



บทบาทของแบคทีเรียละลายฟอสเฟตในการเพิ่มประสิทธิภาพการฟื้นฟูดิน ปนเปื้อนโลหะหนักด้วยพืช

Roles of Phosphate Solubilizing Bacteria in Enhancing Phytoremediation of Heavy Metal Contaminated Sites

ธนากร แสงสง่า^{1*} และ ธารทิพย์ รัตน์¹

¹คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏนครราชสีมา ต.ในเมือง อ.เมือง จ.นครราชสีมา 30000

*Corresponding Author, E-mail: thanakorn.s@nrru.ac.th

Received: 26 June 2017 | Revised: 3 February 2018 | Accepted: 24 August 2018

บทคัดย่อ

มลพิษจากโลหะหนักในดินเป็นปัญหาสิ่งแวดล้อมที่สำคัญและต้องได้รับการแก้ไขอย่างเร่งด่วน เทคโนโลยีการฟื้นฟูดินที่ปนเปื้อนโลหะหนักโดยใช้พืชเป็นที่ยอมรับและวิธีการที่ใช้กันอย่างกว้างขวาง คือ การตรึงด้วยพืชโดยการตรึงโลหะหนักไว้ที่บริเวณราก และการสกัดด้วยพืช ซึ่งโลหะหนักจากดินจะถูกดูดซึมแล้วเคลื่อนย้ายไปสะสมในลำต้นและใบ อย่างไรก็ตามตามความเป็นพิษของโลหะหนักต่อพืชบำบัดอาจเป็นข้อจำกัดของเทคโนโลยี ปฏิสัมพันธ์ระหว่างพืชกับแบคทีเรียโดยเฉพาะในกลุ่มแบคทีเรียละลายฟอสเฟตที่มีคุณสมบัติในการสร้างสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชได้และกรดอินทรีย์โมเลกุลขนาดเล็กช่วยละลายโลหะหนักออกจากอนุภาคดินทำให้เทคโนโลยีมีประสิทธิภาพมากขึ้น ดังนั้นบทความนี้ได้กล่าวถึงแบคทีเรียละลายฟอสเฟตและบทบาทในการส่งเสริมประสิทธิภาพของเทคโนโลยีการฟื้นฟูดินปนเปื้อนโลหะหนักด้วยพืชเพื่อเป็นแนวทางการใช้ประโยชน์อย่างยั่งยืนและเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อมต่อไป

ABSTRACT

Heavy metal pollution in soil is a great environmental problem and must be resolved urgently. Phytoremediation technology is generally accepted and broadly applications are phytostabilization and phytoextraction that is either absorption by root or accumulation by leaves and stems, respectively. Unfortunately, limitation on phytoremediation is heavy metal toxicity to plant. Interaction between plant and microbe, especially phosphate solubilizing bacteria, which produce plant growth regulators and also secrete low molecular weight organic acid for desorption of heavy metals from soil, could enhance efficiency of phytoremediation. In this review, therefore, phosphate solubilizing bacteria and its role in enhancing the efficiency of heavy metal remediation were discussed; that is, guideline for sustainable and environmentally friendly application.

คำสำคัญ: โลหะหนัก การฟื้นฟูสภาพแวดล้อมด้วยพืช แบคทีเรียละลายฟอสเฟต

Keywords: Heavy metal, Phytoremediation, Phosphate solubilizing bacteria

1. บทนำ

ปัญหาการปนเปื้อนโลหะหนักในดินส่งผลกระทบต่อสุขภาพอนามัยของมนุษย์ สัตว์และสิ่งแวดล้อมเนื่องจากดินเป็นทรัพยากรพื้นฐานและเป็นแหล่งที่อยู่อาศัยที่สำคัญต่อการดำรงชีวิต การตกค้างของโลหะหนักในดินสามารถแพร่กระจายไปตามส่วนต่าง ๆ ของสภาวะแวดล้อมและสุดท้ายเข้าสู่ร่างกายผ่านการบริโภคอาหารที่เพาะปลูกในดินที่ปนเปื้อนด้วยโลหะหนักและอาจมีการสะสมปริมาณเพิ่มมากขึ้นได้ตามลำดับขั้นการบริโภค ถ้าหากได้รับโลหะหนักในปริมาณสูงจะทำให้เสียชีวิตทันที แต่ถ้าวินิจฉัยปริมาณน้อยเป็นระยะเวลานานอาจก่อให้เกิดภาวะผิดปกติของร่างกาย เช่น การเกิดโรคมะเร็ง (Carcinogenicity) การกลายพันธุ์ (Mutagenicity) และการเกิดทารกวิรูปในหญิงที่ตั้งครรภ์ได้ (Teratogenicity) (Tchounwou et al., 2012) ปัญหาการปนเปื้อนโลหะหนักส่วนใหญ่เกิดจากการทำเหมืองแร่หรือการใช้สารที่มีโลหะหนักเป็นองค์ประกอบในทางอุตสาหกรรม โลหะหนักหรือธาตุที่มีความเป็นพิษสูง ได้แก่ ตะกั่ว สารหนู แคดเมียมปรอท โครเมียมและแมงกานีส (Ahemad and Malik, 2011; Liu et al., 2013; Waterlot et al., 2013) สำหรับในประเทศไทยมีรายงานการปนเปื้อนโลหะหนักและก่อให้เกิดปัญหาอย่างรุนแรง เช่นรายงานการปนเปื้อนแคดเมียมในพื้นที่ทางการเกษตร อำเภอแม่สอด จังหวัดตาก (Akkajit, 2015) หรือการตกค้างของสารหนู สังกะสี ตะกั่ว แคดเมียมเหล็ก โครเมียม และคอปเปอร์ในน้ำและสะสมในสิ่งมีชีวิต (Pongpetch and Amchuen, 2015) การตกค้างของโลหะหนักส่งผลเสียต่อสิ่งแวดล้อมเนื่องจากเป็นสารมลพิษที่ไม่สามารถย่อยสลายได้ด้วยกระบวนการทางชีวภาพ (Non-biodegradation) มีความคงทนและตกค้างยาวนานในสิ่งแวดล้อม ดังนั้นจึงเป็นเรื่องที่จำเป็นที่จะหาวิธีในการบำบัดฟื้นฟูสภาพแวดล้อมหรือดินที่ปนเปื้อนโลหะหนัก

วิธีการบำบัดฟื้นฟูดินปนเปื้อนโลหะหนักมักใช้วิธีการกายภาพเคมี (Physico-chemical treatment) ซึ่งใช้ต้นทุนค่อนข้างสูงและอาจทำให้ดินมีคุณภาพลดลงและสูญเสียสารอินทรีย์และความอุดมสมบูรณ์ในดิน ปัจจุบันจึงนิยมใช้เทคโนโลยีการบำบัดฟื้นฟูด้วยพืชแทน (Phytoremediation

technology) และกำลังได้รับความสนใจมากขึ้นเรื่อย ๆ เนื่องจากเป็นวิธีที่ปลอดภัย ไม่ทำลายสิ่งแวดล้อม จัดว่าเป็นเทคโนโลยีสีเขียว มีค่าใช้จ่ายต่ำและไม่ก่อให้เกิดสารพิษตกค้างในพื้นที่บำบัด เทคโนโลยีการฟื้นฟูพื้นที่ปนเปื้อนโลหะหนักด้วยพืชอาศัยกระบวนการที่พืชสามารถดูดซับ ดูดซึมโลหะหนักจากอนุภาคดินและนำไปสะสมไว้ตามส่วนต่าง ๆ ของพืช เช่น ราก ลำต้น ใบ แต่อย่างไรก็ตามโลหะหนักส่วนใหญ่ก็มักมีความเป็นพิษต่อพืช ตัวอย่างเช่นในพื้นที่ที่มีการปนเปื้อนโลหะหนักสูงพืชอาจตายได้ เพราะมีผลไปยับยั้งการเติบโตและพัฒนาการของพืชซึ่งส่งผลโดยตรงต่อประสิทธิภาพในการดูดซับดูดซึมโลหะหนักของพืชบำบัด

เทคโนโลยีชีวภาพเพื่อสิ่งแวดล้อมเป็นเครื่องมือสำคัญในการพัฒนาและการประยุกต์ใช้ การค้นหาพืชบำบัดที่เหมาะสมและจุลินทรีย์ที่มีปฏิสัมพันธ์เชิงบวกกับพืชจึงเป็นเรื่องจำเป็นที่ต้องค้นหาและศึกษาวิจัย ในอาณาเขตรากพืช (Rhizosphere) มักพบจุลินทรีย์ที่ทนทานต่อโลหะหนักที่อยู่ร่วมกับพืชและสามารถส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชและช่วยในกระบวนการบำบัดโลหะหนักได้ มีรายงานว่ากลไกสำคัญของจุลินทรีย์ในเขตรากพืชสามารถช่วยลดความเป็นพิษของโลหะหนักและสร้างสารส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช (Khan et al., 2009) จุลินทรีย์กลุ่มนี้ได้รับความสนใจและมีการศึกษากันอย่างกว้างขวางเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการฟื้นฟูดินที่ปนเปื้อนโลหะหนัก คือแบคทีเรียละลายฟอสเฟต (Phosphate solubilizing bacteria, PSB) (He et al., 2010; Misra et al., 2012; Oves et al., 2013) การทำความเข้าใจถึงบทบาทและคุณสมบัติของแบคทีเรียกลุ่มนี้จึงจำเป็นเพื่อการประยุกต์ใช้ในการเพิ่มประสิทธิภาพของเทคโนโลยีการฟื้นฟูดินที่ปนเปื้อนโลหะหนักด้วยพืช

2. เทคโนโลยีการฟื้นฟูสภาพแวดล้อมด้วยพืช

เทคโนโลยีการฟื้นฟูสภาพแวดล้อมด้วยพืช (Phytoremediation technology) ได้รับความสนใจและนิยมนำมาใช้แทนวิธีการฟื้นฟูทางเคมีเพื่อกำจัดหรือลดความเป็นพิษของโลหะหนักที่ปนเปื้อนในดินเนื่องจากเป็นเทคโนโลยีที่เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม เป็นกระบวนการที่ใช้พืชในการกำจัดเปลี่ยนรูปหรือลดความเป็นพิษของสารมลพิษที่ปนเปื้อนและตกค้างอยู่ใน

สภาวะแวดล้อม กลไกในการกำจัดสารมลพิษที่ปนเปื้อนของพืช อาจเกิดได้ทั้งวิธีการโดยตรง คือการย่อยสลายสารมลพิษนั้น ๆ ในต้นพืชและวิธีการโดยอ้อม ได้แก่ การดูดซึม การดูดซับ การสะสม การลดความเป็นพิษหรือการตรึงโลหะหนักที่ปนเปื้อนไว้บริเวณรากพืช ปัจจุบันมีการบำบัดและฟื้นฟูดินที่ปนเปื้อนนิยมใช้วิธีทางกายภาพเคมีแต่มีข้อจำกัดเรื่องค่าใช้จ่ายสูง และส่งผลเสีย

ต่อคุณภาพดินและสิ่งมีชีวิต จึงหันมาใช้เทคโนโลยีชีวภาพโดยใช้พืชเป็นตัวดูดซับและลดความเป็นพิษของโลหะหนักกันมากขึ้น สำหรับการเปรียบเทียบค่าใช้จ่ายแสดงในตารางที่ 1 จะเห็นได้อย่างชัดเจนว่าการฟื้นฟูสภาวะแวดล้อมด้วยพืชเป็นเทคโนโลยีที่มีค่าใช้จ่ายต่ำและมีประสิทธิภาพในการบำบัดฟื้นฟูดินที่ปนเปื้อนโลหะหนัก

ตารางที่ 1 เปรียบเทียบค่าใช้จ่ายในกระบวนการฟื้นฟูดินที่ปนเปื้อนโลหะหนัก (Glass, 1999)

วิธีการ	ค่าใช้จ่าย (บาท/ตัน)*	ข้อจำกัด
การหลอมดินให้เป็นผลึกแก้ว (Vitrification)	2,400-13,600	ระยะเวลาตรวจสอบนาน
การฝังกลบ (Land fill)	3,200-16,000	การขนส่ง/ การขุดคุ้ย/ การติดตามตรวจสอบ
การบำบัดทางเคมี (Chemical remediation)	3,200-16,000	การนำสารปนเปื้อนกลับมาใช้ใหม่
การบำบัดด้วยวิธีการทางไฟฟ้า (Electrokinetics)	640-6,400	การติดตามตรวจสอบ
การฟื้นฟูด้วยพืช (Phytoremediation)	160-1,280	การกำจัดพืชหลังบำบัด

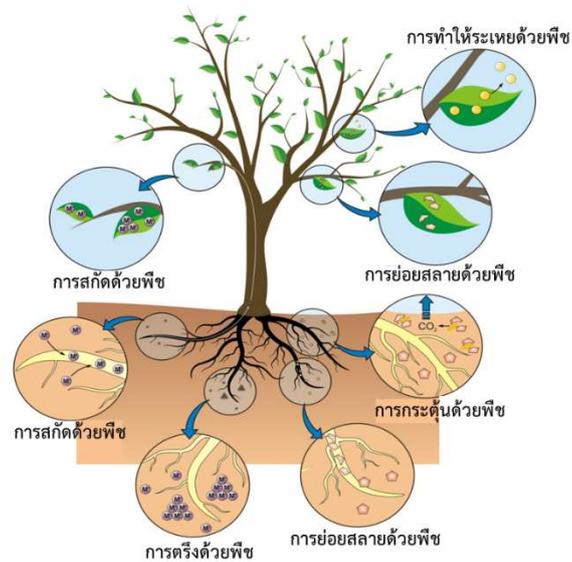
*หมายเหตุ ค่ารวมจากอัตราแลกเปลี่ยน 32 บาทต่อ 1 เหรียญดอลลาร์สหรัฐ

เทคโนโลยีการบำบัดฟื้นฟูดินสภาวะแวดล้อมด้วยพืชสามารถทำได้หลายวิธีการ เช่น การทำให้ระเหยด้วยพืช (phytovolatilization) การย่อยสลายด้วยพืช (phytodegradation) การกระตุ้นด้วยพืช (phytostimulation) การตรึงด้วยพืช (Phytostabilization) และการสกัดด้วยพืช (phytoextraction) ดังแสดงในรูปที่ 1 (Favas et al., 2014) แต่วิธีการที่นิยมใช้กันอย่างแพร่หลายมีอยู่ 2 วิธี (Lorestani et al., 2013) ได้แก่

1. การตรึงด้วยพืช พืชจะมีกระบวนการบางอย่างที่ทำให้โลหะหนักในดินถูกตรึงหรือถูกจับไว้ที่เฉพาะบริเวณราก โลหะหนักเคลื่อนที่ได้น้อยลงหรืออยู่ในรูปที่สิ่งมีชีวิตไม่สามารถดูดซับไปใช้ประโยชน์ได้จึงไม่สามารถแพร่กระจายไปยังส่วนอื่น ๆ ของสภาวะแวดล้อม พืชที่มีกระบวนการตรึงโลหะหนักจะมีกลไกในการทนทานต่อความเป็นพิษของโลหะหนัก ธาตุหรือโลหะจะตกตะกอนไปอยู่ในรูปที่ไม่ละลายน้ำโดยสารที่ปลดปล่อยจากราก (Root exudates) แล้วถูกยึดไว้กับดินบริเวณรอบรากพืช (Favas et al., 2014) ซึ่งเป็นเทคโนโลยีที่ป้องกันการแพร่กระจายของโลหะไปปนเปื้อนในสภาวะแวดล้อมอื่น ๆ ตัวอย่างพืชที่ใช้ในการบำบัดโดยวิธีการตรึงด้วยพืช อาทิพืชในสกุล *Cirsium* (Ahemad, 2015), *Haumaniastrum*, *Eragrostis*, *Ascolepis*, *Gladiolus* และ *Alyssum* (Favas et al., 2014)

2. การสกัดด้วยพืช เป็นการกำจัดโลหะหนักออกจากดิน (Removal technology) โดยรากพืชจะดูดโลหะหนักจากดินแล้วเคลื่อนย้ายไปสะสมในลำต้นและใบ (Metal accumulation) พืชสามารถสะสมโลหะหนักที่จำเป็นสำหรับการเจริญเติบโตและการพัฒนา เช่น เหล็ก แมงกานีส สังกะสี คอปเปอร์ แมกนีเซียม โมลิบดีนัมและนิกเกิล นอกจากนี้พืชเหล่านี้ยังสามารถสะสมโลหะหนักที่ไม่ทราบหน้าที่ทางชีวภาพต่อการเจริญเติบโตได้ด้วย เช่น แคดเมียม โครเมียม ตะกั่ว โคบอลต์ เงิน ซีลีเนียมและปรอท (Garbisu and Alkorta, 2001) วิธีการนี้มีปัจจัยที่เป็นข้อจำกัด เช่น การนำโลหะหนักไปใช้ประโยชน์โดยพืช (Metal bio-availability) ไม่ชัดเจนว่าเพราะอะไรและความทนทานของเซลล์พืชต่อความเป็นพิษของโลหะหนัก ดังนั้นพืชที่ใช้ในการบำบัดจึงควรมีความสามารถในการสะสมโลหะหนักโดยผ่านรากได้มากและสามารถเคลื่อนย้ายสารโลหะหนักไปสู่ส่วนของต้นพืชได้เป็นอย่างดี นอกจากนี้พืชควรมีกลไกในการลดความเป็นพิษของสารโลหะหนักภายในเซลล์ (Metal detoxification) และมีความทนทานต่อปริมาณสารโลหะหนักที่มีความเข้มข้นสูง ตัวอย่างพืชที่เหมาะสม เช่น แซลโซลา โซดา (*Salsola soda*) (Lorestani et al., 2013) ซึ่งเป็นพืชล้มลุกขนาดเล็กมีความสูงประมาณ 70 เซนติเมตร พบได้ในแถบเมดิเตอร์เรเนียน เจริญเติบโตได้ในดินที่มีความเค็ม นอกจากนี้ยังพบว่าสาบเสือ (*Chromolaena odoratum*) ผักกาดกบ (*Gynura pseudochina*) กระจุกไก่ (*Justicia procumbens*) และเทียนดอย

(*Impatiens violaeiflora*) เป็นพืชที่สามารถดูดซึมแคดเมียมได้ ปริมาณสูงอีกด้วย (Pheanark, 2010) ในปริมาณสูงและกระจุกไอนั้นยังสามารถดูดซึมสังกะสีได้ใน



รูปที่ 1 เทคโนโลยีการฟื้นฟูสภาพแวดล้อมด้วยพืช (Favas et al., 2014)

3. การประเมินประสิทธิภาพของพืชในกระบวนการฟื้นฟูทางชีวภาพ

การประเมินประสิทธิภาพของพืชในกระบวนการฟื้นฟูทางชีวภาพสามารถทำได้จากการคำนวณปัจจัยความเข้มข้นทางชีวภาพ (Biological concentration factor, BCF) ซึ่งเป็นอัตราส่วนปริมาณโลหะหนักสะสมในรากและในดิน (สมการที่ 1) (Yoon et al., 2006) ปัจจัยการเคลื่อนย้าย (Translocation

factor, TF) เป็นอัตราส่วนปริมาณโลหะหนักสะสมบริเวณยอดต่อรากพืช (สมการที่ 2) (Cui et al., 2007; Li et al., 2007) และค่าสัมประสิทธิ์การสะสมทางชีวภาพ (Biological accumulation coefficient, BAC) คำนวณได้จากอัตราส่วนปริมาณโลหะหนักในยอดและในดิน (สมการที่ 3) (Li et al., 2007; Cui et al., 2007)

ปัจจัยความเข้มข้นทางชีวภาพ (BCF)	= ปริมาณโลหะหนักสะสมในราก/ปริมาณโลหะหนักสะสมในดิน	(1)
ปัจจัยการเคลื่อนย้าย (TF)	= ปริมาณโลหะหนักสะสมในยอด/ปริมาณโลหะหนักสะสมในราก	(2)
ค่าสัมประสิทธิ์การสะสมทางชีวภาพ (BAC)	= ปริมาณโลหะหนักสะสมในยอด/ปริมาณโลหะหนักสะสมในดิน	(3)

พืชบำบัดจะมีศักยภาพและเหมาะสมกับการฟื้นฟูดินด้วยวิธีใด สามารถตัดสินใจได้ด้วยการคำนวณ BCF, TF และ BAC โดยถ้า BAC มากกว่า 1 พืชจะสามารถสะสมโลหะหนักได้ปริมาณสูงและเหมาะที่จะนำมาใช้ในการฟื้นฟูทางชีวภาพ ถ้าหาก TF และ BCF มากกว่า 1 แสดงว่าพืชชนิดนั้น ๆ เหมาะสมกับการฟื้นฟูดินปนเปื้อนโลหะหนักด้วยวิธีการสกัดด้วยพืชและการตรึงด้วยพืช ตามลำดับ (Yoon et al., 2006; Cui et al., 2007; Li et al., 2007) การเคลื่อนย้ายของโลหะหนักจากบริเวณรากไปยอดได้มาก (TF>1) แสดงว่าพืชนั้นมีคุณสมบัติในการดูดซับโลหะหนักจากดินเข้าสู่รากแล้วเคลื่อนย้ายไปสะสม

บริเวณยอด พืชชนิดนี้สามารถทนทานต่อโลหะหนักได้สูงและมีกลไกในการกำจัดความเป็นพิษจึงเหมาะที่จะใช้ในกระบวนการสกัดด้วยพืช (Ghosh and Singh, 2005; Cui et al., 2007) นอกจากนี้หากมีการสะสมโลหะหนักเฉพาะบริเวณบริเวณรากพืช (BCF>1) แสดงว่าพืชเหมาะสมกับกระบวนการตรึงด้วยพืช

ปัจจัยสำคัญต่อการบำบัดโลหะปนเปื้อนในดินขึ้นอยู่กับชนิดพันธุ์พืชซึ่งแบ่งออกเป็นกลุ่มตามความสามารถในการดูดซับโลหะหนัก (รูปที่ 2) ได้แก่ (Baker, 1981)

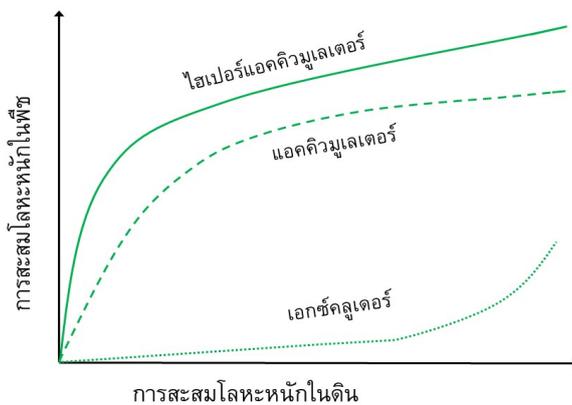
1. เอกซ์คลูเดอร์ (Excluder) เป็นกลุ่มพืชที่ดูดซับโลหะหนักได้ไม่ค่อยดีนักมีกลไกในการเลี่ยงการดูดซับและการสะสม

โลหะหนัก ถึงแม้ว่าในดินจะมีปริมาณโลหะหนักสูงก็ตามพืชกลุ่มนี้ จะดูดซึมและสะสมโลหะหนักได้เพียงเล็กน้อยเท่านั้น อย่างไรก็ตามเมื่อโลหะหนักในดินเพิ่มมากขึ้นจนพืชเสียกลไกในการป้องกันก็จะก่อให้เกิดความเป็นพิษต่อพืชกลุ่มนี้

2. แอคคิวมูเลเตอร์ (Accumulator) เป็นกลุ่มพืชที่สามารถดูดซึมและสะสมโลหะหนักได้ดีในเนื้อเยื่อส่วนต่าง ๆ เมื่อมีการดูดซึมผ่านรากแล้วจะเคลื่อนย้ายไปสะสมตามส่วนอื่น ๆ เช่น ลำต้น ใบ จากนั้นจะมีกลไกการลดความเป็นพิษหรือเปลี่ยนรูปโลหะหนักในเนื้อเยื่อพืช แต่พืชกลุ่มนี้เมื่อมีการสะสมไประยะเวลาหรือความเข้มข้นหนึ่งจากนั้นการสะสมของโลหะหนักในพืชจะคงที่

3. ไฮเปอร์แอคคิวมูเลเตอร์ (Hyperaccumulator) เป็นกลุ่มพืชที่มีความสามารถสูงในการสะสมโลหะหนัก ถึงแม้ว่าในดินจะมีโลหะหนักเพียงปริมาณเล็กน้อย พืชกลุ่มนี้จะมี ความสามารถในการดูดซึมโลหะหนักสะสมไว้ในเนื้อเยื่อส่วนต่าง ๆ ได้ดีและส่วนใหญ่จะเป็นพืชขนาดเล็กที่ต้องใช้พลังงานมาก

พืชบำบัดที่จะนำมาใช้บำบัดโลหะหนักจะต้องเป็นพืชที่ทนต่อปริมาณโลหะสูง (Metallophyte) ซึ่งพืชมีกลไกการนำเข้าไปสะสมภายในเซลล์ (Metal accumulation) และการหลีกเลี่ยงโลหะหนักคือไม่นำเข้าไปสะสม (Metal exclusion) ซึ่งการนำเข้าไปสะสมภายในเซลล์พืชจะมีกระบวนการทำลายหรือลดความเป็นพิษของโลหะหนัก (Detoxification) ดังนั้นพืชที่เป็นเอกซ์คลูเดอร์จะสามารถสะสมโลหะหนักได้ในปริมาณน้อยหรือสะสมเฉพาะบริเวณรากเท่านั้นจึงมีความสามารถในการตรึงหรือลดการเคลื่อนย้ายโลหะหนักไว้ในดินได้ดีกว่า แต่ในทางตรงกันข้ามพืชที่เป็นแอคคิวมูเลเตอร์และไฮเปอร์แอคคิวมูเลเตอร์จะมีความสามารถในการสะสมโลหะหนักได้สูง โดยรากดูดและเคลื่อนย้ายไปสะสมในส่วนลำต้นและใบและมีกลไกในการทำลายหรือลดความเป็นพิษของโลหะหนัก การใช้เทคโนโลยีการฟื้นฟูสภาพแวดล้อมด้วยพืชในประเทศไทยยังมีน้อย ดังนั้นจึงควรมีการศึกษาและพัฒนาอย่างต่อเนื่องโดยค้นหาพืชบำบัดที่เหมาะสมและเก็บรวบรวมสายพันธุ์และบูรณาการเทคโนโลยีให้เหมาะสมสำหรับประเทศไทยต่อไป



สรุปที่ 2 การจำแนกพืชบำบัดตามความสามารถในการดูดซึมโลหะหนักในดินโดยไฮเปอร์แอคคิวมูเลเตอร์เป็นพืชกลุ่มที่มีความสามารถในการดูดซึมโลหะหนักได้ดีถึงแม้ว่าในดินจะมีโลหะหนักปริมาณน้อย แอคคิวมูเลเตอร์เป็นพืชกลุ่มที่ดูดซึมโลหะหนักได้ดีเช่นกันแต่เมื่อถึงความเข้มข้นที่ไม่สามารถดูดซึมได้ พืชจะหยุดการสะสมโลหะหนักในเซลล์ และเอกซ์คลูเดอร์เป็นพืชกลุ่มที่ดูดซึมโลหะหนักได้น้อยที่สุดถึงแม้ในดินจะมีโลหะหนักในปริมาณมากก็ตามและเมื่อมีมากเกินไปความเป็นพิษของโลหะหนักจะทำให้พืชตายได้ (ดัดแปลงจาก Khan et al., 2009)

4. แบคทีเรียละลายฟอสเฟตทนทานโลหะหนัก

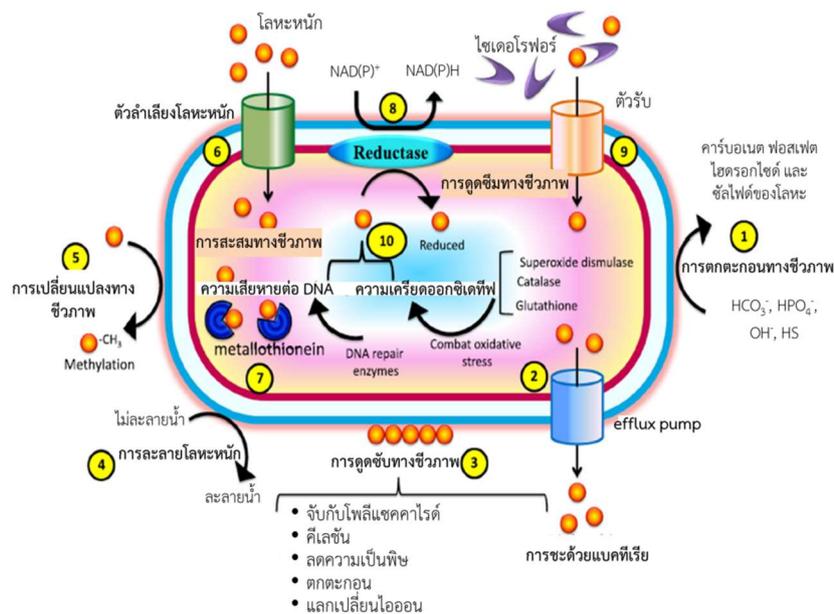
การคัดแยกแบคทีเรียละลายฟอสเฟตทนทานโลหะหนักมักสามารถทำได้โดยการคัดกรองแบคทีเรียจากแหล่งธรรมชาติที่ปนเปื้อนโดยโลหะหนัก เช่น ดินบริเวณใกล้เขตการทำเหมืองแร่ โรงงานอุตสาหกรรม บริเวณที่ปนเปื้อนน้ำมันและน้ำขุ่น

(Pheanark, 2010; Gupta et al., 2007; Susilowati and Syekhfani, 2014) สามารถทำได้โดยเจริญแบคทีเรียบนอาหารเลี้ยงเชื้อคัดเลือกที่นิยม คืออาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง Pikovskaya ซึ่งแบคทีเรียที่สามารถละลายฟอสเฟตที่อยู่ในรูปไตรแคลเซียม บิส (ฟอสเฟต) (Ca₃(PO₄)₂) และใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนและ

แอมโมเนียมซัลเฟต ((NH₄)₂SO₄) เป็นแหล่งไนโตรเจน (Pikovskaya, 1948) แต่วิธีการนี้ทำให้เกิดข้อสงสัยว่าถ้าหากแบคทีเรียไม่สามารถทำให้เกิดบริเวณโสมนอาหารแข็งแต่สามารถละลายฟอสเฟตอินทรีย์ชนิดอื่น ๆ ในอาหารเหลวได้ ดังนั้นจึงได้มีการปรับปรุงวิธีการคัดแยกโดยการเติมบรอมฟีนอล บลู (bromophenol blue) เป็นอินดิเคเตอร์ในการตรวจผล (Gupta et al., 1994) ต่อมามีการพัฒนาสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพของการคัดแยกแบคทีเรียละลายฟอสเฟตให้สูงขึ้น โดยพบว่าปัจจัยที่มีผลต่อการละลายฟอสเฟต ได้แก่ กลูโคส (20 กรัมต่อลิตร) และแมกนีเซียมคลอไรด์ (10 กรัมต่อลิตร) โดยอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมคือ National Botanical Research Institute's Phosphate (NBRIP) การเพาะเลี้ยงแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อ NBRIP จะมีปริมาณการละลายฟอสเฟตมากกว่าอาหารเลี้ยงเชื้อ Pikovskaya ถึง 3 เท่า (Nautiyal, 1999)

ข้อจำกัดหนึ่งของเทคโนโลยีการฟื้นฟูทางชีวภาพ คือ ความเป็นพิษของโลหะหนักที่มีผลยับยั้งการเจริญเติบโตของพืช บำบัดเป็นปัจจัยจำกัดด้านการเจริญเติบโตและการยึดเกาะอนุภาคดินของโลหะหนักทำให้ประสิทธิภาพการฟื้นฟูลดน้อยลง ดังนั้นแบคทีเรียละลายฟอสเฟตที่ช่วยลดความเป็นพิษและทนทานโลหะหนักจะเป็นตัวช่วยที่นำไปสู่การเพิ่มประสิทธิภาพการฟื้นฟูสภาพแวดล้อมปนเปื้อนโลหะหนักด้วยพืชได้โดยอาศัย

ปฏิสัมพันธ์ระหว่างพืชกับแบคทีเรีย (Ahemad, 2015; Paul and Sinha, 2015) การทดสอบความทนทานโลหะหนักของแบคทีเรียละลายฟอสเฟตวิธีที่นิยมและใช้กันอย่างแพร่หลาย คือ Agar dilution method เพื่อหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย (Minimal inhibitory concentration, MIC) อาทิกกรณีของแบคทีเรียละลายฟอสเฟตสายพันธุ์ *Bacillus* sp. KUPSB16 มีค่า MIC ต่อแควตเมียมเฮกซะวาเลนโครเมียม ตะกั่วและสังกะสีเท่ากับ 5.0, 6.8, 4.8 และ 11.0 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ (Paul and Sinha, 2015) กลไกที่แบคทีเรียละลายฟอสเฟตใช้ลดความเป็นพิษโลหะหนัก (รูปที่ 3) ได้แก่ 1) การตกตะกอนทางชีวภาพ 2) การขับสารพิษออกนอกเซลล์ เช่น ระบบการขับโลหะหนักออกจากเซลล์ (Active efflux pump) 3) การดูดซับทางชีวภาพไว้ที่เยื่อหุ้มเซลล์ เช่น การสร้างสารประกอบเชิงซ้อนที่มีหมู่ไทออล (Thiol) หรือสารหมู่ซัลไฟไฮดริล (Sulfhydryl group) จับกับโลหะหนักและทำให้โลหะหนักกลายเป็นสารประกอบเชิงซ้อน 4) การละลายโลหะหนัก 5) การเติมหมู่เมทิล (Methylation) 6) การเก็บกักภายในเซลล์ 7) การสร้างเมโอไนนจับกับโลหะหนัก 8) การออกซิเดชัน 9) การดูดซับทางชีวภาพโดยการหลอมรวมกับไซโตโรฟอร์ และ 10) การรีดักชัน (Ahemad, 2015)



รูปที่ 3 กลไกการลดความเป็นพิษของโลหะหนักโดยแบคทีเรียละลายฟอสเฟต (ดัดแปลงจาก Ahemad, 2015)

5. การส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชบำบัดโดยแบคทีเรียละลายฟอสเฟต

โลหะหนักมีคุณสมบัติที่คงทนในสภาวะแวดล้อมและถูกย่อยสลายทางชีวภาพได้ยาก ในกรณีที่มีการปนเปื้อนโลหะหนัก ความเข้มข้นสูงจะทำให้เกิดสภาวะเครียดในพืช ยับยั้งการทำงานทางสรีรวิทยา การเจริญเติบโตและพัฒนาการของพืช ความทนทานต่อสภาวะแวดล้อมจะลดน้อยลงและถูกบุกรุกโจมตีโดยเชื้อก่อโรคได้ง่ายขึ้น (Ma et al., 2011) ทำให้ประสิทธิภาพการบำบัดโลหะหนักลดลง แต่อย่างไรก็ตามโลหะหนักสามารถเปลี่ยนรูปได้โดยลดความเป็นพิษลงได้โดยอาศัยกิจกรรมของจุลินทรีย์ดิน เช่น แบคทีเรียละลายฟอสเฟตและสังเคราะห์กรดอินโดลแอซิดิกสายพันธุ์ *Cellulosimicrobium cellulans* KUCr3 (Chatterjee et al., 2009), *Pseudomonas* sp. NBRI 4014 (Rajkumar et al., 2005) มีความทนทานต่อเฮกซาวาเลนโครเมียมซึ่งมีความเป็นพิษสูงโดยแบคทีเรียนี้ลดความเป็นพิษโดยการเปลี่ยนรูปเฮกซาวาเลนโครเมียมกลายเป็นไตรวาเลนโครเมียมที่ความเป็นพิษน้อยกว่าโดยกระบวนการรีดักชันหรือการกำจัดความเป็นพิษ ซึ่งกลไกนี้เป็นประโยชน์อย่างมากเมื่อแบคทีเรียเข้าครอบครองในเขตรากพืช สำหรับกิจกรรมของแบคทีเรียละลายฟอสเฟตที่มีบทบาทในการฟื้นฟูดินปนเปื้อนโลหะหนัก ได้แก่

5.1 การสร้างกรดอินทรีย์

การยึดเกาะของโลหะหนักกับอนุภาคดินเป็นปัจจัยหนึ่งที่เป็นอุปสรรคต่อกระบวนการฟื้นฟูดินด้วยพืช เป็นการยากที่พืชจะดูดซึมผ่านรากหรือทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติโครงสร้างที่ยึดจับกันอย่างเหนียวแน่นระหว่างอนุภาคดินกับโลหะหนักได้ แบคทีเรียละลายฟอสเฟตจะสร้างกรดอินทรีย์โมเลกุลขนาดเล็กที่มีคุณสมบัติเป็นสารคีเลตติ้ง (Chelating agents) เช่น กรดแลคติก (Lactic acid) กรดซิตริก (Citric acid) กรด 2-คีโตกลูโคนิก (2-Keto gluconic acid) กรดมาลิก (Malic acid) กรดไกลโคลิก (Glycolic acid) กรดออกซาลิก (Oxalic acid) กรดมาโลนิค (Malonic acid) กรดทาร์ทาริก (Tartaric acid) กรดวาเลอริก (Valeric acid) กรดพิซซิดิก (Picidic acid) กรดซัคซินิก (Succinic acid) และกรดฟอร์มิก (Formic acid) เป็นต้น เมื่อสารเหล่านี้หลั่งออกมาภายนอกเซลล์จะมีคุณสมบัติในการละลายโลหะหนักที่ยึดเกาะอยู่กับอนุภาคดินหรือสามารถเปลี่ยนรูปจากไม่ละลายน้ำเป็นละลายน้ำได้ เช่น นิกเกิล (Becerra-Castro et al., 2011) คอปเปอร์ (Li and Ramakrishna, 2011) และ

สังกะสี (He et al., 2013) นอกจากการช่วยละลายโลหะหนักออกจากอนุภาคดิน แบคทีเรียละลายฟอสเฟตยังช่วยละลายธาตุฟอสฟอรัสในดินทำให้พืชสามารถนำไปใช้ประโยชน์ในการเจริญเติบโตได้อีกด้วย (Becerra-Castro et al., 2011) เพราะฟอสฟอรัสในดินส่วนใหญ่อยู่ในรูปสารประกอบฟอสเฟต เช่น สารประกอบอนินทรีย์ ได้แก่ อะพาไทต์ (Apatite) ไฮดรอกซีอะพาไทต์ (Hydroxyapatite) และ ออกซีอะพาไทต์ (Oxyapatite) หรือสารประกอบอินทรีย์ ได้แก่ อินโนซิทอลฟอสเฟต (Inositol phosphate) ฟอสโฟโมโนเอสเทอร์ (Phosphomonoesters) ฟอสโฟไดเอสเทอร์ (Phosphodiester) และฟอสโฟไตรเอสเทอร์ (Phosphotriester) เป็นจำนวนมากประมาณ 400 ถึง 1,200 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมดิน (Ahemad et al., 2009) แต่เป็นที่น่าเสียดายว่าฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์ต่อพืชและพืชดึงดูดไปใช้ประโยชน์ได้มีไม่เกิน 1 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมดิน (Goldstein, 1994) เนื่องจากฟอสฟอรัสในดินมักรวมตัวและเกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนอื่น ๆ กับธาตุอื่น เช่น ไฮดรอกไซด์ของเหล็ก อลูมิเนียมและแมงกานีสเป็นผลให้ฟอสฟอรัสถูกตรึงหรืออยู่ในรูปที่ไม่ละลายน้ำอยู่กับอนุภาคดิน ดังนั้นแบคทีเรียละลายฟอสเฟตที่สามารถสังเคราะห์กรดอินทรีย์เป็นการช่วยละลายโลหะหนักออกจากดิน ดังนั้นกิจกรรมของแบคทีเรียนี้จึงเหมาะสมกับการใช้ร่วมกับพืชที่เป็นแบบการสกัดด้วยพืชโดยใช้ร่วมกับพืชกลุ่มไฮเปอร์แอคคิวมูเลเตอร์จะทำให้การบำบัดโลหะหนักในดินมีประสิทธิภาพมากขึ้น

5.2 การสังเคราะห์ไซเดอโรฟอรัส

ไซเดอโรฟอรัส (Siderophore) มีบทบาทสำคัญในกระบวนการสนับสนุนการนำธาตุเหล็กไปใช้ประโยชน์ของพืชภายใต้สภาวะปริมาณธาตุเหล็กมีจำกัด โดยแบคทีเรียละลายฟอสเฟตจะสร้างและปลดปล่อยสารไซเดอโรฟอรัสน้ำหนักโมเลกุลต่ำและมีความจำเพาะเจาะจงออกมาเพื่อจับกับธาตุเหล็ก (Iron chelating agent) (Schalk et al., 2011) ธาตุเหล็กที่พบส่วนใหญ่อยู่ในรูปเฟอร์ริคไอออนและอยู่ในรูปของสารประกอบที่ละลายน้ำได้น้อยหรือไม่ละลายน้ำ เช่น ไฮดรอกไซด์และออกซีไฮดรอกไซด์ซึ่งธาตุเหล็กที่ละลายน้ำได้ในดินส่วนใหญ่ไม่เพียงพอต่อการเจริญเติบโตของทั้งพืชและแบคทีเรีย (Ahemad and Kibret, 2013) ไซเดอโรฟอรัสทำให้ธาตุเหล็กละลายและถูกขนส่งเหล็กเข้าสู่พืช และจากรายงานการศึกษาวิจัยพบว่าสามารถจับกับธาตุหรือโลหะหนักชนิดอื่น ๆ ได้ดีอีกด้วย เช่น แมกนีเซียม

แมงกานีส โครเมียม แกลเลียม สังกะสี แคดเมียม นิกเกิล สารหนู ตะกั่วและสารกัมมันตรังสี (Nair et al., 2007; Rajkumar et al., 2010; Schalk et al., 2011) คุณสมบัติในการยับยั้งธาตุเหล็กของแบคทีเรียละลายฟอสเฟตทำให้สามารถควบคุมปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคพืชได้ นอกจากนี้ยังมีรายงานการศึกษาว่าไซโตโรฟอร์สามารถลดความเป็นพิษของโลหะหนักที่ปนเปื้อนในดินบางชนิดที่ได้ด้วย ดังนั้นจะเห็นได้ว่าไซโตโรฟอร์มีความสำคัญมากทั้งในแง่ของการส่งเสริมการเจริญเติบโตและการลดภาวะเครียดจากโลหะหนักต่อพืชได้เช่นเดียวกัน (Gamalero and Glick, 2012) ตัวอย่างเช่น แบคทีเรียละลายฟอสเฟต *Enterobacter* sp. NBRI K28 ผลิตไซโตโรฟอร์ปริมาณสูงช่วยกระตุ้นการเจริญเติบโตของผักกาดเขียว (*Brassica juncea*) และช่วยสนับสนุนการฟื้นฟูด้วยพืชด้วยวิธีการสกัดด้วยพืชให้มีประสิทธิภาพโดยผักกาดเขียวมีการสะสม นิกเกิล สังกะสี และโครเมียมในส่วนต่าง ๆ ของเนื้อเยื่อเพิ่มมากขึ้น (Kumar et al., 2008)

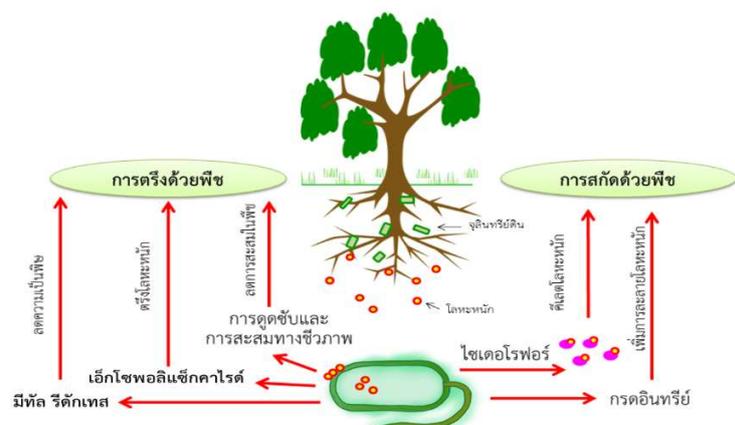
5.3 การสังเคราะห์กรดอินโดลแอซีติก

กรดอินโดลแอซีติก (Indole-3-acetic acid, IAA) เป็นฮอร์โมนพืชหรือสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช ที่สำคัญชนิดหนึ่งในกลุ่มออกซิน (Auxin) แบคทีเรียผลิตกรดอินโดลแอซีติกเป็นกลุ่มของแบคทีเรียที่นำมาใช้ประโยชน์กันอย่างแพร่หลายทั้งทางด้านการเกษตรและสิ่งแวดล้อม การใช้ประโยชน์ทางด้านสิ่งแวดล้อมนั้นมีรายงานว่าแบคทีเรียละลายฟอสเฟตสามารถฟื้นฟูสภาพแวดล้อมที่ปนเปื้อนด้วยโลหะหนักได้โดยการสร้างกรดอินโดลแอซีติกส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชบำบัดทำ

ให้พืชเจริญเติบโตได้ดีขึ้นและกำจัดโลหะหนักในดินได้มากขึ้นด้วย (Darya et al., 2010) แต่ข้อจำกัดของการสังเคราะห์กรดอินโดลแอซีติกของแบคทีเรียละลายฟอสเฟตนั้นต้องการกรดอะมิโนทริปโตเฟนเป็นสารตั้งต้นของวิถีสังเคราะห์และความเป็นพิษของโลหะหนัก เช่น คอปเปอร์และแคดเมียมอาจมีผลยับยั้งการสังเคราะห์กรดอินโดลแอซีติกของแบคทีเรีย (Kamnev et al., 2005)

5.4 การสังเคราะห์เอนไซม์เอซีซีดีอะมิเนส

เอนไซม์เอซีซีดีอะมิเนส (ACC (1-amino cyclopropane-1-carboxylate)-deaminase) เป็นเอนไซม์ที่ช่วยลดระดับเอทิลีนในพืชเมื่ออยู่ในสภาวะเครียดจากความเครียดของโลหะหนัก พืชมีการตอบสนองและการปรับตัวโดยการสร้างเอทิลีน พืชบำบัดที่เจริญเติบโตในดินปนเปื้อนโลหะหนักจะมีการสร้างเอทิลีนจะสูงขึ้นอย่างมากจนมีผลไปยังการเจริญเติบโตของอวัยวะส่วนต่าง ๆ โดยเฉพาะรากซึ่งเป็นบริเวณสำคัญในการดึงดูดหรือตรึงโลหะหนักในดิน แบคทีเรียละลายฟอสเฟตสร้างเอนไซม์เอซีซีดีอะมิเนสเพื่อลดระดับเอทิลีนในพืชให้ต่ำลงโดยที่เอนไซม์เอซีซีดีอะมิเนสจะย่อยสลายเอซีซี สารตัวกลางของการสังเคราะห์เอทิลีน ทำให้ระดับเอทิลีนลดลงและเกิดผลพลอยได้ที่เป็นประโยชน์ 2 ชนิด ได้แก่ แอมโมเนียและแอลฟาซีโตบิวทิลเรตซึ่งเป็นแหล่งไนโตรเจนสำหรับการเจริญของแบคทีเรียต่อไป ดังนั้นแบคทีเรียละลายฟอสเฟตที่สามารถสร้างเอนไซม์เอซีซีดีอะมิเนสได้และครอบครองเขตรากพืชกลุ่มไฮเปอร์แอคคิวมูเลเตอร์ จะทำให้ระบบรากเจริญเติบโตและดูดซึมโลหะหนักได้ดียิ่งขึ้น (Arshad et al., 2007)



รูปที่ 4 บทบาทของแบคทีเรียละลายฟอสเฟตในการสร้างสารเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการบำบัดโลหะหนักด้วยวิธีการตรึงด้วยพืชและการสกัดด้วยพืช (ดัดแปลงจาก Ahemad, 2015)

6. สรุปและข้อเสนอแนะ

การใช้แบคทีเรียละลายฟอสเฟตเพื่อฟื้นฟูปื้นที่ปนเปื้อนโลหะหนักในดินจำเป็นต้องมีการศึกษาค้นคว้าค้นหาพืชไฮเปอร์แอคคิวมูเลเตอร์ที่สามารถสะสมโลหะหนักได้ในปริมาณสูง โดยเก็บรวบรวมพันธุ์ที่เหมาะสมกับประเทศไทยและควรศึกษารวบรวมสายพันธุ์แบคทีเรียละลายฟอสเฟตที่สามารถอยู่ร่วมกับพืชและทนทานต่อความเป็นพิษของโลหะหนักและเป็นสายพันธุ์ที่ควบคุมหรือต่อต้านโรคพืชได้ดี เนื่องจากความเป็นพิษของโลหะหนักทำให้พืชอ่อนแอ ติดเชื้อโรคพืชได้ง่าย ดังนั้นจึงจำเป็นที่จะต้องเลือกใช้แบคทีเรียที่มีคุณสมบัติในการต้านเชื้อโรคพืชร่วมด้วยจะเป็นทางเลือกที่ดีเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพของเทคโนโลยี แต่ทั้งนี้แบคทีเรียบางชนิดเป็นสายพันธุ์อวัยวะโอกาสก่อโรคในมนุษย์ เช่น *Pseudomonas aeruginosa* ดังนั้นหากต้องการนำแบคทีเรียไปใช้ในพื้นที่ยังจำเป็นต้องพิจารณาจริยธรรมและกฎหมายสิ่งแวดล้อมด้วย นอกจากนี้ควรศึกษาชนิดของโลหะหนักให้หลากหลายเนื่องจากในปัจจุบันมีการศึกษากันเพียงไม่กี่ชนิด เช่น นิกเกิล คอปเปอร์ สังกะสีและโครเมียมแต่โลหะหรือธาตุที่มีความเป็นพิษสูง เช่น สารหนู แคดเมียม ตะกั่วและปรอทยังมีน้อย

เทคโนโลยีการฟื้นฟูปื้นสภาพแวดล้อมด้วยพืชต้องอาศัยระยะเวลาในการดำเนินการ ดังนั้นจึงควรเลือกพืชบำบัดประสิทธิภาพสูง เช่น พืชไฮเปอร์แอคคิวมูเลเตอร์ที่มีความสามารถสูงในการสะสมโลหะหนัก มีความทนทานต่อความเป็นพิษของโลหะหนักและเจริญเติบโตได้ในสภาพแวดล้อมของแต่ละพื้นที่ นอกจากนี้จุลินทรีย์ดินกลุ่มแบคทีเรียละลายฟอสเฟตก็มีความสำคัญเช่นกัน ในแง่ของการช่วยละลายโลหะหนักที่จับอยู่กับอนุภาคของดินและการสร้างสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชซึ่งเป็นปฏิสัมพันธ์ระหว่างพืชกับจุลินทรีย์ที่จะเพิ่มประสิทธิภาพเทคโนโลยีการฟื้นฟูดินที่ปนเปื้อนโลหะหนักให้ดียิ่งขึ้น

7. เอกสารอ้างอิง

Ahemad, M. (2015). Phosphate-solubilizing bacteria-assisted phytoremediation of metalliferous soils: a review. 3 Biotech. 5: 111-121.

Ahemad, M. and Kibret, M. (2013). Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria: current

perspective. Journal of King Saud University-Science 26: 1-20.

Ahemad, M. and Malik, A. (2011). Bioaccumulation of heavy metals by zinc resistant bacteria isolated from agricultural soils irrigated with wastewater. Bacteriology Journal 2: 12-21.

Ahemad, M., Zaidi, A., Khan, M.S. and Oves, M. (2009). Biological importance of phosphorus and phosphate solubilizing microbes. In Phosphate Solubilizing Microbes for Crop Improvement. New York: Science Publishers Inc. pp. 1-14.

Akkajit, P. (2015). Review of the current situation of Cd contamination in agricultural field in the Mae Sot district, Tak province, Northwestern Thailand. Applied Environmental Research 37: 71-82.

Arshad, M., Saleem, M. and Hussain, S. (2007). Perspectives of bacterial ACC-deaminase in phytoremediation. Trends in Biotechnology 25: 356-362.

Baker, A.J.M. (1981). Accumulators and excluders strategies in the response of plants to heavy metals. Journal of Plant Nutrition 3: 643-654.

Becerra-Castro, C., Prieto-Fernandez, A., Alvarez-Lopez, V., Monterroso, C., Cabello-Conejo, M.I., Acea, M.J. and Kidd, P.S. (2011). Nickel solubilizing capacity and characterization of rhizobacteria isolated from hyperaccumulating and non-hyperaccumulating subspecies of *Alyssum serpyllifolium*. International Journal of Phytoremediation 13 (suppl): 229-244.

Chatterjee, S., Sau, G.B. and Mukherjee, S.K. (2009). Plant growth promotion by a hexavalent chromium reducing bacterial strain, *Cellulosimicrobium cellulans* KUCr3. World Journal of Microbiology and Biotechnology 25: 1829-1836.

Cui, S., Zhou, Q. and Chao, L. (2007). Potential hyperaccumulation of Pb, Zn, Cu and Cd in enduring plants distributed in an old semetry, northeast, China. Environmental Geology 51: 1043-1045.

Darya, M., Chamber-Pérez, M.A., Palomares, A.J. and Pajuelo, E. (2010). "In situ" phytostabilisation of heavy metal polluted soils using *Lupinus luteus* inoculated with metal resistant plant-growth promoting rhizobacteria. Journal of Hazardous Materials 177: 323-330.

- Favas, P.J., Pratas, J., Varun, M., D' Souza, R. and Paul, M.S. (2014). Phytoremediation of soils contaminated with metals and metalloids at mining areas: Potential of native flora. *In Environmental Risk Assessment of Soil Contamination*. Croatia: InTech. pp. 485–515.
- Gamalero, E. and Glick, B.R. (2012). Ethylene and abiotic stress tolerance in plants. *In Environmental Adaptations and Stress Tolerance of Plants in the Era of Climate Change*. Berlin: Springer-Verlag. pp. 395-412.
- Garbisu, C. and Alkorta, I. (2001). Phytoextraction: a cost-effective plant-based technology for the removal of metals from the environment. *Bioresource Technology* 77: 229-236.
- Ghosh, M. and Singh, S.P. (2005). A review on phytoremediation of heavy metals and utilization of it's by products. *Applied Ecology and Environmental Research* 3: 1-18.
- Glass, D.J. (1999). U.S. and International Markets for Phytoremediation 1999-2000. Needham: D. Glass Associates. p. 266.
- Goldstein, A.H. (1994). Involvement of the quinoprotein glucose dehydrogenase in the solubilization of exogenous phosphates by gram-negative bacteria. *In Phosphate in Microorganisms: Cellular and Molecular Biology*. Washington DC: ASM. pp. 197-203.
- Gupta, N., Sabat, J., Parida, R. and Kerkatta, D. (2007). Solubilization of tricalcium phosphate and rock phosphate by microbes isolated from chromite, iron and manganese mines. *Acta Botanica Croatica* 66: 197-204.
- Gupta, R., Singal, R., Shankar, A., Kuhad, R.C. and Saxena, R.K. (1994). A modified plate assay for screening phosphate solubilizing microorganisms. *Journal of General and Applied Microbiology* 40: 255-260.
- He, H., Ye, Z., Yang, D., Yan, J., Xiao, L., Zhong, T., Yuan, M., Cai, X., Fang, Z. and Jing, Y. (2013). Characterization of endophytic *Rahnella* sp. JN6 from *Polygonum pubescens* and its potential in promoting growth and Cd, Pb, Zn uptake by *Brassica napus*. *Chemosphere* 90: 1960-1965.
- He, L.Y., Zhang, Y.F., Ma, H.Y., Su, L.N., Chen, Z.J., Wang, Q.Y., Meng, Q. and Fang, S.X. (2010). Characterization of copper resistant bacteria and assessment of bacterial communities in rhizosphere soils of copper-tolerant plants. *Applied Soil Ecology* 44: 49-55.
- Kamnev, A.A., Tugarova, A.V., Antonyuk, L.P., Tarantilis, P.A., Polissiou, M.G. and Gardiner, P.H. (2005). Effects of heavy metals on plant-associated rhizobacteria: comparison of endophytic and non-endophytic strains of *Azospirillum brasilense*. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* 19: 91-95.
- Khan, M.S., Zaidi, A., Wani, P.A. and Oves, M. (2009). Role of plant growth promoting rhizobacteria in the remediation of metal contaminated soils. *Environmental Chemistry Letters* 7: 1-19.
- Kumar, K.V., Singh, N., Behl, H.M. and Srivastava, S. (2008). Influence of plant growth promoting bacteria and its mutant on heavy metal toxicity in *Brassica juncea* grown in fly ash amended soil. *Chemosphere* 72: 678-683.
- Li, K. and Ramakrishna, W. (2011). Effect of multiple metal resistant bacteria from contaminated lake sediments on metal accumulation and plant growth. *Journal of Hazardous Materials* 189: 531-539.
- Li, M.S., Luo, Y.P. and Su, Z.Y. (2007). Heavy metals concentrations in soils and plant accumulation in a restored manganese mine land in Guangxi, South China. *Environmental Pollution* 147: 168-175.
- Liu, M., Huang, B., Bi, X., Ren, Z., Shenga, G. and Fu, J. (2013). Heavy metals and organic compounds contamination in soil from an e-waste region in South China. *Environmental Science: Processes & Impacts* 15: 919-929.
- Lorestani, B., Yousefi, N., Cheraghi, M. and Farmany, A. (2013). Phytoextraction and phytostabilization potential of plants grown in the vicinity of heavy metal-contaminated soils: a case study at an industrial town site. *Environmental Monitoring and Assessment* 185: 10217-10223.
- Ma, Y., Rajkumar, M., Vicente, J.A. and Freitas, H. (2011). Inoculation of Ni-resistant plant growth promoting bacterium *Psychrobacter* sp. strain SRS8 for the improvement of nickel phytoextraction by energy crops. *International Journal of Phytoremediation* 13: 126-139.

- Misra, N., Gupta, G. and Jha, P.N. (2012). Assessment of mineral phosphate solubilizing properties and molecular characterization of zinc tolerant bacteria. *Journal of Basic Microbiology* 52: 549-558.
- Nair, A., Juwarkar, A.A. and Singh, S.K. (2007). Production and characterization of siderophores and its application in arsenic removal from contaminated soil. *Water Air & Soil Pollution* 180: 199-212.
- Nautiyal, C.S. (1999). An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. *FEMS Microbiology Letters* 170: 1574-6968.
- Oves, M., Khan, M.S. and Zaidi, A. (2013). Chromium reducing and plant growth promoting novel strain *Pseudomonas aeruginosa* OSG4 1 enhance chickpea growth in chromium amended soils. *European Journal of Soil Biology* 56: 72-83.
- Paul, D. and Sinha, S.N. (2015). Isolation and characterization of a phosphate solubilizing heavy metal tolerant bacterium from River Ganga, West Bengal, India. *Songklanakarin Journal of Science and Technology* 37: 651-657.
- Pheanark, C. (2010). The potential plant for phytoremediation of cadmium and zinc contaminated soils and enhancement of phytoremediation by plant growth promoting rhizobacteria (PGPR). Ph.D. Thesis: Mahidol University, Bangkok.
- Pikovskaya, R.I. (1948). Mobilization of phosphorus in soil in connection with vital activity of some microbial species. *Mikrobiologiya* 17: 362-370.
- Pongpetch, N. and Amchuen, N. (2015). Assessment of heavy metals in fish and water in cage fish culture at Loei river, Loei province. *Journal of Agricultural Technology* 11: 2369-2375.
- Rajkumar, M., Ae, N., Prasad, M.N.V. and Freitas, H. (2010). Potential of siderophore-producing bacteria for improving heavy metal phytoextraction. *Trends in Biotechnology* 28: 142-149.
- Rajkumar, M., Nagendran, R., Lee, K.J., and Lee, W.H. (2005). Characterization of a novel Cr⁶⁺ reducing *Pseudomonas* sp. with plant growth-promoting potential. *Current Microbiology* 50: 266-271.
- Schalk, I.J., Hannauer, M. and Braud, A. (2011). New roles for bacterial siderophores in metal transport and tolerance. *Environmental Microbiology* 13: 2844-2854.
- Susilowati, L.E. and Syekhfani, S. (2014). Characterization of phosphate solubilizing bacteria isolated from Pb contaminated soils and their potential for dissolving tricalcium phosphate. *Journal of Degraded and Mining Lands Management* 1: 57-62.
- Tchounwou, P.B., Yedjou, C.G., Patlolla, A.K. and Sutton, D.J. (2012). Heavy metals toxicity and the environment, *EXS* 101: 133-164.
- Waterlot, C., Bidar, G., Pelfrene, A., Roussel, H., Fourier, H. and Douay, F. (2013). Contamination, fractionation and availability of metals in urban soils in the vicinity of former lead and zinc smelters, France. *Pedosphere* 23: 143-159.
- Yoon, J., Cao, X. and Zhou, O. (2006). Accumulation of Pb, Cu, and Zn in native plants growing on a contaminated Florida site. *Science of the Total Environment* 368: 456-464.

