การย่อยสลายสารพาราไฮดรอกซีเบนโซเอทโดยจุลินทรีย์ในดินตะกอนภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจนและไนเทรต

Biodegradation of *p*–hydroxybenzoate by Microorganisms in Sediment-slurry under Aerobic Denitrification

สุบัณฑิต นิ่มรัตน์[1*] วีรญา ทรัพย์วิลาวรรณ[2] กิตติธัช สุพรรณพันธุ์[2] และวีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย[3]

[1]ภาควิชาจุลชีววิทยาและโครงการวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

[2]ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

[3]ภาควิชาวาริชศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

E-mail: subunti@buu.ac.th

บทคัดย่อ

การศึกษาครั้งนี้ศึกษาถึงการย่อยสลายสารพาราไฮดรอกซีเบนโซเอทโดยจุลินทรีย์ในสารละลายดินตะกอนจากนาข้าวภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจนและไนเทรต โดยทำการศึกษา 3 ชุดการศึกษา คือ ชุดการทดลอง (สารละลายตะกอน ที่เติม 0.1 มิลลิโมลาร์ สารพาราไฮดรอกซีเบนโซเอท) ชุดฆ่าเชื้อ (สารละลายตะกอนที่ปลอดเชื้อ ที่เติม 0.1 มิลลิโมลาร์ สารพาราไฮดรอกซีเบนโซเอท) และชุดควบคุม (ชุดที่มีการเติมสารละลายตะกอนเท่านั้น) ผลการศึกษาพบว่าจุลินทรีย์ในดินตะกอนสามารถย่อยสลายสารพาราไฮดรอกซีเบนโซเอทที่เติม ณ ความเข้มข้น 0.1, 0.1 และ 0.3 มิลลิโมลาร์ โดยเกิดการย่อยสลายภายในระยะเวลา 4, 2 และ 5 วันของการทดลองตามลำดับ โดยในระหว่างการย่อยสลายพบสารเมแทบอไลท์ที่เกิดขึ้นของสารพาราไฮดรอกซีเบนโซเอท คือ ฟีนอลเพียงเล็กน้อยแต่ไม่มีการเกิดก๊าซ รวมทั้งมีการใช้สารไนเทรตตลอดการทดลอง โดยพบปริมาณสารไนเทรตเหลือเท่ากับ 4.50 มิลลิโมลาร์ ในวันสุดท้ายของการทดลอง และเกิดการสะสมของไนไทรต์เพิ่มขึ้นตามระยะเวลาในการทดลองโดยมีค่าเท่ากับ 0.45 มิลลิโมลาร์ ในวันสุดท้ายของการทดลอง ดังนั้นสามารถสรุปได้ว่าจุลินทรีย์ในสารละลายดินตะกอนมีความสามารถการย่อยสลายสารพาราไฮดรอกซีเบนโซเอทภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจนและไนเทรต

คำสำคัญ : สารพาราไฮดรอกซีเบนโซเอท การย่อยสลาย สารละลายดินตะกอน แอโรบิค ดีไนทริฟิเคชัน

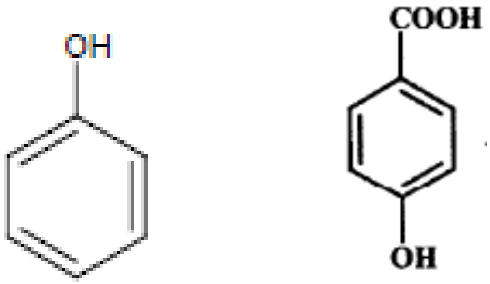
Abstract

This study investigated the biodegradation of *p*-hydroxybenzoate by microorganisms in sediment-slurry from rice paddy soil under aerobic denitrifying conditions. Three treatments were established, active treatment (sediment slurry added with 0.1 mM *p*-hydroxybenzoate), sterile treatment (sterile sediment slurry added with 0.1 mM *p*-hydroxybenzoate), and the control (sediment slurry only). Results showed that the microorganisms in sediment degraded *p*-hydroxybenzoate at concentrations of 0.1, 0.1, and 0.3 mM within 4, 2, and 5 days of the experiment respectively. A small amount of phenol and no gas were found in the biodegradation of *p*-hydroxybenzoate treatment. Nitrate accumulation was also found in the biodegradation of *p*-hydroxybenzoate treatment throughout the experiment and 4.50 mM of nitrate was found on the final day of the experiment. In conclusion, microorganisms in sediment-slurry were capable of degrading *p*-hydroxybenzoate under aerobic denitrifying conditions.

Keywords: *p*-hydroxybenzoate; Biodegradation; Sediment-slurry; Aerobic denitrification

บทนำ

ปัจจุบันประเทศไทยมีบทบาทสำคัญทั้งในด้านอุตสาหกรรมและเกษตรกรรมมากขึ้นทำให้การใช้สารเคมีมีปริมาณเพิ่มขึ้น โดยเฉพาะสารเคมีที่อยู่ในกลุ่มอะโรมาติก ในการทำเกษตรกรรมจะมีการใช้สารเคมีในรูปของยาฆ่าศัตรูพืช เช่น ยาฆ่าแมลง ยาฆ่าเชื้อรา และยาฆ่าวัชพืช เป็นต้น [1] โดยมักมีการใช้สาร 2.4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) และ 2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid (2,4,5-T) ซึ่งสารทั้งสองตัวนี้จัดอยู่ในกลุ่ม Phenoxyalkyl carboxylic acid โดยสารทั้งสองตัวมีการใช้กันอย่างแพร่หลายและพบการตกค้างอยู่ในสิ่งแวดล้อมได้เป็นเวลานาน โดย 2,4-D มีระยะเวลาความคงทน 2-8 สัปดาห์ ส่วน 2,4,5-T มีความคงทน 5-11 สัปดาห์ [2] การที่สารประกอบฟีนอลมีการสะสมอยู่ในสิ่งแวดล้อมเป็นเวลานานจะทำให้เป็นอันตรายต่อสิ่งมีชีวิตในระบบนิเวศน์ รวมทั้งทำให้ดินเสื่อมโทรมลง [1] ส่วนด้านอุตสาหกรรมพบว่า อุตสาหกรรมต่าง ๆ อาทิ อุตสาหกรรมผลิตกระดาษ อุตสาหกรรมอัลลอยด์ อุตสาหกรรมสี อุตสาหกรรมชุบโลหะ อุตสาหกรรมการฟอกหนัง อุตสาหกรรมปิโตรเลียม อุตสาหกรรมฟีนอลิกเรซิน และอุตสาหกรรมต่าง ๆ อีกมากมาย เป็นต้น จากการใช้สารเคมีในกลุ่มอะโรมาติกอย่างกว้างขวาง ทำให้เกิดการปนเปื้อนของสารประกอบในกลุ่มอะโรมาติก เช่น สารประกอบฟีนอลอย่างมากในสิ่งแวดล้อม ซึ่งอาจเกิดจากการปนเปื้อนด้วยสารฟีนอลเองหรือจากสารประกอบฟีนอล โดยน้ำทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรมเหล่านี้จะมีสารประกอบฟีนอลปนเปื้อนอยู่ หรือในบางโรงงานจะมีการเติมฟีนอลลงไปในน้ำทิ้งเพื่อเป็นการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ [3] ซึ่งสารที่มักพบจากการ Biotransformation ของฟีนอล คือ สารพาราไฮรดอกซีเบนโซเอท (PHB)[4] (Fig. 1a and 1b)



(a) (b)

Figure 1 Chemical structure of (a) phenol [5] and (b) *p*-hydroxybenzoate[6]

ดังนั้นในงานวิจัยครั้งนี้ จึงได้ศึกษาการย่อยสลายสารพาราไฮดรอกซีเบนโซเอทภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจนและมีไนเทรต (Aerobic denitrification) โดยใช้ดินตะกอนจากนาข้าวในอำเภอบ่อทอง จังหวัดชลบุรี ที่มีการใช้ยาฆ่าแมลงชนิดคาร์โบฟูรานที่มีสารประกอบอะโรมาติกเป็นส่วนประกอบ เพื่อทราบถึงความสามารถของจุลินทรีย์ในดินตะกอนในการย่อยสลายสารพาราไฮรดอกซีเบนโซเอทภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจนและไนเทรตซึ่งเป็นสภาวะที่พบได้ในดินตะกอนนาข้าวโดยทั่วไป

วัสดุอุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย

1. การเก็บตัวอย่าง[7]

เก็บตัวอย่างของดินตะกอนจากนาข้าวในอำเภอบ่อทอง จังหวัดชลบุรีที่มีการใช้ยาฆ่าแมลงชนิดคาร์โบฟูราน (Fig. 2) โดยเก็บตัวอย่างที่ระดับความลึก 1-10 เซนติเมตร ด้วยใช้ Grab sampler เป็นจำนวน 5 จุด จากนั้นนำดินตะกอนใส่ลงในขวดและปิดฝาหลวม ๆ เก็บที่อุณหภูมิห้องจนกว่าจะทำการทดลอง

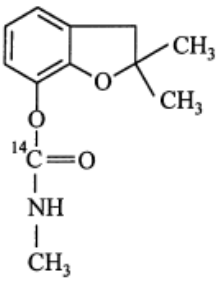


Figure 2 Chemical structure of carbofuran pesticide [8]

2. การเตรียม Defined minimal salt medium (DMSM) [9]

อาหารเลี้ยงเชื้อ DMSM ประกอบด้วยส่วนประกอบหลัก 3 ส่วน คือ (1) สารละลายเกลือ (กรัมต่อลิตร) ประกอบด้วย KCl, 1.3; KH_2PO_4, 0.2; NaCl, 23.0; NH_4Cl, 0.5; $CaCl_2 \cdot H_2O$, 0.1 และ $MgCl_2 \cdot 6H_2O$, 1.3 (2) สารละลาย Trace salt (กรัมต่อลิตร) ประกอบด้วย $CoCl_2 \cdot H_2O$, 2.2; $CuCl_2$, 0.01; H_3Bo_3, 0.38; $MnCl_2 \cdot 4H_2O$, 1.333; $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$, 0.167 และ $ZnCl_2$, 0.14 และ (3) สารละลายวิตามิน (มิลลิกรัมต่อลิตร) ประกอบด้วย B_{12}, 1; Biotin, 20; Folic acid, 20; Nicotinic acid, 50; P-aminobenzoic acid, 50; Pantothenic acid, 50; Pyridoxine HCl, 100; Riboflavin, 50; Thiamin, 50 และ Thiotic, 50 ทำการเตรียมสารละลายแต่ละประเภทแยกกันโดยที่สารละลายเกลือนำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ส่วนสารละลาย Trace salt สารละลายวิตามิน และสารละลายคาร์บอเนตทำให้ปราศจากเชื้อโดยกรองผ่านหัวกรองที่มีขนาดรูกรองเท่ากับ 0.45 ไมโครเมตร จากนั้นนำส่วนสารละลายเกลือมาเติมสารละลาย Trace salt ปริมาตร 5 มิลลิลิตร สารละลายวิตามิน ปริมาตร 1 มิลลิลิตร และสารละลายคาร์บอเนต ปริมาณ 29.8 กรัม

3. การศึกษาการย่อยสลายสารพารา-ไฮดรอกซีเบนโซเอทโดยจุลินทรีย์ในดินตะกอน [10]

นำขวดซีรัมขนาด 60 มิลลิลิตร จำนวน 7 ขวด มาเติมสารละลายตะกอน (10% w/v) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร จากนั้นแบ่งขวดซีรัมออกเป็น 3 ชุดการทดลอง คือ

3.1 ชุดทดลอง (Active) (เติมสารละลายไบคาร์บอเนต ปริมาตร 1.49 มิลลิลิตร DMSM ปริมาตร 42.71 มิลลิลิตร สารละลายวิตามิน ปริมาตร 0.05 มิลลิลิตร Trace salt ปริมาตร 0.25 มิลลิลิตร และ สารพาราไฮดรอกซีเบนโซเอทความเข้มข้น 0.1 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร)

3.2 ชุดฆ่าเชื้อ (Sterile) (จำนวน 2 ขวด โดยเติม DMSM ปริมาตร 42.71 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที และทิ้งให้เย็นเป็นเวลา 2 ชั่วโมง จำนวน 3 ครั้ง จากนั้นเติมสารละลายไบคาร์บอเนต ปริมาตร 1.49 มิลลิลิตร สารละลายวิตามิน ปริมาตร 0.05 มิลลิลิตร Trace salt 0.25 มิลลิลิตร สารพาราไฮดรอกซีเบนโซเอทความเข้มข้น 0.1 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร

3.3 ชุดควบคุม (Background) (จำนวน 2 ขวด โดยเติม DMSM ปริมาตร 43.21 มิลลิลิตร สารละลายไบคาร์บอเนต ปริมาตร 1.49 มิลลิลิตร สารละลายวิตามิน ปริมาตร 0.05 มิลลิลิตร Trace salt ปริมาตร 0.25 มิลลิลิตร) จากนั้นนำชุดการทดลองทั้ง 3 ชุดไปบ่มที่อุณหภูมิห้องในสภาวะที่ไม่มีแสง และวัดปริมาณสารพาราไฮดรอกซีเบนโซเอท สารฟีนอล ไนเทรต และไนไทรต์

4. วิธีการวิเคราะห์ปริมาณสารฟีนอล พาราไฮดรอกซีเบนโซเอท และสารเมแทบอไลท์กลุ่มอะโรมาติกชนิดอื่น ๆ [11]

นำสารละลายในขวดซีรัมปริมาตร 1 มิลลิลิตร มาปั่นแยกตะกอนที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำส่วนใสของสารละลายมากรองด้วยหัวกรองที่มีขนาดรูกรองเท่ากับ 0.45 ไมโครเมตร และนำส่วนใสที่กรองได้ไปวิเคราะห์ปริมาณสารพาราไฮดรอกซีเบนโซเอทและสารตัวกลางต่าง ๆ โดยใช้เครื่อง High Performance Liquid Chromatography (HPLC; Waters 600, Waters cooperation, USA) ด้วย UV detector (Waters 2487, Waters cooperation, USA) ที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร โดยใช้คอลัมน์เป็น Reverse phase C18 Column (ขนาดรูพรุนเท่ากับ 60 อังสตรอม และขนาดอนุภาคเท่ากับ 4 ไมโครเมตร; Nova_pak®, Waters cooperation, USA) และใช้ Eluent เป็น Methanol:water:glacial acid (40:58:2; HPLC grade) และกำหนดอัตราการไหล เท่ากับ 1 มิลลิลิตรต่อนาที จากนั้นคำนวณหาความเข้มข้นโดยเทียบกับกราฟมาตรฐาน

5. วิธีวิเคราะห์ปริมาณไนเทรต [12]

วิเคราะห์โดยวิธีบรูซีน (Brucine) โดยนำสารละลายที่ต้องการวัดปริมาณ 50 ไมโครลิตร ใส่ในหลอดทดลอง และเจือจางในอัตราส่วน 1:40 โดยการเติมน้ำกลั่นหลอดละ 1,950 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปแช่ในน้ำแข็ง โดยเติมโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ปริมาตร 400 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน จากนั้นเติมกรดซัลฟิวริก ปริมาตร 2 มิลลิลิตร นำไปแช่ในน้ำแข็ง และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง Spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 410 นาโนเมตร จะได้เป็นค่าแบลงค์ (Blank) ของสารละลายตัวอย่าง จากนั้นจึงนำสารละลายมาแช่น้ำแข็งอีกครั้งหนึ่ง โดยเติมสารละลายบรูซีน-กรดซัลฟานิลิก ปริมาตร 100 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากันและนำไปแช่ที่อุณหภูมิไม่ต่ำกว่า 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที และนำมาแช่ในน้ำแข็งอีกครั้งเพื่อลดอุณหภูมิให้ได้อุณหภูมิห้อง แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงอีกครั้ง เมื่อได้ค่าการดูดกลืนแสงครั้งที่ 2 ให้นำมาหักลบออกจากแบลงค์ จะได้ค่าการดูดกลืนแสงที่เกิดจากปฏิกิริยาระหว่างไนเทรตกับบรูซีนในสารละลายตัวอย่างโดยทำการวัดที่ความยาวคลื่น 410 นาโนเมตร

6. วิธีการวิเคราะห์ปริมาณไนไทรต์ [13]

วิเคราะห์ปริมาณไนไทรต์โดยใช้วิธีไดอาโซไทเซชัน โดยนำสารละลายตัวอย่างมาปริมาตร 800 ไมโครลิตร เจือจางให้ได้อัตราส่วนเป็น 1:3 โดยเติมน้ำกลั่น ปริมาตร 1,600 ไมโครลิตร ถ้าสารละลายมีสารแขวนลอยอยู่ให้กรองด้วยกระดาษกรองที่มีรูกรองขนาด 0.45 ไมโครเมตร หรือทำการตกตะกอนด้วยอะลูมิเนียมไฮดรอกไซด์ ($Al(OH)_3$) และปรับ pH ให้เป็นกลาง จากนั้นเติมสาร Ethylene diamine tatra-acitic acid (EDTA) ปริมาตร 48 ไมโครลิตร และกรดซัลฟานิลิก ปริมาตร 48 ไมโครลิตร ทำการผสมให้เข้ากันจะได้ pH มีค่าประมาณ 1.4 ปล่อยให้เกิดปฏิกิริยา 3-10 นาที หลังจากนั้นทำการเติมน้ำยาแนฟทิลลามีนไฮโดรคลอไรด์ ปริมาตร 48 ไมโครลิตร และโซเดียมอะซีเตทบัฟเฟอร์ 48 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน จะได้ pH ประมาณ 2.0-2.5 ตั้งทิ้งไว้ 10-30 นาที จนเกิดสีชมพูแล้วจึงนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร

7. วิธีการวิเคราะห์ปริมาณก๊าซทั้งหมด [11]

ทำการวิเคราะห์ปริมาณก๊าซทั้งหมดโดยนำขวดทดลองทั้งหมดมาทำการตรวจวัดปริมาณก๊าซทั้งหมดที่เกิดขึ้นโดยใช้หลอดฉีดยาชนิดแก้วถ้ามีก๊าซเกิดขึ้นจะดันกระบอกสูบขึ้นและอ่านปริมาณก๊าซที่ได้เป็นมิลลิลิตร

3. ผลการวิจัยและวิจารณ์ผล

ผลการศึกษาการย่อยสลายสารพาราไฮดรอกซีเบนโซเอทภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจนและไนเทรต (Aerobic denitrification) โดยจุลินทรีย์ในดินตะกอนด้วยการเก็บตัวอย่างดินตะกอนมาวัดปริมาณสารต่างๆ คาดว่าจะมีการสะสมของสารปนเปื้อนในดินตะกอนเนื่องจากเกษตรกรได้มีการใช้สารกำจัดแมลงฟูราดานในการกำจัดเพลี้ยชนิดต่าง ๆ ซึ่งสารที่ออกฤทธิ์ คือ 2,3-Dihydro-2-2-dimethyl-7-benzofuranol methylar bamate[14] และพบว่าในดินตะกอนมีปริมาณไนเทรตและไนไทรต์เป็น 0.031 และ 0.028 mM ตามลำดับ แต่ไม่พบสารฟีนอลและพาราไฮดรอกซีเบนโซเอท[15] โดยไนเทรตและไนไทรต์ที่พบในดินตะกอนอาจมาจากการถ่ายเทอากาศ ซึ่งถ้ามีออกซิเจนมากจะส่งผลเกิดให้ปฏิกิริยาไนทริฟิเคชัน ซึ่งทำให้แอมโมเนียเปลี่ยนเป็นไนเทรตและไนไทรต์ ทั้งนี้อาจได้รับออกซิเจนจากรากพืชและจุลินทรีย์ในดินที่สามารถในการสังเคราะห์แสง หรืออินทรีย์สารที่พบในดินตะกอนซึ่งถ้ามีปริมาณอินทรีย์สารมากจะเกิดไนเทรตและไนไทรต์สูงกว่าในดินที่มีปริมาณอินทรีย์สารต่ำ นอกจากนี้อาจมีสาเหตุมาจากดินมีความเป็นด่างสูงเกินไป และผลจากกระบวนการไนทริฟิเคชันของจุลินทรีย์ในกลุ่มเฮทเทอโรโทรป [2]

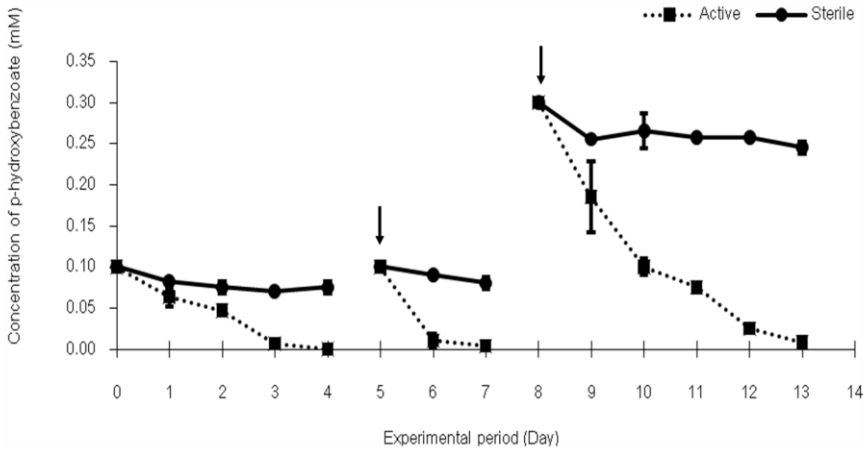


Figure 3 Degradation of *p*-hydroxybenzoate at concentration of 0.1 and 0.3 mM under aerobic denitrification

Note: Arrows indicated that addition of *p*-hydroxybenzoate into treatment was applied.

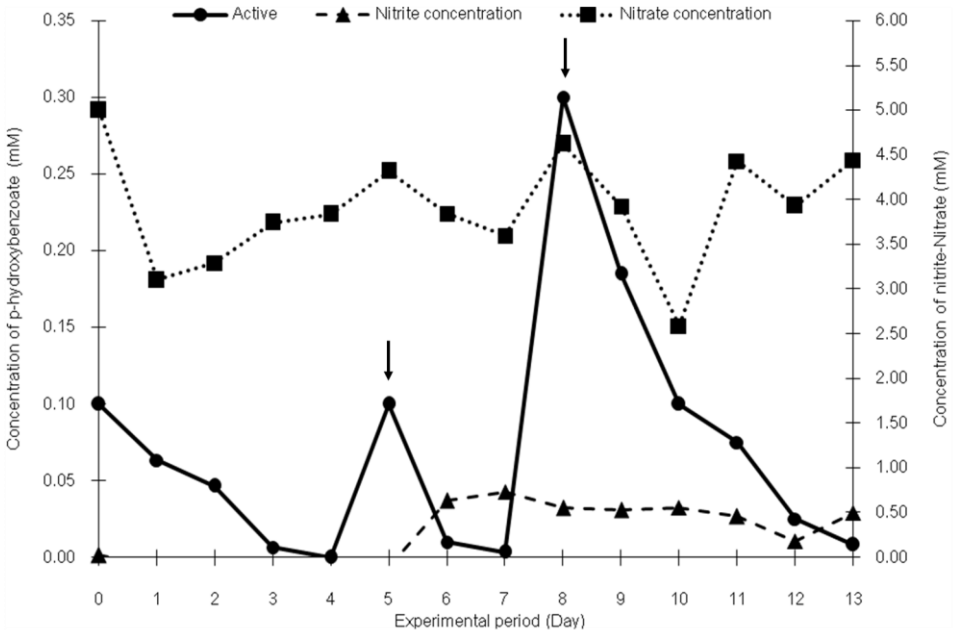


Figure 4 Nitrate and nitrite concentrations during degradation of *p*-hydroxybenzoate at concentration of 0.1 and 0.3 mM under aerobic denitrification

Note: Arrows indicated that the addition of *p*-hydroxybenzoate into treatment was applied.

ผลการศึกษาการย่อยสลายสารพาราไฮดรอกซีเบนโซเอทภายใต้สภาวะที่มีทั้งออกซิเจนและไนเทรตที่ระดับความเข้มของของสารพาราไฮดรอกซีเบโซเอท 0.1 มิลลิโมลาร์ พบว่าในชุดทดลองมีการลดลงของสารพารา-ไฮดรอกซีเบนโซเอทอย่างต่อเนื่อง และหมดในวันที่ 4 ของการทดลอง ส่วนชุดฆ่าเชื้อมีการลดลงของสารพารา-ไฮดรอกซีเบโซเอทเล็กน้อย โดยพบว่ามีเข้มข้นเท่ากับ 0.075 มิลลิโมลาร์ และทั้งชุดการทดลองและชุดฆ่าเชื้อไม่พบก๊าซทั้ง 2 ชุดการทดลอง (Fig. 3) นอกจากนั้นไม่พบว่ามีการสะสมของฟีนอลภายใน 4 วันของการศึกษา สอดคล้องกับการศึกษาของวีรญา ทรัพย์วิลาวรรณ และคณะ [15] ที่ได้ทำการศึกษาถึงการย่อยสลายฟีนอลภายใต้สภาวะที่ใช้ออกซิเจนด้วยสารละลายดินตะกอนจากนาข้าวซึ่งพบว่ามีการปนเปื้อนด้วยไนเทรต (0.031 มิลลิโมลาร์) ไนไทรต์ (0.028 มิลลิโมลาร์) แต่ไม่ปนเปื้อนด้วยฟีนอลและสารพาราไฮดรอกซีเบนโซเอต และเมื่อทำการเติมฟีนอลความเข้มข้น 0.1 มิลลิโมลาร์ จำนวน 2 ครั้ง และ 0.3 มิลลิโมลาร์ พบว่า เกิดการย่อยสลายจนหมดภายในระยะเวลา 2 และ 5 วัน ตามลำดับ นอกจากนั้นยังพบการเกิดก๊าซในชุดทดลองเมื่อเติมฟีนอลความเข้มข้น 0.1 มิลลิโมลาร์ ในครั้งแรกในวันที่ 1 ของการทดลอง และลดลงตามระยะเวลาของการทดลอง และเมื่อทำการคัดแยกจุลินทรีย์ในดินตะกอนจากชุดทดลอง คือ *Bacillus* sp. และการศึกษาของสุบัณฑิต นิ่มรัตน์ และคณะ [7] ที่ทำการศึกษาถึงการย่อยสลายสารพาราไฮดรอกซีเบนโซเอทโดยจุลินทรีย์ในสารละลายดิน ตะกอนจากนาข้าวภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจนพบว่า จุลินทรีย์ในดินตะกอนสามารถย่อยสลายสารพาราไฮดรอกซีเบนโซเอทความเข้มข้น 0.1 และ 0.3 มิลลิโมลาร์ ได้ภายในระยะ 3, 2 และ 5 วัน ตามลำดับ โดยในระหว่างการย่อยสลายสารพารา-ไฮดรอกซีเบนโซเอทที่ระดับความเข้มข้น 0.1 มิลลิโมลาร์ ในวันแรกของการทดลองพบก๊าซและลดลงตาม

ระยะเวลาของการทดลอง แบคทีเรียที่แยกได้จากสารละลายดินตะกอนในการศึกษาครั้งนี้คือ *Bacillus* sp. และสามารถเปลี่ยนไนเทรตเป็นไนไทรต์ รวมทั้งการศึกษาของ Kuhn *et al.* [16] ที่รายงานว่าการย่อยสลายสารพาราไฮดรอกซีเบนโซเอทภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจนและไนเทรตโดยแบคทีเรียในกลุ่ม Denitrifying และ Nitrate-reducer จะไม่พบการสะสมของฟีนอล หรือสารเมทตาบอไลต์

เมื่อเติมสารพาราไฮดรอกซีเบนโซเอทความเข้มข้น 0.1 และ 0.3 มิลลิโมลาร์ อีกครั้งพบว่า มีการย่อยสลายสารพาราไฮดรอกซีเบนโซเอทความเข้มข้น 0.1 มิลลิโมลาร์ ได้อย่างรวดเร็วขึ้น โดยสามารถย่อยสลายได้ภายใน 2 วัน ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับการย่อยสลายในช่วงแรกถึง 4 วัน และพบ ว่าชุดฆ่าเชื้อมีการย่อยสลายตัวไปเพียงเล็กน้อยทำให้เหลือสารเท่ากับ 0.08 มิลลิโมลาร์ ส่วนสารตัวกลางฟีนอลจากการย่อยสลายสารพาราไฮดรอกซีเบนโซเอทความเข้มข้น 0.1 มิลลิโมลาร์ เท่ากับ 0.01 มิลลิโมลาร์ ต่อมาในวันที่ 8 ของการทดลองทำการเติมสารพาราไฮดรอกซีเบนโซ-เอทความเข้มข้น 0.3 มิลลิโมลาร์ พบว่ามีการย่อยสลายเกิดขึ้นภายในเวลา 5 วัน ส่วนชุดฆ่าเชื้อพบการสลายตัวเพียงเล็กน้อยจึงพบการคงเหลือเท่ากับ 0.245 มิลลิโมลาร์

ทั้งนี้การเติมไนเทรตเข้าไปเพื่อเป็นตัวรับอิเล็กตรอนตัวสุดท้ายในกระบวนการหายใจในการย่อยสลายสารพาราไฮดรอกซีเบนโซเอทพบว่า จุลินทรีย์สามารถใช้ไนเทรตได้เพียงบางส่วนและสะสมอยู่ในรูปของไนไทรต์ (Fig. 4) เมื่อเสร็จสิ้นการทดลองพบว่าเหลือปริมาณไนเทรตเป็น 4.50 มิลลิโมลาร์ ซึ่งไนเทรตที่ลดลงอาจเนื่องจากไนเทรตมีการเปลี่ยนแปลงโดยเกิดปฏิกิริยา Assimilatory nitrate reduction กลายเป็นสารอินทรีย์เพื่อนำไปใช้ในการสร้างเซลล์ใหม่

สรุป

จุลินทรีย์ในดินตะกอนจากนาข้าวในอำเภอบ่อทอง จังหวัดชลบุรี สามารถย่อยสลายสารพาราไฮดรอกซีเบนโซเอทภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจนและไนเทรต 0.1 มิลลิโมลาร์ 2 ครั้ง และ 0.3 มิลลิโมลาร์ 1 ครั้ง ภายในระยะเวลา 4, 2 และ 5 วัน และพบสารตัวกลาง คือ สารฟีนอล ในปริมาณที่ไม่สามารถวัดได้จนถึงปริมาณเล็กน้อยเท่ากับ 0.01 มิลลิโมลาร์ และสารไนเทรตมีการเปลี่ยนแปลงเพิ่มขึ้นและลดลงตลอดการทดลอง โดยในวันสุดท้ายของการทดลองพบสารไนเทรตเท่ากับ 4.50 มิลลิโมลาร์ และมีการสะสมของสารไนไทรต์เพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ จนถึงวันสุดท้ายของการทดลองเท่ากับ 0.45 มิลลิโมลาร์ รวมทั้งไม่มีการสะสมก๊าซ ซึ่งจากการศึกษาในครั้งนี้พบว่าข้อมูลที่ได้นั้นสามารถนำไปใช้ในการกำจัดสารพิษพาราไฮดรอกซีเบนโซเอทภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจนและไนเทรตและสารฟีนอลด้วยจุลินทรีย์ที่อยู่ในดินตะกอนจากนาข้าวต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพาที่ให้ความอนุเคราะห์อุปกรณ์และสถานที่ในการทำวิจัย

เอกสารอ้างอิง

[1] มนัส สุวรรณ. 2532. **นิเวศวิทยากับการพัฒนาเศรษฐกิจ**. กรุงเทพ: โอเดียนสโตร์.

[2] สมศักดิ์ วังใน. 2528. **จุลินทรีย์และกิจกรรมในดิน**. กรุงเทพฯ: ไทยวัฒนาพานิชจำกัด.

[3] Mutzel, A.; Reinscheid, U.M.; Antranikian, G.; Muller, R. 1996. “Isolation and character rization of a thermophilic bacillus strain, that de grades phenol and cresol as sole carbon source at 70 ° C”. **Applied Microbiol Bio technol**. 46,593-596.

[4] Zhang, X.; Wiegel, J. 1994. “ Reversible conversion of 4-hydroxybenzoate and phenol by Clostridium hydroxybenzoicum”. **Applied and Environmental Micro biology**, 60(11), 4128-4185.

[5] Basha, K. M.; Rajendran, A.; Thangavelu, V. 20010. " Recent advances in the biodegradation of phenol: A review" . **Asian Journal of Expe rimental Biological Sciences**. 1(2), 219-234.

[6] Paul, D.; Chauhan, A.; Pandey, G.; Jain, R. K. 2004. "Degradation of p-hydroxybenzoate via pro tocatechuate in Arthrobacter proto phorm iae RKJ100 and Burkholderia cep acia RKJ200" . **Current Science**, 87(9), 1263-1268.

[7] สุบัณฑิต นิ่มรัตน์ วีรญา ทรัพย์วิลาวรรณ พีรพัฒน์ สุพรรณพันธุ์ วีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย. 2557. "การย่อยสลายพาราไฮดรอกซีเบนโซเอทโดยจุลินทรีย์ในดินตะกอนภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจน". **วารสารวิทยาศาสตร์ มข**. 2(42), 350-359.

[8] Trabue, S. L.; Ogram, A. V.; Ou, L. -T. 2001. "Dynamics of carbofuran-degrading micro bial communities in soil during three succ essive annual applications of carbofuran". **Soil Biology & Biochemistry**, 33, 75-81.

[9] Healy, J. B.; Young, L. Y. 1979. " Anaerobic biodegr adation of eleven aromatic compounds to methane" . **Applied and Environmental Microbiology**, 38(1), 84-89.

[10] Van Schie, P. M.; Young, L. Y. 1998. "Isolation and characterization of phenol-degrading deni trifying bacteria". **Applied and Environmental Microbiology**, 64(7), 2432-243.

[11] Makehayai, S. 2000. **Biodegradation of methyl parathion, p-nitrophenol and p-aminophenol under anoxic conditions**. Ph.D Dissertation in Enviromental Science : The State University of New Jersey.

[12] Association of Official American Chemists [AOAC]. 2002. **Official methods of analysis**. Association of Official American Chemists, MD.

[13] Stickland, J. D. H.; Parson, T. R. A .1972**.** **practical handbook of seawater analysis** (2nd ed.). Ottawa: Fisheries Research Board of Canada Bulletin.

[14] Alexander, M. 1994. **Bidegradation and biore mediation**. San Diego: Academic Press.

[15] วีรญา ทรัพย์วิลาวรรณ, พีรพัฒน์ สุพรรณพันธุ์, สุบัณฑิต นิ่มรัตน์ และวีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย. 2556. "การย่อยสลายสารฟีนอลโดยจุลินทรีย์ในดินตะกอนภายใต้สภาวะที่ใช้ออกซิเจน". **วารสารความปลอดภัยและสุขภาพ**, 6(22), 25-33.

[16] Kuhn, E.P.; Zeyer, J.; Eicher, P.; Schwarz enbach, R. P. 1988. " Anaerobic degra-dation of alkylated benzenes in denitrifying labor atory aquifer columns" . **Applied Environmental Microbiology**, 54, 490-496.