



โครงการ
การเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์

ชื่อโครงการ การย่อยสลายทางชีวภาพของพทาเลท เอสเทอร์ โดยแบคทีเรียที่คัดแยก
จากดินบริเวณกองขยะและดินตะกอนทะเล
(Biodegradation of phthalate esters by bacteria isolated from
waste dumping site soil and marine sediment)

ชื่อนิสิต นางสาวเมยารวี สกริพันธ์ เลขประจำตัว 5832342023

ภาควิชา จุลชีววิทยา

ปีการศึกษา 2561

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการทางวิชาการที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)

เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการทางวิชาการที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

The abstract and full text of senior projects in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the senior project authors' files submitted through the faculty.

ชื่อโครงการ	การย่อยสลายทางชีวภาพของพทาเลท เอสเทอร์ โดยแบคทีเรียที่คัดแยกจากดินบริเวณกองขยะและดินตะกอนทะเล
นิสิตผู้เสนอโครงการ	นางสาวเมยวีย์ สิริพันธ์
อาจารย์ที่ปรึกษา	รศ.ดร. อรุณทัย ภิญญาคง
ภาควิชา	จุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปีการศึกษา 2561

พทาเลท เอสเตอร์ (Phthalate esters : PAEs) เป็นสารเคมีที่ใช้เติมในกระบวนการผลิตพลาสติก (plasticizer) เพื่อเพิ่มความยืดหยุ่น ทนทาน และโปร่งใสแก่พลาสติก โดยนิยมใช้ในอุตสาหกรรมหลายชนิด เช่น การผลิตผลิตภัณฑ์บรรจุอาหารและการผลิตเครื่องมือแพทย์ เป็นต้น โมเลกุล PAEs ยึดเกาะกับโครงสร้างพลาสติกได้ไม่ดี จึงทำให้หลุดออกจากพลาสติกปนเปื้อนสู่สิ่งแวดล้อมได้ง่าย ส่งผลกระทบต่อระบบนิเวศ นอกจากนี้ PAEs ยังถูกจัดเป็นสารรบกวนการทำงานของต่อมไร้ท่อ (endocrine disrupting compounds: EDCs) ส่งผลกระทบต่อมนุษย์ ดังนั้นการบำบัดสิ่งแวดล้อมปนเปื้อน PAEs จึงเป็นสิ่งจำเป็น โดยวัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้คือ คัดแยกกลุ่มแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลาย PAEs ที่มีโครงสร้างเป็นแอลคิลสายยาว ได้แก่ ได-2-เอทิลเฮกซิล พทาเลท (Di-2-ethylhexyl pththalate: DEHP) ไดบิวทิล พทาเลท (Dibutyl phthalate: DBP) และ PAEs ที่มีโครงสร้างเป็นแอลคิลสายสั้น ได้แก่ ไดเอทิล พทาเลท (Diethyl phthalate: DEP) และ ไดเมทิล พทาเลท (Dimethyl phthalate: DMP) ซึ่ง PAEs ทั้ง 4 ชนิดนี้ นิยมใช้ในอุตสาหกรรมพลาสติกอย่างแพร่หลาย โดยสามารถคัดแยกกลุ่มแบคทีเรียย่อยสลาย PAEs ได้จำนวน 5 กลุ่ม จากตัวอย่างดินกองขยะจากโรงกำจัดมูลฝอยหนองแขม จังหวัดกรุงเทพมหานครและจากดินตะกอนทะเลอ่าวไทย จากนั้นทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลาย PAEs แต่ละชนิดในอาหารเหลว CFMM หรือ NSW ที่มีความเข้มข้นของ PAEs เท่ากับ 100 มิลลิกรัม/ลิตร จากนั้นวิเคราะห์ปริมาณ PAEs ที่เหลืออยู่ด้วยเครื่อง GC-FID ผลการทดลองกลุ่มแบคทีเรียทั้งหมดสามารถย่อยสลาย PAEs ได้อย่างสมบูรณ์ในระยะเวลา 7 วัน โดยเฉพาะกลุ่มแบคทีเรีย LF-NK-DEHP พบว่ามีประสิทธิภาพในการย่อยสลาย DEHP ได้สูงที่สุดในเวลา 2 วัน นอกจากนี้ยังได้ทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลาย PAEs โดยแบคทีเรียย่อยสลายน้ำมันดิบ *Exiguobacterium* sp. AO-11 (MSCU-0807) ผลการทดลองพบว่า *Exiguobacterium* sp. AO-11 สามารถย่อยสลาย DMP ได้อย่างสมบูรณ์ในเวลา 5 วัน งานวิจัยนี้ทำให้ได้แบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลาย PAEs ซึ่งสามารถนำไปใช้สำหรับบำบัดสิ่งแวดล้อมปนเปื้อน PAEs ได้ต่อไป

TITLE	Biodegradation of phthalate esters by bacteria isolated from waste dumping site soil and marine sediment
INVESTIGATION	Miss Meyawee Satiraphan
ADVISOR	Assoc. Prof. Onruthai Pinyakong, Ph.D.
DEPARTMENT	Microbiology, Faculty of science, Chulalongkorn University

Phthalate esters (PAEs) are the group of chemical components in plastic manufacturing (plasticizer) added to raise flexibility, strength and transparency to the plastic. They are popular used in various manufacturing industries such as food containing and medical tools manufacture. PAEs molecules adhere to plastic structures poorly, making it easy to peel from plastic waste into the environment. The contamination of PAEs has effects to ecosystem since PAEs are classified as endocrine disrupting compounds. It is necessary and urgent to remediate the PAEs-contaminated environment. This study aims to obtain bacterial consortia capable of degrading PAEs with long alkyl chain (di-2-ethylhexyl phthalate (DEHP) and dibutyl phthalate (DBP)) and short alkyl chain (diethyl phthalate (DEP) and dimethyl phthalate (DMP)) which are widely used in manufacturing. Five consortia were obtained from enrichment using samples from waste dumping site soil from Nongkham, Bangkok and marine sediment from Gulf of Thailand and PAEs as sole carbon source. PAEs degrading ability was examined in carbon free mineral medium or nutrient seawater medium supplemented with 100 mg L^{-1} of each PAEs separately and the remaining PAEs was analyzed by gas chromatography-flame ionization detector. As a result, all consortia could completely degrade PAEs within 7 days. Interestingly, consortium LF-NK-DEHP showed the highest efficiency in degrading DEHP in which complete degradation was found within 2 days. Moreover, degradation of PAEs by crude oil-degrading *Exiguobacterium* sp. AO-11 from our culture collection was also tested and the result found that it entirely utilized DMP within 5 days. This study provided the candidate PAEs-degrading bacteria which can be used in further bioremediation of PAEs-contaminated environment.

กิตติกรรมประกาศ

โครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี ด้วยความอนุเคราะห์จาก รศ. ดร. อรุทัย ภิญญาคง อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการ ซึ่งท่านได้ให้คำแนะนำและข้อคิดเห็นต่าง ๆ อันเป็นประโยชน์อย่างยิ่งในการทำวิจัย อีกทั้งยังช่วยแก้ปัญหาต่าง ๆ ที่เกิดขึ้นระหว่างการดำเนินงาน ทางผู้จัดทำโครงการขอกราบขอบพระคุณด้วยความเคารพอย่างสูงมา ณ โอกาสนี้

ขอกราบขอบพระคุณคณาจารย์ทุกท่านในภาควิชาจุลชีวะวิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ได้ถ่ายทอดความรู้อันเป็นประโยชน์สำหรับการทำวิจัยในครั้งนี้

ขอกราบขอบพระคุณเจ้าหน้าที่ภาควิชาจุลชีวะวิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยทุกท่าน ที่คอยช่วยเหลือและอำนวยความสะดวกแก่ผู้วิจัยในการดำเนินงาน รวมถึงให้การสนับสนุนด้านเครื่องมือและอุปกรณ์สำหรับการทำวิจัยในครั้งนี้

ขอขอบคุณพี่ ๆ ปริญาโท และปริญาเอกทุกคน โดยเฉพาะพี่หนูโบว์ พี่ไอซ์ และพี่กริ่ง ที่ให้ความช่วยเหลือ และให้คำแนะนำต่าง ๆ ทั้งการใช้อุปกรณ์เครื่องมือและปัญหาที่พบระหว่างการดำเนินงานวิจัยในครั้งนี้

ขอขอบคุณเพื่อน ๆ ภาควิชาจุลชีวะวิทยา รุ่นที่ 42 ทุกคนที่คอยช่วยเหลือและให้กำลังใจ จนผู้วิจัยดำเนินงานวิจัยสำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

สุดท้ายนี้ ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดา ที่ให้การสนับสนุน ช่วยเหลือและให้กำลังใจเสมอมา จนผู้วิจัยสามารถทำโครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์ในครั้งนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

เมยารวี สิริพันธ์

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ	ก
Abstract	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญตาราง	จ
สารบัญรูป	ฉ
บทที่1 บทนำ	1
บทที่2 เครื่องมือ วัสดุ เคมีภัณฑ์	7
บทที่3 วิธีดำเนินการทดลอง	9
บทที่4 ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง	12
บทที่5 บทสรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง	23
เอกสารอ้างอิง	22
ภาคผนวก ก	29
ภาคผนวก ข	31
ภาคผนวก ค	33

สารบัญตาราง

	หน้า	
ตารางที่ 5.1	ตารางสรุปประสิทธิภาพการย่อยสลายสารกลุ่ม PAEs โดยกลุ่มแบคทีเรียที่คัดแยกจากดินกองขยะ เปรียบเทียบกับงานวิจัยอื่นๆ	22
ตารางที่ 5.2	ตารางสรุปประสิทธิภาพการย่อยสลายสารกลุ่ม PAEs โดย AO-11	23
ค.1	ประสิทธิภาพการย่อยสลาย PAEs โดยกลุ่มแบคทีเรียที่คัดแยกจากดินกองขยะ	
ตารางที่ ค.1	ข้อมูลพื้นที่ได้กราฟแสดงถึงความเข้มข้นคงเหลือของ DMP วิเคราะห์โดย GC-FID	35
ตารางที่ ค.2	ข้อมูลพื้นที่ได้กราฟแสดงถึงความเข้มข้นคงเหลือของ DEP วิเคราะห์โดย GC-FID	35
ตารางที่ ค.3	ข้อมูลพื้นที่ได้กราฟแสดงถึงความเข้มข้นคงเหลือของ DBP วิเคราะห์โดย GC-FID	35
ตารางที่ ค.4	ข้อมูลพื้นที่ได้กราฟแสดงถึงความเข้มข้นคงเหลือของ DEHP วิเคราะห์โดย GC-FID	36
ค.2	ประสิทธิภาพการย่อยสลาย PAEs โดยกลุ่มแบคทีเรียที่คัดแยกจากดินตะกอน	
ตารางที่ ค.5	ข้อมูลพื้นที่ได้กราฟแสดงถึงความเข้มข้นคงเหลือของ DEP วิเคราะห์โดย GC-FID	36
ค.3	ประสิทธิภาพการย่อยสลาย PAEs โดยแบคทีเรีย <i>Exiguobacterium</i> sp. AO-11	
ตารางที่ ค.6	ข้อมูลพื้นที่ได้กราฟแสดงถึงความเข้มข้นคงเหลือของ DMP วิเคราะห์โดย GC-FID	36
ตารางที่ ค.7	ข้อมูลพื้นที่ได้กราฟแสดงถึงความเข้มข้นคงเหลือของ DEP วิเคราะห์โดย GC-FID	37
ตารางที่ ค.8	ข้อมูลพื้นที่ได้กราฟแสดงถึงความเข้มข้นคงเหลือของ DEHP วิเคราะห์โดย GC-FID	37
ค.4	ประสิทธิภาพการย่อยสลาย PAEs โดยแบคทีเรีย MSP_DEHP04	
ตารางที่ ค.9	ข้อมูลพื้นที่ได้กราฟแสดงถึงความเข้มข้นคงเหลือของ DEHP วิเคราะห์โดย GC-FID	37
ค.5	จำนวนแบคทีเรียทั้งหมดและแบคทีเรียย่อยสลาย PAEs ในแต่ละกลุ่มแบคทีเรีย	
ตารางที่ ค.10	จำนวนแบคทีเรียทั้งหมดในกลุ่มแบคทีเรีย LF-NK-DMP DMP ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัม/ลิตร เป็นเวลา 7 วัน	38
ตารางที่ ค.11	จำนวนแบคทีเรียทั้งหมดและแบคทีเรียย่อยสลาย DEP ในกลุ่มแบคทีเรีย LF-NK-DEP ระหว่างการย่อยสลาย DEP ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัม/ลิตร เป็นเวลา 7 วัน	38
ตารางที่ ค.12	จำนวนแบคทีเรียทั้งหมดและแบคทีเรียย่อยสลาย DBP ในกลุ่มแบคทีเรีย LF-NK-DBP ระหว่างการย่อยสลาย DBP ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัม/ลิตร เป็นเวลา 7 วัน	38
ตารางที่ ค.13	จำนวนแบคทีเรียทั้งหมดและแบคทีเรียย่อยสลาย DEHP ในกลุ่มแบคทีเรีย LF-NK-DEHP ระหว่างการย่อยสลาย DEHP ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัม/ลิตร เป็นเวลา 7 วัน	38
ตารางที่ ค.14	จำนวนแบคทีเรียทั้งหมดและแบคทีเรียย่อยสลาย DEP ในกลุ่มแบคทีเรีย ST10-DEP ระหว่างการย่อยสลาย DEP ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัม/ลิตร เป็นเวลา 7 วัน	39
ตารางที่ ค.15	จำนวนแบคทีเรียทั้งหมดของ <i>Exiguobacterium</i> sp. AO-11 ระหว่างการย่อยสลาย DEP ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัม/ลิตร เป็นเวลา 7 วัน	39
ตารางที่ ค.16	จำนวนแบคทีเรียทั้งหมดของ <i>Exiguobacterium</i> sp. AO-11 ระหว่างการย่อยสลาย DMP ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัม/ลิตร เป็นเวลา 7 วัน	39
ตารางที่ ค.17	จำนวนแบคทีเรียทั้งหมดของ <i>Exiguobacterium</i> sp. AO-11 ระหว่างการย่อยสลาย DEHP ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัม/ลิตร เป็นเวลา 7 วัน	39
ตารางที่ ค.18	จำนวนแบคทีเรียทั้งหมดของ MSP_DEHP04 ระหว่างการย่อยสลาย DEHP ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัม/ลิตร เป็นเวลา 7 วัน	40

สารบัญรูป

	หน้า
รูปที่ 1.1 โครงสร้างทางเคมีของพทาเลท เอสเตอร์ เป็นวงอะโรมาติก ซึ่งมี R และ R' เป็นหมู่ข้าง	2
รูปที่ 1.2 โครงสร้างทางเคมีของพทาเลท เอสเตอร์ (PAEs) ที่ใช้ในงานวิจัยนี้ ได้แก่ ได-2-เอทิลเฮกซิล พทาเลท (Di-2-ethylhexyl pththalate: DEHP) (ก) ไดบิวทิล พทาเลท (Dibutyl phthalate: DBP) (ข) ไดเอทิล พทาเลท (Diethyl phthalate: DEP) (ค) และไดเมทิล พทาเลท (Dimethyl phthalate: DMP) (ง)	2
รูปที่ 1.3 วิธีการย่อยสลายทางชีวภาพของสารกลุ่มพทาเลท เอสเทอร์ โดย <i>Bacillus mojavensis</i> B1811	5
รูปที่ 1.4 สถานที่เก็บตัวอย่างดินที่ใช้ในงานวิจัย ได้แก่ โรงกำจัดมูลฝอยหนองแขม จังหวัดกรุงเทพมหานคร (13.719694°E, 100.353471°N) (ก) ดินตะกอนทะเลจากบริเวณอ่าวไทย ST-10 (11.780908°E, 100.875043°N) (ข)	5
รูปที่ 3.1 ลักษณะดิน และการทับถมของขยะที่โรงกำจัดมูลฝอยหนองแขม	8
รูปที่ 4.1 ผลการทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลาย DMP ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัม/ลิตร วิเคราะห์ปริมาณ DMP ที่เหลืออยู่ด้วย GC-FID และผลการนับจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดในกลุ่มแบคทีเรีย LF-NK-DMP ระหว่างการย่อยสลาย เป็นเวลา 7 วัน	13
รูปที่ 4.2 ลักษณะโคโลนีที่เจริญในวันที่ 2 (ก) และลักษณะโคโลนีที่เจริญในวันที่ 7 (ข) บนอาหารเลี้ยงเชื้อ LB agar	13
รูปที่ 4.3 ผลการทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลาย DEP ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัม/ลิตร วิเคราะห์ปริมาณ DEP ที่เหลืออยู่ด้วย GC-FID และผลการนับจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดและแบคทีเรียย่อยสลาย DEP ในกลุ่มแบคทีเรีย LF-NK-DEP ระหว่างการย่อยสลายเป็นเวลา 7 วัน	14
รูปที่ 4.4 ลักษณะโคโลนีที่เจริญบน LB agar (ก) และลักษณะโคโลนีที่เจริญบน CFMM agar ที่เติม DEP ความเข้มข้น 100 ppm (ข)	14
รูปที่ 4.5 รูปแบบโคโลนีที่แตกต่างกันได้แก่ สีขาว MSP_DEP01(ก) สีครีม MSP_DEP02 (ข) และสีส้ม MSP_DEP03 (ค)	15
รูปที่ 4.6 ผลการทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลาย DBP ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัม/ลิตร วิเคราะห์ปริมาณ DBP ที่เหลืออยู่ด้วย GC-FID และผลการนับจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดและแบคทีเรียย่อยสลาย DBP ในกลุ่มแบคทีเรีย LF-NK-DBP ระหว่างการย่อยสลายเป็นเวลา 7 วัน	15
รูปที่ 4.7 ลักษณะโคโลนีที่เจริญบน LB agar (ก) และลักษณะโคโลนีที่เจริญบน CFMM agar ที่เติม DBP ความเข้มข้น 100 ppm (ข)	16
รูปที่ 4.8 ผลการทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลาย DEHP ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัม/ลิตร วิเคราะห์ปริมาณ DEHP ที่เหลืออยู่ด้วย GC-FID และผลการนับจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดและแบคทีเรียย่อยสลาย DEHP ในกลุ่มแบคทีเรีย LF-NK-DEHP ระหว่างการย่อยสลายเป็นเวลา 7 วัน	16

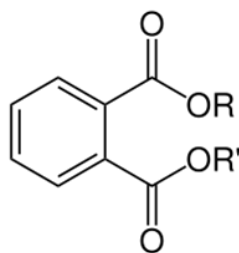
รูปที่ 4.9	ลักษณะโคโลนีที่เจริญบน LB agar (ก) และลักษณะโคโลนีที่เจริญบน CFMM agar ที่เติม DEHP ความเข้มข้น 100 ppm (ข)	17
รูปที่ 4.10	รูปแบบโคโลนีที่แตกต่างกันได้แก่ สีขาว MSP_DEHP04 (ก) สีครีม MSP_DEHP05 (ข) และสีเหลือง MSP_DEHP06 (ค)	17
รูปที่ 4.11	ผลการทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลาย DEP ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัม/ลิตร วิเคราะห์ปริมาณ DEP ที่เหลืออยู่ด้วย GC-FID และผลการนับจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดและแบคทีเรียย่อยสลาย DEP ในกลุ่มแบคทีเรีย ST10-DEP ระหว่างการย่อยสลายเป็นเวลา 7 วัน	18
รูปที่ 4.12	ลักษณะโคโลนีที่เจริญบน marine agar (ก) และลักษณะโคโลนีที่เจริญบน NSW agar ที่เติม DEP ความเข้มข้น 100 ppm(ข)	18
รูปที่ 4.13	ผลการทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลาย DEHP ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัม/ลิตร วิเคราะห์ปริมาณ DEHP ที่เหลืออยู่ด้วย GC-FID และผลการนับจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดและแบคทีเรียย่อยสลาย DEHP ระหว่างการย่อยสลายเป็นเวลา 7 วัน โดย MSP_DEHP04	19
รูปที่ 4.14	ผลการทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลาย DEP ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัม/ลิตร วิเคราะห์ปริมาณ DEP ที่เหลืออยู่ด้วย GC-FID และผลการนับจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดและแบคทีเรียย่อยสลาย DEP ระหว่างการย่อยสลายเป็นเวลา 7 วัน โดย <i>Exiguobacterium</i> sp. AO-11	20
รูปที่ 4.15	ผลการทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลาย DMP ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัม/ลิตร วิเคราะห์ปริมาณ DMP ที่เหลืออยู่ด้วย GC-FID และผลการนับจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดและแบคทีเรียย่อยสลาย DMP ระหว่างการย่อยสลายเป็นเวลา 7 วัน โดย <i>Exiguobacterium</i> sp. AO-11	20
รูปที่ 4.16	ผลการทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลาย DEHP ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัม/ลิตร วิเคราะห์ปริมาณ DEHP ที่เหลืออยู่ด้วย GC-FID และผลการนับจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดและแบคทีเรียย่อยสลาย DEHP ระหว่างการย่อยสลายเป็นเวลา 7 วัน โดย <i>Exiguobacterium</i> sp. AO-11	21
รูปที่ ค.1	กราฟมาตรฐานของ DMP ในช่วงความเข้มข้น 25 มิลลิกรัม/ลิตร ถึง 400 มิลลิกรัม/ลิตร วิเคราะห์โดย GC-FID	33
รูปที่ ค.2	กราฟมาตรฐานของ DEP ในช่วงความเข้มข้น 25 มิลลิกรัม/ลิตร ถึง 400 มิลลิกรัม/ลิตร วิเคราะห์โดย GC-FID	33
รูปที่ ค.3	กราฟมาตรฐานของ DBP ในช่วงความเข้มข้น 25 มิลลิกรัม/ลิตร ถึง 400 มิลลิกรัม/ลิตร วิเคราะห์โดย GC-FID	34
รูปที่ ค.4	กราฟมาตรฐานของ DBP ในช่วงความเข้มข้น 25 มิลลิกรัม/ลิตร ถึง 400 มิลลิกรัม/ลิตร วิเคราะห์โดย GC-FID	34

บทที่ 1

บทนำ

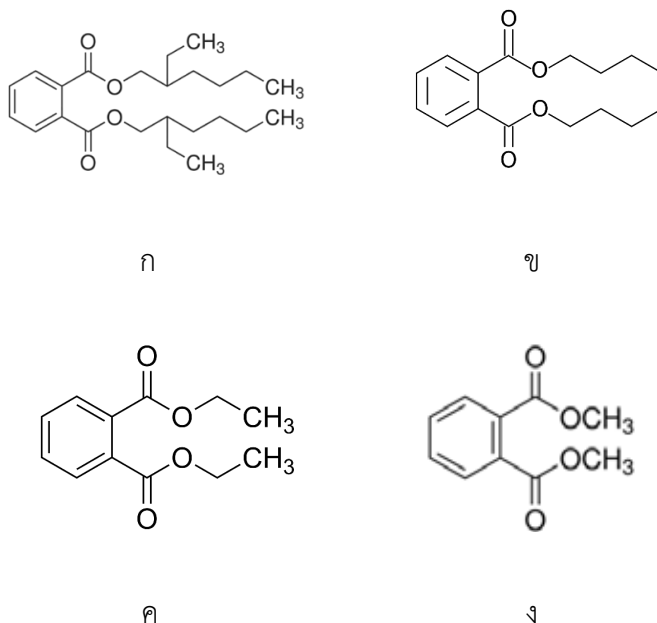
ในปัจจุบันปริมาณการใช้พลาสติกเพิ่มสูงขึ้น ส่งผลให้เกิดขยะพลาสติกมากขึ้น ในขณะที่กระบวนการกำจัดพลาสติกยังไม่มีประสิทธิภาพหรือได้รับความใส่ใจเท่าที่ควร ทำให้ขยะพลาสติกปนเปื้อนสู่ธรรมชาติทั้งพื้นดินและมหาสมุทร โดยในแต่ละปีมีปริมาณขยะพลาสติกจากทั่วโลกเฉลี่ย 8 ล้านตันถูกปล่อยลงสู่มหาสมุทร โดยประเทศไทยถูกจัดอยู่ในลำดับที่ 6 ของประเทศที่ปล่อยขยะพลาสติกสู่มหาสมุทรมากที่สุดจากการประเมินปริมาณขยะจากชายฝั่งของประเทศทั่วโลก (Jambeck และคณะ, 2015) ถึงแม้ว่าประเทศไทยจะมีการรณรงค์ให้ลดการใช้พลาสติก แต่จำนวนการใช้พลาสติกยังคงเพิ่มสูงขึ้น เนื่องจากการเพิ่มขึ้นของจำนวนประชากร การขยายตัวของชุมชนเมือง และพฤติกรรมบริโภคของประชาชน เป็นต้น โดยในปี พ.ศ. 2560 มีขยะมูลฝอยเกิดขึ้น 27.40 ล้านตัน หรือ 75,046 ตันต่อวัน เพิ่มขึ้น 1.26 เปอร์เซ็นต์ จากในปี พ.ศ. 2559 ซึ่งปริมาณขยะมูลฝอยที่ถูกนำไปกำจัดอย่างถูกต้องมีประมาณ 11.7 ล้านตัน หรือ 32,069 ตันต่อวัน คิดเป็นร้อยละ 42.7 ของปริมาณขยะมูลฝอยชุมชนทั้งหมด และขยะมูลฝอยที่ไม่สามารถนำกลับไปใช้ใหม่ได้จะถูกกองทิ้งในบ่อดิน หรือที่รกร้าง ทำให้เกิดการทับถมและอาจเกิดสารพิษตกค้างได้ โดยหนึ่งในปริมาณขยะมูลฝอยที่พบมาก ได้แก่ ขยะพลาสติก (กรมควบคุมมลพิษ, 2560)

พทาเลท เอสเตอร์ (Phthalate esters : PAEs) หรือ PAEs เป็นสารประกอบอะโรมาติกที่มีหมู่คาร์บอกซิลเลท 2 หมู่ (Berg และคณะ, 2003) แสดงโครงสร้างทางเคมีดังรูปที่ 1.1 มีลักษณะเป็นของเหลวใสคล้ายน้ำมัน นิยมใช้เป็นสารเคมีที่เติมในกระบวนการผลิตพลาสติก (plasticizer) เพื่อเพิ่มความยืดหยุ่น ทนทาน และโปร่งใสแก่พลาสติก เนื่องจาก PAEs เป็นสารที่ไม่ระเหย มีคุณสมบัติในการหลอมรวมได้ดี ราคาถูก จึงเป็นที่นิยมในอุตสาหกรรมหลากหลายชนิด โดยเฉพาะอย่างยิ่งการผลิตพลาสติกชนิดพอลิไวนิลคลอไรด์ (Polyvinyl chloride : PVC) (Mersiowsky และคณะ, 2001) โดยในประเทศไทยนั้นมีการผลิต PVC ส่งออกมากที่สุดเป็นอันดับ 1 ในอาเซียน PVC นั้นจัดเป็นวัสดุพอลิเมอร์เอนกประสงค์ มีการประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมหลายชนิด เช่น การผลิตภาชนะบรรจุอาหาร การผลิตเครื่องมืออำนวยความสะดวก และการผลิตเครื่องมือแพทย์ เป็นต้น เมื่อสิ้นสุดการผลิตจะมีปริมาณของ PAEs เท่ากับ 10 - 60 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักพลาสติก (IARC, 2000) โดยโมเลกุล PAEs ไม่เกิดการจับแบบพันธะเคมีกับโครงสร้างของพลาสติก ทำให้สามารถหลุดลอกจากพลาสติกสู่สิ่งแวดล้อมได้ง่าย PAEs ถูกย่อยสลายโดยธรรมชาติได้ยาก เนื่องจากโครงสร้างทางเคมีและความเป็นโมเลกุลไม่มีขั้วจึงไม่ละลายน้ำ แต่ส่วนมากละลายได้ในสารอินทรีย์และน้ำมัน โดยพบปนเปื้อนทั้งในดิน แหล่งน้ำ และอากาศ เกิดการสะสมในธรรมชาติและเข้าสู่ห่วงโซ่อาหารของสัตว์ในที่สุด (Pant และคณะ, 2008; Sargazi และคณะ, 2017) และมีรายงานว่า PAEs บางชนิดถูกจัดให้เป็นสารพิษต่อร่างกายมนุษย์ประเภท B1 ที่สามารถทำให้เกิดอันตรายต่อเด็กแรกเกิด เนื่องจากสามารถยับยั้งการสร้างฮอร์โมนชนิดเทสโทสเตอโรน (Testosterone) ที่มีความสำคัญต่อพัฒนาการของอวัยวะสืบพันธุ์เพศชาย ทำให้ระบบสืบพันธุ์ไม่มีประสิทธิภาพ (Birgit และคณะ, 2018) และยังทำให้อัตราการตั้งครรภ์มีน้อยลง (Reddy และคณะ, 2006)



รูปที่ 1.1 โครงสร้างทางเคมีของพทาเลท เอสเตอร์ เป็นวงอะโรมาติก ซึ่งมี R และ R' เป็นหมู่ข้าง
(Berg และคณะ, 2003)

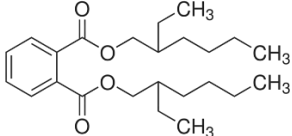
PAEs ที่ใช้ในงานวิจัยนี้มีทั้งหมด 4 ชนิด ได้แก่ ได-2-เอทิลเฮกซิล พทาเลท (Di-2-ethylhexyl pththalate: DEHP) ไดบิวทิล พทาเลท (Dibutyl pththalate: DBP) ไดเอทิล พทาเลท (Diethyl pththalate: DEP) และ ไดเมทิล พทาเลท (Dimethyl pththalate: DMP) ซึ่งมีโครงสร้างทางเคมีแสดงดังรูปที่ 1.2 (ก-ง) โดย PAEs ทั้ง 4 ชนิด นิยมใช้ในอุตสาหกรรมต่างๆ โดยแบ่งลักษณะการใช้งานตามขนาดความยาวของสายแอลคิล ได้แก่ พทาเลท เอสเตอร์ที่มีแอลคิลสายสั้น เช่น DMP, DEP มักใช้ในการผลิตเครื่องสำอาง และน้ำหอม DEHP และ DBP ซึ่งมีแอลคิลสายยาวนิยมใช้ในการผลิต PVC เป็นต้น โดย PAEs ทั้ง 4 ชนิดนี้ถูกจัดให้อยู่ในรายชื่อสารมลพิษ (priority pollutants) และเป็นสารรบกวนการทำงานของต่อมไร้ท่อ (endocrine disrupting compounds: EDCs) โดยองค์การพิทักษ์สิ่งแวดล้อมสหรัฐอเมริกา (US Environmental Protection Agency, USEPA) (Matsumoto และคณะ, 2008; Tickner และคณะ, 2001) นอกจากนี้ในธรรมชาติไม่ได้มีการปนเปื้อน PAEs ชนิดใดชนิดหนึ่งเท่านั้น แต่มักพบในรูป PAEs ผสม ดังนั้นการศึกษา PAEs หลายชนิดจึงเป็นประโยชน์อย่างมาก

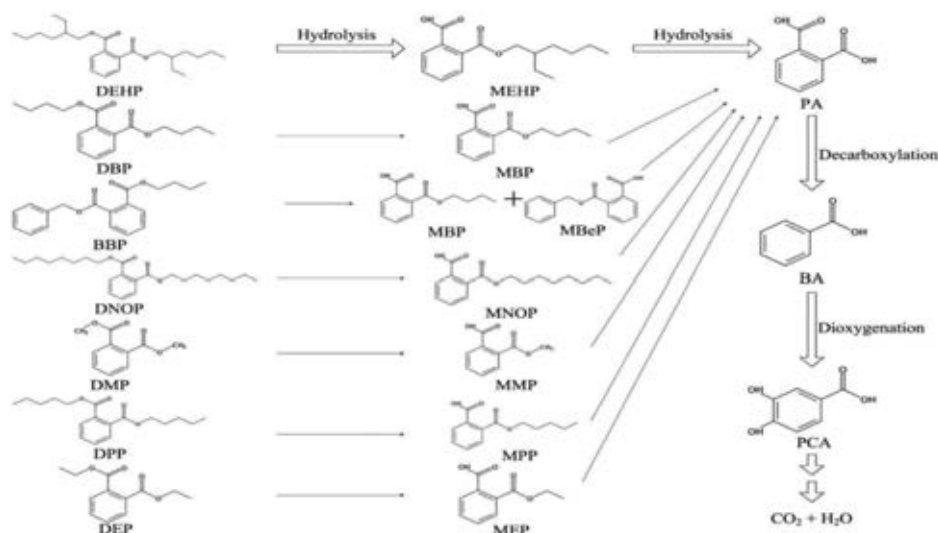


รูปที่ 1.2 โครงสร้างทางเคมีของพทาเลท เอสเตอร์ (PAEs) ที่ใช้ในงานวิจัยนี้ได้แก่ ได-2-เอทิลเฮกซิล พทาเลท (Di-2-ethylhexyl pththalate: DEHP) (ก) ไดบิวทิล พทาเลท (Dibutyl pththalate: DBP) (ข) ไดเอทิล พทาเลท (Diethyl pththalate: DEP) (ค) และ ไดเมทิล พทาเลท (Dimethyl pththalate: DMP) (ง)
(Merck, 2019)

ในปัจจุบันมีการศึกษาค้นคว้าเกี่ยวกับการกำจัด PAEs สามารถแบ่งได้เป็น 3 วิธี ได้แก่ วิธีทางกายภาพ และเคมี เช่น กระบวนการโคแอกกูเลชัน และฟล็อกคูเลชัน (Coagulation & Flocculation) การดูดซับ (Adsorption) โดยใช้แอคติเวเต็ดคาร์บอน เป็นต้น สำหรับวิธีทางชีวภาพเป็นอีกวิธีที่ใช้กำจัด PAEs โดยใช้ เอนไซม์จากจุลินทรีย์ที่หลั่งเพื่อย่อยสลาย PAEs ให้เป็นมวลชีวภาพสำหรับกิจกรรมในการเจริญเติบโต ซึ่งเป็นวิธีที่ได้รับความนิยมอย่างมาก เนื่องจากสามารถปรับเปลี่ยนระบบได้ง่าย ค่าการลงทุนและไม่ก่อให้เกิดมลภาวะ (Nahurira และคณะ, 2017) โดยมีงานวิจัยที่ได้คัดแยกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลายพทาเลท เอสเทอร์ได้ แสดงดังตารางที่ 1.1

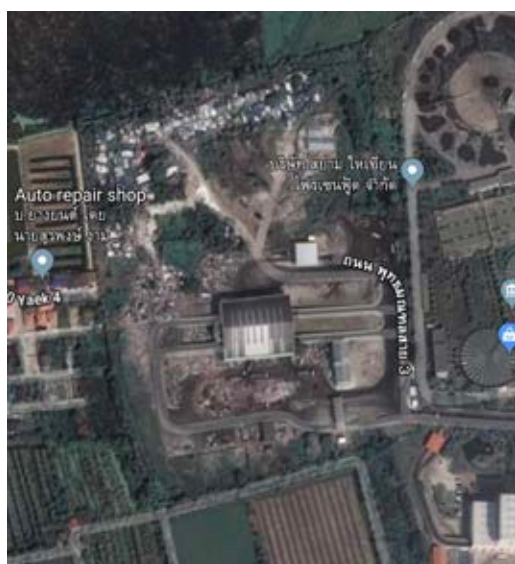
ตารางที่ 1.1 ตัวอย่างแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลายพทาเลท เอสเทอร์

ชนิดพทาเลท เอสเทอร์	แบคทีเรียที่ย่อยสลาย	สถานที่เก็บตัวอย่าง	สภาวะ	ประสิทธิภาพการย่อยสลาย	อ้างอิง
Di (2-Ethylhexyl) phthalate: DEHP 	<i>Mycobacterium</i> sp. YC-RL4	ดินที่ปนเปื้อนจากน้ำมันปิโตรเลียม	30°C	มากกว่า 85 เปอร์เซ็นต์ ใน 5 วัน (ความเข้มข้นเริ่มต้น 50 มิลลิกรัม/ลิตร)	(Ren และคณะ, 2016)
	<i>Rhodococcus</i> sp. WJ4	ดินที่ปนเปื้อนจากสารพทาเลท	28°C	- 96.4 เปอร์เซ็นต์ ใน 7 วัน (ความเข้มข้นเริ่มต้น 200 มิลลิกรัม/ลิตร) ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว - มากกว่า 55 เปอร์เซ็นต์ ใน 21 วัน (ปริมาณเริ่มต้น 1 กรัม) ในดินปนเปื้อนสังเคราะห์	(Wang และคณะ, 2015)
	<i>Acinetobacter</i> sp. SN13	ระบบบำบัดน้ำเสียทางชีวภาพ	30°C	มากกว่า 90 เปอร์เซ็นต์ ใน 5 วัน (ความเข้มข้นเริ่มต้น 500 มิลลิกรัม/ลิตร)	(Xu และคณะ, 2017)
	<i>Gordonia alkanivorans</i> YC-RL2	ดินจากประเทศจีน	30°C	94 เปอร์เซ็นต์ (ความเข้มข้นเริ่มต้น 100-800 มิลลิกรัม/ลิตร)	(Nahurira และคณะ, 2017)

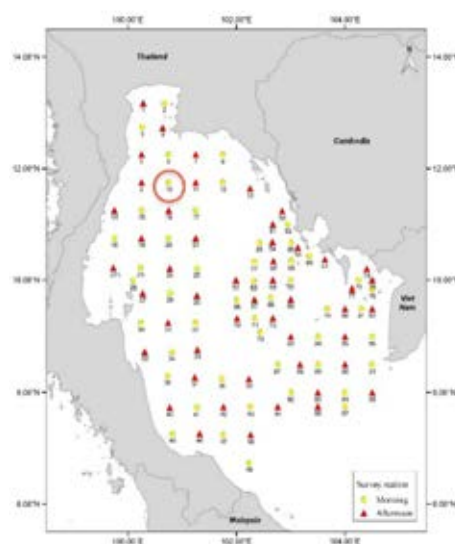


รูปที่ 1.3 วิธีการย่อยสลายทางชีวภาพของสารกลุ่มพทาเลท เอสเทอร์ โดย *Bacillus mojavensis* B1811 (Zhang และคณะ, 2018)

โดยงานวิจัยนี้สนใจคัดแยกแบคทีเรียย่อยสลายพทาเลท เอสเทอร์ จาก 2 แหล่ง (รูปที่ 1.3) ได้แก่ ดินจากบริเวณโรงกำจัดมูลฝอยหนองแขม จังหวัดกรุงเทพมหานคร (13.719694°E, 100.353471°N) ซึ่งเป็นโรงกำจัดขยะผลิตกระแสไฟฟ้าแห่งแรกของประเทศไทย แต่ยังคงมีการนำขยะจากหลายพื้นที่มากองรวมกัน เพื่อรอการกำจัด ทำให้พื้นที่ดังกล่าวมีการทับถมจากขยะหลากหลายประเภท เช่น อุปกรณ์ก่อสร้าง บรรจุภัณฑ์อาหาร เป็นต้น และดินตะกอนทะเลจากบริเวณอ่าวไทย (11.780908°E, 100.875043°N) ซึ่งมีความเสี่ยงต่อการปนเปื้อนของ PAEs



ก.



ข.

รูปที่ 1.4 สถานที่เก็บตัวอย่างดินที่ใช้ในงานวิจัย ได้แก่ โรงกำจัดมูลฝอยหนองแขม จังหวัดกรุงเทพมหานคร (13.719694°E, 100.353471°N) (ก) ดินตะกอนทะเลจากบริเวณอ่าวไทย ST-10 (11.780908°E, 100.875043°N) (ข)

นอกจากนี้ในงานวิจัยนี้ยังได้ทดสอบความสามารถในการย่อยสลาย PAEs ของ *Exiguobacterium* sp. AO-11 จากคลังจุลินทรีย์ของภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย (MSCU-0807) แบคทีเรียดังกล่าวคัดแยกโดย นางสาวผดุงขวัญ ศรีสุวรรณภาพ ในปี 2558 ที่ทำวิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิตในหัวข้อประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันดิบของ *Exiguobacterium* sp. AO-11 ที่คัดแยกจากดินตะกอน บริเวณอ่าวพร้าว เกาะเสม็ด ประเทศไทย พบว่า AO-11 มีความสามารถย่อยสลายน้ำมันดิบความเข้มข้น 0.25 เปอร์เซ็นต์ ได้ 90 เปอร์เซ็นต์ ในเวลา 10 วัน (ผดุงขวัญ ศรีสุวรรณภาพ, 2558) โดยกระบวนการย่อยสลายทางชีวภาพของปีโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนนั้นมีความคล้ายคลึงกับกระบวนการย่อยสลายทางชีวภาพของ PAEs โดยจะได้สารสารมัธยันต์ (intermediate compounds) ชนิดเดียวกัน คือ กรดพทาลิก (phthalic acid) ทำให้แบคทีเรียดังกล่าวมีความน่าสนใจในการนำมาศึกษาความสามารถในการย่อยสลาย PAEs

จุดประสงค์ :

เพื่อคัดแยกกลุ่มแบคทีเรียและแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลายพทาเลท เอสเทอร์ ที่มีโครงสร้างเป็นแอลคิลสายสั้นและสายยาว

สมมติฐาน :

แบคทีเรียที่คัดแยกได้จากดินบริเวณกองขยะและดินตะกอนทะเลมีความสามารถในการย่อยสลายพทาเลท เอสเทอร์ชนิดต่างๆ

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ทราบประสิทธิภาพของจุลินทรีย์แบบกลุ่มและเดี่ยวในการย่อยสลายพทาเลท เอสเทอร์ ชนิดต่างๆ
2. สามารถนำไปประยุกต์ใช้งานและพัฒนาการย่อย plasticizer ชนิดอื่นๆในอนาคตต่อไป

บทที่ 2

เครื่องมือ วัสดุ เคมีภัณฑ์

2.1 เครื่องมือและวัสดุ

1. เครื่องแก้วและอุปกรณ์พื้นฐานที่ใช้โดยทั่วไปในห้องปฏิบัติการ
2. เครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี (Gas Chromatography - Flame Ionization Detector, GC-FID)
 - เครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี รุ่น 6890N บริษัท Agilent Technologies, USA
 - คอลัมน์ (column) ชนิด HP-5
ขนานเส้นผ่านศูนย์กลาง 230 ไมโครเมตร ความยาว 30 เมตร
ภายในเคลือบด้วยเฟนนิล เมทิล ซิโกลเซน เข้มข้น 5% หนา 0.25 ไมครอน บริษัท Agilent Technologies, USA
 - เครื่องตรวจวัด (detector) ชนิด Flame Ionization Detector (FID) บริษัท Agilent Technologies, USA
3. เครื่องชั่ง รุ่น P2002-S และ AG285 บริษัท Mettler Toledo, Switzerland
4. เครื่องปั่นผสม (vortex) รุ่น Gene 2 บริษัท Scientific Industries, USA
5. เครื่องเขย่า รุ่น Innova 4330 บริษัท New Brunswick Scientific
6. เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) รุ่น UV-160A บริษัท Shimadzu, Japan
7. เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH meter) รุ่น 240 บริษัท Nanodrop 2000 บริษัท Thermo Scientific, USA
8. ตู้เขี่ยเชื้อ (ISSCO laminar flow) รุ่น HT-122.5 บริษัท International Scientific Supply, USA
9. หม้อนึ่งฆ่าเชื้อความดันไอ (autoclave) บริษัท Kakusan, Japan
10. เครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดควบคุมอุณหภูมิ (Centrifuge) รุ่น KUBOTA 6500 บริษัท Kubota Corporation, Japan
11. ตู้อบแห้ง (Oven) บริษัท Contherm Scientific, New Zealand
12. ตู้บ่มเชื้ออุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส รุ่น BE800 บริษัท Memmert, Germany
13. ตู้แช่แข็งจุดเยือกแข็งต่ำ (deep freezer) อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส รุ่น ULT1786 บริษัท Forman Scientific, USA
14. ตู้แช่แข็งจุดเยือกแข็งต่ำ (deep freezer) อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส รุ่น MDF-U332 บริษัท Sanyo Electric, Japan

2.2 เคมีภัณฑ์

1. กลีเซอรอล ($C_3H_8O_3$) บริษัท Research organics, USA
2. ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4) บริษัท Merck, Germany
3. แอมโมเนียมไนเตรท (NH_4NO_3) บริษัท Merck, Germany
4. เฟอร์ริกซิเตรท (ferric citrate)
5. ผงสกัดจากยีสต์ (yeast extract) บริษัท Difco, USA
6. ทริปโตน (tryptone) บริษัท Difco, USA
7. โซเดียมคลอไรด์ ($NaCl$) บริษัท Merck, Germany
8. แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$) บริษัท Carlo Erba, France
9. เฟอร์ริกคลอไรด์ เฮกซะไฮเดรต ($FeCl_3 \cdot 6H_2O$)
10. แคลเซียมคลอไรด์ ไดไฮเดรต ($CaCl_2 \cdot 2H_2O$) บริษัท Merck, Germany
11. โซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต โดเดคาไฮเดรต ($Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$)
12. โซเดียมไฮดรอกไซด์ ($NaOH$) บริษัท Merck, Germany
13. ไดคลอโรมีเทน (CH_2Cl_2) บริษัท Merck, Germany
14. ได (2-เอทิลเฮกซิล) พทาเลท (DEHP) บริษัท Tokyo Chemical Industry, Japan
15. ไดบิวทิล พทาเลท (DBP) บริษัท Tokyo Chemical Industry, Japan
16. ไดเมทิล พทาเลท (DMP) บริษัท Tokyo Chemical Industry, Japan
17. ไดเอทิล พทาเลท (DEP) บริษัท Tokyo Chemical Industry, Japan

บทที่ 3

วิธีดำเนินการทดลอง

3.1 เพิ่มจำนวนและคัดแยกแบคทีเรีย

เก็บตัวอย่างดินจากบริเวณกองขยะที่โรงกำจัดมูลฝอยหนองแขม จังหวัดกรุงเทพมหานคร (13.719694°E, 100.353471°N) ลักษณะดินแสดงดังรูปที่ 3.1 ซึ่งเป็นดินที่มีการทับถมของขยะหลากหลายประเภทเป็นเวลานาน ที่ระดับความลึก 10 เซนติเมตร เก็บในถุงซิปล็อคขนาด กว้าง 15 เซนติเมตร และยาว 23 เซนติเมตรที่ผ่านการฆ่าเชื้อ และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จนกว่าจะทำการทดลอง



รูปที่ 3.1 ลักษณะดิน และการทับถมของขยะที่โรงกำจัดมูลฝอยหนองแขม

รับตัวอย่างดินตะกอนจากห้องปฏิบัติการ ซึ่งเก็บตัวอย่างจากอ่าวไทย ชื่อตัวอย่าง ST10 (11.780908°E, 100.875043°N) และแบคทีเรีย *Exiguobacterium* sp. AO-11 (MSCU-0807) ซึ่งคัดแยกจากกลุ่มแบคทีเรียย่อยสลายน้ำมันดิบที่ได้จากดินตะกอนปนเปื้อนน้ำมันดิบ บริเวณอ่าวพร้าว เกาะเสม็ด จังหวัดระยอง (ผดุงขวัญ ศรีสุวรรณภาพ, 2558)

คัดแยกและเพิ่มจำนวนแบคทีเรียย่อยสลาย PAEs (ดัดแปลงจาก Wongwongsee และคณะ, 2013) โดยนำตัวอย่างดินจากกองขยะ 5 กรัม แขนวลอยในอาหารเหลวปราศจากแหล่งคาร์บอน Carbon free mineral medium (CFMM) ปริมาตร 45 มิลลิลิตร (Tosu และคณะ, 2015) สำหรับดินตะกอนทะเล และ *Exiguobacterium* sp. AO-11 แขนวลอยในอาหารเหลว Nutrient Seawater Medium (NSW) ปริมาตร 45 มิลลิลิตร (ดัดแปลงจาก Muangchinda และคณะ, 2018)

จากนั้นเติม PAEs อย่างละ 1 ชนิด ได้แก่ DEHP, DBP, DEP และ DMP ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัม/ลิตร บ่มโดยการเขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบ/นาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน สำหรับแบคทีเรียเดี่ยวใช้เวลาบ่ม 3 วัน จากนั้นดูดอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่มีความขุ่นเมื่อเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่ใส่ตัวอย่างดินหรือแบคทีเรียเดี่ยว 5 มิลลิลิตร ใส่ในอาหารเหลวใหม่ ที่มี PAEs เช่นเดียวกับชุดเดิม ทำซ้ำเป็นจำนวน 4 ครั้ง

3.2. ทดสอบการย่อยสลายพทาเลท เอสเทอร์ ชนิดต่างๆ

3.2.1 เตรียมหัวเชื้อกลุ่มแบคทีเรียและแบคทีเรียเดี่ยว

ถ่ายเชื้อกลุ่มแบคทีเรียที่คัดแยกได้ โดยนำตัวอย่างดินจากกองขยะ ปริมาตร 5 มิลลิลิตรลงในขวดรูปชมพู่ที่บรรจุอาหารเหลว CFMM ปริมาตร 45 มิลลิลิตร สำหรับดินตะกอนทะเลจะถ่ายลงในอาหารเหลว NSW

ปริมาณเท่ากัน โดยอาหารทั้งสองชนิดเติม PAEs ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัม/ลิตร จากนั้นบ่มโดยการเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบ/นาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน สำหรับแบคทีเรียเดี่ยว *Exiguobacterium* sp. AO-11 จะเพิ่มจำนวนโดยนำแบคทีเรียปริมาณ 10 มิลลิลิตร ลงอาหารเหลว 0.25x Marine broth 90 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 วัน จากนั้นนำมาตกตะกอนเซลล์โดยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 นาที ล้างเซลล์ด้วยโซเดียมคลอไรด์ 0.85 เปอร์เซ็นต์ จำนวน 2 รอบ แขนวลอยเซลล์ด้วยโซเดียมคลอไรด์ 0.85 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 30 มิลลิลิตร จากนั้นวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร (OD_{600}) ให้มีค่าประมาณ 1 (ความเข้มข้นของแบคทีเรียประมาณ 10^8 CFU/มิลลิลิตร) บ่มโดยการเขย่าที่เครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบ/นาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จะได้เป็นหัวเชื้อสำหรับทดสอบการย่อย

3.2.2 ทดสอบการย่อยสลายพหาลาเลท เอสเทอร์ ของแบคทีเรียแบคทีเรีย

เติมหัวเชื้อกลุ่มแบคทีเรียและแบคทีเรียเดี่ยวที่เตรียมได้จากข้อ 2.1 5 มิลลิลิตรลงในอาหารเหลว CFMM หรือ NSW ปริมาตร 45 มิลลิลิตร เติม PAEs ชนิดต่างๆ ได้แก่ DEHP, DBP, DEP และ DMP การทดลองละ 1 ชนิด เป็นแหล่งคาร์บอน ทำการทดลอง 3 ซ้ำ ควบคุมกับชุดควบคุมอาหารเหลวที่เติม PAEs แต่ไม่เติมหัวเชื้อกลุ่มแบคทีเรีย บ่มโดยการเขย่าที่เครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบ/นาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างวันที่ 0, 2, 5 และ 7 วัน

จากนั้นวิเคราะห์การเจริญของแบคทีเรียทั้งหมดและแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลาย PAEs โดยเจือจางแบคทีเรียที่ความเข้มข้นของเชื้อ 10^{-4} , 10^{-5} และ 10^{-6} โดยเกลี่ยให้กระจายทั่วผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ *LB agar* หรือ *Marine agar* สำหรับแบคทีเรียทั้งหมด และอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง CFMM หรือ NSW ที่เติมสาร PAEs ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัม/ลิตร สำหรับแบคทีเรียย่อยสลาย PAEs บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน

จากนั้นคัดแยกแบคทีเรียสายพันธุ์บริสุทธิ์ที่มีความสามารถในการย่อยสลาย PAEs จากโคโลนีที่พบบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง CFMM หรือ NSW ที่เติมสาร PAEs ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัม/ลิตร โดยตรวจสอบความบริสุทธิ์ของแบคทีเรียที่คัดแยกได้โดยเขียนบนอาหารเลี้ยงเชื้อ *LB agar* หรือ *Marine agar* บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน (Wang และคณะ, 2015)

3.2.3 สร้างกราฟมาตรฐานสำหรับวิเคราะห์ปริมาณสารกลุ่มพหาลาเลท

สร้างกราฟมาตรฐานสำหรับวิเคราะห์ GC-FID เตรียมพหาลาเลท เอสเทอร์ ผสมลงในไดคลอโรมีเทน ให้ได้ความเข้มข้น 25, 50, 100, 200 และ 400 มิลลิกรัม/ลิตร นำลงในขวดสำหรับวิเคราะห์ GC-FID และวิเคราะห์ปริมาณพหาลาเลท เอสเทอร์ ด้วยเครื่อง Gas chromatography/Flame ionization detector (GC-FID) จากนั้นนำข้อมูลที่ได้มาสร้างกราฟมาตรฐานของพหาลาเลท เอสเทอร์ ระหว่างพื้นที่ใต้กราฟกับค่าความเข้มข้นของพหาลาเลท เอสเทอร์

3.2.4 สกัดและวิเคราะห์ปริมาณสารกลุ่มพทาเลทที่เหลือจากการย่อยสลาย

นำตัวอย่างการทดลองแต่ละวัน เติมไดคลอโรมีเทน 25 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบ/นาทีเป็นเวลา 30 นาที เพื่อแยกชั้นไดคลอโรมีเทน จากนั้นดูดสารชั้นล่างซึ่งเป็นชั้นของไดคลอโรมีเทนใส่ลงในขวดรูปชมพู่ใหม่ และเติมไดคลอโรมีเทน 25 มิลลิลิตร นำไปเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบ/นาทีเป็นเวลา 30 นาที และดูดสารชั้นล่างเช่นเดิม จากนั้นนำไประเหยแห้ง จากนั้นเติมไดคลอโรมีเทน 5 มิลลิลิตร ปั่นผสมด้วยเครื่องผสมสารเป็นเวลา 1 นาที แล้วกรองสารละลายผ่านหัวกรอง PTFE ที่มีขนาดความกว้างรู 0.20 ไมโครเมตร ลงในขวดสำหรับวิเคราะห์ GC-FID จากนั้นวิเคราะห์ด้วยเครื่อง GC-FID ซึ่งมีสภาวะต่างๆ ในระบบดังนี้

คอลัมน์ HP-5	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.32 มิลลิเมตร ยาว 30 เมตร ภายในเคลือบด้วยเฟนิลเมทิลไซโลเซน 5 เปอร์เซ็นต์ หนา 0.25 ไมโครเมตร
อุณหภูมิคอลัมน์	เริ่มต้น 50 องศาเซลเซียส หยุดเป็นเวลา 1 นาที เพิ่มด้วยอัตรา 30 องศาเซลเซียส/นาที จนถึง 280 องศาเซลเซียส และเพิ่มด้วยอัตรา 15 องศาเซลเซียส/นาที จนถึง 310 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 นาที
แก๊สตัวพา	ฮีเลียม
อัตราเร็วแก๊สตัวพา	16.4 มิลลิลิตร/นาที
อุณหภูมิเครื่องตรวจจับ FID	290 องศาเซลเซียส
โหมด	split
ปริมาณสารที่ฉีดวิเคราะห์	1.0 ไมโครลิตร

คำนวณค่าประสิทธิภาพในการย่อยสลาย ดังสมการ

เปอร์เซ็นต์การย่อยสลายสารกลุ่มพทาเลท =

$$\frac{(\text{พื้นที่ใต้กราฟของชุดควบคุม ณ วันที่ใดๆ} - \text{พื้นที่ใต้กราฟของชุดทดลอง}) \times 100}{\text{พื้นที่ใต้กราฟชุดควบคุม ณ วันที่ใดๆ}}$$

3.3 ทดสอบการย่อยสลายพทาเลท เอสเทอร์ ชนิดต่างๆ ของแบคทีเรียเดี่ยว

นำหัวเชื้อแบคทีเรียจากห้องปฏิบัติการและแบคทีเรียสายพันธุ์บริสุทธิ์ที่คัดแยกได้จากข้อ 2.2 มาทดสอบประสิทธิภาพในการย่อยสลาย PAEs ชนิดต่างๆ โดยทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อที่ 2.1. และ 2.2.

ตรวจสอบความเข้มข้นที่เหลืออยู่ของ PAEs โดยเก็บตัวอย่างใน 0, 2, 5, 7 วัน วิเคราะห์ด้วยเครื่อง GC-FID สภาวะเดียวกับที่ระบุในข้อ 2.4.

บทที่ 4

ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง

4.1 การเพิ่มจำนวนและคัดแยกกลุ่มแบคทีเรียย่อยสลาย PAEs

จากการเพิ่มจำนวนกลุ่มแบคทีเรียย่อยสลาย PAEs จากดินจากกองขยะและดินตะกอนทะเลโดยใช้ PAEs 4 ชนิดแยกกัน ได้แก่ DMP DEP DBP และ DEHP เป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าสามารถคัดแยกกลุ่มแบคทีเรียย่อยสลาย PAEs ได้ทั้งจากดินกองขยะและดินตะกอนทะเล รวมทั้งหมด 8 กลุ่ม และได้ฝากเก็บรักษาเชื้อไว้ที่ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย (MSCU) โดยมีรหัสแสดงดังนี้

LF-NK-DMP คือกลุ่มแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากดินกองขยะโดยมี DMP เป็นแหล่งคาร์บอน (MSCU 1086)

LF-NK-DEP คือกลุ่มแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากดินกองขยะโดยมี DEP เป็นแหล่งคาร์บอน (MSCU 1087)

LF-NK-DBP คือกลุ่มแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากดินกองขยะโดยมี DBP เป็นแหล่งคาร์บอน (MSCU 1088)

LF-NK-DEHP คือกลุ่มแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากดินกองขยะโดยมี DEHP เป็นแหล่งคาร์บอน (MSCU 1089)

ST10-DMP คือกลุ่มแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากดินตะกอนทะเลที่มี DMP เป็นแหล่งคาร์บอน (MSCU 1090)

ST10-DEP คือกลุ่มแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากดินตะกอนทะเลที่มี DEP เป็นแหล่งคาร์บอน (MSCU 1091)

ST10-DBP คือกลุ่มแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากดินตะกอนทะเลที่มี DBP เป็นแหล่งคาร์บอน (MSCU 1092)

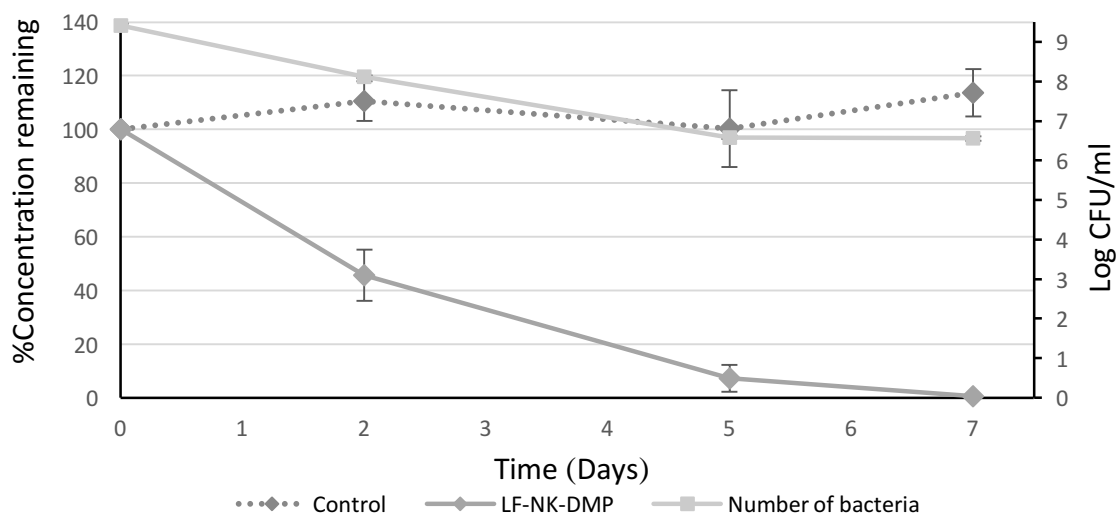
ST10-DEHP คือกลุ่มแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากดินตะกอนทะเลที่มี DEHP เป็นแหล่งคาร์บอน (MSCU1093)

4.2 ประสิทธิภาพการย่อยสลายพหุเลท เอสเทอร์ ของกลุ่มแบคทีเรีย

4.2.1 ประสิทธิภาพการย่อยสลายพหุเลท เอสเทอร์ ของกลุ่มแบคทีเรียที่คัดแยกจากดินจากกองขยะ

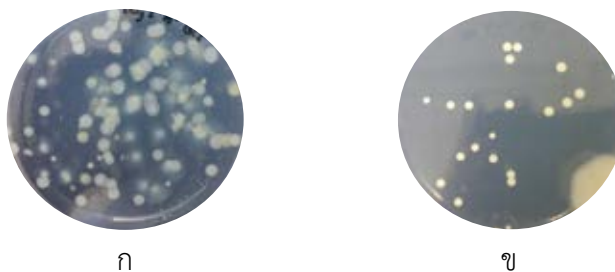
LF-NK-DMP

จากการทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลาย DMP ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัม/ลิตร ของกลุ่มแบคทีเรีย LF-NK-DMP พบว่าสามารถย่อยสลายได้มากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ ในเวลา 2 วัน และย่อยสลายได้อย่างสมบูรณ์ ในเวลา 7 วัน ดังแสดงในรูปที่ 4.1 จากนั้นวิเคราะห์การเจริญของแบคทีเรียทั้งหมด โดยแบคทีเรียใช้เวลาในการเจริญประมาณ 48 ชั่วโมง พบว่าในวันที่ 0 มีจำนวนแบคทีเรียสูงถึง 9 log CFU/ มิลลิลิตร จากนั้นลดลงเรื่อยๆ ตั้งแต่วันที่ 2 จนถึงสิ้นสุดการทดลอง (รูปที่ 4.1)



รูปที่ 4.1 ผลการทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลาย DMP ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัม/ลิตร วิเคราะห์ปริมาณ DMP ที่เหลืออยู่ด้วย GC-FID และผลการนับจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดในกลุ่มแบคทีเรีย LF-NK-DMP ระหว่างการย่อยสลาย เป็นเวลา 7 วัน

และเมื่อสังเกตลักษณะโคโลนีที่เจริญบนอาหาร พบว่ามีโคโลนีที่แตกต่างกัน 4 ลักษณะ ได้แก่ โคโลนีสีขาวขอบฟุ้ง โคโลนีสีขาวขอบเรียบ โคโลนีสีเหลือง และโคโลนีสีเหลืองครีม ดังแสดงในรูปที่ 4.2 ก แต่เมื่อผ่านระยะเวลาการย่อยสลายจนถึงวันที่ 7 พบว่าสามารถสังเกตเห็นโคโลนีได้เพียงลักษณะเดียวคือ โคโลนีสีเหลืองครีมเท่านั้น ดังแสดงในรูป 4.2 ข

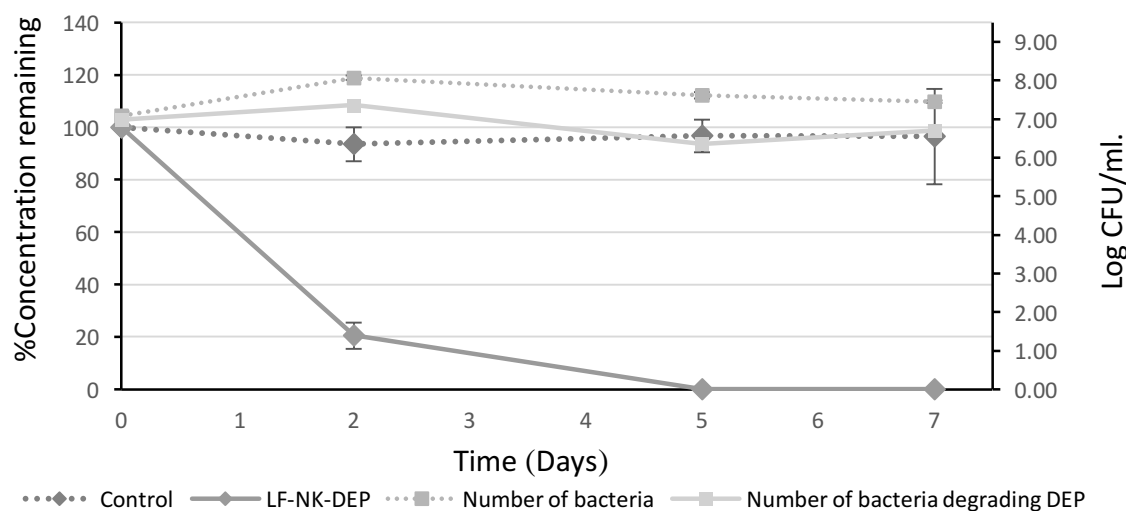


รูปที่ 4.2 ลักษณะโคโลนีที่เจริญในวันที่ 2 (ก) และลักษณะโคโลนีที่เจริญในวันที่ 7 (ข) บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง LB

LF-NK-DEP

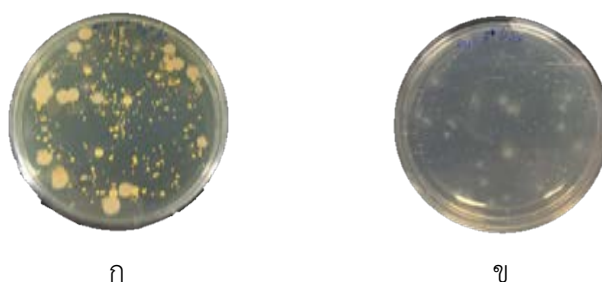
จากการทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลาย DEP ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัม/ลิตร ของกลุ่มแบคทีเรีย LF-NK-DEP พบว่าสามารถย่อยสลายได้มากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ ในเวลา 2 วัน และย่อยสลายได้อย่างสมบูรณ์ในเวลา 7 วัน ดังแสดงในรูปที่ 4.3 เมื่อวิเคราะห์จำนวนแบคทีเรีย พบว่า ณ วันที่ 0 มีจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดประมาณ 7 log CFU/มิลลิลิตร โดยแบคทีเรียใช้เวลาในการเจริญประมาณ 2 วัน จากนั้นมีจำนวนเพิ่มขึ้น 1 log CFU/มิลลิลิตร ในวันที่ 2 จำนวนแบคทีเรียทั้งหมดเริ่มลดลงตั้งแต่วันที่ 5 เช่นเดียวกับจำนวนแบคทีเรียย่อย

สลาย DEP ซึ่งมีจำนวนแบคทีเรียในวันที่ 0 เท่ากับ 6 log CFU/มิลลิลิตร จากนั้นเพิ่มขึ้นในวันที่ 2 และลดลงตั้งแต่วันที่ 5 เป็นต้นไป (รูปที่ 4.3)



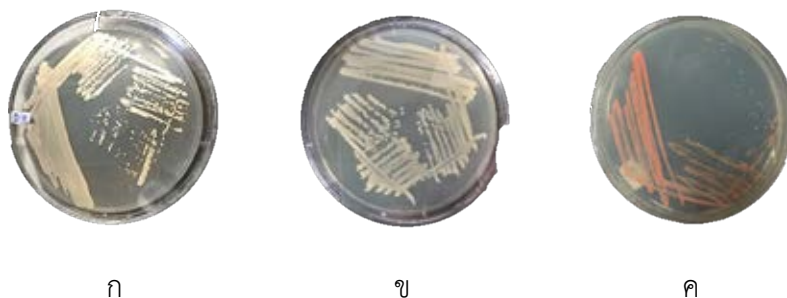
รูปที่ 4.3 ผลการทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลาย DEP ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัม/ลิตร วิเคราะห์ปริมาณ DEP ที่เหลืออยู่ด้วย GC-FID และผลการนับจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดและแบคทีเรียย่อยสลาย DEP ในกลุ่มแบคทีเรีย LF-NK-DEP ระหว่างการย่อยสลายเป็นเวลา 7 วัน

จากการสังเกตลักษณะโคโลนีที่เจริญ พบว่าบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง CFMM ที่มี DEP มีลักษณะโคโลนีที่หลากหลายน้อยกว่าบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง LB และมีขนาดเล็กกว่าอย่างเห็นได้ชัด โดยมีโคโลนีที่แตกต่างกันประมาณ 4 ลักษณะ ได้แก่ สีส้ม สีขาวขบหยัก สีขาวขบเรียบ และสีครีม แต่ตั้งแต่วันที่ 5 เป็นต้นไปพบโคโลนีเพียง 2 ลักษณะเท่านั้น ได้แก่ สีขาวขบเรียบและสีครีม (รูปที่ 4.4)



รูปที่ 4.4 ลักษณะโคโลนีที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง LB (ก) และลักษณะโคโลนีที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง CFMM ที่เติม DEP ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัม/ลิตร (ข)

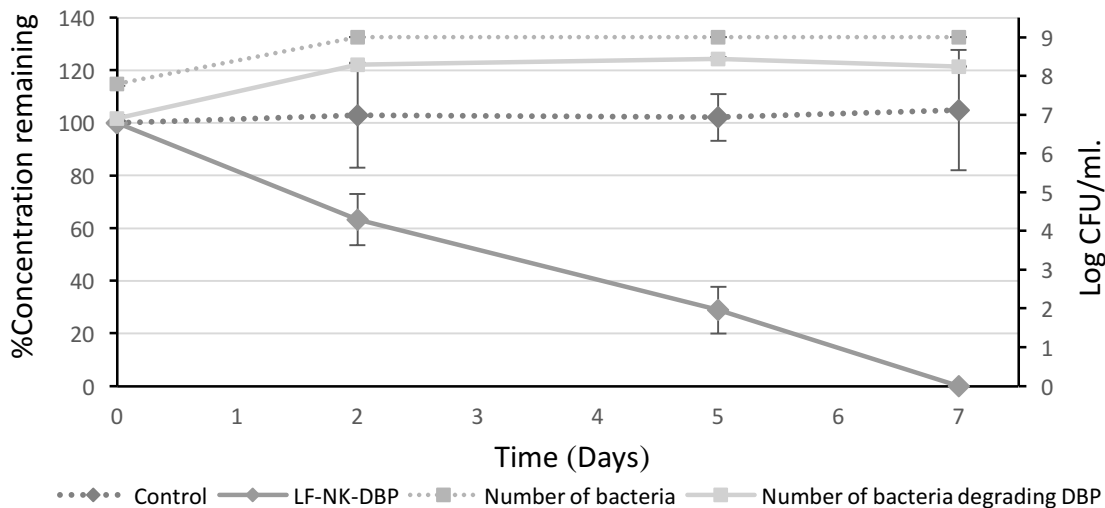
จากการตรวจสอบแบคทีเรียสายพันธุ์บริสุทธิ์ พบว่ามีโคโลนีคัดแยกได้ 3 แบบ ได้แก่ โคโลนีสีขาวขบหยัก โคโลนีสีครีมเหลือง และโคโลนีสีส้มดังแสดงในรูปที่ 4.5 โดยให้รหัสดังต่อไปนี้ MSP_DEP01 MSP_DEP02 และ MSP_DEP3 ตามลำดับ



รูปที่ 4.5 รูปแบบโคโลนีที่แตกต่างกัน ได้แก่ โคโลนีสีขาว MSP_DEP01 (ก) โคโลนีสีครีม MSP_DEP02 (ข) และโคโลนีสีส้ม MSP_DEP03 (ค)

LF-NK-DBP

จากการทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลาย DBP ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัม/ลิตร ของกลุ่มแบคทีเรีย LF-NK-DBP พบว่าสามารถย่อยสลายได้มากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ ในเวลา 5 วัน และย่อยสลายได้อย่างสมบูรณ์ ในเวลา 7 วัน ดังแสดงในรูปที่ 4.6 เมื่อวิเคราะห์จำนวนแบคทีเรีย พบว่าหลังจากการบ่ม 4 วัน จึงสามารถนับจำนวนแบคทีเรียย่อยสลาย DBP ได้ โดยช่วงการทดลองวันที่ 0-2 จำนวนแบคทีเรียเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว จากนั้นการเจริญค่อนข้างคงที่จนถึงวันที่ 7 เช่นเดียวกับจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดมีจำนวนมากกว่า 7 log CFU/มิลลิลิตร ตั้งแต่วันที่ 2 เป็นต้นมา (รูปที่ 4.6)



รูปที่ 4.6 ผลการทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลาย DBP ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัม/ลิตร วิเคราะห์ปริมาณ DBP ที่เหลืออยู่ด้วย GC-FID และผลการนับจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดและแบคทีเรียย่อยสลาย DBP ในกลุ่มแบคทีเรีย LF-NK-DBP ระหว่างการย่อยสลายเป็นเวลา 7 วัน

จากการสังเกตลักษณะโคโลนีที่เจริญ พบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง CFMM มีลักษณะโคโลนีที่หลากหลายน้อยกว่าบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง LB และมีขนาดเล็กกว่าอย่างเห็นได้ชัด ดังแสดงในรูปที่ 4.7 โดยมี

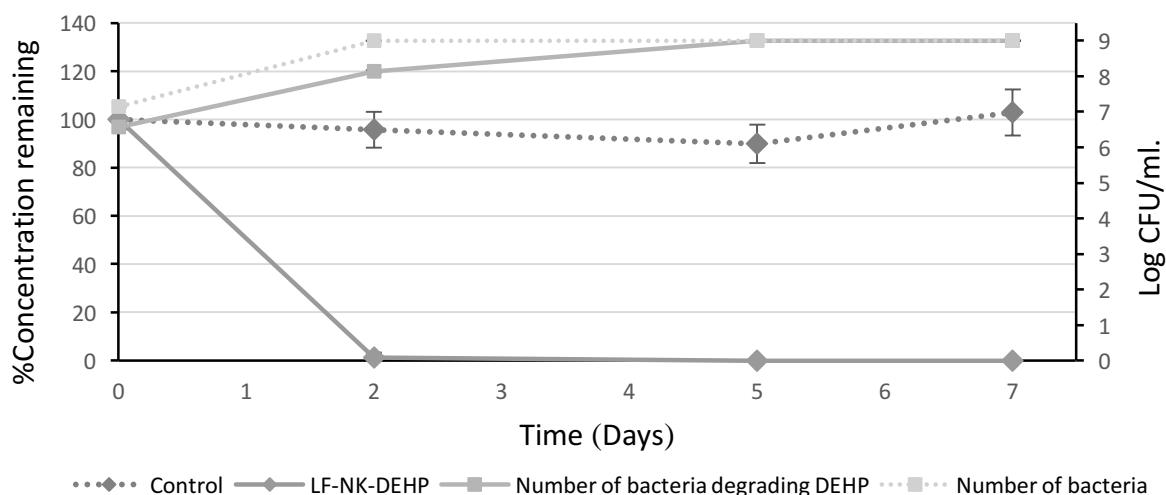
โคโลนีที่แตกต่างกันประมาณ 3 ลักษณะ ได้แก่ โคโลนีสีขาว โคโลนีสีครีม และโคโลนีสีส้ม ซึ่งสังเกตได้ค่อนข้างยาก โดยโคโลนีที่สร้างเม็ดสีนั้น ใช้เวลาในการเจริญอย่างน้อย 4 วัน



รูปที่ 4.7 ลักษณะโคโลนีที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง LB (ก) และลักษณะโคโลนีที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง CFMM ที่เติม DBP ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัม/ลิตร (ข)

LF-NK-DEHP

จากการทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลาย DEHP ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัม/ลิตร ของกลุ่มแบคทีเรีย LF-NK-DEHP พบว่าสามารถย่อยสลายได้อย่างสมบูรณ์ ในเวลา 2 วัน ดังแสดงในรูปที่ 4.8 เมื่อวิเคราะห์จำนวนแบคทีเรีย พบว่าหลังจากการบ่ม 4 วันจึงสามารถนับจำนวนแบคทีเรียย่อยสลาย DEHP ได้ 4 พบว่าในช่วงการทดลองวันที่ 0 -2 จำนวนแบคทีเรียเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว จากนั้นการเจริญค่อนข้างคงที่จนถึงวันที่ 7 เช่นเดียวกับจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดมีจำนวนมากกว่า 7 log CFU/มิลลิลิตร ตั้งแต่วันที่ 2 เป็นต้นมา (รูปที่ 4.8)



รูปที่ 4.8 ผลการทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลาย DEHP ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัม/ลิตร วิเคราะห์ปริมาณ DEHP ที่เหลืออยู่ด้วย GC-FID และผลการนับจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดและแบคทีเรียย่อยสลาย DEHP ในกลุ่มแบคทีเรีย LF-NK-DEHP ระหว่างการย่อยสลายเป็นเวลา 7 วัน

จากการสังเกตลักษณะโคโลนีที่เจริญ พบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง CFMM มีลักษณะโคโลนีที่หลากหลายน้อยกว่าบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง LB และมีขนาดเล็กกว่าอย่างเห็นได้ชัด โดยมีโคโลนีที่แตกต่างกันประมาณ 3 ลักษณะ ได้แก่ สีขาว สีครีมเหลือง และสีส้ม ซึ่งสังเกตได้ค่อนข้างยาก โดยโคโลนีที่สร้างเม็ดสีนั้นใช้เวลาในการเจริญอย่างน้อย 5-7 วัน แต่เมื่อสังเกตชุดการทดลองในวันที่ 5-7 พบว่าโคโลนีส่วนใหญ่เป็นสีขาวเท่านั้น



ก

ข

รูปที่ 4.9 ลักษณะโคโลนีที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง LB (ก) และลักษณะโคโลนีที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง CFMM ที่เติม DEHP ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัม/ลิตร (ข)

จากการตรวจสอบแบคทีเรียสายพันธุ์บริสุทธิ์ พบว่ามีโคโลนีที่คัดแยกได้ 3 แบบ ได้แก่ โคโลนีสีขาว โคโลนีสีครีมเหลือง และโคโลนีสีส้ม ดังแสดงในรูปที่ 4.10 โดยให้รหัสดังต่อไปนี้ MSP_DEHP04 MSP_DEHP05 และ MSP_DEHP06 ตามลำดับ



ก

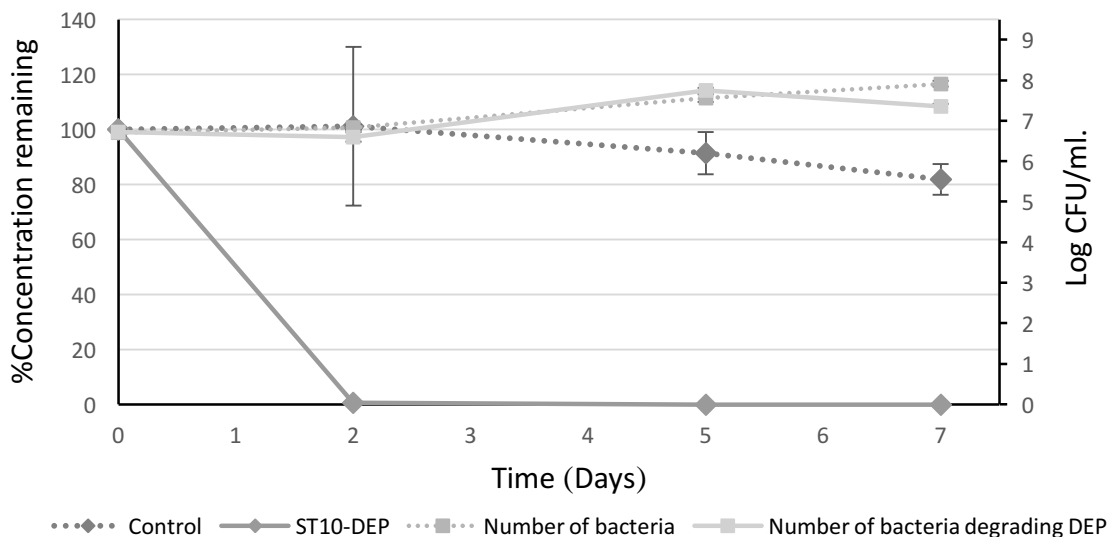
ข

ค

รูปที่ 4.10 รูปแบบโคโลนีที่แตกต่างกัน ได้แก่ โคโลนีสีขาว MSP_DEHP04 (ก) โคโลนีสีครีม MSP_DEHP05 (ข) และโคโลนีสีเหลือง MSP_DEHP06 (ค)

4.2.1 ประสิทธิภาพการย่อยสลายพทาเลท เอสเทอร์ ของกลุ่มแบคทีเรียที่คัดแยกจากดินตะกอนทะเล ST10-DEP

จากการทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลาย DEP ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัม/ลิตร ของกลุ่มแบคทีเรีย ST10-DEP พบว่าสามารถย่อยสลายได้อย่างสมบูรณ์ ในเวลา 2 วัน ดังแสดงในรูปที่ 4.11 เมื่อวิเคราะห์จำนวนแบคทีเรีย พบว่าหลังจากการบ่ม 2 วันจึงสามารถนับจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดและแบคทีเรียย่อยสลาย DEP ได้ โดยตลอดการทดลองจำนวนแบคทีเรียเพิ่มขึ้นอย่างสม่ำเสมอ (รูปที่ 4.11)



รูปที่ 4.11 ผลการทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลาย DEP ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัม/ลิตร วิเคราะห์ ปริมาณ DEP ที่เหลืออยู่ด้วย GC-FID และผลการนับจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดและแบคทีเรียย่อยสลาย DEP ในกลุ่มแบคทีเรีย ST10-DEP ระหว่างการย่อยสลายเป็นเวลา 7 วัน

จากการสังเกตลักษณะโคโลนีที่เจริญ พบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง NSW มีลักษณะโคโลนีที่แตกต่างกัน ประมาณ 3 ลักษณะ ได้แก่ โคโลนีสีขาว โคโลนีสีครีมเหลือง และโคโลนีสีส้ม สังเกตได้ค่อนข้างง่าย มีขนาดเล็กกว่าโคโลนีลักษณะเดียวกันที่พบในอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง Marine แต่เมื่อสังเกตชุดการทดลองในวันที่ 7 พบลักษณะโคโลนีเหลืองเพียง สีขาว และสีครีมเหลืองเท่านั้น ดังแสดงในรูปที่ 4.12

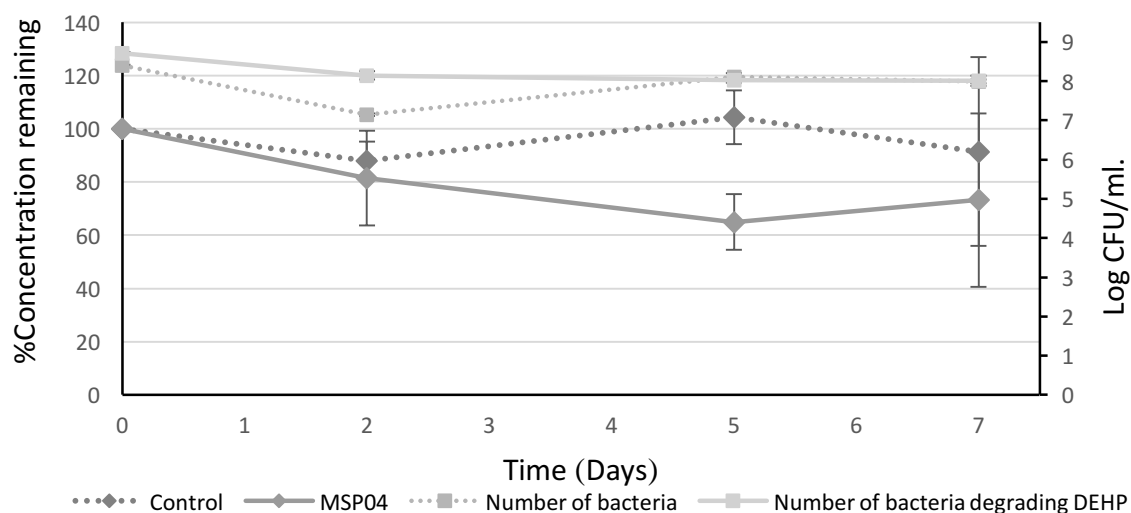


รูปที่ 4.12 ลักษณะโคโลนีที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง marine (ก) และลักษณะโคโลนีที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง NSW agar ที่เติม DEP ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัม/ลิตร (ข)

4.3 ผลการทดสอบการย่อยสลายพหาลา เอสเทอร์ ของแบคทีเรียแบบเดี่ยว

4.3.1 MSP_DEHP04

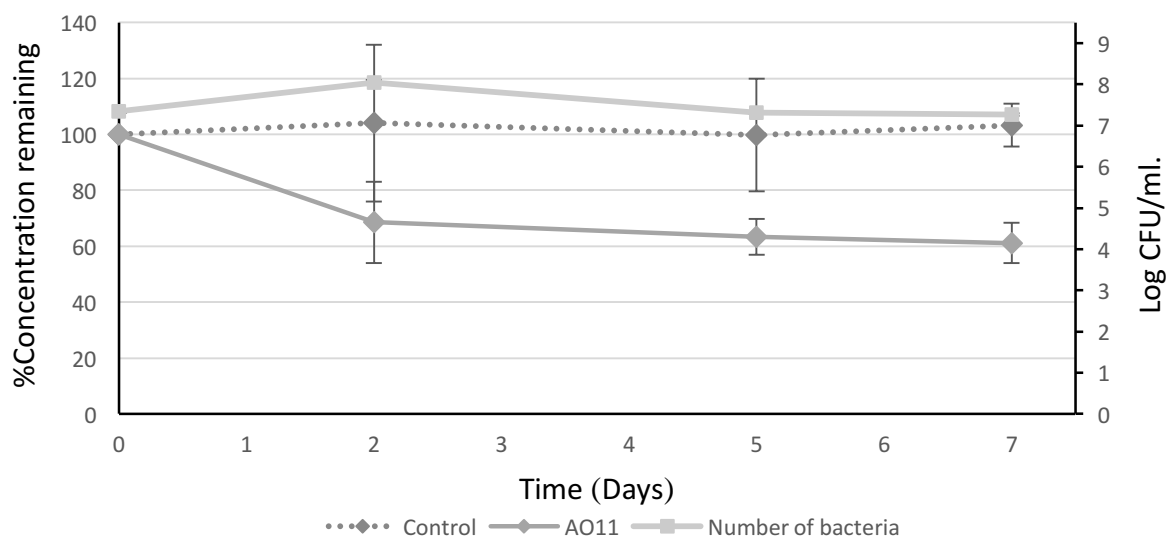
จากการทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลาย DEHP ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัม/ลิตร โดย MSP_DEHP04 พบว่าสามารถย่อยสลายได้ประมาณ 40 เปอร์เซ็นต์ ในเวลา 5 วัน ดังแสดงในรูปที่ 4.13 เมื่อวิเคราะห์จำนวนแบคทีเรีย พบว่าหลังจากการบ่ม 5 วันจึงสามารถนับจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดและแบคทีเรียย่อยสลาย DEHP ได้ โดยตลอดการทดลองจำนวนแบคทีเรียค่อนข้างคงที่ (รูปที่ 4.13)



รูปที่ 4.13 ผลการทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลาย DEHP ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัม/ลิตร วิเคราะห์ปริมาณ DEHP ที่เหลืออยู่ด้วย GC-FID และผลการนับจำนวนแบคทีเรียทั้งหมด ระหว่างการย่อยสลายเป็นเวลา 7 วัน โดย MSP_DEHP04

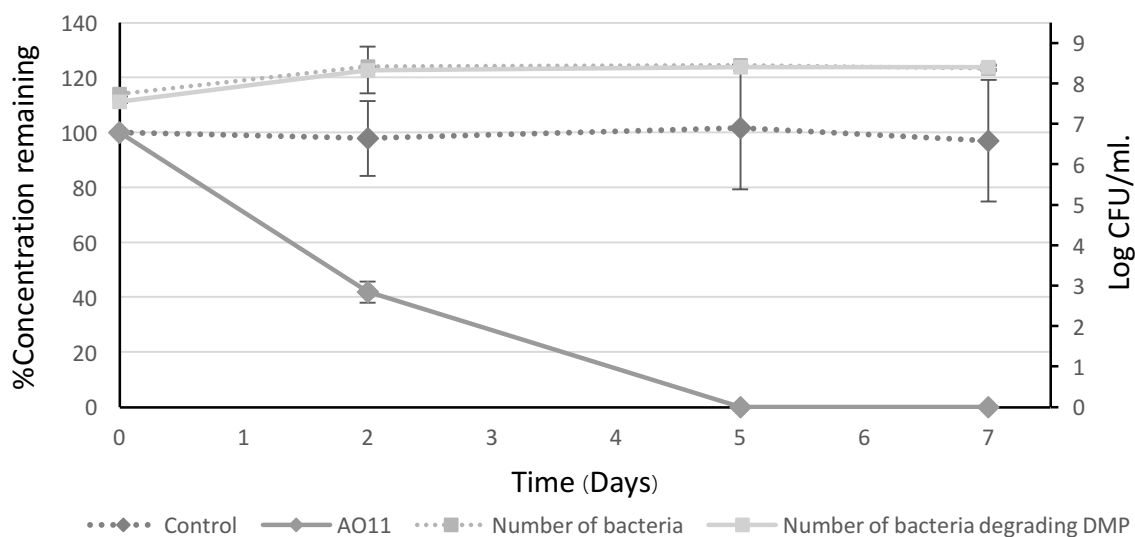
4.3.2 *Exiguobacterium* sp. AO-11

จากการทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลาย DEP ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัม/ลิตร โดย *Exiguobacterium* sp. AO-11 พบว่าสามารถย่อยสลายได้ประมาณ 40 เปอร์เซ็นต์ ในเวลา 7 วัน ดังแสดงในรูปที่ 4.14 เมื่อวิเคราะห์จำนวนแบคทีเรียทั้งหมด พบว่าในวันที่ 2 จำนวนแบคทีเรียเพิ่มขึ้นจาก 7 log CFU/มิลลิลิตร เป็น 8 log CFU/มิลลิลิตร เมื่อระยะเวลาการย่อยสลายผ่านไปถึงวันที่ 5 พบว่าจำนวนแบคทีเรียลดลง 1 log CFU/มิลลิลิตร และจนถึงวันที่ 7 จำนวนแบคทีเรียไม่เปลี่ยนแปลงจากเดิม (รูปที่ 4.14)



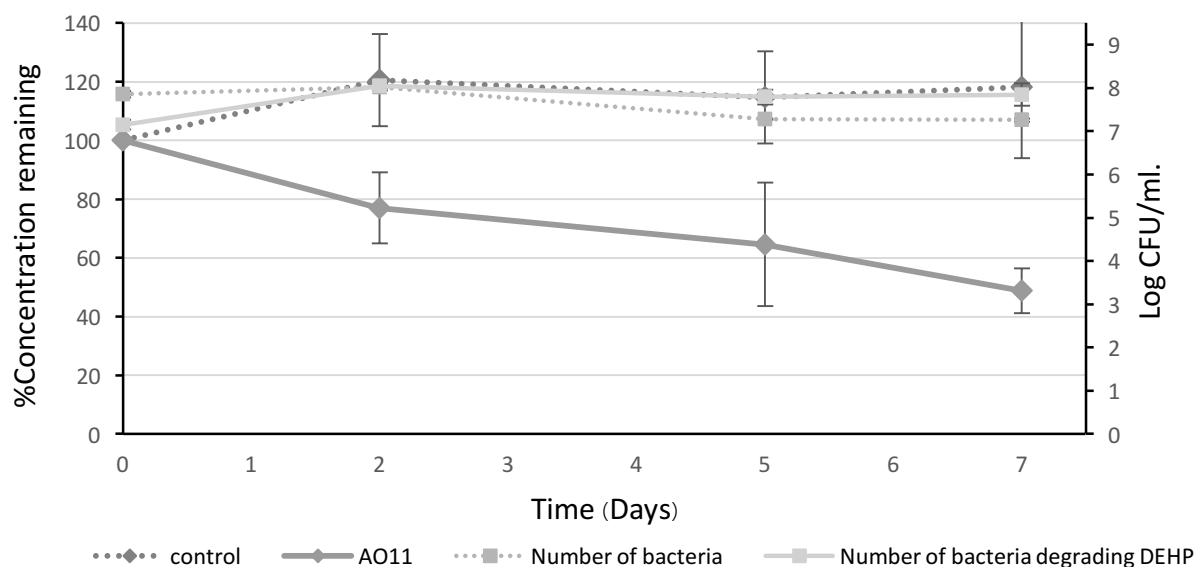
รูปที่ 4.14 ผลการทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลาย DEP ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัม/ลิตร วิเคราะห์ ปริมาณ DEP ที่เหลืออยู่ด้วย GC-FID และผลการนับจำนวนแบคทีเรียทั้งหมด ระหว่างการย่อยสลายเป็นเวลา 7 วัน โดย *Exiguobacterium* sp. AO-11

จากการทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลาย DMP ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัม/ลิตร โดย *Exiguobacterium* sp. AO-11 พบว่าสามารถย่อยสลายได้อย่างสมบูรณ์ในเวลา 5 วัน ดังแสดงในรูปที่ 4.15 เมื่อวิเคราะห์จำนวนแบคทีเรียทั้งหมดและแบคทีเรียย่อยสลาย DMP พบว่าในวันที่ 2 จำนวนแบคทีเรียเพิ่มขึ้น จาก 7 log CFU/มิลลิลิตร เป็น 8 log CFU/มิลลิลิตร หลังจากนั้นจำนวนแบคทีเรียไม่เปลี่ยนแปลงจนถึงวันที่ 7 (รูปที่ 4.15)



รูปที่ 4.15 ผลการทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลาย DMP ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัม/ลิตร วิเคราะห์ ปริมาณ DMP ที่เหลืออยู่ด้วย GC-FID และผลการนับจำนวนแบคทีเรียทั้งหมด ระหว่างการย่อยสลายเป็นเวลา 7 วัน โดย *Exiguobacterium* sp. AO-11

จากการทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลาย DEHP ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัม/ลิตร โดย *Exiguobacterium* sp. AO-11 พบว่าสามารถย่อยสลายได้ประมาณ 60 เปอร์เซ็นต์ ในเวลา 7 วันดังแสดงในรูปที่ 4.16 เมื่อวิเคราะห์จำนวนแบคทีเรียทั้งหมดและแบคทีเรียย่อยสลาย DEHP พบว่าในวันที่ 2 จำนวนแบคทีเรียเพิ่มขึ้นจาก 7 log CFU/มิลลิลิตร เป็น 8 log CFU/มิลลิลิตร เมื่อเข้าสู่วันที่ 5 จนถึงวันที่ 7 จำนวนแบคทีเรียลดลงเป็น 7 log CFU/มิลลิลิตร (รูปที่ 4.16)



รูปที่ 4.16 ผลการทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลาย DEHP ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัม/ลิตร วิเคราะห์ปริมาณ DEHP ที่เหลืออยู่ด้วย GC-FID และผลการนับจำนวนแบคทีเรียทั้งหมด ระหว่างการย่อยสลายเป็นเวลา 7 วัน โดย *Exiguobacterium* sp. AO-11

บทที่ 5

บทสรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

บทสรุป

ผลการศึกษาการย่อยสลายสารกลุ่ม PAEs โดยกลุ่มแบคทีเรียที่คัดแยกจากดินกองขยะและดินตะกอนพบว่าสามารถคัดแยกแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายสารกลุ่ม PAEs ได้ โดยย่อยสลายได้อย่างมีประสิทธิภาพ ทั้ง PAEs ที่มีโครงสร้างเป็นแอลคิลสายยาวได้แก่ DEHP และ DBP และ PAEs ที่มีโครงสร้างเป็นแอลคิลสายสั้น ได้แก่ DEP และ DMP

ตารางที่ 5.1 ตารางสรุปประสิทธิภาพการย่อยสลายสารกลุ่ม PAEs โดยกลุ่มแบคทีเรียที่คัดแยกจากดินกองขยะเปรียบเทียบกับงานวิจัยอื่นๆ

ชนิดแบคทีเรีย	ชนิด PAEs	ความเข้มข้น PAEs (มิลลิกรัม/ลิตร)	เปอร์เซ็นต์การย่อยสลาย	เวลา (วัน)	เอกสารอ้างอิง
LF-NK-DMP	DMP	100	99.5	7	งานวิจัยนี้
LF-NK-DEP	DEP	100	79.5	2	งานวิจัยนี้
LF-NK-DBP	DBP	100	71.0	5	งานวิจัยนี้
LF-NK-DEHP	DEHP	100	98.7	2	งานวิจัยนี้
LV- 1 (<i>Brucella</i> spp. และ <i>Sinobacter</i> spp.)	DBP	100-500	97.6	2	Wang และคณะ, 2017
HD-1 (<i>Gordonia</i> sp. <i>Burkholderia</i> sp. และ <i>Achromobacter</i> sp.)	DBP	1,200	90.0	2	He และคณะ, 2013
	DMP	1,200	87.5		
	DEP	1,200	82.9		
	DEHP	300	7.3		
		1,200	0.5		

เมื่อทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลาย DEHP โดยแบคทีเรียสายพันธุ์บริสุทธิ์ MSP_DEHP04 ที่คัดแยกจากกลุ่มแบคทีเรีย LF-NK-DEHP พบว่าสามารถย่อยสลาย DEHP ได้เช่นกัน

แบคทีเรีย *Exiguobacterium* sp. AO-11 ที่คัดแยกได้จากซึ่งคัดแยกจากกลุ่มแบคทีเรียย่อยสลายน้ำมันดิบที่ได้จากดินตะกอนปนเปื้อนน้ำมันดิบ บริเวณอ่าวพร้าว เกาะเสม็ด จังหวัดระยอง สามารถย่อยสลายสารกลุ่ม PAEs ได้ โดยเรียงลำดับตามประสิทธิภาพการย่อยจากมากไปน้อยได้ดังนี้ DMP>DEHP>DEP โดยสามารถสรุปประสิทธิภาพการย่อยได้ดังแสดงในตารางที่ 5.2

ตารางที่ 5.2 ตารางสรุปประสิทธิภาพการย่อยสลายสารกลุ่ม PAEs โดย AO-11

สารกลุ่ม PAEs	ความเข้มข้น PAEs (มิลลิกรัม/ลิตร)	เปอร์เซ็นต์การย่อยสลาย	เวลา (วัน)
DMP	100	100.0	5
DEP	100	38.8	7
DEHP	100	51.2	7

วิจารณ์ผลการทดลอง

ในหลายงานวิจัยเกี่ยวกับการย่อยสลายสารกลุ่ม PAEs ไม่ว่าจะโดยกลุ่มแบคทีเรีย หรือแบคทีเรียเดี่ยว มักพบว่า PAEs ที่มีโครงสร้างเป็นแอลคิลสายสั้นมักถูกย่อยสลายได้ดีกว่า PAEs ที่มีโครงสร้างเป็นแอลคิลสายยาว (Chang และคณะ, 2004; Quan และคณะ, 2005; Wen และคณะ, 2014; Yue และคณะ, 2017) แต่จากงานวิจัยนี้พบว่ากลุ่มแบคทีเรียที่คัดแยกจากดินกองขยะสามารถย่อยสลาย PAEs ทั้งที่มีโครงสร้างเป็นแอลคิลสายยาวและสายสั้นได้อย่างมีประสิทธิภาพ การทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายสารกลุ่ม PAEs โดยกลุ่มแบคทีเรียคัดแยกจากดินตะกอนนั้นผู้วิจัยสามารถดำเนินการทดลองได้เฉพาะ DEP เนื่องจากเวลาที่จำกัดทำให้ไม่สามารถทดลองสารกลุ่ม PAEs ชนิดอื่นได้ทัน

อย่างไรก็ตามการนำกลุ่มแบคทีเรียมาใช้ในการย่อยสลายนั้นมีข้อจำกัดอยู่หลายอย่าง เช่นการควบคุมสภาวะที่เหมาะสมในการเลี้ยงเชื้อ หรืออาจพบเชื้อก่อโรค ทำให้การนำมาใช้งานเป็นไปได้ยาก จึงจำเป็นต้องมีการแยกแบคทีเรียสายพันธุ์บริสุทธิ์ ระบุชนิดของแบคทีเรียในแต่ละกลุ่ม และทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียเดี่ยว ซึ่งในงานวิจัยนี้ได้แบคทีเรียสายพันธุ์บริสุทธิ์ทั้งหมด 6 สายพันธุ์ แต่เนื่องจากเวลาที่มีจำกัดจึงได้ทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายเพียง 1 สายพันธุ์ นั่นคือ MSP_DEHP04 พบว่าสามารถย่อยสลาย DEHP ได้ประมาณ 40 เปอร์เซ็นต์ในเวลา 5 วัน นอกจากนี้ยังได้รับแบคทีเรียเดี่ยวจากห้องปฏิบัติการคือ *Exiguobacterium* sp. AO-11 เมื่อทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายพบว่าสามารถย่อยสลาย DMP ที่มีโครงสร้างเป็นแอลคิลสายสั้นได้อย่างสมบูรณ์ในระยะเวลา 5 วัน ซึ่งมีประสิทธิภาพมากที่สุดเมื่อเทียบกับพหุเลทชนิดอื่นๆ ที่มีโครงสร้างเป็นแอลคิลสายยาว มีรายงานในทำนองเดียวกันนี้ของ Yue และคณะ (2017) ที่ทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายสารกลุ่มพหุเลทได้แก่ DMP DEP DBP และ DEHP ความเข้มข้นชนิดละ 100 มิลลิกรัม/ลิตร โดยแบคทีเรีย *Acinetobacter* sp. LMB-5 ที่คัดแยกจากดินสำหรับการเกษตร พบว่า LMB-5 สามารถย่อยสลาย DMP DEP DBP ได้ 98.87 เปอร์เซ็นต์ 94.94 เปอร์เซ็นต์ และ 72.15 เปอร์เซ็นต์

ตามลำดับ ภายในเวลา 45 ชั่วโมง ในขณะที่แทบย่อยสลาย DEHP ไม่ได้เลย จากผลการทดลองนี้ทางผู้วิจัยจึงสรุปว่า PAEs ซึ่งมีโครงสร้างเป็นแอลคิลสายสั้นสามารถถูกย่อยสลายได้ดีกว่าสารกลุ่ม PAEs ที่มีโครงสร้างเป็นแอลคิลสายยาว (Yue และคณะ, 2017)

ถึงแม้ว่าประสิทธิภาพการย่อยสลาย ของ MSP_DEHP04 และ *Exiguobacterium* sp. AO-11 จะไม่เทียบเท่าของกลุ่มแบคทีเรียที่คัดแยกจากกองขยะ แต่การได้ทราบถึงความสามารถในการย่อยสลาย PAEs ดังกล่าวถือเป็นจุดเริ่มต้นที่ดี นอกจากนี้ยังไม่เคยมีรายงานการย่อยสลาย PAEs โดยแบคทีเรียในจีนัส *Exiguobacterium* อีกด้วย

ในงานวิจัยนี้ได้กลุ่มแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายสารกลุ่ม PAEs ได้หลากหลายชนิด อีกทั้งยังค้นพบความสามารถในการย่อยสลายสารกลุ่ม PAEs ของแบคทีเรียเดี่ยวอีกด้วย จึงสามารถใช้เป็นฐานข้อมูลสำหรับการพัฒนาต่อยอดเป็นกลุ่มแบคทีเรียพร้อมใช้สำหรับบำบัดพื้นที่ปนเปื้อน PAEs ต่อไป

ข้อเสนอแนะ

เนื่องจากในงานวิจัยนี้ได้ทำการสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายสารกลุ่ม PAEs ของแบคทีเรียที่สภาวะแวดล้อมเดียวเท่านั้น ซึ่งอาจไม่ใช่สภาวะแวดล้อมที่เหมาะสมที่สุดต่อการย่อยสลายสารกลุ่ม PAEs ดังนั้นในการทดลองต่อไปควรแปรผันสภาวะล้อมให้หลากหลายมากขึ้น เช่น อุณหภูมิในการบ่ม ค่า pH หรือความเข้มข้นเริ่มต้นของ PAEs เป็นต้น อีกทั้งยังต้องมีการทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายสารกลุ่ม PAEs ผสมกัน เนื่องจากในสภาพแวดล้อมทั่วไปไม่ได้มีเพียง PAEs ชนิดใดชนิดหนึ่งปนเปื้อนอยู่ และต้องทดสอบสารกลุ่ม PAEs ชนิดอื่นๆ เพื่อประสิทธิภาพการย่อยสลายที่ครอบคลุมมากขึ้น

นอกจากนี้ในอนาคตจำเป็นต้องมีการคัดแยกแบคทีเรียสายพันธุ์บริสุทธิ์จากกลุ่มของแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลาย PAEs ได้ จากนั้นระบุชนิดของแบคทีเรียเพื่อตรวจสอบว่าไม่ใช่เชื้อก่อโรค และทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายสารกลุ่ม PAEs หากพบว่าย่อยสลายได้ อาจเพิ่มประสิทธิภาพของการย่อยสลายโดยนำมารวมกลุ่มจุลินทรีย์ใหม่ (defined consortia) ซึ่งเป็นการใช้จุลินทรีย์มากกว่า 1 ชนิดให้ทำงานร่วมกัน ทำให้สามารถเกิดวิถีเมแทบอลิซึมที่หลากหลายขึ้น โดยจุลินทรีย์ที่นำมารวมกลุ่มนี้จะต้องไม่ยับยั้งการเจริญเติบโตซึ่งกันและกัน และต้องมีอัตราส่วนที่เหมาะสมเพื่อส่งเสริมการเจริญเติบโต (Subashchandrabose และคณะ, 2011)

เอกสารอ้างอิง

ภาษาไทย

กรมควบคุมมลพิษ. รายงานสถานการณ์มลพิษของประเทศไทย ปี 2560. แหล่งที่มา: <http://www.pcd.go.th/file/02-03-60.pdf> ค้นเมื่อ 01 เมษายน, 2562

ผดุงขวัญ ศรีสุวรรณภาพ. (2558). ประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันดิบของ *Exiguobacterium* sp. AO-11 ที่คัดแยกจากดินตะกอน บริเวณอ่าวพร้าว เกาะเสม็ด ประเทศไทย. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต, สาขาวิชาวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ภาษาอังกฤษ

- Abatenh E., Gizaw B., Tsegaye Z. and Wassie M. (2017). "Application of microorganisms in bioremediation-review" Journal Of Environmental Microbiology 1: 02-09
- Berg V. D. M., Sanderson T., Kurihara N. and Katayama A. (2003). "Role of metabolism in the endocrine-disrupting effects of chemicals in aquatic and terrestrial systems." Pure and Applied Chemistry 75: 1917-1932
- Birgit B. H., Lenters V., Giwercman A., Jönsson B.A.G., Toft G., Hougaard K. S., Bonde J. P.E. and Specht I.O. (2018). "Impact of di-(2-ethylhexyl) phthalate metabolites on male reproductive function: a systematic review of human evidence." Current Environment Health Reports 5: 20-33
- Chang B. V., Yang C. M., Cheng C.H. and Yuan S.Y. (2004). "Biodegradation of phthalate esters by two bacteria strains." Chemosphere 55: 533-538.
- Chao K. H. U., Toledo D. A. R. and Shim H. (2018). "Enhanced hybrid removal of DEHP from contaminated water using *Acinetobacter* sp. immobilized on scrap tyres" Energy Procedia 153: 221-225
- Chao W. L., Lin C. M., Shiung I. I. and Kuo Y. L. (2006). "Degradation of di-butyl- phthalate by soil bacteria." Chemosphere 63: 1377-1383.
- Decai J., Kong X., Li Y., Bai Z., Zhuang G., Zhuang Z., and Deng Y. (2015). "Biodegradation of di-*n*-butyl phthalate by *Achromobacter* sp. isolated from rural domestic wastewater" Environmental Research and Public Health 12: 13510-13522
- He Z., Xiao H., Tang L., Min H. and Lu Z. (2013). "Biodegradation of di-*n*-butyl phthalate by a stable bacterial consortium HD-1 enriched from activated sludge" Bioresource Technology 128: 526-532
- IARC (2000). "Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Some industrial chemicals." International Agency for Research on Cancer 77
- Jambeck R. J., Geyer R., Wilcox C., Siegler T. R., Perryman M., Andrady A., Narayan R. and Law K. L. (2015). "Plastic wastes inputs from land to the ocean." Science 347: 768-771

- Li J., Zhang J., Yadav P. M. and Li X. (2019). "Biodegradability and biodegradation pathway of di-(2-ethylhexyl) phthalate by Burkholderia pyrrocinia B1213." Chemosphere 225: 443-450.
- Matsumoto M., Hirata-Koizumi M. and Ema M. (2008). "Potential adverse effects of phthalic acid esters on human health: a review of recent studies on reproduction" Regulatory Toxicology and Pharmacology 50: 37-49
- Merck 2019. resource: <https://www.sigmaaldrich.com/singapore.html> searched on April 1st, 2019
- Mersiowsky, I., Brandsch, R., and Ejlertsson, J. (2001). "Screening for organotin compounds in European landfill leachates." Journal of Environmental Quality 30: 1604-1611.
- Muangchinda C., Rungsahiranrut A., Prombutara P., Soonglersongpha S. and Pinyakong O. (2018). "16S metagenomic analysis reveals adaptability of a mixed-PAH-degrading consortium isolated from crude oil-contaminated seawater to changing environmental conditions" Journal of Hazardous Materials 357: 119-127
- Nahurira R., Ren L., Song J., Jia Y., Wang J., Fan S., Wang H. and Yan Y. (2017). "Degradation of di-(2-ethylhexyl) phthalate by a novel *Gordonia alkanivorans* strain YC-RL2." Current Microbiology 74: 309-319
- Pant N., Shukla M., Kumar Patel D., Shukla Y., Mathur N., Kumar Gupta Y. and Saxena D. K. (2008). "Correlation of phthalate exposures with semen quality." Toxicology and Applied Pharmacology 231: 112-116
- Quan, C. S., Liu Q., Tian W. J., Kikuchi J. and Fan S. D. (2005). "Biodegradation of an endocrine-disrupting chemical, di-2-ethylhexyl phthalate, by *Bacillus subtilis* No. 66." Applied Microbiology and Biotechnology 66: 702-710.
- Reddy BS., Rozati R., Reddy BVR. And Raman NVVSS. (2006). "Association of phthalate esters with endometriosis in Indian women" BJOG: an International Journal of Obstetrics and Gynaecology 113: 525-520
- Ren L., Jia Y., Ruth N., Qiao C., Wang J., Zhao B. and Yan Y. (2016). "Biodegradation of phthalic acid esters by a newly isolated *Mycobacterium* sp. YC-RL4 and the bioprocess with environmental samples" Environmental Science and Pollution Research 23: 16609–16619
- Sargazi S., Mirzaei R., Rahmani M., Mohammadi M.,Khammari A. and Sheikh M. (2017). "One-step in-syringe dispersive liquid-liquid microextraction and GC-FID determination of trace amounts of di-(2-ethylhexyl) phthalate and its metabolite in human urine samples" Journal of Analytical Chemistry 72: 557-561
- Subashchandrabose R. S., Ramakrishnan B., Megharaj M., Venkateswarlu K. and Naidu R. (2011). "Consortia of cyanobacteria/microalgae and bacteria: biotechnological potential" Biotechnology Advances 29: 896-907

- Tickner A. J., Schettler T., Guidotti T., Mccally M. and Rossi M. (2001). "Health risks posed by use of di-2-ethylhexyl phthalate (DEHP) in PVC medical devices: a critical review" American Journal of Industrial Medicine 39: 100-111
- Tosu P., Luepromchai E. and Suttinun O. (2015). "Activation and immobilization of phenol-degrading bacteria on oil palm residues for enhancing phenols degradation in treated palm oil mill effluent" Environmental Engineering Research 20: 141-148
- Urbanek K. A., Rymowicz W., Strzelecki C. M., Kociuba W., Franczak Ł. and Mironiczuk M. A. (2017). "Isolation and characterization of arctic microorganisms decomposing bioplastics." AMB Express 7: 148. doi: 10.1186/s13568-017-0448-4.
- Wanapaisan P., Laothamteep N., Vejarano F., Chakraborty J., Shintani M., Muangchinda C., Morita T., Suzuki-Minakuchi C., Inoue K., Nojiri H. and Pinyakong O. (2018). "Synergistic degradation of pyrene by five culturable bacteria in a mangrove sediment-derived bacterial consortium" Journal of Hazardous Materials 342: 561-570
- Wang J., Man-Yun Z., Ting C., Ye Z., Ying T., Ying-Ming L. and Christie P. (2015). "Isolation and identification of a di-(2-ethylhexyl) phthalate-degrading bacterium and its role in the bioremediation of a contaminated soil" Pedosphere 25: 202-211
- Wang Y, Li F, Ruan X, Song J, Lv L, Chai L, Yang Z. and Luo L. (2017) "Biodegradation of di-n-butyl phthalate by bacterial consortium LV-1 enriched from river sludge." PLoS ONE 12 doi: 10.1371/journal.pone.0178213
- Wang, Y., Yin B., Hong Y., Yan Y. and Gu J. D. (2008). "Degradation of dimethyl carboxylic phthalate ester by *Burkholderia cepacia* DA2 isolated from marine sediment of South China Sea." Ecotoxicology 17: 845-852.
- Wen Z. D., Gao D. W. and Wu W. M. (2014). "Biodegradation and kinetic analysis of phthalates by an *Arthrobacter* strain isolated from constructed wetland soil" Applied Microbiology and Biotechnology 98: 4683-4690
- Wongwongsee W., Chareanpat P. and Pinyakong O. (2013). "Abilities and genes for PAH biodegradation of bacteria isolated from mangrove sediments from the central of Thailand" Marine Pollution Bulletin 74: 95-104
- Xu J., Lu Q., Toledo R. A. D. and Shim H. (2017). "Degradation of di-(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) by an indigenous isolate *Acinetobacter* sp. SN13" International Biodeterioration & Biodegradation 117: 205-214
- Yang J., Guo C., Liu S., Liu W., Wang H., Dang Z and Lu G. (2018). "Characterization of a di-n-butyl phthalate-degrading bacterial consortium and its application in contaminated soil" Environmental Science and Pollution Research 25: 17645-17653
- Yue F., Lishuang Z., Jing W., Ying Z. and Bangce Y. (2017). "Biodegradation of phthalate esters by a newly isolated *Acinetobacter* sp. Strain LMB-5 and characteristics of its esterase" Pedosphere 27: 606-615

- Zeng F., Cui K., Li X., Fu J., and Sheng G. (2004). "Biodegradation kinetics of phthalate esters by *Pseudomonas fluorescens* FS1" Process Biochemistry, 39: 1125–1129.
- Zhang J., Zhang C., Zhu Y., Li J. and Li X. (2018). "Biodegradation of seven phthalate esters by *Bacillus mojavensis* B1811." International Biodeterioration & Biodegradation 132: 200-207.
- Zhao H.-M., Du H., Feng N.-X., Xiang L., Li Y.-W., Li H., Cai Q.-Y. and Mo C.-H. (2015). "Biodegradation of di-n-butylphthalate and phthalic acid by a novel *Providencia* sp. 2D and its stimulation in a compost-amended soil." Biology and Fertility of Soils 52: 65-76.

ภาคผนวก ก

สูตรและวิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

อาหารเลี้ยงเชื้อปราศจากแหล่งคาร์บอน (Carbon Free Mineral Medium; CFMM)

สารละลายส่วนที่ 1

แอมโมเนียมไนเตรต ((NH_4NO_3))	3	กรัม
โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)	2.2	กรัม
โซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต โดเดคาไฮเดรต ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)	0.8	กรัม

ละลายสารทั้งหมดในน้ำกลั่น ปรับความเป็นกรด-ด่างด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ เข้มข้น 5 โมลาร์ จนมีค่าเท่ากับ 7 และปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 1,000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

อาหารเลี้ยงเชื้อแห้ง เตรียมโดยละลายแบคโตเอการ์ 15 กรัม ในอาหารเหลว 1,000 มิลลิลิตร ก่อนนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ

สารละลายส่วนที่ 2

แมกนีเซียมซัลเฟต ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	0.1	กรัม/มิลลิลิตร
เฟอร์ริกคลอไรด์ เฮกซะไฮเดรต ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)	0.05	กรัม/มิลลิลิตร
แคลเซียมคลอไรด์ ไดไฮเดรต ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	0.05	กรัม/มิลลิลิตร

กำจัดเชื้อโดยกรองสารละลายแต่ละชนิดผ่านชุดกรองสำเร็จรูปเซลลูโลสอะซีเตท (CA) ขนาดรูกรอง 0.22 ไมโครเมตร แล้วเติมสารละลายส่วนที่ 2 ชนิดละ 1 มิลลิลิตร ลงในสารละลายส่วนที่ 1 ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร

อาหารเลี้ยงเชื้อ Luria-Bertani (LB)

ทริปโตน (Tryptone)	10	กรัม
ผงสกัดจากยีสต์ (Yeast extract)	5	กรัม
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	5	กรัม

ละลายสารทั้งหมดในน้ำกลั่น ปรับความเป็นกรด-ด่างด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ เข้มข้น 5 โมลาร์ จนมีค่าเท่ากับ 7 และปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 1,000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

อาหารเลี้ยงเชื้อแห้ง เตรียมโดยละลายผงวุ้น 15 กรัม ในอาหารเหลว 1,000 มิลลิลิตร ก่อนนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ

อาหารเลี้ยงเชื้อ Luria-Bertani เจือจาง 4 เท่า (0.25X LB)

ผสมอาหารเหลว LB ปริมาตร 250 มิลลิลิตร และน้ำกลั่น ปริมาตร 750 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

อาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient Seawater (NSW)

แอมโมเนียมไนเตรท (NH_4NO_3)	1	กรัม
ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4)	0.02	กรัม
เฟอร์ริกซิเตรท (ferric citrate)	0.02	กรัม
ผงสกัดจากยีสต์ (Yeast extract)	0.5	กรัม

ละลายสารทั้งหมดในน้ำทะเล ปรับความเป็นกรด-ด่างด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ เข้มข้น 5 โมลาร์ จนมีค่าเท่ากับ 7 และปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 1,000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

อาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง เตรียมโดยละลายแบคทีโอะการ์ 15 กรัม ในอาหารเหลว 1,000 มิลลิลิตร ก่อนนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ

อาหารเลี้ยงเชื้อ Zobell Marine

Zobell Marine	40.25	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

ละลายสารในน้ำกลั่น นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

อาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง เตรียมโดยละลายมารีนอะการ์ 15 กรัม ในอาหารเหลว 1,000 มิลลิลิตร ก่อนนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ

ภาคผนวก ข

สูตรและวิธีการเตรียมสารเคมี

สารละลายไดเมทิล พทาเลท (dimethyl phthalate: DMP) 10,000 มิลลิกรัม/ ลิตร

ไดเมทิล พทาเลท (dimethyl phthalate: DMP)	0.08	มิลลิลิตร
ไดคลอโรมีเทน (CH ₂ Cl ₂)	9.92	มิลลิลิตร

ละลายสารในไดคลอโรมีเทนจนสมบูรณ์ กำจัดเชื้อโดยกรองสารละลายผ่านชุดกรองสำเร็จรูปพอลิเตตระฟลูออโรเอทิลีน (PTFE) ขนาดรูกรอง 0.22 ไมโครเมตร เก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

สารละลายไดเอทิล พทาเลท (Diethyl phthalate: DEP) 10,000 มิลลิกรัม/ ลิตร

ไดเมทิล พทาเลท (dimethyl phthalate: DMP)	0.09	มิลลิลิตร
ไดคลอโรมีเทน (CH ₂ Cl ₂)	9.91	มิลลิลิตร

ละลายสารในไดคลอโรมีเทนจนสมบูรณ์ กำจัดเชื้อโดยกรองสารละลายผ่านชุดกรองสำเร็จรูปพอลิเตตระฟลูออโรเอทิลีน (PTFE) ขนาดรูกรอง 0.22 ไมโครเมตร เก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

สารละลายไดบิวทิล พทาเลท (Dibutyl phthalate: DBP) 10,000 มิลลิกรัม/ ลิตร

ไดเมทิล พทาเลท (dimethyl phthalate: DMP)	0.09	มิลลิลิตร
ไดคลอโรมีเทน (CH ₂ Cl ₂)	9.91	มิลลิลิตร

ละลายสารในไดคลอโรมีเทนจนสมบูรณ์ กำจัดเชื้อโดยกรองสารละลายผ่านชุดกรองสำเร็จรูปพอลิเตตระฟลูออโรเอทิลีน (PTFE) ขนาดรูกรอง 0.22 ไมโครเมตร เก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

สารละลายได-2-เอทิลเฮกซิล พทาเลท (Di-2-ethylhexyl pththalate: DEHP) 10,000 มิลลิกรัม/ ลิตร

ไดเมทิล พทาเลท (dimethyl phthalate: DMP)	0.10	มิลลิลิตร
ไดคลอโรมีเทน (CH ₂ Cl ₂)	9.90	มิลลิลิตร

ละลายสารในไดคลอโรมีเทนจนสมบูรณ์ กำจัดเชื้อโดยกรองสารละลายผ่านชุดกรองสำเร็จรูปพอลิเตตระฟลูออโรเอทิลีน (PTFE) ขนาดรูกรอง 0.22 ไมโครเมตร เก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

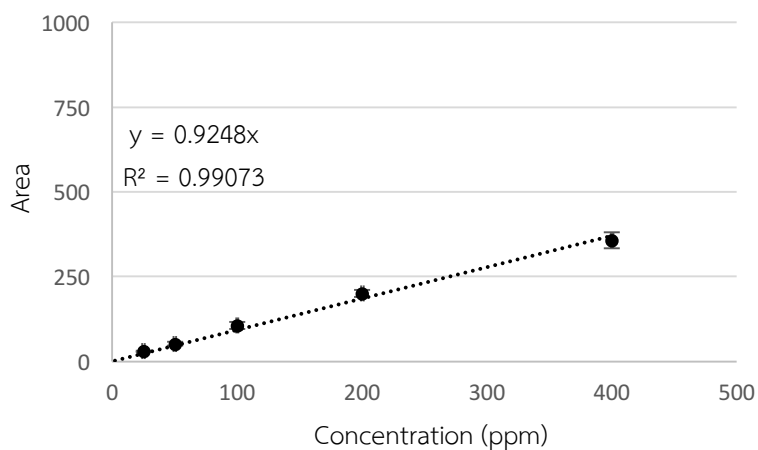
สารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.85 เปอร์เซ็นต์

โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) 8.5 กรัม

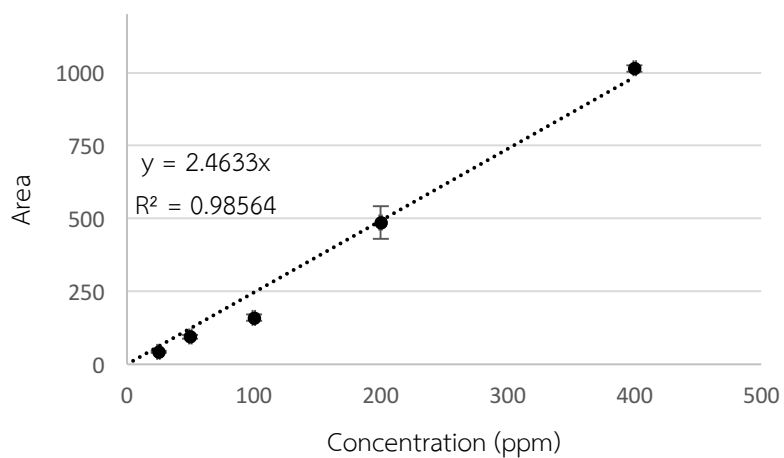
ละลายสารในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

ภาคผนวก ค

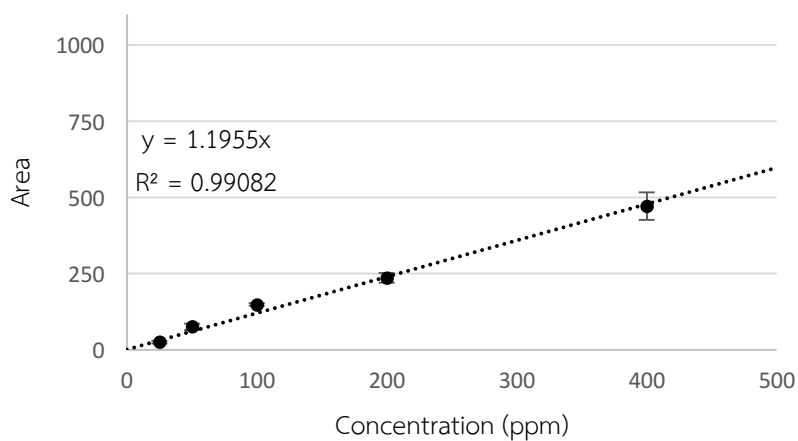
ข้อมูลดิบต่างๆ ในการทดลอง



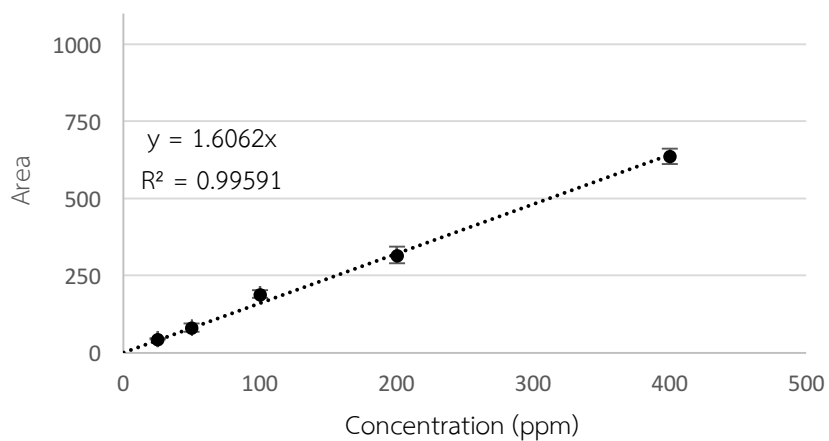
รูปที่ ค.1 กราฟมาตรฐานของ DMP ในช่วงความเข้มข้น 25 มิลลิกรัม/ลิตร ถึง 400 มิลลิกรัม/ลิตร วิเคราะห์โดย GC-FID



รูปที่ ค.2 กราฟมาตรฐานของ DEP ในช่วงความเข้มข้น 25 มิลลิกรัม/ลิตร ถึง 400 มิลลิกรัม/ลิตร วิเคราะห์โดย GC-FID



รูปที่ ค.3 กราฟมาตรฐานของ DBP ในช่วงความเข้มข้น 25 มิลลิกรัม/ลิตร ถึง 400 มิลลิกรัม/ลิตร วิเคราะห์
โดย GC-FID



รูปที่ ค.4 กราฟมาตรฐานของ DEHP ในช่วงความเข้มข้น 25 มิลลิกรัม/ลิตร ถึง 400 มิลลิกรัม/ลิตร วิเคราะห์
โดย GC-FID

ค.1 ประสิทธิภาพการย่อยสลาย PAEs โดยกลุ่มแบคทีเรียที่คัดแยกจากดินกองขยะ

ตารางที่ ค.1 ข้อมูลพื้นที่ใต้กราฟแสดงถึงความเข้มข้นคงเหลือของ DMP วิเคราะห์โดย GC-FID

เวลา(วัน)	ชุดควบคุม			LF-NK-DMP		
	1	2	3	1	2	3
0	1086	1112	1037	1022	1091	1008
2	1171	1322	1089	495	509	616
5	909	1211	1121	92	123	18
7	1311	1154	1207	5.5	5.6	6.3

ตารางที่ ค.2 ข้อมูลพื้นที่ใต้กราฟแสดงถึงความเข้มข้นคงเหลือของ DEP วิเคราะห์โดย GC-FID

เวลา(วัน)	ชุดควบคุม			LF-NK-DEP		
	1	2	3	1	2	3
0	1399	1230	1167	1467	1036	1378
2	1428	1138	1008	220	232.2	258.6
5	1275	1150	1232	0	0	0
7	1194	1008	1426	-	-	-

ตารางที่ ค.3 ข้อมูลพื้นที่ใต้กราฟแสดงถึงความเข้มข้นคงเหลือของ DBP วิเคราะห์โดย GC-FID

เวลา(วัน)	ชุดควบคุม			LF-NK-DBP		
	1	2	3	1	2	3
0	1236.5	1542.4	1082.9	1342.1	1298	1309.4
2	1087.4	1470.7	1360.3	790.9	783.3	868.5
5	1185.8	1516.9	1217	458.1	410	258.3
7	1219	1327.1	1412.1	0	0	0

ตารางที่ ค.4 ข้อมูลพื้นที่ใต้กราฟแสดงถึงความเข้มข้นคงเหลือของ DEHP วิเคราะห์โดย GC-FID

เวลา(วัน)	ชุดควบคุม			LF-NK-DEHP		
	1	2	3	1	2	3
0	1971.6	1926.3	1825	1909.2	1839.4	1925
2	1853.8	1717.1	1892.3	0	64.4	0
5	1728	1696	1802	-	-	-
7	2110	1769	1998	-	-	-

ค.2 ประสิทธิภาพการย่อยสลาย PAEs โดยกลุ่มแบคทีเรียที่คัดแยกจากดินตะกอน

ตารางที่ ค.5 ข้อมูลพื้นที่ใต้กราฟแสดงถึงความเข้มข้นคงเหลือของ DEP วิเคราะห์โดย GC-FID

เวลา(วัน)	ชุดควบคุม			ST10-DEP		
	1	2	3	1	2	3
0	1070	1321.5	1178.2	981	1131.8	1294.4
2	1421	1008.2	1112	6.6	7.4	6
5	1265	1178.1	1003	-	-	-
7	900	998	1012	-	-	-

ค.3 ประสิทธิภาพการย่อยสลาย PAEs โดยกลุ่มแบคทีเรีย *Exiguobacterium* sp. AO-11

ตารางที่ ค.6 ข้อมูลพื้นที่ใต้กราฟแสดงถึงความเข้มข้นคงเหลือของ DMP วิเคราะห์โดย GC-FID

เวลา(วัน)	ชุดควบคุม			<i>Exiguobacterium</i> sp. AO-11		
	1	2	3	1	2	3
0	1159.7	1371	939.3	1183.5	962.1	900
2	1214.8	1126.1	1003	449.9	404.8	409.8
5	936.5	1357	1178	0	0	0
7	1251.5	981	1047.5	-	-	-

ตารางที่ ค.7 ข้อมูลพื้นที่ใต้กราฟแสดงถึงความเข้มข้นคงเหลือของ DEP วิเคราะห์โดย GC-FID

เวลา(วัน)	ชุดควบคุม			<i>Exiguobacterium</i> sp. AO-11		
	1	2	3	1	2	3
0	1299	1230	1004	1467	1036	1378
2	1091	1134	1367	897	798	727
5	1185	1050	1232	627	681	811
7	1294	1208	1126	777	716	798

ตารางที่ ค.8 ข้อมูลพื้นที่ใต้กราฟแสดงถึงความเข้มข้นคงเหลือของ DEHP วิเคราะห์โดย GC-FID

เวลา(วัน)	ชุดควบคุม			<i>Exiguobacterium</i> sp. AO-11		
	1	2	3	1	2	3
0	1612.5	1290.8	1891.9	1500	1621.4	1210.9
2	1891.2	1778.3	2019.2	1052.3	1135.6	1101.6
5	1801	1700	1904.8	810	825.9	1077.6
7	1919.5	1833	1771.1	710.9	682.4	690

ค.4 ประสิทธิภาพการย่อยสลาย PAEs โดยแบคทีเรีย MSP_DEHP04

ตารางที่ ค.9 ข้อมูลพื้นที่ใต้กราฟแสดงถึงความเข้มข้นคงเหลือของ DEHP วิเคราะห์โดย GC-FID

เวลา(วัน)	ชุดควบคุม			MSP_DEHP04		
	1	2	3	1	2	3
0	1431	1414	1289	1107	1024	1450
2	1165	1353	1116	1170.9	884.3	877.5
5	1329	1578.1	1401.5	1023.9	934.3	822.7
7	1023.9	1034.3	1722.7	1001	885	625

ค.5 จำนวนแบคทีเรียทั้งหมดและแบคทีเรียย่อยสลาย PAEs ในแต่ละกลุ่มแบคทีเรีย

ตารางที่ ค.10 จำนวนแบคทีเรียทั้งหมดในกลุ่มแบคทีเรีย LF-NK-DMP DMP ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัม/ลิตร เป็นเวลา 7 วัน

ชนิดอาหาร เลี้ยงเชื้อ	จำนวนแบคทีเรีย (CFU/มิลลิลิตร)			
	วันที่ 0	วันที่ 2	วันที่ 5	วันที่ 7
LB agar	$2.6 \pm 0.2 \times 10^9$	$1.3 \pm 0.1 \times 10^8$	$3.8 \pm 0.3 \times 10^6$	$3.6 \pm 0.4 \times 10^6$

ตารางที่ ค.11 จำนวนแบคทีเรียทั้งหมดและแบคทีเรียย่อยสลาย DEP ในกลุ่มแบคทีเรีย LF-NK-DEP ระหว่างการย่อยสลาย DEP ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัม/ลิตร เป็นเวลา 7 วัน

ชนิดอาหาร เลี้ยงเชื้อ	จำนวนแบคทีเรีย (CFU/มิลลิลิตร)			
	วันที่ 0	วันที่ 2	วันที่ 5	วันที่ 7
LB agar	$1.2 \pm 0.3 \times 10^7$	$1.2 \pm 0.1 \times 10^8$	$4.1 \pm 0.7 \times 10^7$	$2.8 \pm 0.2 \times 10^7$
CFMM agar + DEP 100 ppm	$9.7 \pm 6.9 \times 10^6$	$2.3 \pm 0.4 \times 10^7$	$2.3 \pm 0.4 \times 10^6$	$5.0 \pm 2.5 \times 10^6$

ตารางที่ ค.12 จำนวนแบคทีเรียทั้งหมดและแบคทีเรียย่อยสลาย DBP ในกลุ่มแบคทีเรีย LF-NK-DBP ระหว่างการย่อยสลาย DBP ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัม/ลิตร เป็นเวลา 7 วัน

ชนิดอาหาร เลี้ยงเชื้อ	จำนวนแบคทีเรีย (CFU/มิลลิลิตร)			
	วันที่ 0	วันที่ 2	วันที่ 5	วันที่ 7
LB agar	$6.3 \pm 0.7 \times 10^7$	$>10^9$	$>10^9$	$>10^9$
CFMM agar + DBP 100 ppm	$8.1 \pm 1.3 \times 10^6$	$2.0 \pm 0.1 \times 10^8$	$2.8 \pm 0.2 \times 10^8$	$1.7 \pm 0.1 \times 10^8$

ตารางที่ ค.13 จำนวนแบคทีเรียทั้งหมดและแบคทีเรียย่อยสลาย DEHP ในกลุ่มแบคทีเรีย LF-NK-DEHP ระหว่างการย่อยสลาย DEHP ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัม/ลิตร เป็นเวลา 7 วัน

ชนิดอาหาร เลี้ยงเชื้อ	จำนวนแบคทีเรีย (CFU/มิลลิลิตร)			
	วันที่ 0	วันที่ 2	วันที่ 5	วันที่ 7
LB agar	$1.4 \pm 0.1 \times 10^7$	$>10^9$	$>10^9$	$>10^9$
CFMM agar + DEHP 100 ppm	$3.7 \pm 0.6 \times 10^6$	$1.4 \pm 0.1 \times 10^8$	$>10^9$	$>10^9$

ตารางที่ ค.14 จำนวนแบคทีเรียทั้งหมดและแบคทีเรียย่อยสลาย DEP ในกลุ่มแบคทีเรีย ST10-DEP ระหว่างการย่อยสลาย DEP ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัม/ลิตร เป็นเวลา 7 วัน

ชนิดอาหาร เลี้ยงเชื้อ	จำนวนแบคทีเรีย (CFU/มิลลิลิตร)			
	วันที่ 0	วันที่ 2	วันที่ 5	วันที่ 7
Marine agar	$5.0 \pm 0.1 \times 10^6$	$6.9 \pm 0.1 \times 10^6$	$3.6 \pm 0.1 \times 10^7$	$8.2 \pm 0.1 \times 10^7$
NSW agar + DEP 100 ppm	$5.3 \pm 0.1 \times 10^6$	$4.0 \pm 0.1 \times 10^6$	$5.7 \pm 0.1 \times 10^7$	$2.3 \pm 0.1 \times 10^7$

ตารางที่ ค.15 จำนวนแบคทีเรียทั้งหมดของ *Exiguobacterium* sp. AO-11 ระหว่างการย่อยสลาย DEP ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัม/ลิตร เป็นเวลา 7 วัน

ชนิดอาหาร เลี้ยงเชื้อ	จำนวนแบคทีเรีย (CFU/มิลลิลิตร)			
	วันที่ 0	วันที่ 2	วันที่ 5	วันที่ 7
Marine agar	$2.2 \pm 0.2 \times 10^7$	$1.1 \pm 0.2 \times 10^8$	$2.1 \pm 0.2 \times 10^7$	$1.9 \pm 0.1 \times 10^7$

ตารางที่ ค.16 จำนวนแบคทีเรียทั้งหมดของ *Exiguobacterium* sp. AO-11 ระหว่างการย่อยสลาย DMP ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัม/ลิตร เป็นเวลา 7 วัน

ชนิดอาหาร เลี้ยงเชื้อ	จำนวนแบคทีเรีย (CFU/มิลลิลิตร)			
	วันที่ 0	วันที่ 2	วันที่ 5	วันที่ 7
Marine agar	$5.4 \pm 0.7 \times 10^7$	$2.6 \pm 0.1 \times 10^8$	$2.8 \pm 0.1 \times 10^8$	$2.3 \pm 0.1 \times 10^8$
NSW agar + DMP 100 ppm	$3.5 \pm 0.2 \times 10^7$	$2.1 \pm 1.1 \times 10^8$	$2.5 \pm 0.1 \times 10^8$	$2.5 \pm 0.3 \times 10^8$

ตารางที่ ค.17 จำนวนแบคทีเรียทั้งหมดของ *Exiguobacterium* sp. AO-11 ระหว่างการย่อยสลาย DEHP ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัม/ลิตร เป็นเวลา 7 วัน

ชนิดอาหาร เลี้ยงเชื้อ	จำนวนแบคทีเรีย (CFU/มิลลิลิตร)			
	วันที่ 0	วันที่ 2	วันที่ 5	วันที่ 7
Marine agar	$7.2 \pm 1.2 \times 10^7$	$1.0 \pm 0.2 \times 10^8$	$1.9 \pm 0.1 \times 10^7$	$1.8 \pm 0.2 \times 10^7$
NSW agar + DEHP 100 ppm	$1.4 \pm 0.4 \times 10^7$	$1.1 \pm 0.1 \times 10^8$	$6.2 \pm 2.4 \times 10^7$	$7.0 \pm 3.4 \times 10^7$

ตารางที่ ค.18 จำนวนแบคทีเรียทั้งหมดของ MSP_DEHP04 ระหว่างการย่อยสลาย DEHP ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัม/ลิตร เป็นเวลา 7 วัน

ชนิดอาหาร เลี้ยงเชื้อ	จำนวนแบคทีเรีย (CFU/มิลลิลิตร)			
	วันที่ 0	วันที่ 2	วันที่ 5	วันที่ 7
LB agar	$2.5 \pm 0.1 \times 10^8$	$1.4 \pm 0.1 \times 10^7$	$1.3 \pm 0.1 \times 10^8$	$9.8 \pm 0.1 \times 10^8$
CFMM agar + DEHP 100 ppm	$5.1 \pm 0.1 \times 10^8$	$1.4 \pm 0.1 \times 10^8$	$1.0 \pm 0.1 \times 10^8$	$1.0 \pm 0.1 \times 10^8$