การคัดแยกแบคทีเรียย่อยสลายสารไซเพอร์เมทรินจากดินในพื้นที่เกษตรกรรม
Isolation of Cypermethrin-Degrading Bacteria from Agricultural Soil

รัตติยา ผดุงผล[1*] ชมนาถ เกิดคง[1] อรวรรณ ชวนตระกูล[1] และเอกวัล ลือพร้อมชัย[2]
Rattiya Padungpol[1] Chommanat Kerdkhong[1] Orawan Chountragoon[1] and Ekawan Luepromchai[2]

Received: April 19, 2021
Revised: May 19, 2021
Accepted: August 30, 2021

Abstract: Cypermethrin is a widely used pesticide for pest control in crops. It is persistent to physical degradation, which results in the accumulation of contamination in the environment. Moreover, cypermethrin causes risks to human and animal health. In this study, cypermethrin degrading bacteria was isolated from agricultural soil that cypermethrin has been used for a long time. Cypermethrin-degrading bacteria 21, 16 and 15 isolates were obtained from celery, Chinese broccoli and cucumber planting soil, respectively. All the bacterial isolates were tested for cypermethrin degradation efficiency in a mineral salt medium (MSM) containing 100 mg/L of cypermethrin. It was found that 10 isolates showed degradation efficiency higher than 60% including A21, B1, B3, B6, B13, C8, C9, C10, C11 and C13. These bacteria were identified by 16S rRNA sequences analysis and classified into 6 different genera and 7 species including 5 known bacterial species: *Acinetobacter baumannii, Azoarcus olearius, Phenylobacterium haematophilum, Pseudomonas nitroreducens* and *Shinella zoogloeoides*. Moreover, 2 genera were found to be new bacterial species including *Pseudoxanthomonas* and *Pseudomonas. A. baumannii* B3 had the highest efficiency in degradation of cypermethrin at 93% (3.8 mg/L of cypermethrin remaining) within 7 days. From our results, the cypermethrin-degrading bacteria could be developed into bacterial inoculum and application in bioremediation of cypermethrin-contaminated areas.

Keywords: cypermethrin, biodegradation, cypermethrin-degrading bacteria

บทคัดย่อ: ไซเพอร์เมทรินเป็นสารกำจัดแมลงศัตรูพืชที่เกษตรกรเลือกใช้อย่างแพร่หลาย และเป็นสารที่คงทนต่อการย่อยสลายทางกายภาพ ส่งผลให้เกิดการสะสมหรือปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อม และอาจจะก่อให้เกิดผลกระทบต่อสุขภาพของมนุษย์และสัตว์ งานวิจัยนี้จึงสนใจคัดแยกแบคทีเรียย่อยสลายสารไซเพอร์เมทรินจากดินในพื้นที่เกษตรกรรมที่มีการใช้สารไซเพอร์เมทรินมาเป็นระยะเวลานานจากบริเวณที่เพาะปลูกขึ้นฉ่าย คะน้า และแตงกวา พบว่าสามารถแยกแบคทีเรียย่อยสลายไซเพอร์เมทรินได้ 21 16 และ 15 ไอโซเลท ตามลำดับ แล้วนำแบคทีเรียที่คัดแยกได้ทั้งหมดมาทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายไซเพอร์เมทรินในอาหารเหลว mineral salt medium (MSM)

[1] ศูนย์ปฏิบัติการวิจัยและเรือนปลูกพืชทดลอง ศูนย์วิจัยและบริการวิชาการ คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กำแพงแสน นครปฐม 73140
[1] Central Laboratory and Greenhouse Complex, Research and Service Center, Faculty of Agriculture at Kamphaeng Saen, Kasetsart University, Kamphaeng Saen Campus, Nakhon Pathom, 73140
[2] ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพ 10330
[2] Department of Microbiology, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok, 10330
*Corresponding author : fagrrip@ku.ac.th

ที่มีสารไซเพอร์เมทรินเข้มข้น 100 มิลลิกรัม/ลิตร พบว่ามีแบคทีเรีย 10 ไอโซเลท ที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายไซเพอร์เมทรินมากกว่า ร้อยละ 60 ได้แก่ A21 B1 B3 B6 B13 C8 C9 C10 C11 และ C13 เมื่อระบุชนิดของแบคทีเรียด้วยวิธีทางชีวโมเลกุล โดยการวิเคราะห์ลำดับ 16S rRNA พบว่าเป็นแบคทีเรียที่แตกต่างกันทั้งหมด 6 สกุล และ 7 สปีชีส์ โดยเป็นแบคทีเรียที่ทราบสปีชีส์จำนวน 5 สปีชีส์ ดังนี้ *Acinetobacter baumannii, Azoarcus olearius, Phenylobacterium haematophilum, Pseudomonas nitroreducens* และ *Shinella zoogloeoides* และมีแบคทีเรียที่คาดว่าอาจเป็นแบคทีเรียสปีชีส์ใหม่ 2 สกุล คือ *Pseudoxanthomonas* และ *Pseudomonas* โดย *A. baumannii* B3 มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายไซเพอร์เมทรินมากที่สุดคือ ร้อยละ 93 โดยมีปริมาณไซเพอร์เมทรินคงเหลือ 3.8 มิลลิกรัม/ลิตร หลังจากทดสอบการย่อยสลายเป็นเวลา 7 วัน จากการศึกษาครั้งนี้จะสามารถนำแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพสูงในการย่อยสลายไซเพอร์เมทรินไปศึกษาและพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์หัวเชื้อแบคทีเรียเพื่อการบำบัดพื้นที่ปนเปื้อนไซเพอร์เมทริน

คำสำคัญ: ไซเพอร์เมทริน การย่อยสลายทางชีวภาพ แบคทีเรียย่อยสลายไซเพอร์เมทริน

คำนำ

ไซเพอร์เมทริน (cypermethrin) เป็นสารเคมีสังเคราะห์ที่อยู่ในกลุ่มของไพรีทรอยด์ มีฤทธิ์ในการกำจัดแมลงศัตรูพืช และมีการใช้อย่างแพร่หลายในภาคเกษตรกรรม แม้ว่าระดับความเป็นพิษของสารไซเพอร์เมทรินจะต่ำกว่าสารเคมีในกลุ่มออร์กาโนคลอรีน (organochlorine) และกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟต (organophosphate) แต่ยังเป็นสารที่มีความเสี่ยงต่อสุขภาพของมนุษย์และสัตว์ เช่น มีความรุนแรงต่อระบบประสาท มีผลกระทบต่อระบบสืบพันธุ์ ส่งผลกระทบต่อหน่วยพันธุกรรม รวมถึงเป็นสารก่อมะเร็ง และมีความเป็นพิษอย่างรุนแรงต่อผึ้ง ปลา และสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังในน้ำ (Akbar *et al*., 2015) เมื่อทดสอบความเป็นพิษในหนู พบว่ามีค่า LD_{50} เท่ากับ 247 มิลลิกรัม/กิโลกรัม ซึ่งแสดงถึงความเป็นพิษมาก (โชติมา, 2549) จากงานวิจัยของ Deng *et al*. (2020) ได้ศึกษาการปนเปื้อนของสารไพรีทรอยด์ 4 ชนิดในดินเกษตรกรรม พบว่ามีการปนเปื้อนของสารไซเพอร์เทรินมากเป็นอันดับที่สอง รองจากสารเฟนโพรพาทริน โดยมีสารไซเพอร์เมทรินปนเปื้อน 1.10 นาโนกรัม/กรัมของดิน และมีความเสี่ยงที่เป็นพิษต่อระบบนิเวศในบริเวณที่มีการปนเปื้อนสารไซเพอร์เมทริน นอกจากนี้ยังเป็นสารที่มีความคงทนในสิ่งแวดล้อมและทนต่อการย่อยสลายทางกายภาพ เช่น การย่อยสลายด้วยแสงและอุณหภูมิ เป็นต้น มีค่าครึ่งชีวิตค่อนข้างนาน (94.2-110.3 วัน) (Liu *et al*., 2017) จึงส่งผลให้เกิดการสะสมของสารไซเพอร์เมทรินในสิ่งแวดล้อม แต่ในการย่อยสลายทางชีวภาพโดยกระบวนการของจุลินทรีย์มีบทบาทสำคัญที่ช่วยลดระยะเวลาการย่อยสลายสารเคมีปนเปื้อนได้มากกว่าการย่อยสลายเองตามธรรมชาติ และเป็นทางเลือกที่ปลอดภัย เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม เนื่องจากจุลินทรีย์สามารถนำสารปนเปื้อนไปใช้เป็นแหล่งพลังงานและแหล่งคาร์บอนเพื่อการเจริญเติบโต ส่งผลให้ลดความเข้มข้นและความเป็นพิษของสารปนเปื้อนลดลง (Dua *et al*., 2002) ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงสนใจคัดแยกแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายไซเพอร์เมทรินจากดินในพื้นที่เกษตรกรรมที่มีประวัติการใช้สารไซเพอร์เมทรินเป็นระยะเวลานาน เนื่องจากคาดว่าน่าจะมีแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายไซเพอร์เมทรินอาศัยอยู่ และสามารถพัฒนาแบคทีเรียที่คัดแยกได้เป็นหัวเชื้อแบคทีเรียย่อยสลายไซเพอร์เมทรินต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

การคัดแยกแบคทีเรียย่อยสลายไซเพอร์เมทรินจากดินในพื้นที่เกษตรกรรม

เก็บตัวอย่างดินที่ระดับความลึกจากผิวดินประมาณ 10-20 เซนติเมตร จากพื้นที่เกษตรกรรมที่มีการใช้สารไซเพอร์เมทรินเป็นประจำในเขตอำเภอกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม จำนวน 3 ตัวอย่าง

ที่ปลูกพืชต่างชนิดกัน คือ ขึ้นฉ่าย คะน้า และแตงกวา โดยสุ่มเก็บดินประมาณ 500 กรัม ใส่ในถุงพลาสติก แล้วเก็บรักษาในตู้เย็นอุณหภูมิ 4°ซ จากนั้นแยกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลายไซเพอร์เมทรินจากดินด้วยวิธี enrichment culture โดยนำดินตัวอย่างละ 5 กรัม ใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ mineral salt medium (MSM) ($(NH_4)_2SO_4$ 1.5 กรัม, KH_2PO_4 0.5 กรัม, K_2HPO_4 1.5 กรัม, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.2 กรัม และ NaCl 0.5 กรัม ในน้ำกลั่น 1 ลิตร) (Liu *et al*., 2012) ที่มีเพอร์เมทรินเป็นแหล่งพลังงานและแหล่งคาร์บอน (MSMC) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร บ่มบนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 37°ซ เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นถ่ายเชื้อโดยนำอาหารเลี้ยงเชื้อเก่าปริมาตร 5 มิลลิลิตร ใส่ลงในอาหาร MSMC ใหม่ ปริมาตร 50 มิลลิลิตร นำไปบ่มตามวิธีข้างต้น ทำซ้ำเป็นจำนวน 4 ครั้ง โดยใช้ความเข้มข้นของไซเพอร์เมทรินเท่ากับ 30, 50, 75 และ 100 มิลลิกรัม/ลิตร ตามลำดับ จากนั้นนำอาหารเลี้ยงเชื้อครั้งสุดท้ายมาแยกเชื้อด้วยวิธี Cross streak บนอาหาร nutrient agar (NA) (meat extract 3 กรัม, peptone 5 กรัม และวุ้น 15 กรัม ในน้ำกลั่น 1 ลิตร) จนได้เชื้อบริสุทธิ์

ทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียที่คัดแยกได้ในการย่อยสลายไซเพอร์เมทริน

ทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายไซเพอร์เมทรินของแบคทีเรียที่คัดแยกได้ โดยเติมหัวเชื้อแบคทีเรียความเข้มข้นเท่ากับ 0.5 McFarland standard ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ลงในอาหาร MSM ที่มีไซเพอร์เมทรินความเข้มข้น 100 มิลลิกรัม/ลิตร (MSMC100) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร บ่มบนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 37°ซ เป็นเวลา 7 วัน โดยมีชุดควบคุมคืออาหาร MSM ที่ไม่เติมหัวเชื้อแบคทีเรีย จากนั้นวิเคราะห์ปริมาณไซเพอร์เมทรินคงเหลือ โดยนำตัวอย่างปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมกับเอทานอล ปริมาตร 1 มิลลิลิตร แล้วปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 5 นาที ดูดส่วนใสทั้งหมดใส่หลอดทดลอง เติม 1% KI ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ 10 นาที จากนั้นเติม Leuco crystal violet ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ 10 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร (Shree and Iyer, 2017) โดยเปรียบเทียบปริมาณสารไซเพอร์เมทรินจากกราฟมาตรฐานไซเพอร์เมทริน และคำนวณประสิทธิภาพการย่อยสลายไซเพอร์เมทรินดังสมการ

$$\text{ประสิทธิภาพการย่อยสลายไซเพอร์เมทริน (ร้อยละ)} = \frac{(\text{ปริมาณไซเพอร์เมทรินเริ่มต้น} - \text{ปริมาณไซเพอร์เมทรินคงเหลือ})}{\text{ปริมาณไซเพอร์เมทรินเริ่มต้น}} \times 100$$

ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและระบุชนิดของแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายไซเพอร์เมทรินด้วยวิธีทางชีวโมเลกุล

ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายไซเพอร์เมทริน โดยศึกษาลักษณะของโคโลนีบนอาหาร NA การติดสีย้อมแกรม และส่งแบคทีเรียเพื่อวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ (DNA sequencing) ของ 16S rRNA กับ Macrogen, Inc. (South Korea) แล้วนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้เปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูลสากล (GenBank) เพื่อระบุชนิดของแบคทีเรียด้วยโปรแกรม Blast (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/ Blast.cgi) (Akbar and Sultan, 2016)

ผลการทดลอง

การคัดแยกแบคทีเรียย่อยสลายไซเพอร์เมทรินจากดินในพื้นที่เกษตรกรรม

การคัดแยกแบคทีเรียย่อยสลายไซเพอร์เมทรินจากดินในพื้นที่เกษตรกรรมที่ปลูกพืชต่างกัน 3 ชนิด สามารถคัดแยกแบคทีเรียย่อยสลายไซเพอร์เมทรินได้ทั้งสิ้น 52 ไอโซเลท ดังนี้ ดินจากการเพาะปลูกขึ้นฉ่าย คัดแยกได้ 21 ไอโซเลท (A1 - A21) ดินจากการเพาะปลูกคะน้า คัดแยกได้ 16 ไอโซเลท (B1 – B16) และดินจากการเพาะปลูกแตงกวา

คัดแยกได้ 15 ไอโซเลท (C1 – C15) ซึ่งแบคทีเรียที่คัดแยกได้มีลักษณะแตกต่างกันและจำนวนของแบคทีเรียที่แยกได้แตกต่างกัน เนื่องจากคัดแยกจากดินที่ปลูกพืชต่างชนิดกัน อาจส่งผลให้คุณสมบัติต่างๆ ของดินแตกต่างกัน เช่น อินทรียวัตถุ ค่าความเป็นกรดด่าง ความสามารถในการแลกเปลี่ยนประจุบวก หรือปริมาณของธาตุอาหารในดิน เป็นต้น (de Souza Rocha *et al*., 2020) จากการวิเคราะห์ค่าความเป็นกรดด่างของดินตัวอย่างจากการเพาะปลูกขึ้นฉ่าย คะน้า และแตงกวา พบว่ามีค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 5.5 6.0 และ 6.5 ตามลำดับ ซึ่งอาจส่งผลต่อจำนวนประชากรและความหลากหลายของแบคทีเรียในดิน

ประสิทธิภาพของแบคทีเรียที่คัดแยกได้ในการย่อยสลายไซเพอร์เมทริน

เมื่อนำแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากดินในพื้นที่เกษตรกรรมมาทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายไซเพอร์เมทริน (100 มิลลิกรัม/ลิตร) ในอาหารเหลว MSMC100 เป็นเวลา 7 วัน พบว่าแบคทีเรียส่วนใหญ่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายไซเพอร์เมทรินได้ แต่มีบางไอโซเลทที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายไซเพอร์เมทรินได้สูง โดยไอโซเลท B3 มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายไซเพอร์เมทรินมากที่สุดเท่ากับร้อยละ 96 โดยมีไซเพอร์เมทรินคงเหลือในอาหาร MSM 3.8 มิลลิกรัม/ลิตร รองลงมาคือ B1 มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายไซเพอร์เมทรินเท่ากับร้อยละ 87 และมีจำนวน 10 ไอโซเลทที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายไซเพอร์เมทรินได้มากกว่าร้อยละ 60 (Figure 1) หรือมีปริมาณไซเพอร์เมทรินคงเหลือน้อยกว่า 40 มิลลิกรัม/ลิตร คือ ไอโซเลท A21, B1, B3, B6, B13, C8, C9, C10, C11 และ C13 นอกจากนี้พบว่ามี 1 ไอโซเลทที่ไม่ย่อยสลายไซเพอร์เมทริน คือ ไอโซเลท C14 อาจเกิดจากในระหว่างการแยกเชื้อด้วยวิธี enrichment มีการเจริญเติบโตร่วมกันของแบคทีเรียหลายชนิด ดังนั้นระหว่างกระบวนการย่อยสลายไซเพอร์เมทรินของแบคทีเรียชนิดอื่นที่มีความสามารถย่อยสลายไซเพอร์เมทรินส่วนใหญ่มักพบสารมัธยันต์ (intermediate) 2 ชนิด ได้แก่ 3-phenoxy benzaldehyde (3-PBA) หรือ 3-phenoxy benzoic acid เกิดขึ้นระหว่างกระบวนการเมแทบอไลต์ (Cycon and Piotrowska-Seget, 2016) ดังนั้นคาดว่าไอโซเลท C14 สามารถใช้สารมัธยันต์ที่เกิดขึ้นเพื่อใช้ในการเจริญเติบโตและสามารถเจริญเติบโตร่วมกับแบคทีเรียชนิดอื่น แต่เมื่อนำไอโซเลท C14 มาทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายไซเพอร์เมทรินจึงไม่สามารถย่อยสลายไซเพอร์เมทรินได้

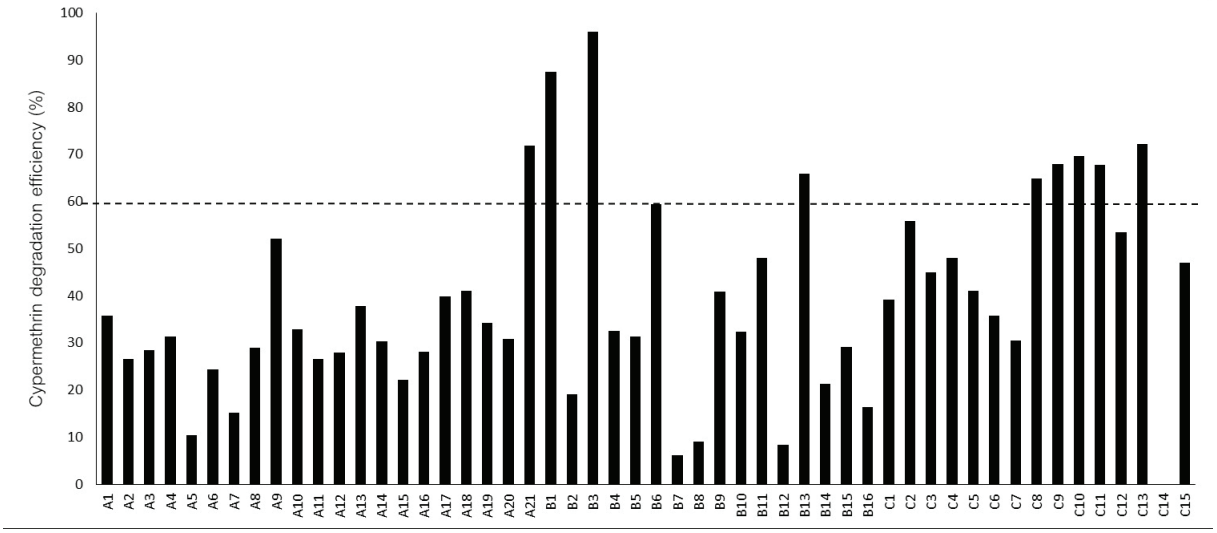

Figure 1 Cypermethrin degradation efficiency of cypermethrin-degradation bacteria after incubation in MSMC100 medium for 7 days.

เมื่อดูสัดส่วนของแบคทีเรียย่อยสลายไซเพอร์เมทรินทั้งหมดและแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายไซเพอร์เมทรินมากกว่าร้อยละ 60 พบว่าดินจากบริเวณเพาะปลูกขึ้นฉ่ายสามารถคัดแยกแบคทีเรียได้ทั้งหมด 21 ไอโซเลท แต่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายไซเพอร์เมทรินมากกว่าร้อยละ 60 เพียง 1 ไอโซเลท (ร้อยละ 5) ดินจากบริเวณเพาะปลูกคะน้าคัดแยกแบคทีเรียได้ทั้งหมด 16 ไอโซเลท และมีประสิทธิภาพในการย่อยสลาย 4 ไอโซเลท (ร้อยละ 25) และคัดแยกแบคทีเรียจากดินเพาะปลูกแตงกวาได้ 15 ไอโซเลท และมีประสิทธิภาพในการย่อยสลายไซเพอร์เมทริน 5 ไอโซเลท (ร้อยละ 33) (Figure 2)

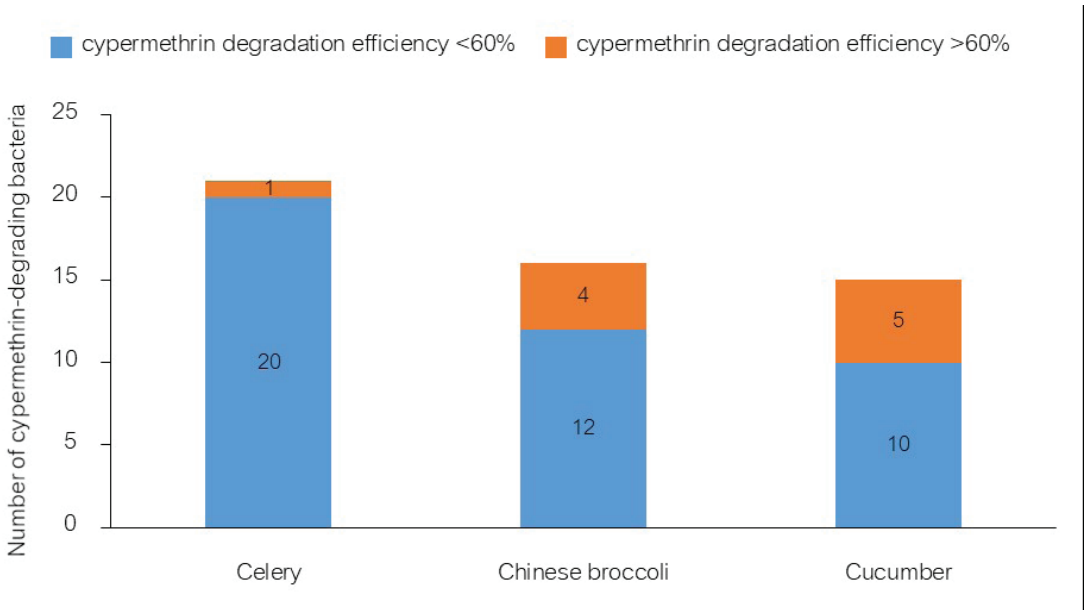

Figure 2 Number of cypermethrin-degrading bacteria with degradation efficiency below or abore 60%. Bacteria were isolated from different agricultural soils of celery, chinese broccoli and cucumber production..

ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและระบุชนิดของแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายไซเพอร์เมทรินด้วยวิธีทางชีวโมเลกุล

เมื่อศึกษาการติดสีย้อมแกรมของแบคทีเรียจำนวนทั้งสิ้น 10 ไอโซเลท ที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายไซเพอร์เมทรินมากกว่าร้อยละ 60 พบว่าแบคทีเรียทั้ง 10 ไอโซเลท เป็นแบคทีเรียแกรมลบ จากรายงานวิจัยที่ผ่านมาคาดว่าแบคทีเรียแกรมลบส่วนใหญ่สามารถใช้สารไซเพอร์เมทรินเป็นแหล่งของสารอาหารได้ดีกว่าแบคทีเรียแกรมบวก เช่น งานวิจัยของ Zhang *et al*. (2008) ที่ศึกษาผลกระทบของสารเคมีกำจัดแมลงศัตรูพืชต่อจำนวนประชากรของจุลินทรีย์ พบว่าต้นแตงกวาที่ฉีดพ่นสารไซเพอร์เมทรินมีประชากรของแบคทีเรียแกรมลบเพิ่มมากขึ้น เช่นเดียวกับงานวิจัยของ Jabeen *et al*. (2017) ได้คัดแยกแบคทีเรียย่อยสลายสารฆ่าแมลงจากดินบริเวณรากพืช 4 ชนิด คือ ถั่วลันเตา หญ้าขจรจบ บาธัว (Bathua) และข้าวสาลี พบว่าสามารถแยกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลายไซเพอร์เมทรินได้ 6 ไอโซเลท ได้แก่ A-C_1 A-C_2 B-B_2 B-C_2 D-C_1 และ D-C_2 แต่มีเพียง 3 ไอโซเลทที่สามารถทนต่อความเข้มข้นของไซเพอร์เมทรินได้ถึง 250 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ได้แก่ ไอโซเลท A-C_1 B-B_2 และ B-C_2 โดยทั้ง 3 ไอโซเลทเป็นแบคทีเรียแกรมลบ

จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียพบว่า บางไอโซเลทมีลักษณะโคโลนีและรูปร่างเซลล์ที่แตกต่างกัน และบางไอโซเลทมีลักษณะที่เหมือนกัน ยกตัวอย่างเช่น ไอโซเลท A21 B13 และ C10 มีโคโลนีรูปร่างกลม สีขาวครีม โปร่งแสง โค้งนูน ขอบหยักเล็กน้อย ผิวเรียบ เป็นแบคทีเรียแกรมลบ และรูปร่างท่อน เมื่อวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rRNA พบว่าทั้ง 3 ไอโซเลท เป็นแบคทีเรีย

สายพันธุ์เดียวกันคือ *Pseudomonas nitroreducens* นอกจากนี้พบว่าไอโซเลท C8 และ C9 มีลักษณะของโคโลนีและลักษณะเซลล์เหมือนกัน คือ โคโลนีกลม สีขาวครีม ขอบหยักเล็กน้อย ผิวขรุขระ เป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปร่างท่อน เมื่อพิสูจน์เอกลักษณ์ทางอนุกรมวิธานพบว่าเป็นแบคทีเรียสายพันธุ์ *Shinella zoogloeoides* (Table 1, Table 2) ในการระบุชนิดของแบคทีเรียเมื่อเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของไอโซเลทกับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูลของแบคทีเรียอ้างอิง (reference sequence) ถ้าค่าความคล้ายคลึงของลำดับ นิวคลีโอไทด์มากกว่าร้อยละ 98.7 ถือว่าเป็นแบคทีเรียที่ทราบชนิดแล้ว แต่กรณีที่ค่าความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์น้อยกว่าร้อยละ 98.7 ถือว่าเป็นแบคทีเรียสปีชีส์ใหม่ (Stackebrandt and Ebers, 2006) ดังนั้นจากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rRNA พบว่าสามารถจัดจำแนกแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายไซเพอร์เมทรินมากกว่าร้อยละ 60 จำนวน 10 ไอโซเลท ได้เป็น 6 สกุล 7 สปีชีส์ โดยเป็นแบคทีเรียที่ทราบสปีชีส์จำนวน 5 สปีชีส์ ดังนี้ *Acinetobacter baumannii, Azoarcus olearius, Phenylobacterium haematophilum, Pseudomonas nitroreducens* และ *Shinella zoogloeoides* โดยมีค่าความคล้ายคลึงอยู่ในช่วง 99.2 – 100% (Table 2) และมีแบคทีเรียที่คาดว่าอาจเป็นแบคทีเรียสปีชีส์ใหม่ 2 สกุล คือ Pseudoxanthomonas และ Pseudomonas

การศึกษาเกี่ยวกับแบคทีเรียย่อยสลายสารกำจัดแมลงศัตรูพืชพบว่ามีแบคทีเรียหลายชนิดที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายไซเพอร์เมทริน เช่น *Bacillus pumilus, Sporosarcina ureae, Pseudomonas aeruginosa, Marinococcus halophilus, Arthrobacter* sp., *Cupriavidus necator, Aeromonas eurenophila* และ *Micrococcus roseus* ซึ่งคัดแยกได้จากดินในพื้นที่เกษตรกรรมที่มีประวัติการใช้สารไซเพอร์เมทรินประมาณ 5 ปี (Ali *et al*., 2011) มีการศึกษาว่า *Acinetobacter baumannii* เป็นแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายสารเคมีกำจัดศัตรูพืชได้หลากหลายชนิด เช่น *A. baumannii* ZH-14 สามารถย่อยสลายเพอร์เมทรินความเข้มข้น 50 มิลลิกรัม/ลิตร ได้ร้อยละ 100 ภายในเวลา 72 ชั่วโมง (Zhan *et al*., 2018) *A. baumannii* AFA สามารถย่อยสลายมาลาไทออน (malathion) ซึ่งเป็นสารกำจัดแมลงศัตรูพืชชนิดออร์กาโนฟอสฟอรัส ที่ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัม/ลิตร ได้ร้อยละ 84 ภายในระยะเวลา 14 วัน (Azmy *et al*., 2015) แม้ว่า *A. baumannii* จะมีประสิทธิภาพในการย่อยสลายไซเพอร์เมทรินได้ดี แต่มีรายงานว่าเป็นแบคทีเรียก่อโรคฉวยโอกาส มักติดเชื้อในผู้ป่วยที่รักษาในโรงพยาบาลเป็นเวลานาน โดยเฉพาะผู้ที่มีภูมิคุ้มกันบกพร่อง (Howard *et al*., 2012) ดังนั้นจึงไม่เหมาะสมที่จะนำแบคทีเรียชนิดนี้มาใช้ในสิ่งแวดล้อมเพื่อป้องกันความเป็นอันตรายต่อสุขภาพของมนุษย์ จากการศึกษาก่อนหน้ายังไม่พบงานวิจัยเกี่ยวกับ *P. nitroreducens* และ *P. resinovorans* ที่มีความสามารถในการย่อยสลายไซเพอร์เมทริน แต่พบว่า *P. nitroreducens* AR-3 มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายคลอไพริฟอสได้อย่างรวดเร็ว ซึ่งคลอไพริฟอสเป็นสารกำจัดแมลงศัตรูพืชชนิดหนึ่ง โดยย่อยสลายสารคลอไพริฟอสถึงร้อยละ 97 (ความเข้มข้นเริ่มต้น 100 มิลลิกรัม/ลิตร) ภายในระยะเวลาเพียง 8 ชั่วโมง (Aswathi *et al*., 2019) ซึ่งมีความสามารถในการย่อยสลายที่รวดเร็วเมื่อเปรียบเทียบกับงานวิจัยครั้งนี้ที่พบว่า *P. nitroreducens* A21 *P. nitroreducens* B13 และ *P. nitroreducens* C10 ซึ่งมีประสิทธิภาพในการย่อยสลายสารไซเพอร์เมทรินความเข้มข้นเริ่มต้น 100 มิลลิกรัม/ลิตร ได้ร้อยละ 72, 66 และ 70 ตามลำดับภายในระยะเวลา 7 วัน โดยประสิทธิภาพการย่อยสลายสารกำจัดแมลงศัตรูพืชและสารปนเปื้อนต่างๆ ที่ไม่เท่ากันอาจเกิดจากความสามารถของแบคทีเรียในการผลิตเอนไซม์และการใช้สารต่างๆ เพื่อเป็นแหล่งพลังงานและแหล่งคาร์บอนที่แตกต่างกัน (Huang *et al*., 2018) ยกตัวอย่างเช่น *P. resinovarans* SPR1 สามารถใช้สารยูจีนอล (eugenol) เป็นแหล่งพลังงานและแหล่งคาร์บอนเพื่อเปลี่ยนเป็นวานิลลิน (Vanillin) 0.24 กรัม/ลิตร และกรดวานิลิก (vanillic acid) 1.1 กรัมต่อลิตร ภายในเวลา 30 และ 60 ชั่วโมง

ตามลำดับ (Ashengroph *et al*., 2011) เช่นเดียวกับ *Phenylobacterium haematophilum* ที่ยังไม่พบการรายงานเกี่ยวกับสายพันธุ์ที่มีความสามารถในการย่อยสลายไซเพอร์เมทริน แต่พบว่า *Ph. immobile* มีความสามารถในการย่อยสลายสารคลอริดาซอล (chloricazon) ซึ่งเป็นสารกำจัดศัตรูพืชชนิดออร์กาโนฟอสเฟต (Lingens *et al*., 1985) Wang *et al.* (2010) ศึกษาการย่อยสลายสาร DDT ของ *Pseudoxanthomonas sp.* WAX พบว่าสามารถย่อยสลาย DDT ความเข้มข้น 20 มิลลิกรัม/ลิตร ได้ร้อยละ 95 ภายในระยะเวลา 72 ชั่วโมง และสามารถย่อยสลายสารไซฟลูทริน (cyfluthrin) ไบเฟนทริน (bifenthrin) และไซเพอร์เมทริน *Shinella zoogloeoides* BC026 มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายไพริดีนความเข้มข้น 1,806 มิลลิกรัม/ลิตร ได้ร้อยละ 100 ภายในเวลา 45.5 ชั่วโมง (Bai *et al.,* 2009) *Azoarcus olearius* เป็นแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนที่คัดแยกจากดินปนเปื้อนน้ำมัน (Chen *et al.,* 2013; Faoro *et al*., 2017) แต่ยังไม่พบการรายงานเกี่ยวกับความสามารถในการย่อยสลายสารไซเพอร์เมทรินหรือสารเคมีกำจัดศัตรูพืชมาก่อน

Table 1 Characterization of the colony and cell morphology of cypermethrin-degrading bacteria.

Isolate	Colony morphology						Cell morphology	
	Color	Form	Elevation	Margin	Surface	Size	Shape	Gram's straining
A21	creamy-white translucent	circular	convex	undulate	smooth	medium	bacillus	negative
B1	white	circular	convex	entire	smooth	small	bacillus	negative
B3	creamy-white	spindle	umbonate	entire	rough	medium	bacillus	negative
B6	creamy-white	circular	convex	entire	smooth	small	bacillus	negative
B13	creamy-white translucent	circular	convex	undulate	smooth	medium	bacillus	negative
C8	creamy-white	circular	raised	erose	rough	small	bacillus	negative
C9	creamy-white	circular	raised	erose	rough	small	bacillus	negative
C10	creamy-white translucent	circular	convex	undulate	smooth	medium	bacillus	negative
C11	creamy-white translucent	circular	convex	undulate	smooth	medium	coccus	negative
C13	light-yellow	circular	convex	entire	smooth	small	bacillus	negative

Table 2 Identification of cypermethrin-degrading bacteria showed degradation efficiency higher than 60%.

Isolate	Identification	GenBank accession no. of the closest species	Base compared	% Similarity
A21	*Pseudomonas nitroreducens*	NR_042435.1	1466/1478	99.2
B1	*Phenylobacterium haematophilum*	NR_041991.1	1396/1406	99.3
B3	*Acinetobacter baumannii*	NR_117620.1	1468/1468	100.0
B6	Closest to *Pseudoxanthomonas mexicana*	NR_025105.1	1443/1476	97.8
B13	*Pseudomonas nitroreducens*	NR_042435.1	1470/1480	99.3
C8	*Shinella zoogloeoides*	NR_041341.1	1411/1417	99.6
C9	*Shinella zoogloeoides*	NR_041341.1	1412/1418	99.6
C10	*Pseudomonas nitroreducens*	NR_042435.1	1458/1468	99.3
C11	Closest to *Pseudomonas resinovorans*	NR_112062.1	1442/1464	98.5
C13	*Azoarcus olearius*	NR_108183.1	1439/1446	99.5

สรุป

การคัดแยกแบคทีเรียย่อยสลายไซเพอร์เมทรินจากดินที่มีการใช้สารไซเพอร์เมทรินเป็นเวลานาน สามารถคัดแยกแบคทีเรียย่อยสลายไซเพอร์เมทรินได้ทั้งหมด 52 ไอโซเลท และพบแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายไซเพอร์เมทรินมากกว่าร้อยละ 60 จำนวน 10 ไอโซเลท แบ่งได้เป็น 6 สกุล 7 สปีชีส์ โดยเป็นแบคทีเรียที่ทราบสปีชีส์จำนวน 5 สปีชีส์ ดังนี้ *Acinetobacter baumannii, Azoarcus olearius, Phenylobacterium haematophilum, Pseudomonas nitroreducens* และ *Shinella zoogloeoides* และมีแบคทีเรียที่คาดว่าอาจเป็นแบคทีเรียสปีชีส์ใหม่ 2 สกุล คือ *Pseudoxanthomonas* และ *Pseudomonas* โดย *A. baumannii* B3 สามารถย่อยสลายไซเพอร์เมทรินความเข้มข้น 100 มิลลิกรัม/ลิตร ได้มากที่สุด เท่ากับร้อยละ 93 (ไซเพอร์เมทรินคงเหลือ 3.8 มิลลิกรัม/ลิตร) หลังจากทดสอบการย่อยสลายเป็นเวลา 7 วัน แต่ *A. baumannii* B3 เป็นแบคทีเรียก่อโรคในมนุษย์ ดังนั้นจึงไม่เหมาะสมต่อการนำมาใช้ในสิ่งแวดล้อม แต่สามารถเลือกแบคทีเรียชนิดอื่นที่มีความสามารถรองลงมาคือ *Ph. haematophilum* B1 เพื่อนำไปศึกษาและพัฒนาเป็นหัวเชื้อแบคทีเรียสำหรับย่อยสลายไซเพอร์เมทรินในพื้นที่ปนเปื้อนได้ในลำดับต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนทุนวิจัยเพื่อพัฒนานักวิจัยรุ่นใหม่ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ประจำปี 2563

เอกสารอ้างอิง

โชติมา วิไลวัลย์. 2549. สารฆ่าแมลง. (ระบบออนไลน์). แหล่งข้อมูล: http://www.chemtrack.org/News-Detail.asp?TID=4&ID=4 (13 กรกฎาคม 2564).

Akbar, S., S. Sultan and M. Kertesz. 2015. Determination of cypermethrin degradation potential of soil bacteria along with plant growth-promoting characteristics. Current Microbiology 70: 75-84.

Akbar, S. and S. Sultan. 2016. Soil bacteria showing a potential of chlorpyrifos degradation and plant growth enhancement. Brazilian Journal of Microbiology 47: 563-570.

Ali, S.S., H. Mazhar and T. Riaz. 2011. Screening and characterization of cypermethrin degrading bacteria from polluted samples. Punjab University Journal of Zoology 26(1): 59-74.

Ashengroph, M., I. Nahvi, H. Zarkesh-Esfahani and F. Momenbeik. 2011. *Pseudomonas resinovorans* SPR1, a newly isolated strain with potential of transforming eugenol to vanillin and vanillic acid. New Biotechnology 28(6): 656-664.

Aswathi, A., A. Pandey and R.K. Sukumaran. 2019. Rapid degradation of the organophosphate pesticide-chlorpyrifos by a novel strain of *Pseudomonas nitroreducens* AR-3. Bioresource Technology 292: https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.122025.

Azmy, A.F., A.E. Saafan, T.M. Essam, M.A. Amin and S.H. Ahmed. 2015. Biodegradation of malathion by *Acinetobacter baumannii* strain AFA isolated from domestic sewage in Egypt. International Journal of Biological, Food, Veterinary and Agricultural Engineering 9(1): 55-65.

Bai, Y., Q. Sun, C. Zhao, D. Wen and X. Tang. 2009. Aerobic degradation of pyridine by a new bacterial strain, *Shinella zoogloeoides* BC026. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology 36: 1391-1400.

Chen, M.H., S.Y. Sheu, E.K. James, C.C. Young and W.M. Chen. 2013. *Azoarcus olearius* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium isolated from oil-contaminated soil. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 63: 3755-3761.

Cycon, M. and Z. Piotrowska-Seget. 2016. Pyrethroid-degrading microorganisms and their potential for the bioremediation of contaminated soil: a review. Frontiers in Microbiology 7: https://doi:10.3389/fmicb.2016.01463.

De Souza Rocha, A.F., L.C. Vitorino, L.A. Bessa, R.R. Guedes Fonseca Cost, M. da Silva Brasil and E.L. Souchie. 2020. Soil parameters affect the functional diversity of the symbiotic microbiota of *Hymenaea courbaril* L., a Neotropical fruit tree. Rhizosphere 16: https://doi.org/10.1016/j.rhisph.2020.100237.

Deng, F., J. Sun, R. Dou, X. Yu, Z. Wei, C. Yang, X. Zeng and L. Zhu. 2020. Contamination of pyrethroids in agricultural soils from the Yangtze River Delta, China. Science of the Total Environment 731: https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.139181.

Dua, M., A. Singh, N. Sethunathan and A.K. Johri. 2002. Biotechnology and bioremediation: successes and limitations. Applied Microbiology and Biotechnology 59: 143-152.

Faoro, H., R.R. Menegazzo, F. Battistoni, P. Gyaneshwar, F.P. do Amaral, C. Taulé, S. Rausch, P.G. Galvão, C. de los Santos, S. Mitra, G. Heijo, S. Sheu, W. Chen, C. Mareque, M.Z. Tadra-Sfeir, J.I. Baldani, M. Maluk, A.P. Guimarães, G. Stacey, E.M. de Souza, F.O. Pedrosa, L.M. Cruz and E.K. James. 2017. The oil-contaminated soil diazotroph *Azoarcus olearius* DQS-4^{T} is genetically and phenotypically similar to the model grass endophyte *Azoarcus* sp. BH72. Environmental Microbiology Reports 9(3): 223-238.

Howard, A., M. O'Donoghue, A. Feeney and R.D. Sleator. 2012. *Acinetobacter baumannii*: an emerging opportunistic pathogen. Virulence 3(3): 243-250.

Huang, Y., L. Xiao, F. Li, M. Xiao, D. Lin, X. Long and Z. Wu. 2018. Microbial degradation of pesticide residues and an emphasis on the degradation of cypermethrin and 3-phenoxy benzoic acid: a review. Molecules 23: https://doi: 10.3390/molecules23092313.

Jabeen, F., M. Ahmed, F. Ahmed, M.B. Sarwar, S. Akhtar and A.A. Shahid. 2017. Characterization of cypermethrin degradaing bacteria: a hidden micro flora for biogeochemical cycling of xenobiotics. Advancements in Life Sciences 4: 97-107.

Lingens, F., R. Blecher, H. Blecher, F. Blobel, J. Eberspächer, C. Fröhner, H. Görisch and G. Layh. 1985. *Phynylobacterium immobile* gen. nov., sp. nov., a Gram-negative bacterium that degrades the herbicide chloridazon. International Journal of Systematic Bacteriology 35(1). 26-39.

Liu, S., K. Yao, D. Jia, N. Zhao, W. Lai and H. Yuan. 2012. A pretreatment method for HPLC analysis of cypermethrin in microbial degradation systems. Journal of Chromatographic Science 50: 469-476.

Liu, J. Y., Ding, L. Ma, G. Gao and Y. Wang. 2017. Combination of biochar and immobilized bacteria in cypermethrin-contaminated soil remediation. International Biodeterioration & Biodegradation 120: 15-20.

Shree, M. and P.R. Iyer. 2017. Degradation and bioremediation of the pesticide cypermethrin by *Pseudomonas* spp. and *Bacillus* spp. Journal of Chemical, Biological and Physical Sciences 8(1): 16-27.

Stackebrandt, E. and J. Ebers. 2006. Taxonomic parameters revisited: tarnished gold standards. Microbial Today 33: 152-155.

Wang, G., J. Zhang, L. Wang, B. Liang, K. Chen, S. Li and J. Jiang. 2010. Co-metabolism of DDT by the newly isolated bacterium, *Pseudoxanthomonas* sp. WAX. Brazilian Journal of Microbiology 41: 431-438.

Zhan, H., H. Wang, L. Liao, Y. Feng, X. Fan, L. Zhang and S. Chen. 2018. Kinetics and novel degradation pathway of permethrin in *Acinetobacter baumanni*i ZH-14. Frontiers in Microbiology 2: doi: 10.3389/fmicb.2018.00098.

Zhang, B., H. Zhang, B. Jin, L. Tang, J. Yang, B. Li, G. Zhuang and Z. Bai. 2008. Effect of cypermethrin insecticide on the microbial community in cucumber phyllosphere. Journal of Environmental Sciences 20(11): 1356-1362.