การขยายกลุ่มจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายสารคลอร์ไพรีฟอส จากดินในไร่พริกที่ปนเปื้อน

Enrichment of Chlorpyrifos-degrading Mixed Cultures from Contaminated Chilli Farm Soil

กาญจนา พานแก้ว[1] วัฒน์สิทธิ์ ศิริวงศ์[2] ศรีเลิศ โชติพันธรัตน์[3] สุมนา สิริพัฒนากุล[*1]
[1]คณะวิศวกรรมศาสตร์ และ ศูนย์ความเป็นเลิศแห่งชาติด้านการจัดการสิ่งแวดล้อมและของเสียอันตราย มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี อ.วารินชำราบ จ.อุบลราชธานี 34190
[2] วิทยาลัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข และ Thai Fogarty ITREOH Center จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปทุมวัน กรุงเทพฯ 10300
[3] คณะวิทยาศาสตร์ และ ศูนย์ความเป็นเลิศแห่งชาติด้านการจัดการสิ่งแวดล้อมและของเสียอันตราย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปทุมวัน กรุงเทพฯ 10300

Kanjana Pankaew[1] Wattasit Siriwong[2] Srilert Chotpantarat[3] Sumana Siripattanakul[*1]
[1]Faculty of Engineering and National Center of Excellence for Environmental and Hazardous Waste Management (NCE-EHWM), Ubon Ratchathani University, Warinchamrap, Ubonratchathani 34190
[2] College of Public Health Science and Thai Fogarty ITREOH Center, Chulalongkorn University, Pathumwan, Bangkok 10330
[3]Faculty of Science and NCE-EHWM, Chulalongkorn University, Pathumwan, Bangkok 10330
Tel : 045-353300 ext 3359 E-mail: ensumasi@ubu.ac.th, jeans_sumana@yahoo.com

บทคัดย่อ

การวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์หลักเพื่อคัดแยกและศึกษาความสามารถของกลุ่มจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายสารคลอร์ไพรีฟอสในดินที่ปนเปื้อนจากไร่พริก การศึกษาเป็นการทดลองในระดับห้องปฏิบัติการ จากผลการคัดแยกพบว่ากลุ่มจุลินทรีย์เป็นกลุ่มเฮเทอโรโทรปสามารถเจริญได้ในสภาวะที่มีอากาศที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และพีเอชประมาณ 7 ส่วนผลการศึกษาการเจริญเติบโตและการย่อยสลายสารของกลุ่มจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้พบว่าจุลินทรีย์มีการเจริญเติบโตในระยะเพิ่มจำนวนเป็นเวลาประมาณ 2 วัน จากนั้นเข้าสู่ระยะคงตัว โดยมีอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของกลุ่มจุลินทรีย์ที่ย่อยสลายสารคลอร์ไพรีฟอส เท่ากับ 1.44 ต่อวัน ซึ่งสารคลอร์ไพรีฟอสลดลงร้อยละ 93 จากการทดลองที่ความเข้มข้นของสารเริ่มต้น 60 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยจลนพลศาสตร์ของการย่อยสลายสารคลอร์ไพรีฟอสเป็นปฏิกิริยาอันดับที่หนึ่ง มีค่าคงที่ของอัตราการเกิดปฏิกิริยาเท่ากับ 0.93 ต่อวัน ผลจากการศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นว่า กลุ่มจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้มีศักยภาพในการประยุกต์ใช้เพื่อลดการปนเปื้อนสารคลอร์ไพรีฟอสในพื้นที่จริงได้ต่อไป

คำหลัก สารคลอร์ไพรีฟอส การย่อยสลายทางชีวภาพ กลุ่มจุลินทรีย์ การขยายเชื้อ

Abstract

The main objective of this research was to preliminarily screen chlorpyrifos-degrading mixed cultures from contaminated chilli farm soil and study their degradation ability. The study was in laboratory scale. The cultures were then determined the growth and degradation ability. The result showed that the mixed cultures were heterotrophic microorganisms which well grew in aerobic condition at temperature

of 30^{0}C and pH of 7.0. For the experiment on microbial growth and pesticide degradation, the results showed that the cultures was in log phase for 2 days and then moved on to stationary phase. Specific growth rate of chlorpyrifos-degrading mixed cultures was 1.44 per day while chlorpyrifos of 93% was removed (initial pesticide concentration of 60 mg/l). The chlorpyrifos degradation kinetics followed the first order kinetic reaction with the rate of 0.93 per day. The results showed that the screened mixed cultures have a potential to remediate chlorpyrifos-contaminated sites.

Keywords: Chlorpyrifos, biodegradation, mixed culture, cultures enrichment

1. บทนำ

เป็นที่รู้กันทั่วไปว่างานเกษตรกรรมมีการใช้สารกำจัดแมลงหลายชนิดในปริมาณมากเพื่อลดการทำลายของแมลงศัตรูพืชหรือการระบาดของโรคพืชได้ ส่งผลให้สินค้าทางการเกษตรเพิ่มมากขึ้น แต่ก็ส่งผลกระทบตามมาในเรื่องของสารกำจัดศัตรูพืชที่ตกค้างในสิ่งแวดล้อม โดยกองวัตถุมีพิษการเกษตร กรมวิชาการเกษตรได้ศึกษาถึงปริมาณสารกำจัดศัตรูพืชตกค้างอยู่ในดินตามภาคต่างๆ ของประเทศไทย พบว่ามีสารกำจัดศัตรูพืชตกค้างอยู่ในดินตามภาคต่าง ๆ ในปริมาณตั้งแต่ 0.02 - 2.0 ส่วนในล้านส่วน (ppm) [21] ซึ่งปัจจุบันแนวโน้มการใช้สารกำจัดศัตรูพืชมีมากขึ้นทุกปีจึงนำไปสู่การตกค้างของสารกำจัดศัตรูพืชในสิ่งแวดล้อมที่มากขึ้นในอนาคต

พริกถือเป็นพืชเศรษฐกิจชนิดหนึ่งที่ใช้สารเคมีจำนวนมากและหลายชนิดเริ่มจากกระบวนการเพาะเมล็ดพันธุ์จนถึงกระบวนการเก็บเกี่ยวพบว่าล้วนจำเป็นต้องใช้สารเคมี เนื่องจากศัตรูพืชที่มารบกวนพริกมีหลายชนิด สารกำจัดศัตรูพืชชนิดหนึ่งที่ใช้กันมากในการปลูกพริกคือสารคลอร์ไพรีฟอส (chlorpyrifos)

สารคลอร์ไพรีฟอส (O,O-diethyl O-3,5,6-trichloro-2-pyridyl phosphorothioate) ซึ่งมีสูตรโครงสร้าง คือ $C_9H_{11}Cl_3NO_3PS$ จัดเป็นสารกำจัดแมลงกลุ่มออร์แกนโนฟอสฟอรัส สารคลอร์ไพรีฟอสมีค่า LD50 (lethal dose 50%) ในหนูเท่ากับ 95-270 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม [19] ในอดีตสารคลอร์ไพรีฟอสถูกนำมาใช้เพื่อกำจัดยุง กำจัดแมลงที่อาศัยอยู่ตามครัวเรือน เช่น ปลวก มด แมลงสาบ ไร และแมลงต่างๆ ที่อยู่ตามสวนและสนามหญ้า เป็นต้น [1] ปัจจุบันนิยมใช้เพื่อประโยชน์ทางการเกษตรโดยสารคลอร์ไพรีฟอสมีประสิทธิภาพในการกำจัดแมลงศัตรูพืช อาทิเช่น ข้าว ข้าวโพด อ้อย ถั่ว ฝ้าย รวมทั้งพืชผัก และผลไม้หลายชนิด เป็นต้น [2-3] ซึ่งสารคลอร์ไพรีฟอสสามารถอยู่คงทนได้ในสิ่งแวดล้อมได้มากกว่า 1 ปี ขึ้นอยู่กับชนิดของดิน สภาพภูมิอากาศและสภาวะอื่นๆ [1, 4] ประกอบกับสารกลุ่มออร์แกนโนฟอสฟอรัสมีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์โคลีนเอสเทอเรสและส่งผลต่อระบบประสาทที่บริเวณต่างๆ เช่น ปมประสาทอัตโนมัติ (sympathetic and parasympathetic ganglions) รอยต่อระหว่างประสาทและกล้ามเนื้อ (neuromuscular junction) และ ในสมองและไขสันหลัง (central nervous system) ทำให้เกิดการสั่น ชักกระตุกและในที่สุดก็ตาย [5] ดังนั้นจึงมีความจำเป็นต้องหาแนวทางในการจัดการการปนเปื้อนของสารคลอร์ไพรีฟอส

จากข้อมูลการวิจัยที่ผ่านมาพบว่ามีวิธีที่สามารถลดการตกค้างของสารในกลุ่มออแกโฟอสฟอรัสหลายวิธี เช่น วิธีการดูดซับ (adsorption) [6] กระบวนการโฟโตไลซิส (photolysis) [7-8] การชะล้าง (leaching) [9] และการย่อยสลายทางชีววิทยาด้วยจุลินทรีย์ (microbial biodegradation) [10] กระบวนการย่อยสลายทางชีววิทยาถือเป็นทางเลือกที่ดี เนื่องจากเป็นวิธีการที่มีประสิทธิภาพในการกำจัดสารอินทรีย์พิษสูง รวมทั้งเป็นวิธีการที่ไม่ใช้สารเคมีในการลดการปนเปื้อนทำให้มีค่าใช้จ่ายในการกำจัดสารพิษน้อย [11] แต่ในปัจจุบันเชื้อจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการย่อยสลายสารคลอไพรีฟอสได้มีการคัดแยกและใช้เฉพาะในต่างประเทศ [12-16] ซึ่งจุลินทรีย์ดังกล่าวอาจไม่เหมาะสมในการประยุกต์ใช้ในประเทศไทยซึ่งมีสภาพแวดล้อมและสภาพภูมิอากาศแตกต่างกัน

จากเหตุผลข้างต้น งานวิจัยนี้จึงมุ่นเน้นศึกษาการคัดแยกกลุ่มจุลินทรีย์ (mixed cultures) ที่ย่อยสลายสารคลอร์ไพรีฟอส โดยศึกษาครอบคลุมถึงการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ดังกล่าวและความสามารถของกลุ่มจุลินทรีย์ในการย่อยสลายสารคลอร์ไพรีฟอส นอกจากนี้งานวิจัยนี้ยังได้หาค่าจลนพลศาสตร์ของการเจริญเติบโตของกลุ่ม

จุลินทรีย์และการย่อยสลายสารคลอร์ไพรีฟอส รวมทั้งศึกษาลักษณะทางกายภาพของจุลินทรีย์ในกลุ่มจุลินทรีย์ดังกล่าวด้วย

2. วิธีการวิจัย

2.1 การเก็บและเตรียมตัวอย่างดิน

ตัวอย่างดินที่ใช้ในการทดลอง เก็บจากบริเวณแปลงปลูกพริกที่ระดับความลึก 0-20 เซนติเมตร จากผิวหน้าดินในพื้นที่ตำบลหัวเรือ อำเภอเมือง จังหวัดอุบลราชธานี ซึ่งเป็นพื้นที่ที่มีการปลูกพริกและมีประวัติการใช้สารกำจัดแมลงกลุ่มออร์แกนโนฟอสฟอรัสเป็นเวลานานกว่า 50 ปี

สำหรับการเตรียมตัวอย่างดิน เริ่มต้นจากการชั่งดินที่ผ่านการคัดแยกหินและเศษใบไม้แล้ว จำนวน 500 กรัม จากนั้นร่อนดินผ่านตะแกรง (รูพรุน 0.5 มิลลิเมตร) แล้วจึงเก็บตัวอย่างดินโดยแช่เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จนกระทั่งก่อนนำมาศึกษาการคัดแยกเชื้อจึงได้ตรวจวัดค่าสารคลอร์ไพรีฟอสตกค้างในดิน ซึ่งพบว่ามีปริมาณสารคลอร์ไพรีฟอสน้อยกว่า 0.01 มิลลิกรัมต่อลิตร (ความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถวัดค่าได้ (Limit of Detection; LOD)) ทั้งนี้อาจเนื่องจากเกิดการย่อยสลายด้วยกระบวนการโฟโตไลซิสในระหว่างการเก็บรักษาและเตรียมตัวอย่างดิน

2.2 การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการคัดแยก

อาหารเลี้ยงเชื้อเอ็มเอสเอ็มชนิดเหลว (Minimal Salt Medium; MSM) เป็นอาหารที่ใช้ในการคัดแยกและปรับสภาพเพื่อให้ได้กลุ่มจุลินทรีย์ที่มีความคงตัว (stable mixed cultures) สูตรอาหารประกอบด้วย $NaHPO_4$ 5.8 กรัม KH_2PO_4 3.0 กรัม NaCl 0.5 กรัม NH_4Cl 1 กรัม และ $MgSO_4$ 0.25 กรัม ซึ่งละลายในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (phosphate buffer) ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ [16] อาหารเลี้ยงเชื้อเอ็มเอสเอ็มที่ใช้ต้องผ่านการฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งฆ่าเชื้อความดันไอที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 30 นาที รอให้เย็นจึงเติมสารคลอร์ไพรีฟอสที่ผ่านการฆ่าเชื้อโดยการกรองผ่านเมมเบรน ขนาดรูพรุน 0.20 ไมโครเมตร ส่วนอาหารเลี้ยงเชื้อเอ็มเอสเอ็มชนิดแข็งมีส่วนประกอบเช่นเดียวกับอาหารเลี้ยงเชื้อเอ็มเอสเอ็มชนิดเหลว แต่มีผงวุ้น (bacto agar) เป็นส่วนผสมร้อยละ 2

2.3 การคัดแยกกลุ่มจุลินทรีย์ที่ย่อยสลายสารกำจัดแมลงคลอร์ไพรีฟอสในเบื้องต้น

การคัดแยกกลุ่มจุลินทรีย์ที่ย่อยสลายสารกำจัดแมลงคลอร์ไพรีฟอสจากตัวอย่างดิน เป็นการคัดแยกโดยเทคนิคการขยายเชื้อ (culture enrichment technique) โดยใช้ตัวอย่างดินที่ปนเปื้อนสารกำจัดแมลงจากแปลงเพาะปลูกพริก จำนวน 20 กรัม เติมลงในขวดรูปชมพู่ที่บรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อเอ็มเอสเอ็มชนิดเหลวมีส่วนประกอบของคลอร์ไพรีฟอส เข้มข้น 60 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งเป็นระดับความเข้มข้นที่อาจตกค้างในสิ่งแวดล้อมโดยคิดจากความเข้มข้นที่เกษตรกรใช้ตามคำแนะนำข้างกล่องการใช้สารกำจัดศัตรูพืชคลอร์ไพรีฟอส (เกรดการค้า) ที่กำหนดไว้ที่ประมาณ 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร และเป็นระดับความเข้มข้นที่มีผู้ศึกษามาแล้วดังอ้างอิงที่ [16] ใช้ปริมาตร 100 มิลลิลิตร หุ้มชุดทดลองด้วยอลูมิเนียมฟอล์ย เพื่อป้องกันการย่อยสลายเนื่องจากแสง จากนั้นนำมาเพาะเลี้ยงในสภาวะควบคุมที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ซึ่งเป็นอุณหภูมิโดยประมาณในบรรยากาศของไทย โดยใช้ตู้บ่มแบบเขย่า (shaking incubator) ที่ความเร็ว 100 รอบต่อนาที เป็นเวลา 14 วัน ซึ่งเป็นระยะเวลาเดียวกับที่ใช้ในการขยายเชื้อจุลินทรีย์ (enrichment) ใน 1 รอบ แล้วจึงถ่ายเชื้อ (subculture) โดยใช้ปิเปตดูดตัวอย่างจากชุดทดลองมา 5 มิลลิลิตร เติมลงในขวดรูปชมพู่ที่บรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อเอ็มเอสเอ็มที่มีส่วนประกอบของสารคลอร์ไพรีฟอสเข้มข้น 60 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาตร 100 มิลลิลิตร (ชุดใหม่) นำมาเพาะเลี้ยงในที่สภาวะเดิม เป็นเวลา 14 วันและถ่ายเชื้อที่สภาวะเดิมซ้ำ 5 ครั้ง [16] จนกว่าจะได้สารละลายที่มีลักษณะใส (soil free solution) ซึ่งคาดว่ามีกลุ่มจุลินทรีย์ที่สามารถทนต่อสภาพที่มีสารกำจัดแมลงคลอร์ไพรีฟอสได้และมีความคงตัว (stable mixed culture)

2.4 การศึกษาลักษณะเบื้องต้นของกลุ่มจุลินทรีย์ที่ย่อยสลายสารคลอร์ไพรีฟอส

การศึกษาลักษณะเบื้องต้นของกลุ่มจุลินทรีย์ที่ย่อยสลายสารคลอร์ไพรีฟอสโดยสังเกตความแตกต่างของขนาดโคโลนีของจุลินทรีย์บนอาหารเลี้ยงชื้อชนิดแข็งและนำโคโลนีที่มีลักษณะที่แตกต่างกันมาศึกษาลักษณะทางกายภาพด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบแสง (optical microscope) เพื่อระบุรูปร่างของเซลล์และการติดสีแกรม

2.5 การศึกษาการเจริญเติบโตของกลุ่มจุลินทรีย์ที่ย่อยสลายสารคลอร์ไพรีฟอส

การศึกษาการเจริญเติบโตของกลุ่มจุลินทร์ที่คัดแยกได้ โดยเติมเชื้อจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้จากข้อ 2.2 ใช้อัตราส่วนร้อยละ 5 โดยปริมาตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเอ็มเอสเอ็มชนิดเหลว ที่มีส่วนผสมของสารคลอร์ไพรีฟอสเข้มข้น 60 มิลลิกรัมต่อลิตร นำมาเพาะเลี้ยงในตู้บ่มเขย่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ที่ความเร็ว 100 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 14 วัน เก็บตัวอย่างจากชุดทดลองเป็นเวลาต่อเนื่องทุกๆ 2 วัน เพื่อนำตัวอย่างมาเพาะเลี้ยงเชื้อด้วยวิธีการเกลี่ยเชื้อ (spread plate technique) บนอาหารเลี้ยงเชื้อสำเร็จรูปเอ็นเอ (Nutrient Agar; NA) ที่ผสมสารคลอร์ไพรีฟอส โดยอาหารเลี้ยงเชื้อเอ็นเอนี้มีส่วนผสม (ต่อสารละลาย 1 ลิตร) ได้แก่ peptic digest of animal tissue 5 กรัม beef extract 1.5 กรัม yeast extract 1.5 กรัม sodium chloride 5 กรัม และ agar 15 กรัม ซึ่งอาหารเลี้ยงเชื้อเอ็นเอฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งฆ่าเชื้อความดันไอ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 30 นาที ส่วนสารคลอร์ไพรีฟอสฆ่าเชื้อโดยการกรองผ่านเมมเบรน ขนาดรูพรุน 0.20 ไมโครเมตร โดยในอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งมีความเข้มข้นของสารคลอร์ไพรีฟอส 60 มิลลิกรัมต่อลิตร

สำหรับเหตุผลที่ในการศึกษาการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์นี้เลี้ยงด้วยอาหารเอ็นเอผสมสารคลอร์ไพรีฟอสดังที่กล่าวไว้ข้างต้น เนื่องจากอาหารเอ็นเอมีส่วนประกอบของสารอาหารครบถ้วนทำให้จุลินทรีย์เจริญเติบโตได้ดีและมีโคโลนีขนาดใหญ่ส่งผลให้สามารถตรวจนับจำนวนได้ง่ายและลดความผิดพลาดในการนับจำนวน

2.6 การศึกษาการย่อยสลายทางชีวภาพของสารคลอร์ไพรีฟอสด้วยกลุ่มจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้

การศึกษาการย่อยสลายสารคลอร์ไพรีฟอสด้วยกลุ่มจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้ โดยเติมเชื้อจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้จากข้อ 2.2 ใช้อัตราส่วนร้อยละ 5 โดยปริมาตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเอ็มเอสเอ็มชนิดเหลว ที่มีสารคลอร์ไพรีฟอสเข้มข้น 60 มิลลิกรัมต่อลิตร [16] ควบคุมสภาวะเพาะเลี้ยงเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส กวนผสมที่ความเร็ว 100 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 14 วัน การเก็บตัวอย่างจากชุดทดลองกระทำต่อเนื่องทุกๆ 2 วัน เพื่อนำตัวอย่างมาวิเคราะห์ปริมาณสารคลอร์ไพรีฟอสคงเหลือ

2.7 การศึกษาจลนพลศาสตร์ของการเจริญเติบโตและจลนพลศาสตร์การย่อยสลายสารคลอร์ไพรีฟอส

การศึกษาจลนพลศาสตร์ของการเจริญเติบโตของกลุ่มจุลินทรีย์ที่ย่อยสลายสารคลอร์ไพรีฟอสเป็นการศึกษาถึงความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนเซลล์จุลินทรีย์ที่เพิ่มขึ้น เมื่อเวลาผ่านไป และนำข้อมูลการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ในระยะเพิ่มจำนวน (log phase) มาคำนวณค่าอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (specific growth rate; μ) และเวลาที่จุลินทรีย์เพิ่มจำนวนอีกหนึ่งเท่า (doubling time) ดังสมการ (1) และ (2) ตามลำดับ [17]

$$\mu = \frac{\ln[\text{เซลล์สุดท้าย}] - \ln[\text{เซลล์เริ่มต้น}]}{(\text{เวลาสุดท้าย} - \text{เวลาเริ่มต้น})} \quad (1)$$

$$t = \ln 2 / \mu \quad (2)$$

สำหรับการศึกษาจลนพลศาสตร์ของการย่อยสลายสารคลอร์ไพรีฟอสเป็นการศึกษาถึงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารกำจัดแมลงคงเหลือกับเวลาในรูปแบบความสัมพันธ์ตามอันดับปฏิกิริยาที่ศูนย์ถึงอันดับปฏิกิริยาที่สอง เพื่อหาอันดับปฏิกิริยาของการย่อยสลายสารดังกล่าว และค่าจลนพลศาสตร์ของการย่อยสลายได้จากสมการเส้นตรงของกราฟนั้น

2.8 วิธีการวิเคราะห์

2.8.1 วิธีการทางชีววิทยา

การศึกษาลักษณะจุลินทรีย์เบื้องต้นและการนับจำนวนจุลินทรีย์ใช้เทคนิคการเกลี่ยเชื้อบนอาหารเอ็นเอซึ่งเป็นอาหารแข็ง จากนั้นสังเกตลักษณะโคโลนีของกลุ่มจุลินทรีย์ ส่วนการนับจำนวนได้เพาะบ่มจุลินทรีย์ในจานเพาะเชื้อในตู้ควบคุมอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ซึ่งมีหน่วยในการนับเป็นซีเอฟยูต่อมิลลิลิตร (CFU (Colonies Forming Unit) /milliliter)

การศึกษาลักษณะทางกายภาพของเซลล์ได้ศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบแสง โดยสังเกตรูปร่างของเซลล์และการติดสีแกรม สำหรับวิธีการใช้กล้องจุลทรรศน์และการย้อมสีแกรมเป็นไปตามหลักการวิเคราะห์ทางชีววิทยาทั่วไป [20]

2.8.2 วิธีการทางเคมี

วิธีการทางเคมี คือ วิเคราะห์สารคลอร์ไพรีฟอสคงเหลือ โดยการเก็บรักษาตัวอย่างใช้อุปกรณ์ทึบแสงและรักษาสภาพตัวอย่างโดยวิธีแช่แข็ง (-20 องศาเซลเซียส) จนกระทั่งวิเคราะห์

สำหรับการเตรียมตัวอย่างก่อนวิเคราะห์ เริ่มต้นจากการสกัดโดยใช้น้ำตัวอย่างปริมาตร 500 มิลลิลิตร เติมผงโซเดียมคลอไรด์ 20 กรัม ลงในตัวอย่างข้างต้น แล้วทำการสกัดตัวอย่างซ้ำ 3 ครั้ง ในกรวยแยกขนาด 500 มิลลิลิตร ด้วยตัวทำละลายไดคลอโรเมทเทน (dichloromethane) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร 1 ครั้ง และปริมาตร 50 มิลลิลิตร 2 ครั้ง นำตัวอย่างที่ผ่านการสกัดมา กรองผ่านสารโซเดียมซัลเฟตแอนไฮดรัส (Na_2SO_4) ลงในขวดก้นกลม ขนาด 250 มิลลิลิตร ระเหยตัวอย่างด้วยเครื่องกลั่นระเหยแห้ง (evaporator) (DTC-21, EYELA, Japan) ที่อุณหภูมิไม่เกิน 42 องศาเซลเซียส จนกระทั่งตัวอย่างแห้ง สุดท้ายปรับปริมาตรด้วยสารละลายเอทธิลอะซิเตท (ethyl acetate) ให้มีปริมาตรเป็น 5 มิลลิลิตร

สำหรับการวิเคราะห์ปริมาณสารคลอร์ไพรีฟอสใช้เครื่องวิเคราะห์แก๊สโครมาโทกราฟ - เฟรมโฟโตเมตริก (Gas Chromatography - Frame Photometric Detector ; GC-FPD) (6890N, Agilent Technologies, USA) คอลัมน์ที่ใช้ชนิด DB-1701 ขนาด 30 เมตร × 0.25 มิลลิเมตร และความหนาแผ่นฟิล์ม(film thickness) 0.25 ไมโครเมตร มีสภาวะที่ใช้ในการวิเคราะห์ดังนี้ ใช้ระบบฉีดตัวอย่างแบบสปลิทเลส (splitless mode) ตั้งค่าอุณหภูมิในระบบฉีดตัวอย่าง (injector temperature) ที่ 200 องศาเซลเซียส ปริมาตรตัวอย่างที่ฉีดแต่ละครั้ง (injection volume) 2.0 ไมโครลิตร โดยใช้แก๊สฮีเลียมเป็นแก๊สนำพา (carrier gas) และปรับอัตราการไหลที่ 1.5 มิลลิลิตรต่อนาที ตั้งค่าอุณหภูมิอบ (oven temperature) เริ่มต้นที่ 80 องศาเซลเซียส แล้วปรับอัตราการเพิ่มขึ้นของอุณหภูมิตามโปรแกรมอุณหภูมิดังนี้ 1) ปรับเพิ่มอุณหภูมิจาก 80 เป็น 195 องศาเซลเซียส ใช้อัตราการเพิ่ม 12 องศาเซลเซียสต่อนาที 2) ปรับเพิ่มอุณหภูมิจาก 195 เป็น 210 องศาเซลเซียส ใช้อัตราการเพิ่ม 2 องศาเซลเซียสต่อนาที และคงที่ไว้ 7 นาที 3) ปรับเพิ่มอุณหภูมิจาก 210 เป็น 225 องศาเซลเซียส ใช้อัตราการเพิ่ม 15 องศาเซลเซียสต่อนาที และคงที่ไว้ 10 นาที 4) ปรับเพิ่มอุณหภูมิจาก 225 เป็น 275 องศาเซลเซียส ใช้อัตราการเพิ่ม 35 องศาเซลเซียสต่อนาที และคงที่ไว้ 7 นาที ตามลำดับ

3. ผลการทดลองและวิจารณ์ผล

3.1 ผลการคัดแยกกลุ่มจุลินทรีย์ที่ย่อยสลายสารคลอร์ไพรีฟอส

การคัดแยกกลุ่มจุลินทรีย์ (mixed cultures) จากดินในขั้นตอนนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อคัดแยกกลุ่มจุลินทรีย์ที่ย่อยสลายสารคลอร์ไพรีฟอสได้ ทำการคัดแยกโดยถ่ายเชื้อ รวม 5 ครั้ง (ถ่ายเชื้อ 1 ครั้ง ใช้เวลาในการปรับสภาพ 2 สัปดาห์)

สภาวะที่ใช้ในการคัดแยกกลุ่มจุลินทรีย์ คือ ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พีเอช 7 ในสภาวะที่มีออกซิเจน ดังนั้นกลุ่มจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้จัดเป็นจุลินทรีย์จำพวกกลุ่มเฮเทอโรโทรป (heterotroph) เจริญเติบโตที่อุณหภูมิ 30องศาเซลเซียส ที่พีเอชประมาณ 7 ในสภาวะที่มีออกซิเจน

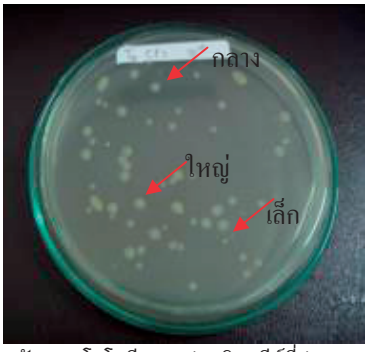
3.2 ผลการศึกษาลักษณะเบื้องต้นของกลุ่มจุลินทรีย์ที่ย่อยสลายสารคลอร์ไพรีฟอส

ผลการศึกษาลักษณะเบื้องต้นของกลุ่มจุลินทรีย์ที่ย่อยสลายสารคลอร์ไพรีฟอส พบว่าเมื่อนำจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้มาเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งลักษณะโคโลนีที่เจริญมีขนาดแตกต่างกันแบ่งได้เป็น 3 ขนาด ดังแสดงในรูปที่ 1 เมื่อสังเกตลักษณะทางกายภาพของโคโลนีพบว่าโคโลนีขนาดเล็กและโคโลนีขนาดกลางมีผิวหน้ามัน ขอบเรียบ แต่โคโลนีขนาดใหญ่มีผิวหน้ามัน ขอบหยัก เมื่อนำโคโลนีทั้ง 3 ขนาดมาศึกษาลักษณะทางกายภาพของจุลินทรีย์ด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบแสงพบว่า โคโลนีทั้ง 3 ขนาด ประกอบด้วยจุลินทรีย์ที่มีรูปร่างเซลล์ 2 แบบ คือ ท่อนสั้น (rod) และวงกลม (cocci) ผลการศึกษาการติดสีแกรมของโคโลนีทั้ง 3 ขนาด พบว่า เซลล์รูปร่างท่อนสั้นติดสีทั้งชนิดแกรมบวกและแกรมลบ ขณะที่เซลล์รูปร่างวงกลมย้อมติดสีแกรมบวก สามารถสรุปผลได้ดังตารางที่ 1 และผลการศึกษาการย้อมสีแกรมแสดงในรูปที่ 2 โดยรูปที่ 2 ข) มีขนาดเซลล์ใหญ่กว่า รูปที่ 2 ก) และรูปที่ 2 ค) และรูปร่างเซลล์ส่วนใหญ่ของโคโลนีขนาดกลางและขนาดใหญ่จะเป็นแบบท่อนสั้น มีเซลล์รูปร่าง

กลมเพียงเล็กน้อยเช่นเดียวกับ รูปที่ 2 ค) แต่รูปที่ 2 ก) รูปร่างเซลล์ส่วนใหญ่จะเป็นแบบวงกลม

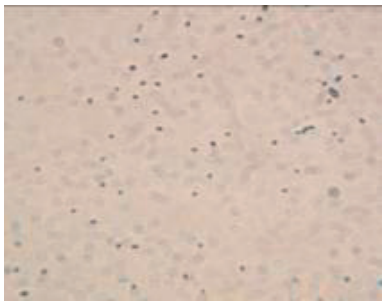
ตารางที่ 1 ลักษณะทางกายภาพของจุลินทรีย์ที่ย่อยสลายสารคลอร์ไพรีฟอส

ลำดับ	ลักษณะทางกายภาพของโคโลนี		ลักษณะเซลล์จุลินทรีย์	
	ขนาด	ลักษณะ	รูปร่าง	การติดสีแกรม
1	เล็ก	ผิวหน้ามัน ขอบเรียบ	แท่งสั้น	แกรมบวกและลบ
			กลม	แกรมบวก
2	กลาง	ผิวหน้ามัน ขอบเรียบ	แท่งสั้น	แกรมบวกและลบ
			กลม	แกรมบวกและลบ
3	ใหญ่	ผิวหน้ามัน ขอบหยัก	แท่งสั้น	แกรมบวกและลบ
			กลม	แกรมบวก

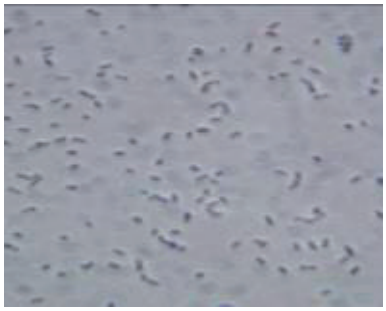


รูปที่ 1 ลักษณะโคโลนีของกลุ่มจุลินทรีย์ที่ย่อยสลายสารคลอร์ไพรีฟอส

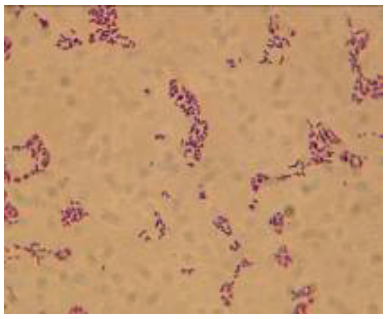
ดังนั้นจึงเป็นไปได้ว่าทั้งกลุ่มจุลินทรีย์ที่ย่อยสลายสารคลอร์ไพรีฟอสจะประกอบด้วยจุลินทรีย์หลายสายพันธุ์รวมตัวกันอยู่ ซึ่งคาดว่าโคโลนีที่มีขนาดแตกต่างกันอาจเกิดจากชนิดจุลินทรีย์ที่แตกต่างกันได้ ซึ่งงานวิจัยที่เกี่ยวข้องในอดีตก็ให้ผลการศึกษาเช่นเดียวกัน [16, 18] กล่าวคือมีจุลินทรีย์หลายสายพันธุ์ที่สามารถย่อยสลายสารคลอร์ไพรีฟอสได้ ดังเช่น Li *et al.* ได้คัดแยกจุลินทรีย์ที่ย่อยสลายสารคลอร์ไพรีฟอส ซึ่งมีรูปร่างเซลล์แบบเป็นท่อนสั้น (rod shape) ย้อมติดสีแกรมลบ และเจริญเติบโตในสภาวะที่มีออกซิเจน และสามารถจำแนกได้ว่าเป็นจุลินทรีย์สายพันธุ์ *Sphingomonas* sp. Dsp-2 [18] ส่วน Anwar *et al.* พบว่าแบคทีเรียแกรมบวก *Bacillus pumilus* C2A1 ก็สามารถย่อยสลายสารคลอร์ไพรีฟอสได้เช่นกัน [16]



ก)



ข)



ค)

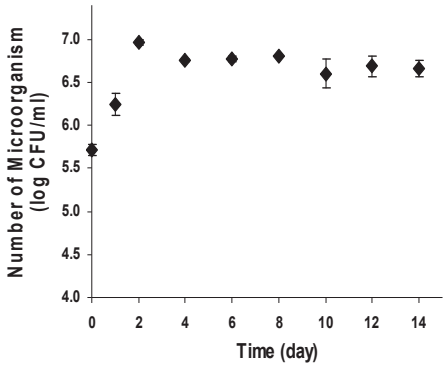
รูปที่ 2 ลักษณะรูปร่างเซลล์และการติดสีแกรมของจุลินทรีย์ที่ย่อยสลายสารคลอร์ไพรีฟอส
ก) ลักษณะเซลล์ของโคโลนีขนาดเล็ก
ข) ลักษณะเซลล์ของโคโลนีขนาดกลาง
ค) ลักษณะเซลล์ของโคโลนีขนาดใหญ่

จากการศึกษาลักษณะเซลล์ของกลุ่มจุลินทรีย์ที่ย่อยสลายสารคลอร์ไพรีฟอส พบว่าจุลินทรีย์ดังกล่าวมีความหลากหลายทางชีวภาพ (biodiversity) สูง ซึ่งบ่งชี้ได้ว่ามีจุลินทรีย์หลายชนิดสามารถทนและย่อยสลายสารคลอร์ไพรีฟอสได้ อย่างที่รู้กันทั่วไปว่ากลุ่มจุลินทรีย์สามารถทำงานได้ดีกว่าจุลินทรีย์สายพันธุ์เดียวในสภาพธรรมชาติ [11] โดยยิ่งมีความหลากหลายมากยิ่งทำให้มีเสถียรภาพสูงตามมา

3.3 ผลการศึกษาการเจริญเติบโตของกลุ่มจุลินทรีย์ที่ย่อยสลายสารคลอร์ไพรีฟอส

ผลการศึกษาการเจริญเติบโตของกลุ่มจุลินทรีย์ที่ย่อยสลายสารคลอร์ไพรีฟอส พบว่ากราฟการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์มีลักษณะ ดังรูปที่ 3 กล่าวคือ ในระหว่างการทดลอง 14 วัน กลุ่มจุลินทรีย์มีการเจริญเติบโตเป็น 2 ระยะ คือ ระยะเพิ่มจำนวน (log phase) และระยะคงตัว (stationary phase) เกิดขึ้นในช่วงเวลาที่ 0-2 วัน และตั้งแต่ 4 วันเป็นต้นไป ตามลำดับ

จากภาพแสดงการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์จะพบว่าไม่ปรากฏระยะเตรียมการ (lag phase) เนื่องจากในขั้นตอนการคัดแยกจุลินทรีย์และในขั้นตอนการศึกษาการเจริญเติบโตใช้อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเดียวกัน กล่าวคือ ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อเอ็มเอสเอ็มที่ผสมสารคลอร์ไพรีฟอส ซึ่งจากโครงสร้างของสารคลอร์ไพรีฟอสซึ่งมีคาร์บอนเป็นองค์ประกอบและจากสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อซึ่งไม่มีสารอินทรีย์คาร์บอนใด ๆ ดังนั้นสามารถกล่าวได้ว่ากลุ่มจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้ใช้สารคลอร์ไพรีฟอสเป็นแหล่งคาร์บอน [16]

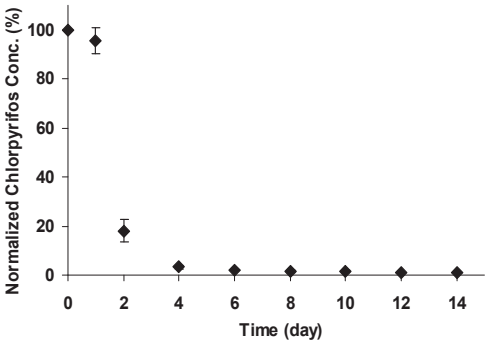


รูปที่ 3 กราฟการเจริญเติบโตของกลุ่มจุลินทรีย์ที่ย่อยสลายสารคลอร์ไพรีฟอส

ผลการศึกษาการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายสารคลอร์ไพรีฟอสทำให้ทราบถึงช่วงการเจริญเติบโตที่เหมาะสำหรับนำมาใช้ศึกษาความสามารถในการย่อยสลายสารคลอร์ไพรีฟอส ซึ่งได้แก่ ช่วงต้นของระยะคงตัว (4 วัน) เนื่องจากช่วงนี้จุลินทรีย์มีการเจริญเติบโตคงที่และมีความสามารถในการย่อยสลายสารได้สูง

3.4 ผลการศึกษาการย่อยสลายทางชีวภาพของสารคลอร์ไพรีฟอสด้วยกลุ่มจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้

การศึกษาความสามารถในการย่อยสลายสารคลอร์ไพรีฟอส ใช้จุลินทรีย์ที่มีจำนวนเซลล์เริ่มต้นในชุดทดลอง เท่ากับ 5.3×10^5 ซีเอฟยูต่อมิลลิลิตร ผลการศึกษาพบว่าความเข้มข้นของสารคลอร์ไพรีฟอสลดลงอย่างรวดเร็วในช่วงการทดลอง 2 วันแรก และที่เวลา 4 ถึง 14 วัน ความเข้มข้นของสารคลอร์ไพรีฟอสจะค่อยๆ ลดลงจนเกือบจะคงที่ ดังรูปที่ 4



รูปที่ 4 กราฟการย่อยสลายสารคลอร์ไพรีฟอส

ผลการศึกษาการย่อยสลายสารในระยะเวลา 14 วัน ซึ่งเป็นช่วงที่จุลินทรีย์เข้าสู่ระยะคงตัวในตอนปลาย พบว่าปริมาณสารคลอร์ไพรีฟอสลดลงร้อยละ 93 ซึ่งการลดลงของสารคลอร์ไพรีฟอส ในสภาวะที่ศึกษาซึ่งเป็นสภาวะที่ควบคุม (ทึบแสง) ปลอดเชื้อและสารเจือปนอื่น ๆ ประกอบกับผลการเจริญเติบโตของกลุ่มจุลินทรีย์ที่แสดงในหัวข้อก่อนหน้านี้สามารถกล่าวได้ว่าสารคลอร์ไพรีฟอสลดลงเนื่องจากกระบวนการย่อยสลายทางชีวภาพแบบใช้อากาศ แต่ยังไม่สามารถสรุปวิถีของการย่อยสลาย (degradation pathway) ได้อย่างชัดเจน ทั้งนี้ความเข้มข้นของสารคลอร์ไพรีฟอสลดลงอย่างรวดเร็วในช่วงการทดลอง 2 วันแรก ส่งผลให้จุลินทรีย์เจริญเติบโตอย่างรวดเร็ว กล่าวคือ จุลินทรีย์เจริญเข้าสู่ระยะเพิ่มจำนวน (log phase) สำหรับที่เวลา 4 ถึง 14 วัน สารอาหาร (สารคลอร์ไพรีฟอส) เริ่มหมดไปส่งผลให้จุลินทรีย์เจริญเติบโตเข้าสู่ระยะคงตัว (stationary phase)

นอกจากนี้ในการศึกษานี้ยังได้ทดสอบการย่อยสลายสารคลอร์ไพรีฟอสในชุดควบคุมซึ่งอยู่ในสภาพปลอดเชื้อ (มีเพียงอาหารเลี้ยงเชื้อและสารคลอร์ไพรีฟอส)

เมื่อกำหนดสภาวะของชุดควบคุมเช่นเดียวกับสภาวะของชุดทดสอบ โดยพบว่าสารคลอร์ไพรีฟอสในชุดควบคุมมีค่าการย่อยสลายประมาณ ร้อยละ 18 เมื่อเวลาผ่านไป 14 วัน ดังนั้นสามารถกล่าวได้อย่างชัดเจนว่ากลุ่มจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้สามารถย่อยสารคลอร์ไพรีฟอสได้

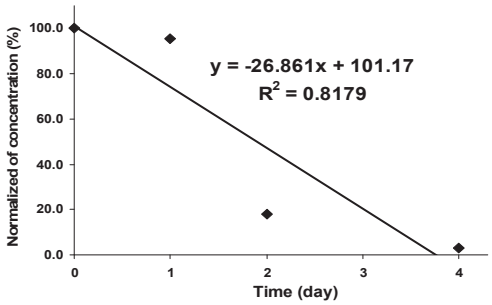
ทั้งนี้การย่อยสลายของสารคลอร์ไพรีฟอสด้วยกระบวนการทางกายภาพและเคมีในสารละลายเกิดจาก 2 กระบวนการหลัก คือ กระบวนการโฟโตไลซิสและกระบวนการไฮโดรไลซิส [22] และงานวิจัยนี้ได้ควบคุมการย่อยสลายโดยกระบวนการโฟโตไลซิสโดยหุ้มชุดทดลองด้วยอลูมิเนียมฟอล์ย ดังนั้นสามารถกล่าวได้ว่าการย่อยสลายของสารในชุดควบคุมเกิดจากกระบวนการไฮโดรไลซิสซึ่งมีลักษณะเช่นเดียวกับงานวิจัยในอดีต ซึ่งพบว่าค่าครึ่งชีวิต (half life) ของสารคลอร์ไพรีฟอสในน้ำปราศจากไอออน (de-ionized water) คือ 49.5 วัน [22]

3.5 ผลการศึกษาจลนพลศาสตร์การเจริญเติบโตและจลนพลศาสตร์ของการย่อยสลายสารคลอร์ไพรีฟอส

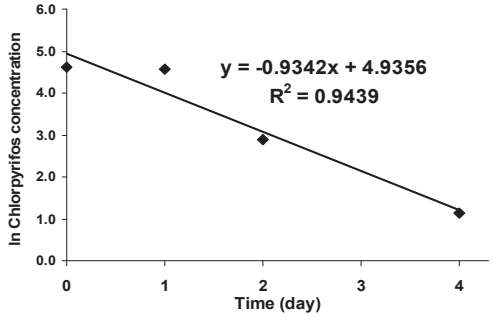
เมื่อนำข้อมูลการศึกษาการเจริญเติบโตของกลุ่มจุลินทรีย์ที่ย่อยสลายสารคลอร์ไพรีฟอสมาสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนเซลล์จุลินทรีย์กับเวลา จะได้กราฟที่มีลักษณะดังรูปที่ 4 กล่าวคือ ระยะเพิ่มจำนวน (log phase) อยู่ที่ช่วงระหว่างวันแรกถึงวันที่ 2 และสามารถอธิบายกราฟในระยะเพิ่มจำนวนได้จากอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ ผลการคำนวณอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของกลุ่มจุลินทรีย์ที่ย่อยสลายสารคลอร์ไพรีฟอส พบว่า มีค่าเท่ากับ 1.44 ต่อวัน และเวลาที่จุลินทรีย์เพิ่มจำนวนอีกหนึ่งเท่า (doubling time) มีค่าเท่ากับ 0.48 วัน

เมื่อนำข้อมูลการศึกษาความสามารถในการย่อยสลายสารคลอร์ไพรีฟอสมาสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารกำจัดแมลงคงเหลือกับเวลาในรูปแบบของอันดับปฏิกิริยาที่ศูนย์ถึงสอง เพื่อหาอันดับปฏิกิริยาของการย่อยสลาย จากการศึกษาพบว่าจลนพลศาสตร์การย่อยสลายสารคลอร์ไพรีฟอสเป็นปฏิกิริยาอันดับที่หนึ่ง มีค่าคงที่ของอัตราการเกิดปฏิกิริยาเท่ากับ 0.9342 ต่อวัน ดังรูปที่ 5

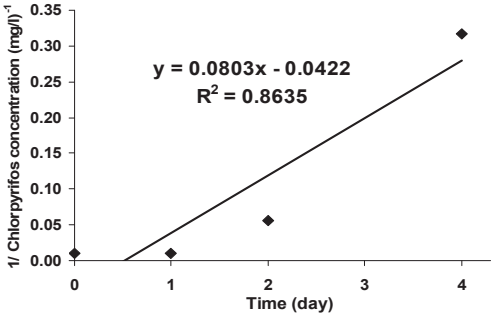
จากค่าอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะและค่าจลนพลศาสตร์การย่อยสลายสารคลอร์ไพรีฟอสที่เกิดขึ้นมีค่าสูง สามารถกล่าวได้ว่าจุลินทรีย์มีการปรับตัวเข้ากับสภาวะแวดล้อมได้ดี สามารถทนสภาวะที่เป็นพิษได้



ก) กราฟความสัมพันธ์ตามปฏิกิริยาอันดับศูนย์



ข) กราฟความสัมพันธ์ตามปฏิกิริยาอันดับหนึ่ง



ค) กราฟความสัมพันธ์ตามปฏิกิริยาอันดับสอง

รูปที่ 5 จลนพลศาสตร์การย่อยสลายสารคลอร์ไพรีฟอส

5. สรุป

กลุ่มจุลินทรีย์ที่คัดแยกจากดินสามารถทนต่อสภาพที่มีสารคลอร์ไพรีฟอสและย่อยสลายสารคลอร์ไพรีฟอสได้ โดยกลุ่มจุลินทรีย์ดังกล่าวจัดเป็นจัดเป็นจุลินทรีย์ในกลุ่มเฮเทอโรโทรป (heterotroph) เจริญเติบโตที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ที่พีเอชประมาณ 7 ในสภาวะที่มีอากาศ ซึ่งประกอบด้วยจุลินทรีย์หลายชนิดทั้งที่เป็นแกรมบวกและแกรมลบ

การศึกษาการเจริญเติบโตของกลุ่มจุลินทรีย์และความสามารถในการย่อยสลายสารคลอร์ไพรีฟอสเป็นเวลา 14 วัน พบว่าจุลินทรีย์มีการเจริญเติบโตรวดเร็วโดย

มีอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของเท่ากับ 1.44 ต่อวัน และสามารถย่อยสลายสารคลอร์ไพรีฟอสได้ร้อยละ 93 ซึ่งจากผลดังกล่าวสามารถกล่าวได้ว่ากลุ่มจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้มีศักยภาพในการประยุกต์ใช้งานในอนาคต

แต่อย่างไรก็ตามก่อนการใช้ประโยชน์ในอนาคตควรมีการศึกษารายละเอียดของกลุ่มจุลินทรีย์เพิ่มขึ้น เช่น ศึกษาการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ในช่วงระยะเวลาที่กว้างขึ้นเพื่อทราบถึงระยะตาย (dead phase) ศึกษาเปรียบเทียบสภาวะการเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิและพีเอชต่างๆ ศึกษาความสามารถในการย่อยสลายสารที่ความเข้มข้นของสารเริ่มต้นแตกต่างกัน หรือในสภาพแวดล้อมต่างกัน เป็นต้น นอกจากนี้ยังควรมีการศึกษาระบุสายพันธุ์ของกลุ่มจุลินทรีย์ รวมทั้งการศึกษาความสามารถในการกำจัดสารคลอร์ไพรีฟอสของจุลินทรีย์ดังกล่าว เพื่อบ่งชี้จุลินทรีย์หลักในกลุ่มจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายสารคลอร์ไพรีฟอสได้

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณทุนสนับสนุนจากศูนย์ความเป็นเลิศด้านการจัดการสิ่งแวดล้อมและของเสียอันตราย ศูนย์เครือข่ายมหาวิทยาลัยอุบลราชธานี และทุนวิจัยจาก Thai Fogarty ITREOH Center (Grant Number: D43 TW007849) และขอขอบคุณภาควิชาวิศวกรรมเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานีในการสนับสนุนเครื่องมือในการวิจัย

เอกสารอ้างอิง

[1] Howard, P.H. 1991. Handbook of Environmental Fate and Exposure Data for Organic Chemicals, Pesticides. Lewis Publishers, Chelsea, 5-12.

[2] Getzin, L.W. 1981. Degradation of chlorpyrifos in soil: influence of autoclaving, soil moisture, and temperature. Journal of Economic Entomology, 74: 158-162.

[3] Racke, K.D., Coats, J.R. and Titus, K.R. 1988. Degradation of chlorpyrifos and its hydrolysis products, 3,5,6-trichloro-2-pyridinol in soil. Journal of Environmental Science and Health, Part B, 23: 527-539.

[4] Wauchope, R.D., Buttler, T.M., Hornsby A.G., Augustijn-Beckers, P.W.M. and Burt, J.P. 1992. SCS/ARS/CES Pesticide properties database for environmental decisionmaking. Review of Environmental Contamination and Toxicology, 123: 1-157.

[5] Oliver, G.R., Bolles, H.G. and Shurdut, B.A. 2000. Chlorpyrifos: probabilistic assessment of exposure and risk. Neuro Toxicology, 21: 203–208.

[6] Van Emmerik, T.J., Angove, M.J., Johnson, B.B. and Well, J.D. 2007. Sorption of chlorpyrifos to selected minerals and the effect of humic acid. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 55: 7527-7533.

[7] Graebing, P. and Chib, J.S. 2004. Soil bacterial functional diversity as influenced by organic amendment application. Bioresource Technology, 97: 1484-1489.

[8] Walia, S., Dureja, P. and Mukerjee, S.K. 1988. New photodegradation products of chlorpyrifos and their detection on glass, soil, and leaf surfaces. Archives of Environmental Contamination and Toxicology, 17: 183–188.

[9] Li, K., Xing, B.S. and Torello, W.A. 2005. Effect of organic Fertilizers derived dissolved organic matter on pesticide sorption and leaching. Environmental Pollution, 134: 187-194.

[10] Singh, B.K., Walker, A. and Wright, D.J. 2006. Bioremedial potential of fenamiphos and chlorpyrifos degrading isolates: Influence of difference environmental conditions. Soil Biology and Biochemistry, 38: 2682-2693.

[11] Siripattanakul, S., Wirojanagud, W., McEvoy, J.M., Limpiyakorn, T. and Khan, E. 2009. Atrazine degradation by stable mixed cultures enriched from agricultural soil and their

characterization. Journal of Applied Microbiology, 106: 986-992.

[12] Singh, B.K., Walker, A., Morgan, J.A.W., and Wright, D.J. 2004. Biodegradation of chlorpyrifos by Enterobacter strain B-14 and its use in Bioremediation of contaminated soils. Applied and Environmental Microbiology, 70: 4855-4863.

[13] Yang, L., Zhao, Y.H., Zhang, B.X., Yang, C.H., and Zhang, X. 2005. Isolation and characterization of a chlorpyifos and 3,5,6-trichloro-2-pyridinol degrading bacterium. FEMS Microbiology Letters, 251: 67-73.

[14] Li, X., He, J. and Li, S. 2007. Isolation of a chlorpyrifos-degrading bacterium, Sphingomonas sp. Strain Dsp-2, and cloning of the mpd gene. Microbiology, 158:143-149.

[15] Xu, G., Zheng, W., Li, Y., Wang, S., Zhang, J. and Yan, Y. 2008. Biodegradation of chlorpyrifos and 3,5,6- trichloro-2-pyridinol by a newly isolated Paracoccus sp. Strain TRP. International Biodeterioration and Biodegradation, 62: 51-56.

[16] Anwar, S., Liaquat, F., Khan, Q.M., Khalid, Z.M. and Iqbal, S. 2009. Biodegradation of chlorpyrifos and its hydrolysis product 3,5,6-trichloro-2-pyridinol by Bacillus pumilus strain C2A1. Journal of Hazardous Materials, 168: 400–405.

[17] Maier, R.M., Pepper, L.L. and Gerba, C.P. 2000. Environmental microbiology. Academic Press, Canada, 44-48.

[18] Li, X., Jiang, J., Gu, L., Ali, S.W., He, J. and Li, S. 2008. Diversity of chlopyrifos- degrading bacteria isolated from chlorpyrifos-contaminated sample. International Biodeterioration and Biodegradation, 62: 331-335.

[19] Kidd, H. and James, D.R. 1991. The Agrochemicals Handbook. 3th Edition, Royal Society of Chemistry Information Service, Cambridge, 5-14.

[20] นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ และ ปรีชา สุวรรณพินิจ. 2547. จุลชีววิทยาทั่วไป. พิมพ์ครั้งที่ 4. สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพฯ, 19-45.

[21]http://www.mcc.cmu.ac.th/graduate/Agro723/Reading_Materials/GREENAG_ORG.htm

[22] Liu, B., McConnell, L.L. and Torrents, A. 2001. Hydrolysis of chlorpyrifos in natural waters of the Chesapeake Bay. Chemosphere, 44: 1315-1323.