การกำจัดยาฆ่าแมลงในน้ำที่มีสารอินทรีย์ธรรมชาติด้วยแลคเคส

ธิดารัตน์ มณีศรี

การค้นคว้าอิสระนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิศวกรรมศาสตร
มหาบัณฑิต สาขาวิชาวิศวกรรมสิ่งแวดล้อม คณะวิศวกรรมศาสตร์
มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี
ปีการศึกษา 2561

ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

REMOVAL OF INSECTICIDE IN WATER CONTAINING NATURAL ORGANIC MATTER BY LACCASE

TIDARAT MANEESRI

AN INDEPENDENT STUDY SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF
THE REQUIREMENTS FOR THE DEGREE OF MASTER OF ENGINEERING
MAJOR IN ENVIRONMENTAL ENGINEERING
FACULTY OF ENGINEERING
UBON RATCHATHANI UNIVERSITY
ACADEMIC YEAR 2018

COPYRIGHT OF UBON RATCHATHANI UNIVERSITY

กิตติกรรมประกาศ

การวิจัย “การกำจัดยาฆ่าแมลงในน้ำที่มีสารอินทรีย์ธรรมชาติด้วยแลคเคส” สำเร็จลุล่วงไปด้วยความอนุเคราะห์จาก ผศ.ดร. กรรณิกา รัตนพงศ์เลขา อาจารย์ที่ปรึกษาค้นคว้าอิสระ และท่านคณะกรรมการทุกท่านที่ได้ที่กรุณาให้คำแนะนำ ตรวจแก้ไข และให้ข้อคิดเห็นต่าง ๆ ตลอดการทำวิจัยได้เสร็จสมบูรณ์ และเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการภาควิชาวิศวกรรมเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานีทุกท่าน ที่คอยให้ความสะดวกในด้านการเบิกใช้อุปกรณ์และสารเคมีต่าง ๆ ผู้วิจัยใคร่ขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ โอกาสนี้

ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อบุตรดี มณีศรี และคุณแม่ลาวัลย์ มณีศรี ที่สนับสนุนเงินทุนและคอยให้กำลังใจในการศึกษาระดับปริญญาโทซึ่งเป็นผู้สนับสนุนหลักในการศึกษาครั้งนี้ และขอขอบคุณนางสาวพิชชานันท์ ไชโย ที่คอยสนับสนุนช่วยเหลือในด้านการทำวิจัย ให้คำปรึกษา และเป็นกำลังใจที่ดีเสมอมา

สุดท้ายนี้ขอขอบคุณนางสาวอภิญญา อ่อนสาร นักศึกษาระดับปริญญาเอก คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี ที่คอยให้คำแนะนำ และให้ความช่วยเหลือในด้านการใช้เครื่องมือวิเคราะห์ตลอดจนผู้มีพระคุณที่มีส่วนเกี่ยวข้องทุกท่าน ที่ไม่สามารถกล่าวได้หมด ผู้วิจัยรู้สึกซาบซึ้งในความกรุณาและกำลังใจอันดียิ่งจากทุกท่าน จึงขอกราบขอบพระคุณ ณ โอกาสนี้

ธิดารัตน์ มณีศรี

ผู้วิจัย

บทคัดย่อ

เรื่อง : การกำจัดยาฆ่าแมลงในน้ำที่มีสารอินทรีย์ธรรมชาติด้วยแลคเคส

ผู้วิจัย : ธิดารัตน์ มณีศรี

ชื่อปริญญา : วิศวกรรมศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชา : วิศวกรรมสิ่งแวดล้อม

อาจารย์ที่ปรึกษา : ผู้ช่วยศาสตราจารย์.ดร. กรรณิกา รัตนพงศ์เลขา

คำสำคัญ : ไดโคฟอล, ไดคลอวอส, ยาฆ่าแมลง, แลคเคส, สารอินทรีย์ธรรมชาติ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการใช้เอนไซม์แลคเคสกึ่งบริสุทธิ์ที่สกัดจาก *Lentinus polychrous* Lev. ในการกำจัดยาฆ่าแมลงในน้ำที่มีสารอินทรีย์ธรรมชาติ (NOM) ซึ่งทำการศึกษา 4 ปัจจัย คือ ค่าความเป็นกรด - ด่าง ค่าความเข้มข้นของสารอินทรีย์ธรรมชาติในน้ำ ความเข้มข้นของยาฆ่าแมลง และอุณหภูมิ ยาฆ่าแมลงที่ใช้คือไดโคฟอลเป็นตัวแทนของกลุ่มออร์กาโนคลอรีน และไดคลอวอสเป็นตัวแทนของกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟต ผลการศึกษาพบว่าการเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรด-ด่างของสารละลาย ความเข้มข้นของสารอินทรีย์ธรรมชาติในน้ำ ความเข้มข้นของยาฆ่าแมลง และอุณหภูมิ ส่งผลต่อประสิทธิภาพในการกำจัดยาฆ่าแมลง สภาวะที่เหมาะสำหรับการกำจัดไดโคฟอล คือ ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7 ค่าความเข้มข้นของสารอินทรีย์ธรรมชาติเท่ากับ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และความเข้มข้นของยาฆ่าแมลงเท่ากับ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่อุณหภูมิ 25 และ 35 องศาเซลเซียส กำจัดได้ร้อยละ 100 ที่ 24 ชั่วโมง ส่วนสภาวะที่เหมาะสำหรับการกำจัดไดคลอวอส คือ ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 5 ค่าความเข้มข้นของ สารอินทรีย์ธรรมชาติเท่ากับ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และความเข้มข้นของยาฆ่าแมลงเท่ากับ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส กำจัดได้ร้อยละ 92.51 ที่ 24 ชั่วโมง

ABSTRACT

TITLE : REMOVAL OF INSECTICIDE IN WATER CONTAINING NATURAL ORGANIC MATTER BY LACCASE
AUTHOR : TIDARAT MANEESRI
DEGREE : MASTER OF ENGINEERING
MAJOR : ENVIRONMENTAL ENGINEERING
ADVISOR : ASST.PROF. KARNIKA RATANAPONGLEKA, Ph.D.
KEYWORDS : DICOFOL, DICHLORVOS, INSECTICIDE, LACCASE, NATURAL ORGANIC MATTER

This research aims to study the removal of insecticide in water containing natural organic matter (NOM) by partially purified laccase extracted from *Lentinus polychrous* Lev. Four factors affecting the removal such as pH value of solution, NOM concentration, insecticide concentration, and temperature were tested. The insecticide used was dicofol representing for organochlorine and dichlorvos representing for organophosphate. The optimum condition for dicofol removal obtained in this study was the pH solution at pH 7, concentration of NOM 1 mg/l and concentration of dicofol 1 mg/l, temperature of 25 and 35 °C. The efficiency dicofol removal was 100% within 24 h. And the optimum condition for dichlorvos removal obtained in this study was the pH solution at pH 5, concentration of NOM 1 mg/l and concentration of dichlorvos 1 mg/l, temperature of 35 °C. The efficiency dichlorvos removal was 92.51% within 24 h.

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	**ก**
บทคัดย่อภาษาไทย	**ข**
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	**ค**
สารบัญ	**ง**
สารบัญตาราง	**ฉ**
สารบัญภาพ	**ช**
บทที่ 1 บทนำ	
1.1 ที่มาและความสำคัญของปัญหา	1
1.2 วัตถุประสงค์	3
1.3 ขอบเขตงานวิจัย	3
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	4
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	
2.1 เอนไซม์	5
2.2 เอนไซม์แลคเคส	6
2.3 สารยาฆ่าแมลง	9
2.4 ไดโคฟอล (DICOFOL)	11
2.5 ไดคลอวอส (DICHLORVOS)	13
2.6 สารอินทรีย์ธรรมชาติ	14
2.7 วิธีการกำจัดสารยาฆ่าแมลง	15
บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย	
3.1 วัสดุและสารเคมี	19
3.2 อุปกรณ์และเครื่องวิเคราะห์	19
3.3 การสกัดเอนไซม์และการเตรียมเอนไซม์แลคเคสกึ่งบริสุทธิ์	20
3.4 กรอบการศึกษา	20
3.5 วิธีการดำเนินการทดลอง	21
3.6 การวิเคราะห์ผลและการคำนวณ	23

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

บทที่ 4 ผลการทดลองและวิเคราะห์ผลการทดลอง

4.1 ผลการสกัดเอนไซม์และการเตรียมเอนไซม์แลคเคสกึ่งบริสุทธิ์ 25

4.2 ผลของความเป็นกรด-ด่างของสารละลายที่มีผลต่อการกำจัดยาฆ่าแมลง 26

4.3 ผลความเข้มข้นของสารอินทรีย์ธรรมชาติที่มีผลต่อการกำจัดยาฆ่าแมลง 29

4.4 ผลความเข้มข้นสารละลายยาฆ่าแมลงที่มีผลต่อการกำจัดยาฆ่าแมลง 33

บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง

5.1 ผลของความเป็นกรด-ด่างของสารละลายที่มีผลต่อการกำจัดยาฆ่าแมลง 41

5.2 ผลความเข้มข้นของสารอินทรีย์ธรรมชาติที่มีผลต่อการกำจัดยาฆ่าแมลง 41

5.3 ผลความเข้มข้นสารละลายยาฆ่าแมลงที่มีผลต่อการกำจัดยาฆ่าแมลง 41

5.4 ผลของอุณหภูมิที่มีผลต่อการกำจัดยาฆ่าแมลง 42

5.5 ข้อเสนอแนะ 42

เอกสารอ้างอิง **43**

ภาคผนวก

ก การหาค่ากิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ 49

ข การวิเคราะห์ปริมาณไดโคฟอลและไดคลอวอส 52

ประวัติผู้วิจัย **54**

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
2.1	สมบัติทางเคมีและกายภาพของไดโคฟอล	12
2.2	สมบัติทางเคมีและกายภาพของไดคลอวอส	13
4.1	ผลการสกัดเอนไซม์และการเตรียมเอนไซม์แลคเคสกึ่งบริสุทธิ์	26

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
2.1	โครงสร้างผลึกของ Trametes versicolor ประกอบด้วย 3 โดเมนที่จับกับกลุ่มคอป-เปอร์ 3 กลุ่ม โดยโดเมนที่ 1 (สีน้ำเงิน) โดเมนที่ 2 (สีเขียว) และโดเมนที่ 3 (สีส้ม) มีสารตั้งต้น ABTS จับบริเวณ Mononuclear และมีพันธะไฮโดรเจนซัลไฟด์ (สีเหลือง) เกิดขึ้นด้วย	8
2.2	การปนเปื้อนของสารเคมีกำจัดศัตรูพืช	11
2.3	โครงสร้างของไดโคฟอล	12
2.4	สัญลักษณ์ความเป็นอันตรายบนฉลากของไดโคฟอล	12
2.5	โครงสร้างของไดคลอวอส	13
2.6	สัญลักษณ์ความเป็นอันตรายบนฉลากของไดคลอวอส	14
3.1	กรอบแนวคิดงานวิจัย	21
4.1	ผลของความเป็นกรด-ด่างของสารละลายที่มีผลต่อการกำจัดไดโคฟอล	27
4.2	ผลของความเป็นกรด-ด่างของสารละลายที่มีผลต่อการกำจัดไดคลอวอส	28
4.3	ผลความเข้มข้นของสารอินทรีย์ธรรมชาติที่มีผลต่อการกำจัดไดโคฟอล	30
4.4	ผลความเข้มข้นของสารอินทรีย์ธรรมชาติที่มีผลต่อการกำจัดไดคลอวอส	31
4.5	ผลความเข้มข้นสารละลายยาฆ่าแมลงที่มีผลต่อการกำจัดไดโคฟอล	34
4.6	ผลความเข้มข้นสารละลายยาฆ่าแมลงที่มีผลต่อการกำจัดไดคลอวอส	35
4.7	ผลของอุณหภูมิที่มีผลต่อการกำจัดไดโคฟอล (ก) ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของไดโคฟอลที่เปลี่ยนแปลงกับเวลา (ข) เปอร์เซ็นต์การกำจัดไดโคฟอลที่เวลา 24 ชั่วโมง ในอุณหภูมิต่าง ๆ	37
4.8	ผลของอุณหภูมิที่มีผลต่อการกำจัดไดคลอวอส (ก) ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของไดคลอวอสที่เปลี่ยนแปลงกับเวลา (ข) เปอร์เซ็นต์การกำจัดไดคลอวอสที่เวลา 24 ชั่วโมง ในอุณหภูมิต่าง ๆ	38

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ที่มาและความสำคัญของปัญหา

ตลอดระยะเวลาที่ผ่านมาทั้งในอดีตและปัจจุบัน เกษตรกรต่างต้องการผลผลิตในปริมาณมาก ดังนั้นเกษตรกรส่วนใหญ่จึงใช้สารเคมีกำจัดศัตรูพืช และแมลงถูกใช้อย่างแพร่หลายเพื่อเพิ่มผลผลิตทางการเกษตรให้ได้มากที่สุด นอกจากจะมีผลดีต่อจำนวนปริมาณผลผลิตแล้วยังมีผลเสียอย่างอื่นตามมาเช่นกัน เนื่องจากพฤติกรรมการใช้สารเคมีของเกษตรกรส่วนใหญ่นั้นมีพฤติกรรมการใช้ที่ ไม่ถูกต้อง เช่น ใช้มือเปล่าขณะผสมสารเคมี สวมเสื้อผ้าไม่มิดชิด และไม่สวมอุปกรณ์ป้องกันอันตราย เป็นต้น ทำให้ส่งผลต่อสุขภาพของตัวเกษตรกรเองรวมไปถึงสิ่งมีชีวิตชนิดอื่นเช่นกัน โดยสารเคมีสามารถเข้าสู่ร่างกายได้ 3 ทาง คือ การหายใจ ทางผิวหนัง และทางปาก ผลกระทบที่เกิดขึ้นนั้นก่อให้เกิดความเป็นพิษเฉียบพลัน และเป็นพิษเรื้อรัง โดยจะมีอาการ เช่น คลื่นไส้ อาเจียน ปวดศีรษะ ปวดกล้ามเนื้อ มะเร็ง เบาหวาน อัมพฤกษ์ อัมพาต โรคผิวหนังต่าง ๆ การเป็นหมัน การพิการของทารกแรกเกิด หรือการเสื่อมสมรรถภาพทางเพศ เป็นต้น [1] นอกจากนี้การใช้สารเคมีดังกล่าวยังส่งผลต่อระบบนิเวศและเกิดการตกค้างในผลผลิตทางการเกษตรอีกด้วย สารยาฆ่าแมลงในทางการเกษตร ที่มีการจำหน่ายทางการค้านั้นมีมากกว่า 1,000 ชนิด ซึ่งสามารถแบ่งออกได้เป็น 4 กลุ่ม คือ (1) กลุ่มออร์กาโนคลอรีน (2) กลุ่มออร์กาโนฟอสเฟต (3) กลุ่มคาร์บาเมต และ (4) กลุ่มสารสังเคราะห์ไพรีทอย หากพิจารณาถึงความเป็นพิษของกลุ่มสารเคมีแต่ละชนิด จะพบว่าสารในกลุ่มออร์กาโนคลอรีน และออร์กาโนฟอสเฟต มีความเป็นพิษสูงและมีการสลายตัวได้ช้ากว่าเมื่อเทียบกับสารยาฆ่าแมลงในกลุ่มอื่น [2-3]

จากพฤติกรรมการใช้สารเคมีของเกษตรกรที่ไม่ถูกต้องนั้นก่อให้เกิดการปนเปื้อนในแหล่งน้ำธรรมชาติเป็นอย่างมาก ซึ่งการปนเปื้อนนั้นไม่ได้พบเฉพาะยาฆ่าแมลงเพียงอย่างเดียว แต่ยังพบสารอื่น ๆ ที่ปนเปื้อนในแหล่งน้ำอีกด้วย เช่น สารอินทรีย์ธรรมชาติ ซึ่งเกิดจากการปนเปื้อนของสารอินทรีย์ในน้ำจากการย่อยสลายของซากพืชซากสัตว์ เรียกว่า Natural organic matter (NOM) ซึ่งสารชนิดนี้ก่อให้เกิดข้อเสียต่อแหล่งน้ำธรรมชาติ โดยทำให้เกิดปัญหาอย่างมากในแหล่งน้ำดิบในกรณีที่นำน้ำจากแหล่งน้ำธรรมชาติไปผลิตน้ำประปา โดยเฉพาะอย่างยิ่งการทำให้เกิดกลิ่น และรสในน้ำ และยังเป็นปัจจัยสำคัญที่ก่อให้เกิดสิ่งปนเปื้อน เช่น การเจริญเติบโตของไวรัสและแบคทีเรียในแหล่งน้ำที่อาจทำให้เกิดโรคในมนุษย์ เป็นต้น [4] จากพฤติกรรมการใช้สารยาฆ่าแมลงของเกษตรกร ภายหลังการฉีดพ่น หยอด หรือหว่าน จะทำให้สารยาฆ่าแมลงถูกดูดซึมเข้าไปในพืชและบางส่วนอยู่บนต้นพืช

ส่วนที่เหลือจะกระจายในอากาศหรือไหลปะปนไปกับน้ำที่ใช้ในการเกษตรลงสู่แหล่งน้ำธรรมชาติ และซึมลงดินไปยังน้ำใต้ดิน ทำให้เกิดการปนเปื้อนของสารยาฆ่าแมลงในสิ่งแวดล้อมเป็นวงกว้าง โดยอัตราการสลายตัวหรือค่าครึ่งชีวิต (half-life) ของสารยาฆ่าแมลงมีความแตกต่างกันตามชนิดและสภาพแวดล้อมที่นำไปใช้ สารยาฆ่าแมลงบางกลุ่มมีอัตราการสลายตัวได้ช้า เช่น กลุ่มออร์กาโนฟอรัส หรือออร์กาโนฟอสเฟตสามารถตกค้างในดินที่มีค่าพีเอชที่เป็นกลาง ได้หลายสัปดาห์ แต่เมื่อค่าพีเอชของดินมีความเป็นกรดมากขึ้น จะทำให้ระยะเวลาในการตกค้างเพิ่มมากขึ้น และสารยาฆ่าแมลงกลุ่มออร์กาโนคลอรีน จะมีอัตราการสลายตัวช้าที่สุดและมีอันตรายมากที่สุด ซึ่งใช้เวลาย่อยสลายในดินประมาณ 1 – 15 ปี โดยมีคุณสมบัติไม่ละลายในน้ำและจะดูดซับกับอนุภาคดิน ซึ่งเมื่อเกิดการพังทลายของดินจะทำให้เกิดการปนเปื้อนลงสู่แหล่งน้ำผิวดินได้ จึงทำให้สารกลุ่มออร์กาโนคลอรีนเกิดการตกค้าง ในแหล่งน้ำต่าง ๆ ในปริมาณที่สูง [5] ดังนั้นจึงควรมีการกำจัดสารยาฆ่าแมลงทั้ง 2 กลุ่ม โดยมีผู้วิจัยได้ศึกษาวิธีการกำจัดสารยาฆ่าแมลงด้วยวิธีการตรึงเซลลูเลส [6] กระบวนการเฟนตัน (Fenton Process) และกระบวนการ UV/H_2O_2 [7] ซึ่งวิธีการเหล่านี้ถึงแม้จะมีประสิทธิภาพในการกำจัดแต่มีต้นทุนใน การดำเนินการค่อนข้างสูง นอกเหนือจากวิธีการเหล่านี้ยังมีวิธีการกำจัดที่เป็นตัวเลือกที่น่าสนใจเช่นกัน นั่นก็คือ การใช้วิธีทางชีวภาพด้วยเอนไซม์ เพราะเอนไซม์สามารถกำจัดสารยาฆ่าแมลงได้ดี และมีต้นทุนในการดำเนินการต่ำอีกด้วย [8]

โดยได้มีงานวิจัยเกี่ยวกับการกำจัดสารยาฆ่าแมลงด้วยวิธีทางชีวภาพด้วยเอนไซม์ของสุภาพร ภารสุวรรณ และหฤทัย แก้วสันเทียะ (2559) [9] ได้ศึกษาการกำจัดไดโคฟอลด้วยแลคเคสหยาบจาก *Lentinus polychrous* Lev. โดยไดโคฟอลนั้นเป็นสารกำจัดแมลงกลุ่มออร์กาโนคลอรีน ทำการศึกษา 4 ปัจจัย ในสภาวะที่เหมาะสมที่สุด คือ ค่าความเป็นกรด-ด่างของสารละลายไดโคฟอลเท่ากับ 4 อุณหภูมิ 30 – 35 องศาเซลเซียส ความเข้มข้นของสารละลายไดโคฟอลเริ่มต้นที่ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ความเข้มข้นของเอนไซม์เท่ากับ 0.358 ยูนิตต่อมิลลิลิตรสามารถกำจัดไดโคฟอลได้ 100% ภายในระยะเวลา 4 ชั่วโมง และในส่วนของงานวิจัยของ สิทธิชัย กิจพฤกษ์และหนึ่งฤทัย ประสานทอง (2560) [10] ได้ศึกษาการใช้เอนไซม์แลคเคสกึ่งบริสุทธิ์ในการกำจัดไดคลอวอส ซึ่งจัดเป็นสารกำจัดยาฆ่าแมลงในกลุ่มออร์แกโนฟอสเฟต ทำการศึกษา 5 ปัจจัย ในสภาวะที่เหมาะสมที่สุดคือ ค่าความเป็นกรด-ด่างของสารละลายไดคลอวอสอยู่ในช่วงพีเอช 5 และ 6 ศึกษาที่อุณหภูมิห้องจนถึง 35 องศาเซลเซียส ความเข้มข้นของสารละลายไดคลอวอสเริ่มต้นที่ 0.48 มิลลิกรัมต่อลิตร ความเข้มข้นของเอนไซม์แลคเคส 0.117 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และความเข้มข้นของสารอินทรีย์ธรรมชาติคือ 2 และ 4 มิลลิกรัมต่อลิตร ผลที่ได้พบว่าสามารถกำจัดสารไดคลอวอสได้ 100% ภายในระยะเวลา 60 นาที ซึ่งจากงานวิจัยที่เกี่ยวข้องดังกล่าวพบว่าเอนไซม์แลคเคสมีประสิทธิภาพในการกำจัดสารไดโคฟอลและไดคลอวอสได้เป็นอย่างดี

จากงานวิจัยข้างต้นพบว่า มีการศึกษาการกำจัดสารยาฆ่าแมลงชนิดไดโคฟอลแลไดคลอวอส ซึ่งเป็นการศึกษาทั้งในสภาวะที่ไม่เติมและเติม NOM สำหรับในสภาวะที่มีการเติม NOM พบว่ามีการศึกษาเฉพาะการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของ NOM ซึ่งผู้วิจัยเห็นว่าน่าจะมีการศึกษาถึงประสิทธิภาพการกำจัดของเอนไซม์แลคเคสในทุกสภาวะที่มีสารดังกล่าวในระบบ ดังนั้นผู้วิจัยจึงสนใจที่จะศึกษาการกำจัดสารยาฆ่าแมลงทั้ง 2 ชนิด ด้วยเอนไซม์ที่สกัดจากเชื้อเห็ด *Lentinus polychrous* Lev. ในสภาวะที่มีการปนเปื้อนของ NOM โดยทำการศึกษาทั้งหมด 4 ปัจจัย คือ ความเข้มข้นของ NOM ความเข้มข้นของไดโคฟอล ความเข้มข้นของไดคลอวอส รวมถึงค่าความเป็นกรด - ด่าง และอุณหภูมิ

1.2 วัตถุประสงค์

เพื่อศึกษาการใช้เอนไซม์แลคเคสกึ่งบริสุทธิ์ในการกำจัดสารยาฆ่าแมลงในน้ำที่มีสารอินทรีย์ธรรมชาติ เมื่อมีการเปลี่ยนแปลงค่าความเข้มข้นของสารอินทรีย์ธรรมชาติในน้ำ (NOM) ความเข้มข้นของยาฆ่าแมลง ค่าความเป็นกรด - ด่าง และอุณหภูมิ

1.3 ขอบเขตงานวิจัย

1.3.1 งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาในระดับห้องปฏิบัติการ

1.3.2 เอนไซม์แลคเคสที่ใช้อยู่ในรูปของเอนไซม์กึ่งบริสุทธิ์ ซึ่งเตรียมจากเชื้อ *Lentinus polychrous* Lev.

1.3.3 การวิเคราะห์ค่ากิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ โดยใช้ ABTS เป็นสารตั้งต้นในการทดสอบ

1.3.4 ยาฆ่าแมลงที่ใช้ในการศึกษาคือ ไดโคฟอล(Dicofol) ซึ่งเป็นตัวแทนของกลุ่มออร์กาโนคลอรีน (Organochlorine) และไดคลอวอส (**Dichlorvos**) เป็นตัวแทนของกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟต

1.3.5 การวิเคราะห์ความเข้มข้นของยาฆ่าแมลงด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (UV-VIS spectrophotometer) ไดโคฟอล (Dicofol) ใช้ความยาวคลื่นเท่ากับ 530 nm และ ไดคลอวอส (**Dichlorvos**) ใช้ความยาวคลื่นเท่ากับ 475 nm

1.3.6 สารอินทรีย์ธรรมชาติได้นำมาจากแหล่งน้ำหนองอีเจมส์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี โดยนำมาผ่านกระบวนการกรองแบบระบบออสโมซิสผันกลับ (Reverse Osmosis, R.O.)

1.3.7 การทดลองในระบบโดยใช้อุณหภูมิเท่ากับ 25, 35, 40, 45 และ 50 องศาเซลเซียส ความเข้มข้นสารยาฆ่าแมลงเท่ากับ 1, 2, 3, 4 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่วนความเข้มของสารอินทรีย์ธรรมชาติเท่ากับ 1, 5, 10, 15 และ 20 มิลลิกรัมต่อลิตร และความเป็นกรด-ด่างอยู่ในช่วง 3-8

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.4.1 ทราบถึงความสามารถของเอนไซม์แลคเคสในการกำจัดสารยาฆ่าแมลงที่ปนเปื้อนในน้ำที่มีสารอินทรีย์ธรรมชาติ

1.4.2 สามารถนำผลของงานวิจัยเป็นข้อมูลพื้นฐานในการประยุกต์ออกแบบในการกำจัดสารยาฆ่าแมลงในปริมาณมาก

1.4.3 ทราบถึงความเป็นไปได้ในการประยุกต์ใช้เอนไซม์แลคเคสในการกำจัดสารยาฆ่าแมลงในกลุ่มออร์กาโนคลอรีนและกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟต

บทที่ 2
ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

การศึกษาการกำจัดสารยาฆ่าแมลงในน้ำที่มีสารอินทรีย์ธรรมชาติด้วยเอนไซม์แลคเคสกึ่งบริสุทธิ์ มีความสำคัญอย่างยิ่งที่จะต้องเข้าใจเกี่ยวกับเอนไซม์แลคเคสและการกำจัดสารยาฆ่าแมลง ซึ่งในบทนี้จะกล่าวถึงความรู้พื้นฐานของเอนไซม์แลคเคส สารยาฆ่าแมลง และสารอินทรีย์ธรรมชาติ โดยเป็นข้อมูลพื้นฐานที่จะสามารถดำเนินการศึกษาภายใต้ทฤษฎีและการทำวิจัย

2.1 เอนไซม์

เอนไซม (Enzyme) เป็นโปรตีนที่มีคุณสมบัติในการเร่งปฏิกิริยาต่าง ๆ ของกระบวนการเมแทบอลิซึม (Metabolism) ไม่วาจะเป็นแคแทบอลิซึม (Catabolism) ซึ่งเป็นกระบวนการสลาย เพื่อให้ได้พลังงาน และหน่วยการสร้าง (Building block) หรือวาเป็นแอนาบอลิซึม (Anabolism) คือการนำเอาหน่วยการสร้างมาเชื่อมต่อกันให้ยาวออกกลายเป็นโพลีเมอรของชีวโมเลกุล [11] โดยกระบวนการในการเร่งปฏิกิริยานั้นเริ่มขึ้นจาก เอนไซมจะเข้ายึดกับโมเลกุลของสารตั้งต้นและมีการทำหน้าที่ตามแต่ชนิดของเอนไซม พอหลังจากปฏิกิริยาเสร็จสิ้นลง จะได้เอนไซมในรูปแบบเดิมกลับคืนมา [12, 25]

2.1.1 คุณสมบัติของเอนไซม

2.1.1.1 เอนไซมมีความจำเพาะสูงมาก (High specificity) ตอสารตั้งตน (Substrate หรือ Reactant) ของปฏิกิริยาที่มันเขาเร่งทำใหเอนไซมหนึ่งตัวมักจะเร่งเพียงปฏิกิริยาเดียว หรือหลายปฏิกิริยาที่ต่อเนื่องกัน ความจำเพาะสูงทำให้มีผลพลอยได้ (By-product) น้อยมาก เมื่อเทียบกับปฏิกิริยาที่ไมใชเอนไซม

2.1.1.2 เอนไซมเกือบทั้งหมดเป็นโปรตีนที่มีขนาดใหญ่ตั้งแต่ 12,000 ถึง 1 ล้านดาลตัน ความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาขึ้นกับโครงรูปธรรมชาติ (Native conformation) ที่ถูกตอง ถาสูญเสียสภาพธรรมชาติ (Denature) หรือแยกออกจากกัน (Dissociate) เป็นหน่วยย่อย (Subunit) ความสามารถดังกล่าวจะลดลงหรือหมดไป ดังนั้นโครงสร้างปฐมภูมิ (Primary structure) โครงสร้างทุติยภูมิ (Secondary structure) โครงสร้างตติยภูมิ (Tertiary structure) และโครงสร้างจตุรภูมิ (Quaternary structure) มีความสำคัญตอการทำงานของเอนไซม

2.1.1.3 เอนไซมหลายชนิดทำงานได้ด้วยตัวของมันเองโดยใชสมบัติของกรดอะมิโน (Amino acid) ชนิดต่าง ๆ ที่มีในโมเลกุล แต่บางชนิดจะตองอาศัยโมเลกุลอื่นช่วย ซึ่งจะเรียกโมเลกุลที่เขาช่วยนี้วา โคแฟกเตอร บางครั้งโมเลกุลเหลานี้มักเปลี่ยนรูปมาจากวิตามินชนิดต่าง ๆ

โคแฟกเตอร์ที่เป็นสารประกอบอินทรียเหลานี้ เรียกอีกอย่างหนึ่งวา โคเอนไซม (Coenzyme) เอนไซมบางชนิดต่องการทั้งโคเอนไซมและไอออนของโลหะจึงจะสามารถทำงานได้ โคเอนไซม หรือไอออนของโลหะ ที่ยึดติดอยู่กับเอนไซมด้วยพันธะโควาเลนต (Covalent bond) จะถูกเรียกวา หมูพร็อสเทติก (Prosthetic group) และเรียกเอนไซมที่มีหมูพร็อสเทติก ติดอยู่จึงจะทำงานได้วา โฮโลเอนไซม (Holoenzyme) ส่วนเอนไซมที่หมูพร็อสเทติกหลุดออกไปแลวไม่สามารถทำงานได้ จะเรียกวา อะโพเอนไซม (Apoenzyme) หรือ อะโพโปรตีน (Apoprotein) นอกจากนี้ เอนไซมบางชนิดจำเป็นต่องถูกดัดแปลง ด้วยการเติมหมู ฟอสเฟต (Phosphorylation) หรือการเติมหมู คารโบไฮเดรต (Glycosylation) หรือวิธีการอื่น ๆ จึงจะสามารถทำงานได้

2.1.2 ปัจจัยที่มีผลตอการทำงานของเอนไซม

2.1.2.1 อุณหภูมิ เมื่ออุณหภูมิสูงขึ้น การเร่งของเอนไซมจะเพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ จนถึงจุดสูงสุดหนึ่ง (Temperature optimum) แลวจะลดลง ซึ่งจำเพาะตามชนิดของเอนไซม สวนใหญ่อยู่ในชวงอุณหภูมิ 25-40 องศาเซลเซียส แต่ที่อุณหภูมิสูงกวาจุดนี้มาก ๆ เอนไซมจะเกิดการเสียการเร่งทางชีวภาพ

2.1.2.2 คาพีเอชจุดที่ทำใหเอนไซมมีการเร่งสูงสุด เรียกวา pH optimum ซึ่งสวนใหญ่อยู่ในชวง พีเอช 6-7.5 ถ้าพีเอชสูง หรือต่ำเกินไปจะทำใหเกิดการสูญเสียการเร่งทางชีวภาพ

2.1.2.3 ความเข้มข้นของเอนไซม ที่ความเข้มขนของสารตั้งต้นมากเกินพอ (Excess) อัตราเร็วของปฏิกิริยาจะเพิ่มขึ้น เมื่อความเข้มขนของเอนไซมเพิ่มขึ้น

2.1.2.4 ความเข้มขนของสารตั้งต้นเมื่อความเข้มขนของเอนไซมคงที่ ที่ความเข้มขนของสารตั้งต้นน้อย ๆ ปฏิกิริยาจะเกิดขึ้นด้วยอัตราเร็วมากจนกระทั่งถึงความเข้มขนของสารตั้งต้นจุดหนึ่งที่อัตราเร็วของปฏิกิริยาจะคงที่ ความเร็วของปฏิกิริยาที่สูงสุด เรียกวา ความเร็วสูงสุด (V_{max}) [11-12]

2.2 เอนไซม์แลคเคส

2.2.1 แหล่งที่พบของเอนไซม์แลคเคส

เอนไซม์แลคเคสเป็นเอนไซม์ที่พบได้ในพืช รา แบคทีเรียและแมลง ซึ่งพบครั้งแรกจากต้น rhus vernicifara ในประเทศญี่ปุ่น โดยมีชื่อสามัญว่า japanese lacquer [13] ในเวลาต่อมาปี ค.ศ. 1886 มีการค้นพบเอนไซม์แลคเคสจากเชื้อราครั้งแรก โดย Bertrand และ Laborde [14] และตั้งแต่นั้นเป็นต้นมา เอนไซม์แลคเคสก็ถูกค้นพบจากเชื้อรา ได้แก่สายพันธุ์ *Ascomycetes Deuteromycetes* และ *Basidiomycetes* และพบมากในราขาว เอนไซม์แลคเคสจากเชื้อราถูกค้นพบมาก ทั้งยังมีประสิทธิภาพในการทำปฏิกิริยามากกว่าเอนไซม์แลคเคสจากพืชหรือจากแบคทีเรีย

เอนไซม์แลคเคสตามระบบ Enzyme commission (EC) ถูกจัดให้อยู่กลุ่มออกซิโดรีดักเทส (oxidoreductases) เพราะจะเร่งปฏิกิริยาออกซิไดซ์ (Oxidize) สารตั้งต้น โดยเอนไซม์แลคเคส

สามารถเร่งปฏิกิริยาออกซิไดซ์ในสารตั้งต้นได้หลายชนิด เช่น สารอินทรีย์ สารอนินทรีย์ ไดฟีนอล (Diphenol) โพลีฟีนอล (Polyphenol) อะมิโน (Amino) ฟีนอล (phenol) เมทธอกซีฟีนอล (Methoxenephenol) อะโรมาติกเอมีน (Aromatic amines) แอสคอร์บิค (Ascorbic) สารที่เหมาะเป็นสารตั้งต้นของเอนไซม์แลคเคส จะมีลักษณะสำคัญดังนี้ คือ ต้องสามารถเข้าจับกับบริเวณ T1 ในโมเลกุลของเอนไซม์ได้ ซึ่งจะถูกกำหนดโดยหมู่แทนที่จะเกาะกับวงแหวนของสารตั้งต้นและศักย์ไฟฟ้าของสารตั้งต้นต้องต่ำเพียงพอ โดยความต่างศักย์ของสารตั้งต้นถูกกำหนดโดยโครงสร้างทางเคมีของหมู่แทนที่ที่แตกต่างกันของสารตั้งต้นและสารตั้งต้นของเอนไซม์แลคเคสที่ทราบกันดี ทั้งมีการใช้กันอย่างกว้างขวาง

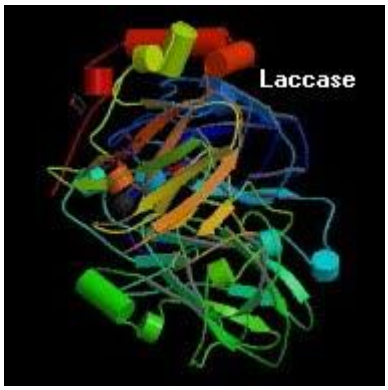
2.2.2 โครงสร้างผลึกของแลคเคส (Crystal structure of laccase)

โครงสร้างผลึก (Crystal structure) คือ การจัดเรียงกันของอะตอมเป็นการเฉพาะตัวในผลึก โครงสร้างผลึกประกอบด้วย หน่วยเซลล์ (Unit cell) ซึ่งเป็นกลุ่มของอะตอมที่จัดเรียงกันในทางเฉพาะเป็นโครงสร้างสามมิติ รูปผลึก (Crystal form) เกิดจากการจับกันหรือจัดเรียงตัวกันอย่างเป็นระเบียบของอะตอมในโครงสร้างภายในและปรากฏเป็นรูปผลึกมีหน้าผลึกด้านต่าง ๆ ประกอบกันขึ้นมาเป็นรูปทรงเรขาคณิตแตกต่างกัน ดังภาพที่ 2.1

2.2.2.1 ลักษณะโครงสร้างผลึกของแลคเคส

การศึกษาโครงสร้างผลึกของแลคเคส (Laccase) ใช้ความละเอียดขนาด (Resolution) 1.5 A° ใช้เทคนิคการแทนที่ของโมเลกุล โดยใช้รูปต้นแบบของแลคเคสจากเชื้อ *Coprinus cinereus* (pdb code : 1HFU) ซึ่งมีลักษณะโครงสร้างโปรตีนแบบพับขดงอและเป็นโปรตีนก้อนที่รวมกับน้ำตาล เรียกว่า ไกลโคโปรตีน (Glycoprotein) ที่มีขนาด 70 × 60 × 50 A° โครงสร้างโมเลกุลที่มีการจัดเรียงโดเมน (Cupredoxin-like domains) ในแต่ละโดเมนมีการต่อแบบ greek key β-barrel กับอะตอมของคอปเปอร์ 3 กลุ่ม (ภาพที่ 2.1) โดยโดเมนที่ 1 อยู่ในช่วง 1-141 โดเมนที่ 2 อยู่ในช่วง 142-303 และโดเมนที่ 3 อยู่ในช่วง 304-498 โครงสร้างโมเลกุลของแลคเคสมีความแข็งแรงและเสถียรมาก เนื่องจากการสร้างพันธะไฮโดรเจนซัลไฟด์ระหว่าง Cys85 กับ Cys485 ของโดเมนที่ 1 และ 3 ตามลำดับ และระหว่าง Cys117 กับ Cys204 ในโดเมนที่ 1 และ 2 แสดงโครงสร้างแลคเคสที่คล้ายกับแลคเคสในกลุ่มเชื้อรา *Basidiomyceteous* และ *Trametes versicolor* [15]

ตำแหน่งที่เกิด N-glycosylation ประกอบด้วย 3-10 ตำแหน่ง มีการเกิด Glycosilaytion 5 พันธะ ที่เชื่อมต่อด้วย α-linked ที่ Asn โดย N-acetylglucosamime 2 โมเลกุล และเชื่อมต่อด้วย β-linked จับกับ Asn โดย N-acetylglucosamime 3 โมเลกุล



ภาพที่ 2.1 โครงสร้างผลึกของ Trametes versicolor ประกอบด้วย 3 โดเมนที่จับกับกลุ่มคอปเปอร์ 3 กลุ่ม โดยโดเมนที่ 1 (สีน้ำเงิน) โดเมนที่ 2 (สีเขียว) และโดเมนที่ 3 (สีส้ม) มีสารตั้งต้น ABTS จับบริเวณ Mononuclear และมีพันธะไฮโดรเจนซัลไฟด์ (สีเหลือง) เกิดขึ้นด้วย [15]

เอนไซม์แลคเคสมีคอปเปอร์ (Copper) เป็นองค์ประกอบ และมีโครงสร้างเป็นแบบมัลติคอปเปอร์ (Multi Copper) เอนไซม์แลคเคสมีหน้าที่ออกซิไดซ์สารตั้งต้น และรีดิวซ์ (Reduce) โมเลกุลออกซิเจน (Oxygen) ให้เป็นน้ำ เช่น การเข้าทำปฏิกิริยากับสารประกอบฟีนอล (Phenol) ซึ่งเอนไซม์แลคเคสอาจจะทำปฏิกิริยาโดยตรงกับสารตั้งต้นหรืออาจจะต้องการสารตัวกลาง (Mediator compound) ทำหน้าที่เป็นสารตั้งต้นร่วมในการเร่งปฏิกิริยาด้วย

กลุ่มคอปเปอร์ที่เป็นองค์ประกอบภายในโครงสร้างโมเลกุลของแลคเคส (Copper type in structure of laccase) มี 3 กลุ่ม คือ

1) กลุ่มคอปเปอร์ T1 (Type-1-copper) เป็นคอปเปอร์สีน้ำเงินที่มีอะตอมของคอปเปอร์ อยู่แบบเดียวๆ มีความสามารถในการดูดกลืนแสง (Absorbance) อิเล็กตรอนที่ 610 นาโนเมตร

2) กลุ่มคอปเปอร์ T2 (Type-2-copper) เป็นคอปเปอร์ที่ไม่มีการดูดกลืนแสง (Absorbance) อิเล็กตรอน แต่จะมีการสร้าง EPR ซึ่งเป็นสัญญาณของโปรตีนจะทำงานร่วมกับคอปเปอร์ T3

3) กลุ่มคอปเปอร์ T3 (Type-3-copper) เป็นคอปเปอร์ที่มีอะตอมอยู่กันเป็นคู่หมุนกับคู่ ของคอป-เปอร์ จะมีการดูดกลืนแสง (Absorbance) อิเล็กตรอนที่ 330 นาโมเมตร

2.2.2.1 ปฏิกิริยาของแลคเคส (Reaction of laccase)

แลคเคสจะทำปฏิกิริยาออกซิเดชันรีดักชันกับอิเล็กตรอนของสารตั้งต้นบริเวณ Mononuclear (Type-1-copper) แล้วอิเล็กตรอนจะถูกถ่ายโอนผ่าน His-Cys-His ซึ่งเป็นบริเวณ Trinuclear (Type-2-copper/Type-3-copper) บริเวณนี้จะทำหน้าที่รีดิวซ์โมเลกุลของออกซิเจนได้

น้ำเกิดขึ้นและจะส่งออกภายนอกต่อไป โดยอิเล็กตรอนจะถูกถ่ายโอนผ่านช่องทางสำหรับการถ่ายโอนอิเล็กตรอนอยู่ 2 ช่องทาง ซึ่งเป็นบริเวณ Trinuclear (T2/T3) ช่องทางแรกเป็นโมเลกุลของคอปเปอร์ T3 (Type-3-copper) ช่องทางนี้จะจับกับโมเลกุลของออกซิเจน ส่วนช่องทางที่ 2 เป็นโมเลกุล ของคอปเปอร์ T2 (Type-2-copper) ช่องนี้จะทำการรีดิวซ์โมเลกุลของออกซิเจนได้น้ำเกิดขึ้น และน้ำจะเคลื่อนที่ไปผสมกับตัวทำละลายต่อไป [15]

2.3 สารยาฆ่าแมลง

2.3.1 ประเภทของสารเคมี [16-20]

สารยาฆ่าแมลงเป็นสารเคมีการเกษตรที่มีจำนวนชนิดมากที่สุด สารยาฆ่าแมลงแบ่งออกเป็นกลุ่มใหญ่ๆ ตามชนิดของสารเคมีได้ 4 ประเภท คือ

2.3.1.1 กลุ่มออร์กาโนคลอไรน์ (Organochlorine) ซึ่งเป็นกลุ่มของสารเคมีที่มีคลอรีนเป็นองค์ประกอบ ยาฆ่าแมลงในกลุ่มนี้ที่นิยมใช้กันมาก คือ ดีดีที (DDT) ดีลดริน (Dieldrin) ออลดริน (Aldrin) ท็อกซาฟีน (Toxaphene) คลอเดน (Chlordane) ลินเดน (Lindane) เอนดริน (Endrin) เฮปตาครอ (Heptachlor) เป็นต้น สารเคมีในกลุ่มนี้ส่วนใหญ่เป็นสารเคมีที่มีพิษไม่เลือก (คือเป็นพิษต่อแมลงทุกชนิด) และค่อนข้างจะสลายตัวช้า ทำให้พบตกค้างในห่วงโซ่อาหารและสิ่งแวดล้อมได้นาน บางชนิดอาจตกค้างได้นานหลายสิบปี ปัจจุบัน ประเทศส่วนใหญ่ทั่วโลกจะไม่อนุญาตให้ใช้สารเคมีในกลุ่มนี้ หรือไม่ก็มีการควบคุมการใช้ ไม่อนุญาตให้ใช้อย่างเสรี เพราะผลกระทบด้านสุขภาพและสิ่งแวดล้อม พิษของออร์กาโนคลอรีน ร่างกายมนุษย์จะได้รับ หรือดูดซึมสารกลุ่มนี้เข้าสู่ร่างกายได้โดยการกิน และหายใจ และเมื่อเข้าสู่ร่างกายแล้วจะไปสะสมอยู่ในไขมันตามส่วนต่าง ๆ ของร่างกาย ส่วนกลุ่มออร์กาโนคลอรีนทำให้เกิดอาการพิษทั้งแบบเรื้อรังและแบบเฉียบพลัน ดังนี้ อาการพิษแบบเรื้อรัง ผู้ป่วยจะแสดงอาการผิดปกติต่อระบบทางเดินอาหาร มีอาการเบื่ออาหาร คลื่นไส้ อาเจียน น้ำหนักลด เหน็ดเหนื่อย และเมื่อยล้าตามร่างกาย [17]

2.3.1.2 กลุ่มออร์กาโนฟอสเฟต (Organophosphate) ซึ่งเป็นกลุ่มที่มีฟอสฟอรัสเป็นองค์ประกอบ โดยสารเคมีในกลุ่มนี้ที่รู้จักกันคือ มาลาไธออน (malathion) อาซินอน (Azinon) เฟนนิโตรไธออน (Fenitrothion) พิริมิฟอสเมธิล (Pirimiphos methyl) และไดคลอวอส (Dichlorvos หรือ DDVP) เป็นต้น พิษของออร์กาโนฟอสเฟต สารกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟตเข้าสู่ร่างกายได้ โดยการกิน หายใจ และซึมเข้าสู่ผิวหนัง ความเป็นพิษจะขึ้นกับอัตราการเปลี่ยนแปลงสารพิษในร่างกายโดยวิธีไฮโดรไลซิส (Hydrolysis) ในตับ โดยทั่วไปสารกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟตมีพิษเฉียบพลันต่อมนุษย์และสัตว์มีกระดูกสันหลัง อาการเฉียบพลันจะทำให้เกิดอาการทางสมอง เนื่องจากความผิดปกติของระบบประสาทส่วนกลาง อาการที่พบ ได้แก่ มึนศีรษะ ปวดศีรษะ งง ซึม กระสับกระส่าย ถ้าอาการมากอาจจะชัก และหมดสติได้ ผู้ป่วยที่มีอาการมากอาจตายได้ เนื่องจากกระบวนการหายใจล้มเหลว ซึ่ง

อาจเกิดขึ้นได้จากหลอดลมตีบตันกล้ามเนื้อของระบบหายใจเป็นอัมพาต และศูนย์ควบคุมการหายใจในสองหยุดทำงาน ในรายที่มีอาการไม่รุนแรง อาจจะดีขึ้นใน 2 – 3 วันแต่จะอ่อนเพลียไม่มีแรงเป็นเวลานาน

2.3.1.3 กลุ่มคาร์บาเมต (Carbamate) ซึ่งมีคาร์บาริลเป็นองค์ประกอบสำคัญ โดยสารเคมีกำจัดแมลงที่รู้จักและใช้กันมาก คือ คาร์บาริล (Carbaril) คาร์โบฟูแรน (Carbo Furan) โพรพอกเซอร์ (Propoxur) เบนดิโอคาร์บ (Bendiocarb) ผู้ที่เสี่ยงต่อการได้รับพิษกลุ่มนี้เป็นกลุ่มเดียวกันกับออร์กาโนฟอสเฟต และก่อให้เกิดอาการเหมือนกัน พิษกลุ่มนี้มีผลต่อระบบประสาทในระยะสั้นโดยกลไกการออกฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ Acetylcholinesterase แต่ระยะเวลาออกฤทธิ์สั้นกว่ากลุ่มออร์กาโนฟอสเฟตและสลายตัวได้รวดเร็ว ทำให้ต้องรีบตรวจเลือดทันทีหลังสัมผัส และเกิดอาการ เพราะระดับเอนไซม์ จะลดลงสู่ระดับปกติได้เร็วกว่าออร์กาโนฟอสเฟตมาก

2.3.1.4 กลุ่มสารสังเคราะห์ไพรีทอย (Pyrethroid) เป็นสารเคมีกลุ่มที่สังเคราะห์ขึ้นโดยมีความสัมพันธ์ตามโครงสร้างของไพรีทริน (Phairetrin) ซึ่งเป็นสารธรรมชาติที่สกัดได้จากพืชไพรีทรัม (Pyretrum) สารเคมีในกลุ่มนี้มีความเป็นพิษต่อแมลงสูง แต่มีความเป็นพิษต่อสัตว์เลือดอุ่นต่ำ อย่างไรก็ตาม สารเคมีกลุ่มนี้มีราคาแพงจึงไม่ค่อยเป็นที่นิยมใช้ สารเคมีกำจัดแมลงในกลุ่มนี้ ได้แก่ เดลตาเมธริน (Deltamethrin) เพอร์เมธริน (Permethrin) เรสเมธริน (Resmethrin) และไบโอเรสเมธริน (Bioresmethrin) เป็นต้น โดยพิษของไพรีทรอยด์ สารกำจัดแมลงกลุ่มไพรีทรอยด์มีกลไกออกฤทธิ์เช่นเดียวกับสารพวกออร์กาโนคลอรีน แต่ฤทธิ์น้อยกว่ามักใช้สารกำจัดแมลงกลุ่มนี้ เพื่อกำจัดแมลงในบ้านเรือนเพราะออกฤทธิ์ให้เกิดอัมพาตในแมลงอย่างรวดเร็ว ส่วนใหญ่มีพิษต่อสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมค่อนข้างต่ำ อาการเป็นพิษจะทำให้คลื่นไส้ อาเจียน เป็นตะคริวที่ท้อง เบื่ออาหาร อ่อนเพลียมีอาการล้า ปวดศีรษะ มึนงง การรับประทานสารนี้ในปริมาณสูง (200-500 มล.) ทำให้เกิดอาการโคม่าภายใน 20 นาที กล้ามเนื้อกระตุกไม่พร้อมกัน และชัก

2.3.2 การปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อม

สารเคมีที่มีพิษร้ายแรงกระจายสู่ระบบนิเวศ ดังภาพที่ 2.2 จะก่อให้เกิดความเสียหายที่หลากหลายต่อสภาพแวดล้อม รวมถึงสัตว์และพืชที่เป็นประโยชน์

ศ.เดวิด พิเมนเทล แห่งมหาวิทยาลัยคอร์แนล, สหรัฐอเมริกา เคยอธิบายไว้ว่าน้อยกว่า 0.1% ของสารเคมีที่ใช้จะไปถึงศัตรูเป้าหมาย (targeted pests) ซึ่งหมายความว่าอีก 99.9% จะปนเปื้อน อยู่ในสิ่งแวดล้อมจนกว่าสารเคมีจะมีการสลายตัวไปโดยธรรมชาติ ภายหลังการฉีด พ่น หยอด หรือหว่าน สารยาฆ่าแมลงจะถูกดูดซึมเข้าไปในพืชและอยู่บนต้นพืชบางส่วน และที่เหลือจะปลิวไปในอากาศหรือรอเวลาที่น้ำจากแปลงเกษตรจะชะสารเคมีลงสู่ดินหรือแหล่งน้ำใกล้เคียง ปัญหาอาจลดลงหากสารยาฆ่าแมลงสามารถสลายตัวได้อย่างรวดเร็ว แต่อัตราการสลายตัวหรือค่าครึ่งชีวิต (half-life) มีความแตกต่างกันตามชนิดและสภาพแวดล้อม สารเคมีในกลุ่มออร์กาโนฟอรัส

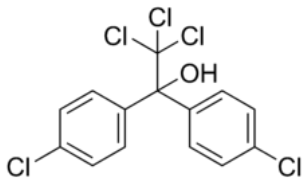
(Organophosphorus) หรือออร์กาโนฟอสเฟต (Organophosphate pesticides) เช่น ไดโครโตฟอส และอีพีเอ็น สามารถตกค้างในดินที่มีความเป็นกลางได้ในเวลาไม่กี่ชั่วโมงถึงหลายสัปดาห์ แต่จะมีอายุยาวนานขึ้นหลายเท่าตัวหากดินมีความเป็นกรดเล็กน้อย สารเคมีกลุ่มคาร์บาเมต (Carbamate) เช่น คาร์โบฟูราน (Carbofuran) แอลดิคาร์บ (Aldicarb) และเมโทมิล (Methomyl) ตกค้างในดินมากที่สุดประมาณ 50 สัปดาห์และในน้ำประมาณ 30 สัปดาห์ สารเคมีกลุ่มไพริทริน (Pyrethrin) มีค่าครึ่งชีวิตประมาณ 12 วันถึง 8 สัปดาห์ แต่มีอายุยาวนานขึ้นในพื้นที่ที่แสงส่องไม่ถึง ทั้งนี้ สารเคมีกลุ่มที่มีอัตราการสลายตัวช้าที่สุดและยังมีความอันตรายสูงคือกลุ่มออร์กาโนคลอรีน เช่น DDT และ เอนโดซัลแฟน ซึ่งใช้เวลาย่อยสลายในดินได้ประมาณ 1 – 15 ปี ดังนั้น จึงยังมีสารเคมีเหล่านี้ตกค้างในลุ่มแม่น้ำและคลองแยกต่าง ๆ ในปริมาณค่อนข้างสูง (แม้ว่าประเทศไทยได้ยกเลิกการใช้ไปแล้วแต่ยังมีการลักลอบนำเข้า และใช้อยู่ในปัจจุบัน) [21]

ภาพที่ 2.2 การปนเปื้อนของสารเคมีกำจัดศัตรูพืช [21]

2.4 ไดโคฟอล (Dicofol)

2.4.1 ลักษณะทั่วไปและโครงสร้าง

ไดโคฟอล เป็นชื่อสามัญที่ได้รับอนุญาตสำหรับองค์การมาตรฐานสากล (ISO) 2,2,2-trichloro-1,1-bis (4-chlorophenyl) ethanol มีสูตรทางเคมี: $C_{14}H_9Cl_5O$ อยู่ในกลุ่มของสารกำจัดศัตรูพืชออร์กาโนคลอรีน ผลิตจาก Dichloro diphenyl trichloroethane (DDT) จึงมีโครงสร้างทางเคมีที่คล้ายกันและคุณสมบัติคล้าย ๆ กัน ดังภาพที่ 2.3



ภาพที่ 2.3 โครงสร้างของไดโคฟอล [22]

2.4.2 คุณสมบัติทางกายภาพ

ไดโคฟอล บริสุทธิ์เป็นผลึกสีขาวที่เป็นของแข็ง ไดโคฟอลเป็นของเหลวข้นหนืดสีน้ำตาลแดงหรือสีเหลืองอำพัน มีความคงตัวในสภาวะที่แห้งและเย็นไม่ละลายในน้ำ แต่สามารถละลายได้ในตัว ทำละลายอินทรีย์ โดยสมบัติทางเคมีและกายภาพของไดโคฟอลในตารางที่ 2.1 [22]

ตารางที่ 2.1 สมบัติทางเคมีและกายภาพของไดโคฟอล

จุดเดือด (°C)	180
จุดหลอมเหลว (°C)	77.5 – 79.5
จุดวาบไฟ (°C) : (Open cup) **(Close up)**	193 120
ความสามารถในการละลายน้ำ (mg/ml ที่ 25 °C)	0.0008
ความหนาแน่น (ที่ 20°C)	1.45
ความดันไอ (mmHg ที่ 25°C)	3.98×10^{-7}

2.4.3 ความเป็นพิษของไดโคฟอล

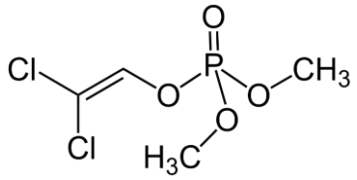
ไดโคฟอล สารกำจัดกลุ่มออร์กาโนคลอรีน สังเคราะห์จาก DDT เป็นวัตถุอันตรายทางการเกษตร (Pesticides) ออกฤทธิ์ในทางสัมผัสความเป็นพิษ มีพิษเฉียบพลันทางปาก ทางผิวหนัง อาการเกิดพิษ จะทำให้ผู้ได้รับพิษมีอาการปวดศีรษะ คลื่นไส้ อาเจียน กระวนกระวาย เจ็บที่ปลายลิ้น ริมฝีปากและบริเวณคางคล้ายกับถูกแทง ขากรรไกรแข็งและปวด ในกรณีที่มีอาการรุนแรงอาจมีอาการชักและตายได้ โดยมีสัญลักษณ์ความเป็นอันตรายบนฉลากตามภาพที่ 2.4 [23, 28]

ภาพที่ 2.4 สัญลักษณ์ความเป็นอันตรายบนฉลากของไดโคฟอล [23]

2.5 ไดคลอวอส (Dichlorvos)

2.5.1 ลักษณะทั่วไปและโครงสร้าง

ไดคลอวอส (Dichlorvos หรือ 2,2-dichlorovinyl dimethyl phosphate เรียกย่อ ๆ ว่า DDVP) เป็นสารยาฆ่าแมลงกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟต เป็นสารประกอบอะโรมาติก (Aromatic Compounds) ที่มีโมเลกุลประกอบด้วยคาร์บอน (C) ไฮโดรเจน (H) คลอรีน (Cl) ออกซิเจน (O) และฟอสฟอรัส(P) มีสูตรทางเคมี คือ $C_4H_7Cl_2O_4P$ มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 220.97 g/mol และไดคลอวอสมีลักษณะโครงสร้าง ดังภาพที่ 2.5 [24]



ภาพที่ 2.5 โครงสร้างของไดคลอวอส [24]

2.5.2 คุณสมบัติทางกายภาพ

ไดคลอวอส เป็นสารฆ่าแมลงในกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟต เป็นของเหลวไม่มีสี หรือมีสีเหลืองอ่อน มีกลิ่นเฉพาะตัว ไดคลอวอสในอากาศทำปฏิกิริยากับอนุมูลอิสระไฮดรอกซิลได้อย่างรวดเร็ว มีค่าครึ่งชีวิตเท่ากับ 15 ชั่วโมง ไดคลอวอสยังทำปฏิกิริยากับโอโซนได้อย่างช้า ๆ โดยมีค่าครึ่งชีวิตเท่ากับ 320 วัน โดยสมบัติทางเคมีและกายภาพของไดคลอวอสในตารางที่ 2.2 [24]

ตารางที่ 2.2 สมบัติทางเคมีและกายภาพของไดคลอวอส

จุดเดือด (°C)	140
จุดหลอมเหลว (°C)	-60
จุดวาบไฟ (°C) : (Open cup)	177
ความสามารถในการละลายน้ำ (mg/ml ที่ 20 °C)	8
ความหนาแน่น (ที่ 25°C)	1.415
ความดันไอ (mmHg ที่ 25°C)	1.58×10^{-2}

2.5.3 ความเป็นพิษของไดคลอวอส

ในมนุษย์ความเป็นพิษเฉียบพลันจากการได้รับไดคลอวอส คือ การยับยั้งเอนไซม์ acetylcholinesterase (AChE) ซึ่งทำหน้าที่ทำลายสารส่งผ่านประสาท acetylcholine (Ach)

บริเวณต่าง ๆ ในระบบประสาท 4 แห่ง ผู้ป่วยที่ได้รับไดคลอวอส ในปริมาณมากอาจตายได้ เนื่องจากการหายใจล้มเหลว กล้ามเนื้อของระบบหายใจเป็นอัมพาต หลอดลมบีบตัว และศูนย์ควบคุมการหายใจในสมองหยุดทำงาน ซึ่งเป็นผลจากการคั่งของ Ach บริเวณทั้ง 4 แห่งในระบบประสาท ประเทศไทยได้มีประกาศกระทรวงอุตสาหกรรม เรื่อง บัญชีรายชื่อวัตถุอันตราย พ.ศ. 2546 ซึ่งออกตามความในพระราชบัญญัติวัตถุอันตราย 2535 กำหนดให้ไดคลอวอสเป็นวัตถุอันตรายชนิดที่ 3 หมายความว่าการผลิต การนำเข้า การส่งออก หรือการมีไว้ในครอบครองต้องได้ใบอนุญาต โดยกรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์เป็นหน่วยงานรับผิดชอบ สำหรับไดคลอวอส ในผลิตภัณฑ์ที่ใช้ในบ้านเรือน สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา กระทรวงสาธารณสุขเป็นหน่วยงานรับผิดชอบ โดยมีสัญลักษณ์ความเป็นอันตรายบนฉลากในภาพที่ 2.6 [23-24]

ภาพที่ 2.6 สัญลักษณ์ความเป็นอันตรายบนฉลากของไดคลอวอส [24]

2.6 สารอินทรีย์ธรรมชาติ

แหล่งที่มาของการเกิดการปนเปื้อนสารอินทรีย์ในน้ำธรรมชาติ

2.6.1 สารอินทรีย์ที่เกิดจากการย่อยสลายของอินทรียสารซากพืชซากสัตว์ในธรรมชาติ เกิดเป็นสารอินทรีย์ที่มีขนาดโมเลกุลเล็กจนสามารถละลายน้ำได้ เช่น สารกลุ่มฮิวมิก (Humic acid) และฟลูวิก (Fluvic acid) ซึ่งสารทั้งสองนี้ยังมีส่วนทำให้เกิดสีในน้ำ (สีน้ำตาลอ่อนหรือสีชา)

2.6.2 สารอินทรีย์ที่จุลินทรีย์สร้างขึ้น ซึ่งจุลินทรีย์ประกอบด้วยโปรโตซัว แบคทีเรีย เชื้อรา และสาหร่ายเซลล์เดียว สารอินทรีย์ที่จุลินทรีย์สร้างขึ้นนี้อาจละลายปนเปื้อนมากับน้ำโดยตรง หรือเกิดจากซากจุลินทรีย์ถูกย่อยสลายทำให้สารอินทรีย์ที่อยู่ภายในเซลล์ละลายปนมากับน้ำ ตัวอย่าง เช่น สารกลุ่มไมโครซีสติน (Microcytin) ที่เกิดจากสาหร่ายสีน้ำเงินแกมเขียวชื่อ ไมโครซิสติน อารูจิโนซา (Microcystin aeruginosa) ซึ่งสารกลุ่มนี้บางตัวเป็นสารพิษ สาหร่ายสีน้ำเงินแกมเขียวชื่อโอเซียลาโตเรีย ลิโมสา (Oseillatoria limosa) จะผลิตสารกลุ่มที่เกิดจากการเผาผลาญในเซลล์ของสารเมททิวลิโซบอนนอล์ (Methylisorneol) ซึ่งเป็นสารที่ทำให้น้ำมีกลิ่นไม่พึงประสงค์เป็นต้น

2.6.3 สารอินทรีย์ที่เกิดจากชุมชน กิจกรรมทางการเกษตรและอุตสาหกรรม ตลอดจนการขับถ่าย ชำระร่างกายของมนุษย์มีส่วนทำให้มีสารอินทรีย์ปนเปื้อนไปกันน้ำได้ รวมทั้งสารเคมี ยาฆ่าแมลงและปุ๋ยเป็นต้น

2.6.4 สารอินทรีย์ที่เกิดจากระบบบำบัดน้ำเสียและระบบปรับสภาพน้ำ เช่น สารเร่งการตกตะกอนในระบบบำบัดน้ำเสีย นอกจากนี้ในระบบบำบัดน้ำเสียทางชีวภาพ ซึ่งมักจะมีสารอินทรีย์ที่จุลินทรีย์ไม่อาจย่อยสลายได้ ตลอดจนซากจุลินทรีย์หลงเหลือปนเปื้อนในน้ำที่ผ่านระบบบำบัด เมื่อผ่านระบบการฆ่าเชื้อโรคด้วยคลอรีนอาจทำให้สารเหล่านี้กลายเป็นสารอินทรีย์ที่มีความเป็นพิษเพิ่มมากขึ้นได้อีกด้วย เช่น ทำให้เกิดสารในกลุ่มไตรเฮโรมีเทน (Trihalomethanes, THM) ซึ่งเป็นสารที่เชื่อว่าเป็นสารก่อมะเร็งชนิดหนึ่ง [26]

จากแหล่งที่มาของการปนเปื้อนของสารอินทรีย์ในน้ำ พบว่าสารอินทรีย์ที่เกิดจากการย่อยสลายของซากพืชซากสัตว์เป็นปัจจัยหลัก ที่ก่อให้เกิดการปนเปื้อนสารอินทรีย์ในน้ำธรรมชาติ (Natural organic matter, NOM) แต่ถ้าพิจารณาตามความเข้มข้นของสารอินทรีย์ที่ปนเปื้อนในน้ำแต่ละแหล่ง พบว่าในน้ำเสียชุมชนมีปริมาณความเข้มข้นของสารอินทรีย์ปนเปื้อนสูงที่สุด

เนื่องจากสารอินทรีย์เป็นสารที่มีคาร์บอนและไฮโดรเจนเป็นองค์ประกอบหลัก บางทีเรียกว่า สารประกอบไฮโดรคาร์บอน (Hydrocarbon) ดังนั้นในการวิเคราะห์ปริมาณของสารอินทรีย์ว่าละลายอยู่ในน้ำมากหรือน้อยจะเป็นจำนวนคาร์บอนที่มีทั้งหมดในน้ำ (Total organic carbon, TOC) ในหน่วยมิลลิกรัมต่อลิตร (โดยไม่นับรวมคาร์บอนของสารประกอบอนินทรีย์หรือในรูปคาร์บอเนต (Carbonate) และไบคาร์บอเนต (Bicarbonate)) ถ้าสารอินทรีย์ที่มีองค์ประกอบของธาตุในหมู่7 ในตารางธาตุ หรือธาตุในกลุ่มเดียวกับคลอรีน ได้แก่ ฟลูออรีน(Fluorene) คลอรีน (Chlorine) โบรมีน (Bromine) ไอโอดีน (Iodine) แอสทาตีน (Astatine) ซึ่งเรียกว่า กลุ่มธาตุเฮโลเจน(Halogen) จะวัดในรูปของฮาโลเจนรวม (Total organic halogen, TOX) สารในกลุ่ม TOX มักจะมีความเป็นพิษอยู่หลายชนิด สารอินทรีย์ที่ละลายปนเปื้อนในน้ำ ถ้าเป็นสารอินทรีย์ที่ระเหยได้ง่าย บางครั้งอาจเรียกว่าสารอินทรีย์ระเหย (Volatile organic compound, VOC) ความเป็นพิษของสารในกลุ่ม TOX หรือสารอินทรีย์ที่ปนเปื้อนในน้ำในรูป TOC ขึ้นอยู่กับชนิดของสารซึ่งบางชนิดอาจมีพิษบางชนิดอาจไม่มีพิษ ต้องทำการพิจารณาเป็นการเฉพาะ แต่สิ่งที่ควรระวังในการนำน้ำไปผ่านระบบฆ่าเชื้อโรคด้วยคลอรีน โอโซน(Ozone) หรือใช้สารในกลุ่มออกซิไดซิงเอเจนต์ (Oxidizing agent) อื่น ๆ ถ้าเป็นน้ำที่มีปริมาณ NOM , TOC หรือ TOX สูง ๆ จะมีความเสี่ยงในการเกิดสารอนุพันธ์ที่เป็นพิษได้มาก จึงควรขจัดสาร NOM โดยใช้สารดูดซับจำพวกถ่านกัมมันต์ (Activated Carbon) เพื่อลดปริมาณ NOM ลงก่อนที่จะผ่านเข้าระบบฆ่าเชื้อโรคด้วยคลอรีน หรือใช้ระบบการขจัดเชื้อโรคโดยการกรองด้วยระบบไมโครฟิวเตรชัน (Micro filtration, MF) หรืออัลตราฟิลเตชัน (Ultra filtration, UF) แทนการฆ่าเชื้อด้วยสารเคมี [26]

2.7 วิธีการกำจัดสารยาฆ่าแมลง

การใช้วิธีทางชีวภาพ โดยการใช้จุลินทรีย์หรือผลิตภัณฑ์จากจุลินทรีย์ เช่น แบคทีเรีย และเชื้อรา

ซึ่งพบว่าเชื้อราส่วนใหญ่ดำรงชีวิตแบบย่อยสลายและดูดซึมสารอาหารจากซากของสิ่งมีชีวิตที่ตายแล้ว โดยสร้างเอนไซม์แล้วปลดปล่อยออกภายนอกเซลล์ (Extracellular enzyme) เพื่อย่อยสลายสารอินทรีย์ที่มีขนาดใหญ่ให้มีขนาดเล็กลงและดูดซึมเข้าสู่เซลล์หรือเส้นใย เพื่อนำไปใช้ในกระบวนการต่าง ๆ ภายในเซลล์ ตัวอย่างสารอินทรีย์ที่ถูกย่อยสลาย เช่น แป้ง เซลลูโลส (Cellulose) โปรตีน (Protein) ไคติน (Chitin) เคอราติน (Keratin) เป็นต้น

A.Cruz-Alcalde et al. (2018) [27] ศึกษาการกำจัดสารกำจัดศัตรูพืชขั้นสูงออกจากน้ำโดยกระบวนการโอโซน โดยศึกษาปฏิกิริยาการเปลี่ยนแปลงของผลิตภัณฑ์และความเป็นพิษที่เกี่ยวข้อง ซึ่งค่าคงที่ของปฏิกิริยา DDVP คือ โอโซน (O_3)และ ไฮดรอกไซด์(OH) มีค่าเท่ากับ 590 และ 2.2 x10^9 $M^{-1}s^{-1}$ ตามลำดับ ค่าเหล่านี้แสดงถึงการย่อยสลายที่เกิดขึ้นระหว่างการทดลองในกระบวนการย่อยสลาย และการวิเคราะห์ LC-MS สำหรับตัวอย่างโอโซน desmethyl dichlorvos (d-DDVP), dichloroacetic acid (DCA) และ dimethyl phosphate (DMP) พบว่ามีการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันในส่วนของโอโซนและไฮดรอกไซด์ ซึ่งในการย่อยสลายมีความเป็นไปได้ 3 แบบ แต่ในส่วนของการวิเคราะห์ทางชีวภาพ พบว่าโมเลกุลของโอโซนไม่สามารถลดความเป็นพิษของสารได้แต่มีความสำคัญในกระบวนการย่อยสลายได้ โดยทั่วไปโอโซนอาจเป็นทางเลือกในการบำบัดที่เหมาะสม สำหรับ DDVP TPs และการลดความเป็นพิษที่เกี่ยวข้องได้

Jianbo Zhang et al. (2010) [6] ได้ศึกษาการกำจัดไดโคฟอลออกจากน้ำด้วยการตรึงเซลลูเลสและปฏิกิริยาจลนพลศาสตร์ การกำจัดไดโคฟอลตรึงด้วยเซลลูเลส ซึ่งมีปัจจัยต่าง ๆ คือ ความเป็นกรด-ด่าง อุณหภูมิ กิจกรรมของเอนไซม์ และความเข้มข้นเริ่มต้นของไดโคฟอล โดยค่า pH ที่เหมาะสมสำหรับการกำจัดไดโคฟอลด้วยตรึงเซลลูโลสอยู่ที่ประมาณ 4-7 อุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับเซลลูเลสที่ตรึงคือ 45 องศาเซลเซียสและ 50 องศาเซลเซียส ปฏิกิริยาการกำจัดของเซลลูเลสที่ถูกตรึงพบว่าเป็นปฏิกิริยาอันดับหนึ่ง พลังงานกระตุ้นคือ 64.3 kJ mol^{-1}

Sibhi Mohammed et al. (2016) [7] ได้ศึกษาการกำจัดไดโคฟอลที่มีอยู่ในน้ำทิ้งด้วยกระบวนการเฟนตัน (Fenton Process) และกระบวนการ UV/H_2O_2 โดยศึกษาปัจจัยความเป็นกรด-ด่าง (pH) ความเข้มข้นของ H_2O_2 และความเข้มข้นของ Fe^{2+} ซึ่งการกำจัดไดโคฟอลด้วยกระบวนการเฟนตันนั้น ความเข้มข้นเริ่มต้นของ H_2O_2 เท่ากับ 60 mg/L และความเข้มข้นของ Fe^{2+} เท่ากับ 16 mg/L ที่ pH เท่ากับ 3 พบว่าที่อัตราคงที่เท่ากับ 0.0643 min^{-1} สามารถกำจัดไดโคฟอลได้ 100% ภายในเวลา 40 นาที ส่วนการบำบัดด้วยกระบวนการ UV/H_2O_2 นั้นความเข้มข้นของ H_2O_2 เท่ากับ 260 mg/L ที่อัตราคงที่เท่ากับ 0.0226 min^{-1} สามารถกำจัดไดโคฟอลที่ความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 3 ภายในเวลา 75 นาที ไปเพียง 80% เท่านั้น ดังนั้น จึงสามารถสรุปได้ว่าการบำบัดด้วยกระบวนการเฟนตันมีประสิทธิภาพมากกว่ากระบวนการ UV/H_2O_2 และสำหรับกระบวนการเฟนตันนั้นครึ่งชีวิต

ของไดโคฟอลเท่ากับ 10.78 นาที ด้วยเหตุนี้ทำให้การกำจัดไดโคฟอลด้วยกระบวนการเฟนตันจึงรวดเร็วกว่าวิธีที่เหลือ

พันธุ์เครือ ทิพย์โสด และคณะ (2555) [8] ศึกษาประสิทธิภาพของแบคทีเรียในการย่อยสลายสารไดโคฟอล ได้ทำการคัดแยกเชื้อแบคทีเรียจากดินที่มีการปนเปื้อนสารไดโคฟอลโดยใช้เทคนิคการเจือจางลำดับส่วน และเลี้ยงบนอาหาร Tryptic Soy Agar (TSA) ผลการทดลองพบว่าสามารถคัดแยกเชื้อแบคทีเรียได้ทั้งหมด 19 ไอโซเลต (Isolate) หลังจากนั้นนำ 19 ไอโซเลตมาทดสอบ โดยใช้ไดโคฟอล ความเข้มข้น 5 ppm เติมลงไปในอาหาร mineral salt yeast-extract medium (MSYM) เขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 300 ชั่วโมง ทำการวิเคราะห์ปริมาณสารไดโคฟอล โดยใช้วิธีแก๊สโครมาโตกราฟฟี ยี่ห้อ Agilent Technologies รุ่น 6890N ผลการทดสอบพบว่าได้เชื้อแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายไดโคโฟลได้อย่างสมบูรณ์ จำนวน 9 ไอโซเลต หลังจากนั้นนำเชื้อทั้ง 9 ไอโซเลต มาทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายไดโคฟอลที่ระยะเวลา 2 และ 4 ชั่วโมง ผลการทดสอบพบว่าเชื้อ MF4 มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายสูงที่สุดเท่ากับ 99.2 % ที่ ระยะเวลา 2 ชั่วโมง และเชื้อ MA4, MF2, MF4, SSF1และ SSF3 ที่มีประสิทธิภาพในการย่อยได้อย่างสมบูรณ์ที่ระยะเวลา 4 ชั่วโมง

สุภาพร ภารสุวรรณ และหฤทัย แก้วสันเทียะ (2559) [9] ศึกษาการกำจัดไดโคฟอลด้วยแลคเคสหยาบจาก *Lentinus polychrous* Lev. ซึ่งประสิทธิภาพในการกำจัดไดโคฟอลแปรผกผันกับความเข้มข้นของสารละลาย ไดโคฟอล โดยความเข้มข้นเริ่มต้นไดโคฟอลมากขึ้นประสิทธิภาพในการกำจัดไดโคฟอลมีแนวโน้มลดลง และค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมอยู่ในช่วงพีเอชที่เป็นกรด สำหรับการกำจัดไดโคฟอลในสภาวะที่เหมาะสมที่สุดที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้ คือ สารละลายมีค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 4 อุณหภูมิ 30-35 องศาเซลเซียส ความเข้มข้นของแลคเคส 0.358 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และความเข้มข้นสารละลายไดโคฟอลเริ่มต้นที่ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถกำจัดไดโคฟอลได้ 100% ภายในระยะเวลา 4 ชั่วโมง ซึ่งผลการศึกษาข้างต้นแสดงให้เห็นว่าแลคเคสหยาบมีศักยภาพในการประยุกต์ใช้กำจัดไดโคฟอล

สิทธิชัย กิจพฤกษ์และหนึ่งฤทัย ประสานทอง (2560) [10] ศึกษาการใช้เอนไซม์แลคเคสกึ่งบริสุทธิ์ในการกำจัดไดคลอวอสซึ่งประสิทธิภาพในการกำจัดไดคลอวอสแปรผกผันกับความเข้มข้นของสารละลายไดคลอวอส โดยความเข้มข้นเริ่มต้นไดคลอวอสมากขึ้นประสิทธิภาพในการกำจัดไดคลอวอสมีแนวโน้มลดลง และค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมอยู่ในช่วงพีเอชที่เป็นกรด สำหรับการกำจัดไดคลอวอสในสภาวะที่เหมาะสมที่สุดที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้ คือ สารละลายมีค่าความเป็นกรด-ด่างอยู่ในช่วงพีเอช 5 และ 6 อุณหภูมิห้องจนถึง 35 องศาเซลเซียส ความเข้มข้นของเอนไซม์แลคเคส 0.117 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ความเข้มข้นสารละลายไดคลอวอส เริ่มต้นที่ 0.48 มิลลิกรัมต่อลิตร และสารอินทรีย์ธรรมชาติ คือ 2 และ 4 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถกำจัดไดคลอวอสได้ 100% ภายใน

ระยะเวลา 60 นาที ซึ่งผลการศึกษาข้างต้นแสดงให้เห็นว่าแลคเคสกึ่งบริสุทธิ์มีประสิทธิภาพในการประยุกต์ใช้กำจัดไดคลอวอส

บทที่ 3
วิธีการดำเนินงานวิจัย

การดำเนินงานวิจัยนี้ได้ศึกษาการสกัดเอนไซม์เลคเคสกึ่งบริสุทธิ์และการกำจัดยาฆ่าแมลงด้วยเอนไซม์เลคเคส โดยเนื้อหาในบทนี้ได้กล่าวถึงหัวข้อต่าง ๆ ได้แก่ วัสดุและสารเคมี อุปกรณ์และเครื่องวิเคราะห์ การสกัดเอนไซม์และการเตรียมเอนไซม์แลคเคสกึ่งบริสุทธิ์ กรอบการศึกษา วิธีการดำเนินการทดลอง และการวิเคราะห์ผลและการคำนวณ

3.1 วัสดุและสารเคมี

3.1.1 ไดโคฟอล (CAS-NO : 115-32-2)

3.1.2 ไดคลอวอส

3.1.3 สารอินทรีย์ธรรมชาติ (NOM)

3.1.4 โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH)

3.1.5 กรดไตรคลอโรอะซิติค (Trichloroacetic acid : TCA)

3.1.6 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid) (ABTS)

3.1.7 ฟลอโรกลูซินอล (Phloroglucinol)

3.1.8 กรดซิตริก (Citric acid)

3.1.9 ไดเบสิก โซเดียมฟอสเฟต (Dibasic sodium phosphate : $Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$)

3.1.10 ไพริดีน (Pyridine)

3.1.11 นอร์มัลเฮกเซน (n-Hexane)

3.2 อุปกรณ์และเครื่องวิเคราะห์

3.2.1 เครื่องแก้ว ได้แก่

3.2.1.1 หลอดทดลอง

3.2.1.2 บีกเกอร์

3.2.1.3 กระบอกตวงขนาด

3.2.1.4 แท่งแก้วคนสาร

3.2.1.5 หลอดหยดสาร

3.2.2 เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง

3.2.3 เครื่องเขย่าอัตโนมัติ

3.2.4 เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge)

3.2.5 อ่างควบคุมอุณหภูมิ (Water bath)

3.2.6 เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (UV-VIS spectrophotometer)

3.2.7 เครื่องกวนสาร (Magnetic Stirrer)

3.3 การสกัดเอนไซม์และการเตรียมเอนไซม์แลคเคสกึ่งบริสุทธิ์

3.3.1 การสกัดเอนไซม์

นำเชื้อเห็ดบดออกมาชั่งน้ำหนัก แล้วเติมน้ำในอัตราส่วน 1 : 3 คนผสมให้เข้ากันโดยใช้เครื่อง กวนแบบแม่เหล็กปั่นที่ 3,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 45 นาที จากนั้นกรองด้วยผ้าขาวบาง นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 6,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 นาที จะได้ส่วนเอนไซม์หยาบที่เป็นของเหลว

3.3.2 การเตรียมเอนไซม์แลคเคสกึ่งบริสุทธิ์

นำเอนไซม์แลคเคสหยาบปริมาตร 6,000 มิลลิลิตร ป้อนผ่านระบบเยื่อกรองไมโครฟิลเตรชัน ที่มีขนาดคัดกรองน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 0.2 ไมครอน โดยปรับอัตราการไหลของระบบที่ 50 มิลลิลิตรต่อนาที บันทึกปริมาตรที่ได้ พร้อมเก็บตัวอย่างมาตรวจวิเคราะห์หาค่ากิจกรรมการทำงานของเอนไซม์และปริมาณโปรตีนทั้งในส่วนของรีเทนเทท(Retentate) และเพอมิเอท(Permeate) จากนั้นนำสารละลายส่วนเพอมิเอทป้อนผ่านระบบเยื่อกรองอัลตราฟิลเตรชันที่มีขนาดคัดกรองน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 30 กิโลดาลตัน (kDa) ปรับอัตราการไหลของระบบที่ 50 มิลลิลิตรต่อนาที บันทึกปริมาตรที่ได้พร้อมเก็บตัวอย่างมาตรวจวิเคราะห์หาค่ากิจกรรมการทำงานของเอนไซม์และปริมาณของโปรตีน

3.4 กรอบการศึกษา

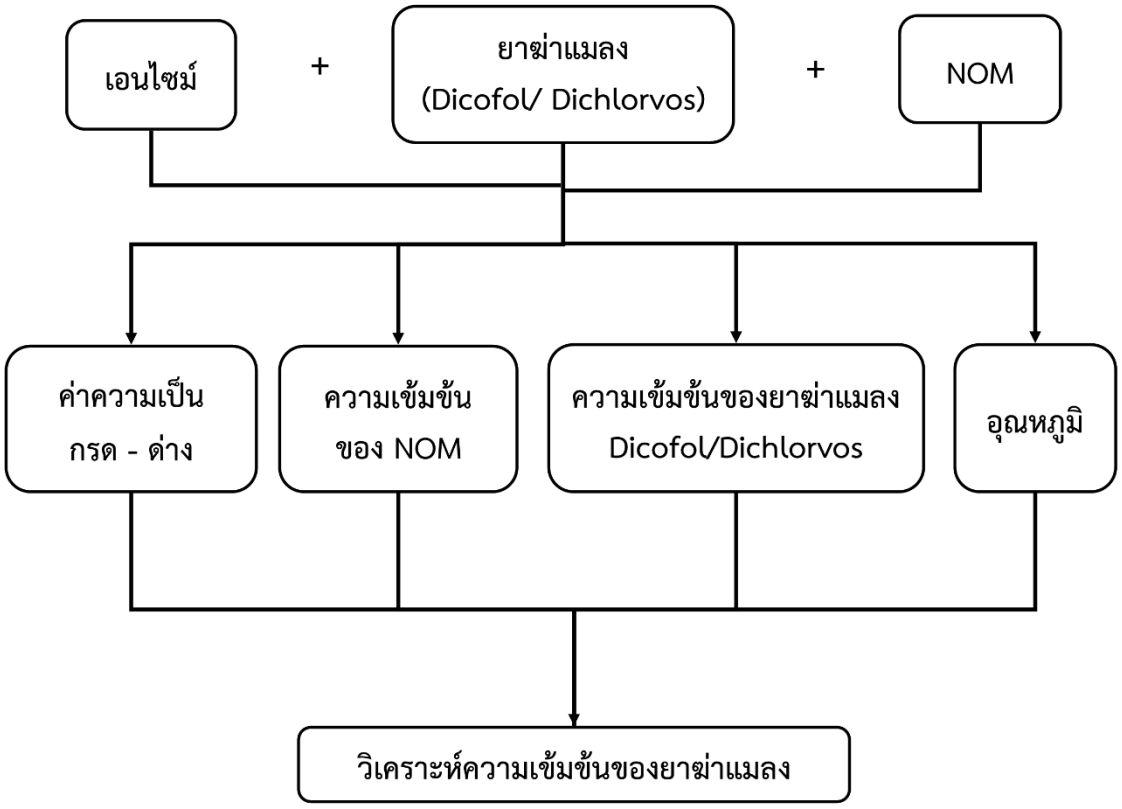
กรอบแนวคิดในการศึกษานี้ แสดงดังภาพที่ 3.1 โดยสามารถแบ่งขั้นตอนการดำเนินการ ทดลองเป็น 4 ขั้นตอนหลักดังนี้

3.4.1 ศึกษาผลของความเป็นกรด-ด่างของสารละลายที่มีผลต่อประสิทธิภาพการกำจัดยาฆ่าแมลง

3.4.2 ศึกษาผลความเข้มข้นของสารอินทรีย์ธรรมชาติที่มีผลต่อประสิทธิภาพการกำจัดยาฆ่าแมลง

3.4.3 ศึกษาผลความเข้มข้นสารละลายยาฆ่าแมลงที่มีผลต่อประสิทธิภาพการกำจัดยาฆ่าแมลง

3.4.4 ศึกษาผลของอุณหภูมิที่มีผลต่อประสิทธิภาพการกำจัดยาฆ่าแมลง



ภาพที่ 3.1 กรอบแนวคิดงานวิจัย

3.5 วิธีการดำเนินการทดลอง

3.5.1 ศึกษาผลของความเป็นกรด-ด่างของสารละลาย

ศึกษาผลของความเป็นกรด-ด่างของสารละลายในช่วง 3-8 ใช้อุณหภูมิในการทดลองเท่ากับ 25 องศาเซลเซียส โดยเตรียมสารละลายยาฆ่าแมลงที่มีสารอินทรีย์ธรรมชาติ ปริมาตรเท่ากับ 100 มิลลิลิตร ซึ่งเตรียมจากยาฆ่าแมลงที่มีความเข้มข้นเท่ากับ 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร และสารอินทรีย์ธรรมชาติที่มีความเข้มข้นเท่ากับ 90 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาตร 16.6 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรเท่ากับ 100 มิลลิลิตร ด้วยสารละลายไดเบสิกโซเดียมฟอสเฟต (Dibasic sodium phosphate) จากนั้นทำการปรับค่าความเป็นกรด-ด่างของสารลายให้อยู่ในช่วง 3-8 เติมเอนไซม์แลคเคสกึ่งบริสุทธิ์ ปริมาตร 50 มิลลิลิตร แล้วเริ่มเก็บตัวอย่างทุก ๆ 1 ชั่วโมงจนครบ 6 ชั่วโมง และเก็บที่ 12 ชั่วโมงและ 24 ชั่วโมง ตามลำดับ จากนั้นนำตัวอย่างมาวิเคราะห์ด้วยเครื่อง UV-VIS spectrophotometer โดยยาฆ่าแมลงตัวอย่างกลุ่มออร์กาโนคลอรีนคือ ไดโคฟอล ใช้ความยาวคลื่น 530 nm และตัวอย่างกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟต คือ ไดคลอวอส ใช้ความยาวคลื่น 475 nm เพื่อวิเคราะห์ความเข้มข้นของสารยาฆ่าแมลงคงเหลือในระบบแล้วนำไปคำนวณค่าประสิทธิภาพการกำจัดของสารยาฆ่าแมลงต่อไป

3.5.2 ศึกษาผลของความเข้มข้นของสารอินทรีย์ธรรมชาติ

ศึกษาผลของความเข้มข้นของสารอินทรีย์ธรรมชาติเท่ากับ 1, 5, 10, 15 และ 20 มิลลิกรัมต่อลิตร ใช้อุณหภูมิในการทดลองเท่ากับ 25 องศาเซลเซียส โดยเตรียมสารละลายยาฆ่าแมลงที่มีสารอินทรีย์ธรรมชาติ ปริมาตรเท่ากับ 100 มิลลิลิตร ซึ่งเตรียมจากยาฆ่าแมลงที่มีความเข้มข้นเท่ากับ 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร และสารอินทรีย์ธรรมชาติที่มีความเข้มข้นเท่ากับ 90 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาตร 1.6, 8.3, 16.6, 25 และ 33.3 มิลลิลิตร ตามลำดับความเข้มข้น ปรับปริมาตรเท่ากับ 100 มิลลิลิตร ด้วยสารละลายไดเบสิกโซเดียมฟอสเฟต (Dibasic sodium phosphate) จากนั้นเติมเอนไซม์แลคเคสกึ่งบริสุทธิ์ ปริมาตร 50 มิลลิลิตร แล้วเริ่มเก็บตัวอย่างทุก ๆ 1 ชั่วโมงจนครบ 6 ชั่วโมง และเก็บที่ 12 ชั่วโมงและ 24 ชั่วโมง ตามลำดับ จากนั้นนำตัวอย่างมาวิเคราะห์ด้วยเครื่อง UV-VIS spectrophotometer โดยยาฆ่าแมลงตัวอย่างกลุ่มออร์กาโนคลอรีนคือ ไดโคฟอล ใช้ความยาวคลื่น 530 nm และตัวอย่างกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟต คือ ไดคลอวอส ใช้ความยาวคลื่น 475 nm เพื่อวิเคราะห์ความเข้มข้นของสารยาฆ่าแมลงคงเหลือในระบบแล้วนำไปคำนวณค่าประสิทธิภาพการกำจัดของสารยาฆ่าแมลงต่อไป

3.5.3 ศึกษาผลของความเข้มข้นสารละลายยาฆ่าแมลง

ศึกษาผลของความเข้มข้นสารละลายยาฆ่าแมลง เท่ากับ 1, 2, 3, 4 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยใช้อุณหภูมิในการทดลองเท่ากับ 25 องศาเซลเซียส โดยเตรียมสารละลายยาฆ่าแมลงที่มีสารอินทรีย์ธรรมชาติ ปริมาตรเท่ากับ 100 มิลลิลิตร ซึ่งเตรียมจากยาฆ่าแมลงที่มีความเข้มข้นเท่ากับ 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาตร 1.5, 3, 4.5, 6 และ 7.5 มิลลิลิตร ตามลำดับความเข้มข้น และสารอินทรีย์ธรรมชาติที่มีความเข้มข้นเท่ากับ 90 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาตร 1.6 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรเท่ากับ 100 มิลลิลิตร ด้วยสารละลายไดเบสิกโซเดียมฟอสเฟต (Dibasic sodium phosphate) จากนั้นเติมเอนไซม์แลคเคสกึ่งบริสุทธิ์ ปริมาตร 50 มิลลิลิตร แล้วเริ่มเก็บตัวอย่างทุก ๆ 1 ชั่วโมงจนครบ 6 ชั่วโมง และเก็บที่ 12 ชั่วโมงและ 24 ชั่วโมง ตามลำดับ จากนั้นนำตัวอย่างมาวิเคราะห์ด้วยเครื่อง UV-VIS spectrophotometer โดยยาฆ่าแมลงตัวอย่างกลุ่มออร์กาโนคลอรีนคือ ไดโคฟอล ใช้ความยาวคลื่น 530 nm และตัวอย่างกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟต คือ ไดคลอวอส ใช้ความยาวคลื่น 475 nm เพื่อวิเคราะห์ความเข้มข้นของสารยาฆ่าแมลงคงเหลือในระบบแล้วนำไปคำนวณค่าประสิทธิภาพการกำจัดของสารยาฆ่าแมลงต่อไป

3.5.4 ศึกษาผลของอุณหภูมิที่มีผลต่อการกำจัดยาฆ่าแมลง

ศึกษาผลของณหภูมิที่มีผลต่อการสลายยาฆ่าแมลงที่ 25, 35, 40, 45 และ 50 องศาเซลเซียส โดยเตรียมสารละลายยาฆ่าแมลงที่มีสารอินทรีย์ธรรมชาติ ปริมาตรเท่ากับ 100 มิลลิลิตร ซึ่งเตรียมจากยาฆ่าแมลงที่มีความเข้มข้นเท่ากับ 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร และสารอินทรีย์ธรรมชาติที่มีความเข้มข้นเท่ากับ 90 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาตร 1.6 มิลลิลิตร ปรับปริมาตร

เท่ากับ 100 มิลลิลิตร ด้วยสารละลายไดเบสิกโซเดียมฟอสเฟต (Dibasic sodium phosphate) จากนั้นเติมเอนไซม์แลคเคสกึ่งบริสุทธิ์ ปริมาตร 50 มิลลิลิตร แล้วเริ่มเก็บตัวอย่างทุก ๆ 1 ชั่วโมงจนครบ 6 ชั่วโมง และเก็บที่ 12 ชั่วโมงและ 24 ชั่วโมง ตามลำดับ จากนั้นนำตัวอย่างมาวิเคราะห์ด้วยเครื่อง UV-VIS spectrophotometer โดยยาฆ่าแมลงตัวอย่างกลุ่มออร์กาโนคลอรีนคือ ไดโคฟอล ใช้ความยาวคลื่น 530 nm และตัวอย่างกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟต คือ ไดคลอวอส ใช้ความยาวคลื่น 475 nm เพื่อวิเคราะห์ความเข้มข้นของสารยาฆ่าแมลงคงเหลือในระบบแล้วนำไปคำนวณค่าประสิทธิภาพการกำจัดของสารยาฆ่าแมลงต่อไป

3.6 การวิเคราะห์ผลและการคำนวณ

3.6.1 การวิเคราะห์ค่ากิจกรรมการทำงานของเอนไซม์

การวิเคราะห์ค่ากิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ โดยใช้ ABTS เป็นสารตั้งต้นในการทดสอบ แล้วนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 420 นาโนเมตร (วิธีการวิเคราะห์ในภาคผนวก ก) โดยค่ากิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ (Enzyme activity) สามารถคำนวณได้ด้วยสมการที่ 3.1

$$\text{Enzyme Activity} = \frac{(A_{420})(0.001 \times 10^{6})(D)}{(\varepsilon)(V)(t)} \qquad (3.1)$$

เมื่อ A_{420} คือ ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 420 nm

D คือ Dilution factor

ε คือ ค่าสัมประสิทธิ์การดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 420 nm เท่ากับ 3.6×10^{4}

V คือ ปริมาตรของเอนไซม์ที่ใช้ทำปฏิกิริยา (ml)

t คือ เวลาที่ใช้ในการเกิดปฏิกิริยา (min)

3.6.2 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน

วิเคราะห์ปริมาณโปรตีน โดยใช้สารละลาย Bradford reagent ในการทดสอบ แล้วนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร นำค่าที่ได้ไปคำนวณหาค่าปริมาณโปรตีน (แสดงวิธีการวิเคราะห์ในภาคผนวก ก)

3.6.3 การวิเคราะห์ปริมาณสารยาฆ่าแมลง

การวิเคราะห์ปริมาณยาฆ่าแมลงในการศึกษาครั้งนี้ใช้วิธีการโดยนำน้ำสารละลายยาฆ่าแมลงที่ความเข้มข้นแตกต่างกันมาวิเคราะห์ด้วยเครื่อง UV-VIS spectrophotometer โดยกลุ่มยาฆ่าแมลงตัวอย่างกลุ่มออร์กาโนคลอรีนคือ ไดโคฟอล ใช้ความยาวคลื่น 530 nm และตัวอย่างกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟต คือ ไดคลอวอส ใช้ความยาวคลื่น 475 nm (วิธีการวิเคราะห์ในภาคผนวก ข)

3.6.4 การคำนวณประสิทธิภาพการกำจัดยาฆ่าแมลง

การคำนวณการกำจัดยาฆ่าแมลง คำนวณโดยนำความเข้มข้นของสารยาฆ่าแมลงเริ่มต้น ลบด้วยความเข้มข้นของสารยาฆ่าแมลง ณ เวลาใด ๆ หารด้วยความเข้มข้นเริ่มต้น แล้วคูณด้วย 100 ดังในสมการที่ 3.2

$$\text{การกำจัดสารยาฆ่าแมลง} = \left(\frac{\text{ความเข้มข้นเริ่มต้น - ความเข้มข้น ณ เวลาใด ๆ}}{\text{ความเข้มข้นเริ่มต้น}} \right) \times 100 \qquad (3.2)$$

บทที่ 4
ผลการทดลองและวิเคราะห์ผลการทดลอง

การศึกษาการกำจัดยาฆ่าแมลงในน้ำที่มีสารอินทรีย์ธรรมชาติด้วยเอนไซม์แลคเคสกึ่งบริสุทธิ์ที่เตรียมจากเชื้อเห็ด *Lentinus polychrous* Lev. โดยมีค่ากิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ 0.116 U/mL ยาฆ่าแมลงที่ใช้ในการศึกษาคือ ไดโคฟอล ซึ่งเป็นตัวแทนของยาฆ่าแมลงกลุ่มออร์กาโนคลอรีน และไดคลอวอส เป็นตัวแทนของยาฆ่าแมลงกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟต ในการศึกษาการกำจัดยาฆ่าแมลงจะทำการวิเคราะห์ค่าความเข้มข้นของสารละลายยาฆ่าแมลงในแต่ละปัจจัย ด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (UV-VIS spectrophotometer) ผลการศึกษาแสดงดังนี้

4.1 ผลการสกัดเอนไซม์และการเตรียมเอนไซม์แลคเคสกึ่งบริสุทธิ์

ผลการสกัดเอนไซม์และการเตรียมเอนไซม์แลคเคสกึ่งบริสุทธิ์ แสดงในตาราง 4.1 เมื่อนำเอนไซม์แลคเคสหยาบปริมาตร 6,000 มิลลิลิตร ไปวิเคราะห์ค่ากิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ (Activity) เท่ากับ 0.134 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ปริมาณโปรตีน (Protein) เท่ากับ 0.109 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และนำมาคำนวณค่ากิจกรรมการทำงานจำเพาะ (Specific activity) ได้เท่ากับ 1.238 ยูนิตต่อมิลลิกรัม มาทำให้บริสุทธิ์โดยผ่านระบบเยื่อกรองที่ประกอบด้วยไมโครฟิลเตรชัน (Microfiltration, MF) และอัลตราฟิลเตรชัน (Ultrafiltration, UF) พบว่าเมื่อนำแลคเคสหยาบผ่านไมโครฟิลเตรชันจะได้สารละลายสองส่วนคือ ส่วนรีเทนเทท (Retentate) และเพอมิเอท (Permeate) โดยได้ปริมาตรเท่ากับ 1500 มิลลิลิตร และ 4500 มิลลิลิตร ตามลำดับ และเมื่อนำไปคำนวณหาค่ากิจกรรมการทำงานของเอนไซม์พบว่าส่วนของรีเทนเททเท่ากับ 0.011 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ปริมาณโปรตีนเท่ากับ 0.073 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และส่วนของเพอมิเอท จะได้ค่ากิจกรรมการทำงานของเอนไซม์เท่ากับ 0.121 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ปริมาณโปรตีนเท่ากับ 0.036 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งจะเห็นว่าเอนไซม์แลคเคสจะมีค่ากิจกรรมการทำงานที่สูงอยู่ในส่วนของเพอมิเอท ดังจะเห็นได้จากค่ากิจกรรมการทำงานจำเพาะ ส่วนของเพอมิเอท สูงกว่ารีเทนเทท ดังนั้นจึงนำในส่วนของเพอมิเอทที่ผ่านระบบไมโครฟิลเตรชันไปทำให้บริสุทธิ์เพิ่มขึ้นโดยใช้ระบบอัลตราฟิลเตรชันและเมื่อผ่านระบบอัลตราฟิลเตรชันจะพบว่าค่ากิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ ที่สูงอยู่ที่บริเวณของส่วนรีเทนเทท โดยพบว่าเพิ่มขึ้นจากค่ากิจกรรมการทำงานจำเพาะเท่ากับ 1.238 ยูนิตต่อมิลลิกรัม เพิ่มขึ้นเป็น 5.880 ยูนิตต่อมิลลิกรัม เมื่อนำมาคำนวณค่าความบริสุทธิ์ (Purification fold) พบว่าเอนไซม์มีความบริสุทธิ์สูงขึ้นเท่ากับ 4.751 จะเห็นว่าการใช้ระบบอัลตราฟิลเตรชัน โดยใช้ขนาดมวลโมเลกุล 30 กิโลดาลตัน สามารถทำให้เอนไซม์มี

ความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น เนื่องจากเอนไซม์มีขนาดมวลโมเลกุลเท่ากับ 55.6 กิโลดาลตัน [29] จึงทำให้เอนไซม์ส่วนใหญ่อยู่ในส่วนของรีเทนเทท ในขณะที่โปรตีนส่วนอื่น ๆ สามารถหลุดออกจากระบบได้

ตารางที่ 4.1 ผลการสกัดเอนไซม์และการเตรียมเอนไซม์แลคเคสกึ่งบริสุทธิ์

		Partial purification of laccase				
		Volume (ml)	Activity (U/ml)	Protein (mg/ml)	Specific activity (U/mg)	Purification folds
Crude enzyme		6000	0.134	0.109	1.238	1.000
MF	retentate	1500	0.011	0.073	0.154	0.125
	permeate	4500	0.121	0.036	3.375	2.726
UF	permeate	1500	0.002	0.024	0.078	0.063
	retentate	3000	0.116	0.020	5.880	4.751

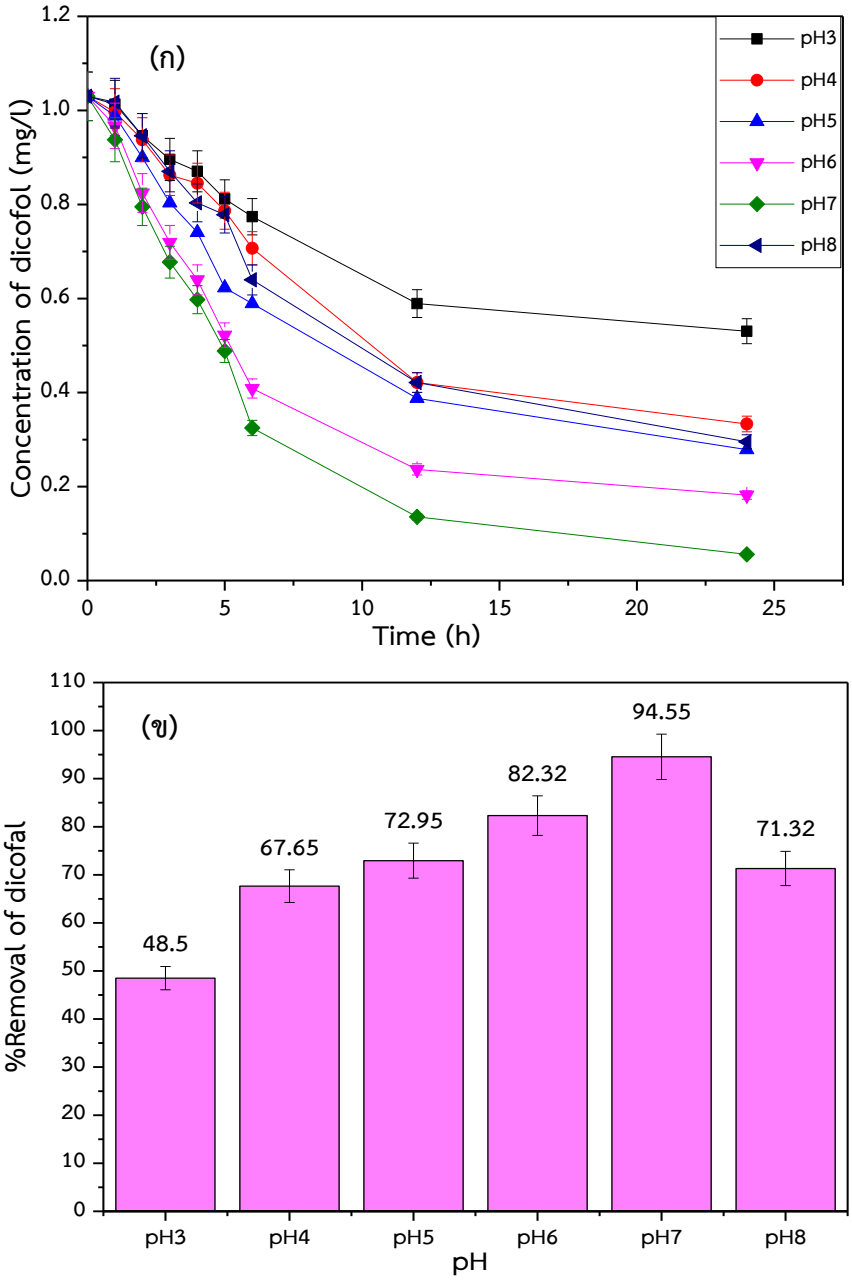
4.2 ผลของความเป็นกรด-ด่างของสารละลายที่มีผลต่อการกำจัดยาฆ่าแมลง

จากการศึกษาผลของค่าความเป็นกรด-ด่างของสารละลายที่มีผลต่อการกำจัดยาฆ่าแมลงในน้ำที่มีสารอินทรีย์ธรรมชาติด้วยเอนไซม์แลคเคสกึ่งบริสุทธิ์นั้น การทดลองนี้ใช้ความเข้มข้นเอนไซม์เท่ากับ 0.116 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 50 มิลลิลิตร สารละลายยาฆ่าแมลงความเข้มข้นเท่ากับ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ความเข้มข้นสารอินทรีย์ธรรมชาติเท่ากับ 10 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส และใช้ค่าความเป็นกรด-ด่างที่ 3, 4, 5, 6, 7 และ 8 ผลการศึกษาแสดงดังภาพที่ 4.1 และ 4.2

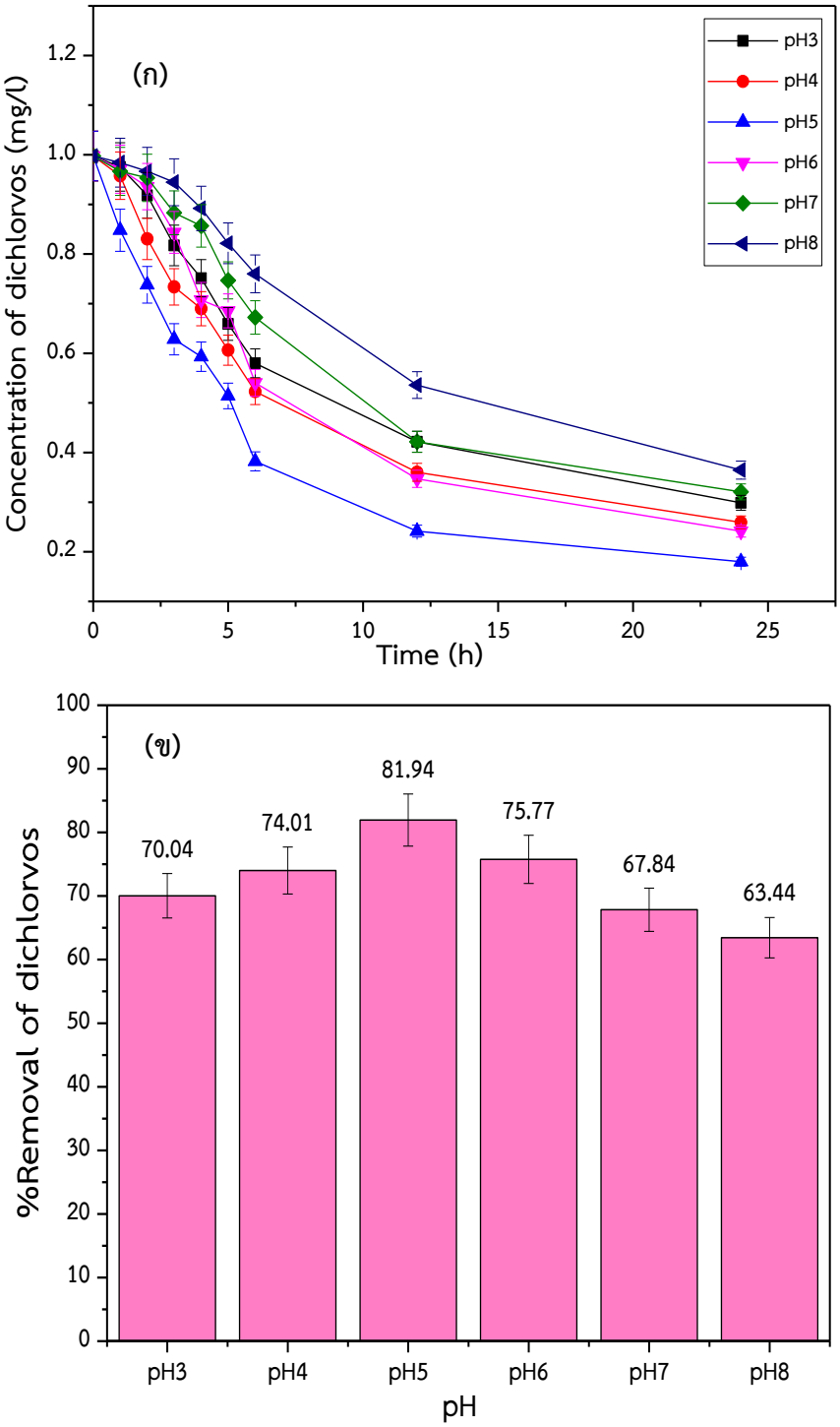
จากผลของความเป็นกรด-ด่างของสารละลายที่มีผลต่อการกำจัดไดโคฟอล (ภาพที่ 4.1) พบว่าความเข้มข้นของไดโคฟอลเปลี่ยนแปลงเมื่อเวลาเพิ่มขึ้นทุกค่าความเป็นกรด-ด่าง (ภาพที่ 4.1(ก)) โดยเมื่อเวลาเพิ่มขึ้นความเข้มข้นของไดโคฟอลมีแนวโน้มลดลงอย่างรวดเร็วในช่วง 12 ชั่วโมงแรก หลังจากนั้นความเข้มข้นลดลงไม่มากเมื่อครบ 24 ชั่วโมง โดยที่ความเป็นกรด-ด่างที่ 7 ความเข้มข้นของไดโคฟอลลดลงอย่างสูงที่สุด ในขณะที่ค่าความเป็นกรด-ด่างที่ 3 มีการลดลงน้อยที่สุด และเมื่อนำความเข้มข้นของไดโคฟอลที่เหลือที่ชั่วโมงที่ 24 มาคำนวณเปอร์เซ็นต์การกำจัดดังแสดงในภาพ 4.1 (ข) พบว่า เปอร์เซ็นต์การกำจัดเท่ากับ 94.55%, 82.32%, 72.95%, 71.32%, 67.65% และ 48.5% ที่ค่าความเป็นกรด-ด่างที่ 7, 6, 5, 8, 4 และ 3 ตามลำดับ

สำหรับผลของความเป็นกรด-ด่างของสารละลายที่มีผลต่อการกำจัดไดคลอวอส (ภาพที่ 4.2) พบว่าแนวโน้มในการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของไดคลอวอสกับเวลา (ภาพที่ 4.2 (ก)) มีแนวโน้มการลดลงคล้ายกับไดโคฟอล แต่ค่าความเป็นกรด-ด่างที่ลดลงมากที่สุดคือ ค่าความเป็นกรด-ด่างที่ 5 และลดลงน้อยที่สุดที่ค่าความเป็นกรด-ด่างที่ 8 เมื่อนำมาคำนวณเปอร์เซ็นต์การกำจัดที่เวลา 24 ชั่วโมง

(ภาพที่ 4.2 (ข)) พบว่าเปอร์เซ็นต์การกำจัดเท่ากับ 81.94%, 75.77%, 74.01%, 70.04%, 67.84% และ 63.44% ที่ค่าความเป็นกรด-ด่างที่ 5, 6, 4, 3, 7 และ 8 ตามลำดับ



ภาพที่ 4.1 ผลของความเป็นกรด-ด่างของสารละลายที่มีผลต่อการกำจัดไดโคฟอล (ก) ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของไดโคฟอลที่เปลี่ยนแปลงกับเวลา (ข) เปอร์เซ็นต์การกำจัดไดโคฟอลที่เวลา 24 ชั่วโมง เมื่อมีการเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรด-ด่าง



ภาพที่ 4.2 ผลของความเป็นกรด-ด่างของสารละลายที่มีผลต่อการกำจัดไดคลอวอส

(ก) ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของไดคลอวอสที่เปลี่ยนแปลงกับเวลา

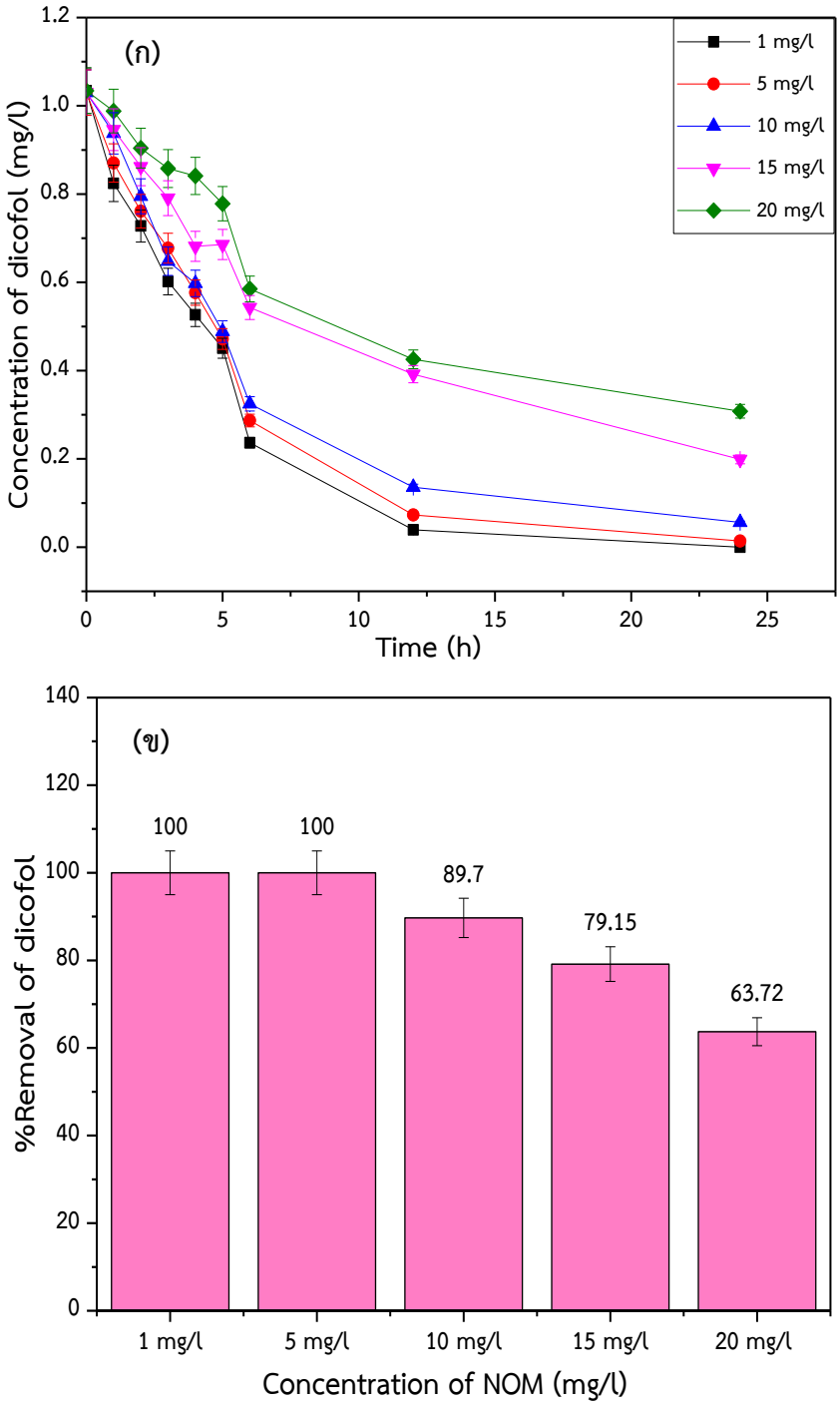
(ข) เปอร์เซ็นต์การกำจัดไดคลอวอสที่เวลา 24 ชั่วโมง เมื่อมีการเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรด-ด่าง

จากผลการศึกษาข้างต้นสามารถอภิปรายได้ว่า การเปลี่ยนแปลงของความเป็นกรด-ด่าง ส่งผลโดยตรงต่อกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ เนื่องจากการปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง จะทำให้มีการเปลี่ยนแปลงประจุบริเวณเร่ง (active site) ของเอนไซม์ ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงรูปร่างหรือโครงสร้างของเอนไซม์ จึงทำให้ความสามารถในการเข้าจับสารตั้งต้นเปลี่ยนไป และจะเห็นว่าเมื่อเปรียบเทียบระหว่างการใช้ไดโคฟอลและไดคลอวอส ซึ่งเป็นสารตั้งต้นคนละชนิดกันจะพบว่าความสามารถในการทำงานของเอนไซม์ที่สารตั้งต้นที่ต่างกัน จะให้ความเป็นกรด-ด่างที่ต่างกันเช่นกัน และจากการศึกษาของ Zhi-Feng Liu et al., (2012) [30] ศึกษาผลกระทบของสารลดแรงตึงผิวต่อการกำจัดฟีนอลด้วยแลคเคสในสารละลายในน้ำ (Aqueous solution) ได้ทำการศึกษาปัจจัยของค่าความเป็นกรด-ด่าง ในช่วง 3-9 พบว่าประสิทธิภาพในการกำจัดฟีนอลมีค่าสูงสุดที่ความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 6 และเปอร์เซ็นต์การกำจัดน้อยมาก เมื่อค่าความเป็นกรด-ด่าง อยู่ในช่วง 8-9 เมื่อเทียบกับช่วง 3-6 จากงานวิจัยที่นำมาอ้างอิงแสดงให้เห็นว่าการกำจัดสารตั้งต้นที่ต่างชนิดกันถึงแม้จะใช้เอนไซม์ชนิดเดียวกันและการทำงานของเอนไซม์สูงสุดนั้นมีค่าที่แตกต่างกัน

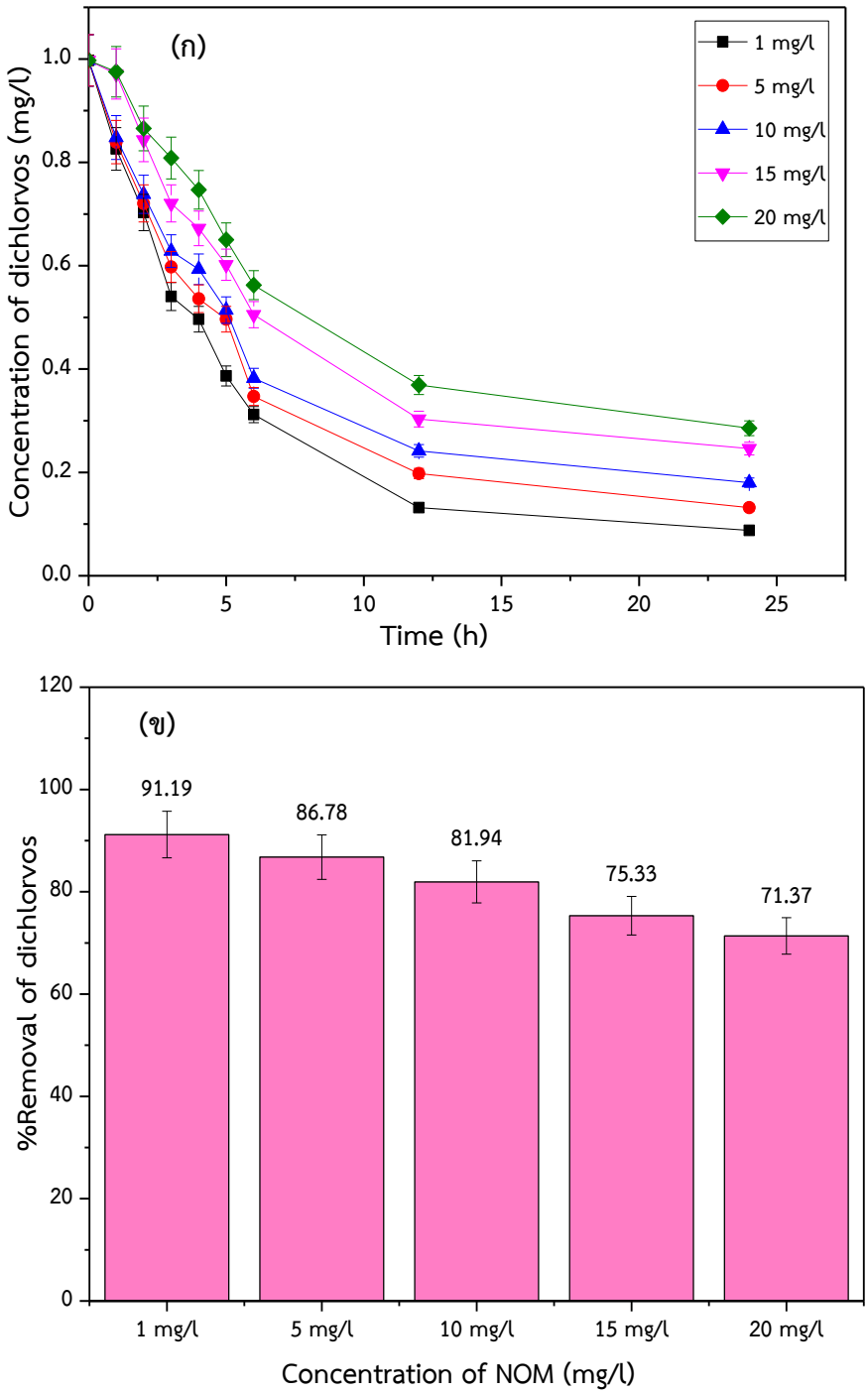
และจากการศึกษางานวิจัยของสุภาพร ภารสุวรรณ และหฤทัย แก้วสันเทียะ (2559) [9] ได้ศึกษาการกำจัดไดโคฟอลด้วยแลคเคสหยาบจาก *Lentinus polychrous* Lev. ซึ่งในระบบศึกษาที่ค่าความเป็นกรด-ด่างที่ 4-8 พบว่าระบบสามารถกำจัดไดโคฟอลได้ 100% ที่ค่าความเป็นกรด-ด่างที่ 4, 5 และ 6 ที่เวลา 6 ชั่วโมง และในขณะที่การกำจัดไดคลอวอส สามารถกำจัดได้ 100% ที่ค่าความเป็นกรด-ด่างที่ 5 และ 6 ที่เวลา 60 นาทีแรก ซึ่งจะเห็นว่าการกำจัดให้เปอร์เซ็นต์การกำจัดสูงสุดที่ค่าความเป็นกรด-ด่างที่ต่างกัน จากผลการศึกษาข้างต้นอาจอธิบายได้ว่า โดยปกติแล้วเอนไซม์แลคเคสมีการทำงานได้ดีในช่วงค่าความเป็นกรด-ด่างที่ 4-7 แต่หากในระบบมีการเติม NOM อาจทำให้ส่งผลต่อการทำงานของเอนไซม์แลคเคส เมื่อมีการเปลี่ยนค่าความเป็นกรด-ด่าง จึงทำให้ค่าการกำจัดเปลี่ยนแปลงไปด้วย

4.3 ผลความเข้มข้นของสารอินทรีย์ธรรมชาติที่มีผลต่อการกำจัดยาฆ่าแมลง

จากการศึกษาผลความเข้มข้นของสารอินทรีย์ธรรมชาติที่มีผลต่อการกำจัดยาฆ่าแมลงในน้ำที่มีสารอินทรีย์ธรรมชาติด้วยเอนไซม์แลคเคสกึ่งบริสุทธิ์ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส การทดลองนี้ใช้ความเข้มข้นเอนไซม์เท่ากับ 0.116 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 50 มิลลิลิตร สารละลายยาฆ่าแมลงมีความเข้มข้นเท่ากับ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยสารไดโคฟอลใช้ค่าความเป็นกรด-ด่างที่ 7 ส่วนสารไดคลอวอสใช้ค่าความเป็นกรด-ด่างที่ 5 ซึ่งความเข้มข้นของสารอินทรีย์ธรรมชาติที่ศึกษาคือ 1, 5, 10, 15 และ 20 มิลลิกรัมต่อลิตร ผลการศึกษาแสดงดังภาพที่ 4.3 และ 4.4



ภาพที่ 4.3 ผลความเข้มข้นของสารอินทรีย์ธรรมชาติที่มีผลต่อการกำจัดไดโคฟอล
(ก) ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของไดโคฟอลที่เปลี่ยนแปลงกับเวลา
(ข) เปอร์เซ็นต์การกำจัดไดโคฟอล ที่เวลา 24 ชั่วโมง เมื่อค่าความเข้มข้นของ NOM เริ่มต้นต่างกัน



ภาพที่ 4.4 ผลความเข้มข้นของสารอินทรีย์ธรรมชาติที่มีผลต่อการกำจัดไดคลอวอส (ก) ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของไดคลอวอสที่เปลี่ยนแปลงกับเวลา (ข) เปอร์เซ็นต์การกำจัดไดคลอวอสที่เวลา 24 ชั่วโมง เมื่อค่าความเข้มข้นของ NOM เริ่มต้นต่างกัน

จากภาพที่ 4.3 ผลความเข้มข้นของสารอินทรีย์ธรรมชาติที่มีผลต่อการกำจัดไดโคฟอล พบว่าความเข้มข้นของไดโคฟอลเปลี่ยนแปลงเมื่อเวลาเพิ่มขึ้นทุกค่าความเข้มข้นของสารอินทรีย์ธรรมชาติ (ภาพที่ 4.3(ก)) จะเห็นว่าความเข้มข้นของสารอินทรีย์ธรรมชาติ 1, 5, 10 มิลลิกรัมต่อลิตร ความเข้มข้นของไดโคฟอลลดลงสูงสุดที่ 12 ชั่วโมงแรก เมื่อเทียบกับความเข้มข้นของสารอินทรีย์ธรรมชาติที่ 15 และ 20 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่มีแนวโน้มการลดลงของความเข้มข้นของไดโคฟอลได้น้อย หลังจากนั้นความเข้มข้นลดลงไม่มากเมื่อครบ 24 ชั่วโมง โดยที่ความเข้มข้นของสารอินทรีย์ธรรมชาติ 1 และ 20 มิลลิกรัมต่อลิตร ความเข้มข้นของไดโคฟอลลดลงสูงสุด ในขณะที่ความเข้มข้นของสารอินทรีย์ธรรมชาติ 20 มีการลดลงน้อยที่สุด และเมื่อนำความเข้มข้นของไดโคฟอลที่เหลือที่ชั่วโมงที่ 24 มาคำนวณเปอร์เซ็นต์การกำจัดดังแสดงในภาพ 4.3 (ข) พบว่าเปอร์เซ็นต์การกำจัดเท่ากับ 100%, 100%, 89.70%, 79.15% และ 63.71% ที่ความเข้มข้นของสารอินทรีย์ธรรมชาติเท่ากับ 1, 5, 10, 15 และ 20 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ

และสำหรับผลของความเข้มข้นของสารอินทรีย์ธรรมชาติที่มีผลต่อการกำจัดไดคลอวอส (ภาพที่ 4.4) พบว่าแนวโน้มในการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของไดคลอวอสเมื่อเทียบกับเวลา (ภาพที่ 4.4 (ก)) มีแนวโน้มการลดลงคล้ายกับไดโคฟอล โดยที่ความเข้มข้นของสารอินทรีย์ธรรมชาติ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ความเข้มข้นของไดคลอวอสลดลงสูงสุด ในขณะที่ความเข้มข้นของสารอินทรีย์ธรรมชาติ 20 มิลลิกรัมต่อลิตร มีการลดลงน้อยที่สุด และเมื่อนำความเข้มข้นของไดคลอวอสที่เหลือที่ชั่วโมงที่ 24 มาคำนวณเปอร์เซ็นต์การกำจัดดังแสดงในภาพ 4.4 (ข) พบว่าเปอร์เซ็นต์การกำจัดเท่ากับ 91.19%, 86.78%, 81.94%, 75.33% และ 71.37% ที่ความเข้มข้นของสารอินทรีย์ธรรมชาติเท่ากับ 1, 5, 10, 15 และ 20 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ

จากผลการทดลองทั้งสองข้างต้นพบว่า จากการศึกษาดังกล่าวสามารถอธิบายได้ว่า เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารอินทรีย์ธรรมชาติให้แก่ระบบ ประสิทธิภาพการกำจัดไดโคฟอลและไดคลอวอสลดลง และเมื่อเปรียบเทียบค่าการกำจัดพบว่าไดโคฟอลและไดคลอวอสมีค่าการกำจัดต่างกัน ซึ่งจากผลข้างต้นอาจแบ่งการอธิบายได้เป็น 2 กรณี คือในกรณีที่ 1 เมื่อในระบบมีสารอินทรีย์ธรรมชาติอาจจะไปยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แลคเคสต่อกำจัดยาฆ่าแมลงทั้ง 2 ชนิด และในกรณีที่ 2 สารอินทรีย์ธรรมชาติอาจจะไปจับกับยาฆ่าแมลง ซึ่งตำแหน่งที่เข้าจับต่างกัน เนื่องจากโครงสร้างของสารทั้งสองต่างกัน ส่งผลให้การทำงานของเอนไซม์เข้าไปกำจัดได้ลดลง ซึ่งจากมูลเหตุข้างต้นของทั้ง 2 กรณี จึงทำให้ค่าการกำจัดที่ได้ต่างกัน

โดยจากการศึกษางานวิจัยของ สิทธิชัย กิจพฤกษ์และหนึ่งฤทัย ประสานทอง (2560) [10] ได้ศึกษาการใช้เอนไซม์แลคเคสกึ่งบริสุทธิ์ในการกำจัดไดคลอวอส ในระบบศึกษาไดคลอวอสความเข้มข้นเท่ากับ 0.48 มิลลิกรัมต่อลิตร ควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 6 และเติมสารอินทรีย์ธรรมชาติที่ 2, 4, 6, 8 และ 10 มิลลิกรัมต่อลิตร ระบบสามารถกำจัดไดคลอวอสได้ 100% ที่สารอินทรีย์ธรรมชาติ

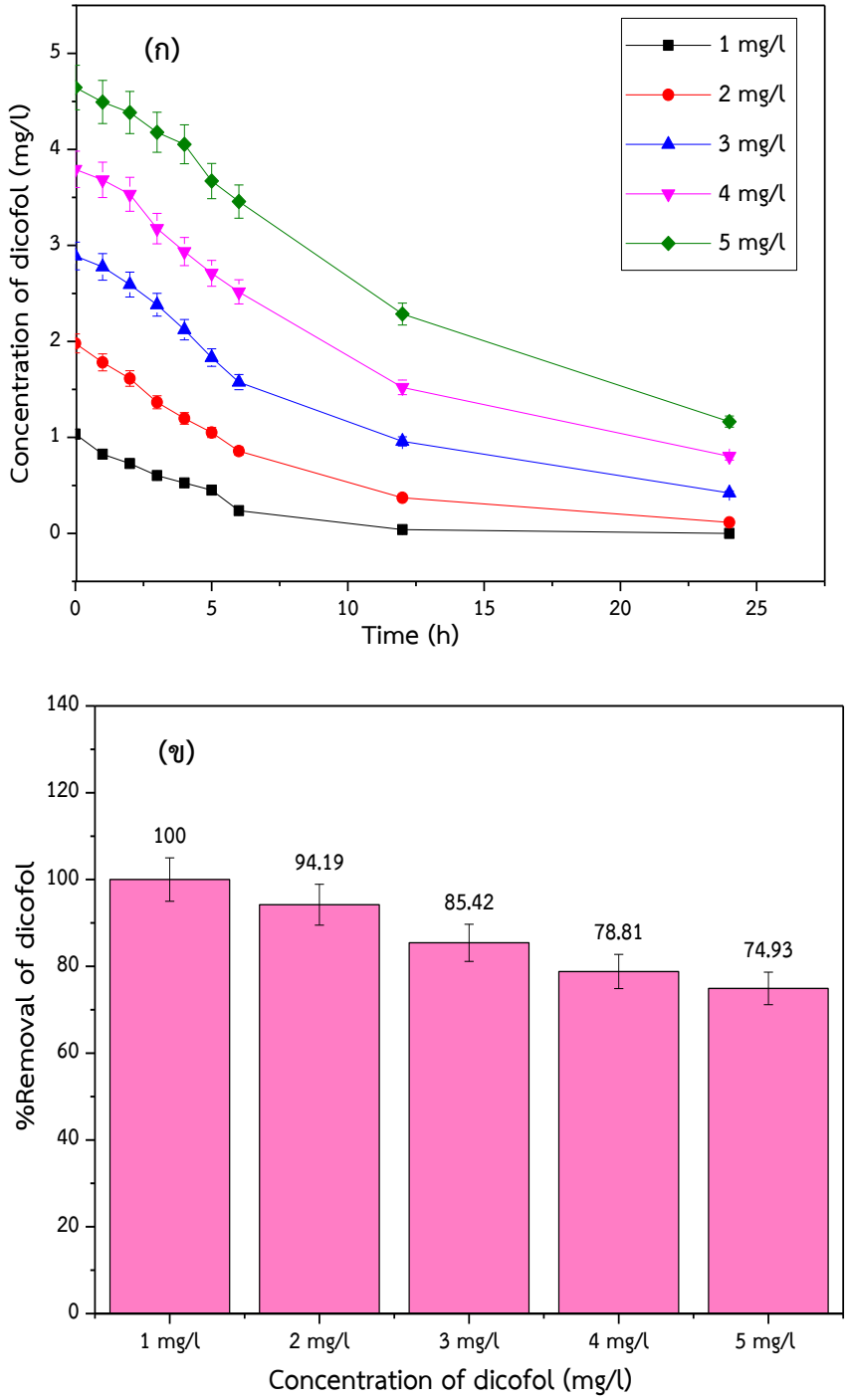
เท่ากับ 2 และ 4 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่ เวลา 90 นาที สำหรับสารอินทรีย์ธรรมชาติเท่ากับ 6 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถกำจัดไดคลอวอสหมดภายใน เวลา 120 นาที ส่วนที่สารอินทรีย์ธรรมชาติ เท่ากับ 8 และ 10 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อเวลาผ่านไป 180 นาที พบว่ามีไดคลอวอสคงเหลือในระบบเท่ากับ 0 จะเห็นได้ว่าเมื่อในระบบเพิ่มความเข้มข้นของสารอินทรีย์ธรรมชาติ จะส่งผลให้การทำงานของเอนไซม์ลดลงประสิทธิภาพในการกำจัดลดลงเช่นกัน

4.4 ผลความเข้มข้นสารละลายยาฆ่าแมลงที่มีผลต่อการกำจัดยาฆ่าแมลง

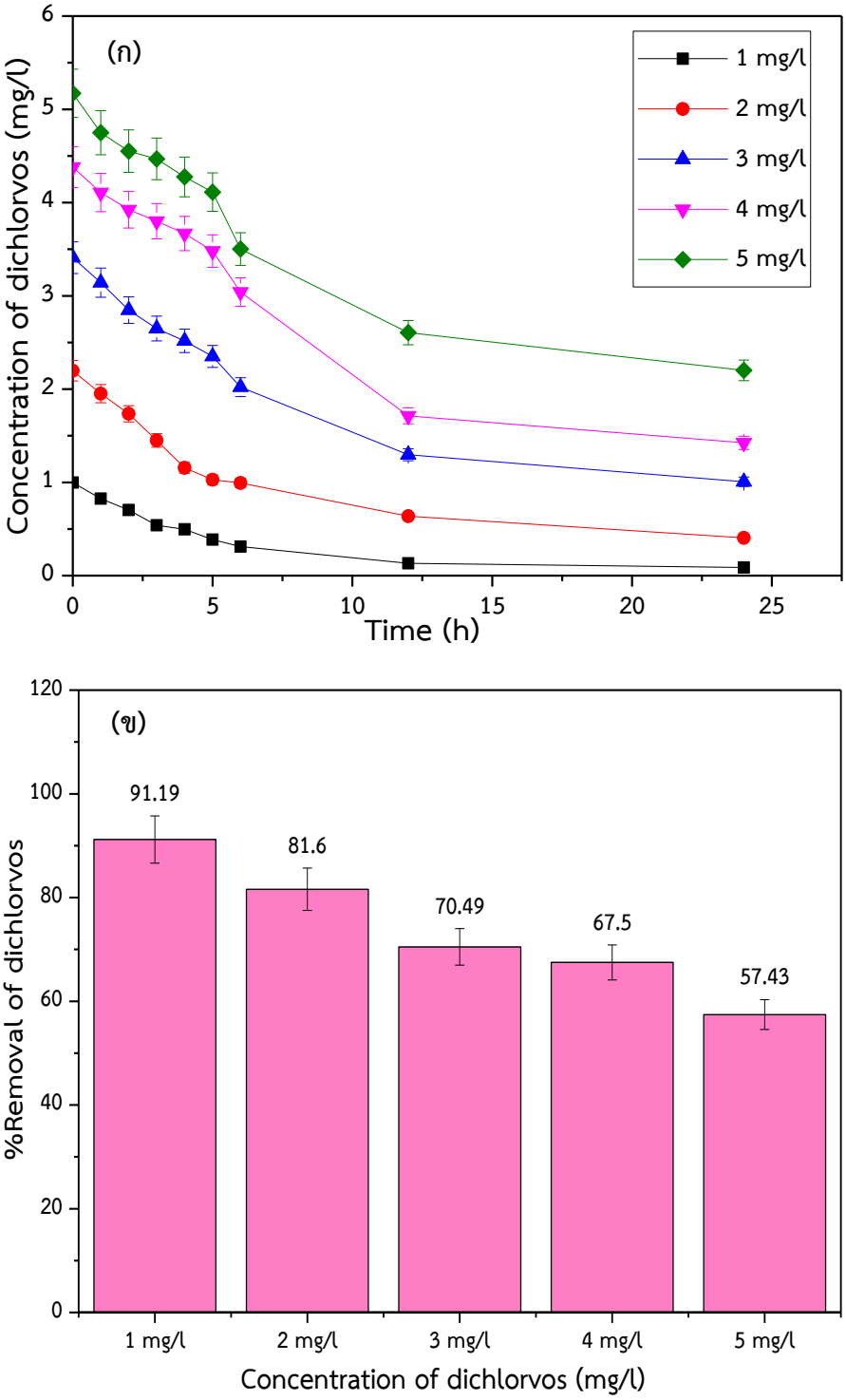
จากการศึกษาผลความเข้มข้นสารละลายยาฆ่าแมลงที่มีผลต่อการกำจัดยาฆ่าแมลงในน้ำที่มีสารอินทรีย์ธรรมชาติด้วยเอนไซม์แลคเคสกึ่งบริสุทธิ์ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส การทดลองนี้ใช้ความเข้มข้นเอนไซม์เท่ากับ 0.116 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ความเข้มข้นสารอินทรีย์ธรรมชาติเท่ากับ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยสารไดโคฟอลใช้ค่าความเป็นกรด-ด่างที่ 7 ส่วนสารไดคลอวอสใช้ค่าความเป็นกรด-ด่างที่ 5 ซึ่งความเข้มข้นของสารละลายยาฆ่าแมลงที่ศึกษาคือ 1, 2, 3, 4 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ผลการศึกษาแสดงดังภาพที่ 4.5 และ 4.6

จากผลความเข้มข้นสารละลายยาฆ่าแมลงที่มีผลต่อการกำจัดไดโคฟอล (ภาพที่ 4.5) พบว่าความเข้มข้นของไดโคฟอลเปลี่ยนแปลงเมื่อเวลาเพิ่มขึ้นทุกค่าความเข้มข้นสารละลายยาฆ่าแมลง (ภาพที่ 4.5 (ก)) โดยเมื่อเวลาเพิ่มขึ้นความเข้มข้นของไดโคฟอลมีแนวโน้มลดลงอย่างรวดเร็วในช่วง 12 ชั่วโมงแรก หลังจากนั้นความเข้มข้นลดลงไม่มากเมื่อครบ 24 ชั่วโมง โดยที่ความเข้มข้นสารละลายยาฆ่าแมลงที่ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ความเข้มข้นของไดโคฟอลลดลงอย่างรวดเร็วที่สุด ในขณะที่ค่าความเข้มข้นสารละลายยาฆ่าแมลงที่ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร มีการลดลงน้อยที่สุด และเมื่อนำความเข้มข้นของไดโคฟอลที่เหลือที่ชั่วโมงที่ 24 มาคำนวณเปอร์เซ็นต์การกำจัดดังแสดงในภาพ 4.5 (ข) พบว่าเปอร์เซ็นต์การกำจัดเท่ากับ 100%, 94.19%, 85.42%, 78.81% และ 74.93% ที่ค่าความเข้มข้นสารละลายยาฆ่าแมลงเท่ากับ 1, 2, 3, 4 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ

และสำหรับผลของความเข้มข้นของสารละลายยาฆ่าแมลงที่มีผลต่อการกำจัดไดคลอวอส (ภาพที่ 4.6) พบว่าแนวโน้มในการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของไดคลอวอส เมื่อเทียบกับเวลา (ภาพที่ 4.6 (ก)) มีแนวโน้มการลดลงคล้ายกับไดโคฟอล โดยที่ความเข้มข้นของสารละลายยาฆ่าแมลง 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ความเข้มข้นของไดคลอวอสลดลงอย่างรวดเร็วที่สุด ในขณะที่ความเข้มข้นของสารละลายยาฆ่าแมลง 5 มิลลิกรัมต่อลิตร มีการลดลงน้อยที่สุด และเมื่อนำความเข้มข้นของไดคลอวอสที่เหลือที่ชั่วโมงที่ 24 มาคำนวณเปอร์เซ็นต์การกำจัดดังแสดงในภาพ 4.6 (ข) พบว่าเปอร์เซ็นต์การกำจัดเท่ากับ 91.19%, 81.6%, 70.49%, 67.5% และ 57.43% ที่ความเข้มข้นของสารละลายยาฆ่าแมลงเท่ากับ 1, 2, 3, 4 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ



ภาพที่ 4.5 ผลความเข้มข้นสารละลายยาฆ่าแมลงที่มีผลต่อการกำจัดไดโคฟอล
(ก) ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของไดโคฟอลที่เปลี่ยนแปลงกับเวลา
(ข) เปอร์เซ็นต์การกำจัดไดโคฟอล ที่เวลา 24 ชั่วโมง เมื่อค่าความเข้มข้นของสารละลายยาฆ่าแมลงเริ่มต้นต่างกัน



ภาพที่ 4. 6 ผลความเข้มข้นสารละลายยาฆ่าแมลงที่มีผลต่อการกำจัดไดคลอวอส
(ก) ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของไดคลอวอสที่เปลี่ยนแปลงกับเวลา
(ข) เปอร์เซ็นต์การกำจัดไดคลอวอสที่เวลา 24 ชั่วโมง เมื่อค่าความเข้มข้นของสารละลายยาฆ่าแมลง เริ่มต้นต่างกัน

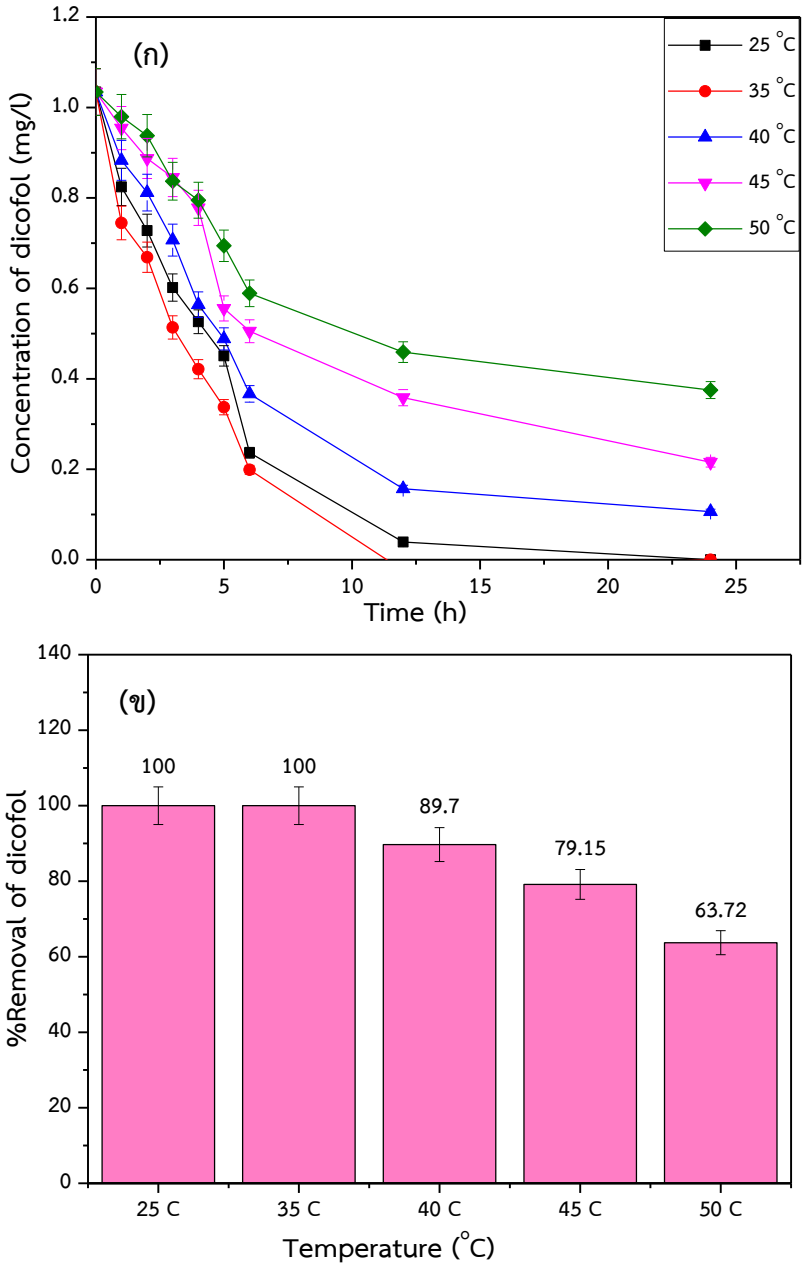
จากผลการทดลองข้างต้นพบว่า จากผลการศึกษาทั้งสองดังกล่าวสามารถอธิบายได้ว่าการเปลี่ยนแปลงค่าความเข้มข้นสารละลายไดโคฟอลและไดคลอวอสเริ่มต้นต่างกัน ปริมาณสารตั้งต้นมีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ เนื่องจากในระบบมีปริมาณของเอนไซม์เท่าเดิมในขณะที่ปริมาณของยาฆ่าแมลงเพิ่มขึ้น ทำให้เอนไซม์ที่อยู่ในระบบไม่เพียงพอต่อปริมาณของยาฆ่าแมลงที่เพิ่มขึ้น จึงทำให้ประสิทธิภาพการกำจัดลดลง และเมื่อพิจารณาการเปรียบเทียบระหว่างการกำจัดของไดโคฟอลและไดคลอวอสจะเห็นว่าเปอร์เซ็นต์ในการกำจัดของไดโคฟอลสูงสุดมีแนวโน้มการกำจัดได้ดีกว่า เนื่องจากอาจเกิดจากโครงสร้างและการเข้าจับกันของสับสเตรทที่ต่างชนิดกัน ทำให้เปอร์เซ็นต์กำจัดแตกต่างกัน จากการศึกษาของ Jianbo Zhang et al., (2010) [6] โดยทำการศึกษาการตรึงเอนไซม์เซลลูเลสเพื่อกำจัดไดโคฟอล ได้ทำการศึกษาที่ความเข้มข้นไดโคฟอล เริ่มต้น คือ 4, 6, 8, 10, 13, 16 และ 20 mg/L พบว่าเมื่อความเข้มข้นไดโคฟอลเพิ่มขึ้นประสิทธิภาพ ในการกำจัดมีแนวโน้มลดลงอย่างต่อเนื่อง และที่ความเข้มข้นไดโคฟอลเริ่มต้นที่ 4 mg/L มีประสิทธิภาพการกำจัดสูงสุดเมื่อเทียบกับความเข้มข้นอื่น เมื่อทำการเปรียบเทียบผลการทดลองกับ งานวิจัยเบื้องต้นทำให้ทราบว่าเมื่อความเข้มข้นของไดโคฟอลผ่านจุดอิ่มตัวของเอนไซม์ (saturation point) ไปแล้วระบบจะมีประสิทธิภาพในการกำจัดลดลง

โดยจากการศึกษางานวิจัยของสุภาพร ภารสุวรรณ และหฤทัย แก้วสันเทียะ (2559) [9] ได้ศึกษาการกำจัดไดโคฟอลด้วยแลคเคสหยาบจาก *Lentinus polychrous* Lev. ซึ่งในระบบศึกษาที่สารละลายตัวอย่างมีความเข้มข้นเท่ากับ 1, 2, 3, 4 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร การจัดไดโคฟอลได้ดีที่สุดคือเมื่อความเข้มข้นของสารละลายไดโคฟอลเริ่มต้นเท่ากับ 1 และ 2 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถกำจัดไดโคฟอลได้ถึง 100% และการศึกษาการกำจัดไดคลอวอสการใช้เอนไซม์แลคเคสกึ่งบริสุทธิ์ ในระบบศึกษาที่สารละลายตัวอย่างความเข้มข้นเท่ากับ 0.48, 1.52, 2.42, 3.59 และ 5.08 มิลลิกรัมต่อลิตร การกำจัดไดคลอวอสที่ความเข้มข้นไดคลอวอสเท่ากับ 0.48 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้เปอร์เซ็นต์การกำจัดได้ 100% ที่เวลา 60 นาที จากผลการทดลองทั้งสอง เมื่อเปรียบเทียบพบว่า ผลงานวิจัยที่อ้างอิงทั้งสองสามารถกำจัดไดโคฟอลและไดคลอวอสได้ 100% แต่จากผลการทดลองจะเห็นว่าไดโคฟอลที่มีสารอินทรีย์ธรรมชาติในระบบสามารถกำจัดได้ 100% แต่จะใช้ระยะเวลาเพิ่มขึ้น ขณะที่ไดคลอวอสที่มีสารอินทรีย์ธรรมชาติในระบบจะเห็นว่าประสิทธิภาพการกำจัดลดลงทำให้เปอร์เซ็นต์การกำจัดลดลงด้วยเช่นกัน

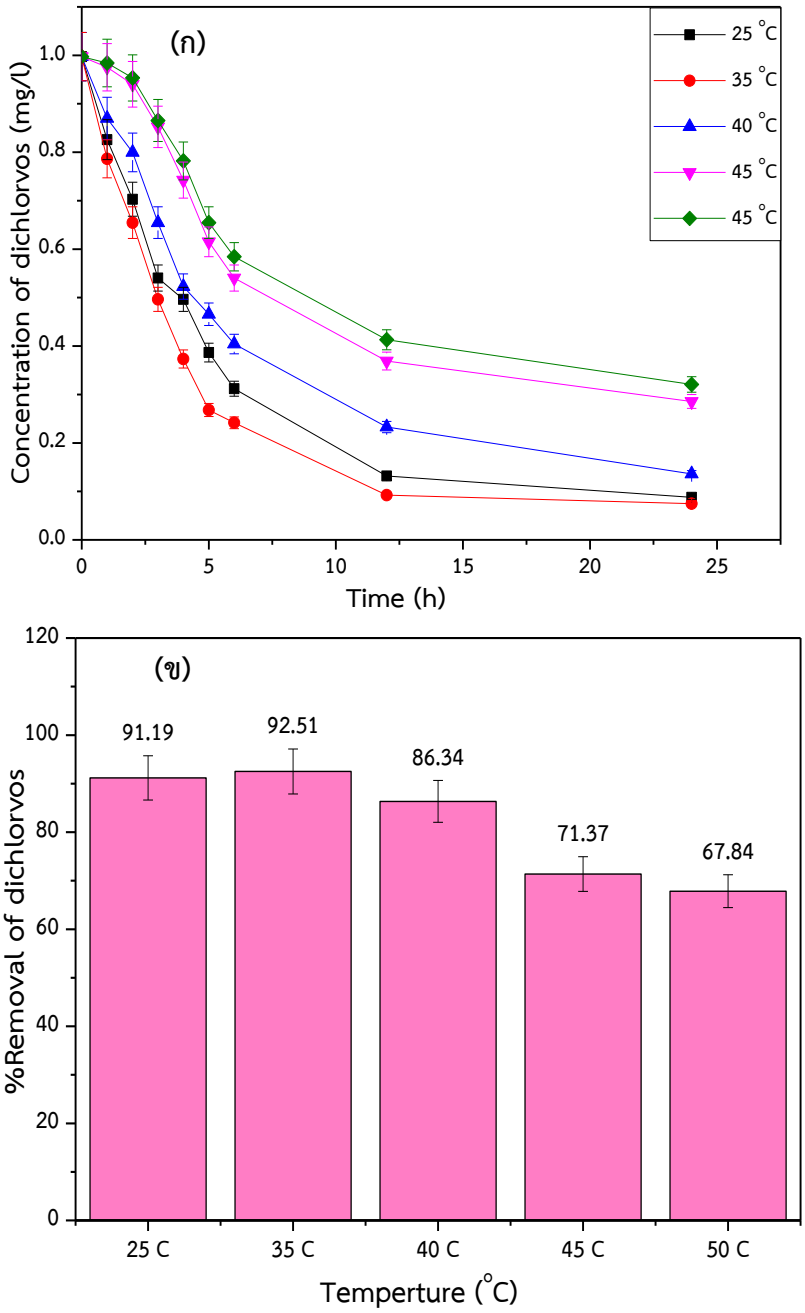
4.5 ผลของอุณหภูมิที่มีผลต่อการกำจัดยาฆ่าแมลง

จากการศึกษาผลของอุณหภูมิที่มีผลต่อการกำจัดยาฆ่าแมลงในน้ำที่มีสารอินทรีย์ธรรมชาติด้วยเอนไซม์แลคเคสกึ่งบริสุทธิ์ การทดลองนี้ใช้ความเข้มข้นเอนไซม์เท่ากับ 0.116 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ความเข้มข้นสารอินทรีย์ธรรมชาติเท่ากับ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยสารไดโคฟอล

ใช้ค่าความเป็นกรด-ด่างที่ 7 ส่วนสารไดคลอวอสใช้ค่าความเป็นกรด-ด่างที่ 5 และเติมสารละลายยาฆ่าแมลงที่ความเข้มข้นเท่ากับ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งใช้อุณหภูมิเท่ากับ 25, 35, 40, 45 และ 50 องศาเซลเซียส ผลการศึกษาแสดงดังภาพที่ 4.7 และ 4.8



ภาพที่ 4.7 ผลของอุณหภูมิที่มีผลต่อการกำจัดไดโคฟอล (ก) ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของไดโคฟอลที่เปลี่ยนแปลงกับเวลา (ข) เปอร์เซ็นต์การกำจัดไดโคฟอลที่เวลา 24 ชั่วโมง ในอุณหภูมิต่าง ๆ



ภาพที่ 4.8 ผลของอุณหภูมิที่มีผลต่อการกำจัดไดคลอวอส (ก) ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของไดคลอวอสที่เปลี่ยนแปลงกับเวลา (ข) เปอร์เซ็นต์การกำจัดไดคลอวอสที่เวลา 24 ชั่วโมง ในอุณหภูมิต่าง ๆ

จากภาพที่ 4.7 ผลของอุณหภูมิที่มีผลต่อการกำจัดไดโคฟอล พบว่า ความเข้มข้นของไดโคฟอลเปลี่ยนแปลงเมื่อเวลาเพิ่มขึ้นทุก ๆ อุณหภูมิ (ภาพที่ 4.7(ก)) จะเห็นว่าอุณหภูมิที่ 25, 35, 40 องศาเซลเซียส ความเข้มข้นของไดโคฟอลลดลงได้อย่างรวดเร็วที่ 12 ชั่วโมงแรก เมื่อเทียบกับอุณหภูมิที่ 45

และ 50 องศาเซลเซียส ที่มีแนวโน้มการลดลงของความเข้มข้นของไดโคฟอลได้น้อย หลังจากนั้นความเข้มข้นลดลงไม่มากเมื่อครบ 24 ชั่วโมง โดยที่อุณหภูมิที่ 25 และ 35 องศาเซลเซียส ความเข้มข้นของไดโคฟอลลดลงอย่างรวดเร็วที่สุด ในขณะที่อุณหภูมิที่ 50 องศาเซลเซียส มีการลดลงน้อยที่สุด และเมื่อนำความเข้มข้นของไดโคฟอลที่เหลือที่ชั่วโมงที่ 24 มาคำนวณเปอร์เซ็นต์การกำจัดดังแสดงในภาพ 4.7 (ข) พบว่าเปอร์เซ็นต์การกำจัดเท่ากับ 100%, 100%, 89.7%, 79.15% และ 63.72% ที่อุณหภูมิเท่ากับ 25, 35, 40, 45 และ 50 องศาเซลเซียส ตามลำดับ

สำหรับผลของความเข้มข้นของสารอินทรีย์ธรรมชาติที่มีผลต่อการกำจัดไดคลอวอส (ภาพที่ 4.8) พบว่าแนวโน้มในการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของไดคลอวอสเมื่อเทียบกับเวลา (ภาพที่ 4.8 (ก)) มีแนวโน้มการลดลงคล้ายกับไดโคฟอล โดยที่อุณหภูมิที่ 35 องศาเซลเซียส ความเข้มข้นของไดคลอวอสลดลงอย่างรวดเร็วที่สุด ในขณะที่อุณหภูมิที่ 50 องศาเซลเซียส มีการลดลงน้อยที่สุด และเมื่อนำความเข้มข้นของไดคลอวอสที่เหลือที่ชั่วโมงที่ 24 มาคำนวณเปอร์เซ็นต์การกำจัดดังแสดงในภาพ 4.8 (ข) พบว่าเปอร์เซ็นต์การกำจัดเท่ากับ 92.51%, 91.19%, 86.34%, 71.37% และ 67.84% ที่อุณหภูมิเท่ากับ 35, 25, 40, 45 และ 50 องศาเซลเซียส ตามลำดับ

ผลการศึกษาข้างต้นทั้งสองดังกล่าวอธิบายได้ว่า เมื่ออุณหภูมิของระบบเพิ่มขึ้นเปอร์เซ็นต์หรือประสิทธิภาพในการกำจัดไดโคฟอลและไดคลอวอสมีแนวโน้มเพิ่มขึ้น และเมื่อได้รับอุณหภูมิที่เหมาะสมเนื่องจากการเพิ่มอุณหภูมิทำให้เพิ่มพลังงานแก่โมเลกุลของสารตั้งต้น ปฏิกิริยาเพิ่มขึ้นเป็นเท่าตัวเมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้น แต่มีแนวโน้มลดลงเมื่ออุณหภูมิในระบบได้รับมีมากเกินไปจนทำให้เอนไซม์เสื่อมสภาพ จากการศึกษาของ Ran Xu et al., (2014) [31] ซึ่งทำการศึกษาการตรึงเอนไซม์แลคเคสเพื่อกำจัดไตรโคลซาน โดยทำการศึกษาอุณหภูมิช่วง 20-60 องศาเซลเซียส ผลการศึกษาพบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสม คือ 30 องศาเซลเซียส ซึ่งเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้น อาจส่งผลให้อัตราการย่อยสลายลดลง

และจากการศึกษางานวิจัยของสุภาพร ภารสุวรรณ และหฤทัย แก้วสันเทียะ (2559) [9] ได้ศึกษาการกำจัดไดโคฟอลด้วยแลคเคสหยาบจาก *Lentinus polychrous* Lev. อุณหภูมิที่ใช้คือ 25, 30, 35, 40 และ 45 องศาเซลเซียส เพิ่มอุณหภูมิจาก 25 องศาเซลเซียส เป็น 30, 35, 40 และ 45 องศาเซลเซียส ทำให้ระบบมีการกำจัดไดโคฟอลเพิ่มขึ้นและค่อยๆลดลงอย่างต่อเนื่อง ที่อุณหภูมิ 30 และ 35 องศาเซลเซียส ให้ค่าเปอร์เซ็นต์การกำจัดสูงที่สุด คือ 100% และที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ให้ค่าเปอร์เซ็นต์การกำจัดไดโคฟอลต่ำที่สุด คือ 55.35% และขณะที่การกำจัดไดคลอวอสในช่วงเวลา 60 นาทีแรก อุณหภูมิห้องไปจนถึง 35 องศาเซลเซียส ให้ค่าเปอร์เซ็นต์การกำจัดได้ 100% จากการอ้างอิงงานวิจัยข้างต้นทั้งสอง เมื่อเทียบกับผลการทดลองแล้ว พบว่าทั้งในกรณีที่ในระบบเติมสารอินทรีย์ธรรมชาติและไม่เติมสารอินทรีย์ธรรมชาติอยู่อุณหภูมิเดียวกัน แต่เปอร์เซ็นต์การกำจัดจะเห็นได้ว่าในกรณีที่ไม่เติมสารอินทรีย์ธรรมชาติสามารถกำจัดได้ 100% ที่ช่วงเวลา 60 นาทีแรก ส่วนใน

กรณีที่ในระบบเติมสารอินทรีย์ธรรมชาติ เปอร์เซ็นต์การกำจัด 100% และ 92.51% ในเวลา 24 ชั่วโมง จะเห็นได้ว่า สารอินทรีย์ธรรมชาติอาจส่งผลต่อระบบในการกำจัดยาฆ่าแมลง

บทที่ 5
สรุปผลการทดลอง

จากการศึกษาการใช้เอนไซม์แลคเคสกึ่งบริสุทธิ์จากเชื้อเห็ด *Lentinus Polychrous* Lev. ในการกำจัดยาฆ่าแมลงที่มีการเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรด-ด่าง ความเข้มข้นสารอินทรีย์ธรรมชาติ ความเข้มข้นของยาฆ่าแมลงเริ่มต้น และอุณหภูมิ สามารถสรุปผลการศึกษาได้ ดังต่อไปนี้

5.1 ผลของความเป็นกรด-ด่างของสารละลายที่มีผลต่อการกำจัดยาฆ่าแมลง

การศึกษาผลของความเป็นกรด-ด่างของสารละลายที่มีผลต่อการกำจัดไดโคฟอลในน้ำที่มีสารอินทรีย์ธรรมชาติด้วยเอนไซม์แลคเคสกึ่งบริสุทธิ์นั้น พบว่าเปอร์เซ็นต์การกำจัดไดโคฟอลที่เวลา 24 ชั่วโมง ค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมที่ 7 สามารถกำจัดได้ 94.55% ส่วนผลของความเป็นกรด-ด่างของสารละลายที่มีผลต่อการกำจัดไดคลอวอส ในการกำจัดไดคลอวอสที่เวลา 24 ชั่วโมง ค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมอยู่ที่ 5 สามารถกำจัดได้ 81.94%

5.2 ผลความเข้มข้นของสารอินทรีย์ธรรมชาติที่มีผลต่อการกำจัดยาฆ่าแมลง

การศึกษาผลความเข้มข้นของสารอินทรีย์ธรรมชาติที่มีผลต่อการกำจัดไดโคฟอลในน้ำที่มีสารอินทรีย์ธรรมชาติด้วยเอนไซม์แลคเคสกึ่งบริสุทธิ์ พบว่าประสิทธิภาพการกำจัดไดโคฟอลลดลงเมื่อเพิ่มความเข้มข้นสารอินทรีย์ธรรมชาติ เปอร์เซ็นต์การกำจัดไดโคฟอลที่เวลา 24 ชั่วโมง การกำจัดไดโคฟอลเอนไซม์ทำงานได้ดีที่สุดที่ความเข้มข้นสารอินทรีย์ธรรมชาติ 1 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร กำจัดได้ 100% ส่วนผลความเข้มข้นของสารอินทรีย์ธรรมชาติที่มีผลต่อการกำจัดไดคลอวอส พบว่าประสิทธิภาพการกำจัดไดคลอวอสลดลงเมื่อเพิ่มความเข้มข้นสารอินทรีย์ธรรมชาติ เปอร์เซ็นต์การกำจัดไดคลอวอสที่เวลา 24 ชั่วโมง การกำจัดไดคลอวอสเอนไซม์ทำงานได้ดีที่สุดที่ความเข้มข้นสารอินทรีย์ธรรมชาติ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร กำจัดได้ 91.19%

5.3 ผลความเข้มข้นสารละลายยาฆ่าแมลงที่มีผลต่อการกำจัดยาฆ่าแมลง

การศึกษาผลความเข้มข้นสารละลายยาฆ่าแมลงที่มีผลต่อการกำจัดไดโคฟอลในน้ำที่มีสารอินทรีย์ธรรมชาติด้วยเอนไซม์แลคเคสกึ่งบริสุทธิ์ พบว่าประสิทธิภาพการกำจัดไดโคฟอลลดลงเมื่อความเข้มข้นของสารละลายไดโคฟอลมากขึ้น เปอร์เซ็นต์การกำจัดไดโคฟอลที่เวลา 24 ชั่วโมงของ จะเห็นว่าความเข้มข้นที่กำจัดไดโคฟอลได้ดีที่สุด คือ 1 มิลลิกรัมต่อกรัม กำจัดได้ 100% ส่วนผลความเข้มข้น

สารละลายยาฆ่าแมลงที่มีผลต่อการกำจัดไดคลอวอส พบว่าความเข้มข้นที่กำจัดไดคลอวอสได้ดีที่สุด คือ 1 มิลลิกรัมต่อกรัม กำจัดได้ 91.19%

5.4 ผลของอุณหภูมิที่มีผลต่อการกำจัดยาฆ่าแมลง

การศึกษาผลของอุณหภูมิที่มีผลต่อการกำจัดไดโคฟอลในน้ำที่มีสารอินทรีย์ธรรมชาติด้วยเอนไซม์แลคเคสกึ่งบริสุทธิ์ พบว่าประสิทธิภาพการกำจัดไดโคฟอลเพิ่มขึ้น เมื่อเพิ่มอุณหภูมิให้แก่ระบบอย่างเหมาะสม แต่จะลดลงเมื่ออุณหภูมิมีค่ามากเกินไป ซึ่งเป็นอุณหภูมิที่ทำให้เอนไซม์เสื่อมสภาพ เปอร์เซ็นต์การกำจัดไดโคฟอลที่เวลา 24 ชั่วโมง อุณหภูมิที่เหมาะสมอยู่ที่ 25 และ 35 องศาเซลเซียส ส่วนผลของอุณหภูมิที่มีผลต่อการกำจัดไดคลอวอส ในอุณหภูมิที่เหมาะสมอยู่ที่ 35 องศาเซลเซียส

5.5 ข้อเสนอแนะ

จากการทดลองพบว่าเอนไซม์แลคเคสกึ่งบริสุทธิ์สามารถกำจัดยาฆ่าแมลงกลุ่มออร์กาโนคลอรีนและกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟตได้ ดังนั้นจึงควรศึกษายาฆ่าแมลงในกลุ่มอื่น ๆ และศึกษาเชื้อต่างสายพันธุ์ในกลุ่มออกซิโดรีดักเตส (oxidoreductases) มาสกัดแลคเคส เพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการกำจัด

เอกสารอ้างอิง

เอกสารอ้างอิง

[1] Greenpeace Thailand. (2559). “ยาฆ่าแมลงและผลกระทบต่อสุขภาพ” http://www.greenpeace.org/seasia/th/press/reports/Pesticides-and-our-Health/. 25 สิงหาคม, 2561.

[2] Green Innovation. (2561). “ยาฆ่าแมลงและผลกระทบต่อสุขภาพ”, https://mgronline.com/greeninnovation/detail/9610000034468fbclid. 25 สิงหาคม, 2561.

[3] สหกรณ์กรีนเนท จำกัด (Green Net Cooperative). (2537). “พิษภัยสารเคมีเกษตร”, http://www.greennet.or.th/article/263. 25 สิงหาคม, 2561.

[4] จรงค์พันธ์ มุสิกะวงศ์ และชัยศรี สุขสาโรจน์. **รายงานการวิจัยการลดสารอินทรีย์ธรรมชาติในน้ำดิบประปาเพื่อควบคุมปริมาณการเกิดสารก่อมะเร็งในน้ำประปา**. คณะวิศวกรรมศาสตร์: มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์, 2552.

[5] สุธาสินี อั้งสูงเนิน. “ผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมจากการใช้สารเคมีกำจัดศัตรูพืช”, **วารสารวิชาการมหาวิทยาลัยอีสเทิร์นเอเชีย**. 9(1): 50 – 63; มกราคม-เมษายน, 2558.

[6] Zhang, Jianbo and et al. “Removal of dicofol from water by immobilized cellulase and its reaction kinetics”, **Journal of Environmental Management**. 92(1): 53-58; January, 2011.

[7] Mohammed, Sibhi and Fasnabi P.A. (2016). “Removal of Dicofol from Waste-Water Using Advanced Oxidation Process”, **Procedia Technology.** https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2212017316302493. February 14, 2019.

[8] พันธุ์เครือ ทิพย์โสด และคณะ. **การศึกษาประสิทธิภาพของแบคทีเรียในการย่อยสลายสารไดโคโฟล**. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต: มหาวิทยาลัยแม่โจ, 2555.

[9] สุภาพร ภารสุวรรณ และหฤทัย แก้วสันเทียะ. **การกำจัดไดโคฟอลด้วยแลคเคสหยาบจาก *Lentinus polychrous* Lev**. โครงการพิเศษการศึกษาหลักสูตรวิศวกรรมศาสตรบัณฑิต: มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี, 2559.

[10] สิทธิชัย กิจพฤกษ์ และหนึ่งฤทัย ประสานทอง. **การย่อยสลายไดคลอวอสด้วยแลคเคสกึ่งบริสุทธิ์**. โครงการพิเศษการศึกษาหลักสูตรวิศวกรรมศาสตรบัณฑิต: มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี, 2560.

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

[11] Bedford, M.R. and G.G. Partridge. **Enzymes in farm animal nutrition**. Bodmin: MPG Books Group, 2001.

[12] Graminha, E.B.N. and et al. 2008. “Enzyme production by solid-state fermentation: Application to animal nutrition”, **Anim. Feed Sci. Technol**. 144: 1–22; June, 2018.

[13] Yoshida, H. “Laccases from Actinobacteria”, **Advances in Microbiology**. 4(6): 472 – 486; May, 2014.

[14] Madhavi, V and SS Lele. “Laccase: properties and applications”, **Bioresources**. 4(4): 1694-1717; November, 2009.

[15] Sroysuwan. (2553). “แลคเคส (Laccase)”, **Crystal Structure of laccase**. https://jan2553computer. blogspot.com/2010/01/crystal- structure-of-laccase.html. 10 กรกฎาคม, 2561.

[16] กรมควบคุมโรค. (2557). “โรคพิษจากสารกำจัดศัตรูพืช” **สารเคมี**. https://www.riskcom thai.org/th/knowledge-disease/protect-health/chemicals-detail.php. 11 กันยายน, 2561.

[17] กองตรวจสอบคุณภาพสินค้าประมง กรมประมง. (2560). “สารตกค้างกลุ่มออการ์โนคลอรีนในผลิตภัณฑ์ประมง”, **บทความด้านเคมี**. https://www4.fisheries.go.th/local/file_document/20170504180931_file.pdf. 11 สิงหาคม, 2561.

[18] ศิริวรรณ ฉันเจริญ, อรพันธ์ อันติมานนท์ และโกวิทย์ บุญมีพงศ์. **คู่มือเกษตรกรปลอดโรคสำหรับเกษตรกรและอาสาสมัครสาธารณสุขประจำหมู่บ้าน**. กรุงเทพฯ: สำนักโรคจากการประกอบอาชีพและสิ่งแวดล้อม กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข, 2553.

[19] ฝ่ายข้อมูล มูลนิธิชีววิถี. (2554). “สารเคมีกำจัดศัตรูพืชและความเสื่อมโทรมในระบบนิเวศ”, **ชีววิถี**. http://www.biothai.net/node/8688?fbclid. 17 สิงหาคม, 2561.

[20] สารานุกรมไทยสำหรับเยาวชน. (2536). “ยาฆ่าแมลง”, **ยาฆ่าแมลง.** http://kanchanapisek.or.th/kp6/sub/book/book.php?book=18&chap=7&page=t18-7-infodetail01.html. 23 กันยายน, 2561.

[21] สุธาสินี อั้งสูงเนิน. “ผลกระทบต่อสิ่งอวดล้อมจากการใช้สารเคมีกำจัดศัตรูพืช”, **วารสารวิชาการมหาวิทยาลัยอีสเทิร์นเอเชีย**. 9(1): 50-63; มกราคม-เมษายน, 2558.

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

[22] National Center for Biotechnology Information. (2019). “Dicofol”, **PubChem Database**. https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/dicofol. 25 สิงหาคม, 2561.

[23] เขมจิรา ปริญญารักษ์ และคณะ. (2560). “ผลกระทบจากการใช้สารเคมี”, **มลภาวะจากการใช้สารเคมีเพื่อการเกษตร**. https://sites.google.com/site/adecmju46011/phlk-ra-thb-cak-kar-chi-sar-khemi-thangkar-kestr-khxng-prathesthiy. 25 สิงหาคม, 2561.

[24] National Center for Biotechnology Information. (2019). “Dichlorvos”, **PubChem Database**. https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/3039#section=Top. 25 สิงหาคม, 2561.

[25] พิชิตพล เจริญทรัพยานันท์. (2560). “เอนไซม์-เทคโนโลยีชีวภาพ”, **เอนไซม์**. http://www.km.itfd.rmutp.ac.th/wp-content/uploads/2011/06/เอนไซม์-เทคโนโลยีชีวภาพ.pdf. 13 สิงหาคม, 2561.

[26] กฤษดา ทองนาค. **การกำจัดสารอินทรีย์ธรรมชาติซึ่งเป็นสารตั้งต้นในการเกิดสารไตรฮาโลมีเทนในระบบประปาด้วยกระบวนการสร้างและรวมตะกอน กรณีตัวอย่างแม่น้ำแม่กลองและแม่น้ำท่าจีน**. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต: มหาวิทยาลัยศิลปากร, 2553.

[27] A.Cruz-Alcalde, C.Sans and S.Esplugas. “Priority pesticide dichlorvos removal from water by ozonation process: Reactivity, transformation products and associated toxicity”, **Separation and Purification Technology**. 192: 123-129; February, 2018.

[28] สำนักควบคุมพืชและวัสดุการเกษตร. **รายงานสรุปการนำเข้าวัตถุอันตรายทางการเกษตร ปี พ.ศ. 2559**. กรุงเทพฯ: กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, 2560.

[29] รักฤดี สารธิมา. **การโคลนและการแสดงออกของยีนแลคเคสจากเชื้อเห็ดลม**. กรุงเทพมหานคร: สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย, 2557.

[30] Liu, Zhi-Feng and et al. “Effect of dirhamnolipid on the removal of phenol catalyzed by laccase in aqueous solution”, **World Journal of Microbiology and Biotechnology**. 28(1): 175–181; January, 2012.

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

[31] Xu, Ran and et al. “Triclosan removal by laccase immobilized on mesoporous nanofibers : Strong adsorption and efficient degradation”, **Chemical Engineering Journal**. 255: 63–70; November, 2014.

[32] Shin, Kwang-Soo and Yeo-Jin Lee. “Purification and characterization of a new member of the laccase family from the white-rot basidiomycete Coriolus hirsutus”, **Archives of Biochemistry and Biophysics**. 384(1): 109-115; December, 2000.

[33] Anupama, Asthana, Pillaia Ajai and Gupta V K. “A simple sensitive spectrophotometric method for determination of dichlorvos in environmental samples”, **Indian Journal of Chemical Technology**. 10(1): 96-98; January, 2003.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก
การหาค่ากิจกรรมการทำงานของเอนไซม์

1. การหาค่ากิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ (Enzyme Activity)

1.1 การเตรียมสาร

1.1.1 การเตรียมสารละลายโซเดียมอะซิเตทบัฟเฟอร์ (ตามวิธีของ Stoll and Blanchard, 1990)

สารละลาย ก : 0.2 M acetic acid (11.55 มิลลิลิตร ในน้ำกลั่น 1 ลิตร) ปิเปตมา 28 มิลลิลิตร

สารละลาย ข : 0.2 M sodium acetate ($C_2H_3O_2Na$ 16.4 กรัม ละลายในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้เป็น 1 ลิตร) ปิเปตมา 22 มิลลิลิตร

การเตรียมสาร โดยผสมสารละลาย ก และ ข ตามสัดส่วนข้างต้น ปรับปริมาตรให้เป็น 1 ลิตร และปรับค่า pH ให้เป็น 4.5

1.1.2 การเตรียมสารละลาย ABTS

เนื่องจากต้องการเตรียมสารละลาย ABTS ที่ความเข้มข้น 10 mM โดยต้องการเตรียม 2 มิลลิลิตร และน้ำหนักโมเลกุลของ ABTS เท่ากับ 514.62 จึงชั่ง ABTS มา 0.0103 กรัม รวมกับน้ำกลั่น 2 มิลลิลิตร

1.1.3 การเตรียมสารละลาย TCA

เนื่องจากต้องการเตรียมสารละลาย TCA ที่ความเข้มข้น 80 %w/w โดยต้องการเตรียม 5 มิลลิลิตร จึงชั่ง TCA มา 4 กรัม รวมกับน้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร

1.2 การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์

สารละลายตัวอย่างเอนไซม์ 50 ไมโครลิตร เติมโซเดียมอะซิเตทบัฟเฟอร์ ปริมาตร 940 ไมโครลิตร และ เติม ABTS ปริมาตร 10 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากัน แล้วนำไปแช่ในอ่างควบคุมอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเติม 80 % w/v TCA ปริมาตร50 ไมโครลิตร เพื่อหยุดปฏิกิริยา นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 420 นาโนเมตร และบันทึกผลการทดลองนำมาคำนวณค่ากิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ดังสมการที่ (3.1) [32]

2. การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน

2.1 การเตรียม Bradford reagent

สารละลาย Bradford reagent ใช้สารละลายสำเร็จรูปของบริษัท Applichem และใช้ bovine serum albumin (BSA) เป็นโปรตีนมาตรฐานที่ความเข้มข้นในช่วง 0-50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

2.2 วิธีวิเคราะห์

ปิเปตสารละลายตัวอย่างมา 100 ไมโครลิตร เติมสารละลาย Bradford reagent 200 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากัน เติมน้ำกลั่น 700 ไมโครลิตร แล้วน้าไว้วัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร

ภาคผนวก ข
การวิเคราะห์ปริมาณไดโคฟอลและไดคลอวอส

1. การวิเคราะห์ปริมาณไดโคฟอลด้วยเครื่อง เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (UV-VIS spectro-photometer)

1.1 วิธีวิเคราะห์

1.1.1 ปิเปตสารละลายตัวอย่างใส่ในหลอดเซนติฟิวปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร

1.1.2 เติม n-Hexane ปริมาตร 1 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงเป็นเวลา 3 นาที ที่ความเร็วรอบ 3,000 รอบ/นาที ไดโคฟอลจะผสมเป็นเนื้อเดียวกันกับ n-Hexane และแยกชั้นกับน้ำ

1.1.3 ปิเปตน้ำทิ้ง ให้เหลือเฉพาะชั้นของ n-Hexane จากนั้นนำไปต้มในน้ำอุณหภูมิ 100°C จนกระทั่ง n-Hexane ระเหยหมดเหลือแค่ไดโคฟอล

1.1.4 เติม pyridine ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร, น้ำปราศจากประจุ (Deionized water, DI water) ปริมาตร 0.25 มิลลิลิตร และ 45%NaOH ปริมาตร 0.25 มิลลิลิตร

1.1.5 นำไปปั่นเหวี่ยงเป็นเวลา 3 นาที ที่ความเร็วรอบ 3,000 รอบ/นาที

1.1.6 นำไปแช่ในอ่างควบคุมอุณหภูมิ (Water bath) โดยปรับอุณหภูมิเป็น 80 °C เป็นเวลา 3 นาที เพื่อให้เกิดสี

1.1.7 จากนั้นนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 530 นาโนเมตร โดยใช้น้ำกลั่นเป็น Blank

2. การวิเคราะห์ปริมาณไดคลอวอสด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (UV-VIS spectro-photometer) [33]

2.1 วิธีวิเคราะห์

2.1.1 ปิเปตสารละลายตัวอย่างใส่ในหลอดทดลองปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร

2.1.2 เติม sodium hydroxide 0.5 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปแช่น้ำเย็นเป็นเวลา 10 นาที

2.1.3 เติม 1% phloroglucinol 1 มิลลิลิตร แล้วนำไปในอ่างควบคุมอุณหภูมิที่ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที

2.1.4 จากนั้นนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 475 นาโนเมตร โดยใช้น้ำกลั่นเป็น Blank

ประวัติผู้วิจัย

ชื่อ	นางสาวธิดารัตน์ มณีศรี
ประวัติการศึกษา	พ.ศ. 2555 – 2558 มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี วิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาสุขาภิบาลสิ่งแวดล้อม
ประวัติการวิจัย	การปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์และสภาพการสุขาภิบาลอาหารของแผงลอยจำหน่ายข้าวมันไก่บริเวณหน้ามหาวิทยาลัยอุบลราชธานี, พ.ศ. 2558