

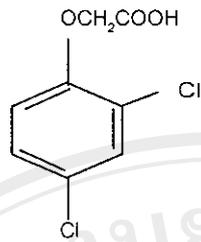
บทที่ 2

ทบทวนเอกสาร

สาร 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid หรือเรียกโดยทั่วไปว่า 2,4-D สังเคราะห์ขึ้นในปี ค.ศ. 1941 ประเทศสหรัฐอเมริกา โดย Zimmerman และ Hitchcock (อ้างโดย สุขุมาศ พนิชศักดิ์ พัฒนา, 2540) สารนี้เป็นที่รู้จักช่วงสงครามโลกครั้งที่ 2 เนื่องจากมีการนำ 2,4-D ไปผสมกับ 2,4,5-Trichlorophenoxyacetic acid (2,4,5-T) หรือที่เรียกว่า Agent Orange สำหรับ Agent White จะประกอบด้วย 2,4-D 80 เปอร์เซ็นต์ กับสารกำจัดวัชพืชอื่นอีก 20 เปอร์เซ็นต์ มาฉีดพ่นป่าเพื่อให้ใบไม้ร่วงเพื่อสะดวกต่อการทำลายฐานที่ตั้งของเวียตกง ต่อมาในปี ค.ศ. 1944 ได้เริ่มผลิตสาร 2,4-D เป็นการค้าโดย Amchem Products Inc. (อ้างโดย ทศพล พรพรหม, 2545)

สาร 2,4-D เป็นสารที่อยู่ในกลุ่ม Phenoxyalkanoic acid herbicides มีสูตรโครงสร้างดังแสดงในรูป 1 สูตรโมเลกุล $C_8H_6Cl_2O_3$ น้ำหนักโมเลกุล 221.04 ความหนาแน่น 1.565 g/ml ที่ 30 องศาเซลเซียส สภาพทางฟิสิกส์เป็นผลึกสีขาวไม่มีกลิ่น จุดหลอมเหลว 135-138 องศาเซลเซียส และจุดเดือด 165 องศาเซลเซียส ละลายได้ในตัวทำละลายหลายชนิด (ตาราง 1) มีชื่อการค้ามากกว่า 100 ชื่อ อาทิ Hedonal, Amor, Larvadex, Neporex, Vetrazine, Trigard, Fluid, 2,4-D butyl ester, Carson P, 2,4-D Goldman 72, Caozin, Konto, Buter 720, Para ester และ Super new 95 ใบทองนัต, เอชโซนัต 95, พาราเอสเทอร์ (อ้างโดยรัชชัช รัตน์ชเลศ, 2540 : ทศพล พรพรหม, 2545 และ พรชัย เหลืองอากาศพงศ์, 2531) สารกลุ่มนี้มีการใช้มานานกว่า 50 ปี ในปัจจุบันนี้ยังมีการใช้กันอย่างกว้างขวางทั่วโลกโดยเฉพาะในสหรัฐอเมริกาและแคนาดา

ประเทศไทยมีรายงานการนำเข้าสารกำจัดศัตรูพืชในปี พ.ศ. 2543 โดยฝ่ายวัตถุดิบพืช กองควบคุมพืชและวัสดุการเกษตร กรมวิชาการเกษตร สาร 2,4-D มีปริมาณการนำเข้ามากเป็นอันดับ 2 ของประเทศรองจากสารกำจัดวัชพืช glyphosate โดยในแต่ละปีมีปริมาณการใช้สารเป็นจำนวนมาก ซึ่งลักษณะที่สำคัญของสาร 2,4-D คือ เป็นสารกำจัดวัชพืชประเภทเลือกทำลาย (selective herbicide) มีฤทธิ์ในการควบคุมวัชพืชใบกว้างใช้ในการปลูกพืชไร่ เช่น ข้าวสาลี ข้าวโพด ข้าวบาร์เลย์ ข้าว และอ้อย นอกจากนี้ยังสามารถใช้ในบริเวณไม้พุ่มและแหล่งน้ำได้ด้วย สารในกลุ่มนี้จะมีคุณสมบัติคล้ายฮอร์โมนพืชที่เรียกว่า hormone type herbicides หรือ growth-regulator herbicides เนื่องจากปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นกับพืชเป็นตำแหน่งเดียวกับ auxin โดย 2,4-D จะเป็นตัวขัดขวางหรือยับยั้งกระบวนการต่างๆในพืชที่สำคัญ เช่น การสังเคราะห์แสง การแบ่งเซลล์ (อ้างโดย รัชชัช รัตน์ชเลศ, 2540 ; ทศพล พรพรหม, 2545 และ พรชัย เหลืองอากาศพงศ์, 2531)



รูป 1 สูตรโครงสร้างของ 2,4-D

ที่มา : อ้างโดยทศพล พรพรหม (2545)

ตาราง 1 ความสามารถในการละลายของ 2,4-D ในตัวทำละลายต่างชนิด

ตัวทำละลาย	การละลาย (% โดยน้ำหนัก)	อุณหภูมิ (°C)
Acetone	85.0	25
Benzene	1.07	28
Carbon disulfide	0.5	29
Carbon tetrachloride	0.1	25
Diesel oil	0.1-0.35	25
Kerosene	0.1-0.35	25
Dioxane	78.5	31
Ethanol 50%	10.3	25
Ethyl alcohol 95%	130.0	25
Ethyl ether	27.0	25
Isopropanol	31.6	31
Methyl isobutyl ketone	31.27	25
Ortho-dichlorobenzene	0.4	25
Toluene	0.067	25
Xylene	0.58	25
Water	0.09	25

ที่มา : อ้างโดย พรชัย เหลืองอากาศ (2531)

ความเป็นพิษของ 2,4-D

สาร 2,4-D สามารถถูกกำจัดออกไปจากร่างกายได้อย่างรวดเร็ว แต่ก็มีรายงานผลของพิษเฉียบพลันต่อมนุษย์ว่า หากถูกผิวหนังทำให้เกิดอาการระคายเคืองเนื่องจากการแทรกซึมเข้าผิวหนังได้ดี การได้รับทางสัมผัสอาจเกี่ยวข้องกับอาการเส้นประสาทส่วนปลาย (peripheral neuropathy nerve damage) โดยอาการของผู้ที่ได้รับสารพิษนี้ คือ เจ็บอกและท้อง อาเจียน วิงเวียนศีรษะ กล้ามเนื้อกระตุกหรือเกร็ง ส่วนพิษเรื้อรังไม่พบอันตรายในสัตว์ทดลองแต่อาจมีปัญหากับ ตับ ไต กล้ามเนื้อ เนื้อเยื่อสมอง มีรายงานว่าเกษตรกรที่ใช้สาร 2,4-D มากกว่า 20 วันต่อปีจะเป็นผู้ที่เสี่ยงต่อการเป็นโรคมะเร็งของต่อมน้ำเหลืองและเสี่ยงต่อการได้รับสารไดออกซิน ที่ปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์ (อ้างโดย ธวัชชัย รัตนชเลศ, 2540 ; รัตนา ลิตะยัง, 2539)

รายงานของ National Institutes of Health ประเทศสหรัฐอเมริกาที่ศึกษาความสัมพันธ์ของการใช้สารพิษของเกษตรกรและการเกิดมะเร็งที่ไม่ใช่มาจากการเกิดของโรคทั่วไปพบว่า เกษตรกรที่ใช้สารกำจัดวัชพืชโดยเฉพาะอย่างยิ่ง 2,4-D จะมีการเกิดโรคมะเร็ง Non-Hodgkin's disease (NHL) สูงกว่าเกษตรกรที่ไม่ใช้สารพิษกลุ่มนี้ โดยการเสี่ยงจากการเกิดโรค NHL ต่อเกษตรกรจะขึ้นอยู่กับความถี่ของการฉีดพ่นพืชไร่ด้วยสารกำจัดวัชพืช เกษตรกรรายที่ใช้สาร 2,4-D ฉีดพ่นพืชไร่ตั้งแต่ 20 ครั้งต่อปีขึ้นไปจะมีอัตราการเสี่ยงต่อโรคนี้ถึง 6 เท่า เมื่อเทียบกับกลุ่มคนที่ไม่ใช้และถ้าเป็นเกษตรกรซึ่งผสมและฉีดสารกำจัดวัชพืชเองจะมีอัตราการเสี่ยงเพิ่มขึ้นเป็น 8 เท่า ต่อการเกิดมะเร็งบริเวณเนื้อเยื่อยึดต่อกระดูก (Soft tissue sarcomas) (อ้างโดย วินัย ปิตินต์, 2541) นอกจากนี้มีรายงานว่าพบ 2,4-D ตกค้างในใบและฝักถั่วเหลืองทำให้ไม่เหมาะต่อการนำไปเลี้ยงสัตว์ (อ้างโดย พงศ์ศรี ไบอดุลย์ และคณะ, 2540)

ด้านสิ่งแวดล้อมพบว่า 2,4-D สามารถเคลื่อนที่ในดินได้แตกต่างกันตามชนิดของดินแต่โอกาสที่จะซึมลงไปปนเปื้อนน้ำใต้ดินถูกจำกัดโดยอัตราการสลายตัวของสารและการที่ถูกพืชดูดซับไว้ อย่างไรก็ตามมีการตรวจพบสารตกค้างของ 2,4-D ในน้ำใต้ดินซึ่งส่วนใหญ่พบว่าเกิดในตำแหน่งที่มีการใช้สาร ได้แก่ ตำแหน่งที่ผสมสารใส่ในเครื่องฉีดพ่นและตำแหน่งที่เทสารทิ้ง จากข้อมูลที่มีอยู่ในปัจจุบันพบว่าสารนี้มีแนวโน้มต่ำที่จะสะสมอยู่ในปลา แต่สูตรส่วนผสมของ 2,4-D บางชนิดเป็นพิษมากต่อปลาหรือสัตว์น้ำที่ไม่มีกระดูกสันหลัง อย่างไรก็ตามสารนี้ไม่เป็นพิษต่อผึ้งสำหรับพืชตอพีชนั้นพบว่า 2,4-D อาจทำความเสียหายแก่พืชที่เพาะปลูกได้ (นิตยา วีระกุล, 2539)

การสลายตัวของ 2,4-D โดยจุลินทรีย์

Kearney and Kaufman (1969) กล่าวว่า การสลายของสารกำจัดวัชพืช phenoxyalkanoic acid ภายหลังจากใส่ลงไปในพื้นที่หรือดินนั้นนับว่ามีความสำคัญมาก เนื่องจากการย่อยสลายโดยเอนไซม์ของพืชจะเป็นปัจจัยสำคัญของการลดความเป็นพิษของสารประกอบเหล่านี้ ส่วนการสลายตัวโดยอาศัยจุลินทรีย์ภายในดินจะมีความสำคัญในแง่การควบคุมความคงทนของสารกำจัดวัชพืชภายในดินและอัตราการสลายตัวของสารกำจัดวัชพืชเปลี่ยนแปลงไปไม่เหมือนกันในแต่ละสภาพของดิน การสลายตัวของสารกำจัดวัชพืชไม่ได้ขึ้นอยู่กับกระบวนการทางเคมีและกายภาพของสารกำจัดวัชพืชเพียงอย่างเดียว ยังขึ้นอยู่กับปัจจัยภายนอกอีกมากมายซึ่งรวมไปถึงสภาพการเปลี่ยนแปลงของ ภูมิอากาศ ความร้อน ความชื้น ชนิดของดิน และปริมาณของฮิวมัสที่มีอยู่ในดิน (อ้างโดย อุดมลักษณ์ อุณจิตต์วารธนะ, 2536)

Audus (1951) ได้แสดงถึงการลดลงของ phenoxyacetic acid เป็นสารตั้งต้นในการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ พบว่าในระยะเริ่มแรกจะมีสารปริมาณเล็กน้อยถูกเคลื่อนย้ายโดยดูดซับด้วย soil colloids แล้วจึงจะเข้าสู่ระยะ lag phase และความยาวของ lag phases จะผันแปรไปตามชนิดของสาร เช่น 2,4-D, MCPA และ 2,4,5-T จะมี lag phase สั้น ยาว และยาวมากตามลำดับ ภายหลังจาก lag phase จะเป็นระยะที่เกิดการลดลงของสารเกิดขึ้นอย่างรวดเร็วมาก ส่วน lag phase นั้นเป็นเวลาที่ต้องการสำหรับการปรับตัวในดินของจุลินทรีย์พวกที่สามารถย่อยสลายสารกำจัดวัชพืชได้ และคาดว่าความสามารถในการย่อยสลายสารกำจัดวัชพืช phenoxyacetic acid จะเกิดขึ้นเมื่อเกิดการกลายพันธุ์หรือเกิดจากการที่มีเอนไซม์ชักนำให้เกิดการปรับปรุงตัวของประชากรของจุลินทรีย์ดินที่ย่อยสลายสาร 2,4-D

Audus (1964) เข้าใจว่า 2,4-D และ MCPA แต่ละอย่างจะ ชักนำให้เกิดเอนไซม์ที่ทำการย่อยสลายเฉพาะอย่างขึ้น ไม่ว่าจะเป็จุลินทรีย์ชนิดเดียวกันหรือต่างชนิดกันก็ตามและเอนไซม์เหล่านั้นสามารถก่อให้เกิดการแตกสลายของโมเลกุลอื่นได้ ซึ่งการแตกสลายจะมีประสิทธิภาพสูงในกรณีที่เกิดมีสารที่สามารถชักนำให้เกิดมีเอนไซม์ขึ้นมา ต่อมา WHO (1989) รายงานว่าการใส่ 2,4-D หรือ phenoxy herbicides อื่นๆลงไปในดินเชื่อว่าเป็นการกระตุ้นให้จุลินทรีย์สามารถย่อยสลายสารนั้นๆได้

จุลินทรีย์สามารถลดความเป็นพิษของ hormone herbicides หลายชนิดและมีแบคทีเรียหลายกลุ่มที่สามารถย่อยสลาย chlorophenoxyacetic acid ภายใต้นดินและในอาหารสังเคราะห์โดยอาจเกิดจากการสลายตัวร่วม (co-metabolism) กล่าวคือจะมีจุลินทรีย์มากกว่าหนึ่งชนิดทำการย่อยสลายสาร เช่น พวกกราย่อยสลายโดยกระบวนการ dealkylation ส่วนพวกแบคทีเรียย่อยสลายโดยกระบวนการ hydrolysis และ dehalogenation (อ้างโดย ทศพล พรพรหม, 2545) ซึ่งจุลินทรีย์จะใช้พลังงาน

จากโมเลกุลของสารเพื่อนำไปใช้ในกระบวนการหายใจและการสร้างโปรตีนแล้วปลดปล่อยก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ออกมา ดังนั้นจึงเท่ากับเป็นการทำให้โมเลกุลของสารกำจัดวัชพืชสูญเสียมวลออกไปจากดินได้

ชนิดของจุลินทรีย์ในดินที่มีความสามารถในการย่อยสลายโมเลกุลของสารเคมีนั้นจะแตกต่างกันไป Kearney and Kaufman (1969) ได้รวบรวมแบคทีเรียและแอคติโนมายซีท ซึ่งสามารถย่อยสลาย 2,4-D ไว้ดังนี้ *Achromobacter* sp., *Arthrobacter* sp., *Corynebacterium* sp., *Flavobacterium aquatile*, *Fl. peregrinum*, *Mycoplana* sp., *Pseudomonas* sp., *Nocardia* sp. และ *Streptomyces viridochromogenes* แต่ในรายงานของสมศักดิ์ วังใน (2528) กล่าวว่าจุลินทรีย์ที่ย่อยสลาย 2,4-D ทั้งหมดเป็นแบคทีเรีย ส่วนราและแอคติโนมายซีทไม่ปรากฏว่ามีความสามารถย่อยสลาย 2,4-D ได้ แบคทีเรียดังกล่าวนี้คือบางสายพันธุ์ของ *Achromobacter* sp., *Arthrobacter* sp., *Corynebacterium* sp., *Flavobacterium* sp. และ *Mycoplana* sp.

Stenson and Walker (1957) แสดงให้เห็นว่า young culture ของ *Achromobacter* sp. และ *Flavobacterium peregrinum* สามารถออกซิไดซ์ 2,4-D และ 4-chloro-2-methylphenoxyacetic acid ได้ดีกว่า old culture *Achromobacter* sp. ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่ย่อยสลาย 2,4-D ที่แยกได้จากดินที่มีประวัติการใช้สารกำจัดวัชพืชจะเจริญได้ดีก็ต่อเมื่อมีสารกระตุ้นการเจริญพวก dicarboxylic acid, bicarbonate, formate, urea และ L-histidine นอกจากนี้ ในช่วงที่อัตราการเจริญสูงสุดอาจต้องการ calcium และ magnesium ในการเจริญ (Bell, 1957) ต่อมาในปี 1958 Steenson and Walker พบว่าสาร MCPA และ 2-chloro-4-methylphenoxyacetic acid เป็นตัวชักนำให้ *Flavobacterium peregrinum* ออกซิไดซ์ 2,4-D ได้ ในขณะที่ Macrae and Alexander (1963) กลับพบว่าจุลินทรีย์ดินพวก *Flavobacterium* sp. ไม่สามารถย่อยสลาย 2,4-D แต่ย่อย 10-(2,4-dichlorophenoxy) decanoic acid และสารพวก Phenoxyalkyl carboxylic acid อื่นๆ ได้ดี

ในรายงานของ WHO (1989) รายงานว่า Le (1984) แยกจุลินทรีย์จากดินที่มีประวัติการใช้สารกำจัดวัชพืชได้ 6 สายพันธุ์ คือ *Flavoobacterium pergrinum*, *Pseudomonas fluorescens*, *Arthrobacter globiformis*, *Brevibacterium* sp., *Streptomyces viridochromogenes* และ *Streptomyces* sp. แต่สายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลาย 2,4-D ได้มากที่สุด คือ *F. pergrinum* โดยคิดเป็น 93.5 เปอร์เซ็นต์ของการย่อยสลายภายในเวลา 80 ชั่วโมง

สมสนธิ เสาแก้ว (2541) พบว่า *Pseudomonas* sp. ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่แยกได้จากดินสามารถย่อยสลายสาร 2,4-D ที่ความเข้มข้น 400 ppm ลงได้ 33.3 เปอร์เซ็นต์ ที่ pH 7 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในเวลา 14 วัน

Ditzelmuller *et al.* (1989) แยกเชื้อ *Xanthobacter* sp. ที่มีความสามารถในการย่อยสลายสาร 2,4-D ได้จากบริเวณผิวดิน มีอัตราการเจริญสูงสุดในอาหารที่มี 2,4-D เป็นแหล่งคาร์บอน ที่ 0.13 ต่อชั่วโมง โดยมีเชื้อเริ่มต้น 0.1 กรัมน้ำหนักแห้งต่อสาร 2,4-D 1 กรัม ในระหว่างการเจริญ ไอออนของคลอไรด์จะถูกปลดปล่อยจาก 2,4-D และจากการตรวจสอบด้วย HPLC ปรากฏว่าไม่มีผลผลิตร่วมของ 2,4-D เลย

แบคทีเรียที่สามารถย่อยสลาย 2,4-D ได้นั้นสามารถแยกได้จากแหล่งธรรมชาติที่ไม่มีประวัติการใช้สาร 2,4-D ซึ่งแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลาย 2,4-D สามารถแยกได้แบคทีเรีย 6 สายพันธุ์ จากแหล่งที่เก็บตัวอย่างทั้งหมด 8 แหล่ง เมื่อวิเคราะห์ 16S rDNA และลักษณะทางกายภาพ ผลแสดงให้เห็นว่า 1 สายพันธุ์ จาก Hawaiian volcanic soil จัดอยู่ในจีนัส *Variovarax* ซึ่งเป็นเชื้อใน class *Proteobacteria* และ อีก 5 สายพันธุ์ ได้มาจาก Hawaiian volcanic soil, Saskatchewan forest soil และ Chilean forest soil เป็นเชื้อในกลุ่ม *Bradyrhizobium* จัดอยู่ใน class *Proteobacteria* ทุกสายพันธุ์เติบโตช้าทั้งใน อาหาร PTYG อาหาร LB และ ในอาหาร 2,4-D ทุกเชื้อมีค่า generation time ประมาณ 16-30 ชั่วโมง ซึ่งช้ากว่าจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายสาร 2,4-D ชนิดอื่นๆที่เคยมีรายงานมา นอกจากนี้เชื้อที่ได้ยังมีสายวิวัฒนาการของยีนที่ทำหน้าที่ในการย่อยสลายสาร 2,4-D และ ยีนที่ทำหน้าที่ควบคุมที่แตกต่างกันด้วย จากผลการทดลองข้างต้นชี้ให้เห็นว่าแบคทีเรียที่ย่อยสลายสาร 2,4-D ที่แยกได้ในสภาพแวดล้อมที่ไม่เคยมีประวัติการใช้สาร 2,4-D เชื้อแบคทีเรียที่ได้มีการเจริญเติบโตที่ช้ามาก (Kamagata *et al.*, 1997)

Rosenberg and Alexander (1980) ทดลองนำดินที่ได้จากเขตร้อนขึ้นมาทดสอบการย่อยสลายสาร 2,4-D ปรากฏว่าปริมาณสาร 2,4-D ลดลงถึง 90 เปอร์เซ็นต์ ภายในเวลา 14 วัน และในการทดลองเดียวกันนี้เมื่อเพิ่มปริมาณสาร 2,4-D ลงไปอีก ปริมาณสาร 2,4-D ลดลง 75 เปอร์เซ็นต์ ภายในเวลาเพียง 3 วัน เท่านั้น ซึ่งแสดงให้เห็นว่าจุลินทรีย์ที่มีอยู่ในดินเขตร้อนขึ้นมีประสิทธิภาพสูงในการย่อยสลายสาร 2,4-D

Valenzuela *et al.* (1997) ได้ทำการทดสอบการย่อยสลายสาร chlorophenols ที่อยู่ในน้ำทิ้งจากโรงงานกระดาษ โดยใช้เชื้อ *Alcaligenes eutrophus* JMP134 (pJP4) ในสถานะที่มีการให้อากาศและไม่มีการให้อากาศ โดยมีการเติม 2,4-D ลงไปในน้ำเสียในความเข้มข้น 400 ppm ซึ่งเชื้อสามารถย่อยสลาย 2,4-D ได้ 45-70 เปอร์เซ็นต์ โดยที่ปริมาณเชื้อเริ่มต้นมีผลต่อการย่อยสลายน้อยมาก เชื้อจะเจริญและมีปริมาณคงที่ที่ 10^3 และ 10^4 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ในน้ำทิ้งที่ไม่เติมอากาศ และที่เติมอากาศตามลำดับ

Haugland *et al.* (1990) พบว่าเมื่อนำพลาสมิด pJP4 จาก *A. eutrophus* JMP134 (2,4-D degrading) มาใส่ให้ *Pseudomonas cepacia* AC1100 (2,4,5-T degrading) พบว่าการย่อยสลายสาร 2,4-D กับ 2,4,5-T มีประสิทธิภาพสูงขึ้น

การศึกษา half-life ของการย่อยสลายสาร 2,4-D โดยจุลินทรีย์ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่สภาวะความเป็นกรดต่างที่ 8.5 - 5 ค่า half-life ของ 2,4-D มีการเปลี่ยนแปลงเพียงเล็กน้อย คือ อยู่ใน ช่วง 5 ถึง 8 วัน แต่ค่า half-life จะเพิ่มมากขึ้นเมื่อค่าความเป็นกรดต่างที่ 4.5 และ 4 โดยมีค่า half-life 21 และ 41 วัน ตามลำดับ (WHO, 1989)

Daane และ Haggbloom (1999) พบว่า *Ralstonia eutropha* (pJP4) ซึ่งมีพลาสมิด pJP4 สามารถพบได้จาก *Eisenia fetida* cocoons ในดิน พลาสมิด pJP4 นี้ประกอบด้วยยีนที่จำเป็นต่อการย่อยสลายสาร 2,4-D และ 2,4-DCP จึงทำการตรวจวัดการย่อยสลายสารพิษ 2,4-D และ 2,4-DCP โดยการเติม cocoons ที่มี *R. eutropha* (pJP4) ดินสภาพธรรมชาติ พบว่าการมี *R. eutropha* (pJP4) ทำให้สาร 2,4-D (100 ppm) หดภายในสัปดาห์แรกของการใส่เชื้อ หากมีการเติม 2,4-D เพิ่มสาร จะถูกย่อยหมดอย่างรวดเร็วภายในเวลา 24 ชั่วโมง จากการวิเคราะห์ปริมาณจุลินทรีย์ในดินพบว่ามี *R. eutropha* (pJP4) 10^4 cfu/g soil ส่วนความเป็นพิษของ 2,4-DCP ต่อการพัฒนาของ earthworm ทดสอบโดยใช้ cocoon โดยที่มีและไม่มี *R. eutropha* (pJP4) จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า cocoons ที่มี *R. eutropha* (pJP4) สามารถที่จะทนสาร 2,4-DCP ที่ความเข้มข้นสูงได้ แสดงให้เห็นว่าการย่อยสาร 2,4-DCP โดย *R. eutropha* (pJP4) ใน cocoons อาจเป็นกลไกสำคัญในการลดความเป็นพิษของสารพิษ

การศึกษาขั้นตอนการย่อยสลายของ 2,4-D เริ่มจากเมื่อ Rogoff and Reid (1956) พบว่า จุลินทรีย์ดินพวก *Corynebacterium* sp. นั้นสามารถสลาย 2,4-D ได้อย่างสมบูรณ์ด้วยการทำลาย ring ของโมเลกุล 2,4-D และในระหว่างการย่อยสลายมีการปลดปล่อย chloride ion ในขณะที่ Kearney and Kaufman (1969) พบว่าการย่อยสลาย 2,4-D เริ่มต้นด้วยการตัดส่วนที่เป็น acetic acid ออกไปก่อนเหลือ chlorophenols และ chlorocatechol หลังจากนั้นเป็นการย่อยสลายตามวิถีทางของการย่อยสลาย phenol การย่อยสลาย 2,4-D นี้จะถือว่าสมบูรณ์ก็ต่อเมื่อมีการตัดเอาส่วนของ side chain, dehalogenation และมีการทำให้ aromatic ring แตกออกแล้วเท่านั้น

Audus (1964) ได้รายงานเกี่ยวกับอิทธิพลของ ring substitution ที่มีต่อการสลายตัวของโมเลกุล phenoxyacetic acid โดยต้องคำนึงถึง การแทนที่คลอรีนในตำแหน่ง para position จะทำให้เกิดการแตกสลายของโมเลกุลได้ง่ายขึ้นในขณะที่การแทนที่คลอรีนในตำแหน่ง ortho position จะทำให้เกิดการแตกสลายของโมเลกุลได้ง่ายกว่าตำแหน่ง meta position แต่ทว่ายากกว่า para position ส่วนการแทนที่คลอรีนในตำแหน่ง meta position นั้น ทำให้โมเลกุลนั้นยากต่อการสลายตัวมาก สำหรับพวก methyl group คงทนต่อการสลายตัวของโมเลกุลได้มากกว่าพวก chloro group ยังมีจำนวน chloro group มากก็ยิ่งเกิดการสลายตัวของโมเลกุลได้ง่ายขึ้น

ในการย่อยสลายสาร 2,4-D เชื่อว่าจะมีสารตัวกลางเกิดขึ้น Audus and Symonds (1955) ได้แยก *Bacterium globiforme* ซึ่งสามารถย่อยสลาย 2,4-D ได้ และมีการสะสมของสารตัวกลางที่เป็นอันตรายต่อพืชอย่างน้อยสองชนิดภายในดิน ต่อมาจากการทดลองของ Bell (1957) ได้กล่าวว่า resting cell ของ *Achromobacter* sp. สามารถ oxidize 2,4-D, MCPA, 2,4,5-T และ 2,4-Dichlorophenol (2,4-DCP) ได้ และผลจากการย่อยสลาย 2,4-D เกิดคลอไรด์ออกมา 94 % ในปีเดียวกัน Steenson and Walker (1957) ได้รายงานว่าสารตัวกลางจากการย่อยสลายสาร 2,4-D ของ *Achromobacter* sp. อาจจะเป็น 2,4-DCP, 4-chlorocatechol และ 6-hydroxy-2,4-dichlorophenoxyacetic acid แต่ในอาหารที่มี 2,4-DCP 1.5 μM / 3 ml เป็นความเข้มข้นที่เป็นพิษต่อการเจริญของ *Achromobacter* sp. นอกจากนี้ยังพบว่าในอาหารที่มี yeast extract ความเข้มข้นสูงจะเกิดการสะสม 2,4-DCP ซึ่งสาร 2,4-DCP ที่ความเข้มข้นต่ำมากกลับมีความเป็นพิษสูงต่อจุลินทรีย์ (Audus, 1964) ส่วน Haugland *et al.* (1990) ทำการศึกษาการเจริญ *Pseudomonas cepacia* AC1100 ในอาหารผสมระหว่าง 2,4-D และ 2,4,5-T เมื่อวิเคราะห์โดย HPLC พบว่ามีการสะสม chlorohydroquinone, 2,4-dichlorophenol และ 2,4,5-trichlorophenol

เชื้อ *Pseudomonas cepacia* DBO1 เป็นอีกสายพันธุ์ที่สามารถใช้ 2,4-D และ succinate ในการเจริญได้โดยการเลี้ยงเชื้อในอาหารทั้งสองอย่างต่อเนื่อง ในระหว่างการเจริญจะเกิดการสะสมของสารตัวกลางเพียงชนิดเดียวคือ 2,4-DCP แต่หากมีการเลี้ยงเชื้อในอาหารที่มี succinate มากกว่า 2,4-D กลับพบว่าอัตราการย่อยสลายสาร 2,4-D มีอัตราลดลงอย่างเห็นได้ชัด (Daugherty and Karel, 1994) แต่ในการย่อยสลายสาร 2,4-D โดย *Aspergillus niger* พบสาร 2,4-dichloro-5-hydroxyphenoxyacetic acid เป็นสารหลักที่เกิดจากการย่อยสลายสาร 2,4-D (Faulkner and Wookcock, 1964) ในรายงานของ Audus (1964) พบว่าเมื่อเพาะเลี้ยง *Corynebacterium* sp. และ *Flavobacterium peregrinum* แต่ละสายพันธุ์ด้วย 2,4-D จะเกิด phenol เป็นสารตัวกลางในการย่อยสลายสาร

Tiedje *et al.* (1969) ศึกษาเอนไซม์ที่ได้จาก *Arthrobacter* sp. ที่เจริญในอาหาร 2,4-D สามารถเปลี่ยน 4-chlorocatechols และ 3,5-dichlorocatechols ได้เป็น cis,cis-3-chloromuconic acid และ cis,cis-2,4-dichloromuconic acid ด้วยกระบวนการ ortho-fission ต่อมา Duxbury *et al.* (1970) ศึกษาเอนไซม์ที่ได้จาก *Arthrobacter* sp. ที่เจริญในอาหาร 2,4-D สามารถเปลี่ยน cis-1-chloro-3-keto-but-1-ene-1,4-dicarboxylic acid (chloromaleylacetic acid) และ cis-3-keto-but-1-ene-1,4-dicarboxylic acid (maleylacetic acid) ได้เป็น succinic acid

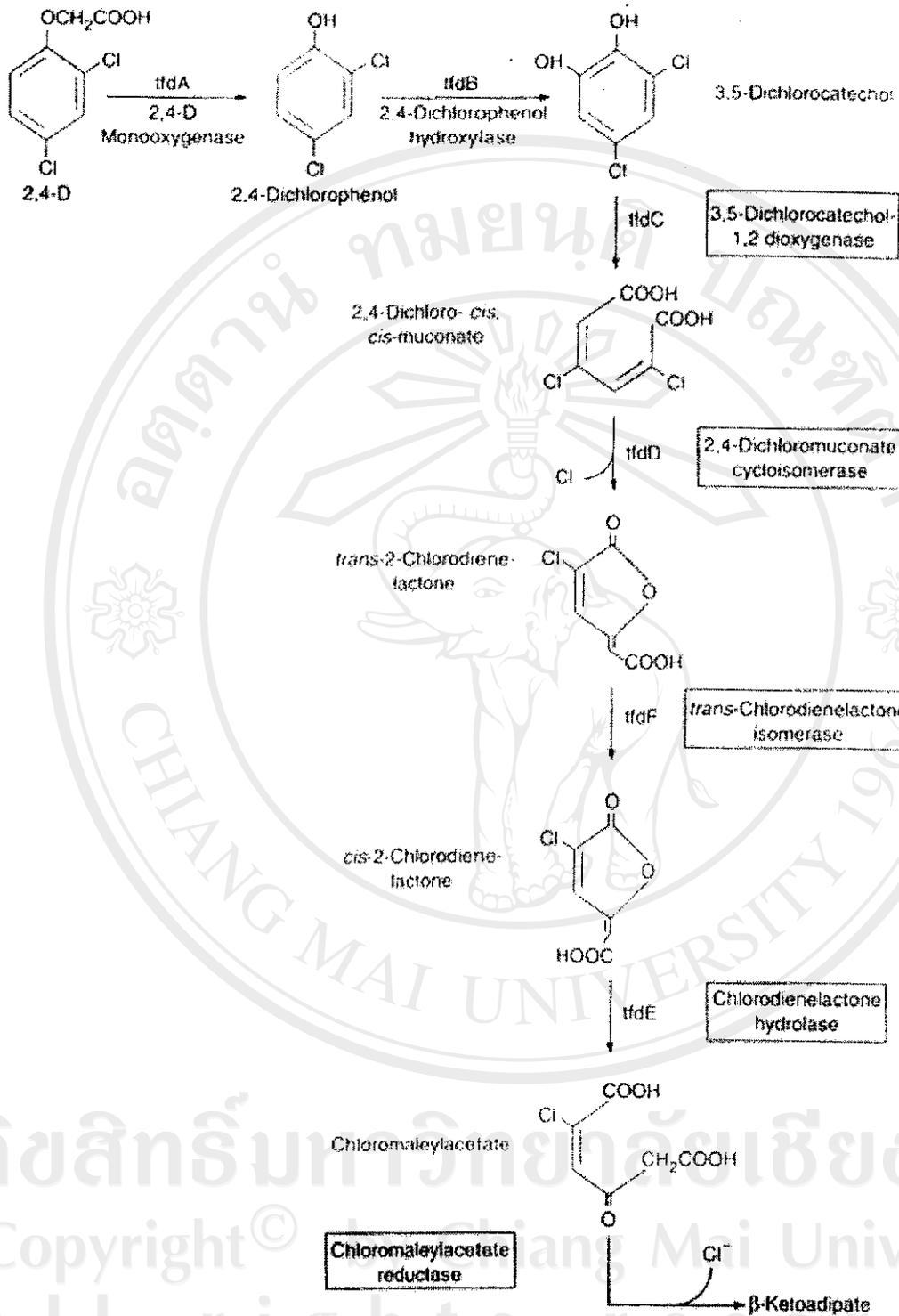
สำหรับกลไกการลดลงของ 2,4-D เป็นผลจากกิจกรรมของจุลินทรีย์สายพันธุ์ต่างๆ โดยมีวิถีทางการย่อยสลาย 2 ทาง คือ ผ่านทาง phenol ดังแสดงในรูป 2 หรือ ผ่านสารตัวกลาง hydroxyphenoxy acetic acid (WHO, 1989 and Kearney and Roberts 1998)

Kearney and Roberts (1998) รายงานว่าการย่อยสลาย 2,4-D ซึ่งพบครั้งแรกใน *Alcaligenes* sp. พบว่าเชื้อนี้สร้างเอนไซม์ monooxygenase ในการย่อยสลาย 2,4-D แต่การเกิดปฏิกิริยาต้องการ NADH หรือ NADPH และออกซิเจนร่วมกันได้ผลผลิตเป็น 2,4-dichlorophenol และ glyoxalate จากนั้น 2,4-dichlorophenol จะถูก hydroxylate ตรงตำแหน่งที่ 5 ของ aromatic ring โดยเอนไซม์ 2,4-dichlorophenol hydroxylase ไปเป็น 3,5 dichlorocatechol ซึ่งจะถูกลดต่อไปผ่าน ortho cleavage pathway จนได้สารประกอบที่สามารถเข้าสู่ TCA cycle ดังแสดงในรูป 3

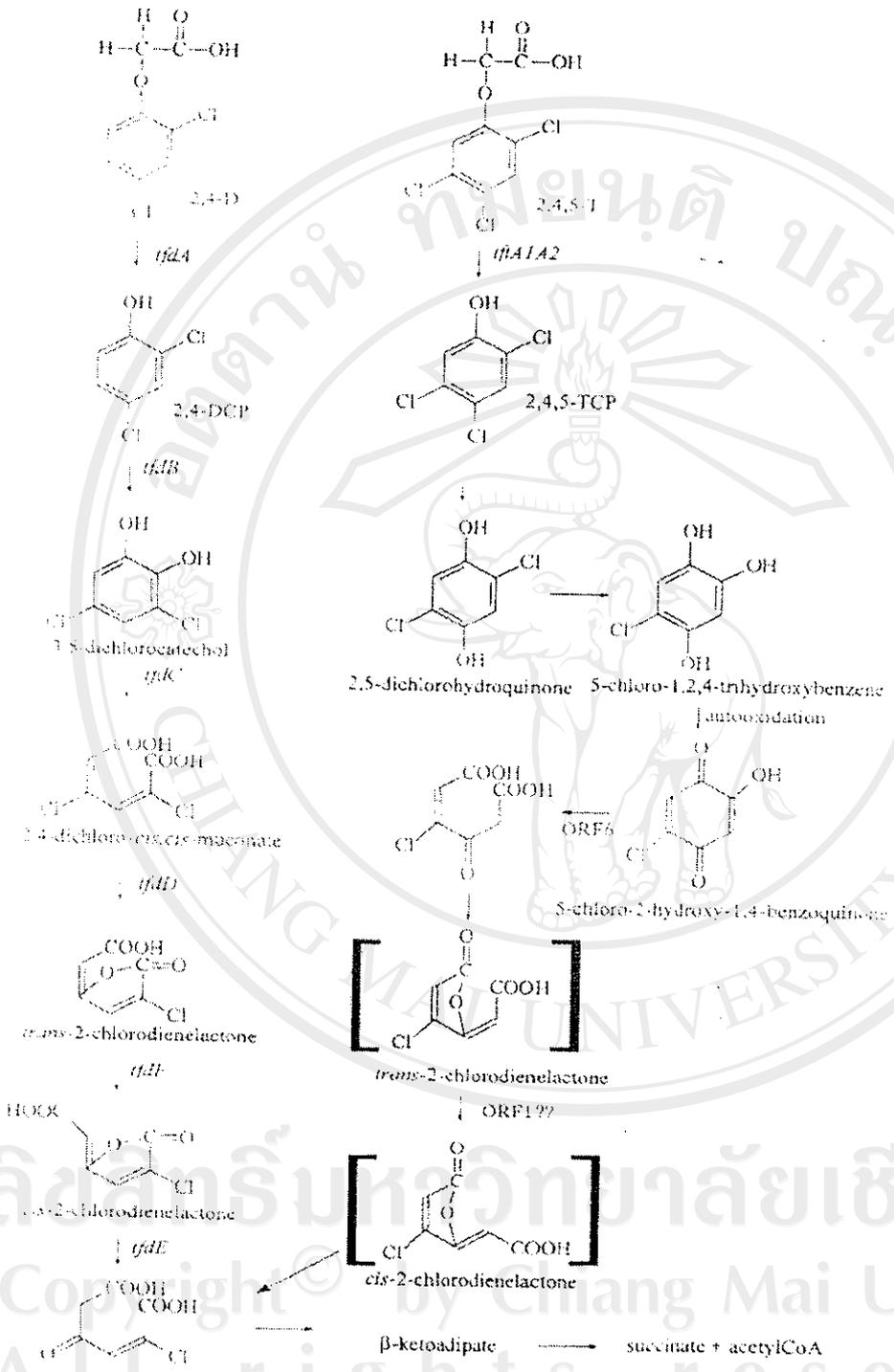
ปัจจัยที่มีผลต่อการย่อยสลายสารกำจัดวัชพืช

ปัจจัยสำคัญต่อการย่อยสลายสารกำจัดวัชพืช อ้างโดยทศพล พรพรหม (2545) ระบบการปลูกพืชมีผลต่อจำนวนจุลินทรีย์และชนิดของจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายสารนั้นๆ ได้ และรายงานของ อุดมลักษณ์ อุ่นจิตต์วรรณะ (2536) กล่าวถึงความถี่ในการใช้สารกำจัดวัชพืชแต่ละครั้งในพื้นที่เดียวกันว่า เมื่อใช้สารกำจัดวัชพืชชนิดเดียวกันเป็นเวลาหลายปีติดต่อกัน พบว่าสารกำจัดวัชพืชจะไม่ถูกลดสลายจะคงสภาพตกค้างอยู่ในดินเนื่องจากจุลินทรีย์ในดินมีปริมาณลดน้อยลงไม่สามารถแบ่งตัวได้จึงไม่มีจุลินทรีย์แทนที่จุลินทรีย์ที่ตายไป ทำให้ปริมาณจุลินทรีย์ลดน้อยลงเรื่อยๆ ทำให้ไม่มีจุลินทรีย์เพียงพอที่จะย่อยสลายสารกำจัดวัชพืชที่ฉีดพ่นลงไป ทำให้ตรวจพบว่าสารกำจัดวัชพืชชนิดเดิมเมื่อใช้ไปในพื้นที่เดิมซ้ำกันเป็นเวลาหลายปีสามารถคงสภาพอยู่ในดินได้นาน

All rights reserved



รูป 2 วิธีการย่อยสลายสาร 2,4-D โดยผ่านทาง phenol
 ที่มา : Kearney and Roberts (1998)



รูป 3 แสดงวิถีทางการย่อยสลายสาร 2,4-D และ 2,4,5-T โดย *Alcaligenes* sp. และ

Burkholderia cepacia AC 1100

ที่มา : Kearney and Roberts (1998)

การแสดงออกของยีน ความสามารถในการย่อยสลายสารของจุลินทรีย์ ขึ้นอยู่กับการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างเอนไซม์ซึ่งใช้ในกระบวนการย่อยสลาย ในบางกรณีที่มีความเข้มข้นของสารต่ำเกินไปทำให้ไม่สามารถกระตุ้นการแสดงออกของยีนได้ จึงต้องมีการเติมตัวเหนี่ยวนำการแสดงออกของยีนลงไปเพื่อให้ยีนที่เกี่ยวข้องถูกแปลรหัสเป็นเอนไซม์ที่ใช้ในการย่อยสลายสารได้อย่างโดยครประกาศา เครือวัลย์ (2543)

Parales and Harwood (2002) กล่าวว่า ความสามารถของแบคทีเรียที่เคลื่อนที่ได้ในการหาหรือตอบสนองต่อสารเคมีอย่างเฉพาะเจาะจงในสิ่งแวดล้อมเป็นการเพิ่มโอกาสในการใช้แหล่งคาร์บอน ในโตรเจน พลังงาน ด้วยเหตุนี้การเคลื่อนที่ของแบคทีเรียจึงมีบทบาทสำคัญในกระบวนการย่อยสลายสารพิษในสิ่งแวดล้อม

ปัจจัยที่มีผลต่อการย่อยสลายสาร 2,4-D

โดยทั่วไปปริมาณ 2,4-D ในดินเหนียวจะลดลงอย่างรวดเร็ว แต่หลังจาก 14 วัน อัตราการลดลงของ 2,4-D ในดินเหนียวกลับลดได้น้อยลงขณะที่อัตราการลดลงของ 2,4-D ของดินทรายภายหลังจาก 14 วัน ลดลงมาก นอกจากนี้จำนวนจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายสาร 2,4-D ระหว่างดินเหนียวกับดินทราย ในระยะแรกจำนวนจุลินทรีย์ในดินเหนียวมากกว่าในดินทรายแต่จำนวนจุลินทรีย์ในดินทรายสามารถเพิ่มขึ้นได้อย่างรวดเร็วเมื่อเพิ่มปริมาณสารกำจัดวัชพืชลงไป (Li-Ise Ou, 1984)

การย่อยสลายสาร 2,4-D ในดินจะถูกย่อยสลายได้ง่ายโดยจุลินทรีย์ ก็ต่อเมื่อสภาวะของดินซึ่งได้แก่ อุณหภูมิ ความชื้นของดินอยู่ในสภาวะที่เหมาะสมต่อการย่อยสลายของจุลินทรีย์และการเพิ่มสารอินทรีย์จะเป็นการกระตุ้นการย่อยสลายสาร 2,4-D ของจุลินทรีย์ด้วย (Audus, 1964)

DeRose and Newman (1947) ได้ศึกษาพบว่าดินในสภาพร่อนและความชื้นสูงเป็นการเร่งอัตราการลดลงของ 2,4-D, 2,4,5-T, และ 2-methyl-4-chlorophenoxyacetic acid แต่การย่อยสลายสาร 2,4-D ในดินสภาวะที่เป็นกรดเกิดขึ้นได้ช้าโดยปริมาณสาร 2,4-D ในดินจะลดลงไป 50 เปอร์เซ็นต์ ก็ต่อเมื่อเวลาผ่านไป 6 สัปดาห์ และปริมาณสาร 2,4-D จะลดลงเหลือ 7 เปอร์เซ็นต์ ต้องใช้เวลา 24 สัปดาห์ (Sattar and Paasivita, 1980)

Nesbitt and Wastson (1980) รายงานว่าในน้ำจำนวนจุลินทรีย์ไม่ใช่ปัจจัยสำคัญในการย่อยสลายสาร 2,4-D แต่การย่อยสลายสาร 2,4-D จะเพิ่มมากขึ้นเมื่อใส่ในโตรเจนกับฟอสฟอรัสและพบว่าช่วงอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการย่อยสลายอยู่ในช่วงอุณหภูมิ 20-25 องศาเซลเซียส

Tyler and Finn (1974) ได้ข้อสรุปว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการย่อยสลายสาร 2,4-D และ 2,4-DCP ของ *Pseudomonas* sp. NCIB 9340 คืออุณหภูมิที่ 25 องศาเซลเซียส ถ้าอุณหภูมิ

เพิ่มขึ้นจาก 25 องศาเซลเซียส จะไปลดการเจริญของ *Pseudomonas* sp. NCIB 9340 อย่างรวดเร็ว ในการย่อยสลาย 2,4-D และ 2,4-DCP แต่การเพิ่มอุณหภูมิจะไม่มีอิทธิพลต่อการย่อยสลายสาร กลูโคส และ succinate ของ *Pseudomonas* sp. NCIB 9340

ในส่วนของสภาวะความเป็นกรด-ด่าง Newman and Dowing (1958) พบว่าจุลินทรีย์ที่ย่อยสลายสาร phenoxyacetic acid จะเจริญได้ที่ความเป็นกรด-ด่างมากกว่า 6.4 ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Tyler and Finn (1974) ที่พบว่าจุลินทรีย์สามารถสลาย 2,4-D ได้ที่ความเป็นกรด-ด่าง 7.1-7.8 และสลาย 2,4-DCP ได้ที่ความเป็นกรด-ด่าง 6.2-6.9 ในขณะที่ Sinton *et al.* (1986) พบว่าการย่อยสลายสาร 2,4-D โดยใช้เชื้อแบบเชื้อผสมค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมต่อการย่อยสลายสาร 2,4-D มีค่าประมาณ 5.5 นอกจากนี้ในระหว่างกระบวนการย่อยสลาย 2,4-D โดยเชื้อผสมในการทดลองแบบ batch culture จะทำให้เกิดกรดขึ้นจึงต้องมีการควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่างให้คงที่ (Kelly *et al.*, 1989)

การย่อยสลาย 2,4-D และสารประกอบที่เกี่ยวข้องโดยทั่วไปจะเป็นกระบวนการให้อากาศ และคาดว่า การให้ออกซิเจนเป็นปัจจัยสำคัญต่อการย่อยสลาย 2,4-D พบว่าอัตราการย่อยสลาย 2,4-D เพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มออกซิเจน ส่วนการย่อยสลายสาร 2,4-D ด้วยจำนวนเซลล์ตั้งต้นที่ต่างกันจะเป็นผลให้อัตราการย่อยสลายแตกต่างกัน โดยจำนวนเซลล์ตั้งต้นที่มากกว่าสามารถย่อยสลายสารได้ดีกว่า จำนวนเซลล์ตั้งต้นที่น้อยและการย่อยสลายสาร 2,4-D ด้วยจำนวนเซลล์ตั้งต้นที่เท่ากันแต่ปริมาณสารตั้งต้นต่างกันจะเป็นผลให้การย่อยสลายสาร 2,4-D ที่มีปริมาณสารตั้งต้นมากมีอัตราการย่อยสลายสูงกว่าปริมาณสารตั้งต้นน้อย (Sinton *et al.*, 1986)

อิทธิพลของ 2,4-D ต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์

Newman and Dowing (1958) ได้ศึกษาถึงอิทธิพลของสารกำจัดวัชพืช 2,4-D ต่อจุลินทรีย์ดิน ปรากฏว่าถ้าใช้ในอัตรา 0.5 ถึง 12 ปอนด์ต่อเอเคอร์ (0.25-6 ppm) จะไม่เป็นอันตรายต่อจุลินทรีย์ดิน ในขณะที่แบคทีเรียพวก *Rhizobium* sp. จะเป็นพวกที่ง่ายต่อการถูกทำลาย โดยความเข้มข้นของ 2,4-D 2 ppm ในขณะที่เชื้อราต้องใช้ถึง 40,000 ppm ดังนั้นถ้าใช้สารกำจัดวัชพืช 2,4-D ในอัตราค่าประมาณ 0.009 ปอนด์ต่อเอเคอร์ (0.0045 ppm) ก็สามารถยับยั้งการเกิดปมของพืชตระกูลถั่วได้ ส่วน nitrifying bacteria อื่นๆ และ *Azotobacter* sp. จะไม่เป็นอันตรายหรือถูกยับยั้งการเจริญเมื่อใช้สารกำจัดวัชพืชชนิดต่างๆ ในอัตรา 0.5-12 ปอนด์ต่อเอเคอร์ (0.25-6.0 ppm) และพบว่า adapted cell ของ *Azotobacter* sp. สามารถเจริญได้ใน 5,000 ppm ของ 2,4-D โดยสรุปแล้วแบคทีเรียพวกแกรมบวกนั้นการเจริญจะถูกยับยั้งในระดับความเข้มข้นต่ำกว่าพวกแบคทีเรียแกรมลบและแบคทีเรียที่ต้องการออกซิเจนในการเจริญจะถูกยับยั้งในระดับความเข้มข้น

ต่ำกว่าแบคทีเรียที่สามารถเจริญได้ทั้งที่มีและไม่มีออกซิเจน ส่วนพวกเชื้อราจะคงทนต่อความเป็นพิษได้ดีกว่าพวกแบคทีเรีย

สาร 2,4-D ที่ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ และ 2 เปอร์เซ็นต์ มีผลยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียกลุ่มแบคทีเรียที่ต้องการออกซิเจนแต่จะไม่มีผลต่อแบคทีเรียที่สามารถเจริญได้ทั้งที่มีและไม่มีออกซิเจนและแบคทีเรียแกรมบวกจะมีความไวต่อสาร 2,4-D และ 2,4,5-T มากกว่าแบคทีเรียแกรมลบ นอกจากนี้แบคทีเรียที่สร้างสปอร์ได้จะมีความไวต่อสาร 2,4-D มากกว่าแบคทีเรียที่ไม่สร้างสปอร์ สำหรับ *Actinomyces* sp. มีความไวต่อสาร phenoxy herbicide ซึ่งมีการทดลองระบุว่าไม่มีการเจริญของ *Actinomyces* sp. ที่ความเข้มข้นของสาร 2,4-D 400 ppm จากการทดลองทั้งหมด 40 การทดสอบ และการเจริญของ *Rhizobium leguminosae* สามารถถูกยับยั้งด้วยสาร 2,4-D ที่ความเข้มข้น 400 ppm แต่ *Rhizobium* สายพันธุ์อื่นๆ จะถูกยับยั้งด้วยสาร 2,4-D ที่ความเข้มข้น 8,000 ppm (Audus, 1964)

Trevors and Starodub (1983) รายงานว่าปริมาณ 2,4-D ที่ความเข้มข้น 0, 10, 25, 50, 75, 100 หรือ 200 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ไม่มีผลต่อกระบวนการหายใจของจุลินทรีย์ในดินทราย แต่ในดินเหนียวสาร 2,4-D มีผลยับยั้งกระบวนการถ่ายทอดอิเล็กตรอนของจุลินทรีย์ดิน

WHO (1989) รายงานว่าสาร 2,4-D ที่ความเข้มข้น 66, 44 และ 22 มิลลิกรัมต่อลิตร ไม่มีผลต่อการเจริญของ *Nocardia* sp., *Pseudomonas fluorescens* และ *Bacillus subtilis*