ว.วิทย. มข. 42(2) 350-359 (2557) KKU Sci. J. 42(2) 350-359 (2014)

การย่อยสลายสารพาราไฮดรอกซีเบนโซเอทโดยจุลินทรีย์ในดินตะกอนภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจน

Biodegradation of *p*-Hydroxybenzoate by Microorganisms in Sediment-slurry under Aerobic Conditions

สุบัณฑิต นิ่มรัตน์[1*] *วีรญา ทรัพย์วิลาวรรณ*[2] *พีรพัฒน์ สุพรรณพันธุ์*[2] *และ วีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย*[3]

บทคัดย่อ

การศึกษาถึงการย่อยสลายสารพาราไฮดรอกซีเบนโซเอทโดยจุลินทรีย์ในสารละลายดินตะกอนจากนาข้าวภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจน พบว่าจุลินทรีย์ในดินตะกอนสามารถย่อยสลายสารพาราไฮดรอกซีเบนโซเอทความเข้มข้น 0.1 มิลลิโมลาร์ ในครั้งที่ 1 และ 2 ภายในระยะ 3 และ 2 วัน ตามลำดับ ในขณะที่สารพารา-ไฮดรอกซีเบนโซเอทความเข้มข้น 0.3 มิลลิโมลาร์ ถูกย่อยสลายภายในระยะเวลา 5 วัน โดยในระหว่างการย่อยสลายสารพาราไฮดรอกซีเบนโซเอทที่ระดับความเข้มข้น 0.1 มิลลิโมลาร์ ในวันแรกของการทดลองพบก๊าซเกิดขึ้นประมาณ 1.0 มิลลิลิตร และลดลงตามระยะเวลาของการทดลอง แบคทีเรียที่แยกได้จากสารละลายดินตะกอนในการศึกษาครั้งนี้คือ *Bacillus* sp. และจุลินทรีย์ในสารละลายดินตะกอนจากนาข้าวภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจนสามารถเปลี่ยนไนเทรตเป็นไนไทรต์

[1]ภาควิชาจุลชีววิทยาและโครงการวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา จ.ชลบุรี 20131

[2]ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา จ.ชลบุรี 20131

[3]ภาควิชาวาริชศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา จ.ชลบุรี 20131

*Corresponding Author, E-mail: subunti@buu.ac.th

ABSTRACT

The biodegradation of *p*-hydroxybenzoate with microorganisms in sediment-slurry from rice paddy under aerobic conditions was investigated. In active experiment, 0.1 mM of *p*-hydroxybenzoate which was applied in the first and the second time were biodegraded within 3 and 2 days, respectively. While 0.3 mM of *p*-hydroxybenzoate was biodegraded within 5 days. In the first time, which added with 0.1 mM was found 1.0 ml of gas produced and decreased all along the experiment. The bacteria isolated from sediment-slurry in this present active treatment were identified as belong to *Bacillus* sp. Microorganisms in sediment-slurry from rice paddy under aerobic conditions were also able to transform nitrate to nitrite.

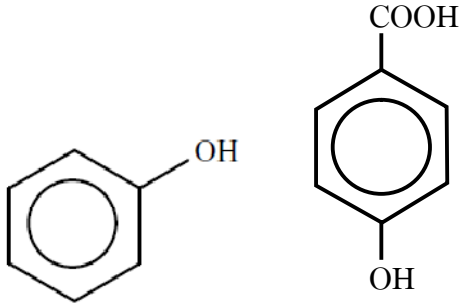
คำสำคัญ: สารพาราไฮดรอกซีเบนโซเอท สารละลายดินตะกอน นาข้าว *Bacillus* sp.
Keywords: *p*-hydroxybenzoate, Sediment-slurry, Rice paddy, *Bacillus* sp.

บทนำ

การใช้สารเคมีในกลุ่มอะโรมาติกทั้งในประเทศไทยและต่างประเทศ ในปัจจุบันพบว่ามีบทบาทสำคัญทั้งทางด้านเกษตรกรรมและอุตสาหกรรม (Chen et al., 2003) ซึ่งทางด้านเกษตรกรรมมีการใช้สารอะโรมาติกในภาพของยาฆ่าศัตรูพืช (pesticides) เพื่อควบคุมศัตรูพืช เช่น ยาฆ่าแมลง (insecticides) ยาปราบวัชพืช (herbicides) (Chakraborty et al., 2010) และยาฆ่าเชื้อรา (fungicides) เป็นต้น (มนัส, 2532) และมักพบการใช้สาร 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) และ 2,4,5-trichlorophenoxy-acetic acid (2,4,5-T) ซึ่งสารทั้งสองชนิดนี้จัดอยู่ในกลุ่ม phenoxyalkyl carboxylic acid และมีการใช้กันอย่างแพร่หลายทั่วโลก (Nakazawa et al., 2004; Sarikaya and Selvi, 2005; Caflan Karasu Benli et al., 2007) ส่วนการใช้สารดังกล่าวในทางด้านอุตสาหกรรมพบว่ามีการใช้อย่างแพร่หลายในอุตสาหกรรมต่าง ๆ ยกตัวอย่างเช่น อุตสาหกรรมผลิตกระดาษ (van Schie and Young, 1998) อุตสาหกรรมสีย้อม (Varsha et al., 2011) อุตสาหกรรมปิโตรเคมี (Riazika et al., 2010) อุตสาหกรรมการกลั่นน้ำมันและอุตสาหกรรมเรซิน (Gayathri and Vasudevan, 2010) เป็นต้น โดยน้ำทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรมเหล่านี้จะมีสารประกอบฟีนอลปนเปื้อนอยู่ (Nair et al., 2008) นอกจากนี้การปนเปื้อนสารอะโรมาติกสามารถพบการปนเปื้อนได้ทั้งในดิน แหล่งน้ำ และน้ำใต้ดินซึ่งเป็นสาเหตุหลักที่ต้องตระหนักไปทั่วโลก (Shourian et al., 2009) โดยเฉพาะอย่างยิ่งสารฟีนอลและสารประกอบฟีนอล (Chakraborty et al., 2010)

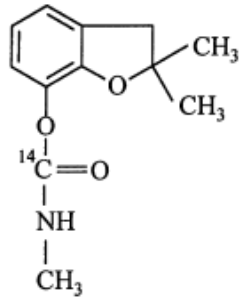
สารพาราไฮดรอกซีเบนโซเอท (*p*-hydroxybenzoate) พบว่าเป็นสารตัวกลางที่เกิดจากการย่อยสลายสารประกอบในกลุ่มอะโรมาติก ยกตัวอย่างเช่น Zhang and Wiegel (1994) ได้ศึกษาการใช้จุลินทรีย์ในการย่อยสลายสารฟีนอลและสารตัวกลางที่เกิดขึ้นจากการย่อยสลายสารฟีนอล และพบว่าสารที่มักเกิดจากการย่อยสลายของสารฟีนอลก็คือสารพาราไฮดรอกซีเบนโซเอทภายใต้สภาวะที่มีไนเทรต (แสดงในรูปที่ 1a และ 1b) รวมทั้งจากการศึกษาของ Juteau et al. (2005) และการศึกษาของ Qiu et

al. (2008) ได้รายงานว่าในระหว่างกระบวนการย่อยสลายสารฟีนอลด้วยวิธีทางชีวภาพโดยใช้จุลินทรีย์พบว่าสารฟีนอลสามารถเปลี่ยนไปเป็นสารตัวกลางคือสารพาราไฮดรอกซีเบนโซเอทเช่นเดียวกัน นอกจากนี้ยังมีรายงานสนับสนุนการใช้จุลินทรีย์จากแหล่งปนเปื้อนสารพาราไฮดรอกซีเบนโซเอท ยกตัวอย่างเช่น การศึกษาของ Paul et al. (2004) ได้ทำการศึกษาการย่อยสลายสารพาราไฮดรอกซีเบนโซเอทโดยจุลินทรีย์ที่แยกได้จากบริเวณพื้นที่ทำการเกษตรที่มีการปนเปื้อนยาฆ่าแมลงพบว่าจุลินทรีย์จากแหล่งปนเปื้อนสารดังกล่าวมีความสามารถในการย่อยสลายสารพารา-ไฮดรอกซีเบนโซเอทได้ ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้จึงมีการศึกษาการย่อยสลายสารพาราไฮดรอกซีเบนโซเอทโดยใช้วิธีการทางชีวภาพเพื่อเป็นทางเลือกหนึ่งในการลดการตกค้างของสารเคมีในสิ่งแวดล้อม (Basha et al., 2010; Riazika et al., 2010) แต่อย่างไรก็ตาม การศึกษาการย่อยสลายภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจนเป็นตัวรับอิเล็กตรอนตัวสุดท้ายโดยจุลินทรีย์ซึ่งเป็นสภาวะที่พบได้ทั่วไปในสิ่งแวดล้อมทั้งในน้ำและในดินยังไม่ค่อยมีการศึกษามากนักเมื่อเปรียบเทียบกับการย่อยสลายภายใต้สภาวะอื่น ๆ ดังนั้นงานวิจัยครั้งนี้จึงได้ศึกษาการย่อยสลายสารพาราไฮดรอกซีเบนโซเอทโดยจุลินทรีย์ในดินตะกอนภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจนโดยใช้ดินตะกอนจากนาข้าวในอำเภอบ่อทอง จังหวัดชลบุรี ซึ่งการใช้ยาฆ่าแมลงชนิดคาร์โบฟูราน เพื่อทราบถึงความสามารถของจุลินทรีย์ในการย่อยสลายสารพาราไฮดรอกซี-เบนโซเอท ทั้งยังเป็นแนวทางในลดต้นทุนการใช้สารเคมีที่ใช้เร่งการย่อยสลายและการตกค้างของสารเคมีในสิ่งแวดล้อม



(a) (b)

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



รูปที่ 2 โครงสร้างทางเคมีของยาฆ่าแมลงชนิดคาร์โบฟูราน (Trabue et al., 2001)

วิธีดำเนินงาน

1. การเก็บตัวอย่าง

เก็บตัวอย่างของดินตะกอนจากนาข้าวในอำเภอบ่อทอง จังหวัดชลบุรีที่มีการใช้ยาฆ่าแมลงชนิดคาร์โบฟูราน (รูปที่ 2) โดยเก็บตัวอย่างที่ระดับความลึก 1-10 เซนติเมตร ด้วยใช้ Grab sampler เป็นจำนวน 5 จุด จากนั้นนำดินตะกอนใส่ลงในขวดและปิดฝาหลวม ๆ เก็บที่อุณหภูมิห้องจนกว่าจะทำการทดลองตามวิธีการของสุบัณฑิต และสุกานดา (2546) รวมทั้งทำการวัดปริมาณสารไนเทรต ไนไทรต์ สารฟีนอล และสารพาราไฮดรอกซีเบนโซเอทในตัวอย่างดินตะกอนจากนาข้าว

2. การเตรียม Defined minimal salt medium (DMSM) (ดัดแปลงมาจาก Healy & Young, 1979)

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

(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 สารละลายวิตามินปริมาตร 1 มิลลิลิตร และสารละลายไบคาร์บอเนต ปริมาณ 29.8 กรัม

3. การศึกษาการย่อยสลายสารพาราไฮดรอกซีเบนโซเอทโดยจุลินทรีย์ในสารละลายดินตะกอน (ดัดแปลงมาจาก van Schie and Young, 1998)

นำขวดซีรัมขนาด 60 มิลลิลิตร จำนวน 7 ขวด มาเติมสารละลายตะกอน (10% w/v) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร จากนั้นแบ่งขวดซีรัมออกเป็น 3 ชุดการทดลอง คือ 1) ชุดทดลอง (Active) (เติมสารละลายไบคาร์บอเนต ปริมาตร 1.49 มิลลิลิตร, DMSM ปริมาตร 42.71 มิลลิลิตร, สารละลายวิตามิน ปริมาตร 0.05 มิลลิลิตร, Trace salt ปริมาตร 0.25 มิลลิลิตร และสารพาราไฮดรอกซีเบนโซเอทความเข้มข้น 0.1 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร) 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) และ 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 และวัดปริมาณ

สารพาราไฮดรอกซีเบนโซเอทสารฟีนอล ไนเทรต และไนไทรต์

4. วิธีการวิเคราะห์ปริมาณสารพาราไฮดรอกซี-เบนโซเอท และสารตัวกลางต่าง ๆ (Nimrat, 2000)

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 (AOAC, 2002)

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 และนำมาแช่ในน้ำแข็งอีกครั้งเพื่อลดอุณหภูมิให้ได้อุณหภูมิห้องแล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงอีกครั้ง เมื่อได้ค่าการดูดกลืนแสงครั้งที่ 2 ให้นำมาหักลบออกจากแบลงค์ จะได้ค่าการดูดกลืนแสงที่เกิดจากปฏิกิริยาระหว่างไนเทรตกับบรูซีนในสารละลายตัวอย่างโดยทำการวัดที่ความยาวคลื่น 410 นาโนเมตร

6. วิธีการวิเคราะห์ปริมาณไนไทรต์ (Stickland and Parson, 1972)

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 และโซเดียม-อะซีเตทบัฟเฟอร์ 48 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน จะได้ pH ประมาณ 2.0-2.5 ตั้งทิ้งไว้ 10-30 นาที จนเกิดสีชมพูแล้วจึงนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร

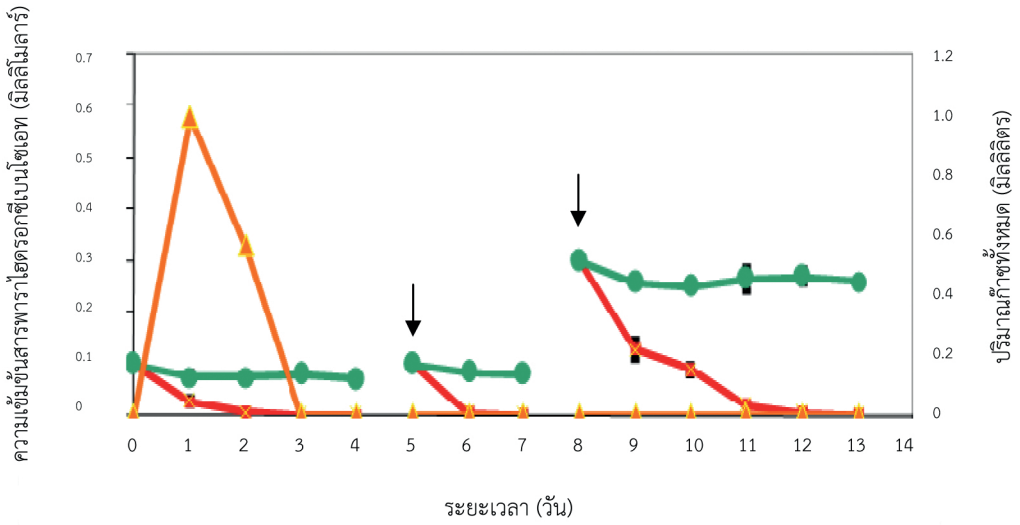
ผลการทดลองและวิจารณ์ผล

จากการศึกษาปริมาณสารไนเทรต ไนไทรต์ สารฟีนอล และสารพาราไฮดรอกซีเบนโซเอท ใน

ตัวอย่างดินตะกอนจากนาข้าวได้ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 1 และเมื่อทำการศึกษาการย่อยสลายสารพาราไฮดรอกซีเบนโซเอทที่ความเข้มข้น 0.1 และ 0.3 มิลลิโมลาร์ ภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจน พบว่าสารพาราไฮดรอกซีเบนโซเอท 0.1 มิลลิโมลาร์ ที่เติมในครั้งแรก (วันที่ 0) หลังการตรวจวัดพบว่ามีปริมาณสารพาราไฮดรอกซีเบนโซเอทลดลงและสามารถย่อยสลายหมดภายในระยะเวลา 3 วัน ต่อมาทำการเติมสารพาราไฮดรอกซีเบนโซเอท 0.1 มิลลิโมลาร์ เป็นครั้งที่สอง (วันที่ 5) พบว่าปริมาณสารพาราไฮดรอกซีเบนโซเอทลดลงและสามารถย่อยสลายหมดภายในระยะเวลา 2 วัน จากนั้นทำการเติมสารพาราไฮดรอกซีเบนโซเอทที่มีความเข้มข้นสูงขึ้นคือเท่ากับ 0.3 มิลลิโมลาร์ (วันที่ 8) พบว่าสารดังกล่าวมีปริมาณลดลงและย่อยสลายหมดภายในระยะเวลา 5 วันของการทดลอง ส่วนชุดฆ่าเชื้อความเข้มข้นของสารพาราไฮดรอกซีเบนโซเอทมีการเปลี่ยนแปลงเล็กน้อย โดยในวันที่ 4 7 และ 13 ของการทดลองมีความเข้มข้น 0.07 0.08 และ 0.26 มิลลิโมลาร์ ดังแสดงในรูปที่ 3 นอกจากนี้ยังพบก๊าซทั้งหมดเกิดขึ้นในชุดทดลองในช่วง 3 วันแรก โดยวันที่ 1 มีก๊าซประมาณ 1.0 มิลลิลิตร และลดลงเป็น 0.53 และ 0.1 มิลลิลิตร ในวันที่ 2 และ 3 ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่ามีการย่อยสลายสารพาราไฮดรอกซีเบนโซเอทอย่างสมบูรณ์จึงเกิดก๊าซในการทดลองขึ้น ทั้งนี้ก๊าซที่เกิดจะเกิดในชุดทดลองที่มีสารพาราไฮดรอกซีเบนโซเอท 0.1 มิลลิโมลาร์ ในครั้งแรกเท่านั้น โดยไม่พบในชุดทดลองที่มีสารพาราไฮดรอกซีเบนโซเอท 0.03 มิลลิโมลาร์ และชุดฆ่าเชื้อ (แสดงในรูปที่ 3) ทั้งยังไม่พบสารฟีนอลเกิดขึ้นทั้งชุดทดลองและชุดฆ่าเชื้อ อาจเนื่องมาจากในการย่อยสลายสารพาราไฮดรอกซีเบนโซเอทเกิดได้ค่อนข้างสมบูรณ์กลายเป็นก๊าซและบางส่วนอาจกลายเป็นสารตัวกลางอื่น ๆ นอกเหนือจากสารที่ทำการวิเคราะห์ ทำให้มีการสะสมของสารตัวกลาง เมื่อทดสอบการย่อยสลายครั้งที่ 2 และครั้งที่ 3 สารพาราไฮดรอกซีเบนโซเอทอาจเปลี่ยนไปเป็นสารตัวอื่น ๆ โดยไม่ได้เปลี่ยนเป็นก๊าซเกิดขึ้นในการย่อยสลาย ซึ่งในการย่อยสลายสารพาราไฮดรอกซีเบนโซเอททั้ง 3 ครั้งไม่พบว่ามีการสะสมของสารฟีนอล หรือสารเมแทบอไลท์ที่ทำการวิเคราะห์อาจเนื่องมาจากเกิดการย่อยสลายที่ค่อนข้างสมบูรณ์ อย่างเช่นการทดลองของ Chatterjee and Bourquin (1987) และ Suemori et al. (1995) ได้ศึกษาการย่อยสลายสารพาราไฮดรอกซีเบนโซเอทได้ β-Ketoadepate และเข้าวัฏจักรเครปส์ (Kreb's cycle) โดย *Caulobacter cresceenlus* และ *Rhodococcus erythropolis* ตามลำดับ

ตารางที่ 1 แสดงปริมาณสารต่าง ๆ ที่พบในตัวอย่างดินตะกอนจากนาข้าว

แหล่งตัวอย่าง	ปริมาณสารต่าง ๆ ที่พบในตัวอย่างดินตะกอนจากนาข้าว (มิลลิโมลาร์)			
	ไนเทรต	ไนไทรต์	สารฟีนอล	สารพาราไฮดรอกซีเบนโซเอท
ดินตะกอนนาข้าว	0.031	0.028	0	0



รูปที่ 3 แสดงการย่อยสลายสารพาราไฮดรอกซีเบนโซเอท ความเข้มข้น 0.1 และ 0.3 มิลลิโมลาร์ ภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจน โดย 'แทนชุดการทดลอง แทนชุดฆ่าเชื้อ และ แทนก๊าซชุดทดลอง

หมายเหตุ: ตรงตำแหน่งที่มีลูกศรแสดงการเติมสารพาราไฮดรอกซีเบนโซเอท

ตารางที่ 2 แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาและการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีของแบคทีเรียที่ย่อยสลายสารพาราไฮดรอกซีเบนโซเอทภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจน

	การทดสอบ	**BUU1**	**BUU2**
ลักษณะสัณฐานวิทยา	ลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (กำลังขยาย 100X)	แกรมบวก สร้างสปอร์ รูปร่างท่อนยาวใหญ่	แกรมบวก สร้างสปอร์ รูปร่าวท่อนยาวผอม
คุณสมบัติทางชีวเคมี	OF-glucose test	-	-
	Motility test	-	+
	H_2S production test	-	-
	Indole production test	-	-
	Nitrate test	-	+
	Citrate utilization test	-	-
	Urea test	-	-
	Oxidase test	-	-
	Catalase test	+	+
ผลการจำแนก		*Bacillus* sp.	*Bacillus* sp.

หมายเหตุ: + แสดงผลการทดสอบเป็นบวก, - แสดงผลการทดสอบเป็นลบ

เมื่อนำตัวอย่างที่มีการย่อยสลายสารพาราไฮดรอกซีเบนโซเอทมีทำการจำแนกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลายสารพาราไฮดรอกซีเบนโซเอท โดยการเพาะเลี้ยงบนอาหาร defined minimal salt medium (DMSM) ที่มีสารพาราไฮดรอกซีเบนโซเอท 0.1 มิลลิโมลาร์ โดยเชื้อจะใช้สารพาราไฮดรอกซีเบนโซเอทเป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงานสำหรับการเจริญได้ ถ้าเชื้อมีความสามารถใน

การย่อยสลายสารดังกล่าวได้ จะนำมาเลี้ยงบนอาหาร Tryptic Soy Agar (TSA) เพื่อเพิ่มจำนวนและนำโคโลนีของเชื้อมาศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีบางประการ โดยจากการจำแนกเชื้อพบว่าแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายสารพาราไฮดรอกซีเบนโซเอทภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจนมีจำนวน 2 ไอโซเลท คือ *Bacillus* sp. ดังแสดงในตารางที่ 2 ซึ่งแบคทีเรียสกุลนี้สามารถพบได้ทั่วไปในสิ่งแวดล้อมทั้งดินและน้ำ รวมทั้งยังเป็นผู้ย่อยสลายที่สำคัญในการย่อยสลายสารประกอบอะโรมาติกที่ปนเปื้อนธรรมชาติ (Crawford, 1976; Peng et al., 2003) และความสามารถในการย่อยสลายปนเปื้อนของ *Bacillus* sp. พบว่าสอดคล้องกับรายงานหลายฉบับที่ผ่านมา เช่น การศึกษาของ Crawford (1976) ที่รายงานว่าการย่อยสลายสารพาราไฮดรอกซีเบนโซเอทโดยเชื้อ *Bacillus brevis*, *B. circulans* และ *B. laterosporus* สามารถเปลี่ยนสารพาราไฮดรอกซีเบนโซเอทไปเป็น Pyruvate, Acetaldehyde และ Malate รวมทั้งการศึกษาของ Peng et al. (2003) ที่ได้ทำการศึกษาการย่อยสลายทางชีวภาพของแบคทีเรียกลุ่ม Thermophile bacilli ในการย่อยสลายสาร Cinnamic, 4-Coumaric และ Ferulic acid ซึ่งแบคทีเรียที่คัดแยกได้ คือ *Bacillus* sp. และพบว่าสามารถย่อยสลายสารทั้ง 3 ชนิดได้ นอกจากนี้ในการย่อยสลายสาร 4-Coumaric พบว่า *Bacillus* sp. strain B1 สามารถย่อยสลายสารดังกล่าวเกิดเป็นสารพาราไฮดรอกซีเบนโซเอทและสามารถย่อยสลายสารพาราไฮดรอกซีเบนโซเอทไปเป็นสาร gentisic acid และจากการศึกษาของ Tallur et al. (2008) ที่ได้ทำการศึกษาการย่อยสลายสารประกอบฟีโนลิก ได้แก่ สารฟีนอล สารพาราครีซอล สารเมทาครีซอล และสารพาราไฮดรอกซีเบนโซเอท โดย *Bacillus* sp. strain PHN1 ที่แยกได้จากดินพบว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ดังกล่าวสามารถเจริญและใช้สารดังกล่าวเป็นทั้งแหล่งคาร์บอนและพลังงาน รวมทั้งยังพบว่า *Bacillus* sp. strain PHN1 สามารถย่อยสลายสารพาราไฮดรอกซีเบนโซเอทและสารอื่น ๆ ได้

ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้การประยุกต์ใช้แบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพสามารถนำไปใช้ในการฟื้นฟูสภาพทางชีวภาพ (bioremediation) สำหรับสิ่งแวดล้อมที่มีการปนเปื้อนด้วยสารประกอบฟีนอลิกหรือสารอนุพันธ์ที่เกิดขึ้นระหว่างการย่อยสลายสารปนเปื้อน รวมทั้งเป็นทางเลือกในการฟื้นฟูสภาพแทนการใช้สารเคมีและลดการตกค้างของสารเคมีต่อไป

บทสรุป

จากการนำดินตะกอนจากนาข้าวในอำเภอบ่อทอง จังหวัดชลบุรี มาทำการศึกษาการย่อยสลายสารพาราไฮดรอกซีเบนโซเอทโดยจุลินทรีย์ในดินตะกอนภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจน โดยมีการวัดปริมาณไนเทรต ไนไทรต์ สารฟีนอล และสารพาราไฮดรอกซีเบนโซเอท พบว่าในดินตะกอนมีไนเทรตและไนไทรต์ 0.031 และ 0.028 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ แต่ไม่พบสารฟีนอลและสารพาราไฮดรอกซีเบนโซเอทเมื่อทำการศึกษาการย่อยสลายสารพาราไฮดรอกซีเบนโซเอทโดยทำการเติมที่ระดับความเข้มข้นข้น 0.1 มิลลิโมลาร์ จำนวน 2 ครั้ง (วันที่ 0 และ 5) พบว่ามีอัตราการย่อยสลายภายใน 3 และ 2 วัน ตามลำดับ และต่อมาเมื่อทำการเติมที่ระดับความเข้มข้นข้น 0.3 มิลลิโมลาร์ พบว่ามีอัตราการย่อยสลายภายใน 5 วัน และไม่พบสารฟีนอล แต่พบว่ามีปริมาณก๊าซทั้งหมดเกิดขึ้นในการย่อยสลายสารพาราไฮดรอกซีเบนโซเอทที่ระดับความเข้มข้น 0.1 มิลลิโมลาร์ ประมาณ 1.0 มิลลิตร ในวันที่ 1 และลดลงเป็น 0.30 และ 0.01 มิลลิลิตร ในวันที่ 2 และ 3 ตามลำดับ จากนั้นได้นำชุดทดลองมาทำการจำแนกเชื้อที่มีความสามารถในการ

ย่อยสลายสารพาราไฮดรอกซีเบนโซเอทและสามารถจัดจำแนกได้ 2 ไอโซเลท คือแบคทีเรียในกลุ่ม *Bacillus* sp.

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณภาควิชาจุลชีววิทยาและภาควิชาวาริชศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ ที่ให้ความอนุเคราะห์และอำนวยความสะดวกในการทดลองและอุปกรณ์

เอกสารอ้างอิง

มนัส สุวรรณ. (2532). นิเวศวิทยากับการพัฒนาเศรษฐกิจ. กรุงเทพ: โอเดียนสโตร์.

สุบัณฑิต นิ่มรัตน์ และ สุกานดา เกื้อกิจกูล. (2546). การย่อยสลาย *p*-Hydroxybenzoate โดยใช้ Mixed culture ภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจน. การประชุมวิชาการครั้งที่ *41* มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ, วันที่ 3-5 กุมภาพันธ์ 2546.

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

Basha, K.M., Rajendran, A. and 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. and Venturi, V. (2001). Regulation of the p-hydroxybenzoic acid hydroxylase gene (*pob*A) in plant-growth-promoting *Pseudomonas putida* WC358. Microbiology 147: 1611-1620.

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

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

Chatterjee, D.K. and Bourquin, A.W. (1987). Metabolism of aromatic compounds by *Caulobacter crescentus*. Journal of Bacteriology 169(5): 1993–1996.

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

Crawford, R.L. (1976). Pathways of 4-hydroxybenzoate degradation among species of *Bacillus*. Journal of Bacteriology 127: 204–210.

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

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

Juteau, P., Cote, V., Duckett, M.-F., Beaudet, R., Lepine, F., Villemur, R. and Bisaillon, J.-G. (2005). *Cryptanaerobacter phenolicus* gen. nov., sp. nov., an anaerobe that transforms phenol into benzoate via 4-hydroxybenzoate. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 55(Pt 1): 245-250.

Nakazawa, H., Takahashi, N., Inoue, K., Ito, Y., Goto, T., Kato, K., Yoshimura, Y. and 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.

Nair, C.I., Jayachadran, K. and Shashidhar, S. (2008). Biodegradation of phenol. African Journal of Biotechnology 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, The State University of New Jersey, New Brunswich, USA.

Paul, D., Chauhan, A., Pandey, G. and Jain, R. (2004). Degradation of p-hydroxybenzoate via protocatechuate in *Arthrobacter protophormiae* RKJ100 and *Burkhoderia cepacia* RKJ200. Current Science 87(9): 1263-1268.

Peng, X., Misawa, N. and Harayama, S. (2003). Isolation and characterization of thermophilic bacilli degrading cinnamic, 4-coumaric, and ferulic Acids. Applied and Environmental Microbiology 69(3): 1417–1427.

Qiu, Y.-L., Hanada, S., Ohashi, A., Harada, H., Kamagata, Y. and Sekiguchi, Y. (2008). *Syntropho rhabdus aromaticivorans* gen. nov., sp. nov., the first cultured anaerobe capable of degrading phenol to acetate in obligate syntrophic associations with a hydrogenotro phic methanogen. Applied and Environ mental Microbiology 74(7): 2051–2058.

Riazika, B., Abbes, B., Messaoud, C. and Soufi,K. (2010). Phenol and benzoic acid degradation by *Pseudomonas aeruginosa*. Journal of Water Resource and Protection 2: 788-791.

Sarikaya, R. and 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.). Environ mental Toxicology and Pharmacology 20: 264-268.

Shourian, M., Noghabi, A.N., Zahiri, H.S., Begheri, T., Karballaei, G., Mollaei, M., Rad, I., Ahadi, S., Raheb, J. and Abbasi, H. (2009). Efficient phenol degradation bya newly characterized *Pseudomonas* sp. SA0.1 isolated from pharmaceutical wastewaters. Desalination 246: 577-594.

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

Suemori, A., Nakajima, K., Kurane, R. and Nakamura, Y. (1995). o-, m- and p-Hydroxybenzoate degradative pathways in *Rhodococcus erythropolis*. FEMS Microbiology Letter 125: 31-36.

Tallur, P.N., Megadi, V.B. and Nin ekar, H.Z. (2008). Biodegradation of p-cresol by immobilized cells of *Bacillus* sp. strain PHN1. Biodegradation 20: 79-83.

Trabue, S.L., Ogram, A.V. and 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. and Young, L.Y. (1998). Isolation and characterization of phenol-degrading deni trifying bacteria. Applied and Environmental Microbiology 64(7): 2432-243.

Varsha, Y.M., Naga Deepthi C.H. and Chenna, S. (2011). An emphasis on xenobiotic degradation in environmental clean up. Journal of Boiremediation & Biodegradation 11: 1-10.

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

❑❑❑❑❑