บทที่ 4
ผลการวิจัย

ลักษณะของดินบริเวณพื้นที่เพาะปลูก ตะกอนดิน และน้ำในลำธาร

ผลการวิเคราะห์คุณสมบัติทางเคมี และชีวภาพของตัวอย่างทั้งหมด มีรายละเอียดแสดงดังตารางที่ 4.1 ซึ่งจากข้อมูลพบว่าดินบริเวณพื้นที่เพาะปลูกซึ่งอยู่บริเวณพื้นที่สูงมีค่าพีเอชเป็นกรดเล็กน้อย (6.1-6.3) ในขณะที่พื้นที่เพาะปลูกใกล้ชุมชนที่ศึกษามีค่าเป็นกลาง (6.7) เช่นเดียวกับตะกอนดินบริเวณต้นน้ำ (6.8) ในขณะที่ตะกอนดินจากแหล่งน้ำกลางหมู่บ้าน และบริเวณลำธารหลังจากน้ำไหลผ่านหมู่บ้านมีค่าเป็นด่างเล็กน้อย (7.6-8.0) โดยค่าพีเอชของดินจัดเป็นพารามิเตอร์ที่เหมาะสม/นิยมใช้ตรวจวิเคราะห์คุณสมบัติทางด้านเคมี ซึ่งพีเอชมีผลต่อธาตุอาหารในดินทั้งทางตรงและทางอ้อม เช่น การที่พีเอชมีอิทธิพลต่อธาตุอาหารในดินซึ่งอยู่ในรูปที่พืชสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ เช่น ธาตุอาหารในดินจะอยู่ในรูปที่พืชนำมาใช้ได้ลดลง เมื่อค่าพีเอชและแคลเซียมเพิ่มสูงขึ้น อีกทั้งสังกะสี นิกเกิล แคดเมียม และทองแดง จะอยู่ในรูปที่ถูกนำไปใช้ได้ลดลงเมื่อค่าพีเอชเพิ่มถึง 7.0 (Bravo et al., 2015) สำหรับโลหะหนักที่สนใจศึกษา เมื่อเปรียบเทียบระหว่างดินจากแหล่งเพาะปลูกกับตะกอนดินในลำธารพบว่าปริมาณโลหะหนักบางชนิดมีความแตกต่างกันอย่างเห็นได้ชัดเจน โดยในภาพรวมดินเพาะปลูกจากบริเวณพื้นที่สูงหลังการเก็บเกี่ยวมีปริมาณโลหะหนักส่วนใหญ่สูงกว่าจุดอื่น โดยเฉพาะสังกะสี และนิเกิล ส่วนปริมาณแคดเมียม และโครเมียมที่พบนั้นมีปริมาณใกล้เคียงกันทั้งในดินเพาะปลูก และตะกอนดินจากแหล่งน้ำ

โดยทั่วไปแล้ว พื้นที่เพาะปลูก และในแหล่งธรรมชาติ มีโลหะหนักปนเปื้อนอยู่เนื่องจากลักษณะทางภูมิประเทศที่อาจพบแร่ธาตุต่างๆ และเกิดจากกิจกรรมการดำเนินชีวิตของผู้คนในบริเวณนั้นๆ อาทิเช่น การใช้ปุ๋ยเคมี, สารเคมีกำจัดแมลง และศัตรูพืช, และของเสียทางการเกษตร (Braconi et al., 2011; Bravo et al., 2015; Chai et al., 2015) เมื่อทำการเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์โลหะหนักในการศึกษานี้กับงานวิจัยที่ศึกษาโลหะหนักในหน้าดินจากแหล่งธรรมชาติ เช่น ทุ่งหญ้า (Chai et al., 2015) พบว่า ปริมาณสังกะสี, นิกเกิล และทองแดง อยู่ในช่วงใกล้เคียงกันกับการศึกษานี้ โดยมีค่าเฉลี่ย 35.0, 15.2, และ 16.7 mg/kg ตามลำดับ แต่เป็นที่น่าสังเกตว่าตัวอย่างดินเพาะปลูกบางแหล่ง (A2) มีการปนเปื้อนของโลหะหนักกลุ่มนี้สูงกว่าค่าเฉลี่ยดังกล่าวมาก อีกทั้งจุดเก็บตัวอย่างส่วนใหญ่ยังมีปริมาณโครเมียมสูงการศึกษาของ Chai et al. (2015) ทั้งนี้อาจเกิดจากการที่บริเวณที่ทำการศึกษามีการใช้สารเคมีทางการเกษตรต่อเนื่องเป็นระยะเวลานาน (สิมนัส และคณะ, 2556) จึงอาจก่อให้เกิดการปนเปื้อนในดิน นอกจากนี้สังกะสีและทองแดงยังจัดเป็นธาตุอาหารเสริม (Micronutrient) ของพืช โดยสังกะสีเกี่ยวข้องกับการทำงานของเอนไซม์ต่างๆในพืช ส่วนทองแดงจัดเป็นธาตุอาหารเสริมเช่นกัน อีกทั้งเกี่ยวเนื่องกับปฏิกิริยาการส่งถ่ายอิเล็กตรอน ซึ่งถ้าพบในปริมาณสูงจะก่อเกิดความเป็นพิษต่อพืช และคน โดยการพบโลหะหนักปนเปื้อนในดินเป็นประเด็นปัญหาซึ่งส่งผลต่อคุณภาพของดิน และก่อเกิดปัญหาทางด้านสาธารณสุขเช่นกัน (Braconi et al., 2011; Bravo et al., 2015)

ตารางที่ 4.1 แสดงลักษณะทางเคมีของตัวอย่างดินบริเวณพื้นที่เพาะปลูก ตะกอนดิน และน้ำในลำธาร

พารามิเตอร์	ตัวอย่างที่ทำการทดสอบ					
	ดินเพาะปลูก			ตะกอนดินในลำธาร		
	A1	A2	A3	B1	B2	B3
พีเอช	6.1	6.3	6.7	6.8	7.6	8.0
ค่าการนำไฟฟ้า (μS/cm)	49.73	47.34	46.26	39.26	51.09	48.32
ความชื้น (%)	10.20	13.26	15.95	44.09	37.97	41.73
Organic carbon (g/kg)	8.02	12.03	9.10	7.23	9.07	2.68
สังกะสี (mg/kg)	26.42	110.58	26.71	45.71	64.75	59.99
นิเกิล (mg/kg)	2.06	38.62	0.50	15.47	23.04	21.59
แคดเมียม (mg/kg)	0.75	2.82	1.09	1.53	1.77	0.21
ทองแดง (mg/kg)	15.67	37.72	14.20	26.53	32.61	25.32
โครเมี่ยม (mg/kg)	11.02	12.89	13.17	13.84	12.38	5.91
โคลิฟอร์มทั้งหมด (log MPN/100ml)	3.11	2.91	3.18	3.38	3.38	2.18
ฟีคอลโคลิฟอร์ม (log MPN/100ml)	3.01	2.59	2.88	3.38	3.38	2.18

หมายเหตุ A1: ระหว่างทำการเพาะปลูก+พื้นที่สูง, A2: หลังผ่านการเพาะปลูก+พื้นที่สูง, A3: หลังผ่านการเพาะปลูก+ใกล้ชุมชน, B1: ตะกอนดินในลำธาร+ต้นน้ำก่อนผ่านชุมชน, B2: ตะกอนดินในลำธาร+กลางชุมชน, B3: ตะกอนดินในลำธาร+ปลายน้ำหลังผ่านชุมชน, B4: น้ำในลำธาร+กลางชุมชน, ค่า n ของแต่ละชุดข้อมูล คือ 2-3

ส่วนปริมาณแบคทีเรียก่อโรคที่ตรวจวิเคราะห์ซึ่งในที่นี้ใช้แบคทีเรียกลุ่มโคลิฟอร์มเป็นตัวแทนการศึกษา (ตารางที่ 4.1) พบว่า โคลิฟอร์มที่พบส่วนใหญ่จัดเป็นฟีคอลโคลิฟอร์ม และปริมาณที่พบไม่มีความแตกต่างกันระหว่างตัวอย่างดินทั้งสองแหล่ง ($p>0.05$) โดยตะกอนดินบริเวณต้นน้ำ และกลางชุมชนที่ศึกษาจัดเป็นจุดที่พบแบคทีเรียกลุ่มดังกล่าวมากที่สุด นอกจากนี้แหล่งน้ำในชุมชนยังจัดเป็นแหล่งน้ำแห่งเดียวที่ผู้คนในชุมชนนำมาใช้ในการดำเนินกิจกรรมต่างๆ ดังนั้นจึงมีวิเคราะห์หาปริมาณโคลิฟอร์มในน้ำบริเวณชุมชนเพิ่มเติม ซึ่งพบว่ามีปริมาณโคลิฟอร์มทั้งหมด และฟีคอลโคลิฟอร์มต่ำกว่าในตะกอนดิน (2.60 log MPN/100 ml) ประมาณ 1 log MPN/100 ml แสดงให้เห็นว่ามีการสะสมตัวของแบคทีเรียตัวแทนที่บริเวณตะกอนดินมากกว่า โดยความชื้นถือเป็นปัจจัยหลักที่มีผลต่อการอยู่รอดของแบคทีเรียในดิน (Santamaria and Toranzos, 2003) เพราะมีส่วนส่งเสริมให้แบคทีเรียสามารถเกาะติด (Adsorption) อยู่กับอนุภาคดินได้ดี โดยเฉพาะในดินเหนียว ซึ่งส่งผลช่วยปกป้องให้เซลล์แบคทีเรียอยู่รอดได้ และแบคทีเรียในดินยังสามารถเคลื่อนที่ไปยังบริเวณอื่นได้เมื่อดินมีความอิ่มน้ำ (Water saturated condition) แต่ค่อนข้างเคลื่อนที่ได้ช้า นอกจากนี้การที่มีฝนตกและชะหน้าดินให้ไหลไปยังบริเวณอื่น (rainfall runoff) ก็ถือเป็นปัจจัยที่สำคัญที่ส่งผลให้แบคทีเรียในดินเคลื่อนที่ไปยังบริเวณอื่นได้อย่างรวดเร็ว โดยเฉพาะการที่ฝนตกหนัก (Parajuli et al., 2009;

Santamaria and Toranzos, 2003) ซึ่งมีรายงานพบว่าเหตุการณ์ดังกล่าวได้ส่งอิทธิพลต่อการก่อโรคที่เกี่ยวข้องกับฟีคอลโคลิฟอร์ม อาทิเช่น Typhoid fever, Hepatitis, Cholera, Dermatitia, และ Leptospirosis เป็นต้น

การดื้อยาของอีโคไลที่คัดแยกจากดินเพาะปลูก ตะกอนดิน และน้ำ

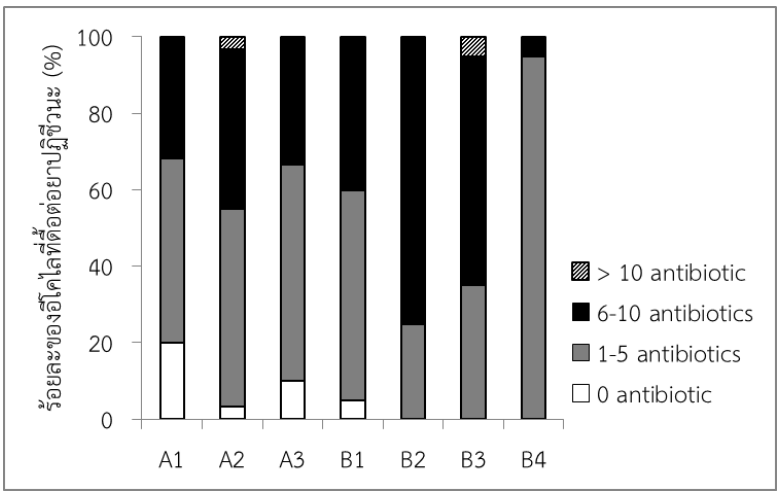
1. การดื้อยาปฏิชีวนะของอีโคไลในภาพรวม

การศึกษาในส่วนนี้มีอีโคไลทั้งหมดที่ทำการทดสอบจำนวน 260 สายพันธุ์ โดยทดสอบความไวต่อยาจำนวน 12 ชนิด ซึ่งแบ่งออกเป็น 8 กลุ่มยาด้วยกันตามวิธีการของ CLSI (2012) ได้แก่ Aminoglycoside, Tetracycline, Phenocol, Fluoroquinolone, Folate pathway inhibitors, Cephem, Penicillin และ Beta-lactamase inhibitor combination โดยผลการศึกษาในภาพรวมพบว่าอีโคไลที่คัดแยกจากบริเวณพื้นที่เพาะปลูกจัดเป็นอีโคไลดื้อยา 80.0-96.7% ในขณะที่อีโคไลเกือบทั้งหมดที่คัดแยกจากตะกอนดิน (95.0-100.0%) และตัวอย่างน้ำจัดเป็นอีโคไลดื้อยา (100.0%) เมื่อพิจารณาจำนวนชนิดยาที่ปรากฏในรูปแบบการดื้อยาของอีโคไลแต่ละสายพันธุ์แยกตามบริเวณที่เก็บข้อมูล ซึ่งรายละเอียดการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติแสดงดังภาพที่ 4.1 โดยอีโคไลสายพันธุ์ที่คัดแยกจากบริเวณพื้นที่เพาะปลูก (A1-A3) มีรูปแบบการดื้อยาที่หลากหลาย ส่วนใหญ่มีการดื้อยาจำนวน 1-5 ชนิดยา/สายพันธุ์ (48.3-56.7%) และเป็นที่น่าสังเกตว่าอีโคไลจากดินในช่วงหลังการเพาะปลูกทั้งสองแหล่ง ไม่ว่าจะเป็นบนพื้นที่สูง (A2, 45.0%) หรือบริเวณใกล้ชุมชน (A3, 33.3%) มีระดับการดื้อยา >6 ชนิดยา/สายพันธุ์ มากกว่าอีโคไลที่คัดแยกจากช่วงที่ทำการเพาะปลูก (31.7%)

ส่วนอีโคไลจากบริเวณแหล่งน้ำใกล้ชุมชนที่ศึกษาพบว่ามีระดับการดื้อยาที่รุนแรงกว่าอีโคไลจากพื้นที่เพาะปลูก โดยแหล่งตะกอนดินบริเวณชุมชน (B2) และตะกอนดินของแหล่งน้ำหลังการไหลผ่านชุมชน (B3) พบการกระจายตัวของรูปแบบการดื้อยาที่ปรากฏ 6-10 ชนิดยา/สายพันธุ์ มากที่สุด โดยพบ 75.0% และ 60.0% ตามลำดับ ซึ่งแสดงให้เห็นว่ากิจกรรมต่างๆของผู้คนในชุมชนน่าจะมีผลการดื้อยาที่เกิดขึ้น (Davies and Davies, 2010) ในขณะที่ตัวอย่างตะกอนดินจากบริเวณต้นน้ำก่อนการไหลผ่านชุมชน (B1) มีระดับการดื้อยาต่ำกว่า โดยพบการดื้อยาชนิด 1-5 และ 6-10 ชนิดยา/สายพันธุ์ จำนวน 55.0% และ 40.0% ตามลำดับ นอกจากนี้เมื่อพิจารณาตัวอย่างน้ำ (B4) จุดเดียวกันกับตะกอนดินกลางชุมชน กลับพบระดับการดื้อยาที่ต่ำกว่าจุดอื่นๆ โดยพบการกระจายตัวของอีโคไลดื้อยาชนิด 1-5 ชนิดยา/สายพันธุ์ มากที่สุดถึง 95.0% ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากตะกอนดินเป็นแหล่งที่มีการสะสมตัวของสารต่างๆ โดยเฉพาะสารมลพิษ เช่น โลหะหนักซึ่งมีผลเหนี่ยวนำให้เกิดการดื้อยาเพิ่มสูงขึ้น (Ji et al., 2012; Peltier et al., 2010) ประกอบกับการที่มีระยะเวลาการสัมผัสสารมลพิษที่ยาวนานกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับอีโคไลที่อยู่ในแหล่งน้ำ (น้ำในบริเวณที่ศึกษาเป็นน้ำไหลต่อเนื่องตลอดเวลา เนื่องจากอยู่บริเวณพื้นที่สูง)

เมื่อวิเคราะห์ผลการศึกษาในรูปของค่า MAR index (multiple antibiotic resistance index) ซึ่งเป็นค่าที่บ่งบอกระดับการดื้อยาปฏิชีวนะของอีโคไลในภาพรวมของแต่ละจุดที่ศึกษา โดยมีค่าอยู่ในช่วง 0.288-0.500 และสอดคล้องกับข้อมูลจำนวนชยิดยาที่ปรากฏในรูปแบบการดื้อยาของ

อีโคไล (ภาพที่ 4.1) ซึ่งอีโคไลในดินเพาะปลูกหลังการเก็บเกี่ยว (A2-A3) มีค่า MAR index สูงกว่าอีโคไลในดินระหว่างช่วงการเพาะปลูก (A1) โดยมีค่า 0.414-0.417 และ 0.293 ตามลำดับ ในกรณีของอีโคไลจากตะกอนดินของแหล่งน้ำ (B1-B3) พบว่าอีโคไลบริเวณตะกอนดินกลางชุมชน (B2) มีระดับการดื้อยาสูงสุดเมื่อเทียบกับจุดอื่น (MAR index = 0.500)

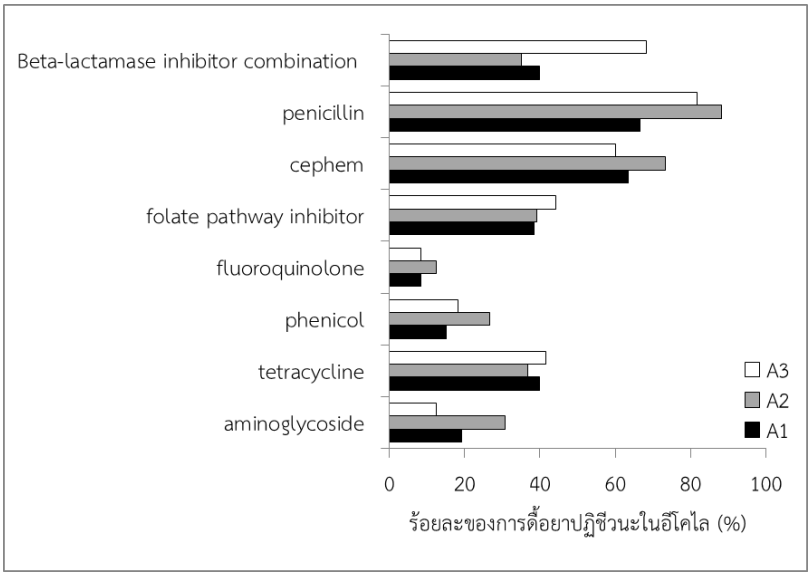


ภาพที่ 4.1 แสดงจำนวนยาปฏิชีวนะที่ทดสอบแล้วปรากฏรูปแบบการดื้อยาในอีโคไลแต่ละสายพันธุ์ โดยแยกผลการทดสอบตามจุดเก็บข้อมูล (A1: ระหว่างทำการเพาะปลูก+พื้นที่สูง, A2: หลังผ่านการเพาะปลูก+พื้นที่สูง, A3: หลังผ่านการเพาะปลูก+ใกล้ชุมชน, B1: ตะกอนดินในลำธาร+ต้นน้ำก่อนผ่านชุมชน, B2: ตะกอนดินในลำธาร+กลางชุมชน, B3: ตะกอนดินในลำธาร+ปลายน้ำหลังผ่านชุมชน, B4: น้ำในลำธาร+กลางชุมชน)

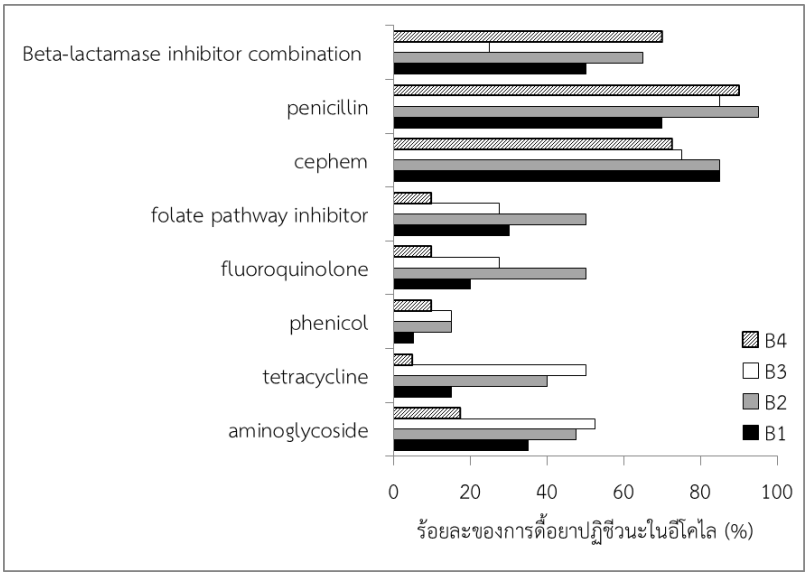
2. การดื้อยาปฏิชีวนะทั้ง 12 ชนิดของอีโคไล และรูปแบบการดื้อยาที่ปรากฏ

ผลการศึกษาการดื้อยาปฏิชีวนะของอีโคไลแต่ละจุด เมื่อพิจารณาแยกออกเป็น 8 กลุ่มยา (ภาพที่ 4.2) ในภาพรวมพบว่าอีโคไลที่ทดสอบมีการดื้อยากลุ่ม Beta-lactam (Cephem, Penicillin และ Beta-lactamase inhibitor combination) สูง (>50.0%) โดยพบอยู่ในช่วง 60.0-85.0%, 66.7-95.0% และ 25.0-70.0% ในยากลุ่ม Cephem, Penicillin และ Beta-lactamase inhibitor combination ตามลำดับ ส่วนการดื้อยาของอีโคไลในกลุ่ม Phenicol มีระดับต่ำเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มอื่น (5.0-26.7%) เมื่อเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างการดื้อยาแต่ละชนิดของอีโคไลในดินเพาะปลูก (A1-A3) และในตะกอนดินของแหล่งน้ำ และน้ำบริเวณชุมชน (B1-B4) พบว่า การดื้อยากลุ่ม Aminoglycoside และ Fluoroquinolone ของอีโคไลจากบริเวณชุมชน (10.0-52.5%) มีระดับสูงกว่าบริเวณเพาะปลูก (8.3-30.8%) ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากยาในกลุ่มดังกล่าวส่วนใหญ่ใช้รักษาโรคในคน ยาดังกล่าวจึงอาจปนเปื้อนสู่สิ่งแวดล้อม ส่งผลต่อการพัฒนาการดื้อยาในบริเวณดังกล่าวก็เป็นไปได้ นอกจากนี้ยาในกลุ่ม Phenicol พบระดับการดื้อยาที่ปรากฏในทิศทางตรงกันข้าม โดยบริเวณที่ทำการเพาะปลูก (15.0-26.7%) มีระดับการดื้อยาที่สูงกว่าในชุมชน (5.0-15.0%) เล็กน้อย จากภาพรวมผลการศึกษาการดื้อยาของอีโคไลในบริเวณพื้นที่เพาะปลูก และชุมชนใกล้เคียง

สอดคล้องกับในงานของ Maal-Bared et. al. (2013) ซึ่งพบว่ากิจกรรมทางการเกษตรมีอิทธิพลต่อความชุกของอีโคไลที่ปรากฏลักษณะการดื้อยา โดยพบการดื้อยากลุ่ม tetracycline สูง (59%) ซึ่งใกล้เคียงกับผลการวิจัยในครั้งนี้ (5-50%)



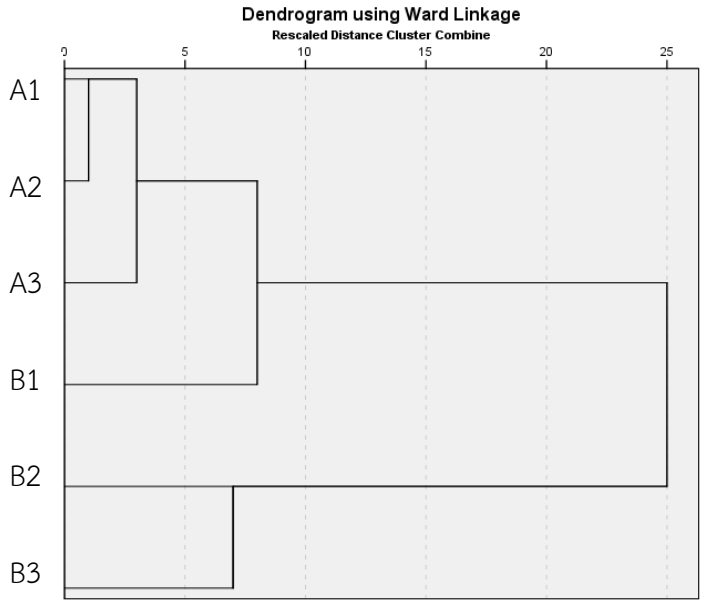
(ก)



(ข)

ภาพที่ 4.2 แสดงข้อมูลการดื้อยาปฏิชีวนะทั้ง 12 ชนิด ของอีโคไลจากแต่ละแหล่ง โดยภาพที่ 10ก แสดงข้อมูลจากบริเวณพื้นที่เพาะปลูก และภาพที่ 10ข แสดงข้อมูลจากบริเวณชุมชน (A1: ระหว่างทำการเพาะปลูก+พื้นที่สูง, A2: หลังผ่านการเพาะปลูก+พื้นที่สูง, A3: หลังผ่านการเพาะปลูก+ใกล้ชุมชน, B1: ตะกอนดินในลำธาร+ต้นน้ำก่อนผ่านชุมชน, B2: ตะกอนดินในลำธาร+กลางชุมชน, B3: ตะกอนดินในลำธาร+ปลายน้ำหลังผ่านชุมชน, B4: น้ำในลำธาร+กลางชุมชน)

จากข้อมูลการดื้อยาปฏิชีวนะทั้ง 12 ชนิด ของอีโคไลที่ทำการเก็บข้อมูลจำนวน 6 จุด (A1-A3 และ B1-B3) เมื่อจัดแบ่งกลุ่มของจุดเก็บตัวอย่างตามความคล้ายคลึงของข้อมูลการดื้อยา (%) ด้วยวิธีการ Hierarchical cluster ดังแสดงผลในภาพที่ 4.3 ซึ่งจากแผนภูมิ Dendrogram เมื่อพิจารณาตามสเกลด้านบนของภาพ ซึ่งเป็นสเกลที่บอกระดับความเหมือนของตัวอย่างแต่ละจุด โดยถ้าสเกลแตกต่างกันน้อยหมายถึง ตัวอย่างมีความใกล้เคียงกันมาก จากหลักการดังกล่าว จะพบว่าสามารถแบ่งลักษณะความคล้ายคลึงกันของอีโคไลในแต่ละจุดเก็บตัวอย่างที่พบออกเป็น 2 cluster ใหญ่ ได้แก่ cluster ที่ 1 อีโคไลที่คัดแยกจากพื้นที่เพาะปลูกทั้งหมด (A1-A3) มีลักษณะการดื้อยาใกล้เคียงกันมาก และนอกจากนี้ยังมีลักษณะใกล้เคียงกันกับอีโคไลสายพันธุ์ที่พบจากตะกอนดินบริเวณต้นน้ำ (B1) แต่ไม่ได้มีความใกล้เคียงกันมากเท่ากับดินเพาะปลูกทั้ง 3 จุด และ cluster ที่ 2 อีโคไลจากตะกอนดินแหล่งน้ำบริเวณกลางชุมชน (B2) และบริเวณที่น้ำไหลผ่านชุมชน (B3) ออกไป มีลักษณะการดื้อยาของอีโคไลมีความคล้ายคลึงกัน นอกจากนี้อีโคไลทั้ง 2 cluster ที่แบ่งตามวิธีการดังกล่าวยังมีลักษณะการดื้อยาที่แตกต่างกันมากอย่างเห็นได้ชัดเจนเมื่อพิจารณาจากแผนภูมิ Dendrogram



ภาพที่ 4.3 แผนภูมิ Dendrogram แสดงการแบ่งกลุ่มอีโคไลจากแต่ละบริเวณที่ทำการเก็บข้อมูลด้วยวิธีการ Hierarchical cluster (A1: ระหว่างทำการเพาะปลูก+พื้นที่สูง, A2: หลังผ่านการเพาะปลูก+พื้นที่สูง, A3: หลังผ่านการเพาะปลูก+ใกล้ชุมชน, B1: ตะกอนดินในลำธาร+ต้นน้ำก่อนผ่านชุมชน, B2: ตะกอนดินในลำธาร+กลางชุมชน, B3: ตะกอนดินในลำธาร+ปลายน้ำหลังผ่านชุมชน)

ในการแปรผลข้อมูลส่วนสุดท้ายเรื่องการดื้อยาปฏิชีวนะนั้น จะเป็นการแบ่งกลุ่มอีโคไลทั้ง 260 สายพันธุ์ ตามลักษณะการดื้อยาที่คล้ายคลึงกัน โดยใช้ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของ Clear zone รอบแผ่นยาทดสอบทั้ง 12 ชนิด ด้วยการใช้วิธี k-means cluster ในการจัดกลุ่ม โดยสามารถจัดแบ่งอีโคไลได้ทั้งหมด 5 cluster ซึ่งเมื่อแบ่งอีโคไลออกเป็น 5 cluster แล้วนั้น จะทำการหาค่าเฉลี่ยของ

เส้นผ่านศูนย์กลาง Clear zone รอบแผ่นยาแต่ละชนิด ในแต่ละ Cluster และทำการแปรผลชุดข้อมูลออกเป็นค่าไวต่อยาปฏิชีวนะ (Sensitive, S), กำลังมีการพัฒนาเป็นแบคทีเรียดื้อยา (Intermediate, I), และ ดื้อต่อยาปฏิชีวนะ (Resistant, R) ตามเกณฑ์การประเมินความไวต่อยาตามวิธีการมาตรฐาน (CLSI, 2012) โดยรายละเอียดแสดงดังในตารางที่ 4.2 ซึ่งข้อมูลที่ได้จากการวิเคราะห์ผลจะช่วยให้ทราบถึงรูปแบบการดื้อยาที่ปรากฏในแต่ละ cluster ซึ่งอีโคไลที่ถูกจัดอยู่ใน cluster ที่ 5 นั้น จัดเป็นอีโคไลที่มีระดับความรุนแรงของการดื้อต่อยาปฏิชีวนะสูงที่สุด พบการดื้อยาถึง 10 ชนิด (GM-S-TC-CIP-ST-TMP-CTX-CAZ-AMP-AMC) ในขณะที่อีโคไลจาก cluster ที่ 1 มีระดับความไวต่อยาสูงที่สุด คือไม่พบการดื้อยาต่อปฏิชีวนะใดๆ (Sensitive strains) ส่วนอีโคไลใน cluster ที่ 2-4 นั้น พบระดับการดื้อยาแตกต่างกันไป โดย cluster ที่ 2 พบเฉพาะการดื้อยา Cefotaxime (CTX) เท่านั้น ส่วน cluster ที่ 3 เป็น cluster ที่มีจำนวนอีโคไลถูกจัดอยู่ในนั้นมากที่สุด (121 สายพันธุ์) พบการดื้อยากลุ่ม Beta-lactam 3 ชนิด ได้แก่ Cefotaxime (CTX), Ceftazidime (CAZ) และ Ampicillin (AMP) สำหรับอีโคไลใน cluster ที่ 4 นั้น จะพบการดื้อยาหลากหลายชนิดมากยิ่งขึ้น (8 ชนิด, TC-CP-ST-TMP-CTX-CAZ-AMP-AMC) กล่าวโดยสรุปมีเฉพาะ cluster ที่ 4 และ 5 เท่านั้น ที่ปรากฏการดื้อยาปฏิชีวนะหลายกลุ่ม

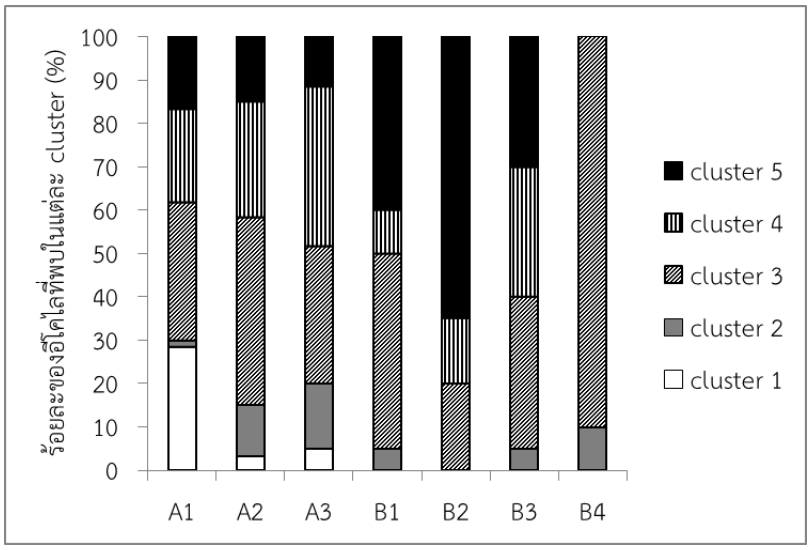
ตารางที่ 4.2 แสดงข้อมูลค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางของ Clear zone รอบแผ่นยาทั้ง 12 ชนิด หลังจากการแบ่งกลุ่มด้วยวิธี k-means cluster

cluster	เส้นผ่านศูนย์กลางของ Clear zone รอบแผ่นยาที่ทดสอบ (cm)											
	GM	S	TC	CP	NOR	CIP	ST	TMP	CTX	CAZ	AMP	AMC
1	29.1	21.6	11.6	26.2	30.5	31.1	34.5	30.0	32.4	20.2	22.9	31.5
2	18.5	16.6	15.2	22.2	25.1	27.1	21.6	18.1	21.9	19.3	14.0	19.6
3	15.5	12.0	14.8	19.6	18.5	19.1	17.3	15.3	17.9	16.8	11.1	14.5
4	14.3	11.8	10.8	12.3	18.6	20.3	6.3	6.2	15.8	17.4	6.4	12.4
5	12.4	10.0	10.6	16.7	13.7	14.8	9.8	8.2	13.0	13.2	7.7	11.3

หมายเหตุ แสดงผลดื้อต่อยาปฏิชีวนะ (R) แรเงาด้วยสีเทาเข้ม, มีการพัฒนาการดื้อยา (I) แรเงาด้วยสีเทาอ่อน, ไวต่อยา แรเงาด้วยสีขาว

เมื่อพิจารณาเชิงลึกถึงที่มาหรือการกระจายตัวของอีโคไล (จุด A1-A3 และ B1-B4) ที่ถูกจัดอยู่ในแต่ละ cluster ซึ่งมีข้อมูลแสดงดังภาพที่ 4.4 พบว่าอีโคไลจากดินเพาะปลูกทั้ง 3 จุด (A1-A3) ถูกจัดอยู่ใน cluster ที่ 3 และ 4 มากที่สุด โดยพบการกระจายตัวของอีโคไลอยู่ในช่วง 21.7-43.3% นอกจากนี้ยังพบอีกว่า อีโคไลจากดินเพาะปลูกในช่วงที่มีการเพาะปลูก (A1) ยังพบการกระจายตัวมากใน cluster ที่ 1 อีกเช่นกัน (28.3%) ซึ่งข้อมูลดังกล่าวอาจสื่อให้เห็นว่า การพัฒนาการดื้อยาส่วนใหญ่น่าจะเกิดขึ้นหลังผ่านกระบวนการเพาะปลูก ในขณะที่อีโคไลจากดินเพาะปลูก (A1-A3) ส่วนใหญ่จัดอยู่ใน cluster ที่ 3 และ 4 แต่อีโคไลจากตะกอนดินแหล่งน้ำทั้ง 3 จุด (B1-B3) พบการกระจายตัวของอีโคไลในแต่ละ cluster แตกต่างจากในดินเพาะปลูก โดยอีโคไลจากตะกอนดินส่วนใหญ่ พบการ

กระจายตัวสูงใน cluster ที่ 3 และ 5 โดย cluster ที่ 5 ซึ่งมีระดับการดื้อยารุนแรงที่สุด พบการกระจายใน cluster นี้ (30.0-65.0%) มากกว่าในอีโคไลจากดินเพาะปลูกอย่างเห็นได้ชัด (11.7-16.7%) นอกจากนี้อีโคไลจากตะกอนดินของลำธารหลังจากผ่านชุมชนไปแล้ว (B3) พบการกระจายตัวของอีโคไลที่มีระดับการดื้อยารุนแรงที่สุดลดลง (cluster ที่ 5, 30.0%) และยังพบการกระจายตัวอยู่ใน cluster ที่ 4 ในระดับเท่ากัน (30.0%) จากฐานข้อมูลในส่วนนี้แสดงให้เห็นว่า อีโคไลที่ดื้อยาหลายกลุ่มยา หรือเรียกว่า Multi-drug resistance bacteria ซึ่งจัดอยู่ใน cluster ที่ 4 และ 5 จะพบมากที่บริเวณตะกอนดินจากชุมชน นอกจากนี้ cluster ที่ 3 ยังสามารถจัดอยู่ในกลุ่ม Multi-drug resistance ได้เช่นเดียวกัน แต่ลักษณะที่ปรากฏไม่ได้มีระดับความรุนแรงเท่ากับ cluster ที่ 4 และ 5 เพราะบางกลุ่มยาค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลาง Clear zone รอบแผ่นยามีค่าอยู่แค่ระดับ Intermediate เท่านั้น เช่นกลุ่มยา Aminoglycoside (S), Tetracycline (TC), Fluoroquinolone (CIP), Folate pathway inhibitors (TMP), และ Beta-lactamase inhibitor combination (AMC) นอกจากนี้เมื่อพิจารณาอีโคไลที่คัดแยกได้จากแหล่งน้ำในชุมชน (B4) พบการกระจายตัวใน cluster ที่ 3 เกือบทั้งหมด (95.0%) ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองก่อนหน้าที่บ่งชี้ว่าอีโคไลในแหล่งน้ำมีระดับการดื้อยาต่ำกว่าในตะกอนดิน



ภาพที่ 4.4 แสดงข้อมูลการกระจายตัวของอีโคไลจากแต่ละจุดเก็บข้อมูล หลังจากการแบ่ง cluster ด้วยวิธี k-means

3. การผลิตเอนไซม์ Extended spectrum beta-lactamase (ESBL) ในอีโคไล

ในการศึกษาการผลิตเอนไซม์ Extended spectrum beta-lactamase (ESBL) ของอีโคไลทั้ง 260 สายพันธุ์ ที่ทำการคัดแยก ซึ่งในภาพรวมพบว่าอีโคไลจากดินพื้นที่เพาะปลูก และตะกอนดินจากแหล่งน้ำมีการผลิตเอนไซม์ดังกล่าวเกิดขึ้นในช่วง 5.0-30.0% โดยอีโคไลจากบริเวณชุมชน (B2) พบการผลิต ESBL สูงกว่าจุดอื่น (30.0%) ทั้งนี้กิจกรรมการดำเนินชีวิตของผู้คนในชุมชนน่าจะมีอิทธิพลต่อปรากฏการดังกล่าว เพราะโดยทั่วไปการแพร่ระบาดของ ESBL พบมากตามโรงพยาบาล

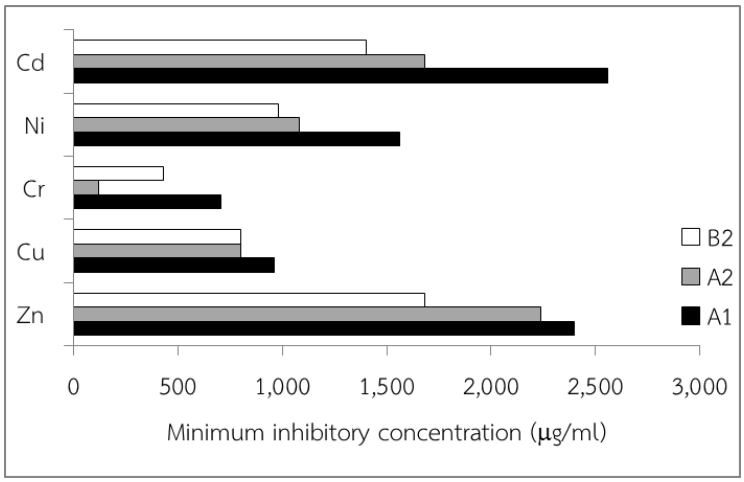
และชุมชน และเกี่ยวข้องกับการดื้อยากลุ่ม beta-lactam เช่น cephalosporin และ aztreonam ซึ่งเป็นยาใน generation ใหม่ และใช้เพื่อรักษาโรคในคนอย่างแพร่หลาย ประกอบกับแบคทีเรียในวงศ์ *Enterobacteriaceae* ซึ่งมีอีโคไลเป็นหนึ่งในสมาชิกนั้น พบว่ายีนที่ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับเอนไซม์ ESBL มักแฝงตัวอยู่ในสารพันธุกรรมชนิดเคลื่อนที่ (Mobile genetic elements) จึงสามารถส่งถ่ายคุณสมบัติดังกล่าวระหว่างแบคทีเรียได้ (HGT) ก่อให้เกิดการแพร่กระจายสู่สิ่งแวดล้อม (Korzeniewska and Harnisz, 2013) และยังมีรายงานพบว่า การเกิด ESBL นั้น มักเกิดร่วมกับคุณสมบัติการดื้อยากลุ่มอื่น (co-resistant) เช่น Aminoglycoside และ Fluoroquinolone ดังนั้นการเกิด Multi-drug resistance จึงพบได้ทั่วไปในแบคทีเรียสายพันธุ์ที่มีการผลิตเอนไซม์ ESBL (Harwalkar et al., 2013) ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาในครั้งนี้ที่พบว่า อีโคไลที่คัดแยกจากตะกอนดินในชุมชน (B2) เป็นอีโคไลที่สามารถผลิต ESBL ได้มากกว่าอีโคไลจากจุดอื่น อีกทั้งยังพบว่าอีโคไลส่วนใหญ่ยังจัดอยู่ใน cluster ที่ 4 และ 5 ซึ่งเป็น cluster ที่พบอีโคไลมีคุณสมบัติดื้อต่อยาปฏิชีวนะหลากหลายกลุ่ม

กล่าวโดยสรุปในส่วนของข้อมูลการดื้อยาปฏิชีวนะของอีโคไล (แบคทีเรียตัวแทนในการศึกษาครั้งนี้) จากบริเวณพื้นที่เพาะปลูก และชุมชนใกล้เคียง ไม่ว่าจะเป็นผลจากการวิเคราะห์ข้อมูลในรูปของจำนวนชนิดยาที่ปรากฏการดื้อยาในอีโคไลแต่ละสายพันธุ์ (ภาพที่ 4.1), ค่า MAR index ซึ่งเป็นตัวแทนการดื้อยาของแต่ละจุดเก็บข้อมูล, การดื้อยาที่ทดสอบทั้ง 12 ชนิด ของอีโคไล (ภาพที่ 4.2), การจัดจำแนกความคล้ายคลึงของรูปแบบการดื้อยาตามลักษณะที่พบในแต่ละจุดเก็บข้อมูล (ภาพที่ 4.3) และตามลักษณะที่พบในอีโคไลแต่ละสายพันธุ์ (ตารางที่ 4.2 และภาพที่ 4.4) และการผลิตเอนไซม์ ESBL ซึ่งออกฤทธิ์ต้านประสิทธิภาพของยา beta-lactam ขั้นสูง โดยผลการศึกษาทั้งหมดแสดงให้เห็นว่า ระดับการดื้อต่อยาปฏิชีวนะในพื้นที่เพาะปลูกมีค่าต่ำกว่าบริเวณชุมชนถึงแม้ว่าค่า MAR index ซึ่งเป็นดัชนีชี้วัดระดับการดื้อยาโดยรวมจะมีค่าใกล้เคียงกัน คือมีค่าระหว่าง 0.293-0.417 และ 0.288-0.500 ตามลำดับ แต่เมื่อพิจารณาจากการจัดกลุ่มตามความคล้ายคลึงกันของอีโคไลในแต่ละจุด (Hierarchical cluster) จะพบว่าอีโคไลจากบริเวณพื้นที่เพาะปลูก (A1-A3) และบริเวณชุมชน (B2-B3) มีรูปแบบการดื้อยาที่แตกต่างกัน โดยจากแผนภูมิ Dendrogram ในภาพที่ 4.2 จะเห็นว่าลักษณะการดื้อยาของอีโคไลถูกจัดแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ๆอย่างชัดเจน และเป็นที่น่าสังเกตว่าอีโคไลจากตะกอนดินบริเวณต้นน้ำก่อนการไหลผ่านชุมชน (B1) กลับมีรูปแบบการดื้อยาใกล้เคียงกับบริเวณพื้นที่เพาะปลูก (A1-A3) มากกว่าในบริเวณชุมชน (B2-B3) ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากอาจมีการปนเปื้อนของอีโคไลจากบริเวณพื้นที่เพาะปลูกไปยังแหล่งต้นน้ำผ่านการชะหน้าดินเมื่อมีฝนตก (Parajuli et al., 2009; Santamaria and Toranzos, 2003) และรูปแบบการดื้อยาดังกล่าวเมื่อพิจารณาจากการแบ่งกลุ่มตามความคล้ายคลึงของอีโคไลแต่ละสายพันธุ์ (k-means cluster) จะพบว่าอีโคไลที่จัดอยู่ใน cluster ที่ 4 และ 5 เป็นอีโคไลที่ดื้อยาหลายกลุ่มยาโดยพบ 5 และ 6 กลุ่มยาตามลำดับ ส่วนนี้มีการกระจายตัวในตะกอนดินจากแหล่งน้ำ (B1-B3) หนาแน่นกว่าในดินเพาะปลูก (A1-A3) โดยเฉพาะในอีโคไลจากบริเวณชุมชน (B2) และบริเวณที่ลำน้ำไหลผ่านชุมชนไปแล้ว (B3) โดยพบถึง 80.0 และ 60.0% ในขณะที่พบในบริเวณดินเพาะปลูก 38.3-48.3% สาเหตุที่เป็นเช่นนี้อาจเนื่องมาจากกิจกรรมการดำเนินชีวิตของผู้คนในชุมชนมีผลต่อการพัฒนารูปแบบการดื้อยา

ปฏิชีวนะ (Unno et al., 2010; Webster et al., 2004) เฉกเช่นเดียวกันกับกิจกรรมทางการเกษตร ซึ่งมีการใช้สารเคมีต่างๆ แต่เนื่องจากการดำเนินกิจกรรมที่แตกต่างกันจึงทำให้รูปแบบการดื้อยาที่ปรากฏแตกต่างกันออกไป ซึ่งสอดคล้องกันกับผลการศึกษาการดื้อยาทั้ง 12 ชนิด ในอีโคไล (ภาพที่ 11) โดยกิจกรรมที่อาจส่งผลกระทบต่อการพัฒนาการดื้อยาในชุมชน ได้แก่ การใช้ยาปฏิชีวนะในการป้องกัน และรักษาโรค, การใช้สารจำพวก personal care products ที่มักจะมี biocides และ disinfection เป็นองค์ประกอบ โดยสารเหล่านั้นจัดเป็นสารที่มีฤทธิ์เหนี่ยวนำการดื้อยาเช่นกัน (Breazeal et al., 2013; Bouki et al., 2013; Morente et al., 2013) นอกจากนี้การที่ตะกอนดินบริเวณปลายน้ำหลังจากไหลผ่านชุมชนไปแล้ว (B3) ปรากฏรูปแบบการดื้อยาคล้ายคลึงกับบริเวณกลางชุมชน (B2) มากกว่าพื้นที่เพาะปลูก แสดงว่าอาจมีการปนเปื้อนของแบคทีเรียดื้อยา และสารเคมีต่างๆจากบริเวณชุมชน แต่เป็นที่น่าสังเกตว่าอัตราส่วนของแบคทีเรียที่มีระดับการดื้อยารุนแรง (cluster ที่ 4 และ 5) กลับลดลง ทั้งนี้อาจเกิดจากสภาวะที่ปราศจากสารเคมีในระดับที่สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการดื้อยา (Sub-lethal concentrations) ส่งผลให้เกิดเหตุการณ์ดังกล่าว (Martinez, 2009) หรือกล่าวอีกนัยหนึ่งว่าในแหล่งน้ำธรรมชาติถ้าไม่มีสิ่งรบกวนต่อการพัฒนาแบคทีเรียดื้อยา ระบบสิ่งแวดล้อมสามารถลดระดับมลพิษซึ่งเกิดจากแบคทีเรียดื้อยาได้ด้วยตนเอง

การทนทานต่อโลหะหนักของอีโคไลที่คัดแยกจากดินเพาะปลูก ตะกอนดิน และน้ำ

การศึกษาถึงการปรากฏลักษณะการดื้อต่อยาปฏิชีวนะ และการทนทานต่อโลหะหนักร่วมกันในอีโคไล ซึ่งการทดสอบนี้ได้ทำการคัดเลือกอีโคไลจำนวน 30 สายพันธุ์ จากดินเพาะปลูกบนพื้นที่สูงทั้งช่วงระหว่างการเพาะปลูก และหลังการเก็บเกี่ยว (A1 และ A2) และตะกอนดินแหล่งน้ำกลางชุมชน (B2) มาทำการหาค่าระดับความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของอีโคไล (MIC) โดยเกลือของโลหะหนักในการทดสอบประกอบไปด้วยสังกะสี, นิเกิล, แคดเมียม, ทองแดง และโครเมี่ยม ซึ่งอีโคไลที่นำมาทดสอบในที่นี้ จะคัดเลือกจากอีโคไลที่ปรากฏลักษณะการดื้อยาหลายกลุ่มร่วมกันเป็นหลัก (MAR index = 0.611-0.700) โดยผลการศึกษาแสดงดังภาพที่ 4.5 ซึ่งพบว่า อีโคไลจากดินในช่วงที่มีการเพาะปลูก (A1) มีการทนต่อโลหะหนัก แคดเมียม>สังกะสี>นิกเกิล>ทองแดง >โครเมียม ส่วนอีโคไลจากดินหลังการเพาะปลูก (A2) และตะกอนดินจากแหล่งน้ำกลางชุมชน (B2) มีรูปแบบเหมือนกัน คือ สังกะสี>แคดเมียม>นิกเกิล>ทองแดง>โครเมียม อีกทั้งยังพบว่า อีโคไลจากทั้ง 3 แหล่ง ที่คัดเลือกมีความทนทานต่อสังกะสี และแคดเมียมมากกว่าโลหะหนักชนิดอื่น โดยมีค่า MIC (Minimum inhibitory concentration) เฉลี่ยอยู่ในช่วง 1,680-2,400 และ 1,400-2,560 μg/ml ตามลำดับ ส่วนโครเมียมนั้น จัดว่ามีค่า MIC ต่ำสุด เมื่อทดสอบกับอีโคไลทั้ง 3 แหล่ง โดยมีค่าเฉลี่ยระหว่าง 117.5-705 μg/ml เมื่อพิจารณาเปรียบเทียบข้อมูล จะพบว่าอีโคไลที่คัดแยกจากพื้นที่ที่อยู่ระหว่างช่วงที่มีการเพาะปลูก (A1) มีค่า MIC เฉลี่ยของโลหะหนักทั้ง 5 ชนิด สูงที่สุด รองลงมาคือ อีโคไลจากพื้นที่เพาะปลูกหลังการเก็บเกี่ยว (A2) และบริเวณในชุมชน (B2) ตามลำดับ



ภาพที่ 4.5 แสดงข้อมูลค่าเฉลี่ยของ Minimum inhibitory concentration (MIC) ของอีโคไลเมื่อทดสอบด้วยโลหะหนักทั้ง 5 ชนิด

Seiler and Berendonk (2012) ได้ทำการรวบรวมบทความวิจัยที่ศึกษาเรื่องการทนทานต่อโลหะหนักร่วมกับการดื้อยาปฏิชีวนะ ซึ่งพบว่าปริมาณโลหะหนักที่ปนเปื้อนในบริเวณที่ศึกษามีผลต่อการเหนี่ยวนำให้เกิดปรากฏการณ์ดังกล่าว อีกทั้งรูปแบบการทนทานต่อโลหะหนักในอีโคไลที่ทดสอบยังมีค่าแตกต่างกัน ซึ่งน่าจะขึ้นกับสภาพแวดล้อมของแต่ละบริเวณเป็นหลัก โดยโลหะหนักที่ปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อมนั้นส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงประชากรแบคทีเรีย (Matyar et al., 2008) รวมทั้งมีอิทธิพลต่อกลไกการดำรงชีวิตเพื่อความอยู่รอดภายใต้สภาวะนั้นๆ ซึ่งกลไกการต่อต้านการออกฤทธิ์ของโลหะหนักต่อเซลล์ บางกลไกได้ส่งผลให้ก่อเกิดการดื้อยาปฏิชีวนะร่วมด้วย อาทิเช่น การพบยีนที่เกี่ยวข้องกับทนทานต่อโลหะหนักควบคู่กับยีนดื้อยาปฏิชีวนะในพลาสมิดเดียวกัน เป็นต้น นอกจากนี้โลหะหนักบางชนิด เช่น สังกะสี, ทองแดง และนิกเกิล ยังจัดเป็นแร่ธาตุ (Micro nutrient) ที่จำเป็นสำหรับการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย โดยมีบทบาทต่อการทำงานของเอนไซม์ต่างๆ แต่ถ้ามีปริมาณสูงจะเป็นพิษต่อเซลล์

จากผลการศึกษาในที่นี้ได้มีการวิเคราะห์ข้อมูลเพื่อหาความสัมพันธ์ระหว่างการเกิดปรากฏการดื้อยาปฏิชีวนะทั้ง 12 ชนิด และความทนทานต่อโลหะหนักทั้ง 5 ชนิดร่วมกัน โดยใช้สมการเส้นตรงประเมินระดับการดื้อยาโดยเฉลี่ย (%R) และค่าเฉลี่ย MIC ของอีโคไลทั้ง 30 สายพันธุ์ที่ทำการทดสอบ (คิดเป็นการหาความสัมพันธ์จำนวน 60 กรณี) กรณีที่ค่า R2 มีค่ามากกว่า 0.500 ในที่นี้จะถือว่าชุดข้อมูลดังกล่าวมีความสัมพันธ์กัน ซึ่งผลการศึกษาพบว่า ค่า MIC ของสังกะสีที่เพิ่มขึ้นมีความสัมพันธ์ต่อการเพิ่มระดับการดื้อยาชนิด Tetracycline (TC, R^2=0.643), Sulfamethoxazole (ST, R^2=0.955), และ Trimethoprim (TMP, R^2=0.955) และค่า MIC ของโลหะหนักชนิดอื่นที่เหลือยังมีความสัมพันธ์เชิงบวกกับการดื้อยา Caftazidime (CAZ) (R^2=0.723-0.974) ซึ่งผลดังกล่าวสอดคล้องกับงานวิจัยของ Matyar et al. (2008) ที่พบว่าแบคทีเรียที่ทนทานต่อโลหะหนักจะมีการดื้อยา trimethoprim-sulfamethoxazole สูง ส่วนงานวิจัยของ Ji et al. (2012) ยังพบว่ายีน sulA และ sulIII ซึ่งเป็นยีนที่ควบคุมกลไกการดื้อยากลุ่ม Sulfonamide ยังมีความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญ

กับปริมาณการพบทองแดงและสังกะสี กล่าวโดยสรุปสำหรับการศึกษาในส่วนนี้ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียที่คัดเลือกมีความทนทานต่อโลหะหนักในระดับสูง และมีความสัมพันธ์กับการเหนี่ยวนำให้เกิดการดื้อยาปฏิชีวนะบางกลุ่ม ซึ่งอาจเป็นผลสืบเนื่องมาจากการใช้สารเคมีในการทำการเกษตรติดต่อกันเป็นเวลานานซึ่งสอดคล้องกับการทนทานต่อโลหะหนัก (MIC) ในอีโคไลที่คัดแยกจากดินในช่วงระหว่างทำการเพาะปลูก (A1) มีค่าสูงกว่าแหล่งอื่น แต่เป็นที่น่าสังเกตว่าระดับค่า MIC ของอีโคไลจากดินหลังการเพาะปลูกมีค่าลดต่ำลง แสดงให้เห็นว่า ถ้าลดปริมาณการใช้สารเคมีสำหรับการเพาะปลูกลง ซึ่งหมายความว่าไม่มีสารเหนี่ยวนำซึ่งก่อให้เกิดการทนทานต่อโลหะหนัก และการปรากฏลักษณะการดื้อยาร่วมด้วย อาจช่วยส่งเสริมให้แบคทีเรียในพื้นที่เพาะปลูกสามารถปรับเปลี่ยนรูปแบบการดำรงชีวิตจนกระทั่งกลายเป็นแบคทีเรียที่ไม่มีคุณสมบัติสร้างระดับมลพิษใดๆ (virulence factors) ต่อสิ่งแวดล้อมก็เป็นไปได้

การกระจายตัวของแบคทีเรียดื้อยาในสิ่งแวดล้อมบริเวณใกล้เคียง

จากข้อมูลในส่วนของการดื้อยาปฏิชีวนะของอีโคไล (ส่วนที่ 1) และข้อมูลการปรากฏลักษณะความทนทานต่อโลหะหนักร่วมด้วย (ส่วนที่ 2) ในที่นี้จะมีการวิเคราะห์ข้อมูลในภาพรวมเพื่อประเมินสถานการณ์การดื้อยาจากแหล่งกำเนิดประเภทพื้นที่เพาะปลูกที่มีการใช้สารเคมีติดต่อกันเป็นเวลานาน ซึ่งผลจากการศึกษาสามารถคาดการณ์คร่าวๆตามสมมุติฐานที่ตั้งไว้ได้ดังนี้

1) แบคทีเรียในดินเพาะปลูกที่ทำการคัดเลือก (อีโคไล) มาทดสอบมีความต้านทานต่อโลหะหนัก ซึ่งในการศึกษานี้มีความต้านทานต่อสังกะสี (2,240-2,400 μg/ml) และแคดเมียม (1,680-2,560 μg/ml) สูงกว่าโลหะหนักประเภทอื่น (117.5-1,560 μg/ml) และยังพบอีกว่าค่า MIC ของโลหะหนักมีความสัมพันธ์กับการดื้อยาบางกลุ่ม เช่น Tetracycline, Folate pathway inhibitors, และ Cephem

2) สามารถพบแบคทีเรียก่อโรค (ซึ่งในที่นี้ใช้อีโคไลเป็นดัชนีชี้วัด) ที่มีคุณสมบัติดื้อต่อยาปฏิชีวนะในดินที่ทำการเพาะปลูก โดยมีรูปแบบการดื้อยาที่หลากหลาย ทั้งชนิดที่มีคุณสมบัติดื้อยาเพียงชนิดเดียว และชนิดที่เป็น Multi-drug resistance bacteria

3) มีโอกาสที่แบคทีเรียดื้อยาปฏิชีวนะจากบริเวณที่ทำการเพาะปลูกจะแพร่กระจาย ไปยังบริเวณใกล้เคียง ซึ่งสอดคล้องกับผลการประเมินข้อมูลผ่านการจัดกลุ่มตามความคล้ายคลึงของลักษณะการดื้อยาที่ปรากฏ (Hierarchical และ k-means cluster) โดยอีโคไลจากตะกอนดินบริเวณต้นน้ำ (B1) มีลักษณะการดื้อยาคล้ายคลึงกับบริเวณพื้นที่เพาะปลูก แต่เมื่อพิจารณาจากอีโคไลในตะกอนดินบริเวณชุมชน (B2) และบริเวณที่ไหลผ่านชุมชนไปแล้ว (B3) จะพบรูปแบบแบบการดื้อยาที่แตกต่างกันไป ซึ่งแสดงให้เห็นว่ากิจกรรมการดำเนินชีวิตของผู้คนในชุมชนส่งผลต่อปรากฏการณ์ดังกล่าว

กล่าวโดยสรุป คือการใช้สารเคมีทางการเกษตรติดต่อกันเป็นระยะเวลานาน ส่งผลให้แบคทีเรียมีความทนทานต่อโลหะหนัก และมีคุณสมบัติการดื้อต่อยาปฏิชีวนะร่วมด้วย โดยแบคทีเรีย

ดังกล่าวสามารถปนเปื้อนสู่สิ่งแวดล้อมผ่านการชะหน้าดินโดยน้ำ นอกจากนี้ถ้ามีการใช้สารเคมีทางการเกษตรลดลง จะส่งผลให้ระดับความรุนแรงของการทนทานต่อโลหะหนักลดลง (ค่า MIC ลดลง) ดังเช่นผลการศึกษาที่พบในดินหลังผ่านการเพาะปลูก และการศึกษานี้ยังพบว่า รูปแบบการดื้อยาที่ปรากฏในพื้นที่เพาะปลูก (A1-A3) ตะกอนดินบริเวณต้นน้ำ (B1) นั้น มีระดับความรุนแรงต่ำกว่าการดื้อยาของแบคทีเรียที่ปนเปื้อนจากกิจกรรมต่างๆในชุมชน (B2) อีกทั้งอีโคไลจากตะกอนดินในลำน้ำหลังจากไหลผ่านชุมชนไป (B3) ยังพบรูปแบบการดื้อยาใกล้เคียงกับในชุมชน เพียงแต่ลดระดับความรุนแรงลง ซึ่งน่าจะเกี่ยวข้องกับการไม่พบสารเหนี่ยวนำการดื้อยา และการปรับสมดุลของระบบสิ่งแวดล้อมในธรรมชาติก็เป็นไปได้