การเปรียบเทียบการย่อยสลายไดยูรอนที่ปนเปื้อนในดินโดยธรรมชาติ การใช้สารเร่งทางชีวภาพและการเติมเชื้อจุลินทรีย์

นายสุรชัย ศรีธรรมภิวัฒน์

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ หลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพ
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2549

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

COMPARISON OF NATURAL, BIOSTIMULATED AND BIOAUGMENTED DEGRADATIONS OF DIURON CONTAMINATED IN SOIL

Mr.Surachai Sritampiwat

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Biotechnology
Faculty of Science
Chulalongkorn University
Academic Year 2006
Copyrigth of Chulalongkorn University

492173

Thesis Title	Comparison of natural, biostimulated and bioaugmented degradations of diuron contaminated in soil
By	Mr.Surachai Sritampiwat
Field of Study	Biotechnology
Thesis Advisor	Assistant Professor Alisa Vangnai, Ph.D.
Thesis Co-advisor	Ekawan Luepromchai, Ph.D.

Accepted by the Faculty of Science, Chulalongkorn University in Partial Fulfillment of the Requirements for the Master's Degree

....Dean of the Faculty of Science

(Professor Piamsak Menasveta, Ph.D.)

THESIS COMMITTEE

.... Chairman

(Associate Professor Aran Incharoensakdi, Ph.D.)

....Thesis Advisor

(Assistant Professor Alisa Vangnai, Ph.D.)

....Thesis Co-advisor

(Ekawan Luepromchai, Ph.D.)

....Member

(Associate Professor Nattaya Ngamrojnavanich, Ph.D.)

....Member

(Associate Professor Sirirat Rengpipat, Ph.D.)

นายสุรชัย ศรีธรรมภิวัฒน์ : การเปรียบเทียบการย่อยสลายไดยูรอนที่ปนเปื้อนในดินโดยธรรมชาติ การใช้สารเร่งทางชีวภาพและการเติมเชื้อจุลินทรีย์ (COMPARISON OF NATURAL, BIOSTIMULATED AND BIOAUGMENTED DEGRADATIONS OF DIURON CONTAMINATED IN SOIL) อ.ที่ปรึกษา : ผศ.ดร.อลิสา วังใน, อ.ที่ปรึกษาร่วม : อ.ดร.เอกวัล ลือพร้อมชัย, 100 หน้า

ไดยูรอน (Diuron, 3-(3,4-dichlorophenyl)-1,1-dimethylurea) เป็นสารประกอบในกลุ่ม Phenylurea herbicides ที่ใช้เป็นสารปราบวัชพืชอย่างแพร่หลาย นิยมใช้กับพืชไร่ เช่น ไร่มันสำปะหลัง ไร่สัปปะรด ไร่ข้าวโพด ไร่ฝ้ายและไร่อ้อย เป็นต้น นอกจากนี้ยังมีการนำไปใช้ในบริเวณที่ไม่มีการเพาะปลูก เช่น ถนนและรางรถไฟ เป็นต้น อย่างไรก็ตามไดยูรอนเป็นสารเคมีที่มีความเป็นพิษสูงและเป็นสารก่อมะเร็ง ประกอบกับมีการดูดซับกับผิวหน้าดินได้ดีและการละลายน้ำต่ำ จึงพบการปนเปื้อนของไดยูรอนในสิ่งแวดล้อมทั้งในดินและในแหล่งน้ำ ดังนั้นจึงจำเป็นที่จะต้องพัฒนาวิธีบำบัดไดยูรอนในสิ่งแวดล้อม วัตถุประสงค์ในการศึกษานี้เพื่อประเมินวิธีบำบัดทางชีวภาพที่เหมาะสมในการกำจัดไดยูรอนที่ปนเปื้อนในดิน โดยเปรียบเทียบวิธีบำบัดทางชีวภาพ 3 วิธี คือ การสลายไดยูรอนที่ปนเปื้อนในดินโดยธรรมชาติ (Natural attenuation) การใช้สารเร่งทางชีวภาพ (Biostimulation) และการเติมเชื้อจุลินทรีย์ (Bioaugmentation) ในดิน 2 ชนิด คือดินร่วนและดินเหนียวปนโคลนที่มีการเติมไดยูรอนความเข้มข้น 20 หรือ 100 ส่วนในล้านส่วน ในชุดการทดลอง A พบว่าการบำบัดดินร่วนที่ปนเปื้อนไดยูรอนความเข้มข้น 20 ส่วนในล้านส่วน โดยวิธีธรรมชาติมีการสลายไดยูรอนที่ปนเปื้อนในดินมากที่สุดถึง 17 เปอร์เซนต์ ใน 8 สัปดาห์ ส่วนชุดการทดลอง B พบว่าการบำบัดดินร่วนที่ปนเปื้อนไดยูรอนความเข้มข้น 20 ส่วนในล้านส่วน โดยวิธีธรรมชาติและการเติมกลุ่มเชื้อแบคทีเรีย A1 สามารถสลายไดยูรอนที่ปนเปื้อนในดินได้เท่ากันคือ 31 เปอร์เซนต์ ใน 15 วัน และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของไดยูรอนในดินร่วนเป็น 100 ส่วนในล้านส่วน วิธีการบำบัดไดยูรอนโดยการเติมกลุ่มเชื้อแบคทีเรีย A1 สามารถสลายไดยูรอนที่ปนเปื้อนในดินได้ 22 เปอร์เซนต์ ใน 15 วัน แต่การบำบัดดินเหนียวปนโคลนที่ปนเปื้อนไดยูรอนทั้ง 2 ชุดการทดลองโดยวิธีบำบัดทางชีวภาพทั้ง 3 วิธี ไม่สามารถสลายไดยูรอนที่ปนเปื้อนในดินได้ สำหรับการตรวจสอบแอคติวิตีของเชื้อจุลินทรีย์ในดิน พบการเพิ่มแอคติวิตีของเชื้อมากที่สุด 4 เท่า เมื่อเติมแอมโมเนียมคลอไรด์ 1,000 ส่วนในล้านส่วน ทั้งในดินร่วนที่ใส่ไดยูรอนความเข้มข้น 20 หรือ 100 ส่วนในล้านส่วนภายใน 15 วัน

ลายมือชื่อนิสิต......สุรชัย ศรีธรรมภิวัฒน์......

สาขาวิชา.........เทคโนโลยีชีวภาพ........... ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา......................

ปีการศึกษา...............2549................ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม......................

4672468623: MAJOR BIOTECHNOLOGY
KEY WORD: DIURON/ NATURAL ATTENUATION/ BIOSTIMULATION/ BIOAUGMENTATION/ SOIL

SURACHAI SRITAMPIWAT: COMPARISON OF NATURAL, BIOSTIMULATED AND BIOAUGMENTED DEGRADATIONS OF DIURON CONTAMINATED IN SOIL. THESIS ADVISOR: ASSIST. PROF. ALISA VANGNAI, Ph.D., THESIS CO-ADVISOR: EKAWAN LUEPROMCHAI, Ph.D., 100 pp.

Diuron (3-(3,4-dichlorophenyl)-1,1-dimethylurea) is a phynylurea herbicide widely used for vegetation control in agricultural areas such as cassava, pineapple, corn, cotton and sugar cane fields and nonagricultural area; for example, along road and railway line. However, diuron is very toxic, harmful and classified as carcinogen. It also sorbs well on soil surface and has low solubility, thus the contaminations of diuron have been found in environmental media including soil and water. It is necessary to develop a remediation technology for diuron in the environment. The objective of this study was to evaluate the best bioremediation technique for diuron contaminated soil treatment. Three types of bioremediation techniques, comprising of natural attenuation, biostimulation and bioaugmentation (with bacterial pure culture and bacterial consortium), were compared in two soil types, namely loam soil and silty clay soil, which contained 20 and 100 ppm of diuron. With 20-ppm diuron in loam soil, the greatest diuron degradation was observed with natural attenuation, i.e. 17% degradation within 8 weeks under the experiment condition A, while under the experiment condition B, diuron in natural attenuation and bioaugmentation were able to be highly degraded with maximal activity by 31% within 15 days. With 100-ppm diuron in loam soil, the greatest diuron degradation was observed with bioaugmentation with consortium A1 by 22% within 15 days. Under silty clay soil condition, there were no noticeable biodegradation among three types of treatment. The increasing of total microbial activity was detected with biostimulation with the addition of 1,000 ppm NH_4Cl by 4-fold in loam soil in both 20-ppm and 100-ppm diuron within 15 days.

Student's signature......Surachai S..........

Field of study.......Biotechnology.......Advisor's signature......Alisa Vangnai......

Academic year..........2006.............Co-advisor's signature......Ekawan L........

ACKNOWLEDGEMENTS

First of all, I wish to express my keen gratitude to Assistant Professor Dr. Alisa Vangnai, my impressive advisor for her suggestion and helpful guidance throughout this study. I would like to acknowledge my coadvisor Dr. Ekawan Leupromchai, for her helpful guidance and laboratory equipment in this study.

I would like to acknowledge my thesis committee Associate Professor Dr. Aran Incharoensakdi, Associate Professor Dr. Nattaya Ngamrojnavanich and Associate Professor Dr. Sirirat Rengpipat for serving as thesis committee, for valuable comments and also for useful suggestions.

There are so many friends to mention from so little space to fill. I would like to give a deep thank to all staff members of room 604, 617, 618 and 707 and friends in the Department of Biochemistry and Program in Biotechnology for their assistance and friendship. I would like to express thanks to Miss Hathairath T.Wattanaphon who give *Enterobacter* strain P2 and *Burkholderia capacia* strain P3 and provide the most useful information for this research.

This work was financially supported by Graduate School and Program in Biotechnology, Faculty of Science, Chulalongkorn University.

Finally, I would like to extend my deepest gratitude to my parents for their love, understanding, encouragement and everything giving to my life.

CONTENTS

	Page
THAI ABSTRACT..	iv
ENGLISH ABSTRACT..	v
ACKNOWLEDGEMENTS..	vi
CONTENTS..	vii
LIST OF TABLES..	x
LIST OF FIGURES..	xi
ABBREVIATIONS..	xiii
CHAPTER I INTRODUCTION..	1
1.1 Statement of problem..	1
1.2 Objectives..	3
1.3 Hypothesis...	4
1.4 Scope of study..	4
CHAPTER II THEORETICAL BACKGROUND AND LITERATURE REVIEWS..................	6
2.1 Diuron..	6
2.1.1 The use of diuron...	6
2.1.2 Physical and chemical properties..	6
2.1.3 Toxicity..	8
2.1.4 Environmental fate...	8
2.2 Physical and chemical treatment of diuron....................................	9
2.3 Overview of bioremediation..	10
2.3.1 Basic concept of bioremediation...	11
2.3.2 Natural attenuation..	12
2.3.3 Biostimulation..	13
2.3.4 Bioaugmentation...	13
2.4 Diuron biodegradation and bioremediation....................................	14

Page

2.5 Total microbial activity study.. 17
2.6 Microbial community analysis.. 18

CHAPTER III MATERIALS AND METHODS.............. 21
3.1 Chemicals and equipments.. 21
3.1.1 Chemicals.. 21
3.1.2 Equipments.. 22
3.2 Culture medium.. 23
3.2.1 The mineral salt medium (MSM).. 23
3.2.2 Luria bertani medium (LB).. 23
3.3 Soil preparation.. 24
3.4 Recovery of diuron from soil.. 25
3.5 Biodegradation of diuron by bacterial in liquid medium.......... 25
3.5.1 Preparation of bacterial inoculum.. 26
3.5.2 Study of diuron degradation.. 26
3.6 Biodegradation of diuron in soil.. 26
3.6.1 Microcosm description of bioremediation treatments...... 26
3.6.1.1 Description of control experiment.. 29
3.6.1.2 Sampling time.. 29
3.6.1.3 Experimental flow chart.. 29
3.6.2 Diuron analysis.. 31
3.6.2.1 Diuron extraction.. 31
3.6.2.2 Diuron analysis by HPLC.. 31
3.6.2.3 Diuron calibration curve.. 31
3.6.3 Microbiological analysis.. 31
3.6.3.1 Determination of the amount of diuron degrading bacteria.. 31
3.6.3.2 Total microbial activity by dehydrogenase activity assay.. 32
3.6.3.3 Analysis of microbial community.. 33

Page

3.6.3.3.1 DNA extraction from soil........................ 33

3.6.3.3.2 Polymerase chain reaction of 16S rDNA...... 34

3.6.3.3.3 Non-determination polyacrylamide gel electrophoresis.................................... 35

3.6.3.3.4 Silver staining.................................... 35

CHAPTER IV RESULTS.. 37

4.1 Soil properties.. 37

4.2 Recovery of diuron from soil.. 39

4.3 Biodegradation of diuron in liquid medium......................... 41

4.4 Biodegradation of diuron in soil microcosm......................... 47

4.4.1 Bioremediation: condition A 47

4.4.1.1 Diuron degradation in loam soil........................ 48

4.4.1.2 Diuron degradation in silty clay soil.................. 55

4.4.2 Bioremediation: condition B........ 62

4.4.2.1 Diuron degradation in loam soil........................ 62

4.4.2.2 Diuron degradationi in silty clay soil.................. 68

CHAPTER V DISCUSSION.. 73

CHAPTER VI CONCLUSIONS AND RECOMMENDATIONS.................. 78

6.1 Conclusions.. 78

6.2 Recommendations.. 79

REFERENCES.. 81

APPENDICES.. 90

BIOGRAPHY... 100

LIST OF TABLES

Table		Page
2.1	Imported herbicide by value in 2003	7
2.2	Physical and chemical properties of diuron..................................	7
3.1	The analysis methods for soil properties.................................	24
4.1	Properties of soil samples...	38
4.2	Characteristic of colonies of the bacterial consortium A1............	46
4.3	Microbial activity estimated by dehydrogenase activity of loam soil treated condition A	54
4.4	Microbial activity estimated by dehydrogenase activity of silty clay soil treated with 20 or 100-ppm condition A	61
4.5	Microbial activity estimated by dehydrogenase activity of loam soil treated with 20 or 100-ppm condition B	67

LIST OF FIGURES

Figure		Page
2.1	Predicted pathway reactions of chemical degradation of diuron	9
2.2	Metabolic pathways of bacterial degradation of diuron and 3,4-dichloroaniline..........	16
3.1	Diuron	21
3.2	The experimental flow chart of soil microcosms..........	30
4.1	The agricultural soil Type I and II	37
4.2	Recovery percentage of diuron extracted from loam soil using liquid-liquid extraction..........	40
4.3	Recovery percentage of diuron extracted from silty clay soil using liquid-liquid extraction..........	40
4.4	Bacterial pure culture: *Enterobacter* strain P2 and *Burkholderia capacia* strain P3 on LB-agar plate..........	41
4.5	Diuron biodegradation in liquid medium of pure bacterial cultures......	42
4.6	Four bacteria consortiums; A1, Y2, R3, and B4 grown in minimal salt medium containing 10 ppm diuron..........	43
4.7	Diuron biodegradation of four bacteria consortiums; A1, Y2, R3, and B4 grown in minimal salt medium containing 10 ppm diuron...........	44
4.8	Comparison of bacterial consortium A1 colonies grown on LB-agar and MSM-agar plate containing diuron 20 ppm	45
4.9	Gram's staining of bacterial consortium A1..........	46
4.10	Biodegradation of 20-ppm diuron in loam soil..........	49
4.11	Biodegradation of 100-ppm diuron in loam soil..........	50
4.12	Number of diuron-degrading bacteria in loam soil..........	52
4.13	Biodegradation of 20-ppm diuron in silty clay soil..........	56
4.14	Biodegradation of 100-ppm diuron in silty clay soil..........	57
4.15	Number of diuron-degrading bacteria in silty clay soil..........	59
4.16	Biodegradation of 20 ppm and 100 ppm of diuron in soil loam........	63
4.17	Number of diuron-degrading bacteria in loam soil..........	65
4.18	Biodegradation of 20 ppm and 100 ppm of diuron in silty clay soil......	69

Figure **Page**

4.19	Number of diuron-degrading bacteria in silty clay soil………………....	70
4.20	SSCP profile of the bioremediation treatment of condition B …………	72

LIST OF ABBREVIATIONS

°C	Degree of Celsius
cm	centimeter
EDTA	Ethelenediaminetetraacetic acid
et al.	Et. Alii (latin), and others
h	hour
HCl	Hydrochloric acid
l	liter
M	molar
mg	milligram
min	minute
ml	milliliter
mM	millimolar
mol	mole
MW	molecular weight
nm	nanometer
O.D	Optical density
rpm	revolution per minutes
SDS	Sodium dodecyl sulfate
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylene ethylene diamine
v/v	volume by volume
µg	microgram
µl	microliter
CMC	Critical Micelle Concentration