บทสรุปผู้บริหาร

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

ผู้วิจัย
1) ผศ. พุทธพร แสงเทียน
ภาควิชาวิศวกรรมเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี
2) ผศ.ดร. สุมนา ราษฎร์ภักดี (สิริพัฒนากุล)
ภาควิชาวิศวกรรมสิ่งแวดล้อม คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น
ภาควิชาวิศวกรรมเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี
3) รศ.ดร. อลิสา วังใน
ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

หน่วยงาน คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ปัญหามลพิษจากการเกษตรที่สำคัญเรื่องหนึ่ง คือ ปัญหาการตกค้างของสารกำจัดศัตรูพืชในแหล่งน้ำ จังหวัดอุบลราชธานีโดยเฉพาะในเขตอำเภอเมืองเป็นแหล่งปลูกพริกขนาดใหญ่ที่สุดในประเทศแห่งหนึ่ง โดยมีพื้นที่เพาะปลูกรวมกว่า 10,000 ไร่ การปลูกพริกมีการใช้สารเคมีหลายชนิด งานวิจัยในอดีตพบสารกำจัดศัตรูพืชตกค้างเกินกว่าค่ามาตรฐานกำหนดทั้งในพริก ดินจากไร่พริก ตลอดจนเลือดของเกษตรกรสูงถึงร้อยละ 50 ดังนั้นสามารถกล่าวได้ว่าในการปลูกพริกใช้สารกำจัดศัตรูพืชจนกระทั่งมีการตกค้างกระจายทั่วทั้งสิ่งแวดล้อม สารกำจัดศัตรูพืชที่ใช้มากที่สุด ได้แก่ สารโพรฟีโนฟอส (profenofos) ซึ่งเป็นสารกำจัดศัตรูพืชในกลุ่มสารออร์แกนโนฟอสฟอรัส จากการสำรวจข้อมูลน้ำบริโภคอุปโภคของประชาชนในเขตพื้นที่ดังกล่าวพบว่าน้ำใต้ดินเป็นแหล่งน้ำบริโภคหลัก โดยประชาชนจำนวนมากสูบน้ำใต้ดินแล้วบริโภคโดยตรงไม่ผ่านการบำบัด ประกอบกับระดับน้ำใต้ดินในเขตพื้นที่ดังกล่าวอยู่ลึกเพียงประมาณ 2-8 เมตร จากผิวดิน จึงมีความเป็นไปได้ว่าสารโพรฟีโนฟอสอาจปนเปื้อนลงสู่แหล่งน้ำใต้ดิน โดยสารโพรฟิโนฟอสเป็นพิษต่อสิ่งมีชีวิต อีกทั้งยังส่งผลต่อกระบวนการเมตาบอลิซึมและการทำงานของประสาทส่วนกลาง หากได้รับอย่างต่อเนื่องแม้จะมีปริมาณน้อยผ่านทางการบริโภคน้ำใต้ดินอาจเป็นอันตรายถึงแก่ชีวิตได้ ดังนั้นจึงมีความจำเป็นต้องพัฒนาเทคโนโลยีในการฟื้นฟูน้ำใต้ดินที่ปนเปื้อนสารโพรฟีโนฟอส

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

จนถึงปัจจุบันยังไม่มีการศึกษาการฟื้นฟูน้ำใต้ดินที่ปนเปื้อนจากสารโพรฟีโนฟอส และจากข้อมูลข้างต้นนี้บ่งชี้ได้ว่าการประยุกต์ใช้เทคโนโลยีการเติมเซลล์และการกระตุ้นทางชีวภาพมีศักยภาพสำหรับการกำจัดสารโพรฟีโนฟอสตกค้างจึงเป็นที่มาของงานวิจัยนี้ โดยงานวิจัยนี้มีเป้าหมายเพื่อพัฒนาเทคโนโลยีการฟื้นฟูน้ำใต้ดินที่ปนเปื้อนสารโพรฟีโนฟอสด้วยกระบวนการทางชีวภาพเชิงปรับปรุงตามแนวทางกระบวนการเติมเซลล์ร่วมกับการกระตุ้นทางชีวภาพ การศึกษานี้มีพื้นที่ศึกษา ณ ตำบลหัวเรือ อำเภอเมือง จังหวัดอุบลราชธานี ซึ่งเป็นพื้นที่ปลูกพริกขนาดใหญ่ที่สุดในประเทศไทย โดยศึกษาครอบคลุมตั้งแต่การคัดแยกจุลินทรีย์จากดินที่ปนเปื้อนสารโพรฟีโนฟอสในแปลงปลูกพริก การระบุสายพันธุ์จุลินทรีย์ การเติมจุลินทรีย์ดังกล่าวเพื่อกำจัดสารโพรฟีโนฟอส การพัฒนาการย่อยสลายสารโพรฟีโนฟอสโดยใช้หลักการกระตุ้นทางชีวภาพ รวมทั้งการสาธิตการฟื้นฟูน้ำใต้ดินด้วยเทคโนโลยีการเติมเซลล์ที่ถูกกระตุ้นที่พัฒนาขึ้น ผลที่ได้จากงานวิจัยนี้สามารถต่อยอดพัฒนาใช้จริงได้ในพื้นที่ศึกษา รวมทั้งยังสามารถขยายผลเพื่อใช้ในการกำจัดสารโพรฟีโนฟอสในพื้นที่ปนเปื้อนอื่นหรือเป็นแนวทางในการพัฒนาใช้สำหรับกำจัดสารปนเปื้อนชนิดอื่น ๆ ได้ต่อไป

วัตถุประสงค์

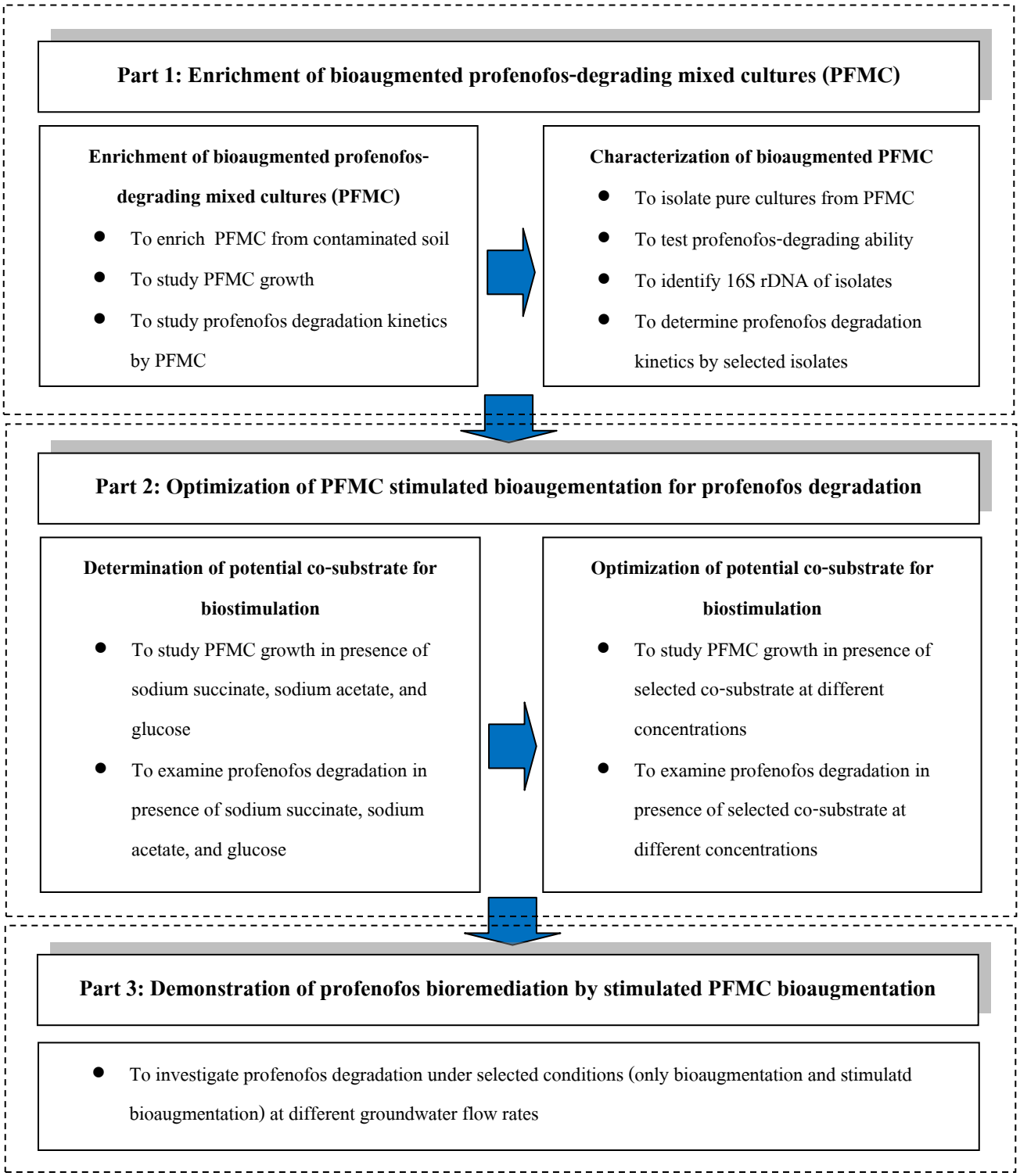
งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์หลัก คือ เพื่อพัฒนาวิธีกำจัดสารกำจัดศัตรูพืชโพรฟีโนฟอสตกค้างในน้ำใต้ดิน โดยใช้วิธีการทางชีววิทยาตามแนวทางการเติมเซลล์ที่ถูกกระตุ้น โดยมีวัตถุประสงค์จำเพาะ คือ

1) เพื่อคัดแยกกลุ่มจุลินทรีย์และระบุสายพันธุ์ที่สามารถย่อยสลายสารโพรฟีโนฟอส
2) เพื่อศึกษาการย่อยสลายสารโพรฟีโนฟอสด้วยการเติมจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้
3) เพื่อการปรับปรุงการย่อยสลายสารโพรฟีโนฟอสโดยใช้กระบวนการกระตุ้นทางชีวภาพ
4) เพื่อสาธิตการฟื้นฟูน้ำใต้ดินที่ปนเปื้อนสารโพรฟีโนฟอสโดยใช้กระบวนการทางชีวภาพเชิงปรับปรุงตามหลักการเติมเซลล์ที่ถูกกระตุ้น

วิธีดำเนินการวิจัย

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

การทดลองแบ่งออกเป็น 3 ขั้นตอน ดังแสดงได้ดังรูปที่ 1 ดังนี้ 1) การคัดแยกกลุ่มจุลินทรีย์สำหรับการเติมเซลล์และศึกษาการย่อยสลายสารโพรพีโนฟอสของจุลินทรีย์ที่ถูกเติม ในขั้นตอนนี้แยกภาระงานออกเป็น 2 ขั้นตอนหลัก คือ การคัดแยกกลุ่มจุลินทรีย์จากดินที่มีการปนเปื้อนสารโพรพีโนฟอส แล้วศึกษาลักษณะการย่อยสลายสารโพรพีโนฟอสของกลุ่มจุลินทรีย์ดังกล่าว (ครอบคลุมจลนพลศาสตร์การเจริญเติบโตและการย่อยสลายของสาร) แล้วจากนั้นในขั้นตอนต่อมาจึงคัดแยกเชื้อจุลินทรีย์บริสุทธิ์เพื่อระบุลักษณะของกลุ่มจุลินทรีย์ 2) การศึกษาการกระตุ้นการย่อยสลายสารโพรพีโนฟอสโดยใช้กระบวนการเมตาโบลิซึมร่วม ในขั้นตอนนี้แยกภาระงานออกเป็น 2 ขั้นตอนหลัก คือ การศึกษาหาสารอาหารร่วมที่ส่งเสริมให้เกิดกระบวนการเมตาโบลิซึมร่วมได้ โดยในการศึกษาครอบคลุมผลต่อการเจริญเติบโตของกลุ่มจุลินทรีย์และความสามารถในการย่อยสลายสาร แล้วคัดเลือกสารอาหารร่วมที่เหมาะสม จากนั้นศึกษาความสัมพันธ์ของความเข้มข้นสารอาหารร่วมและสารโพรพีโนฟอสในการเกิดกระบวนการเมตาโบลิซึมร่วม 3) การสาธิตการฟื้นฟูน้ำใต้ดินที่ปนเปื้อนสารโพรพีโนฟอสตามหลักการเติมเซลล์ที่ถูกกระตุ้น ในขั้นตอนนี้เป็นการสาธิตการกำจัดสารโพรพีโนฟอสในแบบจำลองน้ำใต้ดิน ที่มีอัตราการไหลแตกต่างกัน การศึกษาเติมจุลินทรีย์และสารอาหารร่วมโดยอ้างอิงจากผลในขั้นตอนที่ผ่านมา โดยในการศึกษาครอบคลุมการย่อยสลายสารและวิถีของการย่อยสลาย โดยในขั้นตอนนี้จะได้ศึกษาทั้งเปรียบเทียบ 1) การเติมเซลล์ 2) การเติมเซลล์ที่ถูกกระตุ้น และ 3) ชุดควบคุม (ไม่ได้ทั้งเซลล์และสารอาหารร่วม) ณ อัตราการไหลของน้ำใต้ดินต่าง ๆ



รูปที่ 1 แนวคิดงานวิจัย

ผลการวิจัย

<u>ผลการคัดกลุ่มจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการกำจัดสารโพรฟีโนฟอส</u>

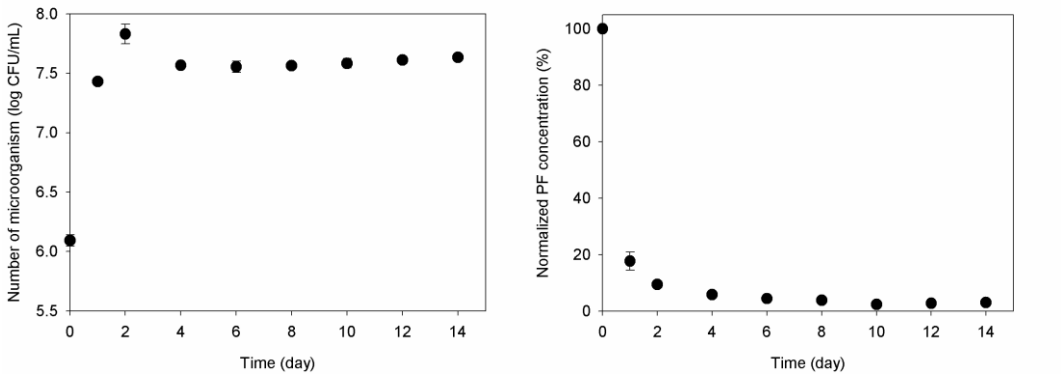
1) ผลการศึกษาการคัดกลุ่มจุลินทรีย์และลักษณะของกลุ่มจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้

การคัดกลุ่มจุลินทรีย์ (mixed cultures) จากดิน มีวัตถุประสงค์เพื่อคัดกลุ่มจุลินทรีย์ที่ย่อยสลายสารโพรฟีโนฟอสได้ ซึ่งกระทำโดยการคัดแยกจุลินทรีย์โดยวิธีถ่ายเชื้อเป็นจำนวน 5 ครั้ง (1 ครั้ง ใช้เวลาในการปรับสภาพ 2 สัปดาห์) สภาวะที่ใช้ในการคัดกลุ่มจุลินทรีย์ คือ ที่อุณหภูมิ 30°C พีเอช 7 และเป็นสภาพที่มีออกซิเจน (aerobic condition) ซึ่งเป็นสภาพที่ใกล้เคียงกับสภาพแวดล้อมในพื้นที่เกษตรกรรมที่ปนเปื้อนสารกำจัดศัตรูพืชโพรฟีโนฟอสจริง เมื่อพิจารณาสภาวะทดลองกลุ่มจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้จัดเป็นจุลินทรีย์ในกลุ่มเฮเทอโรโทรป (heterotroph) ซึ่งใช้สารโพรฟีโนฟอสเป็นแหล่งสารคาร์บอนเดี่ยว (sole carbon source) ได้

จากการศึกษาลักษณะทางกายภาพของกลุ่มจุลินทรีย์ที่ย่อยสลายสารโพรฟีโนฟอส พบว่ากลุ่มจุลินทรีย์ดังกล่าวมีความหลากหลายทางชีวภาพ (biodiversity) ซึ่งบ่งชี้ได้ว่ามีจุลินทรีย์หลายชนิดสามารถทนสารโพรฟีโนฟอสได้ อย่างที่ทราบกันทั่วไปว่ากลุ่มจุลินทรีย์สามารถทำงานได้ดีกว่าจุลินทรีย์สายพันธุ์เดียวในสภาพธรรมชาติ โดยยิ่งมีความหลากหลายมากยิ่งทำให้มีเสถียรภาพสูงตามมา ดังนั้นสามารถกล่าวได้ว่ากลุ่มจุลินทรีย์ที่คัดได้มีศักยภาพในการใช้ประโยชน์ได้จริงต่อไป

2) จลนพลศาสตร์ของการเจริญเติบโตและการย่อยสลายสารโพรฟีโนฟอส

ผลการศึกษาการเจริญเติบเติบของกลุ่มจุลินทรีย์ที่ย่อยสลายสารโพรฟีโนฟอส พบว่ากราฟการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์แสดงดังภาพที่ 1 กล่าวคือ ในระหว่างการทดลอง 14 วัน กลุ่มจุลินทรีย์มีการเจริญเติบโตเป็น 2 ระยะ คือ ระยะเพิ่มจำนวน (log phase) และระยะคงตัว (stationary phase) เกิดขึ้นในช่วงเวลาที่ 0-4 วัน และตั้งแต่ 4 วันเป็นต้นไป ตามลำดับ ส่วนการศึกษาความสามารถในการย่อยสลายสารโพรฟีโนฟอส พบว่าความเข้มข้นของสารโพรฟีโนฟอสลดลงอย่างรวดเร็วในช่วงการทดลอง 2 วันแรก และที่เวลา 4 ถึง 14 วัน ความเข้มข้นของสารโพรฟีโนฟอสค่อยลดลงจนเกือบคงที่ดังภาพที่ 1

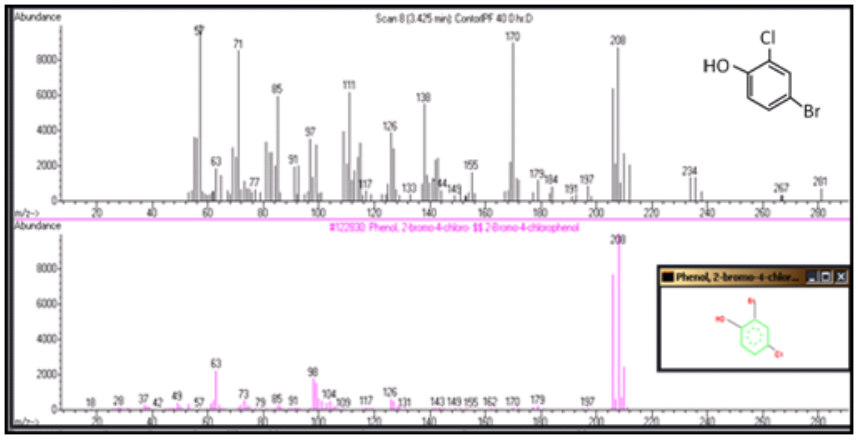


ภาพที่ 1 การเจริญเติบโตของกลุ่มจุลินทรีย์และการย่อยสลายสารโพรฟีโนฟอส

กลุ่มจุลินทรีย์ที่ย่อยสลายสารโพรพีโนฟอสมีความสามารถในการย่อยสลายร้อยละ 97 (ความเข้มข้นเริ่มต้น 22 mg/L) ซึ่งความสามารถในการย่อยสลายสารโพรพีโนฟอสที่เกิดขึ้นมีความสอดคล้องกับกราฟการเจริญเติบของจุลินทรีย์ เมื่อพิจารณาข้อมูลการเจริญเติบโตของกลุ่มจุลินทรีย์ที่ย่อยสลายสารโพรพีโนฟอสและลักษณะการย่อยสลายสารในพบว่าจลนพลศาสตร์การเจริญเติบโตและการย่อยสลายสารโพรพีโนฟอสเป็นไปตามปฏิกิริยาอันดับที่ 1 กล่าวคือ อัตราการเจริญเติบโตและการย่อยสลายสารโพรพีโนฟอสแปรผันตรงกับความเข้มข้นของสารโพรพีโนฟอสตั้งต้น โดยสามารถสรุปค่าคงที่จลนพลศาสตร์การเจริญเติบโตและการกำจัดสารโพรพีโนฟอส เท่ากับ 0.02 และ 0.006 hr^{-1} ตามลำดับ และมีอัตราการย่อยสลายสารโพรพีโนฟอส เท่ากับ 3.0 mg/L/d

3) ผลการวิเคราะห์วิถีการย่อยสลายสารโพรพีโนฟอสโดยกลุ่มจุลินทรีย์เบื้องต้น

สำหรับการวิเคราะห์วิถีการย่อยสลายสารโพรพีโนฟอสเบื้องต้นเป็นการศึกษาเพื่อพิจารณาความเป็นไป (fate) ของสารดังกล่าวในธรรมชาติ ซึ่งการศึกษากระทำควบคู่ไปกับการติดตามความเข้มข้นของสารโพรพีโนฟอสคงเหลือในชุดทดลอง โดยการศึกษานี้วิเคราะห์ผลโดยใช้เครื่องจีซีเอ็มเอส (GC-MS, gas chromatropgrahy-mass spectrometry) ในการระบุสารมัธยันตร์ (intermediate) ต่าง ๆ ผลการศึกษาพบว่าในสารละลายมาตรฐานและชุดควบคุม (ไม่มีจุลินทรีย์) ตรวจพบสารบีซีพี (4-bromo-2-cholorophenol; BCP) ซึ่งมีโครงสร้างดังภาพที่ 2 ในชุดทดลองนี้ไม่มีเซลล์จุลินทรีย์ดังนั้นสามารถระบุได้ว่าสารโพรพีโนฟอสทำปฏิกิริยากับน้ำ (hydrolysis) แล้วแตกตัวเป็นสารบีซีพี แต่ผลจากงานวิจัยนี้พบว่าเมื่อติดตามความเป็นไปของสารอย่างต่อเนื่องพบว่าปริมาณสารบีซีพีคงที่ ดังนั้นผลการศึกษานี้ชี้ชัดได้ว่ากระบวนการไฮโดรไลซีสทำให้สารโพรพีโนฟอสเพียงบางส่วนแตกตัวเป็นเหตุให้สารโพรพีโนฟอสมีความเข้มข้นลดลงเล็กน้อย นอกจากนี้ยังพบว่ากระบวนการแตกตัวนี้ไม่ส่งทำให้สารบีซีพีแตกตัวได้



ภาพที่ 2 โครงสร้างสารบีซีพีและการเปรียบเทียบรูปแบบแมสสเปคตรากับฐานข้อมูล

สำหรับผลจากชุดทดลองที่ได้เติมกลุ่มจุลินทรีย์พบว่าการทดลองที่ระดับความเข้มข้นเริ่มต้นของสารโพรฟีโนฟอสไม่สูงนัก (20 mg/L) การตรวจติดตามไม่พบสารบีซีพี แต่เมื่อทดลองที่ความเข้มข้นเริ่มต้นสูงมากขึ้น (40 mg/L) จึงพบสารบีซีพี จากผลการทดลองในขั้นตอนนี้พบการสะสมของสารบีซีพี (ทำให้ตรวจพบได้) ดังนั้นสามารถกล่าวได้ว่ากลุ่มจุลินทรีย์ที่คัดได้ในการศึกษานี้สามารถย่อยสลายสารโพรฟีโนฟอสเป็นสารบีซีพีได้ แต่เมื่อมีความเข้มข้นของสารโพรฟีโนฟอสสูงจึงทำให้เอนไซม์ไม่สมดุลกับปริมาณสารดังกล่าวจึงพบการสะสมของสารบีซีพี ผลดังกล่าวเป็นไปในทิศทางเดียวกับงานวิจัยในอดีตที่ระบุว่า *Pseudomonas aeruginosa* strain OW สามารถย่อยสลายสารโพรฟีโนฟอสเป็นสารบีซีพีเช่นกัน ทั้งนี้ผลดังกล่าวนี้ยังสามารถระบุได้ว่าเอนไซม์ที่ผลิตขึ้นในกระบวนการย่อยสลายนี้เป็นเอนไซม์ประเภทไฮโดรเลสจึงได้สารมัธยันตร์ขั้นต้นเป็นสารบีซีพี นอกจากนี้ยังพบว่าเมื่อเวลาในการทดลองเพิ่มมากขึ้นสารบีซีพีมีปริมาณลดลงจนไม่สามารถตรวจพบได้ แต่ตรวจพบสารมัธยันตร์อื่น ๆ ซึ่งได้แก่ สาร 2,4-di-tert-butyl phenol และ 3-methoxy phenol

ผลการคัดแยกจุลินทรีย์บริสุทธิ์และการศึกษาลักษณะการย่อยสลายสารโพรฟีโนฟอส

1) ผลการคัดแยกจุลินทรีย์บริสุทธิ์และลักษณะของจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้

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

ตารางที่ 1 ลักษณะทางกายภาพของ PF1 PF2 และ PF3

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

จากการศึกษาในอดีตพบว่า *Pseudomonas aeruginosa* strain OW สามารถย่อยสลายสารโพรฟีโนฟอสได้ จุลินทรีย์ดังกล่าวคัดแยกจากดินที่ปนเปื้อนโพรฟีโนฟอสในประเทศจีน ผลจากงานวิจัยนี้พบว่าจุลินทรีย์สายพันธุ์ *Pseudomonas aeruginosa* อีก 2 พันธุ์ ซึ่งคัดแยกจากดินไร่พริกที่ปนเปื้อนสารโพรฟีโนฟอสในประเทศไทยก็สามารถกำจัดสารโพรฟีโนฟอสได้เช่นกัน นอกเหนือจากนี้ยังมีงานวิจัยในอดีตที่ระบุว่า *Pseudomonas aeruginosa* สามารถย่อยสลายสารกำจัดศัตรูพืชในกลุ่มออร์แกนโนฟอสฟอรัสชนิดอื่น เช่น สารคลอร์ไพรีฟอสได้ เป็นต้น ได้อีกด้วย จากข้อมูลข้างต้นสามารถกล่าวได้ว่า *Pseudomonas aeruginosa* เป็นแบคทีเรียที่คงความสามารถในการกำจัดสารกำจัดศัตรูพืชในกลุ่มออร์แกนโนฟอสฟอรัส ซึ่งคาดว่าจุลินทรีย์ดังกล่าวสามารถผลิตเอนไซม์ที่สามารถย่อยสลายสารออร์แกนโนฟอสฟอรัส (organophosphorus-degrading enzyme) ได้ แต่งานวิจัยนี้ยังไม่สามารถระบุยีน (gene) ที่ควบคุมการทำงานดังกล่าวได้อย่างชัดเจน ในอนาคตควรมีการศึกษาต่อเนื่องในประเด็นดังกล่าวเพื่อให้ทราบถึงกลไกการกำจัดสารโพรฟีโนฟอสโดยจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้

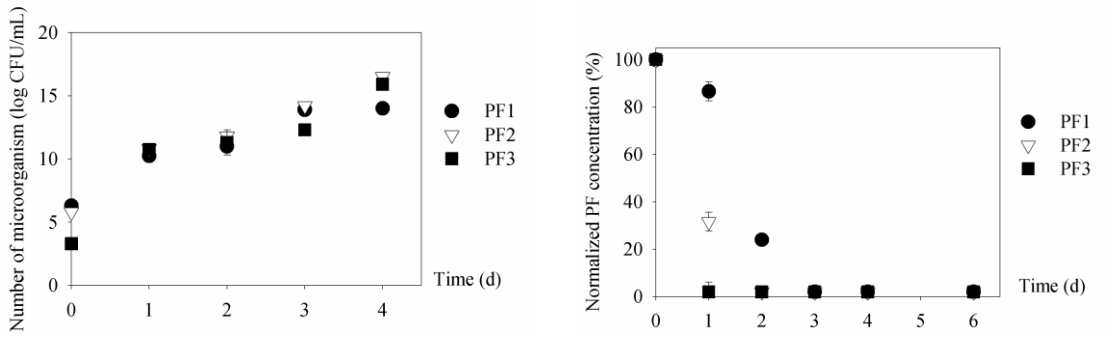
สำหรับสายพันธุ์ *Pseudomonas plecoglossicida* จนถึงปัจจุบันมีเพียงงานวิจัยที่ค้นพบว่าจุลินทรีย์ดังกล่าวสามารถกำจัดสารกำจัดศัตรูพืชไพรีทรอยด์ (pyrethroid) ได้เท่านั้น ผลการศึกษาจากงานวิจัยนี้เป็นการระบุความสามารถของจุลินทรีย์สายพันธุ์ดังกล่าวในการกำจัดสารกำจัดศัตรูพืชออร์แกนโนฟอสฟอรัสเป็นครั้งแรก ดังนั้นในอนาคตจึงควรได้มีการศึกษาต่อเนื่องเกี่ยวกับ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

2) จลนพลศาสตร์ของการเจริญเติบโตและการย่อยสลายสารโพรฟีโนฟอสด้วยจุลินทรีย์บริสุทธิ์

ผลการศึกษาการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์บริสุทธิ์ทั้งสาม ซึ่งได้แก่ PF1 PF2 และ PF3 มีลักษณะดังภาพที่ 3 คือ ในระยะการการทดลอง 4 วัน จุลินทรีย์มีการเจริญเติบโตเพิ่มจำนวนเพิ่มขึ้นมากอย่างต่อเนื่อง โดยเซลล์จุลินทรีย์เพิ่มจำนวนมากถึง 10^{15} CFU/mL เมื่อสิ้นสุดการทดลอง ผลดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้มีความสามารถในการใช้สารโพรฟีโนฟอสเป็นแหล่งคาร์บอนหลักเดี่ยว (sole carbon source) ในการเจริญเติบโตได้เป็นอย่างดี จากผลดังกล่าวเมื่อพิจารณาจลนพลศาสตร์การเจริญเติบโตของจุลินทรีย์บริสุทธิ์ พบว่าการเจริญเติบโตเป็นไปตามปฏิกิริยาอันดับที่ 1 โดยมีค่าคงที่ปฏิกิริยา PF1 PF2 และ PF3 มีค่าคงที่จลนพลศาสตร์การเจริญเติบโตอยู่ระหว่าง 0.08-0.11 hr^{-1} จากข้อมูลดังกล่าวพบว่าการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์บริสุทธิ์สูงกว่ากลุ่มจุลินทรีย์ 5-6 เท่า ซึ่งผลดังกล่าวอาจเกิดจากการแข่งขันการใช้อาหารระหว่างจุลินทรีย์ต่าง ๆ ในกลุ่มจุลินทรีย์ นอกจากนี้จากผลการศึกษายังบ่งชี้ได้ว่าจุลินทรีย์ต่างชนิดมีอัตราการเจริญเติบโตแตกต่างกันด้วย โดย PF3 มีอัตราการเจริญเติบโตสูงสุด

ผลการย่อยสลายโพรฟีโนฟอสของจุลินทรีย์บริสุทธิ์ทั้งสาม ซึ่งผลการศึกษาเป็นไปในลักษณะเดียวกันกับการเจริญเติบโต กล่าวคือ สารโพรฟีโนฟอสซึ่งเป็นสารอาหารคาร์บอนลดลงอย่างรวดเร็วในเวลาเพียง 2-3 วัน เมื่อพิจารณาอัตราการย่อยสลายสารโพรฟีโนฟอสและร้อยละการกำจัดสารโพรฟีโนฟอส พบว่าจุลินทรีย์บริสุทธิ์ทั้งสามมีอัตราการย่อยสลายสารโพรฟีโนฟอสและร้อยละการกำจัดสารโพรฟีโนฟอสถึง 7.6-19.6 mg/L/d และ 93-95 ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับผลการทดลองการย่อยสลายสารโพรฟีโนฟอสตามธรรมชาติ (ชุดทดลองควบคุมที่ไม่มีการเติมเซลล์จุลินทรีย์) พบว่าความเข้มข้นของสารโพรฟีโนฟอสคงเหลือสูงกว่าร้อยละ 95 ภายหลังสิ้นสุดการทดลอง (4 วัน) ดังนั้นสามารถชี้ชัดได้ว่าจุลินทรีย์บริสุทธิ์ทั้งสามมีศักยภาพในการย่อยสลายสารโพรฟีโนฟอสสูง

เมื่อพิจารณาจลนพลศาสตร์การย่อยสลายสารโพรฟีโนฟอสของจุลินทรีย์บริสุทธิ์ พบว่าเป็นไปตามปฏิกิริยาอันดับที่ 1 โดยมีค่าคงที่ค่าคงที่จลนพลศาสตร์การเจริญเติบโตอยู่ระหว่าง 0.023-0.035 hr^{-1} โดยทั่วไปในการฟื้นฟูพื้นที่ปนเปื้อนด้วยวิธีการทางชีวภาพกลุ่มจุลินทรีย์ทำงานได้ดีกว่าจุลินทรีย์บริสุทธิ์ เนื่องจากความหลากหลายในกลุ่มจุลินทรีย์ส่งผลให้จุลินทรีย์สามารถทนต่อสภาพแวดล้อมต่าง ๆ ตลอดจนสามารถเพิ่มเส้นทางวิถีการเปลี่ยนแปลงของสาร (catabolic pathway) ต่าง ๆ แต่ในการศึกษานี้กลับพบว่าจุลินทรีย์บริสุทธิ์ทำงานได้ดีกว่าอาจเนื่องมาจากการปรับสภาพจุลินทรีย์ในอาหารที่ใช้ในการศึกษาส่งผลให้มีอัตราการเจริญเติบโตและการย่อยสลายสูง



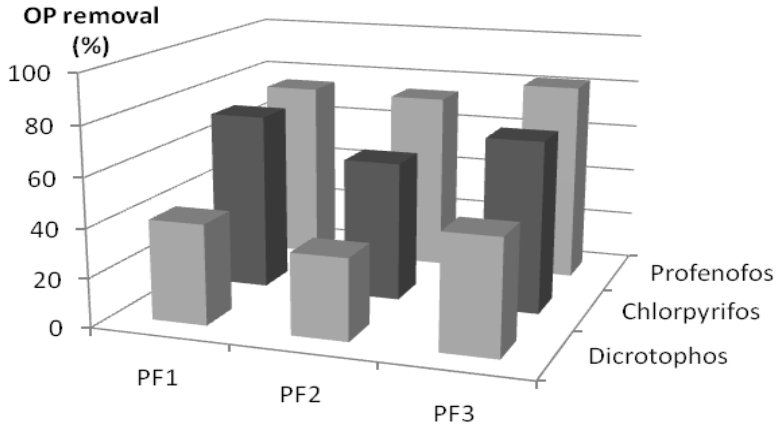
ภาพที่ 3 การเจริญเติบโตของจุลินทรีย์บริสุทธิ์และการย่อยสลายสารโพรฟีโนฟอส

3) ผลการศึกษาความเป็นไปได้ในการย่อยสลายสารกำจัดศัตรูพืชออร์แกนโนฟอสฟอรัสชนิดอื่นด้วยจุลินทรีย์บริสุทธิ์

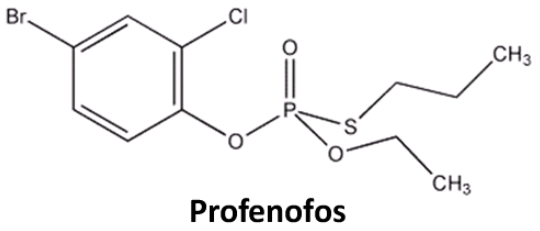
โดยทั่วไปในการใช้สารกำจัดศัตรูในการเกษตรนิยมใช้สารเคมีเกษตรร่วมกันหลายชนิดเพื่อกำจัดศัตรูพืชที่แตกต่างกันออกไป สำหรับการเพาะปลูกพริกนอกจากมีการใช้สารโพรฟีโนฟอสเป็นจำนวนมากแล้ว เกษตรกรยังใช้สารกำจัดศัตรูพืชในกลุ่มออร์แกนโนฟอสฟอรัสหลายชนิด จากการสำรวจพื้นที่เกษตรกรรมพบว่าสารในกลุ่มดังกล่าวที่นิยม ได้แก่ สารโพรฟีโนฟอส สารคลอร์ไพริฟอส (chlorpyrifos) และสารไดโครโตฟอส (dichrotophos) จากข้อมูลดังกล่าวนี้จึงมีความเป็นไปได้ที่อาจมีการปนเปื้อนของสารกำจัดศัตรูพืชดังกล่าวในบริเวณเดียวกับสารโพรฟีโนฟอส

งานวิจัยนี้ได้ศึกษาทดลองย่อยสลายสารคลอร์ไพริฟอสและสารไดโคโตฟอส เพื่อศึกษาความเป็นไปได้ในการกำจัดสารดังกล่าวโดยจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้ รวมทั้งบ่งชี้แนวโน้มของอิทธิพลของสารดังกล่าวต่อการกำจัดสารโพรฟีโนฟอส ผลการทดลองย่อยสลายสารคลอร์ไพริฟอสและสารไดโครโตฟอสโดย PF1 PF2 และ PF3 เปรียบเทียบกับการย่อยสลายสารโพรฟีโนฟอสโดยจุลินทรีย์ดังกล่าวแสดงไว้ในภาพที่ 4 ผลการทดลองพบว่า PF1 PF2 และ PF3 สามารถย่อยสลายสารกำจัดศัตรูพืชได้ใกล้เคียงกัน โดยเมื่อมีจุลินทรีย์ดังกล่าวจำนวนเริ่มต้นประมาณ 10^6 CFU/mL และความเข้มข้นของสารกำจัดศัตรูพืชเริ่มต้น 20 mg/L จุลินทรีย์กำจัดคลอร์ไพริฟอสได้ร้อยละ 57-73 และไดโคโตฟอสได้ร้อยละ 33-47 ในขณะที่จุลินทรีย์กำจัดสารโพรฟีโนฟอสได้ร้อยละ 75-82 จากผลดังกล่าวสามารถระบุได้อย่างชัดเจนว่าจุลินทรีย์บริสุทธิ์ที่คัดแยกได้จากงานวิจัยนี้สามารถกำจัดสาร กำจัดศัตรูพืชกลุ่มออร์แกนโนฟอสฟอรัสได้หลายชนิด

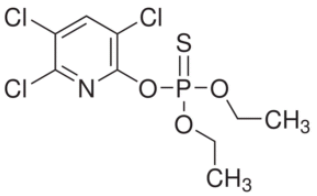
เมื่อพิจารณาโครงสร้างของสารทั้งสาม (ภาพที่ 5) พบว่าสารสารโพรฟีโนฟอสและสารคลอร์ไพริฟอสเป็นสารออร์แกนโนฟอสฟอรัสในกลุ่มฟอสฟอโรไธโอเอท (phosphorothioate) เช่นกันและมีโครงสร้างคล้ายกัน ในทางตรงกันข้ามสารไดโคโตฟอสเป็นสารในกลุ่มฟอสเฟต (phosphate) ซึ่งโครงสร้างทางเคมีแตกต่างกับสารโพรฟีโนฟอส ซึ่งผลการย่อยสลายข้างต้นนี้อาจเนื่องมาจากความใกล้เคียงกันของโครงสร้างสารเป็นเหตุให้จุลินทรีย์สามารถกำจัดสารคลอร์ไพริฟอสได้ดีใกล้เคียงกับสารโพรฟีโนฟอสแม้จะไม่ได้มีการปรับสภาพกับสารคลอร์ไพริฟอสก่อนและเป็นเหตุให้จุลินทรีย์สามารถกำจัดสารไดโคโตฟอสได้ไม่ดีนัก



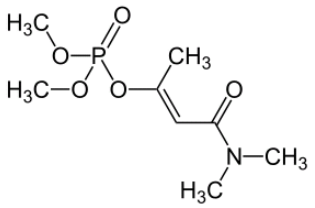
ภาพที่ 4 การย่อยสลายสารคลอร์ไพริฟอสและสารไดโคโตฟอสโดย PF1 PF2 และ PF3



Profenofos



Chlorpyrifos



Dicrotophos

ภาพที่ 5 โครงสร้างสารโพรฟีโนฟอส สารคลอร์ไพริฟอส และสารไดโคโตฟอส

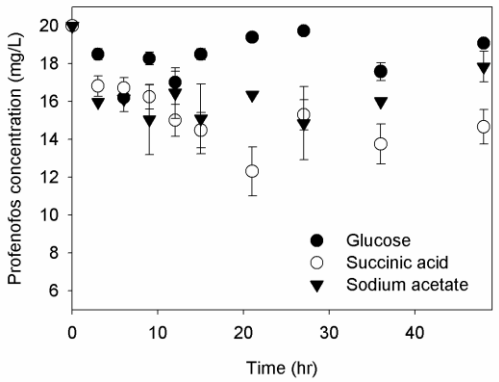
นอกจากนี้มีการศึกษาในอดีตที่พบว่าการย่อยสลายสารไดโครโตฟอสต้องผ่านกระบวนการเมธิลเลชัน (methylation) เป็นสารโมโนโครโตฟอสก่อนกระบวนการไฮโดรไลซีสในขณะที่สารคลอร์ไพริฟอสสามารถถูกย่อยสลายครั้งแรก (primary degradation) ด้วยกระบวนการไฮโดรไลซีสได้เหมือนสารโพรฟีโนฟอส แต่อย่างไรก็ตามโดยภาพรวม PF1 PF2 และ PF3 สามารถกำจัดสารสารออร์แกนโนฟอสฟอรัสทั้งสามได้ดี ดังนั้นหากประยุกต์ใช้จุลินทรีย์นี้จริงคาดว่าจุลินทรีย์เหล่านี้จะสามารถทนทานต่อสภาวะที่มีสารปนเปื้อนร่วมได้ รวมทั้งยังอาจกำจัดสารปนเปื้อนร่วมบางชนิดด้วย

ผลการกระตุ้นการย่อยสลายสารโพรฟีโนฟอสโดยใช้กระบวนการเมตาโบลิซึมร่วม

1) ผลการศึกษาแหล่งคาร์บอนร่วมที่ส่งเสริมกระบวนการเมตาโบลิซึมร่วม

การศึกษาในขั้นตอนนี้มุ่งเน้นเพื่อคัดเลือกสารที่เป็นแหล่งคาร์บอนร่วมที่เหมาะสมในการส่งเสริมการย่อยสลายสารโพรฟีโนฟอสโดยกลุ่มจุลินทรีย์ที่คัดได้ ซึ่งสารที่เลือกในการศึกษาครั้งนี้เป็นสารที่มีการใช้ในกระบวนการเมตาโบลิซึมร่วมทั่วไป ซึ่งได้แก่ กลูโคส (glucose, $C_6H_{12}O_6$) กรดซัคซินิค (succinic acid, $C_4H_4O_4Na_2{\bullet}6H_2O$) โซเดียมอะซิเตรท (sodium acetate, $C_2H_3O_2Na$) ในการทดลองควบคุมปริมาณคาร์บอนและสารโพรฟีโนฟอส เท่ากับ 500 และ 20 mg/L ตามลำดับ ผลการทดลองการเจริญเติบโตของกลุ่มจุลินทรีย์ทั้ง 3 ชุดทดลอง คือ ชุดทดลองที่มีการเติมกลูโคส กรดซัคซินิค และโซเดียมอะซิเตรท มีการเจริญเติบโตของกลุ่มจุลินทรีย์ในลักษณะคล้ายกัน กล่าวคือ กลุ่มจุลินทรีย์มีการเจริญเติบโตเพิ่มจำนวนเพิ่มขึ้นมากในช่วงชั่วโมงที่ 6 ถึงชั่วโมงที่ 20 จากนั้นจำนวนจุลินทรีย์จึงเริ่มคงที่ โดยภายหลังสิ้นสุดการทดลอง (48 ชั่วโมง) ชุดที่มีการเติมกลูโคสมีการเจริญของกลุ่มจุลินทรีย์สูงกว่า 10^{18} CFU/mL รองลงมาเป็นชุดที่เติมโซเดียมอะซิเตรทและชุดที่เติมกรดซัคซินิค เท่ากับ 10^{17} และ 10^{16} CFU/mL ตามลำดับ ซึ่งเมื่อพิจารณาจลนพลศาสตร์การเจริญเติบโตของกลุ่มจุลินทรีย์พบว่าการเจริญเติบโตเป็นไปตามปฏิกิริยาอันดับหนึ่งซึ่งมีค่าคงที่ 0.49-0.62 hr^{-1} ซึ่งสูงกว่าการเจริญเติบโตในชุดควบคุมที่ไม่มีการเติมแหล่งคาร์บอนมาก

สำหรับผลการศึกษาปริมาณสารโพรฟีโนฟอสแสดงดังภาพที่ 6 สารโพรฟีโนฟอสลดลงอย่างรวดเร็วใน 10-20 ชั่วโมงแรกจากนั้นความเข้มข้นของสารโพรฟีโนฟอสจึงเริ่มคงที่ โดยเมื่อสิ้นสุดการทดลอง (48 ชั่วโมง) ชุดที่มีการเติมกรดซัคซินิค และชุดที่เติมโซเดียมอะซิเตรท สามารถลดความเข้มข้นของสารได้ร้อยละ 30 ส่วนชุดที่มีการเติมกลูโคสสามารถลดสารโพรฟีโนฟอสได้น้อยที่สุด คือ ร้อยละ 10 จากผลการทดลองดังกล่าวจะเห็นได้ว่าแหล่งคาร์บอนร่วมต่างชนิดมีผลต่อการย่อยสลายสารโพรฟีโนฟอสอย่างชัดเจน ผลการทดลองดังกล่าวเป็นไปในทิศทางเดียวกับงานวิจัยในอดีตที่พบว่าแบคทีเรียหลายสายพันธุ์นิยมใช้กรดซัคซินิคและโซเดียมอะซิเตรทซึ่งเป็นสารประกอบของกรดไขมันสายสั้น (short-chain fatty acid) เป็นแหล่งคาร์บอนมากกว่ากลูโคสซึ่งเป็นคาร์โบไฮเดรตพื้นฐาน (simple carbohydrate) จลนพลศาสตร์การย่อยสลายสารโพรฟีโนฟอสในชุดที่มีการเติมแหล่งคาร์บอนต่าง ๆ มีค่าคงที่ เท่ากับ 0.001-0.008 hr^{-1} จากผลดังกล่าวนี้บ่งชี้ได้อย่างชัดเจนว่ากรดซัคซินิคช่วยเร่งการย่อยสลายสารโพรฟีโนฟอสอย่างชัดเจน



ภาพที่ 6 การย่อยสลายสารโพรฟีโนฟอสโดยกลุ่มจุลินทรีย์
ภายใต้สภาวะที่มีแหล่งคาร์บอนร่วมต่างชนิด

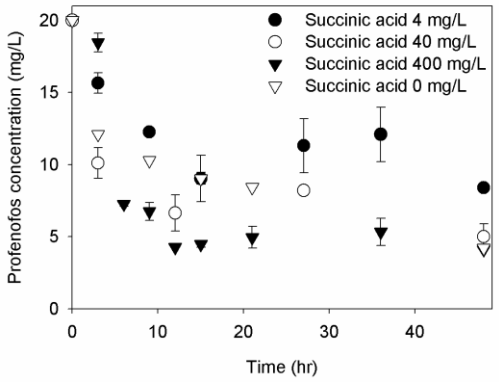
2) ผลการศึกษาความสัมพันธ์ของความเข้มข้นของสารอาหารร่วมและสารโพรฟีโนฟอสใน กระบวนการเมตาโบลิซึมร่วม

การศึกษาในขั้นตอนนี้จึงมุ่งเน้นการศึกษาอิทธิพลความเข้มข้นของกรดซัคซินิคที่ใช้เป็นแหล่งคาร์บอน โดยศึกษาที่ความเข้มข้น 4 40 และ 400 mg-Carbon/L และมีสารโพรฟีโนฟอสเริ่มต้น 20 mg/L เปรียบเทียบกับชุดทดลองที่ไม่ได้เติมกรดซัคซินิค ผลการทดลองพบว่ากลุ่มจุลินทรีย์จากชุดการทดลองที่มีการเติมแหล่งคาร์บอนร่วมความเข้มข้นต่าง ๆ มีการเจริญเติบโตในลักษณะเดียวกัน กล่าวคือ กลุ่มจุลินทรีย์เพิ่มจำนวนขึ้นมากในช่วง 21 ชั่วโมงแรก จากนั้นการเจริญเติบโตจึงเริ่มคงที่เมื่อสิ้นสุดการทดลอง (48 ชั่วโมง) พบว่ากลุ่มจุลินทรีย์เพิ่มจำนวนจากประมาณ 6 เป็น 16 logCFU/mL ค่าคงที่จลนพลศาสตร์การเจริญเติบโต เท่ากับ 0.42-0.50 hr^{-1} จากผลดังกล่าวสามารถกล่าวได้ว่าการเติมแหล่งคาร์บอนร่วมส่งผลให้การเจริญเติบโตเพิ่มขึ้นไม่มากนัก รวมทั้งความเข้มข้นแหล่งคาร์บอนไม่มีผลต่อการเจริญเติบโตของกลุ่มจุลินทรีย์อย่างชัดเจน

สำหรับการย่อยสลายสารโพรฟีโนฟอสพบว่าสารโพรฟีโนฟอสลดลงอย่างรวดเร็วใน 12 ชั่วโมงแรก จากนั้นจึงเริ่มคงที่ (ภาพที่ 7) โดยพบว่าภายหลังสิ้นสุดการทดลอง (48 hr) ชุดทดลองที่มีการเติมแหล่งคาร์บอนร่วม 0 4 40 และ 400 mg-Carbon/L สามารถย่อยสลายสารโพรฟีโนฟอสได้กว่าร้อยละ 80 อัตราการกำจัดสาร เท่ากับ 7.90-31.46 mg/L/d ซึ่งเมื่อพิจารณาจลนพลศาสตร์การย่อยสลายสารโพรฟีโนฟอสพบว่าการย่อยสลายเป็นไปตามปฏิกิริยาอันดับหนึ่ง โดยมีค่าคงที่ เท่ากับ 0.01-0.06 hr^{-1} โดยในชุดทดลองที่ให้ผลดีที่สุด (ชุดทดลองที่เติมแหล่งคาร์บอนร่วม 400 mg/L) การย่อยสลายมีค่าคงที่เพิ่มขึ้นถึง 6 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับชุดที่ไม่ได้เติมแหล่งคาร์บอนร่วม

ผลการศึกษาชี้ให้เห็นอย่างชัดเจนว่าเมื่อเติมแหล่งคาร์บอนร่วมส่งเสริมให้การย่อยสลายเร็วขึ้นอย่างชัดเจน โดยเมื่อความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนร่วมเพิ่มมากการย่อยสลายสารโพรฟีโนฟอสยิ่งเพิ่มขึ้น สำหรับกลไกของกระบวนการเมตาโบลิซึมร่วม (co-metabolism) จากผลจากการศึกษานี้พบว่าสารโพรฟีโนฟอสแม้เป็นสารปลอมปนแต่ก็เป็นสารอาหารที่ใช้ในการเจริญเติบโตได้ เป็นเหตุให้พบว่าในกรณีที่เติมแหล่งคาร์บอนร่วม (กรดซัคซินิค) ส่งผลให้กลุ่มจุลินทรีย์เจริญเติบโตเพิ่มมากขึ้นเพียงเล็กน้อย ดังนั้นจึงอาจกล่าวได้ว่าในกรณีนี้คาดว่าแหล่งคาร์บอนร่วมเหนี่ยวนำกระบวนการเมตาโบลิซึมของสารโพรฟีโนฟอสด้วยกลุ่มจุลินทรีย์ แต่อย่างไรก็ตามผลการศึกษานี้ยังมิอาจระบุการ

เหนี่ยวนำวิถีการย่อยสลายสารโพรฟีโนฟอสอย่างชัดเจนได้ ในอนาคตควรมีการศึกษาในประเด็นนี้เพื่อให้ทราบความเป็นไป (fate) ของสารในสิ่งแวดล้อมอันจะเป็นประโยชน์ต่อการประยุกต์ใช้ในการฟื้นฟูพื้นที่ปนเปื้อนต่อไป



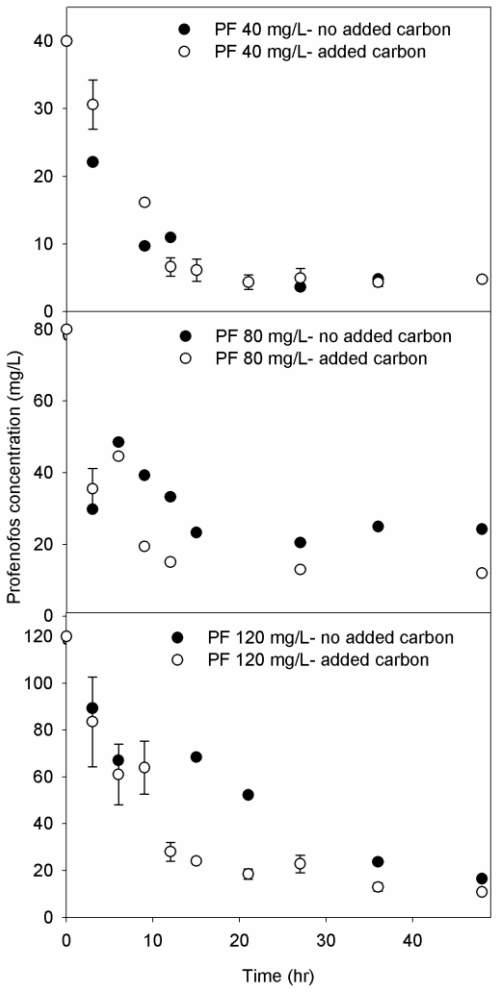
ภาพที่ 7 การย่อยสลายสารโพรฟีโนฟอสของกลุ่มจุลินทรีย์ใน
ภายใต้สภาวะที่มีแหล่งคาร์บอนร่วมต่างความเข้มข้น

จากผลการศึกษาอิทธิพลความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนร่วมในหัวข้อที่ผ่านมาพบว่ากรดซัคซินิคที่ความเข้มข้น 400 mg-Carbon/L มีประสิทธิภาพในการช่วยสนับสนุนการย่อยสลายสารโพรฟีโนฟอสดีที่สุด ดังนั้นจึงเลือกใช้กรดซัคซินิคที่ความเข้มข้นดังกล่าวเป็นแหล่งคาร์บอนร่วม สำหรับการศึกษาอิทธิพลความเข้มข้นของสารโพรฟีโนฟอสเริ่มต้น (40 80 และ 120 mg/L) เปรียบเทียบระหว่างชุดทดลองที่เติมและไม่ได้เติมแหล่งคาร์บอนร่วม ผลการทดลองพบว่ากลุ่มจุลินทรีย์จากชุดการทดลองที่มีสารโพรฟีโนฟอสความเข้มข้นต่าง ๆ มีการเจริญเติบโตในลักษณะเหมือนผลข้างต้น ความเข้มข้นของสารโพรฟีโนฟอสส่งผลต่อการเจริญเติบโตบ้างแต่ไม่ชัดเจนนักเช่นกัน นอกจากนี้ยังพบว่าแม้สารโพรฟีโนฟอสเป็นสารปลอมปนพิษ (toxic xenobiotics) แต่ถึงแม้ความเข้มข้นเริ่มต้นเพิ่มขึ้นสูงถึง 120 mg/L กลุ่มจุลินทรีย์ยังคงมีอัตราการเจริญเติบโตสูงเหมือนชุดทดลองอื่น ๆ

สำหรับการย่อยสลายสารโพรฟีโนฟอสพบว่าสารโพรฟีโนฟอสลดลงอย่างรวดเร็วในระยะเวลาต่างกันจากนั้นจึงเริ่มคงที่ (ภาพที่ 8) โดยที่ความเข้มข้นของสารโพรฟีโนฟอสสูงกลุ่มจุลินทรีย์ย่อยสลายสารจนถึงจุดเสถียรช้ากว่าที่ความเข้มข้นต่ำ ภายหลังสิ้นสุดการทดลอง (48 hr) กลุ่มจุลินทรีย์จากชุดทดลองต่าง ๆ สามารถย่อยสลายสารโพรฟีโนฟอสได้ระหว่างร้อยละ 85-91 อัตราการกำจัดสาร เท่ากับ 31-55 mg/L/d ซึ่งเมื่อพิจารณาจลนพลศาสตร์การย่อยสลายสารโพรฟีโนฟอสพบว่าการย่อยสลายเป็นไปตามปฏิกิริยาอันดับหนึ่ง โดยมีค่าคงที่ เท่ากับ 0.02-0.06 hr^{-1}

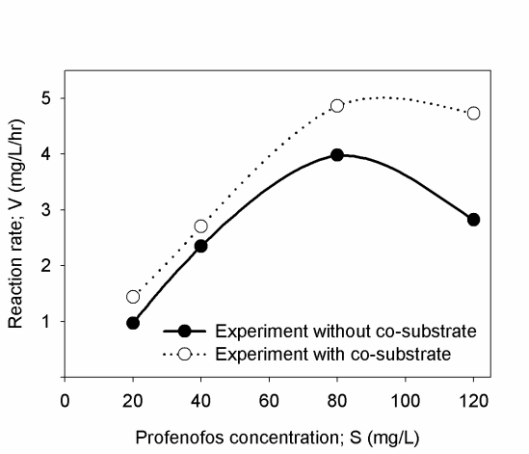
ผลการศึกษาชี้ให้เห็นว่าชุดทดลองที่มีความเข้มข้นของสารโพรฟีโนฟอสเริ่มต้นต่างกันเมื่อเติมแหล่งคาร์บอนร่วมมีผลต่อการย่อยสลายสารโพรฟีโนฟอสต่างกัน โดยเมื่อความเข้มข้นสารสูง (40 80 และ 120 mg/L) แนวโน้มของการย่อยสลายสารในชุดทดลองที่มีการเติมและไม่เติมแหล่งคาร์บอนร่วมใกล้เคียงกันมาก (ทั้งจลนพลศาสตร์การย่อยสลายและอัตราการกำจัดสารโพรฟีโนฟอส) ผลการทดลองในส่วนนี้ขัดแย้งกับผลการทดลองที่ความเข้มข้นเริ่มต้นของสารโพรฟีโนฟอส 20 mg/L ซึ่งแสดงไว้ในหัวข้อที่ผ่านมา กล่าวคือ สำหรับผลการทดลองที่ผ่านมาชุดทดลองที่มีการเติมแหล่งคาร์บอนร่วมมีค่าจลนพลศาสตร์การย่อยสลายและอัตราการกำจัดสารโพรฟีโนฟอสสูงกว่าชุดทดลองที่ไม่ได้เติมแหล่งคาร์บอนร่วมอย่างชัดเจน ผลขัดแย้งดังกล่าวคาดว่าเกิดจากสารโพรฟีโนฟอสซึ่งเป็น

สารอาหารที่ช่วยในการเจริญเติบโตเช่นกันมีปริมาณเพิ่มมากขึ้นเป็นเหตุให้มีการย่อยสลายเพิ่มสูงตาม เนื่องจากการย่อยสลายนี้เป็นไปตามปฏิกิริยาอันดับหนึ่งซึ่งการย่อยสลายขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของสารเริ่มต้น ดังนั้นอิทธิพลของสารอาหารร่วมจึงส่งผลได้ไม่ชัดเจนนัก



ภาพที่ 8 การย่อยสลายสารโพรฟีโนฟอสของกลุ่มจุลินทรีย์ใน ภายใต้สภาวะที่มีสารโพรฟีโนฟอสต่างความเข้มข้น

นอกจากนี้ยังพบว่าเมื่อพิจารณาเปรียบเทียบระหว่างผลการศึกษาจากชุดการทดลองที่มีความเข้มข้นของสารโพรฟีโนฟอส 120 mg/L กับชุดทดลองที่ความเข้มข้นอื่น ๆ พบว่าการย่อยสลายสารโพรฟีโนฟอสลดลงอย่างชัดเจน ซึ่งผลดังกล่าวนี้เมื่อพิจารณาจลนพลศาสตร์ของเอนไซม์ตามหลักของ Michaelis and Menten อาจระบุได้ว่าในสภาวะที่สารโพรฟีโนฟอสมีความเข้มข้นสูงเกิดปรากฏการณ์การยับยั้งด้วยสารอาหารเอง (substrate inhibition) (ภาพที่ 9) กล่าวคือ เมื่อความเข้มข้นของสารอาหาร ซึ่งหมายถึงสารโพรฟีโนฟอสมีความเข้มข้นสูงมากขึ้นพบว่าอัตราการย่อยสลายกลับลดลงชัดเจน โดยผลในภาพดังกล่าวยังพบว่าในสภาวะที่มีแหล่งคาร์บอนร่วมอิทธิพลของปรากฏการณ์การยับยั้งดังกล่าวลดลง ดังนั้นจึงอาจกล่าวได้ว่าแม้แหล่งคาร์บอนร่วมมิได้สนับสนุนกระบวนการเมตาโบลิซึมร่วมอย่างชัดเจนนัก แต่สารดังกล่าวสามารถลดผลการยับยั้งการย่อยสลายสารโพรฟีโนฟอสได้



ภาพที่ 9 จลนพลศาสตร์การย่อยสลายสารโพรฟีโนฟอสตามหลักของ Michaelis and Menten

ผลการสาธิตการฟื้นฟูน้ำใต้ดินที่ปนเปื้อนสารโพรฟีโนฟอสตามหลักการเติมเซลล์ที่ถูกกระตุ้น

1) ผลการศึกษาการเคลื่อนที่ของน้ำใต้ดินและสารโพรฟีโนฟอสในแบบจำลอง

ผลการสาธิตระบบเพื่อประยุกต์ใช้ในการฟื้นฟูน้ำใต้ดินที่ปนเปื้อนสารโพรฟีโนฟอส ในสภาวะที่อัตราการซึมผ่านของน้ำต่างกัน คือ 25 50 และ 100 เซนติเมตรต่อวัน การทดลองศึกษาที่ความเข้มข้นของสารโพรฟีโนฟอส 20 และ 40 มิลลิกรัมต่อลิตร และ แหล่งคาร์บอนร่วม คือ กรดซัคซินิค 400 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยได้เติมกลุ่มจุลินทรีย์ 10^5 และ 10^{15} CFU/mL เพื่อศึกษาประสิทธิภาพในการกำจัดสารโพรฟีโนฟอสในลักษณะการจำลองสภาพน้ำใต้ดิน ผลการศึกษาการเคลื่อนที่ของน้ำใต้ดินและสารโพรฟีโนฟอส และผลการศึกษาอิทธิพลของอัตราการซึมผ่านของน้ำใต้ดินและความเข้มข้นของสารโพรฟีโนฟอส

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

สำหรับผลการศึกษาการเคลื่อนที่ของสารโพรฟีโนฟอสเปรียบเทียบกับคลอไรด์ ผลการทดลองพบว่าช่วง 1 PV แรก ทั้งคลอไรด์และโพรฟีโนฟอสเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วแต่พบว่าโพรฟีโนฟอสมีค่าเพิ่มขึ้นช้ากว่าคลอไรด์ ผลการทดลองนี้บ่งชี้ได้ว่าสารโพรฟีโนฟอสซึ่งเป็นตัวถูกละลาย (solute) มีอิทธิพลของการแพร่กระจาย (dispersion) และ/หรือ การฟุ้งกระจาย (diffusion) ส่งผลให้สารเคลื่อนที่ช้ากว่าน้ำ (คลอไรด์) แต่ผลดังกล่าวมีเพียงเล็กน้อย เมื่อพิจารณาค่าปัจจัยความหน่วง

(retardation factor; R_f) ของสารโพรฟีโนฟอส พบว่าค่า R_f เท่ากับ 1.18 ($PV_{profenofos}$ = 0.68 และ $PV_{chloride}$ = 0.80) ดังนั้นสามารถกล่าวได้ว่าไม่พบการดูดซับของสารโพรฟีโนฟอสในชุดแบบจำลองนี้อย่างชัดเจน นอกจากนี้ยังพบว่าการทดลองตั้งแต่ช่วง 1 PV สารทั้งสองเริ่มคงที่ โดยเมื่อสิ้นสุดการทดลองคลอไรด์และสารโพรฟีโนฟอสมี C/C_0 = 1.0 และ 0.9 ตามลำดับ ผลดังกล่าวแสดงให้เห็นว่ามีการย่อยสลายสารโพรฟีโนฟอสตามธรรมชาติในแบบจำลองบ้างเล็กน้อย ซึ่งอาจเกิดมาจากการย่อยสลายด้วยแสง (photodegradation) หรือไฮโดรไลซีส (hydrolysis) โดยภาพรวมสามารถระบุได้ว่าชุดแบบจำลองคอลัมน์นี้ได้รับอิทธิพลการดูดซับและการย่อยสลายสารตามธรรมชาติเพียงเล็กน้อย

2) ผลการศึกษาอิทธิพลของอัตราการซึมผ่านของน้ำใต้ดินและความเข้มข้นของสารโพรฟีโนฟอส

ผลการสาธิตระบบที่สภาวะที่อัตราการซึมผ่านของน้ำต่างกัน คือ 25 50 และ 100 cm/d ชุดทดลองที่มีความเข้มข้นเริ่มต้นของสารโพรฟีโนฟอส เท่ากับ 20 mg/L และแหล่งคาร์บอนร่วม 400 mg-carbon/L พบว่าตรวจติดตามไม่พบสารโพรฟีโนฟอสเลย ผลลักษณะนี้บ่งชี้ได้ว่าแบบจำลองคอลัมน์ที่มีการเติมเซลล์มีถูกกระตุ้นด้วยการเติมแหล่งคาร์บอนร่วมมีประสิทธิภาพสูงมาก ส่งผลให้สารโพรฟีโนฟอสถูกย่อยสลายทั้งหมดตลอดช่วงการทดลอง ผลการทดลองในส่วนนี้สอดคล้องกับผลการทดลองแบบกะในหัวข้อที่ผ่านมา กล่าวคือ ในการเติมเซลล์และสารอาหารร่วมในปริมาณที่เหมาะสมส่งผลให้การย่อยสลายสารโพรฟีโนฟอสสูงมาก ประสิทธิภาพการย่อยสลายสารโพรฟีโนฟอสในแบบจำลองคอลัมน์แสดงไว้ในตารางที่ 2

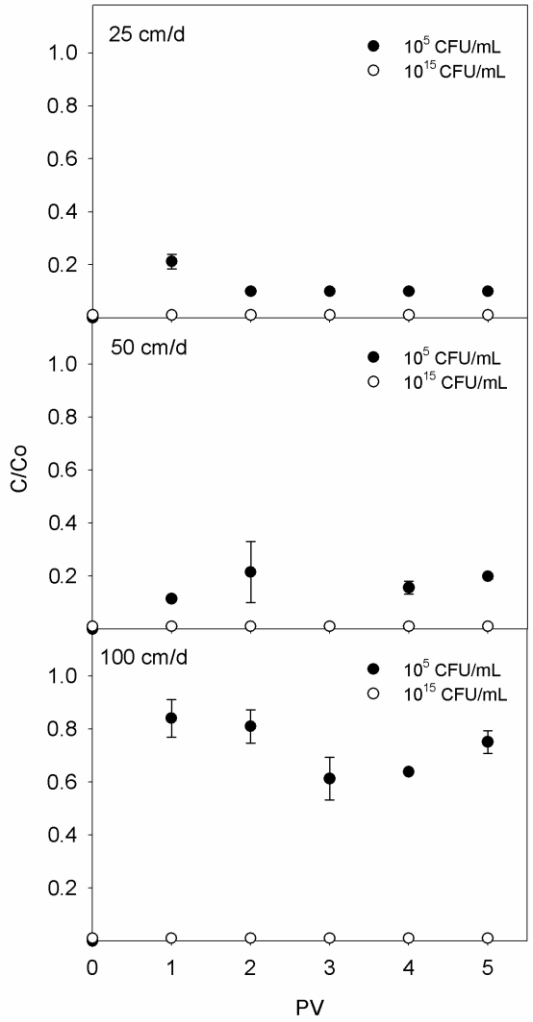
ตารางที่ 2 ประสิทธิภาพการย่อยสลายสารโพรฟีโนฟอสในแบบจำลองคอลัมน์

อัตราการซึมผ่าน (cm/d)	**ร้อยละการย่อยสลายสารโพรฟีโนฟอส ณ การทดลองที่ความเข้มข้นสารโพรฟีโนฟอสและปริมาณเซลล์เริ่มต้น**			
	20 mg/L		**40 mg/L**	
	10^5 CFU/mL	**10^{15} CFU/mL**	**10^5 CFU/mL**	**10^{15} CFU/mL**
25	> 80	> 80	> 90	> 90
50	> 80	> 80	> 90	80
100	> 80	> 80	> 90	30

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

จากผลการทดลองในภาพที่ 10 พบว่าชุดทดลองทุกชุดในช่วง 1-2 PV แรก ตรวจพบสารโพรฟีโนฟอสสูงกว่าช่วงถัดไป (3-5 PV) เล็กน้อยอาจเนื่องมาจากในระยะที่เริ่มทดลองเซลล์ยังมี

ปริมาณน้อย แต่เมื่อเวลาผ่านไปเซลล์เจริญเติบโตเต็มที่ดังนั้นปริมาณสารโพฟีโนฟอสที่ตรวจพบจึงลดลง ส่วนในชุดทดลองที่อัตราการซึมผ่าน 50 และ 100 cm/d ซึ่งคาดว่ามีเซลล์จุลินทรีย์ที่เพิ่มสูงขึ้นเช่นกันจึงให้ผลในลักษณะคล้ายกัน สำหรับผลการสาธิตระบบที่ความเข้มข้นเริ่มต้นของโพรฟีโนฟอสเท่ากับ 40 mg/L และแหล่งคาร์บอนร่วม 400 mg-carbon/L ในกรณีที่เติมกลุ่มจุลินทรีย์ 10^{15} CFU/mL มีผลเป็นดังภาพที่ 10 ผลการทดลองในส่วนนี้พบว่าตรวจติดตามไม่พบโพรฟีโนฟอสเลย ผลลักษณะนี้บ่งชี้ได้ว่าแบบจำลองคอลัมน์ที่มีการเติมเซลล์มีถูกกระตุ้นในปริมาณสูงมีประสิทธิภาพสูงมากขึ้น



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

แนวโน้มของผลการทดลองนี้ชี้ให้เห็นว่าการทดลองที่อัตราการซึมผ่านและปริมาณจุลินทรีย์เป็นปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการย่อยสลายสารโพรฟีโนฟอส ระบบที่มีการเติมเซลล์และกระตุ้นด้วยกระบวนการเมตาโบลิซึมร่วมนี้มีประสิทธิภาพในการกำจัดสารโพรฟีโนฟอสสูง แต่อย่างไรก็ตามในกรณีที่ประยุกต์ใช้ในการฟื้นฟูน้ำใต้ดินที่ปนเปื้อนในพื้นที่ที่มีอัตราการซึมของน้ำสูง (เวลากักน้ำต่ำ) ซึ่งอาจเกิดจากมีปริมาณน้ำฝนมากหรือลักษณะดินมีสภาพการนำน้ำ (hydraulic conductivity) สูงอาจต้องมีการเติมเซลล์จุลินทรีย์ปริมาณเพิ่มสูงขึ้น นอกจากนี้ในก่อนการประยุกต์ใช้จริงควรมีการศึกษา

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

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

<u>สรุปผลการวิจัย</u>

1) <u>การคัดกลุ่มจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการกำจัดสารโพรพีโนฟอส</u>
   1.1) กลุ่มจุลินทรีย์ที่คัดได้เป็นจุลินทรีย์ในกลุ่มเฮเทอโรโทรป ซึ่งใช้สารโพรพีโนฟอสเป็นแหล่งสารคาร์บอนเดี่ยว (sole carbon source) ได้ กลุ่มจุลินทรีย์ดังกล่าวประกอบด้วยจุลินทรีย์ที่มีรูปร่างทั้งแบบท่อนและวงกลม เซลล์มีทั้งชนิดแกรมบวกและแกรมลบ กลุ่มจุลินทรีย์มีความสามารถในการย่อยสลายสารโพรพีโนฟอสได้ร้อยละ 97 จลนพลศาสตร์การเจริญเติบโตและการย่อยสลายสารโพรพีโนฟอสเป็นไปปฏิกิริยาอันดับหนึ่งค่าคงที่ โดยมีค่าคงที่เท่ากับ 0.40 และ 0.15 hr^{-1} ตามลำดับ และมีอัตราการย่อยสลายสารโพรพีโนฟอส 3.0 mg/L/d
   1.2) การวิเคราะห์วิถีการย่อยสลายสารโพรพีโนฟอสพบว่า กลุ่มจุลินทรีย์นี้สามารถย่อยสลายสารโพรพีโนฟอสเป็นสารบีซีพี และตรวจพบสารมัธยันตร์อื่น ๆ ซึ่งได้แก่ สาร 2,4-di-tert-butyl phenol และ สาร 3-methoxy phenol

2) <u>การคัดแยกจุลินทรีย์บริสุทธิ์และการศึกษาลักษณะการย่อยสลายสารโพรพีโนฟอส</u>
   2.1) กลุ่มจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายสารโพรพีโนฟอสที่คัดแยกได้จุลินทรีย์บริสุทธิ์ 3 ชนิด ซึ่งกำหนดชื่อเรียกว่า PF1 PF2 และ PF3 เป็นสายพันธุ์ *Pseudomonas plecoglossicida Pseudomonas aeruginosa* และ *Pseudomonas aeruginosa* ตามลำดับ
   2.2) จลนพลศาสตร์การเจริญเติบโตของจุลินทรีย์บริสุทธิ์เป็นไปตามปฏิกิริยาอันดับที่ 1 โดยมีค่าคงที่จลนพลศาสตร์การเจริญเติบโตอยู่ระหว่าง 1.91-2.68 hr^{-1} และจุลินทรีย์บริสุทธิ์ทั้งสามมีอัตราการย่อยสลายสารโพรพีโนฟอส และร้อยละการกำจัดสารโพรพีโนฟอสถึง 7.6-19.6 mg/L/d และ 93-95 ตามลำดับ
   2.3) PF1 PF2 และ PF3 สามารถย่อยสลายสารกำจัดศัตรูพืชได้ใกล้เคียงกัน จุลินทรีย์กำจัดสารคลอร์ไพริฟอสได้ร้อยละ 57-73 และสารไดโคโตฟอสได้ร้อยละ 33-47 ในขณะที่จุลินทรีย์กำจัดสารโพรพีโนฟอสได้ร้อยละ 75-82

3) <u>การกระตุ้นการย่อยสลายสารโพรพีโนฟอสโดยใช้กระบวนการเมตาโบลิซึมร่วม</u>
   3.1) การทดลองที่เติมสารกลูโคส กรดซัคซินิค และสารโซเดียมอะซิเตรทเป็นแหล่งคาร์บอนร่วมส่งผลต่อการเจริญเติบโตของกลุ่มจุลินทรีย์ไม่มากนัก ชุดทดลองที่เติม

กรดซัคซินิคและโซเดียมอะซิเตรทสามารถลดสารโพรฟีโนฟอสได้ร้อยละ 30 ส่วนชุดที่มีการเติมกลูโคสสามารถลดสารโพรฟีโนฟอสได้ร้อยละ 10

3.2) อิทธิพลความเข้มข้นของกรดซัคซินิคเริ่มต้นที่ใช้เป็นแหล่งคาร์บอนร่วม (4-400 mg/L) ส่งผลต่อการเจริญเติบโตของกลุ่มจุลินทรีย์ไม่มากนัก ประสิทธิภาพการย่อยสลายสารโพรฟีโนฟอสได้กว่าร้อยละ 80 อัตราการกำจัดสารโพรฟรโนฟอสเท่ากับ 7.90-31.46 mg/L/d จลนพลศาสตร์การย่อยสลายสารโพรฟีโนฟอสเป็นไปตามปฏิกิริยาอันดับหนึ่งโดยมีค่าคงที่ เท่ากับ 0.01-0.06 hr^{-1} โดยในชุดทดลองที่ให้ผลดีที่สุด คือ ชุดทดลองที่เติมแหล่งคาร์บอนร่วม 400 mg/L โดยการย่อยสลายมีค่าคงที่เพิ่มขึ้นถึง 6 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับชุดที่ไม่ได้เติมแหล่งคาร์บอนร่วม

3.3) อิทธิพลความเข้มข้นของสารโพรฟีโนฟอสเริ่มต้น (40-120 mg/L) ส่งผลต่อการเจริญเติบโตของกลุ่มจุลินทรีย์ไม่มากนัก สำหรับการย่อยสลายสารโพรฟีโนฟอสพบว่ากลุ่มจุลินทรีย์จากชุดทดลองต่าง ๆ สามารถย่อยสลายสารได้ร้อยละ 85-91 อัตราการกำจัดสาร เท่ากับ 31-55 mg/L/d จลนพลศาสตร์การย่อยสลายสารโพรฟีโนฟอสเป็นไปตามปฏิกิริยาอันดับหนึ่งโดยมีค่าคงที่ เท่ากับ 0.02-0.06 hr^{-1} ผลการศึกษาจากชุดการทดลองที่มีความเข้มข้นของสารโพรฟีโนฟอส 120 mg/L เกิดปรากฏการณ์การยับยั้งด้วยสารอาหารเอง (substrate inhibition) โดยผลในสภาวะที่มีแหล่งคาร์บอนร่วมอิทธิพลของปรากฏการณ์การยับยั้งดังกล่าวลดลง

4) การสาธิตการฟื้นฟูน้ำใต้ดินที่ปนเปื้อนสารโพรฟีโนฟอสตามหลักการเติมเซลล์ที่ถูกกระตุ้น

4.1) ผลการทดลองชี้ให้เห็นว่าอัตราการซึมผ่านและปริมาณจุลินทรีย์เป็นปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการย่อยสลายสารโพรฟีโนฟอส

4.2) ผลการสาธิตระบบที่สภาวะที่อัตราการซึมผ่านของน้ำต่างกัน คือ 25-100 cm/d ความเข้มข้นเริ่มต้นของสารโพรฟีโนฟอส เท่ากับ 20 mg/L และแหล่งคาร์บอนร่วม 400 mg/L พบว่าตรวจติดตามไม่พบสารโพรฟีโนฟอสเลย ผลดังกล่าวบ่งชี้ได้ว่าแบบจำลองคอลัมน์ที่มีการเติมเซลล์มีถูกกระตุ้นด้วยการเติมแหล่งคาร์บอนร่วมมีประสิทธิภาพสูงมาก

4.3) ผลการศึกษาชุดทดลองที่มีความเข้มข้นเริ่มต้นของสารโพรฟีโนฟอส เท่ากับ 40 mg/L และแหล่งคาร์บอนร่วม 400 mg/L ในกรณีที่เติมกลุ่มจุลินทรีย์ 10^5 CFU/mL ชุดทดลองที่อัตราการการซึมผ่าน 25 cm/d สามารถย่อยสลายสารโพรฟีโนฟอสได้กว่าร้อยละ 90 ความสามารถในการย่อยสลายลดลงเมื่อเพิ่มอัตราการซึมผ่านของน้ำ โดยความสามารถในการย่อยสลายสารที่อัตราการซึมผ่าน 50 และ 100 cm/d เท่ากับร้อยละ 80 และร้อยละ 30 ตามลำดับ เมื่อเพิ่มกลุ่มจุลินทรีย์เป็น 10^{15} CFU/mL พบว่าตรวจติดตามไม่พบสารโพรฟีโนฟอสเลย

<u>ข้อเสนอแนะ</u>

1) ควรมีการทดลองผลของสิ่งแวดล้อม อาทิเช่น ปริมาณเกลือในน้ำใต้ดิน ปริมาณสารอินทรีย์ธรรมชาติ และ ค่าพีเอชของน้ำ เป็นต้น ต่อความสามารถในการย่อยสลายสารโพรฟีโนฟอสโดยกลุ่มจุลินทรีย์และจุลินทรีย์บริสุทธิ์

2) ควรมีงานวิจัยต่อเนื่องเพื่อระบุวิถีการย่อยสลายสารโพรฟีโนฟอสโดยกลุ่มจุลินทรีย์และจุลินทรีย์บริสุทธิ์อย่างสมบูรณ์
3) ควรมีงานวิจัยต่อเนื่องเพื่อระบุกลไกกระบวนการเมตาโบลิซึมร่วมสำหรับการย่อยสลายสารโพรฟีโนฟอส
4) ก่อนการประยุกต์ใช้จริงควรมีการศึกษาอิทธิพลของปัจจัยแวดล้อม เช่น อิทธิพลของจุลินทรีย์ในพื้นที่ อิทธิพลของสมบัติดิน อิทธิพลของสมบัติน้ำใต้ดิน เป็นต้น

บทคัดย่อ

สารโพรฟีโนฟอสเป็นสารกำจัดศัตรูพืชที่ใช้กันเป็นจำนวนมากเป็นเหตุให้มีการปนเปื้อนของสารดังกล่าวกระจายทั่วพื้นที่เกษตรกรรม งานวิจัยนี้มีจุดมุ่งหมายเพื่อพัฒนาวิธีกำจัดสารกำจัดศัตรูพืชโพรฟีโนฟอสตกค้างด้วยการเติมเซลล์จุลินทรีย์ที่ถูกกระตุ้น การทดลองแบ่งออกเป็น 3 ขั้นตอน คือ 1) การคัดแยกกลุ่มจุลินทรีย์สำหรับการเติมเซลล์ 2) การศึกษาการกระตุ้นการย่อยสลายสารโพรฟีโนฟอสโดยใช้กระบวนการเมตาโบลิซึมร่วม และ 3) การสาธิตการฟื้นฟูน้ำใต้ดินที่ปนเปื้อนสารโพรฟีโนฟอสตามหลักการเติมเซลล์ที่ถูกกระตุ้น ผลการศึกษาในขั้นตอนแรกพบว่ากลุ่มจุลินทรีย์ที่คัดได้เป็นจุลินทรีย์ในกลุ่มเฮเทอโรโทรป ซึ่งใช้สารโพรฟีโนฟอสเป็นแหล่งสารคาร์บอนเดี่ยวได้ กลุ่มจุลินทรีย์สามารถย่อยสลายสารโพรฟีโนฟอสได้ร้อยละ 97 จากการวิเคราะห์วิถีการย่อยสลายสารโพรฟีโนฟอสพบว่ากลุ่มจุลินทรีย์นี้ย่อยสลายสารโพรฟีโนฟอสเป็นสาร 4-bromo-2-cholorophenol กลุ่มจุลินทรีย์ดังกล่าวประกอบด้วยจุลินทรีย์บริสุทธิ์หลัก 3 ชนิด ซึ่งกำหนดชื่อเรียกว่า PF1 PF2 และ PF3 เป็นสายพันธุ์ *Pseudomonas plecoglossicida Pseudomonas aeruginosa* และ *Pseudomonas aeruginosa* ตามลำดับ

ในขั้นตอนที่สองพบว่าชุดทดลองที่เติมกรดซัคซินิคเป็นแหล่งคาร์บอนร่วมลดโพรฟีโนฟอสได้ดีที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับผลจากการเติมกลูโคสและโซเดียมอะซิเตท อิทธิพลความเข้มข้นของกรดซัคซินิคเริ่มต้น (4-400 mg/L) ส่งผลต่อการเจริญเติบโตของกลุ่มจุลินทรีย์ไม่มากนัก ชุดทดลองที่เติมกรดซัคซินิคมีประสิทธิภาพการย่อยสลายสารโพรฟีโนฟอสได้กว่าร้อยละ 80 อัตราการกำจัดสารโพรฟรโนฟอส เท่ากับ 7.90-31.46 mg/L/d โดยในชุดทดลองที่ให้ผลดีที่สุด คือ ชุดทดลองที่เติมแหล่งคาร์บอนร่วม 400 mg/L สำหรับการย่อยสลายสารโพรฟีโนฟอสที่ความเข้มข้นเริ่มต้นต่าง ๆ (40-120 mg/L) พบว่ากลุ่มจุลินทรีย์จากชุดทดลองต่าง ๆ สามารถย่อยสลายสารได้ร้อยละ 85-91 อัตราการกำจัดสาร เท่ากับ 31-55 mg/L/d นอกจากนี้ยังพบว่าผลการศึกษาจากชุดการทดลองที่มีความเข้มข้นของสารโพรฟีโนฟอส 120 mg/L เกิดปรากฏการณ์การยับยั้งด้วยสารอาหารเอง (substrate inhibition) โดยผลในสภาวะที่มีแหล่งคาร์บอนร่วมอิทธิพลของปรากฏการณ์การยับยั้งดังกล่าวลดลง สำหรับผลการทดลองส่วนสุดท้ายซึ่งจำลองสถานการณ์น้ำใต้ดินที่ปนเปื้อนในรูปแบบถังปฏิกรณ์คอลัมน์ ผลการทดลองชี้ให้เห็นว่าอัตราการซึมผ่าน (25-100 cm/d) และปริมาณจุลินทรีย์ (10^5 และ 10^{15} CFU/mL) เป็นปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการย่อยสลายสารโพรฟีโนฟอสอย่างชัดเจน ผลการวิจัยทั้งหมดนี้บ่งชี้ว่ากลุ่มจุลินทรีย์และจุลินทรีย์บริสุทธิ์ที่เติมมีศักยภาพในการย่อยสลายสารโพรฟีโนฟอสโดยเฉพาะสภาวะที่ถูกกระตุ้น

ABSTRACT

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

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

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากทุนอุดหนุนการวิจัยประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2555-2556 จาก มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี นอกจากนี้งานวิจัยนี้ยังได้รับการสนับสนุนทุนเพื่อนำเสนอผลงานวิจัยในงานประชุมวิชาการระดับนานาชาติจากกองทุนวิจัย มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี และคณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

ผู้วิจัยขอขอบคุณนางศิรินัทกาญจน์ สิงคิบุตร นายครรชิต ปุสิงห์ นายศักดิ์ชัย วังทะพันธ์ และนายวรายุทธ ปฏิโชติ นักศึกษาหลักสูตรมหาบัณฑิตวิศวกรรมสิ่งแวดล้อม ภาควิชาวิศวกรรมเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี ที่ช่วยเก็บข้อมูลทำให้งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ผศ. พุทธพร แสงเทียน
ผศ.ดร. สุมนา ราษฎร์ภักดี
รศ.ดร. อลิสา วังใน

สารบัญ

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

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
บทที่ 3 ระเบียบวิธีวิจัย	**19**
3.1 กรอบการวิจัย	19
3.2 วิธีดำเนินการวิจัย	21
3.2.1 วิธีการคัดแยกกลุ่มจุลินทรีย์สำหรับการเติมเซลล์และศึกษาลักษณะการย่อยสลายสารโพรฟีโนฟอสของจุลินทรีย์ที่ถูกเติม	22
3.2.2 วิธีการศึกษาการกระตุ้นการย่อยสลายสารโพรฟีโนฟอสโดยใช้กระบวนการเมตาโบลิซึมร่วม	25
3.2.3 วิธีการสาธิตการฟื้นฟูน้ำใต้ดินที่ปนเปื้อนสารโพรฟีโนฟอสตามหลักการเติมเซลล์ที่ถูกกระตุ้น	27
บทที่ 4 ผลการวิจัย	**30**
4.1 ผลการคัดกลุ่มจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการกำจัดสารโพรฟีโนฟอส	30
4.1.1 ผลการศึกษาการคัดกลุ่มจุลินทรีย์และลักษณะของกลุ่มจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้	30
4.1.2 จลนพลศาสตร์ของการเจริญเติบโตและการย่อยสลายสารโพรฟีโนฟอส	32
4.1.3 ผลการวิเคราะห์วิถีการย่อยสลายสารโพรฟีโนฟอสโดยกลุ่มจุลินทรีย์เบื้องต้น	34
4.2 ผลการคัดแยกจุลินทรีย์บริสุทธิ์และการศึกษาลักษณะการย่อยสลายสารโพรฟีโนฟอส	39
4.2.1 ผลการคัดแยกจุลินทรีย์บริสุทธิ์และลักษณะของจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้	39
4.2.2 จลนพลศาสตร์ของการเจริญเติบโตและการย่อยสลายสารโพรฟีโนฟอสด้วยจุลินทรีย์บริสุทธิ์	41
4.2.3 ผลการศึกษาความเป็นไปได้ในการย่อยสลายสารกำจัดศัตรูพืชออร์แกนโนฟอสฟอรัสชนิดอื่นด้วยจุลินทรีย์บริสุทธิ์	44
4.3 ผลการกระตุ้นการย่อยสลายสารโพรฟีโนฟอสโดยใช้กระบวนการเมตาโบลิซึมร่วม	50
4.3.1 ผลการศึกษาแหล่งคาร์บอนร่วมที่ส่งเสริมกระบวนการเมตาโบลิซึมร่วม	50
4.3.2 ผลการศึกษาความสัมพันธ์ของความเข้มข้นของสารอาหารร่วมและสารโพรฟีโนฟอสในกระบวนการเมตาโบลิซึมร่วม	54
4.4 ผลการสาธิตการฟื้นฟูน้ำใต้ดินที่ปนเปื้อนสารโพรฟีโนฟอสตามหลักการเติมเซลล์ที่ถูกกระตุ้น	63
4.4.1 ผลการศึกษาการเคลื่อนที่ของน้ำใต้ดินและสารโพรฟีโนฟอสในแบบจำลอง	64
4.4.2 ผลการศึกษาอิทธิพลของอัตราการซึมผ่านของน้ำใต้ดิน	66

สารบัญ (ต่อ)

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