วารสารเกษตรศาสตร์และเทคโนโลยี | Agriculture and Technology Journal

ปีที่ 4 ฉบับที่ 3 กันยายน - ธันวาคม 2566 | Vol.4 No.3 September – December 2023

Received: June 11, 2023; Revised: September 6, 2023; Accepted: September 18, 2023

อีโคไลและรูปแบบการดื้อต่อยาปฏิชีวนะภายใต้กระบวนการผลิตปุ๋ยหมักจากเศษอาหาร

Fate of *Escherichia coli* and their antibiotic resistant pattern in food waste composting process

สิมนัส ตรีเดช[1*] เพียงกมล ยุวนานนท์[1] จุฑารัตน์ ศรีชูเปี่ยม[1] ธวัชชัย ศรีสอาด[1] และวิไล เจียมไชยศรี[2]

Simanata Threedeach[1*], Piangkamon Yuvananont[1], Jutharat Srichoopium[1], Thawatchai Srisaard[1] and Wilai Chiemchaisri[2]

[1]คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยสวนดุสิต กรุงเทพฯ

[1]Faculty of Science and Technology, Suan Dusit University, Bangkok

[2]คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ

[2]Faculty of Engineering, Kasetsart University, Bangkok

[*]Corresponding Author E-mail address: simanata_thr@dusit.ac.th

บทคัดย่อ

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาแบคทีเรียบ่งชี้ที่ก่อโรคและคุณสมบัติการดื้อยาปฏิชีวนะในกระบวนการผลิตปุ๋ยอินทรีย์จากเศษอาหาร อีกทั้งศึกษาปัจจัยด้านสิ่งแวดล้อมที่คาดว่าน่าจะมีอิทธิพลต่อการคงอยู่ของแบคทีเรียก่อโรค และคุณสมบัติการดื้อยาปฏิชีวนะภายใต้กระบวนการผลิตปุ๋ยอินทรีย์ โดยใช้อีโคไลเป็นแบคทีเรียบ่งชี้ ใช้ระยะเวลาทดสอบ 8 สัปดาห์ ภายใต้ถังหมักขนาด 150 ลิตร ที่มีการเติมอากาศ ผลจากการศึกษาพบว่าภาพรวมการดื้อต่อยาปฏิชีวนะของอีโคไลในช่วงเริ่มต้นกระบวนการหมักมีค่า MAR index ของอีโคไลอยู่ที่ 0.312 เมื่อดำเนินการหมักปุ๋ยอินทรีย์ในช่วงแรกที่อุณหภูมิภายในถังปฏิกรณ์เพิ่มขึ้น (37.0-57.0 องศาเซลเซียส) อีโคไลที่สามารถอยู่รอดได้จะมีระดับการดื้อยาเพิ่มสูงขึ้น และค่อยๆ ลดลงตามระยะเวลา โดยในสัปดาห์ที่ 8 ค่า MAR index ของอีโคไลลดลงมาที่ 0.214 ซึ่งอีโคไลส่วนใหญ่ที่เหลือรอดจัดเป็นอีโคไลดื้อยา 1 กลุ่มยา (ร้อยละ 60.0) ในส่วนของน้ำชะจากปุ๋ยหมักช่วงแรกของการหมักพบค่า MAR index (0.405) สูงกว่าในตัวปุ๋ยหมัก และมีค่าลดระดับลงตามระยะเวลาเช่นกัน (สัปดาห์ที่ 7 มีค่า MAR index = 0.150) ดังนั้น ในการนำปุ๋ยหมักจากเศษอาหารไปประยุกต์ใช้ ควรทิ้งช่วงเวลาให้ปุ๋ยหมักเกิดการหมักจนสมบูรณ์หรือมีการพักปุ๋ยหมักทิ้งไว้ เพื่อลดระดับความรุนแรงของการดื้อยาปฏิชีวนะในแบคทีเรียซึ่งอาจปนเปื้อนอยู่ อีกทั้งควรมีระบบจัดการน้ำชะปุ๋ยหมักที่เหมาะสมเพื่อป้องกันการแพร่กระจายของแบคทีเรียกลุ่มดังกล่าวสู่สิ่งแวดล้อม

คำสำคัญ: ปุ๋ยอินทรีย์ กระบวนการหมักปุ๋ยอินทรีย์ เศษอาหาร แบคทีเรียดื้อยาปฏิชีวนะ

Abstract

This study was investigated a potential pathogenic bacteria and antibiotic resistant bacteria (ARB) from the food waste composting. Moreover, study on environment factors may effect to pathogenic bacteria and ARB persistence under food waste composting. *Escherichia coli* as a representative bacterial in this study. Investigated compost for 8 weeks in 150 L reactors in aerobic condition. The results of ARB from materials before composting indicated multiple antibiotic resistant (MAR) index of *E. coli* was 0.312. First phase of composting, temperature inside composts were increased to 37.0-57.0 ^{O}C. *E. coli* survival under high temperature condition had developed to high level of antibiotic resistant and decreased to low level depended on time period. The results of ARB development in 8 weeks of composting was decreased, MAR index of *E. coli* was 0.214. Most of *E. coli* survival classified as ARB which resisted to 1 antibiotic group (60%). Moreover, MAR index of *E. coli* (0.405) from leachate of food waste composting was higher than in compost and decreased depended on ferment time period (7th week, MAR index = 0.150). Therefore, using of food waste compost should be needed more time for completely composting or prolonged compost using to reduced ARB contamination. To reduce the high level of ARB may contaminate in compost, there should be an appropriate leachate management system for protecting the widespread of ARB to the environment.

Keywords: Organic fertilizer, Composting process, Food waste, Antibiotic resistant bacteria

บทนำ

การใช้ทรัพยากรอย่างรู้คุณค่าเป็นเรื่องที่อยู่ในกระแสสังคม และมีความสำคัญต่อการดำเนินชีวิตในปัจจุบัน อันเนื่องมาจากการที่ทุกภาคส่วนต้องร่วมมือกันปรับตัวเพื่อรองรับสถานการณ์การเปลี่ยนแปลงสภาพภูมิอากาศ ขยะเศษอาหารจัดเป็นขยะที่ส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมมากประเภทหนึ่ง ภายใต้การจัดการด้วยการฝังกลบจะก่อเกิดการย่อยสลายได้ก๊าซเรือนกระจกชนิดก๊าซมีเทน ซึ่งการนำขยะจากเศษอาหารมาแปรรูปเป็นปุ๋ยอินทรีย์ถือเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่มีการนำไปประยุกต์ใช้กันอย่างแพร่หลาย และได้รับความนิยมในปัจจุบัน ทั้งระบบที่มีการเติมอากาศและระบบที่ไม่ใช้อากาศ โดยตัวอย่างรูปแบบในการหมักปุ๋ย เช่น ระบบกองบนลาน (Windrow composting) ระบบกองเติมอากาศ (Aerated static pile composting) และการหมักปุ๋ยในระบบปิด (In-vessel composting) เป็นต้น (Palaniveloo et al., 2020) แต่อย่างไรก็ตาม ปัจจุบันมีการใช้ยาปฏิชีวนะในสัตว์เป็นจำนวนมากไม่ว่าจะเป็นเพื่อส่งเสริมการเจริญเติบโต หรือป้องกันโรค ซึ่งการใช้ยาปฏิชีวนะอย่างไม่สมเหตุผลจะก่อให้เกิดการพัฒนาแบคทีเรียดื้อต่อยาปฏิชีวนะขึ้น การนำเนื้อหรือผลิตภัณฑ์จากสัตว์ที่ได้มาบริโภค จะก่อให้เกิดการชักนำแบคทีเรียดื้อยาเข้าสู่ห่วงโซ่อาหาร เกิดการแพร่กระจายสู่ผู้บริโภค ส่งผลต่อปัญหาทางด้านสาธารณสุขตามมา เพราะภายใต้สภาวะที่มีการคงอยู่ของยาปฏิชีวนะแบคทีเรียจะก่อให้เกิดการพัฒนาและปรับตัวให้เหมาะสมเพื่อความอยู่รอด การที่แบคทีเรียมีการพัฒนาสายพันธุ์ให้มีความทนทานต่อยาปฏิชีวนะเรียก แบคทีเรียดื้อยาปฏิชีวนะ โดยแบคทีเรียดังกล่าวจะมีหลายกลไกในการต้านยาปฏิชีวนะ ซึ่งถูกควบคุมกลไกด้วยยีนดื้อยาปฏิชีวนะ โดยยีนส่วนใหญ่จะอยู่ที่พลาสมิดของแบคทีเรีย ซึ่งสามารถถ่ายทอดผ่านยีนจากแบคทีเรียที่ดื้อยาไปสู่แบคทีเรียที่ไม่มีคุณสมบัติดังกล่าวได้ หรืออาจเกิดการถ่ายทอดยีนระหว่างแบคทีเรียที่ดื้อต่อยาปฏิชีวนะด้วยกันเองก่อให้เกิดแบคทีเรียสายพันธุ์ที่มีคุณสมบัติดื้อต่อยาปฏิชีวนะหลายชนิดมากยิ่งขึ้น โดยถือเป็นกลไกสำคัญที่ทำให้เชื้อแบคทีเรียมีวิวัฒนาการอย่างรวดเร็ว และมีการแพร่กระจายไปสู่กลุ่มแบคทีเรียในสิ่งแวดล้อม (Wellington et al., 2013) กระบวนการเหล่านี้

เกิดขึ้นได้โดยไม่จำเป็นต้องใช้การสืบพันธุ์ แต่ส่วนใหญ่ในสิ่งแวดล้อมจะเกิดผ่านกระบวนการที่เรียกว่าการถ่ายทอดยีนในแนวราบ (Horizontal Gene Transfer, HGT) ซึ่งทำให้เชื้อแบคทีเรียสามารถถ่ายทอดยีนข้ามสายพันธุ์กันได้ (Kelly et al., 2009) โดยถือเป็นกลไกสำคัญที่ทำให้เชื้อแบคทีเรียมีวิวัฒนาการอย่างรวดเร็ว และมีการแพร่กระจายยีนดื้อยาปฏิชีวนะเหล่านี้ไปสู่กลุ่มแบคทีเรียในสิ่งแวดล้อม ปัจจุบันมีรายงานวิจัยพบยาปฏิชีวนะ และยีนดื้อยาปฏิชีวนะปนเปื้อนในขยะเศษอาหารอย่างแพร่หลาย ซึ่งมาจากการสะสมในวัตถุดิบชนิดต่าง ๆ ทั้งผัก ผลไม้ และเนื้อสัตว์ (Chen et al., 2021; Zhao et al., 2022) ตลอดจนพบยีนดื้อยาภายใต้กระบวนการหมักเศษอาหาร โดยปัจจัยเช่น อุณหภูมิ ค่าความเป็นกรดด่าง และระยะเวลาในการหมัก มีอิทธิพลต่อปริมาณยีนที่พบเช่นกัน (Wang et al., 2019) ดังนั้นการใช้เศษอาหารเป็นวัตถุดิบในการผลิตปุ๋ยอินทรีย์ควรจะเป็นเรื่องที่ควรระมัดระวังในการดำเนินงาน ซึ่งการสัมผัสกับปุ๋ยลักษณะดังกล่าวโดยตรงมีโอกาสเพิ่มแนวโน้มการแพร่กระจายของแบคทีเรียดื้อยาปฏิชีวนะเข้าสู่ร่างกาย (Furukawa et al., 2018) ซึ่งอาจจะส่งผลให้การรักษาโรคด้วยยาปฏิชีวนะมีประสิทธิภาพลดลงซึ่งจัดเป็นปัญหาที่ทั่วโลกกำลังเผชิญอยู่

ด้วยความตระหนักถึงปัญหาทางด้านสาธารณสุขและสิ่งแวดล้อม อันเนื่องมาจากการก่อเกิดการแพร่กระจายแบคทีเรียดื้อยาปฏิชีวนะโดยมีแหล่งกำเนิดสำคัญมาจากวัสดุที่ใช้เพื่อผลิตปุ๋ยอินทรีย์ ประกอบกับยังมีงานวิจัยที่ทำการศึกษาภายใต้ภูมิอากาศแบบเขตร้อนชื้นอยู่ไม่มากข้อมูลดังกล่าวจึงมีความสำคัญเป็นอย่างยิ่ง ดังนั้นทางคณะผู้วิจัยจึงสนใจที่จะทำการศึกษาถึงรูปแบบการดื้อยาปฏิชีวนะของแบคทีเรียในกระบวนการผลิตปุ๋ยอินทรีย์ โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาแบคทีเรียก่อโรคและคุณสมบัติการดื้อยาปฏิชีวนะภายใต้กระบวนการผลิตปุ๋ยอินทรีย์ และศึกษาปัจจัยด้านสิ่งแวดล้อมที่คาดว่าน่าจะมีอิทธิพลต่อการคงอยู่ของแบคทีเรียก่อโรค และคุณสมบัติการดื้อยาปฏิชีวนะภายใต้กระบวนการผลิตปุ๋ยอินทรีย์ อีกทั้งดำเนินการทดลองภายใต้ข้อสมมติฐาน 2 ประการ คือ ประการที่ 1 น่าจะมีการปนเปื้อนของแบคทีเรียก่อโรคและคุณสมบัติการดื้อยาปฏิชีวนะจากวัสดุที่นำมาใช้ผลิตปุ๋ยอินทรีย์ และประการที่ 2 ภายใต้วิธีการมาตรฐานในการผลิตปุ๋ยอินทรีย์ กระบวนการหมักน่าจะช่วยลดปริมาณของแบคทีเรียก่อโรคและคุณสมบัติการดื้อยาปฏิชีวนะลงได้ โดยการศึกษาในครั้งนี้สุ่มตัวอย่างปุ๋ยอินทรีย์เพื่อตรวจแยกหาเชื้ออีโคไล (*Escherichia coli*) ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมลบ และจัดเป็นกลุ่มแบคทีเรียประจำถิ่นที่ไม่ก่อโรค ขณะเดียวกันสามารถตรวจพบหรือพัฒนาเป็นสายพันธุ์ที่ก่อโรคในระบบทางเดินอาหารได้ เพื่อเป็นแบคทีเรียบ่งชี้ ซึ่งทางคณะผู้วิจัยมีความคาดหวังว่าองค์ความรู้ที่ได้จะมีบทบาทในการเชื่อมโยงถึงปัญหาการกระจายตัวของแบคทีเรียดื้อยาในระบบทางสิ่งแวดล้อม อีกทั้งยังก่อเกิดแนวทางที่เหมาะสมในการพัฒนากระบวนการผลิตปุ๋ยอินทรีย์ที่ลดผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมและมีความปลอดภัยต่อสุขภาพมากยิ่งขึ้น อีกทั้งยังเป็นการดำเนินงานเพื่อส่งเสริมด้านการใช้ทรัพยากรอย่างรู้คุณค่าอีกช่องทางหนึ่ง

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ

ขอบเขตในการศึกษา

ขอบเขตในการศึกษา ประกอบด้วย การศึกษาการดื้อยาปฏิชีวนะจากอีโคไลที่คัดแยกจากกระบวนการผลิตปุ๋ยอินทรีย์จากเศษอาหาร ที่ทำการหมักภายใต้สภาวะที่มีอากาศ ด้วยระยะเวลา 8 สัปดาห์ โดยมีการวิเคราะห์คุณสมบัติทางเคมีของปุ๋ยร่วมด้วย ซึ่งในการวิจัยแบ่งขั้นตอนการดำเนินงานออกเป็น 3 ส่วนดังนี้ ส่วนที่ 1 การหมักปุ๋ยจากเศษอาหาร ส่วนที่ 2 การศึกษาคุณสมบัติของปุ๋ยหมักเศษอาหาร และส่วนที่ 3 การศึกษาการดื้อยาปฏิชีวนะของแบคทีเรียจากปุ๋ยหมักเศษอาหาร โดยขั้นตอนการดำเนินงานในแต่ละส่วนมีดังนี้

การหมักปุ๋ยจากเศษอาหาร

ดำเนินการผลิตปุ๋ยอินทรีย์ในถังหมัก (High Density Polyethylene, HDPE) จำนวน 1 ถัง ที่มีขนาดความจุ 150 ลิตร เส้นผ่านศูนย์กลาง 50 เซนติเมตร สูง 90 เซนติเมตร มีการเจาะรูขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1 เซนติเมตร รอบตัวถังจำนวน

6 ชั้น โดยที่แต่ละชั้นห่างกัน 10-15 เซนติเมตร เพื่อส่งเสริมการระบายอากาศภายในถัง และมีการเจาะช่องขนาดกว้าง 50 เซนติเมตร และยาว 70 เซนติเมตร จำนวน 2 ช่อง ที่ระดับล่างและระดับกลางของถัง สำหรับใช้ในการเก็บตัวอย่างปุ๋ยอินทรีย์เพื่อนำไปทดสอบ นอกจากนี้ด้านล่างของถังมีการต่อท่อสำหรับระบายน้ำเพิ่มเติม และมีการเติมอากาศโดยใช้ปั๊มลมในช่วงแรกของการหมัก ซึ่งจะหยุดเติมอากาศเมื่ออุณหภูมิของปุ๋ยอินทรีย์อยู่ในระดับคงที่วัสดุที่ใช้ในการหมักปุ๋ยอินทรีย์ในที่นี้ใช้ขยะเศษอาหารหมักร่วมกับเศษไม้และใบไม้ที่สับเป็นชิ้นขนาดเล็ก ซึ่งเศษอาหารที่ใช้นำมาจากอาหารเหลือรับประทานในโรงอาหาร โดยจะมีการปรับอัตราส่วนของวัสดุเริ่มต้นให้มีค่าคาร์บอนต่อไนโตรเจน (C/N ratio) อยู่ในช่วงที่ใกล้เคียง 25 ซึ่งเทียบเท่าการใช้ขยะเศษอาหารผสมกับเศษไม้และใบไม้ ในอัตราส่วน 2 ต่อ 1 โดยใช้เศษอาหารสดจำนวน 64 กิโลกรัม เศษไม้และใบไม้จำนวน 32 กิโลกรัม และใช้ร่วมกับสารเร่งซุปเปอร์ พด.1 ของกรมพัฒนาที่ดิน (10 กรัม ละลายน้ำ 2 ลิตร) (รูปที่ 1)

รูปที่ 1 ถังหมักปุ๋ยอินทรีย์ และวัสดุตั้งต้นในการหมัก (ขยะเศษอาหาร และเศษไม้ และใบไม้)

การศึกษาคุณสมบัติของปุ๋ยหมักเศษอาหาร

การศึกษานี้ทำการหมักปุ๋ยเป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์ (60 วัน) มีการเก็บตัวอย่างปุ๋ยหมักสัปดาห์ละ 1 ครั้ง โดยการสุ่มเก็บตัวอย่างเป็นจุดจำนวน 3 จุด ตามช่องเก็บตัวอย่างในรูปที่ 1 คือช่วงล่างของถัง ช่วงกึ่งกลาง และช่วงบน จุดละ 1 ตัวอย่าง (ตัวอย่างละ 100 กรัม) แล้วนำตัวอย่างของทุกจุดมาผสมให้เข้ากันเพื่อใช้เป็นตัวแทนในการวิเคราะห์ และมีการตรวจวัดอุณหภูมิภายในถังหมักทุกวัน (80 วัน) ในการวิเคราะห์คุณสมบัติทางกายภาพและเคมีของตัวอย่างปุ๋ยหมักจะมีการวิเคราะห์ค่าความเป็นกรดด่าง อุณหภูมิ ความชื้น การนำไฟฟ้า ความเค็ม ปริมาณสารอินทรีย์คาร์บอน และไนโตรเจน (AOAC, 2000) สำหรับการวิเคราะห์คุณสมบัติปุ๋ยทางชีวภาพจะมีการวิเคราะห์จุลินทรีย์ทั้งหมด โคลิฟอร์มแบคทีเรีย และอีโคไล นอกจากนี้ยังมีการสุ่มเก็บตัวอย่างน้ำชะจากปุ๋ยหมักเพื่อศึกษาปริมาณจุลินทรีย์ร่วมด้วย โดยในการวิเคราะห์จะใช้การเจือจางตัวอย่างปุ๋ยด้วยสารละลายเพปโทน (Peptone water) ร้อยละ 0.1 ที่มีส่วนผสมของโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ร้อยละ 0.85 ตามอัตราส่วนแบบ tenfold dilution และวิเคราะห์ปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดด้วยเทคนิค Pour-plate และเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Plate count agar (Himedia, India) ที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (Collins et al., 2004) สำหรับการวิเคราะห์ปริมาณโคลิฟอร์มแบคทีเรีย และอีโคไล จะทำการกรองสารละลายปุ๋ยตัวอย่างบนแผ่นกรองแบบมีช่องกริด ขนาดรูพรุน 0.45 ไมครอน เส้นผ่านศูนย์กลาง 47 มิลลิเมตร (Merk Millipore, USA) และนำไปเลี้ยงบนอาหาร Chromocult coliform agar (Merck, USA) ที่ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง โดยโคโลนีที่เป็นอีโคไลจะปรากฏสีน้ำเงิน ส่วนโคโลนีของโคลิฟอร์มชนิดอื่นจะปรากฏสีชมพู (APHA, 2012)

การศึกษาการดื้อยาปฏิชีวนะของแบคทีเรียจากปุ๋ยหมักเศษอาหาร

ดำเนินการวิเคราะห์การดื้อยาปฏิชีวนะของอีโคไลจากตัวอย่างปุ๋ยหมักสัปดาห์ละ 1 ครั้ง โดยแต่ละตัวอย่างทำการคัดแยกอีโคไลจำนวน 20 ไอโซเลต (Isolate) และยังมีการสุ่มวิเคราะห์ในตัวอย่างน้ำชะปุ๋ยหมักเพิ่มเติมในรูปแบบวิธีการเช่นเดียวกัน โดยในการแยกเชื้ออีโคไลจากตัวอย่างปุ๋ย จะทำการคัดแยกโคโลนีเดี่ยวของอีโคไล (สีน้ำเงิน) บนแผ่นกรอง โดยนำแต่ละโคโลนีที่คัดแยกมาบ่มต่อในอาหาร Tryptic soy broth (TSB broth) (Himedia, India) ที่ 35 องศาเซลเซียส จนระดับความขุ่นมีค่าเท่ากับ McFarland Standard เบอร์ 0.5 ($1.5x10^8$ โคโลนี/มิลลิลิตร) จากนั้นทำการสวอป (Swap) เชื้อให้ทั่วอาหาร Mueller Hinton agar (Himedia, India) วางดิสค์ (Disk) ยาปฏิชีวนะบนอาหาร บ่มที่ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง อ่านผลการทดสอบโดยการวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณที่เชื้อไม่ขึ้น (Clear zone) รอบดิสค์ยาในหน่วยมิลลิเมตร แล้วแปรผลเป็นค่าไวต่อยาปฏิชีวนะ (Susceptible (S)), มีแนวโน้มพัฒนาไปสู่การดื้อต่อยาปฏิชีวนะ (Intermediate (I)) และดื้อต่อยาปฏิชีวนะ (Resistant (R)) ด้วยการเทียบกับค่ามาตรฐานตามวิธีการดำเนินงานของ Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI (2012) จากนั้นทำการประเมินค่าร้อยละของการไวต่อยา (สมการที่ 1) และค่าดัชนีการดื้อยาปฏิชีวนะอย่างน้อย 2 ชนิดยา หรือค่า MAR index (Multiple antibiotic resistant index) (สมการที่ 2) แผ่นยาปฏิชีวนะ (BD BBL™ Sensi-Disc™) ที่ใช้ทดสอบจะครอบคลุมยาทั้งสิ้น 7 กลุ่ม ซึ่งใช้สำหรับแบคทีเรียแกรมลบ รวมถึงอีโคไลที่เป็นแบคทีเรียบ่งชี้ อันประกอบด้วยกลุ่มยา Aminoglycoside (Gentamicin 10 µg (GM)), กลุ่มยา Tetracycline (Tetracycline 30 µg (TC)), กลุ่มยา Fluoroquinolone (Norfloxacin 10 µg (NOR)), Ciprofloxacin 5 µg (CIP)), กลุ่มยา Sulfonamide (Sulfamethoxazole/Trimethoprim 23.75/1.25 µg (SXT)), กลุ่มยา Chloramphenicol (Chloramphenical 30 µg (CP)), กลุ่มยา Fosfomycin (Fosfomycin 200 µg (FOS)) และกลุ่มยา Beta-lactam (Cefuroxime 30 µg (CXM), Cefotaxime 30 µg (CTX), Ceftazidime 30 µg (CAZ), Ampicillin 10 µg (AMP))

$$\%S = \frac{\text{จำนวนตัวอย่างที่แสดงผล susceptible}}{\text{จำนวนตัวอย่างทั้งหมด}} x\ 100 \quad (1)$$

$$\%I = \frac{\text{จำนวนตัวอย่างที่แสดงผล Intermediat}}{\text{จำนวนตัวอย่างทั้งหมด}} x\ 100 \quad (2)$$

$$\%R = \frac{\text{จำนวนตัวอย่างที่แสดง Resistant}}{\text{จำนวนตัวอย่างทั้งหมด}} x\ 100 \quad (3)$$

$$\text{MAR index} = \frac{\text{จำนวนดิสค์ยาปฏิชีวนะที่อีโคไลแสดงผล Resistant}}{\text{จำนวนดิสค์ยาปฏิชีวนะทั้งหมดที่ทดสอบ}} x\ 100 \quad (4)$$

สถิติที่ใช้ในการศึกษา

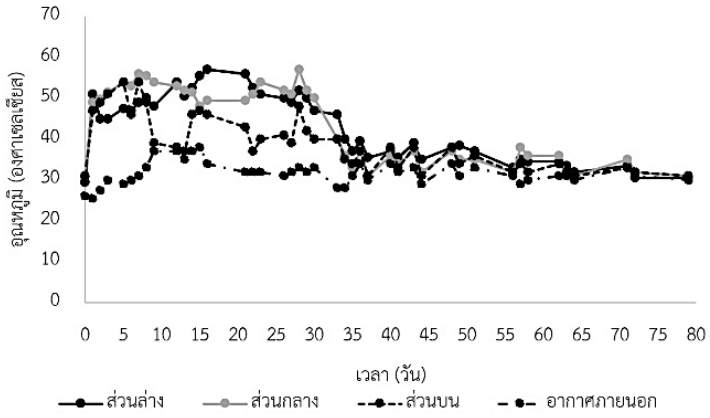
สถิติที่ใช้ในการวิเคราะห์ผลการศึกษาเป็นการใช้สถิติเชิงพรรณนา (Descriptive statistics) ประกอบด้วย การแจกแจงความถี่ด้วยค่าร้อยละ (Percentage) การวัดค่าแนวโน้มเข้าสู่ศูนย์กลางด้วยค่าเฉลี่ย (Mean) และการวัดการกระจายด้วยค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Standard deviation) และมีการใช้สถิติอ้างอิง (Inference statistics) เปรียบเทียบความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปรด้วยการวิเคราะห์การถดถอยเชิงเส้นอย่างง่าย (Simple linear regression analysis)

ผลการวิจัย และการอภิปรายผล

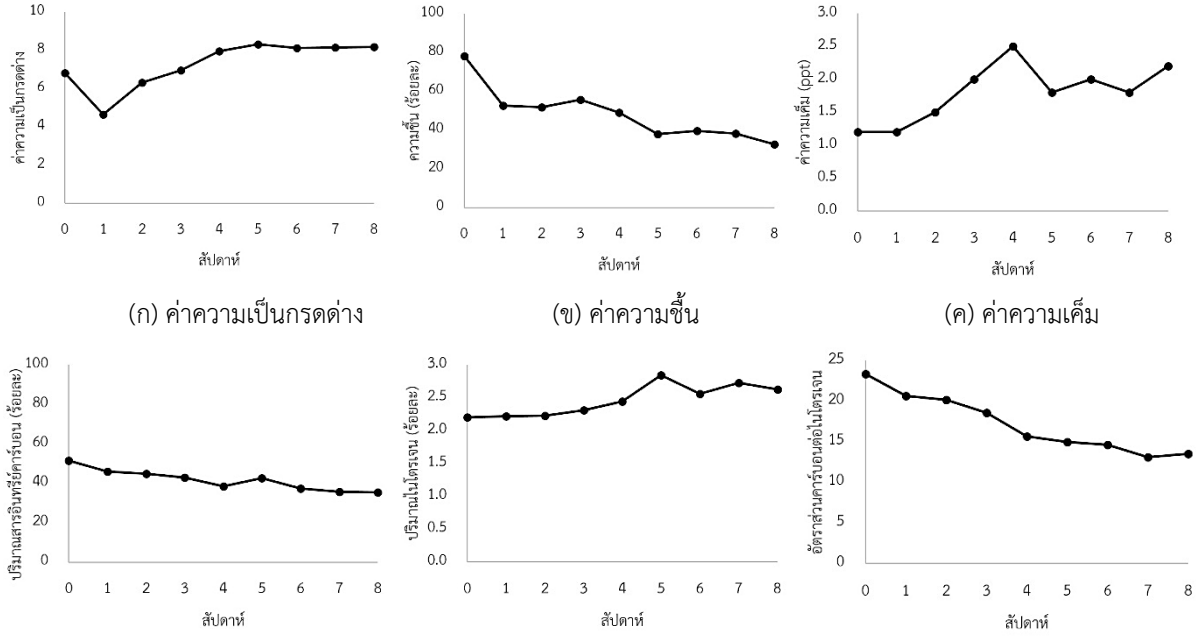
ลักษณะของปุ๋ยหมักเศษอาหาร

ผลจากการศึกษาคุณสมบัติทางด้านกายภาพและเคมีด้านต่าง ๆ ของปุ๋ยอินทรีย์ พบว่า จากการศึกษาอุณหภูมิภายใต้กระบวนการหมักแบบเติมอากาศ ช่วงเริ่มต้นการหมักอุณหภูมิอยู่ที่ 29.5-31.0 องศาเซลเซียส และเพิ่มสูงขึ้นอย่างรวดเร็วในสัปดาห์ที่ 1-4 โดยอยู่ในช่วง 37.0-57.0 องศาเซลเซียส (ค่าเฉลี่ยอุณหภูมิ 49.2 องศาเซลเซียส, ค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน 2.00) เนื่องมาจากกิจกรรมการย่อยสลายสารอินทรีย์ที่อยู่ในรูปย่อยสลายง่ายโดยจุลินทรีย์ ซึ่งกระบวนการจะดำเนินไปจนกระทั่งสารอาหารที่ย่อยสลายง่ายลดปริมาณลง สังเกตได้จากการที่อุณหภูมิของปุ๋ยหมักเริ่มลดลงและมีค่าคงที่ในช่วงถัดไป (รูปที่ 2) ในระหว่างกระบวนการหมักมีการพรมน้ำเล็กน้อยในปุ๋ยหมักสัปดาห์ละครั้ง ค่าความชื้นของปุ๋ยหมักช่วงเริ่มต้นมีค่าความชื้นสูง (ร้อยละ 78.3) อาจเนื่องมาจากเศษอาหารส่วนใหญ่จัดเป็นอาหารเหลือทิ้งจากการรับประทานอาหาร แต่เมื่อระยะเวลาในกระบวนการหมักผ่านไป (สัปดาห์ที่ 5-8) ค่าความชื้นลดลงอยู่ในช่วงร้อยละ 32.5-39.7 (ค่าเฉลี่ยความชื้นร้อยละ 37.0, ค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน 3.13) ในช่วงสัปดาห์แรกค่าความเป็นกรดด่างของปุ๋ยหมักลดต่ำลงจนมีค่าเป็นกรดเล็กน้อย (pH 4.6) และค่อย ๆ เพิ่มขึ้นสูงขึ้นจนอยู่ในช่วงเป็นกลางถึงด่างเล็กน้อยในสัปดาห์ที่ 3-8 (ระหว่าง 7.0-8.3 ค่าเฉลี่ยความเป็นกรดด่าง 7.9, ค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน 0.49) ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากขยะเศษอาหาร เช่น ข้าว เนื้อสัตว์สามารถเปลี่ยนรูปได้ในระยะเวลาอันรวดเร็วผ่านกระบวนการย่อยสลายโดยจุลินทรีย์จากสารอินทรีย์โมเลกุลใหญ่ก่อเกิดเป็นกรดอินทรีย์ซึ่งมีคุณสมบัติเป็นกรดอ่อน ส่วนค่าการนำไฟฟ้าและค่าความเค็มของปุ๋ยหมักเศษอาหารถือว่ามีค่าค่อนข้างสูงกว่าปุ๋ยหมักทั่วไป โดยมีค่าอยู่ในช่วง 2.2-4.3 ไมโครซีเมนต์/เซนติเมตร และ 1.2-2.2 ส่วนต่อพันส่วน (ppt) ตามลำดับ ซึ่งค่าการนำไฟฟ้าจะแสดงถึงปริมาณสารอนินทรีย์ที่พบในปุ๋ย ส่วนค่าความเค็มแสดงถึงปริมาณเกลือในรูปต่าง ๆ โดยค่าดังกล่าวมีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นตามระยะเวลา ในส่วนของปริมาณสารอินทรีย์คาร์บอนนั้น ช่วงสัปดาห์แรกมีค่าอยู่ที่ร้อยละ 45.8 และมีค่าลดตามระยะเวลา (สัปดาห์ที่ 8 มีค่าร้อยละ 35.5) ซึ่งค่าที่ลดลงเนื่องมาจากปฏิกิริยาออกซิเดชันสารอินทรีย์ในปุ๋ยให้กลายไปเป็นก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ และน้ำภายใต้กระบวนการย่อยสลายแบบใช้อากาศ อีกทั้งปริมาณไนโตรเจนในระหว่างการหมักจะมีค่าลดลง เนื่องมาจากอุณหภูมิที่เพิ่มสูงขึ้นในถังหมักส่งผลให้เกิดการระเหยของแอมโมเนีย และเมื่ออุณหภูมิลดต่ำลงจะก่อให้เกิดการสะสมซึ่งอาจเกิดขึ้นจากแบคทีเรียที่ทำหน้าที่ตรึงไนโตรเจนซึ่งค่อนข้างมีบทบาทในช่วงท้ายของกระบวนการหมัก เมื่อพิจารณาอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจน (C/N ratio) พบว่ามีค่าลดลงตามระยะเวลาจาก 23.4 ในสัปดาห์เริ่มต้น (สัปดาห์ที่ 0) เหลือ 13.6 ในสัปดาห์ที่ 8 ซึ่งเกิดขึ้นจากการสะสมปริมาณไนโตรเจนและการย่อยสลายสารอินทรีย์ในกระบวนการ (Kebibeche et al., 2019) (รูปที่ 3)

ตัวอย่างปุ๋ยเมื่อครบระยะเวลาการหมักมีคุณสมบัติทางกายภาพที่สังเกตเห็นได้คือ วัสดุหมักถูกย่อยสลายจนมีขนาดเล็กลง ปรากฏเป็นสีน้ำตาลเข้ม มีกลิ่นคล้ายดิน อีกทั้งไม่พบเศษอาหาร เศษไม้ และใบไม้ ที่มีลักษณะเหมือนกับวัสดุตั้งต้นที่ใช้ และเมื่อพิจารณาเปรียบเทียบกับการกำหนดลักษณะเกณฑ์ปุ๋ยอินทรีย์เพื่อการควบคุมคุณภาพ พบคุณสมบัติปุ๋ยในการศึกษานี้มีปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดไม่น้อยกว่าร้อยละ 1.0 โดยน้ำหนัก ปริมาณอินทรียวัตถุรับรองในรูปสารอินทรีย์คาร์บอนไม่ต่ำกว่าร้อยละ 20 โดยน้ำหนัก อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนไม่เกิน 20:1 ค่าการนำไฟฟ้าไม่เกิน 10 เดซิซีเมนต่อเมตร และความชื้นไม่เกินร้อยละ 30 โดยน้ำหนัก (กรมวิชาการเกษตร, 2564)



รูปที่ 2 อุณหภูมิที่เปลี่ยนแปลงภายใต้กระบวนการหมักปุ๋ยจากเศษอาหารตลอดระยะเวลาการทดลอง



(ก) ค่าความเป็นกรดด่าง (ข) ค่าความชื้น (ค) ค่าความเค็ม

(ง) สารอินทรีย์คาร์บอน (จ) ไนโตรเจน (ฉ) คาร์บอนต่อไนโตรเจน

รูปที่ 3 คุณสมบัติทางกายภาพและเคมีภายใต้กระบวนการหมักปุ๋ยจากเศษอาหาร

จากการศึกษาปริมาณจุลินทรีย์ประเภทต่างๆที่เปลี่ยนแปลงไปตามระยะเวลาในการหมักนั้น พบว่า มีปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดเริ่มต้นอยู่ 6.08x10^8 CFU/g โดยปริมาณจุลินทรีย์ที่สูงอาจเนื่องมาจากมีการเติมสารเร่งซุปเปอร์ พด. 1 ของกรมพัฒนาที่ดินร่วมด้วยเพื่อเพิ่มปริมาณจุลินทรีย์ที่เป็นประโยชน์ต่อกระบวนการย่อยสลาย โดยสารดังกล่าวประกอบด้วยจุลินทรีย์หลากหลายชนิด ตัวอย่างเช่น *Scytalidium thermophilum*, *Chaetomium thermophilum*, *Corynascus verrucosus*, *Scopulariopsis breviacaulis*, *Streptomyces* sp. และ *Bacillus subtilis* และเมื่อครบ 8 สัปดาห์ ปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดลดลงเหลือ 4.21x10^7 CFU/g สำหรับตัวบ่งชี้แบคทีเรียก่อโรคกลุ่มโคลิฟอร์มแบคทีเรียและอีโคไลที่วิเคราะห์จัดเป็นแบคทีเรียกลุ่มสำคัญที่ก่อให้เกิดโรคในระบบทางเดินอาหาร และนิยมใช้เป็นดัชนีชี้วัดกันอย่างแพร่หลาย มีแนวโน้มปริมาณลดลงตามระยะเวลาเช่นเดียวกัน โดยมีปริมาณเริ่มต้นที่ 9.02x10^6 CFU/g และ 3.70x10^5 CFU/g ตามลำดับ และมีปริมาณลดลงเหลือ 2.33x10^5 CFU/g และ 1.98x10^4 CFU/g ตามลำดับ (ตารางที่ 1) จะเห็นได้ว่า จุลินทรีย์ภายใต้กระบวนการหมักมีการเปลี่ยนแปลงตลอดกระบวนการซึ่งขึ้นกับปัจจัยต่าง ๆ เช่น อุณหภูมิ รวมทั้งสารอาหารที่เป็นประโยชน์ต่อการเจริญเติบโต ซึ่งเมื่อสิ้นสุดกระบวนการหมักปริมาณแบคทีเรียกลุ่มโคลิฟอร์มและอีโคไลลดปริมาณลงร้อยละ 97.4 และ

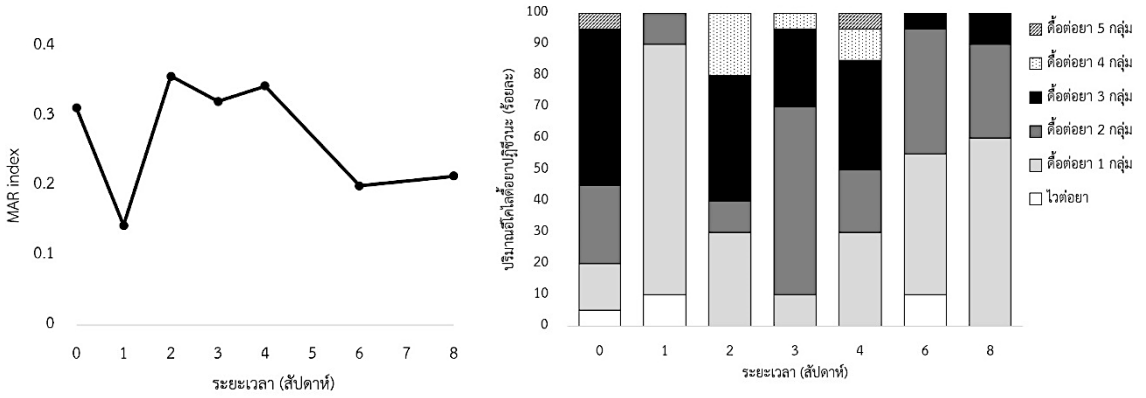
94.6 ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่า กระบวนการหมักแบบใช้อากาศเพื่อผลิตปุ๋ยสามารถลดปริมาณแบคทีเรียก่อโรคได้ (Gou et al., 2018) ซึ่งช่วงแรกที่อุณหภูมิภายในปุ๋ยอินทรีย์เพิ่มสูงขึ้นจะสังเกตพบว่าปริมาณแบคทีเรียก่อโรคจะลดลงอย่างรวดเร็ว สื่อให้เห็นว่าอุณหภูมิสูงเป็นอีกปัจจัยที่ส่งผลต่อปริมาณแบคทีเรียกลุ่มดังกล่าว

ตารางที่ 1 ปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด โคลิฟอร์มแบคทีเรีย และอีโคไลภายใต้กระบวนการหมักปุ๋ยจากเศษอาหาร

สัปดาห์ที่	ปริมาณจุลินทรีย์ประเภทต่าง ๆ ในปุ๋ยหมักจากเศษอาหาร (CFU/g)		
	จุลินทรีย์ทั้งหมด	โคลิฟอร์มแบคทีเรีย	อีโคไล
0	6.08×10^8	9.02×10^6	3.70×10^5
1	2.31×10^8	6.99×10^5	8.04×10^4
2	4.38×10^8	3.65×10^5	9.24×10^4
3	2.87×10^8	4.14×10^5	2.90×10^4
4	4.20×10^8	5.61×10^4	1.88×10^4
5	1.72×10^8	6.29×10^4	3.44×10^4
6	1.47×10^8	4.38×10^5	6.88×10^4
7	9.88×10^7	1.19×10^5	1.17×10^4
8	4.21×10^7	2.33×10^5	1.98×10^4

แบคทีเรียดื้อยาปฏิชีวนะที่คัดแยกจากปุ๋ยหมักเศษอาหาร

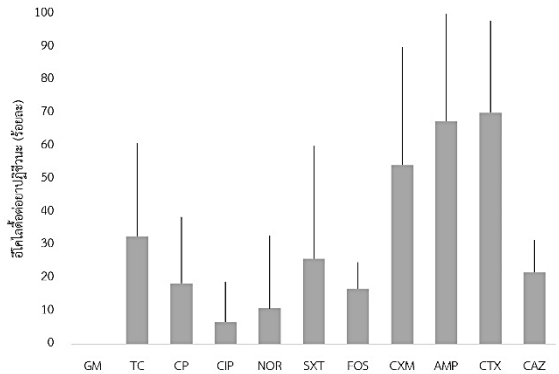
ในการศึกษานี้จะทำการคัดเลือกตัวแทนอีโคไลจากปุ๋ยหมักตัวอย่างละ 20 ไอโซเลต มาทำการทดสอบ รวมเป็น 140 ไอโซเลต ซึ่งในภาพรวมพบว่า อีโคไลส่วนใหญ่พบการดื้อยาปฏิชีวนะร้อยละ 96.4 โดยภาพรวมระดับการดื้อยาของอีโคไล หรือค่า MAR index ช่วงเริ่มต้นการหมักมีค่า 0.312 ระหว่างกระบวนการหมัก ในสัปดาห์ที่ 2-4 MAR index มีค่า 0.321-0.357 และในสัปดาห์ที่ 8 มีค่า 0.214 (รูปที่ 4) แสดงให้เห็นว่ามีการพัฒนาคุณสมบัติการดื้อต่อยาปฏิชีวนะเพิ่มขึ้นในระหว่างกระบวนการหมักปุ๋ย แต่เมื่อกระบวนการแล้วเสร็จระดับการดื้อยาของอีโคไลที่พบจะลดลง เมื่อพิจารณาเพิ่มเติมถึงรูปแบบการดื้อยาปฏิชีวนะของอีโคไลต่อการดื้อยาตั้งแต่ 1-7 กลุ่มยาที่นำมาทำการทดสอบ พบว่าผลการศึกษาเป็นไปในทิศทางเดียวกันกับการศึกษาค่า MAR index กล่าวคือจากภาพรวมผลการศึกษา พบอีโคไลชนิดดื้อต่อยาปฏิชีวนะตั้งแต่ 2-5 กลุ่มยาขึ้นไป มีอัตราส่วนที่ลดลงตามระยะเวลา จากช่วงเริ่มต้นที่พบมากถึงอัตราส่วนร้อยละ 80 และมีค่าลดลงในสัปดาห์ที่ 8 เหลือร้อยละ 40 ในขณะที่พบอีโคไลดื้อต่อยาเพียง 1 กลุ่มยา เพิ่มขึ้นถึงร้อยละ 60 (รูปที่ 4) ซึ่งสนับสนุนผลการศึกษาจากค่า MAR index ที่ระบุว่าระดับการดื้อยาปฏิชีวนะของแบคทีเรียบ่งชี้ในปุ๋ยเศษอาหารมีระดับลดลงเมื่อผ่านกระบวนการหมัก นอกจากนี้ยังสุ่มทำการทดลองคัดแยกอีโคไลจากน้ำชะปุ๋ยหมักมาศึกษาคุณสมบัติการดื้อยา ซึ่งช่วงแรกของการหมักปุ๋ย (สัปดาห์ที่ 1) พบค่า MAR index (0.405) สูงกว่าในตัวปุ๋ยหมัก และมีค่าลดระดับลงมาใกล้เคียงกันในช่วงหลัง (สัปดาห์ที่ 7, MAR index = 0.150) (ไม่มีการแสดงข้อมูล)



(ก) MAR index (ข) การดื้อต่อยาปฏิชีวนะตามกลุ่มยา

รูปที่ 4 ภาพรวมการดื้อต่อยาปฏิชีวนะของอีโคไลตลอดกระบวนการหมักปุ๋ยเศษอาหาร

นอกจากนี้ยังได้ดำเนินการวิเคราะห์รูปแบบการดื้อยาปฏิชีวนะของอีโคไลที่เหลือรอดในตัวอย่างปุ๋ยตามชนิดของยาทั้ง 7 กลุ่ม รวม 11 ชนิดยา ที่นำมาทดสอบ (รูปที่ 5 และตารางที่ 2) พบว่า มีอีโคไลที่เหลือรอดมีอัตราการดื้อต่อยากลุ่ม Beta-lactams ชนิด Cefuroxime (CXM), Ampicillin (AMP) และ Cefotaxime (CTX) อยู่ในระดับสูงตลอดกระบวนการหมักเมื่อเปรียบเทียบกับการดื้อต่อยากลุ่มอื่นๆ โดยมีค่าเฉลี่ยตลอดระยะเวลา 8 สัปดาห์ (สัปดาห์ที่ 1-8) อยู่ที่ร้อยละ 54.2 (ค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน 35.7), ร้อยละ 67.5 (ค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน 34.9), และร้อยละ 70.0 (ค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน 27.09) ตามลำดับ อีกทั้งพบว่าอีโคไลมีความไวต่อยากลุ่ม Aminoglycoside (Gentamicin, GM) และดื้อต่อยากลุ่ม Fluoroquinolones (Ciprofloxacin, CIP และ Norfloxacin, NOR) ในระดับที่ต่ำมาก โดยมีค่าเฉลี่ยตลอดระยะเวลาการทดสอบ (สัปดาห์ที่ 1-8) อยู่ที่ร้อยละ 6.7 (ค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน 12.1) และ ร้อยละ 10.8 (ค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน 22.0) ตามลำดับ ส่วนยาประเภทอื่น ๆ ที่ทดสอบ พบว่ามีระดับการดื้อยาปานกลางเมื่อเปรียบเทียบในภาพรวมทั้งหมด สาเหตุที่พบการดื้อยากลุ่ม Beta-lactams ในระดับสูงเนื่องจากกลไกการออกฤทธิ์เพื่อต้านยาของแบคทีเรียแกรมลบ เช่น อีโคไล ซึ่งจัดเป็นแบคทีเรียกลุ่มโคลิฟอร์ม เกิดขึ้นโดยการผลิตเอนไซม์ Beta-lactamase มาทำการย่อยสลายวงแหวน Beta-lactams ของยาส่งผลให้ยาหมดฤทธิ์ในการทำลายแบคทีเรีย (Rupp and Fey, 2003; Mesa et al., 2006) เป็นกลไกที่พบได้อย่างแพร่หลายในอีโคไล โดยการถ่ายทอดคุณสมบัติดังกล่าวเกิดผ่านยีนควบคุมการดื้อยาปฏิชีวนะซึ่งยีนดังกล่าวส่วนใหญ่จะอยู่ที่พลาสมิดของแบคทีเรีย ซึ่งสามารถถ่ายทอดผ่านยีนจากแบคทีเรียที่ดื้อยาไปสู่แบคทีเรียที่ไม่มีคุณสมบัติดังกล่าวได้ผ่านกระบวนการที่เรียกว่าการถ่ายทอดยีนในแนวราบ (HGT) ซึ่งทำให้เชื้อแบคทีเรียสามารถถ่ายทอดยีนฯ ข้ามสายพันธุ์กันได้ (Kelly et al., 2009)



รูปที่ 5 ค่าเฉลี่ยการดื้อต่อยาปฏิชีวนะแยกตามชนิดยาของอีโคไลตลอดกระบวนการหมักปุ๋ยเศษอาหาร (สัปดาห์ที่ 1-8)

ตารางที่ 2 อีโคไลที่ดื้อต่อยาปฏิชีวนะแต่ละชนิดภายใต้กระบวนการหมักปุ๋ยเศษอาหาร

ชนิดยาปฏิชีวนะ	อีโคไลจากปุ๋ยหมักเศษอาหารที่ดื้อต่อยาปฏิชีวนะแต่ละชนิด (ร้อยละ)						
	สัปดาห์ที่ 0	สัปดาห์ที่ 1	สัปดาห์ที่ 2	สัปดาห์ที่ 3	สัปดาห์ที่ 4	สัปดาห์ที่ 6	สัปดาห์ที่ 8
Gentamicin (GM)	0	0	0	0	0	0	0
Tetracycline (TC)	5	55	45	0	70	20	5
Chloramphenicol (CP)	50	0	50	10	35	15	0
Ciprofloxacin (CIP)	0	0	10	0	30	0	0
Norfloxacin (NOR)	0	0	10	0	55	0	0
Sulfamethoxazole/Trimethoprim (SXT)	65	0	20	90	0	10	35
Fosfomycin (FOS)	30	10	25	25	5	20	15
Cefuroxime (CXM)	95	10	85	95	20	40	75
Ampicillin (AMP)	95	5	95	95	55	65	90
Cefotaxime (CTX)	85	30	95	95	65	45	90
Ceftazidime (CAZ)	10	15	10	30	25	15	35

นอกจากนี้คณะผู้วิจัยยังได้มีการสุ่มตัวอย่างปุ๋ยหมักจากเศษอาหารที่มีการพักทิ้งไว้ต่อเนื่องเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ (เทียบเท่า 12 สัปดาห์ นับจากวันที่เริ่มกระบวนการหมัก) มาทำการทดสอบ ซึ่งพบว่าระดับการดื้อยาปฏิชีวนะของอีโคไลในภาพรวมมีค่าลดลง โดยมีค่า MAR index 0.121 (ไม่มีการแสดงข้อมูล) อีกทั้งพบอัตราส่วนอีโคไลที่ไวต่อยาและดื้อต่อยาปฏิชีวนะเพียง 1 กลุ่มยา ร้อยละ 35 และร้อยละ 55 ตามลำดับ ซึ่งมีค่าระดับความรุนแรงของการดื้อต่อยาลดต่ำลงเมื่อเปรียบเทียบกับปุ๋ยอินทรีย์สัปดาห์ที่ 8 ซึ่งไม่พบอีโคไลที่ไวต่อยา พบเฉพาะอีโคไลดื้อยา 1 กลุ่มยา ร้อยละ 60 เท่านั้น แสดงให้เห็นว่า การทิ้งช่วงเวลาให้ปุ๋ยหมักเกิดการหมักจนสมบูรณ์หรือมีการพักปุ๋ยหมักทิ้งไว้จะช่วยลดระดับความรุนแรงของกลุ่มแบคทีเรียดื้อต่อยาปฏิชีวนะลงได้ ตลอดจนกระบวนการหมักแบบใช้อากาศยังเป็นสภาวะที่ส่งเสริมการลดยีนดื้อยาปฏิชีวนะในปุ๋ยหมัก (Guo et al., 2021; Li et al., 2021, Qiu et al., 2021) อีกทั้งจากผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่าในปุ๋ยหมักจากขยะเศษอาหาร พบเรื่องของการแพร่กระจายการดื้อต่อยาปฏิชีวนะในแบคทีเรียเช่นเดียวกันกับในวัสดุหมักปุ๋ยประเภทมูลสัตว์ แต่ไม่ได้มีระดับรุนแรงเท่า เนื่องจากในการเลี้ยงสัตว์เศรษฐกิจมีการใช้ยาปฏิชีวนะโดยตรง (Wang et al., 2014) แต่อย่างไรก็ตาม โดยทั่วไปขยะเศษอาหารพบการปนเปื้อนด้วยยาปฏิชีวนะหรือแบคทีเรียดื้อยาปฏิชีวนะ ซึ่งอาจมาจากวัตถุดิบในการประกอบอาหารประเภทต่าง ๆ รวมทั้งสารคัดหลั่งของผู้รับประทานที่อาจปนเปื้อนด้วยแบคทีเรียดื้อยาปฏิชีวนะ (Chen et al., 2021; Zhao et al., 2022) สำหรับรูปแบบการพัฒนาการดื้อต่อยาปฏิชีวนะของอีโคไลในปุ๋ยหมักเศษอาหารเมื่อเปรียบเทียบตามระยะเวลาพบว่า มีความสอดคล้องกับผลจากการประเมินค่า MAR index และการดื้อยาตามกลุ่มยาทั้ง 7 กลุ่ม สังเกตได้จากรูปแบบการดื้อยาที่เปลี่ยนแปลงไปภายในกระบวนการหมัก อาทิ การดื้อยา Tetracycline (TC), Ciprofloxacin (CIP) และ Norfloxacin (NOR) แทบจะไม่พบในอีโคไลตั้งต้น แต่กลับพบระดับการดื้อยาที่เพิ่มขึ้นระหว่างกระบวนการหมัก และสุ่มตรวจพบในระดับต่ำ (TC) และไม่พบ CIP และ NOR เมื่อสิ้นสุดระยะเวลา 8 สัปดาห์ รูปแบบการดื้อยาของ Chloramphenicol (CP) และ Fosfomycin (FOS) พบระดับการดื้อยาลดต่ำลงเมื่อสิ้นสุดกระบวนการหมัก เป็นต้น ในการศึกษานี้ได้ทำการหาความสัมพันธ์ระหว่างปัจจัยแวดล้อมภายใต้กระบวนการหมักปุ๋ย (ค่าความเป็นกรดด่าง อุณหภูมิ ความชื้น การนำไฟฟ้า ความเค็ม ปริมาณสารอินทรีย์คาร์บอน ไนโตรเจน และอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน) กับค่าการดื้อต่อยาปฏิชีวนะแต่ละชนิดในอีโคไล ไม่พบว่าปัจจัยแวดล้อมตัวแปรใดที่จะส่งผลต่อรูปแบบการดื้อยาในระดับสูง (ค่า R^2 เข้าใกล้

1) ซึ่งอีโคไลที่ดื้อต่อยา Ceftazidime (CAZ) และระดับความเค็มของปุ๋ยเป็นคู่ที่มีความสัมพันธ์กันมากที่สุด (R^2 = 0.547) ในการทดสอบนี้ โดยระดับการดื้อยา CAZ ของอีโคไลเพิ่มขึ้นเมื่อค่าความเค็มในปุ๋ยสูงขึ้น ซึ่งใกล้เคียงกับ Zhang et al. (2019) ที่พบว่าค่าความเค็มเป็นปัจจัยที่ส่งผลต่อการแพร่กระจายของยีนดื้อยาปฏิชีวนะของดินบริเวณชายหาด

จากการศึกษางานวิจัยที่เกี่ยวข้อง พบการเปลี่ยนแปลงรูปแบบและระดับการดื้อยาปฏิชีวนะในกระบวนการหมักปุ๋ยเศษอาหาร มีอิทธิพลมาจากการเปลี่ยนแปลงชนิดแบคทีเรียในกระบวนการ และปัจจัยสิ่งแวดล้อม ซึ่งการเปลี่ยนแปลงชนิดของแบคทีเรียมีปัจจัยหลักมาจากการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิ โดยในช่วงเริ่มต้นการหมักเป็นสภาวะที่มีสารอาหารปริมาณมากประกอบกับอุณหภูมิที่เพิ่มสูงขึ้นก่อให้เกิดภาวะการเจริญเติบโตแบบแข่งขันกัน (Microbial competition) และในระยะถัดไปของการหมักเมื่อสารอาหารเริ่มลดลงจะก่อเกิดปฏิสัมพันธ์ในรูปแบบการอยู่อาศัยร่วมกัน (Microbial cooperation) ส่งผลให้แบคทีเรียที่อยู่รอดเกิดการปรับตัวและลดการดำเนินกิจกรรม (Zhao et al., 2022) โดยในช่วงการเจริญเติบโตแบบแข่งขันกันของแบคทีเรียจะส่งเสริมให้เกิดยีนดื้อยาปฏิชีวนะในระบบเพิ่มขึ้น ในขณะที่การมีปฏิสัมพันธ์แบบอยู่อาศัยร่วมของแบคทีเรียและการเกิดกระบวนการหมักปุ๋ยที่สมบูรณ์ วัดจากค่าดัชนีการงอกของเมล็ด (Germination index) มีค่ามากกว่าร้อยละ 92.6 จะส่งผลต่อการลดยีนดังกล่าว (Zhao et al., 2022) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษานี้ที่สามารถลดแบคทีเรียบ่งชี้ชนิดอีโคไลในปุ๋ยหมักลงได้ร้อยละ 94.6 จากการคาดการณ์ผลการศึกษานี้ อีโคไล 1.98×10^4 CFU/g ที่เหลือรอดในสัปดาห์ที่ 8 จัดเป็นอีโคไลดื้อยาทั้งหมด แต่ระดับการดื้อยาต่ำลง โดยที่อีโคไล 1.18×10^4 CFU/g จัดเป็นอีโคไลดื้อต่อยาปฏิชีวนะเพียง 1 กลุ่มยา (ร้อยละ 60) ในขณะที่อีโคไล 7.92×10^3 CFU/g จัดเป็นอีโคไลดื้อต่อยาปฏิชีวนะ 2-3 กลุ่มยา (ร้อยละ 40) นอกจากนี้ยังพบว่า มีปัจจัยทางสภาพแวดล้อมอื่น ๆ ที่มีอิทธิพลต่อการดื้อยาปฏิชีวนะภายใต้กระบวนการหมัก เช่น ความเป็นกรดด่าง ปริมาณคาร์บอน และไนโตรเจน (Li et al., 2021) ซึ่งการควบคุมกระบวนการผลิตปุ๋ยหมักให้อยู่ในสภาวะที่เกิดการหมักอย่างสมบูรณ์ มีคุณภาพตามมาตรฐานกำหนดจะช่วยลดระดับความรุนแรงลงได้ ตลอดจนการเพิ่มระยะเวลาการพักปุ๋ยหมักทิ้งไว้น่าจะมีส่วนช่วยละระดับความรุนแรงของแบคทีเรียดื้อยาปฏิชีวนะได้อีกช่องทางหนึ่ง (Zhao et al., 2022)

บทสรุป

จากข้อสมมติฐานของงานวิจัยนี้สามารถสรุปได้ว่าเศษอาหารที่จัดเป็นวัสดุตั้งต้นในกระบวนการหมักปุ๋ยมีการตรวจพบแบคทีเรียบ่งชี้อีโคไลที่มีคุณสมบัติดื้อต่อยาปฏิชีวนะ โดยมีค่า MAR index = 0.312 และมีอีโคไลตั้งต้น 3.70×10^5 CFU/g ภายใต้กระบวนการหมักปุ๋ยแบบใช้อากาศส่งผลให้เมื่อครบระยะเวลา 8 สัปดาห์ สามารถลดระดับการดื้อต่อยาปฏิชีวนะของอีโคไลได้ (MAR index = 0.214) อีกทั้งยังลดปริมาณอีโคไลลงได้ร้อยละ 94.6 (1.98×10^4 CFU/g) ในระหว่างกระบวนการหมักปุ๋ยเศษอาหารพบรูปแบบการดื้อยาที่เปลี่ยนแปลงไปโดยเพิ่มระดับสูงขึ้นในช่วงแรกของการหมักและค่อย ๆ ลดลงตามระยะเวลาการหมัก พบอีโคไลดื้อต่อยาปฏิชีวนะกลุ่ม Beta-lactams (CXM, AMP, CTX และ CAZ) สูง ในขณะที่ไม่พบการดื้อต่อยากลุ่ม Aminoglycoside (GM) ในส่วนของน้ำชะจากปุ๋ยหมักช่วงแรกของการหมักพบค่า MAR index (0.405) สูงกว่าในตัวปุ๋ยหมัก และมีค่าลดระดับลงตามระยะเวลาเช่นกัน (สัปดาห์ที่ 7 มีค่า MAR index = 0.150)

การผลิตปุ๋ยหมักจากขยะเศษอาหาร ควรที่จะต้องคำนึงถึงผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมและสุขภาพในการนำไปใช้งาน ยิ่งส่งเสริมให้เกิดการดำเนินงานที่มีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น ซึ่งการควบคุมกระบวนการผลิตปุ๋ยหมักให้อยู่ในสภาวะที่เกิดการหมักอย่างสมบูรณ์ มีคุณภาพตามมาตรฐานกำหนด หรือมีการพักปุ๋ยทิ้งไว้ เพื่อลดระดับความรุนแรงของการดื้อยาปฏิชีวนะในแบคทีเรียที่อาจปนเปื้อนอยู่ ตลอดจนควบคุมการปล่อยน้ำชะปุ๋ยหมักทิ้งอย่างเหมาะสมเพื่อป้องกันการแพร่กระจายของแบคทีเรียดื้อยาสู่สิ่งแวดล้อม จะส่งผลให้ก่อเกิดแนวทางที่เหมาะสมในการพัฒนากระบวนการผลิตปุ๋ยอินทรีย์ที่มีความปลอดภัยต่อสุขภาพมากยิ่งขึ้น ข้อเสนอแนะสำหรับการขยายผลการดำเนินงานวิจัยในอนาคต เช่น ควรมีการเพิ่มกลุ่มตัวแทนแบคทีเรียก่อโรคที่ทำการทดสอบ ควรมีการขยายผลการศึกษารูปแบบการดื้อต่อยาปฏิชีวนะของแบคทีเรียตัวแทนโดยเพิ่ม

ระยะเวลาในการศึกษาระหว่างการหมักทั้งในส่วนของปุ๋ยหมัก น้ำชะปุ๋ยหมัก หรือช่วงที่ทำการเก็บรักษาปุ๋ยอินทรีย์ อีกทั้งควรเพิ่มเติมการทดลองนำปุ๋ยอินทรีย์ไปเพาะปลูกเพื่อศึกษาการแพร่กระจายของแบคทีเรียดื้อยาปฏิชีวนะในดินและการสะสมในพืช เป็นต้น

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนทุนวิจัยจากสำนักงานการวิจัยแห่งชาติ (วช.) ปีงบประมาณ พ.ศ. 2561

เอกสารอ้างอิง

กรมวิชาการเกษตร. (2564). หลักเกณฑ์การพิจารณาปัจจัยการผลิตพืชอินทรีย์ที่ขอขึ้นทะเบียนเพื่อการค้า (ฉบับปรับปรุง ณ วันที่ 7 มกราคม 2564). ค้นเมื่อ 25 กรกฎาคม 2566. https://www.doa.go.th/psco/wp-content/uploads/2020/06/Organic_1.pdf.

AOAC. (2000). Official Methods of Analysis of AOAC International. 17th Edition. Maryland, USA.

APHA, AWWA, WEF. (2012). Standard method for the examination of water and wastewater. 22nd Edition. Washington, DC, USA.

Chen Z., Li Y., Ye C., He X. and Zhang S. (2021). Fate of antibiotics and antibiotic resistance genes during aerobic co-composting of food waste with sewage sludge. Science of the Total Environment. 784: 146950. doi:10.1016/j.scitotenv.2021.146950.

CLSI. (2012). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; twenty-second in formational supplement. Clinical and Laboratory Standards Insititute.

Collins C.H., Lyne P. M., Grange J. M. and Falkinham III J. O. (2004). Microbiological Methods. 8th Edition. Oxford University Press Inc. London.

Furukawa M., Misawa N. and Moore J.E. (2018). Recycling of domestic food waste does food waste composting carry risk from total antimicrobial resistance (AMR). British Food Journal. 120(11): 2710-2715.

Gou M., Hu H.W., Zhang Y.J., Wang J.T., Hayden H., Tang Y.Q. and He J.Z. (2018). Aerobic composting reduces antibiotic resistance genes in cattle manure and the resistome dissemination in agriculture soils. Science of the Total Environment. 612: 1300-1310.

Guo W., Huang C., Xi B., Tang Z., Tan W., Li W., Zhang Y. and Li W. (2021). The maturity period is the main stage of antibiotic resistance genes reduction in aerobic composting process of swine manure in sub-scale farms. Bioresource Technology. 319: 124139. doi:10.1016/j.biortech.2020.124139.

Kebibeche H., Khelil O., Kacem M. and Harche M.K. (2019). Addition of wood sawdust during the co-composting of sewage sludge and wheat straw influences seeds germination. Ecotoxicology and Environmental Safety. 168: 423-430.

Kelly B.G., Vespermann A. and Bolton D.J. (2009). Horizontal gene transfer of virulence determinants in selected bacterial foodborne pathogens. Food and Chemical Toxicology. 47: 969-977.

Li H., Zheng X., Cao H., Tan L., Yang B., Cheng W. and Xu Y. (2021). Reduction of antibiotic resistance genes under different conditions during composting process of aerobic combined with anaerobic. Bioresource Technology. 325: 124710. doi:10.1016/j.biortech.2021.124710.

Mesa R.J., Blanc V., Blanch A.R., Cortés P., González J.J., Lavilla S., Miró E., Muniesa M., Saco M., Tórtola M.T., Mirelis B., Coll P., Llagostera M., Prats G. and Navarro F. (2006). Extended-spectrum β-lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in different environments (humans, food, animal farms and sewage). Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 58: 211-215.

Palaniveloo K., Amran M.A., Norhashim N.A., Mohamad-Fauzi N., Peng-Hui F., Hui-Wen L., Kai-Lin Y., Jiale L., Chian-Yee M.G., Jing-Yi L., Gunasekaran B. and Razak S.A. (2020). Food Waste Composting and Microbial Community Structure Profiling. Processes. 8: 723. doi:10.3390/pr8060723.

Qiu X., Zhou G., Chen L. and Wang H. (2021). Additive quality influences the reservoir of antibiotic resistance genes during chicken manure composting. Ecotoxicology and Environmental Safety. 220: 112413. doi: 10.1016/j.ecoenv.2021.112413.

Rupp M.E. and Fey P.D. (2003). Extended spectrum β-lactamase (ESBL)-producing Enterobacteriaceae considerations for diagnosis, prevention and drug treatment. Drugs. 63(4): 353-365.

Wang N., Yang X., Jiao S., Zhang J., Ye B. and Gao S. (2014). Sulfonamide-resistant bacteria and their resistance genes in soil fertilized with manures from Jiangsu province, southeastern China. PLOS ONE. 9(11): 1-11.

Wang P., Chen X., Liang X., Cheng M. and Ren L. (2019). Effects of nanoscale zero-valent iron on the performance and the fate of antibiotic resistance genes during thermophilic and mesophilic anaerobic digestion of food waste. Bioresource Technology. 293: 122092. doi:10.1016/j.biortech.2019.122092.

Wellington E.M.H, Boxall A.B.A., Cross P., Feil E.J., Gaze W.H., Hawkey P.M., Johnson-Rollings A.S., Jones D.L., Lee N.M., Otten W., Thomas C.M. and Williams A.P. (2013). The role of the natural environment in the emergence of antibiotic resistance in Gram-negative bacteria. Lancet Infection Disease. 13: 155-165.

Zhang Y.J., Hu H.W., Yan H., Wang J.T., Lam S.K., Chen Q.L., Chen D. and He J.Z. (2019). Salinity as a predominant factor modulating the distribution patterns of antibiotic resistance genes in ocean and river beach soils. Science of The Total Environment. 668: 193-203.

Zhao Y., Chen W., Zhang P., Cai J., Lou Y. and Hu B. (2022). Microbial cooperation promotes humification to reduce antibiotic resistance genes abundance in food waste composting. Bioresource Technology. 362: 127824. doi:10.1016/j.biortech.2022.127824.