ใบรับรองวิทยานิพนธ์

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (ปฐพีวิทยา)

ปริญญา

ปฐพีวิทยา | ปฐพีวิทยา

สาขา | **ภาควิชา**

เรื่อง ประสิทธิภาพของการย่อยสลายสารไดยูรอนโดยแบคทีเรียที่แยกเชื้อบริสุทธิ์จากดิน

The Efficiency of Diuron Degradation by Bacteria Isolated from Soil

นามผู้วิจัย นายกิตติพัฒน์ ใจซื่อ

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก .....

(รองศาสตราจารย์ธงชัย มาลา, Ph.D.)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม .....

(รองศาสตราจารย์ทศพล พรพรหม, Ph.D.)

หัวหน้าภาควิชา .....

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์อรรถศิษฐ์ วงศ์มณีโรจน์, วท.ม.)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

.....

(รองศาสตราจารย์กัญจนา ธีระกุล, D.Agr.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ ..... **เดือน** ..... **พ.ศ.** .....

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

ประสิทธิภาพของการย่อยสลายสารไดยูรอนโดยแบคทีเรียที่แยกเชื้อบริสุทธิ์จากดิน

The Efficiency of Diuron Degradation by Bacteria Isolated from Soil

โดย

นายกิตติพัฒน์ ใจซื่อ

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (ปฐพีวิทยา)
พ.ศ. 2554

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

กิตติพัฒน์ ใจซื่อ 2554: ประสิทธิภาพของการย่อยสลายสารไดยูรอนโดยแบคทีเรียที่แยกเชื้อบริสุทธิ์จากดิน ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (ปฐพีวิทยา) สาขาปฐพีวิทยา ภาควิชาปฐพีวิทยา อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: รองศาสตราจารย์ธงชัย มาลา, Ph.D. 69 หน้า

แยกเชื้อบริสุทธิ์ของแบคทีเรียที่มีความสามารถในการเจริญเติบโตและทนสารไดยูรอน จากตัวอย่างดิน 10 แหล่ง โดย Sk01, Sk02 และ Sk03 เป็นแปลงมันสำปะหลังในจังหวัดกาญจนบุรี Ss04 และ Ss05 เป็นแปลงมันสำปะหลังในจังหวัดสุพรรณบุรี Sn06 และ Sn07 เป็นแปลงปลูกอ้อยในจังหวัดนครปฐม Ss08, Ss09 และ Ss10 เป็นแปลงปลูกอ้อยในจังหวัดสุพรรณบุรี แล้วนำไปศึกษาในอาหาร NA, R-medium, NA ดัดแปลง และ R-medium ดัดแปลง ผลการศึกษาพบว่า จำนวนแบคทีเรียทั้งหมดในดินแต่ละแหล่งไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ แต่จำนวนแบคทีเรียที่ทนสารไดยูรอนมีความแตกต่างกันทางสถิติ โดยดินจากแปลงปลูกอ้อยในจังหวัดสุพรรณบุรี(Ss10) มีจำนวนแบคทีเรียที่ทนสารไดยูรอนมากที่สุด ส่วนดินจากแปลงปลูกอ้อยในจังหวัดนครปฐม(Sn06) มีจำนวนแบคทีเรียที่ทนสารไดยูรอนน้อยที่สุด แบคทีเรียที่พบสามารถจำแนกได้เป็น 6 กลุ่ม กลุ่มที่ 1 และ กลุ่มที่ 4 เป็นแบคทีเรียในจีนัส Bacillus กลุ่มที่ 2, 3, 5 และ กลุ่มที่ 6 เป็นแบคทีเรียในจีนัส Pseudomonas เมื่อนำไปศึกษาการย่อยสลายสารไดยูรอนของเชื้อแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อ R-medium ดัดแปลง โดยวางแผนการทดลองแบบ completely randomized design จำนวน 4 ซ้ำ ประกอบด้วยเชื้อ *Bacillus* sp. จำนวน 5 สายพันธุ์และ *Pseudomonas* sp. จำนวน 15 สายพันธุ์ ผลการทดลองพบว่าเชื้อ *Pseudomonas* sp. มีประสิทธิภาพสูงในการย่อยสลายสารไดยูรอนได้ดีกว่า เชื้อ *Bacillus* sp. โดย *Pseudomonas* sp. SK01, SK13, SK12 และ SK06 สามารถย่อยสลายสารไดยูรอนได้ 3.36, 3.06, 2.92 และ 2.82 มก./ล. ตามลำดับ และ *Bacillus* sp. S04 สามารถย่อยสลายสารไดยูรอนได้ 2.82 มก./ล. ส่วนแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพต่ำสุดคือ *Bacillus* sp. S03 โดยสามารถย่อยสารไดยูรอนได้ 2.00 มก./ล. คัดเลือกแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายสารไดยูรอนที่ดีที่สุด 5 สายพันธุ์ ไปทดสอบการย่อยสลายสารไดยูรอนในดิน โดยวางแผนการทดลองแบบ 6x5 factorial in CRD จำนวน 4 ซ้ำ ปัจจัยที่ 1 ประกอบด้วย เชื้อแบคทีเรีย 5 สายพันธุ์ (*Pseudomonas* sp. SK01, *Pseudomonas* sp. SK06, *Pseudomonas* sp. SK12, *Pseudomonas* sp. SK13, *Bacillus* sp. S04) และไม่ใส่เชื้อ ปัจจัยที่ 2 ประกอบด้วย ความเข้มข้นของไดยูรอน 5 ระดับ (0, 5, 10, 15 และ 20 มก./กก.) ผลการศึกษาพบว่า เมื่อความเข้มข้นของไดยูรอนในดินเพิ่มมากขึ้น ทำให้ประสิทธิภาพในการย่อยสลายและจำนวนของแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์ลดน้อยลง โดย *Pseudomonas* sp. SK01 ย่อยสลายสารไดยูรอนได้ดีที่สุด โดยย่อยสลายได้ 5.00, 7.18, 5.99 และ 3.94 มก./กก. ที่ความเข้มข้น 5, 10, 15 และ 20 มก./กก. ตามลำดับ ส่วน *Bacillus* sp. S04 มีความทนทานต่อสารต่อสารไดยูรอนมากที่สุด

_____ _____ ___ / ___ / ___

ลายมือชื่อนิสิต ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Gittiphat Jaisaue 2011: The Efficiency of Diuron Degradation by Bacteria Isolated from Soil. Master of Science (Soil Science), Major Field: Soil Science, Department of Soil Science. Thesis Advisor: Associate Professor Thongchai Mala, Ph.D. 69 pages.

Isolation of soil bacteria capable on growing and tolerating to diuron from ten soil sources were collected for bacteria isolation. Sk01, Sk02 and Sk03 represented the soils from cassava field in Kanchanaburi province, Ss04 and Ss05 represented the soils from cassava field in Suphanburi province, Sn06 and Sn07 represented the soils from sugar cane field in Nakhonpathom province, Ss08, Ss09 and Ss10 represented the soils from sugar cane field in Suphanburi province. The population of bacteria in various soils was studied on NA, R-medium, modified NA and R-medium. The results revealed that total bacteria of various soils were not significant, but those of diuron tolerated bacteria were significant. The highest population of diuron tolerated bacteria was found in Ss10, while the lowest one was found in Sn06. The diuron tolerated bacteria found in various soils were divided to 6 groups. Bacteria in group 1 and 4 were classified as *Bacillus* sp., but, group 2, 3, 5 and 6 were *Pseudomonas* sp. The capability on diuron degradation of selected bacteria in modified R-medium was studied. The completely randomized design with 4 replications was operated together with 5 strains of *Bacillus* sp. and 15 strains of *Pseudomonas* sp. The concerning bacteria strains were grown in modified R-medium containing 10 mg/l of diuron. The results showed that the strains of *Pseudomonas* sp. had higher efficiency on diuron degradation than those of *Bacillus* sp. The highly effective strains of *Pseudomonas* sp. on diuron degradation were SK01, SK13, SK12 and SK06 which degraded the diuron as much as 3.36, 3.06, 2.92 and 2.82 mg/l, respectively. The highest ability on diuron degradation of bacilli strain was found in *Bacillus* sp. S04 with the degraded diuron at 2.82 mg./l, while the lowest one was *Bacillus* sp. S03 which degraded the diuron as much as 2.00 mg/l. The 5 strains of bacteria, higher efficiency on diuron degradation, was selected to determine the diuron degradation in soil. The 6x5 factorial in completely randomized design with 4 replications was operated which consisted of 6 bacteria strains (*Pseudomonas* sp. SK01, *Pseudomonas* sp. SK06, *Pseudomonas* sp. SK12, *Pseudomonas* sp. SK13, *Bacillus* sp. S04 and non-inoculation) and 5 levels of diuron (0, 5, 10, 15 and 20 mg/kg). The result demonstrated that the diuron degradation ability of various bacteria strains was significant. The highest ability on diuron degradation was found in *Pseudomonas* sp. SK01 which degraded the diuron as much as 5.00, 7.18, 5.99 and 3.94 mg/kg of the rate at 5, 10, 15 and 20 mg/kg soil, respectively. *Bacillus* sp. S04 had the highest ability on tolerating the diuron.

_____ _____ ___ / ___ / ___

Student's signature Thesis Advisor's signature

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. ธงชัย มาลา อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก รองศาสตราจารย์ ดร. ทศพล พรพรหมดร. อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม อาจารย์ ดร. ศุภชัย อำคา ประธารการสอบ และ อาจารย์ ดร. วิสุทธิ์ วีรสาร ผู้ทรงคุณวุฒิภายนอก ที่ให้คำแนะนำและปรึกษาในด้านการเรียน การค้นคว้าวิจัย ตลอดจนการตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์กระทั่งเสร็จสมบูรณ์

ขอขอบคุณคุณ วันทนีย์ พึ่งแสง ที่คอยให้คำแนะนำและอำนวยความสะดวกในการใช้ห้องปฏิบัติการ และขอบคุณเพื่อนๆ พี่ๆ และน้องๆ ที่คอยให้ความช่วยเหลือในการทำงาน

สุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณคุณพ่อ คุณแม่ ที่ได้อบรมสั่งสอนเลี้ยงดู และเป็นคอยกำลังใจ ให้คำปรึกษาตลอดมา และทุกคนในครอบครัวที่คอยเป็นแรงสนับสนุนจนประสบความสำเร็จได้ในวันนี้

กิตติพัฒน์ ใจซื่อ

เมษายน 2554

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารบัญ

หน้า

สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(4)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	3
การตรวจเอกสาร	4
อุปกรณ์และวิธีการ	21
อุปกรณ์	21
วิธีการ	21
ผลและวิจารณ์	32
สรุป	59
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	60
ภาคผนวก	64
ประวัติการศึกษาและการทำงาน	69

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	การนำเข้าสารไดยูรอนในประเทศไทยปี พ.ศ. 2545-2552	12
2	ปริมาณการนำเข้าสารกำจัดวัชพืชในประเทศไทยปี พ.ศ. 2548-พ.ศ. 2552	13
3	ปริมาณของแบคทีเรียทั้งหมดที่เจริญบนอาหาร NA และ R-medium ในดินแต่ละแหล่ง (log cfu/g)	34
4	ปริมาณของแบคทีเรียที่ทนสารไดยูรอนที่เจริญบนอาหาร NA และ R-medium ดัดแปลงในดินแต่ละแหล่ง (log cfu/g)	35
5	ปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดบนอาหาร NA และ NA ดัดแปลง และความหนาแน่นของแบคทีเรียที่ทนสารไดยูรอนในดินแต่ละแหล่ง	36
6	ปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดบนอาหาร R-medium และ R-medium ดัดแปลง และความหนาแน่นของแบคทีเรียที่ทนสารไดยูรอนในดินแต่ละแหล่ง	37
7	ปริมาณของสารไดยูรอนที่เชื้อ *Bacillus* sp. สามารถย่อยได้ หลังจากเลี้ยงเชื้อในอาหาร R-medium ดัดแปลง เป็นเวลา 36 และ 72 ชั่วโมง	45
8	ปริมาณของสารไดยูรอนที่เชื้อ *Pseudomonas* sp. สามารถย่อยได้ หลังจากเลี้ยงเชื้อในอาหาร R-medium ดัดแปลง เป็นเวลา 36 และ 72 ชั่วโมง	48
9	ปริมาณของสารไดยูรอนที่ระดับความเข้มข้น 5, 10, 15 และ 20 มิลลิกรัม/กิโลกรัม ที่แบคทีเรียทั้ง 5 สายพันธุ์สามารถย่อยได้ หลังจากการบ่ม เป็นเวลา 5 วัน	52
10	ปริมาณของสารไดยูรอนที่ระดับความเข้มข้น 5, 10, 15 และ 20 มิลลิกรัม/กิโลกรัม ที่แบคทีเรียทั้ง 5 สายพันธุ์สามารถย่อยได้ หลังจากการบ่ม เป็นเวลา 10 วัน	53
11	ปริมาณของสารไดยูรอนที่ระดับความเข้มข้น 5, 10, 15 และ 20 มิลลิกรัม/กิโลกรัม ที่แบคทีเรียทั้ง 5 สายพันธุ์สามารถย่อยได้ หลังจากการบ่ม เป็นเวลา 5 วัน	54

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้า
12	ปริมาณของสารไดยูรอนที่ระดับความเข้มข้น 15 มิลลิกรัม/กิโลกรัม ที่แบคทีเรียทั้ง 5 สายพันธุ์สามารถย่อยได้ หลังจากการบ่ม เป็นเวลา 5, 10 และ 15 วัน	58

ตารางผนวกที่

1	ปริมาณของสารไดยูรอนที่เชื้อ *Bacillus* sp. สามารถย่อยได้ หลังจากเลี้ยงเชื้อในอาหาร R-medium ดัดแปลง ทุก 6 ชั่วโมงเป็นเวลา 72 ชั่วโมง	65
2	ปริมาณของสารไดยูรอนที่เชื้อ *Pseudomonas* sp. สามารถย่อยได้ หลังจากเลี้ยงเชื้อในอาหาร R-medium ดัดแปลง ทุก 6 ชั่วโมงเป็นเวลา 72 ชั่วโมง	66
3	จำนวนของแบคทีเรียที่เจริญบนอาหาร NA หลังจากการย่อยสลายไดยูรอนในระดับความเข้มข้นต่างๆ ที่ระยะเวลา 15 วัน	68

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	ปฏิกิริยาการย่อยสลายทางเคมีของไดยูรอน	18
2	กลไกการเปลี่ยนรูปของ dichloroaniline เปลี่ยนไปเป็น aminophenoxazones	19
3	กลไกการย่อยสลายของไดยูรอนโดยแบคทีเรีย	20
4	การวัดปริมาณสารไดยูรอนด้วยเครื่อง Hplc	30
5	Standard curve ของสารไดยูรอนที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ	31
6	ลักษณะโคโลนีของแบคทีเรียที่ทนสารไดยูรอน	39
7	ลักษณะของเชื้อ *Bacillus sp.* ภายใต้กล้องจุลทรรศน์	41
8	ลักษณะของเชื้อ *Pseudomonas* sp. ภายใต้กล้องจุลทรรศน์	41
9	ลักษณะของเชื้อ *Bacillus sp.* ที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Bacillus Medium	42
10	ลักษณะของเชื้อ *Pseudomonas* sp. ที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Kings-agar B	42
11	ปริมาณของสารไดยูรอนที่เชื้อ *Bacillus* sp. สามารถย่อยได้ หลังจากเลี้ยงเชื้อในอาหาร R-medium ดัดแปลง เป็นเวลา 72 ชั่วโมง	46
12	ปริมาณของสารไดยูรอนที่เชื้อ *Pseudomonas* sp. สามารถย่อยได้ หลังจากเลี้ยงเชื้อในอาหาร R-medium ดัดแปลง เป็นเวลา 72 ชั่วโมง	47
13	ปริมาณของสารไดยูรอนที่ระดับความเข้มข้น 5 มิลลิกรัม/กิโลกรัม ที่แบคทีเรียทั้ง 5 สายพันธุ์สามารถย่อยได้ หลังจากการบ่ม เป็นเวลา 5, 10 และ 15 วัน	55
14	ปริมาณของสารไดยูรอนที่ระดับความเข้มข้น 10 มิลลิกรัม/กิโลกรัม ที่แบคทีเรียทั้ง 5 สายพันธุ์สามารถย่อยได้ หลังจากการบ่ม เป็นเวลา 5, 10 และ 15 วัน	55
15	ปริมาณของสารไดยูรอนที่ระดับความเข้มข้น 15 มิลลิกรัม/กิโลกรัม ที่แบคทีเรียทั้ง 5 สายพันธุ์สามารถย่อยได้ หลังจากการบ่ม เป็นเวลา 5, 10 และ 15 วัน	56
16	ปริมาณของสารไดยูรอนที่ระดับความเข้มข้น 20 มิลลิกรัม/กิโลกรัม ที่แบคทีเรียทั้ง 5 สายพันธุ์สามารถย่อยได้ หลังจากการบ่ม เป็นเวลา 5, 10 และ 15 วัน	56

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ประสิทธิภาพของการย่อยสลายสารไดยูรอนโดยแบคทีเรียที่แยกเชื้อบริสุทธิ์จากดิน

The Efficiency of Diuron Degradation by Bacteria Isolated from Soil

คำนำ

ในปัจจุบันมีการใช้สารกำจัดศัตรูพืชกันอย่างกว้างขวางมาก เนื่องจากให้ผลรวดเร็ว ใช้สะดวก เสียค่าใช้จ่ายน้อย เมื่อมีการใช้สารกำจัดศัตรูพืชกันเพิ่มขึ้น จึงทำให้สารเคมีเหล่านี้กระจายและสะสมตกค้างอยู่ในสิ่งแวดล้อม ซึ่งอาจมีผลกระทบทั้งโดยตรงและโดยอ้อมต่อความเป็นอยู่และชีวิตมนุษย์ สารเคมีกลุ่มใหญ่ที่สุดที่นิยมใช้กัน คือ สารกำจัดวัชพืช ใน 10 ปีที่ผ่านมามีการนำเข้าสารกำจัดศัตรูพืชเพิ่มขึ้นทุกปี จากปี พ.ศ. 2541 ได้มีการนำเข้า 10,000 ตัน คิดเป็นตัวเงินประมาณ 2,666 ล้านบาท แต่ในปี พ.ศ. 2552 มีการนำเข้าถึง 137,900 ตัน ทำให้ต้องสูญเสียเงินเพื่อนำเข้าสารกำจัดศัตรูพืชปีละหลายหมื่นล้านบาท ในกรณีของสารกำจัดวัชพืชนั้นมีการนำเข้ามากที่สุดในทุกๆปี ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2547 – 2552 การนำเข้าสารกำจัดวัชพืชในปี 2552 มีมากถึง 75,000 ตัน คิดเป็นมูลค่ากว่า 9 พันล้านบาท รองลงมาคือ สารกำจัดแมลง ซึ่งมีปริมาณการนำเข้า 21,590 ตัน คิดเป็นมูลค่า 3.45 พันล้านบาท และสารกำจัดรา 10,630 ตัน คิดเป็นมูลค่า 1.83 พันล้านบาท ตามลำดับ (กรมวิชาการเกษตร, 2552) สำหรับไดยูรอนนั้นเป็นสารกำจัดวัชพืชที่ใช้กันอย่างแพร่หลายในพื้นที่การเกษตรทั่วโลก เป็นสารกำจัดวัชพืชในกลุ่มยูเรียที่สามารถกำจัดวัชพืชได้ทั้งแบบก่อนการงอก (preemergence) และภายหลังการงอก (post-emergence) อย่างไรก็ตาม ไดยูรอนเป็นสารที่มีความเป็นพิษต่อมนุษย์ โดยสามารถก่อให้เกิดมะเร็งในตับ ไต และระบบโลหิต การใช้ไดยูรอนอย่างมากนี้จึงส่งผลให้เกิดการปนเปื้อนของสารที่เป็นอันตรายในสิ่งแวดล้อม โดยเฉพาะอย่างยิ่งในแหล่งน้ำตามธรรมชาติ ทั้งนี้การย่อยสลายไดยูรอนทั้งตามธรรมชาติและการบำบัดด้วยกระบวนการทางเคมีหรือกระบวนการทางชีวภาพนั้นเป็นไปได้ยาก เนื่องจากไดยูรอนมีโครงสร้างทางเคมีที่เสถียรและยังเป็นพิษต่อจุลินทรีย์ ประเทศไทยเองก็มีการใช้ไดยูรอนเป็นจำนวนมาก จากรายงานการนำเข้าไดยูรอนมาใช้ในทางการเกษตรในแต่ละปีมีประมาณล้านกิโลกรัม ไดยูรอนจะปนเปื้อนอยู่ในสิ่งแวดล้อมเป็นเวลานาน โดยจะตกค้างอยู่ในดิน ตะกอน และในน้ำตั้งแต่ 1 เดือนจนถึงหลายปี (Okamura, 2002) และยังสามารถยับยั้งกระบวนการตรึงไนโตรเจนในดินของจุลินทรีย์บางชนิดได้ ปริมาณของไดยูรอนที่ถูกดูดซับอยู่ในดินจะสัมพันธ์โดยตรงกับปริมาณของอินทรียวัตถุในดิน โดยดินชั้นบนที่ความลึก 25 ซม. ที่มีปริมาณอินทรียวัตถุสูงจะมีการชะล้างของไดยูรอนที่ต่ำ (0.08 ไมโครกรัม/กรัม) ส่วนในดินชั้นล่าง มีการชะล้างของไดยูรอนมาก (0.45 ไมโครกรัม/กรัม) จึงมีการปนเปื้อนลงสู่แม่น้ำได้ง่าย (Alva and Singh, 1990) ในตัวอย่างดินบริเวณที่มีประวัติการใช้ไดยู

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

รอนมาเป็นเวลา 13 ปี พบว่ามีการสะสมของไดยูรอน 4.5 กิโลกรัม/เฮกตาร์/ปี (Tworkoski, 2000) อย่างไรก็ตามปริมาณของการดูดซับไดยูรอนจะขึ้นอยู่กับเนื้อดินและโครงสร้างของดินด้วย ในดิน calcareous ไดยูรอนจะถูกดูบซับอยู่ในช่องว่างภายใน 8 วันก่อนถูกจะชะล้างไปที่อื่น (Gooddy, 2002) ไดยูรอนจะมีครึ่งชีวิต 128 วัน ในดินที่มีเนื้อดินเป็นดินร่วน แต่สามารถบำบัดดินปนเปื้อนได้โดยวิธีทางชีวภาพ (Rouchaud, 2000) ไดยูรอนเป็นแหล่งมลพิษของสิ่งมีชีวิตในน้ำ จากการศึกษาตัวอย่างน้ำทั้งหมดในประเทศญี่ปุ่นพบว่า 86 % ของตัวอย่างมีการปนเปื้อนไดยูรอน 3.5 ไมโครกรัม/กรัม (Okamura, 2002) ประเทศเนเธอร์แลนด์อนุญาตให้บริเวณชายฝั่งของทะเล แม่น้ำมีความเข้มข้นของไดยูรอนไม่เกิน 430 นาโนกรัม/ลิตร (Lamoree *et al*., 2002) ในปัจจุบันมีการตรวจพบการตกค้างของสารเคมีในปริมาณมากขึ้นเรื่อยๆ เกือบทุกพื้นที่ของประเทศไทย จากรายงานของกองควบคุมมลพิษซึ่งตรวจพบสารอันตรายตามแหล่งที่มีการเพราะปลูก นอกจากนั้นยังพบการปนเปื้อนของสารเคมีเหล่านี้ในแหล่งน้ำใต้ดินในพื้นที่ 6 จังหวัด คือ เพชรบุรี ลพบุรี สระบุรี อุทัยธานี กาญจนบุรี และสุพรรณบุรี ดังนั้น ปัญหาพิษตกค้างของสารกำจัดวัชพืชในดินจึงเป็นปัญหาที่สำคัญและพยายามหาวิธีแก้ไข อย่างไรก็ตาม แบคทีเรียในดินมีกลไกที่สามารถย่อยสลายไดยูรอนได้ El-Deeb (2000) พบว่า *Pseudomonas* sp. สายพันธุ์ที่แยกได้จากดินสามารถใช้ไดยูรอนเป็นของแหล่งคาร์บอน และมีแบคทีเรียหลายสายพันธุ์ที่เกี่ยวข้องกับการแปรสภาพของไดยูรอนไปเป็นสารตัวอื่นได้เช่น *Streptomyces grivoleus* เปลี่ยน 3,4-dichloroaniline ไปเป็น sulfonylurea (Omer *et al*.,1990) *Rhodoccocus* sp. เปลี่ยน 3,4-dichloroaniline ไปเป็น thiocarbamates (Tam, 1987) *Rhodococcus* sp. สายพันธุ์ NI86/21 เปลี่ยน 3,4-dichloroaniline ไปเป็น triazines (Nagy, 1995) การใช้ประโยชน์จากแบคทีเรียมาช่วยย่อยสลายสารพิษที่ตกค้างในดินจึงเป็นแนวทางหนึ่งที่ควรจะศึกษา และคาดว่าจะสามารถนำมาใช้ประโยชน์ในการย่อยสลายสารพิษที่ตกค้างในดินของประเทศไทยได้

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วัตถุประสงค์

1. คัดเลือกเชื้อแบคทีเรียดินสายพันธุ์ที่มีความทนทานต่อสารกำจัดวัชพืชไดยูรอน

2. เพื่อทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายสารเคมีของเชื้อแบคทีเรียในห้องปฏิบัติการ

3. เพื่อทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายสารเคมีของเชื้อแบคทีเรียในดินจำลอง

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

การตรวจเอกสาร

สารกำจัดศัตรูพืช

สารกำจัดศัตรูพืช (pesticide) คือสารที่ใช้ป้องกัน กำจัด ยับยั้งหรือควบคุมศัตรูพืช อาจเป็นได้ทั้งสารเคมี สารชีวภาพที่ใช้ควบคุมสิ่งที่ไม่ต้องการในการเพาะปลูกหรือเข้าทำลายพืชสารฆ่าศัตรูพืชที่สำคัญของประเทศไทยมีด้วยกัน 8 กลุ่มดังนี้ (ธวัชชัย, 2540)

1. สารกำจัดวัชพืช (herbicide) ใช้ควบคุมวัชพืช
2. สารกำจัดแมลง (insecticide) ใช้ควบคุมแมลงศัตรูพืช
3. สารกำจัดหอย (mollussicide)ใช้ควบคุมหอยทากทั้งชนิดมีเปลือกและไม่มีเปลือก
4. สารกำจัดเห็บไร (acaricide) ใช้ควบคุมเห็บ ไร ปลวก
5. สารกำจัดรา (fungicide) ใช้ควบคุมรา สาเหตุโรคพืช
6. สารกำจัดสัตว์แทะ (rodenticide) ใช้ควบคุมหนูที่กัดกิน ทำลายพืชในไร่
7. สารรมควันพิษ (fumigant) ใช้ควบคุมวัชพืช แมลง และสิ่งมีชีวิตในดิน
8. สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช (plant growth regulator) ใช้ควบคุมการเจริญเติบโตของพืช

ในประเทศไทยได้มีการนำเข้าสารกำจัดศัตรูพืชมาใช้ในทางการเกษตรในปริมาณเพิ่มมากขึ้นทุกปี และสารกำจัดวัชพืชนั้นเป็นสารกำจัดศัตรูพืชที่มีการนำเข้ามากที่สุดในทุกๆปี ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2547 – 2552 การนำเข้าสารกำจัดศัตรูพืชในปี 2552 มีมากถึง 137.59 ล้านกิโลกรัมคิดเป็นมูลค่า 16.82 พันล้านบาท สารที่มีการนำเข้ามากที่สุดคือ สารกำจัดวัชพืช รองลงมาคือ สารกำจัดแมลงและสารกำจัดราซึ่งมีปริมาณการนำเข้า 21.59 ล้านกิโลกรัมคิดเป็นมูลค่า 3.45 พันล้านบาท และ 10.63 ล้านกิโลกรัมคิดเป็นมูลค่า 1.83 พันล้านบาท ตามลำดับ

ในขณะที่สารสารกำจัดศัตรูพืชจำพวก glyphosate isopropyl ammonium มีการนำเข้าในปี 2550 มากที่สุดคือ 34.98 ล้านกิโลกรัมคิดเป็นมูลค่า 3.03 พันล้านบาท รองลงมาคือ paraquat dichloride มีการนำเข้า 16.86 ล้านกิโลกรัมคิดเป็นมูลค่า 1.80 พันล้านบาท ส่วนไดยูรอนมีการนำเข้า 1.79 ล้านกิโลกรัม คิดเป็นมูลค่า 1.80 ร้อยล้านบาท (กรมวิชาการเกษตร, 2552)

1. การจำแนกสารกำจัดวัชพืช (Herbicide Classification)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารกำจัดวัชพืชสามารถแบ่งออกเป็นประเภทหรือกลุ่ม โดยยึดหลักหรือเกณฑ์ต่างๆ กันในที่นี้ จะแบ่งโดยยึดเกณฑ์ 3 ประการ คือ ขอบเขตชนิดพืชที่ควบคุม ลักษณะการใช้กับพืช และเกณฑ์ทางเคมี (Ashton and Craft, 1981)

1.1 แบ่งตามขอบเขตของชนิดพืชที่ควบคุม

ตามเกณฑ์นี้จะสามารถแบ่งสารกำจัดวัชพืชออกได้ 2 ประเภท คือ

ประเภทเลือกทำลาย (selective herbicides) หมายถึง สารเคมีที่มีผลในการควบคุมพืชบางชนิด แต่ไม่มีผลหรือมีผลน้อยกับพืชอีกบางชนิด

ประเภทไม่เลือกทำลาย (nonselective herbicides) หมายถึง สารเคมีที่มีผลในการควบคุมกำจัดหรือเป็นอันตรายกับพืชทุกชนิดที่รับสารประเภทนี้เข้าไป

1.2 แบ่งตามลักษณะการใช้กับพืช

ตามเกณฑ์นี้จะสามารถแบ่งสารกำจัดวัชพืชออกได้ 2 ประเภทเช่นกัน คือ

1) ประเภทใช้ทางใบ (foliar application) หมายถึง สารกำจัดวัชพืชที่เข้าสู่พืชทางใบหรือยอดอ่อน ซึ่งสามารถแบ่งย่อยได้อีก คือ ประเภทสัมผัสหรือถูกตาย (contact herbicides) หมายถึง สารประเภทที่สามารถทำลายพืชได้เฉพาะส่วนที่สารไปสัมผัสเท่านั้น ไม่มีการเคลื่อนย้ายของสารไปสู่ส่วนอื่นๆของพืช ประเภทซึมซาบ (systemic หรือ translocated herbicides) หมายถึง สารที่เมื่อเข้าสู่พืชแล้วสามารถเคลื่อนย้ายไปสู่ส่วนอื่นของพืชได้ โดยจะเคลื่อนย้ายไปตามท่ออาหาร (phloem) เป็นส่วนใหญ่ และจะแสดงผลในการทำลายในจุดต่างๆ ที่สารประเภทนี้เคลื่อนย้ายไปถึง

2) ประเภทใช้ทางดิน (soil application) หมายถึง สารกำจัดวัชพืชที่เข้าสู่พืชทางรากหรือส่วนอื่นๆ ของพืชที่อยู่ใต้ดิน ซึ่งรวมถึงใบเลี้ยงหรือยอดอ่อนก่อนจะโผล่พ้นพื้นผิวดิน มีผลทำให้ส่วนขยายพันธุ์ของพืช ซึ่งเริ่มจะงอกหรือกำลังงอกได้รับอันตราย สารกำจัดวัชพืชประเภทใช้ทางดินมักจะมีผลตกค้างในดิน (residue) สารบางชนิดอยู่ในดินได้นานเป็นปี ขึ้นกับชนิดและความเข้มข้นของสาร และสภาพแวดล้อม เช่น ความชื้นและชนิดของดิน

1.3 แบ่งตามกลุ่มทางเคมี (chemical classification)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Ashton และ Craft (1981) และ Klingman และ Ashton (1982) จำแนกประเภทและกลุ่มของสารกำจัดวัชพืชตามลักษณะทางเคมีได้ดังนี้ คือ

1) ประเภทสารอนินทรีย์ (inorganic herbicides) เช่น ammonium sulfamate (AMS), copper sulfate, calcium cyanamide, copper chelate, sodium chlorate, hexaflurate เป็นต้น มีผลต่อพืชในลักษณะทำลายเซลล์พืชเป็นส่วนใหญ่

2) ประเภทสารอินทรีย์ (organic herbicides) ซึ่งสามารถแบ่งย่อยออกได้เป็นกลุ่มต่างๆ ตามโครงสร้างหลักขององค์ประกอบทางชีวเคมี คือ

Aliphatics เป็นสารที่มีโมเลกุลประกอบด้วยไฮโดรคาร์บอนต่อกันเป็นลูกโซ่ โดยไม่มีส่วนที่เป็น ring สารในกลุ่ม aliphatic บางชนิดมีคลอรีนอยู่บนลูกโซ่ เช่น dalapon และ TCA บางชนิดมีสารหนู (arsenic) เช่น cacodylic acid, DSMA, MAA, MAMA และ MSMA และสารชนิดอื่นๆ ซึ่งมีองค์ประกอบเฉพาะตัว เช่น acrolein allyl alcohol, methyl bromide และ glyphosate สารพวก dalapon และ glyphosate สามารถซึบซาบได้ ใช้กำจัดหญ้าที่มีอายุค้างปี เช่น หญ้าคา ได้ดี โดยเฉพาะ glyphosate เป็นสารที่ใช้ควบคุมกำจัดหญ้าคาที่มีประสิทธิภาพมากที่สุด

Amides สารในกลุ่มนี้ส่วนใหญ่ใช้ทางดิน แบ่งได้เป็น 2 กลุ่มย่อย คือ Chloroacetamides ซึ่งเป็นสารยับยั้งการเจริญเติบโตและลดการขยายและการแบ่งตัวของเซลล์ ตัวอย่างเช่น alachlor, butachlor, metolachlor, propachlor, terbuchlor และ CDAA และอีกกลุ่มย่อยเป็นสารซึ่งมีผลต่อพืชแตกต่างกันไป เช่น diphenamid, napropamide, naptalam, pronamide และ propanil เป็นต้น สารในกลุ่มนี้มีการเลือกทำลายค่อนข้างสูง ตัวอย่างเช่น alachlor ใช้ได้ดีในพืชปลูกใบเลี้ยงเดี่ยว metolachlor ใช้ได้ดีในพืชปลูกตระกูลถั่ว CDAA ใช้ได้ดีในพืชผัก และ butachlor และ propanil ใช้ได้ดีในข้าว

Benzoics สารในกลุ่มนี้ใช้ทางใบ และซึมซาบได้ มีผลต่อพืชในลักษณะเร่งการเจริญเติบโต (growth regulating) ของเซลล์ ทำให้เซลล์และเนื้อเยื่อพืชเจริญเติบโตมากและไม่สมดุลย์ ในที่สุดทำให้พืชตายได้ สารที่สำคัญในกลุ่มนี้ เช่น dicamba, chloramben และ 2, 3, 6-TBA เป็นสารประเภทเลือกทำลาย dicamba กำจัดวัชพืชใบกว้างได้ดี นิยมใช้ในธัญญพืชและทุ่งหญ้า chloramben กำจัดวัชพืชใบแคบได้ดี นิยมใช้ในถั่วเหลือง หน่อไม้ฝรั่ง ถั่วลิสง พริกไทย ฟักทอง มันเทศ และมะเขือเทศ ส่วน TBA มักใช้กำจัดไม้พุ่มหรือไม้ยืนต้นทั้งหลาย

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Bipyridiliums สารในกลุ่มนี้เป็นประเภทสัมผัสหรือถูกตาย อาจมีการเคลื่อนย้ายในพืชได้บ้าง หากฉีดพ่นให้กับพืชในระยะที่ไม่มีแสงแดด มีผลต่อพืชในลักษณะทำลายคลอโรฟิลล์ ทำให้พืชไม่สามารถสังเคราะห์แสงได้ และใบหรือส่วนของต้นที่มีสีเขียวจะเหี่ยวและร่วงในที่สุด สารในกลุ่มนี้หากใช้ทางดินจะไม่มีผลในการทำลายพืช หรือหากใช้น้ำขุ่นผสมในการฉีดพ่น จะทำให้ประสิทธิภาพลดลง สารในกลุ่มนี้ที่สำคัญมี 2 ชนิด คือ paraquat ซึ่งนิยมใช้ในการควบคุมกำจัดวัชพืชบนบก และ diquat ซึ่งนิยมใช้ในการควบคุมกำจัดวัชพืชในน้ำ เนื่องจากสารเคมีในกลุ่มนี้สามารถทำลายพืชทุกชนิด การเลือกทำลายจึงต้องใช้วิธีการในการฉีดพ่นเข้าช่วย คือ การฉีดพ่นไม่ให้ถูกส่วนที่มีสีเขียวของพืชปลูกหรือพืชที่ไม่ประสงค์จะกำจัด

Carbamates สารในกลุ่มนี้มีความสามารถในการเลือกทำลายสูงบางชนิดใช้ทางดิน บางชนิดใช้ทางใบ สามารถเคลื่อนย้ายในพืชได้ มีผลต่อพืชในลักษณะไปยับยั้งการแบ่งเซลล์ (mitotic poisons) โดยสารที่ใช้ทางดินจะยับยั้งการแบ่งเซลล์ของราก และที่ใช้ทางใบจะยับยั้งการแบ่งเซลล์ของใบและราก สารกำจัดวัชพืชที่สำคัญในกลุ่มนี้ เช่น asulam, barban, propham chloropropham และ desmidipham เกือบทุกชนิดนิยมใช้ทางดิน เพื่อควบคุมกำจัดวัชพืชฤดูเดียว และแสดงผลดีในเขตที่มีอากาศค่อนข้างเย็น ยกเว้น asulam ซึ่งสามารถใช้ควบคุมกำจัดวัชพืชค้างปีได้หลายชนิด โดยเฉพาะสามารถควบคุมกำจัดหญ้าคาได้ดีหากใช้ผสมกับ dalapon

Dinitroanilines สารในกลุ่มนี้มีการเลือกทำลายสูง ส่วนใหญ่ใช้ทางดินมี ผลต่อพืชในลักษณะยับยั้งการแบ่งเซลล์โดยเฉพาะเซลล์ของราก ทำให้รากมีลักษณะโค้งงอนหรือสั้นกุด สารเกือบทุกชนิดในกลุ่มนี้ส่วนใหญ่จะมีสีเหลืองส้ม ละลายน้ำได้น้อย และมีอัตราการระเหยสูงจึงมักใช้ ในลักษณะฉีดพ่นแล้วคลุกลงดินก่อนปลูกพืช (preplant-incorporation) สารในกลุ่มนี้มีหลายชนิด แต่ที่สำคัญ เช่น benefin, butralin, dinitramine, fluchloralin, isopropalin nitralin, oryzalin, pendimethalin และ trifluralin สารเหล่านี้บางชนิดได้หยุดการผลิตไปแล้ว บางชนิดยังนิยมใช้กับอย่างแพร่หลาย เช่น trifluralin ซึ่งใช้ได้ดีในพืชผักเกือบทุกชนิด oryzalin ใช้ได้ดีในไม้ผลและไม้ประดับ และ pendimethalin ใช้ได้ดีในข้าว ข้าวโพด และพืชผัก

Diphenyl ethers สารในกลุ่มนี้มีการเลือกทำลายค่อนข้างสูงใช้ทางดินก่อนพืชจะงอกหรืองอกใหม่ๆ เข้าสู่พืชได้ทั้งทางใบและทางราก เคลื่อนย้ายในพืชได้น้อยบางครั้งแสดงผลในลักษณะสัมผัสหรือถูกตาย มีผลต่อพืชในลักษณะการยับยั้งหรือขัดขวางการสร้างและการถ่ายทอดพลังงานของ chloroplast และ mitochondria สารที่สำคัญในกลุ่มนี้ เช่น acifluorfen, bifenox, diclofop, fluorodifen, nitrofen, nitrofluorfen และ oxyfluorfen สารในกลุ่มนี้เกือบทุกชนิด

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Nitriles สารในกลุ่มนี้มีการเลือกทำลายค่อนข้างต่ำ บางชนิดใช้ทางดิน บางชนิดใช้ทางใบ สารที่สำคัญในกลุ่มนี้ คือ dichlobenil, bromoxynil และ ioxynil สาร dichlobenil มีผลด้านยับยั้งการเจริญเติบโตของยอดใบอ่อนหรือปลายราก ในขณะที่ bromoxynil และ ioxynil มีผลทำให้ใบมีสีเหลืองซีด (chlorosis) และแห้งตาย (necrosis) dichlobenil ใช้ก่อนงอก สามารถควบคุมวัชพืชฤดูเดียวในพืชยืนต้นและไม้ผล และสามารถใช้ควบคุมวัชพืชในแหล่งน้ำได้ดีด้วย ส่วน bromoxynil และ ioxynil ใช้ได้ดีในธัญญพืช และแปลงหญ้าสำหรับผลิตเมล็ด

Phenoxys สารในกลุ่มนี้มีการเลือกทำลายค่อนข้างสูง โดยเฉพาะจะทำลายพวกใบกว้างได้ดี เป็นสารที่จัดอยู่ในกลุ่มฮอร์โมนพืช กล่าวคือ หากใช้ในระดับความเข้มข้นต่ำ จะสามารถเร่งและเพิ่มการเจริญเติบโตของพืชได้ หากใช้ในระดับความเข้มข้นสูงสารในกลุ่มนี้จะแสดงผลในลักษณะทำลายพืช ลักษณะการทำลายจะเริ่มด้วยการเกิดอาการโค้งงอกของพืชแบบโค้งลง (epinasty) อันเป็นผลมาจากการที่เนื้อเยื่อของพืชเจริญเติบโตไม่เท่ากัน การโค้งงอทำให้การเคลื่อนย้ายอาหารและน้ำภายในพืชเป็นไปโดยลำบาก ทำให้พืชตายในที่สุด สารกำจัดวัชพืชที่สำคัญในกลุ่มนี้ เช่น 2,4-D, 2, 4, 5-T และ MCPA ทั้งหมดใช้ฉีดพ่นทางใบ 2,4-D มักผลิตในรูปต่างๆ เช่น salt, amine หรือ ester กำจัดวัชพืชใบกว้างและพวกกกได้ดีมาก ในรูป ester ระเหยได้ง่าย เวลาใช้จึงต้องระมัดระวังไม่ควรฉีดพ่นในบริเวณที่มีพืชปลูกเป็นพืชใบกว้าง ทั้ง 2,4-D และ MCPA ใช้กำจัดวัชพืชในพืชปลูกใบแคบ เช่น ข้าวและข้าวโพด ส่วน 2, 4, 5-T ใช้กำจัดต้นไม้ใหญ่ บางครั้งมักใช้ 2, 4, 5-T ผสมรวมกับ 2, 4-D เพื่อใช้ให้สามารถกำจัดวัชพืชใบกว้างข้ามปีได้ดีขึ้น

Thiocarbamate สารในกลุ่มนี้มีการเลือกทำลายค่อนข้างสูง โดยเฉพาะจะทำลายพวกใบแคบได้ดี ใช้ฉีดพ่นทางดิน และจะทำลายยอดอ่อนของพืชที่กำลังงอกจากผิวดิน การทำลายพืชเกิดขึ้นในลักษณะการยับยั้งขบวนการ lipid metabolism สารกำจัดวัชพืชในกลุ่มนี้หลายชนิดแต่ที่สำคัญ คือ butylate, cycloate, EPTC, molinate, pebulate, CDEC, vernolate และ triallate พืชปลูกที่ทนทานต่อสารในกลุ่มนี้ คือ ข้าวโพด และถั่วบางชนิด โดยเฉพาะ molinate สามารถใช้ในข้าวได้ดี ข้อเสียของสารกลุ่มนี้คือ มีการระเหยสูงโดยเฉพาะในสภาพที่มีอุณหภูมิสูงหลังจากฉีดพ่นจึงจำเป็นต้องคลุกลงดิน ซึ่งเป็นการไม่สะดวกในเชิงปฏิบัติทำให้ไม่เป็นที่นิยมใช้ในเขตร้อน

Triazines สารในกลุ่มนี้มีการเลือกทำลายมากน้อยแตกต่างกันตามชนิดของสาร ส่วนใหญ่หรือเกือบทั้งหมดใช้ทางดิน มีผลการทำลายพืชในลักษณะยับยั้งการสังเคราะห์แสงโดยเฉพาะยับยั้งขบวนการที่เรียกว่า Hill reaction ทำให้ใบพืชมีสีเหลืองซีดและตายในที่สุด สารกำจัดวัชพืชในกลุ่มนี้มีหลายชนิด ที่สำคัญคือ atrazine, ametryn, cyanazine, cyprazine, prometon,

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

prometryn, propazine, simazine, simetryn, terbutryn และ metribuzin เกือบทุกชนิดควบคุมวัชพืชฤดูเดียวได้ดีถึงดีมาก atrazine และ ametryn ใช้ได้ดีในไม้ผล สับปะรด อ้อย และข้าวโพด ความแตกต่างของสาร 2 ชนิดนี้ คือ ametryn ละลายน้ำได้มากกว่า และ atrazine สามารถใช้ผสมกับสารอื่นๆ ได้ดีกว่า ทำให้สามารถควบคุมกำจัดวัชพืชได้มากขึ้น metribuzin เป็นสารที่มีขอบเขตการใช้กว้าง สามารถใช้ได้ดีในพืชตระกูลถั่ว หน่อไม้ฝรั่ง และมะเขือเทศ สามารถผสมรวมกับสารอื่นๆ ได้หลายชนิดเช่นเดียวกับ atrazine สารที่สำคัญอีกชนิดในกลุ่มนี้คือ simazine เป็นสารซึ่งมีความสามารถในการละลายน้ำต่ำมาก ใช้ได้กับพืชปลูกหลายชนิดเช่นเดี่ยวกับ atrazine แต่ simazine สามารถใช้ในแหล่งน้ำเพื่อกำจัดวัชพืชน้ำทั้งที่ลอยน้ำและจมน้ำได้ด้วย สารทั้ง 4 ชนิดที่กล่าวถึงในรายละเอียดในกลุ่มนี้จำหน่ายและใช้กันค่อนข้างจะแพร่หลายในประเทศไทย ส่วนชนิดอื่นๆ ที่ไม่ได้กล่าวถึงในรายละเอียด มีการใช้น้อยมาก บางชนิดไม่มีการใช้เลยในประเทศไทย

Ureas สารในกลุ่มนี้มีการเลือกทำลายปานกลางถึงค่อนข้างต่ำ ส่วนใหญ่ใช้ทางดิน มีผลต่อการเจริญเติบโตของพืชในลักษณะการยับยั้งการสังเคราะห์แสง โดยไปยับยั้ง Hill reaction สารกำจัดวัชพืชในกลุ่มนี้มีหลายชนิด และมีมากชนิดกว่ากลุ่มอื่นๆ ชนิดที่สำคัญและมีใช้กันมากในเขตร้อน คือ diuron, fluometuron, linuron, neburon, monuron, siduron และ tebuthiuron สารพวกไดยูรอนมีใช้อย่างกว้างขวางในประเทศไทย สามารถผสมกับสารอื่นๆ หลายชนิด พืชที่ใช้ ไดยูรอนกันมาก คือ กล้วย สับปะรด มะละกอ ข้าวโพด อ้อย ฝ้าย องุ่น และหน่อไม้ฝรั่ง ส่วน fluometuron นิยมใช้ในฝ้ายและอ้อย (เผ่าพงษ์, 2526)

Uracils สารในกลุ่มนี้มีลักษณะในการใช้และการทำลายพืชเช่นเดียว กับกลุ่ม ureas แต่มีความต่างกันในด้านโครงสร้างทางเคมี สารที่สำคัญในกลุ่มนี้ คือ bromacil และ terbacil เป็นสารที่สามารถใช้ในการควบคุมกำจัดวัชพืชฤดูเดียวในพืชยืนต้นได้ดี กล่าวคือ bromacil มีประสิทธิภาพสูงในการควบคุมกำจัดวัชพืชในสวนส้มและสับปะรด โดยเฉพาะการกำจัดวัชพืชในสับปะรด นั้น มักนิยมใช้ร่วมกับ diuron เพื่อช่วยลดค่าใช้จ่ายและผลตกค้างในดิน terbacil ใช้ได้ดีในแอบเปิ้ล ส้ม และอ้อย bromacil สามารถละลายในน้ำได้มากกว่า terbacil ในสภาพที่มีฝนตกชุกการใช้ terbacil จึงอยู่ในดินได้นานกว่า

สารชนิดอื่นๆ มีสารกำจัดวัชพืชอีกหลายชนิดที่การจัดกลุ่มยังไม่ชัดเจน เพราะโครงสร้างเคมีไม่สามารถจัดลงในกลุ่มใดได้ สารกำจัดวัชพืชเหล่านี้มีหลายชนิดที่จำหน่ายและใช้กันอย่างแพร่หลายในประเทศไทย เช่น amitrole ใช้ในบริเวณที่ไม่ได้ปลูกพืช ควบคุมกำจัดวัชพืชทั้งวัชพืชฤดูเดียวและวัชพืชข้ามปี bensulide ใช้ควบคุมกำจัดวัชพืชในไม้ดอกไม้ประดับ และพืชผัก

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

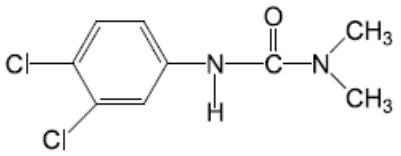
เป็นสารที่ตกค้างในดินนาน จึงมีปัญหาในการใช้ DCPA ใช้กำจัดวัชพืชในพืชตระกูลถั่วและพืชผักได้ดีมาก มีผลตกค้างในดินประมาณ 6 เดือน endothall ใช้ควบคุมกำจัดวัชพืชในแหล่งน้ำ และในสนามหญ้า โดยสามารถควบคุมวัชพืชใบกว้างได้ดี picloram ใช้ควบคุมวัชพืชใบกว้างได้ดีทั้งวัชพืชล้มลุกและยืนต้น สามารถใช้ทำลายต้นไม้ใหญ่และตอไม้ ใช้เป็นสารกำจัดตอยางในการปลูกแทน triclopyr ใช้ในการ ควบคุมกำจัดวัชพืชใบกว้างหลายชนิด รวมทั้งไม้เนื้อแข็ง เช่น ไมยราบยักษ์ นิยมใช้เป็นสารฆ่าตอยางพารา และตอสับปะรด และใช้กำจัดวัชพืชในปาล์มน้ำมัน

2. สารไดยูรอน

ชื่อทางเคมี ไดยูรอน (Diuron)

สูตรทางเคมี $C_9H_{10}Cl_2N_2O$

โครงสร้างโมเลกุล



ไดยูรอนเป็นสารกำจัดวัชพืชที่อยู่กลุ่ม Ureas สารในกลุ่มนี้มีการเลือกทำลายปานกลางถึงค่อนข้างต่ำ ออกฤทธิ์แบบไม่เลือกทำลายและเข้าสู่พืชโดยการดูดซึมโดยการดูดซึม มีการเคลื่อนที่แบบ apoplast โดยผ่านทางท่อน้ำ เป็นการเคลื่อนที่ขึ้น (upward) สามารถควบคุมวัชพืชใบแคบและใบกว้าง อายุปีเดียวและข้ามปี เมื่อพืชได้รับสารในเวลา 2-3 วันจะแสดงอาการใบซีดเหลืองและแห้งตายในที่สุด คงอยู่ในสภาพดินยาวนานประมาณ 4-12 เดือน ในอัตราที่สูงมากอาจมีความคงทนในดินได้ถึง 2 ปีขึ้นอยู่กับสภาพดินและการย่อยสลายของจุลินทรีย์ กลไกลการทำงานของสารไดยูรอนนั้น มีผลต่อการยับยั้งการสังเคราะห์แสง โดยไปยับยั้ง Hill reaction และไปหยุดกระบวนการขนส่งอิเล็กตรอนของ photosystem II ในพืชทำให้พืชไม่สามารถสร้าง ATP และ NADPH (Wessels and Van der Veen, 1956) มีการแนะนำใช้ควบคุมวัชพืชทั่วไปในพื้นที่ที่ไม่มีการปลูกพืช ใช้ที่อัตรา 5 ถึง 30 กิโลกรัมต่อเฮกตาร์ ส่วนวัชพืชฤดูเดียวใช้ในอัตรา 5 ถึง 10 กิโลกรัมต่อเฮกตาร์ ไดยูรอนเป็นสารประกอบที่ไม่มีสีมีสภาพการละลายน้ำที่ 42 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส มีจุดเดือดที่ 158-159 องศาเซลเซียส มีค่า LD_{50} เท่ากับ 3,400 มิลลิกรัมสารออกลิตรต่อกิโลกรัมของน้ำหนักสัตว์ทดลอง มีค่า Henry's law constant 0.000051 Pa m^3 mol^{-1} ไดยูรอนสามารถละลายน้ำได้ในสภาพ pH ปกติ แต่จะสามารถละลายได้มากขึ้นในสภาพที่เป็นกรดจัดและในสภาพที่เป็นด่าง (Spencer, 1982; Salvestrini, 2002)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

การนำเข้าสารไดยูรอนในประเทศไทย

การนำเข้าสารไดยูรอนในประเทศไทย กรมวิชาการเกษตรได้รวบรวมข้อมูลการนำเข้าวัตถุอันตรายทางการเกษตรไว้ พบว่าตั้งแต่ปี พ.ศ. 2545-2552 ประเทศไทยมีการนำเข้าสารไดยูรอนเป็นจำนวนมากถึง 0.3-2.03 ล้านกิโลกรัมต่อปี ซึ่งแสดงไว้ในตารางที่ 1 จากข้อมูลการนำเข้ายังพบว่า มีการนำเข้าสารไดยูรอนติดอยู่ใน 10 อันดับแรก ของการนำเข้าสารกำจัดวัชพืชในประเทศไทยในปี พ.ศ. 2548-2552 (ตารางที่ 2)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 1 การนำเข้าสารไดยูรอนในประเทศไทยปี พ.ศ. 2545-2552

ปี พ.ศ.	สารเคมี	ปริมาณ (ล้านกิโลกรัม)	มูลค่า (ล้านบาท)
2545	สารไดยูรอน	0.3	56.08
2546	สารไดยูรอน	0.62	122.04
2547	สารไดยูรอน	0.85	132.68
2548	สารไดยูรอน	1.02	155.10
2549	สารไดยูรอน	0.81	119.32
2550	สารไดยูรอน	1.79	258.75
2551	สารไดยูรอน	2.03	321.57
2552	สารไดยูรอน	1.20	188.09

ที่มา: กรมวิชาการเกษตร (2552)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 2 ปริมาณการนำเข้าสารกำจัดวัชพืชในประเทศไทยปี พ.ศ. 2548-พ.ศ. 2552

ชื่อสาร	ปริมาณ (ล้านกิโลกรัม)				
	2548	2549	2550	2551	2552
glyphosate isopropylammonium	20.68	27.77	34.98	19.18	39.81
paraquat dichloride	9.45	14.02	16.86	19.74	21.69
2,4-D sodium salt	5.02	6.21	4.04	4.27	3.57
Atrazine	2.40	2.84	3.68	3.77	2.80
Ametryn	1.56	2.03	3.96	4.06	1.60
Propanil	1.23	1.10	1.01	1.80	0.89
Alachlor	1.19	0.76	1.41	0.87	0.74
Butachlor	1.03	1.68	2.01	2.60	2.03
Diuron	1.02	0.81	1.79	2.03	1.20
Sulfur	0.89	1.15	1.04	0.83	0.71

ที่มา: กรมวิชาการเกษตร (2552)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ไดยูรอนในสิ่งแวดล้อม

ไดยูรอนจะปนเปื้อนอยู่ในสิ่งแวดล้อมเป็นเวลานาน โดยจะตกค้างอยู่ในดิน ตะกอน และในน้ำตั้งแต่ 1 เดือนจนถึงหลายปี (Okamura, 2003) และยังสามารถยับยั้งกระบวนการตรึงไนโตรเจนในดินของจุลินทรีย์บางชนิดได้ ปริมาณของไดยูรอนที่ถูกดูดซับอยู่ในดินจะสัมพันธ์โดยตรงกับปริมาณของอินทรียวัตถุในดิน โดยดินชั้นบนที่ความลึก 25 เซนติเมตร ที่มีปริมาณอินทรียวัตถุสูงจะมีการชะล้างของไดยูรอนที่ต่ำ (0.08 ไมโครกรัม/กรัม) ส่วนในดินชั้นล่าง มีการชะล้างของไดยูรอนมาก (0.45 ไมโครกรัม/กรัม) จึงมีการปนเปื้อนลงสู่แม่น้ำได้ง่าย (Alva and Singh, 1990) ในตัวอย่างดินบริเวณที่มีประวัติการใช้ไดยูรอนมาเป็นเวลา 13 ปี พบว่ามีการสะสมของไดยูรอน 4.5 กิโลกรัม/เฮกตาร์/ปี (Tworkoski, 2000) อย่างไรก็ตามปริมาณของการดูดซับไดยูรอนจะขึ้นอยู่กับเนื้อดินและโครงสร้างของดินด้วย ในดิน calcareous ไดยูรอนจะถูกดูบซับอยู่ในช่องว่างภายใน 8 วันก่อนถูกจะชะล้างไปที่อื่น (Gooddy, 2002) ไดยูรอนจะมีครึ่งชีวิต 128 วัน ในดินที่มีเนื้อดินเป็นดินร่วน แต่สามารถบำบัดดินปนเปื้อนได้โดยวิธีทางชีวภาพ (Rouchaud, 2000) ไดยูรอนเป็นแหล่งมลพิษของสิ่งมีชีวิตในน้ำ จากการศึกษาตัวอย่างน้ำทั้งหมดในประเทศญี่ปุ่นพบว่า 86 % ของตัวอย่างมีการปนเปื้อนไดยูรอน 3.5 ไมโครกรัม/กรัม (Okamura, 2003) ประเทศเนเธอร์แลนด์อนุญาตให้บริเวณชายฝั่งของทะเล แม่น้ำ มีความเข้มข้นของไดยูรอนไม่เกิน 430 นาโนกรัม/ลิตร (Lamoree *et al*., 2002)

ผลกระทบของสารไดยูรอนต่อสุขภาพของมนุษย์และสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม

ไดยูรอนที่เข้าสู่ร่างกายมนุษย์จะถูกดูดซับในระบบทางเดินหายใจและในกระเพาะอาหารภายในหนึ่งชั่วโมงจะเกิดการเผาผลาญโดย hydroxylation และ N-dealkylation และจะถูกขับถ่ายกับน้ำปัสสะวะ (Hayes, 1982) ในสุนัขและหนู ครึ่งหนึ่งของสารพิษที่ได้รับจะถูกขับออกมาในรูปของอุจจาระ จากที่ได้มีการทดสอบโดยผสมไดยูรอนในอาหารให้สุนัขและหนูกินเป็นเวลา 9 เดือน พบว่ามีการสะสมไดยูรอนในระดับปริมาณที่สูงมากในตับและไต (Hodge *et al*., 1967) ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมที่มีอายุน้อยจะได้รับพิษของไดยูรอนที่สูงกว่าในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมที่โตเต็มไว ในบางกรณีเมื่อได้รับไดยูรอนในปริมาณที่สูงจะมีผลไปกดระบบประสาทส่วนกลาง แต่ถ้าได้รับไดยูรอนติดต่อกันเป็นเวลานานๆจะมีผลทำให้น้ำหนักลด เลือด ตับและม้ามมีอาการผิดปกติ Hodge *et al*. (1967) ได้ศึกษาความเป็นพิษเรื้อรังจากไดยูรอนโดยแบ่งการทดลองเป็น 2 ส่วน ส่วนที่ 1 ได้ผสมไดยูรอนในอาหาร ความเข้มข้น 0, 0.625, 3.125, 6.25 และ 31.25 มิลลิกรัม/กิโลกรัม/วัน แล้วให้สุนัขพันธ์เล็กเพศผู้ 2 ตัวและเพศเมีย 3 ตัว กินเป็นเวลา 2 ปี ส่วนที่ 2 ศึกษาในหนู 35 ตัวที่ระดับความ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เข้มข้นที่เหมือนกันคือ 0, 1.25, 6.25, 12.5 และ 120 มิลลิกรัม/กิโลกรัม/วัน พบว่าที่ความเข้มข้น 3.125 มิลลิกรัม/กิโลกรัม/วัน ในอาหารที่ให้สุนัขกินและความเข้มข้น 6.25 มิลลิกรัม/กิโลกรัม/วัน ในอาหารที่ให้หนูกินมีผลทำให้เลือดและตับมีความผิดปกติ น้ำหนักลดแต่ไม่มีผลในการทำให้เกิดมะเร็ง ในหนูตัวเมียที่ได้รับไดยูรอนในปริมาณที่เล็กน้อยเป็นเวลาทุกๆวันทำให้ลูกที่เกิดมาในรุ่นที่ 2 และ รุ่นที่ 3 มีน้ำหนักลดลง (Hayes, 1982)

ผลกระทบของสารไดยูรอนต่อลักษณะทางนิเวศวิทยา

ได้มีการศึกษาในสิ่งมีชีวิตหลายชนิด เช่น หนอน หอย กบและปลาทอง สำหรับหนอน (*Lumbriculus variegates)* และ หอย*(Physa gyrina)* มีค่า LC_{50} คือ 29.1 มิลลิกรัม/ลิตร และ15.3 มิลลิกรัม/ลิตร ตามลำดับ (Nebeker and Schuytema,1998) ในกบไดยูรอนมีผลกระทบต่อการอยู่รอดและการเจริญเติบโตจนผิดรูป (Schuytema and Nebeker, 1998) ไดยูรอนเพียงเล็กน้อยจะเป็นพิษต่อนก ในนกกระทามีค่า LC_{50} เท่ากับ 1,730 มิลลิกรัม/กิโลกรัม ในนกกระทาญี่ปุ่นและไก่ฟ้ามีค่า LC_{50} เท่ากับ 500 มิลลิกรัม/กิโลกรัม ในปลามีค่า LC_{50} 48 ชั่วโมงอยู่ในช่วง 4.3 ถึง 42 มิลลิกรัม/ลิตร ปลาเทราท์สายรุ้งมีค่า LC_{50} 96 ชั่วโมงคือ 3.5 มิลลิกรัม/ลิตร และในสัตว์น้ำที่ไม่มีกระดูกสันหลังมีค่า LC_{50} 48 ชั่วโมง อยู่ในช่วง 1 ถึง 2.5 มิลลิกรัม/ลิตร ไดยูรอนจึงเป็นพิษต่อปลาปานกลางและเป็นพิษเล็กน้อยต่อสัตว์น้ำที่ไม่มีกระดูกสันหลัง ความเป็นพิษของไดยูรอน ความเข้มข้นของไดยูรอนที่พบในน้ำโดยทั่วไปจะพบในปริมาณที่ต่ำกว่าเกณฑ์มาตราฐาน แต่ความเข้มข้นที่ต่ำของ 3,4-DCA จะมีผลกระทบต่อสัตว์ในสกุล Crustaceae (Saglio and Trijasse, 1998) แม้มีข้อมูลยังไม่เพียงพอแต่สามารถสรุปได้ว่าถ้าในดินและน้ำมีความเข้มข้นของ 3,4-DCA เกิน 5.0 มิลลิกรัม/กิโลกรัมหรือ 5.0 มิลลิกรัม/ลิตร จะก่อให้เกิดมลพิษต่อสิ่งแวดล้อม (Gooddy, 2002)

การเปลี่ยนรูปในสภาพแวดล้อมโดยสิ่งไม่มีชีวิตและสิ่งมีชีวิต

การย่อยสลายโดยสิ่งไม่มีชีวิต

Hydrolysis ของไดยูรอน

โดยปกติไดยูรอนจะเกิดการ hydrolysis ได้น้อยมากในสารละลายที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เมื่อไดยูรอนเกิดการ hydrolysis จะได้สารผลิตภัณฑ์คือ 3,4-dichloroaniline (3,4-DCA) ซึ่งไม่สามารถกลับคืนรูปเดิมได้ (Salvestrini *et al*., 2002) ในปฏิกิริยาจะมี OH^- และ H^+ เป็นตัวเร่ง

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ปฏิกิริยา มีรายงานว่าอินทรียวัตถุและอนินทรียวัตถุในดินจะเป็นตัวตัวเร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายทางเคมีของไดยูรอน แล้วจะได้สารประกอบพวก amines และ carbon dioxide (ภาพที่ 1) (Salvestrini, 2002)

การย่อยสลายโดยแสง

การเกิด photolysis จะต้องได้รับแสงที่ความยาวคลื่น 200 ถึง 300 นาโนเมตร ใช้ระบบ Photo-Fenton หรือ TiO_2 มาใช้เพื่อลดความเข้มข้นของไดยูรอนในน้ำ (Malato, 2002) พบว่า เมื่อฉายแสงที่ความยาวคลื่น 200 นาโนเมตรเป็นเวลา 125 นาที ปรากฏว่า 90% ของอินทรียวัตถุจะเกิดกระบวนการ mineralization ซึ่งเทคนิคนี้เป็นที่น่าสนใจในการนำไปใช้บำบัดการปนเปื้อนของไดยูรอนได้ แต่ดูเหมือนว่าการใช้แสงมาบำบัดการปนเปื้อนของไดยูรอนมีการศึกษากันน้อยมาก (Okamura, 2002)

การย่อยสลายโดยแสงของ 3,4-dichloroaniline

เมื่อไดยูรอนถูก hydrolysis โดยน้ำหรือถูก photolysis โดยแสงจะเปลี่ยนรูปไปเป็น 3,4-dichloroaniline (Miller *et al*., 1980) การเปลี่ยนรูปโดยทั่วไป จะเกิดการแทนที่ของหมู่ฮาโลเจนในโครงสร้างที่เป็นวงของ 3,4-dichloroaniline เปลี่ยนไปเป็น phenolic compounds ก่อนแล้วจึงเปลี่ยนไปเป็น aminophenoxazones การเปลี่ยนรูปจะเสร็จสมบูรณ์ภายในวันที่ 20 ของการเกิดกระบวนการนี้ (ภาพที่ 2) (Othmen and Boule, 1999)

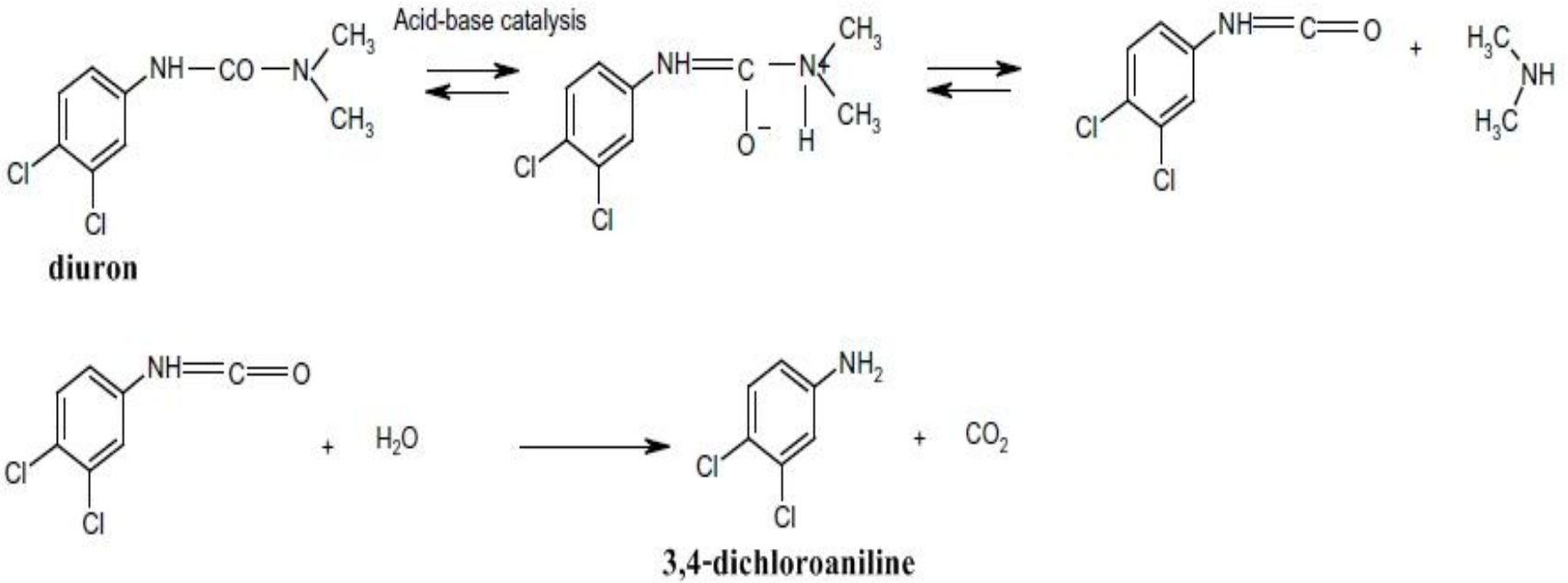
การย่อยสลายโดยสิ่งมีชีวิต

การศึกษาการย่อยสลายทางชีวภาพของไดยูรอนที่สำคัญเริ่มขึ้นเมื่อปี 1973 โดย Geissbuhler ได้ศึกษาการย่อยสลายไดยูรอนในดินที่ฆ่าเชื้อเปรียบเทียบกับดินที่ไม่ได้ฆ่าเชื้อ หลังจากนั้นจึงได้มีการศึกษาสายพันธุ์ของแบคทีเรียและกลไกลต่างๆที่สามารถย่อยสลายไดยูรอนได้เป็นจำนวนมาก เช่น Sorensen *et al.* (2003) ที่พบว่าแบคทีเรียในกลุ่มแอโรบและอะแนโรบ ทั้งแกรมบวกและแกรมลบ แอคติโนมัยซีท และ รา สามารถย่อยสลายไดยูรอนได้ Elisa Esposito (1998) พบว่า Actinomycete strain CCT 4916 มีศักยภาพที่ดีในการใช้บำบัดดินที่ปนเปื้อนสารไดยูรอน โดยสามารถย่อยได้ถึง 37% ของสารไดยูรอนที่ใช้ในการทดลองภายในเวลา 7 วัน และยังพบว่า Actinomycete strain CCT 4916 สามารถใช้สารไดยูรอนเป็นแหล่งของไนโตรเจนกับแหล่ง

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

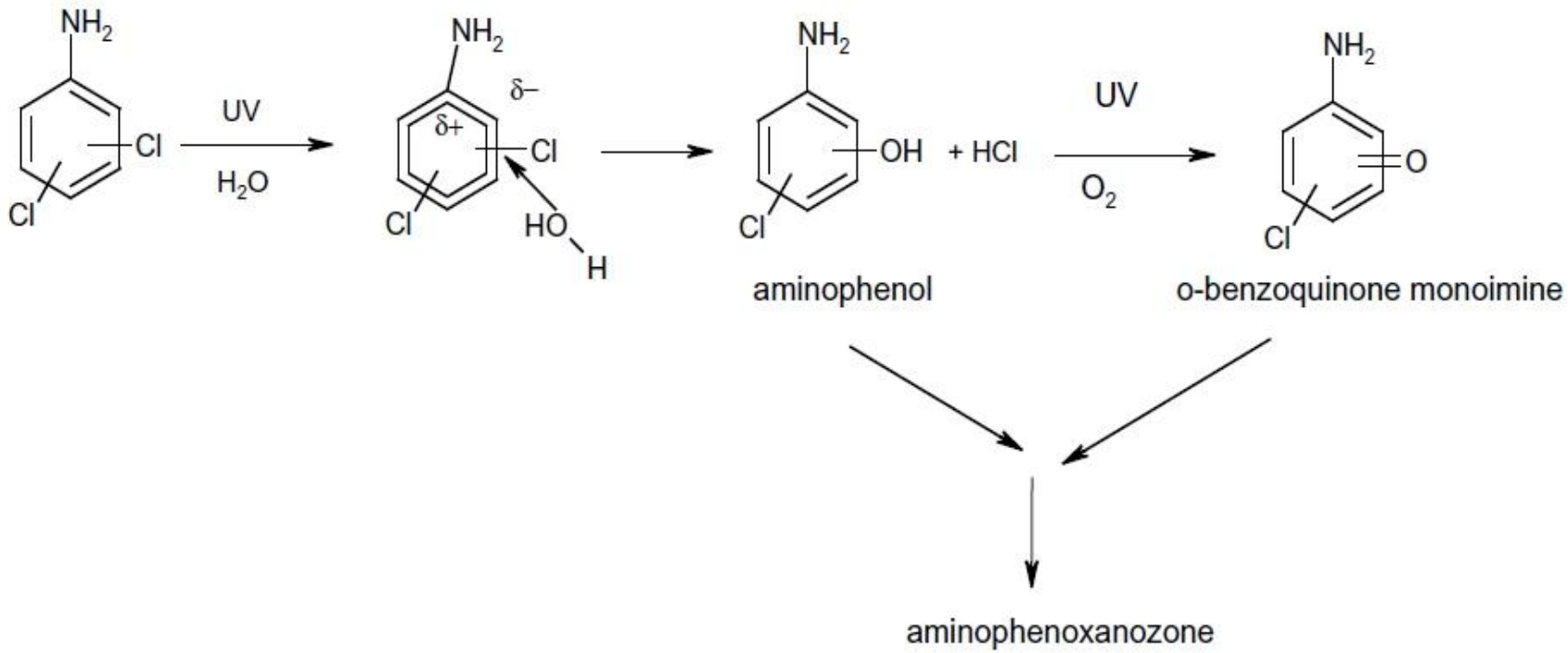
ของคาร์บอนได้ เช่นเดียวกับ El-Deeb, (2000) ที่พบว่า *Pseudomonas* sp. สายพันธุ์ที่แยกได้จากดิน สามารถใช้ไดยูรอนเป็นแหล่งคาร์บอนได้ และสอดคล้องกับรายงานของ Yao al., (2010) ที่กล่าวว่า *Bacillus* sp. ไม่สามารถใช้สารไดยูรอนเป็นแหล่งของคาร์บอนได้ทันที ต้องให้สารไดยูรอนถูก Hydrolysis หรือ ถูก Photolysis ไปเป็น 3,4-dichloroaniline (3,4-DCA) ก่อนจึงจะสามารถใช้ไดยูรอนเป็นแหล่งของคาร์บอนได้ และจากการศึกษาพบว่ามีแบคทีเรียหลายสายพันธุ์ที่เกี่ยวข้องกับการแปรสภาพของไดยูรอนไปเป็นสารตัวอื่นเช่น *Arthrobacter* sp. N2 เปลี่ยนไดยูรอน ไปเป็น3,4-dichloroaniline (Widehem *et al*., 2001) *Streptomyces grivoleus* เปลี่ยน 3,4-dichloroaniline ไปเป็น sulfonylurea (Omer *et al*., 1990) *Rhodoccocus* sp. เปลี่ยน 3,4-dichloroaniline ไปเป็น Thiocarbamates (Tam, 1987) *Rhodoccocus* sp. strainNI86/21 เปลี่ยน 3,4-dichloroaniline ไปเป็น triazines (Nagy, 1995) กลไกการย่อยสลายของไดยูรอนโดยแบคทีเรียได้แสดงไว้ในภาพที่3 (Sorensen, 2003)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



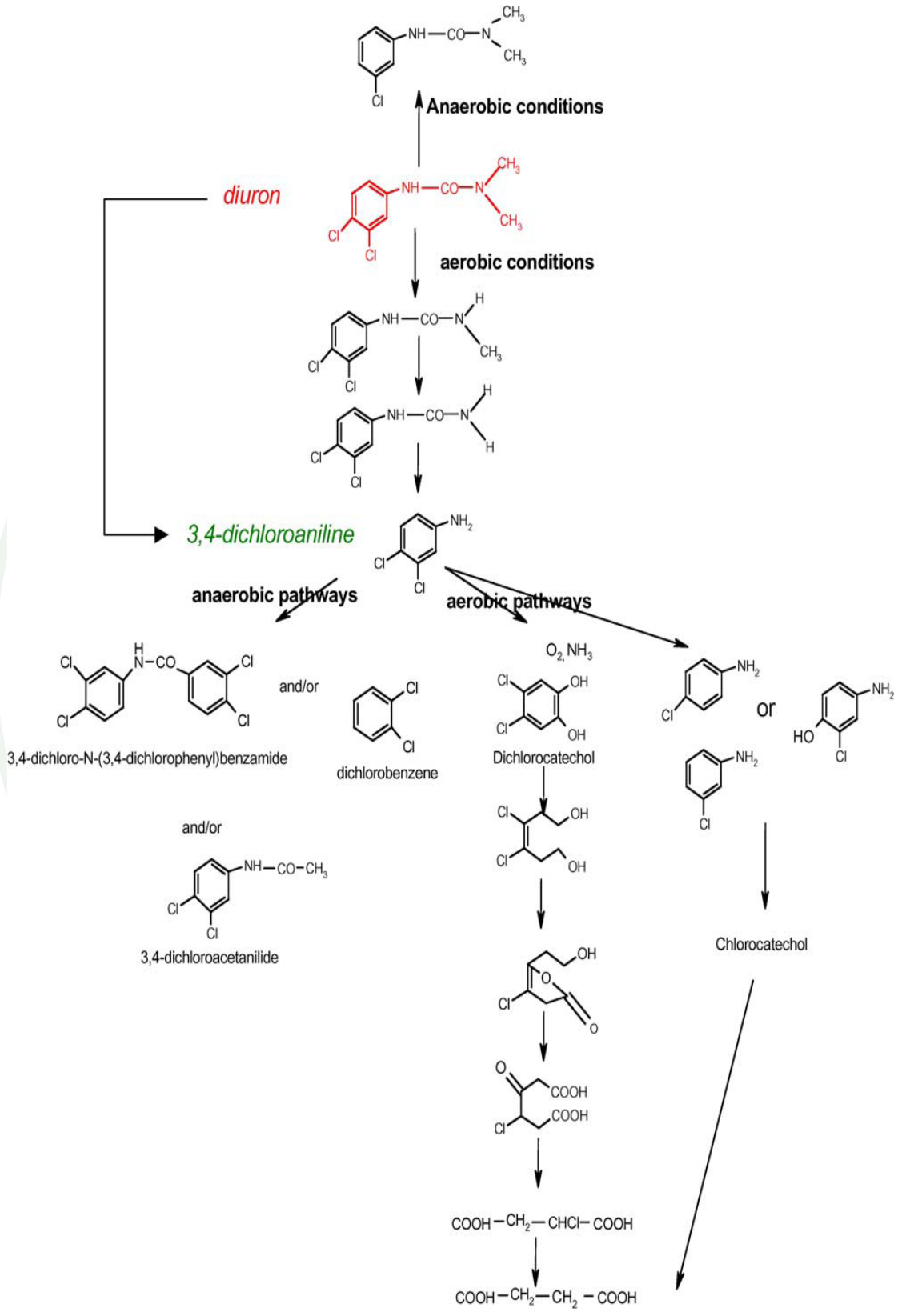
ภาพที่ 1 ปฏิกิริยาการย่อยสลายทางเคมีของไดยูรอน (Salvestrini, 2002)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 2 กลไกการเปลี่ยนรูปของ dichloroaniline เปลี่ยนไปเป็น aminophenoxazones (Othmen and Boule, 1999)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 3 กลไกการย่อยสลายของไดยูรอนโดยแบคทีเรีย (Sorensen, 2003)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. อุปกรณ์การเก็บดิน ได้แก่ พลั่วมือ
2. จานสำหรับเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์
3. ถุงพลาสติกสำหรับเก็บตัวอย่างดิน
4. ขวดเก็บตัวอย่าง
5. ขวดรูปชมพู่ ขนาด 125, 250 และ 500 มิลลิลิตร
6. ตู้บ่มเชื้อ (incubator)
7. เครื่องปั่นเหวี่ยง
8. เครื่อง high performance liquid chromatograph (HPLC)
9. DNA Thermal Cycler
10. Gel Electrophoresis
11. ขวดบรรจุสาร (vial) สำหรับเครื่อง HPLC ขนาด 1.5 มิลลิลิตร
12. เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ (shaker incubater)
13. หม้อนึ่งความดันไอ
14. กระดาษกรอง
15. เครื่อง spectrophotometer
16. กล้องจุลทรรศน์
17. ไดยูรอน 80 (80 % WP)

วิธีการ

1. การแยกเชื้อแบคทีเรียที่มีความสามารถในการเจริญเติบโตและทนสารไดยูรอน

1.1 การเก็บตัวอย่างดิน

เก็บตัวอย่างดินบริเวณที่เคยมีประวัติการใช้สารไดยูรอนในการควบคุมวัชพืชในย้อนหลัง 1-2 ปี จำนวน10 แหล่ง โดยแหล่งที่ 1, 2 และ 3 เป็นแปลงมันสำปะหลังในพื้นที่เขต ตำบลจรเข้เผือก อำเภอท่ามะกา จังหวัด กาญจนบุรี ใช้สัญลักษณ์เป็น Sk01 Sk02 และ Sk03 ตามลำดับ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

แหล่งที่ 4 และ 5 เป็นแปลงมันสำปะหลังในพื้นที่เขต ตำบลด่านช้าง อำเภอด่านช้าง จังหวัดสุพรรณบุรี ใช้สัญลักษณ์เป็น Ss04 และ Ss05 ตามลำดับ แหล่งที่ 6 และ 7 เป็นแปลงปลูกอ้อยในพื้นที่เขต ตำบลกำแพงแสน อำเภอกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม ใช้สัญลักษณ์เป็น Sn06 และ Sn07 ตามลำดับ แหล่งที่ 8, 9 และ 10 เป็นแปลงปลูกอ้อยในพื้นที่เขต ตำบลทุ่งคอก อำเภอสองพี่น้อง จังหวัดสุพรรณบุรี ใช้สัญลักษณ์เป็น Ss08, Ss09 และ Ss10 ตามลำดับ โดยเก็บดินบนที่ความลึก 0-20 เซนติเมตร แบ่งพื้นที่ให้เป็นแปลงย่อยแล้วสุ่มเก็บตัวอย่างดินกระจายทั่วทั้งแปลง แปลงละ 1-2 จุด แล้วนำดินทุกจุดมารวมกันเป็นตัวอย่างดินรวม (composite sample) 1 ตัวอย่างเพื่อเป็นตัวแทนของดินในแปลงนั้น

1.2 การแยกเชื้อแบคทีเรียจากดิน

ใช้วิธี dilution technique โดยใส่ดิน 10 กรัม ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ซึ่งมี sterile water อยู่ 90 มิลลิลิตร เขย่าประมาณ 5 นาที เพื่อให้ดินอยู่ในสภาพแขวนลอยอย่างสมบูรณ์ เจือจางให้ได้ความเข้มข้น 10^{-3}, 10^{-4}, 10^{-5}, 10^{-6} และ 10^{-7} แล้วนำมา spread plate บนอาหารเลี้ยงเชื้อดังนี้

1) อาหาร Nutrient agar เพื่อศึกษาปริมาณแบคทีเรียทั้งหมด

2) อาหาร Nutrient agar ดัดแปลงโดยเติม ไดยูรอน 1 กรัมต่อน้ำ 1 ลิตร เพื่อศึกษาปริมาณแบคทีเรียที่สามารถทนสารไดยูรอนได้

3) อาหาร R-medium เพื่อศึกษาปริมาณแบคทีเรียทั้งหมด

4) อาหาร R-medium ดัดแปลงโดยเติม ไดยูรอน 1 กรัมต่อน้ำ 1 ลิตร เพื่อศึกษาปริมาณแบคทีเรียที่ทนสารไดยูรอนได้

อาหารที่นำมาใช้เลี้ยงเชื้อ มีส่วนประกอบดังนี้

Nutrient agar (NA) มีส่วนประกอบดังนี้

Beef extract	3	กรัม
Peptone	5	กรัม
วุ้น	15	กรัม
Distilled water	1,000	มิลลิลิตร

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Nutrient agar ดัดแปลง มีส่วนประกอบดังนี้

Beef extract	3	กรัม
Peptone	5	กรัม
วุ้น	15	กรัม
Distilled water	850	มิลลิลิตร
ไดยูรอน	1	กรัมในน้ำที่ฆ่าเชื้อแล้ว 150 มิลลิลิตร

อาหาร R-medium มีส่วนประกอบดังนี้

1M KH_2PO_4 (pH 6.8)	67	มิลลิลิตร
12% NH_4Cl	10	มิลลิลิตร
Agar	15	กรัม

นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 °C เป็นเวลา 15 นาที ต่อจากนั้นเติมสารต่อไปนี้

200X R-salt	5	มิลลิลิตร
2000X Trace-element	0.5	มิลลิลิตร
$CaCl_2$	0.2	มิลลิลิตร
20% Glucose	50	มิลลิลิตร
เติมน้ำที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อให้ครบ	1,000	มิลลิลิตร

อาหาร R-medium ดัดแปลง มีส่วนประกอบดังนี้

1M KH_2PO_4 (pH 6.8)	67	มิลลิลิตร
12% NH_4Cl	10	มิลลิลิตร
Agar	15	กรัม

นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 °C เป็นเวลา 15 นาที ต่อจากนั้นเติมสารต่อไปนี้

200X R-salt	5	มิลลิลิตร
2000X Trace-element	0.5	มิลลิลิตร

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

$CaCl_2$	0.2	มิลลิลิตร
20% Glucose	50	มิลลิลิตร
ไดยูรอน	1	กรัมในน้ำที่ฆ่าเชื้อแล้ว 150 มิลลิลิตร
เติมน้ำที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อให้ครบ	1,000	มิลลิลิตร

โดยที่สารที่นำมาเติมทีหลังนี้จะผ่านการกรองด้วยกระดาษกรอง (ADVENTEC MFS, Inc., U.S.A.) ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วขนาด 0.2 ไมโครเมตร

การเตรียม 200X R-salt 500 มิลลิลิตร

$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	40	กรัม
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	1	กรัม
HCl (conc.)	2	มิลลิลิตร

การเตรียม 2000X Trace-element 500 มิลลิลิตร

$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	10	มิลลิกรัม
$MnSO_4 \cdot 4H_2O$	3	มิลลิกรัม
H_3BO_3	30	มิลลิกรัม
$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	20	มิลลิกรัม
$CuCl_2 \cdot 2H_2O$	1	มิลลิกรัม
$NiCl_2 \cdot 6H_2O$	2	มิลลิกรัม
$NaMoO_4 \cdot 2H_2O$	3	มิลลิกรัม

เก็บข้อมูลโดย นับปริมาณและเปรียบเทียบปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดที่เจริญเติบโตบนอาหาร NA และ R-medium ในดินแต่ละแหล่งหลังจากเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 2 วัน และนับปริมาณและเปรียบเทียบปริมาณแบคทีเรียที่ทนสารไดยูรอนที่เจริญเติบโตบนอาหาร NA ดัดแปลงและ R-medium ดัดแปลงในดินแต่ละแหล่งหลังจากเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 2 วัน

คำนวณหาความหนาแน่นของแบคทีเรียที่ทนสารไดยูรอนต่อจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดในอาหาร NA ดัดแปลงและ R-medium ดัดแปลงจาก

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

$$\text{ความหนาแน่นของแบคทีเรียที่ทนสารไดยูรอน (\%)} = \frac{\text{จำนวนแบคทีเรียที่ทนทานไดยูรอน (cfu/g) x 100}}{\text{จำนวนแบคทีเรียทั้งหมด (cfu/g)}}$$

แยกกลุ่มแบคทีเรียโดยอาศัย ขนาด สี ลักษณะขอบ รูปร่างของโคโลนี แล้วคัดเลือกแบคทีเรียที่สามารถเจริญเติบโตได้รวดเร็วไว้จำนวน 20 ไอโซเลต เพื่อจำแนกและศึกษาการเจริญเติบโตของเชื้อในการย่อยสลายสารไดยูรอนในอาหารเลี้ยงเชื้อต่อไป

1.3 การแยกเชื้อให้บริสุทธิ์

คัดเลือกโคโลนีที่สามารถเจริญเติบโตได้รวดเร็วไว้จำนวน 20 ไอโซเลต มาเขี่ยบนอาหารแข็ง R-medium ดัดแปลงจนกระทั่งได้โคโลนีเดี่ยว

1.4 การจำแนกชนิดของแบคทีเรีย

1.4.1 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาเบื้องต้นโดยวิธีการย้อมสีแบบแกรม (Benson, 2005)

นำแบคทีเรียแต่ละกลุ่ม รวม 20 ไอโซเลต มาสเมียร์บนสไลด์ จากนั้นนำมาลนบนเปลวไฟ 2-3 ครั้ง เพื่อให้เชื้อติดแน่นบนสไลด์ แล้วหยด crystal violet ทิ้งไว้ประมาณ 1 นาที ล้างด้วยน้ำเปล่า หยดไอโอดีน ทิ้งไว้ 30 วินาที แล้วล้างด้วยแอลกอฮอล์ 95% โดยให้ไหลผ่านช้าๆ บนสไลด์จนกระทั่งไม่มีสีของ crystal violet ปนไปกับแอลกอฮอล์ จากนั้นย้อมทับด้วย safranin O ทิ้งไว้ 30 วินาที ล้างสีออกด้วยน้ำเปล่า แล้วนำไปส่องใต้กล้องจุลทรรศน์ เพื่อดูการติดสีของเชื้อ

1.4.2 การทดสอบในอาหาร Selective media

นำแบคทีเรียแต่ละกลุ่มมาทดสอบในอาหาร selective media 2 ชนิดคือ

1) อาหารเลี้ยงเชื้อ Bacillus Medium ซึ่งเป็นอาหารสำหรับใช้เลี้ยงเชื้อ *Bacillus* sp.

2) อาหารเลี้ยงเชื้อ Kings-agar B ซึ่งเป็นอาหารสำหรับใช้เลี้ยงเชื้อ *Pseudomonas* sp. เพื่อยืนยันร่วมกับการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาโดยวิธีการย้อมสีแบบแกรม

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ส่วนประกอบของ Bacillus Medium

$MgSO_4$ $7H_2O$	0.2	กรัม
$(NH_4)_2HPO_4$	1.0	กรัม
KCl	0.2	กรัม
Yeast extract	0.2	กรัม
Glucose solution	50.0	มิลลิลิตร
Bromcresol Purple solution	15.0	มิลลิลิตร
Agar	15.0	กรัม
เติมน้ำที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อให้ครบ	1,000	มิลลิลิตร

ส่วนประกอบของ Kings-agar B

Peptone	20.0	กรัม
Glycerol	10.0	มิลลิลิตร
K_2HPO_4	1.5	กรัม
$MgSO_4.7H_2O$	1.5	กรัม
Agar	15.0	กรัม
เติมน้ำที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อให้ครบ	1,000	มิลลิลิตร

2. การศึกษาการย่อยสลายสารไดยูรอนของเชื้อแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อ

2.1 การเตรียมเชื้อแบคทีเรีย

การเตรียมเชื้อแบคทีเรียทำโดย นำแบคทีเรีย 20 สายพันธุ์ สายพันธุ์ละ 1 ลูป มาเลี้ยงในอาหารเหลว R-medium ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 125 มิลลิลิตร จากนั้นนำมาเขย่าที่ความเร็ว 130 รอบ/นาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 4,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 30 นาที นำตะกอนเซลล์ที่ได้มาล้างด้วย 0.85 % NaCl 3 ครั้ง ละลายตะกอนด้วย phosphate buffer 10 มิลลิลิตร วัดค่าความขุ่นของเซลล์ด้วย spectrophotometer รุ่น 550 series, Beckman (Beckman Coulter, Inc., Fullerton, Califonia) ที่ช่วงคลื่นแสง 600 นาโนเมตร ปรับความขุ่นของเซลล์ให้มีค่าความขุ่นเท่ากับ 0.6 เก็บไว้เป็นหัวเชื้อ เพื่อนำไปใช้ในการทดลองต่อไป

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

2.2 การทดสอบการย่อยสลายสารไดยูรอนของเชื้อแบคทีเรียในอาหาร R-medium ดัดแปลง

วางแผนการทดลองแบบ completely randomized design ประกอบด้วย 21 ตำรับการทดลอง โดยแต่ละตำรับการทดลองมี 4 ซ้ำ ประกอบด้วยเชื้อ *Bacillus* sp. จำนวน 5 สายพันธุ์และ *Pseudomonas* sp. จำนวน 15 สายพันธุ์ ดังนี้

ตำรับการทดลองที่ 1 ไม่ใส่เชื้อแบคทีเรีย (control)
ตำรับการทดลองที่ 2 ใส่เชื้อ *Bacillus* sp. S01
ตำรับการทดลองที่ 3 ใส่เชื้อ *Bacillus* sp. S02
ตำรับการทดลองที่ 4 ใส่เชื้อ *Bacillus* sp. S03
ตำรับการทดลองที่ 5 ใส่เชื้อ *Bacillus* sp. S04
ตำรับการทดลองที่ 6 ใส่เชื้อ *Bacillus* sp. S05
ตำรับการทดลองที่ 7 ใส่เชื้อ *Pseudomonas* sp. SK01
ตำรับการทดลองที่ 8 ใส่เชื้อ *Pseudomonas* sp. SK02
ตำรับการทดลองที่ 9 ใส่เชื้อ *Pseudomonas* sp. SK03
ตำรับการทดลองที่ 10 ใส่เชื้อ *Pseudomonas* sp. SK04
ตำรับการทดลองที่ 11 ใส่เชื้อ *Pseudomonas* sp. SK05
ตำรับการทดลองที่ 12 ใส่เชื้อ *Pseudomonas* sp. SK06
ตำรับการทดลองที่ 13 ใส่เชื้อ *Pseudomonas* sp. SK07
ตำรับการทดลองที่ 14 ใส่เชื้อ *Pseudomonas* sp. SK08
ตำรับการทดลองที่ 15 ใส่เชื้อ *Pseudomonas* sp. SK09
ตำรับการทดลองที่ 16 ใส่เชื้อ *Pseudomonas* sp. SK10
ตำรับการทดลองที่ 17 ใส่เชื้อ *Pseudomonas* sp. SK11
ตำรับการทดลองที่ 18 ใส่เชื้อ *Pseudomonas* sp. SK12
ตำรับการทดลองที่ 19 ใส่เชื้อ *Pseudomonas* sp. SK13
ตำรับการทดลองที่ 20 ใส่เชื้อ *Pseudomonas* sp. SK14
ตำรับการทดลองที่ 21 ใส่เชื้อ *Pseudomonas* sp. SK15

โดยดูดสารแขวนลอยเซลล์ที่ได้จากการเตรียมเชื้อจำนวน 200 ไมโครลิตร มาถ่ายใส่ขวดรูปชมพู่ขนาด 125 มิลลิลิตร ที่บรรจุอาหาร R-medium ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ที่ใส่ไดยูรอน 10 มิลลิกรัม/ลิตร เป็นแหล่งของคาร์บอนแทนน้ำตาลกลูโคส ตามแต่ละตำรับการทดลอง เลี้ยงเชื้อไว้ที่

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

อุณหภูมิห้อง ให้อากาศโดยเขย่าที่ความเร็ว 130 รอบ/นาที เก็บข้อมูลทุก 6 ชั่วโมง เป็นเวลา 72 ชั่วโมง โดยใช้ปิเปตที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ดูดอาหาร R-medium ปริมาตร 1 มิลลิลิตร มาใส่ในหลอดแก้วแล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 2 นาที นำส่วนใสมาวัดปริมาณของไดยูรอนที่เหลือด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ช่วงคลื่นแสง 245 นาโนเมตร คำนวณหาปริมาณสารไดยูรอนที่เชื้อแบคทีเรียทั้ง 20 สายพันธุ์สามารถย่อยได้จาก

ปริมาณไดยูรอนที่ย่อยสลายได้ (mg/l) = ปริมาณของสารไดยูรอนเริ่มต้น (mg/l) − ปริมาณของสารไดยูรอนที่เหลือจากการย่อยสลาย (mg/l)

วิเคราะห์ความแปรปรวนและเปรียบเทียบข้อมูลทางสถิติโดยวิธี Duncan's multiple range test คัดเลือกแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายไดยูรอนดีที่สุด 5 สายพันธุ์มาทำการศึกษาต่อไป

3. การศึกษาประสิทธิภาพในการย่อยสลายสารไดยูรอนและความอยู่รอดของจุลินทรีย์ในดิน

วางแผนการทดลองแบบ 6x5 factorial in CRD ประกอบ 30 ตำรับการทดลอง โดยแต่ละตำรับการทดลองมี 4 ซ้ำ ปัจจัยที่ 1 ประกอบด้วย เชื้อแบคทีเรีย 5 สายพันธุ์ คือ *Pseudomonas* sp. SK01, SK06, SK12, SK13, *Bacillus* sp. S04 และไม่ใส่เชื้อ ปัจจัยที่ 2 ประกอบด้วย ความเข้มข้นของไดยูรอน 5 ระดับ คือ 0, 5, 10, 15 และ 20 มก./กก.

ชั่งดิน 250 กรัม ใส่ในขวดแก้วปากกว้างขนาด 24 ออนซ์ (682 มล.) ปิดปากขวดด้วย ผ้าขาวบาง แล้วนำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว จำนวน 3 ครั้ง โดยแต่ละครั้งจะทิ้งไว้หลังจากการฆ่าเชื้อแล้ว 1 วัน เพื่อให้ดินเย็น และให้จุลินทรีย์ชนิดที่สร้างสปอร์เจริญแล้วฆ่าจุลินทรีย์ด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำอีกครั้งหนึ่ง ปรับให้ดินมีความชื้น 10 % โดยเติมน้ำที่ฆ่าเชื้อแล้ว เติมสารไดยูรอนและแบคทีเรียตามแต่ละตำรับการทดลอง โดยตำรับที่มีการเติมเชื้อ จะเติมเชื้อแบคทีเรียจำนวน 10^8 CFU/มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง เก็บตัวอย่างดิน ที่ 0, 5, 10 และ 15 วัน โดยดินที่เก็บจะแยกเป็น 2 ส่วน คือ ส่วนที่ 1 จะนำไปตรวจหาปริมาณสารไดยูรอนที่เหลืออยู่ในดิน และส่วนที่ 2 ตรวจหาปริมาณของแบคทีเรียที่ยังมีชีวิตรอดอยู่ในดิน โดยมีรายละเอียดดังต่อไปนี้

ส่วนที่ 1 นำไปตรวจหาปริมาณสารไดยูรอนที่เหลืออยู่ในดิน โดยมีวิธีการดังนี้ ชั่งตัวอย่าง

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ดิน 15 กรัม ใส่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร เติม methanol 20 มิลลิลิตร นำไปเขย่าด้วยเครื่องเขย่าความเร็ว 140 รอบ/นาที เป็นเวลา 1 ชั่วโมง กรองด้วยกระดาษกรองขนาด 0.45 ไมโครเมตร เก็บสารละลายใสปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ในขวด vial แล้วนำไปวิเคราะห์หาปริมาณของสารไดยูรอนที่เหลืออยู่ด้วยเครื่อง high performance liquid chromatograph (HPLC) สภาวะของเครื่องขณะทำงานเป็นดังนี้

High performance liquid chromatograph (Hplc) มีเครื่องตรวจจับ (detector) เป็นแบบ UV-VIS DETECTOR รุ่น SPD-10 AV ยี่ห้อ SHIMADZU คอลัมน์ (column) ที่ใช้เป็น GL Science Intertsil ODS-3 5 µm 4.6x250 mm Stainless Steel C18 bounded siliga gel colum โดยมีปริมาตรในการฉีดตัวอย่าง (Inject volume) ครั้งละ 10 ไมโครลิตร Pump ที่ใช้เป็นรุ่น LC-10AD VP ยี่ห้อ SHIMADZU ใช้ Low pressure gradient อัตราการฉีดสารเป็น 1.0 มิลลิลิตร/นาที สำหรับการสกัดสารไดยูรอนและสภาวะในการหาปริมาณสารไดยูรอนในการทดลองครั้งนี้ได้ดัดแปลงมาจาก Esposito *et al*. (1998) คือ อุณหภูมิเริ่มต้นที่ 40 ^{o}C แล้วเพิ่มอุณหภูมิเป็น 80 ^{o}C mobile phase/Solvent เป็น methanol/water (70:30) โดย mobile phase/Solvent ต้องผ่านการไล่อากาศด้วยเครื่อง sonication ก่อน ซึ่ง peak ของสารไดยูรอนจะออกที่เวลา (retention time) ประมาณ 9.7 นาที (ภาพที่ 4)

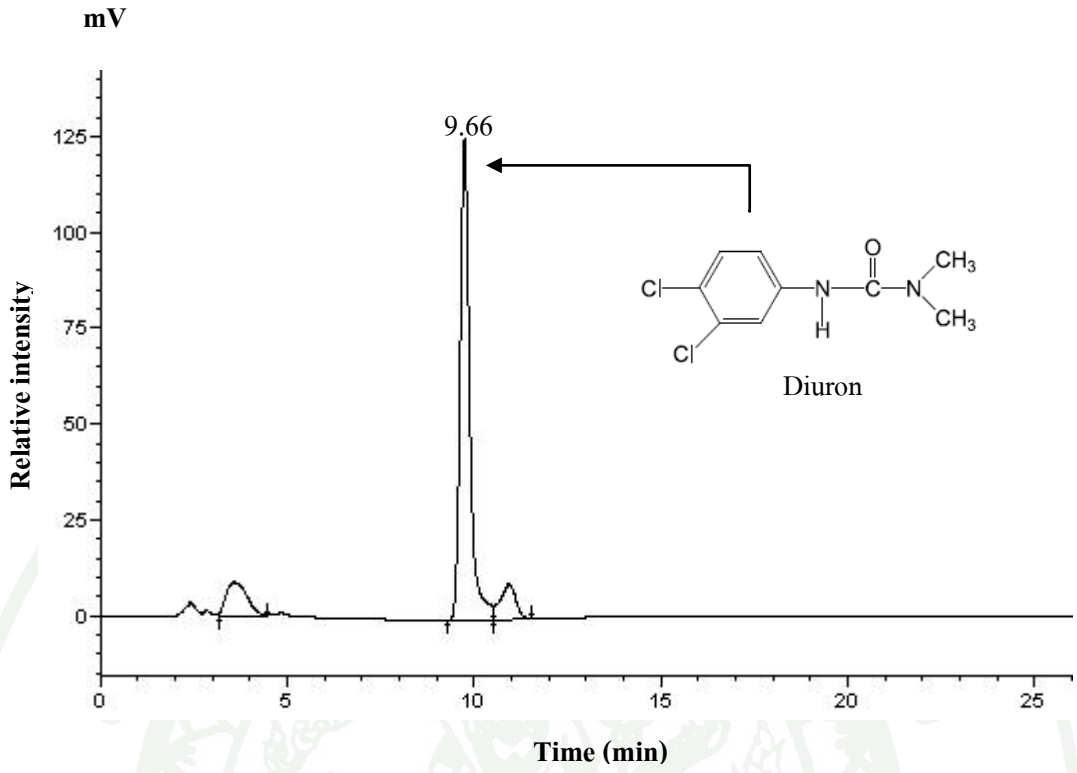
นำค่าที่ได้จากพื้นที่ใต้ peak มาแทนใน สมการ $x=(y-1268.1)/89602$

โดยที่ x คือ ปริมาณของสารไดยูรอนที่เหลือจากการย่อยสลาย
y คือ ค่าที่อ่านได้จากพื้นที่ใต้ peak

สมการนี้ได้จาก กราฟ Standard curve ของสารไดยูรอนที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ (ภาพที่5)

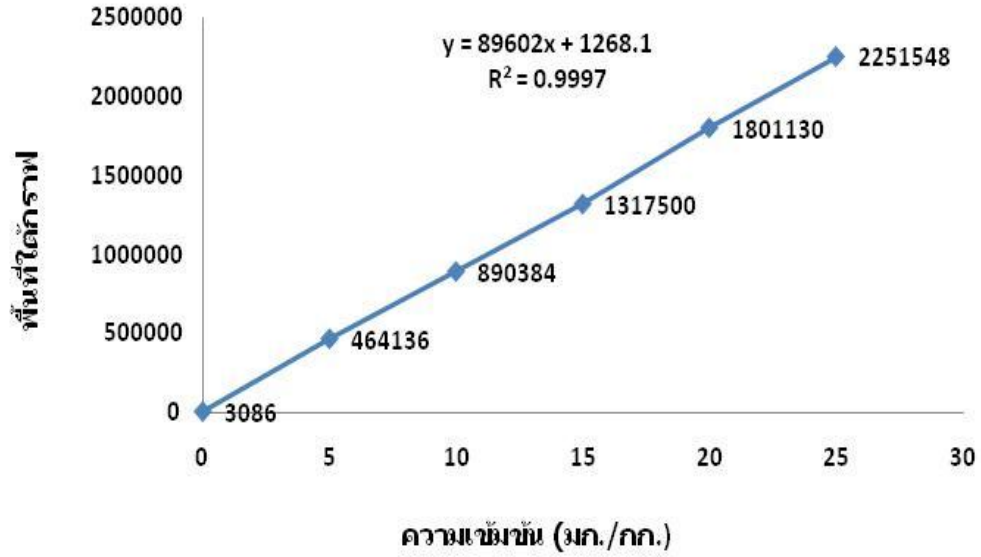
ส่วนที่ 2 นำไปหาปริมาณของแบคทีเรียที่ยังมีชีวิตรอดอยู่ในดิน ด้วยวิธี plate count เริ่มจากใช้วิธี dilution technique โดยใส่ดิน 10 กรัม ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ซึ่งมี sterile water อยู่ 90 มิลลิลิตร เขย่าประมาณ 5 นาที เพื่อให้ดินอยู่ในสภาพแขวนลอยอย่างสมบูรณ์ เจือจางให้ได้ความเข้มข้น 10^{-3}, 10^{-4}, 10^{-5}, 10^{-6} และ 10^{-7} แล้วนำมา spread plate บนอาหารเลี้ยงเชื้อ NA เพื่อตรวจนับปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดที่ยังมีชีวิตรอดอยู่ในดิน

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 4 การวัดปริมาณสารไดยูรอนด้วยเครื่อง Hplc ซึ่ง peak ของสารไดยูรอนออกที่เวลา (retention time) ประมาณ 9.7 นาที

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 5 Standard curve ของสารไดยูรอนของระดับความเข้มข้นต่างๆ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ผลและวิจารณ์

1. การแยกเชื้อแบคทีเรียที่มีความสามารถในการเจริญเติบโตและทนสารไดยูรอน

การศึกษาปริมาณแบคทีเรียจากดิน

จำนวนแบคทีเรียทั้งหมดในอาหารเลี้ยงเชื้อ 2 ชนิดคือ อาหาร NA และอาหาร R-medium ในดิน 10 แหล่ง หลังจากเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 2 วัน พบว่าค่า log ของแบคทีเรียทั้งหมดในดินแต่ละแหล่งไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติทั้งในอาหาร NA และอาหาร R-medium (ตารางที่ 3) จำนวนแบคทีเรียทั้งหมดในอาหารเลี้ยงเชื้อทั้ง 2 ชนิดไม่แตกต่างกันเป็นเพราะว่า ในอาหารเลี้ยงเชื้อทั้ง 2 ชนิด มีปริมาณของธาตุอาหารเพียงพอที่แบคทีเรียจะนำไปใช้เป็นแหล่งของพลังงานและแหล่งของคาร์บอน อีกทั้งในอาหารเลี้ยงเชื้อทั้ง 2 ชนิดมีค่า pH ที่เหมาะสมต่อแบคทีเรีย

ชนิดของอาหารไม่มีผลต่อปริมาณแบคทีเรียที่ทนสารไดยูรอน แต่แหล่งของแบคทีเรียมีผลต่อปริมาณแบคทีเรียที่ทนสารไดยูรอน (ตารางที่ 4) โดยแหล่งแบคทีเรียที่มาจาก Ss04 ที่เลี้ยงในอาหาร NA ดัดแปลง มีค่า log แบคทีเรียที่ทนสารไดยูรอนมากที่สุดคือ 7.30 โดยมีจำนวนแบคทีเรียที่ทนสารไดยูรอน $2.0x10^7$ cfu/ดิน 1 กรัม ส่วนแบคทีเรียจาก Sk03 ที่เลี้ยงในอาหาร NA ดัดแปลง มีค่า log แบคทีเรียที่ทนสารไดยูรอนน้อยที่สุดคือ 5.38 โดยมีจำนวนแบคทีเรียที่ทนสารไดยูรอน $2.4x10^5$ cfu/ดิน 1 กรัม (ตารางที่ 5) สำหรับค่า log แบคทีเรียที่ทนสารไดยูรอนที่เลี้ยงในอาหาร R-medium ดัดแปลง พบว่าแบคทีเรียจาก Ss10 มีค่า log แบคทีเรียที่ทนสารไดยูรอนมากที่สุดคือ 6.97 คิดเป็นจำนวนแบคทีเรียที่ทนสารไดยูรอน $9.4x10^6$ cfu/ดิน 1 กรัม ส่วนแบคทีเรียจาก Sn06 ที่เลี้ยงในอาหาร R-medium ดัดแปลง มีค่า log แบคทีเรียที่ทนสารไดยูรอนน้อยที่สุดคือ 5.81 คิดเป็นจำนวนแบคทีเรียที่ทนสารไดยูรอน $6.5x10^5$ cfu/ดิน 1 กรัม (ตารางที่ 6)

แบคทีเรียที่พบใน NA ดัดแปลงและ R-medium ดัดแปลง มีจำนวนไม่แตกต่างกันเพราะว่าแบคทีเรียจากดินสามารถใช้สารไดยูรอนเป็นแหล่งของไนโตรเจนกับแหล่งของคาร์บอนในการเจริญเติบโตได้ ซึ่งสอดคล้องกับ Sorensen *et al.* (2003) ที่พบว่าแบคทีเรียในกลุ่มแอโรบและอะแนโรบ ทั้งแกรมบวกและแกรมลบ สามารถย่อยสลายไดยูรอนได้ และ El-Deeb (2000) พบว่า *Pseudomonas* sp. สายพันธุ์ที่แยกได้จากดินสามารถใช้ไดยูรอนเป็นแหล่งคาร์บอนได้ จำนวนของแบคทีเรียที่ทนสารไดยูรอนในดินแต่ละแหล่งมีจำนวนแตกต่างกัน เพราะว่า ดินที่เก็บมาเป็นดินที่มาจากพื้นที่ที่เคยใช้สารไดยูรอนในปริมาณที่แตกต่างกัน แบคทีเรียที่อาศัยอยู่ในบริเวณนี้ได้จะต้องมี

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

การปรับตัวเองให้สามารถทนต่อสารไดยูรอนได้ จึงทำให้มีปริมาณของแบคทีเรียในแต่ละแหล่งต่างกันออกไป

ความหนาแน่นของแบคทีเรียที่ทนสารไดยูรอนต่อปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดในอาหาร NA ดัดแปลงพบว่า ในดิน Ss09 มีความหนาแน่นของแบคทีเรียที่ทนสารไดยูรอนสูงที่สุดคือ 8.24 % ส่วนความหนาแน่นของแบคทีเรียที่ทนสารไดยูรอนน้อยที่สุดพบในดินจาก Sn07 คือ 0.20 % (ตารางที่ 5) ขณะที่ความหนาแน่นของแบคทีเรียที่ทนสารไดยูรอนต่อปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดในอาหาร R-medium ดัดแปลงพบว่า ในดิน Ss10 มีความหนาแน่นของแบคทีเรียที่ทนสารไดยูรอนสูงที่สุดคือ 47.00 % ส่วนในดิน Ss05 มีความหนาแน่นของแบคทีเรียที่ทนสารไดยูรอนน้อยที่สุดคือ 0.54 % (ตารางที่ 6) ความหนาแน่นของแบคทีเรียที่ทนสารไดยูรอนจะแสดงให้เห็นว่า ในดินบริเวณนั้นมีสัดส่วนของปริมาณแบคทีเรียที่ทนสารไดยูรอนต่อปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดว่ามากหรือน้อยเพียงใด ซึ่งสามารถบ่งบอกได้ว่าสารไดยูรอนที่ตกค้างอยู่บริเวณนั้นจะเกิดการย่อยสลายได้เร็วหรือช้า ในดินที่มีปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดมากที่สุดหรือมีปริมาณแบคทีเรียที่ทนทานสารไดยูรอนมากที่สุด ไม่จำเป็นเสมอไปที่จะต้องมีความหนาแน่นของแบคทีเรียที่ทนสารไดยูรอนอยู่มากที่สุดด้วย ดินที่มีปริมาณแบคทีเรียที่ทนทานสารไดยูรอนอยู่น้อยอาจจะมีความหนาแน่นของแบคทีเรียที่ทนสารไดยูรอนอยู่มากก็ได้ ถ้าจำนวนของแบคทีเรียทั้งหมดมีน้อย

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 3 ปริมาณของแบคทีเรียทั้งหมดที่เจริญบนอาหาร NA และ R-medium ในดินแต่ละแหล่ง (log cfu/g)

แหล่งของดิน	ชนิดของอาหาร		เฉลี่ย
	NA	R-medium	
Sk01	8.20	7.69	7.95
Sk02	8.38	7.34	7.83
Sk03	7.70	7.08	7.62
Ss04	8.56	7.72	8.00
Ss05	8.79	8.45	8.26
Sn06	7.26	7.00	7.80
Sn07	8.30	8.00	8.17
Ss08	8.60	8.34	8.30
Ss09	7.23	7.90	8.00
Ss10	8.41	7.30	8.04
เฉลี่ย	8.12	7.87	
CV%	4.82		
F-test			
Medium(M)	ns		
Soil(S)	ns		
MxS	ns		

หมายเหตุ ns = ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 4 ปริมาณของแบคทีเรียที่ทนสารไดยูรอนที่เจริญบนอาหาร NA และ R-medium ดัดแปลงในดินแต่ละแหล่ง (log cfu/g)

แหล่งของดิน	ชนิดของอาหาร		เฉลี่ย
	NA ดัดแปลง	R-medium ดัดแปลง	
Sk01	5.85 d	6.18 b	6.02 d
Sk02	6.88 b-c	6.32 b	6.60 b
Sk03	5.38 e	5.92 c	5.65 e
Ss04	7.30 a	6.20 b	6.75 b
Ss05	6.60 d	6.18 b	6.39 c
Sn06	5.41 e	5.81 c	5.61 e
Sn07	5.60 d	6.15 b	5.88 e
Ss08	6.11 c	6.66 a-b	6.39 c
Ss09	6.15 c	6.53 a-b	6.34 c
Ss10	7.08 b	6.97 a	7.03 a
เฉลี่ย	6.21	6.23	
CV%	3.22		
F-test			
Medium(M)	ns		
Soil(S)	**		
MxS	*		

หมายเหตุ ตัวอักษรที่เหมือนกันในสดมภ์เดียวกันไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดย การใช้วิธี DMRT

ns = ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ

* = แตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

** = แตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99%

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 5 ปริมาณแบคทีเรียทั้งหมด บนอาหาร NA และ NA ดัดแปลง และความหนาแน่นของแบคทีเรียที่ทนสารไดยูรอนในดินแต่ละแหล่ง

แหล่งของดิน	NA		NA+Diuron		ความหนาแน่นของแบคทีเรียที่ทนสารไดยูรอน (%)
	แบคทีเรียทั้งหมด (cfu/g)	log cfu/g	แบคทีเรียที่ทนสารไดยูรอน (cfu/g)	log cfu/g	
Sk01	$1.6x10^8$	8.20	$7.0x10^5$	5.85 d	0.44
Sk02	$2.4x10^8$	8.38	$7.5x10^6$	6.88 b-c	3.13
Sk03	$5.0x10^7$	7.70	$2.4x10^5$	5.38 e	0.48
Ss04	$3.6x10^8$	8.56	$2.0x10^7$	7.30 a	5.56
Ss05	$6.1x10^8$	8.79	$4.0x10^6$	6.60 d	0.66
Sn06	$1.8x10^7$	7.26	$2.6x10^5$	5.41 e	1.44
Sn07	$2.0x10^8$	8.30	$4.0x10^5$	5.60 d	0.20
Ss08	$4.0x10^8$	8.60	$1.3x10^6$	6.11 c	0.33
Ss09	$1.7x10^7$	7.23	$1.4x10^6$	6.15 c	8.24
Ss10	$2.6x10^8$	8.41	$1.2x10^7$	7.08 b	4.62
F-test		ns		*	
CV%		4.85		4.62	

หมายเหตุ ตัวอักษรที่เหมือนกันในสดมภ์เดียวกันไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดย การใช้วิธี DMRT

ns = ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ

* = แตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 6 ปริมาณแบคทีเรียทั้งหมด บนอาหาร R-medium และ R-medium ดัดแปลง และความหนาแน่นของแบคทีเรียที่ทนสารไดยูรอนในดินแต่ละแหล่ง

แหล่งของดิน	R-medium		R-medium ดัดแปลง		ความหนาแน่นของแบคทีเรียที่ทนสารไดยูรอน (%)
	แบคทีเรียทั้งหมด (cfu/g)	log cfu/g	แบคทีเรียที่ทนสารไดยูรอน (cfu/g)	log cfu/g	
Sk01	$4.9x10^7$	7.69	$1.5 x10^6$	6.18 b	3.06
Sk02	$2.2x10^7$	7.34	$2.1 x10^6$	6.32 b	9.55
Sk03	$1.2x10^7$	7.08	$8.4 x10^5$	5.92 c	7.00
Ss04	$5.3x10^7$	7.72	$1.6 x10^6$	6.20 b	3.02
Ss05	$2.8x10^8$	8.45	$1.5 x10^6$	6.18 b	0.54
Sn06	$1.0x10^7$	7.00	$6.5 x10^5$	5.81 c	6.50
Sn07	$1.0x10^8$	8.00	$1.4 x10^6$	6.15 b	1.40
Ss08	$2.2x10^8$	8.34	$4.6 x10^6$	6.66 a-b	2.10
Ss09	$8.0x10^7$	7.90	$3.4 x10^6$	6.53 a-b	4.25
Ss10	$2.0x10^7$	7.30	$9.4 x10^6$	6.97 a	47.00
F-test		ns		*	
CV%		4.96		5.12	

หมายเหตุ ตัวอักษรที่เหมือนกันในสดมภ์เดียวกันไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดย การใช้วิธี DMRT

ns = ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ

* = แตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

กลุ่มแบคทีเรียที่มีความสามารถในการเจริญเติบโตและทนสารไดยูรอน

ลักษณะของแบคทีเรียที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient agar ดัดแปลงและ R-medium ดัดแปลงมีความแตกต่างกันและสามารถจัด 6 กลุ่มได้ดังนี้ (ภาพที่ 6)

กลุ่มที่ 1 โคโลนีมีลักษณะกลมนูน เป็นเมือก มีสีขาวขุ่น ลักษณะขอบเรียบ มีผิวมันวาว มีเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ยประมาณ 0.8 ซม. จำนวนโคโลนีที่พบมี $6.9x10^4$ cfu/กรัม

กลุ่มที่ 2 โคโลนีมีลักษณะกลมนูน เป็นเมือก มีสีขาวขุ่น ลักษณะขอบเรียบ มีผิวมันวาว มีเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ยประมาณ 0.6 ซม. จำนวนโคโลนีที่พบมี $4.1x10^4$ cfu/กรัม

กลุ่มที่ 3 โคโลนีมีลักษณะกลมแบน เป็นเมือก มีสีขาวขุ่น ลักษณะขอบเรียบ มีผิวมันวาว มีเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ยประมาณ 1.2 ซม. จำนวนโคโลนีที่พบมี $9.8x10^4$ cfu/กรัม

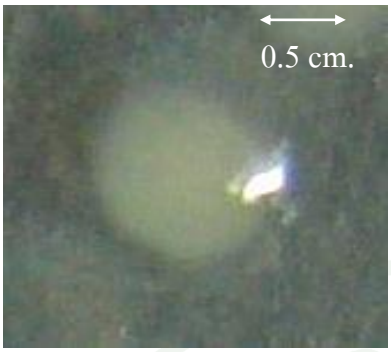
กลุ่มที่ 4 โคโลนีมีลักษณะกลมนูน ไม่เป็นเมือก มีสีขาวขุ่น ลักษณะขอบหยัก มีผิวมันไม่วาว มีเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ยประมาณ 0.4 ซม. จำนวนโคโลนีที่พบมี $2.8x10^4$ cfu/กรัม

กลุ่มที่ 5 โคโลนีมีลักษณะกลมแบน เป็นเมือก มีสีเหลือง ลักษณะขอบเรียบ มีผิวมันวาว มีเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ยประมาณ 0.7 ซม. จำนวนโคโลนีที่พบมี $2.1x10^4$ cfu/กรัม

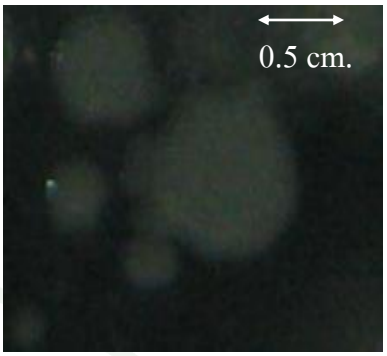
กลุ่มที่ 6 โคโลนีมีลักษณะกลมแบน ไม่เป็นเมือก มีสีเหลือง ลักษณะขอบหยัก มีผิวมันวาว มีเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ยประมาณ 0.5 ซม. จำนวนโคโลนีที่พบมี $1.5x10^4$ cfu/กรัม

ผลการศึกษาพบว่า แบคทีเรียในกลุ่มที่ 3 เจริญเติบโตได้รวดเร็ว โคโลนีมีขนาดใหญ่และพบมากที่สุด รองลงมาคือ แบคทีเรียในกลุ่มที่ 1, 2, 4, 5 และ 6 ตามลำดับ เลือกโคโลนีในแต่ละกลุ่มที่สามารถเจริญเติบโตได้รวดเร็วไว้จำนวน 20 ไอโซเลต โดยเป็นแบคทีเรียในกลุ่มที่ 3 จำนวน 6 ไอโซเลต เป็นแบคทีเรียในกลุ่มที่ 1, 2, 4, 5 และ 6 จำนวน 5, 3, 3, 2 และ 1 ไอโซเลต ตามลำดับ แล้วนำแบคทีเรียทั้ง 20 ไอโซเลต มาจำแนกและศึกษาการการย่อยสลายสารไดยูรอนในอาหารเลี้ยงเชื้อต่อ

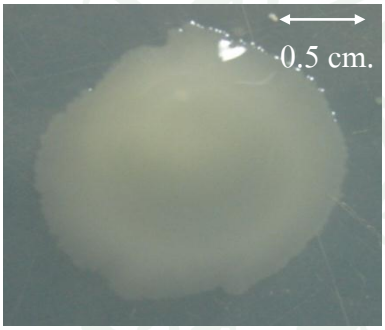
ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



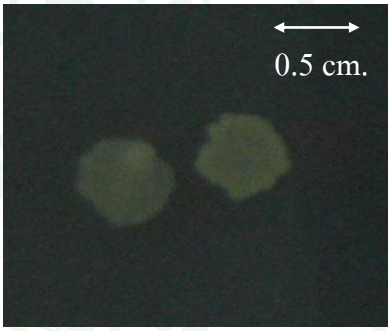
กลุ่มที่ 1



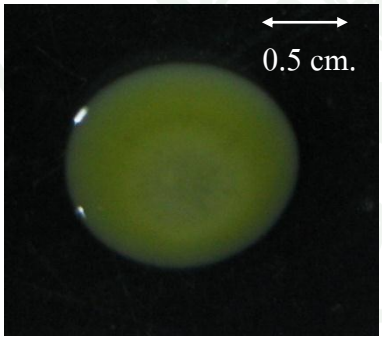
กลุ่มที่ 2



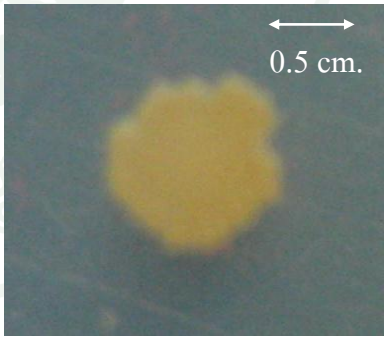
กลุ่มที่ 3



กลุ่มที่ 4



กลุ่มที่ 5



กลุ่มที่ 6

ภาพที่ 6 ลักษณะโคโลนีของแบคทีเรียที่ทนสารไดยูรอนที่เจริญบนอาการ R-medium ดัดแปลงการจำแนกชนิดแบคทีเรียที่ทนต่อสารไดยูรอน

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

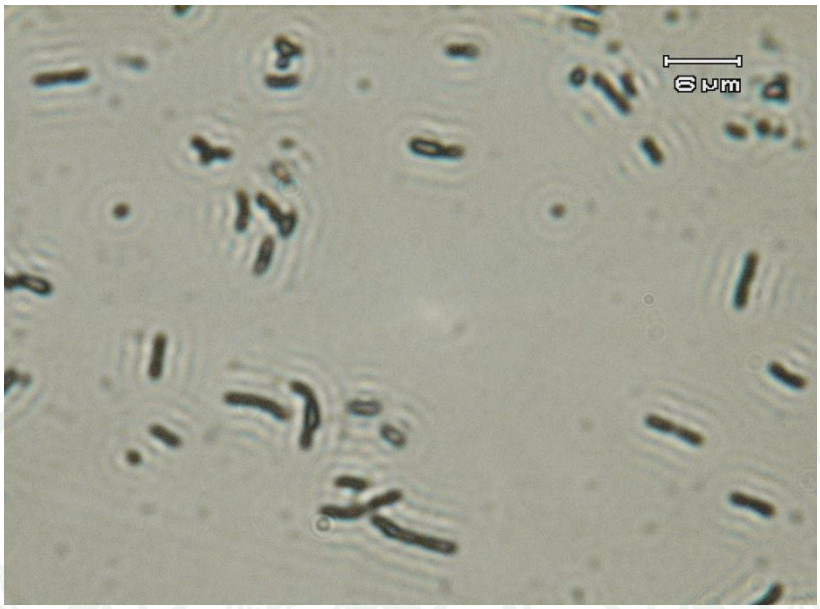
1. การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาบางประการภายใต้กล้องจุลทรรศน์

ผลการศึกษาพบว่ามีแบคทีเรีย 2 กลุ่ม กลุ่มที่ 1 เป็นแบคทีเรียแกรมบวก ติดสี crystal violet ในการย้อมแบบแกรม มีลักษณะเป็นแท่งเดี่ยว ขนาด 1x5 ไมโครเมตร และเรียงต่อกันเป็นสาย สร้างสปอร์รูปไข่อยู่ตรงกลางเซลล์ (ภาพที่ 7) เมื่อศึกษาลักษณะของโคโลนีเปรียบเทียบแล้วคล้ายกับ *Bacillus* sp. และกลุ่มที่ 2 เป็นแบคทีเรียแกรมลบ ติดสี safranin O ในการย้อมแบบแกรม มีลักษณะเป็นแท่ง ขนาด 0.6x3 ไมโครเมตร ไม่สร้างสปอร์ (ภาพที่ 8) โคโลนีมีลักษณะ กลมนูน ขอบเรียบ สีขาว โคโลนีเป็นเมือก เปรียบเทียบแล้ว พบว่าซึ่งลักษณะคล้ายกับ *Pseudomonas* sp.

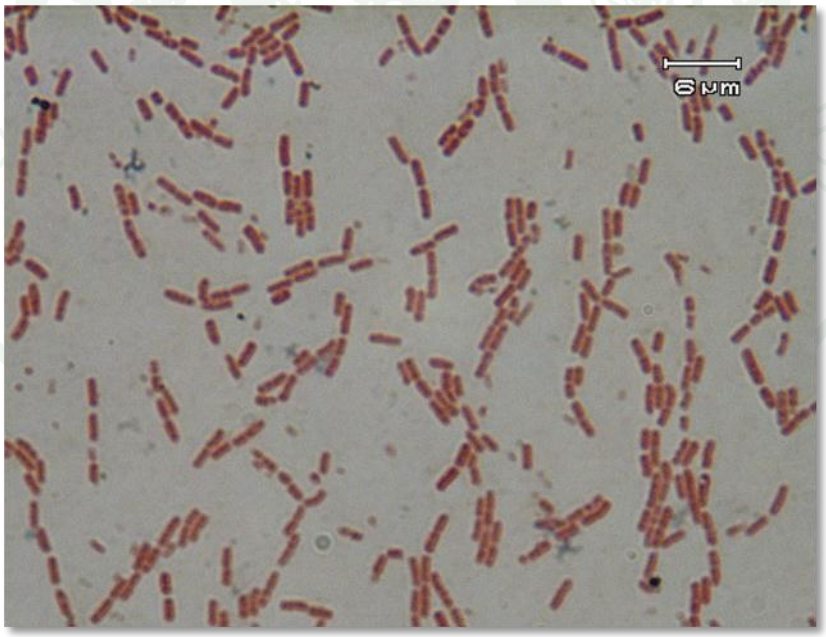
2. การศึกษาบนอาหารเลี้ยงเชื้อเฉพาะ (selective media)

เมื่อนำเชื้อแบคทีเรียทั้ง 20 ไอโซเลตมาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Bacillus Medium ซึ่งเป็นอาหารสำหรับใช้เลี้ยงเชื้อ *Bacillus* sp. และ Kings-agar B ซึ่งเป็นอาหารของเชื้อ *Pseudomonas* sp. เปรียบเทียบร่วมกับการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์โดยวิธีการย้อมสีแบบแกรม ผลการศึกษาพบว่าแบคทีเรียในกลุ่มที่ 1 และ กลุ่มที่ 4 เป็นแบคทีเรียในจีนัส Bacillus (ภาพที่ 9) ส่วนแบคทีเรียในกลุ่มที่ 2, 3, 5 และ กลุ่มที่ 6 เป็นแบคทีเรียในจีนัส Pseudomonas (ภาพที่ 10) และสามารถจำแนกได้เป็น *Bacillus sp.* จำนวน 5 สายพันธุ์ ได้แก่ S01, S02, S03, S04 และ S05 และ *Pseudomonas* sp. จำนวน 15 สายพันธุ์ ได้แก่ SK01 ถึง SK15

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



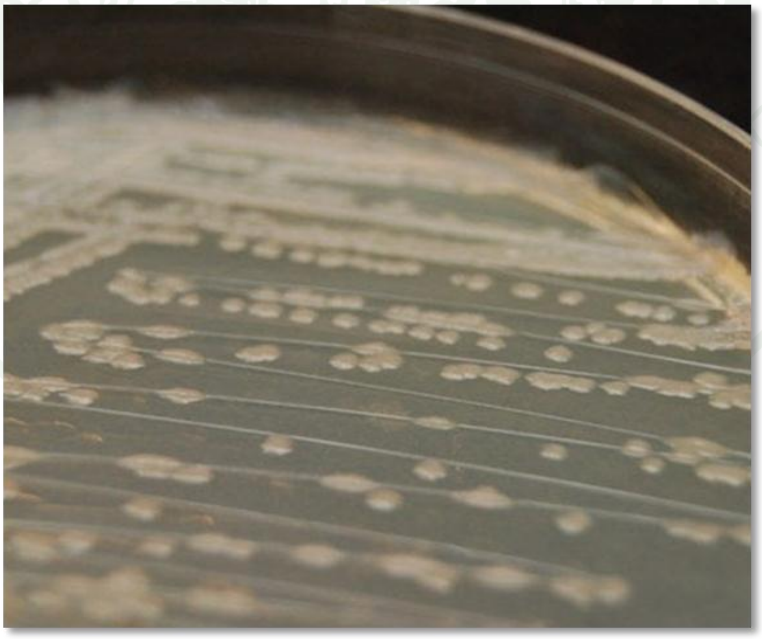
ภาพที่ 7 ลักษณะของเชื้อ *Bacillus sp.* ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ มีลักษณะเป็นแท่งเดี่ยว ขนาด 1x5 ไมโครเมตร สร้างสปอร์รูปไข่อยู่ตรงกลางเซลล์



ภาพที่ 8 ลักษณะของเชื้อ *Pseudomonas* sp. ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ มีลักษณะเป็นแท่ง ขนาด 0.6x3 ไมโครเมตร ไม่สร้างสปอร์

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ภาพที่ 9 ลักษณะของเชื้อ *Bacillus sp.* ที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Bacillus Medium



ภาพที่ 10 ลักษณะของเชื้อ *Pseudomonas* sp. ที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Kings-agar B

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

2. การศึกษาการย่อยสลายสารไดยูรอนของเชื้อแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อ

Bacillus sp. ทั้ง 5 สายพันธุ์ มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายสารไดยูรอนแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ (ตารางที่ 7) โดยในช่วงระหว่างเริ่มต้นจนถึง 12 ชั่วโมงของการบ่มเชื้อ *Bacillus* sp. ทั้ง 5 สายพันธุ์มีแนวโน้มในการย่อยสลายสารไดยูรอนที่รวดเร็ว หลังจากนั้นมีแนวโน้มในการย่อยสลายสารไดยูรอนลดลง แต่ก็ยังสามารถย่อยสลายสารไดยูรอนต่อไปได้ (ภาพที่ 11) หลังจากเวลาผ่านไป 36 ชั่วโมง *Bacillus* sp. แต่ละสายพันธุ์มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายสารไดยูรอนแตกต่างกันทางสถิติ (ตารางที่ 7) โดยสายพันธุ์ S04 มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายสารไดยูรอนได้ดีที่สุด สามารถย่อยสารไดยูรอนได้ 2.26 มิลลิกรัม/ลิตร ส่วนสายพันธุ์ S03 มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายได้ต่ำที่สุด สามารถย่อยสารไดยูรอนได้เพียง 1.39 มิลลิกรัม/ลิตร เมื่อเวลาผ่านไป 72 ชั่วโมงปรากฏว่า สายพันธุ์ S04 ยังมีประสิทธิภาพในการย่อยสลายสารไดยูรอนได้ดีที่สุด โดยสามารถย่อยสารไดยูรอนได้ 2.82 มิลลิกรัม/ลิตร ส่วนสายพันธุ์ S03 มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายสารไดยูรอนได้ต่ำที่สุด โดยสามารถย่อยสารไดยูรอนได้ 2.00 มิลลิกรัม/ลิตร

การย่อยสลายสารไดยูรอนโดย *Pseudomonas* sp. ในช่วงระหว่างเริ่มต้นจนถึง 12 ชั่วโมงของการบ่มเชื้อมีแนวโน้มที่รวดเร็วเช่นกัน แต่หลังจากนั้นแนวโน้มในการย่อยสลายสารไดยูรอนจะค่อนข้างช้าลง (ภาพที่ 12) ในการย่อยสลายสารไดยูรอนโดยเชื้อ *Pseudomonas* sp. แต่ละสายพันธุ์ที่ 36 ชั่วโมง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ (ตารางที่ 8) โดยสายพันธุ์ Ps01 มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายได้ดีที่สุด สามารถย่อยสารไดยูรอนได้ 2.84 มิลลิกรัม/ลิตร ส่วนสายพันธุ์ SK08 มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายสารไดยูรอนได้น้อยที่สุด สามารถย่อยสารไดยูรอนได้เพียง 1.34 มิลลิกรัม/ลิตร เมื่อเวลาผ่านไป 72 ชั่วโมงหลังจากการบ่มเชื้อ สายพันธุ์ SK01 ยังมีประสิทธิภาพในการย่อยสลายสารไดยูรอนได้ดีที่สุด โดยสามารถย่อยสารไดยูรอนได้ 3.36 มิลลิกรัม/ลิตร ส่วนสายพันธุ์ SK08 มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายสารไดยูรอนได้น้อยที่สุด โดยสามารถย่อยสารไดยูรอนได้ 2.15 มิลลิกรัม/ลิตร

เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการย่อยสลายสารไดยูรอนโดยภาพรวมแล้วพบว่า การย่อยสลายสารไดยูรอนโดย *Pseudomonas* sp. มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายสารไดยูรอนได้ดีกว่า *Bacillus* sp. พบว่าเมื่อเวลาผ่านไป 72 ชั่วโมง เชื้อแบคทีเรีย 5 อันดับแรกที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายสารไดยูรอนได้ดีนั้นเป็น *Pseudomonas* sp. 4 สายพันธุ์ คือ สายพันธุ์ SK01, SK13, SK12 และ SK06 ซึ่งสามารถย่อยสลายสารไดยูรอนได้ 3.36, 3.06, 2.92 และ 2.83 มิลลิกรัม/ลิตร ตามลำดับ เป็น *Bacillus* sp. 1 สายพันธุ์ คือ สายพันธุ์ S04 ซึ่งสามารถย่อยสลายสารไดยูรอนได้ 2.82

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

มิลลิกรัม/ลิตร และเชื้อแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายสารไดยูรอนได้น้อยที่สุดคือ สายพันธุ์ S03 โดยสามารถย่อยสารไดยูรอนได้เพียง 2.00 มิลลิกรัม/ลิตร (ตารางที่ 7,8) ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ El-Deeb (2000) ที่พบว่า *Pseudomonas* sp. สายพันธุ์ที่แยกได้จากดิน สามารถใช้คาร์บอนจากไดยูรอนเป็นแหล่งของอาหารและแหล่งพลังงานในการเจริญเติบโตได้โดยตรง และสอดคล้องกับรายงานของ Yao *et al*. (2010) ที่กล่าวว่า *Bacillus* sp. ไม่สามารถใช้สารไดยูรอนเป็นแหล่งของคาร์บอนได้ทันที ต้องให้สารไดยูรอนแตกตัวด้วยน้ำหรือแสง ไปเป็น 3,4-dichloroaniline (3,4-DCA) ก่อนจึงจะสามารถใช้ไดยูรอนเป็นแหล่งของคาร์บอนได้ เชื้อ *Pseudomonas* sp. จึงมีประสิทธิภาพในการย่อยสลายสารไดยูรอนได้ดีกว่า *Bacillus* sp.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

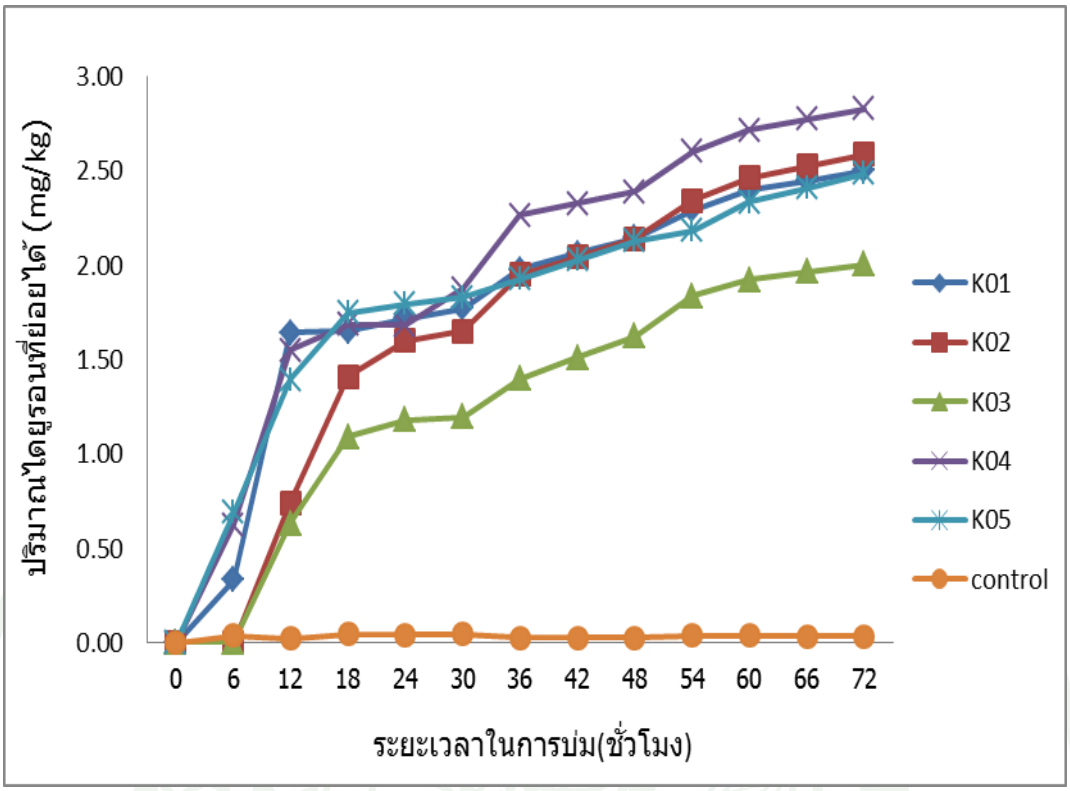
ตารางที่ 7 ปริมาณของสารไดยูรอนที่เชื้อ *Bacillus* sp. สามารถย่อยได้ หลังจากเลี้ยงเชื้อในอาหาร R-medium ดัดแปลง เป็นเวลา 36 และ 72 ชั่วโมง

สายพันธุ์	ปริมาณของสารไดยูรอนที่ย่อยได้ (mg/l)	
Bacillus sp.	36 ชั่วโมง	72 ชั่วโมง
S01	1.97 b	2.49 b
S02	1.94 b	2.58 b
S03	1.39 c	2.00 c
S04	2.26 a	2.82 a
S05	1.92 b	2.48 b
control	0.02 d	0.03 d
F-test	**	**
CV%	4.24	4.58

หมายเหตุ ตัวอักษรที่เหมือนกันในสดมภ์เดียวกันไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดย การใช้วิธี DMRT

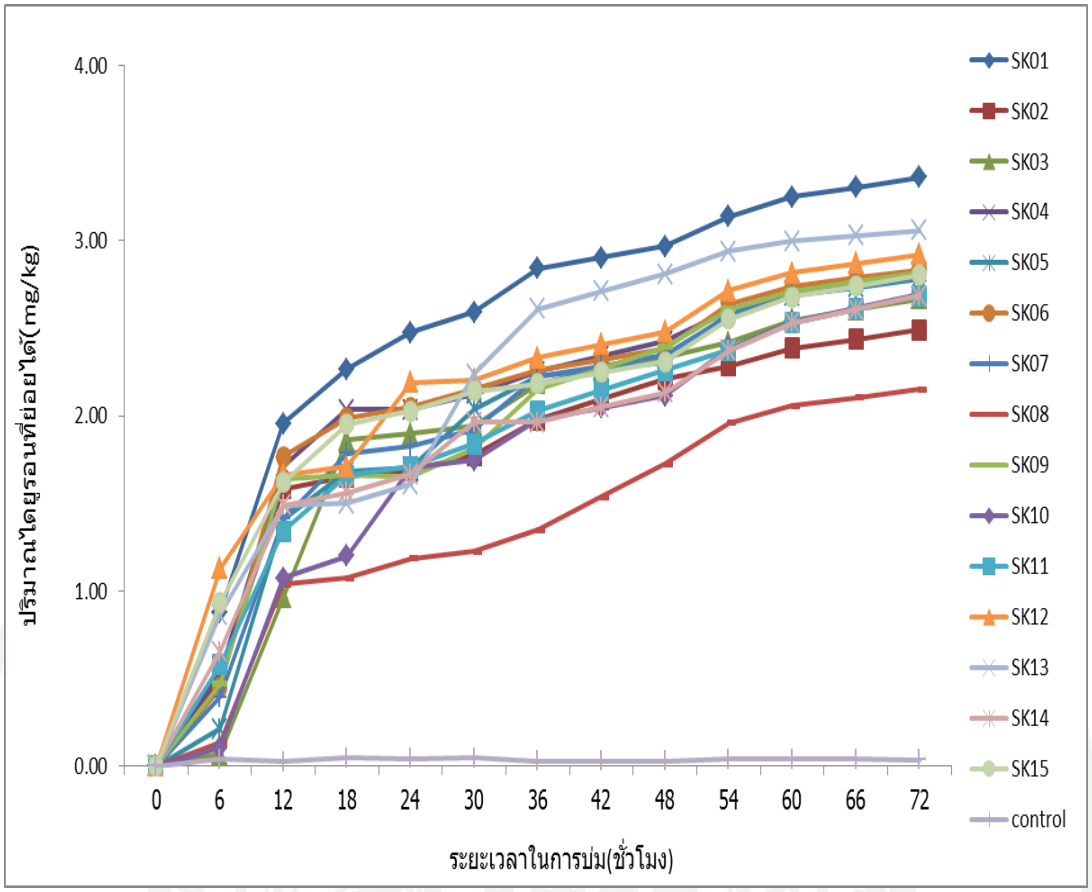
** = แตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99%

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 11 ปริมาณของสารไดยูรอนที่เชื้อ *Bacillus* sp. สามารถย่อยได้ หลังจากเลี้ยงเชื้อในอาหาร R-medium ดัดแปลง เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 12 ปริมาณของสารไดยูรอนที่เชื้อ *Pseudomonas* sp. สามารถย่อยได้ หลังจากเลี้ยงเชื้อในอาหาร R-medium ดัดแปลง เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 8 ปริมาณของสารไดยูรอนที่เชื้อ *Pseudomonas* sp. สามารถย่อยได้ หลังจากเลี้ยงเชื้อในอาหาร R-medium ดัดแปลง เป็นเวลา 36 และ 72 ชั่วโมง

สายพันธุ์	ปริมาณของสารไดยูรอนที่ย่อยได้ (mg/l)	
Pseudomonas sp.	36 ชั่วโมง	72 ชั่วโมง
SK01	**2.84 a**	**3.36 a**
SK02	1.97 c	2.49 c
SK03	2.18 c	2.66 c
SK04	2.25 c	2.82 b-c
SK05	2.22 c	2.78 c
SK06	2.26 c	2.83 b-c
SK07	2.22 c	2.80 b-c
SK08	1.34 d	2.15 d
SK09	2.15 c	2.81 b-c
SK10	1.97 c	2.69 c
SK11	2.03 c	2.68 c
SK12	2.33 b-c	2.92 b
SK13	2.61 a-b	3.06 a-b
SK14	1.96 c	2.68 c
SK15	2.18 c	2.80 b-c
control	0.02 e	0.03 e
F-test	**	**
CV%	5.12	4.88

หมายเหตุ ตัวอักษรที่เหมือนกันในสดมภ์เดียวกันไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดย การใช้วิธี DMRT

** = แตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99%

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

3. การศึกษาประสิทธิภาพในการย่อยสลายสารไดยูรอนและความอยู่รอดของจุลินทรีย์ในดิน

การศึกษาประสิทธิภาพในการย่อยสลายสารไดยูรอนในดินจำลอง

ชนิดของแบคทีเรียและความเข้มข้นของสารไดยูรอนมีผลต่อการย่อยสลายของสารไดยูรอน โดยพบว่า เมื่อเวลาผ่านไป 5 วัน แบคทีเรียทั้ง 5 สายพันธุ์ มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายสารไดยูรอนที่ระดับความเข้มข้น 5, 10, 15 และ 20 มิลลิกรัม/กิโลกรัม ได้แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ (ตารางที่ 9) โดยที่ความเข้มข้นของไดยูรอน 5 มิลลิกรัม/กิโลกรัม *Pseudomonas* sp. SK01 ย่อยสลายสารไดยูรอนได้ดีที่สุดที่ โดยย่อยได้ 3.23 มิลลิกรัม/กิโลกรัม รองลงมาคือ *Pseudomonas* sp. SK12 โดยย่อยสลายสารไดยูรอนได้ 3.17 มิลลิกรัม/กิโลกรัม เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารไดยูรอนเป็น 10, 15 และ 20 มิลลิกรัม/กิโลกรัม *Pseudomonas* sp. SK01 ยังคงย่อยสลายสารไดยูรอนได้ดีกว่าแบคทีเรียสายพันธุ์อื่นๆ แต่ปริมาณของสารไดยูรอนยังคงไม่หมดไปภายในเวาลา 5 วัน ส่วนความเข้มข้นในระดับอื่นนั้น เชื้อแบคทีเรียทั้ง 5 สายพันธุ์ย่อยสารไดยูรอนได้ในปริมาณที่น้อยลงตามความเข้มข้นของสารไดยูรอน โดยเฉพาะที่ความเข้มข้นของสารไดยูรอน 20 มิลลิกรัม/กิโลกรัม จะพบว่า ภายในเวลา 5 วัน ปริมาณของไดยูรอนจะลดน้อยเพียงเล็กน้อยเท่านั้น

เมื่อเวลาผ่านไป 10 วัน แบคทีเรียทั้ง 5 สายพันธุ์ มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายสารไดยูรอนที่ระดับความเข้มข้น 5, 10, 15 และ 20 มิลลิกรัม/กิโลกรัม ได้แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ (ตารางที่ 10) โดยพบว่า *Pseudomonas* sp. SK01 ยังคงย่อยสลายสารไดยูรอนได้ดีที่สุด โดยย่อยสารไดยูรอนที่ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัม/กิโลกรัม ได้หมด รองลงมาคือ สายพันธุ์ SK06, SK13, SK12 และ S04 โดยย่อยได้ 4.98, 4.81, 4.51 และ 4.29 มิลลิกรัม/กิโลกรัม ตามลำดับ ซึ่งปริมาณของสารไดยูรอนที่ความเข้มข้น 5 และ 10 มิลลิกรัม/กิโลกรัม เชื้อแบคทีเรียทั้ง 5 สายพันธุ์ สามารถย่อยสารไดยูรอนได้ในปริมาณที่ใกล้เคียงกัน และสามารถย่อยได้อย่างรวดเร็วตั้งแต่วันแรกที่บ่มเชื้อ (ภาพที่ 13) จนถึงวันที่ 10 ของการบ่มเชื้อ หลังจากนั้นการย่อยสลายสารไดยูรอนของแบคทีเรียเริ่มช้าลง แต่ยังคงย่อยสลายได้เรื่อยๆจนสารไดยูรอนหมดไป แต่เมื่อในดินมีความเข้มข้นของไดยูรอน 20 มิลลิกรัม/กิโลกรัม ปริมาณของไดยูรอนที่เชื้อเชื้อแบคทีเรียทั้ง 5 สายพันธุ์ย่อยได้นั้นจะเหลือเพียงครึ่งหนึ่งของปริมาณที่ย่อยได้ที่ความเข้มข้น 5 และ 10 มิลลิกรัม/กิโลกรัม

หลังจากการย่อยสลายผ่านไป 15 วัน เชื้อแบคทีเรียทุกสายพันธุ์สามารถย่อยสลายสารไดยูรอนได้หมดที่ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัม/กิโลกรัม และย่อยได้เกือบหมดที่ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัม/กิโลกรัม ส่วนตำรับควบคุมนั้นย่อยสลายสารไดยูรอนได้เพียงเล็กน้อยคือ 1.80 มิลลิกรัม/กิโลกรัม

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ส่วนความเข้มข้นของสารไดยูรอนที่ 15 มิลลิกรัม/กิโลกรัม สายพันธุ์ที่มีความสามารถในการย่อยสารไดยูรอนได้ดีที่สุดที่เวลา 15 วัน นั้นเป็น *Pseudomonas* sp. SK01 โดยสามารถย่อยสารไดยูรอนได้ 5.99 มิลลิกรัม/กิโลกรัม รองลงมาคือ *Pseudomonas* sp. SK06 และ *Pseudomonas* sp. SK13 โดยย่อยสารไดยูรอนที่ได้ 5.96 และ 5.54 มิลลิกรัม/กิโลกรัม ส่วน *Pseudomonas* sp. SK12 มีความสามารถในการย่อยสลายสารไดยูรอนได้น้อยที่สุด คือ 5.41 มิลลิกรัม/กิโลกรัม (ตารางที่ 11)

การย่อยสลายสารไดยูรอนของแบคทีเรียทั้ง 5 สายพันธุ์ที่ระดับความเข้มข้นของไดยูรอน 15 มิลลิกรัม/กิโลกรัม ถึงแม้ว่าจะย่อยไดยูรอนได้ลดน้อยลงกว่าความเข้มข้นที่ต่ำกว่านี้ แต่เมื่อพิจารณาจากภาพที่ 14 พบว่า การย่อยสลายของสารไดยูรอนโดยแบคทีเรียทั้ง 5 สายพันธุ์ยังคงมีแนวโน้มในการย่อยที่เพิ่มขึ้นเรื่อยๆ แต่อาจจะต้องใช้เวลาในการย่อยที่นานกว่าในดินที่มีความเข้มข้นของไดยูรอนที่ต่ำกว่านี้ และการใช้แบคทีเรียมาช่วยย่อยนั้นได้ผลที่ดีกว่าการย่อยโดยไม่มีแบคทีเรียมาช่วยย่อยอย่างเห็นได้ชัดเจน ยิ่งเพิ่มความเข้มข้นของสารไดยูรอนให้สูงขึ้นเป็น 20 มิลลิกรัม/กิโลกรัม การย่อยสลายสารไดยูรอนของเชื้อแบคทีเรียทั้ง 5 สายพันธุ์ หลังจากการบ่มเชื้อไว้เป็นเวลา 15 วัน พบว่า *Pseudomonas* sp. SK01 ยังคงมีความสามารถในการย่อยสารไดยูรอนได้ดีที่สุด โดยสามารถย่อยไดยูรอนได้ 3.94 มิลลิกรัม/กิโลกรัม รองลงมาคือ *Pseudomonas* sp. SK13 โดยย่อยสารไดยูรอนได้ 3.81 มิลลิกรัม/กิโลกรัม ส่วน *Pseudomonas* sp. SK12 และ *Bacillus* sp. S04 ย่อยสลายสารไดยูรอนได้เท่ากันคือ 3.72 มิลลิกรัม/กิโลกรัม และสายพันธุ์ที่มีความสามารถในการย่อยสลายสารไดยูรอนได้น้อยที่สุด *Pseudomonas* sp. SK06 โดยย่อยสลายไดยูรอนได้เพียง 3.68 มิลลิกรัม/กิโลกรัม เมื่อในดินมีความเข้มข้นของไดยูรอนในปริมาณที่สูง (20 มิลลิกรัม/กิโลกรัม) การย่อยสลายของแบคทีเรียทั้ง 5 สายพันธุ์มีแน้วโน้มในการย่อยสลายที่เร็วในช่วง 5 วันแรกของการบ่มเชื้อ หลังจากนั้นแนวโน้มในการย่อยเริ่มลดลง แต่ก็ยังคงที่จะย่อยสลายต่อไปได้และเป็นไปอย่างช้าๆ (ภาพที่ 15) ทั้งนี้เนื่องจาก ความเข้มข้นของไดยูรอนในปริมาณที่สูงอาจจะมีผลต่อจำนวนของแบคทีเรีย ทำให้แบคทีเรียมีจำนวนน้อยลง อัตราการย่อยสลายจึงน้อยลง

ความเข้มข้นของไดยูรอนในระดับที่แตกต่างกันจะมีผลต่อระยะเวลาที่แบคทีเรียใช้ในการย่อยสลาย ถ้าในดินมีความเข้มข้นของสารไดยูรอนไม่เกิน 10 มิลลิกรัม/กิโลกรัม แบคทีเรียทั้ง 5 สายพันธุ์ จะใช้เวลาในการย่อยสลายสารไดยูรอนได้จนหมด ประมาณ 15-20 วัน แต่ถ้าในดินไม่มีแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายสารไดยูรอนมาช่วยย่อยสลายนั้น อาจจะต้องใช้เวลานานกว่าไดยูรอนจะย่อยสลายเองได้หมด ยิ่งกว่านั้นถ้าในดินมีความเข้มข้นของไดยูรอนที่สูง คือ 15-20 มิลลิกรัม/กิโลกรัม หรือมากกว่านี้ การย่อยสลายของไดยูรอนโดยที่ไม่มีแบคทีเรียมีประสิทธิภาพมาช่วยย่อยสลายนั้น การย่อยสลายจะเป็นไปอย่างช้าๆ แต่ถ้ามีแบคทีเรียมาช่วยย่อยสลายปริมาณของ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ไดยูรอนที่อยู่ในดินจะลดลงเร็วกว่าปกติ โดยสังเกตุจากผลการทดลองได้ว่า ในระยะเวลาที่เท่ากัน ถ้ามีแบคทีเรียทั้ง 5 สายพันธุ์มาช่วยย่อยสลายสารไดยูรอน ปริมาณของสารไดยูรอนจะลดลงเร็วกว่าประมาณ 3 เท่า เมื่อเทียบกับการที่ไม่มีแบคทีเรียมาช่วยย่อยสลาย

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 9 ปริมาณของสารไดยูรอนที่ระดับความเข้มข้น 5, 10, 15 และ 20 มิลลิกรัม/กิโลกรัม ที่แบคทีเรียทั้ง 5 สายพันธุ์สามารถย่อยได้ หลังจากการบ่ม เป็นเวลา 5 วัน

สายพันธุ์	ความเข้มข้นของสารไดยูรอน (มก./กก.)				เฉลี่ย
	5	10	15	20	
Pseudomonas sp. SK01	3.23 a	3.02 b	2.84 c	1.86 i	0.74 e
Pseudomonas sp. SK06	2.60 e-f	2.36 g	2.33 g	1.72 i-j	2.20 a
Pseudomonas sp. SK12	3.17 a-b	2.86 c	2.67 d-f	1.74 i-j	1.89 c
Pseudomonas sp. SK13	2.70 c-e	2.78 c-d	2.27 g-h	1.65 j	1.81 d
Bacillus sp. S04	2.52 f	2.54 e-f	2.15 h	1.76 i-j	2.10 b
Control	1.09 k	0.98 k-l	0.84 i-m	0.73 m	1.81 d
เฉลี่ย	2.55 a	2.42 b	2.18 c	1.58 d	
CV%			7.73		
F-test					
Isolate(I)			**		
Conc(C)			**		
IxC			**		

หมายเหตุ ตัวอักษรที่เหมือนกันในสดมภ์เดียวกันไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดย การใช้วิธี DMRT

** = แตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99%

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 10 ปริมาณของสารไดยูรอนที่ระดับความเข้มข้น 5, 10, 15 และ 20 มิลลิกรัม/กิโลกรัม ที่แบคทีเรียทั้ง 5 สายพันธุ์สามารถย่อยได้ หลังจากการบ่ม เป็นเวลา 10 วัน

สายพันธุ์	ความเข้มข้นของสารไดยูรอน (มก./กก.)				เฉลี่ย
	5	10	15	20	
Pseudomonas sp. SK01	5.00 a	4.98 a	4.19 d	2.54 f	3.35 a
Pseudomonas sp. SK06	4.81 b	4.51 c	3.74 e	2.41 f-g	3.10 b
Pseudomonas sp. SK12	4.98 a	4.19 d	4.16 d	2.28 g	3.13 b
Pseudomonas sp. SK13	4.51 c	4.29 d	3.61 e	2.32 g	2.95 c
Bacillus sp. S04	4.29 d	4.51 c	3.62 e	2.32 g	2.96 c
Control	1.51 h	1.32 i	1.28 i-j	1.16 j	1.06 d
เฉลี่ย	4.18 a	3.96 b	3.43 c	2.17 d	
CV%	6.46				
F-test					
Isolate(I)	**				
Conc(C)	**				
IxC	**				

หมายเหตุ ตัวอักษรที่เหมือนกันในสดมภ์เดียวกันไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดย การใช้วิธี DMRT

** = แตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99%

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

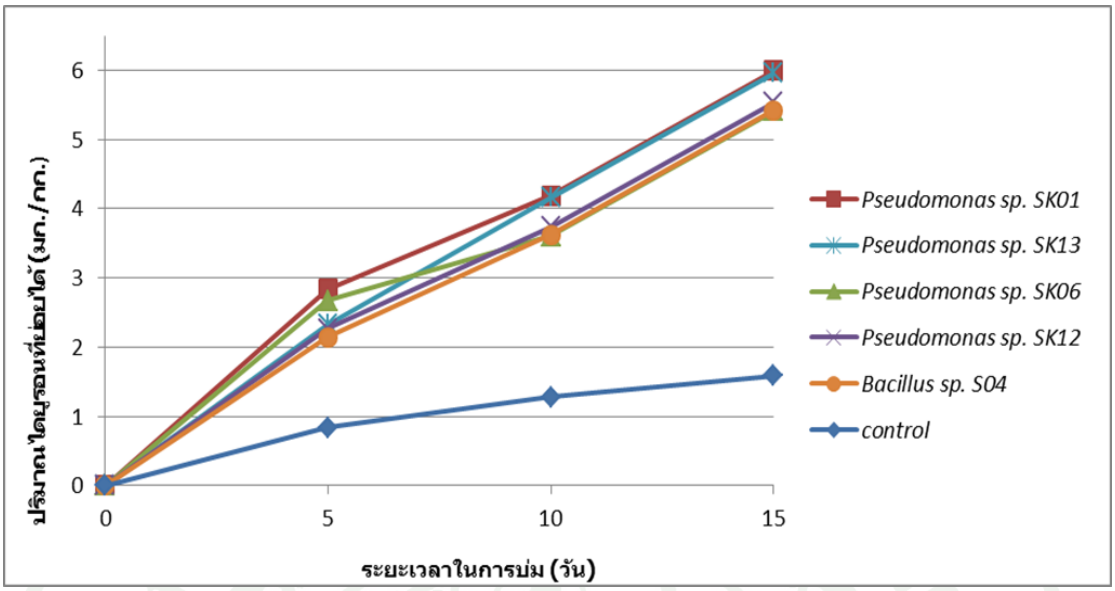
ตารางที่ 11 ปริมาณของสารไดยูรอนที่ระดับความเข้มข้น 5, 10, 15 และ 20 มิลลิกรัม/กิโลกรัม ที่แบคทีเรียทั้ง 5 สายพันธุ์สามารถย่อยได้ หลังจากการบ่ม เป็นเวลา 15 วัน

สายพันธุ์	ความเข้มข้นของสารไดยูรอน (มก./กก.)				เฉลี่ย
	5	10	15	20	
Pseudomonas sp. SK01	5.00 f	7.18 a	5.99 d	3.94 g	4.43 a
Pseudomonas sp. SK06	5.00 f	6.71 b	5.54 e	3.81 g-h	4.22 b
Pseudomonas sp. SK12	5.00 f	6.39 c	5.96 d	3.68 h	4.21 b
Pseudomonas sp. SK13	5.00 f	6.49 c	5.41 e	3.72 h	4.13 b
Bacillus sp. S04	5.00 f	6.71 b	5.42 e	3.72 h	4.18 b
Control	1.80 i	1.65 i-j	1.59 j	1.32 k	1.28 c
เฉลี่ย	4.46 c	5.85 a	4.98 b	3.36 d	
CV%			7.87		
F-test					
Isolate(I)			**		
Conc(C)			**		
IxC			**		

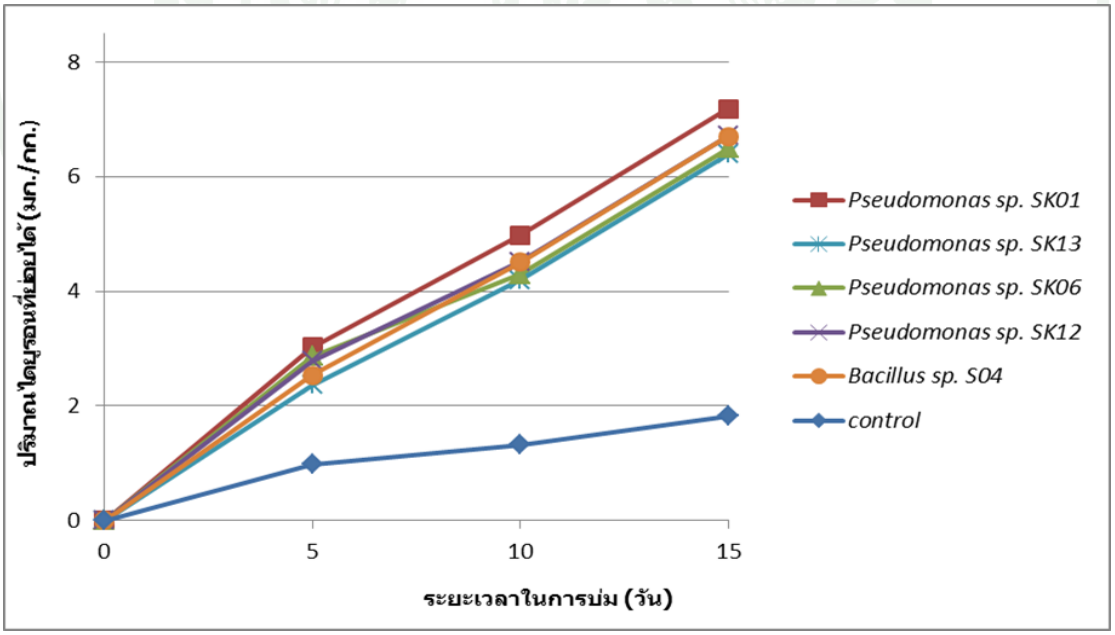
หมายเหตุ ตัวอักษรที่เหมือนกันในสดมภ์เดียวกันไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดย การใช้วิธี DMRT

** = แตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99%

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

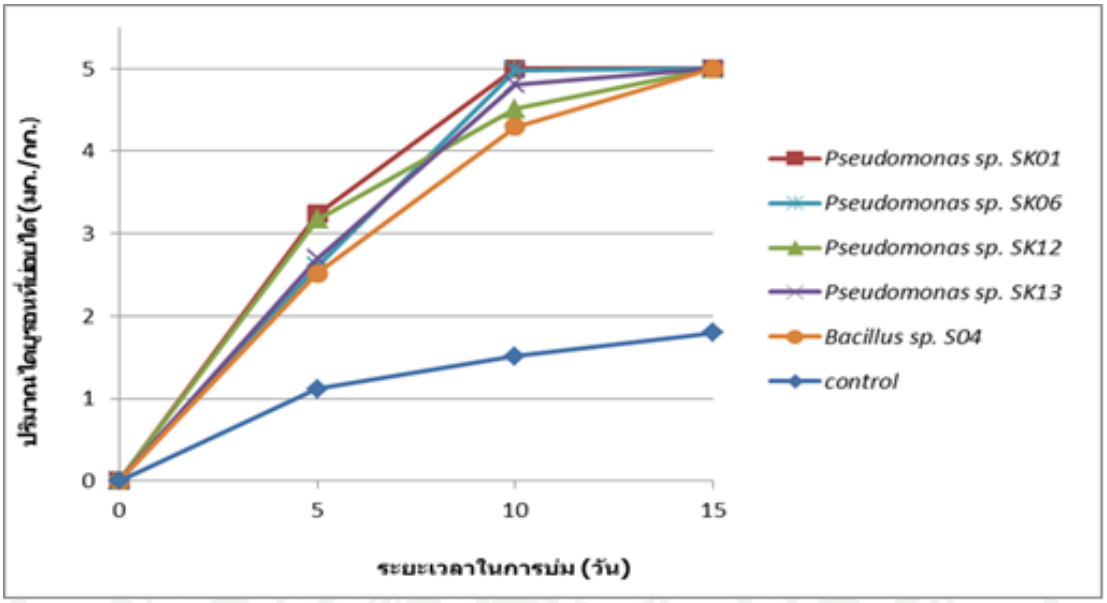


ภาพที่ 13 ปริมาณของสารไดยูรอนที่ระดับความเข้มข้น 5 มิลลิกรัม/กิโลกรัม ที่แบคทีเรียทั้ง 5 สายพันธุ์สามารถย่อยได้ หลังจากการบ่ม เป็นเวลา 5, 10 และ 15 วัน

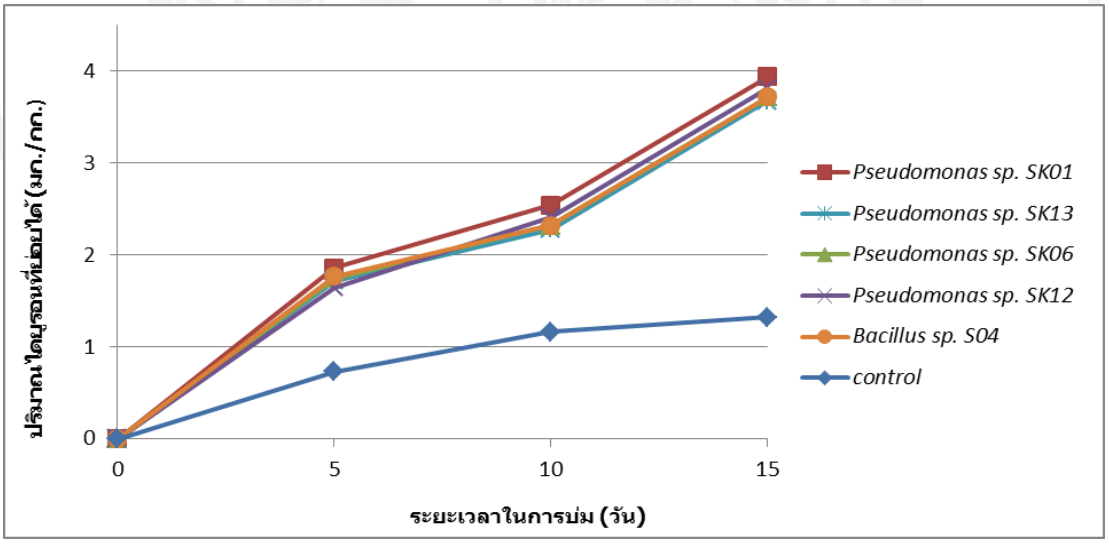


ภาพที่ 14 ปริมาณของสารไดยูรอนที่ระดับความเข้มข้น 10 มิลลิกรัม/กิโลกรัม ที่แบคทีเรียทั้ง 5 สายพันธุ์สามารถย่อยได้ หลังจากการบ่ม เป็นเวลา 5, 10 และ 15 วัน

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 15 ปริมาณของสารไดยูรอนที่ระดับความเข้มข้น 15 มิลลิกรัม/กิโลกรัม ที่แบคทีเรียทั้ง 5 สายพันธุ์สามารถย่อยได้ หลังจากการบ่ม เป็นเวลา 5, 10 และ 15 วัน



ภาพที่ 16 ปริมาณของสารไดยูรอนที่ระดับความเข้มข้น 20 มิลลิกรัม/กิโลกรัม ที่แบคทีเรียทั้ง 5 สายพันธุ์สามารถย่อยได้ หลังจากการบ่ม เป็นเวลา 5, 10 และ 15 วัน

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ปริมาณของแบคทีเรียที่ยังมีชีวิตรอดอยู่ในดิน

ค่า log cfu/g ของแบคทีเรียทั้ง 5 สายพันธุ์ ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ เมื่อพิจารณาถึงสายพันธุ์ของแบคทีเรีย แต่ความเข้มข้นของสารไดยูรอนในระดับที่แตกต่างกัน มีผลทำให้ค่า log cfu/g ของแบคทีเรียทั้ง 5 สายพันธุ์ มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ (ตารางที่ 12) โดยพบว่า ในดินที่มีสารไดยูรอนอยู่ในระดับ 0-10 มิลลิกรัม/กิโลกรัม มีค่า log cfu/g ของแบคทีเรียทั้ง 5 สายพันธุ์มากที่สุด เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารไดยูรอนเป็น 20 มิลลิกรัม/กิโลกรัม ทำให้ ค่า log cfu/g ของแบคทีเรียทั้ง 5 สายพันธุ์ลดลง ทำให้มีค่า log number ของแบคทีเรียน้อยที่สุด ในดินที่ไม่มีการปนเปื้อนของสารไดยูรอน *Pseudomonas* sp. SK13 มีจำนวนของแบคทีเรียที่ยังมีชีวิตรอดมากที่สุด คือ $9.5x10^7$ cfu/g ส่วน *Pseudomonas* sp. SK12 มีจำนวนของแบคทีเรียที่ยังมีชีวิตรอดน้อยที่สุด คือ $8.8x10^7$ cfu/g เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารไดยูรอนเป็น 5 มิลลิกรัม/กิโลกรัม *Pseudomonas* sp. SK01 สามารถใช้สารไดยูรอนที่มีอยู่เพียงเล็กน้อย มาใช้เป็นแหล่งของอาหารและแหล่งของพลังงานได้ดีที่สุด จึงทำให้มีจำนวนแบคทีเรียมากที่สุด คือ $9.4x10^7$ cfu/g ส่วน *Pseudomonas* sp. SK12 ยังคงเหลือจำนวนของแบคทีเรียน้อยที่สุด คือ $8.4 x10^7$ cfu/g เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารไดยูรอนเป็น 10 มิลลิกรัม/กิโลกรัม พบว่า ความเข้มข้นในระดับนี้ แบคทีเรียทั้ง 5 สายพันธุ์ยังคงสามารถย่อยสลายสารไดยูรอนได้ดีอยู่ ทำให้แบคทีเรียมีอาหารใช้ในการเจริญเติบโต โดยเฉพาะ *Bacillus* sp. S04 จึงส่งผลให้มีจำนวนของแบคทีเรียมากที่สุด คือ $7.4x10^7$ cfu/g เมื่อในดินมีความเข้มข้นของสารไดยูรอนในปริมาณที่สูง(15 มิลลิกรัม/กิโลกรัม) ทำให้จำนวนแบคทีเรียลดลงมาอย่างเห็นได้ชัดเจน แต่ *Pseudomonas* sp. SK13 และ *Bacillus* sp. S04มีความทนทานต่อสารไดยูรอนได้ดีจึงมีจำนวนแบคทีเรียที่ทนสารไดยูรอนและสามารถดำรงชีวิตอยู่ได้มากที่สุด เท่ากันคือ $9.3x10^6$ cfu/g ส่วน *Pseudomonas* sp. SK12 มีจำนวนแบคทีเรียที่ทนหรือใช้สารสารไดยูรอนได้น้อย จึงทำให้พบจำนวนแบคทีเรียที่รอดชีวิตน้อยที่สุด คือ $4.9x10^6$ cfu/g ในดินที่มีสารไดยูรอนอยู่ในระดับ 20 มิลลิกรัม/กิโลกรัม ซึ่งถือว่าเป็นความเข้มข้นที่สูงมาก จึงผลต่อจำนวนของแบคทีเรียอย่างมาก แบคทีเรียที่ดำรงชีวิตอยู่ได้นั้นต้องมีประสิทธิภาพที่ดีในการใช้สารไดยูรอนเป็นแหล่งของอาหาร และต้องมีความทนต่อสารไดยูรอนในความเข้มข้นที่สูงได้ดี ซึ่งแบคทีเรียที่มีความสามารถดังที่กล่าว คือ *Bacillus* sp. S04 โดยพบว่ามีแบคทีเรียที่ยังมีชีวิตอยู่จำนวน $3.6x10^6$ cfu/g ส่วนสายพันธุ์ที่ทนไดยูรอนได้น้อยและใช้สารไดยูรอนได้ไม่ดีนักคือ *Pseudomonas* sp. SK13 โดยเหลือแบคทีเรียจำนวน $1.2x10^6$ cfu/g (ตารางผนวกที่ 3)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 12 ปริมาณของแบคทีเรียที่เจริญบนอาหาร NA หลังจากการย่อยสลายไดยูรอนในระดับความเข้มข้นต่างๆ ที่ระยะเวลา 15 วัน (log cfu/g)

ความเข้มข้น (มก./กก.)	จำนวนแบคทีเรีย(cfu/g)				
	Pseudomonas sp. SK01	*Pseudomonas* sp. SK06	*Pseudomonas* sp. SK12	*Pseudomonas* sp. SK13	*Bacillus* sp. S04
0	7.97 a	7.96 a	7.95 a	7.98 a	7.97 a
5	7.97 a	7.94 a	7.93 a	7.97 a	7.93 a
10	7.85 a	7.83 a	7.78 a	7.81 a	7.87 a
15	6.97 b	6.61 b-c	6.61 b-c	6.97 b	6.97 b
20	6.09 d	6.37 c-d	6.01 d	6.08 d	6.37 c-d
F-test	**	**	**	**	**
CV%	8.56	9.83	9.17	7.58	10.32

หมายเหตุ ตัวอักษรที่เหมือนกันในสดมภ์เดียวกันไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติโดย การใช้วิธี DMRT

** = แตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99%

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สรุปผลการทดลอง

เชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากดินทั้ง 10 แหล่ง มีจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดไม่แตกต่างกันทางสถิติเมื่อเลี้ยงบนอาหาร Nutrient agar และอาหาร R-medium แต่มีจำนวนแบคทีเรียที่ทนทานต่อสารไดยูรอนแตกต่างกันทางสถิติ โดยดินจาก Ss10 ซึ่งเป็นดินจากแปลงปลูกอ้อยในจังหวัดสุพรรณบุรี มีจำนวนแบคทีเรียที่ทนต่อสารไดยูรอนมากที่สุด ส่วนดินจาก Sn06 ซึ่งเป็นดินจากแปลงปลูกอ้อยในจังหวัดนครปฐมมีจำนวนแบคทีเรียที่ทนต่อสารไดยูรอนน้อยที่สุด และแบคทีเรียจากแปลงปลูกอ้อยในจังหวัดสุพรรณบุรีที่เจริญบนอาหาร R-medium ดัดแปลง มีความหนาแน่นของแบคทีเรียที่ทนสารไดยูรอนมากที่สุด ส่วนแบคทีเรียจากแปลงปลูกอ้อยในจังหวัดนครปฐมที่เจริญบนอาหาร NA ดัดแปลง มีความหนาแน่นของแบคทีเรียที่ทนสารไดยูรอนน้อยที่สุด

แบคทีเรียที่ทนทานต่อสารไดยูรอนสามารถแบ่งได้เป็น 6 กลุ่ม แบคทีเรียในกลุ่มที่ 1 และกลุ่มที่ 4 เป็นแบคทีเรียในจีนัส Bacillus แบคทีเรียในกลุ่มที่ 2, 3, 5 และ กลุ่มที่ 6 เป็นแบคทีเรียในจีนัส Pseudomonas เชื้อ *Pseudomonas* sp. มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายสารไดยูรอนในอาหารเหลวได้ดีกว่า เชื้อ *Bacillus* sp. โดยเชื้อแบคทีเรีย 5 อันดับแรกที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายสารไดยูรอนในอาหารเหลวนั้นเป็น *Pseudomonas* sp. 4 สายพันธุ์ คือ *Pseudomonas* sp. SK01, SK13, SK12 และ SK06 ซึ่งสามารถย่อยสลายสารไดยูรอนได้ 3.36, 3.06, 2.92 และ 2.82 มิลลิกรัม/ลิตร ตามลำดับ เป็น *Bacillus* sp. 1 สายพันธุ์ คือ *Bacillus* sp. S04 ซึ่งสามารถย่อยสลายสารไดยูรอนในอาหารเหลวได้ 2.82 มิลลิกรัม/ลิตร และเชื้อแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายสารไดยูรอนในอาหารเหลวได้น้อยที่สุดคือ *Bacillus* sp. S03โดยสามารถย่อยสารไดยูรอนได้เพียง 2.00 มิลลิกรัม/ลิตร

ความเข้มข้นของสารไดยูรอนจะมีผลต่อประสิทธิภาพในการย่อยสลายและมีผลต่อปริมาณของแบคทีเรียที่ทนทานต่อสารไดยูรอน โดย *Pseudomonas* sp. SK01 สามารถย่อยสลายสารไดยูรอนที่ความเข้มข้น 5, 10, 15 และ 20 มิลลิกรัม/กิโลกรัม ได้ดีที่สุด โดยย่อยได้ 5.00, 7.18, 5.99 และ 3.94 มิลลิกรัม/กิโลกรัม ตามลำดับ ส่วนแบคทีเรียอีก 4 สายพันธุ์มีความสามารถในการย่อยสารไดยูรอนที่ระดับความเข้มข้นต่างๆได้ในปริมาณที่ใกล้เคียงกัน ส่วนปริมาณของแบคทีเรียที่มีชีวิตรอดในดินหรือแบคทีเรียที่ทนต่อสารไดยูรอน จะพบว่าที่ความเข้มข้นของสารไดยูรอนในระดับ 0-10 มิลลิกรัม/กิโลกรัม พบแบคทีเรียทั้ง 5 สายพันธุ์มากที่สุด ไม่แตกต่างกันทางสถิติ แต่ในดินที่มีความเข้มข้นของสารไดยูรอน 20 มิลลิกรัม/กิโลกรัม จะพบว่า *Bacillus* sp. S04 มีปริมาณของแบคทีเรียที่มีชีวิตรอดในดินหรือแบคทีเรียที่ทนต่อสารไดยูรอนอยู่มากที่สุด

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

กรมวิชาการเกษตร. 2552. **ข้อมูลนำเข้าวัสดุอันตรายทางการ**. ข้อมูลการเกษตร. แหล่งที่มา: http://www.doa.go.th/th/lstDoa3Cate.aspx?id, 20 มกราคม 2553.

คณาจารย์ภาคปฐพีวิทยา. 2541. **ปฐพีวิทยาเบื้องต้น**. พิมพ์ครั้งที่ 8. ภาคปฐพีวิทยา คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

พิมพ์ภัค หีบเงิน. 2551. **การย่อยสลายและการบำบัดทางชีวภาพของดินที่มีการปนเปื้อนสารอาทราซิน**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

เผ่าพงศ์ พงศ์พนรัตน์. 2526. **วัชพืชพืชและการกำจัด**. เอกสารประกอบการฝึกอบรมการพัฒนาแหล่งน้ำขนาดเล็ก สถาบันเทคโนโลยีแห่งเอเชีย. 227-246.

ทศพล พรพรหม. 2545. **สารกำจัดวัชพืช**: หลักการและกลไกเข้าทำลาย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

Alva, A.K. and M. Singh. 1990. **Sorption of bromacil, diuron, norfluron, and simazine at various horizons in two soils**. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 45: 365–374.

Anonymous. 1979. **Herbicide Handbook of the Weed Science Society of America**. Weed Science Society of America. Urbana, IL, USA.

Baitsch, D., C. Sandu, R. Brandsch and G.L. Igloi. 2001. **Gene cluster on pA01 of Arthrobacter nicotinovorans involved in degradation of the plant alkaloid nicotine: cloning purification, and characterization of 2, 6-dihydroxypyridine 3-hydroxylase**. J. Bacteriol. 183: 5262-5267.

Benson, H.J. 2005. **Microbiological Applications.** 9 th ed**.** McGraw-Hill, New York.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Beste, C.E. 1983. **Herbicide handbook of the Weed Science Society of America**. 5th ed. WeedScience Society of America, USA.

CEQ (Council on Environmental Quality). 1981. **Contamination of groundwater by toxic organic chemicals**. US Government Printing Office, Washington DC., 16-39.

Cohen, S., S. Creager, R. Carsel and C. Enfield. 1984. **Potential pesticide contamination of ground water from agricultural uses**. In treatment and disposal of pesticide waste. American Chemical Society. Washington, D.C.

El-Deeb, B.A., S.M. Soltan, A.M. Ali and K.A. Ali, 2000. **Detoxification of the herbicide diuron by *Pseudomonas* sp**. Microbiol. 45: 211–216.

Elisa Esposito, S.M. Paulillo and G.P. Manfio. **Biodegradation of the herbicide diuron in soils by actinomycetes**. Chemosph. 37: 541-548.

Gooddy, D.C., P.J. Chilton and I. Harrison, 2002. **A field study to assess the degradation and transport of diuron and its metabolites in a calcareous soil**. Sci. Total Environ. 297: 67–83.

John E. Cullington. 1999. **Rapid biodegradation of diuron and other phenylurea herbicides by a soil bacterium**. Soil Biol. Biochem. 31: 677-686.

Klingman, G.C. and F.M. Ashton. 1986. **Weed Science Principles and Practices 2nd ed**. John Wiley & Sons, New York, NY, USA.

Lamoree, M.H., C.P. Swart, A. van der Horst and B. van Hattum. 2002. **Determination of diuron and the antifouling paint biocide Irgarol 1051 in Dutch marinas and coastal waters**. J. Chromatogr. 970: 183–190.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Castillo M.A., N. Felis, P. Arago, G. Cuestaa and C. Sabater. 2006. **Biodegradation of the herbicide diuron by streptomycetes isolated from soil**. International Biodeterioration & Biodegradation: 196–202.

Nagy, I., G. Scloofs, F. Compernolle, P. Proost, J. Vanderleyn and R. De Mot. 1995. **Degradation of the thiocarbamate herbicide EPTC (ethyldipropylcarbamothioate) and biosafening by *Rhodococcus* sp. strain HI86/21 involve an inducible cytochrome P450 system and aldehyde dehydrogenase**. J. Bacteriol. 177: 676–687.

Nebeker, A.V. and G.S.Schuytema, 1998. **Chronic effects of the herbicide diuron on freshwater cladocerans, amphipods, midges, minnows, worms, and snails.** Arch. Environ. Contam. Toxicol. 35: 441–446.

Nelson, D.W. and L.E. Sommers. 1986. **Total carbon, Organic Carbon, and Organic Matter**, pp. 570-572. In A.L. Page, eds. Method of Soil Analysis Part 2: Chemical and Microbiological Properties 2nd. Soil Science Society of America Inc., Wisconsin.

Okamura, H. 2002. **Photodegradation of the antifouling compounds irgarol 1051 and diuron released from a commercial antifouling paint**. Chemosph. 48: 43–50.

Omer, C.A., R. Lenstra, P.J. Litle, C. Dean, J.M. Tepperman, K.J. Leto, J.A. Romesser and D.P. Okeefe. 1990. **Gene for two herbicide-inducible cytochrome P450 from *Streptomyces griseoflavus***. J. Bacteriol. 172: 3335–3345.

Prado, A.G.S. and C. Airoldi, 2002. **The toxic effect on soil microbial activity caused by the free or Immobilized pesticide diuron.** Thermoch. Acta 394: 155–162.

Rouchaud, J., R. Neus, K. Bulcke, K. Cools, H. Eelen and T. Dekkers. 2000. **Soil dissipation of diuron, chlorotoluron, simazine, propyzamide and diflufenican herbicides after repeated applications in fruit tree orchards**. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 39: 60–65.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Sorensen, S.R., G.D. Bending, C.S. Jacosen, A. Walker and J. Aamand. 2003. **Microbial degradation of isoproturon and related phenylurea herbicides in and below agricultural fields**. Microbiol. 45: 1–11.

Tam, A.C., R.M. Behki and S.V. Khan. 1987. **Biotransformation catalyzed by the genus *Rhodococcus***. Crit. Rev. Biotechnol. 14: 29–73.

Tworkoski, T.J., W. Welker and G.D. Vass. 2000. **Soil residues following repeat applications of diuron, simazine, and terbacil**. Weed Technol. 14: 191–196.

Widehen, P., S. Aıt-Aıssa, C. Tixier, M. Sancelme, H. Veschambre and N. Truffaut, 2001. **Isolation, characterization and diuron transformation capacities of a bacterial strain *Arthrobacter* sp. N2**. Chemosph. 46: 527–534.

Yao, X.F., F. Fazlurrahman, R. Pandey, J. Pandey, R.G. Mourant, R.K. Jain, J.H. Guo, R.J.Russell, J.G. Oakeshott and G. Pandey. 2010. **Degradation of dichloroaniline isomers by newly isolated *Bacillus megaterium* IMT21**. Microbiol. 16 Dec 2010.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ภาคผนวก

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ 1 ปริมาณของสารไดยูรอนที่เชื้อ *Bacillus* sp. สามารถย่อยได้ หลังจากเลี้ยงเชื้อในอาหาร R-medium ดัดแปลง ทุก 6 ชั่วโมงเป็นเวลา 72 ชั่วโมง

สายพันธุ์	ปริมาณของสารไดยูรอนที่ย่อยได้ (mg/l)											
Bacillus sp.	6 hr.	12 hr.	18 hr.	24 hr.	30 hr.	36 hr.	42 hr.	48 hr.	54 hr.	60 hr.	66 hr.	72 hr.
S01	0.33 b	1.64 a	1.65 b	1.72 a	1.77 b	1.97 b	2.06 b	2.14 b	2.29 c	2.39 c	2.44 c	2.49 b
S02	0.04 c	0.74 d	1.41 c	1.60 b	1.65 c	1.94 b	2.04 b	2.14 b	2.34 b	2.46 b	2.52 b	2.58 b
S03	0.01 c	0.63 e	1.09 d	1.18 c	1.20 d	1.39 c	1.51 c	1.62 c	1.84 e	1.92 d	1.96 d	2.00 c
S04	0.63 a	1.55 b	1.68 b	1.68 b	1.87 a	2.26 a	2.32 a	2.39 a	2.60 a	2.71 a	2.77 a	2.82 a
S05	0.69 a	1.40 c	1.75 a	1.79 a	1.83 a	1.92 b	2.02 b	2.13 b	2.18 d	2.33 c	2.41 c	2.48 b
Control	0.04 c	0.03 f	0.05 e	0.04 d	0.05 e	0.02 d	0.03 d	0.03 d	0.04 f	0.04 e	0.04 e	0.03 d
F-test	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**
CV%	5.34	6.21	4.57	4.29	5.24	4.24	6.13	6.45	5.87	5.48	6.23	4.58

หมายเหตุ ตัวอักษรที่เหมือนกันในสดมภ์เดียวกันไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดย การใช้วิธี DMRT

** = แตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99%

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ 2 ปริมาณของสารไดยูรอนที่เชื้อ *Pseudomonas* sp. สามารถย่อยได้ หลังจากเลี้ยงเชื้อในอาหาร R-medium ดัดแปลง ทุก 6 ชั่วโมงเป็นเวลา 72 ชั่วโมง

สายพันธุ์	ปริมาณของสารไดยูรอนที่ย่อยได้ (mg/l)					
Pseudomonas sp.	6 hr.	12 hr.	18 hr.	24 hr.	30 hr.	36 hr.
SK01	0.88 a-b	1.96 a	2.27 a	2.48 a	2.59 a	2.84 a
SK02	0.51 b-c	1.59 b	1.65 c	1.69 d	1.78 c	1.97 c
SK03	0.07 f	0.96 a	1.86 b	1.90 b	1.95 b-c	2.18 c
SK04	0.53 b-c	1.71 a	2.04 a-b	2.04 b	2.13 b	2.25 c
SK05	0.21 d	1.41 b	1.68 c	1.71 c	2.04 b-c	2.22 c
SK06	0.45 c	1.77 a	1.99 b	2.05 b	2.16 b	2.26 c
SK07	0.40 c	1.41 b	1.79 b	1.83 c	1.92 c	2.22 c
SK08	0.13 e	1.04 d	1.08 e	1.19 e	1.23 e	1.34 d
SK09	0.47 c	1.64 a-b	1.66 c	1.66 d	1.81 c	2.15 c
SK10	0.10 e	1.08 d	1.20 d	1.71 c-d	1.75 d	1.97 c
SK11	0.58 b-c	1.34 c	1.66 c	1.71 c-d	1.84 c	2.03 c
SK12	1.13 a	1.67 a-b	1.71 c	2.19 a-b	2.21 b	2.33 b-c
SK13	0.86 a-b	1.49 b	1.50 c	1.61 d	2.24 b	2.61 a-b
SK14	0.65 b	1.49 b	1.56 c	1.67 d	1.97 b-c	1.96 c
SK15	0.93 a	1.62 a-b	1.95 b	2.03 b	2.14 b	2.18 c
Control	0.04 f	0.03 e	0.05 f	0.04f	0.05 f	0.02 e
F-test	**	**	**	**	**	**
CV%	6.35	6.78	5.37	5.87	6.19	5.12

หมายเหตุ ตัวอักษรที่เหมือนกันในสดมภ์เดียวกันไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดย การใช้วิธี DMRT

** = แตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99%

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ 2 (ต่อ)

สายพันธุ์	ปริมาณของสารไดยูรอนที่ย่อยได้ (mg/l)					
Pseudomonas sp.	42 hr.	48 hr.	54 hr.	60 hr.	66 hr.	72 hr.
SK01	2.91 a	2.97 a	3.14 a	3.25 a	3.31 a	3.36 a
SK02	2.09 c	2.21 b	2.28 c	2.39 c	2.44 c	2.49 c
SK03	2.26 b	2.33 b	2.42 b-c	2.54 c	2.61 c	2.66 c
SK04	2.34 b	2.43 b	2.60 b	2.71 b	2.77 b	2.82 b-c
SK05	2.27 b	2.30 b	2.59 b	2.69 b-c	2.74 b	2.78 c
SK06	2.32 b	2.39 b	2.64 b	2.74 b	2.79 b	2.83 b-c
SK07	2.29 b	2.35 b	2.57 b	2.69 b-c	2.75 b	2.80 b-c
SK08	1.54 d	1.72 d	1.96 d	2.06	2.10 d	2.15 d
SK09	2.27 b	2.39 b	2.61 b	2.71 b	2.76 b	2.81 b-c
SK10	2.05 c	2.12 c	2.39 b-c	2.54 c	2.62 c	2.69 c
SK11	2.15 b	2.26 b	2.38 b-c	2.53 c	2.61 c	2.68 c
SK12	2.41 b	2.48 b	2.71b	2.82 b	2.87 b	2.92 b
SK13	2.71 a	2.81 a	2.94 a	3.00 a	3.03 a-b	3.06 a-b
SK14	2.05 c	2.13 c	2.37 b-c	2.53 c	2.61 c	2.68 c
SK15	2.25 b	2.31 b	2.55 b	2.68 b-c	2.74 b	2.80 b-c
Control	0.03 e	0.03 e	0.04 e	0.04 d	0.04 e	0.03 e
F-test	**	**	**	**	**	**
CV%	5.67	5.98	6.32	6.84	5.24	4.88

หมายเหตุ ตัวอักษรที่เหมือนกันในสดมภ์เดียวกันไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดย การใช้วิธี DMRT

** = แตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99%

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ 3 จำนวนของแบคทีเรียที่เจริญบนอาหาร NA หลังจากการย่อยสลายไดยูรอนในระดับความเข้มข้นต่างๆ ที่ระยะเวลา 15 วัน

ความเข้มข้น (มก./กก.)	จำนวนแบคทีเรีย (cfu/g)				
	Pseudomonas sp. SK01)	*Pseudomonas* sp. SK06)	*Pseudomonas* sp. SK12)	*Pseudomonas* sp. SK13)	*Bacillus* sp. (S04)
0	$9.3x10^7$	$9.2x10^7$	$8.8x10^7$	$9.5x10^7$	$9.4x10^7$
5	$9.4x10^7$	$8.8x10^7$	$8.4x10^7$	$9.2x10^7$	$8.6x10^7$
10	$7.1x10^7$	$6.7x10^7$	$6.1x10^7$	$6.5x10^7$	$7.4x10^7$
15	$9.2x10^6$	$5.6x10^6$	$4.9x10^6$	$9.3x10^6$	$9.3x10^6$
20	$1.7x10^6$	$3.1x10^6$	$1.5x10^6$	$1.2x10^6$	$3.6x10^6$

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ประวัติการศึกษาและการทำงาน

ชื่อ – นามสกุล	นายกิตติพัฒน์ ใจซื่อ
วัน เดือน ปี ที่เกิด	วันที่ 23 สิงหาคม 2529
สถานที่เกิด	อ. สองพี่น้อง จ. สุพรรณบุรี
ประวัติการศึกษา	วท. บ. (เกษตรศาสตร์) มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
ตำแหน่งหน้าที่การงานปัจจุบัน	-
ผลงานดีเด่นและรางวัลวิชาการ	-
ทุนการศึกษาที่ได้รับ	-

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์