รายงานงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

เรื่อง

การคัดเลือกแบคทีเรียที่ย่อยสลายเม็ทโธมิล(แลนเนท)จากดินบริเวณพื้นที่เพาะปลูก

Selection of methomyl (lannate) degrading bacteria from cultivated area soil.

โดย

ดร. สกุณณี บวรสมบัติ
ดร. สุนันทา วังกานต์
รองศาสตราจารย์ วันชัย สนธิไชย

คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

มิถุนายน พ.ศ. 2547

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยชิ้นนี้สำเร็จได้ตามวัตถุประสงค์ เนื่องจากได้รับความเกื้อกูลจากหลายฝ่ายคณะผู้วิจัยจึงใคร่ขอขอบพระคุณ

1. คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ที่ได้ให้การสนับสนุนทุนวิจัย
2. หัวหน้าภาควิชาเคมี และ หัวหน้าภาควิชาชีววิทยา ที่อนุเคราะห์สถานที่ วัสดุ อุปกรณ์
3. เจ้าหน้าที่ภาควิชาเคมีและภาควิชาชีววิทยา ที่ช่วยเหลือดูแลและอำนวยความสะดวก
4. นางสาวชีวาพัฒน์ อรรถพลไพศาล นักศึกษาปริญญาโท ที่ช่วยงานวิจัย

จาก..... คณะผู้วิจัย

ดร. สกุณณี บวรสมบัติ หัวหน้าโครงการ
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ เชียงใหม่ 50202
โทร. 053-943346 ต่อ 1509, 09-7597169
Email: sakunnee@chiangmai.ac.th

ดร. สุนันทา วังกานต์ ผู้ร่วมวิจัย
ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ เชียงใหม่ 50202
โทร. 053-943341-5 ต่อ 139
Email: sunanta@chiangmai.ac.th

รศ. วันชัย สนธิไชย ที่ปรึกษาโครงการ
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ เชียงใหม่ 50202
โทร. 053-943346 ต่อ 1502

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

บทคัดย่อ

จากการนำดินบริเวณพื้นที่การเกษตรซึ่งมีการใช้เมโทมิลในการทำลายศัตรูพืช ในเขตอำเภอสารภี จังหวัดเชียงใหม่ จำนวน 10 ตัวอย่าง มาแยกแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายเมโทมิลโดยการบ่มใน Ringer solution เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำไปบ่มในอาหารเหลว Basal Salt Medium (BSM) ที่มีเมโทมิลความเข้มข้น 250 มิลลิกรัมต่อลิตร จำนวน 5 ครั้ง ครั้งละ 24 ชั่วโมง จากนั้นนำไป spread บนอาหารวุ้น BSM ที่มีเมโทมิลความเข้มข้น 250 มิลลิกรัมต่อลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 48 ชั่วโมง คัดแยกแบคทีเรียได้ 110 ไอโซเลท เป็นกรัมบวก 35 ไอโซเลท และกรัมลบ 75 ไอโซเลท เมื่อนำไอโซเลทที่แยกได้มาคัดเลือกหาแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายเมโทมิลที่ความเข้มข้นสูง โดยการเลี้ยงบนอาหารวุ้น BSM ที่มีความเข้มข้นของเมโทมิล 4,000, 5,000, 6,000 และ 7,000 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ พบว่ามี 8 ไอโซเลทที่สามารถเจริญได้ดีทุกความเข้มข้น เชื้อที่คัดเลือกได้ทั้ง 8 ไอโซเลทนี้มี 4 ไอโซเลทคือ E2 H2 H3 และ H8 ที่ย่อยสลายเมโทมิลได้มากกว่าร้อยละ 50

ABSTRACT

Ten soil samples in agricultural areas where methomyl have been used as pesticides in Sarapee District, Chiang Mai, were used to select methomyl-degrading bacteria. They were inoculated in Ringer solution and incubated at room temperature for 24 hours, then transferred consecutively 5 times into Basal Salt Medium (BSM) broth containing 250 mg/l of methomyl and incubated at room temperature for 24 hours. The cultures were subsequently spread on BSM agar containing 250 mg/l of methomyl and incubated at room temperature for 48 hours. One hundred and ten bacterial isolates, 35 Gram positive and 75 Gram negative, were obtained. To select methomyl-degrading bacteria at high concentration, each isolate was inoculated on BSM agar containing 4,000, 5,000, 6,000 and 7,000 mg/l of methomyl respectively. It was found that 8 isolates were able to grow well at all methomyl concentrations. Four isolates, E2 H2 H3 and H8, were able to degrade methomyl more than 50 percents.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

สารบาญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ก
บทคัดย่อ	ข
สารบาญ	ค
สารบาญภาพและตาราง	ง
บทที่ 1 บทนำและวัตถุประสงค์	1
บทที่ 2 ทบทวนเอกสาร	2
บทที่ 3 วิธีการวิจัย	6
บทที่ 4 ผลการวิจัย	8
บทที่ 5 สรุปและอภิปรายผลการวิจัย	11
เอกสารอ้างอิง	12
ภาคผนวก ก อาหารเลี้ยงเชื้อและวิธีเตรียม	15
ภาคผนวก ข วิธีวิเคราะห์เนื้อดิน	16
ภาคผนวก ค ผลการศึกษาคุณลักษณะของไอโซเลทที่แยกได้จากดิน	18
ภาคผนวก ง ผลการศึกษาความสามารถในการเจริญของแบคทีเรียบนอาหารที่มีเมโทมิลความเข้มข้นต่างกัน	23

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

สารบาญภาพและตาราง

หน้า

รูป 1 แสดงสูตรโครงสร้างของเมโทมิล 2
รูป 2 กราฟการเปลี่ยนแปลงปริมาณเมโทมิล (มก./ลิตร) ของแต่ละไอโซเลท 10

ตาราง 1 รายละเอียดพื้นที่เก็บตัวอย่าง และระยะเวลาที่ใช้เมโทมิล 8
ตาราง 2 คุณลักษณะของดินและปริมาณจุลินทรีย์ในดิน 9
ตาราง 3 การเปลี่ยนแปลงปริมาณเมโทมิลในอาหารเหลว(มก./ลิตร)และเปอร์เซ็นต์ที่ย่อยสลาย 10
ตาราง 4 การปฏิบัติงานปั้นดินเพื่อการวิเคราะห์เนื้อดินเชิงคุณภาพ 16
ตาราง 5 คุณลักษณะทั่วไปของไอโซเลทที่แยกจากดิน 18
ตาราง 6 ความสามารถในการเจริญของแบคทีเรียบนอาหารที่มีเมโทมิลความเข้มข้นต่างกัน 23

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

บทที่ 1
บทนำและวัตถุประสงค์

ในปัจจุบันเกษตรกรไทยมีความเสี่ยงต่อสารเคมีกำจัดศัตรูพืช ทั้งนี้เนื่องจากปัญหาหลักที่สำคัญอย่างหนึ่งของการเกษตร คือการถูกบุกรุกทำลายผลิตผลจากแมลงและศัตรูพืช เป็นผลทำให้ผลผลิตเกิดความเสียหายและลดต่ำลง เกษตรกรจึงหันมาใช้สารเคมีกำจัดศัตรูพืชในการแก้ปัญหาดังกล่าว โดยนำสารพิษต่าง ๆ มาใช้ในการกำจัดศัตรูพืชเพื่อเพิ่มผลผลิตทางการเกษตร สารเคมีกำจัดศัตรูพืชได้ถูกนำมาใช้อย่างแพร่หลายเนื่องจากมีความสะดวกและง่ายต่อการใช้กำจัดศัตรูพืชในบริเวณกว้างและสามารถอยู่คงทนเป็นเวลานาน จากการเพิ่มการใช้สารปราบศัตรูพืชนี้ ทำให้เกิดการตกค้างของสารปราบศัตรูพืชทั้งในดิน น้ำ บรรยากาศ ซึ่งส่งผลกระทบต่อพืช สัตว์ และมนุษย์ โดยกลุ่มที่เสี่ยงต่ออันตรายจากสารปราบศัตรูพืชมากที่สุด คือ กลุ่มเกษตรกรผู้ใช้สารปราบศัตรูพืชโดยไม่มีวิธีป้องกันตนเอง หรือไม่ปฏิบัติตามวิธีการใช้สารปราบศัตรูพืชที่ผู้ผลิตแนะนำ

แลนเนทหรือมีชื่อทางเคมีว่าเมโทมิล (methomyl) เป็นสารเคมีกำจัดศัตรูพืชที่เกษตรกรไทยนิยมใช้มากที่สุดในปัจจุบันเมโทมิลเป็นสารกลุ่มคาร์บาเมต มีฤทธิ์ในการกำจัดพวกแมลงและไร ลักษณะของการทำลายศัตรูพืชจะแบ่งออกเป็นสองแบบ คือ สัมผัสตัวตายและทำให้เกิดพิษต่อกระเพาะอาหาร อันเนื่องมาจากการกินยาเข้าไป ทำให้ตายได้ในที่สุด ดังนั้นเมโทมิลจึงเป็นที่นิยมของเกษตรกรไทยในการนำมาใช้เพื่อป้องกันและกำจัดแมลงศัตรูผลไม้ ผัก ฝ้าย ยาสูบ และพืชผักอื่น ๆ อีกหลายชนิด นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าชาวบราซิลที่ได้รับสารปราบศัตรูพืชเป็นประจำจะมีความถี่ของโครโมโซมที่ผิดปกติมากกว่ากลุ่มคนที่ไม่ได้รับสารปราบศัตรูพืช และการใช้สารเมโทมิลในปริมาณที่มากจะทำให้เกิดการสะสมสารพิษในดิน ตลอดจนสามารถปนเปื้อนลงในแหล่งน้ำได้ โดยเฉพาะอย่างยิ่งการสลายตัวของเมโทมิลในดินและในน้ำจะใช้เวลานาน

ในปัจจุบันมีรายงานหลายฉบับบ่งว่าจุลินทรีย์ในดินมีความสามารถในการสลายสารพิษต่างๆ ดังนั้นจึงเป็นที่มาของการวิจัยครั้งนี้เพื่อต้องการคัดเลือกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการสลายเมโทมิลที่ปนเปื้อนในดินโดยการใช้แบคทีเรียที่แยกได้จากดินบริเวณพื้นที่การเกษตรที่มีการใช้เมโทมิลเป็นประจำ เพื่อนำมาศึกษาถึงความเป็นไปได้ในการใช้แบคทีเรียในการสลายสารพิษดังกล่าว

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เพื่อคัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการย่อยสลายเมโทมิล

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

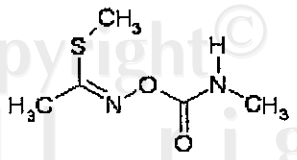
บทที่ 2

ทบทวนเอกสาร

การผลิตสารเมโทมิลเพื่อนำมาใช้ในการเกษตรเริ่มขึ้นในปี พ.ศ. 2510 โดยเมโทมิลถูกจัดเป็นสารเคมีป้องกันศัตรูพืชและสัตว์ประเภทที่มีความเป็นพิษร้ายแรงตามพระราชบัญญัติวัตถุมีพิษ พ. ศ. 2510 และตามประกาศขององค์การอนามัยโลก (WHO)(ฝ่ายจัดการสารพิษ , 2533) เมโทมิลเป็นสารเคมีกำจัดศัตรูพืชชนิดหนึ่งที่มีการใช้อย่างแพร่หลาย เนื่องจากหาซื้อได้ง่ายและมีฤทธิ์ในการทำลายศัตรูพืชอย่างมีประสิทธิภาพ เมโทมิลมีการผลิตในประเทศสหรัฐอเมริกาโดยบริษัทดูปองท์ (DuPont)(Cornell University, 2001) ในทางการค้ามักจะมีการเรียกชื่อสารเคมีนี้ว่า แลนเนท (Lannate), ลาน็อก (Lanox), มีโซไมล์ (Mesomile), เมธาวิน (Methavin) และนูดริน (Nudrin)เป็นต้น นอกจากนี้เมโทมิลยังมีชื่อ IUPAC คือ S-methyl N-(methylcarbamoyloxy thioacetimidate) (World Health Organization, 1983)

เมโทมิลเป็นสารกำจัดแมลงที่อยู่ในกลุ่มคาร์บาเมตมีฤทธิ์ในการป้องกันกำจัดศัตรูพืชจำพวกแมลงและไร โดยลักษณะการทำลายศัตรูพืชจะแบ่งออกเป็น 2 แบบ คือ สัมผัสตัวตาย และทำให้เกิดพิษต่อกระเพาะอาหารอันเนื่องมาจากการกินเข้าไป ซึ่งก็จะทำให้ตายได้ในที่สุด ดังนั้นจึงเป็นที่นิยมกันอย่างแพร่หลายเพื่อป้องกันและกำจัดแมลงศัตรูพืชผลไม้ ผัก ฝ้าย ยาสูบ และพืชชนิดอื่นๆ อีกหลายชนิด นอกจากนี้เมโทมิลยังมีประสิทธิภาพในการควบคุมและทำลายไส้เดือนฝอยภายในดิน

ลักษณะทางกายภาพของเมโทมิลจะเป็นผลึกของแข็งสีขาวที่มีกลิ่นกำมะถันเจือจาง โดยปกติแล้วจะสลายตัวได้ดีในสภาพที่มีอุณหภูมิสูงหรือสภาพที่เป็นด่าง มีความเสถียรในสภาพที่เป็นของแข็งมากกว่าสภาพที่เป็นของเหลว ซึ่งปัจจัยที่มีผลทำให้อัตราการย่อยสลายในของเหลวเพิ่มขึ้นได้แก่ แสงแดด อุณหภูมิที่สูงขึ้น และสภาพความเป็นด่าง ฯลฯ นอกจากนี้เมโทมิลยังเป็นสารที่ไม่กัดกร่อนโลหะ ซึ่งมีสูตรโครงสร้างดังรูป 1 และสารที่เป็นองค์ประกอบทางเคมีคือ $C_5H_{10}N_2O_2S$ มีชื่อว่า S-methyl-N-(methylcarbamoyloxy) thioaetimidate methyl N-[[(methylamino) carbonyl]oxy] ethanimidothioate หรือ 1-(methylthio) ethylideneamino methylcarbamate



รูป 1 แสดงสูตรโครงสร้างของเมโทมิล (American Conference Governmental Industrial Hygienists, 1986)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

สำหรับคุณสมบัติทางกายภาพของเมโทมิล ได้แก่ มีน้ำหนักโมเลกุล (molecular weight) 162.2, มีความถ่วงจำเพาะ (specific gravity) ที่ 24 °C คือ 1.2946 จุดหลอมเหลว (melting point) 78-79 °C และความดันไอ (vapour pressure) ที่ 24 และ 40 °C เท่ากับ $5x10^{-5}$ และ $1.6x10^{-4}$ mm Hg ตามลำดับนอกจากนี้ยังมีความสามารถในการละลาย (solubility) ในตัวทำละลายที่แตกต่างกัน (ฝ่ายจัดการสารพิษ, 2533)

ในปัจจุบันการนำแบคทีเรียมาย่อยสลายสารปราบศัตรูพืชและวัชพืชได้รับความนิยมอย่างแพร่หลาย ทำให้มีงานวิจัยเกี่ยวกับการศึกษาจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายสารกลุ่มดังกล่าวอย่างมากมาย ทั้งทางด้านกระบวนการย่อยสลายสารและการเปลี่ยนรูปของสารในเซลล์จุลินทรีย์ ยีนที่เกี่ยวข้องในการย่อยสลาย ตลอดจนการหาสภาวะที่เหมาะสมต่อจุลินทรีย์ในการย่อยสลายสารดังกล่าวให้มีประสิทธิภาพ ซึ่งสารในกลุ่มคาร์บาเมตก็ได้มีงานวิจัยของ Ambrosoli และคณะ (1996) ได้พบว่า carbofuran ซึ่งเป็นสารเคมีกำจัดศัตรูพืชที่ใช้ในการควบคุมแมลงบริเวณที่ปลูกต้นบีทสามารถย่อยสลายได้ด้วยแบคทีเรีย *Pseudomonas, Arthrobacter* และ *Bacillus* spp. ซึ่งทุกไอโซเลทสามารถ metabolize carbofuran ให้เป็น carbofuran-phenol และเปลี่ยน carbofuran-phenol ไปเป็นสารที่ยังไม่สามารถบ่งบอกได้ แต่ตรวจสอบขั้นตอนนี้โดยศึกษาจากปริมาณของ carbofuran-phenol ที่เหลืออยู่หลังจากการเลี้ยงเป็นเวลา 45 วัน ซึ่งไอโซเลทที่ย่อยสลายได้ดีคือ *Pseudomonas fluorescens, Bacillus* sp. และ *Arthrobacter* sp. ตามลำดับ

Kok และคณะในปี 1999 ได้นำแบคทีเรีย *Methylosinus* ซึ่งเป็นแบคทีเรียกรัมลบมาย่อยสลายสารเคมีกำจัดศัตรูพืช aldicarb โดยมีการประยุกต์คือ ใช้วิธีตรึงเซลล์แบคทีเรียกับ carboxymethylcellulose ด้วยพันธะโควาเลนท์ และศึกษาจลนศาสตร์การย่อยสลาย aldicarb ใน packed-bed reactor (PBR) นอกจาก aldicarb แล้ว สารในกลุ่มคาร์บาเมตตัวอื่นๆก็มีการย่อยสลายโดยใช้แบคทีเรียเช่นกันอาทิ Novak และคณะ (2003) ได้นำแบคทีเรีย *Arthrobacter nicotinae* มาย่อยสลายสารปราบศัตรูพืช juvenoid; ethyl N-{2-[4-(2,2-ethylenedioxy-1-cyclohexyl methyl) phenoxy] ethyl} carbamate (w328) ซึ่งแบคทีเรียดังกล่าวสามารถเจริญได้ในอาหาร minimal medium ที่มี w328 เป็นแหล่งคาร์บอนเพียงชนิดเดียว นอกจากนั้น *Arthrobacter* sp. ยังเป็นแบคทีเรียที่นิยมใช้ในการย่อยสลายสารพิษตัวอื่น เช่น poly (3-hydroxybutyrate) (Asano and Watanabe, 2001)และ polychlorinated biphenyls (Singer *et al.*,2000) เป็นต้น

ไม่เพียงแต่สารในกลุ่มคาร์บาเมตเท่านั้น สาร 2,4-D (2,4-Dichlorophenoxyacetic acid) ซึ่งเป็นยาปราบวัชพืชก็ได้มีงานวิจัยอย่างแพร่หลายเกี่ยวกับการใช้แบคทีเรียในการกำจัดหรือลดปริมาณสารดังกล่าวจากสิ่งแวดล้อม จนกระทั่งในปี 1983 Friedrich และคณะได้พบว่า การย่อย

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

สลาย 2,4-D โดยแบคทีเรีย *Pseudomonas* sp. และ *Alcaligenes* sp. มีความสัมพันธ์กับ plasmid ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Don และ Pimberton ในปี 1981 ที่พบว่า plasmid เหล่านี้สามารถถ่ายทอดโดยวิธี conjugation ระหว่างสปีชีส์แบคทีเรียที่หลากหลาย จากการศึกษาแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลาย 2,4-D ทำให้ทราบว่าแบคทีเรียที่มีการแสดงออก (expressed) ในลักษณะดังกล่าวจะพบใน *Alcaligenes eutrophus*, *Alcaligenes paradoxus* และ *Pseudomonas putida* เท่านั้น นอกจากนี้ Ka และคณะ (1994) ได้เปรียบเทียบการย่อย 2,4-D ระหว่างแบคทีเรียท้องถิ่น และแบคทีเรียที่คัดเลือกแล้วว่าสามารถย่อยสลาย 2,4-D ได้ดี คือ *Pseudomonas cepacia* (pJP4), strain 745, *Sphingomonas paucimobilis* 1443 และ *Pseudomonas pickettii* 712 ซึ่งผลการย่อยสลายจากแบคทีเรียจะมีรูปแบบที่คล้ายกัน และใช้เวลา 1 สัปดาห์ ในการย่อยสลายที่ความเข้มข้น 250 ppm ต่อมาได้มีการศึกษาทางด้าน metabolism ของการย่อยสลาย 2,4-D ในแบคทีเรีย *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 ที่สามารถเปลี่ยน 2,4-D ไปเป็น 2,4-dichlorophenol และ phenoxyacetate เป็น phenol ในปี 2001 Smejkal และคณะก็ได้ทำการทดลองจนทราบว่าแบคทีเรีย *Sphingomonas* sp. มีบทบาทสำคัญในการย่อยสลายสาร 2,4-D ตลอดจนอนุพันธ์อื่นๆของสารดังกล่าว เช่น *Sphingomonas* TFD44 สามารถย่อยสลายยาฆ่าวัชพืชที่เป็นสารประกอบพวก dichlorinated, 2,4-D, (2-(2,4-dichlorophenoxy) propionic acid) และ 2,4- dichlorophenoxybutyric acid เป็นต้น ส่วน *Sphingomonas* AW5 ซึ่งแยกได้จาก 2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid ก็เป็นสายพันธุ์ที่ย่อยสลายสารประกอบพวก phenoxybutyric acid ได้แก่ MCPB (4-chloro-2-methylphenoxybutyric acid)

นอกจาก 2,4-D แล้ว ยาฆ่าวัชพืชที่เป็นสารประกอบ dinitroaniline ได้แก่ trifluralin (2,6-dinitro-N,N-dipropyl-4-(trifluoromethyl) benzenamine) ซึ่งปนเปื้อนอยู่ในดินถูกย่อยสลายได้ด้วยแบคทีเรีย ซึ่ง Bellinaso และคณะ (2003) พบว่าแบคทีเรียที่คัดแยกได้มี 5 ไอโซเลท สามารถย่อยสลาย trifluralin ได้ภายในเวลา 30 วัน ได้แก่ *Klebsiella* sp., *Herbaspirillum* sp., *Bacillus* sp. 2 ไอโซเลท และแบคทีเรีย No. 9 ที่ยังไม่ได้บ่งบอกลักษณะ โดยมีอัตราการย่อยสลาย 24.6, 16.4, 25.0, 16.0 และ 21% ตามลำดับ

ไม่เพียงแต่สารที่กล่าวมาเท่านั้นสารในกลุ่ม organophosphorus insecticide-nematicide ก็สามารถสลายโดยแบคทีเรีย ในปี 2000 Karpouzas และคณะได้ทำการศึกษา ethoprophos (O-ethyl S,S-dipropyl-phosphorodithioate) ซึ่งใช้ในการควบคุม nematode (*Globodera rostochiensis* และ *Globodera pallida*) ในการปลูกมันสำปะหลัง เขาได้พบว่าสารดังกล่าวถูกย่อยสลายด้วยแบคทีเรีย *Pseudomonas putida* epI นอกจากนั้น *Pseudomonas putida* ไอโซเลท epI และ epII ยังสามารถย่อยสลายสาร organophosphorus nematicide ตัวอื่นๆได้ เช่น cadusafos, isozofos, isofenphos และ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

fenamiphos แต่การย่อยสลายจะเกิดขึ้นอย่างช้าๆ และในปีเดียวกันนั้นเองเขาได้ศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการย่อยสลาย ethoprophos โดยแบคทีเรียสปีชีส์เดิม คือ *Pseudomonas putida* และพบว่า ethoprophos ในสิ่งแวดล้อมจะย่อยสลายได้รวดเร็วที่อุณหภูมิ 20 และ 35°C (Karpouzas and Walker, 2000)

นอกจากแบคทีเรียแล้วยังมีรายงานว่า cyanobacteria สามารถย่อยสลายสารปราบศัตรูพืชได้เช่นกัน ในงานวิจัยของ Subarmanian และคณะ (1994) ได้พบว่า cyanobacteria 2 ไอโซเลท คือ *Aulosira fertilissima* ARM68 และ *Nostoc muscorum*ARM221 สามารถสลายสารปราบศัตรูพืชกลุ่ม organophosphorus ได้แก่ monocrotophos และ malathion ที่ความเข้มข้น 50 ppm ในปี 1998 Robert และคณะได้พบว่าแบคทีเรียไอโซเลท 848 สามารถย่อยสลาย linuron และ diuron ได้ แบคทีเรียดังกล่าวแยกจากดินที่ผ่านการเติม isoproturon ซึ่งเป็นยาฆ่าวัชพืชในกลุ่ม phenylurea เช่นเดียวกับ linuron และ diuron งานวิจัยดังกล่าวได้สอดคล้องกับงานวิจัยของ Sorensen และคณะ (2003) ที่กล่าวว่า แบคทีเรียมากมายที่มีความสามารถย่อยสลายยาฆ่าวัชพืชในกลุ่ม phenylurea จะเป็นแบคทีเรียที่แยกได้จากดิน ตัวอย่างเช่น แบคทีเรียที่ย่อยสลาย linuron ได้คือ *Bacillus sphaericus* (Wallnofer, 1969) ส่วนแบคทีเรียที่ย่อยสลาย diuron ได้คือ *Arthrobacter* sp. โดยเฉพาะอย่างยิ่ง *Arthrobacter globiformis* (Widehem *et al.*, 2002) และ Sorensen ยังพบว่า *Sphingomonas* sp. strain SRS2 เป็นแบคทีเรียตัวแรกที่ได้รับการบันทึกว่าสามารถเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของ phenyl ใน phenylurea ได้ โดย SRS2 จะ metabolize ^{14}C-IPU (isoproturon) ซึ่งเป็นแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนให้กลายเป็นสารประกอบ $^{14}CO_2$ และมวลชีวภาพในที่สุด (Sorensen *et al.*, 2001) ปัจจุบันนี้แบคทีเรียในดินได้รับความนิยมกันอย่างแพร่หลายเพื่อใช้บำบัดสารเคมีปราบศัตรูพืชที่ตกค้างในสิ่งแวดล้อม เช่น *Bacillus circulans* และ *Bacillus brevis* ที่สามารถย่อยสลาย hexachlorocyclohexane (HCH) ซึ่งใช้เป็นยาฆ่าแมลงทางการค้าและมีการสะสมในสิ่งแวดล้อม (Gupta and Kaushik, 2000)

ส่วนสารในกลุ่ม chlorinated pesticide ก็นิยมกำจัดจากสิ่งแวดล้อมโดยใช้แบคทีเรียเช่นเดียวกัน ซึ่ง Awasthi และคณะ (2000) ได้ศึกษาการหาสภาวะที่เหมาะสมและย่อยสลาย endosulfan ที่เป็นสารเคมีกำจัดศัตรูพืชพวก chlorinated pesticide ในกลุ่ม cyclodiene โดยใช้แบคทีเรีย *Bacillus* sp. พบว่าดินที่เหมาะสมต่อการย่อยสลายคือ ดินเปียก และการย่อยสลายจะถูกยับยั้งเมื่อเติม sodium acetate และ sodium succinate เป็นแหล่งคาร์บอน pH ที่เหมาะสมคือ 8.5 แบคทีเรียจะเปลี่ยน endosulfan ไปเป็น endosulfan diol และอัตราการย่อยสลายจะเพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ endosulfan เป็น 5 mg/g ดิน สำหรับปริมาณ inoculum ที่เหมาะสมคือ 2 x 10^6 cell/g ดิน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

บทที่ 3
วิธีการวิจัย

1. การเก็บตัวอย่างดิน

สุ่มเก็บตัวอย่างดินจากพื้นที่เพาะปลูกซึ่งมีการใช้เมโทมิลเป็นประจำ (ทราบโดยการสอบถามข้อมูลจากเกษตรกรเจ้าของพื้นที่เพาะปลูก) จำนวน 5 ครั้ง ครั้งละ 2 ตัวอย่าง ๆ ละ 500 กรัม บรรจุตัวอย่างดินในถุงพลาสติก บันทึกรายละเอียดของตัวอย่าง

2. การวิเคราะห์คุณสมบัติของดิน

2.1 การวิเคราะห์ลักษณะเนื้อดิน นำดินตัวอย่าง (จากข้อ 1) ประมาณ 3-5 กรัม หากปั้นเป็นก้อนกลมได้ ปั้นให้มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1 นิ้ว จากนั้นค่อยๆ หยดน้ำใส่ลงไปในดินจนทำให้ดินเหนียวและสามารถติดนิ้วมือได้ จึงทำการปั้นดินด้วยนิ้วมือให้เป็นรูปวงกลม แท่งยาว แท่งสั้น วงแหวน หรือเส้นโค้ง และจำแนกประเภทเนื้อดิน (เกษมศรี ซับซ้อน, 2541)

2.2 การวิเคราะห์สีของดิน นำดินที่เปียกจากข้อ 2.1 มาวาง นำกระดาษที่เจาะรูสี่เหลี่ยมวางทาบบนดิน เปรียบเทียบสีของดินจาก Rock-Color Chart (The Rock-Color Chart Committee, 1995)

2.3 การวิเคราะห์ค่าความเป็นกรดด่างของดิน ชั่งดินตัวอย่าง 10 กรัมใส่ลงในบีกเกอร์ขนาด 50 มล. เติมสารละลาย 0.01 M $CaCl_2$ 20 มล. คนเป็นครั้งคราวในช่วง 30 นาทีแรก ตั้งทิ้งไว้ให้ตกตะกอน เมื่อครบ 1 ชม. วัด pH โดยใช้ pH meter (อ้างโดย มานัส, 2519)

3. การคัดเลือกแบคทีเรีย

3.1 ชั่งดินตัวอย่าง (จากข้อ 1) 10 กรัม ใส่ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มล. ที่มี Ringer's solution ปริมาตร 75 มล. เขย่าที่อุณหภูมิห้อง ความเร็วรอบ 100 rpm เป็นเวลา 24 ชม. (Boonchan *et al.*, 2000) นำส่วนสารละลาย (supernatant) มา 5 มล. ถ่ายใส่อาหาร Basal Salt Medium (BSM)(Gordon and Dobson, 2001) 45 มล. ที่มีเมโทมิลความเข้มข้น 250 มก./ลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน เขย่าที่อุณหภูมิห้อง ความเร็วรอบ 100 rpm เป็นเวลา 24 ชม. ทำการถ่ายเชื้อต่อเนื่องอีก 5 ครั้งโดยใช้ inoculum จากอาหาร BSM เดิม 5 มล. เติมลงในอาหาร BSM ใหม่ 45 มล. ที่มีเมโทมิลความเข้มข้น 250 มก./ลิตร เป็นแหล่งคาร์บอนเขย่าที่ความเร็วรอบ 100 rpm บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชม.

3.2 ทำการแยกแบคทีเรียเมื่อ subculture ครบ 5 ครั้ง โดยปิเปตสารละลายจากอาหารเหลวในข้อ 3.1 มา 1 มล. และทำเจือจางตามลำดับส่วน นำ 0.1 มล. ของตัวอย่างที่มีความเจือจางที่เหมาะสมมา spread plate บนอาหารวุ้น BSM ที่มีเมโทมิลความเข้มข้น 250 มก./ลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 48 ชม. หาปริมาณแบคทีเรียในดินทั้งหมด และคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียที่มี

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ลักษณะโคโลนีต่างกัน restreak จนได้เชื้อบริสุทธิ์ ศึกษาคุณลักษณะพื้นฐานของแบคทีเรียเช่น ลักษณะโคโลนี และการติดสีกรัม

4. การคัดเลือกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการใช้เมโทมิลได้ดี

4.1 นำแบคทีเรียไอโซเลทที่แยกได้จำนวน 110 ไอโซเลท มาคัดเลือกซ้ำโดยเลี้ยงในอาหารเหลว BSM ที่มีความเข้มข้นของเมโทมิล 250 มก./ลิตร เป็นเวลา 24 ชม.

4.2 แตะเชื้อ 1 ลูป จากอาหารเหลวในข้อ 4.1 มา streak บนอาหารวุ้น BSM ที่มีความเข้มข้นของเมโทมิล 250 (ชุดควบคุม), 4,000, 5,000, 6,000 และ 7,000 มก./ลิตร ตามลำดับ บ่มเชื้อเป็นเวลา 48 ชม. เปรียบเทียบการเจริญและเลือกไอโซเลทที่เจริญได้ทุกความเข้มข้นมาทดสอบในขั้นตอนต่อไป

5. การคัดเลือกแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายเมโทมิลในอาหารเหลว

5.1 เตรียมแบคทีเรียเพื่อใช้เป็น inoculum (Boonchan *et al.*, 2000) โดยเพาะแบคทีเรียที่คัดเลือกจากข้อ 4 ลงในอาหาร BSM ที่มีเมโทมิล 250 มก./ลิตร ปริมาตร 50 มล. บ่มที่อุณหภูมิห้อง ความเร็วรอบ 120 rpm เป็นเวลา 24 ชม. เก็บเซลล์โดยนำไปปั่นที่ความเร็วรอบ 6,000 rpm 4°C เป็นเวลา 20 นาที ล้างเซลล์ 2 ครั้ง ด้วยอาหาร BSM ที่ฆ่าเชื้อ และปรับปริมาณให้มีเชื้อตั้งต้นเป็น 10^6 cfu/ml โดยการเติม BSM ในปริมาตรที่เหมาะสม

5.2 เติม inoculum ของแบคทีเรียแต่ละไอโซเลทลงในอาหารเหลว BSM ที่มีปริมาณเมโทมิล 7000 ppm บ่มที่อุณหภูมิห้อง เขย่าที่ความเร็วรอบ 120 rpm เป็นเวลา 12 วัน ทุกๆ 3 วันของการบ่มนำตัวอย่าง 5 มล. ปั่นแยกเซลล์แบคทีเรียที่ความเร็วรอบ 6,000 rpm 4 °C เป็นเวลา 20 นาที และนำสารละลายมาวัดความเข้มข้นของเมโทมิลโดยใช้เทคนิคทางโครมาโทกราฟี (Farre' *et al.*, 2002), (Villavicencio and Blakenship, 2001) เปรียบเทียบปริมาณเมโทมิลที่ลดลงของแต่ละไอโซเลท

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

บทที่ 4
ผลการวิจัย

1. การเก็บตัวอย่างดิน

ดินตัวอย่างได้มาจากพื้นที่การเกษตรที่ปลูกพืชหลายชนิดได้แก่ ผักกวางตุ้ง ผักบุ้ง ผักกาด และดอกกะหล่ำ พื้นที่ส่วนใหญ่มีการใช้เมโทมิลมานาน 5-30 ปี ยกเว้นตัวอย่างที่ 5 ซึ่งมีการใช้เมโทมิลเพียง 2 เดือน (ตาราง 1) โดยมีความถี่ในการใช้ตลอดทั้งปีต่างกันไป แต่ในระหว่างการเพาะปลูกพืชตั้งแต่การเตรียมแปลงพืชจนถึงกำหนดเก็บเกี่ยวจะมีการฉีดพ่นเมโทมิลทุกๆ 7 วัน

ตาราง 1 รายละเอียดพื้นที่เก็บตัวอย่าง และระยะเวลาที่ใช้เมโทมิล

ตัวอย่างดิน	ระยะเวลาในการใช้เมโทมิล	ความถี่ในการใช้เมโทมิล	พืชที่ปลูก
1	30 ปี	ใช้ตลอดปี ยกเว้นฤดูฝน	ผักบุ้ง ผักกาด ดอกกะหล่ำ มะเขือ
2	6 ปี	ใช้ตลอดปี	ผักกาด ดอกกะหล่ำ
3	10 ปี	ใช้ตลอดปี ยกเว้นฤดูฝน	ผักกาด ดอกกะหล่ำ
4	10 กว่าปี	ใช้ตลอดปี ยกเว้นฤดูฝน	ผักบุ้ง ผักกาด ดอกกะหล่ำ
5	2 เดือน	ใช้ทุกๆ 7 วัน	ดอกกะหล่ำ ผักกวางตุ้ง
6	10 กว่าปี	ใช้ตลอดปี	ผักกาด ดอกกะหล่ำ
7	3 ปี	ใช้ตลอดปี ยกเว้นฤดูฝน	ดอกกะหล่ำ
8	10 กว่าปี	ใช้ตลอดปี ยกเว้นฤดูฝน	ผักกาด ดอกกะหล่ำ
9	8 ปี	ใช้ตลอดปี ยกเว้นฤดูฝน	ผักกาด ดอกกะหล่ำ
10	5 ปี	ใช้ตลอดปี ยกเว้นฤดูฝน	ผักกาด ดอกกะหล่ำ

2. คุณลักษณะของดินและปริมาณจุลินทรีย์ในดิน

ดินตัวอย่างมีค่า pH อยู่ระหว่าง 4.63-7.15 มีดินอยู่ 3 ชนิด ได้แก่ ดินทรายร่วน ดินร่วน และดินร่วนปนทรายแป้ง ซึ่งมีสีทั้งหมด 7 ลักษณะ ได้แก่ Very dusky red 10R 2/2, Brownish black 5YR 2/1, Moderate yellowish brown 10YR 5/4, Dark yellowish brown 10YR 4/2, Light olive grey 5Y

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

5/2, Olive grey 5Y 3/2 และ Light olive brown5Y 5/6 (ตาราง 2) จำนวนแบคทีเรียทั้งหมดจากดินแต่ละตัวอย่างมีจำนวนอยู่ในช่วง 1.14×10^5 - 1.62×10^7 cfu/g (ตาราง 2)

ตาราง 2 คุณลักษณะของดินและปริมาณจุลินทรีย์ในดิน

ตัวอย่างดิน	คุณลักษณะของดิน			Total count (cfu/g)
	pH	สี	ชนิดของดิน	
1	4.63	Very dusky red 10R 2/2	ดินทรายร่วน	1.18×10^5
2	6.47	Brownish black 5YR 2/1	ดินทรายร่วน	1.14×10^5
3	5.83	Moderate yellowish brown 10YR 5/4	ดินทรายร่วน	1.40×10^7
4	5.70	Moderate yellowish brown 10YR 5/4	ดินทรายร่วน	1.62×10^7
5	5.03	Dark yellowish brown 10YR 4/2	ดินทรายร่วน	7.93×10^6
6	7.15	Light olive grey 5Y 5/2	ดินร่วน	2.24×10^6
7	6.76	Dark yellowish brown 10YR 4/2	ดินร่วนปนทรายแป้ง	1.34×10^7
8	6.48	Dark yellowish brown 10YR 4/2	ดินทรายร่วน	1.09×10^7
9	5.89	Olive grey 5Y 3/2	ดินร่วนปนทรายแป้ง	1.58×10^6
10	5.35	Light olive brown5Y 5/6	ดินร่วนปนทรายแป้ง	1.22×10^7

3. การคัดเลือกจุลินทรีย์ในดินที่เจริญบนอาหารที่มีเมโทมิล

จากตัวอย่างดิน 10 ตัวอย่าง สามารถแยกแบคทีเรียที่เจริญบนอาหารที่มีเมโทมิลได้ทั้งหมด 110 ไอโซเลท เป็นกรัมลบท่อนยาว (rod) 19 ไอโซเลท กรัมลบท่อนสั้น (short rod) 56 ไอโซเลท กรัมบวกท่อนยาว (rod) 7 ไอโซเลท และกรัมบวกท่อนสั้น (short rod) 28 ไอโซเลท

4. การคัดเลือกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการใช้เมโทมิลได้ดี

แบคทีเรียทั้งหมด 110 ไอโซเลท สามารถคัดเลือกแบคทีเรียที่เจริญในอาหาร Basal Salt Medium (BSM) ที่มีเมโทมิลความเข้มข้น 4,000, 5,000, 6,000 และ 7,000 มก./ลิตร ได้ดีทุกความเข้มข้นทั้งหมด 8 ไอโซเลท คือ E1, E2, H2, H3, H8, H11, I1 และ I8 ไอโซเลท I8 เป็นแบคทีเรียกรัมบวก ส่วนไอโซเลทที่เหลือจะเป็นแบคทีเรียกรัมลบ และทุกไอโซเลทมีรูปร่างเป็น short rod

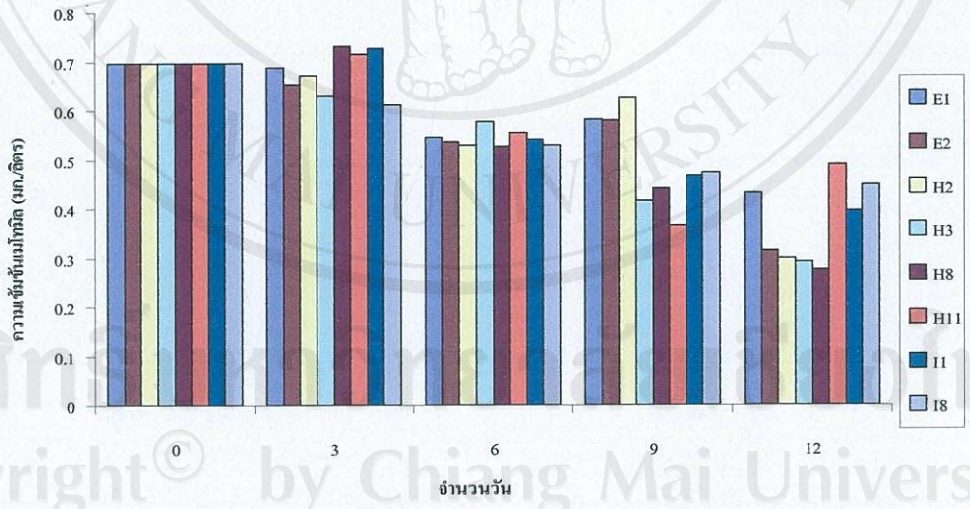
ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

5. การคัดเลือกแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายเมโทมิลในอาหารเหลว

จากการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ทั้ง 8 ไอโซเลท เป็นเวลา 12 วัน พบว่ามี 4 ไอโซเลท ที่สามารถย่อยสลายเมโทมิลได้มากกว่า 50% ได้แก่ ไอโซเลท E2, H2, H3 และ H8 (รูป 2) ซึ่งเมื่อตรวจสอบปริมาณการย่อยสลายเมโทมิลได้ 54.7, 56.9, 58.0 และ 60.4% ตามลำดับ (ตาราง 3)

ตาราง 3 การเปลี่ยนแปลงปริมาณเมโทมิลในอาหารเหลว (มก./ลิตร) และเปอร์เซ็นต์ที่ย่อยสลาย

ไอโซเลท	ปริมาณเมโทมิล (มก./ลิตร) ที่เหลือหลังจากการย่อยสลายในอาหารเหลว					การย่อยสลาย
	0 วัน	3 วัน	6 วัน	9 วัน	12 วัน	(%)
E1	6,957.03	6,867.83	5,440.41	5,822.54	4,319.66	37.9
E2	6,957.03	6,535.00	5,364.64	5,785.83	3,152.76	54.7
H2	6,957.03	6,710.53	5,294.26	6,260.08	2,996.70	56.9
H3	6,957.03	6,293.32	5,776.38	4,150.99	2,921.64	58.0
H8	6,957.03	7,311.73	5,275.61	4,405.29	2,757.08	60.4
H11	6,957.03	7,141.54	5,540.44	3,662.51	4,895.57	29.6
I1	6,957.03	7,272.80	5,401.72	4,677.66	3,943.06	43.3
I8	6,957.03	6,123.39	5,286.07	4,734.53	4,471.92	35.7



รูป 2 กราฟการเปลี่ยนแปลงปริมาณเมโทมิล (มก./ลิตร) ของแต่ละไอโซเลท

จากผลการทดลองจะเห็นว่ามีความเป็นไปที่จะใช้แบคทีเรียในการลดปริมาณเมโทมิลที่ตกค้างในดิน ซึ่งจะทำการศึกษาวิจัยต่อไป

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

บทที่ 5
สรุปและอภิปรายผลการวิจัย

จากผลการวิเคราะห์จำนวนแบคทีเรียทั้งหมดในดินที่เจริญในอาหารที่มีเมโทมิลพบว่าจำนวนแบคทีเรียอยู่ในช่วง 1.14 x 10^5 – 1.62 x 10^7 cfu/g ซึ่งต่ำกว่าจำนวนแบคทีเรียที่พบในดินทั่วไป ที่มีค่าอยู่ระหว่าง 10^8 -10^{10} cfu/g (Alexander,1976) ประเมินได้ว่ามาจากการใช้สารกำจัดศัตรูพืชในปริมาณสูงและเป็นเวลานาน ถึงแม้บางพื้นที่ของการเก็บตัวอย่างจะใช้เมโทมิลเพียง 2 เดือน แต่พื้นที่ทุกตัวอย่างเป็นพื้นที่ทำการเกษตรดังนั้นจึงมีการใช้ยาปราบวัชพืชชนิดอื่นมาก่อน ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของสมศักดิ์ (2528) ที่กล่าวว่าการใช้สารเคมีกำจัดศัตรูพืชและสารปราบศัตรูพืชในปริมาณสูงจะมีผลต่อจำนวนจุลินทรีย์ และสิ่งมีชีวิตในดิน แบคทีเรียที่แยกได้เป็นกลุ่มที่ทนต่อความเข้มข้นของเมโทมิลสูงถึง 7,000 มก./ลิตร ทั้งนี้เนื่องจากแบคทีเรียสามารถใช้เมโทมิลเป็นแหล่งคาร์บอนได้และเป็นแหล่งคาร์บอนเพียงชนิดเดียวในอาหาร (Ambrosoli *et al.*,1996) แบคทีเรียจะเติบโตได้ดี นอกจากนี้แบคทีเรียทั้งหมดแยกมาจากดินที่มีการใช้เมโทมิลอย่างสม่ำเสมอซึ่งสอดคล้องกับงานของ Ambrosoli และคณะ(1996)ที่พบว่า *Pseudomonas fluorescens* เป็นแบคทีเรียที่แยกได้ในพื้นที่สามารถย่อยสลาย carbofuran เป็นสารในกลุ่มคาร์บาเมตได้ดี

แบคทีเรียที่คัดเลือกสามารถเจริญในอาหารที่มีเมโทมิลสูงถึง 7,000 มก./ลิตร เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่มีเมโทมิลเพียง 250 มก./ลิตร ซึ่งการเจริญจะเกิดได้น้อยมากเนื่องจากการที่สารมีความเข้มข้นต่ำเกินไปอาจจะไม่เหนี่ยวนำการเกิด biodegradative activity หรือเกิดการเหนี่ยวนำได้น้อย (Awasthi *et al.*, 2000) และผลดังกล่าวยังสอดคล้องกับรายงานของ Sinton และคณะในปี 1986 ที่ศึกษาการย่อยสลาย 2,4-D ของแบคทีเรียและพบว่าอัตราการย่อยสลาย 2,4-D จะขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของสับสเตรท ดังนั้นเมื่อเพิ่มความเข้มข้นเมโทมิลจึงทำให้แบคทีเรียเจริญได้ดีขึ้น แบคทีเรียที่คัดเลือกได้ 8 ไอโซเลท เป็นแบคทีเรียกรัมลบถึง 7 ไอโซเลท ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Bending *et al.*, (2003) ที่พบว่าแบคทีเรีย *Sphingomonas* sp. สามารถย่อยสลายยาปราบวัชพืช phenylurea ได้ และ *Agrobacterium radiobacter* สามารถย่อยสลาย bromoxynil ซึ่งเป็นยาฆ่าวัชพืชในกลุ่ม arylnitrile ทั้งในสภาวะที่มีการเลี้ยงแบบ batch และ continuous (Muller and Gabriel, 1999) และ*Achromobacter* sp. สามารถใช้ carbofuran เป็นแหล่งไนโตรเจนได้ (Karns *et al.*,1986) อย่างไรก็ตามแบคทีเรียกรัมบวก *Rhodococcus corallinus* สามารถย่อยสลาย s-triazine ซึ่งเป็นสารเคมีกำจัดศัตรูพืชได้ (Arnold *et al.*, 1996) และ *Arthrobacter* sp. (Widehem *et al.*, 2002) สามารถสลายสาร diuron ได้

จากข้อมูลที่ศึกษามาในเบื้องต้นจึงมีความเป็นไปได้สูงที่จะใช้แบคทีเรียลดปริมาณเมโทมิลในดิน และอาจนำมาซึ่งการลดปริมาณสารพิษชนิดอื่นที่ตกค้างในดินได้อีกด้วย

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เอกสารอ้างอิง

เกษมศรี ซับซ้อน. "วิธีวิเคราะห์เนื้อดิน". ใน*ปฐพีวิทยา (Soil Science)*. หน้า 19-23. กรุงเทพฯ: นานาสิ่งพิมพ์, 2541.

ฝ่ายจัดการสารพิษ. "(เม็ทโธมิล (METHOMYL))", เอกสารเผยแพร่ทางวิชาการ, เล่มที่ 14, กองมาตรฐานคุณภาพสิ่งแวดล้อม สำนักงานคณะกรรมการสิ่งแวดล้อมแห่งชาติ, 2533.

มานัส แสนมณีชัย. "การวัด pH ของดินด้วย pH meter". ใน*การวิเคราะห์ดิน พืช และปุ๋ย*. หน้า 35. เชียงใหม่: มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, 2519.

สมศักดิ์ วังใน. "จุลินทรีย์ในดิน". ใน*จุลินทรีย์และกิจกรรมในดิน*. หน้า 163. กรุงเทพฯ: ไทยวัฒนาพานิช, 2528.

Alexander, M. *Introduction to Soil Microbiology*. 2 nd. (Ed.). New York and London: John Wiley and Sons, 1976.

Ambrosoli, R., Negre, M., Gennari, M., (1996) "Indications of the occurrence of enhanced biodegradation of carbofuran in some Italian soils", *Soil Biol. Biochem.*, 28(12), 1749-1752.

American Conference Governmental Industrial Hygienists. 1986. "Documentation of the Threshold Limit Values and Biological Exposure Indices." [Online]. Available http://www.osha.gov/ .(29 March 2003)

Arnold, S. M., Hickey, W. J., Harris, R. F., Talaat, R. E., (1996) "Integrating chemical and biological remediation of atrazine and s-triazine-contaning pesticide wastes", *Environ. Toxicol. Chem.*, 15(8), 1255-1262.

Asano, Y., Watanabe, S., (2001) "Isolation of poly (3-hydroxybutyrate) (PHB)-degrading microorganisms and characterization of PHB-depolymerase from *Arthrobacter* sp. strain W6", *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 65, 1191-1194.

Awasthi, N., Ahuja, R., Kumar, A., (2000) "Factors influencing the degradation of soil-applied endosulfan isomers", *Soil Biol. Biochem.*, 32, 1697-1705.

Bellinaso, M. L., Greer, C. W., Peralba, M. C., Henriques, J. A. P., Gaylarde, C. C., (2003) "Biodegradation of the herbicide trifluralin by bacteria isolated from soil", *FEMS Microbiol. Ecol.*, 43(2), 191-194.

Bending, G.D., Lincoln, S.D., Sørensen, S.R., Morgan, J.A.W., Aamand, J., Walker, A., (2003) "In-field spatial variability in the degradation of the phenyl-urea herbicide isoproturon is

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

the result of interactions between degradative *Sphingomonas* spp. and soil pH", *Appl. Environ. Microbiol..*, (69), 827–834.

Boonchan, S., Britz, M. L., Stanley, G. A., (2000) "Degradation and Mineralization of High-Molecular-Weight Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by Defined Fungal-Bacterial Cocultures", *Appl. Environ. Microbiol.*, 1007-1019.

Cornell University. 2001. "Methomyl (Lannate, Nudrin) EPA pesticide Fact Sheet 4/89." [Online]. Available http://www.pmep.cce.cornel.edu/profiles/insectmite/fenitrothion-methylpara/methomyl/index. html. (4 June 2002).

Don, R. H., Pemberton, J. M., (1981) "Properties of six pesticides degradation plasmids isolated from *Alcaligenes paradoxus* and *Alcaligenes eutrophus*", *J. Bacteriol.*, 145, 681-686.

Farre, M., Fernandez, J., Paez, M., Granada, L., Barba, L., Gutierrez, H. M., Pulgarin, C., Barcelo, D., (2002) "Analysis and toxicity of methomyl and ametryn after biodegradation", *Anal. Bioanal. Chem.*, 373, 704-709.

Friedrich, B., Meyer, M., Schlegal, H. G., (1983) "Transfer and expression of the herbicide-degrading plasmid pJP4 in aerobic autotrophic bacteria", *Arch. Microbiol.*, 134, 92-97.

Gordon, L., Dobson, D. W. A., (2001) " Fluoranthene degradation in *Pseudomonas alcaligenes* PA-10", *Biodegradation*, 12, 393-400.

Gupta, A., Kaushik, C. P., (2000) "Degradation of hexachlorocyclohexane by *Bacillus circulans* and *Bacillus brevis* isolated from soil contaminated with HCH", *Soil Biol. Biochem.*, 32 (11-12), 1803-1805.

Ka, J. O., Holden, W. E., Tiedje, J. M., (1994) "Analysis of competition in soil among 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid-degradation bacteria", *Appl. Environ. Microbiol.*, 1121-1128.

Karns, J. S., Mulbry, W. W., Nelson J. O., Kearney, P. C., (1986) " Metabolism of cabofuran by a pure bacterial culture", *Pestic. Biochem. Physiol.*, 25, 211-217.

Karpouzas, D. G., Walker, A., (2000) "Factors influencing the ability of *Pseudomonas putida* epl to degrade ethoprophos in soil" *Soil Biol. Biochem.*, 32(11-12), 1753-1762.

Kok, F., Arica, Y., Halicigil, C., Alaeddinogly, G. Y., Hasirci, V., (1999) "Biodegradation of aldicarb in a packed-bed reactor by immobilized *Methylosinus*", *Enzyme Microb. Technol.*, 24(5-6), 291-296.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Muller, D., Gabriel, J., (1999) "Bacterial degradation of the herbicide bromoxynil by *Agrobacterium radiobacter* in biofilm", *Folia Microbiol (Praha)*, 44(4), 377-9.

Novak, J., Vlasakova, V.,Tykva, R., Ruml, T., (2003) "Degradation of juvenile hormone analog by soil microbial isolates", *Chemosphere*, 52(1), 151-159.

Roberts, S. J., Walker, A., Cox, L., Welch, S. J., (1998) "Isolation of isoproturon-degrading bacteria from treated soil via three different routs", *J. Appl. Microb.*, 85, 309-316.

Smejkal, C. W., Vallaey, T., Burton, S. K., Lappin-Scott, H. M., (2001) "A rapid method to screen degradation ability in chlorophenoxyalkanoic acid herbicide-degrading bacteria", *Lett. Appl. Microbiol.*, 32, 273-277.

Sorensen, S. R., Ronen, Z., Aamand, J., (2001) "Isolation from agriculture soil and characterization of a *Sphingomonas* sp. able to mineralize the phenylurea herbicide isoproturon", *Appl. Environ. Microbiol.*, 67, 5403-5409.

Sorensen, S. R., Walker, A., Aamand, J., (2003) "Microbial degradation of isoproturon and related phenylurea herbicides in and below agricultural fields", *FEMS Microbiol. Ecol.*, 45(1), 1-11.

Subramanian, G., Sekar, S., Sampoornam, S., (1994) "Biodegradation an utilization of organophosphorus pesticides by cyanobacteria", *Int. Biodeter. Biodegr.*, 33(2), 129-143.

The Rock-Color Chart committee, "Rock-Color Chart", The Geological Society of America, U.S.A., 1995.

Villavicencio, L.E., Blankenship, S. M., (2001) "Ethylene and carbon dioxide concentrations in attached fruits of pepper cultivars during ripening", *Sci Hort.*, 91, 17-24.

World Health Organization. 1983. "Data sheet on pesticide No. 55." [Online]. Available http://www.inchem.org/documents /pds/pds/pest55_e.htm. (4 june 2002).

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ภาคผนวก ก

อาหารเลี้ยงเชื้อและวิธีเตรียม

1. Basal Salt Medium (BSM) (Gordon and Dobson, 2001)

K_2HPO_4	8.71	กรัม
$(NH_4)_2SO_4$	1.98	กรัม
$MgCl_2$	0.095	กรัม
$FeSO_4$	0.006	กรัม
Distilled water	1000	มิลลิลิตร

pH 7.0

ผสมสารต่างๆ นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที ทิ้งไว้ให้เย็นจึงเติมสารละลายเมโทมิลตามความเข้มข้นที่ต้องการ

2. Ringer solution

NaCl	2.25	กรัม
KCl	0.105	กรัม
$CaCl_2.6H_2O$	0.12	กรัม
Na_2HCO_3	0.05	กรัม
Distilled water	1000	มิลลิลิตร

pH 7.0

ผสมสารต่างๆ นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ภาคผนวก ข

วิธีวิเคราะห์เนื้อดิน

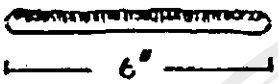
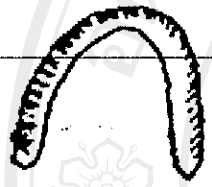
1. ใช้ดินประมาณ 3-5 กรัม หรือ 4 ช้อนโต๊ะ และปั้นเป็นก้อนทรงกลมขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1 นิ้ว
2. หยดน้ำใส่ลงไปในดินจนทำให้ดินเหนียวและสามารถติดนิ้วมือได้
3. ปั้นดินด้วยนิ้วมือตามขั้นตอน และจำแนกประเภทเนื้อดินได้ ดังตาราง 4

ตาราง 4 การปฏิบัติงานปั้นดินเพื่อการวิเคราะห์เนื้อดินเชิงคุณภาพ

รูปดิน	ประเภทของดิน
	ดินทราย (sand) ลักษณะของดินอยู่กันอย่างหลวมๆ อนุภาคของดินแยกออกจากกันเป็นอนุภาคเดี่ยวๆ สามารถคงรูปร่างคล้ายรูปทรงปิรามิด
	ดินทรายร่วน (loamy sand) ลักษณะของดินประกอบด้วยดินแป้งทรายและดินเหนียว ซึ่งดินในกลุ่มนี้มีความสามารถพอเพียงที่จะมีรูปร่างเป็นทรงกลมแตกแยกออกจากกันได้
	ดินร่วนปนทรายแป้ง (silt loam) เป็นลักษณะของเนื้อดินใกล้เคียงกับดินทรายร่วน คือมีอนุภาคของดินทรายแป้ง และดินเหนียวแต่ดินในกลุ่มนี้สามารถปั้นเป็นรูปทรงแท่งสั้นๆ ได้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตาราง 4 (ต่อ) วิธีการปฏิบัติงานปั้นดินเพื่อการวิเคราะห์เนื้อดินเชิงคุณภาพ

รูปดิน	ประเภทของดิน
	ดินร่วน (loam) เนื้อดินกลุ่มนี้ประกอบด้วยเปอร์เซ็นต์ของดินทราย ดินแป้งทราย และดินเหนียวอยู่ในระดับใกล้เคียงกันคือประมาณ 30-40 เปอร์เซ็นต์ และสามารถนำมาปั้นเป็นรูปทรงแท่ง มีความยาวประมาณ 6 นิ้วขึ้นไป และถ้าทำเป็นรูปทรงที่โค้งงอจะแตกหักเสียรูปทรงได้
	ดินร่วนเหนียว (clay loam) เป็นลักษณะของเนื้อดินใกล้เคียงกับดินร่วนแต่มีเปอร์เซ็นต์ของดินเหนียวมากกว่า 40 เปอร์เซ็นต์ จึงทำให้สามารถปั้นเป็นรูปทรงแท่ง และสามารถโค้งงอเป็นรูปเกือกม้าหรือรูปตัวยูได้เป็นอย่างดี
	ดินเหนียว (light clay) มีเปอร์เซ็นต์ของดินเหนียวมากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ จึงสามารถนำดินในกลุ่มนี้มาปั้นเป็นรูปทรงได้ แต่จะมีรอยแตกเกิดขึ้นได้บ้าง
	ดินเหนียวจัด (heavy clay) เนื้อดินในกลุ่มนี้สามารถนำมาปั้นเป็นรูปทรงกลมได้ โดยไม่มีรอยแตกแยกออกจากกัน

(ดัดแปลงจาก เกษมศรี ซับซ้อน, 2541)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ภาคผนวก ค

ตาราง 5 คุณลักษณะทั่วไปของไอโซเลทที่แยกจากดิน

ลำดับ	ไอโซเลท	การติดสีกรัม			รูปร่างเซลล์	ลักษณะโคโลนี
		18 ชม.	24 ชม.	3 วัน		
1	A1	-	-	-	rod	ขาวใส กลม แบน ขอบเรียบ
2	A2	+	+	-	short rod	ครีมใส กลม แบน ขอบเรียบ
3	A3	-	-	-	short rod	ครีมใส กลม แบน ขอบเรียบ
4	A4	-	-	-	rod	ขาวใส กลม แบน ขอบเรียบ
5	A5	-	-	-	short rod	ขาวใส กลม แบน ขอบเรียบ
6	A6	-	-	-	short rod	ครีมใส กลม แบน ขอบเรียบ
7	A7	-	-	-	rod	ขาวใส กลม แบน ขอบเรียบ
8	A8	-	-	-	rod	ขาวใส กลม แบน ขอบเรียบ
9	A9	-	-	-	Short rod	ครีมใส กลม แบน ขอบเรียบ
10	A10	-	-	-	rod	ครีมใส กลม แบน ขอบเรียบ
11	A11	+	-	-	short rod	ครีมใส กลม แบน ขอบเรียบ
12	B1	-	-	-	rod	ขาวใส กลม แบน ขอบเรียบ
13	B2	+	+	+	rod	ครีมใส กลม แบน ขอบเรียบ
14	B3	-	-	-	rod	ครีมใส กลม แบน ขอบเรียบ
15	B4	+	-	-	rod	ครีมใส กลม แบน ขอบเรียบ
16	B5	-	-	-	rod	ขาวใส กลม แบน ขอบเรียบ
17	B6	-	-	-	rod	ครีมใส กลม แบน ขอบเรียบ
18	B7	+	-	-	rod	ครีมใส กลม แบน ขอบเรียบ
19	B8	-	-	-	rod	ครีมใส กลม แบน ขอบเรียบ
20	B9	-	-	-	rod	ครีมใส กลม แบน ขอบเรียบ
21	B10	-	-	-	rod	ขาวใส กลม แบน ขอบเรียบ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ห้องสมุดคณะวิทยาศาสตร์

ตาราง 5 (ต่อ) คุณลักษณะทั่วไปของไอโซเลทที่แยกจากดิน

ลำดับ	ไอโซเลท	การติดสีกรัม			รูปร่างเซลล์	ลักษณะโคโลนี
		18 ชม.	24 ชม.	3 วัน		
22	B11	-	-	-	rod	ขาวใส กลม แบน ขอบเรียบ
23	B12	-	-	-	rod	ขาวใส กลม แบน ขอบเรียบ
24	B13	-	-	-	rod	ขาวใส กลม แบน ขอบเรียบ
25	B14	-	-	-	rod	ครีมใส กลม แบน ขอบเรียบ
26	C1	+	-	-	rod	ขาวใส กลม แบน ขอบเรียบ
27	C2	-	-	-	short rod	ขาวใส กลม แบน ขอบเรียบ
28	C3	-	-	-	short rod	ขาวใส กลม แบน ขอบเรียบ
29	C4	-	-	-	short rod	ขาวใส กลม แบน ขอบเรียบ
30	C5	+	+	+	short rod	ครีมใส กลม แบน ขอบเรียบ
31	C6	-	-	-	short rod	ขาวใส กลม แบน ขอบเรียบ
32	C7	-	-	-	short rod	ขาวใส กลม แบน ขอบเรียบ
33	C8	+	+	+	short rod	ขาวใส กลม แบน ขอบเรียบ
34	C9	-	-	-	short rod	ขาวใส กลม แบน ขอบเรียบ
35	C10	-	-	-	short rod	ขาวใส กลม แบน ขอบเรียบ
36	D1	+	+	+	short rod	ครีมใส กลม แบน ขอบเรียบ
37	D2	+	+	+	short rod	ครีมใส กลม แบน ขอบเรียบ
38	D4	-	-	-	short rod	ขาวใส กลม แบน ขอบเรียบ
39	D5	+	+	+	short rod	ขาวใส กลม แบน ขอบเรียบ
40	D6	+	+	+	short rod	ขาวใส กลม แบน ขอบเรียบ
41	D7	+	+	+	short rod	ขาวใส กลม แบน ขอบเรียบ
42	D8	+	+	+	short rod	ครีมใส กลม แบน ขอบเรียบ
43	D9	+	-	-	short rod	ครีมใส กลม แบน ขอบเรียบ
44	D10	+	+	+	short rod	ขาวใส กลม แบน ขอบเรียบ
45	D11	-	-	-	short rod	ขาวใส กลม แบน ขอบเรียบ
46	E1	-	-	-	short rod	ขาวใส กลม แบน ขอบเรียบ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

วท 18052

ตาราง 5 (ต่อ) คุณลักษณะทั่วไปของไอโซเลทที่แยกจากดิน

ลำดับ	ไอโซเลท	การติดสีกรัม			รูปร่างเซลล์	ลักษณะโคโลนี
		18 ชม.	24 ชม.	3 วัน		
47	E2	-	-	-	short rod	ขาวใส กลม แบน ขอบเรียบ
48	E3	-	-	-	short rod	ขาวใส กลม แบน ขอบเรียบ
49	E4	-	-	-	short rod	ขาวใส กลม แบน ขอบเรียบ
50	E5	-	-	-	short rod	ครีมใส กลม แบน ขอบเรียบ
51	F1	-	-	-	short rod	ครีมใส กลม แบน ขอบเรียบ
52	F2	-	-	-	short rod	ขาวใส กลม แบน ขอบเรียบ
53	F3	-	-	-	short rod	ขาวใส กลม แบน ขอบเรียบ
54	G1	+	+	-	short rod	ขาวใส กลม แบน ขอบเรียบ
55	G2	-	-	-	short rod	ขาวใส กลม แบน ขอบเรียบ
56	G3	+	-	-	short rod	ขาวใส กลม แบน ขอบเรียบ
57	G4	-	-	-	short rod	ขาวใส กลม แบน ขอบเรียบ
58	G5	-	-		short rod	ขาวใส กลม แบน ขอบเรียบ
59	G6	-	-	-	short rod	ขาวใส กลม แบน ขอบเรียบ
60	G7	+	+	-	short rod	ขาวใส กลม แบน ขอบเรียบ
61	G8	+	+	-	short rod	ขาวใส กลม แบน ขอบเรียบ
62	G9	+	+	+	short rod	ขาวใส กลม แบน ขอบเรียบ
63	G10	+	-	-	short rod	ขาวใส กลม แบน ขอบเรียบ
64	G11	+	-	-	short rod	ขาวใส กลม แบน ขอบเรียบ
65	G12	-	-	-	short rod	ครีมใส กลม แบน ขอบเรียบ
66	G13	+	+	+	short rod	ขาวใส กลม แบน ขอบเรียบ
67	G14	-	-	-	short rod	ขาวใส กลม แบน ขอบเรียบ
68	G15	+	+	-	short rod	ครีมใส กลม แบน ขอบเรียบ
69	G16	-	-	-	rod	ครีมใส กลม แบน ขอบเรียบ
70	G17	+	+	+	short rod	ขาวใส กลม แบน ขอบเรียบ
71	H1	-	-	-	short rod	ขาวใส กลม แบน ขอบเรียบ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ตาราง 5 (ต่อ) คุณลักษณะทั่วไปของไอโซเลทที่แยกจากดิน

ลำดับ	ไอโซเลท	การติดสีกรัม			รูปร่างเซลล์	ลักษณะโคโลนี
		18 ชม.	24 ชม.	3 วัน		
72	H2	-	-	-	short rod	ครีมใส กลม แบน ขอบเรียบ
73	H3	-	-	-	short rod	ขาวใส กลม แบน ขอบเรียบ
74	H4	+	+	-	short rod	ครีมใส กลม แบน ขอบเรียบ
75	H5	-	-	-	short rod	ขาวใส กลม นูน ขอบเรียบ
76	H6	-	-	-	short rod	ขาวใส กลม นูน ขอบเรียบ
77	H7	-	-	-	rod	ขาวใส กลม แบน ขอบเรียบ
78	H8	-	-	-	short rod	ครีมใส กลม แบน ขอบเรียบ
79	H10	-	-	-	rod	ครีมใส กลม แบน ขอบเรียบ
80	H11	-	-	-	short rod	ครีมใส กลม แบน ขอบเรียบ
81	H12	-	-	-	short rod	ครีมใส กลม แบน ขอบเรียบ
82	I1	-	-	-	short rod	ครีมใส กลม แบน ขอบเรียบ
83	I2	+	+	-	short rod	ครีมใส กลม แบน ขอบเรียบ
84	I3	-	-	-	short rod	ขาวใส กลม แบน ขอบเรียบ
85	I4	-	-	-	short rod	ขาวใส กลม แบน ขอบเรียบ
86	I5	-	-	-	short rod	ขาวขุ่น กลม แบน ขอบเรียบ
87	I7	-	-	-	short rod	ขาวใส กลม แบน ขอบเรียบ
88	I8	+	+	-	short rod	ขาวใส กลม แบน ขอบเรียบ
89	I9	-	-	-	short rod	ครีมใส กลม แบน ขอบเรียบ
90	I10	-	-	-	short rod	ครีมใส กลม แบน ขอบเรียบ
91	I11	-	-	-	short rod	ครีมใส กลม แบน ขอบเรียบ
92	J1	+	+	-	short rod	ครีมใส กลม แบน ขอบเรียบ
93	J2	-	-	-	short rod	ขาวใส กลม แบน ขอบเรียบ
94	J3	-	-	-	short rod	ขาวใส กลม แบน ขอบเรียบ
95	J4	-	-	-	short rod	ขาวใส กลม แบน ขอบเรียบ
96	J5	+	+	-	short rod	ขาวใส กลม แบน ขอบเรียบ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตาราง 5 (ต่อ) คุณลักษณะทั่วไปของไอโซเลทที่แยกจากดิน

ลำดับ	ไอโซเลท	การติดสีกรัม			รูปร่างเซลล์	ลักษณะโคโลนี
		18 ชม.	24 ชม.	3 วัน		
97	J6	-	-	-	short rod	ขาวใส กลม แบน ขอบเรียบ
98	J7	-	-	-	short rod	ขาวใส กลม แบน ขอบเรียบ
99	J8	-	-	-	short rod	ขาวใส กลม แบน ขอบเรียบ
100	J9	-	-	-	short rod	ขาวใส กลม แบน ขอบเรียบ
101	J10	-	-	-	short rod	ครีมใส กลม แบน ขอบเรียบ
102	J11	+	+	-	short rod	ขาวใส กลม แบน ขอบเรียบ
103	J12	-	-	-	short rod	ขาวใส กลม แบน ขอบเรียบ
104	J13	-	-	-	short rod	ครีมใส กลม แบน ขอบเรียบ
105	J14	-	-	-	short rod	ครีมใส กลม แบน ขอบเรียบ
106	J15	+	+	-	rod	ขาวใส กลม แบน ขอบเรียบ
107	J16	+	+	-	rod	ครีมใส กลม แบน ขอบเรียบ
108	J17	-	-	-	short rod	ครีมใส กลม แบน ขอบเรียบ
109	J18	+	+	+	rod	ครีมใส กลม แบน ขอบเรียบ
110	J19	-	-	-	short rod	ครีมใส กลม แบน ขอบเรียบ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ภาคผนวก ง

ตาราง 6 ความสามารถในการเจริญของแบคทีเรียบนอาหารที่มีเมโทมิลความเข้มข้นต่างกัน

ไอโซเลท	การเจริญของแบคทีเรียที่เมโทมิลความเข้มข้นต่างๆ (มิลลิกรัม/ลิตร)				
	250	4,000	5,000	6,000	7,000
A1	++	++++	++++	+	-
A2	++	+++	++	-	-
A3	++	+++	++	-	-
A4	+	++++	++++	+++	+
A5	++	++++	++++	++++	-
A6	++	+++	++	+	-
A7	+	++++	++++	++++	-
A8	+	++++	++++	+++	+++
A9	++	+	+	-	-
A10	+	-	-	-	-
A11	++	+++	++	-	-
B1	++	+++	+	-	-
B2	++	++++	++++	+++	++++
B3	++	+	-	-	-
B4	++	+++	+++	-	-
B5	++	+++	+++	-	-
B6	++	-	-	-	-
B7	++	++	++	-	-
B8	++	+++	+	-	-
B9	++	+	++	-	-
B10	++	+++	+	-	-

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ตาราง 6 (ต่อ) ความสามารถในการเจริญของแบคทีเรียบนอาหารที่มีเมโทมิลความเข้มข้นต่างกัน

ไอโซเลท	การเจริญของแบคทีเรียที่เมโทมิลความเข้มข้น (มิลลิกรัม/ลิตร)				
	250	4,000	5,000	6,000	7,000
B11	++	+++	+	-	-
B12	++	++	-	-	-
B13	++	+++	-	-	-
B14	+	+	-	-	-
C1	+	++	++	++	++
C2	++	+++++	+++++	++++	++++
C3	+	++	++	-	-
C4	+++	+++++	+++++	++++	++++
C5	++	+++	+++	+++	+++
C6	++	+++++	+++++	+++++	++++
C7	++	+++++	+++++	+++++	++++
C8	++	+++	+++	+++	++
C9	++	+++++	+++++	++++	++++
C10	++	+++++	+++++	++++	++++
D1	++	++++	++++	+++	+++
D2	++	+++	+++	+++	++
D4	++	+++	++	++	+
D5	++	++	++	++	+
D6	++	+++	+++	+++	+
D7	++	+++	+++	+++	+++
D8	++	++++	++++	++++	+++
D9	++	+++	+++	+++	++
D10	+	++++	++++	++++	+++

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตาราง 6 (ต่อ) ความสามารถในการเจริญของแบคทีเรียบนอาหารที่มีเมโทมิลความเข้มข้นต่างกัน

ไอโซเลท	การเจริญของแบคทีเรียที่เมโทมิลความเข้มข้น (มิลลิกรัม/ลิตร)				
	250	4,000	5,000	6,000	7,000
D11	+	+++	+++	+++	+++
E1	++	+++++	+++++	+++++	+++++
E2	++	+++++	+++++	+++++	+++++
E3	++	+++++	+++++	+++++	++++
E4	++	+++++	+++++	++++	++++
E5	++	+++++	+++++	++++	++++
F1	++	+++++	+++	+++++	+++
F2	++	+++	+++	+++	+++
F3	++	+++	+++	+++	+++
G1	++	++++	+++	+++	+++
G2	++	++++	+++	+++	++++
G3	++	++++	+++	+++	+++
G4	++	++	++	+	-
G5	++	++	++	++	++
G6	++	++	++	-	-
G7	-	-	-	-	-
G8	++	+	-	-	-
G9	++	+++	++++	+++	+++
G10	++	+	-	-	-
G11	+	-	-	-	-
G12	++	+++	++	+	-
G13	++	+++	+++	+++	+++
G14	++	++	++	-	-

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตาราง 6 (ต่อ) ความสามารถในการเจริญของแบคทีเรียบนอาหารที่มีเมโทมิลความเข้มข้นต่างกัน

ไอโซเลท	การเจริญของแบคทีเรียที่เมโทมิลความเข้มข้น (มิลลิกรัม/ลิตร)				
	250	4,000	5,000	6,000	7,000
G15	-	-	-	-	-
G16	+	-	-	-	-
G17	++	+++	+++	+++	+++
H1	++	++++	+++++	+++++	+++++
H2	++	+++++	+++++	+++++	+++++
H3	++	+++++	+++++	+++++	+++++
H4	+	+++	+++	+++	+++
H5	++	++++	++++	+++++	+++++
H6	++	++++	-	+++++	+++++
H7	-	+++	-	-	-
H8	++	+++++	+++++	+++++	+++++
H10	+	-	-	-	-
H11	++	+++++	+++++	+++++	+++++
H12	++	+++++	+++++	++++	+++
I1	++	+++++	+++++	+++++	+++++
I2	+	+++	++	+	-
I3	++	+++++	++++	++++	+++++
I4	++	+++++	+++	++++	+++++
I5	+	+++++	+++	++++	++++
I7	+	+++++	+++	++++	++++
I8	++	+++++	+++++	+++++	+++++
I9	++	+++	+++	+++++	+++
I10	++	+++	+++	+++++	+++

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตาราง 6 (ต่อ) ความสามารถในการเจริญของแบคทีเรียบนอาหารที่มีเมโทมิลความเข้มข้นต่างกัน

ไอโซเลท	การเจริญของแบคทีเรียที่เมโทมิลความเข้มข้น (มิลลิกรัม/ลิตร)				
	250	4,000	5,000	6,000	7,000
I11	++	+++	+++	++++	+++
J1	++	+++	+++	++++	+++
J2	++	++	++	++	++
J3	+	++++	++++	+++++	+++
J4	+	++++	++++	+++++	+++
J5	+	++++	+++	+++++	+++
J6	+	-	-	-	-
J7	++	+++	+++++	++++	+++++
J8	++	+++	+++	+++	++++
J9	++	+++	+++	+++	+++++
J10	++	+++	+++	+++	+++++
J11	++	+++	++++	+++	+++++
J12	++	+++	++++	+++	++++
J13	++	+++	+++++	++++	+++++
J14	++	++	+++	+++	+
J15	+	+	-	-	-
J16	+	-	-	-	-
J17	++	+++	++	+++	++
J18	+	-	-	-	-
J19	++	+++	+++	+++	++

หมายเหตุ

\- หมายถึง ไม่สามารถเจริญในอาหารได้

\+ หมายถึง สามารถเจริญในอาหารได้น้อยที่สุด

++ หมายถึง สามารถเจริญในอาหารได้น้อย

+++ หมายถึง สามารถเจริญในอาหารได้ปานกลาง

++++ หมายถึง สามารถเจริญในอาหารได้มาก

+++++ หมายถึง สามารถเจริญในอาหารได้มากที่สุด

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved