



# การย่อยสลายสารฟีนอลโดยจุลินทรีย์ ในสารละลายดินตะกอนภายใต้สภาวะ ที่มีออกซิเจนและไนเตรต

Biodegradation of Phenol by Microorganisms  
in Sediment-Slurry under Aerobic Denitrification

รองศาสตราจารย์ ดร.สุภัททิ์ นิมรัตน์ Ph.D. (Environmental Science)  
ภาควิชาจุลชีววิทยาและโครงการวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา  
วิรัช ทรัพย์วิลาวรรณ ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา  
พีรพัฒน์ สุพรรณพันธุ์ ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา  
รองศาสตราจารย์ ดร.วีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย Ph.D. (Aquaculture)  
ภาควิชาวิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

## บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้ศึกษาการย่อยสลายสารฟีนอลโดยจุลินทรีย์ในสารแขวนลอยดินตะกอนจากนาข้าวที่มีไนเตรต (0.031 มิลลิโมลาร์) และไนไตรต์ (0.028 มิลลิโมลาร์) ภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจนและไนเตรตเมื่อเติมสารฟีนอลลงไปในช่วงทดลองที่ความเข้มข้น 0.1 มิลลิโมลาร์ ในครั้งที่ 1 และครั้งที่ 2 พบว่าจุลินทรีย์ในสารแขวนลอยดินตะกอนสามารถย่อยสลายสารฟีนอลได้ภายในระยะเวลา 3 และ 2 วัน ตามลำดับต่อมาเติมสารฟีนอลความเข้มข้น 0.3 มิลลิโมลาร์ จากการศึกษาครั้งนี้เป็นระยะเวลา 13 วัน พบว่าจุลินทรีย์ในสารแขวนลอยดินตะกอนใช้เวลาการย่อยสลายสารฟีนอลเป็นเวลานานกว่า 5 วัน โดยพบว่ามีสารตัวกลางที่เกิดขึ้น คือ สารพาราไฮดรอกซีเบนโซเอทซึ่งตรวจวัดได้ในวันที่ 3, 6 และ 9 ของการทดลอง โดยมีความเข้มข้นน้อยกว่า 0.01 มิลลิโมลาร์ และนอกจากนี้ยังพบว่าจุลินทรีย์ในสารแขวนลอยดินตะกอนจากนาข้าวมีความสามารถในการใช้ไนเตรตและเปลี่ยนเป็นไนไตรต์

**คำสำคัญ:** สารฟีนอล/การย่อยสลายด้วยวิธีทางชีวภาพ/สภาวะที่มีออกซิเจนและไนเตรต/นาข้าว

## Abstract

In this study, biodegradation of phenol by microorganisms in rice-paddy sediment-slurry which consisted of nitrate (0.031 mM) and nitrite (0.028 mM) was investigated under aerobic denitrifying conditions. In active culture, 0.1 mM phenol which was applied in the first and the second time was biodegraded within 3 and 2 days, respectively. Then 0.3 mM phenol was reapplied into all treatments, the chemical was biodegraded for more than 5 days of the experiment. The detected metabolite of phenol biodegradation was p-hydroxybenzoate which was monitored at day 3, 6 and 9 with the concentration less than 0.01 mM. Furthermore, these microorganisms in sediment-slurry were able to transform nitrate to nitrite.

**Keywords:** Phenol/Biodegradation/Aerobic denitrifying condition/Rice-paddy

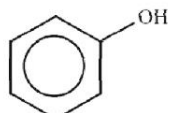
## 1. บทนำ

ปัจจุบันประเทศไทยและประเทศต่างๆ ใช้สารเคมีในกลุ่มอะโรมาติกซึ่งมีบทบาทสำคัญทางด้านอุตสาหกรรมและเกษตรกรรม (Chen et al., 2003) และมีการใช้สารเคมีที่เพิ่มมากขึ้นโดยเฉพาะสารฟีนอลและสารประกอบฟีนอล (Chakraborty et al., 2010) ซึ่งพบว่าการใช้อย่างแพร่หลายในอุตสาหกรรมต่างๆ ตัวอย่างเช่น อุตสาหกรรมผลิตกระดาษ (van Schie & Young, 1998) อุตสาหกรรมสีย้อม (Varsha et al., 2011) อุตสาหกรรมปิโตรเคมี (Riazika et al., 2010) อุตสาหกรรมกลั่นน้ำมันและอุตสาหกรรมเรซิน (Gayathri, & Vasudevan, 2010) เป็นต้น น้ำทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรมเหล่านี้จึงมีสารประกอบฟีนอลปนเปื้อนอยู่ (Nair et al., 2008) ซึ่งอาจปนเปื้อนด้วยสารฟีนอลหรือจากสารประกอบฟีนอล นอกจากนี้บางโรงงานอาจมีการเติมสารฟีนอลลงไปในการบำบัดน้ำทิ้งเพื่อเป็นการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ (Mutzel et al., 1996)

ส่วนในทางด้านเกษตรกรรมจะใช้สารอะโรมาติกในรูปของยาฆ่าศัตรูพืช (Pesticides) เพื่อควบคุมศัตรูพืช เช่น ยาฆ่าแมลง (Insecticides) ยาปราบวัชพืช (Herbicides) (Chakraborty et al., 2010) และยาฆ่าเชื้อรา (Fungicides) เป็นต้น (มนัส สุวรรณ, 2532) และมักพบการใช้สาร 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) และ 2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid (2,4,5-T) ซึ่งสารทั้งสองชนิดนี้จัดอยู่ในกลุ่มฟีนอกซีอัลคิลคาร์บอกซิลิกแอซิด (Phenoxyalkyl carboxylic acid) และมีการใช้กันอย่างแพร่หลายทั่วโลก (Nakazawa et al., 2004; Sarikaya, & Selvi, 2005; Caflan Karasu Benli et al., 2007)

ดังนั้นจึงพบการสะสมของสารฟีนอลและสารประกอบฟีนอลในสิ่งแวดล้อมต่างๆ และสารกลุ่มนี้มีความเป็นพิษต่อมนุษย์ สัตว์ และพืช รวมทั้งทำให้ดินเสื่อมโทรม

(มนัส สุวรรณ, 2532; Nair et al., 2008) เนื่องจากผลกระทบที่เกิดขึ้นจากการปนเปื้อนด้วยสารฟีนอลจึงทำให้มีความต้องการให้มีกระบวนการบำบัดและฟื้นฟูสภาพด้วยวิธีทางชีวภาพซึ่งเป็นวิธีที่นิยมใช้เนื่องจากเป็นวิธีที่เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อมและมีราคาถูกเมื่อเปรียบเทียบกับวิธีทางเคมีและกายภาพ ดังนั้นที่ผ่านมาจึงมีการศึกษาการย่อยสลายสารฟีนอลโดยใช้วิธีการทางชีวภาพเพื่อเป็นทางเลือกหนึ่งในการลดการตกค้างของสารเคมีในสิ่งแวดล้อม (Basha et al., 2010; Riazika et al., 2010) โดยเฉพาะอย่างยิ่งการใช้จุลินทรีย์ในการย่อยสลายสารฟีนอลหรือสารประกอบอื่นๆ ที่ปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อม ตัวอย่างเช่น Zhang, & Wiegel (1994) ได้ศึกษาการใช้จุลินทรีย์ในการย่อยสลายสารฟีนอลและสารตัวกลางที่เกิดขึ้นจากการย่อยสลายสารฟีนอล และพบว่าสารที่มักเกิดจากการย่อยสลายของสารฟีนอลก็คือ สารพาราไฮดรอกซีเบนโซเอทภายใต้สภาวะที่มีไนเตรต (ภาพที่ 1 (a) และ (b)) รวมทั้งมีการศึกษาในแบคทีเรีย เชื้อรา และแบคทีเรียกลุ่มแอคทิโนมัยซีทที่เป็นจุลินทรีย์เดียวในการย่อยสลายสารฟีนอล ยกตัวอย่างเช่น แบคทีเรียสกุล *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Acentobacter* และ *Alcaligenes* เป็นต้น เชื้อราสกุล *Fusarium*, *Corious* และ *Ralstonia* เป็นต้น และแอคทิโนมัยซีทสกุล *Streptomyces* (Nair et al., 2008) นอกจากนี้ยังพบว่าการย่อยสลายสารฟีนอลภายใต้สภาวะที่มีการใช้ออกซิเจนสามารถเกิดขึ้นได้รวดเร็ว (Latha, & Mahadevan, 1997) อย่างไรก็ตามการศึกษาภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจนและมีไนเตรตเป็นตัวรับอิเล็กตรอนตัวสุดท้ายให้จุลินทรีย์มีทางเลือกที่จะใช้ตัวรับอิเล็กตรอนที่เหมาะสมกับสภาวะในขณะนั้น ซึ่งเป็นสภาวะที่พบได้ทั่วไปในสิ่งแวดล้อมทั้งในน้ำและในดินซึ่งยังไม่ค่อยมีการศึกษามากนัก



(a)



(b)

ภาพที่ 1 โครงสร้างทางเคมีของ (a) สารฟีนอล (Nair et al., 2008) และ (b) สารพาราไฮดรอกซีเบนโซเอท (Bertani et al., 2001)

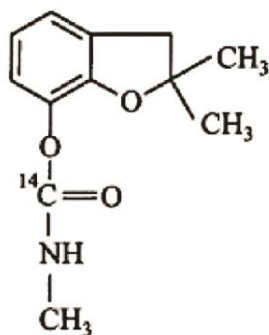


ในงานวิจัยครั้งนี้จึงได้ศึกษาการย่อยสลายสารฟีนอลภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจนและไนเตรตหรือเรียกว่าสภาวะแอโรบิกดีไนทริฟิเคชัน (Aerobic denitrification) ในดินตะกอนจากนาข้าวที่มีการใช้ยาฆ่าแมลงชนิดคาร์โบฟูราน (Carbofuran) ที่เป็นสารประกอบอะโรมาติกเพื่อทำให้ทราบถึงความสามารถในการย่อยสลายสารฟีนอลของกลุ่มจุลินทรีย์ที่อยู่ในดินตะกอนจากนาข้าวในอำเภอบ่อทอง จังหวัดชลบุรี ซึ่งจะนำมาสู่การแยกจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการย่อยสลายสารฟีนอลภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจนและไนเตรตหรือเรียกว่าสภาวะแอโรบิกดีไนทริฟิเคชัน (Aerobic denitrification) ในการศึกษาต่อไป

## 2. วัสดุอุปกรณ์และวิธีการวิจัย

### 2.1 การเก็บตัวอย่าง

เก็บตัวอย่างของดินตะกอนจากนาข้าวในอำเภอบ่อทอง จังหวัดชลบุรีที่มีการใช้ยาฆ่าแมลงชนิดคาร์โบฟูราน (โครงสร้างทางเคมีแสดงในภาพที่ 2) ตามวิธีการของสุบัตติ นิมิตรน และสุกานดา เกื้อกิจกุล (2546) โดยเก็บตัวอย่างเป็นจำนวน 5 จุด ที่ระดับความลึก 1 - 10 เซนติเมตร โดยใช้ Grab sampler จากนั้นนำดินตะกอนใส่ลงในขวดและปิดฝาหลวมๆ เก็บที่อุณหภูมิห้องจนกว่าจะทำการทดลอง



ภาพที่ 2 โครงสร้างทางเคมีของยาฆ่าแมลงชนิดคาร์โบฟูราน (Trabue et al., 2001)

### 2.2 การเตรียม Defined minimal salt medium (DMSM) (ดัดแปลงมาจาก Healy, & Young, 1979)

อาหารเลี้ยงเชื้อ DMSM ประกอบด้วยส่วนประกอบหลัก 3 ส่วน คือ (1) สารละลายเกลือ (กรัม

ต่อลิตร) ประกอบด้วย  $\text{KCl} = 1.3$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4 = 0.2$ ,  $\text{NaCl} = 23.0$ ,  $\text{NH}_4\text{Cl} = 0.5$ ,  $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O} = 0.1$  และ  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O} = 1.3$  (2) สารละลายเกลือปริมาณน้อย (Trace salt) (กรัมต่อลิตร) ประกอบด้วย  $\text{CoCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O} = 2.2$ ,  $\text{CuCl}_2 = 0.01$ ,  $\text{H}_3\text{BO}_3 = 0.38$ ,  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O} = 1.333$ ,  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O} = 0.167$  และ  $\text{ZnCl}_2 = 0.14$  และ (3) สารละลายวิตามิน (มิลลิกรัมต่อลิตร) ประกอบด้วย  $\text{B}_{12} = 1$ , 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 เตรียมสารละลายแต่ละประเภทแยกกันโดยที่สารละลายเกลือนำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ส่วนสารละลายเกลือปริมาณน้อย สารละลายวิตามิน และสารละลายไบคาร์บอเนตทำให้ปราศจากเชื้อโดยการกรองผ่านหัวกรองที่มีขนาดรูกรองเท่ากับ 0.45 ไมโครเมตร จากนั้นนำส่วนสารละลายเกลือมาเติมสารละลายเกลือปริมาณน้อย ปริมาตร 5 มิลลิลิตร สารละลายวิตามินปริมาตร 1 มิลลิลิตร และสารละลายไบคาร์บอเนต ปริมาตร 29.8 กรัม

### 2.3 การศึกษาการย่อยสลายสารฟีนอลโดยจุลินทรีย์ในสารแขวนลอยดินตะกอน (ดัดแปลงมาจาก van Schie, & Young, 1998)

นำขวดซีรัมขนาด 60 มิลลิลิตร จำนวน 7 ขวด มาเติมสารละลายตะกอน (10% w/v) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร จากนั้นแบ่งขวดซีรัมออกเป็น 3 ชุดการทดลอง คือ 1) ชุดทดลอง (Active) (จำนวน 3 ขวด โดยเติมสารละลายไบคาร์บอเนต ปริมาตร 1.49 มิลลิลิตร DMSM ปริมาตร 42.71 มิลลิลิตร สารละลายวิตามิน ปริมาตร 0.05 มิลลิลิตร สารละลายเกลือปริมาณน้อย ปริมาตร 0.25 มิลลิลิตร สารฟีนอลความเข้มข้น 0.1 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร และไนเตรตความเข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร) 2) ชุดฆ่าเชื้อ (Sterile) (จำนวน 2 ขวด โดยเติม DMSM ปริมาตร 42.71 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อและทิ้งให้เย็นจำนวน 3 ครั้ง จากนั้นเติมสารละลายไบคาร์บอเนต ปริมาตร 1.49 มิลลิลิตร สารละลายวิตามิน ปริมาตร 0.05 มิลลิลิตร สารละลายเกลือปริมาณน้อย ปริมาตร 0.25 มิลลิลิตร สารฟีนอลความเข้มข้น 0.1 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร และไนเตรตความเข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร) และ 3) ชุดควบคุม (Background) (จำนวน

2 ขวด โดยเติม DMSM ปริมาตร 43.21 มิลลิลิตร สารละลายไปคาร์บอนต ปริมาตร 1.49 มิลลิลิตร สารละลายวิตามิน ปริมาตร 0.05 มิลลิลิตร และสารละลายเกลือปริมาณน้อย ปริมาตร 0.25 มิลลิลิตร) จากนั้นนำชุดการทดลองทั้ง 3 ชุดไปบ่มที่อุณหภูมิห้องในสภาวะที่ไม่มีแสง และทำการตรวจวัดปริมาณสารฟีนอล ในเทรต และไนไทรต์

#### 2.4 วิธีการวิเคราะห์ปริมาณสารฟีนอล สารพาราไฮดรอกซีเบนโซเอท และสารตัวกลางต่างๆ (Nimrat, 2000)

นำสารละลายในขวดซีรัมปริมาตร 1 มิลลิลิตร มาปั่นแยกตะกอนที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำส่วนใสของสารละลายมากรองด้วยหัวกรองที่มีขนาดรูกรองเท่ากับ 0.45 ไมโครเมตร และนำส่วนใสที่กรองได้ไปวิเคราะห์ปริมาณสารฟีนอล สารพาราไฮดรอกซีเบนโซเอท และสารตัวกลางต่างๆ 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) และกำหนดอัตราการไหล เท่ากับ 1 มิลลิลิตรต่อนาที จากนั้นคำนวณหาความเข้มข้นโดยเทียบกับกราฟมาตรฐาน

#### 2.5 วิธีวิเคราะห์ปริมาณไนเทรต (AOAC, 2002)

วิเคราะห์ปริมาณไนเทรตโดยวิธีบรูซีน (Brucine) โดยนำสารละลายที่ต้องการวัดปริมาณ 50 ไมโครลิตร ใส่ในหลอดทดลอง และเจือจางในอัตราส่วน 1 : 40 โดยการเติมน้ำกลั่นหลอดละ 1,950 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปแช่ในน้ำแข็ง โดยเติมโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ปริมาตร 400 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน จากนั้นเติมกรดซัลฟิวริก ปริมาตร 2 มิลลิลิตร นำไปแช่ในน้ำแข็ง และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) ที่ความยาวคลื่น 410 นาโนเมตร จะได้เป็นค่าแบล็ค (Blank) ของสารละลายตัวอย่าง จากนั้นจึงนำสารละลายมาแช่ในน้ำแข็งอีกครั้งหนึ่ง โดยเติมสารละลายบรูซีน-กรดซัลฟานิลิก ปริมาตร 100 ไมโครลิตร

เข้าให้เข้ากันและนำไปแช่ที่อุณหภูมิไม่ต่ำกว่า 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที และนำมาแช่ในน้ำแข็งอีกครั้งเพื่อลดอุณหภูมิให้ได้อุณหภูมิห้องแล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงอีกครั้ง เมื่อได้ค่าการดูดกลืนแสงครั้งที่ 2ให้นำมาหักลบออกจากแบล็ค จะได้ค่าการดูดกลืนแสงที่เกิดจากปฏิกิริยาระหว่างไนเทรตกับบรูซีนในสารละลายตัวอย่างโดยทำการวัดที่ความยาวคลื่น 410 นาโนเมตร

#### 2.6 วิธีการวิเคราะห์ปริมาณไนไทรต์ (Stickland, & Parson, 1972)

วิเคราะห์ ปริมาณไนไทรต์ โดยใช้วิธีไดอาโซไทเซชัน (Diazotization) โดยนำสารละลายตัวอย่างมาปริมาตร 800 ไมโครลิตร เจือจางให้ได้อัตราส่วนเป็น 1 : 3 โดยเติมน้ำกลั่น ปริมาตร 1,600 ไมโครลิตร ถ้าสารละลายมีสารแขวนลอยอยู่ให้กรองด้วยกระดาษกรองที่มีรูกรองขนาด 0.45 ไมโครเมตร หรือทำการตกตะกอนด้วยอะลูมิเนียมไฮดรอกไซด์ (Al(OH)<sub>3</sub>) และปรับ pH ให้เป็นกลาง จากนั้นเติมสารเอทิลีน ไดอะมีน เตตระแอซิติก แอซิด (Ethylene diamine tetra-acetic acid; EDTA) ปริมาตร 48 ไมโครลิตร และกรดซัลฟานิลิก (Sulfanilic acid) ปริมาตร 48 ไมโครลิตร ทำการผสมให้เข้ากันจะได้ pH มีค่าประมาณ 1.4 ปล่อยให้เกิดปฏิกิริยา 3 - 10 นาที หลังจากนั้นทำการเติมน้ำยาเนฟทิลลามีนไฮโดรคลอไรด์ (Naphthylamine hydrochloride) ปริมาตร 48 ไมโครลิตร และโซเดียมอะซีเตตบัฟเฟอร์ 48 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน จะได้ pH ประมาณ 2.0 - 2.5 ตั้งทิ้งไว้ 10 - 30 นาที จนเกิดสีชมพูแล้วจึงนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร

### 3. ผลการวิจัยและอภิปรายผล

จากการนำตัวอย่างดินตะกอนจากนาข้าวในอำเภอปอทอง จังหวัดชลบุรี มาวัดปริมาณของสารปนเปื้อนชนิดต่างๆ คือ ไนเทรต ไนไทรต์ สารฟีนอล และสารพาราไฮดรอกซีเบนโซเอท เนื่องจากในนาข้าวมีการใช้ปุ๋ยและสารกำจัดแมลงชนิดคาร์โบฟูราน ในการกำจัดเพลี้ยชนิดต่างๆ และสารที่ออกฤทธิ์คือ 2,3-Dihydro-2,2-dimethyl-7-benzofuranol methylcarbamate ซึ่งมีโครงสร้างเป็นวงแหวนอะโรมาติก ผลการศึกษาพบว่าในดินตะกอนมีปริมาณไนเทรตและ



ไนไตรต์เท่ากับ 0.031 และ 0.028 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ แต่ไม่พบสารฟีนอลและสารพาราไฮดรอกซีเบนโซเอ

ต่อมาเมื่อศึกษาการย่อยสลายสารฟีนอล ภายใต้สภาวะที่มีทั้งออกซิเจนและไนเตรตสามารถสรุปได้ว่าดินตะกอนจากนาข้าวที่มีการปนเปื้อนด้วยสารคาร์โบฟูรานดังที่กล่าวมาแล้วนั้นมีความสามารถในการย่อยสลายสารฟีนอลความเข้มข้น 0.1 และ 0.3 มิลลิโมลาร์ ได้ค่อนข้างรวดเร็ว คือ เมื่อเติมสารฟีนอลความเข้มข้นเท่ากับ 0.1 มิลลิโมลาร์ ในชุดทดลองพบว่า สารฟีนอลถูกย่อยสลายอย่างรวดเร็วในวันแรก และต่อมาสารฟีนอลจะค่อยๆ ลดลงในวันที่ 2 จนหมดลงในวันที่ 3 ของการทดลอง ต่อมาทำการเติมสารฟีนอลที่ความเข้มข้นเท่ากับ 0.1 มิลลิโมลาร์ลงไปเป็นครั้งที่ 2 พบว่าเกิดการย่อยสลายได้ภายใน 2 วัน ซึ่งการย่อยสลายสารฟีนอลในชุดทดสอบที่เกิดขึ้นได้อย่างรวดเร็วในการศึกษาครั้งนี้อาจเนื่องจากจุลินทรีย์ที่มีความสามารถนั้นเป็นจุลินทรีย์ที่มีการสัมผัสกับสารฟีนอลในช่วงระยะเวลาหนึ่ง (Basha et al., 2010) และทำการเติมสารฟีนอลความเข้มข้นเท่ากับ 0.3 มิลลิโมลาร์ พบว่าสารฟีนอลถูกย่อยสลายภายในเวลา 5 วันต่อมาและคงเหลือในปริมาณที่ต่ำประมาณ 0.02 มิลลิโมลาร์ รวมทั้งน่าจะมีการเหนี่ยวนำให้เกิดการสร้างเอนไซม์บางชนิดที่สามารถย่อยสลายสารที่มีลักษณะเป็นวงแหวนอะโรมาติกได้ (Alexander, 1994) ซึ่งรวมถึงสารฟีนอลและสารอนุพันธ์ของฟีนอลโดยมีรายงานสนับสนุนของ Nair et al. (2008) กล่าวว่าได้มีรายงานหลายๆ ฉบับที่ศึกษาเกี่ยวกับจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการย่อยสลายสารฟีนอลรวมถึงการทำงานของเอนไซม์ชนิดต่างๆ ซึ่งเอนไซม์เหล่านี้รวมทั้ง Oxygenase, Hydroxylase, Peroxydase, Tyrosinase และ Oxidase เป็นต้น ซึ่งกระบวนการย่อยสลายสารฟีนอลอาจเกิดขึ้นได้ทั้งกระบวนการที่จุลินทรีย์ปล่อยเอนไซม์ออกมาภายนอกเซลล์ หรือการดูดซึมสารเข้าสู่เซลล์เพื่อย่อยสลาย

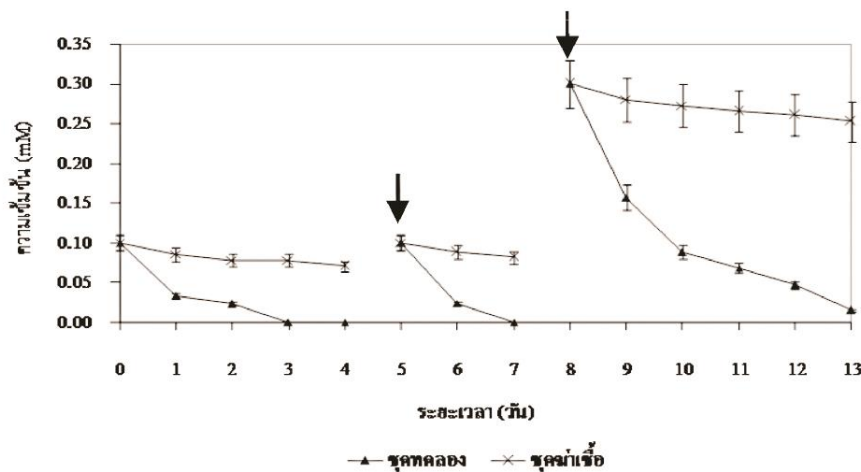
แต่อย่างไรก็ตามประสิทธิภาพในการย่อยสลายสารฟีนอลนั้นขึ้นอยู่กับปริมาณหรือความเข้มข้นของสารตั้งต้นด้วยถ้ามีในปริมาณสูงเกินไปก็สามารถทำให้เกิดกระบวนการยับยั้งโดยสารตั้งต้น (Substrate inhibition) ซึ่งมีผลไปยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ได้ ซึ่งมีรายงานของ Shourian et al. (2009) ที่ได้ทำการศึกษาถึงประสิทธิภาพของ *Pseudomonas* sp. SA01 ในการย่อยสลายสารฟีนอล

พบว่าแบคทีเรียดังกล่าวสามารถย่อยสลายสารฟีนอลได้ที่มีความเข้มข้นต่ำกว่า 1 กรัมต่อลิตร และเมื่อความเข้มข้นของสารฟีนอลเพิ่มสูงขึ้น (มากกว่า 1 กรัมต่อลิตร) พบว่าสารฟีนอลมีผลไปยับยั้งการเจริญของ *Pseudomonas* sp. SA01 รวมทั้งการศึกษาของ Dehkordi et al. (2012) ในการย่อยสลายสารฟีนอลโดยแบคทีเรียจำนวน 2 ไอโซเลท (GSN3 และ GSN5) ที่แยกได้จากดินบริเวณที่ทำเกษตรกรรม โดยเฉพาะเลี้ยงแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีความเข้มข้นของสารฟีนอลเท่ากับ 500 มิลลิกรัมต่อลิตร พบอัตราการเจริญสูงสุดที่ OD เท่ากับ 0.8 และ 0.7 ตามลำดับ และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารฟีนอลเป็น 1,000 และ 2,000 มิลลิกรัม พบว่า GSN3 มีอัตราการเจริญสูงสุดที่ OD เท่ากับ 1.45 และ 0.19 ตามลำดับ ส่วน GSN5 มีอัตราการเจริญสูงสุดที่ OD เท่ากับ 0.98 และ 0.17 ตามลำดับ (Nair et al., 2008) ซึ่งแสดงให้เห็นว่าเมื่อมีปริมาณของสารฟีนอลที่สูงเกินไปแบคทีเรียจะมีอัตราการเจริญที่ลดลง เนื่องจากสารฟีนอลมีผลไปยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียดังกล่าว และในการศึกษาครั้งนี้พบว่าจุลินทรีย์ในดินมีบทบาทสำคัญในการกำจัดสารฟีนอลเมื่อเปรียบเทียบกับชุดฆ่าเชื้อซึ่งมีกลไกการกำจัดคือ กระบวนการทางเคมีและกายภาพพบว่าสามารถกำจัดสารฟีนอลได้เพียงเล็กน้อย โดยสารฟีนอลคงเหลือเท่ากับ 0.07 และ 0.0815 มิลลิโมลาร์ ในวันที่ 4 และ 7 ของการทดลอง ตามลำดับ ต่อมาเติมสารฟีนอลที่ความเข้มข้น 0.3 มิลลิโมลาร์ ลงในชุดฆ่าเชื้อพบว่าในวันสุดท้ายของการทดลองจะมีปริมาณสารฟีนอลคงเหลือเท่ากับ 0.2525 มิลลิโมลาร์

สำหรับการย่อยสลายสารพาราไฮดรอกซีเบนโซเอ โดยมีรายงานของสุบันติต นิมรัตน์ และสุกานดา เกื้อกิจกุล (2546) ที่ได้กล่าวสนับสนุนไว้ว่า จากการศึกษาการย่อยสลายสารพาราไฮดรอกซีเบนโซเอ โดย Mixed culture ภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจนจากตัวอย่างดินตะกอนในนาข้าวและแหล่งน้ำพบว่าการย่อยสลายของสารพาราไฮดรอกซีเบนโซเอจากตัวอย่างตะกอนในนาข้าวเกิดขึ้นได้ดีกว่าที่เกิดขึ้นในตะกอนของแหล่งน้ำ อาจเป็นผลเนื่องมาจากในนาข้าวที่เก็บตัวอย่างดินตะกอนมาใช้ในการใช้คาร์โบฟูรานในการกำจัดเพลี้ยชนิดต่างๆ ซึ่งสารที่ออกฤทธิ์ คือ 2,3-Dihydro-2,2-dimethyl-7-benzofuranol methylcarbamate โดยสารชนิดนี้มีโครงสร้างวงแหวนอะโรมาติก ซึ่งจะทำให้เกิดการเหนี่ยวนำการสร้าง

เอนไซม์ (Enzyme induction) บางชนิดซึ่งส่งผลให้มีการย่อยสลายสารพาราไฮดรอกซีเบนโซเอท ซึ่งมีโครงสร้างเป็นวงแหวนอะโรมาติกได้รวดเร็วกว่าดินตะกอนจากแหล่งน้ำในมหาวิทยาลัยบูรพาที่ไม่มีการเติมสารคาร์โบฟูราน นอกจากนี้แล้วการที่พื้นที่มีการใช้สารโครงสร้างวงแหวนอยู่อาจมีการคัดเลือกกลุ่มจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายด้วยเช่นกัน ซึ่งเอนไซม์ที่ถูกกระตุ้นให้มีการสร้างอาจเป็นเอนไซม์ในกลุ่มที่ทำให้เกิดกระบวนการ Decarboxylation อาทิเช่น เอนไซม์ *p*-hydroxybenzoate decarboxylase และ 3,4-dihydroxybenzoate

decarboxylase เป็นต้น ซึ่งจากรายงานของ Zhang, & Wiegel (1994) รายงานว่าแบคทีเรีย *Clostridium hydroxybenzoicum* มีเอนไซม์ทั้งสองชนิดนี้ในการย่อยสลายสารฟีนอล นอกจากนี้กระบวนการย่อยสลายทางชีวภาพโดยจุลินทรีย์นั้นอาจมีกระบวนการอื่นๆ ที่เข้ามาเกี่ยวข้องนอกจากการเหนี่ยวนำของเอนไซม์ คือ การแลกเปลี่ยนสารพันธุกรรม (Genetic materials) และการพัฒนาความทนต่อความเป็นพิษ เป็นต้น ซึ่งทำให้จุลินทรีย์มีประสิทธิภาพมากขึ้นในการย่อยสลายสารต่างๆ ในสิ่งแวดล้อม

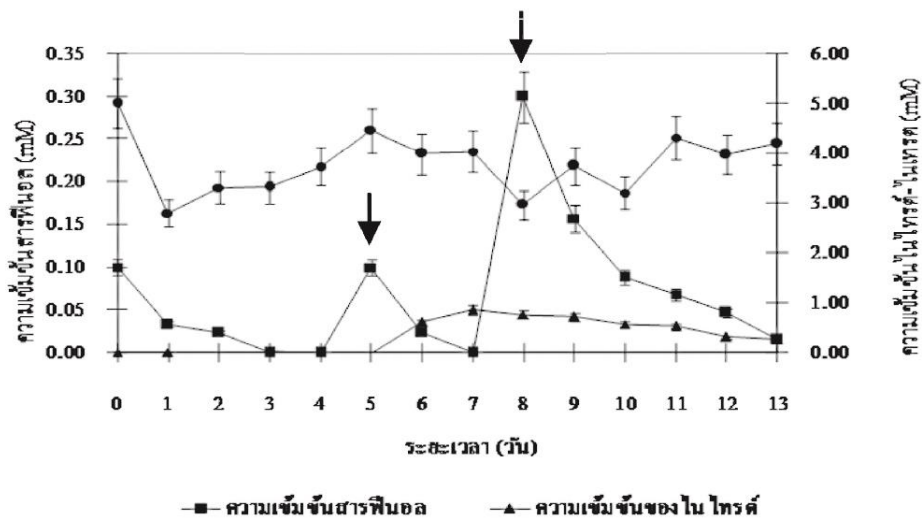


ภาพที่ 3 การย่อยสลายสารฟีนอลความเข้มข้น 0.1 มิลลิโมลาร์ และ 0.3 มิลลิโมลาร์ ภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจนและไนเตรต

หมายเหตุ: ตรงตำแหน่งที่มีลูกศรแสดงการเติมสารฟีนอล

ส่วนการใช้ไนเตรตเป็นตัวรับอิเล็กตรอนตัวสุดท้ายในกระบวนการหายใจแทนออกซิเจน พบว่าจุลินทรีย์ในสารละลายดินตะกอนมีความสามารถในการเปลี่ยนไนเตรตให้เป็นไนไตรต์ สังเกตได้จากการที่ปริมาณไนเตรตจะลดลงและมีปริมาณไนไตรต์เพิ่มขึ้น โดยมีการเพิ่มขึ้นและลดลงของปริมาณสารทั้งสองชนิดตลอดเวลา (ภาพที่ 4) ซึ่งจากการทดลองการย่อยสลายสารฟีนอลภายใต้สภาวะที่ไม่มีทั้งออกซิเจนและไนเตรต ทำให้จุลินทรีย์มีตัวรับอิเล็กตรอนตัวสุดท้าย 2 ตัวคือ ออกซิเจนเป็นตัวรับอิเล็กตรอนตัวสุดท้ายในกระบวนการที่มีออกซิเจน และไนเตรตเป็นตัวรับอิเล็กตรอนตัวสุดท้ายในกระบวนการที่ไร้ออกซิเจน ทั้งนี้พบว่าในชุดทดลองมีสารพาราไฮดรอกซีเบนโซเอทเกิดขึ้นในวันที่ 3, 6 และ 9

ของการทดลอง โดยมีความเข้มข้นน้อยกว่า 0.01 มิลลิโมลาร์ (ตารางที่ 1) จากผลการศึกษานี้สามารถสรุปได้ว่าจุลินทรีย์ในดินตะกอนสามารถย่อยสลายสารฟีนอลให้เป็นสารพาราไฮดรอกซีเบนโซเอท รวมทั้งน่าจะสามารถย่อยสลายสารพาราไฮดรอกซีเบนโซเอทให้มีปริมาณที่ไม่สูงนักเท่ากับ 0.01 มิลลิโมลาร์ และสอดคล้องกับการศึกษาของ Zhang, & Wiegel (1994) ที่พบว่า *Clostridium hydroxybenzoicum* สามารถย่อยสลายสารฟีนอลให้เป็นสารพาราไฮดรอกซีเบนโซเอทได้เช่นกัน รวมทั้งไม่พบว่ามีสารพาราไฮดรอกซีเบนโซเอทเกิดขึ้นจึงเป็นการยืนยันถึงความสามารถของจุลินทรีย์ในการย่อยสลายสารฟีนอลให้เป็นสารพาราไฮดรอกซีเบนโซเอทไม่ใช่เกิดจากกระบวนการทางเคมีและกายภาพนั่นเอง



**ภาพที่ 4** ปริมาณไนโตรเจนและปริมาณไนโตรเจนระหว่างทำการทดลองการย่อยสลายสารฟีนอล ความเข้มข้น 0.1 มิลลิโมลาร์ และ 0.3 มิลลิโมลาร์ ภายใต้สภาวะที่มีทั้งออกซิเจนและไนโตรเจน  
**หมายเหตุ:** ตรงตำแหน่งที่มีลูกศรแสดงการเติมสารฟีนอล

**ตารางที่ 1** ปริมาณสารพาราไฮดรอกซีเบนโซเอทในชุดทดลองและชุดฆ่าเชื้อในวันสุดท้าย

| สารพาราไฮดรอกซีเบนโซเอท    | ชุดทดลอง                  | ชุดฆ่าเชื้อ |
|----------------------------|---------------------------|-------------|
| ปริมาณสาร                  | น้อยกว่า 0.01 มิลลิโมลาร์ | -           |
| ปริมาณก๊าซบริเวณ Headspace | -                         | -           |

**หมายเหตุ:** - หมายถึง ตรวจไม่พบ

#### 4. สรุปผลการวิจัย

จากการตรวจสอบโดยการนำดินตะกอนจากนาข้าวในอำเภอบ่อทอง จังหวัดชลบุรี มาตรวจวัดสารต่างๆ และศึกษาการย่อยสลายสารฟีนอลโดยจุลินทรีย์ในสารละลายดินตะกอนภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจนและไนโตรเจน พบว่าในดินตะกอนมีปริมาณไนโตรเจนและไนโตรเจนเท่ากับ 0.031 และ 0.028 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ โดยไม่พบสารฟีนอลและสารพาราไฮดรอกซีเบนโซเอท เมื่อศึกษาการย่อยสลายสารฟีนอลโดยจุลินทรีย์ในสารละลายดินตะกอนจากการเติมสารฟีนอลความเข้มข้น 0.1 มิลลิโมลาร์ ในวันเริ่มต้นการทดลอง (วันที่ 0) พบว่าสารฟีนอลถูกย่อยสลายได้ภายในเวลา 3 วัน ส่วนการเติมสารฟีนอลความเข้มข้น 0.3 มิลลิโมลาร์ ใช้เวลาในการย่อยสลาย 6 วัน สำหรับชุดฆ่าเชื้อสารฟีนอลมีความ

เข้มข้นลดลงเล็กน้อย โดยในวันที่ 4 และ 7 ของการทดลอง ความเข้มข้นของสารฟีนอล 0.1 มิลลิโมลาร์ พบว่าสารฟีนอลลดลงเหลือเท่ากับ 0.07 และ 0.0815 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ ส่วนสารฟีนอล ณ ความเข้มข้น 0.3 มิลลิโมลาร์ มีความเข้มข้นในวันสุดท้ายของการทดลองเท่ากับ 0.2525 มิลลิโมลาร์ และการใช้ไนโตรเจนเป็นตัวรับอิเล็กตรอนตัวสุดท้ายในกระบวนการหายใจแทนออกซิเจนพบว่าจุลินทรีย์ในสารละลายดินตะกอนมีความสามารถในการใช้ไนโตรเจนได้บางส่วนและสะสมในรูปของไนไตรต์ สังเกตได้จากการที่ปริมาณไนโตรเจนจะลดลง ในขณะที่มีปริมาณไนโตรเจนเพิ่มขึ้นทั้งนี้พบว่าในชุดทดลองมีสารพาราไฮดรอกซีเบนโซเอท เกิดขึ้นในวันที่ 3, 6 และ 9 ของการทดลอง ซึ่งมีความเข้มข้นน้อยกว่า 0.01 มิลลิโมลาร์ แต่ไม่พบสารพาราไฮดรอกซี-

เบนโซเอทในชุดฆ่าเชื้อ และไม่พบปริมาณก๊าซเกิดขึ้น ทั้งในชุดทดลองและชุดฆ่าเชื้อ แสดงว่าสารฟีนอลเกิดการย่อยสลายไม่สมบูรณ์จึงไม่มีก๊าซเกิดขึ้นแต่อาจมีการสะสมในรูปอื่น

จากการศึกษาสามารถสรุปได้ว่าจุลินทรีย์ในดินตะกอนจากนาข้าวในอำเภอบ่อทอง จังหวัดชลบุรี มีความสามารถย่อยสลายสารฟีนอลและเปลี่ยนเป็นสารพาราไฮดรอกซีเบนโซเอท รวมทั้งสามารถย่อยสลายสารพาราไฮดรอกซีเบนโซเอทแต่ไม่สามารถย่อยสลายได้อย่างสมบูรณ์ นอกจากนี้ถ้ามีการปนเปื้อนของสารฟีนอลด้วยความเข้มข้นที่มากขึ้นจะทำให้ระยะเวลาในการย่อยสลายสารฟีนอลเพิ่มขึ้น ดังนั้นสรุปได้ว่าจุลินทรีย์ในดินตะกอนจากนาข้าวสามารถย่อยสลายสารฟีนอลและสารพาราไฮดรอกซีเบนโซเอทในความเข้มข้น 0.1 และ 0.3 มิลลิโมลาร์ แต่ควรมีการตระหนักถึงการปนเปื้อนด้วยสารฟีนอลหรือสารพาราไฮดรอกซีเบนโซเอทด้วยความเข้มข้นที่สูงเพราะน่าจะมีการสะสมของสารทั้ง 2 ชนิดในดินตะกอนจากนาข้าวในอำเภอบ่อทอง จังหวัดชลบุรี เป็นเวลานานขึ้นซึ่งจะทำให้เกิดผลกระทบต่อคนที่ต้องสัมผัสกับบริเวณดังกล่าวที่ปนเปื้อนด้วยสารฟีนอลหรือสารพาราไฮดรอกซีเบนโซเอท

## 5. กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณภาควิชาจุลชีววิทยาและภาคชีววาริชศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ที่ให้ความอนุเคราะห์อุปกรณ์และสถานที่ในการทำวิจัยในครั้งนี้

## เอกสารอ้างอิง

มนัส สุวรรณ (2532) *นิเวศวิทยากับการพัฒนาเศรษฐกิจ*. กรุงเทพฯ: โอเดียนสโตร์.

สุภัณฑิต นิมรัตน์ และสุกานดา เกื้อกิจกุล (2546) การย่อยสลาย *p*-Hydroxybenzoate โดยใช้ mixed culture ภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจน. *การประชุมวิชาการ ครั้งที่ 41 มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ, วันที่ 3 - 5 กุมภาพันธ์ 2546*.

Association of Official American Chemists [AOAC]. (2002). Official methods of analysis. Association of Official American Chemists, MD.

Basha, K.M., Rajendran, A., & Thangavelu, V. (2010). Recent advances in the biodegradation of phenol: A review. *Asian Journal of Experimental Biological Science*, 1 (2), 219 - 234.

Bertani, I., Kojic, M., & Venturi, V. (2001). Regulation of the *p*-hydroxybenzoic acid hydroxylase gene (*pobA*) in plant-growth-promoting *Pseudomonas putida* WC358. *Microbiology*, 147, 1611 - 1620.

Caflan Karasu Benli, A., Sarikaya, R., Sepici-Dincel, A., Selvi, M., Sahin, D., & Erkoc, F. (2007). Investigation of acute toxicity of (2,4-dichlorophenoxy) acetic acid (2,4-D) herbicide on crayfish (*Astacus leptodactylus* Esch. 1823). *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 88, 296 - 299.

Chakraborty, S., Bhattacharya, T., Pael, T.N., & Tiwari, K.K. (2010). Biodegradation of phenol by native microorganism isolated from coke processing wastewater. *Journal of Environmental Biology*, 31, 293 - 296.

Chen, Y.-X., Liu, H., & Chen, H.-L. (2003). Characterization of phenol biodegradation by *Comamonas testosteroni* ZD4-1 and *Pseudomonas aeruginosa* ZD4-3. *Biomedical and Environmental Science*, 16, 163 - 172.

Dehkordi, F.N., Gharavi, S., & Soudi, M.R. (2012). Phenol Biodegradation by Two Bacterial Isolates from Agricultural Soil. *Congress Portal for Ardabil University of Medical Sciences, The 13<sup>th</sup> Iranian & The Second International Congress of Microbiology*.

Gayathri, K.V. & Vasudevan, N. (2010). Enrichment of phenol degrading moderately halophilic bacteria consortium from saline environment, *Journal of Bioremediation & Biodegradation*, 1 (1), 1 - 6.



- Healy, J.B. & Young, L.Y. (1979). Anaerobic biodegradation of eleven aromatic compounds to methane. *Applied and Environmental Microbiology*, 38 (1), 84 - 89.
- Latha, S. & Mahadevan, A. (1997). Review: Role of rhizobia in the degradation of aromatic substances. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 13, 601 - 607.
- Mutzel, A., Reinscheid, U.M., Antranikian, G., & Muller, R. (1996). Isolation and characterization of a thermophilic bacillus strain, that degrades phenol and cresol as sole carbon source at 70°C. *Applied Microbiol Biotechnol*, 46, 593 - 596.
- Nair, C.I., Jayachadran, K., & Shashidhar, S. (2008). Biodegradation of phenol. *African Journal of Biotechnology*, 7 (25), 4951 - 4958.
- Nakazawa, H., Takahashi, N., Inoue, K., Ito, Y., Goto, T., Kato, K., Yoshimura, Y., & Oka, H. (2004). Rapid and simultaneous analysis of dichlorvos, malathion, carbaryl, and 2,4-dichlorophenoxy acetic acid in citrus fruit by flow-injection ion spray ionization tandem mass spectrometry. *Talanta*, 64, 899 - 905.
- Riazika, B., Abbes, B., Messaoud, C., & Soufi, K. (2010). Phenol and benzoic acid degradation by *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Water Resource and Protection*, 2, 788 - 791.
- Sarikaya, R. & Selvi, M. (2005). Investigation of acute toxicity of (2,4-dichlorophenoxy) acetic acid (2,4-D) herbicide on larvae and adult Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.). *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 20, 264 - 268.
- Schwarzenbach, R.P., Gschwend, P.M., & Imboden, D.M. (1993). *Environmental organic chemistry* (1<sup>st</sup> ed). New York: John Wiley & Sons, Inc.
- Shourian, M., Noghabi, K.A., Zahiri, H.S., Bagheri, T., Karballaei, G., Mollaei, M., Rad, I., Ahadi, S., Raheb, J., & Abbasi, H. (2009). Efficient phenol degradation by a newly characterized *Pseudomonas* sp. SA01 isolated from pharmaceutical wastewaters. *Desalination*, 246 (3), 577 - 594.
- Stickland, J.D.H. & Parson, T.R. (1972). *A practical handbook of seawater analysis* (2<sup>nd</sup> ed.). Ottawa: Fisheries Research Board of Canada Bulletin.
- Trabue, S.L., Ogram, A.V., & Ou, L.-T. (2001). Dynamics of carbofuran-degrading microbial communities in soil during three successive annual applications of carbofuran. *Soil Biology & Biochemistry*, 33, 75 - 81.
- van Schie, P.M. & Young, L.Y. (1998). Isolation and characterization of phenol-degrading denitrifying bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 64 (7), 2432 - 2438.
- Varsha, Y.M., Deepthi CH, N., & Chenna, S. (2011). An emphasis on xenobiotic degradation in environmental clean up. *Journal of Boiremediation & Biodegradation*, 11, 1 - 10.
- Zhang, X. & Wiegel, J. (1994). Reversible conversion of 4 - hydroxybenzoate and phenol by *Clostridium hydroxybenzoicum*. *Applied and Environmental Microbiology*, 60 (11), 4128 - 4185.