

การย่อยสลายและการบำบัดทางชีวภาพของดินที่มีการปนเปื้อนสารอาหาราซีน

Biodegradation and Bioremediation of Atrazine Contaminated Soil

คำนำ

ปัจจุบันการผลิตสินค้าทางการเกษตร มุ่งเน้นในเรื่องการเพิ่มผลผลิตเพื่อการค้าทั้งภายในประเทศ ผลิตเพื่อเป็นสินค้าส่งออก และป้อนผลผลิตเข้าสู่โรงงานอุตสาหกรรม การเพิ่มผลผลิตทางการเกษตรทั้งปริมาณและคุณภาพจึงถือเป็นสิ่งจำเป็น การเพิ่มปริมาณและคุณภาพของผลผลิตนอกจากจะทำได้โดยการจัดการดินและปุ๋ยให้เหมาะสมกับพืชที่ปลูก อีกวิธีหนึ่งที่เกษตรกรนิยมก็คือ การใช้สารฆ่าศัตรูพืช (pesticide) ซึ่งเป็นวิธีการจัดการศัตรูพืชที่มีประสิทธิภาพสูงในการควบคุม โรค แมลง และสัตว์ที่เป็นศัตรูพืช รวมทั้งวัชพืชในพื้นที่การเกษตรด้วย วิธีการนี้เป็นวิธีการที่สะดวก ง่ายและเห็นผลรวดเร็ว จึงเป็นที่นิยมของเกษตรกร สารฆ่าศัตรูพืชเป็นคำทั่วไปที่ใช้เรียก สารฆ่าวัชพืช (herbicide) สารฆ่าแมลง (pesticide) สารฆ่าเชื้อรา (fungicide) สารฆ่าเห็บไร (acaricide) สารฆ่าสัตว์แทะ (rodenticide) และสารฆ่าหอย (molluscicide) เป็นต้น และสารฆ่าศัตรูพืชที่มีการใช้มากที่สุดนั้นอยู่ในกลุ่มสารฆ่าวัชพืช

สารฆ่าวัชพืชกลุ่มที่มีการใช้กันอย่างแพร่หลายทั้งในประเทศสหรัฐอเมริกา และทั่วโลก คือ สารในกลุ่มซิมเมตริกอล-ไตรอะซีน (symmetrical-triazine, *s*-triazine) (Hay *et al.*, 1991) ซึ่งสารในกลุ่มนี้ถือว่าเป็นสารแปลกปลอม (xenobiotic compound) ซึ่งไม่มีจุลินทรีย์หรือเอนไซม์ของจุลินทรีย์สามารถทำปฏิกิริยากับสารกลุ่มนี้ได้ โครงสร้างทางเคมีของสารฆ่าวัชพืชในกลุ่มนี้ประกอบด้วยไนโตรเจนและคาร์บอนอย่างละ 3 อะตอมที่เกาะเรียงตัวกันเป็นวงแหวนแบบสมมาตร โดยไนโตรเจนและคาร์บอนจะเกาะกันด้วยพันธะคู่สลับกับพันธะเดี่ยว และสามารถเกิดปฏิกิริยาการแทนที่ในตำแหน่งที่ 2, 4 และ 6 ของโครงสร้าง ปฏิกิริยาการแทนที่ดังกล่าวจะทำให้เกิดสารใหม่ การแทนที่ในตำแหน่งที่ 2 จะพบมากที่สุด เช่นปฏิกิริยาการแทนที่โดยใช้หมู่คลอรีน เมทอกซี และเมทิลไทโอ เป็นต้น

สารในกลุ่มซิมเมตริกอล-ไตรอะซีน หลายชนิดถูกผลิตขึ้นเพื่อเป็นสารฆ่าวัชพืชที่นำมาใช้ทางการเกษตร เช่น อาหาราซีน ซิมาซีน ไชยานาซีน อามิทริน และ โพรมิทริน เป็นต้น (Mirgain *et al.*, 1993) สำหรับสารอาหาราซีนนั้นเป็นสารฆ่าวัชพืชที่ใช้กันอย่างกว้างขวางในพื้นที่เกษตรกรรมทั่วโลก ในการควบคุมวัชพืชพวกใบกว้างและหญ้าบางชนิด ประเทศไทยเองก็มีการใช้สารอาหาราซีน

เป็นจำนวนมาก จากรายงานการนำเข้าสารอาหารจีนมาใช้ทางการเกษตรในแต่ละปีประมาณล้าน กิโลกรัม ดังนั้นเราจึงควรตระหนักถึงการปนเปื้อนของสารนี้ในพื้นที่เพาะปลูก รวมทั้งการ เคลื่อนย้ายสารของสารนี้ไปสู่สิ่งแวดล้อมอื่นๆ ทำให้สารอาหารจีนที่ปนเปื้อนเหล่านี้มีผลกระทบต่อ สิ่งแวดล้อมไม่ว่าจะเป็นพืช สัตว์ มนุษย์ หรือจุลินทรีย์ด้วย ดังนั้นจึงควรรหาแนวทางในการลดการ ปนเปื้อนของสารอาหารจีนในดินด้วย การย่อยสลายของสารอาหารจีนโดยใช้ประโยชน์จาก กิจกรรมของจุลินทรีย์ที่มีอยู่ในดินนั้นเป็นวิธีการหนึ่งซึ่งช่วยในการกำจัดสารอาหารจีนได้เร็วขึ้น ซึ่ง เป็นวิธีที่ช่วยในการรักษาคุณภาพของระบบนิเวศของดิน (soil ecology) อีกทางหนึ่งด้วย ดังนั้น การศึกษาความสามารถในการย่อยสลายสารตกค้างหรือปนเปื้อนในดินโดยกิจกรรมของจุลินทรีย์จึง เป็นสิ่งที่น่าสนใจและเป็นประโยชน์อย่างยิ่งต่อการบำบัดดินโดยวิธีทางชีวภาพ และควรให้ความ สนใจในการศึกษาอย่างจริงจัง

ในการศึกษาครั้งนี้จึงได้ทำการศึกษาค้นหาจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการย่อยสลายสาร อาหารจีนได้ในดินประเทศไทย รวมทั้งทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายสารอาหารจีนและความ อยู่รอดของจุลินทรีย์ในดินจำลอง และศึกษาการย่อยสลายสารอาหารจีนของจุลินทรีย์ที่มีอยู่ใน ธรรมชาติ โดยการเติมวัสดุอินทรีย์ที่ผ่านกระบวนการทางชีวภาพ (bioprocessed materials) เนื่องจากในการเกษตรของประเทศไทยเริ่มนิยมใช้วัสดุอินทรีย์ที่ผ่านกระบวนการทางชีวภาพเหล่านี้ ในการปรับปรุงดิน อีกทั้งรัฐบาลเองก็ส่งเสริมให้มีการใช้วัสดุอินทรีย์ที่ผ่านกระบวนการทางชีวภาพ นอกจากนี้วัสดุอินทรีย์ที่ผ่านกระบวนการทางชีวภาพก็ได้มาจากสิ่งเหลือใช้จากการเกษตร เช่น เศษ พืชที่เหลือจากการเก็บเกี่ยว มูลสัตว์ เป็นต้น

วัตถุประสงค์

1. แยก คัดเลือก และศึกษาลักษณะของจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายสารอาหารจีนได้
2. ทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายสารอาหารจีนของจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้ในดิน
3. ทดสอบความสามารถของจุลินทรีย์ที่มีอยู่ในธรรมชาติในการย่อยสลายสารอาหารจีน

ขอบเขตของการศึกษา

ในการศึกษารั้งนี้จะเป็นการคัดแยกจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายสารอาหารจีนได้จากดินที่มีประวัติการใช้สารอาหารจีน จากนั้นจะนำจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้ไปศึกษาลักษณะของจุลินทรีย์ที่ยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายสารอาหารจีน ทดสอบการใช้สารอาหารจีนเป็นแหล่งคาร์บอนและ/หรือแหล่งไนโตรเจน และทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายสารอาหารจีนและความอยู่รอดของจุลินทรีย์ในดินจำลอง (bioaugmentation) รวมทั้งทดสอบการย่อยสลายสารอาหารจีนของจุลินทรีย์ที่มีอยู่ในธรรมชาติ โดยการเติมวัสดุอินทรีย์ที่ผ่านกระบวนการทางชีวภาพเพิ่มลงในดิน (biostimulation)

คำศัพท์ที่ควรทราบ

Biodegradation หมายถึง กระบวนการที่ทำให้สารเคมีมีโมเลกุลเล็กลงโดยใช้จุลินทรีย์หรือเอนไซม์ของจุลินทรีย์

Bioremediation หมายถึง การใช้กระบวนการทางชีววิทยาพื้นฟูดินและน้ำที่มีการปนเปื้อนสารที่เป็นอันตรายต่อสุขภาพของมนุษย์และ/หรือสิ่งแวดล้อม การใช้จุลินทรีย์ย่อยสลายสารพิษในสิ่งแวดล้อมก็คือวิธีการหนึ่งที่เป็นแบบอย่างของกระบวนการบำบัดทางชีวภาพ

การตรวจเอกสาร

1. สารฆ่าศัตรูพืช

สารฆ่าศัตรูพืช คือ สารที่ใช้ป้องกัน กำจัด ยับยั้งหรือควบคุมศัตรูพืช สารฆ่าศัตรูพืชอาจเป็นได้ทั้งสารเคมี หรือสารชีวภาพ ที่ใช้ควบคุมสิ่งที่ไม่ต้องการในการเพาะปลูกหรือสิ่งที่เข้าทำลายพืช สารฆ่าศัตรูพืชที่สำคัญของประเทศไทยมีด้วยกัน 8 กลุ่ม ดังนี้ (ธวัชชัย, 2540)

1. สารฆ่าวัชพืช (herbicide) ใช้ควบคุมวัชพืช
2. สารฆ่าแมลง (insecticide) ใช้ควบคุมแมลงศัตรูพืชในระยะไข่ ตัวอ่อน และตัวเต็มวัย
3. สารฆ่าหอย (molluscicide) ใช้ควบคุมหอยทากทั้งที่มีเปลือกและไม่มีเปลือก
4. สารฆ่าเห็บไร (acaricide) ใช้ควบคุมเห็บ ไร ปลวก
5. สารฆ่าเชื้อรา (fungicide) ใช้ควบคุมราสาเหตุโรคพืช
6. สารฆ่าสัตว์แทะ (rodenticide) ใช้ควบคุมหนูที่กัดกินทำลายพืชในไร่
7. สารรมควันพิษ (fumigant) ใช้ควบคุมวัชพืช แมลง เชื้อรา และสิ่งมีชีวิตอื่นๆ ในดิน
8. สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช (plant growth regulator) ใช้ควบคุมการเจริญเติบโตของพืช

สารฆ่าศัตรูพืชส่วนใหญ่จะใช้ในการป้องกันพืชไร่เพื่อให้ได้ผลผลิตที่มีคุณภาพดีตรงตามความต้องการและเกิดความเสียหายกับผลผลิตน้อยที่สุด สารฆ่าศัตรูพืชเหล่านี้มีการใช้อย่างแพร่หลายทั่วโลก เนื่องจากเป็นวิธีการที่ง่าย สะดวก และรวดเร็วในการป้องกันและกำจัดศัตรูพืช ในประเทศไทยได้มีการนำเข้าสารฆ่าศัตรูพืช มาใช้ทางการเกษตรมีปริมาณการใช้เพิ่มจำนวนมากขึ้นทุกปี และสารฆ่าวัชพืชนั้นเป็นสารฆ่าศัตรูพืชที่มีการนำเข้ามากที่สุดในทุกๆ ปี ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2539-2550 (ตารางที่ 1)

2. สารฆ่าวัชพืช

สารฆ่าวัชพืช หมายถึง สารเคมีชนิดใดๆ ก็ตามที่นำมาใช้เพื่อฆ่า ทำลายหรือยับยั้งการเจริญเติบโตของวัชพืชไม่ว่าจะเป็นขณะที่วัชพืชงอกขึ้นมาแล้วหรือเป็นเมล็ดที่อยู่ ตลอดจนจนขึ้นส่วนต่างๆ ของวัชพืชที่ขยายพันธุ์ได้ทั้งที่อยู่ในดินหรืออยู่บนดิน (ทศพล, 2545)

ตารางที่ 1 ปริมาณการนำเข้าสารฆ่าศัตรูพืชในประเทศไทยปี พ.ศ. 2543-2550

ประเภทของสารฆ่าวัชพืช	2543		2544		2545		2546	
	ปริมาณ (ล้านกก.)	มูลค่า (ล้านบาท)	ปริมาณ (ล้านกก.)	มูลค่า (ล้านบาท)	ปริมาณ (ล้านกก.)	มูลค่า (ล้านบาท)	ปริมาณ (ล้านกก.)	มูลค่า (ล้านบาท)
สารฆ่าแมลง (insecticide)	12.53	2,001	16.67	2,553	16.35	2,931	14.99	3,136
สารฆ่าเชื้อรา (fungicide)	7.39	1,119	7.82	1,265	8.89	1,444	10.32	1,678
สารฆ่าวัชพืช (herbicide)	29.71	3,841	32.42	4,502	36.60	4,349	50.46	6,101
สารฆ่าไร (acaricide)	0.27	72	0.29	83	0.34	71	0.36	77
สารฆ่าสัตว์แทะ (rodenticide)	0.14	14	0.20	22	0.13	12	0.12	11
สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช (Plant Growth Regulator, PGR)	1.16	115	1.46	170	1.42	145	2.09	103
สารฆ่าหอย (molluscicide)	0.22	33	0.16	13	0.19	12	0.42	33
สารรมควันพิษ (fumigants)	0.57	63	0.78	103	1.09	120	0.79	103
สารฆ่าไส้เดือนฝอย (nematocide)	-	-	-	-	-	-	-	-
รวม (total)	52.01	7,258	59.82	8,713	65.01	9,084	79.58	11,242

ตารางที่ 1 (ต่อ)

ประเภทของสารฆ่าวัชพืช	2547		2548		2549		2550	
	ปริมาณ (ล้านกก.)	มูลค่า (ล้านบาท)	ปริมาณ (ล้านกก.)	มูลค่า (ล้านบาท)	ปริมาณ (ล้านกก.)	มูลค่า (ล้านบาท)	ปริมาณ (ล้านกก.)	มูลค่า (ล้านบาท)
สารฆ่าแมลง (insecticide)	16.73	2,834	16.39	2,928	20.49	3,856	4.69	940
สารฆ่าเชื้อรา (fungicide)	10.11	1,718	8.02	1,594	9.38	1,722	2.44	436
สารฆ่าวัชพืช (herbicide)	55.65	6,079	47.42	5,471	62.13	6,820	22.92	2,439
สารฆ่าไร (acaricide)	0.42	100	0.52	132	0.34	96	0.10	24
สารฆ่าสัตว์แทะ (rodenticide)	0.19	18	0.17	16	0.18	21	0.06	7
สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช (Plant Growth Regulator, PGR)	1.81	174	1.51	180	1.73	191	0.67	60
สารฆ่าหอย (molluscicide)	0.88	76	0.63	96	0.56	61	0.08	11
สารรมควันพิษ (fumigants)	1.10	131	0.81	110	0.95	129	0.26	31
สารฆ่าไส้เดือนฝอย (nematocide)	-	-	-	-	-	-	-	-
รวม (total)	89.90	11,135	75.47	10,530	95.76	12,898.57	31.23	3,953.30

ที่มา: กรมวิชาการเกษตร (2549)

การจำแนกประเภทของสารฆ่าวัชพืชออกเป็นกลุ่มๆ สามารถจำแนกได้ตามลักษณะโครงสร้างพื้นฐานทางเคมี (basic chemical structure) โดยอาศัยลักษณะของโครงสร้างทางโมเลกุล และตำแหน่งอะตอมไอออนหรือธาตุภายในโมเลกุลที่คล้ายคลึงกัน สามารถแบ่งได้เป็น 2 กลุ่ม ดังนี้

1. สารฆ่าวัชพืชที่เป็นสารอนินทรีย์ (inorganic herbicide) เป็นสารฆ่าวัชพืชที่ไม่มีอะตอมของธาตุคาร์บอนในโมเลกุล ได้แก่ ammonium sulfamate (AMS), copper sulfate metaborate และ sodium chlorate เป็นต้น สารในกลุ่มนี้ส่วนใหญ่จะใช้ในการทำลายวัชพืชในพื้นที่ที่ไม่ได้ปลูกพืชเพื่อการเกษตร เช่น ริมถนน ป่าไม้ เป็นต้น

2. สารฆ่าวัชพืชที่เป็นสารอินทรีย์ (organic herbicide) เป็นสารฆ่าวัชพืชที่มีอะตอมของคาร์บอนเป็นองค์ประกอบอย่างน้อย 1 อะตอมในโมเลกุล โดยทั่วไปโมเลกุลของสารอินทรีย์ประกอบด้วยธาตุต่างๆ ซึ่งธาตุที่พบบ่อยที่สุด ได้แก่ คาร์บอน (C) ไฮโดรเจน (H) และออกซิเจน (O) ส่วนธาตุชนิดอื่นที่อาจจะพบได้ในโมเลกุล ได้แก่ ฟลูออรีน (F) คลอรีน (Cl) โบรมีน (Br) ไนโตรเจน (N) ฟอสฟอรัส (P) กำมะถัน (S) และไอโอดีน (I) เป็นต้น โครงสร้างหลักของสารฆ่าวัชพืชพวกสารประกอบอินทรีย์จะมีการเรียงตัวของอะตอมของคาร์บอนกับสารอื่นๆ แบ่งออกเป็น 2 แบบ คือ โครงสร้างของโมเลกุลที่มีการจัดเรียงอะตอมของคาร์บอนเป็นลูกโซ่ เป็นเส้นตรงหรือมีการแตกกิ่งก้านสาขาเรียกว่า แบบอลิฟาติก (aliphatic hydrocarbons) ส่วนโครงสร้างที่มีการเรียงตัวของอะตอมของคาร์บอนเป็นรูปร่างวงจะเรียกว่า แบบอโรมาติก (aromatic hydrocarbons หรือ benzene) (ทศพล, 2545)

การจำแนกอีกแบบที่นิยมใช้ซึ่งเป็นการจำแนกเพื่อสะดวกในการใช้ โดยจำแนกตามช่วงเวลาการใช้งานของสาร (ธวัชชัย, 2540) มีดังนี้

1. สารฆ่าวัชพืชแบบก่อนปลูก เป็นสารฆ่าวัชพืชที่ใช้ก่อนการเตรียมดิน เพื่อฆ่าวัชพืชที่ขึ้นอยู่ก่อนแล้ว จึงไถเตรียมดิน หรือใช้พ่นสารฆ่าวัชพืชแทนการเตรียมดินแล้วปลูกพืชเลย

2. สารฆ่าวัชพืชแบบก่อนงอก เป็นสารฆ่าวัชพืชที่ใช้หลังปลูกพืช แต่ก่อนวัชพืชงอกใน ช่วงเวลาประมาณไม่เกิน 10 วัน เป็นการพ่นลงในดินโดยตรง สารฆ่าวัชพืชเหล่านี้จะเข้าทำลาย

วัชพืชทางส่วนของเมล็ด ราก และยอดอ่อนใต้ดิน โดยต้องใช้ในดินที่มีความชื้นที่เหมาะสม และมีการเตรียมดินอย่างสม่ำเสมอ

3. สารฆ่าวัชพืชแบบหลังงอก เป็นสารฆ่าวัชพืชที่ใช้หลังจากวัชพืชงอกขึ้นมาแล้วในช่วงเวลาเกินกว่า 10 วันขึ้นไป โดยให้สารฆ่าวัชพืชสัมผัสกับส่วนของวัชพืชให้มากที่สุด

3. สารอาหารจีน

สารอาหารจีนเป็นสารพวก xenobiotic compounds ชนิดหนึ่ง สารพวก xenobiotic compounds เป็นสารที่แปลกปลอมสำหรับสิ่งมีชีวิต ซึ่งมีความหมายที่หลากหลายและเป็นสารที่เกี่ยวข้องกับอุตสาหกรรมทางเคมี สามารถเป็นได้ทั้งสารตั้งต้นและสารผลิตภัณฑ์ (Hutzinger, 1981) สารพวก xenobiotic compounds นี้มีโครงสร้างทางโมเลกุลที่ไม่สามารถย่อยสลายได้ด้วยเอนไซม์หรือผลผลิตของเอนไซม์ในธรรมชาติ (Atlas and Bartha, 1998) สาร xenobiotic compounds เป็นสารที่มนุษย์สร้างขึ้นโดยกระบวนการทางอุตสาหกรรม และการสังเคราะห์ทางเคมี (Hutzinger, 1981) สารประกอบเหล่านี้เป็นสารประกอบที่สามารถเปลี่ยนรูปได้ซ้ำ จึงทำให้มีแนวโน้มที่จะเกิดการสะสมในสภาพแวดล้อม (Kamely *et al.*, 1989) และสารพวก xenobiotic compounds นี้ก็ยากต่อการย่อยสลายทางชีวภาพ (Atlas and Bartha, 1998) เนื่องจากการแทนที่ (substitutions) ของโมเลกุลที่แตกต่างไปจากธรรมชาติ อีกทั้งโครงสร้างของสารเป็นพันธะที่แข็งแรง และเป็นวงแหวนอโรมาติก ซึ่งยากต่อการย่อยสลาย (Hutzinger, 1981) สารอาหารจีนเป็นสารฆ่าวัชพืชในกลุ่ม *s*-triazines (ภาพที่ 1) ที่มีโครงสร้างหลักประกอบด้วยอะตอมของคาร์บอน 3 อะตอมกับอะตอมของไนโตรเจน 3 อะตอม เรียงตัวสลับกันเชื่อมต่อกันด้วยพันธะเดี่ยวสลับกับพันธะคู่เป็นรูปวงแหวน 6 เหลี่ยม (Stein, 1973) สารกลุ่ม *s*-triazines เข้าสู่สภาพแวดล้อมในรูปของผลิตภัณฑ์ทางการค้า โดยเป็นสารที่ใช้ในการฟอกขาว สารพิษ โพลีเมอร์ และสารฆ่าวัชพืช ซึ่งสารฆ่าวัชพืชหลายชนิดที่นำมาใช้เป็นสารในกลุ่ม *s*-triazines เช่น สารอาหารจีน ซิมาซีน ไซยานาซีน อามีทริน และโพรมิทริน (Mougin *et al.*, 1994) ดังภาพที่ 1 โดยสารเหล่านี้จะแตกต่างกันที่การแทนที่ในตำแหน่งที่ 2 4 และ 6 ด้วยหมู่

คลอรีน เมทอกซิล และเมทิลไซโอ สำหรับสารอาหารจีนถูกสังเคราะห์ขึ้นครั้งแรกในปี ค.ศ. 1955 มีสูตรโครงสร้างทางเคมี คือ มีคาร์บอนและไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบเป็นรูปร่างแหวน เช่นเดียวกับ *s*-triazines แต่สารอาหารจีนมีการแทนที่ด้วยหมู่คลอรีนในตำแหน่งที่ 2 ดังภาพที่ 1 สารอาหารจีนมีชื่อทางเคมีว่า 2-คลอโร-4-เอทิลอะมิโน-6-ไอโซโพรพิลอะมิโน-1,3,5-เฮส-ไตรอะซีน (2-chloro-4-ethylamino-6-isopropylamino-1,3,5-*s*-triazine) ซึ่งเป็นสารประกอบอินทรีย์ ที่มีโครงสร้างเป็นสารประกอบอโรมาติก สูตรโมเลกุลคือ $C_8H_{14}ClN_5$ มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 215.69 ลักษณะทางกายภาพ เป็นผลึกขาวใส ไม่มีสี มีจุดหลอมเหลวที่อุณหภูมิ 175-177 °C จุดเดือด 200 °C สารอาหารจีนสามารถละลายได้ในน้ำความเข้มข้น 30 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่อุณหภูมิ 20 °C สามารถละลายได้ในเมทานอล (methanol) ที่ความเข้มข้น 18,000 มิลลิกรัมต่อลิตร และสามารถละลายได้ในคลอโรฟอร์มที่ความเข้มข้น 52,000 มิลลิกรัมต่อลิตร (Hayes, 1991) สารอาหารจีนเป็นสารฆ่าวัชพืชแบบเลือกทำลาย (selective herbicide) ชนิดใช้ทางดิน ใช้ควบคุมวัชพืชใบกว้าง และหญ้า เป็นสารฆ่าวัชพืชในไร่ข้าวโพด ข้าวฟ่าง อ้อย สับปะรด หน่อไม้ฝรั่ง พืชวงศ์ส้ม กล้าย มะคาเดเมีย กาแฟ น้ำมันปาล์ม กุหลาบ และพืชไร่อื่นๆ (Beste, 1983) สารอาหารจีนสามารถใช้ควบคุมพืชได้ทั้งแบบก่อนปลูกพืชหลัก (pre-plant) ก่อนวัชพืชงอก (pre-emergence) หรือแบบหลังวัชพืชงอก (post-emergence) โดยปกติจะใช้สารอาหารจีนในอัตรา 160-716 กรัมสารออกฤทธิ์ต่อไร่ (รังสิต, 2526)

4. กลไกการทำงานของสารอาหารจีนในพืช

พืชจะดูดซึมสารอาหารจีนเข้าไปภายในต้นพืชผ่านทางวิถีทางอะโพพลาสต์ (apoplastic pathway) ซึ่งเป็นช่องทางการลำเลียงน้ำของพืช และสารอาหารจีนจะเคลื่อนย้ายไปในส่วนของใบ แล้วไปขัดขวางกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสงของพืช โดยกลไกการทำงานของสารอาหารจีนที่ปรากฏส่วนใหญ่จะเป็นการขัดขวางความสามารถของพืชในกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสง (ภาพที่ 2) ในกระบวนการเคลื่อนที่ของอิเล็กตรอนในระบบแสง II สารอาหารจีนจะไปขัดขวางการทำงานของตัวรับอิเล็กตรอนลำดับที่สอง คือ พลาสโตควิโนน (Q_B) (Amtzen *et al.*, 1982) โดยสารอาหารจีนจะเข้าไปจับกับโปรตีน D1 ซึ่งเป็นโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบของพลาสโตควิโนน (Q_B) มีผลทำให้กระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสงของพืชไม่สมบูรณ์ และทำให้เกิดการสะสมซึ่งเล็ด

ออกซิเจน (singlet oxygen) ซึ่งจะก่อให้เกิดปฏิกิริยาเพอริออกซิเดชัน (peroxidation) ทำให้เม็ดสีที่ใช้ในกระบวนการสังเคราะห์แสงและลิพิดในเยื่อถูกทำลาย (Corbett, 1974)

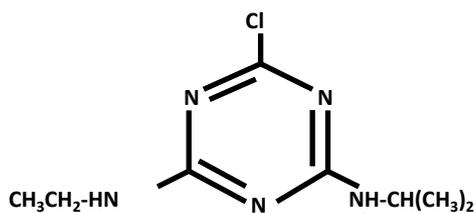
5. ความเป็นพิษของสารอาหารจีนในสิ่งมีชีวิต

สารอาหารจีน ซิมมาซีน และสารฆ่าวัชพืชในกลุ่มของเอส-ไตรอะซีนอื่นๆ มีการใช้อย่างกว้างขวางเพื่อควบคุมวัชพืชใบกว้างในแปลงข้าวโพด พืชไร่ชนิดอื่นๆ เนื่องจากข้าวโพดมีความสามารถในการต้านทานต่อความเป็นพิษของสารเหล่านี้ ในขณะที่พืชไร่ชนิดอื่นๆอาจไม่ต้านทาน มีรายงานว่าสารอาหารจีนและซิมมาซีนที่ตกค้างในดินเป็นสาเหตุทำให้พืชในรุ่นต่อไปที่ไม่มีความสามารถในการต้านทานต่อความเป็นพิษของสารฆ่าวัชพืชเกิดความเสียหายเพราะผลตกค้างของสารอาหารจีนในดิน (Fletcher, 1958; Flury, 1996; Foy, 1960; Frank *et al.*, 1983; Kells *et al.*, 1990; Sheets, 1970) โดยการเข้าไปรบกวนกระบวนการสังเคราะห์แสงดังที่กล่าวแล้วข้างต้นสำหรับสารอาหารจีนที่ถูกดูดซึมโดยพืชนั้นจะเคลื่อนที่ไปสู่ใบ และพืชที่ไม่สามารถต้านทานต่อความเป็นพิษของสารอาหารจีนก็จะแสดงอาการที่เรียกว่า marginal chlorosis ที่ใบล่างของต้นอ่อน (Foy, 1960)

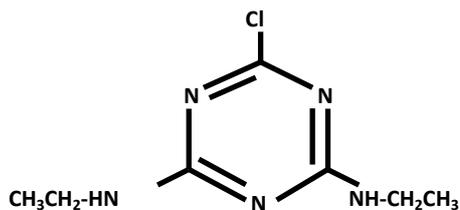
นอกจากนี้ยังมีการศึกษาพบว่าสารอาหารจีนมีผลกระทบต่อแบคทีเรีย แพลงก์ตอนพืช ปลา สัตว์ และมนุษย์ (Hayes, 1982; Hutber *et al.*, 1979; Pipe, 1992; Prasad *et al.*, 1991) สารอาหารจีนจะไปยับยั้งกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสงของแพลงก์ตอนพืช (Pipe 1992) และสารอาหารจีนจะมีผลต่อไซยาโนแบคทีเรียมากกว่าสารพิษอื่น คือ ไดยูรอน>สารอาหารจีน พาราควอต (paraquat) ไกลโฟเสต (glyphosate)>2,4-D>MCPA MCPP (mecoprop) ethephon (Hutber *et al.*, 1979; Maule and Wright, 1984) สำหรับการศึกษาในสัตว์พบว่าเมื่อหนูได้รับสารอาหารจีนเข้าไปในปริมาณ 1,750 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม จะตายภายใน 12-24 ชั่วโมง ส่วนในมนุษย์และสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม เมื่อได้รับสารอาหารจีนที่ความเข้มข้นสูง จะเกิดอาการคลื่นเหียน อาเจียน ท้องร่วง กล้ามเนื้อล้า น้ำลายฟูมปาก และไอของสารอาหารจีนเองก็จะทำให้เกิดอาการระคายเคืองบริเวณตา บริเวณผิวหนัง ระบบทางเดินหายใจติดขัด รวมทั้งยังมีงานวิจัยที่ชี้ให้เห็นว่าสารอาหารจีนเป็นสารที่มีผลทำให้ฮอร์โมนในร่างกายของสิ่งมีชีวิตผิดปกติ (endocrine disruptor) ทำให้การเจริญเติบโต การพัฒนาการ

Atrazine

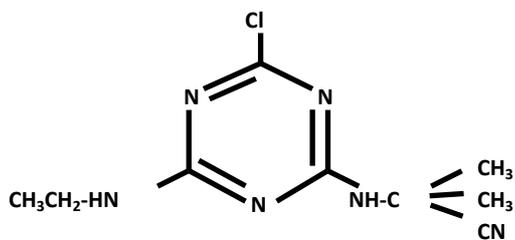
(2-chloro-4-ethylamino-6-

**Simazine**

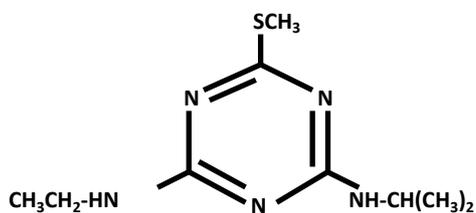
(2-chloro-4,6-bis-(ethylamino)-

**Cyanazine**

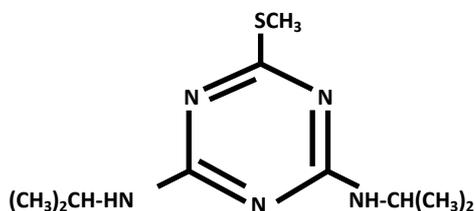
(2-(4-chloro-6-ethylamino-1,3,5-

**Ametryn**

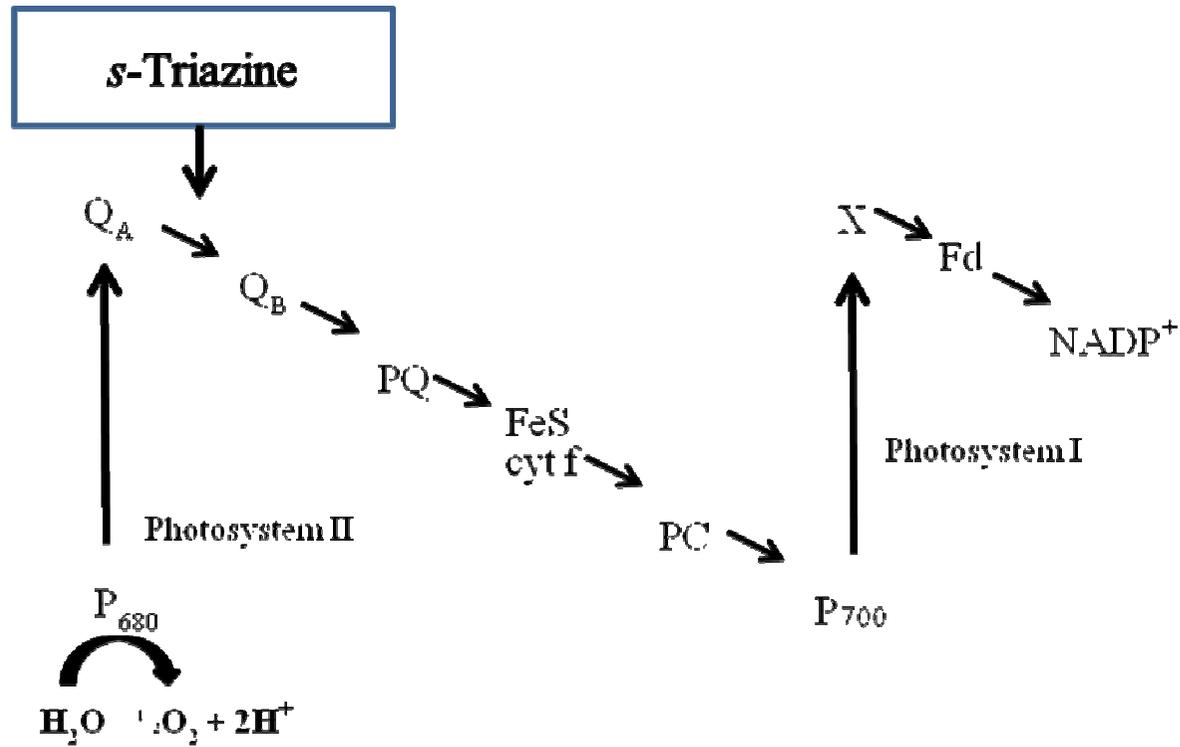
(2-ethylamino-4-

**Prometryn**

(2,4-bis(isopropylamino)-6



ภาพที่ 1 โครงสร้างของสารอาหารพืชและสารประกอบในกลุ่ม *s*-triazine (ซีมาซีน ไซยานาซีน อามีทริน และ โพรมีทริน)



ภาพที่ 2 กลไกการทำงานของสารอาหารซินในพืชโดยสารในกลุ่ม *s*-triazine จะเข้าจับกับโปรตีน D1 ของพลาสโตควิโนน (Q_B) ทำให้อิเล็กตรอนไม่สามารถส่งผ่านไปยังตัวรับอิเล็กตรอนตัวถัดมาได้

และระบบสืบพันธุ์ผิดปกติด้วย โดยสารอาหารที่เข้มข้นเพียง 0.1 ไมโครกรัมต่อลิตร ก็สามารถทำให้การเปลี่ยนแปลงเพศ (sex differentiation) ของกบผิดปกติ คือ ทำให้กบกลายเป็นสัตว์ที่มีอวัยวะเพศสืบพันธุ์แบบสองเพศในตัวเดียวกัน (hermaphrodites) (Hayes *et al.*, 2003) ต่อมาในปี ค.ศ. 2007 Fan *et al.* ได้ทำการศึกษาผลกระทบของสารอาหารที่ต่อระบบต่อมไร้ท่อในสัตว์ ผลการทดลองปรากฏว่าสารอาหารที่เข้มข้นมีผลกระทบต่อระบบต่อมไร้ท่อ ในปลา สัตว์ครึ่งบกครึ่งน้ำ และ สัตว์เลื้อยคลาน โดยสารอาหารที่เข้มข้นยังไปชักนำให้เกิดมะเร็งในต่อมลูกหมากของสัตว์เลื้อยคลานด้วยนม ซึ่งสัตว์เลื้อยคลานด้วยนมนี้มีระบบสืบพันธุ์คล้ายกับของมนุษย์ นอกจากนี้พบว่าสารอาหารที่เข้มข้นสามารถไปยับยั้งการสร้างเอ็นไซม์ของไมโทคอนเดรีย ซึ่งเป็นแหล่งพลังงานของแฟลกเจลลัมที่ใช้ในการเคลื่อนที่ของอสุจิ ทำให้อสุจิเคลื่อนที่ได้ช้าลง (Hase *et al.*, 2008)

6. ค่ามาตรฐานการปนเปื้อนของสารอาหารในดิน

การกำหนดค่ามาตรฐานของการปนเปื้อนของสารอาหารที่พบในแหล่งน้ำ Environment Protection Agency (EPA) ได้กำหนดค่ามาตรฐานของการปนเปื้อนของสารอาหารที่พบได้ในแหล่งน้ำให้มีค่าไม่เกิน 3 ไมโครกรัมต่อลิตร (U.S. EPA, 2003) ในขณะที่องค์การอนามัยโลก กำหนดให้ค่าสูงสุดที่ยอมรับได้ของสารอาหารในน้ำดื่มมีค่าได้ไม่เกิน 2 ไมโครกรัมต่อลิตร (World Health Organization [WHO], 2003) และสำหรับประเทศไทยได้กำหนดมาตรฐานคุณภาพดิน ตามประกาศคณะกรรมการสิ่งแวดล้อมแห่งชาติ ฉบับที่ 25 (พ.ศ. 2547) โดยกำหนดค่ามาตรฐานการปนเปื้อนของสารอันตรายหรือมีผลกระทบต่อสุขภาพอนามัยของประชาชนที่รับสัมผัสดินทั้งทางตรงและทางอ้อม สำหรับสารอาหารที่ยอมรับให้มีการปนเปื้อนได้ในดินที่ใช้ประโยชน์เพื่อการอยู่อาศัยและเกษตรกรรมไม่เกิน 22 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ส่วนในดินที่ใช้ประโยชน์นอกเหนือจากการอยู่อาศัยและเกษตรกรรมยอมให้มีการปนเปื้อนได้ไม่เกิน 110 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (กรมควบคุมมลพิษ, 2548)

7. สภาพของสารอาหารในดิน

สารอาหารเป็นสารที่สามารถเคลื่อนย้าย (mobility) ได้จากดินสู่แหล่งน้ำหรือจากแหล่งน้ำสู่ดิน จากการศึกษาพบว่า สารอาหารสามารถคงทน (persistence) ได้ในดินเป็นระยะเวลาตั้งแต่หนึ่งสัปดาห์ถึงมากกว่าหนึ่งเดือน (Anderson and Georgeson, 1989; Cohen *et al.*, 1984) และ

กระบวนการย่อยสลายของสารนี้ใช้เวลาในบางสภาพแวดล้อม (Baker, 1991; Erickson and Lee, 1989) และจากการเคลื่อนที่ของสารนี้ในดินที่เกิดขึ้นได้ง่ายจึงนำไปสู่ปัญหาการปนเปื้อนของสารอาหารในแหล่งน้ำผิวดินและน้ำใต้ดิน (Baker *et al.*, 1992; Belluck *et al.*, 1991; Eisler, 1989; Kolpin *et al.*, 1993; Mandelbaum *et al.*, 1995) การเคลื่อนที่ของสารอาหาร-ซึ้นในดินขึ้นอยู่กับอิทธิพลของสภาพละลายน้ำ (ค่าการละลายได้สูงสุดในน้ำ 33 มิลลิกรัมต่อลิตร) ค่าสัมประสิทธิ์การดูดซับได้ของสาร (sorption coefficient, K_{oc}) ซึ่งอยู่ในระดับปานกลาง (160 มิลลิกรัมต่อกรัม) และอัตราการย่อยสลายโดยจุลินทรีย์ การเตรียมดินเพื่อการเพาะปลูก โครงสร้างดิน และปริมาณความชื้นในดิน นอกจากนี้การใช้สารอาหารซึ้นในช่วงที่มีฝนตกก็มีส่วนทำให้สารนี้เคลื่อนที่ในดินได้เร็วขึ้น (Eaton and Karns, 1991a and 1991b) การเกิดน้ำไหลบ่า (runoff) และการชะละลาย (leaching) ก็เป็นสาเหตุหนึ่งของการปนเปื้อนของสารอาหารซึ้นในแหล่งน้ำด้วย (Belluck *et al.* 1991; Mandelbaum *et al.*, 1995; Stolpe and Shea, 1995)

การปนเปื้อนของสารอาหารซึ้นในดินและน้ำส่งผลให้ระบบนิเวศวิทยาเปลี่ยนแปลงไปจากเดิม อีกทั้งมนุษย์ยังมีการอุปโภคและบริโภคน้ำเหล่านี้ ดังนั้นนักวิทยาศาสตร์จำนวนมากจึงพยายามค้นคว้าหาทางกำจัดสารอาหารซึ้นที่ปนเปื้อนอยู่ในสภาพแวดล้อมเหล่านี้ เพื่อลดผลกระทบที่มีต่อสิ่งแวดล้อมรวมทั้งมนุษย์ด้วย การใช้จุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการย่อยสลายสารอาหารซึ้นทั้งในดินและแหล่งน้ำเป็นวิธีที่มีการศึกษากันมาบ้างแล้ว เนื่องจากจะสามารถช่วยกำจัดสารอาหารซึ้นที่ตกค้างอยู่ในสิ่งแวดล้อมที่มีประสิทธิภาพและเร็วขึ้น

8. การย่อยสลายสารอาหารซึ้นโดยจุลินทรีย์

8.1 จุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายสารอาหารซึ้น

การย่อยสลายสารอาหารซึ้นโดยจุลินทรีย์ ในอดีตนั้นยังไม่เป็นที่ยอมรับกันมากนัก ถึงแม้จะมีการค้นพบจุลินทรีย์หลายชนิดที่มีความสามารถในการเปลี่ยนรูปสารเคมีในกลุ่ม เอส-ไตรอะซีน แต่จุลินทรีย์เหล่านั้นก็ไม่สามารถเปลี่ยนรูปของสารอาหารซึ้นได้ ตัวอย่างเช่น เอนไซม์จาก *Rhodococcus corallinus* สามารถทำให้เกิดดีคลอรีเนชัน (dechlorination) กับสารในกลุ่มของ คลอโร-เอส-ไตรอะซีน แต่ไม่ทำปฏิกิริยากับสารอาหารซึ้น (Mulbry, 1994) แต่ต่อมาเมื่อได้มีการแยกเชื้อบริสุทธิ์ที่มีความสามารถในการเมแทบอลิซึมสารอาหารซึ้น (Boundy-Mills *et al.*, 1997; Bouquard *et al.*, 1997; Cook, 1987; de Souza *et al.*, 1998; de Souza *et al.*, 1995; Erickson and Lee, 1989; Mandelbaum *et al.*, 1995; Mandelbaum *et al.*, 1993a; Mandelbaum *et al.*, 1993b; Mulbry, 1994;

Nagy *et al.*, 1995; Struthers *et al.*, 1998; Yanze-Kontchou and Gschwind, 1994) แนวคิดเรื่องการย่อยสลายสารอาหารในจุลินทรีย์จึงเริ่มเป็นที่ยอมรับ และพบว่าการย่อยสลายสารอาหารและสารในกลุ่มเอส-ไตรอะซีน ในจุลินทรีย์เกิดขึ้นโดยกระบวนการเอ็น-ดีอัลคิลเลชัน และ ดีคลอรีเนชัน (N-dealkylation and dechlorination) (Erickson and Lee, 1989)

การศึกษาในช่วงแรกๆ นักวิทยาศาสตร์หลายท่านมุ่งเน้นการค้นหายูนิคัลที่มีความสามารถในการเปลี่ยนรูปหรือย่อยสลายสารอาหารโดยวิธี enrichment culture technique ต่อมาเกิดการพบจุลินทรีย์ทั้งเชื้อราและแบคทีเรียบางชนิดซึ่งสามารถเปลี่ยนรูปสารอาหารโดยกระบวนการที่แตกต่างกันไป แต่ไม่พบจุลินทรีย์ใดที่ก่อให้เกิดการมิเนอรัลไลเซชัน (mineralization) ของสารอาหาร (เปลี่ยนคาร์บอนในสารอาหารไปเป็นคาร์บอนไดออกไซด์) จนกระทั่งปี ค.ศ. 1993 ได้มีการค้นพบกลุ่มจุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่ร่วมกัน (consortium) ชนิดหนึ่งที่สามารถแปรสภาพสารอาหารโดยกระบวนการมิเนอรัลไลเซชัน (Mandelbaum *et al.*, 1993b) ต่อมาในปี ค.ศ. 1994 Yanze-Kontchou and Gschwind ได้พบเชื้อบริสุทธิ์ของ *Pseudomonas* sp. สายพันธุ์ YAYA6 ที่มีความสามารถในการแปรสภาพสารอาหาร โดยกระบวนการดังกล่าวและใช้สารอาหารเป็นแหล่งคาร์บอน ในปี ค.ศ. 1995 ได้มีการค้นพบเชื้อบริสุทธิ์อีก 2 ชนิด ที่มีความสามารถแบบเดียวกัน คือ *Pseudomonas* sp. สายพันธุ์ ADP (Mandelbaum *et al.*, 1995) และ *Ralstonia* sp. สายพันธุ์ M91-3 (Radosevich *et al.*, 1995) ที่ใช้สารอาหารเป็นแหล่งไนโตรเจน ในเวลาต่อมาได้มีการค้นพบจุลินทรีย์หลายชนิดที่ย่อยสลายสารอาหาร ได้แก่ *Rhizobium* สายพันธุ์ PATR (Bouquard *et al.*, 1997), *Alcaligenes* SG1 (Boundy-Mills, unpublished data), *Agrobacterium radiobacter* J14a (Struthers *et al.*, 1998), *Clavibacter michiganensis* ATZ1 and *Pseudomonas* sp. สายพันธุ์ CN1 (de Souza *et al.*, 1998) แต่มีจุลินทรีย์เพียง 2-3 ชนิดเท่านั้นที่สามารถใช้สารอาหารเป็นทั้งแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจน จุลินทรีย์เหล่านี้ได้แก่ *Pseudomonas* sp. (Topp *et al.*, 2000a), *Nocardioides* sp. C190 (Topp *et al.*, 2000b), *Arthrobacter aureescens* สายพันธุ์ TC1 (Strong *et al.*, 2002) ซึ่งคุณลักษณะของจุลินทรีย์ที่ใช้สารอาหารเป็นทั้งแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนนั้นเป็นข้อได้เปรียบ (selective advantage) ในการนำจุลินทรีย์ดังกล่าวไปใช้ในการย่อยสลายและบำบัดแหล่งปนเปื้อนหรือตกค้างของสารอาหารโดยวิธีทางชีวภาพ (biodegradation และ bioremediation)

8.2 สารพันธุกรรมที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายสารอาหารไนโตรเจน

สำหรับสารพันธุกรรมที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายสารอาหารไนโตรเจนนั้น เริ่มจากการค้นพบในจุลินทรีย์ที่ย่อยสลายสารในกลุ่มเอส-ไตรอะซีนก่อน ตัวอย่างเช่น สารเมลามีน ซึ่งในกระบวนการย่อยสลายสารเมลามีน เป็นกระบวนการที่เกิดขึ้นใน *Pseudomonas* sp. สายพันธุ์ NRRL B-1227 (Eaton and Karns, 1991a; Eaton and Karns, 1991b) โดยยีน 3 ยีน คือ *trzB*, *trzC* และ *trzD* ซึ่งได้มีการศึกษาและแสดงให้เห็นว่าเกี่ยวข้องกับกระบวนการย่อยสลายสารเมลามีน และยังพบกระบวนการย่อยสลายที่คล้ายคลึงกันใน *Klebsilla pneumonia* สายพันธุ์ 99 (Eaton and Karns, 1991a; Eaton and Karns, 1991b) ในช่วงเวลาต่อมาได้มีการค้นพบยีน *trzA* ซึ่งควบคุมเอนไซม์ไฮโดรไลติก (hydrolytic enzyme) จาก *Rhodococcus corallinus* NRRL B-15444R (Mulbry, 1994) ที่สามารถทำปฏิกิริยา ดีคลอรีเนชัน และดีแอมมิเนชัน (dechlorination and deamination reactions) กับสารเอส-ไตรอะซีน ดีเซทิลซิมาซีน (desethylsimazine) และ ดีเซทิลอะตราซีน (desethylatrazine) และพบกลุ่มของยีนที่ควบคุมกระบวนการดีคลอรีเนชัน หรือ ดีแอมมิเนชันของสารอาหารไนโตรเจน ใน *Rhodococcus* sp. สายพันธุ์ NI86/21 ซึ่งมียีนที่เกี่ยวข้องคือ *thcB*, *thcC* และ *thcD* และเป็นยีนใน cytochrome P450 system (Shao *et al.*, 1995)

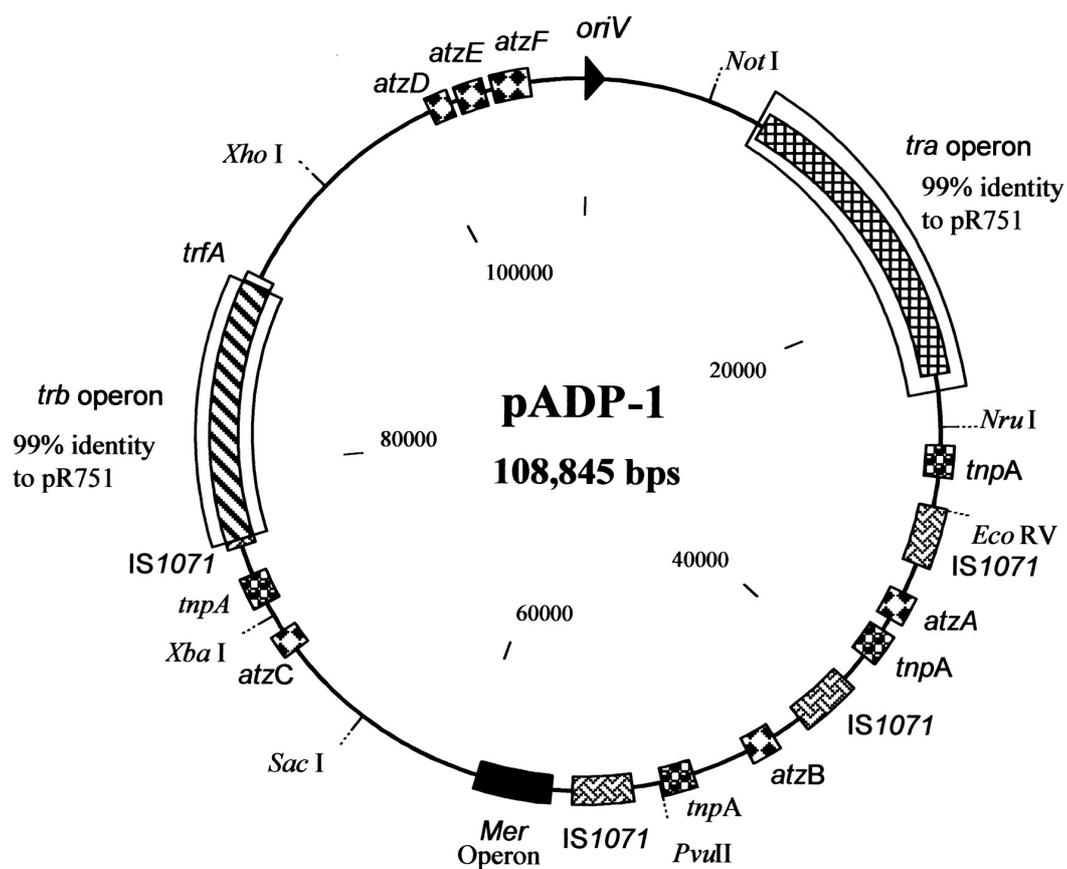
ในช่วงเวลาประมาณ 10 ปีได้มีการศึกษาเกี่ยวกับการย่อยสลายสารอาหารไนโตรเจนอย่างกว้างขวางในประเทศสหรัฐอเมริกา แคนาดา และฝรั่งเศส แต่ *Pseudomonas* สายพันธุ์ ADP เท่านั้นที่มีการศึกษาในรายละเอียดของวิถีการย่อยสลายสารอาหารไนโตรเจน (atrazine degradation pathway) และพบว่าขั้นตอนการย่อยสลายนี้นี้มีความแตกต่างกับจุลินทรีย์ที่พบมาในอดีต ขั้นตอนการย่อยสลายสารอาหารไนโตรเจนในสายพันธุ์ ADP ประกอบด้วย 6 ยีน ซึ่งอยู่บนพลาสมิดที่มีขนาด 108,000 คู่เบส (ภาพที่ 3) คือ *atzA* *atzB* *atzC* *atzD* *atzF* และ *atzE* (ภาพที่ 4) (Boundy-Mills *et al.*, 1997; de Souza *et al.*, 1996; de Souza *et al.*, 1995; Fruchey *et al.*, 2003; Martinez *et al.*, 2001; Sadowsky *et al.*, 1998; Shapir *et al.*, 2002) โดยแต่ละยีนจะมีหน้าที่ที่แตกต่างกัน กล่าวคือ ยีนแรก *atzA* จะเปลี่ยนรูปของสารอาหารไนโตรเจนเป็น ไฮดรอกซีอะตราซีน (hydroxyatrazine) ยีนที่สอง คือ *atzB* จะเปลี่ยนรูป ไฮดรอกซีอะตราซีนเป็น เอ็น-ไอโซโพรพิลแอมเมไลด์ (*N*-isopropylammelide) ขั้นตอนต่อไปเป็นหน้าที่ของยีน *atzC* ซึ่งจะเปลี่ยน เอ็น-ไอโซโพรพิลแอมเมไลด์ เป็น กรดไซยานูริก (cyanuric acid) อีก 3 ขั้นตอนประกอบด้วย *atzD*, *E* และ *F* ที่จะเปลี่ยนไซยานูริก เป็น ไบยูเรต (biuret) และ ไบยูเรต เป็น อัลโลฟานาต (allophanate) จนถึงขั้นสุดท้ายเปลี่ยนจากอัลโลฟานาต (allophanate) เป็น คาร์บอนไดออกไซด์ และแอมโมเนีย ในขณะที่เดียวกันยังมีการศึกษาอื่นๆ ที่พบว่าแบคทีเรียแกรมลบ

หลายชนิดซึ่งมีความสามารถในการย่อยสลายสารอาหารซึ้นนั้นมียีน *atzA*, *atzB* และ *atzC* อยู่และทำหน้าที่เหมือนกัน (de Souza *et al.*, 1998)

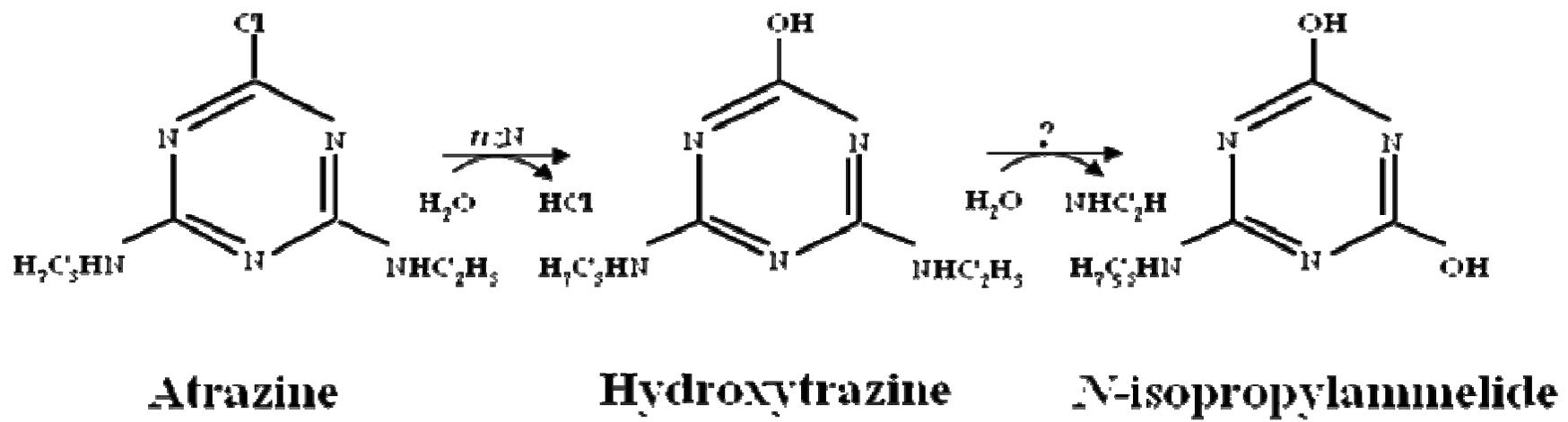
หลังจากการค้นพบกระบวนการย่อยสลายสารอาหารซึ้นในสายพันธุ์ ADP แล้ว ต่อมาในปี พ.ศ. 2543 ได้มีการค้นพบกระบวนการย่อยสลายสารอาหารซึ้นซึ่งแตกต่างจากที่พบในสายพันธุ์ ADP โดยพบในจุลินทรีย์ประเภทแบคทีเรียแกรมบวก จุลินทรีย์ชนิดแรกคือ *Nocardioides* sp. C190 (Top *et al.*, 2000b) ซึ่งมี *trzN* เป็นยีนในขั้นตอนแรกของกระบวนการย่อยสลาย (ภาพที่ 5) สำหรับ *trzN* มีลักษณะพิเศษกว่า *atzA* ตรงที่สามารถเปลี่ยนรูปสารเคมีในกลุ่ม เอส-ไทรอะซีน ได้หลายชนิด ในช่วงเวลาเดียวกันยังค้นพบจุลินทรีย์ประเภทแบคทีเรียแกรมบวก อีก 2 ชนิด คือ *Arthrobacter aurescens* สายพันธุ์ TC1 (Strong *et al.*, 2002) และ *Nocardioides* sp. SP12 (Piutti *et al.*, 2003) ในจุลินทรีย์ทั้ง 2 ชนิดนี้มียีน *trzN*, *atzB* และ *atzC* ในการย่อยสลายสารอาหารซึ้น ดังแสดงในภาพที่ 6 ซึ่งมีความแตกต่างจาก จุลินทรีย์อื่นๆ ที่กล่าวแล้วข้างต้น

9. การศึกษาการบำบัดดินที่มีการปนเปื้อนสารอาหารซึ้นโดยจุลินทรีย์

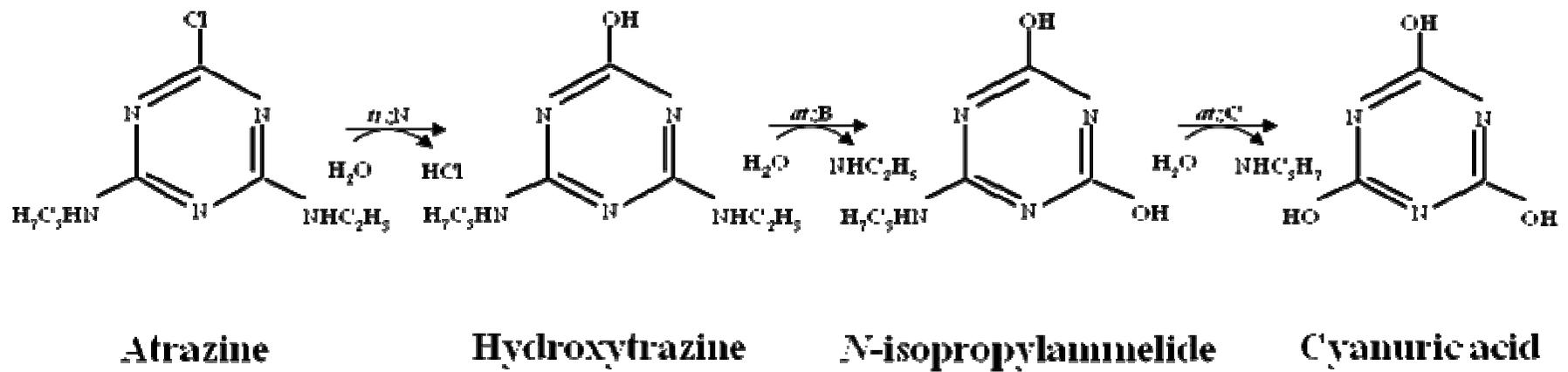
ได้มีการศึกษาการย่อยสลายสารอาหารซึ้นโดยใช้จุลินทรีย์มากมาย จุลินทรีย์ที่นำมาใช้ในการย่อยสลายสารอาหารซึ้น มีทั้งจุลินทรีย์สายพันธุ์เดี่ยวและจุลินทรีย์ที่ต้องอาศัยอยู่ร่วมกัน (consortia) จุลินทรีย์เหล่านี้มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายสารอาหารซึ้นที่ต่างกัน เช่น *Pseudomonas* สายพันธุ์ ADP สามารถย่อยสลายสารอาหารซึ้นได้ร้อยละ 17 ของสารอาหารซึ้นความเข้มข้น 1,500 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมดิน แต่การย่อยสลายจะเพิ่มขึ้นเป็นร้อยละ 70 เมื่อมีการเติมซิเตรทร่วมด้วย และยังมี *Pseudomonas* สายพันธุ์ YAYA6 ที่ย่อยสลายสารอาหารซึ้นได้สมบูรณ์ (จนเป็นคาร์บอนไดออกไซด์) เกินร้อยละ 60 ของสารอาหารซึ้นที่ปนเปื้อนในดินความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมดิน ภายในเวลา 49 วัน (Yanze-Kontchou and Gschwind., 1995) แต่จุลินทรีย์สายพันธุ์นี้จะย่อยสลายสารอาหารซึ้นได้ช้าลงเมื่อดินมีค่า pH ต่ำ และปริมาณอินทรีย์วัตถุสูง และในปี ค.ศ. 1994 Assaf and Turco ได้ทำการศึกษาในจุลินทรีย์ที่ต้องอาศัยอยู่ร่วมกันเพื่อการย่อยสลายสารอาหารซึ้นพบว่า จุลินทรีย์กลุ่มนี้สามารถเปลี่ยนรูปของสารอาหารซึ้นได้ถึงร้อยละ 87 ของสารอาหารซึ้นที่ปนเปื้อนในดินความเข้มข้น 30.2 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมดิน ภายในเวลา 25 วัน จากนั้นสารอาหารซึ้นที่เปลี่ยนรูปร้อยละ 60 สามารถเปลี่ยนเป็นคาร์บอนไดออกไซด์ได้ภายในเวลา 30 วัน



ภาพที่ 3 แผนภาพแสดงตำแหน่งยีนบนพลาสมิด pADP-1 ของ *Pseudomonas* sp. สายพันธุ์ ADP



ภาพที่ 5 กระบวนการย่อยสลายสารอาหารจีน โดย *Nocardioides* sp. C190



ภาพที่ 6 กระบวนการย่อยสลายสารอะทราซีนโดย *Arthrobacter aurescens* TC1

นอกจากนี้ ในปี ค.ศ. 1996 Alvey and Crowley ยังได้ศึกษาพบว่า พืชบริเวณรอบๆ รากไม่มีอิทธิพลต่ออัตราการย่อยสลายสารอาหารซึ้นของจุลินทรีย์ย่อยสลายสารอาหารซึ้นที่ต้องอาศัยอยู่ร่วมกัน อย่างไรก็ตาม จะพบประชากรของแบคทีเรียในบริเวณที่มีพีชมากกว่าบริเวณที่ไม่มีพีช และมีการทดลองโดยการเติม *Agrobacterium radiobacter* J14a ในดินบริเวณที่มีจำนวนประชากรจุลินทรีย์ย่อยสลายสารอาหารซึ้นปริมาณต่ำ และมีสารอาหารซึ้นปนเปื้อนที่ความเข้มข้น 50 และ 200 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม พบว่า เกิดการย่อยสลายในดินที่มีการเติมเชื้อมากกว่าในดินที่ไม่มีการเติมเชื้อ 2-5 เท่า (struthers *et al.*, 1998) การศึกษาปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายสารอาหารซึ้นในดินเหล่านี้เป็นสิ่งสำคัญในการปรับปรุงความสามารถของแบคทีเรียที่จะนำไปใช้ในการย่อยสลายสารอาหารซึ้นในดินที่มีการปนเปื้อน

10. การนำเข้าของสารอาหารซึ้นในประเทศไทย

การนำเข้าสารอาหารซึ้นในประเทศไทย กรมวิชาการเกษตรได้รวบรวมข้อมูลการนำเข้าวัตถุอันตรายทางการเกษตรของประเทศไทยไว้ พบว่าตั้งแต่ปี พ.ศ. 2543-2549 ประเทศไทยมีการนำเข้าสารอาหารซึ้นเป็นจำนวนมากถึง 1.7-2.4 ล้านกิโลกรัมต่อปี ซึ่งมีการนำเข้ามาในรูปของสารอาหารซึ้น และสารอาหารซึ้นผสมสารอามิทรินแสดงไว้ในตารางที่ 2 และจากข้อมูลการนำเข้ายังพบว่ามี การนำเข้าสารอาหารซึ้นติดอยู่ใน 10 อันดับแรก ของการนำเข้าวัตถุอันตรายทางการเกษตรทั้งหมดกว่า 200 ชนิด ในปี พ.ศ. 2546-2550 (ตารางที่ 3-7)

ตารางที่ 2 การนำเข้าสารอาหารจีนของประเทศไทย ปี 2544-2549

ปี พ.ศ.	สารเคมี	ปริมาณสารสำคัญ (ล้านกิโลกรัม)	มูลค่า (ล้านบาท)
2544	สารอาหารจีน	1.8	294
	สารอาหารจีนผสมสารอามีนีทริน	0.16	38
2545	สารอาหารจีน	1.4	245
	สารอาหารจีนผสมสารอามีนีทริน	0.37	84
2546	สารอาหารจีน	2	310
	สารอาหารจีนผสมสารอามีนีทริน	0.2	47
2547	สารอาหารจีน	1.7	222
	สารอาหารจีนผสมสารอามีนีทริน	0.13	28
2548	สารอาหารจีน	2	279
	สารอาหารจีนผสมสารอามีนีทริน	-	-
2549	สารอาหารจีน	2.4	306
	สารอาหารจีนผสมสารอามีนีทริน	0.08	16

ที่มา: กรมวิชาการเกษตร (2549)

ตารางที่ 3 ปริมาณการนำเข้าสารฆ่าศัตรูพืชที่นำเข้าสูงสุด 10 อันดับแรกในปี พ.ศ.2546

ชื่อสาร	ประเภท	ปริมาณ (ล้านกิโลกรัม)
glyphosate isopropylammonium	สารฆ่าวัชพืช	24.81
paraquat dichloride	สารฆ่าวัชพืช	8.36
2,4-D sodium salt	สารฆ่าวัชพืช	5.11
Ametryn	สารฆ่าวัชพืช	2.37
atrazine	สารฆ่าวัชพืช	2.36
parathion methyl	สารฆ่าแมลง	2.14
Mancozeb	สารฆ่าเชื้อรา	1.93
Endosulfan	สารฆ่าแมลง	1.76
carbendazim	สารฆ่าเชื้อรา	1.49
mathamidophos	สารฆ่าแมลง	1.32

ที่มา: กรมวิชาการเกษตร (2549)

ตารางที่ 4 ปริมาณการนำเข้าสารฆ่าศัตรูพืชที่นำเข้าสูงสุด 10 อันดับแรกในปี พ.ศ.2547

ชื่อสาร	ประเภท	ปริมาณ (ล้านกิโลกรัม)
glyphosate isopropylammonium	สารฆ่าวัชพืช	27.78
2,4-D sodium salt	สารฆ่าวัชพืช	5.22
paraquat dichloride	สารฆ่าวัชพืช	9.54
Ametryn	สารฆ่าวัชพืช	2.29
mancozeb	สารฆ่าเชื้อรา	2.31
Chlopyrifos	สารฆ่าแมลง	2.04
Atrazine	สารฆ่าวัชพืช	1.99
Butachlor	สารฆ่าวัชพืช	1.67
Propanil	สารฆ่าวัชพืช	1.42
Diuron	สารฆ่าวัชพืช	1.23

ที่มา: กรมวิชาการเกษตร (2549)

ตารางที่ 5 ปริมาณการนำเข้าสารฆ่าศัตรูพืชที่นำเข้าสูงสุด 10 อันดับแรกในปี พ.ศ.2548

ชื่อสาร	ประเภท	ปริมาณ (ล้านกิโลกรัม)
glyphosate isopropylammonium	สารฆ่าวัชพืช	20.68
paraquat dichloride	สารฆ่าวัชพืช	9.45
2,4-D sodium salt	สารฆ่าวัชพืช	5.05
Atrazine	สารฆ่าวัชพืช	2.40
mancozeb	สารฆ่าเชื้อรา	1.69
ametryn	สารฆ่าวัชพืช	1.56
Diuron	สารฆ่าวัชพืช	1.50
Alachlor	สารฆ่าวัชพืช	1.19
Chlopyrifos	สารฆ่าแมลง	1.06
Butachlor	สารฆ่าวัชพืช	1.03

ที่มา: กรมวิชาการเกษตร (2549)

ตารางที่ 6 ปริมาณการนำเข้าสารฆ่าศัตรูพืชที่นำเข้าสูงสุด 10 อันดับแรกในปี พ.ศ.2549

ชื่อสาร	ประเภท	ปริมาณ (ล้านกิโลกรัม)
glyphosate isopropylammonium	สารฆ่าวัชพืช	27.77
paraquat dichloride	สารฆ่าวัชพืช	14.02
2,4-D sodium salt	สารฆ่าวัชพืช	6.21
Atrazine	สารฆ่าวัชพืช	2.84
Mancozeb	สารฆ่าเชื้อรา	2.07
Ametryn	สารฆ่าวัชพืช	2.03
Butachlor	สารฆ่าวัชพืช	1.68
Chlorpyrifos	สารฆ่าวัชพืช	1.61
Sulfur	สารฆ่าวัชพืช	1.15
Propanil	สารฆ่าวัชพืช	1.10

ที่มา: กรมวิชาการเกษตร (2549)

ตารางที่ 7 ปริมาณการนำเข้าสารฆ่าศัตรูพืชที่นำเข้าสูงสุด 10 อันดับแรกในปี พ.ศ.2550

ชื่อสาร	ประเภท	ปริมาณ (ล้านกิโลกรัม)
glyphosate isopropylammonium	สารฆ่าวัชพืช	9.64
paraquat dichloride	สารฆ่าวัชพืช	4.85
Atrazine	สารฆ่าวัชพืช	2.04
2,4-D sodium salt	สารฆ่าวัชพืช	1.12
Abamectin	สารฆ่าแมลง	1.06
Ametryn	สารฆ่าวัชพืช	1.05
2,4-D dimethyl ammonium	สารฆ่าวัชพืช	0.59
Mancozeb	สารฆ่าเชื้อรา	0.55
Butachlor	สารฆ่าวัชพืช	0.55
Diuron	สารฆ่าวัชพืช	0.53

ที่มา: กรมวิชาการเกษตร (2549)

11. การปนเปื้อนของสารอาหารจีนในประเทศไทย

จากรายงานการสำรวจของกองวัดภูมิพิษ กรมวิชาการเกษตร ปี พ.ศ. 2539-2542 พบว่ามีการแพร่กระจายของสารอาหารจีนในแม่น้ำสายหลักของประเทศไทย โดยในปี พ.ศ. 2539 ภิญญา และคณะ พบปริมาณสารอาหารจีนในแม่น้ำแม่กลองอยู่ในช่วง 0.01-6.63 ไมโครกรัมต่อลิตรในน้ำ และอยู่ในช่วง 0.01-0.02 ไมโครกรัมต่อลิตร ในตะกอน และยังพบในแม่น้ำป่าสักอีกอยู่ในช่วง 0.01-0.57 ไมโครกรัมต่อลิตร ในน้ำ และในตะกอนพบปริมาณอยู่ในช่วง 0.01-0.02 ไมโครกรัมต่อลิตร (ภิญญา และคณะ, 2540) ต่อมาในปี พ.ศ. 2542 วิภา และคณะยังตรวจพบสารอาหารจีนบริเวณห้วยน้ำอูน และแม่น้ำสงคราม ซึ่งมีปริมาณอยู่ในช่วง 0.01-0.95 ไมโครกรัมต่อลิตร ในน้ำ และ 0.01-1.17 ไมโครกรัมต่อลิตร ในตะกอน

ศิวาภรณ์ และคณะ (2545) ตรวจพบสารกลุ่มไตรอะซีนในน้ำใต้ดิน ได้แก่ สารอาหารจีน สารอะมีทริน และสารเมทธิบูซีน บริเวณภาคกลางตอนล่างและภาคตะวันออกเฉียงเหนือตอนล่างของประเทศไทย โดยพบสารอาหารจีนและสารอะมีทรินในปริมาณ 0.02-18.9 ไมโครกรัมต่อลิตร ในช่วงฤดูฝน ปี พ.ศ. 2543 และพบสารอาหารจีนในปริมาณ 0.5-4.0 ไมโครกรัมต่อลิตร ในช่วงฤดูแล้ง ปี พ.ศ. 2544

สุพัตรา (2548) ตรวจพบสารอาหารจีนในน้ำท่าและตะกอนดินบริเวณพื้นที่ลุ่มน้ำคลองอีเต่า ซึ่งพื้นที่บริเวณนั้นร้อยละ 75.10 เป็นพื้นที่ปลูกข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ที่มีการใช้สารอาหารจีน พบว่ามีปริมาณสารอาหารจีนในน้ำท่า มีค่าอยู่ระหว่าง 0.030-4.445 ไมโครกรัมต่อลิตร และพบในตะกอนดินมีค่าอยู่ระหว่าง 0.001-0.179 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม

12. ลักษณะของ *Arthrobacter*

Arthrobacter เป็นจีส (genus) ของแบคทีเรียที่พบได้ในดิน *Arthrobacter* เป็นสมาชิกที่มีเปอร์เซ็นต์ของจำนวนเบส G+C ในปริมาณสูง (Jones and Keddie, 1992; Stackebrandt and Woese, 1981) ทุกๆ สปีชีส์ (species) เป็นแบคทีเรียแกรมบวก สามารถเจริญเติบโตได้ในสภาพที่มีออกซิเจน มีรูปร่าง 2 แบบ คือ ในการเจริญเติบโตช่วง exponential phase มีรูปร่างลักษณะแบบแท่ง (rods) และในช่วง stationary phase มีลักษณะกลม (cocci) (DePrada *et al.*, 1996; Loveland *et al.*, 1994) จีสนี้

มีลักษณะพิเศษ เนื่องจากมีพฤติกรรมที่ผิดปกติในช่วงการแบ่งเซลล์อย่างชัดเจนตรงรอยต่อของผนังเซลล์ชั้นนอก นักจุลชีววิทยา กล่าวว่าชนิดของการแบ่งเซลล์จากลักษณะแ่งไปเป็นลักษณะกลมเป็นการกลับทิศทาง เมื่อดูใต้กล้องจุลทรรศน์จะเห็นว่าแบคทีเรียชนิดนี้แบ่งเซลล์เป็นรูปตัว V (V shape) จากนั้นแบคทีเรียจะกลายรูปร่างเป็นลักษณะกลมซึ่งจะทนทานต่อสภาพที่แห้งแล้ง (Boylen, 1973; Chen and Alexander, 1973; Labeda *et al.*, 1976) และอดอยาก (Boylen and Ensign, 1970; Boylen and Mulks, 1978) ซึ่งเป็นปัจจัยสำคัญสำหรับการเอาตัวรอดของจุลินทรีย์ในดิน (Gray, 1976)

Arthrobacter สามารถย่อยสลายสารประกอบได้หลายชนิด เช่น *Arthrobacter atrocyaneus* MCM B-425 สามารถเปลี่ยนรูปสารฆ่าศัตรูพืชโมโนโครโทฟอส (monocrotophos) ซึ่งเป็นสารออร์แกโนฟอสฟอรัส (Baitsch *et al.*, 2001) และพบ *Arthrobacter* sp. สายพันธุ์ RC100 สามารถย่อยสลายสารคาร์บาริล (1-naphthyl N-methylcarbamate) ได้ โดยใช้สารคาร์บาริลเป็นแหล่งคาร์บอน (Hayatsu *et al.*, 2001) นอกจากนี้ยังพบ *Arthrobacter* ทั้งที่เป็นแบคทีเรียชนิดเดี่ยว และชนิดที่ต้องอาศัยอยู่ร่วมกับจุลินทรีย์ชนิดอื่นที่สามารถย่อยสลายสารประกอบที่ย่อยสลายยากได้อีกด้วย (Casellas *et al.*, 1997)

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. ขวดเก็บตัวอย่าง
2. ถังพลาสติกสำหรับเก็บตัวอย่างดิน
3. ถังน้ำแข็ง
4. อุปกรณ์การเก็บดิน ได้แก่ พลั่วมือ
5. จานสำหรับเลี้ยงจุลินทรีย์
6. ขวดรูปชมพู่ ขนาด 125, 250 และ 500 มิลลิลิตร
7. หม้อนึ่งความดันไอน้ำ
8. กล้องจุลทรรศน์
9. เครื่อง DNA Thermal cycle
10. เครื่องปั่นเหวี่ยง
11. เครื่อง mini gel system
12. ตู้บ่มเชื้อ (incubator)
13. เครื่อง spectrophotometer
14. เครื่อง gas chromatography (GC)
15. ขวดบรรจุสาร (vial) สำหรับเครื่อง GC ขนาด 1.5 มิลลิลิตร
16. เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ (shaker incubator)
17. เครื่อง atomic absorption spectrophotometer
18. เครื่องกลั่น
19. กระดาษกรอง

วิธีการ

1. การแยกจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายสารอาหารจากดิน

1.1 การเก็บตัวอย่างดิน

เก็บตัวอย่างดินที่จะนำมาแยกจุลินทรีย์จากบริเวณแปลงปลูกอ้อยของศูนย์วิจัยอ้อยและน้ำตาลมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน ซึ่งมีประวัติการใช้สารอาหารอินในการควบคุมวัชพืชในไร่อ้อยมานานถึง 21 ปี โดยเก็บดินที่ความลึก 0-10 เซนติเมตร แล้วนำตัวอย่างดินแช่น้ำแข็งในถังน้ำแข็งทันที จากนั้นนำมาเก็บในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 °C จนกว่าจะทำการทดลองต่อไป

1.2 การแยกจุลินทรีย์จากดิน (direct isolation)

ชั่งดินมา 10 กรัม ใส่ใน 0.85 % NaCl 90 มิลลิลิตร ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว จากนั้นนำไปเขย่าเป็นเวลา 30 นาทีด้วยเครื่องเขย่า (agitator) เพื่อให้ดินแตกกลายเป็นสารละลายดิน ตั้งทิ้งไว้ 15 นาที นำสารละลายไปเจือจางด้วย 0.85 % NaCl ให้ได้ความเข้มข้น 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , ..., 10^{-9} แล้วนำมา spread plate บนอาหารแข็ง R-medium 3 สูตรดังนี้

สูตรที่ 1 R-medium ที่ไม่มี NH_4Cl และ Glucose แต่เติมสารอาหารอิน 500 มิลลิกรัมต่อลิตร

สูตรที่ 2 R-medium ที่ไม่มี Glucose แต่เติมสารอาหารอิน 500 มิลลิกรัมต่อลิตร

สูตรที่ 3 R-medium ที่ไม่มี NH_4Cl แต่เติมสารอาหารอิน 500 มิลลิกรัมต่อลิตร

อาหาร R-medium มีส่วนประกอบและปริมาณของอาหาร ดังแสดงในตารางที่ 8

ตารางที่ 8 ส่วนประกอบของอาหาร R-medium

สารเคมี	ปริมาณ	
1M KH_2PO_4 (pH 6.8)	67	มิลลิลิตร
20% glucose	50	มิลลิลิตร
12% NH_4Cl	10	มิลลิลิตร
200X R-salt*	5	มิลลิลิตร
2000X Trace-element*	0.5	มิลลิลิตร
1M CaCl_2 *	0.2	มิลลิลิตร
atrazine*	500	มิลลิกรัมต่อลิตร
Distilled water	1,000	มิลลิลิตร
Agar	15	กรัม

หมายเหตุ * หมายถึง สารที่ไม่ได้ผ่านการฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอ และเติมหลังสารที่ไม่มี * ผ่านการฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดัน ไอแล้ว

สำหรับการเตรียม 200X R-salt และ 2000X Trace-element จะทำการแยกกันดังนี้

การเตรียม 200X R-salt ปริมาตร 500 มิลลิลิตร มีส่วนประกอบและปริมาณ ดังแสดงใน ตารางที่ 9

ตารางที่ 9 ส่วนประกอบของ 200X R-salt

สารเคมี	ปริมาณ	
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	40	กรัม
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1	กรัม
HCl (conc.)	2	มิลลิลิตร

ชั่ง $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ และ $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ จากนั้นเติมน้ำลงไปประมาณ 450 มิลลิลิตร คนให้ละลาย แล้วค่อยเติมกรด HCl (conc.) นำสารละลายที่ได้มาปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร

500 มิลลิลิตร แล้วฆ่าเชื้อโดยผ่านการกรองด้วยกระดาษกรอง (ADVENTEC MFS, Inc., U.S.A.) ขนาด 0.2 ไมโครเมตร

การเตรียม 2000X Trace-element ปริมาตร 500 มิลลิลิตร มีส่วนประกอบและปริมาณ ดังแสดงในตารางที่ 10

ตารางที่ 10 ส่วนประกอบของ 2000X Trace-element

สารเคมี	ปริมาณ
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	10 มิลลิกรัม
MnSO ₄ ·4H ₂ O	3 มิลลิกรัม
H ₃ BO ₃	30 มิลลิกรัม
CoCl ₂ ·6H ₂ O	20 มิลลิกรัม
CuCl ₂ ·2H ₂ O	1 มิลลิกรัม
NiCl ₂ ·6H ₂ O	2 มิลลิกรัม
NaMoO ₄ ·2H ₂ O	3 มิลลิกรัม

นำสารทั้งหมดในตารางข้างตามปริมาณที่กำหนด จากนั้นเติมน้ำลงไปประมาณ 450 มิลลิลิตร คนให้ละลาย แล้วนำสารละลายที่ได้มาปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 500 มิลลิลิตร และฆ่าเชื้อโดยผ่านการกรองด้วยกระดาษกรอง (ADVENTEC MFS, Inc., U.S.A.) ขนาด 0.2 ไมโครเมตร

1.3 การแยกจุลินทรีย์จากดินด้วยเทคนิค enrichment culture

การแยกจุลินทรีย์ด้วยเทคนิค enrichment culture อาหารเหลวที่ใช้ในการทดลองนี้คือ อาหารเหลว R-medium ปริมาตร 20 มิลลิลิตร มีด้วยกัน 3 สูตร ดังนี้

สูตรที่ 1 R-medium แต่เติมอาหารขึ้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร แทน NH₄Cl และ Glucose

สูตรที่ 2 R-medium แต่เติมอาหารขึ้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร แทน Glucose

สูตรที่ 3 R-medium แต่เติมอาหารขึ้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร แทน NH₄Cl

ทำการทดลองในขวดรูปชมพู่ขนาด 150 มิลลิลิตร ชั่งดิน 5 กรัมใส่ลงไปในอาหารเหลวแต่ละสูตรที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว จากนั้นนำไปเขย่าด้วยเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 28 °C เป็นเวลา 2 สัปดาห์ แล้วนำสารละลายดินที่บ่มไว้ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ถ่ายใส่ในอาหาร R-medium ปริมาตร 20 มิลลิลิตร สูตรเดียวกันในขวดใหม่ แล้วนำไปเขย่าต่อที่สภาวะเดิม โดยจะมีการเปลี่ยนถ่ายสารละลายดินที่บ่มไว้ใส่ในอาหารใหม่ทุกๆ 2 สัปดาห์ จนกระทั่งสารละลายดินมีลักษณะใส โดยในแต่ละครั้งที่มีการถ่ายสารละลายดินที่บ่มไว้สู่อาหารใหม่ จะนำสารละลายดินในแต่ละครั้ง มาทำการเจือจางด้วย 0.85% NaCl ให้ได้ความเข้มข้น 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , ..., 10^{-9} แล้วนำมา spread plate ในอาหารแข็ง R-medium สูตรเดียวกับอาหารเหลวที่ทำ enrichment culture (ภาพที่ 7)

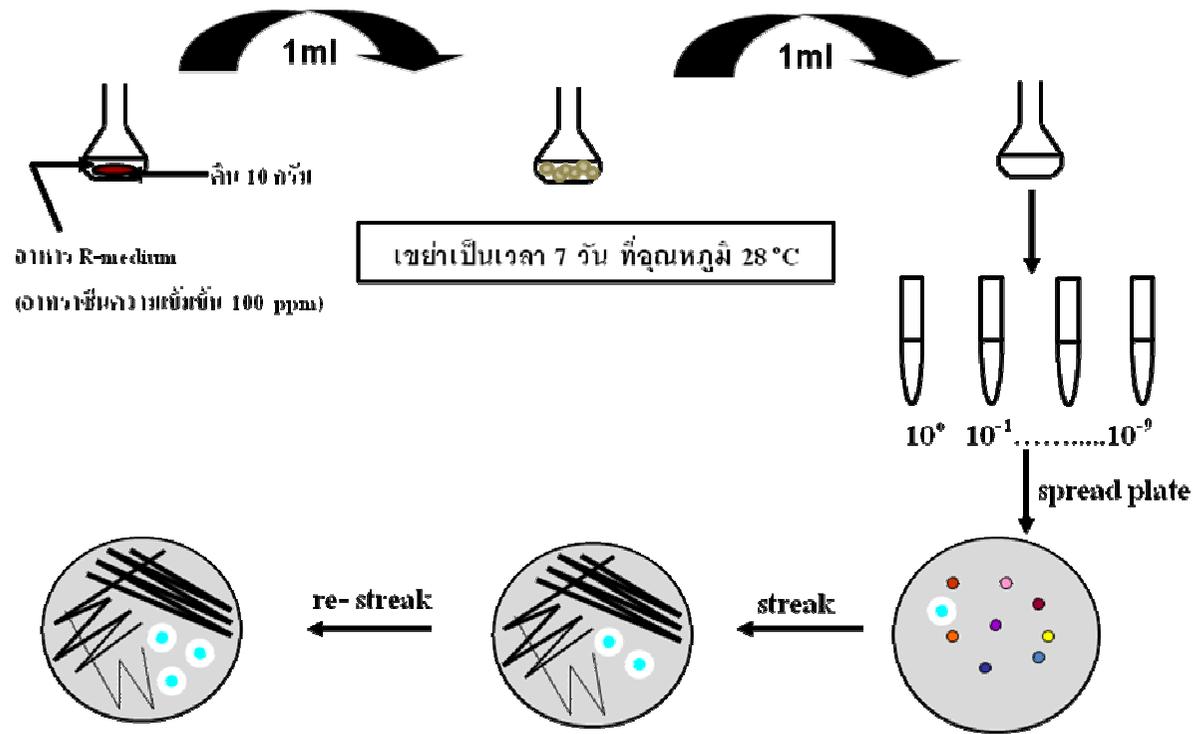
1.4 การแยกจุลินทรีย์ให้บริสุทธิ์

นำโคโลนีที่แสดงวงใสรอบๆ โคโลนีบนอาหารแข็ง R-medium มา streak บนอาหารแข็ง R-medium งานใหม่ ซึ่งเป็นสูตรเดียวกับอาหารแข็งที่ใช้ในการคัดแยกแบคทีเรียด้วยวิธีการสกัดแบคทีเรียโดยตรงจากดิน หรือสูตรเดียวกับอาหารเหลวที่ใช้ในการคัดแยกแบคทีเรียด้วยเทคนิค enrichment culture เมื่อแบคทีเรียโตนำมา re-streak จนกระทั่งได้โคโลนีเดี่ยว (ภาพที่ 7)

2. การบ่งชี้และจัดจำแนกจุลินทรีย์

2.1 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาเบื้องต้นโดยการใช้อุปกรณ์จุลทรรศน์ (microscopic determination)

นำแบคทีเรียที่แสดงวงใสรอบๆ โคโลนีมา 1 โคโลนี หรือโคโลนีเดี่ยว มาเลี้ยงในอาหารเหลว R-medium แล้วเก็บตัวอย่างที่เวลา 18 ชั่วโมง เพื่อให้ได้จุลินทรีย์ที่เจริญเติบโตอยู่ในช่วง log phase และเลี้ยงต่อไปอีกจนถึง 33 ชั่วโมง เพื่อให้ได้จุลินทรีย์ที่เจริญเติบโตอยู่ในช่วง stationary phase จากนั้นนำจุลินทรีย์ที่อยู่ในอาหารเหลวมาหยดบนสไลด์ปิดด้วยกระจกปิดสไลด์ แล้วนำไปส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (Olympus, Japan) ที่กำลังขยาย 100 เท่า เพื่อศึกษารูปร่างของจุลินทรีย์ และวัดขนาดของจุลินทรีย์ด้วย micro meter (Olympus, Japan)



ภาพที่ 7 เทคนิค enrichment culture และการทำให้เชื้อบริสุทธิ์

2.2 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาเบื้องต้นโดยวิธีการย้อมสีแบบแกรม (Benson, 2005)

นำจุลินทรีย์มาเลี้ยงในอาหารเหลว R-medium เป็นเวลา 18 ชั่วโมงเพื่อให้ได้จุลินทรีย์ที่เจริญเติบโตอยู่ในช่วง log phase และเลี้ยงต่อไปอีกเป็นเวลา 33 ชั่วโมง เพื่อให้ได้จุลินทรีย์ที่เจริญเติบโตอยู่ในช่วง stationary phase จากนั้นนำมาทำการย้อมแกรมด้วยวิธีของ Benson โดยมีรายละเอียด ดังนี้

ทำการสเมียร์บนสไลด์ จากนั้นนำมาลนบนเปลวไฟ 2-3 ครั้ง เพื่อให้เชื้อติดแน่นบนสไลด์ แล้วหยด crystal violet ทิ้งไว้ประมาณ 20 วินาที ล้างด้วยน้ำเปล่า หยดไอโอดีน ทิ้งไว้ 1/2-1 นาที แล้วด้วยแอลกอฮอล์ 95% โดยให้ไหลผ่านช้าๆ บนสไลด์ จนกระทั่งไม่มีสีของ crystal violet ปนไปกับแอลกอฮอล์ (อย่างน้อย 20 วินาที) จากนั้นย้อมทับด้วย safranin O ทิ้งไว้ 1 นาที ล้างสีออกด้วยน้ำเปล่า ซับน้ำให้แห้งด้วยกระดาษ แล้วนำไปส่องใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 100 เท่า เพื่อดูการติดสีของจุลินทรีย์

2.3 การศึกษาระดับดีเอ็นเอในส่วนของยีน 16S ไรโบโซมอลอาร์เอ็นเอ (16S rRNA gene)

ศึกษาชนิดของเชื้อโดยทำการศึกษาระดับดีเอ็นเอในส่วนของยีน 16S rRNA ไรโบโซมอลอาร์เอ็นเอ โดยนำจุลินทรีย์ที่เป็นโคโลนีเดี่ยว 1 โคโลนี บนอาหารแข็ง มาใส่ในน้ำที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้วปริมาตร 50 ไมโครลิตร ใช้ไปเปิดดูดุ้นลงเพื่อให้แบคทีเรียกระจายเป็นเนื้อเดียวกันในน้ำ หลังจากนั้นนำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 10 นาที แล้วนำมาวางบนน้ำแข็งทันที นำสารละลายแบคทีเรียที่ได้มาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที แล้วดูดสารละลายใส 25 ไมโครลิตร ใส่หลอด PCR ใหม่เพื่อใช้ในปฏิกิริยา Polymerase chain reaction (PCR)

การทำปฏิกิริยา PCR นำปริมาตรรวม 50 ไมโครลิตร มีส่วนประกอบดังนี้ ดีเอ็นเอ 1 ไมโครลิตร, dNTPs (dATP,dCTP,dTTP และ dGTP) ความเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 0.40 ไมโครลิตร, 10X buffer 5 ไมโครลิตร, MgCl₂ ความเข้มข้น 25 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 3 ไมโครลิตร, universal primer forward และ reverse ความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์ (16S 926f: AAA CTY AAA KGA ATT GAC GG และ 16S 1392r: ACG GGC GGT GTG TRC) ปริมาตร 0.5 ไมโครลิตร และ Taq DNA Polymerase (Fermentas, Canada) ความเข้มข้น 2.5 ยูนิต ปริมาตร 0.25 ไมโครลิตร ปฏิกิริยาสังเคราะห์ดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยา PCR ทำที่ initiation denaturation 98 °C เป็นเวลา 5 นาที

denaturing 95 °C เป็นเวลา 30 วินาที annealing 60 °C เป็นเวลา 1 นาที และ extension 72 °C เป็นเวลา 1 นาที จำนวน 35 รอบ และตามด้วยอุณหภูมิที่ 72 °C เป็นเวลา 2 นาที โดยใช้เครื่อง DNA thermal cycle (PTC 100, MJ. Research) ผลผลิตจากปฏิกิริยา PCR ที่ได้ปริมาณ 10 ไมโครลิตร นำมาวิเคราะห์ด้วยเทคนิค gel electrophoresis บน 1% agarose gel ใน 1X TBE buffer และผลผลิต PCR 40 ไมโครลิตร นำไปวิเคราะห์ลำดับเบส แล้วนำข้อมูลลำดับเบสของเชื้อที่ได้นำมาทำการเปรียบเทียบลำดับเบสในฐานข้อมูลของ Genbank ด้วยโปรแกรม Blastn (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>)

3. ศึกษาการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ในอาหารเหลว R-medium ที่มีอาหารจีนเป็นแหล่งไนโตรเจนและ/หรือคาร์บอน

3.1 การเตรียมจุลินทรีย์สำหรับเป็น inoculums

การเตรียม inoculums ทำโดยนำเชื้อบริสุทธิ์มา 1 โคโลนี ใส่ในอาหารเหลว R-medium ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ที่ใส่สารอาหารจีนเป็นแหล่งไนโตรเจนความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร แทน NH_4Cl จากนั้นนำมาบ่มโดยเขย่าที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง วัดค่าการเจริญเติบโต (OD_{600}) ได้เท่ากับ 0.8 แล้วนำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที แล้วนำตะกอนเซลล์ที่ได้มาล้างด้วย 0.85% NaCl 3 ครั้ง ละลายตะกอนด้วย phosphate buffer ปริมาตร 10 มิลลิลิตร เพื่อนำไปใช้ในการทดลองต่อไป

3.2 การศึกษาการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ในอาหาร R-medium แบบต่างๆ

นำจุลินทรีย์ที่เตรียมเป็น inoculums ปริมาตร 200 ไมโครลิตร มาถ่ายใส่อาหาร R-medium ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ซึ่งอาหารที่ใช้ในการทดลองนี้เป็นอาหาร R-medium ที่มีความแตกต่างกัน 4 แบบ ด้วยกัน คือ

1. อาหาร R-medium (RM)
2. อาหาร R-medium ที่ใส่สารอาหารจีน (RMNN)
3. อาหาร R-medium ที่ใส่สารอาหารจีนความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร แทน NH_4Cl (RMN)
4. อาหาร R-medium ที่ใส่สารอาหารจีนความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร แทนน้ำตาลกลูโคส (RMC)

ทำการทดลองในขวดรูปชมพู่ขนาด 150 มิลลิลิตร แต่ละอาหารทำทั้งหมด 3 ซ้ำ จากนั้นนำมาวัดการเจริญเติบโต ด้วยเครื่อง spectrophotometer รุ่น 550 series, Beckman (Beckman Coulter, Inc., Fullerton, California) ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ทุก 3 ชั่วโมง เป็นเวลา 60 ชั่วโมง

4. การศึกษายีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการย่อยสลายสารอาหาราซีน

ศึกษายีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการย่อยสลายสารอาหาราซีนของจุลินทรีย์ที่แยกได้ ซึ่งยีนที่ทำการศึกษาคือยีน *trzN*, *atzB* และ *atzC* โดยวิธีการทำปฏิกิริยา PCR สำหรับการทำปฏิกิริยา PCR ของยีน *trzN* ในปริมาตรรวม 50 ไมโครลิตร มีส่วนประกอบดังนี้ ดีเอ็นเอ 1 ไมโครลิตร, dNTPs (dATP, dCTP, dTTP และ dGTP) ความเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 0.40 ไมโครลิตร, 10X buffer ปริมาตร 5 ไมโครลิตร, MgCl₂ ความเข้มข้น 25 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 3 ไมโครลิตร, primer forward และ reverse ความเข้มข้นอย่างละ 100 ไมโครโมลาร์ (*trzNC190-10 f* : CAC CAG CAC CTG GAA GG และ *trzNC190-11 r* : GAT TCG AAC CAT AAA CG) (Mulbry *et al.*, 2002) และ Taq DNA Polymerase ความเข้มข้น 2.5 ยูนิต ปริมาตร 0.25 ไมโครลิตร ปฏิกิริยาตั้งคราะห้ดีเอ็นเอ ทำที่ initiation denaturation 94 °C เป็นเวลา 3 นาที denaturing 94 °C เป็นเวลา 1 นาที annealing 55 °C เป็นเวลา 1 นาที และ extension 72 °C เป็นเวลา 2 นาที จำนวน 29 รอบ และตามด้วยอุณหภูมิที่ 72 °C เป็นเวลา 5 นาที โดยใช้เครื่อง DNA thermal cycle (MJ. Research, Model PTC 100) นำผลผลิตจากปฏิกิริยา PCR ที่ได้ 10 ไมโครลิตรมาวิเคราะห์ด้วยเทคนิค gel electrophoresis บน 1% agarose gel ใน 1X TBE buffer

การทำปฏิกิริยา PCR ของยีน *atzB* และ *atzC* ในปริมาตรรวม 50 ไมโครลิตร มีส่วนประกอบดังนี้ ดีเอ็นเอ 1 ไมโครลิตร, dNTPs (dATP, dCTP, dTTP และ dGTP) ความเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 0.40 ไมโครลิตร, 10X buffer ปริมาตร 5 ไมโครลิตร, MgCl₂ ความเข้มข้น 25 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 3 ไมโครลิตร, primer forward และ reverse ความเข้มข้นอย่างละ 100 ไมโครโมลาร์ primer สำหรับยีน *atzB* (*atzB* 973 f: TCA CCG GGG ATG TCG CGG GC และ *atzB* 1476 r: CTC TCC CGC ATG GCA TCG GG) และสำหรับยีน *atzC* (*atzC* 185 f: AGT CAG CGA AGG GCG TAG GTA TCA และ *atzC* 608 r : GAC AAA TCC GGG AGA CAC AAG GTT) (de Souza *et al.*, 1998) และ Taq DNA Polymerase ความเข้มข้น 2.5 ยูนิต ปริมาตร 0.25 ไมโครลิตร ปฏิกิริยาตั้งคราะห้ดีเอ็นเอทำที่ initiation denaturation 98 °C เป็นเวลา 5 นาที denaturing 95 °C เป็น

เวลา 30 วินาที annealing 60 °C 1 นาที และ extension 72 °C เป็นเวลา 1 นาที จำนวน 35 รอบ และตามด้วยอุณหภูมิที่ 72 °C เป็นเวลา 2 นาที โดยใช้เครื่อง DNA thermal cycle (PTC 100, MJ. Research) นำผลผลิตจากปฏิกิริยา PCR ที่ได้ 10 ไมโครลิตรมาวิเคราะห์ด้วยเทคนิค gel electrophoresis บน 1% agarose gel ใน 1X TBE buffer

5. ศึกษาประสิทธิภาพในการย่อยสลายสารอาหารอินทรีย์และความอยู่รอดของจุลินทรีย์ในดินจำลอง

5.1 เก็บตัวอย่างดินจากบริเวณที่มีการปลูกอ้อย ซึ่งไม่มีประวัติการใช้สารอาหารอินทรีย์มาก่อน ภายในมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน แบ่งเป็น 2 ส่วน ดังนี้

5.1.1 นำตัวอย่างดินไปผึ่งลมให้แห้ง จากนั้นนำมาผ่านตะแกรงขนาด 2 มิลลิเมตร และ 0.5 มิลลิเมตร เพื่อนำไปวิเคราะห์สมบัติทางเคมี ดังนี้

วัด pH ด้วย pH meter

การวัด pH ทำได้โดยชั่งดินตัวอย่าง กับน้ำกลั่น อัตราส่วน 1:1 ในกระบอกพลาสติกขนาด 100 มิลลิลิตร ใช้แท่งแก้วคนดินและน้ำเข้ากัน ทิ้งไว้ประมาณ 30 นาที ในระหว่างที่วางทิ้งไว้ควรจะคนดินเป็นครั้งคราว เมื่อครบ 30 นาที นำไปวัดด้วย pH meter

วิเคราะห์อินทรีย์วัตถุในดิน

เป็นการทำปฏิกิริยา wet oxidation ซึ่งเป็นวิธีของ Walkley and Black (Walkley and Black, 1934) โดยใช้ตัวอย่างดินที่บดไว้ละเอียด (ผ่านตะแกรงขนาด 0.5 มิลลิเมตร)

การคำนวณ

$$\% \text{ organic carbon} = \frac{(\text{me K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7 - \text{me FeSO}_4) \times 0.003 \times 100 \times 1.33}{\text{weight of sample in grams}}$$

$$\% \text{ อินทรีย์วัตถุ} = \% \text{ organic carbon} \times 1.72$$

วิเคราะห์หาไนโตรเจนทั้งหมด (total nitrogen)

การวิเคราะห์หาไนโตรเจนทั้งหมด ใช้วิธี Kjeldahl method (Jackson, 1965; ทศนีย์ และจรงค์ษ์, 2542) ประกอบด้วย 2 ส่วนคือ digestion และ distillation

Digestion เป็นการย่อยตัวอย่างดิน (ผ่านตะแกรงร่อนขนาด 0.5 มิลลิเมตร) ด้วยกรด ซัลฟูริกเข้มข้น ที่อุณหภูมิ 320 °C

Distillation เป็นขั้นตอนการกลั่นสารละลายที่ได้จากการย่อย และดักจับไนโตรเจน ด้วย H₃BO₃ indicator

การคำนวณ

$$\% N = \frac{\text{ml HCl used (sample-blank titration)} \times \text{normality ของ HCl} \times 1.4}{\text{weight of soil sample (grams)}}$$

วิเคราะห์หาฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์ (available phosphorous)

วิธีที่ใช้เป็นวิธีของ Bray II (Bray and Krutz, 1945) สกัดดินตัวอย่างด้วยสารละลาย Bray II จากนั้นนำมากรองด้วยกระดาษกรอง Whatmann เบอร์ 2 แล้วนำสารละลาย (aliquot) ไปวัด ปริมาณฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์ด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 882 นาโนเมตร

วิเคราะห์หาโพแทสเซียมที่แลกเปลี่ยนได้ (exchangeable K)

นำดินตัวอย่างมาสกัดด้วยสารละลาย NH₄OAc เขย่าด้วยเครื่องเขย่าเป็นเวลา 30 นาที กรองด้วยกระดาษกรอง Whatmann เบอร์ 2 วิเคราะห์หาปริมาณ K ด้วย Atomic absorption spectrophotometer (Varian AA-220, USA.)

5.1.2 นำดินที่แช่ในน้ำแข็งที่เตรียมไว้ มาร่อนผ่านตะแกรงขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางขนาด 2 มิลลิเมตร จากนั้นนำดินที่ผ่านการร่อนแล้วเก็บไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 °C จนกว่าจะทำการทดลองต่อไป

5.2 การเตรียมจุลินทรีย์สำหรับเป็น inoculums

การเตรียม inoculums ทำโดยนำจุลินทรีย์บริสุทธิ์มา 1 โคโลนี ใส่ ในอาหารเหลว R-medium ที่ใส่สารอาหารซึ่งเป็นแหล่งไนโตรเจนความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร แทน NH_4Cl ปริมาตร 100 มิลลิตร จากนั้นนำมาบ่มโดยเขย่าที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง วัดค่า OD_{600} ได้เท่ากับ 0.8 แล้วนำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที แล้วนำตะกอนเซลล์ที่ได้มาล้างด้วย 0.85% NaCl 3 ครั้ง ละลายตะกอนด้วย phosphate buffer เพื่อนำไปใช้ในการทดลองต่อไป

5.3 ทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายสารอาหารในดิน โดยวางแผนการทดลองดังนี้

- ดำเนินการทดลองที่ 1 ดินชุดควบคุม (control)
- ดำเนินการทดลองที่ 2 ดินที่มีการเติมสารอาหาร
- ดำเนินการทดลองที่ 3 ดินที่มีการเติมสารอาหารและจุลินทรีย์
- ดำเนินการทดลองที่ 4 ดินที่มีการเติมสารอาหาร, จุลินทรีย์ และซีเตรท
- ดำเนินการทดลองที่ 5 ดินที่มีการเติมสารอาหาร, จุลินทรีย์ และแอมโมเนียมซัลเฟต
- ดำเนินการทดลองที่ 6 ดินที่มีการเติมสารอาหาร, จุลินทรีย์, ซีเตรท และแอมโมเนียมซัลเฟต
- ดำเนินการทดลองที่ 7 ดินที่ผ่านการฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ ที่อุณหภูมิ 121 °C เป็นเวลา 20 นาที ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว จำนวน 3 ครั้ง โดยแต่ละครั้งจะทิ้งไว้หลังฆ่าเชื้อเสร็จแล้วเป็นเวลา 1 วัน เพื่อให้ดินเย็น และให้จุลินทรีย์ชนิดที่สร้างสปอร์เจริญแล้วทำการฆ่าจุลินทรีย์ที่เจริญนี้ด้วยความดันไอน้ำอีกครั้งหนึ่ง เติมสารอาหารและเชื้อจุลินทรีย์

การทดลองนี้ทำในขวดแก้วปากกว้าง ขนาด 4 ออนซ์ โดยดำเนินการทดลองละ 3 ซ้ำ แต่ละดำเนินการทดลองบรรจุดิน 35 กรัม เติมสารอาหารความเข้มข้น 150 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมดิน (ดำเนินการทดลองที่ 2-7) สำหรับดำเนินการทดลองที่มีเติมจุลินทรีย์ (ดำเนินการทดลองที่ 3-7) จะมีการเติมจุลินทรีย์จำนวน 10^8 CFUต่อมิลลิลิตร ส่วนดำเนินการทดลองที่มีการเติมซีเตรท (ดำเนินการ

ทดลองที่ 4 และ 6) จะมีการเติมซีเตรทในปริมาณ 0.31 กรัม เพื่อเป็นแหล่งคาร์บอน และดำเนินการทดลองที่มีการเติมแอมโมเนียมซัลเฟต (ดำเนินการทดลองที่ 5 และ 6) จะมีการเติมแอมโมเนียมซัลเฟตในปริมาณ 0.16 กรัม แล้วนำดินที่ผสมแล้วบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง (28-32 °C) เป็นระยะเวลา 3 สัปดาห์ เก็บตัวอย่างดินที่ 0, 1, 2 และ 3 สัปดาห์ โดยดินที่เก็บจะแยกเป็นสองส่วนคือ ส่วนที่ 1 นำไปตรวจวิเคราะห์ปริมาณสารอาหารอินทรีย์ที่อยู่ในดิน และส่วนที่ 2 ตรวจวิเคราะห์ปริมาณจุลินทรีย์สายพันธุ์ ADB ในดินที่ยังมีชีวิตรอดอยู่ในดิน โดยมีรายละเอียดดังต่อไปนี้

ส่วนที่ 1 นำไปหาปริมาณสารอาหารอินทรีย์ที่ยังคงอยู่ในดิน โดยมีวิธีการดังนี้ ซึ่งตัวอย่างดิน 5 กรัม ใส่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร เติมสารละลายสกัดที่มีส่วนผสมของ ethylacetate : hexane อัตราส่วน 1 : 1 ปริมาตร 15 มิลลิลิตร (Mandelbaum *et al.*, 1995) จากนั้นนำไปเขย่าด้วยเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 140 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 คืน ตั้งทิ้งไว้ให้ตกตะกอนแล้วนำสารละลายใสที่สกัดได้มาผ่านโซเดียมซัลเฟตไร้น้ำ จากนั้นเก็บสารละลายที่ได้ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ในขวด vial แล้วนำไปวิเคราะห์ปริมาณสารอาหารอินทรีย์ด้วยเครื่อง Gas Chromatography (GC) (Thermo-Finnigan, Manchester; UK) สภาพของเครื่องขณะทำการวิเคราะห์เป็นดังนี้

Gas chromatography รุ่น TRACE GC 2000 มีเครื่องตรวจจับ (Detector) เป็นแบบ ion trap คอลัมน์ (column) ที่ใช้เป็น capillary column ยี่ห้อ Alltech รุ่น TR-WAX ความยาว 60 เมตร เส้นผ่านศูนย์กลางขนาด 0.25 มิลลิเมตร (60 m x 0.25 mm., 0.25 μ m) สำหรับ Ion source กำหนดให้ มีอุณหภูมิ 230 °C Injection port temperature กำหนดให้ มีอุณหภูมิ 200 °C และกำหนดให้ Inject method เป็นแบบ splitless โดยมีปริมาตรของการฉีดตัวอย่าง (Inject volume) ครั้งละ 1 μ l สำหรับสถานะการใช้เครื่อง GC ในการหาปริมาณสารอาหารอินทรีย์ของการทดลองนี้ได้ดัดแปลงมาจาก Oldal (Oldal *et al.*, 2006) คือ อุณหภูมิเริ่มต้นที่ 70 °C คงอุณหภูมิไว้ 0.5 นาที แล้วเพิ่มอุณหภูมิเป็น 100 °C โดยเพิ่มทีละ 60 °C ทุกๆ นาที และจากอุณหภูมิ 100 °C เพิ่มอุณหภูมิเป็น 240 °C โดยเพิ่มทีละ 10 °C ทุกๆ นาที แล้วคงอุณหภูมิไว้ 20 °C [70 °C hold 0.5 min to 100 °C (60 °C/min), 100 °C to 240 °C hold 20min (10 °C/min)] ซึ่ง peak ของสารอาหารอินทรีย์จะออกที่เวลา (retention time) ประมาณ 26.1 นาที (ภาพที่ 8)

ส่วนที่ 2 นำไปวิเคราะห์หาความอยู่รอดของแบคทีเรียสายพันธุ์ ADB ด้วยวิธี plate count เริ่มจากการแยกจุลินทรีย์จากดินด้วยวิธี direct isolation ทำได้โดย ชั่งดิน 10 กรัม ใส่ในขวดปากกว้างขนาด 250 มิลลิลิตร ที่บรรจุ 0.85% NaCl ปริมาตร 90 มิลลิลิตร ที่ผ่านการฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอลแล้ว จากนั้นนำไปเขย่าด้วยเครื่องเขย่า (agitator) เป็นเวลา 30 นาที ทำการเจือจางด้วย

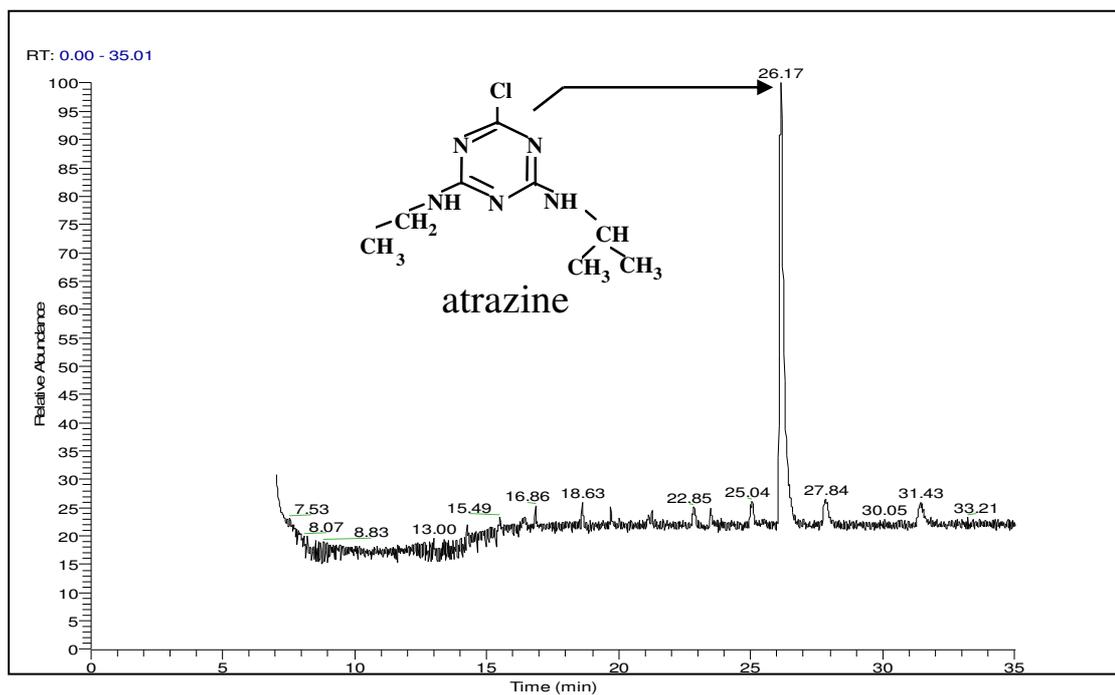
0.85% NaCl ให้ได้ความเข้มข้น 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , ..., 10^{-9} แล้วนำมา spread plate ในอาหาร 2 ชนิด คือ

1. อาหาร Nutrient agar เพื่อตรวจนับจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดในดิน
2. อาหารแข็ง R- medium ที่มีสารอาหารอินทรีย์ความเข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นแหล่งไนโตรเจน เพื่อตรวจวิเคราะห์ปริมาณแบคทีเรียสายพันธุ์ ADB สังเกตได้จากวงใสรอบๆ โคลิโคนินดิน

6. ทดสอบการย่อยสลายสารอาหารอินทรีย์ของจุลินทรีย์ที่มีอยู่ในธรรมชาติ โดยการเติมวัสดุอินทรีย์ที่ผ่านกระบวนการทางชีวภาพ (biostimulation)

6.1 เก็บตัวอย่างดินบริเวณเดียวกับการทดลองที่ 5.1 นำมาผ่านตะแกรงร่อนขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางขนาด 2 มิลลิเมตร

6.2 วิเคราะห์สมบัติทางเคมีของดินและวัสดุอินทรีย์ที่ผ่านกระบวนการทางชีวภาพ ทำเช่นเดียวกับข้อ 5.1.1 แต่สำหรับวัสดุอินทรีย์จะมีส่วนที่แตกต่างกันคือ การวัด pH และการวิเคราะห์ไนโตรเจนทั้งหมดในขั้นตอนการ digestion ซึ่งมีรายละเอียดดังนี้ คือ



ภาพที่ 8 การวัดปริมาณของสารอาหารจีนด้วยเครื่อง GC ซึ่ง peak ของสารอาหารจีนออกที่ retention time ประมาณ 26.1 นาที

วัด pH ด้วย pH meter

การวัด pH ทำได้โดยชั่งดินตัวอย่าง ผสมกับน้ำกลั่น อัตราส่วน 1:5 ในกระบอกพลาสติกขนาด 100 มิลลิลิตร ใช้แท่งแก้วคนดินและน้ำเข้ากัน ทิ้งไว้ประมาณ 30 นาที ในระหว่างที่วางทิ้งไว้ควรจะคนดินเป็นครั้งคราว เมื่อครบ 30 นาที นำไปวัดด้วย pH meter

วิเคราะห์หาไนโตรเจนทั้งหมด (total nitrogen)

การวิเคราะห์หา total nitrogen ใช้วิธี Kjeldahl method (Jackson, 1965; ทศนีย์และจรงค์, 2542) เช่นเดียวกับการวิเคราะห์ดิน แต่น้ำหนักของตัวอย่างวัสดุอินทรีย์ที่ผ่านกระบวนการทางชีวภาพใช้ในการหาไนโตรเจนนั้นเปลี่ยนเป็น 0.2 กรัม

6.3 ศึกษาผลของการเติมวัสดุอินทรีย์ที่ผ่านกระบวนการทางชีวภาพต่อการกระตุ้นการย่อยสลายสารอาหารอินทรีย์ของจุลินทรีย์ที่มีอยู่ในธรรมชาติ โดยนำดินมาเติมวัสดุอินทรีย์ที่ผ่านกระบวนการทางชีวภาพ (bioprocessed material) เพื่อกระตุ้นให้จุลินทรีย์ที่มีอยู่ในธรรมชาติสามารถย่อยสลายสารอาหารอินทรีย์ได้ โดยวัสดุอินทรีย์ที่ผ่านกระบวนการทางชีวภาพที่ใช้ในการทดลองนี้คือ ปุ๋ยหมัก ปุ๋ยคอก และตะกอนเหลวจากก๊าซชีวภาพ ซึ่งในการทดลองนี้ได้มีการเติมซีเตรทด้วย เนื่องจากเป็นแหล่งคาร์บอนที่จุลินทรีย์สามารถใช้ได้เลย และได้มีการศึกษาก่อนหน้านี้ในการย่อยสลายสารอาหารอินทรีย์ สำหรับการทดลองนี้ได้วางแผนการทดลองทั้งหมด 7 ดำรับการทดลองคือ

ดำรับการทดลองที่ 1 ดินชุดควบคุม (control)

ดำรับการทดลองที่ 2 ดินที่มีการเติมสารอาหารอินทรีย์

ดำรับการทดลองที่ 3 ดินที่มีการเติมปุ๋ยหมักและซีเตรท

ดำรับการทดลองที่ 4 ดินที่มีการเติมปุ๋ยคอกและซีเตรท

ดำรับการทดลองที่ 5 ดินที่มีการเติมตะกอนเหลวจากก๊าซชีวภาพและซีเตรท

ดำรับการทดลองที่ 6 ดินที่มีการเติมปุ๋ยคอกเพียงอย่างเดียว

ดำรับการทดลองที่ 7 ดินที่มีการเติมซีเตรทเพียงอย่างเดียว

การทดลองครั้งนี้ทำในขวดแก้วปากกว้างขนาด 4 ออนซ์ ชั่งดินใส่ขวดปากกว้าง 35 กรัม โดยแต่ละดำรับการทดลองทำ 3 ซ้ำ ในดำรับที่มีการเติมสารอาหารอินทรีย์ (ดำรับการทดลองที่ 2-7)

จะมีการเติมสารอาหารขึ้นความเข้มข้น 150 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมดิน ส่วนตำรับการทดลองที่มีการเติมปุ๋ยหมัก ปุ๋ยคอก และตะกอนเหลวจากก๊าซชีวภาพ ในตำรับการทดลองที่ 2 3 และ 5 ตามลำดับ จะมีการเติมปุ๋ยหมัก ปุ๋ยคอก และตะกอนเหลวจากก๊าซชีวภาพอย่างละ 0.25 กรัม และในการเติมซีเตรท (ตำรับการที่ 2, 3, 4 และ 6) จะเติมซีเตรท 0.3 กรัม และบ่มดินที่ผสมแล้วทั้ง 7 ตำรับการทดลองที่อุณหภูมิห้อง (28-32 °C) เป็นระยะเวลา 3 สัปดาห์ เก็บตัวอย่างดินที่ 0, 1, 2 และ 3 สัปดาห์ เพื่อวิเคราะห์ปริมาณอาหารอินทรีย์ที่อยู่ในดิน โดยนำตัวอย่างดินที่เก็บในแต่ละครั้ง 5 กรัมสกัดด้วย ethylacetate : hexane อัตราส่วน 1 : 1 ปริมาตร 15 มิลลิลิตร แล้วนำไปเขย่าด้วยเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 140 รอบต่อนาที ซ้ำมึน จากนั้นนำไปผ่านโซเดียมซัลเฟตไร้น้ำ แล้วนำไปวิเคราะห์หาปริมาณสารอาหารอินทรีย์ด้วยเครื่อง GC ซึ่งมีสถานะของเครื่องและเงื่อนไขในการวิเคราะห์เหมือนในการทดลองที่ 5.2

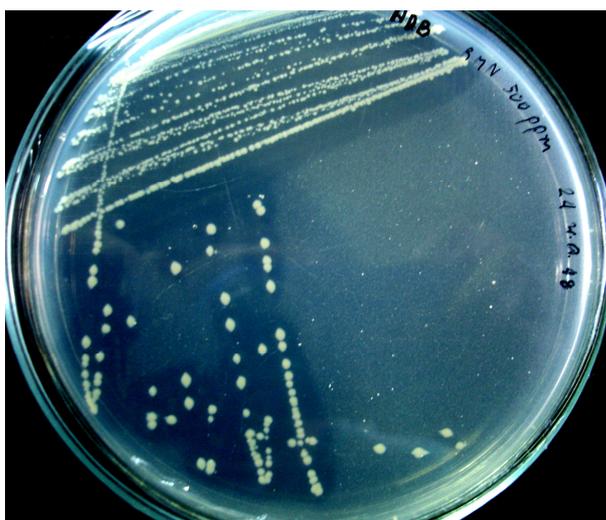
ผลการทดลองและวิจารณ์

1. การแยกจุลินทรีย์ และคัดเลือกจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายสารอาหารราซินได้

การแยกจุลินทรีย์จากตัวอย่างดินที่เก็บมาจากดินบริเวณแปลงปลูกอ้อยของศูนย์วิจัยอ้อยและน้ำตาล มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน ซึ่งมีประวัติการใช้สารอาหารราซินในการควบคุมวัชพืชในไร่อ้อยมานานถึง 21 ปี โดยการแยกจุลินทรีย์จากดิน (direct isolation) ด้วย 0.85% NaCl เป็นเวลา 30 นาที แล้วนำมา spread plate บนอาหารเลี้ยงจุลินทรีย์ชนิดแข็ง R-medium 3 สูตร ไม่พบจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายสารอาหารราซิน แต่การแยกจุลินทรีย์ด้วยเทคนิค enrichment culture โดยทำในอาหารเหลว R-medium 3 สูตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 28 °C เป็นเวลา 2 สัปดาห์ แล้วนำมา spread plate บนอาหารแข็งเลี้ยงจุลินทรีย์ R-medium 3 สูตร ซึ่งเป็นสูตรเดียวกับที่ทำ enrichment culture พบว่า สามารถแยกแบคทีเรียได้หลายชนิด ทั้งโคโลนีสีขาว สีเหลืองปนชมพู สีขาว สีเหลืองอ่อนปนชมพู สีแดง ในอาหารสูตร 1 และในอาหารสูตร 2 พบโคโลนีสีน้ำตาลปนขาว สีแดง สีขาว สีเหลือง ส่วนในอาหารสูตร 3 พบโคโลนีสีเหลือง สีแดง สีแดงปนขาว (ตารางที่ 11) แต่พบแบคทีเรียที่มีสีขาวเหลืองแสดงวงใส (clear zone) รอบๆ โคโลนี ซึ่งแสดงถึงความสามารถในการย่อยสลายสารอาหารราซินได้ บนอาหารแข็ง R-medium ที่ใส่สารอาหารราซินความเข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อลิตร แทน NH_4Cl (อาหารสูตร 3) ซึ่งการแยกแบคทีเรียในครั้งนี้สามารถแยกแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายสารอาหารราซินได้เพียงบ่มในอาหารเหลว R-medium สูตร 3 เพียงแค่ 4 สัปดาห์ ซึ่งสารละลายดินยังไม่ใส โดยแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายสารอาหารราซินที่แยกได้นี้สามารถย่อยสลายสารอาหารราซินโดยใช้สารอาหารราซินเป็นแหล่งไนโตรเจน จากนั้นนำมา re-streak บนอาหารแข็ง R-medium สูตร 3 เช่นกัน เพื่อให้ได้แบคทีเรียโคโลนีเดี่ยวที่บริสุทธิ์ และสามารถย่อยสลายสารอาหารราซินได้ พบว่าแบคทีเรียบริสุทธิ์ที่แยกได้เป็นแบคทีเรีย มีโคโลนีสีขาวเหลือง ผิวมันวาว และแบคทีเรียนี้จะมี clear zone รอบๆ โคโลนีดังแสดงในภาพที่ 9 หลังจากการ streak เป็นเวลา 1 สัปดาห์ และตั้งชื่อแบคทีเรียนี้ว่าสายพันธุ์ ADB

ตารางที่ 11 ลักษณะของโคโลนีที่ได้จากการแยกเชื้อด้วยเทคนิค enrichment culture

อาหาร R-medium	ลักษณะสีของ โคโลนี
สูตร 1	สีเหลืองปนชมพู สีขาว สีเหลืองอ่อนปนชมพู สีแดง
สูตร 2	สีน้ำตาลปนขาว สีแดง สีขาว สีเหลือง
สูตร 3	สีขาวเหลือง สีแดง สีแดงปนขาว



ภาพที่ 9 การย่อยสลายสารอาหารไนโตรเจนของสายพันธุ์ ADB บนอาหารแข็ง R-medium ที่เติมสารอาหารไนโตรเจน 500 มิลลิกรัมต่อลิตร แทน NH_4Cl

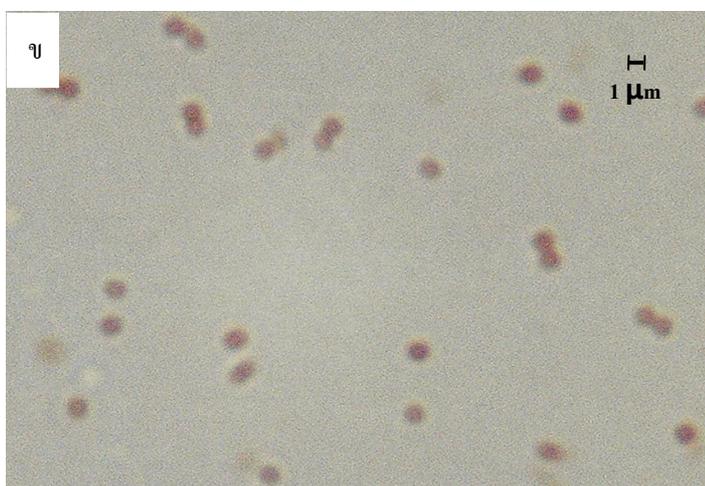
2. ศึกษาลักษณะของจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายสารอาหารจีนได้

2.1 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและการย้อมสีแบบแกรม ด้วยวิธีส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์

หลังจากแยกจุลินทรีย์ได้แบคทีเรียสายพันธุ์ ADB ที่เป็นโคโลนีเดี่ยวแล้ว นำมาศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์พบว่า แบคทีเรียสายพันธุ์ ADB ที่ได้มีลักษณะเป็นแท่ง (rod) มีขนาด 1X 2 ไมครอน ที่ช่วง log phase เมื่อนำมาย้อมสีแบบแกรม แล้วส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ พบว่า แบคทีเรียสายพันธุ์ ADB เป็นแบคทีเรียแกรมบวก ติดสีม่วง (ภาพที่ 10ก) และมีลักษณะกลม (cocci) มีขนาด 1X1 ไมครอน มีทั้งอยู่เป็นคู่และอยู่แบบเดี่ยว ที่ช่วง stationary phase ซึ่งเมื่อนำมาย้อมแกรมจะพบว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ ADB ติดสีแดง (ภาพที่ 10ข) ซึ่งการที่แบคทีเรียสายพันธุ์ ADB มีรูปร่างที่เปลี่ยนไปเมื่อเข้าสู่ช่วง stationary phase ซึ่งเป็นลักษณะหนึ่งของแบคทีเรีย *Arthrobacter*

2.2 การศึกษาชนิดของแบคทีเรียสายพันธุ์ ADB ในระดับดีเอ็นเอในส่วนของยีน 16S ไรโบโซมอลอาร์เอ็นเอ (16S rRNA)

การศึกษาชนิดของแบคทีเรียสายพันธุ์ ADB ระดับดีเอ็นเอในส่วนของยีน 16S ไรโบโซมอลอาร์เอ็นเอ (16S rRNA gene) ของแบคทีเรียสายพันธุ์ ADB ด้วยเทคนิค PCR พบว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ ADB สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ ซึ่งมีขนาดประมาณ 500 คู่เบส จากนั้นนำผลผลิตของปฏิกิริยา PCR ส่งวิเคราะห์ลำดับเบสได้ เมื่อนำลำดับเบสมาเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลลำดับเบสของ Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>) ด้วยโปรแกรม blast n พบว่าลำดับเบสของแบคทีเรียสายพันธุ์ ADB มีความเหมือนกับ *Arthrobacter* sp. ร้อยละ 99 (ภาพที่ 11) แสดงว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ ADB มีแนวโน้มที่จะเป็น *Arthrobacter* sp.



ภาพที่ 10 ก ลักษณะของแบคทีเรียสายพันธุ์ ADB ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ที่มีลักษณะแท่ง (rod) มีขนาด 1×2 ไมครอน ในช่วง log phase
 ข มีลักษณะกลม (cocci) มีขนาด 1×1 ไมครอน มีทั้งอยู่เป็นคู่และอยู่แบบเดี่ยว ในช่วง stationary phase

Arthrobacter sp. JS443 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
Length=1524

Score = 804 bits (435), Expect = 0.0
Identities = 439/441 (99%), Gaps = 1/441 (0%)
Strand=Plus/Plus

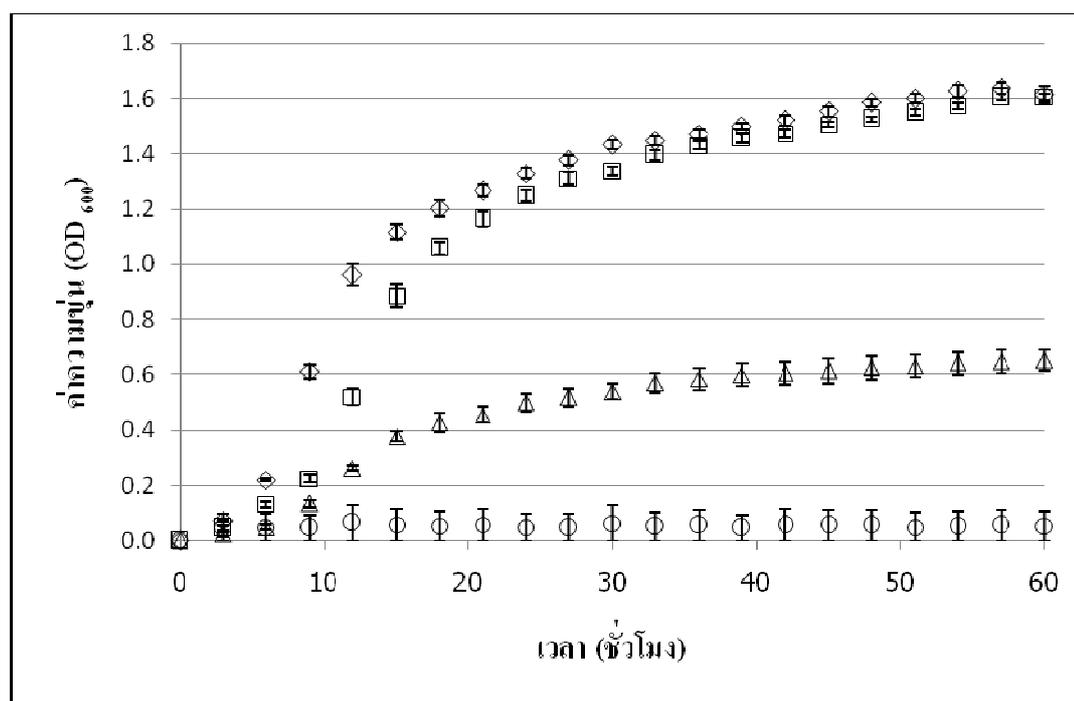
ADB	16	ATTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGGCTTGACATGGACCGGAAAGACCTGG	75
Arthrobacter sp.	933	ATTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGGCTTGACATGGACCGGAAAGACCTGG	992
ADB	76	AAACAGGTGCCCGCTTTGCGGCCGGTTTACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTG	135
Arthrobacter sp.	993	AAACAGGTGCCCGCTTTGCGGCCGGTTTACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTG	1051
ADB	136	TCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTCGTTCATATGTTGCCAGCGG	195
Arthrobacter sp.	1052	TCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTCGTTCATATGTTGCCAGCGG	1111
ADB	196	TTCGGCCGGGGACTCATAGGAGACTGCCGGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGACGACGT	255
Arthrobacter sp.	1112	TTCGGCCGGGGACTCATAGGAGACTGCCGGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGACGACGT	1171
ADB	256	CAAATCATCATGCCCCCTTATGTCTTGGGCTTCACGCATGCTACAATGGCCGGTACAAAGG	315
Arthrobacter sp.	1172	CAAATCATCATGCCCCCTTATGTCTTGGGCTTCACGCATGCTACAATGGCCGGTACAAAGG	1231
ADB	316	GTTGCGATACTGTGAGGTGGAGCTAATCCCAAAAAGCCGGTCTCAGTTCGGATTGGGGTC	375
Arthrobacter sp.	1232	GTTGCGATACTGTGAGGTGGAGCTAATCCCAAAAAGCCGGTCTCAGTTCGGATTGGGGTC	1291
ADB	376	TGCAACTCGACCCCATGAAGTCGGAGTCGCTAGTAATCGCAGATCAGCAACGCTGCGGTG	435
Arthrobacter sp.	1292	TGCAACTCGACCCCATGAAGTCGGAGTCGCTAGTAATCGCAGATCAGCAACGCTGCGGTG	1351
ADB	436	AATACGTTCCCGNCCTTGTA	456
Arthrobacter sp.	1352	AATACGTTCCCGGCCTTGTA	1372

ภาพที่ 11 การเปรียบเทียบลำดับเบสของ 16S rRNA ของแบคทีเรียสายพันธุ์ ADB กับ *Arthrobacter* sp.

3. ทดสอบการใช้สารอาหารจีนเป็นแหล่งไนโตรเจนและ/หรือแหล่งคาร์บอนของแบคทีเรียสายพันธุ์ ADB

การทดลองเลี้ยงสายพันธุ์ ADB ในอาหารเหลว RM RMNN RMN และ RMC เพื่อทดสอบว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ ADB มีความสามารถในการใช้สารอาหารจีนเป็นแหล่งคาร์บอนและ/หรือไนโตรเจน พบว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ ADB สามารถเจริญเติบโตได้ดีในอาหาร RM RMNN และ RMN โดยค่าความขุ่น (OD_{600}) สูงสุดของแบคทีเรียสายพันธุ์ ADB ในอาหาร RM RMNN และ RMN คือ 1.6 1.5 และ 0.7 ตามลำดับ การเจริญเติบโตของแบคทีเรียสายพันธุ์ ADB ในอาหาร RM ในระยะ lag phase อยู่ในเวลาที่ 0-6 ชั่วโมง ส่วนในอาหาร RMNN และ RMN อยู่ในระยะ lag phase ในเวลาที่ 0-9 ชั่วโมง และแบคทีเรียสายพันธุ์ ADB จะเข้าสู่ช่วง stationary phase ที่ชั่วโมงที่ 18 ทั้งในอาหาร RM RMNN และ RMN ส่วนในอาหาร RMC แบคทีเรียสายพันธุ์ ADB ไม่มีการเจริญเติบโต (ภาพที่ 12)

จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ ADB มีการเจริญเติบโตในอาหาร RM ได้ดีกว่าอาหารอื่นๆ สืบเนื่องจากการเจริญเติบโตของแบคทีเรียสายพันธุ์ ADB จะเข้าสู่ระยะ log phase ก่อนอาหาร RMNN และ RMN อีกทั้งค่าความขุ่นใน อาหาร RM >RMNN>RMN ตามลำดับ แบคทีเรียสายพันธุ์ ADB ใช้สารอาหารจีนเป็นแหล่งไนโตรเจนเพื่อการเจริญเติบโตได้เพียงอย่างเดียว ไม่สามารถใช้สารอาหารจีนเป็นแหล่งคาร์บอนได้ ซึ่งเหมือนกับ *Pseudomonas* sp. สายพันธุ์ ADP (Mandelbaum *et al.*, 1995) *Ralstonia* sp. สายพันธุ์ M91-3 (Radosevich *et al.*, 1995) *Agrobacterium radiobacter* J14a (Struthers *et al.*, 1998) *Arthrobacter* sp. AD1 (Cai *et al.*, 2003) และ *Arthrobacter* sp. สายพันธุ์ MCM B-436 (Vaishampayan *et al.*, 2007) ที่สามารถใช้สารอาหารจีนเป็นแหล่งไนโตรเจนได้เช่นเดียวกับแบคทีเรียสายพันธุ์ ADB แต่จากการศึกษาที่ผ่านมาก็ยังพบจุลินทรีย์ที่สามารถใช้สารอาหารจีนเป็นแหล่งคาร์บอน เช่น *Pseudomonas* sp. สายพันธุ์ YAYA6 (Yanze-Kontchon and Gschwind, 1994) หรือเป็นทั้งแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนอีกด้วย เช่น *Pseudomonas* sp. (Topp *et al.*, 2000a) *Nocardioides* sp. C190 (Topp *et al.*, 2000b) และ *Arthrobacter aurescens* TC1 (Strong *et al.*, 2002)

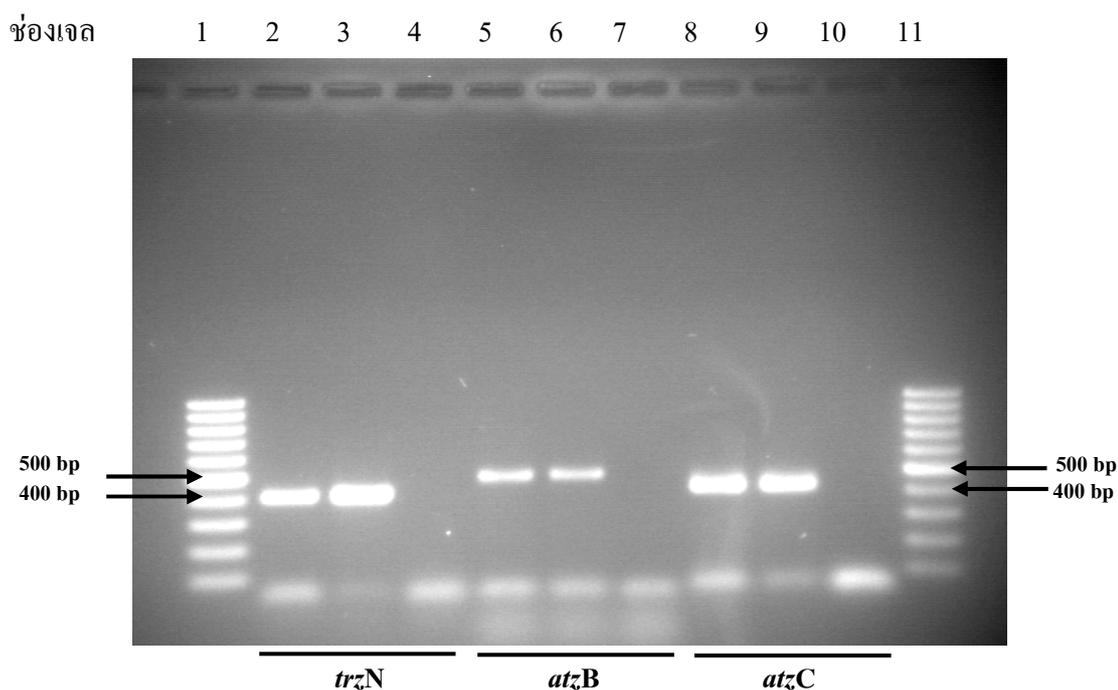


ภาพที่ 12 การเจริญเติบโตของแบคทีเรียสายพันธุ์ ADB ในอาหารเหลว R-medium แบบต่างๆ

- ◇ RM คือ อาหาร R-medium
- RMNN คือ อาหาร R-medium ที่ใส่สารอาหารจีน
- △ RMN คือ อาหาร R-medium ที่ใส่สารอาหารจีนความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร แทน NH_4Cl
- RMC คือ อาหาร R-medium ที่ใส่สารอาหารจีนความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร แทนน้ำตาลกลูโคส

4. การศึกษายีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการย่อยสลายสารอาหารจีนของแบคทีเรียสายพันธุ์ ADB

ผลการทดลองพบว่า แบคทีเรียสายพันธุ์ ADB มียีน *trzN*, *atzB* และ *atzC* ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการย่อยสลายสารอาหารจีน มีขนาดเท่ากับ 0.4 kb, 0.5 kb และ 0.4 kb (ภาพที่ 13) และจากผลดังกล่าวข้างต้นแสดงว่า แบคทีเรียสายพันธุ์ ADB มียีน *trzN*, *atzB* และ *atzC* จึงคาดว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ ADB นี้สามารถเปลี่ยนรูปของสารอาหารจีนได้ โดยเปลี่ยนจากสารอาหารจีนไปเป็นสารไฮดรอกซีอะลคาลอย ด้วยการทำงานของยีน *trzN* (Top *et al.*, 2000b) ต่อมาเปลี่ยนจากสารไฮดรอกซีอะลคาลอย เป็นสารเอ็น-ไอโซโพรพิลแอมเมไนด์ ด้วยยีน *atzB* (Boundy-Mills *et al.*, 1997) และเปลี่ยนจากสารเอ็น-ไอโซโพรพิลแอมเมไนด์ เป็นกรดไซยานูริก ด้วยยีน *atzC* (Sadowsky *et al.*, 1998) ซึ่งกรดไซยานูริกมีโครงสร้างที่จุลินทรีย์อื่นๆ ในดินสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ง่ายที่สามารถนำไปสู่การเกิดการย่อยสลายที่สมบูรณ์จนไปเป็นคาร์บอนไดออกไซด์และแอมโมเนียม และจากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่ามีแบคทีเรียแกรมลบที่มีความสามารถย่อยสลายสารอาหารจีนได้นั้นจะมียีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการย่อยสลายคือ ยีน *atzA*, *atzB* และ *atzC* เช่น *Pseudomonas* สายพันธุ์ ADP (de Souza *et al.*, 1998) *Agrobacterium radiobacter* J14a (Struthers *et al.*, 1998) ส่วนในแบคทีเรียแกรมบวกไม่ว่าจะเป็น *Nocardioide* sp. C190 (Topp *et al.*, 2000b) ที่มียีน *trzN* เป็นยีนตัวแรกในการเปลี่ยนสารอาหารจีนไปเป็นไฮดรอกซีอะลคาลอย และ *Arthrobacter aureescens* สายพันธุ์ TC1 (Strong *et al.*, 2002) ที่มียีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการย่อยสลายสารอาหารจีน คือ ยีน *trzN*, *atzB* และ *atzC* สำหรับแบคทีเรียสายพันธุ์ ADB ก็พบยีน *trzN*, *atzB* และ *atzC* เช่นเดียวกับ *Arthrobacter aureescens* สายพันธุ์ TC1



ภาพที่ 13 ผลผลิตของยีน *trzN*, *atzB* และ *atzC* ในแบคทีเรียสายพันธุ์ ADB

- ช่องเจลที่ 1 คือ ladder 1000 bp
 ช่องเจลที่ 2 คือ *Arthrobacter aurescens* TC1 (positive control)
 ช่องเจลที่ 3 คือ แบคทีเรียสายพันธุ์ ADB
 ช่องเจลที่ 4 คือ น้ำ (negative control)
 ช่องเจลที่ 5 คือ *Arthrobacter aurescens* TC1 (positive control)
 ช่องเจลที่ 6 คือ แบคทีเรียสายพันธุ์ ADB
 ช่องเจลที่ 7 คือ น้ำ (negative control)
 ช่องเจลที่ 8 คือ *Arthrobacter aurescens* TC1 (positive control)
 ช่องเจลที่ 9 คือ แบคทีเรียสายพันธุ์ ADB
 ช่องเจลที่ 10 คือ น้ำ (negative control)
 ช่องเจลที่ 11 คือ ladder 1000 bp

5. การทดสอบประสิทธิภาพในการย่อยสลายสารอาหารอินทรีย์

5.1 สมบัติทางเคมีของดินบางประการ

จากการวิเคราะห์สมบัติทางเคมีของดินบางประการในดิน ก่อนที่จะนำมาศึกษาเมื่อเปรียบเทียบกับระดับความอุดมสมบูรณ์และความเป็นปัญหาของดิน (ตารางผนวกที่ 1-6) พบว่า ดินนี้มีค่า pH 7.63 อยู่ในระดับเป็นด่างเล็กน้อย มีค่าการนำไฟฟ้า (EC) 3.20 เดซิซีเมนต์ต่อเมตร ซึ่งอยู่ในระดับต่ำ หมายถึง ดินที่นำมาทดลองมีความเค็มเล็กน้อย (คณาจารย์ภาควิชาปฐพีวิทยา, 2541) ปริมาณอินทรีย์วัตถุ 1.26% อยู่ในระดับค่อนข้างต่ำ ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด 0.06% อยู่ในระดับต่ำมาก ปริมาณฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์ 108.99 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม อยู่ในระดับสูงมาก และปริมาณโพแทสเซียมที่แลกเปลี่ยนได้ 106.13 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม อยู่ในระดับสูง (กรมพัฒนาที่ดิน, 2548) ซึ่งค่าวิเคราะห์แสดงในตารางที่ 12

5.2 ประสิทธิภาพการย่อยสลายสารอาหารอินทรีย์ในดินของแบคทีเรียสายพันธุ์ ADB

ศึกษาการย่อยสลายสารอาหารอินทรีย์ของแบคทีเรียสายพันธุ์ ADB โดยการวัดปริมาณสารอาหารอินทรีย์ที่ยังคงเหลือในดิน เป็นเวลา 3 สัปดาห์ โดยในการทดลองนี้มีการเติมสารอาหารอินทรีย์เริ่มต้นที่ความเข้มข้น 150 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมดิน ผลการทดลองพบว่า ดำรับการทดลองที่มีการใส่แบคทีเรียสายพันธุ์ ADB (ดำรับการทดลองที่ 3-7) จะพบการย่อยสลายได้หมด 100 เปอร์เซ็นต์ภายใน 1 สัปดาห์ ไม่ว่าจะดินจะมีการเติมสารชีตรท หรือแอม โมเนียมซัลเฟต หรือชีตรทและแอม โมเนียมซัลเฟต รวมทั้งดินที่ผ่านฆ่าเชื้อ แต่อย่างไรก็ตาม ดำรับการทดลองที่มีการเติมสารอาหารอินทรีย์ แต่ไม่เติมแบคทีเรียสายพันธุ์ ADB (ดำรับการทดลองที่ 2) สารอาหารอินทรีย์ลดลงไป 28 เปอร์เซ็นต์ ที่ระยะ 1 สัปดาห์ (ภาพที่ 14)

นอกจากนี้ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า ดินที่นำมาศึกษานี้ไม่มีสารอาหารอินทรีย์ปนเปื้อน สังเกตได้จากดำรับการทดลองที่ 1 ดินที่ไม่มีการเติมสิ่งใดเลย มีปริมาณสารอาหารอินทรีย์เท่ากับ 0 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมดิน ดังแสดงในภาพที่ 10 และจากผลการทดลองทั้งหมดสามารถสรุปได้ว่าการเติมแบคทีเรียสายพันธุ์ ADB จะเป็นการช่วยให้การย่อยสลายสารอาหารอินทรีย์เป็นไปได้อย่างรวดเร็วขึ้น แต่อย่างไรก็ตาม ดินที่นำมาทำการทดลองในครั้งนี้แม้ว่าจะไม่มีการเติมแบคทีเรียสายพันธุ์ ADB เลยก็ตาม ปริมาณสารอาหารอินทรีย์ก็ค่อยๆ ลดลงในแต่ละสัปดาห์ แต่จะช้ากว่าในดำรับการทดลองที่มีการ

เดิมแบคทีเรียสายพันธุ์ ADB (ภาพที่ 14) ซึ่งการสูญหายไปของสารอาหารจีนเหล่านี้ อาจเกิดจากวิธีการสกัดสารอาหารจีนไม่สามารถสกัดสารอาหารจีนออกมาจากดินได้ 100 เปอร์เซ็นต์ หรือ มีจุลินทรีย์ธรรมชาติที่อยู่ในดินที่สามารถย่อยสลายสารอาหารจีนได้ ส่วนในดำรับการทดลองที่ใช้ดินผ่านการฆ่าจุลินทรีย์แล้ว และเดิมแบคทีเรียสายพันธุ์ ADB (ดำรับการทดลองที่ 7) สามารถย่อยสลายสารอาหารจีนได้ แสดงให้เห็นว่า แบคทีเรียสายพันธุ์ ADB นี้ สามารถย่อยสลายสารอาหารจีนได้ โดยไม่ต้องพึ่งพาจุลินทรีย์ชนิดอื่น ซึ่งต่างจากจุลินทรีย์บางชนิดที่ต้องอาศัยอยู่ร่วมกัน (consortia) จึงจะสามารถย่อยสลายสารอาหารจีนได้ (Assaf and Turco, 1994) โดยจุลินทรีย์กลุ่มนี้สามารถเปลี่ยนรูปของสารอาหารจีนได้ 87 เปอร์เซ็นต์ ภายในเวลา 25 วัน ซึ่งต่างจากแบคทีเรียสายพันธุ์ ADB ที่สามารถย่อยสลายสารอาหารจีนได้ 100 เปอร์เซ็นต์ ภายในเวลา 7 วัน นอกจากนี้ยังมี *Pseudomonas* สายพันธุ์ ADP ที่ใช้สารอาหารจีนเป็นแหล่งไนโตรเจนเหมือนกัน สามารถย่อยสลายสารอาหารจีนได้แตกต่างกันคือ *Pseudomonas* สายพันธุ์ ADP สามารถย่อยได้ 17 เปอร์เซ็นต์ (Mandelbaum *et al.*, 1995) สำหรับดินที่มีการเติมซีเตรท หรือแอมโมเนียมซัลเฟต หรือซีเตรทและแอมโมเนียมซัลเฟตร่วมกับแบคทีเรียสายพันธุ์ ADB นั้น แสดงให้เห็นว่าให้ผลการย่อยสลายสารอาหารจีนไม่แตกต่างกัน ซึ่งต่างจาก *Pseudomonas* สายพันธุ์ ADP ที่เมื่อเติมซีเตรทจะช่วยให้สามารถย่อยสลายสารอาหารจีนได้ดีขึ้นเป็น 70 เปอร์เซ็นต์

5.3 ความอยู่รอดของแบคทีเรียสายพันธุ์ ADB

5.3.1 การนับจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดในดินจำลอง

การนับจำนวนประชากรจุลินทรีย์ทั้งหมดบนอาหารแข็ง Nutrient agar พบว่ามีปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดในดินที่ผ่านการฆ่าเชื้อดินก่อนทำการทดลอง (ดำรับการทดลองที่ 7) จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดมากที่สุดในระยะเวลา 3 สัปดาห์ แต่ในดำรับการทดลองอื่นอีก 6 ดำรับการทดลอง ที่มีการเติมสารอาหารจีน แบคทีเรียสายพันธุ์ ADB และ/หรือซีเตรท แอมโมเนียมซัลเฟต (ดำรับการทดลองที่ 1-6) พบว่าจำนวนประชากรของจุลินทรีย์นั้นลดลงตั้งแต่สัปดาห์แรก โดยลดลงจาก 10^6 ไปเป็น 10^5 ในดำรับการทดลองที่ 1 ส่วนในดำรับการทดลองที่ 2 3 4 และ 6 ลดลงจาก 10^7 ไปเป็น 10^6 ส่วนในดำรับการทดลองที่ 5 และ 7 นั้นจุลินทรีย์ค่อนข้างคงที่ คือ 10^6 และ 10^7 ตามลำดับดังแสดงในภาพที่ 15

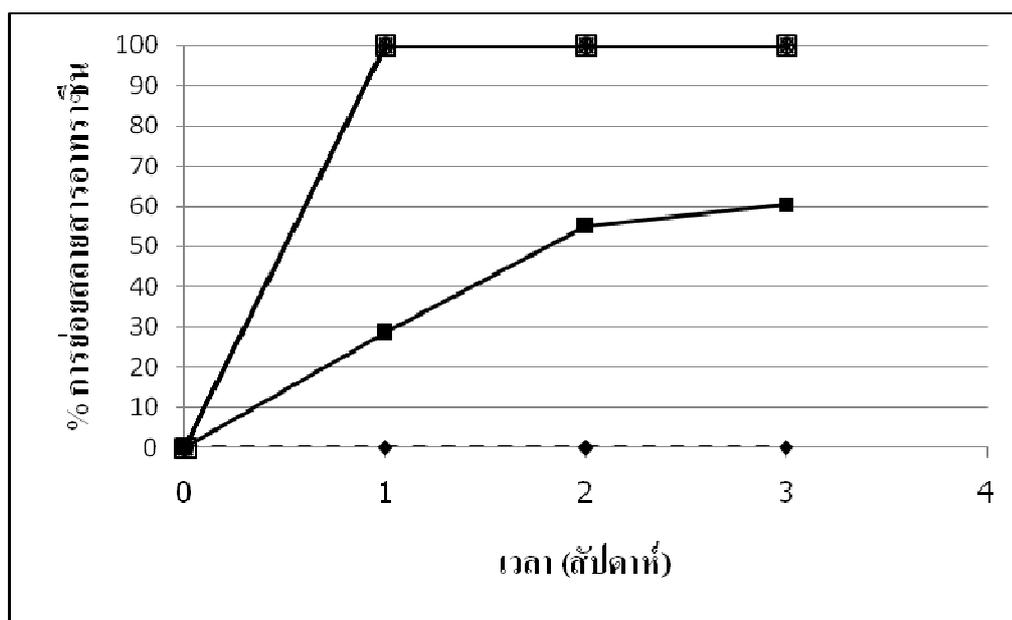
5.3.2 การนับจำนวนแบคทีเรียสายพันธุ์ ADB

การนับจำนวนแบคทีเรียสายพันธุ์ ADB บนอาหารแข็ง R-medium จะเห็นได้ว่าจำนวนแบคทีเรียสายพันธุ์ ADB ในดินที่ผ่านการฆ่าจุลินทรีย์ดินก่อนทำการทดลอง (ดำเนินการทดลองที่ 7) แบคทีเรียสายพันธุ์ ADB สามารถอยู่รอดได้ดีที่สุด โดยมีจำนวนแบคทีเรียสายพันธุ์ ADB ที่ค่อนข้างคงที่ประมาณ 10^7 ส่วนในดินที่มีการเติมสารอาหารซึ้น แบคทีเรียสายพันธุ์ ADB และ/หรือซิเตรท แอมโมเนียมซัลเฟต (ดำเนินการทดลองที่ 3-6) แบคทีเรียสายพันธุ์ ADB จะมีปริมาณลดลงเล็กน้อยจาก 10^7 เป็น 10^6 ภายในระยะเวลา 3 สัปดาห์ที่ทำการทดลอง โดยดินที่เติมสารอาหารซึ้น แบคทีเรียสายพันธุ์ ADB และซิเตรท แบคทีเรียสายพันธุ์ ADB ลดลงมากที่สุด และในดินควบคุมกับดินที่มีเติมสารอาหารซึ้นอย่างเดียว (ดำเนินการทดลองที่ 1 และ 2) ไม่มีการเจริญเติบโตของแบคทีเรียสายพันธุ์ ADB ตลอดระยะเวลาที่ทำการทดลอง ดังแสดงในภาพที่ 16

จากผลการทดลองทำให้ทราบว่า แบคทีเรียสายพันธุ์ ADB สามารถอยู่รอดได้ในดิน และสามารถเจริญเติบโตได้ดีที่สุดในดินที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ซึ่งการเจริญเติบโตได้ในดินที่ผ่านการฆ่าเชื้อยังบอกได้อีกว่า แบคทีเรียสายพันธุ์ ADB นี้ สามารถย่อยสลายสารอาหารซึ้นในดินโดยไม่ต้องอาศัยอยู่ร่วมกันกับจุลินทรีย์ดินชนิดอื่น แต่ถึงกระนั้นแบคทีเรียสายพันธุ์ ADB ก็สามารถอาศัยอยู่ร่วมกับจุลินทรีย์ดินชนิดอื่นได้ และยังสามารถทำหน้าที่ย่อยสลายสารอาหารซึ้นได้ดีพอๆ กับแบคทีเรียสายพันธุ์ ADB ที่อยู่ในดินที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วด้วย คือ สามารถย่อยสลายสารอาหารซึ้นได้หมดภายใน 1 สัปดาห์เช่นกัน นอกจากนี้ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า การใส่ซิเตรท หรือแอมโมเนียมซัลเฟต หรือแอมโมเนียมและซิเตรท เพื่อเป็นการเพิ่มแหล่งไนโตรเจนและ/หรือแหล่งคาร์บอนให้กับเชื้อนั้น แบคทีเรียสายพันธุ์ ADB ก็สามารถย่อยสลายสารอาหารซึ้นหมดภายใน 1 สัปดาห์เช่นกัน ดังนั้น การเติมแหล่งไนโตรเจนและ/หรือแหล่งคาร์บอนเพิ่มจึงไม่จำเป็นสำหรับแบคทีเรียสายพันธุ์ ADB

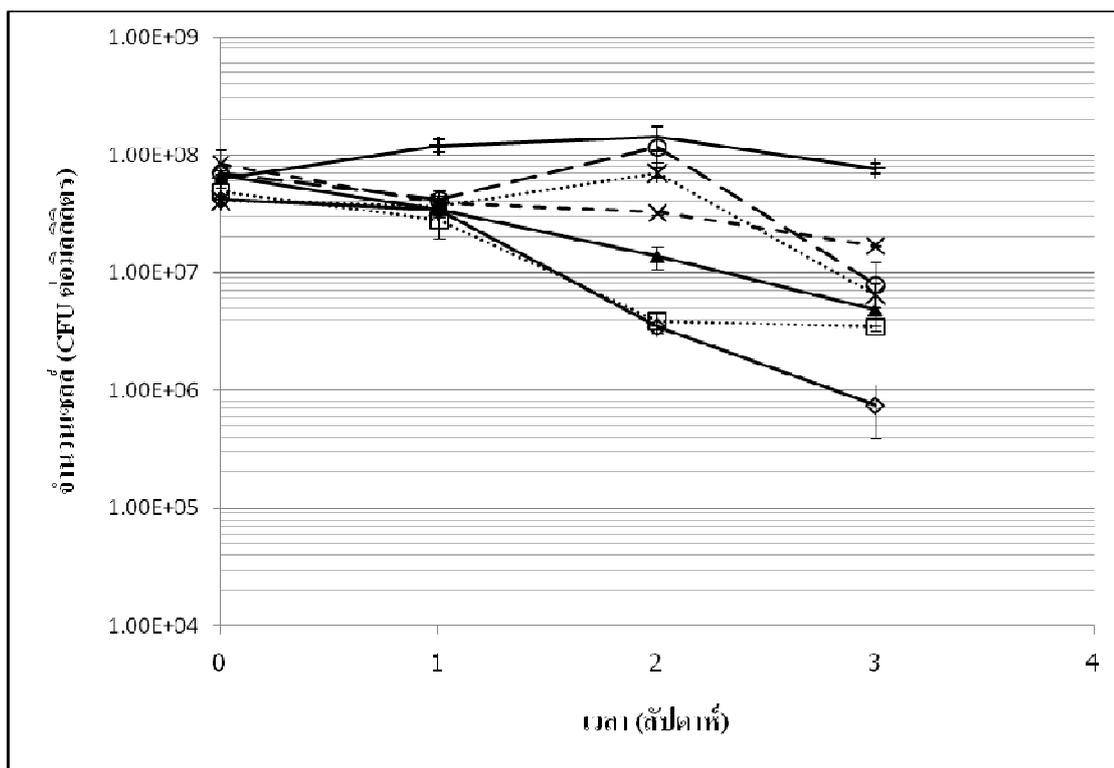
ตารางที่ 12 สมบัติทางเคมีของดินทดลอง

รายการ	ค่าวิเคราะห์
pH (1:1 H ₂ O)	7.63
EC (mS/cm)	3.20
อินทรีย์วัตถุในดิน (%)	1.26
ไนโตรเจนทั้งหมด (%)	0.06
ฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์ (mg/kg)	108.99
โพแทสเซียมที่แลกเปลี่ยนได้ (mg/kg)	106.13



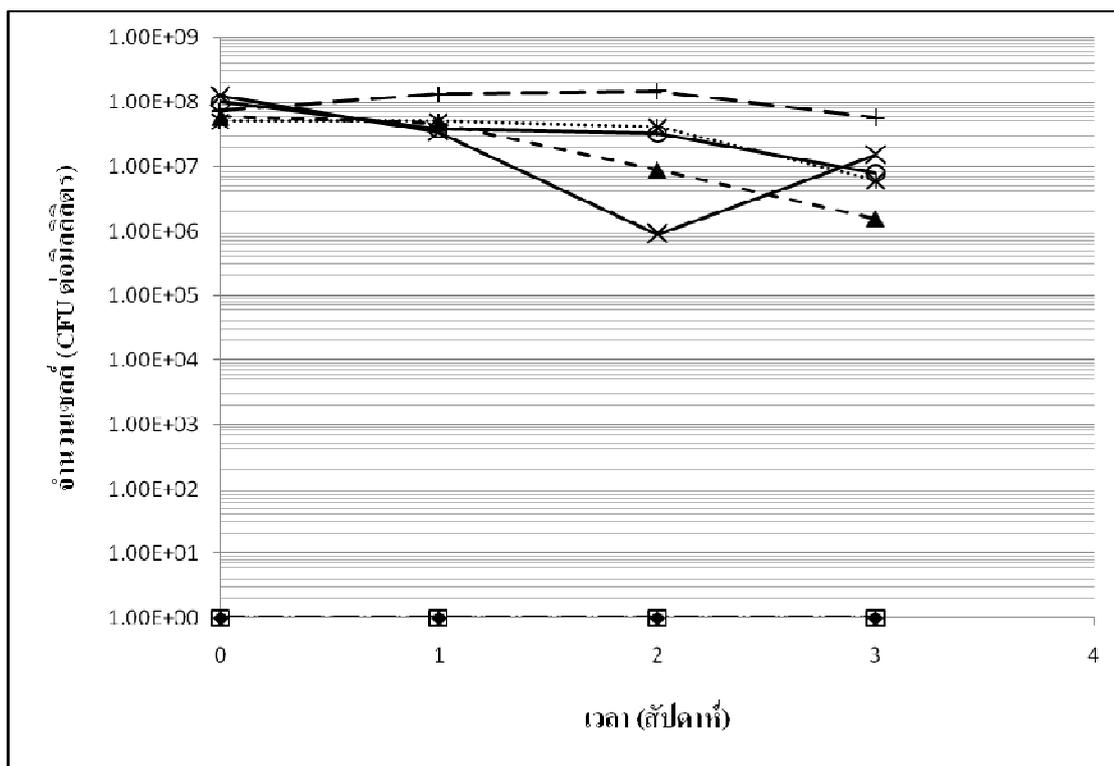
ภาพที่ 14 การย่อยสลายสารอาหารไนโตรเจนในดิน เมื่อมีการเติมแบคทีเรียสายพันธุ์ ADB

- ◆ - คือ ดินซูดควบคุม (control)
- คือ ดินที่มีการเติมสารอาหารไนโตรเจน
- △— คือ ดินที่มีการเติมสารอาหารไนโตรเจนและแบคทีเรียสายพันธุ์ ADB
- คือ ดินที่มีการเติมสารอาหารไนโตรเจน แบคทีเรียสายพันธุ์ ADB และซีเตรท
- *— คือ ดินที่มีการเติมสารอาหารไนโตรเจน แบคทีเรียสายพันธุ์ ADB และแอมโมเนียมซัลเฟต
- คือ ดินที่มีการเติมสารอาหารไนโตรเจน แบคทีเรียสายพันธุ์ ADB, กลูโคส และแอมโมเนียมซัลเฟต
- +— คือ ดินที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วเติมสารอาหารไนโตรเจนและแบคทีเรียสายพันธุ์ ADB



ภาพที่ 15 จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดในดิน โดยการทำ plate count บนอาหารแข็ง Nutrient agar

- ◇ คือ ดินชุดควบคุม (control)
- คือ ดินที่มีการเติมสารอาหารขึ้น
- ▲ คือ ดินที่มีการเติมสารอาหารขึ้นและแบคทีเรียสายพันธุ์ ADB
- x- คือ ดินที่มีการเติมสารอาหารขึ้น แบคทีเรียสายพันธุ์ ADB และซิเตรท
- ※ คือ ดินที่มีการเติมสารอาหารขึ้น แบคทีเรียสายพันธุ์ ADB และแอมโมเนียมซัลเฟต
- คือ ดินที่มีการเติมสารอาหารขึ้น แบคทีเรียสายพันธุ์ ADB, กลูโคส และแอมโมเนียมซัลเฟต
- + คือ ดินที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วเติมสารอาหารขึ้นและแบคทีเรียสายพันธุ์ ADB



ภาพที่ 16 ปริมาณความอยู่รอดของแบคทีเรียสายพันธุ์ ADB ในดิน โดยการทำ plate count บนอาหาร R-medium ที่มีสารอาหารซึนเป็นแหล่งไนโตรเจนความเข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อลิตร

- ◆ คือ ดินชุดควบคุม (control)
- คือ ดินที่มีการเติมสารอาหารซึน
- ▲ คือ ดินที่มีการเติมสารอาหารซึนและแบคทีเรียสายพันธุ์ ADB
- × คือ ดินที่มีการเติมสารอาหารซึน แบคทีเรียสายพันธุ์ ADB และซิเตรท
- ✱ คือ ดินที่มีการเติมสารอาหารซึน แบคทีเรียสายพันธุ์ ADB และแอมโมเนียมซัลเฟต
- คือ ดินที่มีการเติมสารอาหารซึน แบคทีเรียสายพันธุ์ ADB กลูโคส และแอมโมเนียมซัลเฟต
- | คือ ดินที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วเติมสารอาหารซึนและแบคทีเรียสายพันธุ์ ADB

6. ประสิทธิภาพการย่อยสลายสารอาหารจีนโดยจุลินทรีย์ที่มีในธรรมชาติ เมื่อเติมวัสดุอินทรีย์ที่ผ่านกระบวนการทางชีวภาพ

ศึกษาการย่อยสลายสารอาหารจีนของจุลินทรีย์ที่มีอยู่ในธรรมชาติโดยการเติมวัสดุอินทรีย์ที่ผ่านกระบวนการทางชีวภาพ เพื่อกระตุ้นจุลินทรีย์ในดินให้สามารถย่อยสลายสารอาหารจีนได้ ซึ่งวัสดุอินทรีย์ที่ผ่านกระบวนการทางชีวภาพ ที่นำมาศึกษาในครั้งนี้มีปุ๋ยหมัก ปุ๋ยคอก และตะกอนเหลวจากก๊าซชีวภาพ

6.1 สมบัติทางเคมีของดินบางประการ

ดินที่นำมาทำการทดลองเป็นบริเวณเดียวกับการทดลองในข้อ 2 มีสมบัติทางเคมีเหมือนกับข้อ 2.1 ซึ่งค่าวิเคราะห์แสดงในตารางที่ 12

6.2 สมบัติทางเคมีของวัสดุอินทรีย์ที่ผ่านกระบวนการทางชีวภาพบางประการ

ในการทดลองครั้งนี้ได้วิเคราะห์สมบัติทางเคมีของวัสดุอินทรีย์ที่ผ่านกระบวนการทางชีวภาพบางประการ ก่อนที่จะนำมาศึกษาด้วยเมื่อนำค่าวิเคราะห์ไปเปรียบเทียบกับระดับความอุดมสมบูรณ์และความเป็นปัญหา พบว่า ปุ๋ยคอกมีค่า pH 5.29 เป็นกรดจัด ส่วนปุ๋ยหมักมี pH 7.76 เป็นด่างเล็กน้อย และตะกอนเหลวจากก๊าซชีวภาพมี pH 7.23 เป็นกลาง ค่าการนำไฟฟ้า (EC) ของปุ๋ยคอก และปุ๋ยหมัก มีค่า 2.9 และ 3.0 เดซิซีเมนต์ต่อเมตร ถือว่ามีความเค็มอยู่ในระดับเล็กน้อย ส่วนตะกอนเหลวจากก๊าซชีวภาพ มีค่า 0.5 เดซิซีเมนต์ต่อเมตร ถือว่ามีความเค็มอยู่ในระดับต่ำ ซึ่งระดับความเค็มยังถือว่าไม่เป็นพิษต่อพืช (คณาจารย์ภาควิชาปฐพีวิทยา, 2541) ปริมาณไนโตรเจนสำหรับปุ๋ยคอกมี 1.04 % ส่วนในปุ๋ยหมักมีค่า 0.55 % และตะกอนเหลวจากก๊าซชีวภาพมีค่า 0.46 % ปริมาณฟอสฟอรัสทั้งหมดในปุ๋ยคอกมีค่า 1193.28 ปุ๋ยหมัก 801.37 และตะกอนเหลวชีวภาพ 1899.78 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ซึ่งค่าวิเคราะห์แสดงในตารางที่ 13

6.3 ทดสอบการย่อยสลายสารอาหารจีนของจุลินทรีย์ที่มีอยู่ในธรรมชาติ

ศึกษาการย่อยสลายสารอาหารจีนของจุลินทรีย์ที่มีอยู่ในธรรมชาติโดยการเติมวัสดุอินทรีย์ที่ผ่านกระบวนการทางชีวภาพ เพื่อกระตุ้นให้จุลินทรีย์ในดินสามารถย่อยสลายสารอาหาร

ขึ้นได้ ด้วยการวัดปริมาณสารอาหารที่คงเหลืออยู่ในดิน เป็นเวลา 3 สัปดาห์ โดยมีการเติมสารอาหารเริ่มต้นที่ความเข้มข้น 150 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมดิน

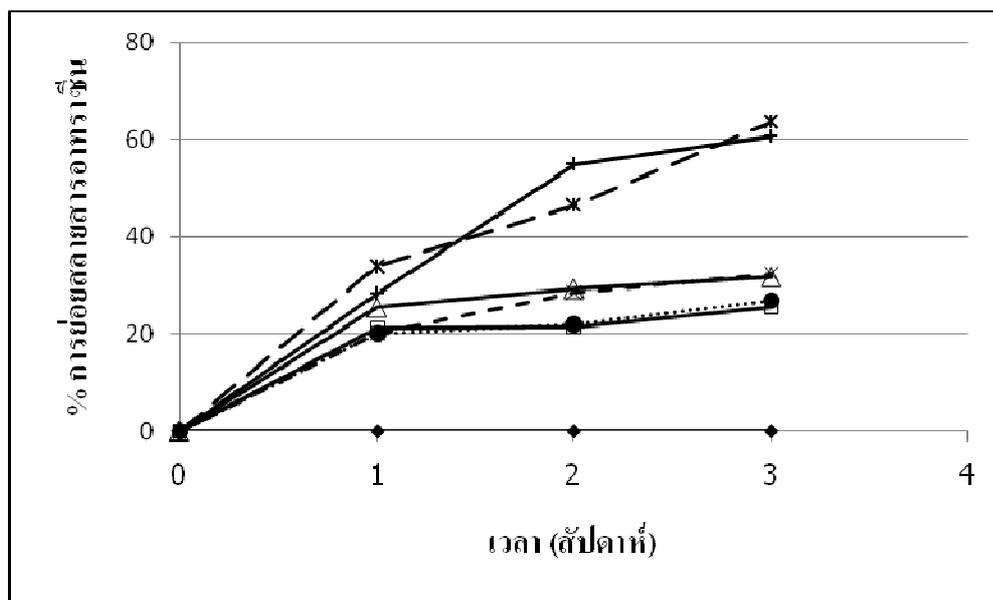
จากผลการทดลองพบว่า ดินที่มีการเติมสารอาหารเช่นเดียว (ดำรับการทดลองที่ 2) สารอาหารลดลง 42 82.5 และ 91.5 มิลลิกรัมสารอาหารต่อกิโลกรัมดิน ในสัปดาห์ที่ 1 2 และ 3 ตามลำดับ และดินที่มีการเติมปุ๋ยคอกอย่างเดียว สารอาหารลดลง 46.5 66 และ 93 มิลลิกรัมสารอาหารต่อกิโลกรัมดิน ในสัปดาห์ที่ 1 2 และ 3 ตามลำดับ ส่วนดินที่มีการเติมปุ๋ยหมัก หรือปุ๋ยคอก หรือตะกอนเหลวจากก๊าซชีวภาพร่วมกับซีเตรท (ดำรับการทดลองที่ 3-5) ในสัปดาห์ที่ 1 สารอาหารลดลง 31.5 33 และ 42 มิลลิกรัมสารอาหารต่อกิโลกรัมดิน ตามลำดับ ต่อมาในสัปดาห์ที่ 2 สารอาหารลดลง 33 39 และ 40.5 มิลลิกรัมสารอาหารต่อกิโลกรัมดิน ตามลำดับ และในสัปดาห์ที่ 3 สารอาหารลดลง 39 43.5 และ 46.5 มิลลิกรัมสารอาหารต่อกิโลกรัมดิน และในดินที่มีการเติมซีเตรทอย่างเดียว (ดำรับการทดลองที่ 7) สารอาหารลดลง 30 33 และ 39 มิลลิกรัมสารอาหารต่อกิโลกรัมดิน ในสัปดาห์ที่ 1 2 และ 3 ตามลำดับดังแสดงในภาพที่ 17

ผลการศึกษาทำให้ทราบว่า การใส่ปุ๋ยคอก ปุ๋ยหมัก หรือตะกอนเหลวจากก๊าซชีวภาพร่วมกับซีเตรท เพื่อเป็นการเพิ่มแหล่งคาร์บอน จะไปยับยั้งการย่อยสลายสารอาหาร จะเห็นได้ว่าการใส่ปุ๋ยคอก ปุ๋ยหมัก หรือตะกอนเหลวจากก๊าซชีวภาพร่วมกับซีเตรทไม่ได้ช่วยกระตุ้นให้จุลินทรีย์ที่มีอยู่ในธรรมชาติสามารถย่อยสลายสารอาหารเช่นเดียวกับดำรับการทดลองที่มีการเติมซีเตรทอย่างเดียว ขณะที่ดำรับการทดลองที่เติมปุ๋ยคอกอย่างเดียว และดำรับการทดลองที่เติมสารอาหารเช่นเดียวจะพบการย่อยสลายของสารอาหารมากกว่า คือ ดำรับการทดลองที่มีการเติมปุ๋ยคอกอย่างเดียว สารอาหารถูกย่อยสลาย 62 เปอร์เซ็นต์ ภายในระยะเวลา 3 สัปดาห์ และดำรับการทดลองที่เติมสารอาหารอย่างเดียว สารอาหารถูกย่อยสลายไป 61 เปอร์เซ็นต์ ภายในระยะเวลา 3 สัปดาห์เท่ากัน ซึ่งปริมาณการลดลงของสารอาหารทั้งสองดำรับการทดลองนั้นไม่แตกต่างกัน แสดงว่าดินที่นำมาทดลองนี้น่าจะมีจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายสารอาหารอยู่ในดิน และจะเกิดการย่อยสลายอย่างช้าๆ โดยที่ไม่ต้องมีการเติมวัสดุอินทรีย์ เพื่อเป็นแหล่งคาร์บอนให้กับดินที่นำมาทดลองเลย เมื่อเปรียบเทียบกับดำรับการทดลองอื่นๆ จะเห็นว่าสอดคล้องกัน คือ ในปี ค.ศ. 2000 Abdelhafid *et al.* ได้ทำการศึกษาการย่อยสลายสารอาหารในดิน โดยมีการเติมแหล่งคาร์บอน (กลูโคส เซลลูโลส ฟางข้าวสาลี ปุ๋ยคอก) และแหล่งไนโตรเจน (แอมโมเนียมไนเตรท แคลเซียมไนเตรท แอมโมเนียมซัลเฟต กรดอะมิโน โปรตีน ไบยูเรต พิวรีน และไดอะมิน) ลงไปในดิน จุลินทรีย์ดินในธรรมชาติสามารถย่อยสลายสารอาหารได้ แต่ผลปรากฏว่าดินที่ไม่มีการเติมแหล่งคาร์บอน และแหล่งไนโตรเจน จุลินทรีย์สามารถย่อยสลายสารอาหารได้มากกว่าดินที่มี

การเติมแหล่งคาร์บอน และแหล่งไนโตรเจน ถึงอย่างไรก็ตาม การทดลองในประเทศอินเดียพบว่า จุลินทรีย์สามารถย่อยสลายสารอาหารจีนจะได้มากขึ้นเมื่อมีการเติมซีเตรทร่วมกับการใส่วัสดุ อินทรีย์ที่ผ่านกระบวนการทางชีวภาพ ภายในระยะเวลา 3 สัปดาห์ (Kadian *et al.*,2007)

ตารางที่ 13 สมบัติบางประการของวัสดุอินทรีย์ที่ผ่านกระบวนการทางชีวภาพ

ชนิดวัสดุอินทรีย์	pH	EC (mS/cm)	%N	P (mg/kg)	%OC
ปุ๋ยคอก	5.29	2.9	1.04	1193.28	12.02
ปุ๋ยหมัก	7.76	3.0	0.55	801.37	6.35
กากก๊าซชีวภาพ	7.23	0.5	0.46	1899.78	5.30



ภาพที่ 17 การย่อยสลายสารอาหารอินทรีย์ในดินเมื่อมีการเติมวัสดุอินทรีย์ที่ผ่านกระบวนการทางชีวภาพชนิดต่างๆ

- ◆— คือ ดินชุดควบคุม (control)
- +— คือ ดินที่มีการเติมสารอาหารอินทรีย์
- คือ ดินที่มีการเติมปุ๋ยหมักและซีเตรท
- △— คือ ดินที่มีการเติมปุ๋ยคอกและซีเตรท
- ×— คือ ดินที่มีการเติมกากก้ำาชีวภาพและซีเตรท
- *— คือ ดินที่มีการเติมปุ๋ยคอกเพียงอย่างเดียว
- คือ ดินที่มีการเติม citrate เพียงอย่างเดียว

สรุป

จากการศึกษาในครั้งนี้พบแบคทีเรียย่อยสลายสารอาหารจากดินบริเวณแปลงปลูกอ้อยของศูนย์วิจัยอ้อยและน้ำตาล มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน ซึ่งมีประวัติการใช้สารอาหารขึ้นในการควบคุมวัชพืชในไร่อ้อยมานานถึง 21 ปีได้ ซึ่งแบคทีเรียที่ได้มีโคโลนีสีขาวเหลือง มีลักษณะกลม (cocci) ขนาด 1X1 ไมครอน เป็นแบคทีเรียแกรมลบ ติดสีแดง และให้ชื่อว่าสายพันธุ์ ADB การศึกษาในระดับดีเอ็นเอในส่วนของยีน 16S ไรโบโซมอลดีเอ็นเอ พบว่ามีความเหมือนกับ *Arthrobacter* sp. 99 เปอร์เซนต์ โดยแบคทีเรียสายพันธุ์ ADB นี้ใช้สารอาหารขึ้นเป็นแหล่งไนโตรเจนเพื่อการเจริญเติบโต มียีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการย่อยสลายสารอาหารขึ้น คือ *trzN*, *atzB* และ *atzC*

การทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายสารอาหารขึ้นในดิน พบว่า แบคทีเรียสายพันธุ์ ADB สามารถย่อยสลายสารอาหารขึ้นได้หมด (150 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมดิน) ภายในเวลา 1 สัปดาห์ ส่วนในตำรับการทดลองที่เติมสารอาหารขึ้นอย่างเดียวสารอาหารขึ้นก็ลดลงเช่นกัน (42 มิลลิกรัมสารอาหารขึ้นต่อกิโลกรัมดิน) ในระยะเวลา 1 สัปดาห์ และแบคทีเรียสายพันธุ์ ADB สามารถมีชีวิตอยู่รอดได้ในดิน แต่ปริมาณของแบคทีเรียสายพันธุ์ ADB จะมีปริมาณลดลงเล็กน้อยจาก 10^7 เป็น 10^6 ส่วนในดินที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วจะมีปริมาณแบคทีเรียสายพันธุ์ ADB ค่อนข้างคงที่คือ ประมาณ 10^7 ตลอดระยะเวลา 3 สัปดาห์ที่ทำการทดลอง นอกจากนี้ยังได้ทำการทดสอบประสิทธิภาพจุลินทรีย์ในธรรมชาติที่มีความสามารถในการย่อยสลายสารอาหารขึ้น โดยกระตุ้นด้วยวัสดุอินทรีย์ที่ผ่านกระบวนการทางชีวภาพ (ปุ๋ยหมัก ปุ๋ยคอก และตะกอนเหลวจากก๊าซชีวภาพ) จะเห็นได้ว่าการใส่ปุ๋ยคอกและดินควบคุมเกิดการย่อยสลายสารอาหารขึ้น แต่การใส่วัสดุอินทรีย์ที่ผ่านกระบวนการทางชีวภาพร่วมกับชีตรทในดินนี้จะเป็นการยับยั้งการย่อยสลายสารอาหารขึ้น

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

- กรมควบคุมมลพิษ. 2547. กำหนดมาตรฐานคุณภาพดิน. ประกาศคณะกรรมการสิ่งแวดล้อมแห่งชาติ. แหล่งที่มา: <http://www.onep.go.th/neb/6.%20Laws/webpage/laws.html>, 26 ธันวาคม 2550.
- กรมพัฒนาที่ดิน กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 2548. รายงานการจัดการทรัพยากรดิน เพื่อการปลูกพืชเศรษฐกิจหลักตามกลุ่มชุดดิน เล่มที่ 1 ดินบนพื้นที่ราบต่ำ. กรมพัฒนาที่ดิน, กรุงเทพฯ.
- กรมวิชาการเกษตร. 2549. ข้อมูลนำเข้าวัตถุดิบทางการเกษตร. ข้อมูลการเกษตร. แหล่งที่มา: <http://www.doa.go.th/th/1stDoa3Cate.aspx?id=100>, 12 มิถุนายน 2549
- คณาจารย์ภาควิชาปฐพีวิทยา. 2541. ปฐพีวิทยาเบื้องต้น. พิมพ์ครั้งที่ 8. ภาควิชาปฐพีวิทยา คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
- ทศพล พรพรหม. 2545. สารกำจัดวัชพืช: หลักการและกลไกเข้าทำลาย. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
- ทัศนีย์ อัดตะนันท์ และจรงค์ จันทร์เจริญสุข. 2542. แบบฝึกหัดและคู่มือปฏิบัติการ: การวิเคราะห์ดินและพืช. ภาควิชาปฐพีวิทยา คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
- รัชชชัย รัตน์ชเลศ. 2540. เทคโนโลยีสารกำจัดวัชพืช. ลินคอร์น, กรุงเทพฯ.
- ภิญญา จำรัสกุล, ศิวาภรณ์ สกฤตเที่ยงตรง, พงศ์ศรี ไบอคุลย์ และพูลสุข หฤทัยธนาสันต์. 2539. การแพร่กระจายของวัชตมมีพิษในน้ำและดินตะกอนบริเวณลุ่มแม่น้ำกลองและคลองแยก. รายงานผลการค้นคว้าวิจัย, กองวัชตมมีพิษการเกษตร, กรมวิชาการเกษตร.
- _____, _____. 2540. การเฝ้าระวังและติดตามการปนเปื้อนของสารพิษการเกษตรในแม่น้ำป่าสัก. รายงานผลการค้นคว้าวิจัย, กองวัชตมมีพิษการเกษตร, กรมวิชาการเกษตร.

รังสิต สุวรรณเขตนิกม, 2526. **สารกำจัดวัชพืชกับผลทางสรีรวิทยาของพืช**. จงเจริญการพิมพ์, กรุงเทพฯ.

วิภา ตังนิพนธ์, มลิสสา คนรู้ และพูลสุข หฤทัยธนาสันต์. 2542. **การเฝ้าระวังและติดตามสารพิษตกค้างในห้วยแม่ น้ำอูนและแม่น้ำสงคราม**. รายงานผลการค้นคว้าวิจัย, กองวัตถุมีพิษ การเกษตร, กรมวิชาการเกษตร.

ศิวาภรณ์ สกุลเที่ยงตรง, มลิสสา เวชยานนท์, พงศ์ศรี ไบอดุลย์ และพูลสุข หฤทัยธนาสวัสดิ์. 2545. การปนเปื้อนวัตถุมีพิษในน้ำใต้ดิน. น. 64-73 ใน รายงานการประชุมวิชาการกองวัตถุมีพิษ การเกษตรครั้งที่ 4. กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, กรุงเทพฯ.

สุพัทธรา แสนพันธุ์. 2548. **ผลของการใช้ที่ดินต่อปริมาณสารอะทราซีนในน้ำท่าและตะกอนดินบริเวณลุ่มน้ำคลองอีเต่า อำเภอวังน้ำเขียว จังหวัดนครราชสีมา**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

Abdelhafid R., S. Houot and E. Barriuso. 2000. Dependence of atrazine degradation on C and N availability in adapted and non-adapted soils. **Soil Biology & Biochemistry**. 32: 389-401.

Atlas, R.M. and R. Bartha. 1998. **Microbial ecology: fundamentals and applications**. 4th ed. An Imprint of Addison Wesley Long Man, Inc. California.

Alvey, S., and D.E. Crowley. 1996. Survival and activity of an atrazine-mineralizing bacterial consortium in rhizosphere soil. **Environ. Sci. Technol.** 30: 1596-1603.

Anderson, P.C. and M. Georgeson. 1989. Herbicide-tolerant mutants of corn. **Genome**. 31: 994-999.

Arntzen, C. J., S. C. Darr, J. E. Mullet, K. E. Steinback and K. Pfister. 1982. Polypeptide determinants of plastoquinone function in photosystem II of chloroplasts. pp. 443-452.

- In* B. Trumponor, ed. **Functions of quinines in energy conserving systems.** Academic Press, New York.
- Assaf, N.A. and R.F. Turco. 1994. Influence of carbon and nitrogen application on atrazine degradation in soil. **Pesticide Science.** 41: 41–47.
- Baitsch, D., C.Sandu, R. Brandsch and G.L. Igloi. 2001. Gene cluster on pAO1 of *Arthrobacter nicotinovorans* involved in degradation of the plant alkaloid nicotine: cloning, purification, and characterization of 2, 6-dihydroxypyridine 3-hydroxylase. **J. Bacteriol.** 183: 5262-5267.
- Baker, F.W.G. 1991. Tropical Grassy Weeds, pp. 96-105. *In* F.W. Baker and P.J. Terry, eds. **CAB International.** Wallingford, England.
- Baker, B.D., P.R. Richards and J.H. Lehr. 1992. **Rational Readings on Environmental Concerns.** Van-Nostrand Reinhold, New York.
- Belluck, D.A., S.L. Benjamin and T. Dawson. 1991. Groundwater contamination by atrazine and its metabolites, pp. 254-273. *In* L. Somasundaram and J. R. Coats, eds. **Pesticide transformation products.** American Chemical Society. Washington D. C.
- Benson, H.J. 2005. **Microbiological Applications.** 9th ed. McGraw-Hill, New York.
- Beste, C.E. 1983. **Herbicide handbook of the Weed Science Society of America.** 5th ed. Weed Science Society of America, USA.
- Boundy-Mills, K.L., M.L. de Souza, R.T. Mandelbaum, L.P. Wackett and M.J. Sadowsky. 1997. The *atzB* gene of *Pseudomonas* sp. strain ADP encodes the second enzyme of a novel atrazine degradation pathway. **Appl. Environ. Microbiol.** 63: 916-923.

- Bouquard, C., J. Ouazzani, J.C. Prome, Y. Michel-Briand and P. Plesiat. 1997. Dechlorination of atrazine by a *Rhizobium* sp. isolate. **Appl. Environ. Microbiol.** 63: 862-866.
- Boylen, C.W. 1973. Survival of *Arthrobacter crystallopoietes* during prolonged periods of extreme desiccation. **J. Bacteriol.** 113: 33-37.
- Boylen, C.W. and J.C. Ensign. 1970. Long-term starvation survival of rod and spherical cells of *Arthrobacter crystallopoietes*. **J. Bacteriol.** 103: 569-577.
- Boylen, C.W. and M.H. Mulks. 1978. The survival of coryneform bacteria during period of prolonged nutrient starvation. **J. Gen. Microbiol.** 105: 323-334.
- Bray, R.H. and L.T. Kurtz. 1945. Determination of total organic and available forms of phosphorus in soils. **Soil Sci.** 59: 39-45.
- Casellas, M., M. Grifoll, J.M. Bayona and A.M. Solanas. 1997. New metabolites in the degradation of fluorene by *Arthrobacter* sp. strain F101. **Appl. Environ. Microbiol.** 63: 819-826.
- Chen, M. and M. Alexander. 1973. Survival of soil bacteria during prolonged desiccation. **Soil. Biol. and Biochem.** 52: 213-221.
- Corbett, J.R. 1974. **The biochemical mode of pesticide.** Academic Press, Inc. New York.
- Cohen, S., S. Creager, R. Carsel and C. Enfield. 1984. Potential pesticide contamination of ground water from agricultural uses. *In* **treatment and disposal of pesticide waste.** American Chemical Society. Washington, D.C.
- Cook, A.M. 1987. Biodegradation of *s*-triazine xenobiotics. **FEMS Microbiol. Rev.** 46: 93-116

- DePrada, P., J. Loveland-Curtze and J.E. Brenchley. 1996. Production of two extracellular alkaline phosphatase by psychrophilic *Arthrobacter* strain. **Appl. Environ. Microbiol.** 62: 3732-3738.
- de Souza, M.L., D. Newcombe, S. Alvey, D.E. Crowley, A. Hay, M.J. Sadowsky and L.P. Wackett. 1998. Molecular basis of a bacterial consortium: interspecies catabolism of atrazine. **Appl. Environ. Microbiol.** 64: 178-184.
- de Souza, M.L., M.J. Sadowsky and L.P. Wackett. 1996. Atrazine chlorohydrase from *Pseudomonas* sp. ADP: gene sequence, enzyme purification and protein characterization. **J. Bacteriol.** 178: 4894-4900.
- _____, L.P. Wackett, K.L. Boundy-Mills, R.T. Mandelbaum and M.J. Sadowsky. 1995. Cloning, characterization, and expression of a gene region from *Pseudomonas* sp. strain ADP involved in the dechlorination of atrazine. **Appl. Environ. Microbiol.** 61: 3373-8.
- Eaton, R.W., and J.S. Karns. 1991a. Cloning and analysis of *s*-triazine catabolic genes from *Pseudomonas* sp. strain NRRLB-12227. **J. Bacteriol.** 173: 1215-1222
- _____ and _____. 1991b. Cloning and comparison of the DNA encoding ammelide aminohydrolase and cyanuric acid amidohydrolase from three *s*-triazine degrading bacterial strains. **J. Bacteriol.** 173: 1363-1366.
- Eisler, R. 1989. Atrazine Hazards to Fish, Wildlife, and Invertebrates. **A Synoptic Review; Contaminant Hazard Review Report No. 18; Fish and Wildlife Service.** U.S. Department of the Interior, Washington, D.C.
- Erickson, L.E. and K.H. Lee. 1989. Degradation of atrazine and related *s*-triazines. **Critical Reviews in Environmental Control.** 19: 1-4
- Fan W., T. Yanase, H. Morinaga, S. Gondo, T. Okabe, M. Nomura, T. Komatsu, K. I. Morohashi, T. B. Hayes, R. Takayanagi and H. Nawata. 2007. Atrazine-Induced Aromatase

Expression Is SF-1 Dependent: Implications for Endocrine Disruption in Wildlife and Reproductive Cancers in Humans. **Environ Health Perspect.** 115: 720-727.

Fletcher, O.H. 1958. The Effects on Subsequent Crops of Simazine Treatment of Corn, pp. 1-2. **In WSSA Abstracts 1958 Meeting.** USA.

Flury, M. 1996. Experimental evidence of transport of pesticides through field soils: A review. **J. Environ. Qual.** 25: 25-45.

Foy, C.L. 1960. Weed Control in Agronomic Crops: a Report of Progress, pp. 66-72. **Proc. California Weed Control Conf.** USA.

Frank, R., G.J. Strons and G.W. Anderson. 1983. Atrazine: The impact of persistent residues in soil on susceptible crop species. **Can. J. Soil Sci.** 63: 315-325.

Fruchey, I., N. Shapir, M.J. Sadowsky and L.P. Wackett. 2003. On the Origins of Cyanuric Acid Hydrolase: Purification, Substrates, and Prevalence of AtzD from *Pseudomonas* sp. Strain ADP. **Appl. Environ. Microbiol.** 69: 3653–3657.

Gray, T.R.G. 1976. Survival of vegetative microbes in soil. **Symposium of the Society for General Microbiology.** 26: 327-364.

Hase Y., M. Tatsuno, T. Nishi, K. Kataoka, Y. Kabe, Y. Yamaguchi, N. Ozawa, M. Natori, H. Handa and H. Watanabe. 2008. Atrazine binds to F1F0-ATP synthase and inhibits mitochondrial function in sperm. **J. BBRC.** 366: 66-72.

Hayatsu, M., A. Mizutani, M. Hashimoto, K. Sato and K. Hayano. 2001. Purification and characterization of carbaryl hydrolase from *Arthrobacter* sp. RC100. **FEMS Microbiology Letters.** 201: 99-103.

- Hayes, W.J. 1982. Pesticides derived from plants and other organisms. pp. 75-11. **Pesticides studies in man.** Baltimore, London.
- Hayes, W.J. and E.R. Laws. 1991. **Handbook of pesticide toxicology Vol. 3.** Academic Press, Inc., New York.
- Hayes, T., K. Haston, M. Tsui, A. Hoang, C. Haeffele and A. Vonk. 2003. Atrazine-Induced Hermaphroditism at 0.1 ppb in American Leopard Frogs (*Rana pipiens*): Laboratory and Field Evidence. **Environ Health Perspect.** 111: 568-575.
- Hutber, G.N., L.J. Rogers and A.J. Smith. 1979. Influence of pesticides on the growth of cyanobacteria. **Z.Allg Mikrobiol.** 19: 397-402.
- Hutzinger, O. and W. Veerkamp. 1981. Xenobiotic chemicals with pollution potential, pp. 3-45. *In* Leisinger, T., Cook, A.M. Hutter, R. and Nuesch, J., eds. **Microbial degradation of xenobiotics and recalcitrant compounds.** Academic Press, London.
- Jackson, M.L. 1965. **Soil Chemical Analysis-Advanced Course.** Department of Soils, University of Wisconsin.
- Jones, D. and R.M. Keddie. 1992. The genus *Arthrobacter*, pp. 1283-1299. *In* A. Balows, H. G. Truper, M. Dworkin, W. Harder and K. H. Schleifer, eds. **The prokaryotes Vol 2.** Springer, New York.
- Kadian, N., A. Gupta, S. Satya, R.K. Metha and A. Malik. 2007. Biodegradation of herbicide (atrazine) in contaminated soil using various bioprocessed materials. **Bioresour Technol.**
- Kamely, D., A. Chakrabarty and G.S. Omenn. 1989. **Biotechnology and biodegradation. Advances in applied biotechnology series.** The Portfolio Publishing Company, The Woodlands, Texas.

- Kells, J.J., R.H. Leep, M.B. Tesar, R.A. Leavitt and J. Cudnohufsky. 1990. Effect of atrazine and tillage on alfalfa (*Medicago sativa*) establishment in a corn (*Zea mays*)-alfalfa rotation. **Weed Technol.** 4: 360-365.
- Kolpin, D.W. and S.J. Kalkhoff. 1993. Atrazine degradation in a small stream in Iowa. **Environ. Sci. Tech.** 27: 134-139.
- Labeda, D.P., K.C. Liu and L.E. Casida, Jr. 1976. Colonization of soil by *Arthrobacter* and *Pseudomonas* under varying conditions of water and nutrient availability as studied by plate counts and transmission electron microscopy. **Appl. Environ. Microbiol.** 31: 551-561.
- Loveland J., K. Gutshall, J. Kasmir, P. Prema and J.E. Brenchley. 1994. Characterization of psychrotrophic microorganism producing β -galactosidase activities. **Appl. Environ. Microbiol.** 60: 12-18.
- Maule A. and S.J.L. Wright. 1984. Herbicide effects on the population growth of some green algae and cyanobacteria. **J Appl Bacteriol** 57: 369-376.
- Mandelbaum, R.T., D.L. Allan and L.P. Wackett. 1995. Isolation and characterization of a *Pseudomonas* sp. that mineralizes the *s*-triazine herbicide atrazine. **Appl. Environ. Microbiol.** 61: 1451-1457.
- _____, L.P. Wackett and D.L. Allan. 1993a. Mineralization of the *s*-triazine ring of atrazine by stable bacterial mixed cultures. **Appl. Environ. Microbiol.** 59: 1695-1701.
- _____, L.P. Wackett and D.L. Allan. 1993b. Rapid hydrolysis of atrazine to hydroxyatrazine by soil bacteria. **Environ. Sci. and Tech.** 27: 1943-1946.

- Martinez, B.L., J. Tomkins, L.P. Wackett, R. Wing and M.J. Sadowsky. 2001. Complete nucleotide sequence and organization of the atrazine catabolic plasmid pADP-1 from *Pseudomonas* sp. strain ADP. **J. Bacteriol.** 183: 5684-5697.
- Mirgain, I., G.A. Green and H. Monteil. 1993. Degradation of atrazine in laboratory microorganisms: Isolation and identification of the biodegradation bacteria. **Environ. Toxicol. Chem.** 12: 1627-1634.
- Mougin, C., C. Laugero, M. Asther, J. Dubroca, P. Frasse and M. Asther. 1994. Biotransformation of the herbicide atrazine by the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. **Appl. Environ. Microbiol.** 60: 705-708.
- Mulbry, W.W. 1994. Purification and characterization of an inducible *s*-triazine hydrolase from *Rhodococcus corallinus* NRRL B-15444R. **Appl. Environ. Microbiol.** 60: 613-618.
- _____, H. Zhu, S.M. Nour and E. Topp. 2002. The triazine hydrolase gene *trzN* from *Nocardioides* sp. strain C190: cloning and construction of gene-specific primers. **FEMS Microbiol Lett.** 206: 75-79.
- Nagy, I., F. Compernelle, K. Ghys, J. Vanderleyden and R. Demot. 1995. A single cytochrome P-450 system is involved in degradation of the herbicides EPTC (*s*-ethyl dipropylthiocarbamate) and atrazine by *Rhodococcus* sp. strain NI86/21. **Appl. Environ. Microbiol.** 61: 2056-2060.
- Nelson, D.W. and L.E. Sommers. 1986. Total carbon, Organic Carbon, and Organic Matter, pp. 570-572. In A.L. Page, eds. **Method of Soil Analysis Part 2: Chemical and Microbiological Properties 2nd**. Soil Science Society of America Inc., Wisconsin.
- Oldal B., E. Maloschik, N. Uzinger, A. Anton and A. Szekacs. 2006. Pesticide residues in Hungarian soils. **Geoderma.** 135: 163-178.

- Pipe A.E. 1992. Pesticide effects on soil algae and cyanobacteria. **Rev. Environ. Contam.** 127: 95-171.
- Piutti, S., E. Semon, D. Landry, A. Hartmann, S. Dousset, E. Lichtfouse, E. Topp, G. Soulas and F. Martin-Laurent. 2003. Isolation and characterization of *Nocardioides* sp. SP12, an atrazine-degrading bacterial strain possessing the gene *trzN* from bulk- and maize rhizosphere soil. **FEMS Microbiol. Lett.** 221: 111-7.
- Prasad, T.A., T. Srinivas, G.M. Rafi and D.C. Reddy. 1991. Effect in vivo of atrazine on haematology and O₂ consumption in fish, *Tilapia mossambica*. **Biochem Int** 23: 157-61.
- Rodosevich, M.S., S.J. Traina, Y.L. Hao and O.H. Tuovinen. 1995. Degradation and mineralization of atrazine by a soil bacterial isolate. **Appl. Environ. Microbiol.** 61: 297-302.
- Sadowsky, M.J., Z. Tong, M.L. de Souza and L.P. Wackett. 1998. AtzC is a new member of the amidohydrolase protein superfamily and is homologous to other atrazine-metabolizing enzymes. **J. Bacteriol.** 180: 152-158.
- Shao, Z.Q. and R. Behki. 1995. Cloning of the genes for degradation of the herbicides EPTC (*S*-ethyl dipropylthiocarbamate) and atrazine from *Rhodococcus* sp. strain TE1. **Appl. Environ. Microbiol.** 61: 2061-2065.
- _____, W. Seffens, W. Seffens, W. Mulbry and R.M. Behki. 1995. Cloning and expression of the *s*-triazine hydrolase gene (*trzA*) from *Rhodococcus corallinus* and development of *Rhodococcus* recombinant strains capable of dealkylating and dechlorinating the herbicide atrazine. **J. Bacteriol.** 177: 5748-5755.
- Shapir, N., J.P. Osborne, G. Johnson, M.J. Sadowsky and L.P. Wackett. 2002. Purification, Substrate Range, and Metal Center of AtzC: the isopropylamide aminohydrolase involved in bacterial atrazine metabolism. **J. Bacteriol.** 184: 5376-5384.

- Sheets, T.J. 1970. Persistence of triazine herbicides in soils. **Residue Rev.** 32: 287.
- Stackebrandt, E. and C.R. Woese. 1981. The evolution of prokaryotes, pp. 1-31. *In* M.J. Carlile, J.F. Collins and B.E.B. Moseley. **Molecular and cellular aspects of microbial evolution.** Cambridge University Press, Cambridge.
- Stein, J.R. 1973. **Handbook of phycological methods : Culture methods and growth measurements.** Cambridge University Press, New York.
- Stolpe, N.B. and P.J. Shea. 1995. Alachlor and atrazine degradation in a Nebraska soil and underlying sediments. **Soil Sci.** 160: 359-370.
- Strong, L.C., C. Rosendahl, G. Johnson, M.J. Sadowsky and L. P. Wackett. 2002. *Arthrobacter aurescens* TC1 metabolites diverse s-triazine ring compounds. **Appl. Environ. Microbiol.** 68: 5973-5980.
- Struthers, J.K., K. Jayachandran and T.B. Moorman. 1998. Biodegradation of atrazine by *Agrobacterium tadioacter* J14a and Use of this strain in bioremediation of contaminated soil. **Appl. Environ. Microbiol.** 64: 3368-3375.
- Topp, E., H. Zhu, S.M. Nour, S. Houot, M. Lewis and D. Cuppels. 2000a. Characterization of an atrazine-degrading *Pseudaminobacter* sp. isolated from Canadian and French agricultural soils. **Appl. Environ. Microbiol.** 66: 2773-2782.
- _____, W.M. Mulbry, H. Zhu, S.M. Nour and D. Cuppels. 2000b. Characterization of s-triazine herbicide metabolism by a *Nocardioides* sp. isolated from agricultural soil. **Appl. Environ. Microbiol.** 66: 3134-3141.
- United State Environmental Protection Agency (US.EPA.). 2003. **2002 Edition of the drinking water standards and health advisories: EPA 822-R-02-038.** Available Source: <http://www.epa.gov/waterscience>, August 28, 2006.

- Vaishampayan, P.A., P.P. Kanekar and P.K. Dhakephalkar. 2007. Isolation and characterization of *Arthrobacter* sp. strain MCM B-436, an atrazine-degrading bacterium, from rhizospheric soil. **International Biodeterioration & Biodegradation**. 60: 273-278.
- Walkley, A. and C.A. Black. 1934. An examination of Degtjareff method for determining soil organic matter and a proposed modification of the chroma acid titration method. **Soil Sci.** 37: 29-35.
- World Health Organization (WHO). 2003. **Guideline for drinking water quality**. Available Source: http://www.who.int/water_sanitation_health/GDWQ/Updating/draftguidel/draftchap87b.htm#8.73, August 28, 2006.
- Yanze-Kontchou, C. and N. Gschwind. 1994. Mineralization of the herbicide atrazine as a carbon source by a *Pseudomonas* strain. **Appl. Environ. Microbiol.** 60: 4297-4302.
- _____, _____. 1995. Mineralization of the herbicide atrazine in soil inoculated with a *Pseudomonas* strain. **J. Agric. Food Chem.** 60: 4297-4302.

ภาคผนวก

ตารางผนวกที่ 1 ระดับความรุนแรงของปฏิกิริยา

ระดับ (rating)	พีสัย (range)
เป็นกรดรุนแรงมากที่สุด (ultra acid)	<3.5
เป็นกรดรุนแรงมาก(extremely acid)	3.5-4.5
เป็นกรดจัดมาก(strongly acid)	4.5-5.0
เป็นกรดจัด(strongly acid)	5.1-5.5
เป็นกรดปานกลาง(moderately acid)	5.6-6.0
เป็นกรดเล็กน้อย(slightly acid)	6.1-6.5
เป็นกลาง(neutral)	6.6-7.3
เป็นด่างเล็กน้อย(slightly alkaline)	7.4-7.8
เป็นด่างปานกลาง(moderately alkaline)	7.9-8.4
เป็นด่างจัด(strongly alkaline)	8.5-9.0
เป็นด่างจัดมาก(very strongly alkaline)	>9.0

ที่มา: คณาจารย์ภาควิชาปฐพีวิทยา (2541)

ตารางผนวกที่ 2 ค่าการนำไฟฟ้า Electric Conductivity(EC)

ระดับ (rating)	พิสัย (dS/m)	
ต่ำมาก(VL)	0-2.0	ดินไม่เค็ม
ต่ำ(L)	2.0-4.0	ดินเค็มเล็กน้อย
ปานกลาง(M)	4.0-8.0	ดินเค็มปานกลาง
สูง(H)	8.0-12.0	ดินเค็มสูง
สูงมาก(VH)	12.0-16.0	ดินเค็มสูงมาก

ที่มา: กรมพัฒนาที่ดิน (2548)

ตารางผนวกที่ 3 อินทรีย์วัตถุ (%)

ระดับ (rating)	พิสัย (%)
ต่ำมาก(VL)	<0.5
ต่ำ(L)	0.5-1.0
ค่อนข้างต่ำ(ML)	1.0-1.5
ปานกลาง(M)	1.5-2.5
ค่อนข้างสูง(MH)	2.5-3.5
สูง(H)	3.5-4.5
สูงมาก(VH)	>4.5

ที่มา: กรมพัฒนาที่ดิน (2548)

ตารางผนวกที่ 4 ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด (%)

ระดับ (rating)	พิสัย (%)
ต่ำมาก(VL)	<0.1
ต่ำ(L)	0.1-0.2
ปานกลาง(M)	0.2-0.5
สูง(H)	0.5-0.75
สูงมาก(VH)	>0.75

ที่มา: กรมพัฒนาที่ดิน (2548)

ตารางผนวกที่ 5 ปริมาณฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์(Available P) (Bray II)

ระดับ (rating)	ฟอสฟอรัส (mg/kg)
ต่ำมาก(VL)	<3
ต่ำ(L)	3-5
ค่อนข้างต่ำ(ML)	6-10
ปานกลาง(M)	11-15
ค่อนข้างสูง(MH)	16-25
สูง(H)	26-45
สูงมาก(VH)	>45

ที่มา: กรมพัฒนาที่ดิน (2548)

ตารางผนวกที่ 6 ปริมาณโพแทสเซียมที่เป็นประโยชน์(Available K)(NH₄OAc)

ระดับ (rating)	พืช (mg/kg)
ต่ำมาก(VL)	<30
ต่ำ(L)	30-60
ปานกลาง(M)	60-90
สูง(H)	91-120
สูงมาก(VH)	>120

ที่มา: กรมพัฒนาที่ดิน (2548)

ประวัติการศึกษาและการทำงาน

ชื่อ-นามสกุล	นางสาวพิมพ์ภัค หีบเงิน
วัน เดือน ปี ที่เกิด	18 สิงหาคม 2526
สถานที่เกิด	โรงพยาบาลศิริราช กรุงเทพมหานคร
ประวัติการศึกษา	วท.บ. (เกษตรศาสตร์) มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ปี 2548
ทุนการศึกษาที่ได้รับ	ทุนสนับสนุนคุณภาพงานวิจัยระดับบัณฑิตศึกษา ประจำปี 2550 บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์