการสร้างสายโพลีเมอร์ของฟอสเฟต โดยสังเกตเห็นว่าในสายพันธุ์กลาย (mutant) ของ *Aerobacter aerogenes* ที่ไม่มีโพลีฟอสเฟตไคเนสนั้นไม่สามารถสร้างสายโพลีฟอสเฟตขึ้นได้ (Harold และ Harold, 1965)

ยีนที่เกี่ยวข้องกับโพลีฟอสเฟตไคเนส

Harold (1966) ได้ศึกษาเมตาบอลิสม (metabolism) ของโพลีฟอสเฟตในเชื้อ *Aerobacter aerogenes* และเสนอว่าเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับเมแทบอลิสมของโพลีฟอสเฟต คือ โพลีฟอสเฟตไคเนส, โพลีฟอสฟาเทส และอัลคาไลน์ ฟอสฟาเทส (alkaline phosphatase) นั้นมียีนควบคุม (regulatory gene) เพียงยีนเดียวแต่ไม่ได้อยู่ในโอเปอรอน (operon) เดียวกัน ซึ่งแสดงได้ดังรูปที่ 2.4 และจุลินทรีย์ที่มียีน *ppk* ได้แสดงไว้ในตารางที่ 2.2



รูปที่ 2.4 วัฏจักรของโพลีฟอสเฟตและการควบคุมทางพันธุศาสตร์ในเชื้อแบคทีเรีย *Aerobacter aerogenes* (Harold, 1966)

ตารางที่ 2.2 เชื้อจุลินทรีย์ที่มียีน *ppk* อยู่ภายในจีโนม (genome)

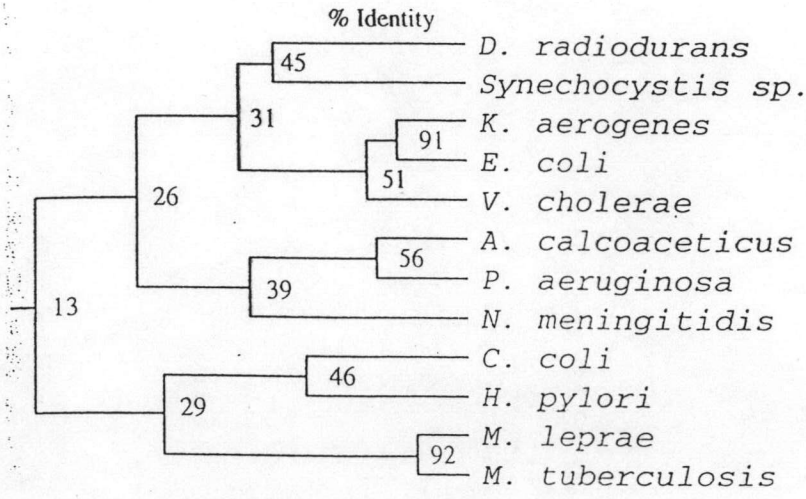
จุลินทรีย์	เอกสารอ้างอิง
Klebsiella aerogenes	Kato และคณะ (1993)
Pseudomonas aeruginosa *Salmonella typhimurium* *Salmonella dublin* *Shigella flexneri* *Klebsiella pneumoniae* *Vibrio cholerae* *Helicobacter pylori* *Streptomyces coelicolor* *Mycobacterium tuberculosis* *Neisseria meningitidis* *Neisseria gonorrhoeae* *Mycobacterium leprae* *Yersinia pestis* *Bordetella pertussis* *Enterococcus faecalis* *Escherichia coli* *Campylobacter coli* *Propionibacterium shermanii* *Clostridium acetobutylicum* *Acinetobacter calcoaceticus* *Deinococcus radiodurans* *Myxococcus xanthus* *Synechocystis* sp. *Dictyostelium discoideum*	Kornberg และคณะ (1999)
Acinetobacter baumannii 252	Gavigan และคณะ (1999)

Kornberg และคณะ (1999) ได้ทดลองนำลำดับเบสของยีน *ppk* ของเชื้อ 15 ชนิดซึ่งได้แก่ *Deinococcus radiodurans, Synechocystis* sp., *Klebsiella aerogenes, Vibrio cholerae, Acinetobacter calcoaceticus, Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa, Neisseria meningitidis, Salmonella typhimurium, Campylobacter coli, Helicobacter pylori, Mycobacterium leprae, Mycobacterium tuberculosis, Klebsiella pneumoniae* และ *Streptomyces coelicolor* มาเทียบหาความเหมือนกัน พบว่ามีส่วนที่เหมือนกันอย่างสมบูรณ์ (complete identity) อยู่เพียง 14 เปอร์เซ็นต์เท่านั้น และเมื่อนำเชื้อทั้ง 15 ชนิดข้างต้นมาหาความเหมือนกันของลำดับกรดอะมิโน พบว่าได้ผลดังตารางที่ 2.3

ตารางที่ 2.3 ผลการเทียบความเหมือนของลำดับกรดอะมิโนของเชื้อ 15 ชนิด

จุลินทรีย์	ความเหมือน (idetity) (เปอร์เซ็นต์)
Deinococcus radiodurans และ *Synechocystis* sp.	45
Mycobacterium leprae และ *Mycobacterium tuberculosis*	92
Campylobacter coli และ *Helicobacter pylori*	46
Acinetobacter calcoaceticus, Pseudomonas aeruginosa และ *Neisseria meningitidis*	39
Klebsiella pneumoniae, Escherichia coli และ *Vibrio cholerae*	51

ซึ่งความเหมือนกันของลำดับกรดอะมิโนดังกล่าวนั้นเกี่ยวข้องกับวิวัฒนาการของเชื้อ ซึ่งสามารถแสดงให้เห็นได้ดังรูปที่ 2.5



รูปที่ 2.5 ต้นไม้วิวัฒนาการ (evolutionary tree) ที่แสดงเปอร์เซ็นต์ความเหมือนของลำดับกรดอะมิโนของโพลีฟอสเฟตไคเนสระหว่างคู่ของสปีชีส์, ระหว่างสปีชีส์ภายในกลุ่ม และระหว่างสปีชีส์ของกลุ่มอื่น (Kornberg, 1999)

Soung-Hee และคณะ (1999) ได้ทดลองใช้วิธีการวิเคราะห์ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลีเมอเรสเพื่อตรวจหายีน *ppk* จากเชื้อจุลินทรีย์หลากหลายชนิดโดยใช้ไพร์เมอร์ที่ออกแบบจากข้อมูลลำดับอนุรักษ์ของยีน *ppk* ที่มีอยู่ พบว่าสามารถเพิ่มปริมาณของยีน *ppk* ได้ในเชื้อกลุ่ม *Rhizobium, Enterobacter, Chlorogloea* และ *Pseudomonas*

Kuo และคณะ (2000) ได้ศึกษาลำดับของยีน *ppk* ในจุลินทรีย์ทางทะเล (marine microorganisms)โดยใช้ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลีเมอเรสร่วมกับไพร์เมอร์ที่ออกแบบจากลำดับอนุรักษ์ของกรดอะมิโนของยีน *ppk* พบว่าได้ข้อมูลในเชื้อ 3 ชนิดคือ *Acinetobacter, Serratia fonticola* และ *Bacillus aquamarinus*