การย่อยสลายสารแกมมา-เอชซีเอชโดยกลุ่มแบคทีเรีย แบคทีเรียผสม และแบคทีเรียสายพันธุ์เดี่ยวจากดิน

γ-HCH Biodegradation by Bacterial Consortium, Mixed Cultures and Single Bacterial Isolate from Soil

ศักดิ์สินทร์ จีนนุ่น

Saksin Jeenoon

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา

วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree of

Master of Science in Biotechnology

Prince of Songkla University

2551

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ชื่อวิทยานิพนธ์ การย่อยสลายสารแกมมา-เอชซีเอชโดยกลุ่มแบคทีเรีย แบคทีเรียผสม และแบคทีเรียสายพันธุ์เดี่ยวจากดิน

ผู้เขียน นายศักดิ์สินทร์ จีนนุ่น

สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

.....

(ดร.วรสันติ์ โสภณ)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

.....

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ศุภศิลป์ มณีรัตน์)

คณะกรรมการสอบ

.....ประธานกรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร.ดวงพร คันธโชติ)

.....กรรมการ

(ดร.วรสันติ์ โสภณ)

.....กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ศุภศิลป์ มณีรัตน์)

.....กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.นุกูล อินทระสังขา)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

.....

(รองศาสตราจารย์ ดร.เกริกชัย ทองหนู)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

ชื่อวิทยานิพนธ์ การย่อยสลายสารแกมมา-เอชซีเอชโดยกลุ่มแบคทีเรีย แบคทีเรียผสม และแบคทีเรียสายพันธุ์เดี่ยวจากดิน

ผู้เขียน นายศักดิ์สินทร์ จีนนุ่น

สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ

ปีการศึกษา 2551

บทคัดย่อ

การวิเคราะห์ปริมาณสารแกมมา-เอชซีเอชตกค้างในตัวอย่างดินจากพื้นที่ทางการเกษตรจังหวัดสงขลาจำนวน 12 บริเวณ พบว่ามีสารแกมมา-เอชซีเอชตกค้างใน 5 จาก 12 บริเวณ โดยมีปริมาณตั้งแต่ 0.03 - 0.45 นาโนกรัมต่อกรัมดินน้ำหนักแห้ง เมื่อคัดแยกแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายสารแกมมา-เอชซีเอชในอาหาร Mineral salt yeast extract medium ที่เสริมสารแกมมา-เอชซีเอช ภายใต้สภาวะที่ให้อากาศ โดยการถ่ายเชื้อลงในอาหารที่เพิ่มความเข้มข้นของสารตั้งแต่ 20 ถึง 200 ส่วนในล้านส่วน (มิลลิกรัมต่อลิตร) สามารถคัดแยกเชื้อแบคทีเรียได้ 35 สายพันธุ์ จากทั้ง 12 บริเวณ (12 กลุ่มเชื้อ) ซึ่งทั้ง 35 ไอโซเลตสามารถย่อยสลายสารแกมมา-เอชซีเอช ความเข้มข้นเริ่มต้น 200 ส่วนในล้านส่วน ได้ร้อยละ 7.97 - 77.98 ในเวลา 96 ชั่วโมง ในขณะที่กลุ่มเชื้อแบคทีเรียทั้ง 12 กลุ่ม สามารถย่อยสลายสารแกมมา-เอชซีเอชได้ร้อยละ 42.2 - 97.6 ในเวลา 96 ชั่วโมง โดยกลุ่มเชื้อแบคทีเรียที่ 9 สามารถย่อยสลายสารได้สูงสุดร้อยละ 97.6 ในเวลา 96 ชั่วโมง

เมื่อนำเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ต่างๆ ในกลุ่มเชื้อที่ 9 ซึ่งประกอบด้วยเชื้อสายพันธุ์ GH9-1, GH9-2, GH9-3 และ GH9-4 มาศึกษาการย่อยสลายสารแกมมา-เอชซีเอช พบว่า สามารถย่อยสลายสารได้ร้อยละ 73.3, 53.3, 51.6 และ 33.6 ในเวลา 96 ชั่วโมง ตามลำดับ และเมื่อศึกษาการย่อยสลายสารแกมมา-เอชซีเอชโดยเชื้อผสม 2 , 3 และ 4 สายพันธุ์ พบว่า เชื้อผสมอัตราส่วน 1:1 (ปริมาตร:ปริมาตร) ระหว่างสายพันธุ์ GH9-1 กับ GH9-3 [Mix(1+3)] มีการย่อยสลายสารสูงสุด คือ ร้อยละ 85.6 ในเวลา 96 ชั่วโมง ขณะที่เชื้อผสมระหว่างสายพันธุ์ GH9-1 กับ GH9-2 [Mix(1+2)], GH9-1 กับ GH9-4 [Mix(1+4)], GH9-2 กับ GH9-3 [Mix(2+3)], GH9-2 กับ GH9-4 [Mix(2+4)] และ GH9-3 กับ GH9-4 [Mix(3+4)] มีการย่อยสลายสารร้อยละ 70, 63, 57.8, 44 และ 41.2 ในเวลา 96 ชั่วโมง ตามลำดับ ส่วนเชื้อผสม 3 สายพันธุ์ที่ไม่เติมเชื้อ GH9-1, GH9-2, GH9-3 และ GH9-4 สามารถย่อยสลายได้ร้อยละ 47.2, 73.8, 44.5 และ73.4 ในเวลา 96 ชั่วโมง ตามลำดับ ในขณะที่เชื้อผสมทั้ง 4 สายพันธุ์สามารถย่อยสลายได้ร้อยละ 71.1 ในเวลา 96 ชั่วโมง

การเทียบเคียงเชื้อ GH9-1, GH9-2, GH9-3 และ GH9-4 โดยวิเคราะห์ยีน 16S rDNA ให้ผลความใกล้เคียงกับเชื้อ *Pseudomonas putida*, *Burkholderia* sp., *Flexibacter* sp. และ *Burkholderia vietnamiensi* ที่ความคล้ายคลึงเท่ากับร้อยละ 99, 98, 98 และ 91 ตามลำดับ

Thesis title γ-HCH Biodegradation by Bacterial Consortium, Mixed Cultures and Single Bacterial Isolate from Soil

Author Mr.Saksin Jeenoon

Major Program Biotechnology

Academic year 2008

ABSTRACT

Soil samples from 5 of 12 agricultural fields in Songkhla Province were found to contain γ-hexachlorocyclohexane (γ-HCH) residual in the range of 0.03 - 0.45 ng/g soil dry weight. From these 12 soil samples, 35 bacterial strains were isolated on mineral salt yeast extract medium supplemented with increasing concentrations of γ-HCH from 20 to 200 ppm (mg/l). All 35 soil isolates were shown to degrade γ-HCH between 7.97 to 77.98% within 96 hours from the initial concentration of 200 ppm. The 12 bacterial consortia also showed the ability to degrade between 42.2 to 97.6% γ-HCH in 96 hours with bacterial consortium-9 achieving the highest γ-HCH degradation of 97.6% in 96 hours.

Bacterial consortium-9, which consisted of isolates GH9-1, GH9-2, GH9-3 and GH9-4, were chosen for the study of γ-HCH degradation by mixed culture. Each isolate was able to degrade 73.3, 53.3, 51.6 and 33.6% of γ-HCH in 96 hours, respectively. Mixed culture [1:1 ratio (v:v)] between GH9-1 and GH9-3 [Mix(1+3)] achieved the highest γ-HCH degradation at 85.6% in 96 hours. While Mixed culture between GH9-1 and GH9-2 [Mix(1+2)], GH9-1 and GH9-4 [Mix(1+4)], GH9-2 and GH9-3 [Mix(2+3)], GH9-2 and GH9-4 [Mix(2+4)], GH9-3 and GH9-4 [Mix(3+4)] were observed to degrade 70, 63, 57.8, 44 and 41.2% of γ-HCH in 96 hours. The exclusion of isolates GH9-1, GH9-2, GH9-3 or GH9-4 from the cultivation medium resulted in the γ-HCH degradation of 47.2, 73.8, 44.5 and 73.4% in 96 hours, respectively. Finally, mixed culture of all four isolates was shown to degrade only 71.1% of γ-HCH in 96 hours.

Based on their 16S rDNA sequences analyses, bacterial isolates GH9-1, GH9-2, GH9-3 and GH9-4 were shown to have similarities or were closely related to *Pseudomonas*

putida (99% identity), *Burkholderia* sp. (98% identity), *Flexibacter* sp. (98% identity) and *Burkholderia vietnamiensis* (91% identity).

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ ดร.วรสันติ์ โสภณ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ที่กรุณาให้ความรู้ คำแนะนำและกำลังใจ ในการทำวิจัย ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ศุภศิลป์ มณีรัตน์ กรรมการที่ปรึกษาร่วมที่ให้คำแนะนำและช่วยเหลือในการทำงานวิจัยให้สำเร็จลุล่วง ขอขอบคุณอาจารย์ทุกท่านในภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพอุตสาหกรรม สำหรับความรู้และคำแนะนำในการเรียนและการทำวิทยานิพนธ์ ขอขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร.ดวงพร คันธโชติ ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.นุกูล อินทระสังขา กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ สำหรับการตรวจทานและข้อเสนอแนะเพิ่มเติมเพื่อให้วิทยานิพนธ์นี้มีความสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น

ขอขอบคุณคณะอุตสาหกรรมเกษตรและบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ที่ให้ทุนอุดหนุนในการทำวิจัยครั้งนี้

ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ และน้องสำหรับกำลังใจและให้โอกาสในการศึกษามาโดยตลอด ขอบคุณพี่ๆ เจ้าหน้าที่ในคณะอุตสาหกรรมเกษตรที่ช่วยอำนวยความสะดวกในงานเอกสาร รวมถึงอุปกรณ์ เครื่องมือ และสารเคมีที่ใช้ในการทำวิจัย และเพื่อนๆ พี่ๆ น้องๆ ตลอดจนทุกๆ ท่านที่มิได้กล่าวมา ณ ที่นี้ด้วย ที่มีส่วนช่วยให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จสมบูรณ์ด้วยดี

ศักดิ์สินทร์ จีนนุ่น

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ.....	(3)
Abstract……..	(5)
กิตติกรรมประกาศ……...	(7)
สารบัญ.....	(8)
รายการตาราง.....	(9)
รายการภาพ.....	(11)
บทที่	
1. บทนำ	
บทนำต้นเรื่อง…….	1
บทตรวจเอกสาร.....	3
วัตถุประสงค์.....	27
2. วัสดุ อุปกรณ์และวิธีการทดลอง	
วัสดุ อุปกรณ์.....	28
วิธีการวิเคราะห์.....	29
วิธีการทดลอง.....	31
3. ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง.....	36
4. สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ.....	74
เอกสารอ้างอิง.....	77
ภาคผนวก.....	83
ประวัติผู้เขียน.....	109

รายการตาราง

ตาราง		หน้า
1.	คุณสมบัติทางกายภาพของสารแกมมา-เอชซีเอช.....	4
2.	ปริมาณสารปราบศัตรูพืชตกค้างในดินจากแหล่งเกษตรกรรมทั่วประเทศ และในน้ำจากแหล่งน้ำทั่วไป ระหว่างปี พ.ศ. 2530-2531.....	6
3.	ปริมาณสารกำจัดศัตรูพืชแกมมา-เอชซีเอชในไขมันมนุษย์จากประเทศต่างๆ.....	8
4.	ความคงทนในดินของสารกำจัดศัตรูพืชกลุ่มออร์แกโนคลอรีน.....	10
5.	ค่าระดับความเป็นพิษ (LD_{50}) ของสารกำจัดศัตรูพืช……	11
6.	Primers ที่ใช้ในการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR และวิเคราะห์ลำดับเบสของ 16S rDNA.....	35
7.	ลักษณะดิน ปริมาณสารแกมมา-เอชซีเอช และสารพารา, พารา′-ดีดีทีในตัวอย่างดิน….	37
8.	สัณฐานวิทยาของแบคทีเรียที่คัดแยกได้จาก 12 กลุ่มเชื้อ เมื่อเลี้ยงบนอาหาร MSYM ที่เสริมสารแกมมา-เอชซีเอช 200 ส่วนในล้านส่วน ($MSYM+HCH_{200}$)……	40
9.	ร้อยละการย่อยสลายสารแกมมา-เอชซีเอชโดยเชื้อแบคทีเรียเดี่ยวเมื่อเลี้ยงในอาหาร $MSYM+HCH_{200}$ ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่า 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 96 ชั่วโมง…….....	46
10.	ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและคุณสมบัติทางชีวเคมีของเชื้อแบคทีเรียที่คัดแยกได้...	67
11.	การจำแนกสกุลของเชื้อแบคทีเรียที่คัดแยกได้ตามลักษณะทางสัณฐานวิทยาและคุณสมบัติทางชีวเคมี…….....	71
12.	เชื้อแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายสารแกมมา-เอชซีเอชจากการศึกษาต่างๆ……..	73
13.	ปริมาณสารแกมมา-เอชซีเอช (ส่วนในล้านส่วน) จากการย่อยสลายโดยกลุ่มเชื้อแบคทีเรียที่คัดแยกจากดิน เมื่อเลี้ยงในอาหาร $MSYM+HCH_{200}$ ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่า 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 96 ชั่วโมง.....	95
14.	การเปลี่ยนแปลงปริมาณเชื้อกลุ่มที่ 9 (Log CFU/mL) และปริมาณสารแกมมา-เอชซีเอช (ส่วนในล้านส่วน) เมื่อเลี้ยงในอาหาร $MSYM+HCH_{200}$ ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่า 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 96 ชั่วโมง.....	96

รายการตาราง (ต่อ)

ตาราง **หน้า**

15. การเปลี่ยนแปลงปริมาณเชื้อเดี่ยว (Log CFU/mL) ในกลุ่มเชื้อที่ 9 เมื่อเลี้ยงกลุ่มเชื้อในอาหาร MSYM+HCH_{200} ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่า 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 96 ชั่วโมง..... 96
16. ปริมาณสารแกมมา-เอชซีเอช (ส่วนในล้านส่วน) จากการย่อยสลายโดยเชื้อเดี่ยวจากกลุ่มเชื้อที่ 9 และกลุ่มเชื้อที่ 9 เมื่อเลี้ยงในอาหาร MSYM+HCH_{200} ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่า 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 96 ชั่วโมง..... 97
17. การเปลี่ยนแปลงปริมาณเชื้อเดี่ยว (Log CFU/mL) จากกลุ่มเชื้อที่ 9 เมื่อเลี้ยงในอาหาร MSYM+HCH_{200} ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่า 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 96 ชั่วโมง…….. 98
18. ปริมาณสารแกมมา-เอชซีเอช (ส่วนในล้านส่วน) ของแบคทีเรียผสม 2 สายพันธุ์และกลุ่มเชื้อที่ 9 เมื่อเลี้ยงในอาหาร MSYM+HCH_{200} ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่า 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 96 ชั่วโมง…… 99
19. การเปลี่ยนแปลงปริมาณแบคทีเรีย (Log CFU/mL) ผสม 2 สายพันธุ์และกลุ่มเชื้อที่ 9 เมื่อเลี้ยงในอาหาร MSYM+HCH_{200} ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่า 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 96 ชั่วโมง…….. 100
20. ปริมาณสารแกมมา-เอชซีเอช (ส่วนในล้านส่วน) ของแบคทีเรียผสม 3 และ 4 สายพันธุ์ และกลุ่มเชื้อแบคทีเรียที่ 9 เมื่อเลี้ยงในอาหาร MSYM+HCH_{200} ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่า 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 96 ชั่วโมง…… 101
21. การเปลี่ยนแปลงปริมาณแบคทีเรีย (Log CFU/mL) ผสม 3 และ 4 สายพันธุ์ และกลุ่มเชื้อแบคทีเรียที่ 9 เมื่อเลี้ยงในอาหาร MSYM+HCH_{200} ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่า 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 96 ชั่วโมง…… 102
22. ปริมาณสารแกมมา-เอชซีเอช (ส่วนในล้านส่วน) จากการย่อยสลายโดยแบคทีเรียเดี่ยวจาก 12 กลุ่มเชื้อ เมื่อเลี้ยงในอาหาร MSYM+HCH_{200} ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่า 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 96 ชั่วโมง…… 103

รายการภาพ

ภาพ		หน้า
1.	โครงสร้างสารแกมมา-เอชซีเอช.....	3
2.	การย่อยสลายสารคลอริเนตไฮโดรคาร์บอนโดยปฏิกิริยา Hydrolytic displacement……..	15
3.	การย่อยสลายสารแกมมา-เอชซีเอชโดยปฏิกริยา Dehydrochlorination……..	16
4.	วิถีการย่อยสลายสารเอชซีเอชโดยจุลินทรีย์ ในสภาวะที่มีอากาศ.....	17
5.	การย่อยสลายสารแกมมา-เอชซีเอชโดยเชื้อ *P. paucimobilis* UT26 ในสภาวะที่มีอากาศ.....	18
6.	วิถีการย่อยสลายสารแอลฟา- บีตา- แกมมา- และเดลตา-เอชซีเอชโดยกลุ่มจุลินทรีย์ภายใต้สภาวะไร้อากาศ……...	19
7.	วิถีการย่อยสลายสารแกมมา-เอชซีเอชโดยแบคทีเรียในสภาวะที่มีอากาศและไม่มีอากาศ……...	20
8.	ปริมาณการย่อยสลายสารแกมมา-เอชซีเอชโดยเชื้อแบคทีเรียเดี่ยวเมื่อเลี้ยงในอาหาร MSYM+HCH_{200} ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่า 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 96 ชั่วโมง.....	43
9.	ปริมาณการย่อยสลายสารแกมมา-เอชซีเอชโดยกลุ่มเชื้อแบคทีเรียเมื่อเลี้ยงในอาหาร MSYM+HCH_{200} ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่า 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 96 ชั่วโมง.....	48
10.	ร้อยละการย่อยสลายสารแกมมา-เอชซีเอชโดยกลุ่มเชื้อแบคทีเรียเมื่อเลี้ยงในอาหาร MSYM+HCH_{200} ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่า 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 96 ชั่วโมง.....	49
11.	ปริมาณสารแกมมา-เอชซีเอชและการเจริญของกลุ่มแบคทีเรียที่ 9 เมื่อเลี้ยงในอาหาร MSYM+HCH_{200} ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่า 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 96 ชั่วโมง.....	50
12.	ปริมาณการย่อยสลายสารแกมมา-เอชซีเอช (A) และการเจริญ (B) ของเชื้อแบคทีเรียเดี่ยวและกลุ่มเชื้อที่ 9 เมื่อเลี้ยงในอาหาร MSYM+HCH_{200} ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่า 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 96 ชั่วโมง.....	53

รายการภาพ (ต่อ)

ภาพ **หน้า**

13. ร้อยละการย่อยสลายสารแกมมา-เอชซีเอชโดยแบคทีเรียเดี่ยวสายพันธุ์ GH9-1 ถึง GH9-4 และกลุ่มเชื้อที่ 9 เมื่อเลี้ยงในอาหาร MSYM+HCH_{200} ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่า 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 96 ชั่วโมง…….. 54
14. ปริมาณการย่อยสลายสารแกมมา-เอชซีเอช (A) และการเจริญ (B) ของเชื้อแบคทีเรียผสม 2 สายพันธุ์และกลุ่มเชื้อที่ 9 เมื่อเลี้ยงในอาหาร MSYM+HCH_{200} ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่า 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 96 ชั่วโมง..... 57
15. ร้อยละการย่อยสลายสารแกมมา-เอชซีเอชโดยแบคทีเรียผสม 2 สายพันธุ์และกลุ่มเชื้อที่ 9 เมื่อเลี้ยงในอาหาร MSYM+HCH_{200} ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่า 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 96 ชั่วโมง……. 58
16. ปริมาณการย่อยสลายสารแกมมา-เอชซีเอช (A) และการเจริญ (B) ของเชื้อแบคทีเรียผสม 3 และ 4 สายพันธุ์ และกลุ่มเชื้อที่ 9 เมื่อเลี้ยงในอาหาร MSYM+HCH_{200} ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่า 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 96 ชั่วโมง..... 59
17. ร้อยละการย่อยสลายสารแกมมา-เอชซีเอชโดยแบคทีเรียผสม 3 และ 4 สายพันธุ์และกลุ่มเชื้อที่ 9 เมื่อเลี้ยงในอาหาร MSYM+HCH_{200} ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่า 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 96 ชั่วโมง……..... 60
18. การเจริญของเชื้อเดี่ยวสายพันธุ์ GH9-1 (A) GH9-2 (B) GH9-3 (C) และ GH9-4 (D) เมื่อเลี้ยงกลุ่มเชื้อในอาหาร MSYM+HCH_{200} ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่า 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 96 ชั่วโมง..... 62
19. เจลอิเล็คโตรโฟริซิสของ PCR ดีเอ็นเอของเชื้อแบคทีเรียจากกลุ่มเชื้อที่ 9 โดยใช้ไพรเมอร์ 27F และ 1492R……... 71
20. แผนภูมิสายวิวัฒนาการชาติพันธุ์ (ไฟโลเจเนติกทรี) ของเชื้อแบคทีเรีย GH9-1 ถึง GH9-4 ที่คัดแยกจากกลุ่มเชื้อแบคทีเรียที่ 9……... 72

รายการภาพ (ต่อ)

ภาพ **หน้า**

21. กราฟมาตรฐานของสารแกมมา-เอชซีเอชที่ได้จากเครื่อง GC-μECD …….. 105

22. โครมาโตแกรมและผลที่แสดงจากการฉีดตัวอย่างในเครื่อง GC-μECD..... 106

23. เครื่อง GC-μECD Hewlett-Packard รุ่น 6890……. ….. 106

24. ลำดับเบส 16S rDNA ของเชื้อ GH9-1..... 107

25. ลำดับเบส 16S rDNA ของเชื้อ GH9-2..... 107

26. ลำดับเบส 16S rDNA ของเชื้อ GH9-3..... 108

27. ลำดับเบส 16S rDNA ของเชื้อ GH9-4..... 108

บทที่ 1

บทนำ

บทนำต้นเรื่อง

ปัจจุบันสารเคมีที่ใช้ในการเกษตร อุตสาหกรรม และสาธารณสุข ก่อให้เกิดปัญหาต่อสิ่งแวดล้อมและสุขภาพอนามัยของมนุษย์ ทั้งโดยทางตรงและทางอ้อม ในขณะที่การเร่งรัดพัฒนาเศรษฐกิจและสังคมของประเทศกำลังดำเนินอยู่นั้น ภาวะมลพิษในสิ่งแวดล้อมอันมีสาเหตุมาจากการเร่งรัดพัฒนานี้ได้เริ่มก่อตัวขึ้น มีการตกค้างและสะสมของสารเคมีทางการเกษตร และอุตสาหกรรม สารเหล่านี้อาจตกค้างในสิ่งแวดล้อมต่างๆ เช่น ดิน น้ำ อากาศ หรือในอาหารที่มนุษย์บริโภค ฯลฯ เป็นเหตุให้คุณภาพของสิ่งแวดล้อมเสื่อมโทรมลง ในขณะเดียวกันบุคคลที่เกี่ยวข้องกับการทำงานดังกล่าวอาจจะได้รับพิษของสารเคมีที่ใช้ในการดำเนินกิจกรรมเหล่านั้นเข้าสู่ร่างกายโดยตรงอาจเป็นทางปาก ทางลมหายใจ ทางผิวหนังทางใดทางหนึ่ง พิษของสารเคมีเข้าไปทำลายสุขภาพของผู้ประกอบการ ทั้งในลักษณะที่รุนแรงเฉียบพลันผลปรากฏทันทีหรือลักษณะแบบเรื้อรัง คือ ค่อยเป็นค่อยไปและปรากฏอาการเมื่อมีการสะสมพิษในระดับหนึ่ง พิษทางอ้อมนั้นคือ พิษที่สะสมอยู่ในสภาพแวดล้อม และสิ่งมีชีวิตทั้งหลายที่มนุษย์ต้องกิน ใช้หรือสัมผัส และร่างกายของมนุษย์จะถูกทำลายได้เช่นกัน

สารแกมมา-เฮกซะคลอโรไซโคลเฮกเซน (สารแกมมา-เอชซีเอช; ชื่อทางเคมีคือ 1,2,3,4,5,6-Hexachlorocyclohexane) เป็นสารกำจัดศัตรูพืชในกลุ่มออร์แกโนคลอรีนชนิดหนึ่งที่มีการนำเข้ามาใช้ในการป้องกันกำจัดศัตรูพืช สารกลุ่มนี้สลายตัวโดยกระบวนการธรรมชาติได้ช้า มีฤทธิ์ตกค้างในสิ่งแวดล้อมนาน มีศักยภาพในการก่อพิษเรื้อรัง ทั้งก่อให้เกิดผลต่อระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย เป็นสารก่อมะเร็ง รวมถึงยังมีผลต่อระบบประสาททั้งในมนุษย์และสัตว์ (Vallack *et al.*, 1998) และยังสามารถถ่ายทอดไปตามห่วงโซ่อาหารได้จึงเกิดการสะสมในสิ่งมีชีวิตแม้มีปริมาณที่ตกค้างเพียงเล็กน้อย (Bioaccumulation leading to Biomagnification) ทำให้มีการกระจายของสารกลุ่มนี้ออกไปได้กว้างมาก ในประเทศไทยมีการนำเข้าและใช้สารกำจัดศัตรูพืชชนิดแกมมา-เอชซีเอชเป็นระยะเวลานานก่อนที่จะมีการเลิกใช้ทางการเกษตรเมื่อปี พ.ศ.2523 ซึ่งถึงแม้จะมีการเลิกใช้แล้วก็ยังมีการตรวจพบในหลายพื้นที่ของประเทศ โดยบ่อยครั้งตรวจพบสารแกมมา-เอชซีเอช และสารดีดีที มีค่าสูงกว่ากลุ่มอื่นในสัตว์น้ำจากบริเวณทะเลสาบสงขลาตอนนอก จังหวัดสงขลาโดยมีค่าเฉลี่ย 21.7 และ 15.1 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ (บุญสิน จิตตะประพันธ์, 2541)

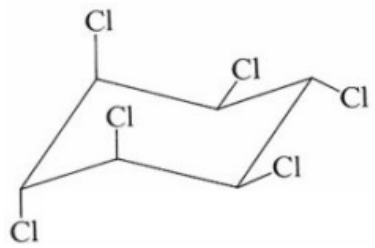
นอกจากนี้ยังพบว่ามีการตกค้างของสารแกมมา-เอชซีเอชและสารดีดีที ในหอยจากบริเวณฝั่งตะวันออกของอ่าวไทยตอนบน เขตจังหวัดฉะเชิงเทรา (กอบทอง ธูปหอม และคณะ, 2527 อ้างโดย บุญสิน จิตตะประพันธ์, 2541)

จากปัญหาดังกล่าวพบว่ามีการปนเปื้อนของสารแกมมา-เอชซีเอชในหลายพื้นที่ของประเทศ แต่ยังมีรายงานเกี่ยวกับวิธีการกำจัดสารในกลุ่มนี้ไม่มากนัก ซึ่งการศึกษาการใช้กระบวนการทางชีวภาพเพื่อกำจัดสารในกลุ่มนี้ โดยการคัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการย่อยสลายสารแกมมา-เอชซีเอชพบเชื้อต่างๆ เช่น *Burkholderia* sp. และ *Flavobacterium* sp. (Murthy and Manonmani, 2007) *Sphingobacterium* sp. และ *Ochrobacterium anthropi* (Pesce and Wunderlin, 2004) และเชื้อ *Pseudomonas* sp. (Sahu *et al.*, 1990 ; Kumar *et al.*, 2006) รวมถึงแอคติโนมัยซีสและเชื้อราบางชนิด เป็นต้น ซึ่งจากงานวิจัยหลายฉบับพบว่าการย่อยสลายสารพิษโดยใช้จุลินทรีย์สายพันธุ์เดียวจะให้อัตราการย่อยสลายต่ำ เนื่องจากในบางกระบวนการเมื่อจุลินทรีย์เข้าย่อยสลายสารพิษซึ่งเป็นสารตั้งต้นทำให้เกิดสารตัวกลางในการย่อยสลายสาร หรือเมแทบอไลท์ (metabolite) บางชนิดขึ้นซึ่งอาจจะมีผลยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ ส่งผลให้มีอัตราการย่อยสลายลดลงหรือหยุดการย่อยสลายไปเลย ดังนั้นงานวิจัยครั้งนี้จึงสนใจศึกษาการย่อยสลายสารแกมมา-เอชซีเอชโดยกลุ่มแบคทีเรียจากดิน เนื่องจากจะเป็นการทำงานร่วมกันของเชื้อหลายสายพันธุ์ ดังนั้นเมื่อเกิดเมแทบอไลท์บางชนิดขึ้นซึ่งอาจจะมีผลยับยั้งแบคทีเรียประเภทแรก แบคทีเรียประเภทที่สองอาจจะเข้ามาทำงานในการย่อยสลายสารเมแทบอไลท์นั้นแทน ส่งผลให้การย่อยสลายดำเนินต่อไปได้ ในขณะที่ถ้าใช้สายพันธุ์เดียวปฏิกิริยาอาจจะไม่เกิดนอกจากนี้การใช้เชื้อหลายสายพันธุ์ทำให้การย่อยสลายเกิดได้เร็วขึ้น แสดงว่าการทำงานของเชื้อในกลุ่มบางสายพันธุ์อาจจะมีความจำเป็นในช่วงแรกของการย่อยสลายหรือช่วงหลังของการย่อยสลายหรือจำเป็นต่อการย่อยสลายโดยรวม ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมุ่งเน้นที่จะศึกษาประสิทธิภาพในการย่อยสารแกมมา-เอชซีเอชโดยใช้แบคทีเรียผสมและแบคทีเรียเดี่ยว เพื่อใช้เป็นข้อมูลเบื้องต้นในการพัฒนาการย่อยสารแกมมา-เอชซีเอชในสิ่งแวดล้อมต่อไป

ตรวจเอกสาร

1. คุณสมบัติและลักษณะของสารกำจัดศัตรูพืชชนิดแกมมา-เอชซีเอช

เอชซีเอช (HCH) หรือ เฮกซะคลอโรไซโคลเฮกเซน (Hexachlorocyclohexane) มีสูตรเคมีคือ $C_6H_6Cl_6$ ชื่อทางเคมีคือ 1,2,3,4,5,6-Hexachlorocyclohexane (ภาพที่ 1) เป็นสารกลุ่มคลอริเนตไฮโดรคาร์บอน (Chlorinated hydrocarbon) ถูกค้นพบครั้งแรกโดย Faraday ในปี ค.ศ. 1825 การสังเคราะห์เอชซีเอชทำได้โดยเติมคลอรีนในเบนซีนและทำให้เกิดปฏิกิริยาโดยการกระตุ้นด้วยแสงอุลตราไวโอเลตให้สารประกอบที่เป็นของแข็ง (Brooks, 1974a) มีสูตรโครงสร้างทั้งหมด 8 ไอโซเมอร์ ($\alpha, \beta, \gamma, \delta, \varepsilon, \eta, \theta, \iota$) มี 4 ไอโซเมอร์ ($\alpha, \beta, \gamma, \delta$) ที่มีคุณสมบัติเหมาะสมในการใช้เป็นสารกำจัดศัตรูพืช โดยเฉพาะแกมมา-เอชซีเอชที่แสดงประสิทธิภาพดีที่สุดในการควบคุมศัตรูพืช เนื่องจากให้ผลการควบคุมที่เร็วและสามารถควบคุมศัตรูพืชได้หลายชนิด (บุญเสริม เซ่งล่าย, 2540)



ภาพที่ 1 โครงสร้างสารแกมมา-เอชซีเอช

Figure 1. Chemical structure of gamma-HCH.

ที่มา : Brooks (1974a)

สารแกมมา-เอชซีเอชมี มีลักษณะเป็นผลึกแบบปริซึมสีขาวละเอียด มีน้ำหนักโมเลกุล 290.80 มีจุดหลอมเหลวที่ 112 - 113 องศาเซลเซียส มีจุดเดือดที่ 288 องศาเซลเซียส ความร้อนที่เกิดการสันดาปเท่ากับ 662.32 กิโลแคลอรี่/โมล ค่าความดันไอที่อุณหภูมิ 20 และ 40 องศาเซลเซียส เท่ากับ 9.4×10^{-6} และ 45.6×10^{-5} มิลลิเมตรปรอท ค่าดัชนีหักเหแสง (n_D^{25}) เท่ากับ 1.644 ± 0.002 และค่าการละลายน้ำเท่ากับ 7.90 ส่วนในล้านส่วน ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส (ตารางที่ 1) สารแกมมา-เอชซีเอชสามารถละลายได้ดีในตัวทำละลายที่ไม่มีขั้ว มีความสามารถในการละลาย (ต่อตัวทำละลาย 100 มิลลิลิตร) 43.5 กรัม ในอะซิโตน 31.4 กรัมในไดออกเซน 28.9 กรัม ในเบนซีน 24.7 กรัมในไซลีน ละลายได้ปานกลางในสารละลายเอทานอล (ร้อยละ 6.7) สารแกมมา-เอชซีเอชมีคุณสมบัติละลายได้ดีในไขมัน ทำให้สามารถสะสมได้ดีในเนื้อเยื่อไขมัน

ตารางที่ 1 คุณสมบัติทางกายภาพของสารแกมมา-เอชซีเอช

Table 1. Physical Properties of gamma-HCH.

Physical Property	
Appearance	colorless crystal
Molecular Weight	290.85
Water Solubility 25°C (ppm)	7.90
Melting Point (°C)	112-113
Adsorption Coefficient	1100
Vapor pressure (mm. Hg at 20°C)	9.4×10^{-6}
Heat of combustion (Kcal/mol)	662.32
Refractive index (n_D^{25})	1.644 ± 0.002

ที่มา : ดัดแปลงจาก Brooks (1974a)

สารแกมมา-เอชซีเอชยากต่อการย่อยสลายโดยแสงอุลตราไวโอเลต มีความคงทนต่อความร้อน การถูกออกซิไดซ์ และทนต่อสภาวะที่เป็นกรด ไม่รวมตัวกับด่างแก่และโลหะ (Iron, Zinc, Aluminium) และไม่ทำปฏิกิริยากับสารออกซิไดซ์ ซึ่งจากการที่อะตอมคาร์บอนแต่ละอะตอมในโมเลกุลของสารแกมมา-เอชซีเอชมีหมู่คลอรีนเกาะ 1 หมู่ ส่งผลให้สารแกมมา-เอชซีเอชมีความคงทนต่อการย่อยสลายในสิ่งแวดล้อม เนื่องจากหมู่คลอรีนจะยับยั้งการเข้าย่อยสลายโดยเอนไซม์จากจุลินทรีย์ นอกจากนี้สารแกมมา-เอชซีเอชมีค่าการละลายน้ำต่ำ (7.90 ส่วนในล้านส่วน) และมีค่า Adsorption Coefficient สูง (เท่ากับ 1100) ส่งผลให้ค่า Bioavailability ของสารลดลงเนื่องจากสารสามารถละลายน้ำได้น้อยอีกทั้งยังสามารถดูดซับกับอนุภาคดินได้ดี ทำให้จุลินทรีย์ไม่สามารถเข้าถึงสารได้หรือเข้าถึงสารเพื่อย่อยสลายได้ยาก ส่งให้ผลสารแกมมา-เอชซีเอชมีความคงทนต่อการถูกย่อยสลายในสิ่งแวดล้อม คงอยู่ในระบบนิเวศและสิ่งแวดล้อมได้นาน และมีศักยภาพในการสะสมในสิ่งมีชีวิต

ความสามารถในการย่อยสลายของสารจะได้รับผลกระทบมากถ้าสารเคมีนั้นถูกจำกัดไว้ด้วยปัจจัยทางกายภาพคือถูกกักไว้ทำให้ไม่สัมผัสกับจุลินทรีย์ และนอกจากนี้ถ้าสารนั้นดูดซับไว้ในช่องว่างระหว่างอนุภาค ผลกระทบก็จะยิ่งมากขึ้น ซับสเตรทจึงต้องการการชะ (Desorption) และแพร่ผ่านไปยังช่องทางระหว่างอนุภาคดินซึ่งอาจจะถูกดูดซับไว้อีกครั้ง ผลการดูดซับระหว่างอนุภาคดินนี้เป็นปัจจัยหลักในการจำกัดกระบวนการเมแทบอลิซึมของสารที่แม้จะสามารถย่อยสลายได้ด้วยกระบวนการที่กล่าวมา

ปัจจุบันการใช้ในรูปของแกมมา-เอชซีเอชหรือลินเดน (Lindane) มีด้วยกัน 4 ผลิตภัณฑ์ ดังนี้ (กรมวิชาการเกษตร, 2537 อ้างโดย บุญเสริม เซ่งล่าย, 2540)

- Lindane 7.5% W/P ชื่อทางการค้า Dolacide ใช้ในการป้องกันกำจัดมด
- Lindane 10% W/V EC ใช้ในการป้องกันกำจัดเห็บ ไร และ หมัด ที่เป็นศัตรูของสัตว์เลี้ยง เช่น โค กระบือ
- Lindane 10% W/V EC ผลิตภัณฑ์ของ Agricultural Chemicals ใช้ในการป้องกัน กำจัด มด ปลวก และทำลายเนื้อไม้
- Lindane 20% W/P EC ใช้ในการป้องกันกำจัดปลวกที่ทำลายลังบรรจุยางพารา

2. ปริมาณของสารกำจัดศัตรูพืชแกมมา-เอชซีเอชที่ตกค้างในสิ่งแวดล้อม

ปัญหาการปนเปื้อนของสารกำจัดศัตรูพืชกลุ่มออร์แกโนคลอรีน (OCPs) เกิดขึ้นทั่วโลก นับตั้งแต่มีการใช้สารกลุ่มนี้ทางการเกษตรเพื่อใช้ป้องกันและกำจัดศัตรูพืช ซึ่งพบว่าสารกลุ่มนี้ก่อให้เกิดปัญหาทางด้านสิ่งแวดล้อม เนื่องจากมีคุณสมบัติคงอยู่ในระบบนิเวศและสิ่งแวดล้อมได้นาน และมีศักยภาพในการสะสมในสิ่งมีชีวิต (บุญเสริม เซ่งล่าย, 2540) สารกลุ่มนี้มักพบในประเทศที่มีภูมิอากาศแบบร้อนชื้น เนื่องจากมีปัญหาการรบกวนของแมลงต่อผลิตผลทางการเกษตร (Sethunathan *et al*., 1982)

การตกค้างสะสมของสารกำจัดศัตรูพืชกลุ่มออร์แกโนคลอรีนในแหล่งน้ำก่อให้เกิดผลทางลบต่อสิ่งแวดล้อม Edward (1997) กล่าวว่าสารกำจัดศัตรูพืชกลุ่มออร์แกโนคลอรีนเป็นกลุ่มที่มีความคงทนมากที่สุดในระบบนิเวศน้ำ โดยสารที่ตกค้างจะเคลื่อนย้ายไปยังองค์ประกอบอื่นๆ ในระบบนิเวศน์ต่อไป เช่น สารดีดีทีซึ่งเป็นสารที่มีสมบัติคล้ายกับสารแกมมา-เอชซีเอช พบว่าดีดีทีสามารถละลายน้ำได้น้อย คือ 0.02 ส่วนในล้านส่วน แต่ละลายได้ดีในตัวทำละลายอินทรีย์ ดังนั้นดีดีทีจึงสะสมในไขมันของสิ่งมีชีวิต เช่น แพลงก์ตอนและจุลินทรีย์ต่างๆ หลังจากนั้นปลาที่กินอาหารที่มีสารดีดีทีที่ตกค้างสะสมเข้าไปมากๆ ชั่วชีวิตของปลานั้นจะมีสารตกค้างดีดีทีสะสมเป็นทวีคูณ (Biological magnification) จากรายงานพบว่าในน้ำแห่งหนึ่งอาจมีปริมาณดีดีที 0.01 ส่วนในล้านส่วน แต่ในปลาที่กินแพลงก์ตอนเป็นอาหารพบว่ามีดีดีที 2 - 3 ส่วนในล้านส่วน และในนกกินปลาเป็นอาหารตรวจพบมีดีดีทีถึง 100 ส่วนในล้านส่วน ดังตัวอย่างของรายงานการสำรวจระหว่างปี ค.ศ. 1966 - 1973 พบสารดีดีทีสะสมในไขมันปลาวาฬสีขาว (White whale) จากมหาสมุทรอาร์คติกบริเวณประเทศแคนาดาเฉลี่ย 2.25 ส่วนในล้านส่วน และในไขมันแมวน้ำ (Weddell seal) ที่มีอยู่ในมหาสมุทรแอตแลนติก 0.06 ส่วนในล้านส่วน (สำนักคณะกรรมการสิ่งแวดล้อมแห่งชาติ, 2530)

การศึกษาเปรียบเทียบการตกค้างของสารกำจัดศัตรูพืชกลุ่มออร์แกโนคลอรีนในประเทศแถบเอเชีย เช่น ประเทศเวียดนาม ไต้หวัน และไทย พบว่ามีค่าการตกค้างของสารดีดีทีเฉลี่ย110, 20 และ 8.3 นาโนกรัมต่อกรัม ตามลำดับ เช่นเดียวกับการตกค้างของสารกลุ่มเอชซีเอช ที่พบว่ามีค่าเฉลี่ย 4.8, 1.4 และ 0.4 นาโนกรัมต่อกรัม ตามลำดับ (Thao *et al*., 1992) จากการสำรวจตะกอนดินบริเวณชายฝั่งทะเลทางตอนเหนือของประเทศเวียดนาม พบปัญหาการตกค้างจากสารเอชซีเอช และดีดีที ในปริมาณ 1.2 - 33.7 นาโนกรัมต่อกรัม และ 6.2 - 10.4 นาโนกรัมต่อกรัม ตามลำดับ ในขณะที่ประเทศเกาหลี พบการปนเปื้อนของสารแกมมา- และเดลต้า-เอชซีเอช (γ-, δ-HCH) เฮปตาคลออีพอกไซด์ (Heptachlor epoxide) และดีลดริน (Dieldrin) ในดินบริเวณพื้นที่ปลูกข้าว มีปริมาณในช่วง 0.17 - 0.94, 0.77 - 2.97, 1.38 - 48 และ 0.32 - 0.49 นาโนกรัมต่อกรัม ตามลำดับ (Nhan *et al.*, 1999)

สำหรับในประเทศไทยได้มีการสำรวจปริมาณสารกำจัดศัตรูพืชออร์แกโนคลอรีนที่ปนเปื้อนในหลายพื้นที่ทั่วประเทศ เช่น ในดินจากแหล่งเกษตรกรรมทั่วประเทศ และในน้ำจากแหล่งน้ำทั่วไป ระหว่างปี พ.ศ. 2530 - 2531 พบว่าร้อยละของสารแกมมา-เอชซีเอชที่พบในตัวอย่างดินและน้ำเท่ากับ 22.08 และ 0.67 ตามลำดับ โดยมีปริมาณเฉลี่ยในดินและน้ำเท่ากับ 0.006 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และ 0.04 ไมโครกรัมต่อลิตร ตามลำดับ (ตารางที่ 2) (นวลศรี ทยาพัชร, 2533 อ้างโดย ศุภมาศ พนิชศักดิ์พัฒนา, 2545)

ตารางที่ 2 ปริมาณสารกำจัดศัตรูพืชกลุ่มออร์แกโนคลอรีนตกค้างในดินและน้ำจากแหล่งเกษตรกรรมทั่วประเทศไทยระหว่างปี พ.ศ. 2530 - 2531

Table 2. Organochlorine pesticide residues in agricultural soil and water around Thailand in 1987 - 1988.

Pesticide	Amount of sample in soil (%)	Residues in soil (mg/kg)	Amount of sample in water (%)	Residues in water (µg/l)
HCHs	10.39	0.001	2.00	0.01
γ-HCH	22.08	0.006	0.67	0.04
DDT+DDE+DDD	70.13	0.072	21.48	0.01
Aldrin	83.31	0.015	56.38	0.08

ที่มา : นวลศรี ทยาพัชร (2533 อ้างโดย ศุภมาศ พนิชศักดิ์พัฒนา, 2545)

บุญเสริม เซ่งล่าย (2540) ได้สำรวจตัวอย่างน้ำและดินตะกอน บริเวณทะเลสาบสงขลาตอนนอก พบการตกค้างของสารกลุ่มเอชซีเอชและดีดีที (โดยเฉพาะแกมมา-เอชซีเอช และพารา, พารา′-ดีดีที) ในปริมาณมากกว่าสารกำจัดศัตรูพืชกลุ่มออร์แกโนคลอรีนชนิดอื่นๆ โดยมีปริมาณอยู่ในช่วง 2 - 44.5 นาโนกรัมต่อลิตรในตัวอย่างน้ำ และ 0.1 - 282.7 ไมโครกรัมต่อลิตรในตัวอย่างดินตะกอน และจากการตรวจการตกค้างของสารกำจัดศัตรูพืชออร์แกโนคลอรีนในสัตว์น้ำบริเวณดังกล่าว ยังพบสารกำจัดศัตรูพืชกลุ่มออร์แกโนคลอรีนในทุกตัวอย่างสัตว์น้ำที่นำมาวิเคราะห์ สารกลุ่มที่พบบ่อยและมีค่าสูงกว่ากลุ่มอื่น คือ สารกลุ่มเอชซีเอชและสารดีดีที โดยมีค่าเฉลี่ย 21.7 และ 15.1 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัมดิน (น้ำหนักเปียก) ตามลำดับ (บุญสิน จิตตะประพันธ์, 2541) นอกจากนั้น บริเวณฝั่งตะวันออกของอ่าวไทยตอนบน ที่มีการเพาะเลี้ยงหอยแมลงภู่ หอยนางรม และหอยแครง ยังพบการตกค้างของสารแกมมา-เอชซีเอช ดีดีที และเอ็นดริน ในระดับต่ำกว่า 0.1 ส่วนในล้านส่วน (มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม) (กอบทอง ฐูปหอม และคณะ, 2527 อ้างโดย บุญสิน จิตตะประพันธ์, 2541)

การที่ตรวจพบสารกำจัดศัตรูพืชกลุ่มออร์แกโนคลอรีนชนิดต่างๆ ตกค้างในสัตว์น้ำบริเวณทะเลสาบสงขลาตอนนอก จังหวัดสงขลา เนื่องจากบริเวณพื้นที่ลุ่มน้ำดังกล่าวมีการใช้ที่ดินเพื่อการเกษตรเป็นส่วนใหญ่ (ประมาณร้อยละ 60) และมีการใช้สารเคมีเพื่อป้องกันศัตรูพืชกันอย่างแพร่หลาย สารเหล่านี้สามารถเคลื่อนย้ายไปสู่แหล่งน้ำและตกค้างในดินตะกอนได้เนื่องจากสารกำจัดศัตรูพืชกลุ่มออร์แกโนคลอรีนมีคุณสมบัติไม่ละลายน้ำ การปนเปื้อนในน้ำจึงอยู่ในรูปที่เกาะติดกับอนุภาคแขวนลอยโดยเฉพาะดินที่ประกอบด้วยอนุภาคของดินเหนียวและอินทรียวัตถุมาก ฉะนั้นการกระจายของมวลสารตกค้างเหล่านี้จึงเกิดจากการไหลพัดพาเอาอนุภาคแขวนลอยที่มวลสารกลุ่มนี้เกาะอยู่ไปยังที่ต่างๆ โดยอนุภาคของที่แขวนลอยอยู่ในน้ำจะเกาะรวมกันเป็นอนุภาคใหญ่แล้วตกลงสู่ท้องน้ำ

การตกค้างของสารกำจัดศัตรูพืชยังขึ้นอยู่กับปัจจัยสิ่งแวดล้อมอื่นๆ เช่น อุณหภูมิและความเป็นกรด-ด่าง ซึ่งเป็นปัจจัยที่ทำให้สารกำจัดศัตรูพืชกลุ่มนี้มีความคงทนอยู่ในแหล่งน้ำธรรมชาติและใช้เวลาในการสลายตัวแตกต่างกันไป เช่น สารแกมมา-เอชซีเอชและดีดีทีจะสลายตัวได้เร็วในสภาวะที่เป็นด่างมากๆ ซึ่งการปนเปื้อนของสารกำจัดศัตรูพืชในแหล่งน้ำธรรมชาติอาจจะมาจากน้ำไหลบ่าหน้าดินของพื้นที่ทางการเกษตร การใช้สารกำจัดศัตรูพืชในน้ำโดยตรง น้ำทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรม น้ำทิ้งจากครัวเรือน น้ำทิ้งจากปศุสัตว์ ฝุ่นและน้ำฝน เป็นต้น (Edward, 1977)

จากการตกค้างของสารกำจัดศัตรูพืชกลุ่มออร์แกโนคลอรีนในสิ่งแวดล้อมได้นำไปสู่การแพร่กระจายและตกค้างในร่างกายของมนุษย์ Stuetz และคณะ (2001) ได้รายงานการสำรวจสารกลุ่มออร์แกโนคลอรีนในน้ำนมของมารดา 25 คน ทางตอนเหนือของประเทศไทย พบสารในกลุ่มดีดีทีทั้งในระดับปานกลางและระดับสูง คือ 209 และ 2,012 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร นอกจากนั้นยัง

พบสารออร์แกโนคลอรีนในกลุ่มอื่นๆ เช่น เฮปตาคลอและเอชซีเอชในน้ำนมด้วยเช่นเดียวกัน นอกจากนั้นโศรยา พันธุ์วิริยะพงษ์ และพูลสุข หฤทัยธนาสันติ์ (2542) ได้ทำการสำรวจเลือดเกษตรกรจำนวน 104 คน จากจังหวัดสระแก้วและจังหวัดอุทัยธานี พบปริมาณสารกลุ่มออร์แกโนคลอรีนในเลือด 100 ตัวอย่าง (ร้อยละ 96) โดยเป็นสารพารา,พารา′-ดีดีที ถึงร้อยละ 31 ของจำนวนตัวอย่าง

จากการสำรวจปริมาณสารแกมมา-เอชซีเอชตกค้างในร่างกายประชากรทวีปยุโรป (อังกฤษและฝรั่งเศส) และสหรัฐอเมริกา ระหว่างปี พ.ศ. 2504 - 2507 พบว่ามีปริมาณสารแกมมา-เอชซีเอชเท่ากับ 0.57, 0.42 และ 1.19 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ และในร่างกายประชากรทวีปเอเชีย ที่ประเทศอินเดียในปี พ.ศ.2507 และประเทศจีนในปี พ.ศ. 2523 - 2524 พบปริมาณสารแกมมา-เอชซีเอชเท่ากับ 1.43 และ 19.7 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ (ตารางที่ 3) (สุภมาศ พนิชศักดิ์พัฒนา, 2545)

ตารางที่ 3 ปริมาณสารกำจัดศัตรูพืชแกมมา-เอชซีเอชในไขมันมนุษย์จากประเทศต่างๆ

Table 3. γ-HCH residues in human fat in different countries.

Country	Year (BE)	Number of sample	γ- HCH (mg/l)
USA	2504 - 2507	399	0.57
England	2504 - 2507	165	0.42
France	2504	10	1.19
India	2507	35	1.43
China	2523 - 2524	217	19.7

ที่มา : ดัดแปลงจาก American Chemical Society (1960 อ้างโดย สุภมาศ พนิชศักดิ์พัฒนา, 2545)

ประเทศไทยได้ห้ามนำสารกลุ่มเอชซีเอชมาใช้เพื่อกิจกรรมทางการเกษตรตั้งแต่ปี พ.ศ. 2523 เนื่องจากพบว่าสารมีฤทธิ์ตกค้างได้นานและอาจก่อให้เกิดโรคมะเร็งได้ แต่ยังอนุญาตให้ใช้ในรูปของอนุพันธ์แกมมา-เอชซีเอช ซึ่งนำเข้ามาในรูปของลินเดน (Lindane) ที่ประกอบด้วยแกมมา-เอชซีเอชร้อยละ 90 ผสมกับ แอลฟา- เบต้า- และเดลต้า-เอชซีเอช ในปี พ.ศ. 2537 ยังพบว่ามีการนำเข้าสารลินเดนเพื่อใช้ทางการเกษตร เช่น ใช้คลุกเมล็ด รมดิน ฉีดพ่นบนใบ ผลไม้ พืชผัก ซุงและใช้กำจัดแมลง ปศุสัตว์ โดยเฉพาะ Lindane 20% W/P EC ใช้ในการป้องกันกำจัดปลวกและแมลงที่ทำลายลังบรรจุยางพารา (กรมวิชาการเกษตร, 2538 อ้างโดย บุญสิน จิตตะประพันธ์, 2541) จากการใช้สารกลุ่มนี้อย่างกว้างขวาง ไม่จำกัดเฉพาะอาชีพใดอาชีพหนึ่ง โดยสามารถใช้ในบ้านที่อยู่อาศัย ในการเกษตรกรรมและอุตสาหกรรม ฉะนั้นจึงพบการปนเปื้อนได้ทั่วไปในสิ่งแวดล้อม

3. ความคงทนของสารกำจัดศัตรูพืชแกมมา-เอชซีเอชในสิ่งแวดล้อม

ความคงทนของสารกำจัดศัตรูพืช หมายถึง ระยะเวลาที่สารสลายตัวได้อย่างน้อยที่สุดร้อยละ 95 ภายใต้สภาวะแวดล้อมและอัตราการใช้ปกติ โดยการสลายตัวจะเกิดขึ้นอย่างสมบูรณ์ด้วยกระบวนการทางเคมีหรือทางชีววิทยา ความคงทนของสารกำจัดศัตรูพืชสามารถแบ่งได้เป็น 3 ระดับ คือ สารเคมีที่ไม่คงทน จะยังคงอยู่ในสิ่งแวดล้อมได้ในระยะเวลา 1 - 2 สัปดาห์ สารเคมีที่คงทนปานกลาง สามารถอยู่ในสิ่งแวดล้อมได้นาน 1 - 48 เดือน และสารเคมีที่มีความคงทนสามารถอยู่ในสิ่งแวดล้อมได้นานถึง 42 ปี หรือนานกว่านั้น สารกำจัดศัตรูพืชกลุ่มออร์แกโนคลอรีน จัดเป็นสารที่มีความคงทนในสิ่งแวดล้อม (บุญสิน จิตตะประพันธ์, 2541)

Edward (1977) กล่าวว่า ความคงทนของสารกำจัดศัตรูพืชออร์แกโนคลอรีนขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายอย่าง ปัจจัยหนึ่งที่สำคัญคือ ครึ่งชีวิตของสารกำจัดศัตรูพืช (Half-life) เช่นในดินพบว่าดีลดรินมีครึ่งชีวิต 2.5 ปี เอ็นดริน 2.2 ปี และแกมมา-เอชซีเอชมีครึ่งชีวิต 1 ปี เป็นต้น สารที่มีครึ่งชีวิตยาวจะสลายตัวช้ากว่าสารที่มีครึ่งชีวิตสั้น สำหรับความคงทนของสารกลุ่มนี้ ดีดีที มีความคงทนในดินมากที่สุด รองลงมาได้แก่ ดีลดริน เอ็นดริน และแกมมา-เอชซีเอช ตามลำดับ ส่วนการสลายตัว ดีดีทีสลายตัวร้อยละ 95 ในเวลา 4 - 30 ปี ดีลดรินและเอ็นดรินสลายตัวร้อยละ 95 ในเวลา 5 - 25 ปี และแกมมา-เอชซีเอชสลายตัวร้อยละ 95 ในเวลา 3 - 10 ปี (ตารางที่ 4) (ศุภมาศ พนิชศักดิ์พัฒนา, 2545) ความคงทนของสารกำจัดศัตรูพืชกลุ่มออร์แกโนคลอรีนนั้น นอกจากจะขึ้นอยู่กับปัจจัยที่กล่าวมาแล้วยังขึ้นอยู่กับปัจจัยทางสิ่งแวดล้อมและคุณสมบัติทางเคมีของสาร เช่น ความสามารถในการสลาย ความเข้มข้น สูตรเคมี ความสามารถในการระเหย และอุณหภูมิ ซึ่งปัจจัยทั้งหลายนี้มีผลต่อการสลายตัวทางเคมีและการสลายตัวทางชีวภาพในดิน

บุญสิน จิตตะประพันธ์ (2541) ศึกษาความสัมพันธ์ของสารกำจัดศัตรูพืชกลุ่มออร์แกโนคลอรีนในสัตว์น้ำ นกน้ำ และสิ่งแวดล้อม บริเวณลุ่มแม่น้ำทะเลสาบสงขลา พบว่ามีค่าสูงขึ้นตามลำดับ นั้นคือในสัตว์น้ำจะมีปริมาณการตกค้างของสารกำจัดศัตรูพืชกลุ่มออร์แกโนคลอรีนสูงกว่าในน้ำและในดินตะกอน โดยเฉลี่ยตัวอย่างจะมีค่า 0.01 ไมโครกรัมต่อลิตร ดินตะกอนมีค่า 23.0 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักแห้ง และไข่นกน้ำมีค่า 243.23 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักแห้ง ปริมาณสารกำจัดศัตรูพืชกลุ่มออร์แกโนคลอรีนในดินตะกอนจะสูงกว่าในน้ำ 2,300 เท่า ในสัตว์น้ำจะสูงกว่าในดินตะกอน 8 เท่า ในไข่นกจะสูงกว่าในสัตว์น้ำประมาณ 1.3 เท่า จะเห็นว่าสารกำจัดศัตรูพืชกลุ่มออร์แกโนคลอรีนในสิ่งมีชีวิตจะมีค่าสูงกว่าในสิ่งแวดล้อม และจะมีค่าสูงขึ้นตามลำดับของผู้ล่า เนื่องจากสารกลุ่มนี้มีคุณสมบัติในการสะสมในสิ่งมีชีวิตได้ จึงทำให้เกิดการสะสมตามลำดับห่วงโซ่อาหาร

ตารางที่ 4 ความคงทนในดินของสารกำจัดศัตรูพืชกลุ่มออร์แกโนคลอรีน

Table 4. Persistency of organochlorine pesticide in soil.

Organochlorine pesticide	Degradation of pesticide at 95% in soil (year)
DDT	4 - 30
Dieldrin	5 - 25
γ-HCH	3 - 10
Chlordane	3 - 5
Heptachlor	3 - 5
Aldrin	1 - 6

ที่มา: ศุภมาศ พนิชศักดิ์พัฒนา (2545)

4. ผลกระทบของสารกำจัดศัตรูพืชแกมมา-เอชซีเอชต่อสิ่งมีชีวิตนอกกลุ่มเป้าหมาย

จากคุณสมบัติของสารกลุ่มออร์แกโนคลอรีนซึ่งตกค้างอยู่ในสภาพแวดล้อมได้นานและย่อยสลายได้ยาก ทำให้สิ่งมีชีวิตอื่นๆ ที่อาศัยอยู่บริเวณพื้นที่ปนเปื้อนและบริเวณใกล้เคียงได้รับสารเข้าสู่ร่างกายและสะสมทำให้เกิดผลกระทบต่อสุขภาพในระยะยาว โดยเฉพาะในมนุษย์ซึ่งส่วนใหญ่ได้รับสารกลุ่มนี้เนื่องจากการปนเปื้อนในอาหาร เช่น เนื้อสัตว์ โดยเฉพาะส่วนที่ติดมัน ผลิตผลทางการเกษตร เช่น นมวัว และพืชผักผลไม้ นอกจากนี้ยังอาจได้รับสารพิษจากการใช้ยาฉีดพ่นฆ่าแมลงหรือเจือปนมากับฝุ่นละออง สารกำจัดศัตรูพืชกลุ่มออร์แกโนคลอรีนส่วนใหญ่ละลายได้ดีในไขมัน จึงสะสมในอวัยวะที่มีส่วนประกอบไขมันสูง เช่น ตับ ไต ระบบประสาท เลือด น้ำดี ม้าม และต่อมแอดรีนัล เป็นต้น สารเอชซีเอชจะออกฤทธิ์ต่อเส้นประสาทสั่งการ (motor nerves) เส้นประสาทรับความรู้สึก (sensory nerves) และส่วนมอเตอร์คอร์เทกซ์ (motor cortex) ในสมอง และอาจเหนี่ยวนำให้มีการสร้างเอนไซม์ที่โครโมโซมของตับเพิ่มมากขึ้นด้วย ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงที่แตกต่างไปจากระดับปกติ โดยเฉพาะฮอร์โมนที่ทำหน้าที่ในการสืบพันธุ์และการสร้างตัวอ่อน

สารกำจัดศัตรูพืชกลุ่มออร์แกโนคลอรีนถูกดูดซึมทั้งจากการกิน การหายใจ และการสัมผัสทางผิวหนัง ความสามารถในการดูดซึมผ่านผิวหนังขึ้นกับชนิดของสาร สารแกมมา-เอชซีเอช รวมทั้งกลุ่มไซโคลไดอีน (อัลดริน ดีลดริน เอ็นดริน คลอร์เดน และเฮปตาคลอ) และ เอ็นโดซัลแฟน ถูกดูดซึมผ่านผิวหนังได้ดี ในขณะที่การดูดซึมผ่านผิวหนังของดีดีที ไดโคโฟล (Dicofol) มาร์เลท (Marlate) ท็อกซาฟีน (Toxaphene) และไมเร็กซ์ (Mirex) ไม่ค่อยดี มีรายงานแสดงว่าแกมมา-เอชซีเอชถูกดูดซึมผ่านผิวหนังได้ร้อยละ 9.3 และถูกดูดซึมได้ดีมากขึ้นถ้าผิวหนังถลอก จึงต้องระวังเมื่อนำไปใช้กับเด็กที่มีอาการผิวหนังอักเสบเนื่องจากเป็นหิด ไขมันและตัวทำละลายไขมันจะช่วย

ให้การดูดซึมสารพิษกลุ่มนี้ดีขึ้น ในขณะที่สารออร์แกโนคลอรีนที่อยู่ในรูปของแข็งจะไม่ค่อยระเหยเท่าใด แต่ถ้าหายใจเอาสารกลุ่มนี้ที่อยู่ในรูปฝุ่นผงหรือรูปยาฉีดเข้าไป สารกลุ่มนี้จะเข้าไปเกาะกับเยื่อเมือกของผนังทางเดินหายใจและอาจถูกกลืนลงไปทำให้เกิดการดูดซึมผ่านทางเดินอาหารได้ ซึ่งสารกลุ่มนี้จะซึมผ่านเยื่อหุ้มเซลล์เข้าไปอยู่ในชั้นไขมันในส่วนต่างๆ ของร่างกาย เช่น บริเวณระบบประสาทส่วนกลาง ตับและไต เป็นต้น (ศุภมาศ พนิชศักดิ์พัฒนา, 2545) สารแกมมา-เอชซีเอช เป็นสารที่มีความเป็นพิษสูงเมื่อเทียบกับสารกำจัดศัตรูพืชชนิดอื่นๆ ในกลุ่ม ซึ่งค่า LD_{50} ของสารแกมมา-เอชซีเอชเท่ากับ 88 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักของสัตว์ทดลอง (ตารางที่ 5) (Brooks, 1974b)

ตารางที่ 5 ค่าระดับความเป็นพิษ (LD_{50}) ของสารกำจัดศัตรูพืช

Table 5. Acute toxicity (LD_{50}) of pesticides.

Pesticide	LD_{50} (mg/kg)	Acute Toxicity Index (100 x 1/LD50)
γ-HCH (Lindane)	88	1.14
DDT	113	0.88
Diphenylamine (DPA)	300	0.33
1-Naphthol	300	0.33
2 4-D	375	0.27
Atrazine	2000	0.05
Malathion	2100	0.5

ที่มา : Brooks (1974b)

5. การย่อยสลายสารกำจัดศัตรูพืชแกมมา-เอชซีเอชโดยจุลินทรีย์

การสลายตัวของสารกำจัดศัตรูพืชและสัตว์โดยใช้จุลินทรีย์ (Microbial degradation) เช่น เชื้อรา แบคทีเรียและจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ เป็นตัวย่อยสลายนั้น จุลินทรีย์ดังกล่าวจะทำการย่อยสลายโมเลกุลของสารเพื่อนำธาตุต่างๆ ที่อยู่ในโมเลกุลมาเป็นแหล่งพลังงานโดยเฉพาะอย่างยิ่งคาร์บอน กระบวนการดังกล่าวมีบทบาทสำคัญในการย่อยสลายสารกำจัดศัตรูพืชในดิน ดังนั้น สภาพแวดล้อมในดินเช่น ความชื้น อุณหภูมิ ความเป็นกรด-ด่าง ปริมาณสารอินทรีย์ ปริมาณอากาศ และปริมาณของจุลินทรีย์ในดินเป็นปัจจัยที่สำคัญ นอกจากนี้ความถี่ในการใช้สารชนิดเดียวกันหรือสารที่อยู่ในกลุ่มเดียวกันมีผลต่อการสลายตัวของสารกำจัดศัตรูพืชด้วย กล่าวคือ หากมีการฉีดพ่นสารชนิดเดิมลงดินบ่อยครั้งจะทำให้การย่อยสลายเร็วยิ่งขึ้น เนื่องจากจุลินทรีย์สามารถปรับตัวเอง

ให้ย่อยสลายสารเคมีชนิดนั้นได้ดียิ่งขึ้น ทำให้มีปริมาณของจุลินทรีย์ในพื้นที่ดังกล่าวสูงขึ้นด้วย จึงทำให้การย่อยสลายเร็วขึ้นกว่าพื้นที่ๆ ไม่เคยใช้สารเคมีดังกล่าวมาก่อน ปัจจุบันได้มีการศึกษาคัดแยกเชื้อจากแหล่งที่ปนเปื้อนสารกำจัดศัตรูพืชกลุ่มออร์แกโนคลอรีนชนิดต่างๆ เพื่อทำการทดลองและหาสภาวะที่เหมาะสมในการย่อยสลายสารกลุ่มนี้

Sahu และคณะ (1992) ศึกษาการย่อยสลายสารเอชซีเอชในดินโคลนและดินร่วนที่เสริมสารเอชซีเอชเริ่มต้น 5 ไมโครกรัมต่อกรัมโดยเชื้อ *Pseudomonas* sp. พบว่า ในดินร่วนเชื้อสามารถย่อยสลายสารแอลฟา- และแกมมา-เอชซีเอช ได้ดีกว่าในดินโคลน โดยสามารถย่อยสลายสารเอชซีเอชจนสมบูรณ์ที่ระยะเวลา 10 - 20 วัน การเติมโซเดียมอะซิเตท (Sodium acetate) ในอาหาร Minimal salt medium จะทำให้เชื้อสามารถย่อยสลายสารบีตา-เอชซีเอชได้ดีขึ้น

Gupta และคณะ (2000) สามารถแยกเชื้อ *Bacillus circulan* และ *Bacillus brevis* จากแหล่งดินที่ปนเปื้อนสารกลุ่มเอชซีเอช พบว่า *B. brevis* มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายสารแกมมา- และอัลฟา-เอชซีเอชในความเข้มข้นเริ่มต้น 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ได้สูงถึงร้อยละ 98.4 และ 94.9 ตามลำดับ ในขณะที่สามารถย่อยสลายสารซิกมา-เอชซีเอชที่ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ได้ร้อยละ 88.6 นอกจากนี้เชื้อ *B. circulan* สามารถย่อยสลายสารอัลฟา-เอชซีเอชที่ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อลิตร ได้ร้อยละ 96.5 และสามารถย่อยสลายซิกมา-เอชซีเอชที่ความเข้มข้น 5 ไมโครกรัมได้ร้อยละ 85.1

Abou-Arab (2002) ทดสอบการใช้เชื้อ *Lactobacillus plantarum* และ *Micrococcus varians* ในการย่อยสลายสารพารา,พารา′-ดีดีที และแกมมา-เอชซีเอชในอาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptic soy broth (TSB) และอาหาร Minimal salt medium (MSM) ทั้งแบบเติมและไม่เติมไนไตรท์ (nitrite) พบว่าดีดีทีสามารถถูกย่อยสลายในอาหาร TSB และ MSM ที่ไม่เติมไนไตรท์ได้ร้อยละ 24.1 และ 32.5 ตามลำดับ ส่วนในอาหารที่เติมไนไตรท์สามารถย่อยสลายได้ร้อยละ 37.5 และ 46.4 ตามลำดับ ในขณะที่ลินเดน (สารแกมมา-เอชซีเอช) สามารถย่อยสลายได้ร้อยละ 27.9 และ 40 ในอาหารทั้งสองชนิดที่ไม่เติมไนไตรท์ และย่อยสลายได้ร้อยละ 38.4 และ 48.4 สำหรับอาหารที่เติมไนไตรท์

Bidlan และ Manonmani (2002) ศึกษาการย่อยสลายสารอัลฟา- บีตา- แกมมา- และเดลตา-เอชซีเอชโดยกลุ่มจุลินทรีย์ พบว่า ที่ความเข้มข้นของเอชซีเอช 10 ไมโครกรัมต่อกรัม กลุ่มจุลินทรีย์สามารถย่อยสลายสารเอชซีเอชชนิดต่างๆ อย่างสมบูรณ์ภายในเวลา 96 - 100 ชั่วโมง โดยสารแกมมา-เอชซีเอชถูกย่อยสลายจนหมดภายในเวลา 72 ชั่วโมง หลังจากนั้นอัลฟา- บีตา- และเดลตา-เอชซีเอชจะถูกย่อยสลายจนหมด ตามลำดับ แต่หากเพิ่มเข้มข้นของเอชซีเอชทั้ง 4 ไอโซเมอร์ เป็น 25 ไมโครกรัมต่อกรัม เวลาที่ใช้ในการย่อยสลายจนสมบูรณ์จะเพิ่มเป็น 120 ชั่วโมง

Benimelli และคณะ (2003) ทำการคัดแยกและจำแนกเชื้อแอคติโนมัยซีสที่ทนต่อสารกลุ่มออร์แกโนคลอรีน 11 ชนิด ได้แก่ อัลดริน คลอเดน ดีดีที ดีดีดี ดีดีอี เดลดริน เฮปตาคลอ เฮปตาคลอ อีพอกไซด์ ลินเดนและไมทอกซิน พบแอกติโนมัยซิส 93 สายพันธุ์ โดยมี 4 สายพันธุ์ที่อยู่ในกลุ่มของ *Streptomyces* คือสายพันธุ์ M4, M7, M9, และ M15 สามารถเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีส่วนผสมของสารกลุ่มออร์แกโนคลอรีน 50 กรัมต่อลิตรได้

Nawab และคณะ (2003) คัดแยกเชื้อจากแหล่งดินที่มีการปนเปื้อนของสารกำจัดศัตรูพืชและสัตว์กลุ่มเอชซีเอชและทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีพบว่า สามารถคัดแยกเชื้อได้ 2 สายพันธุ์ คือ *Pseudomonas* sp. PSI-1 และ PSI-2 เช่นเดียวกับ Kumar และคณะ (2006) ซึ่งศึกษาการย่อยสลายสารเอชซีเอชไอโซเมอร์ต่างๆ ในดินโดยเชื้อ *P. aeruginosa* ITRC-5 โดยใช้ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 10^6 CFU ต่อกรัมดิน ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7 บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส พบว่า สามารถย่อยสลายสารแอลฟา- และแกมมา-เอชซีเอช ความเข้มข้นเริ่มต้น 700 และ 180 ส่วนในล้านส่วน ได้มากกว่าร้อยละ 95 ภายในเวลา 4 วัน ส่วนสารบีตา- และเดลตา-เอชซีเอชความเข้มข้นเริ่มต้น 70 และ 80 ส่วนในล้านส่วน สามารถย่อยสลายได้ร้อยละ 27 และ 77 ภายในเวลา 4 วัน ตามลำดับ

Pesce และ Wunderlin (2004) ศึกษาการย่อยสลายสารแกมมา-เอชซีเอชโดยกลุ่มแบคทีเรียประจำถิ่นจากตะกอนดินที่มีการปนเปื้อน เมื่อนำกลุ่มเชื้อดังกล่าวมาเลี้ยงในอาหาร Mineral salt medium (MSM) ที่เสริมด้วยสารแกมมา-เอชซีเอชเริ่มต้น 120 ส่วนในล้านส่วน บ่มที่อุณหภูมิ 23±2 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7 ในสภาวะที่ให้อากาศ พบว่า สามารถย่อยสลายสารได้ร้อยละ 83 ภายในเวลา 72 ชั่วโมง โดยสามารถคัดแยกเชื้อแบคทีเรียเดี่ยวได้ 4 สายพันธุ์จากกลุ่มเชื้อ ซึ่งเมื่อเทียบเคียงโดยวิเคราะห์ 16S rDNA พบว่าเชื้อทั้ง 4 สายพันธุ์ ได้แก่ *Sphingobacterium spiritivorum*, *Ochrobactrum anthropi*, *Bosea thiooxidans* และ *S. paucimobilis*

6. การย่อยสลายสารโดยจุลินทรีย์เดี่ยวและกลุ่มจุลินทรีย์

ในกรณีที่กระบวนการย่อยสลายต้องการการทำงานร่วมกันของจุลินทรีย์หลายๆ สายพันธุ์ แต่ละสายพันธุ์เหล่านี้อาจจะมีบทบาทในช่วงแรก ช่วงหลังของการย่อยสลาย หรือจำเป็นต่อการย่อยสลายโดยรวม ซึ่งการมีหลายสายพันธุ์จะทำให้การย่อยสลายดำเนินไปได้ ในขณะที่ถ้าใช้สายพันธุ์เดียวปฏิกิริยาอาจจะไม่เกิด หรือการใช้หลายสายพันธุ์ทำให้การย่อยสลายเกิดได้เร็วขึ้น มีรายงานการวิจัยอยู่หลายฉบับเกี่ยวกับการย่อยสลายสารโดยกลุ่มจุลินทรีย์ พบว่า อัตราการย่อยสลายสูงกว่าการใช้เชื้อเดี่ยวและยังสามารถย่อยสลายสารจนสมบูรณ์ได้เป็นก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์และน้ำ เช่น จากรายงานการย่อยสลายสารเพนตะคลอโรฟีนอลโดยใช้กลุ่มจุลินทรีย์ของ Yu และ Ward (1995) เป็นต้น ซึ่งพื้นฐานของการย่อยสลายโดยกลุ่มจุลินทรีย์ก็คือการทำลายสารพิษที่เกิดขึ้นจาก

การทำงานของจุลินทรีย์ในการย่อยสลายสารก่อมลพิษที่เราต้องการกำจัด เพราะในบางกระบวนการของการย่อยสลาย จุลินทรีย์ที่เข้าย่อยสลายสารตั้งต้นทำให้เกิดสาร metabolite ซึ่งอาจจะมีผลยับยั้งจุลินทรีย์บางกลุ่ม เมื่อจุลินทรีย์กลุ่มอื่นเข้ามาทำงานในการย่อยสลายสาร metabolite นั้น ก็ส่งผลให้การย่อยสลายดำเนินต่อไปได้ ในขณะที่ถ้าใช้สายพันธุ์เดียวปฏิกิริยาอาจจะไม่เกิด โดยปกติของการย่อยสลายโดยกลุ่มจุลินทรีย์นั้นจุลินทรีย์กลุ่มที่เข้ามาใช้สาร metabolite ที่เป็นพิษนั้นเป็นแหล่งคาร์บอนและ/หรือแหล่งพลังงาน

Murthy และ Manonmani (2007) ศึกษาการย่อยสลายสารแกมมา-เอชซีเอชโดยกลุ่มจุลินทรีย์ซึ่งประกอบด้วยเชื้อ *Pseudomonas* spp. 7 สายพันธุ์ เชื้อ *Burkholderia*, *Flavobacterium* และ *Vibrio* อย่างละ 1 สายพันธุ์ เมื่อเลี้ยงกลุ่มเชื้อในอาหาร MSM ความเข้มข้นของสารแกมมา-เอชซีเอชเริ่มต้น 25 ส่วนในล้านส่วน พบว่า เชื้อสามารถย่อยสลายสารทันทีหลังจากเติมกล้าเชื้อโดยที่ไม่มีระยะพักตัวโดยสามารถย่อยสลายได้กว่าร้อยละ 95 ภายในเวลา 24 ชั่วโมง

Yu และ Ward (1996) ศึกษาการย่อยสลายสารเพนตะคลอโรฟีนอล 100 ส่วนในล้านส่วนโดยจุลินทรีย์ผสมและจุลินทรีย์เดี่ยว พบว่าการย่อยสลายสารเพนตะคลอโรฟีนอล โดยจุลินทรีย์เดี่ยว 3 สายพันธุ์ คือ *Pseudomonas* sp., *Agrobacterium radiobacter* และ *Flavobacterium gleum* มีอัตราการย่อยสลายเท่ากับร้อยละ 10, 30 และ 50 ตามลำดับในระยะเวลา 4 วัน แต่ถ้าทำการผสมเชื้อ 2 สายพันธุ์ระหว่าง *Pseudomonas+Agrobacterium*, *Pseudomonas+Flavobacterium*, *Agrobacterium+Flavobacterium* และ ผสมทั้ง 3 สายพันธุ์ พบว่า อัตราการย่อยสลายเท่ากับร้อยละ 20, 50, 60 และ 80 ตามลำดับ ซึ่งอัตราการย่อยสลายโดยเชื้อ 2 สายพันธุ์ ระหว่าง *Pseudomonas+Agrobacterium* จะต่ำกว่าเมื่อย่อยสลายโดยเชื้อ *Agrobacterium* สายพันธุ์เดียวและอัตราการย่อยสลายโดย *Pseudomonas+Flavobacterium* จะต่ำกว่าเมื่อย่อยสลายโดยเชื้อ *Flavobacterium* สายพันธุ์เดียว นั้นแสดงว่าเชื้อ *Pseudomonas* อาจมีผลต่อการยับยั้งการย่อยสลายสารเพนตะคลอโรฟีนอลโดยเชื้อ *Agrobacterium* และ *Flavobacterium*

Smith และคณะ (2005) ศึกษาการย่อยสลายสารอะทราซีนโดยกลุ่มจุลินทรีย์ที่คัดแยกจากดิน พบว่า เมื่อนำจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้ 8 สายพันธุ์ คือ *Nocardia*, *Sphingomonas*, *Agrobacterium*, *Variovorax*, *Caulobacter*, *Pseudomonas*, *Flavobacterium* และ *Rhizobium* มาศึกษาการย่อยสลายสารอะทราซีนโดยใช้เชื้อผสมทั้ง 8 สายพันธุ์และใช้เชื้อผสมครั้งละ 7 สายพันธุ์ พบว่า เมื่อใช้เชื้อผสมทั้ง 8 สายพันธุ์ การย่อยสลายเกิดอย่างสมบูรณ์ (ร้อยละ 100) ภายในระยะเวลา 4 วัน เร็วกว่าการย่อยสลายโดยจุลินทรีย์ผสม 7 สายพันธุ์ ซึ่งจะย่อยสลายอย่างสมบูรณ์ภายในระยะเวลา 6 - 10 วัน นอกจากนี้ยังพบอีกว่าในชุดการทดลองที่ผสมเชื้อ 7 สายพันธุ์โดยที่ไม่เติมเชื้อ *Nocardia* ลงไปจะไม่เกิดการย่อยสลายอะทราซีน เนื่องจาก *Nocardia* เป็นสายพันธุ์เดียวที่มียีน *TrzN* ซึ่งสามารถ

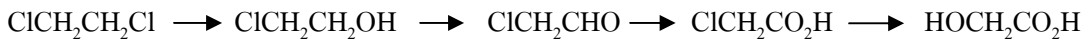
ผลิตเอนไซม์ Atrazine chlorohydrolase มาย่อยสลายอะทราซีนซึ่งเป็นสารตั้งต้นได้ ทำให้เชื้อสายพันธุ์อื่นสามารถย่อยสลายสารตัวกลางที่เกิดจากการย่อยสลายอะทราซีน

Yuan และคณะ (2000) ศึกษาการย่อยสลายสารโพลีอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน (PAHs) โดยกลุ่มจุลินทรีย์ พบว่า เมื่อนำจุลินทรีย์ที่คัดแยกจากดินที่มีการปนเปื้อนน้ำมันดิบได้ 6 สายพันธุ์ มาศึกษาการย่อยสลายสารฟีแนนทรีน พบว่า การย่อยสลายฟีแนนทีนโดยจุลินทรีย์ผสม 6 สายพันธุ์ จะมีอัตราที่เร็วกว่าการย่อยสลายโดยจุลินทรีย์เดี่ยว โดยจุลินทรีย์ผสม 6 สายพันธุ์จะย่อยสลายฟีแนนทรีนความเข้มข้นเริ่มต้น 5 ส่วนในล้านส่วน อย่างสมบูรณ์ในเวลา 2 วัน ส่วนจุลินทรีย์เดี่ยวแต่ละสายพันธุ์จะย่อยสลายสารฟีแนนทรีนที่ความเข้มข้นเดียวกันอย่างสมบูรณ์ในเวลา 6 - 10 วัน สาเหตุที่อัตราการย่อยสลายโดยจุลินทรีย์ผสมเร็วกว่าการย่อยสลายโดยจุลินทรีย์เดี่ยวเนื่องจากในจุลินทรีย์ผสมสามารถผลิตเอนไซม์ได้หลายชนิด ซึ่งเอนไซม์เหล่านี้จะช่วยในการย่อยสลายสารตั้งต้นและสารตัวกลางต่างๆ ส่งผลให้สามารถย่อยสลายสารได้เร็วและย่อยสลายได้อย่างสมบูรณ์

7. ปฏิกิริยาหลักในการย่อยสลายสารเอชซีเอชโดยจุลินทรีย์

ในการย่อยสลายทางชีวภาพของสารกลุ่มออร์แกโนคลอรีน พบว่าการเปลี่ยนรูปของสารโดยจุลินทรีย์แบ่งได้เป็น 3 ทาง (Wackett, 1995) คือ ผ่านกระบวนการเมแทบอลิซึม ใช้ฮาโลคาร์บอนเป็นตัวรับอิเล็คตรอนเพื่อให้ ATP แก่กระบวนการขนส่งอิเล็คตรอน และใช้ร่วมในกระบวนการเมแทบอลิซึม (Co-metabolic) แต่ไม่ให้พลังงาน ซึ่งการแบ่งกลุ่มวิถีการย่อยสลายสารกลุ่มออร์แกนโนคลอรีนจะขึ้นอยู่กับชนิดของปฏิกิริยาในการย่อยสลายสารตั้งต้น ซึ่งปฏิกิริยาการย่อยสลายสารกลุ่มออร์แกนโนคลอรีน อาจแบ่งเป็นกลุ่มกว้าง ๆ ได้ 4 กลุ่ม (Neilson, 1995) คือ

- Hydrolytic displacement (ภาพที่ 2) เป็นการย่อยสลายสารคลอริเนตไฮโดรคาร์บอนแบบโซ่ตรง (Aliphatic chlorinated hydrocarbon) และกรดคาร์บอกซิลิก (Carboxylic acid) ปฏิกิริยานี้จะพบได้น้อยในกลุ่มคลอริเนตไฮโดรคาร์บอนที่เป็นวง (Aromatic chlorinated hydrocarbon) เป็นปฏิกิริยาที่ค่อนข้างซับซ้อนและเกี่ยวข้องกับกลุ่มเอนไซม์ฮาโลไฮโดรเลส (Halohydrolase)



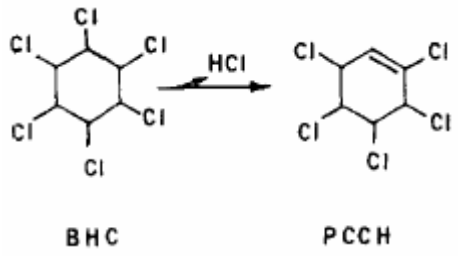
ภาพที่ 2 การย่อยสลายคลอริเนตไฮโดรคาร์บอนโดยปฏิกิริยา Hydrolytic displacement

Figure 2. Hydrolytic displacement of chlorinated hydrocarbon.

ที่มา : Neilson (1995)

- Reductive dechlorination เป็นการแทนที่อะตอมของคลอรีนในโมเลกุลของสารเอชซีเอช ด้วยอะตอมของไฮโดรเจน จากรายงานของ Johri และคณะ (1996) พบว่า เชื้อ *Clostridium rectum* และ *P. putida* สามารถเปลี่ยนสารเอชซีเอชไปเป็น 3,4,5,6,-เตตราคลอโรไซโคลเฮกเซน ภายใต้สภาวะที่ไม่มีอากาศ ด้วยปฏิกิริยานี้

- Dehydrochlorination เป็นการกำจัดอะตอมของไฮโดรเจนและคลอรีนของสารเอชซีเอช ในสภาวะที่มีอากาศและไม่มีอากาศ ทำให้เกิดสารประกอบที่มีพันธะคู่ เป็นผลให้เกิดการเปลี่ยนรูปสารตั้งต้นเป็นอัลคีน (Alkene) และไซโคลอัลคีน (Cycloalkene) ในปฏิกริยานี้แกมมา-เอชซีเอชจะถูกเปลี่ยนไปเป็นแกมมา-เพนตะคลอโรไซโคลเฮกเซน (ภาพที่ 3)



ภาพที่ 3 การย่อยสลายสารแกมมา-เอชซีเอชโดยปฏิกริยา Dehydrochlorination

Figure 3. γ-HCH degradation by dehydrochlorination.

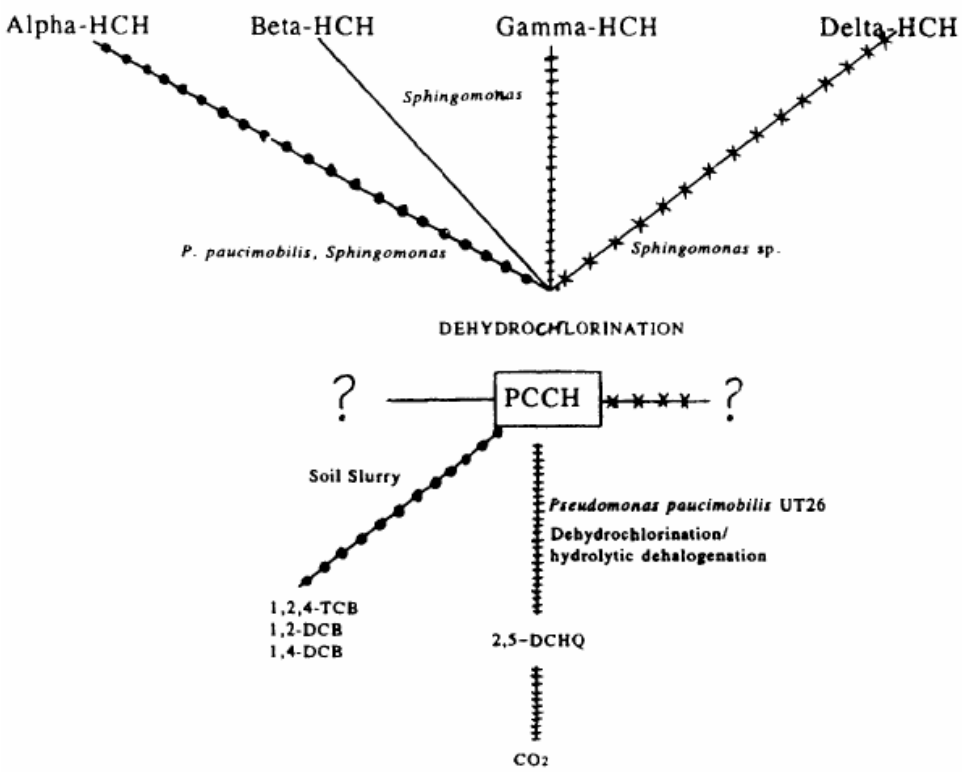
ที่มา : Johri และคณะ (1996)

- Oxidation ปฏิกิริยานี้มีความสำคัญมากในการย่อยสลายสารออร์แกนโนคลอรีนโดยจุลินทรีย์ เป็นการแทนที่คลอรีนในสารออร์แกโนคลอรีนแบบวงแหวนในสภาวะที่มีอากาศโดยเอนไซม์ไดออกซิจิเนส (Dioxygenase) ขั้นตอนที่สำคัญในปฏิกิริยานี้ คือ การเปิดวงแหวนของสารประกอบ โดยปฏิกิริยาจะเกิดตามลำดับ คือ ออกซิเดชั่น (Oxidation) ที่วงแหวน ตามด้วยปฏิกิริยาไฮดรอกซิเลชั่น (Hydroxylation) ทำให้ได้กรดอินทรีย์ที่มีคลอรีนเป็นองค์ประกอบ ซึ่งปฏิกิริยาที่เกิดจะลดลงตามจำนวนโมเลกุลของคลอรีนที่อยู่บนวงแหวน (Matsumura, 1982)

8. วิถีการย่อยสลายสารแกมมา-เอชซีเอชโดยจุลินทรีย์

Johri และคณะ (1996) แสดงวิถีการย่อยสลายสารอัลฟา- บีตา- แกมมา- และเดลตา-เอชซีเอช ในสภาวะที่มีอากาศ (ภาพที่ 4) พบว่า เชื้อ *Sphingomonas* sp. สามารถย่อยสลายอัลฟา- และบีตา-เอชซีเอช เกิดสารตัวกลางคือเพนตะคลอโรไซโคลเฮกเซนโดยอาศัยปฏิกิริยา Dehydrochlorination สำหรับสารอัลฟา-เอชซีเอชสามารถถูกย่อยสลายโดย *Pseudomonas*

paucimobilis UT26 และ *Sphingomonas* sp. เกิดสารตัวกลางคือเพนตะคลอโรไซโคลเฮกเซนโดยอาศัยปฏิกิริยาเดียวกัน หลังจากนั้นเพนตะคลอโรไซโคลเฮกเซนจะถูกเปลี่ยนเป็น 1,2,4-ไตรคลอโรเบนซีน 1,2-ไดคลอโรเบนซีน และ 1,4-ไดคลอโรเบนซีน ตามลำดับ ส่วนแกมมา-เอชซีเอชสามารถถูกย่อยสลายโดย *P. paucimobilis* UT26 เกิดสารตัวกลางคือเพนตะคลอโรไซโคลเฮกเซน และ 2,5-ไดคลอโรไฮโดรควิโนน สุดท้ายเกิดเป็นก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ตามลำดับ โดยอาศัยปฏิกริยา dehydrochlorination เช่นกัน



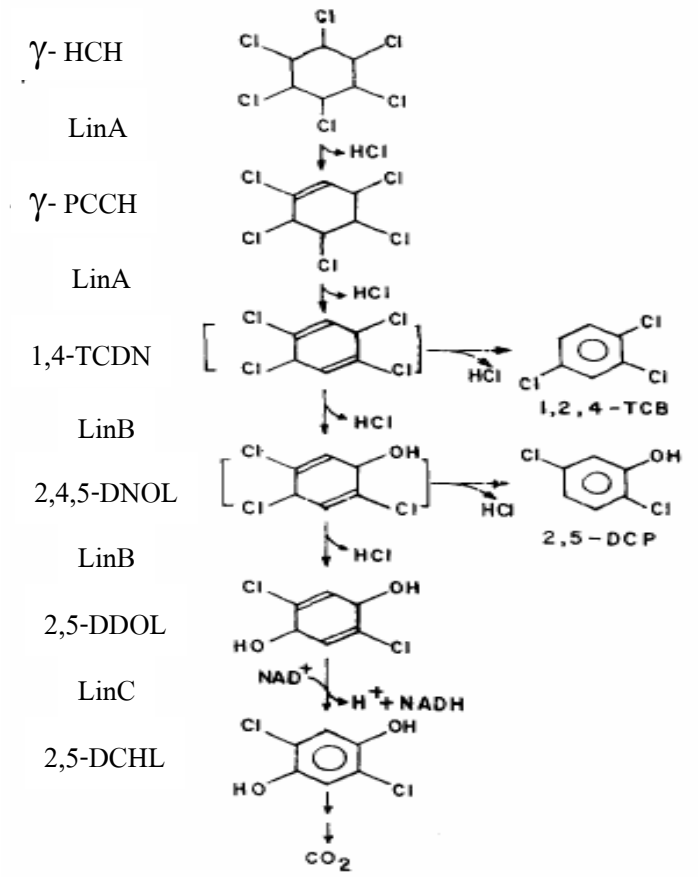
ภาพที่ 4 วิถีการย่อยสลายสารเอชซีเอชโดยจุลินทรีย์ ในสภาวะที่มีอากาศ

Figure 4. Proposed aerobic degradation of HCH isomers by microorganisms.

ที่มา : Johri และคณะ (1996)

การย่อยสลายสารแกมมา-เอชซีเอชโดยเชื้อ *P. paucimobilis* UT26 ในสภาวะที่มีอากาศ (ภาพที่ 5) พบว่า สารแกมมา-เอชซีเอชถูกย่อยสลายเกิดสารตัวกลางคือแกมมา-เพนตะคลอโรไซโคลเฮกเซน (γ- PCCH) ตามด้วย 1,3,4,6-เตตราคลอโร-1,4-ไซโคลเฮกซะไดอีน (1,4-TCDN) โดยการทำงานของเอนไซม์ γ-hexachlorocyclohexane dechlorinase (LinA) ผ่านปฏิกริยา

Dehydrochlorination จากนั้น 1,4-TCDN จะถูกย่อยสลายต่อเป็น 2,4,5-ไตรคลอโร-2,5-ไซโคลเฮกซะไดอีน-1-อัล (2,4,5-DNOL) โดยการทำงานของเอนไซม์ Haloalkane dehalogenase (LinB) ซึ่งสารสองชนิดนี้เป็นสารที่ไม่เสถียรสามารถถูกเปลี่ยนไปอย่างรวดเร็วเป็น 2,5-ไดคลอโร-2,5-ไซโคลเฮกซะไดอีน-1,4-ไดอัล (2,5-DDOL) ตามด้วยปฏิกิริยาออกซิเดชันโดยการทำงานของเอนไซม์ 2,5-Dichloro-2,5-cyclohexadiene-1,4-diol dehydrogenase (LinC) ได้เป็น 2,5-ไดคลอโรไฮโดรควิโนน (2,5-DCHL) และจะถูกย่อยสลายต่อจนเป็นก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ตามลำดับ (Johri *et al.*, 1996)



ภาพที่ 5 การย่อยสลายสารแกมมา-เอชซีเอชโดยเชื้อ *P. paucimobilis* UT26 ในสภาวะที่มีอากาศ

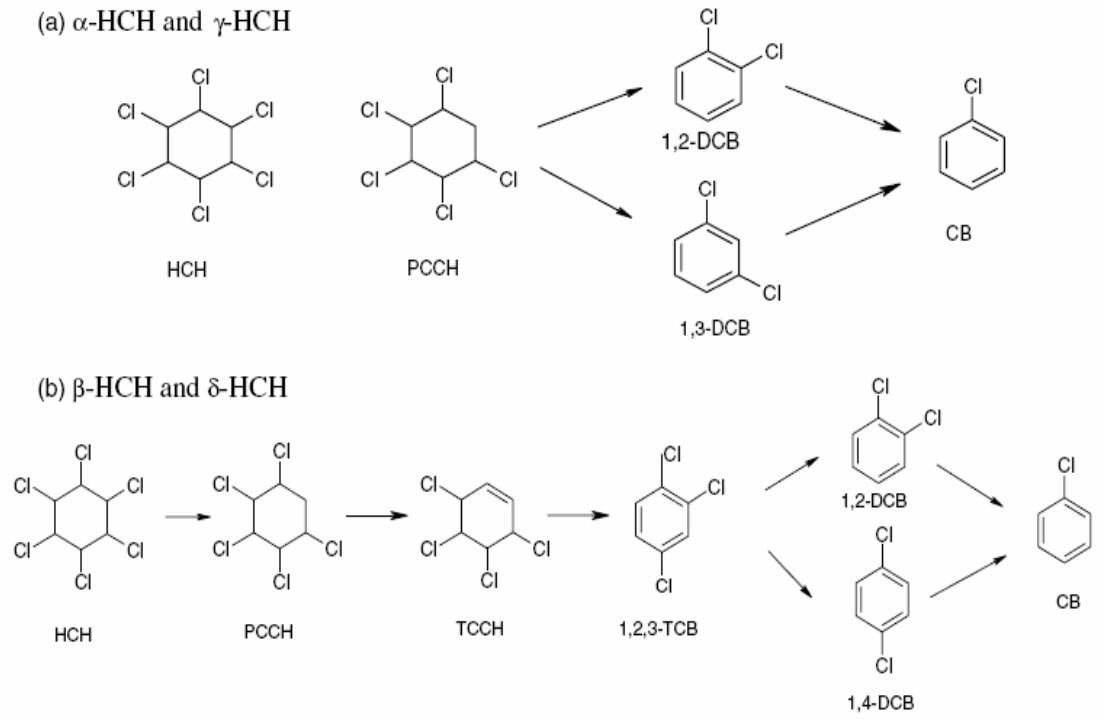
Figure 5. Proposed aerobic degradation pathway of γ-HCH in *P. paucimobilis* UT26.

ที่มา : Johri และคณะ (1996)

นอกจากการย่อยสลายของสารในสภาวะมีอากาศแล้ว ยังมีการศึกษาการย่อยสลายในระบบไม่มีอากาศ ซึ่งพบว่าแบคทีเรียสามารถย่อยสลายสารหลายๆ ชนิดได้ในสภาวะไม่มีอากาศ ซึ่งบางครั้งการย่อยสลายในสภาวะไม่มีอากาศอาจจะมีอัตราการย่อยสลายที่สูงกว่าในสภาวะมีอากาศ

ด้วย หรือบางกรณีสารอาจจะไม่ถูกย่อยสลายในสภาวะที่มีอากาศแต่จะเกิดการย่อยสลายอย่างช้าๆ ในสภาวะไม่มีอากาศ

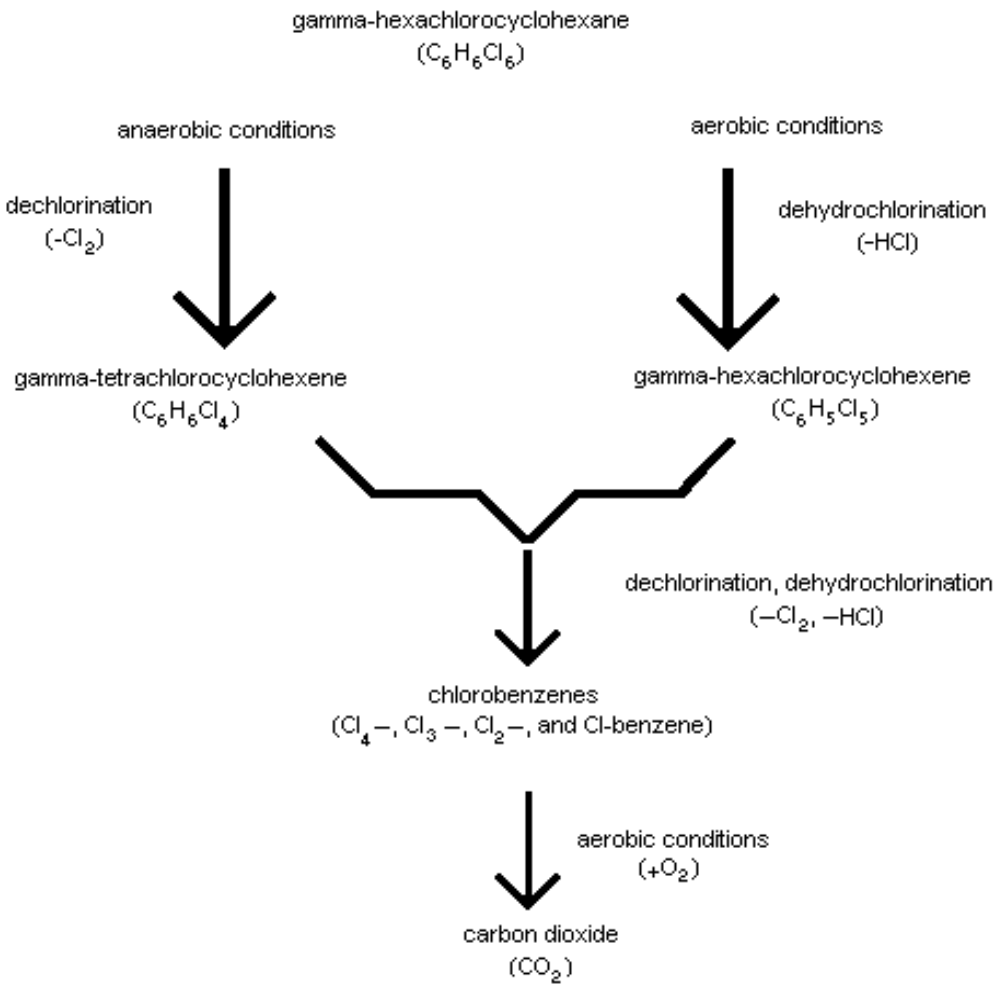
Quintero และคณะ (2005) ศึกษาการย่อยสลายสารแอลฟา- บีตา- แกมมา- และเดลตา-เอชซีเอชโดยกลุ่มจุลินทรีย์ภายใต้สภาวะไร้อากาศ (ภาพที่ 6) พบว่าในขั้นแรกของการย่อยสลายเอชซีเอชทั้ง 4 ไอโซเมอร์ จะเกิดปฏิกริยา Reductive dechlorination เปลี่ยนเอชซีเอชไปเป็นเพนตะคลอโรไซโคลเฮกเซน (PCCH) หลังจากนั้นจะเกิดปฏิกริยา Dehydrochlorination เปลี่ยนPCCH ไปเป็นสารตัวกลางอื่นๆ ซึ่งในแอลฟา- และแกมมา-เอชซีเอช นั้น PCCH จะเปลี่ยนไปเป็น 1,2- หรือ 1,3-ไดคลอโรเบนซีน (1,2- และ 1,3-DCB) และสุดท้ายถูกเปลี่ยนเป็นคลอโรเบนซีน (CB) ตามลำดับ สำหรับในบีตา- และเดลตา-เอชซีเอชนั้น PCCH จะเปลี่ยนไปเป็น เตตราคลอโรไซโคลเฮกเซน (TCCH) 1,2,3-ไตรคลอโรเบนซีน (1,2,3-TCB) 1,2- หรือ 1,4-ไดคลอโรเบนซีน (1,2- และ 1,4-DCB) และสุดท้ายถูกเปลี่ยนเป็นคลอโรเบนซีน (CB) ตามลำดับ



ภาพที่ 6 วิถีการย่อยสลายสารแอลฟา- บีตา- แกมมา- และเดลตา-เอชซีเอชโดยกลุ่มจุลินทรีย์ภายใต้สภาวะไร้อากาศ

Figure 6. Proposed degradation routes for HCH isomers under anaerobic conditions.

ที่มา : Quintero และคณะ (2005)



ภาพที่ 7 วิถีการย่อยสลายสารแกมมา-เอชซีเอช โดยแบคทีเรียในสภาวะที่มีอากาศและไม่มีอากาศ

Figure 7. γ- HCH degradation pathway by bacteria in aerobic and anaerobic conditions.

ที่มา : Brooks (1974b)

ในสิ่งแวดล้อมสามารถเกิดการย่อยสลายสารเอชซีเอชได้ทั้งในสภาวะที่มีอากาศและไม่มีอากาศ แม้ว่ากระบวนการย่อยสลายแบบไม่ใช้อากาศจะเริ่มต้นทันทีที่สารปนเปื้อนลงไปในสิ่งแวดล้อม แต่ระยะเวลาในการปรับตัวของจุลินทรีย์ (Acclimation) จะใช้เวลานานมากกว่าจะตรวจวัดการหายไปของสารได้ และผลิตภัณฑ์หรือ Metabolite ที่เกิดขึ้นจากกระบวนการไม่ใช้อากาศอาจจะถูกย่อยสลายต่อแบบใช้อากาศดังนั้น Monochlorobenzene ที่เกิดจากกระบวนการย่อยสลายของ Hexachlorobenzene ในสภาวะไม่ใช้อากาศสามารถถูกย่อยสลายต่อในสภาวะใช้อากาศ (ภาพที่ 7) (Brooks, 1974b)

9. ปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายสารกำจัดศัตรูพืชในสิ่งแวดล้อม

9.1 จุลินทรีย์

จุลินทรีย์สามารถผลิตเอนไซม์หลายชนิดออกมาย่อยสลายสารกำจัดศัตรูพืชเพื่อนำไปใช้เป็นแหล่งพลังงาน เอนไซม์เหล่านี้จะเรียกว่า Constitutive enzymes แต่มีบางเอนไซม์ที่จุลินทรีย์จะสร้างขึ้นมาก็ต่อเมื่อมีซับสเตรทหรือมีสารที่มีโครงสร้างคล้ายซับสเตรทเท่านั้น เอนไซม์กลุ่มนี้เรียกว่า Inducible enzymes อย่างไรก็ตามอาจจะสามารถตรวจพบ Inducible enzyme ในปริมาณน้อยได้แม้จะมีซับสเตรทก็ตาม กระบวนการเหนี่ยวนำให้มีการสร้างเอนไซม์นั้นเป็นกระบวนการที่ซับซ้อนและมักจะถูกควบคุมโดยระบบ Catabolite repression เช่น ใน *Nocardia* มียีน *TrzN* ซึ่งสามารถผลิตเอนไซม์ Atrazine chlorohydrolase มาย่อยสลายอะทราซีนซึ่งเป็นสารตั้งต้นได้ (Smith *et al*, 2005) ซึ่งจากการสังเกตนี้พบว่าแบคทีเรียที่สามารถเปลี่ยนสารที่ถูกดูดซับได้นั้นอาจจะต้องมี 2 ลักษณะเด่น คือ การจำเป็นต้องมีเอนไซม์ที่มีความสามารถในการย่อยหรือเปลี่ยนสารนั้น และมีความสามารถในการทำให้สารที่ถูกดูดซับอยู่นั้นสามารถย่อยได้ ลำพังการมีเอนไซม์ที่มีความสามารถในการย่อยเพียงอย่างเดียวนั้นไม่เพียงพอในการย่อยสาร ดังนั้นจึงสามารถกล่าวได้ว่าสารประเภท Hydrophobic ที่ถูกดูดซับเอาไว้โดยอนุภาคของดินหรือตะกอนดินนั้นทั้งที่เป็นประเภทสามารถถูกชะออกมาได้และประเภทที่ไม่สามารถชะออกมาได้จะสามารถถูกใช้ได้โดยจุลินทรีย์ ซึ่งสารประเภทหลังนี้มีความสำคัญเพราะสารประเภทนี้จะยังคงหลงเหลือและถูกดูดซับไว้โดยอนุภาคดิน ในขณะที่สารประเภทแรกอาจจะถูกชะออกมาได้เนื่องจากฝนหรือสามารถถูกย่อยสลายโดยจุลินทรีย์ ด้วยเหตุนี้งานวิจัยส่วนใหญ่จึงมักมุ่งเน้นการแยกจุลินทรีย์ที่สามารถใช้สารที่ถูกดูดซับเอาไว้ เพราะเชื้อจุลินทรีย์เหล่านี้สามารถใช้ได้ทั้งสารที่อยู่ในรูปอิสระและรูปที่ถูกดูดซับ

ดังนั้นสามารถสรุปเหตุผลในการที่สารเคมีโมเลกุลซับซ้อนสามารถถูกย่อยสลายได้โดยจุลินทรีย์แต่กลับไม่ถูกย่อยสลาย อาทิเช่น 1) ความเข้มข้นของสารนั้นๆ อาจจะสูงเกินไปทำให้จุลินทรีย์ไม่สามารถเจริญหรือกระบวนการเมแทบอลิซึมถูกยับยั้ง 2) สารอาหารที่มีความสำคัญต่อการเจริญของจุลินทรีย์ในสิ่งแวดล้อมนั้นๆ มีความเข้มข้นต่ำเกินไปทำให้จุลินทรีย์ไม่สามารถเจริญได้ 3) ความเข้มข้นของสารนั้นๆ ต่ำเกินไปที่จะทำให้จุลินทรีย์ใช้ได้ หรือ 4) สารนั้นๆ อาจจะไม่อยู่ในรูปที่จุลินทรีย์จะใช้ได้

Karpouzas และคณะ (2005) ศึกษาการย่อยสลายสารกำจัดศัตรูพืชกลุ่มออร์แกโนฟอสฟอรัสชนิด Cadusafus, Ethoprophos และ Isazofos โดยจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้ 2 สายพันธุ์ คือ *Sphingomonas paucimobilis* และ *Flavobacterium* ซึ่งพบว่าเชื้อทั้ง 2 สายพันธุ์ สามารถย่อยสลายสาร Cadusafus ความเข้มข้นเริ่มต้น 10 ส่วนในล้านส่วน ได้อย่างรวดเร็วคือสามารถย่อยสลายอย่างสมบูรณ์ภายในเวลา 4 และ 8 วันตามลำดับ ส่วนสาร Ethoprophos นั้น เชื้อทั้ง 2 สายพันธุ์จะย่อย

สลายจนสมบูรณ์ได้ช้ากว่า คือใช้เวลา 8 และ 20 วัน ตามลำดับ สำหรับสาร Isazofos นั้น เชื้อทั้ง 2 สายพันธุ์ สามารถย่อยสลายได้น้อยมาก คือ เพียงร้อยละ 20 ในระยะเวลา 20 วัน และเชื้อทั้ง 2 สายพันธุ์จะไม่สามารถย่อยสลายสาร Isofenphos ได้ ซึ่งสาเหตุที่มาจากที่ Ethoprophos มีโครงสร้างคล้ายกับ Cadusafos แตกต่างกันที่ Cadusafos มีหมู่เมทิลมากกว่า 1 หมู่ จากการศึกษาพบว่าในการย่อยสลาย Cadusafos และ Ethoprophos นั้นเชื้อจะกำจัดหมู่ S-propyl ออกจากโมเลกุล แต่ใน Isazofos และ Isoferphos จะมีหมู่อะโรเมติกมาแทนที่ S-propyl ส่งผลให้สามารถย่อยสลายได้ยากหรือไม่ได้เลย

9.2 การดูดจับ (Sorption)

สารบางชนิด เช่น สารโพลีเมอร์สังเคราะห์ไม่สามารถถูกย่อยสลายได้ในสิ่งแวดล้อมหรือสารบางชนิดมีความเป็นไปได้ในการที่จะถูกย่อยสลายโดยจุลินทรีย์แต่ก็ไม่ถูกย่อยดังนั้นจึงมีความจำเป็นในการแยกแยะระหว่างโมเลกุลที่สามารถถูกย่อยสลายได้โดยจุลินทรีย์และโมเลกุลที่ไม่สามารถย่อยสลายได้โดยจุลินทรีย์ในสภาวะใดสภาวะหนึ่ง ดังนั้นการที่จุลินทรีย์ไม่สามารถใช้โมเลกุลของสารอินทรีย์นั้นๆ ได้อาจจะเนื่องมาจากสารนั้นเกาะติดหรือดูดจับ (Sorption) อยู่กับของแข็งในสิ่งแวดล้อมหรือสารนั้นอยู่ในรูปของ Nonaqueous-phase liquids (NAPLs) หรือสารนั้นถูกตรึง (Entrap) ไว้ในโครงสร้างของดิน ตะกอนดิน หรือชั้นน้ำใต้ดิน (Aquifer)

พื้นผิวหรือส่วนที่เป็นของแข็งจะมีส่วนสำคัญในการดำเนินกิจกรรมของจุลินทรีย์ประจำถิ่น เพราะพื้นผิวหรือของแข็งเหล่านี้อาจจะเปลี่ยนคุณลักษณะบางประการของสารเคมีไปหรือเปลี่ยนระดับของสารอาหารทั้งที่เป็นสารอินทรีย์และอนินทรีย์ หรือทำให้ความสัมพันธ์ระหว่างค่าความเป็นกรด-ด่าง หรือออกซิเจนเปลี่ยนแปลงไป หรือทำให้ความเป็นพิษของ Inhibitor ลดลง หรือกักเก็บจุลินทรีย์เอาไว้ หรือระงับการทำงานของ Extracellular เอนไซม์ ซึ่งพื้นผิวหรือชั้นของแข็งที่กล่าวมาอาจจะเป็นดิน แร่ธาตุต่างๆ ส่วนของสารอินทรีย์หรือ Humic substances ของดินหรือตะกอน หรือสารประกอบเชิงซ้อนของคาร์บอน (Complex carbonaceous matter) หรือบางครั้งอาจจะเป็น Amorphous เหล็กออกไซด์หรืออะลูมิเนียมออกไซด์หรือไฮดรอกไซด์ โดยปกติพื้นผิวของของแข็งจะเกิดการดูดซับ (Adsorption) ซึ่งหมายถึงการเกาะติดของสารกับอนุภาคของของแข็ง ในขณะที่การดูดซึม (Absorption) จะกล่าวถึงการดูดซึมของสารเข้าไปในอนุภาคของของแข็ง โดยคำว่า Sorption จะหมายรวมถึงปรากฏการณ์ทั้งการดูดซับและการดูดซึม ในบริเวณที่มีการ Sorption เกิดขึ้นบริเวณนั้นจะเป็นตัวแทนของ Microenvironment ซึ่งมีความแตกต่างเป็นอย่างมากจากสารละลายรอบๆ ดังนั้นจึงมีความจำเป็นที่จะต้องทำความเข้าใจถึงการ Sorption ของสารที่เราสนใจ

จากตัวอย่างการศึกษาการย่อยสลายสารกำจัดศัตรูพืชกลุ่มออร์แกโนฟอสฟอรัสโดย Karpouzas และคณะ (2005) พบว่า ประสิทธิภาพของการย่อยสลายสาร Cadusafos และ

Ethoprophos โดยเชื้อจุลินทรีย์นั้นสูงกว่าของสาร Isazofos และ Isoferphos เนื่องจากสารทั้งสอง (Cadusafos และ Ethoprophos) มีค่าการละลายน้ำที่สูง คือ 240 และ 700 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ รวมทั้งยังมีค่าการดูดจับกับดินที่ต่ำอีกด้วย คือ 351 และ 70 มิลลิกรัมต่อกรัม ตามลำดับ จึงกล่าวได้ว่ามีค่า Bioavailability ที่สูง ทำให้เชื้อสามารถเข้าย่อยสลายได้ง่ายกว่าสาร Isazofos และ Isoferphos

นอกจากค่าการละลายน้ำและค่าการดูดจับกับดินข้างต้นแล้ว ยังมีปัจจัยหลายอย่างที่มีผลต่อการ Sorption ของสารประกอบอินทรีย์ เช่น ชนิดและความเข้มข้นของตัวละลาย ชนิดและปริมาณของแร่ธาตุและสารประกอบต่างๆ ในดิน ปริมาณของสารอินทรีย์ในดินหรือตะกอนนั้นๆ ค่าความเป็นกรด-ด่าง อุณหภูมิ ชนิดของ Cation ซึ่งอยู่ในดินและความสามารถในการแลกเปลี่ยนประจุ และพื้นผิวจำเพาะของดิน เป็นต้น

การดูดซับมีผลต่อการบำบัดสารตกค้างในหลายๆ ทางนอกเหนือจากการดูดจับของซับสเตรทหรือการดูดจับ Extracellular enzyme เนื่องจาก 1) สารอาหารอนินทรีย์หรือ Growth factor อาจจะถูกดูดจับไว้ด้วยเช่นกัน ทำให้อัตราการเจริญของจุลินทรีย์ลดลง 2) สภาพ Microenvironment รอบๆ พื้นผิวอาจจะไม่เอื้อต่อการเปลี่ยนรูปของสาร เนื่องจากการลดลงของค่าความเป็นกรด-ด่างอย่างรวดเร็วเพราะพื้นผิวของสารเป็นประจุลบทำให้ดึงดูดโปรตอนเอาไว้ และ 3) ในทางตรงกันข้ามการดูดซับของซับสเตรททำให้รอบๆ อนุภาคของตัวดูดซับมีความเข้มข้นของซับสเตรทสูง การเจริญของจุลินทรีย์ที่อยู่ใกล้กับพื้นผิวของตัวดูดจับจะเพิ่มสูงขึ้นซึ่งเป็นการกระตุ้นกิจกรรมการบำบัด โดยเฉพาะอย่างยิ่งในกรณีที่ความเข้มข้นของสารอาหารมีปริมาณน้อย

9.3 สภาวะที่เหมาะสมต่อการย่อยสลายสารกำจัดศัตรูพืช

จำนวนของจุลินทรีย์ที่ย่อยสลายสารจะขึ้นกับปัจจัยทางด้านกายภาพ เคมีและชีวภาพ ซึ่งมีผลต่อการเจริญ กิจกรรมและความอยู่รอดของจุลินทรีย์ สิ่งแวดล้อมที่จุลินทรีย์เหล่านี้ทำงานได้นั้นแตกต่างกันมากมายและมีผลต่อจำนวนจุลินทรีย์ อัตราในการเกิดปฏิกิริยาการเปลี่ยนรูป (Transformation) และชนิดของผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นจากกระบวนการย่อยสลาย

บางครั้งสารประกอบอาจจะถูกย่อยในสิ่งแวดล้อมหนึ่งแต่เพียงแค่เกิดการใช้ร่วมกันในกระบวนกันเมแทบอลิซึมของกลุ่มจุลินทรีย์ (Cometabolization) ในอีกสิ่งแวดล้อมหนึ่ง หรือการเปลี่ยนรูปของสารอาจจะเกิดขึ้นได้เพียงช่วงระยะเวลาหนึ่งในหนึ่งปี ซึ่งเหตุผลในการเกิดเช่นนี้อาจจะเนื่องมาจากการมีอยู่ของจุลินทรีย์จำเพาะต่อสารนั้นๆ ในสิ่งแวดล้อม หรือการมีหรือไม่มีสารอาหารเพียงพอต่อการเจริญ หรือการมีสารพิษในสิ่งแวดล้อมนั้นๆ หรือปริมาณออกซิเจน หรือปัจจัยต่างๆ ของสิ่งแวดล้อมนั้นๆ ที่ส่งเสริมหรือจำกัดหรือยับยั้งการย่อยสลายของจุลินทรีย์ ดังนั้นจึงไม่เป็นการถูกต้องที่จะสรุปว่าสารใดที่สามารถย่อยสลายได้ในสิ่งแวดล้อมหนึ่งจะสามารถย่อยสลายได้ในสิ่งแวดล้อมอื่นๆ ด้วย

จุลินทรีย์ทุกสายพันธุ์มีความสามารถในการทนต่อปัจจัยของสิ่งแวดล้อม เช่น อุณหภูมิ ค่าความเป็นกรด-ด่าง และความเค็มได้ไม่เท่ากัน ซึ่งปัจจัยเหล่านี้มีผลต่อการเจริญและการทำงานของจุลินทรีย์ ถ้าในสิ่งแวดล้อมนั้นประกอบไปด้วยจุลินทรีย์หลายสายพันธุ์ซึ่งสามารถเปลี่ยนรูปสารเคมีที่ต้องการ จะทำให้มีโอกาสที่จะเกิดการเปลี่ยนรูปของสารมากกว่าสิ่งแวดล้อมที่มีจุลินทรีย์เพียงสายพันธุ์เดียว นอกเหนือจากสารอาหารที่เป็นปัจจัยในการควบคุมการย่อยสลายของสารแล้ว ปัจจัยหลักอื่นๆ ได้แก่ อุณหภูมิ ค่าความเป็นกรด-ด่าง ความชื้นในกรณีที่เป็นดิน ความเค็มในบางสิ่งแวดล้อม สารพิษและความดันน้ำ (Hydrostatic pressure) ในกรณีดินตะกอนในทะเลลึกหรือระดับความลึกมากจากพื้นดิน

9.3.1 อุณหภูมิ เป็นปัจจัยที่สำคัญต่อการย่อยสลายสารกลุ่มออร์แกโนคลอรีน โดยมีรายงานว่า ในเขตร้อนอัตราการย่อยสลายของสารกลุ่มนี้ในดินจะสูงกว่าในเขตหนาว เนื่องจากอุณหภูมิมีผลต่อกิจกรรมของจุลินทรีย์ จากการศึกษาการย่อยสลายสารเอชซีเอชโดยเชื้อ *Pandoraea* sp. พบว่าอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เหมาะสมในการย่อยสลายสารเอชซีเอช โดยสามารถย่อยสลายสารแอลฟา- และแกมมา-เอชซีเอชได้ร้อยละ 65.2 และ 57.7 ตามลำดับ (Siddique *et al.*, 2002) อาจกล่าวได้ว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมในการย่อยสลายจะขึ้นอยู่กับชนิดของจุลินทรีย์ที่ทำหน้าที่ย่อยสลาย

9.3.2 ค่าความเป็นกรด-ด่าง การย่อยสลายสารออร์แกโนคลอรีน พบว่า เมื่อค่าความเป็นกรด-ด่างสูงขึ้นในระดับหนึ่ง อัตราการย่อยสลายจะสูงขึ้น แต่ถ้าเพิ่มมากกว่านั้นอัตราการย่อยสลายก็จะลดลง มีการศึกษาพบว่าสารออร์แกโนคลอรีนกลุ่มดีดีทีและเอชซีเอช สามารถย่อยสลายได้ดีในดินที่มีสภาวะเป็นด่าง (9.5) มากกว่าในสภาวะที่เป็นกรด (Chawla and Chopra, 1967 อ้างโดย Sethunathan *et al*., 1982)

Kumar และคณะ (2006) ศึกษาการย่อยสลายสารเอชซีเอชในดินโดยเชื้อ *P. aeruginosa* ITRC-5 พบว่า ความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมต่อการย่อยสลายอยู่ในช่วง 7 - 9 แต่ในการย่อยสลายสารดีดีทีโดยเชื้อ *Serratia marcescens* DT-1P พบว่า ค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อที่ใช้ คือ ที่ 7 - 7.5 นอกจากนั้นยังมีรายงานว่าเชื้อ *Pseudomonas paucimobilis* สามารถย่อยสลายสารเอชซีเอชในสภาวะที่เป็นกรดได้ดี (Bidlan and Manonmani, 2002) ในการย่อยสลายสารออร์แกโนคลอรีนโดยเชื้อ *Bacillus* และ *Corynebacterium* พบว่า กิจกรรมของเอนไซม์ดีฮาโลจีเนสจะสูงในช่วงค่าความเป็นกรด-ด่าง 7.6 และ 8 (Olaniran *et al*., 2001) อาจกล่าวได้ว่าค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมในการย่อยสลายสารในกลุ่มนี้ขึ้นอยู่กับชนิดของจุลินทรีย์และสารที่จะทำการย่อยสลาย สภาวะการเป็นกรดหรือด่างแก่ทำให้กิจกรรมการย่อยสลายลดลง ที่สภาวะค่อนข้างเป็นกลางกิจกรรมการบำบัดมีแนวโน้มที่จะเกิดได้เร็วขึ้น

9.3.3 ความเข้มข้นของสารปนเปื้อน มีผลในการยับยั้งการเจริญและเพิ่มระยะเวลาการย่อยสลายโดยจุลินทรีย์ เช่น ความเข้มข้นของสารกำจัดศัตรูพืช 0.5 - 5 ส่วนในล้านส่วน ไม่มีผลต่อการเจริญของเชื้อ *Azotobacter chrooccum* ในอาหารที่มีไนโตรเจน แต่ที่ความเข้มข้นสูงกว่านั้นจะมีผลยับยั้งการเจริญของเชื้อได้ (Kale *et al.*, 1989) ในขณะที่การเจริญของเชื้อ *Pseudomonas* PSI-1 และ PSI-2 จะลดลงตามลำดับ และระยะเวลาในการย่อยสลายนานขึ้น เมื่อความเข้มข้นของสารแกมมา-เอชซีเอชสูงขึ้น 30 - 120 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (Nawab *et al.*, 2003)

9.3.4 สารอาหารและแร่ธาตุ แหล่งคาร์บอนมีผลต่ออัตราการย่อยสลายและการเจริญของจุลินทรีย์ เช่น สารอะซิเตทให้ผลที่แตกต่างกันในการย่อยสลายสารแกมมา- และ เบตา-เอชซีเอชโดยเชื้อ *Pseudomonas* sp. คือ อะซิเตทจะยับยั้งการย่อยสลายแกมมา-เอชซีเอช แต่จะเร่งการย่อยสลายเบตา-เอชซีเอช ซึ่งสาเหตุอาจเนื่องจาก *Pseudomonas* sp. ใช้อะซิเตทเป็นสารอาหารในการเจริญเป็นผลให้ชะลอการย่อยสลายสารแกมมา-เอชซีเอช ส่วนในกรณีของเบตา-เอชซีเอช จะเกิดการย่อยสลายโดยกระบวนการ Co-metabolism ดังนั้นอะซิเตทไม่เพียงแต่ช่วยเร่งสร้างสารเมตาบอไลท์ แต่ยังมีส่วนช่วยในกระบวนการเมตาบอลิซึมด้วย (Sahu *et al.*, 1993)

Bidlan และ Manonmani (2002) ศึกษาแหล่งคาร์บอนที่มีผลต่อการย่อยสลายดีดีทีโดยเชื้อ *Serratia marcescens* DT-1P พบว่า การให้กลีเซอรอล เปปโตน ยีสต์สกัด และอาหาร TSB เป็นแหล่งคาร์บอนแก่เชื้อทำให้การย่อยสลายดีดีทีสมบูรณ์ ในขณะที่โซเดียมซิเตรทให้อัตราการย่อยสลายเพียงร้อยละ 6.67

แบคทีเรียกลุ่ม Heterotrophic และเชื้อราต้องการสารประกอบอินทรีย์ในการเป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงาน นอกจากนี้ยังต้องการสารอาหารอื่นๆ และตัวรับอิเลกตรอน เช่น ออกซิเจน อย่างไรก็ตามตัวรับอิเลกตรอนอาจจะเป็นไนเตรท ซัลเฟต คาร์บอนไดออกไซด์เหล็ก (Ferric iron) หรือสารประกอบอินทรีย์ชนิดอื่นๆ ในกรณีที่แบคทีเรียสามารถใช้สารเหล่านี้ในการรับอิเลกตรอนซึ่งถูกปลดปล่อยออกมาจากกระบวนการออกซิเดชั่นของแหล่งพลังงาน นอกจากนี้แบคทีเรียและเชื้อราหลายชนิดต้องการสารต่างๆ เหล่านี้ในปริมาณน้อย เช่น กรดอะมิโน วิตามินบี วิตามินที่ละลายในไขมันหรือสารอินทรีย์ตัวอื่นๆ ซึ่งสารเหล่านี้เรียกว่า Growth factor

นอกจากปัจจัยข้างต้น จุลินทรีย์ยังต้องการความชื้นที่เหมาะสมในการเกิดปฏิกิริยาการเปลี่ยนรูปสารและการเจริญ ความชื้นที่เหมาะสมจะขึ้นกับคุณสมบัติของดิน สารที่ต้องการย่อยสลาย และสภาวะในการเปลี่ยนรูปสารว่าเป็นสภาวะใช้อากาศหรือไม่ใช้อากาศ ซึ่งถ้ามีน้ำเข้ามามากในอนุภาคดินจะเกิดสภาพไม่มีอากาศขึ้น แต่การที่ความชื้นลดลงมากเกินไปก็จะทำให้อัตราการย่อยสลายลดลงได้ด้วย สภาวะที่มีเกลือหรือความเค็มสูงก็มีผลกระทบต่อการย่อยสลาย เนื่องจากกระบวนการเมตาบอลิซึมจะถูกยับยั้ง น้ำมันและองค์ประกอบ หรือสารก่อมลพิษอื่นๆ ที่มีค่าแรง

โน้มถ่วงจำเพาะสูงกว่าน้ำจะจมลงสู่พื้นน้ำ ทำให้เกิดสภาวะความดันสูงและอุณหภูมิต่ำ กิจกรรมของจุลินทรีย์เกิดขึ้นน้อย กระบวนการย่อยสลายเกิดได้ต่ำ และใช้เวลานานขึ้นในการย่อยสลาย

วัตถุประสงค์

- เพื่อคัดเลือกและเทียบเคียงแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลายสารแกมมา-เอชซีเอช
- เพื่อศึกษาเปรียบเทียบการย่อยสลายสารแกมมา-เอชซีเอชโดยเชื้อแบคทีเรียเดี่ยวและกลุ่มที่คัดเลือกได้

ขอบเขตการวิจัย

นำตัวอย่างดินจากพื้นที่ทางการเกษตรมาคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียที่สามารถเจริญในอาหารที่มีสารแกมมา-เอชซีเอช คัดเลือกเชื้อแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพสูงสุดในการย่อยสลายสารแกมมา-เอชซีเอช ศึกษาการย่อยสลายสารแกมมา-เอชซีเอชโดยแบคทีเรียเดี่ยวและผสม เทียบเคียงสายพันธุ์แบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายสารแกมมา-เอชซีเอช

บทที่ 2

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ

1. ตัวอย่างดิน

ตัวอย่างดินจาก ต. บางเหลียง อ. ควนเนียง จ. สงขลา ซึ่งเป็นพื้นที่เพาะปลูกทางการเกษตรที่มีประวัติการใช้สารกำจัดศัตรูพืช จำนวน 12 บริเวณ สุ่มเก็บตัวอย่างบริเวณละ 9 ตัวอย่างหรือจุดตัวอย่างละประมาณ 500 กรัม โดยใช้พลั่วมือขุดหลุมลึกระดับผิวดิน (0 ถึง 15 เซนติเมตร) นำตัวอย่างดินใส่ถุงพลาสติก แช่ในถังน้ำแข็งหรือเก็บที่ 4 องศาเซลเซียส จนกว่าจะทำการศึกษาต่อไป (กนกนิษฐ์ สอนคง, 2550)

การเตรียมดินก่อนศึกษา: ตากให้แห้งแล้วร่อนด้วยตะแกรงขนาด 10 mesh เพื่อกรองเอาสิ่งแปลกปลอมออก นำตัวอย่างดินในแต่ละจุดที่เก็บจากแปลงเดียวกันมาผสมในปริมาณที่เท่ากัน (50 กรัม น้ำหนักดินแห้ง) เพื่อเป็นตัวแทนของตัวอย่างดินจากแต่ละบริเวณ

2. อาหารเลี้ยงเชื้อ (รายละเอียดและวิธีการเตรียมแสดงในภาคผนวก ก)

- อาหารสำหรับคัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์ที่ย่อยสลายสารแกมมา-เอชซีเอช ได้แก่ Mineral salt yeast-extract medium (MSYM)
- อาหารสำหรับการนับจำนวนแบคทีเรียที่มีชีวิต (Viable plate count) และการเตรียมเชื้อเพื่อสกัดดีเอ็นเอ ได้แก่ Nutrient broth (NB) และ Nutrient agar (NA)
- อาหารสำหรับการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีตามวิธีการของ Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (Krieg, 1984) และ ดวงพร คันธโชติ (2537)

3. สารเคมี (รายละเอียดและวิธีการเตรียมแสดงในภาคผนวก ข)

- สารมาตรฐานออร์แกโนคลอรีน ได้แก่ สารแกมมา-เอชซีเอช (1,2,3,4,5,6-Hexachloro-cyclohexane) Gamma-isomer 97% (AR grade)
- สารสำหรับสกัดสารแกมมา-เอชซีเอช ในตัวอย่างดิน ได้แก่ อะซิโตน เฮกเซน และไดคลอโรมีเทน
- สารทดสอบทางคุณสมบัติชีวเคมี ตามวิธีการของ Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (Krieg, 1984) และ ดวงพร คันธโชติ (2537)

4. อุปกรณ์

- เครื่อง Gas chromatography-Microelectron capture detector (GC-μECD): Hewlett-Packard รุ่น 6890
- เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ (Shaking incubator): Vision Scientific
- ตู้ปลอดเชื้อ (Laminar air flow cabinet): Biohazard laminar flow รุ่น V6 Class II
- เครื่องเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอ (Thermocycler): PERKIN ELMER GeneAmp PCR system รุ่น 2400
- ชุด Gel electrophoresis apparatus และ power supply: BioRad Sub-Cell GT Mini และ PowerPac300
- เครื่อง UV-visible spectrophotometer: Biochrom รุ่น Libra S22
- เครื่องทำความร้อน (Heating block): WEALTEC Corp., Wealtec รุ่น HB-1
- เครื่องหมุนเหวี่ยง (Centrifuge and Microcentrifuge): HETTICH ZENTIFUGEN รุ่น Universal 32R และ DENVILLE รุ่น 260D

5. วิธีการวิเคราะห์

5.1 การวิเคราะห์ปริมาณสารแกมมา-เอชซีเอชด้วยวิธีแก๊สโครมาโตกราฟฟี (กนกนิษฐ์ สอนคง, 2550)

เครื่องแก๊สโครมาโตกราฟฟีใช้เครื่องตรวจวัด (Detector) ชนิด ^{63}Ni Micro electron capture detector (μECD) โดยใช้คอลัมน์แบบ capillary HP-35 (ความยาว 30 เมตร ID 0.25 ไมโครเมตร) สภาวะของเครื่องใช้อุณหภูมิของ Injector 250 องศาเซลเซียส Detector 320 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิคอลัมน์ 150 องศาเซลเซียส จากนั้นเพิ่มอุณหภูมิเป็น 250 องศาเซลเซียส ด้วยอัตราเร็ว 20 องศาเซลเซียสต่อนาที และคงอุณหภูมิที่ 250 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ใช้ฮีเลียมเป็นแก๊สลำเลียง (Carrier gas) อัตราเร็ว 2 มิลลิเมตรต่อนาที และไนโตรเจนเป็นแก๊สแทนที่ (Make up) อัตราเร็ว 60 มิลลิลิตรต่อนาที

วิเคราะห์สารโดยฉีดสารละลายมาตรฐานของสารแกมมา-เอชซีเอช 1 ไมโครลิตร เข้าเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟฟี จะได้โครมาโตแกรมของสารมาตรฐาน เมื่อฉีดตัวอย่างที่เตรียมไว้สำหรับวิเคราะห์ปริมาณเข้าสู่เครื่องแก๊สโครมาโตกราฟฟี จะได้โครมาโตแกรมเปรียบเทียบความเข้มข้นของสารกับกราฟมาตรฐาน (Standard curve) ซึ่งค่าระยะพักตัว (Retention time) จะบอกให้ทราบถึงชนิดของสาร

5.2 การสกัดสารแกมมา-เอชซีเอชจากตัวอย่างดิน (ดัดแปลงจากวิธีของ บุญเสริม เซ่งล่าย, 2540)

นำตัวอย่างดิน 100 กรัม สกัดด้วยอะซิโตน 100 มิลลิลิตร ในกรวยแยกสาร (Separatory funnel) เขย่าบนเครื่องเขย่าเป็นเวลา 1 ชั่วโมง กรองแล้วเก็บส่วนสารละลายไว้ สกัดอีกครั้งด้วยอะซิโตน:เฮกเซน (อัตราส่วน 1:1 โดยปริมาตร) 100 มิลลิลิตร เขย่าอีกครั้งเป็นเวลา 1 ชั่วโมง รวมส่วนสารละลายไว้ด้วยกันแล้วสกัดด้วยเฮกเซน 500 มิลลิลิตร และน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร ในกรวยแยกสาร ทิ้งส่วนน้ำ ส่วนของสารละลายให้ดูดความชื้นด้วยสารละลายโซเดียมซัลเฟตแบบปราศจากน้ำ จากนั้นระเหยด้วยเครื่องระเหยแบบสุญญากาศเพื่อระเหยสารละลายออกจนเหลือปริมาตร 1 มิลลิลิตร ทำความสะอาดสารที่สกัดได้ด้วย Florisil แล้วชะด้วยไดคลอโรมีเทน 40 มิลลิลิตร ระเหยอีกครั้งด้วยเครื่องระเหยแบบสุญญากาศ จากนั้นละลายกลับด้วยนอร์มอลเฮกเซนปริมาตร 1 มิลลิลิตร นำไปวิเคราะห์หาปริมาณสารแกมมา-เอชซีเอชด้วยแก๊สโครมาโตกราฟฟี ตามวิธีการวิเคราะห์ในข้อ 5.1

5.3 การสกัดสารแกมมา-เอชซีเอชจากอาหารเลี้ยงเชื้อ (ดัดแปลงจาก Quintero *et al.*, 2005)

นำตัวอย่างอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาตร 5 มิลลิลิตร ใส่ในกรวยแยกสาร (Separatory funnel) ขนาด 125 มิลลิลิตร สกัดด้วยสารละลายอะซิโตน:เฮกเซน (อัตราส่วน 1:1 โดยปริมาตร) 15 มิลลิลิตร เขย่าอย่างแรง 10 ครั้ง แล้วเปิดวาล์วเพื่อระบายไอระเหยของตัวทำละลาย เขย่าต่อ 20 ครั้ง แล้วจึงเปิดวาล์ว จากนั้นเขย่าต่ออีก 10 ครั้ง ตั้งทิ้งไว้ให้แยกชั้น เปิดวาล์วไขชั้นของอาหารเลี้ยงเชื้อออกทางด้านล่างและเทชั้นตัวทำละลายอินทรีย์ออกทางด้านบนของกรวยแยกสารเพื่อเก็บไว้ ทำการสกัดในชั้นของอาหารเลี้ยงเชื้ออีก 2 ครั้ง จากนั้นนำชั้นของตัวทำละลายอินทรีย์มารวมกัน นำไประเหยจนแห้งด้วยเครื่องระเหยแบบสุญญากาศ ละลายกลับด้วยเฮกเซนปริมาตร 2 มิลลิลิตร นำไปวิเคราะห์หาปริมาณสารแกมมา-เอชซีเอชด้วยแก๊สโครมาโตกราฟฟี ตามวิธีการวิเคราะห์ในข้อ 5.1

5.4 การนับจำนวนแบคทีเรียที่มีชีวิตโดยวิธี Spread plate (Viable plate count)

เจือจางตัวอย่างแบบ 10-fold dilution โดยใช้ Normal saline 0.85% จนได้ความเข้มข้นที่เหมาะสมต่อการนับจำนวนเชื้อนำตัวอย่างที่เจือจางแล้วปริมาตร 100 ไมโครลิตร ใส่ในอาหาร Nutrient agar ทำการ spread plate นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 $\pm$ 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นับจำนวนโคโลนีที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ แล้วนำไปคำนวณจำนวนเชื้อทั้งหมด เขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างแบคทีเรียที่มีชีวิตกับเวลา

6. วิธีการทดลอง

6.1 การศึกษาปริมาณสารแกมมา-เอชซีเอชในตัวอย่างดิน

นำตัวอย่างดินที่เก็บจากบริเวณผิวดิน (ระดับความลึก 0 – 15 เซนติเมตร) ในพื้นที่แปลงเพาะปลูก ซึ่งเป็นดินที่มีประวัติการใช้สารกำจัดศัตรูพืช ที่ได้เตรียมไว้ตามขั้นตอนข้อ 1 มาสกัดและวิเคราะห์ปริมาณสารแกมมา-เอชซีเอชที่ตกค้างในตัวอย่างดิน ตามวิธีการวิเคราะห์ในข้อ 5.1 และข้อ 5.2

6.2 การคัดเลือกเชื้อที่สามารถเจริญและย่อยสลายสารแกมมา-เอชซีเอช

6.2.1 การคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียที่สามารถเจริญในอาหารที่เสริมด้วยสารแกมมา-เอชซีเอช โดยวิธี Selective enrichment method

นำตัวอย่างดิน 10 กรัม ใส่ลงในอาหาร MSYM ที่เสริมสารแกมมา-เอชซีเอช ความเข้มข้น 20 ส่วนในล้านส่วน (หรือ มิลลิกรัมต่อลิตร) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้อง (30 $\pm$ 2 องศาเซลเซียส) เขย่าที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 - 5 วัน จนสังเกตเห็นอาหารเลี้ยงเชื้อขุ่นเนื่องจากมีการเจริญของจุลินทรีย์ ถ่ายเชื้อที่บ่มปริมาณร้อยละ 10 ลงในอาหาร MSYM ที่เพิ่มความเข้มข้นของแกมมา-เอชซีเอชเป็น 50 ส่วนในล้านส่วน บ่มที่สภาวะเดิมเป็นเวลา 3 - 5 วัน หลังจากนั้นทำการถ่ายเชื้อเช่นเดียวกับข้างต้นลงในอาหาร MSYM ที่เพิ่มความเข้มข้นของสารแกมมา-เอชซีเอชเป็น 100, 150 และ 200 ส่วนในล้านส่วน ตามลำดับ ชุดควบคุมได้แก่อาหาร MSYM ที่ไม่ใส่ตัวอย่างดิน นำทุกตัวอย่างกลุ่มเชื้อที่สามารถเจริญที่ความเข้มข้นของสารแกมมา-เอชซีเอช 200 ส่วนในล้านส่วน มาแยกให้ได้โคโลนีเดี่ยวๆ โดยการ Spread plate บนอาหารแข็ง MSYM ที่ผสมสารแกมมา-เอชซีเอช 200 ส่วนในล้านส่วน เลือกโคโลนีที่มีลักษณะต่างๆ มาเขี่ย (Streak) ซ้ำ 3 - 5 ครั้ง เพื่อให้ได้เชื้อบริสุทธิ์ ทำการเก็บตัวอย่างเชื้อเดี่ยวและกลุ่มเชื้อ (ก่อนแยกให้ได้โคโลนีเดี่ยวๆ) โดยนำมาปั่นเหวี่ยงแล้วนำตะกอนเซลล์มากระจายกลับในอาหาร MSYM ที่เสริมสารแกมมา-เอชซีเอชความเข้มข้น 20 ส่วนในล้านส่วน ที่ผสมกลีเซอรอลร้อยละ 20 เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

6.2.2 การศึกษาการย่อยสลายสารแกมมา-เอชซีเอชโดยแบคทีเรียเดี่ยวจากกลุ่มเชื้อต่างๆ

นำเชื้อเดี่ยวที่คัดแยกไว้จากข้อ 6.2.1 มาเตรียมเป็นกล้าเชื้อ โดยเขี่ยเชื้อจากหลอดที่เก็บรักษาเชื้อ 1 ลูป ถ่ายลงในอาหารเหลว Nutrient broth (NB) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส จนมีค่าการดูดกลืนแสงประมาณ 0.5 ที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร เพื่อใช้เป็นเชื้อเริ่มต้น

ถ่ายเชื้อปริมาณร้อยละ 10 ลงในอาหารเหลว MSYM ที่เสริมสารแกมมา-เอชซีเอช ความเข้มข้น 200 ส่วนในล้านส่วน ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 4 วัน เก็บตัวอย่างทุก 12 ชั่วโมง เพื่อนำมาวิเคราะห์ปริมาณเซลล์โดยการหาปริมาณแบคทีเรียที่มีชีวิต ตามวิธีการวิเคราะห์ในข้อ 5.4 และวิเคราะห์หาปริมาณสารแกมมา-เอชซีเอชด้วยแก๊สโครมาโตกราฟฟี ตามวิธีการวิเคราะห์ในข้อ 5.1 และ 5.3 คัดเลือกเชื้อที่มีประสิทธิภาพมากที่สุดในการย่อยสลายสารแกมมา-เอชซีเอช โดยเปรียบเทียบจากร้อยละการย่อยสลายและการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย

ชุดควบคุมได้แก่ อาหาร MSYM ที่เสริมสารแกมมา-เอชซีเอช ความเข้มข้น 200 ส่วนในล้านส่วน แต่ไม่มีการเติมเชื้อลงไป ในแต่ละตัวอย่างจะทำการวิเคราะห์ 3 ซ้ำ เพื่อคำนวณหาค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

$$\text{อัตราการย่อยสลาย (ร้อยละ)} = \frac{A - B}{A} \times 100$$

A = ความเข้มข้นสารแกมมา-เอชซีเอชเริ่มต้นในอาหารเลี้ยงเชื้อ (ส่วนในล้านส่วน)

B = ความเข้มข้นสารแกมมา-เอชซีเอชที่เหลืออยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ (ส่วนในล้านส่วน)

6.2.3 การคัดเลือกกลุ่มเชื้อที่มีประสิทธิภาพสูงสุดในการย่อยสลายสารแกมมา-เอชซีเอช

นำกลุ่มเชื้อจากข้อ 6.2.1 มาเตรียมเป็นกล้าเชื้อตามขั้นตอนข้อ 6.2.2 ถ่ายเชื้อปริมาณร้อยละ 10 ลงในอาหารเหลว MSYM ที่เสริมสารแกมมา-เอชซีเอช ความเข้มข้น 200 ส่วนในล้านส่วน ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 4 วัน เก็บตัวอย่างทุก 12 ชั่วโมง นำมาวิเคราะห์ปริมาณเซลล์โดยการหาปริมาณแบคทีเรียที่มีชีวิต ตามวิธีการวิเคราะห์ในข้อ 5.4 และวิเคราะห์หาปริมาณสารแกมมา-เอชซีเอชด้วยแก๊สโครมาโตกราฟฟี ตามวิธีการวิเคราะห์ในข้อ 5.1 และ 5.3 คัดเลือกกลุ่มเชื้อที่มีประสิทธิภาพสูงสุดในการย่อยสลายสารแกมมา-เอชซีเอช โดยเปรียบเทียบจากร้อยละการย่อยสลายและการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย เพื่อนำไปศึกษาการย่อยสลายสารแกมมา-เอชซีเอชโดยแบคทีเรียเดี่ยวและผสม และเทียบเคียงชนิดของเชื้อแบคทีเรีย

ชุดควบคุมได้แก่ อาหาร MSYM ที่เสริมสารแกมมา-เอชซีเอช ความเข้มข้น 200 ส่วนในล้านส่วน แต่ไม่มีการเติมเชื้อลงไป ในแต่ละตัวอย่างจะทำการวิเคราะห์ 3 ซ้ำ เพื่อคำนวณหาค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

6.3 การศึกษาการย่อยสลายสารแกมมา-เอชซีเอชโดยแบคทีเรียเดี่ยวและผสม

6.3.1 การศึกษาการย่อยสลายสารแกมมา-เอชซีเอชโดยแบคทีเรียเดี่ยว

นำเชื้อเดี่ยวจากกลุ่มเชื้อที่แสดงคุณสมบัติการย่อยสลายสารแกมมา-เอชซีเอชที่ดีที่สุด (จากข้อ 6.2.3) มาเตรียมเป็นกล้าเชื้อตามขั้นตอนข้อ 6.2.2 ถ่ายเชื้อปริมาณร้อยละ 10 ลงในอาหารเหลว MSYM ที่เสริมสารแกมมา-เอชซีเอช ความเข้มข้น 200 ส่วนในล้านส่วน ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 4 วัน เก็บตัวอย่างทุก 12 ชั่วโมง นำมาวิเคราะห์ปริมาณเซลล์โดยการหาปริมาณแบคทีเรียที่มีชีวิต ตามวิธีการวิเคราะห์ในข้อ 5.4 และวิเคราะห์หาปริมาณสารแกมมา-เอชซีเอชด้วยแก๊สโครมาโตกราฟฟี ตามวิธีการวิเคราะห์ในข้อ 5.1 และ 5.3 เพื่อพิจารณาร้อยละการย่อยสลายสารแกมมา-เอชซีเอชและการเจริญของเชื้อ

ชุดควบคุมได้แก่ อาหาร MSYM ที่เสริมสารแกมมา-เอชซีเอช ความเข้มข้น 200 ส่วนในล้านส่วน แต่ไม่มีการเติมเชื้อลงไป ในแต่ละตัวอย่างจะทำการวิเคราะห์ 3 ซ้ำ เพื่อคำนวณหาค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

6.3.2 การศึกษาการย่อยสลายสารแกมมา-เอชซีเอชโดยแบคทีเรียผสม

นำเชื้อเดี่ยวจากกลุ่มเชื้อที่แสดงคุณสมบัติการย่อยสลายสารแกมมา-เอชซีเอชที่ดีที่สุด (จากข้อ 6.2.3) มาเตรียมเป็นกล้าเชื้อตามขั้นตอนข้อ 6.2.2 ทำการผสมกัน 2 สายพันธุ์ ในอัตราส่วน 1:1 (ปริมาตร/ปริมาตร) ถ่ายเชื้อ 10 มิลลิลิตร (ร้อยละ 10 ของปริมาตรที่ใช้ทดลอง) ลงในหลอด Centrifuge ขนาด 20 มิลลิลิตร นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที แยกเอาส่วนใสออก ล้างตะกอนเซลล์ด้วยอาหาร MSYM นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที แยกเอาส่วนใสออกอีกครั้ง กระจายเซลล์กลับในอาหาร MSYM ที่เสริมสารแกมมา-เอชซีเอช ความเข้มข้น 200 ส่วนในล้านส่วน ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 4 วัน เก็บตัวอย่างทุก 12 ชั่วโมง เพื่อนำมาวิเคราะห์ปริมาณเซลล์โดยการหาปริมาณแบคทีเรียที่มีชีวิต ตามวิธีการวิเคราะห์ในข้อ 5.4 และวิเคราะห์หาปริมาณสารแกมมา-เอชซีเอชด้วยแก๊สโครมาโตกราฟฟี ตามวิธีการวิเคราะห์ในข้อ 5.1 และ 5.3 เพื่อพิจารณาร้อยละการย่อยสลายสารแกมมา-เอชซีเอชและการเจริญของเชื้อ

ชุดควบคุมได้แก่ อาหาร MSYM ที่เสริมสารแกมมา-เอชซีเอช ความเข้มข้น 200 ส่วนในล้านส่วน มีการเติมกลุ่มเชื้อที่แสดงคุณสมบัติการย่อยสลายสารแกมมา-เอชซีเอชที่ดีที่สุด (จากข้อ 6.2.3) และที่ไม่เติมเชื้อ ในแต่ละตัวอย่างจะทำการวิเคราะห์ 3 ซ้ำ เพื่อคำนวณหาค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

สำหรับการศึกษาการย่อยสลายสารแกมมา-เอชซีเอชโดยแบคทีเรียผสม 3 และ 4 สายพันธุ์ ทำการเตรียมกล้าเชื้อตามขั้นตอนข้อ 6.2.2 ตามด้วยการผสมเชื้อแบคทีเรีย 3 และ 4 สายพันธุ์ ในอัตราส่วน 1:1:1 (ปริมาตร/ปริมาตร/ปริมาตร) และ 1:1:1:1 (ปริมาตร/ปริมาตร/ปริมาตร/ปริมาตร) ตามลำดับ โดยรวมแล้วปริมาณกล้าเชื้อคือร้อยละ 10 และเลี้ยงเชื้อตามขั้นตอนข้างต้น

6.4 การเทียบเคียงเชื้อแบคทีเรียที่ย่อยสลายสารแกมมา-เอชซีเอช

เตรียมเชื้อเริ่มต้นเช่นเดียวกับข้อ 2.2 จากนั้นนำไปเทียบเคียงชนิดของเชื้อ ดังนี้

6.4.1 การทดสอบทางสัณฐานวิทยา โดยการย้อมแกรม ดูรูปร่าง ขนาดและการเรียงตัวของเซลล์

6.4.2 ทดสอบทางชีวเคมี (ตามวิธีการของ Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (Krieg, 1984) และ ดวงพร คันธโชติ (2537))

การทดสอบเอนไซม์คาตาเลส (Catalase test) การผลิตอินโดล (Indole production test) การทดสอบ Methyl red test การทดสอบ VP (Voges-Proskauer test) การทดสอบการใช้ซิเตรท (Citrate utilization test) การทดสอบการสร้างก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ (Hydrogen sulfide production test) การทดสอบเอนไซม์ออกซิเดส (Oxidase test) การศึกษาความสามารถในการเคลื่อนที่ (Motility test) การทดสอบกระบวนการเปลี่ยนไนเตรท (Nitrate reduction) การทดสอบปฏิกิริยาออกซิเดชั่นและการหมัก (Oxidation-fermentation test)

6.4.3 การวิเคราะห์ลำดับเบสของ 16S rDNA

6.4.3.1 การสกัดดีเอ็นเอของเชื้อโดยวิธี Boiling/Freezing treatment (ดัดแปลงจาก Yamada *et al.*, 2002)

เขี่ยเชื้อจากหลอดที่เก็บรักษาเชื้อลงในอาหาร NB บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 - 24 ชั่วโมง ปิเปตเชื้อปริมาตร 1 มิลลิลิตรใส่ในหลอด Microcentrifuge นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ปิเปตส่วนใสออก ล้างเซลล์ด้วย TE buffer 2 ครั้ง ละลายกลับด้วย TE buffer ปริมาตร 300 ไมโครลิตร นำไปต้มที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส 10 นาที สลับกับการแช่น้ำแข็ง 5 นาที ทำซ้ำ 3 ครั้ง นำไปวิเคราะห์ด้วย Agarose gel electrophoresis จากนั้นทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค Polymerase chain reaction (PCR)

6.4.3.2 การทำ PCR เพื่อเพิ่มจำนวน 16S rDNA

ใช้ Primers 27F และ 1492R เพื่อเพิ่มจำนวน 16S rDNA (ตารางที่ 6) เติมสารสำหรับทำ PCR ดังนี้ 10xPCR buffer 5 ไมโครลิตร สารประกอบ dNTPs ความเข้มข้นชนิดละ 0.2 มิลลิโมลาร์ Primers 27F และ 1492R ชนิดละ 2 ไมโครโมลาร์ ตัวอย่างดีเอ็นเอที่สกัดได้ 10

ไมโครลิตร เอนไซม์ *Taq*DNA polymerase 2.5 Units และน้ำปราศจากอิออนที่ฆ่าเชื้อแล้วให้ได้ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ทำขั้นตอน Denaturation ครั้งแรกที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที จากนั้นทำ PCR 25 รอบ (อุณหภูมิที่ใช้ต่อรอบ: 94 องศาเซลเซียส 1 นาที, 50 องศาเซลเซียส 45 วินาที, และ 72 องศาเซลเซียส 2 นาที) ตามด้วยอุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นทำให้เย็นลงอย่างรวดเร็วที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นำชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ได้ไปวิเคราะห์โดย Agarose gel electrophoresis เพื่อวิเคราะห์หาขนาดโดยเปรียบเทียบกับ Molecular marker ซึ่งผลิตภัณฑ์ของ 16S rDNA ที่ได้มีขนาดประมาณ 1465 คู่เบส (base pairs, -bp)

นำตัวอย่างดีเอ็นเอที่เพิ่มจำนวนแล้วมาทำให้บริสุทธิ์ด้วย PCR purification kit (QIAGEN, Inc.) ก่อนส่งไปวิเคราะห์ลำดับเบสด้วยเครื่อง DNA sequencer (Macrogen, Inc.) เทียบเคียงข้อมูลของลำดับเบสที่ได้กับฐานข้อมูลใน GenBank (BLAST search ที่ http://www.ncbi.nlm.nih.gov/)

ตารางที่ 6 Primers ที่ใช้ในการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR และวิเคราะห์ลำดับเบสของ 16S rDNA

Table 6. Primers used during PCR and DNA sequencing of 16S rDNA.

Primer name	Sequence (5′-3′)	Tm (°C)
27F	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	60.4
1492R	ACGGCTACCTTGTTACGACTT	60.6

บทที่ 3

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. การวิเคราะห์ปริมาณสารแกมมา-เอชซีเอชในตัวอย่างดิน

จากการวิเคราะห์ปริมาณสารแกมมา-เอชซีเอชในตัวอย่างดินจากพื้นที่ทางการเกษตร ต. บางเหลียง อ. ควนเนียง จังหวัดสงขลา จำนวน 12 ตัวอย่าง พบปริมาณสารแกมมา-เอชซีเอชในระดับที่วัดได้ด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟฟีที่มีเครื่องตรวจวัดชนิด ^{63}Ni Micro electron capture detector (GC-μECD) เพียง 5 จาก 12 ตัวอย่าง (ประมาณร้อยละ 42) คือ 0.0 - 0.45 นาโนกรัมต่อกรัมดินน้ำหนักแห้ง (ตารางที่ 7) ซึ่งปริมาณดังกล่าวนั้นอยู่ในระดับที่ต่ำกว่าการตกค้างของสารกำจัดศัตรูพืชกลุ่มออร์แกโนคลอรีนชนิดพารา,พารา′-ดีดีที ที่พบได้ในทุกตัวอย่างดิน ตั้งแต่ 0.19 - 9.84 นาโนกรัมต่อกรัมดินน้ำหนักแห้ง (กนกนิษถ์ สอนคง, 2550) และต่ำกว่าปริมาณสารแกมมา-เอชซีเอชที่พบในตัวอย่างจากการสำรวจจากแหล่งดินเกษตรกรรมทั่วประเทศระหว่างปี พ.ศ. 250 - 251 ที่มีปริมาณเฉลี่ยในดินเท่ากับ 0.006 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (หรือ 6 นาโนกรัมต่อกรัมดิน) (ตารางที่ 2) (นวลศรี ทยาพัชร, 25 อ้างโดย ศุภมาศ พนิชศักดิ์พัฒนา, 2545)

ตัวอย่างดินที่ใช้ในการศึกษาทั้งหมดนี้ เก็บจากพื้นที่ทางการเกษตรที่มีประวัติการใช้สารกำจัดศัตรูพืชมานานกว่า 0 ปี แต่ไม่สามารถระบุชนิดของสารเคมีที่ใช้ได้ และด้วยเหตุที่พื้นที่นั้นมีการใช้สารกำจัดศัตรูพืชหลายชนิดและเป็นเวลานาน ไม่ได้ใช้เฉพาะเจาะจงแต่สารแกมมา-เอชซีเอชหรือพารา,พารา′-ดีดีที จึงทำให้จุลินทรีย์ประจำถิ่น (normal flora) ขาดการกระตุ้นการสร้างเอนไซม์ในการย่อยสลายสารจนนำไปสู่การตกค้างได้ (วินันท์ดา หิมะหมาน, 2541) ถึงแม้กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ จะได้ประกาศห้ามการนำเข้าสารแกมมา-เอชซีเอช และพารา,พารา′-ดีดีทีเพื่อกิจกรรมทางการเกษตรตั้งแต่ปี พ.ศ. 252 และ 25 7 ตามลำดับ แต่ในกรณีของสารพารา,พารา′-ดีดีที ยังมีการใช้ในด้านการสาธารณสุขเพื่อควบคุมไข้มาลาเรียจนกระทั่งปี พ.ศ. 2542 ในขณะที่สารกลุ่มเอชซีเอชยังถูกนำเข้ามาในรูปของลินเดน (Lindane) ซึ่งประกอบด้วยสารแกมมา-เอชซีเอชร้อยละ 90 ผสมกับ แอลฟา- เบต้า- และเดลต้า-เอชซีเอชในปริมาณที่เหลือ (กรมวิชาการเกษตร, 25 8 อ้างโดย บุญสิน จิตตะประพันธ์, 2541) นอกจากลินเดนจะถูกใช้ในแปลงเพาะปลูกพืชแล้ว Lindane 20% W/P C ยังใช้ในการป้องกันกำจัดปลวกและแมลงที่ทำลายลังบรรจุยางพาราในภาคใต้อีกด้วย จะเห็นได้ว่า สารกลุ่มนี้สามารถนำมาใช้งานได้อย่างกว้างขวาง ไม่จำกัดเฉพาะอาชีพ

ตารางที่ 7 ลักษณะดิน ปริมาณสารแกมมา-เอชซีเอช และสารพารา, พารา′-ดีดีทีในตัวอย่างดิน

Table 7. Texture, γ-HCH and *p*,*p*′-DDT concentration of soil samples.

Area	γ-HCH concentration (ng/g soil dry wt)[a]	*p*,*p*′-DDT concentration (ng/g soil dry wt)[b]	Soil texture[b]
Area 1 Cabbage Field	0.0	0.19	loam
Area 2 Broccoli Field	ND	0.80	loam
Area Broccoli Field	ND	0.52	loam
Area 4 Sediment from irrigation ditch	0.45	1.81	silty clay
Area 5 Water Spinach Field	0.08	0. 4	loam
Area 6 Broccoli Field	ND	0.84	loam
Area 7 Chilli Field	ND	6.27	loam
Area 8 Yu Choy Field	ND	0.95	loam
Area 9 Chinese Parsley Field	0.17	0.24	loam
Area 10 Broccoli Field	ND	9.84	laterite
Area 11 Chinese Kale/Broccoli Field	0.22	0.62	loam
Area 12 Lettuce Field	ND	0.79	laterite

Note: (a) ND (Non detectable; Limit of quantification = 0.01 ng/g)

(b) ข้อมูลปริมาณสารพารา, พารา′-ดีดีที จาก กนกนิษถ์ สอนคง (2550)

ใดอาชีพหนึ่ง สามารถใช้ในบ้านที่อยู่อาศัย ใช้ในการเกษตรกรรม และอุตสาหกรรม ดังนั้นจึงพบการปนเปื้อนได้ทั่วไปในสิ่งแวดล้อม

จากการศึกษาของ บุญเสริม เซ่งล่าย (2540) พบว่า สารแกมมา-เอชซีเอช และพารา, พารา′-ดีดีทีตกค้างสูงกว่าสารกำจัดศัตรูพืชกลุ่มออร์แกโนคลอรีนชนิดอื่นๆ ในน้ำและดินตะกอน บริเวณทะเลสาบสงขลาตอนนอก จังหวัดสงขลา ในการวิเคราะห์ปริมาณสารตกค้างครั้งนี้ พบว่าปริมาณการตกค้างของสารแกมมา-เอชซีเอชอยู่ในระดับที่ต่ำกว่าของสารพารา,พารา′-ดีดีที ซึ่งน่าจะมีสาเหตุจากการที่สารแกมมา-เอชซีเอช (การย่อยสลายร้อยละ 95 ในดินใช้เวลา 10 ปี) มีค่าความ

คงทนในสิ่งแวดล้อมต่ำกว่าสารพารา,พารา′-ดีดีที (การย่อยสลายร้อยละ 95 ในดินใช้เวลา 4 - 30 ปี) (Edward, 1977)

การหลงเหลือของสารตกค้างในสิ่งแวดล้อม มีปัจจัยที่เกี่ยวข้องหลายประการ เช่น โครงสร้างและคุณสมบัติของสาร สภาวะแวดล้อมที่ปนเปื้อน และจุลินทรีย์ประจำถิ่นที่สามารถย่อยสลายสารดังกล่าว ในกรณีของสารกำจัดศัตรูพืชกลุ่มออร์แกโนคลอรีนประเภทพารา,พารา′-ดีดีที และแกมมา-เอชซีเอช นั้น เป็นสารประกอบไฮโดรคาร์บอนชนิดวงแหวนที่มีอะตอมของคลอรีนแทนที่อยู่ มีค่าการละลายน้ำที่ต่ำ เช่น 7.90 ส่วนในล้านส่วน ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส สำหรับสารแกมมา-เอชซีเอช มีค่าสัมประสิทธิ์การดูดซับ (Adsorption partition coefficient, K_d) สูงถึง 24,000 และ 1100 สำหรับสารพารา,พารา′-ดีดีทีและแกมมา-เอชซีเอช ตามลำดับ (Brooks, 1974a; Fujimura and Katayama, 1997) ส่งผลให้สารทั้งสองละลายน้ำได้น้อยอีกทั้งยังสามารถดูดซับกับอนุภาคดินได้ดี ทำให้จุลินทรีย์ไม่สามารถเข้าถึงสารได้หรือเข้าถึงสารเพื่อย่อยสลายได้ยาก

นอกจากนั้นลักษณะและองค์ประกอบของดินที่มีการปนเปื้อน เช่น ดินทรายจะมีประสิทธิภาพในการชะออกของสารปนเปื้อนได้ดีกว่าดินประเภทอื่นๆ เนื่องจากน้ำซึมผ่านได้ง่ายกว่าและมีสารอินทรีย์ปริมาณน้อย ทำให้สารสามารถถูกชะด้วยน้ำได้มาก (Fujimura and Katayama, 1997) หรือในการศึกษาของ Sahu และคณะ (1992) ที่ศึกษาการย่อยสลายสารเอชซีเอชไอโซเมอร์ต่างๆ ในดินโคลนและดินร่วนที่ผสมสารเอชซีเอชเริ่มต้น 5 ไมโครกรัมต่อกรัมดินโดยเชื้อ *Pseudomonas* sp. พบว่า ในดินร่วนเชื้อสามารถย่อยสลายสารแอลฟา- และแกมมา-เอชซีเอช ได้ดีกว่าในดินโคลน โดยสามารถย่อยสลายสารเอชซีเอชทั้งสองไอโซเมอร์จนสมบูรณ์ในระยะเวลา 10 - 20 วัน

ในกรณีของตัวอย่างดินที่นำมาศึกษาครั้งนี้ พบว่า มีลักษณะของดินเหนียวผสมดินร่วนเล็กๆ และทราย (Loam และ Silty clay) เป็นหลัก ส่วนตัวอย่างที่เหลือเป็นดินแดงก้อนเล็กๆ ที่ผสมด้วยแร่เหล็กออกไซด์และอะลูมิเนียมไฮดรอกไซด์ (Laterite) เห็นได้ว่ามีการหลงเหลือของสารแกมมา-เอชซีเอชเฉพาะในตัวอย่างดินที่มีองค์ประกอบของดินเหนียวเป็นหลักเท่านั้น

ปัจจัยที่สำคัญและมีผลต่อการย่อยสลายสารตกค้างในดินอีกประการ ได้แก่ จำนวนจุลินทรีย์ประจำถิ่นและความสามารถในการย่อยสลายโดยจุลินทรีย์เหล่านั้น (Aislabie, 1997) ซึ่งปริมาณและชนิดของสารอาหารในดินจะนำไปสู่การเจริญของกลุ่มจุลินทรีย์ข้างต้น ดังนั้นจึงอาจกล่าวได้ว่า สภาวะและองค์ประกอบต่างๆ ได้นำมาสู่การตกค้างของสารพารา,พารา′-ดีดีทีและแกมมา-เอชซีเอชในตัวอย่างดินที่ศึกษา โดยเฉพาะสารพารา,พารา′-ดีดีทีในปริมาณที่สูงและพบได้มากกว่าสารแกมมา-เอชซีเอช

2. การคัดแยกเชื้อแบคทีเรียที่สามารถเจริญบนอาหารที่เสริมสารแกมมา-เอชซีเอช

การคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียจากตัวอย่างดินทั้ง 12 บริเวณ ด้วยวิธี Selective enrichment method ที่ใช้สารแกมมา-เอชซีเอชความเข้มข้นสูงถึง 200 ส่วนในล้านส่วน เป็นสารคัดเลือกนั้น พบการเจริญของเชื้อแบคทีเรียจากทุกตัวอย่างดิน โดยมีเชื้อแบคทีเรียที่มีความแตกต่างกันทางสัณฐานวิทยาทั้งสิ้น 5 ไอโซเลต (ตารางที่ 8) โดยในแต่ละกลุ่มเชื้อ (ตัวอย่างดินจาก 1 บริเวณ) จะคัดแยกแบคทีเรียได้ตั้งแต่ 2 - 4 สายพันธุ์ เมื่อวิเคราะห์ลักษณะโคโลนี ทดสอบการติดสีแกรม และศึกษาลักษณะเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่าเชื้อแบคทีเรียทั้ง 5 ไอโซเลต เป็นแบคทีเรียแกรมลบ มีลักษณะเซลล์เป็นรูปแท่ง หากแบ่งตามลักษณะของโคโลนีที่เจริญบนอาหารแข็ง MSYM ที่เสริมสารแกมมา-เอชซีเอช 200 ส่วนในล้านส่วน พบว่า เชื้อแบคทีเรียกลุ่มใหญ่มีลักษณะโคโลนีที่เป็นวงกลมนูน สีขาวขุ่น ขอบโคโลนีเรียบ และสร้างเมือก (ไอโซเลต 1/1, 4/1, 6/1, 7/1 และ 8/1) อีกกลุ่มมีลักษณะโคโลนีที่เป็น วงกลมนูน สีส้ม (ไอโซเลต 1/2, 2/2, 3/2, 5/2 และ 6/2) นอกจากนั้นมีไอโซเลตที่แสดงคุณลักษณะการสร้างเมือกถึง 11 จาก 15 ไอโซเลต ซึ่งคุณสมบัติดังกล่าวเป็นลักษณะที่พบได้ในเชื้อจุลินทรีย์ที่เจริญอยู่ในสภาวะแวดล้อมที่รุนแรง เช่น มีการปนเปื้อนของสารแปลกปลอมที่ความเข้มข้นสูงๆ เป็นต้น

จากรายงานการวิจัยหลายฉบับ พบว่า เชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายสารกำจัดศัตรูพืชกลุ่มออร์แกโนคลอรีนที่ความเข้มข้นสูงได้ เป็นเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ รูปแท่ง เป็นส่วนใหญ่ เช่นเดียวกับที่คัดแยกได้ในการศึกษาครั้งนี้ เช่น เชื้อ *Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Flavobacterium*, *Vibrio*, *Sphingobacterium spiritivorum*, *S. paucimobilis*, *Ochrobactrum anthropi*, และ *Bosea thiooxidans* เป็นต้น ซึ่งเมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียเหล่านี้ในสภาวะที่เหมาะสมแล้ว สามารถแสดงกิจกรรมการย่อยสลายสารแกมมา-เอชซีเอชที่ความเข้มข้นเริ่มต้นตั้งแต่ 25 - 180 ส่วนในล้านส่วน ได้กว่าร้อยละ 95 ในระยะเวลาไม่เกิน 4 วัน (Nawab *et al.*, 2003; Pesce and Wunderlin, 2004; Kumar *et al.*, 2006; Murthy and Manonmani, 2007)

ตารางที่ 8 สัณฐานวิทยาของแบคทีเรียที่คัดแยกได้จาก 12 กลุ่มเชื้อ เมื่อเลี้ยงบนอาหาร MSYM ที่เสริมสารแกมมา-เอชซีเอช 200 ส่วนในล้านส่วน (MSYM+HCH_{200})

Table 8. Morphological characteristics of bacterial isolates from 12 consortia grown on MSYM supplemented with 200 ppm HCH (MSYM+HCH_{200}).

Isolate	Colony morphology	Gram staining	Cell shape
1/1	White, large circular, opaque, convex, slime	negative	Rod
1/2	Off-White, small circular, smooth edge	negative	Rod
1/□	Orange, small circular, convex	negative	Rod
2/1	White, large circular, opaque, convex, slime	negative	Rod
2/2	Orange, circular, convex	negative	Rod
2/□	Yellowish, circular, translucent, smooth edge	negative	Rod
□/1	White, large circular, opaque, smooth edge, convex, slime	negative	Rod
□/2	Orange, circular, convex	negative	Rod
□/□	White, small circular, translucent, smooth edge	negative	Rod
4/1	White, large circular, opaque, smooth edge, convex, slime	negative	Rod
4/2	Off-White, small circular, smooth edge, flat, slime	negative	Rod
4/□	Yellowish, small circular, translucent, smooth edge, convex	negative	Rod
5/1	White, large circular, translucent, smooth edge, convex, slime	negative	Rod
5/2	Off-White, small circular, smooth edge, flat	negative	Rod
5/□	Orange, small circular, convex	negative	Rod
5/4	White, circular, translucent, smooth edge, flat	negative	Rod
6/1	White, large circular, opaque, smooth edge, convex, slime	negative	Rod
6/2	White, small circular, translucent, smooth edge, flat	negative	Rod
6/□	Orange, small circular, convex	negative	Rod
7/1	White, circular, opaque, smooth edge, convex, slime	negative	Rod
7/2	White, small circular, translucent, convex, slime	negative	Rod
7/□	Orange, small circular, smooth edge, convex	negative	Rod

ตารางที่ 8 (ต่อ)

Table 8. (Continued)

Isolate	Colony morphology	Gram staining	Cell shape
8/1	White, large circular, opaque, smooth edge, convex, slime	negative	Rod
8/2	White, small circular, translucent, flat	negative	Rod
8/□	Off-White, circular, smooth edge, convex	negative	Rod
9/1	White, circular, convex, opaque, slime	negative	Rod
9/2	Yellow, circular, smooth-edge, convex	negative	Rod
9/□	White, large circular, rough-edge, opaque	negative	Rod
9/4	Orange, small circular, translucent	negative	Rod
10/1	Yellow, small circular, smooth-edge, convex	negative	Rod
10/2	White, small circular, opaque, smooth edge, flat	negative	Rod
11/1	White, small circular, opaque, flat	negative	Rod
11/2	Off-White, circular, smooth edge	negative	Rod
12/1	White, small circular, opaque, smooth edge, flat	negative	Rod
12/2	Yellow, small circular, smooth-edge, convex	negative	Rod

3. การคัดเลือกกลุ่มเชื้อแบคทีเรียที่แสดงคุณสมบัติย่อยสลายสารแกมมา-เอชซีเอชสูงสุด

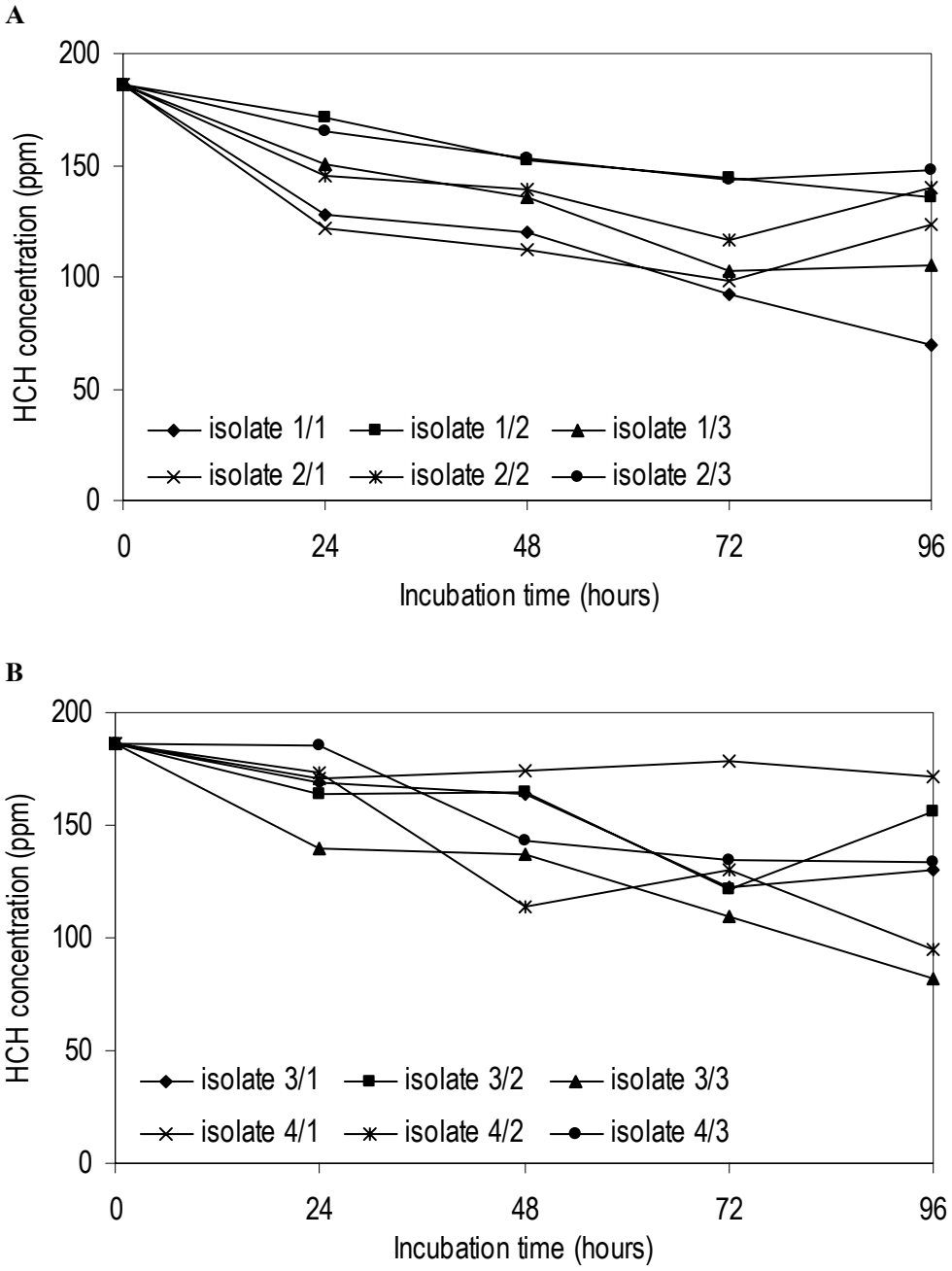
เมื่อนำเชื้อแบคทีเรียเดี่ยวทั้ง □5 สายพันธุ์ ที่คัดแยกได้จากกลุ่มเชื้อทั้ง 12 กลุ่ม มาทดสอบความสามารถในการย่อยสลายสารแกมมา-เอชซีเอช โดยเลี้ยงในอาหาร MSYM ที่เสริมสารแกมมา-เอชซีเอชความเข้มข้นเริ่มต้น 200 ส่วนในล้านส่วน บ่มที่อุณหภูมิ □0 องศาเซลเซียส ในสภาวะที่ให้อากาศ (เขย่าที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที) เป็นเวลา 96 ชั่วโมง พบว่า เชื้อแบคทีเรียทั้ง □5 สายพันธุ์ แสดงคุณสมบัติการย่อยสลายสารแกมมา-เอชซีเอชในช่วงร้อยละ 7.97 - 77.98 (ภาพที่ 8A - F; ตารางที่ 9) เชื้อแบคทีเรียส่วนใหญ่พบการสูญหายของสารแกมมา-เอชซีเอชได้ทันทีเมื่อเติมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งแสดงถึงการสะสมของสารภายในเซลล์ (Bioaccumulation) หรือการดูดจับสาร (Adsorption) ในขณะที่บางสายพันธุ์พบการสูญหายของสารหลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 24 - 48 ชั่วโมง (สายพันธุ์ 4/□,5/2, 5/□,8/1, 8/□,10/1, 11/1 และ 12/2) และ 48 - 72 ชั่วโมง (สายพันธุ์ 10/2) (ภาพที่8A - F)

สำหรับเชื้อแบคทีเรียที่พบการสูญหายของสารแกมมา-เอชซีเอชสูงสุด 5 อันดับแรก ได้แก่ สายพันธุ์ 6/1, 6/2, 9/1, 10/2 และ 10/2 ซึ่งสูญหายไปร้อยละ 77.98, 75.07, 7□.95, 65.7 และ 62.5□ ตามลำดับ ส่วนสายพันธุ์ที่พบการสูญหายของสลายต่ำสุด 5 อันดับ ได้แก่ สายพันธุ์ 12/1, □/2, 8/□, 5/1 และ 4/1 ซึ่งสูญหายเพียงร้อยละ 16.9, 16.1□, 14.82, 14.46 และ 7.97 ตามลำดับ (ตารางที่ 9)

เมื่อนำกลุ่มเชื้อแบคทีเรียทั้ง 12 กลุ่ม (Consortium) มาทดสอบความสามารถในการย่อยสลายสารแกมมา-เอชซีเอช โดยเลี้ยงเชื้อในอาหารและสภาวะเดียวกับการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียเดี่ยวข้างต้น พบว่า กลุ่มเชื้อต่างๆ แสดงการย่อยสลายสารแกมมา-เอชซีเอชได้ตั้งแต่ร้อยละ 42.2 - 97.6 ภายในเวลา 96 ชั่วโมง (ภาพที่ 10) ลักษณะการย่อยสลายสารแกมมา-เอชซีเอชแบ่งได้เป็น 2 แบบ คือ แบบที่เชื้อต้องมีการปรับตัว (Acclimatization) ก่อนการย่อยสลายจะเกิดขึ้น ซึ่งกลุ่มเชื้อแบคทีเรียที่มีลักษณะดังกล่าว ได้แก่ กลุ่มเชื้อแบคทีเรียที่ 1, 2, □และ 10 โดยการย่อยสลายสารเกิดตั้งแต่ชั่วโมงที่ 12 - □6 และดำเนินต่อจนถึงชั่วโมงที่ 48 - 60 ลักษณะการย่อยสลายสารอีกแบบนั้นเชื้อจะสามารถย่อยสลายสารได้ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 0 เป็นต้นไป จากการดูดจับหรือการสะสมของสารเข้าสู่เซลล์ โดยกลุ่มเชื้อแบคทีเรียที่ 4, 5, 8, 11 และ 12 การย่อยสลายจะสิ้นสุดในชั่วโมงที่ □6 - 60 และ กลุ่มแบคทีเรียที่ 6, 7 และ 9 นั้นการย่อยสลายจะดำเนินต่อจนถึงชั่วโมงที่ 96 (ภาพที่ 9A - B)

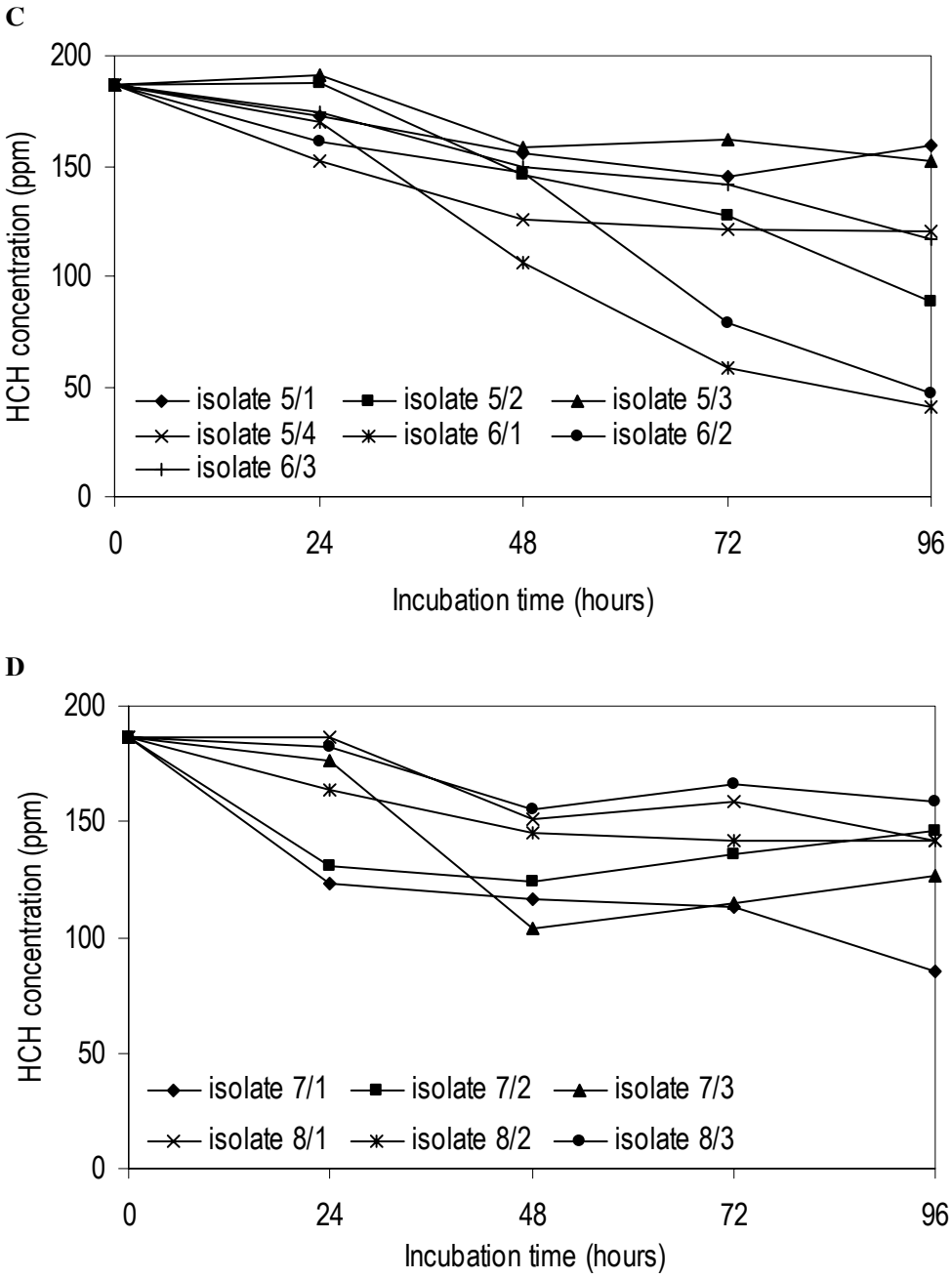
จากผลการย่อยสลายสารแกมมา-เอชซีเอชโดยกลุ่มเชื้อต่างๆ เห็นได้ว่า กลุ่มเชื้อแบคทีเรียที่ 9 สามารถย่อยสลายสารแกมมา-เอชซีเอชได้สูงสุดถึงร้อยละ 97.6 ในเวลา 96 ชั่วโมง ตามด้วยกลุ่มเชื้อแบคทีเรียที่ 1, 5, 7 และ 6 ที่ย่อยสลายสารแกมมา-เอชซีเอชได้ร้อยละ 84.□4, 78.□, 76.7 และ 75.7 ตามลำดับ ในขณะที่กลุ่มเชื้อแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายสารแกมมา-เอชซีเอชได้ต่ำสุด ได้แก่ กลุ่มเชื้อแบคทีเรียที่ 12, □และ 8 ที่ย่อยสลายสารแกมมา-เอชซีเอชได้เพียงร้อยละ 52.05, 51.8 และ 42.2 ตามลำดับ (ภาพที่ 10)

นอกจากนั้นยังสังเกตได้ว่า การลดลงของปริมาณสารแกมมา-เอชซีเอชในอาหารเลี้ยงเชื้อนั้นจะเกิดขึ้นพร้อมกับการเพิ่มของปริมาณเชื้อทั้งหมด ซึ่งแสดงว่ากลุ่มเชื้อแบคทีเรียที่ทำการศึกษาสามารถย่อยสลายสารแกมมา-เอชซีเอชเพื่อใช้เป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงานสำหรับการเจริญ เช่น การเจริญและการย่อยสลายสารแกมมา-เอชซีเอชโดยกลุ่มเชื้อแบคทีเรียที่ 9 (ภาพที่ 11) ที่พบว่าเมื่อเติมกล้าเชื้อลงในอาหาร MSYM ที่เสริมสารแกมมา-เอชซีเอชความเข้มข้นเริ่มต้น 200 ส่วนในล้านส่วน จะมีการเจริญทันทีอย่างรวดเร็วตั้งแต่ชั่วโมงที่ 0 จนถึงชั่วโมงที่ 24 จากนั้นอัตราการเจริญจะลดลงจนเข้าสู่ Stationary phase โดยกลุ่มเชื้อแบคทีเรียที่ 9 จะมีการเจริญสูงสุด (Log 8.□CFU/mL) ในชั่วโมงที่ 48 ซึ่งการเจริญนี้จะสอดคล้องกับการลดลงของปริมาณสารแกมมา-เอชซีเอช ที่มีอัตราการย่อยสลายอย่างรวดเร็วในเวลา □6 ชั่วโมงแรกของการเพาะเลี้ยงเชื้อ จากนั้นจะลดลงและมีระดับการย่อยสลายสารแกมมา-เอชซีเอชได้ร้อยละ 97.6 ภายในเวลา 96 ชั่วโมง (ภาพที่ 10)



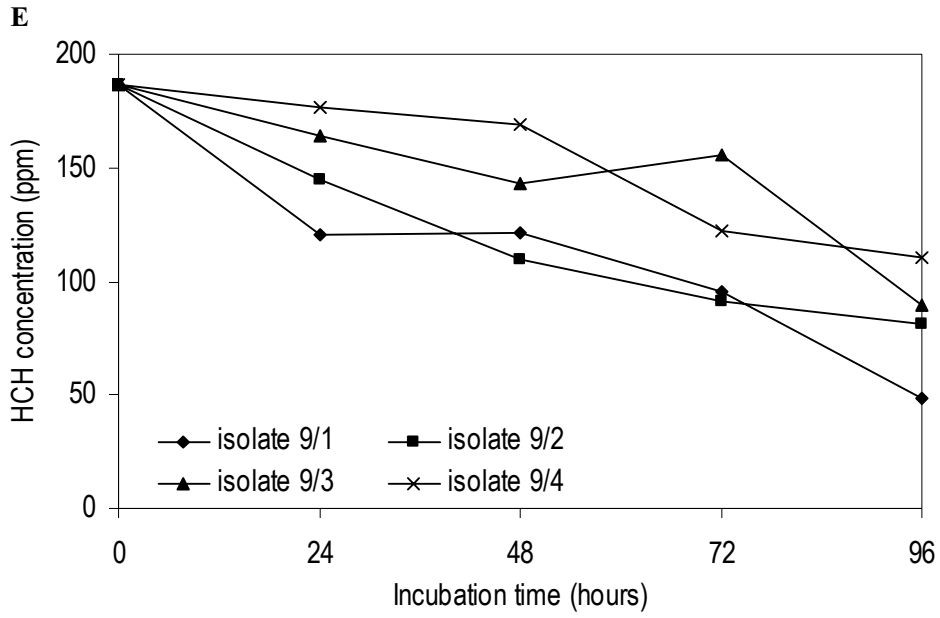
ภาพที่ 8 ปริมาณการย่อยสลายสารแกมมา-เอชซีเอชโดยเชื้อแบคทีเรียเดี่ยวเมื่อเลี้ยงในอาหาร MSYM+HCH_{200} ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่า 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 96 ชั่วโมง (A - F : ไอโซเลต 1/1 - 12/2)

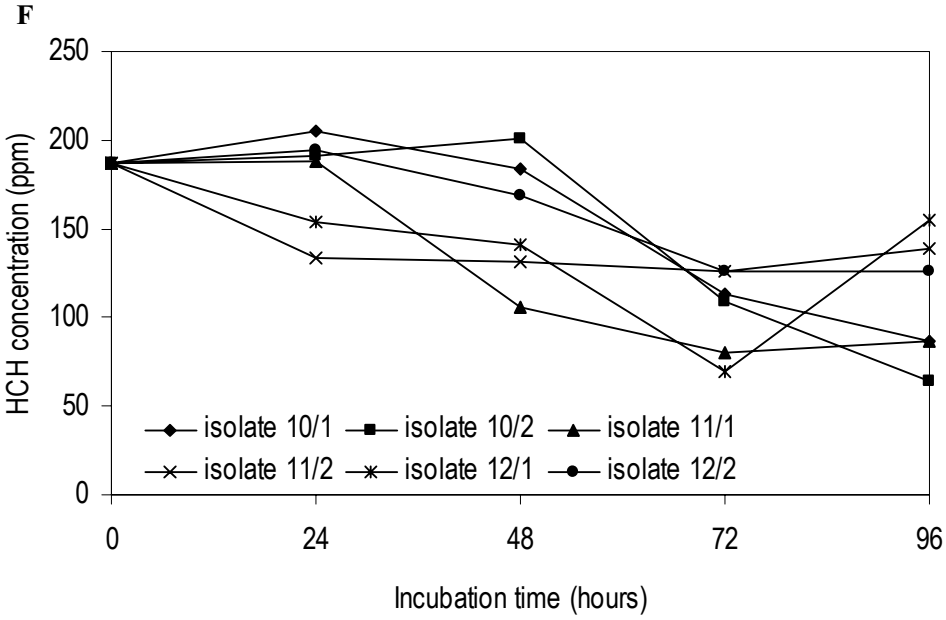
Figure 8. γ-HCH degradation profiles by individual bacterial isolate grown in MSYM+HCH_{200} and incubated at 30°C, 150 rpm for 96 hours. (A - F : Isolates 1/1 - 12/2)



ภาพที่ 8 (ต่อ)

Figure 8. (Continued)





ภาพที่ 8 (ต่อ)

Figure 8. (Continued)

ตารางที่ 9 ร้อยละการย่อยสลายสารแกมมา-เอชซีเอชโดยเชื้อแบคทีเรียเดี่ยว เมื่อเลี้ยงในอาหาร MSYM+HCH_{200} ที่อุณหภูมิ □0 องศาเซลเซียส เขย่า 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 96 ชั่วโมง

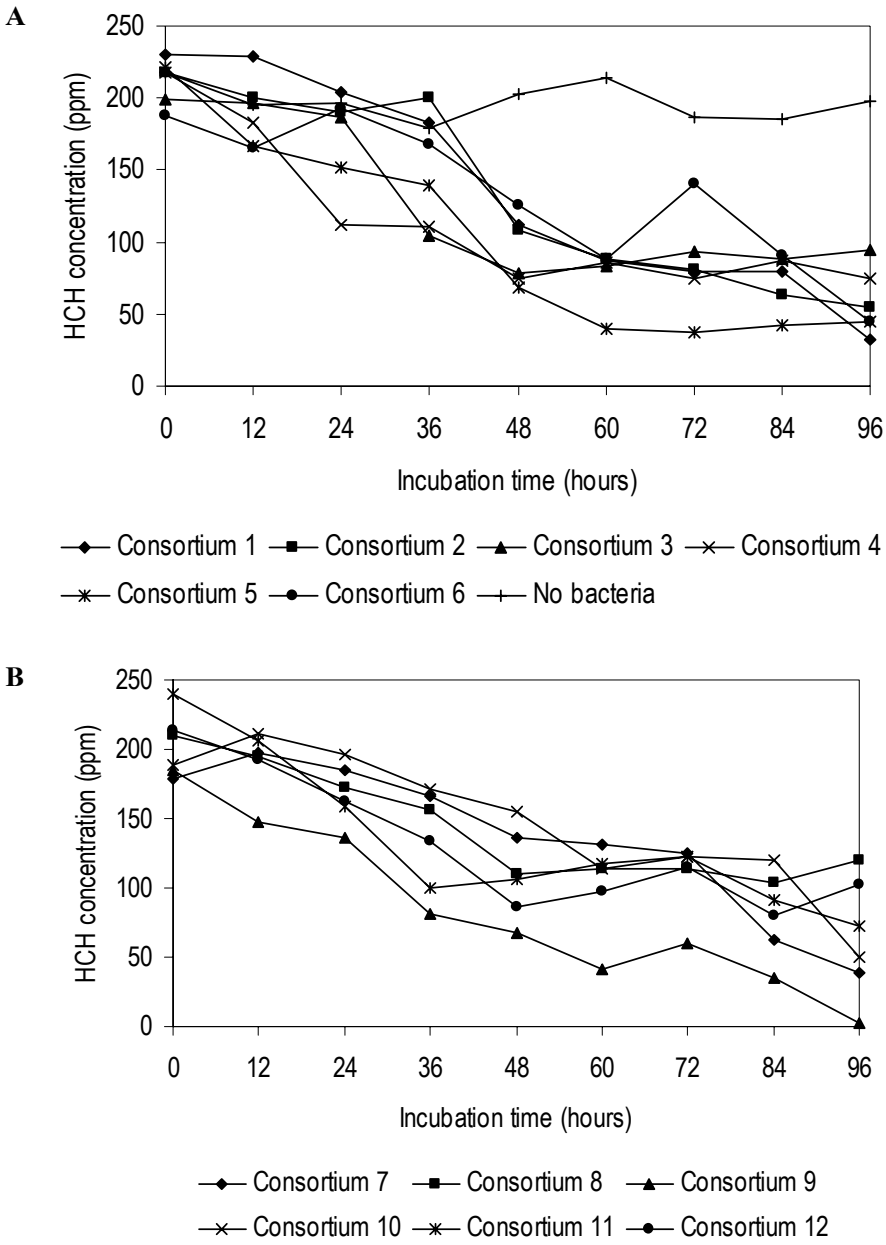
Table 9. Level of γ-HCH degradation by individual bacterial isolate grown in MSYM+HCH_{200} and incubated at □0°C, 150 rpm for 96 hours.

Isolates	γ-HCH disappearance (%)
Control (No bacteria)	9.0
1/1	62.5□
1/2	27.4□
1/□	4□.72
Consortium 1	85.78
2/1	□□.92
2/2	25.09
2/□	20.86
Consortium 2	75.01
□/1	□0.24
□/2	16.1□
□/□	56.17
Consortium □	52.69
4/1	7.97
4/2	49.□2
4/□	28.16
Consortium 4	65.65
5/1	14.46
5/2	52.40
5/□	18.25
5/4	□5.□7
Consortium 5	79.6□

ตารางที่ 9 (ต่อ)

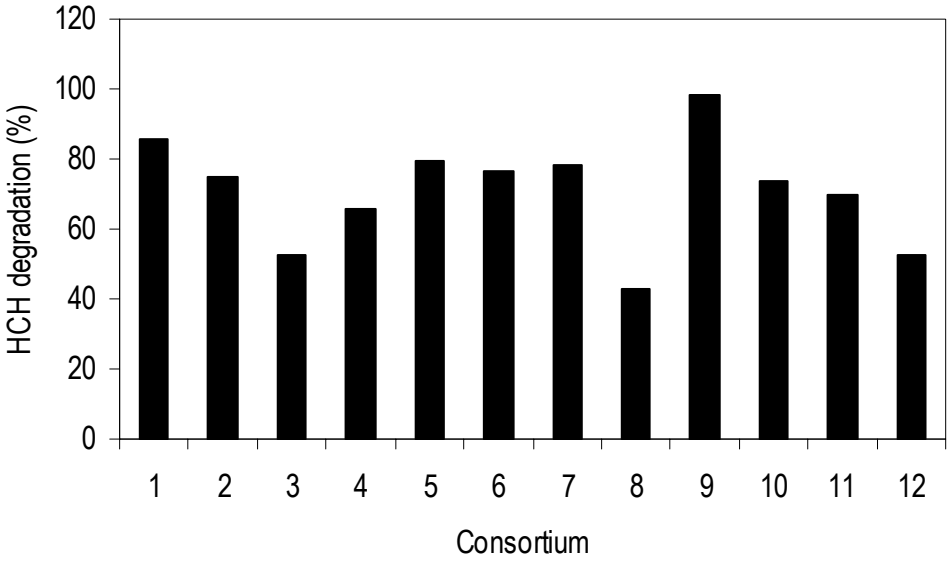
Table 9. (Continued)

Isolates	γ-HCH_{200} disappearance (%)
6/1	77.98
6/2	75.07
6/□	□7.1□
Consortium 6	76.□8
7/1	54.40
7/2	21.84
7/□	□2.12
Consortium 7	78.22
8/1	2□.9□
8/2	2□.82
8/□	14.82
Consortium 8	4□.0□
9/1	7□.95
9/2	56.66
9/□	52.00
9/4	40.74
Consortium 9	98.40
10/1	5□.72
10/2	65.70
Consortium 10	7□.81
11/1	5□.50
11/2	25.64
Consortium 11	69.94
12/1	16.90
12/2	□2.□2
Consortium 12	52.45



ภาพที่ 9 ปริมาณการย่อยสลายสารแกมมา-เอชซีเอชโดยกลุ่มเชื้อแบคทีเรีย เมื่อเลี้ยงในอาหาร MSYM+HCH_{200} ที่อุณหภูมิ □0 องศาเซลเซียส เขย่า 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 96 ชั่วโมง (A : กลุ่มเชื้อแบคทีเรียที่ 1 - 6; B : กลุ่มเชื้อแบคทีเรียที่ 7 - 12)

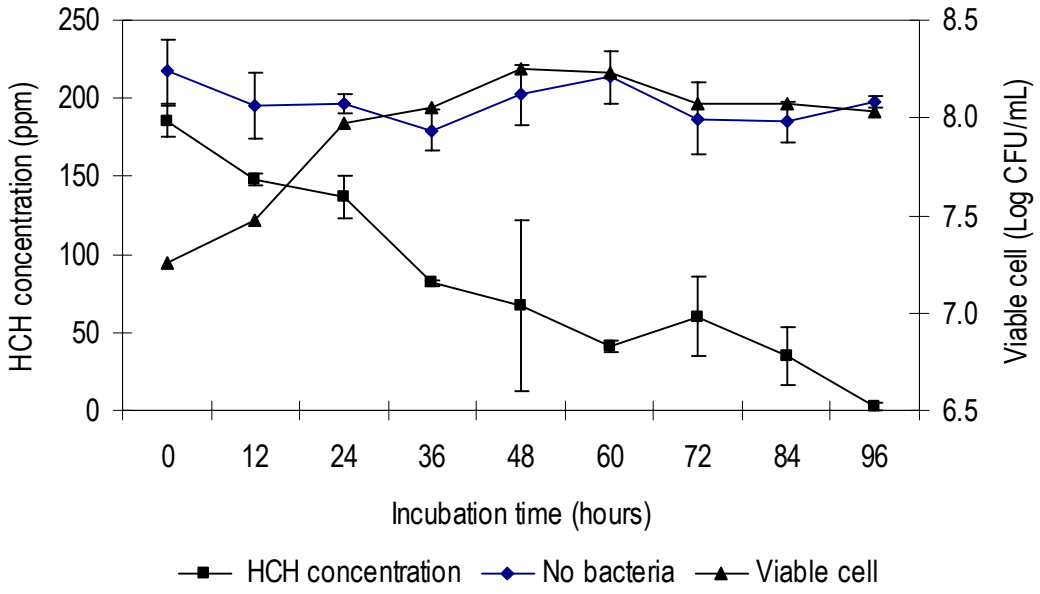
Figure 9. γ-HCH degradation profile by bacterial consortium grown in MSYM+HCH_{200} and incubated at □0°C, 150 rpm for 96 hours. (A : Consortium 1 - 6; B : Consortium 7 - 12)



ภาพที่ 10 ร้อยละการย่อยสลายสารแกมมา-เอชซีเอชโดยกลุ่มเชื้อแบคทีเรีย เมื่อเลี้ยงในอาหาร MSYM+HCH_{200} ที่อุณหภูมิ □0 องศาเซลเซียส เขย่า 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 96 ชั่วโมง (ชุดควบคุม = ไม่มีการเติมกล้าเชื้อ; มีร้อยละการย่อยสลายเท่ากับ 9)

Figure 10. Level of γ-HCH degradation by bacterial consortium grown in MSYM+HCH_{200} and incubated at □0°C, 150 rpm for 96 hours. (Control = No bacteria; Level of γ-HCH degradation = 9%)

ข้อสังเกตอีกประการ คือ การย่อยสลายสารแกมมา-เอชซีเอชโดยเชื้อแบคทีเรียเดี่ยวที่อยู่ในกลุ่มเชื้อเดียวกัน (same consortium) โดยส่วนใหญ่ให้อัตราการย่อยสลายสารที่ต่ำกว่าอัตราการย่อยสลายโดยกลุ่มเชื้อ เช่น กลุ่มเชื้อแบคทีเรียที่ 2 ที่ประกอบด้วยเชื้อเดี่ยวสายพันธุ์ 2/1 - 2/□สามารถย่อยสลายสารแกมมา-เอชซีเอชได้ร้อยละ 74.7 ในเวลา 96 ชั่วโมง ในขณะที่เชื้อเดี่ยวย่อยสลายสารได้เพียงร้อยละ □□.92, 25.09 และ 20.86 ตามลำดับ หรือกลุ่มเชื้อแบคทีเรียที่ 5 ที่ประกอบด้วยเชื้อเดี่ยวสายพันธุ์ 5/1 - 5/4 สามารถย่อยสลายสารแกมมา-เอชซีเอชได้ร้อยละ 78.□ในขณะที่เชื้อเดี่ยวย่อยสลายได้เพียงร้อยละ 14.46, 52.4, 18.25 และ □5.□7 ในเวลา 96 ชั่วโมง ตามลำดับ (ตารางที่ 9; ภาพที่ 10)



ภาพที่ 11 ปริมาณสารแกมมา-เอชซีเอชและการเจริญของกลุ่มแบคทีเรียที่ 9 เมื่อเลี้ยงในอาหาร MSYM+HCH_{200} ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่า 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 96 ชั่วโมง

Figure 11. Growth and γ-HCH degradation of bacterial consortium-9 cultivated in MSYM+HCH_{200} and incubated at 30°C, 150 rpm for 96 hours.

อีกรูปแบบของการย่อยสลายสารแกมมา-เอชซีเอชโดยเชื้อแบคทีเรียเดี่ยวที่อยู่ในกลุ่มเดียวกัน เป็นลักษณะที่ให้อัตราการย่อยสลายสารใกล้เคียงหรือสูงกว่าอัตราการย่อยสลายสารโดยกลุ่มเชื้อเล็กน้อย เช่น กลุ่มเชื้อแบคทีเรียที่ 9 ที่ประกอบด้วยเชื้อเดี่ยวสายพันธุ์ 9/1 - 9/9 สามารถย่อยสลายสารแกมมา-เอชซีเอชร้อยละ 51.8 ขณะที่เชื้อเดี่ยวย่อยสลายสารร้อยละ 50.24, 16.19 และ 56.17 ในเวลา 96 ชั่วโมง ตามลำดับ หรือกลุ่มเชื้อแบคทีเรียที่ 6 ที่ประกอบด้วยเชื้อเดี่ยว 6/1 - 6/3 ย่อยสลายสารแกมมา-เอชซีเอชร้อยละ 75.7 ขณะที่เชื้อเดี่ยวย่อยสลายสารร้อยละ 77.98, 75.07 และ 37.19 ในเวลา 96 ชั่วโมง ตามลำดับ (ตารางที่ 9; ภาพที่ 10)

จะเห็นได้ว่า ในรูปแบบแรกซึ่งเป็นรูปแบบหลักที่พบนั้น เชื้อแบคทีเรียเดี่ยวในกลุ่มเชื้อมีแนวโน้มที่จะมีการทำงานแบบพึ่งพาอาศัยกัน เกื้อหนุนกัน หรืออาจอยู่ร่วมกันในลักษณะอื่นๆ ที่เป็นประโยชน์ขึ้นอยู่กับชนิดของเชื้อแบคทีเรียเดี่ยวที่อยู่ในกลุ่มนั้น ที่เป็นเช่นนี้เพราะการศึกษาครั้งนี้ได้คัดเลือกเชื้อแบคทีเรียจากแหล่งเดียวกัน ดังนั้นเชื้อแบคทีเรียต่างๆ ในกลุ่มจึงมีการปรับตัวให้คงเหลือไว้เฉพาะเชื้อที่สามารถอยู่รอดหรือเจริญในสภาวะที่คัดเลือก

รูปแบบที่สองที่พบในการย่อยสลายสารแกมมา-เอชซีเอช (ถึงแม้จะเป็นส่วนน้อย เพียง 2 จาก 12 กลุ่มเชื้อที่ศึกษา ได้แก่ กลุ่มเชื้อแบคทีเรียที่ และ 6) คือ ลักษณะของการที่อัตราการย่อยสลายโดยเชื้อเดี่ยวกับกลุ่มเชื้อนั้นไม่แตกต่างกันมากหรือต่ำกว่าเล็กน้อยโดยกลุ่มเชื้อ ซึ่งลักษณะเช่นนี้อาจเกิดจากการที่เชื้อเดี่ยวต่างๆ ในกลุ่มไม่ได้ทำงานช่วยเหลือซึ่งกันและกัน หรือผลจากการย่อยสลายสารโดยเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์หนึ่ง ไม่มีส่วนในการย่อยสลายสารโดยเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์อื่นๆ ในกลุ่ม เป็นต้น

รูปแบบที่สามที่พบได้ในการย่อยสลายสารคือ ลักษณะที่อัตราการย่อยสลายโดยกลุ่มเชื้อลดลงเมื่อเทียบกับอัตราการย่อยสลายของเชื้อเดี่ยวในกลุ่มนั้น เนื่องจากผลของการเจริญหรือการย่อยสลายสารของเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์หนึ่ง มีผลยับยั้งการเจริญหรือกิจกรรมการย่อยสลายสารของเชื้ออื่นๆ ในกลุ่ม อย่างไรก็ตาม ยังไม่สามารถระบุได้ชัดจากผลเบื้องต้นในการศึกษาครั้งนี้

การทำงานของเชื้อเดี่ยวแต่ละสายพันธุ์ในกลุ่มเชื้อเพื่อให้เกิดการย่อยสลายสาร โดยมีรูปแบบที่ส่งเสริมซึ่งกันและกัน มีลักษณะของกลไกภายในกลุ่มเชื้อที่สามารถอธิบายได้สามแบบ คือ สายพันธุ์หนึ่งสามารถใช้สารตกค้างที่ก่อมลพิษนั้นแล้วทำให้เกิดสารตัวกลาง (Intermediate) ให้สายพันธุ์ที่สองใช้สารตัวกลางนั้น หรือผลิตวิตามินบี กรดอะมิโน และ growth factors อื่นๆ ให้แก่สายพันธุ์ต่างๆ ที่อยู่ในสิ่งแวดล้อมนั้น หรือสายพันธุ์หนึ่งเปลี่ยนรูป/ย่อยสลายสารก่อมลพิษ ทำให้เกิดผลิตภัณฑ์ที่เชื้อสายพันธุ์ที่สองสามารถใช้ได้ (Cometabolization) เช่น การเปลี่ยนรูปของสารโพลีคลอริเนตไบฟีนิล (Polychlorinated biphenyl; PCB) โดยปราศจากการสะสมของ Chlorinated aromatic product เนื่องจากแบคทีเรียสายพันธุ์แรกเปลี่ยน PCB ไปเป็น Chlorine-containing benzoates ต่อจากนั้นสายพันธุ์อื่นๆ จะทำการย่อยสลายสารต่อ ซึ่งกลไกแบบหลังนี้จะแตกต่างจากกลไกแบบแรกคือ เชื้อสายพันธุ์แรกใช้สารนั้นสำหรับการเจริญหรือเพียงแค่เปลี่ยนรูปเท่านั้น

ลักษณะการย่อยสลายสารที่กล่าวมาข้างต้น สามารถพบได้กับสารไฮโดรคาร์บอนประเภทอื่นๆ เช่น สารเพนตะคลอโรฟีนอล (Pentachlorophenol; PCP) สารฟีแนนทรีน (Phenanthrene) และสารอะทราซีน (Atrazine) ในการย่อยสลายสารเพนตะคลอโรฟีนอลโดยเชื้อ *Pseudomonas* sp., *Agrobacterium radiobacter* และ *Flavobacterium gleum* พบว่า เชื้อ *Pseudomonas* sp. มีผลยับยั้งกิจกรรมการย่อยสลายสารเพนตะคลอโรฟีนอลของเชื้อ *Agrobacterium radiobacter* และ *Flavobacterium gleum* แต่เมื่อเลี้ยงเชื้อทั้งสามร่วมกันแบบเชื้อผสม พบว่า อัตราการย่อยสลายสารเพนตะคลอโรฟีนอลสูงสุด (Yu and Ward, 1996) การย่อยสลายสารฟีแนนทีนโดยจุลินทรีย์ผสม 6 สายพันธุ์ มีอัตราการย่อยสลายอย่างสมบูรณ์ที่เร็วกว่าโดยจุลินทรีย์เดี่ยว (Yuan *et al.*, 2000) และการย่อยสลายสารอะทราซีนโดยเชื้อแบคทีเรียผสมของ *Nocardia*, *Sphingomonas*, *Agrobacterium*, *Variovorax*, *Caulobacter*, *Pseudomonas*, *Flavobacterium* และ *Rhizobium* พบว่า เชื้อ *Nocardia*

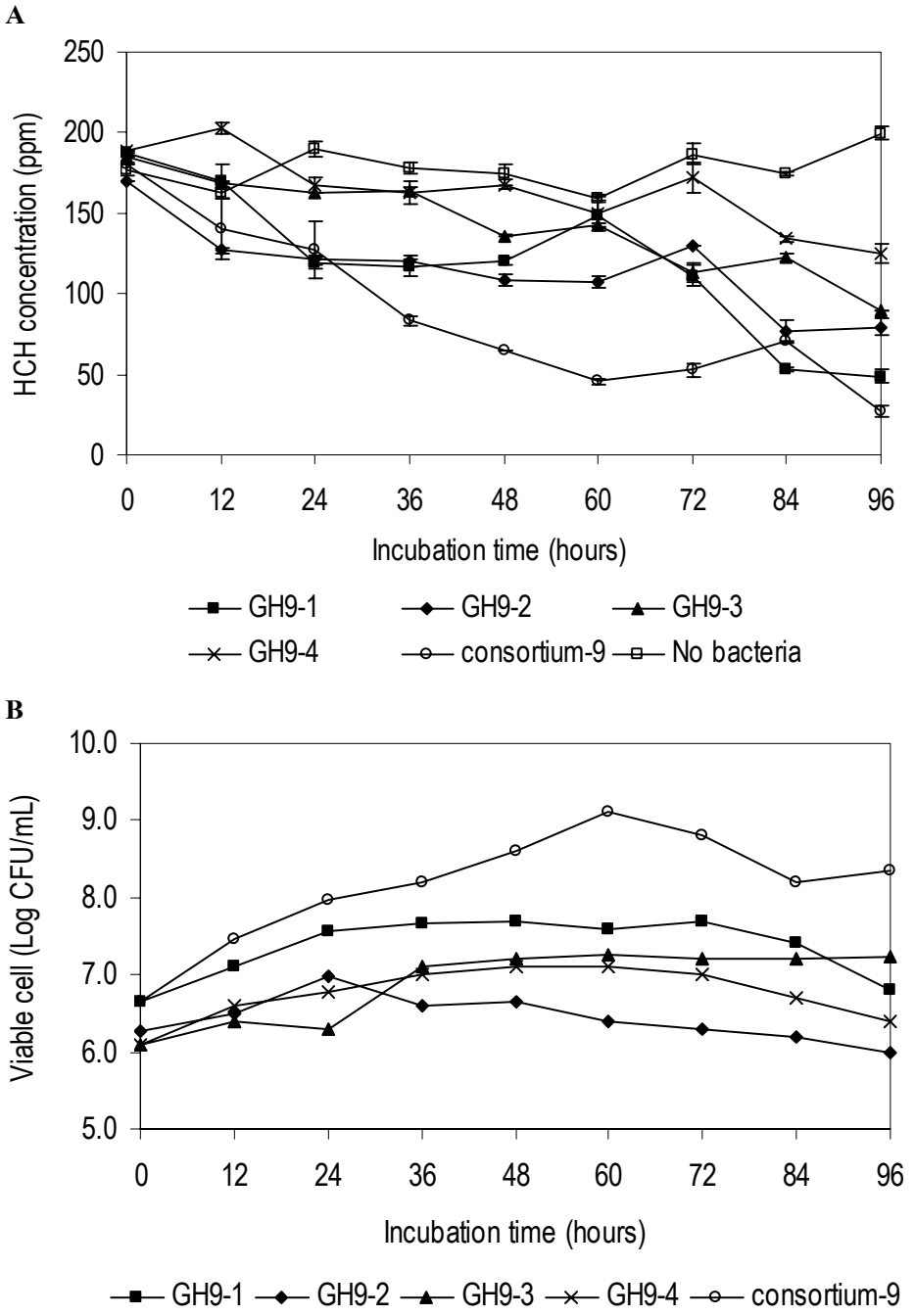
เป็นเชื้อสายพันธุ์เดียวที่สามารถย่อยสลายสารอะทราซีนโดยใช้อะทราซีนเป็นสารตั้งต้นได้ ทำให้เชื้อสายพันธุ์อื่นสามารถย่อยสลายสารตัวกลางที่เกิดจากการย่อยสลายอะทราซีนต่อไป (Smith *et al.*, 2005) แสดงว่า สภาวะการเลี้ยงเชื้อแบบต่างๆ ดังกล่าวสามารถนำไปสู่การเจริญและย่อยสลายสารที่เหมาะสม

เมื่อพิจารณาผลการย่อยสลายสารแกมมา-เอชซีเอชความเข้มข้นเริ่มต้น 200 ส่วนในล้านส่วนโดยเชื้อแบคทีเรียเดี่ยวสายพันธุ์ต่างๆ คู่กับผลการย่อยสลายโดยกลุ่มเชื้อ พบว่า กลุ่มเชื้อแบคทีเรียที่ 9 ซึ่งแยกจากตัวอย่างดินที่ตรวจพบการปนเปื้อนของสารแกมมา-เอชซีเอชเท่ากับ 0.17 นาโนกรัมต่อกรัมดินน้ำหนักแห้ง (ตารางที่ 7) ประกอบด้วยเชื้อเดี่ยว 4 สายพันธุ์ มีอัตราการย่อยสลายสูงสุด (การย่อยสลายร้อยละ 97.6) กลุ่มเชื้อแสดงการเจริญและย่อยสลายสารทันทีตั้งแต่ชั่วโมงที่ 0 และสามารถย่อยสลายสารแกมมา-เอชซีเอชได้มากกว่าร้อยละ 75 ในเวลาเพียง 60 ชั่วโมง นอกจากนี้เชื้อแบคทีเรียเดี่ยวสายพันธุ์ 9/1 - 9/4 ยังมีการย่อยสลายสารแกมมา-เอชซีเอชได้ตั้งแต่ร้อยละ 40.74 - 7□.95 ซึ่งแสดงถึงแนวโน้มที่เชื้อทั้งสี่สายพันธุ์มีการทำงานร่วมกันในกิจกรรมการย่อยสลายสารแกมมา-เอชซีเอชในสภาวะกลุ่มเชื้อหรือเชื้อผสม จึงทำให้ผลของการย่อยสลายสารของกลุ่มเชื้อสูงกว่าเชื้อเดี่ยว สำหรับการศึกษาเปรียบเทียบการย่อยสลายสารแกมมา-เอชซีเอชระหว่างกลุ่มเชื้อ เชื้อเดี่ยว และเชื้อผสม จึงได้เลือกกลุ่มเชื้อที่ 9 และเชื้อแบคทีเรียเดี่ยวในกลุ่มดังกล่าวเพื่อศึกษาต่อไป นอกจากนี้ ได้เรียกเชื้อสายพันธุ์ที่ 9/1, 9/2, 9/□และ 9/4 เป็น GH9-1 (หรือ Hex1), GH9-2 (หรือ Hex2), GH9-□(หรือ Hex□) และ GH9-4 (หรือ Hex4) ตามลำดับ เพื่อให้สอดคล้องกับความสามารถของเชื้อที่สามารถย่อยสลายสารแกมมา-เอชซีเอช (Gamma-hexachlorocyclohexane; γ-HCH)ได้สูงสุด

□. การศึกษาการย่อยสลายสารแกมมา-เอชซีเอชโดยกลุ่มเชื้อแบคทีเรีย เชื้อเดี่ยว และเชื้อผสม

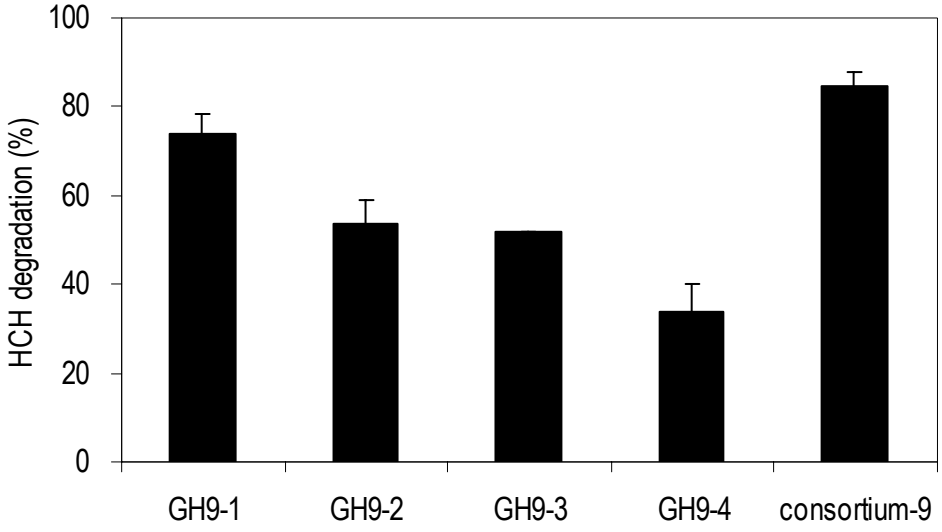
□.1 การย่อยสลายสารแกมมา-เอชซีเอชโดยกลุ่มเชื้อแบคทีเรียที่ □และเชื้อเดี่ยว

เมื่อนำกลุ่มเชื้อแบคทีเรียที่ 9 (Consortium-9) พร้อมทั้งเชื้อเดี่ยว GH9-1, GH9-2, GH9-□ และ GH9-4 มาเลี้ยงในอาหาร MSYM ที่เสริมสารแกมมา-เอชซีเอช 200 ส่วนในล้านส่วน บ่มที่อุณหภูมิ □0 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 96 ชั่วโมง พบว่า กลุ่มเชื้อที่ 9 เชื้อสายพันธุ์ GH9-1, GH9-2 และ GH9-4 มีการเจริญทันทีโดยไม่มีระยะการพักตัวของเชื้อ (Lag phase) พร้อมทั้งเข้าสู่ Stationary phase ในชั่วโมงที่ 60, 24, 24 และ 48 ตามลำดับ ในขณะที่เชื้อสายพันธุ์ GH9-□จะมีระยะการพักตัวใน 24 ชั่วโมงแรก หลังจากนั้นเชื้อจะมีการเจริญอย่างรวดเร็วในช่วงเวลา 12 ชั่วโมง และเข้าสู่ Stationary phase ในชั่วโมงที่ □6 (ภาพที่ 12B) ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Murthy และ Manonmani (2007) ที่ศึกษาการย่อยสลายสารแกมมา-เอชซีเอชโดยกลุ่ม



ภาพที่ 12 ปริมาณการย่อยสลายสารแกมมา-เอชซีเอช (A) และการเจริญ (B) ของเชื้อแบคทีเรียเดี่ยวและกลุ่มเชื้อที่ 9 เมื่อเลี้ยงในอาหาร MSYM+HCH_{200} ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่า 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 96 ชั่วโมง

Figure 12. γ-HCH degradation (A) and growth (B) profiles of individual bacterial isolate and bacterial consortium-9 grown in MSYM+HCH_{200} and incubated at 30°C, 150 rpm for 96 hours.



ภาพที่ 1 ร้อยละการย่อยสลายสารแกมมา-เอชซีเอชโดยแบคทีเรียเดี่ยวสายพันธุ์ GH9-1 ถึง GH9-4 และกลุ่มเชื้อที่ 9 เมื่อเลี้ยงในอาหาร MSYM+HCH_{200} ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่า 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 96 ชั่วโมง

Figure 1. Level of γ-HCH degradation by isolate GH9-1 to GH9-4 and bacterial consortium-9 grown in MSYM+HCH_{200} and incubated at 30°C, 150 rpm for 96 hours.

เชื้อจุลินทรีย์ 10 สายพันธุ์ และพบการย่อยสลายสารได้ทันทีหลังจากการเติมกล้าเชื้อโดยที่ไม่มีระยะพักตัว ซึ่งกลุ่มเชื้อดังกล่าวสามารถย่อยสลายสารได้กว่าร้อยละ 95 ภายในเวลา 24 ชั่วโมง

เมื่อพิจารณาการย่อยสลายสารแกมมา-เอชซีเอชโดยกลุ่มเชื้อแบคทีเรียที่ 9 เชื้อสายพันธุ์ GH9-1, GH9-2, GH9-3 และ GH9-4 พบว่า มีลักษณะการย่อยสลายสารแกมมา-เอชซีเอชที่แตกต่างกัน กลุ่มเชื้อที่ 9 เชื้อสายพันธุ์ GH9-1, GH9-2, และ GH9-3 มีการย่อยสลายสารทันทีที่เติมกล้าเชื้อ ในขณะที่เชื้อสายพันธุ์ GH9-4 เริ่มมีกิจกรรมการย่อยสลายสารที่ชัดเจนตั้งแต่ชั่วโมงที่ 12 เป็นต้นไป (ภาพที่ 12A) มีข้อสังเกตว่ากิจกรรมการย่อยสลายสารโดยเชื้อสายพันธุ์ GH9-1 และGH9-2 จะเกิดขึ้นทันทีตั้งแต่ชั่วโมงที่ 0 แต่จะมีค่าลดลงหรือคงที่ในชั่วโมงที่ 12 - 60 จากนั้นจะเพิ่มขึ้นอีกครั้งตั้งแต่ชั่วโมงที่ 60 - 84 ในขณะที่กิจกรรมการย่อยสลายสารโดยเชื้อสายพันธุ์ GH9-3 จะเกิดขึ้นในอัตราที่สม่ำเสมอตลอดระยะเวลาการทดลอง

จากผลการทดลองนี้ เห็นได้ว่า กิจกรรมการย่อยสลายสารแกมมา-เอชซีเอชโดยเชื้อแบคทีเรียที่ศึกษาเกิดขึ้นควบคู่ไปกับการเจริญของเชื้อ อย่างไรก็ตามปริมาณการย่อยสลายจะไม่สัมพันธ์กับปริมาณของเชื้อ กลุ่มเชื้อแบคทีเรียที่ 9 มีปริมาณเชื้อสูงที่สุดและมีการย่อยสลายสูงสุดร้อยละ 84.57 ในเวลา 96 ชั่วโมง ในขณะที่เชื้อแบคทีเรียเดี่ยวสายพันธุ์ GH9-1, GH9-2, GH9-3 และ GH9-4

ซึ่งมีปริมาณของเชื้อสูงสุดใกล้เคียงกัน (ยกเว้นเชื้อ GH9-1 ที่มีปริมาณเชื้อเริ่มต้นมากกว่าเชื้อสายพันธุ์อื่นประมาณครึ่ง log CFU/ml (ภาพที่ 12)) พบการย่อยสลายสูงสุดที่แตกต่างกัน คือร้อยละ 7□.□,5□.□,51.6 และ □□.9 ในเวลา 96 ชั่วโมง ตามลำดับ (ภาพที่ 1□)

การที่ความสามารถในการย่อยสลายสารแกมมา-เอชซีเอชโดยกลุ่มเชื้อแบคทีเรียที่ 9 สูงกว่าการย่อยสลายโดยเชื้อแบคทีเรียเดี่ยวๆ ในกลุ่มนั้น อาจจะมาจากการที่ในกลุ่มเชื้อมีเชื้ออยู่หลายสายพันธุ์จึงสามารถผลิตเอนไซม์ต่างๆ ที่มีส่วนในการย่อยสลายสารตั้งต้นและสารตัวกลางที่เกิดขึ้น ส่งผลให้สามารถย่อยสลายสารได้เร็วและย่อยสลายได้อย่างสมบูรณ์ อีกทั้งการมีเชื้อหลายสายพันธุ์ยังช่วยลดการเกิดการยับยั้งโดยสารตัวกลาง (Metabolite inhibition) ที่อาจเกิดในบางกระบวนการเมื่อจุลินทรีย์ชนิดแรกเข้าย่อยสลายสารจะทำให้เกิดสารตัวกลาง ซึ่งมีผลไปยับยั้งการเจริญหรือการย่อยสลายสารโดยจุลินทรีย์ชนิดอื่น แต่ถ้าใช้กลุ่มจุลินทรีย์ในการย่อยสลายสารจะมีจุลินทรีย์หลากหลายชนิดที่จะเข้ามาดำเนินปฏิกิริยาต่อ การย่อยสลายสารนั้นก็จะทำให้ไม่มีผลกระทบเกิดขึ้นและส่งผลให้การย่อยสลายสารดำเนินต่อไปได้

จากผลการย่อยสลายสารแกมมา-เอชซีเอชโดยกลุ่มเชื้อแบคทีเรียที่แสดงถึงอัตราการย่อยสลายที่สูงกว่าการใช้เชื้อแบคทีเรียเดี่ยว ดังนั้นในการศึกษาขั้นต่อไปจะศึกษาผลของเชื้อสายพันธุ์ต่างๆ ต่อการย่อยสลายสารแกมมา-เอชซีเอช โดยจะใช้เชื้อแบคทีเรียผสม 2, □และ 4 สายพันธุ์

□.2 การย่อยสลายสารแกมมา-เอชซีเอชโดยเชื้อแบคทีเรียผสม 2 สายพันธุ์

เมื่อเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียผสม 2 สายพันธุ์ในอาหาร MSYM ที่เสริมสารแกมมา-เอชซีเอช 200 ส่วนในล้านส่วน บ่มที่อุณหภูมิ □0 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 96 ชั่วโมง พบว่า การเจริญของเชื้อผสมระหว่างสายพันธุ์ GH9-2 กับ GH9-4 [Mix(2+4)] มีระยะการพักตัวของเชื้อที่ 24 ชั่วโมงแรก ในขณะที่กลุ่มเชื้อที่ 9 และเชื้อแบคทีเรียผสมสายพันธุ์อื่นๆ จะมีการเจริญทันทีเมื่อเติมกล้าเชื้อโดยที่ไม่มีระยะการพักตัว นอกจากนั้นเชื้อทั้งหมดจะเข้าสู่ Stationary phase ของการเจริญตั้งแต่ชั่วโมงที่ 48 เป็นต้นไป (ภาพที่ 14B)

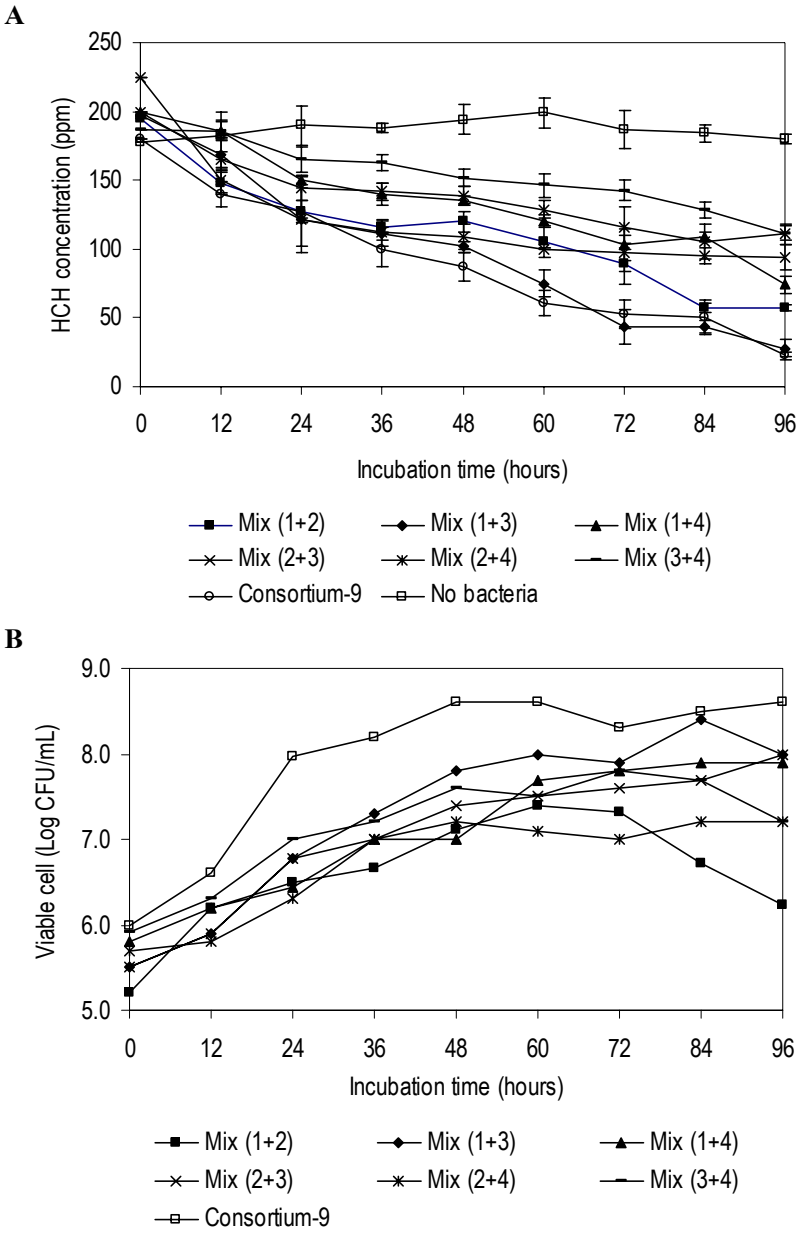
ลักษณะของการย่อยสลายสารแกมมา-เอชซีเอชโดยเชื้อแบคทีเรียผสม 2 สายพันธุ์ต่างๆ มีความคล้ายคลึงกับการย่อยสลายสารโดยกลุ่มเชื้อ นั่นคือ กิจกรรมการย่อยสลายสารเกิดทันที ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 0 และจะมีการย่อยสลายสารตลอดระยะเวลาของการทดลอง (ภาพที่ 14A) เมื่อพิจารณาผลการย่อยสลายสารโดยเชื้อผสม 2 สายพันธุ์ พบว่า เชื้อผสมระหว่างสายพันธุ์ GH9-1 กับ GH9-□ [Mix(1+□)] มีร้อยละการย่อยสลายสารแกมมา-เอชซีเอชที่สูงสุด และไม่แตกต่างจากของกลุ่มเชื้อที่ 9 คือ ร้อยละ 85.6 และ 85 ในเวลา 96 ชั่วโมง ตามลำดับ ส่วนเชื้อผสมระหว่างสายพันธุ์ GH9-1 กับ GH9-2 [Mix(1+2)], GH9-1 กับ GH9-4 [Mix(1+4)], GH9-2 กับ GH9-□[Mix(2+□)], GH9-2 กับ

GH9-4 [Mix(2+4)] และ GH9-□กับ GH9-4 [Mix(□+4)] มีร้อยละการย่อยสลายสารแกมมา-เอชซีเอชที่ 70, 6□,57.8, 44 และ 41.2 ตามลำดับ (ภาพที่ 15)

เมื่อนำผลการย่อยสลายสารแกมมา-เอชซีเอชโดยเชื้อแบคทีเรียเดี่ยว (ผลการทดลองตอนที่ 4.1) มาพิจารณาร่วมกัน เห็นได้ว่า ถึงแม้เชื้อเดี่ยวสายพันธุ์ GH9-2 และ GH9-□มีระดับการย่อยสลายสารแกมมา-เอชซีเอชที่ใกล้เคียงกัน คือ ร้อยละ 5□.□และ 51.6 ในเวลา 96 ชั่วโมง ตามลำดับ แต่เมื่อทำการเลี้ยงเชื้อผสมระหว่างสายพันธุ์ GH9-1 กับ GH9-2 [Mix(1+2)] และ GH9-1 กับ GH9-□ [Mix(1+□)] ได้ระดับการย่อยสลายสารที่แตกต่างกัน คือ ร้อยละ 70 และ 85.6 ในเวลา 96 ชั่วโมง ตามลำดับ ลักษณะเช่นนี้น่าจะเกิดจากการที่เชื้อสายพันธุ์ GH9-□ มีกิจกรรมการย่อยสลายสารแกมมา-เอชซีเอชหรือการเจริญเติบโตที่เสริมการย่อยสลายสารโดยเชื้อสายพันธุ์ GH9-1 ในขณะที่เชื้อสายพันธุ์ GH9-2 นั้นไม่มีคุณลักษณะดังกล่าว (เนื่องจากระดับการย่อยสลายสารแกมมา-เอชซีเอชโดยเชื้อสายพันธุ์ GH9-1 อยู่ที่ร้อยละ 7□.□ในเวลา 96 ชั่วโมง)

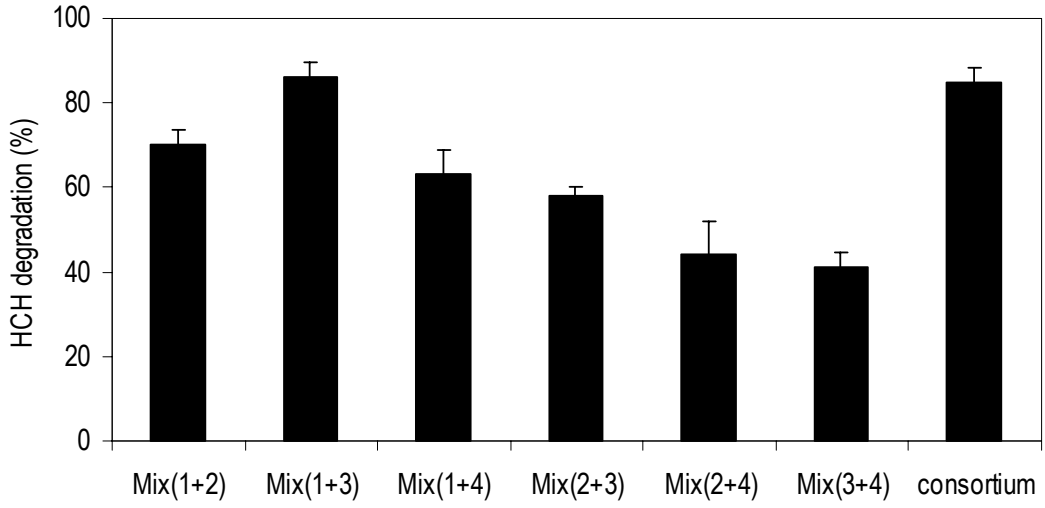
อีกประเด็นที่น่าสนใจได้แก่กรณีของเชื้อเดี่ยวสายพันธุ์ GH9-4 ที่มีระดับการย่อยสลายสารแกมมา-เอชซีเอชอยู่ที่ร้อยละ □□.9 ในเวลา 96 ชั่วโมง (ภาพที่ 1□)เมื่อนำเชื้อสายพันธุ์ GH9-4 เลี้ยงผสมกับเชื้อสายพันธุ์อื่นๆ พบว่า การย่อยสลายสารแกมมา-เอชซีเอชโดยเชื้อผสม 2 สายพันธุ์ต่างๆ มีระดับการย่อยสลายสารที่ลดลง (เชื้อผสมระหว่างสายพันธุ์ GH9-1 กับ GH9-4 [Mix(1+4)], GH9-2 กับ GH9-4 [Mix(2+4)] และ GH9-□กับ GH9-4 [Mix(□+4)] มีร้อยละการย่อยสลายสารแกมมา-เอชซีเอชที่ 6□, 44 และ 41.2 ตามลำดับ) เมื่อเทียบกับเชื้อเดี่ยวเท่านั้น (เชื้อเดี่ยวสายพันธุ์ GH9-1, GH9-2 และ GH9-□มีระดับการย่อยสลายสารแกมมา-เอชซีเอชที่ร้อยละ 7□.□, 5□.□ และ 51.6 ตามลำดับ) หรือกลุ่มเชื้อแบคทีเรียที่ 9 (การย่อยสลายสารแกมมา-เอชซีเอชที่ร้อยละ 85) ซึ่งอาจมีสาเหตุจากการที่กิจกรรมต่างๆ ของเชื้อนั้นส่งผลให้กิจกรรมการย่อยสลายสารแกมมา-เอชซีเอชหรือการเจริญของเชื้อสายพันธุ์อื่นลดน้อยลง

ลักษณะที่กล่าวมาข้างต้นสามารถพบได้ในการย่อยสลายสารประกอบคลอริเนตไฮโดรคาร์บอนอื่นๆ เช่น การย่อยสลายสารเพนตะคลอโรฟีนอล (PCP) ความเข้มข้นเริ่มต้น 100 ส่วนในล้านส่วน โดยเชื้อแบคทีเรีย *Pseudomonas* sp., *Agrobacterium radiobacter* และ *Flavobacterium gleum* พบว่า เชื้อผสม 2 สายพันธุ์ที่มีเชื้อ *Pseudomonas* sp. เป็นองค์ประกอบให้ผลการย่อยสลายสารที่ต่ำกว่า (ร้อยละ 20 ต่อ □0) หรือเท่ากับ (ร้อยละ 50 ต่อ 50) เมื่อใช้เชื้อเดี่ยว แสดงว่าการเจริญและ/หรือการย่อยสลายสารโดยเชื้อ *Pseudomonas* sp. มีผลทั้งในแง่ส่งเสริมและยับยั้งกิจกรรมการย่อยสลายสารโดยเชื้ออื่นๆ (Yu and Ward, 1996) ซึ่งอาจเป็นสาเหตุเดียวกับในกรณีของเชื้อสายพันธุ์ GH9-4 ที่มีต่อเชื้อสายพันธุ์อื่นๆ ในกลุ่มเชื้อแบคทีเรียที่ 9



ภาพที่ 14 ปริมาณการย่อยสลายสารแกมมา-เอชซีเอช (A) และการเจริญ (B) ของเชื้อแบคทีเรียผสม 2 สายพันธุ์และกลุ่มเชื้อที่ 9 เมื่อเลี้ยงในอาหาร MSYM+HCH_{200} ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่า 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 96 ชั่วโมง (1, 2, 3 และ 4 ได้แก่ GH9-1, GH9-2, GH9-3 และ GH9-4 ตามลำดับ)

Figure 14. γ-HCH degradation (A) and growth profiles (B) profiles of mixed culture (two isolates) and bacterial consortium-9 grown in MSYM+HCH_{200} and incubated at 30°C, 150 rpm for 96 hours. (1, 2, 3 and 4 are GH9-1, GH9-2, GH9-3 and GH9-4, respectively)

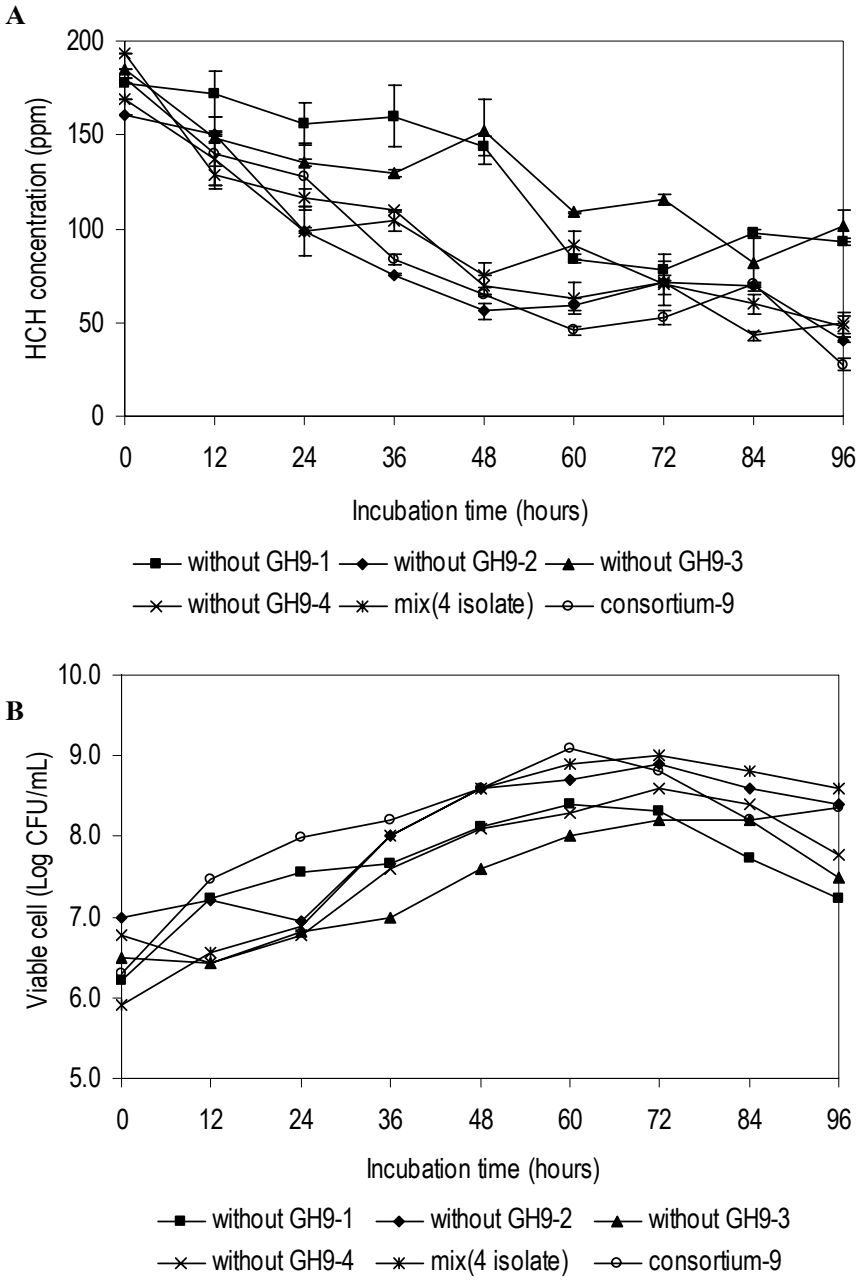


ภาพที่ 15 ร้อยละการย่อยสลายสารแกมมา-เอชซีเอชโดยแบคทีเรียผสม 2 สายพันธุ์และกลุ่มเชื้อที่ 9 เมื่อเลี้ยงในอาหาร MSYM+HCH_{200} ที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส เขย่า 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 96 ชั่วโมง (1, 2, และ 4 ได้แก่ GH9-1, GH9-2, GH9- และ GH9-4 ตามลำดับ)

Figure 15. Level of γ-HCH degradation by mixed culture (two isolates) and bacterial consortium-9 grown in MSYM+HCH_{200} and incubated at 0°C, 150 rpm for 96 hours. (1, 2, and 4 are GH9-1, GH9-2, GH9- and GH9-4, respectively)

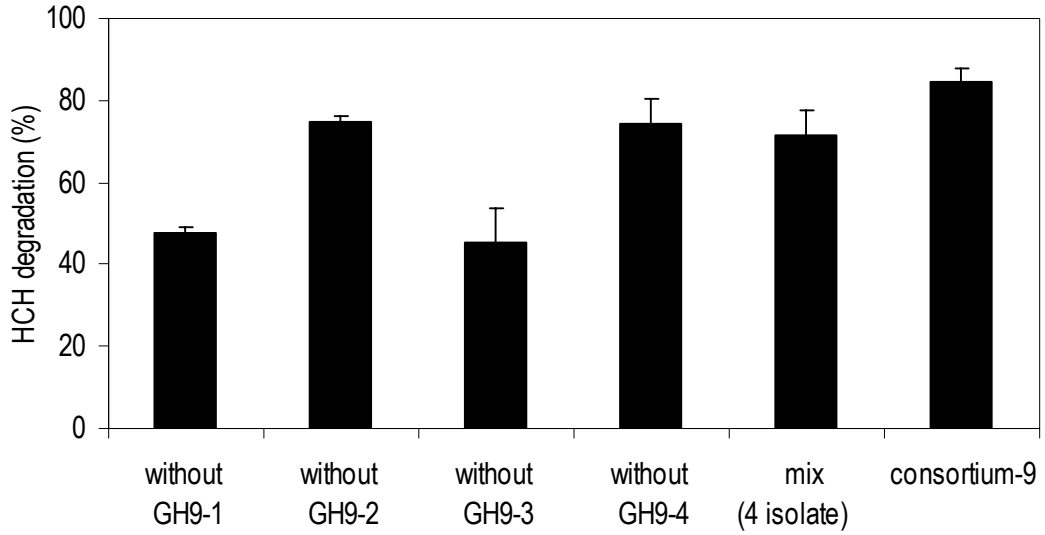
.3 การย่อยสลายสารแกมมา-เอชซีเอชโดยเชื้อแบคทีเรียผสม 3 และ สายพันธุ์

เมื่อทำการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียผสม และ 4 สายพันธุ์ในอาหาร MSYM ที่เสริมสารแกมมา-เอชซีเอช 200 ส่วนในล้านส่วน บ่มที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 96 ชั่วโมง พบว่า การเจริญของกลุ่มเชื้อแบคทีเรียที่ 9 เชื้อผสม 4 สายพันธุ์ และเชื้อผสม สายพันธุ์ที่ไม่เติมเชื้อสายพันธุ์ GH9-1 จะมีการเจริญทันที โดยที่ไม่มีระยะการพักตัวของเชื้อ ซึ่งกลุ่มเชื้อแบคทีเรียที่ 9 จะมีการเจริญสูงสุดเท่ากับ Log 9.1 CFU/ml ในขณะที่เชื้อแบคทีเรียผสม สายพันธุ์ที่ไม่เติมเชื้อ GH9-2, GH9- และ GH9-4 จะมีระยะการพักตัวที่ 24 ชั่วโมงแรก หลังจากนั้นเชื้อจึงมีการเจริญเข้าสู่ระยะ Stationary phase ต่อไป โดยมีการเจริญสูงสุดอยู่ในช่วง Log 8.2 - 8.9 CFU/ml (ภาพที่ 16B)



ภาพที่ 16 ปริมาณการย่อยสลายสารแกมมา-เอชซีเอช (A) และการเจริญ (B) ของเชื้อแบคทีเรียผสม □ และ 4 สายพันธุ์ และกลุ่มเชื้อที่ 9 เมื่อเลี้ยงในอาหาร MSYM+HCH_{200} ที่อุณหภูมิ □0 องศาเซลเซียส เขย่า 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 96 ชั่วโมง

Figure 16. γ-HCH degradation (A) and growth profiles (B) of mixed culture (three isolates and four isolates) and bacterial consortium-9 grown in MSYM+HCH_{200} and incubated at □0°C, 150 rpm for 96 hours.



ภาพที่ 17 ร้อยละการย่อยสลายสารแกมมา-เอชซีเอชโดยแบคทีเรียผสม และ 4 สายพันธุ์และกลุ่มเชื้อที่ 9 เมื่อเลี้ยงในอาหาร MSYM+HCH_{200} ที่อุณหภูมิ องศาเซลเซียส เขย่า 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 96 ชั่วโมง

Figure 17. Level of γ-HCH degradation by mixed culture (three isolates and four isolates) and bacterial consortium-9 grown in MSYM+HCH_{200} and incubated at °C, 150 rpm for 96 hours.

ลักษณะการย่อยสลายสารแกมมา-เอชซีเอชโดยเชื้อแบคทีเรียผสม และ 4 สายพันธุ์ จะมีลักษณะคล้ายกับที่เกิดโดยเชื้อแบคทีเรียผสม 2 สายพันธุ์ กลุ่มเชื้อแบคทีเรียที่ 9 เชื้อแบคทีเรียเดี่ยว สายพันธุ์ GH9-1, GH9-2 และ GH9- นั้นคือ การย่อยสลายสารเกิดขึ้นทันทีเมื่อมีการเติมกล้าเชื้อ (ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 0) (ภาพที่ 16A) ระดับการย่อยสลายสารแกมมา-เอชซีเอชที่สูงที่สุดนั้นเกิดโดยกลุ่มเชื้อแบคทีเรียที่ 9 ที่ร้อยละ 8 .7 ในเวลา 96 ชั่วโมง สำหรับเชื้อแบคทีเรียผสม 4 และ สายพันธุ์ที่ไม่เติมเชื้อ GH9-1, GH9-2, GH9- และ GH9-4 แสดงระดับการย่อยสลายสารแกมมา-เอชซีเอชได้ร้อยละ 71.1, 47.2, 7 .8, 44.5 และ 7 .4 ในเวลา 96 ชั่วโมง ตามลำดับ (ภาพที่ 17)

หากพิจารณาผลการย่อยสลายสารแกมมา-เอชซีเอชโดยเชื้อแบคทีเรียเดี่ยวและผสม 2 สายพันธุ์ (ผลการทดลองตอนที่ 4.1 และ 4.2) ควบคู่กัน พบว่า เมื่อเชื้อแบคทีเรียเดี่ยวสายพันธุ์ GH9-1 ซึ่งสามารถย่อยสลายสารได้สูงสุดร้อยละ 7 . เป็นองค์ประกอบในเชื้อผสม 2 สายพันธุ์ ทำให้ระดับการย่อยสลายสารอยู่ที่ร้อยละ 70 - 85.6 [Mix(1+2) และ Mix(1+)] และในกรณีของเชื้อผสม สายพันธุ์ที่ไม่มีเชื้อสายพันธุ์ GH9-1 เป็นองค์ประกอบ มีระดับการย่อยสลายสารเหลือเพียงร้อยละ

47.2 แสดงว่ากิจกรรมการย่อยสลายสารแกมมา-เอชซีเอชของกลุ่มเชื้อแบคทีเรียที่ 9 นี้ อาจมาจากกิจกรรมการทำงานของสายพันธุ์ GH9-1 เป็นหลัก โดยการสร้างสารตัวกลางที่ส่งเสริมการเจริญและ/หรือการย่อยสลายสารของเชื้อสายพันธุ์อื่นๆ หรือสร้างสารตัวกลางที่ลดความเป็นพิษของสารปนเปื้อนตั้งต้นซึ่งง่ายต่อการย่อยสลายต่อไปโดยเชื้อสายพันธุ์อื่นๆ เป็นต้น

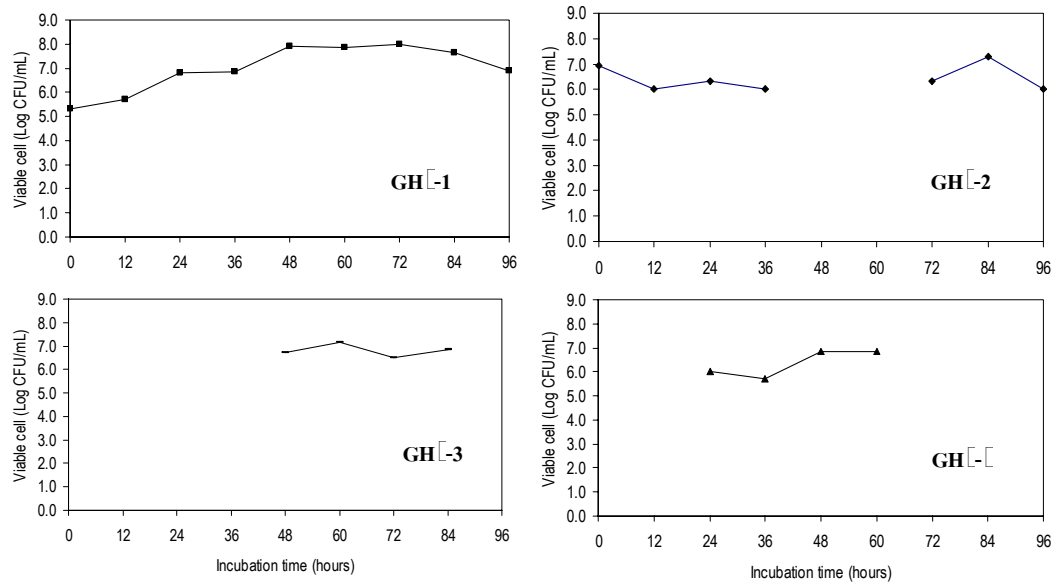
สำหรับเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ GH9-2 และ GH9-□ที่สามารถย่อยสลายสารแกมมา-เอชซีเอชที่ใกล้เคียงกันร้อยละ 5□.□□ และ 51.6 ตามลำดับนั้น ให้ผลการย่อยสลายสารเมื่อเป็นองค์ประกอบของเชื้อผสมที่แตกต่างกัน คือ เมื่อเป็นองค์ประกอบในเชื้อผสม 2 สายพันธุ์กับ GH9-1 นั้น ทำให้ระดับการย่อยสลายสารอยู่ที่ร้อยละ 70 - 85.6 [Mix(1+2) และ Mix(1+□)] และในกรณีของเชื้อผสม □สายพันธุ์ที่ไม่มีเชื้อสายพันธุ์ GH9-2 หรือ GH9-□เป็นองค์ประกอบ มีระดับการย่อยสลายสารร้อยละ 7□.8 และ 44.5 ตามลำดับ แสดงว่ากิจกรรมการย่อยสลายสารแกมมา-เอชซีเอชของสายพันธุ์ GH9-2 ไม่มีส่วนส่งเสริมหรือยับยั้งการเจริญและ/หรือการย่อยสลายสารของเชื้อสายพันธุ์อื่นๆ ในขณะที่เชื้อสายพันธุ์ GH9-□ ให้ผลส่งเสริมกิจกรรมจากเชื้อสายพันธุ์อื่นๆ ในกลุ่มเชื้อโดยเฉพาะเมื่ออยู่ร่วมกับเชื้อสายพันธุ์ GH9-1

ในกรณีของเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ GH9-4 ที่มีร้อยละการย่อยสลายสารแกมมา-เอชซีเอชที่ต่ำสุดของเชื้อกลุ่มนี้ คือ □□.6 เมื่อเป็นองค์ประกอบร่วมในเชื้อผสมต่างๆ จะให้ผลการย่อยสลายสารที่ลดลงจากเมื่อย่อยสลายสาร โดยเชื้อแบคทีเรียเดี่ยวต่างๆ เช่นเดียวกับในกรณีของเชื้อผสม □สายพันธุ์ที่ไม่มีเชื้อสายพันธุ์ GH9-4 เป็นองค์ประกอบ จะมีระดับการย่อยสลายสารที่สูงถึงร้อยละ 7□.4 ดังนั้นกล่าวได้ว่า เชื้อสายพันธุ์ GH9-4 มีผลยับยั้งการเจริญและ/หรือการย่อยสลายสารของเชื้อสายพันธุ์อื่นๆ ซึ่งอาจจะเกิดจากสร้างสารตัวกลางที่มีผลต่อการเจริญของเชื้อสายพันธุ์อื่นๆ หรือย่อยสลายสารแกมมา-เอชซีเอชได้สารตัวกลางที่เชื้อสายพันธุ์อื่นๆ ไม่สามารถนำไปใช้ได้ต่อในการเจริญ เป็นต้น

จากการศึกษาวิจัยหลายกรณีพบว่าการใช้เชื้อผสมเพื่อย่อยสลายสารอาจให้การย่อยสลายสารต่ำกว่าการใช้เชื้อสายพันธุ์เดียว เพราะเชื้อบางสายพันธุ์ในกลุ่มไปยับยั้งการเจริญของเชื้อที่สามารถย่อยสลายสารได้สูง หรือบางกรณีการขาดเชื้อสายพันธุ์ใดสายพันธุ์หนึ่งทำให้ความสามารถในการย่อยสลายสารต่ำลงหรือไม่สามารถย่อยสลายได้เลย เช่น ในกรณีการย่อยสลายสารอะทราซีนโดยกลุ่มจุลินทรีย์ พบว่า การไม่เติมเชื้อ *Nocardia* ลงในกลุ่มทำให้ไม่เกิดการย่อยสลายสารอะทราซีน เนื่องจากเชื้อ *Nocardia* สามารถย่อยสลายสารตั้งต้น นำไปสู่สารตัวกลางที่เชื้อสายพันธุ์อื่นในกลุ่มใช้เพื่อการเจริญและย่อยสลายสารต่อไป (Smith *et al.*, 2005)

อย่างไรก็ตามหากพิจารณาการย่อยสลายสารแกมมา-เอชซีเอชโดยเชื้อผสม 4 สายพันธุ์ ซึ่งมีองค์ประกอบของเชื้อที่เหมือนกับกลุ่มเชื้อแบคทีเรียที่ 9 พบว่า มีระดับการย่อยสลายสารเท่ากับ

ร้อยละ 71.1 และ 8 .7 - 85 ตามลำดับ การที่ระดับการย่อยสลายของสารโดยเชื้อผสม 4 สายพันธุ์ ต่ำกว่าโดยกลุ่มเชื้อแบคทีเรียที่ 9 อาจมีสาเหตุจากการเตรียมกล้าเชื้อของเชื้อผสมที่ไม่เหมาะสม ในการศึกษาครั้งนี้ได้ใช้อัตราส่วนของเชื้อแบคทีเรียที่เป็นกล้าเชื้อที่ 1 ต่อ 1 ในขณะที่องค์ประกอบของเชื้อในกลุ่มได้ปรับตัวเองให้มีสัดส่วนของเชื้อสายพันธุ์ต่างๆ ที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อในสภาวะที่มีสารแกมมา-เอชซีเอชเป็นแหล่งอาหาร ซึ่งลักษณะการทำงานของเชื้อแต่ละสายพันธุ์มีบทบาทอย่างไรต่อกิจกรรมการย่อยสลายสารแกมมา-เอชซีเอชโดยกลุ่มเชื้อนั้น บางสายพันธุ์อาจจะมีความสำคัญในระยะเวลาแรกของการย่อยสลายสาร หรือช่วงหลังของการย่อยสลาย หรือจำเป็นต่อการย่อยสลายโดยรวม หากขาดเชื้อที่สามารถย่อยสลายสารตั้งต้น กลุ่มเชื้อนั้นก็ไม่สามารถย่อยสลายสารได้ถึงแม้จะมีเชื้ออื่นๆ อยู่อีกหลายสายพันธุ์ก็ตาม บางสายพันธุ์เมื่ออยู่รวมกันส่งผลให้การย่อยสลายสารลดลง เป็นต้น



ภาพที่ 18 การเจริญของเชื้อเดี่ยวสายพันธุ์ GH9-1, GH9-2, GH9- และ GH9-4 เมื่อเลี้ยงกลุ่มเชื้อในอาหาร MSYM+HCH_{200} ที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส เขย่า 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 96 ชั่วโมง

Figure 18. Growth profiles of bacterial isolate GH9-1, GH9-2, GH9- and GH9-4 grown as bacterial consortium in MSYM+HCH_{200} and incubated at 0°C, 150 rpm for 96 hours.

เพื่อตรวจสอบสมมติฐานนี้จึงได้วิเคราะห์จำนวนของเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ต่างๆ (Viable cell count) ที่เป็นองค์ประกอบของกลุ่มเชื้อที่ 9 ที่ระยะเวลาต่างๆ ของการเพาะเลี้ยงในอาหาร MSYM ที่เสริมสารแกมมา-เอชซีเอช 200 ส่วนในล้านส่วน บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 96 ชั่วโมง (ภาพที่ 18A - D) พบว่า เชื้อแบคทีเรียทั้งสี่สายพันธุ์มีลักษณะการเจริญที่แตกต่างกันที่ระยะเวลาต่างๆ ของการเพาะเลี้ยง

เมื่อเติมกล้าเชื้อของกลุ่มเชื้อแบคทีเรียที่ 9 (ชั่วโมงที่ 0) พบ การเจริญของเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ GH9-1 และ GH9-2 ทันทีโดยไม่มีระยะการพักตัวของเชื้อ จำนวนเริ่มต้นของเชื้อทั้งสองมีค่า Log 5.6 และ 6.95 CFU/ml ในขณะที่ปริมาณเริ่มต้นของเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ GH9-3 และ GH9-4 มีปริมาณน้อยมาก (ต่ำกว่า Log 6.0 CFU/ml) จึงไม่สามารถเห็นโคโลนีบนจานเพาะเลี้ยง เมื่อนับปริมาณเชื้อโดยวิธี spread plate ที่ระดับการเจือจาง $1/10^6$ เท่า แสดงว่าเชื้อสายพันธุ์ GH9-3 และ GH9-4 มีการเจริญต่ำในขั้นตอนการเตรียมเป็นกล้าเชื้อเริ่มต้น และเมื่อถ่ายเชื้อลงในอาหารที่มีสารแกมมา-เอชซีเอช

เชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ GH9-1 มีการเจริญเพิ่มขึ้นจนถึงชั่วโมงที่ 48 จากนั้นการเจริญจะคงที่โดยมีปริมาณเชื้ออยู่ที่ Log 7.86 - 7.99 CFU/ml และเริ่มลดลงหลังจากชั่วโมงที่ 72 ของการเพาะเลี้ยง อย่างไรก็ตามพบว่ามีการเจริญของเชื้อสายพันธุ์อยู่ในระดับไม่ต่ำกว่าจำนวนเริ่มต้น (Log 5.6 CFU/ml) ตลอดระยะเวลาการเพาะเลี้ยง (ภาพที่ 18A) แสดงว่าเชื้อสายพันธุ์ GH9-1 สามารถเจริญและย่อยสลายสารแกมมา-เอชซีเอชซึ่งเป็นสารตั้งต้น และสารตัวกลางต่างๆ ที่เกิดจากการย่อยสลายได้

สำหรับเชื้อสายพันธุ์ GH9-2 ที่มีจำนวนเชื้อเริ่มต้นสูงสุดในระยะเวลาเริ่มต้นของการเพาะเลี้ยง (ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 0 หรือตั้งแต่ขั้นตอนการเตรียมเป็นกล้าเชื้อ) พบว่า จำนวนเชื้อจะมีค่าลดลงอย่างช้าๆ ใน 36 ชั่งโมงแรกของการเพาะเลี้ยง จนกระทั่งการเจริญลดลงต่ำกว่า Log 6.0 CFU/ml (ไม่สามารถนับโคโลนีบนจานเพาะเลี้ยง) ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 48 - 60 และหลังจากชั่วโมงที่ 72 จำนวนของเชื้อสายพันธุ์ GH9-2 มีค่าเพิ่มขึ้นในระดับที่ใกล้เคียงกับในช่วงเวลา 36 ชั่วโมงแรกของการเพาะเลี้ยง (Log 6.0 - 7.6 CFU/ml) (ภาพที่ 18B) แสดงว่าเชื้อสายพันธุ์ GH9-2 สามารถย่อยสลายสารแกมมา-เอชซีเอชซึ่งเป็นสารตั้งต้น เพื่อใช้ในเป็นแหล่งอาหารและพลังงานในการเจริญได้ต่ำ หรือเกิดสารตัวกลางบางอย่างจากการย่อยสลายที่มายับยั้งการเจริญของเชื้อ GH9-2 และเมื่อปริมาณของสารแกมมา-เอชซีเอชลดลงถึงระดับหนึ่ง (หลังชั่วโมงที่ 60) จำนวนของเชื้อสายพันธุ์ GH9-2 จึงมีค่าเพิ่มขึ้น

ในส่วนของเชื้อสายพันธุ์ GH9-3 และ GH9-4 ที่มีจำนวนเชื้อเริ่มต้น (ชั่วโมงที่ 0) น้อยมาก (ต่ำกว่า Log 6.0 CFU/ml) พบว่า เชื้อทั้งสองไม่มีการเจริญหรือมีการเจริญที่ต่ำมากในเวลาช่วงแรก

จนไม่สามารถนับได้ เชื้อสายพันธุ์ GH9-□สามารถนับจำนวนได้ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 24 - 60 (จำนวนของเชื้อ Log 5.7 - 6.85 CFU/ml) จากนั้นการเจริญจะลดลงอย่างรวดเร็วตั้งแต่ชั่วโมงที่ 72 จนสิ้นสุดการทดลองที่ชั่วโมง 96 (ภาพที่ 18C) ลักษณะเช่นเดียวกันนี้พบได้กับเชื้อสายพันธุ์ GH9-4 ที่สามารถวัดการเจริญได้ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 48 - 84 (จำนวนของเชื้อ Log 6.48 - 7.18 CFU/ml) จากนั้นการเจริญจะลดลงอย่างรวดเร็ว เห็นได้ว่าการเจริญของเชื้อสายพันธุ์ GH9-4 ช้ากว่าเชื้อ GH9-□ประมาณ 24 ชั่วโมง (ภาพที่ 18D) ผลดังกล่าวนี้อาจมีสาเหตุที่เชื้อสายพันธุ์ GH9-□และ GH9-4 สามารถย่อยสลายสารแกมมา-เอชซีเอชซึ่งเป็นสารตั้งต้นได้ต่ำมากจึงมีการเจริญที่ไม่สูงในช่วงแรกของการเพาะเลี้ยง แต่เมื่อเชื้อสายพันธุ์อื่นในกลุ่มเชื้อ เช่น GH9-1 ย่อยสลายสารแกมมา-เอชซีเอชแล้วเกิดสารตัวกลางขึ้นมา ทั้งเชื้อสายพันธุ์ GH9-□และ GH9-4 จะสามารถใช้สารตัวกลางนั้นในการเจริญต่อไป ในขณะเดียวกัน เมื่อสารตัวกลางนั้นลดลงหรือเกิดสารตัวกลางใหม่ก็ส่งผลให้การเจริญคงที่ ยับยั้งการเจริญ และการเจริญลดลงในที่สุด อย่างที่ปรากฏตั้งแต่ชั่วโมง 60 และ 72 สำหรับเชื้อสายพันธุ์ GH9-□และ GH9-4 ตามลำดับ

จากผลการทดลองข้างต้น จะเห็นว่าเชื้อแต่ละสายพันธุ์จะมีการเจริญในช่วงเวลาที่แตกต่างกันโดยขึ้นอยู่กับความสามารถในการย่อยสลายสารตั้งต้นหรือสารตัวกลางต่างๆ ที่เกิดขึ้นระหว่างการย่อยสลาย ซึ่งเชื้อสายพันธุ์ GH9-1 อาจจะเป็นเชื้อสายพันธุ์แรกที่เข้าย่อยสลายสารแกมมา-เอชซีเอช โดยอาจจะสามารถสังเคราะห์เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายสารอย่างสมบูรณ์ ส่วนเชื้อสายพันธุ์ GH9-2 ในช่วงแรกอาจจะย่อยสลายสารแกมมา-เอชซีเอชได้เล็กน้อยหรือไม่ย่อยสลายเลย ซึ่งสังเกตุจากปริมาณเชื้อที่ลดลง ในขณะที่เชื้อสายพันธุ์ GH9-□และ GH9-4 อาจจะสามารถย่อยสลายสารแกมมา-เอชซีเอชได้ แต่เนื่องจากมีปริมาณเชื้อเริ่มต้นที่ต่ำจึงไม่สามารถเห็นการเจริญได้ชัดเจน จากการเจริญของเชื้อ GH9-2 GH9-□และ GH9-4 พบว่าเชื้ออาจใช้สารตัวกลางบางชนิดในการเจริญ ซึ่งจะเห็นจากการที่เชื้อเจริญอย่างรวดเร็วเมื่อเวลาผ่านไประยะหนึ่ง และเมื่อสารตัวกลางดังกล่าวลดลงหรือเกิดสารตัวกลางชนิดอื่นก็จะส่งผลให้การเจริญของเชื้อคงที่และเมื่อถึงระยะหนึ่งเชื้อจะมีการเจริญที่ลดลง

หากต้องการทราบบทบาทและกลไกที่แน่ชัดว่าเชื้อแต่ละสายพันธุ์มีหน้าที่อย่างไรเมื่อเป็นองค์ประกอบของกลุ่มเชื้อต่อการย่อยสลายสารแกมมา-เอชซีเอชและสารตัวกลางต่างๆ ที่เกิดขึ้น จำเป็นต้องทำการวิเคราะห์ชนิดของสารตัวกลางที่เกิดขึ้นระหว่างการย่อยสลายสารตั้งต้นแกมมา-เอชซีเอช พร้อมทั้งวิเคราะห์ชนิดและปริมาณของเอนไซม์ที่เชื้อสังเคราะห์ขึ้น รวมทั้งศึกษาความสามารถในการย่อยสลายสารตัวกลางต่างๆ โดยจุลินทรีย์เดี่ยวในกลุ่มเชื้อ เป็นต้น

5. การเทียบเคียงชนิดของเชื้อแบคทีเรียที่ย่อยสลายสารแกมมา-เอชซีเอช

เมื่อนำเชื้อแบคทีเรียทั้ง 5 สายพันธุ์ที่คัดแยกได้จากตัวอย่างดินของพื้นที่ทางการเกษตร 12 บริเวณใน จ. สงขลา ด้วยเทคนิค Selective enrichment ในอาหาร MSYM ที่เสริมสารแกมมา-เอชซีเอช 200 ส่วนในล้านส่วน มาศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา พบว่า เชื้อแบคทีเรียทั้งหมดเป็นแบคทีเรียแกรมลบ และมีรูปร่างเซลล์เป็นแท่ง (ตารางที่ 8) และจากการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี ซึ่งประกอบด้วย การเคลื่อนที่ของเชื้อ การรีดิวซ์ไนเตรต การทดสอบการผลิตอินโดล การผลิตก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ การใช้ซิเตรต การทดสอบเอนไซม์คาตาเลสและออกซิเดส การทดสอบกระบวนการออกซิเดชัน-การหมัก การผลิตกรดและก๊าซจากคาร์โบไฮเดรตชนิดต่างๆ ได้แก่ น้ำตาลกลูโคส น้ำตาลแลกโตส น้ำตาลซูโครส (ตารางที่ 10) สามารถเทียบเคียงเชื้อแบคทีเรียได้เป็น 3 กลุ่มหรือสกุล (ตารางที่ 11) ดังนี้

<u>แบคทีเรียกลุ่มที่หนึ่ง</u> ซึ่งเป็นแบคทีเรียส่วนใหญ่ที่คัดแยกได้ ได้แก่ *Pseudomonas* ประกอบด้วยเชื้อสายพันธุ์ 1/1, 1/2, 2/1, 2/2, 2/3, 3/1, 3/2, 4/1, 4/3, 5/2, 5/3, 5/4, 6/1, 6/2, 7/1, 7/3, 8/1, 8/2, 8/3, GH9-1, GH9-2, GH9-3, 10/1, 10/2, 11/1, 11/2, 12/1 และ 12/2 มีลักษณะการเรียงตัวของเซลล์กระจาย Chemo-organotroph มีระบบเมทาบอลิซึมเป็นแบบ respiration สร้างเอนไซม์คาตาเลสและออกซิเดส

<u>แบคทีเรียกลุ่มที่สอง</u> ได้แก่ *Serratia* ประกอบด้วยเชื้อสายพันธุ์ 4/1 และ GH9-4 มีลักษณะที่สามารถใช้ซิเตรทและอะซิเตทเป็นแหล่งคาร์บอน หมักกลูโคสเกิดสภาวะเป็นกรดและเกิดแก๊ส การทดสอบ methyl red เป็นลบ และ Voges-Proskauer (VP) เป็นบวก

<u>แบคทีเรียกลุ่มที่สาม</u> ได้แก่ *Proteus* ประกอบด้วยเชื้อสายพันธุ์ 4/2, 5/1, 6/3 และ 7/2 ปกติเซลล์มีรูปร่างเป็นเส้นตรง แต่อาจมีรูปร่างเปลี่ยนแปลงไปได้บางสภาวะ ไม่เคลื่อนที่ หมักกลูโคสเกิดสภาวะเป็นกรดที่เร็วมาก แต่เกิดแก๊สในปริมาณเล็กน้อย สามารถรีดิวซ์ไนเตรทเป็นไนไตรท์ และสร้างอินโดล

ในการรายงานผลงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายสารกำจัดศัตรูพืชกลุ่มออร์แกโนคลอรีนชนิดแกมมา-เอชซีเอช พบเชื้อแบคทีเรียในสกุล *Pseudomonas* เป็นส่วนใหญ่ที่แสดงการย่อยสลายสารแกมมา-เอชซีเอชแบบเชื้อกลุ่ม (Murthy and Manonmani, 2007) และแบบเชื้อเดี่ยว (Nawab *et al.*, 2003; Pesce and Wunderlin, 2004; Kumar *et al.*, 2006) ที่ความเข้มข้นหรืออัตราการย่อยสลายที่สูงเมื่อเป็นองค์ประกอบในกลุ่มเชื้อ เชื้อ *Pseudomonas* spp. 7 สายพันธุ์ ร่วมกับแบคทีเรียสายพันธุ์อื่นๆ สามารถย่อยสลายสารแกมมา-เอชซีเอชที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 25 ส่วนในล้านส่วน ได้กว่าร้อยละ 95 ภายในเวลาเพียง 24 ชั่วโมง (Murthy and Manonmani, 2007) ขณะที่ในสภาวะเชื้อเดี่ยว *P. aeruginosa* ITRC-5 สามารถย่อยสลายสารสารแกมมา-เอชซีเอชที่ความเข้มข้น

เริ่มต้น 180 ส่วนในล้านส่วน ได้กว่าร้อยละ 95 ภายในเวลาเพียง 4 วัน เป็นต้น (Kumar *et al.*, 2006) ซึ่งจากการศึกษาครั้งนี้สามารถคัดเลือกกลุ่มเชื้อและเชื้อแบคทีเรียที่แสดงประสิทธิภาพการย่อยสลายสารแกมมา-เอชซีเอชที่ใกล้เคียงหรือดีกว่ารายงานการวิจัยข้างต้น (ตารางที่ 12)

สำหรับเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ GH9-1, GH9-2, GH9-□และ GH9-4 ที่ได้คัดเลือกมาศึกษาเปรียบเทียบการย่อยสลายสารแกมมา-เอชซีเอชโดยกลุ่มเชื้อ เชื้อเดี่ยว และเชื้อผสมนั้น ได้นำมาวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน 16S rDNA เพื่อจำแนกชนิดของเชื้อต่อ โดยทำการสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธี Boiling/Freezing method ตามด้วยการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอที่สนใจด้วยเทคนิค Polymerase chain reaction (PCR) โดยใช้ Universal primer 27F และ 1492R จากนั้นหาลำดับเบสด้วยไพรเมอร์ดังกล่าว นำลำดับเบสที่ได้มาจัดเรียงใหม่ (Align) โดยใช้โปรแกรม ClustalX เพื่อให้ได้ดีเอ็นเอสายเต็ม (full length) แล้วนำลำดับเบสมาทำการสืบค้นในฐานข้อมูล (BLAST; www.ncbi.nlm.nih.gov)

จากขั้นตอนการวิเคราะห์ข้างต้น พบว่า16S rDNA ของเชื้อทั้งสี่สายพันธุ์สามารถเพิ่มจำนวนได้เมื่อใช้ไพรเมอร์ 27F และ 1492R โดยสังเกตจากแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 1400 คู่เบสที่ปรากฏหลังจากแยกขนาดดีเอ็นเอบนเจลอากาโรส (ภาพที่ 19; แถวที่ 2 - 5) เมื่อวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน 16S rDNA จากเชื้อสายพันธุ์ GH9-1, GH9-2, GH9-□และ GH9-4 และเทียบเคียงผลต่างๆ ด้วยโปรแกรม Treeview เพื่อสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการหรือไฟโลเจเนติกทรี (Phylogenetic tree) (ภาพที่ 20) พบว่า มีความใกล้เคียงกับเชื้อ *Pseudomonas putida*, *Burkholderia* sp., *Flexibacter* sp. และ *Burkholderia vietnamiensis* ด้วยความคล้ายคลึงร้อยละ 99, 98, 98 และ 91 ตามลำดับ

ตารางที่ 10 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและคุณสมบัติทางชีวเคมีของเชื้อแบคทีเรียที่คัดแยกได้

Table 10. Morphological features and biochemical characteristics of the isolated bacteria.

Morphological and biochemical characteristics	Isolates								
	1/1	1/2	1/□	2/1	2/2	2/□	□/1	□/2	□/□
Gram staining	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cell shape	Rod	Rod	Rod	Rod	Rod	Rod	Rod	Rod	Rod
Motility	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Catalase test	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Oxidase test	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Methyl red test	-	-	+	-	+	-	-	-	-
Voges-Proskauer (VP) test	-	-	+	-	-	-	+	-	-
Indole test	-	-	-	+	-	-	-	-	-
Citrate utilization	+	-	-	+	-	-	+	-	-
Oxidation /Fermentation	O/F	O/F	O	O	O/F	O/F	-	O/F	O/F
Acid production from Carbohydrates utilization:									
Lactose	+	+	+	+	+	+	+	-	+
Glucose	+	+	+	+	+	-	+	+	+
Sucrose	+	+	+	+	+	+	+	-	+

+ Positive test

- Negative test

ตารางที่ 10 (ต่อ)

Table 10. (Continued)

Morphological and biochemical characteristics	Isolates								
	4/1	4/2	4/□	5/1	5/2	5/□	5/4	6/1	6/2
Gram staining	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cell shape	Rod	Rod	Rod	Rod	Rod	Rod	Rod	Rod	Rod
Motility	-	-	+	-	-	+	+	-	-
Catalase test	-	+	+	+	+	+	+	+	+
Oxidase test	-	+	+	+	+	+	+	+	+
Methyl red test	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Voges-Proskauer (VP) test	+	-	-	-	+	-	-	-	-
Indole test	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Citrate utilization	+	+	+	+	+	-	+	+	-
Oxidation /Fermentation	O	O	F	O/F	F	O/F	O/F	O	O/F
Acid production from Carbohydrates utilization:									
Lactose	-	-	+	+	-	+	+	+	+
Glucose	-	-	-	+	-	-	+	-	+
Sucrose	-	-	-	+	-	-	+	+	+

+ Positive test

- Negative test

ตารางที่ 10 (ต่อ)

Table 10. (Continued)

Morphological and biochemical characteristics	Isolates								
	6/□	7/1	7/2	7/□	8/1	8/2	8/□	GH9-1	GH9-2
Gram staining	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cell shape	Rod	Rod	Rod	Rod	Rod	Rod	Rod	Rod	Rod
Motility	-	+	-	+	-	-	-	+	+
Catalase test	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Oxidase test	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Methyl red test	+	-	-	+	-	+	-	-	+
Voges-Proskauer (VP) test	-	-	-	+	-	-	+	-	-
Indole test	-	-	-	+	-	-	-	-	-
Citrate utilization	+	-	+	-	-	+	+	+	+
Oxidation /Fermentation	O	F	O/F	O	O	O	F	O/F	O
Acid production from Carbohydrates utilization:									
Lactose	+	+	+	+	+	+	-	+	+
Glucose	+	-	-	+	+	+	-	+	+
Sucrose	+	-	+	+	+	+	-	+	+

+ Positive test

- Negative test

ตารางที่ 10 (ต่อ)

Table 10. (Continued)

Morphological and biochemical characteristics	Isolates							
	GH9-	GH9-4	10/1	10/2	11/1	11/2	12/1	12/2
Gram staining	-	-	-	-	-	-	-	-
Cell shape	Rod	Rod	Rod	Rod	Rod	Rod	Rod	Rod
Motility	+	+	+	+	-	-	-	-
Catalase test	+	+	+	+	+	+	+	+
Oxidase test	+	-	-	+	-	+	+	+
Methyl red test	-	-	-	-	-	-	-	-
Voges-Proskauer (VP) test	-	-	-	-	-	-	-	-
Indole test	-	-	-	-	-	-	-	-
Citrate utilization	+	-	-	+	-	+	-	+
Oxidation /Fermentation	O	O	O/F	O	O/F	O/F	O/F	O/F
Acid production from Carbohydrates utilization:								
Lactose	+	-	+	-	-	+	+	+
Glucose	+	-	+	+	-	-	-	+
Sucrose	+	-	+	-	+	+	+	-

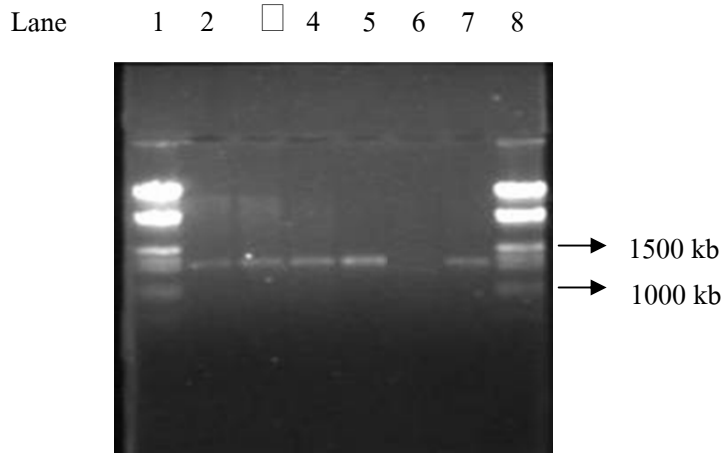
+ Positive test

- Negative test

ตารางที่ 11 การจำแนกสกุลของเชื้อแบคทีเรียที่คัดแยกได้ตามลักษณะทางสัณฐานวิทยาและคุณสมบัติทางชีวเคมี

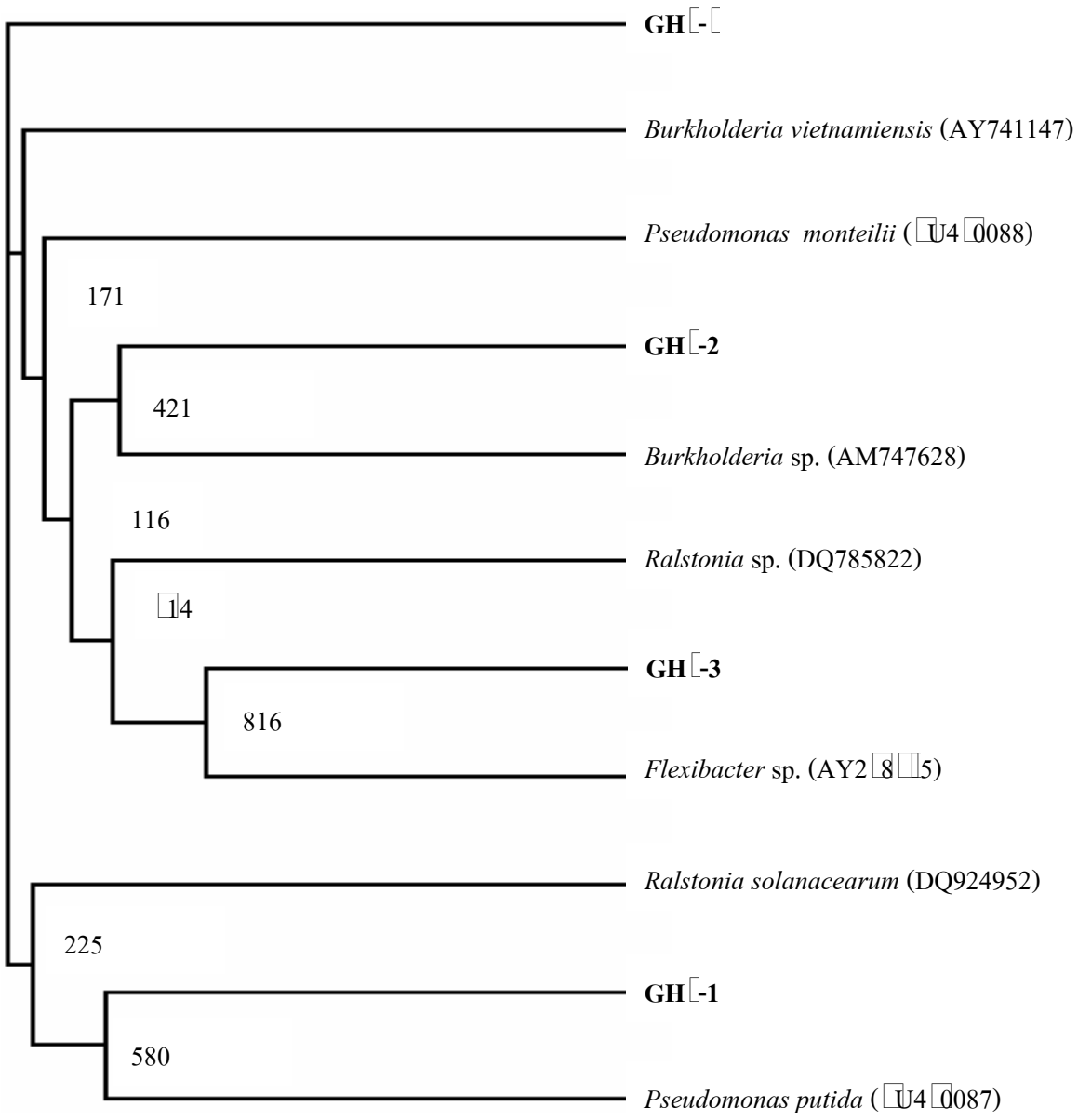
Table 11. Genus of bacterial isolates as defined by their colony and cell morphologies and biochemical characteristics.

Bacterial genus	Isolate
Pseudomonas	1/1, 1/2, 2/1, 2/2, 2/□, □/1, □/2, □/□, 4/□, 5/2, 5/□, 5/4, 6/1, 6/2, 7/1, 7/□, 8/1, 8/2, 8/□, GH9-1, GH9-2, GH9-□, 10/1, 10/2, 11/1, 11/2, 12/1, 12/2
Serratia	4/1, GH9-4
Proteus	4/2, 5/1, 6/□, 7/2



ภาพที่ 19 เจลอิเล็คโตรโฟริซิสของ PCR ดีเอ็นเอของเชื้อแบคทีเรียจากกลุ่มเชื้อที่ 9 โดยใช้ไพรเมอร์ 27F และ 1492R (แถว 1, 8: DNA marker, แถว 2: GH9-1, แถว □:GH9-2, แถว 4: GH9-□,แถว 5: GH9-4, แถว 6: negative control และแถว 7: positive control)

Figure 19. Gel electrophoresis of PCR product from bacterial isolates of consortium-9 amplified with primers 27F and 1492R. (Lane 1, 8: DNA marker, Lane 2: GH9-1, Lane □: GH9-2, Lane 4: GH9-□, Lane 5: GH9-4, Lane 6: negative control and Lane 7: positive control)



ภาพที่ 20 ไฟโลเจเนติกทรี (Phylogenetic tree) ของเชื้อแบคทีเรีย GH9-1 ถึง GH9-4 ที่คัดแยกจากกลุ่มเชื้อแบคทีเรียที่ 9

Figure 20. Phylogenetic tree of bacterial isolates GH9-1 to GH9-4 from bacterial consortium-9.

ตารางที่ 12 เชื้อแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายสารแกมมา-เอชซีเอชจากการศึกษาต่างๆ

Table 12. γ-HCH degrading bacteria as reported in various studies.

Bacteria strains	Initial γ-HCH concentration (ppm)	γ-HCH degradation (%)	References
Burkholderia, *Flavobacterium*, *Pseudomonas* spp.	25	95% in 1 days	Murthy and Manonmani (2007)
P. aeruginosa ITRC-5	180	95% in 4 days	Kumar *et al.* (2006)
Sphingobacterium spiritivorum, Ochrobactrum anthropi, Bosea thiooxidans and S. paucimobilis	120	8 % in days	Pesce and Wunderlin (2004)
Pseudomonas sp.	5	100% in 10 - 20 days	Sahu *et al.* (1992)
P. putida GH9-1, *Burkholderia* sp. GH9-2, *Flexibacter* sp. GH9- and *Burkholderia* sp. GH9-4	200	85% in 4 days	This study

บทที่ 4

สรุปผลการทดลอง

จากการวิเคราะห์ปริมาณสารกำจัดศัตรูพืชกลุ่มออร์แกโนคลอรีนชนิดแกมมา-เอชซีเอชในตัวอย่างดินจากพื้นที่ทางเกษตร ตำบลบางเหลียง อำเภอควนเนียง จังหวัดสงขลา จำนวน 12 บริเวณ พบการปนเปื้อนของสารแกมมา-เอชซีเอชใน 5 จาก 12 ตัวอย่าง โดยมีปริมาณอยู่ในช่วง 0.03 - 0.45 นาโนกรัมต่อกรัมดิน เมื่อนำตัวอย่างดินดังกล่าวมาคัดแยกเชื้อที่สามารถเจริญบนอาหาร MSYM ที่เสริมสารแกมมา-เอชซีเอชความเข้มข้นเริ่มต้น 200 ส่วนในล้านส่วน บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในสภาวะที่ให้อากาศ (เขย่าที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที) เป็นเวลา 96 ชั่วโมง พบว่าสามารถคัดแยกเชื้อแบคทีเรียได้ทั้งหมด 35 ไอโซเลต จาก 12 ตัวอย่างหรือกลุ่มเชื้อ โดยทั้ง 35 ไอโซเลต แสดงกิจกรรมการย่อยสลายสารแกมมา-เอชซีเอชได้ในช่วงร้อยละ 7.97 - 77.98 ในเวลา 96 ชั่วโมง ในขณะที่เมื่อเลี้ยงเชื้อในสภาวะของกลุ่มเชื้อ พบการย่อยสลายสารแกมมา-เอชซีเอชในระดับร้อยละ 42.2 - 97.6 ในเวลา 96 ชั่วโมง

จากการพิจารณาระดับการย่อยสลายสารแกมมา-เอชซีเอชโดยเชื้อแบคทีเรียเดี่ยวสายพันธุ์ต่างๆ กับกลุ่มเชื้อ พบว่า ในสภาวะการเลี้ยงแบบกลุ่มเชื้อจะให้กิจกรรมการย่อยสลายสารที่สูงกว่าแบบเชื้อเดี่ยว กลุ่มเชื้อแบคทีเรียที่ 9 ย่อยสลายสารแกมมา-เอชซีเอชสูงที่สุดและสามารถแยกเป็นแบคทีเรียเดี่ยวๆ ได้แก่ GH9-1, GH9-2, GH9-3 และ GH9-4

เมื่อเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียเดี่ยวสายพันธุ์ GH9-1, GH9-2, GH9-3 และ GH9-4 ในอาหาร MSYM ที่เสริมสารแกมมา-เอชซีเอช 200 ส่วนในล้านส่วน บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 96 ชั่วโมง พบว่า เชื้อสายพันธุ์ GH9-1 สามารถย่อยสลายสารได้สูงสุดร้อยละ 73.3 ในเวลา 96 ชั่วโมงรองลงมาคือเชื้อสายพันธุ์ GH9-2 และ GH9-3 ย่อยสลายได้ร้อยละ 53.3 และ 51.6 ในเวลา 96 ชั่วโมง ตามลำดับ ส่วนเชื้อสายพันธุ์ GH9-4 ย่อยสลายสารได้ต่ำสุดร้อยละ 33.6 ในเวลา 96 ชั่วโมง

เมื่อเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ GH9-1, GH9-2, GH9-3 และ GH9-4 แบบผสม 2 สายพันธุ์ในอาหารและสภาวะข้างต้น พบว่า เชื้อผสมระหว่างสายพันธุ์ GH9-1 กับ GH9-3 [Mix(1+3)] สามารถย่อยสลายสารแกมมา-เอชซีเอชได้สูงสุดร้อยละ 85.6 ในเวลา 96 ชั่วโมง ตามด้วยเชื้อผสมระหว่างสายพันธุ์ GH9-1 กับ GH9-2 [Mix(1+2)], GH9-1 กับ GH9-4 [Mix(1+4)], GH9-2 กับ GH9-3 [Mix(2+3)] และ GH9-2 กับ GH9-4 [Mix(2+4)] มีร้อยละการย่อยสลายสารแกมมา-เอชซีเอชที่ 70,

63, 57.8 และ44 ในเวลา 96 ชั่วโมง ตามลำดับ ในขณะที่เชื้อผสมระหว่างสายพันธุ์ GH9-3 กับ GH9-4 [Mix(3+4)] ย่อยสลายสารได้ต่ำสุดร้อยละ 41 ในเวลา 96 ชั่วโมง

การย่อยสลายสารแกมมา-เอชซีเอชโดยเชื้อแบคทีเรียผสม 3 สายพันธุ์ เมื่อเลี้ยงเชื้อในสภาวะข้างต้น พบว่า เชื้อผสม 3 สายพันธุ์ที่ไม่เติมเชื้อสายพันธุ์ GH9-1, GH9-2, GH9-3 และ GH9-4 มีการย่อยสลายสารแกมมา-เอชซีเอชได้ร้อยละ 47.2, 73.8, 44.5 และ 73.4 ในเวลา 96 ชั่วโมง ตามลำดับ ในขณะที่เชื้อแบคทีเรียผสม 4 สายพันธุ์ (ผสมกล้าเชื้อของสายพันธุ์ต่างๆ ในอัตราส่วน 1 ต่อ 1 (1:1:1:1)) มีการย่อยสลายสารแกมมา-เอชซีเอชได้ร้อยละ 71.1 ในเวลา 96 ชั่วโมง

จากการเปรียบเทียบผลการเจริญและการย่อยสลายสารแกมมา-เอชซีเอชโดยกลุ่มเชื้อแบคทีเรียที่ 9 เชื้อแบคทีเรียเดี่ยวสายพันธุ์ GH9-1, GH9-2, GH9-3 และ GH9-4 เชื้อผสม 2, 3 และ 4 สายพันธุ์ พบว่า เชื้อสายพันธุ์ GH9-1 เป็นเชื้อสายพันธุ์แรก และสายพันธุ์เดียวที่แสดงการย่อยสลายสารแกมมา-เอชซีเอชอย่างสมบูรณ์

จากการเทียบเคียงเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ GH9-1, GH9-2, GH9-3 และ GH9-4 โดยการวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน 16S rDNA พบว่า เชื้อสายพันธุ์ GH9-1, GH9-2, GH9-3 และ GH9-4 มีความใกล้เคียงกับเชื้อ *Pseudomonas putida*, *Burkholderia* sp., *Flexibacter* sp. และ *Burkholderia vietnamiensis* ด้วยความคล้ายคลึงร้อยละ 99, 98, 98 และ 91 ตามลำดับ

ข้อเสนอแนะ

1. การวิเคราะห์การเจริญของเชื้อเดี่ยวแต่ละสายพันธุ์เมื่ออยู่รวมกันเป็นกลุ่มเชื้อ ควรใช้วิธีการวิเคราะห์ทางอณูวิทยา (เช่น เทคนิค Fluorescence *in situ* hybridization; FISH หรือ Denaturing Gradient Gel Electrophoresis; DGGE) เนื่องจากการใช้วิธี Viable plate count ไม่สามารถวิเคราะห์ปริมาณเชื้อที่มีจำนวนน้อยมากได้ จึงส่งผลให้ไม่สามารถเห็นการเจริญได้ชัดเจน
2. การศึกษาในขั้นต่อไปอาจต้องทำการวิเคราะห์ชนิดของสารตัวกลางที่เกิดขึ้นระหว่างการย่อยสลายสารแกมมา-เอชซีเอช และศึกษาความสามารถในการย่อยสลายสารตัวกลางนั้นโดยเชื้อจุลินทรีย์เดี่ยวในกลุ่ม เพื่อให้ทราบถึงบทบาทหน้าที่การทำงานของจุลินทรีย์ในช่วงเวลาต่างๆ
3. การศึกษาในขั้นต่อไปอาจศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการย่อยสลายสารแกมมา-เอชซีเอชโดยจุลินทรีย์ผสม (กลุ่มเชื้อแบคทีเรียที่ 9 และเชื้อผสมระหว่างสายพันธุ์ GH9-1 กับ GH9-3 [Mix(1+3)]) เช่น การศึกษาอัตราส่วนของเชื้อจุลินทรีย์แต่ละชนิด (สัมพันธ์กับปริมาณเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายสาร) ในช่วงเวลาต่างๆ ในการเจริญและย่อยสลายสาร

เอกสารอ้างอิง

กนกนิษถ์ สอนคง. 2550. การคัดเลือก จำแนก และสภาวะที่เหมาะสมในการย่อยสลายสาร พารา,พารา′-ดีดีทีโดยแบคทีเรียจากดิน. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

คณะอนุกรรมการการแก้ไขปัญหาการวิเคราะห์สารพิษและคณะกรรมการสิ่งแวดล้อมเรื่องสารพิษ. 2530. คู่มือการเก็บรักษาตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์โลหะหนัก. งานสารพิษกองมาตรฐานคุณภาพสิ่งแวดล้อม สำนักงานคณะกรรมการสิ่งแวดล้อมแห่งชาติ.

ดวงพร คันธโชติ. 2537. อนุกรมวิธานของแบคทีเรียและปฏิบัติการ. สำนักพิมพ์โอเดียนสโตร์. กรุงเทพฯ.

นิคม ละอองศิริวงศ์ และอดินันท์ หมัดหมาน. 2542. สารป้องกันและกำจัดศัตรูพืชกลุ่มพารา, พารา′-ดีดีทีในทะเลสาบสงขลา. เอกสารวิชาการฉบับที่ 4/2542. สถาบันวิจัยการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง. จังหวัดสงขลา.

บุญสิน จิตตะประพันธ์. 2541. ปริมาณสารกำจัดศัตรูพืชและสัตว์กลุ่มออร์กาโนคลอรีนที่ตกค้างในสัตว์น้ำบริเวณทะเลสาบสงขลาตอนนอก. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

บุญเสริม เซ่งล่าย. 2540. สารป้องกันและกำจัดศัตรูพืชและสัตว์กลุ่มออร์กาโนคลอรีนที่ตกค้างในน้ำและดินตะกอน บริเวณทะเลสาบสงขลาตอนนอก. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

เปี่ยมศักดิ์ มานะเศวต. 2543. แหล่งน้ำกับปัญหามลพิษ. สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. กรุงเทพฯ.

วินันท์ดา หิมะหมาน. 2541. การตรวจหาแบคทีเรียในดินที่สามารถย่อยสลายสารกำจัดวัชพืชอะลาคลอร์และออกซีฟลูออร์เฟน. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

สำนักคณะกรรมการสิ่งแวดล้อมแห่งชาติ. 2530. รายงายย่อยที่ 4 รายงานการสำรวจปัญหาและแหล่งกำเนิดภาวะมลพิษทางน้ำ. กรุงเทพฯ.

ศุภมาศ พนิชศักดิ์พัฒนา. 2545. ภาวะมลพิษของดินจากากรใช้สารเคมี. พิมพ์ครั้งที่ 3. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ.

โศรยา พันธุ์วิริยะพงษ์ และพูลสุข หฤทัยธนาสันต์. 2542. ศึกษาผลกระทบต่อการใช้วัตถุมีพิษในกลุ่มออร์แกนโนคลอรีนต่อเลือดเกษตรกร. ข่าวสารวัตถุมีพิษ. 28:16-31.

Abou-Arab, A. A. K. 2002. Degradation of organochlorine pesticides by meat starter in liquid media and fermented sausage. Food Chem. Technol. 40: 33-41.

Adriaens, P. and Vogel, T. M. 1995. Biological Treatment of Chlorinated Organic. *In* Microbial Transformation and Degradation of Toxic Organic Chemicals. (Young, L. Y. and Cerniglia, C. E., eds.). p. 435-486. Wiley-Liss, Inc. New York.

Aislabie, J. M. 1997. Microbial degradation of DDT and its residues-a review. New Zealand. J. Agri. Res. 40: 269-282.

Aislabie, J. M. and Jone, L. 1996. A review of bacterial degradation of pesticides. J. Soil Res. 33: 925-942.

A.O.A.C. 1990. Official Methods of Analysis of the Association of Official Chemist. (15th ed.). The association of official analytical chemists, Inc., Virginia.

Bidlan, R. and Manonmani, H. K. 2002. Aerobic degradation of dichlorodiphenyltrichloroethane (DDT) by *Serratia marcescens* DT-1P. Proc. Biochem. 38: 49-56.

Bogialli, S., Curini, R., Corcia, A. D., Laganà, A., Nazzari, M. and Tonci, M. 2004. Simple and rapid assay for analyzing residues of carbamate insecticides in bovine milk: hot water extraction followed by liquid chromatography–mass spectrometry. J. Chromatogr. A. 1054: 351-357.

Brooks, G. T. 1974a. Chlorinated Insecticides: Technology and Application. (vol. 1). CRC Press, Inc., Florida, USA.

Brooks, G. T. 1974b. Chlorinated Insecticides: Biological and Environmental Aspects. (vol. 2). CRC Press, Inc., Florida, USA.

Edward, C. A. 1977. Nature and Origins of Pollution of Aquatic System by Pesticides. *In* Pesticide in aquatic environments (ed. Khan, M. A. Q.). Plenum Press. New York.

Giacomazzi, S. and Cochet, N. 2004. Environmental impact of diuron transformation: Rev. Chemosphere. 56: 1021–1032.

Goto, T., Ito, Y., Yamada, S., Matsumoto, H., Okab, H. and Nagase, H. 2006. The high throughput analysis of *N*-methyl carbamate pesticides in fruits and vegetables by liquid chromatography electrospray ionization tandem mass spectrometry using a short column. Anal. Chim. Acta. 55: 225-232.

Guo, C. L., Zhou, Y. S., Wong, Y. S. and Tam, N. F. Y. 2005. Isolation of PAH-degrading bacteria from mangrove sediments and their biodegradation potential. Marine Poll. Bull. 51: 1054-1061.

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

Fujimura, Y. and Katayama, A. 1997. Estimation of DDT availability of DDT-degrading bacterium in soil by a direct extraction method of bacterial cells. Chemosphere. 35: 335-341.

Hirooka, T., Nagase, H., Hirata, K. and Miyamono, K. 2006. Degradation of 2,4-dinitrophenol by a mixed culture of photoautotrophic microorganisms. Biochem. Eng. J. 29: 157-162.

Johri, A. K., Dua, M., Tuteja, D., Saxena, R. and Lal, R. 1996. Genetic manipulations of microorganisms for the degradation of hexachlorocyclohexane. FEMS Microbiol. Rev. 19: 69-84.

Karpouzas, D. G, Fotopoulou, A., Spiroudi, U. M. and Singh, B. K. 2005. Non-specific biodegradation of the organophosphorus pesticides, cadusafos and ethoprophos, by two bacterial isolates. FEMS Microbiol. Ecol. 53: 369-378.

Krogh, K. A., Sorensen, B. H., Mogensen, B. B. and Vejrup, K. V. 2003. Environmental properties and effects of nonionic surfactant adjuvants in pesticides: A review. Chemosphere 50: 871-901.

Kumar, M., Gupta, S.K. and Kumar, G. A. 2006. Biodegradation of hexachlorocyclohexane-isomers in contaminated soils. Soil Biol. Biochem. 38: 2318-2327.

La-Ongsiriwong, N. and Mudmarn, A. 1999. Organochlorine Pesticides Residues in Songkhla Lake. Technical Paper. National Institute of Coastal Aquaculture. Songkhla.

Matsumura, F. 1982. Degradation of Pesticides in Environment by Microorganisms and Sunlight. *In* Biodegradation of Pesticides. (Matsumura, F. and Krishna Murti, C. R., eds.). p. 67-90. Plenum Press. New York.

Murthy, H. M. R., Manonmani, H. K. 2007. Aerobic degradation of technical hexachlorocyclohexane by a defined microbial consortium. J. Hazard. Mater. 149: 18-25.

Nawab, A., Aleem, A. and Malik, A. 2003. Determination of organochlorine pesticides in agricultural soil with special reference to γ-HCH degradation by *Pseudomonas* strains. Biores. Technol. 88: 41-46.

Neilson, A. H. 1995. An environmental perspective on the biodegradation of organochlorine xenobiotics. Int. Biodeter. Biodegrad. 95: 3-21.

Nhan, D. D., Am, N. M., Carvalho, F. P. Villeneuve, J. P. and Cattini, C. 1999. Organochlorine pesticides and PCBs along the coast of North Vietnam. Sci. Total Environ. 238: 363-371.

Noel, R. K. 1984. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Williams & Wilkins, Baltimore, p. 837-942.

Olaniran, A. O., Gabalola, G. O. and Okoh, A. I. 2001. Aerobic dehalogenation potentials of four bacterial species isolated from soil and sewage sludge. Chemosphere. 45 : 45-50.

PAN Pesticides Database Chemicals. 2008. (Online). Available http://www.pesticideinfo.org (1 March 2008)

Pesce, D. and Wunderlin, D. 2004. Biodegradation of lindane by a native bacterial consortium isolated from contaminated river sediment. Inter. Biodeter. Biodegrad. 54: 255-260.

Quraishi, M. S. 1977. Biochemical Insect Control, Its Impact on Economy, Environment and Natural Selection. USA.

Quintero, J. C., Moreira, M. T., Feijoo, G. and Lema, J. M. 2005. Anaerobic degradation of hexachlorocyclohexane isomers in liquid and soil slurry systems. Chemosphere. 61: 528-536.

Rigas, F., Dritsa, V., Marchant, R., Papadopoulou, K., Avramides, E. J. and Hatzianestis, I. 2004. Biodegradation of lindane by *Pleurotus ostretus* via central composite design. Environ. Inter. 31: 194-196.

Sahu, S. K., Patnaik, K. K., Bhuyan, S. and Sethunathan, N. 1993. Degradation of soil-applied isomers of hexachlorocyclohexane by *Pseudomonas* sp. Soil Biol. Biochem. 25 : 387-391.

Sahu, S . K., Patnaik, K. K., Shamila, M. and Sethunathan, N. 1993. Degradation of alfa-, beta- and gamma-hexachlorohexane by a soil bacterium under aerobic condition. Appl. Environ. Microbiol. 56: 3620-3622.

Sethunathan, N., Adhya, T. K. and Raghu, K. 1982. Microbial degradation of pesticides in tropical soils. *In* Biodegradation of Pesticides. (Matsumura, F. and Krishna Murti, C. R., eds.). p. 91-116. Plenum Press. New York.

Siddigui, M. K. J., Anand, M., Mahrotra, P. K., Sarangi, R. and Mathur, N. 2004. Biomonitoring of organochlorines in women with benign and malignant breast disease. Environ. 98: 250-257.

Smith, A. G. 1991. Chlorinated Hydrocarbon Insecticides. *In* Handbook of Pesticides Toxicology (vol. II). (Hayes, W. J. and Laws, E. R., eds.). p. 731-916. Academic Press. London.

Smith, D., Alvey, S. และ Crowley, D. E. 2005. Cooperative catabolic pathways within an atrazine-degrading enrichment culture isolated from soil. FEMS Micro. Ecol. 53: 265-273.

Sogorb, M. A. and Vilanova, E. 2002. Enzymes involved in the detoxification of organophosphorus, carbamate and pyrethroid insecticides through hydrolysis. Toxicol. Lett. 128: 215-228.

Srivastava, S. C., Kumar, R., Prasad, A. K. and Srivastava, S. P. 1994. Effect of hexachlorocyclohexane (HCH) on testicular plasma membrane of rat. Toxicol. Lett. 75: 153-157.

Stuetz, W., Prapamontol, T., Erhardt, J. G. and Classen, H. G. 2001. Organochlorine pesticides residue in human milk of Hmong hill tribe living in Northern Thailand. Sci. Total Environ. 237: 53-60.

Vallack, H. W., Bakker, D. J., Brandt, I., Broström-Lundén, E., Brouwer, A., Bull, K. R., Gourgh, C., Guardans, R., Holoubek, I., Jansson, B., Koch, R., Kuylenstierna, J., Ledoux, A., Mackay, D., McCutcheon, P., Mocarelli, P. and Taalman, R. D. F. 1998. Controlling persistent organics pollutants-what next? Environ. Toxicol. Pharmacol. 6: 143-175.

Wackett, L. P. 1995. Bacterial Co-metabolism of Halogenated Organic Compounds. *In* Microbial Transformation and Degradation of Toxic Organic Chemicals. (L. Y. Young and C. E .Cerniglia eds.). p. 217-242. Wiley-Liss, Inc. New York.

Yamada, Y., Makimura, K., Mirhendi, H, Ueda, K., Nishiyama, Y., Yamaguchi, H. and Osumi, M. 2002. Comparison of difference methods for extraction mitochondrial DNA from human pathogenic yeast. JPN. J. Infect. Dis. 55: 122-125.

Yu, J and Ward, O. 1996. Investigation of the biodegradation of pentachlorophenol by the predominant bacterial strains in a mixed culture. Internat. Biodeter. Biodegrad. 37: 181-187.

Yuan, S. Y., Wei, S. H. and Chang, B. V. 2000. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by a mixed culture. Chemosphere. 41: 1463-1468.

Zi-Wei, Y, Gui-Bin, J. and Heng-Zhen, X. 2002. Distribution of organochlorine pesticides in seawater of Baring and Chukchi Sea. Environ. Pollut. 116: 49-56.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

อาหารเลี้ยงเชื้อและวิธีการเตรียม

สูตรอาหารทุกสูตรใช้ผสมน้ำกลั่น 1 ลิตร

1. Minimal salt – yeast extract medium (MSYM) (ดัดแปลงจาก Pesce and Wunderlin, 2004)

NH_4NO_3	0.25	กรัม
K_2HPO_4	0.675	กรัม
$Ca(NO_3)_2$	0.1	กรัม
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.2	กรัม
$NaHPO_4$	0.5	กรัม
Na_2HPO_4	5.45	กรัม
ยีสต์สกัด	0.1	กรัม

การเตรียม Stock สารแกมมา-เอชซีเอช: ชั่งสารแกมมา-เอชซีเอช 0.25 กรัม ละลายในสารละลายอะซิโตนปริมาตร 50 มิลลิลิตร (ความเข้มข้น 5,000 ส่วนในล้านส่วน) กรองผ่านเยื่อกรองชนิดไนลอนขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางรูพรุน 0.22 ไมโครเมตร ที่ฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที จากนั้นเติมในอาหาร MSYM ให้ได้ความเข้มข้นตามที่ต้องการ

2. Nutrient □gar

Beef extract	3.0	กรัม
Peptone	5.0	กรัม
Agar	15.0	กรัม

3. Nutrient broth

สูตรและวิธีการเตรียมเช่นเดียวกับข้อ 2 แต่ไม่เติมวุ้น (agar)

ภาคผนวก ข

การเทียบเคียงเชื้อจุลินทรีย์โดยอาศัยคุณสมบัติทางชีวเคมี

1. การทดสอบแคตาเลส (Catalase test)

อุปกรณ์และสารเคมี

1. สารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ความเข้มข้นร้อยละ 3
2. กระจกสไลด์
3. ห่วงเขี่ยเชื้อ

วิธีการ

1. เลี้ยงเชื้อในอาหาร nutrient broth บ่มที่อุณหภูมิที่เหมาะสมเป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง
2. หยดสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ความเข้มข้นร้อยละ 3 ลงบนสไลด์
3. ใช้ห่วงเขี่ยเชื้อ เขี่ยเชื้อลงไปแล้วทำการผสมให้เข้ากัน

การวิเคราะห์

ผลบวก เกิดฟองแก๊ส

ผลลบ ไม่มีฟอง

2. การทดสอบออกซิเดส (xidase test)

อุปกรณ์และสารเคมี

1. กระดาษกรอง
2. สารละลาย tetramethyl-*p*-phenylenediamine HCl ความเข้มข้นร้อยละ 0.5
3. เข็มเขี่ยเชื้อ

วิธีการ

1. วางกระดาษกรองที่อิ่มด้วยสารละลาย tetramethyl-*p*-phenylenediamine HCl ความเข้มข้นร้อยละ 0.5
2. ใช้เข็มเขี่ยเชื้อเขี่ยโคโลนีออกมาทดสอบ โดยลากโคโลนีไปมาบนกระดาษ

การวิเคราะห์

ผลบวก เกิดสีม่วงเข้มภายใน 10 วินาที

ผลลบ ไม่เกิด

3. การทดสอบ MR (Methyl red test)

อุปกรณ์และสารเคมี

1. อาหารเหลว MR-VP
2. methyl red

วิธีการ

1. เลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว MR-VP บ่มที่อุณหภูมิเป็นเวลา 5 วัน
2. หยด methyl red 5-6 หยดลงไปในอาหารเหลวที่มีเชื้อ 5 มิลลิลิตร

การวิเคราะห์

ผลบวก สีแดง

ผลลบ เหลืองหรือส้ม

4. การทดสอบ VP (Voges-Proskauer (VP) test)

อุปกรณ์และสารเคมี

1. อาหารเหลว MR-VP
2. สารละลาย naphthol ความเข้มข้นร้อยละ 5
3. สารละลายโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้นร้อยละ 40

วิธีการ

1. เลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว MR-VP บ่มเป็นเวลา 48 ชั่วโมง
2. ถ่ายเชื้อจากข้อ 1 มา 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดสอบ
3. เติม สารละลาย naphthol ความเข้มข้นร้อยละ 5 ปริมาตร 0.6 มิลลิลิตร
4. เติมสารละลายโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้นร้อยละ 40 ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน

การวิเคราะห์

ผลบวก สีแดงภายใน 5 นาที

ผลลบ สีเหลือง

5. การทดสอบอินโดล (Indole test)

อุปกรณ์และสารเคมี

1. อาหารเหลว Tryptone
2. สารละลาย Kovacs' reagent

วิธีการ

1. เลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว Tryptone
2. บ่มไว้เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง แล้วเติมสารละลาย Kovacs' reagent ปริมาตร 5 มิลลิลิตรลงไป

การวิเคราะห์

ผลบวก สีแดงที่ผิวชั้นบน

ผลลบ ไม่เกิดสี ถ้าเป็นสีส้มจัดเป็น variable เนื่องจาก tryptophan ถูกออกซิไดซ์เป็น s atole (methyl indole)

6. การทดสอบการใช้ซิเตรต (Citrate utilization test)

อุปกรณ์และสารเคมี

1. อาหารแข็ง Simmons' Citrate agar
2. เข็มเขี่ยเชื้อ

วิธีการ

1. เลี้ยงเชื้อในอาหารแข็ง Simmons' Citrate agar โดยใช้เข็มเขี่ยเชื้อทำเชื้อให้เป็นจุด
2. บ่มเป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง (สูงสุด 7 วัน)

การวิเคราะห์

ผลบวก มีการเจริญอาหารจะเปลี่ยนจากสีเขียวเป็นสีน้ำเงิน

ผลลบ ไม่มีการเจริญ

7. การทดสอบการย่อยเจลาติน (Gelatin liquefaction test)

อุปกรณ์และสารเคมี

1. อาหารเหลว nutrient broth
2. เจลาตินความเข้มข้นร้อยละ 12
3. สารละลาย mercuric chloride

วิธีการ

1. เลี้ยงเชื้อในอาหาร nutrient broth ที่มีการเติมเจลาตินความเข้มข้นร้อยละ 12 โดยเลี้ยงเชื้อให้เป็นจุดที่เรียกว่า point inoculate บ่มไว้เป็นเวลา 3 วัน
2. เทสารละลาย mercuric chloride ลงไป
3. อ่านผล

การวิเคราะห์

ผลบวก เกิดวงใสรอบบริเวณที่เชื้อเจริญ

ผลลบ ไม่เกิด

8. การทดสอบการย่อยแป้ง

อุปกรณ์และสารเคมี

1. อาหารแข็ง nutrient agar ที่มี soluble starch ร้อยละ 0.2
2. สารละลายไอโอดีน

วิธีการ

1. เลี้ยงเชื้อในอาหารแข็ง nutrient agar ที่มี soluble starch ร้อยละ 0.2 บ่มที่อุณหภูมิที่เหมาะสม จนเชื้อมีการเจริญเกิดขึ้น
2. เทน้ำยาไอโอดีนลงไป แล้วอ่านผล

การวิเคราะห์

ผลบวก อาหารเป็นสีน้ำเงินแต่รอบๆโคโลนีไม่มีสี

ผลลบ เป็นสีน้ำเงินหมด

9. การทดสอบการรีดิวซ์ไนเตรต (Nitrate reduction test)

อุปกรณ์และสารเคมี

1. อาหารเหลว nitrate broth
2. sulfinilic acid
3. α- naphthylamine
4. ผงสังกะสี

วิธีการ

1. เขี่ยเชื้อที่มีอายุ 24 ชั่วโมงลงในอาหารเหลว nitrate broth
2. บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 48 ชั่วโมง
3. หยด sulfinilic acid และ α- naphthylamine
4. ถ้าเกิดสีแดงปนตะกอนแสดงว่าผลการทดสอบเป็นบวก
5. ถ้าไม่เกิดให้เติมผงสังกะสีลงไป

การวิเคราะห์

ผลบวก ไม่เกิดสีเนื่องจากไนเตรตถูกรีดิวซ์เป็นไนไตรต์และไนโตรเจน

ผลลบ ถ้าเกิดสีแดงผลเป็นลบ

10. การทดสอบการสร้างแก๊สไฮโดรเจนซัลไฟด์ (Hydrogen sulfide (H_2S) production test)

อุปกรณ์และสารเคมี

1. เข็มเขี่ยเชื้อ
2. อาหารแข็ง triple sugar iron agar (TSI)

วิธีการ

1. ใช้เข็มเขี่ยเชื้อแตะลงในอาหารแข็ง TSI slant โดยขีดไปขีดมาที่ผิวของพื้นเอียงแล้วแทงลงไปที่ส่วนก้นหลอด
2. บ่มที่อุณหภูมิห้อง ตรวจผลทุกวันจนครบ 5 วัน

การวิเคราะห์

ผลบวก - เกิดสีเหลืองเฉพาะที่ก้นหลอดส่วนผิวพื้นเอียงของอาหารจะมีสีแดงแสดงว่าเชื้อใช้ กลูโคสเพียงอย่างเดียว

- มีสีเหลืองเกิดขึ้นที่ผิวพื้นเอียงเนื่องจากเชื้อมีการใช้แลคโตสหรือซูโครสด้วย
- ถ้ามีการผลิต อาหารจะลอยขึ้นจากก้นหลอด ถ้าเชื้อผลิต H_2S จะเกิดสีดำของเฟอรัสซัลไฟด์ตามรอยที่เชื้อเจริญ

11. การทดสอบการหมักคาร์โบไฮเดรต (Carbohydrate fermentation test)

อุปกรณ์และสารเคมี

1. อาหาร fermentation carbohydrate medium
2. หลอดดักแก๊ส

วิธีการ

1. เลี้ยงเชื้อในอาหาร fermentation carbohydrate medium
2. บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 18 - 24 ชั่วโมง
3. ตรวจผลโดยดูการเปลี่ยนสีของอาหารและดูการเกิดแก๊สในหลอดดักแก๊ส

การวิเคราะห์

ผลบวก - อาหารเปลี่ยนเป็นสีเหลือง แต่ไม่มีแก๊สในหลอดดักแก๊ส แสดงว่าเชื้อหมักคาร์โบไฮเดรตได้เฉพาะกรด

- อาหารมีสีเหลืองและแก๊สในหลอดดักแก๊ส แสดงว่าเชื้อหมักในคาร์โบไฮเดรตแล้วได้กรดและแก๊ส

ผลลบ - อาหารไม่เปลี่ยนสีคือเป็นสีเขียว

12. การทดสอบการออกซิไดซ์และการหมัก (xidation-Fermentation test)

อุปกรณ์และสารเคมี

1. อาหาร Hugh and Leifson's O-F medium
2. พาราฟิน
3. หลอดดักแก๊ส

วิธีการ

1. เลี้ยงเชื้อในอาหาร Hugh and Leifson's O-F medium ชนิดละ 2 หลอดโดยการแทงตรงลงไปในอาหาร
2. หลอดหนึ่งให้อยู่ในสภาพขาดอากาศโดยเทพาราฟินเหลวปิดผิวหน้าประมาณ 2 เซนติเมตร
3. บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง นานประมาณ 48 ชั่วโมง
4. ดูการเปรียบเทียบสีของอาหารและการเกิดแก๊ส

การวิเคราะห์

อาหารเปลี่ยนจากสีเขียวเป็นเหลือง เฉพาะหลอดที่ไม่ได้เทพาราฟิน แสดงว่าเกิด oxidation แต่ถ้าเกิดเปลี่ยนสีทั้งสองหลอด แสดงว่าเป็น fermentation

สูตรอาหารที่ใช้ในการจำแนกเชื้อ

อาหารทุกสูตรใช้ผสมน้ำกลั่น 1 ลิตร

1. Nutrient agar

Beef extract	3.0	กรัม
Peptone	5.0	กรัม
Agar	15.0	กรัม

2. Motility test medium

Tryptone	10.0	กรัม
Sodium chloride	5.0	กรัม
Agar	5.0	กรัม

3. Hugh and Leifson's O-F medium (pH 7.1)

Peptone	2.0	กรัม
K_2HPO_4	0.3	กรัม
NaCl	5.0	กรัม
Agar	3.0	กรัม
Bromthymol blue 0.2%	15.0	กรัม

4. Nitrate broth

Beef extract	3.0	กรัม
Peptone	5.0	กรัม
Potassium nitrate	1.0	กรัม

5. Nutrient gelatin medium

Beef extract	3.0	กรัม
Peptone	5.0	กรัม
Gelatin	120.0	กรัม

6. Tryptone broth

Tryptone	10	กรัม

7. MR-VP medium

Buffered Peptone	7.0	กรัม
Dipotassium phosphate	5.0	กรัม
Dextrose	5.0	กรัม

pH 6.9 ที่ 25 องศาเซลเซียส

8. Simmons' citrate agar

$MnSO_4$	0.2	กรัม
$(NH_4)H_2PO_4$	1.0	กรัม
K_2HPO_4	1.0	กรัม
NaCl	5.0	กรัม
Sodium citrate	2.0	กรัม
Bromthymol blue	0.08	กรัม
Agar	15.0	กรัม

pH 6.8

9. Starch agar

Beef extract	3.0	กรัม
Peptone	5.0	กรัม
Potato starch	10.0	กรัม
Agar	15.0	กรัม

10. Fermentation Carbohydrate medium

Beef extract	3.0	กรัม
Peptone	5.0	กรัม
น้ำตาล	10.0	กรัม

(กลูโคส แลกโตส ซูโครส)

Bromthymol blue 1.6%	4.0	กรัม

pH 6.8-7.0

สารเคมีที่ใช้ในการศึกษาคุณสมบัติทางชีวเคมี

1. สารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ความเข้มข้นร้อยละ 3

H_2O_2	3.0	กรัม
H_2O	100	มิลลิลิตร

2. สารละลายเมทิลเรด (Methyl red)

Methyl red	0.8	กรัม
Ethanol 95%	300	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	200	มิลลิลิตร

3. สารละลายทดสอบไนเตรต (Nitrate test solution)

สารละลาย A:

Sulfanilic acid	0.8	กรัม
5 N acetic acid	100	มิลลิลิตร

4. Voges-Prosauer test solution

สารละลาย A (เก็บในขวดสีชา):

Alpha naphthol	10	กรัม
Ethanol 95%	100	มิลลิลิตร

สารละลาย B:

KOH	20	กรัม
น้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร

5. Bromthymol blue 1.6%

Bromthymol blue	1.6	กรัม
Ethyl alcohol	100	มิลลิลิตร

ภาคผนวก ค

ตารางผลการทดลอง

ตารางที่ 13 ปริมาณสารแกมมา-เอชซีเอช (ส่วนในล้านส่วน) จากการย่อยสลายโดยกลุ่มเชื้อแบคทีเรียที่คัดแยกจากดิน เมื่อเลี้ยงในอาหาร MSYM+HCH_{200} ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่า 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 96 ชั่วโมง

Table 13. γ-HCH concentration (ppm) from bacterial consortium degraded during growth in MSYM+HCH_{200} and incubated at 30°C, 150 rpm for 96 hours.

	0 hr	12 hr	24 hr	36 hr	48 hr	60 hr	72 hr	84 hr	96 hr
Consortium 1	230.15	228.83	203.54	182.71	112.41	86.77	79.01	79.78	32.73
Consortium 2	217.06	200.76	189.85	199.83	108.51	88.24	80.30	63.95	54.25
Consortium 3	198.81	195.91	186.72	104.93	78.71	83.62	92.98	88.45	94.05
Consortium 4	217.81	182.72	111.93	110.89	74.81	86.11	74.72	87.33	74.82
Consortium 5	222.00	166.49	152.18	139.67	68.65	40.14	36.78	42.52	45.22
Consortium 6	187.23	165.47	192.50	167.57	125.50	88.75	140.28	90.35	44.22
Consortium 7	178.48	197.54	185.02	166.74	136.30	131.10	124.76	61.95	38.87
Consortium 8	210.59	195.36	171.95	156.39	110.61	113.83	113.27	103.84	119.98
Consortium 9	185.24	147.86	136.56	81.72	67.17	41.06	60.04	34.38	2.97
Consortium 10	188.96	211.15	196.61	171.59	154.95	113.15	122.66	119.49	49.48
Consortium 11	240.12	205.83	158.41	100.17	106.19	117.22	122.49	91.40	72.19
Consortium 12	214.28	192.65	162.17	133.96	86.70	97.29	114.84	80.58	101.88
No bacteria	217.41	195.20	196.88	179.50	202.29	213.43	187.02	184.88	197.86

ตารางที่ 14 การเปลี่ยนแปลงปริมาณเชื้อกลุ่มที่ 9 (Log CFU/mL) และปริมาณสารแกมมา-เอชซีเอช (ส่วนในล้านส่วน) เมื่อเลี้ยงในอาหาร MSYM+HCH_{200} ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่า 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 96 ชั่วโมง

Table 14. Changing of consortium-9 (Log CFU/mL) and γ-HCH concentration (ppm) from bacterial consortium degraded during grown in MSYM+HCH_{200} and incubated at 30°C, 150 rpm for 96 hours.

	0 hr	12 hr	24 hr	36 hr	48 hr	60 hr	72 hr	84 hr	96 hr
HCH concentration	185.24	147.86	136.56	81.72	67.17	41.06	60.04	34.38	2.97
Viable cell	7.26	7.48	7.97	8.05	8.25	8.23	8.07	8.08	8.03
No bacteria	217.41	195.20	196.88	179.50	202.29	213.43	187.02	184.88	197.86

ตารางที่ 15 การเปลี่ยนแปลงปริมาณเชื้อเดี่ยว (Log CFU/mL) ในกลุ่มเชื้อที่ 9 เมื่อเลี้ยงกลุ่มเชื้อในอาหาร MSYM+HCH_{200} ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่า 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 96 ชั่วโมง

Table 15. Changing of each bacteria (Log CFU/mL) in consortium-9 during consortium grown in MSYM+HCH_{200} and incubated at 30°C, 150 rpm for 96 hours.

	0 hr	12 hr	24 hr	36 hr	48 hr	60 hr	72 hr	84 hr	96 hr
GH9-1	5.30	5.70	6.79	6.83	7.90	7.86	7.99	7.64	6.90
GH9-2	6.95	6.00	6.30	6.00	0.00	0.00	6.30	7.30	6.00
GH9-3	0.00	0.00	6.00	5.70	6.85	6.85	0.00	0.00	0.00
GH9-4	0.00	0.00	0.00	0.00	6.70	7.18	6.48	6.85	0.00

ตารางที่ 16 ปริมาณสารแกมมา-เอชซีเอช (ส่วนในล้านส่วน) จากการย่อยสลายโดยเชื้อเดี่ยวจากกลุ่มเชื้อที่ 9 และกลุ่มเชื้อที่ 9 เมื่อเลี้ยงในอาหาร MSYM+HCH_{200} ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่า 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 96 ชั่วโมง

Table 16. γ-HCH concentration (ppm) from individual bacterial isolate and consortium-9 degraded during grown in MSYM+HCH_{200} and incubated at 30°C, 150 rpm for 96 hours.

	0 hr	12 hr	24 hr	36 hr	48 hr	60 hr	72 hr	84 hr	96 hr
GH9-1	187.23	170.05	119.46	116.16	120.02	149.00	111.41	52.57	48.58
GH9-2	170.12	127.05	121.21	120.65	108.50	107.05	129.29	76.43	79.30
GH9-3	185.24	169.09	163.09	163.38	135.80	142.73	112.99	122.46	89.50
GH9-4	188.96	203.21	167.24	162.62	168.03	150.12	172.23	134.34	125.25
Consortium-9	180.00	140.34	127.58	83.16	65.20	45.62	52.56	70.24	27.38
No bacteria	177.24	162.36	189.88	177.67	173.94	159.06	186.58	174.37	199.78

ตารางที่ 17 การเปลี่ยนแปลงปริมาณเชื้อเดี่ยว (Log CFU/mL) จากกลุ่มเชื้อที่ 9 เมื่อเลี้ยงในอาหาร MSYM+HCH_{200} ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่า 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 96 ชั่วโมง

Table 17. Changing of individual isolate (Log CFU/mL) from consortium-9 during grown in MSYM+HCH_{200} and incubated at 30^{o}C, 150 rpm for 96 hours.

	0 hr	12 hr	24 hr	36 hr	48 hr	60 hr	72 hr	84 hr	96 hr
GH9-1	6.65	7.10	7.56	7.67	7.70	7.60	7.70	7.40	6.80
GH9-2	6.26	6.50	6.97	6.60	6.66	6.40	6.30	6.20	6.00
GH9-3	6.10	6.40	6.30	7.10	7.20	7.25	7.20	7.21	7.23
GH9-4	6.10	6.60	6.77	7.00	7.10	7.10	7.00	6.70	6.40
Consortium-9	6.66	7.46	7.98	8.20	8.60	9.10	8.80	8.20	8.36

ตารางที่ 18 ปริมาณสารแกมมา-เอชซีเอช (ส่วนในล้านส่วน) ของแบคทีเรียผสม 2 สายพันธุ์และกลุ่มเชื้อที่ 9 เมื่อเลี้ยงในอาหาร MSYM+HCH_{200} ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่า 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 96 ชั่วโมง

Table 18. γ-HCH concentration (ppm) from mixed culture (two isolates) degraded during grown in MSYM+HCH_{200} and incubated at 30°C, 150 rpm for 96 hours.

	0 hr	12 hr	24 hr	36 hr	48 hr	60 hr	72 hr	84 hr	96 hr
Mix (GH9-1+GH9-2)	195.00	148.00	127.61	116.16	120.02	105.60	89.10	57.59	57.59
Mix (GH9-1+GH9-3)	197.00	169.00	121.21	111.38	101.94	75.08	43.56	43.56	28.05
Mix (GH9-1+GH9-4)	200.00	186.00	150.00	140.00	135.80	120.00	102.86	108.90	74.00
Mix (GH9-2+GH9-3)	225.00	150.00	121.21	112.20	108.90	100.00	97.00	95.00	94.00
Mix (GH9-2+GH9-4)	200.00	165.13	144.23	141.64	138.27	128.59	115.76	105.38	111.44
Mix (GH9-3+GH9-4)	187.00	186.15	165.17	163.00	151.91	146.42	142.61	128.40	111.00
Consortium-9	180.00	140.34	127.58	100.16	87.20	60.62	52.56	50.24	22.38
No bacteria	177.24	182.36	189.88	187.67	193.94	199.00	186.58	184.37	179.78

ตารางที่ 19 การเปลี่ยนแปลงปริมาณแบคทีเรีย (Log CFU/mL) ผสม 2 สายพันธุ์และกลุ่มเชื้อที่ 9 เมื่อเลี้ยงในอาหาร MSYM+HCH_{200} ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่า 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 96 ชั่วโมง

Table 19. Changing of mixed culture (two isolates) (Log CFU/mL) during grown in MSYM+HCH_{200} and incubated at 30°C, 150 rpm for 96 hours.

	0 hr	12 hr	24 hr	36 hr	48 hr	60 hr	72 hr	84 hr	96 hr
Mix (GH9-1+GH9-2)	5.20	6.20	6.50	6.67	7.12	7.40	7.31	6.72	6.23
Mix (GH9-1+GH9-3)	5.50	5.90	6.77	7.30	7.80	8.00	7.90	8.40	8.00
Mix (GH9-1+GH9-4)	5.80	6.20	6.44	7.00	7.00	7.70	7.80	7.90	7.90
Mix (GH9-2+GH9-3)	5.50	5.90	6.77	7.00	7.40	7.50	7.60	7.70	8.00
Mix (GH9-2+GH9-4)	5.70	5.80	6.30	7.00	7.20	7.10	7.00	7.20	7.20
Mix (GH9-3+GH9-4)	5.91	6.30	7.00	7.20	7.60	7.50	7.80	7.70	7.20
Consortium-9	6.00	6.60	7.98	8.20	8.60	8.60	8.30	8.50	8.60

ตารางที่ 20 ปริมาณสารแกมมา-เอชซีเอช (ส่วนในล้านส่วน) ของแบคทีเรียผสม 3 และ 4 สายพันธุ์ และกลุ่มเชื้อแบคทีเรียที่ 9 เมื่อเลี้ยงในอาหาร MSYM+HCH_{200} ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่า 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 96 ชั่วโมง

Table 20. γ-HCH concentration (ppm) of mixed culture (three and four isolates) during growth in MSYM+HCH_{200} and incubated at 30°C, 150 rpm for 96 hours.

	0 hr	12 hr	24 hr	36 hr	48 hr	60 hr	72 hr	84 hr	96 hr
without GH9-1	177.56	171.84	156.22	159.74	143.81	83.82	77.92	97.33	93.08
without GH9-2	160.75	150.00	99.04	75.39	56.08	59.47	71.76	69.08	40.57
without GH9-3	185.36	148.42	134.93	129.45	151.95	108.50	115.74	81.38	101.16
without GH9-4	193.33	128.45	116.78	109.41	69.26	63.18	71.30	42.72	49.63
Mix (4 isolates)	168.99	137.23	98.36	104.16	75.22	90.98	70.14	59.94	47.90
Consortium-9	180.00	140.34	127.58	83.16	65.20	45.62	52.56	70.24	27.38

ตารางที่ 21 การเปลี่ยนแปลงปริมาณแบคทีเรีย (Log CFU/mL) ผสม 3 และ 4 สายพันธุ์ และกลุ่มเชื้อแบคทีเรียที่ 9 เมื่อเลี้ยงในอาหาร MSYM+HCH_{200} ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่า 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 96 ชั่วโมง

Table 21. Growth of mixed culture (three and four isolates) (Log CFU/mL) during cultivation in MSYM+HCH_{200} and incubated at 30°C, 150 rpm for 96 hours. grown in MSYM+HCH_{200}

	0 hr	12 hr	24 hr	36 hr	48 hr	60 hr	72 hr	84 hr	96 hr
without GH9-1	6.21	7.23	7.56	7.67	8.12	8.40	8.31	7.72	7.23
without GH9-2	7.00	7.20	6.95	8.00	8.60	8.70	8.90	8.60	8.40
without GH9-3	6.49	6.42	6.83	7.00	7.60	8.00	8.20	8.20	7.50
without GH9-4	6.77	6.42	6.77	7.60	8.10	8.30	8.60	8.40	7.76
Mix (4 isolate)	5.91	6.56	6.88	8.00	8.60	8.90	9.00	8.80	8.60
Consortium-9	6.30	7.46	7.98	8.20	8.60	9.10	8.80	8.20	8.36

ตารางที่ 22 ปริมาณสารแกมมา-เอชซีเอช (ส่วนในล้านส่วน) จากการย่อยสลายโดยแบคทีเรียเดี่ยวจาก 12 กลุ่มเชื้อ เมื่อเลี้ยงในอาหาร MSYM+HCH_{200} ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่า 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 96 ชั่วโมง

Table 22. γ-HCH concentration (ppm) from individual isolate from all consortia degraded during grown in MSYM+HCH_{200} and incubated at 30°C, 150 rpm for 96 hours.

Isolate	0 hr	24 hr	48 hr	72 hr	96 hr
1/1	186.46	127.68	120.02	92.43	69.86
1/2	186.46	171.30	151.94	144.56	135.32
1/3	186.46	150.08	135.80	102.86	104.93
2/1	186.46	121.60	112.23	98.00	123.22
2/2	186.46	144.97	139.27	116.76	139.67
2/3	186.46	165.58	153.25	143.61	147.57
3/1	186.46	168.75	164.09	122.21	130.07
3/2	186.46	164.12	164.38	121.65	156.39
3/3	186.46	139.45	136.80	109.50	81.72
4/1	186.46	171.12	173.73	178.05	171.59
4/2	186.46	173.23	113.99	130.29	94.50
4/3	186.46	185.34	143.46	134.12	133.96
5/1	186.46	172.74	155.92	145.52	159.50
5/2	186.46	187.66	145.68	127.74	88.75
5/3	186.46	191.02	158.62	162.04	152.43
5/4	186.46	152.16	125.88	121.39	120.50
6/1	186.46	169.48	105.96	58.55	41.06
6/2	186.46	161.10	146.68	78.78	46.48
6/3	186.46	174.50	149.43	141.97	117.22
7/1	186.46	123.57	116.48	113.28	85.02
7/2	186.46	131.14	124.14	135.89	145.74
7/3	186.46	176.14	103.60	114.88	126.56
8/1	186.46	186.09	151.23	158.49	141.84
8/2	186.46	164.10	145.35	142.05	142.05
8/3	186.46	182.53	155.19	165.98	158.83

ตารางที่ 22

Table 22. (Continued)

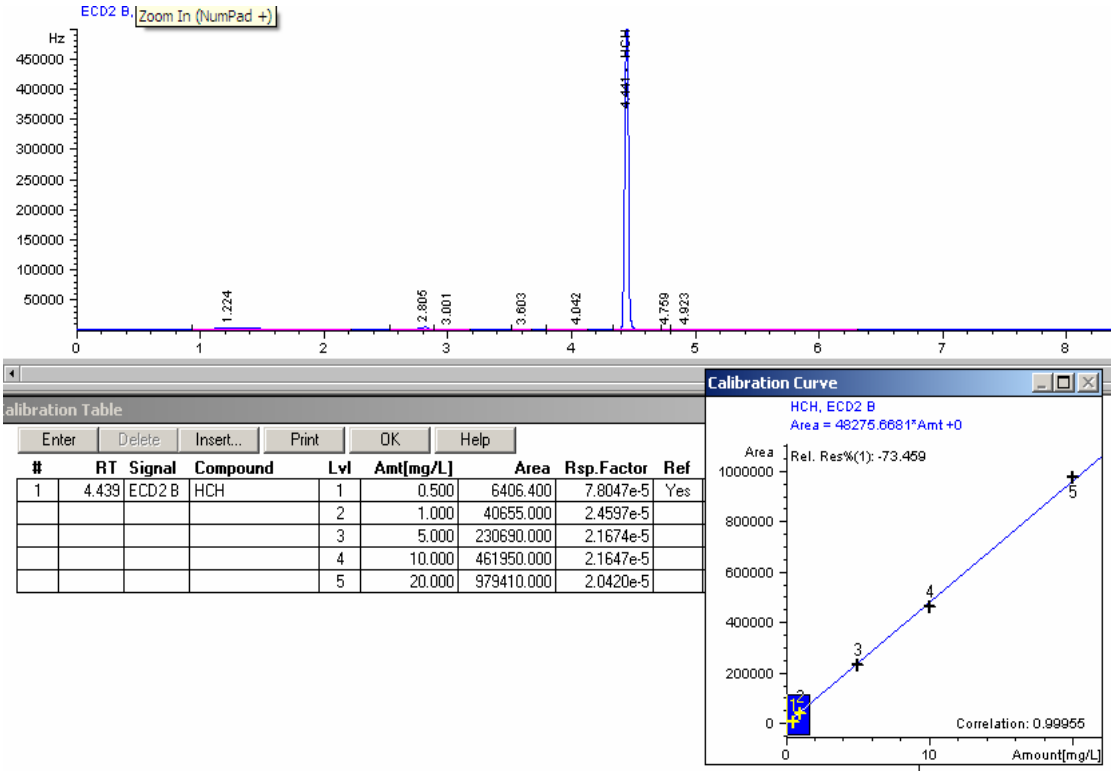
Isolate	0 hr	24 hr	48 hr	72 hr	96 hr
9/1	186.46	120.46	121.02	95.74	48.58
9/2	186.46	144.88	109.50	90.96	80.81
9/3	186.46	164.09	143.46	155.99	89.50
9/4	186.46	176.24	169.03	122.06	110.50
10/1	186.46	204.64	183.71	113.41	86.30
10/2	186.46	190.95	200.83	109.51	63.94
11/1	186.46	187.82	105.93	79.71	86.70
11/2	186.46	133.33	131.89	125.81	138.65
12/1	186.46	153.64	140.67	69.65	154.95
12/2	186.46	194.08	168.57	126.50	126.19

ภาคผนวก ง

กราฟมาตรฐาน

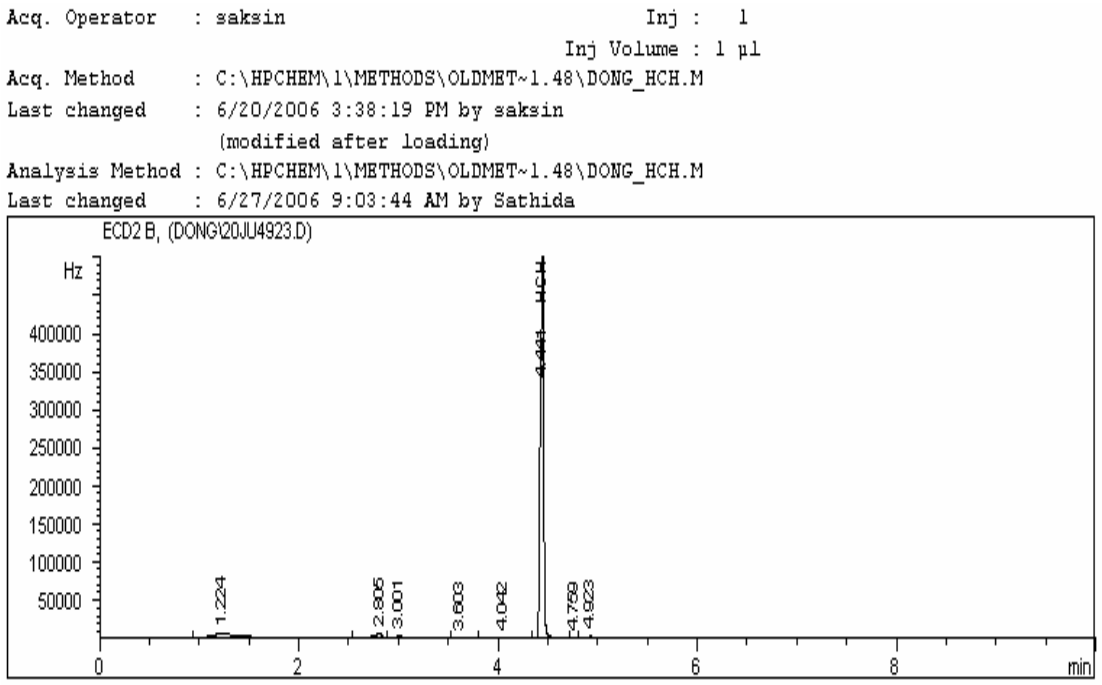
การเตรียมกราฟมาตรฐานสารแกมมา-เอชซีเอช

เตรียมสารมาตรฐานแกมมา-เอชซีเอชที่ความเข้มข้นต่างๆ วิเคราะห์ปริมาณสารแกมมา-เอชซีเอชด้วยเครื่อง GC-μECD ตามวิธีการวิเคราะห์ในข้อ 5.1 (บทที่ 2) เครื่องจะทำการวิเคราะห์และเขียนกราฟมาตรฐานระหว่างพื้นที่ใต้กราฟและความเข้มข้นออกมา (ภาพที่ 21) และทำการคำนวณค่าความเข้มข้นอัตโนมัติเมื่อทำการฉีดตัวอย่างพร้อมทั้งแสดงโครมาโตแกรมของสารตัวอย่าง (ภาพที่ 22)



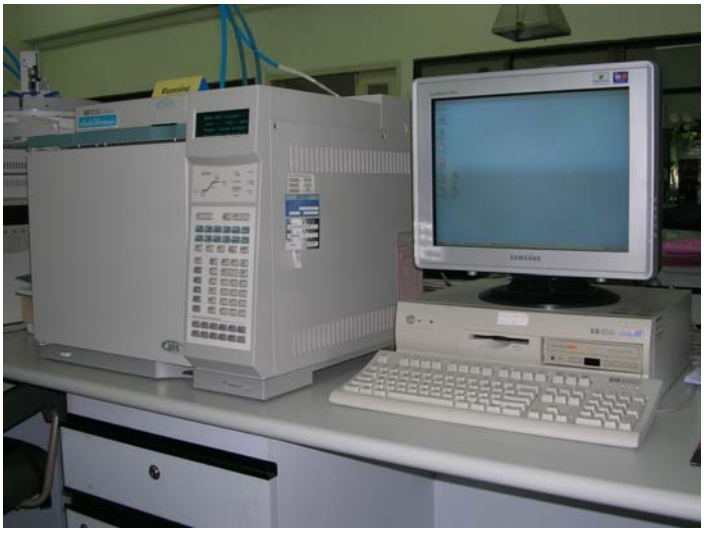
ภาพที่ 21 กราฟมาตรฐานของสารแกมมา-เอชซีเอชที่ได้จากเครื่อง GC-μECD

Figure 21. Standard curve of γ-HCH from GC-μECD.



ภาพที่ 22 โครมาโตแกรมและผลที่แสดงจากการฉีดตัวอย่างในเครื่อง GC-μECD

Figure 22. Chromatogram and result from GC-μECD.



ภาพที่ 23 เครื่อง GC-μECD Hewlett-Pac ard รุ่น 6890

Figure 23. GC-μECD Hewlett-Pac ard model 6890.

TTTGCAGAGATACACAGACGAGCTAGCAGTACCTGCCATCTGGGGGCATAGACTACTCAGAT
AACACATCTAGCGTAGGCTACTTCTTCAGATACTGGCACGGTCAGCAAGATACCTCGGAATA
GCCTGTCGCTAGAACAGTTCATCAGTACGCATTGCCCGCTATGGATGTGACGTATCAGCTCG
ACCAAGAGTTCTGATATCTGCCTGTGGCTGCTGTCTCCCGTAAGAGAGGTATCCGTAGCTGT
TTCCACTTTAAGTTGGGAGGAAGGGCAGTAAGTTAATACCTTGCTGTTTTGACGTTACCGAC
AGAATAAGCACCGGCTAACTCTGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACAGAGGGTGCAAGCGTTAA
TCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCGCGTAGGTGGTTTGTTAAGTTGGATGTGAAAGCCCCGG
GCTCAACCTGGGAACTGCATCCAAAACTGGCAAGCTAGAGTACGGTAGAGGGTGGTGCATTT
TATGGTGCAAGCGGTTTTTGGAATGATAGGCTTACTAAGAGGAGCCGTACCGGTTGTTAATG
AAGCGATAACAATATGGCAAAGGCATCGAAATATGGAAAGGTGCACTGGAGTACCGGATGTT
GGAGGTGGTACTTTTTTACGACAGGGATAAACTGAGGGGTTGTTACCAAAAGGAATAAAGAG
GTGCACTTACCTAGTATAAAATAATTTGGTAGAAATTGTTGTCAGTGGGTCTGGGCCTAAAA
GAATATGCAGAGGAAAAAACTTGGAAAATGCCTTCCCGGAGAATTGGTAAATTTTTGG

ภาพที่ 24 ลำดับเบส 16S rDNA ของเชื้อ GH9-1

Figure 24. 16S rDNA base sequences of isolated bacteria GH9-1

GGGCAGCGCAGCTTACCTGCAGTCGACGGCAGCACGGGTGCTTGCACCTGGTGGCGAGTGGC
GAACGGGTGAGTAATACATCGGAACATGTCCTGTAGTGGGGGATAGCCCGGCGAAAGCCGGA
TTAATACCGCATACGATCCACGGATGAAAGCGGGGGACCTTCGGGCCTCGCGCTATAGGGTT
GGCCGATGGCTGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCTACCAAGGCGACGATCAGTAGCTG
GTCTGAGAGGACGACCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAG
CAGTGGGGAATTTTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCAATGCCGCGTGTGTGAAGAAG
GCCTTCGGGTTGTAAAGCACTTTTGTCCGGAAAGAAATCCTTGGCCCTAATATGGCCGGGGG
ATGACGGTACCGGAAGAATAAGCACCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAG
GGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGTGCGCAGGCGGTTTGCTAAGACCGA
TGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAACTCCATTGGGGACTGAGCAGCCTAGAGTAGGGCA
GAGGGGAGAAGAATTCCACGCGTACCAGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAATACCGATGG
CGAAGGCAGCCCCCTGGGCCAATACTGACGCTCATGCACGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGA
TTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCCTAAACGATGTCAACTAGTTGGTGGGGGATTCATTTCC
TTAGTAACGTAGACTAAACCCGTGAAGTTTGACCCCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGATTAAA
ACTCAAAGGAATTGTCGGGGACCCGCACAAGCGGTGGATGATGTGGATTAATTTGATGCAAC
GCGAAAAACCTTACCTACCCTTGACATGGTCGGAATCCTGAAGAGATTCGGGAGTTCTCGAA
AGAGAACCGGCGCACAGGTGCTGCATGGCCGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTA
AGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTCCTTAGTTGGTACGCAAGAGCACTCTAAGGAGACTG
CCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCCTCATGGCCCTTATGGGTAGGG
CTTCACACGTCATACAATGGTCGGAACAGAGGGTTGCCAACCCGCGAGGGGGAGCTAATCCC
AGAAAACCGATCGTAGTCCGGATTGCACTCTGCAACTCGAGTGCATGAAGCTGGAATCGCTA
GTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGG

ภาพที่ 25 ลำดับเบส 16S rDNA ของเชื้อ GH9-2

Figure 25. 16S rDNA base sequences of isolated bacteria GH9-2

GGCAGCGCAGGCTATAATGCAGTCGAGGGGCAGCATGGGTAGCAATACCTGATGGCGACCGGCAAACGG
GTGCGGAACACGTACGCAACCTTCCTTCAAGCGGGGAATAGCCCAGAGAAATTTGGATTAATACCCCAT
AGGAATGTAGTCTCGCATGAGACAGCATTTAAAGATTTATCACTTGAAGATGGGCGTGCGTCTGATTAG
GTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGCCGACGATCAGTAACTGGCGTGAGAGCGCGACCAGTCACAC
GGGCACTGAGACACGGGCCCGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAAGGAATATTGGTCAATGGACGCAAGT
CTGAACCAGCCATGCCGCGTGGAGGATGAAGGCCCTCTGGGTTGTAAACTTCTTTTATCTGGGACGAAA
CACTTCTTATCTAAGGAGCTTGACGGTACCAGATGAATAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGC
GGTAATACGGAGGGTGCAAGCGTTATCCGGATTCACTGGGTTTAAAGGGTGCGTAGGCGGACTTGTAAG
TCCGTGGTGAAATCTCCGAGCTTAACTCGGAAACTGCCATGGATACTATAAGTCTTGAATGTTGTGGAG
GTTAGCGGAATAGTTCATGTAGCGGTGAAATGCTTAGATATGACCTAGAACACCAATTGCGAAGGCAGC
TGGCTACACAATAATTGACGCTGAGGCACGAAAGCGTGGGGATCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGT
CCACGCCCTAAACGATGATTACTCGACATTTGCGATATATTGTAAGTGTCTGAGCGAAAGCATTAAGTA
ATCCACCTGGGAAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGTCCGCACAAGCGGTGG
AGCATGTGGTTTAATTCGATGATACGCGAGGAACCTTACCTGGGCTAGAATGCAATTTGACCGGTCCTG
AAAGGGATTTTTGTAGCAATACACAGATTGTAAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGCCGTGAGG
TGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTATCACTAGTTGCCAGCACGTAATGGTGGGAACTCT
AGTGAAACTGCCGTCGTAAGACGCGAGGAAGGAGGGGATGATGTCAAGTCATCATGGCCTTTATGCCCA
GGGCTACACACGTGCTACAATGGTAGAGACAAAGGGCTGCTACCTGGTAACAGGCTGCTAATCTCAAAA
ACTCTATCTCAGTTCGGATTGAGGTCTGCAACTCGACCTCATGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGTATA
TCAGCAATGATACGGTGAATACGTTCCCGGACCTTGTACACACCGCCCGTCAAGCCATGAAAGCCGGGG
GGACCTAAGTCGGAACCGCAAGAGCCGCCAGGTAACCGATCC

ภาพที่ 26 ลำดับเบส 16S rDNA ของเชื้อ GH9-3

Figure 26. 16S rDNA base sequences of isolated bacteria GH9-3

CCCGGCGCGCCTACATGCAGTCGACGCCGCCAGGGTAGCCTGCCCTCGGTGGAGAGTGGCGAACCTTTC
AAAGTACTTCTGAANATGTCCCGTGGTGGCGTATCCTCTTGCCAAAGCCTGGATTATCTACCGCATACA
ATTCTCGGATGAAAGCCGGCGACCTTCGGGCCTCCTGCTATATGGTTGGACGACGCGCTGATTAGCTCA
ATCCTGGGGTAAACGCCTACCATGGCCACCATCACTAGCTGGTCTGAGCAGGACCACCCTCCTCCCTGG
GACTGAGACACGGCCCATACTCCTACGGGAGGCAGCATTGTCCAACTTTGCACCATGGGCGAAAGCCTG
ACCCAGCAATGCCGCCTGTGTCAACAATGCCTTCAGGTTGTAAAGCACTTTTGTCCGCCCCGAAATCCT
TGGTCCTAACATGCCCGGGGGATGACGGTACCCTAACAATAATCACCATGCTAACTACGTGCCACCAGC
CTCGGTAATACTTAAGGTGCAAGCGTTAATCCCAATTACCGGCCGCAAAGCGTGCGCAGGCGGTTTGCT
AATACCGATGTGAAATCCCCGGGCTCAATCCGAGGGAACTGCATTGATGACTGGCAGGCTAGAGATATG
CCACAGGGGCGTAGAATTCCACCTGTACCAGTGAAATGCCTAAAGATGTGGAGGAATACCGATGGCGAA
AGCAGCACCCTGGGCCAACACTGACGCTCATGCACGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCT
GGTAGTCCACGCCCTAAACGATGTCAACTAGTTGTTGGGGATTTCATTTCCTTTAGTAACGTAACTAAC
GCCGTAAAGTTGACCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGATTAAAACTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGC
ACAAGCGGTGGATGATGTGGATTAATTCGATGCAACGCGAAAAACCTTACCTACCCTTGACATGGTCGG
AATCCTGAAGAGATTCGGGAGTGCTCGAAAGAGAACCGGCGCACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCT
CGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTCCTTAGTTGCTACGCAAGAGC
ACTCTAAGGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCCTCATGGCCCTTAT
GGGTAGGGCTTCACACGTCATACAATGGTCGGAACAGAGGGTTGCCAACCCGCGAGGGGGAGCTAATCC
CAGAAAACCGATCGTAGTCCGGATTGCACTCTGCAACTCGAGTGCATGAAGCTGGAATCGCTAGTAATC
GCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGTCTTGTACACACCGCCCGTCACACCAGTGGGAGT
GGGTTTTACCAGAAGTGGCTAGTCTAACCGCAAGGAGGANCGTCCCACGGTAGATCAGCGCGGG

ภาพที่ 27 ลำดับเบส 16S rDNA ของเชื้อ GH9-4

Figure 27. 16S rDNA base sequences of isolated bacteria GH9-4

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ สกุล นายศักดิ์สินทร์ จีนนุ่น

รหัสประจำตัวนักศึกษา 4882024

วุฒิการศึกษา

วุฒิ	ชื่อสถาบัน	ปีที่สำเร็จการศึกษา
วิทยาศาสตรบัณฑิต (เคมี-ชีววิทยา)	มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์	2547

ทุนการศึกษา (ที่ได้รับในระหว่างการศึกษา)

- ทุนอุตสาหกรรมเกษตรสู่ความเป็นเลิศ คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ปีการศึกษา 2548

การตีพิมพ์เผยแพร่ผลงาน

Jeenoon, S., Maneerat, S. and Sobhon, V. 2006. Screening of Indigenous Soil Bacteria with the Ability to Degrade Organochlorine Pesticide, γ-HCH. Proceeding of the 6th Environmental Engineering Association Conference on 7-9 March 2007, Phitsanulo□, Thailand. pp. 213. (Poster presentation)

Jeenoon, S., Maneerat, S. and Sobhon, V. 2007. Study of γ-HCH Biodegradation by Soil Isolates. Proceeding of the 7th National Grad-Research Conference on 4 – 5 April 2007, Suratthani, Thailand. pp. 116. (Oral presentation)

Jeenoon, S., Maneerat, S. and Sobhon, V. 2007. Study of γ-HCH Biodegradation by Bacterial Consortium, Single and Mixed Soil Isolates. 19th Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology on 9 – 12 October 2007, Bang□o□, Thailand. pp. 113. (Poster presentation)