

## บทที่ 4

### สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

จากการเก็บตัวอย่างดินในพื้นที่ทางเกษตรภายในจังหวัดสงขลา 2 แห่ง คือ ต.ทุ่งหวัง อ.เมือง และ ต.บางเหลียง อ.ควนเนียง นำมาวิเคราะห์ปริมาณและคัดเลือกเชื้อที่สามารถย่อยสลายสารพารา,พารา'-ดีดีทีในดิน พบว่าตัวอย่างดินจากแปลงเกษตร 18 แปลงที่ทำการวิเคราะห์สารพารา,พารา'-ดีดีที พบสารดังกล่าวอยู่ในช่วง 0.17 - 9.84 นาโนกรัมต่อกรัมดิน และเมื่อนำมาคัดแยกเชื้อที่ทนต่อสารพารา,พารา'-ดีดีที โดยวิธี Selective enrichment method ในอาหาร MSYM ผสมสารพารา,พารา'-ดีดีที 25 พีพีเอ็ม สามารถแยกเชื้อที่มีความแตกต่างทางสัณฐานวิทยาจำนวน 167 สายพันธุ์ และมีเชื้อที่แสดงความสามารถในการย่อยสลายสารพารา,พารา'-ดีดีที โดยแสดงวงใสรอบโคโลนีเมื่อ streak เชื้อทั้งหมดลงบนอาหารอาหาร NA ที่ผสมสารพารา,พารา'-ดีดีทีความเข้มข้น 25, 50 และ 100 พีพีเอ็มพบว่ามีเชื้อจำนวน 11 สายพันธุ์ ที่แสดงวงใส และมี 5 สายพันธุ์ คือ SB1A01, SB2A02, SB1A10, SB1B12 และ SB1B05 สามารถแสดงวงใสในอาหาร NA ที่มีสารพารา,พารา'-ดีดีทีทุกความเข้มข้น จึงเลือกทั้ง 5 สายพันธุ์เพื่อศึกษาประสิทธิภาพการย่อยสลาย

เมื่อศึกษาประสิทธิภาพการย่อยสลายพบว่าเชื้อทั้ง 5 สายพันธุ์สามารถในการย่อยสลายสารพารา,พารา'-ดีดีที ในอาหาร MSYM ผสมสารพารา,พารา'-ดีดีทีความเข้มข้น 25 พีพีเอ็มได้ โดยเชื้อ SB1A10 มีความสามารถย่อยสลายสารพารา,พารา'-ดีดีที ได้สูงสุดคือร้อยละ 37 จึงเลือกเชื้อ SB1A10 ทำการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการย่อยสลายสารพารา,พารา'-ดีดีที

จากการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการย่อยสลายสารพารา,พารา'-ดีดีที พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมในการย่อยสลายสารพารา,พารา'-ดีดีที คือ 30 องศาเซลเซียส ซึ่งสามารถย่อยสลายสารพารา,พารา'-ดีดีทีได้ร้อยละ 39 พีเอชที่เหมาะสมในการย่อยสลายคือพีเอช 7.0 ซึ่งย่อยสลายได้ร้อยละ 42 เมื่อเทียบกับชุดควบคุม (ร้อยละ 36) และสารอาหารที่เหมาะสมในการย่อยสลายคือยีสต์สกัดซึ่งสามารถย่อยสลายสารพารา,พารา'-ดีดีทีได้ถึง 44 เมื่อเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่เติมสารพารา,พารา'-ดีดีที (ร้อยละ 34) และเมื่อหาสภาวะที่เหมาะสมแล้ว จึงศึกษาประสิทธิภาพของเชื้อในการย่อยสลายสารพารา,พารา'-ดีดีที โดยเลี้ยงในอาหาร MSYM ผสมยีสต์สกัดร้อยละ 0.5 ที่ความเข้มข้นของสารพารา,พารา'-ดีดีที 10, 15, 20 และ 25 พีพีเอ็มพบว่าอัตราการย่อยสลายมีแนวโน้มลดลงเมื่อลดความเข้มข้นของสารพารา,พารา'-ดีดีที

เมื่อทำการจำแนกเชื้อที่มีความสามารถในการย่อยสลายสารพารา,พารา'-ดีดีทีทั้ง 5 สายพันธุ์ โดยวิธีทางชีวเคมี พบว่ามีเชื้อ 3 สายพันธุ์ คือ SB1A1, SB1A10 และ SB1B10 เป็นเชื้อ *Staphylococcus* sp. ส่วนเชื้อ SB2A02 และ SB2A12 เป็นเชื้อ *Pseudomonas* sp. โดยเชื้อ SB1A10 ที่ทำการศึกษาอยู่ในกลุ่มของ *Staphylococcus* sp. และเมื่อทำการส่งวิเคราะห์โดยวิธี 16S rDNA พบว่าเป็นเชื้อที่ใกล้เคียงกับ *Staphylococcus haemolyticus* โดยมีร้อยละความคล้ายคลึงเท่ากับ 99 (1360/1362)

#### ข้อเสนอแนะ

1. ในขั้นตอนการคัดเลือกเชื้ออาจใช้วิธีเพิ่มระยะเวลาในการถ่ายเชื้อเพื่อให้สามารถชักนำให้เกิดการสร้างเอนไซม์ที่ย่อยสลายสารปนเปื้อนหรือการใช้สารชักนำให้ได้เชื้อที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายมากขึ้น
2. การศึกษาในขั้นต่อไปอาจทำการศึกษาวิถีการย่อยสลายจากเชื้อคัดแยกได้ เพื่อทำให้เข้าใจถึงกลไกของการลดลงของสารพารา,พารา'-ดีดีทีได้ดียิ่งขึ้น
3. ในขั้นตอนการหาสภาวะที่เหมาะสม ควรหาปริมาณสารอาหารที่เหมาะสมร่วมกับยีสต์สกัดที่ความเข้มข้นต่างๆ เนื่องจากยีสต์สกัดมีผลเพิ่มอัตราการย่อยสลายสารพารา,พารา'-ดีดีทีได้
4. ควรศึกษาการทำงานร่วมกันของกลุ่มเชื้อ (consortium) จากเชื้อที่คัดแยกได้เพื่อให้มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายสารพารา,พารา'-ดีดีทีมากขึ้น
5. การคัดเลือกโดยให้มีการกระตุ้นก่อน คือ เริ่มที่ความเข้มข้นต่ำๆ เพื่อเพิ่มจำนวนเชื้อที่มีความสามารถในการย่อยสลายสารพารา,พารา'-ดีดีที

## เอกสารอ้างอิง

- ดวงพร คันทโชติ. 2537. อนุกรมวิธานของแบคทีเรียและปฏิบัติการ. สำนักพิมพ์โอเดียนสโตร์. กรุงเทพฯ.
- นิคม ละอองศิริวงศ์ และ อุดินันท์ หมัดหมาน. 2542. สารป้องกันและกำจัดศัตรูพืชกลุ่มพารา,พารา'-ดีดีทีในทะเลสาบสงขลา. เอกสารวิชาการฉบับที่ 4/2542. สถาบันวิจัยการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง. จังหวัดสงขลา.
- บุญเสริม แซ่งล่าย. 2540. สารป้องกันและกำจัดศัตรูพืชและสัตว์กลุ่มออร์กาโนคลอรีนที่ตกค้างในน้ำและดินตะกอนบริเวณทะเลสาบสงขลาตอนนอก. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต. มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.
- เปี่ยมศักดิ์ มานะเสวด. 2543. แหล่งน้ำกับปัญหามลพิษ. สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. กรุงเทพฯ.
- วินันท์ดา หิมะหมาน. 2541. การตรวจหาแบคทีเรียในดินที่สามารถย่อยสลายสารกำจัดวัชพืชอะลาคลอร์และออกซีฟลูอร์เฟน. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต. มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.
- ไศรยา พันธุ์วิริยะพงษ์ และ พูลสุข หฤทัยธนาสันดี. 2542. ศึกษาผลกระทบต่อการใช้วัตถุมีพิษในกลุ่มออร์แกนโนคลอรีนต่อเชื้อดักแด้. 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. Toxicol. 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.). pp. 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. Davison, A. D., Boul, H. L., Franzmann, P. D., Jardine, D. R. and Karuso, P. 1999. Isolation of *Terrabacter* sp. strain DDE-1, which metabolizes 1,1-dichloro-2,2-bis(4-chlorophenyl)ethylene when induced with biphenyl. Appl. Environ. Microbiol. 65: 5607-5611.
- Awasthi, N., Ahuja, R., Kumar, A. 2000. Factors influencing the degradation of soil-applied endosulfan isomers. Soil Biol. Biochem. 32: 1697-1705.
- Baloch, U. K. and Haseeb, M. 1996. Xenobiotic in third world agricultural environment. In Environmental Xenobiotics. (Richardson, M., ed.). pp. 73-94. Taylor & Francis. London.
- Benimelli, C. S., Amoroso, M. J., Chaile, A. P. and Castro, G. R. 2003. Isolation of four aquatic *Streptomyces* strains capable of growth on organochlorine pesticides. Biores. Technol. 89: 133-138.

- Bharati, K., Mohanty, S. R., Rao, V. R. and Adhya, T. K. 1999. Effect of endosulfan on methane production from three tropical soils incubated under flooded condition. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 63: 211-218.
- Bidlan, R. and Manonmani, H .K. 2002. Aerobic degradation of dichlorodiphenyltrichloroethane (DDT) by *Serratia marcescens* DT-1P. *Proc. Biochem.* 38: 49-56.
- Blackall, L. L. 1999. Molecular identification of activated sludge foaming bacteria. *In* Workshop in Molecular Biology Techniques. Thaksin University, 22-24 and 26-28 September 1999. pp. j1-j9.
- Bumbus, J. A. and Aust, S. D. 1987. Biodegradation of DDT (1,1-trichloro-2,2-bis(4-chlorophenyl)ethane) by white rod fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.* 53: 2001-2008.
- Chandrappa, M. K. and Harichandra, Z. N. 2004. Biodegradation of DDT by a *Pseudomonas* species. *Curr. Microbiol.* 48: 10-13.
- Chicote, E., García, A. M., Moreno, D.A., Sarró, M. I., Lorenzo, P. I. and Montero, F. 2005. Isolation and identification of bacteria from spent nuclear fuel pools. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 32: 155-162.
- Fries, M., Forney, R. J. and Tiedje, J. M. 1997. Phenol- and toluene-degrading microbial population from an aquifer in which successful trichloroethane cometabolism occurred. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 1523-1530.
- Fuchs, R. A. and Schröder, R. 1983. Agent for control of animal pet. *In* Chemistry of Pesticides. (Büchel ,K. H., ed.). Wiley-Liss, Inc. pp. 9-226. New York.
- 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.
- Galassi, S., Vigano, L. and Sanna, M. 1996. Bioconcentration of organochlorine pesticides in Rainbow trout caged in the river Po. *Chemosphere.* 32 : 1729-1739.
- Grifoll, M., Selifonov, S.A. and Chapman, P.J. 1994. Evidence pathway in the degradation of fluorene by *Pseudomonas* sp. strain F274. . *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 2438-2449.
- Gubta, A., Kaushik, C. P. and Kaushik, A. 2000. Degradation of hexachlorocyclohexane (HCH;  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ , and  $\delta$ ) by *Bacillus circulans* and *Bacillus brevis* isolated from soil contaminated with HCH. *Soil Biol. Biochem.* 32: 1803-1805.

- Harner, T., Wideman, J. L., Jantunen, L. M. M., Bidleman, T. F. and Parkhurst, W. J. 1999. Residues of organochlorine pesticides in Alabama soils. *Environ. Pollut.* 106: 323-332.
- Hägglom, M. M. 1992. Microbial breakdown of halogenated aromatic pesticides and related compounds. *FEMS Microbiol. Rev.* 103: 29-72.
- Innerebner, G., Knapp, B., Vasara, T., Romantschuk, M. and Insam, H. 2006. Traceability of ammonia-oxidizing bacteria in compost-treated soils. *Soil. Biol. Biochem.* 38: 1092-1100.
- Jaga, K. 2000. What are the implication of the interaction between DDT and estrogen receptors in the body? *Medical Hypotheses.* 54: 18-25.
- Jjemba, P. K. 2004. *Environmental Microbiology: Principles and applications.* Science Publishers, Enfield, USA.
- Juhasz, A. L and Naidu, R. 2000. Enrichment and isolation of non-specific aromatic degraders from unique uncontaminated (plant and faecal material) sources and contaminated soils. *J. Appl. Microbiol.* 89: 642:650.
- Kale, S. P., Murthy, N. B. K. and Raghu, K. 1989. Effect of carbofuran, carbaryl, and their metabolites on the growth of *Rhizobium* sp. And *Azotobacter chroococcum*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 42: 769-772.
- Kumblad, L., Olsson, A., Koutny, V. and Berg, H. 2001. Distribution of DDT residues in fish from the Songkhla Lake, Thailand. *Environ. Pollut.* 112: 193-200.
- Kantachote, D., Naidu, R., Singleton, R., MaClure, N. and Hurch, B. D. 2001. Resistant of microbial populations in DDT-contaminated soil. *Appl. Soil Ecol.* 16: 85-90.
- Kim, J. H. and Smith, A. 2001. Distribution of organochlorine pesticides in soil from South Korea. *Chemosphere.* 43: 137-140.
- Lee, Y. K., Kim, H. W., Lui, C. L. and Lee, H. K. 2003. A simple method for DNA extraction from marine bacteria that produce extracellular materials. *J. Microbiol. Methods.* 52: 245-250.
- Marchesi, J. R., Sato, T., Weightman, A. J., Martin, T. A., Fry, J. C., Hiom, S. J. and Wade, W. G. 1998. Design and evaluation of useful bacterium-specific PCR primers that amplify genes coding for bacterial 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 795-799.
- Matsumura, F. 1982. Degradation of pesticides in environment by microorganisms and sunlight. *In Biodegradation of Pesticides.* (Matsumura, F. and Krishna Murti, C. R., eds.). pp. 67-90. Plenum Press. New York.

- Mohn, W. W. and Tiedje, J. M. 1992. Microbial reductive dehalogenation. *Microbiol. Rev.* 56: 482-507.
- Nadeau, L. J., Menn, F., Breen, A. and Sayler, G. S. 1994. Aerobic degradation of 1,1,1-Trichloro-2,2-Bis(4-chlorophenyl)Ethane (DDT) by *Alcaligenes eutrophus* A5. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 51-55.
- Nawab, A., Aleem, A. and Malik, A. 2003. Determination of organochlorine pesticides in agricultural soil with special reference to  $\gamma$ -HCH degradation by *Pseudomonas* strains. *Biores. Technol.* 88: 41-46.
- Neilson, A. H. 1995. An environmental perspective on the biodegradation of organochlorine xenobiotics. *Inter. 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.* 237/238: 363-371.
- Noel, R. K. 1984. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Williams & Wilkins. Baltimore. pp. 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.
- O'Malley, L. P., Collins, A. N. and White, G. F. 2006. Biodegradability of end-groups of the biocide polyhexamethylene biguanide (PHMB) assessed using model compounds. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 33: 667-684.
- Patil, K. C., Matsumura, F. and Boush, G. M. 1970. Degradation of Endrin, Aldrin, and DDT by soil microorganisms. *Appl. Microbiol.* 19: 879-881.
- Pattanasupong, A., Nagase, H., Sugimoto, E., Hori, Y., Hirata, H., Tani, K., Nasu, M. And Miyamoto, K. 2004. Degradation of carbendazim and 2,4-dichlorophenoxyacetic acid by immobilized consortium on Loofa sponge. *J. Biosci. Bioeng.* 98: 28-33.
- Roa, R. V and Alexander, M. 1977. Product from analogs of 1,1,1-trichloro-2,2-bis(*p*-chlorophenyl)ethane (DDT) metabolites by *Pseudomonas putida*. *Appl. Environ. Microbiol.* 33: 101-108.

- 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.). pp. 91-116. Plenum Press. New York.
- Smith, A. G. 1991. Chlorinated hydrocarbon insecticides. *In Handbook of Pesticides Toxicology* (vol. II). (Hayes, W. J. and Laws, E. R., eds.). Academic Press. London. pp. 731-916.
- Stoscheck, C. M. 1990. Quantitation of Protein. *In Method in Enzymology* (vol. 182). (Deutscher, M.P., ed.). pp. 50-67. Academic Press. San Diego.
- 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.
- Suflita, J. M. and Townsend, G. T. 1995. The microbial ecology and physiology of aryl dehalogenation reaction and implication for bioremediation. *In Microbial Transformation and Degradation of Toxic Organic Chemicals.* (Young, L. Y. and Cerniglia, C. E., eds.). pp. 243-268. Wiley-Liss, Inc. New York.
- Sylvestre, M. 1980. Isolation method for bacterial isolates capable of growth on *p*-chlorobiphenyl. *Appl. Environ. Microbiol.* 39: 1223-1224.
- Tanabe, S., Tanaka, H. and Tatsikawa, R. 1984. Polychlorobiphenyl,  $\Sigma$  DDT and hexachlorocyclohexane isomers in the western North Pacific ecosystem. *J. Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 13: 731-738.
- Takeuchi, F., Watanabe, S., Baba, T., Yuzawa, H., Ito, T., Morimoto, Y., Kuroda, M., Cui, L., Takahashi, M., Ankai, A., Baba, S., Fukui, S., Lee, J. C. and Hiramatsu, K. 2005. Whole-Genome Sequencing of *Staphylococcus haemolyticus* uncovers the extreme plasticity of its genome and the evolution of human-colonizing Staphylococcal species. *J. Bacteriol.* 21: 7292-7308.

- 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. *Int. Biodeter. Biodegrad.* 37: 181-187
- 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. (Young, L. Y. and Cerniglia, C. E., eds.). pp. 217-242. Wiley-Liss, Inc. New York.
- Webster, G., Parkes, R. J. Fry, J. C. and Weightman, A. J. 2004. Widespread occurrence of Novel division of bacteria identified by 16S rRNS gene sequences originally found in deep marine sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* 70: 5708-5713.
- Zargar, M. Y. and Johri, B.N. 1995. Effect of Gamma-hexachlorocyclohexane on amyolytic microorganisms of soil and amylase activity. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 55: 426-430
- 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.