บทที่ 3

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

3.1 การวิเคราะห์ปริมาณสารพารา,พารา′-ดีดีทีในตัวอย่างดิน

การวิเคราะห์สารพารา,พารา′-ดีดีทีในตัวอย่างดิน 18 จาก 23 ตัวอย่าง จากพื้นที่ทางการเกษตรในจังหวัดสงขลาทั้ง 2 แหล่ง คือ ต. บางเหลียง อ. ควนเนียง 17 จุด และ ต.ทุ่งหวัง อ.เมือง 6 จุด (ตารางที่ 3) พบปริมาณสารพารา,พารา′-ดีดีที ตั้งแต่ 0.17 - 9.84 นาโนกรัมต่อกรัมดิน ซึ่งตัวอย่างดินทั้งหมดเก็บจากพื้นที่ที่มีประวัติการใช้สารกำจัดศัตรูพืชมานานกว่า 30 ปี แม้ไม่สามารถระบุชนิดของสารเคมีที่ใช้ได้ แต่จากข้อมูลพบว่าในประเทศไทยเริ่มใช้สารดีดีทีในโครงการกำจัดไข้มาเลเรียตั้งแต่ปี พ.ศ. 2493 (เปี่ยมศักดิ์ มานะเศวต, 2543) จากนั้นก็ใช้แพร่หลายในการเป็นสารกำจัดศัตรูพืช เนื่องจากเป็นสารที่มีประสิทธิภาพมากในการกำจัดแมลงศัตรูพืชและพาหะของโรคต่าง ๆ จนกระทั่งมีการลดปริมาณการใช้สารดีดีทีในช่วงกว่า 10 ปีที่ผ่านมา และถูกห้ามใช้ในทางการเกษตรในปี พ.ศ. 2537 (Kumblad *et al.,* 2001) แต่ยังสามารถใช้ในด้านการสาธารณสุขในหลายจังหวัดในภาคเหนือเพื่อการควบคุมไข้มาลาเรียจนถึงปี พ.ศ. 2542 (Stuetz *et al.,* 2001) จากคุณสมบัติเป็นสารที่คงทนในสภาพแวดล้อม มีครึ่งชีวิตอยู่ในช่วง 15 - 20 ปี โดยในเขตหนาวจะสามารถคงสภาพอยู่ได้เป็นเวลานานกว่าเขตร้อน เนื่องจากกิจกรรมของแบคทีเรียในดินจะมีสูงกว่าเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้น (เปี่ยมศักดิ์ มานะเศวต, 2543)

จากการสำรวจการตกค้างของดีดีทีในหลายพื้นที่โดยเฉพาะในทวีปเอเชีย พบว่ามีปริมาณการใช้ดีดีทีจำนวนมากเนื่องจากเป็นพื้นที่ทางการเกษตรเสียเป็นส่วนใหญ่ Nhan และคณะ (1999) ทำการสำรวจตะกอนดินบริเวณชายฝั่งทะเลทางตอนเหนือของประเทศเวียดนาม พบปริมาณดีดีทีตกค้างอยู่ในช่วง 6.2 - 10.4 นาโนกรัมต่อกรัมดิน ซึ่งเป็นปริมาณตกค้างที่สูงเมื่อเทียบกับสารออร์กาโนคลอรีนชนิดอื่น ๆ Nawab และคณะ (2003) ได้ทำการสำรวจสารออร์กาโนคลอรีนในพื้นที่ทางการเกษตรของประเทศอินเดียพบปริมาณสารพารา,พารา′-ดีดีทีเฉลี่ยประมาณ 3.9 ส่วนในพันล้านส่วน สำหรับประเทศไทยนั้นได้มีการสำรวจปริมาณสารออร์กาโนคลอรีนทั้งในแหล่งดินและน้ำโดย นิคม ละอองศิริวงศ์ และ อดินันท์ หมัดหมาน (2542) ได้สำรวจปริมาณสารออร์กาโนคลอรีนในทะเลสาบสงขลาตอนใน ตอนกลาง และตอนนอก พบปริมาณสารดีดีทีเฉลี่ย 23, 143 และ 68 นาโนกรัมต่อลิตร (พีพีที หรือ ส่วนในล้านล้านส่วน) ตามลำดับ อย่างไรก็ตามเมื่อวิเคราะห์ปริมาณการตกค้างของสารพารา,พารา′ดีดีทีในพื้นที่เขตหนาวพบว่ามีปริมาณสูงกว่าใน

เขตร้อน เช่น ในรายงานของ Harner และคณะ (1999) พบสารออร์กาโนคลอรีนที่ตกค้างในดินของพื้นที่ทางการเกษตร 36 แหล่งในรัฐ อลาบามา ประเทศสหรัฐอเมริกา พบปริมาณสารพารา,พารา′-ดีดีทีในปริมาณสูงถึง 24.6 - 30.5 นาโนกรัมต่อกรัมดิน (พีพีบี หรือ ส่วนในพันล้านส่วน)

ตารางที่ 3 ลักษณะดิน ปริมาณสารพารา,พารา′-ดีดีที และปริมาณเชื้อที่เจริญได้ในสารพารา,พารา′-ดีดีทีในตัวอย่างดิน

Table 3. Soil characteristic, amount of *p,p′*-DDT residue, and total number of soil bacteria grown in the presence of *p,p′*-DDT.

Area	*p,p′*-DDT concentration (ng/g soil)	Number of bacteria grown in the presence of *p,p′*-DDT (CFU/g soil)	Soil texture
Bangleang Subdistrict			
Area 1 Broccoli Field	ND	1.29×10^7	loam
Area 2 Broccoli Field	ND	4.83×10^7	loam
Area 3 Sediment from irrigation ditch	ND	4.50×10^7	clay
Area 4 Broccoli Field	ND	8.62×10^7	loam
Area 5 Sediment from Bangleang River	ND	4.30×10^7	silty clay
Area 6 Cabbage Field	0.19 ± 0.000	1.23×10^5	loam
Area 7 Broccoli Field	0.80 ± 0.181	5.41×10^6	loam
Area 8 Broccoli Field	0.52 ± 0.021	1.45×10^6	loam
Area 9 Sediment from irrigation ditch	1.81 ± 0.323	1.24×10^5	silty clay
Area 10 Water Spinach Field	0.34 ± 0.023	4.21×10^5	loam
Area 11 Broccoli Field	0.84 ± 0.000	1.52×10^6	loam
Area 12 Chilli Field	6.27 ± 0.582	3.20×10^5	loam
Area 13 Yu Choy Field	0.95 ± 0.196	5.25×10^4	loam

ตารางที่ 3 (ต่อ)

Table 3 (cont.).

Area	*p,p′*-DDT concentration (ng/g soil)	Number of bacteria grown in the presence of *p,p′*-DDT (CFU/g soil)	Soil texture
Area 14 Chinese Parsley Field	0.24 ± 0.005	2.51×10^5	loam
Area 15 Broccoli Field	9.84 ± 2.576	8.41×10^6	laterite
Bangleang Subdistrict (cont.)			
Area 16 Chinese Kale/Broccoli Field	0.62 ± 0.253	3.47×10^5	loam
Area 17 Lettuce Field	0.79 ± 0.457	4.21×10^6	laterite
Tungwang Subdistrict			
Area 18 Watermelon Field	0.17 ± 0.000	1.20×10^6	Sandy loam
Area 19 Watermelon Field	0.18 ± 0.035	5.20×10^8	Sandy loam
Area 20 Watermelon Field	0.57 ± 0.403	4.70×10^6	Sandy loam
Area 21 Watermelon Field	0.18 ± 0.003	2.30×10^8	Sandy loam
Area 22 Watermelon Field	1.12 ± 0.230	5.40×10^6	Sandy loam
Area 23 Watermelon Field	1.27 ± 0.633	3.90×10^6	Sandy loam

ND = Not determined

± = Standard deviation values (SD)

การหลงเหลือของสารดีดีทีในพื้นที่ดังกล่าวอาจเนื่องจากพื้นที่นั้นมีการใช้สารกำจัดศัตรูพืชหลายชนิดไม่ได้ใช้เฉพาะเจาะจงแต่เฉพาะสารดีดีทีเป็นเวลานาน จึงทำให้จุลินทรีย์ท้องถิ่นขาดการกระตุ้นให้สร้างเอนไซม์ในการย่อยสลายสารดังกล่าว (วินันท์ดา หิมะหมาน, 2541) ทำให้มีสารพารา,พารา′-ดีดีทีหลงเหลือในพื้นที่ การย่อยสลายสารดีดีทีในดินนั้นจะขึ้นอยู่กับจำนวนจุลินทรีย์และความสามารถในการย่อยสลายของจุลินทรีย์เหล่านั้น (Aislabie, 1997) นอกจากนั้นยังขึ้นอยู่กับลักษณะดิน ซึ่งพบว่าดินทรายจะมีประสิทธิภาพในการชะออกของสารปนเปื้อนได้ดีกว่าดินประเภทอื่นๆ เนื่องจากน้ำซึมผ่านได้ง่ายกว่าทำให้สารปนเปื้อนสามารถถูกชะด้วยน้ำได้มากกว่า และสภาพทางเคมีของสารปนเปื้อน ได้แก่ การละลาย การระเหย การย่อยสลาย และการยึดเกาะสาร

กำจัดศัตรูพืชกับอนุภาคของดิน (Fujimura and Katayama, 1997) ซึ่งสารดีดีทีมีค่าสัมประสิทธิ์การดูดซับ (Adsorption partition coefficient, K_d) สูงถึง 243,000 ในขณะที่สารกำจัดศัตรูพืช เช่น อัลดิคาร์บ (Aldicarb) และคาร์โบฟิวเรน (Carbofuran) มีเพียงค่า K_d เพียง 10 และ 29 ตามลำดับ สารที่มีค่าสัมประสิทธิ์การดูดซับสูงจะถูกชะออกไปได้ยาก นอกจากนั้นปริมาณและชนิดของสารอาหารในดินยังมีผลต่ออัตราการย่อยสลายในดินโดยถ้าเพิ่มสารอาหารจำพวกแหล่งคาร์บอนหรือสารลดแรงตึงผิวจะมีผลให้อัตราการย่อยสลายสูงขึ้น (Aislabie, 1997) ดังนั้นในการทดลองอาจจะต้องเพิ่มการวิเคราะห์ลักษณะทางกายภาพและฟิสิกส์ และองค์ประกอบของตัวอย่างดิน เช่น ร้อยละของคาร์บอน ไนโตรเจน อัตราของคาร์บอนต่อไนโตรเจน (C/N ratio) ร้อยละของดินเหนียว เป็นต้น เพื่อบอกสภาพโดยทั่วไปของดินซึ่งอาจมีผลต่อการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ภายในบริเวณดังกล่าว

3.2 การคัดเลือกเชื้อที่สามารถเจริญบนสารพารา,พารา′-ดีดีที

3.2.1 การคัดเลือกเชื้อโดยวิธี Selective enrichment method

เมื่อถ่ายดินลงในอาหาร MSYM ผสมกับสารพารา,พารา′-ดีดีที 25 พีพีเอ็ม เป็นเวลา 7 วัน พบว่าได้เชื้อที่มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาแตกต่างกันจำนวน 167 สายพันธุ์ และเมื่อประเมินปริมาณแบคทีเรียในดินตัวอย่างโดยการเกลี่ยเชื้อลงบนอาหาร NA พบปริมาณแบคทีเรียอยู่ในช่วง $5.25x10^4$ - $5.2x10^8$ CFUต่อกรัมดิน (ตารางที่ 3) การพบเชื้อแบคทีเรียจำนวนมากที่สามารถเจริญในอาหาร MSYM ผสมสารพารา,พารา′-ดีดีทีในความเข้มข้นที่ใช้ทดลอง อาจเนื่องจากแหล่งดินตัวอย่างมีการปนเปื้อนของสารพารา,พารา′-ดีดีที ทำให้เชื้อจุลินทรีย์ท้องถิ่นมีความสามารถทนต่อสารพารา,พารา′-ดีดีทีได้ ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Kantachote และคณะ (2001) ซึ่งได้ทำการศึกษาปริมาณจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ ในพื้นที่ปนเปื้อนและไม่ปนเปื้อนดีดีที พบว่า จำนวนจุลินทรีย์ในพื้นที่ที่ปนเปื้อนดีดีที และพื้นที่ที่ไม่ปนเปื้อนนั้นมีจำนวนจุลินทรีย์ไม่แตกต่างกัน แต่แบคทีเรียในพื้นที่ที่ปนเปื้อนจะสามารถทนต่อดีดีทีได้มากกว่าในพื้นที่ที่ไม่ปนเปื้อนสาร

การคัดเลือกเชื้อโดยวิธี Selective enrichment method เป็นวิธีที่นิยมใช้ในการคัดเชื้อที่ย่อยสลายสารกำจัดศัตรูพืชกลุ่มออร์กาโนคลอรีนและชนิดอื่นๆ จากการศึกษาของ Juhasz และ Naidu (2000) และ Bidlan และ Manonmani (2002) ได้คัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์จากดินที่ปนเปื้อนและไม่ปนเปื้อนสารกำจัดศัตรูพืชด้วยวิธี Selective enrichment method โดยเติมสารพารา,พารา′-ดีดีที ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตรและร้อยละ 5 – 25 ตามลำดับ ลงในอาหาร Basal salt medium การทดลองดังกล่าวสามารถแยกเชื้อแบคทีเรียที่ย่อยสลายสารพารา,พารา′-ดีดีทีได้มากกว่า 4 สายพันธุ์

Nawab และคณะ (2003) สามารถคัดเลือกเชื้อที่ย่อยสลายสารกำจัดศัตรูพืชชนิดเอชซีเอช โดยใช้อาหาร Mineral salt medium ที่ผสมสารเอชซีเอช 30 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เขย่าเป็นเวลา 10 วัน ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส จากนั้นถ่ายเชื้อลงในอาหารใหม่ทำซ้ำ 2 - 3 ครั้ง ตามด้วยการเกลี่ยบนอาหารแข็ง Mineral salt medium ที่ผสมสารเอชซีเอช ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ปริมาณจุลินทรีย์ในดินนั้นขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายประการ เช่น คุณสมบัติและชนิดของดิน พืชที่เพาะปลูก การใช้และวิธีการใช้ที่ดิน (ศุภมาศ พนิชศักดิ์พัฒนา, 2529 อ้างโดย วินันท์ดา หิมะหมาน, 2541) ในการศึกษาครั้งนี้ได้เก็บตัวอย่างดินจากแปลงที่ 1 - 5 และ 18 - 23 ในช่วงระหว่างพักการเพาะปลูกซึ่งไม่มีการใช้สารกำจัดศัตรูพืชในแหล่งดินดังกล่าว อาจเป็นผลทำให้ปริมาณจุลินทรีย์ในดินมีจำนวนมากกว่า (10^6 - 10^8 CFU ต่อกรัมดิน) เมื่อเทียบกับตัวอย่างดินจากแปลงที่ 6 - 17 ซึ่งเก็บในช่วงกำลังเพาะปลูก จากการสอบถามเกษตรกรในท้องถิ่นพบว่ามีการใช้สารกำจัดศัตรูพืชทุกวันเพื่อกำจัดแมลงศัตรูพืชที่เข้ามารบกวน ดังนั้นสารกำจัดศัตรูพืชที่ใช้อาจมีผลต่อจำนวนประชากรของจุลินทรีย์ในพื้นที่ ทำให้มีจำนวนจุลินทรีย์ต่ำกว่าแปลงข้างต้น (10^4-10^6 CFU ต่อกรัมดิน) (ตารางที่ 3) ซึ่งผลนี้สอดคล้องกับรายงานของ Bharati และคณะ (1999) ที่พบว่าสารกำจัดศัตรูพืชเอนโดซัลเฟนสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียกลุ่มเมทาโนเจน (methanogen) โดยระดับของการยับยั้งขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของสาร Zargar and Johri (1995) พบว่าการเจริญของ *Bacillus* sp. ลดลงเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารแกมมา-เอชซีเอช และการทดลองของ Kale และคณะ (1989) ที่ได้ศึกษาการเจริญของเชื้อ *Azotobacter chrooccum* ในอาหารที่มีไนโตรเจน พบว่า ความเข้มข้นของสารกำจัดศัตรูพืชปริมาณ 0.5 - 5 พีพีเอ็ม ไม่มีผลต่อการเจริญของเชื้อ แต่ที่ความเข้มข้นสูงกว่านั้นจะมีผลในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ

อย่างไรก็ดี เนื่องจากดินทั้ง 23 แปลงมีความอุดมสมบูรณ์ต่างกัน ซึ่งค่าที่ได้จากการนับปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดไม่จัดเป็นข้อมูลสำคัญมากนักในการศึกษากิจกรรมของแบคทีเรียในดิน หรือบอกได้เพียงคร่าว ๆ ถึงความอุดมสมบูรณ์ของดินในแหล่งนั้น และนอกจากนั้นยังไม่พบว่าวิธีการที่ใช้ในการศึกษาและอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดใดที่จะสามารถหาปริมาณจุลินทรีย์ในดินได้ถูกต้องทั้งหมด (วินันท์ดา หิมะหมาน, 2541)

3.2.2 การคัดเลือกเชื้อเบื้องต้นที่สามารถย่อยสลายสารพารา,พารา′ดีดีที

จากแบคทีเรียทั้งหมด 167 สายพันธุ์ เมื่อนำไปเลี้ยงบนอาหาร NA ที่มีส่วนผสมของสารพารา,พารา′-ดีดีที 25, 50, 100 พีพีเอ็ม พบว่าเชื้อทุกชนิดสามารถเจริญบนอาหาร NA ที่มีสารพารา, พารา′-ดีดีทีทั้ง 3 ความเข้มข้นเป็นองค์ประกอบได้ และมีเชื้อจำนวน 10 สายพันธุ์ที่แสดงวงใสรอบ ๆ โคโลนีภายหลังจากการเลี้ยงในอาหาร NA ผสมสารพารา,พารา′-ดีดีทีที่ความเข้มข้น 25 พีพีเอ็ม

เป็นเวลา 72 ชั่วโมง โดยวงใสที่เกิดรอบ ๆ โคโลนีแสดงความสามารถในการย่อยสลายสารพารา,พารา′-ดีดีที (ภาพที่ 8) ของเชื้อทั้ง 10 สายพันธุ์ โดยมีเชื้อ 2 สายพันธุ์ ได้แก่ SB1A02 และ SB1A04 ที่แสดงวงใสเฉพาะในอาหาร NA ผสมสารพารา,พารา′-ดีดีที 25 พีพีเอ็ม มีเชื้อ 3 สายพันธุ์ ได้แก่ SB1B04, SB2B05 และ SB3B05 ที่สามารถแสดงวงใสได้ในอาหาร NA ผสมสารพารา,พารา′-ดีดีที 50 พีพีเอ็ม และมีเชื้อ 5 สายพันธุ์ ได้แก่ SB1A01, SB2A02, SB1A10, SB1A12 และ SB1B05 ที่สามารถแสดงวงใสได้ในอาหาร NA ผสมสารพารา,พารา′-ดีดีทีสูงถึง 100 พีพีเอ็ม (ตารางที่ 4) จึงเลือกเอาเชื้อทั้ง 5 สายพันธุ์หลังนี้ไปทำการคัดเลือกหาเชื้อแบคทีเรียที่ดีที่สุดในการศึกษาประสิทธิภาพของการย่อยสลายสารพารา,พารา′-ดีดีทีต่อไป

การทดสอบการย่อยสลายโดยดูวงใสรอบ ๆ โคโลนีของแบคทีเรียเป็นวิธีการที่พบได้บ่อยในการคัดเลือกเชื้อที่ย่อยสลายสารกำจัดศัตรูพืชในกลุ่มออร์กาโนคลอรีน เช่น Sylvestre (1980) ทำการคัดแยกเชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายสารพารา-คลอโรไบฟีนิล (*p*-Chlorobiphenyl, PCB) โดยนำเชื้อที่คัดแยกได้จากการเลี้ยงในอาหาร Minimal medium ผสมสาร PCB จากนั้นเลี้ยงลงบนอาหารวุ้น minimal medium ที่เททับด้วยสาร PCB ความเข้มข้นร้อยละ 5 พบว่าเชื้อที่ให้ผลบวกสามารถแสดงวงใสบนอาหารภายใน 72 ชั่วโมง ส่วนในรายงานของ Nadeau และคณะ (1994) ซึ่งได้ทำการทดสอบเชื้อ *Alcaligenes eutrophus* A5 ที่คัดแยกได้จากดิน สามารถแสดงคุณสมบัติการย่อยสารดีดีทีโดยแสดงวงใสรอบโคโลนีในอาหารที่ผสมสารพารา,พารา′-ดีดีทีความเข้มข้นร้อยละ 1 ขณะที่ Juhasz และ Naidu (2000) ได้คัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์จากดินที่ปนเปื้อนและไม่ปนเปื้อนสารฆ่าแมลงกลุ่มอโรมาติก พบว่าเชื้อสายพันธุ์ AJR^{3}9,504 แสดงความสามารถในการย่อยสลายสารดีดีทีในอาหาร Basal salt medium ที่ผสมสารพารา,พารา′-ดีดีที 100 มิลลิกรัมต่อลิตร เสริมเปปโตน 1 กรัมต่อลิตร โดยสังเกตจากวงใสรอบโคโลนีในอาหารดังกล่าว นอกจากนั้น Aislabie และคณะ (1999) ทำการแยกเชื้อที่สามารถย่อยสลายสารดีดีอีใน Minimal medium ที่ผสมสารดีดีอีความเข้มข้น 0.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และทดสอบประสิทธิภาพในการย่อยสลายสารดีดีอีโดยดูจากวงใสรอบ ๆ โคโลนีของเชื้อในอาหารวุ้นที่ผสมสารดีดีอีโดยบ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 สัปดาห์

การคัดเลือกเชื้อที่สามารถย่อยสลายสารพารา,พารา′-ดีดีทีหรือสารในกลุ่มออร์กาโนคลอรีนในขั้นตอนการคัดเลือกอาจใช้สารที่เป็นสารชักนำ (analogue) ของสารปนเปื้อน คือสารที่มีโครงสร้างทางเคมีใกล้เคียงกับสารปนเปื้อน เพื่อให้เชื้อสามารถเจริญ และชักนำให้เกิดการสร้างเอนไซม์ที่จำเป็นต่อการย่อยสลายสารกลุ่มปนเปื้อน และเนื่องจากไม่เป็นพิษต่อเซลล์จุลินทรีย์ ทำให้จุลินทรีย์สามารถเจริญและใช้สารดังกล่าวเป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงานเพียงแหล่งเดียวได้ สารชักนำดีดีทีที่ได้มีการศึกษาแล้วได้แก่ *p,p′*-Dichlorobenzaphenone (Roa and

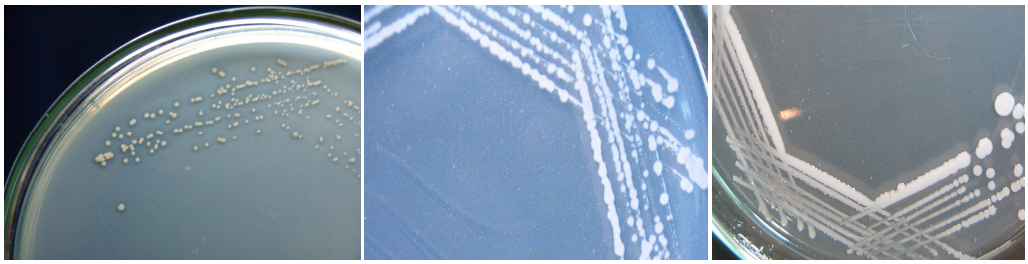
Alexander, 1997), Diphenylethane (DPE) และ Biphenyl (Chandrappa and Harichandra, 2004) ซึ่งสารชักนำกลุ่มนี้จะไม่มีคลอรีนเป็นหมู่แทนที่ (Nonchlorinated) และมีคลอรีนเป็นหมู่แทนที่เพียงตัวเดียว (Monochlorinated) ทำให้มีความเป็นพิษน้อยลง พบว่าเชื้อที่คัดแยกได้จากสารชักนำมีความสามารถในการย่อยสลายสารพารา,พารา′-ดีดีทีได้ โดยใช้เอนไซม์จากวิถีการย่อยสลายสารอนาล็อก เช่นเชื้อ *Pseudomonas* sp. ที่แยกได้จากดินที่ปนเปื้อนสารพารา,พารา′-ดีดีที โดยวิธี Selective enrichment method ในอาหาร Mineral salt medium ผสมไบฟีนิลความเข้มข้นร้อยละ 0.1 สามารถย่อยสลายสารพารา,พารา′-ดีดีทีโดยใช้เอนไซม์ DDT-dioxygenase และ 2,3-dioxybiphenyl-1,2-dioxygenase ส่วนเชื้อที่เลี้ยงในอาหารที่ไม่เติมไบฟีนิลจะไม่มีเอนไซม์ดังกล่าว แสดงให้เห็นว่าไบฟีนิลสามารถชักนำให้เกิดการสร้างเอนไซม์ดังกล่าวได้ (Bidlan and Manonmani, 2002) ซึ่งการคัดเลือกเชื้อด้วยวิธีการใช้สารชักนำ เป็นแนวทางหนึ่งในการคัดเลือกเชื้อที่สามารถย่อยสลายสารปนเปื้อนในภายหลัง เพื่อให้ได้เชื้อที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสารปนเปื้อน และวิธีดังกล่าวสามารถชักนำให้เกิดการย่อยสลายผ่านวิถีการแตกของวงเบนซินตำแหน่ง meta (Meta-cleavage pathway) ซึ่งจะทำให้ได้สารตัวสุดท้ายคือ 4-Chlorobenzoic acid ซึ่งง่ายต่อการย่อยสลายอย่างสมบูรณ์โดยเชื้อจุลินทรีย์อื่น ๆ ในดิน ได้การย่อยสลายสารพารา,พารา′-ดีดีทีอย่างมีประสิทธิภาพ

ตารางที่ 4 ความสามารถในย่อยสลายสารพารา,พารา′-ดีดีทีของเชื้อที่คัดเลือกได้

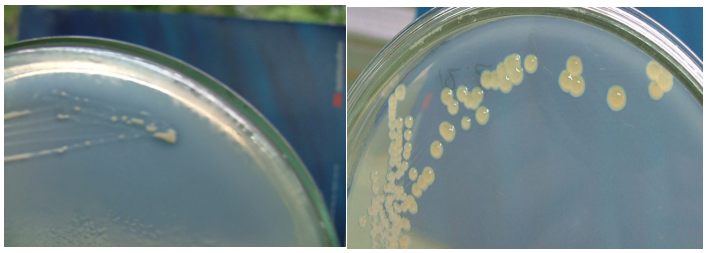
Table 4. *p,p′*-DDT degrading ability of isolated bacteria.

Bacterial Isolates	*p,p′*-DDT concentration in nutrient agar (ppm)		
	25	50	100
SB1A01	+	+	+
SB1A02	+	-	-
SB2A02	+	+	+
SB1A04	+	-	-
SB1A10	+	+	+
SB1A12	+	+	+
SB1B04	+	+	-
SB1B05	+	+	+
SB2B05	+	+	-
SB3B05	+	+	-

A.

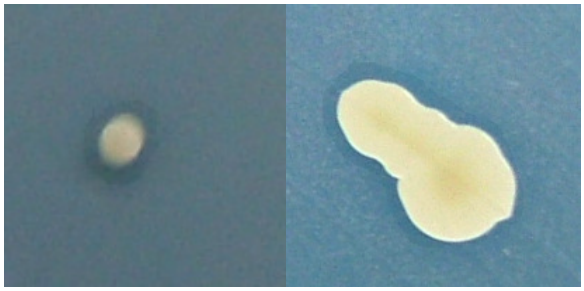


SB1A01 SB2A02 SB1A10



SB1A12 SB1B05

B.



SB1A01 SB1A10

ภาพที่ 8 (A) โคโลนีของเชื้อที่เจริญบนอาหาร NA ผสมสารพารา,พารา′-ดีดีที 25, 50 หรือ 100 พีพีเอ็ม (B) วงใสรอบโคโลนีของสายพันธุ์ SB1A01 และ SB1A10

Figure 8. (A) Bacterial colonies grown on nutrient agar (NA) supplemented with 25, 50, or 100 ppm *p*,*p*′-DDT. (B) Clear zone surrounding the colony of strains SB1A01 and SB1A10.

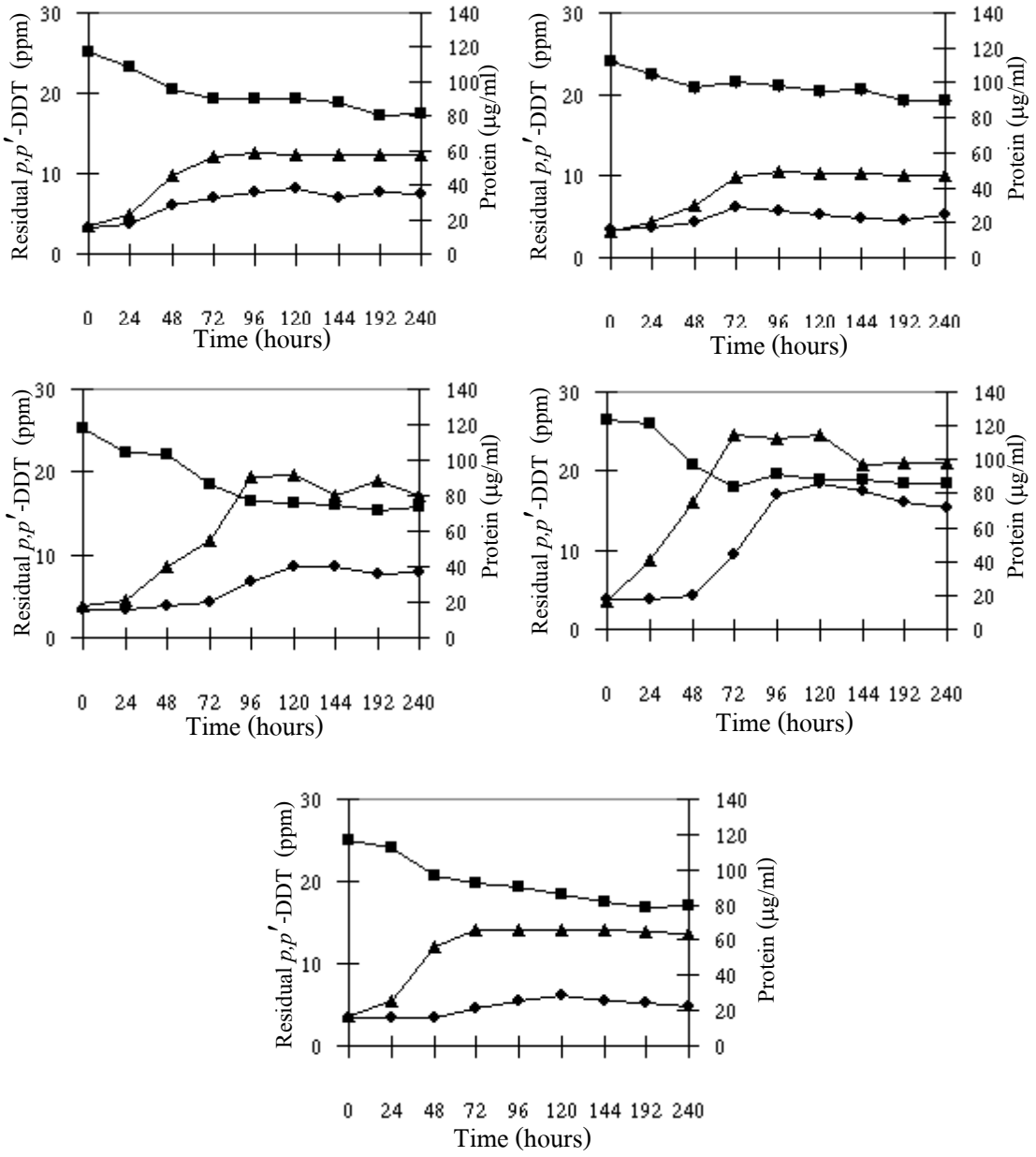
3.3 การคัดเลือกเชื้อที่ดีที่สุดในการย่อยสลายสารพารา,พารา′-ดีดีที

เมื่อนำเชื้อทั้ง 5 สายพันธุ์คือ SB1A01, SB2A02, SB1A10, SB1A12 และ SB1B05 เลี้ยงในอาหาร MSYM ผสมสารดีดีที 25 พีพีเอ็ม เขย่าที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 วัน พบว่าเชื้อทั้ง 5 สายพันธุ์ สามารถเจริญในอาหาร MSYM ผสมสารพารา,พารา′-ดีดีทีความเข้มข้น 25 พีพีเอ็มได้ โดยเชื้อ SB1A12 สามารถเจริญได้สูงสุด รองลงมาคือ SB1A10, SB1B05, SB1A01 และ SB2A02 ตามลำดับ (วัดปริมาณโปรตีนสูงสุด 116, 90, 66, 58 และ 49 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ) ที่เวลา 72 - 96 ชั่วโมง ในขณะที่เชื้อ SB1A10 สามารถย่อยสลายสารพารา,พารา′-ดีดีทีได้สูงสุด คือประมาณร้อยละ 37.4 รองลงมาคือ SB1B05, SB1A01, SB1A12 และSB2A02 โดยย่อยพารา,พารา′-ดีดีทีได้ร้อยละ 32.2, 30.5, 30.4 และ 20.3 ตามลำดับ (ตารางที่ 9; ภาพที่ 9 และ 10)

โดยเชื้อทั้ง 5 สายพันธุ์เจริญในอาหารที่ผสมสารพารา,พารา′-ดีดีที 25 พีพีเอ็มได้สูงกว่าเมื่อเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่มีการเติมสารพารา,พารา′-ดีดีที อาจเนื่องจากเชื้อสามารถใช้สารพารา,พารา′-ดีดีทีเป็นแหล่งอาหารและพลังงาน ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองของ Siddhartha และคณะ (1990) ที่ได้ทำการคัดแยกเชื้อ *Pseudomonas* sp. จากดิน แล้วเลี้ยงในอาหาร Mineral salt ที่ผสมสารอัลฟา เบต้า และแกมมา- เอชซีเอช ในสภาวะที่มีอากาศ พบว่าเชื้อดังกล่าวสามารถย่อยสลายสารโดยใช้เป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงานเพียงอย่างเดียว โดยพบว่าเชื้อสามารถเจริญในอาหารที่ผสมสารเอชซีเอชได้ดีกว่าในอาหารที่ไม่ผสมสารดังกล่าว

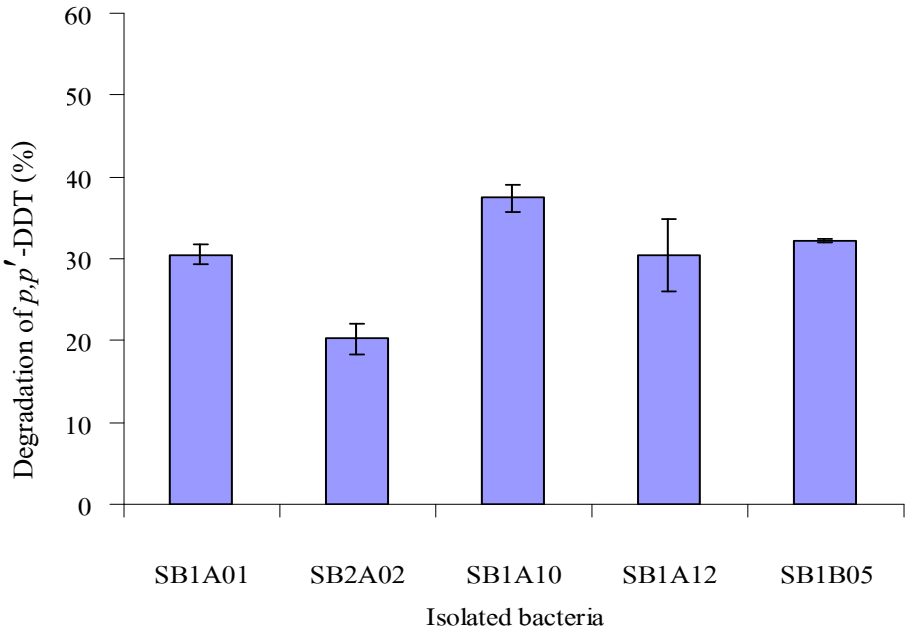
นอกจากนี้ยังพบว่ามีจุลินทรีย์หลายชนิดที่สามารถใช้สารพารา,พารา′-ดีดีทีหรือสารในกลุ่มออร์กาโนคลอรีนชนิดอื่นเป็นแหล่งอาหารและพลังงานเพียงแหล่งเดียว โดยไม่ต้องเติมสารอาหารอื่นร่วม เช่น Bidlan และ Manonmani (2002) ทำการคัดแยกเชื้อที่สามารถย่อยสลายสารพารา,พารา′-ดีดีที พบว่าเชื้อ *Serratia marcescens* DT-1P สามารถย่อยสลายสารพารา,พารา′-ดีดีทีความเข้มข้น 25 พีพีเอ็มในอาหาร Basal mineral medium ได้ร้อยละ 50 ภายในเวลา 48 ชั่วโมง

Chandrappa และ Harichandra (2004) นำเซลล์ระยะพักของเชื้อ *Pseudomonas* sp. ที่คัดแยกจากอาหารที่มีสารไบฟีนิลเป็นแหล่งคาร์บอน เลี้ยงในอาหารที่มีสารพารา,พารา′-ดีดีทีความเข้มข้นร้อยละ 0.05 พบว่าเชื้อสามารถย่อยสลายสารพารา,พารา′-ดีดีทีจนได้สารตัวกลาง 2,3-Dihydroxy-DDT จากการแตกของวงเบนซินตำแหน่งเมต้า (Meta ring cleavage) จนได้สารตัวสุดท้ายคือ 4-Chlorobenzoic acid



ภาพที่ 9 การเจริญของแบคทีเรียในอาหาร MSYM ที่ไม่มีสารพารา,พารา′- ดีดีที (◆) และมีสารพารา,พารา′- ดีดีที 25 พีพีเอ็ม (▲) และการลดลงของสารพารา,พารา′- ดีดีที (■) ของแบคทีเรียสายพันธุ์ A) SB1A01, B) SB2A02, C) SB1A10, D) SB1A12, E) SB1B05

Figure 9. Growth of bacteria in MSYM without *p,p′*-DDT (◆) and supplemented with of 25 ppm *p,p′*-DDT (▲) and reduction of *p,p′*-DDT (■) of bacterial strain A) SB1A01, B) SB2A02, C) SB1A10, D) SB1A12, E) SB1B05



ภาพที่ 10 อัตราการย่อยสลายสารพารา,พารา′-ดีดีทีจากเชื้อที่คัดเลือกได้ชั่วโมงที่ 240

Figure 10. Percentage of *p,p′*-DDT residual from the selected bacteria of 240 h of growth.

Benimelli และคณะ (2003) พบว่าเชื้อ *Streptomycetes* 4 สายพันธุ์ คือ M4, M7, M5 และ M15 ที่คัดแยกได้จากตัวอย่างดินตะกอน สามารถเจริญในอาหาร Minimal medium ที่มีสารอัลดริน ลินเดน และคลอเดน เป็นแหล่งคาร์บอนเพียงแหล่งเดียว และสามารถย่อยสลายสารอัลดรินความเข้มข้นสูงสุด 36 ไมโครกรัมต่อลิตร ได้ร้อยละ 60 - 80

อย่างไรก็ดีพบว่าเชื้อเดี่ยวยังสามารถย่อยสลายสารพารา,พารา′-ดีดีที โดยใช้เป็นแหล่งคาร์บอนได้เพียงเล็กน้อยเมื่อเทียบกับเชื้อกลุ่ม จากการทดลองพบว่าเชื้อ SB1A10 ซึ่งเป็นเชื้อที่ย่อยสารพารา,พารา′-ดีดีทีได้สูงสุด สามารถย่อยดีดีทีเพียงร้อยละ 37.4 ดังนั้นเพื่อเป็นการเพิ่มประสิทธิภาพในการย่อยสลายอาจศึกษาจากเชื้อกลุ่ม ซึ่งจากการรายงานต่าง ๆ พบว่ามีความสามารถในการย่อยสลายสารได้สูงกว่าเชื้อเดียวเนื่องมาจากการทำงานร่วมกันของจุลินทรีย์ทำให้สามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการย่อยสลายสารต่าง ๆ ได้ เช่นการทดลองของ Bidlan และ Manonmani (2002) ในการคัดเลือกเชื้อที่ย่อยสลายสารดีดีทีพบว่าเชื้อผสมที่ได้จากอาหาร Basal mineral medium ก่อนที่แยกศึกษาเชื้อเดี่ยวสามารถย่อยสลายสารดีดีทีได้หมด โดยสามารถย่อยสลายสารดีดีทีความเข้มข้น 5, 10, 15 และ 20 พีพีเอ็มอย่างสมบูรณ์ ภายในระยะเวลา 48, 72, 96 และ 144 ชั่วโมง ตามลำดับ ในขณะเชื้อเดี่ยวที่ศึกษาย่อยได้เพียงร้อยละ 50 เท่านั้น

Yu และ Ward (1996) ศึกษาการย่อยสลายสารเพนตะคลอโรฟีนอล (Pentachlorophenol; PCP) โดยจุลินทรีย์ผสมและจุลินทรีย์เดี่ยว พบว่าการย่อยสลายสารเพนตะคลอโรฟีนอลความเข้มข้นเริ่มต้น 100 พีพีเอ็ม โดยจุลินทรีย์เดี่ยว 3 สายพันธุ์ คือ *Pseudomonas* sp., *Agrobacterium radiobacter* และ *Flavobacterium gleum* มีอัตราการย่อยสลายสาร PCP เท่ากับร้อยละ 10, 30 และ 50 ตามลำดับในระยะเวลา 4 วัน แต่ถ้าทำการผสมเชื้อ 2 สายพันธุ์ระหว่าง *Pseudomonas* sp. บวก *Flavobacterium gleum* และผสมทั้ง 3 สายพันธุ์ พบว่าอัตราการย่อยสลายเท่ากับร้อยละ 20 และ 80 ตามลำดับ ส่วนอัตราการย่อยสลายของเชื้อ 2 สายพันธุ์ ระหว่าง *Pseudomonas* sp. บวก *Agrobacterium radiobacter* จะต่ำกว่าเมื่อย่อยสลายโดยเชื้อ *Agrobacterium radiobacter* สายพันธุ์เดี่ยวและอัตราการย่อยสลายของ *Pseudomonas* sp. บวก *Flavobacterium gleum* จะต่ำกว่าเมื่อย่อยสลายโดยเชื้อ *Flavobacterium gleum* สายพันธุ์เดียว นั้นแสดงว่าเชื้อ *Pseudomonas* sp. อาจมีผลยับยั้งการย่อยสลายสารเพนตะคลอโรฟีนอลโดยเชื้อ *Agrobacterium radiobacter* และ *Flavobacterium gleum* นอกจากนั้นพบว่าสภาวะเช่น อุณหภูมิ พีเอช สารอาหารร่วมและความเข้มข้นของสารปนเปื้อน มีผลต่อประสิทธิภาพในการย่อยสลาย ซึ่งในงานวิจัยนี้ได้ทำการศึกษาผลของสภาวะเหล่านี้ในขั้นตอนต่อไป

3.4 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อประสิทธิภาพในการย่อยสารพารา,พารา′-ดีดีที

จากผลการทดลองข้อ 3.3 พบว่าเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ SB1A10 มีประสิทธิภาพสูงสุดในการย่อยสลายสารพารา,พารา′-ดีดีที คือสามารถลดสารพารา,พารา′-ดีดีทีลงได้ร้อยละ 37.4 จากสารตั้งต้น 25 พีพีเอ็ม จึงได้คัดเลือกเชื้อดังกล่าวเพื่อทำการศึกษาในขั้นตอนต่อไป คือการหาสภาวะที่เหมาะสมในการย่อยสลายสารพารา,พารา′-ดีดีที โดยมีสภาวะที่ใช้ดังต่อไปนี้

3.4.1 ผลของอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อประสิทธิภาพในการย่อยสลายสารพารา,พารา′-ดีดีที

จากการทดลองผลของอุณหภูมิในการย่อยสลายสารพารา,พารา′-ดีดีที โดยเลี้ยงเชื้อ SB1A10 ในอาหาร MSYM ผสมสารพารา,พารา′-ดีดีที 25 พีพีเอ็ม เขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 25, 30, 37 และ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 วัน พบว่า เชื้อดังกล่าวสามารถเจริญได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 30 และสามารถเจริญได้ดีรองลงมาที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส โดยวัดปริมาณโปรตีนเชื้อสูงสุดได้ 70.9 และ 60.3 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ที่ชั่วโมง 96 ในขณะที่การเจริญได้น้อยที่อุณหภูมิ 45 และ 25 องศาเซลเซียส โดยวัดปริมาณโปรตีนเชื้อสูงสุดได้ 43.4 และ 25.1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ที่ชั่วโมง 120

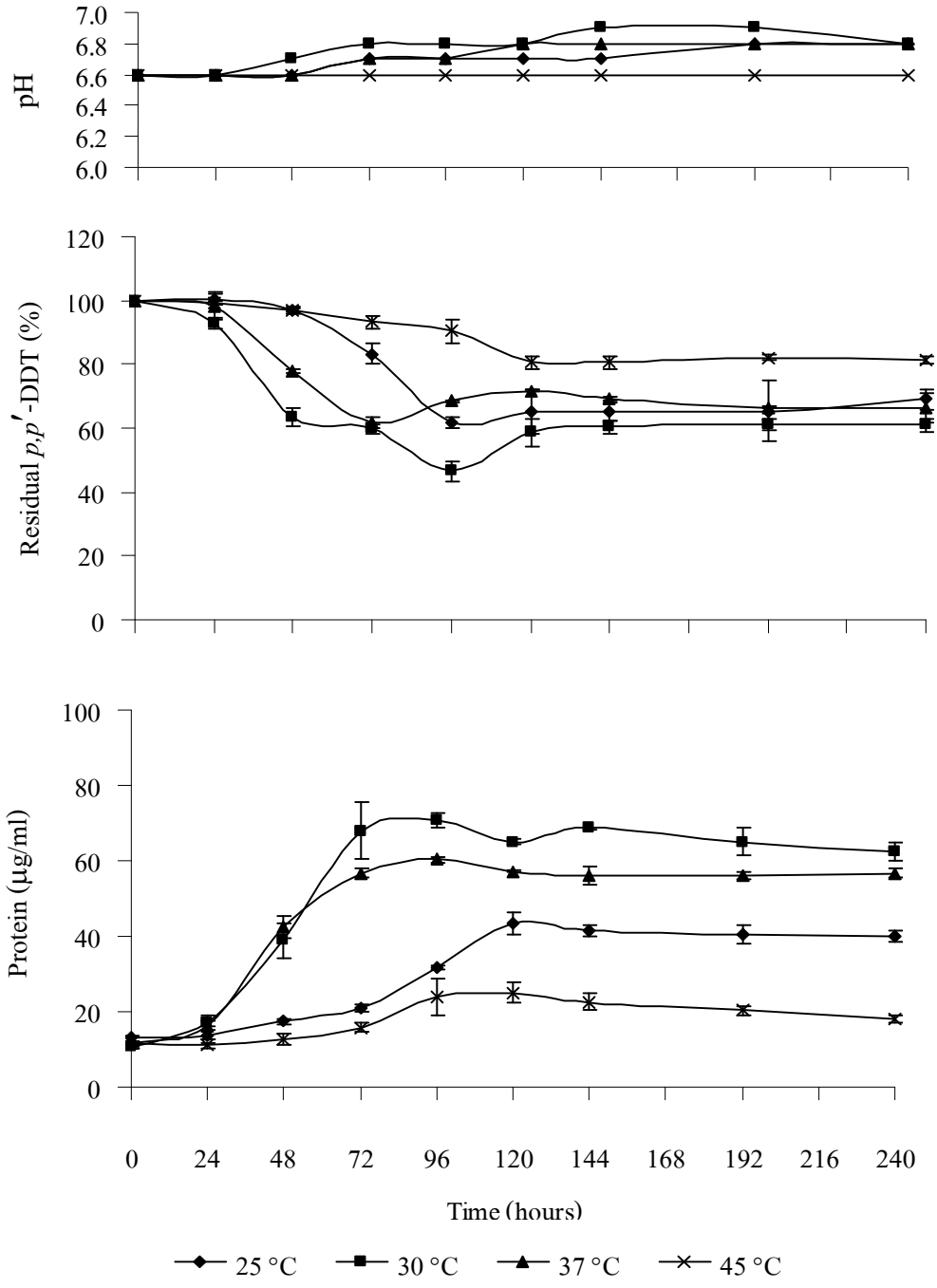
นอกจากนี้เชื้อ SB1A10 สามารถย่อยสลายปริมาณสารพารา.พารา′-ดีดีทีได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส คิดเป็นร้อยละ 39.1 รองลงมาคือ 37, 25 และ 45 องศาเซลเซียส โดยคิด

เป็นร้อยละ 33.7, 31.0 และ 18.7 ตามลำดับ (ภาพที่ 11 และ12) เนื่องจากที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ SB1A10 มีประสิทธิภาพการย่อยสลายสูงสุดจึงถูกเลือกเพื่อทำการศึกษาในขั้นตอนต่อไป

อุณหภูมิเป็นปัจจัยทางสิ่งแวดล้อมหนึ่งที่มีผลต่อจุลินทรีย์ในการย่อยสลายสารปนเปื้อน สำหรับในแหล่งดินที่ปนเปื้อนพบว่าอุณหภูมิมีผลต่อชนิดและปริมาณของจุลินทรีย์ในพื้นที่ เช่น การทดลองของ Kantachote และคณะ (2001) พบว่าเมื่อนำจุลินทรีย์ที่คัดแยกจากดินที่ปนเปื้อนสารดีดีทีในประเทศออสเตรเลียทั้ง 3 ชนิด คือ แบคทีเรีย แอคติโนมัยซิส และเชื้อรา เลี้ยงในอุณหภูมิ 25, 37 และ 55 องศาเซลเซียส พบว่าแบคทีเรียสามารถเจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 25 และ 37 องศาเซลเซียส และเจริญได้เล็กน้อยที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส ในขณะที่แอคติโนมัยซิส และเชื้อราสามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 25 และ 37 องศาเซลเซียสแต่ไม่สามารถเจริญได้ที่ 55 องศาเซลเซียส สำหรับแบคทีเรียโดยทั่วไปมีอุณหภูมิที่เหมาะสมในการย่อยสลายสารปนเปื้อนในช่วง 25 ถึง 35 องศาเซลเซียส (Häggblom, 1992)

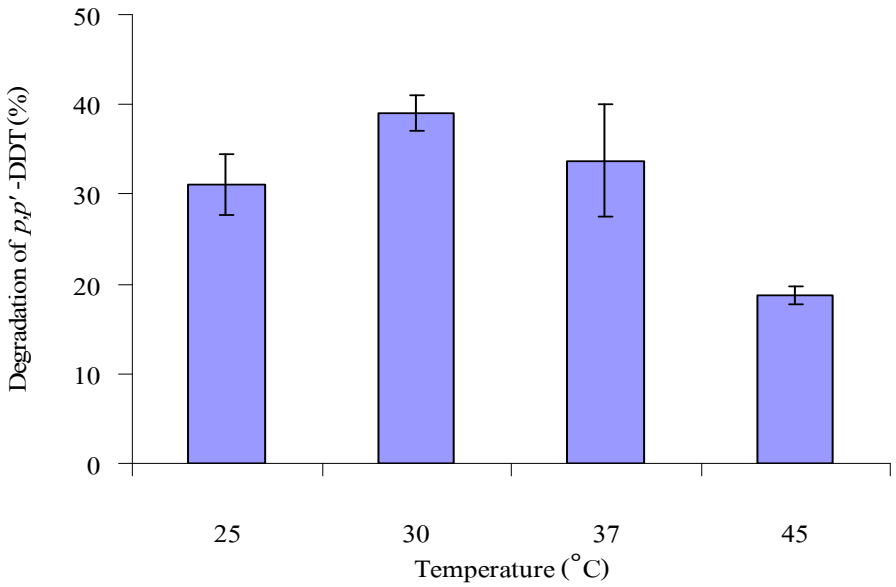
จากการทดลอง พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมในการย่อยสลายสารพารา,พารา′-ดีดีทีของเชื้อ SB1A10 คือ 30 องศาเซลเซียส แต่ในขณะเดียวกันยังสามารถย่อยสลายสารได้ที่อุณหภูมิ 25 และ 45 องศาเซลเซียส เช่นกัน แม้อัตราการย่อยสลายจะต่ำกว่าที่อุณหภูมิ 30 และ 37 องศาเซลเซียส อุณหภูมิการย่อยสลายของสารปนเปื้อนจะขึ้นอยู่กับชนิดของเชื้อที่คัดเลือกได้ เช่นในเชื้อ *Serratia marcescens* DT-1P สามารถย่อยสลายดีดีทีได้ได้ในช่วงอุณหภูมิกว้างตั้งแต่ 4 - 50 องศาเซลเซียส โดยสามารถย่อยดีดีทีความเข้มข้นร้อยละ 5 ได้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และเมื่อเพิ่มอุณหภูมิขึ้นอัตราการย่อยสลายจะเพิ่มขึ้นด้วย โดยอุณหภูมิที่เหมาะสมในการย่อยสลาย คือ 30 องศาเซลเซียส (Bidlan and Manonmani, 2002)

นอกจากนั้นอุณหภูมิที่เหมาะสมในการย่อยสลายสารปนเปื้อน คืออุณหภูมิที่เหมาะสมกับกับกิจกรรมของเอนไซม์ที่ใช้ในการย่อยสลายสารปนเปื้อน เช่น จากการทดลองของ Olaniran และคณะ (2001) ในการแยกเชื้อที่สามารถย่อยสลายสารออร์กาโนคลอรีนด้วยเอนไซม์ดีฮาโลจีเนส พบว่า เชื้อที่คัดแยกได้ คือ *Bacillus* และ *Corynebacterium* มีกิจกรรมของเอนไซม์ดีฮาโลจีเนสสูงสุดที่อุณหภูมิ 30 และ 35 องศาเซลเซียส สำหรับการทดลองบางครั้งอุณหภูมิที่ใช้ในการย่อยสลายสารปนเปื้อนโดยเชื้อแต่ละชนิด อาจได้จากแหล่งที่ทำการคัดเลือกจุลินทรีย์ เช่นเชื้อ *Pseudomonas* sp. F274 ที่คัดแยกได้จากตัวอย่างดินที่ปนเปื้อนครีโอโซต (Creosote) ในประเทศสหรัฐอเมริกา ใช้สภาวะในการเลี้ยงเพื่อย่อยสลายสารฟลูออรีน (Fluorine) ที่อุณหภูมิ 23 องศาเซลเซียส (Grifoll *et al.*, 1994)



ภาพที่ 11 ผลของอุณหภูมิต่อการเปลี่ยนแปลงค่าพีเอช การลดลงของสารพารา,พารา′-ดีดีที และปริมาณโปรตีนของเชื้อ SB1A10 เมื่อเลี้ยงในอาหาร MSYM ผสมสารพารา,พารา′-ดีดีที 25 พีพีเอ็ม

Figure 11. Effect of temperatures on pH, *p,p′*-DDT residual and protein concentrations of strain SB1A10 grown in MSYM with 25 ppm *p,p′*-DDT.



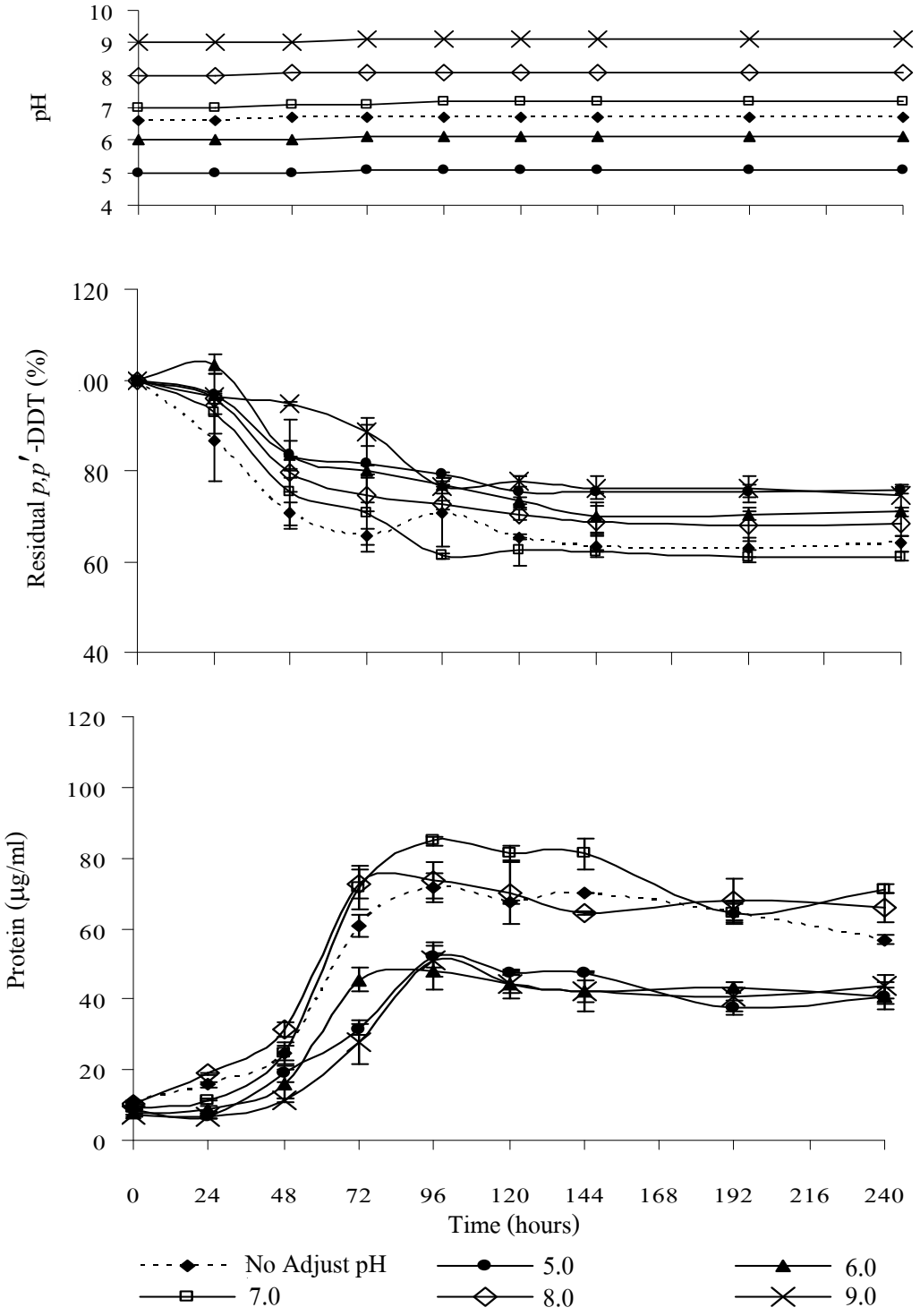
ภาพที่ 12 ผลของอุณหภูมิต่ออัตราการย่อยสลายของสารพารา,พารา′-ดีดีที โดยเชื้อ SB1A10 ชั่วโมงที่ 240

Figure 12. Effect of temperatures on degradation of *p,p′*-DDT by strain SB1A10 at 240 h of growth.

3.4.2 ผลของพีเอชที่เหมาะสมต่อประสิทธิภาพในการย่อยสลายสารพารา,พารา′-ดีดีที

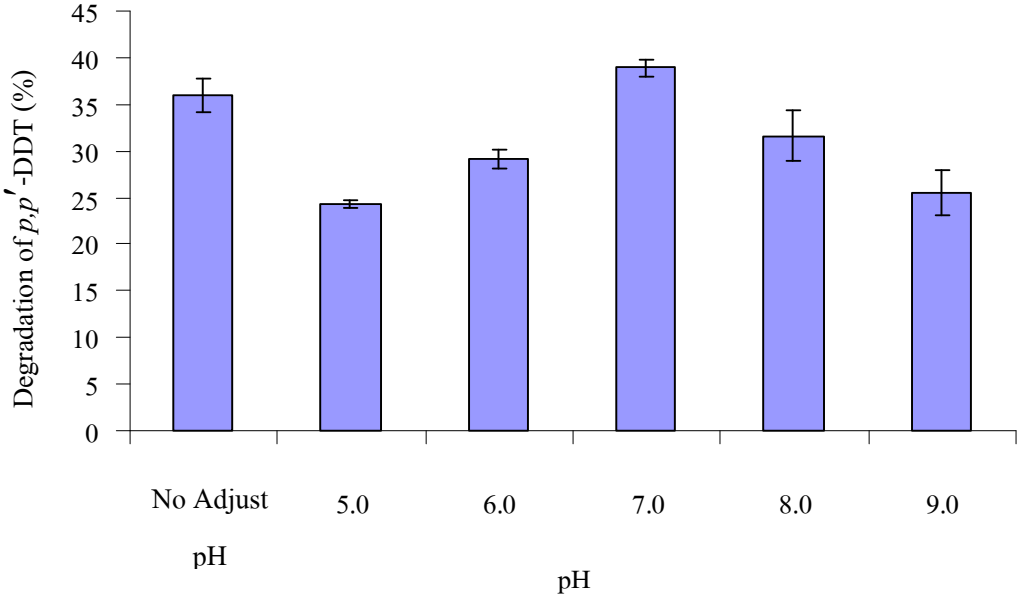
จากการทดลองผลของอุณหภูมิในการย่อยสลายสารพารา,พารา′-ดีดีที โดยเลี้ยงเชื้อ SB1A10 ในอาหาร MSYM ผสมสารพารา,พารา′-ดีดีที 25 พีพีเอ็มโดยปรับพีเอชเป็น 5.0, 6.0, 7.0, 8.0 และ 9.0 ตามลำดับ โดยใช้อาหารที่ไม่ปรับพีเอชเป็นชุดควบคุม เขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที โดยใช้อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการย่อยสลายคือ 30 องศาเซลเซียส จากผลการทดลองในข้อ 3.4.1 เลี้ยงเป็นเวลา 10 วัน พบว่า เชื้อดังกล่าวสามารถเจริญได้ดีที่พีเอช 7.0, 8.0 และชุดควบคุม โดยวัดปริมาณโปรตีนเชื้อสูงสุดได้ 84.9, 73.5 และ 71.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ที่ชั่วโมงที่ 96 และเจริญได้ต่ำที่พีเอช 5.0, 6.0 และ 9.0 ในขณะที่เชื้อสามารถลดปริมาณสารพารา,พารา′-ดีดีทีได้ดีที่สุดที่พีเอช 7.0 คิดเป็นร้อยละ 38.9 รองลงมาคือชุดควบคุม 8.0, 6.0, 9.0 และ 5.0 องศาเซลเซียสตามลำดับ คิดเป็นร้อยละ 36.0, 31.1, 29.1, 25.5 และ 24.3 ตามลำดับ โดยที่พีเอชระหว่างการเลี้ยงไม่เปลี่ยนแปลงมากนัก (ภาพที่ 13 และ 14)

จากผลการทดลอง พบว่าที่พีเอช 7.0 เป็นพีเอชที่เหมาะสมต่อการย่อยสลายเนื่องจากมีอัตราการย่อยสลายและการเจริญสูงสุด รองลงมาคือที่พีเอช 6.0 และ 8.0 ส่วนที่พีเอช 9.0 และ 5.0 มีอัตราการย่อยสลายต่ำสุด อย่างไรก็ดีพบว่าเชื้อ SB1A10 มีความสามารถย่อยสลายสารพารา,พารา′-ดีดีทีในช่วงพีเอชตั้งแต่ 4.0 - 9.0



ภาพที่ 13 ผลของพีเอชต่อการเปลี่ยนแปลงค่าพีเอช การลดลงของสารพารา,พารา′-ดีดีที และปริมาณโปรตีนของเชื้อ SB1A10 เมื่อเลี้ยงในอาหาร MSYM ผสมสารพารา,พารา′-ดีดีที 25 พีพีเอ็ม

Figure 13. Effect of initial pH on pH, *p,p′*-DDT residual and protein concentrations of strain SB1A10 grown in MSYM with 25 ppm *p,p′*-DDT.



ภาพที่ 14 ผลของพีเอชต่ออัตราการย่อยสลายของสารพารา,พารา′-ดีดีทีโดยเชื้อ SB1A10 ชั่วโมงที่ 240

Figure 14. Effect of intial pH on degradation of *p,p′*-DDT by strain SB1A10 at 240 h of growth.

จากข้อมูลพบว่าสอดคล้องกับลักษณะของเชื้อ *Serratia marcescens* DT-1P ที่มีอัตราการย่อยสลายในช่วงพีเอช 4.0 - 8.0 โดยพีเอชที่เหมาะสมในการย่อยสลาย คือพีเอช 7.0 และ 7.5 (Bidlan and Manonmani, 2002) จากผลการทดลอง พบว่าที่พีเอช 7.0 เป็นพีเอชที่เหมาะสมต่อการย่อยสลายเนื่องจากมีอัตราการย่อยสลายและการเจริญสูงสุด รองลงมาคือที่พีเอช 6.0 และ 8.0 ส่วนที่พีเอช 9.0 และ 5.0 มีอัตราการย่อยสลายต่ำสุด อย่างไรก็ดีพบว่าเชื้อ SB1A10 มีความสามารถย่อยสลายสารพารา,พารา′-ดีดีทีในช่วงพีเอชตั้งแต่ 4.0 - 9.0 จากข้อมูลพบว่าสอดคล้องกับลักษณะของเชื้อ *Serratia marcescens* DT-1P ที่มีอัตราการย่อยสลายในช่วงพีเอช 4.0 - 8.0 โดยพีเอชที่เหมาะสมในการย่อยสลาย คือพีเอช 7.0 และ 7.5 (Bidlan and Manonmani, 2002)

สำหรับสารอื่นในกลุ่มเดียวกันที่มีการศึกษา เช่น Pattanasupong และคณะ (2004) ศึกษาการตรึงกลุ่มจุลินทรีย์ (consortium) สำหรับย่อยสลายสาร 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) พบว่าพีเอชที่เหมาะสมในการย่อยสลายอยู่ในช่วง 6 - 9 โดยอัตราการย่อยสลายจะลดลงที่พีเอชต่ำ (4.0 และ 5.0) ซึ่งข้อมูลเกี่ยวกับผลของพีเอชในการย่อยสลายสารดีดีทีมีค่อนข้างน้อย แต่พบว่าสภาวะที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียเพื่อใช้ในการย่อยสลายสารปนเปื้อนโดยทั่วไปอยู่ในช่วง 6.5 - 7.5 สำหรับการย่อยสลายดีดีทีในดินพบว่ากิจกรรมการย่อยสลายเกิดขึ้นน้อยมากที่พีเอชต่ำกว่า 2.98 (Bidlan and Manonmani, 2002)

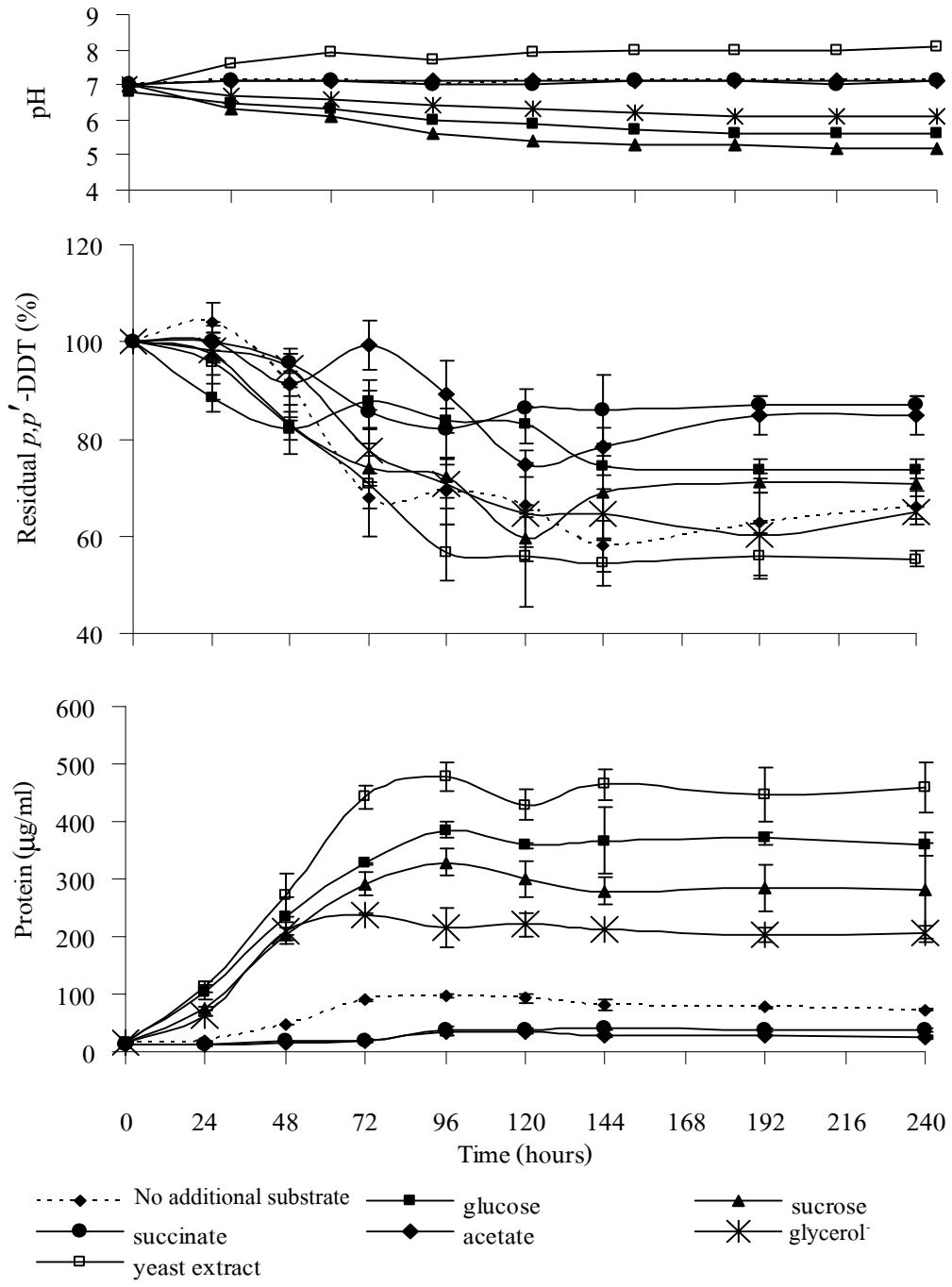
Olaniran และคณะ (2001) ได้ศึกษาถึงผลกระทบของพีเอชต่อกิจกรรมของเอนไซม์ที่ใช้ในการย่อยสลายสารปนเปื้อน โดยในการแยกเชื้อที่สามารถย่อยสลายสารออร์กาโนคลอรีนด้วยเอนไซม์ดีฮาโลจีเนส พบว่า เชื้อที่คัดแยกได้ คือ *Bacillus* และ *Corynebacterium* มีกิจกรรมของเอนไซม์ดีฮาโลจีเนสสูงสุดที่พีเอช 7.6 และ 8.0

3.4.3 ผลของสารอาหารที่เหมาะสมต่อประสิทธิภาพในการย่อยสลายสารพารา,พารา′-ดีดีที

เมื่อเลี้ยงเชื้อ SB1A10 ในอาหาร MSYM ผสมสารพารา,พารา′-ดีดีที 25 พีพีเอ็ม ที่เพิ่มสารอาหารได้แก่ กลูโคส ซูโครส ซักซิเนต อะซิเตต กลีเซอรอล และยีสต์สกัด ร้อยละ 0.5 โดยใช้สภาวะที่เลือกไว้ในข้อ 3.4.1 และ 3.4.2 เขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที และเลี้ยงเป็นเวลา 10 วัน โดยใช้อาหาร MSYM ที่ไม่เติมสารอาหารเพิ่มเป็นชุดควบคุม พบว่า เชื้อดังกล่าวสามารถเจริญได้ดีที่สุดในอาหารที่เติมยีสต์สกัด สามารถวัดปริมาณโปรตีนสูงสุดได้ 478 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร รองลงมาคือ กลูโคส ซูโครส และ กลีเซอรอล (ปริมาณโปรตีนสูงสุด 385 329 และ 328 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ) ในขณะที่เชื้อเจริญในอาหารที่เติมซักซิเนตและอะซิเตตได้ต่ำ (ปริมาณโปรตีน 40.4 และ 33 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ) ในขณะที่การลดลงของสารพารา,พารา′-ดีดีที พบว่ามีเพียงยีสต์สกัดที่ทำให้มีอัตราการย่อยสลายเพิ่มขึ้น คือ สามารถย่อยสลายได้ร้อยละ 42.4 ในขณะที่ชุดควบคุมสามารถย่อยได้ร้อยละ 34.1 และพบว่ากลีเซอรอลไม่ทำให้อัตราการย่อยสลายเปลี่ยนแปลงไป คือย่อยได้ประมาณร้อยละ 35.1 ส่วน ซูโครส กลูโคส อะซิเตต และซักซิเนตทำให้อัตราการย่อยสลายลดลง คือได้ร้อยละ 29.1, 26.2, 15.1 และ 13.1 ตามลำดับ

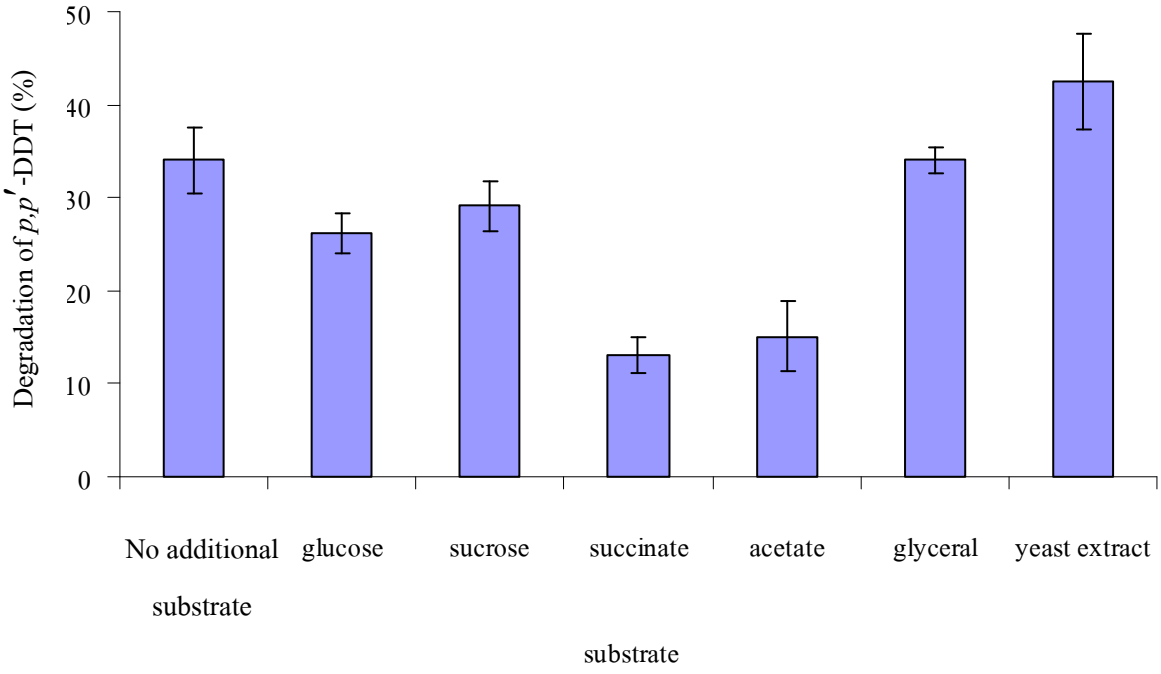
สารอาหารเป็นปัจจัยที่สำคัญต่อการย่อยสลายสารปนเปื้อน โดยพบว่าสารอาหารบางชนิดมีผลต่อการยับยั้งหรือส่งเสริมกิจกรรมของแบคทีเรียในการย่อยสลายสารดีดีที จากผลการทดลองพบว่าเมื่อเติมยีสต์สกัดร้อยละ 0.5 ทำให้อัตราการย่อยสลายและการเจริญของเชื้อเพิ่มขึ้น ในขณะที่กลูโคสและซูโครสแม้ทำให้อัตราการเจริญสูงขึ้น แต่อัตราการย่อยสลายลดลง ส่วนซักซิเนตและอะซิเตตทำให้อัตราการย่อยสลายและการเจริญของเชื้อลดลง

จากผลการทดลองดังกล่าวใกล้เคียงกับผลการทดลองของ Bidlan และ Manonmani (2002) ซึ่งพบว่ายีสต์สกัดทำให้การย่อยสารดีดีทีของเชื้อ *Serratia mercescens* DT-1P เพิ่มขึ้นจากร้อยละ 80 เป็นสามารถย่อยสลายได้สมบูรณ์ ในขณะที่กลูโคสและซูโครสทำให้อัตราการย่อยสลายลดลงจากร้อยละ 80 เป็นร้อยละ 53 และ 65 ตามลำดับ ผลการเติมกลีเซอรอลของเชื้อ SB1A10 พบว่าอัตราการย่อยสลายไม่ต่างจากชุดควบคุม ในขณะที่เชื้อ *Serratia mercescens* DT-1P เมื่อเติมกลีเซอรอลทำให้อัตราการย่อยสลายสารดีดีทีเกิดสมบูรณ์ ส่วนซักซิเนตและอะซิเตตให้ผลเช่นเดียวกันคือมีอัตราการย่อยสลายลดลงมากเมื่อเทียบกับสารอาหารตัวอื่น



ภาพที่ 15 ผลของสารอาหารร่วมต่อการเปลี่ยนแปลงค่าพีเอช การลดลงของสารพารา,พารา′-ดีดีที และปริมาณโปรตีนของเชื้อ SB1A10 เมื่อเลี้ยงในอาหาร MSYM ผสมสารพารา,พารา′-ดีดีที 25 พีพีเอ็ม

Figure 15. Effect of co-substrate on pH, *p,p′*-DDT residual and protein concentrations of strain SB1A10 grown in MSYM with 25 ppm *p,p′*-DDT.



ภาพที่ 16 ผลของสารอาหารร่วมต่ออัตราการย่อยสลายของสารพารา,พารา′-ดีดีทีโดยเชื้อ SB1A10 ชั่วโมงที่ 240

Figure 16. Effect of co-substrate on degradation of *p,p′*-DDT by strain SB1A10 at 240 h of growth.

สารอาหารชนิดต่าง ๆ มีผลต่อการเจริญของเชื้อและการย่อยสลายสารปนเปื้อนต่างกัน เช่น เมื่อเติมอะซิเตตร้อยละ 0.1 ในอาหาร Mineral salt ในการเลี้ยงเชื้อ *Pseudomonas* sp. เพื่อย่อยสลายสาร แกมมา- และ เบต้า-เอชซีเอช พบว่าเชื้อสามารถใช้อะซิเตตเป็นแหล่งอาหารและเพิ่มอัตราการย่อยสลายสารเบต้า-เอชซีเอช ในขณะที่ทำให้อัตราการย่อยสลายของสารแกมมา-เอชซีเอชช้าลง (Sahu *et al.*, 1993)

Awasthi และคณะ พบว่าเมื่อมีโซเดียมอะซิเตตและโซเดียมซักซิเนตจะมีผลยับยั้งการย่อยสลายของเอนโดซัลเฟน (Endosulfan) และยังมีรายงานว่าสารอาหารหลายชนิดขัดขวางการย่อยสลายของสารปนเปื้อนเนื่องจากการเกิดแคตาบอลิกรีเพรสชัน (Catabolic repression) หรือ การลดของอัตราการแปลรหัสดีเอ็นเอ (Transcription) เนื่องจากเกิด Supercoiling บนตำแหน่งโปรโมเตอร์ (promoter) ของดีเอ็นเอ หรือทำให้เกิดการลดลงของการจับกับ Transcription factor (Batsford, 1993 อ้างโดย Bidlan and Manonmani, 2002)

Ko (1968 อ้างโดย Mohn and Tiedje, 1992) พบว่า สารอาหารบางชนิด เช่นยีสต์สกัด อัลฟาฟา สามารถกระตุ้นให้เกิดปฏิกิริยารีดักทีฟดีฮาโลจิเนชันของสารดีดีที ซึ่งสารอาหารเหล่านี้อาจเป็น

ตัวทำให้เกิดตัวให้อิเล็คตรอน (Electron donor) สำหรับปฏิกิริยารีดักทีฟดีฮาโลจิเนชัน (Mohn and Tiedje, 1992)

3.4.4 ผลของปริมาณสารพารา,พารา′-ดีดีทีต่อประสิทธิภาพในการย่อยสลายโดยแบคทีเรียที่คัดเลือกได้

เมื่อเลี้ยงเชื้อ SB1A10 ในอาหารที่เติมยีสต์สกัดเพิ่มในอาหาร MSYM และตามสภาวะที่เลือกในข้อ 3.4.1 - 3.4.3 แล้วศึกษาประสิทธิภาพของเชื้อที่คัดเลือกได้ พบว่าเชื้อสามารถย่อยสลายสารพารา,พารา′ดีดีทีที่ความเข้มข้น 10, 15, 20 และ 25 พีพีเอ็ม ได้ผลดังตารางที่ 5 โดยพบว่าที่ความเข้มข้น 15 และ 20 พีพีเอ็ม เชื้อสามารถย่อยสลายสารได้ปริมาณสูงขึ้น (8.8 และ 9.6 พีพีเอ็ม ตามลำดับ) เมื่อเทียบกับสารพารา,พารา′-ดีดีทีที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 10 พีพีเอ็ม (7.6 พีพีเอ็ม) และที่ความเข้มข้น 25 พีพีเอ็ม ปริมาณการย่อยสลายไม่แตกต่างจากที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 20 พีพีเอ็ม

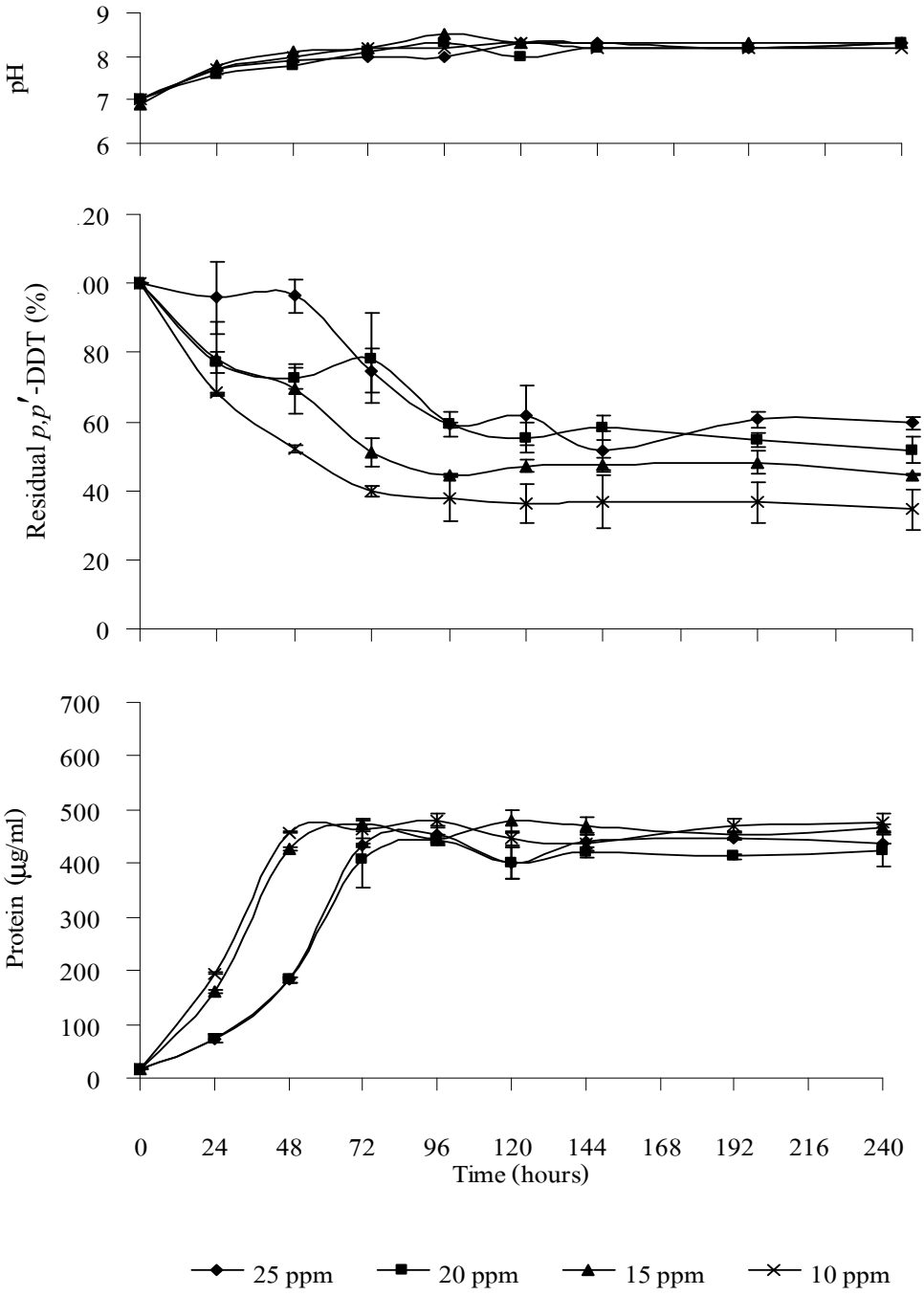
ตารางที่ 5 การลดลงของสารพารา,พารา′-ดีดีทีที่ลดลง ผลผลิตมวลชีวภาพ และอัตราการใช้สารอาหารตั้งต้นของเชื้อ SB1A10 ที่เลี้ยงในอาหาร MSYM ผสมยีสต์สกัดร้อยละ 0.5

Table 5. *p,p′*-DDT reduction, biomass yield and rate of substrate consumption of strain SB1A10 grown in MSYM with addition 0.5% of yeast extract.

Initial *p,p′*-DDT concentration	Amount of *p,p′*-DDT removed (ppm)	Biomass yield (Yx/s)	Substrate consumption (mg/l/hr)
10	7.6 ± 0.57	44.61 ± 2.42[b]	0.028 ± 0.00
15	8.8 ± 0.49	44.19 ± 0.69[b]	0.037 ± 0.00
20	9.6 ± 0.07	45.00 ± 3.40[b]	0.039 ± 0.00
25	9.5 ± 0.71	41.00 ± 0.07[a]	0.039 ± 0.00

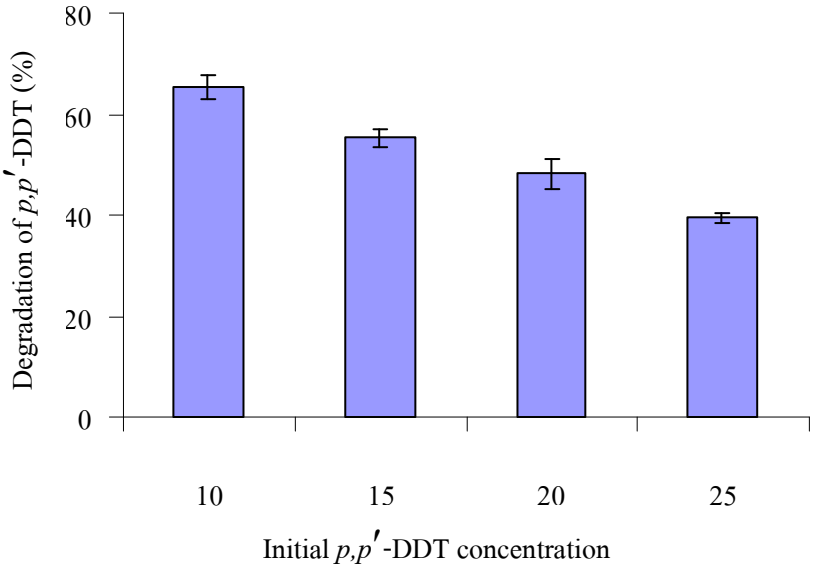
± = Standard deviation values (SD)

a, b and c = Statistically significantly difference with p value < 0.05



ภาพที่ 17 ผลของความเข้มข้นเริ่มต้นที่มีต่อการเปลี่ยนแปลงค่าพีเอช การลดลงของสารพารา,พารา′-ดีดีที และปริมาณโปรตีนของเชื้อ SB1A10 เมื่อเลี้ยงในอาหาร MSYM ผสมสารพารา,พารา′-ดีดีที 25 พีพีเอ็ม

Figure 17. Effect of initial *p,p′*-DDT concentrations on pH, *p,p′*-DDT residual and protein concentrations of strain SB1A10 grown in MSYM with 25 ppm *p,p′*-DDT.



ภาพที่ 18 ผลของความเข้มข้นสารพารา,พารา′-ดีดีทีเริ่มต้นต่ออัตราการย่อยสลายของสารพารา,พารา′-ดีดีทีโดยเชื้อ SB1A10 ชั่วโมงที่ 240

Figure 18. Effect of initial *p,p′*-DDT concentrations on degradation of *p,p′*-DDT by strain SB1A10 at 240 h of growth.

ผลของปริมาณมวลชีวภาพหลังจากเลี้ยงเป็นเวลา 10 วัน พบว่ามีค่าไม่แตกต่างกันมากนัก แต่ระยะเวลาการเจริญของเชื้อพบว่าที่ความเข้มข้นสารพารา,พารา′-ดีดีทีต่ำ คือ 15 และ 20 พีพีเอ็ม เชื้อเจริญสูงสุดในเวลา 48 - 72 ชั่วโมง ขณะที่ความเข้มข้น 20 และ 25 พีพีเอ็มเชื้อเจริญสูงสุดในเวลา 72 - 96 ชั่วโมง (ภาพที่ 17 และ 18) ซึ่งแสดงว่าความเข้มข้นของสารพารา,พารา′-ดีดีทีมีผลต่อการเจริญของเชื้อโดยทำให้อัตราการเจริญช้าลง สำหรับผลของปริมาณการใช้สารอาหารตั้งต้นของเชื้อพบว่าที่ความเข้มข้น 10 พีพีเอ็ม เชื้อสามารถใช้สารอาหารตั้งต้นได้ปริมาณต่ำสุด คือ 0.028 มิลลิกรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง และเพิ่มขึ้นที่ความเข้มข้น 15 และ 20 พีพีเอ็ม แต่คงที่ที่ความเข้มข้น 25 พีพีเอ็ม ซึ่งผลดังกล่าวสอดคล้องกับปริมาณสารพารา,พารา′-ดีดีทีที่ลดลง

จากผลการทดลองข้างต้นที่พบว่าเชื้อสามารถย่อยสารพารา,พารา′-ดีดีทีได้เพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มปริมาณสารจนถึงระดับหนึ่ง อาจเนื่องมาจากเชื้อสามารถใช้สารพารา,พารา′-ดีดีทีเป็นแหล่งอาหารและพลังงาน จนถึงระดับหนึ่งเชื้อจะไม่สามารถย่อยได้มากขึ้นและอาจมีแนวโน้มลดลงหากเพิ่มความเข้มข้นให้สูงขึ้น ดังเช่นการทดลองของ Bidlan และ Manonmani (2002) พบว่าเชื้อ *Serratia*

marcescen DT-1P สามารถย่อยสลายสารพารา,พารา′-ดีดีทีความเข้มข้น 5, 10, 15 และ 25 พีพีเอ็ม ได้สมบูรณ์ที่เวลา 48, 72, 96 และ 144 ชั่วโมง ตามลำดับ การลดลงหรือยับยั้งการย่อยสลายของสารปนเปื้อนโดยจุลินทรีย์ อาจเนื่องจากสารปนเปื้อนมีความเป็นพิษหรือไปยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Nawab และคณะ (2003) ที่พบว่าความเข้มข้นของแกมมา-เอชซีเอชที่สูง จะมีผลให้การเจริญของจุลินทรีย์ลดลง

3.5 การจำแนกชนิดของเชื้อที่สามารถย่อยสลายสารพารา,พารา′-ดีดีที

3.5.1 ผลการทดสอบทางสัณฐานวิทยาและชีวเคมี

จากผลการศึกษาแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลายสารพารา,พารา′-ดีดีทีทั้ง 5 สายพันธุ์ พบว่ามีลักษณะโคโลนีและสัณฐานวิทยาแตกต่างกัน(ตารางที่ 7 และ ภาพที่ 19) โดยมี 3 สายพันธุ์ที่เป็นแบคทีเรียแกรมบวกรูปกลม คือ SB1A01, SB1A10 และ SB1B10 และ 2 สายพันธุ์เป็นแบคทีเรียแกรมลบรูปท่อน คือ SB2A02 และ SB1A12 และเมื่อทำการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี แสดงในตารางที่ 8 พบว่าสามารถจำแนกเชื้อได้เป็น 2 กลุ่ม คือ *Staphylococcus* sp. ได้แก่เชื้อ SB1A01 SB1A10 และ SB1B10 ซึ่งให้ผลบวกในการทดสอบคาตาเลส ไม่มีการสร้างอินโดล เชื้อทุกตัวในกลุ่มสามารถริดิวซ์ไนเตรทได้ รูปร่างกลมและติดสีแกรมลบ อีกกลุ่มหนึ่งคือ *Pseudomanas* sp. ซึ่งสามารถออกซิไดส์คาร์โบไฮเดรตในสภาวะที่มีอากาศ ให้ผลบวกในการเกิดทดสอบออกซิเดส เป็นเชื้อที่ต้องการอากาศให้การทดสอบอินโดลให้ผลเป็นลบ มีรูปร่างท่อน แกรมลบ เชื้อทุกสายพันธุ์ให้ผลบวกในการทดสอบการเคลื่อนที่

จากการทดสอบพบว่าเชื้อที่นำมาทำการศึกษา คือ SB1A10 ซึ่งเป็นเชื้อที่ย่อยสลายสารพารา,พารา′-ดีดีทีได้สูงสุด เป็นเชื้อในกลุ่ม *Staphylococcus* sp. พบว่าจากการศึกษาการย่อยสลายสารพารา,พารา′-ดีดีที ส่วนใหญ่เป็นเชื้อแบคทีเรียแกรมลบได้แก่ *Alcaligenes eutrophus* A5 (Nadeau *et al.*,1995), *Pseudomonas* sp. (Chandrappa *et al.*, 2004) และ *Serratia Marcescens* DT-1P (Bidlan and Manonmani, 2001) เป็นต้น ซึ่งแบคทีเรียแกรมลบสามารถย่อยสลายสารพารา,พารา′-ดีดีทีผ่านกระบวนการแตกวงเบนซินตรงตำแหน่งเมต้า (Meta-cleavage) โดยเอนไซม์ออกซิจิเนส อย่างไรก็ดียังมีรายงานว่าเชื้อแกรมบวกบางชนิดสามารถย่อยสลายสารพารา,พารา′-ดีดีทีและอนุพันธุ์ได้ เช่น *Micrococcus varians* สามารถย่อยสลายสารพารา,พารา′-ดีดีทีได้สารหลักเป็นดีดีดี (Abou-Arab, 2002) *Micrococcus* 204 สามารถย่อยสลายดีดีทีได้เป็นดีดีดี และดีดีเอ เช่นเดียวกับ *Bacillus* sp.459 และ *Bacillus* sp.461 (Patil *et al.*, 1970)

สำหรับสารปนเปื้อนกลุ่มออร์กาโนคลอรีนชนิดอื่น มีรายงานการย่อยสลายโดยแบคทีเรียแกรมบวกเช่นเดียวกัน เชื้อ *Terrabacter* sp. DDE-1 เป็นแบคทีเรียแกรมบวกที่ต้องการอากาศ

สามารถย่อยสลายสารดีดีอีโดยการชักนำด้วยไบฟีนิลโดยย่อยดีดีอีจาก 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรเป็น 0.062 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ภายหลังจากการเลี้ยงเป็นเวลา 10 วัน และเซลล์สามารถย่อยสลายดีดีอีโดยแตกวงเบนซินตรงตำแหน่งเมต้าจนได้สารตัวสุดท้ายคือ 4-คลอโรเบนโซอิก เช่นเดียวกับเชื้อแกรมลบ (Aislabie, 1999)

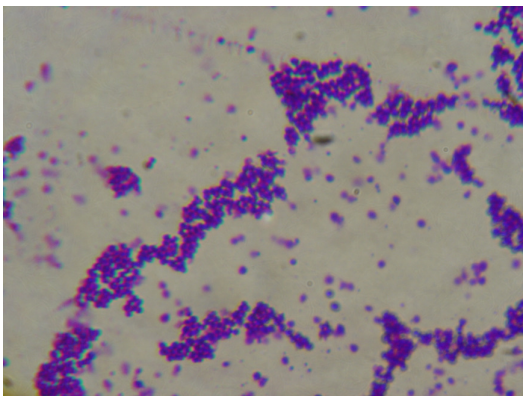
3.5.2 การจำแนกเชื้อโดยวิธี 16S rDNA

เมื่อทำการสกัดเชื้อ SB1A10 ด้วยวิธี Boiling method และนำมาทดลองเพิ่มจำนวนเซลล์ด้วยวิธี polymerase chain reaction (PCR) โดยใช้ universal primer ชุดต่างๆ ที่มีลำดับเบสแตกต่างกัน (ตารางที่ 2 และ 9) พบว่ามี primer จำนวน 9 ชุดที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของเชื้อดังกล่าวโดยการทดลองโดยใช้ primer ชุดต่าง ๆ โดยที่จากการทดลองพบว่า primer 63F และ 1492R สามารถเพิ่มจำนวนได้ดีที่สุดโดยสังเกตสังเกตจากแถบบนเจลอกาโรสจะปรากฏชัดโดยแถบเกิดขึ้นที่ช่วงประมาณ 1400 คู่เบส เมื่อเทียบกับ DNA marker (ภาพที่ 20) และพบว่าการใช้ primer ชุดดังกล่าวให้ช่วงของสายดีเอ็นเอมากที่สุด คือ ประมาณ 1492 คู่เบส จากผลการทดลองจึงเลือก primer 63F และ 1492R เพื่อใช้เป็น primer ในการหาลำดับเบส (Macrogen, Inc.) มีการศึกษา การเลือกใช้ primer ในการจำแนกเชื้อที่ได้จากสิ่งแวดล้อม เช่นการศึกษาของ Marchesi และคณะ (1998) ได้ศึกษาการใช้ชุด primer 63F และ 1387R และชุด primer 27F และ1392R เพื่อใช้ในการจำแนกเชื้อหลากหลายสายพันธุ์ที่คัดแยกได้จากสิ่งแวดล้อมพบว่าชุด primer 63F และ 1387R มีความสามารถในการจำแนกเชื้อได้หลากหลายสายพันธุ์กว่าชุด primer 27F และ 1392R โดยเฉพาะเชื้อกลุ่ม Micrococcus และ Coryneform ซึ่งเป็นเชื้อแกรมบวก ปริมาณ G+C สูง นอกจากนั้นยังมีการศึกษาการใช้ primer 63F ในการจำแนกเชื้อที่คัดแยกได้จากสิ่งแวดล้อมอีกหลายแหล่ง เช่น การจำแนกเชื้อที่ออกซิไดส์แอมโมเนีย (ammonia-oxidizing bacteria) ที่คัดแยกได้จากดิน โดยใช้ primer 63F และ 1387R (Innerebner *et al.*, 2006) จำแนกเชื้อจากตะกอนดินใต้ทะเลลึก โดยใช้ primer 63F และ 665R (Webster *et al.*, 2004) จำแนกเชื้อที่ย่อยสลายสารPolyhexamethylene biguanide (PHMB) โดยใช้ primer 63F และ 1387R (O'Malley *et al.*, 2005) จากนั้นได้เอาลำดับเบสที่ได้จาก primer ทั้ง 2 ชุด มาจัดเรียงใหม่โดยใช้โปรแกรม ClustalX เพื่อให้ได้ดีเอ็นเอสายเต็ม (full length)

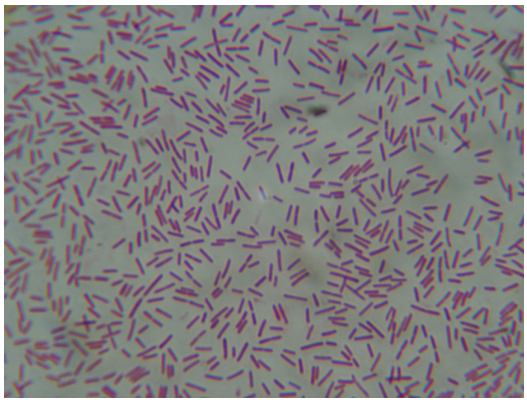
จากลำดับเบสที่ได้มาทำการ BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov) พบว่าเชื้อที่ได้มีความใกล้เคียงกับเชื้อ *Staphylococcus* หลายสายพันธุ์ต่าง ๆ โดยมีร้อยละความคล้ายคลึงเท่ากับ 99 (1360/1362) และเมื่อนำเชื้อเหล่านั้นมาทำการเทียบเคียงโดยใช้โปรแกรม Treeview ได้ไฟโลจินิกทรี

ดังแสดงในภาพที่ 21 จากภาพพบว่าเชื้อตัวอย่างเป็นเชื้อ *Staphylococcus* sp. โดยมีความใกล้เคียงกับ *Staphylococcus haemolyticus* มากที่สุด (ภาพที่ 22)

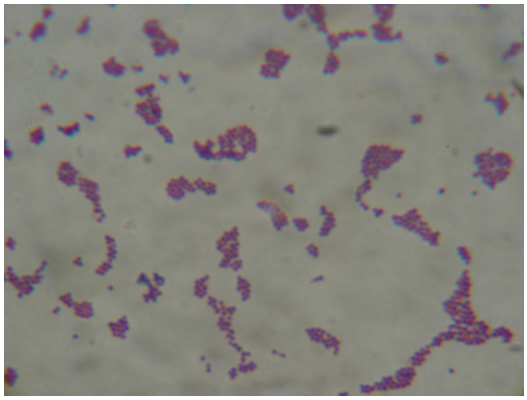
เชื้อ *Staphylococcus haemolyticus* เป็นเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างกลม ให้ผลคาตาเลสเป็นบวกและโคแอกกูเลสเป็นลบ อยู่ในกลุ่ม *Staphylococci* พบได้บ่อยตามผิวหนังและเนื้อเยื่ออ่อน ๆ เป็นเชื้อก่อโรค และเป็นเชื้อที่ทนต่อยาปฏิชีวนะได้สูง (Takeuchi *et al.,* 2005) ส่วนในสิ่งแวดล้อมมีรายงานว่าสามารถคัดแยกเชื้อชนิดนี้ได้จากสนามบิน Moffett ในแคลิฟอร์เนีย (Fries *et al.*, 1997) บ่อสำหรับเก็บเชื้อเพลิงนิวเคลียร์ที่หมดอายุในโรงปฏิกรณ์นิวเคลียร์ (Chicote *et al.*, 2005) แม้ไม่มีรายงานการย่อยสลายสารพารา,พารา′-ดีดีที โดยเชื้อชนิดนี้แต่พบเชื้อ *Staphylococcus haemolyticus* สามารถย่อยสลายสาร Trichloroethane (TCE) ซึ่งเป็นสารกลุ่มออร์กาโนคลอรีนเมื่อมีสารฟีนอลเป็นสารอาหารตั้งต้น (Fries *et al*., 1997) นอกจากนี้เชื้อกลุ่ม *Staphylococci* มีรายงานการย่อยสลายสารกลุ่มออร์กาโนคลอรีนผ่านปฏิกิริยาดีฮาโลจีเนชั่น



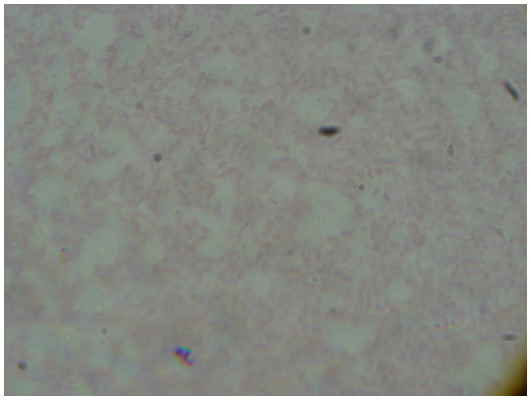
SB1A01



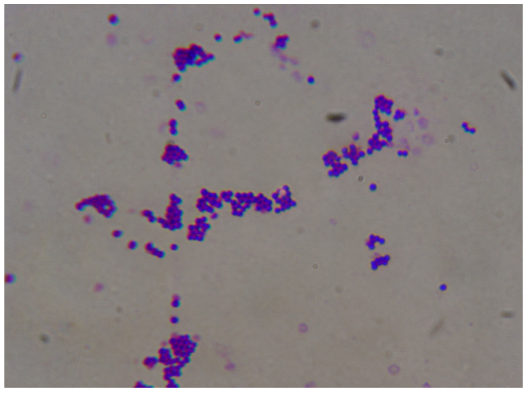
SB2A02



SB1A10



SB1A12



SB1B05

ภาพที่ 19 รูปร่างเซลล์ของเชื้อที่คัดเลือกได้ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (100 เท่า)

Figure 19. Cell morphology of selected bacteria under microscope (100x).

ตารางที่ 6 ผลการทดสอบคุณสมบัติทางสัณฐานวิทยาและชีวเคมีของเชื้อที่คัดเลือกได้

Table 6. Morphological and biochemical characteristic of selected bacteria strain.

Morphological and biochemical characteristics	Selected bacteria				
	SB1A01	SB2A02	SB1A10	SB1A12	SB1B05
Gram staining	+	-	+	-	+
Cell shape	cocci	rod	cocci	rod	cocci
Motility	+	+	+	+	+
Indole test	-	-	-	-	-
Methyl red test	-	-	-	-	-
VP test	-	-	-	-	-
Citrate utilization	-	-	-	-	-
Starch hydrolysis	-	-	-	-	-
Nitrate reduction	+	-	+	-	+
H_2S production	-	-	-	-	-
Catalase test	+	-	+	-	+
Oxidase test	-	+	-	+	-
Oxidation/Fermentation (OF)	N	O	N	O	N
Liquefaction	-	-	-	-	-
Acid production from carbohydrates:					
- Glucose	-	+	-	+	-
- Lactose	+	-	-	-	+
- Sucrose	-	-	-	-	-
Results	*Staphylococcus*	*Pseudomonas*	*Staphylococcus*	*Pseudomonas*	*Staphylococcus*

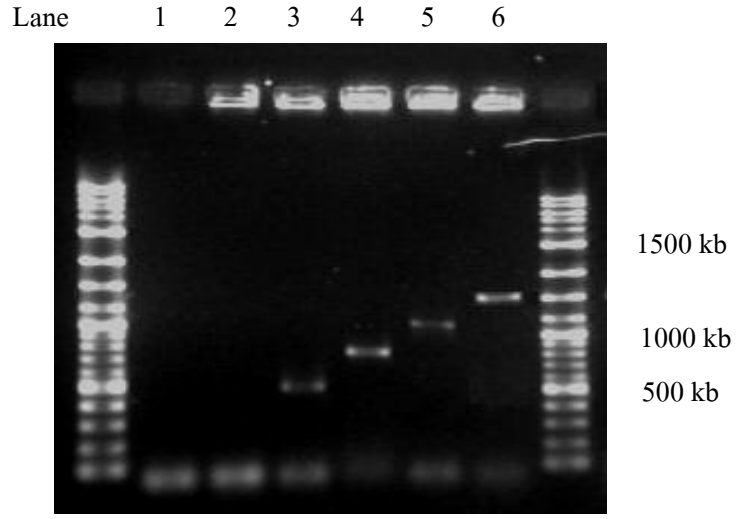
N : No color change in tested medium

O : Change color in tested medium

ตารางที่ 7 ลักษณะโคโลนีบนอาหาร MSYM ผสมสารพารา,พารา′-ดีดีที 25 พีพีเอ็มของแบคทีเรียที่คัดเลือกได้

Table 7. Colony characteristics of the selected bacterial isolates grown on MSYM with the addition of 25 ppm DDT.

Selected strains	Colony morphologies
SB1A01	white, circular, smooth edge, opaque
SB2A02	off-white, circular, smooth edge, opaque, flat
SB1A10	white, circular, smooth edge, opaque
SB1A12	yellowish , circular, smooth edge, slime
SB1B10	white, circular, convex, smooth edge, opaque



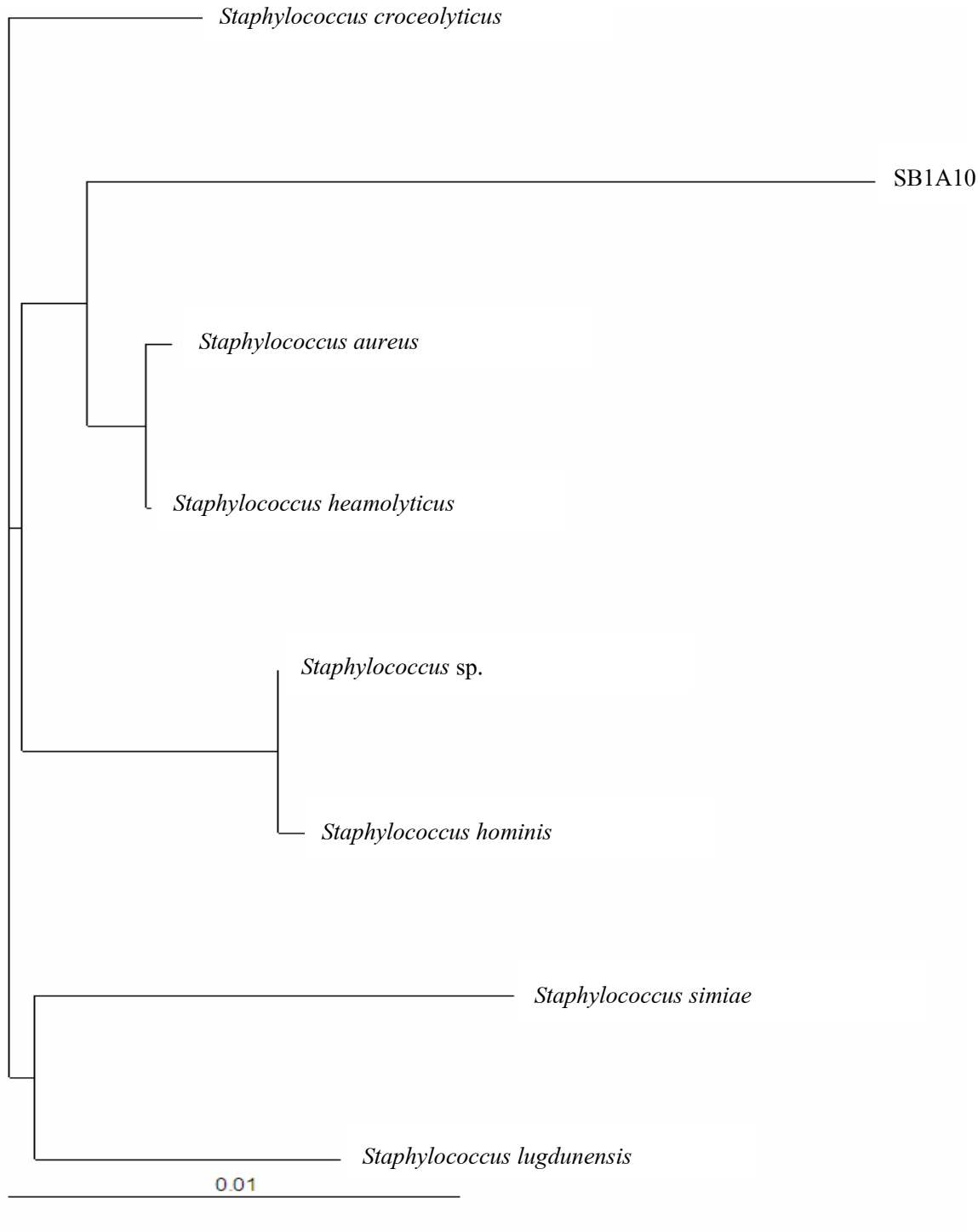
ภาพที่ 20 เจลอิเล็คโตรโฟริซิสของดีเอ็นเอที่เพิ่มจำนวนด้วยเทคนิค PCR ของเชื้อ SB1A10 โดยใช้ไพรเมอร์ต่าง ๆ (เลน 1-6 : น้ำกลั่น, 63F -531R, 63F-536R, 63F-805R, 63F-1115R และ 63F:1492R ตามลำดับ)

Figure 20. Gel electrophoresis of PCR product of SB1A10 with different primer. (Lane1-6 : distilled water, 63F-531R, 63F-536R, 63F-805R, 63F-1115R and 63F-1492R, respectively)

ตารางที่ 8 ผลการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอของเชื้อ SB1A10 โดยใช้ไพรเมอร์ต่าง ๆ

Table 8. Amplification of DNA from strain SB1A10.

Forward primers	Reverse primers	Amplification result
5F	531R	-
	802R	-
	1115R	-
	1492R	-
27F	531R	+
	805R	-
	1115R	-
	1492R	-
63F	531R	-
	536R	+
	805R	+
	1115R	+
	1492R	+
339F	531R	+
	536R	-
	802R	-
	1115R	-
	1492R	-
785F	1115R	+
	1492R	+
1099F	1492R	+



ภาพที่ 21 ไพโลจินิกทรีของเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ SB1A10 วิเคราะห์จากลำดับเบสโดยวิธี 16S rDNA

Figure 21. Phylogenetic tree of strain SB1A10 base on 16S rDNA sequence analysis.