

ชีวผลิตภัณฑ์ย่อยสลายสารเคมีกำจัดศัตรูพืช ในกลุ่มไพรีทรอยด์ ออร์กาโนฟอสเฟต และคาร์บาเมต

Bio-products Degradation of Pyrethroid, Organophosphate and Carbamate Residues

ปัญญาพร อติษภาส, นิชากรณ์ ใจดี, จุฑารัตน์ พรหมสอน, ฟ้าไพลิน เกียรติชัยภา,

ภาวิณี แสงสุข, สุวิจักขณ์ สมจินดา และวิลาวรรณ เชื้อบุญ*

สาขาวิชาเทคโนโลยีการเกษตร คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

ศูนย์รังสิต ตำบลคลองหนึ่ง อำเภอคลองหลวง จังหวัดปทุมธานี 12120

Panyaporn Adispas, Nichakon Jaidee, Jutarat Promsorn, Faphailin Kiatchaipha,

Pawinee Sangsook, Suwajak Somchinda and Wilawan Chuaboon*

Department of Agricultural Technology, Faculty of Science and Technology, Thammasat University,

Rangsit Centre, Khlong Nueng, Khlong Luang, Pathum Thani 12120

Received: May 13, 2020; Accepted: June 11, 2020

บทคัดย่อ

ชีวผลิตภัณฑ์สำหรับย่อยสลายสารเคมีกำจัดศัตรูพืชตกค้างในดินทางการเกษตรในรูปแบบหัวเชื้อเพิ่มปริมาณโดยมีแบคทีเรียที่มีประโยชน์ที่มีประสิทธิภาพในการสลายสารเคมี 3 สายพันธุ์ ได้แก่ สายพันธุ์ SP-TU-C (สลายสารเคมีในกลุ่มไพรีทรอยด์) SP-TU-15-2 (ออร์กาโนฟอสเฟต) และ SP-TU 2-12Y (คาร์บาเมต) นำแบคทีเรียที่มีประโยชน์ดังกล่าวบรรจุในเม็ดบีดส์แต่ละสายพันธุ์ด้วยวิธี spherification เพื่อใช้เป็นหัวเชื้อในการเพิ่มปริมาณในสูตรอาหารเพิ่มปริมาณ โดยพัฒนาสูตรอาหารเพิ่มปริมาณได้ 3 สูตร ที่มีประสิทธิภาพในการเพิ่มปริมาณของแบคทีเรียที่มีประโยชน์ดีกว่าอาหารสูตรมาตรฐาน nutrient glucose broth (NGB) ได้แก่ TU-F1 (ยีสต์ 10 กรัม น้ำ 1 ลิตร) TU-F2 (ยีสต์ 5 กรัม รำข้าว 2.5 กรัม น้ำ 1 ลิตร) และ TU-F3 (ยีสต์ 1 กรัม รำข้าว 1 กรัม ถั่วเหลืองบด 1 กรัม น้ำ 1 ลิตร) โดยสามารถเพิ่มปริมาณเชื้อสายพันธุ์ SP-TU-C, SP-TU-15-2 และ SP-TU 2-12Y เหลือ 1.59×10^{23} , 3.50×10^{23} และ 2.10×10^{23} โคโลนีต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ทั้งนี้เลือกสูตรอาหารเพิ่มปริมาณ TU-F1 ในการศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณของหัวเชื้อแบคทีเรียและอายุการเก็บรักษา วางแผนการทดลองแบบ completely randomized design (CRD) กรรมวิธี 3 ซ้ำ เติมหหัวเชื้อแบคทีเรียที่บรรจุในเม็ดบีดส์ปริมาณ 10 กรัม ต่ออาหารสูตรเพิ่มปริมาณ 1 ลิตร พบว่าแบคทีเรียเจริญเติบโตได้ดีมี Lag และ Log phase สั้นภายใน 3 ชั่วโมงเท่านั้น และเข้าสู่ stationary phase ตั้งแต่ 3-48 ชั่วโมงหลังเลี้ยงเชื้อ อายุการเก็บรักษาของชีวผลิตภัณฑ์ พบว่าหลังเก็บรักษาที่ 5 ± 2 องศาเซลเซียส นาน 3 เดือน เชื้อยังมีปริมาณประชากรคงที่ โดยมีปริมาณประชากรแบคทีเรียสายพันธุ์ SP-TU-C,

SP-TU-15-2 และ SP-TU 2-12Y เจลลี่ 1.0×10^{23} , 3.0×10^{23} และ 9.6×10^{22} โคโลนีต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ เพื่อยืนยันประสิทธิภาพของชีวผลิตภัณฑ์ที่พัฒนาขึ้นควรมีการทดสอบประสิทธิภาพในการย่อยสลายในสภาพไร่และอายุการเก็บรักษาที่ยาวนานขึ้น

คำสำคัญ : ชีวผลิตภัณฑ์; สารเคมีตกค้าง; เอนแคปซูเลท

Abstract

Development of bioproduct for degradation pesticide residues in agricultural soil, with beneficial bacteria that are effective in degrading 3 groups of pesticides, i.e. strain SP-TU-C (pyrethroid group degrading), SP-TU-15-2 (organophosphate group) and SP-TU 2-12Y (carbamate group), was conducted. The beneficial bacteria were encapsulated by the spherification method, and later used as a leavening agent for increasing their amount. To increase the number of the beneficial bacteria, three formulas of the media, i.e. (1) TU-F1 (10 g of yeast, 1 L of water), (2) TU-F2 (5 g of yeast, 2.5 g of rice bran, 1 L of water), and (3) TU-F3 (1 g of yeast, 1 g of rice bran, 1 g of ground soybean, 1 L of water) were developed and compared with the standard medium (nutrient glucose broth, NGB). The averaged population of beneficial bacteria strain SP-TU-C, SP-TU-15-2, and SP-TU 2-12Y were 1.59×10^{23} , 3.50×10^{23} , and 2.1×10^{23} CFU/mL, respectively. The TU-F1 formula was used to study the optimum duration of bacterial culturing. The experimental design was completely randomized design (CRD) with 3 replications, where 10 g of bacterial encapsulate were added to 1 L of TU-F1 formula. The results revealed that the bacteria were grown well, where the lag and log phases were within 3 hours, and entered to stationary phase from 3 to 48 hours after cultured. The shelf life of bioproducts recorded after storage at 5 ± 2 °C for 3 months was revealed that the population of beneficial bacteria of SP-TU-C, SP-TU-15-2 and SP-TU 2-12Y were still stable as 1.0×10^{23} , 3.0×10^{23} and 9.6×10^{22} CFU/mL, respectively. Longer shelf life should be further confirmed the effectiveness of the developed bioproducts, and the degradation efficiency under field conditions.

Keywords: bioproduct; chemical residue; encapsulate

1. คำนำ

ระยะ 30-40 ปีที่ผ่านมา จำนวนประชากรโลกเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว ทำให้การผลิตอาหารไม่เพียงพอต่อจำนวนประชากรโลก จึงเกิดการพัฒนาผลิตผลทั้งในด้านการขยายพื้นที่เพาะปลูก การปรับปรุงพันธุ์พืช การใช้ปุ๋ย และการใช้สารเคมีในการกำจัดศัตรูพืช เพื่อเพิ่มผลผลิตและช่วยบรรเทาการขาดแคลนอาหาร ซึ่งปัจจุบันรายได้หลักของ

ประเทศไทยถือเป็นรายได้ที่มาจากภาคการเกษตร การเกษตรจึงมุ่งเน้นการผลิตในเชิงพาณิชย์มากกว่าการผลิตเพื่อการบริโภคภายในครัวเรือน โดยส่วนมากจะเป็นการทำเกษตรในรูปแบบเกษตรเชิงเดี่ยว เมื่อมีการระบาดของโรคและแมลงจึงทำให้กินพื้นที่เป็นบริเวณกว้าง เกษตรกรมักแก้ไขปัญหาดังกล่าวโดยใช้สารเคมีในการกำจัดศัตรูพืช (นันทิกา, 2559) เมื่อมีการใช้ในปริมาณมากเกินไป

กำหนด ทำให้คุณภาพดินเกิดการเสื่อมสภาพ ต้นทุนการผลิตสูงขึ้น และขณะเดียวกันสารเคมีกำจัดแมลง ได้แก่ สารกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟต คาร์บาเมต และไพรีทรอยด์ เป็นต้น ยังก่อให้เกิดการสะสมสารพิษในสภาพแวดล้อม เช่น มลพิษทางน้ำ มลพิษทางดิน ซึ่งสารเคมีเหล่านี้สามารถแพร่กระจายเข้าสู่ระบบนิเวศและเป็นอันตรายต่อผู้ผลิตบุคคลที่อยู่ใกล้เคียงบริเวณการใช้สารเคมี ตลอดจนผู้บริโภคทั้งในระยะสั้นและระยะยาวที่ได้รับผลกระทบจากการใช้สารเคมีอย่างต่อเนื่อง (Siriwong *et al.*, 2008)

สารเคมีกำจัดแมลงไม่สามารถละลายในน้ำ แต่ละลายได้ดีในไขมัน ยกเว้นออร์กาโนฟอสเฟต (organophosphate) และคาร์บาเมต (carbamate) ที่สามารถละลายน้ำได้เพียงเล็กน้อย เป็นผลให้เกิดการสลายตัวช้า พบว่ามีการสะสมในสิ่งแวดล้อมได้เป็นเวลานานและมีความเสี่ยงสูงในการปนเปื้อนในห่วงโซ่อาหาร ส่วนสารกลุ่มไพรีทรอยด์ (pyrethroid) เดิมเป็นสารที่สกัดได้จากส่วนของพืชโดยตรง ความเป็นพิษค่อนข้างน้อยเมื่อเปรียบเทียบกับออร์กาโนฟอสเฟตและคาร์บาเมต ทำให้มีราคาสูงเนื่องจากกระบวนการผลิตค่อนข้างยุ่งยาก แต่ปัจจุบันสารกลุ่มนี้เป็นสารที่ได้จากการดัดแปลงโครงสร้างโมเลกุลจากสาร pyrethrin ทำให้มีความเป็นพิษเพิ่มมากขึ้น โดยพืชมักดูดซับและกักเก็บสารเหล่านี้ไว้ภายในผลผลิต เนื่องจากสารเคมีเหล่านี้มีกลไกการออกฤทธิ์เป็นทั้งแบบดูดซึมและสัมผัสตาย เมื่อร่างกายได้รับสารพิษจากการกิน การสูดดม และการสัมผัส จะค่อย ๆ สะสมไปเรื่อย ๆ จนถึงระดับหนึ่งจึงจะแสดงอาการให้เห็น ส่วนมากเป็นอาการทางระบบประสาท คือ เกิดความเครียด เบื่ออาหาร น้ำหนักลด (สุทธาสินี, 2558) หากปล่อยให้มีการสะสมไปในสภาพแวดล้อมไปเรื่อย ๆ จะส่งผลกระทบต่อสุขภาพเกษตรกรและผู้บริโภค ดังนั้นควรมีการฟื้นฟูสภาพดินและแหล่งน้ำที่มีการปนเปื้อนสารเคมี

ทางการเกษตร โดยการใช้แบคทีเรียที่มีประโยชน์ในการฟื้นฟูสภาพดินที่มีการปนเปื้อน แต่เนื่องจากการเก็บรักษาของแบคทีเรียบริสุทธิ์ค่อนข้างสั้น และมีกระบวนการยืดอายุการเก็บรักษาแบคทีเรียบริสุทธิ์ที่ยุ่งยาก งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาสูตรชีวผลิตภัณฑ์แบคทีเรียที่มีประโยชน์ในการย่อยสลายสารเคมีที่ตกค้างในดินทางการเกษตรที่สามารถรักษายืดอายุการเก็บรักษาจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการย่อยสลายสารเคมีตกค้างทางการเกษตร และศึกษาสูตรอาหารในการเพิ่มปริมาณแบคทีเรียที่เป็นประโยชน์เพื่อให้มีปริมาณแบคทีเรียมากเพียงพอและสะดวกต่อการนำไปใช้

2. อุปกรณ์และวิธีการ

2.1 การแยกแบคทีเรียที่มีประโยชน์ที่สามารถย่อยสลายสารเคมีทางการเกษตร

2.1.1 การสุ่มเก็บตัวอย่างดิน

สุ่มเก็บตัวอย่างดินในพื้นที่ที่มีประวัติการใช้สารกำจัดศัตรูพืชมากกว่า 15 ปี โดยสุ่มตัวอย่างดินในแปลงปลูกคะน้า ขึ้นฉ่าย ผักสลัด กระเพรา ดอกมะลิ และนาข้าวของเกษตรกรในพื้นที่ในจังหวัดปทุมธานี สุ่มเก็บตัวอย่างดินในแปลงปลูกพืชแต่ละชนิดแปลงละ 5 จุด จุดละ 1 กิโลกรัม ที่ระดับความลึก 0-10 เซนติเมตร จากผิวดิน (ตามวิธีการของทิพย์สุตา และคณะ, 2561) ซึ่งได้ตัวอย่างดินรวมทั้งสิ้น 30 ตัวอย่าง

2.1.2 การแยกแบคทีเรียที่มีประโยชน์

แยกแบคทีเรียจากดินด้วยการเจือจางตัวอย่างด้วยวิธี tenfold dilution (วิลาวรรณ, 2551) และนำดินที่เจือจางแล้วไปกระจายให้ทั่วผิวหน้าอาหาร nutrient glucose agar (NGA) บ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 24-48 ชั่วโมง ตรวจสอบการเจริญของแบคทีเรียบนผิวหน้าอาหาร นำโคโลนีทั้งหมดที่เจริญไป streak บนอาหาร NGA เพื่อแยกเชื้อให้บริสุทธิ์และเก็บไว้ใช้ในการทดลองต่อไป

2.1.3 การทดสอบประสิทธิภาพในการ ย่อยสารเคมี

ทดสอบด้วยวิธีอาหารพิษ (poisoning medium) ตามวิธีดัดแปลงของ วิลาวรรณ (2551) โดยผสมสารเคมีตัวแทนในกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟต คาร์บาเมต และไพรีทรอยด์ ได้แก่ คลอร์ไพริฟอส คาร์โบซัลแฟน ไซเพอร์เมทริน ตามลำดับ แยกเติมสารเคมีแต่ละชนิดลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ NGA ในอัตราแนะนำ แล้วใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร เจาะอาหารเลี้ยงเชื้อ หยดสารละลายแบคทีเรียที่มีประโยชน์ที่ระดับความเข้มข้นประมาณ 1×10^8 โคโลนี/มิลลิลิตร ลงในหลุมทดสอบหลุมละ 10 ไมโครลิตร ประเมินประสิทธิภาพแบคทีเรียที่มีประโยชน์ในการย่อยสลายสารเคมีหรือเจริญคลุมทับผิวหน้าอาหารที่ผสมสารเคมีเปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุมด้วยน้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อ หลังบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 24-48 ชั่วโมง

2.1.4 การทดสอบประสิทธิภาพการย่อย สลายสารเคมีในดินจำลองการปนเปื้อนสารเคมี

เตรียมดินจำลองการปนเปื้อนสารคลอร์ไพริฟอส คาร์โบซัลแฟน และไซเพอร์เมทริน โดยนำหน้าดินสำหรับปลูกพืชน้ำหนัก 1 กิโลกรัม หนึ่งฆ่าเชื้อ 2 ครั้ง ผสมสารเคมีทดสอบในอัตราแนะนำด้วยวิธีการพ่นและคลุกเคล้าให้ทั่วตัวอย่างดิน แล้วเติมแบคทีเรียที่มีประโยชน์ที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายสารเคมีแต่ละชนิดที่ดีที่สุด จากข้อ 2.1.3 แต่ละชนิดในอัตราส่วนดินจำลอง 1 กิโลกรัม/แบคทีเรียที่มีประโยชน์ 10 มิลลิลิตร ความเข้มข้นประมาณ 1×10^8 โคโลนี/มิลลิลิตร วางแผนการทดลองแบบ CRD กรรมวิธีละ 3 ซ้ำ เปรียบเทียบประสิทธิภาพแบคทีเรียที่มีประโยชน์ในการย่อยสลายสารเคมีในดินจำลองกับกรรมวิธีควบคุมด้วยน้ำหนึ่งฆ่าเชื้อ หลังบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 7 และ 14 วัน โดยตรวจสอบสารเคมีตกค้างด้วยชุดตรวจ

GT (กอบทอง, 2542)

ตรวจสอบปริมาณสารตกค้างสารเคมีตกค้างด้วยชุดตรวจ GT (กอบทอง, 2542) และเขียนกราฟมาตรฐาน (standard curve) ของสารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชแต่ละชนิดโดยให้แนวตั้งเป็นค่าความเข้มข้นของสารเคมี และแนวนอนเป็นค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ ข้อมูลที่ได้นำมาวิเคราะห์ความแตกต่างทางของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's multiple rang test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่นไม่น้อยกว่า 95 %

2.2 การเตรียมหัวเชื้อแบคทีเรียที่มี ประโยชน์แบบเม็ดบีดส์

2.2.1 การเตรียมแบคทีเรียที่มีประโยชน์

นำแบคทีเรียที่มีประโยชน์ที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายสารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชในกลุ่มไพรีทรอยด์ ออร์กาโนฟอสเฟต และ คาร์บาเมต อย่างละ 1 สายพันธุ์ รวม 3 สายพันธุ์เลี้ยงในอาหาร NGB เขย่าที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาที นาน 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง (25 ± 3 องศาเซลเซียส) เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

2.2.2 การทำเอนแคปซูเลทของ แบคทีเรียที่มีประโยชน์แบบเม็ดบีดส์

นำแบคทีเรียจากข้อ 2.2.1 นำไปตกตะกอนเซลล์ด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 8,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส แล้วปรับความเข้มข้นเชื้อให้ได้ OD₆₀₀ 1.0 โดยอาศัย spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร จากนั้นนำมาบรรจุลงในเม็ดบีดส์โดยวิธี spherification ดัดแปลงวิธีการของ พัชร และสุธีรา (2561) เก็บรักษาเม็ดบีดส์โดยนำเม็ดบีดส์บรรจุในถุงพอลิพลอดเชื้อ ปิดสนิทด้วยความร้อน และเก็บที่อุณหภูมิ 5 ± 2 องศาเซลเซียส

2.3 การพัฒนาสูตรอาหารเพิ่มปริมาณ หัวเชื้อแบคทีเรียที่มีประโยชน์

2.3.1 การคัดเลือกองค์ประกอบและอัตรา

ส่วนของสารอาหาร

คัดเลือกองค์ประกอบและอัตราส่วนของสารอาหารที่เหมาะสมต่อการเพิ่มปริมาณประชากรเชื้อ เปรียบเทียบประสิทธิภาพในการเพิ่มปริมาณกับสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อมาตรฐานอาหารเหลว NGB ประกอบด้วย 3 สูตร คือ TU-F1 (ประกอบด้วยยีสต์ 10 กรัม ต่อน้ำ 1 ลิตร) TU-F2 (ยีสต์ 5 กรัม และผสมรำข้าว 2.5 กรัม ต่อน้ำ 1 ลิตร) และ TU-F3 (ยีสต์ 1 กรัม ผสมรำข้าว 1 กรัม และถั่วเหลืองบด 1 กรัม ต่อน้ำ 1 ลิตร) นำสูตรอาหารที่พัฒนาขึ้นในสัดส่วนที่เหมาะสมลงตัวผสมให้เข้ากันตามอัตราส่วนกำหนด มาเชื้อแบบร่อนขึ้นนำมาใช้เป็นอาหารเพิ่มปริมาณหัวเชื้อแบคทีเรียที่มีประโยชน์ต่อไป

2.3.2 การทดสอบประสิทธิภาพของสูตรอาหารเพิ่มปริมาณ

วางแผนการทดลองแบบ CRD กรรมวิธีละ 3 ซ้ำ โดยเติมหัวเชื้อแบคทีเรียที่มีประโยชน์แต่ละชนิดที่กักเก็บไว้ในเม็ดบีดส์ 10 กรัม ต่ออาหารสูตรเพิ่มปริมาณ 1 ลิตร แล้วเขย่าที่ความเร็วที่ 120 รอบต่อนาที นาน 24 ชั่วโมง และตรวจนับจำนวนแบคทีเรียที่มีประโยชน์ของแต่ละสายพันธุ์ในอาหารเลี้ยงเชื้อแต่ละชนิดด้วยวิธี dilution plate method เปรียบเทียบปริมาณเชื้อเพื่อคัดเลือกสูตรอาหารเพิ่มปริมาณที่สามารถเพิ่มปริมาณเชื้อแบคทีเรียที่มีประโยชน์แต่ละชนิดได้สูงที่สุดเพื่อใช้ในการทดลองต่อไป เปรียบเทียบประสิทธิภาพกับการเพิ่มปริมาณของแบคทีเรียที่มีประโยชน์ในอาหารเลี้ยงเชื้อมาตรฐาน NGB

2.3.3 การศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณของหัวเชื้อแบคทีเรียที่มีประโยชน์ในสูตรอาหารเพิ่มปริมาณ

คัดเลือกอาหารสูตรเพิ่มปริมาณที่ดีที่สุดจากข้อ 2.3.2 เพื่อใช้ในการศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณของหัวเชื้อแบคทีเรีย

โดยศึกษาการเจริญเติบโตของแบคทีเรียที่มีประโยชน์ (growth curve) ทั้ง 3 สายพันธุ์ ในสูตรอาหารเพิ่มปริมาณดังกล่าว เปรียบเทียบกับอาหารเหลว NGB ตรวจวัดปริมาณเชื้อด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร เพื่อกำหนดช่วงเวลาของการใช้ชีวผลิตภัณฑ์หัวเชื้อเพิ่มปริมาณในการย่อยสลายสารเคมีตกค้างในดินทางการเกษตร

2.4 การศึกษาอายุการเก็บรักษาของชีวผลิตภัณฑ์หัวเชื้อเพิ่มปริมาณแบคทีเรียที่มีประโยชน์

นำหัวเชื้อแบคทีเรียที่มีประโยชน์ที่บรรจุไว้ในเม็ดบีดส์พร้อมทั้งสูตรอาหารเพิ่มปริมาณ สูตรอาหารที่ดีที่สุดจากข้อ 2.3 บรรจุในถุงพอลิพลอดเชื้อซีลปิดสนิทด้วยความร้อน นำไปเก็บรักษาไว้ในอุณหภูมิ 5±2 องศาเซลเซียส และตรวจนับปริมาณแบคทีเรียที่มีประโยชน์ของแต่ละสายพันธุ์ด้วยวิธี dilution plate method ตรวจสอบ 1 และ 3 เดือนหลังเก็บรักษา โดยตรวจสอบการมีชีวิตรอดของแบคทีเรียที่มีประโยชน์แต่ละชนิดในช่วงผลิตภัณฑ์ที่พัฒนาขึ้น เพื่อกำหนดวันหมดอายุของชีวผลิตภัณฑ์

3. ผลการทดลองและวิจารณ์

3.1 การแยกเชื้อและทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายสารเคมี

แยกแบคทีเรียที่มีประโยชน์จากดินที่มีการปนเปื้อนสารเคมีในกลุ่มไพรีทรอยด์ ออร์กาโนฟอสเฟต และคาร์บาเมตได้ทั้งหมด 42 ไอโซเลท และคัดเลือก 3 ไอโซเลท ที่สามารถเจริญได้รวดเร็วภายใน 24 ชั่วโมง และมีประสิทธิภาพในการย่อยสลายสารเคมีเมื่อทดสอบด้วยวิธีอาหารพิษและดินจำลองการปนเปื้อนสารเคมี ได้แก่ แบคทีเรียที่มีประโยชน์ไอโซเลท SP-TU-C, SP-TU-15-2 และ SP-TU 2-12Y มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายสารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชในกลุ่มไพรีทรอยด์ ออร์กา

กาโนฟอสเฟต และคาร์บาเมต ตามลำดับ

3.2 การพัฒนาชีวผลิตภัณฑ์หัวเชื้อเพิ่มปริมาณแบคทีเรียที่มีประโยชน์ในการย่อยสลายสารเคมีตกค้างในดินทางการเกษตร

3.2.1 การเตรียมหัวเชื้อแบคทีเรียที่มีประโยชน์แบบเม็ดบีดส์

เมื่อบรรจุแบคทีเรียที่มีประโยชน์ที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายสารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชในกลุ่มไพรีทรอยด์ ออร์กาโนฟอสเฟต และคาร์บาเมต 3 สายพันธุ์ ได้แก่ SP-TU-C, SP-TU-

15-2 และ SP-TU 2-12Y ตามลำดับ บรรจุลงในเม็ดบีดส์ แยกความแตกต่างของแต่ละสายพันธุ์ด้วยสี ซึ่งกำหนดให้ SP-TU-C (สีเขียว) SP-TU-15-2 (สีฟ้า) และ SP-TU 2-12Y (สีเหลือง) เม็ดบีดส์ที่บรรจุแบคทีเรียที่มีประโยชน์มีขนาดเฉลี่ย 0.8-1.0 มิลลิเมตร (รูปที่ 1) ซึ่งเม็ดบีดส์ที่มีขนาดเล็กทำให้โครงสร้างของเม็ดบีดส์มีความแข็งแรง ไม่แตกเปราะเสียหายง่าย อีกทั้งยังช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการปลดปล่อยแบคทีเรียที่มีประโยชน์ออกมาได้ง่าย ตลอดจนลดพื้นที่ในการเก็บรักษา



Figure 1 Encapsulate of beneficial bacteria: (A) SP-TU-C (green), (B) SP-TU-15-2 (blue), and (C) SP-TU 2-12Y (yellow).

3.2.2 การพัฒนาและทดสอบประสิทธิภาพสูตรอาหารเพิ่มปริมาณ

สูตรอาหารที่เหมาะสมสำหรับการเพิ่มปริมาณแบคทีเรียที่มีประโยชน์ที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายสารเคมีตกค้างในดินทางการเกษตรทั้ง 3 สายพันธุ์ พบว่าสูตรอาหารเพิ่มปริมาณทุกชนิดที่พัฒนาขึ้นมีประสิทธิภาพดีเทียบเท่ากัน โดยสามารถเพิ่มปริมาณเชื้อสายพันธุ์ SP-TU-C, SP-TU-15-2 และ SP-TU 2-12Y เฉลี่ยสูงสุด 1.59×10^{23} , 3.50×10^{23} และ 2.10×10^{23} โคโลนีต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ เมื่อพิจารณาต้นทุนและความสะดวกในการผลิตอาหารเพิ่มปริมาณแบคทีเรียที่มีประโยชน์ พบว่าสูตรอาหารเพิ่มปริมาณ TU-F1 เป็นสูตรอาหารที่สามารถเพิ่มปริมาณได้สะดวก

และมีต้นทุนต่ำที่สุด โดยใช้ยีสต์เพียงอย่างเดียว ปริมาณ 10 กรัม ผสมน้ำ 1 ลิตร จึงเลือกสูตรอาหารนี้เพื่อใช้ในการศึกษาต่อไป

3.3. การศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณของหัวเชื้อแบคทีเรียในสูตรอาหารเพิ่มปริมาณ

การเลี้ยงหัวเชื้อแบคทีเรียในสูตรอาหารเพิ่มปริมาณแบคทีเรียที่มีประโยชน์ TU-F1 ที่ประกอบด้วยยีสต์ 10 กรัม ต่อน้ำ 1 ลิตร โดยเลี้ยงแยกแต่ละสายพันธุ์เปรียบเทียบประสิทธิภาพกับการเลี้ยงในอาหารสูตร NGB พบว่าแบคทีเรียทั้ง 3 สายพันธุ์ ได้แก่ สายพันธุ์ SP-TU-C, SP-TU-15-2 และ SP-TU 2-12Y ที่เลี้ยงในอาหารสูตร TU-F1 สามารถเจริญเติบโตและเพิ่มปริมาณอย่างรวดเร็ว

โดยพบระยะ Lag และ Log phase ในช่วง 2-3 ชั่วโมง และเข้าสู่ช่วง stationary phase ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 3 และคงปริมาณแบคทีเรียที่มีประโยชน์เฉลี่ยสูงสุด จนกระทั่ง 48 ชั่วโมงหลังเลี้ยงเชื้อ ส่วนแบคทีเรียทั้ง 3 สายพันธุ์ ที่เลี้ยงเพิ่มปริมาณในอาหารสูตร NGB พบว่าเข้าสู่ระยะ Lag phase ในชั่วโมงที่ 1-6 และ Log phase ในชั่วโมงที่ 7-19 หลังจากเลี้ยงเชื้อ แล้วจึงเข้าสู่ stationary phase ในชั่วโมงที่ 19-48 (รูปที่ 2) ซึ่งพบว่าอาหารสูตร TU-F1 ที่พัฒนาขึ้นนั้น สามารถกระตุ้นให้เชื้อเข้าสู่ stationary phase อย่างรวดเร็วมากขึ้น โดยช่วงนี้จำนวนแบคทีเรียจะเพิ่มปริมาณมากที่สุด โดยเชื้อแบคทีเรียในช่วง stationary phase จะทนต่อสภาวะต่าง ๆ ได้มากกว่าช่วงการเจริญอื่น ๆ เนื่องจากในช่วงระยะนี้เชื้อจะอ่อนแอและขาดแหล่งอาหารที่สามารถใช้ได้ จึงเป็นสิ่งที่กระตุ้นให้แบคทีเรียปรับสภาพภายในเซลล์เพื่อตอบสนองต่อสิ่งกระตุ้นเหล่านั้น ส่งผลให้ในช่วงระยะนี้รอดชีวิตได้มากกว่าระยะการเจริญเติบโตช่วงอื่น (Liew *et al.*, 2005; Morgan *et al.*, 2006) ซึ่งแสดงให้เห็นว่าชนิดของแบคทีเรีย สูตรอาหารที่เหมาะสม และระยะเวลาในการบ่มมีผลต่อระยะเวลาในการเพิ่มจำนวนเซลล์ โดยสูตรอาหารเพิ่มปริมาณที่พัฒนาขึ้นสามารถกระตุ้นให้แบคทีเรียที่มีประโยชน์เข้าสู่สภาวะ stationary phase ได้เร็ว และสามารถยืดระยะเวลาช่วงดังกล่าวให้ยาวนานมากยิ่งขึ้น ซึ่งจะเป็นการเพิ่มประสิทธิภาพของการใช้แบคทีเรียที่พัฒนาเป็นชีวผลิตภัณฑ์ได้อย่างมีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น โดยจำนวนเซลล์แบคทีเรียจะเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วภายในระยะเวลาอันสั้น ส่งผลให้ผู้ที่ใช้ชีวผลิตภัณฑ์ไม่ต้องวางแผนการใช้ชีวภัณฑ์ กล่าวคือ ผู้ใช้ชีวผลิตภัณฑ์สามารถนำส่วนผสมหัวเชื้อ 10 กรัม ผสมในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร TU-F1 ปริมาณ 1 ลิตร บ่มไว้อุณหภูมิห้องสามารถเริ่มใช้ชีวผลิตภัณฑ์ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 3 หลังเลี้ยงเชื้อ ซึ่งสูตรอาหารบางสูตรอาจ

ต้องใช้เวลาให้แบคทีเรียบางสายพันธุ์มีจำนวนประชากรถึงจุดสูงสุดได้ภายในระยะเวลาเพียง 24 ชั่วโมง แต่บางสูตรอาหารอาจต้องการระยะเวลามากกว่า 24 ชั่วโมง จึงจะสามารถเจริญเติบโตและเพิ่มปริมาณ (Liew *et al.*, 2005; Morgan *et al.*, 2006)

3.4 การศึกษาอายุการเก็บรักษาของชีวผลิตภัณฑ์หัวเชื้อเพิ่มปริมาณแบคทีเรียที่มีประโยชน์

เมื่อนำแบคทีเรียที่มีประโยชน์และมีประสิทธิภาพในการย่อยสลายสารเคมีตกค้างทางการเกษตรบรรจุไว้ในเม็ดบีดส์ เก็บไว้ในอุณหภูมิ 5 ± 2 องศาเซลเซียส มาเลี้ยงเพิ่มปริมาณด้วยสูตรอาหารที่ดีที่สุดเพื่อตรวจสอบการมีชีวิตรอด พบว่าหลังจากเก็บรักษา 1 เดือน แบคทีเรียทั้ง 3 สายพันธุ์ ยังคงความมีชีวิต โดยมีปริมาณประชากรแบคทีเรียสายพันธุ์ SP-TU-C, SP-TU-15-2 และ SP-TU-2-12Y เฉลี่ย 1.1×10^{23} , 3.0×10^{23} และ 1.6×10^{23} โคโลนีต่อมิลลิตร ตามลำดับ หลังเก็บรักษา 3 เดือน พบว่ามีปริมาณประชากรแบคทีเรียแบคทีเรียเฉลี่ย 1.0×10^{23} , 3.0×10^{23} และ 9.6×10^{22} โคโลนีต่อมิลลิตร ตามลำดับ (รูปที่ 3) โดยจำนวนประชากรเชื้อหลังเก็บรักษาพบว่าจำนวนประชากรเชื้อยังมีปริมาณคงที่ ซึ่งให้เห็นว่าวิธีการเก็บรักษาเชื้อโดยบรรจุในเม็ดบีดส์นั้นมีประสิทธิภาพในการช่วยยืดอายุการเก็บรักษาชีวิตของแบคทีเรีย

งานวิจัยของดาราวัต (2558) พบว่า encapsulate ที่ภายในบรรจุแบคทีเรียปฏิบักร์ *Bacillus* หลังจากเก็บไว้ในถุงพลาสติกที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 เดือน มีปริมาณเชื้อลดลงเล็กน้อย และคงที่ในเดือนที่ 3 และ 4 จากนั้นปริมาณเชื้อมีแนวโน้มลดลง เมื่อผ่านไปเป็นเวลา 6 เดือน พบว่ามีการปนเปื้อนของเชื้ออื่นหลังจากเก็บรักษา โดย Chandramoulia (2004) กล่าวว่าเมื่อใช้ความเข้มข้นของโซเดียมอัลจินเตสูงขึ้นก็ย่อมป้องกันจุลินทรีย์ได้

ดีขึ้น การเพิ่มความเข้มข้นของโซเดียมอัลจิเนตจะเป็นการเพิ่มจำนวนการจับแคลเซียมไอออน ส่งผลให้โครงสร้างเจลแข็งแรงขึ้น ซึ่งปัจจัยที่ทำให้จุลินทรีย์ออกมานอกเจลได้นั้นขึ้นอยู่กับความหนาของฟิล์มเคลือบ และอัลจิเนตอยู่ในสภาวะที่มีความเป็นกรดสูง จนมีค่า pKa ต่ำกว่า β -D-mannuronic acid และ α -L-guluronic acid จะส่งผลให้อัลจิเนตเปลี่ยนเป็นกรดอัลจินิก ซึ่งไม่มีสมบัติในการจับกับ

แคลเซียมไอออน ทำให้เม็ดเจลไม่มีความคงตัวและปลดปล่อยจุลินทรีย์ออกมา (Doumeche *et al.*, 2004) นอกจากนี้คุณสมบัติในการเก็บรักษาชีวผลิตภัณฑ์ยังส่งผลต่ออายุของจุลินทรีย์ด้วย โดยรายงานของ Costa และคณะ (2000) พบว่าหากเก็บผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์ที่อุณหภูมิต่ำ (4 องศาเซลเซียส) จะส่งผลให้เชื้อมีอัตราการรอดชีวิตสูงกว่าที่เก็บไว้ในอุณหภูมิห้อง

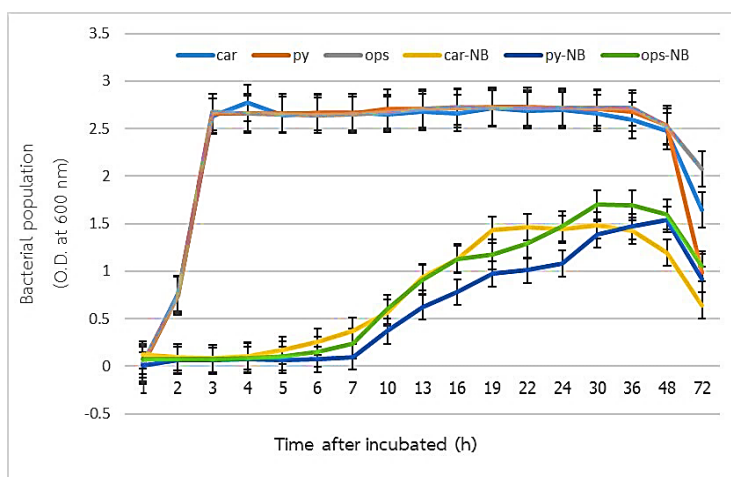


Figure 2 The growth curve of beneficial bacteria cultured in bioproduct compared with that in standard medium; car = strain SP-TU-2-12Y cultured in TU-F1, py = strain SP-TU-C cultured in TU-F1, ops = strain SP-TU-15-2 cultured in TU-F1, car-NB = strain SP-TU-2-12Y cultured in NB, py-NB = strain SP-TU-C cultured in NB, and ops-NB=SP-TU-15-2 cultured in NB.

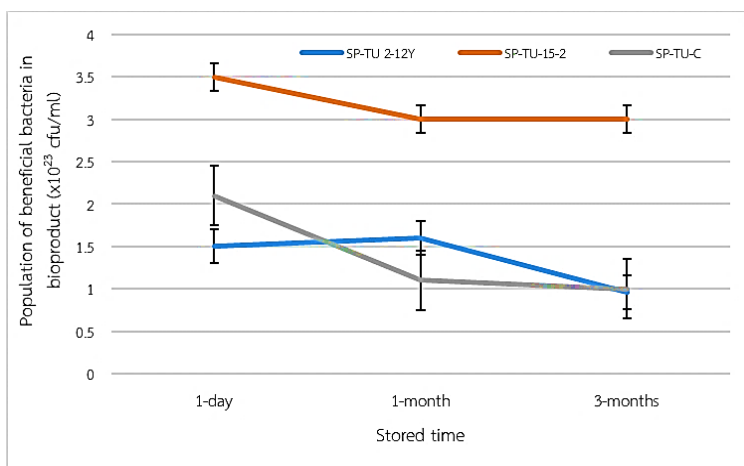


Figure 3 Population of beneficial bacteria in bioproduct after storage at 4 °C for 3 months.

4. สรุป

แบคทีเรียที่มีประโยชน์ที่แยกจากดินที่มีการปนเปื้อนสารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืช 3 ไอโซเลท ได้แก่ SP-TU-C, SP-TU-15-2 และ SP-TU2-12Y ตามลำดับ มีประสิทธิภาพดีในการย่อยสลายสารเคมีทั้งในอาหารพืชและดินจำลองการปนเปื้อนสารเคมีในกลุ่มไพรีทรอยด์ ออร์กาโนฟอสเฟต และคาร์บาเมต ตามลำดับ ซึ่งสามารถนำมาพัฒนาเป็นชีวผลิตภัณฑ์หัวเชื้อเพิ่มปริมาณแบคทีเรียที่มีประโยชน์ในการย่อยสลายสารเคมีในดินทางการเกษตร ประกอบด้วย 2 องค์ประกอบหลัก คือ หัวเชื้อแบคทีเรียที่มีประโยชน์บรรจุในเม็ดบีดส์ และสูตรอาหารเพิ่มปริมาณ TU-F1 หัวเชื้อแบคทีเรียทั้ง 3 สายพันธุ์ เจริญเติบโตได้ดีในสูตรอาหารที่มียีสต์ 10 กรัม ต่อน้ำ 1 ลิตร เป็นสูตรอาหารที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณแบคทีเรียที่มีประโยชน์ ซึ่งมีต้นทุนในการผลิตต่ำ สะดวกในการผลิต และวิธีการใช้ชีวผลิตภัณฑ์ทำได้ง่ายโดยใส่ยีสต์ 10 กรัม ต่อน้ำ 1 ลิตร แล้วเติมหัวเชื้อในเม็ดบีดส์ 10 กรัม ป่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง โดยสามารถเริ่มใช้ชีวผลิตภัณฑ์ 3-48 ชั่วโมง แบคทีเรียที่มีประโยชน์จะมีประสิทธิภาพสูงสุด และอายุการเก็บรักษาชีวผลิตภัณฑ์นั้นพบว่า 3 เดือนหลังเก็บรักษา ยังคงปริมาณประชากรเชื้อได้อย่างมีประสิทธิภาพ ทั้งนี้ควรเก็บรักษาและตรวจนับปริมาณเชื้อต่อไป เพื่อกำหนดวันหมดอายุของชีวผลิตภัณฑ์

5. รายการอ้างอิง

ดาราวดี วงษ์ชาลี, 2558, ประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียปฏิบัณช์ *Bacillus* สูตร Encapsulate ในการควบคุมโรคแอนแทรกซ์ของพริก, วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี, นครราชสีมา.

นันทิกา สุนทรไชยกุล, 2560, ปัจจัยกำหนดการรับรู้ความเสี่ยงเกี่ยวกับการใช้สารเคมีกำจัด

ศัตรูพืชของชาวนาในอำเภอหนองฉาง จังหวัดอุทัยธานี, ว.ความปลอดภัยและสุขภาพ 10(1): 21-34.

พัชรี คำประเวช และสุธีรา วัฒนกุล, 2561, การผลิตเม็ดบีดส์น้ำเสารสด้วยเทคนิครีเวิร์สเฟิรฟิเคชัน, ว.วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 26(8): 1382-1393.

มาลินี ลิ้มโกคา, 2527, พืชวิทยาและปัญหาที่พบในสัตว์, โรงพิมพ์จุลลลลล, กรุงเทพฯ, 397 น.

สุธาสนี อึ้งสูงเนิน, 2558, ผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมจากการใช้สารเคมีกำจัดศัตรูพืช, ว.วิชาการมหาวิทยาลัยอีสเทิร์นเอเซีย ฉบับวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 9(1): 50-63.

Chandramoulia, V., Kailasapathya, K., Peirisp, P. and Jones, M., 2004, An improved method of micro- encapsulation and its evaluation to protect *Lactobacillus* spp. in simulated gastric condition, J. Appl. Microbiol. 56: 27-35.

Costa, E., Usall, J., Teixido, N., Garcia, N. and Vinas, I., 2000, Effect of protective agents, rehydration media and initial cell concentration on viability of *Pantoea agglomerans* strain CPA-2 subjected to freeze-drying, J. Appl. Microbiol. 89: 793-800.

Doumeche, B., Kuppers, M., Stapf, S., Blumich, B., Hartmeier, W. and Ansorge-Schumacher, M.B., 2004, New approaches to visualization, quantification and explanation of acid-induced waterloss from Ca-alginate hydrogel beads, J. Microencapsulat. 21: 565-573.

Liew, S.L., Ariff, A.B. Raha, T.A.R. and Hoa, Y.W., 2005, Optimization of composition for

- p>the production of a probiotic micro
-
- organism,
- Lactobacillus rhamnosus*
- , using
-
- response surface methodology, J. Food
-
- Microbiol. 102: 137-142.
-
- Morgan, C.A., Herman, N., White, P.A. and
-
- Vesey, G., 2006, Preservation of micro-
-
- organisms by drying, J. Microbiol. Methods
-
- 66: 183-193.
-
- Siriwong, W., Thirakhupt, K., Sitticharoenchai,
-
- D., Borjan, M. and Robson, M., 2008,
-
- Organochlorine pesticide residues in
-
- plankton, Rangsit agricultural area, Central
-
- Thailand, J. Toxicol. Environ. Health Sci.
-
- 81: 608-612.