การย่อยสลายสารไกลโฟเสททางชีวภาพของแบคทีเรีย ที่แยกได้จากดินในพื้นที่เพาะปลูก

จุไรรัตน์ อิมินา

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของความสมบูรณ์ของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยแม่โจ้
พ.ศ. 2557

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยแม่โจ้

ใบรับรองวิทยานิพนธ์

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยแม่โจ้

ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

ชื่อเรื่อง

การย่อยสลายสารไกลโฟเสททางชีวภาพของแบคทีเรีย
ที่แยกได้จากดินในพื้นที่เพาะปลูก

โดย

จุไรรัตน์ อิมินา

พิจารณาเห็นชอบโดย

ประธานกรรมการที่ปรึกษา .....

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ฐปน ชื่นบาล)

วันที่ 24 เดือน ก.ค. พ.ศ. 57

กรรมการที่ปรึกษา .....

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ศิราภรณ์ ชื่นบาล)

วันที่ 24 เดือน ก.ค. พ.ศ. 57

กรรมการที่ปรึกษา .....

(อาจารย์ ดร.ศรีกาญจนา คล้ายเรือง)

วันที่ 24 เดือน ก.ค. พ.ศ. 57

ประธานกรรมการประจำหลักสูตร .....

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.มงคล ถิรบุญยานนท์)

วันที่ 24 เดือน ก.ค. พ.ศ. 2557

บัณฑิตวิทยาลัยรับรองแล้ว .....

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.จาตุพงศ์ วาฤทธิ์)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ 24 เดือน ก.ค. พ.ศ. 2557

ชื่อเรื่อง การย่อยสลายสารไกลโฟเสททางชีวภาพของแบคทีเรียที่แยกได้จากดินในพื้นที่เพาะปลูก

ชื่อผู้เขียน นางสาวจุไรรัตน์ อิมินา

ชื่อปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

ประธานกรรมการที่ปรึกษา ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ฐปน ชื่นบาล

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อคัดแยกแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายสารไกลโฟเสทและศึกษาประสิทธิภาพของแบคทีเรียการย่อยสลายสารไกลโฟเสทที่ปนเปื้อนในดิน ในการทดลองได้คัดแยกแบคทีเรียจากดินในพื้นที่การเกษตรที่มีประวัติการใช้สารไกลโฟเสท ผลการทดลองพบว่าสามารถคัดแยกแบคทีเรียได้ทั้งหมด 27 ไอโซเลท หลังจากนั้นทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายสารไกลโฟเสทในระดับห้องปฏิบัติการโดยทำการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียในอาหาร tryptic soy broth (TSB) ที่เติมสารไกลโฟเสทความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อลิตร เขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 10 วัน เก็บตัวอย่างเพื่อหาปริมาณความเข้มข้นของสารไกลโฟเสทด้วยเครื่อง High Performance Liquid Chromatography (HPLC) พบว่าสามารถคัดเลือกแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพการย่อยสลายสารไกลโฟเสทมากที่สุด 3 ไอโซเลท คือ LMC2 MMC2 และ PMA2 จากการตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาและผลการหาลำดับเบสของดีเอ็นเอในส่วนของยีน 16S rRNA พบว่าแบคทีเรียไอโซเลท MMC2 มีลำดับเบสที่คล้ายกับ *Bacillus megaterium* มีความเหมือน 100 เปอร์เซ็นต์ แบคทีเรียไอโซเลท LMC2 มีลำดับเบสที่คล้ายกับ *Bacillus subtilis* มีความเหมือน 100 เปอร์เซ็นต์ และแบคทีเรียไอโซเลท PMA2 มีลำดับเบสที่คล้ายกับ *Bacillus cereus* มีความเหมือน 99 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นทำการศึกษาประสิทธิภาพการย่อยสลายสารไกลโฟเสทในดินโดยทำการศึกษาทั้งหมด 5 ชุดการทดลอง ได้แก่ ไม่เติมแบคทีเรีย (ชุดควบคุม) เติมแบคทีเรียไอโซเลท LMC2, MMC2, PMA2 และแบคทีเรียรวมทั้ง 3 ไอโซเลท (ผสม) ชุดการทดลองละ 3 ซ้ำ มาผสมในดินที่มีการปนเปื้อนของสารไกลโฟเสทความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นระยะเวลา 10 วัน เก็บตัวอย่างดินมาทำการสกัดและหาปริมาณความเข้มข้นของสารไกลโฟเสทที่ด้วยเครื่อง HPLC พบว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ *Bacillus subtilis* (MMC2) และแบคทีเรียสายพันธุ์ *Bacillus cereus* (PMA2) มีประสิทธิภาพการย่อยสลายสารไกลโฟเสทได้มากที่สุดเท่ากับ 98.84 และ 98.46 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

Title Biodegradation of Glyphosate by Bacteria Isolated from Plantation Soil

Author Miss Jurairat Eimina

Degree of Master of Science in Biotechnology

Advisory Committee Chairperson Assistant Professor Dr.Tapana Cheunban

ABSTRACT

The objectives of this study were to isolate bacteria which could degrade glyphosate and to explore the efficiency of bacteria on glyphosate contaminated in the soil degradation. Bacteria were isolated from plantation soil where glyphosate was used to be applied. Results showed that 27 isolates of bacteria could be isolated. Efficiency on glyphosate degradation was later examined in a laboratory where bacteria were cultured in tryptic soy broth (TSB) added with 20 mg/l glyphosate and which were then shaken at the rate of 150 rpm at 37 $^{\circ}$C for 10 days. Samples were collected for finding a level of glyphosate concentration by using High Performance Liquid Chromatography (HPLC). Results showed that 3 isolates of bacteria, LMC2, MMC2 and PMA2, had the highest efficiency on glyphosate degradation, and were then selected. Based on the morphological characteristics and results of base series finding of DNA in gene 16s rRNA, results showed that bacteria isolate MMC2 had base series that showed similarity with *Bacillus megaterium* at 100 percent. Likewise, bacteria isolate LMC2 had base bacterial isolate series showing similarity with *Bacillus subtilis* at 100 percent. Bacteria isolate PMA2 had base series also showing similarity with *Bacillus cereus* at 99 percent. The efficiency of glyphosate degradation in the soil was studied by using 5 treatments: non-application of bacteria (control) application of bacteria (LMC2, MMC2, PMA2) and mixture of 3 isolates, with 3 replications for each method. Bacteria were then mixed in the soil that was contaminated with 20 mg/kg glyphosate for 10 days. Soil samples were collected and extracted to find a level of glyphosate concentration by using HPLC. Results showed that *Bacillus subtilis* (MMC2) and *Bacillus cereus* (PMA2) showed high efficiency in glyphosate degradation of 98.84 and 98.46 percent, respectively.

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ฐปน ชื่นบาล ประธานกรรมการที่ปรึกษา อาจารย์ ดร.ศิราภรณ์ ชื่นบาล และอาจารย์ ดร.ศรีกาญจนา คล้ายเรือง กรรมการที่ปรึกษาที่ได้กรุณาให้คำปรึกษา และสนับสนุนในเรื่องของอุปกรณ์ สารเคมีต่างๆ ที่ใช้ในการทำงานวิจัยในครั้งนี้ ตลอดจนให้คำแนะนำ ตรวจสอบแก้ไขข้อบกพร่องของวิทยานิพนธ์ให้มีความถูกต้องและสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปฏิภาณ สุทธิกุลบุตร สาขาวิชาปฐพีศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ ที่ได้ให้คำแนะนำเกี่ยวกับความรู้พื้นฐานของดินที่ใช้ในการทำงานวิจัยนี้

ขอขอบพระคุณคณาจารย์ เจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการหลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ ที่ให้คำปรึกษา คำแนะนำ และอำนวยความสะดวกในด้านสถานที่ อุปกรณ์ เครื่องมือต่างๆ ที่ใช้ในการทำงานวิจัยนี้ ตลอดจนเพื่อนๆ พี่ๆ น้องๆ ที่คอยให้ความช่วยเหลือและเป็นกำลังใจในการทำครั้งนี้ให้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอขอบคุณ รองศาสตราจารย์ ดนุวัติ เพ็งอ้น และคุณรัตติกาล ติง สถาบันบริการตรวจสอบคุณภาพและมาตรฐานผลิตภัณฑ์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ ที่ให้ความอนุเคราะห์และให้คำแนะนำสำหรับการใช้เครื่อง High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

ขอขอบคุณคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ ที่ให้ทุนสนับสนุนในการทำวิทยานิพนธ์นี้

ขอขอบคุณ บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยแม่โจ้ ที่ให้การสนับสนุนทุนการศึกษาประเภททุนศิษย์เรียนดี ประจำปีการศึกษา 2555

ขอขอบคุณ สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ (สวทช.) ภาคเหนือ ที่ให้การสนับสนุนทุนวิจัยในครั้งนี้

ขอขอบคุณ คุณพ่อทองอินทร์ อิมินา คุณแม่จันทร์นวล อิมินา และญาติ พี่น้องทุกคนที่คอยให้การสนับสนุน ให้ทุนการศึกษา ตลอดจนการอบรมสั่งสอนและให้กำลังใจในการศึกษาและการทำวิทยานิพนธ์ในครั้งนี้เสมอมา

จุไรรัตน์ อิมินา

กรกฎาคม 2557

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ	(3)
ABSTRACT	(4)
กิตติกรรมประกาศ	(5)
สารบัญ	(6)
สารบัญตาราง	(8)
สารบัญภาพ	(9)
สารบัญตารางผนวก	(10)
สารบัญภาพผนวก	(11)
บทที่ 1 บทนำ	1
ความสำคัญของปัญหา	1
วัตถุประสงค์ของการวิจัย	2
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	2
ขอบเขตงานวิจัย	2
บทที่ 2 การตรวจเอกสาร	3
สารกำจัดศัตรูพืชและสารกำจัดวัชพืช	3
สถิติการจำหน่ายและการนำเข้าวัตถุอันตรายทางการเกษตร	4
สารไกลโฟเสท	8
การปนเปื้อนของสารไกลโฟเสทในสิ่งแวดล้อม	14
ผลกระทบจากการใช้สารไกลโฟเสทในการทำการเกษตร	17
เทคโนโลยีการบำบัดสารมลพิษทางชีวภาพ	21
งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	28
บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีการวิจัย	33
อุปกรณ์ในการวิจัย	33
แนวทางการดำเนินงานวิจัย	37
บทที่ 4 ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง	44

หน้า

บทที่ 5 สรุปผลการวิจัย 66

ข้อเสนอแนะ 66

บรรณานุกรม 67

ภาคผนวก 73

ภาคผนวก ก สถานที่เก็บตัวอย่างดินในพื้นที่การเกษตรที่ใช้สารไกลโฟเสท 74

ภาคผนวก ข การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ และสารเคมี 82

ภาคผนวก ค ข้อมูลดิบ 86

ภาคผนวก ง เทคนิคที่ใช้ในการวิเคราะห์ 92

ภาคผนวก จ กราฟมาตรฐานของสารละลายไกลโฟเสท และผลการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC 98

ภาคผนวก ฉ ประวัติผู้วิจัย 106

สารบัญตาราง

ตาราง		หน้า
1	ปริมาณการนำเข้าวัตถุอันตรายทางการเกษตรของประเทศไทย ปี พ.ศ. 2548-2555	6
2	ปริมาณการนำเข้าสารกำจัดศัตรูพืชที่มีการนำเข้าสูงสุด 10 อันดับแรกในปี พ.ศ. 2550-2555	12
3	องค์ประกอบของเซลล์ของจุลินทรีย์	24
4	กลุ่มของแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลายสารมลพิษในสิ่งแวดล้อม	27
5	การวิเคราะห์สารไกลโฟเสทโดยใช้เทคนิคโครมาโตรกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง	39
6	จำนวนแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายสารไกลโฟเสทที่คัดแยกได้จากตัวอย่างดิน 6 แหล่ง	44
7	ประสิทธิภาพการย่อยสลายสารไกลโฟเสทของเชื้อแบคทีเรียที่คัดแยกได้ทั้ง 27 ไอโซเลท (เปอร์เซ็นต์)	48
8	การจัดจำแนกเชื้อแบคทีเรียไอโซเลท LMC2 MMC2 และ PMA2 โดยการหาลำดับเบสของดีเอ็นเอในส่วนของยีน 16S rRNA	57
9	ประสิทธิภาพการย่อยสลายสารไกลโฟเสทในดินของแบคทีเรียที่คัดเลือก	65

สารบัญภาพ

ภาพ		หน้า
1	สถิติการจำหน่ายสารกำจัดวัชพืชทั้งในตลาดต่างประเทศและประเทศไทย	5
2	การเกิดความคงตัวของสารกำจัดวัชพืชในดิน	15
3	กระบวนการสลายตัวของสารกำจัดวัชพืชในสิ่งแวดล้อม	17
4	กลไกและแมแทบอลิซึมสำหรับการย่อยสลายสารไกลโฟเสทด้วยแบคทีเรีย	32
5	ขั้นตอนในการศึกษาวิจัย	37
6	ความเข้มข้นของสารไกลโฟเสทจากการย่อยสลายโดยแบคทีเรียที่คัดแยกได้ที่ระยะเวลา 5 วัน และ 10 วัน (มิลลิกรัมต่อลิตร)	47
7	ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียไอโซเลท LMC2	50
8	ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียไอโซเลท MMC2	51
9	ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียไอโซเลท PMA2	52
10	ขนาดของ DNA ที่ได้จากการทำ PCR ในส่วนของยีน 16S rRNA	53
11	ลำดับเบสของ DNA ในส่วนของยีน 16S rRNA ของแบคทีเรียไอโซเลต LMC2	54
12	ลำดับเบสของ DNA ในส่วนของยีน 16S rRNA ของแบคทีเรียไอโซเลต MMC2	55
13	ลำดับเบสของ DNA ในส่วนของยีน 16S rRNA ของแบคทีเรียไอโซเลต PMA2	56
14	การเปรียบเทียบลำดับเบส 16S rRNA ของแบคทีเรีย ไอโซเลต LMC2	58
15	การเปรียบเทียบลำดับเบส 16S rRNA ของแบคทีเรีย ไอโซเลต MMC2	59
16	การเปรียบเทียบลำดับเบส 16S rRNA ของแบคทีเรีย ไอโซเลต PMA2	60
17	ตัวอย่างดินที่มีการเติมสารไกลโฟเสทความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และแบคทีเรียที่คัดแยก ได้แก่ ไอโซเลท LMC2 MMC2 PMA2 และ MIX	61
18	ความเข้มข้นของสารไกลโฟเสทในดินจากการย่อยสลายโดยแบคทีเรียที่คัดเลือก (มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม)	63

สารบัญตารางผนวก

ตารางผนวก		หน้า
1	ลักษณะโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียที่คัดแยกได้ 27 ไอโซเลท	87
2	ลักษณะเซลล์ของแบคทีเรียโดยเทคนิคการย้อมสีแบบแกรม (gram's staining) แล้วส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1000 เท่า	88
3	ข้อมูลประสิทธิภาพการย่อยสลายสารไกลโฟเสทในระดับห้องปฏิบัติการ ระยะเวลา 5 และ 10 วัน (เปอร์เซ็นต์)	90
4	ข้อมูลประสิทธิภาพของแบคทีเรียในการการย่อยสลายสารไกลโฟเสทในดิน ระยะเวลาตั้งแต่ 0 ถึง 10 วัน (เปอร์เซ็นต์)	91
5	การเตรียมสารละลายไกลโฟเสทมาตรฐานความเข้มข้นตั้งแต่ 0.05 ถึง 80 มิลลิกรัมต่อลิตร	99

สารบัญภาพผนวก

ภาพผนวก		หน้า
1	สวนลำไย และชุดดินที่ 22	75
2	สวนหอม และชุดดินที่ 31	76
3	ไร่ข้าวโพด และชุดดินที่ 31	77
4	สวนมะม่วง และชุดดินที่ 31	78
5	สวนส้ม และชุดดินที่ 56	79
6	ไร่มันฝรั่ง และชุดดินที่ 18	80
7	สวนผักอินทรีย์ และชุดดินที่ 15	81
8	หลักการทำงานของเครื่อง HPLC	93
9	การเคลื่อนที่ของสาร 2 ชนิดในเฟสนิ่งและออกจากเฟสนิ่งในเวลาที่ต่างกัน	94
10	ส่วนประกอบของเครื่อง HPLC	95
11	เครื่องตรวจวัดสัญญาณชนิด diode array detector (DAD)	97
12	กราฟมาตรฐานของสารละลายไกลโฟเสท	99
13	สารไกลโฟเสทที่ใช้ทำกราฟมาตรฐาน	100
14	การวิเคราะห์หาความเข้มข้นของสารไกลโฟเสทที่ลดลงด้วยเครื่อง High Performance Liquid Chromatography (HPLC) รุ่น Agilent 1100	100
15	ผลการวิเคราะห์สารไกลโฟเสทที่เหลือของดินเติมสารไกลโฟเสท (control) ที่ระยะเวลา 10 วัน ด้วยเครื่อง HPLC	101
16	ผลการวิเคราะห์สารไกลโฟเสทที่เหลือของดินเติมสารไกลโฟเสทและเชื้อไอโซเลท LMC2 ที่ระยะเวลา 10 วัน ด้วยเครื่อง HPLC	102
17	ผลการวิเคราะห์สารไกลโฟเสทที่เหลือของดินเติมสารไกลโฟเสทและเชื้อไอโซเลท MMC2 ที่ระยะเวลา 10 วัน ด้วยเครื่อง HPLC	103
18	ผลการวิเคราะห์สารไกลโฟเสทที่เหลือของดินเติมสารไกลโฟเสทและเชื้อไอโซเลท PMA2 ที่ระยะเวลา 10 วัน ด้วยเครื่อง HPLC	104
19	ผลการวิเคราะห์สารไกลโฟเสทที่เหลือของดินเติมสารไกลโฟเสทและเชื้อผสม (MIX) ที่ระยะเวลา 10 วัน ด้วยเครื่อง HPLC	105

บทที่ 1
บทนำ

ความสำคัญของปัญหา

ประเทศไทยมีประชากรที่มีพื้นที่ส่วนใหญ่ใช้ประกอบอาชีพด้านเกษตรกรรม เนื่องจากมีพื้นที่เหมาะสมสำหรับการทำการเกษตร การใช้สารเคมีในการกำจัดวัชพืชเป็นวิธีการที่นิยมใช้กันอย่างกว้างขวาง โดยเฉพาะสารไกลโฟเสทซึ่งจัดเป็นสารเคมีที่มียอดการใช้ทั้งในประเทศและต่างประเทศในแต่ละปีเป็นจำนวนมาก (พรชัย, 2541) และในการทำการเกษตรของเกษตรกรยังขาดระบบการจัดการที่เหมาะสมจึงทำให้ประสบปัญหาด้านสิ่งแวดล้อม โดยเฉพาะปัญหาการเสื่อมโทรมของดินที่ทำการเพาะปลูกซึ่งมีการใช้สารเคมีในปริมาณมากเกินกำหนดและเกิดการตกค้างในดิน ส่งผลให้ดินเสื่อมโทรมและยังส่งผลต่อสุขภาพร่างกายของเกษตรกรผู้ใช้ อีกทั้งยังส่งผลต่อคุณภาพมาตรฐานในด้านความปลอดภัยของผลผลิตทางการเกษตรทั้งสินค้าที่บริโภคในประเทศและสินค้าส่งออก หากมีการสะสมของสารพิษเหล่านี้ในผลผลิตจะส่งผลในด้านสุขภาพร่างกายของผู้บริโภคทำให้เกิดโรคภัยไข้เจ็บมากขึ้น ทำให้สินค้าไม่เป็นที่ยอมรับของตลาดโลกเกิดข้อกีดกันทางการค้า และส่งผลต่อการส่งออกสินค้าเกษตรของประเทศไทย (ทศพล, 2545)

การฟื้นฟูและปรับสภาพดินที่ปนเปื้อนสารไกลโฟเสทในพื้นที่การเกษตรโดยใช้วิธีการทางชีวภาพเข้ามาช่วยทำให้สภาพแวดล้อมเกิดการฟื้นตัว นอกจากนี้การใช้จุลินทรีย์ในการฟื้นฟูสภาพแวดล้อมสามารถช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชที่ปลูกได้พร้อมทั้งสามารถลดความเป็นพิษและโทษที่จะเกิดการตกค้างของสารกำจัดวัชพืชในสิ่งแวดล้อม

การบำบัดสารมลพิษทางชีวภาพ เป็นกระบวนการบำบัดสารที่ปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อมด้วยวิธีทางชีวภาพที่มนุษย์ทำให้เกิดขึ้น โดยอาศัยความสามารถของจุลินทรีย์หรือพืชในการย่อยสลายสารมลพิษให้หมดไป หรือการเปลี่ยนรูปสารมลพิษที่มีความเป็นพิษต่อมนุษย์และสิ่งมีชีวิตในสิ่งแวดล้อมให้มีความเป็นพิษน้อยลง (อลิสา, 2553)

ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์ที่จะคัดแยกแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายสารไกลโฟเสท เพื่อนำไปประยุกต์ใช้ในการฟื้นฟูดินที่มีการปนเปื้อนสารไกลโฟเสทจากการทำการเกษตรแบบเคมีในประเทศไทย ซึ่งคาดว่าจะสามารถแก้ปัญหาการเสื่อมโทรมของดินและปัญหาสารพิษตกค้างในพื้นที่ทำการเกษตรได้

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อคัดแยกแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายสารไกลโฟเสท
2. เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของแบคทีเรียที่คัดแยกได้ในการย่อยสลายสารไกลโฟ-เสทที่ปนเปื้อนในดิน

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ได้แบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายสารไกลโฟเสทได้
2. สามารถพัฒนาเทคโนโลยีการฟื้นฟูดินในการทำการเกษตรให้มีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น

ขอบเขตงานวิจัย

ในการศึกษานี้เป็นการคัดแยกแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายสารไกลโฟเสทจากดินที่มีประวัติการใช้สารไกลโฟเสท และนำแบคทีเรียที่คัดแยกได้ไปศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา จากนั้นทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายสารไกลโฟเสทในระดับห้องปฏิบัติการ เพื่อคัดเลือกแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายสารไกลโฟเสท นำแบคทีเรียที่คัดเลือกมาจัดจำแนกสาย-พันธุ์ของแบคทีเรีย และทดสอบประสิทธิภาพในการย่อยสลายสารไกลโฟเสทในดิน

บทที่ 2

ตรวจเอกสาร

สารกำจัดศัตรูพืชและสารกำจัดวัชพืช

สารกำจัดศัตรูพืช

สารกำจัดศัตรูพืชคือ สารที่ใช้ป้องกัน กำจัด ยับยั้ง และควบคุมศัตรูพืช สารกำจัดศัตรูพืชเป็นได้ทั้งสารเคมีและสารชีวภาพที่ใช้ควบคุมสิ่งที่ไม่ต้องการในการเพาะปลูกหรือสิ่งที่เข้าทำลายพืช สารกำจัดศัตรูพืชที่สำคัญของประเทศไทยมีด้วยกัน 8 กลุ่ม ได้แก่ (ธวัชชัย, 2540)

1. สารกำจัดวัชพืช (herbicide) ใช้ควบคุมและกำจัดวัชพืช
2. สารกำจัดแมลง (insecticide) ใช้ควบคุมและกำจัดแมลงศัตรูพืชในระยะไข่ ตัวอ่อน และตัวเต็มวัย
3. สารกำจัดหอย (mollussicide) ใช้ควบคุมและกำจัดหอยทั้งที่มีเปลือกและไม่มีเปลือก
4. สารกำจัดเห็บไร (acaricide) ใช้ควบคุมและกำจัดเห็บ ไร ปลวก
5. สารกำจัดเชื้อรา (fungicide) ใช้ควบคุมและกำจัดเชื้อราที่เป็นสาเหตุของโรคพืช
6. สารกำจัดสัตว์แทะ (rodenticide) ใช้ควบคุมและกำจัดหนูที่กัดกินทำลายพืชในไร่
7. สารรมควันพิษ (fumigant) ใช้ควบคุมและกำจัดวัชพืช แมลง เชื้อรา และสิ่งมีชีวิตอื่นๆ ในดิน
8. สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช (plant growth regulator) ใช้ควบคุมการเจริญเติบโตของต้นพืช

สารกำจัดวัชพืช

สารกำจัดวัชพืช หรือที่เรียกเป็นภาษาอังกฤษว่า “herbicide” นั้น โดยทั่วไปจะเรียกเป็นภาษาไทยที่แตกต่างกันไปได้หลายอย่าง เช่น ยาฆ่าหญ้า ยาปราบวัชพืช ยากำจัดวัชพืช และสารเคมีกำจัดวัชพืช ซึ่งทั้งหมดการใช้คำว่า “สารกำจัดวัชพืช” เป็นชื่อเรียกที่เหมาะสมที่สุด โดยได้มีการเรียกกันอย่างเป็นทางการในสมาคมวิทยาการวัชพืชแห่งประเทศไทย และกองพฤกษศาสาตร์และวัชพืช กรมวิชาการเกษตร ซึ่งเป็นที่ยอมรับกันทั่วไป สารกำจัดวัชพืช หมายถึง สารเคมีใดๆ ก็ตามที่นำมาใช้เพื่อฆ่า ทำลาย หรือยับยั้งการเจริญเติบโตของวัชพืช ไม่ว่าจะเป็นในขณะที่วัชพืชงอกขึ้นมาแล้วหรือยังเป็นเมล็ดอยู่ตลอดจนชิ้นส่วนต่างๆ ของวัชพืชที่ขยายพันธุ์ได้ทั้งที่อยู่ในดินหรือ

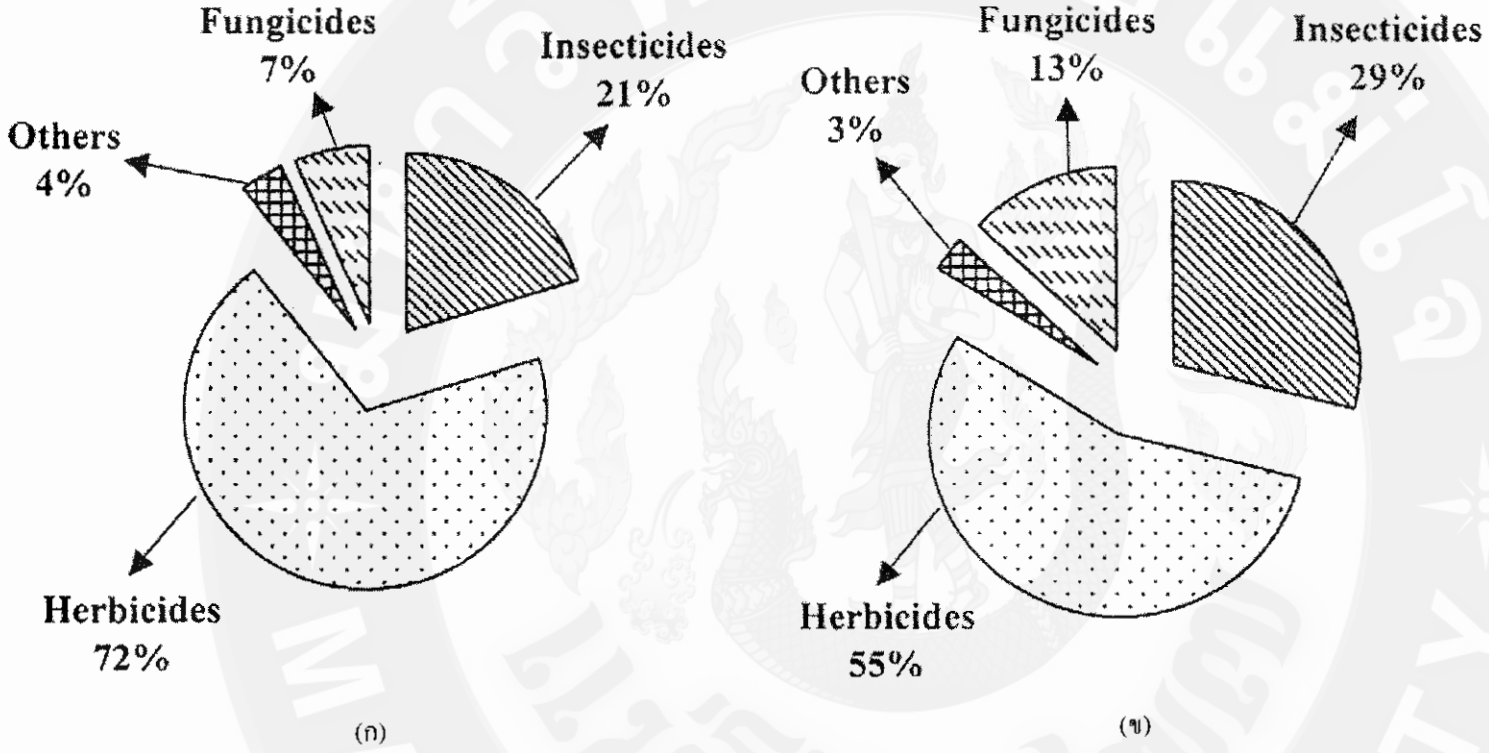
อยู่บนดิน (ทศพล, 2545) สารกำจัดวัชพืชจัดเป็นวัตถุอันตรายชนิดหนึ่ง ซึ่งได้ระบุไว้ในพระราชบัญญัติวัตถุอันตราย ปี พ.ศ. 2535 ของประเทศไทย (กองควบคุมพืชและวัสดุการเกษตร, 2537)

การใช้สารกำจัดวัชพืชในปัจจุบันมีมากกว่าสารกำจัดศัตรูพืชทางการเกษตรชนิดอื่นๆ การป้องกันกำจัดวัชพืชโดยการใช้สารเคมีนั้นเป็นวิธีที่กำลังได้รับความนิยมและใช้กันอย่างแพร่หลายในปัจจุบัน นอกจากนี้ยังสามารถใช้ได้สะดวกรวดเร็วแล้ว ในหลายกรณียังใช้ต้นทุนที่ต่ำกว่าวิธีอื่นๆ โดยเฉพาะในสภาพที่แรงงานหายากและราคาค่าแรงแพง อย่างไรก็ตามการใช้สารกำจัดวัชพืชให้ได้ผลนั้นผู้ใช้จะต้องมีความรู้ที่ดีพอ เนื่องจากสารกำจัดวัชพืชที่ใช้อาจเป็นอันตรายต่อพืชปลูก มนุษย์ สัตว์ และสิ่งแวดล้อมได้ (ทศพล, 2545)

สถิติการจำหน่ายและการนำเข้าวัตถุอันตรายทางการเกษตร

ในปัจจุบันการควบคุมวัชพืชโดยใช้สารกำจัดวัชพืชนั้นเป็นวิธีการที่มีความสำคัญอย่างมาก ทั้งนี้เนื่องจากการปรับปรุงวิธีการปลูก การขยายพื้นที่เพาะปลูก ประกอบกับการเปลี่ยนแปลงสังคมภาคการเกษตรไปเป็นสังคมภาคกึ่งการอุตสาหกรรม ทำให้แรงงานในภาคการเกษตรขาดแคลนและมีค่าจ้างแรงงานสูงขึ้นทำให้ไม่คุ้มค่าต่อการลงทุนและไม่สามารถทำงานได้ทันเวลากับการเจริญเติบโตของวัชพืช ซึ่งจะเห็นได้จากสถิติการจำหน่ายทั้งในตลาดต่างประเทศและประเทศไทยมีการจำหน่ายสารกำจัดวัชพืชในปริมาณที่มาก (ภาพ 1)

ตลาดการค้าสารเคมีเกษตรของประเทศไทยจัดเป็นประเทศในลำดับต้นๆ ของโลกที่มีการใช้สารเคมีทางการเกษตรเป็นจำนวนมาก จากรายงานขององค์การอาหารและเกษตรแห่งสหประชาชาติ (Food and Agriculture Organization of the United Nations; FAO) เมื่อปี พ.ศ. 2543 พบว่า ประเทศไทยมีพื้นที่ทางการเกษตรมากเป็นอันดับที่ 48 ของโลก และมีการใช้สารเคมีกำจัดวัชพืชมากเป็นอันดับ 4 ของโลก และใช้สารเคมีกำจัดแมลงมากเป็นอันดับ 5 ของโลก (ชมรมนักข่าวสิ่งแวดล้อม, 2547) ในประเทศไทยมีการนำเข้าสารกำจัดศัตรูพืชมาใช้ทางการเกษตรในปริมาณเพิ่มขึ้นทุกปี และสารกำจัดวัชพืชมีการนำเข้าสูงที่สุดในทุกๆ ปี ตามข้อมูลของสำนักควบคุมพืชและวัสดุการเกษตร กรมวิชาการเกษตร ซึ่งได้รวบรวมไว้ในตารางปริมาณการนำเข้าวัตถุอันตรายทางการเกษตรของประเทศไทยในปี พ.ศ. 2548-2555 (ตาราง 1)



ภาพ 1 สถิติการจำหน่ายสารกำจัดวัชพืชทั้งในตลาดต่างประเทศและประเทศไทย

(ก) สถิติการจำหน่ายสารกำจัดวัชพืชในตลาดต่างประเทศ

(ข) สถิติการจำหน่ายสารกำจัดวัชพืชในตลาดประเทศไทย

ที่มา: Duke (1998); กองควบคุมพืชและวัสดุการเกษตร (2543); ทศพล (2545)

ตาราง 1 ปริมาณการนำเข้าวัตถุอันตรายทางการเกษตรของประเทศไทยปี พ.ศ. 2548-2555

ประเภทของวัตถุอันตราย	2548		2549		2550		2551	
	ปริมาณ (ล้าน กก.)	มูลค่า (ล้านบาท)	ปริมาณ (ล้าน กก.)	มูลค่า (ล้านบาท)	ปริมาณ (ล้าน กก.)	มูลค่า (ล้านบาท)	ปริมาณ (ล้าน กก.)	มูลค่า (ล้านบาท)
สารกำจัดแมลง (insecticide)	18.40	2,929.67	20.48	3,856.07	21.58	3,745.74	25.33	4,577.47
สารป้องกันและกำจัดโรคพืช (fungicide)	7.92	1,579.01	9.38	1,722.20	10.62	1,833.18	11.25	2,537.02
สารกำจัดวัชพืช (herbicide)	47.50	5,485.72	62.12	6,820.81	79.23	8,914.13	68.82	11,.487.03
สารกำจัดไร (acaricide)	0.52	132.40	0.33	96.47	0.44	111.85	0.44	115.43
สารกำจัดหนู (rodenticide)	0.16	16.34	0.18	21.50	0.26	26.13	0.24	35.13
สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช (plant growth regulator)	1.50	180.18	1.72	191.46	2.43	214.39	1.87	211.35
สารกำจัดหอยและหอยทาก (mollussicide)	0.63	96.52	0.56	61.29	0.69	41.71	0.79	61.87
สารรมควันพิษ (funigants)	0.80	110.81	0.95	129.17	1.08	139.16	1.13	154.86
สารกำจัดไส้เดือนฝอย (nematocide)	-	-	-	-	-	-	0.01	1.5
รวม (total)	75.47	10,530.70	95.76	12,898.57	116.32	15,026.32	109.90	19,181.74

ที่มา: สำนักควบคุมพืชและวัสดุการเกษตร (2555ก)

ตาราง 1 (ต่อ)

ประเภทของวัตถุอันตราย	2552		2553		2554		2555	
	ปริมาณ (ล้าน กก.)	มูลค่า (ล้านบาท)	ปริมาณ (ล้าน กก.)	มูลค่า (ล้านบาท)	ปริมาณ (ล้าน กก.)	มูลค่า (ล้านบาท)	ปริมาณ (ล้าน กก.)	มูลค่า (ล้านบาท)
สารกำจัดแมลง (insecticide)	24.68	3,972.44	23.41	4,669.88	34.67	5,938.02	16.79	3,686.16
สารป้องกันและกำจัดโรคพืช (fungicide)	10.36	2,967.93	9.67	3,859.56	12.17	3,875.35	6.97	3,883.43
สารกำจัดวัชพืช (herbicide)	97.95	9,338.49	80.27	3,859.56	112.17	11,479.52	106.86	11,293.85
สารกำจัดไร (acaricide)	0.62	133.27	0.40	125.88	0.47	133.44	0.19	64.15
สารกำจัดหนู (rodenticide)	0.22	25.78	0.43	61.74	0.49	75.76	0.00001	0.002
สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช (plant growth regulator)	2.10	183.01	2.29	192.07	3.04	363.84	2.37	221.80
สารกำจัดหอยและหอยทาก (mollussicide)	0.69	47.17	0.34	32.83	0.60	55.86	0.23	53.60
สารรมควันพิษ (funigants)	0.94	147.64	0.85	137.38	0.73	122.00	0.94	154.38
สารกำจัดไส้เดือนฝอย (nematocide)	-	-	-	-	0.00003	0.013	0.000004	0.03
รวม (total)	137.59	16,815.76	117.69	17,924.40	164.38	22,043.83	134.37	19,357.44

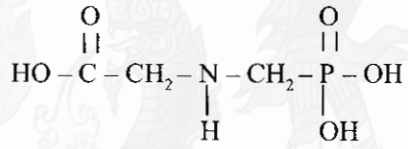
ที่มา: สำนักควบคุมพืชและวัสดุการเกษตร (2555ก)

สารไกลโฟเสท

สารไกลโฟเสทเป็นสารประกอบของสารกำจัดวัชพืชกลุ่มออร์กาโนฟอสฟอเนต (organophosphonate) ซึ่งโครงสร้างโมเลกุลมีพันธะระหว่างอะตอมของคาร์บอนจับกับฟอสฟอรัส (C-P) ที่มีความเสถียร สารไกลโฟเสทเป็นสารที่ออกฤทธิ์ในการกำจัดวัชพืชที่มีการนำไปใช้อย่างแพร่หลายในการทำเกษตรกรรม การใช้สารไกลโฟเสทฉีดพ่นเพื่อกำจัดวัชพืชจะทำให้ใบของวัชพืชเกิดสีเหลืองและตาย ซึ่งเกิดจากการไปยับยั้งการสังเคราะห์กรดอะมิโนชนิดอะโรมาติค (Rueppel *et al.*, 1977) สารไกลโฟเสทมีคุณสมบัติดังนี้คือ

1. คุณสมบัติทางเคมี

สูตรโครงสร้างทางเคมี



ชื่อสามัญ : ไกลโฟเสท (glyphosate)

ชื่อเคมี : เอ็น ฟอสโฟโนเมทธิล ไกลซีน (N – phosphonomethyl glycine)

ชื่อทางการค้า : ราวอั๊พ (roundup)
ไกลโฟเสท (glyphosate)
คาวบอย (cowboy)
สปาร์ค (spark)
โฟเสท (phosate)
เบรส (brace)
ไฟร์ (fire)
คลีนอั๊พ (cleanup)

สูตรเคมี : $C_3H_8NO_5P$

น้ำหนักโมเลกุล : 169.07

สภาพทางฟิสิกส์ : ของแข็ง สีขาวไม่มีกลิ่น

จุดหลอมเหลว : 200 องศาเซลเซียส

จุดเดือด : 109 องศาเซลเซียส

การละลาย : ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ละลายในน้ำได้ 1.2 เปอร์เซ็นต์ (พรชัย, 2531; ทศพล, 2545)

2. การนำไปใช้ในทางการเกษตร

สารไกลโฟเสทจัดเป็นสารกำจัดวัชพืชที่สามารถกำจัดได้ทั้งวัชพืชใบแคบและวัชพืชใบกว้าง เป็นสารที่ดูดซึมเข้าไปในต้นวัชพืช ในสหรัฐอเมริกานิยมใช้สารไกลโฟเสทเพื่อกำจัดวัชพืชที่ขึ้นในแปลงปลูกข้าวโพด ข้าวสาลี ข้าวฟ่าง ส้ม แอปเปิล ท้อ มันฝรั่ง หอมใหญ่ หน่อไม้ฝรั่ง กาแฟ ถั่วลิสง สับปะรด ไม้ดอกไม้ประดับ หญ้าสนาม และในแปลงปลูกป่า นอกจากนี้ยังใช้กำจัดวัชพืชที่ขึ้นในบริเวณที่ไม่ใช้ทำการเกษตรด้วย เช่น ริมถนน ทางรถไฟ และตามบ้านเรือน เป็นต้น (กฤษณา, 2547)

สารไกลโฟเสทเป็นสารที่ใช้ทางใบ และใช้ในการควบคุมวัชพืชแบบหลังงอกและไม่เลือกทำลาย สามารถควบคุมวัชพืชพวกวงศ์หญ้า วัชพืชใบกว้างปีเดียว และวัชพืชข้ามปีพวกหญ้าคา ตลอดจนพวกวัชพืชไม้พุ่มเยื่อแข็ง เช่น ไมยราบยักษ์ แต่ส่วนใหญ่จะเป็นพิษรุนแรงกับวัชพืชพวกวงศ์หญ้าปีเดียว สารสามารถดูดซึมเข้าทางใบหรือส่วนที่มีสีเขียวอื่นๆ ภายหลังฉีดพ่นสารออกฤทธิ์จะเคลื่อนย้ายหรือถูกดูดซึมเข้าสู่ท่อลำเลียงอาหารไปยังส่วนต่างๆ ของต้นพืช แล้วทำลายจุดเจริญของพืชทั้งส่วนยอดและราก (Thomson, 1993)

3. ตำแหน่งที่ทำปฏิกิริยาภายในพืช

สารไกลโฟเสททำงานโดยการเข้าไปยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ 5-enolpyruvylshikimic acid-3-phosphate synthase (EPSPs) ซึ่งกรดอะมิโนดังกล่าวมีความสำคัญต่อกระบวนการสังเคราะห์โปรตีนและจำเป็นสำหรับการเจริญเติบโตของพืช (Carlisle and Trevors, 1988) เอนไซม์ 5-enolpyruvylshikimic acid-3-phosphate synthase (EPSPs) เป็นเอนไซม์ที่พบในคลอโรพลาสต์ของพืชมากกว่าในสัตว์ นอกจากนี้ไกลโฟเสทยังสามารถทำหน้าที่เป็นสารยับยั้ง phosphoenolpyruvate (PEP) ซึ่งเป็นหนึ่งในสารตั้งต้นในการสังเคราะห์กรดอะมิโนที่มีกลิ่นหอม นอกจากนี้ยังมีผลกระทบต่อกระบวนการทางชีวเคมีอื่นๆ อีกด้วย (Tu, 2001)

4. ลักษณะอาการที่พืชได้รับพิษ

ลักษณะอาการที่พืชได้รับพิษหลังจากที่พืชได้รับสารไกลโฟเสทภายใน 4-7 วัน จะมีผลในการยับยั้งการเจริญเติบโตของพืชทันที และวัชพืชวงศ์หญ้าที่อ่อนแอจะแสดงอาการได้รับพิษภายใน 10-20 วัน ทำให้ใบที่ยังไม่แก่เต็มที่และจุดเจริญถูกทำลายไป

การรับพิษจากการดูดซึมจะทำให้พืชดูดซึมสารไกลโฟเสทโดยผ่านทางคิวติเคิลซึ่งสารไกลโฟเสทที่อยู่ในรูปเกลือจะสามารถเข้าสู่พืชได้เร็วกว่าสารที่อยู่ในรูปกรด

การรับพิษจากการเคลื่อนย้ายเกิดจากสารไกลโฟเสทจะเคลื่อนย้ายจากบริเวณส่วนของใบไปสู่เนื้อเยื่อ โดยเฉพาะส่วนที่อยู่บริเวณเนื้อเยื่อเจริญ เนื้อเยื่อที่สะสมอาหาร เนื้อเยื่อที่อยู่ใต้ดิน และใบที่ยังไม่แก่เต็มที่ ดังนั้นอวัยวะของพืชที่ทำหน้าที่สะสมอาหาร เช่น หัว เหง้า และไหล จึงมีสารไกลโฟเสทไปสะสมอยู่ในปริมาณที่ค่อนข้างสูง เป็นผลทำให้มีประสิทธิภาพสามารถควบคุมวัชพืชอายุข้ามปีได้ดี (ทศพล, 2545)

สารไกลโฟเสทเป็นผลิตภัณฑ์ที่ขายอยู่ในรูปของเหลวรูปเกลือไอโซพรอพิลามีน มีสารออกฤทธิ์ 41 เปอร์เซ็นต์ อาการที่พืชแสดงหลังจากฉีดพ่นสารไกลโฟเสทคือ มีอาการเหี่ยวและเหลือง ซึ่งเริ่มจากเนื้อเยื่อที่อ่อนไปสู่เนื้อเยื่อที่แก่ ยอดอ่อนที่งอกใหม่อาจจะมีอาการผิดปกติ เนื่องจากสารไกลโฟเสทจะเข้าไปขัดขวางกลไกการสังเคราะห์โปรตีนภายในต้นพืช (อำพร, 2538)

5. พฤติกรรมในดิน

สารไกลโฟเสทจะถูกดูดยึดด้วยอนุภาคของดินอย่างรุนแรง จุลินทรีย์ในดินหลายชนิดสามารถย่อยสลายโมเลกุลของสารไกลโฟเสทได้ ถึงแม้ว่าสารไกลโฟเสทจะไม่ค่อยมีการสูญเสียโดยปฏิกิริยาของแสงหรือการระเหยก็ตาม แต่การสูญเสียจะเกิดขึ้นได้มากโดยการที่โมเลกุลของสารไกลโฟเสทสลายตัวตัวเนื่องมาจากจุลินทรีย์ในดิน คาร์บอนจากโมเลกุลของสารไกลโฟเสทปริมาณ 10-70 เปอร์เซ็นต์ถูกเปลี่ยนเป็น คาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2) สารไกลโฟเสทมีครึ่งชีวิตในดินนาน 30-47 วัน (พรชัย, 2541; รังสิต, 2547)

6. ข้อมูลความเป็นพิษ

ค่าความเป็นพิษเฉียบพลันในหนู ทางปาก มีค่า LD_{50} เท่ากับ 5,000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และค่าความเป็นพิษเฉียบพลันในกระต่ายทดลอง ทางผิวหนัง มีค่า LD_{50} เท่ากับ 5,000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (ทศพล, 2545) จากการศึกษาผลของสารไกลโฟเสทที่มีต่อหนูทดลองพบว่าเมื่อหนูทดลองได้รับสารไกลโฟเสทเข้าสู่ร่างกายจะมีน้ำหนักตัวลดลง นอกจากนี้ยังพบว่าหนูตัวผู้เป็นเนื้องอกในตับและตับอ่อนมากขึ้น ในขณะที่หนูตัวเมียเป็นมะเร็งที่ต่อมไทรอยด์มากขึ้นด้วย ทั้งนี้เนื่องจากสารไกลโฟเสทมีสารประกอบพวกเอ็นไนโตรโซ่ (N - nitroso compounds) ที่เป็นสารก่อมะเร็ง (กฤษณา, 2547)

7. ค่ามาตรฐานการปนเปื้อนของสารไกลโฟเสทในสิ่งแวดล้อม

การกำหนดค่ามาตรฐานของการปนเปื้อนสารไกลโฟเสทที่มีกำหนดอยู่ในปัจจุบันคือองค์กร environmental protection agency (EPA) ของประเทศสหรัฐอเมริกาซึ่งได้กำหนดค่ามาตรฐานการปนเปื้อนสารไกลโฟเสทที่พบได้ในน้ำดื่มของประเทศสหรัฐอเมริกาไว้ตาม safe drinking water act ว่าค่า maximum contaminant level (MCL) ต้องไม่เกิน 0.7 มิลลิกรัมต่อลิตร

(EPA, 2009) จากการคำนวณของ EPA ค่าการสัมผัสจากสิ่งแวดล้อมต่อวันที่ยังปลอดภัย (reference dose; RfD) ของสารไกลโฟเสทอยู่ที่ 2 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมต่อวัน (EPA, 1993)

การนำเข้าสารไกลโฟเสท

สารไกลโฟเสทมียอดจำหน่ายสูงสุดทั้งในสหรัฐอเมริกาและประเทศอื่นๆ อีกหลายประเทศ โดยมีการจดทะเบียนเป็นสารเคมีเกษตรใน 130 ประเทศทั่วโลก นอกจากนี้ยังมีการประชาสัมพันธ์สรรพคุณของสารไกลโฟเสทว่าเป็นสารกำจัดวัชพืชได้หลายชนิดและมีประสิทธิภาพสูง (กฤษณา, 2547) ทั้งนี้สำนักควบคุมพืชและวัสดุทางการเกษตร กรมวิชาการเกษตร ได้รวบรวมข้อมูลปริมาณการนำเข้าสารกำจัดศัตรูพืชที่มีการนำเข้ามากที่สุด 10 อันดับแรกของประเทศไทยไว้ จากข้อมูลเบื้องต้นพบว่าในปี พ.ศ. 2550-2555 ประเทศไทยได้มีการนำเข้าสารไกลโฟเสทมากที่สุดเป็นอันดับ 1 (ตาราง 2)

ตาราง 2 ปริมาณการนำเข้าสารกำจัดศัตรูพืชที่มีการนำเข้าสูงสุด 10 อันดับแรกในปี พ.ศ. 2550-2555

ลำดับ	ปี พ.ศ.								
	2550			2551			2552		
	ชื่อสาร	ปริมาณ (ล้าน ก.ก.)	มูลค่า (ล้านบาท)	ชื่อสาร	ปริมาณ (ล้าน ก.ก.)	มูลค่า (ล้านบาท)	ชื่อสาร	ปริมาณ (ล้าน ก.ก.)	มูลค่า (ล้านบาท)
1	glyphosate	34.98	3,028	glyphosate	19.17	3,610	glyphosate	39.81	2,750
2	paraquat	16.86	1,808	paraquat	19.74	2,402	paraquat	21.69	2,163
3	2,4-D sodium salt	4.03	316	2,4-D sodium salt	4.25	385	carbofuran	4.45	160
4	ametryn	3.96	555	Atrazine	3.76	474	abamectin	4.20	623
5	atrazine	3.68	356	Ametryn	4.06	681	2,4-D sodium salt	3.56	300
6	parathion methyl	2.74	164	Butachlor	2.59	307	atrazine	2.79	330
7	mancoze	2.00	246	Colopyrifos	2.35	449	glyphosate acid	2.69	327
8	endosulfan	2.24	148	2,4 dimethyl	2.51	180	2,4 dimethyl	2.19	117
9	carbendazin	1.78	258	Mancozeb	2.14	209	butachlor	2.02	211
10	mathamidophos	1.53	248	Propanil	1.79	240	ametryn	1.60	262

ที่มา: สำนักควบคุมพืชและวัสดุการเกษตร (2555ข)

ตาราง 2 (ต่อ)

ลำดับ	ปี พ.ศ.								
	2553			2554			2555		
	ชื่อสาร	ปริมาณ (ล้าน ก.ก.)	มูลค่า (ล้านบาท)	ชื่อสาร	ปริมาณ (ล้าน ก.ก.)	มูลค่า (ล้านบาท)	ชื่อสาร	ปริมาณ (ล้าน ก.ก.)	มูลค่า (ล้านบาท)
1	glyphosate	26.02	1,739	glyphosate	47.17	2,820	glyphosate	40.31	2,516
2	paraquat dichloride	21.02	1,662	paraquat dichloride	28.86	2,417	paraquat dichloride	26.72	2,086
3	ametryn	5.14	709	2,4 dimethyl	4.45	359	ametryn	8.34	1,332
4	2,4-D sodium salt	4.13	317	ametryn	4.79	651	2,4 dimethyl	6.65	512
5	atrazine	4.30	447	2,4-D sodium salt	3.81	353	atrazine	5.87	720
6	2,4 dimethyl	3.92	240	Butachlor	3.87	399	2,4-D sodium salt	4.48	521
7	butachlor	2.18	211	Atrazine	3.20	321	diuron	2.41	450
8	diuron	2.18	317	chlorpyrifos	3.48	524	butachlor	2.28	255
9	chlorpyrifos	1.89	272	Diuron	2.29	372	acetochlor	2.36	198
10	glyphosate acid	1.64	215	Mancozeb	1.86	177	mancozeb	1.40	136

ที่มา: สำนักควบคุมพืชและวัสดุการเกษตร (2555ข)

การปนเปื้อนของสารไกลโฟเสทในสิ่งแวดล้อม

ในปัจจุบันมีการใช้สารเคมีที่อยู่ในรูปของสารอินทรีย์หลายชนิดในทางการเกษตร พบว่าถ้าเกษตรกรไม่มีการจัดการที่ถูกต้องในการใช้สารเคมีเหล่านั้นก็จะทำให้เกิดการสะสมอยู่ในสิ่งแวดล้อมโดยเฉพาะในดิน (Stelmack *et al.*,1999) และสารเคมีบางชนิดยังคงทนอยู่ในสภาพแวดล้อมได้เป็นเวลานานรวมทั้งสามารถยึดเกาะติดกับอนุภาคของดินและเคลื่อนย้ายไปสู่พืชที่มีประโยชน์ได้ (Thapinta and Hudak, 2003)

การใช้สารกำจัดวัชพืชเป็นเวลานาน 30 ปี ภายใต้ระบบนิเวศที่แตกต่างกัน ซึ่งเมื่อทำการสำรวจพบว่าสารไกลโฟเสทยังคงปนเปื้อนอยู่ในดินเป็นเวลานาน ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิดของดิน สภาพภูมิอากาศ และปัจจัยอื่นๆ สารไกลโฟเสทที่สะสมอยู่ในดินจะส่งผลเสียต่อสิ่งแวดล้อมและสุขภาพมนุษย์ (Eberbach, 1998) การพ่นสารไกลโฟเสทลงดินจะทำให้สารไกลโฟเสทถูกอนุภาคดินยึดจับไว้ (กฤษณา, 2547) สารไกลโฟเสทเกิดการปนเปื้อนในน้ำเนื่องจากน้ำฝนส่วนที่ตกลงบนผิวดินแล้วไหลไปตามผิวดินลงสู่ลำน้ำบางส่วนได้ระเหยและรั่วซึมลงไปในดินส่งผลให้เกิดสารพิษต่อสิ่งมีชีวิตในน้ำบางชนิดได้ (Alberdi *et al.*, 1996)

สารไกลโฟเสทสามารถเปลี่ยนแปลงระบบนิเวศทางธรรมชาติโดยส่งผลต่อความหลากหลายของประชากรจุลินทรีย์ในดิน สารประกอบนี้ยับยั้งการเจริญเติบโตและลดปริมาณความหลากหลายของจุลินทรีย์ในดิน เช่น แบคทีเรีย เชื้อรา แอคติโนมัยซิท และยีสต์ (Carlise and Trevors, 1988) ผลกระทบในการใช้สารไกลโฟเสทต่อพืชทำให้พืชตอบสนองต่อการติดเชื้อโดยจุลินทรีย์ก่อโรคในพืช (Levesque and Rahe, 1992)

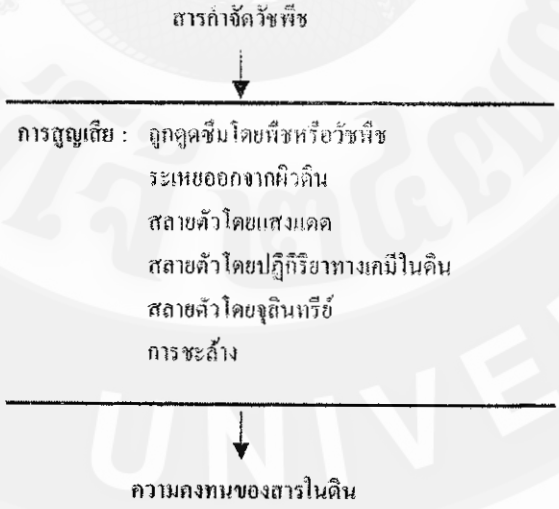
เมื่อเกษตรกรใช้สารเคมีกำจัดศัตรูพืชในแปลงเพาะปลูกก็มีผลกระทบต่อสุขภาพอนามัยของผู้ใช้โดยตรง การได้รับสารพิษเข้าร่างกายโดยไม่ได้ป้องกันตนเองเพียงพอจะทำให้สารพิษเข้าไปสะสมในร่างกายจนเมื่อมีปริมาณมากพอก็แสดงอาการ ในบางรายอาจจะช้าเกินไปที่จะรักษาเนื่องจากมีการสะสมของสารพิษตกค้างในปริมาณสูง ซึ่งเกษตรกรเองอาจไม่ตระหนักถึงความรุนแรงดังกล่าว หรืออาจมีความมุ่งหวังต่อผลตอบแทนในระยะสั้นสูงกว่าปัญหาความเสี่ยงเรื่องสุขภาพที่อาจเกิดขึ้นในระยะยาว นอกจากนั้นผลกระทบด้านสุขภาพอาจเกิดต่อผู้บริโภคจากสารพิษตกค้างที่อยู่ในผลิตผลต่างๆ รวมทั้งสารพิษตกค้างในน้ำดื่ม และในบรรยากาศ (วราภรณ์, 2550)

ความคงทนและผลตกค้างของสารกำจัดวัชพืชในดิน

ระยะเวลาที่สารกำจัดวัชพืชมีฤทธิ์ในดิน เรียกว่า ความคงตัวของสารในดิน (soil persistence) ส่วนอายุของสารที่ตกค้างในดิน เรียกว่า ผลตกค้างของสารในดิน (soil residue) ข้อเสียจากการตกค้างของสารกำจัดวัชพืชในดิน

1. เป็นพิษกับพืชที่ปลูกร่วมกัน
2. เข้าสู่ต้นพืชและสะสมในพืชที่ปลูกร่วมกัน อาจจะเป็นพิษต่อผู้บริโภค
3. สะสมในดินชั้นล่างจนเป็นพิษ
4. ยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ที่เป็นประโยชน์ลดผลตกค้างได้

ความคงทนของสารในดินเมื่อใช้สารกำจัดวัชพืชไม่ว่าจะเป็นลักษณะการฉีดทางใบแบบหลังงอกหรือการฉีดทางดินแบบก่อนงอกโดยตรง โมเลกุลของสารเหล่านี้อาจเกิดความคงทน (persistence of herbicide) ในดินได้ในช่วงระยะเวลายาวนาน แตกต่างกันไป ซึ่งความคงทนของสารในดินนี้ ความจริงแล้วก็คือ ส่วนที่เหลือจากพฤติกรรมต่างๆ ที่ทำให้เกิดการสูญเสีย ได้แก่ การดูดซึมโดยพืชและวัชพืช การระเหยออกจากผิวดิน การสลายตัวโดยแสงแดดหรือโดยปฏิกิริยาทางเคมีในดิน การสลายตัวโดยจุลินทรีย์ในดิน และการชะล้าง เป็นต้น (ภาพ 2)



ภาพ 2 การเกิดความคงตัวของสารกำจัดวัชพืชในดิน

ที่มา: Ross and Lembi (1985)

กระบวนการหลักที่สำคัญในการศึกษาการสลายตัวของสารกำจัดวัชพืชหลังจากที่สารกำจัดวัชพืชตกลงในดิน สามารถเกิดการดูดซึม การเคลื่อนย้าย และการย่อยสลาย ของสารกำจัดวัชพืชมีลักษณะดังนี้

1. การดูดซึม

ขึ้นอยู่กับลักษณะของสารกำจัดวัชพืชโดยสารละลายคอลลอยด์ในดิน จะสามารถจับตัวหรือยึดเกาะได้ดีกับดินที่เป็นอินทรียวัตถุ นอกจากนี้ยังขึ้นอยู่กับอนุภาคของสาร โดยถ้าเป็นสารกำจัดวัชพืชที่เป็นประจุบวกโมเลกุลของสารจะยึดเกาะติดแน่นกับอนุภาคดินได้ดีกว่า แต่ถ้าเป็นประจุลบจะเกิดการผลักและห่างจากอนุภาคของดิน เช่น ไดควอท และ พาราควอท ซึ่งมีอนุภาคเป็นบวก สารดังกล่าวจะไม่แสดงกิจกรรมหรือไม่เปลี่ยนไปอยู่ในรูปที่จะใช้ประโยชน์ได้ในดิน เพราะว่าอนุภาคของสารที่เป็นประจุบวกจะถูกยึดไว้กับอนุภาคของดินซึ่งเป็นประจุลบ

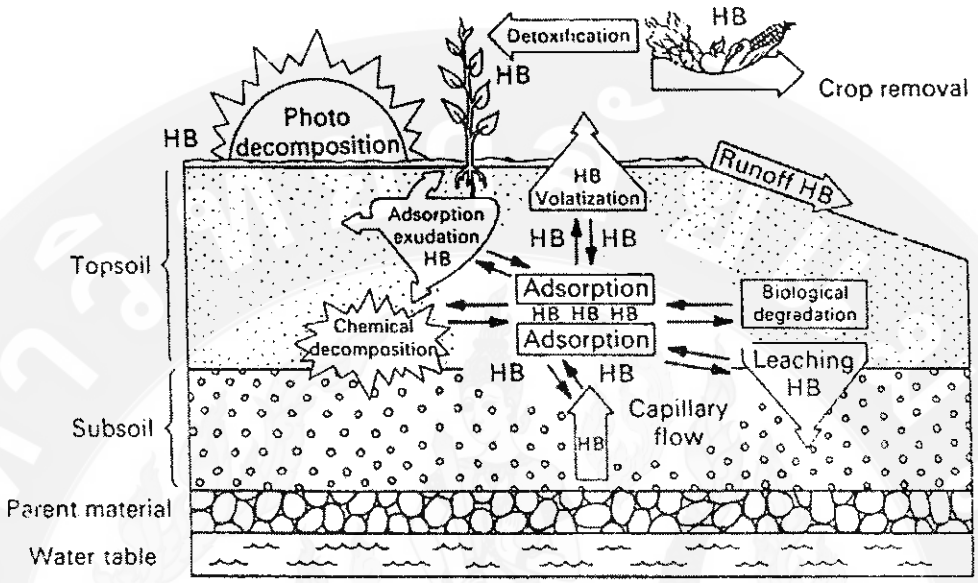
นอกจากนี้ยังพบว่าความชื้นในดินมีผลต่อการยึดเกาะกับอนุภาคของดิน เนื่องจากน้ำมีความสามารถในการยึดเกาะ และเกี่ยวข้องกับการระเหยของสารกำจัดวัชพืชอีกด้วย

2. การเคลื่อนย้าย

ความสามารถของสารกำจัดวัชพืชจะพิจารณาจากการละลายในดินและในน้ำ ซึ่งจะเกิดจากการระเหยและเคลื่อนตัวของน้ำจากดินไปสู่พืช

3. การสลายตัว

การสลายตัวของสารกำจัดวัชพืชเหล่านี้เกี่ยวข้องกับปัจจัยต่างๆ ได้แก่ ปริมาณของสารกำจัดวัชพืช สภาพแวดล้อม การจับตัวกับอนุภาคของสารละลายในดิน และปริมาณจุลินทรีย์ในดิน โดยสารกำจัดวัชพืชบางชนิดสามารถถูกนำไปใช้ในเมตาบอลิซึมของเซลล์จุลินทรีย์บางชนิดได้ โดยการเปลี่ยนรูปไปเป็นอนุพันธ์ต่างๆ ซึ่งจะสามารถนำเข้าสู่วิถีต่างๆ ภายในเซลล์ได้ เช่น วิถี catechol ซึ่งคล้ายกับการย่อยสลายอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนต่างๆ ซึ่งจุลินทรีย์ที่มีกลไกเหล่านี้จัดอยู่ในกลุ่มของรา และแบคทีเรีย เป็นส่วนใหญ่ (กรมควบคุมมลพิษ, 2542) (ภาพ 3)



ภาพ 3 กระบวนการสลายตัวของสารกำจัดวัชพืชในสิ่งแวดล้อม
ที่มา: Ross and Lembi (1985)

ในการใช้สารกำจัดวัชพืชชนิดหนึ่งฉีดพ่นลงไป โดยเฉพาะสารที่มีฤทธิ์ในการควบคุมวัชพืชที่ใช้ทางดินนั้น ผู้ใช้ต้องการให้สารมีความคงทนในดินได้ยาวนาน โดยเฉพาะในช่วงสำคัญที่ต้องการควบคุมวัชพืช ซึ่งจะเห็นได้ว่าขึ้นอยู่กับชนิดของพืชปลูก พืชปลูกบางชนิดที่ต้องการช่วงการปราศจากวัชพืชที่ยาวนานนั้นจำเป็นต้องใช้สารกำจัดวัชพืชที่มีความคงทนได้ยาวนาน ซึ่งอาจยาวนานเกินช่วงอายุการปลูกพืชในฤดูนั้นและมีผลกระทบต่อพืชปลูกชนิดที่อ่อนแอต่อสารกำจัดวัชพืชชนิดนั้น (ทศพล, 2545)

ผลกระทบจากการใช้สารไกลโฟเสทในการทำการเกษตร

การใช้สารไกลโฟเสทในประเทศไทยมีมานานแล้วโดยที่ปริมาณการใช้ไม่ได้ลดลงมีแต่เพิ่มขึ้นตามปริมาณผลผลิตที่ต้องการ จึงทำให้มีการแพร่กระจายของสารไกลโฟเสทต่างๆ ในสิ่งแวดล้อมมากขึ้นด้วยและทำให้เกิดผลกระทบทั้งทางตรงและทางอ้อมต่อระบบนิเวศมากมาย นอกจากนี้สารเคมีเหล่านี้มีความคงทนและยากต่อการย่อยสลาย เนื่องจากมีโครงสร้างที่ซับซ้อนจึงสามารถสะสมอยู่ในสิ่งแวดล้อมได้เป็นระยะเวลานาน (ศิริพรรณ, 2550) องค์การอนามัยโลกได้มีการรวบรวมองค์ความรู้งานวิจัยที่เชื่อมโยงผลกระทบระหว่างพิษภัยจากสารเคมีเกษตรตกค้างที่มี

ต่อสุขภาพ และมลพิษในสภาพแวดล้อม เพื่อให้ตระหนักถึงภัยและความเสียหายที่เกิดขึ้นจากการใช้สารเคมีเกินขนาด (WHO, 2011) การใช้สารเคมีเกษตรในประเทศไทยมีปริมาณเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว แม้ว่าจะมีส่วนช่วยเพิ่มผลผลิตด้านการเกษตร แต่ปริมาณการใช้ที่เพิ่มขึ้นมากผนวกกับการใช้ที่ไม่ถูกต้องได้ก่อให้เกิดผลกระทบรุนแรงต่อทั้งสุขภาพและสิ่งแวดล้อม (วราภรณ์, 2550)

ในปัจจุบันเกษตรกรได้เห็นถึงอันตรายที่เกิดขึ้นจากการใช้สารเคมีกำจัดวัชพืชมากขึ้น ไม่ว่าจะเป็นความเป็นพิษที่เกิดขึ้นกับพืช คน สัตว์ และสิ่งแวดล้อม อีกทั้งสารเคมีบางชนิดยังเกิดการสะสมอยู่ในดินเป็นเวลานาน ทำให้ส่งผลต่อการเพาะปลูกและสิ่งแวดล้อมในบริเวณใกล้เคียง และสามารถคงทนอยู่ในดินได้เป็นเวลานานทำให้ความอุดมสมบูรณ์ของดินและผลผลิตของพืชปลูกลดลง (รังสิต, 2526) ผลกระทบของการใช้สารไกลโฟเสทในการทำเกษตรกรรม ได้แก่

1. ผลกระทบของสารไกลโฟเสทต่อพืช

ผลกระทบของสารไกลโฟเสทที่มีต่อคุณภาพของพืช เช่น การใช้สารไกลโฟเสทในแปลงฝ้าย มีผลทำให้คุณภาพของเมล็ดฝ้ายต่ำ คือทำให้ความงอกลดลง 24-85 เปอร์เซ็นต์ ต้นกล้าอ่อนแอ และไม่สามารถตั้งตัวได้ดีเมื่อนำไปปลูกในแปลง เป็นต้น

นอกจากนี้สารไกลโฟเสทยังมีผลกระทบทำให้พืชเป็นโรคมากขึ้น เช่น ทำให้ประชากรเชื้อที่เป็นสาเหตุโรครากเน่าในถั่วที่อาศัยอยู่ในดินเพิ่มขึ้น และสารไกลโฟเสทที่เข้าไปในต้นสนจะยับยั้งกลไกการป้องกันตัวของต้นสนจากเชื้อรา จึงทำให้ต้นสนเป็นโรคได้ง่าย การใช้สารไกลโฟเสทพ่นเพื่อกำจัดวัชพืชในแปลงแห่งหนึ่งหลังจากนั้นประมาณหนึ่งเดือนได้ปลูกผักกาดหอมและอีกสี่เดือนต่อมาได้นำผักกาดหอมเหล่านั้นไปวิเคราะห์สารตกค้างพบว่ามีสารไกลโฟเสทปนเปื้อนอยู่ เช่นเดียวกับกรณีข้าวบาร์เล่ย์ที่ปลูกภายหลังการใช้สารไกลโฟเสทกำจัดวัชพืชในแปลงหนึ่งเดือนและอีกสี่เดือนต่อมาพบว่าข้าวบาร์เลย์ที่เก็บไปวิเคราะห์นั้นมีสารไกลโฟเสทปนเปื้อนอยู่ นอกจากนี้การนำธัญพืชไปอบเพื่อนำไปทำเป็นอาหารไม่ได้ช่วยให้พิษตกค้างจากสารไกลโฟเสทลดลงได้ (กฤษณา, 2547)

2. ผลกระทบของสารไกลโฟเสทต่อสิ่งแวดล้อม

ปัญหาเกี่ยวกับสารกำจัดวัชพืชตกค้างในสิ่งแวดล้อมนั้นไม่ได้เกิดขึ้นเฉพาะที่ที่มีการใช้สารนี้เท่านั้นแต่สามารถแพร่กระจายและตกค้างในบริเวณกว้าง ซึ่งก่อให้เกิดปัญหาสิ่งแวดล้อมตามมา เริ่มจากสารพิษตกค้างในดินและลำต้นพืชหลังการฉีดพ่นอาจเกิดการสะสมในส่วนหนึ่ง บางส่วนฟุ้งกระจายไปในอากาศ บางส่วนซึมลงไปในดิน และบางส่วนก็ถูกฝนชะและพัดพาไปกับน้ำไหล่บ่าหน้าดินไหลลงสู่แหล่งน้ำ (นวลศรี, 2533)

นอกจากนี้สารเคมีป้องกันกำจัดวัชพืชที่ฉีดพ่นลงในพื้นที่นาข้าวนั้น มีการสะสมในดินได้ในปริมาณที่ไม่เท่ากัน การสลายตัวขึ้นกับค่าครึ่งชีวิต (half-life) ของสารแต่ละชนิด หาก

สลายตัวได้ช้าโอกาสที่จะแพร่กระจายลงสู่แหล่งน้ำย่อมเป็นไปได้สูง (สำนักจัดการคุณภาพน้ำ, 2554) ในการพ่นสารไกลโฟเสทแต่ละครั้งการฟุ้งกระจายของละอองสารเคมีย่อมเกิดขึ้นได้เสมอ เนื่องจากกระแสลมในแปลงทำให้ละอองสารเคมีปลิวไปตกที่อื่นได้ไม่ว่าจะเป็นการใช้เครื่องพ่นสารเคมีชนิดใดก็ตาม การศึกษาเรื่องระยะทางที่ละอองสารเคมีปลิวไปนั้นมีกรณีหนึ่งในรัฐแคลิฟอร์เนียที่พบว่าละอองสารไกลโฟเสทสามารถปลิวไปได้ไกลประมาณ 800 เมตร

การพ่นสารกำจัดวัชพืชลงพื้นดินโดยใช้เครื่องพ่นติดตั้งกันรถแทรคเตอร์สามารถทำให้ต้นกล้าที่อยู่ห่างจากจุดพ่นสาร 20 เมตร ตายไปประมาณ 10 เปอร์เซ็นต์ และต้นกล้าที่อ่อนแอมากๆ จะตายได้แม้อยู่ห่างจากจุดพ่นสารไกลโฟเสทไกลถึง 40 เมตร และการพ่นสารกำจัดวัชพืชทางอากาศโดยใช้เฮลิคอปเตอร์นิยมใช้พ่นสารกำจัดวัชพืชในบริเวณกว้าง เช่น แปลงปลูกพืชที่มีขนาดใหญ่ หรือพื้นที่ป่า เป็นต้น การพ่นสารทางอากาศเช่นนี้ทำให้ละอองสารปลิวได้ไกลเป็นระยะทาง 200 เมตร ขึ้นไป

รวมถึงการพ่นสารกำจัดวัชพืชด้วยเครื่องบินโดยทดลองพ่นในพื้นที่ป่าของแคนาดา พบว่าละอองสารปลิวได้ไกลถึง 300-400 เมตร และในสหรัฐอเมริกาได้มีรายงานว่าการพ่นสารไกลโฟเสทเพียงครั้งเดียวโดยใช้เครื่องบินพ่นสามารถก่อให้เกิดความเสียหายมากมาย เช่น ทำให้ต้นไม้ใหญ่ถูกทำลายประมาณ 1,000 ต้น ข้าวโพดตาย 250 เอเคอร์ มะเขือเทศตาย 155 เอเคอร์ เป็นต้น (กฤษณา, 2547)

3. ผลกระทบของสารไกลโฟเสทต่อสิ่งมีชีวิต

3.1 ผลกระทบของสารไกลโฟเสทต่อแมลง

ถ้ามีสารไกลโฟเสทปนเปื้อนอยู่ที่บริเวณผิวน้ำ แสงแดด หรือน้ำไม่สามารถทำให้สารไกลโฟเสทแตกตัวได้ทันที การสลายตัวของสารไกลโฟเสทในน้ำใช้เวลาประมาณ 70-84 วัน และในดินประมาณ 47-174 วัน แต่ทั้งนี้ไม่ได้หมายความว่าจะสลายตัวทั้งหมดการสลายตัวนี้จะสลายตัวไปเพียงครึ่งหนึ่งเท่านั้น ดังนั้นการปนเปื้อนของสารไกลโฟเสทในดินหรือน้ำจึงมีผลกระทบต่อสิ่งมีชีวิตต่างๆ ในสภาพแวดล้อมได้ เช่น แมลงที่มีประโยชน์พวกแตนเบียน แมลงช้างปีกใส และด้วงเต่า เป็นต้น (กฤษณา, 2547)

3.2 ผลกระทบของสารไกลโฟเสทต่อสัตว์

การพ่นสารไกลโฟเสทลงดินติดต่อกันหลายๆ ครั้งมีผลต่อการเจริญและการมีชีวิตรอดของไส้เดือน ถ้าพ่นลงน้ำจะมีพิษเฉียบพลันต่อปลาโดยที่อุณหภูมิของน้ำและค่าความเป็นกรด-ด่าง ยิ่งสูงทำให้ความเป็นพิษรุนแรงขึ้น นอกจากนี้การพ่นสารไกลโฟเสทเพื่อกำจัดวัชพืชในน้ำให้ไม่มีพืชน้ำเจริญเติบโตให้ร่มเงา น้ำจึงมีอุณหภูมิสูงขึ้นทำให้เกิดอันตรายต่อปลาหรือสัตว์น้ำบางชนิดที่ไม่ชอบอุณหภูมิสูงได้ ทั้งนี้สารไกลโฟเสทยังมีผลกระทบโดยอ้อมต่อนกและสัตว์เลี้ยงลูก

ด้วยนม เนื่องจากสารไกลโฟเสทไปทำลายพืช อาหาร และที่อยู่อาศัยของสัตว์จึงทำให้ประชากรสัตว์เหล่านี้ลดลง ซึ่งการพ่นสารไกลโฟเสทนี้ทำในบริเวณกว้างจึงมีผลกระทบต่อสัตว์ ในขณะที่ออสเตรเลียมีกฎหมายห้ามใช้สารไกลโฟเสทในน้ำหรือใช้ใกล้แหล่งน้ำเพราะสารชนิดนี้อาจมีผลกระทบต่อกบทั้งในระยะตัวอ่อนและเต็มวัย (กฤษณา, 2547)

3.3 ผลกระทบของสารไกลโฟเสทต่อมนุษย์

สารกำจัดวัชพืชทำให้เกิดปัญหาเนื่องจากสารกลุ่มนี้ดูดซึมทางผิวหนังได้ดี โดยเฉพาะถ้ามีบาดแผล พิษเฉียบพลัน มักมีผลต่อตับ ปอด อาจมีเลือดออกในทางเดินอาหาร พิษเรื้อรัง มีอาการเป็นพังผืดที่ปอด นอกจากนั้นสารกำจัดวัชพืชที่มีแนวโน้มถูกนำมาใช้มากขึ้นในปัจจุบันอีกชนิดหนึ่งสารคือไกลโฟเสท ซึ่งสารกลุ่มนี้ทำให้เกิดอาการคลื่นไส้ อาเจียน แน่นหน้าอก อาการรุนแรง อาจมีอาเจียนปนเลือด ปัสสาวะออกน้อย ไตวาย ปอดบวม อาการทางผิวหนัง ผื่นคัน ผิวหนังไหม้ ตาอักเสบได้ (สำนักระบาดวิทยา, 2546) สำหรับผลการศึกษาด้านสาธารณสุขทั้งในประเทศไทยและในต่างประเทศพบว่า พิษภัยจากสารเคมีเกษตรมีผลกระทบที่สำคัญต่อระบบประสาท ระบบทางเดินอาหาร ระบบสืบพันธุ์ ระดับฮอร์โมนเพศ รวมทั้งความพิการแต่กำเนิด (ปัตพงษ์ และคณะ, 2547)

การที่ร่างกายของคนเราจะได้รับสารไกลโฟเสทนั้นมีได้หลายทาง เช่น จากการทำงานที่เกี่ยวข้องกับสารไกลโฟเสทโดยตรง ทั้งการผลิต การขนส่ง การจำหน่าย และการนำไปใช้ การรับประทานอาหารที่มีสารไกลโฟเสทปนเปื้อน ละอองสารไกลโฟเสทจากบริเวณที่มีการพ่นสารปลิวมาถูกตัว การสัมผัสดินที่มีไกลโฟเสทปนเปื้อนอยู่ การดื่มน้ำหรืออาบน้ำในบริเวณที่ใกล้กับบริเวณที่มีการใช้สารไกลโฟเสท เป็นต้น ดังนั้นจะเห็นได้ว่าคนที่ไม่ได้มีอาชีพเกษตรกรก็มีโอกาสได้รับสารไกลโฟเสทเข้าสู่ร่างกายได้เช่นกัน สำหรับผลกระทบที่เกิดขึ้นกับชาวสวนที่ทำงานเกี่ยวข้องกับสารไกลโฟเสทนั้นมีรายงานว่าชาวสวนมักได้รับอันตรายที่บริเวณดวงตาและผิวหนังมากที่สุด เช่น ทำให้เกิดอาการแสบร้อนที่ตาและผิวหนัง มองเห็นไม่ชัด ผิวหนังลอก คลื่นไส้ ปวดศีรษะ อาเจียน ท้องร่วง เจ็บหน้าอก เวียนศีรษะ ชา และหายใจมีเสียงหวีดเนื่องจากหลอดลมตีบ อย่างไรก็ตามสารไกลโฟเสทก็ไม่ใช่สารที่ปลอดภัยต่อมนุษย์และสัตว์ร้อยเปอร์เซ็นต์ เพราะในการผลิตสารไกลโฟเสทนั้นได้มีการผสมสารไม่ออกฤทธิ์ลงไปด้วย และมีงานวิจัยสรุปว่าสารไม่ออกฤทธิ์เหล่านั้นเป็นตัวทำให้เกิดอันตรายต่อระบบต่างๆ ของร่างกายคนได้ การศึกษาพิษเฉียบพลันในคนที่เกิดจากการใช้สารไกลโฟเสทเพื่อฆ่าตัวตาย เป็นกรณีศึกษาของแพทย์ชาวญี่ปุ่นต่อผู้ป่วย 9 ราย ที่ถึงแก่กรรมจากการดื่มสารไกลโฟเสทเข้าไปปริมาณ 200 ซีซี หรือสามในสี่ถ้วย พบว่าหลังจากการกลืนสารไกลโฟเสทเข้าไปแล้วเกิดอาการปวดท้อง อาเจียน มีของเหลวในปอดมาก น้ำท่วมปอด และเม็ดเลือดแดงถูกทำลาย นอกจากนี้การศึกษาในผู้ป่วยรายอื่นๆ ก็พบอาการ

ใกล้เคียง เช่น การทำงานของปอดผิดปกติ ทางเดินอาหารถูกทำลาย คลื่นหัวใจผิดปกติ ความดันโลหิตต่ำ ไตถูกทำลาย เป็นต้น การได้รับสารไกลโฟเสทเข้าสู่ร่างกายปริมาณเล็กน้อยก็มีผลต่อร่างกายได้เช่นกัน ยกตัวอย่างถ้าละอองสารปลิวเข้าตาทำให้ตาบวม ชีพจรเต้นเร็วและความดันโลหิตผิดปกติ เป็นต้น ในขณะที่การศึกษาอาการของผู้ป่วยชาวอเมริกาที่ได้รับสารไกลโฟเสทเข้าสู่ร่างกายพบว่าผู้ป่วยมีอาการเจ็บตา ปวดศรีษะ ท้องร่วง และมีอาการคล้ายไข้หวัดใหญ่ นอกจากนี้ยังพบอาการอื่นๆ อีก เช่น ดวงตา ใบหน้า และข้อต่อต่างๆ บวม ชาบริเวณใบหน้า ผิวหนังไหม้ คันเป็นแผลพุพอง ชีพจรเต้นเร็ว แน่นหน้าอก ไอ และคลื่นไส้อาเจียน เป็นต้น (กฤษณา, 2547)

เทคโนโลยีการบำบัดสารมลพิษทางชีวภาพ

การสะสมของสารต่างๆ ในตะกอนดินในสิ่งแวดล้อมจนก่อให้เกิดมลพิษทางดินนั้น มีสาเหตุทั้งจากธรรมชาติและจากการกระทำของมนุษย์ โดยจากธรรมชาติตัวอย่างเช่น ดินเค็ม ดินเปรี้ยว หรือดินพรุ และจากการกระทำของมนุษย์ ตัวอย่างเช่น การใช้ปุ๋ยเคมีติดต่อกันเป็นเวลานานส่งผลให้ดินมีความเป็นกรดสูง การใช้สารเคมีกำจัดศัตรูพืชทำให้เกิดสารอนินทรีย์มีพิษจำพวกโลหะหนักตกค้างในดิน การปล่อยทิ้งของน้ำเสีย หรือการรั่วไหลของสารกัมมันตภาพรังสีลงสู่ดิน

การใช้ดินเป็นแหล่งวัสดุเหลือใช้หรือการทำเหมืองแร่ ล้วนแต่เป็นสาเหตุทำให้ดินเสื่อมคุณภาพลงทั้งสิ้น การควบคุมและแก้ไขปัญหามลพิษของดินนั้นเบื้องต้นที่สำคัญต้องอาศัยความรู้ความเข้าใจที่ถูกต้องเกี่ยวกับการป้องกันและแก้ไขปัญหามลพิษในดิน มีการพัฒนานำเทคโนโลยีต่างๆ ที่เหมาะสมในการบำบัด และฟื้นฟูดินปนเปื้อนรวมไปถึงการนำมาตรการทางกฎหมายมาควบคุมการใช้ประโยชน์ที่ดิน ซึ่งจะช่วยให้มีการใช้ประโยชน์ที่ดินอย่างคุ้มค่ามากที่สุด

การย่อยสลายทางชีวภาพเป็นกระบวนการที่ทำให้ปริมาณสารอินทรีย์วัตถุในดินลดลงซึ่งสามารถเกิดขึ้นเองได้ในสภาพธรรมชาติ โดยการเปลี่ยนของเสียที่มีสารอินทรีย์เป็นองค์ประกอบให้กลับมาเป็นสารชีวมวลในรูปของ คาร์บอนไดออกไซด์ มีเทน และกรดอนินทรีย์ ปัจจัยที่มีผลต่ออัตราการย่อยสลายทางชีวภาพ ได้แก่

1. สมบัติและความเข้มข้นของมลสารอินทรีย์
2. ชนิดของจุลชีพในดิน
3. ลักษณะและสมบัติของของเสีย ได้แก่ ค่าครึ่งชีวิต และอัตราการคงตัวของมลสาร
4. คุณสมบัติของดิน เช่น เนื้อดิน โครงสร้างของดิน
5. สมบัติของดินในกิจกรรมของสิ่งมีชีวิตในดิน ได้แก่ pH อุณหภูมิ ความชื้นของ

ดิน ออกซิเจนที่มีอยู่ในดิน อินทรียวัตถุ และปริมาณธาตุอาหารในดิน

6. ความสามารถในการอุ้มน้ำ ระดับโครงสร้างของดิน และความเป็นไปได้ในการชะล้างพังทลายดิน (สำนักจัดการคุณภาพน้ำ, 2554)

กระบวนการในการบำบัดสารมลพิษทางชีวภาพ

การบำบัดสารมลพิษทางชีวภาพ คือเป็นกระบวนการบำบัดสารมลพิษที่ปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อมด้วยวิธีทางชีวภาพที่ทำให้บริสุทธิ์เกิดขึ้น โดยอาศัยความสามารถของจุลินทรีย์หรือพืชในการย่อยสลายของสารมลพิษให้หมดไปหรือการเปลี่ยนแปลงสารมลพิษที่มีความเป็นพิษต่อมนุษย์และสิ่งแวดล้อมให้มีความเป็นพิษน้อยลง

เนื่องจากการบำบัดสารมลพิษทางชีวภาพเป็นกระบวนการที่ต้องอาศัยจุลินทรีย์ในสิ่งแวดล้อม หรืออาจจะใช้จุลินทรีย์ที่เติมลงไปเพื่อย่อยสลายสารมลพิษให้มีความเป็นพิษน้อยลง หรือเพื่อใช้สารมลพิษเหล่านั้นเป็นแหล่งอาหารของจุลินทรีย์รวมไปถึงปัจจัยต่างๆ ที่ส่งผลต่อการเจริญแบบวิถีเมแทบอลิซึมของจุลินทรีย์เหล่านั้น องค์ประกอบพื้นฐานที่สำคัญของการบำบัดสารพิษทางชีวภาพ ได้แก่

1. จุลินทรีย์และวิถีเมแทบอลิซึม จุลินทรีย์เป็นตัวที่สำคัญที่สุดของกระบวนการบำบัดสารมลพิษทางชีวภาพ และกระบวนการในการย่อยสลายต้องอาศัยเอนไซม์ในจุลินทรีย์เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาในทางชีวภาพ และกระบวนการบำบัดนี้ก็ต้องขึ้นอยู่กับชนิดของจุลินทรีย์ เนื่องจากจุลินทรีย์แต่ละชนิดมีการสร้างเอนไซม์ที่แตกต่างกัน ชนิดของเอนไซม์มีผลต่อประเภทของปฏิกิริยาการย่อยสลายสารมลพิษเป้าหมาย และมีผลต่อวิถีเมแทบอลิซึมของจุลินทรีย์นั้นต่อสารมลพิษซึ่งในที่นี้ หมายถึงวิถีการย่อยสลายสารมลพิษและจุลินทรีย์อาจจะมีความสามารถในการย่อยสลายสารมลพิษนั้นด้วยตัวของมันเองหรือต้องอาศัยหลักการทำงานร่วมกันของกลุ่มจุลินทรีย์เพื่อให้การย่อยสลายสารพิษเป็นไปอย่างมีประสิทธิภาพมากขึ้น

2. แหล่งพลังงานและตัวรับอิเล็คตรอน นอกจากจะขึ้นอยู่กับจุลินทรีย์แล้ว ตัวที่สำคัญอีกอย่างหนึ่งคือ ประเภทของตัวรับอิเล็คตรอนตัวสุดท้าย และวิถีขนส่งอิเล็คตรอนซึ่งจุลินทรีย์แต่ละชนิดก็มีกระบวนการนี้แตกต่างกัน

3. ความชื้น เป็นอีกปัจจัยที่มีผลต่อการบำบัดสารมลพิษที่ตกค้างในสิ่งแวดล้อมซึ่งมีผลต่อ การเจริญและวิถีเมแทบอลิซึมของจุลินทรีย์ การกระจายตัวและอัตราการสลายของก๊าซรวมถึงออกซิเจนในน้ำ ชนิดและปริมาณของสารมลพิษที่จุลินทรีย์สามารถนำมาใช้ได้ ระดับความเป็นพิษของสารเคมี มีรายงานว่าปริมาณความชื้นมีความเหมาะสมต่อกระบวนการย่อยสลายสารมลพิษคือในช่วง 50-70 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งในจุลินทรีย์แต่ละชนิดมีความเหมาะสมกับระดับ

ความชื้นแตกต่างกัน เช่นราเป็นสิ่งมีชีวิตที่สามารถเจริญได้ในสิ่งแวดล้อมที่มีปริมาณความชื้นต่ำกว่าแบคทีเรีย จากการรายงานของ Lamar *et al.* (1990) ราสามารถเจริญได้และมีความสามารถในการย่อยสลายสารมลพิษในดินที่มีความชื้นตั้งแต่ 20 เปอร์เซ็นต์ ขึ้นไปดังนั้นหากในการบำบัดสารพิษในสิ่งแวดล้อมที่มีปริมาณความชื้นต่ำจึงจำเป็นต้องมีการปรับและควบคุมปริมาณความชื้นให้เหมาะสม

4. ความเป็นกรด-ด่าง ของสิ่งแวดล้อมมีผลต่อการดูดซึมสารอาหาร การทำงานและการเจริญของจุลินทรีย์ในการย่อยสลายสารมลพิษ Vidali (2001) รายงานถึงค่าความเป็นกรด-ด่าง ที่เหมาะสมต่อการเจริญของจุลินทรีย์โดยทั่วไปในดินอยู่ในช่วง 5.5-8.8 แต่ช่วงที่เหมาะสมที่สุดต่อการเกิดการย่อยสลายทางชีวภาพคือในช่วง 5.5-8.0

5. สารอาหารเป็นสิ่งจำเป็นต่อการเจริญและการดำรงชีวิตของจุลินทรีย์ ซึ่งจุลินทรีย์จะดูดซึมสารอาหารจากสิ่งแวดล้อมในธรรมชาติเพื่อการแบ่งเซลล์และการเพิ่มจำนวนเซลล์ โดยแหล่งอาหารที่สำคัญ เช่น คาร์บอน ไนโตรเจนและฟอสฟอรัส (ตาราง 3)

ตาราง 3 องค์ประกอบของเซลล์ของจุลินทรีย์

ธาตุที่เป็นองค์ประกอบของเซลล์	ร้อยละน้ำหนักเซลล์แห้ง
คาร์บอน	50
ออกซิเจน	20
ไนโตรเจน	14
ไฮโดรเจน	8
ฟอสฟอรัส	3
ซัลเฟอร์	1
โพแทสเซียม	1
โซเดียม	1
แคลเซียม	0.5
แมกนีเซียม	0.5
คลอรีน	0.5
เหล็ก	0.2
อื่นๆ	0.3

ที่มา: Stanier *et al.* (1986)

จุลินทรีย์ในธรรมชาติบางชนิดมีความสามารถในการปรับตัวของเซลล์ให้ทนทานต่อความเป็นพิษของสารมลพิษเหล่านี้ในสิ่งแวดล้อม และในเวลาเดียวกันอาจมีความสามารถในการเหนี่ยวนำเพื่อสร้างเอนไซม์และวิธีเมแทบลิซึมที่เหมาะสมต่อการย่อยสลายสารเหล่านี้เพื่อนำมาใช้เป็นสารอาหารในการเจริญสร้างเซลล์ใหม่และในการสร้างพลังงาน จุลินทรีย์ที่มีความสามารถและมีลักษณะสมบัติที่ดีดังกล่าวนี้สามารถพบได้ในสิ่งแวดล้อมทั่วไป และในสิ่งแวดล้อมที่มีการปนเปื้อนของสารพิษ เช่น ดิน น้ำ น้ำบาดาล เป็นต้น

นอกเหนือจากการที่จุลินทรีย์มีวิถีเมแทบอลิซึมในการย่อยสลายสารพิษเพื่อให้ได้เป็นสารอาหารแล้ว ในบางกรณีจุลินทรีย์ไม่สามารถย่อยสลายให้สารเหล่านี้หมดไป แต่มีความสามารถในการเปลี่ยนรูปสารมลพิษไปเป็นสารผลิตภัณฑ์อื่นที่มีความเป็นพิษน้อยลง และวิถีเมแทบอลิซึมของการเปลี่ยนรูปสารดังกล่าวเรียกว่าวิถีเมแทบอลิซึมร่วม ซึ่งเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาการเปลี่ยนรูปของสารมลพิษในวิถีนี้ถูกสร้างขึ้นจากการเหนี่ยวนำด้วยวิถีเมแทบอลิซึมหลักอีกวิถี

หนึ่งซึ่งเป็นวิถีเมแทบอลิซึมของการใช้สารอาหารเพื่อการเจริญและการสร้างพลังงานให้เซลล์ สำหรับการเปลี่ยนรูปสารมลพิษไปเป็นสารผลิตภัณฑ์อื่นที่มีความเป็นพิษน้อยลงด้วยวิถีเมแทบอลิ-ซึมร่วมนี้จัดเป็นกระบวนการลดพิษ ซึ่งจะช่วยให้จุลินทรีย์สามารถเจริญและดำรงชีวิตในสิ่งแวดล้อมที่มีการปนเปื้อนด้วยสารพิษได้โดยเปลี่ยนรูปสารมลพิษเหล่านั้นให้อยู่ในรูปของสารผลิตภัณฑ์ที่มีความเป็นพิษน้อยลงหรือไม่มีเลย

สำหรับสารพิษที่ปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อมจุลินทรีย์สามารถดูดซึมสารมลพิษเหล่านี้นั้นมาเป็นแหล่งอาหารได้ ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับองค์ประกอบ โครงสร้างและระดับความเป็นพิษของสารมลพิษนั้น โดยส่วนใหญ่สารมลพิษที่ปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อมได้แก่สารอินทรีย์ต่างๆ ที่มนุษย์ดัดแปลงจากสารอินทรีย์ธรรมชาติหรือสังเคราะห์ขึ้นเพื่อใช้ประโยชน์เป็นยา หรือในการเกษตรและอุตสาหกรรม ดังนั้นสารมลพิษที่เป็นสารอินทรีย์เหล่านี้มีองค์ประกอบหลักคือ คาร์บอน ไฮโดรเจน ออกซิเจน และอาจมีหมู่โซ่ข้างจำพวกที่ประกอบด้วยไนโตรเจน ซัลเฟอร์ รวมทั้งฮาโล-เจน ดังนั้นตามหลักเบื้องต้นจุลินทรีย์สามารถนำสารมลพิษเหล่านี้มาใช้เป็นสารอาหารได้ อย่างไรก็ตามการสังเคราะห์สารเคมีและการดัดแปลงโครงสร้างทางเคมีทำให้สารประกอบเหล่านี้มีโครงสร้างที่ซับซ้อนและต้านทานการย่อยสลายตามธรรมชาติ นอกจากนั้นแล้ว พบว่าสารประกอบที่มีโครงสร้างที่ซับซ้อนเหล่านี้ยังมีความเป็นพิษต่อจุลินทรีย์อีกด้วย จึงมีการประยุกต์นำกระบวนการทางชีวภาพมาใช้เพื่อย่อยสลายและบำบัดสารมลพิษที่ปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อม (อลิสา, 2553)

วิธีการบำบัดสารมลพิษด้วยกระบวนการทางชีวภาพ

1. การกระตุ้นทางชีวภาพ

เป็นการเติมสารกระตุ้นทางชีวภาพให้แก่จุลินทรีย์ธรรมชาติ เช่น มีการเติมสารอาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญของจุลินทรีย์ธรรมชาติ หรือเติมสารกระตุ้นการสร้างเอนไซม์ในวิถีการย่อยสลายสารพิษ รวมทั้งการปรับสภาพให้มีความเหมาะสมต่อการย่อยสลายทางชีวภาพ เช่น การให้อากาศ และ การให้ออกซิเจน

2. การเติมจุลินทรีย์เพื่อบำบัดสารมลพิษ

ซึ่งจะเติมจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการบำบัดสารมลพิษลงไปในดิน หรือน้ำ ที่มีการปนเปื้อนเพื่อปรับปรุงสิ่งแวดล้อมให้เหมาะสมกับกิจกรรม ของมนุษย์ (อลิสา, 2553)

การย่อยสลายโดยจุลินทรีย์ในดิน

การย่อยสลายทางชีวภาพเป็นการทำลายสารปนเปื้อนโดยอาศัยกิจกรรมของจุลินทรีย์ สารปนเปื้อนเหล่านี้เป็นแหล่งอาหารหรือซับสเตรตของจุลินทรีย์ กระบวนการย่อยสลายอย่างสมบูรณ์หรือที่เรียกว่า mineralization เกี่ยวข้องกับการออกซิไดซ์สารเหล่านั้นให้เป็นคาร์บอนไดออกไซด์และน้ำซึ่งเป็นกระบวนการที่ให้ทั้งคาร์บอนและพลังงานเพื่อการเจริญและการสืบพันธุ์ของเซลล์โดยจะเกิดได้ทั้งสภาวะที่มีและไม่มีออกซิเจน การย่อยสลายแต่ละขั้นตอนเกิดจากการเร่งปฏิกิริยาโดยเอนไซม์ที่จุลินทรีย์สร้างขึ้นมา (วีรนุช, 2551) กระบวนการย่อยสลายทางชีวภาพของสารกำจัดวัชพืชด้วยกิจกรรมของจุลินทรีย์ อาจเกิดขึ้นได้โดยปฏิกิริยาต่างๆ เช่น oxidation reduction และ hydrolysis เป็นต้น (ศิริพรรณ, 2550)

จุลินทรีย์ในดินที่เกิดการย่อยสลายโมเลกุลสารกำจัดวัชพืช ได้แก่ แบคทีเรีย เชื้อรา และแอคติโนมัยสีท ซึ่งจุลินทรีย์จะใช้พลังงานจากโมเลกุลของสารเพื่อนำไปใช้ในกระบวนการหายใจ การสร้างโปรตีน และการขยายพันธุ์ แล้วปลดปล่อยก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ออกมา ดังนั้นจึงเท่ากับเป็นการทำให้โมเลกุลของสารกำจัดวัชพืชออกไปจากดินได้

ปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการย่อยสลายโดยจุลินทรีย์ในดินได้แก่ ชนิดของจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายสาร ความถี่ในการใช้สารกำจัดวัชพืชแต่ละครั้งในพื้นที่ๆ เดียวกัน ระบบการปลูกพืชมีผลต่อจำนวนจุลินทรีย์และชนิด พฤติกรรมทางเคมีและฟิสิกส์ของสารกำจัดวัชพืชในดิน เช่น สารบางชนิดจะถูกดูดยึดอย่างรุนแรงก็จะไม่ถูกย่อยสลาย และระดับกิจกรรมของจุลินทรีย์ซึ่งได้รับอิทธิพลจากสิ่งแวดล้อมขณะนั้น เช่น อุณหภูมิ ความชื้น ปริมาณออกซิเจน การสลายของจุลินทรีย์อาจมีผลต่อปริมาณ และการใช้สารกำจัดวัชพืชได้ เป็นต้น (ทศพล, 2545)

แบคทีเรียมีความสามารถในการบำบัดสารมลพิษ

ในปัจจุบันมีการรวบรวมดัชนีชนิดของแบคทีเรียที่มีความสามารถในการบำบัดสารมลพิษต่างๆ โดยรวบรวมเป็นฐานข้อมูลต่างๆ และมีรายงานว่าแบคทีเรีย *Pseudomonas* มีความสามารถในการย่อยสลายสารมลพิษมากที่สุด ซึ่งมีรายงานถึง 66 สายพันธุ์ ที่สามารถย่อยสลายสารมลพิษจำพวกไฮโดรคาร์บอนสายตรง อะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน สารประกอบไฮโดรคาร์บอนสายตรงและอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนกับหมู่ คลอโร- ไซยาโน- ไนโตร- ฟอสฟอริล- รวมถึงสารประกอบไฮโดรคาร์บอนแบบวง เป็นต้น และแบคทีเรียที่มีความสามารถในการบำบัดทางชีวภาพ สามารถแบ่งออกเป็น 3 กลุ่มหลักดังแสดงในตาราง 4

ตาราง 4 กลุ่มของแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลายสารมลพิษในสิ่งแวดล้อม

กลุ่มแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลายสารมลพิษ	ดัชนีชนิดของแบคทีเรีย (สกุล)
แบคทีเรียแกรมบวกที่มีองค์ประกอบของ G+C สูง (High G+C gram-positive bacteria)	*Arthrobacter, Brevibacterium, Clavibacter, Dehalobacter, Nocardia, Rhodococcus, Streptpmyces, Terrabacter, Corynebacterium*
แบคทีเรียแกรมบวกที่มีองค์ประกอบของ G+C ต่ำ (Low G+C gram-positive bacteria)	*Bacillus, Clostridium, Desulfitobacterium, Eubacterium, Staplrylococcus*
แบคทีเรียแกรมลบในหมวดโปรติโอแบคทีเรีย (Proteobacteria gram-negative)	
- กลุ่มอัลฟา	*Agrobacterium, Ancylobacter, Chelatobacter, Hyphomicrobium, Methylobacterium, Paracoccus, Rhodobacter, Sphingomonas*
- กลุ่มบีตา	*Achromobacter, Alcaligenes, Azoarcus, Burkholderia, Hydrogenophaga, Comamonas, Ralstomia, Thauera, Thiobacillus*
- กลุ่มแกมมา	*Acinetobacter, Aeromonas, Azotobacter, Escherichia, Enterobacter, Klebsiella, Methylobacter, Pseudomonas, Methylococcus, Moraxella*
- กลุ่มแอบซิลอน	*Desulfovibrio*

ที่มา : อลิสา (2553)

การกำจัดสารไกลโฟเสทให้ออกไปจากสิ่งแวดล้อมสามารถทำได้โดยกระบวนการย่อยสลายทางชีวภาพ เนื่องกระบวนการย่อยสลายทางเคมีไม่ค่อยได้ผลเพราะสารไกลโฟเสทมีความเสถียรสูงซึ่งประกอบด้วยคาร์บอนและฟอสฟอรัส (Gimsing *et al.*, 2004) การใช้แบคทีเรียในการบำบัดทางชีวภาพเพื่อให้เกิดประโยชน์มากที่สุดจำเป็นต้องมีความรู้และความเข้าใจเกี่ยวกับสรีรวิทยา จุลชีววิทยา นิเวศวิทยา ชีวเคมี และโมเลกุล เพราะมีผลในด้านการเปลี่ยนแปลงของสารมลพิษ (Iranzo *et al.*, 2001)

สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (2554) ได้ศึกษาเกี่ยวกับการบำบัดสารเคมีทางการเกษตรโดยใช้จุลินทรีย์ เพื่อแก้ปัญหาสารปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อมสำหรับภาคเกษตรและอุตสาหกรรม ซึ่งได้ทำการทดลองในสวนส้มพบว่าสามารถลดปริมาณสารเคมีตกค้างปนเปื้อนในร่องน้ำได้ถึง 10 เท่า ใช้เวลาเพียง 1 เดือน จากนั้นขยายผลต่อเนื่องในการใช้บำบัดสารเคมีการเกษตรตกค้างในพื้นที่ปลูกพืชเศรษฐกิจแบบยกร่อง เพื่อช่วยลดความเสี่ยงสุขอนามัยประชาชนจากสารเคมีปนเปื้อน ช่วยฟื้นฟูสิ่งแวดล้อม แก้ไขปัญหามลภาวะอย่างยั่งยืน

Beulke *et al.* (2004) กล่าวว่าจุลินทรีย์ในดินโดยเฉพาะแบคทีเรียเป็นตัวสำคัญในการย่อยสลายสารเคมีทางการเกษตร สภาพแวดล้อมที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของแบคทีเรียจะทำให้อัตราการย่อยสลายสารกำจัดวัชพืชมีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น สภาพแวดล้อมที่กล่าวถึง คือ อุณหภูมิ ความชื้น และการเติมอากาศ วิธีที่สำคัญในกำจัดสารไกลโฟเสทในดินคือการย่อยสลายโดยระบบเอนไซม์ของแบคทีเรียบางชนิด (Rueppel *et al.*, 1977; Strange-Hansenetal, 2004) และความเข้มข้นของสารไกลโฟเสทในดินจะย่อยสลายได้มากหรือน้อยขึ้นอยู่กับปริมาณและกิจกรรมของแบคทีเรีย (Sorensen *et al.*, 2006)

งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ปัจจุบันมีรายงานวิจัยเกี่ยวกับการบำบัดสารพิษทางชีวภาพโดยนำแบคทีเรียหลากหลายสายพันธุ์มาทดสอบการย่อยสารไกลโฟเสทที่ปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อมให้ลดลง แบคทีเรียเหล่านี้ถูกคัดแยกมาจากแหล่งที่มีการใช้สารกำจัดวัชพืชต่างๆ ซึ่งจากการทดสอบแบคทีเรียที่แยกได้จากดินมีความสามารถในการย่อยสลายสารไกลโฟเสทให้ลดลงได้

จากการศึกษาของ Olawale and Akintobi (2011) ได้ทำการศึกษาการย่อยสลายทางชีวภาพของสารกำจัดวัชพืชไกลโฟเสทโดยคัดแยกแบคทีเรียจากดินที่ใช้ในการเพาะปลูก พบว่าคัดแยกแบคทีเรียได้ 3 ไอโซเลท คือ GDP1 GDP2 และ GDA ซึ่งมีความสามารถในการย่อยสลายสารไกลโฟเสท และเมื่อนำแบคทีเรียดังกล่าวนี้มาทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีพบว่าเป็นแบคทีเรียสาย

พันธุ์ *Pseudomonas putida* *Pseudomonas aeruginosa* และ *Acetobacter faecalis* ตามลำดับ จากนั้นทดสอบการย่อยสลายสารไกลโฟเสทโดยใช้แบคทีเรีย 3 ไอโซเลท คือ GDP1 GDP2 GDA และการผสมแบคทีเรียทั้ง 3 สายพันธุ์เข้าด้วยกันโดยกำหนดให้เป็น CGD พบว่าเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ GDP1 สามารถย่อยสลายสารไกลโฟเสทที่ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในเวลา 72 ชั่วโมง ซึ่งใช้เวลาย่อยสลายสารไกลโฟเสทได้เร็วกว่าแบคทีเรียไอโซเลท GDP2 และ GDA ที่สามารถย่อยสลายสารไกลโฟเสทในเวลา 96 ชั่วโมง

นอกจากนี้มีรายงานของ Moneke *et al.* (2010) ได้ศึกษาเกี่ยวกับการบำบัดทางชีวภาพโดยใช้แบคทีเรียในการย่อยสลายสารกำจัดวัชพืชไกลโฟเสทซึ่งทำการคัดแยกจากพื้นที่เพาะปลูกข้าว 4 แหล่ง ผลการทดลองพบว่าสามารถแยกแบคทีเรียได้ 12 ไอโซเลท และคัดเลือกแบคทีเรียที่สามารถเจริญในอาหาร MSM ที่มีสารไกลโฟเสทเป็นองค์ประกอบได้ 5 สายพันธุ์ ได้แก่ *Escherichia* sp. *Azotobacter* sp. *Alcaligenes* sp. *Acetobacter* sp. และ *Pseudomonas fluorescens* จากนั้นทดสอบความสามารถในการเจริญเติบโตของแบคทีเรียทั้ง 5 สายพันธุ์ ในอาหารที่มีสารไกลโฟเสทเป็นแหล่งอาหารโดยการวัดอัตราการเจริญเติบโตด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร วัดค่าการดูดกลืนแสงทุก 12 ชั่วโมง เริ่มจาก 0-180 ชั่วโมง เมื่อวิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติที่ความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ พบว่าแบคทีเรียทั้ง 5 สายพันธุ์ มีอัตราการเจริญที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญโดยที่แบคทีเรียสายพันธุ์ *Pseudomonas fluorescens* และ *Acetobacter* sp. เป็นแบคทีเรียที่มีความสามารถในการใช้ฟอสฟอรัสที่มีอยู่ในสารไกลโฟเสทเป็นแหล่งอาหารและเจริญได้ดีที่สุด รองลงมาคือ *Azotobacter* sp. *Alcaligenes* sp. และ *Escherichia* sp.

Benslama and Boulahrouf (2013) ได้ศึกษาเกี่ยวกับการคัดแยกแบคทีเรียที่ย่อยสลายสารไกลโฟเสทจากดินที่แตกต่างกันของสาธารณรัฐประชาธิปไตยประชาชนแอลจีเรีย พบว่าสามารถแยกเชื้อแบคทีเรียได้ 5 ไอโซเลท ได้แก่ ไอโซเลท Arph1 และ Arph2 คัดแยกได้จากดินทางการเกษตรที่มีการใช้สารไกลโฟเสท ไอโซเลท Frglu และ Frph คัดแยกได้จากดินในป่าที่มีการใช้สารไกลโฟเสท ไอโซเลท Bisglu คัดแยกได้จากดินของทะเลทรายซาฮารา จากนั้นได้มีตรวจสอบสายพันธุ์ของแบคทีเรียดังกล่าวโดยวิธีการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี และการหาลำดับเบสของดีเอ็นเอในส่วนของยีน 16S rRNA แล้วนำไปเปรียบเทียบความเหมือนใน GenBank จากข้อมูลเบื้องต้นสามารถจำแนกสายพันธุ์ของแบคทีเรียได้ดังนี้ ไอโซเลท Arph1 คล้ายกับ *Pseudomonas putida* ไอโซเลท Arph2 และ Frglu คล้ายกับ *Enterobacter cloaca* ไอโซเลท Frph คล้ายกับ *Rahnella aquatilis* และไอโซเลท Bisglu คล้ายกับ *Serratia marcescens* เมื่อทดสอบอัตราการเจริญเติบโตของแบคทีเรียในอาหารที่มีสารไกลโฟเสทเป็นองค์ประกอบแล้ววัดอัตราการ

เจริญเติบโตได้จากเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 625 นาโนเมตร พบว่า *Pseudomonas putida* มีอัตราการเจริญเติบโตสูงที่สุดและถูกคัดเลือกเพื่อนำไปใช้ในการทดลองหาสภาวะที่เหมาะสม ผลการทดลองพบว่า *Pseudomonas putida* เจริญเติบโตได้ดีที่ค่าความเป็นพีเอช 9 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 168 ชั่วโมง และสามารถเจริญเติบโตและมีชีวิตรอดในอาหารที่มีสารไกลโฟเสท

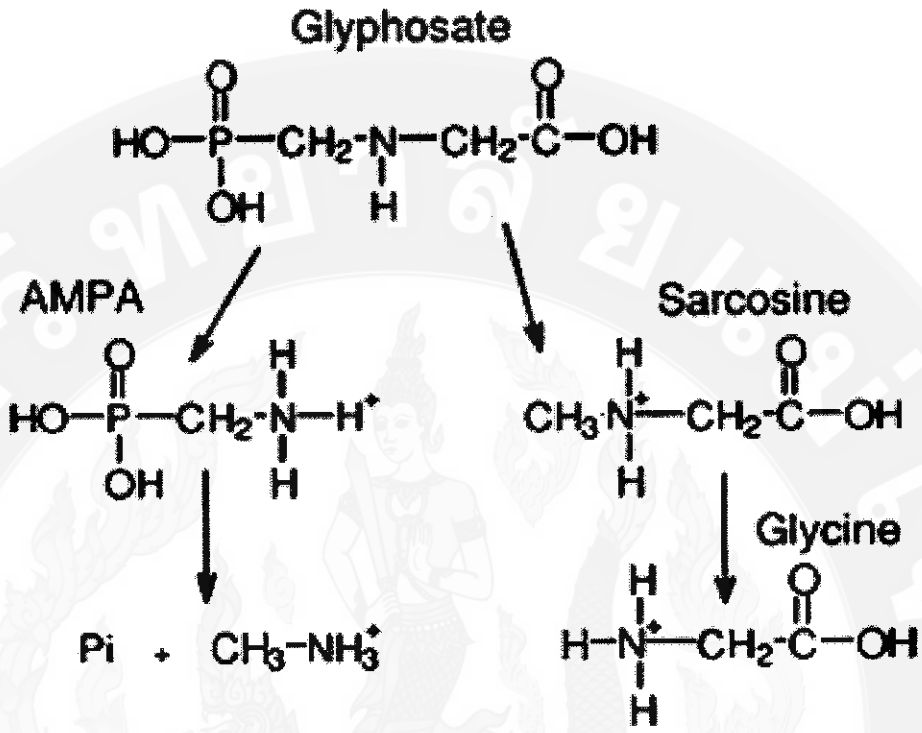
รวมถึงรายงานวิจัยของ Marie-Esther *et al.* (2014) ได้ศึกษาเกี่ยวกับการบำบัดทางชีวภาพโดยการคัดแยกเชื้อแบคทีเรียจากนาข้าวเพื่อย่อยสลายสารไกลโฟเสท จากการคัดแยกสามารถคัดแยกสายพันธุ์แบคทีเรียได้ 2 สายพันธุ์ คือ ไอโซเลท A และ B และจำแนกสายพันธุ์โดยศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา และทางชีวเคมี พบว่าไอโซเลท A คือ *Pseudomonas* sp. ไอโซเลท B คือ *Bacillus subtilis* เมื่อนำแบคทีเรีย *Pseudomonas* sp. และ *Bacillus subtilis* มาวัดอัตราการเจริญเติบโตด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร พบว่า *Pseudomonas* sp. มีอัตราการเจริญเติบโตดีที่สุดที่ 96 ชั่วโมง ค่าความเป็นกรด-ด่าง 6.15 และ *Bacillus subtilis* มีอัตราการเจริญเติบโตดีที่สุดที่ 48 ชั่วโมง ค่าความเป็นกรด-ด่าง 5.75 จากนั้นได้มีการทดสอบอัตราการเจริญของ *Pseudomonas* sp. และ *Bacillus subtilis* ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีสารไกลโฟเสทเป็นองค์ประกอบ พบว่า *Pseudomonas* sp. และ *Bacillus subtilis* สามารถใช้สารไกลโฟเสทเป็นแหล่งฟอสฟอรัสเพื่อใช้ในการเจริญเติบโตได้ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Jacob and Kishore (1987) ได้ทำการศึกษาเกี่ยวกับการย่อยสลายสารไกลโฟเสทด้วยกลไกเมแทบอลิซึมของแบคทีเรีย *Pseudomonas* sp. PG2982 พบว่าแบคทีเรีย *Pseudomonas* sp. PG2982 สามารถย่อยสลายสารไกลโฟเสทได้โดยการสลายที่พันธะคาร์บอนและฟอสฟอรัส ทำให้ได้ฟอสฟอรัสและ กรดอะมิโนซาร์โคซีน และ Jacob *et al.* (1988) กล่าวว่า*Pseudomonas* sp. เป็นแบคทีเรียที่มีความสามารถในการบำบัดทางชีวภาพซึ่งมีความสามรถใช้สารไกลโฟเสทเป็นแหล่งอาหารและแหล่งฟอฟอรัสได้โดย *Pseudomonas* sp. สามารถสังเคราะห์เอนไซม์ C-P lyase เพื่อย่อยสารไกลโฟเสทได้

Inna *et al.* (2010) ได้ศึกษาเกี่ยวกับการบำบัดทางชีวภาพในดินที่ปนเปื้อนสารไกลโฟเสททั้งในระดับห้องปฏิบัติการและแปลงทดลอง ซึ่งในการทดลองใช้แบคทีเรีย 2 สายพันธุ์เพื่อทดสอบการย่อยสลายสารไกลโฟเสท คือ *Achromobacter* sp. Kg16 (VKM B-2534D) และ *Ochrobactrum anthropic* GPK3 พบว่าแบคทีเรียทั้ง 2 สายพันธุ์สามารถย่อยสลายสารไกลโฟเสทได้ 65.8 และ 49.5 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

Jieyu *et al.* (2012) ได้ศึกษาเกี่ยวกับการคัดแยกเชื้อแบคทีเรียเพื่อย่อยสลายสารไกลโฟเสทที่ปนเปื้อนในดิน จากการคัดแยกเชื้อแบคทีเรียจากดินที่ปนเปื้อนสารไกลโฟเสทและทดสอบหาแบคทีเรียที่มีความสามารถย่อยสลายสารไกลโฟเสทโดยวิเคราะห์หาความเข้มข้นของ

สารไกลโฟเสทจากเครื่อง HPLC พบว่า สามารถคัดแยกเชื้อแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลายสารไกลโฟเสทได้ 40 สายพันธุ์ ซึ่งได้ทำการคัดเลือกเพื่อมาใช้ศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสม เพียง 1 สายพันธุ์ คือ ไอโซเลท CB4 จากนั้นได้ทำการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและหาลำดับเบสของดีเอ็นเอในส่วนของยีน 16S rRNA พบว่าเมื่อย้อมแกรมแล้วเป็นแบคทีเรียแกรมบวก และมีความคล้ายคลึงกับ *Bacillus cereus* ร้อยละ 99 หลังจากนั้นแบคทีเรียไอโซเลท CB4 หรือ *Bacillus cereus* มาทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมโดยการวัดอัตราการเจริญด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร พบว่า ไอโซเลท CB4 สามารถเจริญเติบโตได้ในสภาวะพีเอช 6 อุณหภูมิที่เหมาะสม 35 องศาเซลเซียส และสามารถเจริญเติบโตได้ในอาหารที่มีสารไกลโฟเสท เมื่อได้สภาวะที่เหมาะสมแล้วได้ทำการศึกษาประสิทธิภาพการย่อยสลายสารไกลโฟเสทไอโซเลท CB4 เป็นระยะเวลา 5 วัน พบว่าไอโซเลท CB4 หรือ *Bacillus cereus* มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายสารไกลโฟเสท 94.47 เปอร์เซ็นต์ และจากรายงานของ Abdel-Megeed *et al.* (2013) ได้ศึกษาเกี่ยวกับการบำบัดทางชีวภาพโดยการใช้พืชและจุลินทรีย์ในการย่อยสลายสารไกลโฟเสทที่ตกค้างในดินในเรือนกระจกที่มีการใช้สารไกลโฟเสทกำจัดวัชพืช จากการศึกษาพบว่าสามารถคัดแยกแบคทีเรียจากดินได้ 2 ไอโซเลท และเมื่อจำแนกตามวิธีการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี และการหาลำดับเบสของดีเอ็นเอในส่วนของยีน 16S rRNA พบว่าแบคทีเรียทั้ง 2 ไอโซเลท เป็นแบคทีเรีย *Pseudomonas aeruginosa* และ *Bacillus megaterium* และจากการศึกษาเกี่ยวกับความสามารถในการย่อยสลายสารไกลโฟเสทของแบคทีเรีย *Pseudomonas aeruginosa* และ *Bacillus megaterium* พบว่าสามารถย่อยสลายสารไกลโฟเสทได้ในระยะเวลา 5 วัน ทั้งนี้เกิดจากการปรับตัวให้อยู่รอดโดยใช้สารไกลโฟเสทเป็นแหล่งคาร์บอนและฟอสฟอรัสเพื่อใช้ในการเจริญเติบโต

นอกจากนี้ยังมีรายงานของ Mohsen-Nourouzi *et al.* (2011) ได้ศึกษาในเรื่องการคัดแยกเชื้อแบคทีเรียและจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อแบคทีเรียที่คัดแยกได้ เพื่อใช้ในการทดสอบความสามารถของแบคทีเรียในการใช้สารไกลโฟเสทเป็นแหล่งคาร์บอน ซึ่งได้คัดแยกแบคทีเรียจากดินสวนปาล์มน้ำมัน ผลการคัดแยกพบแบคทีเรียมา 2 สายพันธุ์ คือ *Stenotrophomonas maltophilia* และ *Providencia alcalifaciens* ซึ่งได้นำแบคทีเรียทั้ง 2 สายพันธุ์นี้มาผสมกันและทดสอบความสามารถในการใช้สารไกลโฟเสทเป็นแหล่งคาร์บอนโดยวัดได้จากความเข้มข้นของสารไกลโฟเสทที่ลดลง ผลการทดสอบพบว่าแบคทีเรียทั้ง 2 สายพันธุ์นี้สามารถใช้สารไกลโฟเสทเป็นแหล่งคาร์บอนเท่ากับ 99.5 เปอร์เซ็นต์ เนื่องจากแบคทีเรียมีความสามารถในการใช้สารไกลโฟเสทเป็นแหล่งคาร์บอน และแหล่งฟอฟอรัสเพื่อใช้ในการเจริญเติบโต รวมถึงสามารถผลิตกรดอะมิโนไกลซีนได้อีกด้วย (ภาพ 4)



ภาพ 4 กลไกและเมแทบอลิซึมสำหรับการย่อยสลายสารไกลโฟเสทด้วยแบคทีเรีย
ที่มา: Mohsen-Nourouzi *et al.* (2011)

จากรายงานการทดลองข้างต้นพบว่าแบคทีเรียบางสายพันธุ์สามารถอยู่รอดและเจริญเติบโตได้ในที่ที่มีสารกำจัดวัชพืชไกลโฟเสท ซึ่งแสดงถึงการมีศักยภาพของแบคทีเรียที่จะนำไปใช้ในการบำบัดทางชีวภาพของสภาพแวดล้อมที่ปนเปื้อนสารไกลโฟเสทได้

บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีการวิจัย

อุปกรณ์ในการวิจัย

ตัวอย่างดิน

ตัวอย่างดินในพื้นที่การเกษตรที่ใช้สารไกลโฟเสท (ภาคผนวก ก)

- สวนลำไย ตำบลแม่สอย อำเภอจอมทอง จังหวัดเชียงใหม่
- สวนหอม ตำบลแม่สอย อำเภอจอมทอง จังหวัดเชียงใหม่
- ไร่ข้าวโพด ตำบลแม่สอย อำเภอจอมทอง จังหวัดเชียงใหม่
- สวนมะม่วง ตำบลแม่สอย อำเภอจอมทอง จังหวัดเชียงใหม่
- สวนส้ม ตำบลแม่สาว อำเภอแม่อาย จังหวัดเชียงใหม่
- ไร่มันฝรั่ง ตำบลสันทราย อำเภอฝาง จังหวัดเชียงใหม่

ตัวอย่างดินในพื้นที่เกษตรที่ไม่ใช้สารเคมี

- สวนผักอินทรีย์ ตำบลหนองแหย่ง อำเภอสันทราย จังหวัดเชียงใหม่

สารเคมี

1. TSB (tryptic soy both) (Ajax Finechem, Australia)
2. วุ้น (agar) (Union Science, Thai)
3. โซเดียมคลอไรด์ (sodium chloride) (Ajax Finechem, Australia)
4. ไกลโฟเสท (glyphosate) (Dr. Ehrenstorfer GmbH, Germany)

(ภาพผนวก 13)

5. เมทานอล (methanol) (Merck, Germany)
6. กลีเซอรอล (glycerol) (Ajax Finechem, Australia)
7. เอทิลแอลกอฮอล์ (ethyl alcohol) (Union Science, Thai)
8. โซเดียมเฮกซะเมตาฟอสเฟต (Sodium Hexametaphosphate)

(Ajax Finechem, Australia)

สารเคมีย้อมสีแบบแกรม

ชุดย้อมแกรม (Gram's stain set) (Bio-Medical Laboratory, Thai) ประกอบด้วย

1. คริสตัลไวโอเลต (crystal violet)
2. สารละลายไอโอดีน (iodine)
3. อะซิโตน แอลกอฮอล์ (acetone alcohol)
4. ซาฟรานิน (safranin-o)

สารเคมีที่ใช้ในการจำแนกแบคทีเรีย โดยวิธีการหาลำดับเบสของดีเอ็นเอ ในส่วนของยีน 16S rRNA

1. ชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป PureLink™ Genomic DNA Kit (Invitrogen, USA)
2. master mix (Qiagen, Germany)
3. 27F (forward primer) 5'AGAGTTTGATCMTGG CTCAG-3' (Operon, Germany)
4. 1522R (reverse primer) 5'- AAGGAGGTGATCCRCCGCA -3' (Operon, Germany)
5. ชุดทำ PCR Product ให้บริสุทธิ์ GEL/PCR DNA Fragments Extraction Kit (Hiyield, Japan)
6. loading dye (Fermentas LIFE SCIENCES, USA)
7. O' GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder (Fermentas LIFE SCIENCES, USA)
8. absolute ethanol (Merck, Germany)
9. agarose gel (Amresco, USA)

เครื่องมือ

1. incubator	บริษัท Memmert รุ่น UM/SM 200
2. laminar air flow	บริษัท Eis Flufrance
3. spectrophotometer	บริษัท Genesys
4. autoclave	บริษัท Sturdy รุ่น SA-300VL
5. hot air oven	บริษัท Binder
6. กล้องจุลทรรศน์	บริษัท Olympus
7. เครื่องชั่งสารทศนิยม 2 ตำแหน่ง	บริษัท Mettler-Toledo รุ่น AG285
8. เครื่องชั่งสารทศนิยม 4 ตำแหน่ง	บริษัท Swiss Quality รุ่น Precisa 62 A
9. incubator shaker	บริษัท Scietific Promotion รุ่น E24/E24R
10. centrifuge	บริษัท Hettich รุ่น EBA 12R
11. microcentrifuge	บริษัท Harmony รุ่น MCF-1350
12. deep freezer	บริษัท Sanyo
13. PCR sprint thermal cycler	บริษัท Thermal Hybrid รุ่น Sprint
14. transluminator	บริษัท Bio-red
15. fume hood	บริษัท Pro Lab รุ่น 2000
16. microwave	บริษัท LG
17. global positioning system (GPS)	บริษัท GARMIN รุ่น eTrex Legend HCx
18. soil dispersion cups	บริษัท Hamilton Beach
18. high performance liquid chromatography (HPLC)	

บริษัท Agilent Technologies รุ่น Agilent 1100

อุปกรณ์อื่นๆ

1. หลอดทดลอง (test tube)
2. ขวดรูปชมพู่ (flask)
3. บิกเกอร์ (beaker)
4. จานเพาะเชื้อ (plate)
5. แท่งแก้วเกลี่ยเชื้อ (spreader)
6. กระบอกตวง (cylinder)
7. ขวดปรับปริมาตร (volumetric flask)
8. ปิเปต (pipette)
9. ไมโครปิเปต (micropipette)
10. ห่วงถ่ายเชื้อ (loop)
11. ขวดแก้วดูแรน (duran)
12. ขวดไวแอล (vial tube)
13. หลอดปั่นเหวี่ยง (centrifuge tube)
14. แท่งแก้วคนสาร (stirring rod)
15. กระดาษกรอง (filter papers)
16. ไนลอน ไซลิงค์ฟิวเตอร์ (nylon syringe filter)
17. เข็มฉีดยา (syringe)
18. แผ่นสไลด์ (slide)
19. ตะเกียงแอลกอฮอล์ (alcohol burner)
20. ไม้บรรทัด (ruler)
21. พลั่วขุดดิน (spades)

แนวทางการดำเนินงานวิจัย

ในการทดลองเป็นการย่อยสลายสารไกลโฟเสททางชีวภาพของแบคทีเรียที่แยกได้จากดินในพื้นที่เพาะปลูก โดยมีขั้นตอนการศึกษาวิจัยแสดงดังภาพ 5

ภาพ 5 ขั้นตอนในการศึกษาวิจัย

จากแผนภาพขั้นตอนในการศึกษาวิจัยสามารถอธิบายขั้นตอนในการวิจัยโดยละเอียดได้ดังนี้

1. การเก็บตัวอย่างดิน

เก็บตัวอย่างดินจากบริเวณพื้นที่แปลงเพาะปลูกซึ่งมีประวัติการใช้สารไกลโฟเสท โดยใช้พลั่วขุดหลุมลึกระดับ 0-15 เซนติเมตร ซึ่งเป็นความลึกระดับไถพรวน เก็บดินใส่ถุงเก็บตัวอย่างเพื่อนำไปใช้ในการคัดเลือกแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายสารไกลโฟเสท ตรวจวัดพิกัดเพื่อเก็บข้อมูลชุดดินด้วยเครื่องหาพิกัดด้วยสัญญาณดาวเทียม (GPS)

2. การคัดแยกเชื้อแบคทีเรีย

นำตัวอย่างดิน 1 กรัม เติมลงไปในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 0.85 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 9 มิลลิลิตร ซึ่งผ่านการทำให้ปราศจากเชื้อแล้วมาทำการเจือจางเป็นลำดับส่วน (serial dilution) ครั้งละ 10 เท่า จากนั้นเลือกระดับการเจือจางที่เหมาะสม 3 ระดับ คือ 10^{-4} 10^{-5} และ 10^{-6} แล้วนำมาแยกเชื้อโดยการเกลี่ยเชื้อบนอาหารแข็ง tryptic soy agar (TSA) ที่มีสารไกลโฟ-เสทความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม เป็นองค์ประกอบ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำการคัดเลือกโคโลนีที่สามารถเจริญได้และทำให้บริสุทธิ์โดยเทคนิค cross streak บนผิวอาหารแข็ง TSA เก็บเชื้อบริสุทธิ์ในอาหารแข็งวุ้นเอียง (slant agar) และอีกส่วนนำไปเลี้ยงในอาหารเหลว tryptic soy broth (TSB) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นดูดใส่หลอดเก็บเชื้อที่มีสารละลายกลีเซอรอล ความเข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์ นำไปเก็บในตู้แช่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส

3. การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียที่คัดเลือก

นำแบคทีเรียที่คัดแยกได้ในเบื้องต้นมาศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาโดยนำแบคทีเรียที่เก็บไว้ในสารละลายกลีเซอรอลมาเลี้ยงในอาหารเหลว tryptic soy broth (TSB) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำแบคทีเรียที่เจริญในอาหารไปขีด (streak) บนอาหารแข็ง tryptic soy agar (TSA) แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นทำการย้อมสีแบบแกรม (Gram's staining) แล้วนำไปส่องดูใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายสูงสุด ทำการศึกษารูปร่าง การจัดเรียงตัว และการติดสีแกรมของแบคทีเรีย

4. การทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายสารไกลโฟเสทในระดับห้องปฏิบัติการ

นำแบคทีเรียที่คัดแยกได้เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ tryptic soy broth (TSB) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ที่มีสารไกลโฟเสทความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นองค์ประกอบแล้วนำไปเขย่าบน shaker เขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ทำการเก็บตัวอย่างที่ 5 และ 10 วัน นำตัวอย่างที่เก็บมากรองผ่าน filter ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของรู 0.45ไมโครเมตร ใส่ขวด vial ปิดฝาให้สนิท จากนั้นทำการทดสอบความเข้มข้นของสารไกลโฟเสทที่เหลือด้วยเครื่อง high performance liquid chromatography (HPLC) รุ่น agilent 1100 (ภาคผนวก ข) โดยเตรียมสารละลายไกลโฟเสทมาตรฐานความเข้มข้น 0.05 0.5 5 10 20 40 และ 80 มิลลิกรัมต่อลิตร (ตารางผนวก 5) เพื่อสร้างกราฟมาตรฐานของสารละลายไกลโฟเสท (ภาพผนวก 12) ซึ่งกำหนดสภาวะที่เหมาะสมดังตาราง 5

จากนั้นนำข้อมูลที่ได้ทั้งหมดมาวิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติ Analysis of Variance (ANOVA) และวิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's multiple range test ด้วยโปรแกรม SPSS Ver. 11.5 จากนั้นทำการคัดเลือกแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายสารไกลโฟเสทได้ดีที่สุด 3 ไอโซเลท เพื่อนำไปใช้ในการทดลองขั้นตอนการศึกษาอัตราการเจริญของแบคทีเรีย และการทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายสารไกลโฟเสทในดิน

ตาราง 5 การวิเคราะห์สารไกลโฟเสทโดยใช้เทคนิคโครมาโตรกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง

ตัวแปร	สภาวะที่เหมาะสม
1. คอลัมน์	C18 (4.6mm x 150mm, 5μm)
2. ประเภทของเครื่องตรวจวัด	diode array detector (DAD)
3. ความยาวคลื่นที่ตรวจวัด	195 นาโนเมตร
4. ปริมาตรของสารที่ฉีดเข้าเครื่อง	20 ไมโครลิตร
5. สัดส่วนเฟสเคลื่อนที่	น้ำปราศจากไอออน (deionized water)
6. อัตราการไหล	1 มิลลิลิตร/นาที
7. ระยะเวลาการวิเคราะห์ตั้งต้น	6 นาที

ที่มา: Lynn and David (1996)

5. การจำแนกชนิดเชื้อแบคทีเรียโดยการหาลำดับเบส 16S rRNA

5.1 การสกัดดีเอ็นเอของเชื้อแบคทีเรีย

นำเชื้อบริสุทธิ์เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร tryptic soy broth (TSB) แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นแยกเซลล์แบคทีเรียออกจากอาหาร TSB โดยการนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เซลล์แบคทีเรียจะตกตะกอนอยู่ที่ก้นหลอด eppendorf ทำการสกัดดีเอ็นเอของเชื้อแบคทีเรียด้วยชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป PureLink™ Genomic DNA Kit (Invitrogen, USA) ตามขั้นตอนดังนี้

เติม lysozyme digestion buffer ปริมาตร 180 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เติม proteinase K ปริมาตร 20 ไมโครลิตร แล้วเขย่าให้เข้ากันด้วย vortex เติม PureLink™ genomic lysis/binding buffer ปริมาตร 200 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากันด้วย vortex จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เติม ethanol ความเข้มข้น 96-100 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 200 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากันด้วย vortex เป็นเวลา 5 วินาที จากนั้นย้ายมาใส่ในหลอด spin column แล้วปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ล้างดีเอ็นเอด้วยการเติม wash buffer 1 ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เติม wash buffer 2 ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 นาที ชะดีเอ็นเอด้วยการเติม PureLink™ genomic elution buffer ปริมาตร 50 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 นาที ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นนำดีเอ็นเอทั้งหมดที่ได้มาเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิค PCR (polymerase chain reaction)

5.2 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR (polymerase chain reaction)

นำดีเอ็นเอทั้งหมดของเชื้อแบคทีเรียมาเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิค PCR ด้วยเครื่อง PCR Mastercycler Personal โดยใช้ primer คือ 27F (5'AGAGTTTGATCMTGG CTCAG-3') และ 1522R (5'- AAGGAGGTGATCCRCCGCA -3') ทำการเตรียมปฏิกิริยาสำหรับการทำ PCR โดยปริมาตรทั้งหมดเท่ากับ 50 ไมโครลิตร ซึ่งในแต่ละปฏิกิริยาประกอบด้วย

น้ำปราศจากไอออน (deionized water)	ปริมาตร 12 ไมโครลิตร
27F primer (ความเข้มข้น 10 พิโกโมล/ไมโครลิตร)	ปริมาตร 4 ไมโครลิตร
1522R primer (ความเข้มข้น 10 พิโกโมล/ไมโครลิตร)	ปริมาตร 4 ไมโครลิตร
ดีเอ็นเอแม่พิมพ์ (genomic DNA)	ปริมาตร 5 ไมโครลิตร
PCR master mix	ปริมาตร 25 ไมโครลิตร

ผสมส่วนประกอบต่างๆ ในแต่ละปฏิกิริยาให้เข้ากัน จากนั้นทำการเพิ่มปริมาณโดยใช้เครื่อง PCR sprint thermal cycler โดยปฏิกิริยาที่ใช้มีรายละเอียดของอุณหภูมิต่างๆ ในแต่ละรอบดังนี้ ระยะที่ 1 pre-denaturing ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ระยะที่ 2 denaturing ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที ระยะที่ 3 annealing ที่ อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1นาที ระยะที่ 4 extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที ทำซ้ำจากระยะที่ 2 ถึง 4 จำนวน 25 รอบ สุดท้ายเป็นระยะ final extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที

จากนั้นนำ PCR product ที่ได้มาตรวจสอบขนาดของ DNA ภายใต้สนามไฟฟ้าโดยผ่านตัวกลางชนิดวุ้น (agarose gel electrophoresis) ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้ เตรียม agarose gel ความเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ เติม gel star 1 ไมโครลิตรต่อ agarose gel 10 มิลลิลิตร จากนั้นนำเจลมาเทใน apparatus รอให้เจลแข็งตัวดีแล้วนำเจลที่ได้ไปวางในเครื่อง run gel เท 1x TAE buffer ลงไปให้ท่วมเจลเตรียมตัวอย่าง DNA ปริมาตร 5 ไมโครลิตร ผสมกับ loadind dye ปริมาตร 2 ไมโครลิตร แล้วนำไปหยดลงหลุมบนเจลโดยมี DNA marker อยู่ในหลุมที่หนึ่งซึ่งใช้ DNA marker ปริมาตร 1 ไมโครลิตร ผสมกับน้ำปลอดเชื้อปริมาตร 4 ไมโครลิตร และ loadind dye ปริมาตร 2 ไมโครลิตร จากนั้นปิดฝาเครื่องแล้วตั้งค่ากระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที นำเจลไปส่องดูแถบดีเอ็นเอภายใต้แสง UV ด้วยเครื่อง transluminator ทำให้สังเกตเห็นแถบของดีเอ็นเอปรากฏขึ้น จากนั้นนำ PCR product ของชิ้นส่วน 16S rRNA ที่ได้มาทำให้บริสุทธิ์

5.3 การทำ PCR product ให้บริสุทธิ์

นำ PCR product ของชิ้นส่วน 16S rDNA ที่ได้มาทำให้บริสุทธิ์ด้วยชุด GEL/PCR DNA Fragments Extraction Kit (Hiyield, Japan) ตามขั้นตอนดังนี้ นำ PCR product ใส่ลงไปในหลอด microcentrifuge เติม DF buffer ปริมาตร 500 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากันด้วย vortex บ่มที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10-15 นาที แล้วทำการกลับหลอดไปมาทุกๆ 2-3 นาที เอา DF column ใส่ลงใน collection tube นำตัวอย่างใส่ลงใน DF column นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 วินาที เทของเหลวทิ้งแล้วเติม wash buffer ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 วินาที เทของเหลวทิ้งแล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที จากนั้นเติมelution buffer ปริมาตร 30 ไมโครลิตร ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 นาที ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วสูงสุด เป็นเวลา 2 นาที เก็บดีเอ็นเอที่บริสุทธิ์แล้วใน eppendorf และนำไปเก็บไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปวิเคราะห์ลำดับเบสต่อไป

5.4 การจำแนกชนิดของเชื้อแบคทีเรียโดยการหาลำดับเบสในส่วนของยีน 16S rRNA

นำดีเอ็นเอที่บริสุทธิ์แล้วมาวิเคราะห์หาลำดับเบสในส่วนของยีน 16S rRNA โดยในการวิจัยครั้งนี้ได้จัดส่งไปหาลำดับเบสที่บริษัท First BASE Laboratories ณ ประเทศมาเลเซีย แล้วนำลำดับเบสที่ได้ไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล โดยใช้โปรแกรม BLAST ของ The National Center for Biotechnology Information (NCBI) (http:// www.ncbi.nlm.nih.gov) เพื่อระบุสายพันธุ์ของเชื้อแบคทีเรีย

6. ทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายสารไกลโฟเสทในดินด้วยแบคทีเรีย

6.1 ทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายสารไกลโฟเสทในดิน

นำดินที่ใช้ในการทดสอบไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว จากนั้นนำดินที่ผ่านการฆ่าเชื้อปริมาตร 500 กรัม ใส่ลงในถังพลาสติกแล้วเติมสารไกลโฟเสทปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในดินคลุกเคล้าผสมให้เข้ากันโดยให้ดินมีการปนเปื้อนของสารไกลโฟเสทที่ความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม แล้วเติมเชื้อที่คัดเลือกซึ่งที่มีอัตราการเจริญ 10^8 CFU/ml ปริมาตร 25 มิลลิลิตร ในดินผสมให้เข้ากันตั้งทิ้งไว้ในอุณหภูมิห้อง เก็บตัวอย่างดินตั้งแต่ 0-10 วัน

วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ completely randomized design (CRD) แต่ละชุดการทดลองทำ 3 ซ้ำ

ชุดการทดลองที่ 1 ดินเติมสารไกลโฟเสท (control)
ชุดการทดลองที่ 2 ดินเติมสารไกลโฟเสทและเชื้อไอโซเลท 1
ชุดการทดลองที่ 3 ดินเติมสารไกลโฟเสทและเชื้อไอโซเลท 2
ชุดการทดลองที่ 4 ดินเติมสารไกลโฟเสทและเชื้อไอโซเลท 3
ชุดการทดลองที่ 5 ดินเติมสารไกลโฟเสทและเชื้อผสม (MIX)

7.2 วิธีการสกัดสารไกลโฟทในดินเพื่อวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC

เก็บตัวอย่างดินมา 3 กรัม ใส่ลงในขวดรูปชมพู่ที่ทำการฆ่าเชื้อแล้ว เติมเมทานอลความเข้มข้น 100 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 20 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปเขย่าด้วยเครื่อง shaker ที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดระยะเวลา 24 ชั่วโมง ให้ย้ายลงในหลอด centrifuge แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 5000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ดูดส่วนใสมา 1.5 มิลลิลิตร กรองผ่าน filter ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของรู 0.45ไมโครเมตร ใส่ขวด vial ปิดฝา

ให้สนิท (Carl and Moye 1988; Sailaja and Satyaprasad, 2006) จากนั้นนำไปวิเคราะห์หาความเข้มข้นของสารไกลโฟเสทที่เหลือด้วยเครื่อง high performance liquid chromatography (HPLC) รุ่น agilent 1100 (ภาพผนวก 14) โดยกำหนดสภาวะที่เหมาะสม (ตาราง 5)

8. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

วิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติ Analysis of Variance (ANOVA) และวิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's multiple range test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ด้วยโปรแกรม SPSS Ver. 11.5

บทที่ 4
ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. การคัดแยกแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายสารไกลโฟเสท

จากการทดลองได้แยกเชื้อแบคทีเรียจากตัวอย่างดินในพื้นที่แปลงเพาะปลูกซึ่งมีประวัติการใช้สารไกลโฟเสทจากแหล่งต่างๆ เพื่อคัดแยกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลายสารไกลโฟเสท โดยทำการเก็บตัวอย่างดินจากพื้นที่การเกษตรที่มีการใช้สารไกลโฟเสท จำนวน 6 ตัวอย่าง ได้แก่ สวนลำไย สวนหอม ไร่ข้าวโพด สวนมะม่วง สวนส้ม และไร่มันฝรั่ง (ภาคผนวก ก) แล้วทำการคัดแยกแบคทีเรียโดยการเจือจางเป็นลำดับแล้วเกลี่ย (spread plate) บนอาหาร tryptic soy agar (TSA) ที่มีสารไกลโฟเสทความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ผลการคัดแยกเชื้อแบคทีเรียจากดินทั้งหมด 6 ตัวอย่าง พบว่าสามารถคัดแยกเชื้อแบคทีเรียได้ทั้งหมด 27 ไอโซเลท (ตาราง 6) ซึ่งเชื้อแบคทีเรียที่คัดแยกได้จะนำไปทดสอบความสามารถในการย่อยสลายสารไกลโฟเสทในระดับห้องปฏิบัติการในขั้นตอนต่อไป

ตาราง 6 จำนวนแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายสารไกลโฟเสทที่คัดแยกได้จากตัวอย่างดิน 6 แหล่ง

ลำดับ	สถานที่เก็บตัวอย่าง	จำนวนไอโซเลท	รหัสเชื้อ
1	สวนลำไย ต.แม่สอย อ.จอมทอง จ.เชียงใหม่	5	LMC1, LMC2, LMC3, LMC4, LMC5
2	สวนหอม ต.แม่สอย อ.จอมทอง จ.เชียงใหม่	3	OMC1, OMC2, OMC3
3	ไร่ข้าวโพด ต.แม่สอย อ.จอมทอง จ.เชียงใหม่	4	CMC1, CMC2, CMC3, CMC4
4	สวนมะม่วง ต.แม่สอย อ.จอมทอง จ.เชียงใหม่	5	MMC1, MMC2, MMC3, MMC4, MMC5

ตาราง 6 (ต่อ)

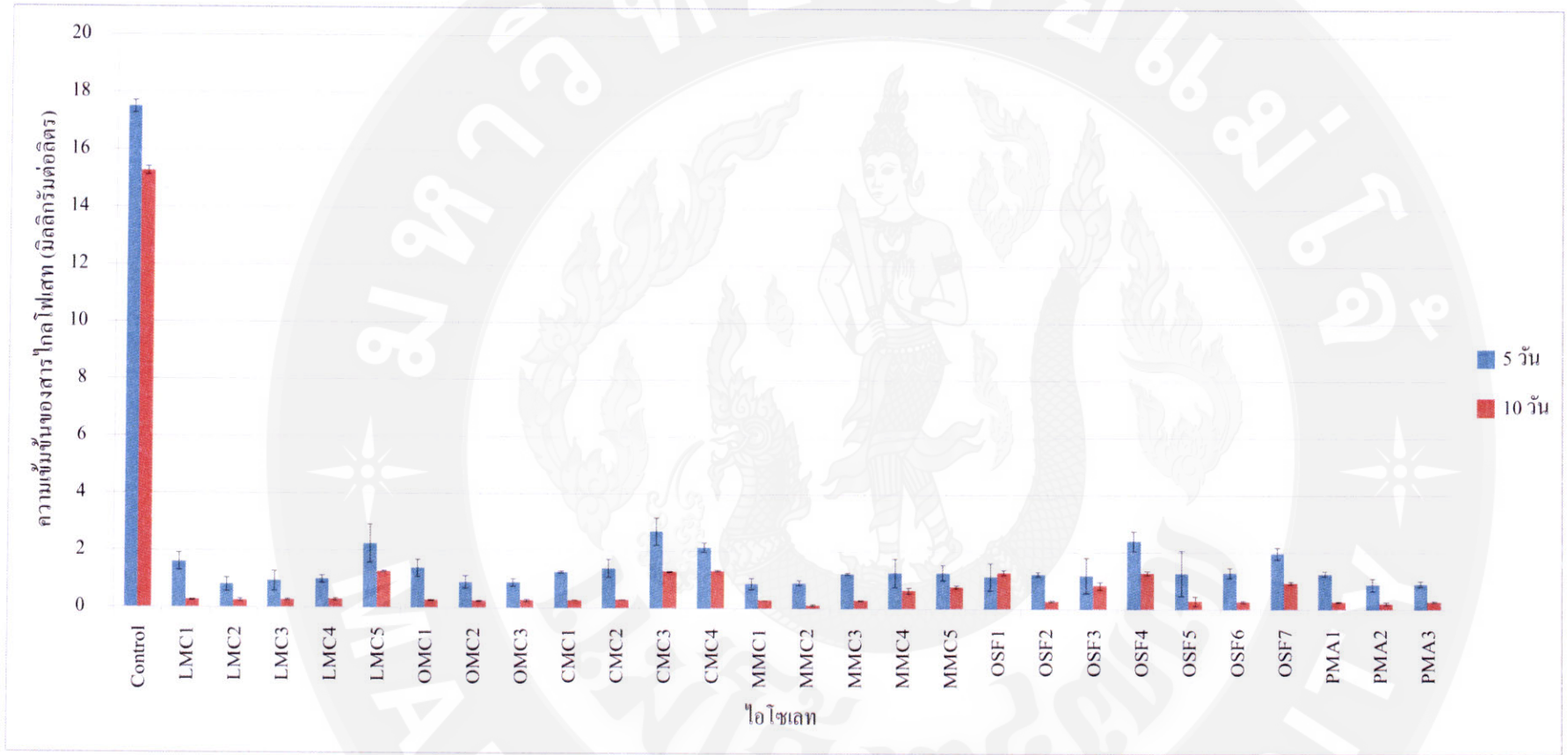
ลำดับ	สถานที่เก็บตัวอย่าง	จำนวนไอโซเลท	รหัสเชื้อ
5	สวนส้ม ต.สันทราย อ.ฝาง จ.เชียงใหม่	7	OSF1, OSF2, OSF3, OSF4, OSF5, OSF6, OSF7
6	ไร่มันฝรั่ง ต. แม่สาว อ.แม่อาย จ.เชียงใหม่	3	PMA1, PMA2, PMA3

นำแบคทีเรียทั้ง 27 ไอโซเลท มาทำการศึกษาลักษณะของโคโลนีเพื่อแยกความแตกต่างของแบคทีเรีย จากการศึกษาลักษณะของโคโลนีของแบคทีเรียทั้ง 27 ไอโซเลท พบว่าโคโลนีของแบคทีเรียมีลักษณะโคโลนี สีของโคโลนี ลักษณะขอบโคโลนี และลักษณะผิวหน้าของโคโลนีที่แตกต่างกันดังตารางผนวก 1

จากการศึกษาลักษณะของเซลล์แบคทีเรียโดยเทคนิคการย้อมสีแบบแกรม (gram's staining) แล้วส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1000 เท่า พบว่าแบคทีเรียที่ได้ทั้งหมดมีทั้งแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ มีรูปร่างเป็นท่อน มีการเรียงจัดเรียงตัวเป็นเซลล์เดี่ยว และเรียงต่อกันเป็นเส้นสายหรือโซ่ ส่วนแบคทีเรียที่มีรูปร่างกลม อยู่เป็นเซลล์เดี่ยว และจัดตัวเป็นกลุ่มคล้ายพวงองุ่น (ตารางผนวก 2)

2. การทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายสารไกลโฟเสทของเชื้อแบคทีเรียที่คัดแยกได้ในระดับห้องปฏิบัติการ

จากการทดลองได้นำเชื้อแบคทีเรียที่คัดแยกได้ทั้ง 27 ไอโซเลท มาทำการทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายสารไกลโฟเสทในระดับห้องปฏิบัติการ โดยเติมสารไกลโฟเสทลงไปในอาหารที่มีเชื้อแบคทีเรียที่ใช้ในการทดสอบข้างต้นให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 20 มิลลิกรัมต่อลิตร แล้วนำไปเขย่าบน shaker เขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ทำการเก็บตัวอย่างที่ 5 และ 10 วัน จากนั้นทำการวิเคราะห์หาความเข้มข้นของสารไกลโฟเสทที่เหลือด้วยเครื่อง high performance liquid chromatography (HPLC) จาการทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายสารไกลโฟเสทพบว่าเชื้อแบคทีเรียที่คัดแยกได้ทั้ง 27 ไอโซเลท มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายสารไกลโฟเสทจากความเข้มข้นเริ่มต้น 20 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยที่ระยะเวลา 5 วัน ไอโซเลท LMC2 MMC2 และ PMA2 สามารถย่อยสลายสารไกลโฟเสทจากความเข้มข้นเริ่มต้น 20 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้เหลืออยู่ 0.80 0.90 และ 0.87 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ และที่ระยะเวลา 10 วัน ไอโซเลท LMC2 MMC2 และ PMA2 สามารย่อยสลายสารไกลโฟเสทจากความเข้มข้นเริ่มต้น 20 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้เหลืออยู่ 0.25 0.12 และ 0.20 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ (ภาพ 6) จากการศึกษาของ Bazot and Lebeau (2008) ที่พบว่าเชื้อแบคทีเรียในธรรมชาติสามารถเปลี่ยนสารอินทรีย์ที่เป็นองค์ประกอบของสารไกลโฟเสทซึ่งเป็นอันตรายต่อสิ่งแวดล้อมและสิ่งมีชีวิตให้กลายเป็นสารที่ไม่เป็นอันตรายหรือลดความเป็นพิษของสารไกลโฟเสทให้น้อยลง และได้ศึกษาเกี่ยวกับการคัดแยกแบคทีเรียเพื่อใช้ในการบำบัดสารพิษทางชีวภาพพบว่า *Pseudomonas* 4ASW มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายสารไกลโฟเสทให้ลดลงได้ และ Shinabarger and Braymer (1984) พบว่า *Pseudomonas* sp. มีประสิทธิภาพในการสังเคราะห์เอนไซม์เพื่อย่อยสารไกลโฟเสทเพื่อใช้ในการเจริญเติบโต นอกจากนี้มีรายงานวิจัยของ Pipke and Amrhein (1988) ที่พบว่า *Arthrobacter atrocyaneus* เป็นแบคทีเรียที่สามารถเจริญเติบโตได้ในแหล่งที่มีสารไกลโฟเสทเนื่องจากแบคทีเรียใช้สารไกลโฟเสทเป็นแหล่งฟอสฟอรัสเพื่อใช้ในการเจริญเติบโต ทั้งนี้สารไกลโฟเสทเป็นแหล่งฟอสฟอรัสที่แบคทีเรียบางสายพันธุ์ใช้เป็นอาหารในการเจริญเติบโตได้ (Balthazor and Hallas, 1986; Quinn *et al.*, 1988)



ภาพ 6 ความเข้มข้นของสารไกลโฟเสทจากการย่อยสลายโดยแบคทีเรียที่คัดแยกได้ที่ระยะเวลา 5 วัน และ 10 วัน (มิลลิกรัมต่อลิตร)

เมื่อวิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติ Analysis of Variance (ANOVA) และวิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's multiple range test ด้วยโปรแกรม SPSS พบว่าเชื้อแบคทีเรียที่คัดแยกได้ทั้ง 27 ไอโซเลท มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายสารไกลโฟเสทที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ โดยไอโซเลท MMC2 LMC2 และ PMA2 มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายสารไกลโฟเสทมากที่สุด เท่ากับ 97.44 97.37 และ 97.30 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งชุดควบคุม (control) มีสารไกลโฟเสทลดลงน้อยที่สุด เท่ากับ 18.10 เปอร์เซ็นต์ (ตาราง 7) จากการทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายสารไกลโฟเสทได้สอดคล้องกับรายงานวิจัยของ Moneke *et al.* (2010) ที่ได้กล่าวว่าแบคทีเรียบางสายพันธุ์สามารถทนต่อความเป็นพิษของสารไกลโฟเสทได้และเจริญเติบโตได้โดยใช้สารไกลโฟเสทเป็นแหล่งอาหาร และจากรายงานวิจัยของ Inna *et al.* (2010) พบว่าแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากดิน ได้แก่ *Achromobacter* sp. และ *Ochrobactrum anthropic* มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายสารไกลโฟเสทได้ 65.8 และ 49.5 เปอร์เซ็นต์

ตาราง 7 ประสิทธิภาพการย่อยสลายสารไกลโฟเสทของเชื้อแบคทีเรียที่คัดแยกได้ทั้ง 27 ไอโซเลท (เปอร์เซ็นต์)

ไอโซเลท	ประสิทธิภาพการย่อยสลายสารไกลโฟเสท (เปอร์เซ็นต์)
Control	18.10^{G}
LMC1	95.34^{ABC}
LMC2	97.37^{A}
LMC3	97.00^{AB}
LMC4	96.77^{AB}
LMC5	91.18^{EF}
OMC1	95.85^{ABC}
OMC2	97.14^{AB}
OMC3	97.11^{AB}
CMC1	96.14^{AB}
CMC2	95.80^{ABC}
CMC3	90.50^{F}

ตาราง 7 (ต่อ)

ไอโซเลท	ประสิทธิภาพการย่อยสลายสารไกลโฟเสท (เปอร์เซ็นต์)
CMC4	91.38 ^{EF}
MMC1	97.11 ^{AB}
MMC2	97.44 ^{A}
MMC3	96.22 ^{AB}
MMC4	95.26 ^{ABC}
MMC5	94.89 ^{BC}
OSF1	93.99 ^{CD}
OSF2	96.26 ^{AB}
OSF3	96.37 ^{AB}
OSF4	90.84 ^{EF}
OSF5	96.13 ^{AB}
OSF6	96.12 ^{AB}
OSF7	92.80 ^{DF}
PMA1	96.21 ^{AB}
PMA2	97.30 ^{A}
PMA3	97.08 ^{AB}
F-test	*

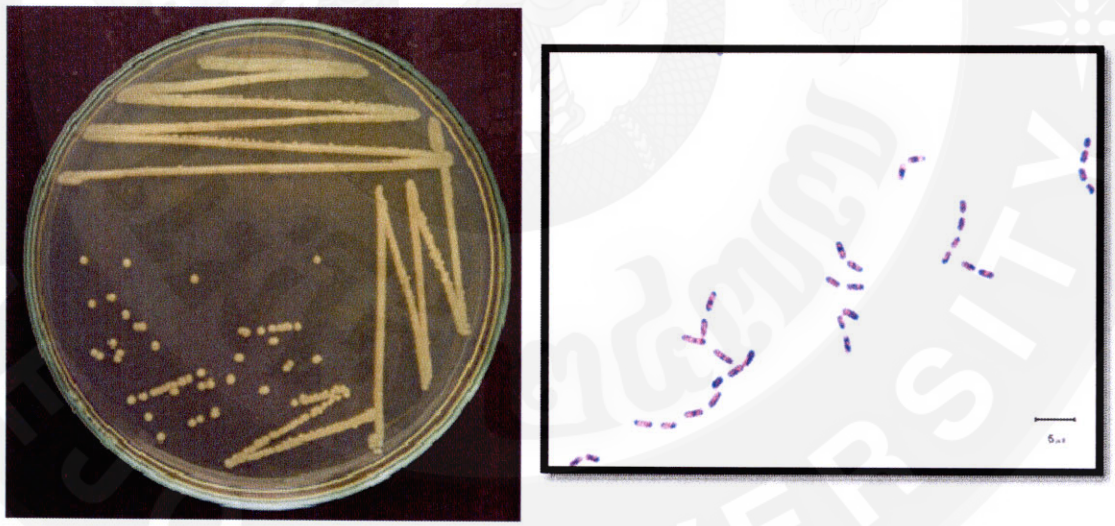
หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยตัวอักษรที่เหมือนกันในแนวตั้งไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

3. การศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือก

จากข้อมูลการทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายสารไกลโฟเสทของเชื้อแบคทีเรียที่คัดแยกได้ในระดับห้องปฏิบัติการ สามารถคัดเลือกแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายสารไกลโฟเสทได้ดีที่สุด 3 ไอโซเลท คือ LMC2 MMC2 และ PMA2 เมื่อศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกจำนวน 3 ไอโซเลท พบว่ามีลักษณะดังนี้

3.1 เชื้อแบคทีเรียไอโซเลท LMC2

ลักษณะโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียไอโซเลท LMC2 เป็นแบคทีเรียที่มีโคโลนีขุ่น (opaque) ลักษณะของโคโลนีกลม (circular) ขอบโคโลนีเรียบ (entire) ระดับความสูงของโคโลนีโค้งตรงกลางนูนเป็นชั้นที่สอง (umbonate) ผิวหน้าเกลี้ยง (smooth) และเมื่อใช้เทคนิคการย้อมสีแบบแกรม (gram's staining) แล้วส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1000 เท่า พบว่าเซลล์แบคทีเรียมีเป็นท่อน มีการเรียงตัวเป็นเส้นสายหรือเป็นสายโซ่ ติดสีม่วงเป็นแบคทีเรียแกรมบวก (ภาพ 7)



(ก) (ข)

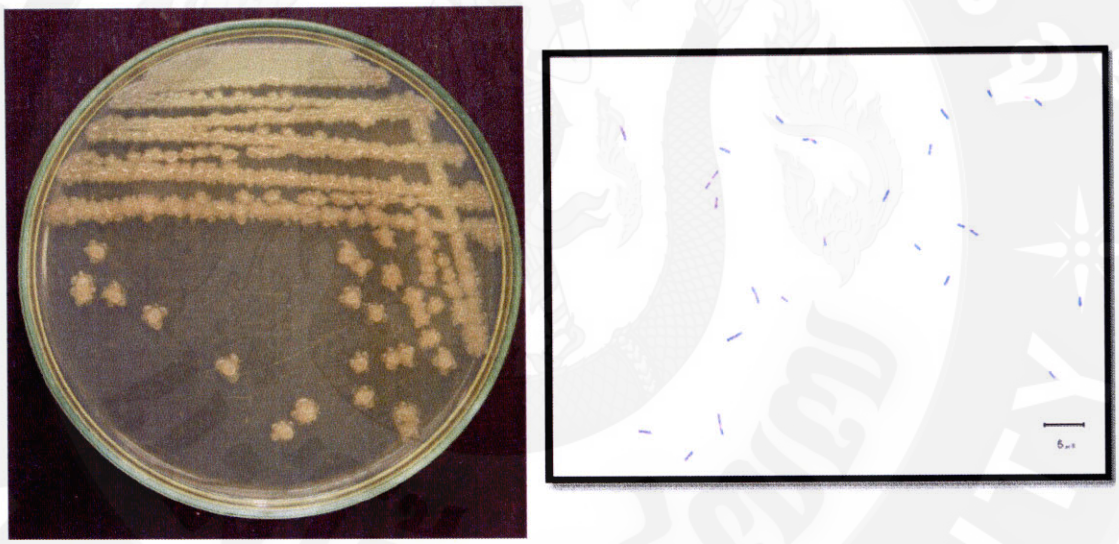
ภาพ 7 ลักษณะของแบคทีเรียไอโซเลท LMC2

(ก) ลักษณะโคโลนีของแบคทีเรียไอโซเลท LMC2 บนอาหาร tryptic soy agar (TSA)

(ข) รูปร่างการติดสีของแบคทีเรียไอโซเลท LMC2 อายุ 12 ชั่วโมง โดยเทคนิคการย้อมสีแบบแกรม (gram's staining) แล้วส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1000 เท่า

3.2 เชื้อแบคทีเรียไอโซเลท MMC2

ลักษณะโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียไอโซเลท MMC2 เป็นแบคทีเรียที่มีโคโลนีขุ่น (opaque) ลักษณะของโคโลนีรูปร่างไม่แน่นอน (lrregular) ริมขอบโคโลนีเป็นคลื่นที่โค้งเว้าเพียงเล็กน้อย (undulate) ระดับความสูงของโคโลนีโค้งตรงกลางนูนเป็นชั้นที่สอง (umbonate) ผิวหน้าขรุขระ (rough) เนื้อโคโลนีเป็นเมือกเหนียว (mucoid) และเมื่อใช้เทคนิคการย้อมสีแบบแกรม (gram's staining) แล้วส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1000 เท่า พบว่าเซลล์แบคทีเรียเป็นท่อนยาว มีการเรียงตัวกระจายตัวเป็นเส้นสายหรือเป็นสายโซ่ ติดสีม่วงเป็นแบคทีเรียแกรมบวก (ภาพ 8)



(ก) (ข)

ภาพ 8 ลักษณะของแบคทีเรียไอโซเลท MMC2

(ก) ลักษณะโคโลนีของแบคทีเรียไอโซเลท MMC2 บนอาหาร tryptic soy agar (TSA)

(ข) รูปร่างการติดสีของแบคทีเรียไอโซเลท MMC2 อายุ 12 ชั่วโมง โดยเทคนิคการย้อมสีแบบแกรม (gram's staining) แล้วส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1000 เท่า

3.3 เชื้อแบคทีเรียไอโซเลท PMA2

ลักษณะโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียไอโซเลท PMA2 เป็นแบคทีเรียที่มีโคโลนีขุ่น (opaque) ลักษณะของโคโลนีกลม (circular) ขอบโคโลนีเรียบ (entire) ระดับความสูงของโคโลนีโค้งตรงกลางนูนเป็นชั้นที่สอง (umbonate) ผิวหน้าเกลี้ยง (smooth) และเมื่อใช้เทคนิคการย้อมสีแบบแกรม (gram's staining) แล้วส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1000 เท่า พบว่าเซลล์แบคทีเรียเป็นท่อน มีการเรียงตัวเป็นเส้นสายหรือเป็นสายโซ่ ติดสีม่วงเป็นแบคทีเรียแกรมบวก (ภาพ 9)

(ก) (ข)

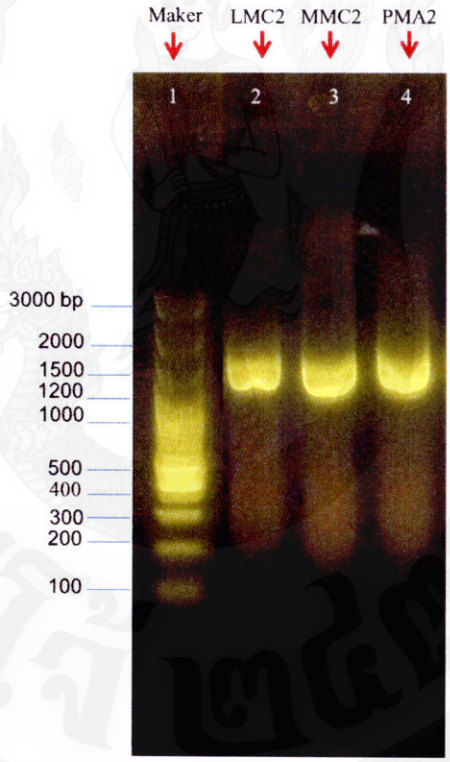
ภาพ 9 ลักษณะของแบคทีเรียไอโซเลท PMA2

(ก) ลักษณะโคโลนีของแบคทีเรียไอโซเลท PMA2 บนอาหาร tryptic soy agar (TSA)

(ข) รูปร่างการติดสีของแบคทีเรียไอโซเลท PMA2 อายุ 12 ชั่วโมง โดยเทคนิคการย้อมสีแบบแกรม (gram's staining) แล้วส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1000 เท่า

5. การจำแนกชนิดเชื้อแบคทีเรียโดยการหาลำดับเบส 16S rRNA

จากการนำเชื้อจุลินทรีย์ไอโซเลท LMC2 MMC2 และ PMA2 ที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายสารไกลโฟเสทมาสกัดดีเอ็นเอโดยชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป (PureLink™ Genomic DNA Kit) และนำ genomic DNA ที่ได้มาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในส่วนของยีน 16S rRNA ด้วยวิธี PCR (polymerase chain reaction) โดยใช้ universal primer 1 คู่ คือ 27F และ 1522R จากนั้นนำมาตรวจสอบขนาดของชิ้นดีเอ็นเอของแบคทีเรีย พบว่า PCR product ทั้ง 3 ไอโซเลท มีขนาดประมาณ 1500 คู่เบส (ภาพ 10)



ภาพ 10 ขนาดของ DNA ที่ได้จากการทำ PCR ในส่วนของยีน 16S rRNA

หมายเหตุ Lane 1 คือ 100 bp DNA ladder คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน O' GeneRulerTM 100 bp DNA Ladder

Lane 2 คือ ขนาดของ DNA ที่ได้จากการทำ PCR ของแบคทีเรียไอโซเลท LMC2 โดยใช้ไพรเมอร์ชุด 27F และ 1522R

Lane 3 คือ ขนาดของ DNA ที่ได้จากการทำ PCR ของแบคทีเรียไอโซเลท MMC2 โดยใช้ไพรเมอร์ชุด 27F และ 1522R

Lane 4 คือ ขนาดของ DNA ที่ได้จากการทำ PCR ของแบคทีเรียไอโซเลท PMA2 โดยใช้ไพรเมอร์ชุด 27F และ 1522R

นำ PCR product มาทำให้บริสุทธิ์ด้วยชุด GEL/PCR DNA Fragments Extraction Kit แล้วนำ PCR product ที่บริสุทธิ์นี้ไปหาลำดับเบสของดีเอ็นเอในส่วนของยีน 16S rRNA แล้วนำลำดับเบสที่ได้จาก primer ทั้ง 1 คู่ ของเชื้อแบคทีเรียไอโซเลท LMC2 MMC2 และ PMA2 ไปสร้าง contiq ในโปรแกรม BioEdit พบว่า ไอโซเลท LMC2 MMC2 และ PMA2 มีลำดับเบสของ DNA ในส่วนของยีน 16S rRNA ที่จะนำไปเปรียบเทียบความเหมือนใน GenBank ซึ่งได้มาจากการนำ primer 1 คู่ คือ 27F และ 1522R ไปเปรียบเทียบกันในโปรแกรม BioEdit ดังภาพ 11 12 และ 13 ตามลำดับ

AACTGATTAGAAGCTTGCTTCTATGACGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGCAACCTG
CCTGTAAGACTGGGATAACTTCGGGAAACCGAAGCTAATACCGGATAGGATCTTCTCCTTCATGG
GAGATGATTGAAAGATGGTTTCGGCTATCACTTACAGATGGGCCCGCGGTGCATTAGCTAGTTGGT
GAGGTAACGGCTCACCAAGGCAACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGG
ACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAG
TCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGCTTTCGGGTCGTAAAACTCTGTTGTTAGGGAA
GAACAAGTACGAGAGTAACTGCTCGTACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTAC
GTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCG
CGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCATTGGAAACT
GGGGAACTTGAGTGCAGAAGAGAAAAGCGGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATG
TGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTTTTTGGTCTGTAACTGACGCTGAGGCGCGAAAGCGTG
GGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGAG
GGTTTCCGCCCTTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGA
CTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCA
ACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTGACAACTCTAGAGATAGAGCGTTCCCCTTCGG
GGGACAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCC
CGCAACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTTAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGG
TGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCCTTATGACCTGGGCTACACA
CGTGCTACAATGGATGGTACAAAGGGCTGCAAGACCGCGAGGTCAAGCCAATCCCATAAAACCAT
TCTCAGTTCGGATTGTAGGCTGCAACTCGCCTACATGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCA
GCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCACGAGAGTTTGTA
ACACCCGAAGTCGGTGGAGTAACCGTAAGGAGCTAGCCGCCTAAGGTGGGACAGA

ภาพ 11 ลำดับเบสของ DNA ในส่วนของยีน 16S rRNA ของแบคทีเรียไอโซเลท LMC2

GCGGACAGATGGGAGCTTGCTCCCTGATGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCT
GCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATGGTTGTTTGAACCGCATG
GTTCAAACATAAAAGGTGGCTTCGGCTACCACTTACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTG
GTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTG
GGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAA
AGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGG
AAGAACAAGTACCGTTCGAATAGGGCGGTACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAAC
TACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGG
GCTCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAA
ACTGGGGAACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAG
ATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTAACTGACGCTGAGGAGCGAAAGC
GTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTA
GGGGGTTTCCGCCCCTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGTCGC
AAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGA
AGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTGACAATCCTAGAGATAGGACGTCCCCT
TCGGGGGCAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAG
TCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTCAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGC
CGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCCTTATGACCTGGGCTAC
ACACGTGCTACAATGGACAGAACAAAGGGCAGCGAAACCGCGAGGTTAAGCCAATCCCACAAAT
CTGTTCTCAGTTCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGG
ATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCACGAGAGTTT
GTAACACCCGAAGTCGGTGAGGTAACCTTTTAGGAGCCAGCCGCCGAAGGTGGGACAGATGATT

ภาพ 12 ลำดับเบสของ DNA ในส่วนของยีน 16S rRNA ของแบคทีเรียไอโซเลท MMC2

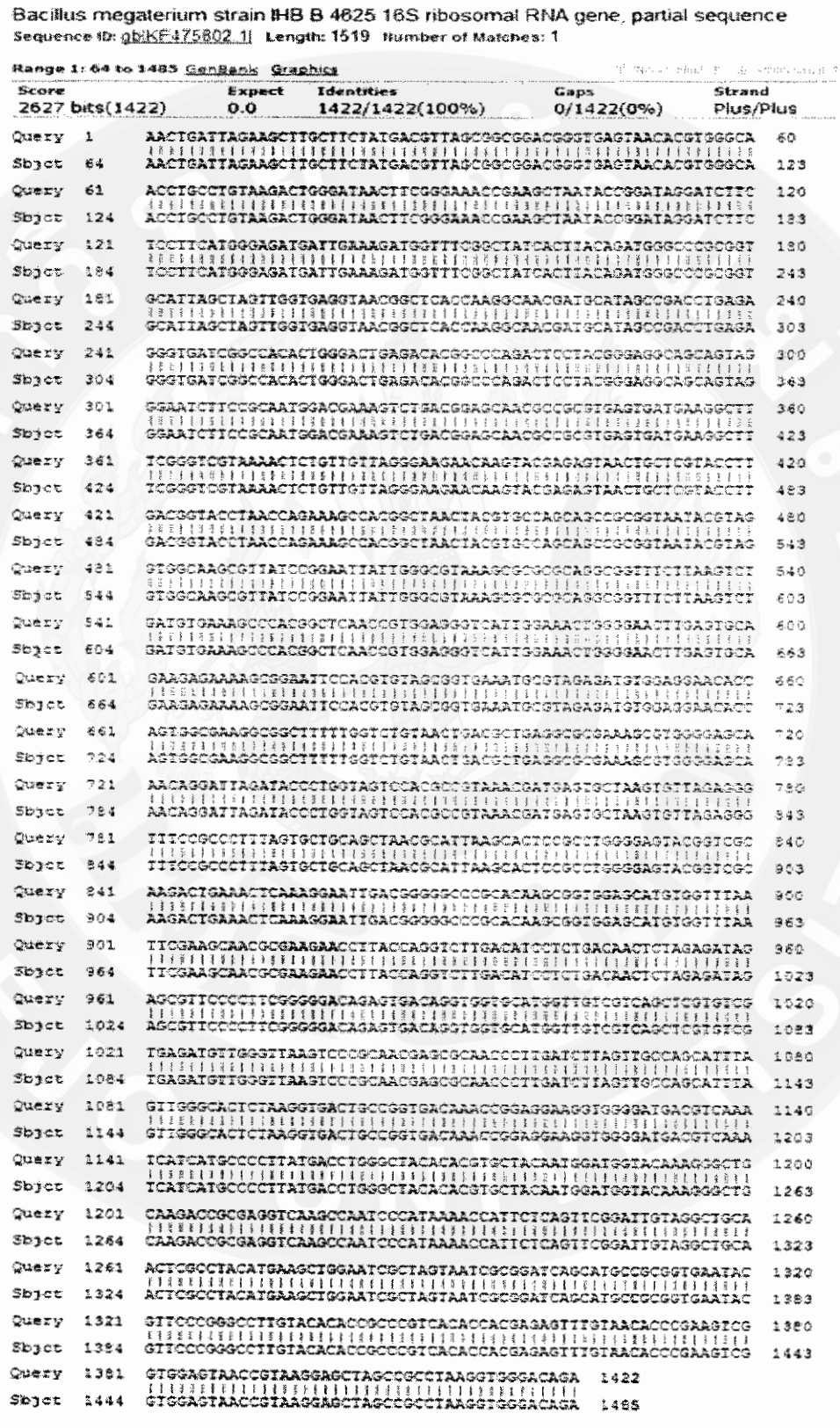
GCGAATGGATTAAGAGCTTGCTCTTATGAAGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAAC
CTGCCCATAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATAACATTTTGAACCGCA
TGGTTCAAAATTGAAAGGCGGCTTCGGCTGTCACTTATGGATGGACCCGCGTCGCATTAGCTAGTT
GGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACT
GGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGA
AAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGCTTTCGGGTCGTAAAACTCTGTTGTTAGG
GAAGAACAAGTGCTAGTTGAATAAGCTGGCACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAA
CTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAG
CGCGCGCAGGTGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCATTGGA
AACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAAAGTGGAATTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAAA
GATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTTTCTGGTCTGTAACTGACACTGAGGCGCGAAAG
CGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTT
AGAGGGTTTCCGCCCTTTAGTGCTGAAGTTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGCCG
CAAGGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCG
AAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTGAAAACCCTAGAGATAGGGCTTCTCC
TTCGGGAGCAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAA
GTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCATCATTAAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTG
CCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCCTTATGACCTGGGCTA
CACACGTGCTACAATGGACGGTACAAAGAGCTGCAAGACCGCGAGGTGGAGCTAATCTCATAAA
ACCCTTCTCAGTTCGGATTGTAGGCTGCAACTCGCCTACATGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCG
GATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCACGAGAGT
TTGTAACACCCGAAGTCGGTGGGGTAACCTTTTTTGGAGCCAGCCGCCTAAGGTGGGACAGATGA
TT

ภาพ 13 ลำดับเบสของ DNA ในส่วนของยีน 16S rRNA ของแบคทีเรียไอโซเลท PMA2

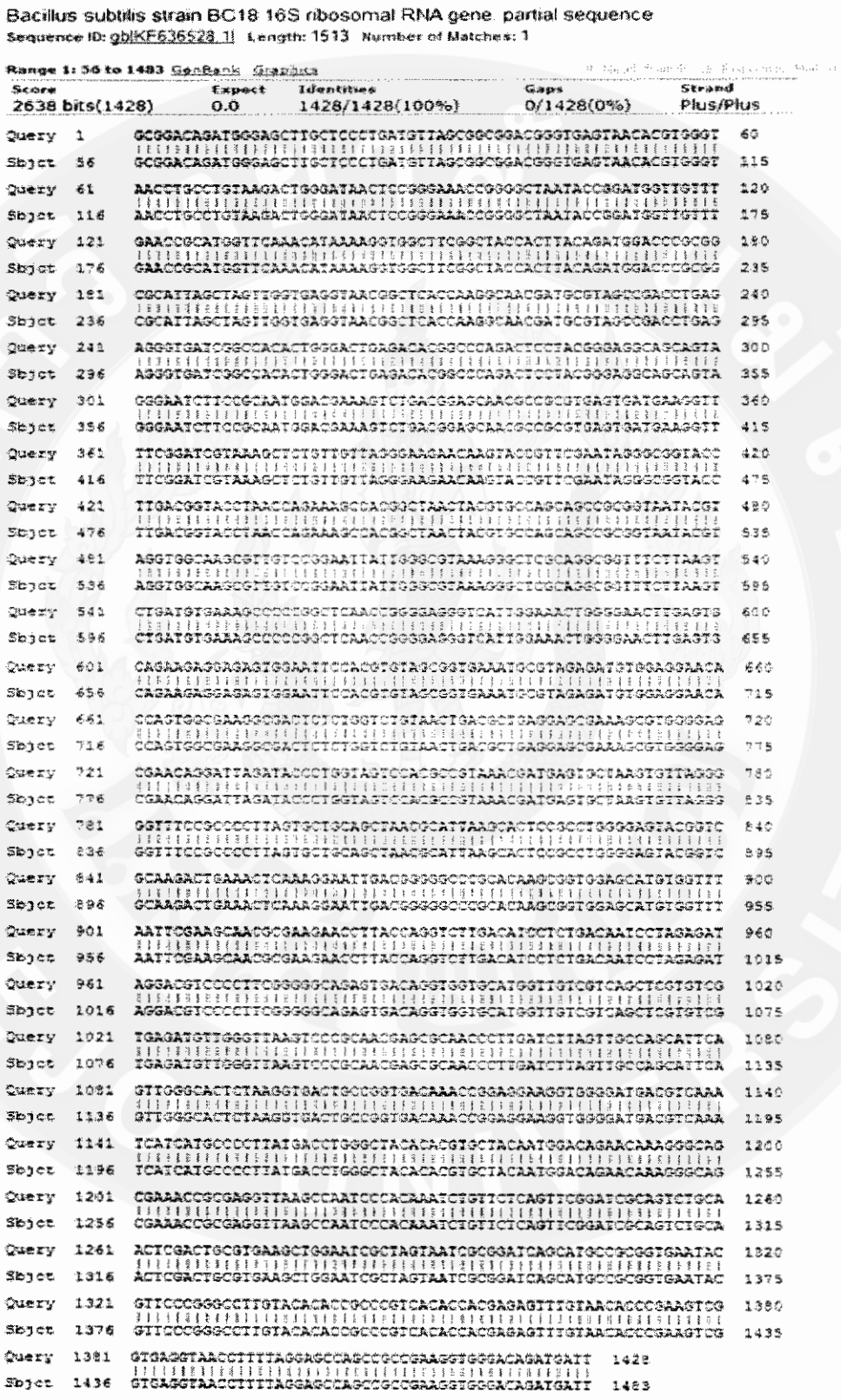
จากนั้นนำลำดับเบสที่ได้ไปเทียบความคล้ายจากฐานข้อมูลลำดับเบสใน GenBank โดยใช้โปรแกรม BLAST ได้ผลดังนี้คือ แบคทีเรียไอโซเลท LMC2 มีลำดับเบสของยีน 16S rRNA เหมือนกับ *Bacillus megaterium* 100 เปอร์เซ็นต์ (ตาราง 8 และภาพ 14) แบคทีเรียไอโซเลท MMC2 มีลำดับเบสของยีน 16S rRNA เหมือนกับ *Bacillus subtilis* 100 เปอร์เซ็นต์ (ตาราง 8 และภาพ 15) และแบคทีเรียไอโซเลท PMA2 มีลำดับเบสของยีน 16S rRNA เหมือนกับ *Bacillus cereus* 99 เปอร์เซ็นต์ (ตาราง 8 และภาพ 16) เนื่องจาก *Bacillus* เป็นแบคทีเรียในกลุ่มที่ต้องการออกซิเจนในการเจริญเติบโต (aerobic bacteria) สามารถเจริญได้ดีที่อุณหภูมิต่ำจนถึงอุณหภูมิสูง และเจริญในสภาวะพีเอช ช่วงกว้างตั้งแต่ 2-11 ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ (บัวสาย และคณะ, 2556)

ตาราง 8 การจัดจำแนกเชื้อแบคทีเรียไอโซเลท LMC2 MMC2 และ PMA2 โดยการหาลำดับเบสของดีเอ็นเอในส่วนของยีน 16S rRNA

ไอโซเลท	แบคทีเรีย	accession number	identities	% homology
LMC2	*Bacillus megaterium*	KF475802.1	1422/1422	100
MMC2	*Bacillus subtilis*	KF636528.1	1422/1422	100
PMA2	*Bacillus cereus*	KF601957.1	1422/1422	99



ภาพ 14 สายพันธุ์ของแบคทีเรียที่ได้จากการนำไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลใน GenBank โดยใช้โปรแกรม BLAST ของแบคทีเรียไอโซเลท LMC2



ภาพ 15 สายพันธุ์ของแบคทีเรียที่ได้จากการนำไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลใน GenBank โดยใช้โปรแกรม BLAST ของแบคทีเรียไอโซเลท MMC2

Bacillus cereus strain SBTBC-008 16S nbosomal RNA gene, partial sequence
Sequence ID: gb|KF601957.1| Length: 1557 Number of Matches: 1

Range 1: 69 to 1498 GenBank Graphics

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
2619 bits(1418)	0.0	1427/1431(99%)	1/1431(0%)	Plus/Plus

```
Query  1     GCGAATGGATTAAGAGCTTGCTCTTATGAAGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGG  60
Sbjct  69    GCGAATGGATTAAGAGCTTGCTCTTATGAAGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGG  128

Query  61    GTAACCTGCCCATAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATAACATT  120
Sbjct  129   GTAACCTGCCCATAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATAACATT  188

Query  121   TTGAACCGCATGGTTCAAAATTGAAAGGCGGCTTCGGCTGTCACTTATGGATGGACCCGC  180
Sbjct  189   TTGAACCGCATGGTTCGAAATTGAAAGGCGGCTTCGGCTGTCACTTATGGATGGACCCGC  248

Query  181   GTCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTG  240
Sbjct  249   GTCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTG  308

Query  241   AGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAG  300
Sbjct  309   AGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAG  368

Query  301   TAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGG  360
Sbjct  369   TAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGG  428

Query  361   CTTTCGGGTCGTAAAACTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTGCTAGTTGAATAAGCTGGCA  420
Sbjct  429   CTTTCGGGTCGTAAAACTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTGCTAGTTGAATAAGCTGGCA  488

Query  421   CCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATAC  480
Sbjct  489   CCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATAC  548

Query  481   GTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGTGGTTTCTTAA  540
Sbjct  549   GTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGTGGTTTCTTAA  608

Query  541   GTCTGATGTGAAAGCCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCATTGGAAACTGGGAGACTTGAG  600
Sbjct  609   GTCTGATGTGAAAGCCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCATTGGAAACTGGGAGACTTGAG  668

Query  601   TGCAGAAGAGGAAAGTGGAATTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATATGGAGGAA  660
Sbjct  669   TGCAGAAGAGGAAAGTGGAATTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATATGGAGGAA  728

Query  661   CACCAGTGGCGAAGGCGACTTTCTGGTCTGTAACTGACACTGAGGCGCGAAAGCGTGGGG  720
Sbjct  729   CACCAGTGGCGAAGGCGACTTTCTGGTCTGTAACTGACACTGAGGCGCGAAAGCGTGGGG  788

Query  721   AGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAG  780
Sbjct  789   AGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAG  848

Query  781   AGGGTTTCCGCCCTTTAGTGCTGAAGTTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGG  840
Sbjct  849   AGGGTTTCCGCCCTTTAGTGCTGAAGTTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGG  908

Query  841   CCGCAAGGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGT  900
Sbjct  909   CCGCAAGGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGT  968

Query  901   TTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTGAAAACCCTAGAG  960
Sbjct  969   TTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTGAAAACCCTAGAG  1028

Query  961   ATAGGGCTTCTCCTTCGGGAGCAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGT  1020
Sbjct  1029  ATAGGGCTTCTCCTTCGGGAGCAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGT  1088

Query  1021  CGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCATCATT  1080
Sbjct  1089  CGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCATCATT  1148

Query  1081  AAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCA  1140
Sbjct  1149  AAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCA  1208

Query  1141  AATCATCATGCCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGACGGTACAAAGAGC  1200
Sbjct  1209  AATCATCATGCCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGACGGTACAAAGAGC  1268

Query  1201  TGCAAGACCGCGAGGTGGAGCTAATCTCATAAAACCGTTCTCAGTTCGGATTGTAGGCTG  1260
Sbjct  1269  TGCAAGACCGCGAGGTGGAGCTAATCTCATAAAACCGTTCTCAGTTCGGATTGTAGGCTG  1328

Query  1261  CAACTCGCCTACATGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAAT  1320
Sbjct  1329  CAACTCGCCTACATGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAAT  1388

Query  1321  ACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCACGAGAGTTTGTAACACCCGAAGT  1380
Sbjct  1389  ACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCACGAGAGTTTGTAACACCCGAAGT  1448

Query  1381  CGGTGGGGTAACCTTTTTTGGAGCCAGCCGCCTAAGGTGGGACAGATGATT  1431
Sbjct  1449  CGGTGGGGTAACC-TTTTTGGAGCCAGCCGCCTAAGGTGGGACAGATGATT  1498
```

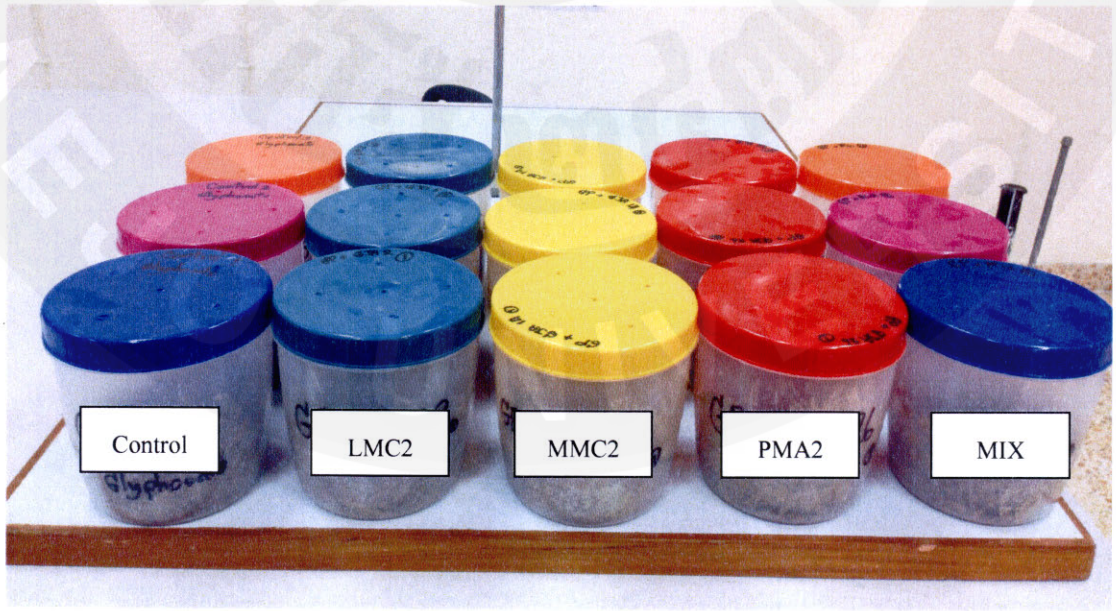
ภาพ 16 สายพันธุ์ของแบคทีเรียที่ได้จากการนำไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลใน GenBank โดยใช้โปรแกรม BLAST ของแบคทีเรียไอโซเลท PMA2

6. ทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายสารไกลโฟเสทในดินด้วยแบคทีเรีย

จากการทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียในการย่อยสลายสารไกลโฟเสทในดิน ได้วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ Completely Randomized Design (CRD) ประกอบด้วย 5 ชุดการทดลอง ได้แก่

- ดินเติมสารไกลโฟเสท (Control)
- ดินเติมสารไกลโฟเสทและเชื้อ LMC2
- ดินเติมสารไกลโฟเสทและเชื้อ MMC2
- ดินเติมสารไกลโฟเสทและเชื้อ PMA2
- ดินเติมสารไกลโฟเสทและเชื้อผสม (MIX)

แต่ละชุดการทดลองจะทำ 3 ซ้ำ เก็บตัวอย่างมาสกัดเพื่อหาความเข้มข้นของสารไกลโฟเสทโดยวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC เป็นระยะเวลา 0-10 วัน (ภาพ 17) ผลการทดลองพบว่าดินที่เติมสารไกลโฟเสท (Control) มีอัตราการลดลงของสารไกลโฟเสทช้าเนื่องจากไม่ได้เติมแบคทีเรียเพื่อช่วยในการย่อยสลาย ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับดินที่เติมแบคทีเรียไอโซเลท LMC2 MMC2 PMA2 และดินเติมแบคทีเรียทั้ง 3 ไอโซเลท ผสมกัน (MIX) จะเห็นได้ว่าสารไกลโฟเสทมีอัตราการลดลงเร็วกว่าชุดควบคุมที่ไม่ได้เติมแบคทีเรียเนื่องจากแบคทีเรียสามารถย่อยสลายสารไกลโฟเสทได้



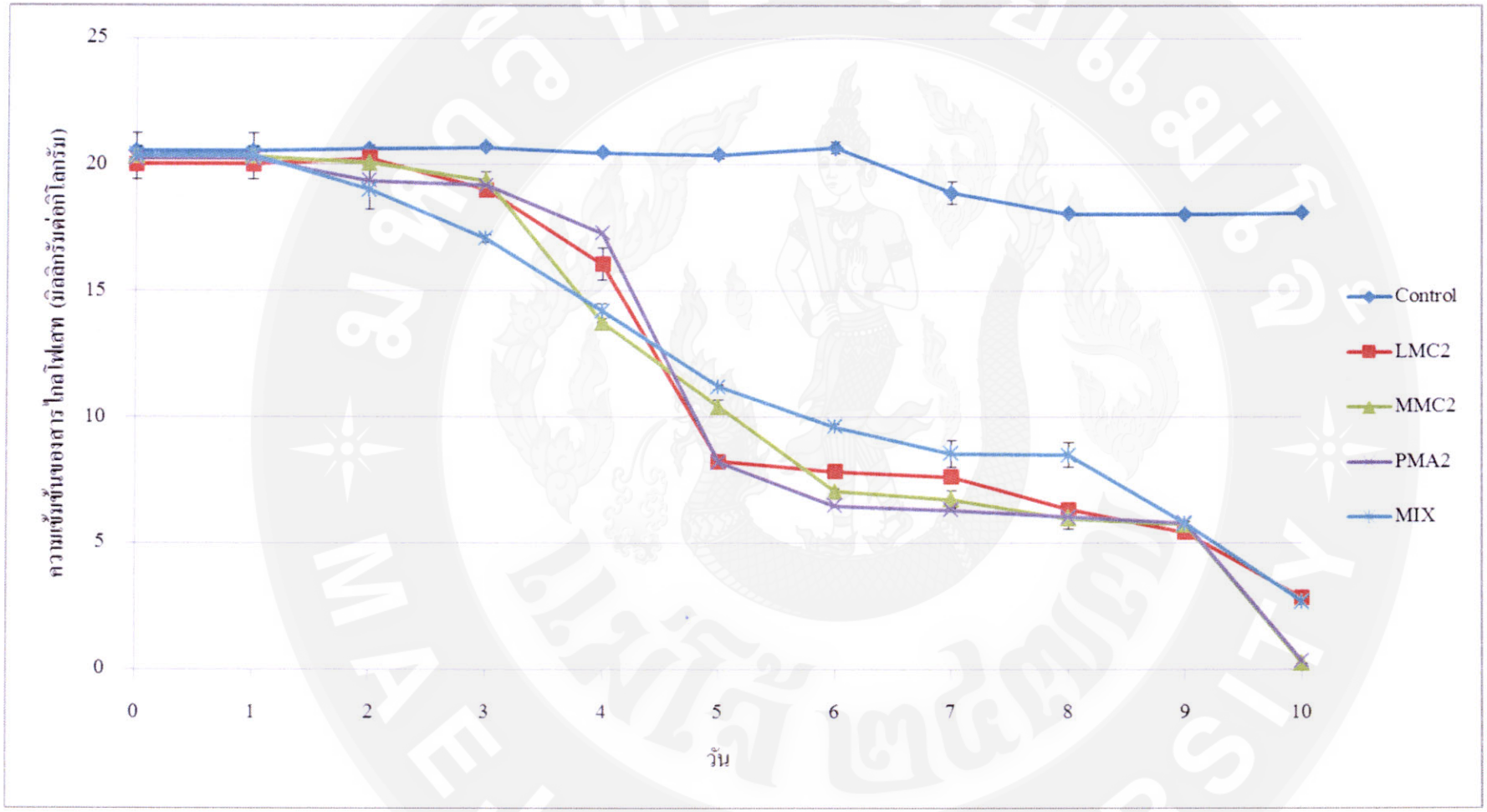
ภาพ 17 ตัวอย่างดินที่มีการเติมสารไกลโฟเสทความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และแบคทีเรียที่คัดแยก ได้แก่ ไอโซเลท LMC2 MMC2 PMA2 และ MIX

จากการทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียในการย่อยสลายสารไกลโฟเสทในดินทั้ง 5 ชุดการทดลอง เป็นระยะเวลา 0-10 วัน พบว่าในช่วงระยะเวลา 0-1 วัน ยังไม่พบอัตราการลดลงของสารไกลโฟเสทที่ชัดเจน แต่หลังจากช่วงระยะเวลา 2-10 วัน จะเห็นว่าอัตราการลดลงของสารไกลโฟเสทเริ่มชัดเจนมากขึ้นเริ่ม ซึ่งที่ระยะเวลา 10 วัน พบว่าชุดการทดลองที่ 1 ดินเติมสารไกลโฟเสท (Control) สารไกลโฟเสทจากความเข้มข้นเริ่มต้น 20 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม เหลืออยู่ 18.09 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (ภาพผนวก 15)

ชุดการทดลองที่ 2 ดินเติมสารไกลโฟเสทและไอโซเลท LMC2 (*Bacillus megaterium*) สามารถย่อยสลายสารไกลโฟเสทในดินจากความเข้มข้นเริ่มต้น 20 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ให้เหลืออยู่ 2.81 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (ภาพผนวก 16)

ชุดการทดลองที่ 3 ดินเติมสารไกลโฟเสทและไอโซเลท MMC2 (*Bacillus subtilis*) สามารถย่อยสลายสารไกลโฟเสทในดินจากความเข้มข้นเริ่มต้น 20 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ให้เหลืออยู่ 0.23 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (ภาพผนวก 17)

ชุดการทดลองที่ 4 ดินเติมสารไกลโฟเสทและไอโซเลท PMA2 (*Bacillus cereus*) และชุดการทดลองที่ 5 ดินเติมสารไกลโฟเสทและเชื้อผสม (MIX) (ภาพผนวก 18 และ 19) สามารถย่อยสลายสารไกลโฟเสทในดินจากความเข้มข้นเริ่มต้น 20 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ให้เหลืออยู่ 0.30 และ 2.66 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ (ภาพ 18)



ภาพ 18 ความเข้มข้นของสารไกลโฟเสทในดินจากการย่อยสลายโดยแบคทีเรียที่คัดเลือก (มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม)

จากการวิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติ Analysis of Variance (ANOVA) และวิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's Multiple Range Test พบว่าแต่ละชุดการทดลองมีประสิทธิภาพในการย่อยสลายสารไกลโฟเสทที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

โดยชุดการทดลองที่ 3 ดินเติมสารไกลโฟเสทและไอโซเลท MMC2 (*Bacillus subtilis*) และชุดการทดลองที่ 4 ดินเติมสารไกลโฟเสทและไอโซเลท PMA2 (*Bacillus cereus*) มีประสิทธิภาพการย่อยสลายสารไกลโฟเสทได้มากที่สุดเท่ากับ 98.84 และ 98.46 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ รองลงมาคือ ชุดการทดลองที่ 5 ดินเติมสารไกลโฟเสทและเชื้อผสม (MIX) มีประสิทธิภาพการย่อยสลายสารไกลโฟเสท เท่ากับ 86.69 เปอร์เซ็นต์ ชุดการทดลองที่ 2 ดินเติมสารไกลโฟเสทและไอโซเลท LMC2 (*Bacillus megaterium*) มีประสิทธิภาพการย่อยสลายสารไกลโฟเสทเท่ากับ 85.94 เปอร์เซ็นต์ ชุดการทดลองที่ 1 ดินเติมสารไกลโฟเสท (Control) มีประสิทธิภาพการย่อยสลายสารไกลโฟเสทน้อยที่สุด เท่ากับ 9.53 เปอร์เซ็นต์ (ตาราง 9) จากผลการทดลองดังกล่าวมีความสอดคล้องกับรายงานวิจัยของ Marie-Esther *et al.* (2014) ที่ได้ทำการศึกษาโดยใช้แบคทีเรียสายพันธุ์ *Bacillus subtilis* เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีสารไกลโฟเสทเป็นองค์ประกอบแล้วพบว่า *Bacillus subtilis* สามารถเจริญเติบโตได้เนื่องจากใช้สารไกลโฟเสทเป็นแหล่งฟอสฟอรัสเพื่อใช้ในการเจริญของเซลล์ รวมถึงรายงานวิจัยของ Jieyu *et al.* (2012) ได้ศึกษาเกี่ยวกับการคัดแยกเชื้อแบคทีเรียเพื่อย่อยสลายสารไกลโฟเสทที่ปนเปื้อนในดิน พบว่า *Bacillus cereus* สามารถเจริญเติบโตได้ในอาหารที่มีสารไกลโฟเสท เมื่อศึกษาประสิทธิภาพการย่อยสลายสารไกลโฟเสทผลการทดลองพบว่า *Bacillus cereus* มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายสารไกลโฟเสท 94.47 เปอร์เซ็นต์ และ Abdel -Megeed *et al.* (2013) กล่าวว่า *Bacillus megaterium* สามารถย่อยสลายสารไกลโฟเสทได้ ทั้งนี้เกิดจากการปรับตัวให้อยู่รอดโดยใช้สารไกลโฟเสทเป็นแหล่งคาร์บอนและฟอสฟอรัสเพื่อใช้ในการเจริญเติบโต

ตาราง 9 ประสิทธิภาพการย่อยสลายสารไกลโฟเสทในดินของแบคทีเรียที่คัดเลือก

ชุดทดลอง	ประสิทธิภาพการย่อยสลายสารไกลโฟเสท (เปอร์เซ็นต์)
Control	9.53^{D}
LMC2	85.94^{C}
MMC2	98.84^{A}
PMA2	98.46^{A}
Mix	86.69^{B}
F-test	*

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยตัวอักษรที่เหมือนกันในแนวตั้งไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

บทที่ 5
สรุปผลการวิจัย

1. จากการคัดแยกแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายสารไกลโฟเสทในระดับห้องปฏิบัติการ สามารถคัดเลือกแบคทีเรีย 3 ไอโซเลท ที่มีประสิทธิภาพการย่อยสลายสารไกลโฟเสทมากที่สุดคือ ไอโซเลท MMC2 LMC2 และ PMA2 มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายสารไกลโฟเสทมากที่สุด เท่ากับ 97.44 97.37 และ 97.30 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

2. จากการตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาและผลการหาลำดับเบสของดีเอ็นเอในส่วนของยีน 16S rRNA พบว่าแบคทีเรียไอโซเลท LMC2 มีลำดับเบส ที่คล้ายกับ *Bacillus megaterium* มีความเหมือน 100 เปอร์เซ็นต์ แบคทีเรียไอโซเลท MMC2 มีลำดับเบส มีคล้ายกับ *Bacillus subtilis* มีความเหมือน 100 เปอร์เซ็นต์ และแบคทีเรียไอโซเลท PMA2 มีลำดับเบส ที่คล้ายกับ *Bacillus cereus* มีความเหมือน 99 เปอร์เซ็นต์

3. จากการทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายสารไกลโฟเสทในดิน พบว่าแบคทีเรียไอโซเลท MMC2 (*Bacillus subtilis*) และแบคทีเรียไอโซเลท PMA2 (*Bacillus cereus*) มีประสิทธิภาพการย่อยสลายสารไกลโฟเสทได้มากที่สุดเท่ากับ 98.84 และ 98.46 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ รองลงมาคือแบคทีเรียไอโซเลททั้ง 3 ผสมกัน (MIX) มีประสิทธิภาพการย่อยสลายสารไกลโฟเสทเท่ากับ 86.69 เปอร์เซ็นต์ แบคทีเรียไอโซเลท LMC2 (*Bacillus megaterium*) มีประสิทธิภาพการย่อยสลายสารไกลโฟเสทเท่ากับ 85.94 เปอร์เซ็นต์ ส่วนดินเติมสารไกลโฟเสท (Control) สารไกลโฟเสทสลายตัวได้น้อยที่สุดเท่ากับ 9.53 เปอร์เซ็นต์

ข้อเสนอแนะ

จากการทดสอบการย่อยสลายสารไกลโฟเสททางชีวภาพของแบคทีเรียที่แยกได้จากดินในพื้นที่เพาะปลูก ผลปรากฏว่าแบคทีเรียทั้ง 3 ไอโซเลท มีประสิทธิภาพการย่อยสลายสารไกลโฟเสทได้ดี สามารถนำไปศึกษาขั้นต่อไปในพื้นที่เกษตรกรรมเพื่อผลการทดลองที่มีความแม่นยำและถูกต้องมากขึ้น

บรรณานุกรม

กฤษณา รุ่งโรจน์วณิชย์. 2547. สืบสาวราวเรื่องของไกลโฟเสท. **วารสารเคหเกษตร.** 28(9): 224-229.

กองควบคุมพืชและวัสดุการเกษตร. 2537. **การขึ้นทะเบียนวัตถุมีพิษทางการเกษตรในประเทศไทย.** กรุงเทพฯ: กรมวิชาการเกษตร. 912 น.

กองควบคุมพืชและวัสดุทางการเกษตร. 2543. **รายงานประจำปี 2543.** ด่านตรวจพืชและวัสดุการเกษตรท่าเรือกรุงเทพ. กรมวิชาการเกษตร. [ระบบออนไลน์]. แหล่งข้อมูล: www.doae.go.th (4 มกราคม 2555).

กรมควบคุมมลพิษ. 2542. **การยกร่างกลไกควบคุมทางกฎหมายระหว่างประเทศเพื่อควบคุมการปลดปล่อยสารมลพิษที่ตกค้างยาวนานในสิ่งแวดล้อม.** [ระบบออนไลน์]. แหล่งข้อมูล: www.pcd.go.th (10 ธันวาคม 2554).

จีรนันท์ ชัยวาฤทธิ์. 2555. **High Performance Liquid Chromatography (HPLC).** [ระบบออนไลน์]. แหล่งข้อมูล: http://www.mfu.ac.th/center/stic/index.php/chemical-analysis-instrument-menu/item/126-high-performance-liquid-chromatography-hplc.html (4 มกราคม 2555).

ชมรมนักข่าวสิ่งแวดล้อม. 2547. **"เมื่อปลาจะกินดาว" ในรายงานสถานการณ์สิ่งแวดล้อม 10 เรื่องในปี 2547.** กรุงเทพฯ: สมาคมนักข่าวหนังสือพิมพ์แห่งประเทศไทย. 302 น.

ทศพล พรพรหม. 2545. **สารกำจัดวัชพืชหลักการและกลไกการทำลาย.** กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 274 น.

ธวัชชัย รัตน์ชเลศ. 2540. **เทคโนโลยีกำจัดวัชพืช.** เชียงใหม่: คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. 259 น.

บัวสาย เพชรสุริยวงศ์, นงพงา คุณจักร และอาภรณ์ วงษ์วิจารณ์. 2556. **การแยกและการจัดจำแนกแบคทีเรียจากดินที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อรา.** [ระบบออนไลน์]. แหล่งข้อมูล: www.kucon.lib.ku.ac.th/Fulltext/KC5005016.pdf (4 ธันวาคม 2556).

ปัตพงษ์ เกษสมบรูณ์, นุศราพร เกษสมบูรณ์ และนาถธิต วีระปรียากร. 2547. **สารเคมีอันตรายภัยคุกคามต่อสุขภาพของคนไทย: แผนงานวิจัยนโยบายทางด้านสาธารณสุข.** นนทบุรี. สถาบันวิจัยระบบทางด้านสาธารณสุข. 79 น.

พรชัย เหลืองอาภาพงศ์. 2531. **สารกำจัดวัชพืช.** เชียงใหม่: ภาควิชาพืชไร่ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. 515 น.

_____. 2541. **คู่มือการใช้สารไกลโฟเสท.** เชียงใหม่: ภาควิชาพืชไร่ คณะเกษตรศาสตร์. มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. 103 น.

นวลศรี ทยาพัชร. 2533. **ปัญหาสารพิษทางการเกษตรในประเทศไทย.** กรุงเทพฯ: กองวัตถุมีพิษการเกษตร กรมวิชาการเกษตร. 71 น.

แม้น อมรสิทธิ์, อมร เพชรสม, พลกฤษณ์ แสงวณิช, ภควดี สุทธิ์ไวยกิจ, มาณพ สิทธิเดช, สายสุนีย์ เหลี่ยวเรืองรัตน์, อุมาพร สุขม่วง และวันเพ็ญ ช้อนแก้ว. 2553. **หลักการและเทคนิคการวิเคราะห์เชิงเครื่องมือ.** กรุงเทพฯ: จุฬาลงกณ์มหาวิทยาลัย. 623 น.

_____. 2526. **ยากำจัดวัชพืชกับผลทางสรีรวิทยาของพืช.** กรุงเทพฯ: ภาควิชาพืชไร่นา มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 360 น.

รังสิต สุวรรณเขตนิคม. 2547. **สารป้องกันกำจัดวัชพืช: พื้นฐานและวิธีการใช้**. กรุงเทพฯ: ภาควิชาพืชไร่นา มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 467 น.

สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย. 2554. **วิจัยจุลินทรีย์ บำบัดเคมีเกษตร.** [ระบบออนไลน์]. แหล่งข้อมูล: http://www.thaipost.net/node/37925 (10 มกราคม 2555).

สำนักควบคุมพืชและวัสดุการเกษตร. 2555ก. **รายงานสรุปการนำเข้าวัตถุอันตรายทางการเกษตร.** กรมวิชาการเกษตร. [ระบบออนไลน์]. แหล่งข้อมูล: www.doae.go.th (4 มกราคม 2555).

_____. 2555ข. **วัตถุอันตรายที่มีการนำเข้าสูงสุด 10 อันดับแรก.** กรมวิชาการเกษตร. [ระบบออนไลน์]. แหล่งข้อมูล: www.doae.go.th (4 มกราคม 2555).

สำนักจัดการคุณภาพน้ำ. 2554. **รายงานสถานการณ์มลพิษทางน้ำจากนาข้าวและการจัดการ.** กรุงเทพฯ: กรมควบคุมมลพิษ. 87 น.

สำนักระบาดวิทยา. 2546. **สรุปรายงานการเฝ้าระวังโรค.** [ระบบออนไลน์]. แหล่งที่มา: http://epid.moph.go.th (14 สิงหาคม 2555).

วราภรณ์ ปัญญาวดี. 2550. **เศษฐศาสตร์ว่าด้วยนโยบายสารเคมีเกษตร.** เชียงใหม่: มหาวิทยาลัยแม่โจ้. 182 น.

วีรนุช หลาง. 2551. **จุลชีววิทยาสิ่งแวดล้อม.** นครปฐม: คณะศิลปะศาสตร์และวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน. 166 น.

วุฒิชาติ สิริช่วยชู, ณรงค์ ตรีสุวรรณ, สุพร บุญประดับ, สมศักดิ์, ขนิษฐศรี ฮุ่นตระกูล, บำรุง ทรัพย์มาก, สุมิตรา วัฒนา, อัธยะ พินจงสกุลดิษฐ, สยาม ไชยทิพย์, กรรณิสา สฤษณ์ศิริ และอมรรัตน์ สระเพ็ชร. 2548. **มหัศจรรย์พันธุ์ดิน กลุ่มชุดดินสำหรับการปลูกพืชเศรษฐกิจประเทศไทย.** กรุงเทพฯ: สำนักสำรวจดินและวางแผนการใช้ที่ดิน กรมพัฒนาที่ดิน กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 137 น.

ศิริพรรณ สารินทร์. 2550. **จุลชีววิทยาสิ่งแวดล้อม.** พิษณุโลก: คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวรพิษณุโลก. 302 น.

อลิสา วังใน. 2553. **การบำบัดสารมลพิษทางชีวภาพ.** กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยจุฬาลงกรณ์. 351 น.

อำพร คล้ายแก้ว. 2538. **การใช้สารกำจัดวัชพืชอย่างถูกวิธี.** กรุงเทพฯ: สำนักวิจัยและพัฒนา กรมชลประทาน. 35 น.

Abdel-Megeed, A., M.W. Sadik, H.O. Al-Shahrani and H.M. All. 2013. Phyto-Microbial degradation of glyphosate in riyadh area. **International Journal of Microbiology Research**. 5(5): 458-466.

Alberdi, J.L., M.E. Saenz, W.D. Marzio and M.C. Tortorelli. 1996. Comparative acute toxicity of two herbicides paraquat and glyphosate to Daphnia magna and spinulata. **Bull Environ Contam Toxicol**. 57: 229–235.

Balthazor, T.M. and L.E. Hallas. 1986. Glyphosate degrading microorganisms from industrial activated sludge. **Appl Environ Microbiol.** 51: 432-434.

Bazot, S. and T. Lebeau. 2008. Simultaneous mineralization of glyphosate and diuron by a consortium of three bacteria as freeand/or immobilized-cells formulations. **Appl Microbiol Biotechnol**. 77: 1351–1358.

Benslama, O. and A. Boulahrouf. 2013. Isolation and characterization of glyphosate degrading bacteria from different soils of Algeria. **African Journal of Biotechnology.** 7(49): 5587-5595.

Beulke, S., C.D. Brown, C.J. Fryer and W. Beinum. 2004. Influence of kinetic sorption and diffusion on pesticide movement through aggregated soils. **Chemosphere**. 57: 481–490.

Carl, J.M. and H.A. Moye. 1988. Extraction of glyphosate herbicide from soil and clay minerals and determination of residues in soils. **J. Agric. Food Chem.** 1088(36): 488-491.

Carlisle, S. M., and J. T. Trevors. 1988. Glyphosate in the environment. **Water Air Soil Pollut.** 39:409-420.

Duke, O.S. 1998. Herbicide-resistant crops : their impact on weed science. **J. Weed Sci. Tech.** 43: 94-100.

Eberbach, P.L. 1998. Applying non -- steady - state compartmental analysis to investigate the simultaneous degradation of soluble and sorbed glyphosate (N - (phosphonomethyl) glycine) in four soils. **Pestic Sci**. 52: 229–240.

Environmental Protection Agency. 1993. Reregistration Eligibility Decision (R.E.D.) facts sheet for glyphosate. [Online]. Available: www.epa.gov (November 8, 2013).

Environmental Protection Agency. 2009. National primary drinking water regulation. [Online]. Available: www.epa.gov (November 8, 2013).

Gimsing, A.L, O.K. Borggard and P. Sestoff. 2004. Modelling the kinetics of the competitive adsorption and desorption of glyphosate and gibbsite and in soils. **Environ. Sci. Technol.** 38: 1718-1722.

Inna, T.E., I.K. Nina, S. Tatyana, Z. Mikhail, A.Z. Gennady and A.L. Alexey. 2010. Bioremediation of glyphosate-contaminated soils. **Appl Microbiol Biotechnol.** 88: 585–594.

Iranzo, M., I, Sain-Pardo, R. Boluda, J. Sanchez and S. Mormeneo. 2001. The use of microorganisms in environmental remediation. **Ann. Microbiol**. 51: 135-143.

Jacob, G.S. and G.M. Kishore. 1987. Degradation of glyphosate by *Pseudomonas* sp. PG2982 via a sarcosine. **Intermediate. J. Biol. Chem.** 262(25): 2164-2168.

Jacob, G.S., J.R. Gabrow, L.E. Hallas, N.M. Kimack, G.M. Kishore and J. Schaefer. 1988. Metabolism of glyphosate in *Pseudomonas* sp. strain LBr. **Appl. Environ. Microbiol.** 54: 2953-2958.

Jieyu. F., Y. Guoxia, Z. Haoyu, S. Guanying, G. Yucong, H. Taiping and T. Ke. 2012. Isolation, identification and characterization of a glyphosate-degrading bacterium, *Bacillus cereus* CB4, from soil. **J. Gen. Appl. Microbiol.** 58: 263-271.

Lamar, R.T., M.J. Larsen and T.K. Kirk. 1990. Sensitivity to and degradation of pentachlorophenol by *Phenerochaete* spp. **Appl.Environ. Microbiol.** 56: 3519-3526.

Levesque, C.A., and J.E. Rahe. 1992. Herbicide interactions with fungal root pathogens with special reference to glyphosate. **Annu Rev Phytopathol.** 30: 579–602

Lynn, W.M. and F.T. David. 1996. Liquid chromatographic determination of glyphosate in water - soluble granular formulation: collaborative study. [Online]. Available: http://www.docstoc.com/docs/149327253/Liquid-Chromatographic-Determination-of-Glyphosate-in-Water (November 1, 2012).

Marie-Esther, D.U., M.V. Okorie and E. Simeon. 2014. Isolation, characterization and biodegradation assay of glyphosate utilization bacteria from exposed rice farm. **International Journal of Scientific & Engineering Research**. 5(2): 2229-5518.

Mohsen-Nourouzi, M., T.G. Chuah, S.Y. Thomas and C.J. Lim. 2011. Glyphosate utilization as the source of carbon: isolation and identification of new bacteria. **E-Journal of Chemistry**. 8(4): 1582-1587.

Moneke, A.N., G.N. Okpala and C.U. Anyanwu. 2010. Biodegradation of glyphosate herbicide in vitro using bacterial isolates from four rice fields. **African Journal of Biotechnology.** 9(26): 4067-4074.

NMSU. 2006. Procedure for Agilent 1200 HPLC. [Online]. Available: http://web.nmsu.edu/~kburke/Instrumentation/NMSU_1200HPLC_Procd.html (March 12, 2013).

Olawale, A.K. and O.A. Akintobi. 2011. Biodegradation of glyphosate pesticide by bacteria isolated from agricultural soil. **Report and Opinion**. 3(1): 124-128.

Pipke, R. and N. Amrhein. 1988. Degradation of the phosphonate herbicide glyphosate by *Arthrobacter atrocyaneus* ATCC 13752. **Appl. Environ. Microbiol.** 54: 1293-1296.

Quinn, J.P., J.M. Peden and R.E. Dick. 1988. Glyphosate tolerance and utilization by the micrflora of soils treated with the herbicide. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 29: 511-516.

Ross, M.A. and C.A. lembi. 1985. **Applied Weed Science.** Burgess Publishing, Minneapolis, Minnesota. 340 p.

Rueppel, M., B. Brightwell, J. Schaefer and J. Marcel. 1977. Metabolism and degradation of glyphosate in soil and water. **J Agric Food Chem.** 25: 517–528.

Sailaja, K.K. and K. Satyaprasad. 2006. Degradation of Glyphosate in Soil and its Effect on Fungal Population. **Journal of Environ. Science&engg.** 48(3): 189-190.

Shinabarger D.A. and H.D. Braymer. 1984. Glyphosate catabolism by *Pseudomonas* sp strain PG2982. **J. Bacteriol.** 168: 702-707.

Skoog, D.A., J.F. Holler and Nieman, T.A. 1998. Principles of Instrumental Analysis. 7th ed. United States of America; Saunders College Publishing.

Sorensen, S.R., A. Schultz, O.S. Jacobsen and J. Aamand. 2006. Sorption, desorption and mineralization of the herbicides glyphosate and MCPA in samples from two Danish soil and subsurface profiles. **Environ Pollut**. 141: 184-194.

Stanier, R.Y., J.L. Ingraham, M.L. Wheelis and P.R. Painter. 1986. The Microbial world. 5th ed. Englewood Cliffs, NJ: Prentice-Hall.

Stelmack, P.L., M.R. Gray and M.A. Pickard. 1999. Bacterial adhesion to soil contaminants in the presence of surfactants. **App. Environ. Microbiol**. 65: 165-168.

Strange-Hansen. R., P.E. Holm, O.S. Jacobsen and C.S. Jacobsen. 2004. Sorption, mineralization and mobility of N- (phosphonomethyl) glycine (glyphosate) in five different types of gravel. **Pest Manag Sci.** 60: 570–578

Thapinta, A. and P.F. Hudak. 2003. Use of geographic information systems for assessing ground water pollutin potential by pesticides in central Thailand. **Environment International.** 29: 87-93.

Thomson, W.T. 1993. **Agricultural Chemicals**, Book II Herbicides. Fresno: Thomson Publications. 309 p.

Tu, C.M. 2001. Effects of herbicides and fumigants on microbial activities in soil. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology.** 53: 12-17.

Vidali, M. 2001. Bioremediation an overview. **Pure Appl. Chem.** 73(7): 1163-1172.

WHO. 2011. **Agrochemicals, health and environment: directory of resources.** [Online]. Available: http://www.who.int/heli/en (July 12, 2012).

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

สถานที่เก็บตัวอย่างดินในพื้นที่การเกษตรที่ใช้สารไกลโฟเสท

สถานที่เก็บตัวอย่างดิน

สถานที่เก็บตัวอย่างดินในพื้นที่การเกษตรที่ใช้สารไกลโฟเสทเพื่อคัดแยกแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายสารไกลโฟเสท มีดังนี้

1. สวนลำไย ตำบลแม่สอย อำเภอจอมทอง จังหวัดเชียงใหม่ (ภาพผนวก 1)

(ก) (ข)

ภาพผนวก 1 สวนลำไย และชุดดินที่ 22

(ก) สวนลำไย ตำบลแม่สอย อำเภอจอมทอง จังหวัดเชียงใหม่

(ข) ชุดดินที่ 22 (วุฒิชาติ, 2548)

สวนลำไย ตำบลแม่สอย อำเภอจอมทอง จังหวัดเชียงใหม่ พิกัด 47Q 0461991, 2020831 เป็นชุดดินที่ 22 เป็นกลุ่มดินร่วนหยาบลึกมาก ที่เกิดจากตะกอนลำน้ำเนื้อหยาบ ปฏิกิริยาดินเป็นกรดจัดถึงปานกลาง สามารถทำการปลูกไม้ผล พืชไร่ พืชผัก พืชตระกูลถั่วได้ (วุฒิชาติ, 2548)

2. สวนหอม ตำบลแม่สอย อำเภอจอมทอง จังหวัดเชียงใหม่ (ภาพผนวก 2)

(ก) (ข)

ภาพผนวก 2 สวนหอม และชุดดินที่ 31

(ก) สวนหอม ตำบลแม่สอย อำเภอจอมทอง จังหวัดเชียงใหม่

(ข) ชุดดินที่ 31 (วุฒิชาติ, 2548)

สวนหอม ตำบลแม่สอย อำเภอจอมทอง จังหวัดเชียงใหม่ พิกัด 47Q 0461093, 2020354 เป็นชุดดินที่ 31 เป็นกลุ่มดินเหนียวลึกถึงลึกมาก ที่เกิดจากวัตถุต้นกำเนิดดินเนื้อละเอียด ปฏิกิริยาดินเป็นกลางหรือเป็นด่าง การระบายน้ำดีถึงดีปานกลาง ความอุดมสมบูรณ์ปานกลาง สามารถเลือกพื้นที่ค่อนข้างราบเรียบเพื่อปลูกพืชผัก พืชไร่ และไม้ผลได้ (วุฒิชาติ, 2548)

3. ไร่ข้าวโพด ตำบลแม่สอย อำเภอจอมทอง จังหวัดเชียงใหม่ (ภาพผนวก 3)

(ก)

(ข)

ภาพผนวก 3 ไร่ข้าวโพด และชุดดินที่ 31

(ก) ไร่ข้าวโพด ตำบลแม่สอย อำเภอจอมทอง จังหวัดเชียงใหม่

(ข) ชุดดินที่ 31 (วุฒิชาติ, 2548)

ไร่ข้าวโพด ตำบลแม่สอย อำเภอจอมทอง จังหวัดเชียงใหม่ พิกัด 47Q 0461081, 2020442 เป็นชุดดินที่ 31 เป็นกลุ่มดินเหนียวลึกถึงลึกมาก ที่เกิดจากวัตถุต้นกำเนิดดินเนื้อละเอียด ปฏิกิริยาดินเป็นกลาง หรือเป็นด่าง การระบายน้ำดีถึงดีปานกลาง ความอุดมสมบูรณ์ปานกลาง สามารถเลือกพื้นที่ค่อนข้างราบเรียบเพื่อปลูกพืชผัก พืชไร่ และไม้ผลได้ (วุฒิชาติ, 2548)

4. สวนมะม่วง ตำบลแม่สอย อำเภอจอมทอง จังหวัดเชียงใหม่ (ภาพผนวก 4)

(ก) (ข)

ภาพผนวก 4 สวนมะม่วง และชุดดินที่ 31

(ก) สวนมะม่วง ตำบลแม่สอย อำเภอจอมทอง จังหวัดเชียงใหม่

(ข) ชุดดินที่ 31 (วุฒิชาติ, 2548)

สวนมะม่วง ตำบลแม่สอย อำเภอจอมทอง จังหวัดเชียงใหม่ พิกัด 47Q 0461071, 2020395 เป็นชุดดินที่ 31 เป็นกลุ่มดินเหนียวลึกถึงลึกมาก ที่เกิดจากวัตถุต้นกำเนิดดินเนื้อละเอียด ปฏิกิริยาดินเป็นกลาง หรือเป็นด่าง การระบายน้ำดีถึงดีปานกลาง ความอุดมสมบูรณ์ปานกลาง สามารถเลือกพื้นที่ค่อนข้างราบเรียบเพื่อปลูกพืชผัก พืชไร่ และไม้ผลได้ (วุฒิชาติ, 2548)

5. สวนส้ม ตำบลแม่สาว อำเภอแม่อาย จังหวัดเชียงใหม่ (ภาพผนวก 5)

(ก) (ข)

ภาพผนวก 5 สวนส้ม และชุดดินที่ 56

(ก) สวนส้ม ตำบลแม่สาว อำเภอแม่อาย จังหวัดเชียงใหม่

(ข) ชุดดินที่ 56 (วุฒิชาติ, 2548)

สวนส้ม ตำบลแม่สาว อำเภอแม่อาย จังหวัดเชียงใหม่ พิกัด 47Q 0525087, 2212371 เป็นชุดดินที่ 56 เป็นกลุ่มดินลึกปานกลางถึงชั้นหินพื้น เศษหินหรือลูกรัง ปฏิกิริยาดินเป็นกรดจัดการระบายน้ำดีถึงดีปานกลาง ความอุดมสมบูรณ์ต่ำ สามารถปลูกไม้ผล และเลือกพื้นที่ค่อนข้างราบเรียบเพื่อปลูกพืชไร่ และพืชผักได้ (วุฒิชาติ, 2548)

7. สวนผักอินทรีย์ ตำบลหนองแหย่ง อำเภอสันทราย จังหวัดเชียงใหม่ (ภาพผนวก 7)

(ก) (ข)

ภาพผนวก 7 สวนผักอินทรีย์ และชุดดินที่ 15

(ก) สวนผักอินทรีย์ ตำบลหนองแหย่ง อำเภอสันทราย จังหวัดเชียงใหม่

(ข) ชุดดินที่ 15 (วุฒิชาติ, 2548)

สวนผักอินทรีย์ ตำบลหนองแหย่ง อำเภอสันทราย จังหวัดเชียงใหม่ พิกัด 47Q 0511207, 2087441 เป็นชุดดินที่ 15 เป็นกลุ่มดินทรายแป้งลึกมากที่เกิดจากตะกอนลำน้ำ ปฏิกิริยาดินกลางหรือเป็นด่าง สามารถปลูกพืชผัก พืชไร่ และไม้ผลได้ (วุฒิชาติ, 2548)

6. ไร่มันฝรั่ง ตำบลสันทราย อำเภอฝาง จังหวัดเชียงใหม่ (ภาพผนวก 6)

(ก) (ข)

ภาพผนวก 6 ไร่มันฝรั่ง และชุดดินที่ 18

(ก) ไร่มันฝรั่ง ตำบลสันทราย อำเภอฝาง จังหวัดเชียงใหม่

(ข) ชุดดินที่ 18 (วุฒิชาติ, 2548)

ไร่มันฝรั่ง ตำบลสันทราย อำเภอฝาง จังหวัดเชียงใหม่ พิกัด 47Q 0521996, 2197133 เป็นชุดดินที่ 18 เป็นกลุ่มดินร่วนละเอียดลึกมาก ที่เกิดจากตะกอนลำน้ำ ปฏิกิริยาดินกลางหรือเป็นด่าง สามารถปลูกพืชผัก พืชไร่ และไม้ผลได้ (วุฒิชาติ, 2548)

ภาคผนวก ข

การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ และสารเคมี

การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. อาหารเหลวสูตร TSB

Tryptic Soy Broth	6.0	กรัม

ละลายส่วนผสมข้างต้นด้วยน้ำกลั่นให้เป็นเนื้อเดียวกัน ปรับปริมาตรให้เป็น 1 ลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที

2. อาหารแข็งสูตร TSA

Tryptic Soy Broth	6.0	กรัม
Agar (วุ้น)	15	กรัม

ละลายด้วยน้ำกลั่นให้เป็นเนื้อเดียวกัน ปรับปริมาตรให้เป็น 1 ลิตร ต้มให้ผงวุ้นละลายเป็นเนื้อเดียวกัน นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที

การเตรียมสารเคมี

1. การเตรียมโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 0.85 เปอร์เซ็นต์ (w/v)

เตรียมโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 0.85 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 500 มิลลิลิตร จากความเข้มข้น 100 เปอร์เซ็นต์ ดังนี้

$$C1V1 = C2V2$$

$$0.85 \times 500 = 100 \times V2$$

$$V2 = 4.25$$

ดังนั้น ชั่งโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 100 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 4.25 กรัม มาผสมกับน้ำกลั่น และทำการปรับปริมาตรให้ได้ 500 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น

2. การเตรียมเอทานอล ความเข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ (v/v)

เตรียมเอทานอล ความเข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 100 มิลลิลิตร จากเอทานอล ความเข้มข้น 95 เปอร์เซ็นต์ ดังนี้

เทเอทานอล ความเข้มข้น 95 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 70 มิลลิลิตร ใส่กระบอกตวง ผสมกับน้ำกลั่น 30 มิลลิลิตร

3. การเตรียมกลีเซอรอล ความเข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์ (v/v)

เตรียมกลีเซอรอล ความเข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 100 มิลลิลิตร จากกลีเซอรอล ความเข้มข้น 80 เปอร์เซ็นต์ ดังนี้

$$C1V1 = C2V2$$

$$20 \times 100 = 80 \times V2$$

$$V2 = 25$$

ดังนั้น ปิเปตกลีเซอรอล ความเข้มข้น 80 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 25 มิลลิลิตร มาผสมกับน้ำกลั่น และทำการปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น

4. การเตรียมสารไกลโฟเสท ความเข้มข้น 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร

เตรียมสารไกลโฟเสทความเข้มข้น 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ดังนี้

1 เปอร์เซ็นต์ เท่ากับ 10,000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม จากสารไกลโฟเสทความเข้มข้น 97 เปอร์เซ็นต์ เท่ากับ 970,000 มิลลิกรัมต่อลิตร

$$C_1V_1 = C_2V_2$$

$$1{,}000 \times 100 = 970{,}000 \times V_2$$

$$V_2 = 0.1$$

ดังนั้น ชั่งสารไกลโฟเสทปริมาตร 0.1 กรัม มาผสมกับน้ำปราศจากไอออน และทำการปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร

ภาคผนวก ค

ลักษณะของแบคทีเรียที่คัดแยกได้และข้อมูลดิบ

ตารางผนวก 1 ลักษณะโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียที่คัดแยกได้ 27 ไอโซเลท

ลำดับ	ไอโซเลท	รูปร่าง	ขอบโคโลนี	ผิวหน้า
1	LMC1	กลม	ขอบเรียบ	เรียบ
2	LMC2	กลม	ขอบเรียบ	เรียบ
3	LMC3	กลม	ขอบเรียบ	เรียบ
4	LMC4	กลม	ขอบเรียบ	เรียบ
5	LMC5	กลม	ขอบเรียบ	ย่น
6	OMC1	กลม	ขอบเรียบ	เรียบ
7	OMC2	กลม	ขอบเรียบ	เรียบ
8	OMC3	กลม	ขอบเรียบ	เรียบ
9	CMC1	กลม	ขอบเรียบ	ย่น
10	CMC2	ไม่แน่นอน	โค้งหรือเว้า	เรียบ
11	CMC3	กลม	ขอบเรียบ	ย่น
12	CMC4	กลม	ขอบเรียบ	ย่น
13	MMC1	ไม่แน่นอน	โค้งหรือเว้า	เรียบ
14	MMC2	ไม่แน่นอน	โค้งหรือเว้า	ขรุขระ
15	MMC3	กลม	ขอบเรียบ	เรียบ
16	MMC4	กลม	ขอบเรียบ	ขรุขระ
17	MMC5	กลม	ขอบเรียบ	เรียบ
18	OSF1	กลม	ขอบเรียบ	เรียบ
19	OSF2	กลม	ขอบเรียบ	เรียบ
20	OSF3	กลม	ขอบเรียบ	ย่น
21	OSF4	กลม	ขอบเรียบ	เรียบ
22	OSF5	กลม	ขอบเรียบ	เรียบ
23	OSF6	กลม	ขอบเรียบ	ย่น
24	OSF7	ไม่แน่นอน	โค้งหรือเว้า	เรียบ
25	PMA1	กลม	ขอบเรียบ	เรียบ
26	PMA2	กลม	ขอบเรียบ	เรียบ
27	PMA3	กลม	ขอบเรียบ	เรียบ

ตารางผนวก 2 ลักษณะเซลล์ของแบคทีเรียโดยเทคนิคการย้อมสีแบบแกรม (gram's staining) แล้วส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1000 เท่า

ลำดับ	ไอโซเลท	รูปร่าง	การติดสีแกรม	การจัดเรียงตัวของเซลล์
1	LMC1	ท่อนสั้น	แกรมบวก	เป็นเส้นสายหรือโซ่
2	LMC2	ท่อนยาว	แกรมบวก	เป็นเส้นสายหรือโซ่
3	LMC3	ท่อนยาว	แกรมลบ	เซลล์เดี่ยว
4	LMC4	ท่อนยาว	แกรมลบ	เซลล์เดี่ยว
5	LMC5	ท่อนสั้น	แกรมบวก	เป็นเส้นสายหรือโซ่
6	OMC1	ท่อนยาว	แกรมลบ	เซลล์เดี่ยว
7	OMC2	ท่อนสั้น	แกรมบวก	เป็นเส้นสายหรือโซ่
8	OMC3	ท่อนยาว	แกรมบวก	เซลล์เดี่ยว
9	CMC1	ท่อนสั้น	แกรมบวก	เป็นเส้นสายหรือโซ่
10	CMC2	ท่อนยาว	แกรมลบ	เซลล์เดี่ยว
11	CMC3	ทรงกลม	แกรมลบ	เซลล์เดี่ยว
12	CMC4	ท่อนสั้น	แกรมบวก	เป็นเส้นสายหรือโซ่
13	MMC1	ท่อนยาว	แกรมลบ	เป็นเส้นสายหรือโซ่
14	MMC2	ท่อนยาว	แกรมบวก	เป็นเส้นสายหรือโซ่
15	MMC3	ท่อนยาว	แกรมลบ	เซลล์เดี่ยว
16	MMC4	ท่อนสั้น	แกรมบวก	เป็นเส้นสายหรือโซ่
17	MMC5	ทรงกลม	แกรมบวก	เป็นกลุ่มคล้ายพวงองุ่น
18	OSF1	ท่อนยาว	แกรมบวก	เป็นเส้นสายหรือโซ่
19	OSF2	ท่อนสั้น	แกรมลบ	เซลล์เดี่ยว
20	OSF3	ท่อนสั้น	แกรมบวก	เซลล์เดี่ยว
21	OSF4	ทรงกลม	แกรมบวก	เป็นกลุ่มคล้ายพวงองุ่น
22	OSF5	ท่อนสั้น	แกรมลบ	เป็นเส้นสายหรือโซ่
23	OSF6	ท่อนสั้น	แกรมบวก	เป็นเส้นสายหรือโซ่
24	OSF7	ท่อนยาว	แกรมลบ	เซลล์เดี่ยว
25	PMA1	ท่อนยาว	แกรมบวก	เป็นเส้นสายหรือโซ่

ตารางผนวก 2 (ต่อ)

ลำดับ	ไอโซเลท	รูปร่าง	การติดสีแกรม	การจัดเรียงตัวของเซลล์
26	PMA2	ท่อนสั้น	แกรมบวก	เป็นเส้นสายหรือโซ่
27	PMA3	ท่อนยาว	แกรมบวก	เป็นเส้นสายหรือโซ่

ตารางผนวก 3 ข้อมูลประสิทธิภาพการย่อยสลายสารไกลโฟเสทในระดับห้องปฏิบัติการ ระยะเวลา 5 และ 10 วัน (เปอร์เซ็นต์)

ชุดการทดลอง	ประสิทธิภาพการย่อยสลายสารไกลโฟเสท (เปอร์เซ็นต์)	
	5 วัน	10 วัน
Control	12.52	23.67
LMC1	92.03	98.65
LMC2	95.99	98.74
LMC3	95.35	98.64
LMC4	94.99	98.54
LMC5	88.73	93.62
OMC1	93.06	98.64
OMC2	95.50	98.78
OMC3	95.56	98.66
CMC1	93.66	98.62
CMC2	93.05	98.55
CMC3	86.54	93.56
CMC4	89.34	93.41
MMC1	95.64	98.59
MMC2	95.49	99.39
MMC3	93.90	98.55
MMC4	93.71	96.81
MMC5	93.67	96.12
OSF1	94.34	93.63
OSF2	93.88	98.63
OSF3	94.10	98.63
OSF4	88.06	93.63
OSF5	93.68	98.57
OSF6	93.61	98.63

ตารางผนวก 3 (ต่อ)

ชุดการทดลอง	ประสิทธิภาพการย่อยสลายสารไกลโฟเสท (เปอร์เซ็นต์)	
	5 วัน	10 วัน
OSF7	90.21	95.39
PMA1	93.77	98.65
PMA2	95.64	98.96
PMA3	95.54	98.62

ตารางผนวก 4 ข้อมูลประสิทธิภาพของแบคทีเรียในการการย่อยสลายสารไกลโฟเสทในดิน ระยะเวลาตั้งแต่ 0 ถึง10 วัน (เปอร์เซ็นต์)

ระยะเวลา (วัน)	ชุดการทดลอง				
	control	LMC2	MMC2	PMA2	MIX
0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
1	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
2	0.00	0.00	0.34	3.15	0.26
3	0.00	4.91	3.10	4.12	14.60
4	0.00	19.67	31.28	13.50	28.97
5	0.00	58.87	48.02	59.13	44.03
6	0.00	60.80	64.81	67.65	51.98
7	5.57	61.97	66.42	68.51	57.30
8	9.77	68.40	70.19	69.85	57.60
9	9.85	73.00	71.41	71.02	71.20
10	9.53	85.94	98.84	98.46	86.69

ภาคผนวก ง

เทคนิคที่ใช้ในการวิเคราะห์

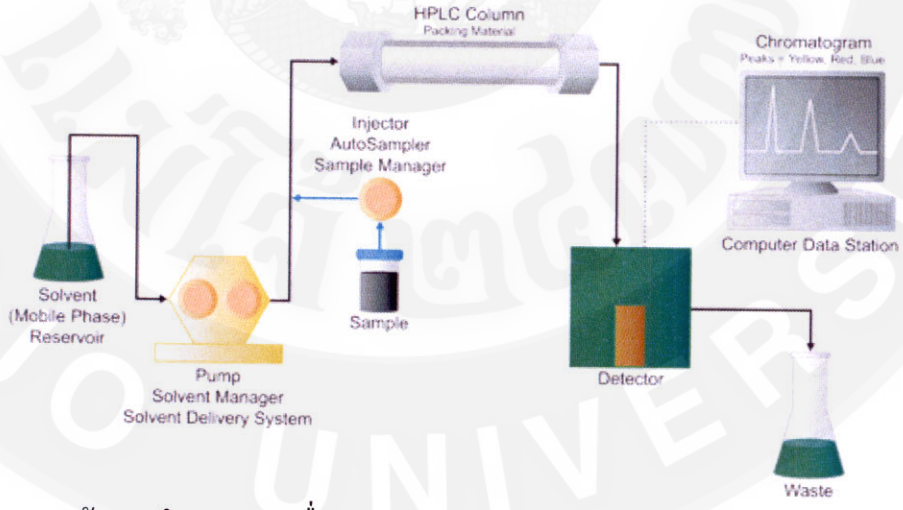
เทคนิคที่ใช้ในการวิเคราะห์

เทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (high performance liquid chromatography)

เทคนิค HPLC สามารถใช้ในการวิเคราะห์สารอินทรีย์ สารอนินทรีย์ ทั้งในรูปโมเลกุลและไอออน สามารถวิเคราะห์สารโมเลกุลขนาดใหญ่ โดยสารที่วิเคราะห์ต้องสามารถละลายได้ในสารละลายตัวชะ นอกจากนี้ยังสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในงานทางด้านต่างๆ เช่น ด้านผลิตภัณฑ์ยา ด้านชีวเคมี ผลิตภัณฑ์อาหาร เคมีภัณฑ์ ด้านสิ่งแวดล้อม สารพิษตกค้าง สารเสพติด และด้านการตรวจทางคลินิก เป็นต้น

หลักการทำงานของเครื่อง HPLC

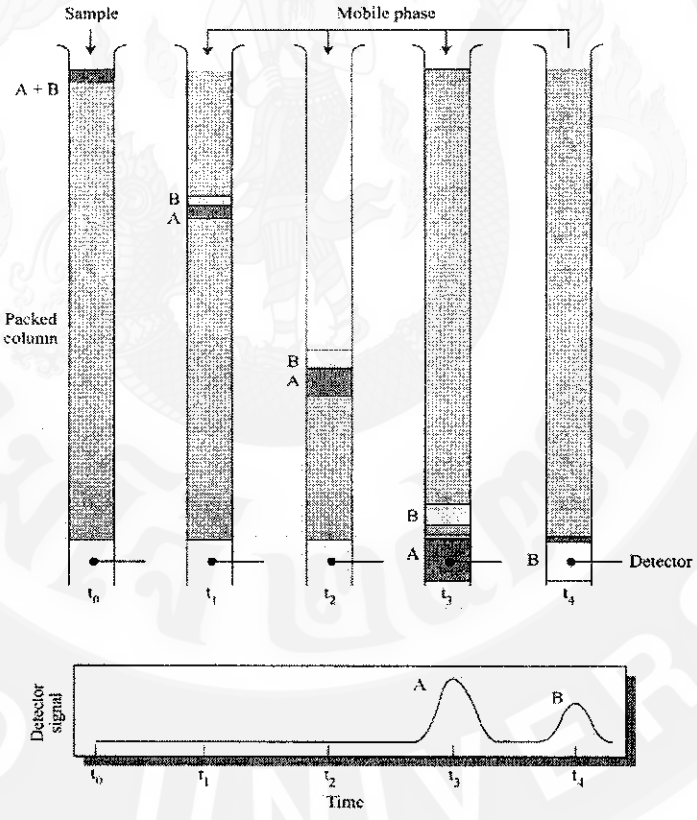
โครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง หรือที่นิยมเรียกกันว่า HPLC เป็นวิธีที่ใช้สำหรับวิเคราะห์สารอินทรีย์และสารอนินทรีย์ทั้งเชิงคุณภาพและเชิงปริมาณ สามารถวิเคราะห์สารหลายชนิดที่ผสมกันได้พร้อมกัน ในการวิเคราะห์ต้องสามารถแยกสารผสมออกจากกันได้อย่างสมบูรณ์สารแต่ละชนิดจะเคลื่อนที่เข้าเครื่องตรวจวัดตามลำดับดังภาพผนวก 8



ภาพผนวก 8 หลักการทำงานของเครื่อง HPLC
ที่มา: จีรนันท์ (2555)

สารแต่ละชนิดแยกจากกันได้หากเกิด differential sorption ระหว่าง 2 เฟส คือ เฟสนิ่ง (stationary phase) และเฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) โดยเฟสที่นิ่งเป็นของแข็งหรือของเหลวเคลือบอยู่บนของแข็งบรรจุอยู่ในคอลัมน์ ส่วนเฟสเคลื่อนที่เป็นของเหลวเรียกว่า สารละลายตัวชะ

(eluent) สารผสมเคลื่อนที่ผ่านเฟสนิ่งโดยการนำพาของเฟสเคลื่อนที่ด้วยเส้นทางที่แตกต่างกัน (differential migration) ซึ่งเป็นผลจากการกระจายตัวของสารแต่ละชนิดที่อยู่ในตัวอย่างบนเฟสนิ่งแตกต่างกันทำให้สารแต่ละชนิดแยกจากกันได้ (ภาพผนวก 9) การใช้เครื่อง HPLC สามารถวิเคราะห์สารได้ในปริมาณต่ำระดับไมโครกรัมถึงนาโนกรัม สำหรับการวิเคราะห์สารแต่ละชนิดต้องเลือกใช้คอลัมน์ สารละลายตัวชะ และดีเทกเตอร์ให้เหมาะสม ปริมาณสารตัวอย่างที่ฉีดเข้าเครื่องมีปริมาตรต่ำระดับไมโครลิตร พร้อมทั้งสามารถประมวลผลข้อมูลโดยคอมพิวเตอร์ทำให้ได้ข้อมูลครบถ้วน สำหรับการหาปริมาณ การควบคุมคุณภาพ การตรวจสอบความเหมาะสมของระบบและอาจรวมถึงการประเมินความเหมาะสมของวิธีทดสอบ (แม้น และคณะ, 2553)

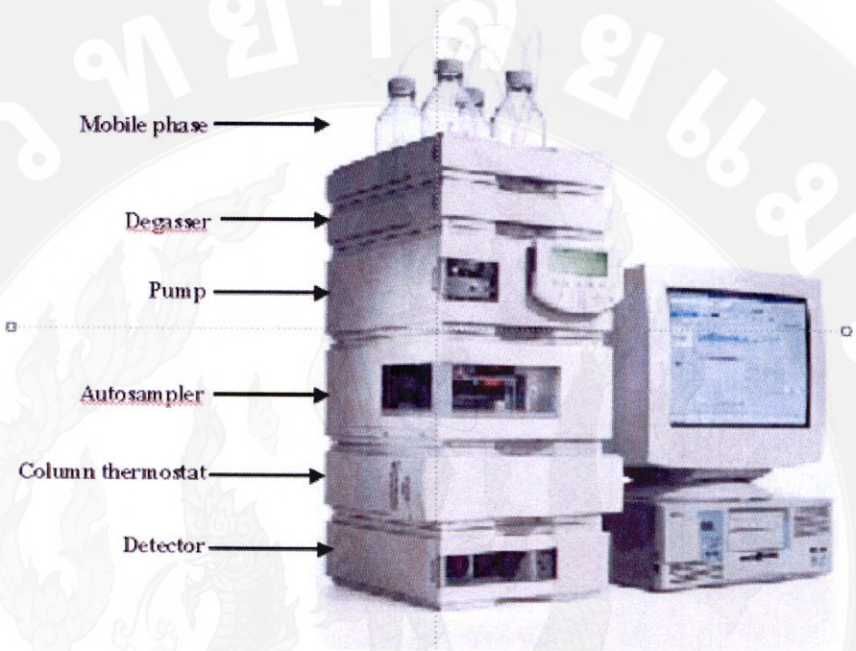


ภาพผนวก 9 การเคลื่อนที่ของสาร 2 ชนิดในเฟสนิ่งและออกจากเฟสนิ่งในเวลาที่ต่างกัน

ที่มา : Skoog *et al.* (1998)

อุปกรณ์สำหรับเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง

เครื่อง HPLC มีส่วนประกอบที่สำคัญดังนี้ (ภาพผนวก 10)



ภาพผนวก 10 ส่วนประกอบของเครื่อง HPLC
ที่มา: จีรนันท์ (2555)

1. เฟสเคลื่อนที่ (mobile phase)

ตัวทำละลายที่ใช้ในการชะหรือแยกตัวอย่าง เป็นเฟสเคลื่อนที่มีลักษณะเป็นของเหลว ทำหน้าที่ในการนำสารตัวอย่างและตัวทำละลายเข้าสู่ stationary phase (ในที่นี้คือคอลัมน์) เพื่อให้เกิดกระบวนการแยกภายในคอลัมน์

2. ดีเกสเซอร์ (degasser)

ทำหน้าที่กำจัดฟองอากาศ อากาศที่มีอยู่ใน mobile phase เพื่อไม่ให้ฟองอากาศเข้าสู่ column และ detector

3. ปั๊ม (pump)

ปั๊มจะทำหน้าที่ดึงตัวทำละลาย (mobile phase) เข้าสู่ระบบ HPLC เนื่องจากในการแยกสารผสมในเทคนิค HPLC จะอาศัยหลักการไหลของเฟสเคลื่อนที่ผ่านเฟสอยู่กับที่ที่มีขนาด

อนุภาคเล็กมากจึงทำให้เกิดความต้านทานในการไหล ระบบปั๊มจึงมีความสำคัญมากในการที่จะทำให้เกิดความดันสูงเพื่อที่จะเอาชนะแรงต้านทาน

4. อินเจคเตอร์ (injector)

ทำหน้าที่ในการฉีดสารตัวอย่างเข้าระบบ HPLC สำหรับ HPLC รุ่น Agilent 1100 เป็นระบบฉีดแบบอัตโนมัติ

5. คอลัมน์ (column)

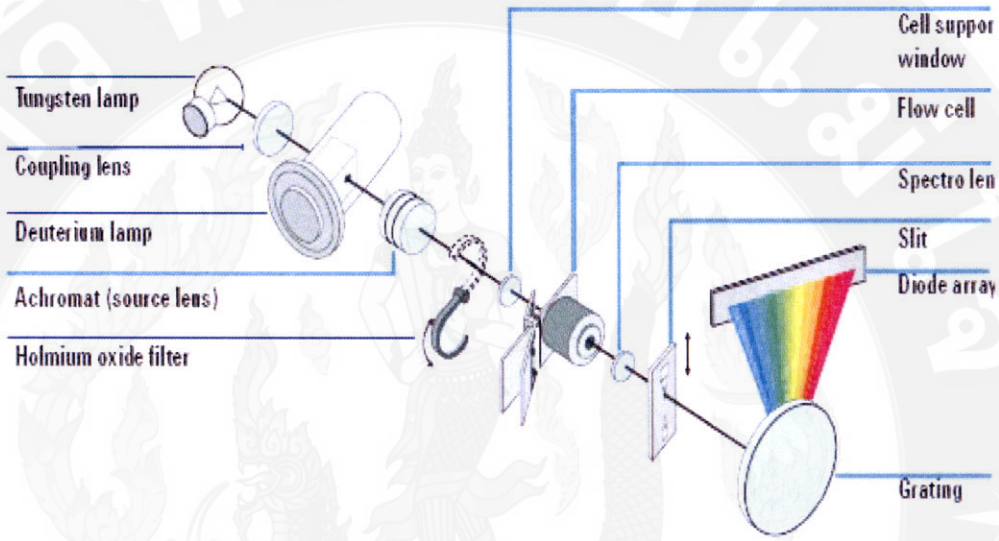
คอลัมน์หรือจะเรียกว่า stationary phase มีลักษณะเป็นของแข็งหรือเจล เป็นเฟสอยู่กับที่ทำหน้าที่ให้เกิดกระบวนการแยกของสารที่สนใจ โดยกระบวนการแยกเกิดขึ้นระหว่าง mobile phase กับ stationary phase แต่สำหรับ HPLC รุ่น Agilent 1100 มีอุปกรณ์เพิ่มเติมที่สามารถควบคุมอุณหภูมิคอลัมน์จึงเรียกว่า column thermostat สิ่งสำคัญที่สุดอย่างหนึ่งที่ทำให้ผลการวิเคราะห์ออกมาดีหรือไม่คือคอลัมน์ที่ใช้ในการแยกสาร ปัจจุบันวัสดุที่บรรจุในคอลัมน์เพื่อการแยก (packing materials) ยังมีการพัฒนาไปเรื่อยๆ เพื่อให้ได้คอลัมน์ที่เหมาะกับงานต่างๆ ได้ดีที่สุด ความรู้เรื่องการพัฒนา packing materials จะช่วยให้นักวิเคราะห์เลือกใช้ชนิดของคอลัมน์ได้เหมาะสมกับงาน

6. ตัวตรวจวัดสัญญาณ (detector)

ตัวตรวจวัดสัญญาณทำหน้าที่ในการตรวจวัดสัญญาณของสารที่สนใจที่ได้จากกระบวนการแยก มีหลายชนิดด้วยกัน การเลือกใช้ขึ้นกับตัวอย่างที่สนใจว่าสามารถตอบสนองกับ detector ชนิดไหนได้ดี การทำงานของตัววัดสัญญาณในเทคนิค HPLC นั้น มีหลักการคือเมื่อเฟสเคลื่อนที่ผ่านสารตัวอย่าง หรือชะสารตัวอย่างออกจากคอลัมน์จะเข้าสู่ตัว detector output ที่อ่านได้จากตัว detector แล้วเปลี่ยนเป็นสัญญาณไฟ (electrical signal) ซึ่งจะแปรตามคุณสมบัติบางประการของเฟสที่เคลื่อนที่หรือของสารตัวอย่างได้

diode array detector (DAD) เป็นตัวตรวจวัดสัญญาณที่วัดค่าการดูดกลืนแสงของสาร สามารถวัดได้ทีละหลายความยาวคลื่นในเวลาเดียวกันและวัดได้ตั้งแต่ 190-850 นาโนเมตร ระบบการเดินทางของแสงจะเป็นแบบย้อนแสง reverse optics คือ แสงจากแหล่งกำเนิดแสง light source จะผ่านไปยัง flow cell ก่อนที่จะผ่านไปยัง monochromator คือ slit และ grating เมื่อแสงตกกกระทบบน grating แสงจะกระจายออกเป็นความยาวคลื่นต่างๆ แล้วไปตกกระทบบนแผงของ diode array ตรวจวัดสัญญาณออกมาเป็นโครมาโทแกรม diode array detector สามารถเก็บข้อมูล

spectrum ของพีกต่างๆ ของโครมาโทแกรมได้ด้วย ตัวอย่างที่เหมาะกับ detector นี้ต้องเป็นตัวอย่างที่สามารถดูดกลืนแสงได้ (ภาพผนวก 11)



ภาพผนวก 11 เครื่องตรวจวัดสัญญาณชนิด diode array detector (DAD)
ที่มา: NMSU (2006)

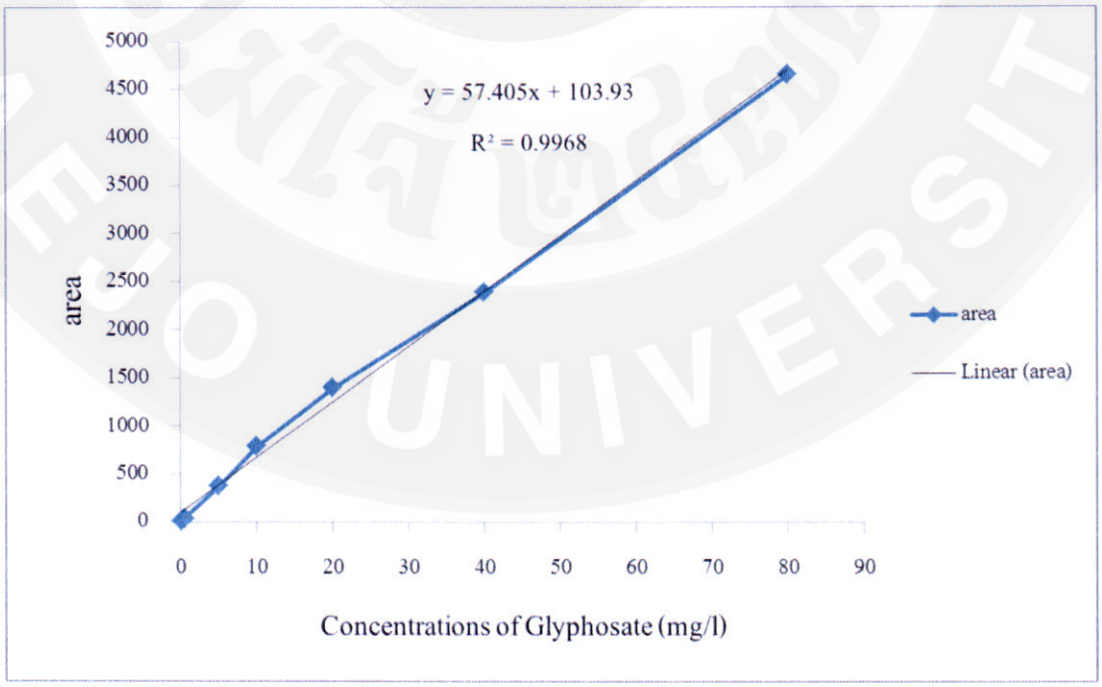
ภาคผนวก จ

กราฟมาตรฐานของสารละลายไกลโฟเสท และผลการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC

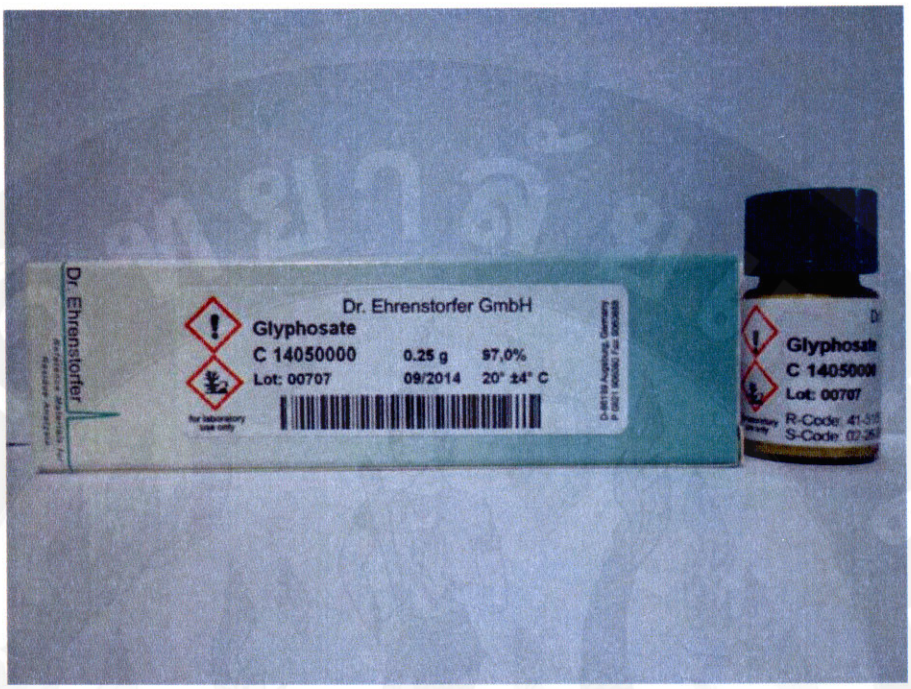
กราฟมาตรฐานของสารละลายไกลโฟเสท

ตารางผนวก 5 การเตรียมสารละลายไกลโฟเสทมาตรฐานความเข้มข้นตั้งแต่ 0.05 ถึง 80 มิลลิกรัมต่อลิตร

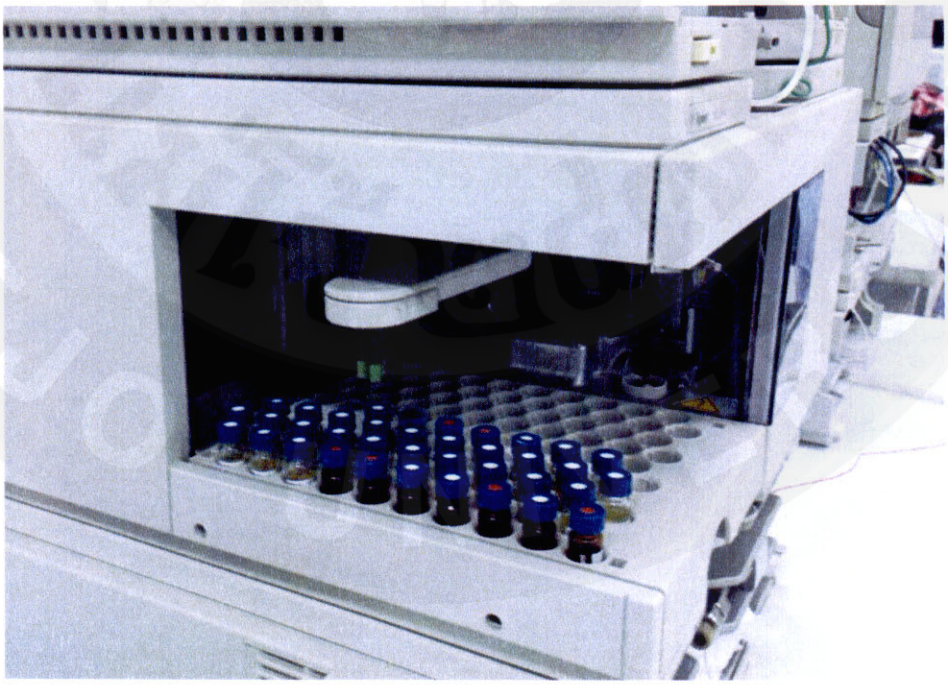
ความเข้มข้นของสารไกลโฟเสทที่ต้องการ (มิลลิกรัมต่อลิตร)	area
0.05	10.80
0.5	38.70
5	378.00
10	785.30
20	1402.30
40	2389.80
80	4652.00



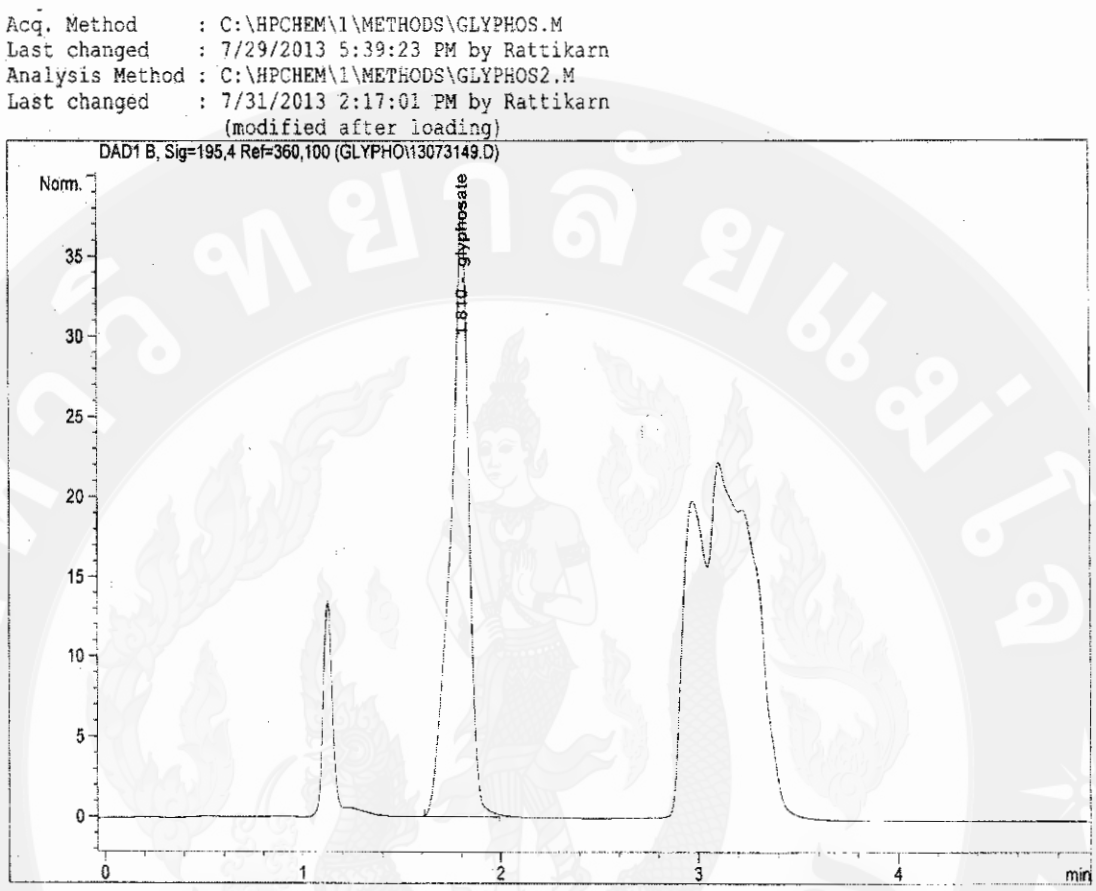
ภาพผนวก 12 กราฟมาตรฐานของสารละลายไกลโฟเสท



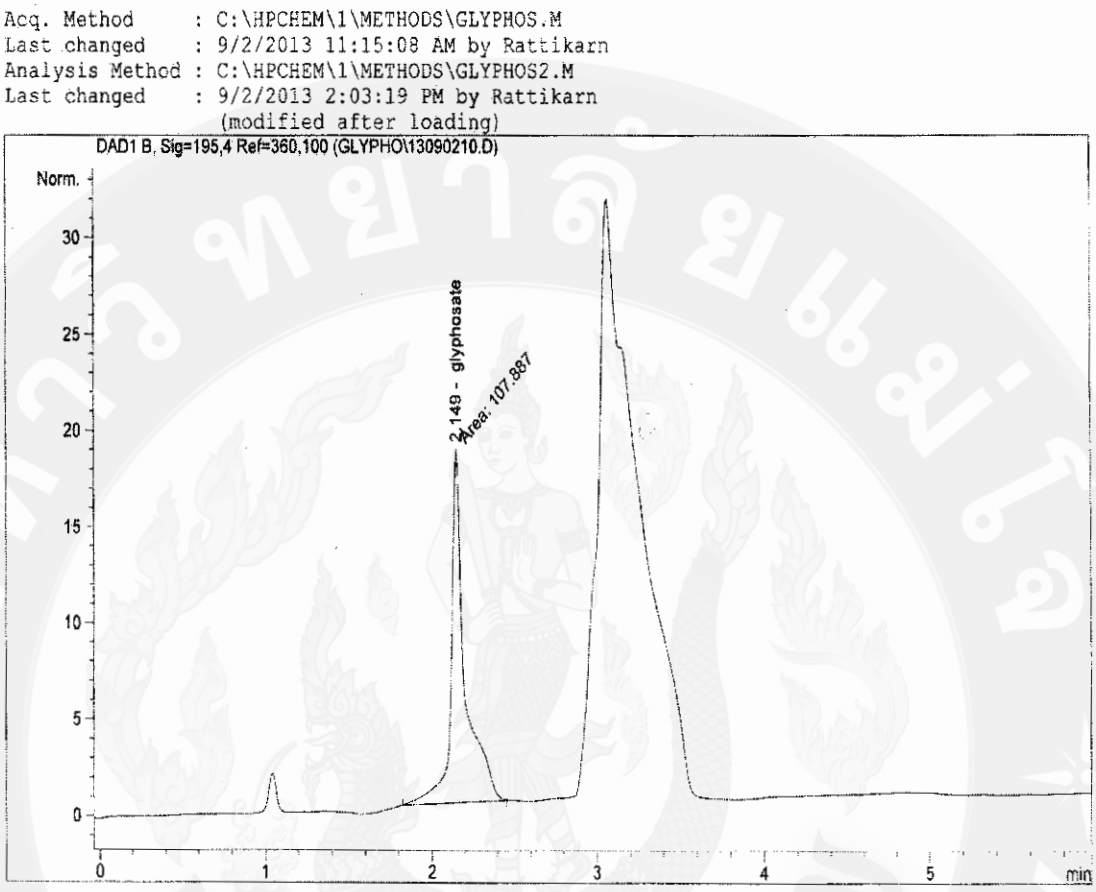
ภาพผนวก 13 สารไกลโฟเสทที่ใช้ทำกราฟมาตรฐาน



ภาพผนวก 14 การวิเคราะห์หาความเข้มข้นของสารไกลโฟเสทที่เหลืออยู่ด้วยเครื่อง High Performance Liquid Chromatography (HPLC) รุ่น Agilent 1100

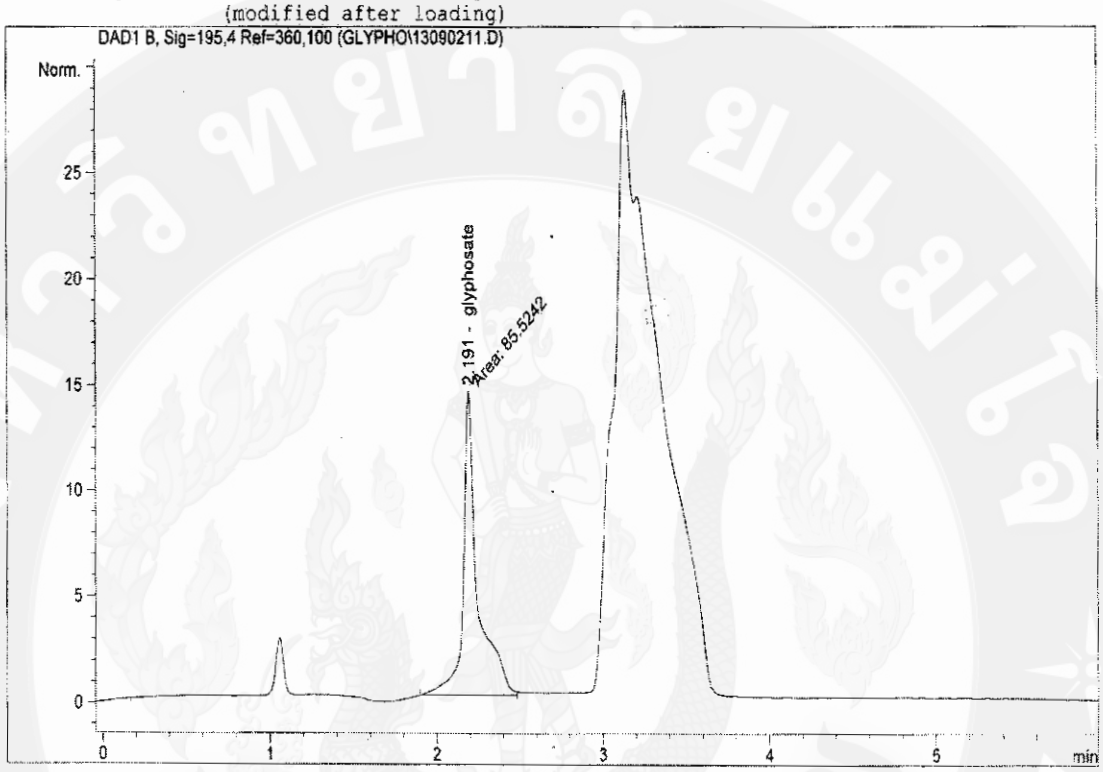


ภาพผนวก 15 ผลการวิเคราะห์สารไกลโฟเสทที่เหลือของดินเติมสารไกลโฟเสท (control) ที่ระยะเวลา 10 วัน ด้วยเครื่อง HPLC

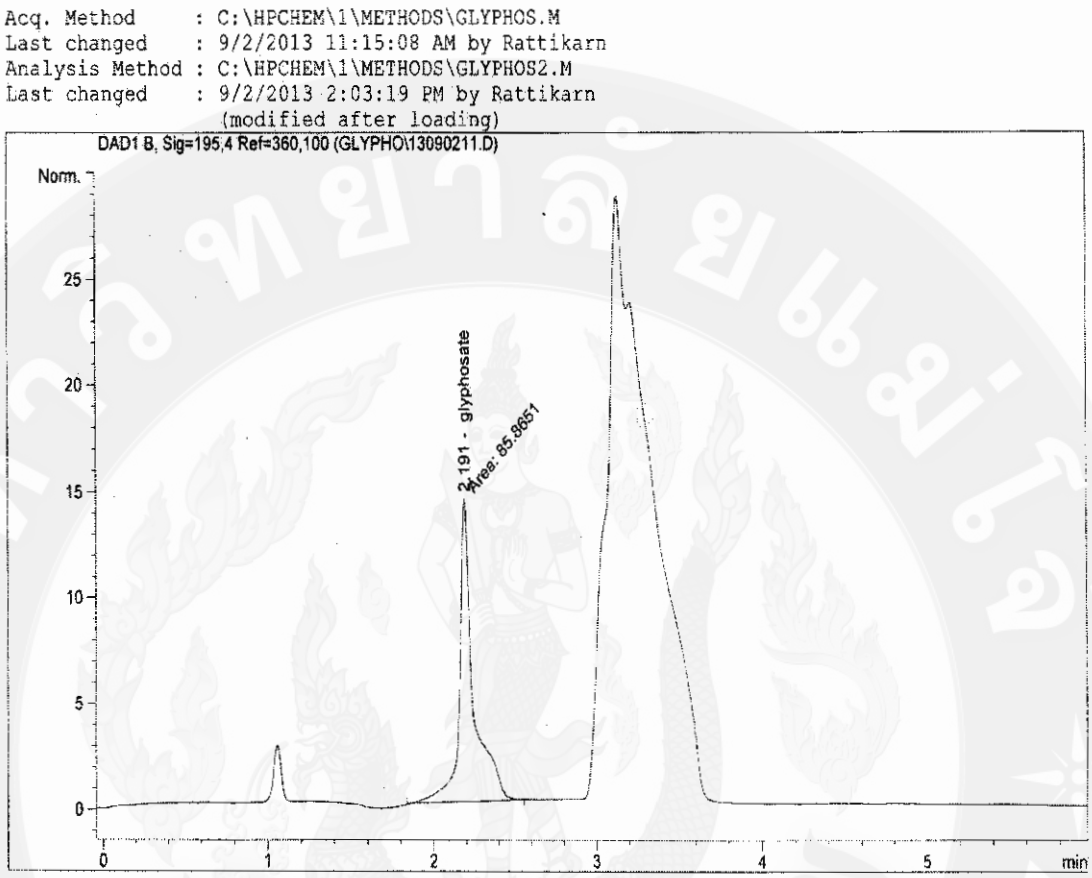


ภาพผนวก 16 ผลการวิเคราะห์สารไกลโฟเสทที่เหลือของดินเติมสารไกลโฟเสทและเชื้อไอโซเลท LMC2 ที่ระยะเวลา 10 วัน ด้วยเครื่อง HPLC

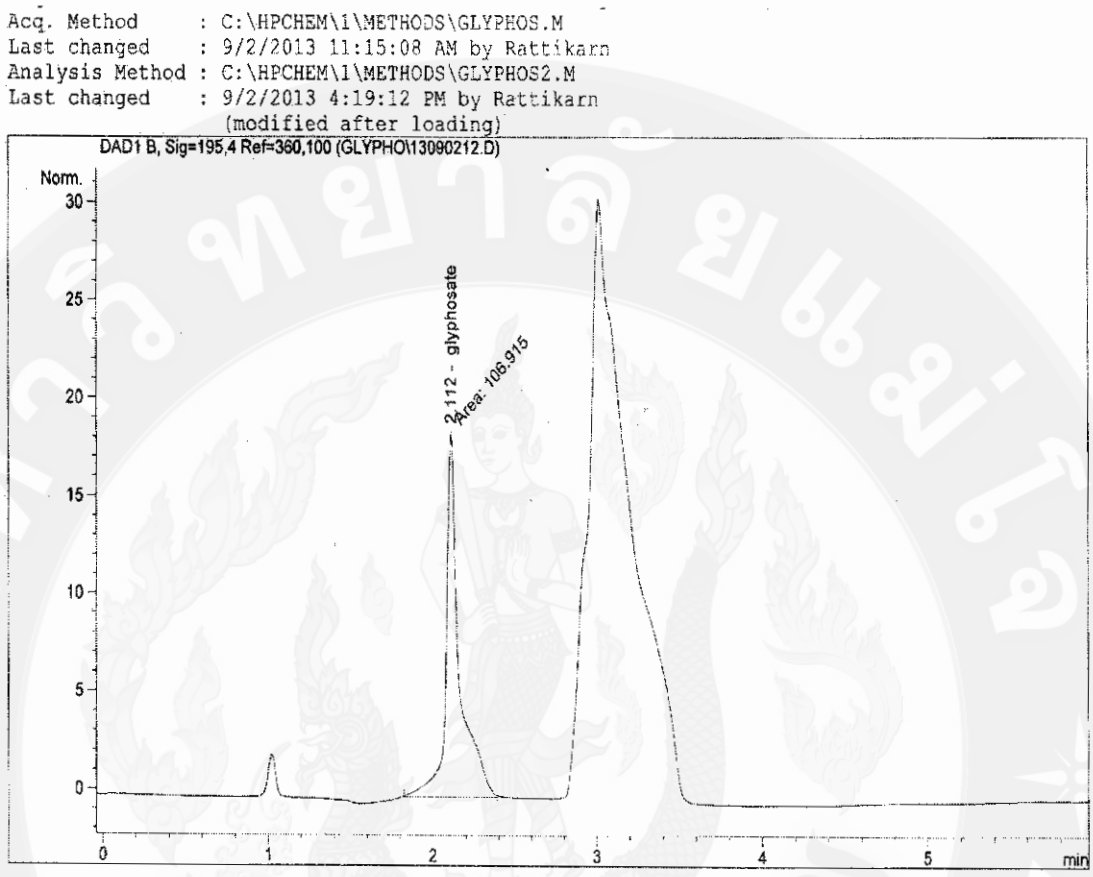
```
Acq. Method      : C:\HPCHEM\1\METHODS\GLYPHOS.M
Last changed     : 9/2/2013 11:15:08 AM by Rattikarn
Analysis Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\GLYPHOS2.M
Last changed     : 9/2/2013 2:03:19 PM by Rattikarn
                   (modified after loading)
```



ภาพผนวก 17 ผลการวิเคราะห์สารไกลโฟเสทที่เหลือของดินเติมสารไกลโฟเสทและเชื้อไอโซเลท MMC2 ที่ระยะเวลา 10 วัน ด้วยเครื่อง HPLC



ภาพผนวก 18 ผลการวิเคราะห์สารไกลโฟเสทที่เหลือของดินเติมสารไกลโฟเสทและเชื้อไอโซเลท PMA2 ที่ระยะเวลา 10 วัน ด้วยเครื่อง HPLC



ภาพผนวก 19 ผลการวิเคราะห์สารไกลโฟเสทที่เหลือของดินเติมสารไกลโฟเสทและเชื้อผสม (MIX) ที่ระยะเวลา 10 วัน ด้วยเครื่อง HPLC

ภาคผนวก ฉ

ประวัติผู้วิจัย

ประวัติผู้วิจัย

ชื่อ-สกุล	นางสาวจุไรรัตน์ อิมินา	
เกิดเมื่อ	10 ตุลาคม 2532	
ประวัติการศึกษา	พ.ศ. 2544	ประถมศึกษาปีที่ 6 โรงเรียนบ้านหนองคัน จังหวัดเชียงใหม่
	พ.ศ. 2546	มัธยมศึกษาตอนต้น โรงเรียนไทยรัฐวิทยา 79 (บ้านหนองอาบช้าง) จังหวัดเชียงใหม่
	พ.ศ. 2549	มัธยมศึกษาตอนปลาย โรงเรียนจอมทอง จังหวัดเชียงใหม่
	พ.ศ. 2553	ปริญญาตรี สาขาเทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยว มหาวิทยาลัยแม่โจ้ จังหวัดเชียงใหม่
ประวัติการฝึกงาน	พ.ศ. 2552	นักศึกษาฝึกงานโครงการหลวงแม่ปูนหลวง อำเภอพร้าว จังหวัดเชียงใหม่
ผลงานทางวิชาการ	พ.ศ. 2555	การนำเสนอผลงานทางวิชาการในการประชุมวิชาการแห่งชาติ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน ครั้งที่ 9 เรื่องการศึกษาประสิทธิภาพของแบคทีเรียในการย่อยสลายสารไกลโฟเสท