การศึกษาประสิทธิภาพของแบคทีเรียในการย่อยสลายสารไกลโฟเสท

Study on Efficiency of Bacteria on Glyphosate Degradation

จุไรรัตน์ อิมินา[1] ฐปน ชื่นบาล[1] และ ศิราภรณ์ ชื่นบาล[1]

Jurairat Eimina[1], Tapana Cheunbarn[1] and Siraporn Cheunbarn[1]

บทคัดย่อ

การคัดแยกแบคทีเรียจากดินในพื้นที่การเกษตรที่มีประวัติการใช้สารไกลโฟเสทเพื่อทดสอบหาแบคทีเรียในดินที่สามารถย่อยสลายสารไกลโฟเสท ด้วยเทคนิค Enrichment culture โดยการทำเจือจางเป็นลำดับส่วนแล้วทำการเลี้ยงเชื้อบนอาหาร TSA (Tryptic Soy Agar) ผลการทดลองพบว่าสามารถคัดแยกเชื้อแบคทีเรียได้ทั้งหมด 27 ไอโซเลต หลังจากนั้นทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายสารไกลโฟเสทในระดับห้องปฏิบัติการโดยทำการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียในอาหาร TSB (Tryptic Soy Broth) ที่มีสารไกลโฟเสทความเข้มข้น 20 ppm เขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที บ่มเชื้อที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 วัน เก็บตัวอย่างที่ระยะเวลา 5 และ 10 วัน เพื่อหาปริมาณความเข้มข้นของสารไกลโฟเสทด้วยเครื่อง High Performance Liquid Chromatograph (HPLC) ผลการทดลองพบว่าได้เชื้อแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายดีที่สุด จำนวน 5 ไอโซเลต ได้แก่ GJA2 GJA7 GJA8 GJA14 และ GJA26 โดยไอโซเลต GJA2 มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายสูงที่สุดเท่ากับ 73.3 เปอร์เซ็นต์ ที่ระยะเวลา 5 วัน และ ไอโซเลต GJA14 มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายเพิ่มสูงขึ้นเท่ากับ 95.9 เปอร์เซ็นต์ ที่ระยะเวลา 10 วัน

ABSTARCT

Bacteria were isolated from soils glyphosate contaminated by using enrichment culture technique with serial dilution and culture on Tryptic Soy Agar (TSA). The results showed that bacteria 27 bacterial isolates were initially found to be capable of degrading glyphosate. Then, the quantity of glyphosate degradation test was determination by added glyphosate for the concentration to 20 ppm in Tryptic Soy Broth (TSB). Next, shake at speeds 150 rounds per minutes for 10 days which it incubates at 37 degrees C. Finally, sampling at day 5 and day 10 to determines the concentrations of glyphosate with High Performance Liquid Chromatograph (HPLC). The results showed that 5 isolates including GJA2, GJA7, GJA8, GJA14, and GJA26 were best glyphosate degradations. Especially isolates GJA2 had the highest glyphosate degradation rate of 73.3 % at day 5 and the isolate GJA14 up to 95.9 % at day 10.

Key Words : bacteria, degrading, glyphosate

e-mail address: ja_jurairat@hiotmail.com

[1] ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ เชียงใหม่ 50290

[1] Department of Biotechnology, Faculty of Science, Maejo University, Chiang Mai 50290

คำนำ

ประเทศไทยเป็นประเทศที่ประชากรส่วนใหญ่ประกอบอาชีพด้านเกษตรกรรม เนื่องจากมีพื้นที่ ที่เหมาะสมในการทำการเกษตร พืชเศรษฐกิจที่สำคัญที่ทำรายได้เข้าสู่ประเทศ ได้แก่ ผัก และผลไม้

การใช้สารเคมีกำจัดวัชพืชเป็นวิธีการที่นิยมใช้กันอย่างกว้างขวาง โดยเฉพาะสารไกลโฟเสท ซึ่งจัดเป็นสารเคมีที่มียอดการใช้ทั้งในประเทศและต่างประเทศในแต่ละปีเป็นจำนวนมาก (พรชัย, 2541) ไกลโฟเสทจัดอยู่ในกลุ่มฟอสฟอเนท ชื่อทางเคมีคือ N – phosphonomethyl glycine มีคุณสมบัติเป็นสารกำจัดวัชพืชที่สามารถทำลายรากของต้นวัชพืชที่อยู่ใต้ดินทำให้วัชพืชตายทั้งต้น ใช้กำจัดวัชพืชทั้งใบแคบและใบกว้าง เมื่อวัชพืชได้รับสารไกลโฟเสทจะแสดงอาการเหี่ยวและเหลืองแล้วตาย เนื่องจากสารไกลโฟเสทจะเข้าไปขัดขวางกลไกการสังเคราะห์โปรตีนภายในต้นวัชพืช (อำพร, 2538)

ในปัจจุบันเกษตรกรได้เห็นถึงอันตรายที่เกิดขึ้นจากการใช้สารเคมีกำจัดวัชพืชมากขึ้น ซึ่งสารกำจัดวัชพืชที่ใช้มีความเป็นพิษต่อพืช คน สัตว์ และสิ่งแวดล้อม อีกทั้งสารเคมีบางชนิดยังเกิดการสะสมอยู่ในดินเป็นเวลานาน ทำให้ส่งผลต่อการเพาะปลูกและสิ่งแวดล้อมในบริเวณใกล้เคียง และสามารถคงทนอยู่ในดินได้เป็นเวลานาน ทำให้จุลินทรีย์ในดินลดลง ความอุดมสมบูรณ์ของดินและผลผลิตของพืชปลูกลดลง เนื่องจากสารกำจัดวัชพืชเหล่านั้นไม่ถูกย่อยสลาย ทำให้ตกค้างอยู่ในดินได้เป็นเวลานาน แต่ในการทำการเกษตรขาดการพัฒนาอาชีพเกษตรกรรมอย่างเป็นระบบ ทำให้ประสบปัญหาด้านสิ่งแวดล้อม ซึ่งมีการใช้สารเคมีในปริมาณที่มากเกินที่กำหนด และเกิดการตกค้างในดินส่งผลให้ดินเสื่อมโทรม ต้องใช้ปุ๋ยเคมีมากขึ้นต้นทุนการผลิตสูงขึ้นตามไปด้วย นอกจากนี้ยังส่งผลกระทบต่อคุณภาพมาตรฐานในด้านความปลอดภัยของผลผลิตทางการเกษตร ทั้งสินค้าที่บริโภคในประเทศและสินค้าส่งออก หากมีการสะสมของสารพิษเหล่านี้อยู่ในผลผลิตทางการเกษตรมากขึ้นการเกิดโรคภัยไข้เจ็บจะมากขึ้นอย่างชัดเจน สินค้าจะไม่เป็นที่ยอมรับของตลาดโลก ส่งผลเสียต่อการส่งออกสินค้าเกษตรของไทย (ทศพล, 2545)

อลิสา (2553) กล่าวว่า การบำบัดสารมลพิษทางชีวภาพ เป็นกระบวนการบำบัดสารที่ปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อมด้วยวิธีทางชีวภาพที่มนุษย์ทำให้เกิดขึ้น โดยอาศัยความสามารถของจุลินทรีย์หรือพืชในการย่อยสลายสารมลพิษให้หมดไป หรือการเปลี่ยนรูปสารมลพิษที่มีความเป็นพิษต่อมนุษย์และสิ่งมีวิตในสิ่งแวดล้อมให้มีความเป็นพิษน้อยลง นอกจากนี้วิธีที่สำคัญในกำจัดสารไกลโฟเสทในดินคือการย่อยสลายโดยระบบเอนไซม์ของจุลินทรีย์บางชนิด (Rueppel *et al.,* 1977; Strange-Hansen *et al.,* 2004) และสารไกลโฟเสทในดินจะย่อยสลายได้ดีขึ้นอยู่กับปริมาณและกิจกรรมของจุลินทรีย์ (Sorensen *et al.,* 2006)

Beulke *et al.* (2004) กล่าวว่า จุลินทรีย์ในดินโดยเฉพาะ แบคทีเรีย รา เป็นตัวสำคัญในการย่อยสลายสารเคมีทางการเกษตร และสภาพแวดล้อมที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์จะทำให้อัตราการย่อยสลายสารกำจัดวัชพืชมีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น

ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์ที่จะคัดแยกแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายสารไกลโฟเสท เพื่อนำไปประยุกต์ใช้ในการฟื้นฟูดินที่มีการปนเปื้อนสารไกลโฟเสทในประเทศไทย ซึ่งคาดว่าจะสามารถแก้ปัญหาการเสื่อมโทรมของดินและปัญหาสารพิษตกค้างในพื้นที่ทำการเกษตรได้

อุปกรณ์และวิธีการ

1. การคัดแยกแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายสารไกลโฟเสท

เก็บตัวอย่างดินในพื้นที่แปลงเพาะปลูกที่มีประวัติการฉีดพ่นสารไกลโฟเสทผ่านไป 4 สัปดาห์ โดยใช้พลั่วขุดหลุมลึกระดับ 0-15 เซนติเมตร ซึ่งเป็นความลึกระดับไถพรวน เก็บดินใส่ถุงเก็บตัวอย่างเพื่อนำไปใช้ในการคัดเลือกแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายสารไกลโฟเสท แหล่งที่เก็บตัวอย่างดิน ได้แก่

- สวนลำไย ต.แม่สอย อ.จอมทอง จ.เชียงใหม่
- สวนหอม ต.แม่สอย อ.จอมทอง จ.เชียงใหม่
- ไร่ข้าวโพด ต.แม่สอย อ.จอมทอง จ.เชียงใหม่
- สวนมะม่วง ต.แม่สอย อ.จอมทอง จ.เชียงใหม่
- สวนส้ม ต.แม่อาย อ.ฝาง จ.เชียงใหม่
- ไร่มันฝรั่ง ต.แม่อาย อ.ฝาง จ.เชียงใหม่

นำตัวอย่างดินมาทำการเจือจางเป็นลำดับส่วน จากนั้นนำมาแยกเชื้อโดยการเกลี่ยเชื้อบนอาหาร Tryptic Soy Agar (TSA) ที่มีสารไกลโฟเสทเป็นองค์ประกอบ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เลือกโคโลนีที่ปรากฏวงใสรอบโคโลนีและทำการแยกบริสุทธิ์โดยการใช้เข็มเขี่ยที่ฆ่าเชื้อแล้วแตะเชื้อ และนำไปลากบนผิวอาหารแข็ง ไม่ให้เส้นทับกันกับรอยลากแรกๆ จะให้การเจริญที่ติดต่อกัน รอยลากท้ายๆ จะทำให้เซลล์ แต่ละเซลล์จะเจริญขึ้นเป็นโคโลนีที่แยกกัน บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมงจากนั้นเก็บเป็นเชื้อทดสอบในอาหารแข็งวุ้นเอียง

2. การทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายสารไกลโฟเสทในระดับห้องปฏิบัติการ

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptic Soy Broth (TSB) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร เติมสารไกลโฟเสทลงไปให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 20 ppm (ชุดควบคุม) จากนั้นเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptic Soy Broth (TSB) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ใส่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร แล้วเขี่ยเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้ใส่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptic Soy Broth (TSB) แล้วนำไปเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำการวัดการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 660 นาโนเมตร ให้ได้เท่ากับ 1 จากนั้นทำการเติมสารไกลโฟเสทลงไปในอาหารที่มีเชื้อแบคทีเรียที่ใช้ในการทดสอบข้างต้นให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 20 ppm นำตัวอย่างทั้งหมดรวมทั้งชุดควบคุมไปเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ทำการเก็บตัวอย่างที่ 5 และ 10 วัน เพื่อทำการทดสอบความเข้มข้นของสารไกลโฟเสทที่ลดลงด้วยเครื่อง High-Performance Liquid Chromatography (HPLC) รุ่น Agilent 1100

ผลการทดลองและวิจารณ์

1.การคัดแยกแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายสารไกลโฟเสท

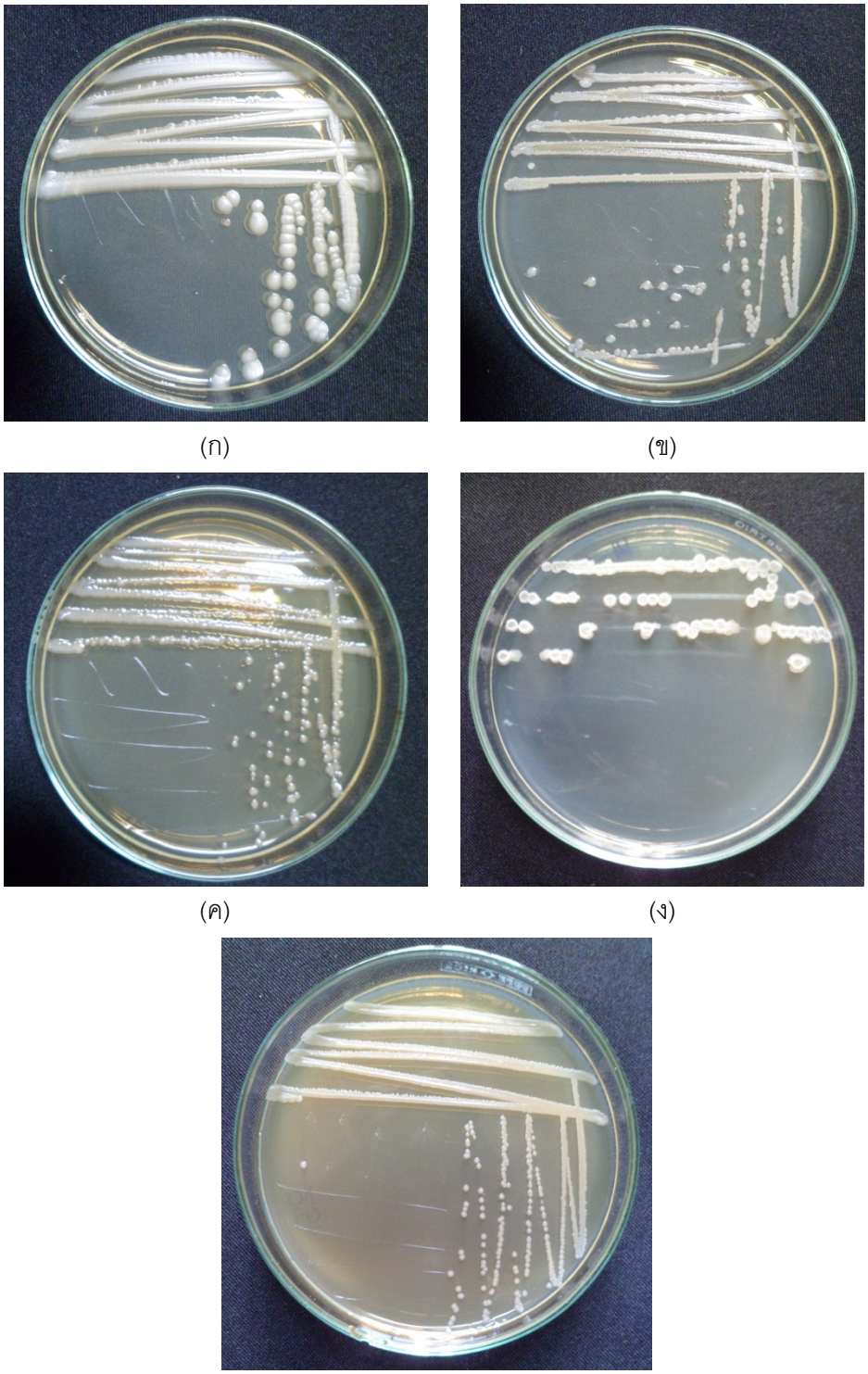
จากการเก็บตัวอย่างดินจากแหล่งต่างๆ จำนวน 6 แหล่ง เพื่อคัดแยกแบคทีเรียโดยทำการเจือจางเป็นลำดับส่วน แล้วเลี้ยงเชื้อบนอาหาร TSA (Tryptic Soy Agar) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สามารถแยกเชื้อแบคทีเรียได้ทั้งหมด 27 ไอโซเลต ดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 จำนวนแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายสารไกลโฟเสทที่คัดแยกได้

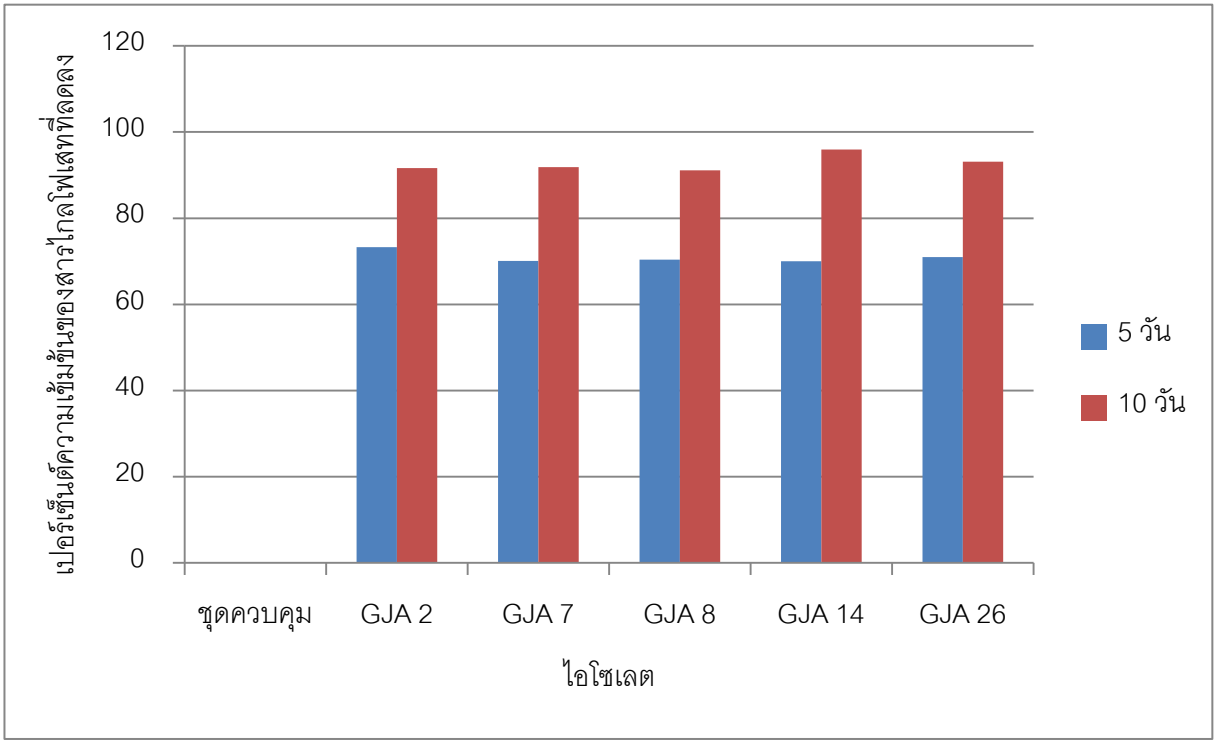
ลำดับ	สถานที่เก็บตัวอย่าง	จำนวนไอโซเลต	รหัสเชื้อ
1	สวนลำไย ต.แม่สอย อ.จอมทอง จ.เชียงใหม่	5	GJA1, GJA2, GJA3, GJA4,GJA5
2	สวนหอม ต.แม่สอย อ.จอมทอง จ.เชียงใหม่	3	GJA6, GJA7, GJA8
3	ไร่ข้าวโพด ต.แม่สอย อ.จอมทอง จ.เชียงใหม่	4	GJA9, GJA10, GJA11, GJA12
4	สวนมะม่วง ต.แม่สอย อ.จอมทอง จ.เชียงใหม่	5	GJA13, GJA14, GJA15, GJA16,GJA17
5	สวนส้ม ต.แม่อาย อ.ฝาง จ.เชียงใหม่	7	GJA18, GJA19, GJA20, GJA21, GJA22, GJA23, GJA24
6	ไร่มันฝรั่ง ต.แม่อาย อ.ฝาง จ.เชียงใหม่	3	GJA25, GJA26, GJA27

2. การทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายสารไกลโฟเสทในระดับห้องปฏิบัติการ

จากการทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายสารไกลโฟเสทในระดับห้องปฏิบัติการพบว่า เชื้อแบคทีเรียที่คัดแยกได้มีประสิทธิภาพการย่อยสลายสารไกลโพเสทจากความเข้มข้นเริ่มต้น 20 ppm ให้ความเข้มข้นของสารไกลโฟเสทลดลงได้ ทั้งนี้มีเชื้อแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายสารไกลโฟเสทได้ดีที่สุด 5 ไอโซเลต ได้แก่ GJA2 GJA7 GJA8 GJA14 และ GJA26 (ภาพที่ 1) โดยเมื่อทดสอบที่ระยะเวลาการย่อยสลายสารไกลโพเสทที่ 5 วัน พบว่าชุดควบคุมที่ไม่สามารถย่อยสลายสารไกลโฟเสทได้ แต่ไอโซเลต GJA2 มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายมากที่สุดเท่ากับ 73.3 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือ GJA26 GJA8 GJA7 และ GJA14 มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายเท่ากับ 70.9 70.4 70.0 และ 69.9 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และเมื่อทดสอบที่ระยะเวลาย่อยสลายสารไกลโพเสทที่ 10 วัน ไอโซเลต GJA14 มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายเพิ่มสูงขึ้นมากที่สุดเท่ากับ 95.9 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือ GJA26 GJA7 GJA2 และ GJA8 มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายเพิ่มสูงขึ้นเท่ากับ 93.1 91.8 91.6 และ 91.0 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ภาพที่ 2) ซึ่งการย่อยสลายดังกล่าวมีประสิทธิภาพสูงกว่าการทดลองของ Inna *et al*. (2010) ที่สามารถคัดแยกจุลินทรีย์ย่อยสลายสารไกลโฟเสทได้ 2 สายพันธุ์ ได้แก่ *Achromobacter* sp. Kg16 (VKM B-2534D) และ *Ochrobactrum anthropic* GPK3 (VKM B-2554D) ซึ่งมีประสิทธิภาพในการย่อยสลายเท่ากับ 65.8 และ 49.5 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ



ภาพที่ 1 ลักษณะโคโลนีของแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายสารไกลโฟเสท (ก) GJA2 (ข) GJA7 (ค) GJA8 (ง) GJA14 และ (จ) GJA26



ภาพที่ 2 ประสิทธิภาพของแบคทีเรียในการย่อยสลายสารไกลโฟเสทในระยะเวลา 5 วัน และ 10 วัน

สรุป

จากการทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายสารไกลโฟเสท พบว่า สามารถคัดแยกเชื้อแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายสารไกลโฟเสทได้ดีที่สุด จำนวน 5 ไอโซเลต ได้แก่ GJA2 GJA7 GJA8 GJA14 และ GJA26 ซึ่งเมื่อทดสอบที่ระยะเวลา 5 วัน ไอโซเลท GJA2 มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายสูงที่สุดเท่ากับ 73.3 เปอร์เซ็นต์ และที่ระยะเวลา 10 วัน ไอโซเลต GJA14 มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายเพิ่มสูงขึ้นเท่ากับ 95.9 เปอร์เซ็นต์

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณสาขาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันบริการตรวจสอบคุณภาพและมาตรฐานผลิตภัณฑ์ (IQS) มหาวิทยาลัยแม่โจ้ ที่สนันสนุนเครื่องมือในห้องปฏิบัติการ และสำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ เครือข่ายภาคเหนือ (สวทช.) ที่สนับสนุนทุนการวิจัย

เอกสารอ้างอิง

ทศพล พรพรหม. 2545. **สารกำจัดวัชพืชและหลักการและกลไกการทำลาย**. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ.

พรชัย เหลืองอาภาพงศ์. 2541. **คู่มือการใช้สารไกลโฟเสท**. พิมพ์ครั้งที่ 1. โรงพิมพ์มิ่งเมือง, เชียงใหม่.

อลิสา วังใน. 2553. **การบำบัดสารมลพิษทางชีวภาพ**. พิมพ์ครั้งที่ 1. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยจุฬาลงกรณ์. กรุงเทพฯ.

อำพร คล้ายแก้ว. 2538. **การใช้สารกำจัดวัชพืชอย่างถูกวิธี**. กรุงเทพฯ: สำนักวิจัยและพัฒนา กรมชลประทาน.

Beulke, S., C.D. Brown, C.J. Fryer and W. Beinum van. 2004. Influence of kinetic sorption and diffusion on pesticide movement through aggregated soils. **Chemosphere** 57: 481–490.

Inna, T.E., I.K. Nina, S. Tatyana, Z. Mikhail, A.Z. Gennady and A.L. Alexey. 2010. Bioremediation of glyphosate-contaminated soils. **Appl Microbiol Biotechnol**. 88: 585–594.

Rueppel, M., B. Brightwell, J. Schaefer and J. Marcel. 1977. Metabolism and degradation of glyphosate in soil and water. **J Agric Food Chem**. 25: 517-528.

Sorensen, S.R., A. Schultz, O.S. Jacobsen and J. Aamand. 2006. Sorption, desorption and mineralization of the herbicides glyphosate and MCPA in samples from two Danish soil and subsurface profiles. **Environ Pollut**. 141: 184-194.

Strange-Hansen R., P.E. Holm, O.S. Jacobsen and C.S. Jacobsen. 2004. Sorption, mineralization and mobility of N-(phosphonomethyl) glycine (glyphosate) in five different types of gravel. **Pest Manag Sci**. 60: 570–578.