

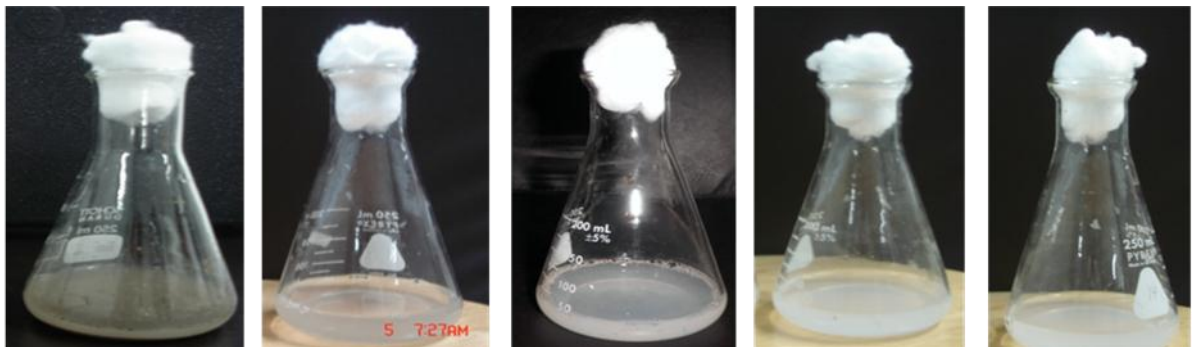
บทที่ 4

ผลการวิจัย

4.1 ผลการคัดกลุ่มจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการกำจัดสารโพรพิโนฟอส

4.1.1 ผลการศึกษาการคัดกลุ่มจุลินทรีย์และลักษณะของกลุ่มจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้

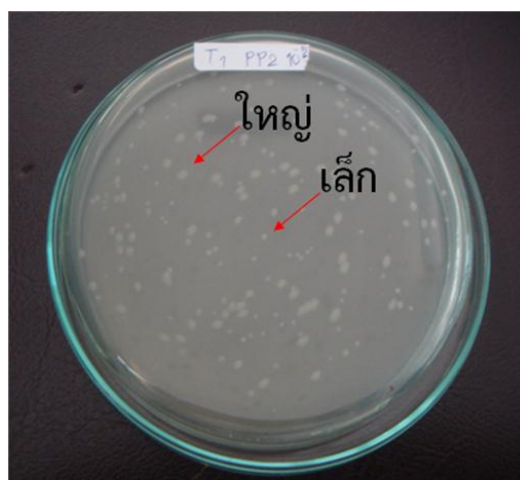
การคัดกลุ่มจุลินทรีย์ (mixed cultures) จากดิน ในขั้นตอนนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อคัดกลุ่มจุลินทรีย์ที่ย่อยสลายสารโพรพิโนฟอสได้ ซึ่งกระทำได้โดยการคัดแยกจุลินทรีย์โดยวิธีถ่ายเชื้อเป็นจำนวน 5 ครั้ง (1 ครั้ง ใช้เวลาในการปรับสภาพ 2 สัปดาห์) ดังภาพที่ 4.1



ภาพที่ 4.1 ลักษณะการถ่ายเชื้อเพื่อคัดแยกกลุ่มจุลินทรีย์ย่อยสลายสารโพรพิโนฟอสจากดิน

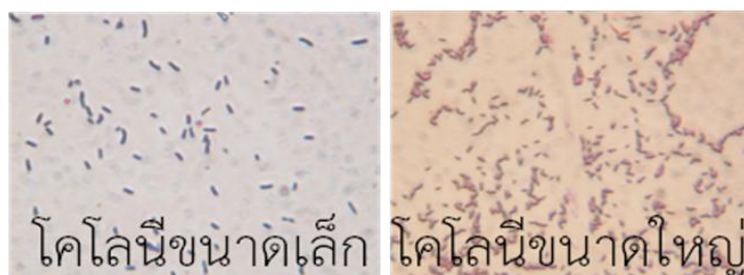
สภาวะที่ใช้ในการคัดกลุ่มจุลินทรีย์ คือ ที่อุณหภูมิ 30°C พีเอช 7 และเป็นสภาพที่มีออกซิเจน (aerobic condition) ซึ่งเป็นสภาพที่ใกล้เคียงกับสภาพแวดล้อมในพื้นที่เกษตรกรรมที่ปนเปื้อนสารกำจัดศัตรูพืชโพรพิโนฟอสจริงเมื่อพิจารณาสภาวะทดลองกลุ่มจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้จัดเป็นจุลินทรีย์ในกลุ่มเฮเทอโรโทรป (heterotroph) ซึ่งใช้สารโพรพิโนฟอสเป็นแหล่งสารคาร์บอนเดี่ยว (sole carbon source) ได้ สำหรับการชี้ชัดว่ากลุ่มจุลินทรีย์ที่คัดได้ดังกล่าวสามารถย่อยสลายสารกำจัดแมลงได้จริงจึงทำการทดสอบความสามารถในการย่อยสลายเบื้องต้น (pre-test) พบว่ากลุ่มจุลินทรีย์ที่คัดได้สามารถย่อยสลายสารโพรพิโนฟอสได้อย่างชัดเจน สำหรับรายละเอียดการศึกษาความสามารถในการย่อยสลายสารโพรพิโนฟอสได้นำเสนอในหัวข้อต่อไป

การศึกษาลักษณะทางกายภาพของกลุ่มจุลินทรีย์ที่คัดได้ โดยนำกลุ่มจุลินทรีย์ดังกล่าวมาเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งพบว่ากลุ่มจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายสารโพรพีนอซได้มีขนาดโคโลนีที่ต่างกัน โดยในเบื้องต้นสามารถจำแนกโคโลนีได้ 2 ขนาด ดังแสดงในภาพที่ 4.2 จากผลการศึกษานี้สามารถกล่าวได้ว่ากลุ่มจุลินทรีย์ที่ย่อยสลายสารโพรพีนอซประกอบด้วยจุลินทรีย์หลายสายพันธุ์รวมตัวกันอยู่ ซึ่งงานวิจัยที่ในอดีตก็ให้ผลการศึกษาในลักษณะเดียวกัน กล่าวคือ ในการคัดแยกจุลินทรีย์เพื่อใช้ในการย่อยสลายสารใด ๆ โดยทั่วไปแล้วมีมากกว่าหนึ่งสายพันธุ์ซึ่งอาจอยู่อาศัยร่วมกันหรือทำงานร่วมกัน (Cycon et al., 2009; Malgani and Chatterjee, 2009; Malgani et al., 2009)



ภาพที่ 4.2 ลักษณะโคโลนีของกลุ่มจุลินทรีย์ที่ย่อยสลายสารโพรพีนอซ

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



ภาพที่ 4.3 ลักษณะรูปร่างเซลล์และการติดสีแกรมของจุลินทรีย์ที่ย่อยสลายสารโพรพีนอซ

ตารางที่ 4.1 ลักษณะทางกายภาพของจุลินทรีย์ที่ย่อยสลายสารโพรพีนอฟอส

ขนาดโคโลนี	ลักษณะโคโลนี	รูปร่าง	การติดสีแกรม
เล็ก	ผิวหน้ามัน	แท่งสั้น	บวก ลบ
	ขอบหยัก	กลม	บวก
ใหญ่	ผิวหน้ามัน	แท่งสั้น	บวก ลบ
	ขอบหยัก	กลม	บวก

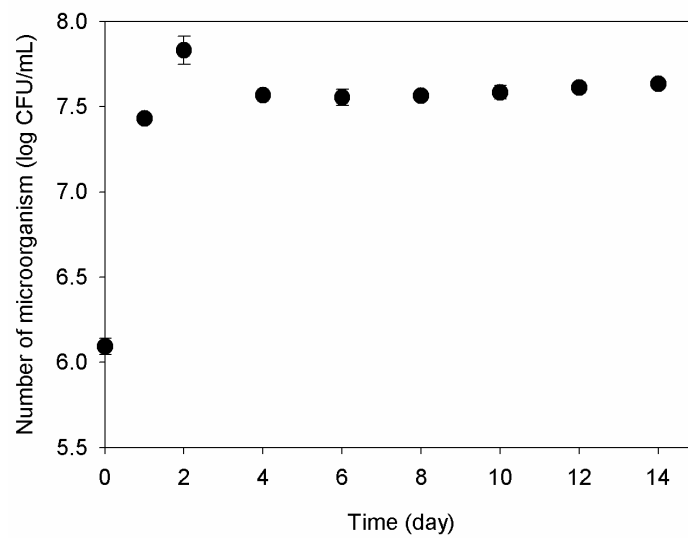
จากการศึกษาลักษณะทางกายภาพของกลุ่มจุลินทรีย์ที่ย่อยสลายสารโพรพีนอฟอส พบว่าจุลินทรีย์ดังกล่าวมีความหลากหลายทางชีวภาพ (biodiversity) ซึ่งบ่งชี้ได้ว่ามีจุลินทรีย์หลายชนิดสามารถทนสารโพรพีนอฟอสได้ อย่างที่ทราบกันทั่วไปว่ากลุ่มจุลินทรีย์สามารถทำงานได้ดีกว่าจุลินทรีย์สายพันธุ์เดียวในสภาพธรรมชาติ (Siripattanakul et al., 2009) โดยยิ่งมีความหลากหลายมากยิ่งขึ้นก็ยิ่งเสถียรภาพสูงตามมา ดังนั้นสามารถกล่าวได้ว่ากลุ่มจุลินทรีย์ที่คัดได้มีศักยภาพในการใช้ประโยชน์ได้จริงต่อไป

4.1.2 จลนพลศาสตร์ของการเจริญเติบโตและการย่อยสลายสารโพรพีนอฟอส

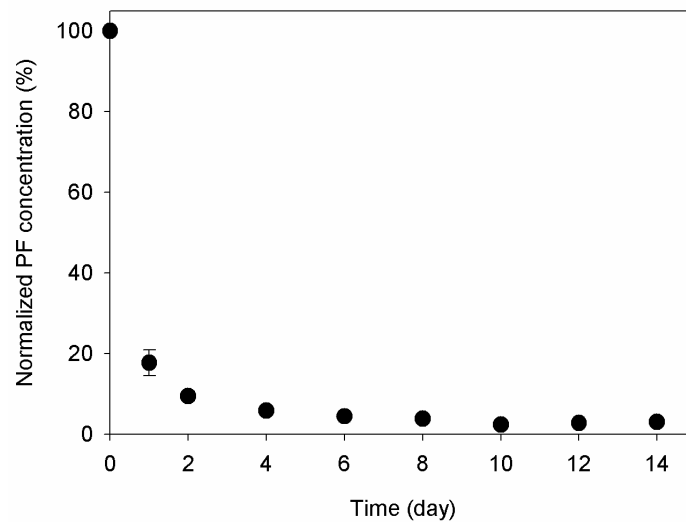
ผลการศึกษาการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ที่ย่อยสลายสารโพรพีนอฟอส พบว่ากราฟการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์แสดงดังภาพที่ 4.4 (ข้อมูลดิบในภาคผนวก ข) กล่าวคือ ในระหว่างการทดลอง 14 วัน กลุ่มจุลินทรีย์มีการเจริญเติบโตเป็น 2 ระยะ คือ ระยะเพิ่มจำนวน (log phase) และระยะคงตัว (stationary phase) เกิดขึ้นในช่วงเวลาที่ 0-4 วัน และตั้งแต่ 4 วันเป็นต้นไป ตามลำดับ จากภาพแสดงการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์พบว่าไม่ปรากฏระยะเตรียมการ (lag phase) เนื่องจากในการคัดแยกจุลินทรีย์ดังกล่าวใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีสารโพรพีนอฟอสเป็นส่วนผสมอยู่แล้ว โดยมีการคัดแยกซ้ำๆ ในสภาวะเช่นเดิมและในอาหารชนิดเดิมทำให้จุลินทรีย์มีการปรับสภาพให้เข้ากับสิ่งแวดล้อมและมีความคงตัวแม้เป็นสภาวะที่มีสารกำจัดแมลงเป็นองค์ประกอบ

ผลการศึกษาการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายสารโพรพีนอฟอสทำให้ทราบถึงช่วงการเจริญเติบโตเหมาะสำหรับนำมาใช้ศึกษาความสามารถในการย่อยสลายสารโพรพีนอฟอสในอนาคต ซึ่งได้แก่ ช่วงต้นของระยะคงตัว (4 วัน) เนื่องจากช่วงนี้จุลินทรีย์มีการเจริญเติบโตคงที่และมีความสามารถในการย่อยสลายสารโพรพีนอฟอสได้สูง

การศึกษาความสามารถในการย่อยสลายสารโพรพีนอฟอส ใช้จุลินทรีย์ที่มีจำนวนเซลล์เริ่มต้นในชุดทดลอง เท่ากับ 1.25×10^7 CFU/mL ผลการศึกษาพบว่าความเข้มข้นของสารโพรพีนอฟอสลดลงอย่างรวดเร็วในช่วงการทดลอง 2 วันแรก และที่เวลา 4 ถึง 14 วัน ความเข้มข้นของสารโพรพีนอฟอสค่อย ๆ ลดลงจนเกือบคงที่ดังภาพที่ 4.5 (ข้อมูลดิบในภาคผนวก ข)



ภาพที่ 4.4 การเจริญเติบโตของกลุ่มจุลินทรีย์ที่ย่อยสลายสารโพรพิโนฟอส



ภาพที่ 4.5 การย่อยสลายสารโพรพิโนฟอสโดยกลุ่มจุลินทรีย์

ผลการศึกษาการย่อยสลายสารในระยะเวลา 14 วัน ซึ่งเป็นช่วงที่จุลินทรีย์เข้าสู่ระยะคงตัวในตอนปลาย พบว่า กลุ่มจุลินทรีย์ที่ย่อยสลายสารโพรพิโนฟอสมีความสามารถในการย่อยสลายร้อยละ 97 (ความเข้มข้นเริ่มต้น 22 mg/L) ซึ่งความสามารถในการย่อยสลายสารโพรพิโนฟอสที่เกิดขึ้นมีความสอดคล้องกับกราฟการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ ทั้งนี้ความเข้มข้นของสารโพรพิโนฟอสลดลงอย่างรวดเร็วในช่วงการทดลอง 2 วันแรก ส่งผลให้จุลินทรีย์เจริญเติบโตอย่างรวดเร็ว กล่าวคือ

จุลินทรีย์เจริญเข้าสู่ระยะเพิ่มจำนวน (log phase) สำหรับที่เวลา 4 ถึง 14 วัน สารอาหาร ซึ่งได้แก่ สารโพฟีโนฟอส เริ่มหมดไปส่งผลให้จุลินทรีย์เจริญเติบโตเข้าสู่ระยะคงตัว (stationary phase)

เมื่อนำข้อมูลการเจริญเติบโตของกลุ่มจุลินทรีย์ที่ย่อยสลายสารโพฟีโนฟอส และ ลักษณะการย่อยสลายสารในภาพที่ 4.4 และ 4.5 พบว่าจลนพลศาสตร์การเจริญเติบโตและการย่อยสลายสารโพฟีโนฟอสเป็นไปตามปฏิกิริยาอันดับที่ 1 กล่าวคือ อัตราการเจริญเติบโตและการย่อยสลายสารโพฟีโนฟอสแปรผันตรงกับความเข้มข้นของสารโพฟีโนฟอสตั้งต้น โดยสามารถสรุปข้อมูลจลนพลศาสตร์และความสามารถในการกำจัดสารโพฟีโนฟอสได้ดังตารางที่ 4.2

ตารางที่ 4.2 จลนพลศาสตร์การเจริญเติบโตและการย่อยสลายสารโพฟีโนฟอสโดยกลุ่มจุลินทรีย์

ข้อมูล	สมการ	R ²	ค่าคงที่
จลนพลศาสตร์การเจริญเติบโต	$Y_1 = 0.02X + 7.05$	1.00	0.02 hr^{-1}
จลนพลศาสตร์การย่อยสลายสารโพฟีโนฟอส	$Y_2 = -0.006X + 1.12$	0.87	0.006 hr^{-1}
อัตราการย่อยสลายสารโพฟีโนฟอส	3.0 mg/L/d		
ร้อยละของการกำจัดสารโพฟีโนฟอส	97		

หมายเหตุ X = เวลา (hr)
 Y_1 = log (จำนวนเซลล์)
 Y_2 = log (ความเข้มข้นของโพฟีโนฟอส)

4.1.3 ผลการวิเคราะห์วิถีการย่อยสลายสารโพฟีโนฟอสโดยกลุ่มจุลินทรีย์เบื้องต้น

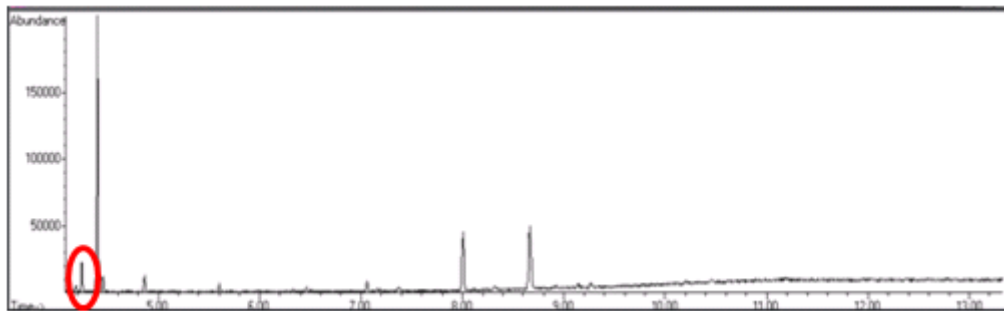
สำหรับการวิเคราะห์วิถีการย่อยสลายสารโพฟีโนฟอสเบื้องต้นเป็นการศึกษาเพื่อพิจารณาความเป็นไป (fate) ของสารดังกล่าวในธรรมชาติ ซึ่งการศึกษาระยะนี้ควบคู่ไปกับการติดตามความเข้มข้นของสารโพฟีโนฟอสคงเหลือในชุดทดลอง โดยการศึกษาวิเคราะห์ผลโดยใช้เครื่องจีซีเอ็มเอส (GC-MS, gas chromatography-mass spectrometry) ในการระบุสารมัธยันตร์ (intermediate) ต่าง ๆ ผลการศึกษาแสดงดังตารางที่ 4.3

ผลการศึกษาพบว่าในสารละลายมาตรฐานและชุดควบคุม (ไม่มีจุลินทรีย์) ตรวจพบสารบีซีพี (4-bromo-2-chlorophenol; BCP) ดังแสดงในภาพที่ 4.6 และ 4.7 ซึ่งมีโครงสร้างดังภาพที่ 4.8 ในชุดทดลองนี้ไม่มีเซลล์จุลินทรีย์ดังนั้นสามารถระบุได้ว่าสารโพฟีโนฟอสทำปฏิกิริยากับน้ำ (hydrolysis) แล้วแตกตัวเป็นสารบีซีพี ผลดังกล่าวนี้สอดคล้องกับงานวิจัยของ Zamy et al. (2004) ที่มีการศึกษารูปแบบการแตกตัวของสารในกลุ่มออร์แกนโนฟอสฟอรัส (รวมถึงสารโพฟีโนฟอสด้วย) ในสารละลายที่เจือจางด้วยน้ำ ผลการศึกษาพบว่าโพฟีโนฟอสสามารถแตกตัวเป็นสารบีซีพีเช่นกัน แต่อย่างไรก็ตามผลจากงานวิจัยนี้พบว่าเมื่อติดตามความเป็นไปของสารอย่างต่อเนื่องพบว่าปริมาณสารบีซีพีคงที่ ดังนั้นผลการศึกษาครั้งนี้ชี้ชัดได้ว่ากระบวนการไฮโดรไลซิสทำให้สารโพฟีโนฟอสเพียงบางส่วนแตกตัวเป็นเหตุให้สารโพฟีโนฟอสมีความเข้มข้นลดลงเล็กน้อย นอกจากนี้ยังพบว่ากระบวนการแตกตัวนี้ไม่ส่งผลให้สารบีซีพีแตกตัวได้ เนื่องจากโครงสร้างของสารบีซีพีเป็นโครงสร้างอะโรมาติก (aromatic structure) ซึ่งมีพันธะที่แข็งแรง

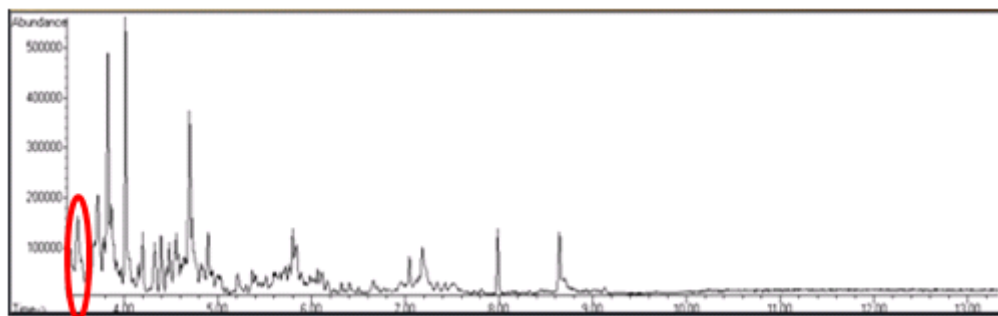
ตารางที่ 4.3 การติดตามสารมัธยันตร์จากการทดลองการย่อยสลายสารโพฟีโนฟอส

ชุดทดลอง	ความเข้มข้นสารโพฟีโนฟอสเริ่มต้น (mg/L)	ผลการติดตาม
สารละลายมาตรฐาน	15	● ตรวจพบสารบีซีพี (ภาพที่ 4.6 และ 4.8)
ชุดควบคุม (ไม่มีจุลินทรีย์)	40	● ตรวจพบสารบีซีพี (ภาพที่ 4.7 และ 4.8)
ชุดทดลองที่เติมกลุ่มจุลินทรีย์	20	● ตรวจไม่พบสารมัธยันตร์
	40	● เมื่อทดลองในช่วงแรกตรวจพบสารบีซีพี แต่เมื่อเวลาเพิ่มขึ้นตรวจไม่พบสารบีซีพี ● เมื่อทดลอง 3 hr ตรวจพบสาร 2,4-di-tert-butyl phenol ซึ่งมีพื้นที่ใต้กราฟ เท่ากับ 7,633,043 แต่เมื่อเวลาทดลองนานขึ้นเป็น 12 hr พบการสะสมเพิ่มขึ้นของสารดังกล่าว โดยพบว่ามีพื้นที่ใต้กราฟเพิ่มขึ้นเป็น 7,898,706 ซึ่งคิดการเพิ่มขึ้นของสารดังกล่าวได้ประมาณร้อยละ 3.5 (ภาพที่ 4.9)
	120	● เมื่อทดลอง 3 hr ตรวจพบสารบีซีพี (ภาพที่ 4.10) ● เมื่อทดลอง 6 hr ตรวจไม่พบสารบีซีพี แต่พบสาร 3-methoxy phenol แทนที่ในจุดเดิมที่พบบีซีพี (ดูรายละเอียดในโครมาโตแกรมในภาพที่ 4.10)

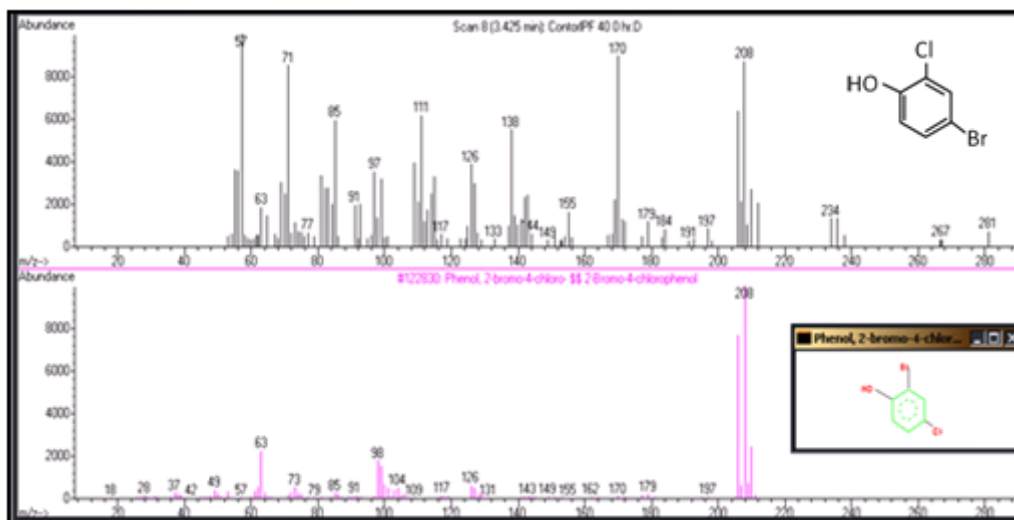
โดยทั่วไปในกระบวนการย่อยสลายสารปลอมปนโดยจุลินทรีย์ (xenobiotic degradation by microorganisms) จุลินทรีย์ผลิตเอนไซม์ที่ย่อยสลายสารปลอมปนทำให้สารนั้น ๆ เปลี่ยนเป็นสารมัธยันตร์ขั้นต้น (primary intermediate) และหากจุลินทรีย์สามารถผลิตเอนไซม์ที่ย่อยสลายสารมัธยันตร์ สารมัธยันตร์ขั้นต้นจะถูกเปลี่ยนต่อ ๆ ไปจนกระทั่งเกิดกระบวนการกลายเป็นแร่ธาตุสมบูรณ์ (complete mineralization) ซึ่งท้ายที่สุดผลิตภัณฑ์สุดท้าย (end product) ของกระบวนการ ได้แก่ คาร์บอนไดออกไซด์ แก๊สไนโตรเจน แก๊สแอมโมเนีย เป็นต้น (อลิสซา วังไฉ, 2553) แต่หากจุลินทรีย์ไม่สามารถผลิตเอนไซม์ในขั้นตอนใด ๆ หรือผลิตได้ไม่สอดคล้องกับปริมาณของสารจะส่งผลให้เกิดการสะสมของสารขั้นต่อนั้น ๆ



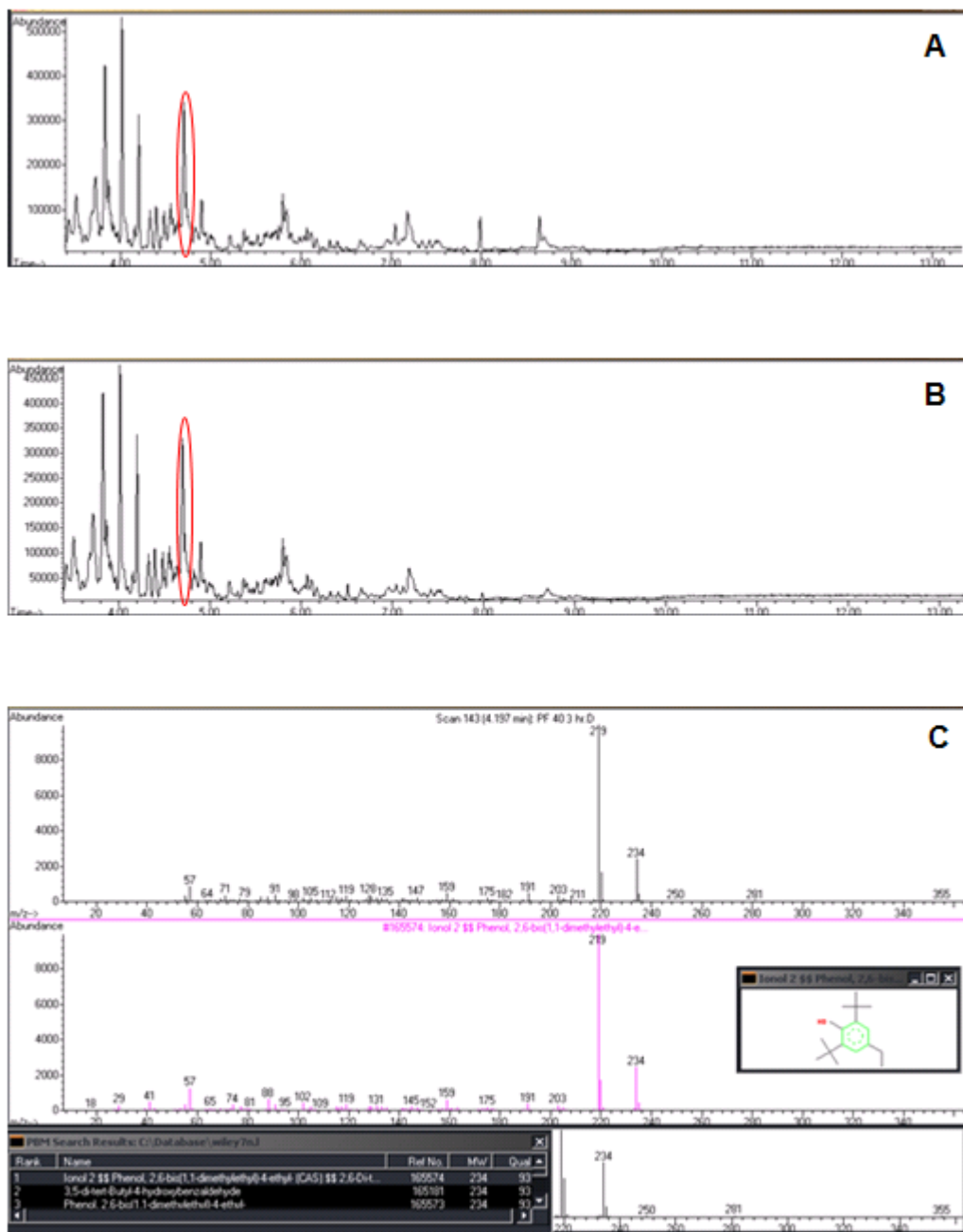
ภาพที่ 4.6 การตรวจพบสารปซีพีในสารละลายมาตรฐาน



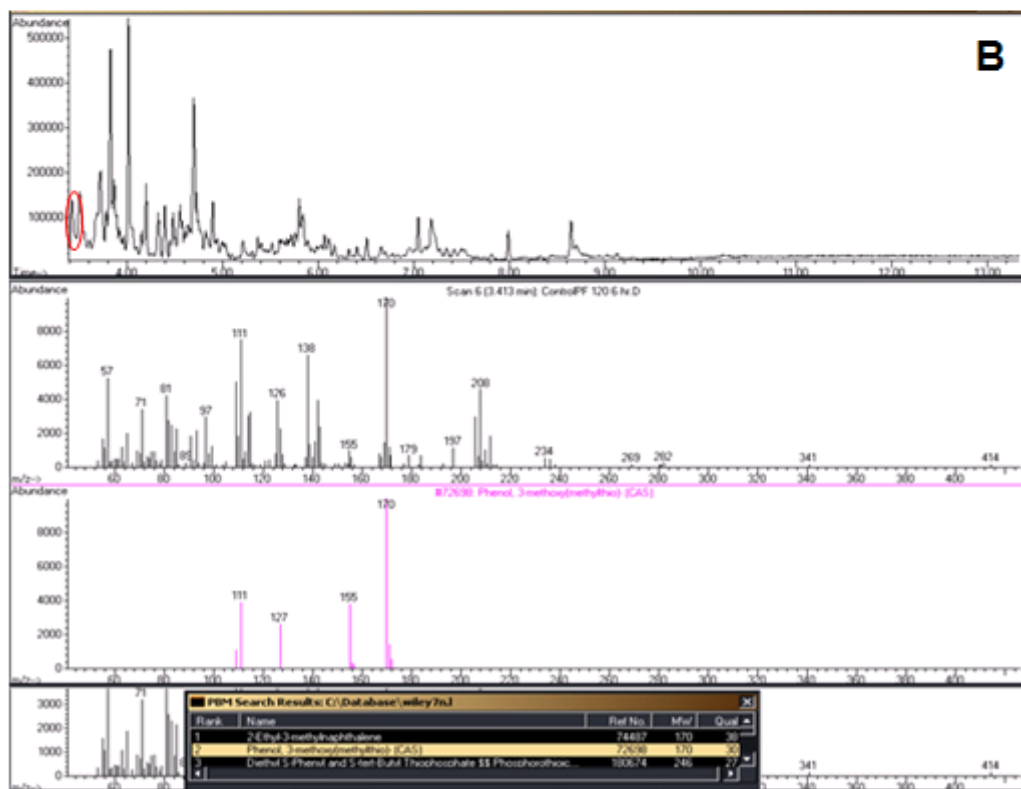
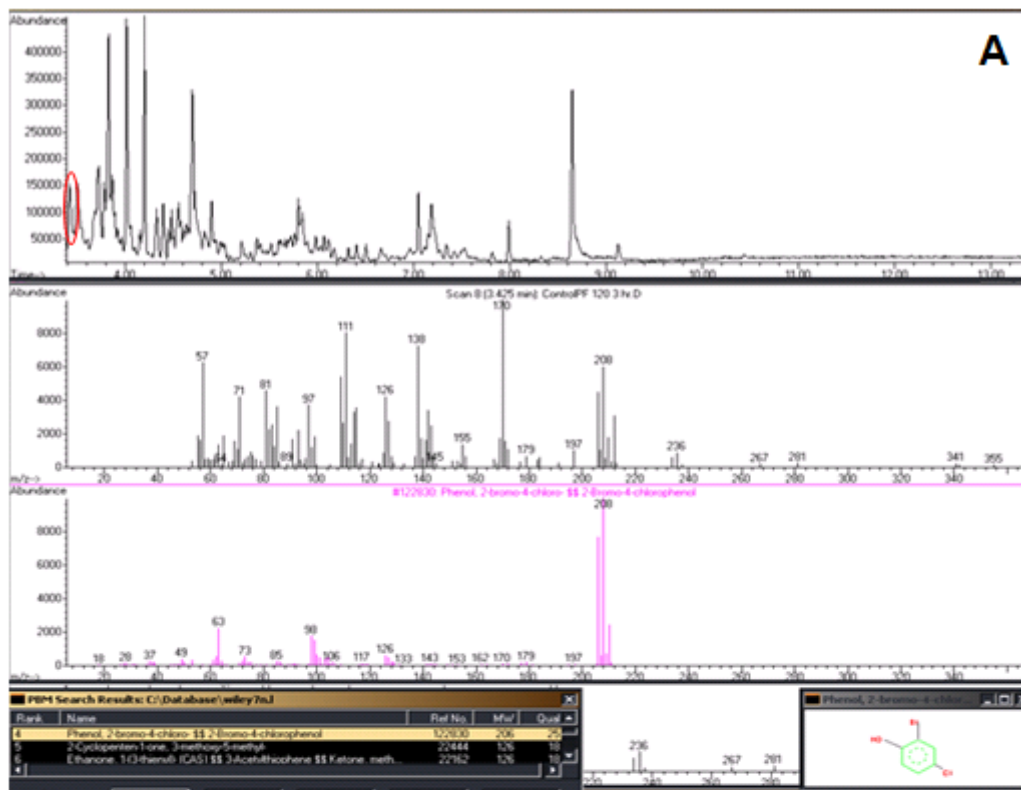
ภาพที่ 4.7 การตรวจพบสารปซีพีในชุดควบคุม



ภาพที่ 4.8 โครงสร้างสารปซีพีและการเปรียบเทียบรูปแบบแมสสเปกตรากับฐานข้อมูล



ภาพที่ 4.9 การตรวจพบสาร 2,4-di-tert-butyl phenol ในชุดทดลองการย่อยสลายสารโพรพิโนฟอสความเข้มข้น 40 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่เวลาเริ่มต้น (A) 3 hr และ (B) 12 hr (C) การเปรียบเทียบแบบแมสสเปกตรากับฐานข้อมูล



ภาพที่ 4.10 การตรวจพบสารในชุดทดลองการย่อยสลายสารโพธิ์โนฟอส
ความเข้มข้น 120 มิลลิกรัมต่อลิตร เวลาในการทดลอง
(A) 3 hr ตรวจพบสารบีซีพี และ (B) 6 hr ตรวจพบสาร 3-methoxy phenol

สำหรับผลจากชุดทดลองที่ได้เติมกลุ่มจุลินทรีย์พบว่าการทดลองที่ระดับความเข้มข้นเริ่มต้นของสารโพรพิโนฟอสไม่สูงนัก (20 mg/L) การตรวจติดตามไม่พบสารบีซีพี แต่เมื่อทดลองที่ความเข้มข้นเริ่มต้นสูงมากขึ้น (40 mg/L) จึงพบสารบีซีพี (ดังรายละเอียดในตารางที่ 4.3) จากผลการทดลองในขั้นตอนนี้พบการสะสมของสารบีซีพี (ทำให้ตรวจพบได้) ในการทดลองที่ความเข้มข้นของสารโพรพิโนฟอสเริ่มต้น 40 mg/L สามารถกล่าวได้ว่ากลุ่มจุลินทรีย์ที่คัดได้ในการศึกษานี้สามารถย่อยสลายสารโพรพิโนฟอสเป็นสารบีซีพีได้ แต่เมื่อมีความเข้มข้นของสารโพรพิโนฟอสสูงจึงทำให้เอนไซม์ไม่สมดุลกับปริมาณสารดังกล่าวจึงพบการสะสมของสารบีซีพี ผลดังกล่าวเป็นไปในทิศทางเดียวกับงานวิจัยในอดีตที่ระบุว่า *Pseudomonas aeruginosa* strain OW สามารถย่อยสลายสารโพรพิโนฟอสเป็นสารบีซีพีเช่นกัน (Malgani et al., 2009) ทั้งนี้ผลดังกล่าวนี้ยังสามารถระบุได้ว่าเอนไซม์ที่ผลิตขึ้นในกระบวนการย่อยสลายนี้เป็นเอนไซม์ประเภทไฮโดรเลสจึงได้สารมัธยันตร์ขึ้นต้นเป็นสารบีซีพี

ผลจากชุดทดลองที่ได้เติมกลุ่มจุลินทรีย์พบว่าการทดลองที่ระดับความเข้มข้นเริ่มต้นของสารโพรพิโนฟอส 120 mg/L (ตารางที่ 4.3 และ ภาพที่ 4.10) ซึ่งพบว่าเมื่อเวลาในการทดลองเพิ่มมากขึ้นสารบีซีพีมีปริมาณลดลงจนไม่สามารถตรวจพบได้ แต่ตรวจพบสาร 3-methoxy phenol แทนที่ในจุดเดิมที่พบบีซีพี ผลการทดลองนี้สามารถชี้ชัดได้ว่ากลุ่มจุลินทรีย์นั้นนอกจากจะสามารถย่อยสลายสารโพรพิโนฟอสแล้วยังสามารถย่อยสลายสารบีซีพีได้อีกด้วย สอดคล้องกับผลการทดลองที่ระดับความเข้มข้นเริ่มต้นของสารโพรพิโนฟอส 20 mg/L ซึ่งตรวจไม่พบสารบีซีพี ทั้งที่สารดังกล่าวเกิดขึ้นแม้แต่ในชุดควบคุม ผลการทดลองนี้บ่งบอกถึงการย่อยสลายอย่างต่อเนื่องทั้งสารโพรพิโนฟอสและสารบีซีพีโดยกลุ่มจุลินทรีย์ทำให้ไม่สามารถตรวจพบสารทั้งสองได้ นอกจากนี้ได้มีการตรวจพบสารมัธยันตร์อื่น ๆ ซึ่งได้แก่ สาร 2,4-di-tert-butyl phenol (ภาพที่ 4.9) โดยเมื่อทดลองเป็นเวลายาวนานขึ้นพบการสะสมของสารดังกล่าวด้วย

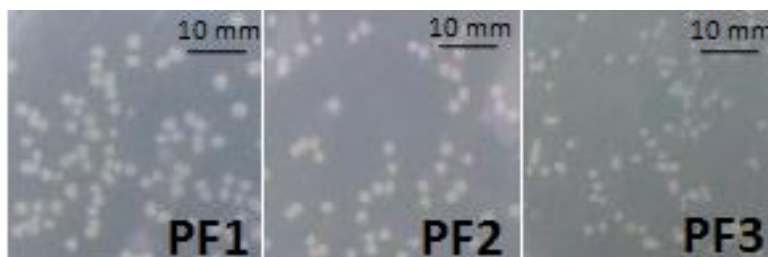
จากผลดังกล่าวแสดงให้เห็นว่ากลุ่มจุลินทรีย์ที่คัดได้มีศักยภาพการประยุกต์ใช้ในการกำจัดสารโพรพิโนฟอสทางชีวภาพ ซึ่งวิถีในการย่อยสลายสารดังกล่าวยังไม่สามารถระบุได้ชัดเจน แต่สามารถชี้ให้เห็นได้ว่าสารโพรพิโนฟอสถูกย่อยสลายอย่างแน่นอน รวมทั้งผลจากงานวิจัยนี้เป็นผลงานแรกที่ระบุการย่อยสลายสารโพรพิโนฟอสและสารบีซีพีพร้อมกันโดยกลุ่มจุลินทรีย์ (simultaneous microbial degradation) และได้ระบุสารมัธยันตร์เพิ่มมากขึ้นจากงานวิจัยในอดีต แต่อย่างก็ตามควรมีงานวิจัยต่อเนื่องเพื่อระบุวิถีการย่อยสลายอย่างสมบูรณ์ในอนาคต

4.2 ผลการคัดแยกจุลินทรีย์บริสุทธิ์และการศึกษาลักษณะการย่อยสลายสารโพรพิโนฟอส

4.2.1 ผลการคัดแยกจุลินทรีย์บริสุทธิ์และลักษณะของจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้

จากการคัดแยกกลุ่มจุลินทรีย์ได้ในหัวเชื้อที่ผ่านมาเพื่อใช้ในการฟื้นฟูพื้นที่ปนเปื้อนสารโพรพิโนฟอสต่อไป การศึกษาลักษณะของกลุ่มจุลินทรีย์จึงได้กระทำเพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานประกอบการใช้ประโยชน์ของกลุ่มจุลินทรีย์ต่อไป โดยการศึกษาครอบคลุมการคัดสายพันธุ์ (isolation) ชนิดหลักโดยวิธีการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง การระบุลักษณะทางกายภาพ และการระบุสายพันธุ์จาก 16S rRNA ด้วยวิธีการทางชีวโมเลกุล ซึ่งผลการศึกษาที่มีรายละเอียดดังต่อไปนี้

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



ภาพที่ 4.11 ลักษณะโคโลนีของ PF1 PF2 และ PF3

ตารางที่ 4.4 ลักษณะทางกายภาพของ PF1 PF2 และ PF3

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

จากการศึกษาในอดีตพบว่า *Pseudomonas aeruginosa* strain OW สามารถย่อยสลายสารโพรพีนอซได้ (Malgani et al., 2009) จุลินทรีย์ดังกล่าวคัดแยกจากดินที่ปนเปื้อนสารโพรพีนอซในประเทศจีน ผลจากงานวิจัยนี้พบว่าจุลินทรีย์สายพันธุ์ *Pseudomonas aeruginosa* อีก 2 พันธุ์ ซึ่งคัดแยกจากดินไร่พริกที่ปนเปื้อนสารโพรพีนอซในประเทศไทยก็สามารถกำจัดสารโพรพีนอซได้เช่นกัน นอกเหนือจากนี้ยังมีการวิจัยในอดีตที่ระบุว่า *Pseudomonas aeruginosa* สามารถย่อยสลายสารกำจัดศัตรูพืชในกลุ่มออร์แกนโนฟอสฟอรัสชนิดอื่น เช่น สารคลอร์ไพริฟอสได้

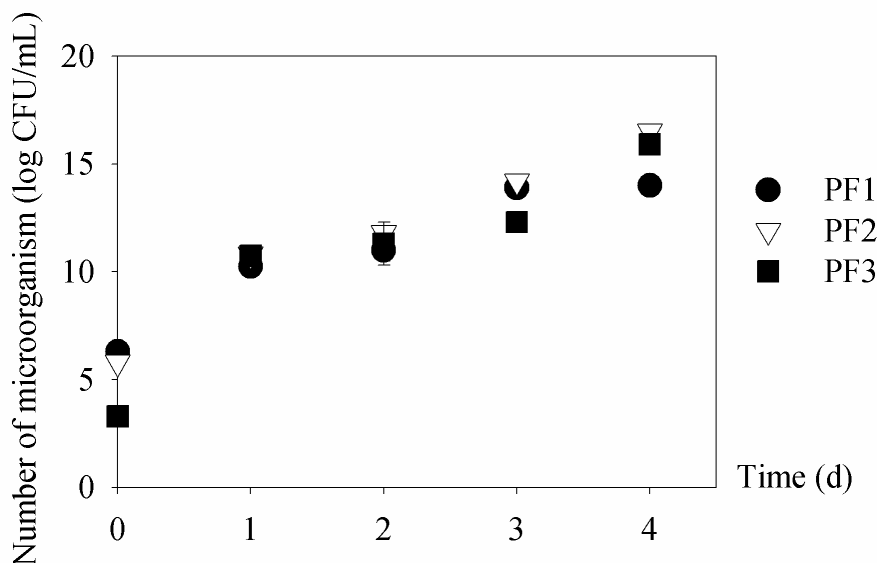
เป็นต้น ได้อีกด้วย (Fulekar and Geetha, 2008; Malgani and Chatterjee, 2009) จากข้อมูลข้างต้นสามารถกล่าวได้ว่า *Pseudomonas aeruginosa* เป็นแบคทีเรียที่คงความสามารถในการกำจัดสารกำจัดศัตรูพืชในกลุ่มออร์แกนโนฟอสฟอรัส ซึ่งคาดว่าจุลินทรีย์ดังกล่าวสามารถผลิตเอนไซม์ที่สามารถย่อยสลายสารออร์แกนโนฟอสฟอรัส (organophosphorus-degrading enzyme) ได้ แต่งานวิจัยนี้ยังไม่สามารถระบุยีน (gene) ที่ควบคุมการทำงานดังกล่าวได้อย่างชัดเจน ในอนาคตควรมีการศึกษาต่อเนื่องในประเด็นดังกล่าวเพื่อให้ทราบถึงกลไกการกำจัดสารโพรพิโนฟอสโดยจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้

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

4.2.2 จลนพลศาสตร์ของการเจริญเติบโตและการย่อยสลายสารโพรพิโนฟอสด้วย จุลินทรีย์บริสุทธิ์

ผลการศึกษาการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์บริสุทธิ์ทั้งสาม ซึ่งได้แก่ PF1 PF2 และ PF3 มีลักษณะดังภาพที่ 4.12 (ข้อมูลดิบแสดงในภาคผนวก ข) คือ ในระยะการการทดลอง 4 วัน จุลินทรีย์มีการเจริญเติบโตเพิ่มจำนวนเพิ่มขึ้นมากอย่างต่อเนื่อง โดยเซลล์จุลินทรีย์เพิ่มจำนวนมากถึง 10^{15} CFU/mL เมื่อสิ้นสุดการทดลอง งานวิจัยนี้ศึกษาการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ในสภาวะที่ไม่มีส่วนประกอบของสารอินทรีย์คาร์บอนอื่นแต่พบว่าจุลินทรีย์บริสุทธิ์เจริญเติบโตได้รวดเร็วมาก ซึ่งจากผลดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้มีความสามารถในการใช้สารโพรพิโนฟอสเป็นแหล่งคาร์บอนหลักเดี่ยว (sole carbon source) ในการเจริญเติบโตได้เป็นอย่างดี

จากผลดังกล่าวเมื่อพิจารณาจลนพลศาสตร์การเจริญเติบโตของจุลินทรีย์บริสุทธิ์ พบว่าการเจริญเติบโตเป็นไปตามปฏิกิริยาอันดับที่ 1 โดยมีค่าคงที่ปฏิกิริยาแสดงดังตารางที่ 4.5 PF1 PF2 และ PF3 มีค่าคงที่จลนพลศาสตร์การเจริญเติบโตอยู่ระหว่าง $0.08-0.11 \text{ hr}^{-1}$ จากข้อมูลดังกล่าวพบว่าการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์บริสุทธิ์สูงกว่ากลุ่มจุลินทรีย์ 5-6 เท่า ซึ่งผลดังกล่าวอาจเกิดจากการแข่งขันการใช้อาหารระหว่างจุลินทรีย์ต่าง ๆ ในกลุ่มจุลินทรีย์ นอกจากนี้จากผลการศึกษาข้างบ่งชี้ได้ว่าจุลินทรีย์ต่างชนิดมีอัตราการเจริญเติบโตแตกต่างกันด้วย โดย PF3 มีอัตราการเจริญเติบโตสูงสุด



ภาพที่ 4.12 การเจริญเติบโตของจุลินทรีย์บริสุทธิ์ที่ย่อยสลายสารโพรพีโนฟอส

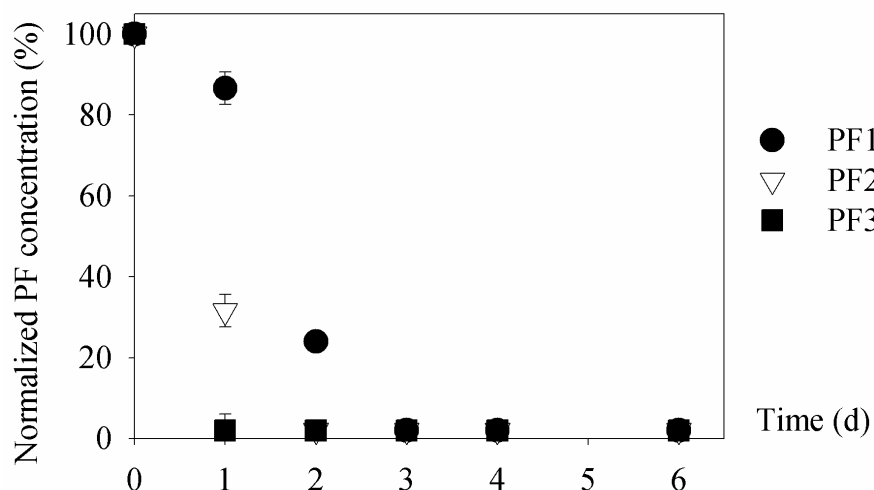
ตารางที่ 4.5 จลนพลศาสตร์การเจริญเติบโตของจุลินทรีย์บริสุทธิ์ที่ย่อยสลายสารโพรพีโนฟอส

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

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

ส่วนภาพที่ 4.13 (ข้อมูลดิบแสดงในภาคผนวก ข) แสดงผลการย่อยสลายโพรพีโนฟอสของจุลินทรีย์บริสุทธิ์ทั้งสาม ซึ่งผลการศึกษาเป็นไปในลักษณะเดียวกันกับการเจริญเติบโต กล่าวคือ สารโพรพีโนฟอสซึ่งเป็นสารอาหารคาร์บอนลดลงอย่างรวดเร็วในเวลาเพียง 2-3 วัน สอดคล้องกับผลการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ที่มีการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็ว เมื่อพิจารณาอัตราการย่อยสลายสารโพรพีโนฟอสและร้อยละการกำจัดสารโพรพีโนฟอสดังแสดงในตารางที่ 4.6 พบว่า จุลินทรีย์บริสุทธิ์ทั้งสามมีอัตราการย่อยสลายสารโพรพีโนฟอสและร้อยละการกำจัดสารโพรพีโนฟอสถึง 7.6-19.6 mg/L/d และ 93-95 ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับผลการทดลองการย่อยสลายสารโพรพีโนฟอสตามธรรมชาติ (ชุดทดลองควบคุมที่ไม่มีการเติมเซลล์จุลินทรีย์) พบว่าความเข้มข้นของสารโพรพีโนฟอสคงเหลือสูงกว่าร้อยละ 95 ภายหลังสิ้นสุดการทดลอง (4 วัน) ดังนั้นสามารถชี้ชัดได้ว่าจุลินทรีย์บริสุทธิ์ทั้งสามมีศักยภาพในการย่อยสลายสารโพรพีโนฟอสสูง

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



ภาพที่ 4.13 การย่อยสลายสารโพรพิโนฟอสโดยจุลินทรีย์บริสุทธ์

ตารางที่ 4.6 อัตราการย่อยสลายสารโพรพิโนฟอสและร้อยละการกำจัดสารโพรพิโนฟอสของจุลินทรีย์บริสุทธ์

จุลินทรีย์	อัตราการย่อยสลายสารโพรพิโนฟอส (mg/L/d)	ร้อยละการกำจัดสารโพรพิโนฟอส
PF1	7.6	95.0
PF2	9.8	93.1
PF3	19.6	95.3

เมื่อพิจารณาจลนพลศาสตร์การย่อยสลายสารโพรพิโนฟอสของจุลินทรีย์บริสุทธ์พบว่า เป็นไปตามปฏิกิริยาอันดับที่ 1 โดยมีค่าคงที่ปฏิกิริยาแสดงดังตารางที่ 4.7 ผลการศึกษาบ่งชี้ได้ว่าปฏิกิริยาการย่อยสลายสารโพรพิโนฟอสขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของสารเริ่มต้น PF1 PF2 และ PF3 มีค่าคงที่จลนพลศาสตร์การเจริญเติบโตอยู่ระหว่าง $0.023-0.035 \text{ hr}^{-1}$ โดยทั่วไปในการฟื้นฟูพื้นที่ปนเปื้อนด้วยวิธีการทางชีวภาพกลุ่มจุลินทรีย์ทำงานได้ดีกว่าจุลินทรีย์บริสุทธ์ (Siripattanakul et al., 2009) เนื่องจากความหลากหลายในกลุ่มจุลินทรีย์ส่งผลให้จุลินทรีย์สามารถทนต่อ

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

ตารางที่ 4.7 จลนพลศาสตร์การย่อยสลายสารโพรพีโนฟอสของจุลินทรีย์บริสุทธิ์

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

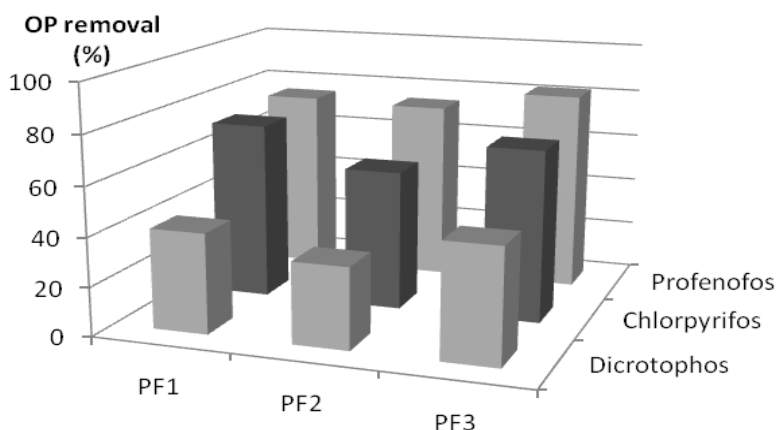
หมายเหตุ y = log (ความเข้มข้นของโพรพีโนฟอส)
 x = เวลา (hr)

4.2.3 ผลการศึกษาความเป็นไปได้ในการย่อยสลายสารกำจัดศัตรูพืชออร์แกนโนฟอสฟอรัสชนิดอื่นด้วยจุลินทรีย์บริสุทธิ์

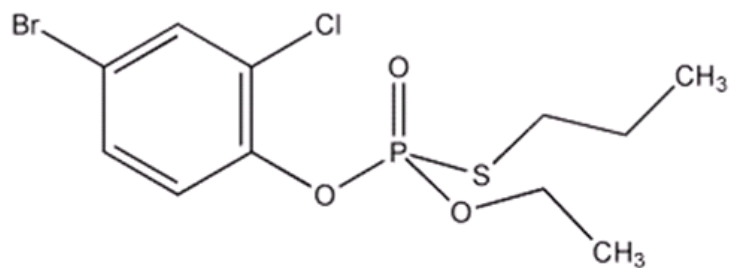
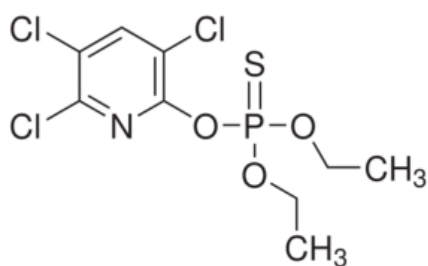
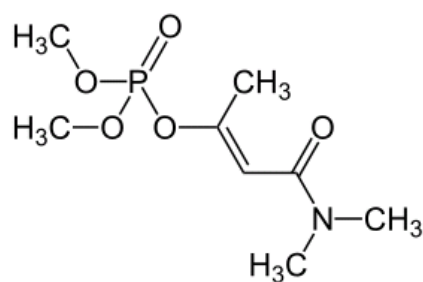
โดยทั่วไปในการใช้สารกำจัดศัตรูในการเกษตรนิยมใช้สารเคมีเกษตรร่วมกันหลายชนิดเพื่อกำจัดศัตรูพืชที่แตกต่างกันออกไป สำหรับการเพาะปลูกพริกนอกจากมีการใช้สารโพรพีโนฟอสเป็นจำนวนมากแล้ว เกษตรกรยังใช้สารกำจัดศัตรูพืชในกลุ่มออร์แกนโนฟอสฟอรัสหลายชนิด จากการสำรวจพื้นที่เกษตรกรรมพบว่าสารในกลุ่มดังกล่าวที่นิยม ได้แก่ สารโพรพีโนฟอส สารคลอร์ไพริฟอส (chlorpyrifos) และสารไดโครโตฟอส (dichrotophos) จากข้อมูลดังกล่าวนี้จึงมีความเป็นไปได้ที่อาจมีการปนเปื้อนของสารกำจัดศัตรูพืชดังกล่าวในบริเวณเดียวกับสารโพรพีโนฟอส

งานวิจัยนี้ได้ศึกษาทดลองย่อยสลายสารคลอร์ไพริฟอสและสารไดโครโตฟอส เพื่อศึกษาความเป็นไปได้ในการกำจัดสารดังกล่าวโดยจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้ รวมทั้งบ่งชี้แนวโน้มของอิทธิพลของสารดังกล่าวต่อการกำจัดสารโพรพีโนฟอส ผลการทดลองย่อยสลายสารคลอร์ไพริฟอสและสารไดโครโตฟอสโดย PF1 PF2 และ PF3 เปรียบเทียบกับการย่อยสลายสารโพรพีโนฟอสโดยจุลินทรีย์ดังกล่าวแสดงไว้ในภาพที่ 4.14 (ข้อมูลดิบแสดงในภาคผนวก ข) ผลการทดลองพบว่า PF1 PF2 และ PF3 สามารถย่อยสลายสารกำจัดศัตรูพืชได้ใกล้เคียงกัน โดยเมื่อมีจุลินทรีย์ดังกล่าวจำนวนเริ่มต้นประมาณ 10⁶ CFU/mL และความเข้มข้นของสารกำจัดศัตรูพืชเริ่มต้น 20 mg/L จุลินทรีย์กำจัดสารคลอร์ไพริฟอสได้ร้อยละ 57-73 และสารไดโครโตฟอสได้ร้อยละ 33-47 ในขณะที่จุลินทรีย์กำจัดสารโพรพีโนฟอสได้ร้อยละ 75-82 จากผลดังกล่าวสามารถระบุได้อย่างชัดเจนว่าจุลินทรีย์บริสุทธิ์ที่คัดแยกได้จากงานวิจัยนี้สามารถกำจัดสารกำจัดศัตรูพืชกลุ่มออร์แกนโนฟอสฟอรัสได้หลายชนิด

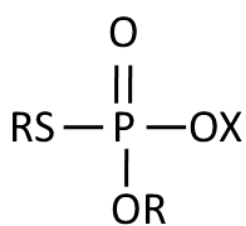
เมื่อพิจารณาโครงสร้างของสารทั้งสาม (ภาพที่ 4.15) พบว่าสารสารโพรพิโนฟอส (O-(4-bromo-2-chlorophenyl) O-ethyl S-propyl phosphorothioate) และสารคลอร์ไพริฟอส (O,O-diethyl O-(3,5,6-trichloro-2-pyridinyl) phosphorothioate) เป็นสารออร์แกนโนฟอสฟอรัสในกลุ่มฟอสฟอโรโรเออเอท (phosphorothioate) เช่นกัน (US EPA, 2009) และมีโครงสร้างคล้ายกันแต่จัดเป็นจำพวกกลุ่มย่อยต่างกัน โดยสารโพรพิโนฟอสจัดเป็นสารในกลุ่มย่อยเอสอัลคิลฟอสฟอโรโรเออเอท (S-alkyl phosphorothioate) ส่วนสารคลอร์ไพริฟอสเป็นจัดเป็นสารในกลุ่มย่อยโออัลคิลฟอสฟอโรโรเออเอท (O-alkyl phosphorothioate) ดังแสดงในภาพที่ 4.16 เนื่องจากความใกล้เคียงกันของโครงสร้างสารเป็นเหตุให้จุลินทรีย์สามารถกำจัดสารคลอร์ไพริฟอสได้ดีใกล้เคียงกับสารโพรพิโนฟอสแม้จะไม่ได้มีการปรับสภาพกับสารคลอร์ไพริฟอสก่อน ในทางตรงกันข้ามสารไดโคโตฟอส (1E)-3-(dimethylamino)-1-methyl-3-oxo-1-propenyl dimethyl phosphate) เป็นสารในกลุ่มฟอสเฟต (phosphate) ดังแสดงในภาพที่ 4.10 (US EPA, 2009) ซึ่งโครงสร้างทางเคมีของสารแตกต่างกับสารโพรพิโนฟอส เป็นเหตุให้จุลินทรีย์สามารถกำจัดสารไดโคโตฟอสได้ไม่ดีนัก



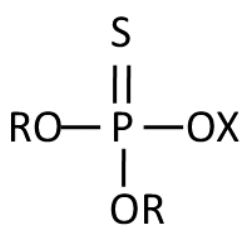
ภาพที่ 4.14 การย่อยสลายสารคลอร์ไพริฟอสและสารไดโคโตฟอสโดย PF1 PF2 และ PF3

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

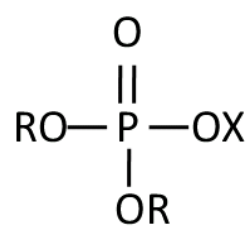
ภาพที่ 4.15 โครงสร้างสารโทรฟีนโฟส สารคลอร์ไพริโฟส และสารไดโครโตโฟส



**S-alkyl
phosphorothioate**

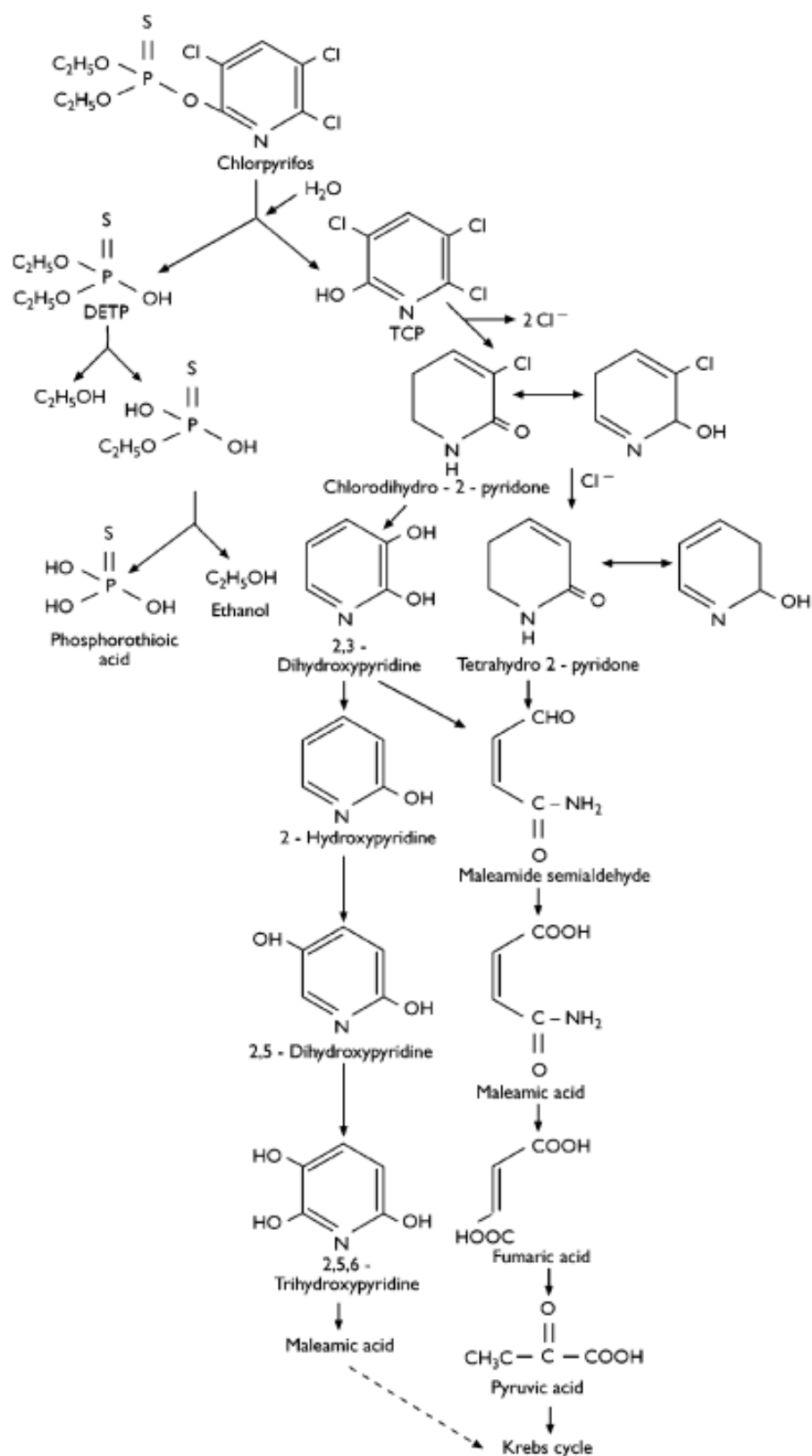


**O-alkyl
phosphorothioate**

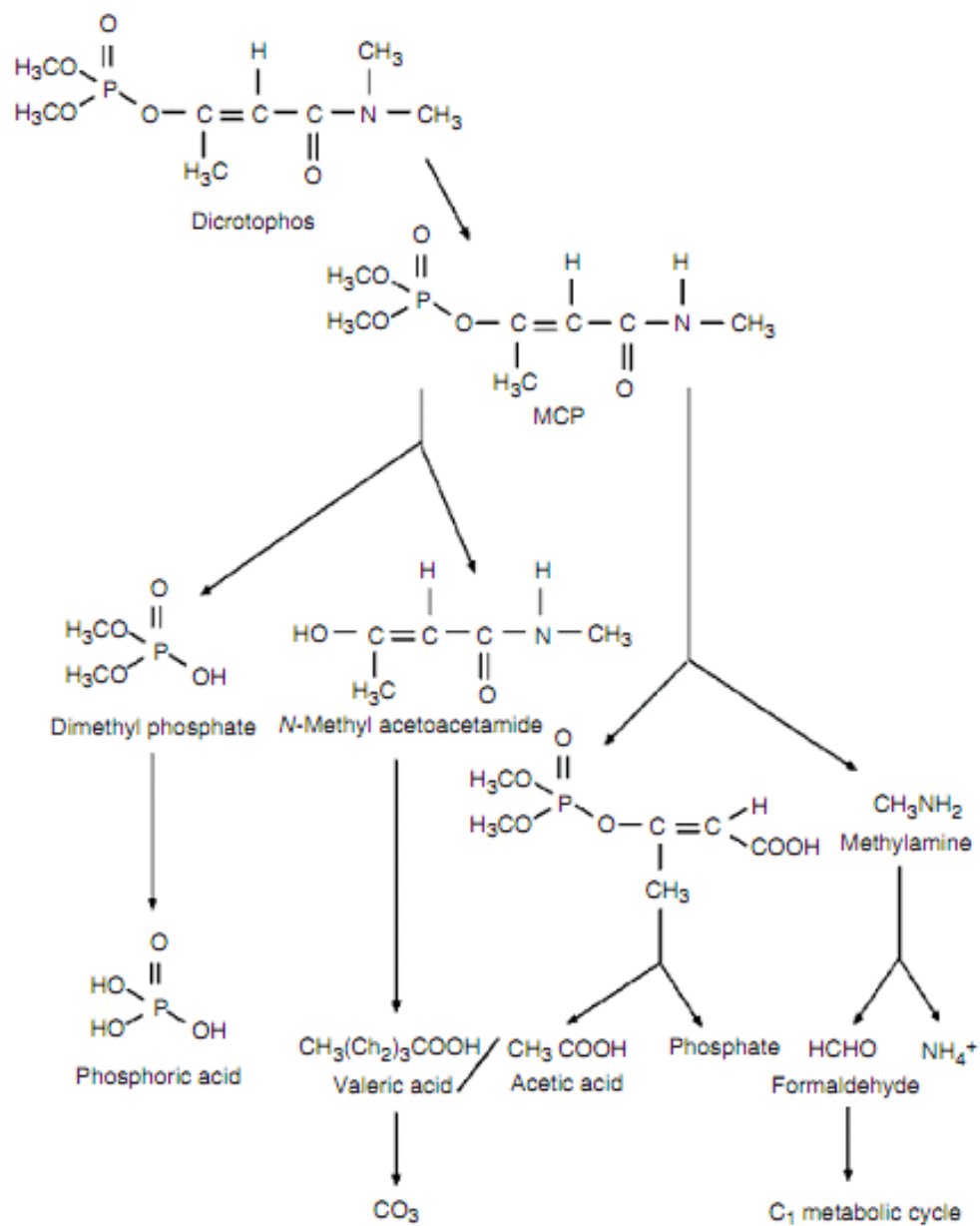
**Phosphate**

ภาพที่ 4.16 โครงสร้างทางเคมีของสารออร์แกนโนฟอสฟอรัสกลุ่มเอสอัลคิลฟอสโฟโรไฮโอเอท กลุ่มโออัลคิลฟอสโฟโรไฮโอเอท และกลุ่มฟอสเฟต

หากพิจารณาวิเคราะห์ผลการย่อยสลายข้างต้นจากวิถีการย่อยสลาย (degradation pathway) ของสารทั้งสาม โดยทั่วไปเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายสารออร์แกนโนฟอสฟอรัส ได้แก่ เอนไซม์ฟอสฟาเตส (phosphatase) เอนไซม์เอสเตอเรส (esterase) เอนไซม์ไฮโดรเลส (hydrolase) และเอนไซม์ออกซิจีเนส (oxygenase) (Kanekar et al., 2004) งานวิจัยในอดีตส่วนมากรายงานถึงการย่อยสลายสารออร์แกนโนฟอสฟอรัสเกิดจากการทำงานของเอนไซม์ออร์แกนโนฟอสเฟตไฮโดรเลส (organophosphate hydrolase) (Kanekar et al., 2004; Singh and Walker, 2006) อาทิเช่น การย่อยสลายสารคลอร์ไพริฟอส พาราไธออน โมโนโครโทฟอส เป็นต้น จากการศึกษาของ Singh and Walker (2006) ได้รวบรวมวิถีการย่อยสลายของสารคลอร์ไพริฟอสและสารไดโครโตสโดยจุลินทรีย์แสดงดังภาพที่ 4.17 และ 4.18 ซึ่งหากพิจารณาจากภาพทั้งสองพบว่าสารคลอร์ไพริฟอสสามารถถูกย่อยสลายครั้งแรก (primary degradation) ด้วยกระบวนการไฮโดรไลซิสได้เหมือนสารโทรฟิโนฟอส ในขณะที่สารไดโครโตฟอสต้องผ่านกระบวนการเมทิลเลชัน (methylation) เป็นสารโมโนโครโทฟอสก่อนกระบวนการไฮโดรไลซิส ดังนั้นการกำจัดสารไดโครโตฟอสจึงน้อยกว่าสารอื่น ๆ แต่อย่างไรก็ตามโดยภาพรวม PF1 PF2 และ PF3 สามารถกำจัดสารออร์แกนโนฟอสฟอรัสทั้งสามได้ดี ดังนั้นหากประยุกต์ใช้จุลินทรีย์นี้จริง คาดว่าจุลินทรีย์เหล่านี้จะสามารถทนทานต่อสภาวะที่มีสารปนเปื้อนร่วมได้ รวมทั้งยังอาจกำจัดสารปนเปื้อนร่วมบางชนิดได้ด้วย



ภาพที่ 4.17 วิธีการย่อยสลายของสารคลอไพริฟอสโดยจุลินทรีย์ (Singh and Walker, 2006)

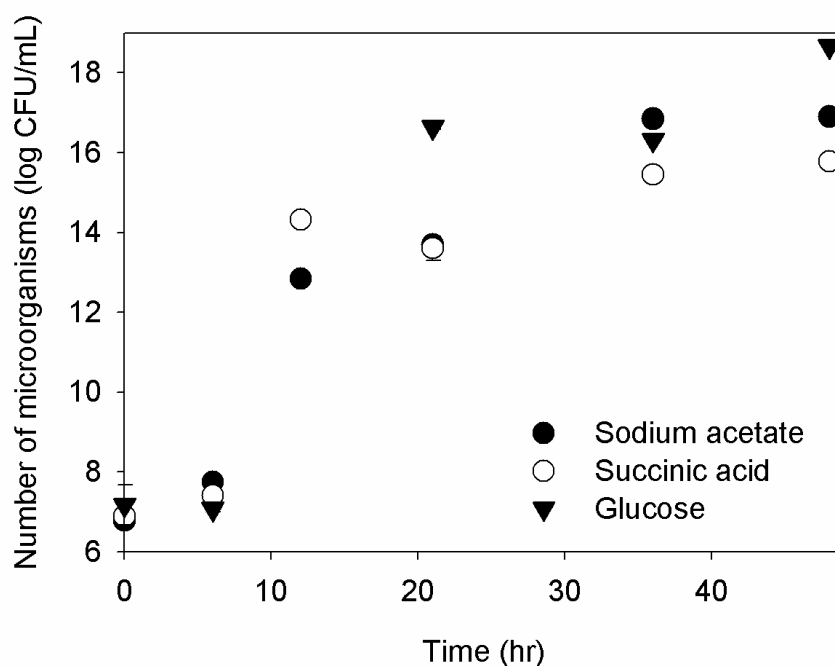


ภาพที่ 4.18 วิธีการย่อยสลายของสารไดโครโทฟอสโดยจุลินทรีย์ (Singh and Walker, 2006)

4.3 ผลการกระตุ้นการย่อยสลายสารโพรพีนอฟอสโดยใช้กระบวนการเมตาโบลิซึมร่วม

4.3.1 ผลการศึกษาแหล่งคาร์บอนร่วมที่ส่งเสริมกระบวนการเมตาโบลิซึมร่วม

การศึกษาในขั้นตอนนี้มุ่งเน้นเพื่อคัดเลือกสารที่เป็นแหล่งคาร์บอนร่วมที่เหมาะสมในการส่งเสริมการย่อยสลายสารโพรพีนอฟอสโดยกลุ่มจุลินทรีย์ที่คัดได้ ซึ่งสารที่เลือกในการศึกษาครั้งนี้เป็นสารที่มีการใช้ในกระบวนการเมตาโบลิซึมร่วมทั่วไป (Xie et al., 2008) ซึ่งได้แก่ กลูโคส (glucose, $C_6H_{12}O_6$) กรดซัคซินิค (succinic acid, $C_4H_4O_4Na_2 \cdot 6H_2O$) โซเดียมอะซิเตรท (sodium acetate, $C_2H_3O_2Na$) ในการทดลองควบคุมปริมาณคาร์บอนและสารโพรพีนอฟอส เท่ากับ 500 และ 20 mg/L ตามลำดับ ผลการเจริญเติบโตของกลุ่มจุลินทรีย์ การเปลี่ยนแปลงของค่าซีไอดี และการย่อยสลายสารโพรพีนอฟอสแสดงในภาพที่ 4.19 ถึง 4.21 (ข้อมูลดิบแสดงในภาคผนวก ข)



ภาพที่ 4.19 การเจริญเติบโตของกลุ่มจุลินทรีย์ในการย่อยสลายสารโพรพีนอฟอส ภายใต้สภาวะที่มีแหล่งคาร์บอนร่วมต่างชนิด

ผลการทดลองการเจริญเติบโตของกลุ่มจุลินทรีย์ทั้ง 3 ชุดทดลอง คือ ชุดทดลองที่มีการเติมกลูโคส กรดซัคซินิก และโซเดียมอะซิเตรท มีการเจริญเติบโตของกลุ่มจุลินทรีย์ในลักษณะคล้ายกันดังภาพที่ 4.1 (ข้อมูลดิบแสดงในภาคผนวก ข) กล่าวคือ กลุ่มจุลินทรีย์มีการเจริญเติบโตเพิ่มจำนวนเพิ่มขึ้นมากในช่วงชั่วโมงที่ 6 ถึงชั่วโมงที่ 20 จากนั้นจำนวนจุลินทรีย์จึงเริ่มคงที่ โดยภายหลังสิ้นสุดการทดลอง (48 ชั่วโมง) ชุดที่มีการเติมกลูโคสมีการเจริญของกลุ่มจุลินทรีย์สูงกว่า 10^{18} CFU/mL รองลงมาเป็นชุดที่เติมโซเดียมอะซิเตรทและชุดที่เติมกรดซัคซินิก เท่ากับ 10^{17} และ 10^{16} CFU/mL ตามลำดับ ซึ่งเมื่อพิจารณาจลนพลศาสตร์การเจริญเติบโตของกลุ่มจุลินทรีย์พบว่าการเจริญเติบโตเป็นไปตามปฏิกิริยาอันดับหนึ่งซึ่งมีค่าคงที่แสดงดังตารางที่ 4.8

ตารางที่ 4.8 จลนพลศาสตร์การเจริญเติบโตของกลุ่มจุลินทรีย์ในการย่อยสลายสารโพธิ์โนฟอส ภายใต้สภาวะที่มีแหล่งคาร์บอนร่วมต่างชนิด

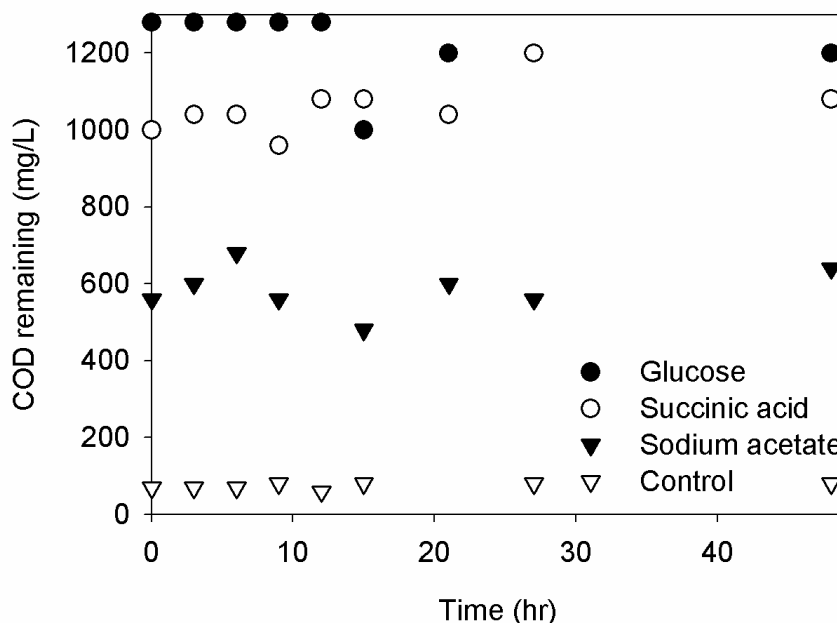
แหล่งคาร์บอนร่วม	สมการจลนพลศาสตร์การเจริญเติบโต	R^2	ค่าคงที่ (hr^{-1})
กลูโคส	$y = 0.51x + 6.09$	0.87	0.51
กรดซัคซินิก	$y = 0.62x + 5.82$	0.80	0.62
โซเดียมอะซิเตรท	$y = 0.49x + 5.92$	0.92	0.49

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

การเจริญเติบโตของกลุ่มจุลินทรีย์ในชุดที่มีการเติมแหล่งคาร์บอนต่าง ๆ มีค่าคงที่เท่ากับ $0.49\text{-}0.62 \text{ hr}^{-1}$ สูงกว่าการเจริญเติบโตในชุดควบคุมที่ไม่มีการเติมแหล่งคาร์บอนมาก (ซึ่งมีค่าคงที่เท่ากับ 0.02 hr^{-1}) ซึ่งผลดังกล่าวสอดคล้องกับงานวิจัยในอดีต (Jianlong et al., 2002; Grant and Betts; 2004; Xia et al., 2009) ที่มีการศึกษาเกี่ยวกับการเติมแหล่งคาร์บอนเพื่อเพิ่มการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ โดยผลการศึกษาพบว่าเมื่อมีการเติมแหล่งคาร์บอนจะส่งผลให้จุลินทรีย์มีการเจริญเติบโตมากขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับชุดที่ไม่มีการเติมแหล่งคาร์บอน นอกจากนี้ยังพบว่าในกรณีที่มีการเติมผลการเจริญเติบโตของกลุ่มจุลินทรีย์แตกต่างกันอย่างชัดเจนขึ้นกับโครงสร้างของแหล่งคาร์บอนแต่ละชนิด นอกจากนี้ยังขึ้นอยู่กับความจำเพาะของจุลินทรีย์ในการใช้แหล่งคาร์บอนนั้นเพื่อการเจริญเติบโต (Xie et al., 2009)

สำหรับผลการศึกษาค่าซีไอดีพบว่าค่าซีไอดีมีแนวโน้มคงที่ตลอดช่วงการทดลองดังภาพที่ 4.20 จากผลการทดลองจะเห็นว่าค่าซีไอดีเริ่มต้นในแต่ละชุดมีค่าไม่เท่ากัน แม้จะมีการควบคุมปริมาณคาร์บอนในองค์ประกอบของสารที่เติมลงไปแล้วก็ตาม ผลดังกล่าวชี้ให้เห็นอย่างชัดเจนว่าปริมาณ (มวล) ของคาร์บอนในชุดทดลองทุกชุดแม้จะควบคุมให้เท่ากันแต่การเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันระหว่างคาร์บอนดังกล่าวและสารเคมีในการวิเคราะห์ค่าซีไอดีต่างกัน ซึ่งอาจบ่งชี้ได้ว่าความเป็นไปได้ในการใช้ประโยชน์ทางชีวภาพ (bioavailability) ของสารคาร์บอนร่วมในการศึกษานี้ต่างกัน เมื่อประมวลผลดังกล่าวร่วมกับผลการเจริญเติบโตในการทดลองตอนที่ผ่านมามพบว่าปรากฏการณ์นี้ส่งผลให้กลุ่มจุลินทรีย์สามารถเจริญเติบโตได้ต่างกัน ดังผลการเจริญภาพที่ 4.19

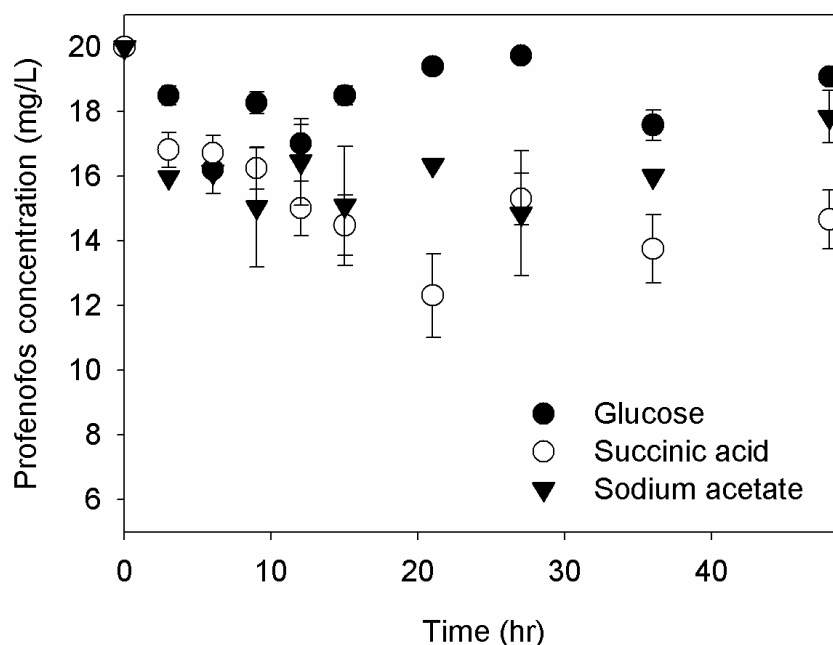
นอกจากนี้ยังพบว่าจากผลการวิเคราะห์ค่าซีโอดีในการทดลองนี้มีค่าลดลงเพียงเล็กน้อยแม้พบการเจริญเติบโตของกลุ่มจุลินทรีย์สูงมาก (ซึ่งบ่งชี้การใช้คาร์บอนปริมาณมากเช่นกัน) โดยทั่วไปหลักการวิเคราะห์ค่าซีโอดีเป็นการวิเคราะห์ปริมาณออกซิเจนที่เปลี่ยนแปลงเพื่อบ่งชี้การเกิดออกซิเดชันและปริมาณสารอินทรีย์ แต่เนื่องจากสารคาร์บอนที่ใช้ในการศึกษานี้มีโครงสร้างซับซ้อน การเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันอาจยังเกิดขึ้นได้ในสารมัธยันตร์ต่าง ๆ ส่งผลให้ค่าซีโอดีลดลงน้อยมาก ดังนั้นอาจกล่าวได้ว่าในการศึกษานี้ผลการวิเคราะห์ค่าซีโอดีเป็นเพียงการบ่งชี้ในเบื้องต้นเท่านั้นมีอาจสรุปผลได้อย่างชัดเจน



ภาพที่ 4.20 การเปลี่ยนแปลงของค่าซีโอดีในการย่อยสลายสารโพรพิโนฟอส ภายใต้สภาวะที่มีแหล่งคาร์บอนร่วมต่างชนิด

สำหรับผลการศึกษาปริมาณสารโพรพิโนฟอสแสดงดังภาพที่ 4.21 สารโพรพิโนฟอสลดลงอย่างรวดเร็วใน 10-20 ชั่วโมงแรกจากนั้นความเข้มข้นของสารโพรพิโนฟอสจึงเริ่มคงที่ โดยเมื่อสิ้นสุดการทดลอง (48 ชั่วโมง) ชุดที่มีการเติมกรดซัคซินิก และชุดที่เติมโซเดียมอะซิเตรท สามารถลดความเข้มข้นของสารได้ร้อยละ 30 ส่วนชุดที่มีการเติมกลูโคสสามารถลดสารโพรพิโนฟอสได้น้อยที่สุดคือ ร้อยละ 10 จากผลการทดลองดังกล่าวจะเห็นได้ว่าแหล่งคาร์บอนร่วมต่างชนิดมีผลต่อการย่อยสลายสารโพรพิโนฟอสอย่างชัดเจน ผลการทดลองดังกล่าวเป็นไปในทิศทางเดียวกับงานวิจัยในอดีตที่พบว่าแบคทีเรียหลายสายพันธุ์นิยมใช้กรดซัคซินิกและโซเดียมอะซิเตรทซึ่งเป็นสารประกอบของกรดไขมันสายสั้น (short-chain fatty acid) เป็นแหล่งคาร์บอนมากกว่ากลูโคสซึ่งเป็นคาร์โบไฮเดรตพื้นฐาน (simple carbohydrate) (Kim et al., 1997; Xia et al., 2009)

จลนพลศาสตร์การย่อยสลายสารโพรพิโนฟอสในชุดที่มีการเติมแหล่งคาร์บอนต่าง ๆ มีค่าคงที่ เท่ากับ $0.001-0.008 \text{ hr}^{-1}$ (ดังตารางที่ 4.9) ในขณะที่ในการทดลองที่ไม่มีการเติมแหล่งคาร์บอนรวมมีค่าคงที่ 0.006 hr^{-1} (ผลการทดลองในหัวข้อที่ผ่านมา) ซึ่งจากผลดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าแหล่งคาร์บอนรวมอาจช่วยสนับสนุนหรือยับยั้งการย่อยสลายสารโพรพิโนฟอสได้ ในกรณีของกลูโคสมีผลอย่างชัดเจนว่าการย่อยสลายสารซึ่งค่าคงที่จลนพลศาสตร์การย่อยสลายสารโพรพิโนฟอสซึ่งมีค่าลดลงถึง 6 เท่า ดังนั้นจากผลดังกล่าวนี้บ่งชี้ได้อย่างชัดเจนว่ากลูโคสส่งผลยับยั้งกระบวนการย่อยสลายสารโพรพิโนฟอส ส่วนกรดซักซินิกช่วยเร่งการย่อยสลายสารโพรพิโนฟอสได้ในขณะที่โซเดียมอะซิเตรทไม่ส่งผลใด ๆ อย่างชัดเจน ดังนั้นในการทดลองต่อ ๆ ไปจะได้มุ่งเน้นการศึกษาการย่อยสลายสารโพรพิโนฟอสโดยการเติมกรดซักซินิกร่วมเท่านั้น



ภาพที่ 4.21 การย่อยสลายสารโพรพิโนฟอสโดยกลุ่มจุลินทรีย์ภายใต้สภาวะที่มีแหล่งคาร์บอนร่วมต่างชนิด

ตารางที่ 4.9 จลนพลศาสตร์การกำจัดสารโพรพีนอฟอสของกลุ่มจุลินทรีย์ภายใต้
สภาวะที่มีแหล่งคาร์บอนร่วมต่างชนิด

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

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

4.3.2 ผลการศึกษาความสัมพันธ์ของความเข้มข้นของสารอาหารร่วมและ สารโพรพีนอฟอสในกระบวนการเมตาโบลิซึมร่วม

1) ผลการศึกษาอิทธิพลของความเข้มข้นแหล่งคาร์บอนร่วม

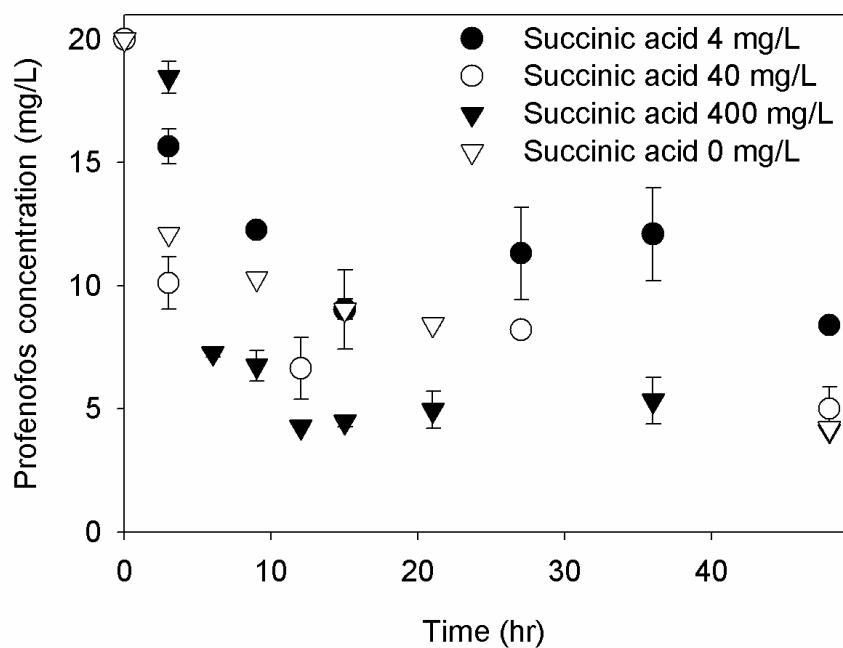
จากผลการศึกษาชนิดแหล่งคาร์บอนร่วมในหัวข้อที่ผ่านมาพบว่ากรดซัคซินิกมีประสิทธิภาพในการช่วยเพิ่มการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์และสนับสนุนการย่อยสลายสารโพรพีนอฟอสสูงที่สุด ดังนั้นจึงเลือกใช้กรดซัคซินิกเป็นแหล่งคาร์บอนร่วม แต่จากผลในหัวข้อที่ผ่านมาพบว่าการส่งเสริมการย่อยสลายสารโพรพีนอฟอสยังไม่สูงนักซึ่งอาจเกิดจากความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนร่วมยังไม่เหมาะสม การศึกษาในขั้นตอนนี้จึงมุ่งเน้นการศึกษาอิทธิพลความเข้มข้นของกรดซัคซินิกที่ใช้เป็นแหล่งคาร์บอน โดยศึกษาที่ความเข้มข้น 4 40 และ 400 mg-Carbon/L และมีสารโพรพีนอฟอสเริ่มต้น 20 mg/L เปรียบเทียบกับชุดทดลองที่ไม่ได้เติมกรดซัคซินิก ซึ่งผลการทดลองการเจริญเติบโตและการย่อยสลายเป็นไปตามภาพที่ 4.22 และ 4.23 (ข้อมูลดิบแสดงในภาคผนวก ข)

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

สำหรับการย่อยสลายสารโพรพีโนฟอสพบว่าสารโพรพีโนฟอสลดลงอย่างรวดเร็วใน 12 ชั่วโมงแรก จากนั้นจึงเริ่มคงที่ โดยพบว่าภายหลังสิ้นสุดการทดลอง (48 hr) ชุตทดลองที่มีการเติมแหล่งคาร์บอนร่วม 0 4 40 และ 400 mg-Carbon/L สามารถย่อยสลายสารโพรพีโนฟอสได้กว่าร้อยละ 80 อัตราการกำจัดสาร เท่ากับ 7.90-31.46 mg/L/d (ตารางที่ 4.11) ซึ่งเมื่อพิจารณาจลนพลศาสตร์การย่อยสลายสารโพรพีโนฟอสพบว่าการย่อยสลายเป็นไปตามปฏิกิริยาอันดับหนึ่ง โดยมีค่าคงที่ เท่ากับ 0.01-0.06 hr⁻¹ (ตารางที่ 4.11) โดยในชุตทดลองที่ให้ผลดีที่สุด (ชุตทดลองที่เติมแหล่งคาร์บอนร่วม 400 mg/L) การย่อยสลายมีค่าคงที่เพิ่มขึ้นถึง 6 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับชุตที่ไม่ได้เติมแหล่งคาร์บอนร่วม

ผลการศึกษาชี้ให้เห็นอย่างชัดเจนว่าเมื่อเติมแหล่งคาร์บอนร่วมส่งเสริมให้การย่อยสลายเร็วขึ้นอย่างชัดเจน โดยเมื่อความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนร่วมเพิ่มมาการย่อยสลายสารโพรพีโนฟอสยิ่งเพิ่มขึ้น แต่อย่างไรก็ตามเมื่อเปรียบเทียบผลการศึกษาในหัวข้อที่ผ่านมาซึ่งเติมกรดซัคซินิก 500 mg-Carbon/L พบว่าค่าคงที่จลนพลศาสตร์การย่อยสลายสารโพรพีโนฟอสลดลงเหลือเพียง 0.008 hr⁻¹ จากผลทั้งสองส่วนสามารถวิเคราะห์ได้ว่าแหล่งคาร์บอนร่วมส่งเสริมการย่อยสลายสารโพรพีโนฟอสได้แต่หากมีแหล่งคาร์บอนร่วมปริมาณมากเกินไปอาจเกิดการยับยั้งการย่อยสลายสารโพรพีโนฟอสได้ เนื่องจากเกิดการแข่งขันระหว่างสารโพรพีโนฟอสและกรดซัคซินิกเพื่อเป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับกลุ่มจุลินทรีย์ ผลการศึกษานี้เป็นเรื่องทั่วไปพบในการศึกษาที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายสารแปลกปลอม (xenobiotics) ในกรณีที่มีสารคาร์บอนอื่นร่วมเช่นกัน (Parekh et al., 1994; Singh et al, 2004) ดังเช่นตัวอย่างจากงานวิจัยของ Singh et al. (2004) ในการศึกษาการย่อยสลายสารคลอร์ไพริฟอสโดย *Enterobacter* Strain B-14 พบว่าในสถานะที่มีแหล่งคาร์บอนร่วมจุลินทรีย์ดังกล่าวไม่สามารถย่อยสลายสารคลอร์ไพริฟอสได้ และจุลินทรีย์สามารถย่อยสลายสารคลอร์ไพริฟอสได้อีกครั้งเมื่อแหล่งคาร์บอนร่วมเริ่มหมดลง

สำหรับกลไกของกระบวนการเมตาโบลิซึมร่วม (co-metabolism) สารอาหารที่ใช้ในการเจริญเติบโต (growth substrate) อาจส่งผลต่อกระบวนการเมตาโบลิซึมได้ 2 ลักษณะ ลักษณะแรก คือ สารดังกล่าวช่วยเร่งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์และส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนรูป (transformation) ของสารอาหารที่ไม่ช่วยในการเจริญเติบโต (non-growth substrate) (Grant and Betts, 2004; Xie et al, 2009) หรือในอีกลักษณะ คือ สารอาหารร่วมอาจเหนี่ยวนำกระบวนการเมตาโบลิซึมของสารแปลกปลอม (Girbal and Betts, 2000) ผลจากการศึกษานี้พบว่าสารโพรพีโนฟอสแม้เป็นสารแปลกปลอมแต่ก็เป็นสารอาหารที่ใช้ในการเจริญเติบโตได้ เป็นเหตุให้พบว่าการเติมแหล่งคาร์บอนร่วม (กรดซัคซินิก) ส่งผลให้กลุ่มจุลินทรีย์เจริญเติบโตเพิ่มมากขึ้นเพียงเล็กน้อย ดังนั้นจึงอาจกล่าวได้ว่าในกรณีนี้คาดว่าแหล่งคาร์บอนร่วมเหนี่ยวนำกระบวนการเมตาโบลิซึมของสารโพรพีโนฟอสด้วยกลุ่มจุลินทรีย์ แต่อย่างไรก็ตามผลการศึกษานี้ยังมีอาจจะบ่งชี้ว่าเหนี่ยวนำวิธีการย่อยสลายสารโพรพีโนฟอสอย่างชัดเจนได้ ในอนาคตควรมีการศึกษาในประเด็นนี้เพื่อให้ทราบความเป็นไป (fate) ของสารในสิ่งแวดล้อมอันจะเป็นประโยชน์ต่อการประยุกต์ใช้ในการฟื้นฟูพื้นที่ปนเปื้อนต่อไป



ภาพที่ 4.23 การย่อยสลายสารโพรฟีนอฟูสของกลุ่มจุลินทรีย์ใน
ภายใต้สภาวะที่มีแหล่งคาร์บอนร่วมต่างเข้มข้น

ตารางที่ 4.11 จลนพลศาสตร์และอัตราการกำจัดสารโพรฟีนอฟูสของกลุ่มจุลินทรีย์ภายใต้
สภาวะที่มีแหล่งคาร์บอนร่วมต่างเข้มข้น

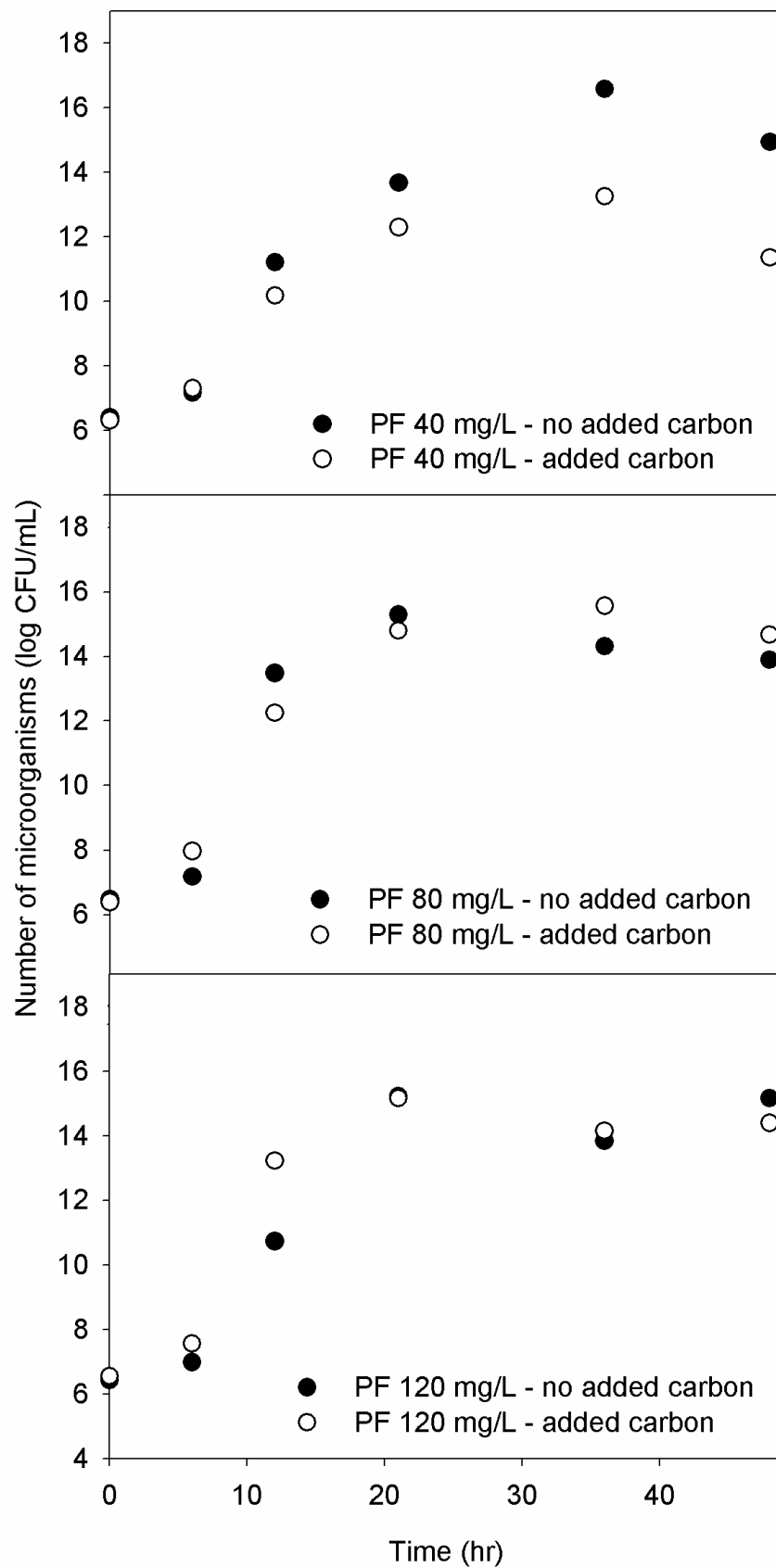
ความเข้มข้นแหล่ง คาร์บอนร่วม (mg-Carbon/L)	สมการจลนพลศาสตร์ การย่อยสลายสาร	R^2	ค่าคงที่ (hr^{-1})	อัตราการกำจัดสาร (mg/L/d)
4	$y = -0.02x + 1.28$	0.99	0.02	17.56
40	$y = -0.04x + 1.22$	0.84	0.04	26.71
400	$y = -0.06x + 1.33$	0.92	0.06	31.46
0	$y = -0.01x + 1.18$	0.90	0.01	7.90

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

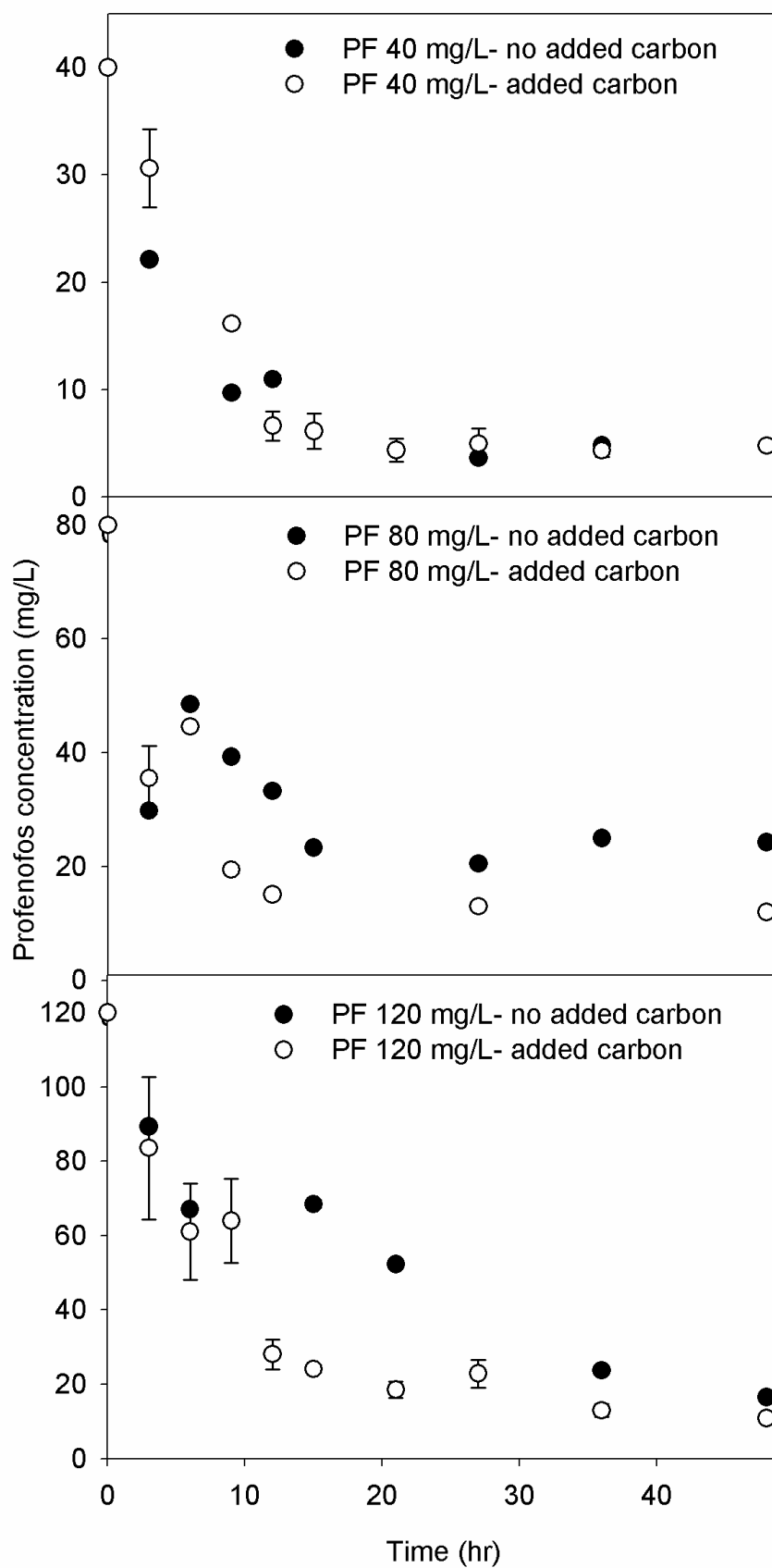
2) ผลการศึกษาอิทธิพลของความเข้มข้นสารโพรพิโนฟอส

จากผลการศึกษาอิทธิพลความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนร่วมในหัวข้อที่ผ่านมาพบว่ากรดซัคซินิกที่ความเข้มข้น 400 mg-Carbon/L มีประสิทธิภาพในการช่วยสนับสนุนการย่อยสลายสารโพรพิโนฟอสดีที่สุด ดังนั้นจึงเลือกใช้กรดซัคซินิกที่ความเข้มข้นดังกล่าวเป็นแหล่งคาร์บอนร่วม สำหรับการศึกษาในขั้นตอนนี้มุ่งเน้นการศึกษาอิทธิพลความเข้มข้นของสารโพรพิโนฟอสเริ่มต้น (40 80 และ 120 mg/L) เปรียบเทียบระหว่างชุดทดลองที่เติมและไม่ได้เติมแหล่งคาร์บอนร่วม ผลการทดลองการเจริญเติบโตและการย่อยสลายเป็นไปดังภาพที่ 4.24 และ 4.25 (ข้อมูลดิบแสดงในภาคผนวก ข)

ผลการทดลองพบว่ากลุ่มจุลินทรีย์จากชุดการทดลองที่มีสารโพรพิโนฟอสความเข้มข้นต่าง ๆ มีการเจริญเติบโตในลักษณะเดียวกัน กล่าวคือ กลุ่มจุลินทรีย์เพิ่มจำนวนขึ้นมากในช่วง 21 ชั่วโมงแรก จากนั้นการเจริญเติบโตจึงเริ่มคงที่ เมื่อสิ้นสุดการทดลอง (48 ชั่วโมง) พบว่ากลุ่มจุลินทรีย์เพิ่มจำนวนจากประมาณ 6 เป็น 16 logCFU/mL ค่าคงที่จลนพลศาสตร์การเจริญเติบโตเท่ากับ 0.30-0.47 hr⁻¹ (ตารางที่ 4.12) จากผลดังกล่าวนี้สามารถสังเกตได้ว่าการเติมคาร์บอนร่วมมิได้ส่งผลต่อการเจริญเติบโต ส่วนความเข้มข้นของสารโพรพิโนฟอสส่งผลต่อการเจริญเติบโตบ้างแต่ไม่ชัดเจนนักเช่นกัน นอกจากนี้ยังพบว่าแม้สารโพรพิโนฟอสเป็นสารปลอมปนพิษ (toxic xenobiotics) แต่ถึงแม้ความเข้มข้นเริ่มต้นเพิ่มขึ้นสูงถึง 120 mg/L กลุ่มจุลินทรีย์ยังคงมีอัตราการเจริญเติบโตสูงเหมือนชุดทดลองอื่น ๆ ซึ่งผลดังกล่าวนี้คาดว่าเกิดจากกลุ่มจุลินทรีย์นี้ได้รับการปรับสภาพในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีสารโพรพิโนฟอส



ภาพที่ 4.24 การเจริญเติบโตของกลุ่มจุลินทรีย์ในการย่อยสลายสารโพรพิโนฟอส ภายใต้สภาวะที่มีสารโพรพิโนฟอสต่างเข้มข้น



ภาพที่ 4.25 การย่อยสลายสารโพรฟีนอพอของกลุ่จุลินทรีย์ใน
ภายใต้สภาวะที่มีสารโพรฟีนอพอต่างเข้มข้น

สำหรับการย่อยสลายสารโพรพีโนฟอสพบว่าสารโพรพีโนฟอสลดลงอย่างรวดเร็ว ในระยะเวลาต่างจากนั้นจึงเริ่มคงที่ (ภาพที่ 4.25) โดยที่ความเข้มข้นของสารโพรพีโนฟอสสูงกลุ่ม จุลินทรีย์ย่อยสลายสารจนถึงจุดเสถียรช้ากว่าที่ความเข้มข้นต่ำ พบว่าภายหลังสิ้นสุดการทดลอง (48 hr) กลุ่มจุลินทรีย์จากชุดทดลองต่าง ๆ สามารถย่อยสลายสารโพรพีโนฟอสได้ระหว่างร้อยละ 85-91 อัตราการกำจัดสาร เท่ากับ 31-55 mg/L/d (ตารางที่ 4.13) ซึ่งเมื่อพิจารณาจลนพลศาสตร์การย่อยสลายสารโพรพีโนฟอสพบว่าการย่อยสลายเป็นไปตามปฏิกิริยาอันดับหนึ่ง โดยมีค่าคงที่ เท่ากับ $0.02-0.06 \text{ hr}^{-1}$ (ตารางที่ 4.13)

ผลการศึกษาชี้ให้เห็นว่าชุดทดลองที่มีความเข้มข้นของสารโพรพีโนฟอสเริ่มต้นต่างกันเมื่อเติมแหล่งคาร์บอนร่วมมีผลต่อการย่อยสลายสารโพรพีโนฟอสต่างกัน โดยเมื่อความเข้มข้นสารโพรพีโนฟอสสูง (40 80 และ 120 mg/L) แนวโน้มของการย่อยสลายสารในชุดทดลองที่มีการเติมและไม่เติมแหล่งคาร์บอนร่วมใกล้เคียงกันมาก(ทั้งจลนพลศาสตร์การย่อยสลายและอัตราการกำจัดสารโพรพีโนฟอส) ผลการทดลองในส่วนนี้ขัดแย้งกับผลการทดลองที่ความเข้มข้นเริ่มต้นของสารโพรพีโนฟอส 20 mg/L ซึ่งแสดงไว้ในหัวข้อที่ผ่านมา กล่าวคือ สำหรับผลการทดลองที่ผ่านมาชุดทดลองที่มีการเติมแหล่งคาร์บอนร่วมมีค่าจลนพลศาสตร์การย่อยสลายและอัตราการกำจัดสารโพรพีโนฟอสสูงกว่าชุดทดลองที่ไม่ได้เติมแหล่งคาร์บอนร่วมอย่างชัดเจน ผลขัดแย้งดังกล่าวคาดว่าเกิดจากสารโพรพีโนฟอสซึ่งเป็นสารอาหารที่ช่วยในการเจริญเติบโตเช่นกันมีปริมาณเพิ่มมากขึ้นเป็นเหตุให้มีการย่อยสลายเพิ่มสูงตาม เนื่องจากการย่อยสลายนี้เป็นไปตามปฏิกิริยาอันดับหนึ่งซึ่งการย่อยสลายขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของสารเริ่มต้น ดังนั้นอิทธิพลของสารอาหารร่วมจึงส่งผลได้ไม่ชัดเจนนัก

นอกจากนี้ยังพบว่าเมื่อพิจารณาเปรียบเทียบระหว่างผลการศึกษาจากชุดการทดลองที่มีความเข้มข้นของสารโพรพีโนฟอส 120 mg/L กับชุดทดลองที่มีความเข้มข้นอื่น ๆ พบว่าการย่อยสลายสารโพรพีโนฟอสลดลงอย่างชัดเจน (ตารางที่ 4.13) ซึ่งผลดังกล่าวนี้นี้เมื่อพิจารณาจลนพลศาสตร์ของเอนไซม์ตามหลักของ Michaelis and Menten อาจจะบ่งชี้ได้ว่าในสภาวะที่สารโพรพีโนฟอสมีความเข้มข้นสูงเกิดปรากฏการณ์การยับยั้งด้วยสารอาหารเอง (substrate inhibition) (ภาพที่ 4.26) กล่าวคือ เมื่อความเข้มข้นของสารอาหาร ซึ่งหมายถึงสารโพรพีโนฟอสมีความเข้มข้นสูงมากขึ้นพบว่าอัตราการย่อยสลายกลับลดลงชัดเจน โดยผลในภาพดังกล่าวยังพบว่าในสภาวะที่มีแหล่งคาร์บอนร่วมอิทธิพลของปรากฏการณ์การยับยั้งดังกล่าวลดลง ดังนั้นจึงอาจกล่าวได้ว่าแม้แหล่งคาร์บอนร่วมมิได้สนับสนุนกระบวนการเมตาโบลิซึมร่วมอย่างชัดเจนนัก แต่สารดังกล่าวสามารถลดผลการยับยั้งการย่อยสลายสารโพรพีโนฟอสได้

ตารางที่ 4.12 จลนพลศาสตร์การเจริญเติบโตของกลุ่มจุลินทรีย์ในการย่อยสลายสารโพธิ์โนฟอส ภายใต้สภาวะที่มีสารโพธิ์โนฟอสต่างความเข้มข้น

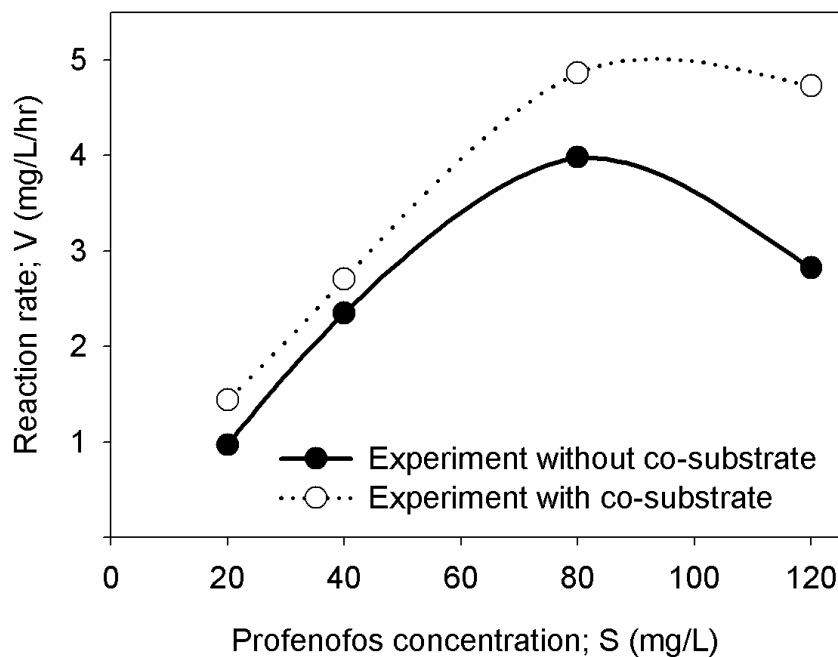
ความเข้มข้นสารโพธิ์โนฟอส (mg/L)	การเติมแหล่งคาร์บอนร่วม	สมการจลนพลศาสตร์การเจริญเติบโต	R^2	ค่าคงที่ (hr^{-1})
40	ไม่เติม	$y = 0.30x + 6.54$	0.95	0.30
40	เติม	$y = 0.30x + 6.10$	0.97	0.30
80	ไม่เติม	$y = 0.47x + 6.06$	0.89	0.47
80	เติม	$y = 0.42x + 6.22$	0.96	0.42
120	ไม่เติม	$y = 0.44x + 5.52$	0.95	0.44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

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

ตารางที่ 4.13 จลนพลศาสตร์และอัตราการกำจัดสารโพธิ์โนฟอสของกลุ่มจุลินทรีย์ภายใต้สภาวะที่มีแหล่งสารโพธิ์โนฟอสต่างความเข้มข้น

ความเข้มข้นสารโพธิ์โนฟอส (mg/L)	การเติมแหล่งคาร์บอนร่วม	สมการจลนพลศาสตร์การย่อยสลายสาร	R^2	ค่าคงที่ (hr^{-1})	อัตราการกำจัดสาร (mg/L/d)
40	ไม่เติม	$y = -0.05x + 1.54$	0.89	0.05	32.33
40	เติม	$y = -0.05x + 1.59$	0.94	0.05	31.15
80	ไม่เติม	$y = -0.04x + 1.90$	0.99	0.04	27.88
80	เติม	$y = -0.06x + 1.86$	0.88	0.06	34.03
120	ไม่เติม	$y = -0.01x + 2.02$	0.92	0.02	51.74
120	เติม	$y = -0.02x + 1.89$	0.83	0.02	54.53

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



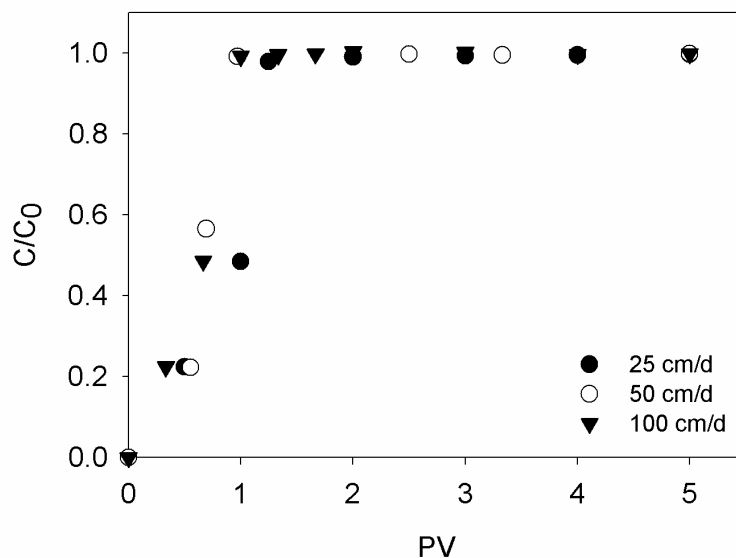
ภาพที่ 4.26 จลนพลศาสตร์การย่อยสลายสารโพรฟิโนฟอสตามหลักของ Michaelis and Menten

4.4 ผลการสาธิตการฟื้นฟูน้ำใต้ดินที่ปนเปื้อนสารโพรฟิโนฟอสตามหลักการเติมเซลล์ที่ถูกกระตุ้น

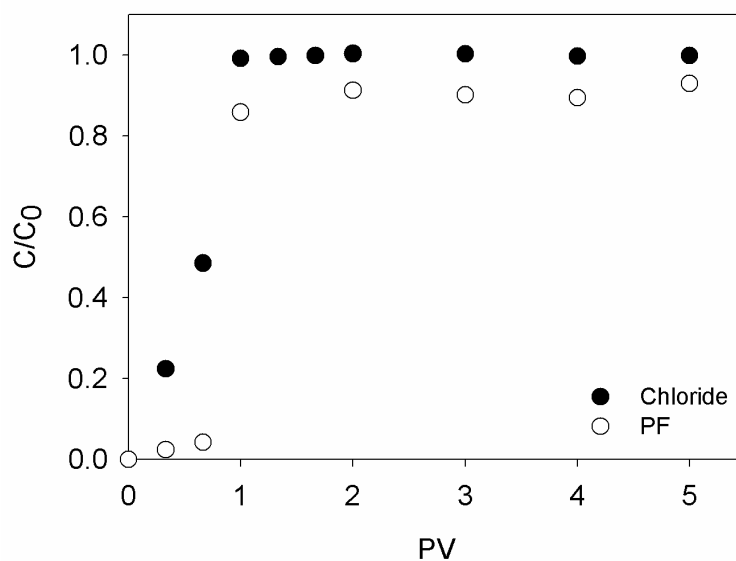
ผลการสาธิตระบบเพื่อประยุกต์ใช้ในการฟื้นฟูน้ำใต้ดินที่ปนเปื้อนสารโพรฟิโนฟอส ในสภาวะที่อัตราการซึมผ่านของน้ำต่างกัน คือ 25 50 และ 100 เซนติเมตรต่อวัน การทดลองศึกษาที่ความเข้มข้นของสารโพรฟิโนฟอส 20 และ 40 มิลลิกรัมต่อลิตร และ แหล่งคาร์บอนร่วม คือ กรดซัคซินิก 400 มิลลิกรัมต่อลิตร (เลือกใช้กรดซัคซินิกตามผลการศึกษาในหัวข้อที่ผ่านมา) โดยได้เติมกลุ่มจุลินทรีย์ 10^5 และ 10^{15} CFU/mL เพื่อศึกษาประสิทธิภาพในการกำจัดสารโพรฟิโนฟอสในลักษณะการจำลองสภาพน้ำใต้ดิน ผลการศึกษากการเคลื่อนที่ของน้ำใต้ดินและสารโพรฟิโนฟอส และผลการศึกษาอิทธิพลของอัตราการซึมผ่านของน้ำใต้ดินและความเข้มข้นของสารโพรฟิโนฟอสมีรายละเอียดแสดงดังต่อไปนี้

4.4.1 ผลการศึกษาการเคลื่อนที่ของน้ำใต้ดินและสารโพธิ์โนฟอสในแบบจำลอง

การทดลองเบรคทรูทเซอร์เซอร์ (tracer breakthrough test) มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการเคลื่อนที่ของน้ำใต้ดินและสารโพธิ์โนฟอสในแบบจำลองคอลัมน์ทราย การทดลองกระทำโดยการติดตามปริมาณประจุคลอไรด์ (ในรูปค่าความนำไฟฟ้า (electrical conductivity)) ซึ่งเป็นตัวแทนน้ำใต้ดินและสารโพธิ์โนฟอส ผลการทดลองพบว่าค่า C/C_0 (C คือ ความเข้มข้นคลอไรด์หรือสารโพธิ์โนฟอส ณ เวลาใด ๆ และ C_0 คือ ความเข้มข้นคลอไรด์หรือโพธิ์โนฟอสที่เวลาเริ่มต้น) เป็นดังภาพที่ 4.27 และ 4.28 (ข้อมูลดิบแสดงในภาคผนวก ข)



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



ภาพที่ 4.28 การเคลื่อนที่ของคลอไรด์และสารโพธิ์โนฟอส ณ อัตราการซึมผ่าน 100 cm/d

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

สำหรับการศึกษาจากภาพที่ 4.28 ซึ่งเป็นผลการเคลื่อนที่ของสารโพรฟิโนฟอสเปรียบเทียบกับคลอไรด์ ณ อัตราการซึมผ่าน 100 cm/d ผลการทดลองพบว่าในช่วง 1 PV แรก ทั้งคลอไรด์และโพรฟิโนฟอสเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว แต่พบว่าสารโพรฟิโนฟอสมีค่าเพิ่มขึ้นช้ากว่าคลอไรด์ ผลการทดลองนี้บ่งชี้ได้ว่าสารโพรฟิโนฟอสซึ่งเป็นตัวถูกละลาย (solute) มีอิทธิพลของการแพร่กระจาย (dispersion) และ/หรือ การฟุ้งกระจาย (diffusion) ส่งผลให้สารเคลื่อนที่ช้ากว่าน้ำ (คลอไรด์) เพียงเล็กน้อย

เมื่อพิจารณาค่าปัจจัยความหน่วง (retardation factor; R_f) ของสารโพรฟิโนฟอสในแบบจำลองคอลัมน์นี้ตามสมการที่ 4.1 พบว่าค่า R_f เท่ากับ 1.18 ($PV_{\text{profenofos}} = 0.68$ และ $PV_{\text{chloride}} = 0.80$) ดังนั้นสามารถกล่าวได้ว่าไม่พบการดูดซับของสารโพรฟิโนฟอสในชุดแบบจำลองนี้อย่างชัดเจน ซึ่งลักษณะดังกล่าวนี้เกิดจากการศึกษาที่ทดลองโดยใช้ทรายที่ผ่านการเตรียมด้วยการล้างและเผาเพื่อกำจัดสารอินทรีย์ติดค้างเป็นผลให้ทรายดังกล่าวไม่มีความสามารถในการดูดซับ ผลในลักษณะนี้เกิดขึ้นในการศึกษาในอดีตที่มีการทดลองเบรคทวร์จเทอร์เซอร์ของสารกำจัดศัตรูพืชอาทราซีนเช่นกัน (Siripattanakul et al., 2009)

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

นอกจากนี้ยังพบว่าการทดลองตั้งแต่ช่วง 1 PV สารทั้งสองเริ่มคงที่ โดยเมื่อสิ้นสุดการทดลองคลอไรด์และสารโพรฟิโนฟอสมี $C/C_0 = 1.0$ และ 0.9 ตามลำดับ ผลดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าการย่อยสลายสารโพรฟิโนฟอสตามธรรมชาติในแบบจำลองบ้างเล็กน้อย ซึ่งอาจเกิดมาจากการย่อยสลายด้วยแสง (photodegradation) หรือไฮโดรไลซิส (hydrolysis) โดยภาพรวมสามารถระบุได้ว่าชุดแบบจำลองคอลัมน์นี้ได้รับอิทธิพลการดูดซับและการย่อยสลายสารตามธรรมชาติเพียงเล็กน้อย การศึกษาในอดีต (Siripattanakul et al., 2009) และการศึกษานี้มุ่งเน้นการศึกษาผลของการย่อยสลายสารกำจัดศัตรูพืชทางชีวภาพดังนั้นปัจจัยแวดล้อมอื่น ๆ เช่น ลักษณะของชุดแบบจำลอง การดูดซับสารในตัวกลาง (medium) การย่อยสลายในธรรมชาติ เป็นต้น จำเป็นต้องควบคุมให้เกิดขึ้นน้อยที่สุด ซึ่งผลการทดลองนี้ต่อนี้ชี้ชัดว่าแบบจำลองที่ใช้ในการศึกษานี้เหมาะสมตามวัตถุประสงค์ข้างต้น

4.4.2 ผลการศึกษาอิทธิพลของอัตราการซึมผ่านของน้ำใต้ดินและความเข้มข้นของสารโพรพีโนฟอส

ผลการสาธิตระบบที่สภาวะที่อัตราการซึมผ่านของน้ำต่างกัน คือ 25 50 และ 100 cm/d ชุดทดลองที่มีความเข้มข้นเริ่มต้นของสารโพรพีโนฟอส เท่ากับ 20 mg/L และแหล่งคาร์บอนรวม 400 mg-carbon/L มีผลเป็นดังภาพที่ 4.29 (ข้อมูลดิบแสดงในภาคผนวก ข) จากผลการทดลองทั้งหมดในส่วนนี้พบว่าตรวจติดตามไม่พบสารโพรพีโนฟอสเลย (ค่าจำกัดการตรวจพบ (detection limit) เท่ากับ 4 mg/L) ผลลักษณะนี้บ่งชี้ได้ว่าแบบจำลองคอลัมน์ที่มีการเติมเซลล์มีอุปกรณ์ด้วยการเติมแหล่งคาร์บอนรวมมีประสิทธิภาพสูงมาก ส่งผลให้สารโพรพีโนฟอสถูกย่อยสลายทั้งหมดตลอดช่วงการทดลอง ผลการทดลองในส่วนนี้สอดคล้องกับผลการทดลองแบบกะในหัวข้อที่ผ่านมา กล่าวคือ ในการเติมเซลล์และสารอาหารรวมในปริมาณที่เหมาะสมส่งผลให้การย่อยสลายสารโพรพีโนฟอสสูงมาก ประสิทธิภาพการย่อยสลายสารโพรพีโนฟอสในแบบจำลองคอลัมน์แสดงไว้ในตารางที่ 4.14

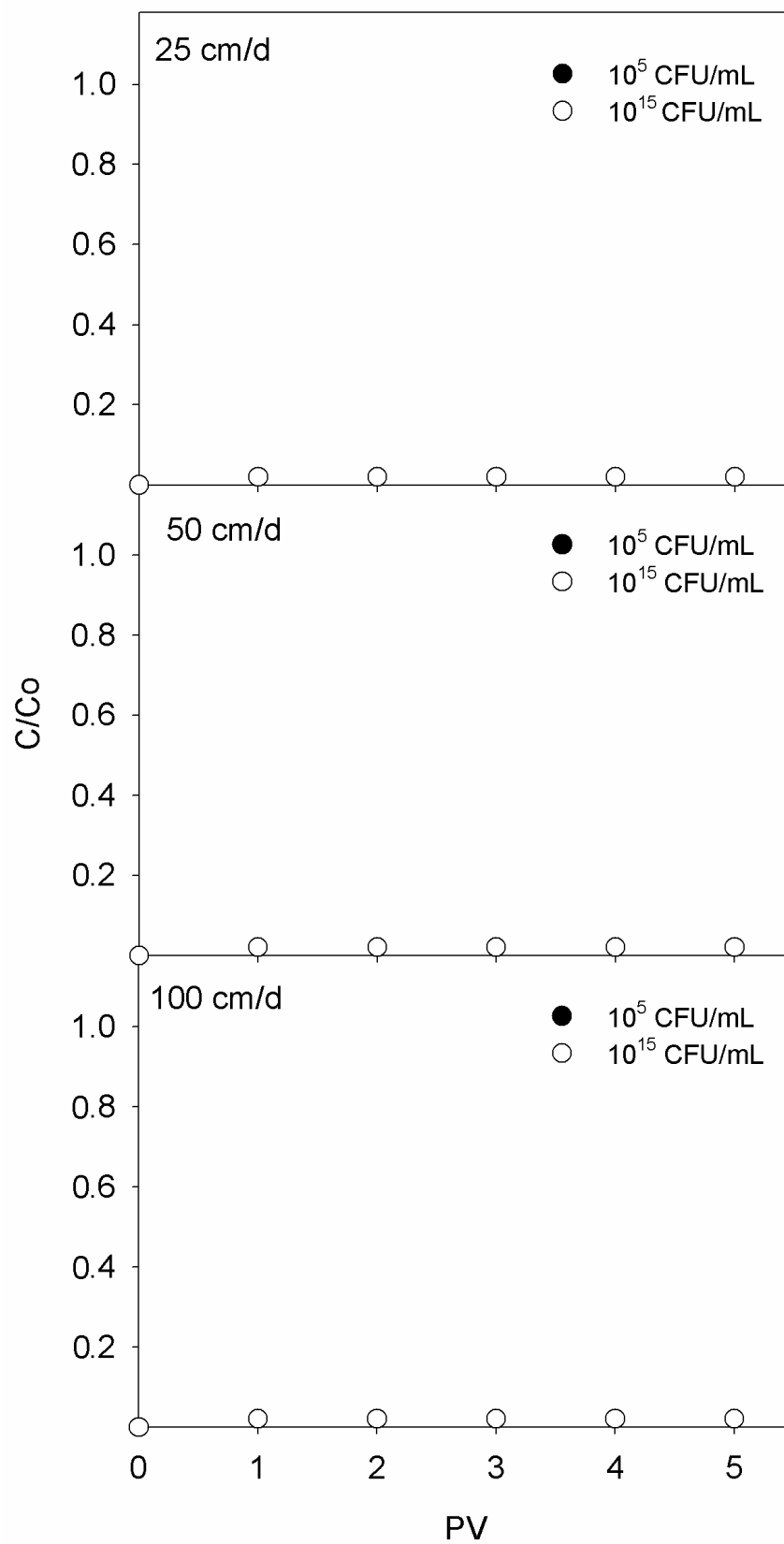
ส่วนผลการศึกษาชุดทดลองที่มีความเข้มข้นเริ่มต้นของสารโพรพีโนฟอส เท่ากับ 40 mg/L และแหล่งคาร์บอนรวม 400 mg-carbon/L มีผลเป็นดังภาพที่ 4.30 (ข้อมูลดิบแสดงในภาคผนวก ข) ซึ่งผลการทดลองพบว่าในกรณีที่เติมกลุ่มจุลินทรีย์ 10^5 CFU/mL ที่อัตราการซึมผ่านของน้ำต่าง ๆ ค่า C/C_0 มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเมื่อผ่านไป 1 PV จากนั้นลดลงเล็กน้อยและเริ่มคงที่จนสิ้นสุดการทดลอง 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 โดยสามารถย่อยสลายสารโพรพีโนฟอสได้กว่าร้อยละ 90 ความสามารถในการย่อยสลายลดลงเมื่อเพิ่มอัตราการซึมผ่านของน้ำ โดยความสามารถในการย่อยสลายสารที่อัตราการซึมผ่าน 50 และ 100 cm/d เท่ากับร้อยละ 80 และร้อยละ 30 ตามลำดับ ดังตารางที่ 4.14

จากผลการทดลองในภาพที่ 4.30 พบว่าชุดทดลองทุกชุดในช่วง 1-2 PV แรก ตรวจพบสารโพรพีโนฟอสสูงกว่าช่วงถัดไป (3-5 PV) เล็กน้อยอาจเนื่องมาจากในระยะที่เริ่มทดลองเซลล์ยังมีปริมาณน้อย แต่เมื่อเวลาผ่านไปเซลล์เจริญเติบโตเต็มที่ดังนั้นปริมาณสารโพรพีโนฟอสที่ตรวจพบจึงลดลง การทดลองขั้นตอนนี้มิได้วิเคราะห์การเจริญเติบโตของเซลล์ในแบบจำลองเนื่องจากข้อจำกัดของชุดทดลอง แต่ผลการทดลองหัวข้อก่อนหน้านี้สนับสนุนผลการทดลองนี้ กล่าวคือ ในการทดลองแบบกะพบว่าจากเซลล์จุลินทรีย์เริ่มต้น 10^6 CFU/mL เจริญเติบโตเป็น 10^{11} CFU/mL ในเวลา 12 ชั่วโมง (ภาพที่ 4.24) ซึ่งสามารถบ่งชี้ได้ว่าเซลล์เพิ่มมากถึง 10^5 CFU/mL หากพิจารณาชุดทดลองที่อัตราการซึมผ่าน 25 cm/d และคำนวณกลับเป็นเวลาก็ก็น่าจะคิดเป็น 12 hr/PV ดังนั้นภายหลังจากการทดลอง 1 PV คาดว่าเซลล์จุลินทรีย์เพิ่มสูงขึ้นมากนี้มีส่วนสำคัญในการย่อยสลายสารโพรพีโนฟอสซึ่งในระยะเวลา หรือ PV ต่อ ๆ มาเซลล์จุลินทรีย์เข้าสู่สภาวะคงตัว (stationary phase) (ดังภาพที่ 4.24) ส่งผลให้ประสิทธิภาพการย่อยสลายคงตัวด้วยเช่นกัน ส่วนในชุดทดลองที่อัตราการซึมผ่าน 50 และ 100 cm/d ซึ่งคาดว่ามีความเข้มข้นที่เพิ่มสูงขึ้นเช่นกันจึงให้ผลในลักษณะคล้ายกัน

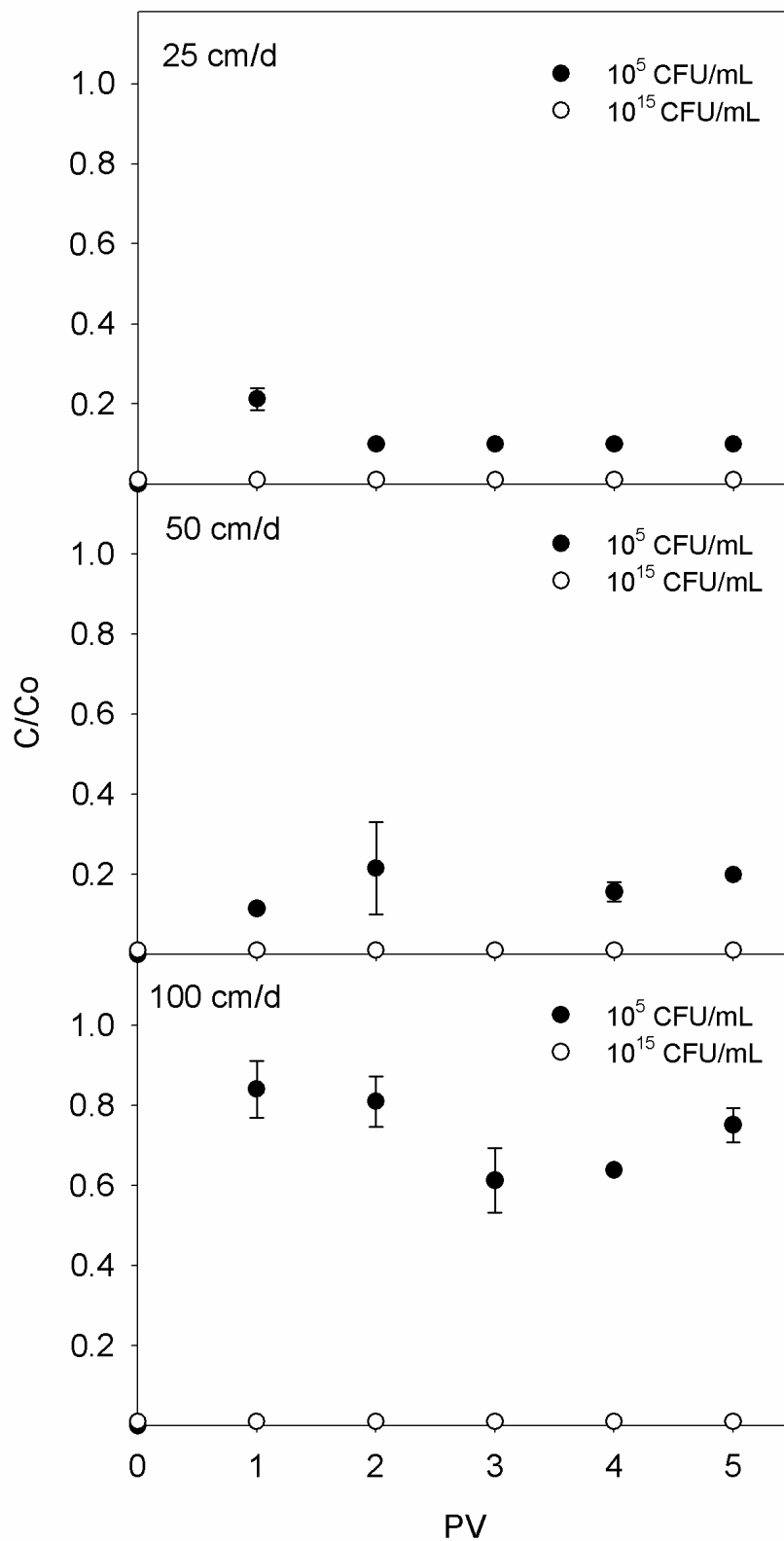
สำหรับผลการสาธิตระบบที่มีความเข้มข้นเริ่มต้นของสารโพรพีโนฟอส เท่ากับ 40 mg/L และแหล่งคาร์บอนรวม 400 mg-carbon/L ในกรณีที่เติมกลุ่มจุลินทรีย์ 10^{15} CFU/mL มีผล

เป็นดังภาพที่ 4.30 ผลการทดลองในส่วนนี้พบว่าตรวจติดตามไม่พบสารโพรพิโนฟอสเลย ผลลักษณะนี้บ่งชี้ได้ว่าแบบจำลองคอลัมน์ที่มีการเติมเซลล์มีภูมิต้านทานในปริมาณสูงมีประสิทธิภาพสูงมากขึ้น

แนวโน้มของผลการทดลองนี้ชี้ให้เห็นว่า การทดลองที่อัตราการซึมผ่านและปริมาณจุลินทรีย์เป็นปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการย่อยสลายสารโพรพิโนฟอส ซึ่งปัจจัยดังกล่าวเป็นปัจจัยที่พบในงานวิจัยในอดีตเช่นกัน (Siripattanakul et al., 2009) ระบบที่มีการเติมเซลล์และกระตุ้นด้วยกระบวนการเมตาโบลิซึมร่วมกันมีประสิทธิภาพในการกำจัดสารโพรพิโนฟอสสูง แต่อย่างไรก็ตามในกรณีที่ประยุกต์ใช้ในการฟื้นฟูน้ำใต้ดินที่ปนเปื้อนในพื้นที่ที่มีอัตราการซึมของน้ำสูง (เวลากักน้ำต่ำ) ซึ่งอาจเกิดจากมีปริมาณน้ำฝนมากหรือลักษณะดินมีสภาพการนำน้ำ (hydraulic conductivity) สูงอาจต้องมีการเติมเซลล์จุลินทรีย์ปริมาณเพิ่มสูงขึ้น นอกจากนี้ในการประยุกต์ใช้จริงควรมีการศึกษาอิทธิพลของปัจจัยแวดล้อมชีวภาพ (biotic) และไม่ใช่ชีวภาพ (abiotic) ด้วย เช่น อิทธิพลของจุลินทรีย์ในพื้นที่ (indigenous microorganisms) อิทธิพลของสมบัติดิน (อาทิ ค่าพีเอชของดิน ปริมาณสารอินทรีย์ในดิน เป็นต้น) อิทธิพลของสมบัติน้ำใต้ดิน เป็นต้น



ภาพที่ 4.29 สารโพรพีโนฟอสคงเหลือจากแบบจำลองคอลัมน์สำหรับการทดลองที่มีความเข้มข้นโพรพีโนฟอส 20 mg/L และมีเซลล์เริ่มต้น 10^5 (●) และ 10^{15} CFU/mL (○)



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

ตารางที่ 4.14 ประสิทธิภาพการย่อยสลายสารโพรพิโนฟอสในแบบจำลองคอลัมน์

อัตรา การซึมผ่าน (cm/d)	ร้อยละการย่อยสลายสารโพรพิโนฟอส ณ การทดลองที่ความเข้มข้น สารโพรพิโนฟอสและปริมาณเซลล์เริ่มต้น			
	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