รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

# การศึกษานิเวศน์วิทยาของจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายสารที่มี phenol เป็นองค์ประกอบ

# Molecular Ecological Analysis on Microbial Community of Phenolic-Compound Degrading Bacteria

โดย

ปถมาพร สุกปลั่ง และ อัจฉราวรรณ ทองมี

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

สนับสนุนโดย

สถาบันวิจัย มหาวิทยาลัยรังสิต

**ISBN 974-9921-18-6**

สัญญาเลขที่ 008/2545

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

# การศึกษานิเวศน์วิทยาของจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายสารที่มี phenol เป็นองค์ประกอบ

# Molecular Ecological Analysis on Microbial Community of Phenolic-Compound Degrading Bacteria


| คณะผู้วิจัย | สังกัด |
|---|---|
| 1. ผศ.ดร. ปถมาพร สุกปลั่ง | คณะวิทยาศาสตร์ |
| 2. ผศ.ดร. อัจฉราวรรณ ทองมี | คณะเทคนิคการแพทย์ |


มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

สนับสนุนโดย
สถาบันวิจัย มหาวิทยาลัยรังสิต

**ISBN 974-9921-18-6**

**บทสรุปเชิงนโยบายสำหรับผู้บริหาร**

**งานวิจัย**

**เรื่อง**

# การศึกษานิเวศน์วิทยาของจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายสารที่มี phenol เป็นองค์ประกอบ

## มูลเหตุจูงใจ

Phenolic compounds เป็นสารประกอบที่พบมากในสิ่งแวดล้อม ทั้งในดินและน้ำ สารประกอบนี้ได้จากการปล่อยออกมาจากรากพืช การย่อยสลายของซากพืช นอกจากนี้ phenolic compounds ยังเป็นส่วนประกอบที่สำคัญในปุ๋ย ยาปราบวัชพืช และยาปราบศัตรูพืช ได้แก่ 2,4 dichlorophenoxy acetic acid (2,4-D), 2,4,5 trichlorophenoxy acetic acid (2,4,5-D) และ carbofuran และสารในกลุ่มนี้ยังเป็นส่วนประกอบในสารเคมีที่ใช้ในอุตสาหกรรมต่างๆ เช่นการทำพลาสติก การทำหนัง และการทำสี ปัจจุบันความต้องการอาหารและสาธารณูปโภคต่างๆ ของประชากรมีมากขึ้น จึงมีผลให้มีการเร่งการผลิตพืชผักและผลไม้ รวมทั้งการขยายขอบเขตของอุตสาหกรรม จึงก่อให้เกิดการปนเปื้อนของ phenolic compounds ในสิ่งแวดล้อมมากขึ้น

ในธรรมชาติการย่อยสลาย phenolic compounds อาจเกิดขึ้นได้เองโดยการทำงานร่วมกันของจุลินทรีย์ที่อยู่ในบริเวณนั้นๆ หากมีการปนเปื้อนสารนั้นในปริมาณมากจนทำให้จุลินทรีย์ไม่สามารถทำการย่อยสลายสารเหล่านี้ได้ทัน จะมีผลให้มีสารเหล่านี้ตกค้างในธรรมชาติเป็นจำนวนมากและก่อให้เกิดภาวะเป็นพิษขึ้นได้ นอกจากนี้การสะสมของสารเหล่านี้เป็นระยะเวลานานทำให้เกิดการเสื่อมคุณภาพของดินและทำลายจุลินทรีย์และสิ่งมีชีวิตอื่นๆ ที่มีประโยชน์ต่อการรักษาความอุดมสมบูรณ์ของดินอีกด้วย ก่อให้เกิดมลพิษของสิ่งแวดล้อม มีผลกระทบต่อมนุษย์และต่อสิ่งมีชีวิตอื่นๆ

ในงานวิจัยครั้งนี้มุ่งที่จะคัดเลือกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลาย phenolic compounds ที่สะสมอยู่ในดินพื้นที่เกษตรกรรมในประเทศไทย และทำการศึกษาความเกี่ยวข้องกันของสายพันธุ์ของแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลาย phenolic compounds โดยใช้เทคนิคทางชีวโมเลกุล ซึ่งข้อมูลที่ได้นี้จะมีประโยชน์ในการคัดเลือกสายพันธุ์ต่างๆของแบคทีเรียที่สามารถย่อย phenolic compounds ต่างๆ ที่ตกค้างในสิ่งแวดล้อม เพื่อลดปริมาณการสะสมของสารเหล่านี้ที่มีอยู่ในดิน แต่เนื่องจากสารที่มี phenol เป็นองค์ประกอบนั้นมีมากมายหลายชนิด ดังนั้นในการที่จะหาแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลาย phenolic compounds ทั้งหมด

นั้นเป็นไปได้ยาก รวมทั้งแบคทีเรียใดที่สามารถย่อยสารที่มี phenol เป็นองค์ประกอบชนิดหนึ่งก็มีโอกาสที่จะย่อยสลายสารอื่นๆ ที่มี phenol เป็นองค์ประกอบที่มีโครงสร้างคล้ายกันได้ ดังนั้นผู้วิจัยจึงคัดเลือกสารบางชนิดที่มี phenol ring คือ 2,4-D และ carbofuran เป็นตัวแทนของสารที่มี phenol เป็นองค์ประกอบสำหรับใช้ในการศึกษานี้ เนื่องจากสารทั้งสองนี้เป็นสารสำคัญที่เกษตรกรนิยมใช้เป็นปุ๋ยเพื่อเร่งให้พืชเจริญเร็วขึ้น และใช้เป็นยาปราบศัตรูพืช

**วัตถุประสงค์ของโครงการ**

1. แยกแบคทีเรีย (isolate) ที่สามารถย่อยสลาย phenolic compounds เช่น 2,4 D และ carbofuran ที่ตกค้างอยู่ในดินพื้นที่เกษตรกรรม
2. จำแนกชนิดของแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลายสาร 2,4 D และ carbofuran โดยใช้ cell morphology, colony morphology, biochemical characteristics และ 16S rRNA gene sequencing
3. ศึกษานิเวศวิทยาของแบคทีเรียในดินที่สามารถย่อยสลาย phenolic compounds เช่น 2,4 D และ carbofuran

**การดำเนินงานวิจัย**

แบ่งเป็น 6 ส่วน คือ

1. การเก็บตัวอย่างดิน
2. การแยกแบคทีเรียจากดินที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี 2,4- dichlorophenoxy-acetic acid (2,4-D) และ carbofuran
3. การทดสอบการย่อยสลาย 2,4-D และ carbofuran โดยแบคทีเรียที่แยกได้
4. การสกัดจีโนมดีเอ็นเอ (Gemomic DNA extraction) และการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอโดยวิธีการ Polymerase Chain Reaction (PCR) ของแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลาย 2,4-D และ carbofuran
5. การหาลำดับนิวคลีโอไทด์และวิเคราะห์ข้อมูลของนิวคลีโอไทด์ (DNA sequencing and Data analysis) ของแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลาย 2,4-D และ carbofuran
6. การจัดกลุ่มของแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลาย 2,4-D และ carbofuran

**สรุปผลการวิจัย**

**1. การเก็บตัวอย่างดิน**

ตัวอย่างดินที่นำมาหาแบคทีเรียที่สามารถเจริญได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี 2,4-D และ carbofuran ผสมอยู่ เป็นดินได้มาบริเวณที่มีการเกษตรกรรมในเขตจังหวัดปทุมธานี และ

นครปฐมซึ่งมีการปลูกพืชต่างชนิดกัน เช่น อ้อย ส้มเขียวหวาน ข้าวโพด ซึ่งเคยมีการใช้ปุ๋ยหรือยาฆ่าวัชพืชมาก่อน จำนวนทั้งสิ้น 20 ตัวอย่าง

**2. การแยกแบคทีเรียจากดินที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี 2,4- dichlorophenoxy-acetic acid (2,4-D) และ carbofuran**

จากการแยกแบคทีเรียจากดินในพื้นที่เกษตรกรรมซึ่งมีจำนวน 20 ตัวอย่าง พบว่าแบคทีเรียที่สามารถเจริญได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี 2,4-D ความเข้มข้น 50 mg/l มีจำนวน 32 สายพันธุ์ โดยเชื้อที่แยกได้ในขั้นตอนนี้อาจมีทั้งกลุ่มที่ใช้ 2,4-D เป็นแหล่งคาร์บอน หรือกลุ่มที่สามารถทน 2,4-D ได้ จากจำนวนเชื้อทั้งหมด 32 สายพันธุ์ พบว่ามี 4 สายพันธุ์ที่แตกต่างกัน จึงกำหนดสายพันธุ์เป็น สายพันธุ์ที่ 1, 2, 3 และ 4 เพื่อนำมาทำการทดสอบความสามารถในการย่อยสลาย 2,4-D ต่อไป

นอกจากนี้พบแบคทีเรียที่สามารถเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี carbofuran ความเข้มข้น 50 mg/l จำนวน 46 สายพันธุ์ โดยเชื้อที่แยกได้ในขั้นตอนนี้อาจมีทั้งกลุ่มที่ใช้ carbofuran เป็นแหล่งคาร์บอน หรือกลุ่มที่สามารถทน carbofuran ได้ จากจำนวนเชื้อที่ได้ทั้งหมด พบว่ามี 5 สายพันธุ์ที่แตกต่างกัน กำหนดเป็น สายพันธุ์ 1, 2, 3, 4 และ 5 จากนั้นนำทั้ง 5 สายพันธุ์มาทำการทดสอบความสามารถในการย่อยสลาย carbofuran

**3. การทดสอบการย่อยสลาย 2,4-D และ carbofuran โดยแบคทีเรียที่แยกได้**

เมื่อคัดเลือกแบคทีเรียที่มีลักษณะแตกต่างกันมาจำนวน 5 สายพันธุ์ จากแบคทีเรียที่แยกได้ นำมาทดสอบการย่อยสลาย carbofuran พบว่า เมื่อเลี้ยงแบคทีเรียใน MS liquid culture medium ที่มี carbofuran ความเข้มข้น 50 mg/l เป็นแหล่งคาร์บอน เป็นเวลา 3 วัน เชื้อเจริญเพิ่มจำนวนขึ้นและปริมาณ carbofuran ลดลงจนหมดไป โดยตรวจวัดปริมาณของ carbofuran ที่ลดลงด้วย High Performance Liquid Chromatography (HPLC) แสดงว่าเชื้อใช้ carbofuran เป็นแหล่งของอาหารและพลังงาน เมื่อเปรียบเทียบกับอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่มี carbofuran ซึ่งใช้เป็น growth control การเจริญของเชื้อในการทดลองนี้ลดลงเนื่องจากไม่มีแหล่งอาหารให้กับเชื้อเพื่อใช้ในการเจริญ

เมื่อคัดเลือกแบคทีเรียที่มีลักษณะแตกต่างกันมาจำนวน 4 สายพันธุ์ จากแบคทีเรียที่แยกได้ นำมาทดสอบการย่อยสลาย 2,4-D พบว่ามีเพียง 1 สายพันธุ์ที่สามารถย่อยสลาย 2,4-D ได้ คือ สายพันธุ์ที่ 1 ซึ่งแยกได้จากดินที่ได้จากแปลงไร่อ้อย (มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน) จากนั้นทำการทดสอบการย่อยสลาย 2,4-D พบว่าสามารถย่อยสลายได้เล็กน้อยในวันที่ 5 จาก 50 mg/l ลดลงเหลือ 37.5 mg/l คิดเป็นร้อยละ 25 และสามารถย่อยสลายได้เกือบหมดในวันที่ 7 จาก 50 mg/l ลดลงเหลือ 12.5 mg/l คิดเป็นร้อยละ 75 โดยตรวจวัดปริมาณของ 2,4-D ที่ลดลงด้วย High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

**4. การสกัด DNA และการเพิ่มจำนวน DNA โดยวิธี PCR**

เมื่อนำแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์ที่แยกได้มาสกัด DNA จากนั้นนำ DNA ที่ได้จาก crude lysate และจากการสกัดด้วยการใช้ phenol-chloroform และ CTAB มาทำการเพิ่มจำนวนโดยวิธี Polymerase chain reaction (PCR) ซึ่ง Primer ที่ใช้คือ universal 16S rRNA (5'AAGGAGGTGATCCAGCCGCA3' และ 5'AGAGTTTGATCCT GGCTCAG3') พบว่าได้ PCR product ขนาดประมาณ1.5 กิโลเบส

**5. การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rRNA gene**

เมื่อเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของแบคทีเรียที่แยกได้จากดินที่มีความสามารถในการย่อยสลาย carbofuran และ 2,4-D กับนิวคลีโอไทด์ของแบคทีเรียต่างๆ ที่มีใน National Center for Biotechnology Information (NCBI) database พบว่าแบคทีเรียที่แยกได้มีลำดับนิวคลีโอไทด์คล้ายคลึงกับแบคทีเรียใน Genera *Pseudomonas* และ *Stenotrophomonas*

**6. การจัดกลุ่มและการศึกษาความเกี่ยวข้องกันของแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลาย 2,4-D และ carbofuran**

เมื่อนำแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลาย 2,4-D และ carbofuran ทั้งหมด 5 สายพันธุ์ มาทำการแยกวินิจฉัยโดยศึกษาลักษณะรูปร่าง (cell morphology) ของเชื้อโดยทำการย้อมสี และทำการทดสอบคุณสมบัติทางด้านชีวเคมีของแบคทีเรีย ทำให้สามารถจัดจำแนกแบคทีเรียดังกล่าวอยู่ในกลุ่ม Glucose non-fermenter Gram negative bacilli หรือ GNF bacilli และเมื่อเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของแบคทีเรียที่แยกได้นี้กับนิวคลีโอไทด์ของแบคทีเรียต่างๆ ที่มีใน National Center for Biotechnology Information (NCBI) database พบว่าแบคทีเรียที่แยกได้มีลำดับนิวคลีโอไทด์คล้ายคลึงกับแบคทีเรียใน Genera *Pseudomonas* และ *Stenotrophomonas* โดยมี %similarity ตั้งแต่ 95%-98%

การศึกษา phylogenetic tree โดยการทำ multiple alignment ของลำดับนิวคลีโอไทด์ของแบคทีเรียที่สามารถในการย่อยสลาย 2,4-D และ carbofuran ที่แยกได้กับแบคทีเรียชนิดอื่นๆ ซึ่งเป็นการนำเอาเทคนิคทางชีวโมเลกุลมาศึกษาถึงความเกี่ยวข้องกันของสายพันธุ์ของแบคทีเรียที่สามารถในการย่อยสลาย 2,4-D และ carbofuran กับแบคทีเรียชนิดอื่นๆที่มีลำดับของนิวคลีโอไทด์ใกล้เคียงกัน จากการศึกษานี้พบว่าแบคทีเรียที่แยกได้ทั้ง 5 สายพันธุ์ นั้นมีความเกี่ยวข้องกับแบคทีเรียใน Genera *Pseudomonas* และ *Stenotrophomonas* เช่น *Pseudomonas* sp. *Pseudomonas putida, Pseudomonas fragi* และ *Stenotrophomonas maltophilia* ซึ่งแบคทีเรียเหล่านี้เป็นแบคทีเรียที่พบทั่วไปในดิน (soil bacteria) และเป็นกลุ่มของแบคทีเรียที่มี metabolic diversity สูงคือสามารถย่อยสลายหรือใช้สารหลากหลายชนิดเป็นแหล่งของคาร์บอนและพลังงาน เมื่อแบคทีเรียเหล่านี้อยู่ร่วมกันในระบบนิเวศน์จะสามารถ

ร่วมกันย่อยสลายสารตกค้างของ phenol compounds ซึ่งจะมีผลให้การย่อยสลายเกิดขึ้นได้อย่างรวดเร็วและมีประสิทธิภาพเพิ่มขึ้น

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

# กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณทุกท่านที่ได้ให้การสนับสนุนจนทำให้งานวิจัยนี้สำเร็จได้ด้วยดี ดังมีรายนามดังนี้ สถาบันวิจัยมหาวิทยาลัยรังสิตที่ได้ให้ทุนสนับสนุนการวิจัยในครั้งนี้ คณบดีคณะวิทยาศาสตร์และคณบดีคณะเทคนิคการแพทย์ที่ได้เอื้อเฟื้ออุปกรณ์ เครื่องมือและสถานที่ในการทำวิจัยในครั้งนี้ รวมทั้งอาจารย์และเจ้าหน้าที่คณะวิทยาศาสตร์และคณะเทคนิคการแพทย์ที่ได้อำนวยความสะดวกในการใช้อุปกรณ์ เครื่องมือและสารเคมี ต่างๆ ในการทำการทดลอง

งานวิจัยนี้คงจะสำเร็จไปไม่ได้ หากไม่ได้รับความร่วมมืออย่างดีจาก นางสาวศรีจิต อัศวภูมิ นางสาวกิตติญาพร จันทร์งามดี นางสาวยุวดี งามสะพรั่ง นายขวัญชัย สมเปลี่ยน นายอนุวัฒน์ หม่องกี และนางสาว โปติกา โชติพงศ์ นักศึกษาคณะเทคนิคการแพทย์และนักศึกษาคณะวิทยาศาสตร์ สาขาวิทยาศาสตร์ชีวการแพทย์ ที่ให้ความร่วมมือจนงานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี ซึ่งคณะผู้วิจัยขอขอบคุณมา ณ ที่นี้

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

# บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้เป็นการแยก และจัดกลุ่มแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลายสารประกอบที่มี phenol เป็นองค์ประกอบจากดินในเขตเกษตรกรรมที่มีการใช้ปุ๋ยเคมีและยาปราบศัตรูพืช ซึ่งในงานวิจัยนี้ใช้ carbofuran และ 2,4-D เป็นตัวแทนของสารประกอบที่มี phenol เป็นองค์ประกอบในการศึกษาและแยกแบคทีเรียที่มีความสามารถดังกล่าว เนื่องจาก carbofuran เป็นยาปราบศัตรูพืชที่เกษตรกรนิยมใช้ ขณะเดียวกัน 2,4-D ถูกนำมาใช้เป็นปุ๋ยเพื่อเร่งการเจริญของพืช การใช้สารทั้งสองชนิดนี้เป็นจำนวนมาก มีผลให้มีการตกค้างของสารเหล่านี้ในดินและน้ำและมีผลกระทบต่อมนุษย์และสิ่งมีชีวิต เนื่องจากสารนี้มีความเป็นพิษสูง

จากการคัดเลือกแบคทีเรียจากตัวอย่างดินทั้งสิ้น 20 ตัวอย่าง พบว่ามีแบคทีเรียที่สามารถเจริญได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี 2,4-D เป็นแหล่งคาร์บอนทั้งสิ้น 32 isolates ทำการเลือกมา 4 isolates เพื่อทดสอบการย่อยสลาย 2,4-D โดยสังเกตจากการเจริญของแบคทีเรียที่เพิ่มขึ้นเมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี 2,4-D เป็นแหล่งของคาร์บอนร่วมกับการทดสอบการลดลงของ 2,4-D ซึ่งวัดปริมาณด้วยเครื่อง High Performance Liquid Chromatography (HPLC) พบว่ามีเพียง 1 isolates เท่านั้นที่สามารถย่อยสลาย 2,4-D ได้ 75% ในวันที่ 7 และเมื่อทำการจัดกลุ่มแบคทีเรียนี้โดยอาศัยการศึกษารูปร่างลักษณะ คุณสมบัติทางด้านชีวเคมี พบว่าแบคทีเรียที่ได้จัดอยู่ในกลุ่ม Glucose non - fermenter Gram negative bacteria และจากการศึกษา 16S rRNA gene sequencing analysis พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของแบคทีเรียนี้มีเหมือนกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อย carbofuran และถูกจัดอยู่ในกลุ่มของ *Pseudomonas*

จากการคัดเลือกแบคทีเรียที่เจริญได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี carbofuran พบว่ามี 46 isolates ที่สามารถเจริญได้โดยใช้เป็นสารนี้เป็นแหล่งของคาร์บอนและไนโตรเจน จากนั้นเลือกมา 5 isolates เพื่อทดสอบการย่อยสลาย carbofuran พบว่าทั้ง 5 isolates สามารถย่อยสลาย carbofuran ได้หมดในวันที่ 3 ของการเลี้ยงเชื้อ เมื่อทำการจัดกลุ่มแบคทีเรียเหล่านี้โดยอาศัยการศึกษารูปร่างลักษณะ คุณสมบัติทางด้านชีวเคมี พบว่า isolates ที่ได้จัดอยู่ในกลุ่ม Glucose non - fermenter Gram negative bacteria และจากการศึกษา 16S rRNA gene sequencing analysis พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของแบคทีเรียเหล่านี้มีความคล้ายคลึงกับแบคทีเรียในสายพันธุ์ *Pseudomonas* และ *Stenotrophomonas* คือ isolate 1 มีความคล้ายคลึงกับ *Pseudomonas* sp. strain E22 (similarity = 95%) isolate 2 มีความคล้ายคลึงกับ *Pseudomonas putida* strain NA-1 (similarity = 98%) isolate 3 มีความคล้ายคลึงกับ *Pseudomonas* sp. strain ND6 (similarity = 98%) isolate 4 มีความคล้ายคลึงกับ

*Pseudomonas* sp. strain TS1138 (similarity = 97%) และ isolate 5 มีความคล้ายคลึงกับ *Stenotrophomonas maltophilia* strain CR3 (similarity = 97%)

การที่แยกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลาย carbofuran และ 2,4-D ได้จากดินที่มีประวัติการปนเปื้อนของสารนี้ แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียในดินสามารถที่จะพัฒนาความสามารถในการย่อยสลายสารต่าง ๆที่ปนเปื้อน ซึ่งอาจนำมาใช้เป็นประโยชน์ในการกำจัดหรือลดการปนเปื้อนของสารต่าง ๆที่ตกค้างในสิ่งแวดล้อมได้

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

## Abstract

The aim of this work was to isolate, identify and classify phenolic compound-degrading bacteria from soil samples collected from various areas of pesticide and fertilizer application in Thailand. The ability of endogeneous bacteria to degrade model compounds, carbofuran (2,3-dihydro-2,2-dimethyl-7-benzofuranyl methylcarbamate) and 2,4 -dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D), was focused in this research.

Carbofuran is a pesticide that is widely used in agriculture. In addition, 2,4-D is also widely used as a fertilizer. Carbofuran and 2,4-D are highly toxic to mammals and can be potentially hazardous as a result of accidental spills and runoff from areas of application. Therefore, disposal methods for excess carbofuran and 2,4-D are needed. Also of concern is the application of isolated bacteria to decontaminate carbofuran and 2,4-D polluted sites in Thailand.

Bacteria utilizing 2,4-D were isolated from soil samples collected from agricultural sites. Thirty two bacterial isolates were isolated from 20 soil samples. Four of those were selected to determine the 2,4-D degrading ability by observing cell growth in mineral salts liquid medium supplemented with 2,4-D and measuring the decrease of 2,4-D using High Performance Liquid Chromatography (HPLC). Only one isolate was found to degrade approximately 75% of 2,4-D after 7 days of incubation. The bacterial strain was classified as glucose non - fermenter Gram negative bacteria. Furthermore, the nucleotide sequence analysis reveals that the isolate shows identical sequences to one of the bacterial strains that can degrade carbofuran and is classified as *Pseudonomas.*

Forty six bacterial isolates capable of degrading carbofuran as the sole source of carbon and nitrogen were isolated from liquid cultures of soil samples. Five isolates were selected to test for degrading ability by observing cell growth in mineral salts liquid medium supplemented with carbofuan and measuring the decrease of carbofuran using High Performance Liquid Chromatography (HPLC). All of five strains can degrade carbofuran completely in three days. These isolates were identified and classified by cell morphology, biochemical tests and partial 16S rRNA gene sequence analysis. The bacterial strains were all classified as glucose non - fermenter Gram negative bacteria. The nucleotide sequence analysis reveals that the isolates show high similarity to

*Pseudonomas* and *Sterotrophomonas*, *i.e*., isolate 1 is related to *Pseudomonas* sp. strain E22 (similarity = 95%) ; isolate 2 is related to *Pseudomonas putida* strain NA-1 (similarity = 98%) ; isolate 3 is related to *Pseudomonas* sp. strain ND6 (similarity = 98%) ; isolate 4 is related to *Pseudomonas* sp. strain TS1138 (similarity = 97%) ; and isolate 5 is related to *Stenotrophomonas maltophilia* strain CR3 (similarity = 97%).

Carbofuran and 2,4-D degrading bacteria were found in almost all of the samples collected from soils with a history of carbofuran and 2,4-D application. This suggests that a variety of soil bacteria have developed the capability to degrade phenolic compounds. Such bacteria potentially could be used to decontaminate pesticide and fertilizer -polluted sites.

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

# สารบัญ


| | หน้า |
|---|---|
| กิตติกรรมประกาศ | ข |
| บทคัดย่อ | ค |
| Abstract | จ |
| สารบัญตาราง | ซ |
| สารบัญภาพ | ฌ |
| บทที่ 1 บทนำ | |
| 1. ที่มาของปัญหา | 1 |
| 2. ทบทวนเอกสาร | 3 |
| 3. วัตถุประสงค์ของโครงการ | 19 |
| 4. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ | 19 |
| บทที่ 2 วัสดุอุปกรณ์และวิธีการทดลอง | |
| 1. แผนการวิจัย | 20 |
| 2. เครื่องมือและอุปกรณ์ | 20 |
| 3. สารเคมีและน้ำยา | 20 |
| 4. อาหารเลี้ยงเชื้อ | 21 |
| 5. วิธีการทดลอง | 21 |
| บทที่ 3 ผลการวิจัย | 28 |
| บทที่ 4 สรุปและวิจารณ์ | 48 |
| เอกสารอ้างอิง | 52 |


มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

# สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 1.1 จุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายสาร 2,4-D และระยะเวลาที่ใช้ในการย่อยสลาย 2,4-D 7

ตารางที่ 1.2 อาการและอาการแสดงจากการที่มี Ach สะสมที่อวัยวะต่างๆ 13

ตารางที่ 1.3 องค์ประกอบของเบสของ DNA ในแบคทีเรีย 18

ตารางที่ 3.1 สถานที่เก็บตัวอย่างดิน 28

ตารางที่ 3.2 จำนวนแบคทีเรียที่เจริญใน mineral salt liquid medium ที่มี 2,4-D ความเข้มข้นต่าง ๆ กันตั้งแต่ 0.05-0.5 g/l 29

ตารางที่ 3.3 จำนวนแบคทีเรียที่มีชีวิต (viable cell number) เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่มี 2,4-D (control) และมี 2,4-D 30

ตารางที่ 3.4 ปริมาณเชื้อแบคทีเรียที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีความเข้มข้นของ carbofuran แตกต่างกัน 33

ตารางที่ 3.5 จำนวนแบคทีเรียที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี carbofuran และไม่มี Carbofuran 34

ตารางที่ 3.6 การจัดกลุ่มแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลาย carbofuran จาก 20 ตัวอย่างดิน 37

ตารางที่ 3.7 แสดงเปอร์เซ็นต์ similarity ของนิวคลีโอไทด์ของแบคทีเรียสายพันธุ์ต่างๆ 46

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

# สารบัญภาพ

หน้า

รูปที่ 1.1 คุณสมบัติและสูตรโครงสร้างของ 2,4-D amine salt 5
รูปที่ 1.2 คุณสมบัติและสูตรโครงสร้างของ 2,4-D ester 6
รูปที่ 1.3 Pathway การย่อยสลายของ 2,4-D โดยแบคทีเรีย Gram negative bacilli 9
รูปที่ 1.4 Pathway การย่อยสลายของ 2,4-D โดยแบคทีเรีย Gram negative bacilli 10
รูปที่ 1.5 โครงสร้างของ carbofuran 11
รูปที่ 3.1 autodegradation control ของ 2,4-D ที่ไม่ได้เกิดการสลายในวันที่ 0, 5 และ 7 31
รูปที่ 3.2 การย่อยสลายของ 2,4-D โดยแบคทีเรียสายพันธุ์ที่ 1 ในวันที่ 5 และวันที่ 7 31
รูปที่ 3.3 แสดงการไม่มีการย่อยสลาย 2,4-D โดยสายพันธุ์ที่ 2, 3 และ 4 32
รูปที่ 3.4 ชุดควบคุม (control set) สำหรับการตรวจวัด carbofuran ด้วย HPLC 34
รูปที่ 3.5 การลดลงของปริมาณ carbofuran ใน culture ของสายพันธุ์ที่ 1 ที่ตรวจวัดโดย HPLC 35
รูปที่ 3.6 การลดลงของปริมาณ carbofuran ใน culture ของสายพันธุ์ที่ 2 ที่ตรวจวัดโดย HPLC 35
รูปที่ 3.7 การลดลงของปริมาณ carbofuran ใน culture ของสายพันธุ์ที่ 3 ที่ตรวจวัดโดย HPLC 36
รูปที่ 3.8 การลดลงของปริมาณ carbofuran ใน culture ของสายพันธุ์ที่ 4 ที่ตรวจวัดโดย HPLC 36
รูปที่ 3.9 การลดลงของปริมาณ carbofuran ใน culture ของสายพันธุ์ที่ 5 ที่ตรวจวัดโดย HPLC 37
รูปที่ 3.10 การเพิ่มจำนวน DNA โดยวิธี PCR (Polymerase Chain Reaction) ใช้ DNA template ที่ได้จากการสกัด DNA โดยวิธี CTAB 39
รูปที่ 3.11 การเพิ่มจำนวน DNA โดยวิธี PCR (Polymerase Chain Reaction) ใช้ DNA template ที่ได้จาก crude lysate 40
รูปที่ 3.12 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rRNA gene ของแบคทีเรียสายพันธุ์ที่ 1 41
รูปที่ 3.13 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rRNA gene ของแบคทีเรียสายพันธุ์ที่ 2 42
รูปที่ 3.14 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rRNA gene ของแบคทีเรียสายพันธุ์ที่ 3 43
รูปที่ 3.15 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rRNA gene ของแบคทีเรียสายพันธุ์ที่ 4 44
รูปที่ 3.16 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rRNA gene ของแบคทีเรียสายพันธุ์ที่ 5 45
รูปที่ 3.17 Phylogenetic tree แสดงความสัมพันธ์ของแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลาย phenolic compound 47

# บทที่ 1
# บทนำ

## 1. ที่มาของปัญหา

Phenolic compounds เป็นสารประกอบที่พบมากในสิ่งแวดล้อม ทั้งในดินและน้ำ สารประกอบนี้ได้จากการปล่อยออกมาจากรากพืช ได้แก่ 4-hydroxybenzoate, ferulic acid และ vanilic acid และได้จากการย่อยสลายของซากพืช ได้แก่ lignin และ tannin นอกจากนี้ phenolic compounds ยังเป็นส่วนประกอบที่สำคัญในปุ๋ย ยาปราบวัชพืช และยาปราบศัตรูพืช ได้แก่ 2,4 dichlorophenoxy acetic acid (2,4-D), 2,4,5 trichlorophenoxy acetic acid (2,4,5-D) และ carbofuran และสารในกลุ่มนี้ยังเป็นส่วนประกอบในสารเคมีที่ใช้ในอุตสาหกรรมต่างๆ เช่นการทำพลาสติก การทำหนัง และการทำสี เนื่องจากในปัจจุบันมีการเจริญเติบโตทางด้านเกษตรกรรมและอุตสาหกรรมเพิ่มมากขึ้น เพื่อให้สามารถตอบสนองต่อความต้องการอาหารและสาธารณูปโภคต่างๆของประชากรที่เพิ่มจำนวนมากขึ้น จึงมีผลให้มีการเร่งการผลิตพืชผักและผลไม้ รวมทั้งการขยายขอบเขตของอุตสาหกรรม จึงทำให้มีการใช้ปุ๋ยหรือยาปราบศัตรูพืชมากขึ้น ก่อให้เกิดการปนเปื้อนของ phenolic compounds ในรูปต่างๆ ได้แก่ chlorophenol หรือ polychlorinated biphenyls ในสิ่งแวดล้อมมากขึ้น (1)

การย่อยสลาย phenolic compounds ในธรรมชาติอาจเกิดขึ้นได้เองโดยการทำงานร่วมกันของจุลินทรีย์ที่อยู่ในบริเวณนั้นๆ(2) แต่ในบางกรณีหากมีการปนเปื้อนสารนั้นในปริมาณมากจนทำให้จุลินทรีย์ไม่สามารถทำการย่อยสลายสารเหล่านี้ได้ทัน จะมีผลให้มีสารเหล่านี้ตกค้างในธรรมชาติเป็นจำนวนมากและก่อให้เกิดภาวะเป็นพิษขึ้นได้ นอกจากนี้การสะสมของสารเหล่านี้เป็นระยะเวลานานจะทำให้เกิดการเสื่อมคุณภาพของดินและทำลายจุลินทรีย์และสิ่งมีชีวิตอื่นๆที่มีประโยชน์ต่อการรักษาความอุดมสมบูรณ์ของดินอีกด้วย (3-6) ซึ่งอาจก่อให้เกิดผลกระทบต่อมนุษย์และต่อสิ่งมีชีวิตอื่นๆ และก่อให้เกิดมลพิษของสิ่งแวดล้อม ในปัจจุบันมลพิษเป็นปัญหาที่สำคัญของประเทศและนับวันปัญหานี้มีการทวีความรุนแรงมากขึ้น

จากรายงานการนำเข้าของยาปราบศัตรูพืชทางการเกษตรในประเทศไทย ในปี พ.ศ. 2541-2545 พบว่าการนำเข้าของสารกำจัดวัชพืชมีปริมาณและมูลค่าเพิ่มมากขึ้นทุกปีและพบว่ามีการนำเข้า 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) และ carbofuran ในปริมาณที่สูงอย่างสม่ำเสมอ (7-9) สาร 2,4-D เป็นสารกำจัดวัชพืชในกลุ่ม Phenoxy acids ที่ได้รับความนิยมสูงในหมู่เกษตรกรที่ทำการเกษตร เนื่องจากสารนี้มีจำหน่ายตามท้องตลาดทั่วไป หาซื้อง่าย ใช้สะดวก มีฤทธิ์ในการทำลายและควบคุมวัชพืชได้อย่างสิ้นซากและยาวนาน (10) เมื่อสาร 2,4-D เข้าสู่วัชพืชแล้ว จะไปเร่งการแบ่งเซลล์และการเจริญเติบโตของของวัชพืช ทำให้มีการสังเคราะห์ RNA และโปรตีนมากกว่าปกติ วัชพืชจะแสดงอาการที่มีรูปร่างผิดปกติ แตกกิ่งก้านมากขึ้น

ก้านใบและลำต้นโค้งงอ ลำต้นโป่งพอง มีการยืดขนาดของลำต้น ซึ่งการเจริญของวัชพืชอย่างรวดเร็วนี้ทำให้วัชพืชสูญเสียพลังงานที่สะสมไว้จนตายไปในที่สุด จากการที่สาร 2,4-D เป็นสารประเภทเลือกทำลายจึงเลือกทำลายวัชพืชซึ่งเป็นกลุ่มเป้าหมายได้ดี โดยมีผลน้อยหรือไม่มีผลต่อพืชที่ต้องการเพาะปลูก หากมีการใช้สาร 2,4-D ติดต่อกันเป็นเวลานานหรือใช้สารนี้ในปริมาณที่มาก จะทำให้เกิดการสะสมของสารนี้ในดิน และหากมีการสะสมในปริมาณที่มากเกินกว่าที่สารนี้จะสลายได้เองตามธรรมชาติจะก่อให้เกิดการตกค้างของสารนี้อยู่ในดิน ซึ่งจะมีผลต่อการเจริญของจุลินทรีย์และสัตว์ที่อยู่ในบริเวณนั้น เช่น ไส้เดือน นอกจากนี้เมื่อมีการเคลื่อนย้ายของสารเหล่านี้จากดินสู่แหล่งน้ำย่อมมีผลให้สารเหล่านี้แพร่กระจายสู่ระบบนิเวศน์และเกิดการสะสมสารพิษนี้ในห่วงโซ่อาหารได้ เมื่อคนกินสัตว์หรือพืชที่มีการสะสมของสารนี้จะได้รับสารนี้เข้าไปสะสมในคนนั้น ซึ่งอาจก่อให้ก่อเกิดอันตรายต่อคนนั้นได้หากผู้นั้นมีการปริมาณสารนี้ในร่างกายมากเกิน ซึ่งอาการที่สำคัญได้แก่ เจ็บหน้าอกและท้อง อาเจียน วิงเวียนศีรษะ และกล้ามเนื้อกระตุก (11) ในธรรมชาติ 2, 4-D สามารถสลายตัวได้ ซึ่งระยะเวลาในการสลายนั้นประมาณ 1-6 สัปดาห์ ทั้งนี้ขึ้นกับปริมาณของ 2,4-D ที่สะสมอยู่ในดินนั้นและสภาวะแวดล้อมซึ่งได้แก่ อุณหภูมิ pH และความลึกของชั้นดิน (12) อย่างไรก็ตามในปัจจุบันพบว่ามีการสะสมของ 2,4-D ในพื้นที่ที่มีการเกษตรกรรมเป็นจำนวนมาก เนื่องจากปริมาณการใช้ที่สูงขึ้น จึงทำให้การสลายของ 2,4-D ในธรรมชาตินั้นไม่สมดุลกับปริมาณที่เพิ่มขึ้นของสารนี้ในธรรมชาติ ด้วยเหตุนี้การศึกษาถึงวิธีการลดปริมาณของ 2,4-D จึงมีความสำคัญเป็นอย่างยิ่ง ในการลดปริมาณของ 2,4-D นั้นสามารถทำได้หลายวิธี ได้แก่ วิธีทางเคมี เช่น การสกัด 2,4-D ที่ปนเปื้อนในดินด้วยสารเคมีเช่น dichloromethane (13) ซึ่งวิธีการเหล่านี้สามารถลดการปนเปื้อนของสาร 2,4-D ในดินได้ในระดับหนึ่งแต่อาจก่อให้เกิดการสะสมของสารเคมีชนิดอื่นเพิ่มขึ้นในสิ่งแวดล้อม นอกจากนี้ยังสามารถกำจัดสาร 2,4-D ได้ด้วยวิธีทางชีวภาพ ได้แก่ การดูดซึมสาร 2,4-D ด้วยเชื้อรา (14)

Carbofuran (2,3-dihydro-2,2-dimethyl-7-benzofuranyl methylcarbamate) หรือที่เกษตรกรรู้จักในชื่อว่า Furadan เป็นสารกำจัดศัตรูพืชจำพวกวัชพืช สารนี้จัดอยู่ในกลุ่ม carbamate จากโครงสร้างพื้นฐานสารนี้เป็น phenolic compound ชนิดหนึ่ง carbofuran มีความเป็นพิษสูง ($LD_{50}$= 2 mg/kg in mice) (4, 15) และมีความสามารถในการยับยั้ง acetyl-cholinesterase enzyme ที่เกี่ยวข้องกับการทำงานของระบบประสาท ทำให้เกิดอันตรายต่อสุขภาพของมนุษย์ (4, 5, 16, 17) สารนี้ทนทานต่อการเสื่อมสลายโดยธรรมชาติ จึงทำให้มีการตกค้างของสารนี้มากขึ้นเรื่อยๆ การสลายตัวของสารนี้ในธรรมชาติใช้เวลาตั้งแต่สองสัปดาห์จนถึงประมาณหนึ่งปีทั้งนี้ขึ้นกับสภาวะแวดล้อมในขณะนั้น จึงมีผลให้เกิดการสะสมของ carbofuran และ metabolites ของสารนี้ในสิ่งแวดล้อม ซึ่งจะส่งผลกระทบต่อขบวนการห่วงโซ่อาหาร วิธีการกำจัด carbofuran ที่สะสมอยู่ในดินพื้นที่เกษตรกรรมมีอยู่หลายวิธี ทั้งปฏิกิริยาการสลายตัวด้วยแสง (photodecomposition) เกิดขึ้นโดยรังสี ultraviolet การสลายตัวทางเคมีเกิดจากปฏิกิริยาเคมีได้หลายแบบ เช่น ปฏิกิริยาการแยกสลายด้วยน้ำ (hydrolysis)

ปฏิกิริยาออกซิเดชัน (oxidation reaction) ปฏิกิริยาไอโซเมอไรเซชัน (isomerization) การแตกตัวเป็นไอออน (ionization) และการเกิดเกลือ (salt formation) และการย่อยสลายทางชีวภาพ (biodegradation) ซึ่งอาศัยกิจกรรมของจุลินทรีย์ในดิน (6, 18) โดยพบว่าการย่อยสลายทางชีวภาพก่อให้เกิด metabolites และ by products ที่มีความเป็นพิษน้อยลง ซึ่งในกระบวนการย่อยสลายของ carbofuran โดยจุลินทรีย์ในดินเกิดขึ้นได้เนื่องจากจุลินทรีย์ใช้สารประกอบนี้เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจน (18)

ในงานวิจัยครั้งนี้มุ่งที่จะคัดเลือกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลาย phenolic compounds ที่สะสมอยู่ในดินพื้นที่เกษตรกรรมในประเทศไทย และทำการศึกษาความเกี่ยวข้องกันของสายพันธุ์ของแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลาย phenolic compounds โดยใช้เทคนิคทางชีวโมเลกุล ซึ่งข้อมูลที่ได้นี้จะมีประโยชน์ในการคัดเลือกสายพันธุ์ต่างๆ ของแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อย phenolic compounds ต่างๆ ที่ตกค้างในสิ่งแวดล้อม เพื่อลดปริมาณการสะสมของสารเหล่านี้ที่มีอยู่ในดิน อีกทั้งยังช่วยปรับปรุงและฟื้นฟูคุณภาพดินให้ดีขึ้น คืนความสมดุลย์ของระบบนิเวศน์ นอกจากนี้ทำให้ลดอันตรายของสารนี้ต่อสุขภาพอนามัยของมนุษย์และสัตว์ แต่เนื่องจากสารที่มี phenol เป็นองค์ประกอบนั้นมีมากมายหลายชนิด ดังนั้นในการที่จะหาแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลาย phenolic compounds ทั้งหมดนั้นเป็นไปได้ยาก รวมทั้งแบคทีเรียใดที่สามารถย่อยสารที่มี phenol เป็นองค์ประกอบชนิดหนึ่ง ก็มีโอกาสที่จะย่อยสลายสารอื่นๆ ที่มี phenol เป็นองค์ประกอบที่มีโครงสร้างคล้ายกันได้ ดังนั้นผู้วิจัยจึงคัดเลือกสารบางชนิดที่มี phenol ring คือ 2,4-D และ carbofuran เป็นตัวแทนของสารที่มี phenol เป็นองค์ประกอบสำหรับใช้ในการศึกษานี้ เนื่องจากสารทั้งสองนี้เป็นสารสำคัญที่เกษตรกรนิยมใช้เป็นปุ๋ยเพื่อเร่งให้พืชเจริญเร็วขึ้น และใช้เป็นยาปราบศัตรูพืช

## 2. ทบทวนเอกสาร

### 2.1 สารกำจัดศัตรูพืช

สารกำจัดศัตรูพืช หมายถึง สารเคมีหรือวัตถุมีพิษที่ได้มาจากธรรมชาติหรือสังเคราะห์ขึ้นเพื่อใช้กำจัด ทำลาย ควบคุม และป้องกันสิ่งมีชีวิตหลายชนิดที่เป็นศัตรูและรบกวนการเจริญของพืชรวมทั้งทำลายผลิตผลทางการเกษตร (4) หากแบ่งชนิดของสารกำจัดศัตรูพืชโดยอาศัยโครงสร้างและองค์ประกอบทางเคมีของสาร สามารถแบ่งสารกำจัดศัตรูพืชออกเป็น 6 กลุ่ม (3-6) คือ

1. กลุ่มคลอรีนอินทรีย์ (chlorinated hydrocarbon or organochlorine) เช่น DDT, chlordane สารเหล่านี้ใช้ฆ่าแมลงในวงกว้าง และมีความคงทนในดินและสภาพแวดล้อมได้นานมาก

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

2. กลุ่มฟอตเฟตอินทรีย์ (organophosphate) เช่น parathion, DMP และ amiprophos สารในกลุ่มนี้เป็นสารออกฤทธิ์ในวงกว้าง สารในกลุ่มนี้สลายตัวได้เร็ว สามารถใช้ฆ่าแมลงก่อนการเก็บเกี่ยวผลผลิตได้ ในด้านการใช้กำจัดวัชพืชใช้เป็นประเภทสัมผัสตาย และใช้ฉีดพ่นทางใบ สารในกลุ่มนี้จัดเป็นกลุ่มที่เป็นพิษสูงที่สุดของทั้งแมลงและสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม โดยสารกลุ่มนี้จะยับยั้งการทำงานของ acetylcholinesterase enzyme

3. กลุ่มกรดคลอโรฟีน็อกซี (chlorophenoxy acid) เช่น 2,4-dichloro-phenoxyacetic acid (2,4-D), 2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid (2,4,5-T) เป็นสารเลือกทำลายที่ใช้กับพืชใบกว้าง เป็นประเภทดูดซึม มีคุณสมบัติคล้ายฮอร์โมนพืชจึงกระตุ้นการเจริญของพืชอย่างรวดเร็ว ทำให้พืชเจริญอย่างรวดเร็วเกินไปจึงสูญเสียพลังงานที่พืชสะสมไว้จนตายในที่สุด

4. กลุ่มคาร์บาเมต (carbamate) เช่น carbofuran (furadan), carbaryl (sevin), arprocarb (baygon) เป็นสารที่นิยมใช้กันมากในปัจจุบัน เนื่องจากมีพิษต่อสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมต่ำ มีฤทธิ์ตกค้างในดินระยะเวลาค่อนข้างสั้น

5. กลุ่มไตรอะซีน (triazine) เช่น simazine, cyanazine, ametryn, atrazine เป็นสารเลือกทำลายใช้แบบก่อนงอก สามารถควบคุมได้ทั้งวัชพืชใบแคบและใบกว้าง

6. กลุ่มแทนที่ยูเรีย (substituted urea) เช่น linuron, diuron, monuron สารส่วนใหญ่เป็นสารเลือกทำลาย ใช้ได้ทั้งแบบก่อนงอกและหลังงอก ควบคุมได้ทั้งวัชพืชใบกว้างและใบแคบ

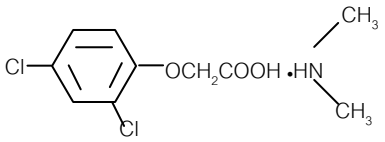
**2.2 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D)**

สาร 2,4-D เป็นสารกำจัดวัชพืชในกลุ่ม Phenoxy acids สูตรเคมี $C_8H_6Cl_2O_3$ มีน้ำหนักโมเลกุล 221.0 เป็นผลึกสีขาว ไม่มีกลิ่น จุดหลอมตัว 140°C จุดเดือด 160 °C สามารถละลายได้ในตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ เช่น Acetone, Benzene,Carbon disulfide, Carbon tetrachloride, Diesel oil, Kerosene, Dioxane, Ethyl alcohol 95%, Ethyl ether, Isopropanol, Methyl isobutyl ketone, Ortho-dichlorobenzene, Toluene, Xylene, น้ำ

สาร 2,4-D ในรูปดั้งเดิมจะอยู่ในรูปของกรด แต่ในการนำมาใช้นั้น ได้มีการดัดแปลงให้ 2,4-D เปลี่ยนแปลงไป โดยอาจอยู่ในรูปของเกลือ (salt) ชนิดต่าง ๆได้แก่ 2,4-D amine salt หรือ 2,4-D ester ดังแสดงในรูปที่ 1.1 และ 1.2

สาร 2,4-D จัดเป็นสารกำจัดวัชพืชประเภทเลือกทำลาย (selective herbicide) ซึ่งจะมีฤทธิ์ในการควบคุมวัชพืชใบกว้างเป็นส่วนใหญ่ แต่ก็สามารถควบคุมวัชพืชตระกูลหญ้าได้ดี สาร 2,4-D นี้สามารถนำไปใช้ในการควบคุมวัชพืชในการปลูกพืชหลายชนิด เช่น ข้าว ข้าวโพด ข้าวฟ่าง อ้อยและยางพารา (19)

**2,4-D amine salt**

| | |
|---|---|
| **สูตรโครงสร้าง** |  |
| **ชื่อสามัญ** | 2,4-D amine |
| **สูตรเคมี** | $C_{10}H_{13}Cl_2NO_3$ |
| **น้ำหนักโมเลกุล** | 266.1 |
| **สภาพทางฟิสิกส์** | ผลึกสีขาว ไม่มีกลิ่น |
| **จุดหลอมตัว-จุดเดือด** | จุดหลอมตัว 85-87 $^{o}$C |
| **การละลาย** | ละลายได้ดีมากในน้ำคือ ประมาณ 300 กรัม/น้ำ 100 กรัม และละลายได้ดีใน Methanol , Ethanol , Isopropanal และ Acetone แต่ไม่ละลายในน้ำ Diesel oil และ Kerosene ที่ 20 $^{o}$C |

**รูปที่ 1.1** คุณสมบัติและสูตรโครงสร้างของ 2,4-D amine salt (10)

สาร 2,4-D จะสามารถเข้าทำลายพืชทั้งทางรากและทางใบ โดยจะผ่านทาง cuticle ของใบพืชได้อย่างง่ายดาย 2,4-D ที่อยู่ในรูปของเกลือต่าง ๆ ซึ่งเป็นพวก polar หรือพวกที่ละลายได้ในน้ำ จะสามารถซึมเข้าทางรากของพืชได้ 2,4-D จะมีการทำลายพืชในหลายลักษณ์ โดยจะเป็นตัวขัดขวางหรือยับยั้งกระบวนการต่าง ๆ ในพืช ที่สำคัญ ๆ มากมาย เช่น ขบวนการสังเคราะห์แสง (photosynthesis) การหายใจ (respiration) ตลอดจนการแบ่งเซลล์ (cell division)

สารในกลุ่มนี้เป็นสารสังเคราะห์ที่มีคุณสมบัติช่วยเร่งการเจริญเติบโตของพืชคล้ายกับพวกฮอร์โมนพืชที่พบในธรรมชาติจัดว่าเป็นสารที่มีความเป็นพิษต่อพืชหลายชนิดเพราะว่ามีศักยภาพในการทำลายพืชมากกว่าสารพวกฮอร์โมนพืชทั่วไป สารในกลุ่มนี้ค่อนข้างจะเป็นสารประเภทเคลื่อนย้ายได้ โดยสามารถเคลื่อนย้ายได้ทั้งส่วนที่ไม่มีชีวิตภายในต้นพืช (Apoplast; xylem) และส่วนที่มีชีวิตภายในต้นพืช (Symplast; phloem) ไปยังบริเวณเนื้อเจริญของพืช ทำให้พืชได้รับพิษโดยจะไปรบกวนกระบวนการ metabolism ของ nucleic acid นอกจากนี้สารในกลุ่มนี้ยังเกี่ยวข้องกับระดับความสมดุลของฮอร์โมนในเนื้อเยื่อพืช โดยจะไปชักนำให้มีการเพิ่มการสังเคราะห์ RNA อย่างรวดเร็ว ปริมาณของ RNA ที่เพิ่มขึ้นนี้จะเป็นตัวชักนำกระตุ้นในกระบวนการสร้างโปรตีน การสังเคราะห์แสง การดูดยึดสารและการแบ่งเซลล์แบบชั่วคราว อย่างไรก็ตาม จะมีผลทำให้เนื้อเยื่อพืชโป่งพองและบวมโตขึ้น มีผลทำให้ไปขัดขวางการ

เคลื่อนย้ายสารในกระบวนการสังเคราะห์แสงในบริเวณเนื้อเยื่อภายในที่สำคัญ ๆ ก่อให้เกิดการพัฒนาของเนื้อเยื่อพืชและอวัยวะพืชมีการเจริญเติบโตที่ผิดปกติไป

2,4-D สามารถยึดติดกับอนุภาคของดินได้เป็นผลให้มีการสะสมของ 2,4-D ในดิน การยึดติดกับดินของ 2,4-D ขึ้นอยู่กับรูปของ 2,4-D และคุณสมบัติของดิน ดินที่มีอินทรียวัตถุสูงและดินเหนียวจะมีการดูดยึดโมเลกุลของ 2,4-D ได้มาก 2,4-D ในรูปของเกลือจะยึดเกาะกับดินได้น้อยเนื่องจากสารนี้สามารถละลายน้ำได้ดีจึงถูกชะออกโดยน้ำ (10)

ปริมาณการสะสมของ 2,4-D ในดินนั้นขึ้นกับปริมาณ 2,4-D ที่เพิ่มเข้าไปในดินโดยการใส่ในสารกำจัดวัชพืช และขึ้นกับปริมาณการสลายของ 2,4-D หากมีการใสเพิ่มของ 2,4-D ในปริมาณมาก ๆ ในขณะที่อัตราการสลายของ 2,4-D คงที่ก็จะมีผลให้มีการสะสมของ 2,4-D ในธรรมชาติมากขึ้น ซึ่งจะก่อให้เกิดผลเสียต่อดิน ระบบนิเวศน์ ห่วงโซ่อาหารรวมทั้งเป็นอันตรายต่อมนุษย์และสัตว์

2,4-D มีระดับความเป็นพิษต่อสัตว์ทดลองปานกลาง คือ มีค่า $LD_{50}$ (Acute-Oral, Rat) 300-1000 mg/kg (10) หากถูกผิวหนังจะทำให้เกิดการระคายเนื่องจากมีการแทรกซึมเข้าผิวหนังได้ดี อาการของผู้ที่ได้รับสารพิษนี้ เช่น เจ็บอกและท้อง อาเจียน วิงเวียนศีรษะ กล้ามเนื้อกระตุก การได้รับสารทางสัมผัสอาจจะเกี่ยวข้องกับการทำลายเส้นประสาทส่วนปลาย นอกจากนี้อาจมีผลต่อ ตับ ไต กล้ามเนื้อ และเนื้อเยื่อสมอง มีรายงานว่าเกษตรกรที่ใช้ 2,4-D มากกว่า 20 วันต่อปี จะเป็นผู้ที่เสี่ยงต่อการเป็นมะเร็งของต่อมน้ำเหลือง (non-Hodgkin's lymphoma) (11)

**2,4-D ester**

**สูตรโครงสร้าง**

| | |
|---|---|
| **ชื่อสามัญ** | a low volatile 2,4-D ester |
| **สูตรเคมี** | $C_{14}H_{18}Cl_2O_4$ |
| **น้ำหนักโมเลกุล** | 321.2 |
| **สภาพทางฟิสิกส์** | ของเหลว ไม่มีสี ไม่มีกลิ่น |
| **จุดหลอมตัว-จุดเดือด** | จุดเดือด 156-162 °C |
| **การละลาย** | ละลายได้ดีในน้ำและตัวทำละลายที่เป็นอินทรีย์สาร (organic solvents) ชนิดต่าง ๆ |

**รูปที่ 1.2** คุณสมบัติและสูตรโครงสร้างของ 2,4-D ester (10)

ดังนั้นการลดปริมาณ 2,4-D ที่สะสมในธรรมชาติจึงมีความสำคัญเป็นอย่างยิ่ง ซึ่งการสลายของ 2,4-D นั้นเกิดขึ้นได้หลายวิธีดังจะได้กล่าวต่อไป

การสลาย 2,4-D เกิดขึ้นได้ด้วยวิธีการต่าง ๆ เช่น การสลายตัวโดยอาศัยพลังงานจากแสงอาทิตย์ การสลายโดยอาศัยปฏิกิริยาทางเคมี และ การสลายตัวทางชีวภาพ (20, 21)

การสลายตัวของ 2,4-Dโดยแสงอาทิตย์ (photodegradation) เกิดขึ้นได้เนื่องจากโมเลกุลของ 2,4-D ดูดซึมพลังงานจากแสงอาทิตย์และทำให้อิเลคตรอนอยู่ในสถานะกระตุ้น (exited state) และเปลี่ยนแปลงโครงสร้างโมเลกุลได้ (20) โดยทั่วไปโมเลกุลของ 2,4-D จะดูดสับพลังงานจากแสงอาทิตย์ในช่วงความยาวคลื่น 282 nm ได้ดี (21)

การสลายตัวของ 2,4-D โดยปฏิกิริยาทางเคมี (chemical degradation) เกิดขึ้นโดยปฏิกิริยาทางเคมีในดิน เช่นการแยกสลายด้วยน้ำ (hydrolysis) ปฏิกิริยาออกซิเดชัน ปฏิกิริยาไอโซเมอไรเซชัน (isomerization) การแตกตัวเป็นไอออน (ionization) และการเกิดเกลือ (salt formation) ซึ่งปฏิกิริยาสำคัญที่เกิดเป็นส่วนใหญ่คือการแยกสลายด้วยน้ำและปฏิกิริยาออกซิเดชัน การเกิดปฏิกิริยาแต่ละชนิดจะขึ้นอยู่กับสภาพดินและสภาพความเป็นกรดเป็นด่างของดิน โดยพบว่าในสภาพดินที่เป็นกลางการเกิดปฏิกิริยาการแยกสลายด้วยน้ำของสารหลายชนิดจะเกิดขึ้นอย่างเล็กน้อย แต่เมื่อดินมีความเป็นกรดมากขึ้นจะเร่งปฏิกิริยาการแยกสลายตัวด้วยน้ำให้เกิดได้ดีขึ้น (20)

การสลายตัวทางชีวภาพ(biodegradation) โดยส่วนใหญ่เกิดจากจุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่ในดินได้แก่ Bacteria และ Fungi ตัวอย่างเช่น *Actinomycetes* , *Achromobacter* , *Arthrobacter* , *Corynebacterium* ,*Fflavobacterium* , *Mycoplasma* ตารางที่ 1.1 แสดงถึงจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลาย 2,4-D และระยะเวลาที่ใช้ในการย่อยสลายสารนี้

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

**ตารางที่ 1.1** จุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายสาร 2,4-D และระยะเวลาที่ใช้ในการย่อยสลาย 2,4-D (22)

| | **ระยะเวลา** | **จุลินทรีย์** |
|---|---|---|
| 2,4-dichlorophenoxyacetic acid | 2-8 สัปดาห์ | *Achromobacter*<br>*Corynebacterium*<br>*Flavobacterium* |

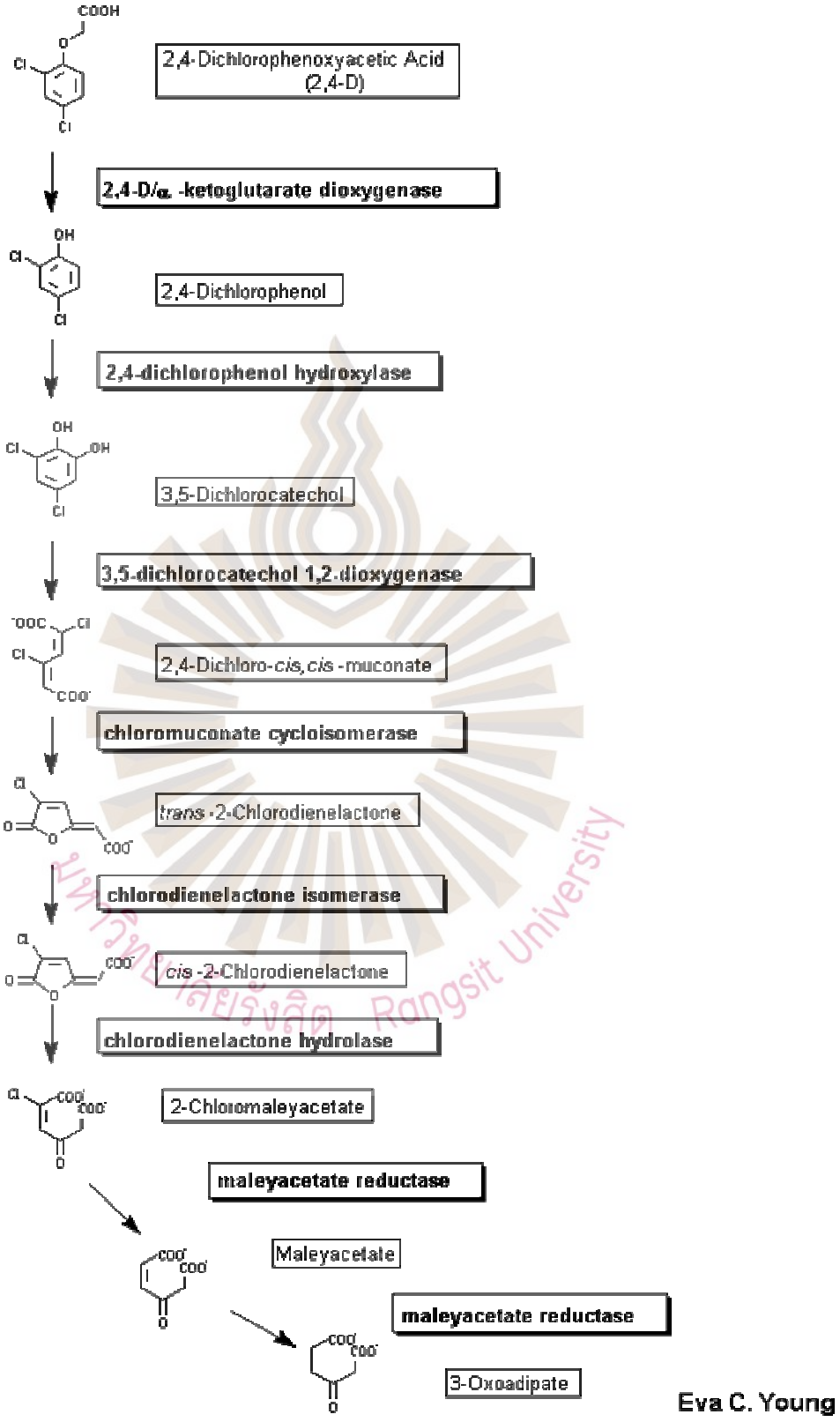
จุลินทรีย์เหล่านี้บางชนิดสามารถใช้สารนี้เป็นแหล่งของคาร์บอนและพลังงาน เพื่อสร้างโปรตีน และ การขยายพันธุ์ หากการย่อยสลายเป็นไปโดยสมบูรณ์ผลจากการย่อยสลายจะได้ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ออกมา ปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการย่อยสลาย 2,4-D โดยจุลินทรีย์ในดิน ได้แก่ ชนิดของจุลินทรีย์ ปริมาณของจุลินทรีย์ในดิน ความถี่ในการใช้สาร อุณหภูมิและความชื้นเป็นต้น

Young ได้ศึกษา pathway ของการย่อยสลาย 2,4-D พบว่าการย่อยสลาย 2,4-D เริ่มต้นด้วยการตัดส่วนที่เป็น acetic acid ออกไปก่อนเหลือ chlorophenols และ chlorocatechol จากนั้นมีการตัดเอาส่วนของ side chain , dehalogenation และมีการทำให้ aromatic ring แตกออกสุดท้ายจะได้ $CO_2$ ออกมา (23) ดังแสดงในรูปที่ 1.3 และ 1.4

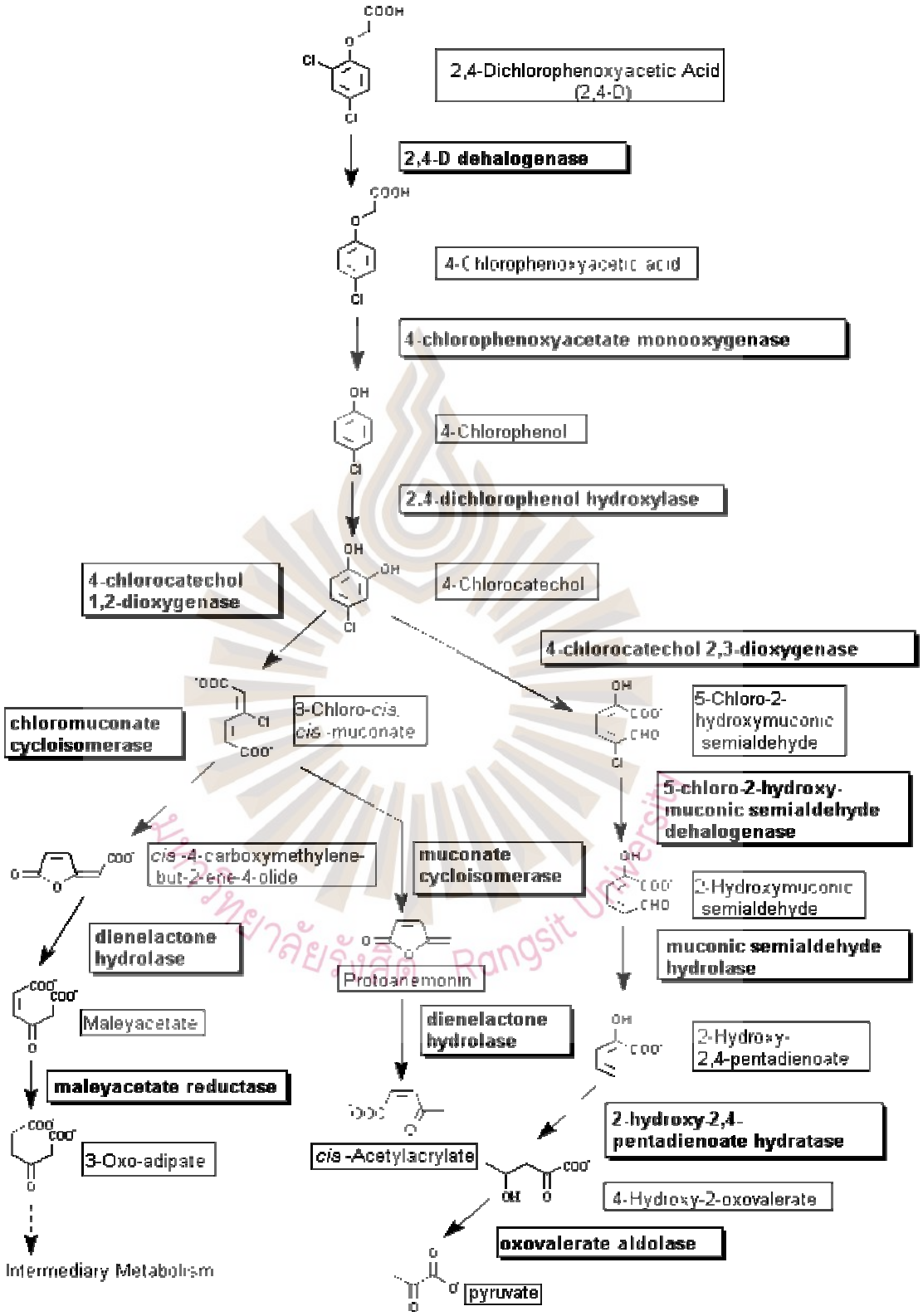
การย่อยสลาย 2,4-D โดยจุลินทรีย์ต่างชนิดกันจะใช้เวลาในการย่อยที่แตกต่างกัน และขบวนการในการย่อยสลาย (pathway) อาจมีความแตกต่างกัน หากมีการย่อยที่สมบูรณ์ ผลสุดท้ายของการย่อยสลายจะได้ $CO_2$ ออกมา (23)

Kye-Hheon Oh และ Olli H. Tuovinen ในปี 1994 (24) ได้ทำการย่อยสลาย 2,4-D ใน fixed film column reactor โดยพบว่าการย่อยสลายสารนี้เป็นการทำงานร่วมกันของแบคทีเรียในดิน คือ *Pseudomonas* spp., *Flavobacterium* spp. และ *Achromobacter* spp. และมีการศึกษาของ Ilona McGhee และ Richard G. Burns ในปี 1995 (25) ได้ทำการสลาย 2,4-D โดย *Xanthomonas maltophilia*, *Pseudomonas* sp. และ *Rhodococcus globerulus* ซึ่งต้องใช้เวลาถึง 28 วันในการย่อยสลายสารนี้ในดิน

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University



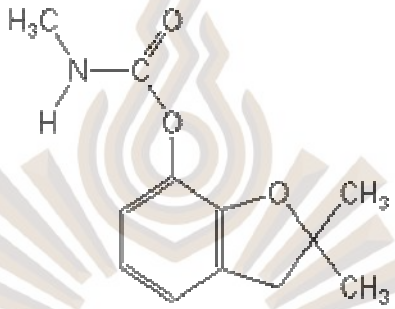

**รูปที่ 1.3** Pathway การย่อยสลายของ 2,4-D โดยแบคทีเรีย Gram negative bacilli (23)




**รูปที่ 1.4** Pathway การย่อยสลายของ 2,4-D โดยแบคทีเรีย Gram negative bacilli (23)

### 2.3 Carbofuran

Carbofuran เป็นสารกำจัดศัตรูพืชในกลุ่ม carbarmate จากโครงสร้างพื้นฐานจัดเป็น phenolic compound มีชื่อทางเคมีว่า 2,3-dihydro-2,2-dimethyl –7-benzofuranyl-N-methylcarbamate สูตรเคมี $C_{12}H_{15}NO_3$ มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 221.25 ลักษณะเป็นผลึกสีขาว มีจุดหลอมเหลวที่ 150-152$^{o}$C สามารถละลายน้ำได้ 320 mg/l (700 ppm.) ที่อุณหภูมิ 25ºC ละลายได้ดีในตัวทำละลายหลายชนิด เช่น dichloromethane, methylenechloride, acetone, cyclohexane, dimethyl sulfoxide, dimethyl formamide, propan-2-ol เป็นต้น carbofuran ถูก hydrolysis ได้ในสภาพด่าง ไม่สลายตัวในสภาพที่เป็นกลางหรือกรด (16, 17) ค่าครึ่งชีวิตของ carbofuran ในดินมีค่าประมาณ 30-117 วัน (26) มีสูตรโครงสร้างดังแสดงในภาพที่ 1.5




**รูปที่ 1.5** โครงสร้างของ carbofuran

Carbofuran ถูกจัดเป็นสารกำจัดศัตรูพืชที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจและได้รับความนิยมอย่างมากในปัจจุบัน (27) ผลิตโดยบริษัท FMC Corporation สหรัฐอเมริกา เข้าสู่ตลาดตั้งต่ปี พ.ศ. 2510 ภายใต้ชื่อการค้าว่า Furadan มีรูปแบบในทางการค้าหลายรูปแบบ คือ ในรูปเม็ด 2%, 3%, 5% และ 10% และ ในรูปผงกระจายตัวง่าย 48% (16, 17) เป็นสารเคมีกำจัดแมลงประเภทดูดซึม (systemic pesticide) สามารถกำจัดแมลงในวงกว้างจะออกฤทธิ์โดยการดูดซึมเข้าสู่เซลล์พืช สารจะถูกดูดซึมเข้าไปในพืชและมีกลไกการออกฤทธิ์กำจัดแมลงและไส้เดือนฝอยได้เมื่อใส่ลงในดิน สามารถควบคุมแมลงศัตรูพืชที่อาศัยอยู่ในดินได้อย่างมีประสิทธิภาพ (18) ใช้ฉีดพ่นทางใบเพื่อควบคุมแมลงและไรศัตรูพืชในอัตรา 140-160 กรัมต่อไร่ ใช้ในหลุมปลูกเพื่อควบคุมการทำลายเมล็ดโดยแมลงใช้ในอัตรา 80-620 กรัมต่อไร่ หรือหว่านในอัตรา 0.96-1.6 กิโลกรัมต่อไร่เพื่อควบคุมไส้เดือนฝอย สำหรับ furadan 3%G ที่ใช้กันมากในประเทศไทยนั้นได้มีการแนะนำการใช้ในอัตราตั้งแต่ 2.5-10 กิโลกรัมต่อไร่ ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับลักษณะการใช้และชนิดของพืช (17)

มีผู้รายงานเกี่ยวกับการเปลี่ยนแปลงของ carbofuran ในแมลง และสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม 56 รายที่ได้รับสารนี้โดยวิธีหว่านและคลุก carbofuran กับดินในแปลงทดลอง พบว่า

carbofuran ที่พบในแมลง และสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม จะมีการเปลี่ยนแปลงสารนี้โดยขบวนการ hydrolysis, oxidation และ conjugation เป็น 3-hydroxy carbofuran, 3-keto carbofuran, carbofuran phenol, carbofuran-3-hydroxy-7-phenol, carbofuran-3-keto-7-phenol และอื่นๆ อย่างรวดเร็ว ซึ่งสารเหล่านี้เป็นสารประกอบที่มีพิษน้อยลงและไม่มีพิษ และสัตว์สามารถกำจัดสารเหล่านี้ออกทางขบวนการขับถ่ายของเสีย ทั้งนี้ผู้วิจัยเสนอว่าไม่มีการสะสมของ carbofuran และ metabolites ของสารนี้ในเนื้อเยื่อของสัตว์ (16, 18)

จากรายงานของกรมควบคุมโรคพืชและวัสดุทางการเกษตร (9) มีข้อสรุปว่าปริมาณของ carbofuran ที่มีปริมาณสูงมากกว่า 90% ในสารกำจัดศัตรูพืช มีความเป็นพิษสูง ($LD_{50}$ = 2 mg/kg in mice) (4, 15) สามารถก่อให้เกิดอันตรายต่อสัตว์ทดลองเมื่อได้รับทางปาก และทางการหายใจ แต่สารนี้ไม่ถูกดูดซึมทางผิวหนังทำให้ไม่เกิดการระคายเคืองทางผิวหนัง แต่เมื่อเข้าตาแม้ปริมาณเพียงเล็กน้อยจะทำให้ม่านตาหดและระคายเคืองต่อตา (16) พิษทางปาก (acute oral) ของ carbofuran ต่อสุนัข และไก่ มีค่า $LD_{50}$ = 8-14 mg/ น้ำหนักตัว 1 kg และ 19 mg / น้ำหนักตัว 1 kg ตามลำดับ พิษทางผิวหนังต่อกระต่าย มีค่า $LD_{50}$ = 2550 mg/ น้ำหนักตัวกระต่าย 1 kg จากการให้อาหารที่มีสารนี้ 25 mg/น้ำหนักหนู 1 kg และ 20 mg/ น้ำหนัก สุนัข 1 kg เป็นเวลา 2 ปี ปรากฏว่าไม่มีความผิดปกติเกิดขึ้น ซึ่งให้ผลเช่นเดียวกับการให้อาหารที่มีสารนี้ปริมาณ 10 mg/kg ต่อหนูใน 3 generation (17) $LD_{50}$ ต่อ Daphnia = 0.02 ppm, Mosquito larvae 0.054 ppm, $LD_{50}$ ต่อนก Mallard 0.4 ppm และนก Pheasant 4.2 ppm ค่า $LD_{50}$ ต่อหนูทดลองที่ให้ทางผิวหนัง 10,500 mg/น้ำหนักตัว 1 kg ค่า $LD_{50}$ ของ carbofuran 75% ในรูปผงละลายน้ำ เมื่อให้ในลักษณะฝุ่นต่อหนูทดลองโดยการหายใจ 0.053 mg ต่ออากาศ 1 ลิตร (16) สารนี้ถูกเปลี่ยนแปลงในตับ และถูกขับออกทางปัสสาวะของสัตว์ โดยมีการสลายตัวไป 50% ภายในเวลา 30-60 วัน เมื่อสลายตัวจะได้สารใหม่ที่สำคัญคือ 3-ketocarbofuran และ 3-hydroxycarbofuran โดยเฉพาะสารใหม่ชนิดหลังนี้มีพิษต่ำต่อแมลงและสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม โดยปกติแล้วพิษทางสัมผัสต่อมนุษย์และสัตว์มีน้อย แต่พิษทางปากและระบบหายใจสูง (17)

สารกำจัดศัตรูพืชในกลุ่ม carbamate เป็นวัตถุมีพิษที่ออกฤทธิ์ในการขัดขวางการทำงานของ acetylcholinesterase enzyme (5, 18) ตรงบริเวณ esteratic site ของเอนไซม์โมเลกุล ซึ่งเป็น enzyme ที่เกี่ยวข้องกับการทำงานของระบบประสาท ทำให้มีการสะสมของเอนไซม์นี้ที่รอยต่อประสานระหว่างเซลล์ประสาท การรวมตัวระหว่าง carbofuran กับ acetylcholinesterase enzyme (Ach E) อย่างถาวรจะทำลายฤทธิ์เอนไซม์ ทำให้มีการสะสมของ acetylcholine ที่รอยต่อประสานระหว่างเซลล์ประสาท เกิดการกระตุ้นเซลล์ประสาทอย่างมากมายและติดต่อกันเรื่อยไปโดยเฉพาะในระบบพาราซิมพาธิติค (parasympathetic system) และระบบมอเตอร์ของร่างกาย กล้ามเนื้อจะกระตุกสั่นจนเกิดอาการเกร็ง แต่หากความเข้มข้นของ acetylcholine เพิ่มมากเกินไปจะทำให้เกิดฤทธิ์ตรงข้าม คือ เกิดอาการอ่อนเพลียมากจน

เป็นอัมพาตทั้งประสาทและกล้ามเนื้อ กล้ามเนื้อลายจะได้รับผลกระทบมากกว่ากล้ามเนื้อเรียบ การคั่งของ Ach ในอวัยวะต่างๆทำให้เกิดพยาธิสภาพในอวัยวะนั้นๆ ดังแสดงในตารางที่ 1.2

**ตารางที่ 1.2** อาการและอาการแสดงจากการที่มี Ach สะสมที่อวัยวะต่างๆ

| เนื้อเยื่อประสาทและตัวรับ | อวัยวะ | อาการ |
|---|---|---|
| Parasympathetic autonomic (muscarinic receptors) postganglionic nerve fibers | Exocrine glands | น้ำตาไหล, น้ำลายฟูมปาก, เหงื่อแตก |
| | ตา | ม่านตาตีบ,หนังตาตก,ตาพร่า, เยื่อบุตาแดง, น้ำตาแดง |
| | ทางเดินอาหาร | คลื่นไส้, อาเจียน,ปวดเกร็งในท้อง, ท้องร่วง,อุจจาระราด |
| | ทางเดินหายใจ | น้ำมูกไหล, ไอ, เสมหะมาก,อืดอัดในทรวงอก, หลอดลมหดเกร็ง, หายใจลำบาก |
| | ระบบไหลเวียนโลหิต | หัวใจเต้นช้า, ความดันโลหิตลด |
| | ทางเดินปัสสาวะ | ปัสสาวะราด |
| Parasympathetic และ Sympathetic autonomic fiber (nicotinic receptors) | ระบบไหลเวียนโลหิต | หัวใจเต้นเร็ว,ซีดเผือด, ความดันโลหิตเพิ่ม |
| Somatic motor nerve fibers (nicotinic receptor) | กล้ามเนื้อลาย | Muscle fasciculation (หนังตา, กล้ามเนื้อใบหน้า), ตะคริว, tendon reflexs ลด, กล้ามเนื้อทั่วๆไป (รวมทั้งกล้ามเนื้อหายใจ) อ่อนล้า, อัมพาต (Flaccid sinvrigid tone) |
| สมอง (acetylcholine receptor) | ระบบประสาทส่วนกลาง | ซึม, อ่อนล้า, สับสน, ขาดสมาธิ, ปวดศีรษะ, หมดสติ, ไม่มี reflex, สั่น, หายใจลำบาก, ชัก, ตัวเขียว |

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

นอกจากนี้อาการของผู้ป่วยที่ได้รับพิษของ carbofuran อย่างเฉียบพลันจะมีอาการอ่อนเพลีย ปวดศีรษะ คลื่นไส้อาเจียน สายตาพร่า มือขาสั่น เจ็บหน้าอกและหายใจลำบาก มักมีเสมหะ อาจมีอาการตัวเขียว (cyanosis) มีอาการชักเกร็งกระตุกของกล้ามเนื้อ ชักแบบหมดสติ สาเหตุของการเสียชีวิต คือ การติดขัดของระบบทางเดินหายใจ ซึ่งอาจตายภายใน 24 ชั่วโมง หลังจากได้รับสารนี้เข้าไป (5)

ในการใช้สารเคมีกำจัดศัตรูพืช เช่น แมลง หนู หรือแม้แต่วัชพืช ผู้ใช้มักจะไม่คำนึงถึงพิษตกค้างของวัตถุมีพิษเหล่านั้นที่จะมีต่อมนุษย์และสิ่งแวดล้อม สารพิษที่ใช้กำจัดศัตรูพืชจำนวนมากมีตกค้างอยู่ในดินภายหลังจากการฉีดพ่นหรือหว่านลงสู่ดินโดยตรง การฉีดพ่นสารพิษไปยังส่วนเหนือดินของพืชมีบางส่วนของสารกำจัดศัตรูพืชร่วงสู่ดินจากการชะล้างของน้ำฝน พืช สัตว์ที่ได้รับสารพิษแล้วตายลง หรือสิ่งขับถ่ายจากสัตว์ที่ได้รับสารพิษก็มีส่วนปนเปื้อนดินได้ ดังนั้นดินจึงเป็นแหล่งที่มีการสะสมของสารพิษกำจัดศัตรูพืชแหล่งใหญ่ ซึ่งสามารถถ่ายเทต่อไปสู่อากาศ น้ำ หรือสิ่งมีชีวิตอื่นได้

Carbofuran เป็นสารพิษที่เกษตรกรนิยมใช้มากที่สุดชนิดหนึ่ง เพราะสามารถใช้ป้องกันกำจัดแมลง ไส้เดือนฝอยในพืชไร่และพืชผักหลายชนิดได้ดีมาก เนื่องจากสารนี้ละลายน้ำได้ดีพืชสามารถดูดซึมได้ง่ายและเคลื่อนย้ายไปสู่ส่วนต่างๆของพืชได้รวดเร็ว เมื่อแมลงกัดกินหรือดูดน้ำเลี้ยงจากพืชสารนี้ก็จะเข้าสู่ระบบทางเดินอาหารและเป็นพิษต่อแมลงทันที

นอกจากนี้แล้วการสะสมของ carbofuran และ metabolites ของสารนี้ที่ตกค้างอยู่ในดินส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมและระบบนิเวศ เนื่องจากสารนี้มีความคงทน การสลายตัวของสารนี้โดยธรรมชาติใช้เวลาตั้งแต่สองสัปดาห์จนถึงประมาณหนึ่งปีขึ้นกับสภาวะแวดล้อมในขณะนั้น

จากการใช้สารกำจัดศัตรูพืชจำนวนมากขึ้นเรื่อยๆ เป็นเวลานาน มีผลทำให้เกิดการตกค้างสะสมในสิ่งแวดล้อม ซึ่งสารกำจัดศัตรูพืชแต่ละชนิดสามารถสลายตัวได้เองในธรรมชาติแต่ย่อยสลายได้ยากและใช้เวลานานในการย่อยสลายขึ้นอยู่กับความคงทนของสารกำจัดศัตรูพืชในสิ่งแวดล้อม ความคงทน (persistence) ของสารกำจัดศัตรูพืชในดิน หมายถึง ระยะเวลาที่สารกำจัดศัตรูพืชชนิดหนึ่งๆ เสื่อมสภาพไป 95% เป็นอย่างน้อย ภายใต้อัตราที่ใช้และสภาพแวดล้อมปกติ สารเคมีที่เสื่อมสภาพไปภายในเวลา 1 ถึง 12 สัปดาห์ถือว่า ไม่คงทน (nonpersistent) สารที่เสื่อมสภาพไปภายในเวลา 1 ถึง 18 เดือนถือว่า คงทนปานกลาง (moderately persistent) ส่วนสารเคมีที่ยังคงสภาพในสิ่งแวดล้อมไดเป็นเวลา 2 ปีขึ้นไปถือว่าคงทน (persistent) (6) ความคงทนของสารกำจัดศัตรูพืชในดินเป็นผลรวมของกระบวนการทางเคมี ฟิสิกส์ และชีวเคมีที่เกิดขึ้นกับสารเหล่านี้ รวมทั้งสมบัติทางเคมีของสารกำจัดศัตรูพืชชนิดนั้นๆ

สารกำจัดวัชพืชส่วนใหญ่จะมีผลตกค้างไม่เกินสองปีหากใช้สารเคมีชนิดนั้นๆ ในอัตราที่แนะนำ แต่อย่างไรก็ตาม ความคงทนของสารเคมีชนิดหนึ่งในดินมิใช่ค่าคงที่ ทั้งนี้เนื่องจากความคงทนของสารขึ้นอยู่กับปัจจัยหลัก 2 ประการ กล่าวคือ ประการแรก คือ

คุณสมบัติของดิน ได้แก่ ชนิดของดินปริมาณอินทรียวัตถุในดิน ปริมาณและชนิดของอนุภาคดิน pH ของดิน ปริมาณน้ำในดิน การระบายอากาศในดิน ชนิดและปริมาณของสิ่งมีชีวิตในดิน พืชพรรณที่ปลูก การเกษตรกรรม ตลอดจนลักษณะหน้าดินต่อลมและแสงแดด ซึ่งปัจจัยต่างๆ เหล่านี้มีอิทธิพลต่อกระบวนการต่างๆ ในการสลายตัวของสารเคมีในดิน และประการที่สองที่สำคัญคือ ชนิดและคุณสมบัติของสารเคมีนั้นเอง ปัจจัยเหล่านี้มีผลร่วมต่อกันมิใช่ปัจจัยแยกอิสระ

การใช้สารกำจัดศัตรูพืชเป็นเวลานานมีผลทำให้มีการทำลายล้างศัตรูพืชชนิดหนึ่งให้หมดไป รวมทั้งศัตรูพืชที่มีอยู่ในธรรมชาติก็ถูกทำลายไปด้วย ซึ่งเท่ากับเป็นการลดการแก่งแย่งกับศัตรูพืชชนิดอื่นที่อยู่ในระบบนิเวศน์นั้น แมลงหรือพืชที่มิได้เป็นอันตรายจากสารนี้ก็จะเติบโตแทนที่อย่างรวดเร็ว อาจก่อให้เกิดศัตรูพืชพันธุ์ใหม่ที่มีระดับความรุนแรงมากกว่าเดิมได้ นอกจากนี้ในกรณีที่ศัตรูพืชนั้นมีการปรับตัวให้ต้านทานต่อสารนี้จะก่อให้เกิดการดื้อยา ซึ่งจะมีผลให้มีการระบาดของศัตรูพืชเพิ่มมากขึ้นจำเป็นต้องใช้สารกำจัดศัตรูพืชปริมาณมากขึ้น (6) การแพร่กระจายของ carbofuran ในดินก่อให้เกิดการหมุนเวียนสารนี้เข้าสู่ระบบนิเวศและเกิดการสะสมสารดังกล่าวในโซ่อาหาร (food chain) เนื่องจากการที่สารนี้ปนเปื้อนในแม่น้ำลำคลอง ห้วย หนอง บึง ทะเล และมหาสมุทร และสะสมในแพลงตอน (plankton) และสัตว์น้ำขนาดเล็กที่อาศัยอยู่ในแหล่งน้ำนั้น ซึ่งเป็นโซ่อาหารของปลาและสัตว์น้ำอื่นๆ การสะสมของสารนี้ในวงจรโซ่อาหารเพิ่มขึ้นเรื่อยๆเป็นลำดับขั้นจากการกินเป็นทอดๆ เมื่อมีการสะสมถึงจุดๆหนึ่งที่สิ่งมีชีวิตไม่อาจทนได้ก็จะตายลง โดยเฉพาะพวกแพลงตอนและสัตว์น้ำขนาดเล็กจะตายก่อน ทำให้สมดุลย์ธรรมชาติขาดไปส่งผลกระทบถึงปลา และสัตว์น้ำอื่นๆที่เป็นอาหารของมนุษย์ เนื่องจากมนุษย์ซึ่งอยู่บนสุดของโซ่อาหาร (Top of food chain) กินทั้งสัตว์บกสัตว์น้ำ และพืช ดังนั้นมนุษย์จึงเป็นผู้ที่สะสมสารพิษนี้มากกว่าสิ่งมีชีวิตอื่นๆ (5, 16, 17, 28)

ผลกระทบที่เกิดขึ้นทำให้มีการคิดค้นวิธีกำจัด carbofuran ที่ตกค้างอยู่ในดิน โดยธรรมชาติแล้วสารนี้สามารถสลายตัวโดยปฏิกิริยาจากแสง (photodecomposition) ซึ่งเกิดขึ้นโดยรังสีเหนือม่วง (ultraviolet) แสงจะทำให้เกิดการเสื่อมสลายของสาร โดยพลังงานจากรังสีจะถูกดูดซับโดยโมเลกุลของสารทำให้อิเล็กตรอนอยู่ในสภาวะถูกกระตุ้น (exited state) จนเปลี่ยนแปลงโครงสร้างโมเลกุลได้ แต่ปริมาณที่สลายตัวอาจไม่มากนักเนื่องจากเกิดขึ้นได้เฉพาะส่วนที่อยู่ผิวดิน นอกจากนี้การย่อยสลายโดยแสงทำให้สารมีโครงสร้างที่ซับซ้อนน้อยลงส่งผลให้มีการย่อยโดยจุลินทรีย์ในดินตามมา เช่น สารประกอบลิกนินในดิน

การสลายตัวของ carbofuran โดยใช้ปฏิกิริยาทางเคมีก็มีความสำคัญเช่นกัน โดยสารนี้เกิดปฏิกิริยาเคมีได้หลายอย่าง เช่น การแยกสลายด้วยน้ำ (hydrolysis), ปฏิกิริยาออกซิเดชันไอโซเมอไรเซชัน (oxidation isomerization), การแตกตัวเป็นไอออน (ionization), และการเกิดเกลือ (salt formation) ซึ่งปฏิกิริยาสำคัญที่เกิดขึ้นส่วนใหญ่คือการแยกสลายด้วย

น้ำและออกซิเดชัน สำหรับประเทศไทยมีการทดลองใช้สารดูดซับ เช่น active charcoal เติมลงในดินเพื่อลดปริมาณสารนี้ (28)

การย่อยสลายตัวด้วยวิธีทางชีวภาพ เป็นวิธีการที่สำคัญอีกวิธีหนึ่งที่ถูกนำมาใช้ในการย่อยสลายสารกำจัดศัตรูพืชที่ตกค้างในดินได้ การย่อยสลายทางชีวภาพ (biodegradation) ของสารกำจัดศัตรูพืชเป็นการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของสารประกอบดังกล่าวจนเสียสภาพโมเลกุลเดิมโดยกิจกรรมของจุลินทรีย์ในดิน ซึ่งอาจเกิดขึ้นได้โดยปฏิกิริยาต่างๆ เช่น ปฏิกิริยาออกซิเดชัน รีดักชัน การแยกสลายด้วยน้ำ

ในกระบวนการเมแทบอลิซึมของสารกำจัดศัตรูพืชโดยจุลินทรีย์ดินนั้น ส่วนที่เป็นสารประกอบอินทรีย์จะถูกจุลินทรีย์ใช้เป็นแหล่งพลังงาน การย่อยสลายสารเกิดได้ช้าในระยะแรกเริ่มเนื่องจากจุลินทรีย์ต้องใช้เวลาในการปรับตัวเพื่อให้เข้ากับสิ่งแวดล้อมใหม่ สำหรับปัจจัยที่มีผลต่อกิจกรรมในการย่อยสลายสารศัตรูพืชเป็นปัจจัยหลักเดียวกันกับการย่อยสลายสารอินทรีย์โดยทั่วไป อันได้แก่ความเหมาะสมของอุณหภูมิ สภาพความชื้น และปริมาณอินทรีย์วัตถุในดิน

ในกระบวนการย่อยสลายของ carbofuran โดยจุลินทรีย์นั้นเกิดขึ้นโดยที่สารประกอบนี้จะถูกจุลินทรีย์ใช้เป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงาน จากรายงานของ Venkateswarlu และคณะในปี 1977 พบว่าในดินที่มีน้ำขังนาน 40 วัน carbofuran จะถูกย่อยสลายมากกว่า 75% แต่ในสภาพที่ไม่มีน้ำขังจะสลายตัวเพียง 20% โดยในดินที่ไม่มีการฆ่าเชื้อจะย่อยสลายได้ 62-75% ในขณะที่ดินที่ได้รับการฆ่าเชื้อมีการย่อยเพียง 18-27% เท่านั้น (29)

นอกจากนี้ได้มีการทดลองใช้จุลินทรีย์ในดินและจุลินทรีย์ที่อยู่ในกากน้ำตาลมาทำการย่อยสลาย carbofuran ในดิน โดยเปรียบเทียบกับจุลินทรีย์ที่จัดทำเป็น effective microorganism เพื่อใช้ในการบำบัดน้ำเสีย ผลการวิจัยนี้พบว่าจุลินทรีย์ที่อยู่ในดินและกากน้ำตาลสามารถทำการย่อยสลาย carbofuran ได้ดีกว่าการใช้ effective microorganism (28) จะเห็นว่าเมื่อสารนี้สลายตัวด้วยแสงหรือปฏิกิริยาทางเคมีแล้วก็ต้องอาศัยกิจกรรมของจุลินทรีย์ในดินเพื่อให้ได้ metabolites และ by product ที่มีความเป็นพิษน้อยที่สุด

ในปี 1988 Chaudhry และ Ali สามารถแยกแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลาย carbofuran ได้ 15 isolates จากดินที่มีประวัติการใช้ carbofuran ในบริเวณ Florida ซึ่งเชื้อที่แยกได้จัดอยู่ใน genera *Pseudomonas* และ *Flavobacterium* โดยแบ่งได้เป็น 3 กลุ่มคือ กลุ่มที่1 ใช้ carbofuran เป็นแหล่งไนโตรเจน มี 6 isolates กลุ่มที่2 ใช้ carbofuran เป็นแหล่งคาร์บอน มี 7 isolates โดยในกลุ่มที่1 และ 2 จะ Hydrolyzed carbofuran เป็น carbofuran phenol และกลุ่มที่3 มี 2 isolates ซึ่งเป็นกลุ่มที่ใช้ carbofuran เป็นแหล่งคาร์บอนได้อย่างรวดเร็ว โดยพบว่ามากกว่า 40% ของ [$^{14}$C] carbofuran จะสลายเป็น $^{14}CO_2$ ภายใน 1 ชม. โดยการสลายแบบ oxidative pathway (15)

Ramanand และคณะ พบว่า *Arthrobacter* sp. แยกได้จากดินที่มีน้ำท่วมขังสามารถสลาย carbofuran ที่ติดฉลากที่วง furan ด้วย $^{14}C$ เป็น $^{14}CO_2$ ภายใน 72-120 ชม.ใน mineral salts medium ที่ใช้ carbofuran เป็นแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจน ภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจน (30)

ในปี 2000 Karpouzas และคณะ ได้แยกแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลาย cabofuran ได้ 23 isolates แล้วนำมาจัดหมวดหมู่ด้วย Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) ของ 16S rRNA gene และ partial 16S rRNA sequence analysis พบว่า 9 isolates คล้ายกับ *Pseudomonas* strains, 7 isolates คล้ายกับ *Flexibacter/ Cytrophaga/ Bacteroids* group อีก 7 isolatesที่เหลือจัดอยู่ใน genera *Staphylococcus,Bacillus, Paenobacillus, Moraxella, Bordetella* และ *Microbacterium* (31)

ในปี 2002 Chaudhry และคณะ ได้ศึกษาการย่อยสลาย carbofuran โดย *Pseudomonas* sp. 50432 ผ่านทางขบวนการ oxidation พบว่ามี metabolites ที่เกิดจากการย่อยสลายสารนี้หลายชนิด ซึ่งผู้วิจัยได้ทำการแยกชนิดของผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นด้วย gas chromatography/mass spectroscopy พบว่า 4-hydroxycarbofuran เป็นหนึ่งใน metabolites ที่ได้จากปฏิกิริยาการสลายสารนี้ และ 4-hydroxycarbofuran มีความเป็นพิษน้อยกว่า carbofuran (18)

**2.4 การจัดจำแนกจุลินทรีย์ (Classification)**

การจัดจำแนกประเภทจุลินทรีย์ (Classification) (32) เป็นการจัดจำพวกของจุลินทรีย์โดยจัดลำดับอย่างมีระบบ ดังนั้นก่อนที่จะจัดจำแนกจุลินทรีย์ได้จะต้องรู้จักลักษณะของจุลินทรีย์นั้น (characteristics) ซึ่งลักษณะที่สำคัญของจุลินทรีย์ที่ใช้ในการศึกษาเพื่อจัดจำแนกชนิดของจุลินทรีย์ได้แก่

**1. ลักษณะทางสัณฐานวิทยา** (Morphological characteristics) โดยดูจากขนาด รูปร่าง โครงสร้างของเชื้อจุลินทรีย์ ซึ่งการศึกษาต้องใช้กล้องจุลทรรศน์ที่มีกำลังขยายประมาณ 1000 เท่าหรืออาจใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนที่ให้รายละเอียดมากขึ้น

**2. องค์ประกอบทางเคมี** (Chemical composition) ซึ่งเซลล์ของจุลินทรีย์แต่ละตัวจะประกอบด้วยสารอินทรีย์ที่แตกต่างกัน เช่น มีไลโพพอลิแซ็กคาร์ไรด์ (lipopolysaccharide) ที่ผนังเซลล์เป็นลักษณะของแบคทีเรียแกรมลบ แต่แบคทีเรียแกรมบวกไม่มี หรือผนังเซลล์ของราและสาหร่ายก็มีองค์ประกอบที่แตกต่างจากแบคทีเรีย หรือความแตกต่างของไวรัสแต่ละชนิดอยู่ที่ชนิดของกรดนิวคลีอิกว่าเป็น RNA หรือ DNA

**3. ลักษณะทางเมแทบอลิซึม** (Metabolic characteristics) กระบวนการดำรงชีวิตของเซลล์เกิดจากปฏิกริยาทางเคมีที่เรียกว่า เมแทบอลิซึม (metabolism) ปฏิกริยานี้จะแตกต่างตามชนิดของจุลินทรีย์ เช่น จุลินทรีย์บางชนิดได้พลังงานจากแสง บางชนิดได้พลังงานจากการ

ออกซิเดชันสารอินทรีย์หรืออนินทรียสาร นอกจากนี้จุลินทรีย์ยังแตกต่างกันที่วิถี (pathway) ของการสังเคราะห์องค์ประกอบของเซลล์ ซึ่งปฏิกิริยาเคมีเกิดจากการทำงานของเอนไซม์

**4. ลักษณะทางพันธุกรรม** (Genetic characteristics) โดยดูจากองค์ประกอบของเบสของ DNA ซึ่ง DNA ประกอบด้วยคู่เบส คือกวานีน (G) คู่กับไซโทซีน (C) และอะดีนีน (A) คู่กับไทมีน (T) จำนวนของนิวคลีโอไทด์ในดีเอ็นเอคิดเป็นเปอร์เซนต์ของกวานีนกับไซโทซีนรวมกันที่เรียกว่า โมลเปอร์เซ็นต์ G+C (mole% G+C) ค่านี้จะแตกต่างไปตามชนิดของจุลินทรีย์ ดังแสดงในตารางที่ 1.3 หรือดูจากลำดับนิวคลีโอไทด์เบสใน DNA ซึ่งลำดับของนิวคลีโอไทด์เบสใน DNA นี้จะจำเพาะกับชนิดของจุลินทรีย์ ซึ่งเป็นหลักที่สำคัญที่สุดในการจัดหมวดหมู่จุลินทรีย์ นอกจาก DNA ในโครโมโซมแล้วเซลล์จุลินทรีย์ยังอาจมี DNA ในพลาสมิดด้วย ซึ่งพลาสมิดสามารถจำลองตัวเองได้อิสระภายในเซลล์และทำให้เซลล์แสดงลักษณะพิเศษบางอย่าง เช่น สร้างสารพิษ (toxin) การทนทานต่อสารปฏิชีวนะหรือสามารถใช้สารเคมีบางอย่างเป็นอาหารได้

**ตารางที่ 1.3** องค์ประกอบของเบสของ DNA ในแบคทีเรีย (33)

| Species | Mole % G+C Content of DNA |
|---|---|
| *Azospirillium brasilense* | 70-71 |
| *Azospirillium lipoferum* | 69-70 |
| *Campylobacter fetus* | 32-35 |
| *Campylobacte jejuni* | 31 |
| *Klebsiella pneumoniae* | 56-58 |
| *Klebsiella terrigena* | 57 |
| *Neisseria gonorrhoeae* | 50-53 |
| *Neisseria elongata* | 53-54 |
| *Pseudomonas aeruginosa* | 67 |
| *Pseudomonas cichorii* | 56 |
| *Wolinella recta* | 42-46 |
| *Wolinella. succinogenes* | 46-49 |

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

**3. วัตถุประสงค์ของโครงการ**

3.1 แยกแบคทีเรีย (isolate) ในดินที่สามารถย่อยสลาย phenolic compounds เช่น 2,4 D และ carbofuran ที่ตกค้างอยู่ในดินพื้นที่เกษตรกรรม

3.2 จำแนกชนิดของแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลายสาร 2,4 D และ carbofuran โดยใช้ cell morphology, colony morphology, biochemical characteristics และ 16S rRNA sequencing

3.3 ศึกษานิเวศวิทยาของแบคทีเรียในดินที่สามารถย่อยสลาย phenolic compounds เช่น 2,4 D และ carbofuran

**4. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ**

4.1 คัดเลือกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลาย 2,4 D และ carbofuran

4.2 ลดปริมาณการสะสมของ 2,4 D และ carbofuran ที่มีอยู่ในดิน

4.3 ทำให้ทราบกลุ่มแบคทีเรีย (community) ที่สามารถนำมาใช้ร่วมกันเพื่อให้การย่อยสลาย 2,4 D และ carbofuran สมบูรณ์และรวดเร็วยิ่งขึ้น

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

# บทที่ 2
# วัสดุอุปกรณ์ และวิธีการทดลอง

## 1. แผนการวิจัย

ขอบเขตของงานวิจัยแบ่งเป็น 6 ส่วน คือ

1. การเก็บตัวอย่างดิน
2. การแยกแบคทีเรียจากดินที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี 2,4- dichlorophenoxy-acetic acid (2,4-D) และ carbofuran
3. การทดสอบการย่อยสลาย 2,4-D และ carbofuran โดยแบคทีเรียที่แยกได้
4. การสกัดจีโนมดีเอ็นเอ (Gemomic DNA extraction) และการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอโดยวิธีการ Polymerase Chain Reaction (PCR) ของแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลาย 2,4-D และ carbofuran
5. การหาลำดับนิวคลีโอไทด์และวิเคราะห์ข้อมูลของนิวคลีโอไทด์ (DNA sequencing and Data analysis) ของแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลาย 2,4-D และ carbofuran
6. การจัดกลุ่มของแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลาย 2,4-D และ carbofuran

## 2. เครื่องมือและอุปกรณ์

1. Water bath shaker
2. Environmental shaker ES-20
3. เครื่อง High Performance Liquid Chromatography (HPLC) Shimudzu ประเทศญี่ปุ่น
4. Microcentrifuge, Eppendroff , USA.
5. Cellulose acetate milipore filter (pore size = 0.45 μm)
6. 2400 PCR Thermal Cyclers, Perkin Elmer รุ่น 2400 , USA.

## 3. สารเคมีและน้ำยา

1. di-Sodium hydrogen orthophosphate dihydrate ($Na_2HPO_4.2H_2O$)
   MW = 177.99, %assay = 98%
2. Potassium dihydrogen orthophosphate ($KH_2PO_4$)
   MW = 136.09, %assay = 99%

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

3. Ammonium chloride ($NH_4Cl$) MW = 53.49, %assay = >99
4. Magnesium sulphate ($MSO_4.7H_2O$)
   MW = 246.47, %assay = 98-102%
5. Calcium chloride ($CaCl_2.2H_2O$)
   MW = 147.02, %assay = 99-102%
6. Carbofuran ($C_{12}H_{15}NO_3$)
   Technical grade, %assay = 98%
7. 2,4- dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D), FLUKA ประเทศ SWITZERLAND
8. Purify agar, FISHER BIOTECH
9. 0.8% Agarose gel
10. 10x Tris-borate buffer (0.89 M Tris – 0.89 M boric acid,0.025 M EDTA, pH 8.3)
11. Tracking dye (0.025%Bromphenol blue, 40%Ficoll 400, 0.1%SDS)
12. 2.5 μg/ml Ethidium bromide

**4. อาหารเลี้ยงเชื้อ** (ปรับปรุงจาก Sukplang et al, 1999) (34)

**4.1. Mineral Salt Liquid Medium** ประกอบด้วย

| | | |
|---|---|---|
| - $Na_2HPO_4•2H_2O$ | 6.0 | g/l |
| - $KH_2PO_4$ | 3.0 | g/l |
| - $NH_4Cl$ | 1.0 | g/l |
| - $MgSO_4•7H_2O$ | 0.2 | g/l |
| - $CaCl_2•2H_2O$ | 0.1 | g/l |
| - 2,4-D | 0.05 | g/l |

**4.2. Mineral Salt Solid Medium** ประกอบด้วย

- Mineral Salt Liquid Medium เติม purify agar 10 g ใน 1 liter ของ liquid medium

**5. วิธีการทดลอง**

**5.1. การเก็บตัวอย่างดิน**

เลือกเก็บดินบริเวณพื้นที่เกษตรกรรมที่มีการสะสมของสารกำจัดศัตรูพืช โดยเลือกเก็บบริเวณผิวหน้าดิน ความลึกไม่เกิน 10 เซนติเมตร ทำการเก็บดินส่วน ต้นแปลง กลางแปลง ท้ายแปลง ข้างแปลง โดยใช้ช้อนพลาสติกตักดินใส่ซองพลาสติกใส จากนั้นทำการติดฉลาก และ ระบุ

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

สถานที่เก็บ วัน-เวลาที่เก็บ ผู้เก็บและนำส่งห้องปฏิบัติการโดยไม่ให้สัมผัสกับความชื้นทั้งหมด 20 ตัวอย่าง

**5.2. การหาความเข้มข้นของ 2,4-D ที่เหมาะสมสำหรับการเจริญของแบคทีเรีย**

นำดินบดละเอียด 1 g ใส่ลงใน mineral salt liquid culture medium 50 ml ที่มีความเข้มข้นของ 2,4-D แตกต่างกันคือ 0.05 g/l , 0.1 g/l , 0.2 g/l และ 0.5 g/l ทำการ incubate ที่ 30º C เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมงใน water bath shaker หรือ environmental shaker ที่ความเร็วรอบ 100-200 รอบ/นาที ปิเปตของผสมจาก liquid culture medium 50 µl ใส่ใน mineral salt solid culture medium ที่มี 2,4-D ความเข้มข้น 0.05 g/l จากนั้นทำการ spread plate แล้ว incubate ที่ 30º C 24-48 ชั่วโมง นับจำนวนจุลินทรีย์ที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ

**5.3. การหาความเข้มข้นของ carbofuran ที่เหมาะสมสำหรับการเจริญของแบคทีเรีย**

นำตัวอย่างดิน (1 ตัวอย่าง) 1 g ใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ คือ MS liquid culture medium (16) ที่มี carbofuran ความเข้มข้น 50 mg/l, 100 mg/l และ 200 mg/l เป็นแหล่งคาร์บอน ปริมาตร 50 ml บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30º C พร้อมกับเขย่า ที่ความเร็วรอบ 100-200 รอบ/นาที เป็นเวลา 3 วัน วัดการเจริญของเชื้อโดยการนับจำนวนเซลล์ที่ยังมีชีวิตอยู่ (viable cell number) โดยการ spread บน MS solid culture medium ที่มี carbofuran ความเข้มข้น 50 mg/l ทุกวันที่ 1, 2, 3 ของการเลี้ยงเชื้อ

**5.4. การแยกแบคทีเรียจากดินที่สามารถเจริญได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี 2,4-D**

นำดินบดละเอียด 1 g ใส่ลงใน liquid culture medium 50 ml ที่มีความเข้มข้นของ 2,4-D ที่เหมาะสม (จากการทดลองใน 4.2) ทำการ incubate ที่ 30º C เป็นเวลา 7 วันใน water bath shaker หรือ environmental shaker ที่ความเร็วรอบ 100-200 รอบ/นาที ในวันที่ 1, 3, 5 และ 7 ของการ incubate ปิเปตของผสมจาก liquid culture medium 50 µl ใส่ใน solid culture medium ทำการ spread plate แล้ว incubate ที่ 30º C สังเกตการเจริญของจุลินทรีย์บนอาหารเลี้ยงเชื้อ และ นำ colony แต่ละลักษณะที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อมาทำการแยกเชื้อจนได้เชื้อที่บริสุทธิ์ (pure culture)

**5.5. การแยกแบคทีเรียจากดินที่สามารถเจริญได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี carbofuran**

นำตัวอย่างดิน 1 g ใส่ลงใน 50 ml ของ MS liquid culture medium ที่มี carbofuran ความเข้มข้น 50 mg/l เป็นแหล่งคาร์บอน บ่มเชื้อที่ 30º C เป็นเวลา 10 วันพร้อมเขย่าที่ความเร็วรอบ 100-200 รอบ/นาที ในวันที่ 1, 2, 3, 5, 7 ของการบ่มเชื้อ นำ culture medium 50 µl spread บน MS solid culture medium ที่มี carbofuran ความเข้มข้น

50mg/l เป็นแหล่งคาร์บอน สังเกตการเจริญของจุลินทรีย์บนอาหารเลี้ยงเชื้อ และนำ colony แต่ละลักษณะที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อมาทำการแยกให้บริสุทธิ์ (pure culture) บน MS solid culture medium ที่มี carbofuran ความเข้มข้น 50 mg/l เป็นแหล่งคาร์บอน นำเชื้อที่บริสุทธิ์ไปทดสอบการใช้carbofuran เป็นแหล่งคาร์บอน

**5.6. ทดสอบการย่อยสลาย 2,4-D**

นำแบคทีเรียที่แยกได้มาทดสอบการย่อยสลาย 2,4-Dโดยใส่แบคทีเรียลงใน mineral salt liquid medium ที่มี 2,4-D เป็นแหล่งคาร์บอน ทำการ Incubate ที่ 30 ºC วัดการเจริญของเชื้อโดยการนับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต (viable cell number) และวัดปริมาณ 2,4-D ที่ลดลง ในวันที่ 0, 3 , 5 และ 7 ของการ incubate โดยใช้ High Performance Liquid Chromatography (HPLC) (7) โดยใช้ Waters-Novapak C18 column (5µm, 250mm X 3.6mm) เป็น stationary phase ใช้ methanol : water with 2%acetic acid (60:40) เป็น mobile phase โดยมี flow rate 0.7 ml/ min ทำการตรวจสอบ 2,4-D ด้วยเครื่อง UV spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 280 nm

ในการทดสอบว่าการเจริญของแบคทีเรียนี้เกิดขึ้นโดยการใช้ 2,4-D เป็นแหล่งคาร์บอนมิได้เกิดจากการใช้อาหารที่สะสมอยู่ภายในเซลล์ จึงมีการทำชุดควบคุมการเจริญ (growth control) ซึ่งประกอบด้วย Mineral Salt liquid medium ที่ไม่มี 2,4-D ผสมอยู่และเติมเชื้อแบคทีเรียลงไป สังเกตการเจริญที่แตกต่างกันของแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อทั้งที่มี 2,4-D และไม่มี 2,4-D และนอกจากนี้เพื่อเป็นการยืนยันว่าการลดลงของ 2,4-D เกิดขึ้นเนื่องจากการทำงานของแบคทีเรีย มิได้เกิดจากการสลายตัวของ 2,4-D เองโดยธรรมชาติ (autodegradation) จึงมีการทำชุดควบคุม (autodegradation control) ซึ่งประกอบด้วย Mineral Salt liquid mediumที่ผสม 2,4-D แต่ไม่เติมเชื้อแบคทีเรียลงไป โดยทำการวัดปริมาณของ 2,4-D ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแบคทีเรียเจริญอยู่ เปรียบเทียบกับอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่มีการเจริญของแบคทีเรียเจริญในอาหารนั้น

**5.7. ทดสอบการย่อยสลาย carbofuran**

นำแบคทีเรียที่แยกได้แต่ละสายพันธุ์มาเพิ่มจำนวนใน MS solid culture medium ที่มี carbofuran ความเข้มข้น 50 mg/ l บ่มเชื้อที่ 30°C เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง ใช้ swab ป้ายเชื้อมาใส่ใน 0.85% Sodium chloride และปรับความขุ่นให้ได้เท่ากับ McFarland Standard number 0.5 (จำนวนเชื้อประมาณ 1.5 x $10^8$ CFU/ml)

นำเชื้อที่ปรับความขุ่นแล้วปริมาตร 1 ml เติมลงในชุดทดลองที่ 1 ซึ่งมี MS liquid culture medium ปริมาตร 50 ml ที่มี carbofuran ความเข้มข้น 50 mg/l เป็นแหล่งคาร์บอนให้กับแบคทีเรียและในชุดทดลองที่ 2 MS liquid culture medium ที่ไม่มี carbofuran ผสมอยู่ ซึ่งในชุดทดลองนี้ใช้ เป็น growth control ทดสอบว่าการเจริญของแบคทีเรียนี้เกิดขึ้นโดยการใช้ carbofuran เป็นแหล่งคาร์บอน มิได้เกิดจากการใช้อาหารที่สะสมอยู่ภายในเซลล์

(endogenous source) ชุดทดลองที่ 3 เป็น MS liquid culture medium ที่มี carbofuran ความเข้มข้น 50 mg/l แต่ไม่มีการเติมแบคทีเรีย เพื่อใช้เป็น autodegradation control ยืนยันว่าการลดลงของ carbofuran เกิดขึ้นเนื่องจากการทำงานของแบคทีเรีย มิได้เกิดจากการสลายตัวเองโดยธรรมชาติ

นำชุดทดลองทั้ง 3 ชุด บ่มที่ 30º C พร้อมกับเขย่าที่ความเร็วรอบ 100-200 รอบ/นาที วัดการเจริญของเชื้อโดยการนับจำนวนเซลล์ที่ยังมีชีวิตอยู่ (viable cell number) โดยการ spread บน MS solid medium และตรวจวัดปริมาณ carbofuran

ตรวจวัดปริมาณ carbofuran โดยนำสารละลายจากชุดทดลองที่ 1 และ 2 ปริมาตร 1.5 ml ปั่นที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบ/นาที เวลา 5 นาที กรองเอาเฉพาะส่วนใสนำไปตรวจวัดปริมาณ carbofuran โดยใช้ High-Performance Liquid Chromatography (HPLC) โดยใช้ $C_{18}$ column เป็น stationary phase และใช้ water : acetonitrile (60 : 40 by volume) เป็น mobile phase ซึ่งมี flow rate เท่ากับ 1 ml/min และตรวจสอบปริมาณ carbofuran โดยใช้ UV spectrophotometer detector ความยาวคลื่น 220 nm

**5.8. การจัดกลุ่มชนิดของแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลาย 2,4-D และ Carbofuran**

จัดกลุ่มของแบคทีเรียที่ย่อยสลาย 2,4-D และ Carbofuran โดยอาศัยลักษณะโคโลนีของแบคทีเรีย รูปร่างและการติดสีจาก Gram's stain และทดสอบชีวเคมีเบื้องต้น ได้แก่ Oxidase test, Catalase test, Triple Sugar Iron (TSI) test, glucose OF test และ Motility test เป็นต้น

**5.9. การเลี้ยงเชื้อใน liquid culture medium (เตรียมสกัด DNA)**

1. Inoculate เชื้อใส่ใน liquid culture medium 2 ml
2. Incubate ที่ 30 °C เป็นเวลา 18 – 24 ชั่วโมงใน environmental shaker ที่ความเร็ว รอบ 100- 200 รอบ/นาที
3. นำเชื้อที่เจริญเต็มที่แล้วไปสกัด DNA ต่อไปตามลำดับ

**5.10. การเตรียมสกัดจีโนมดีเอ็นเอจากแบคทีเรีย**

5.10.1. วิธี Phenol : Chloroform (35)

1. นำแบคทีเรียที่เจริญเติบโตเต็มที่แล้ว (18-24 ชั่วโมง) 5 มิลลิลิตรใส่หลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตรมาปั่นตกตะกอนที่ความเร็วรอบ 4000 รอบ/ นาที เป็นเวลา10 นาที ดูดอาหารเลี้ยงเชื้อออกให้หมดด้วย Pasteur pipette
2. ละลายตะกอนด้วย TE buffer 567 ไมโครลิตร จากนั้นเติม 10% SDS 30 ไมโครลิตรและ proteinase K ความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร 3 ไมโครลิตร ตามลำดับ และบ่มเชื้อที่ 37 องศาเซลเซียส 1 ชั่วโมง
3. เติม Chloroform/Isoamyl alcohol ในอัตราส่วน 24:1 จำนวน 1.5 มิลลิลิตร ผสมให้

เข้ากันอย่างเบาๆ

4. ปั่นที่ 4000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที
5. ดูดชั้นน้ำที่อยู่ชั้นบนสุดด้วย Pasteur pipette ใส่หลอดใหม่
6. เติม Chloroform/ Isoamyl alcohol ให้มีปริมาตรเท่าชั้นน้ำ แล้วทำการสกัดด้วยการเขย่าอย่างเบาอีก 2 ครั้ง
7. เก็บชั้นน้ำเพียงชั้นเดียวมาเติม 5 M NaCl
8. เติม 95% เอธานอล ปริมาตร 2 เท่าของปริมาตรชั้นน้ำ ผสมให้เข้ากันโดยการกลับหลอดอย่างเบาๆ
9. ปั่นสารละลาย Chromosomal DNA ที่ 4000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที
10. นำตะกอนไปทำให้แห้งที่อุณหภูมิแห้ง
11. ละลายตะกอนด้วยสารละลาย TE buffer ประมาณ 20 –50 ไมโครลิตร
12. เก็บสารละลาย Chromosomal DNA ที่อุณหภูมิ 4 $^{\circ}$C

5.10.2. วิธี Cetylltrimethyl ammonium bromide (CTAB) (36)

1. นำแบคทีเรียที่เจริญเติบโตเต็มที่แล้ว (18-24 ชั่วโมง) 5 มิลลิลิตรใส่หลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตรมาปั่นตกตะกอนที่ความเร็วรอบ 10000 รอบ/ นาที เป็นเวลา 2 นาที
2. ละลายตะกอนด้วย TE buffer 567 ไมโครลิตร จากนั้นเติม 10% SDS 30 ไมโครลิตร และ proteinase K ความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร 3 ไมโครลิตร ตามลำดับ และบ่มเชื้อที่ 37 องศาเซลเซียส 1 ชั่วโมง
3. เติม NaCl ความเข้มข้น 5 โมลาร์ 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน จากนั้นเติมสารละลาย CTAB/ NaCl 80 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน จากนั้นนำไปบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส 10 นาที
4. เติม choroform/isoamyl alcohol 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปปั่น 4 – 5 นาที จากนั้นดูดส่วนใสไปใส่หลอดใหม่
5. เติม phenol/chloroform/isoamyl alcohol เท่าตัว ผสมให้เข้ากัน นำไปปั่น 5 นาที จากนั้นนำส่วนใสไปใส่หลอดใหม่
6. เติม isopropanol 0.6 เท่า เขย่าจนกระทั่งดีเอ็นเอตกตะกอน
7. นำส่วนที่ตกตะกอนมาเติม 70 % ethanol 1 มิลลิลิตรเพื่อล้างตะกอนดีเอ็นเอ
8. ปั่น 5 นาที และเทส่วนบนออก เหลือตะกอน,ปล่อยทิ้งไว้ให้แห้ง ตามลำดับ
9. ละลายตะกอนด้วย TE buffer 10-20 ไมโครลิตร
10. เก็บดีเอ็นเอไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส

**5.11. การเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอโดยวิธีการ PCR (Polymerase Chain Reaction)** (37)

การเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอโดยวิธีการ PCR นำดีเอ็นเอของแบคทีเรียมา 10 ไมโครลิตร หรือนำโคโลนีของแบคทีเรียมาละลายในน้ำกลั่น 100 ไมโครลิตรผสมให้เข้ากันและไปทำให้เซลล์แตกโดยไปบ่มที่ 70 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำ Crude lysate 1 ไมโครลิตรเติมน้ำกลั่น 19 ไมโครลิตรเพื่อใช้เป็น PCR template และไพรเมอร์ universal 16SRNA (5'AAGGAGGTGATCCAGCCGCA3' และ 5'AGAGTTTGATCCTGGCTCAG3') ซึ่งขนาดประมาณ1.5 กิโลเบส โดยในแต่ละปฏิกิริยาประกอบด้วยสารเคมีดังนี้

| | |
|---|---|
| 2.5 U of Taq DNA polymerase | 0.5 ul |
| 10x taq DNA polymerase buffer | 10 ul |
| 50 umol dNTP | 2 ul |
| 20 pmol univeral forward primer | 2 ul |
| 20 pmol univeral reverse primer | 2 ul |
| distilled water | up to 100 |
| template DNA | 1 ul |

ใช้เครื่อง 2400 Thermal Cyclers ทำปฏิกริยา จำนวน 35 รอบโดยมี condition ดังนี้

| | | |
|---|---|---|
| Preheating | 94 °C | 40 วินาที |
| Denaturation | 94 °C | 1 นาที |
| Annealing | 55 °C | 1 นาที |
| Extension | 72 °C | 10 นาที |
| Final product | เก็บที่ 4 C | |

เมื่อได้ PCR Product นำไปทำ electrophoresisโดยใช้ PCR product 10 ไมโครลิตร loading dye 2 ไมโครลิตร

**5.12. การหาลำดับนิวคลีโอไทด์และการวิเคราะห์ข้อมูลของลำดับนิวคลีโอไทด์ (16S rRNA gene sequencing and Data analysis)**

ดีเอ็นเอที่ถูกเพิ่มจำนวนโดยวิธี PCR ถูกทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ Promega PCR Wizard kit (Promega Corp., Madison. WI) แล้วหาลำดับนิวคลีโอไทด์โดยใช้เครื่อง ABI PRISM 3100 Genetic Big Dye Terminator Cycle Sequencing (BIOSERVICE UNIT, Bangkok, Thailand). ข้อมูลของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ จะถูกเปรียบเทียบกับข้อมูลของลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rRNA บริเวณลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เป็นบริเวณอนุรักษ์ (conserved regions) ที่ได้ถูกรายงานไว้ก่อนหน้านี้ และลักษณะของโครงสร้างทุติยภูมิตามที่ได้อ้างอิงไว้

จากนั้นสร้าง phylogenetic tree โดยเริ่มจากการทำ multiple alignment ลำดับนิว-คลีโอไทด์ที่ได้ โดยใช้ clustal W ข้อมูลที่ได้สามารถนำไปวิเคราะห์และสร้าง phylogenetic tree โดยตรงด้วย DNAmlk (DNA Maximum Likelihood program with molecular clock) (38)

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

# บทที่ 3
# ผลการวิจัย

## 1. การเก็บตัวอย่างดิน

การเลือกเก็บดินบริเวณพื้นที่ที่มีการเพาะปลูกพืชต่างๆ กัน ดังแสดงในตารางที่ 3.1 ได้ดินทั้งหมด 20 ตัวอย่าง เพื่อนำมาทำการหาเชื้อแบคทีเรียที่สามารถเจริญได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี 2,4-D และ carbofuran ผสมอยู่ ดินที่ใช้ในการวิจัยนี้ได้มาจากดินในบริเวณที่มีการกสิกรรม ซึ่งคาดว่ามีการใช้ปุ๋ยหรือยาฆ่าวัชพืชมาก่อน ดินจำนวนทั้งสิ้น 20 ตัวอย่าง มาจากบริเวณที่ทำการปลูกพืชต่างชนิดกันและอยู่ในพื้นที่ต่าง ๆ ดังแสดงในตารางที่ 3.1

**ตารางที่ 3.1** สถานที่เก็บตัวอย่างดิน

| พื้นที่การเกษตร | สถานที่ |
|---|---|
| แปลงไร่อ้อย | สวนอาจารย์ตึ๋ง วัดป่างิ้ว อ.สามโคก จ. ปทุมธานี |
| แปลงส้มเขียวหวาน | สวนพีระพร ต.บ้านงิ้ว อ.สามโคก จ. ปทุมธานี |
| แปลงข้าวโพด | สวนหน้าเอก ต.บ้านงิ้ว อ.สามโคก จ. ปทุมธานี |
| แปลงโหระพา | บ้านคลองสิบสอง ต.หลักหก อ.เมือง จ.ปทุมธานี |
| แปลงกุยช่าย, คะน้า | สวนประกอบ ต.บางหลวง อ.เมือง จ.ปทุมธานี |
| แปลงถั่วเหลือง, ไร่อ้อย | มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ อ.กำแพงแสน จ.นครปฐม |

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

**2. การหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ 2,4-D สำหรับการเจริญของแบคทีเรียในดิน**

เมื่อทำการนับจำนวนจุลินทรีย์ที่เลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ (mineral salt liquid medium) ที่มีปริมาณ 2,4-D ที่แตกต่างกัน พบว่าแบคทีเรียที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อนั้นมีจำนวนแตกต่างกันดังแสดงในตารางที่ 3.2 ซึ่งพบว่าความเข้มข้นของ 2,4-D ที่เหมาะสมที่ทำให้แบคทีเรียเจริญได้ดีที่สุดคือ 50 mg/l จึงใช้ความเข้มข้น ที่ 50 mg/l นี้ในการทดลองต่อ ๆ ไป

**ตารางที่ 3.2** จำนวนแบคทีเรียที่เจริญใน mineral salt liquid medium ที่มี 2,4-D ความเข้มข้นต่าง ๆ กันตั้งแต่ 50-500 mg/l

| ความเข้มข้น (mg/l) | จำนวนแบคทีเรีย (CFU/ml) |
|---|---|
| 50 | $11.4\times10^{6}$ |
| 100 | $3.8\times10^{5}$ |
| 200 | $5.1\times10^{5}$ |
| 500 | $5.5\times10^{5}$ |

**3. การแยกแบคทีเรียจากดินที่สามารถเจริญได้ใน 2,4-dichlorophenoxy acetic acid**

จากการแยกแบคทีเรียจากดินในพื้นที่เกษตรกรรม ที่สามารถเจริญได้ใน 2,4-D โดยนำดินบดละเอียด 1 g ใส่ลงใน liquid culture medium 50 ml ที่มี 2,4-D เป็นแหล่งคาร์บอน แล้วแยกเชื้อให้บริสุทธิ์โดยการ streak ลงบน solid culture medium ที่มี 2,4-D เป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าแบคทีเรียที่แยกได้มีจำนวน 32 isolates ดังนี้

| | | | |
|---|---|---|---|
| แปลงส้มเขียวหวาน (จ. ปทุมธานี) | จำนวน | 1 | สายพันธุ์ |
| แปลงกุยช่าย (จ. ปทุมธานี) | จำนวน | 1 | สายพันธุ์ |
| แปลงคะน้า (จ. ปทุมธานี) | จำนวน | 1 | สายพันธุ์ |
| แปลงโหระพา (จ. ปทุมธานี) | จำนวน | 1 | สายพันธุ์ |
| แปลงข้าวโพด (จ. ปทุมธานี) | จำนวน | 1 | สายพันธุ์ |
| แปลงไร่อ้อย (จ. ปทุมธานี) | จำนวน | 2 | สายพันธุ์ |
| แปลงถั่วเหลือง (ม.เกษตรศาสตร์ กำแพงแสน) | จำนวน | 16 | สายพันธุ์ |
| แปลงไร่อ้อย (ม.เกษตรศาสตร์ กำแพงแสน) | จำนวน | 9 | สายพันธุ์ |

จากจำนวนเชื้อทั้งหมด 32 สายพันธุ์ พบว่ามี 4 สายพันธุ์ที่แตกต่างกัน จึงกำหนดสายพันธุ์เป็นสายพันธุ์ที่ 1, 2, 3 และ 4 เพื่อนำมาทำการทดสอบความสามารถในการย่อยสลาย 2,4-D ต่อไป

**4. การทดสอบการย่อยสลาย 2,4-dichlorophenoxy acetic acid**

4.1. การเจริญของแบคทีเรีย

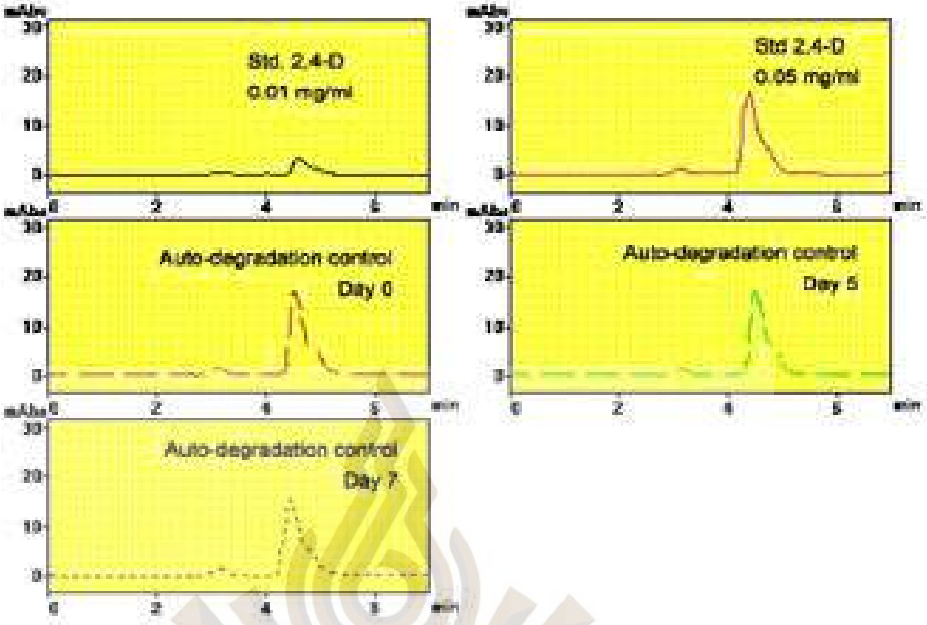
เมื่อนำแบคทีเรียที่แยกได้มาทดสอบการย่อยสลายโดยใส่แบคทีเรียลงใน mineral salt liquid medium ที่มี 2,4-D เป็นแหล่งคาร์บอน วัดการเจริญของแบคทีเรียโดยการนับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต (viable cell number) โดยเปรียบเทียบกับ control ซึ่งเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่มี 2,4-D พบว่า จำนวนแบคทีเรียที่มีชีวิตของ control มีจำนวนค่อนข้างคงที่ในวันต่อมา ขณะที่จำนวนแบคทีเรียที่มีชีวิตที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี 2,4-D มีจำนวนเพิ่มขึ้นดังตัวอย่างแสดงในตารางที่ 3.3

**ตารางที่ 3.3** จำนวนแบคทีเรียที่มีชีวิต (viable cell number) เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่มี 2,4-D (control) และมี 2,4-D

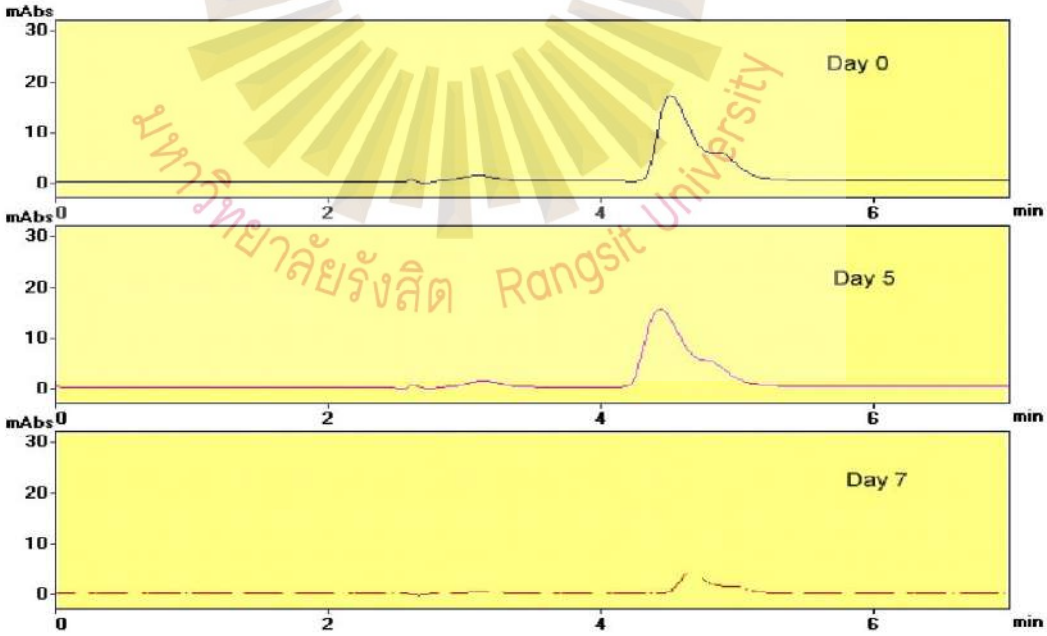
| Strain | viable cell count ( CFU/ml ) | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Day-0 | | Day-1 | | Day-3 | | Day-5 | | Day-7 | |
| | Control | 2,4-D | Control | 2,4-D | Control | 2,4-D | Control | 2,4-D | Control | 2,4-D |
| 1 | $7.5x10^7$ | $7.5x10^7$ | $9.6x10^7$ | $1.2x10^8$ | $1.5x10^8$ | $3.6x10^8$ | $1.2x10^8$ | $1.7x10^9$ | $7.3x10^7$ | $3.1x10^9$ |
| 2 | $5.2x10^7$ | $5.2x10^7$ | $4.3x10^7$ | $7.1x10^7$ | $9.5x10^7$ | $1.4x10^8$ | $6.8x10^7$ | $2.2x10^8$ | $1.7x10^7$ | $1.1x10^8$ |
| 3 | $4.5x10^7$ | $4.5x10^7$ | $1.6x10^7$ | $9.4x10^7$ | $8.5x10^7$ | $2.2x10^8$ | $7.5x10^7$ | $2.8x10^8$ | $2.2x10^7$ | $1.7x10^8$ |
| 4 | $6.9x10^7$ | $6.9x10^7$ | $5.9x10^7$ | $6.2x10^7$ | $1.010^8$ | $1.4x10^8$ | $1.2x10^8$ | $2.2x10^9$ | $1.7x10^8$ | $2.5x10^9$ |

4.2. การวิเคราะห์ปริมาณของ 2,4-D

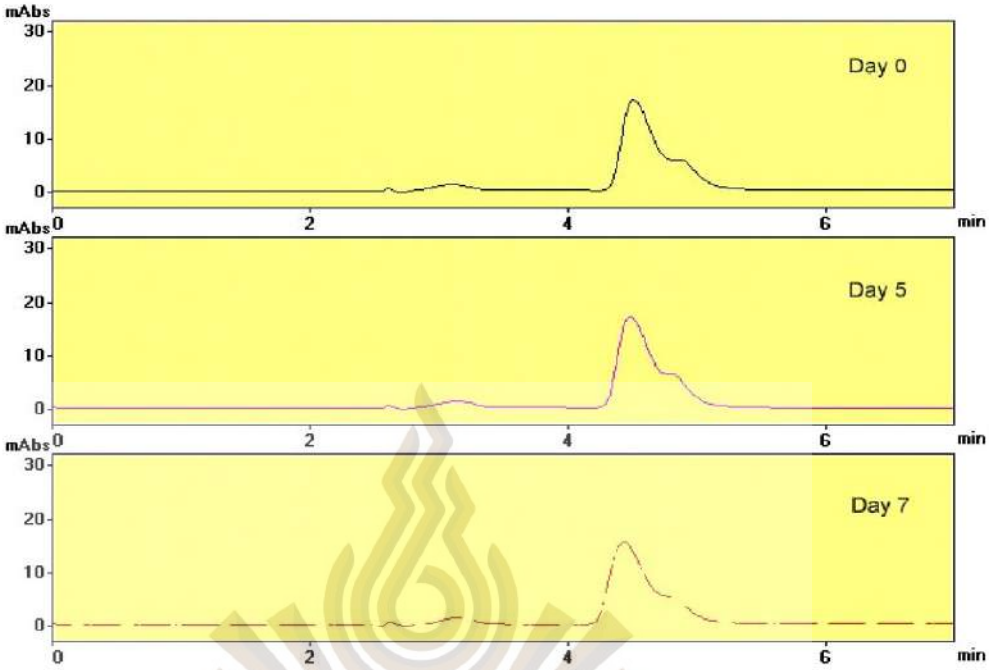
นำแบคทีเรียมาทำการทดสอบการย่อยสลาย 2,4-D โดยการตรวจวัดปริมาณของ 2,4-D ที่ลดลงด้วย High Performance Liquid Chromatography (HPLC) ซึ่งจะทำการตรวจวัดการย่อยสลายเมื่อเพาะเลี้ยงแบคทีเรียใน 2,4-D ในวันที่ 0, 3, 5 และ 7 พร้อมทั้งทำชุดควบคุมการทดสอบการย่อยสลายที่เกิดขึ้นเอง (autodegradation control) พบว่า การย่อยสลาย 2,4-D เกิดขึ้นในวันที่ 5 เล็กน้อยและสามารถย่อยสลายได้เกือบหมดในวันที่ 7 ในขณะที่ autodegradation control ไม่มีการเปลี่ยนแปลง ดังแสดงในรูปที่ 3.1- 3.3




**รูปที่ 3.1** autodegradation control ของ 2,4-D ที่ไม่เกิดการสลายในวันที่ 0, 5 และ 7




**รูปที่ 3.2** การย่อยสลายของ 2,4-D โดยแบคทีเรียสายพันธุ์ที่1 ในวันที่ 5 (คิดเป็นร้อยละ 25) และวันที่ 7 (คิดเป็นร้อยละ 75)




**รูปที่ 3.3** แสดงการไม่มีการย่อยสลาย 2,4-D โดยแบคทีเรียสายพันธุ์ที่ 2,3 และ 4

**5. การจัดกลุ่มชนิดของแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลาย 2,4-D**

นำแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลาย 2,4-D มาทำการแยกวินิจฉัยศึกษาลักษณะรูปร่าง (cell morphology) ของเชื้อโดยทำการย้อมสี และทำการทดสอบคุณสมบัติทางด้านชีวเคมีของแบคทีเรีย ให้ผลดังนี้

Gram negative bacilli, non lactose fermenter

Catalase test : +

Oxidase test : +

Triple Sugar Iron (TSI) test : K/N

Glucose OF test : -/-

Motility test : +

จากผลการทดสอบสามารถจัดจำแนกแบคทีเรียนี้ได้ว่าน่าจะอยู่ในกลุ่ม Glucose-non fermenting gram negative bacilli หรือ GNF bacilli

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

**6. การหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ carbofuran สำหรับการเจริญของแบคทีเรีย**

เมื่อทำการนับจำนวนจุลินทรีย์ที่เลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ (mineral salt liquid medium) ที่มีปริมาณ carbofuran ที่แตกต่างกัน พบว่าแบคทีเรียที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อนั้นมีจำนวนแตกต่างกันดังแสดงในตารางที่ 3.4 ซึ่งพบว่าความเข้มข้นของ carbofuran ที่เหมาะสมที่ทำให้แบคทีเรียเจริญได้ดีที่สุดคือ 50 mg/l จึงใช้ความเข้มข้นที่ 50 mg/l นี้ในการทดลองต่อ ๆ ไป

**ตารางที่ 3.4** ปริมาณเชื้อแบคทีเรียที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีความเข้มข้นของ carbofuran แตกต่างกัน

| carbofuran (mg/l) | day 0 (CFU/ml) | day 1 (CFU/ml) | day 2 (CFU/ml) | day 3 (CFU/ml) |
|---|---|---|---|---|
| 50 | $1.25\times10^{8}$ | $3.3\times10^{8}$ | $1.67\times10^{9}$ | $1.88\times10^{9}$ |
| 100 | $1.1\times10^{8}$ | $3.1\times10^{8}$ | $5.2\times10^{6}$ | $3.4\times10^{6}$ |
| 200 | $1.8\times10^{8}$ | $5.7\times10^{8}$ | $1.04\times10^{7}$ | $7.3\times10^{6}$ |

**7. การแยกแบคทีเรียที่สามารถเจริญได้ใน carbofuran**

จากตัวอย่างดิน 20 ตัวอย่างข้างต้น พบแบคทีเรียที่สามารถเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี carbofuran จำนวน 46 isolates คือ 12 isolates จากตัวอย่างดินแปลงโหระพา จ. ปทุมธานี และ 34 isolates จากดินเกษตรกรรม อ.กำแพงแสน จ. นครปฐม จากจำนวนเชื้อที่ได้ทั้งหมด พบว่ามี 5 สายพันธุ์ที่แตกต่างกัน กำหนดเป็น สายพันธุ์ 1, 2, 3, 4 และ 5 จากนั้นนำทั้ง 5 สายพันธุ์มาทำการทดสอบความสามารถในการย่อยสลาย carbofuran

**8. การทดสอบการย่อยสลาย carbofuran**

8.1. การเจริญของแบคทีเรีย

เมื่อนำแบคทีเรียที่แยกได้มาทดสอบการย่อยสลายโดยใส่แบคทีเรียลงใน mineral salt liquid medium ที่มี carbofuran เป็นแหล่งคาร์บอน วัดการเจริญของแบคทีเรียโดยการนับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต (viable cell number) โดยเปรียบเทียบกับ control ซึ่งเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่มี carbofuran พบว่า จำนวนแบคทีเรียที่มีชีวิตของ control มีจำนวนค่อนข้างคงที่ในวันต่อมา ขณะที่จำนวนแบคทีเรียที่มีชีวิตที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี carbofuran มีจำนวนเพิ่มขึ้นดังตัวอย่างแสดงในตารางที่ 3.5

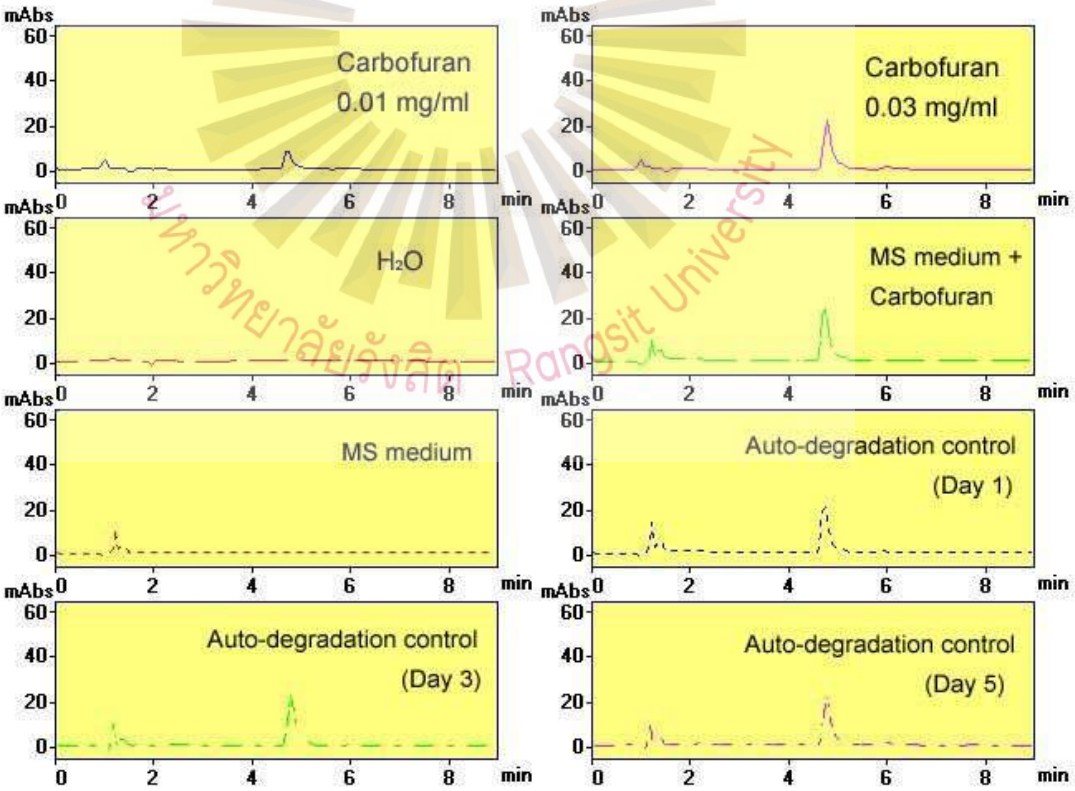
8.2. การวิเคราะห์ปริมาณของ carbofuran

นำแบคทีเรียมาทำการทดสอบการย่อยสลาย carbofuran โดยการตรวจวัดปริมาณของ carbofuran ที่ลดลงด้วย High Performance Liquid Chromatography (HPLC) ซึ่งจะทำการตรวจวัดการย่อยสลายเมื่อเพาะเลี้ยงแบคทีเรียใน carbofuran ในวันที่ 0, 3 และ 5พร้อมทั้งทำชุด

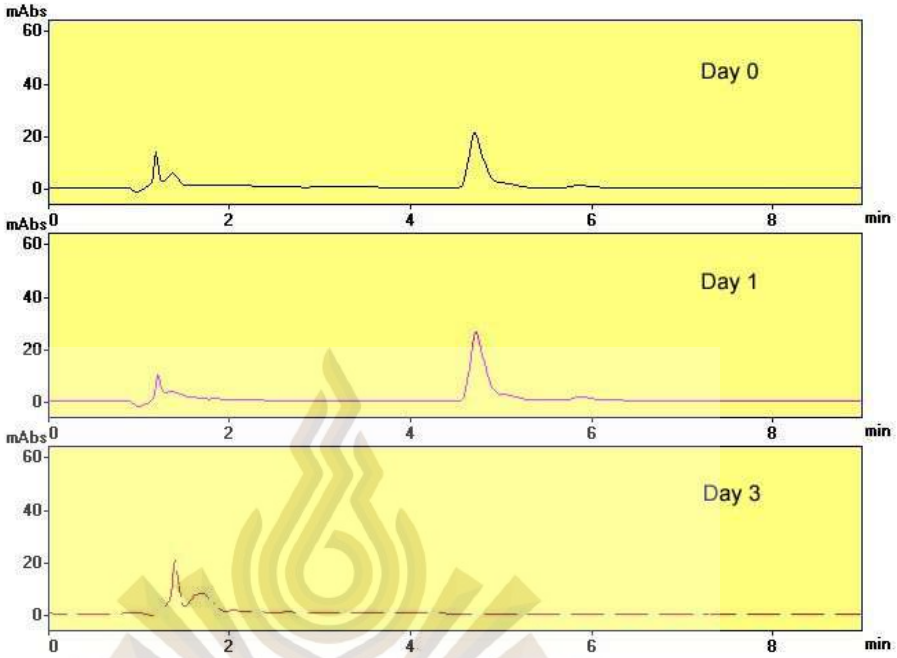
ควบคุมการทดสอบการย่อยสลายที่เกิดขึ้นเอง (autodegradation control) ซึ่งประกอบด้วย MS liquid culture ที่ไม่มีแบคทีเรียเจริญอยู่ พบว่าในชุดทดลองที่มีแบคทีเรียจะมีปริมาณ carbofuran ลดลงและไม่สามารถตรวจพบ carbofuran ได้เมื่อบ่มเชื้อไว้เป็นเวลา 3 วัน ในขณะที่ปริมาณ carbofuran ในชุดทดลองที่ไม่มีแบคทีเรียจะคงที่ตลอดการทดลอง ดังแสดงในรูปที่ 3.4- 3.9

**ตารางที่ 3.5** จำนวนแบคทีเรียที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี carbofuran และไม่มี Carbofuran

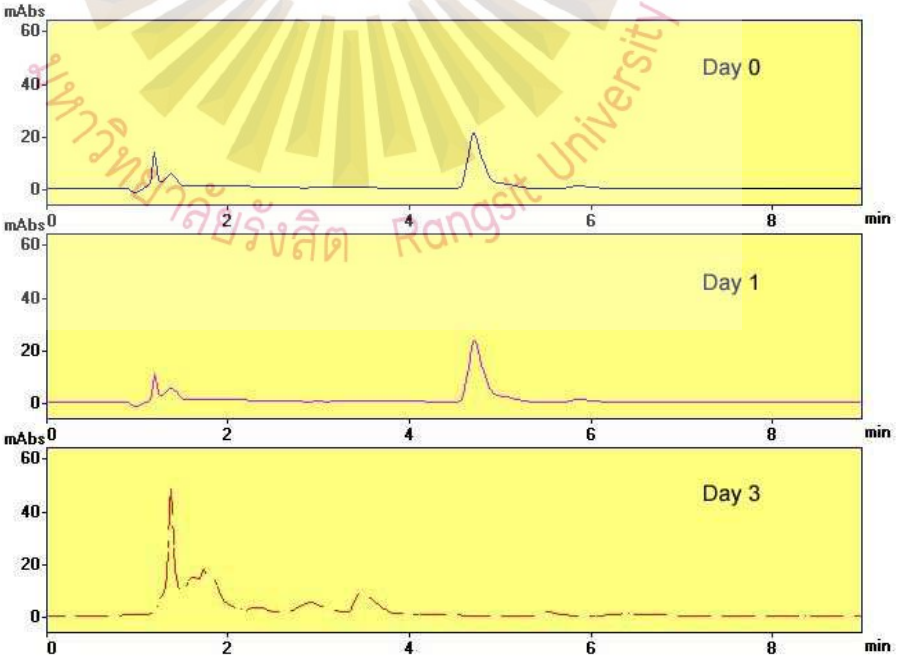
| Isolate | จำนวนเชื้อใน MS ที่ไม่มี carbofuran (CFU/ml) | | | | จำนวนเชื้อใน MS ที่มี carbofuran (CFU/ml) | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | day 0 | day 1 | day 2 | day 3 | day 0 | day 1 | day 2 | day 3 |
| CF1 | $2.45 \times 10^6$ | $2.84 \times 10^6$ | $8.4 \times 10^5$ | $4.7 \times 10^4$ | $2.45 \times 10^6$ | $4.0 \times 10^6$ | $7.8 \times 10^6$ | $9.7 \times 10^6$ |
| CF2 | $4.9 \times 10^6$ | $6.8 \times 10^6$ | $1.38 \times 10^6$ | $7.2 \times 10^5$ | $4.9 \times 10^6$ | $2.8 \times 10^6$ | $4.3 \times 10^6$ | $1.92 \times 10^7$ |
| CF3 | $2.65 \times 10^7$ | $2.08 \times 10^7$ | $6.4 \times 10^6$ | $3.5 \times 10^5$ | $2.65 \times 10^7$ | $5.2 \times 10^7$ | $6.3 \times 10^7$ | $7.0 \times 10^7$ |
| CF4 | $2.14 \times 10^7$ | $2.22 \times 10^7$ | $1.38 \times 10^7$ | $1.09 \times 10^6$ | $2.14 \times 10^7$ | $2.27 \times 10^7$ | $3.17 \times 10^7$ | $7.9 \times 10^7$ |
| CF5 | $4.35 \times 10^5$ | $3.2 \times 10^5$ | $3.1 \times 10^4$ | $2.8 \times 10^4$ | $4.35 \times 10^5$ | $6.4 \times 10^5$ | $3.0 \times 10^6$ | $4.7 \times 10^6$ |



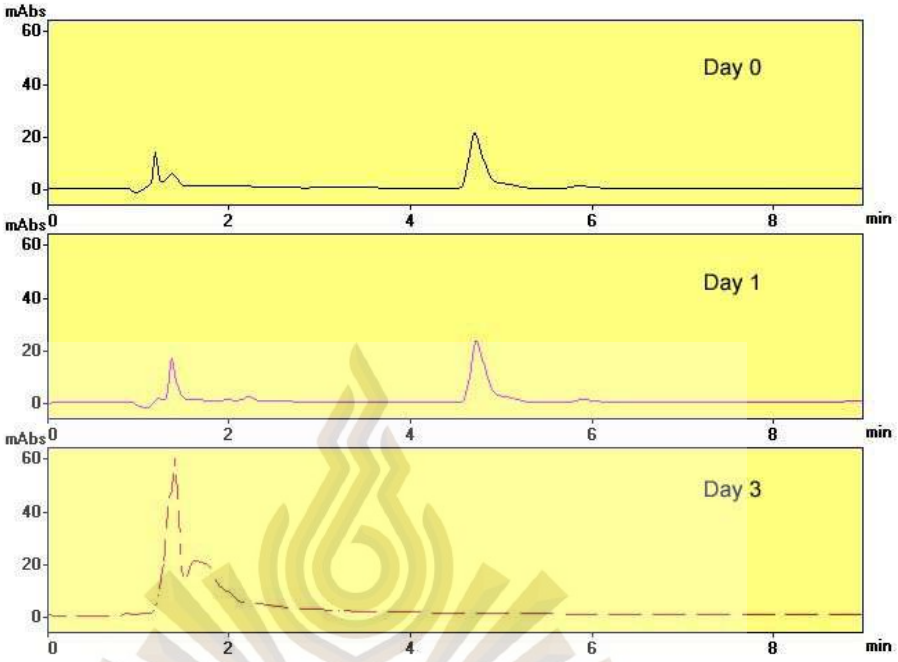

**รูปที่ 3.4** ชุดควบคุม (control set) สำหรับการตรวจวัด carbofuran ด้วย HPLC



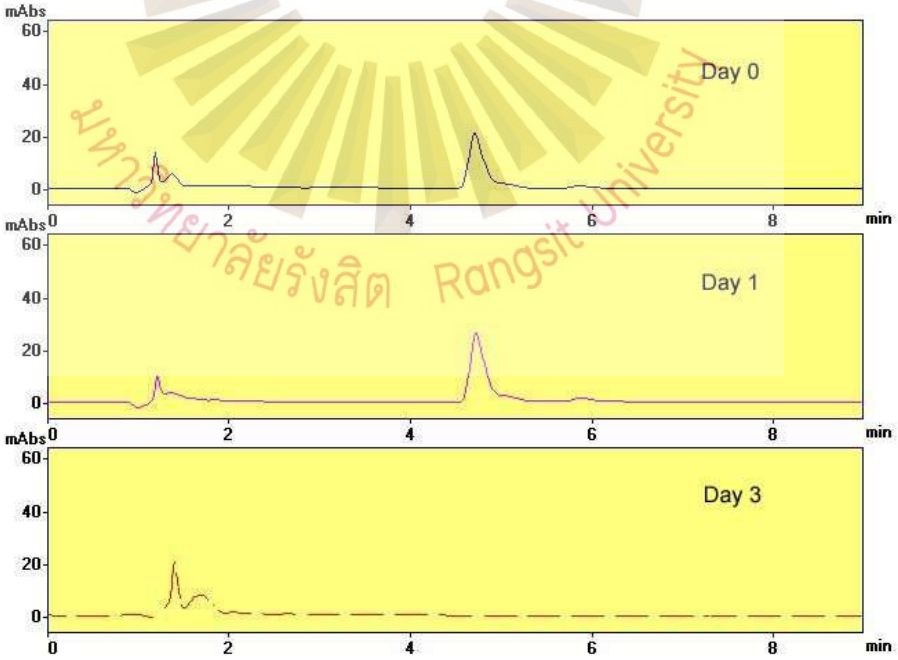

**รูปที่ 3.5** การลดลงของปริมาณ carbofuran ใน culture ของสายพันธุ์ที่1 ที่ตรวจวัดโดย HPLC



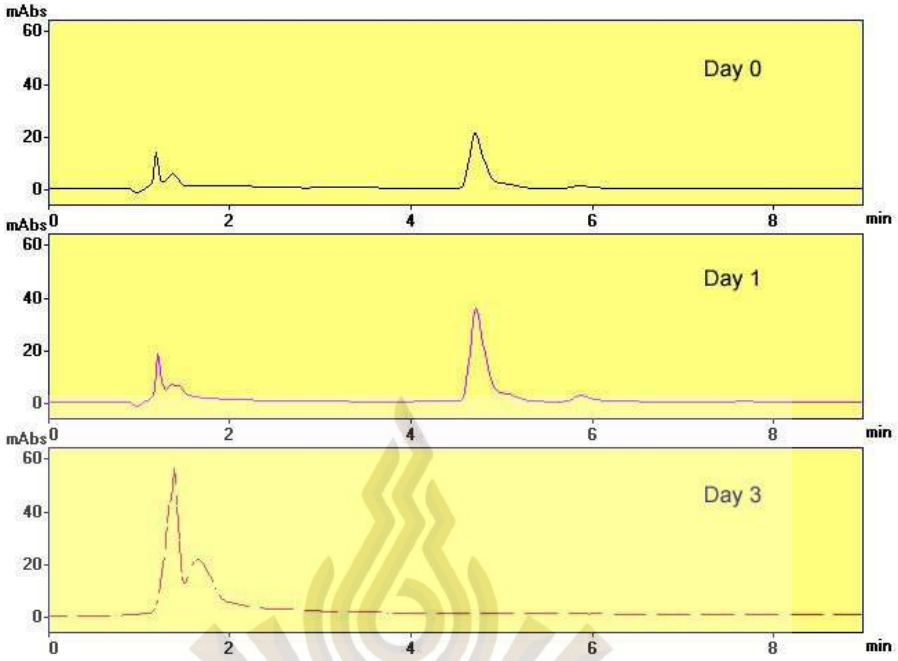

**รูปที่ 3.6** การลดลงของปริมาณ carbofuran ใน cultureของสายพันธุ์ที่ 2 ที่ตรวจวัดโดย HPLC




**รูปที่ 3.7** การลดลงของปริมาณ carbofuran ใน cultureของสายพันธุ์ที่ 3 ที่ตรวจวัดโดย HPLC




**รูปที่ 3.8** การลดลงของปริมาณ carbofuran ใน culture ของสายพันธุ์ที่4 ที่ตรวจวัดโดย HPLC




**รูปที่ 3.9** การลดลงของปริมาณ carbofuran ใน culture ของสายพันธุ์ที่5 ที่ตรวจวัดโดย HPLC

**9. การจัดกลุ่มชนิดของแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลาย carbofuran**

นำแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลาย carbofuran มาทำการแยกวินิจฉัย ศึกษาลักษณะรูปร่าง (cell morphology) ของเชื้อโดยทำการย้อมสี และทำการทดสอบคุณสมบัติทางด้านชีวเคมีของแบคทีเรีย ให้ผลดังแสดงในตารางที่ 3.6

**ตารางที่ 3.6** การจัดกลุ่มแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลาย carbofuran จาก20 ตัวอย่างดิน

| Isolate | Gram's stain | Glucose fermenter | Glucose oxidizer | Oxidase test | Catalase test | TSI |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | Gram negative bacilli | - | + | + | + | K/N |
| 2 | Gram negative bacilli | - | + | + | + | K/N |
| 3 | Gram negative bacilli | - | + | + | + | K/N |
| 4 | Gram negative bacilli | - | + | + | + | K/N |
| 5 | Gram negative bacilli | - | + | + | + | K/N |

จากผลการทดสอบสามารถจัดจำแนกเชื้อได้ว่าน่าจะอยู่ในกลุ่ม Glucose-non fermenting gram negative bacilli หรือ GNF bacilli

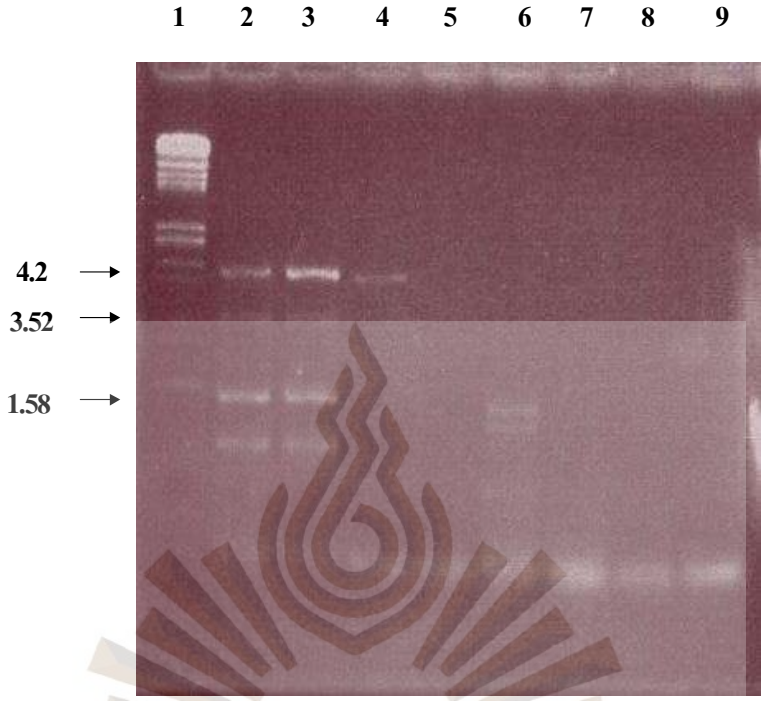
จากการศึกษาลักษณะรูปร่างของเซลล์ (cell morphology) ลักษณะของโคโลนี (colony morphology) และคุณสมบัติทางด้านชีวเคมีของแบคทีเรียที่ย่อยสลาย carbofuran และ 2,4-D ที่แยกได้ทั้งสิ้น 6 สายพันธุ์ คือ แบคทีเรียที่ย่อยสลาย 2,4-D ที่กำหนดว่าเป็นสายพันธุ์ที่ 1 และแบคทีเรียที่ย่อยสลาย carbofuran ที่กำหนดว่าเป็นสายพันธุ์ 1, 2, 3, 4 และ 5 นั้น พบว่าแบคทีเรียที่ย่อยสลาย 2,4-D ที่กำหนดว่าเป็นสายพันธุ์ที่ 1 นั้นมีรูปร่างของเซลล์ ลักษณะของโคโลนี รวมทั้งคุณสมบัติทางชีวเคมีเหมือนกับ สายพันธุ์ 1 ที่สามารถย่อยสลาย carbofuran ได้ ดังนั้นเพื่อที่จะสะดวกในการทดลองขั้นต่อไป จึงกำหนดชื่อสายพันธุ์ของแบคทีเรียที่แยกได้ทั้งหมดว่า เป็น isolate 1, 2, 3, 4 และ 5

**10. การสกัด DNA และการเพิ่มจำนวน DNA โดยวิธี PCR**

เมื่อนำแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์ที่แยกได้มาสกัด DNA จากนั้นนำ DNA ที่ได้จาก crude lysate และจากการสกัดด้วยการใช้ phenol-chloroform และ CTAB มาทำการเพิ่มจำนวนโดยวิธี Polymerase chain reaction (PCR) ซึ่ง Primer ที่ใช้คือ universal 16S rRNA (5'AAGGAGGTGATCCAGCCGCA3' และ 5'AGAGTTTGATCCT GGCTCAG3') พบว่าได้ PCR product ขนาดประมาณ1.5 กิโลเบส ซึ่งผลจากการเพิ่มจำนวน DNA โดยใช้ DNA template จากการสกัด DNA โดยวิธี CTAB ดังแสดงในรูปที่ 3.10 และผลจากการเพิ่มจำนวน DNA โดยใช้ DNA template จาก crude lysate ดังแสดงในรูปที่ 3.11

**11. การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rRNA gene**

เมื่อนำ DNA ที่ถูกทำให้เพิ่มจำนวนด้วยวิธี PCR มาหาลำดับนิวคลีโอไทด์โดยใช้เครื่อง ABI PRISM 3100 Genetic Big Dye Terminator Cycle Sequencing พบว่าแบคทีเรียทั้ง 5 สายพันธุ์ที่สามารถย่อยสลาย carbofuran และ 2,4-D มีลำดับนิวคลีโอไทด์ ดังแสดงในรูปที่ 3.12-3.16



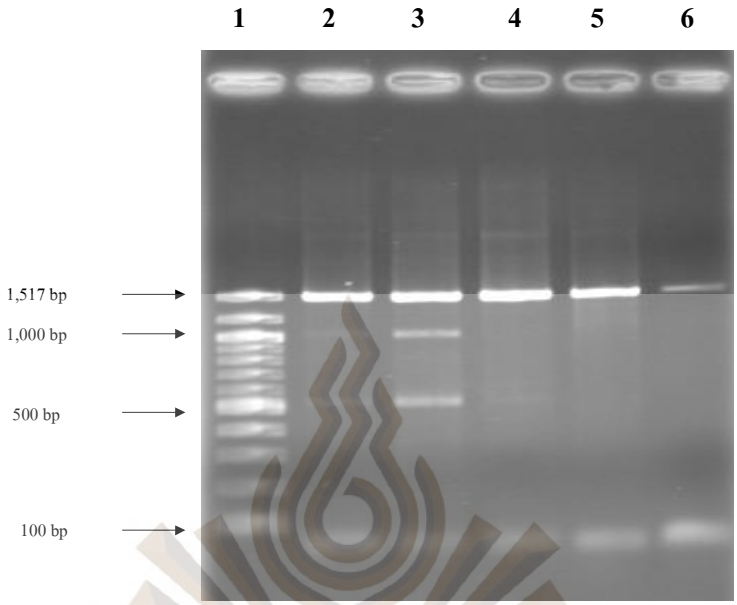

**รูปที่ 3.10** การเพิ่มจำนวน DNA โดยวิธี PCR (Polymerase Chain Reaction) ใช้ DNA template ที่ได้จากการสกัด DNA โดยวิธี CTAB

เลนที่ 1 คือ lambda x (HindIII/EcoRI cut)

เลนที่ 2-8 คือ DNA จากแบคทีเรียที่ย่อยสลาย carbofuran และ 2,4-D

เลนที่ 9 คือ Control ที่ไม่มี DNA template

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University




**รูปที่ 3.11** การเพิ่มจำนวน DNA โดยวิธี PCR (Polymerase Chain Reaction) ใช้ DNA template ที่ได้จาก crude lysate

เลนที่ 1 คือ 100 base pair ladder

เลนที่ 2-6 คือ DNA จากแบคทีเรียที่ย่อยสลาย carbofuran และ 2,4-D

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

NCCCTCNGGNNNNGGGGTTTCCCCTNTATTATACGTGTGTTACGACTTCCCCCC
ANTTCATNAATCACACCGTGGCTAACCGTCCTCCCGAAGGTTAGACTAGCTACTT
CTGGTGCAACCCACTCCCATGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAAC
GTATTCACCGTGACATTCTGATTCACGATTACTAGCGATTCCGACTTCACGCAGTC
AAGTTGCAGACTGCGATCCGGACTACGATCGGTTTTATGGGATTAGCTCCACCTC
GGCGGCTTGGCAACCCTTTGTACCGACCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCAGGCC
GTAAGGGCCATGATGACTTGACGTCATCCCCACNTTCCTCCGGTTTGANACCGGN
AGCCTCCTTANAGTGGCCACCATTACGTGCTGNTAACTANGGACAAGGGTTGCNC
TCGTNACNGCNACTNAACNNAACATNTNAGGAGACNAGCTGACGANAGCCNNGA
NGTNGNNTGTNTCAAGGNTCCNGANGGCNCCNGNGAGCGGTANAANNGTGTTNT
GGGGNGTNNAGGGCCTGTCTNAGGNNGCNNNNTCNTNANACCNNNNNTNTNNN
GTNGTNGTCGNGTNGTGCTNNCNGNNTNCTNCNNGGTTNGANNNNGNNGTGTTG
ANCGGNGGGGNGNCGNGCTTTNCNTCNGCNTTCNCTTGTCTNNTGCATGNGGNN
CNNNNNNNNNGNGTGNAGNGNNANGGGAGTGANNNNNNANTATGNGCTNTNGCN
ATAGTANTNGTNNNGNNNANTNTCNNTATNCTNNNCGNNNCGTCGTGGTGNCGN
TTGGGNTGTNCNNNNCNGTNGGANTCACNANTGTNTCNCNCNATGCNNCNTNNN
AGCNCNCGNAGTCNANTCNGGTNGNGANNNNCCAGCCTTGTCNTCAGAGGTGGG
GCTGATCAGTGANNTNCACTAANCGNNGGCNNCCNGACCGTGNCNTNNNNNNGT
TNNNGNNGNAGGTNTTATCTGTGNGCNTNCGNTAGCGGGTCGCNGTNTGGGGGT
GNTTGATNGNNGGNNGGGNGTGGGCCTGNTNCNTCGNNCTTGGGCGGGTNGTG
ANTGCGGTGNCGNGTGGTGGGANGTCTNGNTNNGATNGNTCGTTGTGTCGTGTG
GTC

**รูปที่ 3.12** แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rRNA gene ของแบคทีเรียสายพันธุ์ที่ 1

NGGNNNNNGGGGTTCCCCTANNNGCTACTNNTTACGACTTCACCCCAGTTCATNA
ATCACACCGTGGTAACCGTCCCCCCGAAGGTTAGACTAGCTACTTCTGGTGCAAC
CCACTCCCATGGNTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTCACC
GCGACATTCTGATTCGCGATTACTAGCGATTCCGACTTCACGCAGTCGAGTTGCA
GACTGCGATCCGGACTACGATCGGTTTTGTGAGATTAGCTCCACCTCGCGGCTTG
GCAACCCTCTGNTACCGACCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCAGGCCGTAAGGGC
CATGATGACTTGACGTCATCCCCACCTTCCTCCGGTTTGTCACCGGCAGTCTCCT
TAGAGTGCCCACCATAACGTGCTGGTAACTAAGGACAAGGGTTGCGCTCGTTAC
GGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAGCCATGCAGCACCTG
TGTCAGAGTTCCCGAAGGCACCAATCCATCTCTGGAAAGTTCTCTGNGTGTCAAG
GNCTNNTTAAGGNNNTNCNNTGGNTTNNANTTNATGCNNANGNGNNCNNNNNNN
NNGCGGGNCCNNNNNGGNCNNNNNNNTNNTAGGTNGNNGNNGNNNTGGNNGG
NGGNGNNCNGNNNNNNTGNCNGGGNCCTGNNNNGGNGGGGTNNNGNNTGGGC
TGNNNNGNTTNGNGNNNNNNGNNNCGGGTTGNGNTGNGNNGNNNNNNNNNNT
NNNNNNGTNTNNGNNGNNNNNGGNTNGNGTGNNNNGNGTGNNGNNNNTNGTGN
GNNGGTNNGGGTNGTNNGNGNNNNGNGNNNNTGNNNGNGNGGGNGNNNGNNG
GGGGNTGGGCGNNTGTNNNNNCGNGGNNGNNTGNGGNGTNNGNNGGTTNNNNN
TTNGNNNNGGGGGGGNGGNGGNNGGNNNNTNTTTGGTTNNNNNGCNTTNNNNN
GGNNGNNTGTNTNNANNNNTNNGNNG

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

**รูปที่ 3.13** แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rRNA gene ของแบคทีเรียสายพันธุ์ที่ 2

GGNNNNNGGGNCTCCCCTNTAGTCTACGTGTTTACGACTTCACCCCANTTCATNAAT
CACACCGTGGTAACCGTCCNCCCGAAGGTTAGACTAGCTACTTCTGGTGCAACCCA
CTCCCATGGNTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTCACCGCGA
CATTCTGATTCGCGATTACTAGCGATTCCGACTTCACGCAGTCGAGTTGCAGACTGC
GATCCGGACTACGATCGGTTTTGTGAGATTAGCTCCACCTCGCGGCTTGGCAACCC
TCTGTACCGACCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCAGGCCGTAAGGGCCATGATGACT
TGACGTCATCCCCACCTTCCTCCGGTTTGTCACCGGCAGTCTCCTTAGAGTGCCCAC
CATAANGTGCTGGTAACTAAGGACAAGGGTTGCGCTCGTTACGGGACTTAACCCAA
CATCTCACGACACGAGCTGACGACAGNCATGCAGCACCTGTGTCAGAGTTCCCGAA
GGCACCAATCCATCTCTGGAAAGNNCTCTNNNNTGTNANGGCGGNNTAGGNNNTNN
NNNTNGNNTNNNATTANGNNNNTNNNNNNNNNNTNNTNNNGGNNNNNNNNNNNNN
NNNNNNNNNNGNNNGNNNNNNNNNNGNNGNNNNNNNNNNNNTGNNNNNNNNNNT
NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNGNGNNNNNNGGNNTNNNNNGNNNN
NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNGNNTNNNNNNTNNNNNNNTNNNNTG
NNNNNNNNNNNGGNNNNNNNNNNNNNNNNGNNNNNNNNNGNNNNNNNGNNNN
GNGNNNNNNGNNNNGNNNGNTNNNNNNNNNNNGNNNNNNNNNNNNNNNTNTNN
NNNNNNNNNNNNGNNNNNNNNNGNTNNNNNNNNNNNNNNNNNNGGNNGNNNN
NNNNNTNNNNNNNNNNNNNNGNNNNNNNNNNNNNNNG

**รูปที่ 3.14** แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rRNA gene ของแบคทีเรียสายพันธุ์ที่ 3

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

GNNNNNAGGGGTNCCCNTACGGCTACNTNTTTACGACTTCACCCCAGTTCATNAA
TCACACCGTGGTAACCGTCCCCCCGAAAGGTTAGACTAGCTACTTCTGGTGCAAC
CCACTCCCATGGNTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTCACC
GCGACATTCTGATTCGCGATTACTAGCGATTCCGACTTCACGCAGTCGAGTTGCA
GACTGCGATCCGGACTACGATCGGTTTTGTGAGATTAGCTCCACCTCGCGGCTTG
GCAACCCTCTGTACCGACCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCAGGCCGTAAGGGCC
ATGATGACTTGACGTCATCCCCACCTTCCTCCGGTTTGTCACCGGCAGTCTCCTT
AGAGTGCCCACCATAACGTGCTGGTAACTAAGGACAAGGGTTGCGCTCGTTACG
GGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAGCCATGCAGCACCTGTG
TCAGAGTTCCCGAAGGCACCAATCCATCTCTGGAAAGTTNTCTGNATGTCAAGGN
CNGGNTAAGGTNCTTNGNGTNGNTNNNANTNNANNNNNNTGNNCCNNNNNTTNT
NNGNNCCCNNTNNNNNNTTGNNNNNNNNNNNNNNNNGNNNNNNNNNNNNNNN
NNNNNGNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNGTNNNNNNNNGNNNTNNNNNNNNN
NNNNGNGGNNNNNNNNNTNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN
NNNNNNGNTTNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNGNNNGNNNNNNGNNNNNNNNN
NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNGNNNNNNNNNNNNNNNN
NNNGNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN
NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNTNNNGNNNNNNNNNGNNNNNNNNN
NNNNNNNNNTNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNGGNNNNN

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

**รูปที่ 3.15** แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rRNA gene ของแบคทีเรียสายพันธุ์ที่ 4

AGCCTTCNCCGAATATGTGCTACNTTGANTTACGACTTCACCCCGAGTTCATCGGCC
ACACCGTTGGCAAGCGCCCTCCCGAAGGTTAAGCTACCTGCTTCTGGTGCAACAAA
CTCCCATGGNTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTCACCGCAG
CAATGCTGATCTGCGATTACTAGCGATTCCGACTTCATGGAGTCGAGTTGCAGACTC
CAATCCGGACTGAGATAGGGTTTCTGGGATTGGCTNACCGTCGCCGGCTTGCAGCC
CTCTGTCCCTACCATTGTAGTACGTGTGTAGCCCTGGCCGTAAGGGCCATGATGACT
TGACGTCATCCCCACCTTCCTCCGGTTTGTCACCGGCGGTCTCCTTAGAGTTCCCAC
CATTACGTGCTGGCAACTAAGGACAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGNACTTAACCCAA
CATCTCACGACACGAGCTGACGACAGCCATGCANNACCTGTGTTCGAGTTCCCGAA
GGCACCNATCCATCTCTGGAAAGTTNTTGANATGTCAANGNCNNNTAANGNTNTTCN
TNTTNGNNTCAATTAANNNNNTANTNNTNNGNTTTTNTNGNNNNNNNNNNNNNTNN
NATGNTNNGNNTNNNNANNNTNNNNNNNNNNGNNANTNNNNNNNTNNNTNNNNAN
NNNNNNNNNNNTNNNNNNNNNNTNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNTNNNNNG
NTTNNTNTNTNTGGNNNTNNNNTNNNNNGNNNNNGNNNNTNNGNNNNTGNNNNNNT
NNNNNNNNNNNTNNNNNNNNNNNNNNNNNTNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNT
NNNNNNNNNNNNNGNNNNNGNGNNNNNNNNNNNNNNNNGNTTNNTNNTNNNNNNNT
NNNNNNNNNNNNNNNNNTNNNNNNNNNNNNNNNNTNNNNGNNNGNNGNNNCNNN
NNNNTGNNNNNNNNNNNNNTNTNNNNNNNNNNNNNNNNTTNNNNNNGNTNNNNNN
NNNGNNNTNNTNTTNNNNNNNNNNNNNNTNNTNNN

**รูปที่ 3.16** แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rRNA gene ของแบคทีเรียสายพันธุ์ที่ 5

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

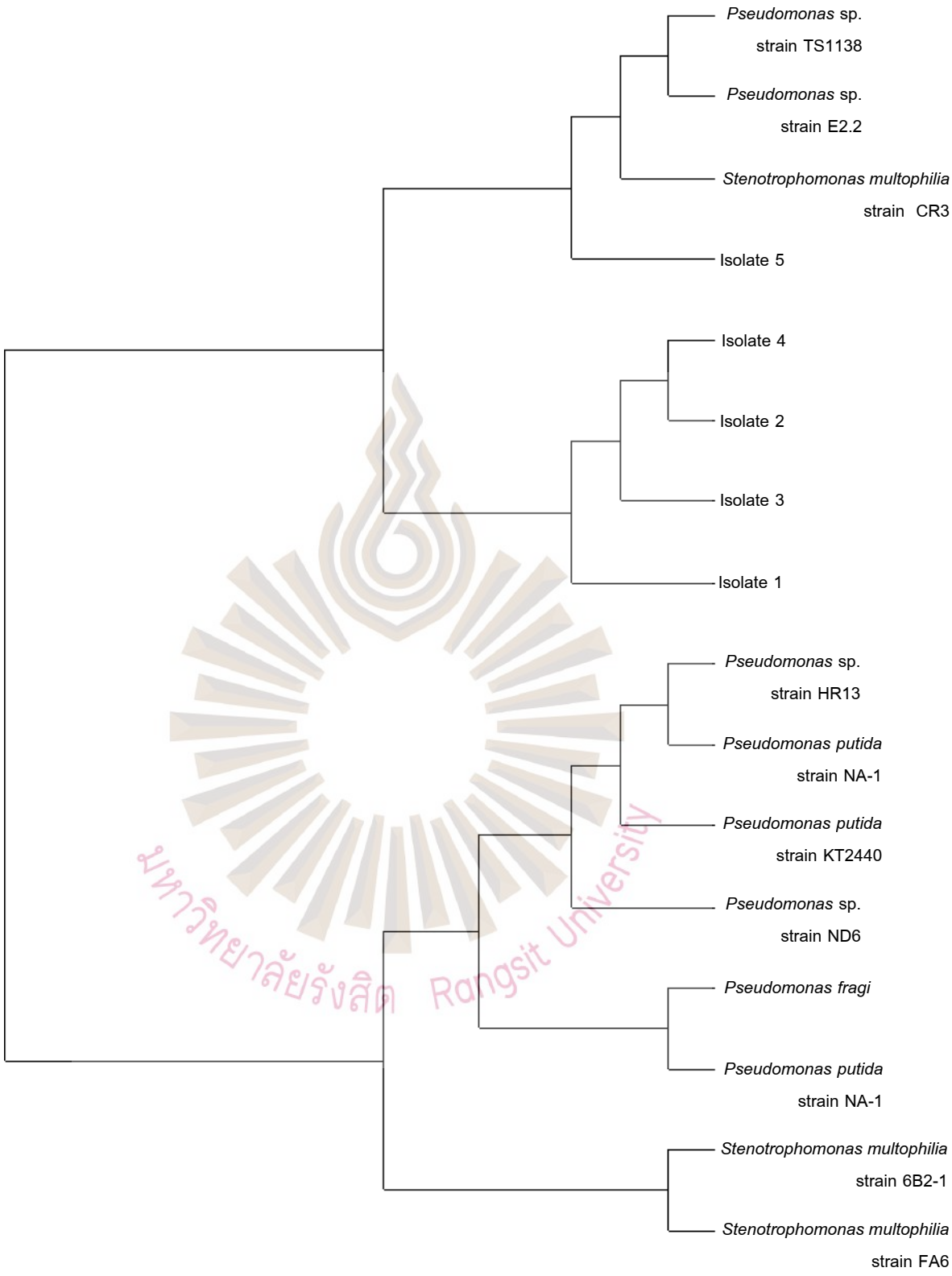
**12. การวิเคราะห์ข้อมูลของลำดับนิวคลีโอไทด์**

เมื่อเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของแบคทีเรียที่แยกได้จากดินที่มีความสามารถในการย่อยสลาย carbofuran และ 2,4-D กับนิวคลีโอไทด์ของแบคทีเรียต่างๆ ที่มีใน National Center for Biotechnology Information (NCBI) database พบว่าแบคทีเรียที่แยกได้มีลำดับนิวคลีโอไทด์คล้ายคลึงกับแบคทีเรียใน Genus *Pseudomonas* และ *Stenotrophomonas* ดังแสดงในตารางที่ 3.7 และเมื่อทำ multiple alignment ของลำดับนิวคลีโอไทด์ของแบคทีเรียที่แยกได้กับแบคทีเรียอื่นๆ ในดิน พบโครงสร้าง phylogenetic tree ดังแสดงในรูปที่ 3.17

**ตารางที่ 3.7** แสดงเปอร์เซ็นต์ similarity ของนิวคลีโอไทด์ของแบคทีเรียสายพันธุ์ต่างๆเทียบกับแบคทีเรียใน National Center for Biotechnology Information (NCBI) database

| แบคทีเรีย | Taxon | %similarity |
|---|---|---|
| 1 | *Pseudomonas* sp. strain E22 | 95 |
| 2 | *Pseudomonas putida* strain NA-1 | 98 |
| 3 | *Pseudomanas* sp. strain ND6 | 98 |
| 4 | *Pseudomonas* sp. strain TS1138 | 97 |
| 5 | *Stenotrophomonas maltophilia* strain CR3 | 97 |

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University




มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

**รูปที่ 3.17** Phylogenetic tree แสดงความสัมพันธ์ของแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลาย carbofuran และ 2,4-D

# บทที่ 4
# สรุปและวิจารณ์

ในงานวิจัยครั้งนี้มุ่งที่จะคัดเลือกแบคทีเรียและศึกษานิเวศน์วิทยาของแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลาย phenolic compounds ที่ตกค้างและสะสมอยู่ในดินพื้นที่เกษตรกรรมในประเทศไทย แต่เนื่องจากสารที่มี phenol เป็นองค์ประกอบนั้นมีมากมายหลายชนิด ดังนั้นในการที่จะหาแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลาย phenolic compounds ทั้งหมดนั้นเป็นไปได้ยาก ดังนั้นจึงใช้ 2,4-D และ carbofuran เป็นตัวแทนของสารที่มี phenol เป็นองค์ประกอบสำหรับใช้ในการศึกษานี้ เนื่องจากเหตุผลที่สารทั้งสองนี้เป็นสารสำคัญที่เกษตรกรนิยมใช้เป็นปุ๋ยเพื่อเร่งให้พืชเจริญเร็วขึ้น และใช้เป็นยาปราบศัตรูพืช

**1. การแยก (isolate) แบคทีเรียที่สามารถย่อยสลาย 2,4-D และ carbofuran**

การแยกเชื้อแบคทีเรียจากตัวอย่างดินในพื้นที่เกษตรกรรม 20 ตัวอย่าง พบแบคทีเรียที่สามารถเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี carbofuran ความเข้มข้น 50 mg/l มีจำนวนทั้งสิ้น 46 isolates โดยเชื้อที่แยกได้ในขั้นตอนนี้อาจมีทั้งกลุ่มที่ใช้ carbofuran เป็นแหล่งคาร์บอน หรือกลุ่มที่สามารถทน carbofuran ได้

เมื่อทำการทดสอบหาความเข้มข้นของ carbofuran ที่เหมาะสมที่จะใช้ในการเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย พบว่าความเข้มข้นที่เหมาะสมในการเลี้ยงเชื้อ คือ 50 mg/l เนื่องจากเป็นความเข้มข้นที่ทำให้แบคทีเรียเหล่านี้เจริญได้ดีที่สุด ส่วนที่ความเข้มข้นของ carbofuran 100 mg/l และ 200 mg/l นั้นมีผลทำให้แบคทีเรียมีการเจริญที่ลดลง เนื่องจากความเข้มข้นที่สูงเกินไปอาจทำให้มีการยับยั้งการเจริญของเชื้อ ถ้าใช้ความเข้มข้นที่ต่ำกว่านี้แหล่งคาร์บอนอาจไม่เพียงพอในการเจริญของเชื้อ ซึ่งจะมีผลให้การเจริญของเชื้อจะลดลงเช่นเดียวกัน

เมื่อคัดเลือกแบคทีเรียที่มีลักษณะแตกต่างกันมาจำนวน 5 isolates จากแบคทีเรียที่แยกได้ นำมาทดสอบการย่อยสลาย carbofuran พบว่า เมื่อเลี้ยงแบคทีเรียใน MS liquid culture medium ที่มี carbofuran ความเข้มข้น 50 mg/l เป็นแหล่งคาร์บอนเป็นเวลา 3 วัน เชื้อเจริญเพิ่มจำนวนขึ้นและปริมาณ carbofuran ลดลงจนหมดไป แสดงว่าเชื้อใช้ carbofuran เป็นแหล่งของอาหารและพลังงาน เมื่อเปรียบเทียบกับอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่มี carbofuran ซึ่งใช้เป็น growth control การเจริญของเชื้อในการทดลองนี้ลดลงเนื่องจากไม่มีแหล่งอาหารให้กับเชื้อเพื่อใช้ในการเจริญ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Ramanand และคณะ (30) ที่พบว่า *Arthrobacter* sp.ที่แยกได้จากดินที่มีน้ำท่วมขังสามารถสลาย carbofuran ที่ติดฉลากที่วง furan ด้วย $^{14}C$ เป็น $^{14}CO_2$ ภายใน 72-120 ชม. เมื่อเพาะเลี้ยงใน mineral salts medium โดยใช้ carbofuran เป็นแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจน ภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจน

การจัดกลุ่มแบคทีเรียทั้ง 5 isolates ที่สามารถย่อยสลาย carbofuran ได้ พบว่าแบคทีเรียทั้งหมดจัดอยู่ในกลุ่ม Gram negative bacteria Glucose Non - Fermenter (GNF) ซึ่งพบได้ในสิ่งแวดล้อม งานวิจัยนี้พบว่า แบคทีเรียที่สามารถย่อยสลาย carbofuran ได้คล้ายกับ *Pseudomonas* strains ซึ่งพบได้ในสิ่งแวดล้อม สอดคล้องกับงานวิจัยของ Karpouzas และคณะ (31) ที่แยกแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลาย cabofuran ได้ 23 isolates นำมาจัดหมวดหมู่ด้วย Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) ของ 16S rRNA gene และ partial 16S rRNA sequence analysis พบว่า 9 isolates คล้ายกับ *Pseudomonas* strains

การแยกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลาย 2,4-D ในดิน จำนวน 20 ตัวอย่าง พบว่าจากสายพันธุ์ทั้งหมดจำนวน 32 สายพันธุ์ มีเพียง 1 สายพันธุ์ที่สามารถย่อยสลาย 2,4-D ได้ คือ สายพันธุ์ที่ 1 ซึ่งแยกได้จากดินที่ได้จากแปลงไร่อ้อย (มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน) จากนั้นทำการทดสอบการย่อยสลาย 2,4-D พบว่าสามารถย่อยสลายได้เล็กน้อยในวันที่ 5 จาก 50 mg/l ลดลงเหลือ 37.5 mg/l คิดเป็นร้อยละ 25 และสามารถย่อยสลายได้เกือบหมดในวันที่ 7 จาก 50 mg/l ลดลงเหลือ 12.5 mg/l คิดเป็นร้อยละ 75 เมื่อทำการแยกวินิจฉัยศึกษาลักษณะรูปร่าง (cell morphology) ของเชื้อโดยทำการย้อมสี และทำการทดสอบทางชีวเคมี สามารถวินิจฉัยได้ว่าเชื้อที่สามารถย่อยสลาย 2,4-D น่าจะจัดอยู่ในกลุ่ม GNF bacilli ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ V. Grace Matheson และคณะในปี 1996 (15) ได้ทำการทดสอบการย่อยสลายของ 2,4-D โดยเชื้อ *Burkholderia* sp. strain TFD6 ซึ่งอยู่ในกลุ่ม GNF bacilli พบว่าเชื้อสามารถย่อยสลายได้หมดในระยะเวลา 2 วัน

ในการวิจัยนี้พบว่ามีแบคทีเรียเพียง 1 สายพันธุ์เท่านั้นที่สามารถย่อยสลาย 2,4-D ได้ในระยะเวลา 7 วันส่วนเชื้ออื่นๆ ไม่สามารถย่อยสลายได้ในระยะเวลา 7 วัน อาจเนื่องมากจากระยะเวลาในการทำการทดสอบการย่อยสลาย 2,4-D สั้นเกินไป หรือสภาวะที่ทำการเพาะเลี้ยงไม่เหมาะสมกับแบคทีเรียนี้หรือสายพันธุ์เหล่านั้นอาจต้องการสารอาหารอื่นๆอีกนอกเหนือจาก mineral salt ที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง หรือแบคทีเรียที่ได้มีความสามารถสร้างพลังงานได้ในระดับที่ต่ำจึงทำให้พลังงานที่ได้ไม่เพียงที่จะสามารถย่อยสลาย 2,4-D ซึ่งต้องใช้พลังงานที่สูงพอสมควร

งานวิจัยนี้ได้ทำการทดสอบการย่อยสลาย 2,4-D โดยใช้ pure culture โดยใช้แบคทีเรียเพียง 1 สายพันธุ์ ดังนั้นการย่อยสลายอาจดีขึ้นถ้าทำการทดสอบการย่อยสลายแบบ mixed culture คือใช้แบคทีเรียมากกว่า 1 สายพันธุ์ทำงานร่วมกัน เช่นเดียวกับที่ Kye-Hheon Oh และ Olli H. Tuovinen ได้รายงานในปี 1994 (24) ซึ่งได้ทำการย่อยสลาย 2,4-D ใน fixed film column reactor โดยการทำงานร่วมกันของแบคทีเรียในดิน คือ *Pseudomonas* spp., *Flavobacterium* ssp. และ *Achromobacter* spp. พบว่าสามารถย่อยสลาย 2,4-D ได้อย่างสมบูรณ์ในระยะเวลา 4 วัน และ มีการศึกษาของ Ilona McGhee และ Richard G. Burns ในปี 1995 (25) ได้ทำการสลาย 2,4-D โดย *Xanthomonas maltophilia*, *Pseudomonas* sp. และ

*Rhodococcus globerulus* ซึ่งต้องใช้เวลาถึง 28 วันในการย่อยสลายสารนี้ในดิน งานวิจัยนี้จะสมบูรณ์ยิ่งขึ้น ถ้าทำการศึกษาและทดสอบการย่อยสลาย 2,4-D และ carbofuran แบบ mixed culture และใช้ตัวอย่างดินจำนวนเพิ่มมากขึ้น ทั้งนี้เนื่องจากการใช้ตัวอย่างดินที่แตกต่างกันออกไปอาจทำให้ได้เชื้อที่มีความสามารถในการย่อยสลาย 2,4-D และ carbofuran เพิ่มมากยิ่งขึ้น

งานวิจัยนี้ได้ทำการเลือกดินพื้นที่เกษตรกรรมที่ได้มีการใช้สารกำจัดศัตรูพืชชนิดต่างๆ โดยเลือกดินบริเวณผิวหน้าดิน เนื่องจากดินบริเวณนี้ส่วนใหญ่จะมีเชื้อแบคทีเรียชนิด aerobic bacteria อาศัยอยู่ซึ่งเชื้อชนิดนี้สามารถเจริญได้รวดเร็วกว่าเชื้อแบคทีเรียชนิด anaerobic bacteria ดังนั้นความสามารถในการย่อยสลายสารกำจัดวัชพืชของ aerobic bacteria จะเกิดขึ้นได้ดีและรวดเร็วกว่า anaerobic bacteria

นอกจากนี้งานวิจัยนี้ได้ทำการเลือกศึกษาแบคทีเรียสายพันธุ์ในประเทศไทย เพื่อให้ได้เชื้อที่เป็น endogenous ในแหล่งพื้นที่เกษตรกรรมในประเทศ เนื่องจากแบคทีเรียดังกล่าวจะมีความทนทานและสามารถเจริญได้ในสภาวะแวดล้อมต่างๆ ในประเทศไทยได้ดี ซึ่งหากนำแบคทีเรียกลุ่มนี้มาใช้ในขบวนการกำจัดสารตกค้างใน in situ น่าจะได้ผลที่ดี เนื่องจากแบคทีเรียเหล่านี้เคยอยู่ได้ในสภาวะแวดล้อมนั้นๆ จึงไม่จำเป็นต้องใช้เวลาในการปรับตัวและสามารถเจริญเติบโตโดยใช้สารตกค้างดังกล่าวเป็นแหล่งของคาร์บอนและพลังงานได้ ซึ่งน่าจะดีกว่าการนำแบคทีเรียจากแหล่งอื่นเข้าไป

## 2. การจัดกลุ่มและการศึกษาความเกี่ยวข้องกันของแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลาย 2,4-D และ carbofuran

เมื่อนำแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลาย 2,4-D และ carbofuran มาทำการแยกวินิจฉัยโดยศึกษาลักษณะรูปร่าง (cell morphology) ของเชื้อโดยทำการย้อมสี และทำการทดสอบคุณสมบัติทางด้านชีวเคมีของแบคทีเรีย ทำให้สามารถจัดจำแนกแบคทีเรียดังกล่าวอยู่ในกลุ่ม glucose-non fermenting Gram negative bacilli หรือ GNF bacilli และเมื่อเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของแบคทีเรียที่แยกได้นี้กับนิวคลีโอไทด์ของแบคทีเรียต่างๆ ที่มีใน National Center for Biotechnology Information (NCBI) database พบว่าแบคทีเรียที่แยกได้มีลำดับนิวคลีโอไทด์คล้ายคลึงกับแบคทีเรียใน Genus *Pseudomonas* และ *Stenotrophomonas* โดยมี %similarity ตั้งแต่ 95%-98% ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Karpozas และคณะ (31) ที่ได้จัดหมวดหมู่ของแบคทีเรียที่สามารถย่อย carbofuran ด้วย Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) ของ 16 S rRNA gene และ partial S rRNA gene sequencing พบว่า9 isolates จาก 23 isolates ที่แยกได้จัดอยู่ในกลุ่ม *Pseudomonas* ทั้งนี้อาจเนื่องจากว่า *Pseudomonas* นี้เป็นแบคทีเรียที่พบได้ทั่วไปในสิ่งแวดล้อม เช่น ในดิน รวมทั้งแบคทีเรียในกลุ่มนี้มี metabolic diversity คือมีความสามารถใน

การใช้สารต่างๆในขบวนการดำรงชีพได้อย่างมากมาย ดังจะพบว่าแบคทีเรียกลุ่มนี้มักจะร่วมในขบวนการ metabolism ของสารหลายๆ ชนิดที่มีโครงสร้างซับซ้อน

การศึกษา phylogenetic tree โดยการทำ multiple alignment ของลำดับนิวคลีโอไทด์ของแบคทีเรียที่สามารถในการย่อยสลาย 2,4-D และ carbofuran ที่แยกได้กับแบคทีเรียชนิดอื่นๆ เป็นการนำเอาเทคนิคทางชีวโมเลกุลมาศึกษาถึงความเกี่ยวข้องกันของสายพันธุ์ของแบคทีเรียที่สามารถในการย่อยสลาย 2,4-D และ carbofuran กับแบคทีเรียชนิดอื่นๆที่มีลำดับของนิวคลีโอไทด์ใกล้เคียงกัน ซึ่งจากการศึกษานี้พบว่าแบคทีเรียที่แยกได้ทั้ง 5 isolates นั้นมีความเกี่ยวข้องกับแบคทีเรียในกลุ่ม *Pseudomonas* เช่น *Pseudomonas* sp., *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas fragi* และ *Stenotrophomonas maltophilia* ซึ่งแบคทีเรียเหล่านี้เป็นแบคทีเรียที่พบได้ในดินและสิ่งแวดล้อมเช่นเดียวกัน การศึกษาถึงความเกี่ยวข้องกันของกลุ่มของแบคทีเรียนี้อาจจะมีประโยชน์ในการนำสายพันธุ์ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีความใกล้เคียงแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลาย 2,4-D และ carbofuran ที่แยกได้มาทดลองย่อยสลาย 2,4-D และ carbofuran ที่ตกค้างในดิน ทั้งนี้เนื่องจากเหตุผลที่แบคทีเรียที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีความคล้ายคลึงกันอาจจะมีขบวนการ metabolisms ที่ใกล้เคียงกัน ซึ่งจะเป็นวิธีการหนึ่งในการการพัฒนาสายพันธุ์ที่มีความสามารถในการย่อยสลายสารที่ตกค้างในดินและสิ่งแวดล้อมให้เพิ่มขึ้น

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

# เอกสารอ้างอิง


1. van Zoest, R. and van Eck, G.T.M. 1993. Behaviour of selected PCBs, PAHs and gamma-HCH in the Scheldt estuary, S.W. Netherlands. **Neth. J. Aquat. Ecol**. 27: 301-308
2. de Bont, J.A., Vorage, M.J., Hartmans, S., and van den Tweel, W.J. Microbial degradation of 1,3-dichlorobenzene. 1986. **Appl. Environ. Microbiol.** 52(4): 677–680.
3. บัญญัติ สุขศรีงาม. **จุลชีววิทยาทั่วไป**. โอ.เอส.พริ้นติ้ง เฮ้าส์, บัญญัติ, 2534.
4. พาลาภ สิงหเสนี. **พิษของยาฆ่าแมลงต่อผู้ใช้และสิ่งแวดล้อม**. ภาควิชาเภสัชศาสตร์ คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 2528.
5. ไมตรี สุทธจิตต์. **สารพิษรอบตัวเรา**. โรงพิมพ์ดาว คอมพิวกราฟิค, 2531.
6. ศุภมาศ พนิชศักดิ์พัฒนา. **ภาวะมลพิษของดินจากการใช้สารเคมี**. พิมพ์ครั้งที่ 3. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, 2545.
7. สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร โดยความร่วมมือของกรมศุลกากร. ยาปราบศัตรูพืช: ปริมาณและการนำเข้ารายเดือน, 2546
8. กองควบคุมพืชและวัสดุการเกษตร. **สรุปรายงานการนำเข้าวัตถุอันตรายทางการเกษตร.** กองควบคุมพืชและวัสดุการเกษตร กรมวิชาการเกษตร, 2545.
9. กองควบคุมพืชและวัสดุการเกษตร. **สรุปรายงานการนำเข้าวัตถุอันตรายทางการเกษตร.** กองควบคุมพืชและวัสดุการเกษตร กรมวิชาการเกษตร,2539-2544.
10. พรชัย เหลืองอาภาพงศ์. **สารกำจัดวัชพืช (Herbicide).** ภาควิชาพืชไร่ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, 2531.
11. ธวัชชัย รัตน์ชเลศ: **หนังสือเทคโนโลยีสารกำจัดวัชพืช (Herbicide technology).** ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, 2540.
12. Sandmann, E.R.I.C., Loos, M.A. and Dyk, L.P. 1988. The microbial degradation of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid in soil. **Rev Environ Contam toxicol**. 101:1-51.
13. Amarante O.P. de, Brito Jr.,N.M., dos Santos T.C.R., Nunes G.S., Ribeiro M.L. **Determination of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and its major transformation product in soil samples by liquid chromatographic analysis.** Elsevier Science Atlanta, 2003.

14. Benoit P, Barriuso E and Calvet R. 1998. Biosorption characterization of herbicide 2,4-D and atrazine and two chlorophenols on fungal mycelium. **Chemosphere**. Vol. 37 (7) :1271-1282.
15. Chaudhry, G.R. and Ali, A.N. 1988. Bacteria Metabolism of Carbofuran. **Applied and Environmental Microbiology**. 54(6):1414-1419.
16. ชวลิต เข็มพรหมมา. **พิษเฉียบพลันของคาร์บาริล คาร์โบฟูรานและส่วนผสมของสารทั้งสองชนิดที่มีต่อปลาตะเพียนขาว (*Puntius gonionutus* Bleeker) และกุ้งก้ามกราม (*Macrobracnium rosenbergii* DE Man)**. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, 2529.
17. อารยา กำเนิดมั่น**. การกระจายตัวของคาร์โบฟูรานในระบบนิเวศน์จำลองโดยใช้เทคนิคทางนิวเคลียร์**. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, 2532.
18. Chaudhry G. Rasul, *et al.* 2002. Induction of carbofuran oxidation to 4-hydroxycarbofuran by *Pseudomonas* sp.50432**. FEMS Microbiology Letters**. 214 :171-176.
19. ทศพล พรพรหม. **สารกำจัดวัชพืช: หลักการและกลไกการทำลาย (Herbicide:principles and mode of action)** . ภาควิชาพืชไร่นา คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, ตุลาคม 2545
20. ศุภมาศ พนิชศักดิ์พัฒนา: **ภาวะมลพิษของดินจากการใช้สารเคมี**. ภาควิชาปฐพีวิทยา คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, 2545
21. วิทูร อัตนโถ และ ไพโรจน์ อุ่นสมบัติ. **พิษวิทยาคลินิค: ยาปราบศัตรูพืช.** โครงการตำราศิริราช คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล, กรุงเทพฯ, 2529.
22. สมศักดิ์ วังใน: **จุลินทรีย์และกิจกรรมในดิน,** 2528
23. 2,4- Dichlorophenoxyacetic acid pathway. **http:// www. Google.co.th/images.**
24. Kye-Hheon O.H. and Tuovinen O.H. 1994. Biodegradation of the Phenoxy Herbicides MCPP and 2,4-D in Fixed-Film Column Reactors. **International Biodegradation & Biodegradation**. Vol 33, 93-99.
25. McGhee I. and Burns Richard G. 1995. Biodegradation of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) and 2-methyl-4-chlorophenoxyacetic acid (MCPA) in contaminated soil. **Applied Soil Ecology**. Vol 2, 143-154.
26. Worthing, C.R. and Hance, R.J. **The Pesticide Manual. 9$^{th}$ed**. The British Crop Protection Council, 1991.

27. Mohapatra Soudamini and Awasthi, M.D. 1997. Enhancement of Carbofuran Degradation by Soil Enrichment Cultures, Bacterial Cultures and by Synergistic Interaction among Bacterial Cultures. **Pesticide.Science**. 49:164-168.

28. กองมาตรฐานคุณภาพสิ่งแวดล้อม. **การประเมินความเสี่ยงอันตรายจากสารเคมีเบื้องต้น**. สำนักงานคณะกรรมการสิ่งแวดล้อมแห่งชาติ กระทรวงวิทยาศาสตร์และพลังงาน, 2532.

29. Venkateswarlu, K., Gowda T.K.S. and Sethunathan, N. 1977. Persistance and Biodegradation of Carbofuran in Flooded Soils. **Journal of Agricultural and Food Chemietry**. 25:533-536.

30. Ramanand, K., Sharmila, M. and Sethunathan, N. 1988. Mineralization of Carbofuran by a soil Bacterium. **Applied and Environmental Microbiology**. 54(8): 2129-2133.

31. Karpouzas, D.G., Morgan, J.A.W. and Walker, A. 2000. Isolation and characterization of 23 carbofuran-degrading bacteria from soils from distant geographical areas. **Letters in Applied Microbiology**. 31: 353-358.

32. นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ และปรีชา สุวรรณพินิจ. **จุลชีววิทยาทั่วไป.** สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 2541.

33. Krieg, N.R. (ed.), **Bergey's Manual of Systemaic Bacteriology**, vol.1, William & Wilkins, Baltimore, 1984.

34. Sukplang, P., Thongmee, A. and Vela, G. Roland. 1999. Degradation of Linseed oil vapors by Soil Bacteria in Trickling Biofilters. **Bioremediation Journal.** 3(3): 189-199.

35. นภา ศิวรังสรรค์, **ปฏิบัติการทางพันธุวิศวกรรม.** สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 2547.

36. Frederick M. Ausubel, et al. **Short protocols in molecular biology.** 2nd edition, 1992.

37. Edwards, U., Rogall, T., Blocker, H., Emde, M., and Bottger, EC. 1989. Isolation and direct nucleotide determination of entire genes: Characterization of a gene encoding for 16S ribosomal RNA. **Nucleic Acids Res.** 17: 7843-7853.

38. Hall, Tom. **BioEdit program**. Department of Microbiology, North Carolina State University. NC, U.S.A.