การย่อยสลายฟีนอลในดินตะกอนภายใต้สภาวะที่ใช้ออกซิเจน

Biodegradation of Phenol in Sediment-Slurry under Aerobic Condition

วีรญา ทรัพย์วิลาวรรณ
นิสิตภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา
พีรพัฒน์ สุพรรณพันธุ์
นิสิตภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา
รองศาสตราจารย์ ดร.สุบัณฑิต นิ่มรัตน์ Ph.D. (Environmental Science)
ภาควิชาจุลชีววิทยาและโครงการวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา
รองศาสตราจารย์ ดร.วีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย Ph.D. (Aquaculture)
อาจารย์ประจำภาควิชาวาริชศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

บทคัดย่อ

ในการศึกษาครั้งนี้ศึกษาถึงการย่อยสลายฟีนอลภายใต้สภาวะที่ใช้ออกซิเจนด้วยสารละลายดินตะกอนจากนาข้าว ซึ่งพบว่า มีการปนเปื้อนด้วยไนเทรต (0.031 มิลลิโมลาร์) ไนไทรต์ (0.028 มิลลิโมลาร์) แต่ไม่ปนเปื้อนด้วยฟีนอลและสารพาราไฮดรอกซีเบนโซเอต เมื่อทำการเติมฟีนอลความเข้มข้น 0.1 มิลลิโมลาร์ ที่เติมครั้งแรก (วันที่ 0) และครั้งที่ 2 (วันที่ 6) ลงไปในชุดทดลองผลการศึกษาพบว่าจุลินทรีย์ในสารละลายดินตะกอนสามารถย่อยสลายฟีนอลได้หมดภายในเวลา 2 วันเท่ากัน ส่วนเมื่อเติมฟีนอลความเข้มข้น 0.3 มิลลิโมลาร์ พบว่า เกิดการย่อยสลายจนหมดภายในระยะเวลา 5 วัน นอกจากนั้นยังพบการเกิดก๊าซในชุดทดลองเมื่อเติมฟีนอลความเข้มข้น 0.1 มิลลิโมลาร์ ในครั้งแรกในวันที่ 1 ของการทดลอง และลดลงตามระยะเวลาของการทดลอง และเมื่อทำการคัดแยกจุลินทรีย์ในดินตะกอนจากชุดทดลองคือ *Bacillus* sp.

คำสำคัญ: ฟีนอล/การย่อยสลาย/ดินตะกอน/*Bacillus* sp.

Abstract

Biodegradation of phenol in sediment-slurry sample from rice paddy was investigated under aerobic condition in this study. These slurry samples were contaminated with nitrate (0.031 mM), nitrite (0.028 mM) but not with phenol or *p*-hydroxybenzoate. In active experiment, 0.1 mM of phenol applied at the rst time (day 0) and the second time (day 6) was completely biodegraded within 2 days. When 0.3 mM of phenol was reapplied in all treatments, the chemical was completely biodegraded within 5 days of the experiment. The gas production was monitored in the active experiment with 0.1 mM of phenol at the first day of the experiment and then it decreased all along the experiment. *Bacillus* sp. was isolated and identified from active treatments containing sediment-slurry from rice paddy under aerobic conditions.

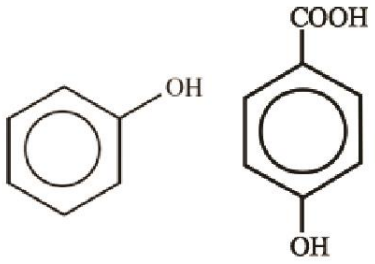
Keywords: Phenol/Biodegradation/ Sediment-slurry/*Bacillus* sp.

1. บทนำ

ปัจจุบันประเทศไทยและประเทศต่างๆ ได้มีการขยายตัวทางอุตสาหกรรมและเกษตรกรรมมากขึ้นส่งผลให้มีการใช้สารเคมีเพิ่มมากขึ้นโดยเฉพาะอย่างยิ่งสารเคมีในกลุ่มอะโรมาติก ในด้านเกษตรกรรมจะมีการใช้สารอะโรมาติกในรูปของยาฆ่าศัตรูพืช เพื่อการควบคุมศัตรูพืช เช่น สารฆ่าแมลง สารฆ่าเชื้อรา และสารปราบวัชพืช เป็นต้น (มนัส สุวรรณ, 2532) โดยมักพบการใช้สาร 2,4-ไดคลอโรฟีนอกซีอะเซติกแอซิด (2,4-dichlorophenoxyacetic acid; 2,4-D) และ 2,4,5 ไตรคลอโรฟีนอกซีอะเซติกแอซิด (2,4,5 trichlorophenoxyacetic acid; 2,4,5-T) ซึ่งสารทั้งสองชนิดนี้จัดอยู่ในกลุ่มฟีนอกซีอัลคิลคาร์บอกซีลิกแอซิด (Phenoxyalkyl carboxylic acid) มีการใช้กันอย่างแพร่หลายและพบการตกค้างอยู่ในสิ่งแวดล้อมได้เป็นเวลานาน โดย (2,4-D) มีระยะเวลาความคงทนนานถึง 2 - 8 สัปดาห์ ส่วน (2,4,5-T) มีความคงทนได้นานถึง 5 - 11 สัปดาห์ (สมศักดิ์ วังใน, 2528)

ส่วนในด้านอุตสาหกรรมพบว่า มีการใช้สารเคมีได้ทั่วไปในโรงงานอุตสาหกรรมต่างๆ เช่น อุตสาหกรรมผลิตกระดาษ อุตสาหกรรมอัลลอยด์ อุตสาหกรรมสี อุตสาหกรรมชุบโลหะ อุตสาหกรรมการฟอกหนัง อุตสาหกรรมปิโตรเลียม อุตสาหกรรมฟีนอลิก-เรซิน และอุตสาหกรรมต่างๆ อีกมากมาย เป็นต้น จากการใช้สารเคมีในกลุ่มอะโรมาติกอย่างกว้างขวาง ทำให้เกิดการปนเปื้อนของสารประกอบในกลุ่มอะโรมาติก อาทิ สารประกอบฟีนอลเป็นจำนวนมากในสิ่งแวดล้อม โดยน้ำทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรมเหล่านี้จะมีสารประกอบฟีนอลปนเปื้อนอยู่ หรือในบางโรงงานจะมีการเติมฟีนอลลงไปในน้ำทิ้งเพื่อเป็นการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ (Mutzel, Reinscheid, Antranikian, & Muller, 1996)

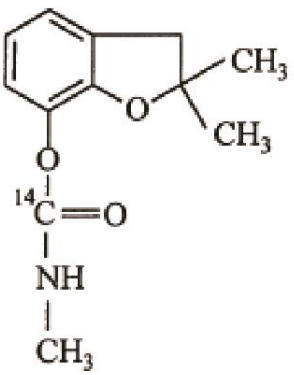
การสะสมของฟีนอลและสารประกอบฟีนอลในสิ่งแวดล้อมเป็นเวลานานจะทำให้เป็นอันตรายต่อสิ่งมีชีวิตในระบบนิเวศ รวมทั้งทำให้ดินเสื่อมโทรมลง (สมศักดิ์ วังใน, 2528) จากผลกระทบที่เกิดขึ้นการศึกษาการย่อยสลายฟีนอลโดยใช้วิธีการทางชีวภาพ เพื่อเป็นทางเลือกหนึ่งในการลดการตกค้างของสารเคมีจากการใช้สารเร่งการสลายตัวของฟีนอลและช่วยประหยัดค่าใช้จ่ายการย่อยสลายฟีนอล โดยมีการศึกษาการใช้จุลินทรีย์ในการย่อยสลายฟีนอลและสารตัวกลาง (Intermediate) ที่เกิดขึ้นจากการย่อยสลายฟีนอลที่มักพบจากการ Biotransformation ของฟีนอล คือ สารพาราไฮดรอกซีเบนโซเอต (*p*-hydroxybenzoate) (Zhang, & Wiegel, 1994) ซึ่งมีโครงสร้างทางเคมีแสดงในภาพที่ 1a และ 1b



(a) (b)

ภาพที่ 1 โครงสร้างทางเคมีของ (a) ฟีนอล (Nair, Jayachadran, & Shashidhar, 2008) และ (b) สารพาราไฮดรอกซีเบนโซเอต (Bertani, Kojic, & Venturi, 2001)

ดังนั้น ในงานวิจัยครั้งนี้จึงได้ทำการศึกษาการย่อยสลายสารประกอบฟีนอลภายใต้สภาวะที่ใช้ออกซิเจนในดินตะกอนจากนาข้าวที่มีการใช้สารฆ่าแมลงชนิดคาร์โบฟูแรน (Carbofuran) ที่เป็นสารประกอบอะโรมาติก (ภาพที่ 2) เพื่อทำให้ทราบถึงความสามารถในการย่อยสลายฟีนอลของกลุ่มจุลินทรีย์ที่อยู่ในดินตะกอนจากนาข้าวในอำเภอบ่อทอง จังหวัดชลบุรี



ภาพที่ 2 โครงสร้างทางเคมีของสารฆ่าแมลงชนิดคาร์โบฟูแรน (Trabue, Ogram, & Ou, 2001)

2. วิธีดำเนินการวิจัย

2.1 การเก็บตัวอย่าง

เก็บตัวอย่างดินตะกอนจากนาข้าวในอำเภอบ่อทอง จังหวัดชลบุรีที่มีการใช้สารฆ่าแมลงชนิดคาร์โบฟูแรน (โครงสร้างทางเคมีแสดงในภาพที่ 2) ตามวิธีการของสุบัณฑิต นิ่มรัตน์ และสุกานดา เกื้อกิจกูล (2546) โดยเก็บตัวอย่างจำนวน 5 จุด ที่ระดับความลึก 1 - 10 เซนติเมตร ด้วยใช้อุปกรณ์เก็บตัวอย่าง (Grab Sampler) จากนั้นนำดินตะกอนใส่ลงในขวดและปิดฝาหลวมๆ เก็บที่อุณหภูมิห้องจนกว่าจะทำการทดลองต่อไป

2.2 การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเกลือน้อย (Defined Minimal Salt Medium; DMSM)

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ DMSM ตามวิธีการของ Healy, & Young (1979) ประกอบด้วยส่วนประกอบหลัก 3 ส่วน คือ (1) สารละลายเกลือ (กรัมต่อลิตร) ประกอบด้วย KCl = 1.3, KH_2PO_4 = 0.2, NaCl = 23.0, NH_4Cl = 0.5, $CaCl_2.H_2O$ = 0.1 และ $MgCl_2.6H_2O$ = 1.3 (2) สารละลายเกลือน้อยมาก (Trace Salt) (กรัมต่อลิตร) ประกอบด้วย $CoCl_2.H_2O$ = 2.2, $CuCl_2$ = 0.01, H_3BO_3 = 0.38, $MnCl_2.4H_2O$ = 1.333, $Na_2MoO_4.2H_2O$ = 0.167 และ $ZnCl_2$ = 0.14 และ (3) สารละลายวิตามิน (มิลลิกรัมต่อลิตร) ประกอบด้วยวิตามิน B_{12} = 1, Biotin = 20, Folic acid = 20, Nicotinic acid = 50, *p*-aminobenzoic acid = 50, Pantothenic acid = 50, Pyridoxine HCl = 100, Riboavin = 50, Thiamin = 50 และ Thiotic = 50 ทำการเตรียมสารละลายแต่ละประเภทแยกกันโดยที่สารละลายเกลือนำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ส่วนสารละลายเกลือ Trace Salt สารละลายวิตามิน และสารละลายไบคาร์บอเนตทำให้ปราศจากเชื้อโดยกรองผ่านกระดาษกรองขนาด 0.45 ไมโครเมตร จากนั้นนำส่วนสารละลายเกลือมาเติมสารละลาย Trace Salt ปริมาตร 5 มิลลิลิตร สารละลายวิตามินปริมาตร 1 มิลลิลิตร และสารละลายไบคาร์บอเนต ปริมาณ 29.8 กรัม

2.3 การศึกษาการย่อยสลายฟีนอลโดยจุลินทรีย์ในสารละลายดินตะกอน

ทำการศึกษาการย่อยสลายฟีนอลโดยจุลินทรีย์ในสารละลายดินตะกอนตามวิธีการของ van Schie, & Young (1998) โดยนำขวดซีรัมขนาด 60 มิลลิลิตร จำนวน 7 ขวด มาเติมน้ำเกลือ (Normal Saline Solution; NSS) ซึ่งใช้เป็นสารละลายตะกอน (10% w/v) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร จากนั้นแบ่งขวดซีรัมออกเป็น 3 ชุดการทดลองคือ (1) ชุดทดลอง (Active) เติมสารละลายไบคาร์บอเนต ปริมาตร 1.49 มิลลิลิตร DMSM ปริมาตร 42.71 มิลลิลิตร สารละลายวิตามิน ปริมาตร 0.05 มิลลิลิตร สารละลาย trace salt ปริมาตร 0.25 มิลลิลิตร ฟีนอลความเข้มข้น 0.1 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร (2) ชุดฆ่าเชื้อ (Sterile) จำนวน 2 ขวด โดยเติม DMSM ปริมาตร 42.71 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อและทิ้งให้เย็น จำนวน 3 ครั้ง จากนั้นเติมสารละลายไบคาร์บอเนต ปริมาตร 1.49 มิลลิลิตร สารละลายวิตามิน ปริมาตร 0.05 มิลลิลิตร สารละลาย Trace Salt 0.25 มิลลิลิตร ฟีนอลความเข้มข้น 0.1 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร และ (3) ชุดควบคุม (Background) จำนวน 2 ขวด โดยเติม DMSM ปริมาตร 43.21 มิลลิลิตร สารละลายไบคาร์บอเนต ปริมาตร 1.49 มิลลิลิตร สารละลายวิตามิน ปริมาตร 0.05 มิลลิลิตร สารละลาย Trace salt ปริมาตร 0.25 มิลลิลิตร จากนั้นปิดฝาให้สนิทด้วยจุกยางและฝาอลูมิเนียม ต่อมานำมาทำการปรับความดันในส่วนอากาศเหนือสารละลายในขวดทดลอง (Headspace) ให้เท่ากับศูนย์ด้วยหลอดฉีดยาชนิดแก้ว จากนั้นนำชุดการทดลองทั้ง 3 ชุดไปบ่มที่อุณหภูมิห้องในสภาวะที่ไม่มีแสง และวัดปริมาณฟีนอล สารพาราไฮดรอกซีเบนโซเอต ไนเทรต และไนไทรต์ และทำการเติมฟีนอลความเข้มข้น 0.1 มิลลิโมลาร์ในครั้งที่ 2 โดยเติมหลังจากการตรวจวัดปริมาณฟีนอลและพบว่า ไม่มีฟีนอลคงเหลือจากที่เติมในครั้งแรก ต่อมาเติมความเข้มข้นของฟีนอลเป็น 0.3 มิลลิโมลาร์ ในครั้งที่ 3 หลังจากการตรวจวัดปริมาณฟีนอลและพบว่า ไม่มีฟีนอลคงเหลือจากที่เติมในครั้งที่ 2

2.4 วิธีการวิเคราะห์ปริมาณฟีนอล สารพาราไฮดรอกซีเบนโซเอต และก๊าซ

ทำการวิเคราะห์ปริมาณฟีนอล สารพาราไฮดรอกซีเบนโซเอต และก๊าซ ตามวิธีการของ Nimrat (2000) โดยนำขวดทดลองทั้งหมดมาทำการตรวจวัดปริมาณก๊าซทั้งหมดที่เกิดขึ้นโดยใช้หลอดฉีดยาชนิดแก้วถ้ามีก๊าซเกิดขึ้นจะดันกระบอกสูบขึ้นและอ่านปริมาณก๊าซที่ได้เป็นมิลลิลิตร และต่อมานำสารละลายในขวดซีรัมปริมาตร 1 มิลลิลิตร มาปั่นแยกตะกอนที่ความเร็ว 18,000xg เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำส่วนใสของสารละลายมากรองด้วยกระดาษกรองขนาด 0.45 ไมโครเมตร และนำส่วนใสที่กรองได้ไปวิเคราะห์

ปริมาณฟีนอล สารพาราไฮดรอกซีเบนโซเอต 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 Mobile Phase เป็น Methanol: Water: Glacial Acid (40: 58: 2) และกำหนดอัตราการไหล (Flow Rate) เท่ากับ 1 มิลลิลิตรต่อนาที จากนั้นคำนวณหาความเข้มข้นโดยเทียบกับกราฟมาตรฐาน

2.5 วิธีวิเคราะห์ปริมาณไนเทรต

วิเคราะห์โดยวิธีบรูซีน (Brucine) ตามวิธีการของ Association of Official American Chemists (2002) โดยนำสารละลายที่ต้องการวัดปริมาณ 50 ไมโครลิตร ใส่ในหลอดทดลอง และเจือจางในอัตราส่วน 1 : 40 โดยการเติมน้ำกลั่นหลอดละ 1,950 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปแช่ในน้ำแข็ง โดยเติมโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ปริมาตร 400 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน จากนั้นเติมกรดซัลฟิวริก ปริมาตร 2 มิลลิลิตร นำไปแช่ในน้ำแข็ง และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ (Spectrophotometer) ที่ความยาวคลื่น 410 นาโนเมตร จะได้เป็นค่าแบลงค์ (Blank) ของสารละลายตัวอย่าง จากนั้นจึงนำสารละลายมาแช่น้ำแข็งอีกครั้งหนึ่ง โดยเติมสารละลายบรูซีน กรดซัลฟานิลิก ปริมาตร 100 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากันและนำไปแช่ที่อุณหภูมิไม่ต่ำกว่า 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที และนำมาแช่ในน้ำแข็งอีกครั้งเพื่อลดอุณหภูมิให้ได้อุณหภูมิห้องแล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงอีกครั้ง เมื่อได้ค่าการดูดกลืนแสงครั้งที่ 2 ให้นำมาหักลบออกจากแบลงค์ จะได้ค่าการดูดกลืนแสงที่เกิดจากปฏิกิริยาระหว่างไนเทรตกับบรูซีนในสารละลายตัวอย่างโดยทำการวัดที่ความยาวคลื่น 410 นาโนเมตร

2.6 วิธีการวิเคราะห์ปริมาณไนไทรต์

วิเคราะห์ปริมาณไนไทรต์โดยใช้วิธีไดอาโซไทเซชัน (Diazotization) ตามวิธีการของ Stickland, & Parson (1972) โดยนำสารละลายตัวอย่างมาปริมาตร 800 ไมโครลิตร เจือจางให้ได้อัตราส่วนเป็น 1 : 3 โดยเติมน้ำกลั่นปริมาตร 1,600 ไมโครลิตร ถ้าสารละลายมีสารแขวนลอยอยู่ให้กรองด้วยกระดาษกรองที่มีรูกรองขนาด 0.45 ไมโครเมตร หรือทำการตกตะกอนด้วยอะลูมิเนียมไฮดรอกไซด์ (Al(OH)3) และปรับ pH ให้เป็นกลาง จากนั้นเติมสารเอทิลีนไดอะมีนเตตราอะเซติกแอซิด (Ethylene diamine tetra-acetic 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 ผสมให้เข้ากันจะได้ pH ประมาณ 2.0 - 2.5 ตั้งทิ้งไว้ 10 - 30 นาที จนเกิดสีชมพูแล้วจึงนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร

2.7 การคัดแยกและจัดจำแนกจุลินทรีย์จากดินตะกอน

ทำการคัดแยกและจัดจำแนกจุลินทรีย์จากตัวอย่างดินตะกอนจากนาข้าวตามวิธีการของ Cavallo, & Stabili (2002) และ Stabili, Acquaviva, & Cavallo (2005) โดยนำตัวอย่างดินตะกอนปริมาณ 50 กรัม มาเจือจางแบบ 10 เท่า (10-Fold Dilution) ด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.85% (w/v) ให้มีระดับการเจือจางที่เหมาะสม จากนั้นปิเปตสารละลายดินตะกอนปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ (Plate Count Agar) ระดับการเจือจางละ 3 ซ้ำ และทำการเกลี่ยตัวอย่างด้วยเทคนิคสเปรดเพลท (Spread Plate Technique) นำจานอาหารเพาะเชื้อไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 - 48 ชั่วโมง

จากนั้นนำโคโลนีที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อไปตรวจสอบลักษณะสัณฐานวิทยาบนอาหารเลี้ยงเชื้อ DMSM และ Tryptic Soy Agar (TSA) และลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ รวมทั้งทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีเบื้องต้น ได้แก่ Catalase Test, Oxidase Test, Indole Production Test, Citrate Utilization Test, Motility Test, Urease Test, H_2S Production Test, Nitrate Reduction Test และ OF-Glucose Test เพื่อจัดจำแนกชนิดแบคทีเรียตาม Bergey's Manual of Systematic Bacteriology และ Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (Krieg, & Holt, 1984, Holt, Krieg, Sneath, Staley, & Williams, 1994)

3. ผลการวิจัยและอภิปรายผล

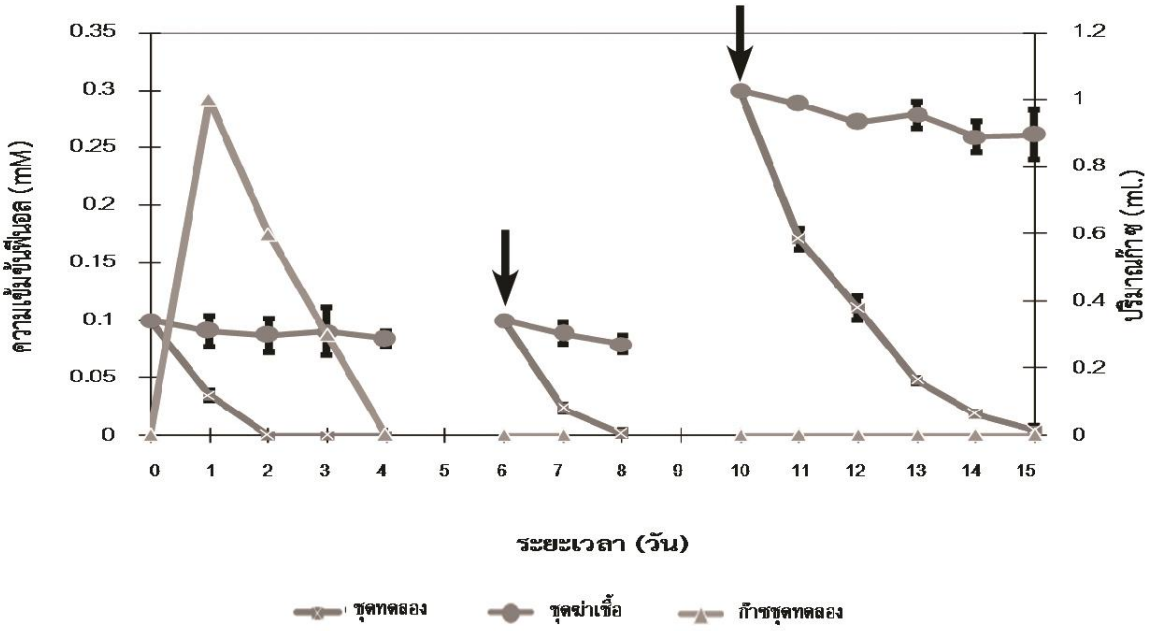
จากการศึกษาการย่อยสลายฟีนอลภายใต้สภาวะที่ใช้ออกซิเจนโดยจุลินทรีย์ในดินตะกอนจากสารละลายดินตะกอนของนาข้าว บริเวณอำเภอบ่อทอง จังหวัดชลบุรี ที่มีการปนเปื้อนของไนเทรตและไนไทรต์ เท่ากับ 0.031 และ 0.028 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ โดยไม่พบฟีนอลและพาราไฮดรอกซีเบนโซเอต ซึ่งพบว่า ในชุดทดลองที่เติมฟีนอลในปริมาณเท่ากับ 0.1 มิลลิโมลาร์ ทั้ง 2 ครั้ง (วันที่ 0 และ 6) ในชุดที่มีดินตะกอนจากนาข้าวพบว่า เกิดการลดลงอย่างรวดเร็วของฟีนอลและไม่สามารถวัดได้ในวันที่ 2 ของการทดลอง ส่วนชุดการทดลองที่มีการเติมฟีนอลในปริมาณเท่ากับ 0.3 มิลลิโมลาร์ มีการลดลงอย่างรวดเร็วในช่วง 2 วันแรกของการทดลองและค่อยๆ ลดลงจนไม่สามารถวัดได้ในวันที่ 5 ของการทดลอง ซึ่งแสดงให้เห็นว่า เมื่อมีความเข้มข้นของฟีนอลในระดับต่ำๆ จะเกิดการย่อยสลายได้เร็วกว่าเมื่อมีความเข้มข้นที่สูงขึ้นและสอดคล้องกับการศึกษาการย่อยสลายฟีนอลและสารประกอบของฟีนอลของ *Pseudomonas putida* EKII ที่แยกได้จากดินในแหล่งเกษตรกรรม พบว่า *Pseudomonas putida* EKII สามารถย่อยสลายฟีนอลที่ความเข้มข้น 0.2 กรัมต่อลิตร (2.12 มิลลิโมลาร์) ถึง 1.0 กรัมต่อลิตร (10.6 มิลลิโมลาร์) แต่ที่ความเข้มข้นของฟีนอลสูงกว่านี้ *Pseudomonas putida* EKII ไม่สามารถย่อยสลายฟีนอลได้ เนื่องจากความเข้มข้นของฟีนอลที่สูงนี้จะทำให้เซลล์ของ *Pseudomonas putida* EKII ตาย (Cavallo, & Stabili, 2002) โดยจะทำให้โปรตีนและเอนไซม์ของ *Pseudomonas putida* EKII เสียสภาพ นอกจากนั้นยังทำลายโปรตีนที่เยื่อหุ้มเซลล์ (Cell Membrane) และขัดขวางกระบวนการละลายของชั้นไขมันที่เยื่อหุ้มเซลล์เป็นผลให้บทบาทการเป็นสิ่งขัดขวางการเกิดออสโมซิส (Osmotic Barrier) ลดลงเซลล์จึงตายได้ (บัญญัติ สุขศรีงาม, 2534) โดย Bayly and Wigmore (Bayly, & Wigmore, 1972) ได้กล่าวไว้ว่า แบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายฟีนอลที่ความเข้มข้น 2.5 มิลลิโมลาร์ ซึ่งในการย่อยสลายสารดังกล่าวแบคทีเรียจะต้องมีความสามารถในการทนต่อฟีนอลและต้องมีโครงสร้างที่เอื้ออำนวยต่อสภาวะที่มีฟีนอล ทั้งนี้บริเวณนาข้าวเป็นพื้นที่เกษตรที่มีใช้ยาปราบศัตรูพืช ตลอดจนปุ๋ยเคมี ซึ่งสารเหล่านี้อาจมีฟีนอลเป็นส่วนประกอบหรือเกิดการเปลี่ยนสภาพให้เป็นฟีนอลในสิ่งแวดล้อม และอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้เป็นอาหาร DMSM (Bayly, & Wigmore, 1972) ซึ่งมีสารฟีนอลเป็นแหล่งคาร์บอนเพียงชนิดเดียว ดังนั้น จุลินทรีย์ในดินตะกอนอาจย่อยสลายฟีนอลให้เปลี่ยนเป็นก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์รวมกับก๊าซชนิดอื่นๆ และน้ำ ตามหลักการการย่อยสลายแบบสมบูรณ์ (Cemiglia, 1992) และจากการย่อยสลายฟีนอลที่เกิดขึ้นได้อย่างรวดเร็วแสดงว่า จุลินทรีย์มีความเคยชินกับฟีนอล หรือสารในกลุ่มที่มีโครงสร้างใกล้เคียงกับฟีนอลทำให้จุลินทรีย์ใช้ระยะเวลาในการปรับตัว (Acclimation Period) สั้นมาก (Basha, Rajendran, & Thangavelu, 2010) ทำให้การย่อยสลายเกิดได้เร็ว รวมทั้งพบว่า ชุดฆ่าเชื้อจากการเติมฟีนอลความเข้มข้น 0.1 มิลลิโมลาร์ ในวันที่ 0 ของการทดลอง พบว่าปริมาณฟีนอลมีการเปลี่ยนแปลงเล็กน้อย โดยในวันที่ 4 ของการทดลองพบฟีนอลมีความเข้มข้นลดลงเท่ากับ 0.07 มิลลิโมลาร์ และเมื่อเติมฟีนอลความเข้มข้น 0.1 มิลลิโมลาร์ลงไปอีกครั้งในวันที่ 6 ของการทดลองพบว่า ในวันที่ 8 ของการทดลองฟีนอลมีความเข้มข้นลดลงเล็กน้อยเท่ากับ 0.08 มิลลิโมลาร์ ต่อมาเมื่อเติมฟีนอล 0.3 มิลลิโมลาร์ ในวันที่ 10 ของการทดลอง พบว่า ปริมาณฟีนอลที่คงเหลือในวันสุดท้ายของการทดลองเท่ากับ 0.26 มิลลิโมลาร์ นอกจากนี้ยังพบว่า ในวันที่ 1 ของการทดลองมีก๊าซเกิดขึ้นในชุดทดลองประมาณ 1 มิลลิลิตร และลดลงเหลือประมาณ 0.50 และ 0.25 มิลลิลิตร ในวันที่ 2 และ 3 ของการทดลองตามลำดับ และไม่พบก๊าซในชุดทดลองจนวันสุดท้ายของการทดลอง ดังแสดงในตารางที่ 1 ดังนั้น จึงสามารถสรุปได้ว่าจุลินทรีย์ในดินตะกอนมีบทบาทสำคัญในการย่อยสลายฟีนอลจากการศึกษาในครั้งนี้

ตารางที่ 1 ปริมาณก๊าซทั้งหมด ในชุดทดลองและชุดฆ่าเชื้อ

ระยะเวลาการทดลอง (วัน)	ปริมาณปริมาณก๊าซทั้งหมด	
	ชุดทดลอง	ชุดฆ่าเชื้อ
0	-	-
1	1.00 มิลลิลิตร	-
2	0.50 มิลลิลิตร	-
3	0.25 มิลลิลิตร	-
4	-	-
5	-	-
6	-	-
7	-	-
8	-	-
9	-	-
10	-	-
11	-	-
12	-	-
13	-	-
14	-	-
15	-	-

หมายเหตุ: - หมายถึง ตรวจไม่พบ

นอกจากนี้ยังพบว่า มีสารพาราไฮดรอกซีเบนโซเอต เกิดขึ้นในวันที่ 4 และวันสุดท้ายของการทดลอง โดยมีความเข้มข้นน้อยกว่า 0.01 มิลลิโมลาร์ และไม่พบการสะสมของสารพาราไฮดรอกซีเบนโซเอต อาจเนื่องมาจากการย่อยสลาย ในครั้งนี้เป็นการย่อยสลายที่รวดเร็วและค่อนข้างสมบูรณ์ โดยฟีนอลเปลี่ยนไปเป็นก๊าซแต่ในการย่อยสลายฟีนอลในครั้งที่ 2 ที่ความเข้มข้น 0.1 มิลลิโมลาร์ และที่ความเข้มข้น 0.3 มิลลิโมลาร์ ไม่มีปริมาณก๊าซเกิดขึ้นแสดงว่า ฟีนอลไม่ได้ถูกเปลี่ยนเป็นก๊าซแต่อาจถูกเปลี่ยนเป็นสารตัวกลางอื่นที่ไม่ใช่สารพาราไฮดรอกซีเบนโซเอตซึ่งในการศึกษาครั้งนี้ไม่ได้ทำการตรวจวิเคราะห์ถึงสารตัวกลางอื่นๆ ส่วนในชุดฆ่าเชื้อไม่พบปริมาณก๊าซและสารพาราไฮดรอกซีเบนโซเอต ดังแสดงในภาพที่ 3



ภาพที่ 3 แสดงการย่อยสลายฟีนอลความเข้มข้น 0.1 และ 0.3 มิลลิโมลาร์ ภายใต้สภาวะที่ใช้ออกซิเจน
หมายเหตุ: ตำแหน่งที่มีลูกศรแสดงการเติมฟีนอลลงไป

เมื่อนำตัวอย่างสารละลายดินตะกอนที่มีการย่อยสลายฟีนอลภายใต้สภาวะที่ใช้ออกซิเจนมาทำการคัดแยกและจำแนกแบคทีเรียในการศึกษาครั้งนี้และทำการตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์พบว่า เป็นแบคทีเรียแกรมบวกรูปท่อนสั้น สร้างสปอร์ และจากทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีของแบคทีเรียกลุ่มดังกล่าวพบว่าสามารถจำแนกแบคทีเรียได้เป็น *Bacillus* sp. (ตารางที่ 2) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Gurujeyalakshmi and Oriel (1989) ซึ่งสามารถแยกแบคทีเรียที่ย่อยสลายฟีนอลจากโคลนในแม่น้ำ คือ *Bacillus stearothermophilus* BR219 และจากการศึกษาของ Mutzel et al. (1996) ที่สามารถแยกแบคทีเรียที่ย่อยสลายฟีนอลได้เป็น *Bacillus* sp. เช่นกัน

ตารางที่ 2 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีของแบคทีเรียที่ย่อยสลายสารฟีนอลภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจน

การทดสอบ		ผลการทดสอบ
ลักษณะทางสัณฐานวิทยา	**ลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (กำลังขยาย 100X)**	**แกรมบวก รูปร่างท่อนสั้น สร้างสปอร์**
คุณสมบัติทางชีวเคมี	OF-Glucose Test	-
	Motility Test	+
	H_2S Production Test	-
	Indole Production Test	-
	Nitrate Reduction Test	+
	Citrate Utilization Test	+
	Urease Test	-
	Oxidase Test	+
	Catalase Test	+
ผลการจำแนก	*Bacillus* sp.	

หมายเหตุ: +; ให้ผลการทดสอบเป็นบวก, -; ให้ผลการทดสอบเป็นลบ

4. สรุปผลการทดลอง

การศึกษาการย่อยสลายฟีนอลด้วยใช้จุลินทรีย์ในดินตะกอนภายใต้สภาวะที่ใช้ออกซิเจนโดยใช้ดินตะกอนจากนาข้าวในอำเภอบ่อทอง จังหวัดชลบุรี และเมื่อนำมาศึกษาการย่อยสลายฟีนอลด้วยจุลินทรีย์ในดินตะกอน พบว่าฟีนอลสามารถย่อยสลายได้โดยแบคทีเรียที่อยู่ในดินตะกอน คือ *Bacillus* sp. ซึ่งการย่อยสลายที่เกิดขึ้นเป็นการย่อยสลายแบบสมบูรณ์ อีกทั้งเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของฟีนอลให้มีความเข้มข้นที่สูงขึ้นแบคทีเรียดังกล่าวยังสามารถย่อยสลายฟีนอลได้อย่างมีประสิทธิภาพ

5. กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณภาควิชาจุลชีววิทยาและภาควิชาวาริชศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพาที่ให้ความอนุเคราะห์อุปกรณ์และสถานที่ในการทำวิจัย

เอกสารอ้างอิง

บัญญัติ สุขศรีงาม (2534) *จุลชีววิทยาทั่วไป*. กรุงเทพฯ: โอ. เอส. พริ้นติ้ง เฮ้าส์.

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

สมศักดิ์ วังใน (2528) *จุลินทรีย์และกิจกรรมในดิน*. กรุงเทพฯ: ไทยวัฒนาพานิชจำกัด.

สุบัณฑิต นิ่มรัตน์ และสุกานดา เกื้อกิจกูล (2546) การย่อยสลาย *p*-Hydroxybenzoate โดยใช้ mixed culture ภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจน. ใน การประชุมวิชาการครั้งที่ 41 มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ วันที่ 3 - 5 กุมภาพันธ์ 2546.

Association of Official American Chemists [AOAC]. (2002). *Official methods of analysis*. Association of Ofcial 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 Sciences, 1 (2), 219 - 234.

Bayly, R.C. & Wigmore, G.J. (1973). Metabolism of phenol and cresols by mutants of Pseudomonas putida. Journal of Bacteriology, 113 (3), 1112 - 1120.

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

Cavallo, R.S. & Stabili, L. (2002). Presence of vibrios in seawater and *Mytilus alloprovincialis* (Lam.) from the Mar Piccolo of Toranto (Ionian Sea). *Water Research,* 36, 3719 - 3726.

Cerniglia, C.E. (1992). Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Biodegradation,* 3, 351 - 368.

Healy, J.B. & Young, L.Y. (1979). Anaerobic biodegradation of eleven aromatic compounds to methane. *Applied and Environmental Microbiology,* 38 (1), 84 - 89.

Holt, J.G., Krieg, N.R., Sneath, P.H.A., Staley, J.T. & Williams, S.T. (1994). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology,* Vol.1. Baltimore: Williams & Wilkins.

Krieg, N.R. & Holt, J.G. (1984). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology,* Vol.1. Baltimore: Williams & Wilkins.

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 ^{0}C. *Applied Microbiol Biotechnol,* 46, 593 - 596.

Nair, C.I., Jayachadran, K. & Shashidhar, S. (2008). Biodegradation of phenol. *African Journal of Biotechnilogy,* 7 (25), 4951 - 4958.

Nimrat, S. (2000). Biodegradation of methyl parathion, *p*-nitrophenol and *p*-aminophenol under anoxic conditions (Ph.D. in Environmental Sciences), Department of Enviromental Science, Retgers, TheState University of New Jersey, New Brunswich, USA.

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

Stabili, L., Acquaviva, M. & Cavallo, R.A. (2005). *Mytilis alloprovincialis* filter feeding on the bacterial community in Mediterranean area (Northern Ionian Sea, Italy). *Water Research,* 36, 469 - 477.

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 - 243.

Zhang, X. & Wiegel, J. (1994). Reversible conversion of 4-hydroxybenzoate and phenol by *Clostridium hydroxybenzoicum*. *Applied and Environmental Microbiology,* 60 (11), 4128 - 4185.