

## บทที่ 4

### ผลการทดลองและการวิจารณ์

#### 4.1 การเพิ่มจำนวนเชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถโตบนโทลูอินได้

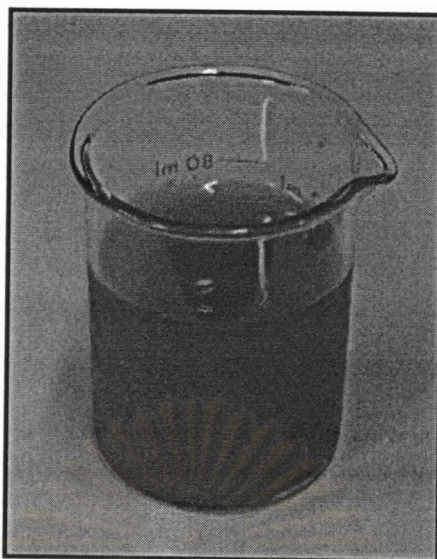
การดำเนินการทดลองในงานวิจัยครั้งนี้จะจงใจใช้เชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถโตบนโทลูอิน จึงต้องเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ด้วยโทลูอินเสียก่อน แล้วจึงนำเชื้อจุลินทรีย์ดังกล่าวมาใช้ในขั้นตอนต่อไป

ในการเริ่มต้นทำการทดลอง ได้ทำการเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ให้คุ้นเคยกับการใช้โทลูอินเป็นซับสเตรต วิธีการเลี้ยงได้กล่าวไว้ในขั้นตอนที่ 3.2.1 โดยใช้หัวเชื้อจุลินทรีย์ (Seed) จากโรงบำบัดน้ำเสียสี่พระยา ตำแหน่งที่เก็บเชื้อจุลินทรีย์มาใช้คือน้ำในถังเติมอากาศ เลี้ยงจนกระทั่งวัดค่า Optical Density ( $OD_{550}$ ) ได้เท่ากับ 1 ซึ่งเป็นค่าที่แสดงถึงความเข้มข้นของเชื้อจุลินทรีย์

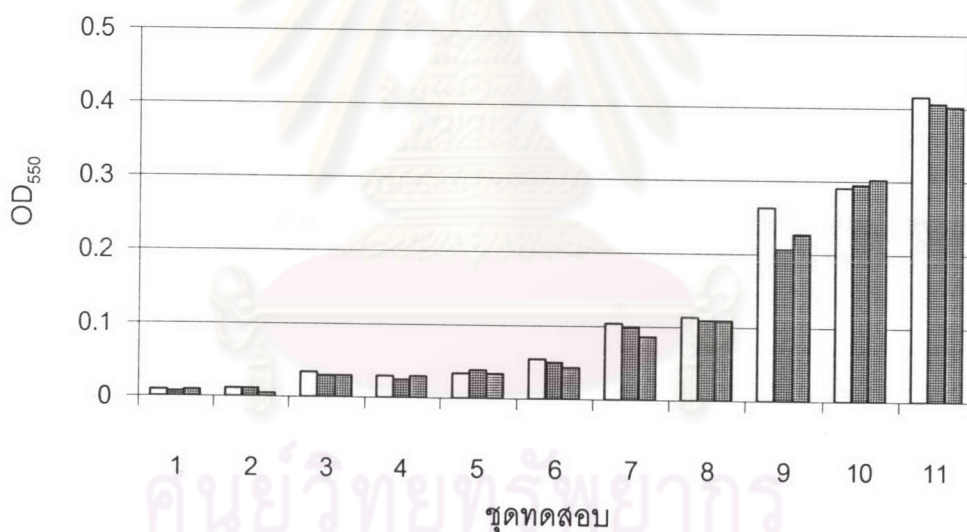
ในช่วง 2 เดือนแรกของการเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ไม่พบการเปลี่ยนแปลงของความขุ่น คาดว่าเกิดจากการปรับตัวให้เกิดความคุ้นเคยกับการใช้โทลูอินเป็นซับสเตรต เพราะเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้เป็นเชื้อที่นำมาจากระบบบำบัดน้ำเสียชุมชน

เมื่อเข้าสู่เดือนที่ 3 เริ่มสังเกตเห็นการเจริญเติบโตบนโทลูอิน โดยสังเกตได้จากสีของน้ำที่เลี้ยงเปลี่ยนสีจากใสเป็นสีน้ำตาลส้มขุ่นดังรูปที่ 4.1 จากนั้นจึงทำการเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ต่อไปจนกระทั่งวัดค่า Optical Density ( $OD_{550}$ ) ได้เท่ากับ 1 จึงนำเชื้อจุลินทรีย์มาทดสอบการเจริญเติบโตตามขั้นตอนที่ 3.2.2 เพื่อให้แน่ใจว่า เชื้อจุลินทรีย์ที่เลี้ยงได้นั้นเป็นเชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถโตบน โทลูอินได้

ชุดทดสอบที่ใช้มีทั้งหมด 11 ชุดดังนี้ ชุดทดสอบที่ 1 ถึง 4 เป็นชุดควบคุม โดยที่ชุดทดสอบที่ 1 เป็น Media control ซึ่งไม่มีทั้งเซลล์จุลินทรีย์และโทลูอิน ชุดทดสอบที่ 2 เป็น Substrate control มีโทลูอินแต่ไม่มีเซลล์จุลินทรีย์ ชุดทดสอบที่ 3 เป็น Nonbio control เป็นชุดที่มีทั้งโทลูอินและเซลล์จุลินทรีย์แต่ทำการฆ่าเซลล์จุลินทรีย์ด้วยเมอคิวริกคลอไรด์ ชุดทดสอบที่ 4 เป็น Seed control คือเป็นชุดที่มีเซลล์จุลินทรีย์แต่ไม่มีโทลูอิน ส่วนชุดทดสอบที่ 5 ถึง 11 เป็นชุดทดสอบที่บรรจุโทลูอินความเข้มข้นแตกต่างกันดังนี้ 10 50 100 200 300 400 และ 500 มิลลิกรัมต่อลิตรตามลำดับ



รูปที่ 4.1 เชื้อจุลินทรีย์ที่โตบนโทลูอินได้



รูปที่ 4.2 ค่า OD<sub>550</sub> ของชุดทดสอบหลังจากทำการทดลอง 3 วัน

ผลการทดสอบพบว่า เมื่อเริ่มทำการทดสอบค่า OD<sub>550</sub> ของชุดทดสอบทั้งหมดมีค่าใกล้เคียงกันเฉลี่ยประมาณ  $0.010 \pm 0.004$  หลังจากทำการทดลอง 3 วัน พบว่าค่า OD<sub>550</sub> ของน้ำในชุดทดสอบที่บรรจุโทลูอินความเข้มข้นแตกต่างกันมีการเจริญเติบโตแตกต่างกันตามไปด้วยดังรูปที่ 4.2 โดยน้ำในชุดทดสอบที่ได้รับโทลูอินเป็นขั้วสเตรตที่ความเข้มข้นสูงมีค่า OD<sub>550</sub> สูงกว่าเชื้อ จุลินทรีย์ที่ได้รับโทลูอินเป็นขั้วสเตรตที่ความเข้มข้นต่ำ ในขณะที่ชุดทดสอบที่ 1 – 4 ซึ่งเป็น

ขวดควบคุม วัดค่า OD<sub>550</sub> ได้ใกล้เคียงกับค่าเริ่มต้น เนื่องจากขวดทดสอบทั้งสี่ขาดองค์ประกอบที่ทำให้เชื้อจุลินทรีย์เจริญเติบโตได้ ขวดทดสอบทั้งสี่จึงไม่มีการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์เกิดขึ้น ซึ่งผลที่ได้จากการทดสอบสามารถสรุปได้ว่าเชื้อจุลินทรีย์ที่เลี้ยงได้นั้นสามารถโตบนโทลูอินได้

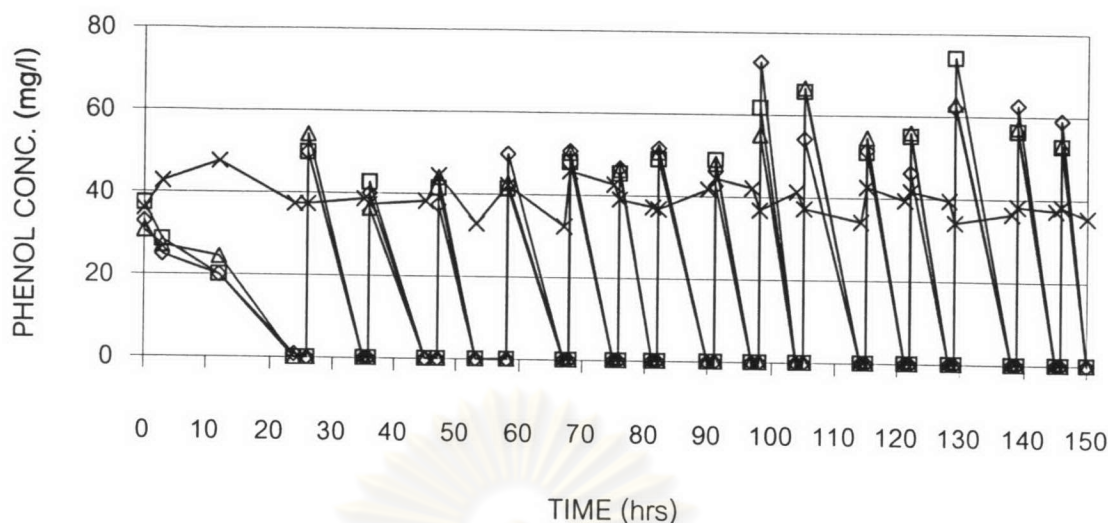
## 4.2 การศึกษาค่า Growth Yield (Y)

งานวิจัยนี้ในขั้นตอนนี้เป็นการศึกษาค่าสัมประสิทธิ์การเจริญเติบโต (Growth Yield : Y) ของซบสเตรต 3 ชนิด ได้แก่ โทลูอิน ฟีนอลและเบนซิลแอลกอฮอล์ โดยแบ่งการทดลองออกเป็น 3 ชุด รายละเอียดแสดงไว้ดังตารางที่ 3.2 ผลการทดลองที่ได้จะรายงานผลและวิเคราะห์ผลเฉพาะชุดการทดลองที่ใช้ฟีนอลเป็นซบสเตรต เนื่องจากการทดลองของชุดการทดลองที่ใช้โทลูอินและเบนซิลแอลกอฮอล์เป็นซบสเตรตนั้น เป็นการศึกษาพร้อมกับนายภฤษฎี จองโชติศิริกุล จึงขอกล่าวถึงเฉพาะค่า Y ที่ผ่านการวิเคราะห์ข้อมูลแล้ว

### 4.2.1 การศึกษาค่า Growth Yield (Y) ของจุลินทรีย์ที่ใช้ฟีนอลเป็นซบสเตรต

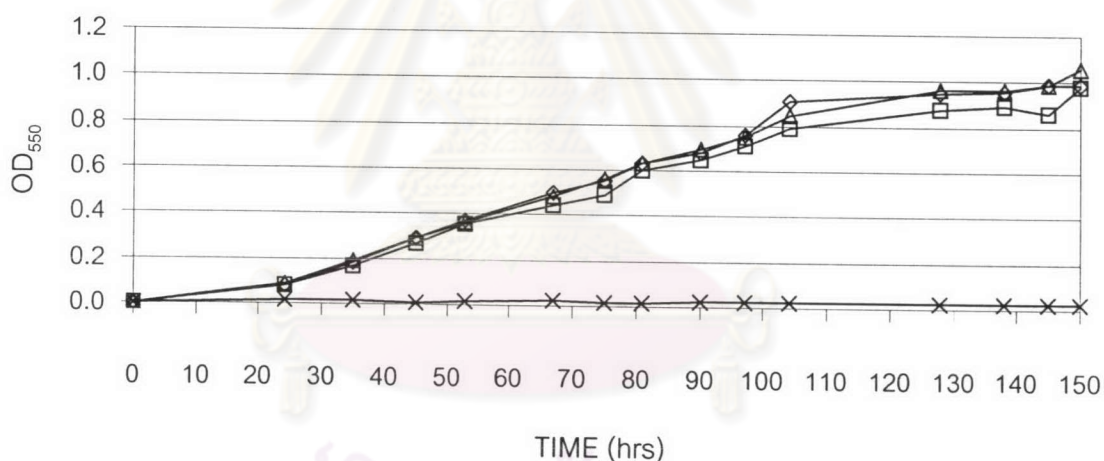
การทดลองชุดนี้ประกอบด้วยขวดซีรัม 4 ขวด โดยมีขวดซีรัม 3 ขวดสำหรับการทดลอง 3 ซ้ำ และมีขวดซีรัม 1 ขวดที่ฆ่าเซลล์จุลินทรีย์ด้วยเมอคิวริกคลอไรด์ (HgCl<sub>2</sub>) เพื่อเป็นชุดควบคุม (Control) ใช้ฟีนอลเป็นซบสเตรตที่ความเข้มข้นเริ่มต้นประมาณ 50 มิลลิกรัมต่อลิตร และความเข้มข้นเริ่มต้นของเซลล์จุลินทรีย์ประมาณ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร นำขวดซีรัมทั้งหมดใส่ลงในเครื่องเขย่าตั้งความเร็วรอบที่ 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 25 องศาเซลเซียส ตลอดระยะเวลาการทดลอง ทำการเติมฟีนอลและเก็บตัวอย่างเรื่อย ๆ จนกระทั่งค่าวัดค่า OD<sub>550</sub> ได้เท่ากับ 1 จึงหยุดการทดลอง

ผลการศึกษาพบว่าเกิดการเปลี่ยนแปลงในความเข้มข้นของฟีนอลของชุดการทดลองทั้ง 3 ซ้ำ การเจริญเติบโตของจุลินทรีย์จะมีการแปรเปลี่ยนไปตามปริมาณของซบสเตรตที่ได้รับ ดังรูปที่ 4.3 และ 4.4 ซึ่งมีความสัมพันธ์กัน รายละเอียดผลการทดลองแสดงในตารางที่ ข-1 และ ข-2 ในภาคผนวก ข.



รูปที่ 4.3 ความเข้มข้นของฟีนอลที่เปลี่ยนแปลงไปทีละชั่วโมง

(□ , ขวดที่ 1 ; ◇, ขวดที่ 2 ; △ , ขวดที่ 3 ; x , ขวดควบคุม)



รูปที่ 4.4 ค่า OD<sub>550</sub> ที่เพิ่มขึ้นทีละชั่วโมง

(□ , ขวดที่ 1 ; ◇, ขวดที่ 2 ; △ , ขวดที่ 3 ; x , ขวดควบคุม)

ในครั้งแรกของการเติมฟีนอลจุลินทรีย์ใช้เวลาในการย่อยสลายฟีนอลนานประมาณ 24 ชั่วโมง เนื่องจากจุลินทรีย์ที่นำมาใช้เป็นจุลินทรีย์ที่โตบนโกลูอิน จึงต้องมีการปรับตัวให้เกิดความคุ้นเคยกับซับสเตรตชนิดใหม่ เมื่อเติมฟีนอลในครั้งต่อไปจุลินทรีย์ใช้เวลาในการย่อยสลายฟีนอลน้อยกว่า 24 ชั่วโมงตลอดและมีแนวโน้มเร็วขึ้นเรื่อยๆ ค่า OD<sub>550</sub> ที่วัดได้ยังคงมีค่าเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ แสดงให้เห็นถึงการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ จนกระทั่งค่า OD<sub>550</sub> มีค่าประมาณ 1 จึงนำเซลล์จุลินทรีย์ในขวดซีรัมมาวิเคราะห์ค่าของแข็งแขวนลอย (TSS)

ค่า TSS ที่วัดได้มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ  $20.85 \pm 2.85$  มิลลิกรัม และมวลของฟีนอลที่เติมทั้งหมดมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ  $37.57 \pm 0.31$  มิลลิกรัม ดังนั้นค่า Y ของจุลินทรีย์ที่ใช้ฟีนอลเป็นซับสเตรตมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ  $0.55 \pm 0.073$  มิลลิกรัม-เซลล์ / มิลลิกรัม-ฟีนอล ซึ่งผลการทดลองที่ได้มีค่าใกล้เคียงกับค่า Y ที่ศึกษาโดย Chang และ Alvarez-Cohen (1995) และ Tejasen (2003)

#### 4.2.2 การศึกษาค่า Growth Yield (Y) ของจุลินทรีย์ที่ใช้โทลูอินและเบนซิลแอลกอฮอล์เป็นซับสเตรต

การศึกษาค่า Growth Yield (Y) ของจุลินทรีย์ที่ใช้โทลูอินและเบนซิลแอลกอฮอล์เป็นซับสเตรตเป็นการศึกษาร่วมกับนายกฤษฎี จงโชติศิริกุล จึงขอกล่าวถึงเฉพาะค่า Y ที่ผ่านการวิเคราะห์ข้อมูลแล้ว

สำหรับจุลินทรีย์ที่ใช้โทลูอินเป็นซับสเตรต ค่า TSS ที่วัดได้มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ  $20.68 \pm 1.88$  มิลลิกรัม และมวลของโทลูอินที่เติมทั้งหมดมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ  $27.81 \pm 1.54$  มิลลิกรัม ดังนั้นค่า Y ของจุลินทรีย์ที่ใช้โทลูอินเป็นซับสเตรตมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ  $0.742 \pm 0.028$  มิลลิกรัม-เซลล์ / มิลลิกรัม-โทลูอิน ส่วนจุลินทรีย์ที่ใช้เบนซิลแอลกอฮอล์ เป็นซับสเตรต ค่า TSS ที่วัดได้มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ  $21.68 \pm 2.01$  มิลลิกรัม และมวลของเบนซิลแอลกอฮอล์ที่เติมทั้งหมดมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ  $35.96 \pm 0.81$  มิลลิกรัม ดังนั้นค่า Y ของจุลินทรีย์ที่ใช้เบนซิลแอลกอฮอล์เป็นซับสเตรตมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ  $0.603 \pm 0.057$  มิลลิกรัม-เซลล์ / มิลลิกรัม-เบนซิลแอลกอฮอล์

#### 4.3 การศึกษาค่า TCE Transformation Yield ( $T_y$ )

งานวิจัยนี้ได้มุ่งเน้นศึกษาค่า TCE Transformation Yield ( $T_y$ ) โดยแบ่งการทดลองออกเป็น 5 ชุด ชุดละ 6 ลำดับ ลำดับของซับสเตรตแสดงรายละเอียดไว้ในตารางที่ 3.2 การทดลองแต่ละชุดประกอบด้วยขวดซีรัม 4 ขวด โดยมีขวดซีรัม 3 ขวดสำหรับการทดลอง 3 ชั่วโมง และขวดซีรัม 1 ขวดที่ฆ่าเซลล์จุลินทรีย์ด้วยเมอคิวริกคลอไรด์ ( $HgCl_2$ ) เพื่อเป็นชุดควบคุม (Control) ใช้ความเข้มข้นเริ่มต้นของไตรคลอโรเอทิลีนประมาณ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ความเข้มข้นเริ่มต้นของซับสเตรตประมาณ 40 มิลลิกรัมต่อลิตร และความเข้มข้นเริ่มต้นของเซลล์จุลินทรีย์ประมาณ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร นำขวดซีรัมทั้งหมดใส่ลงในเครื่องเขย่าตั้งความเร็วรอบที่ 200 รอบต่อนาทีตลอดระยะเวลาการทดลอง ทำการทดลองที่อุณหภูมิห้องประมาณ 25 องศาเซลเซียส ทำการเก็บตัวอย่างจนกระทั่งความเข้มข้นของไตรคลอโรเอทิลีนที่เก็บได้มีค่าค่อนข้างคงที่จึงหยุดการทดลอง รายละเอียดผลการศึกษานี้แสดงในภาคผนวก ค. ส่วนการทดลองในลำดับที่ 2 ถึง 6 ทำการทดลองเช่นเดียวกับลำดับที่ 1 ต่างกันที่การทดลองในลำดับที่ 2 นี้ใช้เซลล์จุลินทรีย์ต่อเนื่องจากการทดลอง

ลำดับที่ 1 โดยทำการเติมอากาศเพื่อไล่ไตรคลอโรเอเทธิลินที่เหลืออยู่ในขวดซีรัมจากการทดลองลำดับที่ 1 ออก ถ่ายเซลล์จุลินทรีย์ส่วนเกินออกโดยคำนวณจากค่า Growth Yield (Y) ที่ได้จากการทดลองในขั้นตอนที่ 4.2 และเติมอาหารเลี้ยงเชื้อ BSM แทน รายละเอียดการคำนวณแสดงไว้ในภาคผนวก จ. ผลการทดลองที่ได้จะแยกรายงานผลและวิเคราะห์ผลในแต่ละชุดการทดลองรวมทั้งสิ้น 5 ชุด ดังนี้

#### 4.3.1 การทดลองชุดที่ 1 เป็นการทดลองใช้เบนซิลแอลกอฮอล์เป็นซับสเตรตแทนโทลูอีนในการบำบัดไตรคลอโรเอเทธิลิน

การทดลองชุดที่ 1 เป็นการศึกษาความเป็นไปได้ในการใช้เบนซิลแอลกอฮอล์เป็นซับสเตรตแทนโทลูอีนในการย่อยสลายไตรคลอโรเอเทธิลินโดยใช้จุลินทรีย์ที่โตบนโทลูอีน เริ่มการทดลองโดยใช้โทลูอีนเป็นซับสเตรตในการย่อยสลายไตรคลอโรเอเทธิลินในลำดับที่ 1 และ 2 แล้วจึงเปลี่ยนชนิดของซับสเตรตเป็นเบนซิลแอลกอฮอล์ในลำดับที่ 3 ถึง 5 จากนั้นจึงเปลี่ยนชนิดของซับสเตรตกลับไปเป็นโทลูอีนอีกครั้งในลำดับที่ 6 จากผลการศึกษาของการทดลองชุดที่ 1 (แสดงรายละเอียดในตารางที่ ค-1 ถึง ค-6 ในภาคผนวก ค.) ได้นำค่า TCE Transformation yield ( $T_y$ ) ที่คำนวณได้ในแต่ละลำดับของซับสเตรตมาเขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์กันดังรูปที่ 4.5



รูปที่ 4.5 ความสัมพันธ์ระหว่างค่า TCE Transformation yield ( $T_y$ ) กับลำดับของซับสเตรตของการทดลองชุดที่ 1 (□, ชุดที่ 1 ; ◇, ชุดที่ 2 ; △, ชุดที่ 3)

เมื่อพิจารณารูปที่ 4.5 จะเห็นว่าค่า  $T_y$  ของการทดลองลำดับที่ 1 มีค่าเฉลี่ยประมาณ 0.0257 มิลลิกรัม-ทีซีอี/มิลลิกรัม-โทลูอิน ซึ่งเป็นค่าที่สูงที่สุด ในการทดลองลำดับที่ 2 จุลินทรีย์ใช้เวลาในการย่อยสลายโทลูอินนานขึ้น ส่วนไตรคลอโรเอทิลีนจุลินทรีย์ย่อยสลายได้น้อยลง ส่งผลให้ค่า  $T_y$  ลดลงตามไปด้วย โดยค่า  $T_y$  ลดลงจากการทดลองลำดับที่ 1 ร้อยละ 15 ทั้งนี้อาจเป็นเพราะจุลินทรีย์ที่ใช้ต่อเนื่องจากการทดลองในลำดับที่ 1 นั้นอาจเป็นจุลินทรีย์ที่โดนพิษจาก TCE epoxide ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Wackett และ Householder (1989) และ Heald และ Jenkins (1994) ที่พบว่าพิษจาก TCE epoxide ทำให้จุลินทรีย์ *Pseudomonas putida* F1 ที่ใช้โทลูอินเป็นซับสเตรตนั้นย่อยสลายไตรคลอโรเอทิลีนได้ลดลง ส่วน Bielefeldt และคณะ (1995) ได้อธิบายว่าการเติมโทลูอิน (Growth substrate) ในการทดลองลำดับที่ 2 นั้นเป็นการเพิ่มจำนวนจุลินทรีย์ขึ้นมาแทนที่ตัวที่หมดความสามารถจากพิษของ TCE epoxide ทำให้ปฏิกิริยาการย่อยสลายทั้งโทลูอินและไตรคลอโรเอทิลีนยังคงเกิดขึ้นต่อไป แต่ระยะเวลาที่ใช้จะนานขึ้นเนื่องจากต้องใช้เวลาในการเพิ่มจำนวนจุลินทรีย์ขึ้นมาใหม่ ซึ่งเป็นการนำจุลินทรีย์ในระยะ Death phase มาเพาะเลี้ยงต่อเนื่องช่วง Lag phase ก็จะใช้เวลามากขึ้น (Yeager และคณะ, 2001)

เมื่อเปลี่ยนชนิดของซับสเตรตเป็นเบนซิลแอลกอฮอล์ในลำดับที่ 3 จุลินทรีย์ใช้เวลาในการย่อยสลายเบนซิลแอลกอฮอล์น้อยกว่าย่อยสลายโทลูอิน Kahng และคณะ (2001) ศึกษาพบว่าโทลูอินถูกย่อยสลายทางชีวภาพได้หลายวิถีและใช้เอนไซม์หลายชนิดซึ่งก็คือเอนไซม์ TDO T2MO T3MO และ T4MO ส่วน Tejasen (2003) ศึกษาพบว่าเบนซิลแอลกอฮอล์ถูกย่อยสลายทางชีวภาพได้อย่างน้อย 2 วิถีโดยใช้เอนไซม์ monooxygenase และ Alcohol dehydrogenase ซึ่งอาจเป็นไปได้ที่จุลินทรีย์ใช้เอนไซม์ตัวเดียวกันในการย่อยสลายทั้งโทลูอินและเบนซิลแอลกอฮอล์ ซึ่งก็คือเอนไซม์ toluene ortho monooxygenase ทำให้จุลินทรีย์ไม่ต้องเสียเวลาในการสร้างเอนไซม์ชนิดใหม่และสามารถปรับตัวให้คุ้นเคยกับซับสเตรตชนิดใหม่ได้อย่างรวดเร็ว เมื่อพิจารณาผลการทดลองดังรูปที่ 4.5 พบว่าเมื่อเปลี่ยนชนิดของซับสเตรตจากโทลูอินเป็นเบนซิลแอลกอฮอล์ในลำดับที่ 3 ค่า  $T_y$  ลดลงจากการทดลองลำดับที่ 2 ร้อยละ 58 ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Bielefeldt และคณะ (1995) ที่พบว่าในระยะยาวจุลินทรีย์จะยังสามารถย่อยสลาย Growth substrate ได้ดีแต่ความสามารถในการย่อยสลายไตรคลอโรเอทิลีนลดลง เพราะยังจุลินทรีย์ย่อยสลายไตรคลอโรเอทิลีนได้ลดลง TCE epoxide ก็จะมีค่าลดลงด้วยทำให้จุลินทรีย์สามารถมีชีวิตอยู่ได้ แสดงให้เห็นว่าจุลินทรีย์มีการปรับตัวเพื่อความอยู่รอดนั่นเอง

ผลการศึกษาต่อมาในลำดับที่ 4 และ 5 ขณะที่ชนิดของซับสเตรตยังคงเป็นเบนซิลแอลกอฮอล์ จุลินทรีย์ย่อยสลายไตรคลอโรเอทิลีนได้มากกว่าการทดลองในลำดับที่ 3 ส่งผลให้ค่า  $T_y$  ในการทดลองลำดับที่ 4 เพิ่มขึ้นประมาณร้อยละ 33 และค่อนข้างคงที่ในลำดับที่ 5

และเมื่อเปลี่ยนชนิดของซับสเตรตกลับไปเป็นโทลูอินอีกครั้งในลำดับที่ 6 เปรียบเทียบกับการใช้เบนซิลแอลกอฮอล์เป็นซับสเตรตในการทดลองลำดับที่ 4 และ 5 ค่า  $T_y$  ลดลงประมาณร้อยละ 20 แต่เมื่อเปรียบเทียบกับการใช้โทลูอินเป็นซับสเตรตในลำดับที่ 1 และ 2 พบว่าค่า  $T_y$  ลดลงประมาณร้อยละ 50 เนื่องจากการเปลี่ยนชนิดของซับสเตรตกลับไปเป็นโทลูอินในลำดับที่ 6 เป็นการทดลองเพียงแค่ลำดับเดียวจึงไม่ทราบว่าค่า  $T_y$  จะเพิ่มมากไปกว่านี้หรือเปล่า ซึ่งค่า  $T_y$  อาจมีการคืนกลับมา(recovery) มากเท่าการทดลองในลำดับที่ 1 และ 2

#### 4.3.2 การทดลองชุดที่ 2 เป็นการทดลองใช้เบนซิลแอลกอฮอล์เป็นซับสเตรตแทน ฟีนอลในการบำบัดไตรคลอโรเอเทธิลีน

การทดลองชุดที่ 2 เป็นการศึกษาความเป็นไปได้ในการใช้เบนซิลแอลกอฮอล์เป็นซับสเตรตแทนฟีนอลในการย่อยสลายไตรคลอโรเอเทธิลีนโดยใช้จุลินทรีย์ที่โตบนโทลูอิน เริ่มการทดลองโดยใช้ฟีนอลเป็นซับสเตรตในการย่อยสลายไตรคลอโรเอเทธิลีนในลำดับที่ 1 และ 2 แล้วจึงเปลี่ยนชนิดของซับสเตรตเป็นเบนซิลแอลกอฮอล์ในลำดับที่ 3 ถึง 5 จากนั้นจึงเปลี่ยนชนิดของซับสเตรตกลับไปเป็นฟีนอลอีกครั้งในลำดับที่ 6 จากผลการศึกษาของการทดลองชุดที่ 2 (แสดงรายละเอียดในตารางที่ ค-7 ถึง ค-12 ในภาคผนวก ค.) ได้นำค่า TCE Transformation yield ( $T_y$ ) ที่คำนวณได้ในแต่ละลำดับของซับสเตรตมาเขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์กันดังรูปที่ 4.6



รูปที่ 4.6 ความสัมพันธ์ระหว่างค่า TCE Transformation yield ( $T_y$ ) กับลำดับของซับสเตรตของการทดลองชุดที่ 2 (□ , ชุดที่ 1 ; ◇ , ชุดที่ 2 ; △ , ชุดที่ 3)



ในการทดลองลำดับที่ 1 จุลินทรีย์ใช้เวลาในการย่อยสลายฟีนอลได้ใกล้เคียงกับการย่อยสลายโทลูอินในการทดลองชุดที่ 1 ลำดับที่ 1 จากผลการศึกษาของ Nelson และคณะ (1987) ที่พบว่าทั้งฟีนอลและโทลูอินถูกย่อยสลายกลายเป็น 3-methylcatechol เหมือนกันโดยใช้เอนไซม์ TDO หรือ T2MO ซึ่งอาจเป็นไปได้ที่จุลินทรีย์ใช้เอนไซม์ตัวเดียวกันในการย่อยสลายทั้งโทลูอินและฟีนอล ซึ่งก็คือเอนไซม์ TDO หรือ T2MO จุลินทรีย์จึงไม่ต้องเสียเวลาในการสร้างเอนไซม์ชนิดใหม่และสามารถปรับตัวให้คุ้นเคยกับซับสเตรตชนิดใหม่ได้อย่างรวดเร็ว ปฏิบัติการร่วมย่อยสลายไตรคลอโรเอทิลีนยังคงเกิดขึ้น ค่า  $T_y$  ของการทดลองลำดับที่ 1 มีค่าเฉลี่ยประมาณ 0.0172 มิลลิกรัม-ทีซีอี/มิลลิกรัม-ฟีนอล ในการทดลองลำดับที่ 2 จุลินทรีย์ย่อยสลายไตรคลอโรเอทิลีนได้มากขึ้น ส่งผลให้ค่า  $T_y$  เพิ่มขึ้นตามไปด้วย เมื่อพิจารณารูปที่ 4.6 จะเห็นว่าค่า  $T_y$  เพิ่มจากการทดลองลำดับที่ 1 ร้อยละ 23 โดยประมาณ ซึ่งเป็นค่าที่สูงที่สุดของการทดลองชุดนี้

เมื่อพิจารณาผลการทดลองดังรูปที่ 4.8 และ 4.9 พบว่าเมื่อเปลี่ยนชนิดของซับสเตรตจากฟีนอลเป็นเบนซิลแอลกอฮอล์ในลำดับที่ 3 Tejasen (2003) รายงานว่าอาจเป็นไปได้ที่จุลินทรีย์ใช้เอนไซม์ตัวเดียวกันในการย่อยสลายทั้งฟีนอลและเบนซิลแอลกอฮอล์ ซึ่งก็คือเอนไซม์ *ortho* monooxygenase จุลินทรีย์จึงไม่ต้องเสียเวลาในการสร้างเอนไซม์ชนิดใหม่ ปฏิบัติการร่วมย่อยสลายไตรคลอโรเอทิลีนยังคงเกิดขึ้นอย่างต่อเนื่อง ค่า  $T_y$  ลดลงจากการทดลองลำดับที่ 2 ประมาณร้อยละ 32 ผลการศึกษาต่อมาในลำดับที่ 4 ขณะที่ชนิดของซับสเตรตยังคงเป็นเบนซิลแอลกอฮอล์ ค่า  $T_y$  ลดลงจากการทดลองในลำดับที่ 3 เพียงเล็กน้อยคือประมาณร้อยละ 14 และในลำดับที่ 5 ค่า  $T_y$  เพิ่มขึ้นจากการทดลองในลำดับที่ 4 ร้อยละ 21 โดยประมาณ เมื่อพิจารณาภาพรวมของการทดลองในลำดับที่ 3 ถึง 5 ถือได้ว่า  $T_y$  มีค่าค่อนข้างคงที่เปลี่ยนแปลงไม่มากนัก

เมื่อเปลี่ยนชนิดของซับสเตรตกลับมาเป็นฟีนอลอีกครั้งหนึ่งในลำดับที่ 6 เปรียบเทียบกับการใช้เบนซิลแอลกอฮอล์เป็นซับสเตรตในการทดลองลำดับที่ 3 ถึง 5 ค่า  $T_y$  ลดลงประมาณร้อยละ 23 แต่เมื่อเปรียบเทียบกับการใช้ฟีนอลเป็นซับสเตรตในลำดับที่ 1 และ 2 พบว่าค่า  $T_y$  ลดลงประมาณร้อยละ 42

#### 4.3.3 การทดลองชุดที่ 3 เป็นการหาค่า TCE Transformation yield โดยใช้โทลูอินเป็นซับสเตรตในการบำบัดไตรคลอโรเอทิลีน

จากผลการศึกษาของการทดลองชุดที่ 3 ที่ใช้โทลูอินเป็นซับสเตรตชนิดเดียวตลอดการทดลอง ได้นำค่า TCE Transformation yield ( $T_y$ ) ที่คำนวณได้ในแต่ละลำดับของซับสเตรตมาเขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์กันได้ดังรูปที่ 4.7 รายละเอียดผลการศึกษาแสดงดังตารางที่ ค-13 ถึง ค-18 ในภาคผนวก ค.

การทดลองชุดที่ 3 นี้เป็นการศึกษาค่า TCE Transformation yield ในการใช้โทลูอินเป็น ตัวเร่งในการย่อยสลายไตรคลอโรเอทิลีน เมื่อพิจารณาผลการทดลองดังรูปที่ 4.7 พบว่าค่า  $T_y$  ตอนเริ่มทำการทดลองในลำดับที่ 1 มีค่าสูงที่สุด และมีค่าลดลงในลำดับที่ 2 และ 3 ร้อยละ 20 และ 23 ตามลำดับ เมื่อพิจารณาภาพรวมของการทดลองในลำดับที่ 3 ถึง 6 ค่า  $T_y$  ค่อนข้างคงที่



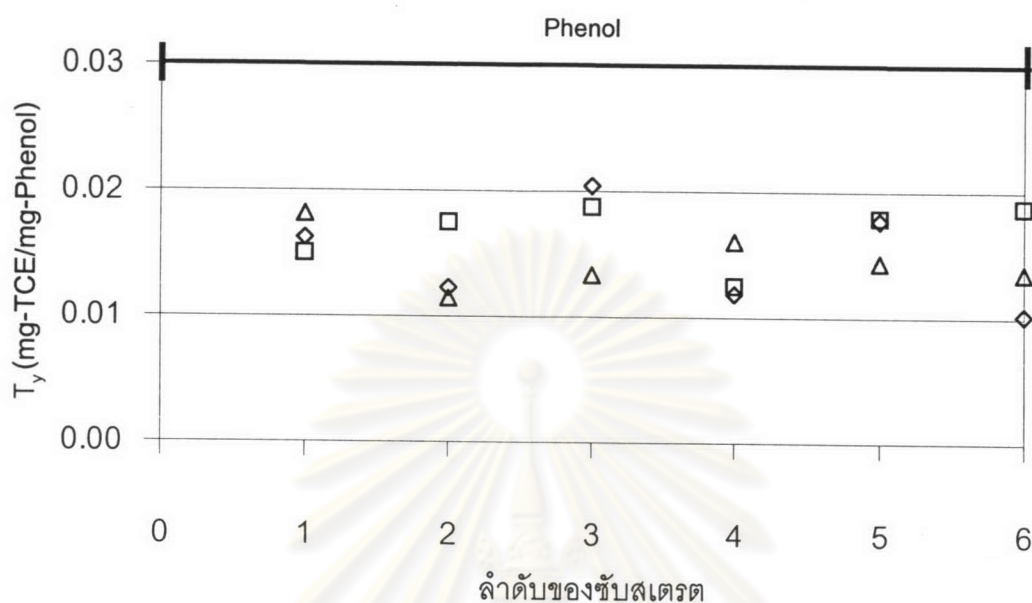
รูปที่ 4.7 ความสัมพันธ์ระหว่างค่า TCE Transformation yield ( $T_y$ ) กับลำดับของขั้นตอนของการทดลองชุดที่ 3 (□ , ชุดที่ 1 ; ◇ , ชุดที่ 2 ; △ , ชุดที่ 3)

ค่า  $T_y$  ของการใช้โทลูอินเป็นตัวเร่งในการย่อยสลายไตรคลอโรเอทิลีนที่ได้จากการทดลองชุดนี้มีค่าเฉลี่ยจากการทดลองช่วงที่  $T_y$  มีค่าค่อนข้างคงที่แล้วคือในลำดับที่ 3 ถึง 6 ประมาณ  $0.0137 \pm 0.003$  มิลลิกรัม-ทีซีอี / มิลลิกรัม-โทลูอิน ซึ่งเป็นค่าที่บ่งบอกถึงปริมาณของไตรคลอโรเอทิลีนที่ถูกย่อยสลายต่อปริมาณตัวเร่งที่ถูกใช้ไป ทำให้ประมาณได้ว่าการย่อยสลายไตรคลอโรเอทิลีน 1 มิลลิกรัมต้องใช้โทลูอินประมาณ 73 มิลลิกรัม

#### 4.3.4 การทดลองชุดที่ 4 เป็นการหาค่า TCE Transformation yield โดยใช้ฟีนอลเป็นตัวเร่งในการบำบัดไตรคลอโรเอทิลีน

จากผลการศึกษาของการทดลองชุดที่ 4 ที่ใช้ฟีนอลเป็นตัวเร่งชนิดเดียวตลอดการทดลอง ได้นำค่ามวลของไตรคลอโรเอทิลีนที่ถูกย่อยสลายและค่า TCE Transformation yield

( $T_y$ ) ที่คำนวณได้ในแต่ละลำดับของชั้นสเตรตมาเขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์กันดังรูปที่ 4.8 รายละเอียดผลการศึกษาดังตารางที่ ค-19 ถึง ค-24 ในภาคผนวก ค.



รูปที่ 4.8 ความสัมพันธ์ระหว่างค่า TCE Transformation yield ( $T_y$ ) กับลำดับของชั้นสเตรตของการทดลองชุดที่ 4 (□, ชุดที่ 1 ; ◇, ชุดที่ 2 ; △, ชุดที่ 3)

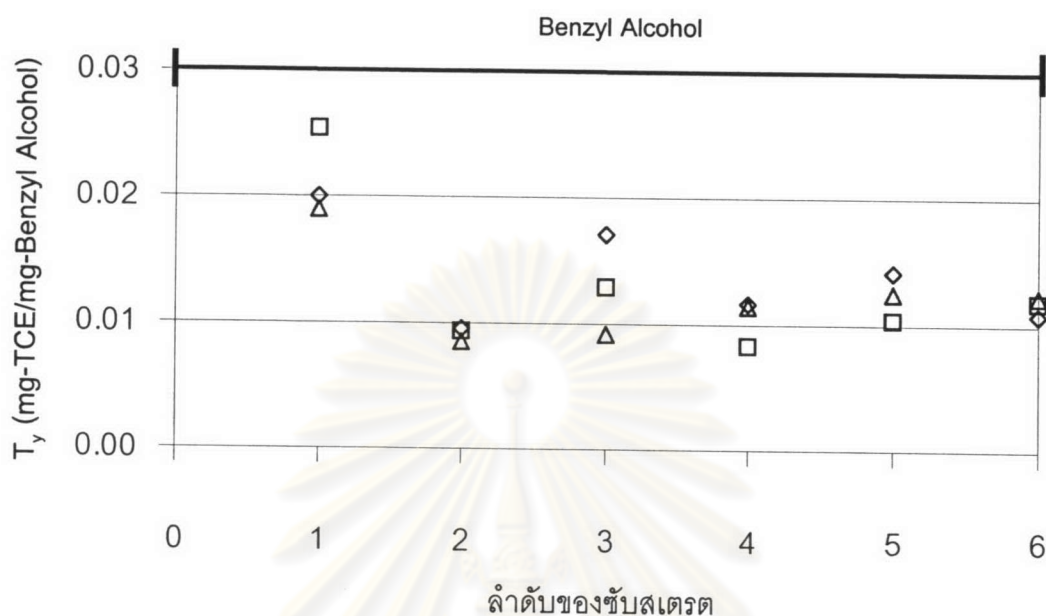
การทดลองชุดที่ 4 นี้เป็นการศึกษาค่า TCE Transformation yield ในการใช้ฟินอลเป็นชั้นสเตรตในการย่อยสลายไตรคลอโรเอเทธิลีน จากผลการทดลองดังรูปที่ 4.8 ค่า  $T_y$  ในลำดับที่ 2 ลดลงจากลำดับที่ 1 ประมาณร้อยละ 16 และค่า  $T_y$  ในลำดับที่ 3 เพิ่มขึ้นจากลำดับที่ 2 ประมาณร้อยละ 21 เมื่อพิจารณาภาพรวมของการทดลองค่า  $T_y$  มีค่าใกล้เคียงกันทุกลำดับของชั้นสเตรต

ค่า  $T_y$  ของการใช้ฟินอลเป็นชั้นสเตรตในการย่อยสลายไตรคลอโรเอเทธิลีนที่ได้จากการทดลองชุดนี้ มีค่าเฉลี่ยจากการทดลองในลำดับที่ 3 ถึง 6 ประมาณ  $0.0154 \pm 0.003$  มิลลิกรัม-ทีซีอี / มิลลิกรัม-ฟินอล ทำให้ประมาณได้ว่าการย่อยสลายไตรคลอโรเอเทธิลีน 1 มิลลิกรัมต้องใช้ฟินอลประมาณ 66 มิลลิกรัม

#### 4.3.5 การทดลองชุดที่ 5 เป็นการหาค่า TCE Transformation yield โดยใช้เบนซิล-แอลกอฮอล์เป็นชั้นสเตรตในการบำบัดไตรคลอโรเอเทธิลีน

จากผลการศึกษาของการทดลองชุดที่ 5 ที่ใช้เบนซิลแอลกอฮอล์เป็นชั้นสเตรตชนิดเดียวตลอดการทดลอง ได้นำค่า TCE Transformation yield ( $T_y$ ) ที่คำนวณได้ในแต่ละลำดับของ

ข้อสอบตรงมาเขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์กันได้ดังรูปที่ 4.9 รายละเอียดผลการศึกษาดังตารางที่ ค-25 ถึง ค-30 ในภาคผนวก ค.



รูปที่ 4.9 ความสัมพันธ์ระหว่างค่า TCE Transformation yield ( $T_y$ ) กับลำดับของข้อสอบตรงของการทดลองชุดที่ 5 (□ , ชุดที่ 1 ; ◇ , ชุดที่ 2 ; △ , ชุดที่ 3)

การทดลองชุดที่ 5 นี้เป็นการศึกษาค่า TCE Transformation yield ในการใช้เบนซิลแอลกอฮอล์เป็นข้อสอบตรงในการย่อยสลายไตรคลอโรเอทิลีน เมื่อพิจารณาผลการทดลองดังรูปที่ 4.9 พบว่า  $T_y$  ในลำดับที่ 1 มีค่าเฉลี่ยประมาณ 0.0214 มิลลิกรัม-ทีซีอี / มิลลิกรัม-เบนซิลแอลกอฮอล์ซึ่งเป็นค่าที่สูงที่สุด ค่า  $T_y$  ในลำดับที่ 2 ลดลงจากลำดับที่ 1 ประมาณร้อยละ 57 และในลำดับที่ 3 เพิ่มขึ้นจากลำดับที่ 2 ประมาณร้อยละ 30 เมื่อพิจารณาภาพรวมของการทดลองในลำดับที่ 3 ถึง 6  $T_y$  มีค่าใกล้เคียงกันจนถึงได้ว่าคงที่

ค่า  $T_y$  ของการใช้เบนซิลแอลกอฮอล์เป็นข้อสอบตรงในการย่อยสลายไตรคลอโรเอทิลีนที่ได้จากการทดลองชุดนี้ มีค่าเฉลี่ยจากการทดลองลำดับที่ 3 ถึง 6 ประมาณ  $0.0119 \pm 0.002$  มิลลิกรัม-ทีซีอี / มิลลิกรัม-เบนซิลแอลกอฮอล์ ซึ่งเป็นค่าที่บ่งบอกถึงปริมาณของไตรคลอโรเอทิลีนที่ถูกย่อยสลายต่อปริมาณข้อสอบตรงที่ถูกใช้ไป ทำให้ประมาณได้ว่าการย่อยสลายไตรคลอโรเอทิลีน 1 มิลลิกรัมต้องใช้เบนซิลแอลกอฮอล์ประมาณ 84 มิลลิกรัม

เมื่อเปรียบเทียบค่า  $T_y$  ที่ได้จากการทดลองกับงานวิจัยที่ผ่านมาดังตารางที่ 4.1 พบว่าค่า  $T_y$  ที่ได้จากงานวิจัยที่ผ่านมา มีค่าต่างไปค่า  $T_y$  ที่ได้จากการทดลอง และค่า  $T_y$  ของงานวิจัยที่ผ่านมา

มากก็มีค่าแตกต่างกันเองเช่นเดียวกัน โดย  $T_y$  บางค่าต่างกันถึง 10 เท่า ซึ่งอธิบายความแตกต่างของค่า  $T_y$  ได้ดังนี้

ตารางที่ 4.1 เปรียบเทียบค่า  $T_y$  ที่ได้จากการทดลองกับงานวิจัยที่ผ่านมา

Growth substrate	Microorganism	$T_y$ (mg-TCE/mg-Substrate)	Reference
Toluene	Mixed culture	0.0021	a
Toluene	<i>Burkholderia cepacia</i> G4	0.014	b
Toluene	Mixed culture	0.0137	This study
Phenol	Mixed culture	0.017	a
Phenol	Mixed culture	0.11	c
Phenol	<i>Burkholderia cepacia</i> G4	0.02	d
Phenol	Mixed culture	0.05	e
Phenol	Mixed culture	0.0154	This study
Benzyl alcohol	Mixed culture	0.0159	F
Benzyl alcohol	Mixed culture	0.0119	This study

a. Chang และ Alvarez-Cohen 1995b; b. Landa และคณะ 1994; c. Hopkins และคณะ 1993; d. Folsom และ Chapman 1991; e. Shurtliff และคณะ 1996; f. Tejasen 2003.

เหตุผลที่อธิบายได้เป็นอันดับแรกก็คือ การทำงานวิจัยที่สภาพแวดล้อมแตกต่างกัน เช่น พีเอช อุณหภูมิ ปริมาณออกซิเจน ปริมาณสารพิษ อาจเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้  $T_y$  มีค่าแตกต่างกัน Hopkins และคณะ (1993b) กล่าวไว้ว่า competitive inhibition ก็เป็นสาเหตุทำให้ค่า  $T_y$  ลดลง นอกจากนี้เขายังพบว่าอัตราส่วนความเข้มข้นของไตรคลอโรเอทิลีนที่ต่ำและความเข้มข้นของซัลเฟตที่สูงก็ทำให้ค่า  $T_y$  ลดลง จากผลการทดลองของเขาที่ได้ทำการหาค่า  $T_y$  ในภาคสนามจริงพบว่าเมื่อความเข้มข้นของซัลเฟตคงที่และเพิ่มความเข้มข้นของไตรคลอโรเอทิลีนขึ้นเรื่อย ๆ ค่า  $T_y$  ที่ได้ก็มีค่าเพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ เช่นกัน และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของซัลเฟตโดยให้ความเข้มข้นของไตรคลอโรเอทิลีนคงที่พบว่า  $T_y$  มีค่าลดลง และจากอัตราส่วนระหว่างความเข้มข้นของไตรคลอโรเอทิลีนและความเข้มข้นของซัลเฟตที่มีผลต่อค่า  $T_y$  ทำให้ทราบต่อไปได้ว่าอีกสาเหตุหนึ่งที่ทำให้ ค่า  $T_y$  มีค่าลดลงก็คือความเป็นพิษจาก TCE epoxide ที่ทำให้ในระยะยาวจุลินทรีย์จะยังสามารถย่อยสลาย Growth substrate ได้ดีแต่ความสามารถในการย่อยสลายไตรคลอโรเอทิลีนลดลง (Bielefeldt และคณะ, 1995)

จากประโยชน์ของค่า TCE Transformation yield ที่ทำให้สามารถคำนวณปริมาณซับสเตรตและปริมาณออกซิเจนที่ต้องใช้ ซึ่งเป็นค่าใช้จ่ายที่สำคัญในการบำบัดไตรคลอโรเอเทอริลินในภาคสนาม ค่า  $T_y$  ที่สูงกว่าแสดงว่าต้องใช้ปริมาณซับสเตรตในการบำบัดไตรคลอโรเอเทอริลินน้อยกว่า ดังนั้นจึงควรหาวิธีที่ทำให้ค่า  $T_y$  เพิ่มขึ้นเพราะมีความสำคัญในการลดค่าใช้จ่ายในการบำบัด การเติม dithiothreitol ก็เป็นวิธีหนึ่งที่ทำให้ค่า  $T_y$  เพิ่มขึ้น เพราะเป็นการเพิ่มความสามารถในการย่อยสลายไตรคลอโรเอเทอริลินของจุลินทรีย์ที่โดนพิษจาก TCE epoxide (Heald และ Jenkins, 1994)

จากค่า TCE Transformation yield และค่า Growth yield ที่ได้จากผลการทดลองในหัวข้อที่ 4.2 และ 4.3 ทำให้ประมาณค่า Transformation capacity ( $T_c$ ) อย่างคร่าว ๆ ได้ ซึ่งแสดงถึงปริมาณเซลล์จุลินทรีย์ (Active cells) ที่ต้องใช้ในการย่อยสลายไตรคลอโรเอเทอริลิน ที่สามารถคำนวณได้โดยใช้สมการที่ 2.6 หน้า 24 ดังนี้

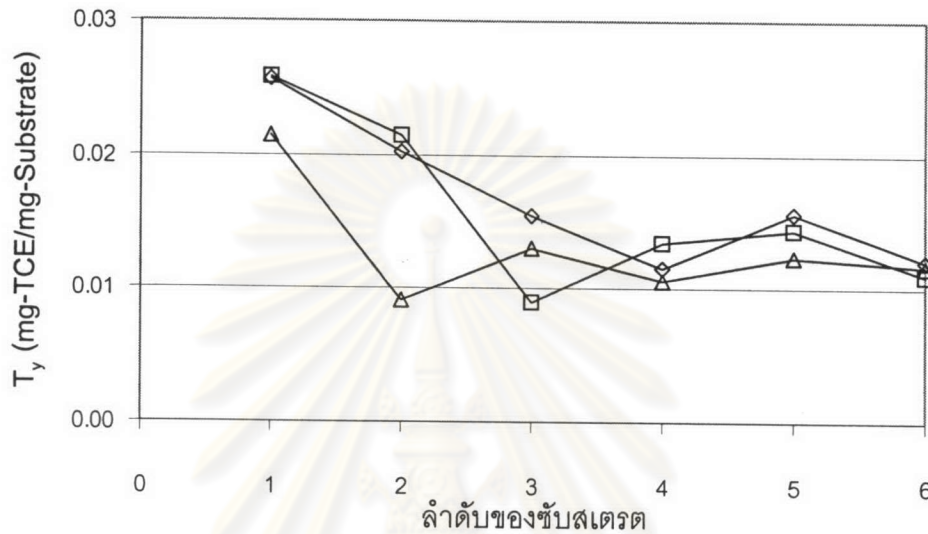
$$\begin{aligned} T_c &= \frac{0.0137 \text{ มิลลิกรัม-ทีซีอี} / \text{มิลลิกรัม-โทลูอีน}}{0.742 \text{ มิลลิกรัม-เซลล์} / \text{มิลลิกรัม-โทลูอีน}} \\ &= 0.0185 \text{ มิลลิกรัม-ทีซีอี} / \text{มิลลิกรัม-เซลล์} \end{aligned}$$

ผลการคำนวณค่า  $T_c$  ของการใช้โทลูอีน ฟีนอลและเบนซิลแอลกอฮอล์เป็นซับสเตรตในการย่อยสลายไตรคลอโรเอเทอริลินมีค่าประมาณ 0.0185 0.0277 และ 0.0197 มิลลิกรัม-ทีซีอี / มิลลิกรัม-เซลล์ ตามลำดับ ทำให้ประมาณได้ว่าการย่อยสลายไตรคลอโรเอเทอริลิน 1 มิลลิกรัมใช้เซลล์จุลินทรีย์ประมาณ 54 36 และ 51 มิลลิกรัม สำหรับการใช้โทลูอีน ฟีนอลและเบนซิลแอลกอฮอล์เป็นซับสเตรตตามลำดับ

เมื่อเปรียบเทียบค่า  $T_c$  ที่คำนวณได้เรียงลำดับจากน้อยไปมากได้ดังนี้ ค่า  $T_c$  ของจุลินทรีย์ที่ใช้โทลูอีน เบนซิลแอลกอฮอล์และฟีนอลเป็นซับสเตรตตามลำดับ แสดงว่าในการใช้โทลูอีนเป็นซับสเตรตจะต้องใช้จุลินทรีย์ในการย่อยสลายไตรคลอโรเอเทอริลินมากที่สุด รองลงมาคือเบนซิลแอลกอฮอล์และฟีนอล ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองหาค่า  $T_c$  ของ Chang และคณะ (1995b) ที่แสดงให้เห็นว่า TCE epoxide เป็นพิษต่อจุลินทรีย์ที่ใช้โทลูอีนเป็นซับสเตรตมากกว่าจุลินทรีย์ที่ใช้ฟีนอลเป็นซับสเตรต

#### 4.4 ความเป็นไปได้ในการใช้เบนซิลแอลกอฮอล์เป็นซับสเตรตแทนโทลูอินหรือฟีนอล

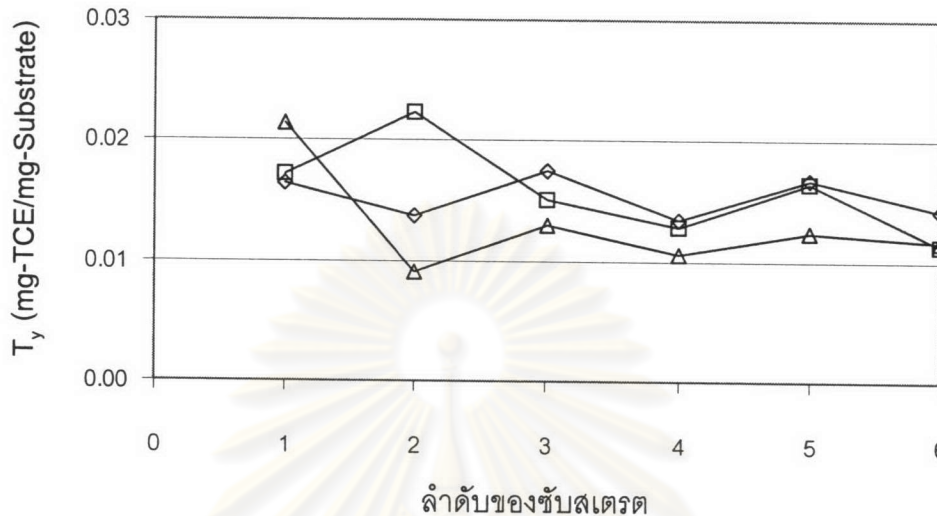
จากการทดลองใช้เบนซิลแอลกอฮอล์เป็นซับสเตรตแทนโทลูอินและฟีนอล นำความสัมพันธ์ระหว่างค่า TCE Transformation yield กับลำดับของซับสเตรตจากรูปที่ 4.5 4.7 และ 4.9 เขียนรวมเป็นรูปที่ 4.10 และจากรูปที่ 4.6 4.8 และ 4.9 เขียนรวมเป็นรูปที่ 4.11



รูปที่ 4.10 ค่า TCE Transformation yield เฉลี่ยของการทดลองชุดที่ 1 3 และ 5  
(□ , ชุดที่ 1 ; ◇ , ชุดที่ 3 ; △ , ชุดที่ 5)

พิจารณารูปที่ 4.10 ในลำดับที่ 1 ถึง 3 ของกราฟการทดลองชุดที่ 1 (□) พบว่าเมื่อเปลี่ยนซับสเตรตจากโทลูอินเป็นเบนซิลแอลกอฮอล์ในลำดับที่ 3  $T_y$  มีค่าลดลง และเมื่อพิจารณากราฟของการทดลองชุดที่ 3 (◇) เปรียบเทียบกัน พบว่าในการใช้โทลูอินเป็นซับสเตรตเพียงชนิดเดียว ค่า  $T_y$  ใน ลำดับที่ 1 ถึง 3 ก็ลดลงด้วยเช่นกัน แสดงว่าค่า  $T_y$  ของกราฟของการทดลองชุดที่ 1 ที่ลดลงนั้นไม่ได้มีสาเหตุมาจากการเปลี่ยนชนิดของซับสเตรต ทั้งนี้อาจมีสาเหตุมาจากจุลินทรีย์ที่ใช้ต่อเนื่องจากการทดลองในลำดับที่ 1 และ 2 นั้นอาจเป็นจุลินทรีย์ที่โดนพิษจาก TCE epoxide ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Wackett และ Householder (1989) Heald และ Jenkins (1994) และ Chang และคณะ (1995b) ที่พบว่าพิษจาก TCE epoxide ทำให้จุลินทรีย์ที่ใช้โทลูอินเป็นซับสเตรตย่อยสลายไตรคลอโรเอทิลีนได้ลดลง ค่า  $T_y$  ในลำดับที่ 3 ของกราฟการทดลองชุดที่ 1 มีค่าน้อยกว่าการทดลองชุดที่ 3 นี้บ่งบอกได้ว่าในช่วงแรกของการเปลี่ยนซับสเตรต การใช้โทลูอินเป็นซับสเตรตมีประสิทธิภาพในการย่อยสลายไตรคลอโรเอทิลีนดีกว่าการใช้เบนซิลแอลกอฮอล์ แต่ค่า  $T_y$  ในลำดับที่ 4 และ 5 ของกราฟการทดลองชุดที่ 1 มีค่าใกล้เคียงกันบ่งบอกได้ว่าเมื่อเวลาผ่านไปประสิทธิภาพในการย่อยสลายไตรคลอโรเอทิลีนมีค่าใกล้เคียงกันด้วย และ

เมื่อพิจารณาภาพรวมของกราฟทั้ง 3 เส้นในรูปที่ 4.10 จะเห็นว่าในลำดับที่ 4 ถึง 6  $T_y$  มีค่าใกล้เคียงกัน แสดงให้เห็นว่าสามารถใช้เบนซิลแอลกอฮอล์เป็นซับสเตรตแทนโกลูอินได้โดยไม่มีผลเสียเกิดขึ้น



รูปที่ 4.11 ค่า TCE Transformation yield เฉลี่ยของการทดลองชุดที่ 2 4 และ 5  
(□ , ชุดที่ 2 ; ◇, ชุดที่ 4 ; △, ชุดที่ 5)

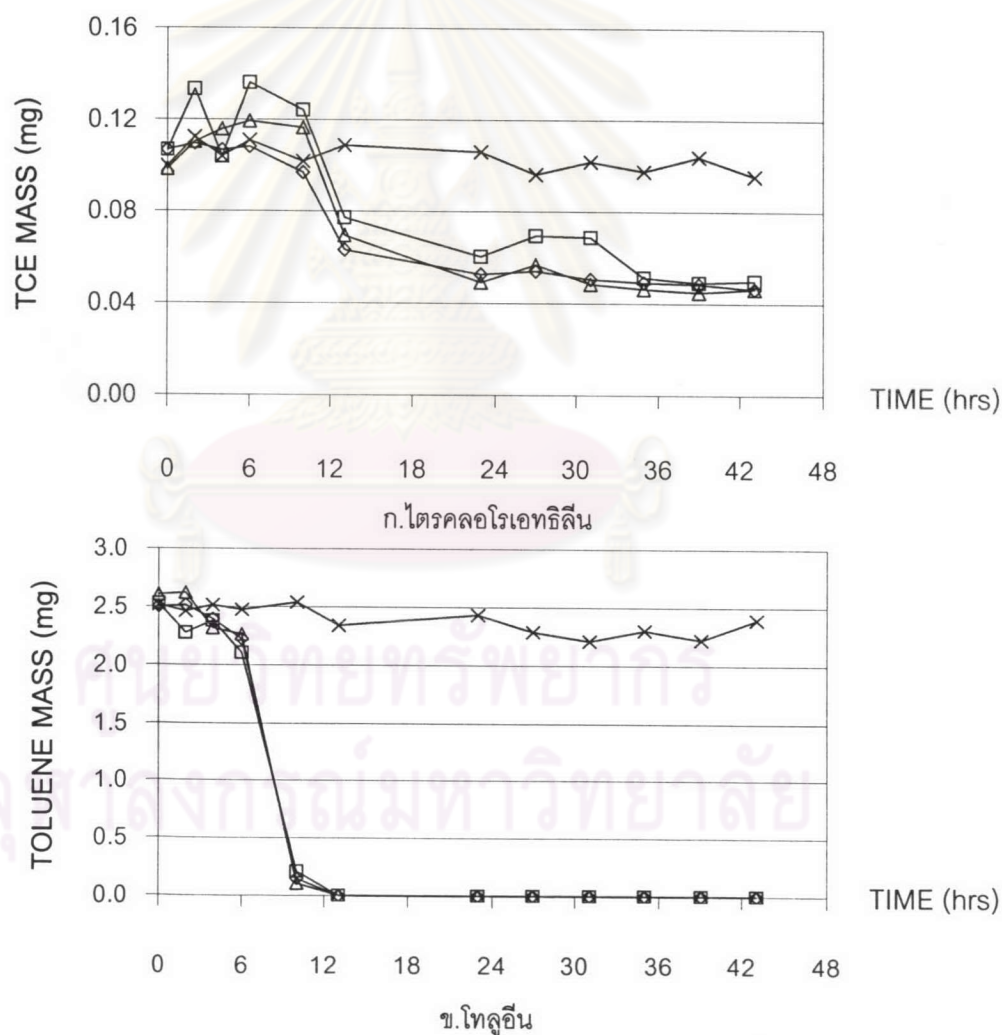
เมื่อพิจารณารูปที่ 4.11 ค่า  $T_y$  ในลำดับที่ 3 ของกราฟการทดลองชุดที่ 2 มีค่าน้อยกว่าการทดลองชุดที่ 4 เพียงร้อยละ 13 บ่งบอกได้ว่าในช่วงแรกของการเปลี่ยนซับสเตรตเป็นเบนซิลแอลกอฮอล์ ประสิทธิภาพในการย่อยสลายไตรคลอโรเอทิลีนในการใช้ฟีนอลเป็นซับสเตรตดีกว่าการใช้เบนซิลแอลกอฮอล์เพียงเล็กน้อย แต่ค่า  $T_y$  ในลำดับที่ 4 และ 5 ของกราฟการทดลองชุดที่ 2 มีค่าใกล้เคียงกันกับกราฟของการทดลองชุดที่ 4 โดยต่างกันเพียงร้อยละ 4 และ 1 ตามลำดับ บ่งบอกได้ว่าเมื่อเวลาผ่านไปประสิทธิภาพในการย่อยสลายไตรคลอโรเอทิลีนมีค่าใกล้เคียงกันด้วย และเมื่อพิจารณาภาพรวมของกราฟทั้ง 3 เส้นในรูปที่ 4.11 พบว่าในลำดับที่ 3 ถึง 6  $T_y$  มีค่าใกล้เคียงกัน แสดงให้เห็นว่าสามารถใช้เบนซิลแอลกอฮอล์เป็นซับสเตรตแทนฟีนอลได้โดยไม่มีผลเสียเกิดขึ้นเช่นเดียวกัน

ด้วยคุณสมบัติของเบนซิลแอลกอฮอล์ที่ไม่เป็นพิษ ละลายน้ำได้ดี ไม่ลุกติดไฟ และยังไม่มีความหมายควบคุมการใช้ จึงมีความเป็นไปได้ที่จะใช้เบนซิลแอลกอฮอล์เป็นทางเลือกหนึ่งในการใช้เป็นซับสเตรตแทนโกลูอินและฟีนอลในการบำบัดไตรคลอโรเอทิลีนกรณีที่มีการปนเปื้อนในทางภาคสนาม



#### 4.5 Competitive inhibition ที่พบในการทดลอง

ผลการศึกษาแสดงในรูปที่ 4.12 เป็นตัวอย่างของการใช้โทลูอีนเป็นยับยั้งในการย่อยสลายไตรคลอโรเอทิลีน ในช่วงแรกของการทดลองมวลของโทลูอีนและไตรคลอโรเอทิลีนมีค่าค่อนข้างคงที่ ต่อมาในขณะที่มวลของโทลูอีนเริ่มลดลงมวลของไตรคลอโรเอทิลีนยังคงเปลี่ยนแปลงไม่มากนัก จากรูปที่ 4.12 จะเห็นได้ว่ามวลของไตรคลอโรเอทิลีนจะไม่ลดลงจนกว่ามวลของโทลูอีนเกือบหมด ซึ่งเกิดจาก Competitive inhibition เนื่องจากทั้งโทลูอีนและไตรคลอโรเอทิลีนถูกย่อยสลายโดยใช้เอนไซม์ชนิดเดียวกัน จึงเกิดการแย่งเอนไซม์กันระหว่างโทลูอีนและไตรคลอโรเอทิลีน โทลูอีนแย่งเอนไซม์ได้ดีกว่าจึงหมดก่อน เมื่อโทลูอีนหมดเอนไซม์จึงทำปฏิกิริยากับไตรคลอโรเอทิลีน



รูปที่ 4.12 มวลไตรคลอโรเอทิลีนและโทลูอีนที่ลดลงของการทดลองชุดที่ 1 ลำดับที่ 1

(□ , ชุดที่ 1 ; ◇ , ชุดที่ 2 ; △ , ชุดที่ 3 ; x , ชุดควบคุม)

#### 4.6 การศึกษาค่าตัวแปรทางคิเนติกส์ของการร่วมย่อยสลายไตรคอลลีโรเอทริลินโดยใช้แบบจำลองคอมพิวเตอร์

งานวิจัยนี้ออกแบบการทดลองโดยใช้แบบจำลองคอมพิวเตอร์ AQUASIM2.1b วิเคราะห์การร่วมย่อยสลายไตรคอลลีโรเอทริลินโดยใช้โกลูอิน ฟีนอล และเบนซิลแอลกอฮอล์เป็นซับสเตรต โดยนำค่าตัวแปรทางคิเนติกส์ของงานวิจัยที่ผ่านมาตามที่ได้อ้างอิงในตารางที่ 3.3 ป้อนเข้าไปในโปรแกรม AQUASIM2.1b ซึ่งรายละเอียดการใช้โปรแกรมได้กล่าวไว้อย่างละเอียดในหัวข้อที่ 3.2.5

จากการนำข้อมูลที่ได้จากการทดลองชุดที่ 3 4 และ 5 ในช่วงที่  $T_y$  มีค่าค่อนข้างคงที่แล้ว คือในลำดับที่ 3 ถึง 6 ลำดับละ 3 ชั่วโมง มาทำการหาค่าตัวแปรทางคิเนติกส์ที่เหมาะสม (Fitting of model) ทั้งหมด 4 ตัวคือ  $k_g$ ,  $K_{sg}$ ,  $k_c$  และ  $K_{sc}$  โดยใช้สมการที่ 2.2 และ 2.3 ดังนี้

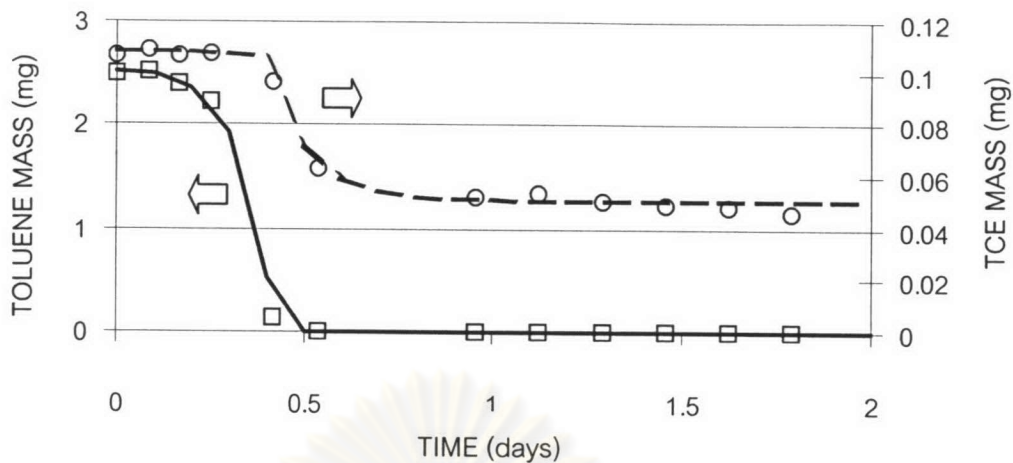
สมการที่ 2.2 คือสมการสำหรับการย่อยสลายโกลูอิน ฟีนอลและเบนซิลแอลกอฮอล์ (Growth substrate) ใช้สำหรับหาค่าตัวแปรทางคิเนติกส์ 2 ตัวคือ  $k_g$  และ  $K_{sg}$

$$-r_g = \frac{Xk_g S_g}{K_{sg} \left(1 + S_c / K_{isc}\right) + S_g} \quad (2.2)$$

สมการที่ 2.3 คือสมการสำหรับการย่อยสลายไตรคอลลีโรเอทริลิน (Cometabolic substrate) ใช้สำหรับหาค่าตัวแปรทางคิเนติกส์ 2 ตัวคือ  $k_c$  และ  $K_{sc}$

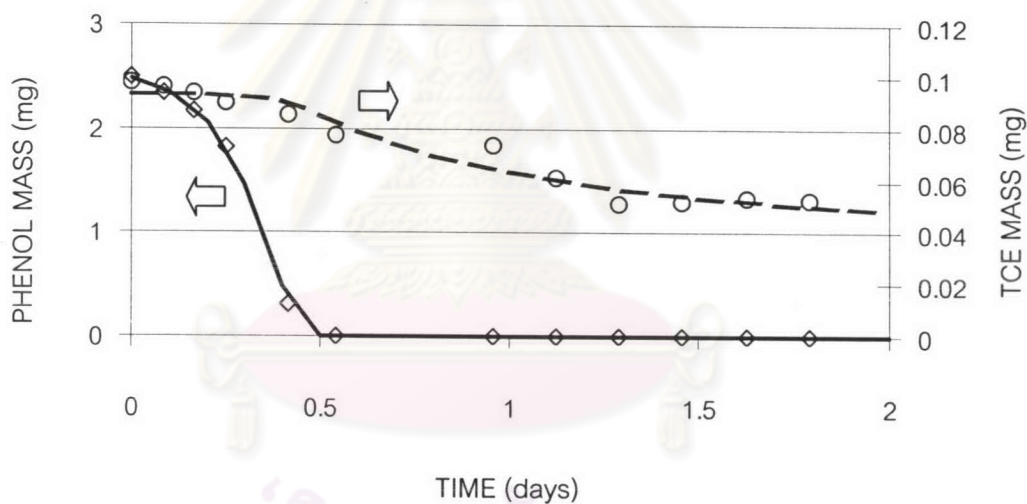
$$-r_c = \frac{Xk_c S_c}{K_{sc} \left(1 + S_g / K_{isg}\right) + S_c} \quad (2.3)$$

พบว่าผลจากการประมาณตัวแปรทางคิเนติกส์ที่เหมาะสม (Estimation parameter) โดยใช้โปรแกรม AQUASIM2.1b ทำการ Fitted model ไปเรื่อย ๆ จนกระทั่งได้เส้นกราฟที่ดีที่สุดเป็นดังตารางที่ 4.2 และเมื่อเปรียบเทียบกราฟที่ได้จากผลการทดลองกับการประมาณโดยโปรแกรม AQUASIM2.1b เป็นดังรูปที่ 4.13 ถึง 4.15 ซึ่งค่าตัวแปรทางคิเนติกส์ของแต่ละรูปแสดงในตารางที่ 4.2



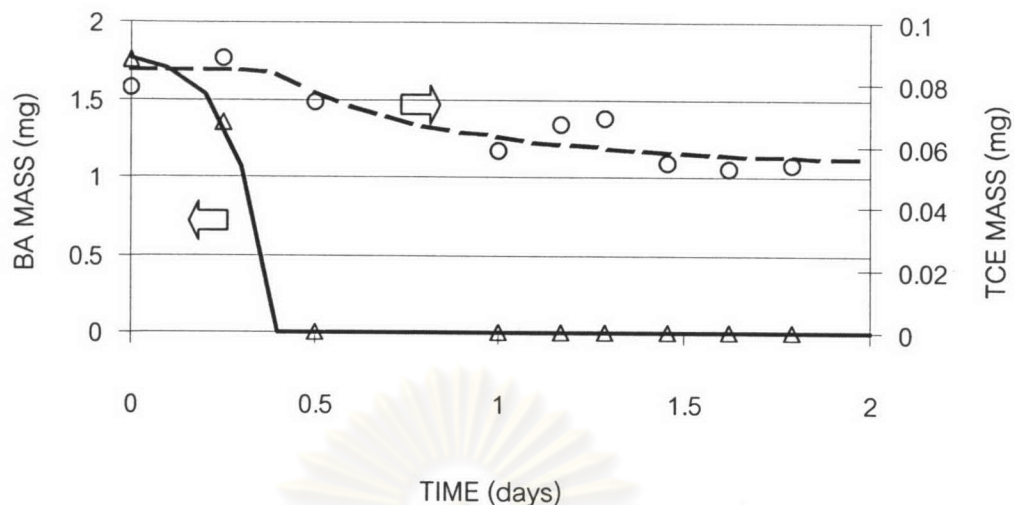
รูปที่ 4.13 แบบจำลองของการร่วมย่อยสลายไตรคลอโรเอทิลีนโดยใช้โทลูอีนเป็นขั้วสเตรต

( Toluene mass  $\square$  , data ; — , model ; TCE mass O , data ; -- , model )



รูปที่ 4.14 แบบจำลองของการร่วมย่อยสลายไตรคลอโรเอทิลีนโดยใช้ฟีนอลเป็นขั้วสเตรต

( Phenol mass  $\diamond$  , data ; — , model ; TCE mass O , data ; -- , model )



รูปที่ 4.15 แบบจำลองของการร่วมย่อยสลายไตรคลอโรเอทรีนโดยใช้เบนซิลแอลกอฮอล์เป็นซับสเตรต (BA mass  $\Delta$ , data ; —, model ; TCE mass O, data ; - -, model)

ตารางที่ 4.2 ผลจากการประมาณตัวแปรทางคิเนติกส์ที่เหมาะสมโดยใช้โปรแกรม AQUASIM2.1b

ซับสเตรต	$k_g$ (1/day)	$K_{sg}$ (mg/l)	$k_c$ (1/day)	$K_{sc}$ (mg/l)
โทลูอีน	$4.01 \pm 0.61$	$1.29 \pm 0.58$	$1.67 \pm 1.35$	$7.61 \pm 2.45$
ฟีนอล	$5.27 \pm 1.03$	$0.98 \pm 0.43$	$1.39 \pm 0.83$	$6.62 \pm 3.51$
เบนซิลแอลกอฮอล์	$7.09 \pm 1.93$	$0.83 \pm 0.25$	$1.46 \pm 1.02$	$7.06 \pm 5.45$

เมื่อพิจารณารูปที่ 4.13 ถึง 4.15 ในช่วงแรกที่มวลของไตรคลอโรเอทรีนยังไม่ลดลงจนกว่ามวลของซับสเตรตใกล้เคียงหมดนั้น เนื่องจากปฏิกิริยาการย่อยสลายเกิดช้าลงเนื่องจากการทำงานของเอนไซม์ถูกยับยั้ง แสดงให้เห็นถึง Competitive inhibition ในเทอมของ  $1 + S_g / K_{sg}$  และ  $1 + S_c / K_{sc}$  ในสมการที่ 2.2 และ 2.3 ตามลำดับ แสดงว่าสมการที่ 2.2 ถึง 2.4 ยังใช้ได้ดีสำหรับการทำนายการทำงานของกระบวนการร่วมย่อยสลายไตรคลอโรเอทรีน

การเปรียบเทียบค่าตัวแปรทางคิเนติกส์ที่ได้จากการประมาณโดยใช้โปรแกรม AQUASIM2.1b กับค่าตัวแปรทางคิเนติกส์ที่ได้จากงานวิจัยที่ผ่านมาเป็นดังตารางที่ 4.3 และ 4.4

ตารางที่ 4.3 เปรียบเทียบค่าตัวแปรทางคิเนติกส์ของกระบวนการร่วมย่อยสลายไตรคลอโรเอทิลีนโดยใช้โกลูอินเป็นซับสเตรด  
ที่ได้จากการประมาณด้วยโปรแกรม AQUASIM2.1b กับงานวิจัยที่ผ่านมา

Microorganism	Growth Substrate	$k_g$ (1/day)	$K_{sg}$ (mg/l)	$k_c$ (1/day)	$K_{sc}$ (mg/l)	Reference
<i>Burkholderia cepacia</i> G4	Toluene	9.29	1.15	0.94	0.79	Landa และคณะ, 1994
<i>Pseudomonas putida</i> B2	Toluene	4.0	2.7	1.3	6.4	Kelly และคณะ, 2000
Mixed culture	Toluene	0.44	1.02	0.17	8.64	Chang และ Alv., 1995a
Mixed culture	Toluene	1.5	1.0	0.7	10	McCarty และคณะ, 1998
<i>Pseudomonas</i> B1	Toluene	13.03	1.96	-	-	Chang และคณะ, 1993
<i>Pseudomonas</i> X1	Toluene	10.84	1.88	-	-	Chang และคณะ, 1993
<i>Burkholderia cepacia</i> G4	Toluene	8.68	0.074	3.5	1.58	Newman และคณะ, 1995
<i>Pseudomonas putida</i> F1	Toluene	20.60	13.8	-	-	Reardon และคณะ, 2000
<i>Pseudomonas putida</i> R1	Toluene	12.10	0.1	-	-	Pedersen และคณะ, 1997
<i>Pseudomonas putida</i> 54G	Toluene	10.08	3.98	-	-	Mirpuri และคณะ, 1997
<i>Pseudomonas putida</i> O1	Toluene	17.28	15.07	-	-	Oh และคณะ, 1994
<i>Pseudomonas putida</i> ATCC 23973	Toluene	10.49	6.0	-	-	Choi และคณะ, 1992
<i>Pseudomonas putida</i>	Toluene	-	-	0.49	10.12	Heald และ Jenkins, 1994
<i>Pseudomonas cepacia</i> G4	Toluene	-	-	1.706	3.81	Sun และคณะ, 1996
<i>Pseudomonas cepacia</i> G4	Toluene	-	-	1.89	1.314	Sun และคณะ, 1996
<i>Pseudomonas putida</i> F1	Toluene	-	-	0.75	0.66	Sun และคณะ, 1996
<i>Ralstonia pickettii</i> PKO1	Toluene	-	-	0.37	9.8	Park และคณะ, 2002
Mixed culture	Toluene	4.01	1.29	1.67	7.61	This study ***

\*\*\* ค่าเฉลี่ยของข้อมูลจากการทดลองชุดที่ 3 ในช่วงที่  $T_y$  มีค่าค่อนข้างคงที่แล้วคือในลำดับที่ 3 ถึง 6 ลำดับละ 3 ชั่วโมง

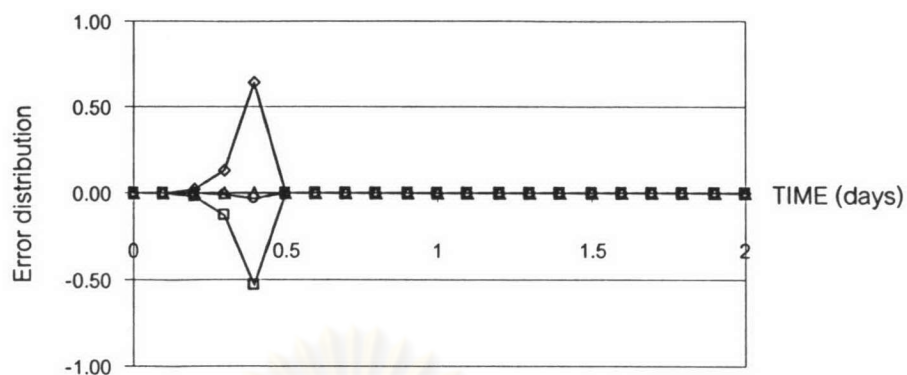
ตารางที่ 4.4 เปรียบเทียบค่าตัวแปรทางคิเนติกส์ของกระบวนการร่วมย่อยสลายไตรคลอโรเอทิลีนโดยใช้ฟีนอลและเบนซิลแอลกอฮอล์เป็นซับสเตรต  
ที่ได้จากการประมาณด้วยโปรแกรม AQUASIM2.1b กับงานวิจัยที่ผ่านมา

Microorganism	Growth Substrate	$k_g$ (1/day)	$K_{sg}$ (mg/l)	$k_c$ (1/day)	$K_{sc}$ (mg/l)	Reference
<i>Burkholderia cepacia</i> G4	Phenol	31.5	0.8	1.5	0.39	Folsom และคณะ, 1994
Mixed culture	Phenol	-	-	0.21	2.04	Chang และ Alv., 1995a
<i>Ralstonia eutropha</i> JMP134	Phenol	-	-	2.14	83	Ayoubi และ Harker, 1998
Mixed culture	Phenol	9.3	<3.3	0.33	11	Shurtliff และคณะ, 1996
<i>Actinomycetes</i>	Phenol	10.2	0.34	0.15	0.14	Lee และคณะ, 2000
<i>Burkholderia cepacia</i> E1	Phenol	3.4	0.05	0.23	3.0	Futamata และคณะ, 2001
<i>Comamonas testosteroni</i> R2	Phenol	8.8	0.08	0.13	4.2	Futamata และคณะ, 2001
<i>Comamonas testosteroni</i> E6	Phenol	2.7	0.01	0.25	4.6	Futamata และคณะ, 2001
<i>Comamonas testosteroni</i> R5	Phenol	18.3	0.04	0.19	1.5	Futamata และคณะ, 2001
<i>Pseudomonas putida</i> P35X	Phenol	6.2	0.34	0.10	15.8	Futamata และคณะ, 2001
<i>Ralstonia eutropha</i>	Phenol	8.6	0.94	-	-	Leonard และ Lindley, 1999
<i>Ralstonia eutropha</i> JMP134	Phenol	9.4	5.55	-	-	Muller และ Babel, 1995
Mixed culture	Phenol	6.0	11	-	-	Goudar และคณะ, 2000
Mixed culture	Phenol	3.5	0.07	0.16	0.3	Tejasen, 2003
Mixed culture	Phenol	5.27	0.98	1.39	6.62	This study ***
Mixed culture	Benzyl Alcohol	1.06	5.29	0.084	0.33	Tejasen, 2003
Mixed culture	Benzyl Alcohol	7.09	0.83	1.46	7.06	This study ***

\*\*\* ค่าเฉลี่ยของข้อมูลจากการทดลองชุดที่ 4 และ 5 ในช่วงที่  $T_y$  มีค่าค่อนข้างคงที่แล้วคือในลำดับที่ 3 ถึง 6 ลำดับละ 3 ชั่วโมง

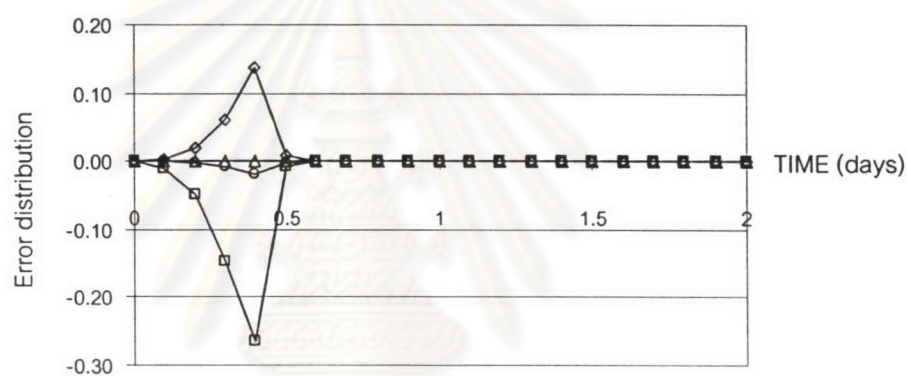
จากตารางที่ 4.3 และ 4.4 พบว่าตัวแปรทางคิเนติกส์ที่ได้จากการประมาณโดยโปรแกรม AQUASIM2.1b มีค่าต่างไปจากค่าตัวแปรทางคิเนติกส์ที่ใช้ในการออกแบบการทดลองซึ่งได้เลือกมาจากงานวิจัยที่ผ่านมา เนื่องจากค่าตัวแปรทางคิเนติกส์ที่ได้จากงานวิจัยที่ผ่านมาพัฒนามาจากการทดลองที่ใช้จุลินทรีย์พันธุ์บริสุทธิ์ (pure culture) ชนิด *Burkholderia cepacia* G4 ที่ได้ศึกษามาแล้วว่าเป็นจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพดีในการร่วมย่อยสลายไตรคลอโรเอเทธิลีน แต่การทดลองในครั้งนี้ใช้จุลินทรีย์พันธุ์ผสม (mixed culture) ที่มีความหลากหลายของเชื้อจุลินทรีย์มากและมีความซับซ้อนแปรเปลี่ยนตลอดเวลา จึงมีผลต่อค่าตัวแปรทางคิเนติกส์ของระบบ ทำให้ค่า  $k_0$  และค่า  $k_c$  มีค่าไม่คงที่ และการทำงานวิจัยที่สภาพแวดล้อมแตกต่างกัน เช่น พีเอช อุณหภูมิ ปริมาณออกซิเจน และปริมาณสารพิษ ก็เป็นอีกสาเหตุหนึ่งที่ทำให้ตัวแปรทางคิเนติกส์มีค่าไม่คงที่เช่นกัน นอกจากนี้วิธีการทดลองก็เป็นสาเหตุที่ทำให้ตัวแปรทางคิเนติกส์มีค่าต่างไปจากค่าคิเนติกส์ของคนอื่น จึงควรที่จะทำการทดลองโดยใช้ความเข้มข้นเริ่มต้นของซับสเตรตหรือไตรคลอโรเอเทธิลีนหลาย ๆ ค่าและควรวัดข้อมูลช่วงการลดลงของซับสเตรตหรือไตรคลอโรเอเทธิลีนหลาย ๆ ค่า

ทั้งนี้เมื่อพิจารณาค่าตัวแปรทางคิเนติกส์จากตารางที่ 4.3 และ 4.4 ที่มีความแตกต่างกันนั้น แบ่งได้เป็น 3 กลุ่มคือ กลุ่มที่มีค่า  $K_{s0}$  และค่า  $K_{sc}$  ต่ำ (< 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร) ปานกลาง (0.1 – 1 มิลลิกรัมต่อลิตร) และสูง (1 – 16 มิลลิกรัมต่อลิตร) และเมื่อพิจารณาตารางที่ 4.3 และ 4.4 พบว่า Futamata และคณะ 2001 ที่ทำการศึกษาค่าตัวแปรทางคิเนติกส์โดยใช้จุลินทรีย์คนละชนิด รายงานผลของค่าตัวแปรทางคิเนติกส์แตกต่างกัน ในขณะที่การทดลองที่ใช้จุลินทรีย์ชนิดเดียวกันคือ *Burkholderia cepacia* G4 ที่ทำการทดลองโดยผู้วิจัยหลาย ๆ ชุด คือ Landa และคณะ 1994 Newman และคณะ 1995 และ Sun และคณะ 1996 ก็รายงานผลของค่าตัวแปรทางคิเนติกส์แตกต่างกันเช่นกัน จากค่าตัวแปรทางคิเนติกส์ของแต่ละกลุ่มที่มีค่าแตกต่างกันมากแสดงให้เห็นว่าข้อมูลที่น่าจะมีความน่าเชื่อถือลดลง จากตารางที่ 4.2 ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) ที่ได้แสดงถึงความน่าเชื่อถือของข้อมูลเพราะฉะนั้นข้อมูลที่มีค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานต่ำจะมีความน่าเชื่อถือมากกว่าข้อมูลที่มีค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสูง ซึ่งสอดคล้องกับการคำนวณ Error distribution ของโปรแกรม AQUASIM2.1b ซึ่งแสดงได้ดังรูปที่ 4.16 ถึง 4.18



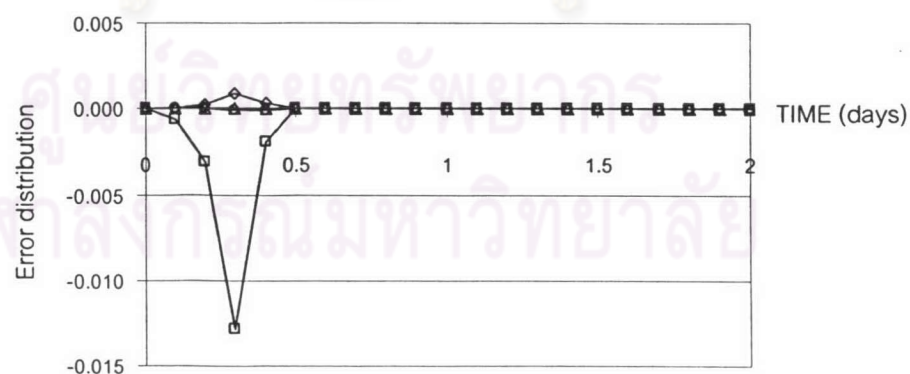
รูปที่ 4.16 Error distribution ของการร่วมย่อยสลายไตรคลอโรเอทิลีนโดยใช้โซเดียมไฮดรอกไซด์เป็นขั้วสเตรต

(□,  $k_g$ ; ◇,  $K_{sg}$ ; △,  $k_c$ ; ○,  $K_{sc}$ )



รูปที่ 4.17 Error distribution ของการร่วมย่อยสลายไตรคลอโรเอทิลีนโดยใช้ฟีนอลเป็นขั้วสเตรต

(□,  $k_g$ ; ◇,  $K_{sg}$ ; △,  $k_c$ ; ○,  $K_{sc}$ )



รูปที่ 4.18 Error distribution ของการร่วมย่อยสลายไตรคลอโรเอทิลีนโดยใช้เบนซิลแอลกอฮอล์

เป็นขั้วสเตรต (□,  $k_g$ ; ◇,  $K_{sg}$ ; △,  $k_c$ ; ○,  $K_{sc}$ )



จากรูปที่ 4.16 ถึง 4.18 เป็นการคำนวณ Error distribution ของโปรแกรม AQUASIM2.1b ในการประมาณค่าตัวแปรทางคิเนติกส์ของการรวมย่อยสลายไตรคัลอโรเอทิลีนโดยใช้ข้อสมมติต่าง ๆ เส้นกราฟที่อยู่ไกลจากแกน X มากแสดงว่ามีความผิดพลาดมาก เมื่อพิจารณาทั้ง 3 รูป จะเห็นว่าเส้นกราฟที่แสดงถึงค่า  $k_c$  และ  $K_{sc}$  ประมาณค่าตัวแปรทางคิเนติกส์ได้ผิดพลาดมากกว่าค่า  $k_o$  และ  $K_{so}$  ซึ่งสอดคล้องกับการประมาณค่าตัวแปรทางคิเนติกส์ที่เหมาะสมโดยใช้โปรแกรม AQUASIM2.1b ดังตารางที่ 4.2 ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) ที่ได้แสดงถึงความน่าเชื่อถือของข้อมูล ค่า  $k_o$  และ  $K_{so}$  เป็นข้อมูลที่มีค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานต่ำจะมีความน่าเชื่อถือมากกว่าค่า  $k_c$  และ  $K_{sc}$  ซึ่งเป็นข้อมูลที่มีค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสูง

และเมื่อพิจารณาค่าตัวแปรทางคิเนติกส์ที่ได้จากการประมาณโดยโปรแกรมในการทดลองครั้งนี้สำหรับข้อสมมติทั้ง 3 ชนิด พบว่าค่า  $K_{so}$  ของจุลินทรีย์ที่ใช้โกลูอินเป็นข้อสมมติอยู่ในช่วงปานกลาง และค่า  $K_{so}$  ของจุลินทรีย์ที่ใช้พินอลและเบนซิลแอลกอฮอล์เป็นข้อสมมติอยู่ในช่วงสูง ส่วนค่า  $K_{sc}$  ของจุลินทรีย์ที่ใช้ข้อสมมติทั้ง 3 ชนิดอยู่ในช่วงสูง ซึ่งค่า  $K_{so}$  ที่น้อยกว่าค่า  $K_{sc}$  มากแสดงว่าเกิด Competitive inhibition อย่างเห็นได้ชัด โดยจุลินทรีย์จะย่อยสลายสารที่มีค่า  $K_{so}$  น้อยกว่าก่อนแล้วค่อยย่อยสลายสารที่มีค่า  $K_{sc}$  มาก ซึ่งสอดคล้องกับผลการวิจัยครั้งนี้ที่จุลินทรีย์ย่อยสลายข้อสมมติหมดก่อนแล้วจึงย่อยสลายไตรคัลอโรเอทิลีน

อย่างไรก็ตามผู้ที่นำค่าตัวแปรทางคิเนติกส์เหล่านี้ไปใช้จะต้องประยุกต์ใช้ด้วยความระมัดระวังโดยต้องทำความเข้าใจหลักการและกลไกของกระบวนการรวมทั้งที่มาที่ไปของข้อมูลให้ดีเสียก่อน หากสามารถวิจัยและทดลองหาค่าตัวแปรทางคิเนติกส์ขึ้นมาเองสำหรับงานนั้น ๆ โดยเฉพาะก็สมควรทำเป็นอย่างยิ่งเพราะจะทำให้งานที่ได้มีความถูกต้องแม่นยำมากขึ้น

ในทางปฏิบัติการนำข้อมูลนี้ไปใช้ออกแบบการทดลองแบบคอลัมน์หรือนำข้อมูลไปประยุกต์ใช้บำบัดการปนเปื้อนของไตรคัลอโรเอทิลีนในภาคสนามก็ตาม ถือได้ว่าข้อมูลนี้เป็นค่าที่ยังไม่ปลอดภัย ซึ่งอาจทำให้เกิดความเสียหายต่อระบบนิเวศน์ ความปลอดภัยของมนุษย์และสัตว์ ดังนั้นจึงต้องมีการตรวจสอบโปรแกรมด้วยการทดลองที่มีสภาพใกล้เคียงกับการนำไปใช้จริง และในการนำไปใช้งานในภาคสนามจริงค่าตัวแปรทางคิเนติกส์เหล่านี้มีโอกาสเปลี่ยนแปลงได้อีก จึงควรจะมีการติดตามตรวจสอบผลอยู่เสมอ ๆ