



รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

การพัฒนาติดินที่ปนเปื้อนสารกำจัดศัตรูพืช
โพลีโนฟอสด้วยวิธีทางชีวภาพเชิงปรับปรุง
โดยใช้หลักการเติมเซลล์ที่ถูกกระตุ้น

โดย

ผู้ช่วยศาสตราจารย์พุทธพร แสงเทียน และคณะ

มิถุนายน 2557



รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

การฟื้นฟูน้ำใต้ดินที่ปนเปื้อนสารกำจัดศัตรูพืชโพฟโนฟอส ด้วยวิธีทางชีวภาพเชิงปรับปรุงโดยใช้ หลักการเติมเซลล์ที่ถูกกระตุ้น

Enhanced Bioremediation of Profenofos Pesticide-contaminated Groundwater Using Stimulated Cell Augmentation Approach

ผู้วิจัย

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ พุทธพร แสงเทียน
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุมนา ราชภรรภกติ
รองศาสตราจารย์ ดร. อลิสา วงศ์ใน

สังกัด

คณะวิศวกรรมศาสตร์
มหาวิทยาลัยขอนแก่น
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยงบประมาณ
ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2555-2556 ตามมติคณะกรรมการ

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย ผู้ให้ทุนไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

บทสรุปผู้บริหาร

ชื่อเรื่อง	การฟื้นฟูน้ำใต้ดินที่ปนเปื้อนสารกำจัดศัตรูพืชโพโรฟโนฟอสด้วยวิธีทางชีวภาพเชิงปรับปรุงโดยใช้หลักการเติมเซลล์ที่ถูกกระตุ้น Enhanced Bioremediation of Profenofos Pesticide-contaminated Groundwater Using Stimulated Cell Augmentation Approach
ผู้วิจัย	1) พศ. พุทธพร แสงเทียน ภาควิชาชีวกรรมเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี 2) พศ.ดร. สุมนา ราชภูรภักดี (สีริพัฒนาภูล) ภาควิชาชีวกรรมสิ่งแวดล้อม คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ภาควิชาชีวกรรมเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี 3) รศ.ดร. อลิสา วงศ์ใน ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
หน่วยงาน	คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ปัญหามลพิษจากการเกษตรที่สำคัญเรื่องหนึ่ง คือ ปัญหาการตกค้างของสารกำจัดศัตรูพืชในแหล่งน้ำ จังหวัดอุบลราชธานีโดยเฉพาะในเขตอำเภอเมืองเป็นแหล่งปลูกพ稷ขนาดใหญ่ที่สุดในประเทศไทยแห่งหนึ่ง โดยมีพื้นที่เพาะปลูกกว่า 10,000 ไร่ การปลูกพ稷มีการใช้สารเคมีหลายชนิด งานวิจัยในอดีตพบสารกำจัดศัตรูพืชตกค้างเกินกว่ามาตรฐานกำหนดทั้งในพ稷 ดินจากไร่พ稷 ตลอดจนเลือดของเกษตรกรสูงถึงร้อยละ 50 ดังนั้นสามารถกล่าวได้ว่าในการปลูกพ稷ใช้สารกำจัดศัตรูพืชจนกระทั่งมีการตกค้างกระจายทั่วทั้งสิ่งแวดล้อม สารกำจัดศัตรูพืชที่ใช้มากที่สุด ได้แก่ สารโพโรฟโนฟอส (profenofos) ซึ่งเป็นสารกำจัดศัตรูพืชในกลุ่มสารออร์แกนิฟอฟอรัส จากการสำรวจข้อมูลน้ำบริโภคอุปโภคของประชาชนในเขตพื้นที่ดังกล่าวพบว่าน้ำใต้ดินเป็นแหล่งน้ำบริโภคหลัก โดยประชาชนจำนวนมากสูบน้ำใต้ดินแล้วบริโภคโดยตรงไม่ผ่านการทำบัด ประกอบกับระดับน้ำใต้ดินในเขตพื้นที่ดังกล่าวอยู่ลึกเพียงประมาณ 2-8 เมตร จากผิด din จึงมีความเป็นไปได้ว่าสารโพโรฟโนฟโนจะปนเปื้อนลงสู่แหล่งน้ำใต้ดิน โดยสารโพโรฟโนฟโนเป็นพิษต่อสิ่งมีชีวิต อีกทั้งยังส่งผลต่อกระบวนการเมtabolism และการทำงานของประสาทส่วนกลาง หากได้รับอย่างต่อเนื่องแม้จะมีปริมาณน้อยผ่านทางการบริโภคน้ำใต้ดินอาจเป็นอันตรายถึงแก่ชีวิตได้ ดังนั้นจึงมีความจำเป็นต้องพัฒนาเทคโนโลยีในการฟื้นฟูน้ำใต้ดินที่ปนเปื้อนสารโพโรฟโนฟอส

สำหรับเทคโนโลยีที่ใช้ในการกำจัดสารตกค้างในธรรมชาติที่นิยมใช้มากวิธีการหนึ่ง คือ วิธีการทางชีวภาพ โดยงานวิจัยในอดีตได้ประยุกต์ใช้กระบวนการพื้นฟูทางชีวิทยา (bioremediation) ซึ่งเป็นการใช้จุลินทรีย์ในการกำจัดสารกำจัดศัตรูพืชตกค้างหลายชนิด โดยมีทั้งการใช้จุลินทรีย์ดังกล่าวโดยตรง และเพิ่มประสิทธิภาพการกำจัดสารด้วยการเติมเซลล์ (cell bioaugmentation) กล่าวคือ เป็นการเพิ่มเซลล์จุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการกำจัดสารพิษในพื้นที่ปนเปื้อน หรือปรับปรุงความสามารถในการกำจัดสารตกค้างด้วยกระตุ้นทางชีวภาพ (biostimulation) โดยการเติมสารอาหารส่งผลให้เกิดเมตาโบลิซึมร่วม (co-metabolism) และเพิ่มประสิทธิภาพในการย่อยสลายสารตกค้าง

จนถึงปัจจุบันยังไม่มีการศึกษาการพื้นฟูน้ำใต้ดินที่ปนเปื้อนจากสารโพเรฟิโนฟอส และจากข้อมูลข้างต้นนี้บ่งชี้ได้ว่าการประยุกต์ใช้เทคโนโลยีการเติมเซลล์และการกระตุ้นทางชีวภาพมีศักยภาพสำหรับการกำจัดสารโพเรฟิโนฟอสตกค้างจริงเป็นที่มาของงานวิจัยนี้ โดยงานวิจัยนี้มีเป้าหมายเพื่อพัฒนาเทคโนโลยีการพื้นฟูน้ำใต้ดินที่ปนเปื้อนสารโพเรฟิโนฟอสด้วยกระบวนการทางชีวภาพเชิงปรับปรุงตามแนวทางกระบวนการเติมเซลล์ร่วมกับการกระตุ้นทางชีวภาพ การศึกษานี้มีพื้นที่ศึกษาณ ตำบลหัวเรือ อำเภอเมือง จังหวัดอุบลราชธานี ซึ่งเป็นพื้นที่ปลูกพริกขนาดใหญ่ที่สุดในประเทศไทย โดยศึกษาครอบคลุมตั้งแต่การคัดแยกจุลินทรีย์จากดินที่ปนเปื้อนสารโพเรฟิโนฟอสในแปลงปลูกพริก การระบุสายพันธุ์จุลินทรีย์ การเติมจุลินทรีย์ดังกล่าวเพื่อกำจัดสารโพเรฟิโนฟอส การพัฒนาการย่อยสลายสารโพเรฟิโนฟอสโดยใช้หลักการกระตุ้นทางชีวภาพ รวมทั้งการสาหริთการพื้นฟูน้ำใต้ดินด้วยเทคโนโลยีการเติมเซลล์ที่ถูกกระตุ้นที่พัฒนาขึ้น ผลที่ได้จากการวิจัยนี้สามารถต่อยอดพัฒนาให้จริงได้ในพื้นที่ศึกษา รวมทั้งยังสามารถขยายผลเพื่อใช้ในการกำจัดสารโพเรฟิโนฟอสในพื้นที่ปนเปื้อนอื่น หรือเป็นแนวทางในการพัฒนาใช้สำหรับกำจัดสารปนเปื้อนชนิดอื่น ๆ ได้ต่อไป

วัตถุประสงค์

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์หลัก คือ เพื่อพัฒนาวิธีกำจัดสารกำจัดศัตรูพืชโพเรฟิโนฟอสตกค้างในน้ำใต้ดิน โดยใช้วิธีการทางชีวิทยาตามแนวทางการเติมเซลล์ที่ถูกกระตุ้น โดยมีวัตถุประสงค์จำเพาะคือ

- 1) เพื่อคัดแยกกลุ่มจุลินทรีย์และระบุสายพันธุ์ที่สามารถย่อยสลายสารโพเรฟิโนฟอส
- 2) เพื่อศึกษาการย่อยสลายสารโพเรฟิโนฟอสด้วยการเติมจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้
- 3) เพื่อการปรับปรุงการย่อยสลายสารโพเรฟิโนฟอสโดยใช้กระบวนการกระตุ้นทางชีวภาพ
- 4) เพื่อสาหริთการพื้นฟูน้ำใต้ดินที่ปนเปื้อนสารโพเรฟิโนฟอสโดยใช้กระบวนการทางชีวภาพเชิงปรับปรุงตามหลักการเติมเซลล์ที่ถูกกระตุ้น

วิธีดำเนินการวิจัย

งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาในระดับห้องปฏิบัติการ โดยทดลองที่ภาควิชาวิศวกรรมเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี และภาคชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย มีการเก็บข้อมูลและตัวอย่างดินจากแปลงปลูกพริก ตำบลหัวเรือ อำเภอเมือง จังหวัดอุบลราชธานี การดำเนินงานแบ่งออกเป็น 5 ช่วง คือ 1) การศึกษาและรวบรวมข้อมูลที่เกี่ยวข้อง โดยขั้นตอนนี้เป็นการรวบรวมข้อมูลทฤษฎี การงานวิจัยที่เกี่ยวข้องในอดีต 2) การออกแบบการทดลอง ขั้นตอนนี้เป็นการวางแผนและออกแบบการทดลอง โดยมุ่งเน้นให้ออกแบบให้ครอบคลุม วัตถุประสงค์ของการศึกษาทั้งหมด และมีชุดเปรียบเทียบเพื่อสามารถบ่งชี้ความเชื่อมั่นของผลการศึกษาได้ 3) การทดลองและการอภิปรายผล ขั้นตอนนี้เป็นการทดลองตามแผนการที่วางไว้ และวิเคราะห์ผลการศึกษา คำนวนหาค่าจลนพลศาสตร์ 4) สรุปผลการศึกษา ขั้นตอนนี้เป็นการสรุปผลการศึกษาทั้งหมด และเสนอแนะแนวทางในการศึกษาต่อในอนาคต และ 5) การเผยแพร่ผลงานและการประยุกต์ใช้ในอนาคต ผลการศึกษานี้จะได้นำเสนอให้ชุมชน นอกจากนี้ผลการศึกษายังจะได้รับการเผยแพร่ในวงการวิชาการผ่านทางการประชุมวิชาการ หรือบทความวิจัยในวารสารวิชาการได้ต่อไป

การทดลองแบ่งออกเป็น 3 ขั้นตอน ดังแสดงได้ดังรูปที่ 1 ดังนี้ 1) การคัดแยกกลุ่มจุลินทรีย์ สำหรับการเติมเซลล์และศึกษาการย่อยสลายสารโพร์ฟิโนฟอสของจุลินทรีย์ที่ถูกเติม ในขั้นตอนนี้ แยกภาระงานออกเป็น 2 ขั้นตอนหลัก คือ การคัดแยกกลุ่มจุลินทรีย์จากดินที่มีการปนเปื้อนสารโพร์ฟิโนฟอส และศึกษาลักษณะการย่อยสลายสารโพร์ฟิโนฟอสของกลุ่มจุลินทรีย์ดังกล่าว (ครอบคลุม จลนพลศาสตร์การเจริญเติบโตและการย่อยสลายของสาร) และจากนั้นในขั้นตอนต่อมาจึงคัดแยก เชื้อจุลินทรีย์บริสุทธิ์เพื่อบรรบุลักษณะของกลุ่มจุลินทรีย์ 2) การศึกษาการกระตุ้นการย่อยสลายสารโพร์ฟิโนฟอสโดยใช้กระบวนการเมตาโบลิซึมร่วม ในขั้นตอนนี้แยกภาระงานออกเป็น 2 ขั้นตอนหลัก คือ การศึกษาหาสารอาหารร่วมที่ส่งเสริมให้เกิดกระบวนการเมตาโบลิซึมร่วมได้ โดยในการศึกษา ครอบคลุมผลต่อการเจริญเติบโตของกลุ่มจุลินทรีย์และความสามารถในการย่อยสลายสาร และคัดเลือกสารอาหารร่วมที่เหมาะสม จากนั้นศึกษาความสัมพันธ์ของความเข้มข้นสารอาหารร่วมและสารโพร์ฟิโนฟอสในการเกิดกระบวนการเมตาโบลิซึมร่วม 3) การสาหร่ายการพื้นพูน้ำใต้ดินที่ปนเปื้อนสารโพร์ฟิโนฟอสตามหลักการเติมเซลล์ที่ถูกกระตุ้น ในขั้นตอนนี้เป็นการสาหร่ายการกำจัดสารโพร์ฟิโนฟอสในแบบจำลองน้ำใต้ดิน ที่มีอัตราการไหลแตกต่างกัน การศึกษาเติมจุลินทรีย์และสารอาหารร่วม โดยอ้างอิงจากผลในขั้นตอนที่ผ่านมา โดยในการศึกษาครอบคลุมการย่อยสลายสารและวิถีของการย่อยสลาย โดยในขั้นตอนนี้จะได้ศึกษาทั้งเปรียบเทียบ 1) การเติมเซลล์ 2) การเติมเซลล์ที่ถูกกระตุ้น และ 3) ชุดควบคุม (ไม่ได้ทั้งเซลล์และสารอาหารร่วม) ณ อัตราการไหลของน้ำใต้ดินต่าง ๆ

Part 1: Enrichment of bioaugmented profenofos-degrading mixed cultures (PFMC)

Enrichment of bioaugmented profenofos-degrading mixed cultures (PFMC)

- To enrich PFMC from contaminated soil
- To study PFMC growth
- To study profenofos degradation kinetics by PFMC

Characterization of bioaugmented PFMC

- To isolate pure cultures from PFMC
- To test profenofos-degrading ability
- To identify 16S rDNA of isolates
- To determine profenofos degradation kinetics by selected isolates

Part 2: Optimization of PFMC stimulated bioaugmentation for profenofos degradation

Determination of potential co-substrate for biostimulation

- To study PFMC growth in presence of sodium succinate, sodium acetate, and glucose
- To examine profenofos degradation in presence of sodium succinate, sodium acetate, and glucose

Optimization of potential co-substrate for biostimulation

- To study PFMC growth in presence of selected co-substrate at different concentrations
- To examine profenofos degradation in presence of selected co-substrate at different concentrations

Part 3: Demonstration of profenofos bioremediation by stimulated PFMC bioaugmentation

- To investigate profenofos degradation under selected conditions (only bioaugmentation and stimulated bioaugmentation) at different groundwater flow rates

รูปที่ 1 แนวคิดงานวิจัย

ผลการวิจัย

ผลการคัดกลุ่มจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการกำจัดสารโพร์ฟิโนฟอส

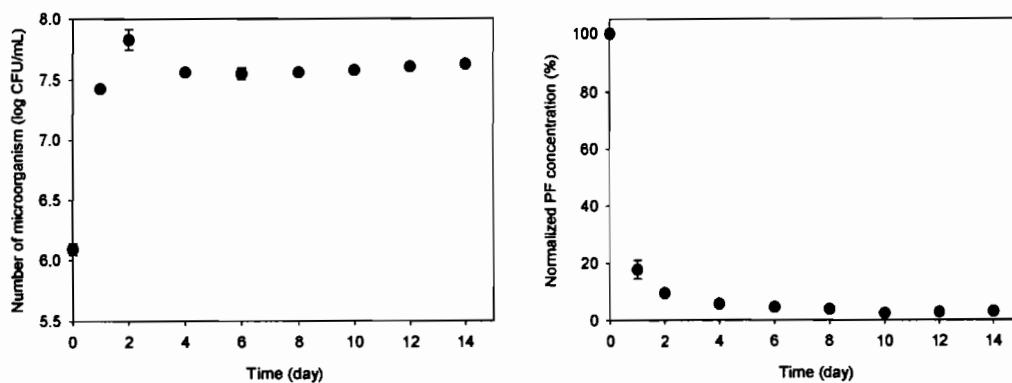
1) ผลการศึกษาการคัดกลุ่มจุลินทรีย์และลักษณะของกลุ่มจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้

การคัดกลุ่มจุลินทรีย์ (mixed cultures) จากดิน มีวัตถุประสงค์เพื่อคัดกลุ่มจุลินทรีย์ที่ย่อยสารโพร์ฟิโนฟอสได้ ซึ่งกระทำโดยการคัดแยกจุลินทรีย์โดยวิธีถ่ายเชื้อเป็นจำนวน 5 ครั้ง (1 ครั้ง ใช้เวลาในการปรับสภาพ 2 สัปดาห์) สภาวะที่ใช้ในการคัดกลุ่มจุลินทรีย์ คือ ที่อุณหภูมิ 30°C พีเอช 7 และเป็นสภาพที่มีออกซิเจน (aerobic condition) ซึ่งเป็นสภาพที่ใกล้เคียงกับสภาพแวดล้อมในพื้นที่เกษตรกรรมที่ปนเปื้อนสารกำจัดศัตรูพืชโพร์ฟิโนฟอสจริง เมื่อพิจารณา สภาวะทดลองกลุ่มจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้จัดเป็นจุลินทรีย์ในกลุ่มเยอโรโโทรฟ (heterotroph) ซึ่งใช้สารโพร์ฟิโนฟอสเป็นแหล่งสารคาร์บอนเดียว (sole carbon source) ได้

จากการศึกษาลักษณะทางกายภาพของกลุ่มจุลินทรีย์ที่ย่อยสารโพร์ฟิโนฟอส พบว่า กลุ่มจุลินทรีย์ตั้งกล่าวมีความหลากหลายทางชีวภาพ (biodiversity) ซึ่งบ่งชี้ได้ว่ามีจุลินทรีย์หลายชนิดสามารถทนสารโพร์ฟิโนฟอสได้ อย่างที่ทราบกันทั่วไปว่ากลุ่มจุลินทรีย์สามารถทำงานได้ดีกว่า จุลินทรีย์สายพันธุ์เดียวในสภาพธรรมชาติ โดยยิ่งมีความหลากหลายมากยิ่งทำให้มีเสถียรภาพสูง ตามมา ดังนั้นสามารถกล่าวได้ว่ากลุ่มจุลินทรีย์ที่คัดได้มีศักยภาพในการใช้ประโยชน์ได้จริงต่อไป

2) จนพลศาสตร์ของการเจริญเติบโตและการย่อยสารโพร์ฟิโนฟอส

ผลการศึกษาการเจริญเติบโตของกลุ่มจุลินทรีย์ที่ย่อยสารโพร์ฟิโนฟอส พบว่ากราฟ การเจริญเติบโตของจุลินทรีย์แสดงดังภาพที่ 1 กล่าวคือ ในระหว่างการทดลอง 14 วัน กลุ่มจุลินทรีย์ มีการเจริญเติบโตเป็น 2 ระยะ คือ ระยะเพิ่มจำนวน (log phase) และระยะคงตัว (stationary phase) เกิดขึ้นในช่วงเวลาที่ 0-4 วัน และตั้งแต่ 4 วันเป็นต้นไป ตามลำดับ ส่วนการศึกษา ความสามารถในการย่อยสารโพร์ฟิโนฟอส พบว่าความเข้มข้นของสารโพร์ฟิโนฟอสลดลงอย่างรวดเร็วในช่วงการทดลอง 2 วันแรก และที่เวลา 4 ถึง 14 วัน ความเข้มข้นของสารโพร์ฟิโนฟอสค่อยลดลงจนเกือบคงที่ตั้งภาพที่ 1

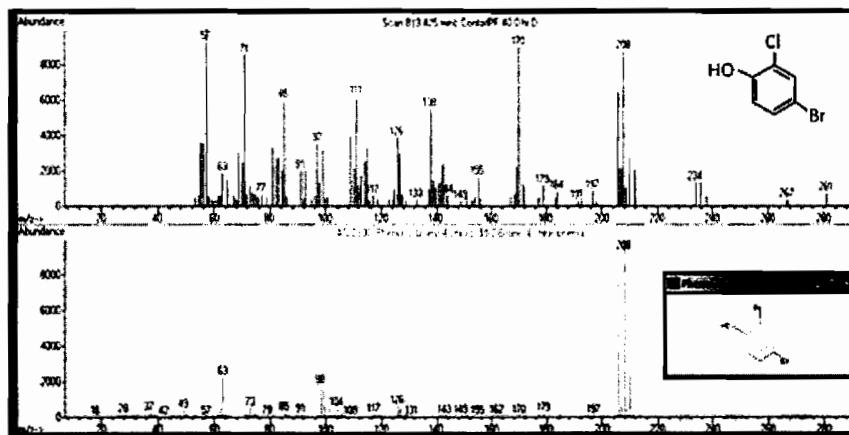


ภาพที่ 1 การเจริญเติบโตของกลุ่มจุลินทรีย์และการย่อยสารโพร์ฟิโนฟอส

กลุ่มจุลินทรีย์ที่ย่อยสลายสารโพร์ฟิโนฟอสมีความสามารถในการย่อยสลายร้อยละ 97 (ความเข้มข้นเริ่มต้น 22 mg/L) ซึ่งความสามารถในการย่อยสลายสารโพร์ฟิโนฟอสที่เกิดขึ้นมีความสามารถคล้องกับการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ เมื่อพิจารณาข้อมูลการเจริญเติบโตของกลุ่มจุลินทรีย์ที่ย่อยสลายสารโพร์ฟิโนฟอสและลักษณะการย่อยสลายสารในพบว่าจนพลศาสตร์การเจริญเติบโตและการย่อยสลายสารโพร์ฟิโนฟอสเป็นไปตามปฏิกิริยาอันดับที่ 1 กล่าวคือ อัตราการเจริญเติบโตและการย่อยสลายสารโพร์ฟิโนฟอสแปรผันตรงกับความเข้มข้นของสารโพร์ฟิโนฟอสตั้งต้น โดยสามารถสรุปค่าคงที่จนพลศาสตร์การเจริญเติบโตและการกำจัดสารโพร์ฟิโนฟอส เท่ากับ 0.02 และ 0.006 hr^{-1} ตามลำดับ และมีอัตราการย่อยสลายสารโพร์ฟิโนฟอส เท่ากับ 3.0 mg/L/d

3) ผลการวิเคราะห์วิถีการย่อยสลายสารโพร์ฟิโนฟอสโดยกลุ่มจุลินทรีย์เบื้องต้น

สำหรับการวิเคราะห์วิถีการย่อยสลายสารโพร์ฟิโนฟอสเบื้องต้นเป็นการศึกษาเพื่อพิจารณาความเป็นไป (fate) ของสารตั้งต้นในธรรมชาติ ซึ่งการศึกษาระที่ควบคู่ไปกับการติดตามความเข้มข้นของสารโพร์ฟิโนฟอสคงเหลือในชุดทดลอง โดยการศึกษานี้วิเคราะห์ผลโดยใช้เครื่องจีซีเอ็ม เอส (GC-MS, gas chromatography-mass spectrometry) ในการระบุสารมัรยันตร์ (intermediate) ต่าง ๆ ผลการศึกษาพบว่าในสารละลายมาตรฐานและชุดควบคุม (ไม่มีจุลินทรีย์) ตรวจสารบีซีพี (4-bromo-2-cholorophenol; BCP) ซึ่งมีโครงสร้างดังภาพที่ 2 ในชุดทดลองนี้ไม่มีเซลล์จุลินทรีย์ดังนั้นสามารถระบุได้ว่าสารโพร์ฟิโนฟอสทำปฏิกิริยากับน้ำ (hydrolysis) แล้วแตกตัวเป็นสารบีซีพี แต่ผลจากการวิจัยนี้พบว่าเมื่อติดตามความเป็นไปของสารอย่างต่อเนื่องพบว่าปริมาณสารบีซีพีคงที่ ดังนั้นผลการศึกษานี้ชัดได้ว่ากระบวนการไฮโดรไลซิสทำให้สารโพร์ฟิโนฟอสเพียงบางส่วนแตกตัวเป็นเหตุให้สารโพร์ฟิโนฟอสมีความเข้มข้นลดลงเล็กน้อย นอกจากนี้ยังพบว่ากระบวนการแตกตัวนี้ไม่ส่งทำให้สารบีซีพีแตกตัวได้



ภาพที่ 2 โครงสร้างสารบีซีพีและการเปรียบเทียบรูปแบบแมสสเปกตรากับฐานข้อมูล

สำหรับผลจากชุดทดลองที่ได้เติมกลุ่มจุลินทรีย์พบว่าการทดลองที่ระดับความเข้มข้นเริ่มต้นของสารโพร์ฟินฟอสไม่สูงนัก (20 mg/L) การตรวจติดตามไม่พบสารบีซีพี แต่เมื่อทดลองที่ความเข้มข้นเริ่มต้นสูงมากขึ้น (40 mg/L) จึงพบสารบีซีพี จากผลการทดลองในขั้นตอนนี้พบการสะสมของสารบีซีพี (ทำให้ตรวจพบได้) ดังนั้นสามารถกล่าวได้ว่ากลุ่มจุลินทรีย์ที่คัดได้ในการศึกษานี้สามารถย่อยสลายสารโพร์ฟินฟอสเป็นสารบีซีพีได้ แต่เมื่อความเข้มข้นของสารโพร์ฟินฟอสสูงจึงทำให้เอนไซม์ไม่สมดุลกับปริมาณสารดังกล่าวจึงพบการสะสมของสารบีซีพี ผลดังกล่าวเป็นไปในทิศทางเดียวกับงานวิจัยในอดีตที่ระบุว่า *Pseudomonas aeruginosa* strain OW สามารถย่อยสลายสารโพร์ฟินฟอสเป็นสารบีซีพี เช่นกัน ทั้งนี้ผลดังกล่าวนี้ยังสามารถระบุได้ว่าเอนไซม์ที่ผลิตขึ้นในกระบวนการย่อยสลายนี้เป็นเอนไซม์ประเภทไฮโดรเลสเจิงได้สารมาร์ยันตร์ขั้นต้นเป็นสารบีซีพี นอกจากนี้ยังพบว่าเมื่อเวลาในการทดลองเพิ่มมากขึ้นสารบีซีพีมีปริมาณลดลงจนไม่สามารถตรวจพบได้ แต่ตรวจพบสารมาร์ยันตร์อื่น ๆ ซึ่งได้แก่ สาร 2,4-di-tert-butyl phenol และ 3-methoxy phenol

ผลการคัดแยกจุลินทรีย์บริสุทธิ์และการศึกษาลักษณะการย่อยสลายสารโพร์ฟินฟอส

1) ผลการคัดแยกจุลินทรีย์บริสุทธิ์และลักษณะของจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้

การศึกษาลักษณะของกลุ่มจุลินทรีย์ได้กระทำเพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานประกอบการใช้ประโยชน์ของกลุ่มจุลินทรีย์ต่อไป โดยการศึกษาครอบคลุมการคัดสายพันธุ์ (isolation) ชนิดหลักโดยวิธีการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง การระบุลักษณะทางกายภาพ และการระบุสายพันธุ์จาก 16S rRNA ด้วยวิธีการทางชีวโมโนเลกุล จากกลุ่มจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายสารโพร์ฟินฟอสที่คัดแยกได้ (กำหนดชื่อเรียกว่า MIX) ภายหลังที่เขียวเชื้อบนอาหารแข็งต่อเนื่องพบว่า MIX มีจุลินทรีย์หลัก (predominant strain) 3 ชนิด ซึ่งกำหนดชื่อเรียกว่า PF1 PF2 และ PF3 โดยจุลินทรีย์ทั้งสามมีสายพันธุ์และลักษณะทางกายภาพแตกต่างกันดังข้อมูลที่แสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ลักษณะทางกายภาพของ PF1 PF2 และ PF3

ลักษณะ	จุลินทรีย์		
	PF1	PF2	PF3
สีโคโลนี (colony color)	เหลือง	เหลือง	เหลือง
ผิวโคโลนี (colony surface)	เรียบ	ไม่เรียบ	ไม่เรียบ
ขอบโคโลนี (colony edge)	เรียบ	ไม่เรียบ	ไม่เรียบ
ขนาดโคโลนี ณ 24 hr (colony size at 24 hr)	2.0 mm	1.5 mm	1.0 mm
การย้อมแกรม (gram straining)	ลบ	ลบ	ลบ
รูปร่างเซลล์ (cell shape)	แท่งสั้น	แท่งสั้น	แท่งสั้น
สายพันธุ์ (จากการเปรียบเทียบ 16S rRNA ใน GenBank)	<i>Pseudomonas plecoglossicida</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>

จากการศึกษาในอดีตพบว่า *Pseudomonas aeruginosa* strain OW สามารถย่อยสลายสารโพร์ฟินฟอสได้ จุลินทรีย์ดังกล่าวคัดแยกจากดินที่ปนเปื้อนโพร์ฟินฟอสในประเทศจีน ผลจากงานวิจัยนี้พบว่าจุลินทรีย์สายพันธุ์ *Pseudomonas aeruginosa* อีก 2 พันธุ์ ซึ่งคัดแยกจากดินไม่พริกที่ปนเปื้อนสารโพร์ฟินฟอสในประเทศไทยสามารถกำจัดสารโพร์ฟินฟอสได้เช่นกัน นอกเหนือจากนี้ยังมีงานวิจัยในอดีตที่ระบุว่า *Pseudomonas aeruginosa* สามารถย่อยสลายสารกำจัดศัตรูพืชในกลุ่มออร์แกนโนฟอฟอรัสชนิดอื่น เช่น สารคลอร์ไพร์ฟอสได้ เป็นต้น ได้อีกด้วย จากข้อมูลข้างต้นสามารถกล่าวได้ว่า *Pseudomonas aeruginosa* เป็นแบคทีเรียที่คงความสามารถในการกำจัดสารกำจัดศัตรูพืชในกลุ่มออร์แกนโนฟอฟอรัส ซึ่งคาดว่าจุลินทรีย์ดังกล่าวสามารถผลิตเอนไซม์ที่สามารถย่อยสลายสารออร์แกนโนฟอฟอรัส (organophosphorus-degrading enzyme) ได้ แต่งานวิจัยนี้ยังไม่สามารถระบุยืน (gene) ที่ควบคุมการทำงานดังกล่าวได้อย่างชัดเจน ในอนาคตควรมีการศึกษาต่อเนื่องในประเด็นดังกล่าวเพื่อให้ทราบถึงกลไกการกำจัดสารโพร์ฟินฟอสโดยจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้

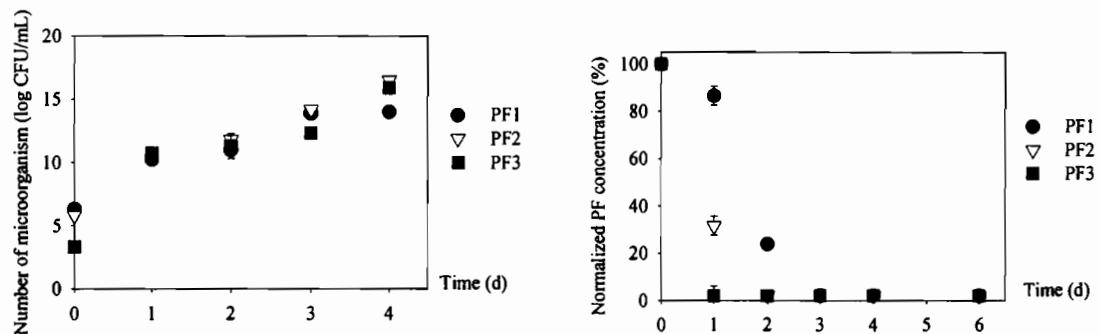
สำหรับสายพันธุ์ *Pseudomonas plecoglossicida* จนถึงปัจจุบันมีเพียงงานวิจัยที่ค้นพบว่าจุลินทรีย์ดังกล่าวสามารถกำจัดสารกำจัดศัตรูพืชไพรีทรอยด์ (pyrethroid) ได้เท่านั้น ผลการศึกษาจากงานวิจัยนี้เป็นการระบุความสามารถของจุลินทรีย์สายพันธุ์ดังกล่าวในการกำจัดสารกำจัดศัตรูพืช ออร์แกนโนฟอฟอรัสเป็นครั้งแรก ดังนั้นในอนาคตจึงควรได้มีการศึกษาต่อเนื่องเกี่ยวกับ *Pseudomonas plecoglossicida* ในการกำจัดสารกำจัดศัตรูพืชต่าง ๆ เพิ่มเติม

2) ผลงานศาสตร์ของการเจริญเติบโตและการย่อยสลายสารโพร์ฟินฟอสด้วยจุลินทรีย์บริสุทธิ์

ผลการศึกษาการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์บริสุทธิ์ทั้งสาม ซึ่งได้แก่ PF1 PF2 และ PF3 มีลักษณะดังภาพที่ 3 คือ ในระยะเวลาทดลอง 4 วัน จุลินทรีย์มีการเจริญเติบโตเพิ่มจำนวนเพิ่มขึ้นมากอย่างต่อเนื่อง โดยเซลล์จุลินทรีย์เพิ่มจำนวนมากถึง 10^{15} CFU/mL เมื่อสิ้นระยะเวลาทดลอง ผลดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้มีความสามารถในการใช้สารโพร์ฟินฟอสเป็นแหล่งคาร์บอนหลักเดียว (sole carbon source) ในการเจริญเติบโตได้เป็นอย่างดี จากผลดังกล่าวเมื่อพิจารณาผลงานศาสตร์การเจริญเติบโตของจุลินทรีย์บริสุทธิ์ พบร่วมกับการเจริญเติบโตเป็นไปตามปฏิกริยาอันดับที่ 1 โดยมีค่าคงที่ปฏิกริยา PF1 PF2 และ PF3 มีค่าคงที่ผลงานศาสตร์การเจริญเติบโตอยู่ระหว่าง $0.08-0.11 \text{ hr}^{-1}$ จากข้อมูลดังกล่าวพบว่าการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์บริสุทธิ์สูงกว่ากลุ่มจุลินทรีย์ 5-6 เท่า ซึ่งผลดังกล่าวอาจเกิดจากการแข่งขันการใช้อาหารระหว่างจุลินทรีย์ต่าง ๆ ในกลุ่มจุลินทรีย์ นอกจากนี้จากการศึกษายังบ่งชี้ได้ว่าจุลินทรีย์ต่างชนิดมีอัตราการเจริญเติบโตแตกต่างกันด้วย โดย PF3 มีอัตราการเจริญเติบโตสูงสุด

ผลการย่อยสลายโพร์ฟินฟอสของจุลินทรีย์บริสุทธิ์ทั้งสาม ซึ่งผลการศึกษาเป็นไปในลักษณะเดียวกันกับการเจริญเติบโต กล่าวคือ สารโพร์ฟินฟอสซึ่งเป็นสารอาหารการรับน้ำดลงอย่างรวดเร็วในเวลาเพียง 2-3 วัน เมื่อพิจารณาอัตราการย่อยสลายสารโพร์ฟินฟอสและร้อยละการกำจัดสารโพร์ฟินฟอส พบร่วมกับจุลินทรีย์บริสุทธิ์ทั้งสามมีอัตราการย่อยสลายสารโพร์ฟินฟอสและร้อยละการกำจัดสารโพร์ฟินฟอสถึง $7.6-19.6 \text{ mg/L/d}$ และ 93-95 ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับผลการทดลองการย่อยสลายสารโพร์ฟินฟอสตามธรรมชาติ (ชุดทดลองควบคุมที่ไม่มีการเติมเซลล์จุลินทรีย์) พบร่วมกับความเข้มข้นของสารโพร์ฟินฟอสคงเหลือสูงกว่าร้อยละ 95 ภายหลังสิ้นสุดการทดลอง (4 วัน) ดังนั้นสามารถชี้ชัดได้ว่าจุลินทรีย์บริสุทธิ์ทั้งสามมีศักยภาพในการย่อยสลายสารโพร์ฟินฟอสสูง

เมื่อพิจารณาจากผลศาสตร์การย่อยสลายสารโพร์ฟีโนฟอสของจุลินทรีย์บริสุทธิ์ พบว่า เป็นไปตามปฏิกิริยาอันดับที่ 1 โดยมีค่าคงที่ค่าคงที่ของผลศาสตร์การเจริญเติบโตอยู่ระหว่าง $0.023\text{--}0.035\text{ hr}^{-1}$ โดยทั่วไปในการพื้นพื้นที่ปั่นเป็นอันดับวิธีการทางชีวภาพกลุ่มจุลินทรีย์ทำงานได้ดีกว่า จุลินทรีย์บริสุทธิ์ เนื่องจากความหลากหลายในกลุ่มจุลินทรีย์ส่งผลให้จุลินทรีย์สามารถทนต่อ สภาพแวดล้อมต่าง ๆ ตลอดจนสามารถเพิ่มเส้นทางวิถีการเปลี่ยนแปลงของสาร (catabolic pathway) ต่าง ๆ แต่ในการศึกษานี้กลับพบว่าจุลินทรีย์บริสุทธิ์ทำงานได้ดีกว่าอาจเนื่องมาจากการ ปรับสภาพจุลินทรีย์ในอาหารที่ใช้ในการศึกษาส่งผลให้มีอัตราการเจริญเติบโตและการย่อยสลายสูง



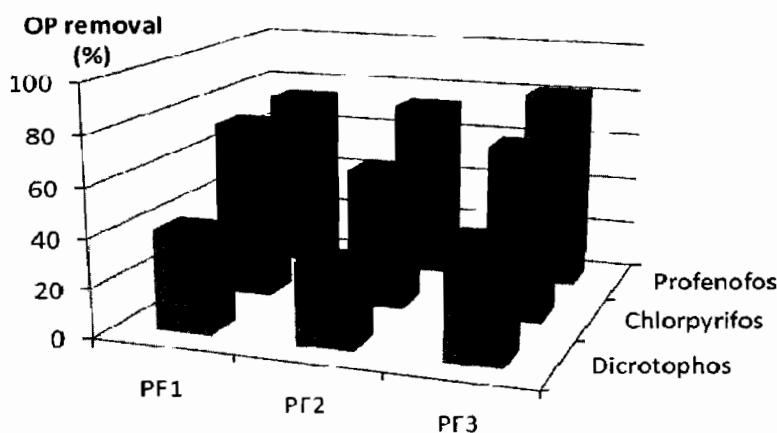
ภาพที่ 3 การเจริญเติบโตของจุลินทรีย์บริสุทธิ์และการย่อยสลายสารโพร์ฟีโนฟอส

3) ผลการศึกษาความเป็นไปได้ในการย่อยสลายสารกำจัดศัตรูพืชօร์แกนโนฟอฟอร์สชนิดอื่น ด้วยจุลินทรีย์บริสุทธิ์

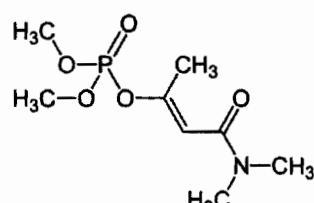
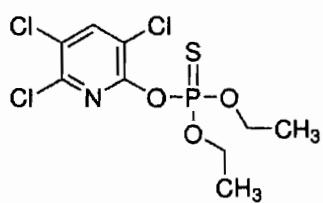
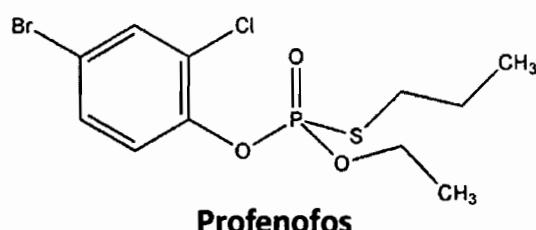
โดยทั่วไปในการใช้สารกำจัดศัตรูในการเกษตรนิยมใช้สารเคมีเกษตรร่วมกันหลายชนิดเพื่อ กำจัดศัตรูพืชที่แตกต่างกันออกไป สำหรับการเพาะปลูกพริกนอกจากมีการใช้สารโพร์ฟีโนฟอสเป็น จำนวนมากแล้ว เกษตรกรยังใช้สารกำจัดศัตรูพืชในกลุ่มօร์แกนโนฟอฟอร์สหลายชนิด จากการ สำรวจพื้นที่เกษตรกรรมพบว่าสารในกลุ่มดังกล่าวที่นิยม ได้แก่ สารโพร์ฟีโนฟอส สารคลอร์ไฟร์ ฟอส (chlorporyrifos) และสารไดโคโรตอฟอส (dichrotophos) จากข้อมูลดังกล่าวนี้จึงมีความเป็นไปได้ ที่อาจมีการปนเปื้อนของสารกำจัดศัตรูพืชดังกล่าวในบริเวณเดียวกับสารโพร์ฟีโนฟอส

งานวิจัยนี้ได้ศึกษาทดลองย่อยสลายสารคลอร์ไฟร์ฟอสและสารไดโคโรตอฟอส เพื่อศึกษาความ เป็นไปได้ในการกำจัดสารดังกล่าวโดยจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้ รวมทั้งบ่งชี้แนวโน้มของอิทธิพลของสาร ดังกล่าวต่อการกำจัดสารโพร์ฟีโนฟอส ผลการทดลองย่อยสลายสารคลอร์ไฟร์ฟอสและสารไดโคโรต อฟอสโดย PF1 PF2 และ PF3 เปรียบเทียบกับการย่อยสลายสารโพร์ฟีโนฟอสโดยจุลินทรีย์ดังกล่าว แสดงไว้ในภาพที่ 4 ผลการทดลองพบว่า PF1 PF2 และ PF3 สามารถย่อยสลายสารกำจัดศัตรูพืชได้ ใกล้เคียงกัน โดยเมื่อมีจุลินทรีย์ดังกล่าวจำนวนเริ่มต้นประมาณ 10^6 CFU/mL และความเข้มข้นของ สารกำจัดศัตรูพืชเริ่มต้น 20 mg/L จุลินทรีย์กำจัดคลอร์ไฟร์ฟอสได้ร้อยละ 57-73 และไดโคโรตอฟอสได้ ร้อยละ 33-47 ในขณะที่จุลินทรีย์กำจัดสารโพร์ฟีโนฟอสได้ร้อยละ 75-82 จากผลดังกล่าวสามารถ ระบุได้อย่างชัดเจนว่าจุลินทรีย์บริสุทธิ์ที่คัดแยกได้จากงานวิจัยนี้สามารถกำจัดสารกำจัดศัตรูพืชกลุ่ม օร์แกนโนฟอฟอร์สได้หลายชนิด

เมื่อพิจารณาโครงสร้างของสารทั้งสาม (ภาพที่ 5) พบร่วมกันว่าสารสารโพเรฟีโนฟอสและสารคลอร์ไพริฟอสเป็นสารออร์แกนิโนฟอสฟอรัสในกลุ่มฟอสฟอริโธไอเดต (phosphorothioate) เช่นกันและมีโครงสร้างคล้ายกัน ในทางตรงกันข้ามสารไดโคโตฟอสเป็นสารในกลุ่มฟอสเฟต (phosphate) ซึ่งโครงสร้างทางเคมีแตกต่างกับสารโพเรฟีโนฟอส ซึ่งผลการย่อยสลายข้างต้นนี้อาจเนื่องมาจากการใกล้เคียงกันของโครงสร้างสารเป็นเหตุให้จุลินทรีย์สามารถกำจัดสารคลอร์ไพริฟอสได้ดีใกล้เคียงกับสารโพเรฟีโนฟอสแม้จะไม่ได้มีการปรับสภาพกับสารคลอร์ไพริฟอสก่อนและเป็นเหตุให้จุลินทรีย์สามารถกำจัดสารไดโคโตฟอสได้ไม่ดีนัก



ภาพที่ 4 การย่อยสลายสารคลอร์ไพริฟอสและสารไดโคโตฟอสโดย PF1 PF2 และ PF3



ภาพที่ 5 โครงสร้างสารโพเรฟีโนฟอส สารคลอร์ไพริฟอส และสารไดโคโตฟอส

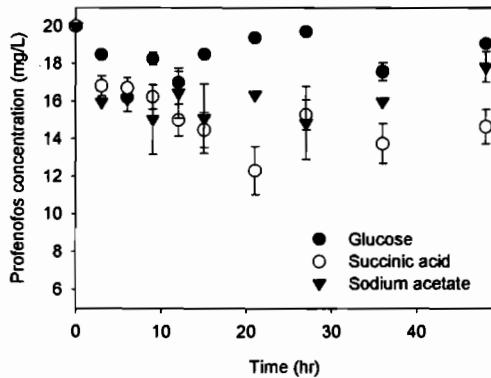
นอกจากนี้มีการศึกษาในอดีตที่พบว่าการย่อยสลายสารไดโครโตฟอสต้องผ่านกระบวนการเมธิลเลชัน (methylation) เป็นสารโนโนโกรโตฟอสก่อนกระบวนการไฮโดรไลซ์ในขณะที่สารคลอร์ไฟฟอสสามารถถูกย่อยสลายครั้งแรก (primary degradation) ด้วยกระบวนการไฮโดรไลซ์ได้ เมื่อนสารโพร์ฟิโนฟอส แต่อย่างไรก็ตามโดยภาพรวม PF1 PF2 และ PF3 สามารถกำจัดสารสารออร์แกโนฟอสฟอร์สทั้งสามได้ดี ดังนั้นหากประยุกต์ใช้จุลินทรีย์นี้จริงคาดว่าจุลินทรีย์เหล่านี้จะสามารถทบทวนต่อสภาวะที่มีสารปนเปื้อนร่วมได้ รวมทั้งยังอาจกำจัดสารปนเปื้อนร่วมบางชนิดด้วย

ผลการกระบวนการย่อยสลายสารโพร์ฟิโนฟอสโดยใช้กระบวนการเมตาโบลิซึมร่วม

1) ผลการศึกษาแหล่งการบอนร่วมที่ส่งเสริมกระบวนการเมตาโบลิซึมร่วม

การศึกษาในขั้นตอนนี้มุ่งเน้นเพื่อคัดเลือกสารที่เป็นแหล่งการบอนร่วมที่เหมาะสมในการส่งเสริมการย่อยสลายสารโพร์ฟิโนฟอสโดยกลุ่มจุลินทรีย์ที่คัดได้ ซึ่งสารที่เลือกในการศึกษารังนี้เป็นสารที่มีการใช้ในกระบวนการเมตาโบลิซึมร่วมทั่วไป ซึ่งได้แก่ กลูโคส (Glucose , $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$) กรดซัคซินิก (succinic acid , $\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_4\text{Na}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) โซเดียมอะซิเตอท (sodium acetate , $\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2\text{Na}$) ในการทดลองควบคุมปริมาณการบอนและสารโพร์ฟิโนฟอส เท่ากับ 500 และ 20 mg/L ตามลำดับ ผลการทดลองการเจริญเติบโตของกลุ่มจุลินทรีย์ทั้ง 3 ชุดทดลอง คือ ชุดทดลองที่มีการเติมกลูโคส กรดซัคซินิก และโซเดียมอะซิเตอท มีการเจริญเติบโตของกลุ่มจุลินทรีย์ในลักษณะคล้ายกัน กล่าวคือ กลุ่มจุลินทรีย์มีการเจริญเติบโตเพิ่มจำนวนเพิ่มขึ้นมากในช่วงชั่วโมงที่ 6 ถึงชั่วโมงที่ 20 จากนั้นจำนวนจุลินทรีย์จึงเริ่มคงที่ โดยภายในชั่วโมงที่ 48 ชั่วโมง ชุดที่มีการเติมกลูโคสมีการเจริญของกลุ่มจุลินทรีย์สูงกว่า 10^{18} CFU/mL รองลงมาเป็นชุดที่เติมโซเดียมอะซิเตอทและชุดที่เติมกรดซัคซินิก เท่ากับ 10^{17} และ 10^{16} CFU/mL ตามลำดับ ซึ่งเมื่อพิจารณาจากผลศาสตร์การเจริญเติบโตของกลุ่มจุลินทรีย์พบว่าการเจริญเติบโตเป็นไปตามปฏิกิริยาอันดับหนึ่งซึ่งมีค่าคงที่ $0.49-0.62 \text{ hr}^{-1}$ ซึ่งสูงกว่าการเจริญเติบโตในชุดควบคุมที่ไม่มีการเติมแหล่งการบอนมาก

สำหรับผลการศึกษาปริมาณสารโพร์ฟิโนฟอสแสดงดังภาพที่ 6 สารโพร์ฟิโนฟอสลดลงอย่างรวดเร็วใน 10-20 ชั่วโมงแรกจากนั้นความเข้มข้นของสารโพร์ฟิโนฟอสจึงเริ่มคงที่ โดยเมื่อสิ้นสุดการทดลอง (48 ชั่วโมง) ชุดที่มีการเติมกรดซัคซินิก และชุดที่เติมโซเดียมอะซิเตอท สามารถลดความเข้มข้นของสารได้ร้อยละ 30 ส่วนชุดที่มีการเติมกลูโคสมีความสามารถลดสารโพร์ฟิโนฟอสได้น้อยที่สุด คือ ร้อยละ 10 จากผลการทดลองดังกล่าวจะเห็นได้ว่าแหล่งการบอนร่วมต่างชนิดมีผลต่อการย่อยสลายสารโพร์ฟิโนฟอสอย่างชัดเจน ผลการทดลองดังกล่าวเป็นไปในทิศทางเดียวกับงานวิจัยในอดีตที่พบว่า แบคทีเรียหลายสายพันธุ์นิยมใช้กรดซัคซินิกและโซเดียมอะซิเตอทซึ่งเป็นสารประกอบของกรดไขมันสายสั้น (short-chain fatty acid) เป็นแหล่งการบอนมากกว่ากลูโคสซึ่งเป็นคาร์โบไฮเดรตพื้นฐาน (simple carbohydrate) จลนพลศาสตร์การย่อยสลายสารโพร์ฟิโนฟอสในชุดที่มีการเติมแหล่งการบอนต่าง ๆ มีค่าคงที่ เท่ากับ $0.001-0.008 \text{ hr}^{-1}$ จากผลดังกล่าวนี้ปั่งชี้ได้อย่างชัดเจนว่ากรดซัคซินิกช่วยเร่งการย่อยสลายสารโพร์ฟิโนฟอสอย่างชัดเจน



ภาพที่ 6 การย่อยสลายสารโพร์ฟินฟอสโดยกลุ่มจุลินทรีย์
ภายใต้สภาวะที่มีแหล่งคาร์บอนร่วมต่างชนิด

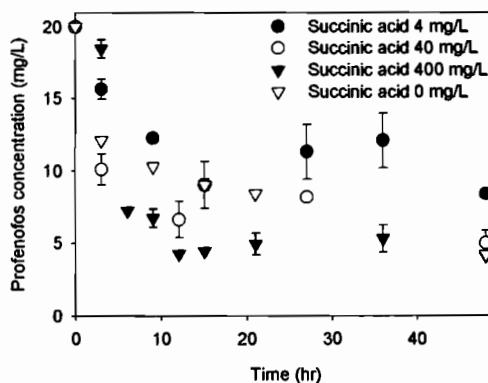
- 2) ผลการศึกษาความสัมพันธ์ของความเข้มข้นของสารอาหารร่วมและสารโพร์ฟินฟอสในกระบวนการเมตาโบลิซึมร่วม

การศึกษาในขั้นตอนนี้จึงนับถือการศึกษาอิทธิพลความเข้มข้นของกรดชักซินิกที่ใช้เป็นแหล่งคาร์บอน โดยศึกษาที่ความเข้มข้น 4, 40 และ 400 mg-Carbon/L และมีสารโพร์ฟินฟอสเริ่มต้น 20 mg/L เปรียบเทียบกับชุดทดลองที่ไม่ได้เติมกรดชักซินิก ผลการทดลองพบว่ากลุ่มจุลินทรีย์จากชุดการทดลองที่มีการเติมแหล่งคาร์บอนร่วมความเข้มข้นต่าง ๆ มีการเจริญเติบโตในลักษณะเดียวกัน กล่าวคือ กลุ่มจุลินทรีย์เพิ่มจำนวนขึ้นมากในช่วง 21 ชั่วโมงแรก จากนั้นการเจริญเติบโตจึงเริ่มคงที่ เมื่อสิ้นสุดการทดลอง (48 ชั่วโมง) พบว่ากลุ่มจุลินทรีย์เพิ่มจำนวนจากประมาณ 6 เป็น 16 logCFU/mL ค่าคงที่จันพลศาสตร์การเจริญเติบโต เท่ากับ $0.42-0.50 \text{ hr}^{-1}$ จากผลดังกล่าวสามารถกล่าวได้ว่าการเติมแหล่งคาร์บอนร่วมส่งผลให้การเจริญเติบโตเพิ่มขึ้นไม่มากนัก รวมทั้งความเข้มข้นแหล่งคาร์บอนไม่มีผลต่อการเจริญเติบโตของกลุ่มจุลินทรีย์อย่างชัดเจน

สำหรับการย่อยสลายสารโพร์ฟินฟอสพบว่าสารโพร์ฟินฟอสลดลงอย่างรวดเร็วใน 12 ชั่วโมงแรก จากนั้นจึงเริ่มคงที่ (ภาพที่ 7) โดยพบว่าภายหลังสิ้นสุดการทดลอง (48 hr) ชุดทดลองที่มีการเติมแหล่งคาร์บอนร่วม 0, 4, 40 และ 400 mg-Carbon/L สามารถย่อยสลายสารโพร์ฟินฟอสได้ กว่าร้อยละ 80 อัตราการกำจัดสาร เท่ากับ $7.90-31.46 \text{ mg/L/d}$ ซึ่งเมื่อพิจารณาจันพลศาสตร์การย่อยสลายสารโพร์ฟินฟอสพบว่าการย่อยสลายเป็นไปตามปฏิกิริยาอันดับหนึ่ง โดยมีค่าคงที่ เท่ากับ $0.01-0.06 \text{ hr}^{-1}$ โดยในชุดทดลองที่ให้ผลดีที่สุด (ชุดทดลองที่เติมแหล่งคาร์บอนร่วม 400 mg/L) การย่อยสลายมีค่าคงที่เพิ่มขึ้นถึง 6 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับชุดที่ไม่ได้เติมแหล่งคาร์บอนร่วม

ผลการศึกษาซึ่งให้เห็นอย่างชัดเจนว่าเมื่อเติมแหล่งคาร์บอนร่วมส่งเสริมให้การย่อยสลายเร็วขึ้นอย่างชัดเจน โดยเมื่อความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนร่วมเพิ่มมากการย่อยสลายสารโพร์ฟินฟอสยังเพิ่มขึ้น สำหรับกลไกของกระบวนการเมตาโบลิซึมร่วม (co-metabolism) จากผลจากการศึกษานี้พบว่าสารโพร์ฟินฟอสแม้เป็นสารปลอมปนแต่ก็เป็นสารอาหารที่ใช้ในการเจริญเติบโตได้ เป็นเหตุให้พบว่าในกรณีที่เติมแหล่งคาร์บอนร่วม (กรดชักซินิก) ส่งผลให้กลุ่มจุลินทรีย์เจริญเติบโตเพิ่มมากขึ้น เพียงเล็กน้อย ดังนั้นจึงอาจกล่าวได้ว่าในกรณีนี้คาดว่าแหล่งคาร์บอนร่วมเหล่านี้ยังนำกระบวนการเมตาโบลิซึมของสารโพร์ฟินฟอสด้วยกลุ่มจุลินทรีย์ แต่อย่างไรก็ตามผลการศึกษานี้ยังมิอาจระบุการ

เห็นยานำวิถีการย่อยสลายสารโพร์ฟินฟอสอย่างชัดเจนได้ ในอนาคตควรมีการศึกษาในประเด็นนี้ เพื่อให้ทราบความเป็นไป (fate) ของสารในสิ่งแวดล้อมอันจะเป็นประโยชน์ต่อการประยุกต์ใช้ในการพื้นฟูพื้นที่ป่าเปื้อนต่อไป



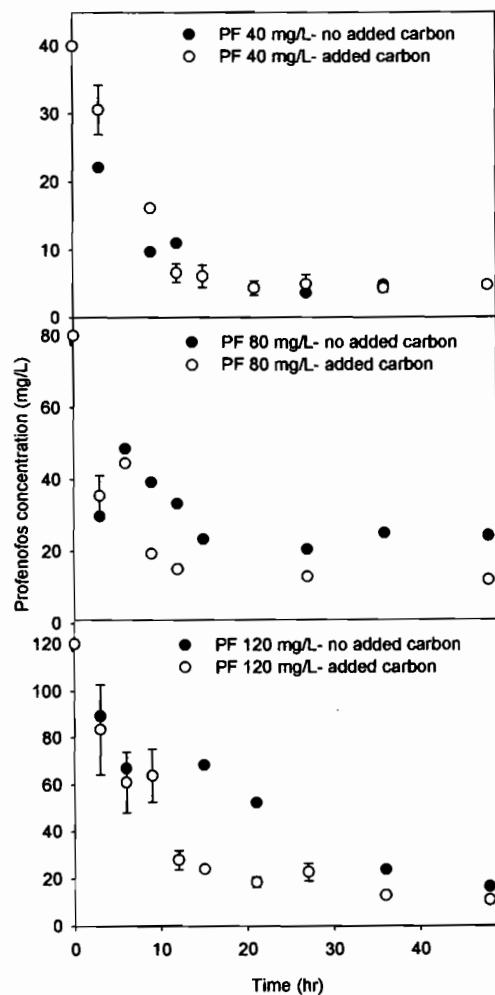
ภาพที่ 7 การย่อยสลายสารโพร์ฟินฟอสของกลุ่มจุลินทรีย์ใน
ภายใต้สภาวะที่มีแหล่งคาร์บอนร่วมต่างความเข้มข้น

จากการศึกษาอิทธิพลความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนร่วมในหัวข้อที่ผ่านมาพบว่ากรดซัคซินิกที่ความเข้มข้น 400 mg-Carbon/L มีประสิทธิภาพในการช่วยสนับสนุนการย่อยสลายสารโพร์ฟินฟอสสูงที่สุด ดังนั้นจึงเลือกใช้กรดซัคซินิกที่ความเข้มข้นดังกล่าวเป็นแหล่งคาร์บอนร่วม สำหรับการศึกษาอิทธิพลความเข้มข้นของสารโพร์ฟินฟอสเริ่มต้น (40 80 และ 120 mg/L) เปรียบเทียบระหว่างชุดทดลองที่เติมและไม่ได้เติมแหล่งคาร์บอนร่วม ผลการทดลองพบว่ากลุ่มจุลินทรีย์จากชุดการทดลองที่มีสารโพร์ฟินฟอสความเข้มข้นต่าง ๆ มีการเจริญเติบโตในลักษณะเหมือนผลข้างต้น ความเข้มข้นของสารโพร์ฟินฟอสส่งผลต่อการเจริญเติบโตบ้างแต่ไม่ชัดเจนนักเช่นกัน นอกจากนี้ยังพบว่าแม้สารโพร์ฟินฟอสเป็นสารปลอมปนพิษ (toxic xenobiotics) แต่ถึงแม้ความเข้มข้นเริ่มต้นเพิ่มขึ้นสูงถึง 120 mg/L กลุ่มจุลินทรีย์ยังคงมีอัตราการเจริญเติบโตสูงเหมือนชุดทดลองอื่น ๆ

สำหรับการย่อยสลายสารโพร์ฟินฟอสพบว่าสารโพร์ฟินฟอสลดลงอย่างรวดเร็วในระยะเวลาต่างกันจากนั้นจึงเริ่มคงที่ (ภาพที่ 8) โดยที่ความเข้มข้นของสารโพร์ฟินฟอสสูงกลุ่มจุลินทรีย์อยู่สลายสารจนถึงจุดเสถียรซักกว่าที่ความเข้มข้นต่ำ ภายหลังสิ้นสุดการทดลอง (48 hr) กลุ่มจุลินทรีย์จากชุดทดลองต่าง ๆ สามารถย่อยสลายสารโพร์ฟินฟอสได้ระหว่างร้อยละ 85-91 อัตราการกำจัดสาร เท่ากับ 31-55 mg/L/d ซึ่งเมื่อพิจารณาจากผลศาสตร์การย่อยสลายสารโพร์ฟินฟอสพบว่าการย่อยสลายเป็นไปตามปฏิกิริยาอันตัดหนึ่ง โดยมีค่าคงที่ เท่ากับ $0.02-0.06 \text{ hr}^{-1}$

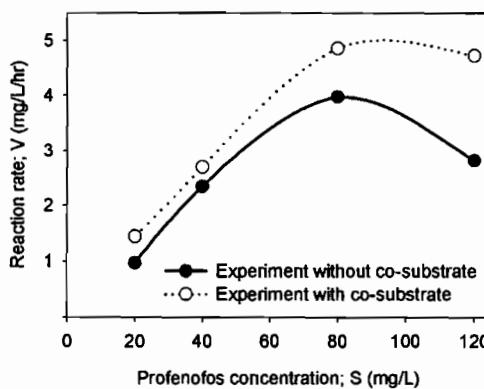
ผลการศึกษาชี้ให้เห็นว่าชุดทดลองที่มีความเข้มข้นของสารโพร์ฟินฟอสเริ่มต้นต่างกันเมื่อเติมแหล่งคาร์บอนร่วมมีผลต่อการย่อยสลายสารโพร์ฟินฟอสต่างกัน โดยเมื่อความเข้มข้นสารสูง (40 80 และ 120 mg/L) แนวโน้มของการย่อยสลายสารในชุดทดลองที่มีการเติมและไม่เติมแหล่งคาร์บอนร่วมใกล้เคียงกันมาก (ทั้งจนผลศาสตร์การย่อยสลายและอัตราการกำจัดสารโพร์ฟินฟอส) ผลการทดลองในส่วนนี้ขัดแย้งกับผลการทดลองที่ความเข้มข้นเริ่มต้นของสารโพร์ฟินฟอส 20 mg/L ซึ่งแสดงไว้ในหัวข้อที่ผ่านมา กล่าวคือ สำหรับผลการทดลองที่ผ่านมาชุดทดลองที่มีการเติมแหล่งคาร์บอนร่วมมีค่าจนผลศาสตร์การย่อยสลายและอัตราการกำจัดสารโพร์ฟินฟอสสูงกว่าชุดทดลองที่ไม่ได้เติมแหล่งคาร์บอนร่วมอย่างชัดเจน ผลขัดแย้งดังกล่าวคาดจากสารโพร์ฟินฟอสซึ่งเป็น

สารอาหารที่ช่วยในการเจริญเติบโต เช่น กันมีปริมาณเพิ่มมากขึ้น เป็นเหตุให้มีการย่อยสลายเพิ่มสูงตามเนื่องจากการย่อยสลายนี้เป็นไปตามปฏิกิริยาอันดับหนึ่ง ซึ่งการย่อยสลายขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของสารเริ่มต้น ดังนั้นอิทธิพลของสารอาหารร่วมจึงส่งผลได้ไม่ชัดเจนนัก



ภาพที่ 8 การย่อยสลายสารโพร์ฟิโนฟอสของกลุ่มจุลทรรศน์ใน
ภายใต้สภาวะที่มีสารโพร์ฟิโนฟอสต่างความเข้มข้น

นอกจากนี้ยังพบว่าเมื่อพิจารณาเปรียบเทียบระหว่างผลการศึกษาจากชุดการทดลองที่มีความเข้มข้นของสารโพร์ฟิโนฟอส 120 mg/L กับชุดทดลองที่ความเข้มข้นอื่น ๆ พบร่วมกับการย่อยสลายสารโพร์ฟิโนฟอสลดลงอย่างชัดเจน ซึ่งผลดังกล่าวนี้เมื่อพิจารณาจalon พลศาสตร์ของเอนไซม์ตามหลักของ Michaelis and Menten อาจระบุได้ว่าในสภาวะที่สารโพร์ฟิโนฟอสมีความเข้มข้นสูงเกิดปรากฏการณ์การยับยั้งด้วยสารอาหารเอง (substrate inhibition) (ภาพที่ 9) กล่าวคือ เมื่อความเข้มข้นของสารอาหาร ซึ่งหมายถึงสารโพร์ฟิโนฟอสมีความเข้มข้นสูงมากขึ้นพบว่าอัตราการย่อยสลายกลับลดลงชัดเจน โดยผลในภาพดังกล่าวยังพบว่าในสภาวะที่มีแหล่งคาร์บอนร่วมอิทธิพลของปรากฏการณ์การยับยั้งดังกล่าวลดลง ดังนั้นจึงอาจกล่าวได้ว่าแม้แหล่งคาร์บอนร่วมมีได้สนับสนุนกระบวนการเมตาโบลิซึมร่วมอย่างชัดเจนนัก แต่สารตั้งกล่าวสามารถลดผลการยับยั้งการย่อยสลายสารโพร์ฟิโนฟอสได้



ภาพที่ 9 จันพลศาสตร์การย่อยสลายสารโพร์ฟิโนฟอสตามหลักของ Michaelis and Menten

ผลการสาขิตการพื้นฟูน้ำใต้ดินที่ปนเปื้อนสารโพร์ฟิโนฟอสตามหลักการเติมเซลล์ที่ถูกกรงตัน

1) ผลการศึกษาการเคลื่อนที่ของน้ำใต้ดินและสารโพร์ฟิโนฟอสในแบบจำลอง

ผลการสาขิตระบบเพื่อประยุกต์ใช้ในการพื้นฟูน้ำใต้ดินที่ปนเปื้อนสารโพร์ฟิโนฟอส ในสภาวะที่อัตราการซึมผ่านของน้ำต่างกัน คือ 25 50 และ 100 เซนติเมตรต่อวัน การทดลองศึกษาที่ความเข้มข้นของสารโพร์ฟิโนฟอส 20 และ 40 มิลลิกรัมต่อลิตร และ แหล่งการบ่อนรุ่ม คือ กรดซัคซินิก 400 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยได้เติมกลุ่มจุลินทรีย์ 10^5 และ 10^{15} CFU/mL เพื่อศึกษาประสิทธิภาพในการกำจัดสารโพร์ฟิโนฟอสในลักษณะการจำลองสภาพน้ำใต้ดิน ผลการศึกษาการเคลื่อนที่ของน้ำใต้ดินและสารโพร์ฟิโนฟอส และผลการศึกษาอิทธิพลของอัตราการซึมผ่านของน้ำใต้ดินและความเข้มข้นของสารโพร์ฟิโนฟอส

การทดลองเบรคทรูจ์เทอร์เชอร์ (tracer breakthrough test) มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการเคลื่อนที่ของน้ำใต้ดินและสารโพร์ฟิโนฟอสในแบบจำลองคอลัมน์ราย ผลการศึกษาพบว่าการเคลื่อนที่ของน้ำใต้ดินเมื่อมีอัตราการซึมผ่านต่าง ๆ กันมีค่าใกล้เคียงกัน โดยพบว่าค่า C/C_0 (ความเข้มข้น เวลาใด ๆ ต่อความเข้มข้นเริ่มต้น) มีค่าประมาณ 1 เมื่อการทดลองผ่านไป 1.00-1.25 PV ตามทฤษฎีแล้วการเคลื่อนที่ของน้ำใต้ดินขึ้นอยู่กับการไหลของน้ำ (advection) และการแพร่กระจาย (dispersion) โดยกราฟเบรคทรูจ์ (breakthrough curve) มีลักษณะเป็นกราฟโค้งรูปตัวเอสและมีค่า $C/C_0 = 0.5$ ณ การทดลอง 1 PV แต่จากลักษณะกราฟในการศึกษานี้พบว่าค่า C/C_0 เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว (ไม่ใช่กราฟโค้งรูปตัวเอส) ซึ่งลักษณะดังกล่าวเกิดจากอิทธิพลการไหลของน้ำใต้ดินเป็นหลัก นอกจากนี้ยังพบว่าอัตราการซึมผ่านของน้ำ (ซึ่งแปรผันตรงกับอัตราการไหลของน้ำ) ไม่มีผลต่อการเคลื่อนที่ของน้ำในชุดทดลองคอลัมน์

สำหรับผลการศึกษาการเคลื่อนที่ของสารโพร์ฟิโนฟอสเปรียบเทียบกับคลอไรด์ ผลการทดลองพบว่าช่วง 1 PV แรก ทั้งคลอไรด์และโพร์ฟิโนฟอสเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วแต่พบว่าโพร์ฟิโนฟอสมีค่าเพิ่มขึ้นมากกว่าคลอไรด์ ผลการทดลองนี้บ่งชี้ได้ว่าสารโพร์ฟิโนฟอสซึ่งเป็นตัวถูกละลาย (solute) มีอิทธิพลของการแพร่กระจาย (dispersion) และ/หรือ การพุ่งกระจาย (diffusion) ส่งผลให้สารเคลื่อนที่มากกว่าน้ำ (คลอไรด์) แต่ผลดังกล่าวมีเพียงเล็กน้อย เมื่อพิจารณาค่าปัจจัยความหน่วง

(retardation factor; R_f) ของสารโพร์ฟีโนฟอส พบร่วมค่า R_f เท่ากับ 1.18 ($PV_{profenofos} = 0.68$ และ $PV_{chloride} = 0.80$) ดังนั้นสามารถกล่าวได้ว่าไม่พบการลดชักของสารโพร์ฟีโนฟอสในชุดแบบจำลอง น้อยกว่าชุดเจน นอกจ้านี้ยังพบว่าการทดลองตั้งแต่ช่วง 1 PV สารทั้งสองเริ่มคงที่ โดยเมื่อสิ้นสุดการทดลองคลอร์ดและสารโพร์ฟีโนฟอสมี $C/C_0 = 1.0$ และ 0.9 ตามลำดับ ผลดังกล่าวแสดงให้เห็นว่ามีการย่อยสลายสารโพร์ฟีโนฟอสตามธรรมชาติในแบบจำลองบ้างเล็กน้อย ซึ่งอาจเกิดมาจากการย่อยสลายด้วยแสง (photodegradation) หรือไฮโดรไลซิส (hydrolysis) โดยภาพรวมสามารถสรุปได้ว่า ชุดแบบจำลองคอลัมน์นี้ได้รับอิทธิพลการลดชักและการย่อยสลายสารตามธรรมชาติเพียงเล็กน้อย

2) ผลการศึกษาอิทธิพลของอัตราการซึมผ่านของน้ำใต้ดินและความเข้มข้นของสารโพร์ฟีโนฟอส

ผลการสาจิระบบที่สภาวะที่อัตราการซึมผ่านของน้ำต่างกัน คือ 25 50 และ 100 cm/d ชุดทดลองที่มีความเข้มข้นเริ่มต้นของสารโพร์ฟีโนฟอส เท่ากับ 20 mg/L และแหล่งคาร์บอนร่วม 400 mg-carbon/L พบร่วมตรวจสอบติดตามไม่พบสารโพร์ฟีโนฟอสเลย ผลลักษณะนี้บ่งชี้ได้ว่าแบบจำลองคอลัมน์ที่มีการเติมเซลล์มีถูกกระตุ้นด้วยการเติมแหล่งบอนร่วมมีประสิทธิภาพสูงมาก ส่งผลให้สารโพร์ฟีโนฟอสถูกย่อยสลายทั้งหมดตลอดช่วงการทดลอง ผลการทดลองในส่วนนี้สอดคล้องกับผลการทดลองแบบกะในหัวข้อที่ผ่านมา กล่าวคือ ในกรณีการเติมเซลล์และสารอาหารร่วมในปริมาณที่เหมาะสมส่งผลให้การย่อยสลายสารโพร์ฟีโนฟอสสูงมาก ประสิทธิภาพการย่อยสลายสารโพร์ฟีโนฟอสในแบบจำลองคอลัมน์แสดงไว้ในตารางที่ 2

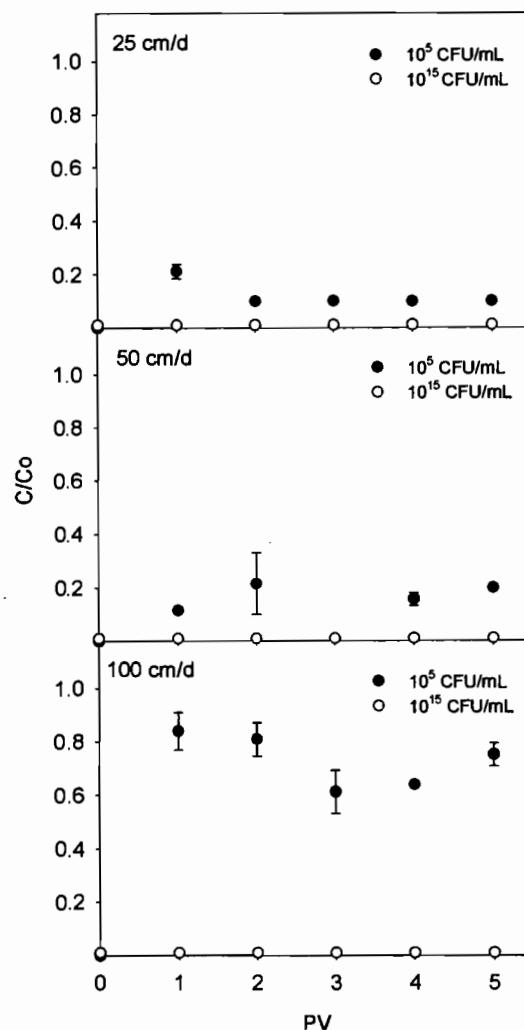
ตารางที่ 2 ประสิทธิภาพการย่อยสลายสารโพร์ฟีโนฟอสในแบบจำลองคอลัมน์

อัตรา การซึมผ่าน (cm/d)	ร้อยละการย่อยสลายสารโพร์ฟีโนฟอส ณ การทดลองที่ความเข้มข้น สารโพร์ฟีโนฟอสและปริมาณเซลล์เริ่มต้น			
	20 mg/L		40 mg/L	
	10^5 CFU/mL	10^{15} CFU/mL	10^5 CFU/mL	10^{15} CFU/mL
25	> 80	> 80	> 90	> 90
50	> 80	> 80	> 90	80
100	> 80	> 80	> 90	30

ส่วนผลการศึกษาชุดทดลองที่มีความเข้มข้นเริ่มต้นของสารโพร์ฟีโนฟอส เท่ากับ 40 mg/L และแหล่งคาร์บอนร่วม 400 mg-carbon/L มีผลเป็นตั้งภาพที่ 10 ซึ่งผลการทดลองพบว่าในกรณีที่เติมกลุ่มจุลินทรีย์ 10^5 CFU/mL ที่อัตราการซึมผ่านของน้ำต่าง ๆ ค่า C/C_0 มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเมื่อผ่านไป 1 PV จากนั้นลดลงเล็กน้อยและเริ่มคงที่จนสิ้นสุดการทดลอง โดยการทดลอง ณ อัตราการซึมผ่านของน้ำ 25 50 และ 100 cm/d มีค่า $C/C_0 = 0.10$ 0.20 และ 0.69 ตามลำดับ เมื่อสิ้นสุดการทดลองชุดทดลองที่อัตราการการซึมผ่าน 25 cm/d มีความสามารถในการย่อยสลายสารได้มากที่สุด โดยสามารถย่อยสลายสารโพร์ฟีโนฟอสได้กว่าร้อยละ 90 ความสามารถในการย่อยสลายลดลงเมื่อเพิ่มอัตราการซึมผ่านของน้ำ โดยความสามารถในการย่อยสลายสารที่อัตราการซึมผ่าน 50 และ 100 cm/d เท่ากับร้อยละ 80 และร้อยละ 30 ตามลำดับ ดังตารางที่ 2

จากผลการทดลองในภาพที่ 10 พบร่วมชุดทดลองทุกชุดในช่วง 1-2 PV แรก ตรวจพบสารโพร์ฟีโนฟอสสูงกว่าช่วงถัดไป (3-5 PV) เล็กน้อยอาจเนื่องมาจากในระยะที่เริ่มทดลองเซลล์ยังมี

ปริมาณน้อย แต่เมื่อเวลาผ่านไปเซลล์เจริญเติบโตเต็มที่ดังนั้นปริมาณสารโพฟในฟอสที่ตรวจพบจึงลดลง ส่วนในชุดทดลองที่อัตราการซึมผ่าน 50 และ 100 cm/d ซึ่งคาดว่ามีเซลล์จุลินทรีย์ที่เพิ่มสูงขึ้น เช่นกันจึงให้ผลในลักษณะคล้ายกัน สำหรับผลการสาอิตระบบที่ความเข้มข้นเริ่มต้นของโพฟในฟอสเท่ากับ 40 mg/L และแหล่งคาร์บอนรวม 400 mg-carbon/L ในกรณีที่เติมกลุ่มจุลินทรีย์ 10^{15} CFU/mL มีผลเป็นตังภาพที่ 10 ผลการทดลองในส่วนนี้พบว่าตรวจสอบตามไม่พบโพฟในฟอสเลย ผลลักษณะนี้บ่งชี้ได้ว่าแบบจำลองคอลัมน์ที่มีการเติมเซลล์มีถูกกระตุ้นในปริมาณสูงมีประสิทธิภาพสูงมากขึ้น



ภาพที่ 4.10 สารโพฟในฟอสคงเหลือจากแบบจำลองคอลัมน์สำหรับการทดลองที่มีความเข้มข้นโพฟในฟอส 40 mg/L และมีเซลล์เริ่มต้น 10^5 (●) และ 10^{15} CFU/mL (○)

แนวโน้มของผลการทดลองนี้ชี้ให้เห็นว่าการทดลองที่อัตราการซึมผ่านและปริมาณจุลินทรีย์ เป็นปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการย่อยสลายสารโพฟในฟอส ระบบที่มีการเติมเซลล์และกระตุ้นด้วยกระบวนการเมตาโบลิกซึ่งร่วมนี้มีประสิทธิภาพในการกำจัดสารโพฟในฟอสสูง แต่อย่างไรก็ตามในกรณีที่ประยุกต์ใช้ในการพื้นที่น้ำได้ดินที่ปนเปื้อนในพื้นที่ที่มีอัตราการซึมของน้ำสูง (เวลา กันน้ำต่ำ) ซึ่งอาจเกิดจากมีปริมาณน้ำฝนมากหรือลักษณะดินมีสภาพการนำน้ำ (hydraulic conductivity) สูงอาจต้องมีการเติมเซลล์จุลินทรีย์ปริมาณเพิ่มสูงขึ้น นอกจากนี้ในกรณีการประยุกต์ใช้จริงควรมีการศึกษา

อิทธิพลของปัจจัยทางชีวภาพ (biotic) และไม่ใช่ชีวภาพ (abiotic) เช่น อิทธิพลของจุลินทรีย์ในพื้นที่ (indigenous microorganisms) อิทธิพลของสมบัติดิน (อาทิ ค่าพื้นที่ของดิน ปริมาณสารอินทรีย์ในดิน เป็นต้น) อิทธิพลของสมบัติน้ำใต้ดิน เป็นต้น

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

สรุปผลการวิจัย

1) การคัดกลุ่มจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการกำจัดสารโพร์ฟิโนฟอส

- 1.1) กลุ่มจุลินทรีย์ที่คัดได้เป็นจุลินทรีย์ในกลุ่มเยเทอโรโโทรป ซึ่งใช้สารโพร์ฟิโนฟอสเป็นแหล่งสารคาร์บอนเดียว (sole carbon source) ได้ กลุ่มจุลินทรีย์ดังกล่าว ประกอบด้วยจุลินทรีย์ที่มีรูปร่างทั้งแบบห่อหุ้นและวงกลม เซลล์มีทั้งชนิดแกรมบวก และแกรมลบ กลุ่มจุลินทรีย์มีความสามารถในการย่อยสลายสารโพร์ฟิโนฟอสได้ร้อยละ 97 จนนพศาสตร์การเจริญเติบโตและการย่อยสลายสารโพร์ฟิโนฟอสเป็นไปปฏิกริยาอันดับหนึ่งค่าคงที่ โดยมีค่าคงที่เท่ากับ 0.40 และ 0.15 hr^{-1} ตามลำดับ และมีอัตราการย่อยสลายสารโพร์ฟิโนฟอส 3.0 mg/L/d
- 1.2) การวิเคราะห์วิถีการย่อยสลายสารโพร์ฟิโนฟอสพบว่า กลุ่มจุลินทรีย์สามารถย่อยสลายสารโพร์ฟิโนฟอสเป็นสารบีซีพี และตรวจพบสารมาร์ยันต์อื่น ๆ ซึ่งได้แก่ สาร 2,4-di-tert-butyl phenol และ สาร 3-methoxy phenol

2) การคัดแยกจุลินทรีย์บริสุทธิ์และการศึกษาลักษณะการย่อยสลายสารโพร์ฟิโนฟอส

- 2.1) กลุ่มจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายสารโพร์ฟิโนฟอสที่คัดแยกได้จุลินทรีย์บริสุทธิ์ 3 ชนิด ซึ่งกำหนดชื่อเรียกว่า PF1 PF2 และ PF3 เป็นสายพันธุ์ *Pseudomonas plecoglossicida* *Pseudomonas aeruginosa* และ *Pseudomonas aeruginosa* ตามลำดับ
- 2.2) จนนพศาสตร์การเจริญเติบโตของจุลินทรีย์บริสุทธิ์เป็นไปตามปฏิกริยาอันดับที่ 1 โดยมีค่าคงที่จนนพศาสตร์การเจริญเติบโตอยู่ระหว่าง $1.91-2.68 \text{ hr}^{-1}$ และ จุลินทรีย์บริสุทธิ์ทั้งสามมีอัตราการย่อยสลายสารโพร์ฟิโนฟอส และร้อยละการกำจัดสารโพร์ฟิโนฟอสถึง $7.6-19.6 \text{ mg/L/d}$ และ 93-95 ตามลำดับ
- 2.3) PF1 PF2 และ PF3 สามารถย่อยสลายสารกำจัดศัตรูพืชได้ใกล้เคียงกัน จุลินทรีย์กำจัดสารคลอร์ไฟฟอสได้ร้อยละ 57-73 และสารไดโคโนฟอสได้ร้อยละ 33-47 ในขณะที่จุลินทรีย์กำจัดสารโพร์ฟิโนฟอสได้ร้อยละ 75-82

3) การระดับการย่อยสลายสารโพร์ฟิโนฟอสโดยใช้กระบวนการเมต้าบolic ร่วม

- 3.1) การทดลองที่เติมสารกลูโคส กรดซัคcharic และสารโซเดียมอะซิเตอทเป็นแหล่งการบ่อนร่วมส่งผลต่อการเจริญเติบโตของกลุ่มจุลินทรีย์ไม่มากนัก ชุดทดลองที่เติม

- | | |
|---|---------|
| 3.2) อิทธิพลความเข้มข้นของกรดซัคซินิกเริ่มต้นที่ใช้เป็นแหล่งคาร์บอนร่วม ($4-400 \text{ mg/L}$) ส่งผลต่อการเจริญเติบโตของกลุ่มจุลินทรีย์ไม่มากนัก ประสิทธิภาพการย่อยสลายสารโพร์ฟีโนฟอสได้กว่าร้อยละ 80 อัตราการกำจัดสารโพร์ฟีโนฟอส เท่ากับ $7.90-31.46 \text{ mg/L/d}$ จนพลาสต์การย่อยสลายสารโพร์ฟีโนฟอสเป็นไปตามปฏิกริยาอันดับหนึ่งโดยมีค่าคงที่ เท่ากับ $0.01-0.06 \text{ hr}^{-1}$ โดยในชุดทดลองที่ให้ผลดีที่สุด คือ ชุดทดลองที่เติมแหล่งคาร์บอนร่วม 400 mg/L โดยการย่อยสลาย มีค่าคงที่เพิ่มขึ้นถึง 6 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับชุดที่ไม่ได้เติมแหล่งคาร์บอนร่วม | 30 |
| 3.3) อิทธิพลความเข้มข้นของสารโพร์ฟีโนฟอสเริ่มต้น ($40-120 \text{ mg/L}$) ส่งผลต่อการเจริญเติบโตของกลุ่มจุลินทรีย์ไม่มากนัก สำหรับการย่อยสลายสารโพร์ฟีโนฟอส พบว่ากลุ่มจุลินทรีย์จากชุดทดลองต่าง ๆ สามารถย่อยสลายสารได้ร้อยละ 85-91 อัตราการกำจัดสาร เท่ากับ $31-55 \text{ mg/L/d}$ จนพลาสต์การย่อยสลายสารโพร์ฟีโนฟอสเป็นไปตามปฏิกริยาอันดับหนึ่งโดยมีค่าคงที่ เท่ากับ $0.02-0.06 \text{ hr}^{-1}$ ผลการศึกษาจากชุดทดลองที่มีความเข้มข้นของสารโพร์ฟีโนฟอส 120 mg/L เกิดปรากฏการณ์การยับยั้งด้วยสารอาหารเอง (substrate inhibition) โดยผลในสภาวะที่มีแหล่งคาร์บอนร่วมอิทธิพลของปรากฏการณ์การยับยั้งดังกล่าวลดลง | (4-400) |
- 4) การสาหร่ายพื้นผุน้ำได้ดินที่ปนเปื้อนสารโพร์ฟีโนฟอสตามหลักการเติมเซลล์ที่ถูกกระตุ้น
- 4.1) ผลการทดลองซึ่งให้เห็นว่าอัตราการซึมผ่านและปริมาณจุลินทรีย์เป็นปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการย่อยสลายสารโพร์ฟีโนฟอส
 - 4.2) ผลการสาหร่ายระบบที่สภาวะที่อัตราการซึมผ่านของน้ำต่างกัน คือ $25-100 \text{ cm/d}$ ความเข้มข้นเริ่มต้นของสารโพร์ฟีโนฟอส เท่ากับ 20 mg/L และแหล่งคาร์บอนร่วม 400 mg/L พบว่าตรวจติดตามไม่พบสารโพร์ฟีโนฟอสเลย ผลดังกล่าวบ่งชี้ได้ว่า แบบจำลองคอลัมน์ที่มีการเติมเซลล์มีถูกกระตุ้นด้วยการเติมแหล่งคาร์บอนร่วมมีประสิทธิภาพสูงมาก
 - 4.3) ผลการศึกษาชุดทดลองที่มีความเข้มข้นเริ่มต้นของสารโพร์ฟีโนฟอส เท่ากับ 40 mg/L และแหล่งคาร์บอนร่วม 400 mg/L ในกรณีที่เติมกลุ่มจุลินทรีย์ 10^5 CFU/mL ชุดทดลองที่อัตราการการซึมผ่าน 25 cm/d สามารถย่อยสลายสารโพร์ฟีโนฟอสได้กว่าร้อยละ 90 ความสามารถในการย่อยสลายลดลงเมื่อเพิ่มอัตราการซึมผ่านของน้ำ โดยความสามารถในการย่อยสลายสารที่อัตราการซึมผ่าน 50 และ 100 cm/d เท่ากับร้อยละ 80 และร้อยละ 30 ตามลำดับ เมื่อเพิ่มกลุ่มจุลินทรีย์เป็น 10^{15} CFU/mL พบว่าตรวจติดตามไม่พบสารโพร์ฟีโนฟอสเลย

ข้อเสนอแนะ

- 1) ควรมีการทดลองผลของสิ่งแวดล้อม อาทิ เช่น ปริมาณเกลือในน้ำได้ดิน ปริมาณสารอินทรีย์ ธรรมชาติ และ ค่าพีเอชของน้ำ เป็นต้น ต่อความสามารถในการย่อยสลายสารโพร์ฟีโนฟอส โดยกลุ่มจุลินทรีย์และจุลินทรีย์บริสุทธิ์

- 2) ความมีงานวิจัยต่อเนื่องเพื่อระบุวิถีการย่อยสลายสารโพเรนฟอสโดยกลุ่มจุลินทรีย์และจุลินทรีย์บริสุทธิ์อย่างสมบูรณ์
- 3) ความมีงานวิจัยต่อเนื่องเพื่อระบุกลไกกระบวนการเมตาโบลิซึมร่วมสำหรับการย่อยสลายสารโพเรนฟอส
- 4) ก่อนการประยุกต์ใช้จริงความมีการศึกษาอิทธิพลของปัจจัยแวดล้อม เช่น อิทธิพลของจุลินทรีย์ในพื้นที่ อิทธิพลของสมบัติดิน อิทธิพลของสมบัติน้ำใต้ดิน เป็นต้น

บทคัดย่อ

สารโพร์ฟินฟอสเป็นสารกำจัดศัตรูพืชที่ใช้กันเป็นจำนวนมากเป็นเหตุให้มีการปนเปื้อนของสารดังกล่าวกระจายทั่วพื้นที่เกษตรกรรม งานวิจัยนี้มีจุดมุ่งหมายเพื่อพัฒนาวิธีกำจัดสารกำจัดศัตรูพืชโพร์ฟินฟอสตอกค้างด้วยการเติมเซลล์จุลินทรีย์ที่ถูกกระดูน การทดลองแบ่งออกเป็น 3 ขั้นตอน คือ 1) การคัดแยกกลุ่มจุลินทรีย์สำหรับการเติมเซลล์ 2) การศึกษาการกระตุนการย่อยสลายสารโพร์ฟินฟอสโดยใช้กระบวนการเมตาโบลิซึมร่วม และ 3) การสาหร่ายพื้นพูน้ำใต้ดินที่ปนเปื้อนสารโพร์ฟินฟอสตามหลักการเติมเซลล์ที่ถูกกระดูน ผลการศึกษาในขั้นตอนแรกพบว่ากลุ่มจุลินทรีย์ที่คัดได้เป็นจุลินทรีย์ในกลุ่มเอเทอโรโตรัส ซึ่งใช้สารโพร์ฟินฟอสเป็นแหล่งสารคาร์บอนเดียวได้ กลุ่มจุลินทรีย์สามารถย่อยสลายสารโพร์ฟินฟอสได้ร้อยละ 97 จากการวิเคราะห์วิถีการย่อยสลายสารโพร์ฟินฟอสพบว่ากลุ่มจุลินทรีย์นี้ย่อยสลายสารโพร์ฟินฟอสเป็นสาร 4-bromo-2-cholorophenol กลุ่มจุลินทรีย์ดังกล่าวประกอบด้วยจุลินทรีย์บริสุทธิ์หลัก 3 ชนิด ซึ่งกำหนดชื่อเรียกว่า PF1 PF2 และ PF3 เป็นสายพันธุ์ *Pseudomonas plecoglossicida* *Pseudomonas aeruginosa* และ *Pseudomonas aeruginosa* ตามลำดับ

ในขั้นตอนที่สองพบว่าชุดทดลองที่เติมกรดชักซินิกเป็นแหล่งสารบอนร่วมลดโพร์ฟินฟอสได้ดีที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับผลจากการเติมกลูโคสและโซเดียมอะซิเตท อิทธิพลความเข้มข้นของกรดชักซินิกเริ่มต้น ($4-400 \text{ mg/L}$) ส่งผลต่อการเจริญเติบโตของกลุ่มจุลินทรีย์ไม่มากนัก ชุดทดลองที่เติมกรดชักซินิกมีประสิทธิภาพการย่อยสลายสารโพร์ฟินฟอสได้กว่าร้อยละ 80 อัตราการกำจัดสารโพร์ฟินฟอส เท่ากับ $7.90-31.46 \text{ mg/L/d}$ โดยในชุดทดลองที่ให้ผลดีที่สุด คือ ชุดทดลองที่เติมแหล่งสารบอนร่วม 400 mg/L สำหรับการย่อยสลายสารโพร์ฟินฟอสที่ความเข้มข้นเริ่มต้นต่าง ๆ ($40-120 \text{ mg/L}$) พบว่ากลุ่มจุลินทรีย์จากชุดทดลองต่าง ๆ สามารถย่อยสลายสารได้ร้อยละ 85-91 อัตราการกำจัดสาร เท่ากับ $31-55 \text{ mg/L/d}$ นอกจากนี้ยังพบว่าผลการศึกษาจากชุดการทดลองที่มีความเข้มข้นของสารโพร์ฟินฟอส 120 mg/L เกิดปรากฏการณ์การยับยั้งด้วยสารอาหารเอง (substrate inhibition) โดยผลในสภาวะที่มีแหล่งสารบอนร่วมอิทธิพลของปรากฏการณ์การยับยั้งดังกล่าวลดลง สำหรับผลการทดลองส่วนสุดท้ายซึ่งจำลองสถานการณ์น้ำใต้ดินที่ปนเปื้อนในรูปแบบถังปฏิกรณ์คลุมน์ ผลการทดลองซึ่งให้เห็นว่าอัตราการซึมผ่าน ($25-100 \text{ cm/d}$) และปริมาณจุลินทรีย์ (10^5 และ 10^{15} CFU/mL) เป็นปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการย่อยสลายสารโพร์ฟินฟอสอย่างชัดเจน ผลการวิจัยทั้งหมดนี้บ่งชี้ว่ากลุ่มจุลินทรีย์และจุลินทรีย์บริสุทธิ์ที่เติมมีศักยภาพในการย่อยสลายสารโพร์ฟินฟอสโดยเฉพาะสภาวะที่ถูกกระดูน

ABSTRACT

Profenofos (PF) is a heavily used organophosphorus pesticide (OPP) of which its contamination is ubiquitous in agricultural area. This study aims to develop profenofos removal technique using stimulated microbial cell augmentation. The experiment divided into 3 parts including 1) isolation of a microbial consortium for cell augmentation, 2) investigation of profenofos degradation stimulation using co-metabolism process and 3) demonstration of profenofos contaminated-groundwater remediation using stimulated cell augmentation approach. The results from the first part showed that an enriched consortium was heterotrophic microorganism which could use profenofos as a sole carbon source. The consortium degraded profenofos for 97%. Based on profenofos degradation pathway analysis, this consortium degraded profenofos to 4-bromo-2-chlorophenol. The consortium comprised three predominant PF-degrading strains designated PF1, PF2 and PF3. The isolates (PF1, PF2 and PF3) were characterized as *Pseudomonas plecoglossicida*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Pseudomonas aeruginosa*, respectively.

In the second part, the test with succinic acid supplement as a co-carbon source removed profenofos the best compared to those with glucose and sodium acetate. The initial concentrations of succinic acid (4-400 mg/L) slightly influenced microbial growth. The test with succinic acid supplement efficiently degraded profenofos of more than 80% (profenofos removal rates of 7.90-31.46 mg/L/d). The test with co-carbon source supplement of 400 mg/L performed the best. For the profenofos degradation at the different initial concentrations (40-120 mg/L), the tests could degrade profenofos of 85-91% (the degradation rate of 31-55 mg/L/d). Otherwise, substrate inhibition was found in the test with profenofos of 120 mg/L while the test with co-carbon supplement could reduce the phenomenon. For the last experiment, column reactor was applied for simulation of contaminated groundwater condition. The infiltration rates (25-100 cm/d) and microbial numbers (10^5 且 10^{15} CFU/mL) obviously affected profenofos degradation. All results indicated that the bioaugmented consortium and isolates are potential for PF remediation especially under stimulated condition.

สารบัญ

	หน้า
บทสรุปผู้บริหาร	i
บทคัดย่อ	ix
ABSTRACT	x
กิตติกรรมประกาศ	xi
สารบัญ	xii
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ที่มาและความสำคัญของปัญหา	1
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย	3
1.3 ขอบเขตการวิจัย	3
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับและหน่วยงานที่นำผลการวิจัยไปใช้ประโยชน์	4
บทที่ 2 ทดลองและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	6
2.1 สารกำจัดศัตรูพืชโพรฟีโนฟอส	6
2.1.1 สมบัติของสารโพรฟีโนฟอส	6
2.1.2 การใช้ประโยชน์ของสารโพรฟีโนฟอส	6
2.1.3 ความเป็นพิษของสารโพรฟีโนฟอส	7
2.1.4 ความคงทนของสารโพรฟีโนฟอสในสิ่งแวดล้อม	7
2.2 การพื้นพื้นที่ปันเปื้อนด้วยวิธีการทางชีวภาพ	7
2.2.1 ชนิดและลักษณะสมบัติของจุลินทรีย์ในการย่อยสลายทางชีวภาพ	8
2.2.2 ปฏิกิริยาและปัจจัยที่มีผลต่อการย่อยสลายทางชีวภาพ	11
2.3 กระบวนการเติมเชลล์	14
2.3.1 ประเภทของการเติมทางชีวภาพ	14
2.3.2 แหล่งที่มาของเชลล์ที่ใช้ในการเติมเชลล์	15
2.3.3 ปัจจัยแวดล้อมที่มีผลต่อเชลล์ที่ถูกเติม	16
2.4 กระบวนการกระตุ้นทางชีวภาพ	16
2.4.1 การกระตุ้นโดยการเติมสารอาหารเพื่อช่วยการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์	17
2.4.2 การกระตุ้นโดยการเติมสารเหนี่ยวนำเอนไซม์หรือเกิดเมตาโบลิซึมร่วม	17

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
บทที่ 3 ระเบียบวิธีวิจัย	19
3.1 กรอบการวิจัย	19
3.2 วิธีดำเนินการวิจัย	21
3.2.1 วิธีการคัดแยกกลุ่มจุลินทรีย์สำหรับการเติมเซลล์และศึกษาลักษณะการย่อยสลายสารโพร์ฟิโนฟอสของจุลินทรีย์ที่ถูกเติม	22
3.2.2 วิธีการศึกษาการกระตุ้นการย่อยสลายสารโพร์ฟิโนฟอสโดยใช้กระบวนการเมตาโบลิซึมร่วม	25
3.2.3 วิธีการสาหร่ายพื้นผืน้ำใต้ดินที่ปนเปื้อนสารโพร์ฟิโนฟอสตามหลักการเติมเซลล์ที่ถูกกระตุ้น	27
บทที่ 4 ผลการวิจัย	30
4.1 ผลการคัดกลุ่มจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการกำจัดสารโพร์ฟิโนฟอส	30
4.1.1 ผลการศึกษาการคัดกลุ่มจุลินทรีย์และลักษณะของกลุ่มจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้	30
4.1.2 จำนวนพลาสตอร์ของการเจริญเติบโตและการย่อยสลายสารโพร์ฟิโนฟอส	32
4.1.3 ผลการวิเคราะห์วิถีการย่อยสลายสารโพร์ฟิโนฟอสโดยกลุ่มจุลินทรีย์เบื้องต้น	34
4.2 ผลการคัดแยกจุลินทรีย์บริสุทธิ์และการศึกษาลักษณะการย่อยสลายสารโพร์ฟิโนฟอส	39
4.2.1 ผลการคัดแยกจุลินทรีย์บริสุทธิ์และลักษณะของจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้	39
4.2.2 จำนวนพลาสตอร์ของการเจริญเติบโตและการย่อยสลายสารโพร์ฟิโนฟอสด้วยจุลินทรีย์บริสุทธิ์	41
4.2.3 ผลการศึกษาความเป็นไปได้ในการย่อยสลายสารกำจัดศัตรูพืชออร์แกนโนฟอสฟอร์สชนิดอื่นด้วยจุลินทรีย์บริสุทธิ์	44
4.3 ผลการกระตุ้นการย่อยสลายสารโพร์ฟิโนฟอสโดยใช้กระบวนการเมตาโบลิซึมร่วม	50
4.3.1 ผลการศึกษาแหล่งการบอนร่วมที่ส่งเสริมกระบวนการเมตาโบลิซึมร่วม	50
4.3.2 ผลการศึกษาความสัมพันธ์ของความเข้มข้นของสารอาหารร่วมและสารโพร์ฟิโนฟอสในกระบวนการเมตาโบลิซึมร่วม	54
4.4 ผลการสาหร่ายพื้นผืน้ำใต้ดินที่ปนเปื้อนสารโพร์ฟิโนฟอสตามหลักการเติมเซลล์ที่ถูกกระตุ้น	63
4.4.1 ผลการศึกษาการเคลื่อนที่ของน้ำใต้ดินและสารโพร์ฟิโนฟอสในแบบจำลอง	64
4.4.2 ผลการศึกษาอิทธิพลของอัตราการซึมผ่านของน้ำใต้ดิน	66

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ	71
5.1 สรุปผลการวิจัย	71
5.2 ข้อเสนอแนะ	73
เอกสารอ้างอิง	74
ภาคผนวก	80
ภาคผนวก ก วิธีการวิเคราะห์	81
ภาคผนวก ข ข้อมูลผลการทดลอง	114
ภาคผนวก ค ผลงานตีพิมพ์ภายใต้ทุนวิจัย	124
ภาคผนวก ง สรุปผลการดำเนินการวิจัย	157

บทที่ 1 บทนำ

1.1 ที่มาและความสำคัญของปัญหา

พื้นที่ส่วนใหญ่ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือเป็นพื้นที่เกษตรกรรม จากข้อมูลของสำนักผังประเทศไทยและผังภาค กรมโยธาธิการและผังเมือง กระทรวงมหาดไทย ระบุว่าพื้นที่เกษตรกรรมของภาคคิดเป็นพื้นที่ร้อยละ 44 ของพื้นที่ทั้งหมดในประเทศไทย (www.dpt.go.th/nrp/about1/intro_northeast.html) โดยพื้นที่ดังกล่าวมีการเพาะปลูกทั้งพืชสวน พืชไร่ ตลอดจนผักชนิดต่าง ๆ จากการสำรวจข้อมูลเบื้องต้นพบว่าในการปลูกผักมีการใช้สารเคมีปริมาณมาก ทั้งเพื่อการกำจัดแมลง วัชพืช และศัตรูพืชอื่น ๆ ตลอดจนการใช้สารเคมีเพื่อเร่งการเจริญเติบโต โดยเฉพาะอย่างยิ่งในการปลูกพริก กล่าวคือ พริกเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญชนิดหนึ่งมีพื้นที่เพาะปลูกกระจายอยู่ทั่วภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ซึ่งพริกดังกล่าวถูกส่งจำหน่ายทั้งในรูปแบบพริกสดและพริกแห้ง รวมทั้งมีการจำหน่ายไปยังต่างประเทศเพื่อเป็นแหล่งรายได้ในอุตสาหกรรมอาหาร ดังนั้นในการปลูกพริกจึงมีการใช้สารเคมีหลายชนิดทั้งเพื่อกำจัดศัตรูพืชและเพิ่มผลผลิต แหล่งการปลูกพริกที่สำคัญที่สุดแห่งหนึ่งในประเทศไทย คือ จังหวัดอุบลราชธานี โดยมีพื้นที่เพาะปลูกพริกมากกว่า 10,000 ไร่ กระจายอยู่ในเขตพื้นที่อำเภอเมือง อำเภอเมืองสามสิบ อำเภอเชียงใน อำเภอสิรินธร และ อำเภอพิบูลมังสาหาร จังหวัดอุบลราชธานี (วัชชัย นิ่มกิรตัน และคณะ, 2550) ในปี พ.ศ. 2549 ถึง พ.ศ. 2550 มีการสำรวจสารกำจัดศัตรูพืชตกค้างในพริกพบว่ามีตัวอย่างพริกที่พบสารตกค้างสูงถึงร้อยละ 49 โดยพบว่ามีสารกำจัดศัตรูพืชกลุ่มօร์แกโนฟอฟอร์สตกค้างเกินมาตรฐานมากที่สุด (นาถยา จันทร์ส่อง และคณะ, 2550) นอกจากนี้ยังพบการตกค้างของสารกลุ่มดังกล่าวในดิน รวมทั้งพบสารตกค้างในเลือดเกษตรกรจัดอยู่ในเกณฑ์ที่มีความเสี่ยงถึงร้อยละ 58 (นาถยา จันทร์ส่อง และคณะ, 2550)

จากการสำรวจพื้นที่เพาะปลูกพริกพบว่าต่ำบลหัวเรือ อำเภอเมือง จังหวัดอุบลราชธานี เป็นแหล่งปลูกพริกขนาดใหญ่มีพื้นที่รวมมากกว่า 8,000 ไร่ (ภาพที่ 1.1) โดยเกษตรกรส่วนใหญ่ใช้สารกำจัดศัตรูพืชจำนวนมากและหลากหลายชนิด (ภาพที่ 1.2) จากการรวบรวมข้อมูลพบว่าสารกำจัดแมลงที่ใช้มากที่สุด ได้แก่ สารโพเรฟโนฟอส (profenofos) ซึ่งเป็นสารกำจัดศัตรูพืชในกลุ่มสารօร์แกโนฟอฟอร์ส โดยเกษตรกรฉีดพ่นสารดังกล่าวโดยสเปรย์สเปรย์สเปรย์ต่อเนื่อง เพื่อกำจัดแมลงตลอดทั้งช่วงการผลิต นอกจากนี้จากการสำรวจพบว่าระดับน้ำใต้ดินในเขตพื้นที่ดังกล่าวอยู่ลึกเพียงประมาณ 2-8 เมตร จากผิดติด ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้ว่าสารโพเรฟโนฟอสที่ฉีดพ่นปริมาณมากนั้นสามารถปนเปื้อนลงสู่แหล่งน้ำใต้ดินซึ่งเป็นแหล่งน้ำบริโภคหลักของประชาชนในเขตพื้นที่นี้ได้ สำหรับข้อมูลด้านพิชวิทยาพบว่าสารโพเรฟโนฟอสเป็นพิษทั้งต่อสัตว์ที่มีกระดูกสันหลังและไม่มีกระดูกสันหลัง (Moulton et al., 1996; Fulton and Key, 2001) สารโพเรฟโนฟอสส่งผลต่อกระบวนการเมตาบอลิซึมทั้งในมนุษย์และสัตว์ (Gotoh et al., 2001; Abass et al., 2007; Ismail et al., 2009) โดยสารโพเรฟโนฟอสมีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อะซิทิลโคลีนเอสเทอเรส ซึ่งส่งผลต่อการทำงานของประสาทส่วนกลาง (Landis and Yu, 1995) หากได้รับอย่างต่อเนื่องแม้จะมีปริมาณน้อยผ่านทางการบริโภคน้ำใต้ดินอาจเป็นอันตรายถึงแก่ชีวิตได้

ดังนั้นมีความจำเป็นต้องพัฒนาเทคโนโลยีในการฟื้นฟูให้ดินที่ปนเปื้อนสารกำจัดศัตรูพืชโพธิ์ในฟอส



ภาพที่ 1.1 ไร่พักต่ำบลหัวเรือ อำเภอเมือง จังหวัดอุบลราชธานี



ภาพที่ 1.2 สารกำจัดศัตรูพืชที่ใช้ในการปลูกพฤษ

สำหรับเทคโนโลยีที่ใช้ในการกำจัดสารตกค้างในธรรมชาติ จากข้อมูลในอดีตพบว่าการกำจัดสารตกค้างในสิ่งแวดล้อมด้วยวิธีการทางชีวภาพเป็นหนึ่งในวิธีการที่นิยมใช้ เนื่องจากเป็นวิธีการที่มีประสิทธิภาพสูง ต้นทุนและค่าใช้จ่ายในการดำเนินการน้อย รวมทั้งยังเป็นวิธีการที่เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม (Alexander, 1999) โดยงานวิจัยในอดีตได้ประยุกต์ใช้กระบวนการฟื้นฟูทางชีวิทยา (bioremediation) สำหรับกำจัดสารกำจัดศัตรูพืชในกลุ่มสารออร์แกนโนฟอสฟอรัสในสิ่งแวดล้อมหลายชนิด อาทิ เช่น สารคลอไพรีฟอส (chlorpyrifos) สารมาลาไซโอน (malathion) และ ดีเมตอนเอ็สมেทอิล (demeton-s-methyl) เป็นต้น (Girbal et al., 2000; Singh et al., 2004; Anwar et al., 2009; Xia et al., 2009) ผลงานวิจัยดังกล่าวพบว่ากระบวนการฟื้นฟูทางชีวภาพมีประสิทธิภาพในการกำจัดสารออร์แกนโนฟอสฟอรัสตกค้างได้ดี

แนวทางการประยุกต์ใช้กระบวนการฟื้นฟูทางชีวภาพนокจากจะใช้ได้โดยตรงแล้ว ยังสามารถเพิ่มประสิทธิภาพได้โดยการเติมเซลล์ (cell bioaugmentation) กล่าวคือ เทคนิคดังกล่าวเป็นการเติมเซลล์จุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการกำจัดสารพิษในพื้นที่ปนเปื้อน ซึ่งเมื่อจุลินทรีย์มีจำนวนมากขึ้นจะส่งผลให้ความสามารถในการกำจัดสารพิษเพิ่มขึ้น โดยเทคนิคนี้ได้รับการพัฒนาและใช้กำจัดสารกำจัดศัตรูพืชทั้งในแรงงานวิจัยและการปฏิบัติงานจริง ตัวอย่างเช่น ในการศึกษาของ

Siripattanakul et al. (2009) ได้ประยุกต์ใช้เทคนิคการเติมเซลล์เพื่อกำจัดสารกำจัดศัตรูพืชอาทราชีน โดยพบว่าสารดังกล่าวถูกกำจัดได้สูงถึงร้อยละ 80 เป็นต้น นอกจากนี้ยังมีงานวิจัยอีกที่ได้ปรับปรุงแนวทางพื้นฟูด้วยวิธีการทางชีววิทยาโดยใช้กระบวนการกระตุ้นทางชีวภาพ (biostimulation) โดยการเติมสารอาหารส่งผลให้เกิดเมตาโบลิซึมร่วม (co-metabolism) เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการย่อยสลายสารออร์แกนโนฟอสฟอรัส โดยผลการศึกษาดังกล่าวพบว่ากระบวนการดังกล่าวส่งผลให้สารออร์แกนโนฟอสฟอรัสถูกย่อยสลายได้มากและรวดเร็วขึ้น (Girbal et al., 2000; Xia et al., 2009)

แต่อย่างไรก็ตามจนถึงปัจจุบันยังไม่มีการศึกษาการพื้นฟูน้ำใต้ดินที่ปั่นเปื้อนจากสารโพร์ฟีโนฟอส และจากข้อมูลข้างต้นนี้บ่งชี้ได้ว่าการประยุกต์ใช้เทคโนโลยีการเติมเซลล์และการกระตุ้นทางชีวภาพมีศักยภาพสำหรับการกำจัดสารโพร์ฟีโนฟอสตกค้างจึงเป็นที่มาของงานวิจัยนี้ โดยงานวิจัยนี้มีเป้าหมายเพื่อพัฒนาเทคโนโลยีการพื้นฟูน้ำใต้ดินที่ปั่นเปื้อนสารโพร์ฟีโนฟอสด้วยกระบวนการทางชีวภาพเชิงปรับปรุงตามแนวทางกระบวนการเติมเซลล์ร่วมกับการกระตุ้นทางชีวภาพ การศึกษานี้มีพื้นที่ศึกษา ณ ตำบลหัวเรือ อำเภอเมือง จังหวัดอุบลราชธานี ซึ่งเป็นพื้นที่ปลูกพริกขนาดใหญ่ที่สุดในประเทศไทย โดยศึกษาครอบคลุมดังแต่การคัดแยกจุลินทรีย์จากดินที่ปั่นเปื้อนสารโพร์ฟีโนฟอสในแปลงปลูกพริก การระบุสายพันธุ์จุลินทรีย์ การเติมจุลินทรีย์ดังกล่าวเพื่อกำจัดสารโพร์ฟีโนฟอส การพัฒนาการย่อยสลายสารโพร์ฟีโนฟอสโดยใช้หลักการกระตุ้นทางชีวภาพ รวมทั้งการสาอิตการพื้นฟูน้ำใต้ดินด้วยเทคโนโลยีการเติมเซลล์ที่ถูกกระตุ้นที่พัฒนาขึ้น ผลที่ได้จากการวิจัยนี้สามารถต่อยอดพัฒนาใช้จริงได้ในพื้นที่ศึกษา รวมทั้งยังสามารถขยายผลเพื่อใช้ในการกำจัดสารโพร์ฟีโนฟอส ในพื้นที่ปั่นเปื้อนอื่นหรือเป็นแนวทางในการพัฒนาใช้สำหรับกำจัดสารปนเปื้อนชนิดอื่น ๆ ได้ต่อไป

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

วัตถุประสงค์หลัก

เพื่อพัฒนาวิธีกำจัดสารกำจัดศัตรูพืชโพร์ฟีโนฟอสตกค้างในน้ำใต้ดิน โดยใช้วิธีการทางชีววิทยา ตามแนวทางการเติมเซลล์ที่ถูกกระตุ้น

วัตถุประสงค์จำเพาะ

- 1) เพื่อคัดแยกกลุ่มจุลินทรีย์และระบุสายพันธุ์จุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายสารโพร์ฟีโนฟอส
- 2) เพื่อศึกษาลักษณะการย่อยสลายสารโพร์ฟีโนฟอสด้วยการเติมจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้
- 3) เพื่อการปรับปรุงการย่อยสลายสารโพร์ฟีโนฟอสโดยใช้กระบวนการกระตุ้นทางชีวภาพ
- 4) เพื่อสาอิตการพื้นฟูน้ำใต้ดินที่ปั่นเปื้อนสารโพร์ฟีโนฟอสโดยใช้กระบวนการทางชีวภาพเชิงปรับปรุงตามหลักการเติมเซลล์ที่ถูกกระตุ้น

1.3 ขอบเขตการวิจัย

- 1) กลุ่มจุลินทรีย์คัดแยกจากตัวอย่างดินในแปลงปลูกพริกที่มีประวัติการใช้สารโพร์ฟีโนฟอสเป็นระยะเวลาระยะหนึ่ง ณ ตำบลหัวเรือ อำเภอเมือง จังหวัดอุบลราชธานี
- 2) กลุ่มจุลินทรีย์คัดแยกจากดินโดยการเพาะเลี้ยงต่อเนื่องในห้องปฏิบัติการ
- 3) สารกำจัดแมลงโพร์ฟีโนฟอสที่ใช้ในการศึกษาการย่อยสลายเป็นเกรดการค้าที่ใช้จริงในพื้นที่

- 4) การวิเคราะห์ค่าความเข้มข้นพรีโนฟอสใช้เครื่องแก๊สโครมาโตกราฟและเครื่องวัดแมสซีเล็คทีฟ (Gas Chromatography with Mass Selective Detector, GC-MSD)
- 5) การระบุสายพันธุ์จุลินทรีย์ใช้การระบุโครงสร้างพันธุกรรม 16S rDNA
- 6) การศึกษาลักษณะการย่อยสลายสารกำจัดแมลงพรีโนฟอสพิจารณาจากความสามารถในการย่อยสลายสารสารกำจัดแมลงพรีโนฟอส จนผลศาสตร์การย่อยสลายสารพรีโนฟอส และการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์
- 7) การเติมจุลินทรีย์เพื่อย่อยสลายสารพรีโนฟอสศึกษา ณ ความเข้มข้นของสารที่แตกต่างกัน
- 8) การกระตุนทางชีวภาพมุ่งเน้นเพื่อส่งเสริมให้เกิดการเมตาโบลิซึมร่วม
- 9) กระตุนทางชีวภาพใช้สารอาหารร่วมที่ความเข้มข้นแตกต่างกันเป็นแหล่งอาหารในการกระตุนย่อยสลายสารพรีโนฟอส
- 10) การสาอิทธิการพื้นผ่าน้ำใต้ดินที่ปนเปื้อนสารพรีโนฟอสโดยใช้กระบวนการทางชีวภาพเชิงปรับปรุงเป็นการศึกษาในแบบจำลองน้ำใต้ดินในระดับห้องปฏิบัติการ

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับและหน่วยงานที่นำผลการวิจัยไปใช้ประโยชน์

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

- 1) ผลการศึกษาได้เชื่อจุลินทรีย์ที่สามารถกำจัดสารพรีโนฟอสได้
- 2) ผลการศึกษาสามารถปรับปรุงสภาวะการทำงานเพื่อให้จุลินทรีย์สามารถใช้กำจัดสารพรีโนฟอสได้ดีขึ้น
- 3) จุลินทรีย์และสภาวะการกระตุนที่เหมาะสมสามารถนำไปใช้กำจัดสารพรีโนฟอสที่ปนเปื้อนในน้ำใต้ดินที่ปนเปื้อนในพื้นที่ศึกษาได้
- 4) แนวทางหรือรูปแบบการประยุกต์ใช้กระบวนการที่ศึกษาวิจัยเพื่อกำจัดสารพรีโนฟอสในน้ำใต้ดิน
- 5) จุลินทรีย์และสภาวะการกระตุนที่เหมาะสมสามารถนำไปใช้กำจัดสารพรีโนฟอสที่ปนเปื้อนในน้ำใต้ดินที่ปนเปื้อนในพื้นที่อื่น ๆ ได้
- 6) องค์ความรู้จากการวิจัยเป็นองค์ความรู้ซึ่งเป็นประโยชน์ต่อวงการศึกษาวิจัย รวมทั้งยังสามารถนำไปศึกษาต่อยอดเพื่อกำจัดสารพรีโนฟอสที่ปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อมนอกเหนือจากน้ำใต้ดินได้อีกด้วย โดยคาดว่าผลการวิจัยจะสามารถเผยแพร่ผ่านบทความวิจัยในการประชุมวิชาการหรือวารสารทั้งในระดับชาติและระดับนานาชาติ
- 7) องค์ความรู้จากการวิจัยสามารถใช้ประกอบการกำหนดนโยบาย ตลอดจนยุทธศาสตร์การป้องกันและความคุ้มคลุมพิษสิ่งแวดล้อมได้
- 8) แนวทางการศึกษาสามารถนำไปปรับใช้เพื่อกำจัดสารพิษปนเปื้อนชนิดอื่นในน้ำใต้ดินได้

หน่วยงานที่นำผลการวิจัยไปใช้ประโยชน์

- 1) กรมควบคุมมลพิษ ซึ่งดูแลการจัดการมลพิษในสิ่งแวดล้อม ครอบคลุมการจัดการแก้ปัญหาการปนเปื้อนของมลพิษในน้ำใต้ดิน

- 2) หน่วยงานภาครัฐอื่น ๆ เช่น กรมทรัพยากรน้ำบาดาล กระทรวงเกษตร ตลอดจนกระทรวงสาธารณสุขสามารถนำผลการวิจัยไปใช้ประกอบการจัดการน้ำได้ดินและการใช้สารกำจัดศัตรูพืช เพื่อให้สารดังกล่าวเกิดประโยชน์สูงสุดต่อการผลิตแต่ไม่ส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม
- 3) นักวิชาการ ประกอบด้วย อาจารย์ นักวิจัย นิสิตนักศึกษาภายในประเทศและนานาชาติ โดยนักวิชาการสามารถนำผลการวิจัยนี้ไปใช้หรือศึกษาเพิ่มเติมได้ในอนาคต ซึ่งนักวิชาการสามารถทราบผลการวิจัยจากบทความวิชาการหรือผ่านการประชุมวิชาการต่าง ๆ
- 4) บริษัทที่ปรึกษาทางสิ่งแวดล้อม สามารถนำความรู้จากการวิจัยนี้เพื่อแก้ไขปัญหาการปนเปื้อนมลพิษในน้ำได้ดินทั้งสำหรับสารเคมีในพอกส่องหรือเป็นแนวทางเพื่อประยุกต์ใช้สำหรับสารพิษชนิดอื่น ๆ

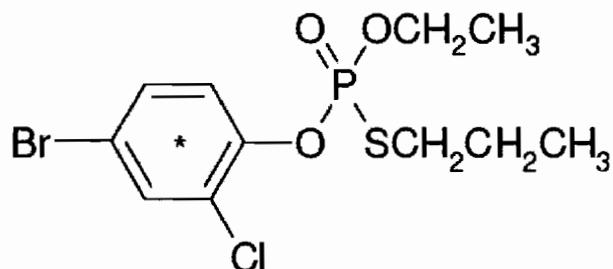
บทที่ 2

ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 สารกำจัดศัตรูพืชโพรฟีโนฟอส

2.1.1 สมบัติของสารโพรฟีโนฟอส

สารโพรฟีโนฟอสเป็นสารเคมีในกลุ่มคลอร์ฟอฟฟ์ คือ $C_{11}H_{15}BrClO_3PS$ ชื่อทางเคมี คือ O-(4-bromo-2-chlorophenyl) O-ethyl S-propyl phosphorothioate มีลักษณะทางโครงสร้างของสารโพรฟีโนฟอสดังภาพที่ 2.1 น้ำหนักโมเลกุล 373.6 มีจุดเดือดที่ $110^{\circ}C$ ที่ 0.001 mmHg ลักษณะทางกายภาพเป็นของเหลวสีเหลืองมีกลิ่นเหม็น ความสามารถในการละลายน้ำ 20 mg/l ที่ $25^{\circ}C$ (Worthing ,1979) สารโพรฟีโนฟอสสามารถละลายได้ดีในตัวทำละลาย อาทิ เช่น อัซโซโน เมทานอล ไฮเดรน มีค่าความหนาแน่นที่ 1.46 g/ml มีความคงตัวในสภาพเป็นกลางและเป็นกรดอ่อนแต่สามารถถูกไฮโดรไอลเซนในสภาพเป็นด่าง



ภาพที่ 2.1 ลักษณะโครงสร้างของสารโพรฟีโนฟอส

2.1.2 การใช้ประโยชน์ของสารโพรฟีโนฟอส

สารโพรฟีโนฟอสได้นำมาใช้ประโยชน์ในทางการเกษตรเพื่อการควบคุมแมลง ทั้งกล่มเพี้ย ไฟ ไร หนอง และแมลงต่าง ๆ ที่เป็นศัตรูพืชในพืชไร่ต่าง ๆ เช่น ฝ้าย มันฝรั่ง ผักต่าง ๆ เป็นต้น โดยพบว่ามีหลายประเทศที่ใช้สารโพรฟีโนฟอสกันอย่างแพร่หลาย ตัวอย่างเช่น ในปากีสถานมีการใช้สารโพรฟีโนฟอส คิดเป็นร้อยละ 80 ของสารกำจัดแมลงทั้งหมดที่ใช้เพื่อควบคุมศัตรูพืชในไร่ฝ้าย ในประเทศไทยมีปัจจุบันใช้สารโพรฟีโนฟอสเป็นอย่างแพร่หลายเพื่อควบคุมแมลงศัตรูพืชในพริกไทย ผัก และรักษาพืชต่างๆ ในสหราชอาณาจักรกว่าร้อย 80 ของรัฐที่มีการเพาะปลูกฝ้ายใช้สารโพรฟีโนฟอส (US EPA, 2006)

ส่วนในประเทศไทยสารโพรฟีโนฟอสถูกใช้ด้านการเกษตร เช่น การปลูกพริกและผักต่าง ๆ รวมถึงการใช้ในการป้องกันกำจัดแมลงศัตรูฝ้าย เช่น หนองเจ้าสมอฝ้าย หนองกระทู้ผัก หนองม้วนใบฝ้าย หนองคีบกินใบ มนวนแดงฝ้าย จากการสำรวจข้อมูลสารโพรฟีโนฟอสที่ใช้ในทางการค้าพบว่าอัตราส่วนการใช้งานทั่วไป ได้แก่ ปริมาณสารโพรฟีโนฟอสเข้มข้น (สารความเข้มข้นร้อยละ 40 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) 80 ลบ.ซม. ผสมน้ำ 20 ลิตร ซึ่งคิดเป็นประมาณ 1.7 กรัมต่อลิตร ฉีดพ่นลงในพืชและดิน

2.1.3 ความเป็นพิษของสารโพรฟีโนฟอส

องค์การอนามัยโลก (WHO, World Health Organization) ได้จำแนกสารโพรฟีโนฟอสให้อยู่ในกลุ่มสารอันตรายในคลาสที่ 2 (toxicity class II) (WHO, 2004) โพรฟีโนฟอสเป็นหนึ่งในสารกลุ่มอร์แกนโนฟอฟอรัสซึ่งเป็นพิษทั้งต่อสัตว์ที่มีกระดูกสันหลัง และไม่มีกระดูกสันหลัง (Moulton et al., 1996; Fulton and Key, 2001) จากงานวิจัยที่ผ่านมาพบว่ามีข้อมูลการศึกษาถึงผลกระทบของสารโพรฟีโนฟอสต่อกระบวนการเปลี่ยนแปลงระบบทางabolish ทั้งในมนุษย์ (Gotoh et al., 2001) และสัตว์ เช่น ปลาкарพ (Ismail et al., 2009) และหมู (Abass et al., 2007) เป็นต้น โดยสารโพรฟีโนฟอสมีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเทอเรสซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่เร่งการสลายตัวของสารอะเซทิลโคลีนซึ่งเป็นสารสื่อประสาทบริเวณรอยต่อของเซลล์ประสาท (Landis and Yu, 1995) ทำให้เกิดการสะสมของอะเซทิลโคลีนซึ่งเป็นสารสื่อประสาทบริเวณรอยต่อของเซลล์ประสาทที่บริเวณต่างๆ จึงเกิดการกระตุ้นเซลล์ประสาทมากและติดต่อกันนาน โดยเฉพาะที่ระบบประสาಥัตโนมัติทำให้กล้ามเนื้อกระตุกและเกร็งและเกิดอาการอ่อนเพลีย หากได้รับในปริมาณมากอาจถึงตายได้ สำหรับในสัตว์พบว่า มีค่า LD₅₀ ในหมูเท่ากับ 538 mg/kg (Pope, 1999)

2.1.4 ความคงทนของสารโพรฟีโนฟอสในสิ่งแวดล้อม

สารโพรฟีโนฟอสมีความคงตัวในสภาวะที่เป็นกลางและเป็นกรดอ่อนๆ แต่จะถูกไฮโดรไลซ์ได้ง่ายในสารละลายที่เป็นด่าง สารโพรฟีโนฟอสมีค่าครึ่งชีวิตในน้ำอยู่ที่ประมาณ 0.25 ถึง 93 วัน และมีค่าครึ่งชีวิตในดินอยู่ที่ประมาณ 1 สัปดาห์ (Roberts and Hutson, 1998)

2.2 การฟื้นฟูพื้นที่ปนเปื้อนด้วยวิธีการทางชีวภาพ

การฟื้นฟูพื้นที่ปนเปื้อนด้วยวิธีการทางชีวภาพ (bioremediation) หมายถึง การกำจัดมลสารโดยการย่อยสลายหรือเปลี่ยนรูปสารให้มีความเป็นพิษลดลงด้วยกระบวนการทางชีวภาพ (Alexander, 1999) โดยที่นำไปเป็นกระบวนการดังกล่าวเป็นการทำลายโดยจุลินทรีย์ การฟื้นฟูพื้นที่ปนเปื้อนด้วยวิธีการทางชีวภาพเป็นการบูรณาการความรู้ทั้งด้านวิศวกรรม จุลชีววิทยา ชีวเคมี นิเวศวิทยา ตลอดจนธารนิเวศวิทยาเพื่อควบคุมให้จุลินทรีย์สามารถย่อยสลายสารพิษเป้าหมายได้ภายใต้สภาวะแวดล้อมต่าง ๆ กระบวนการการฟื้นฟูพื้นที่ปนเปื้อนด้วยวิธีการทางชีวภาพเป็นการปรับปรุงอัตราการย่อยสลายมลสารด้วยการเติมสารอาหาร สารคาร์บอน ตลอดจนตัวให้อิเล็กตรอน (electron donor) นอกจากนี้ยังอาจเติมจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการย่อยสลายมลสารเพื่อเพิ่มอัตราการย่อยสลายได้อีกด้วย เป้าหมายของการฟื้นฟูพื้นที่ปนเปื้อนด้วยวิธีการทางชีวภาพ คือ การเปลี่ยนสภาพมลสารให้กลายเป็นแร่ธาตุอย่างสมบูรณ์ (complete mineralization) โดยไม่มีสารมัลยันต์ (intermediate) สะสมในสิ่งแวดล้อม องค์ประกอบพื้นฐานของการฟื้นฟูพื้นที่ปนเปื้อนด้วยวิธีการทางชีวภาพ ได้แก่ ชนิดและลักษณะสมบัติของจุลินทรีย์ และปัจจัยแวดล้อมที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์และการย่อยสลายมลสาร (Alexander, 1999)

2.2.1 ชนิดและลักษณะสมบัติของจุลินทรีย์ในการย่อยสลายทางชีวภาพ

จุลินทรีย์เป็นองค์ประกอบที่สำคัญที่สุดในกระบวนการการพื้นฟื้นที่ปนเปื้อนด้วยวิธีการทางชีวภาพ กล่าวคือ จุลินทรีย์จะผลิตเอนไซม์ซึ่งเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาชีวภาพ (biocatalyst) เพื่อใช้การในย่อยสลายมลสาร ดังนั้นสามารถกล่าวได้ว่าความสามารถในการย่อยสลายมลสารและวิถีการย่อยสลาย (degradation pathway) ขึ้นอยู่กับจุลินทรีย์และความสามารถในการผลิตเอนไซม์ ประเภทของจุลินทรีย์สามารถแบ่งออกได้หลายรูปแบบ เช่น แบ่งตามแหล่งของคาร์บอน และแหล่งพลังงานที่ได้รับ โดยมีรายละเอียดดังนี้

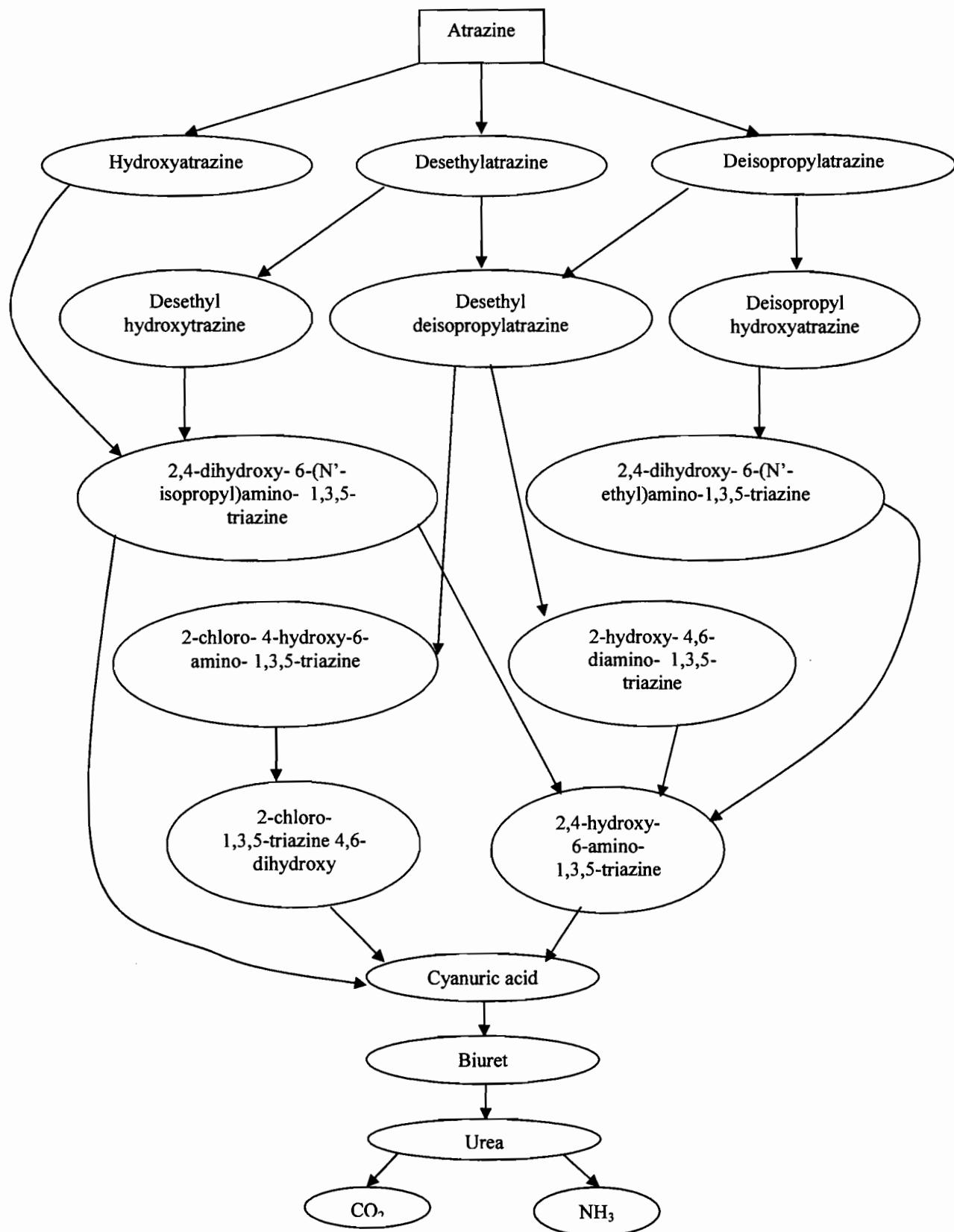
1. การแบ่งประเภทของจุลินทรีย์ตามแหล่งของคาร์บอน (carbon source)

- เยหอโรโทรป (heterotroph) คือ จุลินทรีย์ที่ใช้คาร์บอนจากสารอินทรีย์ใน การสร้างเซลล์ สามารถกล่าวได้ว่าจุลินทรีย์กลุ่มนี้ใช้สารอินทรีย์เป็นอาหาร ดังนั้นสารอินทรีย์ที่ปนเปื้อนอยู่ในพื้นที่จะถูกกำจัดไป
- ออโตโทรป (autotroph) คือ จุลินทรีย์ที่ใช้คาร์บอนจากกําช คาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2) เพื่อการสร้างเซลล์ โดยทั่วไปกลุ่มจุลินทรีย์นี้มีบทบาทในการกำจัดสารอินทรีย์ แต่มีบทบาทอื่น ๆ ที่สำคัญ เช่น จุลินทรีย์ที่ กำจัดไนโตรเจนด้วยกระบวนการในตริฟิเคชัน (nitrification) เป็นต้น

2. การแบ่งประเภทของจุลินทรีย์ตามแหล่งของพลังงาน (energy source)

- โฟโตโทรป (phototroph) คือ จุลินทรีย์ที่ใช้แสงเป็นแหล่งพลังงาน ซึ่งจุลินทรีย์ ประเภทนี้สามารถแบ่งย่อยตามแหล่งエネルギーที่ใช้ กลุ่มย่อยที่เป็นสารอินทรีย์ที่แหล่งエネルギー เรียกว่า โฟโตเยหอโรโทรป (photoheterotroph) เช่น แบคทีเรียที่กำจัดซัลฟอร์ (sulfur-reducing bacteria) เป็นต้น ส่วนจุลินทรีย์ที่ใช้กําชคาร์บอนไดออกไซด์เป็นแหล่งエネルギー เรียกว่า โฟโตออโตโทรป (photoautotroph) เช่น สาหร่าย และแบคทีเรียที่สังเคราะห์แสง เป็นต้น
- เคโมโทรป (chemotroph) คือ จุลินทรีย์ที่ได้แหล่งพลังงานจากปฏิกิริยา ออกซิเดชัน-รีดักชัน ซึ่งแบ่งย่อยตามแหล่งエネルギーได้เป็น 2 กลุ่มย่อย คือ กลุ่มที่ใช้คาร์บอนจากสารอินทรีย์ เรียกว่า เคโมเยหอโรโทรป (chemoheterotroph) เช่น โพโตชา รา และ แบคทีเรียส่วนใหญ่ ซึ่งจุลินทรีย์ ประเภทนี้ได้พลังงานจากปฏิกิริยาออกซิเดชัน-รีดักชันการย่อยสลายสารอินทรีย์ ส่วนจุลินทรีย์ที่ใช้แหล่งエネルギーจากกําชคาร์บอนไดออกไซด์เรียกว่า เคโมออโต โทรป (chemoautotroph) เช่น ในตรีไฟอิงแบคทีเรีย (nitrifying bacteria) เป็นต้น สำหรับจุลินทรีย์กลุ่มนี้จะได้พลังงานมาจากปฏิกิริยา ออกซิเดชัน-รีดักชัน ของสารอินทรีย์ เช่น แอมโมเนียม ในธรรมชาติ และซัลไฟด์ เป็นต้น

การย่อยสลายมลสารอินทรีย์เกิดจากการเปลี่ยนรูปมลสาร (biotransformation) เป็นมลสารอินทรีย์ชนิดอื่น ๆ หรืออาจกล่าวได้ว่ากระบวนการย่อยสลายไม่สมบูรณ์ แต่ถ้ากระบวนการย่อยสลายสมบูรณ์สารอินทรีย์จะถูกเปลี่ยนเป็นแร่ธาตุหรือสารอินทรีย์ (mineralization) จุลินทรีย์ชนิดต่าง ๆ อาจมีความสามารถในการย่อยสลายได้ทั้งมลสารและสารอินทรีย์มัธยันตรีได้อย่างสมบูรณ์หรือเพียงบางชนิด ตัวอย่างเช่น การย่อยสลายสารกำจัดศัตรูพืชอาทราราซีน (atrazine) มีวิถีการย่อยสลายทางชีวภาพสมบูรณ์ดังภาพที่ 2.2 และมีจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการย่อยสลายได้สมบูรณ์และบางส่วนดังตารางที่ 2.1



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

ตารางที่ 2.1 จุลินทรีย์และผลิตภัณฑ์ของการย่อยสลายสารอาหารชีน

Microorganisms	Degradation products	References
<i>Pseudomonas ADP</i>	CO ₂	Mandelbaum et al., 1995.
<i>Rhodococcus TE1</i>	DIA, DEA	Shao and Behki, 1995.
<i>Ralstonia M91-3</i>	CO ₂	Radosevich et al., 1995.
<i>Alcaligenes SG1</i>	CO ₂	Boundy et al., 1997.
<i>Rhizobium PATR</i>	CO ₂	Bouquard et al., 1997.
<i>Agrobacterium J14A</i>	CO ₂	Struthers et al., 1998.
<i>Bacterium 38/38</i>	CO ₂	de Souza et al., 1998.
<i>Clavibacter michiganese ATZ1</i>	N-ethylammelide	de Souza et al., 1998.
<i>Arthrobacter aurescens TC1</i>	Cyanuric acid	Strong et al., 2002.
<i>Nocardiooides</i> sp. SP12	Cyanuric acid	Piutti et al., 2003.
<i>Chelatobacter heintzii</i> C1t	Cyanuric acid	Rousseaux et al., 2003.
<i>Arthrobacter nicotinovorans</i> H1M	Cyanuric acid	Aislabie et al., 2005.

2.2.2 ปฏิกิริยาและปัจจัยที่มีผลต่อการย่อยสลายทางชีวภาพ

ประเภทของปฏิกิริยาการเปลี่ยนหรือย่อยสลายมลสารด้วยกระบวนการทางชีวภาพสามารถแบ่งออกได้เป็น 6 ประเภท (อลิสา วงศ์ใน, 2553) ดังต่อไปนี้

- ปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส (hydrolysis)
- ปฏิกิริยาการแตกตัว (cleavage)
- ปฏิกิริยาออกซิเดชัน-รีดักชัน (oxidation and reduction)
- ปฏิกิริยาดีไฮdroเจนชัน (dehydrogenation)
- ปฏิกิริยาดีไฮdroไฮโลเจนชัน (dehydrohalogenation)
- ปฏิกิริยาการแทนที่ (substitution)

ปัจจัยที่มีผลต่อกระบวนการย่อยสลายในการฟื้นฟูพื้นที่ป่าเบื้องมือหลายประการ ซึ่งมีรายละเอียด ดังนี้

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

- สำหรับย่อยสลายสารพิษเป็นจุลินทรีย์ที่มีการคัดแยกได้จากพื้นที่ที่เป็นปื้นที่ที่บ่อเป็นสารพิษนั้น ๆ ที่สามารถปรับตัวทันต่อสารพิษและสามารถย่อยสลายสารพิษนั้นได้
2. แหล่งพลังงาน ใน การย่อยสลายสารพิษจะเกิดปฏิกิริยาต่าง ๆ ได้แก่ ปฏิกิริยาออกซิเดชัน-รีดักชัน ซึ่งสุดท้ายจะเป็นการสร้างพลังงานให้แก่เซลล์จุลินทรีย์เพื่อการเจริญเติบโต จากการศึกษาการย่อยสลายสารมลพิษของจุลินทรีย์ เพื่อใช้เป็นแหล่งพลังงาน (Malghani et al., 2009; Xie et al., 2009) พบว่าจุลินทรีย์มีการย่อยสลายสารมลพิษเพื่อใช้เป็นแหล่งพลังงานในการเจริญเติบโต เช่นงานวิจัยในอดีตได้ศึกษาการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ในอาหารเลี้ยงเชื้อเอ็มเอสเอ็ม (Minimal Salt Medium ; MSM) ที่สมสารไดอะซิโนน (diazinon) ผลการศึกษาการย่อยสลายสารพิษ และผลของการเจริญเติบโตแสดงให้เห็นว่าเชื้อจุลินทรีย์มีการใช้สารพิษเพื่อเป็นแหล่งพลังงานสำหรับการเจริญเติบโต โดยเมื่อเวลาผ่านไปความเข้มข้นของสารลดลงกว่าร้อยละ 80 และจำนวนเซลล์มีการเพิ่มกว่า 3 เท่าในระยะเวลา 14 วัน
 3. ความชื้น ความชื้นหรือปริมาณน้ำในสิ่งแวดล้อมเป็นอีกปัจจัยที่มีผลต่อการย่อยสลายสารพิษของจุลินทรีย์ โดยส่งผลต่อการเจริญเติบโตและการเปลี่ยนรูปสารพิษการกระจายตัว และการละลายของก้าชออกซิเจน และปริมาณของสารพิษที่จุลินทรีย์สามารถนำมาใช้ประโยชน์ได้ ขึ้นอยู่กับสมบัติของสารพิษนั้น ๆ
 4. ความเป็นกรดด่าง ความเป็นกรดด่างของสิ่งแวดล้อมมีผลต่อการดูดซึมสารอาหาร การเจริญและการทำงานของจุลินทรีย์ ดังนั้นในการย่อยสลายสารพิษทางชีวภาพจึงจำเป็นต้องมีการควบคุมความเป็นกรดด่างอย่างสม่ำเสมอ จากการศึกษาที่ผ่านมาได้มีการทดลองเพื่อย่อยสลายสารมลพิษในสภาพของความเป็นกรดด่างที่ต่างกัน ตัวอย่างเช่น จากงานวิจัยที่ผ่านมา (Malghani et al., 2009) ได้ศึกษาความสามารถในการย่อยสลายสารโพเรฟิโนฟอสของจุลินทรีย์ที่ผ่านการคัดแยก โดยในการทดลองได้มีการทดสอบผลของความเป็นกรดด่างต่อประสิทธิภาพในการย่อยสลายสารโพเรฟิโนฟอส ช่วงพีเอชที่ทดสอบ คือ 5.5-7.2 ผลการทดลองพบว่าจุลินทรีย์สามารถย่อยสลายสารโพเรฟิโนฟอสได้ดีที่สุดที่พีเอช 6.5 จากผลดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าที่สภาพความเป็นกรดด่างต่างกันมีผลต่อความสามารถในการย่อยสลายสารมลพิษของจุลินทรีย์
 5. อุณหภูมิ เป็นปัจจัยที่มีผลต่ออัตราการย่อยสลายสารพิษ โดยอุณหภูมิจะมีผลต่อการเกิดปฏิกิริยาเคมีต่าง ๆ รวมไปถึงการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ที่มีความจำเพาะต่ออุณหภูมิในสภาพแวดล้อมนั้น ๆ จากการวิจัยของ Head and Oleszkiewicz (2004) ได้ศึกษาการย่อยสลายในโตรเจน โดยทำการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิเพื่อศึกษาการเกิดปฏิกิริยาในตรีฟิเคชัน (nitrification) ของจุลินทรีย์ ทดลองโดยใช้อุณหภูมิเริ่มต้นที่ 20 25 และ 30°C อุณหภูมิสุดท้ายที่ 10°C จากการทดลองพบว่าอุณหภูมิเริ่มต้นที่ 20°C มีการลดลงของแอมโมเนียในโตรเจน (NH_3-N) มากที่สุดรองลงมาคือที่อุณหภูมิ 25 และ 30°C ซึ่งการลดลงของแอมโมเนียในโตรเจนแสดงให้เห็นถึงการเกิดปฏิกิริยาในตรีฟิเคชันมากที่สุด จากผลดังกล่าวจะเห็นว่าอุณหภูมิมีผลต่อการทำงานของจุลินทรีย์และการเกิดปฏิกิริยาเคมีต่าง ๆ

6. สารอาหาร สารอาหารเป็นสิ่งจำเป็นต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ในการเจริญเติบโต โดยสารอาหารหลักได้แก่ คาร์บอน ในไตรเจน และฟอสฟอรัส รวมไปถึงสารอินทรีย์อื่น ๆ ซึ่งโดยทั่วไปสารพิษที่ปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อมจุลินทรีย์อาจสามารถย่อยลายและนำสารนั้นมาเป็นสารอาหารได้ โดยได้มีการศึกษาผลของสารอาหารต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ (Xie et al., 2009; Malghani et al., 2009) การศึกษาดังกล่าวเติมสารอาหารนอกเหนือจากสารพิษที่จุลินทรีย์สามารถย่อยลายเพื่อใช้เป็นแหล่งพลังงานหลักเพิ่มลงไป เช่นในงานวิจัยของ Xie et al. (2009) ได้มีการศึกษาการย่อยลายสารมาลาไทอ่อน (Malathion) โดยมีการเติมสารอาหารที่นอกเหนือจากสารพิษ ซึ่งผลการทดลองพบว่าจุลินทรีย์สามารถในการย่อยลายสารพิษเพิ่มมากขึ้นกว่าร้อยละ 60 เมื่อเทียบกับชุดที่ไม่มีการเติมสารอาหาร จากการดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าสารอาหารมีความจำเป็นต่อการย่อยลายสารพิษของจุลินทรีย์
7. โครงสร้างของสารพิษ ในการย่อยลายสารพิษทางชีวภาพโครงสร้างและลักษณะสมบัติของสารพิษ เป็นปัจจัยที่ส่งผลต่อการย่อยลายสารและการดูดซึมน้ำสารมาใช้เป็นสารอาหารในการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ จากรายงานวิจัยที่ผ่านมาได้มีการนำจุลินทรีย์มาใช้ย่อยลายสารอาhraซีน (Li et al., 2008) ผลการศึกษาระบุว่า จุลินทรีย์ใช้สารอาhraซีนเป็นแหล่งในไตรเจน และจากการวิจัย Malghani et al., (2009) ได้คัดแยกเชื้อที่สามารถย่อยลายสารโพร์ฟิโนฟอส จากการวิจัยระบุได้ว่า จุลินทรีย์ย่อยลายสารโพร์ฟิโนฟอสเพื่อใช้เป็นแหล่งคาร์บอน จากการวิจัยทั้งสองแสดงให้เห็นว่าเนื่องจากโครงสร้างของสารพิษที่ต่างกัน จุลินทรีย์จะมีการย่อยลายสารพิษนั้นเพื่อใช้เป็นแหล่งสารอาหารต่างกัน
8. จำนวนครั้งหรือความถี่ของการปนเปื้อนสารพิษ เมื่อมีการปนเปื้อนของสารพิษในสิ่งแวดล้อม จุลินทรีย์สามารถปรับตัวให้ทนต่อสารหรือมีการย่อยสารพิษนั้น และเมื่อมีการปนเปื้อนสารพิษเดิมหรือสารพิษที่มีโครงสร้างคล้ายกันในครั้งต่อมา จะทำให้จุลินทรีย์ในบริเวณดังกล่าวไม่ต้องใช้เวลาในการปรับตัวนาน ส่งผลต่อความสามารถในการย่อยลายสารพิษที่ปนเปื้อนสูงขึ้น จากรายงานวิจัยหลายชิ้นที่ได้มีการศึกษาเกี่ยวกับการคัดแยกจุลินทรีย์จากพื้นที่ปนเปื้อนสารพิษเพื่อใช้สำหรับการย่อยลายสารพิษ โดยทำการคัดแยกจุลินทรีย์จากพื้นที่ที่มีการปนเปื้อนของสารพิษ สะสมเป็นเวลานานเพื่อให้ได้จุลินทรีย์ที่ทนต่อสารพิษ และสามารถย่อยสารพิษนั้นได้อย่างมีประสิทธิภาพ (Li et al., 2007; Wang et al., 2007; Benimeli et al., 2008; Li et al., 2008; Xie et al., 2009; Malghani et al., 2009)

2.3 กระบวนการเติมทางชีวภาพ

กระบวนการเติมทางชีวภาพ (bioaugmentation) หรือ การเติมสารชีวภาพเป็นกระบวนการที่ใช้ในทางเกษตรมาเป็นเวลานาน (van Veen et al., 1997; Gentry et al., 2004) เช่น การเติมปุ๋ยชีวภาพซึ่งมีจุลินทรีย์ที่ช่วยส่งเสริมการเผาปลูกพืช การปลูกพืชตระกูลถั่วซึ่งที่รากพืชมีแบคทีเรียที่ช่วยในการดึงน้ำและแร่ธาตุในการเผาปลูก เป็นต้น ในงานสิ่งแวดล้อมการเติมทางชีวภาพเป็นกระบวนการที่ใช้ในการย่อยสลายสารอินทรีย์ในถังเชปติก (septic tank) และการทำปุ๋ยหมักอย่างแพร่หลาย (Fang and Wong, 2001) ต่อมาการเติมทางชีวภาพได้รับการพัฒนาเพื่อใช้ในการฟื้นฟูพื้นที่ป่าเปื้อน (van Veen et al., 1997; Devinny and Chang, 2000; Gentry et al., 2004)

2.3.1 ประเภทของการเติมทางชีวภาพ

เทคนิคการเติมทางชีวภาพสามารถจำแนกออกได้เป็น 4 กลุ่ม (Gentry et al., 2004)

ดังนี้

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

เทคนิคการเติมทั้งหมดส่วนมากแล้วยังอยู่ในขั้นตอนการศึกษาวิจัย มีเพียงการเติมเซลล์ที่ได้รับการพัฒนาจนกระทั่งประยุกต์ใช้จริง เนื่องจากเป็นวิธีการไม่ซับซ้อนและมีประสิทธิภาพในการฟื้นฟูการปนเปื้อนสูง สาเหตุที่จำเป็นต้องมีการเติมเซลล์เนื่องจากจุลินทรีย์ในธรรมชาติอาจไม่สามารถกำจัดสารพิษหรือใช้เวลานานในการกำจัด ดังนั้นการเติมเซลล์จึงสามารถแก้ปัญหาดังกล่าวได้ โดยปัจจัยพิจารณาในการเติมเซลล์ประกอบด้วย แหล่งที่มาของเซลล์และปัจจัยแวดล้อมที่มีผลต่อเซลล์ที่ถูกเติม

2.3.2 แหล่งที่มาของเชลล์ที่ใช้ในการเติมเชลล์

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

- แหล่งปนเปื้อนอื่น ก่อว่าคือ แหล่งปนเปื้อนอื่นซึ่งมีสารปนเปื้อนประเภทเดียวกัน ซึ่งได้คัดแยกและระบุสายพันธุ์จุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการกำจัดสารปนเปื้อนแล้ว อาจนำมาใช้ในพื้นที่อื่น ๆ ได้ เช่นกัน ตัวอย่างเช่น ในการทำจัดสารอาหารชีน *Pseudomonas* sp. ADP ซึ่งมีความสามารถในการกำจัดสารอาหารชีนสูงมาก (Mandelbaum et al., 1995) จากนั้นจึงได้มีทั้งการศึกษาวิจัยตลอดจนการประยุกต์ใช้จุลินทรีย์ดังกล่าวในการฟื้นฟูพื้นที่ปนเปื้อนตามมากรามาในหลายประเทศ (Katz et al., 2000; Seffernick et al., 2000; Clausen et al., 2002; Gonzalez et al., 2003; Neumann et al., 2004) เป็นต้น
- พื้นที่ศึกษา แหล่งจุลินทรีย์ที่ใช้ในการเติมเชลล์ที่สำคัญคือที่พื้นที่ปนเปื้อน ก่อว่าคือ ในพื้นที่ปนเปื้อนเองมีความเป็นไปได้ที่จะมีจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการย่อยสลายสารปนเปื้อน ซึ่งสามารถกระทำได้โดยการคัดแยกจุลินทรีย์จากดินหรือน้ำที่ปนเปื้อน จุลินทรีย์ดังกล่าวมีข้อดี คือ ภายหลังจากการคัดแยกจุลินทรีย์ที่ต้องการได้แล้ว เมื่อนำไปใช้จริงจุลินทรีย์ดังกล่าวมีความคุ้นเคยกับสภาพแวดล้อมของพื้นที่ศึกษา ดังนั้นจุลินทรีย์นี้จะสามารถเจริญเติบโตและมีประสิทธิภาพในการกำจัดสารปนเปื้อนสูง (Devinny and Chang, 2000)
- จุลินทรีย์ทางการค้า เป็นอีกทางเลือกของแหล่งจุลินทรีย์ ข้อดีของจุลินทรีย์ประเภทนี้ คือ ความสะดวกในการใช้งาน แต่อย่างก็ตามจุลินทรีย์นี้มีข้อเสีย คือ ในบางครั้งข้อมูลของจุลินทรีย์เป็นความลับทางการค้า ส่งผลให้กรณีที่มีปัญหาในขณะใช้งานอาจจัดการแก้ไขเองได้ยาก รวมทั้งจุลินทรีย์ดังกล่าวมีได้นำมาจากพื้นที่ศึกษาโดยตรงอาจมีปัญหาการปรับสภาพกับสิ่งแวดล้อม (Qasim and Stinehelfer, 1982; Devinny and Chang, 2000)
- จุลินทรีย์ดัดแปลงพันธุกรรม จุลินทรีย์ประเภทนี้มีการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมซึ่งอาจเป็นการรวมหรือเคลื่อนย้ายยีนบางอย่างเพื่อการกำจัดสารปนเปื้อน ซึ่งวิธีการนี้เป็นทางเลือกในการกำจัดสารปนเปื้อนหลายชนิดพร้อมกัน ตัวอย่างเช่น ในงานวิจัยของ Wackett et al. (1995) ได้ดัดแปลงจุลินทรีย์ *Pseudomonas putida* ให้มียีนที่สามารถควบคุมการกำจัดสารที่มีฟลูออรินคลอรีน และโพรเม็นเป็นองค์ประกอบ ดังนั้นจุลินทรีย์ดังกล่าวสามารถกำจัดสารทั้งสามกลุ่มได้ในเวลาเดียวกัน แต่อย่างไรก็ตามวิธีการนี้มีค่าใช้จ่ายสูง มีความยุ่งยากในการปฏิบัติ และยังอาจมีอันตรายอื่น ๆ จำกัดด้วย (Devinny and Chang, 2000)



2.3.3 ปัจจัยแวดล้อมที่มีผลต่อเซลล์ที่ถูกเติม

ปัจจัยแวดล้อมที่มีผลต่อเซลล์ที่ถูกเติมในการพื้นฟูพื้นที่ป่าเบื้องมีรายละเอียดดังตารางที่ 2.2 (van Veen et al., 1997) ซึ่งปัจจัยแวดล้อมสามารถจำแนกได้เป็น 2 กลุ่ม คือ ปัจจัยทางชีวภาพและปัจจัยอื่น ปัจจัยแวดล้อมนี้ส่งผลต่อจุลินทรีย์แตกต่างกันออกไปตามกรณีศึกษา โดยอาจส่งผลต่อจำนวนจุลินทรีย์หรือกิจกรรมเมtabolic (metabolic activity) ซึ่งส่งผลต่อการพื้นฟูพื้นที่เช่นกัน

ตารางที่ 2.2 ปัจจัยแวดล้อมที่มีผลต่อเซลล์ที่ถูกเติม

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

2.4 กระบวนการกระตุ้นทางชีวภาพ

กระบวนการกระตุ้นทางชีวภาพ (biostimulation) คือ การเติมสารกระตุ้นทางชีวภาพให้จุลินทรีย์ในธรรมชาติ เช่น สารอาหาร สารกระตุ้นสร้างเอนไซม์ สารปรับสภาพแวดล้อมหรือสภาวะให้เหมาะสมสมต่อจุลินทรีย์ เป็นต้น โดยกระบวนการดังกล่าวมีเป้าหมายเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการย่อยสลายสารปนเปื้อนโดยจุลินทรีย์ในธรรมชาติ ซึ่งอาจเป็นการลดระยะเวลาในการปรับตัวหรือเร่งอัตราการย่อยสลายก็ได้ ปัจจัยที่มีผลต่อการการปรับตัวของจุลินทรีย์ ได้แก่ ชนิดและปริมาณสารปนเปื้อน อุณหภูมิ ค่า pH เอช ปริมาณออกซิเจน และปริมาณสารอาหาร เป็นต้น การกระตุ้นทางชีวภาพ

สามารถกระทำได้หลายลักษณะ โดยวิธีการที่นิยม คือ การกระตุ้นโดยการเติมสารอาหารเพื่อช่วยการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ และการกระตุ้นโดยการเติมสารหนี้ยานำเข้าในไซม์หรือเกิดเมตาโบลิซึมร่วม ซึ่งวิธีการทั้งสองมีรายละเอียดดังต่อไปนี้

2.4.1 การกระตุ้นโดยการเติมสารอาหารเพื่อช่วยการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์

การกระตุ้นด้วยการเติมสารอาหารมีวัตถุประสงค์เพื่อเพิ่มจำนวนจุลินทรีย์ ซึ่งจะส่งผลให้ประสิทธิภาพในการกำจัดสารปนเปื้อนเพิ่มตามมาด้วย สารอาหารที่เติมโดยทั่วไป ได้แก่ สารคาร์บอนและสารในโตรเจนในปริมาณที่เหมาะสมต่อจุลินทรีย์นั้น ๆ เนื่องจากจุลินทรีย์จำเป็นต้องใช้คาร์บอนและในโตรเจนในการเจริญเติบโตและเพิ่มจำนวน ซึ่งแม้สารปนเปื้อนอาจประกอบด้วยสารอาหารดังกล่าว แต่อาจมีปริมาณไม่เพียงพอส่งผลให้การเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ไม่ดี หรือในทางกลับกันหากมีการเติมสารอาหารในปริมาณไม่เหมาะสม อาจส่งผลในการยับยั้งการทำงานของจุลินทรีย์ได้

ตัวอย่างเช่น ในการย่อยสลายสารอาหารซึ่งเป็นสารอินทรีย์ที่มีหัวไนโตรเจนและคาร์บอนเป็นองค์ประกอบ พบร่วมกับจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการย่อยสลายสารอาหารซึ่งจำเป็นต้องกระตุ้นด้วยการเติมสารในโตรเจนและการรับอนแทกต่างกัน โดยพบว่าแบคทีเรีย *Pseudomonas* sp. ADP และ *Agrobacterium radiobacter* J14a (Mandelbaum et al., 1995; Struthers et al., 1998) จำเป็นต้องเติมสารคาร์บอนอินทรีย์ในการกระตุ้นการย่อยสลายสารอาหารซึ่ง ส่วนการศึกษาของ Gonzalez et al. (2003) พบร่วมในการย่อยสลายสารอาหารซึ่งโดยแบคทีเรีย *Pseudomonas* sp. ADP ถูกยับยั้งเมื่อมีการเติมสารในโตรเจนเพิ่มเข้าไป ในขณะที่แบคทีเรีย *Ralstonia* sp. M91-3 (Radosevich et al., 1995) สามารถใช้สารอาหารซึ่งเป็นหัวไนโตรเจนโดยไม่จำเป็นต้องเติมสารอาหารหลักเพิ่ม

นอกจากนี้การกระตุ้นด้วยการเติมสารอาหารยังอาจต้องเติมสารอินทรีย์อื่น ๆ ที่จำเป็น หรือสารปรับสมภาวะให้เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ เช่น สารปรับค่าพีเอช ปริมาณอากาศ และความชื้น เป็นต้น ซึ่งปัจจัยเหล่านี้นอกจากจะส่งผลต่อการเจริญเติบโตหรือจำนวนจุลินทรีย์แล้วยังสามารถส่งผลต่ออัตราการย่อยสลายสารปนเปื้อนด้วย กล่าวคือ บางกรณี จุลินทรีย์มีการเจริญเติบโตได้ดีแต่มีอัตราการย่อยสลายต่ำ ซึ่งอาจเกิดจากมีสภาวะแวดล้อมไม่เหมาะสมต่อการย่อยสลายสารปนเปื้อนได้

2.4.2 การกระตุ้นโดยการเติมสารหนี้ยานำเข้าในไซม์หรือเกิดเมตาโบลิซึมร่วม

ตามที่ได้อ้างในเบื้องต้นเกี่ยวกับการย่อยสลายทางชีวภาพว่าเป็นกระบวนการที่เกี่ยวข้องกับการเร่งปฏิกิริยาด้วยเอนไซม์ การสร้างเอนไซม์ของจุลินทรีย์ในบางกรณีเกิดขึ้นได้เอง แต่ในบางครั้งจำเป็นต้องมีการเหนี่ยวนำ (induction) ส่วนมากแล้วการย่อยสลายสารปนเปื้อนเป็นกระบวนการคatabolic (catabolic) ซึ่งต้องการการเหนี่ยวนำโดยมักจะเกิดขึ้นในระยะปรับตัว (lag phase) ของการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ ตัวอย่างการเติมสารหนี้ยานำ เช่น ในการศึกษาของ Kaneva et al. (1998) เกี่ยวกับการย่อยสลายสารกำจัดศัตรูพืชพาราโนนพบว่าสารโคบัลต์คลอไรด์ (cobalt chloride) สามารถเหนี่ยวนำการทำงานของเอนไซม์օอแกโนฟอฟอรัสไฮดrolase (organophosphorus hydrolase) ได้

ส่วนการเกิดเมตาโบลิซึมร่วม (co-metabolism) คือ การที่จุลินทรีย์สามารถเปลี่ยนรูปสารหนึ่ง ๆ ที่ไม่ใช่สารอาหาร พร้อมกับการใช้สารอาหารในการเจริญเติบโต โดยสารดังกล่าวอาจมีหรือไม่มีประโยชน์ต่อจุลินทรีย์ได้ หลักการเมตาโบลิซึมร่วมเกิดจากการศึกษาในอดีตพบว่าอัตราการย่อยสลายของสารบินเป็นไปไม่สัมพันธ์กับอัตราการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ โดยในระยะแรกของการศึกษาระบวนการเมตาโบลิซึมร่วมพบว่าการย่อยสลายสารอีเทน โพรเพน และบิวเทนด้วยแบคทีเรีย *Pseudomonas methanica* เกิดขึ้นได้ เมื่อมีการเลี้ยงแบคทีเรียดังกล่าวในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีมีเทนเป็นสารอาหาร ปรากฏการณ์ดังกล่าวสามารถบอกได้ว่าเป็นกระบวนการเมตาโบลิซึมร่วมที่มีมีเทนเป็นสารอาหาร ปัจจุบันหลักการเมตาโบลิซึมร่วมได้รับการพัฒนาและประยุกต์ใช้ในการพื้นฟูพื้นที่ปนเปื้อนอย่างต่อเนื่อง เช่น การกำจัดสารเพนตะคลอโรฟีโนล (Banerji and Bajpai, 1994) สารคิวโนลีน (Jianlong et al., 2002) และสารกำจัดศัตรูพืชมาราไโอลอน (Xie et al., 2009) เป็นต้น

บทที่ 3

ระเบียบวิธีวิจัย

3.1 ครอบครัววิจัย

งานวิจัยนี้สามารถแบ่งออกได้เป็น 3 ส่วน ดังครอบแนวคิดของงานวิจัยที่แสดงในภาพที่ 3.1 ในส่วนแรกเป็นการคัดแยกกลุ่มจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการกำจัดสารโพร์ฟินฟอสเพื่อใช้ในการเติมเซลล์ (bioaugmentation) จากนั้นจึงนำกลุ่มจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้จากส่วนที่หนึ่งมาศึกษารายละเอียดสารโพร์ฟินฟอสภายใต้สภาวะที่ได้รับการกระตุ้นทางชีวภาพ (biostimulation) แล้วจึงสาขิตการใช้จุลินทรีย์ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมสำหรับการกำจัดสารโพร์ฟินฟอสในน้ำได้ดี

Part 1: Enrichment of bioaugmented profenofos-degrading mixed cultures (PFMC)

Enrichment of bioaugmented profenofos-degrading mixed cultures (PFMC)

- To enrich PFMC from contaminated soil
- To study PFMC growth
- To study profenofos degradation kinetics by PFMC

Characterization of bioaugmented PFMC

- To isolate pure cultures from PFMC
- To test profenofos-degrading ability
- To identify 16S rDNA of isolates
- To determine profenofos degradation kinetics by selected isolates

Part 2: Optimization of PFMC stimulated bioaugmentation for profenofos degradation

Determination of potential co-substrate for biostimulation

- To study PFMC growth in presence of sodium succinate, sodium acetate, and glucose
- To examine profenofos degradation in presence of sodium succinate, sodium acetate, and glucose

Optimization of potential co-substrate for biostimulation

- To study PFMC growth in presence of selected co-substrate at different concentrations
- To examine profenofos degradation in presence of selected co-substrate at different concentrations

Part 3: Demonstration of profenofos bioremediation by stimulated PFMC bioaugmentation

- To investigate profenofos degradation under selected conditions (only bioaugmentation and stimulated bioaugmentation) at different groundwater flow rates

ภาพที่ 3.1 กรอบแนวคิดงานวิจัย

3.2 วิธีดำเนินการวิจัย

งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาในระดับห้องปฏิบัติการโดยศึกษาทดลองที่ภาควิชาวิศวกรรมเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี และภาคชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยมีการเก็บข้อมูลและตัวอย่างดินจากแปลงปลูกพริก ตำบลหัวเรือ อำเภอเมือง จังหวัดอุบลราชธานี การดำเนินงานแบ่งออกเป็น 5 ช่วง คือ

1. **การศึกษาและรวบรวมข้อมูลที่เกี่ยวข้อง** โดยขั้นตอนนี้เป็นการรวบรวมข้อมูลทฤษฎี การงานวิจัยที่เกี่ยวข้องในอดีต
2. **การออกแบบการทดลอง** ขั้นตอนนี้เป็นการวางแผนและออกแบบการทดลอง โดยมุ่งเน้นให้ออกแบบให้ครอบคลุมวัตถุประสงค์ของการศึกษาทั้งหมด และมีชุดเบรียบเทียบเพื่อสามารถบ่งชี้ความเชื่อมั่นของผลการศึกษาได้
3. **การทดลองและการอภิปรายผล** ขั้นตอนนี้เป็นการทดลองตามแผนการที่วางไว้ และวิเคราะห์ผลการศึกษา คำนวนหาค่าจำลองพลาสต์
4. **สรุปผลการศึกษา** ขั้นตอนนี้เป็นการสรุปผลการศึกษาทั้งหมด และเสนอแนะแนวทางในการศึกษาต่อในอนาคต
5. **การเผยแพร่ผลงานและการประยุกต์ใช้ในอนาคต** ผลการศึกษานี้จะได้นำเสนอให้ชุมชนนอกจากนี้ผลการศึกษายังจะได้รับการเผยแพร่ในวงการวิชาการผ่านทางการประชุมวิชาการหรือบทความวิจัยในการสารวิชาการได้ต่อไป

การทดลองแบ่งออกเป็น 3 ขั้นตอนหลักตามกรอบการวิจัย อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง มีรายละเอียด ดังนี้

1. เครื่องแก๊สที่ใช้ในการทดลอง
2. เครื่องวัดค่าพีเอช
3. ตู้อบ
4. เครื่องเขย่า
5. ชุดอุปกรณ์สำหรับวัดค่าซีโอดี
6. ชุดอุปกรณ์สำหรับวัดค่าของแข็ง
7. ชุดอุปกรณ์สำหรับการวิเคราะห์ดีเอ็นเอ
8. เครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี (gas chromatography)
9. เครื่องสเปกต์โรเมทรี (spectrometer)
10. ชุดคลิมน์และอุปกรณ์สำหรับการสาธิตการพื้นฟูพื้นที่
11. ถังปฏิกิริณ์ สารเคมี และวัสดุที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อ
12. สารเคมีและวัสดุที่ใช้ในการวิเคราะห์ค่าซีโอดี
13. สารเคมีและวัสดุที่ใช้ในการวิเคราะห์ค่าของแข็ง
14. สารเคมีและวัสดุที่ใช้ในการวิเคราะห์สารโพธิโนฟอส ซึ่งประกอบด้วย สารมาตรฐาน วัสดุและสารเคมีสำหรับการสกัดสาร วัสดุ สารเคมีและแก๊สสำหรับการวิเคราะห์ด้วยเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี

15. สารเคมีและวัสดุที่ใช้ในการวิเคราะห์ดีอีนเอ ซึ่งประกอบด้วย ชุดสกัดดีอีนเอ ชุดเพิ่มจำนวนดีอีนเอด้วยวิธีการพิซิวาร์ และชุดตรวจระบุโครงสร้างดีอีนเอ

3.2.1 วิธีการคัดแยกกลุ่มจุลินทรีย์สำหรับการเติมเซลล์และศึกษาลักษณะการย่อยสลายสารโพร์ฟินฟอสของจุลินทรีย์ที่ถูกติ่ม

ในขั้นตอนนี้แยกภาระงานออกเป็น 2 ขั้นตอนหลัก คือ การคัดแยกกลุ่มจุลินทรีย์จากดินที่มีการปนเปื้อนสารโพร์ฟินฟอส และศึกษาลักษณะการย่อยสลายสารโพร์ฟินฟอสของกลุ่มจุลินทรีย์ดังกล่าว (ครอบคลุมจนพลศาสตร์การเจริญเติบโตและการย่อยสลายของสาร) และจากนั้นในขั้นตอนต่อมาจึงคัดแยกเชื้อจุลินทรีย์บริสุทธิ์เพื่อรับลักษณะของกลุ่มจุลินทรีย์ ในแต่ละขั้นตอนย่อยมีวิธีการดังนี้

3.2.1.1 การคัดแยกกลุ่มจุลินทรีย์และศึกษาลักษณะการย่อยสลายสารโพร์ฟินฟอส

- การเก็บและเตรียมตัวอย่างดิน ตัวอย่างดินที่ใช้ในการทดลอง เก็บจากบริเวณแปลงปลูกพริกในพื้นที่ตำบลหัวเรือ อำเภอเมือง จังหวัดอุบลราชธานี จากนั้นเตรียมตัวอย่างดินโดยเริ่มต้นจากการซึ่งดินที่ผ่านการคัดแยกทินและเศษใบไม้แล้วจำนวน 500 กรัม จากนั้nr่อนดินผ่านตะแกรง (รูพรุน 0.5 มิลลิเมตร) แล้วจึงเก็บ เช่าตัวอย่างดินไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส
- การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการคัดแยก อาหารเลี้ยงเชื้ออัมເອສເອມ ชนิดเหลว (Minimal Salt Medium; MSM) เป็นอาหารที่ใช้ในการคัดแยกและปรับสภาพเพื่อให้ได้กลุ่มจุลินทรีย์ที่มีความคงตัว (stable mixed cultures) สูตรอาหารประกอบด้วย NaHPO_4 5.8 กรัม KH_2PO_4 3.0 กรัม NaCl 0.5 กรัม NH_4Cl 1 กรัม และ MgSO_4 0.25 กรัม ซึ่งละลายในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (phosphate buffer) ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ อาหารเลี้ยงเชื้ออัมເອສເອມที่ใช้ต้องผ่านการฆ่าเชื้อด้วยหม้อน้ำแข็งเชื้อความดันไอที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 30 นาที รอให้เย็นจึงเติมสารโพร์ฟินฟอสที่ผ่านการฆ่าเชื้อด้วยการกรองผ่านเมมเบรน 0.20 ไมโครเมตร ส่วนอาหารเลี้ยงเชื้ออัมເອສເອມชนิดแข็งมีสูตรเข่นเดียวกับชนิดเหลว แต่มีผงวุน (bacto agar) เป็นส่วนผสมร้อยละ 2 (รายละเอียดแสดงไว้ในภาคผนวก ก)
- การคัดแยกกลุ่มจุลินทรีย์ที่ย่อยสลายสารโพร์ฟินฟอส การคัดแยกกลุ่มจุลินทรีย์ที่ย่อยสลายสารโพร์ฟินฟอสจากตัวอย่างดิน เป็นการคัดแยกโดยเทคนิคการขยายเชื้อ (culture enrichment technique) โดยใช้ตัวอย่าง

ดินที่ปนเปื้อนสารกำจัดแมลงจากแปลงเพาะปลูกพริก จำนวน 20 กรัม เติมลงในขวดรูปทรงกระบอกขนาด 20 มิลลิเมตร ที่มีส่วนประกอบของโพธิ์ใบฟอส เข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งเป็นระดับความเข้มข้นสารละลายน้ำได้สูงสุด ใช้ปริมาตร 100 มิลลิลิตร หุ้มชุดทดลองด้วยอลูมิเนียมฟอร์ลี่ เพื่อป้องกันการย่ออุ่นโดยสภาพอากาศ จากนั้นนำมาเพาะเลี้ยงในสภาพควบคุมที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ซึ่งเป็นอุณหภูมิโดยประมาณในบรรยายกาศของไทย โดยใช้ตู้บ่มแบบเช่นเดียวกับความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 14 วัน จากนั้นจึงถ่ายเชือดโดยใช้ปีกเปตคุดตัวอย่างจากชุดทดลองเดิมใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชือดสูตรเดิมร้อยละ 5 โดยปริมาตร นำมาเพาะเลี้ยงในที่สภาวะเดิม เป็นเวลา 14 วัน และถ่ายเชือดที่สภาวะเดิมซ้ำ 5 ครั้ง จนกว่าจะได้สารละลายที่มีลักษณะใสปราศจากดิน (soil free solution) ซึ่งคาดว่ามีกลุ่มจุลินทรีย์ที่สามารถทนต่อสภาพที่มีสารกำจัดแมลงโพธิ์ใบฟอสได้และมีความคงตัว (stable mixed culture) (รายละเอียดแสดงไว้ในภาคผนวก ก)

- การศึกษาลักษณะการย่อยสลายของกลุ่มจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้ เริ่มต้นโดยเติมเชือดจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้ ใช้อัตราส่วนร้อยละ 5 โดยปริมาตร ลงในอาหารเลี้ยงเชือดโดยอุ่นโดยประมาณในตู้บ่มแบบเช่นเดียวกับอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 14 วัน เก็บตัวอย่างจากชุดทดลองเป็นเวลาต่อเนื่อง 2 วันต่อครั้ง เพื่อนำมาวิเคราะห์หาจำนวนเซลล์และสารโพธิ์ใบฟอสคงเหลือ
- การคำนวณจำนวนเซลล์ของกระบวนการเจริญเติบโตและจำนวนเซลล์ของกระบวนการย่อยสลายสารโพธิ์ใบฟอส การศึกษาจำนวนเซลล์ของกระบวนการเจริญเติบโตของกลุ่มจุลินทรีย์ที่ย่อยสลายสารโพธิ์ใบฟอสเป็นการศึกษาถึงความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนเซลล์จุลินทรีย์ที่เพิ่มขึ้น เมื่อเวลาผ่านไป และนำข้อมูลการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ในระยะเพิ่มจำนวน (log phase) มาคำนวณค่าอัตราการเจริญเติบโตและการย่อยสลายสาร
- วิธีการวิเคราะห์ การวิเคราะห์จำนวนเซลล์จุลินทรีย์ใช้เครื่องสเปกโตรเมทริหรือการนับจำนวนด้วยการเพาะเลี้ยงเชือบนอาหารแข็ง ส่วนการวิเคราะห์สารโพธิ์ใบฟอสคงเหลือใช้เครื่องแก๊สโครมาโทกราฟิตามวิธีการมาตรฐานของ US (วิธีการวิเคราะห์แสดงไว้ในภาคผนวก ก)

3.2.1.2 การคัดแยกจุลินทรีย์บริสุทธิ์และศึกษาลักษณะการย่อยสลายสารโพร์ฟิโนฟอส

- การคัดแยกจุลินทรีย์ที่ย่อยสลายสารโพร์ฟิโนฟอส การคัดแยกจุลินทรีย์ที่ย่อยสลายสารโพร์ฟิโนฟอสจากกลุ่มจุลินทรีย์โดยเทคนิคการเขี้ยวเชือ (streak plate technique) จนกระทั่งได้โคลoniเดียว จากนั้นจึงนำไประบุสายพันธุ์
- การระบุสายพันธุ์จุลินทรีย์ เริ่มต้นด้วยการสกัดดีเอ็นเอจากจุลินทรีย์จากนั้นเพิ่มจำนวน 16S rDNA ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลีเมอเรส (Polymerase Chain Reaction; PCR) จากนั้นจึงนำไประบุโครงสร้างดีเอ็นเอ (sequence) สุดท้ายจึงนำมาเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลดีเอ็นเอซึ่งอยู่ใน GenBank เพื่อระบุสายพันธุ์จุลินทรีย์ (รายละเอียดแสดงไว้ในภาคผนวก ก)
- การระบุความสามารถการย่อยสลายของจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้ เริ่มต้นโดยเติมเชื้อจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้ ใช้อัตราส่วนร้อยละ 5 โดยปริมาตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเอ็มเอสเอ็มชนิดเหลว ที่มีส่วนผสมของสารโพร์ฟิโนฟอสเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อลิตร นำมาเพาะเลี้ยงในตู้ปั่มนเขย่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 4 วัน เก็บตัวอย่างจากชุดทดลองวันสุดท้าย เพื่อนำวิเคราะห์หาสารโพร์ฟิโนฟอสเปรียบเทียบกับวันแรก โดยจุลินทรีย์ที่สามารถกำจัดสารโพร์ฟิโนฟอสได้จะได้นำมาศึกษาในขั้นตอนต่อไป
- การศึกษาลักษณะการย่อยสลายของจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้ เริ่มต้นโดยเติมเชื้อจุลินทรีย์โดยใช้อัตราส่วนร้อยละ 5 โดยปริมาตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเอ็มเอสเอ็มชนิดเหลว ที่มีส่วนผสมของสารโพร์ฟิโนฟอสเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อลิตร นำมาเพาะเลี้ยงในตู้ปั่มนเขย่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 4 วัน เก็บตัวอย่างจากชุดทดลองเป็นเวลาต่อเนื่อง 2 วันต่อครั้ง เพื่อนำมาวิเคราะห์หาจำนวนเซลล์และสารโพร์ฟิโนฟอสคงเหลือ
- การคำนวณจำนวนพลศาสตร์ของการเจริญเติบโตและจำนวนพลศาสตร์การย่อยสลายสารโพร์ฟิโนฟอส การศึกษาจำนวนพลศาสตร์ของการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ที่ย่อยสลายสารโพร์ฟิโนฟอสได้เป็นการศึกษาถึงความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนเซลล์จุลินทรีย์ที่เพิ่มขึ้น เมื่อเวลาผ่านไป และนำข้อมูลการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ในระยะเพิ่มจำนวน (log phase) มาคำนวณค่าอัตราการเจริญเติบโตและการย่อยสลายสาร

- การศึกษาการย่อยสลายสารกำจัดศัตรูพืชօร์แกนโนฟอสฟอรัสชนิดอื่น โดยจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้ เริ่มต้นโดยเติมเชื้อจุลินทรีย์โดยใช้อัตราส่วนร้อยละ 5 โดยปริมาตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเอ็มเอสเอ็มชนิดเหลว ที่มีส่วนผสมของสารคลอร์ไฟร์ฟอสและไดโครโตฟอส (สารกำจัดศัตรูพืชօร์แกนโนฟอสฟอรัสชนิดอื่นที่พบการใช้และการปนเปื้อนร่วมกับสารโพเรฟโนฟอส) เข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อลิตร นำมาเพาะเลี้ยงในตู้บ่มเพาะที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 4 วัน เก็บตัวอย่างจากชุดทดลองเพื่อนำมาวิเคราะห์หาจำนวนเซลล์และสารคงเหลือ
- วิธีการวิเคราะห์ การวิเคราะห์จำนวนเซลล์จุลินทรีย์ใช้เครื่องสเปกโตรเมทรหรือการนับจำนวนด้วยการเพาะเลี้ยงเชื้อบนอาหารแข็ง ส่วนการวิเคราะห์สารโพเรฟโนฟอสคงเหลือใช้เครื่องแก๊สโครมაโตรกราฟิตามวิธีการมาตรฐานของ US EPA (วิธีการวิเคราะห์แสดงไว้ในภาคผนวก ก)

3.2.2 วิธีการศึกษาการกระตุ้นการย่อยสลายสารโพเรฟโนฟอสโดยใช้กระบวนการเมตาโบลิซึมร่วม

ในขั้นตอนนี้แยกภาระงานออกเป็น 2 ขั้นตอนหลัก คือ การศึกษาหาสารอาหารร่วมที่ส่งเสริมให้เกิดกระบวนการเมตาโบลิซึมร่วมได้ โดยในการศึกษาครอบคลุมผลต่อการเจริญเติบโตของกลุ่มจุลินทรีย์และความสามารถในการย่อยสลายสาร แล้วคัดเลือกสารอาหารร่วมที่เหมาะสมที่สุดในขั้นตอนต่อมาจึงศึกษาหาความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารอาหารร่วมและสารโพเรฟโนฟอสในการเกิดกระบวนการเมตาโบลิซึมร่วม ในแต่ละขั้นตอนย่อยมีวิธีการดังนี้

3.2.2.1 การศึกษาหาสารอาหารร่วมที่ส่งเสริมกระบวนการเมตาโบลิซึมร่วม

- การศึกษาลักษณะการย่อยสลายโดยใช้สารอาหารร่วมแตกต่างกัน เริ่มต้นโดยเติมเชื้อจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้ใช้อัตราส่วนร้อยละ 5 โดยปริมาตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเอ็มเอสเอ็มชนิดเหลว ที่มีส่วนผสมของสารโพเรฟโนฟอสเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อลิตร และมีสารอาหารร่วมแตกต่างกัน ซึ่งได้แก่ โซเดียมอะซิเตท โซเดียมซัคซิเนท และกลูโคส ที่มีความเข้มข้นของคาร์บอน 500 มิลลิกรัมต่อลิตร นำมาเพาะเลี้ยงในตู้บ่มเพาะที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 14 วัน เก็บตัวอย่างจากชุดทดลองเป็นเวลาต่อเนื่อง เพื่อนำมาวิเคราะห์ท่าจำนวนเซลล์ สารโพเรฟโนฟอสคงเหลือและค่าซีโอดี (บ่งชี้การใช้สารอาหารร่วม)

- การคำนวณจำนวนพลศาสตร์ของการเจริญเติบโตและจำนวนพลศาสตร์การย่อยสลายสารโพร์ฟินฟอส การศึกษาจำนวนพลศาสตร์ของการเจริญเติบโตของกลุ่มจุลินทรีย์ที่ย่อยสลายสารโพร์ฟินฟอสเป็นการศึกษาถึงความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนเซลล์จุลินทรีย์ที่เพิ่มขึ้น เมื่อเวลาผ่านไป และนำข้อมูลการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ในระยะเพิ่มจำนวน (log phase) มาคำนวณค่าอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (specific growth rate) และเวลาที่จุลินทรีย์เพิ่มจำนวนอีกหนึ่งเท่า (doubling time) ผลการศึกษาในขั้นตอนนี้จะได้ใช้เป็นแนวทางในการคัดเลือกสารอาหารร่วมที่เหมาะสม เพื่อใช้ศึกษาในขั้นต่อไป
- วิธีการวิเคราะห์ การวิเคราะห์จำนวนเซลล์จุลินทรีย์ใช้เครื่องสเปกโตรเมทรหรือการนับจำนวนด้วยการเพาะเลี้ยงเชื้อบนอาหารแข็ง ส่วนการวิเคราะห์สารโพร์ฟินฟอสคงเหลือใช้เครื่องแก๊สโครมาตอกร้าฟิตามวิธีการมาตรฐานของ US EPA การวิเคราะห์ค่าซีโอดีวิเคราะห์เฉพาะซีโอดีคละลาย (soluble COD) ตามวิธีการมาตรฐาน (วิธีการวิเคราะห์แสดงไว้ในภาคผนวก)

3.2.2.2 การศึกษาความสัมพันธ์ของความเข้มข้นของสารอาหารร่วมและสารโพร์ฟินฟอสในกระบวนการเมتاโบลิซึมร่วม

- การศึกษาลักษณะการย่อยสลายสารโพร์ฟินฟอสที่ความเข้มข้นของสารและสารอาหารร่วมแตกต่างกัน เริ่มต้นโดยเติมเชื้อจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้ใช้อัตราส่วนร้อยละ 5 โดยปริมาตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเอ็มเออสเอ็มซnid เหลว ที่มีส่วนผสมของสารโพร์ฟินฟอสเข้มข้น 0 5 10 และ 20 มิลลิกรัมต่อลิตร และมีสารอาหารร่วมที่มีความเข้มข้นของคาร์บอน 50 100 500 และ 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร นำมาเพาะเลี้ยงในตู้บ่มเย้ายาที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 14 วัน เก็บตัวอย่างจากชุดทดลองเป็นเวลาต่อเนื่อง เพื่อนำวิเคราะห์หาจำนวนเซลล์สารโพร์ฟินฟอสคงเหลือ และค่าซีโอดี (บ่งชี้การใช้สารอาหารร่วม)
- การคำนวณจำนวนพลศาสตร์ของการเจริญเติบโตและจำนวนพลศาสตร์การย่อยสลายสารโพร์ฟินฟอส การศึกษาจำนวนพลศาสตร์ของการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ที่ย่อยสลายสารโพร์ฟินฟอสได้เป็นการศึกษาถึงความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนเซลล์จุลินทรีย์ที่เพิ่มขึ้น เมื่อเวลาผ่านไป และนำข้อมูลการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ในระยะเพิ่มจำนวน (log phase) มาคำนวณค่าอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (specific growth rate)

- วิธีการวิเคราะห์ การวิเคราะห์จำนวนเชลล์จุลินทรีย์ใช้เครื่องสเปคโตรเมท รีหรือการนับจำนวนด้วยการเพาเดี้ยงเชือบอาหารแข็ง ส่วนการ วิเคราะห์สารโพฟอสคงเหลือใช้เครื่องแก๊สโครม่าโทรกราฟิตาม วิธีการมาตรฐานของ US EPA การวิเคราะห์ค่าซีโอดีวิเคราะห์เฉพะซีโอดีลัลัย (soluble COD) ตามวิธีการมาตรฐาน (วิธีการวิเคราะห์แสดงไว้ ในภาคผนวก)

3.2.3 วิธีการสาอิทธิการพื้นพูน้ำได้ดินที่ปนเปื้อนสารโพฟอสตามหลักการเติมเชลล์ที่ ถูกกระตุ้น

ในขั้นตอนนี้เป็นการสาอิทธิการกำจัดสารโพฟอสในแบบจำลองน้ำได้ดิน ที่มีอัตรา การซึมผ่าน (infiltration rate) แตกต่างกัน คือ 25 50 และ 100 เซนติเมตรต่อวัน (อัตราการไหล เท่ากับ 0.5 1.0 และ 2.0 มิลลิตรต่อนาที ซึ่งทดลองตามแนวทางของงานวิจัยในอดีต (Siripattanakul et al., 2009) การศึกษาเติมจุลินทรีย์และสารอาหารร่วมโดยอ้างอิงจากผลใน ขั้นตอนที่ผ่านมา โดยในการศึกษาครอบคลุมการย่อยสลายสารและวิธีของการย่อยสลาย โดยใน ขั้นตอนนี้จะได้ศึกษาทั้งเปรียบเทียบ 1) การเติมเชลล์ 2) การเติมเชลล์ที่ถูกกระตุ้น และ 3) ชุด ควบคุม (ไม่ได้ทั้งเชลล์และสารอาหารร่วม) ณ อัตราการไหลของน้ำได้ดินต่าง ๆ

การทดลองสามารถแบ่งออกได้เป็น 3 ขั้นตอนหลัก ได้แก่ การเตรียมทราย การเตรียม คอลัมน์ และการทดลองสาอิทธิการกำจัดสารโพฟอสในแบบจำลองน้ำได้ดิน ซึ่งมีรายละเอียดดังนี้

- การเตรียมทราย การทดลองนี้ใช้ทรายซิลิก้าควอตซ์ เริ่มต้นจากการล้างทรายและ ร่อนผ่านตะแกรง โดยทรายมีขนาด 0.25 ถึง 0.45 มิลลิเมตร จากนั้นนำไปอบฆ่า เชื้อด้วยหม้อนึ่งไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ในการอบ ฆ่าเชื้อจะทำซ้ำ 3 ครั้ง ติดต่อกันเป็นเวลา 3 วัน (Siripattanakul et al., 2009)
- การเตรียมแบบจำลองคอลัมน์ คอลัมน์ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 3.2 เซนติเมตร ยาว 40 เซนติเมตร ทำจากแก้ว (ซึ่งบรรจุทรายเต็มคอลัมน์) ที่ผ่าเชื้อด้วยการล้าง ด้วยไอโซพรพานอล (isopropanol) ความเข้มข้นร้อยละ 70 คอลัมน์ต่อ ประกอบกับปั๊มสูบน้ำตัวอย่างที่ปนเปื้อนเข้าสู่คอลัมน์ดังภาพที่ 3.2 ในลักษณะไหล ขึ้น (up-flow)
- การทดลองสาอิทธิการกำจัดสารโพฟอสในแบบจำลองน้ำได้ดิน การทดลอง เริ่มต้นจากการทดสอบการไหลของน้ำและสารโพฟอสซึ่งเรียกว่า การทดสอบเทส เชอร์ (tracer test) การทดสอบเทสเซอร์กระทำโดยการนำสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ 0.01 โมลาร์ ใส่ลงในถังเก็บน้ำ จากนั้นปั๊มสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ 0.01 โมลาร์ เข้าสู่คอลัมน์ให้ไหลผ่านคอลัมน์จนเต็ม แล้วเพิ่มความเข้มข้นของ แคลเซียมคลอไรด์ในถังเป็น 0.05 โมลาร์ เก็บตัวอย่างน้ำที่ไหลผ่านคอลัมน์ตั้งแต่

เริ่มเพิ่มความเข้มข้นจนสารละลายในถังหมด นำตัวอย่างน้ำที่แหล่งผ่านคอลัมน์ไปวัดค่าการนำไฟฟ้า เพื่อศึกษาลักษณะการเคลื่อนที่ของน้ำผ่านคอลัมน์ จากนั้นทดสอบการไหลของโพร์ฟอสในลักษณะเดียวกันเพื่อศึกษาการเคลื่อนที่ของสารผ่านคอลัมน์

สำหรับการทดลองสาอิทธิการกำจัดสารโพร์ฟอสในแบบจำลองน้ำใต้ดิน เตรียมคอลัมน์ 3 คอลัมน์ ซึ่งได้แก่ 1) คอลัมน์ที่เติมเซลล์เชื้อจุลทรรศน์ร้อยละ 5 โดยปริมาตรผสมกับรายก่อนบรรจุลงในคอลัมน์ 2) คอลัมน์ที่เติมเซลล์เชื้อจุลทรรศน์ร้อยละ 5 เช่นเดียวกับคอมลัมน์แรก และ 3) ชุดควบคุม (ไม่ได้ทั้งเซลล์และสารอาหารร่วม) จากนั้นใช้ปั๊มสูบน้ำใต้ดินที่ปั๊มน้ำป้อนสารโพร์ฟอสสังเคราะห์เข้าสู่คอลัมน์ (โดยในคอลัมน์ที่ 2 มีการเติมสารอาหารร่วมด้วย) โดยควบคุมอัตราการไหลที่ 30 90 และ 180 มิลลิลิตรต่อวัน การทดลองวิเคราะห์ค่าซีโอดีและสารโพร์ฟอสคงเหลือต่อเนื่อง เป็นปริมาตร 10 เท่าของปริมาตรของว่าง (pore volume)

- วิธีการวิเคราะห์ การวิเคราะห์สารโพร์ฟอสคงเหลือใช้เครื่องแก๊สโครมาตอกราฟิตามวิธีการมาตรฐานของ US EPA การวิเคราะห์ค่าซีโอดีวิเคราะห์เฉพาะซีโอดีละลาย (soluble COD) ตามวิธีการมาตรฐาน (วิธีการวิเคราะห์แสดงไว้ในภาคผนวก)

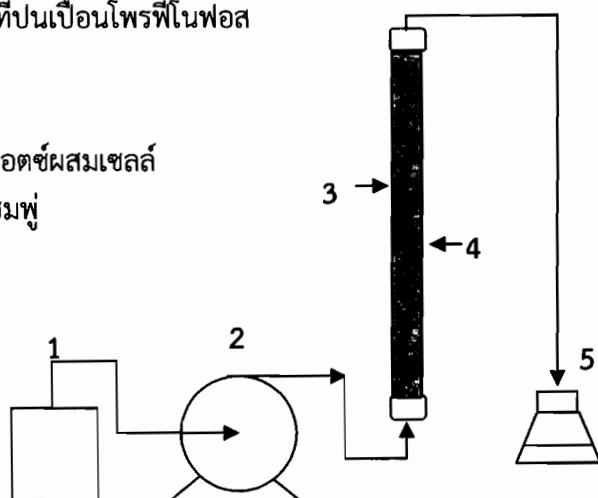
1 = ถังใส่น้ำที่ปนเปื้อนโพธิโนฟอส

2 = ปั๊ม

3 = คอลัมน์

4 = ทรายควบคุมสมดุล

5 = ขวดรูปชมพู่



ภาพที่ 3.2 แบบจำลองคอลัมน์

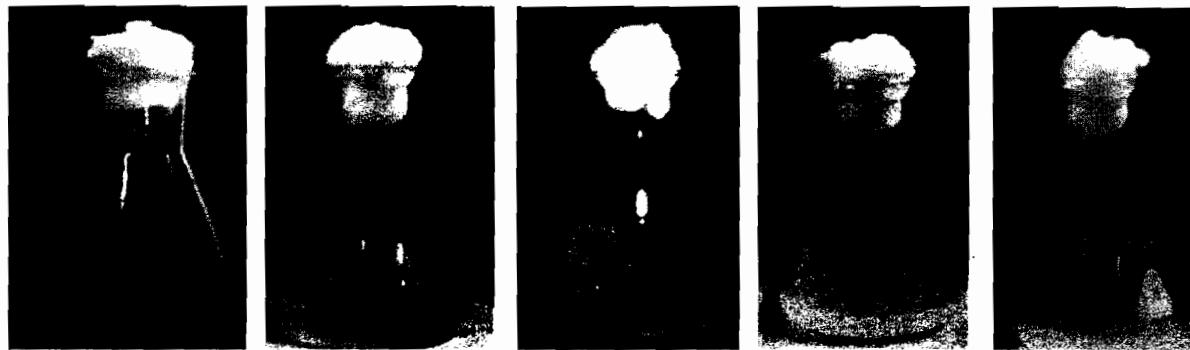
บทที่ 4

ผลการวิจัย

4.1 ผลการคัดกลุ่มจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการกำจัดสารโพร์ฟิโนฟอส

4.1.1 ผลการศึกษาการคัดกลุ่มจุลินทรีย์และลักษณะของกลุ่มจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้

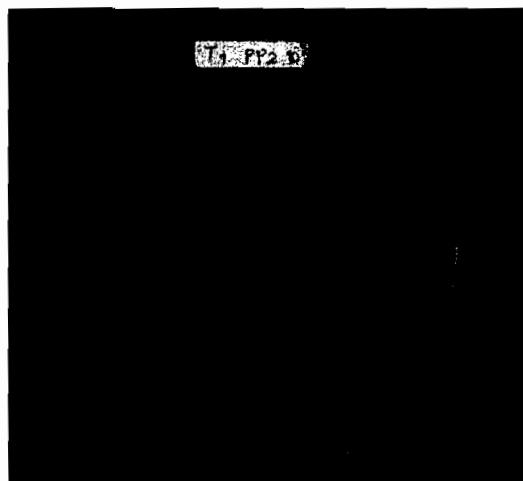
การคัดกลุ่มจุลินทรีย์ (mixed cultures) จากดิน ในขั้นตอนนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อคัด กลุ่มจุลินทรีย์ที่ย่อยสารโพร์ฟิโนฟอสได้ ซึ่งกระทำโดยการคัดแยกจุลินทรีย์โดยวิธีถ่ายเชื้อเป็น จำนวน 5 ครั้ง (1 ครั้ง ใช้เวลาในการปรับสภาพ 2 สัปดาห์) ดังภาพที่ 4.1



ภาพที่ 4.1 ลักษณะการถ่ายเชื้อเพื่อคัดแยกกลุ่มจุลินทรีย์ย่อยสารโพร์ฟิโนฟอสจากดิน

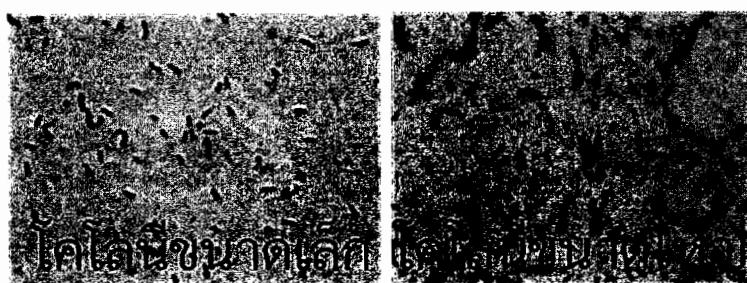
สภาวะที่ใช้ในการคัดกลุ่มจุลินทรีย์ คือ ที่อุณหภูมิ 30°C พีเอช 7 และเป็นสภาพที่มี อออกซิเจน (aerobic condition) ซึ่งเป็นสภาพที่ใกล้เคียงกับสภาพแวดล้อมในพื้นที่เกษตรกรรมที่ ปัจจุบันทำการกำจัดศัตรูพืชโพร์ฟิโนฟอสจริงเมื่อพิจารณาสภาวะทดลองกลุ่มจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้ จัดเป็นจุลินทรีย์ในกลุ่มเยหetrotroph (heterotroph) ซึ่งใช้สารโพร์ฟิโนฟอสเป็นแหล่งสารคาร์บอน เดียว (sole carbon source) ได้ สำหรับการเข้าขัดว่ากลุ่มจุลินทรีย์ที่คัดได้ดังกล่าวสามารถย่อยสาร สารกำจัดแมลงได้จริงจึงทำการทดสอบความสามารถในการย่อยสารโพร์ฟิโนฟอสเบื้องต้น (pre-test) พบว่ากลุ่ม จุลินทรีย์ที่คัดได้สามารถย่อยสารโพร์ฟิโนฟอสได้อย่างชัดเจน สำหรับรายละเอียดการศึกษา ความสามารถในการย่อยสารสารโพร์ฟิโนฟอสได้นำเสนอในหัวข้อต่อไป

การศึกษาลักษณะทางกายภาพของกลุ่มจุลินทรีย์ที่คัดได้ โดยนำกลุ่มจุลินทรีย์ดังกล่าวมาเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งพบร่วมกับกลุ่มจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายสารโพร์ฟิโนฟอสได้มีขนาดโคลอนีที่แตกต่างกัน โดยในเบื้องต้นสามารถจำแนกโคลอนีได้ 2 ขนาด ดังแสดงในภาพที่ 4.2 จากผลการศึกษานี้สามารถกล่าวได้ว่ากลุ่มจุลินทรีย์ที่ย่อยสลายสารโพร์ฟิโนฟอสประกอบด้วยจุลินทรีย์หลายสายพันธุ์รวมตัวกันอยู่ ซึ่งงานวิจัยที่ในอดีตก็ให้ผลการศึกษาในลักษณะเดียวกันกล่าวคือ ในการคัดแยกจุลินทรีย์เพื่อใช้ในการย่อยสลายสารได ๆ โดยทั่วไปแล้วมีมากกว่าหนึ่งสายพันธุ์ซึ่งอาจอยู่อาศัยร่วมกันหรือทำงานร่วมกัน (Cycon et al., 2009; Malgani and Chatterjee, 2009; Malgani et al., 2009)



ภาพที่ 4.2 ลักษณะโคลอนีของกลุ่มจุลินทรีย์ที่ย่อยสลายสารโพร์ฟิโนฟอส

สำหรับผลจากการศึกษาลักษณะโครงสร้างของกลุ่มจุลินทรีย์ดังกล่าว (ภาพที่ 4.2) ด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบแสง (optical microscope) พบว่าทั้งกลุ่มจุลินทรีย์ย่อยสลายโพร์ฟิโนฟอสประกอบด้วยจุลินทรีย์ที่มีรูปร่างเซลล์ 2 แบบ คือ ท่อน (rod) และวงกลม (cocci) เซลล์มีทั้งชนิดแกรมบวกและแกรมลบดังแสดงในภาพที่ 4.3 ซึ่งลักษณะทางกายภาพของกลุ่มจุลินทรีย์ที่คัดได้สามารถสรุปได้ดังตารางที่ 4.1



ภาพที่ 4.3 ลักษณะรูปร่างเซลล์และการติดสีแกรมของจุลินทรีย์ที่ย่อยสลายสารโพร์ฟิโนฟอส

ตารางที่ 4.1 ลักษณะทางกายภาพของจุลินทรีย์ที่ย่อยสลายสารโพร์ฟิโนฟอส

ขนาดโคลนี	ลักษณะโคลนี	รูปร่าง	การติดสีแกรม
เล็ก	ผิวน้ำมัน	แท่งสั้น	บวก ลบ
	ขอบหยัก	กลม	บวก
ใหญ่	ผิวน้ำมัน	แท่งสั้น	บวก ลบ
	ขอบหยัก	กลม	บวก

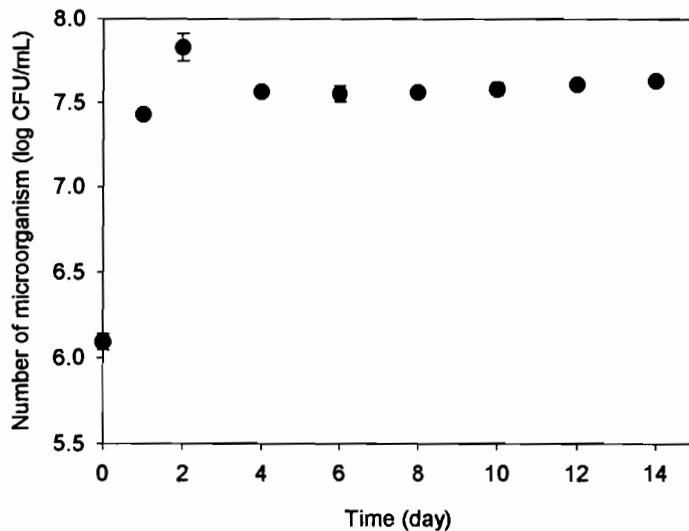
จากการศึกษาลักษณะทางกายภาพของกลุ่มจุลินทรีย์ที่ย่อยสลายสารโพร์ฟิโนฟอส พบว่าจุลินทรีย์ดังกล่าวมีความหลากหลายทางชีวภาพ (biodiversity) ซึ่งบ่งชี้ได้ว่ามีจุลินทรีย์หลายชนิดสามารถทนสารโพร์ฟิโนฟอสได้ อย่างที่ทราบกันทั่วไปว่ากลุ่มจุลินทรีย์สามารถทำงานได้ดีกว่าจุลินทรีย์สายพันธุ์เดียวในสภาพธรรมชาติ (Siripattanakul et al., 2009) โดยยิ่งมีความหลากหลายมากยิ่งทำให้มีเสถียรภาพสูงตามมา ดังนั้นสามารถกล่าวได้ว่ากลุ่มจุลินทรีย์ที่คัดได้มีศักยภาพในการใช้ประโยชน์ได้จริงต่อไป

4.1.2 จนพลศาสตร์ของการเจริญเติบโตและการย่อยสลายสารโพร์ฟิโนฟอส

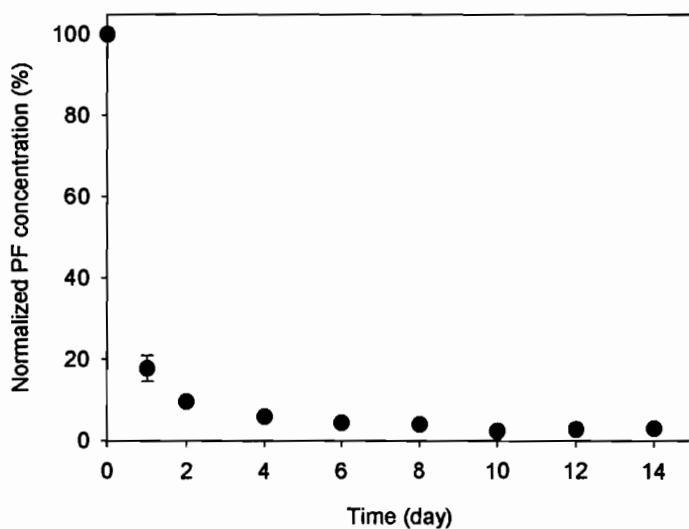
ผลการศึกษาการเจริญเติบโตของกลุ่มจุลินทรีย์ที่ย่อยสลายสารโพร์ฟิโนฟอส พบว่า กราฟการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์แสดงดังภาพที่ 4.4 (ข้อมูลดิบในภาคผนวก ข) กล่าวคือ ในระหว่างการทดลอง 14 วัน กลุ่มจุลินทรีย์มีการเจริญเติบโตเป็น 2 ระยะ คือ ระยะเพิ่มจำนวน (log phase) และระยะคงตัว (stationary phase) เกิดขึ้นในช่วงเวลาที่ 0-4 วัน และตั้งแต่ 4 วันเป็นต้นไป ตามลำดับ จากภาพแสดงการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์พบว่าไม่ปรากฏระยะเตรียมการ (lag phase) เนื่องจากในการคัดแยกจุลินทรีย์ดังกล่าวใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีสารโพร์ฟิโนฟอสเป็นส่วนผสมอยู่แล้ว โดยมีการคัดแยกช้าๆ ในสภาวะ เช่นเดิมและในอาหารชนิดเดิมทำให้จุลินทรีย์มีการปรับสภาพให้เข้ากับสิ่งแวดล้อมและมีความคงตัวแม้เป็นสภาวะที่มีสารกำจัดแมลงเป็นองค์ประกอบ

ผลการศึกษาการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายสารโพร์ฟิโนฟอสทำให้ทราบถึงช่วงการเจริญเติบโตเหมาะสมสำหรับนำมาใช้ศึกษาความสามารถในการย่อยสลายสารโพร์ฟิโนฟอส ในอนาคต ซึ่งได้แก่ ช่วงต้นของระยะคงตัว (4 วัน) เนื่องจากช่วงนี้จุลินทรีย์มีการเจริญเติบโตคงที่และมีความสามารถในการย่อยสลายสารโพร์ฟิโนฟอสได้สูง

การศึกษาความสามารถในการย่อยสลายสารโพร์ฟิโนฟอส ใช้จุลินทรีย์ที่มีจำนวนเซลล์เริ่มต้นในชุดทดลอง เท่ากับ 1.25×10^7 CFU/mL ผลการศึกษาพบว่าความเข้มข้นของสารโพร์ฟิโนฟอสลดลงอย่างรวดเร็วในช่วงการทดลอง 2 วันแรก และที่เวลา 4 ถึง 14 วัน ความเข้มข้นของสารโพร์ฟิโนฟอสค่อยๆ ลดลงจนเกือบคงที่ดังภาพที่ 4.5 (ข้อมูลดิบในภาคผนวก ข)



ภาพที่ 4.4 การเจริญเติบโตของกลุ่มจุลินทรีย์ที่ย่อยสลายสารโพร์ฟีโนฟอส



ภาพที่ 4.5 การย่อยสลายสารโพร์ฟีโนฟอสโดยกลุ่มจุลินทรีย์

ผลการศึกษาการย่อยสลายสารในระยะเวลา 14 วัน ซึ่งเป็นช่วงที่จุลินทรีย์เข้าสู่ระยะคงตัวในตอนปลาย พบร้า กลุ่มจุลินทรีย์ที่ย่อยสลายสารโพร์ฟีโนฟอสสมีความสามารถในการย่อยสลาย ร้อยละ 97 (ความเข้มข้นเริ่มต้น 22 mg/L) ซึ่งความสามารถในการย่อยสลายสารโพร์ฟีโนฟอสที่เกิดขึ้นมีความสอดคล้องกับกราฟการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ ทั้งนี้ความเข้มข้นของสารโพร์ฟีโนฟอสลดลงอย่างรวดเร็วในช่วงการทดลอง 2 วันแรก ส่งผลให้จุลินทรีย์เจริญเติบโตอย่างรวดเร็ว กล่าวคือ

จุลินทรีย์เจริญเข้าสู่ระยะเพิ่มจำนวน (log phase) สำหรับที่เวลา 4 ถึง 14 วัน สารอาหาร ซึ่งได้แก่ สารโพร์ฟิโนฟอส เริ่มหมวดไปส่งผลให้จุลินทรีย์เจริญเติบโตเข้าสู่ระยะคงตัว (stationary phase)

เมื่อนำข้อมูลการเจริญเติบโตของกลุ่มจุลินทรีย์ที่ย่อยสลายสารโพร์ฟิโนฟอส และ ลักษณะการย่อยสลายสารในภาพที่ 4.4 และ 4.5 พบว่าจนพลศาสตร์การเจริญเติบโตและการย่อย สลายสารโพร์ฟิโนฟอสเป็นไปตามปฏิกิริยาอันดับที่ 1 กล่าวคือ อัตราการเจริญเติบโตและการย่อย สลายสารโพร์ฟิโนฟอสแปรผันตรงกับความเข้มข้นของสารโพร์ฟิโนฟอสตั้งต้น โดยสามารถสรุป ข้อมูลจนพลศาสตร์และความสามารถในการกำจัดสารโพร์ฟิโนฟอสได้ดังตารางที่ 4.2

ตารางที่ 4.2 จนพลศาสตร์การเจริญเติบโตและการย่อยสลายสารโพร์ฟิโนฟอสโดยกลุ่มจุลินทรีย์

ข้อมูล	สมการ	R ²	ค่าคงที่
จนพลศาสตร์การเจริญเติบโต	$Y_1 = 0.02X + 7.05$	1.00	0.02 hr ⁻¹
จนพลศาสตร์การย่อยสลายสารโพร์ฟิโนฟอส	$Y_2 = -0.006X + 1.12$	0.87	0.006 hr ⁻¹
อัตราการย่อยสลายสารโพร์ฟิโนฟอส	3.0 mg/L/d		
ร้อยละของการกำจัดสารโพร์ฟิโนฟอส	97		

หมายเหตุ X = เวลา (hr)

Y₁ = log (จำนวนเซลล์)

Y₂ = log (ความเข้มข้นของโพร์ฟิโนฟอส)

4.1.3 ผลการวิเคราะห์วิถีการย่อยสลายสารโพร์ฟิโนฟอสโดยกลุ่มจุลินทรีย์เบื้องต้น

สำหรับการวิเคราะห์วิถีการย่อยสลายสารโพร์ฟิโนฟอสเบื้องต้นเป็นการศึกษาเพื่อ พิจารณาความเป็นไป (fate) ของสารตั้งกล่าวในธรรมชาติ ซึ่งการศึกษาระทำความคูณไปกับการ ติดตามความเข้มข้นของสารโพร์ฟิโนฟอสคงเหลือในชุดทดลอง โดยการศึกษานี้วิเคราะห์ผลโดยใช้ เครื่องจีซีเอ็มเอส (GC-MS, gas chromatography-mass spectrometry) ในการระบุสารมัธยัณฑ์ (intermediate) ต่าง ๆ ผลการศึกษาแสดงดังตารางที่ 4.3

ผลการศึกษาพบว่าในสารละลายน้ำและชุดควบคุม (ไม่มีจุลินทรีย์) ตรวจพบ สารบีซีพี (4-bromo-2-cholorophenol; BCP) ดังแสดงในภาพที่ 4.6 และ 4.7 ซึ่งมีโครงสร้างดัง ภาพที่ 4.8 ในชุดทดลองนี้ไม่มีเซลล์จุลินทรีย์ดังนั้นสามารถระบุได้ว่าสารโพร์ฟิโนฟอสทำปฏิกิริยากับ น้ำ (hydrolysis) แล้วแตกตัวเป็นสารบีซีพี ผลดังกล่าวนี้สอดคล้องกับงานวิจัยของ Zamy et al. (2004) ที่มีการศึกษารูปแบบการแตกตัวของสารในกลุ่มอร์แกนโนฟอสฟอรัส (รวมถึงสารโพร์ฟิโน ฟอสด้วย) ในสารละลายน้ำ ผลการศึกษาพบว่าโพร์ฟิโนฟอสสามารถแตกตัวเป็นสาร บีซีพีเช่นกัน แต่อย่างไรก็ตามผลจากการวิจัยนี้พบว่าเมื่อติดตามความเป็นไปของสารอย่างต่อเนื่อง พบว่าปริมาณสารบีซีพีคงที่ ดังนั้นผลการศึกษานี้ชี้ชัดได้ว่ากระบวนการไฮโดรไลซิสทำให้สาร โพร์ฟิโนฟอสเพียงบางส่วนแตกตัวเป็นเหตุให้สารโพร์ฟิโนฟอสมีความเข้มข้นลดลงเล็กน้อย นอกจากนี้ยังพบว่ากระบวนการแตกตัวนี้ไม่ส่งทำให้สารบีซีพีแตกตัวได้ เนื่องจากโครงสร้างของสาร บีซีพีเป็นโครงสร้างอะโรมาติก (aromatic structure) ซึ่งมีพันธะที่แข็งแรง

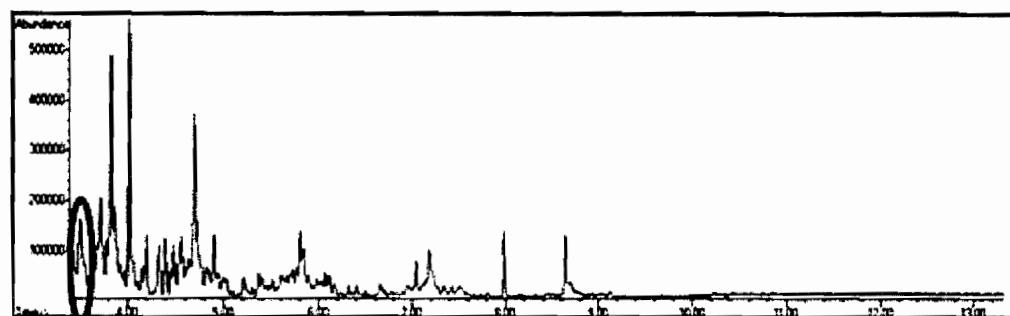
ตารางที่ 4.3 การติดตามสารมัธยัณฑ์จากการทดลองการย่อยสลายสารโพร์ฟินฟอส

ชุดทดลอง	ความเข้มข้นสาร โพร์ฟินฟอส เริ่มต้น (mg/L)	ผลการติดตาม
สารละลายน้ำตราชาน	15	<ul style="list-style-type: none"> ตรวจพบสารบีซีพี (ภาพที่ 4.6 และ 4.8)
ชุดควบคุม (ไม่มีจุลินทรีย์)	40	<ul style="list-style-type: none"> ตรวจพบสารบีซีพี (ภาพที่ 4.7 และ 4.8)
ชุดทดลองที่เติม กลุ่มจุลินทรีย์	20	<ul style="list-style-type: none"> ตรวจไม่พบสารมัธยัณฑ์
	40	<ul style="list-style-type: none"> เมื่อทดลองในช่วงแรกตรวจพบสารบีซีพี แต่เมื่อเวลาเพิ่มขึ้นตรวจไม่พบสารบีซีพี เมื่อทดลอง 3 hr ตรวจพบสาร 2,4-di-tert-butyl phenol ซึ่งมีพื้นที่ได้กราฟเท่ากับ 7,633,043 แต่เมื่อเวลาทดลองนานขึ้นเป็น 12 hr พบการสะสมเพิ่มขึ้นของสารดังกล่าว โดยพบว่ามีพื้นที่ได้กราฟเพิ่มขึ้นเป็น 7,898,706 ซึ่งคิดการเพิ่มขึ้นของสารดังกล่าวได้ประมาณร้อยละ 3.5 (ภาพที่ 4.9)
	120	<ul style="list-style-type: none"> เมื่อทดลอง 3 hr ตรวจพบสารบีซีพี (ภาพที่ 4.10) เมื่อทดลอง 6 hr ตรวจไม่พบสารบีซีพี แต่พบสาร 3-methoxy phenol แทนที่ในจุดเดิมที่พบบีซีพี (ดูรายละเอียดในโครมาโทแกรมในภาพที่ 4.10)

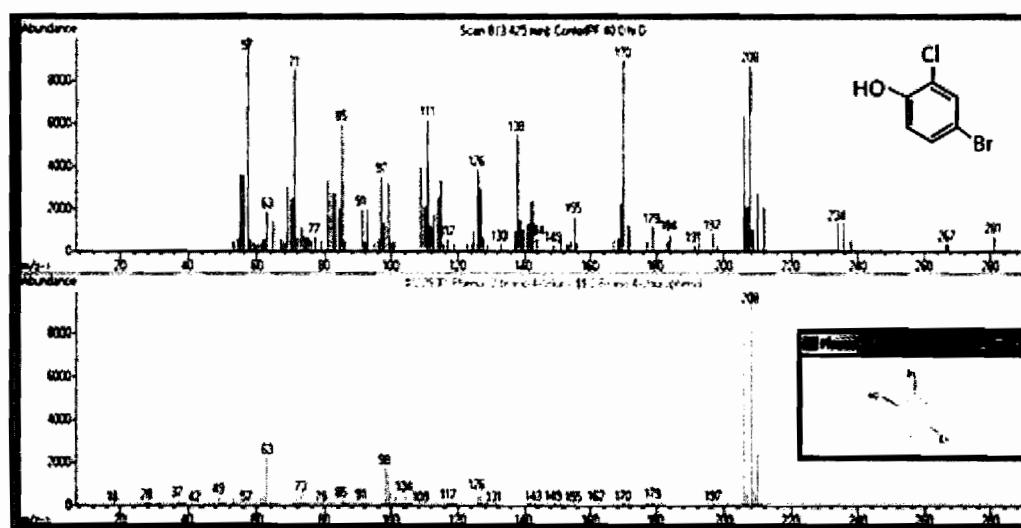
โดยทั่วไปในกระบวนการย่อยสลายสารปلومปอนโดยจุลินทรีย์ (xenobiotic degradation by microorganisms) จุลินทรีย์ผลิตเอนไซม์ที่ย่อยสลายสารปلومปอนทำให้สารนั้น ๆ เปลี่ยนเป็นสารมัธยัณฑ์ขั้นต้น (primary intermediate) และหากจุลินทรีย์สามารถผลิตเอนไซม์ที่ย่อยสลายสารมัธยัณฑ์ สารมัธยัณฑ์ขั้นต้นจะถูกเปลี่ยนต่อ ๆ ไปจนกระทั่งเกิดกระบวนการกลায์เป็นแร่ธาตุสมบูรณ์ (complete mineralization) ซึ่งท้ายที่สุดผลิตภัณฑ์สุดท้าย (end product) ของกระบวนการ ได้แก่ คาร์บอนไดออกไซด์ แก๊สไนโตรเจน แก๊สแอมโมเนียม เป็นต้น (อลิสา วงศ์, 2553) แต่หากจุลินทรีย์ไม่สามารถผลิตเอนไซม์ในขั้นตอนใด ๆ หรือผลิตได้ไม่สมดุล กับปริมาณของสารจะส่งผลให้เกิดการสะสมของสารขั้นตอนนั้น ๆ



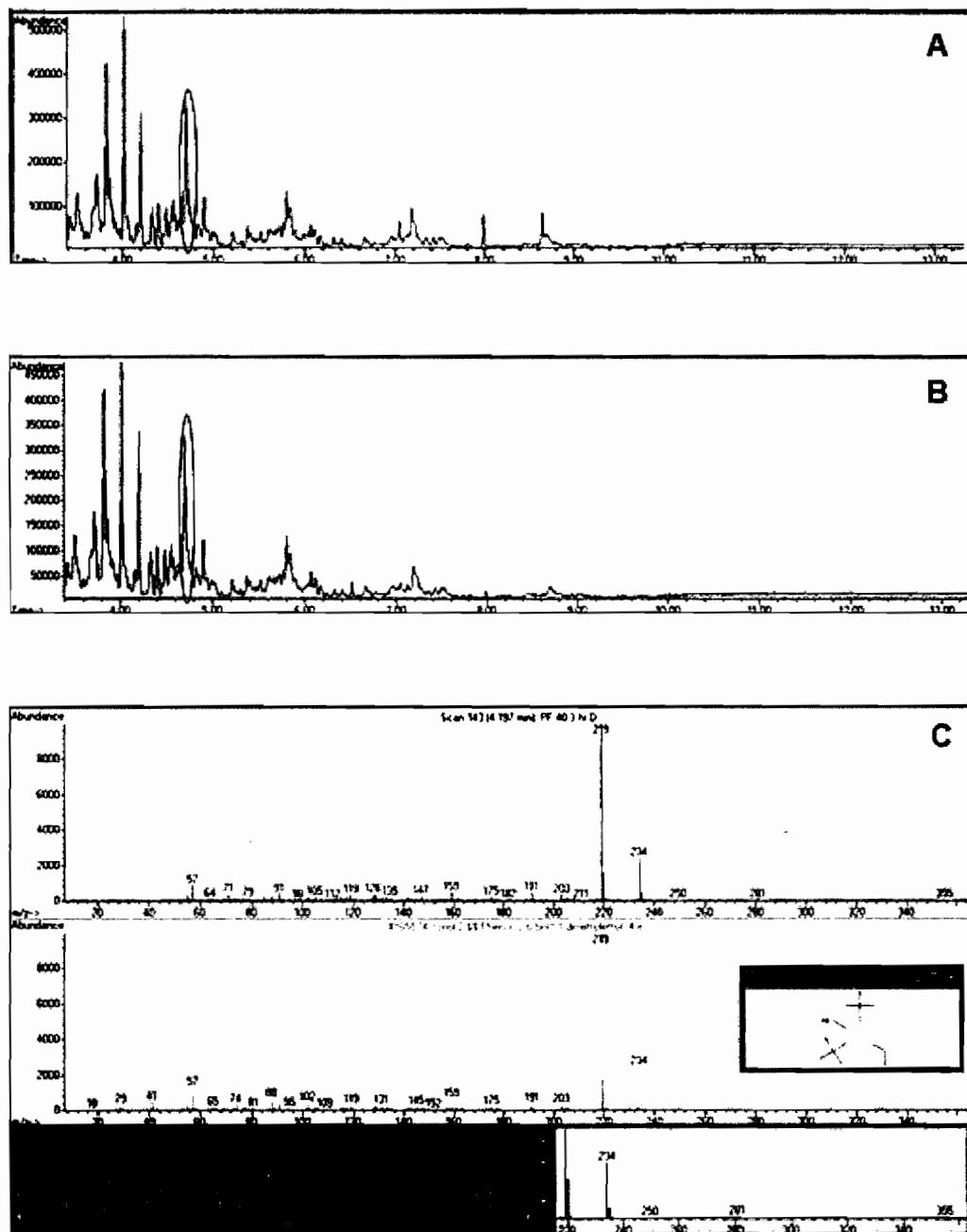
ภาพที่ 4.6 การตรวจพบสารบีซีพีในสารละลายน้ำมารถราน

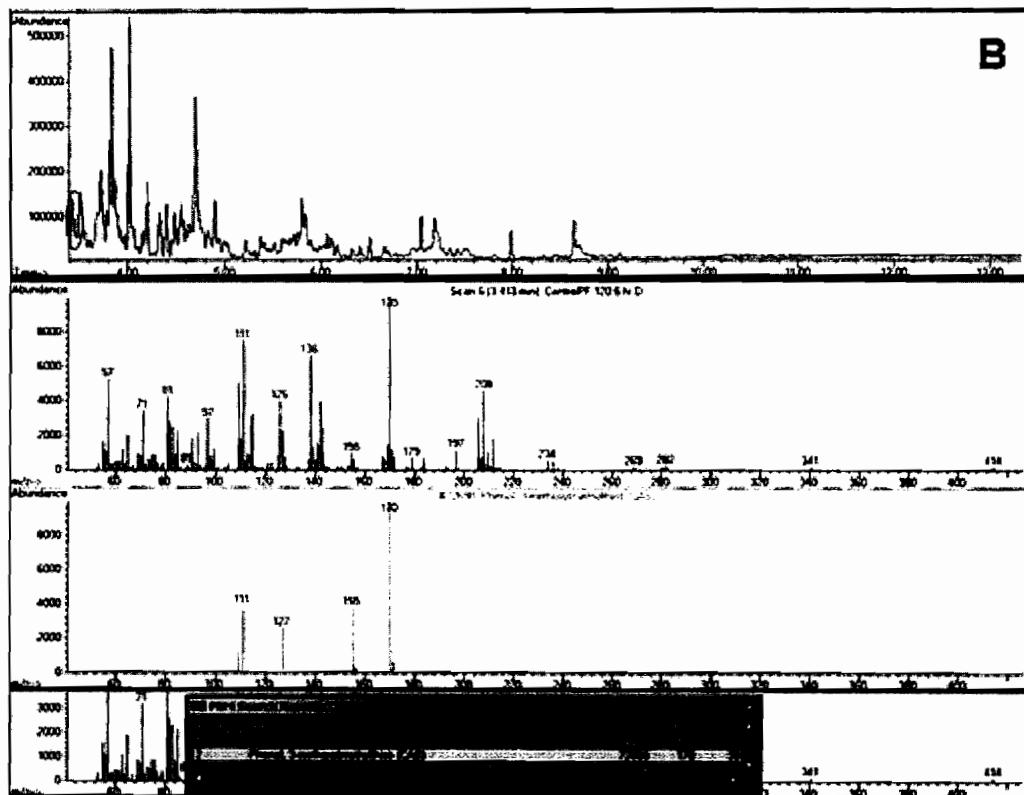
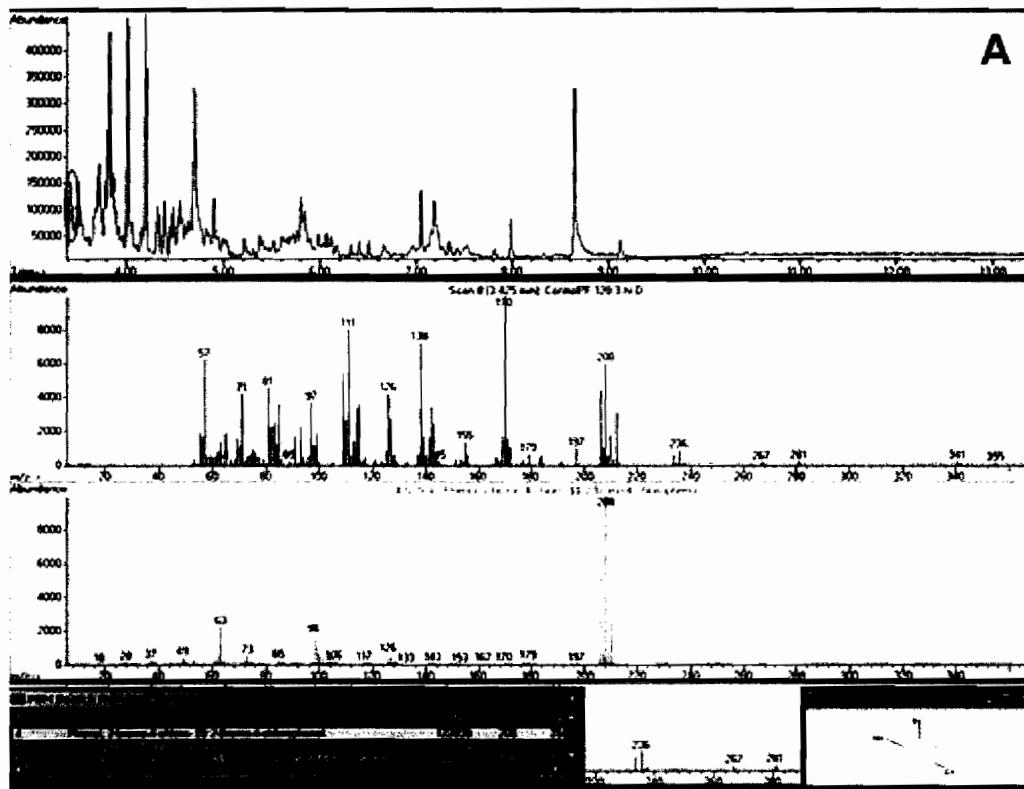


ภาพที่ 4.7 การตรวจพบสารบีซีพีในชุดควบคุม



ภาพที่ 4.8 โครงสร้างสารบีซีพีและการเปรียบเทียบรูปแบบแมสสเปกตรากับฐานข้อมูล





ภาพที่ 4.10 การตรวจพบสารในชุดทดลองการย่อยสลายสารโพร์ฟีโนฟอส

ความเข้มข้น 120 มิลลิกรัมต่อลิตร เวลาในการทดลอง

(A) 3 hr ตรวจพบสารบีซีพี และ (B) 6 hr ตรวจพบสาร 3-methoxy phenol

สำหรับผลจากชุดทดลองที่ได้เติมกลุ่มจุลินทรีย์พบว่าการทดลองที่ระดับความเข้มข้นเริ่มต้นของสารโพร์ฟิโนฟอสไม่สูงนัก (20 mg/L) การตรวจติดตามไม่พบสารบีซีพี แต่เมื่อทดลองที่ความเข้มข้นเริ่มต้นสูงมากขึ้น (40 mg/L) จึงพบสารบีซีพี (ดังรายละเอียดในตารางที่ 4.3) จากผลการทดลองในขั้นตอนนี้พบการสะสมของสารบีซีพี (ทำให้ตรวจพบได้) ในการทดลองที่ความเข้มข้นของสารโพร์ฟิโนฟอสเริ่มต้น 40 mg/L สามารถกล่าวได้ว่ากลุ่มจุลินทรีย์ที่คัดได้ในการศึกษานี้สามารถย่อยสลายสารโพร์ฟิโนฟอสเป็นสารบีซีพีได้ แต่เมื่อมีความเข้มข้นของสารโพร์ฟิโนฟอสสูงจึงทำให้เอนไซม์ไม่สมดุลกับปริมาณสารดังกล่าวจึงพบการสะสมของสารบีซีพี ผลดังกล่าวเป็นไปในทิศทางเดียวกับงานวิจัยในอดีตที่ระบุว่า *Pseudomonas aeruginosa* strain OW สามารถย่อยสลายสารโพร์ฟิโนฟอสเป็นสารบีซีพีเช่นกัน (Malgani et al., 2009) ทั้งนี้ผลดังกล่าววนนี้ยังสามารถระบุได้ว่าเอนไซม์ที่ผลิตขึ้นในกระบวนการย่อยสลายนี้เป็นเอนไซม์ประเภทไฮโดรเลสเจิงได้สารมาร์ยันตร์ขึ้นต้นเป็นสารบีซีพี

ผลจากชุดทดลองที่ได้เติมกลุ่มจุลินทรีย์พบว่าการทดลองที่ระดับความเข้มข้นเริ่มต้นของสารโพร์ฟิโนฟอส 120 mg/L (ตารางที่ 4.3 และ ภาพที่ 4.10) ซึ่งพบว่าเมื่อเวลาในการทดลองเพิ่มมากขึ้นสารบีซีพีมีปริมาณลดลงจนไม่สามารถตรวจพบได้ แต่ตรวจพบสาร 3-methoxy phenol แทนที่ในจุดเดิมที่พบบีซีพี ผลการทดลองนี้สามารถชี้ชัดได้ว่ากลุ่มจุลินทรีย์นี้นอกจากจะสามารถย่อยสลายสารโพร์ฟิโนฟอสแล้วยังสามารถย่อยสลายสารบีซีพีได้อีกด้วย ผลคล้องกับผลการทดลองที่ระดับความเข้มข้นเริ่มต้นของสารโพร์ฟิโนฟอส 20 mg/L ซึ่งตรวจไม่พบสารบีซีพี ทั้งที่สารดังกล่าวเกิดขึ้นแม้แต่ในชุดควบคุม ผลการทดลองนี้บ่งบอกถึงการย่อยสลายอย่างต่อเนื่องทั้งสารโพร์ฟิโนฟอสและสารบีซีพีโดยกลุ่มจุลินทรีย์ทำให้ไม่สามารถตรวจพบสารทั้งสองได้ นอกจากนี้ได้มีการตรวจพบสารมาร์ยันตร์อื่น ๆ ซึ่งได้แก่ สาร 2,4-di-tert-butyl phenol (ภาพที่ 4.9) โดยเมื่อทดลองเป็นเวลาภานานขึ้นพบการสะสมของสารดังกล่าวด้วย

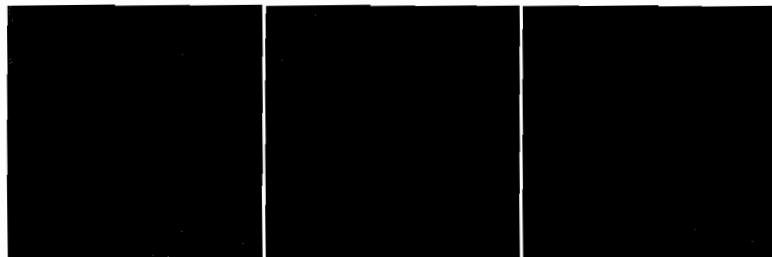
จากการดังกล่าวแสดงให้เห็นว่ากลุ่มจุลินทรีย์ที่คัดได้มีศักยภาพการประยุกต์ใช้ในการกำจัดสารโพร์ฟิโนฟอสทางชีวภาพ ซึ่งวิถีในการย่อยสลายสารดังกล่าวยังไม่สามารถระบุได้ยังชัดเจน แต่สามารถชี้ให้เห็นได้ว่าสารโพร์ฟิโนฟอสถูกย่อยสลายอย่างแน่นอน รวมทั้งผลงานวิจัยนี้เป็นผลงานแรกที่ระบุการย่อยสลายสารโพร์ฟิโนฟอสและสารบีซีพีร่วมกันโดยกลุ่มจุลินทรีย์ (simultaneous microbial degradation) และได้ระบุสารมาร์ยันตร์เพิ่มมากขึ้นจากการวิจัยในอดีต แต่อย่างไรก็ตามความมีงานวิจัยต่อเนื่องเพื่อระบุวิถีการย่อยสลายอย่างสมบูรณ์ในอนาคต

4.2 ผลการคัดแยกจุลินทรีย์บริสุทธิ์และการศึกษาลักษณะการย่อยสลายสารโพร์ฟิโนฟอส

4.2.1 ผลการคัดแยกจุลินทรีย์บริสุทธิ์และลักษณะของจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้

จากการคัดแยกกลุ่มจุลินทรีย์ได้ในหัวข้อที่ผ่านมาเพื่อใช้ในการพื้นฟูพื้นที่ปืนเปื้อนสารโพร์ฟิโนฟอสต่อไป การศึกษาลักษณะของกลุ่มจุลินทรีย์จึงได้กระทำเพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานประกอบการใช้ประโยชน์ของกลุ่มจุลินทรีย์ต่อไป โดยการศึกษาครอบคลุมการคัดสายพันธุ์ (isolation) ชนิดหลักโดยวิธีการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง การระบุลักษณะทางกายภาพ และการระบุสายพันธุ์จาก 16S rRNA ด้วยวิธีการทางชีวโมเลกุล ซึ่งผลการศึกษามีรายละเอียดดังต่อไปนี้

จากกลุ่มจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายสารโพร์ฟิโนฟอสทีคัดแยกได้ (กำหนดชื่อเรียกว่า MIX) ภายหลังที่เข้าสู่อนอาหารแข็งต่อเนื่องพบว่า MIX มีจุลินทรีย์หลัก (predominant strain) 3 ชนิด ซึ่งกำหนดชื่อเรียกว่า PF1 PF2 และ PF3 โดยจุลินทรีย์ทั้งสามมีสายพันธุ์และลักษณะทางกายภาพแตกต่างกันดังข้อมูลที่แสดงในภาพที่ 4.11 และตารางที่ 4.4



ภาพที่ 4.11 ลักษณะโคโลนีของ PF1 PF2 และ PF3

ตารางที่ 4.4 ลักษณะทางกายภาพของ PF1 PF2 และ PF3

ลักษณะ	จุลินทรีย์		
	PF1	PF2	PF3
สีโคโลนี (colony color)	เหลือง	เหลือง	เหลือง
ผิวโคโลนี (colony surface)	เรียบ	ไม่เรียบ	ไม่เรียบ
ขอบโคโลนี (colony edge)	เรียบ	ไม่เรียบ	ไม่เรียบ
ขนาดโคโลนี ณ 24 hr (colony size at 24 hr)	2.0 mm	1.5 mm	1.0 mm
การย้อมแกรม (gram straining)	ลบ	ลบ	ลบ
รูปร่างเซลล์ (cell shape)	แท่งสั้น	แท่งสั้น	แท่งสั้น
สายพันธุ์ (จากการเปรียบเทียบ 16S rRNA ใน GenBank)	<i>Pseudomonas plecoglossicida</i> (similarity of 100%)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (similarity of 98%)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (similarity of 99%)

จากการศึกษาในอดีตพบว่า *Pseudomonas aeruginosa* strain OW สามารถย่อยสารโพร์ฟิโนฟอสได้ (Malgani et al., 2009) จุลินทรีย์ดังกล่าวคัดแยกจากดินที่ปนเปื้อนสารโพร์ฟิโนฟอสในประเทศไทย ผลจากการวิจัยนี้พบว่าจุลินทรีย์สายพันธุ์ *Pseudomonas aeruginosa* อีก 2 พันธุ์ ซึ่งคัดแยกจากดินไร่พริกที่ปนเปื้อนสารโพร์ฟิโนฟอสในประเทศไทยสามารถกำจัดสารโพร์ฟิโนฟอสได้เช่นกัน นอกจากนี้จากนี้ยังมีงานวิจัยในอดีตที่ระบุว่า *Pseudomonas aeruginosa* สามารถย่อยสารกำจัดศัตรูพืชในกลุ่มออร์แกนิฟอสฟอรัสชนิดอื่น เช่น สารคลอร์ไพรีฟอสได้

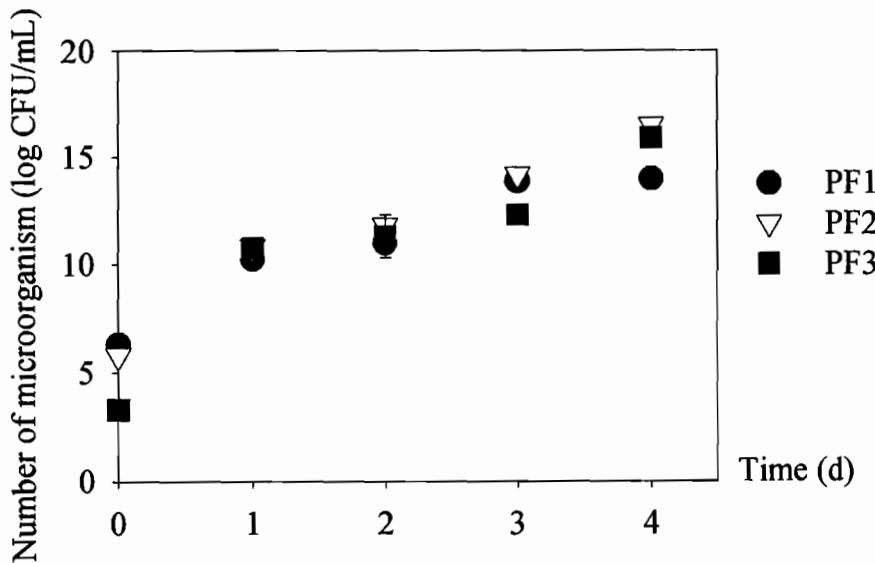
เป็นต้น ได้ออกด้วย (Fulekar and Geetha, 2008; Malgani and Chatterjee, 2009) จากข้อมูล ข้างต้นสามารถกล่าวได้ว่า *Pseudomonas aeruginosa* เป็นแบคทีเรียที่คงความสามารถในการ กำจัดสารกำจัดศัตรูพืชในกลุ่มออร์แกโนฟอสฟอรัส ซึ่งคาดว่าจุลินทรีย์ดังกล่าวสามารถผลิตเอนไซม์ ที่สามารถย่อยสลายสารออร์แกโนฟอสฟอรัส (organophosphorus-degrading enzyme) ได้ แต่ งานวิจัยนี้ยังไม่สามารถระบุยีน (gene) ที่ควบคุมการทำงานดังกล่าวได้อย่างชัดเจน ในอนาคตควรมี การศึกษาต่อเนื่องในประเด็นดังกล่าวเพื่อให้ทราบถึงกลไกการกำจัดสารโพเรฟิโนฟอสโดยจุลินทรีย์ที่ คัดแยกได้

สำหรับสายพันธุ์ *Pseudomonas plecoglossicida* จนถึงปัจจุบันมีเพียงงานวิจัยที่ ค้นพบว่าจุลินทรีย์ดังกล่าวสามารถกำจัดสารกำจัดศัตรูพืชไพริทรอยด์ (pyrethroid) ได้เท่านั้น ผล การศึกษาจากงานวิจัยนี้เป็นการระบุความสามารถของจุลินทรีย์สายพันธุ์ดังกล่าวในการกำจัดสาร กำจัดศัตรูพืชออร์แกโนฟอสฟอรัสเป็นครั้งแรก ดังนั้นในอนาคตจึงควรได้มีการศึกษาต่อเนื่อง เกี่ยวกับ *Pseudomonas plecoglossicida* ในการกำจัดสารกำจัดศัตรูพืชต่าง ๆ เพิ่มเติม

4.2.2 ผลงานศาสตร์ของการเจริญเติบโตและการย่อยสลายสารโพเรฟิโนฟอสด้วย จุลินทรีย์บริสุทธิ์

ผลการศึกษาการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์บริสุทธิ์ทั้งสาม ซึ่งได้แก่ PF1 PF2 และ PF3 มีลักษณะดังภาพที่ 4.12 (ข้อมูลดิบแสดงในภาคผนวก ฯ) คือ ในระยะเวลาการทดลอง 4 วัน จุลินทรีย์มีการเจริญเติบโตเพิ่มจำนวนเพิ่มขึ้นมากอย่างต่อเนื่อง โดยเซลล์จุลินทรีย์เพิ่มจำนวนถึง 10^{15} CFU/mL เมื่อสิ้นสุดการทดลอง งานวิจัยนี้ศึกษาการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ในสภาวะที่ไม่มี ส่วนประกอบของสารอินทรีย์คาร์บอนอื่นแต่พบว่าจุลินทรีย์บริสุทธิ์เจริญเติบโตได้รวดเร็วมาก ซึ่งจาก ผลดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้มีความสามารถในการใช้สารโพเรฟิโนฟอสเป็นแหล่ง คาร์บอนหลักเดียว (sole carbon source) ในการเจริญเติบโตได้เป็นอย่างดี

จากผลดังกล่าวเมื่อพิจารณาจากผลงานศาสตร์การเจริญเติบโตของจุลินทรีย์บริสุทธิ์ พบร่วมกับการเจริญเติบโตเป็นไปตามปฏิกิริยาอันดับที่ 1 โดยมีค่าคงที่ปฏิกิริยาแสดงดังตารางที่ 4.5 PF1 PF2 และ PF3 มีค่าคงที่ผลงานศาสตร์การเจริญเติบโตอยู่ระหว่าง $0.08-0.11 \text{ hr}^{-1}$ จากข้อมูล ดังกล่าวพบว่าการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์บริสุทธิ์สูงกว่ากลุ่มจุลินทรีย์ 5-6 เท่า ซึ่งผลดังกล่าวอาจ เกิดจากการแข่งขันการใช้อาหารระหว่างจุลินทรีย์ต่าง ๆ ในกลุ่มจุลินทรีย์ นอกจากนี้จากผล การศึกษายังบ่งชี้ได้ว่าจุลินทรีย์ต่างชนิดมีอัตราการเจริญเติบโตแตกต่างกันด้วย โดย PF3 มีอัตราการ เจริญเติบโตสูงสุด



ภาพที่ 4.12 การเจริญเติบโตของจุลินทรีย์บริสุทธิ์ที่ย่อยสลายสารโพเรฟีโนฟอส

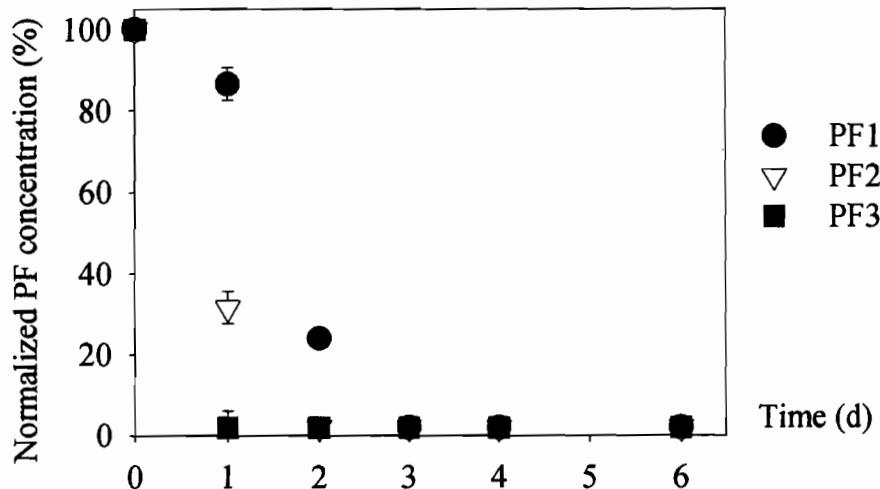
ตารางที่ 4.5 จำนวนพลาสต์การเจริญเติบโตของจุลินทรีย์บริสุทธิ์ที่ย่อยสลายสารโพเรฟีโนฟอส

จุลินทรีย์	สมการจำนวนพลาสต์การเจริญเติบโต	R^2	ค่าคงที่ (hr^{-1})
PF1	$y = 0.08x + 7.28$	0.90	0.08
PF2	$y = 0.10x + 6.86$	0.95	0.10
PF3	$y = 0.11x + 5.36$	0.85	0.11

หมายเหตุ y = เวลา (จำนวนเซลล์)
 x = เวลา (hr)

ส่วนภาพที่ 4.13 (ข้อมูลดิบแสดงในภาคผนวก ฯ) แสดงผลการย่อยสลายสารโพเรฟีโนฟอสของจุลินทรีย์บริสุทธิ์ทั้งสาม ซึ่งผลการศึกษาเป็นไปในลักษณะเดียวกันกับการเจริญเติบโตกล่าวคือ สารโพเรฟีโนฟอสซึ่งเป็นสารอาหารcarbонลดลงอย่างรวดเร็วในเวลาเพียง 2-3 วัน สอดคล้องกับผลการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ที่มีการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็ว เมื่อพิจารณาอัตราการย่อยสลายสารโพเรฟีโนฟอสและร้อยละการกำจัดสารโพเรฟีโนฟอสดังแสดงในตารางที่ 4.6 พบว่า จุลินทรีย์บริสุทธิ์ทั้งสามมีอัตราการย่อยสลายสารโพเรฟีโนฟอสและร้อยละการกำจัดสารโพเรฟีโนฟอสถึง 7.6-19.6 mg/L/d และ 93-95 ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับผลการทดลองการย่อยสลายสารโพเรฟีโนฟอสตามธรรมชาติ (ชุดทดลองควบคุมที่ไม่มีการเติมเซลล์จุลินทรีย์) พบว่าความเข้มข้นของสารโพเรฟีโนฟอสคงเหลือสูงกว่าร้อยละ 95 ภายหลังสิ้นสุดการทดลอง (4 วัน) ดังนั้นสามารถสรุปได้ว่าจุลินทรีย์บริสุทธิ์ทั้งสามมีศักยภาพในการย่อยสลายสารโพเรฟีโนฟอสสูง

เมื่อพิจารณาเปรียบเทียบกับการศึกษาที่ผ่านมาพบว่า *Pseudomonas aeruginosa* strain OW *Pseudomonas putida* strain W และ *Burkholderia gladioli* strain Y สามารถย่อยสลายสารโพร์ฟินฟอสได้กว่าร้อยละ 90 ในเวลา 2 วัน เช่นกัน (Malgani and Chatterjee, 2009; Malgani et al., 2009) ผลการทดลองนี้ชี้ดัดว่าจุลินทรีย์บริสุทธิ์ที่คัดแยกได้ในงานวิจัยนี้มีศักยภาพในการนำไปใช้ประโยชน์ได้ในอนาคตทั้งในรูปจุลินทรีย์บริสุทธิ์และกลุ่มจุลินทรี



ภาพที่ 4.13 การย่อยสลายสารโพร์ฟินฟอสโดยจุลินทรีย์บริสุทธิ์

ตารางที่ 4.6 อัตราการย่อยสลายสารโพร์ฟินฟอสและร้อยละการกำจัดสารโพร์ฟินฟอสของจุลินทรีย์บริสุทธิ์

จุลินทรี	อัตราการย่อยสลายสารโพร์ฟินฟอส (mg/L/d)	ร้อยละการกำจัดสารโพร์ฟินฟอส
PF1	7.6	95.0
PF2	9.8	93.1
PF3	19.6	95.3

เมื่อพิจารณาจนผลศาสตร์การย่อยสลายสารโพร์ฟินฟอสของจุลินทรีย์บริสุทธิ์พบว่าเป็นไปตามปฏิกริยาอันดับที่ 1 โดยมีค่าคงที่ปฏิกริยาแสดงดังตารางที่ 4.7 ผลการศึกษาบ่งชี้ได้ว่าปฏิกริยาการย่อยสลายสารโพร์ฟินฟอสขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของสารเริ่มต้น PF1 PF2 และ PF3 มีค่าคงที่จนผลศาสตร์การเจริญเติบโตอยู่ระหว่าง $0.023\text{--}0.035 \text{ hr}^{-1}$ โดยทั่วไปในการพื้นฟูพื้นที่ปืนเป็นปืนด้วยวิธีการทางชีวภาพกลุ่มจุลินทรีทำงานได้ดีกว่าจุลินทรีย์บริสุทธิ์ (Siripattanakul et al., 2009) เนื่องจากความหลากหลายในกลุ่มจุลินทรีส่งผลให้จุลินทรีสามารถทนต่อ

สภาพแวดล้อมต่าง ๆ ตลอดจนสามารถเพิ่มเส้นทางวิถีการเปลี่ยนแปลงของสาร (catabolic pathway) ต่าง ๆ (Alvey and Crowley, 1996; Smith et al., 2005) แต่ในการศึกษานี้กลับพบว่า จุลินทรีย์บริสุทธิ์ทำงานได้ดีกว่าอาจเนื่องมาจากการปรับสภาพจุลินทรีย์ในอาหารที่ใช้ในการศึกษา ส่งผลให้มีอัตราการเจริญเติบโตและการย่อยสลายสูง

ตารางที่ 4.7 จำนวนพลาสต์การย่อยสลายสารโพเรฟโนฟอสของจุลินทรีย์บริสุทธิ์

จุลินทรีย์	สมการจำนวนพลาสต์การย่อยสลายสาร	R^2	ค่าคงที่ (hr^{-1})
PF1	$y = -0.023x + 1.55$	0.86	0.023
PF2	$y = -0.035x + 1.42$	0.95	0.035
PF3	$y = -0.035x + 1.02$	0.75	0.035

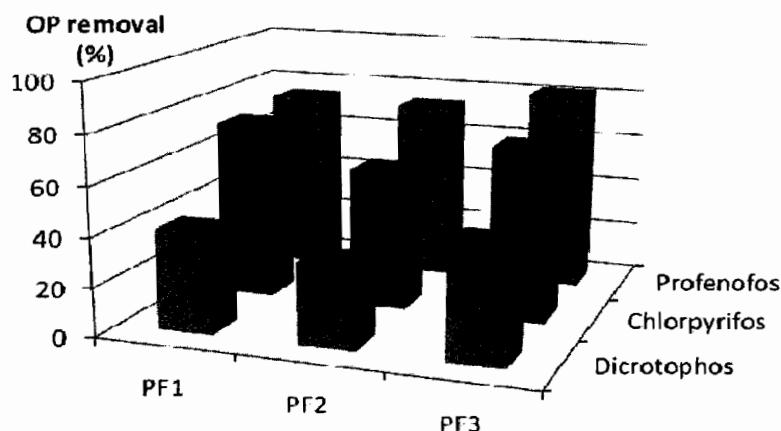
หมายเหตุ y = \log (ความเข้มข้นของโพเรฟโนฟอส)
 x = เวลา (hr)

4.2.3 ผลการศึกษาความเป็นไปได้ในการย่อยสลายสารกำจัดศัตรูพืชօร์แกนโนฟอสฟอรัสชนิดอื่นด้วยจุลินทรีย์บริสุทธิ์

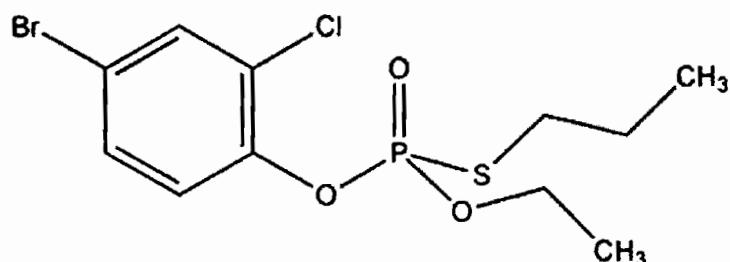
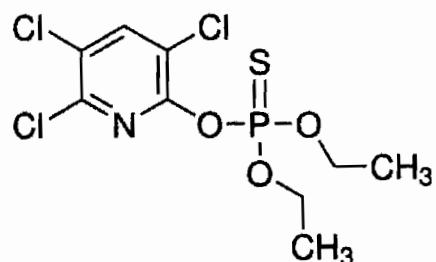
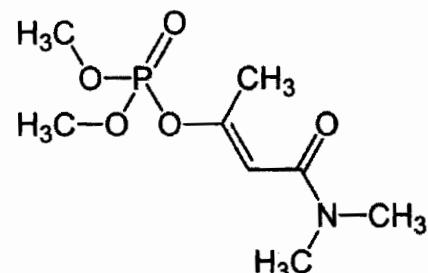
โดยทั่วไปในการใช้สารกำจัดศัตรูในการเกษตรนิยมใช้สารเคมีเกษตรร่วมกันหลายชนิด เพื่อกำจัดศัตรูพืชที่แตกต่างกันออกไป สำหรับการเพาะปลูกพิริกริกนจากมีการใช้สารโพเรฟโนฟอส เป็นจำนวนมากแล้ว เกษตรกรยังใช้สารกำจัดศัตรูพืชในกลุ่มօร์แกนโนฟอสฟอรัสหลายชนิด จาก การสำรวจพื้นที่เกษตรกรรมพบว่าสารในกลุ่มดังกล่าวที่นิยม ได้แก่ สารโพเรฟโนฟอส สารคลอร์ไพริฟอส (chlorpyrifos) และสารไดโครโตฟอส (dichrotophos) จากข้อมูลดังกล่าวนี้จึงมีความ เป็นไปได้ที่อาจมีการปนเปื้อนของสารกำจัดศัตรูพืชดังกล่าวในบริเวณเดียวกับสารโพเรฟโนฟอส

งานวิจัยนี้ได้ศึกษาทดลองย่อยสลายสารคลอร์ไพริฟอสและสารไดโโคโตฟอส เพื่อศึกษา ความเป็นไปได้ในการกำจัดสารดังกล่าวโดยจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้ รวมทั้งบ่งชี้แนวโน้มของอิทธิพล ของสารดังกล่าวต่อการกำจัดสารโพเรฟโนฟอส ผลการทดลองย่อยสลายสารคลอร์ไพริฟอสและสารไดโโคโตฟอสโดย PF1 PF2 และ PF3 เปรียบเทียบกับการย่อยสลายสารโพเรฟโนฟอสโดยจุลินทรีย์ ดังกล่าวแสดงไว้ในภาพที่ 4.14 (ข้อมูลดิบแสดงในภาคผนวก ข) ผลการทดลองพบว่า PF1 PF2 และ PF3 สามารถย่อยสลายสารกำจัดศัตรูพืชได้ใกล้เคียงกัน โดยเมื่อมีจุลินทรีย์ดังกล่าวจำนวน เริ่มนั้นประมาณ 10^6 CFU/mL และความเข้มข้นของสารกำจัดศัตรูพืชเริ่มนั้น 20 mg/L จุลินทรีย์ กำจัดสารคลอร์ไพริฟอสได้ร้อยละ 57-73 และสารไดโโคโตฟอสได้ร้อยละ 33-47 ในขณะที่จุลินทรีย์ กำจัดสารโพเรฟโนฟอสได้ร้อยละ 75-82 จากผลดังกล่าวสามารถสรุปได้อย่างชัดเจนว่าจุลินทรีย์ บริสุทธิ์ที่คัดแยกได้จากงานวิจัยนี้สามารถกำจัดสารกำจัดศัตรูพืชกลุ่มօร์แกนโนฟอสฟอรัสได้หลาย ชนิด

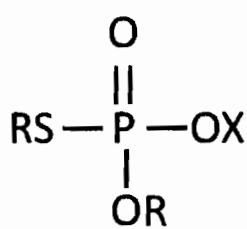
เมื่อพิจารณาโครงสร้างของสารทั้งสาม (ภาพที่ 4.15) พบว่าสารสารโพร์ฟินฟอส (*O*-(4-bromo-2-chlorophenyl) *O*-ethyl *S*-propyl phosphorothioate) และสารคลอร์ไฟริฟอส (*O,O*-diethyl *O*-(3,5,6-trichloro-2-pyridinyl) phosphorothioate) เป็นสารออร์แกนโนฟอฟอรัสในกลุ่มฟอฟอร์โอลีโอดีเอท (phosphorothioate) เช่นกัน (US EPA, 2009) และมีโครงสร้างคล้ายกันแต่จัดเป็นจำพวกกลุ่มย่อยต่างกัน โดยสารโพร์ฟินฟอฟอสจัดเป็นสารในกลุ่มย่อย เอสอัลกิลฟอฟอร์โอลีโอดีเอท (*S*-alkyl phosphorothioate) ส่วนสารคลอร์ไฟริฟอสเป็นจัดเป็นสาร ในกลุ่มย่อยโออัลกิลฟอฟอร์โอลีโอดีเอท (*O*-alkyl phosphorothioate) ดังแสดงในภาพที่ 4.16 เนื่องจากความใกล้เคียงกันของโครงสร้างสารเป็นเหตุให้จุลินทรีย์สามารถกำจัดสารคลอร์ไฟริฟอสได้ดี ใกล้เคียงกับสารโพร์ฟินฟอฟอสแม้จะไม่ได้มีการปรับสภาพกับสารคลอร์ไฟริฟอสก่อน ในทางตรงกัน ข้ามสารไดโคโตฟอส (1E)-3-(dimethylamino)-1-methyl-3-oxo-1-propenyl dimethyl phosphate) เป็นสารในกลุ่มฟอฟเฟต (phosphate) ดังแสดงในภาพที่ 4.10 (US EPA, 2009) ซึ่งโครงสร้างทางเคมีของสารแตกต่างกับสารโพร์ฟินฟอฟอส เป็นเหตุให้จุลินทรีย์สามารถกำจัดสารไดโคโตฟอสได้ไม่ดีนัก



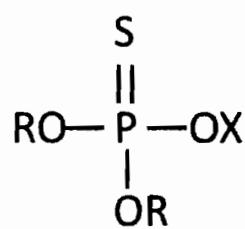
ภาพที่ 4.14 การย่อยสลายสารคลอร์ไฟริฟอสและสารไดโคโตฟอสโดย PF1 PF2 และ PF3

**Profenofos****Chlorpyrifos****Dicrotophos**

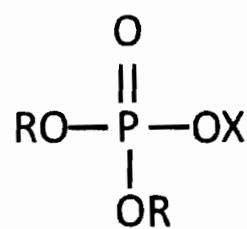
ภาพที่ 4.15 โครงสร้างสารโพรฟีโนฟอส สารคลอร์ไฟริฟอส และสารไดโคตอฟอส



**S-alkyl
phosphorothioate**

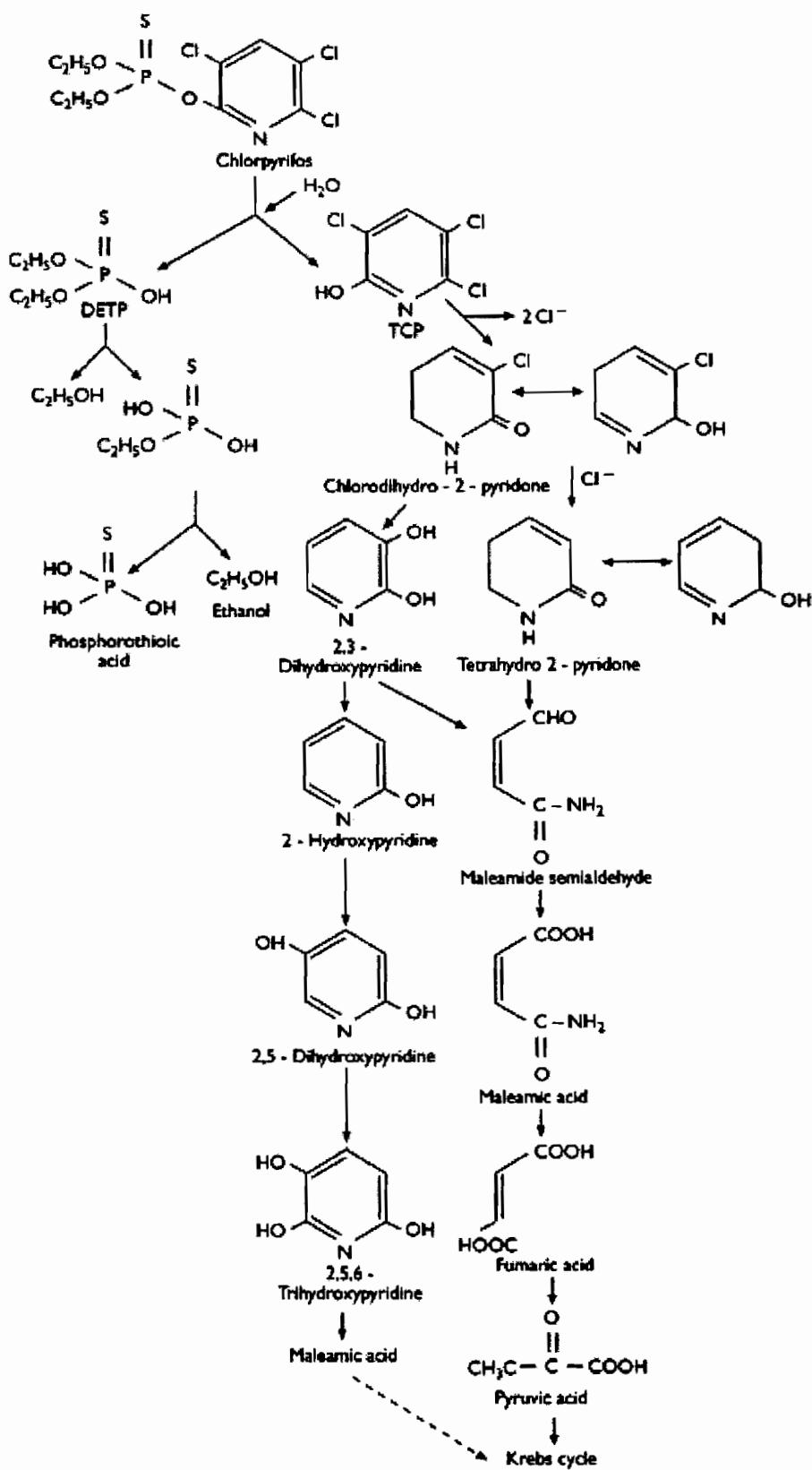


**O-alkyl
phosphorothioate**

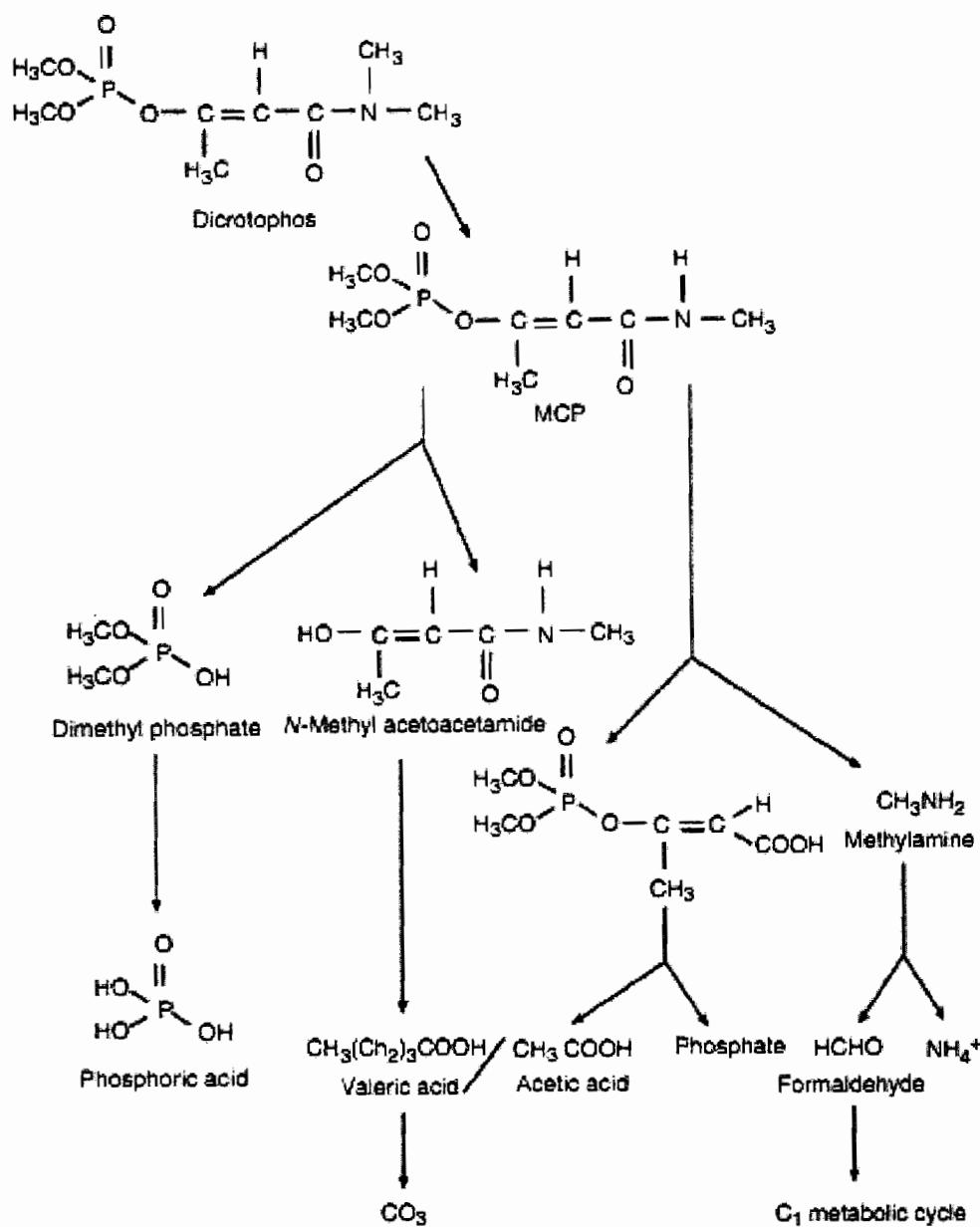
**Phosphate**

ภาพที่ 4.16 โครงสร้างทางเคมีของสารออร์แกโนฟอสฟอรัสกลุ่มเอสอัลกิลฟอสฟอโรไฮโดรเจท กลุ่มโออัลกิลฟอสฟอโรไฮโดรเจท และกลุ่มฟอสเฟต

หากพิจารณาเวเคราะห์ผลการย่อยสลายข้างต้นจากวิถีการย่อยสลาย (degradation pathway) ของสารทั้งสาม โดยที่ไป่อนไขม์ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายสารออร์แกนโนฟอสฟอรัส ได้แก่ เอนไซม์ฟอสฟาเตส (phosphatase) เอนไซม์เอสเตอเรส (esterase) เอนไซม์ไฮดrolase และเอนไซม์ออกซีเจนส์ (oxygenase) (Kanekar et al., 2004) งานวิจัยในอดีตส่วนมากรายงานถึงการย่อยสลายสารออร์แกนโนฟอสฟอรัสเกิดจากการทำงานของเอนไซม์ออร์แกนโนฟอสเฟตไฮดrolase (organophosphate hydrolase) (Kanekar et al., 2004; Singh and Walker, 2006) อาทิเช่น การย่อยสลายสารคลอร์ไฟฟอฟ พาราไรอ่อน โมโนโครโตฟอส เป็นต้น จากการศึกษาของ Singh and Walker (2006) ได้ร่วบรวมวิถีการย่อยสลายของสารคลอร์ไฟฟอฟและสารไดโครโตอสโดยจุลินทรีย์แสดงดังภาพที่ 4.17 และ 4.18 ซึ่งหากพิจารณาจากภาพทั้งสองพบว่าสารคลอร์ไฟฟอฟสามารถถูกย่อยสลายครั้งแรก (primary degradation) ด้วยกระบวนการไฮโดรไลซีสได้เหมือนสารโพธิโนฟอฟ ในขณะที่สารไดโครโตฟอสต้องผ่านกระบวนการเมธิลเลชัน (methylation) เป็นสารโมโนโครโตฟอสก่อนกระบวนการไฮโดรไลซีส ดังนั้นการกำจัดสารไดโครโตฟอฟจึงน้อยกว่าสารอื่น ๆ แต่อย่างไรก็ตามโดยภาพรวม PF1 PF2 และ PF3 สามารถกำจัดสารสารออร์แกนโนฟอสฟอรัสทั้งสามได้ดี ดังนั้นหากประยุกต์ใช้จุลินทรีย์นี้จริงคาดว่าจุลินทรีย์เหล่านี้จะสามารถแทนทดแทนต่อสภาวะที่มีสารปนเปื้อนร่วมได้ รวมทั้งยังอาจกำจัดสารปนเปื้อนร่วมบางชนิดได้ด้วย



ภาพที่ 4.17 วิถีการย่อยสลายของสารคลอร์ไพริฟอสโดยจุลินทรีย์ (Singh and Walker, 2006)

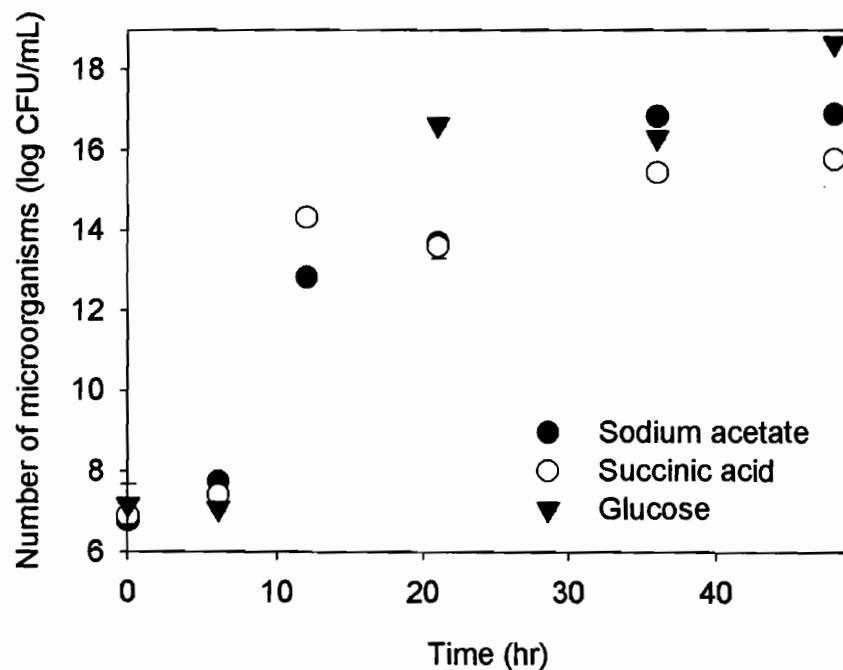


ภาพที่ 4.18 วิถีการย่อยสลายของสารไดโคร็อฟอสโดยจุลินทรีย์ (Singh and Walker, 2006)

4.3 ผลการกระตุ้นการย่อยสลายสารโพร์ฟิโนฟอสโดยใช้กระบวนการเมตาโบลิซึมร่วม

4.3.1 ผลการศึกษาแหล่งการบอนร่วมที่ส่งเสริมกระบวนการเมตาโบลิซึมร่วม

การศึกษาในขั้นตอนนี้มุ่งเน้นเพื่อคัดเลือกสารที่เป็นแหล่งการบอนร่วมที่เหมาะสมใน การส่งเสริมการย่อยสลายสารโพร์ฟิโนฟอสโดยกลุ่มจุลินทรีย์ที่คัดได้ ซึ่งสารที่เลือกในการศึกษารังนี้ เป็นสารที่มีการใช้ในกระบวนการเมตาโบลิซึมร่วมทั่วไป (Xie et al., 2008) ซึ่งได้แก่ กลูโคส ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$) กรดซัคซินิก (succinic acid, $\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_4\text{Na}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) โซเดียมอะซิเตอท (sodium acetate, $\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2\text{Na}$) ในการทดลองควบคุมปริมาณสารบอนและสารโพร์ฟิโนฟอส เท่ากับ 500 และ 20 mg/L ตามลำดับ ผลการเจริญเติบโตของกลุ่มจุลินทรีย์ การเปลี่ยนแปลงของค่าซีโอดี และการ ย่อยสลายสารโพร์ฟิโนฟอสแสดงในภาพที่ 4.19 ถึง 4.21 (ข้อมูลดิบแสดงในภาคผนวก ฯ)



ภาพที่ 4.19 การเจริญเติบโตของกลุ่มจุลินทรีย์ในการย่อยสลายสารโพร์ฟิโนฟอส ภายใต้สภาวะที่มีแหล่งการบอนร่วมต่างชนิด

ผลการทดลองการเจริญเติบโตของกลุ่มจุลินทรีย์ทั้ง 3 ชุดทดลอง คือ ชุดทดลองที่มีการเติมกลูโคส กรดซัคcharic และโซเดียมอะซิเตอท มีการเจริญเติบโตของกลุ่มจุลินทรีย์ในลักษณะคล้ายกันดังภาพที่ 4.1 (ข้อมูลดิบแสดงในภาคผนวก ข) กล่าวคือ กลุ่มจุลินทรีย์มีการเจริญเติบโตเพิ่มจำนวนเพิ่มขึ้นมากในช่วงชั่วโมงที่ 6 ถึงชั่วโมงที่ 20 จากนั้นจำนวนจุลินทรีย์คงเริ่มคงที่ โดยภายหลังสิ้นสุดการทดลอง (48 ชั่วโมง) ชุดที่มีการเติมกลูโคสมีการเจริญของกลุ่มจุลินทรีย์สูงกว่า 10^{18} CFU/mL รองลงมาเป็นชุดที่เติมโซเดียมอะซิเตอทและชุดที่เติมกรดซัคcharic เท่ากับ 10^{17} และ 10^{16} CFU/mL ตามลำดับ ซึ่งเมื่อพิจารณาจากผลศาสตร์การเจริญเติบโตของกลุ่มจุลินทรีย์พบว่าการเจริญเติบโตเป็นไปตามปฏิกิริยาอันดับหนึ่งซึ่งมีค่าคงที่แสดงดังตารางที่ 4.8

ตารางที่ 4.8 จลนพลศาสตร์การเจริญเติบโตของกลุ่มจุลินทรีย์ในการย่อยสลายสารโพธิโนฟอส ภายใต้สภาวะที่มีแหล่งคาร์บอนร่วมต่างชนิด

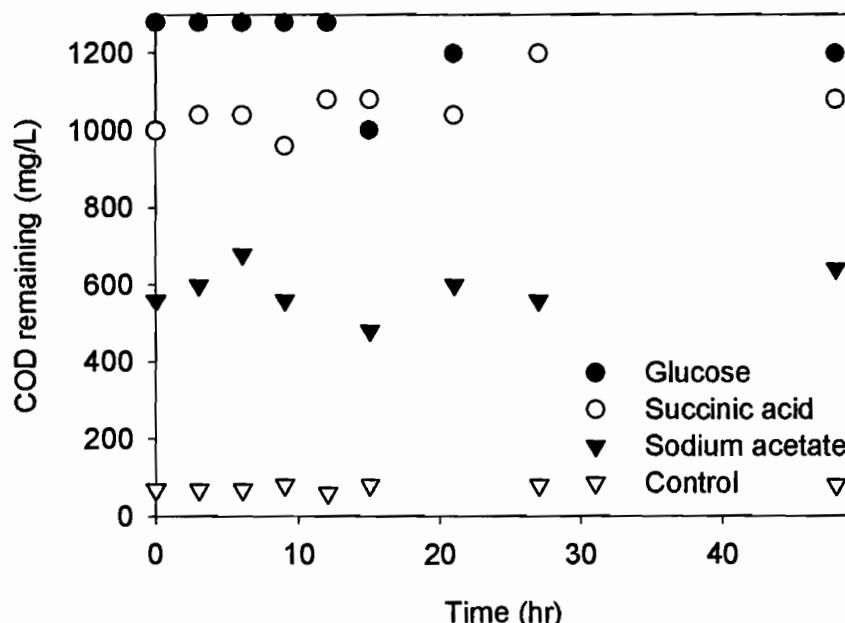
แหล่งคาร์บอนร่วม	สมการจลนพลศาสตร์การเจริญเติบโต	R^2	ค่าคงที่ (hr^{-1})
กลูโคส	$y = 0.51x + 6.09$	0.87	0.51
กรดซัคcharic	$y = 0.62x + 5.82$	0.80	0.62
โซเดียมอะซิเตอท	$y = 0.49x + 5.92$	0.92	0.49

หมายเหตุ y = \log (จำนวนเซลล์)
 x = เวลา (hr)

การเจริญเติบโตของกลุ่มจุลินทรีย์ในชุดที่มีการเติมแหล่งคาร์บอนต่าง ๆ มีค่าคงที่เท่ากับ $0.49-0.62 hr^{-1}$ สูงกว่าการเจริญเติบโตในชุดควบคุมที่ไม่มีการเติมแหล่งคาร์บอนมาก (ซึ่งมีค่าคงที่ เท่ากับ $0.02 hr^{-1}$) ซึ่งผลดังกล่าวสอดคล้องกับงานวิจัยในอดีต (Jianlong et al., 2002; Grant and Betts; 2004; Xia et al., 2009) ที่มีการศึกษาเกี่ยวกับการเติมแหล่งคาร์บอนเพื่อเพิ่มการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ โดยผลการศึกษาพบว่าเมื่อมีการเติมแหล่งคาร์บอนจะส่งให้จุลินทรีย์มีการเจริญเติบโตมากขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับชุดที่ไม่มีการเติมแหล่งคาร์บอน นอกจากนี้ยังพบว่าในกรณีที่มีการเติมผลการเจริญเติบโตของกลุ่มจุลินทรีย์แตกต่างกันอย่างชัดเจนกันขึ้นกับโครงสร้างของแหล่งคาร์บอนแต่ละชนิด นอกจากนี้ยังขึ้นอยู่กับความจำเพาะของจุลินทรีย์ในการใช้แหล่งคาร์บอนนั้นเพื่อการเจริญเติบโต (Xie et al., 2009)

สำหรับผลการศึกษาค่าซีโอดีพบว่าค่าซีโอดีมีแนวโน้มคงที่ตลอดช่วงการทดลองดังภาพที่ 4.20 จากผลการทดลองจะเห็นได้ว่าค่าซีโอดีเริ่มต้นในแต่ละชุดมีค่าไม่เท่ากัน แม้จะมีการควบคุมปริมาณคาร์บอนในองค์ประกอบของสารที่เติมลงไปแล้วก็ตาม ผลดังกล่าวซึ่งให้เห็นอย่างชัดเจนว่าปริมาณ (มวล) ของคาร์บอนในชุดทดลองทุกชุดแม้จะควบคุมให้เท่ากันแต่การเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันระหว่างคาร์บอนดังกล่าวและสารเคมีในการวิเคราะห์ค่าซีโอดีต่างกัน ซึ่งอาจบ่งชี้ได้ว่าความเป็นไปได้ในการใช้ประโยชน์ทางชีวภาพ (bioavailability) ของสารคาร์บอนร่วมในการศึกษานี้ต่างกัน เมื่อประมวลผลดังกล่าวร่วมกับผลการเจริญเติบโตในการทดลองตอนที่ผ่านมาพบว่า ปรากฏการณ์นี้ส่งผลให้กลุ่มจุลินทรีย์สามารถเจริญเติบโตได้ต่างกัน ดังผลการเจริญภาพที่ 4.19

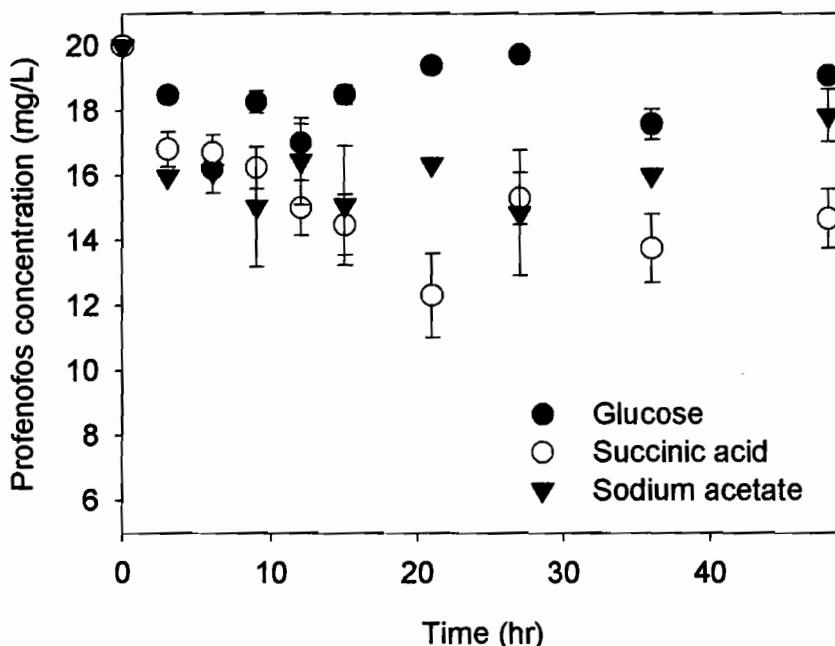
นอกจากนี้ยังพบว่าจากผลการวิเคราะห์ค่าซีโอดีในการทดลองนี้มีค่าลดลงเพียงเล็กน้อยแม้พบรการเจริญเติบโตของกลุ่มจุลทรรศสูงมาก (ซึ่งบ่งชี้การใช้คาร์บอนปริมาณมากเข่นกัน) โดยทั่วไปหลักการวิเคราะห์ค่าซีโอดีเป็นการวิเคราะห์ปริมาณออกซิเจนที่เปลี่ยนแปลงเพื่อบ่งชี้การเกิดออกซิเดชันและปริมาณสารอินทรีย์ แต่เนื่องจากสารคาร์บอนที่ใช้ในการศึกษานี้มีโครงสร้างซับซ้อน การเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันอาจยังเกิดขึ้นได้ในสารมารยันต์ต่าง ๆ ส่งผลให้ค่าซีโอดีลดลงน้อยมาก ดังนั้นอาจกล่าวได้ว่าในการศึกษานี้ผลการวิเคราะห์ค่าซีโอดีเป็นเพียงการบ่งชี้ในเบื้องต้นเท่านั้น มิอาจสรุปผลได้อย่างชัดเจน



ภาพที่ 4.20 การเปลี่ยนแปลงของค่าซีโอดีในการย่อยสารพอกฟอส
ภายใต้สภาวะที่มีแหล่งการบ่อนร่วมต่างชนิด

สำหรับผลการศึกษาปริมาณสารพอกฟอสแสดงดังภาพที่ 4.21 สารพอกฟอสลดลงอย่างรวดเร็วใน 10-20 ชั่วโมงจากนั้นความเข้มข้นของสารพอกฟอสจะคงที่ โดยเมื่อสิ้นสุดการทดลอง (48 ชั่วโมง) ชุดที่มีการเติมกรดซัคซินิค และชุดที่เติมโซเดียมอะซิเตอท สามารถลดความเข้มข้นของสารได้ร้อยละ 30 ส่วนชุดที่มีการเติมกลูโคสสามารถลดสารพอกฟอสได้น้อยที่สุด คือ ร้อยละ 10 จากผลการทดลองดังกล่าวจะเห็นได้ว่าแหล่งการบ่อนร่วมต่างชนิดมีผลต่อการย่อยสารพอกฟอสอย่างชัดเจน ผลการทดลองดังกล่าวเป็นไปในทิศทางเดียวกับงานวิจัยในอดีตที่พบว่าแบบที่เรียกว่าพาร์ฟาโนน (short-chain fatty acid) เป็นแหล่งการบอนมากกว่ากลูโคสซึ่งเป็นการนำไปใช้เดรตพื้นฐาน (simple carbohydrate) (Kim et al., 1997; Xia et al., 2009)

จอนพลศาสตร์การย่อยสลายสารโพร์ฟีโนฟอสในชุดที่มีการเติมแหล่งคาร์บอนต่าง ๆ มีค่าคงที่ เท่ากับ $0.001\text{-}0.008 \text{ hr}^{-1}$ (ดังตารางที่ 4.9) ในขณะที่ในการทดลองที่ไม่มีการเติมแหล่ง คาร์บอนร่วม มีค่าคงที่ 0.006 hr^{-1} (ผลการทดลองในหัวข้อที่ผ่านมา) ซึ่งจากผลดังกล่าวแสดงให้เห็น ว่าแหล่งคาร์บอนร่วมอาจช่วยสนับสนุนหรือยับยั้งการย่อยสลายสารโพร์ฟีโนฟอสได้ ในกรณีของ กลูโคسمีผลอย่างชัดเจนว่าการย่อยสลายสารซึ่งค่าคงที่จอนพลศาสตร์การย่อยสลายสารโพร์ฟีโนฟอส ซึ่งมีค่าลดลงถึง 6 เท่า ดังนั้นจากผลดังกล่าวนี้ปัจจัยดังกล่าวจึงมีผลอย่างชัดเจนว่ากลูโคสมีผลส่งผลยับยั้งกระบวนการ ย่อยสลายสารโพร์ฟีโนฟอส ส่วนกรดซัคชินิกช่วยเร่งการย่อยสลายสารโพร์ฟีโนฟอสได้ในขณะที่ โซเดียมอะซิเตอที่ไม่ส่งผลใด ๆ อย่างชัดเจน ดังนั้นในการทดลองต่อ ๆ ไปจะได้มุ่งเน้นการศึกษาการ ย่อยสลายสารโพร์ฟีโนฟอสโดยการเติมกรดซัคชินิกร่วมเท่านั้น



ภาพที่ 4.21 การย่อยสลายสารโพร์ฟีโนฟอสโดยกลุ่มจุลินทรีย์
ภายใต้สภาพที่มีแหล่งคาร์บอนร่วมต่างชนิด

ตารางที่ 4.9 จอนพลศาสตร์การกำจัดสารโพร์ฟิโนฟอสของกลุ่มจุลินทรีย์ภายใต้สภาวะที่มีแหล่งคาร์บอนร่วมต่างชนิด

แหล่งคาร์บอนร่วม	สมการจอนพลศาสตร์การย่อยสลายสาร	R^2	ค่าคงที่ (hr^{-1})
กลูโคส	$y = -0.001x + 1.29$	0.43	0.001
กรดซัคcharic	$y = -0.008x + 1.28$	0.94	0.008
โซเดียมอะซิเตอท	$y = -0.006x + 1.27$	0.62	0.006

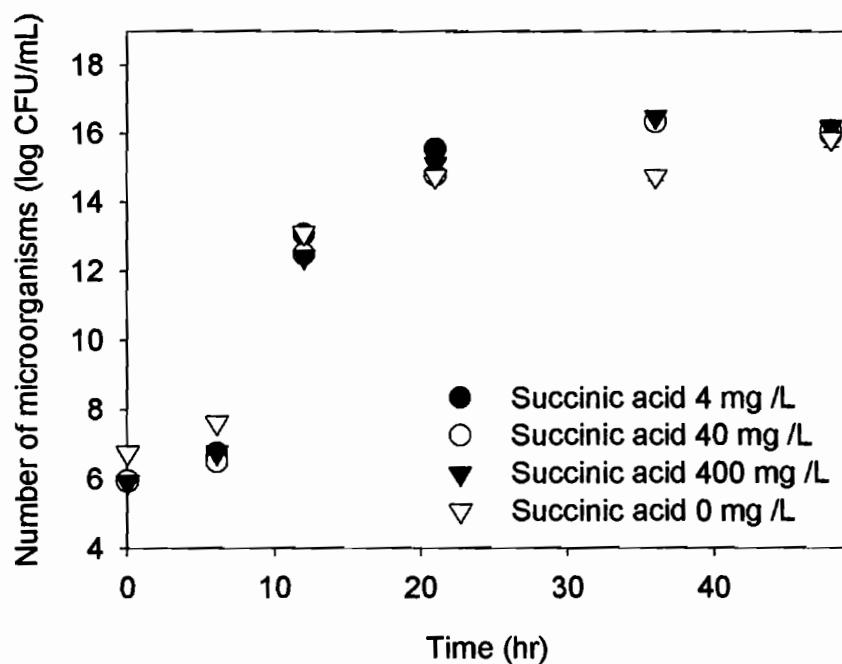
หมายเหตุ y = log (ความเข้มข้นของโพร์ฟิโนฟอส)
 x = เวลา (hr)

4.3.2 ผลการศึกษาความสัมพันธ์ของความเข้มข้นของสารอาหารร่วมและสารโพร์ฟิโนฟอสในกระบวนการเมตาโบลิซึมร่วม

1) ผลการศึกษาอิทธิพลของความเข้มข้นแหล่งคาร์บอนร่วม

จากการศึกษาขนาดแหล่งคาร์บอนร่วมในหัวข้อที่ผ่านมาพบว่ากรดซัคcharic มีประสิทธิภาพในการช่วยเพิ่มการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์และสนับสนุนการย่อยสลายสารโพร์ฟิโนฟอสสูงที่สุด ดังนั้นจึงเลือกใช้กรดซัคcharic เป็นแหล่งคาร์บอนร่วม แต่จากผลในหัวข้อที่ผ่านมาพบว่า การส่งเสริมการย่อยสลายสารโพร์ฟิโนฟอสสูงไม่สูงนักซึ่งอาจเกิดจากความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนร่วมยังไม่เหมาะสม การศึกษาในขั้นตอนนี้จึงมุ่งเน้นการศึกษาอิทธิพลความเข้มข้นของกรดซัคcharic ที่ใช้เป็นแหล่งคาร์บอน โดยศึกษาที่ความเข้มข้น 4, 40 และ 400 mg-Carbon/L และมีสารโพร์ฟิโนฟอสเริ่มต้น 20 mg/L เปรียบเทียบกับชุดทดลองที่ไม่ได้เติมกรดซัคcharic ซึ่งผลการทดลองการเจริญเติบโตและการย่อยสลายเป็นไปดังภาพที่ 4.22 และ 4.23 (ข้อมูลดิบแสดงในภาคผนวก ๔)

ผลการทดลองพบว่ากลุ่มจุลินทรีย์จากชุดการทดลองที่มีการเติมแหล่งคาร์บอนร่วมความเข้มข้นต่าง ๆ มีการเจริญเติบโตในลักษณะเดียวกัน กล่าวคือ กลุ่มจุลินทรีย์เพิ่มจำนวนขึ้นมากในช่วง 21 ชั่วโมงแรก จากนั้นการเจริญเติบโตจึงเริ่มคงที่ เมื่อสิ้นสุดการทดลอง (48 ชั่วโมง) พบว่ากลุ่มจุลินทรีย์เพิ่มจำนวนจากประมาณ 6 เป็น 16 logCFU/mL ค่าคงที่จอนพลศาสตร์การเจริญเติบโต เท่ากับ $0.42-0.50 hr^{-1}$ (ตารางที่ 4.10) จากผลดังกล่าวสามารถกล่าวได้ว่าการเติมแหล่งคาร์บอนร่วมส่งผลให้การเจริญเติบโตเพิ่มขึ้นไม่มากนัก รวมทั้งความเข้มข้นแหล่งคาร์บอนไม่มีผลต่อการเจริญเติบโตของกลุ่มจุลินทรีย์อย่างชัดเจน



ภาพที่ 4.22 การเจริญเติบโตของกลุ่มจุลินทรีย์ในการย่อยสลายสารโพร์ฟีโนฟอส
ภายใต้สภาวะที่มีแหล่งคาร์บอนร่วมต่างความเข้มข้น

ตารางที่ 4.10 จำนวนศาสตร์การเจริญเติบโตของกลุ่มจุลินทรีย์ในการย่อยสลายสารโพร์ฟีโนฟอส
ภายใต้สภาวะที่มีแหล่งคาร์บอนร่วมต่างความเข้มข้น

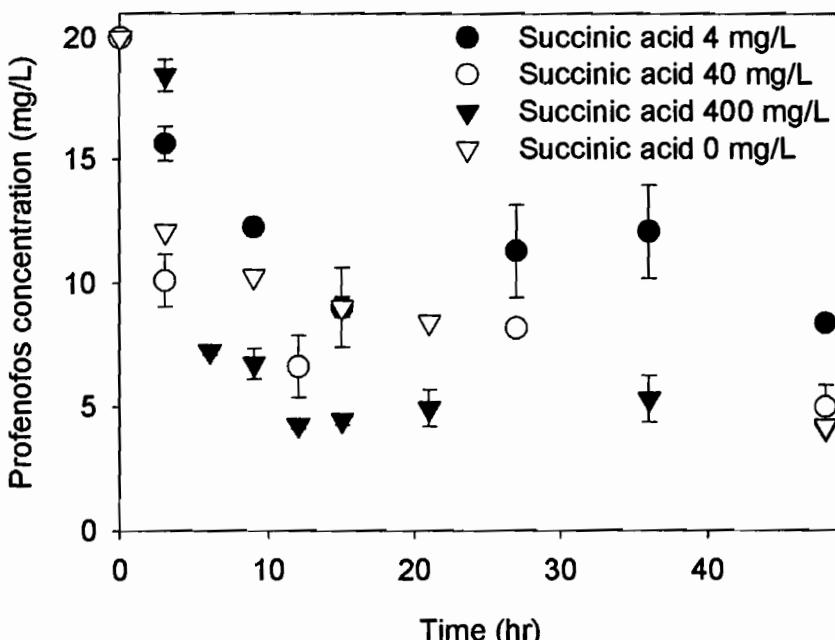
ความเข้มข้นแหล่ง คาร์บอนร่วม (mg-Carbon/L)	สมการจำนวนศาสตร์การเจริญเติบโต	R^2	ค่าคงที่ (hr^{-1})
4	$y = 0.50x + 5.43$	0.91	0.50
40	$y = 0.47x + 5.39$	0.90	0.47
400	$y = 0.48x + 5.40$	0.93	0.48
0	$y = 0.42x + 6.48$	0.90	0.42

หมายเหตุ y = \log (จำนวนเซลล์)
 x = เวลา (hr)

สำหรับการย่อยสลายสารโพร์ฟิโนฟอสพบว่าสารโพร์ฟิโนฟอสลดลงอย่างรวดเร็วใน 12 ชั่วโมงแรก จากนั้นจึงเริ่มคงที่ โดยพบว่าภายในสิบสี่ชั่วโมง (48 hr) ชุดทดลองที่มีการเติมแหล่งคาร์บอนร่วม 0.4-40 และ 400 mg-Carbon/L สามารถย่อยสลายสารโพร์ฟิโนฟอสได้กว่าร้อยละ 80 อัตราการกำจัดสาร เท่ากับ $7.90-31.46 \text{ mg/L/d}$ (ตารางที่ 4.11) ซึ่งเมื่อพิจารณาจนผลศาสตร์การย่อยสลายสารโพร์ฟิโนฟอสพบว่าการย่อยสลายเป็นไปตามปฏิกิริยาอันดับหนึ่งโดยมีค่าคงที่ เท่ากับ $0.01-0.06 \text{ hr}^{-1}$ (ตารางที่ 4.11) โดยในชุดทดลองที่ให้ผลดีที่สุด (ชุดทดลองที่เติมแหล่งคาร์บอนร่วม 400 mg/L) การย่อยสลายมีค่าคงที่เพิ่มขึ้นถึง 6 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับชุดที่ไม่ได้เติมแหล่งคาร์บอนร่วม

ผลการศึกษาชี้ให้เห็นอย่างชัดเจนว่าเมื่อเติมแหล่งคาร์บอนร่วมส่งเสริมให้การย่อยสลายเร็วขึ้นอย่างชัดเจน โดยเมื่อความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนร่วมเพิ่มมากการย่อยสลายสารโพร์ฟิโนฟอสยิ่งเพิ่มขึ้น แต่อย่างไรก็ตามเมื่อเปรียบเทียบผลการศึกษาในหัวข้อที่ผ่านมาซึ่งเติมกรดซัคชินิค 500 mg-Carbon/L พบร้าค่าคงที่จนผลศาสตร์การย่อยสลายสารโพร์ฟิโนฟอสลดเหลือเพียง 0.008 hr^{-1} จากผลทั้งสองส่วนสามารถวิเคราะห์ได้ว่าแหล่งคาร์บอนร่วมส่งเสริมการย่อยสลายสารโพร์ฟิโนฟอสได้แต่หากมีแหล่งคาร์บอนร่วมปริมาณมากเกินไปอาจเกิดการยับยั้งการย่อยสลายสารโพร์ฟิโนฟอสได้ เนื่องจากเกิดการแข่งขันระหว่างสารโพร์ฟิโนฟอสและกรดซัคชินิคเพื่อเป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับกลุ่มจุลินทรีย์ ผลการศึกษานี้เป็นเรื่องทั่วไปพบในการศึกษาที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายสารแพลก์คลอม (xenobiotics) ในกรณีที่มีสารcarbonอื่นร่วมเช่นกัน (Parekh et al., 1994; Singh et al., 2004) ดังเช่นตัวอย่างจากงานวิจัยของ Singh et al. (2004) ในการศึกษาการย่อยสลายสารคลอร์ไฟฟอสโดย *Enterobacter Strain B-14* พบร้าในสภาวะที่มีแหล่งคาร์บอนร่วมจุลินทรีย์ดังกล่าวไม่สามารถย่อยสลายสารคลอร์ไฟฟอสได้ และจุลินทรีย์สามารถย่อยสลายสารคลอร์ไฟฟอสได้อีกรั้งเมื่อมีแหล่งคาร์บอนร่วมเริ่มหมดลง

สำหรับกลไกของกระบวนการเมตาโบลิซึมร่วม (co-metabolism) สารอาหารที่ใช้ในการเจริญเติบโต (growth substrate) อาจส่งผลต่อกระบวนการเมตาโบลิซึมได้ 2 ลักษณะ ลักษณะแรก คือ สารดังกล่าวช่วยเร่งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์และส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนรูป (transformation) ของสารอาหารที่ไม่ช่วยในการเจริญเติบโต (non-growth substrate) (Grant and Betts, 2004; Xie et al., 2009) หรือในอีกลักษณะ คือ สารอาหารร่วมอาจเหนี่ยวนำกระบวนการเมตาโบลิซึมของสารปลอมปน (Girbal and Betts, 2000) ผลจากการศึกษานี้พบว่าสารโพร์ฟิโนฟอสแม้เป็นสารปลอมปนแต่ก็เป็นสารอาหารที่ใช้ในการเจริญเติบโตได้ เป็นเหตุให้พบว่าในกรณีที่เติมแหล่งคาร์บอนร่วม (กรดซัคชินิค) ส่งผลให้กลุ่มจุลินทรีย์เจริญเติบโตเพิ่มมากขึ้นเพียงเล็กน้อย ดังนั้นจึงอาจกล่าวได้ว่าในกรณีนี้คาดว่าแหล่งคาร์บอนร่วมเหนี่ยวนำกระบวนการเมตาโบลิซึมของสารโพร์ฟิโนฟอสด้วยกลุ่มจุลินทรีย์ แต่อย่างไรก็ตามผลการศึกษานี้ยังมิอาจระบุการเหนี่ยวนำวิถีการย่อยสลายสารโพร์ฟิโนฟอสอย่างชัดเจนได้ ในอนาคตควรมีการศึกษาในประเด็นนี้เพื่อให้ทราบความเป็นไป (fate) ของสารในสิ่งแวดล้อมอันจะเป็นประโยชน์ต่อการประยุกต์ใช้ในการพื้นฟูพื้นที่ป่าเบื้องต่อไป



ภาพที่ 4.23 การย่อยสลายสารโพร์ฟีโนฟอสของกลุ่มจุลินทรีย์ใน
สภาพที่มีแหล่งคาร์บอนร่วมต่างความเข้มข้น

ตารางที่ 4.11 จอนพลศาสตร์และอัตราการกำจัดสารโพร์ฟีโนฟอสของกลุ่มจุลินทรีย์ภายใต้
สภาพที่มีแหล่งคาร์บอนร่วมต่างความเข้มข้น

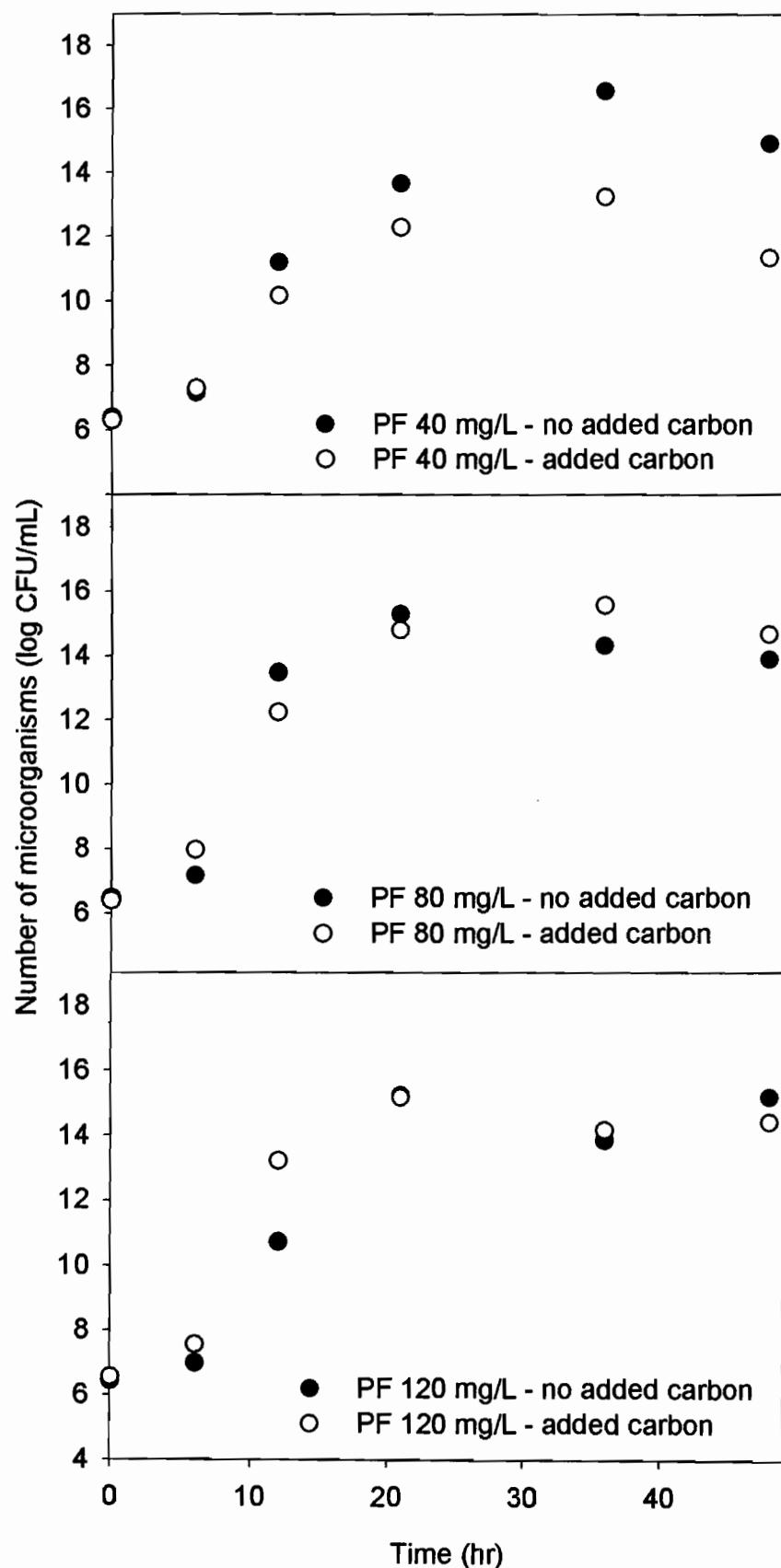
ความเข้มข้นแหล่ง คาร์บอนร่วม (mg-Carbon/L)	สมการจอนพลศาสตร์ การย่อยสลายสาร	R^2	ค่าคงที่ (hr ⁻¹)	อัตราการกำจัดสาร (mg/L/d)
4	$y = -0.02x + 1.28$	0.99	0.02	17.56
40	$y = -0.04x + 1.22$	0.84	0.04	26.71
400	$y = -0.06x + 1.33$	0.92	0.06	31.46
0	$y = -0.01x + 1.18$	0.90	0.01	7.90

หมายเหตุ $y = \log$ (ความเข้มข้นของโพร์ฟีโนฟอส)
 $x = \text{เวลา (hr)}$

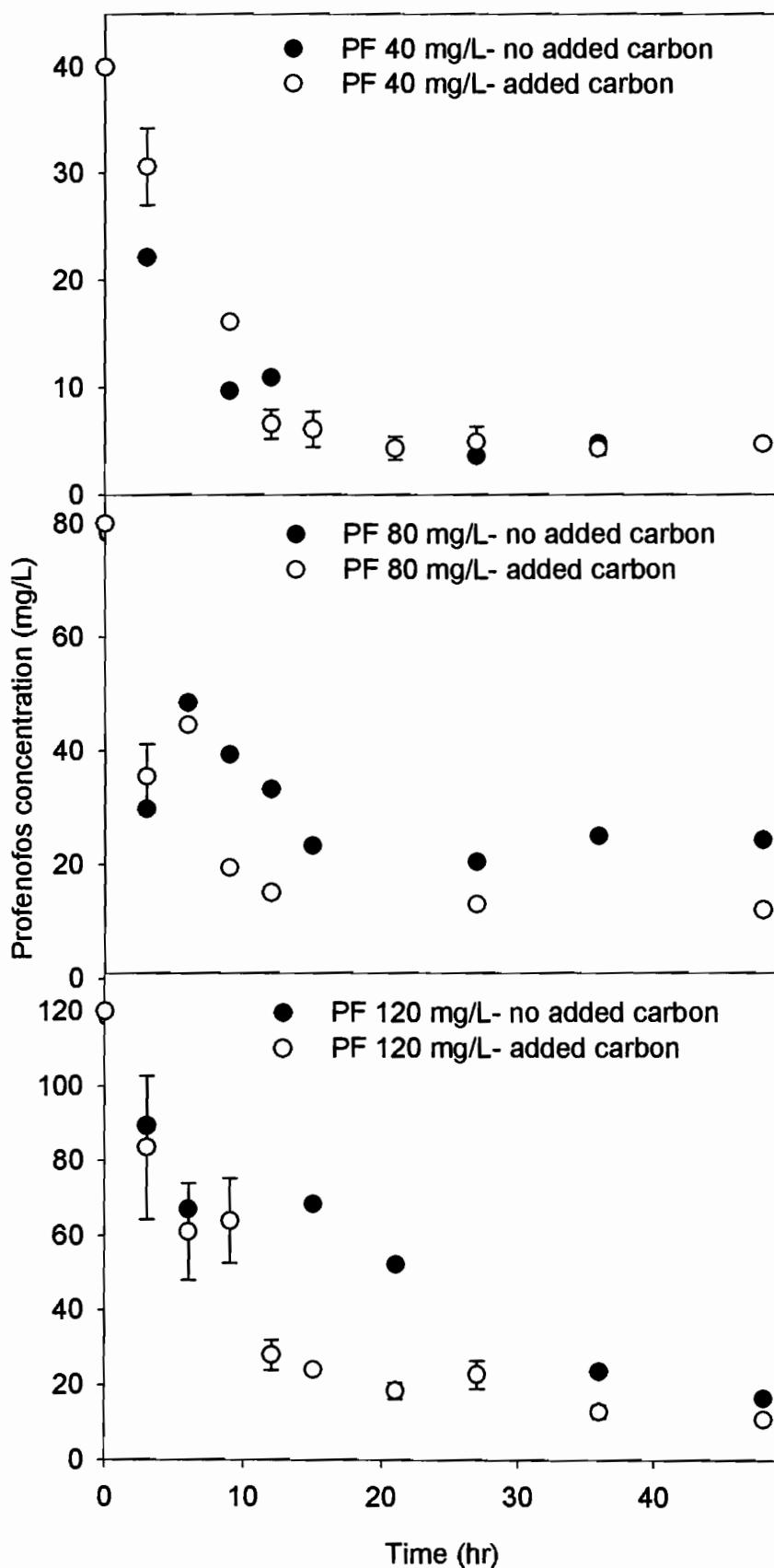
2) ผลการศึกษาอิทธิพลของความเข้มข้นสารโพร์ฟีโนฟอส

จากการศึกษาอิทธิพลความเข้มข้นของแหล่งการบอนร่วมในหัวข้อที่ผ่านมาพบว่าการดัดซัคชินิกที่ความเข้มข้น 400 mg-Carbon/L มีประสิทธิภาพในการช่วยสนับสนุนการย่อยสลายสารโพร์ฟีโนฟอสตีที่สุด ดังนั้นจึงเลือกใช้การดัดซัคชินิกที่ความเข้มข้นดังกล่าวเป็นแหล่งการบอนร่วม สำหรับการศึกษาในขั้นตอนนี้มุ่งเน้นการศึกษาอิทธิพลความเข้มข้นของสารโพร์ฟีโนฟอสเริ่มต้น (40 80 และ 120 mg/L) เปรียบเทียบระหว่างชุดทดลองที่เติมและไม่ได้เติมแหล่งการบอนร่วม ผลการทดลองการเจริญเติบโตและการย่อยสลายเป็นไปดังภาพที่ 4.24 และ 4.25 (ข้อมูลดิบแสดงในภาคผนวก ๔)

ผลการทดลองพบว่ากลุ่มจุลินทรีย์จากชุดการทดลองที่มีสารโพร์ฟีโนฟอสความเข้มข้นต่าง ๆ มีการเจริญเติบโตในลักษณะเดียวกัน กล่าวคือ กลุ่มจุลินทรีย์เพิ่มจำนวนขึ้นมากในช่วง 21 ชั่วโมงแรก จากนั้นการเจริญเติบโตจึงเริ่มคงที่ เมื่อสิ้นสุดการทดลอง (48 ชั่วโมง) พบว่ากลุ่มจุลินทรีย์เพิ่มจำนวนจากประมาณ 6 เป็น 16 logCFU/mL ค่าคงที่จอนพลศาสตร์การเจริญเติบโตเท่ากับ $0.30\text{-}0.47 \text{ hr}^{-1}$ (ตารางที่ 4.12) จากรезультатดังกล่าวนี้สามารถสังเกตได้ว่าการเติมการบอนร่วมมีได้ส่งผลต่อการเจริญเติบโต ส่วนความเข้มข้นของสารโพร์ฟีโนฟอสส่งผลต่อการเจริญเติบโตบ้างแต่ไม่ชัดเจนนักเช่นกัน นอกจากนี้ยังพบว่าแม่สารโพร์ฟีโนฟอสเป็นสารปลอมปนพิษ (toxic xenobiotics) แต่ถึงแม้ความเข้มข้นเริ่มต้นเพิ่มขึ้นสูงถึง 120 mg/L กลุ่มจุลินทรีย์ยังคงมีอัตราการเจริญเติบโตสูงเหมือนชุดทดลองอื่น ๆ ซึ่งผลดังกล่าวนี้ค่าดว่าเกิดจากกลุ่มจุลินทรีย์นี้ได้รับการปรับสภาพในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีสารโพร์ฟีโนฟอส



ภาพที่ 4.24 การเจริญเติบโตของกลุ่มจุลินทรีย์ในการย่อยสลายสารโพร์ฟีโนฟอส
ภายใต้สภาวะที่มีสารโพร์ฟีโนฟอสต่างความเข้มข้น



ภาพที่ 4.25 การย่อยสลายสารโพร์ฟีโนฟอสของกลุ่มจุลินทรีย์ใน
ภายใต้สภาพที่มีสารโพร์ฟีโนฟอสต่างความเข้มข้น

สำหรับการย่อยสลายสารโพร์ฟิโนฟอสพบว่าสารโพร์ฟิโนฟอสลดลงอย่างรวดเร็ว ในระยะเวลาต่างกันจากนั้นจึงเริ่มคงที่ (ภาพที่ 4.25) โดยที่ความเข้มข้นของสารโพร์ฟิโนฟอสสูงกลุ่ม จุลินทรีย์ย่อยสลายสารจนถึงจุดเสถียรซึ่งก้าวที่ความเข้มข้นต่ำ พบร่วมกับหลังสิ้นสุดการทดลอง (48 hr) กลุ่มจุลินทรีย์จากชุดทดลองต่าง ๆ สามารถย่อยสลายสารโพร์ฟิโนฟอสได้ระหว่างร้อยละ 85-91 อัตราการกำจัดสาร เท่ากับ $31-55 \text{ mg/L/d}$ (ตารางที่ 4.13) ซึ่งเมื่อพิจารณาจากจำนวนผลศาสตร์การ ย่อยสลายสารโพร์ฟิโนฟอสพบว่าการย่อยสลายเป็นไปตามปฏิกิริยาอันดับหนึ่ง โดยมีค่าคงที่ เท่ากับ $0.02-0.06 \text{ hr}^{-1}$ (ตารางที่ 4.13)

ผลการศึกษาชี้ให้เห็นว่าชุดทดลองที่มีความเข้มข้นของสารโพร์ฟิโนฟอสเริ่มต้น ต่างกันเมื่อเติมแหล่งคาร์บอนร่วมมือผลต่อการย่อยสลายสารโพร์ฟิโนฟอสต่างกัน โดยเมื่อความเข้มข้น สารโพร์ฟิโนฟอสสูง ($40-80$ และ 120 mg/L) แนวโน้มของการย่อยสลายสารในชุดทดลองที่มีการเติม และไม่เติมแหล่งคาร์บอนร่วมใกล้เคียงกันมาก(ทั้งจำนวนผลศาสตร์การย่อยสลายและอัตราการกำจัด สารโพร์ฟิโนฟอส) ผลการทดลองในส่วนนี้ขัดแย้งกับผลการทดลองที่ความเข้มข้นเริ่มต้นของสารโพร์ฟิโนฟอส 20 mg/L ซึ่งแสดงไว้ในหัวข้อที่ผ่านมา กล่าวคือ สำหรับผลการทดลองที่ผ่านมาชุดทดลอง ที่มีการเติมแหล่งคาร์บอนร่วมมีจำนวนผลศาสตร์การย่อยสลายและอัตราการกำจัดสารโพร์ฟิโนฟอส สูงกว่าชุดทดลองที่ไม่ได้เติมแหล่งคาร์บอนร่วมอย่างชัดเจน ผลขัดแย้งดังกล่าวคาดว่าเกิดจากสารโพร์ฟิโนฟอสซึ่งเป็นสารอาหารที่ช่วยในการเจริญเติบโต เช่นกันมีปริมาณเพิ่มมากขึ้นเป็นเหตุให้มีการย่อยสลายเพิ่มสูงตาม เนื่องจากการย่อยสลายนี้เป็นไปตามปฏิกิริยาอันดับหนึ่งซึ่งการย่อยสลายขึ้นอยู่กับ ความเข้มข้นของสารเริ่มต้น ดังนั้นอิทธิพลของสารอาหารร่วมจึงส่งผลได้ไม่ชัดเจนนัก

นอกจากนี้ยังพบว่าเมื่อพิจารณาเปรียบเทียบระหว่างผลการศึกษาจากชุดการ ทดลองที่มีความเข้มข้นของสารโพร์ฟิโนฟอส 120 mg/L กับชุดทดลองที่ความเข้มข้นอื่น ๆ พบร่วม การย่อยสลายสารโพร์ฟิโนฟอสลดลงอย่างชัดเจน (ตารางที่ 4.13) ซึ่งผลดังกล่าวเนี้ยเมื่อพิจารณา จำนวนผลศาสตร์ของเอนไซม์ตามหลักของ Michaelis and Menten อาจระบุได้ว่าในสภาวะที่สาร โพร์ฟิโนฟอสมีความเข้มข้นสูงเกิดปรากฏการณ์การยับยั้งด้วยสารอาหารเอง (substrate inhibition) (ภาพที่ 4.26) กล่าวคือ เมื่อความเข้มข้นของสารอาหาร ซึ่งหมายถึงสารโพร์ฟิโนฟอสมีความเข้มข้นสูง มากขึ้นพบว่าอัตราการย่อยสลายกลับลดลงชัดเจน โดยผลในภาพดังกล่าวยังพบว่าในสภาวะที่มี แหล่งคาร์บอนร่วมอิทธิพลของปรากฏการณ์การยับยั้งดังกล่าวลดลง ดังนั้นจึงอาจกล่าวได้ว่าแม้ แหล่งคาร์บอนร่วมมีได้สนับสนุนกระบวนการเมตาโบลิซึมร่วมอย่างชัดเจนนัก แต่สารดังกล่าวสามารถ ลดผลการยับยั้งการย่อยสลายสารโพร์ฟิโนฟอสได้

ตารางที่ 4.12 จันพลศาสตร์การเจริญเติบโตของกลุ่มจุลทรียในการย่อยสลายสารโพรฟีโนฟอส
ภายใต้สภาวะที่มีสารโพรฟีโนฟอสต่างความเข้มข้น

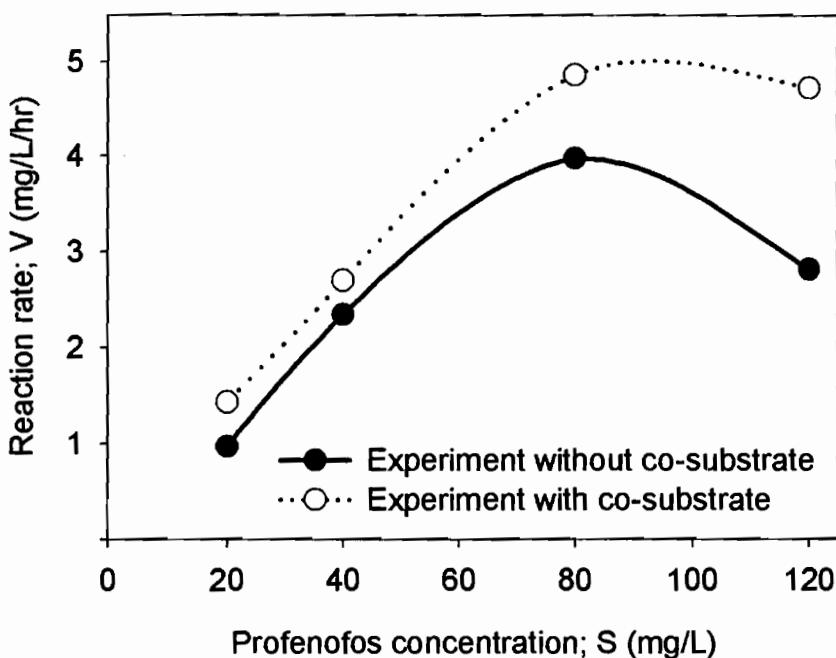
ความเข้มข้นสาร โพรฟีโนฟอส (mg/L)	การเติมเหล็ก คาร์บอนร่วม	สมการจันพลศาสตร์ การเจริญเติบโต	R^2	ค่าคงที่ (hr^{-1})
40	ไม่เติม	$y = 0.30x + 6.54$	0.95	0.30
40	เติม	$y = 0.30x + 6.10$	0.97	0.30
80	ไม่เติม	$y = 0.47x + 6.06$	0.89	0.47
80	เติม	$y = 0.42x + 6.22$	0.96	0.42
120	ไม่เติม	$y = 0.44x + 5.52$	0.95	0.44
120	เติม	$y = 0.45x + 6.25$	0.91	0.45

หมายเหตุ $y = \log$ (จำนวนเซลล์)
 $x =$ เวลา (hr)

ตารางที่ 4.13 จันพลศาสตร์และอัตราการกำจัดสารโพรฟีโนฟอสของกลุ่มจุลทรีภายใต้
สภาวะที่มีเหล็กสารโพรฟีโนฟอสต่างความเข้มข้น

ความเข้มข้นสาร โพรฟีโนฟอส (mg/L)	การเติมเหล็ก คาร์บอนร่วม	สมการ จันพลศาสตร์การ ย่อยสลายสาร	R^2	ค่าคงที่ (hr^{-1})	อัตราการกำจัด สาร (mg/L/d)
40	ไม่เติม	$y = -0.05x + 1.54$	0.89	0.05	32.33
40	เติม	$y = -0.05x + 1.59$	0.94	0.05	31.15
80	ไม่เติม	$y = -0.04x + 1.90$	0.99	0.04	27.88
80	เติม	$y = -0.06x + 1.86$	0.88	0.06	34.03
120	ไม่เติม	$y = -0.01x + 2.02$	0.92	0.02	51.74
120	เติม	$y = -0.02x + 1.89$	0.83	0.02	54.53

หมายเหตุ $y = \log$ (ความเข้มข้นของโพรฟีโนฟอส)
 $x =$ เวลา (hr)



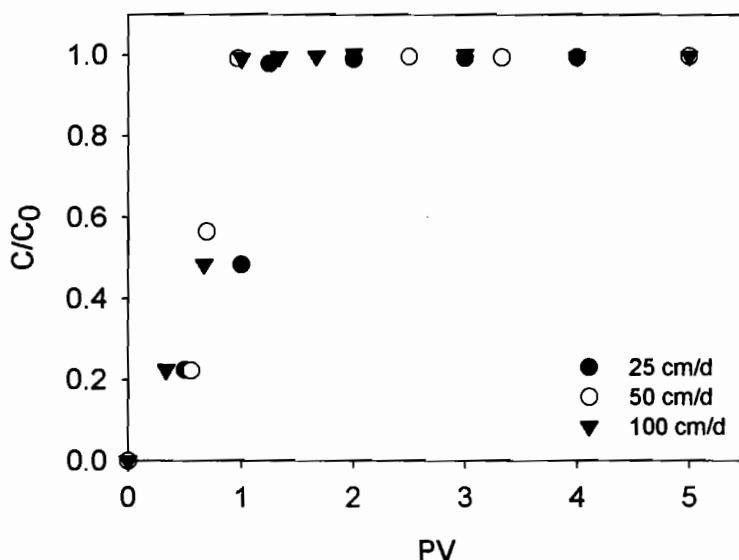
ภาพที่ 4.26 จลนพลศาสตร์การย่อยสารเคมีในน้ำโดยการเพิ่มสารเคมีในน้ำเป็นสารตัวต้าน Michaelis and Menten

4.4 ผลการสาหริtipการเพิ่มน้ำให้ดินที่ปนเปื้อนสารเคมีในน้ำตามหลักการเติม เชลล์ที่ถูกกระตุ้น

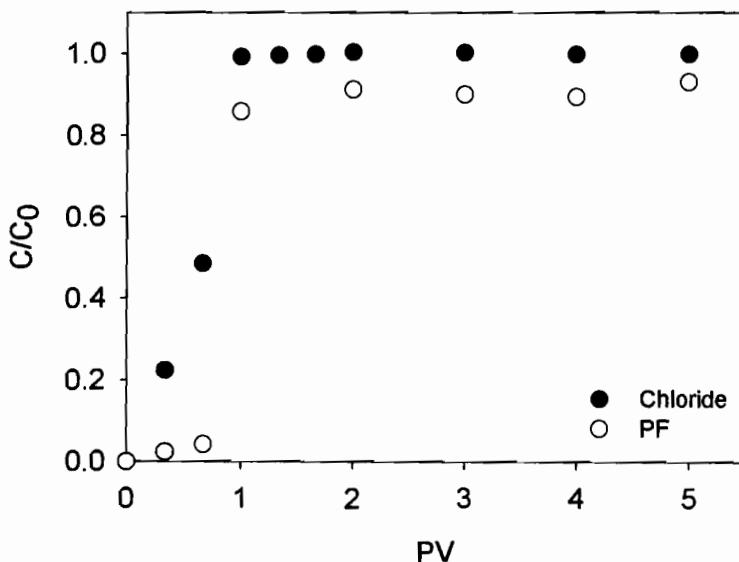
ผลการสาหริtipระบบเพื่อประยุกต์ใช้ในการเพิ่มน้ำให้ดินที่ปนเปื้อนสารเคมีในน้ำ ในสภาวะที่อัตราการซึมผ่านของน้ำต่างกัน คือ 25 50 และ 100 เซนติเมตรต่อวัน การทดลองศึกษาที่ความเข้มข้นของสารเคมีในน้ำ 20 และ 40 มิลลิกรัมต่อลิตร และ แหล่งการรับอนุร่วม คือ กรณีชั้นดิน 400 มิลลิกรัมต่อลิตร (เลือกใช้กรณีชั้นดินตามผลการศึกษาในหัวข้อที่ผ่านมา) โดยได้เติมกลุ่มเชลล์ที่มี 10⁵ และ 10¹⁵ CFU/mL เพื่อศึกษาประสิทธิภาพในการกำจัดสารเคมีในน้ำ ผลการทดลองแสดงว่าสารเคมีในน้ำให้ดินที่ปนเปื้อนสารเคมีในน้ำสามารถลดลงได้มากเมื่อเพิ่มน้ำให้ดินและเพิ่มสารเคมีในน้ำ แต่การเพิ่มน้ำให้ดินและเพิ่มสารเคมีในน้ำไม่สามารถลดลงได้มากเมื่อเพิ่มน้ำให้ดินและเพิ่มสารเคมีในน้ำ

4.4.1 ผลการศึกษาการเคลื่อนที่ของน้ำใต้ดินและสารโพร์ฟิโนฟอสในแบบจำลอง

การทดลองเบรคทรูจ์เทรเซอร์ (tracer breakthrough test) มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษา การเคลื่อนที่ของน้ำใต้ดินและสารโพร์ฟิโนฟอสในแบบจำลองคอลัมน์ราย การทดลองกระทำโดย การติดตามปริมาณประจุคลอไรด์ (ในรูปค่าความนำไฟฟ้า (electrical conductivity)) ซึ่งเป็น ตัวแทนน้ำใต้ดินและสารโพร์ฟิโนฟอส ผลการทดลองพบว่าค่า C/C_0 (C คือ ความเข้มข้นคลอไรด์ หรือสารโพร์ฟิโนฟอส ณ เวลาใด ๆ และ C_0 คือ ความเข้มข้นคลอไรด์หรือโพร์ฟิโนฟอสที่เวลาเริ่มต้น) เป็นดังภาพที่ 4.27 และ 4.28 (ข้อมูลดิบแสดงในภาคผนวก ฯ)



ภาพที่ 4.27 การเคลื่อนที่ของคลอไรด์ ณ อัตราการซึมผ่าน 25 50 และ 100 cm/d



ภาพที่ 4.28 การเคลื่อนที่ของคลอไรด์และสารโพร์ฟิโนฟอส ณ อัตราการซึมผ่าน 100 cm/d

ผลการศึกษาจากภาพที่ 4.27 พบว่าการเคลื่อนที่ของน้ำใต้ดินเมื่อมีอัตราการซึมผ่านต่าง ๆ กันมีค่าใกล้เคียงกัน โดยพบว่าค่า C/C_0 มีค่าประมาณ 1 เมื่อการทดลองดำเนินไป 1.00-1.25 PV ตามทฤษฎีแล้วการเคลื่อนที่ของน้ำใต้ดินขึ้นอยู่กับการไหลของน้ำ (advection) และการแพร่กระจาย (dispersion) โดยกราฟเบรคทรูจ (breakthrough curve) มีลักษณะเป็นกราฟโค้งรูปตัวเอสและมีค่า $C/C_0 = 0.5$ ณ การทดลอง 1 PV แต่จากลักษณะกราฟในภาพที่ 4.27 พบว่าค่า C/C_0 เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว (ไม่ใช่กราฟโค้งรูปตัวเอส) ซึ่งลักษณะดังกล่าวเกิดจากอิทธิพลการไหลของน้ำใต้ดินเป็นหลัก นอกจากนี้ยังพบว่าอัตราการซึมผ่านของน้ำ (ซึ่งแปรผันตรงกับอัตราการไหลของน้ำ) ไม่มีผลต่อการเคลื่อนที่ของน้ำในชุดทดลองคลอโรน์ ในการทดลองเบรคทรูจเพรเซอร์ของสารโพร์ฟโนฟอสจึงได้ศึกษาเพียงอัตราการซึมผ่าน 100 cm/d เท่านั้น

สำหรับผลการศึกษาจากภาพที่ 4.28 ซึ่งเป็นผลการเคลื่อนที่ของสารโพร์ฟโนฟอสเปรียบเทียบกับคลอไรด์ ณ อัตราการซึมผ่าน 100 cm/d ผลการทดลองพบว่าในช่วง 1 PV แรก หั้งคลอไรด์และโพร์ฟโนฟอสเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว แต่พบว่าสารโพร์ฟโนฟอสมีค่าเพิ่มขึ้นช้ากว่าคลอไรด์ ผลการทดลองนี้บ่งชี้ได้ว่าสารโพร์ฟโนฟอสจึงเป็นตัวถูกละลาย (solute) มีอิทธิพลของการแพร่กระจาย (dispersion) และ/หรือ การพุ่งกระจาย (diffusion) ส่งผลให้สารเคลื่อนที่ช้ากว่าน้ำ (คลอไรด์) เพียงเล็กน้อย

เมื่อพิจารณาค่าปัจจัยความหน่วง (retardation factor; R_f) ของสารโพร์ฟโนฟอสในแบบจำลองคลอโรน์นี้ตามสมการที่ 4.1 พบว่าค่า R_f เท่ากับ 1.18 ($PV_{profenofos} = 0.68$ และ $PV_{chloride} = 0.80$) ดังนั้นสามารถกล่าวได้ว่าไม่พบการดูดซับของสารโพร์ฟโนฟอสในชุดแบบจำลองนี้อย่างชัดเจน ซึ่งลักษณะดังกล่าวนี้เกิดจากการศึกษานี้ทดลองโดยใช้ทรายที่ผ่านการเตรียมด้วยการล้างและเผาเพื่อกำจัดสารอินทรีย์ติดค้างเป็นผลให้ทรายดังกล่าวไม่มีความสามารถในการดูดซับ ผลในลักษณะนี้เกิดขึ้นในการศึกษาในอดีตที่มีการทดลองเบรคทรูจเพรเซอร์ของสารกำจัดศัตรูพืชอาหารชีนเช่นกัน (Siripattanakul et al., 2009)

$$R_f = \frac{PV_{profenofos} (\text{at } C/C_0 = 0.5)}{PV_{chloride} (\text{at } C/C_0 = 0.5)} \quad \text{สมการที่ 4.1}$$

นอกจากนี้ยังพบว่าการทดลองตั้งแต่ช่วง 1 PV สารทั้งสองเริ่มคงที่ โดยเมื่อสิ้นสุดการทดลองคลอไรด์และสารโพร์ฟโนฟอสมี $C/C_0 = 1.0$ และ 0.9 ตามลำดับ ผลดังกล่าวแสดงให้เห็นว่ามีการย่อยสลายสารโพร์ฟโนฟอสตามธรรมชาติในแบบจำลองบางเล็กน้อย ซึ่งอาจเกิดมาจากการย่อยสลายด้วยแสง (photodegradation) หรือไฮโดรไลซิส (hydrolysis) โดยภาพรวมสามารถระบุได้ว่า ชุดแบบจำลองคลอโรน์นี้ได้รับอิทธิพลการดูดซับและการย่อยสลายสารตามธรรมชาติเพียงเล็กน้อย การศึกษาในอดีต (Siripattanakul et al., 2009) และการศึกษานี้มุ่งเน้นการศึกษาผลของการย่อยสลายสารกำจัดศัตรูพืชทางชีวภาพดังนั้นปัจจัยแวดล้อมมีน้อย เช่น ลักษณะของชุดแบบจำลอง การดูดซับสารในตัวกลาง (medium) การย่อยสลายในธรรมชาติ เป็นต้น จำเป็นต้องควบคุมให้เกิดขึ้นอย่างสุ่ม ซึ่งผลการทดลองนี้ตอนนี้ชี้ชัดว่าแบบจำลองที่ใช้ในการศึกษานี้เหมาะสมตามวัตถุประสงค์ ข้างต้น

4.4.2 ผลการศึกษาอิทธิพลของอัตราการซึมผ่านของน้ำใต้ดินและความเข้มข้นของสารโพร์ฟิโนฟอส

ผลการสาขิตรอบที่สภาวะที่อัตราการซึมผ่านของน้ำต่างกัน คือ 25 50 และ 100 cm/d ชุดทดลองที่มีความเข้มข้นเริ่มต้นของสารโพร์ฟิโนฟอส เท่ากับ 20 mg/L และแหล่งคาร์บอนร่วม 400 mg-carbon/L มีผลเป็นดังภาพที่ 4.29 (ข้อมูลดิบแสดงในภาคผนวก ข) จากผลการทดลองหั้งหมดในส่วนนี้พบว่าตรวจติดตามไม่พบสารโพร์ฟิโนฟอสเลย (ค่าจำกัดการตรวจพบ (detection limit) เท่ากับ 4 mg/L) ผลลักษณะนี้บ่งชี้ได้ว่าแบบจำลองคงลัมน์ที่มีการเติมเซลล์มีถูกกระตุ้นด้วยการเติมแหล่งคาร์บอนร่วมมีประสิทธิภาพสูงมาก ส่งผลให้สารโพร์ฟิโนฟอสถูกย่อยสลายทั้งหมดตลอดช่วงการทดลอง ผลการทดลองในส่วนนี้สอดคล้องกับผลการทดลองแบบกะในหัวข้อที่ผ่านมา กล่าวคือ ในการเติมเซลล์และสารอาหารร่วมในปริมาณที่เหมาะสมส่งผลให้การย่อยสลายสารโพร์ฟิโนฟอสสูงมาก ประสิทธิภาพการย่อยสลายสารโพร์ฟิโนฟอสในแบบจำลองคงลัมน์แสดงไว้ในตารางที่ 4.14

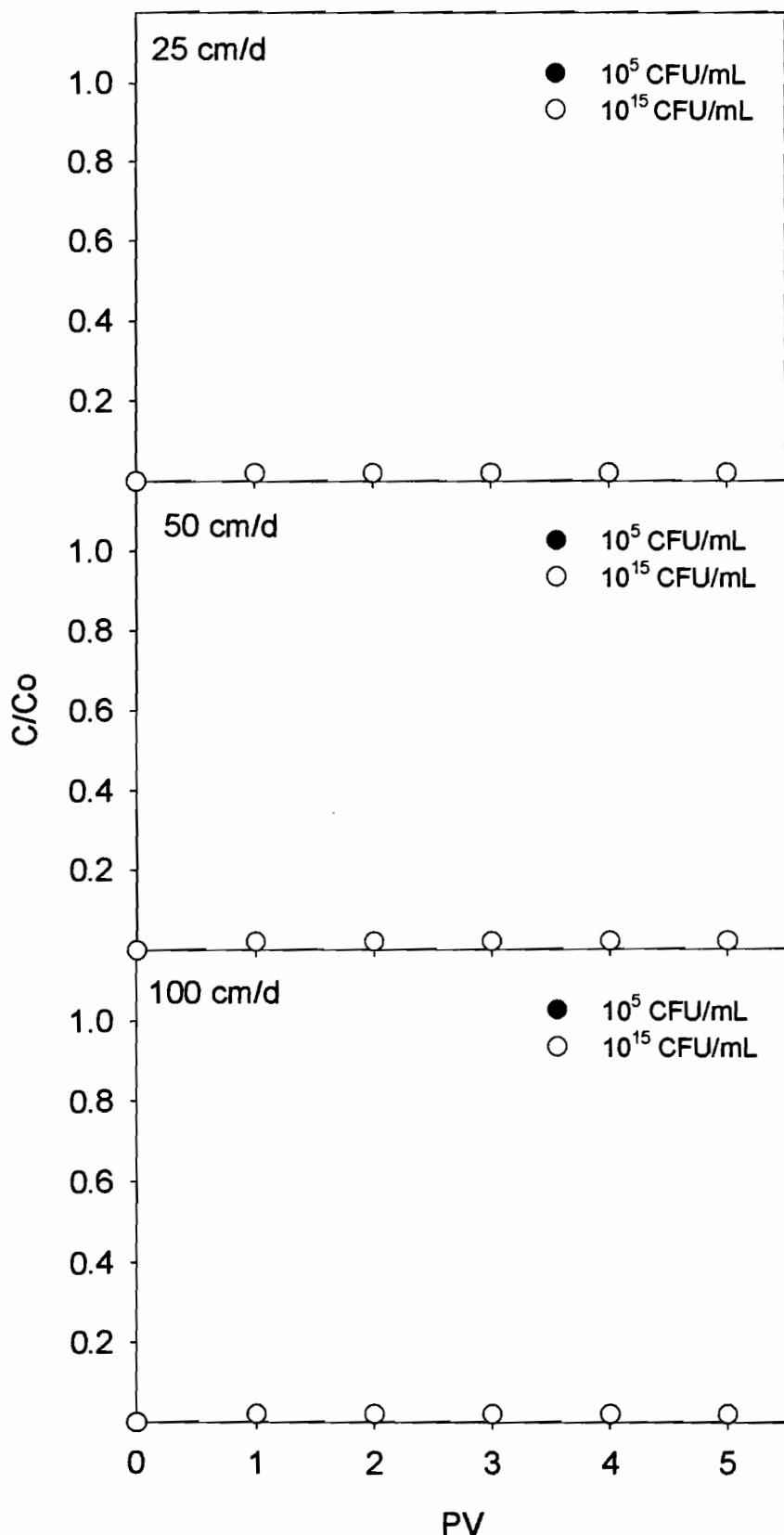
ส่วนผลการศึกษาชุดทดลองที่มีความเข้มข้นเริ่มต้นของสารโพร์ฟิโนฟอส เท่ากับ 40 mg/L และแหล่งคาร์บอนร่วม 400 mg-carbon/L มีผลเป็นดังภาพที่ 4.30 (ข้อมูลดิบแสดงในภาคผนวก ข) ซึ่งผลการทดลองพบว่าในกรณีที่เติมกลุ่มจุลินทรีย์ 10^5 CFU/mL ที่อัตราการซึมผ่านของน้ำต่าง ๆ ค่า C/C₀ มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเมื่อผ่านไป 1 PV จากนั้นลดลงเล็กน้อยและเริ่มคงที่จนสิ้นสุดการทดลอง โดยการทดลอง ณ อัตราการซึมผ่านของน้ำ 25 50 และ 100 cm/d มีค่า C/C₀ = 0.10 0.20 และ 0.69 ตามลำดับ เมื่อสิ้นสุดการทดลองชุดทดลองที่อัตราการการซึมผ่าน 25 cm/d มีความสามารถในการย่อยสลายสารได้มากที่สุด โดยสามารถย่อยสลายสารโพร์ฟิโนฟอสได้กว่าร้อยละ 90 ความสามารถในการย่อยสลายลดลงเมื่อเพิ่มอัตราการซึมผ่านของน้ำ โดยความสามารถในการย่อยสลายสารที่อัตราการซึมผ่าน 50 และ 100 cm/d เท่ากับร้อยละ 80 และร้อยละ 30 ตามลำดับ ดังตารางที่ 4.14

จากการทดลองในภาพที่ 4.30 พบร่วมชุดทดลองทุกชุดในช่วง 1-2 PV แรก ตรวจพบสารโพร์ฟิโนฟอสสูงกว่าช่วงถัดไป (3-5 PV) เล็กน้อยอาจเนื่องมาจากในระยะที่เริ่มทดลองเซลล์ยังมีปริมาณน้อย แต่มีเวลาผ่านไปเซลล์เจริญเติบโตเต็มที่ดังนั้นปริมาณสารโพร์ฟิโนฟอสที่ตรวจพบจึงลดลง การทดลองขั้นตอนนี้มีได้เคราะห์การเจริญเติบโตของเซลล์ในแบบจำลองเนื่องจากข้อจำกัดของชุดทดลอง แต่ผลการทดลองทั้งสองหัวข้อก่อนหน้านี้สนับสนุนผลการทดลองนี้ กล่าวคือ ในการทดลองแบบกะพบว่าจากเซลล์จุลินทรีย์เริ่มต้น 10^6 CFU/mL เจริญเติบโตเป็น 10^{11} CFU/mL ในเวลา 12 ชั่วโมง (ภาพที่ 4.24) ซึ่งสามารถบ่งชี้ได้ว่าเซลล์เพิ่มมากถึง 10^5 CFU/mL หากพิจารณาชุดทดลองที่อัตราการซึมผ่าน 25 cm/d และคำนวนกลับเป็นเวลา กันน้ำจะคิดเป็น 12 hr/PV ดังนั้น ภัยหลังการทดลอง 1 PV คาดว่าเซลล์จุลินทรีย์เพิ่มสูงขึ้นมากนี้มีส่วนสำคัญในการย่อยสลายสารโพร์ฟิโนฟอสซึ่งในระยะเวลา หรือ PV ต่อ ๆ มาเซลล์จุลินทรีย์เข้าสู่สภาวะคงตัว (stationary phase) (ดังภาพที่ 4.24) ส่งผลให้ประสิทธิภาพการย่อยสลายคงตัวด้วยเช่นกัน ส่วนในชุดทดลองที่อัตราการซึมผ่าน 50 และ 100 cm/d ซึ่งคาดว่ามีเซลล์จุลินทรีย์ที่เพิ่มสูงขึ้นเช่นกันจึงให้ผลในลักษณะคล้ายกัน

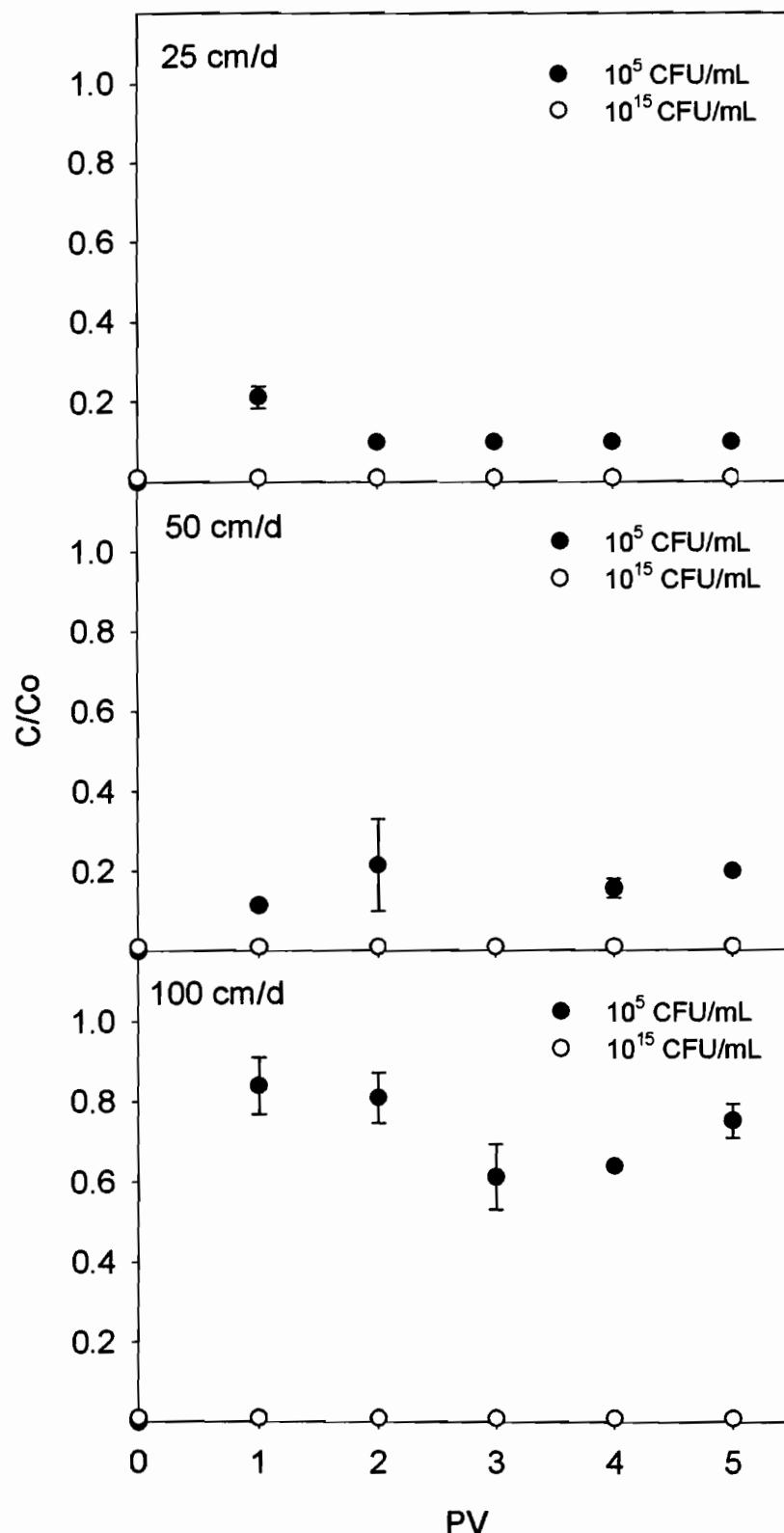
สำหรับผลการสาขิตรอบที่มีความเข้มข้นเริ่มต้นของสารโพร์ฟิโนฟอส เท่ากับ 40 mg/L และแหล่งคาร์บอนร่วม 400 mg-carbon/L ในกรณีที่เติมกลุ่มจุลินทรีย์ 10^{15} CFU/mL มีผล

เป็นดังภาพที่ 4.30 ผลการทดลองในส่วนนี้พบว่าตรวจสอบตามไม่พบร่องรอยของสารเคมีใดๆ ผลลัพธ์จะนี้บ่งชี้ได้ว่าแบบจำลองคอลัมน์ที่มีการเติมเซลล์มีภูกระดับต้นในปริมาณสูงนี้ประสิทธิภาพสูงมากขึ้น

แนวโน้มของผลการทดลองนี้ชี้ให้เห็นว่า การทดลองที่อัตราการซึมผ่านและปริมาณจุลินทรีย์เป็นปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการย่อยสลายสารเคมีในพืช ซึ่งปัจจัยดังกล่าวเป็นปัจจัยที่พบริบูรณ์ในอดีตเช่นกัน (Siripattanakul et al., 2009) ระบบที่มีการเติมเซลล์และกระดับต้นด้วยกระบวนการเมตาโบลิซึมร่วมนี้มีประสิทธิภาพในการกำจัดสารเคมีในพืชสูง แต่อย่างไรก็ตามในกรณีที่ประยุกต์ใช้ในการฟื้นฟูน้ำใต้ดินที่ปนเปื้อนในพื้นที่มีอัตราการซึมของน้ำสูง (เวลา กันน้ำต่ำ) ซึ่งอาจเกิดจากมีปริมาณน้ำฝนมากหรือลักษณะดินมีสภาพการนำน้ำ (hydraulic conductivity) สูงอาจต้องมีการเติมเซลล์จุลินทรีย์ปริมาณเพิ่มสูงขึ้น นอกจากนี้ในการประยุกต์ใช้จริงควรมีการศึกษาอิทธิพลของปัจจัยแวดล้อมชีวภาพ (biotic) และไม่ใช่ชีวภาพ (abiotic) ด้วย เช่น อิทธิพลของจุลินทรีย์ในพื้นที่ (indigenous microorganisms) อิทธิพลของสมบัติดิน (อาทิ ค่าพีเอชของดิน ปริมาณสารอินทรีย์ในดิน เป็นต้น) อิทธิพลของสมบัติน้ำใต้ดิน เป็นต้น



ภาพที่ 4.29 สารโพร์ฟิโนฟอสคงเหลือจากแบบจำลองคอลัมน์สำหรับการทดลอง
ที่มีความเข้มข้นโพร์ฟิโนฟอส 20 mg/L และมีเชลล์เริ่มต้น 10^5 (●) และ 10^{15} CFU/mL (○)



ภาพที่ 4.30 สารโพเรฟโนฟอสคงเหลือจากแบบจำลองคอลัมน์สำหรับการทดลองที่มีความเข้มข้นโพเรฟโนฟอส 40 mg/L และมีเซลล์เริ่มต้น 10^5 (●) และ 10^{15} CFU/mL (○)

ตารางที่ 4.14 ประสิทธิภาพการย่อยสลายสารโพร์ฟีโนฟอสในแบบจำลองคอลัมน์

อัตรา การซึมผ่าน (cm/d)	ร้อยละการย่อยสลายสารโพร์ฟีโนฟอส ณ การทดลองที่ความเข้มข้น สารโพร์ฟีโนฟอสและปริมาณเชลล์เริ่มต้น			
	20 mg/L		40 mg/L	
	10^5 CFU/mL	10^{15} CFU/mL	10^5 CFU/mL	10^{15} CFU/mL
25	> 80	> 80	> 90	> 90
50	> 80	> 80	> 90	80
100	> 80	> 80	> 90	30

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

5.1.1 การคัดกรุ่นจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการกำจัดสารโพรฟีโนฟอส

- 1) กลุ่มจุลินทรีย์ที่คัดได้เป็นจุลินทรีย์ในกลุ่มเยเทอโรโทรป ซึ่งใช้สารโพรฟีโนฟอสเป็นแหล่งสารคาร์บอนเดียว (sole carbon source) ได้ กลุ่มจุลินทรีย์ดังกล่าว ประกอบด้วยจุลินทรีย์ที่มีรูปร่างหั้งแบบห่อนและวงกลม เชลล์มีหั้งชนิดแกรมบวกและแกรมลบ
- 2) กลุ่มจุลินทรีย์ที่คัดได้มีความสามารถในการย่อยสลายสารโพรฟีโนฟอสได้ร้อยละ 97 จนผลศาสตร์การเจริญเติบโตและการย่อยสลายสารโพรฟีโนฟอสเป็นไปปฏิกริยา อันดับหนึ่งค่าคงที่ โดยมีค่าคงที่เท่ากับ 0.40 และ 0.15 hr^{-1} ตามลำดับ และมีอัตราการย่อยสลายสารโพรฟีโนฟอส 3.0 mg/L/d
- 3) การวิเคราะห์วิถีการย่อยสลายสารโพรฟีโนฟอสพบว่า กลุ่มจุลินทรีย์นี้สามารถย่อยสลายสารโพรฟีโนฟอสเป็นสารบีซีพี และตรวจพบสารมอร์ยันต์อิน ๆ ซึ่งได้แก่ สาร 2,4-di-tert-butyl phenol และ สาร 3-methoxy phenol

5.1.2 การคัดแยกจุลินทรีย์บริสุทธิ์และการศึกษาลักษณะการย่อยสลายสารโพรฟีโนฟอส

- 1) กลุ่มจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายสารโพรฟีโนฟอสที่คัดแยกได้จุลินทรีย์บริสุทธิ์ 3 ชนิด ซึ่งกำหนดชื่อเรียกว่า PF1 PF2 และ PF3 เป็นสายพันธุ์ *Pseudomonas plecoglossicida* *Pseudomonas aeruginosa* และ *Pseudomonas aeruginosa* ตามลำดับ
- 2) จนผลศาสตร์การเจริญเติบโตของจุลินทรีย์บริสุทธิ์เป็นไปตามปฏิกริยาอันดับที่ 1 โดยมีค่าคงที่จนผลศาสตร์การเจริญเติบโตอยู่ระหว่าง $1.91\text{-}2.68 \text{ hr}^{-1}$ และจุลินทรีย์บริสุทธิ์ทั้งสามมีอัตราการย่อยสลายสารโพรฟีโนฟอส และร้อยละการกำจัดสารโพรฟีโนฟอสถึง $7.6\text{-}19.6 \text{ mg/L/d}$ และ 93-95 ตามลำดับ
- 3) PF1 PF2 และ PF3 สามารถย่อยสลายสารกำจัดศัตรูพืชได้ใกล้เคียงกัน จุลินทรีย์กำจัดสารคลอร์ไฟฟอสได้ร้อยละ 57-73 และสารไดโคโนฟอสได้ร้อยละ 33-47 ในขณะที่จุลินทรีย์กำจัดสารโพรฟีโนฟอสได้ร้อยละ 75-82

5.1.3 การระดูนการย่อยสลายสารโพรฟีโนฟอสโดยใช้กระบวนการเมตาโบลิซึมร่วม

- 1) การทดลองที่เติมสารกลูโคส กรดซัคcharinic และสารโซเดียมอะซิเตอทเป็นแหล่งคาร์บอนร่วมส่งผลต่อการเจริญเติบโตของกลุ่มจุลินทรีย์ไม่นานัก กลุ่มจุลินทรีย์มีการเจริญเติบโตเพิ่มจำนวนเพิ่มขึ้นเป็น 16-18 logCFU/mL จนผลศาสตร์การเจริญเติบโตของกลุ่มจุลินทรีย์เป็นไปตามปฏิกริยาอันดับหนึ่งซึ่งมีค่าคงที่ $0.49\text{-}0.62 \text{ hr}^{-1}$ ชุดทดลองที่เติมกรดซัคcharinic และโซเดียมอะซิเตอทสามารถลดสารโพรฟีโนฟอสได้ร้อยละ 30 ส่วนชุดที่มีการเติมกลูโคสสามารถลดสารโพรฟีโนฟอสได้ร้อยละ 10

เนื่องจากการดซัคชินิคและโซเดียมอะซิเตอร์ชีซึ่งเป็นสารประกอบของกรดไขมันสายสั้น ซึ่งเป็นแหล่งคาร์บอนที่จุลินทรีย์ทั่วไปนิยมใช้มากกว่ากลูโคสซึ่งเป็นคาร์โบไฮเดรต พื้นฐาน

- 2) อิทธิพลความเข้มข้นของกรดซัคชินิคเริ่มต้นที่ใช้เป็นแหล่งคาร์บอนร่วม ($4\text{-}400 \text{ mg/L}$) ส่งผลต่อการเจริญเติบโตของกลุ่มจุลินทรีย์ไม่มากนัก กลุ่มจุลินทรีย์จากทุกชุด การทดลองเพิ่มจำนวนจากประมาณ 6 เป็น $16 \log_{10} \text{CFU/mL}$ โดยมีค่าคงที่ จลนพลศาสตร์การเจริญเติบโต เท่ากับ $0.42\text{-}0.50 \text{ hr}^{-1}$ ประสิทธิภาพการย่อยสลายสารโพร์ฟิโนฟอสได้กว่าร้อยละ 80 อัตราการกำจัดสารโพร์ฟิโนฟอส เท่ากับ $7.90\text{-}31.46 \text{ mg/L/d}$ จลนพลศาสตร์การย่อยสลายสารโพร์ฟิโนฟอสเป็นไปตามปฏิกิริยาอันดับหนึ่งโดยมีค่าคงที่ เท่ากับ $0.01\text{-}0.06 \text{ hr}^{-1}$ โดยในชุดทดลองที่ให้ผลดีที่สุด คือ ชุดทดลองที่เติมแหล่งคาร์บอนร่วม 400 mg/L โดยการย่อยสลายมีค่าคงที่เพิ่มขึ้นถึง 6 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับชุดที่ไม่ได้เติมแหล่งคาร์บอนร่วม
- 3) อิทธิพลความเข้มข้นของสารโพร์ฟิโนฟอสเริ่มต้น ($40\text{-}120 \text{ mg/L}$) ส่งผลต่อการเจริญเติบโตของกลุ่มจุลินทรีย์ไม่มากนัก กลุ่มจุลินทรีย์จากทุกชุดการทดลองเพิ่มจำนวนจากประมาณ 6 เป็น $16 \log_{10} \text{CFU/mL}$ ค่าคงที่จลนพลศาสตร์การเจริญเติบโต เท่ากับ $0.30\text{-}0.47 \text{ hr}^{-1}$ สำหรับการย่อยสลายสารโพร์ฟิโนฟอสพบว่ากลุ่มจุลินทรีย์จากชุดทดลองต่าง ๆ สามารถย่อยสลายสารได้ร้อยละ 85-91 อัตราการกำจัดสาร เท่ากับ $31\text{-}55 \text{ mg/L/d}$ จลนพลศาสตร์การย่อยสลายสารโพร์ฟิโนฟอสเป็นไปตามปฏิกิริยาอันดับหนึ่งโดยมีค่าคงที่ เท่ากับ $0.02\text{-}0.06 \text{ hr}^{-1}$ ผลการศึกษาจากชุดการทดลองที่มีความเข้มข้นของสารโพร์ฟิโนฟอส 120 mg/L เกิดปรากฏการณ์การยับยั้งด้วยสารอาหารเอง (substrate inhibition) โดยผลในสภาวะที่มีแหล่งคาร์บอนร่วม อิทธิพลของปรากฏการณ์การยับยั้งดังกล่าวลดลง

5.1.4 การสาอิทธิการพื้นพื้น้ำได้ต้นที่ปนเปื้อนสารโพร์ฟิโนฟอสตามหลักการเติมเซลล์ที่ถูกกระตุ้น

- 1) ผลการทดลองชี้ให้เห็นว่าอัตราการซึมผ่านและปริมาณจุลินทรีย์เป็นปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการย่อยสลายสารโพร์ฟิโนฟอส
- 2) ผลการสาอิทธิระบบที่สภาวะที่อัตราการซึมผ่านของน้ำต่างกัน คือ $25\text{-}100 \text{ cm/d}$ ความเข้มข้นเริ่มต้นของสารโพร์ฟิโนฟอส เท่ากับ 20 mg/L และแหล่งคาร์บอนร่วม 400 mg/L พบร่วมกับจดหมายไม่พบสารโพร์ฟิโนฟอสเลย ผลดังกล่าวบ่งชี้ได้ว่าแบบจำลองคงคล้มน์ที่มีการเติมเซลล์มีถูกกระตุ้นด้วยการเติมแหล่งคาร์บอนร่วมมีประสิทธิภาพสูงมาก
- 3) ผลการศึกษาชุดทดลองที่มีความเข้มข้นเริ่มต้นของสารโพร์ฟิโนฟอส เท่ากับ 40 mg/L และแหล่งคาร์บอนร่วม 400 mg/L ในกรณีที่เติมกลุ่มจุลินทรีย์ 10^5 CFU/mL ชุดทดลองที่อัตราการการซึมผ่าน 25 cm/d สามารถย่อยสลายสารโพร์ฟิโนฟอสได้กว่าร้อยละ 90 ความสามารถในการย่อยสลายลดลงเมื่อเพิ่มอัตราการซึมผ่านของน้ำ โดยความสามารถในการย่อยสลายสารที่อัตราการซึมผ่าน 50 และ 100 cm/d เท่ากับ

ร้อยละ 80 และร้อยละ 30 ตามลำดับ เมื่อเพิ่มกลุ่มจุลินทรีย์เป็น 10^{15} CFU/mL
พบว่าตรวจติดตามไม่พบสารโพเรฟโนฟอสเลย

5.2 ข้อเสนอแนะ

- 1) ควรมีการทดลองอิทธิพลของสิ่งแวดล้อม อาทิ เช่น ปริมาณเกลือในน้ำได้ดิน ปริมาณสารอินทรีย์ธรรมชาติ และ ค่าพีเอชของน้ำ เป็นต้น ต่อความสามารถในการย่อยสลายสารโพเรฟโนฟอสโดยกลุ่มจุลินทรีย์และจุลินทรีย์บริสุทธิ์
- 2) ควรมีงานวิจัยต่อเนื่องเพื่อระบุวิถีการย่อยสลายสารโพเรฟโนฟอสโดยกลุ่มจุลินทรีย์ และจุลินทรีย์บริสุทธิ์อย่างสมบูรณ์
- 3) ควรมีงานวิจัยต่อเนื่องเพื่อระบุกลไกกระบวนการเมตาโบลิซึมร่วมสำหรับการย่อยสลายสารโพเรฟโนฟอส
- 4) ก่อนการประยุกต์ใช้จริงควรมีการศึกษาอิทธิพลของปัจจัยแวดล้อม เช่น อิทธิพลของจุลินทรีย์ในพื้นที่ อิทธิพลของสมบัติดิน อิทธิพลของสมบัติน้ำได้ดิน เป็นต้น

เอกสารอ้างอิง

- ธรัชชัย นิมกิ่งรัตน์, โสภิตา สมคิด, นาตามา จันทร์ส่อง, จุฬาพร ตั้งวาย, รัชดาวัลย์ สิริธนิตันนท์, และ สุภาพร บังพรม. 2550. การพัฒนาระบบการผลิตเทคโนโลยีการผลิตพิริกเพื่อเพิ่มคุณภาพในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ตอนล่าง. ศูนย์วิจัยพืชสวนศรีสะเกษ, กรมวิชาการเกษตร, ศรีสะเกษ.
- นาตามา จันทร์ส่อง, อิทธิพล บังพรม, และ สุภาพร บังพรม. 2550. ชนิดและปริมาณสารพิษตกค้าง ในพิริก คิน และนำ้ได้ดินของแปลงเกษตรกรภาคตะวันออกเฉียงเหนือตอนล่างตามโครงการเกษตรดีที่เหมาะสม (GAP: พีช). ศูนย์วิจัยพืชสวนศรีสะเกษ, กรมวิชาการเกษตร, ศรีสะเกษ.
- อลิสา วังใน. 2553. การบำบัดสารมลพิษทางชีวภาพ. สำนักพิมพ์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพฯ. 350 หน้า.
- Abass, K., Reponen, P. Jalonens, J., and Pelkonen, O. 2007. In vitro metabolism and interaction of profenofos by human, mouse and rats liver preparations. **Pesticide Biochemistry and Physiology** 87, 238-247.
- Aislabie, J., Bej, A.K., Ryburn, J., Lloyd, N., and Wilkins, A. 2005. Characterization of *Arthrobacter nicotinovorans* HIM, an atrazine-degrading bacterium, from agricultural soil New Zealand. **FEMS Microbiology Ecology** 52, 279–286.
- Alexander, M. 1999. **Biodegradation and Bioremediation**. 2nd edition, Academic Press, CA, USA.
- Alvey, S. and Crowley, D.E. 1996. Survival and activity of an atrazine-mineralizing bacterial consortium in rhizosphere soil. **Environmental Science and Technology**. 30, 1596-1603.
- Anwar, S., Liaquat, F., Khan, Q.M., Khalid, Z.M., and Iqbal, S. 2009. Biodegradation of chlorpyrifos and its hydrolysis product 3,5,6-trichloro-2-pyridinol by *Bacillus pumilus* strain C2A1” **Journal of Hazardous Materials**. 38, 2682-2693.
- Banerji, S. and Bajpai, R.K. 1994. Cometabolism of pentachlorophenol by microbial species. **Jounal of Hazardous Materials** 39, 19-31.
- Benimeli, C.S., Fuentes, M.S., Abate, C.M., and Amoroso, M.J. 2008. Bioremediation of lindane-contaminated soil by *Streptomyces* sp. M7 and its effect on Zea mays growth **International Biodeterioration and Biodegradation**. 61, 233-239.
- Boundy-Mills, K.L., de Souza, M.L., Mandelbaum, R.T., Wackett, L.P., and Sadowsky, M.J. 1997. The *atzB* gene of *Pseudomonas* sp. strain ADP encodes the second enzyme of a novel atrazine degradation pathway. **Applied and Environmental Microbiology** 63, 916-923.

- Bouquard, C., Ouazzani, J., Prome, J., Yvon, M., and Siat, P.P. 1997. Dechlorination of atrazine by a *Rhizobium* sp. isolate. *Applied and Environmental Microbiology* 63, 862-866.
- Carter, D.S. 1996. Determination of atrazine and its major degradation products in soil pore water by solid-phase extraction, chemical derivatization, and gas chromatography/mass spectrometry, US Geological Survey, Indiana, USA.
- Clausen, G.B., Larsen, L., Johnsen, K., de Lipthay, J.R., and Aamand, J. 2002. Quantification of the atrazine-degrading *Pseudomonas* sp. strain ADP in aquifer sediment by quantitative competitive polymerase chain reaction. *FEMS Microbiology Ecology* 41, 221-229.
- Cycon, M., Wojcik, M., and Piotrowska-Seget, Z. 2009. Biodegradation of the organophosphorus insecticide diazinon by *Serratia* sp. and *Pseudomonas* sp. and their use in bioremediation of contaminated soil. *Chemosphere*, 76, 494-501.
- Devinny, J.S. and Chang, S. 2000. Bioaugmentation for soil bioremediation. In Wise, D.L., Trantolo, D.J., Cichon, E.J., Inyang, H.I., and Stottmeier U., *Bioremediation of contaminated soils*, Marcel Dekker, New York, USA.
- de Souza, M.L., Newcombe, D., Alvey, S., Crowley, D.E., Hay, A., Sadowsky, M.J., and Wackett, L.P. 1998. Molecular basis of a bacterial consortium: Interspecies catabolism of atrazine. *Applied and Environmental Microbiology* 64, 178-184.
- Fang, M., and Wong, J.W. 2001. Seeding effect on cocomposting wastewater biosolids with coal ash. *Water Environment Research* 73, 633-638.
- Fulton, M.H. and Key, P.B. 2001. Acetylcholinesterase inhibition in estuarine fish and invertebrates as an indicator of organophosphorus insecticide exposure and effects. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 20, 37-45.
- Girbal, L., Rols, J., and Lindley, N.D. 2000. Growth rate influences reductive biodegradation of the organophosphorus pesticide demeton by *Corynebacterium glutamicum*. *Biodegradation*. 11, 371-376.
- Gentry, T.J., Rensing, C., and Pepper, I.L. 2004. New approach for bioaugmentation as a remediation technology. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology* 34, 447-494.
- Gonzalez, V.G., Govantes, F., Shaw, L.J., Burns, R.G., and Santero, E. 2003. Nitrogen control of atrazine utilization in *Pseudomonas* sp. strain ADP. *Applied and Environmental Microbiology* 69, 6987-6993.

- Gotoh, M., Sakata, M., Endo, T., Hayashi, H., Seno, H. and Suzuki, O. 2001. Profenofos metabolites in human poisoning. *Forensic Science International*. 116, 221-226.
- Grant R.J. and Betts W.B. 2004. Mineral and carbon usage of two synthetic pyrethroid degrading bacterial isolates. *Journal of Applied Microbiology*. 97, 656-662.
- Head, M.A. and Oleszkiewicz, J.A. 2004. Bioaugmentation for nitrification at cold temperatures. *Water Research*. 38, 523-530.
- Ismail, M., Ali, R., Ali, T., Waheed, U., and Khan, Q.M. 2009. Evaluation of the Acute Toxicity of Profenofos and Its Effects on the Behavioral Pattern of Fingerling Common Carp (*Cyprinus carpio* L., 1758). *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. 82, 569-573.
- Jianlong, W., Xiangchun, Q., Liping, H., Yi, Q., and Hegemann, W. 2002. Kinetics of co-metabolism of quinoline and glucose by *Burkholderia pickettii*. *Process Biochemistry* 37, 831-836.
- Katz, I., Green, M., Ruskol, Y., and Dosoretz, C.G. 2000. Characterization of atrazine degradation and nitrate reduction by *Pseudomonas* sp. strain ADP. *Advances in Environmental Research* 4, 219-224.
- Kaneva, I., Mulchandani, A., and Chen, W. 1998. Factors Influencing Parathion Degradation by Recombinant *Escherichiacoli* with Surface-Expressed Organophosphorus Hydrolase. *Biotechnology Progress* 14, 275-278.
- Kim, M.H., Hao, O.J., Wang, N.S. 1997. *Acinetobacter* isolates from different activated sludge processes: characteristics and neural network identification. *FEMS Microbiology Ecology* 23 (3), 217-227.
- Landis, W.G. and Yu M. 1995. *Introduction to Environmental Toxicology: Impacts of Chemicals Upon Ecological Systems*. CRC Press, FL, USA.
- Li, Q., Li, Y., Zhu, X., and Cai, B. 2008. Isolation and characterization of atrazine-degrading *Arthrobacter* sp. AD26 and use of this strain in bioremediation of contaminated soil, *Journal of Environmental Sciences*. 20, 1226-1230.
- Li, X., He, J., and Li, S. 2007. Isolation of a chlorpyrifos-degrading bacterium, *Sphingomonas* sp. Strain Dsp-2, and cloning of the *mpd* gene", *Research in Microbiology* 158, 143-149.
- Malghani, S. and Chatterjee, N. 2009. Isolation and characterization of a profenofos degrading bacterium. *Brazilian Journal of Microbiology*, 40(4), 893-900.
- Malghani, S., Chatterjee, N., Yu, H.X., Luo, Z. 2009. Isolation and identification of Profenofos degrading bacteria. *Journal of Environmental Science*, 21, 1591-1597.

- Mandelbaum, R.T., Allan, D.L., and Wackett, L.P. 1995. Isolation and characterization of a *Pseudomonas* sp. that mineralizes the s-triazine herbicide atrazine. *Applied and Environmental Microbiology* 61, 1451-1457.
- Moulton, C.A., Fleming W.J., and Purnell, C.E. 1996. Effects of two cholinesterase-inhibiting pesticides on freshwater mussels. *Environmental Toxicology and Chemistry* 15, 131-137.
- Mulbry, W.W., Del Valle, P.L., and Karns J.S.. 1996. Biodegradation of the Organophosphate Insecticide Coumaphos in Highly Contaminated Soils and In Liquid Wastes. *Pesticide Science* 48, 149-155.
- Neumann, G., Teras, R., Monson, L., Kivisaar, M., Schauer, F., and Heipieper, H. J. 2004. Simultaneous degradation of atrazine and phenol by *Pseudomonas* sp. strain ADP: effects of toxicity and adaptation. *Applied and Environmental Microbiology* 70, 1907-1912.
- Parekh, N.R., Suett, D.L., Roberts, S.J., and Welch, S.J. 1994. Rapid degradation of the triazinone herbicide metamitron by a *Rhodococcus* sp. isolated from treated soil. *Journal of Applied Bacteriology* 77, 467-475.
- Pepper, I.L., Gentry, T.J., Newby, D.T., Roane, T.M., and Josephson, K.L. 2002. The role of cell bioaugmentation and gene bioaugmentation in the remediation of co-contaminated soils. *Environmental Health Perspectives* 110, 943-946.
- Piutti, S., Semon, E., Landry, D., Hartmann, A., Dousset, S., Lichtfouse, E., Topp, E., Soulas, G., and Martin-Laurent, F. 2003. Isolation and characterization of *Nocardoides* sp. SP12, an atrazine-degrading bacterial strain possessing the gene *trzN* from bulk- and maize rhizosphere soil. *FEMS Microbiology Letters* 221, 111-117.
- Pope, C.N. 1999. Organophosphorus pesticides: Do they all have the same mechanism of toxicity?, *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B: Critical Reviews.* 2, 161-181
- Qasim, S.R. and Stinehelpfer, M.L. 1982. Effect of a bacterial culture product on biological kinetics. *Journal of the Water Pollution Control Federation* 54, 255-260.
- Radosevich, M., Traina, S.J., Hao, Y.L., and Tuovinen, O.H. 1995. Degrading and mineralization of atrazine by soil bacterial isolate. *Applied and Environmental Microbiology* 61, 297-302.
- Robert, T. and Hutson, D.H. 1998. *Metabolic pathways of agrochemicals: Herbicides and plant growth regulators, Part 1.* Royal Society of Chemistry, Great Britain.
- Rousseaux, S., Hartmann, A., Lagacherie, B., Piutti, S., Andreux, F., and Soulàs, G. 2003. Inoculation of an atrazine-degrading strain, *Chelatobacter heintzii* Cit1, in four

- different soils: effects of different inoculum densities. **Chemosphere** 51, 569-576.
- Sadowsky, M.J., and Wackett, L.P. 2001. Genetics of atrazine and s-triazine degradation by *Pseudomonas* sp. strain ADP and other bacteria. In Hall, J.C., Hoagland, R.E., and Zablotowicz, R.M., **Pesticide biotransformation in plants and microorganisms similarities and divergences**, pp 268-282, Washington D.C.: Oxford University Press,
- Seffernick, J.L., Johnson, G., Sadowsky, M.J., and Wackett, L.P. 2000. Substrate specificity of atrazine chlorohydrolase and atrazine-catabolizing bacteria. **Applied and Environmental Microbiology** 66, 4247-4252.
- Shao, Z.O. and Behki, R. 1995. Cloning of the genes for degradation of the herbicides EPTC (S-ethyl dipropylthiocarbamate) and atrazine from *Rhodococcus* sp. strain TE1. **Applied and Environmental Microbiology** 61, 2061-2065.
- Singh, B.K., Walker, A., Morgan, J.A.W., and Wright, D.J. 2004. Biodegradation of chlorpyrifos by *Enterobacter* strain B-14 and its use in bioremediation of contaminated soils. **Applied Environmental Microbiology** 70(8), 4855-4863.
- Singh, B.K., Walker A. and Wright D.J. 2006. Bioremedial potential of fenamiphos and chlorpyrifos degrading isolates: Influence of difference environmental conditions. **Soil Biology and Biochemistry** 38, 2682-2693.
- Siripattanakul, S., Wirojanagud, W., McEvoy, J., M., Casey, F., X., M., and Khan, E. 2009. Bioaugmentation of immobilized and free mixed cultures for removing atrazine in agricultural infiltrate and its bacterial community structural change. **Journal of Hazardous Materials**, 168, 1373-1379.
- Smith, D., Alvey, S. and Crowley, D.E. 2005. Cooperative catabolic pathways within an atrazine-degrading enrichment culture isolated from soil. **FEMS Microbiological Ecology**. 53, 265-273.
- Strong, L.C., Rosendahl, C., Johnson G., Sadowsky, M.J., and Wackett, L.P. 2002. *Arthrobacter aurescens* TC1 metabolizes diverse s-triazine ring compounds. **Applied and Environmental Microbiology** 68, 5973-5980.
- Struthers, J.K., Jayachandran, K., and Moorman, T.B. 1998. Biodegradation of atrazine by *Agrobacterium radiobacter* J14a and use of this strain in bioremediation of contaminated Soil. **Applied and Environmental Microbiology** 64, 3368-3375.
- Xie, S., Liu, J., Li, L., and Qiao, C. 2009. Biodegradation of malathion by *Acinetobacter johnsonii* MA19 and optimization of cometabolism substrates. **Journal of Environmental Sciences**. 21, 76-82.
- US EPA. 2006. **Finalization of Interim Reregistration Eligibility Decisions (IREDs) and Interim Tolerance Reassessment and Risk Management Decisions (TREDs) for the Organophosphate Pesticides, and Completion of the**

- Tolerance Reassessment and Reregistration Eligibility Process for the Organophosphate Pesticides. US EPA, Washington DC, USA.
- US EPA. 2009. Index to Pesticide Types and Families and Part 180 Tolerance Information of Pesticide Chemicals in Food and Feed Commodities. US EPA, Washington DC, USA.
- van Veen, J.A., van Overbeek, L.S., and van Elsas, J.D. 1997. Fate and activity of microorganism introduced into soil. **Microbiology and Molecular Biology Reviews** 61, 121-135.
- Wackett, L.P., Lange, C.C., and Ornstein, R.L. 1995. Biodehalogenation: natural and engineered systems. In Hinchee, R.E., Fredrickson, J., and Alleman, B.C. **Bioaugmentation for Site Remediation**, Battelle Press, Columbus, USA.
- Wang, F., Grundmann, S., Schmid, M., Dorfler, U., Roherer, S., Charles, J., Hartmann, M.A., Jiang, X., and Schroll, R. 2007. Isolation and characterization of 1,2,4-Trichlorobenzene mineralizing *Bordetella* sp. and its bioremediation potential in soil" **Chemosphere**. 67, 896-902.
- WHO (World Health Organization). 2004. **The WHO recommended classification of pesticides by hazard and guidelines to classification**. Geneva, Switzerland.
- Worthing, C.R. 1979. **The Pesticide Manual**. 6th ed. British Crop Protection Council Publications, England.
- www.dpt.go.th/nrp/about1/intro_northeast.html เข้าถึงเมื่อ วันที่ 4 สิงหาคม 2553.
- Zamy, C., Mazellier, P., Legube, B. 2004. Phototransformation of selected organophosphorus pesticides in dilute aqueous solutions. **Water Research**. 38, 2305-2314.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก
วิธีการวิเคราะห์

การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อเอ็มเอสเอ็ม (Minimal Salt Medium, MSM)

การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อเอ็มเอสเอ็มนิดเหลวมีรายการสารเคมีและวิธีการเตรียม ดังนี้

สารเคมี

1) NaHPO ₄ 12H ₂ O	14.678	กรัม
2) KH ₂ PO ₄	3	กรัม
3) NaCl	0.5	กรัม
4) NH ₄ Cl	2	กรัม
5) MgSO ₄ 7H ₂ O	0.513	กรัม

วิธีการ

ละลายสารเคมีข้างต้นด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์เข้มข้น (Phosphate buffer) 10 mM และปรับปริมาณรูปที่ให้เป็น 1 ลิตร นำไปกำจัดเชื้อด้วยหม้อนึ่งฆ่าเชื้อความดันไอน้ำ ที่อุณหภูมิ 121 °C เป็นระยะเวลา 15 นาที รอให้เย็นลงเติมสารโพร์ฟินฟอสที่ผ่านการฆ่าเชื้อโดยวิธีการกรองผ่านกระดาษกรองที่มีขนาดรูพรุน 0.20 μm

หมายเหตุ : การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อเอ็มเอสเอ็มนิดแข็งมีวุ้นเป็นส่วนผสม ร้อยละ 1.5 และยีสต์สกัดร้อยละ 0.1 ใช้สารโพร์ฟินฟอสเกรดการค้าผสมในอาหาร 60 มิลลิกรัมต่อลิตร

2. การเตรียมอาหารเอ็นเอ (Nutrient Agar, NA)

การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อเอ็นเอมีอุปกรณ์และวิธีการเตรียม ดังนี้

สารเคมี

อาหารเลี้ยงเชื้อชนิด NA	28	กรัม
-------------------------	----	------

วิธีการ

ละลายอาหารเลี้ยงเชื้อเอ็นเอด้วยน้ำกลั่นและปรับปริมาณรูปที่ให้เป็น 1 ลิตร นำไปกำจัดเชื้อด้วยหม้อนึ่งฆ่าเชื้อความดันไอน้ำ ที่อุณหภูมิ 121 °C เป็นเวลา 15 นาที

ภาคผนวก ก2
การเพาะเชื้อด้วยเทคนิคการเกลี่ยเชื้อ (Spread plate technique)

การเพาะเชื้อด้วยเทคนิคการเกลี่ยเชื้อ (Spread plate technique)

1. การเพาะเชื้อด้วยเทคนิคการเกลี่ยเชื้อ (Spread plate technique)

การเพาะเชื้อด้วยเทคนิคการเกลี่ยเชื้อ (spread plate) เป็นวิธีการเพาะเชื้อเพื่อนับจำนวนโคโลนีของจุลินทรีย์ที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ วิธีนี้ผู้คร่าห์จะสามารถสังเกตลักษณะโคโลนีของจุลินทรีย์ได้ง่าย ซึ่งมีรายละเอียด ดังนี้

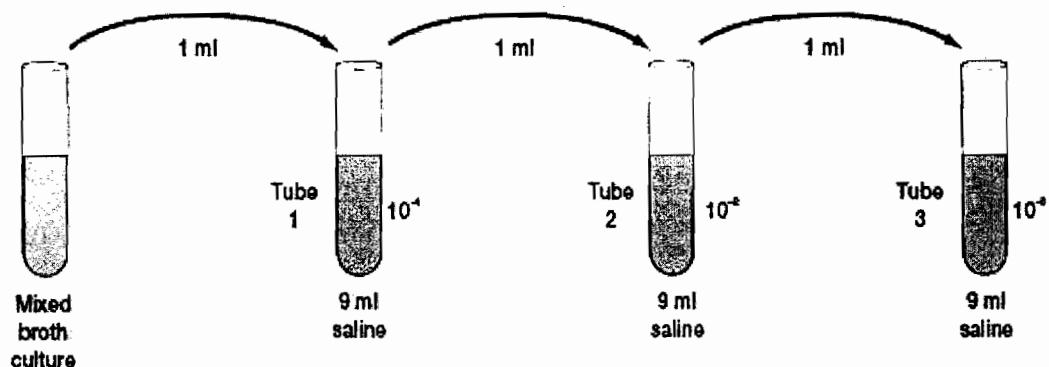
1.1 การเจือจางแบบ 10 serial dilutions

1.1 ปีเปต 1 มล. ชั้สเพนชันของเชื้อตั้งต้นด้วยเทคนิคปลดดเชื้อ มาใส่หลอดที่มีน้ำเจือจางปลดดเชื้อ ปริมาตร 9 มล. เขย่าให้เข้ากัน จะได้เป็นชั้สเพนชันของเชื้อที่ระดับความเจือจาง 10^{-1}

1.2 ปีเปตชั้สเพนชันของเชื้อที่ได้ (10^{-1}) 1 มล. ใส่หลอดที่มีน้ำเจือจางปลดดเชื้อ ปริมาตร 9 มล. เขย่าให้เข้ากันจะได้เป็นชั้สเพนชันของเชื้อที่ระดับความเจือจาง 10^{-2}

1.3 ปีเปตชั้สเพนชันของเชื้อที่ได้ (10^{-2}) 1 มล. ใส่หลอดที่มีน้ำเจือจางปลดดเชื้อ ปริมาตร 9 มล. เขย่าให้เข้ากัน จะได้เป็นชั้สเพนชันของเชื้อที่ระดับความเจือจาง 10^{-3}
โดยขั้นตอนการเจือจางตัวอย่างแสดงไว้ในภาพที่ ก2-1

1.4 นำไปใช้ต่อในขั้นตอนที่ 2 เรื่องการเพาะเลี้ยงแบบเกลี่ยเชื้อ



ภาพที่ ก2-1 ขั้นตอนการทำ Serial dilution

1.2 การเพาะเชื้อแบบ Spread Plate มีขั้นตอนดังนี้

2.1 ระบุชื่อชุดตัวอย่าง วันที่ทำการทดลองที่ด้านล่างของจานเพาะเชื้อ

2.2 ปีเปตตัวอย่างปริมาตร 0.1 มล. ลงที่ตำแหน่งตรงกลางจานเพาะเชื้อ^{แสดงไว้ในภาพที่ ก2-2 (a)}

2.3 จุ่มแท่งแก้วรูปตัวแอล (spreader) ในแอลกอฮอล์เข้มข้นร้อยละ 95แล้วเอียงแท่งแก้วรูปตัวแอลตามขอบบีกเกอร์เพื่อแยกแอลกอฮอล์ส่วนเกินออก แสดงไว้ในภาพที่ ก2-2 (b)

2.4 นำแท่งแก้วเกลี่ยรูปตัวแอลไปเพาไฟจนแอลกอฮอล์ไหม้หมด และปล่อยให้เย็น

แสดงไว้ในภาพที่ ก2-2 (c)

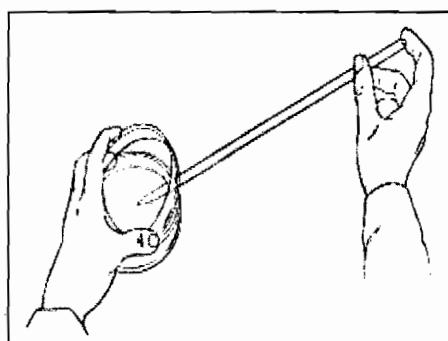
2.5 นำแท่งแก้วเกลี่ยรูปตัวแอลเกลี่ยเชือให้ทั่วจานจานเพาะเชื้อและระมัดระวังไม่ให้มีสัมผัสถกับขอบด้านในของจานเพาะเชื้อ แสดงไว้ในภาพที่ ก2-2 (d)

2.6 จุ่มแท่งแก้วเกลี่ยรูปตัวแอลในแอลกอฮอล์เข้มข้นร้อยละ 95 และกำจัดแอลกอฮอล์

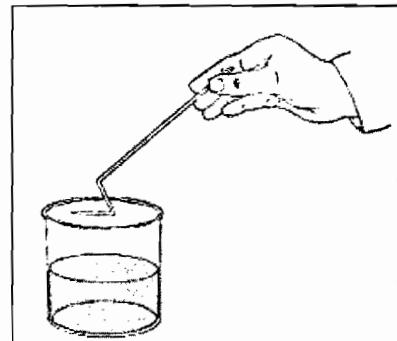
ส่วนเกินโดยให้แท่งแก้วแตะขอบบีกเกอร์ นำเผาไฟจนแอลกอฮอล์ไหม้หมด ปล่อยให้เย็นและนำไปเกลี่ยเชื้อแบคทีเรียจากในจานเพาะเชื้อที่เหลือ ขั้นตอนการเกลี่ยเชื้อแสดงดังภาพที่ ก2-2

2.7 กลับจานเพาะเชื้อให้ด้านที่มีอาหารเพาะเชื้อยื่นด้านบน และนำไปบ่มในตู้บ่มเชื้อควบคุมอุณหภูมิ

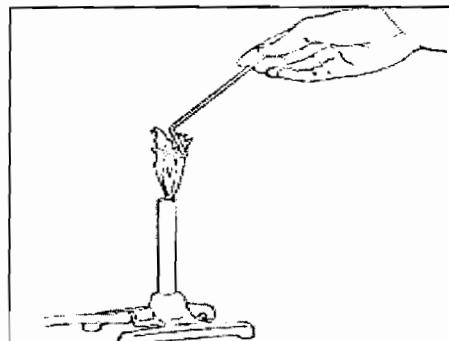
2.8. สังเกตลักษณะของโคโลนีที่ปรากฏและนับจำนวนโคโลนี



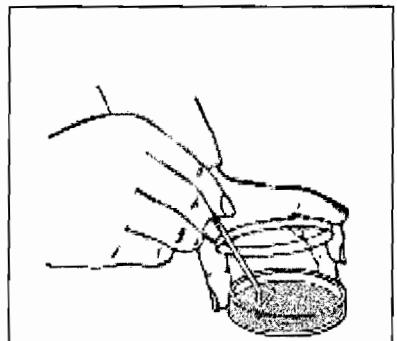
(b)



(a)



(c)



(d)

ภาพที่ ก2-2 ขั้นตอนเพาะเชื้อด้วยเทคนิคการเกลี่ยเชื้อ

ภาคผนวก ก3

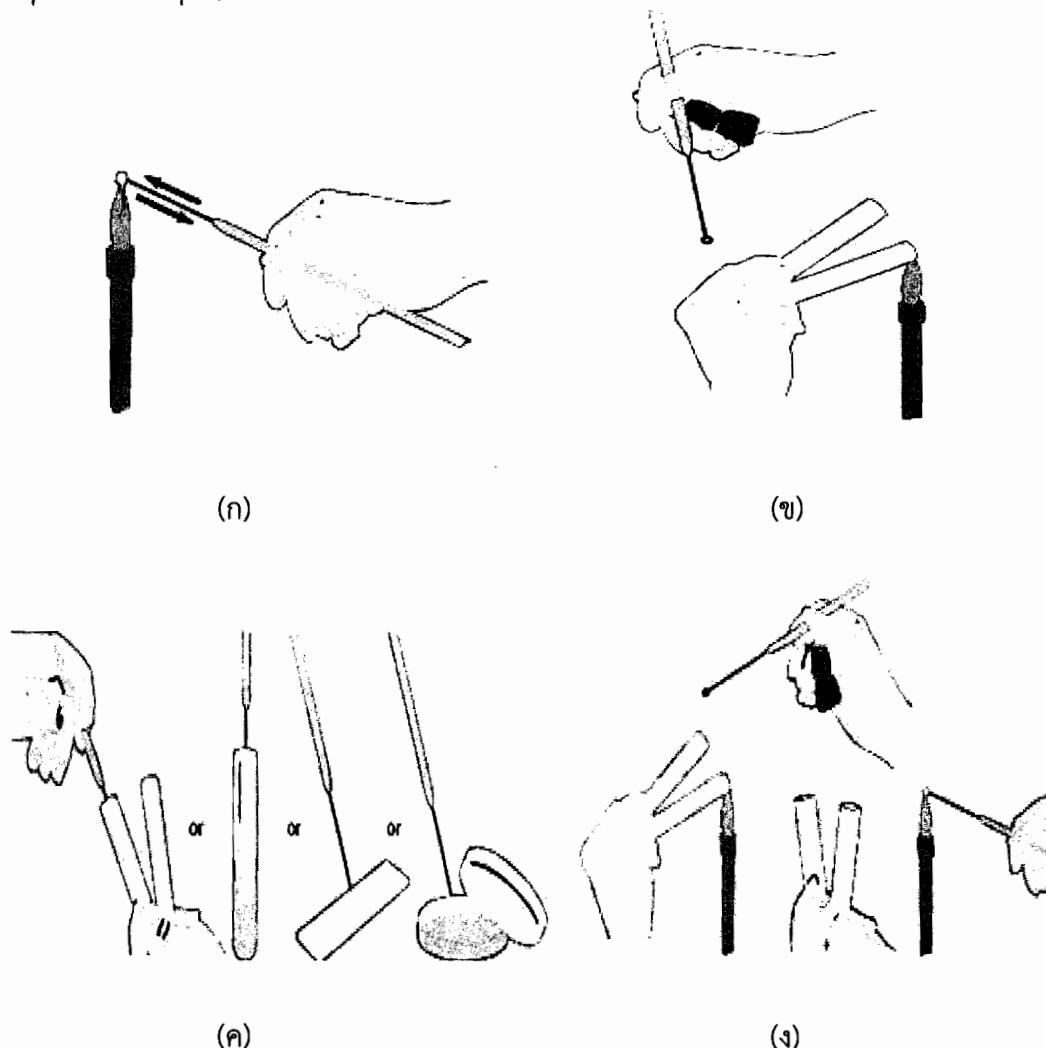
การทำเชื้อให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิคการเขี่ยเชื้อ (Steak plate technique)

การทำให้เชื้อปริสุทธิ์ด้วยเทคนิค Streak plate

1. การทำให้เชื้อปริสุทธิ์ด้วยเทคนิค Streak plate

หลักการของการแยกเชื้อให้ปริสุทธิ์บนอาหารเลี้ยงเชื้อ (culture medium) คือ จะต้องแยกเชื้อให้ได้โคลoni เดียวๆ (single colony) จากนั้นจึงนำเชื้อที่เป็นโคลoni เดียวที่แยกได้ไปศึกษา รูปร่างลักษณะ และคุณสมบัติต่างๆ เพื่อให้ทราบว่าเป็นเชื้อชนิดใด โดยมีรายละเอียดดังนี้

1.1 ใช้ลูบเขี่ยเชื้อ (Loop) เขี่ยเอาเชื้อออกจากหลอดที่มีเชื้อด้วยเทคนิคปลอดเชื้อ (Aseptic technique) ดังแสดงในภาพที่ ก3-1



ภาพที่ ก3-1 การถ่ายเชื้อด้วยเทคนิคปลอดเชื้อ

1.2 ทำการ Streak เชื้อที่อยู่ปลาย loop ลงบนจานเพาะเชื้อที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อที่ได้เตรียมไว้ แล้ว ด้วยความระมัดระวัง ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้

1.2.1 เปิดฝาจานเพาะเชื้อให้มีซ่องว่างเพียงพอที่จะสอด Loop เข้าไปได้ง่าย ดังแสดงในภาพที่ ก3-2 (ก) แล้วสอด Loop ที่มีเชือแบบที่เรียกว่าทำการ streak ที่พื้นที่หมายเลข 1 โดยในระหว่างการ streak จะต้องไม่ทำให้ผิวของอาหารแตก

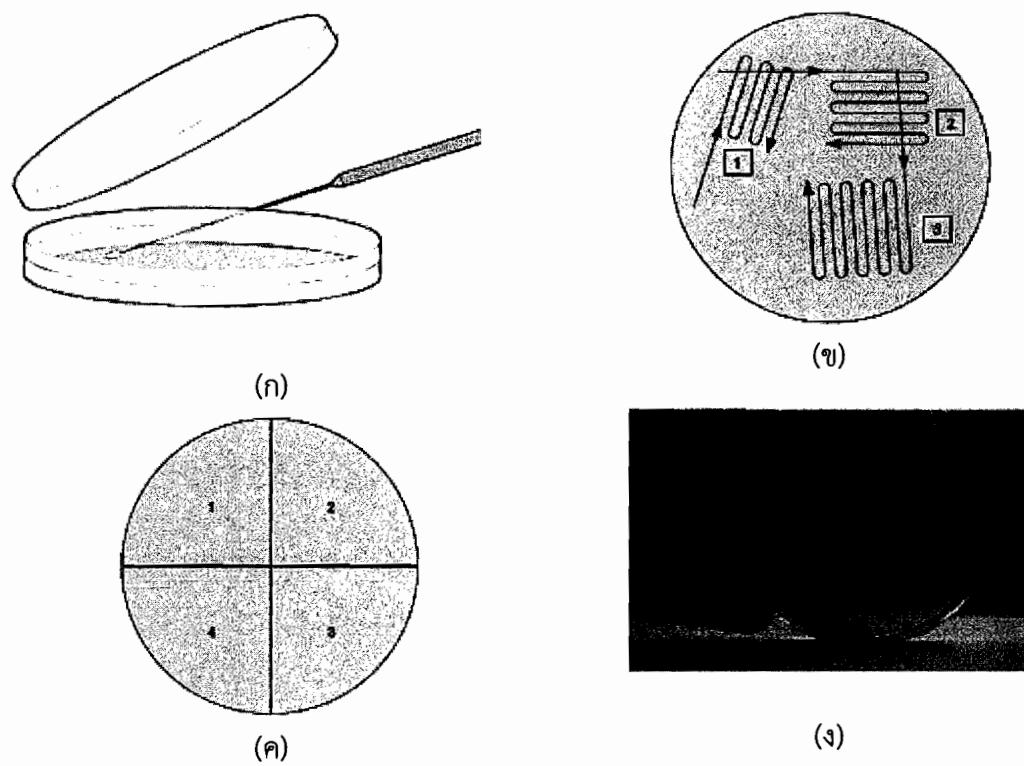
1.2.2 เมื่อ streak ที่บริเวณพื้นที่หมายเลข 1 แล้วให้นำ Loop ออกมาจากเชือโดยการเผาไฟ จนกว่าจะทำให้ Loop เย็นลงโดยการแตะที่ขอบของอาหารเลี้ยงเชือใกล้ๆ กับบริเวณหมายเลข 1

1.2.3 หมุนจานเพาะเชื้อให้อยู่ในตำแหน่งที่เหมาะสมสำหรับการ streak บริเวณพื้นที่หมายเลข 2 แล้วทำการ cross streak โดยจุดเริ่มต้นจะอยู่ที่บริเวณพื้นที่หมายเลข 1 แล้วทำการ Streak ที่บริเวณพื้นที่หมายเลข 2 ดังภาพที่ ก3-2 (ข)

1.2.4 เมื่อ streak ที่บริเวณพื้นที่หมายเลข 2 แล้วให้นำ Loop ออกมาจากเชือโดยการเผาไฟ หลังจากนั้นทำให้ Loop เย็นลงโดยการแตะที่ขอบของอาหารเลี้ยงเชือใกล้ๆ กับบริเวณหมายเลข 2

1.2.5 หมุนจานเพาะเชื้อให้อยู่ในตำแหน่งที่เหมาะสมสำหรับการ streak บริเวณพื้นที่หมายเลข 3 แล้วทำการ cross streak โดยจุดเริ่มต้นจะอยู่ที่บริเวณพื้นที่หมายเลข 2 แล้วทำการ Streak ที่บริเวณพื้นที่หมายเลข 3 ดังภาพที่ ก3-2 (ข) ถ้าหากจำเป็นสามารถทำการ streak ที่บริเวณพื้นที่หมายเลข 4 ได้

1.2.6 กลับจานเพาะเชื้อแล้วนำไปบ่มในตู้บ่มเชือควบคุมอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง แล้วสังเกตการณ์เจริญของเชื้อ



ภาพที่ ก3-2 ขั้นตอนการทำเชื้อบริสุทธิ์ด้วยเทคนิค Streak plate

ภาคผนวก ก4
การระบุสายพันธุ์แบบที่เรีย

การระบุสายพันธุ์แบคทีเรีย

The isolates were identified by 16S ribosomal Ribonucleic acid (16S rRNA) sequence analysis. In brief, each bacterial culture was grown overnight. The genomic DNA from each culture was extracted using a standard boiling method. The 16S rRNA gene fragment was amplified from the genomic DNA by the polymerase chain reaction (PCR) using the bacterium-specific primers: a 63f-forward primer (5'CAGGCCTAACACATGCAAGTC3') and a 1387r-reverse primer (5'GGCGGGWGTGTACAAGGC3'). A 25- μ l PCR reaction mixture was prepared according to the manufacturer's protocol (Fermentas, USA). The 16S rRNA amplification was performed in a thermal cycler (Perkin Elmer model-2400, USA) with the following conditions: 94°C (3 min), followed by 30 cycles of 95°C (1 min), 55°C (1 min) and 72°C (1.5 min), with a final extension of 72°C (5 min). The PRC product (ca. 1,300 bps) was then cloned into pGEM-T Easy vector (Promega, USA) and transformed into competent Escherichia coli DH5a cells. The plasmid DNA was then isolated using the QIAprep Spin Miniprep kit (Qiagen, Netherlands) and sequenced. The partial 16S rRNA gene sequence of the isolates was analyzed using the nucleotide BLAST (BLASTN) algorithm of the National Center for Biotechnology Information (NCBI).

ภาคผนวก ก5
การย้อมสีแกรม

การย้อมสีแกรม

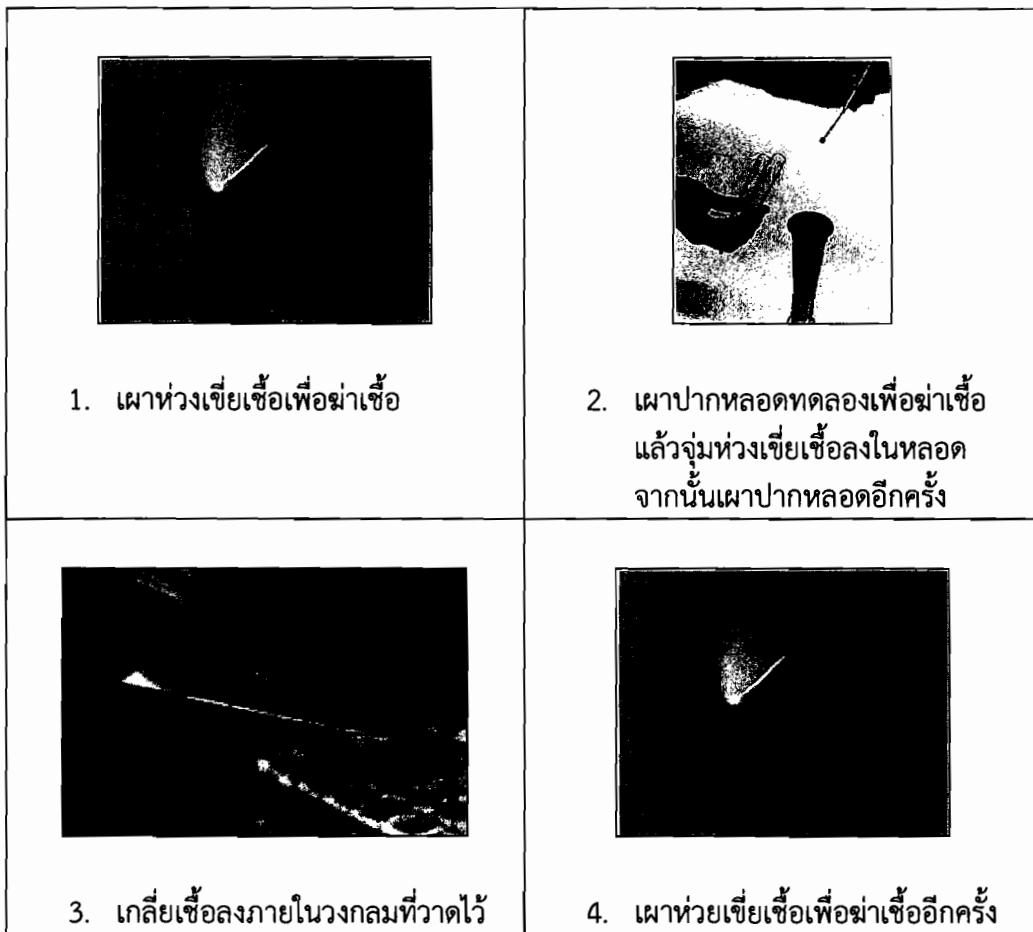
การย้อมสีแกรมจะต้องประกอบด้วยขั้นตอนการเตรียมสไลด์ตัวอย่างและขั้นตอนการย้อมสีแกรม ซึ่งมีรายละเอียดดังต่อไปนี้

1. การเตรียมสไลด์ก่อนการย้อมสี มีขั้นตอนดังนี้

- 1) เตรียมอุปกรณ์ต่างๆ ดังนี้ หลอดเก็บเชื้อที่จะทำการศึกษา แผ่นสไลด์ ห่วงเชือก ตะเกียงและกอกอชอร์ และปากกาเขียนแผ่นใส
- 2) ใช้ปากกาเขียนแผ่นใสเขียนวงกลมบนสไลด์ เพื่อกำหนดขอบเขตที่จะนำเข้ามาป้ายลงบนสไลด์ จากนั้นกลับแผ่นสไลด์ที่ขัดไว้ด้วยปากกาให้อยู่ด้านล่าง
- 3) ผ่าห่วงเชือกด้วยตะเกียงจนร้อนแดง เพื่อผ่าเชือกจากนั้นรอให้เย็น ประมาณ 10 วินาที ระหว่างอย่าให้ปลายห่วงเชือกกระทบกับสิ่งอื่นรอบๆ
- 4) ใช้มือข้ายื่อหลอดเชื้อตัวอย่าง ใช้มือขวาดึงสำลีออกจากหลอดเก็บเชื้อโดยระวังไม่ให้มือสัมผัสกับปากหลอดด้านใน 百分百เรื่องของปากหลอดและรีบปิดสำลีลงในหลอดตามเดิม
- 5) นำห่วงเชือกผ่านการผ่าเชือกแล้ว เชือกออกจากหลอดเก็บเชื้อ แล้วผ่าปากหลอดและรีบปิดสำลีลงในหลอดตามเดิม
- 6) เกลี่ยเชือก (Smear) ** ลงบนสไลด์ในวงกลมที่เขียนไว้ ถ้าเชือมีความหนาแน่นสูงให้เติมน้ำกลั่นปลอดเชือกเพิ่มอีก 1 หยด และเกลี่ยเชือกให้กระจายมากที่สุด
- 7) ผ่าห่วงเชือกจนร้อนแดง เพื่อเก็บไว้ใช้ในครั้งต่อไป นำสไลด์ไปผ่านเปลวไฟ 2-3 ครั้ง เพื่อเป็นการทำให้เชือติดแน่นกับแผ่นสไลด์ ป้องกันไม่ให้เชือหลุดจากแผ่นสไลด์ในระหว่างขั้นตอนการย้อม วิธีนี้เรียกว่า Heat fixed การทำเช่นนี้ทำให้เกิดการตกตะกอน (Coagulation) ของโปรตีนทำให้เซลล์ติดแผ่นสไลด์ การเตรียมสไลด์ก่อนย้อมสีมีลักษณะดังภาพที่ ก5-1

** การทำ Smear มี 2 วิธี คือ

1. ถ้าแบคทีเรียเลี้ยงอยู่ในอาหารเหลว ให้ใช้ห่วงเชือก (loop) ที่ผ่าเชือแล้ว (โดยการนำไปเผาไฟจนร้อนแดงแล้วปล่อยให้เย็น) จุ่มลงในอาหารเลี้ยงเชือ แล้วยกห่วงเชือขึ้นตรงๆ จะเห็นว่ามีแผ่นพิล์มบางๆ นำไปป้ายลงบนแผ่นสไลด์ที่เตรียมไว้ เกลี่ยเชือให้เป็นวงกลมกระจายบนสไลด์
2. ถ้าแบคทีเรียเลี้ยงอยู่ในอาหารแข็ง (agar) ให้หยดน้ำกลั่นปราศจากเชือลงบนสไลด์ 1 หยดเล็กๆ (อาจใช้ห่วงเชือเพียงแค่มาก 1 ครั้ง) แล้วจึงนำห่วงเชือที่ผ่าเชือไปแตะแบคทีเรียบนอาหารเลี้ยงเชือเพียงเล็กน้อย นำมาป้ายบนหยดน้ำแล้วเกลี่ยเชือให้เป็นแผ่นกระจายเป็นวงกลมบนสไลด์ ทึ่งให้แห้ง รอยเกลี่ยที่ดีจะต้องบางมีเชือแผ่กระจายสม่ำเสมอ



ภาพที่ ก5-1 การเตรียมสไลด์ตัวอย่างก่อนการย้อมสีแกรม

2. การย้อมสีแกรม (Gram's differential staining) มีขั้นตอนดังนี้

1) นำสไลด์ตัวอย่างวางลงบนตะแกรงสำหรับย้อมสี โดยด้านที่ Smear อยู่ด้านบนหยดสี Crystal Violet ลงบนสไลด์ให้ทั่วๆ จับเวลา 1 นาที

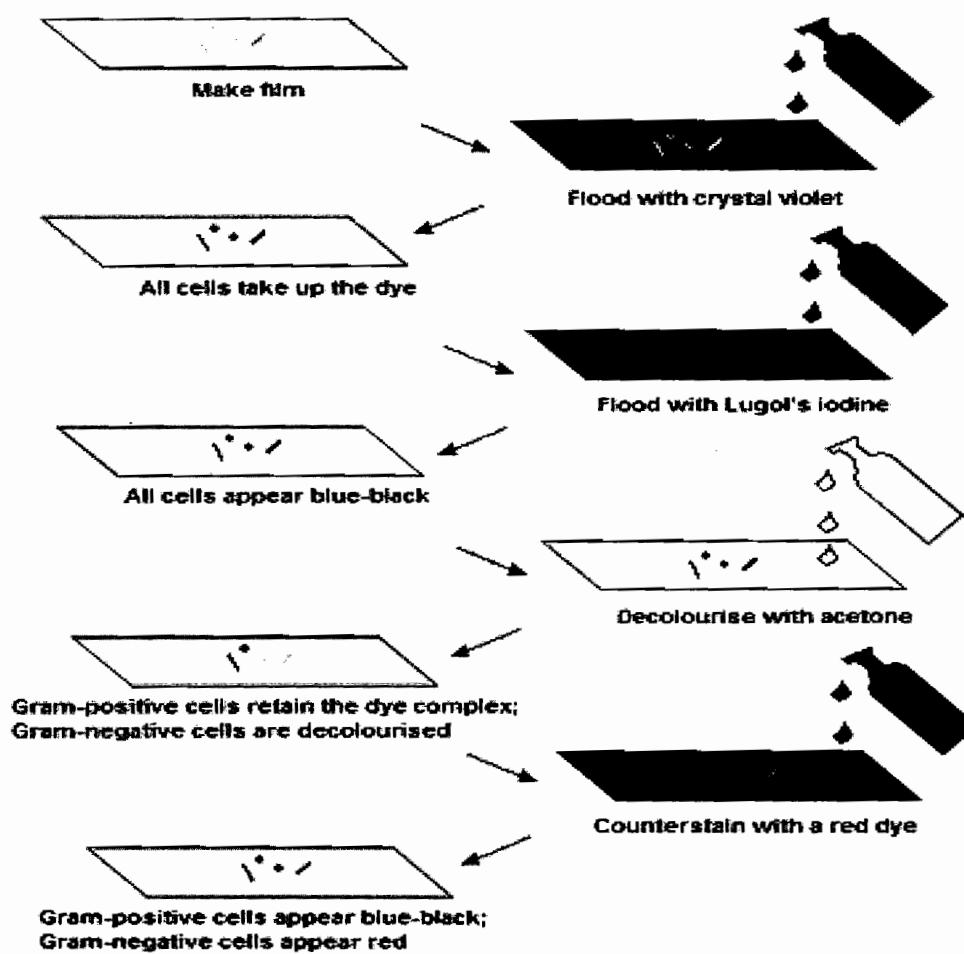
2) ล้างสีออกจากสไลด์ด้วยน้ำกลั่นหรือเปิดให้น้ำไหลผ่านสไลด์เบาๆ หรือใช้น้ำจากชุดฉีดล้างก็ได้ ห้ามเทสีออกก่อนใช้น้ำล้าง เพราะ Crystal Violet จะตกตะกอนและแท้งบนสไลด์อย่างรวดเร็ว

3) ซับน้ำที่ล้างออกจากสไลด์เบาๆ จากนั้นหยด Gram's iodine ลงบนสไลด์จนทั่วทั้งสไลด์เป็นเวลา 1 นาที Gram's iodine จะทำให้ติดกับเซลล์ได้ดีขึ้นโดยจะปลดการละลายของสีออกจากผนังเซลล์

4) ล้างออกด้วยน้ำเช่นเดียวกับข้อ 2)

5) ล้างสีออกจากแผ่นสไลด์โดยหยด 95% เอทิลแอลกอฮอล์ผ่านสไลด์ โดยถือสไลด์ด้วยปากคีบให้สไลด์เอียงเป็นมุมล่างจนสีไม่ถูกล้างออกมาก อีก ในขั้นนี้สีที่ย้อมแกรมลบจะถูกชะล้างออกจากเซลล์ส่วนในกรณีของแกรมบวกสีจะยังติดกับผนังเซลล์อยู่ และไม่ถูกล้างออกด้วย แอลกอฮอล์ (ขั้นตอนนี้ใช้เวลาไม่เกิน 10 วินาที)

- 6) ล้างออกด้วยน้ำอุ่นร้อนเร็ว
- 7) ย้อมสีอีกครั้งด้วยสีที่สอง Safranin (Counter stain) ใช้เวลาในการย้อม 1 นาที
- 8) ล้างสีออกด้วยน้ำตามวิธีในข้อ 2)
- 9) ทิ้งสไลด์ให้แห้งโดยผึ่งไว้ให้แห้งเอง หรือใช้กระดาษซับเบาๆ สไลด์ควรจะแห้งสนิทก่อนการนำไปดูด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบแสง แสดงขั้นตอนการย้อมสีแกรมดังภาพที่ ก5-2



ภาพที่ ก5-2 ขั้นตอนการย้อมสีแกรม

ภาคผนวก ก6
วิธีการวิเคราะห์สารออร์แกนโนฟอสฟอรัส

วิธีการวิเคราะห์สารออร์แกนโนฟอสฟอรัส

1. วิธีการวิเคราะห์สารกำจัดแมลงออร์แกนโนฟอสฟอรัส

วิธีการวิเคราะห์สารกำจัดแมลงออร์แกนโนฟอสฟอรัสอ้างอิงจาก QuEChERS (รายละเอียดดังในข้อ 2) แต่มีการพัฒนาให้เหมาะสมกับตัวอย่างและเครื่องมือโดยมีรายละเอียด ดังนี้

1.1 วิธีวิเคราะห์

1.1.1 การเก็บและรักษาตัวอย่าง

เก็บตัวอย่างด้วยอุปกรณ์ที่กันแสง ควรเก็บรักษาตัวอย่างโดยการแช่เย็นที่อุณหภูมิ 4 °C เก็บในที่มืด

1.1.2 การเตรียมตัวอย่าง

ตวงน้ำตัวอย่างปริมาตร 10 ml เติมสารละลายนะเชิโตไนโตรล์(acetonitrile) ผสมกรดอะซิติก (acetic acid) ร้อยละ 0.1 10 ml ลงในตัวอย่างข้างต้นแล้วทำการเขย่าให้เข้ากัน จากนั้นเติมสารโซเดียมคลอไรด์ 1 g แมกนีเซียมชัลเฟต-7-ไฮเดรต 4 g เขย่าให้เข้ากัน นำไปบีบให้วาย ที่ความเร็ว 5,000 rpm เป็นเวลา 5 นาที เก็บตัวอย่างที่ผ่านการสกัด 1 ml เติมสารดูดซับของแข็ง SPE เขย่าให้เข้ากันจากนั้นบีบให้วาย ที่ความเร็ว 13,000 rpm เก็บตัวอย่าง 0.5 ml นำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟ (Gas Chromatography-Mass spectrometry, GCMS) วิธีการสกัดเป็นไปตามวิธี QuEChERS ประสิทธิภาพการสกัดร้อยละ 80

1.1.3 การวิเคราะห์ตัวอย่าง

วิเคราะห์ด้วยเครื่องจีซีซีมีอุปกรณ์ตรวจจับแบบแมสซีเล็กทีฟ (mass selective detector) (รุ่น 6890N, Agilent Technologies, สหรัฐอเมริกา) โดยเครื่องจีซีที่ใช้มีคอลัมน์โครมา

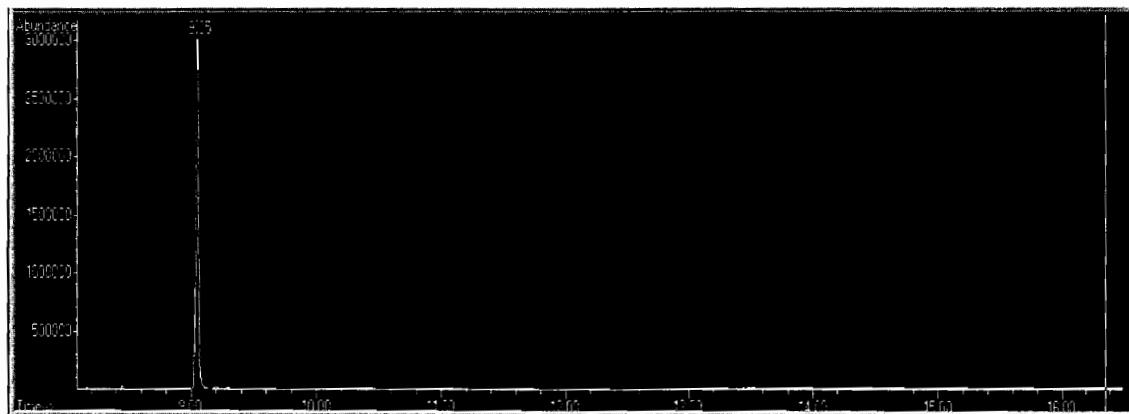
โทรกราฟชนิด DB-5 ขนาด 30 m × 0.25 mm และความหนาแผ่นฟิล์ม (film thickness) 0.25 µm ระบบฉีดตัวอย่างแบบสปลิทเลส (splitless mode) ตั้งค่าอุณหภูมิระบบฉีดตัวอย่าง (injection temperature) ที่ 250 องศาเซลเซียส ปริมาตรตัวอย่างที่ฉีดแต่ละครั้ง (injection volume) เท่ากับ 1.0 ไมโครลิตร ตั้งค่าอุณหภูมิที่เตาอบ (oven temperature) เริ่มต้นที่ 90 องศาเซลเซียส อัตราการเพิ่มขึ้นของอุณหภูมิเป็นดังโปรแกรมอุณหภูมิที่เพิ่มขึ้น (temperature gradient program) ที่แสดงในตารางที่ ก6-1 การวิเคราะห์ใช้แก๊สซีเลียมเป็นแก๊สนำพา (carrier gas) ปรับอัตราการไหลที่ 2.0 ไมโครลิตรต่อนาที สารออกที่ 9.07 นาที

ตารางที่ ก6-1 โปรแกรมอุณหภูมิที่ใช้เคราะห์สารออร์แกนโนฟอสฟอรัส

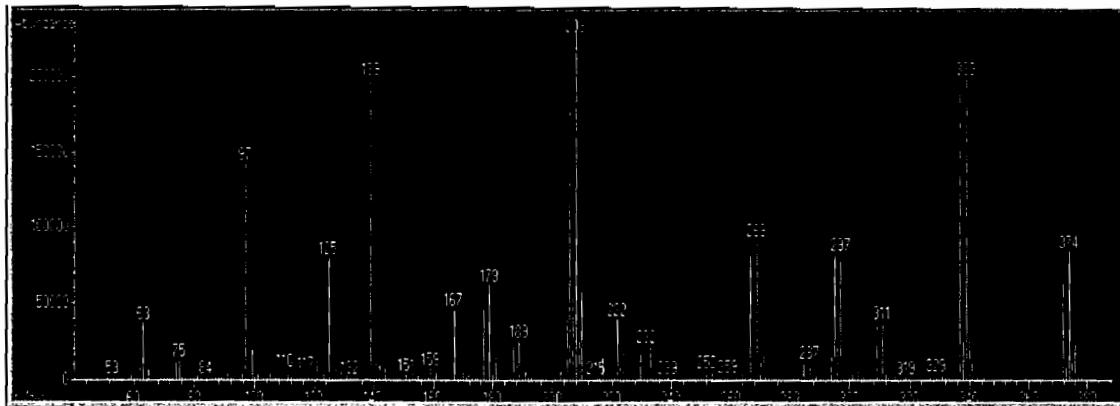
ลำดับที่	ขั้นตอน	อัตราการเพิ่มขึ้นของ อุณหภูมิ ($^{\circ}\text{C}/\text{min}$)	อุณหภูมิสุดท้าย ($^{\circ}\text{C}$)	ระยะเวลา (Hold) (min)
1	เริ่มต้น	-	90	0.00
2	การเพิ่มครั้งที่ 1	20	220	1.00
3	การเพิ่มครั้งที่ 2	10	280	3.00
4	หลังการเพิ่ม	-	300	3.50
รวม				20

1.1.4 โครมาโตแกรมสารมาตรฐานกลุ่มออร์แกนโนฟอสฟอรัส

ผลจากการวิเคราะห์สารมาตรฐานสามารถแสดงในรูปแบบโครมาโตแกรมของสารโพร์ฟิโนฟอสดังภาพ ก6-1 และ ก6-2 จะพบว่าสารโพร์ฟิโนฟอสปรากฏ ณ เวลา 9.05 นาที



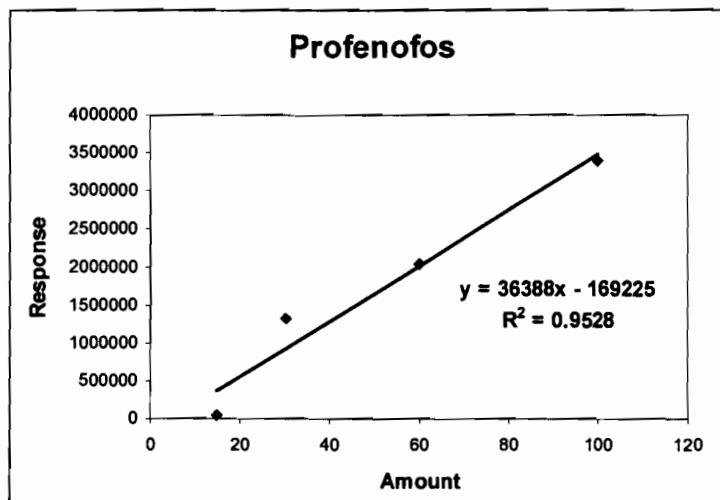
ภาพที่ ก6-1 ลักษณะโครมาโตแกรมของสารโพร์ฟิโนฟอส



ภาพที่ ก6-2 ไออุ่นแมสของสารโพร์ฟิโนฟอล

1.2 การทำกราฟมาตรฐาน

เตรียมสารละลายมาตรฐานที่มีส่วนผสมของสารกำจัดแมลงที่เราต้องการวิเคราะห์ดังเช่นในงานวิจัยนี้ใช้สารโพร์ฟินฟอスマตฐาน (ของบริษัท Restek Catalog 560935 ความเข้มข้น 100 $\mu\text{g/mL}$ ละลายใน Ethyl Acetate) การเตรียมชุดความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานกระทำโดยการนำสารโพร์ฟินฟอスマตฐานละลายในอะซิโตนไตรล์จำนวน 4 ความเข้มข้น นำไปวิเคราะห์ปริมาณความเข้มข้นสารด้วยเครื่อง GC-MS และนำผลการวิเคราะห์มาสร้างกราฟมาตรฐานความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารโพร์ฟินฟอสและพื้นที่ได้กราฟ จะได้กราฟมาตรฐานของสารโพร์ฟินฟอสลักษณะดังภาพที่ ก 6-3



ภาพที่ ก6-3 ลักษณะกราฟมาตราฐานสารไฟโนฟอส

1.3 การควบคุมคุณภาพในขั้นตอนการตรวจวิเคราะห์

การควบคุมคุณภาพในขั้นตอนการตรวจวิเคราะห์สามารถทำได้โดยการวิเคราะห์ตัวอย่างในช่วงความเข้มข้นที่อยู่ในช่วงจำกัดการวิเคราะห์ปริมาณ (Limit of Quantitation; LOQ) โดยมีค่าเท่ากับ 2 mg/l สำหรับสารโพรฟีโนฟอส โดยในการทำการฟมาตรฐานต้องมีค่า R^2 มากกว่า 0.95 นอกจากนี้ยังได้มีการตรวจสอบประสิทธิภาพขั้นตอนการสกัด โดยการเตรียมน้ำตัวอย่างที่มีความเข้มข้นของสารโพรฟีโนฟอส 20 ส่วนในล้านส่วน ทำการสกัดตามวิธี QuEChERS จากนั้นนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟ (Gas Chromatography-Mass spectrometry, GCMS) วัดความเข้มข้นของสารโพรฟีโนฟอสได้ 17 - 22 ส่วนในล้านส่วน จากผลดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าขั้นตอนการสกัดมีประสิทธิภาพกว่าร้อยละ 80

2. วิธีวิเคราะห์สารกำจัดแมลงออร์แกนโนฟอสฟอรัสตามวิธี QuEChERS

วิธีวิเคราะห์สารกำจัดแมลงออร์แกนโนฟอสฟอรัสตามวิธี QuEChERS มีวิธีการดังนี้

QuEChERS - Mini-Multiresidue Method for the Analysis of Pesticides

Page 1 of 12

QuEChERS**A Mini-Multiresidue Method for the Analysis of
Pesticide Residues in Low-Fat Products****1. Aim and Scope**

This manuscript describes a method for the analysis of pesticide residues in produce with a low fat content, such as fruits, vegetables, cereals as well as processed products including dried fruit.

2. Short Description

The homogeneous and representative subsample is extracted in frozen condition with the help of acetonitrile. After addition of magnesium sulfate, sodium chloride and buffering citrate salts (pH 5-5.5), the mixture is shaken intensively and centrifuged for phase separation. An aliquot of the organic phase is cleaned-up by dispersive SPE employing bulk sorbents (e.g. PSA, GCB) as well as MgSO₄ for the removal of residual water. PSA treated extracts are acidified by adding a small amount of formic acid, to improve the storage stability of certain base-sensitive pesticides. The final extract can be directly employed for GC- and LC-based determinative analysis. Quantification is performed using an internal standard, which is added to the extract after the initial addition of acetonitrile. Samples with a low water content (<80%) require the addition of water before the initial extraction to get a total of ca. 10 mL water. When dealing with samples containing <25% water (e.g. cereals, dried fruit, honey, spices) the size of the analytical sample may have to be reduced (e.g. 1-5 g) depending on the load of matrix-co-extractives expected in the final extracts. A brief overview of the method is shown in the flowchart at the end of this document.

QuEChERS - Mini-Multiresidue Method for the Analysis of Pesticides

Page 2 of 12

3. Devices and Consumables

- Sample processing equipment: e.g. Stephan UM 5 universal
- Automatic pipettes (e.g. for 10-10 μ L, 200-1000 μ L and 1-10 mL)
- 50 mL Teflon® centrifuge tubes with screw caps (e.g. Oak-ridge from Nalgene 3114-0050) or disposable 50 mL centrifuge tubes (e.g. 114x28 mm, PP, Sarstedt article-no. 62.548.004)
- 10 mL PP-single use centrifuge tubes with screw caps (e.g. greiner bio one article-no. 163270 or Simport/Canada, catalogue no. T550-10AT)
- 10 mL solvent-dispenser for acetonitrile
- Centrifuges for 50 mL and 10 mL centrifuge tubes
- Powder funnels, to fit for the centrifuge tubes
- 1.5 mL vials for GC-autosampler
- plastic cups (stackable) for the storage of the pre-weighed salt mixture (e.g. flame photometer cups 25 mL art. no. 10-00172 from a) GML-Alfaplast (>1000 pieces) or from b) JURO-LABS, D-91239 Henfenfeld (> 100 pieces)
- Sample divider, to automatically portion the salts (e.g. from Retsch/Haan, PT 100 or Fritsch/Idar-Oberstein, Laborette 27). The solids needed for „dispersive SPE“ can be portionated using for example the "Repro" high precision sample divider from "Bürkle" using the 10 mL PP tubes from Simport:

4. Chemicals

- Acetonitrile, pesticide residue grade
- NaCl p.a.
- Disodium hydrogencitrate sesquihydrate (e.g. Aldrich 359084 or Fluka 71635)
- Trisodium citrate dihydrate (e.g. Sigma S4641 or Riedel-de Haen 32320)
- Sodium hydroxide p.a., whereof a 5N-solution (0.2 g/1 mL water) is prepared
- Bondesil-PSA 40 μ m (Varian article no. 12213023/10 g or 12213024/100 g)
- GCB-sorbent, (e.g. Supelco, Supelclean Envi-Carb SPE bulk packing, article no. 57210U). Alternatively isolate material from packed cartridges
- Magnesium sulphate anhydrous coarsely grained (e.g. FLUKA 63135)
- Magnesium sulphate anhydrous fine powder (e.g. MERCK 1.06067)
Note: Phthalates can be removed in a muffle furnace by heating to 550 °C (e.g. overnight)
- Formic acid conc. (>95%ig), prepare a 5 % solution (vol/vol) in acetonitrile
- Pesticide Standards e. g. from Riedel de Haen, Dr. Ehrenstorfer, promocore
- Internal and quality control (QC) standards see Table 1

QuEChERS - Mini-Multiresidue Method for the Analysis of Pesticides

Page 3 of 12

Table 1: Potential internal standards (ISTDs) or quality control (QC) standards.

Name of the compound	Log P (octanol-water)	Chlorine atoms	Exemplary conc. [µg/mL] ¹	GC				LC			
				ECD	NPD	MSD	MSD	MB/MS	MS/MS		
				B1 (+)	C1 (-)	ESI (+)	ESI (-)				
Potential Internal Standards											
PCB 8	5.09	2	50	+++	-	++	+++	-	-	-	-
PCB 18	5.55	3	50	+++	-	++	+++	-	-	-	-
PCB 28	5.62	3	50	+++	-	++	+++	-	-	-	-
PCB 52	6.09	4	50	+++	-	++	+++	-	-	-	-
Triphenyl phosphate	4.59	-	20	-	+++	+++	-	+++	-	-	-
Tris-(1,3-Dichloropropyl)-phosphate	3.65	6	50	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+	
Triphenylmethane	5.37	-	10	-	-	+++	-	-	-	-	-
Bis-nitrophenyl urea (Nicarbazin)	3.76	-	10	-	-	-	-	-	-	+++	
Potential Quality Control Standards											
PCB 138	6.83	6	50	+++	-	++	+++	-	-	-	-
PCB 153	7.75	6	50	+++	-	++	+++	-	-	-	-
Anthracene (or its d10 analogue)	4.65	-	100	-	-	++	-	-	-	-	-

¹concentrations exemplary, use acetonitrile as solvent**Annotations 1:**

The use of **more than one** internal and quality control standards is recommended to enable recognition of errors due to mispipetting or discrimination during partitioning or cleanup.

In this method the internal standard (ISTD) is employed at an early stage of the analytical procedure (comparable to a surrogate standard). To avoid overestimations of results it is important that the compound used as ISTD does not experience any significant losses during the procedure (e.g. higher than 5%). When analyzing fruit and vegetable samples this criterion is generally met by all compounds listed in the table above.

In the case of samples with higher fat content, however, the situation is different. Since the solubility of fat in the acetonitrile layer is very limited, excessive sample fat will form an additional layer into which analytes may partition and get lost. The extent of losses depends on the amount of lipids in the sample as well as on the polarity of the analytes with the most non-polar ones showing the highest losses. In the presence of elevated fat amounts (e.g. > 0,3 g fat/ 10 mL acetonitrile) it is thus recommended to employ the internal standard at the end of the procedure (to an aliquot of the final extract) assuming the volume of the organic phase as being exactly 10 mL. It should be furthermore noted that the recoveries of pesticides having very low polarity (e.g. hexachlorobenzene and DDT) will drop below 70% at fat contents greater than 0,5 g/ 10 mL acetonitrile. PCB 138 or 153 may be used as **surrogate QC standards** to indicate or rule out any significant losses of pesticides. As long as one of those two compounds shows recovered greater than 70% it is to be expected that this will also be the case even for the most non-polar pesticides.

QuEChERS - Mini-Multiresidue Method for the Analysis of Pesticides

Page 4 of 12

Losses of certain compounds (of low polarity and planar structure) may also occur during „Dispersive SPE“ when employing GCB sorbent for chlorophyll rich samples (see 6.3). Some of the potential ISTDs listed above may also be affected. This can be avoided by employing the ISTD at the end of the procedure, assuming the volume of the organic phase as being exactly 10 ml. Anthracene, which shows a very strong affinity towards GCB may be used as surrogate QC standard. Anthracene recoveries greater than 70% will indicate that no unacceptable losses of pesticides with very high affinity towards GCB (such as hexachlorobenzene, chlorothalonil, thiabendazole) have occurred.

For the preparation of calibration solutions a dilution of the ISTD solutions is necessary according to the amount of extract used (see 6.3).

5. Safety annotations

When using dry ice, solvents, solids and standards the corresponding safety direction sheets and the safety information on the vessels have to be taken into account.

6. Procedure

6.1. Sample processing

Subsampling of the laboratory samples is performed following the existing regulations, directives or guidelines. In the case of fruits and vegetables, cryogenic milling (e.g. using dry ice) is highly recommended to increase homogeneity and thus reduce sub-sampling variation and to reduce the size of the sample particles and thus assist the extraction of residues. Cutting the samples coarsely (e.g. 3x3 cm) with a knife and putting them into the freezer (e.g. -18°C overnight) prior to cryogenic milling reduces the amount of dry ice required and facilitates processing.

QuEChERS - Mini-Multiresidue Method for the Analysis of Pesticides

Page 5 of 12

Annotations 2:

- Generally, comminution at room temperature may lead to major losses for several sensitive pesticides but also result in an insufficient degree of comminution thus impeding the extractability of residues enclosed in remaining particles. Furthermore, the degree of homogeneity achieved is generally not as good as in cryogenic processing leading to greater sub-sampling variations. If the necessary degree of comminution cannot be achieved with the means available in the laboratory, the use of larger sample amounts for analysis (scaling up) and/or the use of Ultra-Turrax during the first extraction step may help to overcome these problems (see below).
- Samples with a water content between 25 und 80 % (e.g. bananas) require the addition of water to achieve a total of 10 g water (when 10 g sample is employed). Products with a water content < 25 % (e.g. flour, dried fruits, honey, spices), the sample amount may have to be reduced and water has to be added as shown in the table below. The added water should be at a low temperature (e.g. <4°C) to compensates the heat development caused by the addition of the salts.
Homogenous samples (e.g. flower) can be weighed directly into the extraction tube followed by the addition of the necessary amount of water. To avoid a degradation of sensitive pesticides, the temperature during the extraction should be kept as low as possible. When dealing with inhomogeneous samples which are difficult to comminute (e.g. dried fruits) water can be added before processing to assist comminution. In this case a larger amount of the produce (e.g. 500 g) is weighed and the appropriate amount of water is added (for dried fruits for example 750 g). The mixture is then comminuted (preferably with the help of dry ice). Cold water should be used here as well, to reduce the required amount of dry ice. An aliquot of the resulting homogenate is used for further sample preparation as described below.

Table 2: Water addition for several sample types

Sample type	Weigh	Water	Annotation
Cereals	5 g	10 g	
Dried fruits	5 g	7.5 g	Water can be added during comminution step. 12.5 g homogenate is used for analysis
Fruits and vegetables > 80 % water content	10 g	-	
Fruits and vegetables 25-80 % water content	10 g	X g	X = 10 g – water amount in 10 g sample
Honey	5 g	10 g	
Spices	2 g	10 g	

QuEChERS - Mini-Multiresidue Method for the Analysis of Pesticides

Page 6 of 12

6.2. Extraction/Partitioning

10.0 g \pm 0.1 g of the comminuted homogenous and frozen sample are weighed into a 50 mL centrifuge tube, 10 mL acetonitrile and the ISTD solution (e.g. 100 μ L of an ISTD-mixture, containing one or several of the compounds listed in table 1 in the concentrations given) are added and the tube is closed and shaken vigorously by hand for 1 minute.

Annotations 3:

- If the sample's degree of comminution is insufficient, the extraction can be assisted by a disperser (e.g. Ultra-Turrax). The dispersing element is immersed into the sample/acetonitrile mixture and comminution is performed for about 2 min. at high speed. If the ISTD solution has been already added, no rinsing of the dispersing element is necessary. Nevertheless, the blender has still to be cleaned thoroughly before being used for the next sample to avoid cross-contamination. When using the disposable 50 mL centrifuge tubes (see devices and consumables) the common 19 mm dispersing elements can be used. The Teflon tubes however have smaller openings requiring dispensing elements of smaller diameters (e.g. 10 mm).
- The described extraction step is scalable as desired, as long as the amounts of solvent and salts used remain in the same proportion (see below). It should be kept in mind, however, that the smaller the amount of sample employed the higher the sub-sampling variability will be. During validation each laboratory should investigate the typical sub-sampling variabilities achieved when employing the available comminution devices, using representative samples containing incurred residues.
- For recovery studies e.g. 10 g sample is fortified using 100 μ L of a pesticide solution in acetonitrile or acetone. A short vibration using a Vortex mixer may help to disperse solvent and pesticides well throughout the sample. Fortification using larger volumes of standard solution (e.g. > 500 μ L) should be avoided. If this is not possible, a volume compensation should be performed in the blank samples used to prepare matrix matched calibration solutions, to avoid differences in the matrix concentration of the final extract.
- Blank extracts for the preparation of calibration solutions: The use of matrix matched calibration solutions is necessary to minimize errors associated with matrix induced enhancement or suppression effects during GC- and LC-determination. The blank matrix should be similar to the matrix of the samples to be analyzed and should not contain any detectable residues of the analytes of interest. The blank sample is treated the same way as any other sample, but no ISTD is added during extraction and cleanup. (The preparation of calibration solutions is described below.)

QuEChERS - Mini-Multiresidue Method for the Analysis of Pesticides

Page 7 of 12

After that add a mixture of:

- 4 g ± 0.2 g Magnesium sulphate anhydrous,
- 1 g ± 0.05 g Sodium chloride,
- 1 g ± 0.05 g Trisodium citrate dihydrate and
- 0.5 g ± 0.03 g Disodium hydrogencitrate sesquihydrate

It's easier to prepare the necessary number of portions of salts before starting the extraction procedure. The tube is closed and immediately shaken vigorously by hand for 1 minute (see annotations on how to prevent the formation of lumps) and centrifuged (e.g. 5 min. 3000 U/min).

Pesticides with acidic groups (e.g. phenoxyalcanoic acids) interact with amino-sorbents such as PSA. Thus, if such pesticides are within the scope of analysis, their determinative analysis (preferably via LC-MS/MS neg.) should be performed directly from the raw extract after centrifugation but prior to cleanup. For this, an aliquot of the raw extract is filled into a vial (e.g. 200 µL into a vial with micro-inlay).

Annotations 4:

- The preparation of the salt mixtures can be extremely facilitated using a sample divider (see 3. Devices and Consumables). As an alternative the use of portioning spoons is helpful, although not as precise as the divider.
- By adding the citrate buffering salts most samples obtain pH-values between 5 and 5.5. This pH range is a compromise, at which both, the quantitative extraction of sour herbicides and the protection of alkali labile (e.g. captan, folpet, tolyfluanid) and acid labile (e.g. pymetrozine, dioxacarb) compounds is sufficiently achieved. For acid rich samples (with pH<3) the pH-value achieved after the addition of buffering salt is normally below 5. To protect acid labile compounds the pH-value can be elevated by adding 5N NaOH: for lemons, limes and currants 600 µL, for raspberry 200µL NaOH solution is needed.
- In the presence of water, magnesium sulphate tends to form lumps, which can harden rapidly. This can be avoided, if immediately after the addition of the salt mixture the centrifuge tube is shaken vigorously for a few seconds. The 1 minute extraction of the entire batch can be performed in parallel after the salts have been added to all the samples.

QuEChERS - Mini-Multiresidue Method for the Analysis of Pesticides

Page 8 of 12

6.3. Dispersive SPE:

An aliquot of the extract is transferred into a PP-single use centrifugation tube which contains 25 mg PSA and 150 mg magnesium sulphate per mL extract (e.g.: for 8 mL extract 200 mg PSA and 1.2 g magnesium sulphate are needed). The tube is shaken vigorously for 30 s and centrifuged (e.g. for 5 min. 3000 U/min).

Annotations 5:

- Co-extracted fat and waxes may negatively affect the ruggedness of the GC analysis. The co-extracted fats or waxes can be separated from the extracts to a large extent by putting them in the freezer (more than 1 hour, e.g. overnight). Both is possible, freezing out of the raw extract or the final extract after cleanup and acidification. After a short centrifugation, the required amount of the still cold extract is withdrawn. This procedure is for example applicable for cereals and citrus fruits treated with waxes. It has been shown that pesticides and the proposed Internal and QC standards are not affected by this step.
Fats can be also effectively removed using C18 or C8 silica based reversed-phase sorbents (25 or 50 mg/mL extract respectively) together with PSA and magnesium sulfate in the dispersive SPE step.
- For samples, with a high content of carotinoides (e.g. red sweet pepper, carrots) or chlorophyll (e.g. spinach, lamb's lettuce, rucola, curly kale, wine leaves und Lactuca varieties except iceberg lettuce), dispersive SPE is performed using a combination of PSA and GCB (Graphitized Carbon Black). The cleanup time (shaking) is extended from 30 s to 2 min. It has to be taken into account, that some planar pesticides have a great affinity to the planar structure of GCB. But recovery studies showed, that no noteworthy losses occur, if the extract after dispersive SPE with GCB still maintains some visible amount of chlorophyll or carotinoides. The following amounts of GCB/mL extract can be used (exemplary): a) 2.5 mg for carrots, romana lettuce, head lettuce and the like, or b) 7.5 mg for red sweet pepper, spinach, lamb's lettuce, rucola and the like. Please refer to "Annotations 1" for information as regards the use of internal and QC standards.
- To simplify the procedure it is helpful to prepare a pre-mixture of pulverized (i) MgSO₄ and GCB (MgSO₄ to GCB: 60:1 in case a) and 20:1 in case b]). The amount of the magnesium sulphate/GCB mixture and PSA to be employed will depend on the volume of raw extract (e.g. 1 mL spinach extract will require 157.5 ≈ 160 mg of the 20:1 mixture and 25 mg PSA).

After centrifugation the cleaned extract is transferred into a screw cap vial and pH is quickly adjusted to ca. 5 by adding a 5 % formic acid solution in acetonitrile (vol/vol) (pro mL extract ca. 10 µL).

Michelangelo Anastassiades, CVUA Stuttgart

QuEChERS - Mini-Multiresidue Method for the Analysis of Pesticides

Page 9 of 12

The pH-adjusted extract is filled into vials for gas- and liquid chromatography and is used for further analysis.

Annotations 6:

- Following contact with PSA the pH of the extracts increases reaching measured values of above 8, thus compromising the stability of base sensitive pesticides (e.g. captan, folpet, dichlofuanid, tolyfluanid, pyridate, methiocarb sulfon, chlorothalonil). If the extracts are acidified quickly to pH 5 the degradation of such compounds is reduced significantly so that storage over several days is possible. At this pH acid-labile pesticides (e.g. pymetrozine, dioxacarb, thiocarb) are also sufficiently stable over several days. Only some very sensitive sulfonyl urea herbicides, carbosulfan and benfuracarb aren't protected sufficiently at pH 5. However, these compounds are stable at the pH of the non-acidified extract (after dispersive SPE) over several days. If these compounds are within the scope of analysis an aliquot of the non-acidified extract is used for measurement. If the measurement can be performed quickly, the extract at pH 5 can be used as well. Carbosulfan and benfuracarb (both having individual MRLs) are degraded to carbofuran within the samples as well as in the extracts at pH 5. Thus, merely if carbofuran is present in the acidified extract an additional run of the alkaline aliquot is needed. Normally no residues of sulfonyl ureas are to be expected, because the compounds are very instable and very low doses are used to achieve a sufficient impact in agriculture.
- The final extract has a concentration of ca. 1 g/mL. If GC systems with normal split/splitless injectors are used (injection vol. 1 µL) the limits of detection and determination achieved are in many cases not low enough. The use of GC-inlets that allow injection of larger volumes (23 µL) and offer the possibility of solvent venting (e.g. PTV = Programmed Temperature Vaporizer) are thus highly recommended. The solvent venting protects NPD detectors which can be additionally protected by delaying the hydrogen flow into the NPD during the first minutes of a run.
- If large volume injection cannot be performed and the desired detection limits of the compounds of interest cannot be achieved, the concentration of the extracts and, if necessary, a solvent exchange may be considered. If GC/MSD is employed a concentration of the extracts by a factor of four should be sufficient. To achieve this e.g. 4 mL of the acidified extract (pH 5) are transferred into a test tube and reduced to ca. 1 mL at 40 °C using a slight nitrogen flow. Solvent exchange is an option if GC performance using acetonitrile is not satisfactory or if NPD is employed (without PTV-injector). For this, an extract aliquot is evaporated to almost dryness at 40 °C using a slight nitrogen flow (some droplets of a keeper e.g. dodecane can help to reduce losses of the most volatile compounds) and resolved in 1 mL of an appropriate solvent. The blank extract (needed for the preparation of calibration solutions) should be treated the same way.

QuEChERS - Mini-Multiresidue Method for the Analysis of Pesticides

Page 10 of 12

6.4. Preparation of calibration solutions

To prepare calibration solutions a blank matrix containing no detectable residues of the analytes of interest is necessary. The blank is treated as any other sample, but no ISTD is added. To compensate matrix induced effects during chromatography to a large extent, it is best to choose a matrix of the same sample type (e.g. apple for apple samples, carrots for carrot samples and so on).

An aliquot of the blank extract is fortified with the desired amount of a pesticide or a pesticide mixture and a known amount of ISTD solution is added at approximately the same concentration as in the sample extracts. Pipetting ISTD solution in the very same way as in the sample preparation (same pipette, same volume) will help to minimize systematic errors. This means that a dilution of the ISTD is necessary. For example 1 mL of the blank extract is fortified with 1/10 of the amount of ISTD added to the samples. To reduce matrix induced effects during GC, sample and calibration solutions should have the same concentration of co-extracted matrix components. To ensure this a volume compensation may be necessary. In the case of MRL violations the quantifications is performed as described in 6.5.

6.5. Calibration following the procedure of standard additions

In case of suspected violative residues, or for compounds which are known to cause severe problems during GC (e.g. strong matrix induced effects), the procedure of standard addition is performed for quantification, where several aliquots of the extract are fortified with increasing amounts of the analyte of interest. This procedure requires a knowledge of the approximate concentration of the analyte in question in the sample.

The standard solutions should be miscible with the sample extract solution. Also, all vials should have the same end volume and the same solvent composition.

Pipette scheme 1:

Additions	Vial 1	Vial 2	Vial 3	Vial 4
Sample extract	1000 µL (1 g sample)			
ISTD	Already included	Already included	Already included	Already included
Thiabendazole standard solution, (2 µg/mL)	-	100 µL (0.4 µg)	200 µL (0.8 µg)	300 µL (1.2 µg)
Solvent	300 µL	200 µL	100 µL	-
Final volume	1300 µL	1300 µL	1300 µL	1300 µL

(exemplary for an expected thiabendazole concentration of 0.8 mg/kg – or 0.8 µg thiabendazole/1 g sample)

QuEChERS - Mini-Multiresidue Method for the Analysis of Pesticides

Page 11 of 12

The analyte concentration in the sample is calculated using the area proportions analyte to ISTD as shown in Fig. 1 by calculating the linear regression. It is important to check that the generated standard addition curve is linear since any curvature can influence the slope and thus the result.

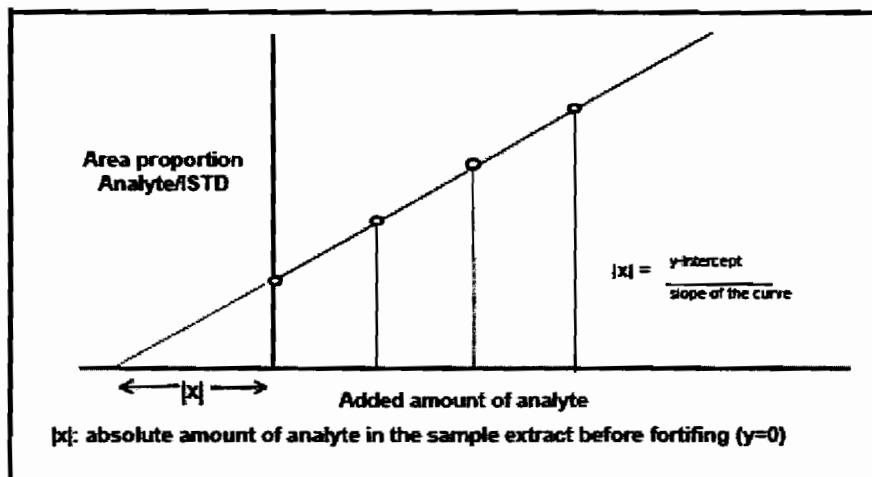


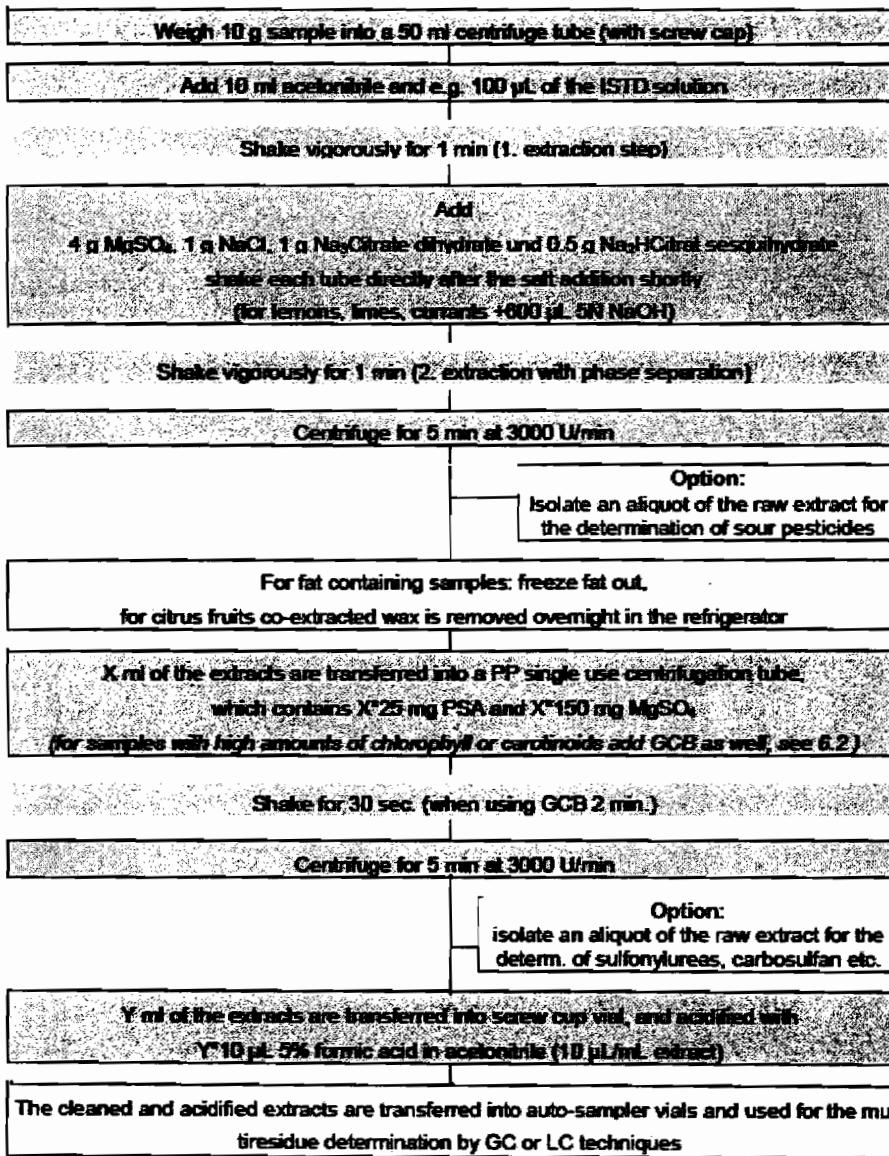
Fig. 1: Internal calibration using the procedure of standard additions, schematically

7. Reference

M. Anastassiades, S. J. Lehotay, D. Stajnbaher, F. J. Schenck
Fast and Easy Multiresidue Method Employing Acetonitrile Extraction/Partitioning and
"Dispersive Solid-Phase Extraction" for the Determination of Pesticide Residues in
Produce, J. AOAC Int., 86 (2003) 412-431

QuEChERS - Mini-Multiresidue Method for the Analysis of Pesticides

Page 12 of 12

8. Procedure schematical (for 10 g sample)

ภาคผนวก ข
ข้อมูลผลการทดสอบ

ตารางที่ ข.1 ผลการศึกษาการเจริญเติบโตของกลุ่มจุลินทรีย์ที่ย่อยสลายสารโพเรฟโนฟอส

เวลา (วัน)	จำนวนเซลล์จุลินทรีย์ (CFU/mL)		
	ชุดทดลองที่ 1	ชุดทดลองที่ 2	ค่าเฉลี่ย
0	1.11×10^6	1.38×10^6	1.25×10^6
1	2.54×10^7	2.86×10^7	2.70×10^7
2	5.6×10^7	8.2×10^7	6.90×10^7
4	3.5×10^7	3.9×10^7	3.70×10^7
6	3.2×10^7	4.0×10^7	3.60×10^7
8	3.7×10^7	3.6×10^7	3.65×10^7
10	3.5×10^7	4.2×10^7	3.85×10^7
12	3.8×10^7	4.4×10^7	4.10×10^7
14	4.1×10^7	4.5×10^7	4.30×10^7

ตารางที่ ข.2 ผลการศึกษาการย่อยสลายสารโพเรฟโนฟอสโดยกลุ่มจุลินทรีย์

เวลา (วัน)	ความเข้มข้นสารโพเรฟโนฟอส					
	ชุดทดลองที่ 1		ชุดทดลองที่ 2		ค่าเฉลี่ย	
	mg/L	ร้อยละ	mg/L	ร้อยละ	mg/L	ร้อยละ
0	48.20	100.00	50.80	100.00	49.50	100.00
1	7.00	14.52	10.60	20.87	8.80	17.69
2	4.00	8.30	5.40	10.63	4.70	9.46
4	2.60	5.39	3.20	6.30	2.90	5.85
6	2.20	4.56	2.20	4.33	2.20	4.45
8	1.80	3.73	2.00	3.94	1.90	3.84
10	0.80	1.66	1.60	3.15	1.20	2.40
12	1.40	2.90	1.40	2.76	1.40	2.83
14	1.60	3.32	1.40	2.76	1.50	3.04

ตารางที่ ข.3 ผลการศึกษาการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์บริสุทธิ์ที่ย่อยสลายสารโพร์ฟีโนฟอส

เวลา (วัน)	จำนวนเซลล์จุลินทรีย์ ($\log CFU/mL$)		
	PF1	PF2	PF3
0	6.3	5.8	3.3
1	10.3	10.8	10.7
2	11.0	11.8	11.3
3	13.9	14.2	12.3
4	14.0	16.5	15.9

ตารางที่ ข.4 ผลการศึกษาการย่อยสลายสารโพร์ฟีโนฟอสโดยจุลินทรีย์บริสุทธิ์

เวลา (วัน)	ความเข้มข้นสารโพร์ฟีโนฟอส					
	PF1		PF2		PF3	
	mg/L	ร้อยละ	mg/L	ร้อยละ	mg/L	ร้อยละ
0	20.0	100.0	20.0	100.0	20.0	100.0
1	17.3	86.6	6.3	31.6	0.4	2.0
2	4.8	24.0	0.4	2.0	0.4	2.0
3	0.4	2.0	0.4	2.0	0.4	2.0
4	0.4	2.0	0.4	2.0	0.4	2.0

ตารางที่ ข.5 ผลการศึกษาการย่อยสลายสารกำจัดศัตรูพืชกลุ่มออร์แกนโนฟอสฟอรัส

จุลินทรีย์	สารกำจัดศัตรูพืชกลุ่มออร์แกนโนฟอสฟอรัส		
	สารโพร์ฟีโนฟอส	สารคลอร์ไพริฟอส	สารไดโครโนฟอส
PF1	40.95	72.50	75.00
PF2	33.16	57.14	73.91
PF3	46.74	70.37	82.14

ตารางที่ ข.6 ผลการศึกษาการเจริญเติบโตของกลุ่มจุลทรรศน์ในการย่อยสลายสารโพร์ฟินฟอส
ภายใต้สภาพที่มีแหล่งคาร์บอนร่วมต่างชนิด

เวลา (hr)	จำนวนเซลล์จุลทรรศน์ (CFU/mL)					
	กรดซัคซินิก		โซเดียมอะซิเตอท		กรูโคส	
	ชุดที่ 1	ชุดที่ 2	ชุดที่ 1	ชุดที่ 2	ชุดที่ 1	ชุดที่ 2
0	4.40E+06	8.20E+06	8.60E+06	7.00E+06	4.80E+06	4.80E+07
6	6.20E+07	5.00E+07	3.00E+07	2.20E+07	1.40E+07	1.00E+07
12	8.00E+12	6.00E+12	2.14E+14	2.10E+14	-	-
21	4.00E+13	6.00E+13	2.00E+13	8.00E+13	5.06E+16	3.78E+16
36	6.60E+16	7.40E+16	2.00E+15	4.00E+15	2.00E+16	2.20E+16
48	8.00E+16	8.00E+16	6.00E+15	6.00E+15	4.60E+18	4.60E+18

ตารางที่ ข.7 ผลการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของค่าซีโอดีในการย่อยสลายสารโพร์ฟินฟอส
ภายใต้สภาพที่มีแหล่งคาร์บอนร่วมต่างชนิด

เวลา (hr)	ค่าซีโอดี (mg/L)			
	ไม่เติมคาร์บอน (ชุดควบคุม)	กรูโคส	กรดซัคซินิก	โซเดียมอะซิเตอท
0	70	1280	1000	560
3	70	1280	1040	600
6	70	1280	1040	680
9	80	1280	960	560
12	60	1280	1080	-
15	80	1000	1080	480
21	-	1200	1040	600
27	80	1200	1200	560
36	60	840	680	360
48	80	1200	1080	640

ตารางที่ ข.8 ผลการศึกษาการย่อยสลายสารโพร์ฟีโนฟอสโดยกลุ่มจุลินทรีย์
ภายใต้สภาวะที่มีแหล่งคาร์บอนร่วมต่างชนิด

เวลา (hr)	ความเข้มข้นสารโพร์ฟีโนฟอส (mg/L)					
	กลูโคส		กรดซัคcharic		โซเดียมอะซิเตอร์	
	ชุดที่ 1	ชุดที่ 2	ชุดที่ 1	ชุดที่ 2	ชุดที่ 1	ชุดที่ 2
0	20.00	20.00	20.00	20.00	20.00	20.00
3	18.79	18.20	17.36	16.28	15.97	-
6	16.95	15.46	17.27	16.17	16.14	-
9	18.61	17.93	16.88	15.61	16.91	13.19
12	17.60	16.42	15.86	14.17	17.79	15.12
15	18.79	18.20	15.42	13.55	16.93	13.25
21	19.51	19.27	13.61	11.01	16.35	-
27	19.78	19.68	16.10	14.51	16.79	12.92
36	18.06	17.12	14.81	12.70	16.01	-
48	19.26	18.90	15.57	13.76	18.65	17.03

ตารางที่ ข.9 ผลการศึกษาการเจริญเติบโตของกลุ่มจุลินทรีย์ในการย่อยสลายสารโพร์ฟีโนฟอส
ภายใต้สภาวะที่มีแหล่งคาร์บอนร่วมต่างความเข้มข้น

เวลา (hr)	จำนวนเซลล์จุลินทรีย์ ($\log CFU/mL$) สภาวะที่มีแหล่งคาร์บอนร่วม		
	4 mg/L	40 mg/L	400 mg/L
0	5.95	5.94	5.91
6	6.74	6.51	6.77
12	13.07	12.49	12.41
21	15.55	14.77	15.11
36	16.35	16.34	16.51
48	15.95	16.11	16.20

ตารางที่ ข.10 ผลการศึกษาการย่อยสลายสารโพร์ฟีโนฟอสโดยกลุ่มจุลินทรีย์
ภายใต้สภาวะที่มีแหล่งคาร์บอนร่วมต่างความเข้มข้น

เวลา (hr)	ความเข้มข้นสารโพร์ฟีโนฟอส (mg/L) สภาวะที่มีแหล่งคาร์บอนร่วม					
	4 mg/L		40 mg/L		400 mg/L	
	ชุดที่ 1	ชุดที่ 2	ชุดที่ 1	ชุดที่ 2	ชุดที่ 1	ชุดที่ 2
0	20.00	20.00	20.00	20.00	20.00	20.00
3	16.36	14.94	11.17	9.04	19.11	17.80
6	19.27	-	13.15	10.69	7.44	7.10
9	12.26	8.60	14.37	12.05	7.37	6.12
12	8.72	5.45	7.90	5.39	4.27	-
15	10.63	7.43	12.25	-	4.68	4.28
21	13.67	11.05	11.63	9.37	5.71	4.20
27	13.18	9.43	9.75	8.21	10.18	-
36	13.99	10.20	12.50	9.31	6.27	4.40
48	8.40	7.17	5.89	4.11	4.11	-

ตารางที่ ข.11 ผลการศึกษาการเจริญเติบโตของกลุ่มจุลินทรีย์ในการย่อยสลายสารโพร์ฟีโนฟอส
ภายใต้สภาวะที่มีสารโพร์ฟีโนฟอสความเข้มข้น 40 mg/L

เวลา (hr)	จำนวนเซลล์จุลินทรีย์ (logCFU/mL) กรณีที่	
	ไม่เติมแหล่งคาร์บอนร่วม	เติมแหล่งคาร์บอนร่วม
0	6.41	6.32
6	7.17	7.31
12	11.21	10.18
21	13.68	12.30
36	16.58	13.26
48	14.94	11.36

หมายเหตุ การเติมแหล่งคาร์บอนร่วมควบคุมไว้ที่ความเข้มข้น 400 mg/L

ตารางที่ ข.12 ผลการศึกษาการเจริญเติบโตของกลุ่มจุลินทรีย์ในการย่อยสลายสารโพร์ฟีโนฟอส
ภายใต้สภาวะที่มีสารโพร์ฟีโนฟอสความเข้มข้น 80 mg/L

เวลา (hr)	จำนวนเซลล์จุลินทรีย์ (logCFU/mL) กรณีที่	
	ไม่เติมแหล่งคาร์บอนร่วม	เติมแหล่งคาร์บอนร่วม
0	6.47	6.39
6	7.18	7.96
12	13.48	12.25
21	15.29	14.80
36	14.31	15.56
48	13.89	14.67

หมายเหตุ การเติมแหล่งคาร์บอนร่วมควบคุมไว้ที่ความเข้มข้น 400 mg/L

ตารางที่ ข.13 ผลการศึกษาการเจริญเติบโตของกลุ่มจุลินทรีย์ในการย่อยสลายสารโพร์ฟีโนฟอส
ภายใต้สภาวะที่มีสารโพร์ฟีโนฟอสความเข้มข้น 120 mg/L

เวลา (hr)	จำนวนเซลล์จุลินทรีย์ (logCFU/mL) กรณีที่	
	ไม่เติมแหล่งคาร์บอนร่วม	เติมแหล่งคาร์บอนร่วม
0	6.42	6.55
6	6.98	7.56
12	10.73	13.22
21	15.23	15.16
36	13.84	14.15
48	15.16	14.39

หมายเหตุ การเติมแหล่งคาร์บอนร่วมควบคุมไว้ที่ความเข้มข้น 400 mg/L

ตารางที่ ข.14 ผลการศึกษาการย่อยสลายสารโพร์ฟีโนฟอสโดยกลุ่มจุลินทรีย์
ภายใต้สภาวะที่มีสารโพร์ฟีโนฟอสความเข้มข้น 40 mg/L

เวลา (hr)	ความเข้มข้นสารโพร์ฟีโนฟอส (mg/L) กรณีที่		
	ไม่เติมแหล่งคาร์บอนร่วม	เติมแหล่งคาร์บอนร่วม	
		ชุดที่ 1	ชุดที่ 2
0	40.00	40.00	40.00
3	22.12	26.99	34.25
6	7.50	12.25	24.67
9	9.71	7.21	25.09
12	10.96	5.30	8.01
15	11.04	4.48	7.80
21	12.78	3.28	5.46
27	3.63	3.52	6.39
36	4.81	3.76	4.89
48	4.79	4.79	40.00

หมายเหตุ การเติมแหล่งคาร์บอนร่วมควบคุมไว้ที่ความเข้มข้น 400 mg/L

ตารางที่ ข.15 ผลการศึกษาการย่อยสลายสารโพร์ฟีโนฟอสโดยกลุ่มจุลินทรีย์
ภายใต้สภาวะที่มีสารโพร์ฟีโนฟอสความเข้มข้น 80 mg/L

เวลา (hr)	ความเข้มข้นสารโพร์ฟีโนฟอส (mg/L) กรณีที่		
	ไม่เติมแหล่งคาร์บอนร่วม	เติมแหล่งคาร์บอนร่วม	
		ชุดที่ 1	ชุดที่ 2
0	80.00	80.00	80.00
3	29.78	36.73	34.30
6	48.55	44.58	71.97
9	39.27	19.42	7.39
12	33.24	21.78	8.30
15	23.29	-	-
21	22.54	-	-
27	20.49	-	-
36	24.98	-	-
48	24.25	35.40	11.95

หมายเหตุ การเติมแหล่งคาร์บอนร่วมควบคุมไว้ที่ความเข้มข้น 400 mg/L

ตารางที่ ข.16 ผลการศึกษาการย่อยสลายสารโพร์ฟิโนฟอสโดยกลุ่มจลินทรีย์
ภายใต้สภาพที่มีสารโพร์ฟิโนฟอสความเข้มข้น 120 mg/L

เวลา (hr)	ความเข้มข้นสารโพร์ฟิโนฟอส (mg/L) กรณีที่		
	ไม่เติมแหล่งคาร์บอนร่วม	เติมแหล่งคาร์บอนร่วม	
		ชุดที่ 1	ชุดที่ 2
0	120.00	120.00	120.00
3	89.32	64.41	102.75
6	67.04	48.13	74.02
9	48.45	52.75	75.27
12	30.26	32.13	24.02
15	68.40	24.76	23.41
21	52.33	20.72	16.39
27	22.95	26.67	19.16
36	23.76	11.34	14.67
48	16.52	10.94	-

หมายเหตุ การเติมแหล่งคาร์บอนร่วมควบคุมไว้ที่ความเข้มข้น 400 mg/L

ตารางที่ ข.17 ผลการศึกษาการเคลื่อนที่ของคลอไรด์และสารโพร์ฟิโนฟอสในแบบจำลองคอลัมน์

C/C ₀ ของคลอไรด์ ณ อัตราการซึมผ่าน						C/C ₀ ของโพร์ฟิโนฟอส ณ อัตราการซึมผ่าน	
PV	25 cm/d	PV	50 cm/d	PV	100 cm/d	PV	100 cm/d
0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
0.50	0.22	0.56	0.22	0.33	0.22	0.33	0.02
1.00	0.48	0.69	0.57	0.67	0.49	0.67	0.04
1.25	0.98	0.97	0.99	1.00	0.99	1.00	0.86
2.00	0.99	2.50	1.00	1.33	1.00	2.00	0.91
3.00	0.99	3.33	0.99	1.67	1.00	3.00	0.90
4.00	0.99	5.00	1.00	2.00	1.00	4.00	0.89
5.00	1.00			3.00	1.00	5.00	0.93
				4.00	1.00		
				5.00	1.00		

ตารางที่ ข.18 ผลการศึกษาสารโพร์ฟิโนฟอสคงเหลือจากแบบจำลองคอลัมน์สำหรับการทดลองที่มีความเข้มข้นโพร์ฟิโนฟอส 20 mg/L และมีปริมาณเชลล์เริ่มต้น 10^5 CFU/mL

ปริมาตรซองว่าง (PV)	สารโพร์ฟิโนฟอสคงเหลือ (mg/L) ณ อัตราการซึมผ่าน		
	25 cm/d	50 cm/d	100 cm/d
0.00	< 4	< 4	< 4
1.00	< 4	< 4	< 4
2.00	< 4	< 4	< 4
3.00	< 4	< 4	< 4
4.00	< 4	< 4	< 4
5.00	< 4	< 4	< 4

หมายเหตุ ค่าจำกัดการวิเคราะห์ (detection limit) เท่ากับ 4 mg/L

ตารางที่ ข.19 ผลการศึกษาสารโพร์ฟิโนฟอสคงเหลือจากแบบจำลองคอลัมน์สำหรับการทดลองที่มีความเข้มข้นโพร์ฟิโนฟอส 20 mg/L และมีปริมาณเชลล์เริ่มต้น 10^{15} CFU/mL

ปริมาตรซองว่าง (PV)	สารโพร์ฟิโนฟอสคงเหลือ (mg/L) ณ อัตราการซึมผ่าน		
	25 cm/d	50 cm/d	100 cm/d
0.00	< 4	< 4	< 4
1.00	< 4	< 4	< 4
2.00	< 4	< 4	< 4
3.00	< 4	< 4	< 4
4.00	< 4	< 4	< 4
5.00	< 4	< 4	< 4

หมายเหตุ ค่าจำกัดการวิเคราะห์ (detection limit) เท่ากับ 4 mg/L

ตารางที่ ข.20 ผลการศึกษาสารโพร์ฟิโนฟอสคงเหลือจากแบบจำลองคอลัมน์สำหรับการทดลองที่มีความเข้มข้นโพร์ฟิโนฟอส 40 mg/L และมีปริมาณเชลล์เริ่มต้น 10^5 CFU/mL

ปริมาตรซองว่าง (PV)	สารโพร์ฟิโนฟอสคงเหลือ (mg/L) ณ อัตราการซึมผ่าน					
	25 cm/d		50 cm/d		100 cm/d	
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2
0.00	<4	<4	<4	<4	<4	<4
1.00	7.41	9.60	4.23	4.90	30.78	36.47
2.00	<4	<4	13.20	<4	29.85	34.92
3.00	<4	<4	-	-	27.70	21.30
4.00	<4	<4	5.27	7.21	25.80	25.27
5.00	<4	<4	7.55	8.33	31.73	28.35

หมายเหตุ ค่าจำกัดการวิเคราะห์ (detection limit) เท่ากับ 4 mg/L

ตารางที่ ข.21 ผลการศึกษาสารโพร์ฟิโนฟอสคงเหลือจากแบบจำลองคอลัมน์สำหรับการทดลองที่มีความเข้มข้นโพร์ฟิโนฟอส 40 mg/L และมีปริมาณเชลล์เริ่มต้น 10^{15} CFU/mL

ปริมาตรซองว่าง (PV)	สารโพร์ฟิโนฟอสคงเหลือ (mg/L) ณ อัตราการซึมผ่าน					
	25 cm/d		50 cm/d		100 cm/d	
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2
0.00	<4	<4	<4	<4	<4	<4
1.00	<4	<4	<4	<4	<4	<4
2.00	<4	<4	<4	<4	<4	<4
3.00	<4	<4	<4	<4	<4	<4
4.00	<4	<4	<4	<4	<4	<4
5.00	<4	<4	<4	<4	<4	<4

หมายเหตุ ค่าจำกัดการวิเคราะห์ (detection limit) เท่ากับ 4 mg/L

ภาคผนวก ค
ผลงานตีพิมพ์ภายนอกให้ทุนวิจัย

Siripattanakul-Ratpukdi, S., Vangnai, A.S., Pankaew, K., Patichot, W. Biodegradation of profenofos pesticide by novel isolated cultures and their characterization. The 4th KKU International Engineering Conference 2012 (KKU-IENC 2012), Khon Kaen, Thailand, May 10-12, 2012.

ผลงานดังกล่าวได้รับรางวัล KKU-IENC 2012 Best Paper Award



The 4th KKU International Engineering Conference 2012 (KKU-IENC 2012)
 "Driving together towards ASEAN Economic Community"
 Faculty of Engineering, Khon Kaen University, Thailand, May 10-12, 2012

Biodegradation of Profenofos Pesticide by Novel Isolated Cultures and Their Characterization

Sumanasiripattanakul-Ratpukdi^{1,2*} Alisa S. Vangnai³ Kanjana Pankaew¹ Warayut Patichot¹

¹Department of Chemical Engineering, Faculty of Engineering, Ubon Ratchathani University,
 Ubon Ratchathani 34190, Thailand

*E-mail: ensumas@ubu.ac.th, jeans_sumanas@yahoo.com

²Center of Excellence for Environmental and Hazardous Waste Management,
 Ubon Ratchathani University, Ubon Ratchathani 34190, Thailand

³Department of Biochemistry, Faculty of Science, Chulalongkorn University,
 Bangkok 10330, Thailand

Abstract—This study aims to isolate and characterize a profenofos pesticide (PF)-degrading bacterial consortium and pure cultures from chilli farm soil. The work also focused on bacterial growth and profenofos degradation. The experiment was performed at the initial profenofos concentration of 20 mg/L. The result showed that the enriched consortium comprised three predominant PF-degrading strains designated PF1, PF2, and PF3. The isolates (PF1, PF2, and PF3) were characterized as *Pseudomonas plecoglossicida*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Pseudomonas aeruginosa*, respectively. For the growth and PF degradation kinetic tests, a consortium and all isolates could utilize PF as a sole carbon source with PF removal of more than 90% within 6 d. A large number of cells increased during the first two days. The bacterial growth and PF degradation rates followed the first order kinetic reaction with the rates of 0.40 to 2.68 1/d and 0.34 to 1.96 1/d, respectively. The PF utilization rates of 3.0 to 19.6 mg/L/d were determined. The results indicated that the consortium and isolates are efficient for profenofos degradation and have potential for profenofos remediation.

Keywords: degradation, insecticide, isolation, profenofos

I. INTRODUCTION

It is known that organophosphorus pesticides (OP) have been developed to replace organochlorine pesticides for agricultural purpose. The pesticides are efficient and inexpensive which result in extensive utilization [1,2]. This leads to OP contamination in either agricultural products or environmental media [1,3]. Organophosphorus pesticides do not only damage weeds and insects but also could cause inhibition of cholinesterase activity resulting in malfunction of nerve impulse transmission and toxic to invertebrates, fish, animal, and human [4,5]. Among OPs, profenofos (O-4-bromo-2-chlorophenyl O-ethyl S-propyl phosphorothioate), C₁₁H₁₃BrClO₃PS, is one of OPs broadly used in many countries (Figure 1). Profenofos (PF) is normally applied for pest control in cotton, fruit, and vegetable cultivation. Intensive use of PF leads to its accumulation in environment and contamination as

residues in foods, fruits, vegetables, and environment [5]. For example, it was found that profenofos was the highest applied pesticide for chilli cultivation in the north eastern area of Thailand. Profenofos residues in chilli soil, and farmers were also detected. As a result, there should be a technique to alleviate the problem.

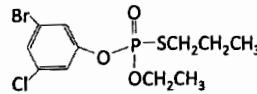


Figure 1. Profenofos

Bioremediation is one of the key attenuation processes of pesticide contamination in the environment. The technique has been successfully applied for OP remediation [2,5,6]. The technique involved the isolation of pesticide-degrading microbial cultures and the utilization of the isolated cultures for the pesticide removal later on. Thus far, there are only two publications on isolation and characterization of PF-degrading bacteria [5,7]. Three PF-degrading bacteria (*Pseudomonas putida* strain W, *Burkholderia gladioli* strain Y, and *Pseudomonas aeruginosa* strain OW) were previously isolated for China soil remediation site at PF concentration of 200 µg/g [5,7]. In the real practices, failure of bioremediation by exogenous cultures is considered because the cultures somehow do not well survive and work in different environmental media and conditions [8,9].

For successful PF bioremediation, indigenous PF-degrading cultures were enriched and isolated. Degradation kinetics of PF by an enriched consortium and novel isolated strains were conducted. The cultures were also identified and characterized. In the future, the isolated cultures could be applied for the PF-contaminated site remediation. Also, the kinetic result could be used as a basic knowledge for the future application.

II. MATERIALS AND METHODS

A. Chemicals

Commercial grade PF was used in the experiment (Profenofos 500EC, Syngenta Crop Protection Co., Bangkok, Thailand). Profenofos (analytical grade, Sigma Chemical Co., Singapore) was used for PF analysis. All other chemicals for bacterial medium preparation and PF analysis were analytical and HPLC grades from local chemical distributors.

B. Enrichment and isolation of PF-degrading cultures

Profenofos-degrading species were isolated from chilli farm soil experienced PF exposure for years (Ubon Ratchathani, Thailand). A sterile basal salts medium containing KH_2PO_4 of 3.0 g/L, NH_4Cl of 1 g/L, NaCl of 0.5 g/L, MgSO_4 of 0.25 g/L, and PF of 20 mg/L (in 10 mM of phosphate buffer solution) was utilized. Agar of 2.0% (w/v) and yeast extract of 0.1% (w/v) were added in agar medium preparation.

The culture enrichment and isolation procedures were as follows. Air-dried soil sample (20 g) from the site were mixed in the PF-containing basal salt medium (100 mL), incubated on a rotary shaker at 100 rpm and $30 \pm 2^\circ\text{C}$ for two weeks. The soil suspension (10 mL) was used as the inoculum and inoculated into the PF-containing fresh medium (100 mL). Then, the re-cultivation was conducted for 4 times consecutively. The enriched consortium was maintained for further investigation and was purified by spreading and streaking plate techniques. All plates were incubated at $30 \pm 2^\circ\text{C}$ for 14 days. Single colonies were obtained after several subcultures. The consortium and isolated cultures were then characterized.

C. Characterization of PF-degrading cultures

Colony and cell morphology of the isolated cultures were characterized. The isolates were identified by 16S ribosomal Ribonucleic acid (16S rRNA) sequence analysis. In brief, each bacterial culture was grown overnight. The genomic DNA from each culture was extracted using a standard boiling method. The 16S rRNA gene fragment was amplified from the genomic DNA by the polymerase chain reaction (PCR) using the bacterium-specific primers: a 63f-forward primer (5' CAGGCCTAACACATGCAAGTC3') and a 1387r-reverse primer (5' GGGCGGWGTGTACAAGGC3'). A 25- μl PCR reaction mixture was prepared according to the manufacturer's protocol (Fermentas, USA). The 16S rRNA amplification was performed in a thermal cycler (Perkin Elmer model-2400, USA) with the following conditions: 94°C (3 min), followed by 30 cycles of 95°C (1 min), 55°C (1 min) and 72°C (1.5 min), with a final extension of 72°C (5 min). The PCR product (ca. 1,300 bps) was then cloned into pGEM-T Easy vector (Promega, USA) and transformed into competent Escherichia coli DH5 α cells. The plasmid DNA was then isolated using the QIAprep Spin Miniprep kit (Qiagen, Netherlands) and sequenced. The partial 16S rRNA gene sequence of the isolates was analyzed using the nucleotide BLAST (BLASTN) algorithm of the National Center for Biotechnology Information (NCBI).

D. Profenofos biodegradation by PF-degrading cultures

Duplicate batch experiments of PF biodegradation by the consortium and the isolated cultures were conducted. The consortium and cultures were shaken in the 200-mL medium with the initial PF concentration of 20 mg/L on a rotary shaker at 100 rpm and $30 \pm 2^\circ\text{C}$ for 6 days. Profenofos concentration and cell number (viable plate count) measurements were performed daily. Abiotic control test (no bacterial cultures) was also performed. The bacterial growth and PF degradation kinetic rates were then calculated.

E. Profenofos and intermediate metabolite analysis

Profenofos concentration was measured using a QuEChERS extraction technique and a gas chromatograph with a mass selective detector (GC-MSD) and DB-5 column (30.0 m length, 0.25 mm i.d., 0.25 μm film thickness). The sample of 10 mL of was placed into a 50-mL disposable polypropylene centrifuge tube with 10-mL of acetonitrile and acetic acid of 0.1% mixture. The centrifuge tube was capped and shaken for 1 min. After that, NaCl of 1 g and anhydrous MgSO_4 of 4 g were added. The tube was then shaken vigorously for 1 min and centrifuged at 5,000 rpm for 5 min. The supernatant (acetonitrile extract) was transferred into a SPE tube (QuEChERS D-SPE, Agilent, USA) to clean up residue. The tube was capped and mixed in a vortex mixer for 1 min, and then centrifuged at 5,000 rpm for 3 min. The cleaned sample was transferred to a GC vial.

One-microliter of the cleaned sample was injected to the GC. The GC conditions were: splitless injection, injection port temperature of 220°C, and helium gas (carrier gas) flow of 2 $\mu\text{L}/\text{min}$. The GC temperature program was started at 90°C, increased to 220°C at a rate of 20°C/min and retained for 1 min, increased to 280°C at a rate of 10°C/min and retained for 3 min, and increased to 300°C. Profenofos peak was detected at 9.07 min. Degradation intermediate product was monitored along with PF detection.

III. RESULTS AND DISCUSSION

A. Enrichment, isolation, and characterization of PF-degrading cultures

The PF-degrading consortium (referred to as MIX hereafter) was enriched in aerobic condition at pH of 7 and temperature of 30°C. Based on the enrichment medium formulation, the consortium could utilize PF as a sole carbon source. This is similar to the previous studies which reported the OP utilization as a sole carbon source [2,5,7]. The consortium plated onto the medium agar comprised numerous types of bacterial colonies. This indicates that the soil used in this study was rich in PF-degrading cultures.

The PF-degrading cultures were then isolated from MIX. Three isolates designated PF1, PF2, and PF3 were observed morphological characteristics (Table 1 and Figure 2). All isolates were different in colony morphology. The isolates were observed by microscopic approach. It was found that the isolates were short rod with negative in gram staining.

The isolates, PF1, PF2, and PF3, were identified by 16S rRNA analysis as *Pseudomonas plecoglossicida*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Pseudomonas aeruginosa* with similarity of 100%, 98%, and 99%, respectively. Previously, *Pseudomonas aeruginosa* strain OW was isolated for PF degradation [5]. The isolate was enriched from the PF-contaminated soil in China. In this study, two more strains in the same species (*Pseudomonas aeruginosa* strain PF2 and *Pseudomonas aeruginosa* strain PF3) isolated from chilli farm soil in Thailand were proposed for PF degradation. There were prior studies reporting OP remediation by *Pseudomonas aeruginosa* strains, such as profenofos and chlorpyrifos degradations [5,10]. The result suggested that *Pseudomonas aeruginosa* might conserve OP-degrading microbial enzymes resulting widely discovered the *Pseudomonas aeruginosa* strains able to degrade OPs. For PF1, *Pseudomonas plecoglossicida* was reported pyrethroid degradability [11]. To the best of our knowledge, this is the first report on OP degradation by *Pseudomonas plecoglossicida*.

TABLE I. MORPHOLOGICAL CHARACTERISTICS OF PF-DEGRADING BACTERIA

Characteristic	Isolate		
	PF1	PF2	PF3
Colony color	Yellow	Yellow	Yellow
Colony form	Circular	Circular	Circular
Colony elevation	Raised	Raised	Raised
Colony margin	Entire	Undulate	Entire
Colony diameter (at 24 h)	2.0 mm	1.5 mm	1.0 mm
Gram staining	Negative	Negative	Negative
Cell shape	Short rod	Short rod	Short rod

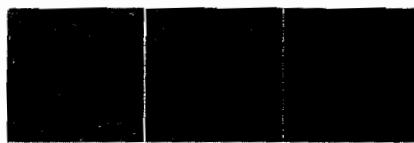


Figure 2. Colonies of PF-degrading bacteria isolated from chilli farm soil.

B. Kinetics of bacterial growth and PF degradation

The growth of MIX, PF1, PF2, and PF3 measured by viable cell counting is shown in Figure 3. The MIX consortium and the pure cultures (PF1, PF2, and PF3) provided the different results. The viable cell number of MIX grew from 7.1 to 7.6 logCFU/mL. The MIX cultures reached the stationary phase after 2 d. Cell numbers of all three isolates quickly increased more than 7 logCFU/mL within 4 d. This indicates that both consortium and isolated cultures were able to survive and reproduce in the medium containing PF but the pure isolates likely to endure in the PF-contaminated environment. Based on the growth kinetics, the pure isolates perforated 5 to 6 times higher than MIX (Table II). This may be due to the competition between the cultures in the consortium.

The reduction of PF concentration during the biodegradation test is shown in Figure 4. Similar to the

bacterial growth result, MIX and the pure isolates performed differently. In the test by MIX, the PF concentration continuously decreased in the first two days and the concentration dropped gradually thereafter. For all pure isolates, the PF concentration dramatically decreased in the first three days. After the 6-d experiment, MIX, PF1, PF2, and PF3 removed PF for 90.0%, 95.0%, 93.1%, and 95.3%, respectively (Table III). In the abiotic control test (no cell), the PF concentration remained more than 95% (data not shown). The consortium and isolates performed the PF treatment (PF utilization) at the rate of 3.0 to 19.6 mg/L/d. The pure isolates performed better than the consortium. The treatment result well correlated to the bacterial growth result. The MIX consortium grew slower resulting in lower PF treatment rate compared to those by the pure isolates. The PF degradation by all cultures followed the first-order kinetics (Table IV).

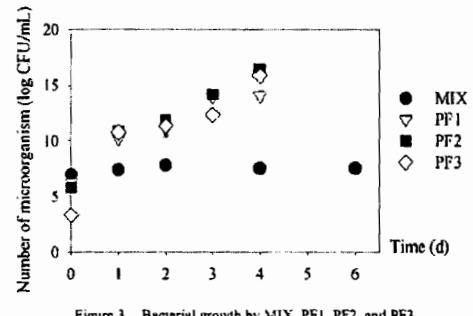


Figure 3. Bacterial growth by MIX, PF1, PF2, and PF3.

TABLE II. BACTERIAL GROWTH RATES OF PF-DEGRADING CULTURES

Culture	Growth kinetic equation*	R ²
MIX	y = 0.40x + 7.05	1.00
PF1	y = 1.91x + 7.28	0.90
PF2	y = 2.48x + 6.86	0.95
PF3	y = 2.68x + 5.36	0.85

* y = log (bacterial number)

x = time (hr)

The PF degradations by the consortium and cultures (more than 90%) were comparable to those by *Pseudomonas aeruginosa* strain OW, *Pseudomonas putida* strain W, *Burkholderia gladioli* strain Y, previously isolated [5,7]. The result indicated that the novel enriched consortium and three isolated cultures were potential for the PF bioremediation. Generally, the consortium has been shown to be more suitable for bioremediation compared to pure cultures in practice. This is because their biodiversity can enhance environmental survival and increase the number of catabolic pathways available for contaminant biodegradation [12,13]. In this case; however, the pure cultures were acclimated in the medium and

S. Siripattanakul-Raiyukdi et al. / KKU-IENC 2012, Thailand, May 10-12, 2012

no environmental stresses in the tested condition leading to better growth and performance presented by the isolated cultures. Before the real practices, the influence of environmental conditions, such as pH and temperature on PF degradation should be conducted.

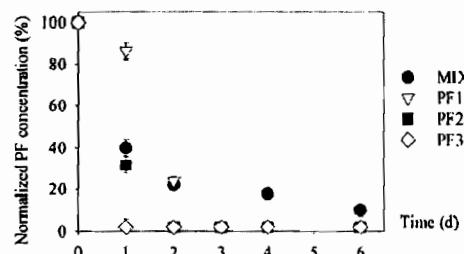


Figure 4. PF degradation by MIX, PF1, PF2, and PF3.

TABLE III. PROPENOFOS UTILIZATION RATES OF PF-DEGRADING CULTURES AND PF REMOVAL PERCENTAGE

Culture	Substrate utilization rate (mg/L/d)	PF removal (%)
MIX	3.0	90.0
PF1	7.6	95.0
PF2	9.8	93.1
PF3	19.6	95.3

TABLE IV. PROPENOFOS DEGRADATION RATES OF PF-DEGRADING CULTURES AND PF REMOVAL PERCENTAGE

Culture	PF degradation kinetic equation*	R ²
MIX	y = -0.15x + 1.12	0.87
PF1	y = -0.57x + 1.55	0.86
PF2	y = -0.85x + 1.42	0.95
PF3	y = -0.85x + 1.02	0.75

* y = log (PF concentration)

x = time (hr)

C. Detection of profenofos intermediate metabolite

During the profenofos degradation by the pure isolates and consortium, 4-bromo-2-chlorophenol (BCP) (a GC peak with m/z of 207, 281, and 73) was detected (data not shown). Similar result was also reported elsewhere [5]. The result suggested that PF was transformed via organophosphorus hydrolase enzyme, which was known as a typical bacterial enzyme for wide range of organophosphorus pesticide degradation [1]. The potential profenofos degradation pathway was proposed (Figure 5).

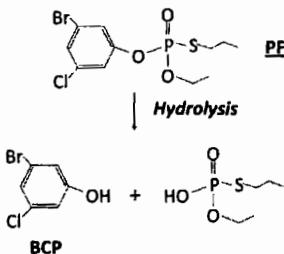


Figure 5. Potential profenofos degradation pathway.

IV. CONCLUSIONS

Novel PF-degrading consortium and three isolated cultures including *Pseudomonas plecoglossicida* strain PF1, *Pseudomonas aeruginosa* strain PF2, and *Pseudomonas aeruginosa* strain PF1 were isolated. All cultures were efficient in PF insecticide degradation (PF removal of more than 90% within 6 d). The novel cultures were promising for PF remediation. For further study, the influence of environmental conditions on PF degradation should be performed. Also, the full PF degradation pathway by the novel consortium and isolates should be conducted for insight investigation.

ACKNOWLEDGMENT

This material is based upon work supported by Ubon Ratchathani University and Office of the National Research Council of Thailand. This work is also conducted under the research cluster "Fate and Removal of Emerging Micropollutants in Environment" granted by Center of Excellence for Environmental and Hazardous Waste Management. Any opinions, findings, and conclusions or recommendations expressed in this material are those of the author and do not necessarily reflect the views of grant providers.

REFERENCES

- [1] P.P. Kanekar, B.J. Bhadbhade, N.M. Deshpande and S.S. Sameik, "Biodegradation of organophosphorus pesticides," Proc. Indian Natl. Sci. Acad., vol. B70(1), pp.57-70, 2004.
- [2] M. Cycon, M. Wojciek, Z. Piotrowska-Seget, "Biodegradation of the organophosphorus insecticide diazinon by *Serratia* sp. And *Pseudomonas* sp. And their use in bioremediation of contaminated soil," Chemosphere, vol. 76, pp.494-501, 2009.
- [3] M.G. Roveratti, "Monitoring of organochlorine and organophosphorus pesticides in the water of the Reconquista River," Water Res., vol. 35(14), pp.3457-3461, 2001.
- [4] M. Gotoh, M. Sakata, T. Endo, H. Hayashi, H. Seno, and O. Suzuki, "Profenofos metabolites in human poisoning," Forensic Sci. Int., vol.116, pp.221-226, 2001.

The 4th KKU International Engineering Conference 2012 (KKU-IENC 2012)
 "Driving together towards ASEAN Economic Community"
 Faculty of Engineering, Khon Kaen University, Thailand, May 10-12, 2012

- [5] S. Malghani and N. Chatterjee, "Isolation and characterization of a profenofos degrading bacterium," *J. Environ. Sci.*, vol. 21, pp.1591-1597, 2009.
- [6] G. Xu, W. Zheng, Y. Li, S. Wang, J. Zhang, Y. Yan, "Biodegradation of chlorpyrifos and 3, 3', 6-trichloro-2-pyridinol by a newly isolated *Paracoccus* sp. strain TRP," *Int. Biodegr. Biodegr.*, vol. 62, pp.51-56, 2008.
- [7] S. Malghani, N. Chatterjee, H.X. Yu, Z. Luo, "Isolation and identification of Profenofos degrading bacteria," *Braz. J. Microbiol.*, vol.40(4), pp.893-900, 2009.
- [8] J.K. Struthers, K. Jayachandran, and T.B. Moorman, "Biodegradation of atrazine by *Agrobacterium radiobacter* J14a and use of this strain in bioremediation of contaminated Soil," *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 64, pp.3368-3375, 1998.
- [9] S. Rousseaux, A. Hartmann, B. Lagacherie, S. Piutti, F. Andreux, and G. Soulas, "Inoculation of an atrazine-degrading strain, *Chelatobacter heinzii* Citi1, in four different soils: effects of different inoculum densities," *Chemosphere*, vol. 51, pp.569-576, 2003.
- [10] M.H. Fulckar and M. Geetha, "Bioremediation of Chlorpyrifos by *Pseudomonas aeruginosa* using scale up technique," *J. Appl. Biosci.*, vol. 12, pp. 657-660, 2008.
- [11] H. Boncha and M.H. Fulckar, "*Pseudomonas placoglossicida* as a novel organism for the bioremediation of cypermethrin," *Biol. Med.*, vol. 1 (4), pp. 1-10, 2009.
- [12] S. Alvey, and D.E. Crowley, "Survival and activity of an atrazine-mineralizing bacterial consortium in rhizosphere soil," *Environ. Sci. Technol.* vol.30, pp.1596-1603, 1996.
- [13] D.Smith, S. Alvey, and D.E. Crowley, "Cooperative catabolic pathways within an atrazine-degrading enrichment culture isolated from soil," *FEMS Microbiol. Ecol.*, vol.53, pp.265-273, 2005.

Siripattanakul-Ratpukdi, S., Vangnai, A.S. Sangthean, P., Singkibut, S. Profenofos insecticide degradation by novel microbial consortium and isolates enriched from contaminated chili farm soil. *Submitted to Environmental Science and Pollution Research*

1 **Profenofos Insecticide Degradation by Novel Microbial Consortium and Isolates**
2 **Enriched from Contaminated Chili Farm Soil**
3 Sumana Siripattanakul-Ratpukdi^{1,2*}, Alisa S. Vangnai^{2,3}, Puttaporn Sangthean⁴,
4 Sirimittakan Singkibut⁴

5 ¹Department of Environmental Engineering, Faculty of Engineering,
6 Khon Kaen University, Khon Kaen 40002, Thailand

7 ²Center of Excellence on Hazardous Substance Management (HSM), Bangkok 10330,
8 Thailand

9 ³ Department of Biochemistry, Faculty of Science, Chulalongkorn University,
10 Bangkok 10330, Thailand

11 ⁴Department of Chemical Engineering, Faculty of Engineering, Ubon Ratchathani
12 University, Ubon Ratchathani 34190, Thailand

13

14 *Corresponding author. Department of Environmental Engineering, Faculty of
15 Engineering, Khon Kaen University, 123 Mittapap Road, Muang District, Khon Kaen
16 40002, Thailand. Phone: 66-43-202572; Fax: 66-43-202571; E-mail:
17 sumana.r@kku.ac.th; jeans_sumana@yahoo.com

18

19 **Abstract**

20 Profenofos (PF) is one of the heavily used organophosphorus pesticides (OPPs) of which
21 its contamination is ubiquitous in agricultural area. This study aims to acquire and
22 characterize PF-degrading bacterial cultures from contaminated soil. OPP degradation by
23 the novel isolates was then investigated. The experiment was performed at the initial PF
24 concentration of 20 mg L⁻¹. The result showed that the enriched consortium comprised
25 three predominant PF-degrading strains designated PF1, PF2 and PF3. The isolates (PF1,
26 PF2 and PF3) were characterized as *Pseudomonas plecoglossicida*, *Pseudomonas*
27 *aeruginosa* and *Pseudomonas aeruginosa*, respectively. A consortium and all isolates
28 could utilize PF as a sole carbon source with PF removal of more than 90% via
29 hydrolysis process. The bacterial growth and PF degradation rates followed the first order
30 kinetic reaction with the rates of 0.4 to 2.7 h⁻¹ and 0.15 to 1.96 h⁻¹, respectively.
31 Additional carbon supplement deteriorated PF biodegradation. The enriched cultures
32 were also capable for degrading chlorpyrifos and dicrotophos pesticides (33-73%
33 removal). The results indicated that the consortium and isolates are efficient for PF and
34 other OPP degradation and have potential for PF remediation.

35

36 **Keywords:** biodegradation, insecticide, isolation, organophosphorus, profenofos,
37 *Pseudomonas*.

38

39

40 **Introduction**

41 Organophosphorus pesticide (OPP) has been developed for agricultural purpose for years.
42 One-third of pesticides used globally belong to OPP because they are efficient and
43 inexpensive (Kanekar et al. 2004; Singh and Walker, 2006; Cycon et al. 2009). This
44 results in OPP contamination in environmental media including soil, groundwater and
45 surface water (Roverdatti, 2001; Kanekar et al. 2004). Among pesticides under OPP,
46 profenofos (O-4-bromo-2-chlorophenyl O-ethyl S-propyl phosphorothioate),
47 C₁₁H₁₅BrClO₃PS, is one of OPPs broadly used in many countries, such as Thailand,
48 Vietnam and India (Swarnam and Velmurugan, 2013; Toan et al. 2013). Profenofos (PF)
49 is normally used for pest control in cotton, fruit, chili and vegetable cultivation. Intensive
50 use of PF leads to its contamination in environment.

51 Bioremediation is one of the effective environmental treatment technologies
52 (Simpattanakul et al. 2009). The technique has been successfully applied for OPP
53 remediation (Xu et al. 2008; Cycon et al. 2009). The technique involved enrichment of
54 pesticide-degrading microbial cultures and the utilization of the enriched cultures for
55 removing pesticide later on. So far, there are only a few publications on enrichment and
56 isolation of PF-degrading bacteria such as the enrichment of the degrading cultures
57 (Malghani and Chatterjee, 2009; Malghani et al. 2009; Salunkhe et al. 2013). Also, there
58 are limited information on PF biodegradation kinetics and potential biodegradation
59 pathway.

60 This study aimed to enrich and identify indigenous PF-degrading cultures from
61 heavily PF-contaminated soil. Degradation of PF by an enriched consortium and
62 predominant isolated strains were subsequently performed. The possibility of additional

63 carbon supplement on PF degradation was carried out. This work also determined
64 potential PF degradation pathway using detection of degradative intermediate
65 metabolites. The PF-enriched cultures could later on be applied for treatment of PF-
66 contaminated sites. The basic knowledge of the degradation kinetics and pathway could
67 be used to ensure the optimal treatment operation.

68

69 Materials and Methods

70

71 Chemicals

72 Commercial grade OPPs including Profenofos 500EC (50% W/V EC, Syngenta Crop
73 Protection Co., Bangkok, Thailand) were used in the degradation assay experiment. PF,
74 chlorpyrifos (CF) and dicrotophos (DP) (analytical standard grade, Supelco, Sigma
75 Chemical Co., Singapore) were used for OPP analysis. All other chemicals for bacterial
76 medium preparation and OPP analysis were analytical and HPLC grades, respectively
77 purchased from local chemical distributor.

78

79 Enrichment and isolation of PF-degrading cultures

80 PF-degrading bacteria were enriched from PF-contaminated chili farm soil (Ubon
81 Ratchathani, Thailand). The culture enrichment and isolation procedures were as follows.
82 Air-dried soil sample (20 g) from the site were mixed in the PF-containing basal salt
83 medium (100 mL), incubated on a rotary shaker at 100 rpm and 30 ± 2 °C for two weeks.
84 The soil suspension (10 mL) was used as the inoculum and inoculated into the PF-
85 containing fresh medium (100 mL). Then, the re-cultivation was conducted for 4 times
86 repeatedly. The enriched consortium was subcultured into the PF-containing medium for

every two weeks to obtain a stable PF-degrading consortium. The enriched consortium was purified by spreading and streaking plate techniques. All plates were incubated at 30 \pm 2 °C for 14 d. Single colonies were obtained after several streaking-plate cultivations.

Formulation of PF-containing basal salts medium included KH₂PO₄ of 3.0 g L⁻¹, NH₄Cl of 1 g L⁻¹, NaCl of 0.5 g L⁻¹, MgSO₄ of 0.25 g L⁻¹ and PF of 20 mg L⁻¹ (in 10 mM of phosphate buffer solution, pH 7.0). All chemicals except PF were sterilized by autoclave while PF were filtered sterile. Agar of 2.0% (w/v) was added in agar medium preparation.

95

96 Identification of PF-degrading isolates

Colony and cell morphology of the isolated cultures were preliminarily observed using traditional microbiological methods. The isolates were classified by 16S rRNA sequence analysis. Each bacterial culture was cultivated overnight. The genomic DNA from each culture was extracted using a standard boiling method. The 16S rRNA gene fragment was amplified from the genomic DNA by the polymerase chain reaction (PCR) using the bacterium-specific primers: a 63f-forward primer (5' CAGGCCTAACACATGCAAGTC3') and a 1387r-reverse primer (5' GGGCGGWGTGTACAAGGC3') (Marchesi *et al.* 1998). A 25- μ l PCR reaction mixture was prepared according to the manufacturer's protocol (Fermentas, USA).

The 16S rRNA amplification was performed in a thermal cycler (Perkin Elmer model-2400, USA) with the following conditions: 94°C (3 min), followed by 30 cycles of 95°C (1 min), 55°C (1 min) and 72°C (1.5 min), with a final extension of 72°C (5 min). The PRC product was then cloned into pGEM-T Easy vector (Promega, USA) and transformed into competent *Escherichia coli* DH5 α cells. The plasmid DNA was then

111 isolated using the QIAprep Spin Miniprep kit (Qiagen, Netherlands) and sequenced
112 (Macrogen, Korea). The partial 16S rRNA gene sequence of the isolates was analyzed
113 using the nucleotide BLAST (BLASTN) algorithm of the National Center for
114 Biotechnology Information (NCBI).

115

116 **PF biodegradation assay**

117 Duplicate batch experiments of PF biodegradation by the consortium and the isolated
118 cultures were conducted. The experiments with and without additional carbon supplement
119 were performed. The consortium and isolates were shaken in the 200-mL medium with
120 the initial PF concentration of 20 mg L⁻¹ on a rotary shaker at 100 rpm and 30 ± 2°C for 4
121 d. For the experiment with additional carbon sources, sodium succinate
122 ($C_4H_4O_4Na_2 \cdot 6H_2O$), sodium acetate ($C_2H_3O_2Na$) and glucose ($C_6H_{12}O_6 \cdot H_2O$) of 500 mg
123 carbon L⁻¹ were added. PF concentration and cell number (viable plate count)
124 measurements were performed daily. Abiotic control test (without bacterial cultures) was
125 also performed. The PF residual was analyzed using a gas chromatograph with a mass
126 selective detector (GC-MSD). The bacterial growth and PF degradation kinetic rates were
127 then calculated.

128 The PF biodegradation assays at PF concentrations of 20-120 mg L⁻¹ were conducted
129 to identify PF intermediates and potential PF degradation pathway. The experiment was
130 performed similar to earlier assay with different PF concentrations. The PF degradation
131 intermediate peak was monitored using GC-MSD along with PF detection.

132

133 Biodegradation assay of selected OPPs

134 Degradation assay of other selected OPPs were performed. CF and DP which were the
135 insecticides widely used in vegetable cultivation were chosen. This is because these
136 pesticides possibly co-contaminate in the same area. The isolates were inoculated in a
137 liquid medium at 20 mg L⁻¹ of the insecticides on a rotary shaker at 100 rpm and 30 ± 2
138 °C for 6 d.

139

140 PF, PF intermediate metabolite and other OPP analysis

141 PF concentration was extracted using a QuEChERS extraction technique. The sample of
142 10 mL of was placed into a 50-mL disposable polypropylene centrifuge tube with 10-mL
143 of acetonitrile and acetic acid of 0.1% mixture. The centrifuge tube was capped and
144 shaken for 1 min. After that, NaCl of 1 g and anhydrous MgSO₄ of 4 g were added. The
145 tube was then shaken vigorously for 1 min and centrifuged at 5,000 rpm for 5 min. The
146 supernatant (acetonitrile extract) was transferred into a SPE tube (QuEChERS D-SPE,
147 Agilent, USA) to clean up the residue. The tube was capped and mixed in a vortex mixer
148 for 1 min and then centrifuged at 5,000 rpm for 3 min. The cleaned sample was
149 transferred to a GC vial.

150 PF concentration was measured using a GC-MSD (Agilent 6890N, Agilent, USA)
151 with a DB-5 column (30.0 m length, 0.25 mm i.d., 0.25 µm film thickness). One-
152 microliter of the cleaned sample was injected into GC-MSD. The GC conditions were:
153 splitless injection, injection port temperature of 220°C and helium gas (carrier gas) flow
154 of 2 mL min⁻¹. The GC temperature program was started at 90°C, increased to 220°C at a
155 rate of 20°C min⁻¹ and retained for 1 min, increased to 280°C at a rate of 10°C min⁻¹ and

156 retained for 3 min and increased to 300°C. PF peak was detected at 9.07 min. Degradation
157 intermediate peak was monitored along with PF detection.

158 For CF and DP analysis, the samples were extracted using the method for PF analysis
159 as mentioned in earlier paragraph. The samples were measured using a gas
160 chromatograph (Agilent 6890N series) with a flame photometric detector and a DB-
161 1701 column (30.0 m length, 0.25 mm i.d., 0.25 µm film thickness). One-microliter of the
162 cleaned sample was injected to the GC. The GC conditions were: splitless injection,
163 injection port temperature of 220°C and helium gas (carrier gas) flow of 0.75 mL min⁻¹.
164 The GC temperature program was started at 80°C and retained for 1 min, increased to
165 195°C at a rate of 12°C min⁻¹, increased to 210°C at a rate of 2°C min⁻¹ and retained for 3
166 min, increased to 225°C at a rate of 15°C min⁻¹ and retained for 2 min and increased to
167 275°C at a rate of 40°C min⁻¹ and retained for 10 min. The peak retention times of DP and
168 CF were 11.7 and 18.0 min, respectively.

169

170 Results and discussion

171

172 Enrichment, isolation and identification of PF-degrading bacteria

173 The PF-degrading consortium (referred to as MIX hereafter) was enriched in aerobic
174 condition at pH of 7 and temperature of 30°C. The consortium plated onto the medium
175 agar comprised numerous types of bacterial colonies. The soil used in this study was rich
176 in PF-tolerant cultures. During the isolation process, only three isolates were well and
177 continuously grown in PF-containing medium. This indicates that the pure isolates were
178 PF-degrading bacteria (namely PF1, PF2 and PF3).

179 The isolates, PF1, PF2 and PF3, were then identified by 16S rRNA analysis as
180 *Pseudomonas plecoglossicida* (GenBank accession number KJ143902), *Pseudomonas*
181 *aeruginosa* (GenBank accession number KJ143903) and *Pseudomonas aeruginosa*
182 (GenBank accession number KJ143904) with similarity of 98% to *Pseudomonas*
183 *plecoglossicida* strain SR7 (GenBank accession number KC634234.1), 100% to
184 *Pseudomonas aeruginosa* strain PGPR 10 (GenBank accession number KF640236.1)
185 and 99% to *Pseudomonas aeruginosa* strain QHFQZ1 (GenBank accession number
186 HQ844495.1), respectively.

187 The consortium and three isolates reported in this work could utilize PF as a sole
188 carbon source. This is similar to the previous studies which reported the OP utilization as
189 a sole carbon source (Cycon et al. 2009). Previously, Malghani and Chatterjee (2009)
190 isolated *Pseudomonas aeruginosa* strain OW from the PF-contaminated soil in China.
191 Also, Fulekar and Geetha (2008) reported that *Pseudomonas aeruginosa* could remove
192 CF. In present study, two more strains belong to *Pseudomonas aeruginosa* (PF2 and PF3)
193 isolated from the contaminated chili farm soil in Thailand were proposed for PF
194 degradation. The result suggested that *Pseudomonas aeruginosa* may conserve OPP-
195 degrading microbial enzymes resulting widely discovered the *Pseudomonas aeruginosa*
196 strains able to degrade OPPs. On the other hand, although role of *Pseudomonas*
197 *plecoglossicida* as pyrethroid pesticide-degrading bacterium has been previously reported
198 (Boricha and Fulekar, 2009), there is no published report on OPP biodegradation by this
199 microbial species. To the best of our knowledge, this is the first finding on OPP
200 degradation by *Pseudomonas plecoglossicida* (strain PF1).

201

202 Bacterial growth and PF degradation

203 The growth of MIX, PF1, PF2 and PF3 measured by viable cell counting on basal salt
204 medium agar containing PF is shown in Figure 1. While growth of MIX reached the
205 stationary phase after 2 d and increased from 7.1 to 7.6 log CFU mL⁻¹ after 4 d, cell
206 number of each isolate could quickly increase to 14.0-16.5 log CFU mL⁻¹ within 4 d.
207 Based on the growth kinetic rates presented in Table 1, the pure isolates (at the growth
208 rates of 1.9-2.7 1 h⁻¹) performed approximately 5 to 6 times higher than MIX (0.4 1 h⁻¹).

209 This result indicates that even though both consortium and isolated cultures were able
210 to survive and reproduce in the medium containing PF, growth of each isolate was
211 enhanced when grown independently the pure isolates likely to better survive in the PF-
212 contaminated environment. This may be due to the competition between the cultures in
213 the consortium. This is similar to the work by Salunkhe et al. (2013). It was reported the
214 rapid growth rate of pure cultures (*Bacillus subtilis* strains) isolated from grapevines or
215 grape rhizosphere during profenofos biodegradation.

216 The reduction of PF concentration during the biodegradation test is shown in Figure
217 1. For all tests, the PF concentration continuously decreased in the first three days and the
218 concentration dropped gradually thereafter. After the 4-d experiment, MIX, PF1, PF2 and
219 PF3 removed PF for 90.0-95.3% (Table 1). In the abiotic control test (no cell), the PF
220 concentration decreased less than 5.0% suggesting that PF removal by physical or
221 chemical reactions was minimal. The PF degradation by all cultures followed the first-
222 order kinetics (Table 1). The consortium and isolates utilized PF at the rate of 3.0-19.6
223 mg L⁻¹ d⁻¹ (Table 1). Apparently, the pure isolates performed better than the consortium.
224 The treatment result well correlated to the bacterial growth result. MIX grew slower
225 resulting in lower PF treatment rate compared to those by the pure isolates.

226 The PF degradations by the consortium and cultures (more than 90%) were
227 comparable to those by *Pseudomonas aeruginosa* strain OW, *Pseudomonas putida* strain
228 W, *Burkholderia gladioli* strain Y, previously isolated (Malghani and Chatterjee, 2009;
229 Malghani et al. 2009). The result indicated that the newly enriched consortium and three
230 isolated cultures have potential application for the PF bioremediation. Generally, the
231 consortium has been shown to be more suitable for bioremediation compared to pure
232 cultures in practice. This is because their biodiversity can enhance environmental survival
233 and increase the number of catabolic pathways available for contaminant biodegradation
234 (Alvey and Crowley, 1996; Smith et al. 2005). In this case; however, the pure cultures
235 were acclimated in the medium and no environmental stresses in the tested condition
236 leading to better growth and performance presented by the isolated cultures.

237

238 Bacterial growth and PF degradation with additional carbon supplement

239 The experiment in this section was to determine the potential of additional carbon sources
240 for enhancement of PF biodegradation. Three additional carbon sources including sodium
241 succinate, sodium acetate and glucose were chosen (Xie et al. 2008).

242 Microbial cell numbers quickly rose from 6.8 to 18.7 log CFU mL⁻¹ after 48 hr.
243 Microbial cell growth followed the first kinetic reaction at the rates of 5.97, 4.38 and 5.26
244 h⁻¹ with the supplementation of sodium succinate, sodium acetate and glucose,
245 respectively. The result suggested that the additional carbon source obviously accelerated
246 the growth rate (10-14 times). This result well related to previous work (Jianlong et al.
247 2002; Grant and Betts; 2004; Xia et al. 2009). The test with sodium succinate and glucose
248 supplements had higher growth rate than that of the test with sodium acetate. Additional

249 carbon sources affected the growth rates to different extents since carbon structure was
250 specific to each microorganism (Xie et al. 2009).

251

252 PF intermediate metabolite detection

253 In the control (no cell) test, it was detected an intermediate product of PF, 4-bromo-2-
254 chlorophenol (BCP) (a GC peak with m/z of 207, 281, and 73) (Figure 3) while PF
255 concentration slightly decreased (less than 5%). This indicated that PF was reacted with
256 water and produced BCP via abiotic hydrolysis process. After continued monitoring for
257 14 d, BCP concentration detected was quite stable (data not shown).

258 For PF biodegradation assay, the PF intermediate metabolite detection from tests at
259 the initial PF concentrations of 20-120 mg L⁻¹ was performed. From the test with the
260 initial PF concentration of 20 mg L⁻¹, BCP (which was presented in the microbial
261 medium as mentioned in earlier section) disappeared along with PF biodegradation. This
262 revealed that the enriched cultures could simultaneously degrade PF and BCP.

263 During the PF degradation at the concentration of 40 mg L⁻¹ and higher, BCP was
264 accumulated in early stage of the test (the first 3 hr). In later period (after 6 hr), it was
265 noticed that 3-methoxy phenol (3-MP) appeared and replaced BCP (Figure 3). This
266 potentially be that BCP degraded to 3-MP (Figure 4). Additionally, it was found 2,4-di-
267 tert-butyl phenol (2,4-DTBP) during the degradation test. It was known that 2,4-DTBP
268 could be used for pesticide production (Schwetlick et al. 1991).

269 For PF degradation intermediate detection, BCP production via abiotic hydrolysis
270 process well correlated to the study by Zamy et al. (2004). It was reported that OPPs
271 including PF could hydrolyze in dilute OPP solution. The result suggested that abiotic
272 hydrolysis slightly contributes PF degradation (less than 5%). Since BCP is more stable

273 than PF, BCP concentration remained constant for longer period. During the PF
274 degradation, BCP was accumulated similar to the result described elsewhere (Malgani et
275 al. 2009). The result suggested that PF degraded via enzymatic organophosphorus
276 hydrolysis. Organophosphorus hydrolase has been known as a typical bacterial enzyme
277 for wide range of organophosphorus pesticide degradation (Kanekar et al. 2004). The
278 appearance of 3-MP is different from proposed PF degradation in soil by Food and
279 Agriculture Organization of the United Nations (FAO) (FAO 2012). FAO expected that
280 BCP potentially degraded to 3-chloro-4-methoxyphenol in a sterile soil (Figure 4). This
281 could be state that abiotic and biotic processes may give different PF degradation
282 pathway. The cultures enriched in this study were promising for PF degradation since
283 they could degrade both PF and its intermediate product (BCP). The potential PF
284 degradation pathway was proposed (Figure 4). The complete PF biodegradation pathway
285 is recommended for future investigation.

286

287 **Selected OPP degradation**

288 In practice, farmers apply a couple types of pesticides simultaneously for better pest
289 control. For instance, in Thailand, farmers concurrently apply PF, CF and DP for
290 vegetable cultivation. Based on this information, degradation of CF and DP by the
291 enriched cultures was performed for investigating the treatment potential. The
292 degradation result is presented in Figure 5. After the 4-d experiment, the degradation
293 performance by PF1, PF2 and PF3 was similar. When the microbial cells of 10^6 CFU mL⁻¹
294 and the initial pesticide concentration of 20 mg L⁻¹ were tested, PF, CF and DP reduced
295 for 75-82%, 57-73% and 33-47%, respectively (Figure 5).

296 Among three OPPs tested, PF and CF structure are similar. They are chemicals under
297 phosphorothioate group while DP is a chemical belong to phosphate group (Figure 6). PF
298 is *S*-alkyl phosphorothioate sub-group whereas CF is *O*-alkyl phosphorothioate sub-
299 group. It was observed that the pesticide degradation performances were different. This
300 may be from the pesticide structure. PF degradation performance is highest because the
301 cultures were acclimated for PF. The chemical structure of CF is more similar to PF
302 compared to that of DP resulting in high CF performance.

303 For enzymatic degradation point of view, four enzymes including phosphatase,
304 esterase, hydrolase and oxygenase involved in OPP biodegradation pathway (Kanekar et
305 al. 2004). Singh and Walker (2006) summarized CF and DP biodegradation pathways.
306 Like PF, CF primarily degrades *via* hydrolysis process. DP degradation is more
307 complicated. DP transforms to monocrotophos *via* methylation and continuously
308 degrades *via* hydrolysis process. This could be the reason why DP was degraded less than
309 PF and CF. However, based on the result in this section, the enriched cultures were
310 potential for PF and other OPP remediation. For future study, the influence of
311 environmental conditions on PF degradation should be performed. Also, the full PF
312 degradation pathway by isolates should be conducted for insight investigation.

313

314 **Conclusions**

315 Novel PF-degrading consortium and three isolated cultures including *Pseudomonas*
316 *plecoglossicida* strain PF1, *Pseudomonas aeruginosa* strain PF2 and *Pseudomonas*
317 *aeruginosa* strain PF3 were enriched. The novel cultures used PF as a sole carbon source.
318 All cultures were capable in PF insecticide degradation (PF removal of more than 90%
319 within 4 d). The cultures could degrade PF, PF intermediate and other OPPs. For future

320 study, the influence of environmental conditions on PF degradation should be performed.
321 Also, the full PF degradation pathway by the novel consortium and isolates should be
322 conducted for insight investigation.

323

324 **Acknowledgments**

325 This material is based upon work supported by Ubon Ratchathani University and Office
326 of the National Research Council of Thailand. This work is also conducted under a
327 research program granted by Center of Excellence on Hazardous Substance Management.
328 Any opinions, findings and conclusions or recommendations expressed in this material
329 are those of the author and do not necessarily reflect the views of grant providers.

330

331 **References**

- 332 Alvey S, Crowley DE (1996) Survival and activity of an atrazine-mineralizing bacterial
333 consortium in rhizosphere soil. Environ Sci Technol 30: 1596-1603
- 334 Boricha H, Fulekar MH (2009) *Pseudomonas plecoglossicida* as a novel organism for the
335 bioremediation of cypermethrin. Biol Med 1: 1-10
- 336 Cycon M, Wojcik M, Piotrowska-Seget Z (2009) Biodegradation of the
337 organophosphorus insecticide diazinon by *Serratia* sp. and *Pseudomonas* sp. and
338 their use in bioremediation of contaminated soil. Chemosphere 76: 494-501
- 339 FAO (2012) *Profenofos* 171. http://www.fao.org/fileadmin/templates/agphome/documents/Pests_Pesticides/JMPR/Evaluation08/Profenofos.pdf
- 340 Fulekar MH, Geetha M (2008) Bioremediation of chlorpyrifos by *Pseudomonas*
341 *aeruginosa* using scale up technique. J Appl Biosci 12: 657-660

- 343 Grant RJ, Betts WB (2004) Mineral and carbon usage of two synthetic pyrethroid
344 degrading bacterial isolates. *J Appl Microbiol* 97: 656-662
- 345 Kanekar PP, Bhadbade BJ, Deshpande NM, Sarnaik SS (2004) Biodegradation of
346 organophosphorus pesticides. *Proc Indian Natn Sci Acad B*70: 57-70
- 347 Jianlong W, Xiangchun Q, Liping H, Yi Q, Hegemann W (2002) Kinetics of co-
348 metabolism of quinoline and glucose by *Burkholderia pickettii*. *Process Biochem* 37:
349 831-836
- 350 Malghani S, Chatterjee N (2009) Isolation and characterization of a PF degrading
351 bacterium. *J Environ Sci* 21: 1591-1597
- 352 Malghani S, Chatterjee N, Yu HX, Luo Z (2009) Isolation and identification of
353 profenofos degrading bacteria. *Braz J Microbiol* 40: 893-900
- 354 Marchesi JR, Sato T, Weightman AJ, Martin TA, Fry JC, Hiom SJ, Dymock D, Wade
355 WG (1998) Design and evaluation of useful bacterium-specific PCR primers that
356 amplify genes coding for bacterial 16S rRNA. *Appl Environ Microbiol* 64: 795-799
- 357 Roverdatti MG (2001) Monitoring of organochlorine and organophosphorus pesticides in
358 the water of the Reconquista River. *Water Res* 35: 3457-3461
- 359 Salunkhe VP, Sawant IS, Banerjee K, Rajguru YR, Wadkar PN, Oulkar DP, Naik DG,
360 Sawant SD (2013) Biodegradation of profenofos by *Bacillus subtilis* isolated from
361 grapevines (*Vitis vinifera*). *J Agric Food Chem* 61: 7195-7202
- 362 Schwedick K, Pionteck J, Winkler A, Hfihner U, Kroschwitz H, Habicher WD (1991)
363 Organophosphorus antioxidants: part X mechanism of antioxidant action of aryl
364 phosphites and phosphonites at higher temperatures. *Polym Degrad Stabil* 31: 219-
365 228

- 366 Singh BK, Walker A (2006) Microbial degradation of organophosphorus compounds.
367 FEMS Microbiol Rev 30: 428-471
- 368 Siripattanakul S, Wirojanagud W, McEvoy JM, Limpiyakorn T and Khan E (2009)
369 Atrazine degradation by stable mixed cultures enriched from agricultural soil and
370 their characterization. J Appl Microbiol 106: 986-992
- 371 Smith D, Alvey S, Crowley DE (2005) Cooperative catabolic pathways within an
372 atrazine-degrading enrichment culture isolated from soil. FEMS Microbiol Ecol 53:
373 265-273
- 374 Swarnam TP, Velmurugan A (2013) Pesticide residues in vegetable samples from the
375 Andaman Islands, India. Environ Monit Assess 185: 6119-6127
- 376 Toan PV, Sebesvari Z, Bläsing M, Rosendahl I, Renaud FG (2013) Pesticide
377 management and their residues in sediments and surface and drinking water in the
378 Mekong Delta, Vietnam. Sci Total Environ 452-453: 28-39
- 379 Xie S, Liu J, Li L, Qiao C (2009) Biodegradation of malathion by *Acinetobacter*
380 *johsonii* MA19 and optimization of cometabolism substrates. J Environ Sci 21:
381 76-82
- 382 Xu G, Zheng W, Li Y, Wang S, Zhang J, Yan Y (2008). Biodegradation of chlorpyrifos
383 and 3, 5, 6-trichloro-2-pyridinol by a newly isolated *Paracoccus* sp. strain TRP. Int
384 Biodeter Biodegr 62: 51-56
- 385
- 386

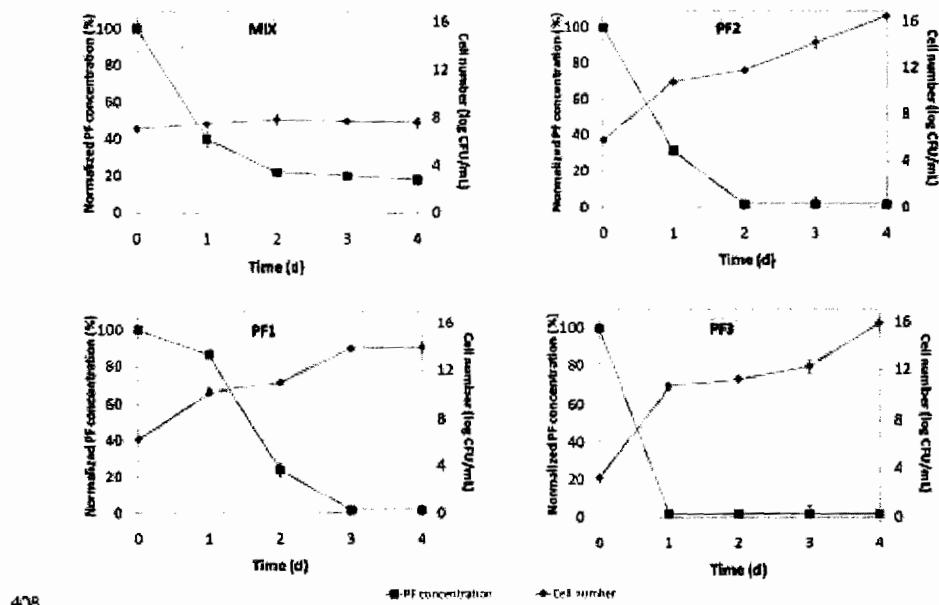
387 **Table and figure captions**
388
389 **Table 1** Microbial growth and PF degradation kinetic rates
390
391 **Figure 1** Bacterial growth and PF degradation by the enriched consortium and isolates
392
393 **Figure 2** Bacterial growth and PF degradation by MIX under presence of additional
394 carbon source conditions
395
396 **Figure 3** BCP (a) and 3-MP (b) chromatograms and mass spectra
397
398 **Figure 4** Potential pathway of PF microbial degradation by the consortium and isolates
399
400 **Figure 5** Comparison of PF, CF and DP degradation performance by the isolates
401
402 **Figure 6** PF, CF and DP and their OPP chemical structures
403

404 Table 1

Culture	Growth kinetics		PF degradation kinetics		Substrate utilization rate (mg L ⁻¹ d ⁻¹)	PF removal (%)
	Equation ⁽¹⁾	R ²	Equation ⁽²⁾	R ²		
MIX	y = 0.40x + 7.05	1.00	y = -0.15x + 1.12	0.87	3.0	90.0
PF1	y = 1.91x + 7.28	0.90	y = -0.57x + 1.55	0.86	7.6	95.0
PF2	y = 2.48x + 6.86	0.95	y = -0.85x + 1.42	0.95	9.8	93.1
PF3	y = 2.68x + 5.36	0.85	y = -0.85x + 1.02	0.75	19.6	95.3

405 ⁽¹⁾ x = time (h) y = log (bacterial number)406 ⁽²⁾ x = time (h) y = log (log (PF concentration))

407

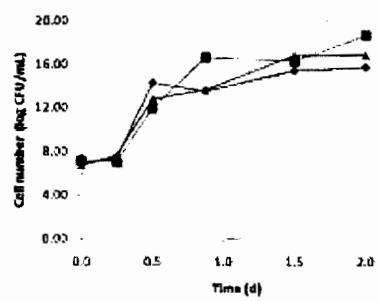


408

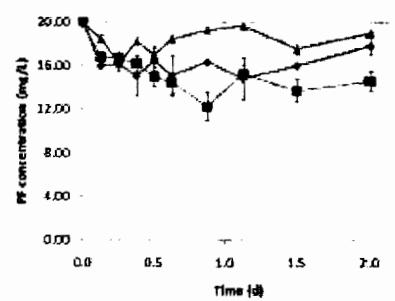
409 Figure 1

410

411



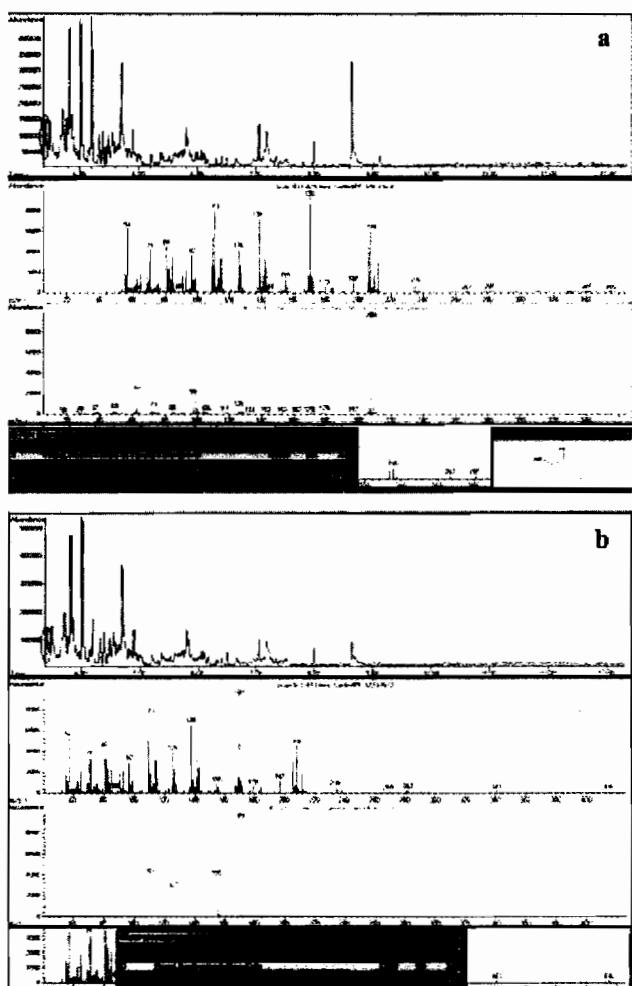
412



413 Figure 2

414

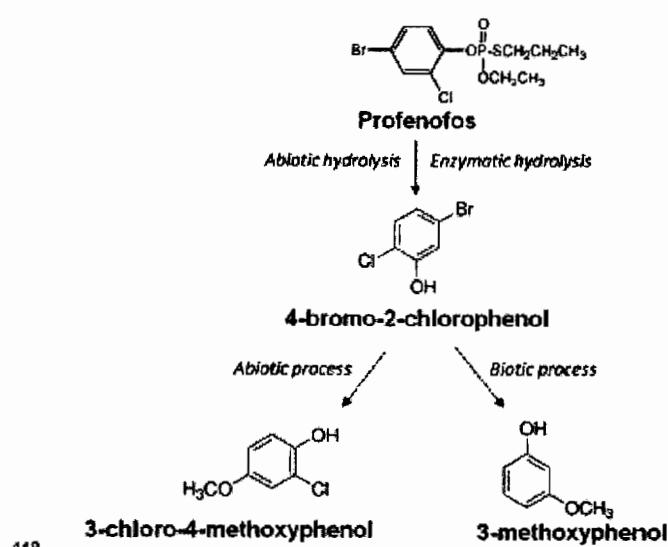
21



415

416 **Figure 3**

417

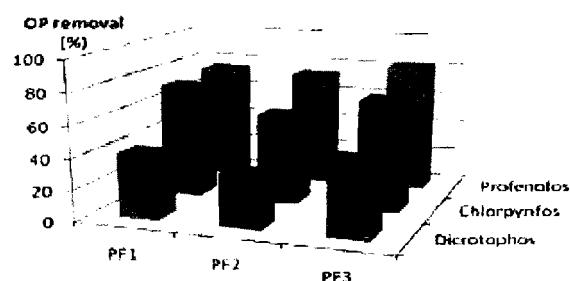


418

419 **Figure 4**

420

421

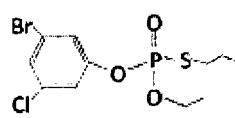
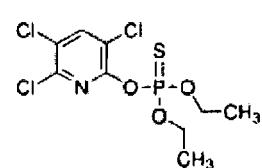
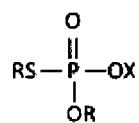
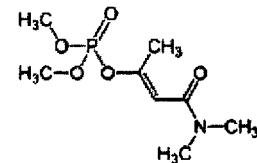
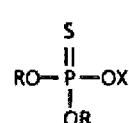
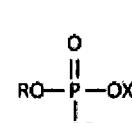


422

423 **Figure 5**

424

425

Profenofos*Chlorpyrifos**Dicrotophos**S-alkyl phosphorothioate**O-alkyl phosphorothioate**Phosphate*

426

427 **Figure 6**

428

ภาคผนวก ง
สรุปผลการดำเนินการวิจัย

ผลสรุปแผนการดำเนินงานและผลการปฏิบัติงานจริง

กิจกรรม	ปีที่ 1				ปีที่ 2				ปีที่ 3			ผู้รับผิดชอบ
	3	6	9	12	3	6	9	12	3	6	9	
1. รวมรวมและศึกษางานที่เกี่ยวข้อง	■											ผศ.ดร.สุมนา ราชภูรภักดี
2. คัดแยกกลุ่มจุลินทรีย์ในการย่อยสลายสารโพเรฟิโนฟอส	■											ผศ.ดร.สุมนา ราชภูรภักดี และคณะ
3. ศึกษาการเติมกลุ่มจุลินทรีย์ในการย่อยสลายสารโพเรฟิโนฟอส		■										ผศ.ดร.สุมนา ราชภูรภักดี และคณะ
4. คัดแยกและระบุจุลินทรีย์บริสุทธิ์ในการย่อยสลายสารโพเรฟิโนฟอส		■	■			■	■					ผศ.ดร.สุมนา ราชภูรภักดี และคณะ
5. ศึกษาลักษณะการย่อยสลายสารโพเรฟิโนฟอสด้วยจุลินทรีย์บริสุทธิ์			■	■	■	■	■					ผศ.ดร.สุมนา ราชภูรภักดี และคณะ
6. จัดเตรียมและเผยแพร่ผลงานวิจัย ครั้งที่ 1			■	■	■	■	■					ผศ.ดร.สุมนา ราชภูรภักดี และคณะ
7. ศึกษาการย่อยสลายสารโพเรฟิโนฟอสโดยใช้สารอาหารร่วมต่าง ๆ					■	■						ผศ.พุทธพร แสงเทียน และคณะ
8. ศึกษาการย่อยสลายสารโพเรฟิโนฟอสโดยใช้สารอาหารร่วมที่ความเข้มข้นต่าง ๆ					■	■	■					ผศ.พุทธพร แสงเทียน และคณะ
9. สาธิตการเพ้นพูน้ำได้ดินที่ปนเปื้อนสารโพเรฟิโนฟอส						■	■	■				ผศ.พุทธพร แสงเทียน และคณะ
10. จัดเตรียมและเผยแพร่ผลงานวิจัย ครั้งที่ 2						■	■	■				ผศ.พุทธพร แสงเทียน และคณะ



แผนการดำเนินงาน



การปฏิบัติงานจริง

รายงานสรุปการใช้งบประมาณ

หมวด/รายการ	จำนวนเงิน (บาท)					
	2555		2556		รวม	
	แผ่น	ใช้จ่ายจริง	แผ่น	ใช้จ่ายจริง	แผ่น	ใช้จ่ายจริง
1. หมวดค่าตอบแทน - ค่าท้าการนอกเวลา ราชการ	15,000.00	15,000.00	15,000.00	15,000.00	30,000.00	30,000.00
2. หมวดค่าใช้สอย - ค่าจ้างเหมาງูช่วย นักวิจัย	95,280.00	95,280.00	95,280.00	95,280.00	190,560.00	190,560.00
- ค่าจ้างวิเคราะห์	40,720.00	9,416.00	21,000.00	14,876.00	61,720.00	24,292.00
3. หมวดค่าวัสดุ						
- ค่าวัสดุ	160,000.00	144,505.00	183,720.00	191,155.79	343,720.00	335,660.79
4. หมวดค่าสาธารณูปโภค						
- ค่าสาธารณูปโภค	31,100.00	31,100.00	31,500.00	31,500.00	62,600.00	62,600.00
รวมทั้งสิ้น	342,100.00	295,301.00	346,500.00	347,811.79	688,600.00	643,112.79

ตารางเปรียบเทียบวัตถุประสงค์และผลที่ได้รับจากการดำเนินโครงการ

วัตถุประสงค์	ผลที่ได้รับ
เพื่อคัดแยกกลุ่มจุลินทรีย์และระบุสายพันธุ์จุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสารอาหารในฟอส	<ul style="list-style-type: none"> ● กลุ่มจุลินทรีย์ที่ย่อยสารอาหารในฟอส ● จุลินทรีย์บริสุทธิ์ที่ย่อยสารอาหารในฟอส ● ข้อมูลสายพันธุ์จุลินทรีย์ที่ย่อยสารอาหารในฟอส
เพื่อศึกษาลักษณะการย่อยสารอาหารในฟอสด้วยการเติมจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้	<ul style="list-style-type: none"> ● ลักษณะและจำนวนเซลล์การย่อยสารอาหารในฟอสของกลุ่มจุลินทรีย์ ● ลักษณะและจำนวนเซลล์การย่อยสารอาหารในฟอสของจุลินทรีย์บริสุทธิ์
เพื่อการปรับปรุงการย่อยสารอาหารในฟอสโดยใช้กระบวนการกระตุนทางชีวภาพ	<ul style="list-style-type: none"> ● สารอาหารร่วมที่เหมาะสมสำหรับส่งเสริมให้เกิดกระบวนการเมตาโบลิซึมร่วมในการย่อยสารอาหารในฟอสได้ ● ความเข้มข้นของสารอาหารร่วมที่เหมาะสม
เพื่อสาอิตรการพื้นที่ใต้ดินที่ปนเปื้อนสารอาหารในฟอสโดยใช้กระบวนการทางชีวภาพเชิงปรับปรุงตามหลักการเติมเซลล์ที่ถูกกระตุน	<ul style="list-style-type: none"> ● ผลการกำจัดสารอาหารในฟอสตกค้างในน้ำใต้ดินด้วยวิธีการเติมเซลล์

