

บทความวิจัย (Research Article)

การย่อยสลายสารไกลโฟเสตทางชีวภาพโดยแบคทีเรียแยกจากดินเกษตร

รูปน ชื่นบาล*, ศรีกาญจนา คล้ายเรือง, จุไรรัตน์ อิมินา

Biodegradation of glyphosate by bacteria isolated from agricultural soil

Tapana Cheunbarn*, Srikanjana Klayraung, Jurairat Eimina

School of Science, Maejo University, Sansai District, Chiangmai Province 50290

* Corresponding author, E-mail: tapanach@gmail.com

Naresuan Phayao J. 2015;8(1):15-20.

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์ของการศึกษาคือเพื่อประเมินค่าขีดความสามารถการย่อยสลายสารไกลโฟเสตทางชีวภาพโดยแบคทีเรียแยกจากดินเกษตร คัดแยกแบคทีเรียได้กลุ่มแยก 27 กลุ่มจากผืนดินเคยใช้สารฆ่าวัชพืชไกลโฟเสต มีกลุ่มแยกของแบคทีเรีย 3 กลุ่มคือ LMC2, MMC2 และ PMA2 มีอัตราการย่อยสลายสารไกลโฟเสตทางชีวภาพสูงสุด อิงกับอนุกรมของกรดดีออกซีไรโบนิวคลีอิกในยีนแสดงให้เห็นว่า ทั้งสามกลุ่มมีการเรียงลำดับกรดดีออกซีไรโบนิวคลีอิกคล้ายคลึงกับแบคทีเรียวงศ์แบซิลลัส การทดสอบกระทำโดยการบำบัดทดลอง 6 การออกแบบแบบสุ่มได้แก่ ดินไม่มีแบคทีเรีย ดินมีแบซิลลัส เมกาทีเรียม ดินมีแบซิลลัส ซับติลิส ดินมีแบซิลลัส ซีเรียส และดินมีแบคทีเรียสามกลุ่มแยก ทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง สกัดตัวอย่างดินโดยกระบวนการแยกสารประกอบเกิดระหว่างสองเฟสเพื่อระบุหาระดับความเข้มข้นของไกลโฟเสต ผลการศึกษาพบว่า แบซิลลัส ซับติลิสและแบซิลลัส ซีเรียสสามารถย่อยสลายได้ร้อยละ 98.84 และ 98.46 ตามลำดับ

คำสำคัญ: การย่อยสลายทางชีวภาพ, แบซิลลัส, ไกลโฟเสต

Abstract

The objective of the study was to evaluate the biodegradation performance of glyphosate by bacteria isolated from agricultural soil. The 27 bacterial isolates were obtained from the plot where glyphosate herbicide was previously applied. Three isolates of bacteria; LMC2, MMC2, and PMA2 showed the highest rate in the glyphosate degradation. Based series finding of DNA in gene 16s rRNA, showed that bacteria isolates LMC2, MMC2, and PMA2 had bacterial DNA sequence similar to *Bacillus megaterium*, *B. subtilis*, and *B. cereus* (99%). The performance degradation testing of glyphosate in the soil was conducted by six experimental treatments in a complete randomized design: soil with no bacteria, soil with *B. megaterium*, *B. subtilis*, *B. cereus*, and mixture of the three isolates. The trials were replicated 3 times. The soil samples were extracted by using High Performance Liquid Chromatography (HPLC) to determine concentration levels for glyphosate. The results revealed that glyphosate was readily degraded by *B. subtilis* (98.84%), and *B. cereus* (98.46%), respectively.

Keywords: biodegradation, bacillus, glyphosate

คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ อำเภอสันทราย จังหวัดเชียงใหม่ 50290

รับต้นฉบับวันที่ 11 กันยายน 2557, รับลงตีพิมพ์วันที่ 5 มีนาคม 2558

บทนำ

การใช้สารกำจัดวัชพืชอย่างกว้างขวางของประเทศไทย ส่งผลกระทบทางตรงและทางอ้อมต่อระบบนิเวศ ด้วยสารเคมีเหล่านี้คงทนและยากต่อการย่อยสลาย [1] สารไกลโฟเสต (glyphosate) ชื่อทางเคมีคือ N – phosphonomethyl glycine เป็นสารเคมีที่นิยมใช้อย่างมากทั้งในประเทศและต่างประเทศ [2] ด้วยโครงสร้างคาร์บอกซิลกับฟอสฟอรัสการใช้สารไกลโฟเสตฉีดพ่นวัชพืช เป็นผลให้ใบเหลืองและตาย [3]

น้ำฝนชะสารเคมีลงแม่น้ำลำคลองและปนเปื้อนน้ำใต้ดิน บางส่วนระเหยและซึมลงดิน [4] คงอยู่เป็นเวลานาน [5] เป็นพิษต่อพืช คน สัตว์ และสิ่งแวดล้อม รวมถึงความอุดมสมบูรณ์ของดินและผลผลิตการเกษตรลดลง [6]

การย่อยสลายสารพิษทางชีวภาพเป็นกระบวนการบำบัดสารปนเปื้อน อาศัยความสามารถการย่อยสลายของแบคทีเรีย [7] แบคทีเรียบางสายพันธุ์ทนความเป็นพิษของไกลโฟเสตและใช้ไกลโฟเสตเป็นแหล่งอาหาร [8] ยกตัวอย่าง *Achromobacter* sp. และ *Ochrobactrum anthropic* สามารถย่อยสลายไกลโฟเสตร้อยละ 65.8 และ 49.5 ตามลำดับ [9] แบคทีเรียบางชนิดสามารถย่อยสลายไกลโฟเสตด้วยการสลายพันธะคาร์บอนและฟอสฟอรัส ได้แก่ *Pseudomonas* sp., *Pseudomonas fluorescens* และ *Acetobacter* sp. [3,10]

คณะผู้วิจัยประสงค์คัดแยกแบคทีเรียย่อยสลายไกลโฟเสตและประเมินขีดความสามารถการย่อย เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานในการลดทอนสารพิษในดินและการพลิกฟื้นความมีชีวิตของดิน

วัสดุและวิธีการ

การคัดแยกแบคทีเรียจากดินปนเปื้อนไกลโฟเสต

เก็บตัวอย่างดินจากพื้นที่ใช้ไกลโฟเสตมาก่อน ณ ระดับไถพรวนลึก 0 ถึง 15 เซนติเมตร เจือจางตัวอย่างดิน 1 กรัมครั้งละ 10 เท่า (ten-

fold serial dilution) ให้ได้ 3 ระดับ คือระดับเป็น 10 เท่า 4, 5 และ 6 ครั้ง (10^{-4} 10^{-5} และ 10^{-6})

เกลี่ยเชื้อบนอาหารแข็ง (Tryptic Soy Agar – TSA) และมีไกลโฟเสตความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อลิตร บ่มอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสนาน 24 ชั่วโมง คัดเลือกกลุ่มแยก (isolate) อันเจริญและทำให้บริสุทธิ์ได้ด้วยการเชยตัวอย่างเป็นหลายแนวระนาบ (cross streak) บนจานอาหารแข็ง

การจำแนกชนิดแบคทีเรียโดยการหาลำดับเบส 16S rRNA

นำแบคทีเรียคัดแยกได้จากอาหารแข็งเขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบต่อวินาที อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง และวัดค่าการดูดกลืนแสง (optical density – OD) ที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร (nm) ให้ได้เท่ากับ 1 จากนั้นเติมไกลโฟเสตความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อลิตรในอาหารแข็งเก็บตัวอย่างวันที่ 10 ของการทดลองเพื่อทดสอบความเข้มข้นหลงเหลือของไกลโฟเสตด้วยกระบวนการแยก

สารประกอบเกิดระหว่างสองเฟส (High Performance Liquid Chromatography – HPLC) รุ่น Agilent 1100 คอลัมน์ C18 (4.6 x 150 มิลลิเมตร, 5 ไมโครเมตร) ประเภท diode-array detector (DAD) [11]

ย้อมสีแกรม (Gram's stain) ตัวอย่างเพื่อศึกษารูปร่าง การจัดเรียงตัว และการติดสีแกรมด้วยกล้องจุลทรรศน์

สกัดกรดดีออกซีไรโบนิวคลีอิก (deoxyribonucleic acid – DNA) ด้วยชุดสำเร็จรูป (PureLink™ Genomic DNA Kit) เพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยเทคนิค polymerase chain reaction (PCR) และใช้ ตัวเริ่มต้นสร้างสายพันธุกรรมที่ต้องการ (primer) คือ 27F (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') และ 1522R (5'-AAGGAGGTGATCCRCGCA -3') นำผลผลิตตรวจสอบขนาดของสารพันธุกรรมภายใต้สนามไฟฟ้าโดยผ่านตัวกลางวุ้นอะกาโรส (agarose

gel electrophoresis) ทำชิ้นส่วน 16S rRNA ให้บริสุทธิ์ด้วยชุด GEL/PCR DNA Fragments Extraction Kit และวิเคราะห์หาลำดับเบสโดยบริษัท First BASE Laboratories ประเทศมาเลเซีย สุดท้ายเปรียบเทียบลำดับเบสกับฐานข้อมูลใช้โปรแกรม Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) ของศูนย์ข้อมูลข่าวสารชีวเทคโนโลยีแห่งชาติประเทศสหรัฐอเมริกาเพื่อระบุสายพันธุ์

การทดสอบประสิทธิภาพของการย่อยสลายไกลโพลีเอสเตอร์

นำดินปลอดสารเคมีจากแปลงเกษตรอินทรีย์ผ่านการฆ่าเชื้อ 500 กรัม เติมไกลโพลีเอสเตอร์กระแทกความเข้มข้นเท่ากับ 20 มิลลิกรัมต่อลิตร แบคทีเรียที่ใช้เดิมมีอัตราการเจริญ 10^8 หน่วยก่อรูปกลุ่มต่อลูกบาศก์ มิลลิเมตร (colony forming unit – CFU) จำนวน 25 มิลลิตร ชุดการทดลองประกอบด้วย 6 การออกแบบ แต่ละชุดทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง ที่อุณหภูมิห้อง เป็นการออกแบบสุ่มสมบูรณ์ (completely randomized design – CRD)

การออกแบบที่ 1 เป็นดินเติมไกลโพลีเอสเตอร์ แต่ปราศจากแบคทีเรีย (กลุ่มควบคุม) ส่วนการออกแบบที่ 2, 3 และ 4 เป็นดินเติมสารไกลโพลีเอสเตอร์และกลุ่มแยกของแบคทีเรียชนิดที่ 1, 2 และ 3 ตามลำดับ สำหรับการออกแบบที่ 5 เป็นดินเติมสารไกลโพลีเอสเตอร์และกลุ่มแยกของแบคทีเรียทั้ง 3 ชนิด

เก็บตัวอย่างดินในวันที่ 0 ถึง 10 เพื่อสกัดไกลโพลีเอสเตอร์ด้วยร้อยละ 100 เมทานอล บั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ดูดส่วนใสจำนวน 1.5 มิลลิเมตร กรองผ่านกระดาษกรองขนาด 0.45 ไมโครเมตร ใส่ขวดแก้วขนาดเล็ก [12,13] วิเคราะห์ด้วยกระบวนการแยกสารประกอบเกิดระหว่างสองเฟส ความแตกต่างทางสถิติวิเคราะห์ใช้วิธีพิสัยเชิงพหุคูณ (Duncan's multiple range test) ระดับนัยสำคัญคือ $p < 0.05$

ผลการศึกษา

แยกตัวอย่างดินจาก 6 ประเภทพื้นที่เพาะปลูกได้แบคทีเรีย 27 กลุ่มแยก พื้นที่เพาะปลูกส้ม ลำไย และมะม่วงเป็นแหล่งพบรหัสเชื่อมมากที่สุดสามอันดับแรก ดังตารางที่ 1

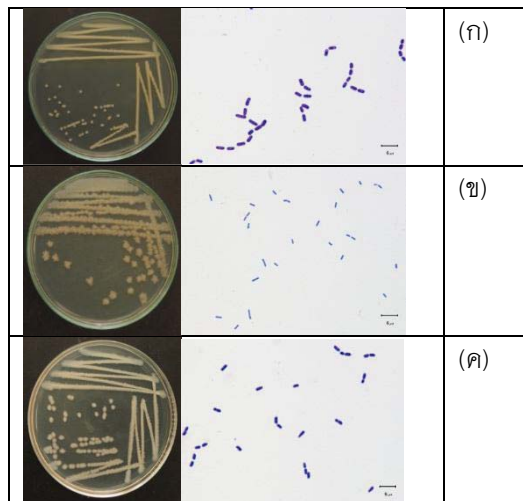
ตารางที่ 1 กลุ่มแยกของแบคทีเรียคัดแยกจากพื้นที่ใช้ไกลโพลีเอสเตอร์มาก่อน

เพาะปลูก	รหัสเชื่อม (จำนวน)
ส้ม	OSF1, OSF2, OSF3, OSF4, OSF5, OSF6, OSF7 (7)
ลำไย	LMC1, LMC2, LMC3, LMC4, LMC5 (5)
มะม่วง	MMC1, MMC2, MMC3, MMC4, MMC6 (5)
ข้าวโพด	CMC1, CMC2, CMC3, CMC4 (4)
หอม	OMC1, OMC2, OMC3 (3)
มันฝรั่ง	PMA1, PMA2, PMA3 (3)

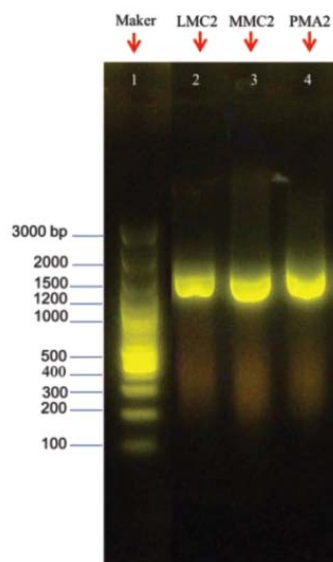
กลุ่มแยก MMC2, LMC2 และ PMA2 มีประสิทธิภาพย่อยสลายไกลโพลีเอสเตอร์สูงสุดเท่ากับ ร้อยละ 97.44, 97.37 และ 97.30 ตามลำดับ ส่วนการย่อยสลายแบคทีเรียรูปร่างเป็นท่อน เรียงตัวเป็นเส้นหรือสายโซ่ ดิดีสแกรมบวก (สีม่วงน้ำเงิน) ดังภาพที่ 1

สารพันธุกรรมของ LMC2, MMC2 และ PMA2 ขนาดประมาณ 1,500 คู่เบส (base pair) ดังภาพที่ 2 เทียบเคียงลำดับเบสของยีน 16S rRNA กับฐานข้อมูลพบว่า LMC2 มีลำดับเบสคล้าย *B. megaterium* ร้อยละ 100 ส่วน MMC2 มีลำดับเบสคล้ายกับ *B. subtilis* ร้อยละ 100 สำหรับ PMA2 มีลำดับเบสคล้ายกับ *B. cereus* ร้อยละ 99.0

ประสิทธิภาพของแบคทีเรียทั้ง 5 การออกแบบย่อยสลายไกลโพลีเอสเตอร์ วันที่ 1 ถึง 10 พบว่า MMC2 และ PMA2 สามารถย่อยสลายไกลโพลีเอสเตอร์เหลือน้อยสุดเท่ากับ 0.23 และ 0.30 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ

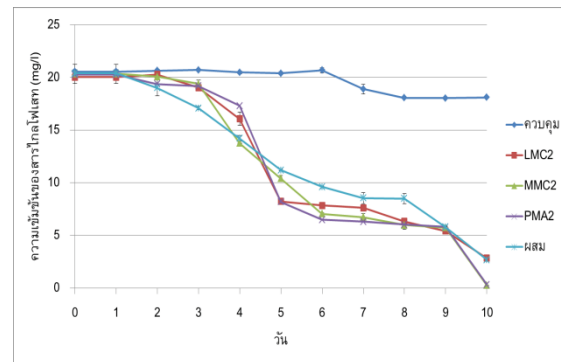


ภาพที่ 1 ลักษณะรูปร่างของแบคทีเรีย (ก) LMC2 (ข) MMC2 (ค) PMA2



ภาพที่ 2 ขนาดของสารพันธุกรรมของแบคทีเรีย LMC2, MMC2 และ PMA2

การออกแบบที่ 3 และ 4 มีประสิทธิภาพย่อยสลายไกลโฟเสตใกล้เคียงกันเท่ากับร้อยละ 98.84 และร้อยละ 98.46 ตามลำดับ รองลงมาคือ การออกแบบที่ 6 ร้อยละ 86.69 การออกแบบที่ 5 ร้อยละ 86.69 การออกแบบที่ 2 ร้อยละ 85.94 เมื่อเปรียบเทียบกับ การออกแบบที่ 1 (กลุ่มควบคุม) ร้อยละ 9.53 ภาพโดยรวมกลุ่มศึกษาทุกกลุ่มมีประสิทธิภาพมากกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ดังภาพที่ 3



ภาพที่ 3 ความเข้มข้นของไกลโฟเสตระหว่าง วันที่ 1 ถึง 10 ของการทดสอบ 6 การออกแบบ

วิจารณ์

ดินตัวอย่างจากพื้นที่ใช้สารไกลโฟเลตมาก่อนยังสามารถตัดแยกแบคทีเรียได้ เพราะแบคทีเรียเหล่านี้มีความสามารถบำบัดย่อยสลายและใช้ไกลโฟเลตเป็นแหล่งอาหาร ยกตัวอย่าง *Pseudomonas* sp. สามารถสังเคราะห์เอนไซม์ย่อยการเชื่อมระหว่างคาร์บอนกับฟอสฟอรัส (C-P lyase) ย่อยสารไกลโฟเลต [14] ลดความเป็นพิษของไกลโฟเลต [15] มีแหล่งคาร์บอนและฟอสฟอรัสใช้ในการเจริญเติบโต [16] เช่น *B. subtilis* [17]

แบคทีเรียวงศ์แบซิลลัสมีประสิทธิภาพย่อยไกลโฟเลต การศึกษานี้แบซิลลัส ซีเรียมีประสิทธิภาพเท่ากับร้อยละ 98.46 ใกล้เคียงกับการศึกษาในประเทศไนจีเรียเท่ากับร้อยละ 94.47 [18] อย่างไรก็ตาม แบซิลลัสอื่นมีประสิทธิภาพใกล้เคียงกัน

การศึกษาแบบทดลองให้ผลเป็นค่ามัธยฐานหนึ่ง จำเป็นต้องศึกษาท่ามกลางสภาวะพื้นที่การเพาะปลูกจริง ร่วมกับมาตรการเสริมอื่นเพื่อลดทอนสารพิษและพลิกฟื้นความมีชีวิตของดินเกษตร

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณสำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ (สวทช) ภาคเหนือ ผู้สนับสนุนทางการเงิน

เอกสารอ้างอิง

1. ศิริพรรณ สารินทร์. จุลชีววิทยาสิ่งแวดล้อม. พิษณุโลก: คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร; 2550.
2. พรชัย เหลืองอาภาพงศ์. คู่มือการใช้สารไกลโฟเสต. เชียงใหม่: ภาควิชาพืชไร่ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่; 2541.
3. Moneke AN, Okpala GN, Anyanwu CU. Biodegradation of glyphosate herbicide in vitro using bacterial isolates from four rice fields. African J Biotechnol. 2010;9(26):4067–74.
4. Alberdi JL, Saenz ME, DiMarzio WD, Tortorelli MC. Comparative acute toxicity of two herbicides paraquat and glyphosate to daphnia magna and spinulata. Bull Environ Contam Toxicol. 1996; 57: 229–35.
5. Eberbach P. Applying non-steady-state compartmental analysis to investigate the simultaneous degradation of soluble and sorbed glyphosate (n-(phosphonomethyl) glycine) in four soils. Pestic Manag Sci. 1998;52(3):229–40.
6. รังสิต สุวรรณเขตนิคม. ยากำจัดวัชพืชกับผลทางสรีรวิทยาของพืช. กรุงเทพฯ: ภาควิชาพืชไร่ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์; 2526.
7. อลิสา วังใน. การบำบัดสารมลพิษทางชีวภาพ. กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยจุฬาลงกรณ์; 2553.
8. Strange-Hansen R, Holm PE, Jacobsen OS, Jacobsen CS. Sorption mineralization and mobility of N-(phosphonomethyl) glycine (glyphosate) in five different types of gravel. Pest Manag Sci. 2004;60:570–8.
9. Inna TE, Nina IK, Tatyana S, Mikhail Z, Gennady AZ, Alexey AL. Bioremediation of glyphosate-contaminated soils. Appl Microbiol Biotechnol. 2010;8(2):585–94.
10. Kishore GM, Jacob GS. Degradation of glyphosate by *Pseudomonas* sp. PG2982 via a sarcosine Intermediate. J Biol Chem. 1987;262(25):12164–8.
11. Rueppel ML, Brightwell BB, Schaefer J, Marvel JT. Metabolism and degradation of glyphosate in soil and water. J Agric Food Chem. 1977;25(3):517–28.
12. Carl JM, Moye HA. Extraction of glyphosate herbicide from soil and clay minerals and determination of residues in soils. J Agric Food Chem. 1988;1088(36):488–91.
13. Sailaja KK, Satyaprasad K. Degradation of glyphosate in soil and its effect on fungal population. J Environ Sci Engine. 2006;48(3):189–90.
14. Jacob GS, Gabrow JR, Hallas LE, Kimack NM, Kishore GM, Schaefer J. Metabolism of glyphosate in *Pseudomonas* sp. strain LBr. Appl Environ Microbiol. 1988;54(12):2953–8.
15. Bazot S, Lebeau T. Simultaneous mineralization of glyphosate and diuron by a consortium of three bacteria as free and/or immobilized-cells formulations. Appl Microbiol Biotechnol. 2008;77:1351–8.
16. Pipke R, Amrhein N. Degradation of the phosphonate herbicide glyphosate by *Arthrobacter atrocyaneus* ATCC 13752. Appl Environ Microbiol. 1988;54(5):1293–6.
17. Marie-Esther DU, Mkpuma VO, Enemuo S. Isolation, characterization and biodegradation assay of glyphosate utilization bacteria from exposed rice farm. Inter J Sci Engine Res. 2014;5(2):1672.
18. Jieyu F, Guoxia Y, Haoyu Z, Guanying S, Yucong G, Taiping H, et al. Isolation, identification and characterization of a

glyphosate-degrading bacterium, *Bacillus cereus* CB4, from soil. J Gen Appl Microbiol.

2012;58(4):263-71.