

## การย่ออย่างสละการโพรฟินฟอสภายได้สภาวะที่มีสารอาหารร่วม

๑๗๖

วราภรณ์ ปฏิโชค

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิศวกรรมศาสตรมหาบัณฑิต  
สาขาวิชาวิศวกรรมดิจิทัล คณะวิศวกรรมศาสตร์  
มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

พ.ศ. ๒๕๕๕

ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยอุบลราชธานี



**PROFENOFOS DEGRADATION UNDER CO-SUBSTRATE  
CONDITION**

**WARAYUT PATICHOT**

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULLFILLMENT OF THE REQUIREMENTS  
FOR THE DEGREE OF MASTER OF ENGINEERING  
MAJOR IN ENVIRONMENTAL ENGINEERING  
FACULTY OF ENGINEERING  
UBON RATCHATHANI UNIVERSITY  
YEAR 2012  
COPYRIGHT OF UBON RATCHATHANI UNIVERSITY



ใบรับรองวิทยานิพนธ์  
มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี  
ปริญญา วิศวกรรมศาสตรมหาบัณฑิต  
สาขาวิชาวิศวกรรมสิ่งแวดล้อม คณะวิศวกรรมศาสตร์

เรื่อง การย่อถายสาร โพร์ฟิโนฟอสภายใต้สภาพที่มีสารอาหารร่วม

ผู้จัด นายวราภรณ์ ปฏิโชติ

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

อาจารย์ที่ปรึกษา

กรรมการ

กรรมการ

กรรมการ

คณบดี

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อุทิศ อินทร์ประสิทธิ์)

มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี รับรองแล้ว

(รองศาสตราจารย์ ดร.อุทิศ อินทร์ประสิทธิ์)

รองอธิการบดีฝ่ายวิชาการ

ปฏิบัติราชการแทนอธิการบดี มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

ปีการศึกษา 2555

## กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์นี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณ บุคคล และกลุ่มบุคคลต่าง ๆ ที่ได้กรุณาให้คำปรึกษา แนะนำ ช่วยเหลือ อย่างดีเยี่ยม ทั้งในด้านวิชาการและด้านการดำเนินงานวิจัย ได้แก่

ขอขอบพระคุณ พศ.ดร.สุมนา สิริพัฒนาภูล อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่ค่อยดูแลเอาใจใส่และให้คำปรึกษาเกี่ยวกับวิทยานิพนธ์ทำให้งานวิจัยจนเสร็จสิ้นและลุล่วงไปด้วยดี

ขอขอบพระคุณประธานหลักสูตรสาขาวิชาศึกกรรมสิ่งแวดล้อม คณะกรรมการสอน วิทยานิพนธ์ทุกท่าน ที่ได้ให้คำแนะนำ ปรึกษาเกี่ยวกับวิทยานิพนธ์ทำให้งานวิจัยสำเร็จลุล่วงไปด้วยดี รวมถึงเจ้าหน้าที่ธุรการบันทึกศึกษา สาขาวิชาศึกกรรมสิ่งแวดล้อม คณะกรรมการศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี ที่กรุณาช่วยเหลือในระหว่างดำเนินงานวิทยานิพนธ์ครั้งนี้

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการภาควิชาศึกกรรมเคมี คณะศึกกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี ที่ได้ให้ความอนุเคราะห์สถานที่ เครื่องมือและอุปกรณ์ต่าง ๆ ในการทดลองเป็นอย่างดี

ขอขอบคุณเพื่อน ๆ นักศึกษาปริญญาโท สาขาวิชาศึกกรรมสิ่งแวดล้อม และน้อง ๆ นักศึกษาปริญญาตรี สาขาวิชาศึกกรรมสิ่งแวดล้อม และสาขาวิชาศึกกรรมเคมีและชีวภาพ คณะศึกกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี ที่เคยให้กำลังใจและช่วยเหลือในการทำงานวิจัย ด้วยดีตลอดมา

ขอขอบพระคุณหลักสูตรบัณฑิตศึกษา สาขาวิชาศึกกรรมสิ่งแวดล้อม คณะ ศึกกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติและกลุ่มวิจัยความ เป็นไปและ การกำจัดจุลทรรศน์ใหม่ในสิ่งแวดล้อม (ภายใต้การสนับสนุนของศูนย์ความเป็น เลิศด้านการจัดการสิ่งแวดล้อมและของเสียอันตราย) ที่ให้การสนับสนุนด้านทุนวิจัยเป็นอย่างดี

ท้ายนี้ ขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดา ที่ให้การเดียงคุณธรรมและส่งเสริมการศึกษาเป็น อย่างดีตลอดมาในอดีต จนทำให้ผู้วิจัยประสบความสำเร็จในชีวิตตลอดมา

เจตุฤทธิ์  
(นายราษฎร์ ปฏิโชค)

ผู้วิจัย

## บทคัดย่อ

**ชื่อเรื่อง** : การย่อยสลายสารโพรฟีโนฟอสกายให้สภาวะที่มีสารอาหารร่วม

**โดย** : วราบุตร ปฏิโชค

**ชื่อปริญญา** : วิศวกรรมศาสตรมหาบัณฑิต

**สาขาวิชา** : วิศวกรรมสิ่งแวดล้อม

**ประธานกรรมการที่ปรึกษา** : ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุมนา ศิริพัฒนาภูต

**คำพิเศษคัญ** : โพรฟีโนฟอส การย่อยสลายทางชีวภาพ สารอาหารร่วม

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการย่อยสลายสาร โพรฟีโนฟอสทางชีวภาพด้วยกลุ่ม จุลินทรีย์ภายใต้สภาวะที่มีสารอาหารร่วม กลุ่มจุลินทรีย์ที่ใช้ในการศึกษานี้ขยายมาจากคินที่ปนเปื้อนสาร โพรฟีโนฟอสในไบร็อก การศึกษาครอบคลุมการทดลอง 3 ส่วน คือ 1) การศึกษาลักษณะของกลุ่มจุลินทรีย์ 2) การย่อยสลายสาร โพรฟีโนฟอสด้วยกลุ่มจุลินทรีย์ภายใต้สภาวะที่มีสารอาหารร่วม 3) การสาขิดการกำจัดสาร โพรฟีโนฟอสในน้ำไดคินด้วยกลุ่มจุลินทรีย์ภายใต้สภาวะที่มีสารอาหารร่วม ผลการทดลองในส่วนแรกพบว่ากลุ่มจุลินทรีย์ประกอบด้วยจุลินทรีย์บริสุทธิ์ 4 ชนิด (PF1, PF2, PF3 และ PF4) จุลินทรีย์ทั้งหมดเป็นแบคทีเรียแกรมลบและมีลักษณะเป็นแท่ง น่องจากนี้ยังพบว่าจุลินทรีย์ทั้งหมดสามารถย่อยสลายสาร โพรฟีโนฟอสได้กว่าร้อยละ 90 สำหรับการศึกษาผลในส่วนที่ 2 สารอาหารร่วมที่ศึกษา ได้แก่ โซเดียมซัคซิเนต (sodium succinate) โซเดียมอะซิเตอท (sodium acetate) และ กลูโคส (glucose) ผลการทดลองพบว่าชนิดของสารอาหารร่วม ความเข้มข้นของสารอาหารร่วม และความเข้มข้นของสาร โพรฟีโนฟอสมีผลต่อศักยภาพการย่อยสลายสาร โพรฟีโนฟอส การทดลองในสภาวะที่มีการเติมโซเดียมซัคซิเนตกลุ่มจุลินทรีย์สามารถย่อยสลายสาร โพรฟีโนฟอสคิดที่สุดคือร้อยละ 80 (จากความเข้มข้นเริ่มต้น 20 มิลลิกรัมต่อลิตร) ซึ่งมีอัตราการย่อยสลายจำเพาะ  $1.88 \times 10^{-15}$  ในโครกรัมต่อชั่วโมง และมีอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ 1.715 ต่อชั่วโมง ส่วนผลการทดลองขั้นสุดท้าย (การสาขิดระบบคงลัมเน่เพื่อกำจัดสาร โพรฟีโนฟอสภายใต้สภาวะที่มีสารอาหารร่วม) พบว่าอัตราการซึมผ่านของน้ำไดคิน สังเคราะห์มีผลต่อประสิทธิภาพการย่อยสลายสาร โพรฟีโนฟอส กล่าวคือ เมื่ออัตราการซึมผ่านสูง ส่งผลการย่อยสลายสาร โพรฟีโนฟอสลดลง โดยการทดลองที่อัตราการซึมผ่านของน้ำ 25 เซนติเมตรต่อวันมีประสิทธิภาพในการย่อยสลายสาร โพรฟีโนฟอสสูงที่สุดถึงร้อยละ 90 ผลการ

ทดลองทั้งหมดบ่งชี้ได้ว่ากลุ่มจุลินทรีย์สามารถย่อยสลายสารกำจัดศัตรูพืชโพร์ฟิโนฟอสได้ดี โดยในกรณีที่มีการเติมสารอาหารร่วมสามารถเร่งให้การย่อยสลายสารโพร์ฟิโนฟอสสูงขึ้น

## **ABSTRACT**

TITLE : PROFENOFOS DEGRADATION UNDER CO-SUBSTRATE  
CONDITION

BY : WARAYUT PATICHOT

DEGREE : MASTER OF ENGINEERING

MAJOR : ENVIRONMENTAL ENGINEERING

CHAIR : ASST. PROF. SUMANA SIRIPATTANAKUL, Ph.D.

KEYWORDS : PROFENOFOS / BIODEGRADATION / CO-SUBSTRATE

The objective of this research was to study profenofos biodegradation using mixed cultures under co-substrate-supplemented condition. Mixed cultures used in the study were enriched from profenofos-contaminated chili farm soil. The study included 3 parts of experiments: 1) characterization of the mixed cultures, 2) investigation of profenofos degradation under co-substrate-supplemented condition, and 3) demonstration of profenofos removal from groundwater using the mixed cultures under co-substrate-supplemented condition. The result from the first part showed that the mixed cultures consisted of four pure isolates (designated PF1, PF2, PF3, and PF4). All isolates were gram negative and rod shape bacteria. It was also found that all isolates could degrade profenofos of about 90 percent. For the second experiment, sodium succinate, sodium acetate, and glucose were tested as co-substrates. The result showed that types of co-substrates, concentrations of co-substrates, and concentrations of profenofos affected profenofos degradation performance. In the test with sodium succinate supplement, the mixed cultures gave the highest profenofos degradation (80 percent) at the initial profenofos concentration of 20 milligram per liter with the specific degradation rate of  $1.88 \times 10^{-15}$   $\mu\text{g}/\text{CFU}/\text{hour}$  and the specific growth rate of 1.715 per hour. For the final experiment (demonstration of column system for profenofos removal under co-substrate-supplemented condition), the result showed that synthetic groundwater infiltration rate influenced profenofos degradation efficiency. The higher infiltration rate resulted in the lower profenofos degradation. The test at the infiltration rate of 25 centimeter per day performed the highest profenofos

degradation (90%). All results indicated that the mixed cultures efficiently degraded the profenofos pesticide. The supplement of the co-substrate could accelerate the profenofos degradation.

## สารบัญ

	หน้า
<b>กิตติกรรมประกาศ</b>	<b>ก</b>
<b>บทคัดย่อภาษาไทย</b>	<b>ข</b>
<b>บทคัดย่อภาษาอังกฤษ</b>	<b>ง</b>
<b>สารบัญ</b>	<b>ฉ</b>
<b>สารบัญตาราง</b>	<b>ช</b>
<b>สารบัญรูปภาพ</b>	<b>ญ</b>
<b>บทที่</b>	
<b>1 บทนำ</b>	
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัจจุบัน	1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย	2
1.3 ขอบเขตของงานวิจัย	2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	3
1.5 สถานที่ทำการวิจัย	3
<b>2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง</b>	
2.1 สารกำจัดแมลงโพรฟิโนฟอส	4
2.2 การย่อยสลายสารพิษเป็นเป็นทางชีวภาพ (Biodegradation)	7
2.3 การเกิดเมตาบอลิซึมร่วม (Co-metabolism)	10
2.4 การฟื้นฟูพื้นที่ปนเปื้อนสารพิษด้วยวิธีการทางชีวภาพ (Bioremediation)	12
<b>3 วิธีดำเนินการวิจัย</b>	
3.1 กรอบการศึกษา	17
3.2 วิธีดำเนินงานวิจัย	21
<b>4 ผลการวิจัย และอภิปรายผล</b>	
4.1 ผลการศึกษาการเตรียมกลุ่มชุดนิทรรศ์ที่ใช้ในการขอยสลาย สารโพรฟิโนฟอส	27
4.2 ผลการศึกษาผลของการย่อยสลายสารโพรฟิโนฟอสภายใต้ สภาพแวดล้อมอาหารร่วม	31

## สารบัญ ( ต่อ )

	หน้า
4.3 การศึกษาประสิทธิภาพในการย้อมสลายเมื่ออยู่ภายใต้สภาวะ ที่มีสาร โพรฟิโนฟอส และแหล่งการบน ในระดับความ เข้มข้นต่างๆ	40
4.4 การสาดตระบบเพื่อประยุกต์ใช้ในการพื้นผืน้ำไดคินที่ ป่นเปื้อนสาร โพรฟิโนฟอส	48
4.5 ผลการวิเคราะห์วิถีการย้อมสลายสาร โพรฟิโนฟอสเบื้องต้น	53
<b>5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ</b>	
5.1 สรุปผลการวิจัย	59
5.2 ข้อเสนอแนะ	60
<b>เอกสารอ้างอิง</b>	<b>61</b>
<b>ภาคผนวก</b>	
ก การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ	67
ข การเพาะเชื้อด้วยเทคนิคการเกลี่ยเชื้อ (Spread plate technique)	69
ค การทำเชื้อให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิคการเบี่ยงเชื้อ (Steak plate technique)	72
ง การคำนวณจำนวนจุลินทรีย์	76
จ การย้อมสีแกรม	78
ฉ การวิเคราะห์สาร โพรฟิโนฟอส	83
ช ข้อมูลผลการวิจัย	100
ซ ผลงานการนำเสนอในการประชุมวิชาการระดับชาติ	111
<b>ประวัติผู้วิจัย</b>	<b>126</b>

## สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
2.1 ประมาณสารพิษต่อก้าง (MRL) ในอาหาร	6
3.1 ชุดการทดลองชนิดของสารอาหารร่วม	18
3.2 ชุดการทดลองความเข้มข้นของสารอาหารร่วม	18
3.3 ชุดการทดลองความเข้มข้นของสารโพรฟีโนฟอส	18
4.1 สรุปลักษณะของจุลินทรีย์	28
4.2 สรุปผลการวิเคราะห์ 16S rDNA ของจุลินทรีย์บริสุทธิ์ที่ผ่านการคัดแยก	28
4.3 อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของจุลินทรีย์บริสุทธิ์	29
4.4 อัตราการย่อยสลายสารโพรฟีโนฟอสจำเพาะของจุลินทรีย์บริสุทธิ์	31
4.5 อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของกลุ่มจุลินทรีย์ภายใต้สภาวะที่มีสารอาหารร่วม	33
4.6 อัตราการย่อยสลายสารจำเพาะของกลุ่มจุลินทรีย์ภายใต้สภาวะที่มีสารอาหารร่วม	37
4.7 อัตราการย่อยสลายสารจำเพาะของกลุ่มจุลินทรีย์ที่ความเข้มข้นของสาร แหล่งคาร์บอนต่างๆ	40
4.8 อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของกลุ่มจุลินทรีย์ที่ความเข้มข้นของสาร แหล่งคาร์บอนต่างๆ	40
4.9 อัตราการย่อยสลายสารจำเพาะของกลุ่มจุลินทรีย์ที่ระดับความเข้มข้นของสาร กำจัดแมลง 120 มิลลิกรัมต่อลิตร	47
4.10 อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของกลุ่มจุลินทรีย์ที่ระดับความเข้มข้นของสาร กำจัดแมลง 120 มิลลิกรัมต่อลิตร	47
4.11 ประสิทธิภาพการย่อยสลายสารโพรฟีโนฟอสในแบบจำลองคงลัมน์ ความเข้มข้น ของสารโพรฟีโนฟอสเริ่มต้น 20 มิลลิกรัมต่อลิตร	52
4.12 ประสิทธิภาพการย่อยสลายสารโพรฟีโนฟอสในแบบจำลองคงลัมน์ ความเข้มข้น ของสารโพรฟีโนฟอสเริ่มต้น 40 มิลลิกรัมต่อลิตร	52
๙.1 โปรแกรมอุณหภูมิที่ใช้ไวเคราะห์สารออร์แกนโนฟอฟอรัส	85
๙.2 ผลการเจริญเติบโตของกลุ่มจุลินทรีย์ที่ผ่านการคัดแยก	101
๙.3 ผลการเจริญเติบโตของกลุ่มจุลินทรีย์ภายใต้สภาวะที่มีสารอาหารร่วม ครั้งที่ 1	102
๙.4 ผลการเจริญเติบโตของกลุ่มจุลินทรีย์ภายใต้สภาวะที่มีสารอาหารร่วม ครั้งที่ 2	102

## สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่	หน้า
ช.5 ผลการย่อยスタイルสาร โพร์ฟีโนฟอสภายใต้สภาวะที่มีสารอาหารร่วม ครั้งที่ 1	103
ช.6 ผลการย่อยスタイルสาร โพร์ฟีโนฟอสภายใต้สภาวะที่มีสารอาหารร่วม ครั้งที่ 2	103
ช.7 ผลการวิเคราะห์ค่าซีไอดีในการย่อยスタイルสาร โพร์ฟีโนฟอสภายใต้สารอาหารร่วม	104
ช.8 ผลการย่อยスタイルสาร โพร์ฟีโนฟอสที่ความเข้มข้นของสารเหลืองต่าง ๆ ครั้งที่ 1	104
ช.9 ผลการย่อยスタイルสาร โพร์ฟีโนฟอสที่ความเข้มข้นของสารเหลืองต่าง ๆ ครั้งที่ 2	105
ช.10 ผลการเจริญเติบโตของกลุ่มจุลินทรีย์ที่ความเข้มข้นของสารเหลืองต่าง ๆ	105
ช.11 ผลการย่อยスタイルสาร โพร์ฟีโนฟอสที่ความเข้มข้นของสาร 40 มิลลิกรัมต่อลิตร	106
ช.12 ผลการเจริญเติบโตของกลุ่มจุลินทรีย์ที่ความเข้มข้นของสาร โพร์ฟีโนฟอส 40 มิลลิกรัมต่อลิตร	106
ช.13 ผลการย่อยスタイルสาร โพร์ฟีโนฟอสที่ความเข้มข้นของสาร 80 มิลลิกรัมต่อลิตร	107
ช.14 ผลการเจริญเติบโตของกลุ่มจุลินทรีย์ที่ความเข้มข้นของสาร โพร์ฟีโนฟอส 80 มิลลิกรัมต่อลิตร	104
ช.15 ผลการย่อยスタイルสาร โพร์ฟีโนฟอสที่ความเข้มข้นของสาร 120 มิลลิกรัมต่อลิตร	108
ช.16 ผลการเจริญเติบโตของกลุ่มจุลินทรีย์ที่ความเข้มข้นของสาร โพร์ฟีโนฟอส 120 มิลลิกรัมต่อลิตร	108
ช.17 ผลการย่อยスタイルสาร โพร์ฟีโนฟอสในแบบจำลองคอลัมน์ ความเข้มข้นของสาร โพร์ฟีโนฟอสเริ่มต้น 20 มิลลิกรัมต่อลิตร	109
ช.18 ผลการย่อยสไตล์สาร โพร์ฟีโนฟอสในแบบจำลองคอลัมน์ ความเข้มข้นของสาร โพร์ฟีโนฟอสเริ่มต้น 40 มิลลิกรัมต่อลิตร ครั้งที่ 1	109
ช.19 ผลการย่อยสไตล์สาร โพร์ฟีโนฟอสในแบบจำลองคอลัมน์ ความเข้มข้นของสาร โพร์ฟีโนฟอสเริ่มต้น 40 มิลลิกรัมต่อลิตร ครั้งที่ 2	110

## สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
2.1 ลักษณะโครงสร้างของสาร โพร์ฟิโนฟอส	4
2.2 การทำงานของระบบการเติมเซลล์	13
2.3 การทำงานของระบบระบายน้ำทางชีวภาพ	13
2.4 การทำงานของระบบการอัดอากาศทางชีวภาพ	14
2.5 การทำงานของระบบถังปฏิกิริยาระบบชีวภาพ	15
2.6 การทำงานของระบบผนังชีวภาพ	16
2.7 ตัวอย่างการใช้ระบบผนังชีวภาพสำหรับบำบัดน้ำเสียดินที่ปนเปื้อนในโตรเจน	16
3.1 แผนภาพขั้นตอนการวิจัย	20
3.2 แบบจำลองคอลัมน์	25
3.3 ชุดทดลองคอลัมน์	25
4.1 ลักษณะโคลนีของจุลินทรีย์บริสุทธิ์ ก) ลักษณะโคลนีของ PF1 ข) ลักษณะโคลนีของ PF2 ค) ลักษณะโคลนีของ PF3 ง) ลักษณะโคลนีของ PF4	27
4.2 ลักษณะรูปร่างเซลล์และการติดสีแกรมของจุลินทรีย์บริสุทธิ์ (ก) ลักษณะเซลล์ของ PF1 (ข) ลักษณะเซลล์ของ PF2 (ค) ลักษณะเซลล์ของ PF3 (ง) ลักษณะเซลล์ของ PF4	28
4.3 การเจริญเติบโตของจุลินทรีย์บริสุทธิ์	29
4.4 การย่อยสลายสาร โพร์ฟิโนฟอส โดยจุลินทรีย์บริสุทธิ์	31
4.5 การเจริญเติบโตของกลุ่มจุลินทรีย์ภายใต้สภาวะที่มีสารอาหารร่วม	33
4.6 การลดลงของค่า COD (ชุดควบคุมมีสารพิษไม่มีเซลล์ (PF) ชุดควบคุมมีสารพิษมีเซลล์ (CPF) ชุดที่มีสารพิษมีเซลล์เติมสารควร์บอนกูลูโคส (GCPF) ชุดที่มีสารพิษมีเซลล์เติมสารควร์บอนกรดซัคcharinik (SuCPF) ชุดที่มีสารพิษมีเซลล์เติมสารควร์บอนโซเดียมอะซิเตอท (SoCPF))	35
4.7 การย่อยสลายสาร โพร์ฟิโนฟอสภายใต้สภาวะที่มีสารอาหารร่วม	37
4.8 ผลการย่อยสลายสาร โพร์ฟิโนฟอสที่ความเข้มข้นของสารเหลืองต่างๆ	39
4.9 ผลการศึกษาที่ระดับความเข้มข้นของสารกำจัดแมลง 40 มิลลิกรัมต่อลิตร	42
4.10 ผลการศึกษาที่ระดับความเข้มข้นของสารกำจัดแมลง 80 มิลลิกรัมต่อลิตร	44
4.11 ผลการศึกษาที่ระดับความเข้มข้นของสารกำจัดแมลง 120 มิลลิกรัมต่อลิตร	46

## สารบัญภาค (ต่อ)

ภาคที่	หน้า
4.12 การย้อมสลายสารคลอไพริดและสารโพร์ฟิโนฟอสในแบบจำลองคงคลั่นน์	48
4.13 การย้อมสลายสารโพร์ฟิโนฟอสในแบบจำลองคงคลั่นน์ ความเข้มข้นของสารโพร์ฟิโนฟอส 20 มิลลิกรัมต่อลิตร เซลล์เริ่มต้น $10^5$ ชีเอฟยูต่อมิลลิลิตร (A) และ เซลล์เริ่มต้น $10^{15}$ ชีเอฟยูต่อมิลลิลิตร (B) อัตราการซึมผ่าน 25 เซนติเมตรต่อวัน (25) 50 เซนติเมตรต่อวัน (50) และ 100 เซนติเมตรต่อวัน (100)	50
4.14 การย้อมสลายสารโพร์ฟิโนฟอสในแบบจำลองคงคลั่นน์ ความเข้มข้นของสารโพร์ฟิโนฟอส 40 มิลลิกรัมต่อลิตร เซลล์เริ่มต้น $10^5$ ชีเอฟยูต่อมิลลิลิตร (A) และ เซลล์เริ่มต้น $10^{15}$ ชีเอฟยูต่อมิลลิลิตร (B) อัตราการซึมผ่าน 25 เซนติเมตรต่อวัน (25) 50 เซนติเมตรต่อวัน (50) และ 100 เซนติเมตรต่อวัน (100)	51
4.15 โครงสร้างของสารโพร์ฟิโนฟอส	54
4.16 โครงสร้างของสาร 4-bromo-2-chrolophenol (BCP)	54
4.17 การวิเคราะห์ BCP ในสารโพร์ฟิโนฟอสมาตรฐาน 15 มิลลิกรัมต่อลิตร (A) และ ในชุดการย้อมสลายสารโพร์ฟิโนฟอสความเข้มข้น 40 มิลลิกรัมต่อลิตร (B)	55
4.18 วิถีการย้อมสลายของสารโพร์ฟิโนฟอส	56
4.19 การวิเคราะห์ BCP ชุดการย้อมสลายสารโพร์ฟิโนฟอสความเข้มข้น 120 มิลลิกรัมต่อลิตร เวลาในการทดลอง 3 ชั่วโมง (A) และเวลาในการทดลอง 6 ชั่วโมง (B)	57
4.20 การวิเคราะห์สารประกอบฟีนอล ในชุดการย้อมสลายสารโพร์ฟิโนฟอสความเข้มข้น 40 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่เวลาเริ่มต้น 3 ชั่วโมง (A) ที่เวลา 6 ชั่วโมง (B)	58
๔.1 ขั้นตอนการทำ Serial dilution	70
๔.2 ขั้นตอนการเพาะเชื้อด้วยเทคนิคการเกลี่ยเชื้อ	71
๕.1 การถ่ายเชื้อด้วยเทคนิคปลอดเชื้อ	73
๕.2 ขั้นตอนการแยกเชื้อบริสุทธิ์ด้วยเทคนิคเจียบเชื้อ (Streak plate)	75
๖.1 การเตรียมสไลด์ตัวอย่างก่อนการขึ้นมีศีแทร็ม	80
๖.2 ขั้นตอนการขึ้นมีศีแทร็ม	82
๗.1 ลักษณะโครงมาตรฐานโดยแทร็มของสารโพร์ฟิโนฟอส	85
๗.2 ไออกอนแมลงของสารโพร์ฟิโนฟอส	86
๗.3 ลักษณะการภาพมาตรฐานสารโพร์ฟิโนฟอส	86

## บทที่ 1

### บทนำ

#### 1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัจจุบัน

ปัจจุบันกิจกรรมทางการเกษตรต่าง ๆ เช่น การปลูกข้าว พ稷 ฝ้าย รวมทั้งพืชผัก และผลไม้หลายชนิดมีการใช้สารกำจัดศัตรูพืชหลายชนิดและมีปริมาณการใช้ที่เพิ่มมากขึ้น เพื่อลดการทำลายของแมลงศัตรูพืช ส่งผลให้ปริมาณการตกค้างของสารกำจัดศัตรูพืชในธรรมชาติมีแนวโน้มเพิ่มมากขึ้น (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร) โดยเฉพาะอย่างยิ่งมีงานวิจัยในอดีตได้ระบุการปนเปื้อนสารกำจัดศัตรูพืชหลายชนิดในน้ำได้ดิน (อดิสา วงศ์, 2553)

สาร โพรฟีโนฟอส ( $O$ -(4-bromo-2-chlorophenyl)  $O$ -ethyl  $S$ -propylphosphorothioate) มีสูตรโมเลกุล คือ  $C_{11}H_{15}O_3PSBrCl$  เป็นสารกำจัดแมลงในกลุ่มอร์แกนโนฟอสฟอรัสที่มีการใช้มากที่สุดชนิดหนึ่ง สารกลุ่มนี้คังกล่าวสามารถตกค้างในธรรมชาติเป็นเวลานาน โดยขึ้นอยู่กับสภาพอากาศ และสถานะอื่น ๆ โดยสาร โพรฟีโนฟอสสามารถตกค้างในน้ำได้สูงสุด 20 ล้านในล้านส่วน สารกลุ่มนี้มีฤทธิ์ส่งผลต่อระบบประสาทและกล้ามเนื้อหัวใจในมนุษย์และสัตว์ (Venkateswara et al., 2003; US EPA, 2006; WHO, 2009) โดยปริมาณสารพิษตกค้างสูงสุดที่ยอมรับได้ (Maximum Residue Limit; MRL) ของสาร โพรฟีโนฟอสคือ 5 ส่วนในล้านส่วน (สำนักงานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ, 2551) ดังนั้นจึงจำเป็นต้องหาแนวทางจัดการการปนเปื้อนของสาร โพรฟีโนฟอส

การจัดการสารตกค้างในน้ำได้ดินที่นิยมวิธีหนึ่งคือวิธีการทางชีวภาพ ซึ่งวิธีดังกล่าวมีประสิทธิภาพสูง ไม่มีการใช้สารเคมี ต้นทุนค่าใช้จ่ายต่ำ และเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม (กาญจนานา พานแก้ว, 2553; Malghani et al., 2009) จากงานวิจัยการใช้วิธีทางชีวภาพในการย่อยสลายสารพิษ (Fantroussi and Agathos, 2005; Park and Kim, 2008; Siripattanakul et al., 2009) พบว่าจุลินทรีย์สามารถย่อยสลายสารพิษเพื่อใช้เป็นสารอาหารสำหรับการเจริญเติบโต แต่อย่างไรก็ตามมีวิธีการเพิ่มประสิทธิภาพในการบำบัดให้ดีขึ้น จึงได้มีการพัฒนาใช้กระบวนการเมtabolism ร่วม (Co-metabolism) โดยกระบวนการดังกล่าวเป็นการเติมสารอาหารที่จำเป็นสำหรับการเจริญของจุลินทรีย์ เพื่อให้กระบวนการย่อยสลายสารพิษเพิ่มสูงขึ้น ซึ่งจากการวิจัยที่ผ่านมาได้มีการศึกษาเกี่ยวกับการใช้กระบวนการเมtabolism ร่วมเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการย่อยสลายสารพิษหลายชนิดเช่น โพรฟีโนฟอสและ มาลา ไทรอน (Malghani et al., 2009; Xie et al., 2009) จากผลการ

ทดลองดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าเมื่อมีการเติมสารอาหารจะส่งผลให้การเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ และประสิทธิภาพในการย่อยถ่ายสารพิษเพิ่มมากขึ้น

ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้มีเป้าหมายเพื่อศึกษาการย่อยถ่ายสารโพรฟอสเมื่อยูไนท์ภาวะที่มีสารอาหารร่วม โดยใช้จุลทรีย์ที่คัดแยกได้จากการวิจัยที่ผ่านมา (กาญจนาน พานเกี้ยว, 2553) เน้นศึกษาชนิดและปริมาณของสารที่ใช้แหล่งการบ่อน ที่ทำให้เกิดการย่อยถ่ายสารที่ดีที่สุด นอกจากนี้ยังได้มีการสาซิคการนำบัคสาร โพรฟอส ในน้ำไดคิน โดยใช้สภาวะที่เหมาะสมต่อ การย่อยถ่ายสาร โพรฟอส เพื่อเป็นข้อมูลสำหรับการประยุกต์ใช้พื้นฟูน้ำไดคินที่ป่นเปี้ยนสาร โพรฟอสต่อไปในอนาคต

## 1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1.2.1 เพื่อศึกษากำลังณูของจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยถ่ายสาร โพรฟอสได้

1.2.2 เพื่อศึกษาการย่อยถ่ายสาร โพรฟอสเมื่อยูไนท์ภายใต้สภาวะที่มีสารอาหารร่วม

1.2.2.1 ศึกษาชนิดของสารอาหารที่เหมาะสมที่ทำให้เกิดการย่อยถ่ายสาร โพรฟอสที่ดีที่สุด

1.2.2.2 ศึกษาความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารอาหาร สำหรับการย่อยถ่ายสาร โพรฟอสที่ดีที่สุด

1.2.3 เพื่อสาซิคการประยุกต์ใช้ระบบสำหรับการย่อยถ่ายสาร โพรฟอสในน้ำไดคินในระดับน้ำร่องนาดเล็ก

## 1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

1.3.1 สารกำจัดแมลงกลุ่มอร์แกน โนฟอสฟอรัสที่ใช้ในการทำวิจัยคือ สาร โพรฟอส โดยการทดลองการศึกษาการย่อยถ่ายใช้สาร โพรฟอสเกรดการค้า ส่วนการวิเคราะห์ใช้สาร มาตรฐานเกรดสำหรับการวิเคราะห์

1.3.2 การทดสอบเป็นการทดลองระดับห้องปฏิบัติการ

1.3.3 แหล่งการบ่อนที่ศึกษาคือ โซเดียมซัคซิเนต (sodium succinate) โซเดียมอะซิเตอท (sodium acetate) และ กลูโคส (glucose)

1.3.4 ความเข้มข้นของสาร โพรฟอสที่ศึกษาคือ 20, 40, 80 และ 120 มิลลิกรัมต่อ ลิตร

1.3.5 ความเข้มข้นของเหลวที่ศึกษาคือ 4 40 400 และ 500 มิลลิกรัมต่อ ลิตร

1.3.6 ปริมาณเซคลิกูลินทรีย์ที่ใช้ในการศึกษา คือ ร้อยละ 5 ต่อบริบูรณ์ ( $10^6$  ชีเอฟบูต่อ มิลลิลิตร)

1.3.7 การศึกษาแบบเพาะเลี้ยงในสภาวะที่มีการควบคุมอุณหภูมิที่  $30^{\circ}\text{C}$  และ เข่าที่ ความเร็ว 100 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 วัน และ ปรับพีโซชเริ่มต้นของสารก่อนทดลองที่พีโซช 7

1.3.8 การศึกษาในระดับนำร่องขนาดเล็กทดลองในแบบจำลองคลื่นที่อุณหภูมิห้อง ควบคุมให้มีอัตราการซึมผ่าน 25 50 และ 100 เซนติเมตรต่อวัน

1.3.9 การวิเคราะห์ความเข้มข้นสาร โพรฟิโนฟอสกงเหลือโดยใช้เครื่องแก๊ส โครมაโตกราฟี-แมสสเปกโตรมิที (Gas Chromatography-Mass Spectrometry, GC-MS)

#### 1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.4.1 สามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการย่อยสลายสาร โพรฟิโนฟอสได้ดีขึ้น

1.4.2 สามารถประยุกต์วิธีการเพื่อใช้สำหรับพื้นที่ดินที่ปนเปื้อนสารพิษได้จริง

#### 1.5 สถานที่ทำการวิจัย

ห้องปฏิบัติการภาควิชาเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

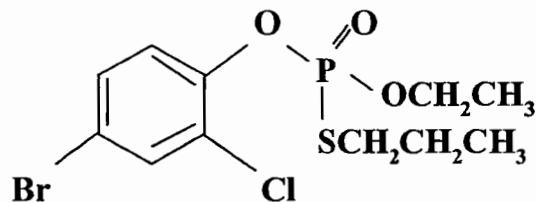
## บทที่ 2

### ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

#### 2.1 สารกำจัดแมลงไฟฟ์โนฟอส

##### 2.1.1 รายละเอียดทั่วไป

สาร ไฟฟ์โนฟอส (*O*-(4-bromo-2-chlorophenyl)-*O*-ethyl-*S*-propyl phosphorothioate) มีสูตรโครงสร้าง คือ  $C_{11}H_{15}OSBrCl$  และมีลักษณะโครงสร้างดังแสดงในภาพที่ 2.1 จัดเป็นสารในกลุ่มօร์แกนโนฟอสฟอรัส สารไฟฟ์โนฟอสมีจุดเดือดที่ 100 องศาเซลเซียส (1.8 Pa) ความหนาแน่น 1.46 กรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตร ที่ 20 องศาเซลเซียส ความสามารถในการละลายน้ำ 20 ส่วนในล้านส่วน สารกลุ่มนี้มีฤทธิ์ส่งผลกระทบต่อการทำงานของระบบประสาทและกล้ามเนื้อ ทึ้งในมนุษย์และสัตว์ (Venkateswara et al., 2003; US EPA, 2006; WHO, 2009)



ภาพที่ 2.1 ลักษณะโครงสร้างของสาร ไฟฟ์โนฟอส

##### 2.1.2 ลักษณะการใช้งานสาร ไฟฟ์โนฟอส

สาร ไฟฟ์โนฟอส เป็นสารป้องกันกำจัดแมลงที่ออกฤทธิ์ฆ่าแมลงได้กว้างทั้งกลุ่มเพี้ยไฟ ไร หนอน และแมลงต่าง ๆ ในพืช ผัก และไม้ผล จึงเป็นสารเคมีอีกชนิดหนึ่งที่นิยมใช้ทางการเกษตร เพื่อลดการทำลายของแมลงศัตรูพืชที่จะเกิดต่อพืชผลทางการเกษตร โดยในสหรัฐอเมริกากว่าร้อยละ 80 ของรัฐที่มีการเพาะปลูกฝ้ายจะมีการใช้สาร ไฟฟ์โนฟอส (US-EPA, 2006) ส่วนในประเทศไทยสาร ไฟฟ์โนฟอสถูกใช้ในด้านการเกษตร เช่น การปลูกพริกและผักต่าง ๆ รวมถึงการใช้ในการป้องกันกำจัดแมลงศัตรูฝ้าย เช่นหนอนเจาสมอฝ้าย หนอนกระทุ่ง หนอน

ม้วนใบฝ่าย หนอนคีบกินใบ และวนแಡงฝ่าย โดยใช้ในอัตรา 80 มิลลิลิตร (ความเข้มข้นของสาร โพร์ฟิโนฟอสร้อยละ 40 มวลดต่อบرمิลลิตร) ผสมน้ำ 20 ลิตร ซึ่งคิดเป็นปริมาณ 1.7 กรัมต่อลิตร

### 2.1.3 การออกฤทธิ์ของสาร โพร์ฟิโนฟอส

การออกฤทธิ์ของสาร โพร์ฟิโนฟอส ซึ่งเป็นสารกำจัดแมลงกลุ่มอร์แกโนฟอฟอร์ส จะรวมตัวกับเนื้อไขมันอะเซทิลโคลีนเอสเทอเรสอย่างถาวร ทำให้เกิดการสะสมของอะเซทิลโคลีนที่บริเวณต่าง ๆ ได้แก่ บริเวณที่ติดต่อระหว่างประสาทและกล้ามเนื้อ ซึ่งการรวมตัวระหว่างฟอสเฟตอินทรีย์ในสารกำจัดแมลงกลุ่มอร์กานฟอฟอร์ส กับเนื้อไขมันอะเซทิลโคลีนเอสเทอเรส จะทำลายฤทธิ์เอนไซม์นี้ ทำให้เกิดการคั่งของปริมาณของอะเซทิลโคลีน ที่บริเวณปลายเซลล์ประสาท ทำให้เกิดการกระตุ้นเซลล์ประสาทดicitต่อกัน โดยเฉพาะในระบบพาราซิมพาเตติก และระบบที่ควบคุมการเคลื่อนไหวของร่างกาย กล้ามเนื้อจะกระตุกสั่นเกิดอาการเกร็ง แต่หากความเข้มข้นของอะเซทิลโคลีนมากเกินไป จะทำให้เกิดฤทธิ์ตรงข้าม คือ เกิดอาการอ่อนเพลียจนอัมพาต หงุดหงิด และการหายใจลำบาก และกล้ามเนื้อ หัวใจเต้นเร็ว ความดันโลหิตสูง การหายใจลำบาก และเสียชีวิตในที่สุด (สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา กระทรวงสาธารณสุข, 2542)

### 2.1.4 การปนเปื้อนและความคงทนของสาร โพร์ฟิโนฟอสในสิ่งแวดล้อม

สาร โพร์ฟิโนฟอส เป็นสารกลุ่มอร์แกโนฟอฟอร์สมิเน่าหนักโมเลกุล 373.6 WHO จัดความเป็นพิษในระดับ II โดยมีค่า LD<sub>50</sub> ในหนูท่ากับ 358 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (WHO, 2001) มีความสามารถในการละลายน้ำ 20 ส่วนในล้านส่วน ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส มีการสะสมและส่งผลต่อเนื้อเยื่อหنجอกของปลา (Venkateswara et al., 2003) รวมทั้งสามารถตกค้างในพืชผัก เป็นเวลานาน ขึ้นอยู่กับสภาพอากาศและสภาพวัย สาร โพร์ฟิโนฟอส มีค่าครึ่งชีวิตในดินอยู่ที่ปริมาณ 1 สัปดาห์ (US EPA, 2006; จินตนา ภูมิภูมิชัย และคณะ, 2551) นอกจากนี้ยังมีการสำรวจพบการตกค้างของสารกลุ่มอร์แกโนฟอฟอร์สในดิน ร้อยละ 49 และในเลือดของเกษตรกรจัดอยู่ในเกณฑ์ที่มีความเสี่ยงร้อยละ 58 (นาเดชา จันทร์ส่อง และคณะ, 2550) ซึ่งปริมาณสารพิษตกค้างสูงสุดที่ยอมรับได้ (Maximum Residue Limit; MRL) ในอาหารแสดงดังตารางที่ 2.1

ตารางที่ 2.1 ปริมาณสารพิษตกค้าง (MRL) ในอาหาร (สำนักงานมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ, 2551)

ชนิดพืช	ปริมาณสารพิษสูงสุด (มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม)
กะหล่ำปลี	1
ไข่	0.02
เครื่องในสัตว์ปีก	0.05
เครื่องในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม	0.05
ขมพุ	0.05
ต้นหอม	0.05
ถั่วเหลือง	0.05
ทุเรียน	0.05
นม	0.01
น้ำมันเม็ดฟ้า	0.05
เนื้อสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม	0.05
ผักกระภูเขา กะหล่ำปลี	0.5
พริก	5
พริกหวาน	0.5
มะเขือเทศ	2
มะนาว	0.05
มะม่วง	0.2
มังคุด	5
เม็ดฟ้า	2
ส้ม	0.1
ห้อมแดง	0.05
ห้อมใหญ่	0.05
อุ่น	0.05

## 2.2 การย่อยสลายสารพิษปนเปื้อนทางชีววิทยา (Biodegradation)

### 2.2.1 องค์ประกอบในการย่อยสลายสารพิษทางชีววิทยา

การย่อยสลายสารพิษทางชีวภาพ เป็นการใช้จุลินทรีย์เพื่อย่อยสลายสารพิษหรือลดความเป็นพิษของสารนั้น ๆ ลง ถึงแม้ว่าการประยุกต์ใช้จุลินทรีย์ในการบำบัดน้ำทึ่งจากชุมชนและน้ำเสียอุตสาหกรรมมีการใช้มานาน แต่การนำจุลินทรีย์มาใช้ในการย่อยสลายสารพิษจัดเป็นเทคโนโลยีใหม่ในการบำบัดสารมลพิษที่ปนเปื้อนในดิน อากาศ น้ำ และน้ำใต้ดิน โดยการย่อยสลายสารมลพิษทางชีวภาพแตกต่างจากระบบบำบัด คือ ระบบบำบัดน้ำเสียจะมีการควบคุมให้จุลินทรีย์อยู่ในสภาพที่เหมาะสมต่อการการเจริญเติบโตและการทำงาน ซึ่งสภาพดังกล่าวจะต่างจากสภาพของสิ่งแวดล้อมตามธรรมชาติ เนื่องจากสารมลพิษในสิ่งแวดล้อมธรรมชาติจะอยู่ในหลายรูปแบบ เช่น ถูกคุกคามกับอนุภาคดิน ละลายอยู่ในน้ำ และ/หรือในสภาพแก๊ส เป็นต้น ทำให้ยากต่อการควบคุมสภาพต่าง ๆ ให้มีความเหมาะสมต่อการย่อยสลายและการบำบัดสารมลพิษของจุลินทรีย์อย่างมีประสิทธิภาพ (อดิสา วงศ์ใน, 2553) โดยปัจจัยที่มีต่อความสามารถในการย่อยสลายสารมลพิษที่ปนเปื้อนของจุลินทรีย์มีหลายปัจจัยด้วยกัน ดังนี้

2.2.1.1 ชนิดและลักษณะสมบัติของจุลินทรีย์ จุลินทรีย์ในธรรมชาติที่มีการปรับตัวให้สามารถทนต่อสารพิษ และมีความสามารถในการย่อยสลายสารพิษนั้นเพื่อใช้เป็นสารอาหารหรือเปลี่ยนรูปสารพิษให้มีความเป็นพิษน้อยลง จากงานวิจัยหลายชิ้นที่ผ่านมา (Benimeli et al., 2008; Li et al., 2007; Wang et al., 2007; Li et al., 2008; Malghani et al., 2009; Xie et al., 2009) ซึ่งได้มีการคัดแยกจุลินทรีย์เพื่อศึกษาการย่อยสลายสารมลพิษ ผลการศึกษาพบว่าจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้สามารถย่อยสลายสารพิษได้อย่างมีประสิทธิภาพ ซึ่งจุลินทรีย์ที่ใช้สำหรับย่อยสลายสารพิษเป็นจุลินทรีย์ที่มีการคัดแยกได้จากพื้นที่ที่ปนเปื้อนสารพิษนั้น ๆ ที่สามารถปรับตัวทนต่อสารพิษและสามารถย่อยสลายสารพิษนั้นได้

2.2.1.2 แหล่งพลังงาน ใน การย่อยสลายสารพิษจะเกิดปฏิกิริยาต่าง ๆ ได้แก่ ปฏิกิริยาออกซิเดชัน-รีดักชัน ซึ่งสุกทায়ะเป็นการสร้างพลังงานให้แก่เซลล์จุลินทรีย์เพื่อการเจริญเติบโต จากการศึกษาการย่อยสลายสารมลพิษของจุลินทรีย์ เพื่อใช้เป็นแหล่งพลังงาน (Cycon et al., 2009; Malghani et al., 2009; Xie et al., 2009) พบว่าจุลินทรีย์มีการย่อยสลายสารมลพิษเพื่อใช้เป็นแหล่งพลังงานในการเจริญเติบโต เช่นงานวิจัยของ Cycon et al. (2009) ได้ศึกษาการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ในอาหารเอ็ม莫เลม (Minimal Salt Medium; MSM) ที่ผสมสารไดอะซิโนน (diazinon) ผลการศึกษาการย่อยสลายสารพิษ และผลของการเจริญเติบโตแสดงให้เห็นว่า เชื้อจุลินทรีย์มีการใช้สารพิษเพื่อเป็นแหล่งพลังงานสำหรับการเจริญเติบโต โดยเมื่อเวลาผ่านไป ความเข้มข้นของสารคลดลงกว่าร้อยละ 80 และจำนวนเซลล์มีการเพิ่มกว่า 3 เท่าในระยะเวลา 14 วัน

2.2.1.3 ความชื้น ความชื้นหรือปริมาณน้ำในสิ่งแวดล้อมเป็นอีกปัจจัยที่มีผลต่อการย่อยสลายสารพิษของจุลินทรีย์ โดยส่วนใหญ่ต่อการเจริญเติบโตและการเปลี่ยนรูปสารพิษ การกระจายตัว และการละลายของก้าชออกซิเจน และปริมาณของสารพิษที่จุลินทรีย์สามารถนำมารับประทานได้ขึ้นอยู่กับสมบัติของสารพิษนั้น ๆ

2.2.1.4 ความเป็นกรดค้าง ความเป็นกรดค้างของสิ่งแวดล้อมมีผลต่อการคัดซึมสารอาหาร การเจริญและการทำงานของจุลินทรีย์ ดังนี้ในการย่อยสลายสารพิษทางชีวภาพจึงจำเป็นต้องมีการควบคุมความเป็นกรดค้างอย่างสม่ำเสมอ จากการศึกษาที่ผ่านมาได้มีการทดลองเพื่อย่อยสลายสารามลพิษในสภาพของความเป็นกรดค้างที่ต่างกัน จากการวิจัยที่ผ่านมา (Malghani et al., 2009) ได้ศึกษาความสามารถในการย่อยสลายสาร โพรฟิโนฟอสของจุลินทรีย์ที่ผ่านการคัดแยกโดยในการทดลองได้มีการทดสอบผลของความเป็นกรดค้างต่อประสิทธิภาพในการย่อยสลายสาร โพรฟิโนฟอสได้ดีที่สุดที่ pH 5.5-7.2 ผลการทดลองพบว่าจุลินทรีย์สามารถย่อยสลายสาร โพรฟิโนฟอสได้ดีที่สุดที่ pH 6.5 จากผลดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าที่สภาพความเป็นกรดค้างต่างกัน มีผลต่อความสามารถในการย่อยสลายสารามลพิษของจุลินทรีย์

2.2.1.5 อุณหภูมิ เป็นปัจจัยที่มีผลต่ออัตราการย่อยสลายสารพิษ โดยอุณหภูมิจะมีผลต่อการเกิดปฏิกิริยาเคมีต่าง ๆ รวมไปถึงการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ที่มีความจำเพาะต่ออุณหภูมิ ในสภาพแวดล้อมนี้ ๆ จากการวิจัยของ Head and Oleszkiewicz (2004) ได้ศึกษาการย่อยสลายในโตรเจน โดยทำการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิเพื่อศึกษาการเกิดปฏิกิริยาในตรีฟิเคลชั่น (nitrification) ของจุลินทรีย์ทดลองโดยใช้อุณหภูมิเริ่มต้นที่ 20-25 และ 30 °C อุณหภูมิสุดท้ายที่ 10 °C จากการทดลองพบว่าอุณหภูมิเริ่มต้นที่ 20 °C มีการลดลงของแอมโมเนียม ( $\text{NH}_3\text{-N}$ ) มากที่สุดรองลงมาคือที่อุณหภูมิ 25 และ 30 °C ซึ่งการลดลงของแอมโมเนียมในโตรเจนแสดงให้เห็นถึงเกิดปฏิกิริยาในตรีฟิเคลชั่นมากที่สุด จากผลดังกล่าวจะเห็นว่าอุณหภูมิมีผลต่อการทำงานของจุลินทรีย์และการเกิดปฏิกิริยาเคมีต่าง ๆ

2.2.1.6 สารอาหาร สารอาหารเป็นสิ่งจำเป็นต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ใน การเจริญเติบโต โดยสารอาหารหลักได้แก่ คาร์บอน ในโตรเจน และฟอสฟอรัส รวมไปถึงสารอินทรีย์อื่น ๆ ซึ่งโดยทั่วไปสารพิษที่ปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อมจุลินทรีย์อาจสามารถย่อยสลายและนำสารนั้นมาเป็นสารอาหารได้ โดย Xie et al. (2009) และ Malghani et al. (2009) ได้มีการศึกษาผลของสารอาหารต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ โดยการเติมสารอาหารอกเหนือจากสารพิษที่จุลินทรีย์สามารถย่อยสลายเพื่อใช้เป็นแหล่งพลังงานหลักเพิ่มลงไป เช่นในงานวิจัยของ Xie et al. (2009) ได้มีการศึกษาการย่อยสลายสารมาลาไธโอน (Malathion) โดยมีการเติมสารอาหารที่นอกเหนือจากสารพิษ ซึ่งผลการทดลองพบว่าจุลินทรีย์สามารถในการย่อยสลายสารพิษเพิ่มมากขึ้น

กว่าร้อยละ 60 เมื่อเทียบกับชุดที่ไม่มีการเติมสารอาหาร จากผลดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าสารอาหารมีความจำเป็นต่อการย่อยสลายสารพิษของจุลินทรีย์

2.2.1.7 โครงสร้างของสารพิษ ใน การย่อยสลายสารพิษทางชีวภาพ โครงสร้าง และลักษณะสมบัติของสารพิษ เป็นปัจจัยที่ส่งผลต่อการย่อยสลายสารและการคุ้มครองสำหรับน้ำที่เป็นสารอาหารในการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ จากรายงานวิจัยที่ผ่านมา Li et al. (2008) ได้มีการนำจุลินทรีย์มาใช้ย่อยสลายสารอะตราซิน ได้มีการระบุว่าจุลินทรีย์ที่ใช้อะตราซินเป็นแหล่งในโตรเจน และจากการวิจัยของ Malghani et al. (2009) ได้คัดแยกเชื้อที่สามารถย่อยสลายสาร โพธิ์ฟูฟ่อง จากการวิจัยระบุได้ว่าจุลินทรีย์ย่อยสลายสาร โพธิ์ฟูฟ่องเพื่อใช้เป็นแหล่งคาร์บอน จากการวิจัยทั้งสองแสดงให้เห็นว่าเนื่องจากโครงสร้างของสารพิษที่ต่างกัน จุลินทรีย์จะมีการย่อยสลายสารพิษนั้นเพื่อใช้เป็นแหล่งสารอาหารต่างกัน

2.2.1.8 จำนวนครั้งหรือความถี่ของการปนเปื้อนสารพิษ เมื่อมีการปนเปื้อนของสารพิษในสิ่งแวดล้อม จุลินทรีย์จะมีการปรับตัวให้ทนต่อสารหรือมีการย่อยสารพิษนั้น และเมื่อมีการปนเปื้อนสารพิษเดิมหรือสารพิษที่มีโครงสร้างคล้ายกันในครั้งต่อมา จะทำให้จุลินทรีย์ในบริเวณดังกล่าวไม่ต้องใช้เวลาในการปรับตัวนาน ส่งผลต่อความสามารถในการย่อยสลายสารพิษที่ปนเปื้อนสูงขึ้น จากรายงานวิจัยหลายชิ้นที่ได้มีการศึกษาเกี่ยวกับการคัดแยกจุลินทรีย์จากพื้นที่ปนเปื้อนสารพิษเพื่อใช้สำหรับการย่อยสลายสารพิษ โดยทำการคัดแยกจุลินทรีย์จากพื้นที่ที่มีการปนเปื้อนของสารพิษสะสมเป็นเวลานานเพื่อให้ได้จุลินทรีย์ที่ทนต่อสารพิษ และสามารถย่อยสลายสารพิษนั้นได้อย่างมีประสิทธิภาพ (Benimeli et al., 2008; Li et al., 2007; Wang et al., 2007; Li et al., 2008; Xie et al., 2009; Malghani et al., 2009; กาญจนาน พานแก้ว, 2553)

## 2.2.2 การกระตุ้นทางชีวภาพ

การย่อยสลายสารพิษด้วยกระบวนการทางชีวภาพโดยการทํางานของจุลินทรีย์ ในธรรมชาติจะมีประสิทธิภาพเมื่อมีการเจริญและเพิ่มจำนวนของจุลินทรีย์ ดังนั้นการกระตุ้นทางชีวภาพจึงเป็นการเพิ่มการเจริญของจุลินทรีย์ ทำได้โดยการให้สารอาหารที่จำเป็นสำหรับการเจริญเติบโต เช่น การให้แหล่งคาร์บอน ในโตรเจน การกระตุ้นการสร้างเอนไซม์เพื่อย่อยสลายสารพิษ นอกจากนั้นการกระตุ้นยังรวมไปถึงการปรับสภาพต่างๆ ให้เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ เช่น ค่าความเป็นกรดด่าง อากาศ และความชื้น เป็นต้น เพื่อให้จุลินทรีย์มีการเจริญเพิ่มขึ้น ลดเวลาในการปรับตัวของจุลินทรีย์ และเร่งอัตราการย่อยสลายสารพิษ (อดิสา วงศ์, 2553) โดยหนึ่งในวิธีการการกระตุ้นทางชีวภาพคือกระบวนการเมtabolism คือกระบวนการอลิซึมร่วม (Co-metabolism)

### 2.3 การเกิดเมตาบolaลิซึมร่วม (Co-metabolism)

กระบวนการเมตาบolaลิซึมร่วมเป็นกระบวนการย่อยสลายทางชีวภาพโดยอาศัยปัจจัยด้านสารอาหาร ซึ่งการเกิดเมตาบolaลิซึมร่วมจะเกิดเมื่อจุลินทรีย์ได้รับสารอาหารที่ช่วยในการเจริญเติบโตจากแหล่งอื่นที่ไม่ใช่สารพิษ ได้แก่ การให้แหล่งคาร์บอน ในโตรเจน รวมทั้งสารอนินทรีย์อื่น ๆ ในปริมาณที่เหมาะสมเมื่อเกิดเมตาบolaลิซึมร่วมขึ้นจะทำให้เกิดการเปลี่ยนรูปและย่อยสลายสารพิษ ตลอดจนการเพิ่มอัตราการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ ซึ่งมีปัจจัยในการเกิดเมตาบolaลิซึมร่วมดังนี้ (อดิสา วงศ์ใน, 2553)

2.3.1 อุณหภูมิ เป็นปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์และอัตราการย่อยสลายสารพิษ เนื่องจากอุณหภูมนิ่มผลต่อปฏิกิริยาเคมีต่าง ๆ เมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นทำให้เกิดการละลายน้ำของสารมากขึ้น ส่งผลต่อการสัมผัสสารของจุลินทรีย์มากขึ้น และในอุณหภูมิที่เหมาะสมจะทำให้จุลินทรีย์มีการเจริญเติบโตสูงขึ้น ทำให้มีการย่อยสลายสารพิษเพื่อใช้เป็นสารอาหารในการเจริญเติบโตมากขึ้นเช่นกัน (อดิสา วงศ์ใน, 2553)

2.3.2 ความเป็นกรดเป็นด่างและปริมาณอากาศ มีผลต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ และการทำงานของเอนไซม์ในการก่อให้เกิดกระบวนการเมตาบolaลิซึมในการย่อยสลายสารต่าง ๆ

2.3.3 ปริมาณสารอาหาร มีผลต่อการเจริญของจุลินทรีย์ เนื่องจากจุลินทรีย์จำเป็นต้องใช้สารอาหารสำหรับการเจริญเติบโต หากปริมาณสารอาหารต่ำเกินไปจะทำให้จุลินทรีย์มีอัตราการเจริญต่ำ แต่หากมีปริมาณสารอาหารมากเกินไปจุลินทรีย์จะเลือกใช้สารอาหารมากกว่าการใช้สารพิษเป็นอาหาร ดังนั้นปริมาณสารอาหารต้องมีปริมาณที่เหมาะสมเพื่อให้จุลินทรีย์เจริญเติบโตและย่อยสลายสารพิษไปพร้อมกันดังตัวอย่างการศึกษาของ Xie et al. (2009) ได้มีการทดลองเพื่อหาความเหมาะสมของปริมาณสารอาหารและสารพิษต่อการย่อยสลายสารมลพิษมาลาไธอ่อน โดยการเติมสารอาหารและสารพิษในอัตราส่วนต่าง ๆ ผลการศึกษาพบว่าปริมาณสารอาหารมีผลต่อการย่อยสลายสารพิษ คือเมื่อเพิ่มปริมาณสารอาหารเพิ่มขึ้น ความสามารถในการย่อยสลายสารพิษจะเพิ่มขึ้นตามไปด้วยในระดับหนึ่ง และหากเพิ่มปริมาณสารอาหารมากขึ้นเรื่อย ๆ ความสามารถในการย่อยสลายสารพิษมีแนวโน้มลดลง แต่หากไม่มีการเติมสารอาหารจุลินทรีย์จะไม่มีการเจริญเติบโตและย่อยสลายสารมาลาไธอ่อนเลย โดยอัตราส่วนที่เหมาะสมสำหรับการย่อยสลายสารมาลาไธอ่อน คือที่อัตราส่วนของโซเดียมซัคซิเนต 128.6 มิลลิกรัมต่อมากาลาไธอ่อน 1 มิลลิกรัม ทำให้ค่าคงที่การย่อยสลายสารมาลาไธอ่อนสูงที่สุดถึง 3.5837 มิลลิกรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง จากผลดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าปริมาณของสารอาหารส่งผลต่อการย่อยสลายสารพิษของจุลินทรีย์

2.3.4 ชนิดและความเข้มข้นของสารพิษ สารพิษที่มีโครงสร้างต่างกันจะมีผลต่อ จุลินทรีย์แตกต่างกันไป โดยจุลินทรีย์จะมีการปรับตัวเพื่อให้สามารถทนต่อสารหรือย่อยสลาย สารพิษนั้นได้ นอกจากนี้ความเข้มข้นของสารพิษก็เป็นอีกปัจจัย เนื่องจากจุลินทรีย์มีความสามารถในการรับรู้ความเป็นพิษที่ต่างกัน หากความเข้มข้นของสารพิษค่าเกินไปจะทำให้จุลินทรีย์ไม่ ปรับตัวและย่อยสลายสารพิษนั้น จากงานวิจัยหลายชิ้นที่ผ่านมา มีการศึกษาการย่อยสลายสารพิษโดย ใช้จุลินทรีย์ โดยคัดแยกจุลินทรีย์จากพืชนที่ปนเปื้อนสารพิษเป็นเวลานาน ๆ เพื่อให้ได้จุลินทรีย์ที่ ปรับตัวทนต่อสารพิษและสามารถย่อยสลายสารพิษนั้น ได้อย่างมีประสิทธิภาพ (Wang et al., 2007; LI et al., 2008; Lima et al., 2009; Malghani et al., 2009; Xie et al., 2009) เช่นงานวิจัยของ Malghani et al. (2009) ที่คัดแยกเชื้อจากดินที่มีประวัติการใช้สาร โพร์ฟิโนฟอสเป็นเวลา กว่า 6-7 ปี เพื่อใช้ในการทดลองย่อยสลายสารด้วยจุลินทรีย์ ซึ่งจากการผลการศึกษาการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ ที่ผ่านการคัดแยกเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ ที่ผสมสาร โพร์ฟิโนฟอส ซึ่งผลการศึกษาการเจริญเติบโต พบว่าเชื้อสามารถเจริญเติบโตได้อย่างรวดเร็วในระยะเวลา 30 ชั่วโมง โดยมีระยะที่เป็นช่วงการ ปรับตัวเพียง 10 ชั่วโมง ผลดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าเชื้อมีความสามารถสำหรับการย่อยสลายสาร โพร์ฟิโนฟอส

2.3.5 ชนิดและความจำเพาะของเอนไซม์ กระบวนการย่อยสลายสารพิษทางชีวภาพ จำเป็นต้องอาศัยเอนไซม์เพื่อให้การเกิดกระบวนการเมตабอลิซึม โดยเอนไซม์ส่วนใหญ่ต้องมีการ หนีบวนนำให้เกิดการสร้าง การสร้างเอนไซม์ของจุลินทรีย์จะถูกสร้างขึ้นเมื่อจุลินทรีย์ทำการย่อย สลายสารพิษที่ปนเปื้อน การทำงานของเอนไซม์ในการย่อยสลายสารพิษมีความสามารถในการ เร่งปฏิกิริยาการเปลี่ยนรูปของสาร โดยจะมีความจำเพาะต่อสารพิษชนิดนั้น ๆ เช่น เอนไซม์บิวเทน มองออกซิจีเนส(Butane monooxygenase) เป็นเอนไซม์จากแบคทีเรียที่เรียกว่าบิวเทน เป็นแหล่งพลังงาน โดยแบคทีเรียจะสร้างเอนไซม์เมื่อถูกหนีบวนด้วยบิวเทน (Butane) ซึ่ง เอนไซม์ดังกล่าวสามารถเร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายสารพวกอีเทน(Ethane) และ อีทิน (Ethen) (อภิสา วงศ์, 2553)

## 2.4 การฟื้นฟูพื้นที่ปนเปื้อนสารพิษด้วยวิธีการทางชีวภาพ (bioremediation)

การฟื้นฟูพื้นที่ปนเปื้อนสารพิษด้วยวิธีการทางชีวภาพ เป็นวิธีการที่ใช้กระบวนการย่อยสลายทางธรรมชาติของสิ่งมีชีวิต ได้แก่ จุลินทรีย์ พืช หรือวัสดุชีวภาพในการบำบัดสารพิษที่ปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อม เป็นวิธีที่เป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม ใช้งบประมาณในการดำเนินการน้อย ทำให้เป็นที่ยอมรับในกรณีที่จะประยุกต์ใช้ในพื้นที่จริง (อดิสา วงศ์, 2553) การฟื้นฟูพื้นที่ปนเปื้อนสารพิษด้วยวิธีการทางชีวภาพแบ่งออกได้เป็น 2 ประเภท ดังนี้

### 2.4.1 การบำบัดสารพิษด้วยวิธีทางชีวภาพแบบภายในบริเวณ (In-situ)

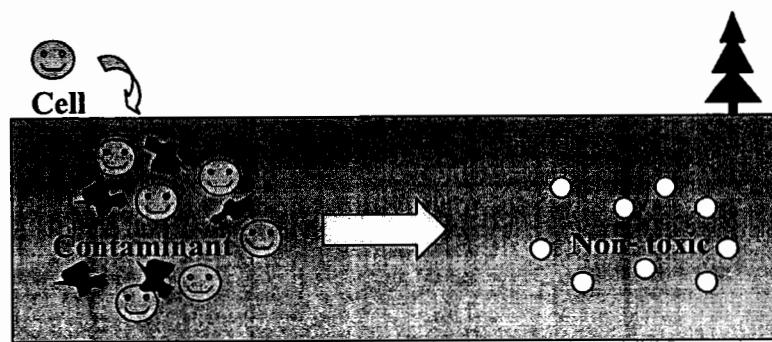
การบำบัดสารพิษแบบภายในบริเวณ เป็นการบำบัดสารพิษในสิ่งแวดล้อมบริเวณนั้นๆ โดยไม่มีการเคลื่อนย้ายสารตัวกลาง ได้แก่ ดิน น้ำ ที่ปนเปื้อนไปที่อื่น

### 2.4.2 การบำบัดสารพิษด้วยวิธีทางชีวภาพแบบภายนอกบริเวณ (Ex-situ)

การบำบัดสารพิษแบบภายนอกบริเวณ เป็นการบำบัดสารพิษที่ปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อม โดยในกระบวนการนี้ตัวกลางที่ปนเปื้อนจะถูกขนย้ายออกจากบริเวณที่มีการปนเปื้อนไปยังบริเวณที่เตรียมไว้สำหรับการบำบัดโดยเฉพาะ

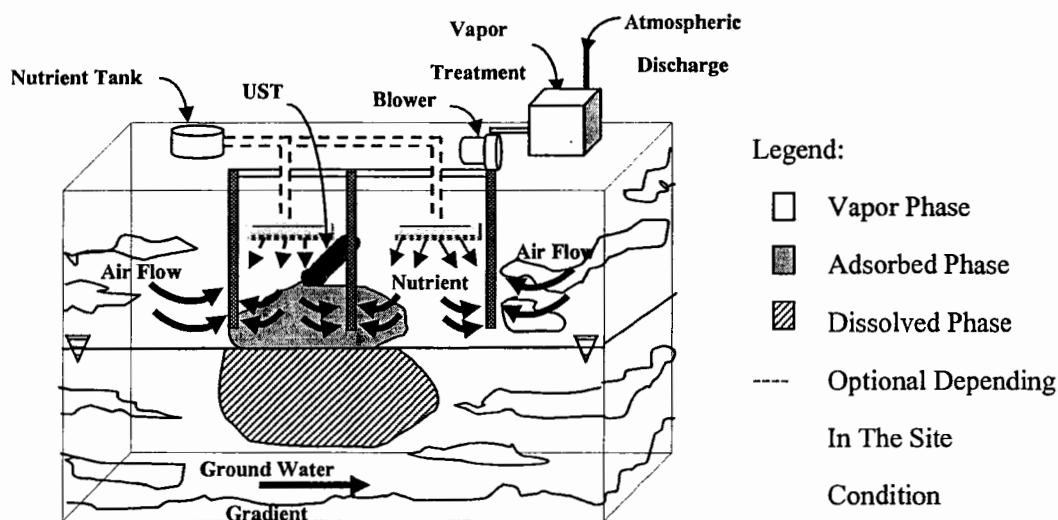
นอกจากนี้การฟื้นฟูพื้นที่ปนเปื้อนสารพิษด้วยวิธีการทางชีวภาพสามารถแบ่งออกได้ตามลักษณะของเทคโนโลยีที่ใช้ดังนี้

(1) การเติมเชลล์ (Bioaugmentation) เป็นเทคโนโลยีการฟื้นฟูที่มีการเติมจุลินทรีย์ลงไปในตัวกลางที่มีการปนเปื้อนสารเคมี เช่น ดิน น้ำ หรือดินตะกอน จุลินทรีย์ที่เติมลงไปอาจเป็นจุลินทรีย์สายพันธุ์ที่มีในพื้นที่ปนเปื้อนนั้น (indigenous) หรือเป็นจุลินทรีย์สายพันธุ์ที่คัดแยกได้จากที่ปนเปื้อนอื่น (exogenous) โดยเติมจุลินทรีย์ลงไปเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพของกระบวนการย่อยสลายสารพิษปนเปื้อนในพื้นที่นั้นซึ่งมีลักษณะดังภาพที่ 2.2 ตัวอย่างการใช้ระบบเติมเชลล์เพื่อย่อยสลายสารพิษโดยรุ่งภา ทองอรุณ (2548) ได้มีการทดลองใช้ระบบการเติมเชลล์เพื่อย่อยสลายสาร 4-คลอโรอะเนลิน ที่ปนเปื้อนในดิน โดยการทดสอบจะทดสอบในดินสองชนิดคือดินร่วน และดินร่วนปนทราย ที่ผสมสาร 4-คลอโรอะเนลิน 500 ส่วนในดินส่วน ผลการทดลองพบว่าการเติมเชลล์สามารถย่อยสลายสารได้ถึงร้อยละ 96 ในระยะเวลา 28 วัน สำหรับดินร่วน และย่อยสลายสารได้ร้อยละ 95 ในระยะเวลา 2 เดือน สำหรับดินร่วนปนทราย ซึ่งการย่อยสลายของสารตามธรรมชาติสามารถย่อยได้เพียงร้อยละ 67 เท่านั้น จากผลดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าการเติมเชลล์ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการย่อยสลายสารพิษ



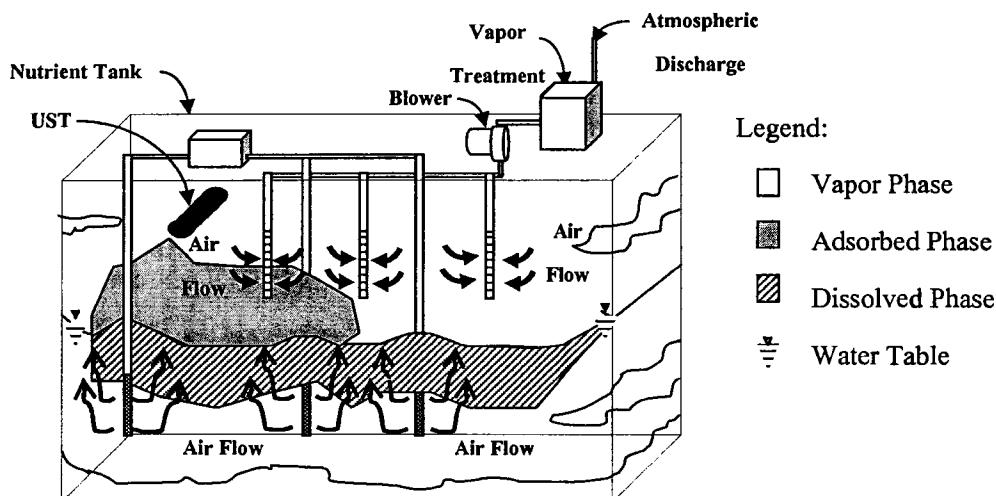
ภาพที่ 2.2 การทำงานของระบบการเติมเซลล์

(2) การระบบทางชีวภาพ (Bioventing) เป็นเทคโนโลยีที่คำนึงการในพื้นที่โดยการเติมอากาศ หรือสารอาหารลงไปในระบบโดยการเติมอากาศจะเป็นการเติมในอัตราที่ช้าเพื่อกระตุ้นการเจริญเติบโตและกระบวนการย่อยสลายของจุลินทรีย์ในพื้นที่ (indigenous microorganisms) และป้องกันการระเหย (volatilization) ของสารพิษปนเปื้อนที่ต้องการกำจัดออกสู่บรรยายกาศซึ่งมีลักษณะดังภาพที่ 2.3 ดัวอย่างเช่นในงานวิจัยของ Frutos et al. (2010) ได้มีการประยุกต์ใช้ระบบระบบทางชีวภาพเพื่อย่อยสลายสารฟีแนนโทลีน (Phenanthrene) ที่ปนเปื้อนในดิน โดยศึกษาการเพิ่มขึ้นของปริมาณคาร์บอนและการเปลี่ยนแปลงของสารพิษ จากผลการทดลองพบว่าเมื่อมีการเติมอากาศย่างดองเนื่องทำให้ปริมาณคาร์บอนในดินลดลง ทำให้ดินมีสภาพเหมาะสมสำหรับการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ส่งผลให้ความสามารถในการย่อยสลายสารฟีแนนโทลีนสูงถึงร้อยละ 93 ในระยะเวลา 7 เดือน จากผลดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าระบบการระบบทางชีวภาพมีประสิทธิภาพสำหรับการบำบัดหรือพื้นที่ปนเปื้อนสารพิษ



ภาพที่ 2.3 การทำงานของระบบระบบทางชีวภาพ (US EPA, 1994)

(3) การอัดอากาศทางชีวภาพ (Biosparging) เป็นการเติมอากาศเข้าสู่ระบบภายในดินให้สภาวะที่มีแรงดันเพื่อเพิ่มปริมาณออกซิเจนในชั้นน้ำใต้ดิน (saturated zone) ซึ่งจะส่งผลให้ตระการย่อยสลายทางชีวภาพเพิ่มขึ้นซึ่งมีลักษณะดังภาพที่ 2.4 การประยุกต์ใช้ระบบการอัดอากาศทางชีวภาพ ตัวอย่างงานวิจัยในอดีตของ Kao et al. (2008) ได้นำการศึกษาการย่อยสลายสารไฮโดรคาร์บอนจากกระบวนการปั๊มน้ำในน้ำใต้ดิน เช่น เบนซิน โอลูอิน เอทิลเบนซิน และไชลีนซึ่งเรียกว่าสารไฮโดรคาร์บอนบีเทกซ์ (BTEX) จากผลการศึกษาพบว่าจุลินทรีสามารถย่อยสลายสารไฮโดรคาร์บอนบีเทกซ์ได้ร้อยละ 70 ในระยะเวลา 10 เดือน จากผลดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าระบบอัดอากาศมีประสิทธิภาพในการพื้นฟูน้ำใต้ดินที่ปนเปื้อน

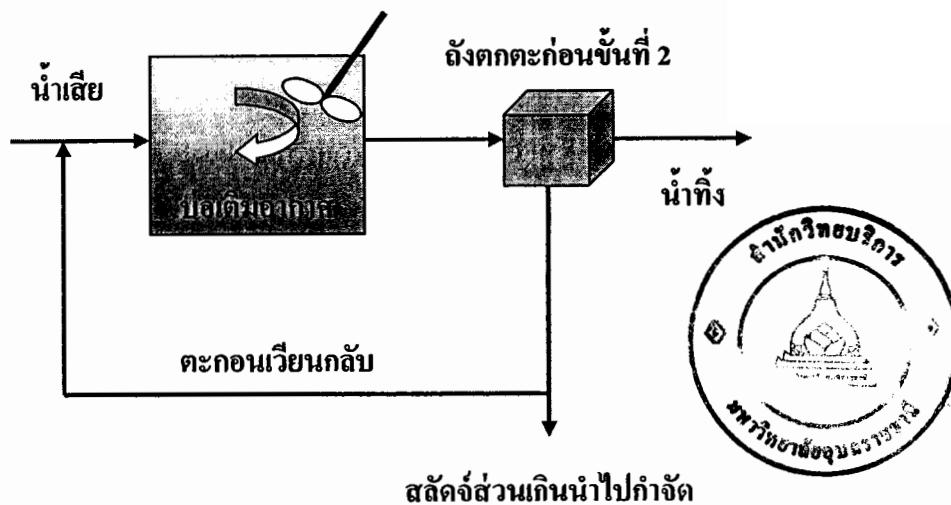


ภาพที่ 2.4 การทำงานของระบบการอัดอากาศทางชีวภาพ (US EPA, 1994)

(4) การซึมผ่าน (Percolation) เป็นเทคโนโลยีที่ใช้บำบัดสารปนเปื้อนที่เป็นของเหลวโดยการเติมสารอาหาร และอากาศในรูปของเหลวลงสู่บริเวณที่ปนเปื้อนสารพิษ สารอาหารและอากาศที่เติมลงไปจะช่วยกระตุ้นการเจริญเติบโตของจุลินทรีทำให้อัตราการย่อยสลายสารพิษเพิ่มขึ้น

(5) ถังปฏิกรณ์ชีวภาพ (Bioreactor) เป็นถังปฏิกรณ์ที่ใช้สำหรับบำบัดดิน น้ำ ดินตะกอน กากตะกอนจากการผลิตทางอุตสาหกรรมหรือจากระบบบำบัดต่าง ๆ ตัวกลางที่ปนเปื้อนจะถูกนำมาใส่ในถังปฏิกรณ์ ซึ่งอาจมีการเติมออกซิเจน สารอาหารต่าง ๆ จุลินทรีหรืออาจมีการปรับสภาวะต่าง ๆ เช่น อุณหภูมิ ความเป็นกรดเป็นด่าง ให้เหมาะสมเพื่อให้กระบวนการย่อยสลายในถังปฏิกรณ์เกิดขึ้นอย่างมีประสิทธิภาพ ตัวอย่างการใช้งานระบบถังปฏิกรณ์ชีวภาพ เช่น ระบบบำบัดน้ำเสียแบบแยกทิเวต์คสแล็คจ์แบบกวนผสานอย่างสมบูรณ์ (Completely mixed activated sludge) โดยลักษณะของระบบแยกทิเวต์คสแล็คจ์แบบนี้ จะมีถังเติมอากาศที่สามารถให้น้ำและสแล็คท์ท่ออยู่ใน

ถังผึ้งเป็นเนื้อเดียวกันตลอดทั่วทั้งถัง น้ำเสียจะกระหายไปทั่วถัง และสภาพแวดล้อมต่าง ๆ ในถัง เดิมอาการนี่ค่าสมำ่เสมอทำให้จุลินทรียังคงต่าง ๆ ที่มีอยู่มีลักษณะเดียวกันตลอดทั้งถังทำให้ สามารถนำบัดน้ำเสียได้อย่างนีประสิตพิภพ (สำนักงานจัดการคุณภาพน้ำ กรมควบคุมมลพิษ, 2554) ดังแสดงในภาพที่ 2.5

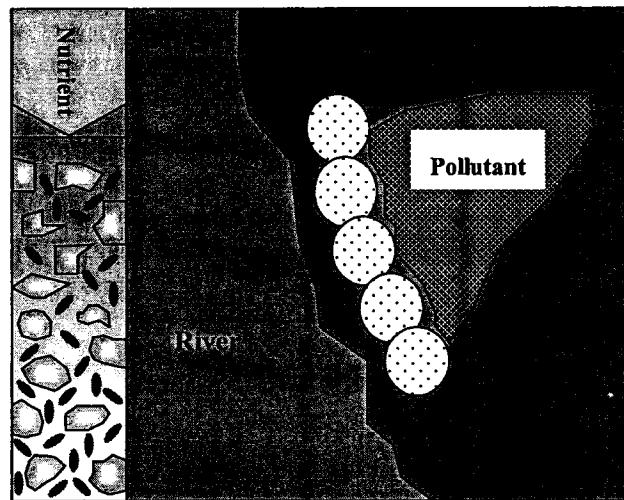


ภาพที่ 2.5 การทำงานของระบบถังปฏิกรณ์ชีวภาพ (สำนักงานจัดการคุณภาพน้ำ กรมควบคุมมลพิษ, 2554)

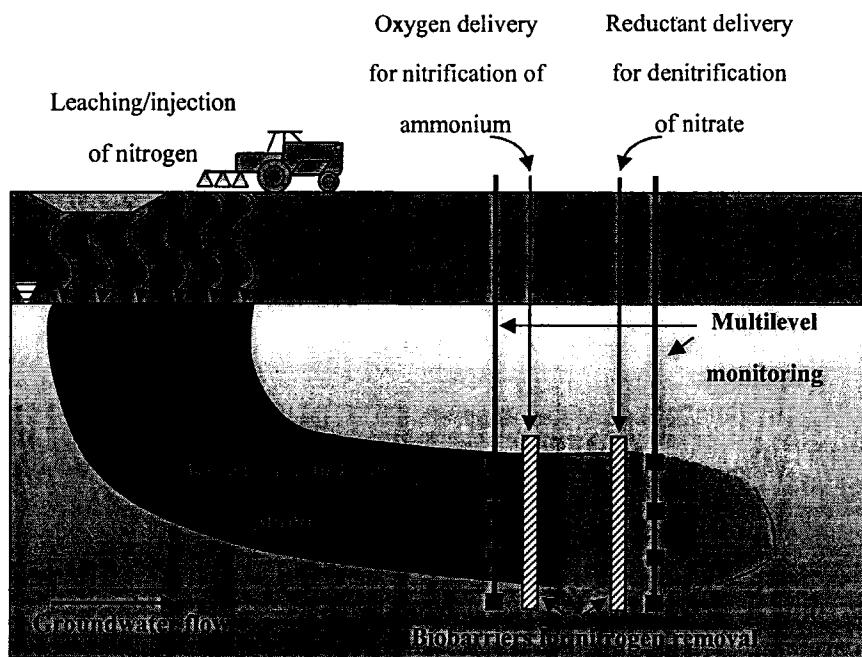
(6) พนังชีวภาพ (Biobarrier) เทคโนโลยีพนังชีวภาพเป็นเทคโนโลยีที่มีการพัฒนาจาก เทคนิคการนำบัดด้วยวิธีกรองชีวภาพ (Biofilter) (Lennox and Ashe, 2009) ซึ่งระบบประกอบด้วย ตัวกล่องที่มีรูพรุนอาจเป็นวัสดุประเภทอินทรีซึ่งอาจจะใช้เป็นแหล่งอาหารของจุลินทรี ได้แก่ คิน เปล็อกไนซ์ ภาคตะกอนน้ำเสีย อะบินทรี (Osman et al., 2008) เป็นต้น โดยการติดตั้งระบบพนัง ชีวภาพจะติดตั้งระบบวางทิศทางการเคลื่อนที่ของสารพิษ เมื่อสารพิษปนเปื้อนที่ต้องการนำบัด ผ่านเข้าสู่ตัวกล่องที่มีจุลินทรี จุลินทรีจะทำหน้าที่ในการย่อยสลายสารพิษที่ปนเปื้อนหรือเปลี่ยน รูปใหม่ความเป็นพิษลดลง

ปัจจัยที่มีผลต่อการทำงานของพนังชีวภาพ คือ อัตราส่วนระหว่างคาร์บอนกับไนโตรเจน (C/N Ratio) ที่เหมาะสมกับจุลินทรี (Hunter and shaner, 2009; Hunter and shaner, 2010) ขนาด ของรูพรุนที่เหมาะสมเพื่อให้มีความดันน้ำอยู่ ค่าความเป็นกรดค้าง (pH) ความหนาของตัวกล่อง อุณหภูมิ เป็นปัจจัยสำคัญมากในระบบควรรักษาอุณหภูมิและความชื้นของชั้นตัวกล่องซึ่งมีชั้นบาง ๆ (Biofilm) เคลือบบนผิwtัวกล่อง ใช้เป็นที่แลกเปลี่ยนอากาศ และอาหารให้แก่จุลินทรีเพื่อให้

ชุลินทรีสามารถจัดเริ่มเติบโต และย่อขยะสารพิษได้ (Seo et al., 2009; Hunter., 2009; Saponaro et al., 2009; Yeh et al., 2010) ภาพที่ 2.6 และ 2.7 แสดงถึงกลไกของระบบผนังชีวภาพและการประยุกต์ใช้



ภาพที่ 2.6 การทำงานของระบบผนังชีวภาพ (Lenoex, 2009)



ภาพที่ 2.7 ตัวอย่างการใช้ระบบผนังชีวภาพสำหรับบำบัดน้ำเสียคืนที่ปนเปื้อนในโตรเจน (Patterson B., 2011)

## บทที่ 3

### วิธีดำเนินการวิจัย

#### 3.1 ครอบการวิจัย

##### ขั้นเตรียมการ

การเตรียมเชื้อจุลินทรีย์ นำเชื้อจุลินทรีย์ที่ได้ผ่านการคัดแยก (กาญจนฯ พานแก้ว , 2552) มาทำการขยายเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเอ็มเอสเอ็มชนิดเหลว (Minimal Salt Medium , MSM) ที่มีสารโพรฟิโนฟอส เพาะเลี้ยงในตู้บ่มเบ่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ที่ความเร็ว 100 รอบต่อนาที เป็นเวลา 4 วัน

การศึกษาสมบัติของเชื้อจุลินทรีย์โดยทำการแยกเชื้อบริสุทธิ์ และ ศึกษาลักษณะของจุลินทรีย์เพื่อนำออกลักษณะเบื้องต้น ตลอดจนความสามารถในการย่อยสลายสาร โพรฟิโนฟอส โดยการคัดแยกเชื้อจุลินทรีย์บริสุทธิ์ใช้เทคนิคการเย็บเชื้อบนจาน (Streak plate technique) โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อเอ็มเอสเอ็ม (Minimal Salt Medium ; MSM) ผสมสารสกัดจากเยลล์ (Yeast Extract) ผงวุ้น (Agar) และ สาร โพรฟิโนฟอส 20 มิลลิกรัมต่อลิตร จนได้เชื้อที่บริสุทธิ์ ก่อนนำไปลักษณะโคลอโนนในจานเลี้ยงเชื้อเหมือนกันทั้งหมด

งานวิจัยทั้งหมดแบ่งออกเป็น 3 ขั้นตอน ดังนี้

##### 3.1.1 การศึกษาสารที่เป็นแหล่งคาร์บอนที่ทำให้เกิดการย่อยสลายดีที่สุด

การศึกษาในขั้นนี้จะ มีการเติมสารที่เป็นแหล่งคาร์บอนเข้าไป เพื่อให้จุลินทรีย์ใช้ในการเจริญเติบโต โดยสารที่ใช้เป็นแหล่งคาร์บอนคือ กรดซัคชิโนนิก (succinic acid,  $C_4H_6O_4Na_2 \cdot 6H_2O$ ) โซเดียมอะซิเตอท (sodium acetate,  $C_2H_3O_2Na$ ) กลูโคส (glucose,  $C_6H_{12}O_6$ ) ระบุชื่อชุคในการทดลองดังตารางที่ 3.1 ควบคุมปริมาณการบ่อนที่ 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร (Xie et al., 2008) โดยความเข้มข้นของสารกำจัดแมลงที่ 20 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อคัดเลือกสารที่เป็นแหล่งการบ่อนที่ทำให้เกิดการย่อยสลายสารกำจัดแมลง (โพรฟิโนฟอส) ที่ดีที่สุด

ตารางที่ 3.1 ชุดการทดลองชนิดของสารอาหารร่วม

ชุดการทดลอง	ชื่อชุดการทดลอง
MSM + Cell + Profenofos	CPF
MSM + Glucose + Cell + Profenofos	GCPF
MSM + Succinic Acid + Cell + Profenofos	SuCPF
MSM + Sodium Acetate + Cell + Profenofos	SoCPF

3.1.2 การศึกษาประสิทธิภาพในการย่อยสลายเมื่อยุ่งภายในตัวสภาวะที่มีสาร โพร์ฟีโนฟอส และแหล่งการ์บอน ในแต่ละความเข้มข้น

การศึกษาในขั้นนี้จะเป็นการศึกษาระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ของสารกำจัดแมลง และสารที่ใช้เป็นแหล่งการ์บอน ที่ทำให้เกิดการย่อยสลายสารกำจัดแมลงที่ดีที่สุด โดยความเข้มข้นของสาร โพร์ฟีโนฟอสที่ศึกษา คือ 40, 80 และ 120 มิลลิกรัมต่อลิตร และความเข้มข้นของสาร ที่ใช้เป็นแหล่งการ์บอนคือ 4, 40 และ 400 มิลลิกรัมต่อลิตร ทำการเปรียบเทียบกับชุดควบคุม ที่ไม่ได้มีการเติมสารแหล่งการ์บอน ระบุชื่อชุดการทดลองดังตารางที่ 3.2 และ 3.3 เพื่อหาความเข้มข้นที่เหมาะสมที่สุด เพื่อย่อยสลายสาร โพร์ฟีโนฟอส

ตารางที่ 3.2 ชุดการทดลองความเข้มข้นของสารอาหารร่วม

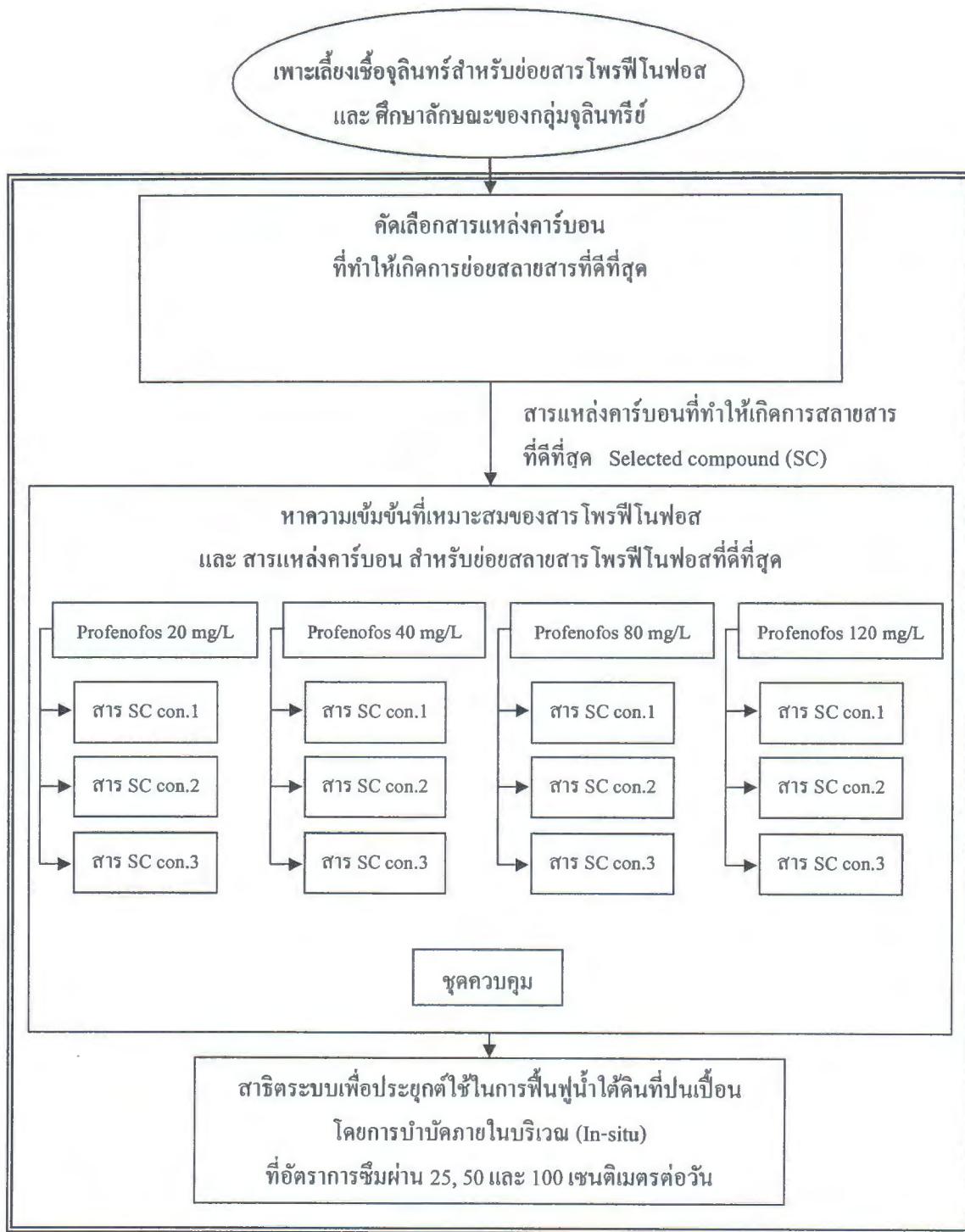
ชุดการทดลอง	ชื่อชุดการทดลอง
MSM + Cell + Profenofos	CPF
MSM + Con.Carbon 4 + Cell + Profenofos	XCPF 4
MSM + Con.Carbon 40 + Cell + Profenofos	XCPF 40
MSM + Con.Carbon 400 + Cell + Profenofos	XCPF 400

ตารางที่ 3.3 ชุดการทดลองความเข้มข้นของสาร โพร์ฟีโนฟอส

ชุดการทดลอง	ชื่อชุดการทดลอง
MSM + Cell + Profenofos	CPF
MSM + Carbon X + Cell + Profenofos 40	carbonCPF 40
MSM + Carbon X + Cell + Profenofos 80	carbonCPF 80
MSM + Carbon X + Cell + Profenofos 120	carbonCPF 120

### 3.1.3 การสาขิตระบบเพื่อประยุกต์ใช้ในการพื้นฟูน้ำใต้ดินที่ปนเปื้อนสารโพร์ฟิโนฟอส โดยกระบวนการบำบัดภายในบริเวณ (In-situ)

ในขั้นนี้จะเป็นการจำลองระบบน้ำใต้ดิน เพื่อกำจัดสารโพร์ฟิโนฟอสที่ปนเปื้อน โดยจำลองที่อัตราการไหลของน้ำใต้ดินต่างกัน โดยใช้ความเข้มข้นของสารโพร์ฟิโนฟอส และแหล่งการบ่อนจาก การศึกษาในขั้นตอนที่ผ่านมา จากขั้นตอนการทำงานทั้งหมดสามารถแสดงแนวทางการดำเนินงานวิจัยดังภาพที่ 3.1



### ภาพที่ 3.1 แผนภาพขั้นตอนการวิจัย

### 3.2 วิธีดำเนินการวิจัย

วิธีดำเนินการวิจัยกล่าวถึง สารเคมี อุปกรณ์ เครื่องมือและขั้นตอนดำเนินการวิจัย ซึ่งมีรายละเอียดการทำวิจัย ดังต่อไปนี้

#### 3.2.1 อุปกรณ์และสารเคมี

3.2.1.1 อาหารเลี้ยงเชื้อเอ็มเอสเอ็ม (Minimal Salt Medium, MSM)

3.2.1.2 สารโพร์ฟโนฟอส (เกรดการค้า)

3.2.1.3 ตู้บ่มเพาะเชื้อแบบเบข่า

3.2.1.4 ตู้บ่มเพาะเชื้อควบคุมอุณหภูมิ (Incubator)

3.2.1.5 หม้อน้ำฆ่าเชื้อควยแรงดันไอน้ำ

3.2.1.6 เครื่องวิเคราะห์แก๊สโกรมาโทกราฟ

3.2.1.7 เครื่องปั่นไฟฟ้า

3.2.1.8 แท่งแก้วรูปตัวแอล (Spreader)

3.2.1.9 ขวดรูปชنمพู่

3.2.1.10 ขวดปรับปริมาตร

3.2.1.11 ปีเปต

3.2.1.12 กระบวนการตัว

3.2.1.13 ตะเกียงแอลกอฮอล์

3.2.1.14 ปีกเกอร์

3.2.1.15 หลอดทดลอง

3.2.1.16 หลอดฝ่าเกลียว

3.2.1.17 ชุดดูดซับของแข็ง (DSPE)

3.2.1.18 ตัวกรองขนาด 0.2 ไมครอน

3.2.1.19 เอ็มฉีดยา

3.2.2 การเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์สำหรับย่อยสลายสาร โพร์ฟโนฟอส และ การศึกษาสมบัติของกลุ่มจุลินทรีย์

รายละเอียดขั้นตอนการเพาะเลี้ยง และการศึกษาสมบัติกลุ่มจุลินทรีย์มีวิธีการดังต่อไปนี้

3.2.2.1 การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1) การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ เอ็มเอสเอ็ม (Minimal salt medium, MSM)

สูตรอาหารประกอบด้วย  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  5.8 กรัม  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  3.0 กรัม  $\text{NaCl}$  0.5 กรัม และ  $\text{MgSO}_4$  0.25 กรัม

2) ละลายสารข้างตันในสารละลายน้ำฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (phosphate buffer) ความเข้มข้น 10 มิลลิโนลาร์ นำไปป้อนผ่านเชือด้ายหนอนนิ่งความดัน ໄໂອ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 30 นาที ทิ้งไว้ให้เย็น

3) เติมสาร โพร์ฟีโนฟอสที่ผ่านการกรองด้วยกระดาษกรองขนาด 0.2 ไมโครเมตร (สำหรับอาหารเดี่ยงเชื้อ อีเมอสอีเมนแข็ง ใช้สูตรเดียวกันกับแบบเหลว แต่มีการเติม พงรุ้น (Agar) ร้อยละ 1.5 และสารสกัดจากยีสต์ (Yeast extract) ร้อยละ 0.05

### 3.2.2.2 การศึกษาสมบัติของกลุ่มจุลินทรีย์

การศึกษาสมบัติของกลุ่มจุลินทรีย์ประกอบด้วย 3 ขั้นตอน ดังนี้

#### 1) การคัดแยกเชื้อจุลินทรีย์บริสุทธิ์

การคัดแยกเชื้อจุลินทรีย์บริสุทธิ์ใช้เทคนิคการเจี้ยงเชื้อบนจาน (Streak plate technique) โดยใช้อาหารเดี่ยงเชื้ออีเมอสอีเมน (Minimal salt medium; MSM) ผสมสารสกัดจากยีสต์ (Yeast Extract) พงรุ้น (Agar) และสาร โพร์ฟีโนฟอส 20 มิลลิกรัมต่อลิตร (รายละเอียดวิธีการเจี้ยงเชื้อแสดงในภาคผนวก ค) ซึ่งการคัดแยกเริ่มต้นจากการเจี้ยงกลุ่มจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายสาร โพร์ฟีโนฟอสที่ขบจำกัดในงานวิจัยที่ผ่านมา (กาญจนา พานแก้ว, 2553) จากนั้นจึงคัดแยกโดยใช้อุปกรณ์ต่างกันลงในอาหารเดี่ยงเชื้อจานใหม่ด้วยวิธีการเดียวกันอย่างต่อเนื่อง จนกระทั่งได้เชื้อจุลินทรีย์บริสุทธิ์ ก่อรากคือ ลักษณะโคลoni ในงานเดี่ยงเชื้อเหมือนกันทั้งหมด (การถ่ายเชื้อระหว่างอาหารแข็งรวมทั้งถึง 3 ครั้ง) จากนั้นจึงศึกษาลักษณะเบื้องต้นและความสามารถของเชื้อจุลินทรีย์บริสุทธิ์

#### 2) การศึกษาลักษณะเบื้องต้น

การศึกษาลักษณะเบื้องต้นของเชื้อจุลินทรีย์บริสุทธิ์ ประกอบด้วย การสังเกตลักษณะโคลoni บนจานเดี่ยงเชื้อ การศึกษาลักษณะของเซลล์และการติดสีแกรมโดยใช้กล้องจุลทรรศน์แบบแสง (Optical microscope) โดยวิธีการทดลองเป็นไปตามหลักการศึกษาทางชีววิทยาทั่วไป (รายละเอียดการเตรียมแสดงในภาคผนวก ข และ จ)

#### 3) การศึกษาความสามารถในการย่อยสลายสาร โพร์ฟีโนฟอส

การศึกษาความสามารถในการย่อยสลายสาร โพร์ฟีโนฟอสโดยเชื้อจุลินทรีย์บริสุทธิ์ มีวัตถุประสงค์เพื่อระบุจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายสาร โพร์ฟีโนฟอสในกลุ่มจุลินทรีย์ การทดลองเริ่มต้นโดยการเติมจุลินทรีย์ที่ผ่านการคัดแยก 1 ห่วง ลงในอาหารอีเมอสอีเมน ชนิดเหลวที่มีสาร โพร์ฟีโนฟอส 20 มิลลิกรัมต่อลิตร จากนั้นเพาะเจี้ยงในสภาพที่มีการควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส และเบี่ยงที่ความเร็ว 100 รอบต่อนาที เป็นเวลา 4 วัน ภายหลังการทดลองเสร็จสิ้นนำตัวอย่างอาหารเดี่ยงเชื้อไปวิเคราะห์หาสาร โพร์ฟีโนฟอสคงเหลือ วิเคราะห์โดยใช้

เครื่องวิเคราะห์แก๊สโกรนาโทกราฟ (Gas chromatography; GC) เปรียบเทียบกับความเข้มข้นของสารโพร์ฟิโนฟอส ณ เวลาเริ่มต้นตัน (รายละเอียดการวิเคราะห์แสดงในภาคผนวก ฉ)

### 3.2.3 การศึกษาสารที่เป็นแหล่งคาร์บอนที่ทำให้เกิดการย่อยสลายสารดีที่สุด

รายละเอียดขั้นตอนการศึกษาสารที่เป็นแหล่งคาร์บอนที่ทำให้เกิดการย่อยสลาย ดีที่สุด มีวิธีการดังนี้

3.2.3.1 เติมเชื้อจุลินทรีย์อัตราส่วนร้อยละ 5 โดยปริมาตร ลงในอาหารเดี่ยง เชื้อเอ็มเอสเอ็มเหลว ที่ผสมสารแหล่งคาร์บอนร่วมคือ โซเดียมซัคซิเนต ที่ความเข้มข้นของคาร์บอน 500 มิลลิกรัมต่อลิตรเพาะเลี้ยงในถูบ่มเบ่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 100 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 วัน จากนั้น เติมสารโพร์ฟิโนฟอส 20 มิลลิกรัมต่อลิตร เพาะเลี้ยงในถูบ่มเบ่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 100 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 วัน เก็บตัวอย่างชั่วโมงที่ 3, 6, 9, 12, 15, 21, 27, 36 และ 48

3.2.3.2 เติมเชื้อจุลินทรีย์อัตราส่วนร้อยละ 5 โดยปริมาตร ลงในอาหารเดี่ยง เชื้อเอ็มเอสเอ็มเหลว ที่ผสมสารโพร์ฟิโนฟอส 20 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยใช้สารแหล่งคาร์บอนร่วมคือ โซเดียมซัคซิเนต ที่ความเข้มข้นของคาร์บอน 500 มิลลิกรัมต่อลิตร (เติมสารแหล่งคาร์บอนและสารโพร์ฟิโนฟอฟอร์อมกัน) เพาะเลี้ยงในถูบ่มเบ่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 100 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 วัน เก็บตัวอย่างชั่วโมงที่ 3, 6, 9, 12, 15, 21, 27, 36 และ 48

3.2.3.3 ทำการทดลองเหมือนข้อที่ 3.1.3.1 และ 3.1.3.2 แต่เปลี่ยนสารแหล่งคาร์บอนร่วม เป็น โซเดียมอะซิเตอท และ กูลูโคส (ทดลองช้า 2 ชั่วโมง) ทดสอบ

3.2.3.4 นำตัวอย่างที่ได้มาทำการวิเคราะห์หาจำนวนเซลล์ ความเข้มข้นของสารที่เป็นแหล่งคาร์บอน และสารโพร์ฟิโนฟอฟอร์อมกัน (รายละเอียดการวิเคราะห์สารแสดงในภาคผนวก ฉ)

3.2.4 การศึกษาประสิทธิภาพในการย่อยสลาย เมื่อยุ่งภายในตัว ที่มีสารโพร์ฟิโนฟอส และแหล่งคาร์บอน ในแต่ละความเข้มข้น

รายละเอียดขั้นตอนการศึกษาประสิทธิภาพในการย่อยสลายเมื่อยุ่งในตัว ตามอัลซึมร์ ระหว่างสารโพร์ฟิโนฟอส และแหล่งคาร์บอนในแต่ละความเข้มข้น มีวิธีการดังต่อไปนี้

3.2.4.1 เติมเชื้อจุลินทรีย์อัตราส่วนร้อยละ 5 โดยปริมาตร ลงในอาหารเอ็มเอสเอ็มเหลว ที่มีส่วนผสมของสารโพร์ฟิโนฟอฟอร์อมกัน 40, 80 และ 120 มิลลิกรัมต่อลิตร และใช้สารแหล่งคาร์บอนที่มีความเข้มข้นของคาร์บอน 4, 40 และ 400 มิลลิกรัมต่อลิตร นำไป

เพาะเลี้ยงในถุงปุ๋มเบเย่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 100 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 วัน เก็บตัวอย่างชั่วโมงที่ 3, 6, 9, 12, 15, 21, 27, 36 และ 48 ( ทดลองซ้ำ 2 ซ้ำทุกชุดการทดลอง )

3.2.4.2 นำตัวอย่างที่ได้มาทำการวิเคราะห์หาจำนวนเซลล์ ความเข้มข้นของสารที่เป็นแหล่งการรับอน และสาร โพร์ฟิโนฟอสคงเหลือ

3.2.5 การสาดทิ่อมนบเพื่อประยุกต์ใช้ในการพื้นฟูน้ำใต้ดินที่ปั่นเปื้อน สาร โพร์ฟิโนฟอส โดยกระบวนการบำบัดภายในบริเวณ (In-situ) ด้วยแบบจำลองคอลัมน์

ในขั้นนี้จะเป็นการออกแบบจำลองการไหลของน้ำใต้ดิน สำหรับการกำจัดสาร โพร์ฟิโนฟอสในสภาพที่อัตราการซึมผ่านของน้ำต่างกัน คือ 25, 50 และ 100 เซนติเมตรต่อวัน (Siripattanakul et al., 2008) ใช้ความเข้มข้นของสาร โพร์ฟิโนฟอสและ แหล่งการรับอนจากการศึกษา ในขั้นตอนที่ผ่านมานามาเปรียบเทียบที่อัตราการไหลต่าง ๆ เพื่อศึกษาประสิทธิภาพในการกำจัดสาร โพร์ฟิโนฟอส รายละเอียดแบบจำลองคอลัมน์ดังนี้

### 3.2.5.1 การเตรียมทรัพย์

การเตรียมทรัพย์จะใช้ทรัพย์ที่มีขนาด 0.25 ถึง 0.45 มิลลิเมตร นำไปอบผ่า เชือด้วยหม้อน้ำร้อน ใจน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ในการอบผ่าเชือดทำซ้ำ 3 ครั้ง ติดต่อกันเป็นเวลา 3 วัน (Siripattanakul et al., 2008)

### 3.2.5.2 แบบจำลองคอลัมน์

คอลัมน์แก้วขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 3.2 เซนติเมตร ยาว 40 เซนติเมตร ทำจากแก้ว ภายในคอลัมน์บรรจุทรายสูง 30 เซนติเมตร (ปริมาตรซึ่งว่างภายในคอลัมน์ 100 มิลลิลิตร) ผสมเชือจุลินทรีย์ร้อยละ 5 โคลบปริมาตร ใช้ปั๊มโซลินอยด์สูบตัวบ่งที่ปั่นเปื้อนเข้าสู่ คอลัมน์ดังภาพที่ 3.2 และ 3.3 ควบคุมอัตราการซึมผ่านของน้ำที่ 25, 50 และ 100 เซนติเมตรต่อวัน (อัตราการไหล 0.55, 1.1 และ 2.2 มิลลิลิตรต่อนาที )

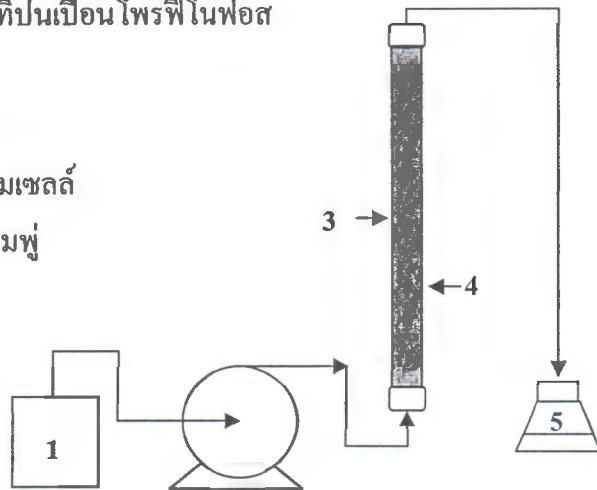
1 = ถังใส่น้ำที่ปั๊บเปื้อน โพร์ฟิโนฟอส

2 = ปั๊ม

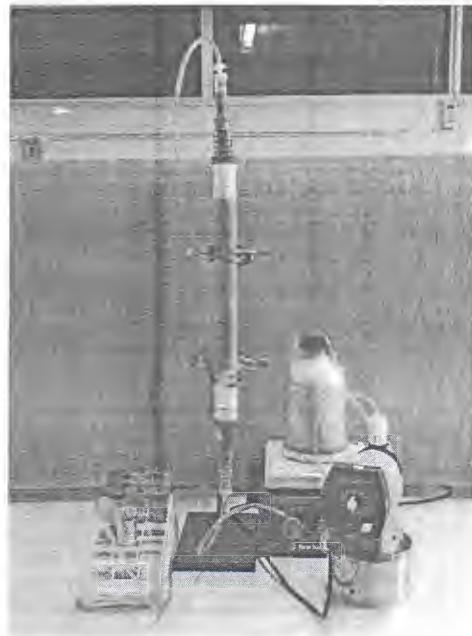
3 = คอลัมน์

4 = ทรายพสมเซลล์

5 = ขวดรูปชنمพู่



ภาพที่ 3.2 แบบจำลองคอลัมน์



ภาพที่ 3.3 ชุดทดลองคอลัมน์

### 3.2.5.3 การทดสอบการให้หล่องน้ำและสาร โพร์ฟิโนฟอส

การทดสอบการให้หล่องน้ำและสาร โพร์ฟิโนฟอส มีขั้นตอนดังนี้

1) การทดสอบการให้หล่องน้ำกระทำโดยการนำสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ 0.01 โมล ใส่ลงในถังจากนั้นปั๊มสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ 0.01 โมล เข้าสู่คอลัมน์ให้ไหลผ่านคอลัมน์จนเต็ม

2) เพิ่มความเข้มข้นของแคลเซียมคลอไรด์ในถังเป็น 0.05 โมล เก็บตัวอย่างน้ำที่ไหลผ่านคอลัมน์ตั้งแต่เริ่มเพิ่มความเข้มข้นสารละลายในถังหมด

3) นำตัวอย่างน้ำที่ไหลผ่านคอลัมน์ไปวัดค่าการนำไฟฟ้า เพื่อหาเวลาที่น้ำใช้ในการเคลื่อนที่ผ่านคอลัมน์

4) การทดสอบการให้หล่องโพร์ฟิโนฟอสจะกระทำเช่นกัน แต่เปลี่ยนจากสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ เป็นสาร โพร์ฟิโนฟอส เก็บน้ำตัวอย่างน้ำที่ไหลผ่านคอลัมน์วิเคราะห์ปริมาณของสาร โพร์ฟิโนฟอส เพื่อหาเวลาที่สารใช้ในการเคลื่อนที่ผ่านคอลัมน์

## บทที่ 4

### ผลการวิจัย และอภิปรายผล

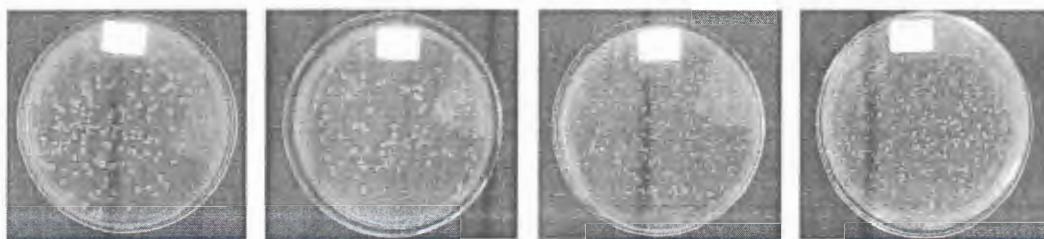
#### 4.1 ผลการศึกษาการเติบโตกลุ่มจุลินทรีย์ที่ใช้ในการย่อยสลายสารโพร์ฟิโนฟอส

##### 4.1.1 ผลการคัดแยกจุลินทรีย์บริสุทธิ์และการศึกษาลักษณะของจุลินทรีย์

การคัดแยกจุลินทรีย์บริสุทธิ์และการศึกษาลักษณะเบื้องต้นของจุลินทรีย์ ภายหลัง การคัดแยกได้โคลนีที่มีลักษณะและขนาดต่างกัน 4 ลักษณะ ดังภาพที่ 4.1 คือ โคลนีขนาดใหญ่ กถาง เสือก และเล็กมาก (ระบุชื่อ คือ PF1, PF2, PF3 และ PF4) โดยลักษณะโคลนีของ PF1, PF3 และ PF4 มีผิวน้ำมันและขอบเรียบ ส่วนโคลนีของ PF2 มีผิวน้ำมันและขอบหยัก

เมื่อนำจุลินทรีย์บริสุทธิ์ทั้ง 4 มาศึกษาลักษณะคัวบกด้วยกลูตรรสน์พบว่าลักษณะ ของเซลล์ คือ แท่งสั้น (short rod) ดังภาพที่ 4.2 ผลการคัดแยกจุลินทรีย์บริสุทธิ์ และการศึกษา ลักษณะเบื้องต้นของจุลินทรีย์ สรุปได้ดังตารางที่ 4.1

จุลินทรีย์บริสุทธิ์วิเคราะห์ 16S rDNA เพื่อระบุชนิดและสายพันธุ์พบว่าเป็น จุลินทรีย์ในวงศ์ *Pseudomonas* โดยจุลินทรีย์ PF1 จัดอยู่ในสายพันธุ์ *Pseudomonas plecoglossicida* PF 2 และ PF3 จัดอยู่ในสายพันธุ์ *Pseudomonas aeruginosa* ส่วน PF4 ยังไม่สามารถระบุชนิดและ สายพันธุ์ได้ จากผลการวิเคราะห์ 16S rDNA พบว่าเป็นจุลินทรีย์ *Pseudomonas* คล้ายกับงานวิจัยของ Malghani et al. (2009) ที่ได้มีการคัดแยกจุลินทรีย์จากคินที่มีการปนเปื้อนสาร โพร์ฟิโนฟอส โดยผล ของ Malghani et al. (2009) คัดแยกได้จุลินทรีย์สายพันธุ์ *Pseudomonas aeruginosa* เช่นเดียวกับ PF2 และ PF3 ผลการวิเคราะห์ 16S rDNA สรุปได้ดังตารางที่ 4.2



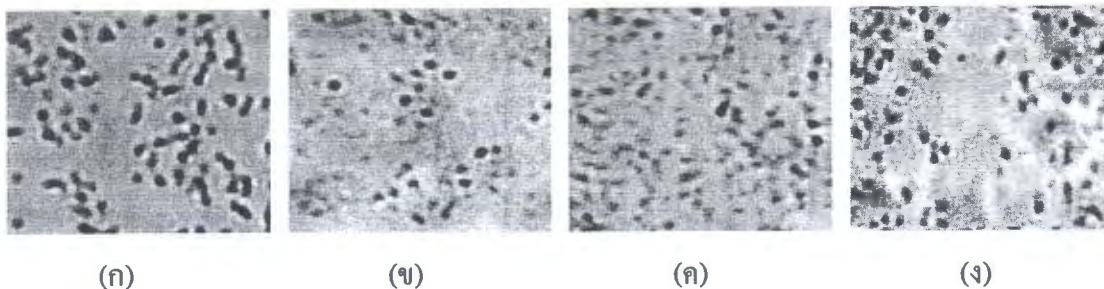
(ก)

(ข)

(ค)

(ง)

ภาพที่ 4.1 ลักษณะโคลนีของจุลินทรีย์บริสุทธิ์ ก) ลักษณะโคลนีของ PF1 ข) ลักษณะโคลนี ของ PF2 ค) ลักษณะโคลนีของ PF3 ง) ลักษณะโคลนีของ PF4



ภาพที่ 4.2 ลักษณะรูปร่างเซลล์และการติดสีแกรมของจุลินทรีย์บริสุทธิ์ (ก) ลักษณะเซลล์ของ PF1  
(บ) ลักษณะเซลล์ของ PF2 (ค) ลักษณะเซลล์ของ PF3 (ง) ลักษณะเซลล์ของ PF4

ตารางที่ 4.1 สรุปลักษณะของจุลินทรีย์บริสุทธิ์ที่ผ่านการคัดแยก

ชื่อ	ลักษณะทางกายภาพของโคลoni		ลักษณะเซลล์จุลินทรีย์	
	ขนาด	ลักษณะ	รูปร่าง	การติดสีแกรม
PF1	ใหญ่	ผิวน้ำมัน ขอบเรียบ	แท่งสั้น	แกรมลบ
PF2	กลาง	ผิวน้ำมัน ขอบหยัก	แท่งสั้น	แกรมลบ
PF3	เล็ก	ผิวน้ำมัน ขอบเรียบ	แท่งสั้น	แกรมลบ
PF4	เล็กมาก	ผิวน้ำมัน ขอบเรียบ	แท่งสั้น	แกรมลบ

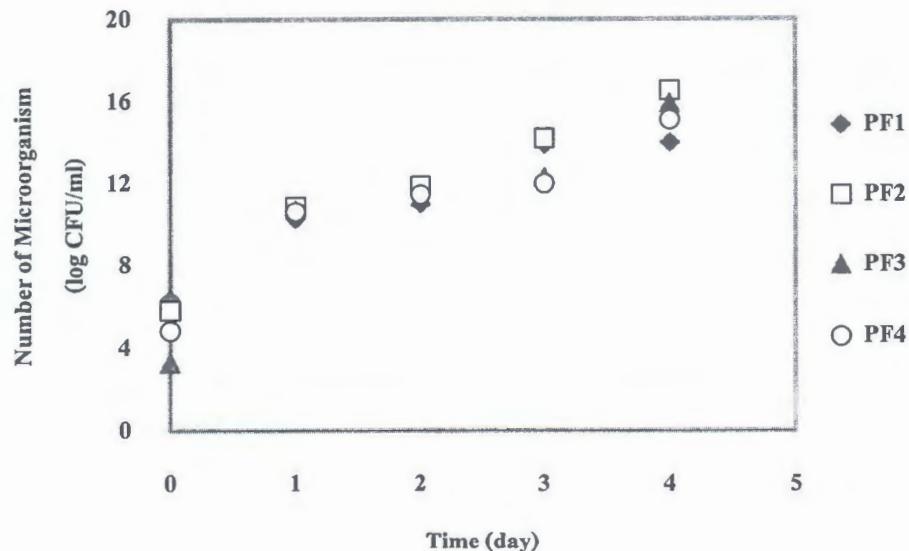
ตารางที่ 4.2 สรุปผลการวิเคราะห์ 16S rDNA ของจุลินทรีย์บริสุทธิ์ที่ผ่านการคัดแยก

ชื่อ	วงศ์	สายพันธุ์
PF1	<i>Pseudomonas</i>	<i>Plecoglossicida</i>
PF2	<i>Pseudomonas</i>	<i>Aeruginosa</i>
PF3	<i>Pseudomonas</i>	<i>Aeruginosa</i>
PF4	ยังไม่ระบุ	ยังไม่ระบุ

#### 4.1.2 ผลการศึกษาการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์บริสุทธิ์

ผลการทดลองการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์บริสุทธิ์ พบว่ากราฟการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์มีลักษณะดังภาพที่ 4.3 (ข้อมูลคิดจำเพาะในภาคผนวก ช) คือ ในกระบวนการทดลอง 4 วัน จุลินทรีย์มีการเจริญเติบโตเพิ่มจำนวนเพิ่มขึ้นมาก เป็นไปตามผลการวิจัยที่ได้มีการศึกษาการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสารกลุ่มօอแกโนฟอสฟอรัสและมีการเพิ่มจำนวนเซลล์

จุลินทรีย์มากขึ้น (กาญจนा พานแก้ว, 2553; Malghani et al., 2009) เนื่องจากในการศึกษานี้ใช้อาหารເອີ້ນເອສເອີ້ນທີ່ໄມ້ສ່ວນປະກອບຂອງສາຣອິນທຽບກຳນົດອັນແພບວ່າຈຸລິນທຽບບໍລິສູທີ່ທີ່ສໍາເລັດໃຊ້ເຈົ້າຢູ່ເຕີບໂຕນຳກຳ ທີ່ຈຶ່ງຈາກພົດດັກລ່າວແສດງໃຫ້ເຫັນວ່າຈຸລິນທຽບທີ່ຄັດແຍກໄດ້ມີຄວາມສາມາດໃນການໃຊ້ສາຣ ໂພຣີໂນພົດເປັນແຫດ່ງກຳນົດອັນທັກເດືອນ (sole carbon source) ໃນການເຈົ້າຢູ່ເຕີບໂຕ ໂດຍກ່າວັນຕົ້ນກ່າວັນຕົ້ນ (ການເຈົ້າຢູ່ເຕີບໂຕເປັນປຸກົກົງຢາຍອັນດັບໜິ່ງ) ສຽງໄປໄດ້ດັ່ງຕາງໆທີ່ 4.3 ນອກຈາກນີ້ຈາກພົດການສຶກຍາຍັງປັ້ງໝື້ໄດ້ວ່າຈຸລິນທຽບຕ່າງໝັ້ນມີອັດການເຈົ້າຢູ່ເຕີບໂຕແຕກຕ່າງກັນດ້ວຍ ໂດຍ PF3 ມີອັດການເຈົ້າຢູ່ເຕີບໂຕສູງສຸດ



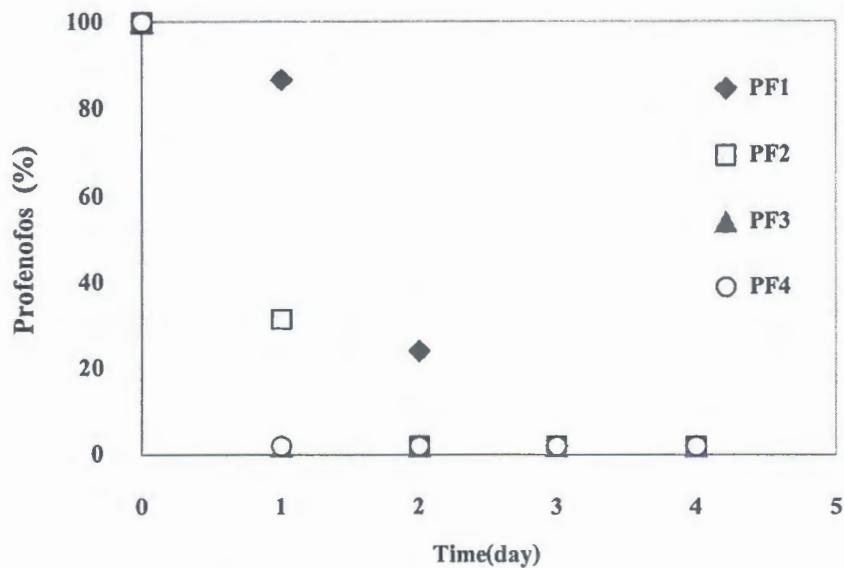
ກາພທີ່ 4.3 ການເຈົ້າຢູ່ເຕີບໂຕຂອງຈຸລິນທຽບບໍລິສູທີ່

ຕາຮາງທີ່ 4.3 ອັດການເຈົ້າຢູ່ເຕີບໂຕຈຳເພາະຂອງຈຸລິນທຽບບໍລິສູທີ່

ຂໍ້ອ	ອັດການເຈົ້າຢູ່ເຕີບໂຕຈຳເພາະ (ຕ່ອວັນ)
PF1	4.43
PF2	6.19
PF3	7.26
PF4	5.93

#### 4.1.3 ผลการศึกษาความสามารถในการย่อยสลายสารโพร์ฟีโนฟอส

ผลการทดลองความสามารถในการย่อยสลายสารโพร์ฟีโนฟอสของจุลินทรี บริสุทธิ์ พบว่าความเข้มข้นของสารโพร์ฟีโนฟอสลดลงในช่วงเวลาสองวันแรกเมื่อถูกย่อยโดย จุลินทรี PF2, PF3 และ PF4 ส่วนการย่อยสลายสารของจุลินทรี PF1 พบว่าความเข้มข้นของสารโพร์ฟีโนฟอสลดลงในช่วงเวลา 0 ถึง 3 วัน ดังภาพที่ 4.4 (ข้อมูลคิดแสตนด์ในภาคผนวก ช) ซึ่งผลการย่อยสลายสอดคล้องกับผลการเจริญเติบโต ซึ่ง PF2, PF3 และ PF4 มีค่าอัตราการเจริญเติบโตสูงกว่า PF1 ทำให้มีความต้องการสารอาหารมาก ดังนั้นความเข้มข้นของสารโพร์ฟีโนฟอสซึ่งเป็นแหล่งคาร์บอนจึงลดลงอย่างรวดเร็วในช่วง 0 ถึง 2 วัน นอกจากนี้สอดคล้องกับงานวิจัยของ Malghani et al. (2009) ที่ศึกษาการย่อยสลายสารโพร์ฟีโนฟอสโดยใช้เชื้อจุลินทรี *Pseudomonas aeruginosa* เช่นเดียวกัน (stain OW) จากผลการศึกษาพบว่าจุลินทรีสายพันธุ์ดังกล่าวสามารถย่อยสลายสารโพร์ฟีโนฟอสได้กว่าร้อยละ 90 ภายในระยะเวลา 48 ชั่วโมง โดยค่าอัตราการย่อยสลายสารโพร์ฟีโนฟอส จำเพาะของ PF1, PF2, PF3 และ PF4 เท่ากับ  $1.25 \times 10^{-13}$ ,  $1.35 \times 10^{-11}$ ,  $1.79 \times 10^{-10}$  และ  $2.38 \times 10^{-10}$  ในโครกรัมต่อชั่วโมงต่อวัน ตามลำดับ (การย่อยสลายเป็นปฏิกิริยาอันดับสูนย์) ดังตารางที่ 4.4 นอกจากนี้เมื่อเปรียบเทียบกับงานวิจัยในอดีตซึ่งศึกษาการย่อยสลายสารโพร์ฟีโนฟอสคั่วยกลุ่ม จุลินทรี (ซึ่งเป็นกลุ่มที่เชื้อจุลินทรีถูกคัดแยกออกมา) การย่อยสลายเป็นปฏิกิริยาอันดับสอง (กาญจน พานแก้ว, 2553) โดยอัตราการย่อยสลายและประสิทธิภาพการย่อยสลายสารโพร์ฟีโนฟอสเท่ากับ 0.081 ต่อมิลลิกรัมต่อเดือนต่อวัน และประสิทธิภาพการย่อยสลายสารเท่ากับร้อยละ 60 จากผลดังกล่าวซึ่งให้เห็นว่าเชื้อจุลินทรีบริสุทธิ์มีศักยภาพสูงกว่ากลุ่มจุลินทรี เนื่องจากเชื้อดังกล่าวได้รับการคัดสายพันธุ์ที่มีความสามารถในการย่อยสลายสารโดยเฉพาะ แต่ยังไงก็ตามในทางปฏิบัติการประยุกต์ใช้จริงในสิ่งแวดล้อมเชื้อจุลินทรีบริสุทธิ์อาจมีปรับตัวได้ไม่เท่ากับกลุ่มจุลินทรี เนื่องจากกลุ่มจุลินทรีสามารถปรับตัวและทนทานต่อสภาวะแวดล้อม ตลอดจนการแย่งช�ันกับจุลินทรีอื่น ๆ ในธรรมชาติได้กว่าจุลินทรีบริสุทธิ์ (Siripattanakul et al., 2009) ดังนั้นในงานวิจัยนี้ในหัวข้อต่อไปจึงเน้นการศึกษาเพื่อประยุกต์ใช้กับกลุ่มจุลินทรีเป็นหลัก



ภาพที่ 4.4 การย่อยสลายสาร โพรฟีโนฟอสโดยจุลินทรีย์บริสุทธิ์

ตารางที่ 4.4 อัตราการย่อยสลายสาร โพรฟีโนฟอสจำเพาะของจุลินทรีย์บริสุทธิ์

ชื่อ	อัตราการย่อยสลายสาร โพรฟีโนฟอสจำเพาะ (ไมโครกรัมต่อชีวภาพต่อวัน)	ร้อยละการย่อยสลาย สาร โพรฟีโนฟอส
PF1	$1.25 \times 10^{-13}$	95.0
PF2	$1.35 \times 10^{-11}$	93.1
PF3	$1.79 \times 10^{-10}$	95.3
PF4	$2.38 \times 10^{-10}$	97.3

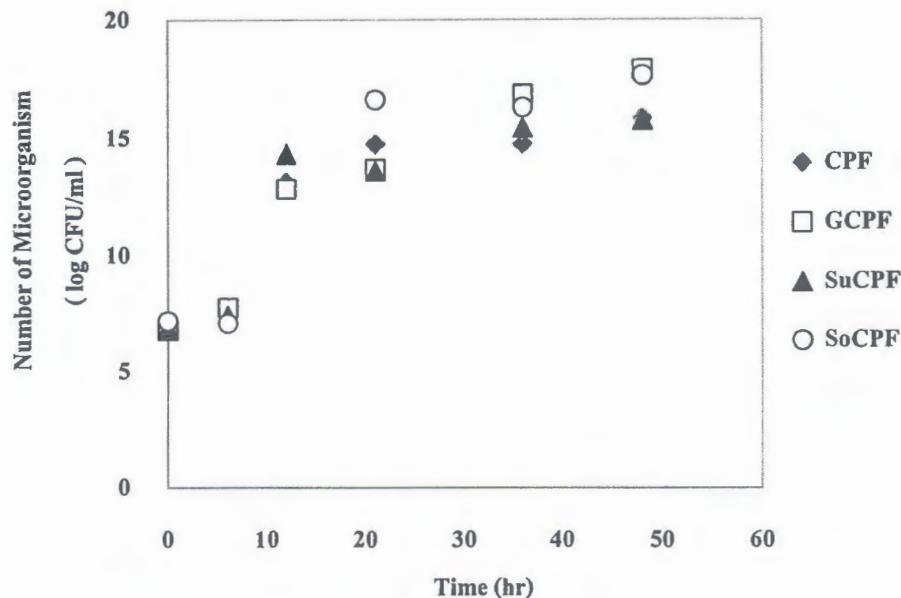
#### 4.2 ผลการศึกษาผลของการย่อยสลายสาร โพรฟีโนฟอสภายใต้ภาวะสารอาหารร่วม

##### 4.2.1 ผลการศึกษานิคของสารแหล่งคาร์บอนร่วมในการย่อยสลายสาร โพรฟีโนฟอส

ผลการศึกษาสารที่เป็นแหล่งการบอนร่วมที่ทำให้การย่อยสลายสาร โพรฟีโนฟอส ดีที่สุด ซึ่งสารที่ใช้เป็นแหล่งการบอนคือ กรดซัคชารินิก (succinic acid,  $C_4H_4O_4Na_2 \cdot 6H_2O$ ) โซเดียมอะซิเตอท (sodium acetate,  $C_2H_3O_2Na$ ) กลูโคส (glucose,  $C_6H_{12}O_6$ ) ควบคุมปริมาณการบอนที่ 0.5 กรัม ต่อลิตร (Xie et al., 2008) โดยความเข้มข้นของสาร โพรฟีโนฟอสที่ศึกษา คือ 20 มิลลิกรัมต่อลิตร ผลการเจริญเติบโตของกลุ่มจุลินทรีย์ การเปลี่ยนแปลงของค่าซีโอดี และการย่อยสลายสาร โพรฟีโนฟอสมีดังนี้

#### 4.2.1.1 ผลการเจริญเติบโตของกลุ่มจุลินทรีย์

ผลการทดลองการเจริญเติบโตของกลุ่มจุลินทรีย์ทั้ง 4 ชุดการทดลองคือ ชุดที่มีการเติมสารกลูโคส (GCPF) ชุดที่มีการเติมกรดซัคซินิก (SuCPF) และชุดที่มีการเติมโซเดียมอะซิเตอท (SoCPF) พบว่าрафการเจริญเติบโตของกลุ่มจุลินทรีย์มีลักษณะดังภาพที่ 4.1 (ข้อมูลดิบแสดงในภาคผนวก ๑) คือ กลุ่มจุลินทรีย์มีการเจริญเติบโตเพิ่มจำนวนเพิ่มขึ้นมากในช่วง ชั่วโมงที่ ๖ ถึงชั่วโมงที่ ๑๒ จำนวนจุลินทรีย์ซึ่งเริ่มคงที่ โดยภายในชั่วโมงที่ ๔๘ (๔๘ ชั่วโมง) ชุดที่มีการเติมสารกลูโคสมีการเจริญของกลุ่มจุลินทรีย์สูงที่สุดถึง  $10^{18}$  ชีเอฟบูต่อ มิลลิลิตร รองลงมาเป็นชุดที่เติมโซเดียมอะซิเตอทและชุดที่เติมกรดซัคซินิก เท่ากับ  $10^{17}$  และ  $10^{16}$  ชีเอฟบูต่อ มิลลิลิตร ตามลำดับ (การย่อยสลายเป็นปฏิกิริยาอันดับศูนย์) จากผลดังกล่าวจะเห็นว่า แนวโน้มการเจริญเติบโตของกลุ่มจุลินทรีย์ในชุดที่มีการเติมสารแหล่งการรับอนุสูงกว่าการ เจริญเติบโตในชุดควบคุมที่ไม่มีการเติมสารแหล่งการรับอนุซึ่งผลดังกล่าวสอดคล้องกับงานวิจัยของ Grant and Betts (2004) ที่มีการศึกษาเกี่ยวกับการเติมสารแหล่งการรับอนุเพื่อเพิ่มการเจริญเติบโตของ จุลินทรีย์ โดยผลการศึกษาพบว่าเมื่อมีการเติมสารแหล่งการรับอนุจะส่งผลให้จุลินทรีย์มีการ เจริญเติบโตมากขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับชุดที่ไม่มีการเติมสารแหล่งการรับอนุโดยเฉพาะชุดที่เติมสาร กลูโคส โดยอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของจุลินทรีย์ในชุดที่มีการเติมกลูโคสมีการอัตราการเจริญ เติบสูงที่สุดคือ 4.59 ชีเอฟบูต่อวัน รองลงมาเป็นชุดที่เติมกรดซัคซินิก คือ 3.93 ชีเอฟบูต่อวัน สำหรับ ชุดเติมโซเดียมอะซิเตอท และชุด ไม่มีการเติมสารคราร์บอนร่วม มีอัตราการเจริญเติบโตใกล้เคียงกัน คือ 3.39 ชีเอฟบูต่อวัน (การเจริญเติบโตเป็นปฏิกิริยาอันดับหนึ่ง) ดังตารางที่ 4.5 ซึ่งผลการ เจริญเติบโตของกลุ่มจุลินทรีย์จะแตกต่างกันขึ้นกับโครงสร้างของสารแหล่งการรับอนุแต่ละชนิด นอกจากนี้ยังขึ้นอยู่กับความจำเพาะของกลุ่มจุลินทรีย์ในการใช้สารแหล่งการรับอนุนั้นเพื่อการ เจริญเติบโต (Xie et al., 2009)



ภาพที่ 4.5 การเจริญเติบโตของกลุ่มจุลินทรีย์ภายในสภาวะที่มีสารอาหารร่วม

ตารางที่ 4.5 อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของกลุ่มจุลินทรีย์ภายในสภาวะที่มีสารอาหารร่วม

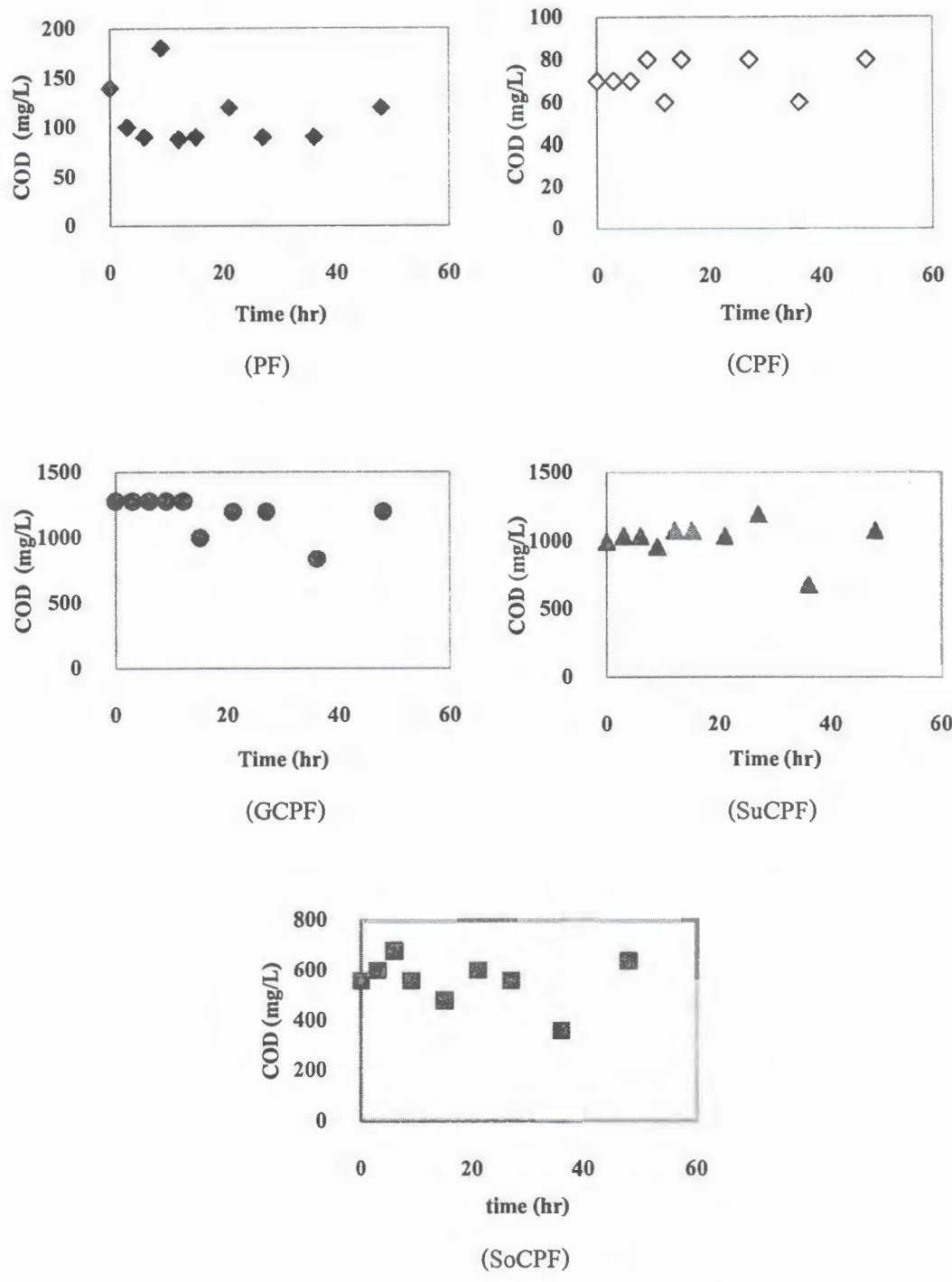
ชื่อ	อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (ต่อวัน)
CPF	$3.386 \pm 1.97$
GCPF	$4.598 \pm 1.15$
SuCPF	$3.937 \pm 1.20$
SoCPF	$3.394 \pm 1.93$

#### 4.2.1.2 ผลการย่อยสลายสารเหลืองคราบอนร่วนในรูปค่าซีไอดี

ผลการทดลองความสามารถในการย่อยสลายสารเหลืองคราบอนร่วนพนวณค่าซีไอดีลดลงในช่วงไม่งานที่ 3 สำหรับชุดการทดลองที่ไม่มีการเติมเชื้อกลุ่มจุลินทรีย์ ส่วนในชุดการทดลองที่มีการเติมเชื้อกลุ่มจุลินทรีย์การลดลงของค่าซีไอดีจะเริ่มลดลงในช่วงไม่งานที่ 6 และค่อยๆ ลดลงจนถึงสุดการทดลอง ดังภาพที่ 4.6 (ข้อมูลคิดเหตุในภาคผนวก ฯ) จากผลการทดลองจะเห็นได้ว่าค่าซีไอดีเริ่มต้นในแต่ละชุดมีค่าไม่เท่ากัน แม้จะมีการควบคุมปริมาณคราบอนร่วนในองค์ประกอบของสารที่เติมลงไปແล็กก์ตาม ผลดังกล่าวซึ่งให้เห็นอย่างชัดเจนว่าปริมาณ (มวล) ของคราบอนในชุดทดลองทุกชุดแม้จะควบคุมให้เท่ากันแต่การเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันระหว่าง

การ์บอนดังกล่าวและสารเคมีในการวิเคราะห์ค่าซีโอดีต่างกัน ซึ่งอาจบ่งชี้ได้ว่าความเป็นไปได้ในการใช้ประโยชน์ทางชีวภาพ (bioavailability) ของสารการ์บอนร่วมในการศึกษานี้ต่างกัน เมื่อประมวลผลดังกล่าวร่วมกับผลการเจริญเติบโตในกราฟแสดงตอนที่ผ่านมาพบว่าปรากฏการณ์นี้ส่งผลให้กลุ่มจุลินทรีย์สามารถเจริญเติบโตได้ต่างกัน ดังผลการเจริญภาพที่ 4.5

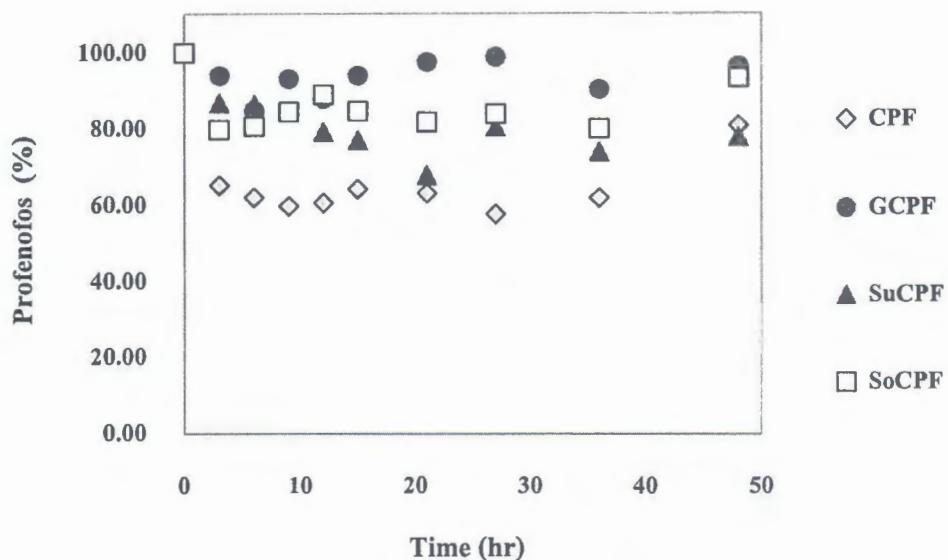
แต่อย่างไรก็ตามจากผลการวิเคราะห์ค่าซีโอดีในการทดลองนี้มีค่าลดลงเพียงเล็กน้อยแม้พัฒนาการเจริญเติบโตของกลุ่มจุลินทรีย์สูงมาก (บ่งชี้การใช้การ์บอนปริมาณมาก เช่นกัน) โดยทั่วไปหลักการวิเคราะห์ค่าซีโอดีเป็นการวิเคราะห์ปริมาณออกซิเจนที่เปลี่ยนแปลงเพื่อบ่งชี้การเกิดออกซิเดชันและปริมาณสารอินทรีย์ แต่เนื่องจากสารcarbonที่ใช้ในการศึกษานี้มีโครงสร้างซับซ้อนการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันอาจยังเกิดขึ้นได้ในสารผลิตภัณฑ์ส่งผลให้ค่าซีโอดีลดลงน้อยมาก (Malghani et al., 2009) ดังนั้นอาจกล่าวได้ว่าในการศึกษานี้วิเคราะห์ค่าซีโอดีเพื่อคุ้มครองเปลี่ยนแปลงของปริมาณสารcarbonในระบบเป็นเพียงการบ่งชี้ในเบื้องต้นเท่านั้นที่อาจสรุปผลได้อย่างชัดเจน



ภาพที่ 4.6 การลดลงของค่า COD (ชุดควบคุมมีสารพิษไม่มีเซลล์ (PF) ชุดควบคุมมีสารพิษมีเซลล์ (CPF) ชุดที่มีสารพิษมีเซลล์เติมสารการ์บอนกํา邑ส (GCPF) ชุดที่มีสารพิษมีเซลล์เติมสารการ์บอนกรดซัคซินิก (SuCPF) ชุดที่มีสารพิษมีเซลล์เติมสารการ์บอนโซเดียมอะซิเตอท (SoCPF))

#### 4.2.1.3 ผลการย่อสลายสาร โพร์ฟีโนฟอสของกลุ่มจุลินทรี

ผลการปริมาณสาร โพร์ฟีโนฟอสแสดงดังภาพที่ 4.7 สาร โพร์ฟีโนฟอส ลดลงอย่างรวดเร็วใน 3 ชั่วโมงแรกจากนั้นความเข้มข้นของสาร โพร์ฟีโนฟอสจึงเริ่มงดที่ โดยเมื่อ สิ้นสุดการทดลอง (48 ชั่วโมง) ชุดควบคุมที่เติมกลุ่มจุลินทรีแต่ไม่มีการเติมสารแหล่งคาร์บอน โดยสามารถลดสาร โพร์ฟีโนฟอสได้ร้อยละ 40 รองลงมาคือชุดที่มีการเติมกรดซัคซินิก และชุดที่เติม โซเดียมอะซิเตอท สามารถลดความเข้มข้นของสารได้ร้อยละ 30 ส่วนชุดที่มีการเติมกลูโคสสามารถลดสาร โพร์ฟีโนฟอสได้น้อยที่สุด คือ ร้อยละ 10 ดังภาพที่ 4.7 (ข้อมูลคิดเบ댓ในภาคผนวก ช) ค่า อัตราการย่อสลายสารจำเพาะของ CPF, GCPF, SuCPF และ SoCPF เท่ากับ  $2.60 \times 10^{-7}$ ,  $7.45 \times 10^{-9}$ ,  $3.74 \times 10^{-7}$  และ  $1.73 \times 10^{-8}$  ไมโครกรัมต่อซีเอฟยูต่อชั่วโมง ตามลำดับ (การย่อสลายเป็นปฏิกิริยา อันดับศูนย์) ดังตารางที่ 4.6 จากผลการทดลองดังกล่าวจะเห็นได้ว่าชุดที่มีการเติมสารควรรับอนร่วม ทั้งหมดมีความสามารถในการลดสาร โพร์ฟีโนฟอสได้น้อยกว่าชุดควบคุม ซึ่งมีความเป็นไปได้ว่า กลุ่มจุลินทรีใช้สารควรรับอนร่วมที่เติมลงไปมากกว่าการย่อสลายสาร โพร์ฟีโนฟอสเพื่อใช้ในการ เจริญเติบโตดังผลการเจริญเติบโตของกลุ่มจุลินทรีในภาพที่ 4.5 และ 4.6 เมื่อเปรียบเทียบกับ งานวิจัยที่ผ่านมา (Malghani et al., 2009; Xie et al., 2009) ที่มีการศึกษาเกี่ยวกับการเติมสารแหล่ง かる์บอนเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการย่อสลายสารพิษ เช่นเดียวกับน้ำที่มีสารแหล่งかる์บอน ที่นักหนึ่งจากสารพิษลงไปจะสามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการย่อสลายสารพิษได้มากขึ้นก็ตาม แต่หากความเข้มข้นของสารพิษและสารแหล่งかる์บอนแตกต่างกันก็มีความเป็นไปได้ที่จะทำให้ ความสามารถในการย่อสลายสารพิษของจุลินทรีลดลง ดังในงานวิจัยของ Xie et al. (2009) ที่ ศึกษาปัจจัยของความเข้มข้นของสารพิษและสารแหล่งかる์บอนพบว่าเมื่อความเข้มข้นของสาร แหล่งかる์บอนมากหรือน้อยเกินไป คือ หากอัตราส่วนความเข้มข้นของสารควรรับอนร่วมน้อยกว่า สารพิษมาก หรือ อัตราส่วนของสารควรรับอนร่วมมากกว่าความเข้มข้นของสารพิษมากก็จะทำให้ ความสามารถในการย่อสลายสารพิษของจุลินทรีลดลงได้ โดยจากการวิจัยดังกล่าวผลอัตราส่วนที่ เหมาะสมต่อการย่อสลายสารพิษคือ ที่อัตราส่วนของโซเดียมซัคซินेट 128.6 มิลลิกรัมต่อมหาลา ไหตอน 1 มิลลิกรัม ทำให้ค่าคงที่การย่อสลายสารมหาลาไหตอนสูงถึง 3.5837 มิลลิกรัมต่อลิตร ชั่วโมง จากผลการวิจัยดังกล่าว เมื่อเปรียบเทียบกับผลการย่อสลายสาร โพร์ฟอสจึงมีความเป็นไปได้ว่า ปัจจัยของความเข้มข้นของสารควรรับอนร่วมและความเข้มข้นของสาร โพร์ฟีโนฟอส ส่งผลให้การ ย่อสลายสาร โพร์ฟีโนฟอสลดลง ดังนี้นี่จึงทำเป็นต้องมีการศึกษาปัจจัยดังกล่าวในขั้นต่อไป



ภาพที่ 4.7 การย่อยสลายสาร โพรฟิโนฟอสภายในสภาวะที่มีสารอาหารร่วมปริมาณ 500 มิลลิกรัมต่อลิตร

ตารางที่ 4.6 อัตราการย่อยสลายสารจำเพาะของกลุ่มชุดนทรีย์ภายใต้สภาวะที่มีสารอาหารร่วม

ชื่อ	อัตราการย่อยสลายสารจำเพาะ (ซีอีฟยูต่อมิลลิลิตรต่อชั่วโมง)	ร้อยละการย่อยสลาย สารโพรฟิโนฟอส
CPF	$2.60 \times 10^{-7} \pm 4.53 \times 10^{-9}$	$40 \pm 5.02$
GCPF	$7.45 \times 10^{-9} \pm 8.34 \times 10^{-10}$	$5 \pm 8.04$
SuCPF	$3.74 \times 10^{-7} \pm 3.23 \times 10^{-8}$	$25 \pm 4.39$
SoCPF	$1.73 \times 10^{-8} \pm 6.11 \times 10^{-9}$	$20 \pm 4.08$

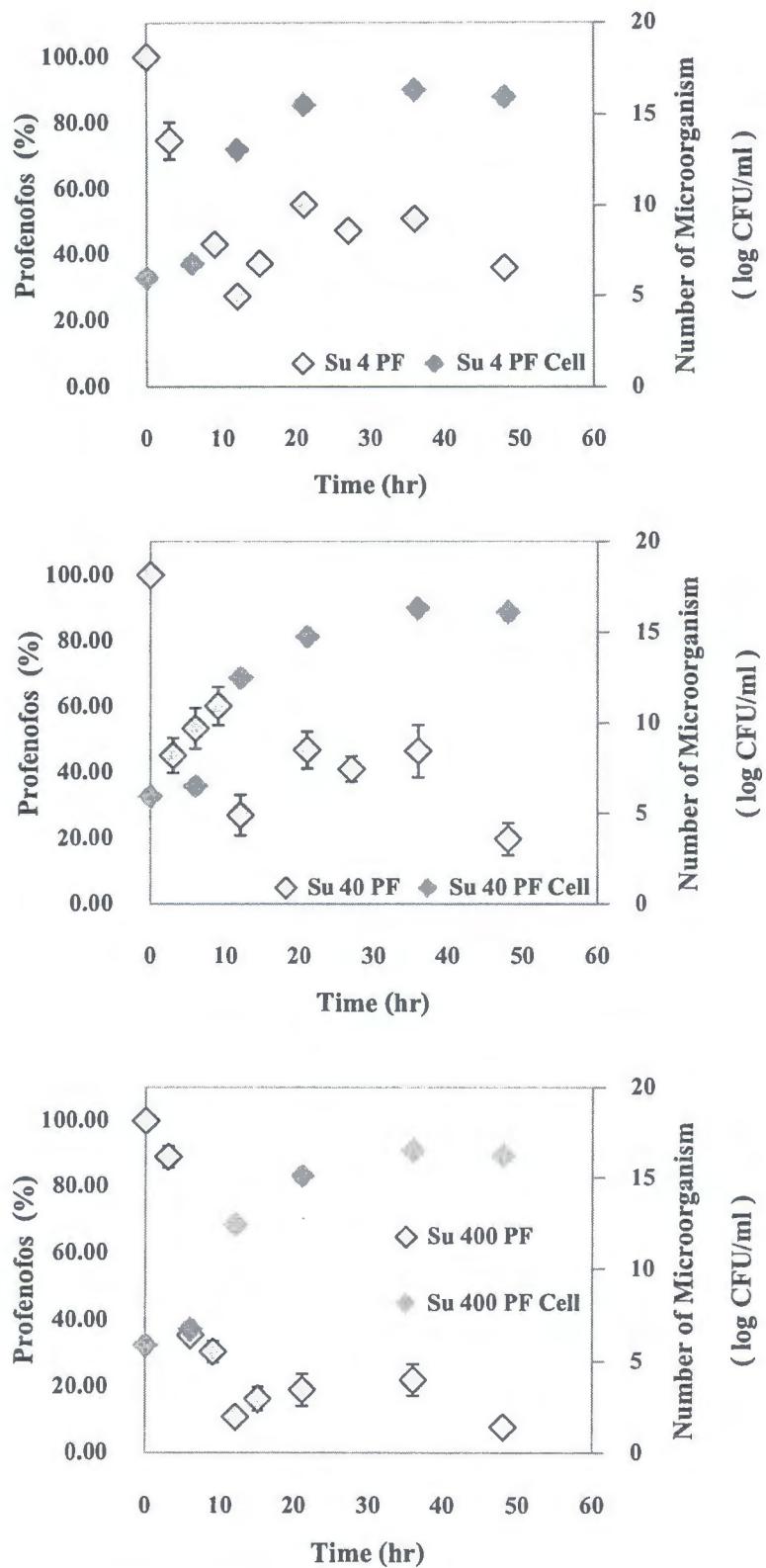
#### 4.2.2 ผลการศึกษาการย่อยสลายสาร โพรฟิโนฟอสในสภาวะที่เติมแหล่งการบ่อนร่วมความเข้มข้นต่าง ๆ

##### 4.2.2.1 ผลการศึกษาระดับความเข้มข้นของสารแหล่งการบ่อนร่วม

ผลการศึกษาระดับความเข้มข้นของสารแหล่งการบ่อนร่วมจากผลการทดลองที่ 4.2 แสดงให้เห็นว่ากรดซัคซินิกมีประสิทธิภาพในการช่วยเพิ่มการเจริญเติบโตของกลุ่มชุดนทรีย์ทำให้มีความสามารถในการย่อยสลายสาร โพรฟิโนฟอสสูงที่สุด ดังนี้นึ่งเลือกใช้กรด

ซัคซินิกในการศึกษาระดับความเข้มข้นของสารแหล่งคาร์บอน โดยความเข้มข้นของกรดซัคซินิกที่ใช้เป็นแหล่งคาร์บอนคือ 4 40 และ 400 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าสารโพรฟิโนฟลดลงอย่างรวดเร็ว ใน 6 ชั่วโมงแรกในชุดที่มีการเติมสารแหล่งคาร์บอน 4 และ 40 มิลลิกรัมต่อลิตร จากนั้นการย่อยสลายจึงคงที่ ส่วนชุดที่มีการเติมสารแหล่งคาร์บอน 400 มิลลิกรัมต่อลิตร สารโพรฟิโนฟสมีการลดลงอย่างช้าๆ ในช่วง 3 ชั่วโมงแรก จากนั้นจึงมีการลดลงอย่างรวดเร็ว จนถึงชั่วโมงที่ 12 จากนั้น การย่อยสลายจึงคงที่ โดยเมื่อสิ้นสุดการทดลองชุดที่มีความเข้มข้นของกรดซัคซินิก 400 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถลดสารโพรฟิโนฟได้มากที่สุดถึงร้อยละ 80 รองลงมาคือชุดที่มีความเข้มข้นของกรดซัคซินิก 40 มิลลิกรัมต่อลิตร และชุดที่มีความเข้มข้นของกลูโคส 4 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยสามารถลดสารโพรฟิโนฟได้ร้อยละ 60 โดยค่าอัตราการย่อยสลายสารจำเพาะของชุด SuCPF 4, SuCPF 40 และ SuCPF 400 เท่ากับ  $8.56 \times 10^{-16}$ ,  $1.86 \times 10^{-15}$  และ  $1.88 \times 10^{-15}$  ไมโครกรัมต่อชีวอฟยูต่อชั่วโมง ตามลำดับ (การย่อยสลายเป็นปฏิกิริยาอันดับสูง) ดังตารางที่ 4.7 (ข้อมูลดิบแสดงในภาคผนวก ช) ผลดังกล่าวสอดคล้องกับงานวิจัยที่ผ่านมา (Malghani et al., 2009; Xie et al., 2009) ที่มีการศึกษาเกี่ยวกับการเติมสารแหล่งคาร์บอนเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการย่อยสลายสารพิษ พบว่าเมื่อเติมสารคาร์บอนที่น้อยหนึ่งจากสารพิษลงไปจะสามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการย่อยสลายสารพิษ ได้มากขึ้น จากผลดังกล่าวบ่งชี้ว่าสารแหล่งคาร์บอนกรดซัคซินิกที่ความเข้มข้น 400 มิลลิกรัมต่อลิตรมีความเหมาะสมสำหรับใช้ในการทดลองขั้นต่อไป

ผลการทดลองการเจริญเติบโตของกลุ่มจุลินทรีย์พบว่ากราฟการเจริญเติบโตของกลุ่มจุลินทรีย์มีการเจริญเติบโตเพิ่มจำนวนเพิ่มขึ้นมากในช่วงชั่วโมงที่ 6 ถึงชั่วโมงที่ 12 จากนั้นการเจริญเติบโตจึงเริ่มคงที่ทั้ง 3 ชุดการทดลองดังภาพที่ 4.8 โดยเมื่อสิ้นสุดการทดลอง (48 ชั่วโมง) พบว่าทั้ง 3 ชุดการทดลองมีกลุ่มจุลินทรีย์เจริญเติบโตสูงถึง  $10^{15}$  ชีวอฟยูต่อ มิลลิลิตร โดยค่าอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของชุด SuCPF Cell 4, SuCPF Cell 40 และ SuCPF Cell 400 เท่ากับ 1.667, 1.696 และ 1.715 ต่อชั่วโมง ตามลำดับ (การเจริญเติบโตเป็นปฏิกิริยาอันดับหนึ่ง) ดังตารางที่ 4.8 (ข้อมูลดิบแสดงในภาคผนวก ช) ซึ่งผลดังกล่าวสอดคล้องกับงานวิจัยของ Xie et al. (2009) ที่มีการศึกษาเกี่ยวกับการเติมสารแหล่งคาร์บอนอื่นนอกจากสารพิษให้กับกลุ่มจุลินทรีย์โดยมีการทดลองเติมสารแหล่งคาร์บอนในความเข้มข้นต่างๆ ผลการศึกษาพบว่าจุลินทรีย์มีการเจริญเติบโตมากขึ้นเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารแหล่งคาร์บอนร่วม



ภาพที่ 4.8 ผลการย้อมสลายสาร โพร์ฟิโนฟอสที่ความเข้มข้นของสารแหล่งการรับอนค่าง ๆ

ตารางที่ 4.7 อัตราการย่อยสลายสารจำเพาะของกลุ่มจุลทรรศ์ที่ความเข้มข้นของสารเหล่งคาร์บอนต่าง ๆ

ชื่อ	อัตราการย่อยสลายสารจำเพาะ (ในโครงการต่อซีเอฟพีต่อชั่วโมง)	ร้อยละการย่อยสลายสารโพร์ฟิโนฟอส
Su 4 CPF	$8.56 \times 10^{-16} \pm 8.27 \times 10^{-17}$	$35 \pm 8.35$
Su 40 CPF	$1.86 \times 10^{-15} \pm 2.30 \times 10^{-16}$	$55 \pm 4.36$
Su 400 CPF	$1.88 \times 10^{-15} \pm 1.98 \times 10^{-16}$	$80 \pm 3.23$

ตารางที่ 4.8 อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของกลุ่มจุลทรรศ์ที่ความเข้มข้นของสารเหล่งคาร์บอนต่าง ๆ

ชื่อ	อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (ต่อชั่วโมง)
Su 4 CPF Cell	$1.667 \pm 0.46$
Su 40 CPF Cell	$1.696 \pm 0.10$
Su 400 CPF Cell	$1.715 \pm 0.11$

4.3 การศึกษาประสิทธิภาพในการย่อยสลายเมื่อออยู่ภายในไฟฟ้าระหว่างที่มีสาร โพร์ฟิโนฟอส และเหล่งคาร์บอนในระดับความเข้มข้นต่าง ๆ

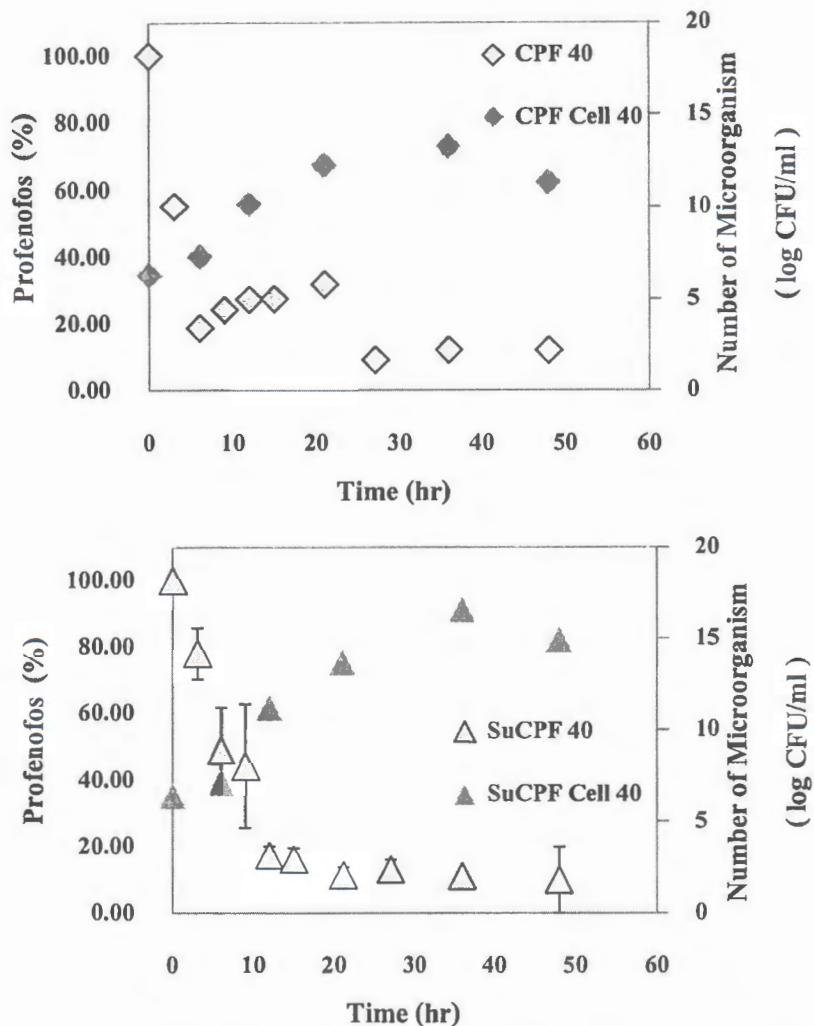
ผลการศึกษาระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ของสาร โพร์ฟิโนฟอส และสารที่ใช้เป็นเหล่งคาร์บอน ที่ทำให้เกิดการย่อยสลายสาร โพร์ฟิโนฟอสที่ดีที่สุด โดยความเข้มข้นของสาร โพร์ฟิโนฟอสที่ศึกษา คือ 40 80 และ 120 มิลลิกรัมต่อลิตร และความเข้มข้นของสารคาร์บอนที่ 400 มิลลิกรัมต่อลิตร ได้ผลการทดลองดังนี้

#### 4.3.1 ผลการศึกษาที่ระดับความเข้มข้นของสาร โพร์ฟิโนฟอส 40 มิลลิกรัมต่อลิตร

ผลการศึกษาที่ระดับความเข้มข้นของสาร โพร์ฟิโนฟอส 40 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่า สารมีการลดลงในช่วงชั่วโมงที่ 3 ถึง 12 จากนั้นการลดลงเริ่มคงที่ทั้งชุดที่มีการเติมสารเหล่งคาร์บอนและชุดที่ไม่มีการเติมสารเหล่งคาร์บอน โดยเมื่อสิ้นสุดการทดลองพบว่าทั้งสองชุดการ

ทดลองสามารถลดสาร โพร์ฟิโนฟอสได้ไกล์เคียงกันคือ ร้อยละ 90 ดังภาพที่ 4.9 ค่าการย่อyle слайสารจำเพาะของชุด CPF 40 และ SuCPF 40 คือ  $9.19 \times 10^{-11}$  และ  $2.48 \times 10^{-14}$  ไมโครกรัมต่อซีเอฟยูต่อชั่วโมง ตามลำดับ ( การย่อyle слайเป็นปฏิกิริยาอันดับสูงย ) ผลดังกล่าวเมื่อเปรียบเทียบกับงานวิจัยที่ผ่านมา (Malghani et al., 2009 และ Xie et al., 2009) ที่มีการศึกษาเกี่ยวกับการเติมสารแหล่งคาร์บอนเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการย่อyle слайสารพิษ ซึ่งในการศึกษาพบว่าเมื่อเติมสารคาร์บอนที่นักออกแบบจากสารพิษลงไปในบริมาณที่เหมาะสมจะสามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการย่อyle слายสารพิษได้ แต่ผลจากการทดลองความสามารถในการลดสาร โพร์ฟิโนฟอสของชุดที่เติมสารแหล่งคาร์บอนมีค่าการย่อyle слайต่ำกว่าชุดที่ไม่มีการเติมสารแหล่งคาร์บอน แต่กับกลุ่มจุลินทรีย์มีการเพิ่มจำนวนเพิ่มมากขึ้นผลดังกล่าวแสดงให้เห็นว่ากลุ่มจุลินทรีย์ใช้สารแหล่งคาร์บอนที่เติมลงไปโดยไม่ใช้แหล่งคาร์บอนที่เป็นสารพิษทำให้การย่อyle слายสารพิษไม่คิดขึ้นแม้กลุ่มจุลินทรีย์จะมีจำนวนเพิ่มขึ้น

ผลการทดลองการเจริญเติบโตของกลุ่มจุลินทรีย์พบว่ากราฟการเจริญเติบโตของกลุ่มจุลินทรีย์มีการเจริญเติบโตเพิ่มจำนวนเพิ่มขึ้นมากในช่วงชั่วโมงที่ 6 ถึงชั่วโมงที่ 24 จากนั้นการเจริญเติบโตจะเริ่มคงที่ทั้ง 2 ชุดการทดลอง ดังภาพที่ 4.9 เมื่อสิ้นสุดการการทดลอง (48 ชั่วโมง) พบว่าชุดที่มีการเติมสารแหล่งคาร์บอนมีกลุ่มจุลินทรีย์เจริญเติบโตสูงถึง  $10^{16}$  ซีเอฟยูต่อมิลลิลิตร ส่วนชุดที่ไม่มีการเติมสารแหล่งคาร์บอนกลุ่มจุลินทรีย์มีการเจริญเติบโตเพียง  $10^{13}$  ซีเอฟยูต่อมิลลิลิตร ค่าการเจริญเติบโตจำเพาะเท่ากับ 0.842 และ 1.422 ต่อชั่วโมง ตามลำดับ ( การเจริญเติบโต เป็นปฏิกิริยาอันดับหนึ่ง ) จากผลดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าเมื่อมีการเติมสารแหล่งคาร์บอนให้กับกลุ่มจุลินทรีย์จะทำให้จุลินทรีย์มีการเพิ่มจำนวนมากขึ้นดังตารางที่ 4.9 สรุคคล้องกับงานวิจัยของ Malghani et al. (2009) ที่มีการศึกษาเกี่ยวกับการเติมสารแหล่งคาร์บอนอื่นนอกจากสารพิษให้กับจุลินทรีย์ ซึ่งผลการศึกษาพบว่าจุลินทรีย์มีการเจริญเติบโตมากขึ้นเมื่อมีการเติมสารแหล่งคาร์บอน



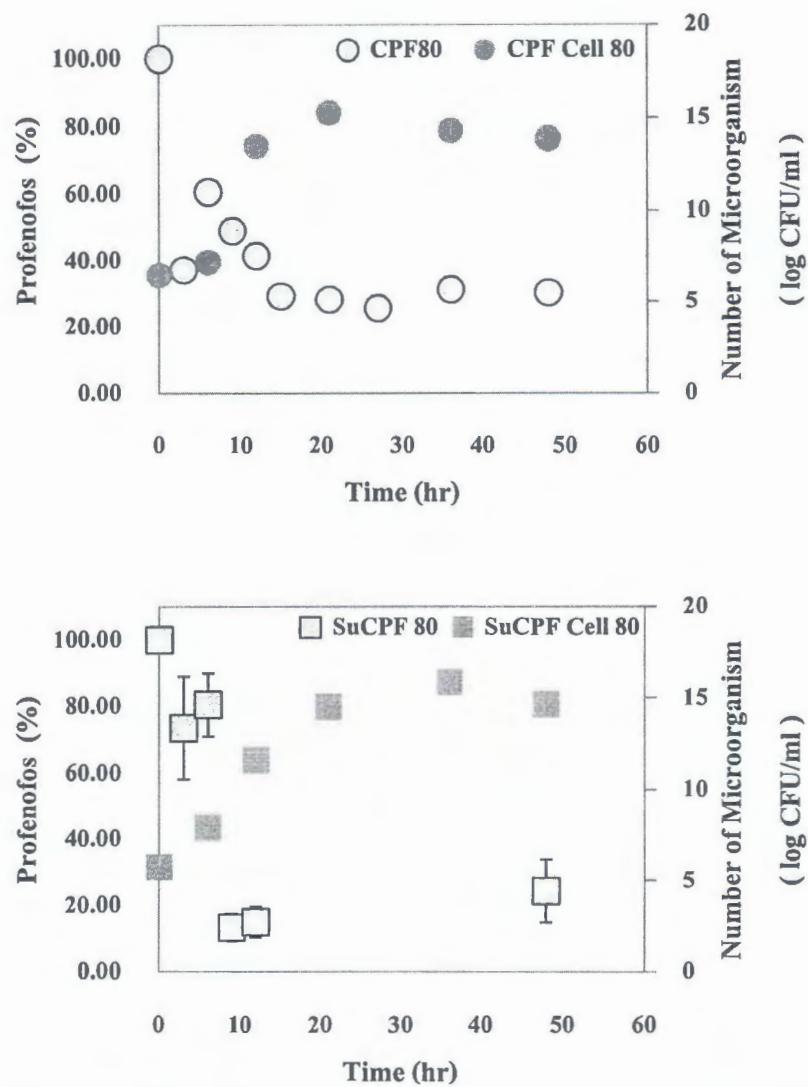
ภาพที่ 4.9 ผลการศึกษาที่ระดับความเข้มข้นของสาร โพรฟีโนฟอส 40 มิลลิกรัมต่อลิตร

#### 4.3.2 ผลการศึกษาที่ระดับความเข้มข้นของสาร โพรฟีโนฟอส 80 มิลลิกรัมต่อลิตร

ผลการศึกษาที่ระดับความเข้มข้นของสาร โพรฟีโนฟอส 80 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่า สารมีการลดลงในช่วงชั่วโมงที่ 3 ถึง 12 จากนั้นการลดลงเริ่มคงที่ทั้งชุดที่มีการเติมสารแหล่ง คาร์บอนและชุดที่ไม่มีการเติมสารแหล่ง คาร์บอน โดยเมื่อสิ้นสุดการทดลองพบว่าชุดการทดลองที่มี การเติมสารแหล่ง คาร์บอนสามารถลดสาร โพรฟีโนฟอสได้ร้อยละ 90 ส่วนชุดที่ไม่เติมสารแหล่ง คาร์บอนสามารถลดสาร โพรฟีโนฟอสได้เพียงร้อยละ 70 ค่าการย่อยสลายสารจำเพาะของชุด CPF 80 และ SuCPF 80 คือ  $4.29 \times 10^{-13}$  และ  $7.74 \times 10^{-14}$  ในโครงการนี้เชื้อพยาธิชุดที่ชั่วโมง ตามลำดับ (การย่อยสลายเป็นปฏิกิริยาอันดับสูงสุด) ผลดังกล่าวสอดคล้องกับงานวิจัยที่ผ่านมา (Malghani et al., 2009 และ Xie et al., 2009) ที่มีการศึกษาเกี่ยวกับการเติมสารแหล่ง คาร์บอนเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพใน

การย่อถ่ายสารพิษ ซึ่งในการศึกษาพบว่าเมื่อเติมสารคาร์บอนที่นอกเหนือจากสารพิษลงไปในปริมาณที่เหมาะสมสามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการย่อถ่ายสารพิษได้ จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าเมื่อเติมสารเหล่งคาร์บอนทำให้ความสามารถในการลดสารโพรฟิโนฟอส เพิ่มสูงขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับชุดที่ไม่เติมสารเหล่งคาร์บอน และเมื่อเปรียบเทียบกับผลการทดลองที่ 4.3.1 ที่มีการศึกษาระดับของสารโพรฟิโนฟอสที่ต่ำกว่า และมีการเติมสารเหล่งคาร์บอนในการทดลอง เช่นกัน พบว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสาร โพรฟิโนฟอสขึ้นการเจริญเติบโตของกลุ่มจุลินทรีย์ในชุดที่เติมและไม่เติมสารเหล่งคาร์บอนไม่แตกต่างกัน ในขณะที่ความสามารถในการลดสาร โพรฟิโนฟอสกลับเพิ่มมากขึ้นแสดงให้เห็นว่าสารเหล่งคาร์บอนที่เติมลงไปช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการย่อถ่ายสารของกลุ่มจุลินทรีย์

ผลการทดลองการเจริญเติบโตของกลุ่มจุลินทรีย์พบว่าการเจริญเติบโตของกลุ่มจุลินทรีย์มีการเจริญเติบโตเพิ่มจำนวนเพิ่มขึ้นในช่วงชั่วโมงที่ 6 ถึงชั่วโมงที่ 24 จากนั้นการเจริญเติบโตจะเริ่มคงที่ทั้ง 2 ชุดการทดลอง ดังภาพที่ 4.10 เมื่อสิ้นสุดการการทดลอง (48 ชั่วโมง) พบว่าชุดที่มีการเติมสารเหล่งคาร์บอนมีกลุ่มจุลินทรีย์เจริญเติบโตสูงถึง  $10^{15}$  ชี.เอฟ.ยูต่อ มิลลิลิตร ส่วนชุดที่ไม่มีการเติมสารเหล่งคาร์บอนกลุ่มจุลินทรีย์มีการเจริญเติบโตเพียง  $10^{14}$  ชี.เอฟ.ยูต่อ มิลลิลิตร ค่าการเจริญเติบโตจำเพาะเท่ากับ 1.237 และ 1.482 ต่อชั่วโมง ตามลำดับ ( การเจริญเติบโต เป็นปฏิกริยาอันดับหนึ่ง ) ซึ่งผลดังกล่าวเมื่อเปรียบเทียบกับงานวิจัยที่ผ่านมา (Malghani et al., 2009 และ Xie et al., 2009) ที่มีการศึกษาเกี่ยวกับการเติมสารเหล่งคาร์บอนอื่นนอกจากสารพิษให้กับจุลินทรีย์ ซึ่งผลการศึกษาพบว่าจุลินทรีย์มีการเจริญเติบโตมากขึ้นเมื่อมีการเติมสารเหล่งคาร์บอนแต่จากการทดลองผลการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ในชุดที่ไม่เติมสารเหล่งคาร์บอนและเติมสารเหล่งคาร์บอนมีค่าไม่แตกต่างกัน แสดงให้เห็นว่าจุลินทรีย์มีการย่อถ่ายสารพิษเพื่อใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในการเจริญเติบโตส่างผลให้เจริญเติบโตเพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อยเมื่อเทียบกับชุดที่ไม่เติมสารเหล่งคาร์บอน ดังตารางที่ 4.9



ภาพที่ 4.10 ผลการศึกษาที่ระดับความเข้มข้นของสาร โพร์ฟิโนฟอส 80 มิลลิกรัมต่อลิตร

#### 4.3.3 ผลการศึกษาที่ระดับความเข้มข้นของสาร โพร์ฟิโนฟอส 120 มิลลิกรัมต่อลิตร

ผลการศึกษาที่ระดับความเข้มข้นของสาร โพร์ฟิโนฟอส 120 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่า สารมีการลดลงในช่วงชั่วโมงที่ 3 ถึง 12 จากนั้นการลดลงเริ่มคงที่ทั้งชุดที่มีการเติมสารแหล่ง คาร์บอนและชุดที่ไม่มีการเติมสารแหล่ง คาร์บอนดังภาพที่ 4.11 โดยเมื่อสิ้นสุดการทดลองพบว่า ชุด การทดลองที่มีการเติมสารแหล่ง คาร์บอนสามารถลดสาร โพร์ฟิโนฟอสได้ร้อยละ 90 ส่วนชุดที่ ไม่เติมสารแหล่ง คาร์บอนสามารถลดสาร โพร์ฟิโนฟอสได้เพียงร้อยละ 60 ค่าการย่อยสลายสาร จำเพาะของชุด CPF 120 และ SuCPF 120 คือ  $2.72 \times 10^{-14}$  และ  $2.61 \times 10^{-13}$  ในโครงการรัฐเชื้อเพลิง ต่อชั่วโมง ตามลำดับ (ผลการย่อยสลายเป็นปฏิกิริยาอันดับสูงสุด) ซึ่งค่าการย่อยสลายสารจำเพาะ

เพิ่มขึ้นในขณะที่การทดลองที่ 4.3.1 และ 4.3.2 ค่าการย่อystyle จำเพาะของสารของชุดที่เติมสาร แหล่งการรับอนุมัติกว่าชุดที่ไม่เติมสารแหล่งการรับอนุมัติการย่อystyle สารดังตารางที่ 4.8

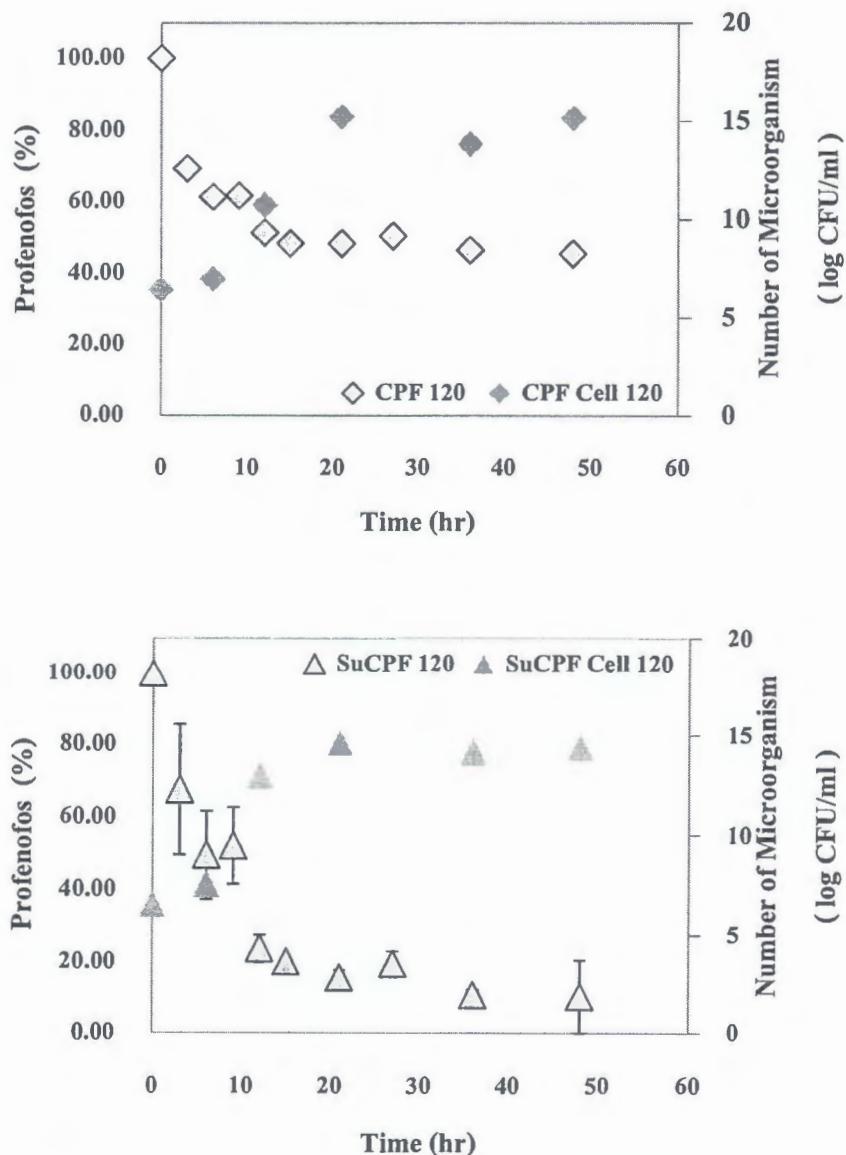
ผลการทดลองการเจริญเติบโตของกลุ่มจุลินทรีย์พบว่าการเจริญเติบโตของกลุ่มจุลินทรีย์มีการเจริญเติบโตเพิ่มจำนวนเพิ่มขึ้นในช่วงชั่วโมงที่ 6 ถึงชั่วโมงที่ 24 จากนั้นการเจริญเติบโตจะเริ่มคงที่ทั้ง 2 ชุดการทดลอง ดังภาพที่ 4.11 เมื่อสิ้นสุดการการทดลอง (48 ชั่วโมง) พบว่าชุดที่ไม่มีการเติมสารแหล่งการรับอนุมัติกลุ่มจุลินทรีย์เจริญเติบโตสูงถึง  $10^{15}$  ชีเอฟยูต่อมิลลิลิตร ส่วนชุดที่มีการเติมสารแหล่งการรับอนุมัติกลุ่มจุลินทรีย์มีการเจริญเติบโตเพียง  $10^{14}$  ชีเอฟยูต่อมิลลิลิตร ค่าการเจริญเติบโตจำเพาะเท่ากับ 1.457 และ 1.304 ต่อชั่วโมง ตามลำดับ (ผลการเจริญเติบโตเป็นปฏิกริยาอันดับหนึ่ง)

จากผลการทดลองพบว่าโดยภาพรวมเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสาร โพร์ฟิโนฟอส กลุ่มจุลินทรีย์ (ในชุดทดลองที่ไม่มีการเติมสารแหล่งการรับอนร่วม) มีอัตราการเจริญเติบโตสูงขึ้น อย่างชัดเจน (ตารางที่ 4.9) ผลดังกล่าวบ่งชี้ได้ว่าสาร โพร์ฟิโนฟอสซึ่งเป็นแหล่งการรับอนหลักในอาหารเลี้ยงเชื้อนี้ทำให้เมื่อเพิ่มความเข้มข้นจึงส่งผลต่อการเจริญเติบโตของกลุ่มจุลินทรีย์อย่างเด่นชัด แต่ในทางตรงกันข้ามผลการเจริญเติบโตของกลุ่มจุลินทรีย์ในชุดที่เติมสารแหล่งการรับอนร่วมมีค่าค่อนข้างคงที่ (ในการทดลองที่มีความเข้มข้นสาร โพร์ฟิโนฟอสต่าง ๆ กัน) จากผลการทดลองส่วนนี้ชี้ให้เห็นว่ากลุ่มจุลินทรีย์ใช้สารแหล่งการรับอนเป็นหลักในการเจริญเติบโต ซึ่งสารดังกล่าวได้เดิมในปริมาณที่เท่ากันในการทดลองทุกชุดส่งผลให้การเจริญเติบโตของกลุ่มจุลินทรีย์ ใกล้เคียงกันทุกชุด นอกจากนี้ผลการทดลองนี้ยังระบุได้ว่าในสภาวะแวดล้อมนี้ความเข้มข้นของสาร โพร์ฟิโนฟอสไม่มีอิทธิพลต่อการเจริญเติบโตของกลุ่มจุลินทรีย์

ส่วนในประเด็นการย่อystyle สาร โพร์ฟิโนฟอสในกรณีที่ไม่มีการเติมสารแหล่งการรับอนร่วม อัตราการย่อystyle สารจำเพาะลดลงอย่างมากเมื่อสาร โพร์ฟิโนฟอสเพิ่มขึ้น (ตารางที่ 4.9) ซึ่งผลดังกล่าวบ่งชี้การเกิดการยับยั้งด้วยตัวเอง (self inhibition) กล่าวคือ สาร โพร์ฟิโนฟอสซึ่งเป็นสารcar รับอนหลักในการเจริญเติบโตของกลุ่มจุลินทรีย์แต่ในขณะเดียวกันก็เป็นสารพิษซึ่งมีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของกลุ่มจุลินทรีย์ เช่นกัน ผลดังกล่าวบ่งชี้ส่งผลต่อเนื่องให้ประสิทธิภาพการย่อystyle สาร โพร์ฟิโนฟอสลดลงคัวข่ายเช่นกัน

สำหรับผลการย่อystyle สาร โพร์ฟิโนฟอสในกรณีที่มีการเติมสารcar รับอนร่วม ผลการทดลองมีทิศทางตรงกันข้ามกับชุดที่ไม่มีการเติมสารแหล่งการรับอน ผลการทดลองพบว่าเมื่อสาร โพร์ฟิโนฟอสสูงขึ้นอัตราการย่อystyle สารจำเพาะสูงขึ้นเช่นกัน ปรากฏกรณีลักษณะนี้เป็นกระบวนการเมตาโนบิลิซึ่งร่วมซึ่งสารแหล่งการรับอนที่เติมในการทดลองนี้ นอกจากจะสามารถการเจริญเติบโตของกลุ่มจุลินทรีย์แล้วยังสามารถเพิ่มสมรรถภาพของกลุ่มจุลินทรีย์ด้วย ซึ่งผลการ

ทดลองนี้สอดคล้องกับงานวิจัยในอดีต ของ Xie et al. (2009) ที่มีการศึกษาเกี่ยวกับการเติมสารแفلังค์การ์บอนอั่นจากสารพิษให้กับจุลินทรีย์ ผลการศึกษาพบว่าเมื่อเติมสารแفلังค์การ์บอนร่วมทำให้จุลินทรีย์มีการเจริญเติบโตเพิ่มขึ้นจากความหนาแน่นของเซลล์ 0.605 กรัมต่อลิตร เป็น 1.813 กรัมต่อลิตร และเพิ่มประสิทธิภาพในการสามารถย่อยสลายสารจากร้อยละ 60 เป็นร้อยละ 90 ผลดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าเมื่อเติมสารแفلังค์การ์บอนร่วมส่งผลให้จุลินทรีย์มีการเจริญเติบโตที่สูงขึ้น และช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการย่อยสลายสารพิษด้วย



ภาพที่ 4.11 ผลการศึกษาที่ระดับความเข้มข้นของสาร โพร์ฟโนฟอส 120 มิลลิกรัมต่อลิตร

ตารางที่ 4.9 อัตราการย่อยสลายสารจำเพาะของกลุ่มจุลินทรีย์ที่ระดับความเข้มข้นของสารโพรฟิโนฟอส 120 มิลลิกรัมต่อลิตร

ชื่อ	ความเข้มข้น (มิลลิกรัมต่อลิตร)	อัตราการย่อยสลายสารจำเพาะ (ไมโครกรัมต่อชั่วโมง)	ร้อยละการย่อยสลาย สารโพรฟิโนฟอส
CPF	40	$9.19 \times 10^{-11} \pm 6.00 \times 10^{-12}$	$89.0 \pm 4.41$
	80	$4.29 \times 10^{-13} \pm 3.57 \times 10^{-14}$	$77.3 \pm 8.34$
	120	$2.72 \times 10^{-14} \pm 1.33 \times 10^{-14}$	$67.0 \pm 2.51$
SuCPF	40	$2.48 \times 10^{-14} \pm 8.12 \times 10^{-15}$	$88.6 \pm 4.09$
	80	$7.74 \times 10^{-14} \pm 9.40 \times 10^{-15}$	$82.4 \pm 4.57$
	120	$2.61 \times 10^{-13} \pm 1.15 \times 10^{-14}$	$86.0 \pm 4.35$

ตารางที่ 4.10 อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของกลุ่มจุลินทรีย์ที่ระดับความเข้มข้นของสารโพรฟิโนฟอส 120 มิลลิกรัมต่อลิตร

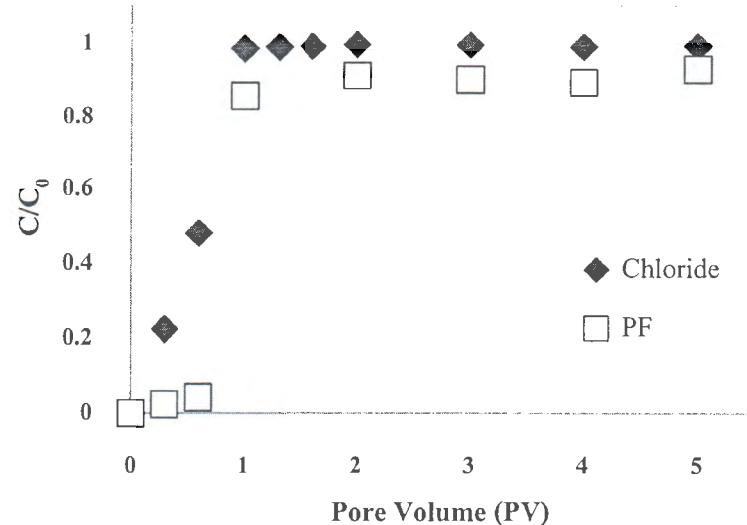
ชื่อ	ความเข้มข้น (มิลลิกรัมต่อลิตร)	อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (ต่อชั่วโมง)
CPF Cell	40	$0.841 \pm 0.07$
	80	$1.237 \pm 0.13$
	120	$1.457 \pm 1.31$
SuCPF Cell	40	$1.422 \pm 0.01$
	80	$1.482 \pm 0.01$
	120	$1.304 \pm 0.02$

#### 4.4 การสาขิตระบบที่ใช้ในการพื้นฟูน้ำให้ดินที่ปูเปื้อนสารโพร์ฟีโนฟอส

ผลการสาขิตระบบที่ใช้ในการพื้นฟูน้ำให้ดินที่ปูเปื้อนสารโพร์ฟีโนฟอส ในสภาวะที่อัตราการซึมผ่านของน้ำต่างกัน คือ 25, 50 และ 100 เซนติเมตรต่อวัน (อัตราการไหล 0.55, 1.1, 2.2 มิลลิตรต่อนาที) การทดลองศึกษาที่ความเข้มข้นของสารโพร์ฟีโนฟอส 20 และ 40 มิลลิกรัมต่อลิตร และ แหล่งการบอนกรดซัคชาริน 400 มิลลิกรัมต่อลิตร (เลือกใช้กรดซัคชารินตามผลการศึกษาในหัวข้อที่ผ่านมา) เพื่อศึกษาประสิทธิภาพในการกำจัดสารโพร์ฟีโนฟอส

##### 4.4.1 ผลการทดสอบการไหลของน้ำ และสารโพร์ฟีโนฟอส

ผลการทดสอบการไหลของน้ำและสารโพร์ฟีโนฟอส พบว่าค่า  $C/C_0$  ( $C$  คือความเข้มข้นของคลอไรด์หรือสารโพร์ฟีโนฟอส ที่เวลาใด ๆ และ  $C_0$  คือ ความเข้มข้นของคลอไรด์หรือสารโพร์ฟีโนฟอสที่เวลาเริ่มต้น) ของคลอไรด์ และสารโพร์ฟีโนฟอสมีค่าเพิ่มขึ้นเมื่อเวลาผ่านไป 1 PV (PV: Pore Volume คือ ปริมาณซ่องว่างในคอลัมน์) ดังภาพที่ 4.12 โดยผลดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าเมื่อน้ำและสารโพร์ฟีโนฟอสไหลผ่านคอลัมน์ ความเข้มข้นของสารที่ออกจากคอลัมน์มีค่าใกล้เคียงกับความเข้มข้นเริ่มต้นของสารที่เข้าคอลัมน์ ซึ่งบ่งชี้ว่าสารโพร์ฟีโนฟอสมีการเคลื่อนที่ไปพร้อมกับน้ำและไม่มีการย่อยสลายหรือการดูดซับในชุดทดลองคอลัมน์



ภาพที่ 4.12 การย่อยสลายสารคลอไรด์และสารโพร์ฟีโนฟอสในแบบจำลองคอลัมน์

#### 4.4.2 ผลการสาขิตรอบที่สภาวะที่อัตราการซึมผ่านของน้ำต่างกัน

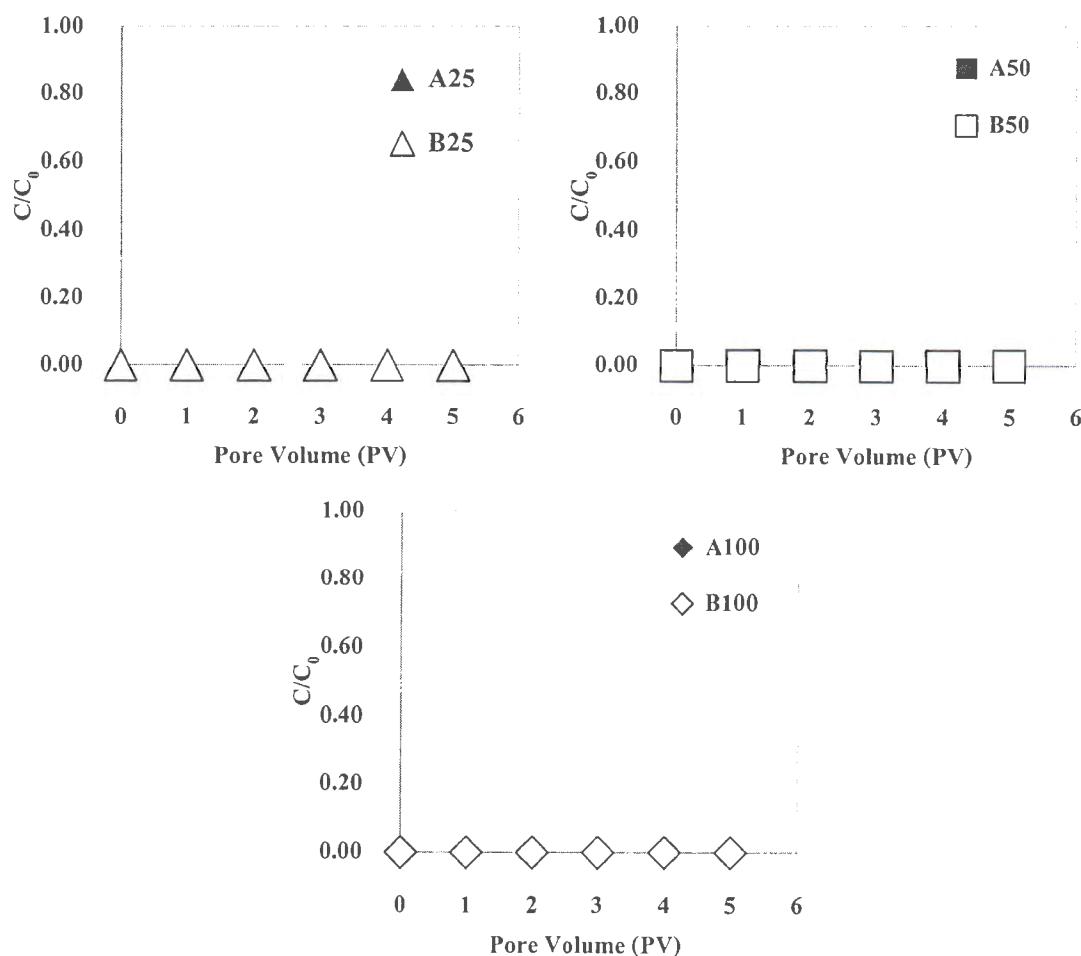
ผลการสาขิตรอบที่สภาวะที่อัตราการซึมผ่านของน้ำต่างกัน คือ 25, 50 และ 100 เซนติเมตรต่อวัน ชุดทดลองที่มีความเข้มข้นเริ่มน้ำต้นของสาร โพร์ฟิโนฟอส เท่ากับ 20 มิลลิกรัม ต่อลิตร มีผลเป็นดังภาพที่ 4.13 จากผลการทดลองทั้งหมดในส่วนนี้พบว่าไม่สามารถตรวจสอบคิดตามสาร โพร์ฟิโนฟอสได้เลย (ค่าจำกัดการวิเคราะห์ เท่ากับ 4 มิลลิกรัมต่อลิตร) ผลลักษณะนี้บ่งชี้ได้ว่า ระบบแบบจำลองคงดั้มน้ำที่มีการเติมเซลล์และสารอาหารร่วมมีประสิทธิภาพสูงมากส่งผลให้สาร โพร์ฟิโนฟอสถูกย่อยอย่างทั่วถึง ผลการทดลองในส่วนนี้สอดคล้องกับผลการทดลองแบบกะในหัวข้อที่ผ่านมา กล่าวคือ ในการเติมเซลล์และสารอาหารในบริมาณที่เหมาะสมสมส่งผลให้การย่อยอย่างสาร โพร์ฟิโนฟอสสูงถึงร้อยละ 80 ประสิทธิภาพการทดลองทั้งหมดสรุปได้ดังตารางที่ 4.10

ส่วนผลการศึกษาชุดทดลองที่มีความเข้มข้นเริ่มน้ำต้นของสาร โพร์ฟิโนฟอส เท่ากับ 40 มิลลิกรัมต่อลิตร มีผลเป็นดังภาพที่ 4.14 ซึ่งผลการทดลองพบว่าที่อัตราการซึมผ่านของน้ำ 25 เซนติเมตรต่อวัน ค่า  $C/C_0$  เพิ่มขึ้นเมื่อผ่านไป 1 PV จากนั้นเริ่มลดลงที่ 2 PV และคงที่จนสิ้นสุด การทดลอง ส่วนผลที่อัตราการซึมผ่านของน้ำ 50 และ 100 เซนติเมตรต่อวัน พบว่าค่า  $C/C_0$  หลังจาก 1 PV ค่า  $C/C_0$  เพิ่มขึ้นและคงที่จนสิ้นสุดการทดลอง จากแนวโน้มของผลการทดลองในภาพที่ 4.14 ชี้ให้เห็นว่าการทดลองที่อัตราการซึมผ่านต่ำ (เวลา กักน้ำสูง) ระบบมีประสิทธิภาพสูง

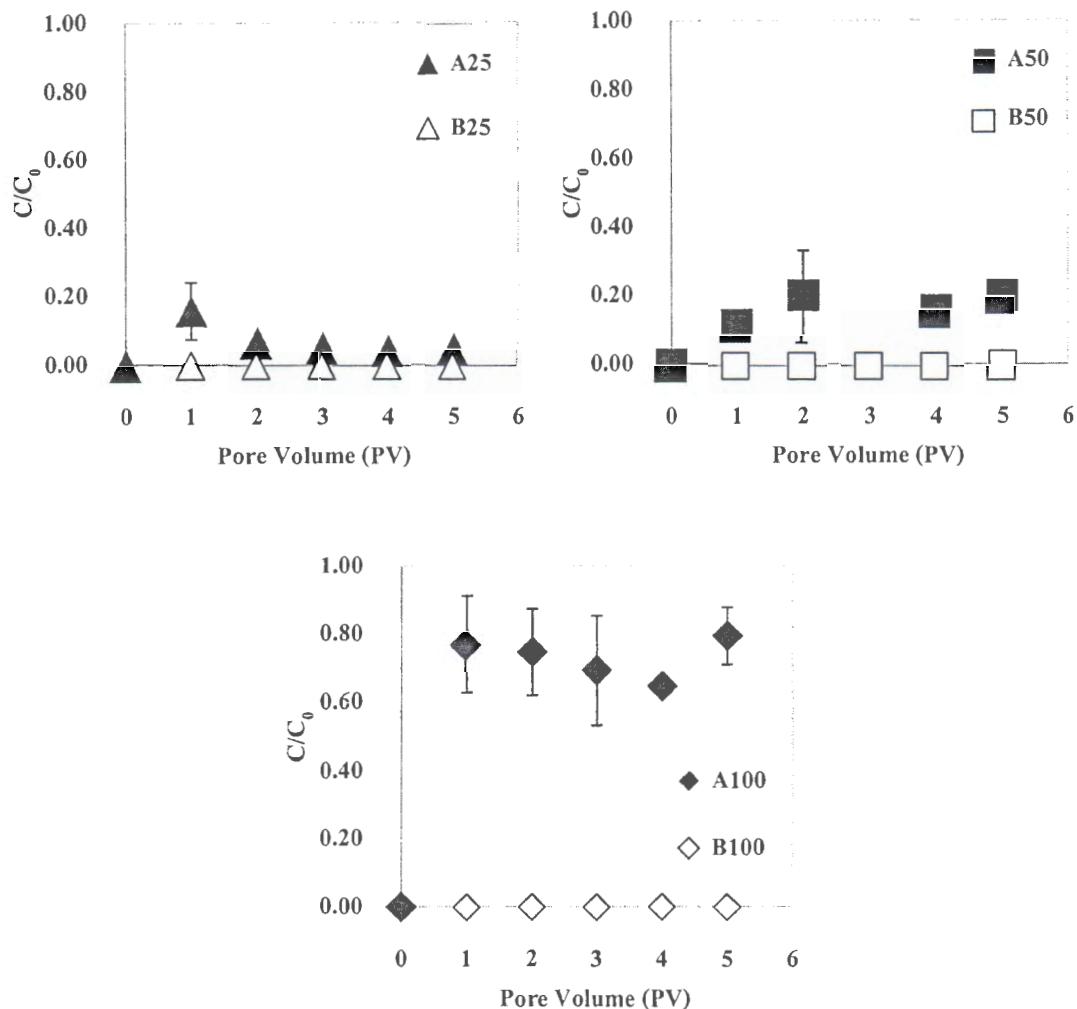
สำหรับชุดทดลองที่อัตราการซึมผ่าน 25 เซนติเมตรต่อวัน การทดลองในช่วง 1 PV ตรวจพบสาร โพร์ฟิโนฟอสเล็กน้อยอาจเนื่องมาจากในระยะที่เริ่มทดลองเซลล์ยังมีปริมาณน้อย แต่เมื่อเวลาผ่านไป (2-5 PV) เซลล์เจริญเติบโตเต็มที่ดังนั้นปริมาณสาร โพร์ฟิโนฟอสที่ตรวจพบจึงลดลง การทดลองนี้ขึ้นตอนนี้มิได้วิเคราะห์การเจริญเติบโตของเซลล์ในแบบจำลองเนื่องจาก ข้อจำกัดของชุดทดลอง แต่ผลการทดลองหัวข้อก่อนหน้านี้สนับสนุนผลการทดลองนี้ คือ ในการทดลองแบบพบว่าเซลล์กลุ่มจุลินทรีย์จาก  $10^5$  ชีอ蜉ต่อมิลลิตร เจริญเป็น  $10^{11}$  ชีอ蜉ต่อมิลลิตร ในเวลา 12 ชั่วโมง (ภาพที่ 4.9) ซึ่งสามารถบ่งชี้ได้ว่าเซลล์เพิ่มมากกว่า 2 เท่า ชุดทดลองที่อัตราการซึมผ่าน 25 เซนติเมตรต่อวัน หากคำนวณกลับเป็นเวลา กักน้ำจะคิดเป็น 12 ชั่วโมง ดังนั้นสามารถกล่าวได้ว่าเซลล์กลุ่มจุลินทรีย์ที่เพิ่มสูงขึ้นนี้มีส่วนสำคัญในการย่อยอย่างสาร โพร์ฟิโนฟอส ในการทดลองช่วง 2 ถึง 5 PV

เมื่อสิ้นสุดการทดลองชุดทดลองที่อัตราการการซึมผ่าน 25 เซนติเมตรต่อวัน มีความความสามารถในการย่อยอย่างสาร ได้มากที่สุด โดยสามารถย่อยอย่างสาร โพร์ฟิโนฟอสได้กว่าร้อยละ 90 ความสามารถในการย่อยอย่างสารลดลงเมื่อเพิ่มอัตราการซึมผ่านของน้ำ โดยความสามารถในการย่อยอย่างสารที่อัตราการซึมผ่าน 50 และ 100 เซนติเมตรต่อวัน เท่ากับร้อยละ 80 และร้อยละ 30 ตามลำดับ ดังภาพที่ 4.14

นอกจากนี้เมื่อเพิ่มปริมาณเซลล์เริ่มต้นในระบบมากขึ้น จาก  $10^5$  เป็น  $10^{15}$  พบว่าสารโพร์ฟิโนฟอสสูงขึ้นอย่างสลายจนหมดในทุกชุดการทดลอง (ค่าจำากัดการวิเคราะห์ เท่ากับ 4 มิลลิกรัมต่อลิตร) ดังภาพที่ 4.14 ผลการทดลองเมื่อเปรียบเทียบกับงานวิจัยที่ผ่านมา (Siripattanakul et al., 2009) ที่ศึกษาการกำจัดสารพิษโดยใช้จุลินทรีย์ *Agrobacterium radiobactor* J14a ใน columน์ซึ่งผลการศึกษาพบว่าเมื่ออัตราการซึมผ่านของน้ำเพิ่มขึ้นจะส่งผลให้การย่อยสลายสารของจุลินทรีย์ลดลง และเมื่อเพิ่มปริมาณเซลล์เริ่มต้นในระบบมากขึ้นจะทำให้ความสามารถในการย่อยสลายสารพิษเพิ่มมากขึ้น โดยผลการทดลองสอดคล้องกับผลการศึกษาดังกล่าว ประสมติธิภาพการทดลองทั้งหมดสรุปได้ดังตารางที่ 4.11



ภาพที่ 4.13 การย่อยสลายสารโพร์ฟิโนฟอสในแบบจำลองคอลัมน์ ความเข้มข้นของสารโพร์ฟิโนฟอส 20 มิลลิกรัมต่อลิตร เซลล์เริ่มต้น  $10^5$  ชีเอฟยูต่อมิลลิลิตร (A) และเซลล์เริ่มต้น  $10^{15}$  ชีเอฟยูต่อมิลลิลิตร (B) อัตราการซึมผ่าน 25 เชนติเมตรต่อวัน (25) 50 เชนติเมตรต่อวัน (50) และ 100 เชนติเมตรต่อวัน (100)



ภาพที่ 4.14 การย่อยสลายสารโพร์ฟีโนฟอสในแบบจำลองคอลัมน์ ความเข้มข้นของสารโพร์ฟีโนฟอส 40 มิลลิกรัมต่อลิตร เชคล์เริ่มต้น  $10^5$  ซีเอฟบีต่อมิลลิลิตร (A) และ เชคล์เริ่มต้น  $10^{15}$  ซีเอฟบีต่อมิลลิลิตร (B) อัตราการซึมผ่าน 25 เซนติเมตรต่อวัน (25) 50 เซนติเมตรต่อวัน (50) และ 100 เซนติเมตรต่อวัน (100)

ตารางที่ 4.11 ประสิทธิภาพการย่อยสลายสาร โพร์ฟีโนฟอสในแบบจำลองคอลัมน์ ความเข้มข้นของสาร โพร์ฟีโนฟอสเริ่มต้น 20 มิลลิกรัมต่อลิตร

อัตราการซึมผ่าน (เซนติเมตรต่อวัน)	ปริมาณเชลล์ (ซีเอฟพยูต่อมิลลิลิตร)	ความเข้มข้นของ สาร โพร์ฟีโนฟอส (มิลลิกรัมต่อลิตร)		ร้อยละการย่อยสลาย สาร โพร์ฟีโนฟอส
		เข้าระบบ	ออกระบบ	
25	$10^5$	20	ND	> 80
	$10^{15}$	20	ND	> 80
50	$10^5$	20	ND	> 80
	$10^{15}$	20	ND	> 80
100	$10^5$	20	ND	> 80
	$10^{15}$	20	ND	> 80

หมายเหตุ : ค่าจำกัดการวิเคราะห์ เท่ากับ 4 มิลลิกรัมต่อลิตร

ตารางที่ 4.12 ประสิทธิภาพการย่อยสลายสาร โพร์ฟีโนฟอสในแบบจำลองคอลัมน์ ความเข้มข้นของสาร โพร์ฟีโนฟอสเริ่มต้น 40 มิลลิกรัมต่อลิตร

อัตราการซึมผ่าน (เซนติเมตรต่อวัน)	ปริมาณเชลล์ (ซีเอฟพยูต่อมิลลิลิตร)	ความเข้มข้นของ สาร โพร์ฟีโนฟอส (มิลลิกรัมต่อลิตร)		ร้อยละการย่อยสลาย สาร โพร์ฟีโนฟอส
		เข้าระบบ	ออกระบบ	
25	$10^5$	40	ND	> 90
	$10^{15}$	40	ND	> 90
50	$10^5$	40	8	$80 \pm 1.94$
	$10^{15}$	40	ND	> 90
100	$10^5$	40	27	$30 \pm 6.88$
	$10^{15}$	40	ND	> 90

หมายเหตุ : ค่าจำกัดการวิเคราะห์ เท่ากับ 4 มิลลิกรัมต่อลิตร

#### 4.5 ผลการวิเคราะห์วิถีการย่อยสลายสารโพรฟินฟอสเบื้องต้น

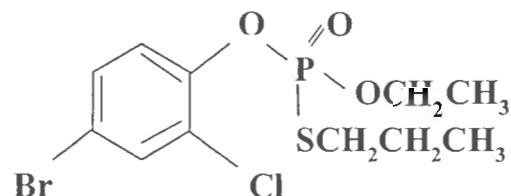
ผลการวิเคราะห์วิถีการย่อยสลายสารโพรฟินฟอสเบื้องต้น โดยการวิเคราะห์สารเมตาโนไรท์ (metabolite) ต่าง ๆ สารโพรฟินฟอสมีโครงสร้าง  $C_{11}H_7SO_3PSBrCl$  ดังภาพที่ 4.15 ซึ่งในทุกชุดการทดลองสามารถวิเคราะห์พบ 4-bromo-2-cholorophenol (BCP) ซึ่งมีโครงสร้างดังภาพที่ 4.16 ที่เวลา 3.425 นาที น้ำหนักโมเลกุล 206 เช่น ผลของสารโพรฟินฟอสสามารถความเข้มข้น 15 มิลลิกรัมต่อลิตร ผลของชุดทดลองย่อยสลายสารโพรฟินฟอสความเข้มข้นเริ่มต้น 40 มิลลิกรัมต่อลิตร ดังภาพที่ 4.17 จากผลการตรวจพบ BCP ในทุกชุดการทดลองนี้คาดว่า BCP เกิดจากการแตกตัวของสารโพรฟินฟอสซึ่งสามารถเกิดขึ้นเองโดยการทำปฏิกิริยา กับน้ำ (hydrolysis) และ/หรือเกิดจากการย่อยสลายของเชลล์จุลินทรีย์ ซึ่งมีงานวิจัยที่ผ่านมาของ Zamy et al. (2004) ที่มีการศึกษา รูปแบบการแตกตัวของสารในกลุ่มออร์แกโนฟอฟอรัสในสารละลายที่เจือจากค้ามน้ำรวมถึงสารโพรฟินฟอสด้วย ผลการศึกษาพบว่า โพรฟินฟอสสามารถแตกตัวเป็น BCP ได้ซึ่งเป็นการทำปฏิกิริยา กับน้ำ และงานวิจัยของ Malghani et al. (2009) ที่ศึกษาการย่อยสลายสารโพรฟินฟอสโดยใช้แบคทีเรียที่คัดแยกได้ โดยผลการศึกษาระบุว่า เชือแบบที่เรียกว่าคัดแยกได้นั้นสามารถย่อยสลายสารโพรฟินฟอสให้แตกตัวเป็น BCP ได้ จากเหตุผลดังกล่าวอาจระบุว่า วิถีการย่อยสลายของสารโพรฟินฟอสเป็น BCP ใน การศึกษานี้ ก็ติดตามการทำปฏิกิริยา กับน้ำ และ/หรือ การย่อยสลายของจุลินทรีย์

สำหรับชุดทดลองควบคุม (ไม่มีเชลล์จุลินทรีย์) เมื่อติดตามต่อเนื่องพบว่า ปริมาณ BCP กงที่ ดังนั้นสามารถชี้ชัดได้ว่า กระบวนการ ไฮโดรไลซีสในการศึกษามีสารโพรฟินฟอสบางส่วนถูกย่อยสลายเป็น BCP แต่กระบวนการนี้ไม่สามารถย่อยสลาย BCP ได้ ซึ่งวิถีการย่อยสลายของกระบวนการ ไฮโดรไลซีสเสนอไว้ในภาพที่ 4.18

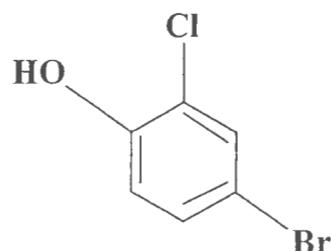
เมื่อวิเคราะห์สาร BCP ในชุดการทดลองที่มีเชลล์จุลินทรีย์พบว่า การทดลองที่ระดับความเข้มข้นเริ่มต้นของสารโพรฟินฟอสต่ำ ( $20 \text{ mg/L}$ ) การตรวจติดตามไม่พบสาร BCP แต่เมื่อทดลองที่ความเข้มข้นเริ่มต้นสูงมากขึ้น ( $40 \text{ mg/L}$ ) พบสาร BCP และเมื่อเวลาในการทดลองเพิ่มมากขึ้น BCP มีปริมาณลดลงจนไม่สามารถตรวจพบได้ แต่ตรวจพบสาร 3-methoxy phenol ณ เวลาที่เคยตรวจพบ BCP (เวลาในที่นี้ คือ เวลาในการวิเคราะห์สารด้วยเครื่องจีซี-เอ็มเอส ซึ่งพิจารณาในรูปของโคมาราโตแกรม) ตัวอย่างเช่นผลการทดลองการย่อยสลายสารโพรฟินฟอสที่ความเข้มข้น 120 มิลลิกรัมต่อลิตร พบร่วมกับการทดลองที่ระดับเวลาทดลอง 3 ชั่วโมง สามารถตรวจพบ BCP ณ เวลา 3.425 นาที (เวลาในการวิเคราะห์สารด้วยเครื่องจีซี-เอ็มเอส) แต่หลังจาก 6 ชั่วโมงของการทดลองไม่สามารถวิเคราะห์สาร BCP ได้ แต่ตรวจพบ 3-methoxy phenol ดังภาพที่ 4.19

นอกจากนี้ได้มีการตรวจพิสูจน์การประกลบฟีนอล(2,4-di-tert-butyl phenol) ณ เวลา 4.20 นาที (เวลาในการวิเคราะห์สารด้วยเครื่องจีซี-เอ็มเอส) โดยเมื่อทดลองเป็นเวลาบานานาขึ้นพบว่าสารดังกล่าวมีปริมาณเพิ่มมากขึ้น ตัวอย่างเช่นผลการทดลองการย้อมสลายสารโพร์ฟินฟอสที่ความเข้มข้น 40 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อเริ่มการทดลองที่ระยะเวลาทดลอง 3 ชั่วโมง ตรวจพบสารประกลบฟีนอล 2,4-di-tert-butyl phenol โดยมีพื้นที่ได้กราฟเท่ากับ 7,633,043 เมื่อเวลาในการทดลองผ่านไป 12 ชั่วโมง พื้นที่ได้กราฟมีค่าเพิ่มสูงขึ้นเป็น 7,898,706 ดังภาพที่ 4.20

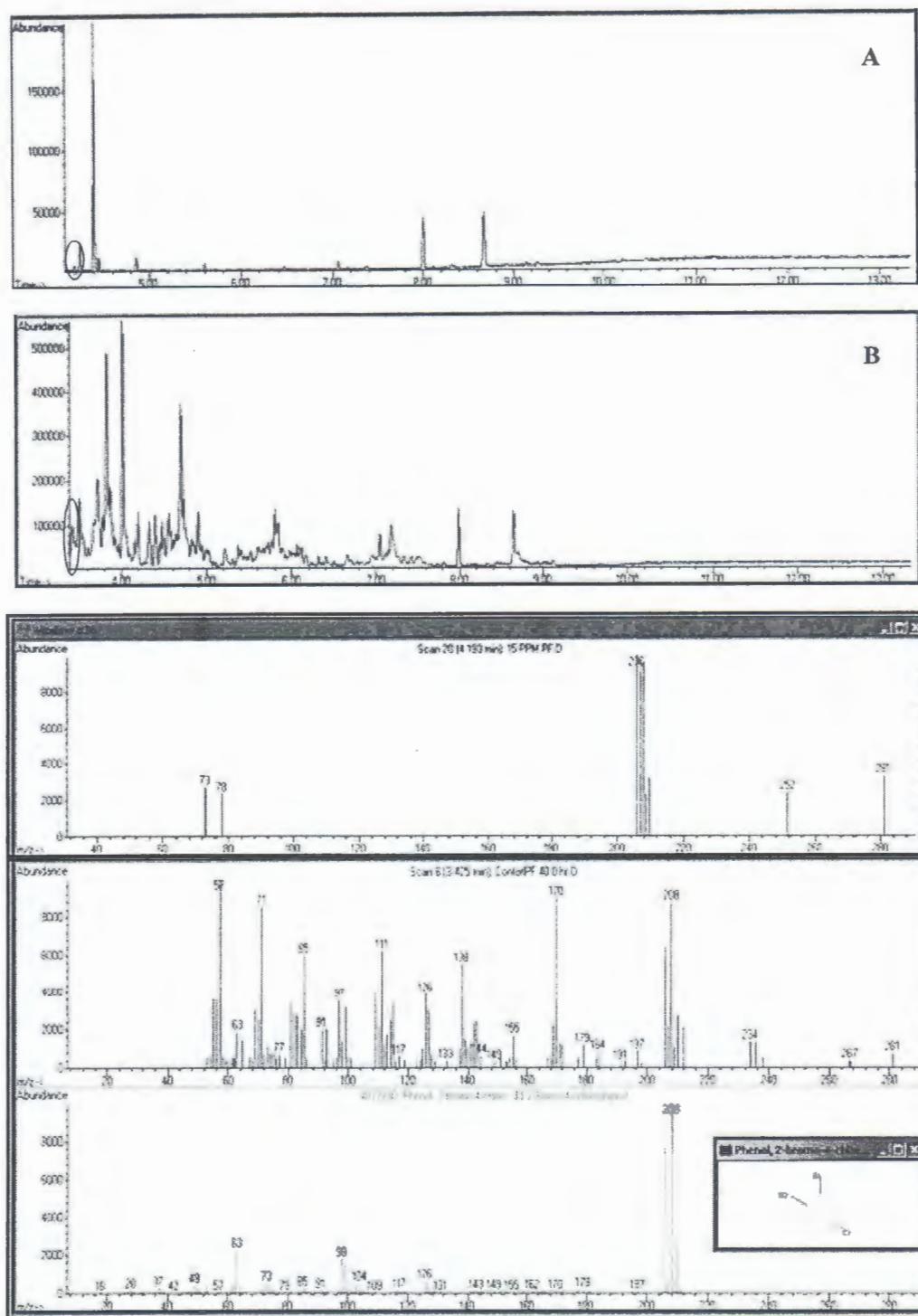
จากผลดังกล่าวแสดงให้เห็นว่ากุ่มจุลินทรีย์ที่ใช้งานวิจัยนี้มีความสามารถย้อมสลายสารโพร์ฟินฟอสทางชีวภาพสูง ให้สารผลิตภัณฑ์ที่มีความเป็นพิษต่ำ (Kegley, S.E., and et al, 2010) ซึ่งวิถีในการย้อมสลายสารดังกล่าวบังไม่สามารถระบุได้ยังชัดเจนแต่สามารถชี้ให้เห็นได้ว่าสารโพร์ฟินฟอสสูญเสียสลายอย่างแน่นอน โดยสารเมตาโนบีโอลท์บานชนิด ได้แก่ 4-bromo-2-chlorophenol (BCP) 3-methoxy phenol และ 2,4-di-tert-butyl phenol รวมทั้งพบว่ากุ่มจุลินทรีย์สามารถย้อมสลาย BCP ได้อีกด้วย แต่อย่างไรก็ตามความมีงานวิจัยที่ชัดเจนในประเด็นดังกล่าวอีก รวมทั้งความมีงานวิจัยต่อเนื่องเพื่อรับรู้วิถีการย้อมสลายอย่างสมบูรณ์ในอนาคต



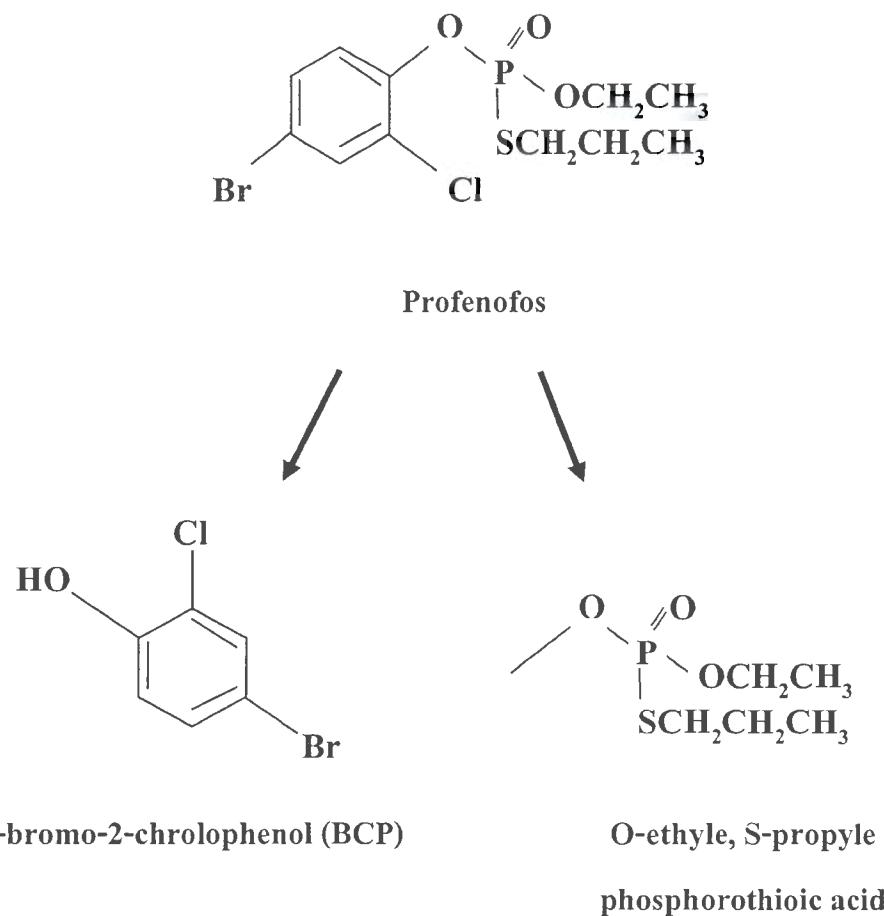
ภาพที่ 4.15 โครงสร้างของสารโพร์ฟินฟอส



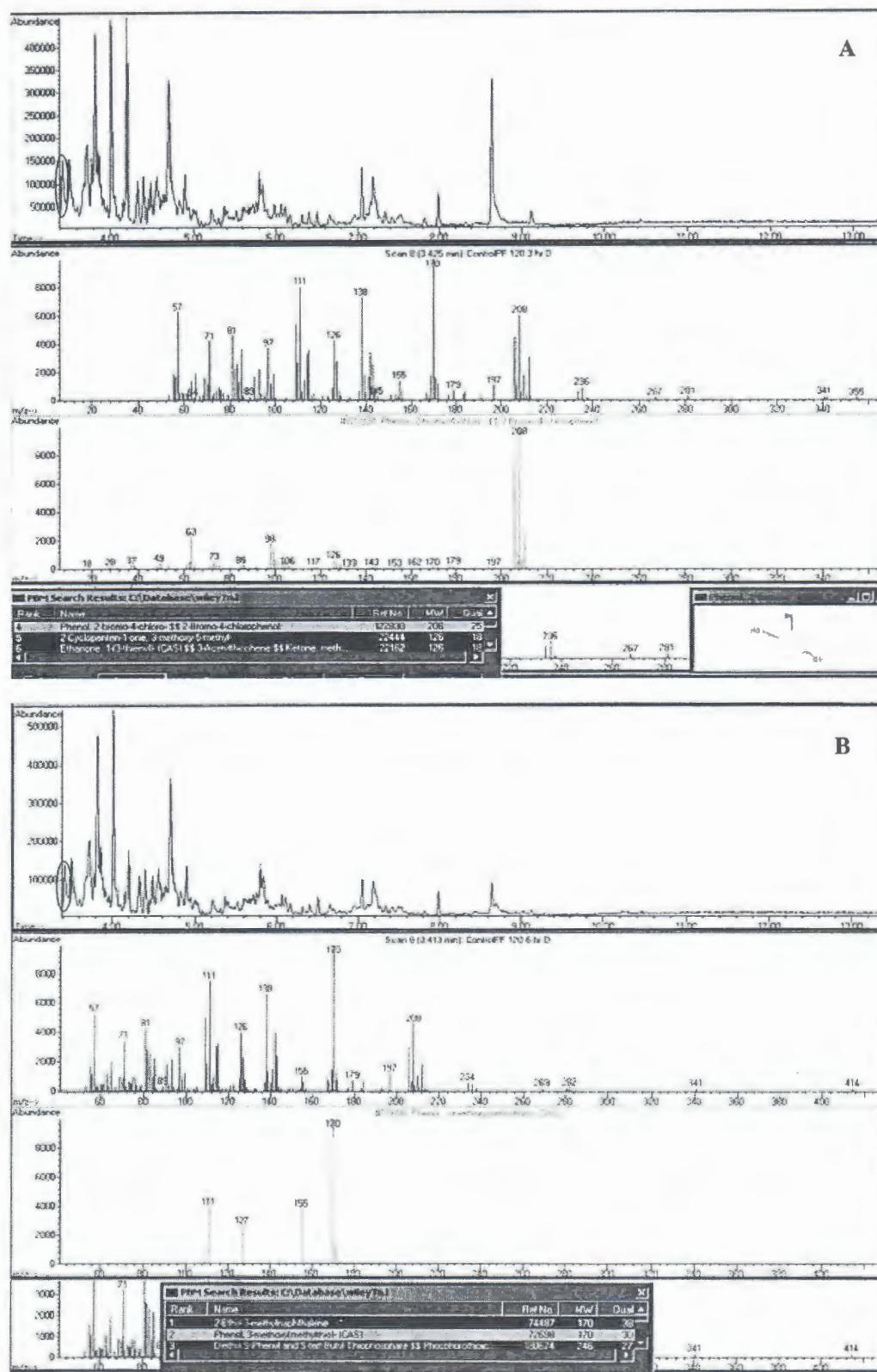
ภาพที่ 4.16 โครงสร้างของสาร 4-bromo-2-chlorophenol (BCP)



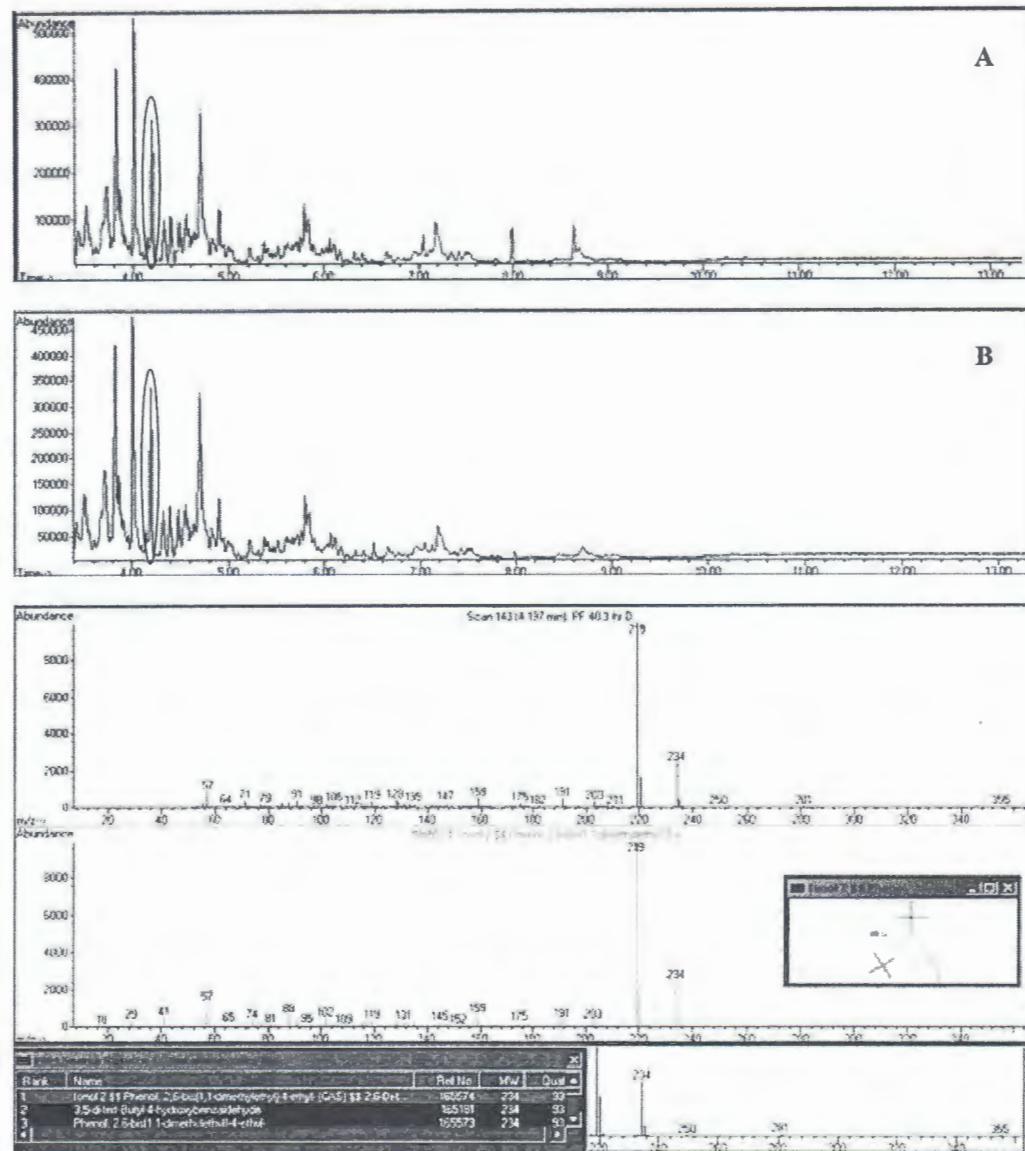
ภาพที่ 4.17 การวิเคราะห์ BCP ในสารโพร์ฟีโนฟอสมาร์กูน 15 มิลลิกรัมต่อลิตร (A) และในชุดการย่อยสลายสารโพร์ฟีโนฟอสความเข้มข้น 40 มิลลิกรัมต่อลิตร (B)



ภาพที่ 4.18 วิถีการย่อยสลายของสาร โปรดีโนฟอส



ภาพที่ 4.19 การวิเคราะห์ BCP ชุดการย่อยสลายสารโพร์ฟิโนฟอสความเข้มข้น 120 มิลลิกรัม ต่อติดิตร เวลาในการทดสอบ 3 hr (A) และเวลาในการทดสอบ 6 hr (B)



ภาพที่ 4.20 การวิเคราะห์สารประกอบฟินอล ในชุดการย่อยสลายสาร โพธิ์ในพ่อส่วนเข้มข้น 40 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่เวลาเริ่มต้น 3 hr (A) ที่เวลา 6 hr (B)

## บทที่ 5

### สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

#### 5.1 สรุปผลการวิจัย

5.1.1 การศึกษาเพื่อบ่งชี้ลักษณะของกลุ่มจุลินทรีย์สามารถแยกจุลินทรีย์บริสุทธิ์ได้ 4 ชนิดคือ PF1 PF2 PF3 และ PF4 ซึ่งมีลักษณะเซลล์และโคลoni ต่าง ๆ กัน แต่เป็นแกรมลบทั้งหมด จุลินทรีย์ที่คัดแยกได้ทั้งหมดสามารถทนต่อสภาพที่มีสาร โพร์ฟิโนฟอสและสามารถย่อยสลายสาร โพร์ฟิโนฟอสได้ โดยมีอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของจุลินทรีย์เท่ากับ  $4.40 \times 10^{-13}$  ต่อวัน และสามารถย่อยสลายสาร โพร์ฟิโนฟอสได้ร้อยละ 90 อัตราการย่อยสลายจำเพาะเท่ากับ  $1.25 \times 10^{-13}$  ถึง  $2.37 \times 10^{-10}$  ในโครงการรัมต่อชีเอฟบูต่อวัน

5.1.2 การย่อยสลายสาร โพร์ฟิโนฟอสเมื่อออยู่ภายในได้สภาวะที่มีสารอาหารร่วม

5.1.2.1 การย่อยสลายสาร โพร์ฟิโนฟอสเมื่อออยู่ภายในได้สภาวะที่มีการเติมกรดซัคซินิก สามารถย่อยสลายได้ที่สุดคือร้อยละ 80 ซึ่งมีอัตราการย่อยสลายจำเพาะ  $1.88 \times 10^{-15}$  ในโครงการรัมต่อชีเอฟบูต่อชั่วโมง และมีอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ 1.715 ต่อชั่วโมง

5.1.2.2 การย่อยสลายสาร โพร์ฟิโนฟอสที่ระดับความเข้มข้นของสาร โพร์ฟิโนฟอส 120 มิลลิกรัมต่อลิตร และมีการเติมกรดซัคซินิกสามารถย่อยสลายสาร โพร์ฟิโนฟอสคือที่สุดคือร้อยละ 90 มีค่าอัตราการย่อยสลายจำเพาะ  $2.61 \times 10^{-13}$  ในโครงการรัมต่อชีเอฟบูต่อชั่วโมง และอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะเท่ากับ 1.304 ต่อชั่วโมง

5.1.3 การศึกษาอัตราการซึมผ่านของน้ำที่ 25 เซนติเมตรต่อวันมีประสิทธิภาพในการย่อยสลายสาร โพร์ฟิโนฟอสสูงที่สุดถึงร้อยละ 90 รองลงมาคืออัตราการซึมผ่านที่ 50 และ 100 เซนติเมตรต่อวัน โดยสามารถย่อยสลายสาร ได้ร้อยละ 80 และร้อยละ 30 ตามลำดับ

5.1.4 วิถีการย่อยสลายสาร โพร์ฟิโนฟอสเบื้องต้น ยังไม่สามารถระบุได้ชัดเจน แต่สามารถชี้ให้เห็นได้ว่าสาร โพร์ฟิโนฟอสถูกย่อยสลายอย่างแน่นอน โดยตรวจพบสารเมตาโนไอล์ บางชนิด ได้แก่ 4-bromo-2-cholorophenol (BCP) 3-methoxy phenol และ 2,4-di-tert-butyl phenol รวมทั้งพบว่ากลุ่มจุลินทรีย์สามารถย่อยสลาย BCP ได้อีกด้วย

## 5.2 ข้อเสนอแนะ

5.2.1 ควรศึกษาเรื่องจุลินทรีย์บริสุทธิ์ที่ผ่านการคัดแยก โดยนำจุลินทรีย์แต่ละชนิดมาบ่มอย

ถ่ายสารโพร์ฟิโนฟอสที่ปัจจัยต่างๆ เช่น ความชื้นขั้น ดูดหกนิ และความเป็นกรดเป็นด่าง เป็นต้น

5.2.2 ควรศึกษาการบ่มอยสารโพร์ฟิโนฟอสในกรณีที่มีสารอาหารร่วมมากกว่า 1 ชนิด

5.2.3 ควรศึกษาโดยนำเข้าที่ผ่านการคัดแยก บ่มอยถ่ายสารพิษชนิดอื่นๆ ในกลุ่ม

เอกสารอ้างอิง

## เอกสารอ้างอิง

- กาญจนา พานแก้ว. การคัดเลือกกลุ่มจุลินทรีย์ขั้นต้นที่สามารถย่อยสลายสารกำจัดแมลงกลุ่ม ออร์แกโนฟอสฟอรัส. การศึกษาวิธีการปรับปรุงคุณภาพกระบวนการผลิตอาหารพืช : มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี, 2552.
- จินتنا ภู่มึงกุญชัย ไชยยันต์บูรณะ และเนาวรัตน์ เอื้ออัจฉราคุล. โครงการวิจัยนิคปริมาณสารพิษ ตกค้างของ profenofos ในพืชเพื่อกำหนดค่าปริมาณสูงสุดของสารพิษตกค้าง (MRL) ครั้งที่ 1-2. สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร : กรมวิชาการเกษตร, 2551.
- นาตามา จันทร์ส่อง. ศึกษาชนิดและปริมาณสารพิษตกค้างในพืช คิน และน้ำไดคินของแปลง เกษตรกรภาคตะวันออกเฉียงเหนือตอนล่างตามโครงการเกษตรเกษตรที่เหมาะสม (GAP : พีช) อุบลราชธานี. กลุ่มพัฒนาการตรวจสอบพืชและปัจจัยการผลิต สำนักวิจัย และพัฒนาการเกษตร เขตที่ 4 : กรมวิชาการเกษตร, 2552.
- ฝ่ายวัตถุนิพิทย์ สำนักควบคุมพืชและวัสดุการเกษตร. ปริมาณการนำเข้าสารกำจัดศัตรูพืช. [http://www.oae.go.th/ewt\\_news.php?nid=146&filename=index](http://www.oae.go.th/ewt_news.php?nid=146&filename=index). ตุลาคม 2553.
- รุ่งภา ทองอรุณ. การสลายสารตามธรรมชาติ การใช้สารเร่งการสลายและการเติมเขื้อจุลินทรีย์เพื่อ สลายสาร 4-คลอโรอะเนลินที่ปนเปื้อนในคิน. วิทยานิพนธ์ปริญญาศาสตร มหาบัณฑิต : จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 2548.
- สำนักงานมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ (มกอช). “ปริมาณสารพิษตกค้าง (MRL) ที่ กำหนดให้มีในอาหารของไทย”, มาตรฐานสินค้าเกษตร 2551. <http://www.acfs.go.th/searchMRL.php>. ตุลาคม, 2553.
- สำนักจัดการคุณภาพน้ำ กรมควบคุมมลพิษ. ระบบบำบัดน้ำเสียแบบแอทเทิลสแลค. [http://www.pcd.go.th/info\\_serv/water\\_wt.html](http://www.pcd.go.th/info_serv/water_wt.html). ตุลาคม, 2553.
- อภิญญา จันทร์วัฒนะ. เทคนิคพื้นฐานทางจุลชีววิทยา. <http://www.agro.kmutnb.ac.th/e-learning/521302/1.php>. ตุลาคม, 2553.
- อลิสา วงศ์. การบำบัดสารมลพิษทางชีวภาพ Bioremediation. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ : สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 2553.
- Benimeli C.S., and et al. “Bioremediation of lindane-contaminated soil by *Streptomyces* sp. M7 and its effect on Zea mays growth”, International Biodeterioration & Biodegradation. 61: 233-239, 2008.

### ເອກສາຣອ້າງອີງ (ຕ່ອ)

- Cyon M., and et al. "Biodegradation of the organophosphorus insecticide diazinon by *Serratia* sp. And *Pseudomonas* sp. And their use in bioremediation of contaminated soil", *Chemosphere*. 76: 494-501, 2009.
- Fantroussi S.E. and Agathos S.N. "Is bioaugmentation a feasible strategy for pollutant removal and site remediation?", *Current Opinion in Microbiology*. 8: 268-275, 2005.
- Grant R.J. and Betts W.B. "Mineral and carbon usage of two synthetic pyrethroid degrading bacterial isolates", *Journal of Applied Microbiology*. 97: 656–662, 2004.
- Head M.A. and Oleszkiewicz J.A.. "Bioaugmentation for nitrification at cold temperatures", *Water Research*. 38: 523-530, 2004.
- Hunter W.J. and Shaner D.L.. "Biological Remediation of Groundwater Containing Both Nitrate and Atrazine", *Current Opinion in Microbiology*. 60: 42-46, 2010.
- Hunter W.J. and Shaner D.L.. "Nitrogen limited biobarriers remove atrazine from contaminated water: Laboratory studies", *Journal of Contaminant Hydrology*. 103: 29-37, 2009.
- Hunter W.J.. "Vadose Zone Microbial Biobarriers Remove Nitrate from Percolating Groundwater", *Current Opinion in Microbiology*. 58: 622-627, 2009.
- Javier F., and et al. "Bioventing remediation and ecotoxicity evaluation of phenanthrene-contaminated soil", *Journal of Hazardous Materials*. 183: 806-813, 2010.
- Kao C.M., and et al. "Application of in situ biosparging to remediate a petroleum-hydrocarbon spill site: Field and microbial evaluation", *Chemosphere*. 70: 1492-1499, 2008.
- Kegley, S.E., and et al. PAN Pesticide Database. <http://www.pesticideinfo.org>. october, 2010.
- Lennox J. and Ashe J.. "Biofilms as Biobarriers", *The American Biology Teacher*. 71: 1, 2009.
- Li Q., and et al. "Isolation and characterization of atrazine-degrading *Arthrobacter* sp. AD26 and use of this strain in bioremediation of contaminated soil", *Jounal of Environmental Sciences*. 20: 1226-1230, 2008.
- Li X., and et al. "Isolation of a chlorpyrifos-degrading bacterium, *Sphingomonas* sp. Strain Dsp-2, and cloning of the *mpd* gene", *Research in Microbiology*. 158: 143-149, 2007.

## ເອກສາຣອ້າງອີງ (ຕ່ອ)

- Lima D., and et al. "Evaluating a bioremediation tool for atrazine contaminated soils in open soil microcosms: The effectiveness of bioaugmentation and biostimulation approaches", *Chemosphere*. 74: 187-192, 2009.
- Malghani S., and et al. "Isolation and characterization of a profenofos degrading bacterium", *Jounal of Envionmental Sciences*. 21: 1591-1597, 2009.
- Mansfield G. R. "Agricultural and horticultural end-use possibilities abound for woven, nonwoven and knitted fabrics", *Nonwovens/Technical*, [http://www.textileworld.com/Articles/2005/September/Nonwovens\\_Technical/Agrotextiles\\_A\\_Growing\\_Field.html](http://www.textileworld.com/Articles/2005/September/Nonwovens_Technical/Agrotextiles_A_Growing_Field.html). october, 2011.
- Osman K.A., and et al. "Bioremediation of oxamyl in sandy soil using animal manures", *International Biodeterioration and Biodegradation*. 63: 341-346, 2009.
- Park D., and et al. "Bioaugmentation of cyanide-degrading microorganisms in a full-scale cokes wastewater treatment facility", *Bioresource Technology*. 99: 2092-2096, 2008.
- Patterson B."Pollution Beating Bugs", *Land and Water Link*, <http://www.clw.csiro.au/publications/clw-link/clwlink-15/page10.html>. october, 2011.
- Saponaro S., and et al. "Groundwater remediation by an in situ biobarrier: A bench scale feasibility test for methyl tert-butyl ether and other gasoline compounds", *Journal of Hazardous Materials*. 167: 545-552, 2009.
- Seo Y., and et al. "The application of a mulch biofilm barrier for surfactant enhanced polycyclic aromatic hydrocarbon bioremediation", *Environmental Pollution*. 157: 95-101, 2009.
- Siripattanakul S., and et al. "Atrazine degradation by stable mixed cultures enriched from agricultural soil and their characterization", *Journal of Applied Microbiology*. 106: 986-992, 2009.
- Siripattanakul S., and et al. "Atrazine removal in agricultural infiltrate by bioaugmented polyvinyl alcohol immobilized and free *Agrobacterium radiobacter* J14a:A sand colum study", *Chemosphere*. 74: 308-313, 2009.

## ເອກສາຣອ້າງອີງ (ຕ່ອ)

- Siripattanakul S., and et al. "A feasibility study of immobilized and free mixed culture bioaugmentation for treating atrazine in infiltrate", Journal of Hazardous Materials. 168: 1373–1379, 2009.
- US EPA. Finalization of Interim Reregistration Eligibility Decisions (IREDs): Profenofos. [http://www.epa.gov/opprrd1/REDs/2540\\_ired.pdf](http://www.epa.gov/opprrd1/REDs/2540_ired.pdf). october, 2010.
- Venkateswara R.J. and et al. "Toxic effects of profenofos on tissue acetylcholinesterase and gill morphology in a euryhaline fish, *Oreochromis mossambicus*", Archives of Toxicology. 77: 227-232, 2003.
- Wang F., and et al. "Isolation and characterization of 1,2,4-Trichlorobenzene mineralizing *Bordetella* sp. And its bioremediation potential in soil", Chemosphere. 67: 896-902, 2007.
- WHO. Report of the Joint Meeting of the FAO Panel of Experts on Pesticide Residues in Food and the Environment and the WHO Core Assessment Group on Pesticide Residues. <http://www.who.int/foodsafety/chem/jmpr/publications/reports/en/index.html>. october, 2010.
- WHO. The WHO recommended classification of pesticides by hazard and guidelines to classification. [www.inchem.org/documents/pds/pdsother/class\\_2009.pdf](http://www.inchem.org/documents/pds/pdsother/class_2009.pdf). october, 2010.
- Xie S.. and et al. "Biodegradation of malathion by *Acinetobacter johnsonii* MA19 and optimization of cometabolism substrate", Journal of Environmental Sciences. 21: 76-82, 2009.
- Yeh C.-H., and et al. "A permeable reactive barrier for the bioremediation of BTEX-contaminated groundwater; Microbial community distribution and removal efficiencies", Journal of Hazardous Materials. 178: 74-80, 2010.
- Zamy C., and et al. "Phototransformation of selected organophosphorus pesticides in dilute aqueous solutions", Water Research. 38: 2305–2314, 2004.

เอกสารอ้างอิง

## เอกสารอ้างอิง

- กาญจนา พานแก้ว. การคัดเลือกกลุ่มจุลินทรีย์ขั้นต้นที่สามารถย่อยสลายสารกำจัดแมลงกลุ่ม ออร์แกโนฟอสฟอรัส. การศึกษาวิธีการปรับปรุงคุณภาพกระบวนการผลิตยาปฏิชีวนะ : มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี, 2552.
- จินتنا ภู่มึงกุญชัย ไชยยันต์บูรณะ และเนาวรัตน์ เอื้ออัจฉราคุล. โครงการวิจัยนิคปริมาณสารพิษ ตกค้างของ profenofos ในพิริกเพื่อกำหนดค่าปริมาณสูงสุดของสารพิษตกค้าง (MRL) ครั้งที่ 1-2. สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร : กรมวิชาการเกษตร, 2551.
- นาตามา จันทร์ส่อง. ศึกษาชนิดและปริมาณสารพิษตกค้างในพิริก คิน และน้ำไดคินของแปลง เกษตรกรภาคตะวันออกเฉียงเหนือตอนล่างตามโครงการเกษตรเกษตรที่เหมาะสม (GAP : พีช) อุบลราชธานี. กลุ่มพัฒนาการตรวจสอบพิชและปัจจัยการผลิต สำนักวิจัย และพัฒนาการเกษตร เขตที่ 4 : กรมวิชาการเกษตร, 2552.
- ฝ่ายวัตถุนิพิษ สำนักควบคุมพิชและวัสดุการเกษตร. ปริมาณการนำเข้าสารกำจัดศัตรูพิช. [http://www.oae.go.th/ewt\\_news.php?nid=146&filename=index](http://www.oae.go.th/ewt_news.php?nid=146&filename=index). ตุลาคม 2553.
- รุ่งภา ทองอรุณ. การสลายสารตามธรรมชาติ การใช้สารเร่งการสลายและการเติมเชื้อจุลินทรีย์เพื่อ สลายสาร 4-คลอโรอะเนลินที่ปนเปื้อนในคิน. วิทยานิพนธ์ปริญญาศาสตร มหาบัณฑิต : จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 2548.
- สำนักงานมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ (มกอช). “ปริมาณสารพิษตกค้าง (MRL) ที่ กำหนดให้มีในอาหารของไทย”, มาตรฐานสินค้าเกษตร 2551. <http://www.acfs.go.th/searchMRL.php>. ตุลาคม, 2553.
- สำนักจัดการคุณภาพน้ำ กรมควบคุมมลพิษ. ระบบบำบัดน้ำเสียแบบแอทเทิลสแลค. [http://www.pcd.go.th/info\\_serv/water\\_wt.html](http://www.pcd.go.th/info_serv/water_wt.html). ตุลาคม, 2553.
- อภิญญา จันทร์วัฒนะ. เทคนิคพื้นฐานทางจุลชีววิทยา. <http://www.agro.kmutnb.ac.th/e-learning/521302/1.php>. ตุลาคม, 2553.
- อลิสา วงศ์ใน. การบำบัดสารมลพิษทางชีวภาพ Bioremediation. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ : สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 2553.
- Benimeli C.S., and et al. “Bioremediation of lindane-contaminated soil by *Streptomyces* sp. M7 and its effect on Zea mays growth”, International Biodeterioration & Biodegradation. 61: 233-239, 2008.

## ເອກສາຣອ້າງອີງ (ຕ່ອ)

- Cyon M., and et al. "Biodegradation of the organophosphorus insecticide diazinon by *Serratia* sp. And *Pseudomonas* sp. And their use in bioremediation of contaminated soil", *Chemosphere*. 76: 494-501, 2009.
- Fantroussi S.E. and Agathos S.N. "Is bioaugmentation a feasible strategy for pollutant removal and site remediation?", *Current Opinion in Microbiology*. 8: 268-275, 2005.
- Grant R.J. and Betts W.B. "Mineral and carbon usage of two synthetic pyrethroid degrading bacterial isolates", *Journal of Applied Microbiology*. 97: 656–662, 2004.
- Head M.A. and Oleszkiewicz J.A.. "Bioaugmentation for nitrification at cold temperatures", *Water Research*. 38: 523-530, 2004.
- Hunter W.J. and Shaner D.L.. "Biological Remediation of Groundwater Containing Both Nitrate and Atrazine", *Current Opinion in Microbiology*. 60: 42-46, 2010.
- Hunter W.J. and Shaner D.L.. "Nitrogen limited biobarriers remove atrazine from contaminated water: Laboratory studies", *Journal of Contaminant Hydrology*. 103: 29-37, 2009.
- Hunter W.J.. "Vadose Zone Microbial Biobarriers Remove Nitrate from Percolating Groundwater", *Current Opinion in Microbiology*. 58: 622-627, 2009.
- Javier F., and et al. "Bioventing remediation and ecotoxicity evaluation of phenanthrene-contaminated soil", *Journal of Hazardous Materials*. 183: 806-813, 2010.
- Kao C.M., and et al. "Application of in situ biosparging to remediate a petroleum-hydrocarbon spill site: Field and microbial evaluation", *Chemosphere*. 70: 1492-1499, 2008.
- Kegley, S.E., and et al. PAN Pesticide Database. <http://www.pesticideinfo.org>. october, 2010.
- Lennox J. and Ashe J.. "Biofilms as Biobarriers", *The American Biology Teacher*. 71: 1, 2009.
- Li Q., and et al. "Isolation and characterization of atrazine-degrading *Arthrobacter* sp. AD26 and use of this strain in bioremediation of contaminated soil", *Jounal of Environmental Sciences*. 20: 1226-1230, 2008.
- Li X., and et al. "Isolation of a chlorpyrifos-degrading bacterium, *Sphingomonas* sp. Strain Dsp-2, and cloning of the *mpd* gene", *Research in Microbiology*. 158: 143-149, 2007.

## ເອກສາຣອ້າງອີງ (ຕ່ອ)

- Lima D., and et al. "Evaluating a bioremediation tool for atrazine contaminated soils in open soil microcosms: The effectiveness of bioaugmentation and biostimulation approaches", *Chemosphere*. 74: 187-192, 2009.
- Malghani S., and et al. "Isolation and characterization of a profenofos degrading bacterium", *Jounal of Envionmental Sciences*. 21: 1591-1597, 2009.
- Mansfield G. R. "Agricultural and horticultural end-use possibilities abound for woven, nonwoven and knitted fabrics", *Nonwovens/Technical*, [http://www.textileworld.com/Articles/2005/September/Nonwovens\\_Technical/Agrotextiles\\_A\\_Growing\\_Field.html](http://www.textileworld.com/Articles/2005/September/Nonwovens_Technical/Agrotextiles_A_Growing_Field.html). october, 2011.
- Osman K.A., and et al. "Bioremediation of oxamyl in sandy soil using animal manures", *International Biodeterioration and Biodegradation*. 63: 341-346, 2009.
- Park D., and et al. "Bioaugmentation of cyanide-degrading microorganisms in a full-scale cokes wastewater treatment facility", *Bioresource Technology*. 99: 2092-2096, 2008.
- Patterson B."Pollution Beating Bugs", *Land and Water Link*, <http://www.clw.csiro.au/publications/clw-link/clwlink-15/page10.html>. october, 2011.
- Saponaro S., and et al. "Groundwater remediation by an in situ biobarrier: A bench scale feasibility test for methyl tert-butyl ether and other gasoline compounds", *Journal of Hazardous Materials*. 167: 545-552, 2009.
- Seo Y., and et al. "The application of a mulch biofilm barrier for surfactant enhanced polycyclic aromatic hydrocarbon bioremediation", *Environmental Pollution*. 157: 95-101, 2009.
- Siripattanakul S., and et al. "Atrazine degradation by stable mixed cultures enriched from agricultural soil and their characterization", *Journal of Applied Microbiology*. 106: 986-992, 2009.
- Siripattanakul S., and et al. "Atrazine removal in agricultural infiltrate by bioaugmented polyvinyl alcohol immobilized and free *Agrobacterium radiobacter* J14a:A sand colum study", *Chemosphere*. 74: 308-313, 2009.

## ເອກສາຣອ້າງອີງ (ຕ່ອ)

- Siripattanakul S., and et al. "A feasibility study of immobilized and free mixed culture bioaugmentation for treating atrazine in infiltrate", Journal of Hazardous Materials. 168: 1373–1379, 2009.
- US EPA. Finalization of Interim Reregistration Eligibility Decisions (IREDs): Profenofos. [http://www.epa.gov/opprrd1/REDs/2540\\_ired.pdf](http://www.epa.gov/opprrd1/REDs/2540_ired.pdf). october, 2010.
- Venkateswara R.J. and et al. "Toxic effects of profenofos on tissue acetylcholinesterase and gill morphology in a euryhaline fish, *Oreochromis mossambicus*", Archives of Toxicology. 77: 227-232, 2003.
- Wang F., and et al. "Isolation and characterization of 1,2,4-Trichlorobenzene mineralizing *Bordetella* sp. And its bioremediation potential in soil", Chemosphere. 67: 896-902, 2007.
- WHO. Report of the Joint Meeting of the FAO Panel of Experts on Pesticide Residues in Food and the Environment and the WHO Core Assessment Group on Pesticide Residues. <http://www.who.int/foodsafety/chem/jmpr/publications/reports/en/index.html>. october, 2010.
- WHO. The WHO recommended classification of pesticides by hazard and guidelines to classification. [www.inchem.org/documents/pds/pdsother/class\\_2009.pdf](http://www.inchem.org/documents/pds/pdsother/class_2009.pdf). october, 2010.
- Xie S.. and et al. "Biodegradation of malathion by *Acinetobacter johnsonii* MA19 and optimization of cometabolism substrate", Journal of Environmental Sciences. 21: 76-82, 2009.
- Yeh C.-H., and et al. "A permeable reactive barrier for the bioremediation of BTEX-contaminated groundwater; Microbial community distribution and removal efficiencies", Journal of Hazardous Materials. 178: 74-80, 2010.
- Zamy C., and et al. "Phototransformation of selected organophosphorus pesticides in dilute aqueous solutions", Water Research. 38: 2305–2314, 2004.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก  
การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

## การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

### 1. การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อเอ็นโซลเอ็ม (Minimal Salt Medium, MSM) (กาญจนา พานแก้ว, 2552)

การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อเอ็นโซลเอ็มชนิดเหลวมีรายการสารเคมีและวิธีการเตรียม ดังนี้

#### สารเคมี

1) NaHPO <sub>4</sub> ·12H <sub>2</sub> O	14.678	กรัม
2) KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	3	กรัม
3) NaCl	0.5	กรัม
4) NH <sub>4</sub> Cl	2	กรัม
5) มิลลิกรัม SO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.513	กรัม

#### วิธีการ

ละลายสารเคมีข้างต้นด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์เข้มข้น (Phosphate buffer) 10 mM และปรับปริมาณต่อสุดท้ายให้เป็น 1 ลิตร นำไปจำจัดเชื้อด้วยหม้อนั่งผ่าเชือกความดันไอ ที่อุณหภูมิ 121 °C เป็นระยะเวลา 15 นาที รอให้เย็นจึงเติมสาร โพร์ฟโนฟอสที่ผ่านการฆ่าเชื้อโดยวิธีการกรองผ่านกรองที่มีขนาดครึ่งรุน 0.20 μm

หมายเหตุ : การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อเอ็นโซลเอ็มชนิดแข็งมีวุ้นเป็นส่วนผสม ร้อยละ 1.5 และยีสต์ สกัดร้อยละ 0.1 ใช้สาร โพร์ฟโนฟอสเกรดการค้าผสมในอาหาร 60 มิลลิกรัมต่อลิตร

### 2. การเตรียมอาหารเอ็นแอร์ (Nutrient Agar, NA)

การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อเอ็นเอ็มอยู่กรณีและวิธีการเตรียม ดังนี้

#### สารเคมี

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

#### วิธีการ

ละลายอาหารเลี้ยงเชื้อเอ็นเอ็มน้ำกับน้ำแล้วนำไปจำจัดเชื้อด้วยน้ำกับน้ำแล้วนำไปจำจัดเชื้อด้วยหม้อนั่งผ่าเชือกความดันไอ ที่อุณหภูมิ 121 °C เป็นเวลา 15 นาที

ภาคผนวก ข  
การเพาะเชื้อด้วยเทคนิคการเกลี่ยเชื้อ (Spread plate technique)

## การเพาะเชื้อด้วยเทคนิคการเกลี่ยเชื้อ (Spread plate technique)

### 1. การเพาะเชื้อด้วยเทคนิคการเกลี่ยเชื้อ (Spread plate technique)

การเพาะเชื้อด้วยเทคนิคการเกลี่ยเชื้อ (Spread plate) เป็นวิธีการเพาะเชื้อเพื่อนับจำนวนโคโลนีของจุลินทรีย์ที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ วิธีนี้ผู้คร่าห์จะสามารถสังเกตถักษณะโคโลนีของจุลินทรีย์ได้ง่าย ซึ่งมีรายละเอียด ดังนี้

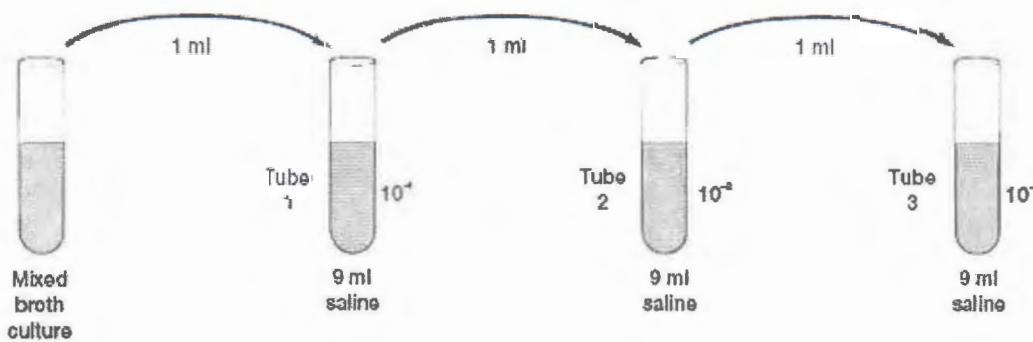
#### 1.1 การเจือจางแบบ 10 serial dilutions

1.1 ปีเปต 1 มิลลิลิตร ชั้สเพนชันของเชื้อตั้งต้นด้วยเทคนิคปลอดเชื้อ มาใส่หลอดที่มีน้ำเจือจางปลอดเชื้อ ปริมาตร 9 มิลลิลิตร เบย่าให้เข้ากัน จะได้เป็นชั้สเพนชันของเชื้อที่ระดับความเจือจาง  $10^{-1}$

1.2 ปีเปตชั้สเพนชันของเชื้อที่ได้ ( $10^{-1}$ ) 1 มิลลิลิตร ใส่หลอดที่มีน้ำเจือจางปลอดเชื้อ ปริมาตร 9 มิลลิลิตร เบย่าให้เข้ากันจะได้เป็นชั้สเพนชันของเชื้อที่ระดับความเจือจาง  $10^{-2}$

1.3 ปีเปตชั้สเพนชันของเชื้อที่ได้ ( $10^{-2}$ ) 1 มิลลิลิตร ใส่หลอดที่มีน้ำเจือจางปลอดเชื้อ ปริมาตร 9 มิลลิลิตร เบย่าให้เข้ากัน จะได้เป็นชั้สเพนชันของเชื้อที่ระดับความเจือจาง  $10^{-3}$   
โดยขั้นตอนการเจือจางตัวอย่างแสดงไว้ในภาพที่ บ.1

#### 1.4 นำไปใช้ต่อในขั้นตอนที่ 2 เรื่องการเพาะเลี้ยงแบบเกลี่ยเชื้อ



ภาพที่ บ.1 ขั้นตอนการทำ Serial dilution (มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าพระนครเหนือ,  
2553)

#### 1.2 การเพาะเชื้อแบบ Spread Plate มีขั้นตอนดังนี้

2.1 ระบุชื่อชุดตัวอย่าง วันที่ทำการทดลองที่ด้านล่างของงานเพาะเชื้อ

2.2 ปีเปตตัวอย่างปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ลงที่ตำแหน่งตรงกลางงานเพาะเชื้อ<sup>2</sup>  
แสดงไว้ในภาพที่ บ.2 (ก)

2.3 จุ่มแท่งแก้วรูปตัวแอล (spreader) ในแอลกอฮอล์เข้มข้นร้อยละ 95 แล้วเอียงแท่งแก้วรูปตัวแอลแบบบีกเกอร์เพื่อแยกแอลกอฮอล์ส่วนเกินออก แสดงไว้ในภาพที่ ข.2 (ข)

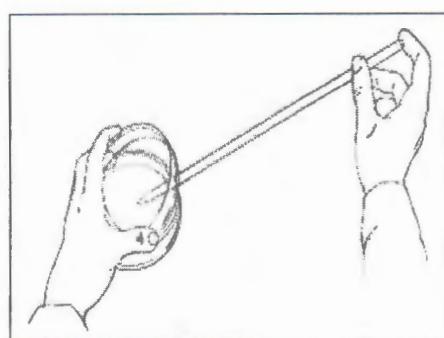
2.4 นำแท่งแก้วเคลือบรูปตัวแอลไปเผาไฟจนแอลกอฮอล์ไหม้หมด และปล่อยให้เย็น แสดงไว้ในภาพที่ ข.2 (ค)

2.5 นำแท่งแก้วเคลือบรูปตัวแอลเคลือบเชือให้ทั่วงานงานเพาะเชื้อและระมัดระวังไม่ให้มือสัมผัสกับขอบด้านในของงานเพาะเชื้อ แสดงไว้ในภาพที่ ข.2 (ง)

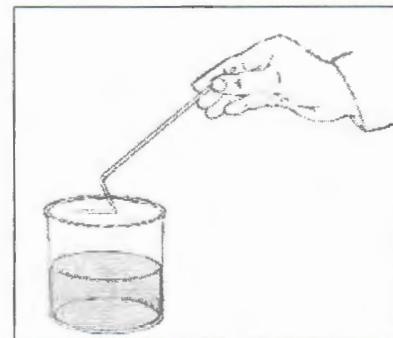
2.6 จุ่มแท่งแก้วเคลือบรูปตัวแอลในแอลกอฮอล์เข้มข้นร้อยละ 95 และกำจัดแอลกอฮอล์ส่วนเกินโดยให้แท่งแก้วแตะขอบบีกเกอร์ นำเผาไฟจนแอลกอฮอล์ไหม้หมด ปล่อยให้เย็นและนำไปเกลี่ยเชือเบนคที่เรียกว่าในงานเพาะเชื้อที่เหลือ ขั้นตอนการเกลี่ยเชือแสดงดังภาพที่ ข.2

2.7 กลับงานเพาะเชื้อให้ด้านที่มีอาหารเพาะเชื้ออยู่ด้านบน แล้วนำไปปั่นในตู้ปั่นเชือความถี่วนอุณหภูมิ

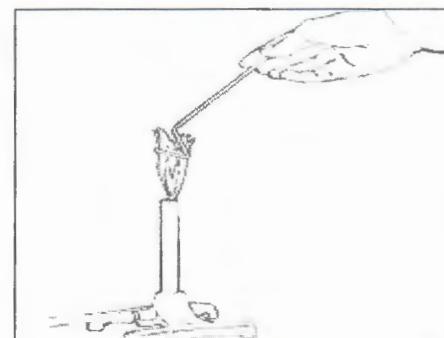
2.8 สังเกตลักษณะของโคโลนีที่ปรากฏและนับจำนวนโคโลนี



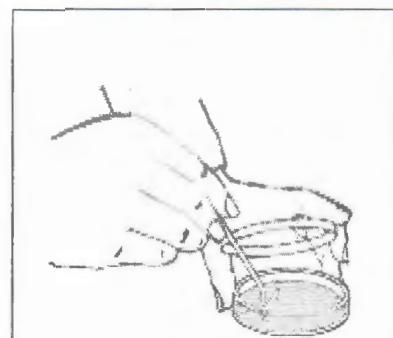
(ก)



(ข)



(ก)



(ง)

ภาพที่ ข.2 ขั้นตอนเพาะเชื้อด้วยเทคนิคการเกลี่ยเชือ (อกิญญา จันทร์วัฒน์, 2553)

### ภาคผนวก ค

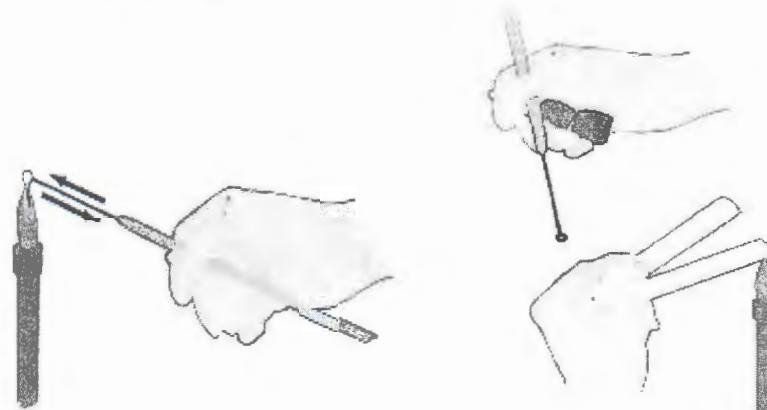
การทำเชื้อให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิคการเขี่ยเชื้อ (Steak plate technique)

## การทำให้เชื้อบริสุทธิ์ด้วยเทคนิค Streak plate

### 1. การทำให้เชื้อบริสุทธิ์ด้วยเทคนิค Streak plate

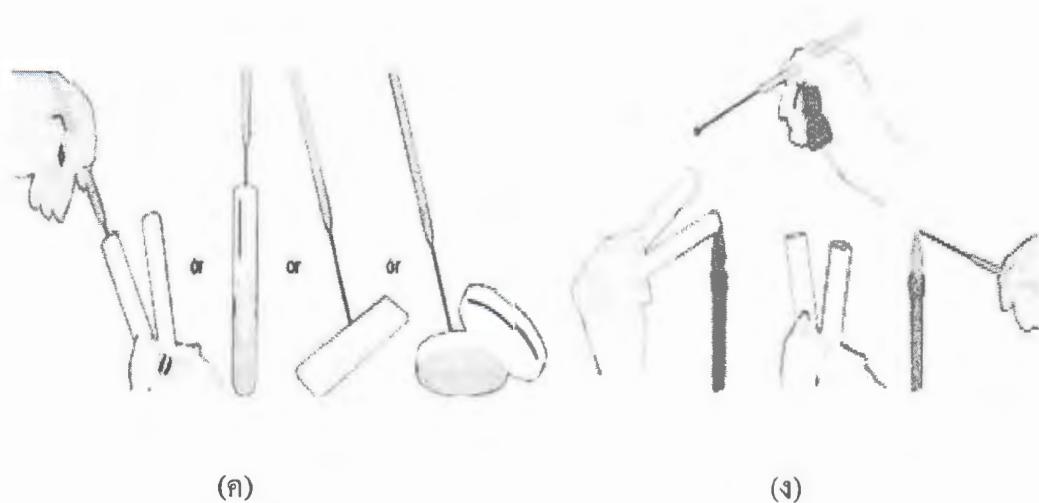
หลักการของการแยกเชื้อให้บริสุทธิ์บนอาหารเลี้ยงเชื้อ (Culture medium) คือ จะต้องแยกเชื้อให้ได้โคลoniเดี่ยวๆ (Single colony) จากนั้นจึงนำเชื้อที่เป็นโคลoniเดี่ยวที่แยกได้ไปศึกษาprü่ร่างลักษณะ และคุณสมบัติต่างๆ เพื่อให้ทราบชนิดเชื้อ โดยมีรายละเอียดดังนี้

1.1 ใช้คุณเจี้ยเชื้อ (Loop) เพื่อเอาเชื้ออออกจากหลอดที่มีเชื้อด้วยเทคนิคปลอดเชื้อ (Aseptic technique) ดังแสดงในภาพที่ ค.1



(ก)

(ข)



(ก)

(ข)

ภาพที่ ค.1 การถ่ายเชื้อด้วยเทคนิคปลอดเชื้อ (อภิญญา จันทร์วัฒน์, 2553)

1.2 ทำการเขี่ยเชือที่อยู่ปลายถุงลงบนจานเพาะเชือที่มีอาหารเลี้ยงเชือที่ได้เตรียมไว้แล้ว ด้วยความระมัดระวัง ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้

1.2.1 เปิดฝาจานเพาะเชือให้มีช่องว่างเพียงพอที่จะสอดถุงเข้าไปได้ง่าย ดังแสดงในภาพที่ ค.2 (ก) แล้วสอดถุงที่มีเชือเบคที่เรียบอยู่ทำการ เขี่ยที่พื้นที่หมายเลข 1 โดยในระหว่างการ เจี่ยจะต้องไม่ทำให้ผิวของอาหารแตก

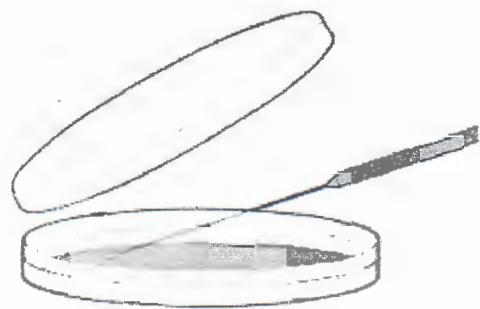
1.2.2 เมื่อเจี่ยที่บริเวณพื้นที่หมายเลข 1 แล้วให้นำถุงออกมาก่อนเชือโดยการณาไฟ จากนั้นทำให้ถุงเย็นลงโดยการแตะที่ขอบของอาหารเลี้ยงเชือใกล้ๆ กับบริเวณหมายเลข 1

1.2.3 หมุนจานเพาะเชือให้อยู่ในตำแหน่งที่เหมาะสมสำหรับการเจี่ยบริเวณพื้นที่ หมายเลข 2 แล้วทำการ เจี่ยไว้โดยจุดเริ่มต้นจะอยู่ที่บริเวณพื้นที่หมายเลข 1 แล้วทำการเจี่ยที่ไปที่ บริเวณพื้นที่หมายเลข 2 ดังภาพที่ ค.2 (ข)

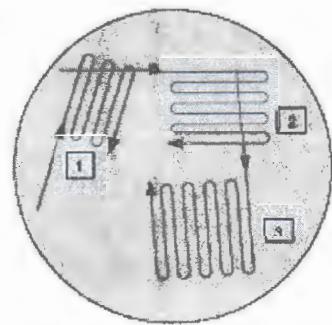
1.2.4 เมื่อ เจี่ย ที่บริเวณพื้นที่หมายเลข 2 แล้วให้นำถุงออกมาก่อนเชือโดยการณาไฟ หลังจากนั้นทำให้ถุงเย็นลงโดยการแตะที่ขอบของอาหารเลี้ยงเชือใกล้ๆ กับบริเวณหมายเลข 2

1.2.5 หมุนจานเพาะเชือให้อยู่ในตำแหน่งที่เหมาะสมสำหรับการเจี่ยบริเวณพื้นที่ หมายเลข 3 แล้วทำการ เจี่ยไว้โดยจุดเริ่มต้นจะอยู่ที่บริเวณพื้นที่หมายเลข 2 แล้วทำการเจี่ยที่ไปที่ บริเวณพื้นที่หมายเลข 3 ดังภาพที่ ค.2 (ข) ถ้าหากจำเป็นสามารถทำการเจี่ยที่บริเวณพื้นที่หมายเลข 4 ได้

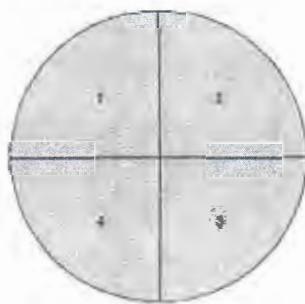
1.2.6 กลับจานเพาะเชือแล้วนำไปบ่มในถุงมีเชือควบคุมอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง แล้วสังเกตการณ์เจริญของเชือ



(ก)



(ง)



(ค)



(จ)

ภาพที่ ค.2 ขั้นตอนการแยกเชื้อบริสุทธิ์ด้วยเทคนิคเจี้ยบเชือ (Streak plate) (อกกิจญา จันทร์วัฒน์,  
2553)

ภาคผนวก ง  
การคำนวณจำนวนชุดลินทรีย์

## การคำนวณจำนวนจุลินทรี

### การคำนวณจำนวนจุลินทรี

ตรวจนับจำนวนเชื้อจุลินทรีทั้งหมด โดยใช้เครื่องนับจำนวนโคลนี (Manual Colony Counter) และนำมาคำนวณจำนวนจุลินทรี ในหน่วย ซีเอฟยูต่อมิลลิลิตร (colony forming units/ml) (APA, 2010) ดังสมการที่ 1

$$\frac{x}{0.1} \times \text{ระดับความเจือจาง} \quad \text{สมการที่ (1)}$$

เมื่อ  $x$  คือ จำนวนโคลนีเฉลี่ย

ภาคผนวก จ  
การย้อมสีแกรม

## การย้อมสีแกรม

การย้อมสีแกรมจะต้องประกอบด้วยขั้นตอนการเตรียมสไลด์ตัวอย่างและขั้นตอนการย้อมสีแกรม (เว็บไซต์สำหรับเทคนิคการแพทย์, 2553) ซึ่งมีรายละเอียดดังต่อไปนี้

### 1. การเตรียมสไลด์ก่อนการย้อมสี มีขั้นตอนดังนี้

1) เตรียมอุปกรณ์ต่างๆ ดังนี้ หลอดเก็บเชื้อที่จะทำการศึกษา แผ่นสไลด์ ห่วงเขี่ยเชื้อ ตะเกียงแอลกอฮอล์ และปากกาเขียนแผ่นใส

2) ใช้ปากกาเขียนแผ่นใสเขียนวงกลมบนสไลด์ เพื่อกำหนดขอบเขตที่จะนำเข้ามาป้ายลงบนสไลด์ งานนั้นกลับแผ่นสไลด์ที่จัดไว้ด้วยปากกาให้อยู่ด้านล่าง

3) เมาห่วงเขี่ยเชื้อด้วยตะเกียงจนร้อนแดง เพื่อฆ่าเชื้อจากนั้นรอให้เย็น ประมาณ 10 วินาที ระวังอย่าให้ปลายห่วงเขี่ยเชื้อกระทบกับสิ่งอื่นรอบๆ

4) ใช้มือช้ำยถือหลอดเชื้อตัวอย่าง ใช้มือขวาดึงสำลีออกจากหลอดเก็บเชื้อโดยระวังไม่ให้มือสัมผัสกับปากหลอดด้านใน เผาบริเวณรอบปากหลอดและรีบปิดสำลีลงในหลอดตามเดิม

5) นำห่วงเขี่ยที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว เขี่ยเชื้อออกจากหลอดเก็บเชื้อ แล้วเผาปากหลอดและรีบปิดสำลีลงในหลอดตามเดิม

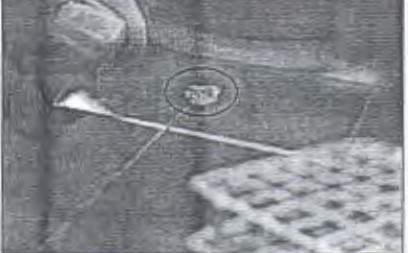
6) เกลี่ยเชื้อ (Smear) \*\* ลงบนสไลด์ในวงกลมที่เขียนไว้ ถ้าเชื้อมีความหนาแน่นสูงให้เดินน้ำกกลั่นปลอดเชื้อเพิ่มอีก 1 หยด และเกลี่ยเชื้อให้กระจายมากที่สุด

7) เมาห่วงเขี่ยจนร้อนแดง เพื่อกำไว้ใช้ในครั้งต่อไป  
นำสไลด์ไปผ่านแปลไฟ 2-3 ครั้ง เพื่อเป็นการทำให้เชื้อติดแน่นกับแผ่นสไลด์ ป้องกันไม่ให้เชื้อหลุดจากแผ่นสไลด์ในระหว่างขั้นตอนการย้อม วิธีนี้เรียกว่า Heat fixed การทำเช่นนี้ทำให้เกิดการตกละลาย (Coagulation) ของโปรตีนทำให้เซลล์ติดแผ่นสไลด์ การเตรียมสไลด์ก่อนย้อมสีมีลักษณะดังภาพที่ จ.1

\*\* การทำเกลี่ยมี 2 วิธี คือ

1. ถ้าแบบที่เรียกเลี้ยงอยู่ในอาหารเหลว ให้ใช้ห่วงเขี่ยเชื้อ (loop) ที่ฆ่าเชื้อแล้ว (โดยการนำไปเผาไฟจนร้อนแดงแล้วปล่อยให้เย็น) จุ่มลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ แล้วยกห่วงเขี่ยเชื้อขึ้นตรงๆ จะเห็นว่ามีแผ่นฟิล์มบางๆ นำไปป้ายลงบนแผ่นสไลด์ที่เตรียมไว้ เกลี่ยเชื้อให้เป็นวงกลมกระจายบนสไลด์

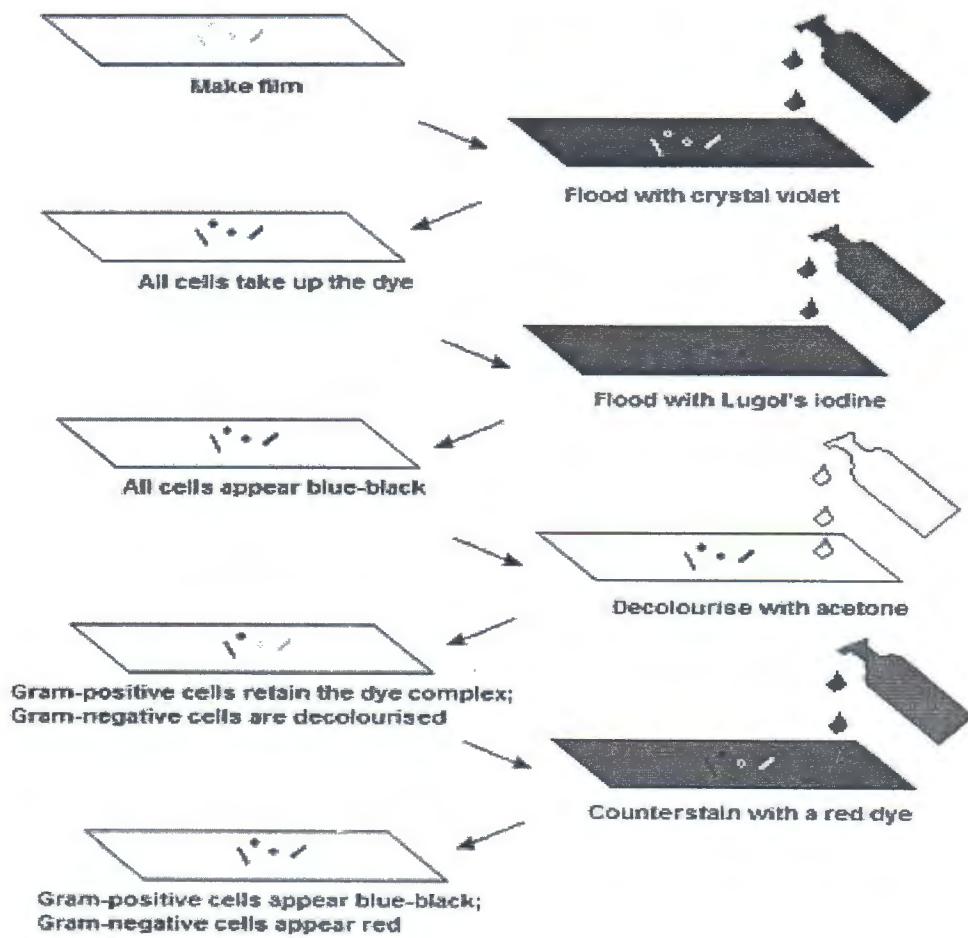
2. ถ้าแบคทีเรียเดี่ยงอยู่ในอาหารแข็ง (agar) ให้หยดน้ำกลั่นปราศจากเชื้อลงบนสไลด์ 1 หยดเล็กๆ (อาจใช้ห่วงเขี้ยวเชือกตาม 1 ครั้ง) แล้วจึงนำห่วงเขี้ยวที่ม่าเชือไปแตะแบคทีเรียบนอาหารเดี่ยงเชือเพียงเล็กน้อย นำมาป้ายบนหยดน้ำแล้วเกลี่ยเชือให้เป็นแผ่นกระจายเป็นวงกลมบนสไลด์ ทึ่งให้แห้ง รอยเกลี่ยที่ดีจะต้องบางมีเชือแผ่นกระจายสม่ำเสมอ

 1. เพาห่วงเขี้ยวเพื่อม่าเชือ	 2. เพาปากหลอดทดลองเพื่อม่าเชือ แล้วจุ่มห่วงเขี้ยวลงในหลอด จากนั้นเพาปากหลอดอีกครั้ง
 3. เกลี่ยเชือลงภายในวงกลมที่วัดไว้	 4. เพาห่วงเขี้ยวเพื่อม่าเชืออีกครั้ง

ภาพที่ จ.1 การเตรียมสไลด์ตัวอย่างก่อนการข้อมูลสีแกรน

**2. การย้อมสีแกรม (Gram's differential staining) มีขั้นตอนดังนี้**

- 1) นำสไลด์ตัวอย่างวางลงบนตะแกรงสำหรับย้อมสี โดยค้านที่ Smear อยู่ด้านบนหยดสี Crystal Violet ลงบนสไลด์ให้ทั่ว จับเวลา 1 นาที
- 2) ล้างสีออกจากสไลด์ด้วยน้ำกลิ้นหรือเปิดให้น้ำไหลผ่านสไลด์เบาๆ หรือใช้น้ำจากขวดฉีดล้างก็ได้ ห้ามเทสีออกก่อนใช้น้ำล้าง เพราะ Crystal Violet จะตกตะกอนและแห้งบนสไลด์อย่างรวดเร็ว
- 3) ขับน้ำที่ล้างออกจากสไลด์เบาๆ จากนั้นหยด Gram's iodine ลงบนสไลด์จนทั่วทั้งไวรบันสไลด์เป็นเวลา 1 นาที Gram's iodine จะทำให้ติดกับเซลล์ได้ดีขึ้น โดยจะไปลดการละลายของสีออกจากผนังเซลล์
- 4) ล้างออกด้วยน้ำเช่นเดียวกับข้อ 2)
- 5) ล้างสีออกจากแผ่นสไลด์โดยหยด 95% เอทิลแอลกอฮอล์ผ่านสไลด์ โดยถือสไลด์ด้วยปากคีบให้สไลด์เอียงเป็นมุมล้างจนสีไม่ถูกล้างออกมาอีก ในขั้นนี้สีที่ย้อมแกรมลบจะถูกชะล้างออกจากเซลล์ส่วนในกรณีของแกรมบวกสีจะยังติดกับผนังเซลล์อยู่ และไม่ถูกล้างออกด้วยแอลกอฮอล์ (ขั้นตอนนี้ใช้เวลาไม่เกิน 10 วินาที)
- 6) ล้างออกด้วยน้ำอีกครั้งด้วยสีที่สอง Safranin (Counter stain) ใช้เวลาในการข้อม 1 นาที
- 7) ล้างสีออกด้วยน้ำตามวิธีในข้อ 2)
- 8) ทิ้งสไลด์ให้แห้งโดยผึ่งไว้ให้แห้งเอง หรือใช้กระดาษซับเบาๆ สไลด์ควรจะแห้งสนิทก่อนการนำไปดูด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบแสง แสดงขั้นตอนการข้อมสีแกรมดังภาพที่ จ.2



ภาพที่ จ.2 ขั้นตอนการย้อมสีแกรม (Heritage, 2010)

ภาคผนวก ฉ  
วิธีการวิเคราะห์สารออร์แกนโนฟอสฟอรัส

## วิธีการวิเคราะห์สารออร์แกนโนฟอสฟอรัส

### 1. วิธีการวิเคราะห์สารกำจัดแมลงออร์แกนโนฟอสฟอรัส

วิธีการวิเคราะห์สารกำจัดแมลงออร์แกนโนฟอสฟอรัสอ้างอิงจาก QuEChERS (รายละเอียดดังในข้อ 2.) แต่มีการพัฒนาให้เหมาะสมกับตัวอย่างและเครื่องมือโดยมีรายละเอียดดังนี้

#### 1.1 วิธีวิเคราะห์

##### 1.1.1 การเก็บและรักษาตัวอย่าง

เก็บตัวอย่างด้วยอุปกรณ์ที่กันแสง ควรเก็บรักษาตัวอย่างโดยการแช่เย็นที่อุณหภูมิ  $4^{\circ}\text{C}$  เก็บในที่มืด

##### 1.1.2 การเตรียมตัวอย่าง

ตวงน้ำตัวอย่างปริมาตร  $10 \text{ ml}$  เติมสารละลายนะซิโตไนไตรเลส(acetonitrile) ผสมกรดอะซิติก (acetic acid) ร้อยละ  $0.1 - 10 \text{ ml}$  ลงในตัวอย่างข้างต้นแล้วทำการเบย่าให้เข้ากัน จากนั้นเติมสารโซเดียมคลอไรด์  $1 \text{ g}$  แมgnีเซียมซัลเฟต-7-ไฮเดรต  $4 \text{ g}$  เบย่าให้เข้ากัน นำไปปั่นให้วิ่งที่ความเร็ว  $5,000 \text{ rpm}$  เป็นเวลา  $5 \text{ นาที}$  เก็บตัวอย่างที่ผ่านการสกัด  $1 \text{ ml}$  เติมสารคุดซับของแข็ง SPE เบย่าให้เข้ากันจากนั้นปั่นให้วิ่งที่ความเร็ว  $13,000 \text{ rpm}$  เก็บตัวอย่าง  $0.5 \text{ ml}$  นำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่องแก๊สโคมากอตกราฟ (Gas Chromatography-Mass spectrometry, GCMS) วิธีการสกัดเป็นไปตามวิธี QuEChERS ประสิทธิภาพการสกัดร้อยละ 80

##### 1.1.3 การวิเคราะห์ตัวอย่าง

วิเคราะห์ด้วยเครื่องจีซีซีมิส์อุปกรณ์ตรวจจับแบบแมสซีเล็กทิฟ (mass selective detector) (รุ่น 6890N, Agilent Technologies, สหรัฐอเมริกา) โดยเครื่องจีซีที่ใช้มีคอลัมน์โคมากอตกราฟชนิด DB-5 ขนาด  $30 \text{ m} \times 0.25 \text{ mm}$  และความหนาแผ่นฟิล์ม (film thickness)  $0.25 \mu\text{m}$

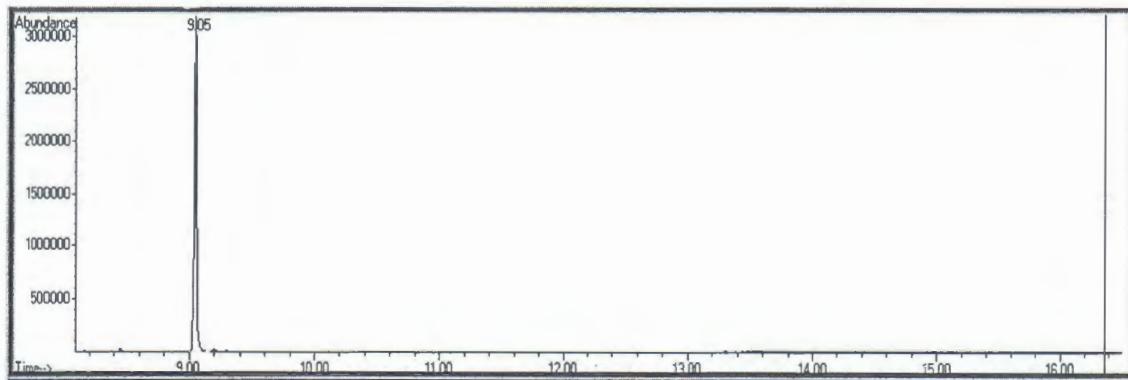
ระบบฉีดตัวอย่างแบบสปลิลเลส (splitless mode) ตั้งค่าอุณหภูมิระบบฉีดตัวอย่าง (injection temperature) ที่  $250$  องศาเซลเซียส ปริมาตรตัวอย่างที่ฉีดแต่ละครั้ง (injection volume) เท่ากับ  $1.0 \text{ } \mu\text{l}$  ในโครลิตร ตั้งค่าอุณหภูมิที่เตาอบ (oven temperature) เริ่มต้นที่  $90$  องศาเซลเซียส อัตราการเพิ่มขึ้นของอุณหภูมิเป็นดังโปรแกรมอุณหภูมิที่เพิ่มขึ้น (temperature gradient program) ที่แสดงในตารางที่ ฉบับ 1 การวิเคราะห์ใช้แก๊สไฮเดรนเป็นแก๊สนำพา (carrier gas) ปรับอัตราการไหลที่  $2.0 \text{ } \mu\text{l}/\text{min}$  โครลิตรต่อนาที สารออกที่  $9.07 \text{ min}$

**ตาราง ฉ.1 โปรแกรมอุณหภูมิที่ใช้เคราะห์สารออร์แกนในฟอสฟอรัส**

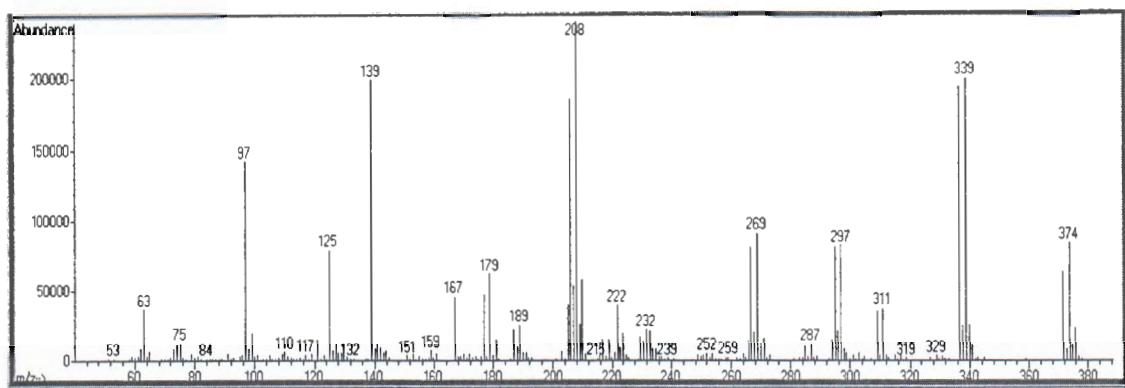
ลำดับที่	ขั้นตอน	อัตราการเพิ่มน้ำหนักของ อุณหภูมิ ( $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ )	อุณหภูมิสุดท้าย ( $^{\circ}\text{C}$ )	ระยะเวลา (Hold) (min)
1	เริ่มต้น	-	90	0.00
2	การเพิ่มครั้งที่ 1	20	220	1.00
3	การเพิ่มครั้งที่ 2	10	280	3.00
4	หลังการเพิ่ม	-	300	3.50
รวม				20

**1.1.4 โคลร์มาโตแกรมสารมาตรฐานกุ่มออร์แกนในฟอสฟอรัส**

ผลจากการวิเคราะห์สารมาตรฐานสามารถแสดงในรูปแบบโคลร์มาโตแกรมของสาร โพธิ์ในฟอสดังภาพ ฉ.2 จะพบว่าสาร โพธิ์ในฟอสปรากฏ เวลา 9.05 นาที และผลไอก้อนแมส ของสาร โพธิ์ในฟอสดังภาพที่ ฉ.2



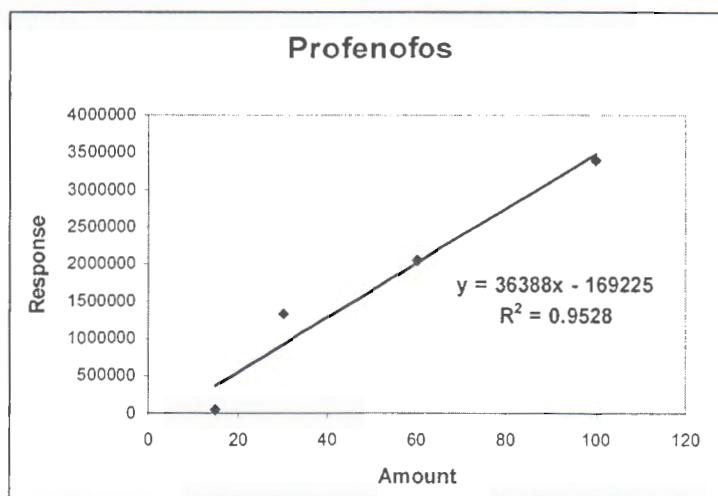
**ภาพที่ ฉ.1 ลักษณะโคลร์มาโตแกรมของสาร โพธิ์ในฟอส**



ภาพที่ ฉ.2 ไออ่อนแมสของสาร โพร์ฟีโนฟอส

## 1.2 การทำกราฟมาตรฐาน

เตรียมสารละลายน้ำมาตรฐานที่มีส่วนผสมของสารกำจัดแมลงที่เราต้องการวิเคราะห์ดังนี้ในงานวิจัยนี้ใช้สาร โพร์ฟีโนฟอสมาตรฐาน (ของบริษัท Restek Catalog 560935 ความเข้มข้น 100 µg/mL ละลายใน Ethyl Acetate) การเตรียมชุดความเข้มข้นของสารละลายน้ำมาตรฐานกระทำโดยการนำสาร โพร์ฟีโนฟอสมาตรฐานละลายในอะซิโตในไตรล์จำนวน 4 ความเข้มข้น นำไปวิเคราะห์ปริมาณความเข้มข้นสารด้วยเครื่อง GC-MS และนำผลการวิเคราะห์มาสร้างกราฟมาตรฐานความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสาร โพร์ฟีโนฟอสและพื้นที่ได้กราฟ จะได้กราฟมาตรฐานของสาร โพร์ฟีโนฟอสลักษณะดังภาพที่ ฉ.3



ภาพที่ ฉ.3 ลักษณะกราฟมาตรฐานสาร โพร์ฟีโนฟอส

### 1.3 การควบคุมคุณภาพในขั้นตอนการตรวจวิเคราะห์

การควบคุมคุณภาพในขั้นตอนการวิเคราะห์สามารถทำได้โดยการวิเคราะห์ตัวอย่าง ในช่วงความเข้มข้นที่อยู่ในช่วงจำกัดการวิเคราะห์ปริมาณ (Limit of Quantitation; LOQ) โดยมีค่าเท่ากับ 2 มิลลิกรัมต่อลิตร สำหรับสารโพร์ฟิโนฟอส โดยในการทำการฟอกมาตรฐานต้องมีค่า  $R^2$  มากกว่า 0.95 นอกจากนี้ยังได้มีการตรวจสอบประสิทธิภาพขั้นตอนการสกัด โดยการเตรียมน้ำตัวอย่างที่มีความเข้มข้นของสารโพร์ฟิโนฟอส 20 ส่วนในล้านส่วน ทำการสกัดตามวิธี QuEChERS จากนั้นนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่องแก๊สโคมากอตกราฟ (Gas Chromatography-Mass spectrometry, GCMS) วัดความเข้มข้นของสารโพร์ฟิโนฟอสได้ 17 - 22 ส่วนในล้านส่วน จากผลดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าขั้นตอนการสกัดมีประสิทธิภาพกว่าร้อยละ 80

### 2. วิธีวิเคราะห์สารกำจัดแมลงออร์แกนโนฟอฟอร์สตามวิธี QuEChERS

วิธีวิเคราะห์สารกำจัดแมลงออร์แกนโนฟอฟอร์สตามวิธี QuEChERS มีวิธีการดังนี้<sup>2</sup>

# 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 MgSO<sub>4</sub> 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 $\mu$ L, 200-1000 $\mu$ 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 "Burkhardt" 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  $\mu$ 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, promochem
- 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. ( $\mu\text{g/mL}$ ) <sup>1</sup>	GC				LC			
				ECD	NPD	MSD	MSD	MS/MS	MS/MS	ESI (+)	ESI (-)
Potential Internal Standards											
PCB 8	5.09	2	50	+++	-	++	+++	-	-	-	-
PCB 19	5.55	3	50	+++	-	++	+++	-	-	-	-
PCB 29	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 (Ncarbazin)	3.76	-	10	-	-	-	-	-	+++	-	-
Potential Quality Control Standards											
PCB 138	5.83	6	50	+++	-	++	+++	-	-	-	-
PCB 153	7.75	6	50	+++	-	++	+++	-	-	-	-
Anthracene (or its d10 analogue)	4.45	-	100	-	-	++	-	-	-	-	-

<sup>1</sup>concentrations 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 recoveries 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 ± 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 µL 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 dispersing 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 µL 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 µL) 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:

- $4\text{ g} \pm 0.2\text{ g}$  Magnesium sulphate anhydrous,
- $1\text{ g} \pm 0.05\text{ g}$  Sodium chloride,
- $1\text{ g} \pm 0.05\text{ g}$  Trisodium citrate dihydrate and
- $0.5\text{ g} \pm 0.03\text{ g}$  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  $\mu\text{L}$  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  $\text{pH} < 3$ ) 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  $\mu\text{L}$ , for raspberry 200  $\mu\text{L}$  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 carotinoids (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 carotinoids. 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 (!) MgSO<sub>4</sub> and GCB (MgSO<sub>4</sub> 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).

## 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, dichlofluanid, 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, thiodicarb) 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.

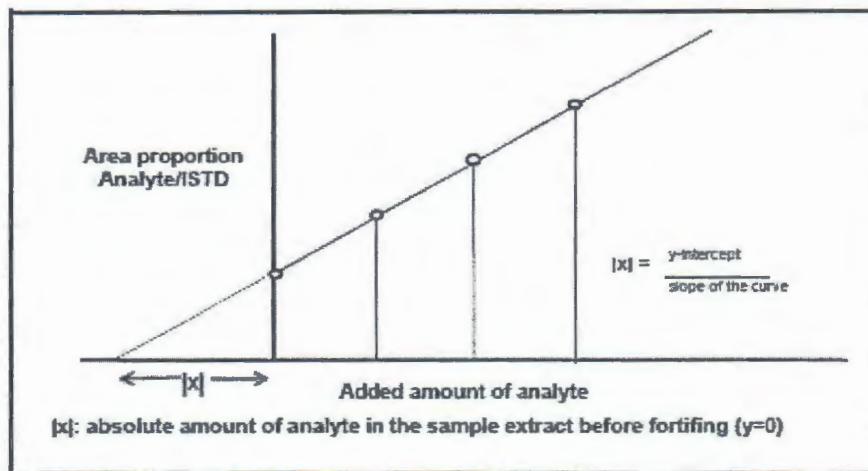


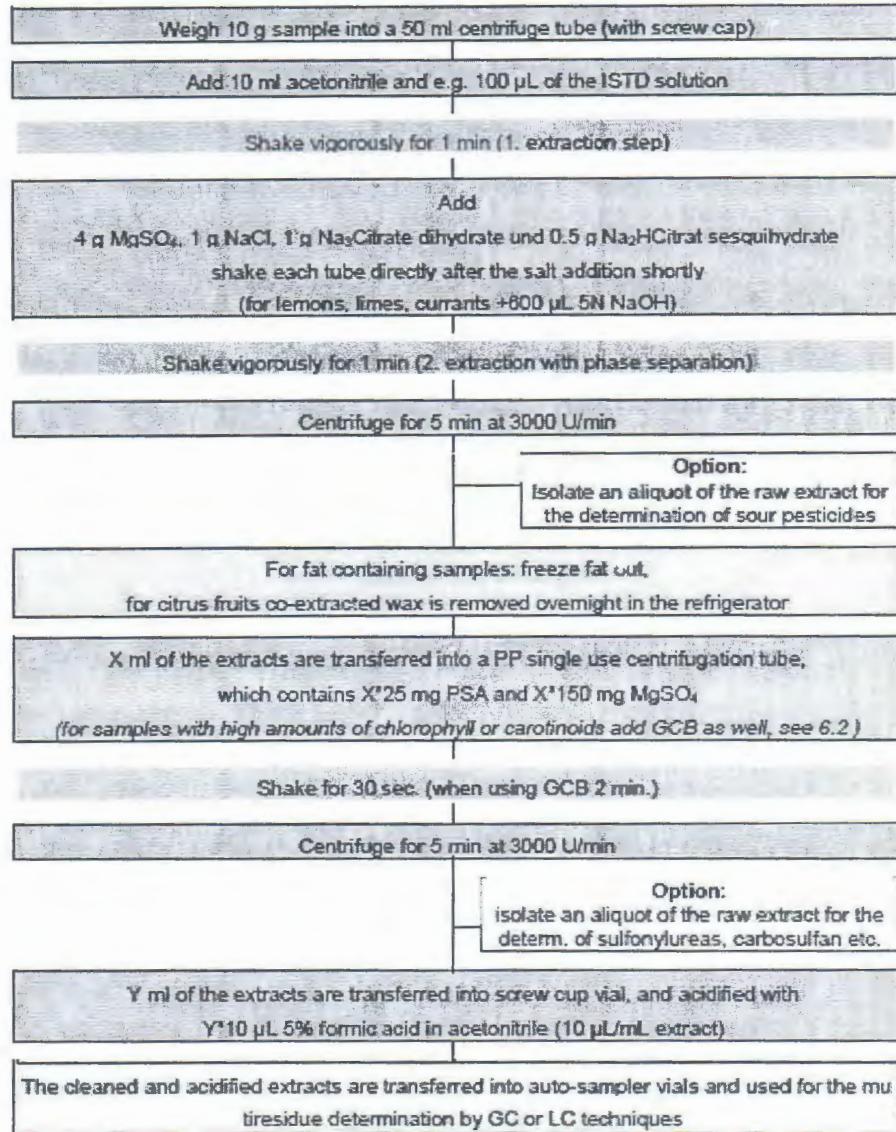
Fig. 1: Internal calibration using the procedure of standard additions, schematically

## 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 ช  
ข้อมูลผลการวิจัย

### ข้อมูลผลการวิจัย

#### 1. ผลการศึกษาการเตือนภัยน้ำท่วมในกรณีการยื่อยสลายสารโพร์ฟิโนฟอส

ตาราง ช.1 ผลการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ที่ผ่านการคัดแยก

ชนิด	จำนวนเซลล์ (เชื้อฟูดูต่อมิลลิลิตร)				
	0 day	1 day	2 day	3 day	4 day
PF1	2E+6	1.8E+10	1E+11	8E+13	1E+14
PF2	6.3E+5	7.2E+10	7.4E+11	1.66E+14	3.5E+16
PF3	2E+4	5.6E+10	2.29E+11	2E+12	8.3E+15
PF4	6.6E+4	4.21E+10	2.88E+11	1E+12	1.3E+15

ตารางที่ ช.2 ผลการยับยั้งสลายสาร โพร์ฟิโนฟอสของจุลินทรีย์ที่ผ่านการคัดแยก

ชนิด	ความเข้มข้นของสารโพร์ฟิโนฟอส (มิลลิกรัมต่อลิตร)				
	0 day	1 day	2 day	3 day	4 day
PF1	20	17.326	4.802	4*	4*
PF2	20	6.312	4*	4*	4*
PF3	20	4*	4*	4*	4*
PF4	20	4*	4*	4*	4*

\* คือ ค่าจำกัดการวิเคราะห์ เท่ากับ 4 มิลลิกรัมต่อลิตร

**2. ผลการศึกษาการย่อยสลายสารโพธิ์โนฟอสภายในตัวสภาวะสารอาหารร่วม**

**ตารางที่ ช.3 ผลการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ภายใต้สภาวะที่มีสารอาหารร่วม ครั้งที่ 1**

เวลา (hr)	จำนวนเซลล์ (เชือฟยูด้อมิลลิลิตร)			
	Control	Glucose	Succinic Acid	Sodium Acetate
0	6E+6	4.4E+6	8.6E+6	4.8E+6
6	4.8E+7	6.2E+7	3E+7	1.4E+7
12	1.2E+13	8E+12	2.14E+14	-
21	8E+14	4E+13	2E+13	5.06E+16
36	4E+14	6.6E+16	2E+15	2E+16
48	4E+15	8E+16	6E+15	4.6E+18

**ตารางที่ ช.4 ผลการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ภายใต้สภาวะที่มีสารอาหารร่วม ครั้งที่ 2**

เวลา (hr)	จำนวนเซลล์ (เชือฟยูด้อมิลลิลิตร)			
	Control	Glucose	Succinic Acid	Sodium Acetate
0	5.8E+6	8.2E+6	7E+6	4.8E+7
6	3.8E+7	5E+7	2.2E+7	1E+7
12	1.4E+13	6E+12	2.1E+14	-
21	4E+14	6E+13	8E+13	3.78E+16
36	8E+14	7.4E+16	4E+15	2.2E+16
48	1.2E+16	8E+16	6E+15	4.6E+18

ตารางที่ ช.5 ผลการย้อมสลายสาร โพร์ฟีโนฟอสกายได้สภาวะที่มีสารอาหารร่วม ครั้งที่ 1

เวลา (hr)	ความเข้มข้นของสาร โพร์ฟีโนฟอส (มิลลิกรัมต่อลิตร)			
	Control	Glucose	Succinic Acid	Sodium Acetate
0	20.00	20.00	20.00	20.00
3	13.06	18.79	17.36	15.97
6	12.42	16.95	17.27	16.14
9	11.98	18.61	16.88	16.91
12	12.14	17.60	15.86	17.79
15	12.87	18.79	15.42	16.93
21	12.65	19.51	13.61	16.35
27	11.55	19.78	16.10	16.79
36	12.40	18.06	14.81	16.01
48	16.17	19.26	15.57	18.65

ตารางที่ ช.6 ผลการย้อมสลายสาร โพร์ฟีโนฟอสกายได้สภาวะที่มีสารอาหารร่วม ครั้งที่ 2

เวลา (hr)	ความเข้มข้นของสาร โพร์ฟีโนฟอส (มิลลิกรัมต่อลิตร)			
	Control	Glucose	Succinic Acid	Sodium Acetate
0	20.00	20.00	20.00	20.00
3	11.25	18.20	16.28	11.10
6	10.36	15.46	16.17	11.49
9	9.76	17.93	15.61	13.19
12	9.99	16.42	14.17	15.12
15	10.98	18.20	13.55	13.25
21	10.68	19.27	11.01	11.95
27	9.17	19.68	14.51	12.92
36	10.34	17.12	12.70	11.20
48	15.50	18.90	13.76	17.03

ตารางที่ ช.7 ผลการวิเคราะห์ค่าซีโอดีในการย้อมสลายสารโพร์ฟิโนฟอสกابใช้สารอาหารร่วม

เวลา (hr)	ค่าซีโอดี (มิลลิกรัมต่อลิตร)			
	Control	Glucose	Succinic Acid	Sodium Acetate
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 ช.8 ผลการย้อมสลายสารโพร์ฟิโนฟอสที่ความเข้มข้นของสารแผลงคาร์บอนต่าง ๆ ครั้งที่ 1

เวลา (hr)	ความเข้มข้นของสารโพร์ฟิโนฟอส (มิลลิกรัมต่อลิตร)			
	Control	Succinic Acid 4 มิลลิกรัม	Succinic Acid 40 มิลลิกรัม	Succinic Acid 400 มิลลิกรัม
0	20.00	20.00	20.00	20.00
3	12.10	16.36	11.17	19.11
6	12.99	19.27	13.15	7.44
9	10.34	12.26	14.37	7.37
12	5.76	8.72	7.90	4.27
15	9.45	10.63	12.25	4.68
21	8.38	13.67	11.63	5.71
27	6.26	13.18	9.75	10.18
36	11.09	13.99	12.50	6.27
48	4.21	8.40	5.89	4.11

ตารางที่ ช.9 ผลการย่อбыสถายสาร โพรฟีโนฟอสที่ความเข้มข้นของสารแหล่งการบอนต่าง ๆ ครั้งที่ 2

เวลา (hr)	ความเข้มข้นของสารโพรฟีโนฟอส (มิลลิกรัมต่อมิลลิตร)			
	Control	Succinic Acid 4 มิลลิกรัม	Succinic Acid 40 มิลลิกรัม	Succinic Acid 400 มิลลิกรัม
0	20.00	20.00	20.00	20.00
3	9.85	14.94	9.04	17.80
6	-	-	10.69	7.10
9	10.22	8.60	12.05	6.12
12	6.26	5.45	5.39	-
15	8.63	7.43	-	4.28
21	8.47	11.05	9.37	4.20
27	5.78	9.43	8.21	-
36	-	10.20	9.31	4.40
48	-	7.17	4.11	-

ตารางที่ ช.10 ผลการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ที่ความเข้มข้นของสารแหล่งการบอนต่าง ๆ

เวลา (hr)	จำนวนเซลล์ (ซีอีพียูต่อมิลลิลิตร)		
	Succinic Acid 4 มิลลิกรัม	Succinic Acid 40 มิลลิกรัม	Succinic Acid 400 มิลลิกรัม
0	9E+5	8.7E+5	8.2E+5
6	5.5E+6	3.2E+6	5>9E+6
12	1.17E+13	3.1E+12	2.6E+12
21	3.53E+15	5.9E+14	1.3E+15
36	2.25E+16	2.2E+16	3.2E+16
48	9E+15	1.3E+16	1.6E+16

3. ผลการศึกษาประสิทธิภาพในการย่อยสลายเมื่ออยู่ภายใต้สภาวะที่มีสาร โพร์ฟีโน่ พอส และแหล่งคาร์บอน ในระดับความเข้มข้นต่าง ๆ

ตารางที่ ช.11 ผลการย่อยสลายสาร โพร์ฟีโน่พอสที่ความเข้มข้นของสาร 40 มิลลิกรัมต่อลิตร

เวลา (hr)	ความเข้มข้นของสาร โพร์ฟีโน่พอส (มิลลิกรัมต่อลิตร)		
	Control	Profenofos ครั้งที่ 1	Profenofos ครั้งที่ 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	-

ตารางที่ ช.12 ผลการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ที่ความเข้มข้นของสาร โพร์ฟีโน่พอส 40 มิลลิกรัมต่อลิตร

เวลา (hr)	จำนวนเซลล์ (เชือฟยูต่อมิลลิลิตร)	
	Control	Profenofos Cell
0	2.55E+6	2.08E+6
6	1.48E+7	2.06E+7
12	1.63E+11	1.5E+10
21	4.8E+13	2E+12
36	3.77E+16	1.81E+13
48	8.7E+14	2.3E+11

ตารางที่ ช.13 ผลการข้อยสลายสาร โพร์ฟีโนฟอสที่ความเข้มข้นของสาร 80 มิลลิกรัมต่อลิตร

เวลา (hr)	ความเข้มข้นของสารโพร์ฟีโนฟอส (มิลลิกรัมต่อลิตร)		
	Control	Profenofos ครั้งที่ 1	Profenofos ครั้งที่ 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

ตารางที่ ช.14 ผลการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ที่ความเข้มข้นของสาร โพร์ฟีโนฟอส 80 มิลลิกรัมต่อลิตร

เวลา (hr)	จำนวนเซลล์ (เชือกต่อมิลลิลิตร)	
	Control	Profenofos Cell
0	2.97E+6	2.47E+6
6	1.53E+7	9.08E+7
12	3.02E+13	1.76E+12
21	1.96E+15	6.3E+14
36	2.06E+14	3.6E+15
48	7.8E+13	4.69E+14

ตารางที่ ช.15 ผลการย่อylextry สาร โพร์ฟีโนฟอสที่ความเข้มข้นของสาร 120 มิลลิกรัมต่อลิตร

เวลา (hr)	ความเข้มข้นของสาร โพร์ฟีโนฟอส (มิลลิกรัมต่อลิตร)		
	Control	Profenofos ครั้งที่ 1	Profenofos ครั้งที่ 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	-

ตารางที่ ช.16 ผลการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ที่ความเข้มข้นของสาร โพร์ฟีโนฟอส 120 มิลลิกรัมต่อลิตร

เวลา (hr)	จำนวนเซลล์	
	Control	Profenofos Cell
0	2.62E+6	3.53E+6
6	9.5E+6	3.64E+7
12	5.4E+10	1.69E+13
21	1.7E+15	1.43E+15
36	6.9E+13	1.41E+14
48	1.44E+15	2.48E+14

4. ผลการสาซิตระบบที่ป้องกันการฟื้นฟูน้ำได้ดีที่สุดที่ป้องกันสารโพร์ฟิโนฟอส

ตารางที่ ช.17 ผลการย้อมสลายสารโพร์ฟิโนฟอสในแบบจำลองคอลัมน์ ความเข้มข้นของสารโพร์ฟิโนฟอสเริ่มต้น 20 มิลลิกรัมต่อลิตร

อัตราการซึมผ่าน (เซนติเมตรต่อวัน)	ปริมาณเซลล์ (ซีเอฟพูด์ต่อ มิลลิลิตร)	ความเข้มข้นของสารโพร์ฟิโนฟอส (มิลลิกรัมต่อลิตร)					
		เข้าระบบ	1 PV	2 PV	3 PV	4 PV	5 PV
25	$10^5$	20	ND	ND	ND	ND	ND
	$10^{15}$	20	ND	ND	ND	ND	ND
50	$10^5$	20	ND	ND	ND	ND	ND
	$10^{15}$	20	ND	ND	ND	ND	ND
100	$10^5$	20	ND	ND	ND	ND	ND
	$10^{15}$	20	ND	ND	ND	ND	ND

ตารางที่ ช.18 ผลการย้อมสลายสารโพร์ฟิโนฟอสในแบบจำลองคอลัมน์ ความเข้มข้นของสารโพร์ฟิโนฟอสเริ่มต้น 40 มิลลิกรัมต่อลิตร ครั้งที่ 1

อัตราการซึมผ่าน (เซนติเมตรต่อวัน)	ปริมาณเซลล์ (ซีเอฟพูด์ต่อ มิลลิลิตร)	ความเข้มข้นของสารโพร์ฟิโนฟอส (มิลลิกรัมต่อลิตร)					
		เข้าระบบ	1 PV	2 PV	3 PV	4 PV	5 PV
25	$10^5$	40	7.41	ND	ND	ND	ND
	$10^{15}$	40	ND	ND	ND	ND	ND
50	$10^5$	40	4.23	13.20	-	5.27	7.55
	$10^{15}$	40	ND	4*	ND	ND	ND
100	$10^5$	40	30.78	29.85	27.70	25.80	31.73
	$10^{15}$	40	ND	ND	ND	ND	ND

ค่าจำกัดการวิเคราะห์ เท่ากับ 4 มิลลิกรัมต่อลิตร

ตารางที่ ช.19 ผลการย้อมสลายสารโพร์ฟิโนฟอสในแบบจำลองคอลัมน์ ความเข้มข้นของสารโพร์ฟิโนฟอสเริ่มต้น 40 มิลลิกรัมต่อลิตร ครั้งที่ 2

อัตราการซึมผ่าน (เขนคิเนตรต่อวัน)	ปริมาณเชลล์ (ชีเอฟ yü ต่อ มิลลิลิตร)	ความเข้มข้นของสารโพร์ฟิโนฟอส (มิลลิกรัมต่อลิตร)					
		ເຫັນະບນ	1 PV	2 PV	3 PV	4 PV	5 PV
25	$10^5$	40	9.60	ND	ND	ND	ND
	$10^{15}$	40	ND	ND	ND	ND	ND
50	$10^5$	40	4.90	ND	-	7.21	8.33
	$10^{15}$	40	ND	ND	ND	ND	ND
100	$10^5$	40	36.47	34.92	21.30	25.27	28.35
	$10^{15}$	40	ND	ND	ND	ND	ND

ค่าจำกัดการวิเคราะห์ เท่ากับ 4 มิลลิกรัมต่อลิตร

ภาคผนวก ช

ผลงานการนำเสนอในการประชุมวิชาการระดับชาติ และนานาชาติ

# การคัดแยกจุลินทรีย์บริสุทธิ์ที่สามารถย่อยสลายสารกำจัดศัตรูพืชโพรฟีโน่ ฟอสจากดินในไร่พริกที่ป่นเปื่อน

## Isolation of Profenofos Pesticide-degrading Pure Cultures from Contaminated Chilli Farm Soil

วราษฎร์ บุญเชติ<sup>1</sup> กาญจนา พานเก้า<sup>2</sup> อลิสา วงศ์ใน<sup>3</sup> และ สุมนา ศิริพัฒนาภูล<sup>2\*</sup>

Warayut Pritchot<sup>1</sup>, Kanjana Pankaew<sup>2</sup>, Alisa Vangnai<sup>3</sup>, and Sumana Siripattanakul<sup>2\*</sup>

'นักศึกษาบัณฑิตศึกษา หลักสูตรวิศวกรรมสิ่งแวดล้อม ภาควิชาวิศวกรรมเคมี

คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี จ.อุบลราชธานี 34190;

<sup>2</sup>คณะวิศวกรรมศาสตร์ และศูนย์ความเป็นเลิศแห่งชาติด้านการจัดการสิ่งแวดล้อมและของเสียอันตราย

มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี จ.อุบลราชธานี 34190;

<sup>3</sup>คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพ 10330;

\*โทรศัพท์ : 045-353300 ต่อ 3359 , โทรสาร : 045-35333 E-mail :sumana.s@ubu.ac.th ,

jeans\_sumana@yahoo.com

### บทคัดย่อ

การวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อคัดแยกจุลินทรีย์บริสุทธิ์จากกลุ่มจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายสารโพรฟีโน่ฟอสจากดินในไร่พริกที่ป่นเปื่อน โดยมุ่งเน้นศึกษาการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์บริสุทธิ์และการศึกษาความสามารถในการย่อยสลายสารโพรฟีโน่ฟอส การศึกษาจะทดลองในสภาพที่มีสารโพรฟีโน่ฟอส 20 มิลลิกรัมต่อลิตร เพราะเดี๋ยงในเครื่องเบย์แบบบันมีอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสมีการเบย์ที่ความเร็ว 100 รอบต่อนาที เป็นเวลา 4 วัน การเก็บตัวอย่างเก็บต่อเนื่องทุกวันเพื่อวิเคราะห์หาสารโพรฟีโน่ฟอสคงเหลือและจำนวน เชคล์จุลินทรีย์ ผลการคัดแยกได้โคลoniที่มีลักษณะต่างกัน 4 ลักษณะ คือ PF1 PF2 PF3 และ PF4 ซึ่งเป็นแบบที่เรียกว่า 'ก' ที่มีขนาดและผิวต่าง ๆ กัน การศึกษาการเจริญเติบโตและความสามารถในการย่อยสลายพบว่าจุลินทรีย์ทั้งหมดสามารถย่อยสลายสารโพรฟีโน่ฟอสได้มากกว่าร้อยละ 90 ภายในระยะเวลา 4 วัน และจำนวนเซลล์มีการเพิ่มขึ้นมากในช่วงเวลาสองวันแรก อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะเท่ากับ 4.40 ถึง 7.20 ต่อวัน และอัตราการย่อยสลายจำเพาะเท่ากับ  $1.25 \times 10^{-13}$  ถึง  $2.37 \times 10^{-10}$  ไมโครกรัมต่อชั่วโมงต่อวัน ซึ่งจากผลดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าจุลินทรีย์บริสุทธิ์ที่คัดแยกได้มีประสิทธิภาพในย่อยสลายสารโพรฟีโน่ฟอสสูงและบ่งชี้ความเป็นไปได้ในการประยุกต์ใช้เพื่อฟื้นฟูการปนเปื้อนสารโพรฟีโน่ฟอสในพื้นที่จริงได้ต่อไป

คำสำคัญ : สารโพรฟีโน่ฟอส , การย่อยสลายทางชีวภาพ , การคัดแยก

### Abstract

The main objective of this research was to isolation of profenofos pesticide-degrading pure cultures from chilli farm soil. The work focused on microbial growth and profenofos degradation of the pure cultures. The experiment was performed at initial profenofos concentration of 20 มิลลิกรัมต่อลิตร. The tested conditions of temperature 30 °C and shaking at 100 rpm for 4 day were applied. Samples for residual profenofos concentration and number of microbial cell analysis were collected everyday. The result showed that four patterns of colonies (designated PF1 PF2 PF3 and PF4) were isolated.. All of them were gram-positive bacteria with different in size and surface. In growth and degradation tests, all isolates could utilized profenofos of more than 90 percent within 4 days. A large number of cells increased during the first two days. The specific growth rate was 4.40 to 7.20 per day and the specific degradation rate was  $1.25 \times 10^{-13}$  to  $2.37 \times 10^{-10}$  μg/CFU/day. Based on the results, it indicated that the isolates were efficient for profenofos degradation and potential for profenofos remediation.

**Keywords :** profenofos ; biodegradation ; isolation

### บทนำ

การปลูกพริกมีการใช้สารกำจัดศัตรูพืชหลายชนิด โดยหนึ่งในสารที่มีการใช้มากที่สุด คือ สารโพรฟโนฟอส (Profenofos; C<sub>11</sub>H<sub>15</sub>SO<sub>3</sub>PSBrCl) ซึ่งเป็นสารในกลุ่morogeninoฟอฟอรัส สารก่อรุ่นดังกล่าวสามารถถูกกำจัดได้สูงสุด 20 มิลลิกรัมต่อลิตร สารก่อรุ่นนี้มีฤทธิ์ส่งผลกระทบต่อการทำงานของระบบประสาทส่วนกลางของสัตว์และมนุษย์ [1-2] นอกจากนี้จากข้อมูลที่ระบุไว้ในสำนักงานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ ปริมาณสารพิษต่อก้างสูงสุดที่ยอมรับได้ (Maximum Residue Limit; MRL) ของสารโพรฟโนฟอส คือ 5 มิลลิกรัม/kg จากการใช้สารโพรฟโนฟอสปริมาณมากประกอบกับความเป็นพิษของสาร จึงจำเป็นต้องหาแนวทางในการพื้นฟูพื้นที่จากการปนเปื้อนของสารโพรฟโนฟอสเพื่อรองรับปัญหาการตอกက้างของสารดังกล่าวในอนาคต

วิธีการพื้นฟูพื้นที่ปนเปื้อนที่เป็นที่นิยมวิธีการหนึ่ง คือ การพื้นฟูด้วยวิธีการทางชีววิทยา (bioremediation) จากงานวิจัยที่ผ่านมา มีการขยายกลุ่มจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายสารโพรฟโนฟอสจากดินปนเปื้อนในไร่พริก [3] โดยกลุ่มจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้สามารถย่อยสลายสารโพรฟโนฟอสได้ดี กล่าวคือ กลุ่มจุลินทรีย์สามารถกำจัดสารโพรฟโนฟอสได้มากกว่าร้อยละ 90 แต่ในการศึกษาดังกล่าวบังไม่ได้คัดแยกจุลินทรีย์บริสุทธิ์ (pure culture) จากกลุ่มจุลินทรีย์ดังกล่าว รวมทั้งบังไม่มีการศึกษาสมบัติของกลุ่มจุลินทรีย์นี้ได้ในอนาคต

ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงมุ่งเน้นการศึกษาลักษณะเบื้องต้นของกลุ่มจุลินทรีย์ดังกล่าว โดยประกอบด้วยการแยกเชื้อบริสุทธิ์และศึกษาลักษณะของจุลินทรีย์นั้น ๆ รวมทั้งศึกษาความสามารถในการย่อยสลายสารโพรฟโนฟอสของจุลินทรีย์บริสุทธิ์ ผลการศึกษานี้สามารถใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานเพื่อประกอบการประยุกต์ใช้กลุ่มจุลินทรีย์นี้ได้ในอนาคต

## อุปกรณ์และวิธีการ

### 1. อาหารเลี้ยงเชื้อ

อาหารเลี้ยงเชื้อเอ็มเอสเอ็ม (Minimal Salt Medium ; MSM) ประกอบด้วย  $\text{NaHPO}_4$  5.8 กรัม  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  3.0 กรัม  $\text{NaCl}$  0.5 กรัม  $\text{NH}_4\text{Cl}$  1 กรัม และ มิลลิกรัม  $\text{SO}_4$  0.25 กรัม ละลายน้ำทั้งหมดด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (phosphate buffer) 10 มิลลิโลมล และปรับปริมาตรสูดท้ายให้เป็น 1 ลิตร จากนั้นนำไปกำจัดเชื้อด้วยหม้อนึ่งผ่า เชือความดัน ไออกซิเจน 121 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 30 นาที รอให้เย็นจึงเตรียมสำหรับการเพาะเชื้อโดยวิธีการกรองผ่านกระดาษกรองที่มีขนาดครุพrun 0.20 ไมโครเมตร ตัวอาหารเอ็มเอสเอ็มนิคแข็งสำหรับคัดแยกเชื้อจุลินทรีย์มีการผสมสารสกัดจากเบียร์ (yeast extract) ร้อยละ 0.1 และ ผงวุ้น (agar) ร้อยละ 1.5 [3]

### 2. การคัดแยกเชื้อจุลินทรีย์บริสุทธิ์

การคัดแยกเชื้อจุลินทรีย์บริสุทธิ์ใช้เทคนิคการเขี่ยเชือบน้ำ (streak plate technique) โดยใช้อาหารเลี้ยง เชื้อเอ็มเอสเอ็มนิคแข็งที่ผสมสารสกัดจากเบียร์ (Yeast Extract) ผงวุ้น (Agar) และสารโพร์ฟิโนฟอส 60 มิลลิกรัม/ลิตร ซึ่งการคัดแยกร่วมด้วยการเขี่ยกลุ่มจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสารอาหารโพร์ฟิโนฟอส ที่ขยายตัวกินในงานวิจัยที่ผ่านมา [3] จากนั้นจึงคัดแยกโคลonielักษณะต่างกันลงในอาหารเลี้ยงเชื้อจานใหม่ด้วยวิธีการเดียวกันอย่างต่อเนื่องจนกระทั่งได้เชื้อจุลินทรีย์บริสุทธิ์ ก่อตัวคือ ลักษณะโคลonielักษณะเป็นวงกลมที่มีขอบเขตชัดเจน ไม่มีก้อนกันทึบหมัด (การถ่ายเชื้อระหว่างอาหารแท่งรวมทั้งสิ้น 4 ครั้ง) จากนั้นจึงศึกษาลักษณะเป็นองค์ประกอบต้นและความสามารถของเชื้อจุลินทรีย์บริสุทธิ์

### 3. การศึกษาลักษณะเบื้องต้นของจุลินทรีย์

การศึกษาลักษณะเบื้องต้นของเชื้อจุลินทรีย์บริสุทธิ์ ประกอบด้วย การสังเกตลักษณะโคลonielักษณะโดยใช้กล้องจุลทรรศน์แบบแสง (optical microscope) โดยวิธีการทดลองเป็นไปตามหลักการศึกษาทางชีววิทยาทั่วไป

### 4. การศึกษาการย่อยสารอาหารโพร์ฟิโนฟอสและการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์บริสุทธิ์

การศึกษาความสามารถในการย่อยสารอาหารโพร์ฟิโนฟอสโดยเชื้อจุลินทรีย์บริสุทธิ์ มีวัตถุประสงค์เพื่อระบุจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสารอาหารโพร์ฟิโนฟอสในกลุ่มจุลินทรีย์ เริ่มด้วยการเตรียมจุลินทรีย์ที่ผ่านการคัดแยก 1 ห่วง ลงในอาหารเอ็มเอสเอ็มนิคเหลวที่มีสารโพร์ฟิโนฟอส 20 มิลลิกรัมต่อลิตร จากนั้นเพาะเลี้ยงในสภาพที่มีการควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส และเขย่าที่ความเร็ว 100 รอบต่อนาที เป็นเวลา 4 วัน เก็บตัวอย่างอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อวิเคราะห์หาสารโพร์ฟิโนฟอสคงเหลือวิเคราะห์โดยใช้เครื่องวิเคราะห์แก๊สโคมาก trography (Gas Chromatography; GC) เพื่อหาความสามารถและจำนวนผลิตภัณฑ์การย่อยสารอาหารโพร์ฟิโนฟอสของจุลินทรีย์ นอกจากนี้ยังได้ศึกษาจำนวนผลิตภัณฑ์การเจริญเติบโตของจุลินทรีย์บริสุทธิ์โดยทำการนับจำนวนโคลonielักษณะโดยใช้เทคนิคการเกลี่ยเชื้อ (spread plate technique) ซึ่งมีหน่วยเป็นเชื้อฟูต่อเมลลิลิลิตร (Colonies Forming Unit per milliliter; CFU/ml)

### 5. การวิเคราะห์สารโพร์ฟิโนฟอส

การวิเคราะห์สารโพร์ฟิโนฟอสคงเหลือ โดยการสกัดสารโพร์ฟิโนฟอสจากอาหารเลี้ยงเชื้อเอ็มเอสเอ็ม ด้วยอะซิโตไดโนไตริต(acetonitrile) ผสมกรดอะซิติก (acetic acid) ร้อยละ 0.1 ซึ่งวิธีการนี้เป็นไปตามหลักการ

QuEChERS [5] จากนั้นนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่องจีซีซิงมีอุปกรณ์ตรวจจับแบบแมสซีเล็กทีฟ (mass selective detector) (รุ่น 6890N, Agilent Technologies, สหรัฐอเมริกา) โดยเครื่องจีซีที่ใช้มีค่าลิมิต์โครมาโตรกราฟชีนิค DB-5 ขนาด 30 เมตร  $\times$  0.25 มิลลิเมตร และความหนาแผ่นฟิล์ม (film thickness) 0.25 ไมโครเมตร

สำหรับวิธีการวิเคราะห์มีรายละเอียดคือ ระบบฉีดตัวอย่างแบบสปลิทเลส (splitless mode) ตั้งค่า อุณหภูมิระบบฉีดตัวอย่าง (injection temperature) ที่ 250 องศาเซลเซียส ปริมาตรตัวอย่างที่ฉีดแต่ละครั้ง (injection volume) เท่ากัน 1.0 ไมโครลิตร ตั้งค่าอุณหภูมิเตาอบ (oven temperature) เริ่มต้นที่ 90 องศาเซลเซียส อัตราการเพิ่มขึ้นของอุณหภูมิเป็นดัง โปรแกรมอุณหภูมิที่เพิ่มขึ้น (temperature gradient program) ที่แสดงในตารางที่ 1 การวิเคราะห์ใช้แก๊สไฮเดรนเป็นแก๊สนำพา (carrier gas) ปรับอัตราการไหลที่ 2.0 ไมโครลิตรต่อนาที สารออกที่ 9.07 นาที

ตารางที่ 1 โปรแกรมอุณหภูมิที่ใช้วิเคราะห์สารโพร์ฟิโนฟอส

ลำดับที่	ขั้นตอน	อัตราการเพิ่มขึ้น ของอุณหภูมิ ( $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ )	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

#### 6. การคำนวณอัตราการเจริญเติบโตและการย่อยสลายสารโพร์ฟิโนฟอส

การคำนวณอัตราการเจริญเติบโตและการย่อยสลายสารโพร์ฟิโนฟอสจำเพาะ เป็นการศึกษาถึง ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารคงเหลือกับเวลาและจำนวนเซลล์จุลินทรีย์ที่เพิ่มขึ้นเมื่อเวลาผ่านไป การคำนวณค่าอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (specific growth rate;  $\mu$ ) เป็นดังสมการที่ (1) และอัตราการย่อยสลายสารโพร์ฟิโนฟอสจำเพาะ (specific substrate utilization rate;  $q$ ) เป็นดังสมการที่ (2)

$$\mu = \frac{\ln x_t - \ln x_0}{t} \quad (1)$$

$$q = \frac{[(s_0 - s_t)/t]}{[(x_t + x_0)/2]} \quad (2)$$

เมื่อ  $x_t$  คือ จำนวนเซลล์สุดท้าย (ซีอฟยูต่อมิลลิลิตร)  $x_0$  คือ จำนวนเซลล์เริ่มต้น (ซีอฟยูต่อมิลลิลิตร)

- t) คือ เวลาที่ใช้ในการย้อมสลายสาร (วัน)  $r_0$  คือ ความเข้มข้นของสารเริ่มต้น (มิลลิกรัมต่อลิตร)  
 s, คือ ความเข้มข้นของสารสุดท้าย (มิลลิกรัมต่อลิตร)

### ผลการทดลองและวิเคราะห์

#### 1. ผลการคัดแยกจุลินทรีย์บริสุทธิ์และการศึกษาลักษณะเบื้องต้นของจุลินทรีย์

การคัดแยกจุลินทรีย์บริสุทธิ์และการศึกษาลักษณะเบื้องต้นของจุลินทรีย์ ภายหลังการคัดแยกได้โคโลนีที่ทึบมีลักษณะต่างกัน 4 ลักษณะ คือ โคโลนีขนาดใหญ่ กลวง เด็ก และเด็กมาก (ระบุชื่อ คือ PF1 PF2 PF3 และ PF4) โดยลักษณะโคโลนีของ PF1 PF3 และ PF4 มีผิวน้ำมันและขอบเรียบดังรูปที่ 1 ส่วนโคโลนีของ PF2 มีผิวน้ำมัน และขอบหยัก

เมื่อนำจุลินทรีย์ทั้ง 4 มาศึกษาลักษณะด้วยกล้องจุลทรรศน์พบว่าลักษณะของเซลล์มี 2 ลักษณะ คือ แท่งสั้น (short rod) และวงกลม (cocci) โดยที่ PF1 มีลักษณะเป็นแท่งสั้น ส่วน PF2 PF3 และ PF4 มีลักษณะเป็นวงกลมดังรูปที่ 2 ผลการคัดแยกจุลินทรีย์บริสุทธิ์ และการศึกษาลักษณะเบื้องต้นของจุลินทรีย์ สรุปได้ดังตารางที่ 2



ก)

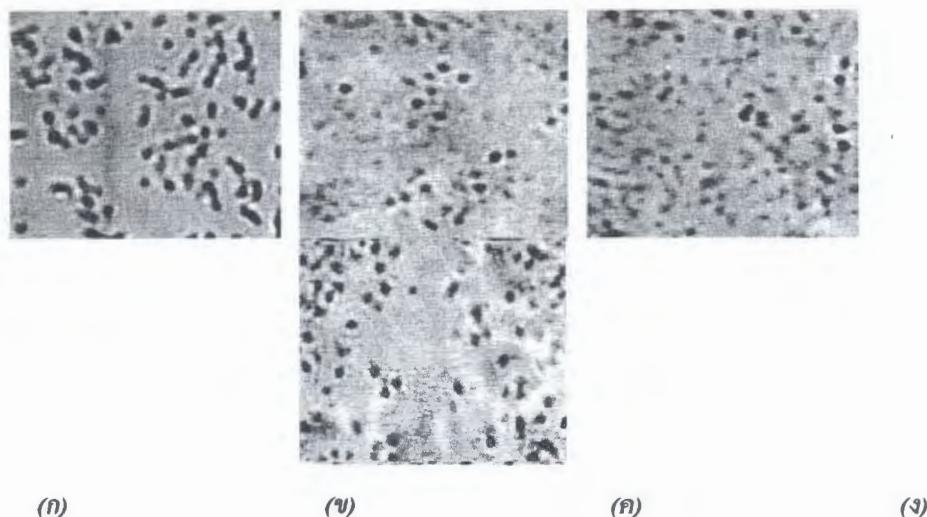
ห)

ก)

จ)

รูปที่ 1 ลักษณะโคโลนีของจุลินทรีย์บริสุทธิ์ ก) ลักษณะโคโลนีของ PF1

ห) ลักษณะโคโลนีของ PF2 ก) ลักษณะโคโลนีของ PF3 จ) ลักษณะโคโลนีของ PF4



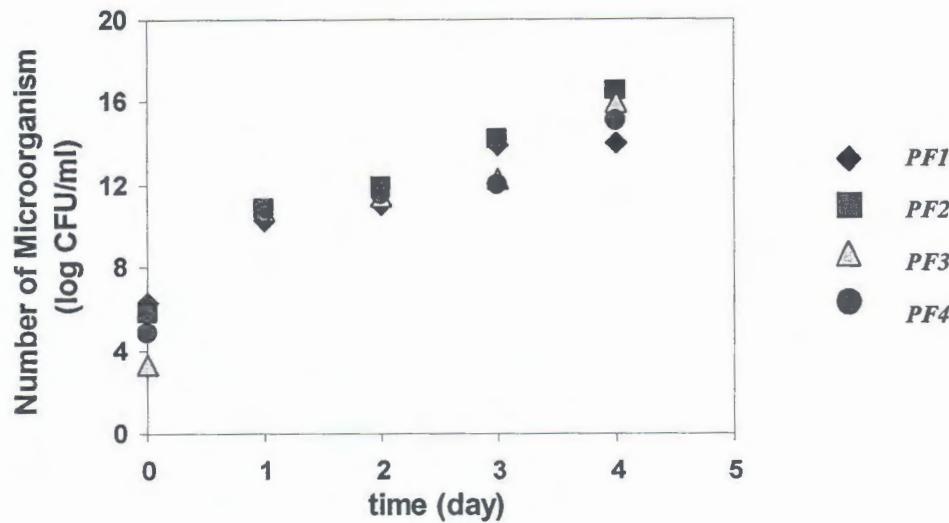
รูปที่ 2 ลักษณะรูปร่างเซลล์และการติดสีแกรมของจุลินทรีย์บริสุทธิ์ (ก) ลักษณะเซลล์ของ PF1  
(ข) ลักษณะเซลล์ของ PF2 (ค) ลักษณะเซลล์ของ PF3 (ง) ลักษณะเซลล์ของ PF4

ตารางที่ 2 สรุปลักษณะของจุลินทรีย์บริสุทธิ์ที่ผ่านการคัดแยก

ชื่อ	ลักษณะทางกายภาพของโคลoni		ลักษณะเซลล์จุลินทรีย์	
	ขนาด	ลักษณะ	รูปร่าง	การติดสีแกรม
PF1	ใหญ่	ผิวน้ำมัน ขอบเรียบ	แท่งสั้น	แกรมบวก
PF2	กลาง	ผิวน้ำมัน ขอบหยัก	วงกลม	แกรมบวก
PF3	เด็ก	ผิวน้ำมัน ขอบเรียบ	วงกลม	แกรมบวก
PF4	เด็กมาก	ผิวน้ำมัน ขอบเรียบ	วงกลม	แกรมบวก

## 2. ผลการศึกษาการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์บริสุทธิ์

ผลการทดลองการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์บริสุทธิ์ พบว่าการฟาร์มการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์มีลักษณะคังງูที่ 3 คือ ในระหว่างการทดลอง 4 วัน จุลินทรีย์ มีการเจริญเติบโตเพิ่มจำนวนเพิ่มขึ้นมาก เป็นไปตามผลการวิจัยที่ได้มีการศึกษาการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสารอ่อน溶ของแกโนฟอสฟอรัส [3, 7] เมื่องจากในการศึกษานี้ใช้อาหารเอื้อมเอกสารที่ไม่มีส่วนประกอบของสารอินทรีย์ carbon source แต่พบว่าจุลินทรีย์บริสุทธิ์ทั้งสี่มีการเจริญเติบโตมาก ซึ่งจากผลดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้มีความสามารถในการใช้สารฟอฟอสเป็นแหล่งคาร์บอนเดียว (sole carbon source) ในการเจริญเติบโต โดยค่าอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของจุลินทรีย์ PF1 PF2 PF3 และ PF4 เท่ากับ 4.43 6.19 7.26 และ 5.93 ต่อวัน ตามลำดับ สรุปได้ดังตารางที่ 3 นอกจากนี้จากการศึกษาข้างบ่งชี้ได้ว่าจุลินทรีย์ต่างชนิดมีอัตราการเจริญเติบโตแตกต่างกันด้วยโดย PF3 มีอัตราการเจริญเติบโตสูงสุด



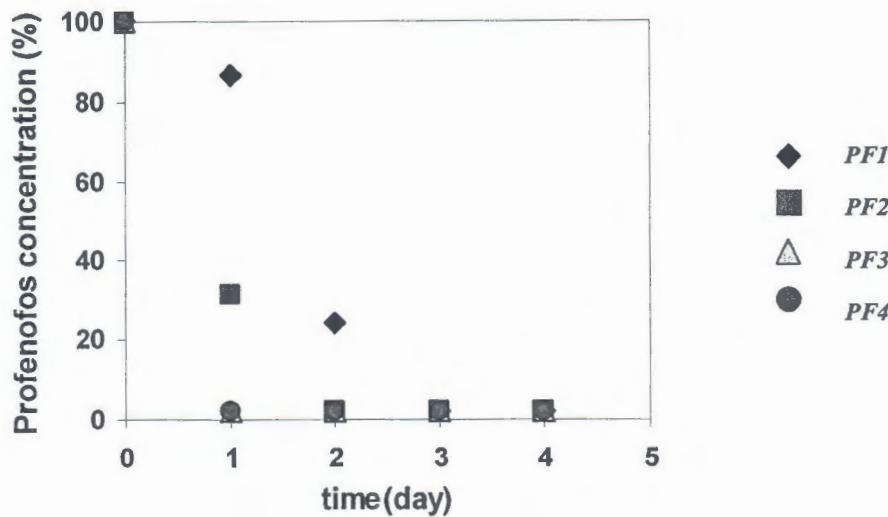
รูปที่ 3 กราฟการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์บริสุทธิ์

ตารางที่ 3 อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของจุลินทรีย์บริสุทธิ์

ชื่อ	อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (ต่อวัน)
PF1	4.43
PF2	6.19
PF3	7.26
PF4	5.93

### 3. ผลการศึกษาความสามารถในการย่อยสลายสารโพร์ฟิโนฟอส

ผลการทดลองความสามารถในการย่อยสลายสาร โพร์ฟิโนฟอสของจุลินทรีย์บริสุทธิ์ พบว่าความเข้มข้นของสาร โพร์ฟิโนฟอสลดลงในช่วงเวลาสองวันแรกเมื่อยูกับโดยจุลินทรี PF2 PF3 และ PF4 ส่วนการย่อยสลายสารของจุลินทรี PF1 พบว่าความเข้มข้นของสาร โพร์ฟิโนฟอสลดลงในช่วงเวลา 0-3 วัน ดังรูปที่ 4 ซึ่งผลการย่อยสลายลดลงต่อเนื่องกับผลการเจริญเติบโต ซึ่ง PF2 PF3 และ PF4 มีอัตราการเจริญเติบโตสูงกว่า PF1 ทำให้มีความต้องการสารอาหารมาก ดังนั้นความเข้มข้นของสาร โพร์ฟิโนฟอสซึ่งเป็นแหล่งอนามัยมีผลต่อการย่อยสลายสาร ในกลุ่มออกโซฟอรัสเช่นกัน [3, 7] ค่าอัตราการย่อยสลายสาร โพร์ฟิโนฟอสจำเพาะของ PF1 PF2 PF3 และ PF4 เท่ากับ  $1.25 \times 10^{-13}$   $1.35 \times 10^{-11}$   $1.79 \times 10^{-10}$  และ  $2.38 \times 10^{-10}$  ในโครกรัมต่อชั่วโมงต่อวัน ตามลำดับ



รูปที่ 4 กราฟการย้อมสลายสาร โพร์ฟีโนฟอสโดยจุลินทรีย์บริสุทธิ์

ตารางที่ 4 อัตราการย้อมสลายสาร โพร์ฟีโนฟอสจำเพาะของจุลินทรีย์บริสุทธิ์

ชื่อ	อัตราการย้อมสลายสาร โพร์ฟีโนฟอส จำเพาะ ( $\mu\text{g}/\text{CFU/day}$ )	ร้อยละการย้อมสลาย สาร โพร์ฟีโนฟอส
PF1	$1.25 \times 10^{-13}$	95.0
PF2	$1.35 \times 10^{-11}$	93.1
PF3	$1.79 \times 10^{-10}$	95.3
PF4	$2.38 \times 10^{-10}$	97.3

#### สรุปผลการทดลอง

การศึกษาเพื่อนบ่ริสุทธิ์ลักษณะของจุลินทรีย์สามารถแยกจุลินทรีย์บริสุทธิ์ได้ 4 ชนิดคือ PF1 PF2 PF3 และ PF4 ซึ่งมีลักษณะเซลล์และโคลอโนนต่าง ๆ กัน แต่เป็นกรรมวากทั้งหมด จุลินทรีย์ที่คัดแยกได้ทั้งหมดสามารถถอนต่อสภาพที่มีสาร โพร์ฟีโนฟอสและสามารถย้อมสลายสาร โพร์ฟีโนฟอสได้ โดยมีอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของจุลินทรีย์เท่ากับ 4.40 ถึง 7.20 ต่อวัน และสามารถย้อมสลายสาร โพร์ฟีโนฟอสได้ร้อยละ 90 อัตราการย้อมสลายจำเพาะเท่ากับ  $1.25 \times 10^{-13}$  ถึง  $2.37 \times 10^{-10}$  ไมโครกรัมต่อชีเอฟบูต่อวัน จากผลดังกล่าวสามารถบ่ริสุทธิ์ลักษณะของจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้ในการประบูต์ใช้งานต่อไป

#### กิตติกรรมประกาศ

ผู้จัดของขอบคุณสนับสนุนจากศูนย์ความเป็นเลิศแห่งชาติด้านการจัดการสิ่งแวดล้อมและเชิงเสียงธันราย ศูนย์เครือข่ายมหาวิทยาลัยอุบลราชธานี และขอบคุณภาควิชาวิศวกรรมเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานีในการสนับสนุนเครื่องมือสำหรับทำการวิจัย

### เอกสารอ้างอิง

- [1] USEPA. 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. Washington DC, USA.on July 31, 2006
- [2] WHO (World Health organization). 2009. The WHO recommended classification of pesticides by hazard and guidelines to classification, Geneva, Switzerland.
- [3] กาญจนฯ พานแก้ว. 2553. การคัดเลือกกลุ่มจุลินทรีย์ขั้นต้นที่สามารถย่อยสลายสารกำจัดแมลงกลุ่ม ออร์เกนโนฟอฟอร์ส (การค้นคว้าอิสระ) คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี
- [4] Anastassiades M.. QuEChERS A Mini-Multiresidue Method for the Analysis of Pesticide Residues in Low-Fat Products, CVUA Stuttgart, 1-12
- [7] Malghani S.and Chatterjee N.2009 Isolation and characterization of a profenofos degrading bacterium . Journal of Environmental Sciences. 21(2009): 1591–1597

# Biodegradation of Profenofos Pesticide by Novel Isolated Cultures and Their Characterization

Sumana Siripattanakul-Ratpukdi<sup>1,2\*</sup> Alisa S. Vangnai<sup>3</sup> Kanjana Pankaew<sup>1</sup> Warayut Patichot<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Chemical Engineering, Faculty of Engineering, Ubon Ratchathani University,  
Ubon Ratchathani 34190, Thailand

\*E-mail: ensumasi@ubu.ac.th, jeans\_sumana@yahoo.com

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

<sup>3</sup> Department 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  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . 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  $\mu\text{g}/\text{mL}/\text{d}$  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

## 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),

$\text{C}_{11}\text{H}_{15}\text{BrClO}_3\text{PS}$ , 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.

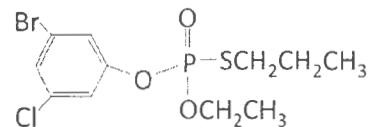


Figure 1. Profenofos

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  $\mu\text{g}/\text{g}$  [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.

## Materials and Methods

### 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.

### 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  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  of 3.0 g/L,  $\text{NH}_4\text{Cl}$  of 1 g/L,  $\text{NaCl}$  of 0.5 g/L,  $\text{MgSO}_4$  of 0.25 g/L, and PF of 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (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  $30\pm2^\circ\text{C}$  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  $30\pm2^\circ\text{C}$  for 14 days. Single colonies were obtained after several subcultures. The consortium and isolated cultures were then characterized.

### 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- $\mu\text{l}$  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 PCR 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).

### 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  $\mu\text{g}/\text{mL}$  on a rotary shaker at 100 rpm and  $30\pm2^\circ\text{C}$  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.

### 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  $\mu\text{m}$  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,  $\text{NaCl}$  of 1 g and anhydrous  $\text{MgSO}_4$  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 µL/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.

### Results and Discussion

#### 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 I 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 chloryrifos 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.

#### 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 log<sub>10</sub> cfu/ml within 4 d. The MIX cultures reached the stationary phase after 2 d. Cell numbers of all three isolates quickly increased more than 7 log<sub>10</sub> cfu/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  $\text{mg/mg/d}$ . 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).

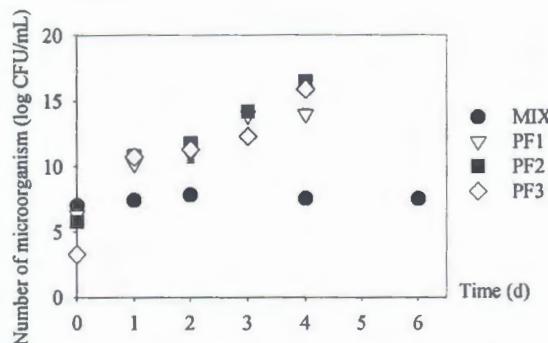


Figure 3. Bacterial growth by MIX, PF1, PF2, and PF3.

TABLE II. BACTERIAL GROWTH RATES OF PF-DEGRADING CULTURES

Culture	Growth kinetic equation*	R <sup>2</sup>
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 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.

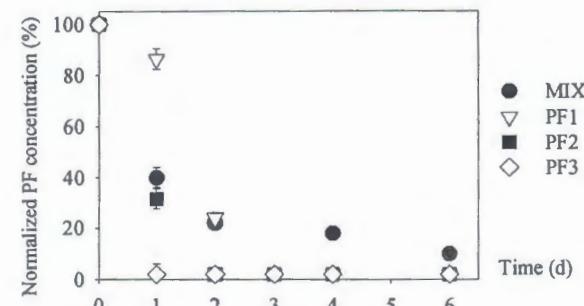


Figure 4. PF degradation by MIX, PF1, PF2, and PF3.

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

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

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

Culture	PF degradation kinetic equation*	R <sup>2</sup>
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)

#### 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).

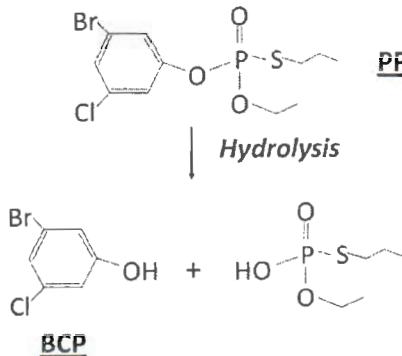


Figure 5. Potential profenofos degradation pathway.

### 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. Sarnaik, “Biodegradation of organophosphorus pesticides.” Proc. Indian Natn. Sci. Acad., vol. B70(1), pp.57-70, 2004.
- [2] M. Cycon, M. Wojcik, Z. Piotrowska-Seget, “Biodegradation of the organophosphorus insecticide diazinon by *Serratia* sp. And *Pseudomonas* sp. And their use in bioremediation of contaminated soil.” Chemsphere, vol. 76, pp.494-501, 2009.
- [3] M.G. Roverdatti, “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 poisoing.” Forensic Sci. Int., vol.116, pp.221-226, 2001.
- [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, 5, 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. Soulard, “Inoculation of an atrazine-degrading strain, *Chelatobacter heintzii* Ctl1, in four different soils: effects of different inoculum densities.” Chemsphere, vol. 51, pp.569-576, 2003.
- [10] M.H. Fulekar and M. Geetha, “Bioremediation of Chlorpyrifos by *Pseudomonas aeruginosa* using scale up technique,” J. Appl. Biosci., vol. 12, pp. 657-660, 2008.
- [11] H. Boricha and M.H. Fulekar, “*Pseudomonas plecoglossicida* 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.



## ประวัติผู้วิจัย

ชื่อ

นายราษฎร์ ปฏิโชติ

วัน เดือน ปี เกิด

29 มีนาคม 2531

ประวัติการศึกษา

วิศวกรรมศาสตรบัณฑิต (วิศวกรรมเคมีและชีวภาพ)

นำเสนอผลงานในการประชุมวิชาการ

มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี, พ.ศ. 2552

ราษฎร์ ปฏิโชติ กาญจนานา พานเก้า อลิสา วงศ์ใน และ สุนนา สิริพัฒนาภูล. “การคัดแยกถุงลินทรีบอร์สุทธิ์ที่สามารถย่อยสลายสารกำจัดศัตรูพืช โพเรฟโนฟอสจากดินในไร่พริกที่ป่นเปี้ยน”, ใน การประชุมวิชาการสั่งแวดล้อมแห่งชาติครั้งที่ 10. สงขลา : สมาคมวิศวกรรมสั่งแวดล้อมแห่งประเทศไทย, 2554.

Siripattanakul-Ratpukdi S. Vangnai A.S. Pankaew K.

Patichot W. “Biodegradation of Profenofos Pesticide

by Novel Isolated Cultures and Their Characterization

”. The 4<sup>th</sup> KKU International Engineering Conference

2012 (KKU-IENC 2012). Khon Kaen : Faculty of

Engineering, Khon Kaen University, Thailand, May

10-12, 2012