การศึกษาคุณสมบัติของแบคทีเรียทนโปรฟีโนฟอสที่แยกจากดินที่ปนเปื้อนสารกำจัดแมลง

Characterization of profenofos tolerant bacteria isolated from pesticide contaminated soil

ทิพย์สุดา สุตะภักดิ์ ปาริชาติ พุ่มขจร และพงศ์ศักดิ์ รัตนชัยกุลโสภณ*
ภาควิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี
*E-mail: rattanachaikunsopon@yahoo.com

บทคัดย่อ

โปรฟีโนฟอส (profenofos) เป็นสารกำจัดแมลงประเภทออร์กาโนฟอสเฟต (organophospahtes) ที่นิยมใช้ในประเทศไทย และมักพบการปนเปื้อนในพื้นที่เกษตรกรรม ดังนั้นแบคทีเรียที่จะนำไปใช้ในดินที่มีการปนเปื้อนโปรฟีโนฟอสจึงต้องสามารถทนสารกำจัดแมลงดังกล่าวได้ การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อแยก และศึกษาคุณสมบัติบางประการของแบคทีเรียทนโปรฟีโนฟอส จากแบคทีเรียจำนวน 10 ไอโซเลตที่สุ่มเลือกจากแบคทีเรียที่สามารถเจริญบนอาหาร nutrient agar ที่มีโปรฟีโนฟอสความเข้มข้น 100 ppm พบว่าแบคทีเรียรหัส PFN-03 ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมบวกมีความสามารถในการทนโปรฟีโนฟอสได้สูงสุด โดยสามารถทนโปรฟีโนฟอสได้สูงถึง 2,000 ppm การสกัดพลาสมิดไม่พบพลาสมิดในแบคทีเรียรหัส PFN-03 จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วน 16S rDNA ทำให้สามารถจัดจำแนกแบคทีเรียรหัส PFN-03 ได้เป็น *Brevibacillus brevis* แบคทีเรียที่ได้จากการศึกษานี้อาจมีประโยชน์ต่อการนำไปใช้ในดินหรือสิ่งแวดล้อมที่มีการปนเปื้อนโปรฟีโนฟอสและสารกำจัดแมลงในกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟตต่อไป

คำสำคัญ : โปรฟีโนฟอส สารกำจัดแมลง ออร์กาโนฟอสเฟต

Abstract

Profenofos is an organophosphate pesticide commonly used in Thailand and is often found to be contaminated in agricultural areas. Therefore, bacteria to be used in soil contaminated with profenofos have to be tolerant to the pesticide. This study aimed to isolate and partial characterize profenofos tolerant bacteria. Of all 10 randomly selected bacteria grown on nutrient agar containing 100 ppm of profenofos, it was found that the bacterial isolate PFN-03, a gram positive bacteria, was the most profenofos tolerant bacterial isolate. It was tolerant to profenofos as high as 2,000 ppm. Plasmid isolation did not find a plasmid in the bacterial isolate PFN-03 had no plasmid. From the 16S rDNA sequence analysis, it was identified as *Brevibacillus brevis*. The bacterium obtained from this study might be useful for its application in soil or environment contaminated with profenofos and organophosphate pesticides.

Keywords : Profenofos; Pesticide; Organophosphates

1. บทนำ

ในปัจจุบันภาคการเกษตรกำลังเผชิญกับปัญหาหลายประการ เช่น ความแห้งแล้ง การลดลงของพื้นที่ทำการเกษตร พืชผลทางการเกษตรที่ลดลง ดินเค็ม การปนเปื้อนของสารเคมีในดิน ปริมาณธาตุอาหารพืชลดลงเป็นต้น ดังนั้นการเพิ่มปริมาณผลผลิตทางการเกษตรให้มีปริมาณเพียงพอต่อการเพิ่มขึ้นของจำนวนประชากรโลกจึงเป็นสิ่งสำคัญ โดยการเพิ่มปริมาณผลผลิตทางการเกษตรสามารถทำได้หลายวิธี เช่น การใช้พันธุ์พืชที่ให้ผลผลิตสูง การใช้เครื่องจักรแทนการใช้แรงงานคน การใช้ฮอร์โมนพืชสังเคราะห์ การใช้ปุ๋ยเคมี และการใช้สารกำจัดแมลงในการป้องกันและกำจัดศัตรูพืช

การใช้สารกำจัดแมลงในทางการเกษตรมีทั้งข้อดีและข้อเสีย โดยข้อดีของการใช้สารดังกล่าว เช่น ใช้ได้สะดวก ทุกเวลา ทำลายแมลงได้อย่างรวดเร็ว ไม่ต้องใช้เทคนิคมาก สามารถใช้รวมกับยาปราบศัตรูพืชชนิดอื่น เป็นต้น ส่วนข้อเสียของการใช้สารกำจัดแมลงมีหลายประการ เช่น ทำให้ปริมาณแมลงศัตรูพืชเพิ่มมากขึ้นกว่าเดิม เนื่องจากศัตรูธรรมชาติถูกทำลายไป เกิดอันตรายโดยตรงต่อผู้ใช้ ทำให้สิ่งมีชีวิตอื่นที่ไม่ต้องการทำลายต้องตายไปด้วย เช่น นก ปลา ผึ้งและแมลงมีประโยชน์ชนิดต่าง ๆ ก่อให้เกิดการระบาดของแมลงชนิดใหม่ๆ ซึ่งแต่ก่อนไม่ปรากฏว่ามีความสำคัญ ทำให้สมดุลธรรมชาติเสียไป สิ่งแวดล้อมเป็นพิษ ทำให้สภาพทางระบบนิเวศที่สลับซับซ้อนเปลี่ยนแปลงไป เกิดการระบาดของแมลงได้ง่าย [1] ข้อเสียของการใช้สารกำจัดแมลงอีกประการหนึ่งคืออาจทำให้แมลงศัตรูพืชพัฒนาภูมิต้านทานสารเคมี ซึ่งเป็นคุณสมบัติทางวิวัฒนาการของแมลงในการดำรงเผ่าพันธุ์ การทนสารเคมีที่มีพิษสามารถถ่ายทอดไปยังลูกหลานได้ จึงทำให้เกษตรกรต้องใช้สารกำจัดแมลงมากขึ้นหรือต้องเปลี่ยนชนิดสารกำจัดแมลงใหม่เพื่อกำจัดแมลง การเกิดพิษตกค้างของยาฆ่าแมลงในพืช สัตว์ และสิ่งแวดล้อมก็จัดเป็นปัญหาสำคัญซึ่งอาจเป็นอันตรายต่อมนุษย์ได้

การนำแบคทีเรียไปใช้ในสิ่งแวดล้อมที่มีการปนเปื้อนสารกำจัดแมลง เช่น การนำแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการทำให้สารประเภท phosphate แตกตัวเป็น phosphorus ไปใช้ในการส่งเสริมการเจริญของพืชในดินที่มีการปนเปื้อนสารกำจัดแมลง [2] และการนำแบคทีเรียที่สามารถสร้างสารส่งเสริมการเจริญของพืช (plant growth promoting substances) ไปใช้ในการส่งเสริมการเจริญของพืชในดินที่มีการปนเปื้อนสารกำจัดแมลง [3] แบคทีเรียดังกล่าวต้องสามารถทนสารกำจัดแมลงได้ เพื่อที่จะได้เจริญเติบโตและทำหน้าที่ในดินที่มีการปนเปื้อนสารกำจัดแมลงได้ โปรฟีโนฟอส (profenofos) เป็นสารกำจัดแมลงชนิดหนึ่งในกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟต (organophosphates) ที่ออกฤทธิ์ในทางสัมผัสและกิน โดยเป็นสารพิษประเภท cholinesterase inhibitor [4] สารกำจัดแมลงชนิดนี้เป็นสารเคมีที่กำจัดศัตรูพืชได้หลายชนิด เช่น หนอนใยผัก หนอนเจาะสมอฝ้าย หนอนกระทู้ยาสูบ หนอนกระทู้ควายพระอินทร์ หนอนคืบกะหล่ำ ด้วงงวงเจาะสมอ เพลี้ยอ่อน เพลี้ยไฟ เพลี้ยกระโดด ไรฝ้าย โดยนิยมใช้กับฝ้าย อ้อย มันฝรั่ง ยาสูบ ถั่วเหลือง หอม พริก ผักตระกูลกะหล่ำ องุ่น ข้าวโพด และพืชอื่น [4] ทำให้ที่ดินเกษตรกรรมหลายแห่งมีการปนเปื้อนโปรฟีโนฟอส ดังนั้นการนำจุลินทรีย์ไปใช้ในที่ดินดังกล่าวจึงมักประสบปัญหาจากการตายของจุลินทรีย์อันเนื่องจากสารกำจัดแมลง ดังนั้นในการศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อแยกแบคทีเรียที่ทนโปรฟีโนฟอสจากดินที่มีประวัติการใช้สารกำจัดแมลง และศึกษาความสามารถในการทนโปรฟีโนฟอสของแบคทีเรียที่แยกได้ นอกจากนี้ยังตรวจหา พลาสมิด และจัดจำแนกชนิด (identification) ของแบคทีเรียที่ทนโปรฟีโนฟอสดีที่สุด แบคทีเรียที่ได้จากการศึกษานี้อาจมีประโยชน์ต่อการนำไปใช้ในสิ่งแวดล้อมที่มีการปนเปื้อนโปรฟีโนฟอส และสารกำจัดแมลงในกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟตต่อไป

2. วัสดุอุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย

2.1 การเก็บตัวอย่างดิน

ตัวอย่างดินจำนวน 1 ตัวอย่างที่ใช้ในการทดลองเก็บจากบริเวณแปลงปลูกพริก 1 แปลง ที่ระดับความลึก 0-10 เซนติเมตรจากผิวดิน ในพื้นที่ตำบลแสนสุข อำเภอวารินชำราบ จังหวัดอุบลราชธานี ซึ่งเป็นพื้นที่ที่มีประวัติการใช้สารกำจัดแมลงประเภทออร์กาโนฟอสเฟตเป็นเวลานานมากกว่า 10 ปี

2.2 การแยกแบคทีเรียทนโปรฟีโนฟอส

2.2.1 อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้คัดแยกแบคทีเรีย

อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการคัดแยกแบคทีเรียทนโปรฟีโนฟอส คือ nutrient agar (NA) ที่มีโปรฟีโนฟอสเข้มข้น 100 ppm (NA-p100) และ nutrient broth (NB) ที่มีโปรฟีโนฟอสเข้มข้น 100 ppm (NB-p100)

การเติมโปรฟีโนฟอสในอาหารจะเติมหลังจากที่มีการฆ่าเชื้ออาหารด้วยหม้อนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 20 นาที แล้วตั้งทิ้งไว้ให้มีอุณหภูมิประมาณ 60°C

2.2.2 สารกำจัดแมลง

สารกำจัดแมลงที่ใช้ในการศึกษานี้คือโปรฟีโนฟอส (ชื่อการค้า ซีลีครอน) ที่มีความเข้มข้นเท่ากับ 500,000 ppm (50% v/w)

2.2.3 การคัดแยกแบคทีเรีย

ในการศึกษานี้ใช้วิธี culture enrichment technique ในการแยกแบคทีเรียที่สามารถทนโปรฟีโนฟอส ซึ่งทำได้โดยการนำตัวอย่างดิน 10 g เติมลงในขวดรูปชมพู่ (Erlenmeyer flask) ขนาด 125 ml ที่บรรจุอาหาร NB ปริมาตร 100 ml ที่มีการเติมโปรฟีโนฟอส ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 100 ppm จากนั้นนำไปบ่มในตู้บ่มเขย่า (incubator shaker) ที่ความเร็วรอบ 150 rpm อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 72 ชั่วโมง จากนั้นนำไปทำการเจือจางให้มีระดับความเข้มข้นต่างๆ คือ 10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3}, 10^{-4}, 10^{-5} และ 10^{-6} นำเซลล์แขวนลอย (culture) ที่ระดับความเจือจาง 10^{-4}, 10^{-5} และ 10^{-6} มาแยกเชื้อบนอาหาร NA ที่เติมโปรฟีโนฟอสเข้มข้น 100 ppm โดยวิธี spread plate นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สุ่มเลือกเฉพาะโคโลนีเดี่ยวที่เจริญบน NA-p100 มาเลี้ยงในอาหาร NB-p100 บ่มที่ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำแบคทีเรียที่เจริญใน NB-p100 มา streak บน NA-p100 บ่มที่ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อได้เชื้อบริสุทธิ์นำมาเลี้ยงในอาหาร NB-p100 บ่มที่ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมงอีกครั้งเพื่อเก็บรักษา

การเก็บรักษาแบคทีเรียที่แยกได้ทำโดยนำแบคทีเรียที่เจริญใน NB-p100 มาผสมกับกลีเซอรอล (glycerol) โดยให้มีความเข้มข้นของกลีเซอรอลเท่ากับ 20% v/v เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20°C เพื่อใช้ในการศึกษาต่อไป

2.3 การตรวจสอบรูปร่างของแบคทีเรียที่แยกได้

การตรวจสอบรูปร่างของแบคทีเรียที่แยกได้ทำโดยวิธีการย้อมแกรม (gram stain) และศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ที่กำลังขยาย 1,000 เท่า

2.4 การศึกษาความสามารถของแบคทีเรียในการทนโปรฟีโนฟอส

การศึกษาความสามารถของแบคทีเรียในการทนโปรฟีโนฟอส โดยวิธี broth dilution assay ซึ่งมีวิธีการดังนี้ เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ NB ปริมาตร 2.4 มิลลิลิตรให้มีความเข้มข้นของโปรฟีโนฟอส เท่ากับ 125, 250, 500, 1,000, 1,500 และ 2,000 ppm เติม culture ของแบคทีเรียทนโปรฟีโนฟอส ที่บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตรลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อ NB ที่มีความเข้มข้นของโปรฟีโนฟอสที่แตกต่างกันที่เตรียมไว้แล้ว นำหลอดทดลองทั้งหมดไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สังเกตการเจริญของแบคทีเรียในทุกหลอดทดลอง ทำการทดลอง 2 ซ้ำ

2.5 การสกัดพลาสมิดจากแบคทีเรียทนโปรฟีโนฟอส

การสกัดพลาสมิดจากแบคทีเรียทนโปรฟีโนฟอส โดยใช้ชุดสกัดพลาสมิดสำเร็จรูป (*AccuPrep*® Plasmid Mini Extraction Kit, Bioneer, Daejeon, Repulic of Korea) โดยทำตามคำแนะนำของบริษัทผู้ผลิต จากนั้นตรวจสอบผลการสกัดพลาสมิดด้วยวิธี agarose gel electrophoresis โดยใช้ 1% agarose gel การทดลองนี้ใช้ *Tetragenococcus halophilus* ที่มีพลาสมิด pUBU [5] และไม่มีพลาสมิดเป็น positive control และ negative control ตามลำดับ

2.6 การจัดจำแนกชนิดของแบคทีเรียทนโปรฟีโนฟอสโดยวิธี 16S rDNA sequence analysis

การจัดจำแนกชนิดของแบคทีเรียทนโปรฟีโนฟอสโดยวิธี 16S rDNA sequence analysis โดยสกัด genomic DNA ของแบคทีเรียด้วยชุดสกัดสำเร็จรูป

Genomic DNA Extraction Kit Mini (RBC Bioscience, Taipei, Taiwan) โดยทำตามคำแนะนำของบริษัทผู้ผลิต นำ genomic DNA ที่ได้มาใช้เป็นแม่แบบ (template) เพื่อทำ PCR (polymerase chain reaction) โดยใช้ primer 2 ชนิด ได้แก่

FD1 (5' AGAGTTTGATCCTGGCTCAG 3') [6]

RP2 (5' ACGGCTACCTTGTTACGACTT 3') [6]

การทำ PCR แต่ละครั้งใช้สารต่าง ๆ ดังนี้ 2X PCR master mix ปริมาตร 25 ไมโครลิตร primer FD1 (10 μM)และ RP2 (10 μM) อย่างละ 2.5 ไมโครลิตร และ Genomic DNA (1 μg/ml) ปริมาตร 20 ไมโครลิตร สภาวะที่ใช้ในการทำ PCR คือ 94°C เป็นเวลา 5 นาที 1 รอบ 94°C เป็นเวลา 1 นาที 55°C เป็นเวลา 1 นาที และ 72°C เป็นเวลา 1 นาที 30 รอบ และ 72°C เป็นเวลา 7 นาที 1 รอบ นำ PCR product ที่ได้ไปตรวจวิเคราะห์ลำดับเบสด้วยเครื่อง automated DNA sequencer (BioDesign Co., Ltd., Prathumthani. Thailand) แล้วนำลำดับเบสที่ได้ไปเปรียบเทียบกับลำดับเบสของ 16S rDNA ในฐานข้อมูล GENBANK โดยใช้โปรแกรม BLASTN (Basic Local Alignment Search Tools) เพื่อหาค่าเปอร์เซ็นต์ความคลายคลึง (% homology) ระหว่างลำดับเบสของ 16S rDNA ของแบคทีเรียทนโปรฟีโนฟอส กับลำดับเบสของ 16S rDNA ของแบคทีเรียในฐานข้อมูล GENBANK

3. ผลการวิจัยและอภิปรายผล

3.1 แบคทีเรียทนโปรฟีโนฟอส**ที่แยกได้จากดิน**

จากการสุ่มเลือกแบคทีเรียที่แยกได้จากดินบนอาหาร NA-p100 จำนวน 10 ไอโซเลต (isolate) โดยให้รหัสเป็น PFN-01 ถึง PFN-10 เพื่อนำมาตรวจสอบการติดสีแกรม และรูปร่างของแบคทีเรีย พบว่าแบคทีเรียที่เลือกมามีทั้งแบคทีเรียแกรมบวกและแบคทีเรียแกรมลบ (Table 1) โดยมีแบคทีเรียแกรมบวกจำนวน 4 ไอโซเลต และแบคทีเรียแกรมลบจำนวน 6 ไอโซเลต

Table 1. Phenotypic characteristics of profenofos tolerant bacteria

Bacterial isolate	Gram stain	Morphology
PFN-01	negative	bacillus
PFN-02	positive	bacillus
PFN-03	positive	bacillus
PFN-04	negative	bacillus
PFN-05	negative	bacillus
PFN-06	positive	bacillus
PFN-07	negative	bacillus
PFN-08	positive	bacillus
PFN-09	negative	bacillus
PFN-10	negative	bacillus

3.2 การศึกษาความสามารถของแบคทีเรียในการทน โปรฟีโนฟอส

เมื่อนำแบคทีเรียที่สุ่มเลือกทั้งหมดมาทดสอบความสามารถในการทนโปรฟีโนฟอสที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ พบว่าแบคทีเรียรหัส PFN-03 มีความสามารถในการทนโปรฟีโนฟอสสูงสุดที่ระดับความเข้มข้น 2,000 ppm (Table 2) ดังนั้นแบคทีเรียดังกล่าวจึงถูกนำไปศึกษาคุณสมบัติต่อไป

การที่แบคทีเรียมีความสามารถในการทนสารกำจัดแมลงได้ต่างกันอาจขึ้นกับปัจจัยหลายอย่าง เช่น สายพันธุ์ของแบคทีเรีย และกลไกที่แบคทีเรียใช้เพื่อให้ทนต่อสารกำจัดแมลง [7-10] อย่างไรก็ตามในการทดลองนี้ไม่ได้ดำเนินการวิจัยเพื่อหาสาเหตุที่ทำให้แบคทีเรียต่าง ๆ ที่แยกได้ทนสารกำจัดแมลงได้ต่างกัน ดังนั้นจึงยังไม่สามารถสรุปได้แน่ชัดว่าความแตกต่างกันในการทนสารกำจัดแมลงของแบคทีเรียเหล่านี้เกิดจากปัจจัยใด

3.3 การตรวจสอบการมีพลาสมิดของแบคทีเรียรหัส PFN-03

เมื่อนำแบคทีเรียรหัส PFN-03 มาสกัดพลาสมิด พบว่าแบคทีเรียดังกล่าวไม่มีพลาสมิด เช่นเดียวกับผลที่ได้จากการสกัดพลาสมิดจาก *T. halophilus* ที่ไม่มีพลาสมิด (negative control) ส่วนการสกัดพลาสมิดจาก *T. halophilus* ที่มีพลาสมิด pUBU (positive

control) พบพลาสมิดที่มีขนาดประมาณ 4.5 kb ซึ่งเป็นขนาดของพลาสมิด pUBU จึงทำให้สามารถสรุปได้ว่ายีนที่เกี่ยวข้องกับความสามารถในการทนโปรฟีโนฟอสของแบคทีเรียรหัส PFN-03 เป็นยีนที่อยู่ในโครโมโซม

จากการวิจัยที่ผ่านมาทำให้ทราบว่าความสามารถในการทนสารกำจัดแมลงของแบคทีเรียถูกควบคุมโดยยีน โดยยีนดังกล่าวอาจอยู่ในโครโมโซม หรือพลาสมิดก็ได้ขึ้นอยู่กับชนิดของแบคทีเรีย ตัวอย่างเช่น ความสามารถในการทน monochrotophos ของ *Staphylococcus aureus* [11] ความสามารถในการทน carbofuran ของ *Sphingomonas* sp. [12] และความสามารถในการทน parathion ของ *Pseudomonas diminuta* [13] ถูกควบคุมโดยยีนที่อยู่ในพลาสมิด ในขณะที่ความสามารถในการทน coumaphos ของ *Agrobacterium radiobacter* [14] และความสามารถในการทน isofenophos ของ *Arthrobacter* sp. [15] ถูกควบคุมโดยยีนที่อยู่ในโครโมโซม

Table 2. Profenofos tolerance of the selected bacteria

Bacterial isolate	Profenofos concentrations (ppm)					
	125	250	500	1,000	1,500	2,000
PFN-01	+	+	+	-	-	-
PFN-02	+	+	+	+	-	-
PFN-03	+	+	+	+	+	+
PFN-04	-	-	-	-	-	-
PFN-05	+	+	+	+	+	-
PFN-06	-	-	-	-	-	-
PFN-07	-	-	-	-	-	-
PFN-08	-	-	-	-	-	-
PFN-09	-	-	-	-	-	-
PFN-10	-	-	-	-	-	-

+ = can grow in the medium containing profenofos;
- = cannot grow in the medium containing profenofos

3.4 การจัดจำแนกชนิดของแบคทีเรียรหัส PFN-03 โดยวิธี 16S rDNA sequence analysis

จากการทำ PCR เพื่อเพิ่มปริมาณ 16S rDNA พบว่า PCR product ที่ได้มีขนาดประมาณ 1,500 bp และเมื่อนำไปตรวจหาลำดับเบส พบว่ามีลำดับเบสจำนวน 1,490 bp และเมื่อนำลำดับเบสดังกล่าวไปเปรียบเทียบกับลำดับเบสของ 16S rDNA ที่อยู่ในฐานข้อมูล GENBANK พบว่าลำดับเบสของ PCR product ที่ได้มีความคล้ายคลึงกับลำดับเบสของ 16S rDNA ของ *Brevibacillus brevis* strain DMS 30 (accession NR_112204.1) ด้วยเปอร์เซ็นต์ความคล้ายคลึง (% homology) เท่ากับ 99% ผลจากการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียรหัส PFN-03 มีความเป็นไปได้ที่จะเป็นแบคทีเรีย *Brevibacillus brevis* จากงานวิจัยที่ผ่านมาพบว่ามีแบคทีเรียหลายสายพันธุ์ที่สามารถทนโปรฟีโนฟอส ได้ เช่น *Bacillus subtilis* [16] *Burkholderia gladioli* [17] *Pseudomonas putida* [17] *Pseudoxanthomonas suwonensis* [18] และ *Staphylococcus aureus* [16] นอกจากแบคทีเรียแล้วยังพบว่ามีเชื้อราอีกหลายสายพันธุ์ที่สามารถทนโปรฟีโนฟอสได้ [19]

4. สรุปและเสนอแนะ

แบคทีเรียทนโปรฟีโนฟอสที่ได้จากการศึกษานี้มีความสามารถทนโปรฟีโนฟอสได้สูงถึง 2,000 ppm เมื่อเทียบกับค่าเฉลี่ยทั่วไปที่มักพบปนเปื้อนในดินและสิ่งแวดล้อม [9] ซึ่งมีค่าประมาณ 50-100 ppm ดังนั้นแบคทีเรียนี้จึงมีศักยภาพที่จะนำไปใช้ประโยชน์ในดินหรือสิ่งแวดล้อมที่มีการปนเปื้อน โปรฟีโนฟอส

โดยปกติแล้วแบคทีเรียที่ทนสารกำจัดแมลงในกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟตชนิดใดชนิดหนึ่งได้มักจะทนสารกำจัดแมลงชนิดอื่นในกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟตได้ด้วย เนื่องจากสารกำจัดแมลงในกลุ่มนี้มีโครงสร้างหลัก (core structure) ที่เหมือนกัน [9] ดังนั้นหากทำการทดลองต่อไปเพื่อตรวจสอบว่าแบคทีเรียทนโปรฟีโนฟอสที่ได้จากการศึกษานี้สามารถทนสารกำจัดแมลงชนิดอื่นในกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟตด้วย ก็จะทำให้แบคทีเรียดังกล่าวสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้หลากหลายยิ่งขึ้น

เอกสารอ้างอิง

[1] Damalas, C. A. and Eleftherohorinos, I. G. 2011. “Pesticide Exposure, Safety Issues, and Risk Assessment Indicators”. **International Journal of Environmental Research and Public Health.** 8(5): 1402-1409.

[2] Maria, L. M. and et al. 2017. “Aluminum-tolerant bacteria improve the plant growth and phosphorus content in ryegrass grown in a volcanic soil amended with cattle dung manure”. **Applied Soil Ecology**. 115: 19-26.

[3] Ahemad, M. and Khan, M. S. 2011. “Assessment of pesticide–tolerant and functional diversity of bacterial strains isolation from rhizospheres of different crops”. **Insight Microbiology** 1(1): 8-19.

[4] Glickman, A. H., Wing, K. D. and Casida, J. E. 1984. “Profenofos insecticide bioactivation in relation to antidote action and the stereospecificity of acetylcholinesterase inhibition, reactivation, and aging”. **Toxicology and Applied Pahrmacology**. 73(1): 16-22.

[5] Phumkhachorn, P. and Rattanachaikunsopon, P. 2016. “A broad host range food-grade cloning vector for lactic acid bacteria”. **Biologia.** 71(5): 457-463.

[6] Ota-Tsuzuki, C., Brunheira, A. T. P. and Mayer, M. P.A. 2008. “16S rRNA region based PCR protocol for identification and subtyping of *Parvimonas micra*”. **Brazilian Journal of Microbiology.** 39(4): 605-607.

[7] Silver, S. and Phung L. T. 1996. “Bacterial heavy metal resistance: new surprises”. **Annual Review of Microbiology**. 50: 753-789.

[8] Bentley, R. and Chasteen, T. G. 2002. “Microbial methylation of metalloids: Arsenic, antimony and bismuth”. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**. 66(2): 250-271.

[9] McBride, B. C. and Wolfe, R. S. 1971. “Biosynthesis of dimethylarsine by a methanobacterium”. **Biochemistry**. 10(23): 4312-4317.

[10] Aguirre, S. P. and Lowe K. L.. 2010. “Pesticide-tolerant bacteria isolated from agricultural canals in the lower Rio Grande Valley of South Texas”. **Online Journal of Biological Sciences**. 10(3): 126-135.

[11] Umamaheswari S. and Murali M. 2010. “Prevalence of plasmid mediated pesticide resistant bacterial assemblages in crop fields”. **Journal of Environmental Biology**. 31(6): 957-964.

[12] Feng X, Ou L. T. and Ogram A. 1997. “Plasmid-mediated mineralization of carbofuran by Sphingomonas sp. strain CF06”. **Applied and Environmental Microbiology**. 63(4): 1332-1337.

[13] Mulbry, W. W. and et al. 1987. “Physical comparison of parathion hydrolase plasmids from *Pseudomonas diminuta* and *Flavobacterium* sp.”. **Plasmid**. 18(2)**:** 173-177.

[14] Horne, I. and et al. 2002. “Identification of an *opd* (organophosphate degradation) gene in an *Agrobacterium* isolate”. **Applied and Environmental Microbiology**. 68(7): 3371-3376.

[15] Ohshiro, K. and et al. 1997. “Characterization of isofenphos hydrolases from *Arthrobacter* sp. strain B-5”. **Journal of Fermentation and Bioengineering**. 83(3), 238-245

[16] Tamilselvan, C. and et al. 2014. “Biological degradation of metribuzin and profenofos by some efficient bacterial isolates”. **International Letters of Natural Sciences**. 14: 26-39.

[17] Malghani, S. and et al. 2009. “Isolation and identification of profenofos degrading bacteria”. **Brazilian Journal of Microbiology**. 40(4): 893-900.

[18] Talwar, M. P. and Ninnekar, H. Z. 2015. “Biodegradation of pesticide profenofos by the free and immobilized cells of *Pseudoxanthomonas suwonensis* strain HNM”. **Journal of Basic Microbiology**. 55(9): 1094-1103.

[19] Abd El-Ghany, T. M. and Masmali, I. A. 2016. “Fungal biodegradation of organophosphorus insecticides and their impact on soil microbial population”. **Journal of Plant Pathology and Microbiology**. 7(5): 349.