ชื่อวิทยานิพนธ์ การคัดเลือก จำแนก และสภาวะที่เหมาะสมในการย่อยสลายสารพารา,พารา′-ดีดีทีโดยแบคทีเรียจากดิน

ผู้เขียน นางสาวกนกนิษถ์ สอนคง

สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ

ปีการศึกษา 2549

บทคัดย่อ

ดีดีทีเป็นสารกำจัดศัตรูพืชกลุ่มออร์กาโนคลอรีนที่มีคุณสมบัติตกค้างในธรรมชาติเป็นเวลานาน ก่อให้เกิดปัญหาต่อสิ่งแวดล้อม และสุขภาพของมนุษย์และสัตว์ในระยะยาว จากการวิเคราะห์ปริมาณสารพารา,พารา′-ดีดีทีในตัวอย่างดิน จากพื้นที่ทางการเกษตรจำนวน 23 จุด พบว่ามีปริมาณดีดีทีตกค้างตั้งแต่ 0.17-9.84 นาโนกรัมต่อกรัมดิน และเมื่อทำการคัดแยกเชื้อโดยวิธี Selective enrichment method พบว่าปริมาณเชื้อที่ทนต่อปริมาณสารพารา,พารา′-ดีดีทีในดินเมื่อใส่ลงในอาหาร Minimal salt-yeast extract medium (MSYM) ผสมสารพารา,พารา′-ดีดีที 25 พีพีเอ็ม (MSYM+DDT_{25}) เป็นเวลา 7 วัน มีจำนวนตั้งแต่ 4.72 - 8.72 log CFU/กรัมดิน พบว่าเป็นเชื้อที่มีลักษณะโคโลนีแตกต่างกัน 167 ชนิด เมื่อนำเชื้อทั้งหมดมาทำการทดสอบความสามารถในการย่อยสลายสารพารา,พารา′-ดีดีที โดยเขี่ยเชื้อลงบนอาหารแข็ง MSYM ผสมสารพารา,พารา-ดีดีทีความเข้มข้น 25, 50 และ 100 พีพีเอ็ม พบว่ามีเชื้อ 10 ชนิดที่แสดงวงใสบนอาหาร MSYM ผสมสารพารา,พารา′-ดีดีที โดยมีเชื้อ 5 สายพันธุ์ที่สามารถแสดงวงใสในอาหาร MSYM ผสมสารพารา,พารา′-ดีดีที ทั้ง 3 ความเข้มข้น ได้แก่ เชื้อ SB1A01, SB2A02, SB1A10, SB1A12 และ SB1B05 เมื่อเลี้ยงเชื้อทั้ง 5 สายพันธุ์ในอาหาร MSYM+DDT_{25} ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที พบว่าเชื้อ SB1A10 สามารถเจริญและย่อยสลายสารพารา,พารา′-ดีดีที ได้สูงสุดถึงร้อยละ 37.4 และเชื้อ SB2A02 มีความสามารถในการย่อยสลายต่ำสุดคือร้อยละ 20.3 จึงนำเชื้อ SB1A10 ทำการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการย่อยสลายสารพารา,พารา′-ดีดีทีต่อไป

การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการย่อยสลายสารพารา,พารา′-ดีดีที พบว่าเชื้อ SB1A01 สามารถเจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 30 และ 37 องศาเซลเซียส (ปริมาณโปรตีน 70.9 และ 60.3 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) และสามารถย่อยสลายพารา,พารา′-ดีดีทีสูงสุดที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส คือสามารถย่อยสลายได้ร้อยละ 39.1 รองลงมาคือที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสย่อยได้ร้อยละ 33.7 พีเอชที่เหมาะสมในการเจริญและย่อยสลายสารพารา,พารา′-ดีดีทีได้แก่พีเอช 7.0

สามารถย่อยได้ร้อยละ 38.9 ในขณะที่พีเอช 5.0 และ 9.0 ลดประสิทธิภาพในการย่อยสลายสารพารา ,พารา-ดีดีที โดยย่อยสลายได้ร้อยละ 24.3 และ 25.5 ตามลำดับ เมื่อเทียบกับชุดควบคุม (ร้อยละ 36.0) ส่วนสารอาหารร่วมที่เหมาะสมในการย่อยสลาย ได้แก่ ยีสต์สกัดร้อยละ 0.5 ซึ่งสามารถเพิ่มประสิทธิภาพการย่อยสลายได้เป็นร้อยละ 42.4 เมื่อเทียบกับชุดควบคุม (ร้อยละ 34.1) โดยที่อะซิเตตและซักซิเนตลดประสิทธิภาพในการย่อยสลายสารพารา,พารา′-ดีดีทีโดยเหลือเพียงร้อยละ 15.1 และ 13.1 ตามลำดับ การทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายสารพารา,พารา′-ดีดีทีที่ความเข้มข้นเริ่มต้นต่าง ๆ พบว่าเชื้อสามารถย่อยสลายสารได้สูงขึ้นเมื่อความเข้มข้นเพิ่มขึ้นจนคงที่ที่ความเข้มข้น 25 พีพีเอ็ม

ผลการจำแนกเชื้อที่มีความสามารถในการย่อยสลายสารพารา,พารา′-ดีดีทีทั้ง 5 สายพันธุ์ โดยทางวิธีทางสัณฐานวิทยาร่วมกับวิธีทางชีวเคมี พบว่าสามารถจำแนกเชื้อได้เป็น 2 กลุ่ม คือ SB1A1, SB1A10 และ SB1B10 เป็นเชื้อในจีนัส *Staphylococcus* sp. ส่วนเชื้อ SB2A02 และ SB2A12 เป็นเชื้อ *Pseudomonas* sp. โดยเชื้อ SB1A10 ที่ทำการศึกษาอยู่ในกลุ่มของ *Staphylococcus* sp. โดยมีความใกล้เคียงกับเชื้อ *Staphylococcus haemolyticus* ที่มีความคล้ายคลึงในระดับร้อยละ 99

Thesis Title	Screening, Identification and Optimization for the Degradation of *p,p′*-DDT by Soil Bacteria
Author	Miss Kanoknit Sonkong
Major Program	Biotechnology
Academic Year	2006

ABTRACT

DDT is an organochlorine pesticide that can persist in environment resulting in environmental problem with chronic effects on human and animal health. The determination of *p,p′*-DDT in soil samples from 23 agricultural fields found *p,p′*-DDT residual in the range of 0.17 - 9.84 ng/g soil. The amount of DDT-resistant bacteria in soil when grown in mineral salt medium with DDT addition (25 ppm) (MSYM+DDT_{25}) for 7 days using selective enrichment method were found in the range of 4.72 - 8.72 log CFU/ml. From these, 167 different morphological strains were isolated with 10 strains showing DDT-degrading ability as indicated by clear zone around colonies when grown in different concentration of *p,p′*-DDT on nutrient agar (25, 50 and 100 ppm *p,p′*-DDT). Five strains showing clear zone surrounding colony in all concentrations of *p,p′*-DDT were strains SB1A01, SB2A02, SB1A10, SB1A12 and SB1B05. When grown in MSYM+DDT_{25} with shaking at 150 rpm and incubated at 30°C for 10 days, the strain SB1A10 showed the highest *p,p′*-DDT degradation ability with 37.4% while the isolate SB2A02 had the lowest *p,p′*-DDT degradation ability of 20.3%. Thus, the strain SB1A10 was selected for further studies of the optimal condition for *p,p′*-DDT degradation.

Optimal temperature, pH, co-substrate and initial *p,p′*-DDT concentration were studied. The results showed that strain SB1A01 had optimal temperatures for growth at 30 and 37°C (70.9 และ 60.3 μg/ml protein). The optimal temperature for degradation was at 30°C giving 39.1% *p,p′*-DDT degradation followed by at 37°C with 33.7% *p,p′*-DDT degradation. The optimal pH for degradation was 7.0 (38.9% *p,p′*-DDT degradation) while pH 5.0 and 9.0 resulted in reduced degradation ability when compare to control (24.3%, 25.5% and 36%, respectively). Yeast extract 0.5% was found to be the optimal co-substrate required for *p,p′*-DDT

degradation and could reduce *p,p′*-DDT by 42.4%. The addition of acetate and succinate resulted in reduced degradation ability (15.1% and 13.1%, respectively). Comparison on degradation efficiency at different initial *p,p′*-DDT concentrations revealed that the ability to degrade *p,p′*-DDT of strain SB1A10 increased with the increase of *p,p′*-DDT concentration up to 25 ppm.

Based upon morphological and biochemical characterizations, 2 isolates were identified in the genus *Pseudomonas* and 3 isolates were identified in the genus *Staphylococcus*. Strain SB1A10 used in the optimization of *p,p′*-DDT degradation studies was further identified by 16S rDNA analysis and found to be 99% identical to *Staphylococcus haemolyticus*.