ผลของมูลสัตว์ต่อการย่อยสลายสารอาทราซีนในสภาพห้องปฏิบัติการ

Effect of Animal Manures on Biodegradation of Atrazine *in Vitro*

เชษฐ์ชัชชัยย์ นิลาภรณ์[1] อรวรรณ ชุณหชาติ[2] วนิดา สืบสายพรหม[3] ทศพล พรพรหม[1] และจำเนียร ชมภู[1*]

Shetshutchai Nilaporn[1] Orawan Chunhachart[2] Wanida Suebsaiprom[3] Tosapon Pornprom[1] and Jamnian Chompoo[1*]

Received: April 19, 2021
Revised: May 19, 2021
Accepted: June 21, 2021

Abstract: Nowadays, herbicides are widely used in preventing and controlling the weeds in crop fields, but at the same time herbicide residues have brought serious harm to human's health and environment. The utilization of microorganisms to decompose contaminated chemicals in environment is an alternative process to overcome the challenges at low cost. The purposes of this study were to identify bacteria isolated from 6 types of animal manures (viz. cow, buffalo, swine, equine, swiftlet and chicken manures), which could be able to grow in atrazine-selective medium. Besides, amount of residual atrazine in medium was analyzed. Moreover, performance of each animal manure for the degradation of atrazine in soil was determined. The experiments were designed in completely randomized design (CRD) with 3 replications. The results showed that swiftlet manure was the best decomposer, which reduced atrazine by 87.79% as compared to the control (ATZ-selective medium without animal manure). *Ochrobactrum anthropic*, *Achromobacter denitrificans* and *Klebsiella pneumonia* were found in this manure, which could metabolize the atrazine into deisopropylatrazine.

Keywords: microorganism, deisopropylatrazine, swiftlet manure, equine manure

บทคัดย่อ: ปัจจุบันนี้ใช้สารกำจัดวัชพืชนิยมใช้อย่างแพร่หลายเพื่อป้องกันกำจัดวัชพืชในแปลงปลูกพืช แต่ในขณะเดียวกันการตกค้างของสารทำให้เกิดปัญหาต่อสุขภาพของมนุษย์และสิ่งแวดล้อม การใช้ประโยชน์จากจุลินทรีย์ในการย่อยสลายสารกำจัดวัชพืชที่ปนเปื้อนอยู่ในสภาพแวดล้อมเป็นกระบวนการหนึ่งที่มีประสิทธิภาพและต้นทุนต่ำ การทดลองนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อจำแนกชนิดของแบคทีเรียในมูลสัตว์ 6 ชนิด (ได้แก่ มูลโค มูลกระบือ มูลม้า มูลสุกร มูลไก่ และมูลนกแอ่นกินรัง) ที่สามารถเจริญเติบโตในอาหารคัดเลือกเฉพาะ atrazine-selective medium และวิเคราะห์ปริมาณของสาร atrazine ที่ตกค้างในอาหารเลี้ยงเชื้อ นอกจากนี้ยังทำการทดสอบประสิทธิภาพของมูลสัตว์แต่ละชนิดในการย่อยสลายสาร atrazine ที่ตกค้างในดิน ในการศึกษาครั้งนี้วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (completely randomized design; CRD) จำนวน 3 ซ้ำ ผลการทดลองพบว่า มูลนกแอ่นกินรังสามารถย่อยสลายสาร atrazine ในอาหารคัดเลือกได้มากที่สุด มีประสิทธิภาพ

[1] ภาควิชาพืชไร่นา คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม 73140
Department of Agronomy, Faculty of Agriculture at Kamphaeng Saen, Kasetsart University, Nakhon Pathom 73140

[2] ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะศิลปศาสตร์และวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม 73140
Department of Microbiology, Faculty of Liberal Arts and Science, Kasetsart Unversity, Nakhon Pathom 73140

[3] ภาควิชาสัตวบาล คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม 73140
Department of Animal Science, Faculty of Agriculture at Kamphaeng Saen, Kasetsart University, Nakhon Pathom 73140

* Corresponding author: agrjnc@ku.ac.th

ทำให้สาร atrazine ลดลง 87.79% เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม (อาหารคัดเลือกเฉพาะที่ไม่ใส่มูลสัตว์)โดยที่พบแบคทีเรีย *Ochrobactrum anthropic, Achromobacter denitrificans* และ *Klebsiella pneumonia* ซึ่งสามารถย่อยสลายสาร atrazine ให้เปลี่ยนรูปเป็น deisopropylatrazine.

คำสำคัญ: จุลินทรีย์ ดีไอโซโพรพิลอาทราซีน มูลนกแอ่นกินรัง มูลม้า

คำนำ

อาทราซีน (atrazine) เป็นสารกำจัดวัชพืชที่ใช้พ่นแบบก่อนงอก นิยมใช้ในการควบคุมวัชพืชทั้งใบกว้างและวงศ์หญ้าในแปลงปลูกข้าวโพด ข้าวฟ่าง สับปะรด และอ้อย (ทศพล, 2560) เนื่องจาก atrazine เป็นสารที่ละลายได้ในน้ำ จึงสามารถปนเปื้อนไปกับน้ำใต้ดิน โดยที่ Rohde *et al.* (1981) รายงานว่า สาร atrazine สามารถตกค้างอยู่บนผิวหน้าดินลึกประมาณ 10 เซนติเมตร ได้นานมากกว่า 4 เดือน และสามารถถูกชะล้างด้วยน้ำ ตกค้างอยู่ในน้ำได้เป็นระยะเวลานานมีค่าครึ่งชีวิต 200 วัน จากการศึกษาของ Loughlin *et al.* (2016) พบว่า สาร atrazine มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงเพศของกุ้งเรนโบว์ (red claw crayfish) ในช่วงแรกของการพัฒนาตัวอ่อน ทำให้เกิดความผิดปกติของต่อมไร้ท่อ ส่งผลให้กุ้งมีสัดส่วนของเพศเมียเพิ่มขึ้น นอกจากนี้ Hayes *et al.* (2010) ยังพบว่า กบเพศผู้ที่อาศัยอยู่ในแหล่งน้ำที่มีสาร atrazine ปนเปื้อนจะมีลักษณะทางพันธุกรรมเปลี่ยนแปลง 10 เปอร์เซ็นต์ มีลักษณะของร่างกายและพฤติกรรมเหมือนเพศเมียหรือกลายเป็นกะเทย สำหรับผลกระทบของสาร atrazine ต่อมนุษย์นั้นมีรายงานว่า ผู้หญิงท้องที่อาศัยอยู่ในบริเวณที่มีการใช้สาร atrazine มีโอกาสเกิดความผิดปกติของทารกในครรภ์ ทำให้ทารกมีน้ำหนักน้อย คลอดก่อนกำหนด และอาจเป็นโรคผนังท้องไม่ปิด (gastroschisis) ซึ่งเป็นภาวะความพิการแต่กำเนิด โดยจะมีลำไส้อยู่นอกช่องท้อง เพราะผนังหน้าท้องใกล้กับสะดือแยกออกเป็นช่องโหว่ (Waller *et al.*, 2010) ส่วนผลของสาร atrazine ต่อมนุษย์ผู้ชาย จากผลการตรวจสอบปัสสาวะ พบว่า คุณภาพ ปริมาณ และการเคลื่อนที่ของอสุจิลดลง (Swan *et al.*, 2003) จากรายงานความเป็นพิษของสาร atrazine ต่อสิ่งมีชีวิต จึงมีความจำเป็นอย่างมากที่ต้องหาวิธีฟื้นฟูสภาพแวดล้อมลดการปนเปื้อนของสาร atrazine โดยที่การใช้จุลินทรีย์ในการลดมลพิษ (microbial bioremediation) เป็นกระบวนการหนึ่งที่มีประสิทธิภาพและต้นทุนต่ำ สามารถใช้ในการย่อยสลายสารเคมีที่ปนเปื้อนอยู่ในสภาพแวดล้อมได้ (Kalimuthu *et al.*, 2011) ซึ่งส่วนใหญ่สาร atrazine จะถูกย่อยสลายด้วยจุลินทรีย์โดยปฏิกิริยา *N*-dealkylation, dechlorination และ ring cleavage (Struthers *et al.*, 1998) ส่วน Strong *et al.* (2002) รายงานว่า แบคทีเรียบางชนิดสามารถย่อยสลายสาร atrazine ที่ตกค้างในดินได้ด้วยกระบวนการ mineralization ซึ่ง Rousseaux *et al.* (2003) พบว่า จุลินทรีย์ในดินสามารถย่อยสลายสาร atrazine ได้ที่ตำแหน่ง carbon dioxide และ ammonia ของโครงสร้างสาร โดยที่สาร chloro-s-triazine metabolites ของสาร atrazine ที่ถูกย่อยสลายด้วยจุลินทรีย์ ได้แก่ deethylazine, deisopropylatrazine และ dealkylatrazine จากการศึกษาของ Kanissery and Sims (2011) พบว่า จุลินทรีย์มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายสารเคมีที่ปนเปื้อนกับดิน ทำให้สารถูกย่อยสลายได้เร็วกว่าการปล่อยให้สลายเองตามธรรมชาติ Oliveiro *et al.* (2014) ได้ศึกษาผลของน้ำทิ้งจากคอกสุกรต่อการเคลื่อนย้ายของสาร glyphosate ที่ปนเปื้อนอยู่ในดิน ด้วยการตรวจวัดปริมาณของสาร glyphosate ทุกๆ 60 วันหลังใส่น้ำทิ้งจากคอกมูลสุกร พบว่าปริมาณของสาร glyphosate มีแนวโน้มลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม (ไม่ใส่น้ำทิ้งจากคอกสุกร) ส่วน Candia *et al.* (2012) รายงานว่า การใส่น้ำทิ้งจากคอกโค อัตรา 100,000 ลิตรต่อเฮกตาร์ ลงในดินที่มีการตกค้างของสาร dimethenamid ซึ่งมีค่าครึ่งชีวิตเท่ากับ 28 วัน ทำให้ค่าครึ่งชีวิตของสารนี้ลดลง เท่ากับ 13 วัน หลังจากใส่น้ำทิ้ง 10 วัน สำหรับ Gupta and Baummer (1996) พบว่า เชื้อ *Pseudomonas* sp.

และ *Actinomycetes* sp. เป็นจุลินทรีย์ที่สามารถพบได้ในมูลไก่ สามารถย่อยสลายสาร atrazine ที่ตกค้างในดินได้ 86 เปอร์เซ็นต์ หลังจากใส่มูลไก่ 60 วัน ดังนั้นการทดลองจึงมีวัตถุประสงค์เพื่อจำแนกชนิดของแบคทีเรียในมูลสัตว์ด้วยอาหารคัดเลือกเฉพาะที่ใส่สาร atrazine (atrazine-selective medium) และวิเคราะห์ปริมาณของสาร atrazine ที่ตกค้างในอาหารเลี้ยงเชื้อ เพื่อทดสอบประสิทธิภาพในการย่อยสลายสาร atrazine ของจุลินทรีย์ในมูลสัตว์แต่ละชนิด

อุปกรณ์และวิธีการ

การเตรียมตัวอย่างมูลสัตว์

เก็บตัวอย่างมูลโค มูลกระบือ มูลม้า และมูลไก่ จากฟาร์มของภาควิชาสัตวบาล คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม ส่วนตัวอย่างมูลสุกรเก็บตัวอย่างจากฟาร์มของเกษตรกร จังหวัดราชบุรี สำหรับมูลนกแอ่นกินรังเก็บตัวอย่างจากบ้านรังนกของเกษตรกร อำเภอบ้านแหลม จังหวัดเพชรบุรี โดยที่สัตว์แต่ละชนิดได้รับอาหารที่แตกต่างกัน คือ โค กระบือ และม้า กินพืชอาหารสัตว์เป็นอาหาร สำหรับสุกรและไก่ กินอาหารข้นสำเร็จรูปทางการค้าที่มีคุณค่าทางโภชนาการตรงตามความต้องการของสัตว์ ส่วนนกแอ่นกินรังกินแมลงตามธรรมชาติเป็นอาหาร

นำตัวอย่างมูลสัตว์ตากบนลานซีเมนต์ในที่ร่ม เป็นเวลา 1 สัปดาห์ จนกระทั่งตัวอย่างแห้ง เก็บตัวอย่างมูลสัตว์แต่ละชนิดใส่กระสอบปุ๋ย เพื่อนำไปทำการทดลอง

การจำแนกชนิดของจุลินทรีย์ในมูลสัตว์แต่ละชนิด

จำแนกชนิดของเชื้อจุลินทรีย์ในมูลสัตว์แต่ละชนิด ที่ห้องปฏิบัติการภาควิชาจุลชีววิทยา คณะศิลปศาสตร์และวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ จังหวัดนครปฐม ทำการเตรียมอาหารคัดเลือก atrazine-selective medium (ATZ-selective medium) สำหรับเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย ปริมาตร 1 ลิตร ที่มีส่วนผสมของ K_2HPO_4 (1.6 กรัม), KH_2PO_4 (0.4 กรัม), $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (0.2 กรัม), NaCl (0.1 กรัม), $CaCl_2$ (0.2 กรัม), sucrose (1 กรัม), sodium citrate (1 กรัม), atrazine stock solution (ความเข้มข้น 200 ppm), salt stock solution ปริมาตร 20 มิลลิลิตร และ vitamin stock solution ปริมาตร 20 มิลลิลิตร (ตามสูตรของ Mandelbaum *et al*., 1995) หลังจากนั้นใส่สาร cycloheximide (50 มิลลิกรัมต่อลิตร) เพื่อป้องกันการปนเปื้อนของเชื้อรา

คัดเลือกเชื้อแบคทีเรียที่สามารถเจริญเติบโตได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อ ATZ-selective medium ด้วยการนำตัวอย่างมูลสัตว์แต่ละชนิดที่เตรียมไว้ บดให้ละเอียด ปริมาณ 10 กรัม ใส่ลงใน phosphate buffer (ความเข้มข้น 0.1 M, pH 7.2) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร นำไปวางบนเครื่องเขย่า ที่อุณหภูมิห้อง เขย่าด้วยความเร็ว 120 รอบต่อนาที นาน 2 ชั่วโมง หลังจากนั้นกรองสารละลายมูลสัตว์ด้วยกระดาษกรอง นำของเหลวที่ผ่านการกรอง ปริมาตร 5 มิลลิลิตร เทใส่ลงในอาหาร ATZ-selective medium ปริมาตร 20 มิลลิลิตร บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง ในที่มืด เป็นเวลา 2 สัปดาห์ แล้วทำการย้ายเชื้อลงในอาหาร ATZ-selective medium ใหม่ ด้วยการดูดอาหารที่มีการเลี้ยงเชื้อเดิม ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ใส่ลงในอาหาร ATZ-selective medium ใหม่ นำไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง ในที่มืด นาน 2 สัปดาห์ กระทำเช่นนี้อีก 2 ครั้ง รวมเป็นเวลา 2 เดือน

หลังจากนั้นนำสารแขวนลอยเชื้อแบคทีเรียที่สามารถเจริญเติบโตได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อ ATZ-selective medium มา spread plate เพื่อคัดเลือกโคโลนีของเชื้อแบคทีเรีย และทำให้ได้โคโลนีของเชื้อบริสุทธิ์อีกครั้งด้วยการนำไป cross streak บนอาหาร nutrient agar (NA) นำไปส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์ และศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเซลล์เชื้อแบคทีเรียด้วยการย้อมแกรม ที่งานชันสูตรโรคสัตว์ กำแพงแสน ศูนย์วิจัยและบริการวิชาการทางสัตวแพทย์ คณะสัตวแพทย์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม โดยการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีด้วยเครื่อง Vitek II Complex analyser (bioMerieux, UK)

วิเคราะห์ปริมาณของสาร atrazine และ deisopropylatrazine

ตรวจสอบปริมาณของสาร atrazine และสาร deisopropylatrazine (ซึ่งเป็นสาร metabolite

ชนิดหนึ่งที่เกิดขึ้นจากกระบวนการ *N*-dealkylation จากการย่อยสลายของสาร atrazine) โดยนำอาหาร ATZ-selective medium ที่เลี้ยงเชื้อแบคทีเรียที่มีชีวิตรอดในอาหารคัดเลือกครั้งสุดท้าย มาปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 15,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที ดูดสารละลายใสส่วนบน นำไประเหยด้วยเครื่อง evaporator หลังจากนั้นละลาย crude extract ด้วย methanol ดูดสารละลาย 2 ไมโครลิตร ฉีดเข้าเครื่อง HPLC (Waters Delta 600, East Lyme, NT, USA) ด้วย LiChrospher 100 RP-18 column (5 µm particle size, 125 x 4 mm) โดยใช้สารเคลื่อนย้าย mobile phase ได้แก่ acetonitrile (A), methanol (B) และ น้ำบริสุทธิ์ (C) ตามเงื่อนไขของ Steinheimer (1993) ที่แสดงใน (Table 1) ซึ่งความเร็วของการเคลื่อนย้ายของสาร เท่ากับ 0.8 มิลลิลิตรต่อนาที ความยาวคลื่นของ UV-detection เท่ากับ 220 นาโนเมตร คำนวณปริมาณสาร atrazine (ATZ) และ deisopropylatrazine (DIA) จากกราฟมาตรฐาน HPLC chromatogram ของ DIA (ในรูป Technical grade จาก Dr.Ehrenstoefer GmbH-BgH, Augsburg-Germany) และ ATZ (ในรูป Technical grade จากบริษัท Combi-Blocks Inc., USA) ด้วยสมการ regression ของ peak area เมื่อ Y= 26,623x + 439,378 (R^2= 0.999) และ Y= 49,370x + 360,249 (R^2= 0.999) ตามลำดับ

Table 1 HPLC gradient condition for determination of atrazine and deisopropylatrazine contents

Time (min)	Mobile phase			Time (min)	Mobile phase		
	Acetonitrile (A)	Methanol (B)	Water (C)		Acetonitrile (A)	Methanol (B)	Water (C)
0.00	10	0	90	25.00	0	100	0
6.00	25	0	75	27.00	25	0	75
15.0	75	0	25	30.00	10	0	90
20.00	100	0	0				

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

วางแผนการทดลองแบบ completely randomized design (CRD) จำนวน 3 ซ้ำ วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติด้วยโปรแกรม SPSS Version 16.0 (International Business Machines Corporation, New York, USA) เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธีของ Duncan's multiple range test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ($P < 0.05$)

ผลการทดลองและวิจารณ์

การจำแนกชนิดของจุลินทรีย์ในมูลสัตว์แต่ละชนิดที่สามารถเจริญเติบโตได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีการใส่สาร atrazine หรืออาหารคัดเลือก ATZ-selective medium พบว่า ในมูลสัตว์เกือบทุกชนิดที่นำมาทดสอบ มีแบคทีเรีย *Pseudomonas* sp. อาศัยอยู่ (Table 2) ซึ่ง Deredjian *et al*. (2014) พบว่า *Pseudomonas* sp. เป็นแบคทีเรียแกรมลบรูปท่อน สามารถพบได้ทั่วไปในมูลสัตว์ เช่น วัว และม้า กากตะกอนน้ำเสีย และในดินที่ทำการเกษตร นอกจากนี้ยังพบแบคทีเรียชนิดอื่นๆ ได้แก่ *Brucella melitensis* ในมูลโค แบคทีเรีย *Stenotrophomonas maltophilia* ในมูลสุกร และ *Enterobacter cloacae* ในมูลไก่ อย่างไรก็ตามจากการทดลองพบว่า มูลนกแอ่นกินรังไม่พบเชื้อในกลุ่ม *Pseudomonas* sp. แต่กลับพบเชื้อแบคทีเรียที่แตกต่างจากมูลสัตว์ชนิดอื่น ได้แก่ *Ochrobactrum anthropic*, *Achromobacter denitrificans* และ *Klebsiella pneumoniae* ซึ่งอาจเป็นจุลินทรีย์ประจำถิ่นในระบบทางเดินอาหารของนกนางแอ่น Nur (2012) ได้ศึกษาและจำแนกชนิดของจุลินทรีย์ในมูลนกแอ่น พบจุลินทรีย์หลายชนิด ได้แก่

Klebesills pneumonia sub *ozanae, Klebesills pneumonia* sub pneumonia, *Serratia fonticola, Serratia liquifiences, Citrobacter freundii, Enterobacter intermedius, Edwarseiella tarda, Escherchia coli* และ *Proteus vulgaris* ซึ่ง Jensen (1998) รายงานว่า องค์ประกอบของอาหารที่สัตว์กินเป็นปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อชนิดและกิจกรรมของจุลินทรีย์ในระบบทางเดินอาหารของสัตว์ ดังนั้น อาหารหลักของนกแอ่นกินรัง ได้แก่ แมลงจำพวกมด มีปีกและแมลงเม่า คิดเป็น 99 เปอร์เซ็นต์ของปริมาณอาหารทั้งหมดที่นกแอ่นกิน นอกจากนี้ยังสามารถกินแมลงขนาดเล็ก เช่น แตนเบียนฝอย แตนไทร และแมลงวัน (อรนลิน, 2559) จึงอาจเป็นเหตุให้พบชนิดของเชื้อจุลินทรีย์ที่แตกต่างกับมูลสัตว์ชนิดอื่นที่ใช้ในการทดลองซึ่งกินพืชและอาหารสำเร็จรูป

Table 2 The types of bacteria from each animal manures that were found in atrazine-selective medium

Manure	Type of bacteria
Cow manure	*Brucella melitensis* *Pseudomonas aeruginosa*
Buffalo manure	*Pseudomonas aeruginosa* *Pseudomonas putida*
Swine manure	*Pseudomonas aeruginosa* *Stenotrophomonas maltophilia*
Equine manure	*Pseudomonas aeruginosa*
Swiftlet manure	*Achromobacter denitrificans* *Klebsiella pneumoniae* *Ochrobactrum anthropic*
Chicken manure	*Enterobacter cloacae* *Pseudomonas aeruginosa*

จากการวิเคราะห์ปริมาณสาร atrazine ในอาหารเลี้ยงเชื้อด้วยเทคนิค HPLC เพื่อทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสาร atrazine ของแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ในมูลสัตว์แต่ละชนิดด้วยการเปรียบเทียบ retention time (RT) ของสารตาม HPLC chromatogram ของสารมาตรฐาน (Figure 1) พบว่า สาร deisopropylatrazine และ atrazine มีค่า RT เท่ากับ 2.646 และ 3.181 นาที ตามลำดับ ซึ่งสาร DIA เกิดจากกระบวนการ N-dealkylation หรือปฏิกิริยาที่ทำให้กลุ่มของ methyl ($-CH_3$) หรือ methylene ($-CH_2$) หลุดออกจากโครงสร้างของสาร atrazine (Sene *et al*., 2010) ผลการวิเคราะห์พบว่า มูลนกแอ่นกินรัง มีแบคทีเรียที่สามารถย่อยสาร atrazine ทำให้ปริมาณของสาร atrazine ลดลงมากที่สุด โดยที่พบสาร atrazine ตกค้าง 23.29 ± 3.05 ppm ลดลง 87.79 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบกับอาหารคัดเลือกที่ไม่ใส่มูลสัตว์ (ชุดควบคุม) (Table 3) นอกจากนี้ยังพบว่า มูลนกแอ่นกินรังที่บ่มในอาหารคัดเลือก มีสาร deisopropylatrazine เกิดขึ้น 3.56 ± 0.56 ppm ซึ่งไม่แตกต่างทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับการใส่มูลม้า 3.80 ± 0.45 ppm ในขณะที่อาหารคัดเลือก ATZ-selective medium ที่ใส่มูลโคและมูลกระบือมีจุลินทรีย์สามารถย่อยสาร atrazine ให้กลายเป็น deisopropylatrazine ได้ปริมาณสูงที่สุด 7.50 ± 1.74 และ 7.39 ± 2.84 ppm ตามลำดับ ส่วนอาหารคัดเลือก ATZ-selective medium ที่ใส่มูลสุกรและมูลไก่มีจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสาร atrazine ให้เปลี่ยนเป็น deisopropylatrazine ได้น้อยมาก ในทางกลับกันยังคงพบปริมาณของสาร atrazine สูง รองลงมาจาก

ชุดควบคุม 114.09 ± 11.27 และ 132.04 ± 18.79 ppm ตามลำดับ ดังนั้นจากผลการวิเคราะห์ปริมาณสาร atrazine และ deisopropylatrazine ในอาหารคัดเลือก ATZ-selective medium จะเห็นได้ว่าการที่ไม่พบสาร DIA ในอาหารคัดเลือกที่ใส่มูลไก่และมูลสุกรในขณะที่ปริมาณของสาร atrazine ลดลง และพบว่ามูลนกแอ่นกินรังสามารถย่อยสาร atrazine ให้กลายเป็น DIA ได้ในปริมาณที่น้อยในขณะที่ปริมาณของสาร atrazine ลดลงมาก อาจเป็นไปได้ว่าการย่อยสาร atrazine ในการทดลองนี้สามารถย่อยสลายสาร atrazine ให้อยู่ในรูปสาร metabolite ชนิดอื่นๆ ที่นอกเหนือจากสาร DIA เช่น deethylatrazine หรือ hydroxylatrazine ซึ่งสามารถถูกเปลี่ยนแปลงไปเป็นแอมโมเนีย และคาร์บอนไดออกไซด์ได้ (Sene *et al*., 2010) จากผลการทดลองปริมาณของสาร atrazine ในอาหารคัดเลือกที่ลดลงเมื่อใส่มูลนกแอ่นกินรัง อาจเป็นไปได้ว่าแบคทีเรียที่อยู่ในมูลสัตว์ชนิดนี้ที่พบสามารถเจริญเติบโตในอาหารคัดเลือก ได้แก่ *Ochrobactrum anthropic*, *Achromobacter denitrificans* และ *Klebsiella pneumonia* มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายสาร atrazine ซึ่ง Laura *et al*. (1996) รายงานว่า *Ochrobactrum anthropic* เป็นแบคทีเรีย gram-negative bacillus ที่สามารถมีชีวิตในดินที่มีสาร atrazine โดยใช้ atrazine เป็นแหล่งคาร์บอนในการเจริญเติบโต ส่วน Zhang *et al*. (2019) รายงานว่า *Klebsiella variicola* มีความสามารถในการย่อยสลายสาร atrazine ได้อย่างมีประสิทธิภาพโดยใช้สาร atrazine เป็นแหล่งไนโตรเจนเพื่อการเจริญเติบโต สำหรับ Fernandes *et al*. (2018) พบว่า *Achromobacter* sp. มียีน *atz*A, *atz*B และ *atz*C ซึ่งทำให้แบคทีเรียชนิดนี้สามารถย่อยสลายสาร atrazine ได้

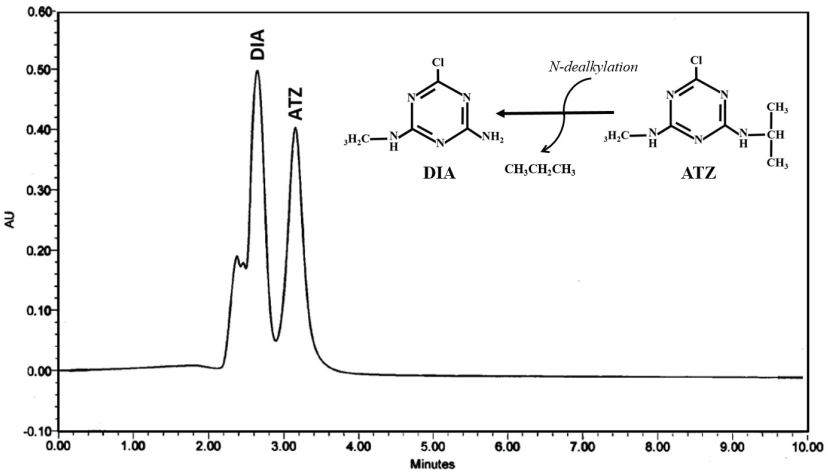

Figure 1 HPLC chromatogram of pure deisopropylatrazine (DIA) and atrazine (ATZ).

Table 3 Concentration of deisopropylatrazine (DIA) and atrazine (ATZ) in atrazine-selective medium after incubating for 2 weeks with survival colonies from animal manures

Treatment	ATZ		DIA
	Concentration (ppm)	Percentage of ATZ decreasing (%)	Concentration (ppm)
Control (without manure)	190.67 ± 8.45 a [1/]		0.00 ± 0.00 c
Cow manure	114.09 ± 11.27 bc	40.16	7.50 ± 1.74 a
Buffalo manure	132.04 ± 18.79 b	30.75	7.39 ± 2.84 a
Swine manure	110.13 ± 9.76 bc	42.24	0.00 ± 0.00 c
Equine manure	96.81 ± 6.60 c	49.23	3.80 ± 0.45 b
Swiftlet manure	23.29 ± 3.05 d	87.79	3.56 ± 0.56 b
Chicken manure	94.29 ± 3.05 c	50.55	0.00 ± 0.00 c

[1/] The data represent the mean ± SD of three replications. Values followed by the same letters within each column are not significantly different according to Duncan's new multiple range test (P< 0.05).

โดยที่ Srivastava *et al*. (2007) รายงานว่า จุลินทรีย์สามารถพบได้โดยทั่วไปในธรรมชาติทั้งในดิน น้ำ และบริเวณรอบรากพืช ซึ่งมีความหลากหลายของสายพันธุ์เชื้อจุลินทรีย์ และทำให้ระบบนิเวศมีความสมดุล ด้วยศักยภาพที่แตกต่างกัน เช่น ช่วยควบคุมเชื้อสาเหตุโรคพืช ช่วยละลายแร่ธาตุอาหารในดินให้เป็นประโยชน์ต่อพืช ช่วยสร้างสารกระตุ้นการเจริญเติบโตของพืช รวมทั้งผลิตสารปฏิชีวนะและเอนไซม์ต่างๆ เป็นต้น ดังนั้นผลของมูลสัตว์ต่อการย่อยสลายสาร atrazine ในดิน อาจมีผลร่วมจากจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ ที่เกิดขึ้นตามธรรมชาติในดินด้วย ซึ่ง สุวรรณี (2555) รายงานว่า จุลินทรีย์ในดินตามธรรมชาติบางชนิดสามารถปรับตัวให้ทนทานต่อสารเคมีและใช้สารเคมีที่ตกค้างในดินนั้นเพื่อเป็นแหล่งอาหารและพลังงานในการเจริญเติบโต เช่น จุลินทรีย์ที่ย่อยสลาย atrazine ซึ่งมีทั้งเชื้อราและเชื้อแบคทีเรีย นอกจากเชื้อแบคทีเรียที่สามารถจำแนกได้จากมูลสัตว์แต่ละชนิดในการทดลองนี้แล้วนั้น ในมูลสัตว์อาจจะมีจุลินทรีย์กลุ่มอื่น เช่น แอคติโนมัยซีส หรือเชื้อราที่สามารถย่อยสลายสาร atrazine ได้ โดย Jayabarath *et al*. (2010) พบว่า *Streptomyces alanosinicus, Streptoverticillium album, Nocardia farcinia, Streptomyces atratus, N. vaccini, N. amarae* และ *Micromonospora chalcea* สามารถและเจริญเติบโตและย่อยสลายสาร atrazine ได้ นอกจากนี้ยังมีงานวิจัยอีกมากมายที่รายงานถึงเชื้อแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายสาร atrazine ได้ ตัวอย่างเช่น *Arthrobacter* sp. (Wang and Xie, 2012) *Chelatobacter heintzii* (Rousseaux *et al*., 2003) *Rhodococcus* sp., *Acinetobacter* sp., *Streptomyces* sp., *Pseudomonas aeruginosa, Clavibacter michiganense* (Popov *et al*., 2005), *Enterobacter cloacae* (Shapir *et al*., 2006), *Bacillus megaterium*, *Alcaligenes faecalis, Klebsiella ornithinolytica* และ *Agrobacterium tumefaciens* (Siripattanakul *et al*., 2009) โดยที่ภายใต้สภาวะที่มีอากาศ (aerobic condition) เชื้อ *Rhodococcus* strain TE1 สามารถย่อยสลายสาร atrazine ให้กลายเป็นสาร deethylatrazine และ deisopropylatrazine ได้ (Behki *et al*., 1993) ส่วนเชื้อ *Pseudomonas* strain ADP สามารถย่อยสาร atrazine ให้เปลี่ยนเป็นสาร cyanuric acid (de Souza *et al*., 1998) ดังนั้นอาจเป็นไปได้ว่า ปริมาณของสาร atrazine ที่ลดลงในอาหาร ATZ-selective medium อาจมีการถูกย่อยสลายด้วยจุลินทรีย์ชนิดอื่นที่ไม่ได้ทำการคัดกรอง และจัดจำแนกได้ในการทดลอง

สรุป

มูลนกแอ่นกินรังสามารถย่อยสลายสาร atrazine ในอาหารคัดเลือก atrazine-selective

medium ได้ดีที่สุด โดยที่พบแบคทีเรีย *Ochrobactrum anthropi, Achromobacter denitrificans* และ *Klebsiella pneumonia* ซึ่งมีรายงานว่าสามารถย่อยสลายสาร atrazine ได้

คำขอบคุณ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยภายใต้แผนงานเสริมสร้างศักยภาพและพัฒนานักวิจัยรุ่นใหม่ตามทิศทางยุทธศาสตร์การวิจัยและนวัตกรรมประเภทบัณฑิตศึกษา จากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ประจำปี 2562 และทุนอุดหนุนงานวิจัยพืชไร่นา ซึ่งเป็นโครงการสนับสนุนและส่งเสริมการวิจัยของภาควิชาพืชไร่นา คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เอกสารอ้างอิง

ทศพล พรพรหม. 2560. สารป้องกันกำจัดวัชพืช หลักการและกลไกการทำลายพืช. สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพฯ.

สุวรรณี แทนธานี. 2555. จุลินทรีย์เทคโนโลยีชีวภาพเพื่อการปรับปรุงบำรุงดิน. วารสารกรมวิทยาศาสตร์บริการ 60: 36-39.

อรนลิน นิ่มนวล. 2559. การศึกษาค้นคว้าและสร้างองค์ความรู้. (ระบบออนไลน์). แหล่งข้อมูล: https://sites.google.com/a/prachuabwit. ac.th/nk-nangxaen28866/home. (1 ธันวาคม 2562).

Behki, R., E. Topp, W. Dick and P. Germon. 1998. Metabolism of the herbicide atrazine by *Rhodococcus* strains. Applied and Environmental Microbiology 59(6): 1955-1959. doi: 10.1128/AEM.59.6.1955-1959.1993.

Candia, O., M. de la Luz Mora, R. Demanet, G. Briceño and G. Palma. 2012. Effect of liquid cow manure amendment on dimethanamid persistence in volcanic soil. Journal of Soil Science and Plant Nutrition 12(1): 153-163. doi: 10.4067/S0718-95162012000100013.

Deredjian, A., C. Colinon, E. Hien, E. Brothier, B. Youenou, B. Cournoyer, S. Dequiedt, A. Hartmann, C. Jolivet, S. Houot, L. Ranjard, N.P.A. Saby and S. Nazaret. 2014. Low occurrence of *Pseudomonas aeruginosa* in agricultural soils with and without organic amendment. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology 4(53): 1-12. doi: 10.3389/fcimb.2014.00053.

de Souza, M.L., D. Newcombe, S. Alvey, D.E. Crowley, A. Hay, M.J. Sadowsky and L.P. Wackett. 2000. Molecular basis of a bacterial consortium: interspecies catabolism of atrazine. Applied and Environmental Microbiology 64(1): 178-184. doi: 10.1128/AEM.64.1.178-184.1998.

Fernandes, A.F.T., V.S. Braz, A. bauermeister, J. Augusto, R. Paschoal, N.P. Lopes and E.G. Stehling. 2018. Degradation of atrazine by *Pseudomonas* sp. and *Achromobacter* sp. isolated from Brazilian agricultural soil. International Biodeterioration and Biodegradation 130: 17-22. doi: 10.1016/j.ibiod.2018.03.011.

Gupta, G. and J. Baummer. 1996. Biodegradation of atrazine in soil using poultry litter. Journal of Hazardous Materials 45(1-2): 185-192. doi: 10.1016/0304-3894(95)00090-9.

Hayes, T.B., V. Khoury, A. Narayan, M. Nazir, A. Park, T. Brown, L. Adame, E. Chan, D. Buchholz, T. Stueve and S. Gallipeau. 2010. Atrazine induces complete feminization and chemical castration in male African clawed frogs (*Xenopus laevis*). Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 107(10): 4612-4617. doi: 10.1016/0304-3894(95)00090-9.

Jayabarath, J., S.A. Musfira, R. Giridhar, S. Shyam sundar and R. Arulmurugan. 2010. Biodegradation of carbofuran pesticide by saline soil actinomycetes. International Journal of Biotechnology and Biochemistry 6(2): 187-193.

Jensen, B.B. 1998. The impact of feed additives on the microbial ecology of the gut in young pigs. Journal of Animal and Feed Sciences 7(Suppl. 1): 45-64. doi: 10.22358/jafs/69955/1998.

Kalimuthu, K., R.D.J. Solomon, S. Ganesh-Kumar and J. Vimalan. 2011. Reductive dechlorination of perchloroethylene by *Bacillus* sp. Jsk1 isolated from dry cleaning industrial sludge. Carpathian Journal of Earth and Environmental Sciences 6(1): 165-170.

Kanissery, R.G. and G.K. Sims. 2011. Biostimulation for the enhanced degradation of herbicides in soil. Applied and Environmental Soil Science 2011: Article ID 843450. doi: 10.1155/2011/843450.

Laura, D., G. de Socio, R. Frassanito and D. Rotilio. 1996. Effects of atrazine on *Ochrobactrum anthropi* membrane fatty acids. Applied and Environmental Microbiology 62(7): 2644-2646. doi: 10.1128/AEM. 62.7.2644-2646.1996.

Loughlin, C.M., I.S. Canosa, G.R. Silveyra, L.S. López and E.M. Rodríquez. 2016. Effects of atrazine on growth and sex differentiation, in juveniles of the freshwater crayfish *Cherax quadricarinatus*. Ecotoxicology and Environmental Safety 131: 96-103. doi: 10.1016/j.ecoenv.2016.05.009.

Mandelbaum, R.T., D.L. Allan and L.P. Wackett. 1995. Isolation and characterization of a *Pseudomonas* sp. that mineralizes the s-triazine herbicide atrazine. Applied and Environmental Microbiology 61(4): 1451-1457. doi: 10.1128/AEM.61.4.1451-1457.1995.

Nur, N.M. 2012. Isolation and characterization of bacteria from feces samples from commercialized swiftlet farming. B.S. Project, Universiti Malaysia Sawarak.

Oliveira, D.A., A. Pinheiro and M. da Veiga. 2014. Effects of pig slurry application on soil physical and chemical properties and glyphosate mobility. Revista Brasileira De Ciencia Do Solo 38: 1421-1431. doi: 10.1590/S0100-06832014000500007.

Popov, V.H., P.S. Cornish, K. Sultana and E.C. 2005. Atrazine degradation in soils: the role of microbial communities, atrazine application history, and soil carbon. Australian Journal of Soil Research 43(7): 861-871. doi: 10.1071/SR04048.

Rohde, W.A., L.E. Asmussen, E.W. Hauser, M.L. Hester and H.D. Allison. 1981. Atrazine persistence in soil and transport in surface and subsurface runoff from plots in the coastal plain of the southern United States. Agro-Ecosystem 7(3): 225-238. doi: 10.1016/0304-3746(81)90004-4.

Rousseaux, S., A. Hartmann, B. Lagacherie, S. Piutti, F. Andreux and G. Soulas. 2003. Inoculation of an atrazine-degrading strain, *Chelatobacter heintzii* Citl, in four different soils: effects of different inoculum densities. Chemosphere 51(7): 569-576. doi: 10.1016/S0045-6535(02)00810-X.

Sene, L., A. Converti, G.A.R. Secchi and R.C.G. Simão. 2010. New aspects on atrazine

biodegradation. Brazilian Archives of Biology and Technology 53(2): 487-496. doi: 10.1590/S1516-89132010000200030.

Shapir, N., G. Cheng, M.J. Sadowsky and L.P. Wackett. 2006. Purification and characterization of TrzF: biuret hydrolysis by allophanate hydrolase supports growth. Applied and Environmental Microbiology 72(4): 2491-2495. doi: 10.1128/AEM.72.4.2491-2495.2006.

Siripattanakul, S., W. Wirojanagud, J. McEvoy, T. Limpiyakorn and E. Khan. 2009. Atrazine degradation by stable mixed cultures enriched from agricultural soil and their characterization. Journal of Applied Microbiology 106(3): 986-992. doi: 10.1111/j.1365-2672.2008.04075.x.

Srivastava, R., D. Roseti and A.K. Sharma. 2007. The evaluation of microbial diversity in vegetable based cropping system under organic farming practices. Applied Soil Ecology 36(2-3): 116-123. doi: 10.1016/j.apsoil.2007.01.008.

Steinheimer, T.R. 1993. HPLC determination of atrazine and principal degradates in agricultural soils and associated surface and ground water. Journal of Agricultural and Food Chemistry 41(4): 588-595. doi: 10.1021/jf00028a016.

Strong, L.C., C. Rosendahl, G. Johnson, M.J. Sadowsky and L.P. Wackett. 2002. *Arthrobacter aurescens* TC1 metabolizes diverse s-triazine ring compounds. Applied and Environmental Microbiology 68(12): 5973-5980. doi: 10.1128/AEM.68.12.5973-5980.2002.

Struthers, J.K., K. Jayachandran and T.B. Moorman. 1998. Biodegradation of atrazine by *Agrobacterium radiobacter* J14a and use of this strain in bioremediation of contaminated soil. Applied and Environmental Microbiology 64(9): 3368-3375. doi: 10.1128/AEM.64.9.3368-3375.1998.

Swan, S.H., R.L. Kruse, F. Liu, D.B. Barr, E.Z. Drobnis, J.B. Redmon, C. Wang, C. Brazil and J.W. Overstreet. 2003. Seman quality in relation to biomarkers of pesticide exposure. Environmental Health Perspectives 111(12): 1478-1484. doi: 10.1289/ehp.6417.

Waller, S.A., K. Paul, S.E. Peterson and J.E. Hitti. 2010. Agricultural-related chemical exposures, season of conception, and risk of gastroschisis in Washington State. American Journal of Obstetrics and Gynecology 202(3): 241.e1-e6. doi: 10.1016/j.ajog.2010.01.023.

Wang, Q. and S. Xie. 2012. Isolation and characterization of a high-efficiency soil atrazine-degrading *Arthrobacter* sp. strain. International Biodeterioration and Biodegradation 71(2012): 61-66. doi: 10.1016/j.ibiod.2012.01.005.

Zhang, J., S. Liang, X. Wang, Z. Lu, P. Sun, H. Zhang and F. Sun. 2019. Biodegradation of atrazine by the novel *Klebsiella variicola* strain FH-1. BioMed Research Internation 2019: Article ID4756579. doi: 10.1155/2019/4756579.