การคัดแยกแบคทีเรียที่ทนต่อสารไพรีทรอยด์จากดินในพื้นที่การเกษตร

Screening of Pyrethroid Resistance Bacteria from Agricultural Soil

จิตติมา กอหรั่งกูล[1]
[1]หลักสูตรนวัตกรรมชีวผลิตภัณฑ์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี
มหาวิทยาลัยราชภัฏวไลยอลงกรณ์ ในพระบรมราชูปถัมภ์
**ผู้นิพนธ์หลัก (Corresponding Author) E-mail:Jittima@vru.ac.th*

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อคัดแยกและศึกษาสมบัติเบื้องต้นของเชื้อแบคทีเรียที่ทนต่อสารไพรีทรอยด์จากดินเกษตรด้วยเทคนิค Enrich culture โดยทำการเจือจางตัวอย่างดินแบบลดลำดับส่วนแล้วเลี้ยงเชื้อบนอาหาร TSA (Tryptic Soy Agar) สามารถแยกเชื้อแบคทีเรียที่มีลักษณะโคโลนีที่แตกต่างกันได้ 3 ไอโซเลต เมื่อนำแบคทีเรียที่ได้มาศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและทดสอบสมบัติทางชีวเคมี ผลที่ได้คาดว่าไอโซเลต PT1 และ PT3 น่าจะเป็นแบคทีเรียในสกุล *Micrococcus* sp. ส่วน PT2 น่าจะเป็นแบคทีเรียในสกุล *Bacillus* sp. ผลการทดสอบหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารไพรีทอยด์ต่อการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย (MIC : Minimum Inhibitory Concentration) พบว่าเชื้อแบคทีเรียมีค่า MIC สูงสุดอยู่ที่ 7.5 mM คือไอโซเลต PT1

คำสำคัญ: ไพรีทรอยด์, การบำบัดทางชีวภาพ, การย่อยสลายทางชีวภาพ

Abstract

The objective of this study is to screen and study preliminary characteristics of pyrethroid resistant bacteria from agricultural soil. Bacteria were isolated from pyrethroid contaminated soil using enrichment culture technique with serial dilution and culture on Tryptic Soy Agar (TSA). The results showed that 3 isolates of bacteria were screened. The isolates were characterized by staining and different biochemical tests. The results indicated that the isolate PT1 and PT3 would probably be *Staphylococcus* sp. and the isolate PT2 should be *Bacillus* sp. The pyrethroid minimum inhibitory concentration (MIC) study found that the highest MIC was 7.5 mM which was the MIC of isolate PT1.

Keywords: Pyrethroid, Bioremediation, Biodegradation

บทนำ

ประเทศไทยมีการใช้สารกำจัดศัตรูพืชกันอย่างกว้างขวาง ทำให้ส่งผลกระทบทั้งทางตรงและทางอ้อมต่อระบบนิเวศเนื่องด้วยสารเคมีเหล่านี้คงทนและยากต่อการย่อยสลาย (ศิริพรรณ สารินทร์, 2550) ไพรีทรอยด์เป็นกลุ่มสารเคมีสังเคราะห์ที่เลียนแบบสารสกัดจากธรรมชาติ ไพรีทรัม (Pyrethrum) หรือไพริทริน (Pyrethrins) ที่พบในพืชตระกูลดอกเบญจมาศ ไพรีทรอยด์สังเคราะห์คล้ายกับไพริทรินตามธรรมชาติแต่ได้รับการปรับปรุงเพิ่มความคงอยู่ได้ในสิ่งแวดล้อม (สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา, 2552) สารที่รู้จักและใช้กันในขณะนี้ได้แก่ ไซเปอร์เมธริน (Cypermethin) และ เดลตาเมธริน (Deltamethrin) (สถาบันอาหาร กระทรวงอุตสาหกรรม)

จากการที่ไพรีทรอยด์ถูกจัดว่าปลอดภัยกว่าและเป็นทางเลือกแทนการใช้สารกำจัดศัตรูพืชในกลุ่ม organophosphates (OPs) ทำให้เป็นที่นิยมมากขึ้น การใช้สารไพรีทรอยด์ที่เพิ่มมากขึ้นอย่างต่อเนื่องส่งผลให้เกิดปัญหาการปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อมทั้งในส่วนของดินและน้ำและส่งผลถึงสิ่งมีชีวิตที่ไม่ใช่เป้าหมายในการกำจัด (Antwi and Reddy, 2015) จากคุณสมบัติของสารที่เป็น Highly hydrophobic ทำให้ไพรีทรอยด์สามารถยึดเกาะกับอนุภาคของดินและสารอินทรีย์ได้ดี ส่งผลให้ถูกชะล้างลงสู่แหล่งน้ำใต้ดินและก่อให้เกิดผลเสียต่อระบบนิเวศ (Xu และคณะ, 2015) มีรายงานว่าไพรีทรอยด์ส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงเชิงปริมาณและคุณภาพของจุลินทรีย์ในดิน ก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงต่อสมดุลของไนโตรเจนในดินซึ่งนำไปสู่ผลกระทบต่อการเจริญเติบโตของพืชและความอุดมสมบรูณ์ของดิน (Tejada และคณะ, 2015, Das และคณะ 2016) ในส่วนของสิ่งมีชีวิตไพรีทรอยด์ส่งผลต่อระบบประสาทของสัตว์มีกระดูกสันหลังและสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังโดยการก่อให้เกิดสภาวะตื่นตัวที่มากเกินไปและทำลายการทำงานของโซเดียมชาแนลส่งผลให้โซเดียมชาแนลเปิดในระยะเวลาที่นานกว่าปกติ (Vijvergerg HP และคณะ, 1990)

การบำบัดทางชีวภาพ (Bioremediation) เป็นวิธีที่อาศัยความสามารถของจุลินทรีย์ในการย่อยสารพิษให้มีปริมาณลดลง ในดินและในน้ำที่มีการปนเปื้อนสารกำจัดศัตรูพืชจากหลายๆ แหล่งได้มีการรายงานว่าสามารถบำบัดการปนเปื้อนนี้ได้โดยการใช้จุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการย่อยสลายสารพิษ (Mariusz Cycon’ และ Zofia Piotrowska-Seget, 2016) วิธีการทางชีวภาพที่อาศัยกิจกรรมของแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายสารปราบศัตรูพืชได้จึงเป็นวิธีที่เหมาะสมและมีประสิทธิภาพวิธีหนึ่งในการบำบัดสารฆ่าแมลงที่ตกค้างอยู่ในสิ่งแวดล้อม

วัตถุประสงค์

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อแยกเชื้อแบคทีเรียที่ทนต่อสารไพรีทรอยด์จากดินในพื้นที่การเกษตรภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจน เพื่อการประยุกต์และพัฒนาสู่การเป็นจุลินทรีย์ที่ใช้ในการบำบัดสารไพรีทรอยด์โดยกระบวนการทางชีวภาพ

วิธีการวิจัย

1. การเก็บตัวอย่าง

เก็บตัวอย่างดินจากพื้นที่การเกษตรซึ่งมีประวัติในการปลูกข้าวในเขต ตำบลดาวเรือง อำเภอเมือง จังหวัดสระบุรี ทำการเก็บตัวอย่างในช่วงฤดูฝน ตัวอย่างดินมีประวัติการใช้สารกำจัดศัตรูพืชหลังจากฉีดพ่น 3-5 สัปดาห์ โดยใช้พลั่วมือขุดหลุมลึกระดับ 0-15 เซนติเมตร ซึ่งเป็นความลึกระดับไถพรวน เก็บตัวอย่างดินส่วนตรงกลางจำนวน 5 จุด จุดละ 500 กรัม ใส่ถุงรวมกันเพื่อนำไปใช้ในการคัดเลือกแบคทีเรีย และเก็บสารไพรีทรอยด์ที่ฉีดพ่นในพื้นที่ใส่ขวดสีชาเพื่อนำมาทำการทดลองต่อไป (พันธุ์เครือ ทิพย์โสด และคณะ, 2558)

2. การคัดแยกแบคทีเรีย

เจือจางตัวอย่างดิน 1 กรัม ครั้งละ 10 เท่า (ten-fold serial dilution) ให้ได้ 2 ระดับ คือเป็น 10 เท่า 5 และ 6 ครั้ง (10^{-5}, 10^{-6}) จากนั้นนำมาแยกเชื้อโดยการเกลี่ยเชื้อลงบนอาหารแข็ง (Tryptic Soy Agar – TSA) ที่มีไพรีทรอยด์เข้มข้น 20 mM (MC Ifediegwu, 2015) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เลือกแบคทีเรียที่เป็นโคโลนีเดี่ยวและมีลักษณะต่างกันมา streak ลงบนอาหารแข็งวุ้นเอียง TSA เพื่อทำการทดลองต่อไป

3. การจำแนกชนิดของแบคทีเรียที่แยกได้

แบคทีเรียที่แยกได้จากวิธีในข้อ 2. นำมาจำแนกชนิดโดยศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาและลักษณะทางกายภาพที่ปรากฏบนอาหารเลี้ยงเชื้อ รวมทั้งทดสอบสมบัติทางชีวเคมี โดยทำการศึกษาขนาด ลักษณะ ผิวสัมผัส และสีของโคโลนี การย้อมแกรม ทดสอบการสร้างแก๊สในอาหาร EC broth ทดสอบการหมักคาร์บอไฮเดรตและการสร้างแก๊สไฮโดรเจนซัลไฟด์บนอาหาร Triple Sugar Iron (TSI) และทดสอบการสังเคราะห์เอนไซม์ยูรีเอสในอาหาร Urea agar (base)

4. การหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย (Minimal Inhibitory concentration; MIC)

นำแบคทีเรียที่แยกได้มาเลี้ยงในอาหาร Muller Hinton broth 20 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่ความเร็วรอบ 200 rpm เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง จากนั้นนำมาวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร ปรับค่าความขุ่นให้ได้ 0.5 McFarland (ประมาณ 10^8 CFU/ml) นำหลอดทดลองที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วจำนวน 10 หลอด ทำการดูดอาหาร Muller Hinton broth ใส่ลงไปในหลอดที่ 2-10 หลอดละ 1 มิลลิลิตร และดูดสารไพรีทรอยด์ที่เตรียมไว้ซึ่งมีความเข้มข้น 60mM ใส่ลงไปในหลอดที่ 1 และ 2 หลอดละ 1 มิลลิลิตร จากนั้นดูดสารละลายในหลอดที่ 2 จำนวน 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดที่ 3 ทำซ้ำในทำนองเดียวกันไปจนถึงหลอดที่ 9 สำหรับหลอดที่ 9 ผสมสารละลายให้เข้ากันดีแล้วทำการดูดสารละลายในหลอดที่ 9 ทิ้งไป 1 มิลลิลิตร สำหรับหลอดที่ 10 จะมีอาหารเลี้ยงเชื้อเพียงอย่างเดียวซึ่งใช้เป็น Positive control (PS) จากนั้นทำการเติมเชื้อที่เตรียมไว้ใส่ลงในหลอดที่ 1 ถึงหลอดที่ 10 หลอดละ

100 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง ซึ่งค่า MIC จะได้จากค่าความเข้มข้นของสารที่ต่ำที่สุดที่เชื้อไม่สามารถเจริญเติบโตได้

ผลและอภิปรายผลการวิจัย

จากการเก็บตัวอย่างดินจากพื้นที่การเกษตรในจังหวัดสระบุรีเพื่อคัดแยกแบคทีเรียที่ทนต่อสารไพรีทรอยด์ โดยทำการเจือจางเป็นลำดับส่วน แล้วเลี้ยงเชื้อบนอาหาร TSA (Tryptic Soy Agar) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ไพรีทรอย์ถูกใช้เป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับการแยกเชื้อสายพันธุ์ที่สามารถทนต่อไพรีทรอยด์ได้โดยใช้ Enrichment technique ในการคัดแยกเชื้อสามารถแยกแบคทีเรียได้ทั้งหมด 3 ไอโซเลตซึ่งสามารถเจริญได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีความเข้มข้นของไพรีทรอยด์ 20 mM โดยให้ชื่อว่า PT1 PT2 และ PT3 ความสามารถในการทนต่อสารกำจัดศัตรูพืชของไอโซเลตหล่านี้จะนำไปทำการทดสอบค่า Minimum Inhibitory Concentration (MIC) ต่อไป

นำเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้ทั้ง 3 ไอโซเลตมาทำการศึกษาทางสัญฐานวิทยา ทำการย้อมแกรม ย้อมสปอร์ ศึกษาลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ และทดสอบทางชีวเคมีเพื่อศึกษาการหมักคาร์โบไฮเดรตและการสร้างไฮโดรเจนซัลไฟด์ ศึกษาการสังเคราะห์เอนไซม์ยูรีเอสและศึกษาการสร้างแก๊ส ผลที่ได้ดังแสดงในตารางที่ 1 และ 2

ตารางที่ 1 ลักษณะโคโลนีของแบคทีเรียที่แยกได้จากดินที่มีการปนเปื้อนสารไพรีทรอยด์

ไอโซเลต	ลักษณะของโคโลนี			
	รูปร่าง	ลักษณะผิวหน้า	ลักษณะขอบ	สีของโคโลนี
PT1	กลมขนาดใหญ่	มันวาว	ขอบเรียบ	สีขาวใส
PT2	กลมขนาดใหญ่	ไม่มันวาว	ขอบหยัก	สีขาวขุ่นทึบแสง
PT3	กลมขนาดเล็ก	มันวาว	ขอบเรียบ	สีขาวใส

ตารางที่ 2 ลักษณะรูปร่างภายใต้กล้องจุลทรรศน์และผลการทดสอบทางชีวเคมี

การทดสอบ	PT1	PT2	PT3
ย้อมแกรม	+	+	+
ลักษณะใต้กล้องจุลทรรศน์	Cocci	Rod	Cocci
ย้อมสปอร์	-	+	-
TSI	-/-	K/A	-/-
EC	++	--	++
Urease	+	-	+

หมายเหตุ: K/A = มีการหมักคาร์โบไฮเดรตและสร้างกรด

-/- = ไม่มีการหมักคาร์โบไฮเดรตและไม่มีการสร้างกรด

จากการศึกษาลักษณะโคโลนี ภายใต้กล้องจุลทรรศน์และทดสอบทางชีวเคมีพบว่า ลักษณะโคโลนีของเชื้อทั้ง 3 ไอโซเลตมีความคล้ายคลึงกัน แตกต่างกันเล็กน้อยที่ขนาดและลักษณะขอบของโคโลนี โดย PT1 และ PT3 มีสีของโคโลนีที่ขาวใสลักษณะผิวหน้ามันวาวและมีของเรียบ แต่แตกต่างกันที่ขนาดของโคโลนี โดย PT1 มีขนาดของโคโลนีที่ใหญ่กว่า PT3 ส่วนไอโซเลต PT2 มีขนาดโคโลนีใหญ่ ผิวหน้าไม่มันวาว ขอบหยักและมีสีขาวขุ่นทึบแสง จากลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์แสดงให้เห็นว่าทั้ง 3 ไอโซเลตย้อมติดสีแกรมบวก โดยไอโซเลต PT1 และ PT3 มีลักษณะกลมย้อมไม่ติดสปอร์ ส่วน PT2 มีลักษณะท่อนย้อมติดสปอร์ เมื่อนำไปทดสอบทางชีวเคมีพบว่า ไอโซเลต PT1 และ PT3 ไม่มีการสร้างกรดไม่ไม่เกิดการย่อยคาร์โบไฮเดรต มีการสังเคราะห์เอนไซม์ยูรีเอส จึงทำให้สามารถคาดได้ว่าเชื้อไอโซเลต PT1 และ PT3 เป็นเชื้อในกลุ่ม *Micrococcus* sp. จากการทดสอบทางชีวเคมีของไอโซเลต PT2 พบว่ามีการย่อยคาร์โบไฮเดรตและมีการสร้างกรด ไม่พบการสังเคราะห์ยูรีเอส จึงคาดว่า PT2 น่าจะเป็นเชื้อในกลุ่ม *Bacillus* sp. ผลที่ได้นี้ สอดคล้องกับงานวิจัยในการแยกแบคทีเรียจากดินที่มีการปนเปื้อนยาปราบศัตรูพืชในกลุ่มไพรีทรอยด์ ซึ่งเมื่อทำการศึกษาเพื่อระบุชนิดของแบคทีเรียพบว่าเป็นแบคทีเรียในกลุ่ม *Micrococcus sp.* (Tallur และคณะ, 2008) และ *Bacillus cibi* (Pandey และคณะ, 2014) ซึ่งเชื้อแบคทีเรียดังกล่าวนี้มีความสามารถในการย่อยสลายสารในกลุ่มไพรีทรอยด์ได้ ในการบ่งชี้ชนิดของเชื้อควรมีการทดสอบทางชีวเคมีเพิ่มเติมรวมถึงการทำการศึกษาลำดับเบสเพื่อระบุชนิดของเชื้อที่ชัดเจนต่อไป แบคทีเรียสายพันธุ์อื่นๆ ที่มีการศึกษาและพบว่ามีความสามารถในการย่อยสลายอย่างเช่น *Xanthomonas maltophilia* พบว่าสามารถเจริญได้ในความเข้มข้นที่แตกต่างกันของไซเปอร์เมธริน (Jabeen และคณะ, 2017) *Pseudomonas sp.* และ *Serratia sp.* ซึ่งแยกได้จากดินและน้ำยาแช่แกะสามารถใช้ไซเปอร์เมธรินและฟลูเมธรินเป็นแหล่งพลังงานได้ (Jilani S และ Altaf Khan M, 2004, Grant R และ Betts W, 2004)

แบคทีเรียทั้ง 3 ไอโซเลตที่แยกได้ นำมาทดสอบเพื่อหาค่า MIC โดยใช้ความเข้มข้นของสารไพรีทรอยด์เริ่มต้นที่ 30 mM เพื่อหาความเข้มข้นต่ำสุดของสารไพรีทรอยด์ที่สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้ ซึ่งค่า MIC ของแบคทีเรียทั้ง 3 ไอโซเลต ดังแสดงในตารางที่ 3

ตารางที่ 3 ค่า MIC ของสารไพรีทรอยด์ที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 30 mM

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	PS
เชื้อ	30 mM	15 mM	7.5 mM	3.75 mM	1.87 mM	0.93 mM	0.46 mM	0.23 mM	0.11 mM	

PT1	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
PT2	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
PT3	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+

หมายเหตุ: PS = positive control

เมื่อนำแบคทีเรียทั้ง 3 ไอโซเลตมาทำการทดลองเพื่อหาค่าต่ำสุดของสารไพรีทรอยด์ที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียได้พบว่า ไอโซเลต PT1 มีค่า MIC สูงที่สุดอยู่ที่ 7.5 mM ส่วนไอโซเลต PT2 และ PT3 มีค่า MIC อยู่ที่ 1.87 mM และ 0.93 mM ตามลำดับ ซึ่งผลที่ได้สอดคล้องกับการทดลองของ Tallur และคณะ (2008) และ Pandey และคณะ (2014) ซึ่งพบว่าค่าความเข้มข้นสูงของสารในกลุ่มไพรีทรอยด์ที่เชื้อสามารถนำไปใช้ได้ สำหรับ *Micrococcus sp.* อยู่ที่ 2.40 mM และ สำหรับ *Bacillus cibi* อยู่ที่ 1.89 mM ตามลำดับ ผลที่ได้แสดงให้เห็นว่าปริมาณสารที่เหมาะสมสำหรับแบคทีเรียทั้ง 3 ไอโซเลตนี้แตกต่างกัน แต่อย่างไรก็ตามความเข้มข้นที่สูงไม่ก่อให้เกิดความเป็นพิษกับแบคทีเรียทั้ง 3 ไอโซเลต แต่จะมีผลต่อย่อยสลายสารปราบศัตรูพืชที่ลดลง จากการทดลอง Jilani และ Khan (2004) ใช้ความเข้มข้นของสารไซเปอร์เมธริน 80-125 ppm ในการทดสอบกับเชื้อ *Pseudomonas* พบว่าที่ความเข้มข้นที่สูงขึ้นระยะเวลาในการแบ่งตัวของจุลินทรีย์จะเพิ่มมากขึ้น และอัตราการใช้ซับสเตรตจะลดลง จากการศึกษาค่า MIC ของสารไซเปอร์เมธรินที่ได้จากการทดลองกับเชื้อ *Xanthomonas maltophilia* อยู่ที่ 100-200 μg/ml และมากกว่า 200 μg/ml สำหรับเชื้อ *Acinetobacter* (Jabeen และคณะ, 2017) ในการทดสอบการทนต่อสารปราบศัตรูพืชชนิดต่างๆ ของเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* PAL106 พบว่าสามารถทนต่อสารไซเปอร์เมธินได้ถึง 12,000 ppm (Naphade และคณะ, 2012) การศึกษาเหล่านี้แสดงให้เห็นถึงความสามารถของสายพันธุ์แบคทีเรียในการย่อยสลายสารในกลุ่มไพรีทรอยด์และใช้เป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับการเจริญเติบโต

จากการที่เชื้อแบคทีเรียไอโซเลต PT1 ทนต่อสารไพรีทรอยด์ได้ดีกว่า PT2 และ PT3 และสามารถทนต่อสารไพรีทรอยด์ที่ความเข้มข้นสูงได้ อาจเป็นเพราะแบคทีเรียมีการปรับตัวเพื่อให้สามารถอยู่ในสิ่งแวดล้อมที่ปนเปื้อน และมีกลไลที่สามารถปรับเปลี่ยนสารไพรีทรอยด์ให้เป็นสารที่มีความเป็นพิษน้อยลงหรือนำสารนั้นมาใช้ในการเจริญเติบโตได้ (Jiani และ Khan, 2004) ซึ่งคุณสมบัติเหล่านี้ทำให้สามารถพัฒนาเพื่อนำไปใช้ในกระบวนการการบำบัดสารกำจัดศัตรูพืชไพรีทรอยด์โดยกระบวนการทางชีวภาพได้ต่อไป

สรุปผลการวิจัย

จากการศึกษาการคัดแยกเชื้อแบคทีเรียที่ทนต่อไพรีทรอยด์ในพื้นที่การเกษตรพบว่าสามารถคัดแยกเชื้อที่ทนต่อไพรีทรอยด์ได้ 3 ไอโซเลตคือ PT1 PT2 และ PT3 ซึ่งแบคทีเรียเหล่านี้สามารถใช้ไพรีทรอยด์เป็นแหล่งคาร์บอนได้ จากการศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์และทดสอบทางชีวเคมีของเชื้อแบคทีเรียทั้ง 3 ไอโซเลตคาดว่า PT1 และ PT3 น่าจะเป็น *Micrococcus sp.* และ PT2 น่าจะเป็น *Bacillus sp.* แต่อย่างไรก็ตามผลของการทดสอบทางชีวเคมีมีไม่มากเพียงพอที่จะสรุปได้อย่างแน่ชัดว่าเชื้อที่แยกได้เป็นสายพันธุ์ดังกล่าวหรือไม่ จึงควรมีการทำการทดสอบทางชีวเคมีเพิ่มเติมรวมถึงศึกษาลำดับเบสเพื่อบ่งชี้ชนิดของเชื้อที่คัดแยกได้ให้ชัดเจนและถูกต้องต่อไป จากการทดสอบค่า MIC ของไพรีทรอยด์พบว่าไอโซเลต PT1 มีค่าสูงที่สุด โดยมีค่าอยู่ที่ 7.5 mM ควรมีการศึกษาต่อไปถึงสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเจริญเติบโต ร่วมกับศึกษาหาประสิทธิภาพในการย่อยสลายไพรีทรอยด์ของแบคทีเรียเหล่านี้ เพื่อให้สามารถนำเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้นี้ไปประยุกต์ใช้ในการบำบัดการปนเปื้อนของไพรีทรอยด์ในสิ่งแวดล้อมด้วยกระบวนการการฟื้นฟูทางชีวภาพต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

การวิจัยครั้งนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี เนื่องจากได้รับความอนุเคราะห์และช่วยเหลืออย่างดียิ่งจากหลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพ และศูนย์วิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏวไลยอลงกรณ์ ในพระบรมราชูปถัมภ์ ที่ให้ความอนุเคราะห์สถานที่ เครื่องมือวิทยาศาสตร์ ตลอดจนอุปกรณ์ในการวิจัยครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

พันธุ์เครือ ทิพย์โสด, ฐปน ชื่นบาล, ศิราภรณ์ ชื่นบาล และณิชมน ธรรมรักษ์ (2558). การศึกษาประสิทธิภาพของแบคทีเรียในการย่อยสลายสารไดโคโฟล. *การประชุมแห่งชาติมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน ครั้งที่ 9* (น.1158-1165). มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กำแพงแสน. ไทย. สืบค้นจาก https://esd.kps.ku.ac.th/kuk-conference/img/gallery/article_9/pdf/o_plant09.pdf

ศิริพรรรณ สารินทร์. (2550). *จุลชีววิทยาสิ่งแวดล้อม.* พิษณุโลก: สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยนเรศวร

สถาบันอาหาร กระทรวงอุตสาหกรรม. (ม.ป.ป). *สารกำจัดแมลงและศัตรูพืช กลุ่มไพรีทรับและสารสังเคราะห์ไพรีทรอยด์ (Pyrethrum and Pyrethroides).* สืบค้น 26 มกราคม 2564, จาก http://fic.nfi.or.th/foodsafety/upload/damage/pdf/pyrethrum_and_pyrethroides_2.pdf

สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา. (2552). *ปลอดยุงปลอดภัยถ้าถ้าใช้ยากันยุงถูกวิธี.* สืบค้น 25

มกราคม 2564, จาก https://db.oryor.com/databank

Antwi, F., and Reddy, G.V.P. (2015). Toxicological effects of pyrethroids on non-target aquatic insects. *Toxicol. Pharmacol.,* 40, 915-923. doi: 10.1016/j.etap.2015.09.023

Das, R., Das, S. J., and Das, A. C. (2016). Effect of synthetic pyrethroid insecticides on N2-fixation and its mineralization in tea soil. *Eur. J. Soil Biol.* 74, 9–15. doi: 10.1016/j.ejsobi.2016.02.005

Grant, R., and Betts, W. (2004). Mineral and carbon usage of two synthetic pyrethroid degrading bacterial isolates. *Journal of Applied Microbiology.* 97(3), 656-662. doi: 10.1111/j.1365-2672.2004.02358.x

Ifediegwu, MC. (2015). Isolation, Growth and Identification of Chlorpyrifos degrading bacteria from agricultural soil in Anambra State, Nigeria. *Universal Journal of Microbiology Research.* 3(4), 46-52. doi: 10.13189/ujmr.2015.030402

Jabeen, F., Ahmed, M., Ahmed, F., Biala, Sawar, B.M., Akhtar, S., and Shahid, A.A. (2017). Characterization of cypermethrin degrading bacteria: A hidden micro flora for biogeochemical cycling of xenobiotics. *Advancements in life sciences.* 4(3), 97-107. http://www.als-journal.com/articles/vol4issue3/435.17/241.pdf

Jilani, S., and Altaf Khan, M. (2004). Isolation, characterization and growth response of pesticides degrading bacteria. *Journal of Biological Sciences.* 4(1), 15-20. doi: 10.3923/ibs.2004.15.20

Mariusz, C. and Zofia, P-S. (2016). Pyrethroid-degrading microorganisms and their potential for their bioremediation of contaminated soils: A review. *Frontier in Microbiology.* 7, 1-26. doi: 10.3389/fmicb.2016.01463

Naphade, S.R., Durve, A.A., Bhot, M., Varghese, J. and Chandra, N. (2012). Isolation, characterization and identification of pesticide tolerating bacteria from garden soil. *European Journal of Experimental Biology.* 2(5), 1943-1951. https://www.imedpub.com/articles/isolation-characterization-and-identification-of-pesticide-tolerating-bacteria-from-garden-soil.pdf

Pandey, P., Pant, G., and Sibi, G. (2014). Isolation and characterization of bifenthrin catabolizing bacterial strain *Bacillus cibi* from soil for pyrethroids biodegradation. *Online Journal of Biological Sciences.* 14(3), 188-195. doi: 10.3844/ojbsci.2014.188.195

Tallur P.N., Megadi V.B., and Ninneka H.Z. (2008). Biodegradation of cypermethrin by *Micrococcus* sp. Strain CPN 1. *Biodegradation*. 19, 77-82. doi: 10.1007/s10532-007-9116-8

Tejada, M., García, C., Hernández, T., and Gómez, I. (2015). Response of soil microbial activity and biodiversity in soils polluted with different concentrations of cypermethrin insecticide. *Arch. Environ. Contam. Toxicol*. 69, 8–19. doi: 10.1007/s00244-014-0124-5

Vijverberg, HP., Vanden B.J. (1990). Neurotoxicological effects and the mode of action of pyrethroid insecticides. *Critical Reviews in Toxicology.* 21(20), 105-126 http://www.als-journal.com/articles/vol4issue3/435.17/241.pdf

Xu, Z., Shen, X., Zhang. X.-C., Liu, W., and Yang, F. (2015). Microbial degradation of alpha-cypermethrin in soil by compound-specific stable isotope analysis. *Journal of Hazardous Mater.* 295, 37-42. doi: 10.1016/j.jhazmat.2015.03.062