



รายงานการวิจัย
เรื่อง

ผลกระทบจากการใช้สารเคมีทางการเกษตรที่มีต่อการดื้อยาปฏิชีวนะของ
แบคทีเรียในดินเพาะปลูก และในพื้นที่ชุมชนชาวกระเหรี่ยง หมู่บ้านตะเพินคี
จังหวัดสุพรรณบุรี

The Effects of Pesticide Usage on the Prevalence of Antibiotic
Resistance in Bacteria from Agriculture soil and Karen
Community in Ta Phoen Khi Village, Suphan Buri Province.

นางสาวสิมณัส ตรีเดช
นางสาวเพียงกมล ยุวนานนท์
นางสาวจุฑารัตน์ ศรีชูเปี่ยม

มหาวิทยาลัยสวนดุสิต
2558
ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยสวนดุสิต



รายงานการวิจัย
เรื่อง

ผลกระทบจากการใช้สารเคมีทางการเกษตรที่มีต่อการดื้อยาปฏิชีวนะของ
แบคทีเรียในดินเพาะปลูก และในพื้นที่ชุมชนชาวกระเหรี่ยง หมู่บ้านตะเพินคี
จังหวัดสุพรรณบุรี

The Effects of Pesticide Usage on the Prevalence of Antibiotic
Resistance in Bacteria from Agriculture soil and Karen
Community in Ta Phoen Khi Village, Suphan Buri Province.

นางสาวสิมนัส ตรีเดช
นางสาวเพียงกมล ยუნานนท์
นางสาวจุฑารัตน์ ศรีชูเปี่ยม
(ศูนย์สิ่งแวดล้อม คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี
มหาวิทยาลัยสวนดุสิต)

มหาวิทยาลัยสวนดุสิต

2558

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยสวนดุสิต

(งานวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนจากงบประมาณแผ่นดินด้านการวิจัย ปีงบประมาณ 2557)

หัวข้อวิจัย	ผลกระทบจากการใช้สารเคมีทางการเกษตรที่มีต่อการดื้อยาปฏิชีวนะของแบคทีเรียในดินเพาะปลูก และในพื้นที่ชุมชนชาวกระเหรี่ยง หมู่บ้านตะเพินคี จังหวัดสุพรรณบุรี	
ผู้ดำเนินการวิจัย	1. นางสาวสิมน์ส ตรีเดช	หัวหน้าโครงการวิจัย
	2. นางสาวเพียงกมล ยูนานนท์	ผู้ร่วมวิจัย
	3. นางสาวจุฑารัตน์ ศรีชูเปี่ยม	ผู้ร่วมวิจัย
ที่ปรึกษา	รศ.ดร.วิไล เจียมไชยศรี	
หน่วยงาน	ศูนย์สิ่งแวดล้อม คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยสวนดุสิต	
ปี พ.ศ.	2558	

การศึกษาข้อมูลในครั้งนี้เป็นการศึกษาเกี่ยวกับผลของการใช้สารเคมีทางการเกษตรติดต่อกันเป็นระยะเวลานาน ที่มีต่อแบคทีเรียก่อโรคในบริเวณพื้นที่เพาะปลูก และบริเวณชุมชนที่อาศัยอยู่ใกล้เคียง โดยจะเป็นการศึกษาคุณสมบัติการดื้อยาปฏิชีวนะควบคู่กับการทนทานต่อโลหะหนัก ซึ่งชุมชนที่ทำการศึกษาข้อมูลนั้น มีภูมิประเทศตั้งอยู่บนพื้นที่สูง และอยู่ใกล้เคียงกับอุทยานแห่งชาติ ทำการประกอบอาชีพทางการเกษตรโดยการปลูกพืชไร่เป็นหลัก มีการใช้สารเคมีทางการเกษตรติดต่อกันเป็นระยะเวลานาน ในที่นี้ทำการศึกษาโดยการคัดแยกอีโคไลจำนวน 260 สายพันธุ์จากดินเพาะปลูก ตะกอนดินแหล่งน้ำ และน้ำ เบื้องต้นผลการทดสอบความไวต่อยาจำนวน 12 ชนิด พบว่าอีโคไลส่วนใหญ่จัดเป็นอีโคไลที่มีคุณสมบัติดื้อยาปฏิชีวนะ (80.0-100.0%) เมื่อพิจารณาจากค่า MAR index ซึ่งบ่งบอกถึงการดื้อยาปฏิชีวนะหลายชนิด พบว่าอีโคไลในดินเพาะปลูกหลังการเก็บเกี่ยวมีค่าสูงกว่าอีโคไลในดินระหว่างช่วงการเพาะปลูก โดยมีค่า 0.414-0.417 และ 0.293 ตามลำดับ ส่วนอีโคไลจากบริเวณชุมชนที่ศึกษา (ตะกอนดินแหล่งน้ำ) พบว่ามีระดับการดื้อยาที่รุนแรงกว่าอีโคไลจากพื้นที่เพาะปลูก โดยอีโคไลบริเวณตะกอนดินกลางชุมชนมีระดับการดื้อยาสูงสุดเมื่อเทียบกับจุดอื่น (MAR index = 0.500) เมื่อพิจารณาการดื้อยาปฏิชีวนะในแต่ละชนิด พบว่า อีโคไลที่ทดสอบมีการดื้อยาในกลุ่ม Beta-lactam เช่น Cephem, Penicillin และ Beta-lactamase inhibitor combination ในระดับที่สูง โดยพบอยู่ในช่วง 60.0-85.0%, 66.7-95.0% และ 25.0-70.0% ตามลำดับ แต่อย่างไรก็ตาม การดื้อยาของอีโคไลในกลุ่ม Phenicol มีระดับต่ำเมื่อเปรียบเทียบกับยาในกลุ่มอื่น (5.0-26.7%) นอกจากนี้ยังมีการศึกษาความคล้ายคลึงของข้อมูลการดื้อยาปฏิชีวนะผ่านการจัดกลุ่มด้วยวิธี Hierarchical cluster ซึ่งสามารถแบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่ โดย cluster ที่ 1 คืออีโคไลที่คัดแยกจากพื้นที่เพาะปลูกทั้งหมดมีลักษณะการดื้อยาปฏิชีวนะใกล้เคียงกันมาก และนอกจากนี้ยังมีลักษณะใกล้เคียงกันกับอีโคไลสายพันธุ์ที่พบจากตะกอนดินบริเวณต้นน้ำ แต่ไม่ได้มีความใกล้เคียงกันมากเท่ากับดินเพาะปลูกทั้ง 3 จุด และ cluster ที่ 2 คืออีโคไลจากตะกอนดินแหล่งน้ำบริเวณกลางชุมชน และบริเวณที่น้ำไหลผ่านชุมชนออกไป ทั้งนี้เนื่องจากการดำเนินกิจกรรมที่แตกต่างกันส่งผลให้รูปแบบการดื้อยาปฏิชีวนะที่ปรากฏแตกต่างกันออกไป อาทิเช่น กิจกรรมทางการเกษตรซึ่งมีการใช้สารเคมีต่างๆ และกิจกรรมการดำเนินชีวิตของผู้คนในชุมชน สำหรับผลการทดสอบความทนทานต่อโลหะหนักในอีโคไล โดยการหาค่า MIC (Minimum inhibitory

concentration) กับโลหะหนักชนิดสังกะสี นิเกิล แคดเมียม ทองแดง และโครเมียม พบว่าอีโคไลที่คัดแยกจากพื้นที่ที่อยู่ระหว่างช่วงที่มีการเพาะปลูกมีค่า MIC ของโลหะหนักทั้ง 5 ชนิด สูงที่สุด (705-2,560 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) รองลงมาคือ อีโคไลจากพื้นที่เพาะปลูกภายหลังการเก็บเกี่ยว (117.5-2,240 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) และบริเวณในชุมชน (427.5-1,680 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าอีโคไลพบตามพื้นที่เพาะปลูก และตะกอนดินในแหล่งน้ำบริเวณใกล้เคียงมีคุณสมบัติการดื้อยาปฏิชีวนะร่วมกับความทนทานต่อโลหะหนักเกิดขึ้น โดยโลหะหนักที่ทำการทดสอบนั้นจัดเป็นตัวแทนสารเคมีที่น่าจะเกิดการสะสมตามบริเวณที่ทำการทดสอบ แต่เมื่อมีการพักดินที่ทำการเพาะปลูกไว้ (หมายถึงไม่มีการสัมผัสสารเคมีในช่วงระยะเวลาหนึ่ง) พบว่าคุณสมบัติความทนทานต่อโลหะหนักนั้นลดลง และยังพบอีกว่าโลหะหนักมีอิทธิพลในการเหนี่ยวนำให้ระดับการดื้อยาปฏิชีวนะเพิ่มสูงขึ้น อาทิเช่น ค่า MIC ของสังกะสีที่เพิ่มขึ้นมีความสัมพันธ์ต่อการเพิ่มระดับการดื้อยาปฏิชีวนะชนิด Tetracycline ($R^2=0.643$), Sulfa- methoxazole ($R^2=0.955$), และ Trimethoprim ($R^2=0.955$) และค่า MIC ของโลหะหนักชนิดอื่น (นิเกิล แคดเมียม ทองแดง และโครเมียม) ยังมีความสัมพันธ์เชิงบวกกับการดื้อยาปฏิชีวนะชนิด Caftazidime (CAZ) ($R^2=0.723-0.974$)

Research Title	The Effects of Pesticide Usage on the Prevalence of Antibiotic Resistance in Bacteria from Agriculture soil and Karen Community in Ta Phoen Khi Village, Suphan Buri Province.
Researcher	Miss Simanata Threedeach Miss Jutharat Srichoopium Miss Piangkamon Yuvananont
Research Consultants	Assoc.Prof.Wilai Chiemchaisri
Organization	The Environmental Center, Faculty of Science and Technology Suan Dusit University
Year	2015

This study was focused on the impact of long-term chemicals using in agriculture soils on the pathogenic bacteria that isolated from cultivated and community areas. Thus, antibiotic resistant and heavy metal tolerance *Escherichia coli* were observed. The study community was located on the hill and near the natural park. Almost of people carry on an occupation as agriculturist, which was long-term chemical used. The 260 *E. coli* strains were isolated from agriculture and water/sediments of small stream near the community. Antibiotic susceptibility testing on 12 antibiotic agents found that most of *E. coli* was classified as antibiotic resistant strains (80.0-100.0%). Consideration on MAR index, referred to multi-drug resistance bacteria, showed that MAR index of *E. coli* from agriculture soils after harvest period was higher than during crop production, with the values 0.414-0.417, and 0.293, respectively. However, MAR index of *E. coli* from water/ sediments in community had higher than the others. By *E. coli* at central of community area had the highest of multi-drug resistance strains (MAR index = 0.500). Focused on *E. coli* susceptible to each antibiotic agent it was found high proportion of beta-lactam resistant strains for instance 60.0-85.0% of cephem, 66.7-95.0% of penicillin, and 25.0-70.0% of beta-lactamase inhibitor combination. Conversely, the lowest of phenicol resistant *E. coli* was occurred (5.0-26.7%). Likewise, similarity of antibiotic resistance expression was determined by Hierarchical cluster and categorized into 2 clusters. Cluster 1 consisted of *E. coli* from agriculture soils and upstream sediment, all agriculture soil samples had similar expressed to antibiotic resistance than the others. Cluster 2 included *E. coli* from sediments of central of community area and downstream. The obtained data indicated that anthropogenic activities such as crop production and people in rural community had affected on antibiotic resistance bacteria. Moreover,

heavy metal tolerance *E. coli* was determined by MIC (Minimum inhibitory concentration) method based on zinc, nickel, cadmium, copper, and chromium. The results found that *E. coli* isolated from agriculture soils during crop production had the highest of MIC values of 5 heavy metals (705-2,560 micrograms/milliliter), followed by agriculture soils after harvest (117.5-2,240 micrograms/milliliter), and sediments of community area (427.5-1,680 micrograms/milliliter). It suggested that co-selection process of antibiotic resistant and heavy metal tolerance were occurred in agriculture soils and sediments. All heavy metals were represented the chemical substances that accumulated from the study sites. However, fallow period (not contact to chemical substances) had influence to reduced heavy metal properties in *E. coli*. In addition, heavy metal had the impact to induce antibiotic resistant *E. coli*. For instance, high level of MIC of zinc correlated to the increasing of tetracycline ($R^2=0.643$), sulfa-methoxazole ($R^2=0.955$), and trimethoprim ($R^2=0.955$) resistant *E. coli*. MIC of nickel, cadmium, copper, and chromium also had positive relationship to caftazidime ($R^2=0.723-0.974$) resistant *E. coli*.

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัย เรื่องการศึกษาผลกระทบจากการใช้สารเคมีทางการเกษตรที่มีต่อการดื้อยาปฏิชีวนะของ แบคทีเรียในดินเพาะปลูก และในพื้นที่ชุมชนชาวกระเหรี่ยง หมู่บ้านตะเพินคี จังหวัดสุพรรณบุรี สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี ด้วยความร่วมมือจากหลายฝ่าย คณะผู้วิจัยขอขอบพระคุณ คุณปราโมท จงกลวานิชสุข หัวหน้าอุทยานแห่งชาติพุเตย คุณปรรัตน์ พงษ์พิชัยณรงค์ เจ้าหน้าที่ประชาสัมพันธ์และเผยแพร่ประจำอุทยานแห่งชาติพุเตย และเจ้าหน้าที่อุทยานแห่งชาติพุเตยทุกท่าน ที่ให้ความร่วมมือในการเก็บข้อมูล และอำนวยความสะดวกจนทำให้งานวิจัยนี้สำเร็จ คณะผู้วิจัยขอขอบพระคุณเป็นอย่างสูงมา ณ โอกาสนี้

คณะผู้วิจัยขอขอบพระคุณ สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.) และมหาวิทยาลัยสวนดุสิต ที่ให้ทุนอุดหนุนการดำเนินการวิจัยในครั้งนี้ ขอขอบคุณศูนย์สิ่งแวดล้อมที่เอื้อเพื่อสถานที่อุปกรณ์ และเครื่องมือในการศึกษาวิจัย

คณะผู้วิจัยหวังเป็นอย่างยิ่งว่างานวิจัย เรื่องการศึกษาผลกระทบจากการใช้สารเคมีทางการเกษตรที่มีต่อการดื้อยาปฏิชีวนะของ แบคทีเรียในดินเพาะปลูก และในพื้นที่ชุมชนชาวกระเหรี่ยง หมู่บ้านตะเพินคี จังหวัดสุพรรณบุรี คงเป็นประโยชน์สำหรับอุทยานแห่งชาติพุเตย ชุมชนหมู่บ้านตะเพินคี และหน่วยงานที่เกี่ยวข้อง หากงานวิจัยนี้มีสิ่งใดขาดตกบกพร่องหรือผิดพลาดประการใด ก็ขออภัยมา ณ ที่นี้ด้วย

คณะผู้วิจัย

2558

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ค
กิตติกรรมประกาศ	จ
สารบัญ	ฉ
สารบัญตาราง	ช
สารบัญภาพ	ฌ
บทที่ 1 บทนำ	1
ความเป็นมาและความสำคัญ	1
วัตถุประสงค์ของการวิจัย	3
ขอบเขตการวิจัย	3
สมมติฐานการวิจัย	4
คำจำกัดความที่ใช้ในงานวิจัย	4
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	5
บทที่ 2 แนวคิด ทฤษฎี เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	6
สารเคมีกำจัดศัตรูพืช	6
โลหะในดิน และความสัมพันธ์กับจุลินทรีย์	6
จุลินทรีย์ในดิน	8
ยาปฏิชีวนะ	10
แบคทีเรียตัวยา	14
คุณสมบัติของเอนไซม์ Extended beta-lactamase (ESBL)	18
ข้อมูลทั่วไปของพื้นที่ที่ศึกษา	20
การศึกษาวิจัยที่เกี่ยวข้อง	23
กรอบแนวคิดในการวิจัย	25
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย	26
วิธีการศึกษา	26
ส่วนที่ 1: การศึกษาข้อมูลของแบคทีเรียก่อโรคที่พบในดินเพาะปลูก และบริเวณชุมชนที่อยู่ใกล้เคียง รวมทั้งคุณสมบัติการตัวยาปฏิชีวนะ ของแบคทีเรีย	26
การเก็บข้อมูลสำหรับการศึกษา	26
การวิเคราะห์คุณสมบัติทางด้านเคมี และชีวภาพจากตัวอย่างดิน	27

บทที่ 3	วิธีดำเนินการวิจัย (ต่อ)	
	การทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะ (Antibiotic susceptibility testing)	28
	การทดสอบการผลิตเอนไซม์เบต้าแลคตาเมสชนิด Extended spectrum beta-lactamase (ESBL) ในอีโคไลที่คัดแยก	31
	ส่วนที่ 2 การศึกษาถึงการปรากฏลักษณะการดื้อต่อยาปฏิชีวนะและการทนทานต่อโลหะหนักร่วมกันในแบคทีเรียก่อโรคที่คัดแยกจากดินเพาะปลูก และชุมชนบริเวณใกล้เคียง	31
	ส่วนที่ 3 ศึกษาการกระจายตัวของเชื้อแบคทีเรียดื้อยาในสิ่งแวดล้อมบริเวณใกล้เคียง	32
	สถานที่ทำการทดลอง/เก็บข้อมูล	33
บทที่ 4	ผลการวิจัย	34
	ลักษณะของดินบริเวณพื้นที่เพาะปลูก ตะกอนดิน และน้ำในลำธาร	34
	การดื้อยาของอีโคไลที่คัดแยกจากดินเพาะปลูก ตะกอนดิน และน้ำ	36
	การทนทานต่อโลหะหนักของอีโคไลที่คัดแยกจากดินเพาะปลูก ตะกอนดิน และน้ำ	43
	การกระจายตัวของแบคทีเรียดื้อยาในสิ่งแวดล้อมบริเวณใกล้เคียง	45
บทที่ 5	สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ	47
	สรุปผลการวิจัย	47
	อภิปรายผล	48
	ข้อเสนอแนะในการนำผลการวิจัยไปใช้	48
	ข้อเสนอแนะในการทำวิจัยครั้งต่อไป	49
บรรณานุกรม		50
	บรรณานุกรมภาษาไทย	50
	บรรณานุกรมภาษาต่างประเทศ	51
ภาคผนวก		56
	ภาคผนวก ก ภาพการเก็บตัวอย่าง	57
	ภาคผนวก ข เอกสารเผยแพร่ความรู้	61
ประวัติผู้วิจัย		64

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
2.1	แสดงคุณสมบัติของเอนไซม์ ESBL และ AmpC beta-lactamase	19
3.1	แสดงรายละเอียดของยาปฏิชีวนะที่ใช้ในการทดสอบความไวต่อยาของอีโคไล	30
4.1	แสดงลักษณะทางเคมีของตัวอย่างดินบริเวณพื้นที่เพาะปลูก ตะกอนดิน และน้ำในลำธาร	35
4.2	แสดงข้อมูลค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางของ Clear zone รอบแผ่นยาทั้ง 12 ชนิด หลังจากการแบ่งกลุ่มด้วยวิธี k-means cluster	40

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
2.1	แสดงการออกฤทธิ์ของยาปฏิชีวนะประเภทต่างๆต่อเซลล์แบคทีเรีย	13
2.2	แสดงกลไกการยับยั้งตัวยาปฏิชีวนะมาจากแบคทีเรียชนิดอื่น	15
2.3	แสดงโครงสร้างหลักของยากลุ่ม beta-lactam ซึ่งประกอบไปด้วยวงแหวน beta-lactam	19
2.4	แสดงลักษณะพื้นที่ที่ทำการศึกษา	21
2.5	แสดงแผนที่อุทยานแห่งชาติพุเตย จังหวัดสุพรรณบุรี	22
2.6	แสดงกรอบแนวคิดของโครงการวิจัย	25
3.1	แสดงรายละเอียดการเก็บข้อมูล และการทดสอบสำหรับการศึกษาใน ส่วนที่ 1	27
3.2	แสดงชุดการทดสอบหาค่า Minimum inhibitory concentration (MIC)	32
4.1	แสดงจำนวนยาปฏิชีวนะที่ทดสอบแล้วปรากฏรูปแบบการตัวยาในอีโคไลแต่ละสายพันธุ์ โดยแยกผลการทดสอบตามจุดเก็บข้อมูล (A1: ระหว่างทำการเพาะปลูก+พื้นที่สูง, A2: หลังผ่านการเพาะปลูก+พื้นที่สูง, A3: หลังผ่านการเพาะปลูก+ใกล้ชุมชน, B1: ตะกอนดินในลำธาร+ต้นน้ำก่อนผ่านชุมชน, B2: ตะกอนดินในลำธาร+กลางชุมชน, B3: ตะกอนดินในลำธาร+ปลายน้ำหลังผ่านชุมชน, B4: น้ำในลำธาร+กลางชุมชน)	37
4.2	แสดงข้อมูลการตัวยาปฏิชีวนะทั้ง 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)	38
4.3	แผนภูมิ Dendrogram แสดงการแบ่งกลุ่มอีโคไลจากแต่ละบริเวณที่ทำการเก็บข้อมูล ด้วยวิธีการ Hierarchical cluster (A1: ระหว่างทำการเพาะปลูก+พื้นที่สูง, A2: หลังผ่านการเพาะปลูก+พื้นที่สูง, A3: หลังผ่านการเพาะปลูก+ใกล้ชุมชน, B1: ตะกอนดินในลำธาร+ต้นน้ำก่อนผ่านชุมชน, B2: ตะกอนดินในลำธาร+กลางชุมชน, B3: ตะกอนดินในลำธาร+ปลายน้ำหลังผ่านชุมชน)	39
4.4	แสดงข้อมูลการกระจายตัวของอีโคไลจากแต่ละจุดเก็บข้อมูล หลังจากการแบ่ง cluster ด้วยวิธี k-means	41
4.5	แสดงข้อมูลค่าเฉลี่ยของ Minimum inhibitory concentration (MIC) ของอีโคไลเมื่อทดสอบด้วยโลหะหนักทั้ง 5 ชนิด	44

บทที่ 1

บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญ

ประเทศไทยเป็นประเทศเกษตรกรรมและเป็นประเทศหนึ่งในหลายๆประเทศที่กำลังพัฒนา ซึ่งประสบกับปัญหาเกี่ยวกับอันตรายจากการใช้สารเคมีในการกำจัดศัตรูพืช เนื่องจากยังไม่มีความรู้ที่เพียงพอในการใช้ ก่อให้เกิดการใช้ในปริมาณที่เกินจำเป็น หรือใช้อย่างไม่เหมาะสม รวมทั้งไม่มีการป้องกันตนเอง ซึ่งนอกจากจะก่อให้เกิดอันตรายโดยตรงต่อตนเองแล้ว ยังก่อให้เกิดอันตรายแก่ผู้บริโภคทางอ้อม เช่น การบริโภคผลผลิตที่ยังมีสารเคมีตกค้างอยู่ เกิดการสะสมของสารพิษในร่างกายก่อให้เกิดอันตรายได้ เป็นต้น นอกจากนี้สารเคมีกำจัดศัตรูพืชส่วนใหญ่มีก่อกำเนิดความเป็นพิษตกค้างในสิ่งแวดล้อมเป็นเวลานาน บางชนิดใช้เวลาเป็นปีเนื่องจากสลายตัวได้ยาก เมื่อพิจารณาในแง่ของปัญหาต่อสุขภาพ จะเป็นที่น่าวิตกที่ทราบกันดีอยู่แล้วว่าก่อให้เกิดโรคต่างๆทั้งชนิดเฉียบพลัน เนื่องจากได้รับสารเคมีเกินปริมาณที่ร่างกายจะรับได้ หรือก่อให้เกิดโรคชนิดเรื้อรัง ซึ่งเกิดจากการได้รับสารเคมีสะสมเป็นระยะเวลานาน นอกจากการก่อเกิดปัญหาดังกล่าวมาข้างต้นแล้ว สารเคมีกำจัดศัตรูพืชยังมีผลต่อการอยู่รอดของแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ในดินที่ทำการเพาะปลูก ซึ่งจะก่อให้เกิดการคัดเลือกสายพันธุ์ของแบคทีเรียขึ้น โดยจะมีการพัฒนาและปรับตัวให้เหมาะสมเพื่อความอยู่รอดภายใต้สภาวะที่มีการปรากฏของสารเคมีเหล่านั้น ก่อให้เกิดการเปลี่ยนกลุ่มประชากรของเชื้อแบคทีเรียที่มีอยู่ตามธรรมชาติ ก่อให้เกิดสายพันธุ์ใหม่ที่มีความทนทานต่อสภาวะกดดันมากยิ่งขึ้น สิ่งนี้ถือเป็นปัญหาหนึ่งที่มีความสำคัญ เนื่องจากแบคทีเรียในดิน มีบทบาทสำคัญก่อให้เกิดการหมุนเวียนวัฏจักรของสาร เช่น คาร์บอน ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส กำมะถัน ออกซิเจน และแคลเซียม (วีรานุช, 2554) ก่อให้เกิดความหลากหลายในระบบนิเวศ ซึ่งเป็นการพัฒนาอย่างยั่งยืน (Habi and Daba, 2009; Bahig et al., 2008)

โดยทั่วไปแบคทีเรียที่มีความทนทานต่อสภาวะต่างๆ เช่น อุณหภูมิสูง สภาวะกรด-ด่าง และสารเคมีที่เป็นพิษต่อเซลล์ มักจะมีหลากหลายกระบวนการเมตาโบลิซึม เพื่อช่วยให้เซลล์อยู่รอด (Bahig et al., 2008) และในแบคทีเรียเหล่านั้นมักจะพบพลาสมิด (Plasmid) ซึ่งมีส่วนใหญ่ที่ควบคุมกระบวนการเหล่านั้นมักจะพบที่พลาสมิด และไม่ค่อยมีความสัมพันธ์กับยีนที่จำเป็นต่อการถ่ายทอดลักษณะทางพันธุกรรมไปสู่รุ่นถัดไป ซึ่งจะพบอยู่ที่โครโมโซม (chromosome) ซึ่งโดยทั่วไปแล้วพื้นที่ที่ทำการเพาะปลูกที่มีการใช้สารเคมีในการกำจัดศัตรูพืชรวมถึงปุ๋ยเคมีติดต่อกันเป็นเวลานาน จะทำให้ความหลากหลายของเชื้อแบคทีเรียในดินเกิดการเปลี่ยนแปลงไป ซึ่งส่งผลกระทบต่อความอุดมสมบูรณ์ของดิน โดยในดินจะมีการสะสมของสารเคมีดังกล่าว รวมถึงโลหะหนักซึ่งอาจปนเปื้อนมาจากการใช้สารเคมี หรืออาจมีอยู่ตามธรรมชาติในดิน สิ่งเหล่านี้นอกจากจะส่งผลกระทบต่อกลุ่มประชากรเชื้อแบคทีเรียในดินแล้ว ยังส่งผลให้เชื้อแบคทีเรียพัฒนาสายพันธุ์ตนเองให้มีความทนทานต่อทั้งสารเคมีกำจัดศัตรูพืช และโลหะหนัก โดยมียีนที่พลาสมิดทำหน้าที่ควบคุมลักษณะดังกล่าว ซึ่งการทนทานต่อสารเคมีกำจัดศัตรูพืช และโลหะหนักนั้นสามารถถ่ายทอดผ่านยีนจากเชื้อแบคทีเรียที่ทนทานไปสู่เชื้อแบคทีเรียที่ไม่ทนทานได้ หรือถ่ายทอดยีนจากเชื้อแบคทีเรียทั่วไปในสิ่งแวดล้อมไปสู่เชื้อแบคทีเรียก่อโรค รวมถึงอาจ

เกิดการถ่ายทอดยีนระหว่างแบคทีเรียที่ทนทานด้วยกัน ก่อให้เกิดแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติทนทานต่อสิ่งต่างๆหลายชนิดมากยิ่งขึ้น ซึ่งกระบวนการเหล่านี้เกิดขึ้นได้โดยไม่ต้องใช้การสืบพันธุ์ แต่ส่วนใหญ่ในสิ่งแวดล้อมจะเกิดผ่านกระบวนการที่เรียกว่าการถ่ายทอดยีนในแนวนราบ (Horizontal gene transfer, HGT) ซึ่งทำให้เชื้อแบคทีเรียสามารถถ่ายทอดยีนข้ามสายพันธุ์กันได้ (Kelly et al., 2009) โดยถือเป็นกลไกสำคัญที่ทำให้เชื้อแบคทีเรียมีวิวัฒนาการอย่างรวดเร็ว และมีการแพร่กระจายยีนเหล่านี้ไปสู่ประชากรเชื้อแบคทีเรียในสิ่งแวดล้อมแหล่งต่างๆ

นอกจากนี้เมื่อพิจารณาในส่วนของยาปฏิชีวนะ ซึ่งในปัจจุบันจัดเป็นยาที่มีการใช้กันอย่างกว้างทั้งการรักษาโรคติดเชื้อในคน และสัตว์ รวมถึงใช้ในสัตว์เพื่อส่งเสริมการเจริญเติบโต (Hirsch et al., 1999) แต่เนื่องจากการใช้ยากันอย่างไม่สมเหตุสมผล และใช้กันอย่างเกินจำเป็น จึงก่อให้เกิดปัญหาเชื้อดื้อยาปฏิชีวนะขึ้นโดยเฉพาะอย่างยิ่งในเชื้อแบคทีเรีย ซึ่ง ณ ปัจจุบันถือเป็นโรคอุบัติใหม่ และจัดเป็นปัญหาใหญ่ในระดับนานาชาติ ส่งผลกระทบต่อสุขภาพ และเศรษฐกิจตามมา โดยนอกจากจะพบการดื้อยาปฏิชีวนะตามโรงพยาบาลและในชุมชนแล้ว ยังพบการระบาดตามแหล่งต่างๆในสิ่งแวดล้อมทั่วไป เช่น แหล่งน้ำ, ดิน, ระบบบำบัดน้ำเสีย, ฟาร์มเลี้ยงสัตว์, การประมง, หลุมฝังกลบขยะ เป็นต้น เนื่องจากการดำเนินกิจกรรมต่างๆล้วนแล้วแต่เกี่ยวข้องกับการใช้ยาปฏิชีวนะ สำหรับคุณสมบัติการดื้อต่อยาปฏิชีวนะนั้นส่วนใหญ่จะถูกควบคุมโดยยีนที่พลาสมิด โดยเกิดการดื้อยาได้จากการอยู่ในสภาวะแวดล้อมที่มียาปฏิชีวนะ หรืออาจเกิดจากการถ่ายทอดยีนดื้อยาด้วยกระบวนการ HGT เช่นเดียวกันกับกรณีคุณสมบัติการทนต่อสารเคมีกำจัดศัตรูพืชและโลหะหนัก แสดงให้เห็นว่าเชื้อแบคทีเรียที่ไม่เคยสัมผัสยาปฏิชีวนะก็สามารถที่จะดื้อต่อยานั้นๆได้โดยได้รับการถ่ายทอดยีน นอกจากนี้ยังมีรายงานการวิจัยที่พบว่า สภาวะแวดล้อมที่ตึงเครียดบางประการส่งผลให้เชื้อแบคทีเรียดื้อต่อยาปฏิชีวนะได้ อาทิเช่นโลหะหนัก และยีนที่ทำหน้าที่ควบคุมการทนต่อสารเคมีกำจัดศัตรูพืช โลหะหนัก และยาปฏิชีวนะบางชนิดมีความสัมพันธ์กัน โดยอาจพบอยู่ที่พลาสมิดชนิดเดียวกัน จะเห็นได้จากการที่มีรายงานการวิจัยพบเชื้อแบคทีเรียดื้อต่อคุณลักษณะทั้ง 3 ประการร่วมกัน (Habi and Daba, 2009; Bahig et al., 2008)

จากการที่คณะผู้วิจัยสำรวจข้อมูลเบื้องต้นของบริเวณที่ต้องการศึกษาถึงการดำเนินกิจกรรมต่างๆของชาวกะเหรี่ยง ณ หมู่บ้านตะเพินคี ที่ตั้งอยู่ในเขตอุทยานแห่งชาติพุเตย จังหวัดสุพรรณบุรี พบว่ามีการดำเนินกิจกรรมที่เกี่ยวข้องกับการใช้สารเคมีในการเพาะปลูกพืชไร่ในเชิงพาณิชย์ติดต่อกันเป็นเวลานาน รวมถึงไม่มีการจัดการขยะที่เกิดขึ้นอย่างเป็นระบบ ซึ่งอาจก่อให้เกิดผลกระทบ 2 ประการ คือ 1) ในแง่ของสุขภาพชาวกะเหรี่ยงในชุมชนจากการมีความเสี่ยงที่จะได้รับเชื้อแบคทีเรียดื้อยา และ 2) ในแง่ของบริเวณนี้อาจเป็นอีกแหล่งหนึ่งที่มีการแพร่กระจายเชื้อแบคทีเรียดื้อยา เนื่องจากเป็นแหล่งที่ตั้งอยู่ในบริเวณที่ระบบนิเวศมีความอุดมสมบูรณ์ รวมถึงเป็นพื้นที่ต้นน้ำของลำน้ำหลักที่ไหลลงไปสู่จังหวัดกาญจนบุรี และจังหวัดสุพรรณบุรี ซึ่งส่วนใหญ่มีการใช้ที่ดินทางการเกษตร ซึ่งถ้าเกิดการแพร่กระจายอาจเป็นอีกสาเหตุที่อาจก่อให้เกิดการปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรียดื้อยาสู่ผลผลิตทางการเกษตร และอาจแพร่กระจายสู่ผู้บริโภคตามวัฏจักรห่วงโซ่อาหารต่อไป

ด้วยความตระหนักถึงปัญหาความสัมพันธ์ระหว่างการใช้ยาปฏิชีวนะของเชื้อแบคทีเรียและการใช้สารเคมีทางการเกษตรติดต่อกันเป็นระยะเวลาอันยาวนานในอีกแง่มุมหนึ่ง ซึ่งไม่ค่อยมีการกล่าวถึงทางคณะผู้วิจัยจึงมีความสนใจที่จะดำเนินการศึกษาภายใต้ข้อสมมติฐาน 3 ประการ ดังนี้ 1) เชื้อ

แบคทีเรียในดินเพาะปลูกที่มีความต้านทานต่อสารเคมีกำจัดศัตรูพืช และโลหะหนัก จะมีคุณสมบัติในการต่อต้านยาปฏิชีวนะด้วยหรือไม่, 2) มีโอกาสที่จะพบเชื้อแบคทีเรียก่อโรคที่ต่อต้านยาปฏิชีวนะในดินเพาะปลูกหรือไม่ และ 3) มีโอกาสหรือไม่ที่เชื้อแบคทีเรียจากบริเวณดังกล่าวจะแพร่กระจายไปยังบริเวณใกล้เคียง โดยได้แบ่งการดำเนินการศึกษาออกเป็น 3 ส่วน อันประกอบด้วย ส่วนที่ 1 การศึกษาข้อมูลของเชื้อแบคทีเรียในดินเพาะปลูกที่มีความทนทานต่อสารเคมีกำจัดศัตรูพืช โลหะหนัก และยาปฏิชีวนะ ส่วนที่ 2 ศึกษาถึงเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในดินเพาะปลูกที่มีคุณสมบัติตามการศึกษาส่วนแรก และ ส่วนที่ 3 ศึกษาการกระจายตัวของเชื้อแบคทีเรียที่อยู่ในสิ่งแวดล้อมบริเวณใกล้เคียง ซึ่งเมื่อเสร็จสิ้นกระบวนการศึกษา ทางคณะผู้วิจัยมีความคาดหวังว่า องค์ความรู้ที่ได้จะมีบทบาทในการเชื่อมโยงถึงปัญหาการกระจายตัวของแบคทีเรียที่อยู่ในระบบทางสิ่งแวดล้อม ทราบถึงแนวทางที่เหมาะสมในการลดปัญหาดังกล่าว เพื่อให้เกิดผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมน้อยที่สุดเท่าที่จะเป็นไปได้ และน่าจะเป็นประโยชน์ต่อผู้ที่สนใจทำการศึกษาทางด้านนี้ และที่สำคัญเมื่อพิจารณาทางด้านสาธารณสุข การประเมินข้อมูลออกมาในระดับความเสี่ยงต่อสุขภาพว่ามีโอกาสความเป็นไปได้มากน้อยเพียงใดที่จะได้รับเชื้อแบคทีเรียก่อโรคที่ปนเปื้อนในบริเวณดังกล่าวเข้าสู่ร่างกาย ซึ่งอาจส่งผลต่อการเกิดโรคติดเชื้ออุบัติใหม่ น่าจะเป็นอีกประเด็นหนึ่งที่น่าสนใจ และมีประโยชน์ต่อหน่วยงานต่างๆที่เกี่ยวข้อง

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างแบคทีเรียในดินเพาะปลูกที่ทนทานต่อโลหะหนัก และมีคุณสมบัติในการต่อต้านยาปฏิชีวนะ
2. ศึกษาความเป็นไปได้ที่แบคทีเรียก่อโรคที่พบในดินเพาะปลูกจะเกิดการต่อต้านยาปฏิชีวนะ และรูปแบบการต่อต้านยาปฏิชีวนะที่พบ
3. เพื่อประเมินความเสี่ยงต่อสุขภาพจากการติดเชื้อก่อโรคจากแบคทีเรียก่อโรค และการกระจายตัวสู่บริเวณใกล้เคียง

ขอบเขตการวิจัย

1. พื้นที่ที่ใช้ในการศึกษา คือ บริเวณที่ทำการเพาะปลูกพืชไร่นานที่มีการใช้สารเคมีติดต่อกันเป็นเวลานาน และบริเวณสิ่งแวดล้อมใกล้เคียง ณ หมู่บ้านตะเพินคี่ ในเขตอุทยานแห่งชาติพุเตย จังหวัดสุพรรณบุรี
2. การตรวจวิเคราะห์คุณสมบัติพื้นฐานของดินเพาะปลูกพืชไร่ และตัวอย่างทางสิ่งแวดล้อมบริเวณใกล้เคียง ประกอบด้วย การตรวจวิเคราะห์พารามิเตอร์ 2 ด้าน คือ 1) พารามิเตอร์พื้นฐานทั่วไปทางด้านเคมี และ 2) พารามิเตอร์ทางด้านชีววิทยา เช่น จำนวนประชากรเชื้อแบคทีเรีย
3. การตรวจวิเคราะห์ความทนทานต่อโลหะหนัก โดยวิธี การทดสอบหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียได้ (Minimum inhibitory concen-

tration: MIC) โดยโลหะหนักที่ใช้ทดสอบ จะทำการศึกษาข้อมูลเพิ่มเติมจากงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับโลหะหนักที่มักพบว่ามีบทบาทต่อการดื้อยาปฏิชีวนะ

4. การตรวจวิเคราะห์การดื้อยาปฏิชีวนะกลุ่มต่างๆใช้วิธีศึกษาการแพร่ของยาจากแผ่นกระดาษที่มียาปฏิชีวนะ (Disk diffusion method) โดยยาปฏิชีวนะที่ใช้ในการทดสอบจะครอบคลุมตามการออกฤทธิ์ในการยับยั้งหรือกำจัดแบคทีเรียที่ต้องการศึกษา ซึ่งกรณีนี้ต้องทราบกลุ่มเชื้อแบคทีเรียที่พบก่อนถึงจะทำการเลือกยามาทดสอบได้อย่างเหมาะสม และผลการทดสอบจะแสดงค่า 3 ระดับ คือ S (sensitive), I (Intermediate) และ R (resistant)

5. ตัวแทนของเชื้อแบคทีเรียก่อโรคที่จะทำการศึกษาคือ อีโคไล โดยยาที่ใช้ทดสอบจะครอบคลุมยาทั้งสิ้นจำนวน 12 ชนิด ซึ่งแบ่งออกเป็น 8 กลุ่มยาด้วยกันตามวิธีการของ CLSI (2012) ได้แก่ Aminoglycoside, Tetracycline, Phenocol, Fluoroquinolone, Folate pathway inhibitors, Cephem, Penicillin และ Beta-lactamase inhibitor combination

6. รูปแบบการดื้อยาปฏิชีวนะกลุ่มต่างๆที่ต้องการศึกษา ประกอบด้วย จำนวนเชื้อที่ดื้อต่อยา (Resistant), จำนวนเชื้อที่น่าจะพัฒนาไปเป็นเชื้อดื้อยาในอนาคต (Intermediate), จำนวนเชื้อที่ไม่ดื้อต่อยา (Sensitive), รูปแบบการดื้อยา (เชื้อ 1 โคโลนี มีความสามารถในการดื้อยาได้กี่ชนิด, Antibiotic resistant pattern), และจำนวนเชื้อที่ดื้อต่อยามากกว่า 1 ชนิด ขึ้นไป (Multi-drug resistance bacteria, MAR หรือ)

สมมติฐานการวิจัย

1. เชื้อแบคทีเรียในดินเพาะปลูกที่มีความต้านทานต่อโลหะหนัก จะมีคุณสมบัติในการดื้อต่อยาปฏิชีวนะด้วยหรือไม่
2. มีโอกาสที่จะพบเชื้อแบคทีเรียก่อโรคที่ดื้อต่อยาปฏิชีวนะในดินเพาะปลูกหรือไม่
3. มีโอกาสหรือไม่ที่เชื้อแบคทีเรียดื้อยาปฏิชีวนะจากบริเวณที่ทำการเพาะปลูกจะแพร่กระจาย ไปยังบริเวณใกล้เคียง

คำจำกัดความที่ใช้ในงานวิจัย

1. แบคทีเรียดื้อยาปฏิชีวนะ (Antibiotic resistance bacteria) คือ แบคทีเรียที่มีคุณสมบัติต้านการออกฤทธิ์ของยาปฏิชีวนะ ส่งผลให้ยาไม่สามารถกำจัดเซลล์แบคทีเรีย หรือยับยั้งการการเติบโตได้ โดยคุณสมบัติดังกล่าวเกิดจากการพัฒนาปรับตัวของแบคทีเรียผ่านการกลายพันธุ์ (mutation) หรือจากการได้รับการถ่ายทอดยีนดื้อยาปฏิชีวนะมาจากแบคทีเรียอื่น (Horizontal gene transfer) (Chee-Stanford et al., 2009)

2. ยาปฏิชีวนะ (Antibiotics) คือ ยาที่มีคุณสมบัติต้านแบคทีเรีย โดยนิยมใช้กันแพร่หลายทั้งในคน และสัตว์ เพื่อการรักษา และป้องกันโรค นอกจากนี้ยังใช้เพื่อส่งเสริมการเจริญเติบโตของสัตว์ด้วย (Chee-Stanford et al., 2009)

3. โลหะหนัก (Heavy metals) คือ โลหะที่มีความหนาแน่นมากกว่า 5 g/cm^3 หรือเรียกว่า transition elements โดยบางตัวมีบทบาทสำคัญในการเป็นแหล่งธาตุอาหารรองที่จำเป็นสำหรับกระบวนการต่างๆภายในเซลล์สิ่งมีชีวิต แต่อย่างไรก็ตามถ้ามีในปริมาณที่ไม่เหมาะสมต่อกลไกภายในเซลล์จะก่อให้เกิดความเป็นพิษได้ (Nies, 1999) นอกจากนี้ยังจัดเป็นธาตุที่ก่อให้เกิดมลพิษต่อสิ่งแวดล้อม ถึงแม้จะพบในปริมาณที่ต่ำก็ตาม (Babai and Ron, 1998)

4. Co-resistance คือ การพบรูปแบบการดื้อยาปฏิชีวนะควบคู่กับการทนทานต่อสารเคมีต่างๆในแบคทีเรียสายพันธุ์เดียวกัน โดยกระบวนการที่เกิดขึ้นเรียก Co-selection โดยเกิดจากการที่ยีนที่ทำหน้าที่ควบคุมคุณสมบัติดังกล่าวได้ปรากฏอยู่ที่สารพันธุกรรมประเภทเคลื่อนที่ (Mobile genetic elements) ชนิดเดียวกัน ได้แก่ plasmid, transposon และ integrin ตัวอย่างดังเช่น การพบการดื้อยาปฏิชีวนะควบคู่กับการทนทานต่อโลหะหนักชนิดต่างๆในอีโคไล (Baker-Austin et al., 2006)

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ทราบข้อมูลที่เกี่ยวข้องกับเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในดินเพาะปลูกที่มีการใช้สารเคมีอย่างต่อเนื่อง อันได้แก่ ข้อมูลความสัมพันธ์ระหว่างการทนทานต่อโลหะหนัก และการดื้อยาปฏิชีวนะ
2. ทราบถึงผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม สุขภาพ รวมถึงปัจจัยเสี่ยงต่อการรับเชื้อแบคทีเรียดื้อยาปฏิชีวนะจากบริเวณดังกล่าวเข้าสู่ร่างกาย
3. เพื่อใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานสำหรับการศึกษาในเรื่องการดื้อยาปฏิชีวนะของแบคทีเรียสำหรับตัวอย่างที่มาจากพื้นที่ที่มีการใช้สารเคมีทางการเกษตรอย่างต่อเนื่อง หรือจากตัวอย่างที่มีลักษณะใกล้เคียงกัน
4. มีการเผยแพร่ข้อมูลในรูปแบบความในวารสารทางวิชาการ รวมทั้งองค์ความรู้ที่น่าจะเป็นประโยชน์ต่อหน่วยงานทั้งภาครัฐและเอกชนที่มีบทบาทต่อการแก้ไขหรือลดปัญหาดังกล่าว รวมถึงชุมชนที่ได้รับผลกระทบ และบุคคลทั่วไปที่ให้ความสนใจ

บทที่ 2

แนวคิด ทฤษฎี เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

สารเคมีกำจัดศัตรูพืช

สารเคมีกำจัดศัตรูพืช (Pesticides) หมายถึง สารที่ใช้ในการป้องกันกำจัดแมลง ไร หรือศัตรูชนิดอื่นๆ ในสัตว์ รวมถึงสารที่ใช้เพื่อกระตุ้นการเจริญเติบโตของพืช สารที่ทำให้ใบไม้ร่วง สารที่ทำให้ผลร่วง หรือป้องกันมิให้ผลร่วงก่อนเจริญเติบโตเต็มที่ และสารที่ใช้ก่อนหรือหลังเก็บเกี่ยวผลผลิต เพื่อป้องกันการทำลายผลผลิตผลในระหว่างการเก็บรักษาและขนส่ง (กรมควบคุมมลพิษ, 2554) ประโยชน์ที่สำคัญ คือ การเพิ่มผลผลิตทางการเกษตร และควบคุมพาหะนำโรค สารส่วนใหญ่มีอันตรายสูงต่อมนุษย์และทำให้เกิดปัญหาตามมามากมาย ดังนี้

1. สารไม่ได้ฆ่าเฉพาะแมลงศัตรูพืชเท่านั้น แต่นก ผีเสื้อ แมลงอื่นที่มีประโยชน์ และสัตว์อื่นในบริเวณนั้นถูกฆ่าด้วย ทำให้สมดุลธรรมชาติเสียไป

2. สารบางชนิดสลายตัวยากและบางชนิดแทบจะไม่มีสลายตัว ทำให้ตกค้างและปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อมเป็นเวลานาน ทั้งในดิน และแหล่งน้ำ ตลอดจนห่วงโซ่อาหารทำให้มีผลกระทบต่อสัตว์และมนุษย์

สารเคมีที่ใช้ทางการเกษตรเหล่านี้ ใช้ในขั้นตอนต่างๆ ตั้งแต่ก่อนปลูก ระหว่างการเจริญเติบโตของพืช ก่อนเก็บเกี่ยวและสำหรับการเก็บรักษา จึงทำให้ปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อมได้ง่าย โดยเฉพาะสารที่สลายตัวยาก นอกจากนั้นยังอาจเกิดปัญหาจากการใช้งานและการทิ้งขยะจากการใช้งานอย่างไม่ถูกต้อง ทำให้เกิดผลกระทบต่อผู้ปฏิบัติงาน สิ่งแวดล้อม และผู้บริโภคในที่สุด การใช้สารเคมีเหล่านี้ยังอาจทำให้เกิดการต้านทานของแมลงที่ต้องการกำจัดและต้องใช้ปริมาณมากขึ้น หรือใช้สารที่มีพิษร้ายแรงกว่าเดิม ทำให้เกิดปัญหาต่อเนื่องไม่สิ้นสุด

โลหะในดิน และความสัมพัทธ์กับจุลินทรีย์

1. การแบ่งประเภทของโลหะ

โลหะแบ่งออกเป็น 3 ประเภท ได้แก่ 1) โลหะ, 2) เมทัลลอยด์ (Metalloids) และ 3) โลหะหนัก (Heavy metals) นอกจากนี้เมื่อแบ่งตามหน้าที่และความสำคัญ ยังสามารถแบ่งออกได้ 3 ประเภท ดังนี้ (วีรานูช, 2554)

- 1.1 กลุ่มที่ 1 โลหะที่มีความจำเป็นต่อการทำงานของสิ่งมีชีวิต (Essential metals) ได้แก่ Na, K, Mg, Ca, V, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn, Mo และ W โดย Na, K, Mg และ Ca จัดเป็นธาตุที่สิ่งมีชีวิตทุกชนิดต้องการ โดยทั่วไปโลหะเหล่านี้มีความจำเป็นในการเจริญเติบโต และการเมแทบอลิซึมของเซลล์ โดยนำไปใช้ในการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์, การส่งผ่านโมเลกุล, โครงสร้างโปรตีน, การทำให้ประจุเป็นกลาง และการควบคุมแรงดันออสโมติก แต่ถ้ามีความเข้มข้นของโลหะประเภทนี้มากเกินไปจะเกิดความเป็นพิษ ส่งผลให้จุลินทรีย์สร้างกลไกการทนต่อโลหะขึ้นมา

1.2 กลุ่มที่ 2 โลหะที่มีความเป็นพิษ (Toxic metals) ได้แก่ Ag, Cd, Sn, Tl, Pb, Au, Hg, Al และเมทัลลอยด์ Ge, As, Sb และ Se โลหะมักอยู่ในรูปประจุบวก ในขณะที่เมทัลลอยด์อยู่ในรูปประจุลบ ซึ่งโลหะเหล่านี้แสดงพิษโดยการเข้าไปแทนที่โลหะที่จำเป็นในการจับกับโมเลกุลชีวภาพ รวมถึงยับยั้งหน้าที่ของเอนไซม์ และขัดขวางโครงสร้างของกรดนิวคลีอิก

1.3 กลุ่มที่ 3 โลหะที่ไม่จำเป็นต่อจุลินทรีย์ ไม่เป็นพิษ และไม่ทราบผลกระทบทางชีวภาพ (Non-essential, non-toxic metal with no know to biological effects) ได้แก่ Rb, Cs, Sr และ Ti บางครั้ง

2. สภาพพร้อมใช้ของโลหะในสิ่งแวดล้อม (Metal bioavailability)

โลหะในสภาพที่เป็นพิษกับจุลินทรีย์ คือ โลหะที่อยู่ในสภาพพร้อมใช้งานทางชีวภาพ (ละลายน้ำได้ ไม่ถูกดูดซับ และถูกเคลื่อนย้ายได้) ซึ่งปัจจัยที่มีผล ได้แก่ คุณสมบัติทางเคมีของโลหะ, การดูดซับกับแร่ธาตุ และสารอินทรีย์ในดิน, พีเอช, ค่ารีดอกซ์ และจุลินทรีย์ (วีรานูช, 2554) โดยรายละเอียดต่างๆมีดังต่อไปนี้

2.1 เคมีของโลหะ

โลหะทุกชนิดที่มีประจุบวก (Cationic) เมื่ออยู่ในรูปอิสระในดินจะทำปฏิกิริยากับอนุภาคดินหรือเกลือที่มีประจุลบ เช่น ฟอสเฟต, ซัลเฟต และอินทรีย์สารที่มีประจุลบ เช่น ไฮดรอกไซด์ และไทออล และยังสามารถยึดเกาะกับผนังเซลล์ของจุลินทรีย์ เป็นผลให้เกิดสภาพความเป็นพิษขึ้น ซึ่งความแข็งแรงของโลหะในการจับกับอนุภาคต่างๆ พิจารณาได้จากค่าสัมพรรคภาพของการดูดซับ (Adsorption affinity) โดยขนาดของประจุแสดงถึงความแข็งแรงของการดูดซับ

2.2 ความสามารถในการแลกเปลี่ยนประจุ

สิ่งที่มีผลต่อการแลกเปลี่ยนประจุในดิน คือ ชนิดของดิน, ปริมาณสารอินทรีย์ในดิน และสารประกอบต่างๆในดิน ซึ่งสารต่างๆในดินจะมีหมู่ Functional ที่แตกต่างกันไป โดยหมู่ที่สามารถจับกับโลหะหนักได้ คือ คาร์บอกซิล, คาร์บอนิล, ฟีนิล, ไฮดรอกซิล, อะมิโน, อิมิดาโซล, ซัลไฮดริล และซัลโฟนิค ซึ่งเมื่อโลหะจับกับสารเหล่านี้จะถูกนำไปใช้ไม่ได้ จึงมีความเป็นพิษต่อเซลล์ต่ำ

2.3 ค่ารีดอกซ์โพเทนเชียล

สภาพพร้อมใช้งานของโลหะ คือ รูปประจุบวกที่ละลายน้ำ พบได้ที่สภาวะที่มีออกซิเจน หรือสภาพออกซิไดส์ (+800 ถึง 0 mV) ส่วนสภาพที่ไม่สามารถใช้งานได้ คือ สภาวะไร้อากาศ หรือสภาพรีดิวซ์ (0 ถึง -400 mV) อาจถูกแบคทีเรียเปลี่ยนรูปให้ไม่เป็นพิษ และไม่ละลายน้ำ หรือเกิดการตกตะกอนกับสารบางประเภท เป็นต้น

2.4 ค่าพีเอช

เมื่อพีเอชเพิ่มขึ้นค่าการละลายน้ำของโลหะหนักจะลดลง โดยที่พีเอชต่ำจะพบในรูปอิสระ ส่วนที่พีเอชสูงจะอยู่ในรูปโลหะคาร์บอเนต และฟอสเฟต ซึ่งเป็นรูปที่ไม่ละลายน้ำ

3. แหล่งของโลหะในดิน

นอกจากการพบตามธรรมชาติในดินแล้ว ยังสามารถการปนเปื้อนได้จากแหล่งอื่นๆ โดยมีรายละเอียดดังนี้ (สุบัญญัติ, 2552)

- 3.1 การปนเปื้อนในอากาศ พบได้ทั้งในรูปของแข็ง และสารละลาย
- 3.2 การปนเปื้อนในน้ำทิ้ง โดยเฉพาะน้ำเสียจากแหล่งอุตสาหกรรม
- 3.3 สารปรับปรุงดิน เป็นสารที่ทำให้ดินมีคุณภาพดีขึ้น เหมาะสมสำหรับการเพาะปลูก แต่อาจมีโลหะปนเปื้อนอยู่ด้วย เช่น การใช้สารเคมีกำจัดศัตรูพืช, ปุ๋ยอินทรีย์ หรือปุ๋ยหมัก, ปุ๋ยเคมี, ปุ๋ยขาว และของเสียจากอุตสาหกรรมการเกษตร

จุลินทรีย์ในดิน

ดินเป็นแหล่งที่อยู่อาศัยของสิ่งมีชีวิตหลายชนิดรวมทั้งจุลินทรีย์ โดยดินที่อุดมสมบูรณ์จะมีจุลินทรีย์หลายกลุ่มอาศัยอยู่ร่วมกัน มีบทบาทต่อระบบนิเวศทางดิน โดยเป็นผู้ย่อยสลายซากสิ่งมีชีวิตที่เน่าเปื่อยผุพัง ทั้งซากพืชซากสัตว์ ผลิตภัณฑ์มวล เปลี่ยนแปลงแร่ธาตุในดินให้เป็นประโยชน์ต่อจุลินทรีย์และพืช ก่อเกิดการหมุนเวียนแร่ธาตุ และสารอาหาร โดยจำนวนของจุลินทรีย์ในดิน และการแพร่กระจายขึ้นกับแหล่งอาหาร, ความชื้น, พีเอช, อุณหภูมิ, เนื้อดิน และโครงสร้างของดิน เป็นต้น โดยบริเวณหน้าดินจะพบมากกว่าบริเวณที่ลึกลงไป ซึ่งกลุ่มของจุลินทรีย์ที่พบในดินประกอบไปด้วยแบคทีเรีย, เชื้อรา, แอคติโนมัยซีท, สาหร่าย, ไฮยาโนแบคทีเรีย และไวรัส ซึ่งไวรัสนั้นอาจอาศัยอยู่ร่วมกับสิ่งมีชีวิตอื่นๆ (ดวงพร, 2545; วีรานุช, 2554; สุบัญญัติ, 2552)

1. แบคทีเรียในดิน

แบคทีเรียจัดเป็นกลุ่มที่พบจำนวนมากที่สุดในดิน เมื่อเปรียบเทียบกับจุลินทรีย์ชนิดอื่น โดยแบคทีเรียบางชนิดนั้นสามารถก่อโรคต่อพืช คน และสัตว์ แบคทีเรียเจริญเติบโตและเพิ่มจำนวนได้ดีในดินที่มีอินทรีย์วัตถุ ความชื้นพอสมควร และค่าพีเอชระหว่าง 5.5-9.0 หรือ รวมถึงในดินสำหรับการเกษตร และบริเวณที่มีพืชขึ้นอย่างหนาแน่น ซึ่งบริเวณรากพืชจะพบแบคทีเรียมากกว่าบริเวณอื่น แบคทีเรียในดินมีความสำคัญต่อระบบนิเวศ ในฐานะที่เป็นผู้ย่อยสลายอินทรีย์วัตถุในดิน รวมถึงสารที่ย่อยสลายยาก ก่อให้เกิดการหมุนเวียนสารต่างๆในดินได้ดี แบคทีเรียที่พบมากมี 3 Order ได้แก่

1.1 Order Pseudomonadales :

Pseudomonas ใน Family Pseudomonadaceae

1.2 Order Eubacteriales 5 Family

- Family Rhizobiaceae : Rhizobium, Agrobacterium, Chromobacterium
- Family Achromobacteriaceae : Achromobacter, Flavobacterium
- Family Micrococcaceae : Micrococcus, Sarcina
- Family Corynebacteriaceae : Corynebacterium, Arthrobacter
- Family Bacillaceae : Bacillus, Clostridium

1.3 Order Actinomycetales

- Family Mycobacteriaceae : Mycobacterium, Mycococcus
- Family Actinomycetaceae : Actinomyces, Nocardia
- Family Streptomycetaceae : Streptomyces
- Family Actinoplanaceae : Streptosporangium

2. จุลินทรีย์ชนิดอื่นๆในดิน

2.1 เชื้อรา

เป็นกลุ่มจุลินทรีย์ในดินอีกกลุ่ม โดยอาจอยู่อย่างอิสระ หรือมีการอยู่ร่วมกับรากพืช ลักษณะที่พบอาจเป็นได้ทั้งเส้นใย (Mycelium), ไรโซมอร์ฟ (Rhizomorph), สปอร์ของเชื้อรา และเห็ดชนิดต่างๆ มีบทบาทในการย่อยสลายซากพืชซากสัตว์รวมถึงฮิวมัสในดิน มีความต้องการออกซิเจน และส่วนใหญ่เจริญเติบโตได้ดีในดินที่เป็นกรด จึงพบมากที่บริเวณผิวหน้าดิน และลึกลงไปประมาณ 10 เซนติเมตร

2.2 แอคติโนมัยซีท

เป็นแบคทีเรียที่มีการเจริญเป็นเส้นใย (Hyphae) สร้างโคนิเดีย (Conidia) และสปอร์แรงเจีย (Sporangia) ซึ่งคล้ายกับเชื้อราแต่ไม่มีไคตินและเซลลูโลสเป็นองค์ประกอบในผนังเซลล์แบบเชื้อรา โดยในการจัดจำแนกยังคงจัดเป็นแบคทีเรียที่ต้องการออกซิเจน สามารถเจริญเติบโตได้ในดินที่เป็นกลางถึงด่าง ประมาณ 5.5-10.0

3. จุลินทรีย์ก่อโรคทางดิน

จุลินทรีย์ในดินสามารถแบ่งออกได้เป็นกลุ่มที่ก่อให้เกิดประโยชน์ และกลุ่มที่ก่อให้เกิดโรค โดยกลุ่มที่ก่อให้เกิดโรคในดินแบ่งออกเป็น กลุ่มที่ก่อโรคในพืช และกลุ่มที่ก่อโรคในคนและสัตว์ โดยมีรายละเอียดดังนี้

3.1 กลุ่มก่อโรคในพืช

ส่วนใหญ่จะเป็นพวกเชื้อรา เนื่องจากเจริญเติบโตได้ดีในบริเวณที่มีความชื้นต่ำ เช่น บริเวณพื้นผิวของพืช โดยโรคพืชที่พบ ได้แก่ โรคราสนิม, โรคเขม่าดำ, โรคใบไหม้ และโรคเหี่ยว ส่วนโรคที่เกิดจากแบคทีเรียพบน้อย ซึ่งเกิดได้จากการที่แบคทีเรียผลิตเอนไซม์มาย่อยสลายเนื้อเยื่อพืช เช่น โรคเน่า นอกจากนี้ไวรัสยังก่อโรคในพืชได้เช่นกัน

3.2 กลุ่มก่อโรคในคนและสัตว์

โดยทั่วไปจุลินทรีย์ก่อโรคในคนและสัตว์จากดินจะเป็นพวกปรสิต แต่ส่วนใหญ่การเกิดโรคมักเกิดจากจุลินทรีย์ในแหล่งอื่นปนเปื้อนลงสู่ดิน อันได้แก่ แบคทีเรียกลุ่มก่อโรคในลำไส้ เช่น *Salmonella* sp. และ *Shigella* sp. ซึ่งแบคทีเรียกลุ่มนี้มีชีวิตอยู่ในดินได้ไม่นาน นอกจากนี้แบคทีเรียประจำถิ่นที่อาศัยอยู่ในดินบางชนิดก็สามารถก่อโรคในคนและสัตว์ได้เช่นกัน อาทิเช่น *Pseudomonas aeruginosa* ก่อเกิดโรคติดเชื้อที่ผิวหนัง, ตา, หู และระบบทางเดินหายใจ ส่วนแบคทีเรียก่อโรคที่อาศัยอยู่ในดินได้นานจะเป็นกลุ่มที่มีความสามารถในการสร้างสปอร์ เช่น *Bacillus*

anthracis ก่อให้เกิดโรคแอนแทรกซ์ในสัตว์, *Clostridium tetani* ก่อให้เกิดโรคบาดทะยัก และ *C. botulinum*, *C. perfringens* ก่อโรคอาหารเป็นพิษชนิดรุนแรง เป็นต้น

ยาปฏิชีวนะ

ยาปฏิชีวนะ (Antibiotics) จัดเป็นยาที่มีการใช้บ่อยที่สุดชนิดหนึ่งทางการแพทย์ จากข้อมูลสถานการณ์ยาปฏิชีวนะระหว่างปี พ.ศ. 2548-2552 ในโรงพยาบาลระดับทุติยภูมิถึงตติยภูมิ จาก 5 ภูมิภาค รวม 16 แห่ง ในเครือข่ายเฝ้าระวังเชื้อดื้อยาต้านจุลชีพแห่งชาติ เมื่อพิจารณาการแบ่งกลุ่มยาตาม ATC code (Anatomical therapeutic chemical classification) และวัดปริมาณการใช้ยาในหน่วย defined daily doses/ 1000 patient-days (DDDs/1000 PDs) และมูลค่าในหน่วยบาทพบว่า กลุ่มยาสำหรับโรคติดเชื้อจัดอยู่ใน 3 อันดับแรก ของกลุ่มยาที่มีมูลค่าการสั่งใช้สูงสุด โดยโรงพยาบาลส่วนใหญ่มีแนวโน้มของปริมาณการสั่งใช้เพิ่มสูงขึ้นทุกปี เป็น 1.1-2.0 เท่า ในระยะเวลา 5 ปี ซึ่งในภาพรวมของประเทศ กลุ่มยาปฏิชีวนะที่มีมูลค่าการสั่งใช้รวมสูงเป็นอันดับต้น ได้แก่ carbapenems, cephalosporin, penicillin และ penicillins and enzyme inhibitors (แผนงานสร้างกลไกเฝ้าระวังและพัฒนาระบบยา, 2554)

ส่วนใหญ่การใช้ยาปฏิชีวนะนั้น มีวัตถุประสงค์เพื่อกำจัดเชื้อก่อโรคทั้งในคน และสัตว์ โดยรูปแบบการใช้ขึ้นอยู่กับการออกฤทธิ์ที่จำเพาะของยาแต่ละชนิด โดยเฉพาะในสัตว์นั้นได้มีการใช้เพื่อเป็นสารเร่งการเจริญเติบโตอีกทางหนึ่ง (Hirsch et al., 1999) จากการใช้ยาที่แพร่หลาย และการใช้ยาที่ไม่เหมาะสมก่อให้เกิดปัญหาแบคทีเรียดื้อต่อยาปฏิชีวนะขึ้น โดยปัจจุบันปัญหาดังกล่าวไม่ได้เกิดขึ้นเฉพาะแต่ในวงการแพทย์เท่านั้น หากกลับพบแพร่กระจายสู่สิ่งแวดล้อมต่างๆ (Zhang and Zhang, 2011) ยาปฏิชีวนะมีหลายประเภท เมื่อแบ่งตามประเภทสารตั้งต้นในการผลิต จะมีทั้งที่ผลิตจากจุลินทรีย์, การสังเคราะห์ และสารกึ่งสังเคราะห์ นอกจากนี้เมื่อแบ่งตามประเภทของกลไกการออกฤทธิ์ของยา สามารถแบ่งได้ 5 ประเภท ดังนี้ (ศิริพร, 2548; ภัทรชัย, 2549)

1. ออกฤทธิ์ที่ระดับผนังเซลล์ (Cell wall synthesis inhibitors)

เป็นยาที่มีกลไกยับยั้งการสร้างผนังเซลล์ ส่วนใหญ่เป็นพวกที่ยับยั้งการสังเคราะห์ peptidoglycan ซึ่งเป็นส่วนประกอบสำคัญของผนังเซลล์ ทำให้ผนังเซลล์ไม่แข็งแรง แบคทีเรียแบ่งตัวไม่ได้ ยาในกลุ่มนี้ได้แก่ ยากลุ่ม beta-lactams, glycopeptides, bacitracin และ cycloserine โดยมีรายละเอียดดังต่อไปนี้

1) Beta-lactams: ยากลุ่มนี้มีโครงสร้างที่สำคัญ คือ ส่วนวงแหวน beta-lactam ยาออกฤทธิ์โดยการเข้าจับและยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ carboxypeptidase และ transpeptidase ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องการสร้างสาย peptidoglycan รวมเรียกเอนไซม์กลุ่มนี้ว่า penicillin-binding protein (PBP) โดยยาในกลุ่มนี้ประกอบด้วย penicillins, cephalosporins, cephamycins, monobactams และ carbapenems

- Penicillins: โครงสร้างหลักของยากลุ่มนี้ คือ กรด 6-aminopenicillanic ซึ่งประกอบด้วยวงแหวน beta-lactam เชื่อมต่อกับวงแหวน thiazolidine โดยแบ่งได้ 2 กลุ่มใหญ่ คือ

1) กลุ่มที่สกัดจากธรรมชาติ เช่น Penicillin G และ Penicillin V ส่วนใหญ่ออกฤทธิ์ได้ดีต่อเชื้อแกรมบวก และ 2) กลุ่มยาแก๊งสังเคราะห์ ซึ่งแบ่งออกเป็นหลายกลุ่มย่อย มีประสิทธิภาพในการออกฤทธิ์แตกต่างกันไป แต่ครอบคลุมในกลุ่มเชื้อแกรมบวกมากยิ่งขึ้น ยาที่จัดอยู่ในกลุ่มนี้ ได้แก่ Penicillinase-resistant penicillins, Isoxazolyl penicillins และ Extended-spectrum penicillins

- Cephalosporins: โครงสร้างหลักของยาในกลุ่มนี้ คือ กรด 7-amino cephalosporanic ซึ่งประกอบด้วยวงแหวน beta-lactam เชื่อมต่อกับวงแหวน dihydrothiazine ยาในกลุ่มนี้ออกฤทธิ์ต่อเชื้อได้หลากหลาย ยกเว้นกับ enterococci ซึ่งต้องอาศัยกลุ่มนี้โดยธรรมชาติ และนอกจากนี้ยังแบ่งยาออกได้เป็น 4 generations

2) Cycloserines: มีโครงสร้างคล้าย D-alanine จึงมีผลในการยับยั้งกระบวนการสร้าง D-alanine-D-alanine ซึ่งเป็นโครงสร้างสำคัญสำหรับการสร้าง peptidoglycan ของผนังเซลล์ และเป็นยาที่มีผลข้างเคียงสูง จึงไม่นิยมใช้ ส่วนใหญ่ใช้เป็นยาสำรอง

3) Glycopeptides: ยาออกฤทธิ์โดยการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ transglycosylase ซึ่งมีความสำคัญต่อการสร้าง peptidoglycan โดยการจับตัวกับส่วน D-alanine-D-alanine ที่ปลายสาย pentapeptide ซึ่งเป็นส่วนประกอบในโครงสร้างโมเลกุลต้นกำเนิดของ peptidoglycan ยาในกลุ่มนี้ได้แก่ vancomycin และ teicoplanin

4) Bacitracin: เป็นยาที่สกัดได้จากเชื้อ *Bacillus subtilis* โดยจัดเป็นสารประกอบ polypeptide มีความเป็นพิษต่อคนและสัตว์ เนื่องจากดูดซึมไม่ดีที่ระบบทางเดินอาหาร จึงมักใช้เป็นยาทาภายนอก ใช้รักษาโรคติดเชื้อจากแบคทีเรียแกรมบวกเป็นหลัก กลไกการออกฤทธิ์เกิดจากการยับยั้งการปล่อยหน่วย mucopeptide ซึ่งเป็นสารต้นกำเนิดของการสร้าง peptidoglycan ออกจากไขมันที่ทำหน้าที่เป็นพาหะนำสารจากชั้นเยื่อหุ้มเซลล์มาที่ชั้นผนังเซลล์ ทำให้สารพาหะไม่สามารถแยกตัวออกไปนำหน่วย mucopeptide ใหม่ ต่อไปได้อีก

2. ออกฤทธิ์ที่ระดับเยื่อหุ้มเซลล์ (Cell membrane function inhibitors)

เยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรียประกอบด้วยชั้น โพรตีน-ไลปิด-โพรตีน นอกจากนี้ด้านนอกของเยื่อหุ้มเซลล์ยังมี polysaccharide ยึดกับโพรตีนด้วย ยาปฏิชีวนะในกลุ่มนี้จะเข้าไปแทรกระหว่างโพรตีนกับไลปิด ทำให้เยื่อหุ้มเซลล์ฉีกขาด สารใน cytoplasm ไหลออกมาทำให้เซลล์ตาย เนื่องจากเยื่อหุ้มเซลล์แบคทีเรียมีโครงสร้างคล้ายเยื่อหุ้มเซลล์ของยูคาริโอต ทำให้ยามีผลข้างเคียงสูงหากเข้าสู่ร่างกาย ยาปฏิชีวนะในกลุ่มนี้ได้แก่ polymyxins, gramicidins และ tyrocidin

1) Polymyxins: สร้างจากเชื้อ *Bacillus polymyxa* ออกฤทธิ์ต่อแบคทีเรียแกรมลบ มีผลข้างเคียงต่อสิ่งมีชีวิตสูง เช่น ระบบประสาท และไต จึงนิยมใช้รักษาเฉพาะโรคติดเชื้อที่รุนแรง หรือใช้เป็นยาทาภายนอก

2) Gramicidins และ Tyrocidin: สร้างจากเชื้อ *Bacillus* spp. ใช้ทำลายแบคทีเรียแกรมบวกมากกว่าโดยทำให้องค์ประกอบภายในเซลล์รั่วไหลออกมา แต่ยาไม่มีความเป็นพิษต่อเนื้อเยื่อ การใช้ยาในกลุ่มนี้จึงอยู่ในวงจำกัด (นงลักษณ์ และปรีชา, 2550)

3. ออกฤทธิ์ยับยั้งการสังเคราะห์กรดนิวคลีอิก (Nucleic acid synthesis inhibitors)

ยาในกลุ่มนี้จะออกฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสร้างกรดนิวคลีอิก หรือเข้าจับกับกรดนิวคลีอิกโดยตรงเพื่อขัดขวางการเพิ่มปริมาณในการแบ่งเซลล์ ยาในกลุ่มนี้ส่วนใหญ่มีผลกระทบบกกับเซลล์ของยูคาริโอตจึงไม่สามารถนำมาใช้ในคนได้ โดยตัวที่ออกฤทธิ์แต่เฉพาะในเซลล์ของโปรคาริโอตและสามารถนำมาใช้ได้ ได้แก่ Quinolones, Rifamycins และ Metronidazoles

1) Quinolones หรือ Fluroquinolones: เป็นสารสังเคราะห์ซึ่งออกฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ DNA gyrase และ topoisomerase II ทำให้ไม่เกิดการสังเคราะห์กรดนิวคลีอิกส่งผลให้แบคทีเรียตาย ยาแบ่งออกได้หลายกลุ่มตามการออกฤทธิ์ ตัวอย่างเช่น 1) Narrow spectrum ออกฤทธิ์ต่อแบคทีเรียแกรมลบ เช่น Nalidixic acid และ Cinoxacin, 2) Broad spectrum ยากลุ่มนี้เกิดจากการเพิ่มอะตอมฟลูออรีนเข้าไปที่โครงสร้างของ Nalidixic acid จึงเรียวยากลุ่มนี้ว่า Fluoroquinolones ออกฤทธิ์ต่อเชื้อทั้งแกรมบวกและลบ เช่น Norfloxacin, Ofloxacin, Enoxacin, Ciprofloxacin, Lomefloxacin และ Fleroxacin เป็นต้น

2) Rifamycins: ยากลุ่มนี้ออกฤทธิ์โดยการจับกับ beta-subunit ของเอนไซม์ RNA polymerase และยับยั้งหน้าที่เอนไซม์ในการสร้าง RNA ยาออกฤทธิ์ต่อเชื้อแกรมบวก รวมทั้งเชื้อแกรมลบบางกลุ่ม โดยยาที่สำคัญในกลุ่มนี้คือ Rifampin

3) Metronidazole: ยาในกลุ่มนี้จะไปทำปฏิกิริยากับเอนไซม์ nitroreductase ของเซลล์แบคทีเรีย ทำให้ยาเป็นพิษต่อเซลล์และเกิดการทำลาย DNA เป็นยาที่มีบทบาทสำคัญในการรักษาโรคติดเชื้อจากแบคทีเรียกลุ่ม anaerobe

4. ออกฤทธิ์ยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีน (Protein synthesis inhibitor)

โดยยากลุ่มนี้จะออกฤทธิ์ยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีนของเซลล์ที่ไรโบโซม และตัวยามีผลกระทบบกกระบวนการดังกล่าวในคน ตัวอย่างยาในกลุ่มนี้ ได้แก่ Aminoglycosides, Tetracyclines, Macrolides, Chloramphenicol, Lincosamide, Streptogramins และ Oxazalidinones

1) Aminoglycosides: ออกฤทธิ์ยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีนโดยการจับตัวอย่างถาวรกับไรโบโซมหน่วยย่อย 30S ทำให้ไรโบโซมทำงานผิดปกติ เซลล์ไม่สังเคราะห์โปรตีน จึงตายในที่สุด ยามีบทบาทต่อเชื้อแกรมลบ รวมถึงเชื้อแกรมบวกบางชนิด ตัวอย่างยาในกลุ่มนี้ เช่น Kanamycin, Gentamicin, Tobramycin, Streptomycin, Netilmicin และ Amikacin เป็นต้น

2) Tetracyclines: ยาออกฤทธิ์โดยการจับตัวแบบชั่วคราวกับไรโบโซมหน่วยย่อย 30S มีผลยับยั้งการเข้าร่วมตัวกับ tRNA จึงขัดขวางการสังเคราะห์โปรตีน โดยยาในกลุ่มนี้มีฤทธิ์กว้างต่อทั้งเชื้อแกรมบวกและแกรมลบ โดยยาที่จัดอยู่ในกลุ่มนี้ ได้แก่ Tetracycline, Doxycycline, Chlortetracycline, Oxytetracycline, Minocycline เป็นต้น

3) Macrolides: ยาออกฤทธิ์โดยการจับตัวแบบชั่วคราวกับไรโบโซมหน่วยย่อย 50S บริเวณ 23S rRNA มีผลยับยั้งกระบวนการ elongation ในการสร้างสายโปรตีน ยามีฤทธิ์ต่อเชื้อแกรมบวก โดยยาที่จัดอยู่ในกลุ่มนี้ ได้แก่ Erythromycin, Clarithromycin, Azithromycin

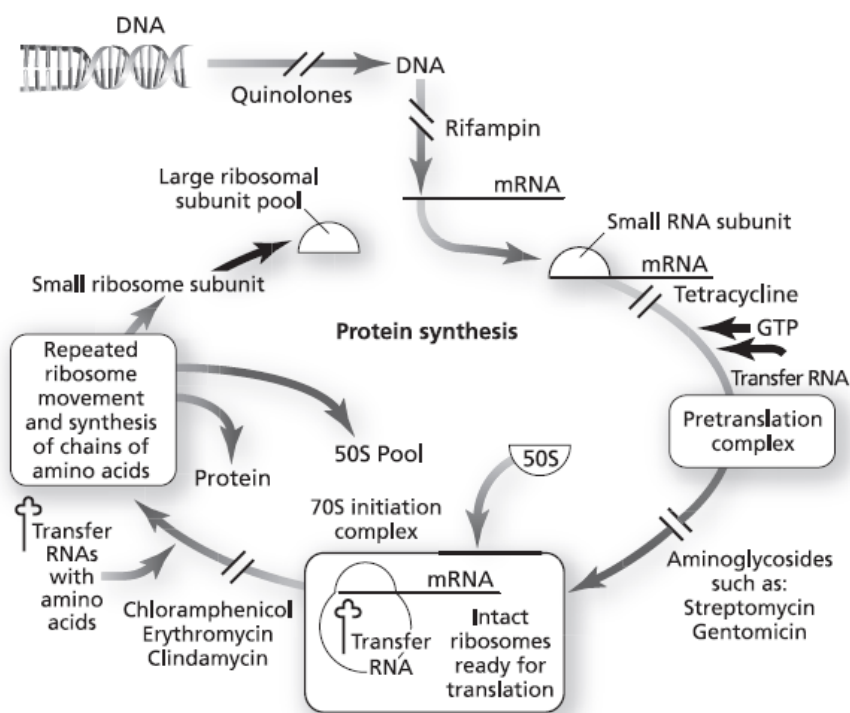
4) Chloramphenicol: ยาจะจับตัวแบบชั่วคราวกับเอนไซม์ peptidyltransferase ซึ่งเป็นส่วนประกอบของไรโบโซมหน่วยย่อย 50S โดยเอนไซม์ดังกล่าวมีบทบาทต่อการสร้างสายโปรตีนจัดเป็นยาที่มีผลต่อเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ

5. ออกฤทธิ์รบกวนเมตาบอลิซึม (Antimetabolites)

เป็นยาปฏิชีวนะที่ออกฤทธิ์แบบนี้ส่วนใหญ่ มีลักษณะโครงสร้างคล้ายสารที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการเมตาบอลิซึม จึงแย่งจับเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องได้ และการยับยั้งของยาลักษณะนี้พบว่าสามารถฟื้นฟูสภาพเดิมเมื่อปริมาณยาลดลง หรือยาหมดฤทธิ์ หรือมีสารตั้งต้นที่เอนไซม์ไปแย่งกันจับมากกว่าปกติ โดยรายละเอียดของยาในกลุ่มนี้ ได้แก่

1) Sulfonamide: เป็นยาที่ยับยั้งการเมตาบอลิซึมกรดโฟเลต โดยยามีโครงสร้างคล้ายสารตั้งต้นของการสร้างกรด (para-aminobenzolic acid, PABA) จึงสามารถจับกับเอนไซม์ dihydrofolate synthetase ซึ่งมีบทบาทในการสร้างกรดดังกล่าวทำให้แบคทีเรียขาดกรดโฟเลตในการสังเคราะห์ DNA

2) Trimethoprim: เป็นยาที่มีกลไกการทำงานคล้าย Sulfonamide แต่ต่างกันว่า Trimethoprim ออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ dihydrofolate reductase ซึ่งมีบทบาทในการสร้างกรดโฟเลตเช่นกัน ซึ่งเมื่อมีการใช้ร่วมกับ Sulfonamide จะออกฤทธิ์เสริมกันมากขึ้น



ภาพที่ 2.1 แสดงการออกฤทธิ์ของยาปฏิชีวนะประเภทต่างๆต่อเซลล์แบคทีเรีย (Guilfoile, 2007)

แบคทีเรียดื้อยา (Antibiotic resistance bacteria)

ขณะที่มีการใช้ยาปฏิชีวนะกันอย่างกว้างขวาง อัตราการดื้อยาของแบคทีเรียต่างๆ ตื้อยาเหล่านี้มีแนวโน้มสูงขึ้นด้วย โดยการดื้อยาของแบคทีเรียเกิดขึ้นจากการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรม (Mutation) ของแบคทีเรีย ซึ่งการเปลี่ยนแปลงนี้อาจเกิดขึ้นที่ส่วนของโครโมโซม โดยโครโมโซมมีขนาดใหญ่ประกอบด้วยยีนที่จะแสดงออกเป็นลักษณะต่างๆ ของเชื้อมากมายรวมทั้งการดื้อยาซึ่งการดื้อยาปฏิชีวนะอาจเกิดจากพลาสมิดซึ่งเป็นสารพันธุกรรมที่อยู่นอกโครโมโซม (extrachromosome) โดยพลาสมิดมีขนาดเล็กกว่าโครโมโซมมาก โดยยีนที่ควบคุมการดื้อยาที่อยู่บนพลาสมิดของแบคทีเรียชนิดหนึ่งสามารถถ่ายทอดไปยังแบคทีเรียชนิดอื่นๆ ได้ง่าย ทำให้เกิดการแพร่กระจายการดื้อยาจากเชื้อหนึ่งไปสู่อีกเชื้อหนึ่งได้รวดเร็ว (พิณทิพย์, 2544) โดยยีนดื้อยาที่ได้รับขนถ่ายมานี้จะอยู่ในรูปต่างๆ ที่สำคัญ คือ naked DNA, phage หรือ plasmids ซึ่งมีผลทำให้เกิดปัญหาการเพิ่มขึ้นของเชื้อดื้อยา และเมื่อเชื้อดื้อยาก่อโรคและเมื่อเกิดการดื้อของเชื้อตื้อยาชนิดหนึ่งอาจจะมีการดื้อต่อยาหลายๆ กลุ่มไปด้วย ทำให้มียาให้เลือกใช้น้อยลง (ศิริพร, 2548; นพรัตน์, 2554)

1. การเกิดการดื้อยาของแบคทีเรียเกิดขึ้นได้ 2 แนวทาง คือ

1.1 เกิดจากการเลือกสรรตามธรรมชาติ (Natural selection) แบคทีเรียแต่ละชนิดจะมียีนดื้อยาอยู่ในตัวอยู่แล้วตามธรรมชาติ แต่เป็นจำนวนน้อย เมื่อแบคทีเรียชนิดดังกล่าวมีการสัมผัสกับยาปฏิชีวนะมากและนานขึ้น ยาจะทำลายเชื้อที่ไม่ดื้อยาจนหมด และไม่สามารถทำลายส่วนที่ดื้อต่อยาได้ ดังนั้นจะมีการเจริญเพิ่มจำนวนและแสดงออกเป็นแบคทีเรียดื้อยาอย่างสมบูรณ์

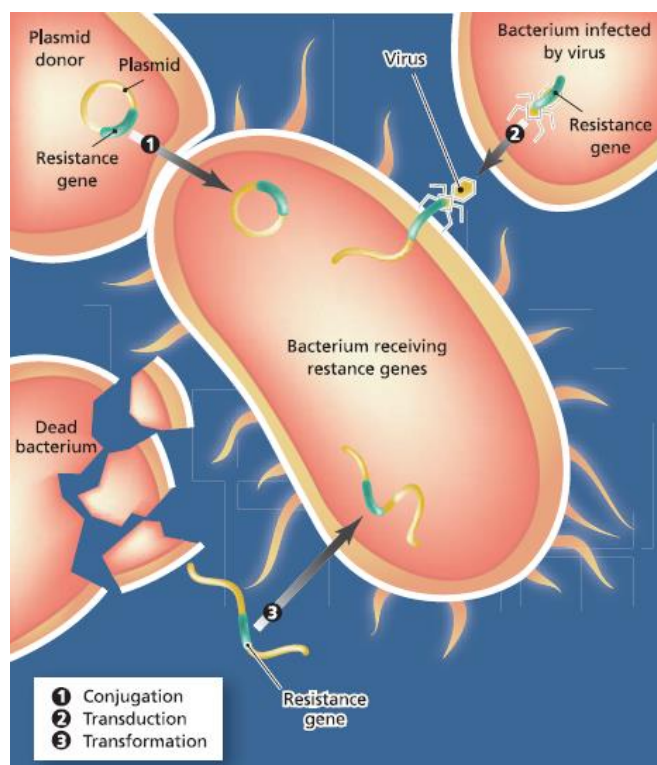
1.2 เกิดจากการเหนี่ยวนำให้เกิดโดยการใช้ยาปฏิชีวนะ แต่ละชนิดจะมีความไวต่อยาปฏิชีวนะ แต่เมื่อใดมีโอกาสสัมผัสกับยาปฏิชีวนะ โดยเฉพาะในขนาดและระยะเวลาในการให้ที่ไม่เหมาะสมที่จะทำลายเชื้อได้หมด เชื้อก็จะพัฒนาการเปลี่ยนแปลงสารพันธุกรรมให้สามารถทนทานต่อการทำลายของยาได้ เชื้อดื้อยาเหล่านี้ อาจเกิดจากการได้รับยีนดื้อยาจากเชื้ออื่นด้วยกระบวนการต่างๆ (Horizontal gene transfer, HGT) ผ่านสารพันธุกรรมชนิดเคลื่อนที่ได้ (Mobile genetic elements) เช่น plasmids, transposons และ integrons นอกจากนี้กระบวนการรับยีนดื้อยาจากแบคทีเรียอื่นยังประกอบไปด้วยกลไกต่างๆ ดังนี้ transformation (DNA uptake), conjugation (direct contact transfer of mobile plasmids), และ transduction (uptake of naked DNA) (Jury et al., 2010; Taylor et al., 2011)

2. กลไกการดื้อยาปฏิชีวนะมี 4 วิธี คือ

2.1 การเปลี่ยนแปลงเป้าหมายในการออกฤทธิ์ของยา (Target site alteration)

การดื้อยาโดยวิธีนี้ในระยะเริ่มแรกพบว่าเชื่อมีการสร้างเป้าหมายใหม่ทำให้ยาไม่สามารถจับกับเป้าหมายเดิมได้ การดื้อยาวิธีนี้มีแยกออกเป็น การสร้างเป้าหมายใหม่ รวมทั้งการเปลี่ยนแปลงเส้นทางเมตาบอลิก การสร้างเป้าหมายให้มากเกินไป รวมทั้งการสร้างเส้นทางเมตาบอลิกที่มากเกินไป และการป้องกันไม่ให้ยาเข้าสู่เป้าหมาย (target protection) ซึ่งการเปลี่ยนแปลงเป้าหมายในการออกฤทธิ์ของยาเป็นวิธีการดื้อยาที่สำคัญยาปฏิชีวนะกลุ่มต่อไปนี้ คือ การดื้อยากุ่ม Beta-

lactam โดยเฉพาะ Penicillin และ Methicillin โดยเชื้อ *S. pneumoniae* และ *S. aureus* ตามลำดับ การดื้อยา Quinolone โดยเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก และแกรมลบ การดื้อยา Tetracycline โดยเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ การดื้อยา Trimethoprim และ Sulfonamide โดยเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ การดื้อยา Vancomycin โดยเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก การดื้อยา Streptomycin และ Spectinomycin โดยแบคทีเรียแกรมบวก แกรมลบ และ Mycobacterium



ภาพที่ 2.2 แสดงกลไกการรับยีนดื้อยาปฏิชีวนะมาจากแบคทีเรียชนิดอื่น (Guilfoile, 2007)

2.2 การสร้างเอนไซม์มาทำลายยา (Enzymatic deactivation)

แบคทีเรียหลายชนิดสามารถทำลายยาต้านจุลชีพ โดยทำให้ยาเปลี่ยนแปลงสภาพไป ทำให้ไม่สามารถออกฤทธิ์ได้ เช่น *S. aureus* ที่ดื้อต่อยา Penicillin จะทำลายยาให้เปลี่ยนเป็น penicilloic acid ในกรณีของ Cephalosporins ก็เกิดขึ้นทำนองเดียวกัน ซึ่งเป็นผลมาจากเอนไซม์ เบต้าแลคแทมเมส (Beta-lactamase) สร้างโดยแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบหลายชนิด ทำให้เชื้อดื้อยาในระดับที่สูงได้ เอนไซม์ lactamase แบ่งเป็นหลายประเภทตามชนิดของยา เป็นเอนไซม์ที่สร้างโดยยีนบนโครโมโซม หรือพลาสมิด หรือทรานส์โปซอนก็ได้ และอาจเป็นเอนไซม์ที่สร้างตลอดเวลา หรือสร้างเฉพาะเมื่อมีสารตั้งต้น (substrate) ก็ได้ การดื้อยาในกลุ่ม Aminoglycosides โดยเอนไซม์ aminoglycosides - modifying จะย่อยสลายยาในกลุ่ม Aminoglycosides ที่กลุ่ม amino และกลุ่ม hydroxy เช่น acetyltransferase (AAC) ทำหน้าที่ย่อยสลายยาด้วยกระบวนการ acetylation ที่กลุ่มอะมิโน เอนไซม์ที่สำคัญ คือ AAC(6) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่พบบ่อยที่สุดจากเชื้อ

แบคทีเรียทรงแท่งแกรมลบโดย AAC(6) ทำลายกลุ่ม amino ที่วงแหวนที่ 2 ของยาในตำแหน่งที่ 6 ตำแหน่งนี้พบในAminoglycosides ทุกตัว จึงย่อยสลาย Aminoglycosides ทุกตัว ซึ่งเอนไซม์ทั้ง 3 ถูกกลุ่มพบในแบคทีเรียทรงแท่งแกรมลบ นอกจากนั้น ยังพบ bifunctional enzyme ซึ่งประกอบด้วยเอนไซม์ AAC(6) และ APH(2) เอนไซม์นี้ผลิตจากเชื้อแบคทีเรียทรงกลมแกรมบวก คือ *S. aureus*, *S. epidermidis*, *Enterococcus faecalis* และ *E. faecium* และเป็นตัวการที่สำคัญที่ทำให้เชื้อแบคทีเรียทรงกลมแกรมบวกดื้อต่อยากลุ่มนี้ (พิณทิพย์, 2544)

2.3 การลดการนำยาเข้าเซลล์ของแบคทีเรีย (Decreased Uptake)

ยาปฏิชีวนะจะออกฤทธิ์ได้ตัวยาคจะต้องผ่านเข้าเซลล์ (entry) ของจุลินทรีย์เสียก่อน การเข้าสู่เซลล์ของยาอาจใช้พลังงานหรือไม่ใช้พลังงานก็ได้ ช่องทางที่ยาปฏิชีวนะจะเข้าเซลล์ของแบคทีเรียที่สำคัญ ได้แก่ ที่ outer membrane protein ซึ่งเรียกว่า porin ในเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ จะมี porin ที่สำคัญอย่างน้อย 5 ชนิด คือ OmpC, OmpF, LamD, PhoE และ โปรตีน K แต่ OmpF จะมีความสำคัญมากที่สุด ช่องทาง porin เป็นทางเข้าที่สำคัญของยาปฏิชีวนะส่วนใหญ่ โดยเฉพาะกลุ่ม Beta-lactam และ Quinolone นอกจากนั้นยาปฏิชีวนะอาจเข้าที่โปรตีนพิเศษบางตัว เช่น Imipenem สามารถเข้าสู่แบคทีเรียทางโปรตีน D2 ยาปฏิชีวนะกลุ่ม Aminoglycosides ไม่เข้าทาง porin แต่จะเข้าเซลล์ของจุลชีพที่ทางเชื่อมระหว่าง LPS ด้วยวิธี self-promoted uptake การลดการนำเข้าของยาอาจเกิดขึ้นโดยธรรมชาติ ตัวอย่างเช่น เชื้อแบคทีเรียไม่ต้องการออกซิเจนจะดื้อต่ออะมิโนกลัยโคไซด์เนื่องจากไม่มี ระบบขนส่งอิเล็กตรอนชนิด cytochrome-mediate electron transport การดื้อยาโดยธรรมชาติเกิดจากการลดการนำยาเข้าเซลล์เป็นวิธีที่สำคัญด้วย และเกิดภายหลัง พบได้บ่อยในเชื้อบางชนิดเช่น *P. aeruginosa* และ *E. cloacae* ซึ่งมักนำยาเข้าเซลล์น้อยอยู่แล้วโดยธรรมชาติ เมื่อมีพัฒนาการดื้อยาได้ไวขึ้น ยาปฏิชีวนะบางตัวก็ไม่สามารถออกฤทธิ์ได้จากการดื้อยาโดยวิธีนี้และเกิดชั่วคราว พบได้จากการดื้อยาแบบ functional ของเชื้อต่ออะมิโนกลัยโคไซด์เมื่อมีการสัมผัสกับยาครั้งแรก การดื้อยาแบบนี้ไม่มีการเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมีแบบถาวร และไม่มีการควบคุมทางพันธุกรรมที่ผิดไปจากเดิม ส่วนการลดการนำเข้าเซลล์ของแบคทีเรียเกิดได้ 2 วิธี

1) การลดการซึมผ่าน (Decreased permeability) การดื้อยาโดยการลดการนำยาเข้าเซลล์ของจุลินทรีย์ อาจเกิดโดยวิธีการลดการซึมผ่าน หรือการขยับยาจากจุลินทรีย์ เช่น เชื้อ *P. aeruginosa* ดื้อต่อยากลุ่ม Beta-lactam โดยการซึมผ่าน เชื้อแบคทีเรียส่วนใหญ่ดื้อต่อ tetracycline โดยวิธี active efflux ส่วนการดื้อยากลุ่ม Quinolone มักเกิดจาก 2 วิธีร่วมกัน โดยทั่วไป การดื้อยาโดยการลดการนำยาเข้าเซลล์ทำให้เกิดการดื้อยาโดยวิธี decreased permeability ร่วมกับ active efflux จะทำให้เกิดการดื้อยาระดับสูง (high-level resistance) ยาปฏิชีวนะที่ไม่สามารถออกฤทธิ์ได้โดยจุลินทรีย์ลดการซึมผ่านของยาเข้าเซลล์ ได้แก่ Beta-lactam, Chloramphenicol, Quinolone, Tetracycline และ Trimethoprim การดื้อยาแบบนี้ไม่ใช่กลไกหลักของยาเหล่านี้ยกเว้นที่เกิดกับเชื้อบางตัว เท่านั้น เช่น *P. aeruginosa* ดื้อต่อ Beta-lactam และ Aminoglycosides ส่วนใหญ่การดื้อยาแบบนี้จะเป็นกลไกรอง เชื้อที่ดื้อต่อยา ปฏิชีวนะด้วยวิธีนี้ที่สำคัญ คือ *P. aeruginosa* ดังกล่าวแล้ว *N. gonorrhoeae* ที่ดื้อต่อ Beta-lactam, Enterobacter

sp. ที่ ต้อยยา Beta-lactamase, อีโคไล ที่ ต้อยยา Chloroamphenicol, Tetracycline และ Quinolone

2) การขับยาออกจากเชื้อ (Active efflux) กลไกนี้เป็นกลไกการต้อยยาที่สำคัญของ ยา 3 กลุ่ม ต่อไปนี้ คือ

- การต้อยยา กลุ่ม Tetracycline ในปัจจุบัน ยา กลุ่ม Tetracycline เป็นยาที่มีประโยชน์สำหรับจุลชีพที่ไม่ใช่แบคทีเรียเป็นสิ่งสำคัญ แบคทีเรียหลายชนิดต้อยยา กลุ่มนี้โดยวิธี active efflux เป็นสำคัญ การต้อยยาแบบ active efflux ในยา กลุ่ม tetracycline ถูกควบคุมโดยยีนหลายกลุ่ม เรียกว่า ynf tet จะเห็นได้ว่าเชื้อแบคทีเรียที่ต้อยยาโดยวิธี efflux เป็นส่วนใหญ่ ส่วนเชื้อ Mycoplasma และ Ureaplasma ต้อยยาโดยวิธีการเปลี่ยนแปลงเป้าหมาย การต้อยยา กลุ่ม Tetracycline มีการควบคุมทางพันธุกรรมโดยพลาสมิด

- การต้อยยา กลุ่ม Quinolone โดยปกติหลังจากจุลชีพมี uptake ของ quinolone แล้วมักมี efflux เกิดขึ้นโดยธรรมชาติ แต่การมี efflux ที่เพิ่มมากขึ้นเป็นกลไกอย่างหนึ่งที่ทำให้มีการต้อยยานี้ จากการศึกษาพบว่าเชื้อ S. aureus มี efflux ที่เพิ่มมากขึ้นและมีความสัมพันธ์กับการต้อยยา การต้อยยาโดยวิธีนี้เป็น การต้อยยาในระดับต่ำก็จริง แต่ระดับ MIC ที่เพิ่มขึ้นก็เพียงพอที่จะทำให้มีเชื้อต้อยยาจากการกลายพันธุ์เกิดขึ้นใน ระหว่างการรักษาได้ เชื้อ S. aureus ที่ต้อยยาโดยวิธีนี้จะเกิดกับยาที่ละลายน้ำได้ดี เช่น Norfloxacin, Enoxacin, Ofloxacin และ Ciprofloxacin มากกว่า ยาที่ละลายน้ำไม่ดี การต้อยยา กลุ่มแรกจะมี MIC เพิ่มขึ้น 32 เท่า แต่ยา กลุ่มหลังจะมี MIC เพิ่มขึ้นเพียง 2 เท่า ส่วนการศึกษาในแบคทีเรียแกรมลบนั้นพบว่า มี efflux ในระดับปกติ และยังไม่พบว่า efflux ระดับปกติในเชื้อแบคทีเรียแกรมลบเป็นสาเหตุของการต้อยยา การควบคุมทางพันธุกรรมเกิดโดยทางโครโมโซมแต่อาจกลายเป็นพลาสมิดได้ในอนาคต เพราะยีนที่กำกับการต้อยยาอยู่บนจุดที่ไวมากของโครโมโซม

- การต้อยยา กลุ่ม Macrolide กลไกการขับยาออกจากเซลล์โดยอาศัยพลังงานคือ proton-motive force (PMF) หรือ ATP แบคทีเรียที่จะขับยาออกจากเซลล์ได้จะมีโปรตีนที่สำคัญที่ cytoplasmic membrane เรียกว่า integral inner membrane protein

2.4 การเปลี่ยนแปลงขบวนการเมตะบอลิซึม

การเปลี่ยนแปลงขบวนการเมตะบอลิซึมของตัวแบคทีเรียโดยใช้ขบวนการอื่นที่ไม่ใช่ขบวนการเดิมที่ยาเคยออกฤทธิ์ขัดขวางได้ตัวอย่างเช่นการต้อยยา Sulfamethoxazole และ Trimethoprim เป็นต้น

ในวันสุขภาพโลก ปี พ.ศ. 2554 องค์การอนามัยโลกได้นำประเด็นปัญหาแบคทีเรียที่ต้อยยาปฏิชีวนะ (Antibiotic resistance bacteria) มารณรงค์ สืบให้เห็นว่า ณ สถานการณ์ปัจจุบัน เรื่องดังกล่าวถือเป็นปัญหาทางด้านสาธารณสุขที่มีความสำคัญในระดับนานาชาติ และเป็นวาระเร่งด่วนที่นานาชาติควรมีมาตรการในการป้องกันและควบคุมก่อนที่จะสถานการณ์จะทวีความรุนแรงยิ่งขึ้น โดยปัญหาการต้อยยาปฏิชีวนะนั้นได้ส่งผลกระทบต่อสุขภาพของมนุษยชาติ รวมถึงความสูญเสียทางด้านเศรษฐกิจจากการที่มีค่าใช้จ่ายในการรักษาโรคที่เพิ่มมากขึ้น เนื่องจากแบคทีเรียต้อยยาจัดได้ว่าเป็นโรคติดเชื้ออุบัติใหม่ (Emerging infectious diseases) มีระดับความรุนแรงของ

การก่อโรคที่เพิ่มขึ้น ในบางกรณีอาจมีระดับความรุนแรงมากจนถึงขั้นเป็นอันตรายต่อชีวิต จากอุบัติการณ์ดังกล่าวจำเป็นต้องมีการใช้ยาปฏิชีวนะ (Antibiotic) ที่มีประสิทธิภาพสูงกว่าเดิมในการรักษา ซึ่งอาจจะเป็นยาที่มีมูลค่าสูงขึ้น หรือในอนาคตหากปัญหาดังกล่าวทวีความรุนแรงยิ่งขึ้น โรคติดเชื้อบางชนิดก็อาจจะไม่สามารถหายาปฏิชีวนะมารักษาได้ โดยทั่วไปแล้วยาปฏิชีวนะนั้น จัดเป็นกลุ่มยาที่มีการใช้กันอย่างแพร่หลาย ทั้งในแง่ของการรักษาโรคติดเชื้อ โดยเฉพาะจากแบคทีเรียในมนุษย์และสัตว์ รวมถึงใช้เป็นวัตถุเติมในอาหารสัตว์เพื่อเร่งการเจริญเติบโต สำหรับการใช้อยาปฏิชีวนะในสัตว์นั้นครอบคลุมทั้งอุตสาหกรรมปศุสัตว์ ประมง หรือแม้แต่กระทั่งการรักษาโรคติดเชื้อในสัตว์เลี้ยงตามบ้านเรือน

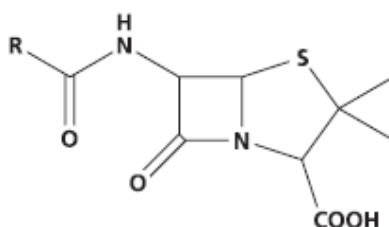
สถานการณ์ปัญหาแบคทีเรียดื้อยาในประเทศไทยนั้น ถ้าพิจารณาจากการใช้อยาปฏิชีวนะในมนุษย์ เรื่องนี้จัดเป็นปัญหาทางด้านสาธารณสุขที่สำคัญในระดับชาติ โดยพบว่าปริมาณการใช้อยาปฏิชีวนะที่เพิ่มสูงขึ้นอย่างต่อเนื่องทุกปี ประกอบกับมีการใช้อย่างไม่สมเหตุสมผลทั้งในโรงพยาบาลและชุมชน รวมถึงการที่สามารถหาซื้อได้ง่ายโดย บางครั้งไม่จำเป็นต้องมีใบสั่งยา (แผนงานสร้างกลไกเฝ้าระวังและพัฒนาระบบยา, 2554) ปัจจัยต่างๆ เหล่านี้ล้วนแล้วแต่ส่งเสริมให้แบคทีเรียทั้งสายพันธุ์ที่ก่อโรค และสายพันธุ์ประจำถิ่น มีการพัฒนาและปรับตัวให้เหมาะสมเพื่อความอยู่รอดภายใต้สภาวะที่มีการปรากฏของยาปฏิชีวนะ หรืออาจเรียกได้ว่าเกิดการคัดเลือกสายพันธุ์แบคทีเรียที่ดื้อยาขึ้น นอกเหนือจากนี้ ด้านการใช้อยาปฏิชีวนะในสัตว์เชิงพาณิชย์ พบปัญหาการเลือกใช้ชนิดยา, ปริมาณยา, และระยะเวลาการใช้อย่างไม่เหมาะสม ซึ่งอาจเป็นปัจจัยส่งเสริมการเกิดแบคทีเรียดื้อยา และบางกรณีอาจพบการตกค้างของยาปฏิชีวนะในเนื้อสัตว์ด้วย สำหรับการใช้อยาปฏิชีวนะในสัตว์เลี้ยง สาเหตุของการก่อเกิดแบคทีเรียดื้อยา อาจมาจากการที่เจ้าของซื้อยามารักษาเอง หรือเมื่อนำไปรักษาอาจมีการให้อาหรือนำมารักษาไม่ต่อเนื่อง (สถาบันวิจัยระบบสาธารณสุข, 2555)

คุณสมบัติของเอนไซม์ Extended beta-lactamase (ESBL)

ยากลุ่ม beta-lactam ประกอบด้วยยาในกลุ่มย่อยหลายกลุ่ม ได้แก่ penicillin , cephem (cephalosporin และ cephamycin) , monobactam และ carbapenem โดยที่ยาหลายชนิดสามารถออกฤทธิ์ต้านแบคทีเรียแกรมบวก และแกรมลบ จัดเป็นยาต้านแบคทีเรียกลุ่มใหญ่ที่สุด และใช้มากที่สุดในด้านเวชปฏิบัติ เนื่องด้วยยามีฤทธิ์ฆ่าแบคทีเรีย (bactericidal effect) อีกทั้งมีความปลอดภัยในการใช้ และยาหลายชนิดมีฤทธิ์กว้าง (broad spectrum) แต่ถ้ามีการใช้ในปริมาณที่มากอาจทำให้มีการคัดเลือกตามธรรมชาติ (natural selection) ของสายพันธุ์ที่ดื้อยา หรือมีการกลายพันธุ์ที่เพิ่มความสามารถในการดื้อยา จึงทำให้มีเชื้อดื้อยาเพิ่มขึ้นและแพร่กระจายต่อไป ปัญหาการดื้อยาในกลุ่ม beta-lactam จึงพบได้มากขึ้น และส่งผลให้เกิดความล้มเหลวในการรักษา

การดื้อยากลุ่ม beta-lactam เกิดขึ้นได้จากหลายกลไก กลไกสำคัญที่สุดในแบคทีเรียแกรมลบ คือ การสร้างเอนไซม์เพื่อทำลายยา ที่เรียกว่าเอนไซม์ beta-lactamase ซึ่งมีความสามารถในการออกฤทธิ์ทำลายพันธะเคมีของวงแหวน beta-lactam (beta-lactam ring) ที่เป็นส่วนแกนของโครงสร้างทางเคมีของยา (ภาพที่ 2.3) ทำให้อยาไม่สามารถออกฤทธิ์ฆ่าเชื้อได้ อย่างไรก็ตามเอนไซม์ beta-lactamase มีความหลากหลายทางโครงสร้างโมเลกุล กลไกการออกฤทธิ์และประสิทธิภาพใน

การทำลายยา ซึ่งมีรายงานชนิดของเอนไซม์เพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง เอนไซม์ ESBL ส่วนใหญ่เป็นเอนไซม์ beta-lactamase ใน class A ตามโครงสร้างโมเลกุล ซึ่งคุณสมบัติหลักของเอนไซม์คือสามารถทำลายยาในกลุ่ม penicillin, cephalosporin (รวมถึง oxyimino-cephalosporin) และ monobactam ได้ แต่ไม่มีฤทธิ์ทำลายยาในกลุ่ม cephamycin และ carbapenem รวมถึงสามารถต้านฤทธิ์ได้ด้วยสารยับยั้งเอนไซม์ beta-lactamase เช่น กรด clavulanic คุณสมบัติดังกล่าวมีความสำคัญในการใช้จำแนกเอนไซม์ ESBL และ AmpC beta-lactamase ซึ่งเป็นเอนไซม์ beta-lactamase ใน class C เอนไซม์ทั้งสองกลุ่มนี้พบได้บ่อยในเชื้อวงศ์ Enterbacteriaceae เช่นเดียวกัน โดยมีข้อเปรียบเทียบคุณสมบัติดังแสดงในตารางที่ 1 เอนไซม์ beta-lactamase ที่มีคุณสมบัติเป็น ESBL มีจำนวนมาก ซึ่งมีความแตกต่างทางโครงสร้างโมเลกุลและคุณสมบัติบางประการ โดยชนิดที่พบระบาดอยู่ในปัจจุบันส่วนใหญ่เป็นสมาชิกของวงศ์ CTX-M, TEM และ SHV ส่วนวงศ์อื่นๆ พบได้น้อย เช่น VEB, OXA, PER, GES, IBC, BES, SFO (ภัทรชัย และอนุชา, 2555)



ภาพที่ 2.3 แสดงโครงสร้างหลักของยาในกลุ่ม beta-lactam ซึ่งประกอบไปด้วยวงแหวน beta-lactam (Guilfoile, 2007)

ตารางที่ 2.1 แสดงคุณสมบัติของเอนไซม์ ESBL และ AmpC beta-lactamase

คุณสมบัติของเอนไซม์	ESBL	AmpC beta-lactamase
การจัดกลุ่มตามโครงสร้างโมเลกุล	Class A	Class C
การจัดกลุ่มตามความสามารถในการออกฤทธิ์	Group 2be	Group 1
การทำลายยาในกลุ่ม cephalosporin รุ่นที่ 3	ได้	ได้
การทำลายยาในกลุ่ม cephalosporin รุ่นที่ 4	ได้	ไม่ได้
การทำลายยา aztreonam	ได้	ได้
การทำลายยาในกลุ่ม cephamycin	ไม่ได้	ได้
การทำลายยาในกลุ่ม carbapenem	ไม่ได้	ไม่ได้
การถูกต้านด้วยสารยับยั้งเอนไซม์ beta-lactamase	ได้	ไม่ได้

(ภัทรชัย และอนุชา, 2555)

ข้อมูลทั่วไปของพื้นที่ที่ศึกษา

1. ข้อมูลทั่วไปของพื้นที่

อุทยานแห่งชาติพุเตย ตั้งอยู่ในจังหวัดสุพรรณบุรี มีเนื้อที่ 198,422 ไร่ จัดตั้งขึ้นเนื่องจากกรมป่าไม้เห็นว่า พื้นที่ป่าเพื่อการอนุรักษ์บางส่วนในเขตป่าสงวนแห่งชาติ ป่าองค์พระ ป่าเขาพระกำ และป่าห้วยพลู ท้องที่อำเภอด่านช้าง จังหวัดสุพรรณบุรี มีสภาพป่าอุดมสมบูรณ์เป็นแหล่งต้นน้ำลำธารในการเกษตร ของจังหวัดสุพรรณบุรีและจังหวัดกาญจนบุรี มีทิวทัศน์สวยงาม สัตว์ป่าชุกชุมสมควรอนุรักษ์ไว้เป็นสมบัติของชาติ จึงแต่งตั้งให้ นายพันเทพ อันตระกูล นักวิชาการกรมป่าไม้ ไปทำการสำรวจบุกเบิกเตรียมการประกาศเป็นอุทยานแห่งชาติ ตั้งแต่ปี 2538 จนถึงปี 2541 จึงได้ประกาศเป็นอุทยานแห่งชาติลำดับที่ 84 ในราชกิจจานุเบกษาเล่มที่ 115 ตอนที่ 67ก ลงวันที่ 30 กันยายน พ.ศ. 2541 โดยใช้ชื่อว่า "อุทยานแห่งชาติพุเตย" ต่อมาได้มีคำสั่งกรมป่าไม้ที่ 2421/2543 ลงวันที่ 12 ธันวาคม พ.ศ. 2543 ให้โอนงานวนอุทยาน "ถ้ำเขาวง" ซึ่งอยู่ในความรับผิดชอบของป่าไม้เขตนครสวรรค์ จำนวน 8,125 ไร่ ผนวกเข้าเป็นพื้นที่ส่วนหนึ่งของอุทยานแห่งชาติพุเตย โดยให้มีการจัดการตามระบบอุทยานแห่งชาติ โดยมีลักษณะตามแสดงในภาพที่ 2.4-2.5 (สำนักอุทยานแห่งชาติ, 2556)

2. ลักษณะภูมิประเทศ

สภาพทั่วไปเป็นเทือกเขาสูงติดต่อกันสลับซับซ้อน จุดสูงสุดที่ยอดเขาเทวดา ระดับความสูง 1,123 เมตร เป็นต้นน้ำลำธาร ซึ่งไหลลงอ่างเก็บน้ำลำตะเพิน ตามโครงการอันเนื่องมาจากพระราชดำริ มีคลอง ลำห้วยต่างๆ เช่น ห้วยเหล็กไหล ห้วยวังน้ำเขียว ห้วยองค์พระ ห้วยท่าเตื่อ ห้วยขมื่น ห้วยองคต ซึ่งเป็นลำน้ำสายหลักของชาวสุพรรณบุรี และเป็นต้นกำเนิดของเขื่อนกระเสียวพันธุ์ไม้และสัตว์ป่า มีสภาพเป็นป่าดิบชื้นเช่น ป่าสนสองใบ ป่าเต็งรังอุทยานแห่งชาติพุเตยมีสัตว์ป่าอาศัยอยู่มากมายหลายชนิดด้วยกัน สัตว์ที่มีเป็นจำนวนมากในพื้นที่ ได้แก่ เสียงผา นกเงือก ชะนี ลิงลม

3. สภาพภูมิอากาศ สภาพอากาศ

มีลมมรสุมพัดผ่านตลอดปี เกิดฤดูกาล 3 ฤดู คือ ฤดูฝน ประมาณ เดือนพฤษภาคม ถึงกลางเดือนตุลาคม ฤดูหนาว ประมาณปลายเดือนตุลาคม ถึงเดือน กุมภาพันธ์ และฤดูร้อน ประมาณกลางเดือนกุมภาพันธ์ ถึงกลางเดือนพฤษภาคม อุณหภูมิเฉลี่ยโดยทั่วไปประมาณ 25-30 องศาเซลเซียส แต่ในฤดูหนาวจะมีอุณหภูมิประมาณ 10-15 องศาเซลเซียส และที่หมู่บ้านกระเหรี่ยงตะเพินคี่นี้มีอุณหภูมิประมาณ 5-6 องศาเซลเซียส

4. หมู่บ้านกระเหรี่ยงตะเพินคี่

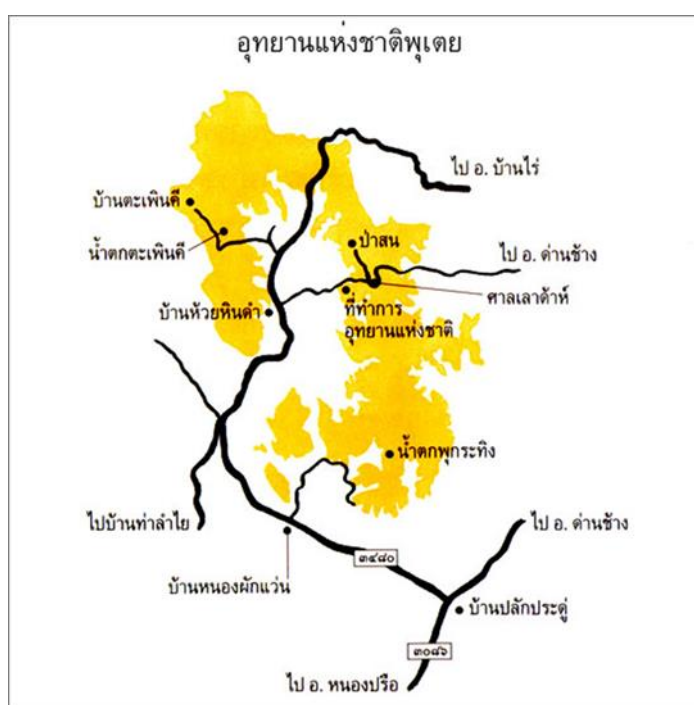
หมู่บ้านกระเหรี่ยงตะเพินคี่ (ที่ตั้งของหน่วยพิทักษ์อุทยานฯ พุเตยที่ 3 ตะเพินคี่) เป็นป่าที่สวยงาม และเป็นที่ตั้งของหมู่บ้านกระเหรี่ยง ชนกลุ่มน้อยที่อาศัยมากกว่า 200 ปี ฝืนป่า และต้นน้ำตะเพินคี่ ยังคงสภาพสมบูรณ์ เหมาะแก่การท่องเที่ยวเชิงผจญภัยล่องไพร เป็นดินแดนแห่งความหนาว

เย็น ในหน้าหนาวอุณหภูมิจะลดลง 5-6 องศาเซลเซียส ยอดเขาเทวดาที่ความสูงกว่า 1000 เมตร และยังเป็นดินแดนรอยต่อของสามจังหวัด คือ สุพรรณบุรี อุทัยธานี และกาญจนบุรี

5. แหล่งน้ำ

5.1 น้ำตกตะเพินคี่น้อย: เป็นน้ำตกขนาดเล็กอยู่ใกล้กับหมู่บ้านตะเพินคี่ มีน้ำไหลตลอดปี เป็นความงามทางธรรมชาติ ที่คนภายนอกไม่ค่อยได้มีโอกาสไปสัมผัส เหมาะสำหรับผู้ที่รักการเดินทางแบบผจญภัยเล็กๆ

5.2 น้ำตกตะเพินคี่ใหญ่: เป็นน้ำตกขนาดเล็กมีสองชั้น ความสูงประมาณชั้นละ 5-6 เมตร มีน้ำไหลตลอดปี เพราะเป็นต้นน้ำและบ่อน้ำผุด ที่เกิดขึ้นเองตามธรรมชาติ และยังมีถ้ำที่สวยงามที่ยังอยู่ระหว่างการสำรวจ



ภาพที่ 2.4 แสดงลักษณะพื้นที่ที่ทำการศึกษา (สำนักอุทยานแห่งชาติ, 2556)

การศึกษาวิจัยที่เกี่ยวข้อง

การศึกษาในครั้งนี้ดำเนินการภายใต้ข้อสมมติฐาน 3 ข้อ ที่กล่าวว่า 1) เชื้อแบคทีเรียในดินเพาะปลูกที่มีความต้านทานต่อโลหะหนัก จะมีคุณสมบัติในการดื้อต่อยาปฏิชีวนะด้วยหรือไม่, 2) มีโอกาสที่จะพบเชื้อแบคทีเรียก่อโรคที่ดื้อต่อยาปฏิชีวนะในดินเพาะปลูกหรือไม่, และ 3) มีโอกาสหรือไม่ที่เชื้อแบคทีเรียดื้อยาปฏิชีวนะจากบริเวณที่ทำการเพาะปลูกจะแพร่กระจาย ไปยังบริเวณใกล้เคียง ดังข้อสันนิษฐานที่กล่าวมานั้นสามารถแยกประเด็นการศึกษาที่เกี่ยวข้องออกเป็น 3 ประเด็นหลัก ได้แก่ 1) ปริมาณแบคทีเรียก่อโรคที่พบในพื้นที่ทางการเกษตร, 2) การทนทานต่อสารอื่นของแบคทีเรีย อาทิเช่น โลหะหนัก และสารเคมีทางการเกษตร, และ 3) การพบลักษณะร่วมกันระหว่างการดื้อต่อยาปฏิชีวนะ และการทนทานต่อโลหะหนัก โดยรายละเอียดของการศึกษาข้อมูลแต่ละส่วนมีดังต่อไปนี้

1. ปริมาณแบคทีเรียก่อโรคที่พบในพื้นที่ทางการเกษตร

โดยทั่วไปแบคทีเรียในดินเพาะปลูกทางการเกษตรพบปริมาณแตกต่างกัน ขึ้นกับชนิดของดินและกิจกรรมในแต่ละบริเวณ เช่น ในช่วง 1×10^6 - 3×10^6 โคโลนี/กรัมดิน (Negrenu et al., 2012) และเป็นที่ทราบกันดีว่าจุลินทรีย์ในดินมีความหลากหลายมาก โดยพบประมาณ 13,000 ชนิด (species) (Giller et al., 1998) โดยตัวอย่างของแบคทีเรียที่พบในดิน ได้แก่ Bacillus, Micrococcus, Staphylococcus, Pseudomonas, Escherichia, Shigella, Xanthomonas, Acetobacter, Citrobacter, Enterobacter, Moraxella และ Methylococcus (Bahig et al., 2008)

2. การทนทานต่อสารเคมีของแบคทีเรีย

โดยทั่วไปเป็นที่ทราบกันดีอยู่แล้วว่าการดื้อยาปฏิชีวนะของแบคทีเรียเกิดจากการเลือกสรรตามธรรมชาติ (Natural selection) เพราะแบคทีเรียแต่ละชนิดจะมียีนดื้อยาอยู่ในตัวอยู่แล้วตามธรรมชาติ แต่สาเหตุที่เป็นปัจจัยหลักคือ การถูกเหนี่ยวนำโดยการใช้อยาปฏิชีวนะ โดยแบคทีเรียจะเกิดพัฒนาการเปลี่ยนแปลงสารพันธุกรรมให้สามารถทนทานต่อการทำลายของยาได้ ดังเช่นนี้เรียกว่า เกิดการกลายพันธุ์ (Mutation) นอกจากนี้ อาจเกิดจากการได้รับยีนดื้อยาจากแบคทีเรียอื่นด้วย กระบวนการส่งถ่ายยีน (Horizontal gene transfer, HGT) ผ่านสารพันธุกรรมชนิดเคลื่อนที่ได้ (Mobile genetic elements) เช่น plasmids, transposons และ integrons ซึ่งกระบวนการรับยีนดื้อยาจากแบคทีเรียอื่นยังประกอบไปด้วยกลไกต่างๆ ดังเช่น transformation (DNA uptake), conjugation (direct contact transfer of mobile plasmids), และ transduction (uptake of naked DNA) (Jury et al., 2010; Taylor et al., 2011)

ในปัจจุบันนี้เริ่มมีงานวิจัยที่ค้นพบว่าในสิ่งแวดล้อมนั้นมีปัจจัยอื่นนอกเหนือจากยาปฏิชีวนะที่สามารถเหนี่ยวนำให้แบคทีเรียมีคุณสมบัติดื้อต่อยาปฏิชีวนะ (Selective pressure) เกิดขึ้น อาทิเช่น สภาวะแวดล้อมที่กดดัน (Environmental stresses) ซึ่งมีผลรบกวนกระบวนการต่างๆ ของเซลล์ ได้แก่ growth-inhibiting stresses, oxidative stress, และ cell envelope damage ส่งผลให้

เซลล์เกิดการปรับตัวให้เข้ากับสภาพแวดล้อมดังกล่าวเพื่อการอยู่รอด (McMahon et al., 2007; Poole, 2012) โดยโลหะหนักจัดเป็นสารประเภทหนึ่งส่งผลให้แบคทีเรียสามารถปรับตัวอยู่รอดได้ (ทนทานต่อโลหะหนัก) ก่อเกิดการพัฒนาระดับยีน ซึ่งมียางานการวิจัยที่เริ่มพบว่า ยีนดื้อยาปฏิชีวนะที่เกิดขึ้นสัมพันธ์กับโลหะหนักที่พบในสิ่งแวดล้อม (Ji et al., 2012) อาทิเช่น Bahig et al. (2008) ทำการทดสอบการทนต่อโลหะหนักของแบคทีเรียที่คัดแยกด้วยการหาค่า Minimum inhibitory concentrations (MIC) โดยพบว่า เชื้อส่วนใหญ่ทนต่อตะกั่วสูง มีค่า MIC 1,200 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร, โคบอล และสารหนู 800 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร, นิกเกิล 1,200 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร, ทองแดง 1,000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และค่าน้อยกว่า 600 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร สำหรับโลหะหนักชนิดอื่นๆ โดยเชื้อที่คัดแยกจากทั้งสองพื้นที่มีการทนทานต่อโลหะหนักมากกว่า 1 ชนิดขึ้นไป โดยเชื้อสามารถใช้ Carbaryl ซึ่งเป็นสารเคมีกำจัดแมลง เป็นแหล่งคาร์บอน และพลังงานในการเจริญเติบโต โดยแบคทีเรีย *Citrobacter* ให้ผลการทดสอบดีที่สุด

3) การพบลักษณะร่วมกันระหว่างการดื้อยาปฏิชีวนะ และการทนทานต่อโลหะหนัก

เมื่อแบคทีเรียมีความทนทานต่อโลหะหนักนั้น มักจะมีกลไกของเซลล์เพื่อช่วยปรับสมดุลเพื่อให้แบคทีเรียสามารถอยู่รอดได้ ซึ่งกลไกเหล่านั้นบางครั้งก็จัดเป็นกลไกเดียวกันกับกลไกการดื้อยาปฏิชีวนะ อาทิเช่น Habi and Daba (2009) ได้ทำการศึกษาเชื้อกลุ่ม Enterobacteriaceae ที่คัดแยกจากบริเวณที่พบการปนเปื้อนของแคดเมียม, ปรอท และตะกั่ว ตรวจพบปริมาณความเข้มข้น 32, 8 และ 4,096 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และพบว่าแบคทีเรียที่มีความทนทานต่อตะกั่วมากที่สุด นอกจากนี้ยังพบการดื้อยาปฏิชีวนะร่วมในกลุ่ม Erythromycin (45.45-68.8%), Tetracyclines (14-61.11%), Streptomycin (16-24%) นอกจากนี้ยังพบว่าการปรากฏของยีนดื้อยากลุ่ม Sulfonamide เช่น sulA และ sulIII สอดคล้องเชิงบวกกับปริมาณทองแดง, สังกะสี และปรอท (Ji et al., 2012)

กรอบแนวคิดในการวิจัย



ภาพที่ 2.6 แสดงกรอบแนวคิดของโครงการวิจัย

บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย

วิธีการศึกษา

การศึกษาในครั้งนี้เป็นการศึกษาต่อเนื่องจากงานวิจัยก่อนหน้า เรื่อง “พฤติกรรมของเกษตรกรในการใช้สารเคมีกำจัดแมลง และศัตรูพืชที่มีผลกระทบต่อคุณภาพดิน และน้ำของชุมชนโดยรอบอุทยานแห่งชาติพุเตย จังหวัดสุพรรณบุรี” ซึ่งผลการศึกษาในงานวิจัยดังกล่าว แสดงให้เห็นว่าชุมชนที่ทำการศึกษาประกอบอาชีพเกษตรกรรม มีการเพาะปลูกพืชไร่บริเวณพื้นที่สูง และยังมีการใช้สารเคมีทางการเกษตรอย่างต่อเนื่องเป็นเวลานาน ประกอบกับบริเวณดังกล่าว เป็นแหล่งต้นน้ำ อีกทั้งยังมีระบบนิเวศที่มีความสมบูรณ์ ด้วยความตระหนักถึงปัญหาด้านสิ่งแวดล้อม และสาธารณสุข อันน่าจะเกิดจากกิจกรรมต่างๆของผู้คนในชุมชน ดังนั้น การศึกษาในส่วนนี้จึงดำเนินการภายใต้สมมุติฐานที่ว่า การใช้สารเคมีทางการเกษตรติดต่อกันเป็นเวลานาน น่าจะส่งผลกระทบต่อการพัฒนาแบคทีเรียดื้อยาขึ้น เพราะสารเคมีต่างๆ โดยเฉพาะโลหะหนักซึ่งอาจพบสะสมอยู่ในบริเวณนั้นมีอิทธิพลต่อการเหนี่ยวนำให้แบคทีเรียพัฒนาคุณสมบัติการดื้อยาขึ้นได้ และถ้าเกิดการแพร่กระจายสู่ชุมชนใกล้เคียง โดยเฉพาะตามแหล่งน้ำที่ใช้อุปโภคบริโภค อาจส่งผลกระทบต่อผู้คนที่ได้รับแบคทีเรียดื้อยาเข้าสู่ร่างกาย ก่อให้เกิดปัญหาทางด้านสาธารณสุขตามมาก็เป็นไปได้

สำหรับการดำเนินการวิจัยในครั้งนี้ ได้แบ่งขั้นตอนการดำเนินงานออกเป็น 3 ส่วน ดังนี้ ส่วนที่ 1 การศึกษาข้อมูลของแบคทีเรียก่อโรคที่พบในดินเพาะปลูก และบริเวณชุมชนที่อยู่ใกล้เคียง รวมทั้งคุณสมบัติการดื้อยาปฏิชีวนะของแบคทีเรียเหล่านั้น ส่วนที่ 2 การศึกษาถึงการปรากฏลักษณะการดื้อยาปฏิชีวนะและการทนทานต่อโลหะหนักร่วมกัน (Co-selection) ในแบคทีเรียก่อโรคที่คัดแยกจากดินเพาะปลูก และชุมชนบริเวณใกล้เคียง และ ส่วนที่ 3 ศึกษาการกระจายตัวของเชื้อแบคทีเรียดื้อยาในสิ่งแวดล้อมบริเวณใกล้เคียง โดยรายละเอียดการดำเนินงานแต่ละส่วนมีดังต่อไปนี้

1. การศึกษาข้อมูลของแบคทีเรียก่อโรคที่พบในดินเพาะปลูก และบริเวณชุมชนที่อยู่ใกล้เคียง รวมทั้งคุณสมบัติการดื้อยาปฏิชีวนะของแบคทีเรียเหล่านั้น

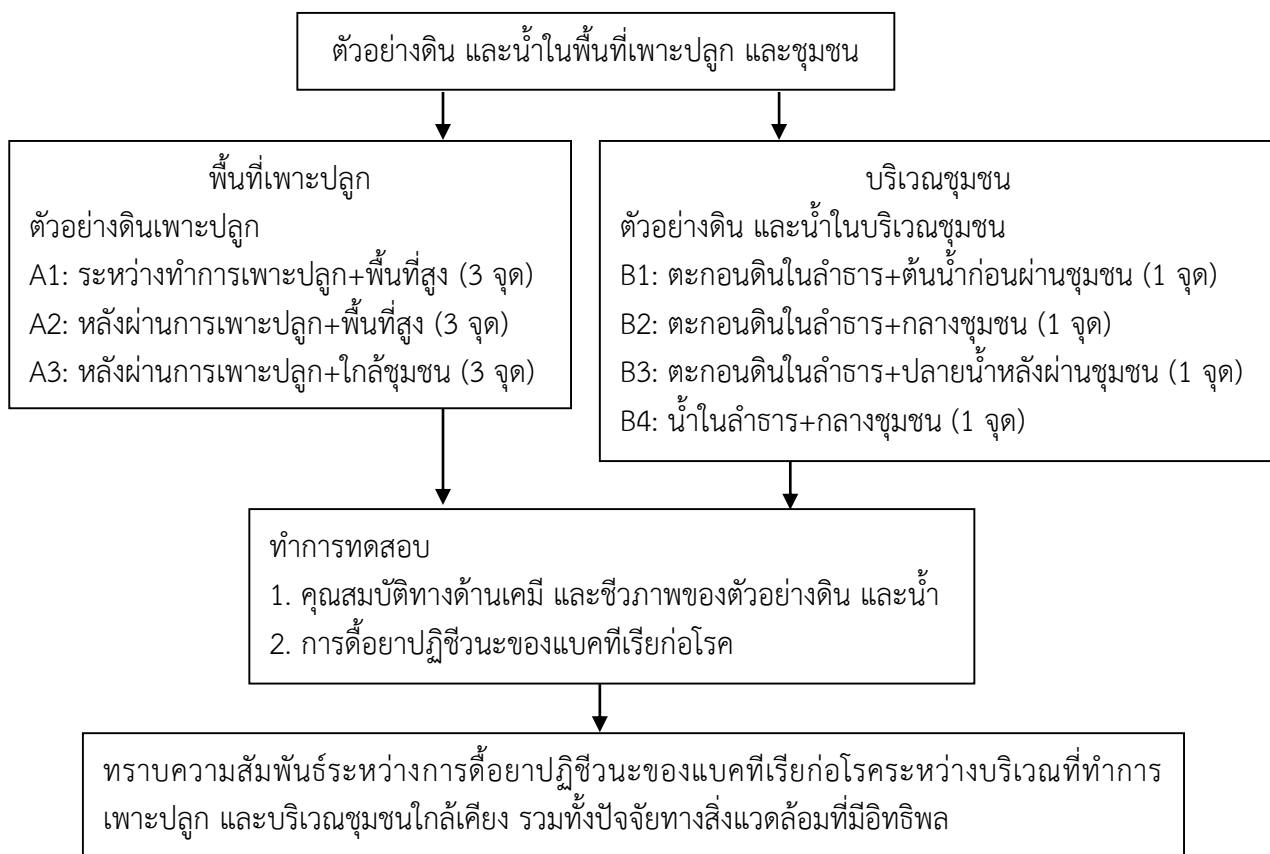
โดยการศึกษาในส่วนนี้มีรูปแบบการเก็บข้อมูลในแต่ละจุด และการดำเนินการทดลอง มีรายละเอียดดังแสดงในภาพที่ 3.1

1.1 การเก็บข้อมูลสำหรับการศึกษา

ตัวอย่างดินที่ทำการเพาะปลูกนั้น ในที่นี้จะทำการเก็บข้อมูลจากบริเวณที่ทำการเพาะปลูกจำนวน 3 แปลง โดยบริเวณพื้นที่สูงซึ่งมีการทำการเกษตรกันอย่างแพร่หลาย จะทำการเก็บข้อมูลจากแปลงเพาะปลูกพืชไร่จำนวน 2 แปลง ซึ่งแบ่งออกเป็นแปลงที่อยู่ระหว่างช่วงที่มีการเพาะปลูก (A1) และแปลงที่อยู่ในช่วงพักแปลง หลังจากการเก็บเกี่ยว (A2) ส่วนแปลงสุดท้ายจะทำการเก็บข้อมูลจากแปลงเพาะปลูกที่อยู่ใกล้ชุมชนที่ต้องการศึกษา โดยแปลงดังกล่าวจัดเป็นแปลงที่ทำการเก็บเกี่ยวผลผลิตแล้ว (A3) สำหรับการเก็บข้อมูลตัวอย่างดินในแต่ละแปลง จะทำการเก็บข้อมูลจำนวน 3 จุด (ที่ทำการเลือกเก็บข้อมูลพื้นที่เพาะปลูกจำนวน 3 จุด เนื่องจากพื้นที่ในแต่ละแปลง

เพาะปลูกมีบริเวณกว้าง จึงทำการสุ่มเก็บตัวอย่างเพื่อใช้เป็นตัวแทน) โดยทำการเก็บดินที่ระดับความลึก 5-10 เซนติเมตร เมื่อวัดจากผิวหน้าดิน

ตัวอย่างตะกอนดิน และน้ำจากชุมชนบริเวณใกล้เคียง ซึ่งในการศึกษานี้จะเก็บข้อมูลจากลำธารขนาดเล็กที่ไหลผ่านชุมชน โดยแบ่งการเก็บข้อมูลออกเป็น 3 ช่วง ได้แก่ ช่วงแรก ต้นน้ำก่อนที่น้ำในลำธารจะไหลผ่านชุมชน (B1), ช่วงที่ 2 ระหว่างน้ำในลำธารไหลผ่านชุมชน (B2), และช่วงที่ 3 ปลายน้ำหลังจากน้ำในลำธารได้ไหลผ่านชุมชน (B3) ส่วนการเก็บข้อมูลจากลำธารทั้ง 3 ช่วง จะเก็บตะกอนดินจากลำธาร ทั้งนี้ น้ำในลำธารค่อนข้างไหลเร็ว เนื่องจากเป็นการไหลจากพื้นที่สูงลงสู่พื้นที่ต่ำ ดังนั้น ตะกอนดินจึงน่าจะเป็นตัวแทนข้อมูลที่มีความเหมาะสมกว่าการเก็บข้อมูลจากตัวอย่างน้ำ ซึ่งสำหรับตัวอย่างน้ำนั้นจะทำการเก็บข้อมูลเฉพาะบริเวณกลางชุมชนเท่านั้น (B4)



ภาพที่ 3.1 แสดงรายละเอียดการเก็บข้อมูล และการทดสอบสำหรับการศึกษาใน ส่วนที่ 1

1.2 การวิเคราะห์คุณสมบัติทางด้านเคมี และชีวภาพจากตัวอย่างดิน

คุณสมบัติทางด้านเคมีของดินเพาะปลูก และตะกอนดิน (A1-A3 และ B1-B3) จะทำการวิเคราะห์พารามิเตอร์ที่สำคัญทางด้านเคมี สำหรับการวิเคราะห์โลหะหนักนั้น จะทำการศึกษากำหนด 5 ชนิด ได้แก่ สังกะสี (Zinc, Zn), นิกเกิล (Nickel, Ni), แคดเมียม (Cadmium, Cd), ทองแดง (Copper, Cu), โครเมียม (Chromium, Cr) (APHA, 2005) โดยโลหะหนักทั้ง 5 ชนิด ที่ทำการ

วิเคราะห์ คัดเลือกมาจากชนิดของโลหะหนักที่มีรายงานการวิจัยพบว่ามีอิทธิพลต่อการเหนี่ยวนำให้แบคทีเรียปรากฏลักษณะการดื้อยาปฏิชีวนะร่วมกับการทนทานต่อโลหะหนัก อีกทั้งบางชนิดยังเป็นแหล่งธาตุอาหารรอง (Trace elements) ที่จำเป็นสำหรับกระบวนการเมตาบอลิซึมของเซลล์ (Ji et al., 2012)

ในการวิเคราะห์คุณสมบัติทางด้านชีวภาพของตัวอย่างดิน ตะกอนดิน (A1-A3 และ B1-B3) และน้ำ (B4) จะทำการวิเคราะห์ปริมาณแบคทีเรียก่อโรค โดยในที่นี้จะใช้แบคทีเรียกลุ่มโคลิฟอร์ม (Coliform bacteria) เป็นดัชนีชี้วัด ซึ่งแบคทีเรียกลุ่มนี้จัดเป็นแบคทีเรียแกรมลบ (Gram negative bacteria) อยู่ในวงศ์ (Family) *Enterobacteriaceae* มีถิ่นอาศัยประจำอยู่ที่บริเวณลำไส้ (Gastrointestinal tract) ของคน และสัตว์เลือดอุ่น โดยทั่วไปนิยมใช้เป็นแบคทีเรียตัวแทนในการศึกษาการปนเปื้อนของสิ่งขับถ่ายจากสิ่งมีชีวิตดังกล่าวสู่สิ่งแวดล้อม เนื่องจากมีช่วงกว้างในการเจริญเติบโต สามารถอยู่รอดได้ภายใต้สภาวะกดดัน (Ishii and Sadowsky, 2008; Łuczkiwicz et al., 2010) การศึกษานี้ทำการทดสอบเพื่อหาปริมาณโคลิฟอร์มทั้งหมด และฟิคอลโคลิฟอร์มโดยใช้วิธีการ Most probable number (MPN) (APHA, 2005)

1.3 การทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะ (Antibiotic susceptibility testing)

การศึกษาในส่วนนี้จะใช้อีโคไล (*Escherichia coli*) เป็นตัวแทนของแบคทีเรียก่อโรค โดยอีโคไลนั้นจัดเป็นแบคทีเรียในกลุ่มโคลิฟอร์ม (Łuczkiwicz et al., 2010) และยังเป็นแบคทีเรียที่ส่วนใหญ่นิยมใช้ศึกษาเรื่องการดื้อยาปฏิชีวนะโดยเฉพาะในสิ่งแวดล้อม (Baum and Marre, 2005; Dolejská et al., 2008) รวมถึงในปัจจุบันอีโคไลจัดเป็นแบคทีเรียที่มีปัญหาการดื้อสูงและดื้อยาหลายชนิดซึ่งถือเป็นปัญหาสำคัญทางด้านสาธารณสุข (นียดา, 2554) เริ่มแรกจะทำการคัดแยกอีโคไลก่อน โดยใช้เทคนิคการกรองผ่านกระดาษกรองฆ่าเชื้อที่มีขนาดรูพรุน (Pore size) 0.45 ไมครอน (Sartorius) ถ้าเป็นตัวอย่างน้ำ (B4) จะใช้น้ำปริมาณ 5-10 มิลลิลิตร ในการกรอง ส่วนตัวอย่างดิน และตะกอนดิน (A1-A3 และ B1-B3) จะทำการเจือจางกับน้ำเกลือ (NaCl) 0.85 เปอร์เซ็นต์ ก่อนที่จะทำการกรอง ส่วนกระดาษกรองที่ผ่านการกรองนั้น จะนำไปบ่มบนอาหาร Chromocult Coliform agar ES® (Merck Microbiology) ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ภายหลังจากบ่มจะทำการตรวจสอบโคโลนีที่ปรากฏ โดยโคโลนีสีน้ำเงิน คือ อีโคไล และโคโลนีสีชมพู คือ แบคทีเรียกลุ่มโคลิฟอร์มสายพันธุ์อื่น สำหรับโคโลนีของอีโคไลจะทำการตรวจสอบซ้ำ โดยการเขี่ยตัวอย่างเชื้อลงบนอาหาร Methylene Blue agar (EMB, Biomark Laboratory) และทำการบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ซึ่งถ้าปรากฏโคโลนีที่มีลักษณะเลื่อมเงา สีเขียวโลหะ (Metallic sheen) แสดงว่าตัวอย่างดังกล่าวจัดเป็นอีโคไล นอกจากนี้ในแต่ละจุดที่ทำการเก็บข้อมูล จะทำการคัดเลือกอีโคไลจำนวน 20 โคโลนี สำหรับการทดสอบความไวต่อยา

การตรวจสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะของอีโคไลจะใช้วิธีการ Disk diffusion method โดยใช้แผ่นยา (Kirby-Bauer, KB, BBL) ที่มีความเข้มข้นมาตรฐานตามวิธีการของ Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI (2012) ซึ่งการศึกษานี้จะใช้เวลาในการทดสอบจำนวน 12 ชนิด แบ่งออกเป็นยาจำนวน 8 กลุ่ม โดยรายละเอียดแสดงดังตารางที่ 3.1 ส่วนการทดสอบเริ่มจากนำโคโลนีเดี่ยวๆของอีโคไลที่คัดแยกได้มาเลี้ยงในอาหาร Tryptic Soy broth (HIMEDIA) และบ่ม

ที่ 37 องศาเซลเซียส จนระดับความขุ่นของอาหารมีค่าเท่ากับ McFarland Standard เบอร์ 0.5 ซึ่งคิดเป็นปริมาณเชื้อเทียบเท่า 1.5×10^8 CFU/ml จากนั้นทำการ Swap อีโคไลที่เตรียมไว้ให้ทำอาหารสำหรับทดสอบความไวต่อยา Muller Hinton agar (BBL) ด้วยไม้พันสำลี ทิ้งไว้ให้อาหารแห้งประมาณ 10-15 นาที และทำการวางแผ่นยาปฏิชีวนะลงบนอาหารดังกล่าว นำไปบ่มที่ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาอ่านผลการทดสอบ โดยการวัดเส้นผ่านศูนย์กลางของ Clear zone ที่เกิดรอบบริเวณแผ่นยาแต่ละชนิดในหน่วยมิลลิเมตร จากนั้นทำการแปรผลเป็นค่า S, I และ R จากการเปรียบเทียบกับค่ามาตรฐาน (CLSI, 2012) และมีการคำนวณแบ่งกลุ่มความไว และการดื้อยาดังสมการที่ 3.1-3.3

โดย	S = Sensitive	เชื้อแบคทีเรียไม่ดื้อต่อยาปฏิชีวนะชนิดนั้นๆ
	I = Intermediate	เชื้อแบคทีเรียอาจมีการพัฒนาจนดื้อต่อยาปฏิชีวนะชนิดนั้นๆ
	R = Resistance	เชื้อแบคทีเรียดื้อต่อยาปฏิชีวนะชนิดนั้นๆ

การคำนวณการดื้อยา

$$\% \text{ การดื้อยา} = \frac{\text{จำนวนอีโคไลที่ดื้อยา}}{\text{จำนวนอีโคไลทั้งหมดที่ทดสอบ}} \times 100 \quad (3.1)$$

(% Resistance)

$$\% \text{ การเริ่มพัฒนาการดื้อยา} = \frac{\text{จำนวนอีโคไลที่เริ่มพัฒนาการดื้อยา}}{\text{จำนวนอีโคไลทั้งหมดที่ทดสอบ}} \times 100 \quad (3.2)$$

(% Intermediate)

$$\% \text{ ความไวต่อการต้านการดื้อยา} = \frac{\text{จำนวนอีโคไลที่ไวต่อการต้านการดื้อยา}}{\text{จำนวนอีโคไลทั้งหมดที่ทดสอบ}} \times 100 \quad (3.3)$$

(% Sensitive)

หมายเหตุ คำว่า “สายพันธุ์อีโคไล” ในที่นี้ คณะผู้วิจัยต้องการสื่อความหมายถึงอีโคไลแต่ละโคโลนีที่ทำการคัดแยก นอกจากนี้ยังมีการหาค่า MAR index (multiple antibiotic resistance index) ซึ่งเป็นค่าที่บ่งบอกระดับการดื้อยาในภาพรวมของแต่ละตัวอย่าง โดยคำนวณจากสูตร “a/b” โดยที่ “a” แทนจำนวนแผ่นยาทดสอบทั้งหมดที่แสดงผลว่าอีโคไลดื้อยานั้นๆ และ “b” แทนจำนวนแผ่นยาทดสอบทั้งหมดที่ใช้ในการทดสอบ (Krumperman 1983) เมื่อค่า “a/b” ของตัวอย่างใดเข้าใกล้ 1 แสดงว่าอีโคไลในตัวอย่างนั้นมีระดับการดื้อยารุนแรง คือเป็นอีโคไลที่ดื้อยาหลายชนิดนั่นเอง และการศึกษานี้ยังมีการวิเคราะห์ผลเพิ่มเติม โดยการจัดกลุ่มตามลักษณะความเหมือน ซึ่งจัดแบ่งได้ตาม 2 วิธีการหลัก ดังต่อไปนี้

1) การจัดแบ่งตามจุดเก็บข้อมูลทั้ง 6 จุด

การจัดกลุ่มการดื้อยาปฏิชีวนะของอีโคไลตามแต่ละบริเวณที่ทำการศึกษา (6 จุด) เพื่อศึกษาความคล้ายคลึงของอีโคไลในแต่ละบริเวณ โดยใช้ค่าร้อยละของการดื้อยา (%R) ในการแบ่งกลุ่ม ด้วยวิธีการ Hierarchical cluster ซึ่งภายใต้วิธีการนี้ใช้การจับคู่ความเหมือนของชุด

ข้อมูลด้วย Squared Euclidean Distance (SED) และ Ward's method ควบคู่กัน (SPSS program) (Berge et al., 2003)

ตารางที่ 3.1 แสดงรายละเอียดของยาปฏิชีวนะที่ใช้ในการทดสอบความไวต่อยาของอีโคไล

ยาปฏิชีวนะ	ตัวย่อ	ความเข้มข้นใน แผ่นยา (µg)	ค่ามาตรฐาน (CLSI, 2012)		
			S	I	R
Aminoglycoside					
- Gentamicin	GM	10	≥15	13-14	≤12
- Streptomycin	S	10	≥15	12-14	≤11
Tetracycline					
- Tetracycline	TC	30	≥15	12-14	≤11
Phenicol					
- Chloramphenicol	CP	5	≥18	13-17	≤12
Fluoroquinolone					
- Norfloxacin	NOR	10	≥17	13-16	≤12
- Ciprofloxacin	CIP	5	≥21	16-20	≤15
Folate pathway inhibitors					
- Trimethoprim/Sulfamethoxazole	ST	1.25/23.75	≥16	11-15	≤10
- Trimethoprim	TMP	5	≥16	11-15	≤10
Cephem					
- Cefotaxime	CTX	30	≥26	23-25	≤22
- Cefazidime	CAZ	30	≥21	18-20	≤17
Penicillin					
- Ampicillin	AMP	10	≥17	14-16	≤13
Beta-lactamase inhibitor combination					
- Amoxicillin/clavulanic acid	AMC	20/10	≥18	14-17	≤13

หมายเหตุ ยา Cephem, Penicillin, และ Beta-lactamase inhibitor combination จัดอยู่ในกลุ่ม beta-lactam เช่นเดียวกัน

2) การจัดแบ่งกลุ่มอีโคไลทั้ง 260 สายพันธุ์

ในที่นี้ทำการจัดแบ่งอีโคไลทั้ง 260 สายพันธุ์ ตามลักษณะความคล้ายกันของรูปแบบการดื้อยาปฏิชีวนะที่ปรากฏ โดยใช้ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของ Clear zone รอบแผ่นยาของยาทั้ง 12 ชนิด เป็นข้อมูลพื้นฐานในการจัดกลุ่ม และใช้วิธีการ k-means cluster ในการ

ประมวลผล (SPSS program) (ที่ใช้วิธีการนี้เนื่องจากเป็นวิธีการที่ใช้กับกลุ่มตัวอย่างมากกว่า 200 ตัวอย่างขึ้นไป) โดยทำการคัดเลือกจำนวน cluster ที่เหมาะสม (ค่า k) ด้วยการใช้แผนภูมิ Dendrogram ของ Hierarchical cluster จากนั้นเมื่อได้ค่า k ที่เหมาะสมแล้วจึงทำการจัดแบ่ง cluster ด้วยวิธีการ k-means ต่อไป (Berge et al., 2003; Sarstedt and Mooi, 2011)

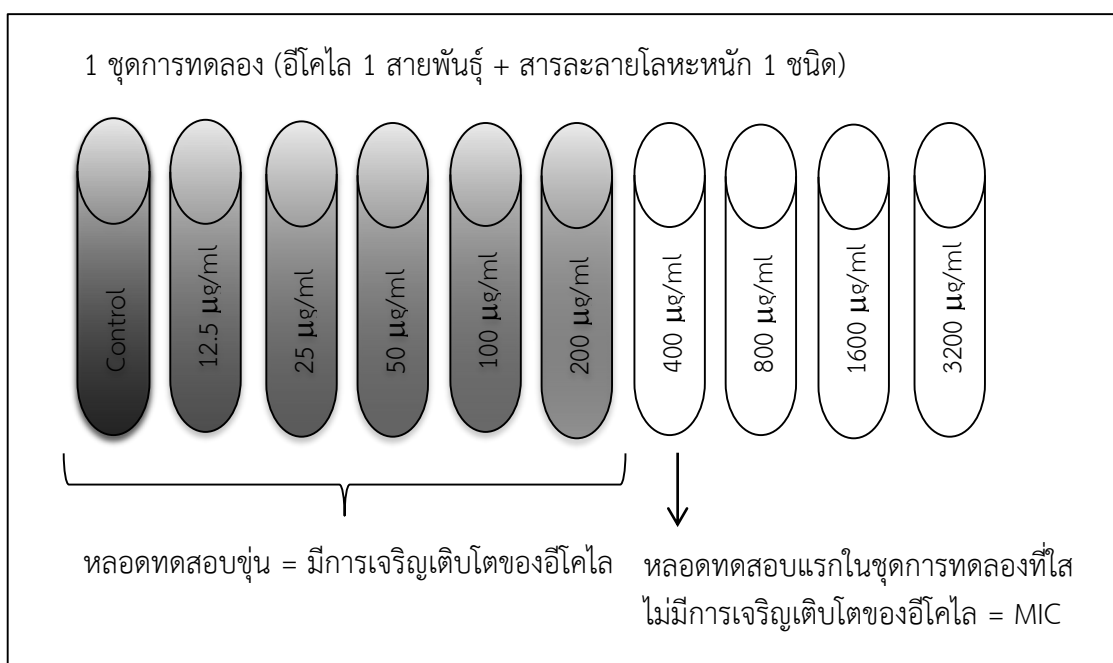
1.4 การทดสอบการผลิตเอนไซม์เบต้าแลคตาเมสชนิด Extended spectrum beta-lactamase (ESBL) ในอีโคไลที่คัดแยก

อีโคไลที่ทำการคัดแยกทั้งหมดจำนวน 260 โคโลนี เพื่อใช้ทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะในหัวช็อกก่อนหน้า (1.3) จะนำมาทดสอบการผลิตเอนไซม์ Extended spectrum beta-lactamase (ESBL) ควบคู่กันไป โดยเอนไซม์ดังกล่าวจะพบมากในแบคทีเรียวงศ์ *Enterobacteriaceae* และสามารถยับยั้งการออกฤทธิ์ของยาในกลุ่ม beta-lactam เช่น penicillin, cephalosporin และ aztreonam โดยการย่อยสลายวงแหวนของยา (Mesa et al., 2006; Rupp and Fey, 2003) ในการทดสอบนั้น วิธีการเตรียมอีโคไลก่อนการ Swap ลงบนอาหาร Muller Hinton agar ใช้วิธีการเช่นเดียวกันกับหัวช็อก 1.3 ส่วนแผ่นยาปฏิชีวนะที่ใช้ในการทดสอบ ประกอบด้วยแผ่นยา AMC (20/10 µg), CTX (30 µg) และ CAZ (30 µg) โดยแผ่นยา AMC จะวางตำแหน่งตรงกลางจานเพาะเชื้อ ส่วนแผ่นยา CTX และ CAZ วางห่างจากจุดศูนย์กลางของยา AMC ประมาณ 15-20 เซนติเมตร ทำการบ่มที่ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง เมื่อครบเวลา อ่านผลการทดสอบจาก Clear zone รอบแผ่นยา AMC กับแผ่นยา CTX หรือ CAZ ที่ออกฤทธิ์เสริมกัน ซึ่งถ้าพบปรากฏการณ์ดังกล่าว แสดงว่าเกิดการผลิตเอนไซม์ ESBL ขึ้น (Jarlier et al., 1988)

2. การศึกษาถึงการปรากฏลักษณะการดื้อต่อยาปฏิชีวนะและการทนทานต่อโลหะหนักพร้อมกัน ในแบคทีเรียก่อโรคที่คัดแยกจากดินเพาะปลูก และชุมชนบริเวณใกล้เคียง

จากผลการศึกษาในส่วนของ 1 จะทำการคัดเลือกอีโคไลมาทดสอบการทนทานต่อโลหะหนักเพิ่มเติม โดยคัดเลือกอีโคไลจากดินเพาะปลูกบนพื้นที่สูงทั้งช่วงระหว่างการเพาะปลูก และหลังการเก็บเกี่ยว (A1 และ A2) รวมทั้งอีโคไลจากตะกอนดินแหล่งน้ำกลางชุมชนใกล้เคียง (B2) จำนวนจุดละ 10 สายพันธุ์ โดยพิจารณาจากรูปแบบการดื้อยาปฏิชีวนะที่ปรากฏ ซึ่งในที่นี้สนใจศึกษาอีโคไลสายพันธุ์ที่มีการดื้อยาหลายกลุ่ม สำหรับเกลือของโลหะในการทดสอบประกอบไปด้วยสังกะสี (Zn^{2+} , $Zn(O_2CCH_3)_2$), นิกเกิล (Ni^{2+} , $NiCl_2 \cdot 6H_2O$), แคดเมียม (Cd^{2+} , $CdCl_2 \cdot 5H_2O$), ทองแดง (Cu^{2+} , $CuSO_4$), โครเมียม (Cr^{3+} , $K_2Cr_2O_7$) ทำการทดสอบหาระดับความเข้มข้นต่ำสุดของโลหะที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของอีโคไล (MIC, Minimum inhibitory concentration) ด้วยวิธีการ Double dilution ในอาหารเหลว โดยความเข้มข้นของโลหะที่ทดสอบอยู่ในช่วงระหว่าง 12.5-3,200 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร (Matyar et al., 2008) วิธีการเริ่มจากนำอีโคไลสายพันธุ์ที่ต้องการศึกษามาเลี้ยงในอาหาร Tryptic Soy broth และบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส ค้างคืน จากนั้นนำมาใช้เป็นแหล่งอีโคไลเริ่มต้นในการทดสอบหาค่า MIC โดยเติมอีโคไลเริ่มต้นลงในอาหาร Luria-bertani broth

พร้อมทั้งปรับให้มีปริมาณอีโคไลเริ่มต้นเทียบเท่ากับ McFarland Standard เบอร์ 0.5 หรือเทียบเท่า ค่าจากการวัดค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างในช่วง 600 นาโนเมตร ซึ่งต้องอยู่ระหว่างค่า 0.05-0.10 บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นทำการเติมสารละลายเกลือของโลหะที่ความเข้มข้นต่างๆลงไป แล้วบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาอ่านผลการทดสอบเพื่อหาค่า MIC โดยการสังเกตจากความขุ่นของหลอดทดสอบเมื่อมองด้วยตาเปล่า ซึ่งหลอดทดสอบแรกจากทั้งชุดการทดลองที่ไม่ปรากฏการเจริญเติบโตของอีโคไล (ตัวอย่างมีลักษณะใส) แล้วนั้น ถือว่าเป็นค่า MIC ของชุดการทดลองนั้นๆ (ภาพที่ 3.2) ส่วนในภาพรวมการศึกษามีชุดการทดลองหาค่า MIC จำนวน 150 ชุด (อีโคไลจำนวน 30 สายพันธุ์ \times เกลือของโลหะจำนวน 5 ชนิด)



ภาพที่ 3.2 แสดงชุดการทดสอบหาค่า Minimum inhibitory concentration (MIC)

3. การศึกษาการกระจายตัวของเชื้อแบคทีเรียที่อยู่ในสิ่งแวดล้อมบริเวณใกล้เคียง

เมื่อเสร็จสิ้นการดำเนินงานทั้ง 2 ส่วน จะมีการวิเคราะห์ข้อมูลในภาพรวมเพื่อประเมินสถานการณ์การดื้อยาจากแหล่งกำเนิดประเภทพื้นที่เพาะปลูกที่มีการใช้สารเคมีติดต่อกันเป็นเวลานาน ซึ่งจะทำให้ทราบถึงความสัมพันธ์ระหว่างการดื้อยาของเชื้อแบคทีเรียในดินกับคุณสมบัติความต้านทานโลหะหนักกว่าจะเป็นจริงตามข้อสมมติฐานหรือไม่ โดยข้อสมมติฐานประกอบด้วย 1) แบคทีเรียในดินเพาะปลูกที่มีความต้านทานต่อโลหะหนัก จะมีคุณสมบัติในการดื้อยาปฏิชีวนะด้วยหรือไม่, 2) มีโอกาสที่จะพบเชื้อแบคทีเรียก่อโรคที่ดื้อยาปฏิชีวนะในดินเพาะปลูกหรือไม่, และ 3) มีโอกาสหรือไม่ที่เชื้อแบคทีเรียดื้อยาปฏิชีวนะจากบริเวณที่ทำการเพาะปลูกจะแพร่กระจายไปยังบริเวณใกล้เคียง

ซึ่งผลการศึกษาคาดว่าพื้นที่ที่ศึกษาน่าจะเป็นอีกแหล่งหนึ่งที่ส่งเสริมให้เกิดการดื้อยาปฏิชีวนะเพิ่มมากขึ้น รวมถึงน่าจะก่อให้เกิดความเสี่ยงต่อสุขภาพจากการปนเปื้อนของเชื้อดื้อยาดังกล่าวออกสู่ชุมชนใกล้เคียง และแพร่กระจายสู่สิ่งแวดล้อม รวมทั้งหาแนวทางที่เหมาะสมในการลดปัญหาดังกล่าว เนื่องจากบริเวณดังกล่าวถือเป็นบริเวณที่ระบบนิเวศมีความอุดมสมบูรณ์และเป็นแหล่งต้นน้ำที่สำคัญ พร้อมทั้งมีการเผยแพร่ผลงานสู่สาธารณชนในรูปผลงานทางวิชาการ เอกสารเผยแพร่แก่ผู้ที่ได้รับผลกระทบ หน่วยงานที่เกี่ยวข้อง และผู้ที่สนใจทั่วไป

สถานที่ทำการทดลอง/เก็บข้อมูล

1. สถานที่ในการเก็บข้อมูล คือ บริเวณพื้นที่เพาะปลูก และบริเวณใกล้เคียงที่คาดว่าน่าจะมีการแพร่กระจายของเชื้อแบคทีเรียดื้อยาปฏิชีวนะ ณ ชุมชนชาวกะเหรี่ยง หมู่บ้านตะเพินคี จังหวัดสุพรรณบุรี
2. สถานที่สำหรับวิเคราะห์ข้อมูล คือ ห้องปฏิบัติการของศูนย์สิ่งแวดล้อม คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยสวนดุสิต

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 และนิกเกิล 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 พุงหญ้า (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) ทั้งนี้อาจเกิดจากการที่บริเวณที่ทำการศึกษามีการใช้สารเคมีทางการเกษตรต่อเนื่องเป็นระยะเวลาอันยาวนาน (สิมน์ส และคณะ, 2556) จึงอาจก่อให้เกิดการปนเปื้อนในดิน นอกจากนี้สังกะสีและทองแดงยังจัดเป็นธาตุอาหารเสริม (Micronutrient) ของพืช โดยสังกะสีเกี่ยวข้องกับการทำงานของเอนไซม์ต่างๆในพืช ส่วนทองแดงจัดเป็นธาตุอาหารเสริมเช่นกัน อีกทั้งเกี่ยวข้องกับปฏิกิริยาการส่งถ่ายอิเล็กตรอน ซึ่งถ้าพบในปริมาณสูงจะก่อให้เกิดความเป็นพิษต่อพืช และคน โดยการพบโลหะหนักปนเปื้อนในดินเป็นประเด็นปัญหาซึ่งส่งผลต่อคุณภาพของดิน และก่อให้เกิดปัญหาทางด้านสาธารณสุขเช่นกัน (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 ($\mu\text{S}/\text{cm}$)	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
นิกเกิล (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
โครเมียม (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
ฟิคอลโคลิฟอร์ม (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 โคลิฟอร์มที่พบส่วนใหญ่จัดเป็นฟิคอลโคลิฟอร์ม และปริมาณที่พบไม่มีความแตกต่างกันระหว่างตัวอย่างดินทั้งสองแหล่ง ($p > 0.05$) โดยตะกอนดินบริเวณต้นน้ำ และกลางชุมชนที่ศึกษาจัดเป็นจุดที่พบแบคทีเรียกลุ่มดังกล่าวมากที่สุด นอกจากนี้แหล่งน้ำในชุมชนยังจัดเป็นแหล่งน้ำแห่งเดียวที่ผู้คนในชุมชนนำมาใช้ในการดำเนินกิจกรรมต่างๆ ดังนั้นจึงมีวิเคราะห์หาปริมาณโคลิฟอร์มในน้ำบริเวณชุมชนเพิ่มเติม ซึ่งพบว่ามีปริมาณโคลิฟอร์มทั้งหมด และฟิคอลโคลิฟอร์มต่ำกว่าในตะกอนดิน ($2.60 \log \text{MPN}/100 \text{ ml}$) ประมาณ $1 \log \text{MPN}/100 \text{ ml}$ 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) ซึ่งมีรายงานพบว่าเหตุการณ์ดังกล่าวได้ส่งอิทธิพลต่อการก่อโรคที่เกี่ยวข้องกับพืคโคลโคลิฟอร์ม อาทิเช่น Typhoid fever, Hepatitis, Cholera, Dermatitis, และ Leptospirosis เป็นต้น

การดื้อยาของอีโคไลที่คัดแยกจากดินเพาะปลูก ตะกอนดิน และน้ำ

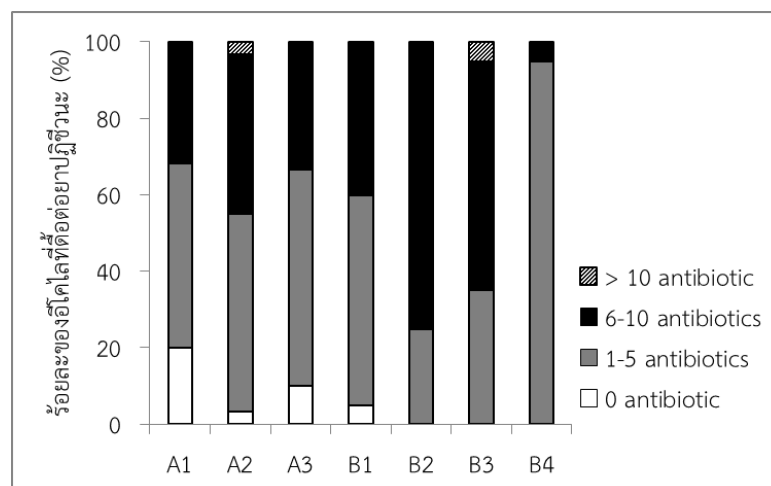
1. การดื้อยาปฏิชีวนะของอีโคไลในภาพรวม

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 ไม่ว่าจะ เป็นบนพื้นที่สูง (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 โลหะหนักซึ่งมีผลเหนี่ยวนำให้เกิดการดื้อยาเพิ่มขึ้น (Ji et al., 2012; Peltier et al., 2010) ประกอบกับการที่มีระยะเวลาการสัมผัสสารมลพิษที่ยาวนานกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับอีโคไลที่อยู่ในแหล่งน้ำ (น้ำในบริเวณที่ศึกษาเป็นน้ำไหลต่อเนื่องตลอดเวลา เนื่องจากอยู่บริเวณพื้นที่สูง)

เมื่อวิเคราะห์ผลการศึกษาในรูปแบบของค่า MAR index (multiple antibiotic resistance index) ซึ่งเป็นค่าที่บ่งบอกระดับการดื้อยาปฏิชีวนะของอีโคไลในภาพรวมของแต่ละจุดที่ศึกษา โดยมีค่าอยู่ในช่วง 0.288-0.500 และสอดคล้องกับข้อมูลจำนวนชนิดยาที่ปรากฏในรูปแบบการดื้อยาของ

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)

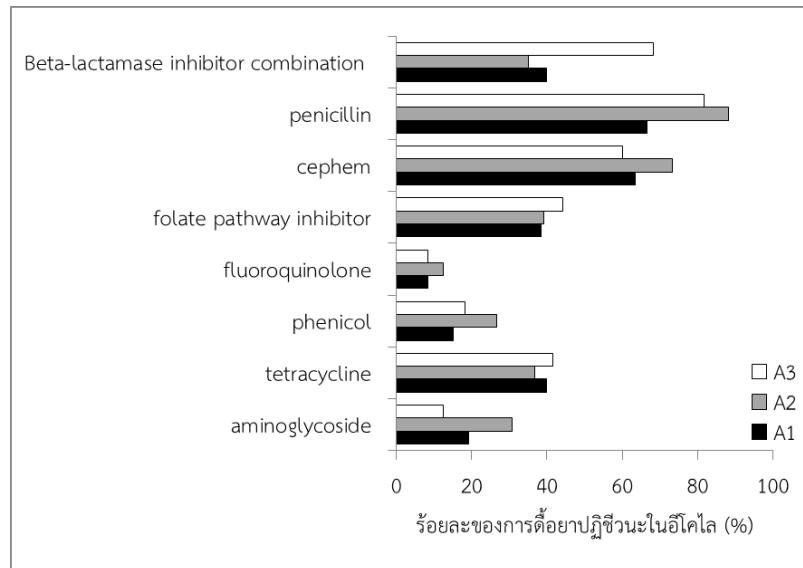


ภาพที่ 4.1 แสดงจำนวนยาปฏิชีวนะที่ทดสอบแล้วปรากฏรูปแบบการดื้อยาในอีโคไลแต่ละสายพันธุ์ โดยแยกผลการทดสอบตามจุดเก็บข้อมูล (A1: ระหว่างทำการเพาะปลูก+พื้นที่สูง, A2: หลังผ่านการเพาะปลูก+พื้นที่สูง, A3: หลังผ่านการเพาะปลูก+ใกล้ชุมชน, B1: ตะกอนดินในลำธาร+ต้นน้ำก่อนผ่านชุมชน, B2: ตะกอนดินในลำธาร+กลางชุมชน, B3: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

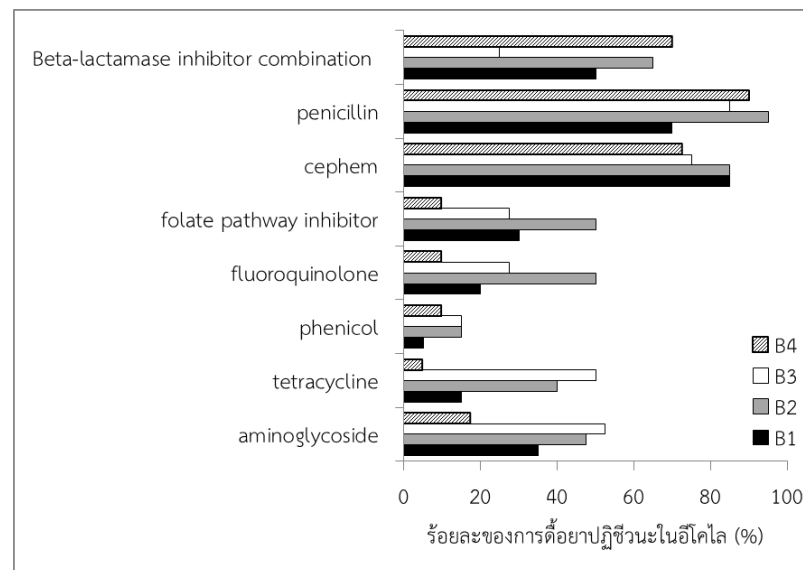
2. การดื้อยาปฏิชีวนะทั้ง 12 ชนิดของอีโคไล และรูปแบบการดื้อยาที่ปรากฏ

ผลการศึกษาการดื้อยาปฏิชีวนะของอีโคไลแต่ละจุด เมื่อพิจารณาแยกออกเป็น 8 กลุ่มยา (ภาพที่ 4.2) ในภาพรวมพบว่าอีโคไลที่ทดสอบมีการดื้อยาในกลุ่ม 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% ในยาในกลุ่ม Cephem, Penicillin และ Beta-lactamase inhibitor combination ตามลำดับ ส่วนการดื้อยาของอีโคไลในกลุ่ม Phenicol มีระดับต่ำเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มอื่น (5.0-26.7%) เมื่อเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างการดื้อยาแต่ละชนิดของอีโคไลในดินเพาะปลูก (A1-A3) และในตะกอนดินของแหล่งน้ำ และน้ำบริเวณชุมชน (B1-B4) พบว่า การดื้อยาในกลุ่ม 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 โดยพบการดื้อยาในกลุ่ม tetracycline สูง (59%) ซึ่งใกล้เคียงกับผลการวิจัยในครั้งนี้ (5-50%)



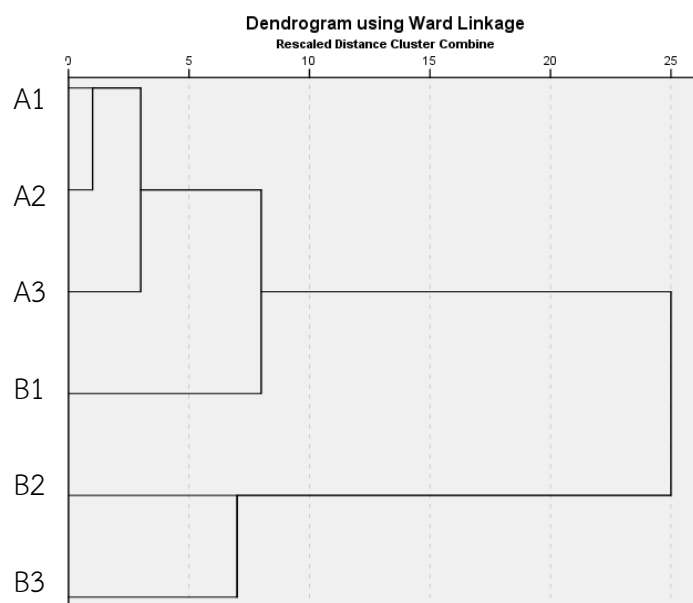
(ก)



(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 แสดงการแบ่งกลุ่มอีโคไลจากแต่ละบริเวณที่ทำการเก็บข้อมูล ด้วยวิธีการ 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 จัดเป็นอีโคไลที่มีระดับความรุนแรงของการดื้อยาปฏิชีวนะสูงที่สุด 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) พบการดื้อยาในกลุ่ม 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

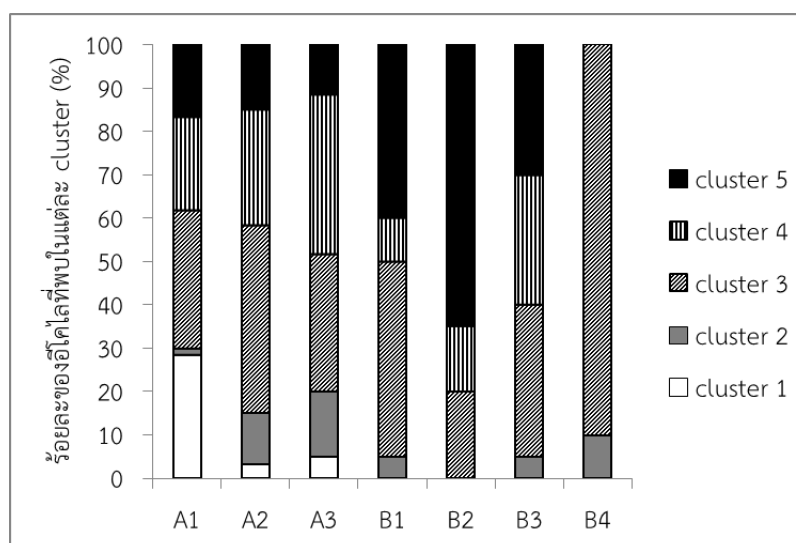
ตารางที่ 4.2 แสดงข้อมูลค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางของ Clear zone รอบแผ่นยาทั้ง 12 ชนิด หลังจากการแบ่งกลุ่มด้วยวิธี k-means cluster

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 แสดงผลดื้อยาปฏิชีวนะ (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 การพัฒนาการดื้อยาส่วนใหญ่ น่าจะเกิดขึ้นหลังผ่านกระบวนการเพาะปลูก 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%) ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองก่อนหน้านี้ที่บ่งชี้ว่าอีโคไลในแหล่งน้ำมีระดับการดื้อยาต่ำกว่าในตะกอนดิน



ภาพที่ 4.4 แสดงข้อมูลการกระจายตัวของอีโคไลจากแต่ละจุดเก็บข้อมูล หลังการแบ่ง cluster ด้วยวิธี k-means

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

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

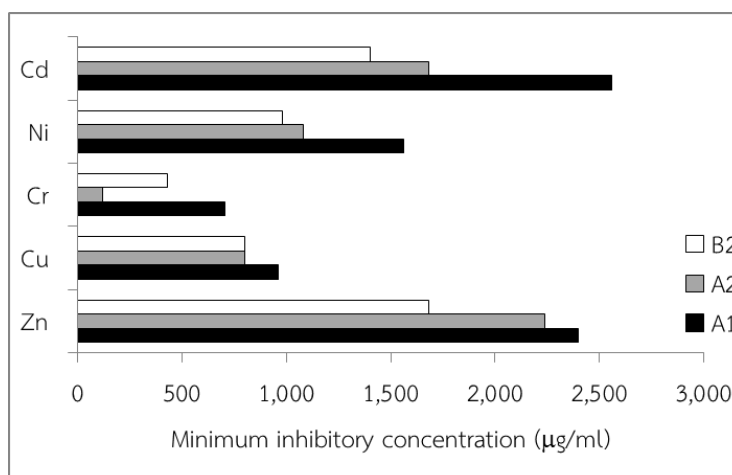
และชุมชน และเกี่ยวข้องกับการดื้อยาในกลุ่ม beta-lactam เช่น cephalosporin และ aztreonam ซึ่งเป็นยาใน generation ใหม่ และใช้เพื่อรักษาโรคในคนอย่างแพร่หลาย ประกอบกับแบคทีเรียในวงศ์ *Enterobacteriaceae* ซึ่งมีอีโคไลเป็นหนึ่งในสมาชิกนั้น พบว่ายีนที่ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับการดื้อยา ESBL มักแฝงตัวอยู่ในสารพันธุกรรมชนิดเคลื่อนที่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

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 ขึ้นสูง โดยผลการศึกษาทั้งหมดแสดงให้เห็นว่า ระดับการดื้อยาปฏิชีวนะในพื้นที่เพาะปลูกมีค่าต่ำกว่าบริเวณชุมชนถึงแม้ว่าค่า 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 และเป็นที่น่าสนใจที่อีโคไลจากตะกอนดินบริเวณต้นน้ำก่อนการไหลผ่านชุมชน (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) เฉกเช่นเดียวกับกิจกรรมทางการเกษตร ซึ่งมีการใช้สารเคมีต่างๆ แต่เนื่องจากการดำเนินกิจกรรมที่แตกต่างกันจึงทำให้รูปแบบการดื้อยาที่ปรากฏแตกต่างกันออกไป ซึ่งสอดคล้องกันกับผลการศึกษาการดื้อยาทั้ง 12 ชนิด ในอีโคไล (ภาพที่ 11) โดยกิจกรรมที่อาจส่งผลกระทบต่อพัฒนาการดื้อยาในชุมชน 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) ปรากฏรูปแบบการดื้อยาคลายคลึงกับบริเวณกลางชุมชน (B2) มากกว่าพื้นที่เพาะปลูก แสดงว่าอาจมีการปนเปื้อนของแบคทีเรียดื้อยา และสารเคมีต่างๆจากบริเวณชุมชน แต่เป็นที่น่าสังเกตว่าอัตราส่วนของแบคทีเรียที่มีระดับการดื้อยารุนแรง (cluster ที่ 4 และ 5) กลับลดลง ทั้งนี้อาจเกิดจากสภาวะที่ปราศจากสารเคมีในระดับที่สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการดื้อยา (Sub-lethal concentrations) ส่งผลให้เกิดเหตุการณ์ดังกล่าว (Martinez, 2009) หรือกล่าวอีกนัยหนึ่งว่าในแหล่งน้ำธรรมชาติถ้าไม่มีสิ่งรบกวนต่อการพัฒนาแบคทีเรียดื้อยา ระบบสิ่งแวดล้อมสามารถลดระดับมลพิษซึ่งเกิดจากแบคทีเรียดื้อยาได้ด้วยตนเอง

การทนทานต่อโลหะหนักของอีโคไลที่คัดแยกจากดินเพาะปลูก ตะกอนดิน และน้ำ

การศึกษาถึงการปรากฏลักษณะการดื้อยาปฏิชีวนะ และการทนทานต่อโลหะหนักร่วมกัน ในอีโคไล ซึ่งการทดสอบนี้ได้ทำการคัดเลือกอีโคไลจำนวน 30 สายพันธุ์ จากดินเพาะปลูกบนพื้นที่สูง ทั้งช่วงระหว่างการเพาะปลูก และหลังการเก็บเกี่ยว (A1 และ A2) และตะกอนดินแหล่งน้ำกลางชุมชน (B2) มาทำการหาค่าระดับความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของอีโคไล (MIC) โดยเกลือของโลหะหนักในการทดสอบประกอบไปด้วยสังกะสี, นิกเกิล, แคดเมียม, ทองแดง และโครเมียม 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) ได้ทำการรวบรวมบทความวิจัยที่ศึกษาเรื่องการทนทานต่อโลหะหนักกับการดื้อยาปฏิชีวนะ ซึ่งพบว่าปริมาณโลหะหนักที่ปนเปื้อนในบริเวณที่ศึกษามีผลต่อการเหนี่ยวนำให้เกิดปรากฏการณ์ดังกล่าว อีกทั้งรูปแบบการทนทานต่อโลหะหนักในอีโคไลที่ทดสอบยังมีค่าแตกต่างกัน ซึ่งน่าจะขึ้นกับสภาพแวดล้อมของแต่ละบริเวณเป็นหลัก โดยโลหะหนักที่ปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อมนั้นส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงประชากรแบคทีเรีย (Matyar et al., 2008) รวมทั้งมีอิทธิพลต่อกลไกการดำรงชีวิตเพื่อความอยู่รอดภายใต้สภาวะนั้นๆ ซึ่งกลไกการต่อต้านการออกฤทธิ์ของโลหะหนักต่อเซลล์ บางกลไกได้ส่งผลให้เกิดการดื้อยาปฏิชีวนะร่วมด้วย 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 R^2 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* ซึ่งเป็นยีนที่ควบคุมกลไกการดื้อยาในกลุ่ม Sulfonamide ยังมีความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญ

กับปริมาณการพบทองแดงและสังกะสี กล่าวโดยสรุปสำหรับการศึกษาในส่วนนี้ ซึ่งแสดงให้เห็นว่า แบคทีเรียที่คัดเลือกมีความทนทานต่อโลหะหนักในระดับสูง และมีความสัมพันธ์กับการเหนี่ยวนำให้เกิดการดื้อยาปฏิชีวนะบางกลุ่ม ซึ่งอาจเป็นผลสืบเนื่องมาจากการใช้สารเคมีในการทำการเกษตร ติดต่อกันเป็นเวลานานซึ่งสอดคล้องกับการทนทานต่อโลหะหนัก (MIC) ในอีโคไลที่คัดแยกจากดิน ในช่วงระหว่างทำการเพาะปลูก (A1) มีค่าสูงกว่าแหล่งอื่น แต่เป็นที่น่าสังเกตว่าระดับค่า MIC ของอีโคไลจากดินหลังการเพาะปลูกมีค่าลดลง แสดงให้เห็นว่า ถ้าลดปริมาณการใช้สารเคมีสำหรับการเพาะปลูกลง ซึ่งหมายความว่าไม่มีสารเหนี่ยวนำซึ่งก่อให้เกิดการทนทานต่อโลหะหนัก และการปรากฏลักษณะการดื้อยาร่วมด้วย อาจช่วยส่งเสริมให้แบคทีเรียในพื้นที่เพาะปลูกสามารถปรับเปลี่ยนรูปแบบการดำรงชีวิตจนกระทั่งกลายเป็นแบคทีเรียที่ไม่มีคุณสมบัติสร้างระดับมลพิษใดๆ (virulence factors) ต่อสิ่งแวดล้อมก็เป็นไปได้

การกระจายตัวของแบคทีเรียดื้อยาในสิ่งแวดล้อมบริเวณใกล้เคียง

จากข้อมูลในส่วนของ การดื้อยาปฏิชีวนะของอีโคไล (ส่วนที่ 1) และข้อมูลการปรากฏลักษณะความทนทานต่อโลหะหนักร่วมด้วย (ส่วนที่ 2) ในที่นี้จะมีการวิเคราะห์ข้อมูลในภาพรวมเพื่อประเมินสถานการณ์การดื้อยาจากแหล่งกำเนิดประเภทพื้นที่เพาะปลูกที่มีการใช้สารเคมีติดต่อกันเป็นเวลานาน ซึ่งผลจากการศึกษาสามารถคาดการณ์คร่าวๆตามสมมุติฐานที่ตั้งไว้ได้ดังนี้

1) แบคทีเรียในดินเพาะปลูกที่ทำการคัดเลือก (อีโคไล) มาทดสอบมีความต้านทานต่อโลหะหนัก ซึ่งในการศึกษานี้มีความต้านทานต่อสังกะสี (2,240-2,400 $\mu\text{g/ml}$) และแคดเมียม (1,680-2,560 $\mu\text{g/ml}$) สูงกว่าโลหะหนักประเภทอื่น (117.5-1,560 $\mu\text{g/ml}$) และยังพบอีกว่าค่า MIC ของโลหะหนักมีความสัมพันธ์กับการดื้อยาบางกลุ่ม เช่น Tetracycline, Folate pathway inhibitors, และ Cephem

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

3) มีโอกาสที่แบคทีเรียดื้อยาปฏิชีวนะจากบริเวณที่ทำการเพาะปลูกจะแพร่กระจายไปยังบริเวณใกล้เคียง ซึ่งสอดคล้องกับผลการประเมินข้อมูลผ่านการจัดกลุ่มตามความคล้ายคลึงของลักษณะการดื้อยาที่ปรากฏ (Hierarchical และ k-means cluster) โดยอีโคไลจากตะกอนดินบริเวณต้นน้ำ (B1) มีลักษณะการดื้อยาคู่คล้ายคลึงกับบริเวณพื้นที่เพาะปลูก แต่เมื่อพิจารณาจากอีโคไลในตะกอนดินบริเวณชุมชน (B2) และบริเวณที่ไหลผ่านชุมชนไปแล้ว (B3) จะพบรูปแบบการดื้อยาที่แตกต่างกันไป ซึ่งแสดงให้เห็นว่ากิจกรรมการดำเนินชีวิตของผู้คนในชุมชนส่งผลต่อปรากฏการณ์ดังกล่าว

กล่าวโดยสรุป คือการใช้สารเคมีทางการเกษตรติดต่อกันเป็นระยะเวลาอันยาวนาน ส่งผลให้แบคทีเรียมีความทนทานต่อโลหะหนัก และมีคุณสมบัติการดื้อต่อยาปฏิชีวนะร่วมด้วย โดยแบคทีเรีย

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

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

สรุปผลการวิจัย

จากการศึกษาข้อมูลในครั้งนี้ ซึ่งเป็นเรื่องที่เกี่ยวข้องกับการใช้สารเคมีทางการเกษตรติดต่อกันเป็นระยะเวลาอันยาวนาน จะส่งผลต่อแบคทีเรียก่อโรคในบริเวณพื้นที่เพาะปลูก และบริเวณชุมชนที่อาศัยอยู่ใกล้เคียงอย่างไรบ้าง โดยเป็นการดำเนินงานวิจัยต่อเนื่องของทางคณะผู้วิจัย (สิมนัส และคณะ, 2556) ซึ่งก่อนหน้ามีนี้ พบว่าชุมชนที่ทำการศึกษาข้อมูลนั้น มีภูมิประเทศตั้งอยู่บนพื้นที่สูงและอยู่ใกล้เคียงกับอุทยานแห่งชาติ ทำการประกอบอาชีพทางการเกษตรโดยการปลูกพืชไร่เป็นหลัก มีการใช้สารเคมีทางการเกษตรติดต่อกันเป็นระยะเวลาอันยาวนาน ซึ่งคาดการณ์ว่าเหตุการณ์ดังกล่าวน่าจะมีอิทธิพลต่อการเปลี่ยนแปลงกลุ่มประชากรในดินเพาะปลูก อีกทั้งส่งผลให้แบคทีเรียที่อยู่รอดมีการปรับตัวให้เข้ากับสภาพแวดล้อมใหม่ ซึ่งวิธีการปรับตัวดังกล่าว อาจรวมถึงการส่งเสริมให้แบคทีเรียเพิ่มคุณสมบัติที่มีความรุนแรง (virulence factors) สามารถก่อให้เกิดปัญหาต่อสุขภาพของผูกรคนในบริเวณใกล้เคียง รวมทั้งอาจก่อให้เกิดการปนเปื้อนสู่สิ่งแวดล้อม เนื่องจากชุมชนดังกล่าวตั้งอยู่บริเวณพื้นที่สูง ซึ่งมีทรัพยากรธรรมชาติอุดมสมบูรณ์ อีกทั้งยังเป็นแหล่งต้นน้ำด้วยเช่นกัน ทางคณะผู้วิจัยได้ตระหนักถึงปัญหาดังกล่าว จึงก่อเกิดงานวิจัยเรื่องนี้ขึ้นมา ซึ่งผลจากการศึกษาในภาพรวมทำให้ทราบว่า แบคทีเรียก่อโรคที่พบตามพื้นที่เพาะปลูก และตะกอนดินในแหล่งน้ำบริเวณใกล้เคียงมีคุณสมบัติการดื้อยาปฏิชีวนะร่วมกับความทนทานต่อโลหะหนักเกิดขึ้น ซึ่งในที่นี้โลหะหนักที่ทำการทดสอบจัดเป็นตัวแทนสารเคมีที่น่าจะเกิดการสะสมตามบริเวณดังกล่าว แต่เมื่อมีการพักดินที่ทำการเพาะปลูกไว้ (หมายถึงไม่มีการสัมผัสสารเคมีในช่วงระยะเวลาหนึ่ง) พบว่าคุณสมบัติความทนทานต่อโลหะหนักนั้นลดลง นอกจากนี้เมื่อพิจารณาในแง่ของการกระจายตัวของแบคทีเรียดื้อยาสู่สิ่งแวดล้อมพบว่า มีการกระจายตัวสู่แหล่งน้ำบ้างเล็กน้อย โดยเฉพาะต้นน้ำ เมื่อเปรียบเทียบกับลักษณะความคล้ายคลึงของรูปแบบการดื้อยาที่ปรากฏ แต่เนื่องจากกิจกรรมการดำเนินชีวิตของผูกรคนในชุมชน ซึ่งคาดว่าน่าจะทำให้เกิดการปนเปื้อนของแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติการดื้อยาสู่แหล่งน้ำเพิ่มเติม ดังนั้นรูปแบบการดื้อยาที่ปรากฏจากบริเวณชุมชนจึงน่าจะเป็นรูปแบบการดื้อยาร่วมกันระหว่างกิจกรรมทางการเกษตร และกิจกรรมของผูกรคนในชุมชน เพราะการเกิดการดื้อยานั้นเกิดขึ้นได้จากการมีสารที่มีอิทธิพลมาเหนี่ยวนำให้เกิดคุณสมบัติดังกล่าวร่วมกับการถ่ายทอดยีนที่เกี่ยวข้องระหว่างแบคทีเรียต่างๆผ่านทางสารพันธุกรรมเคลื่อนที่ เช่น plasmids, transposons และ integrons นอกจากนี้ยังพบอีกว่าแบคทีเรียจากตะกอนดินในลำน้ำหลังจากที่ไหลผ่านชุมชนไปมีระดับการดื้อยาที่รุนแรงลดลง แต่ยังคงสูงกว่าแบคทีเรียจากพื้นที่เพาะปลูก แสดงให้เห็นว่าเมื่อไม่มี (หรือมีการปนเปื้อนในระดับต่ำ) การปนเปื้อนของสารเคมีทางการเกษตร หรือสารปนเปื้อนจากกิจกรรมต่างๆในชุมชนที่สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการดื้อยาระดับความรุนแรงจะค่อยๆลดลง

อภิปรายผล

การศึกษาในที่นี้เป็นการศึกษาที่ค่อนข้างใหม่ เนื่องจากการศึกษาการดื้อยาปฏิชีวนะในพื้นที่สูง ที่มีการนำมาใช้ทางการเกษตร หรือในดินประเภทต่างๆ (Ji et al., 2012) ยังไม่แพร่หลาย โดยส่วนใหญ่จะทำการศึกษาในกรณีที่มีการปนเปื้อนจากน้ำเสียชุมชนที่ผ่านระบบบำบัด หรือการนำมูลสัตว์ หรือกากตะกอนจากระบบบำบัดน้ำเสียมาใช้ประโยชน์ เนื่องจากแหล่งดังกล่าวถือเป็นแหล่งที่สำคัญที่ก่อให้เกิดการแพร่กระจายของแบคทีเรียดื้อยาสู่สิ่งแวดล้อม อีกทั้งการศึกษาข้อมูลการดื้อยาในชุมชน โดยทั่วไปจะศึกษาตามชุมชนในเมืองมากกว่าชุมชนในชนบท ประกอบกับมีปัจจุบันมีรายงานการวิจัยที่เริ่มศึกษาเรื่องการเกิดการดื้อยาปฏิชีวนะร่วมกับการทนทานต่อสารเคมีประเภทต่างๆเพิ่มมากขึ้น จากองค์ความรู้ดังกล่าว ที่พบว่าสารเคมีต่างๆเป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่สำคัญซึ่งส่งอิทธิพลต่อการเหนี่ยวนำการดื้อยา ประกอบกับพื้นที่ที่ทำการศึกษาคือเป็นบริเวณที่มีความอ่อนไหวเนื่องจากอยู่ใกล้แหล่งธรรมชาติ ดังนั้นจึงก่อเกิดงานวิจัยชุดนี้ขึ้น โดยผลการศึกษาที่ได้จะทำการเปรียบเทียบข้อมูลให้ใกล้เคียงกับผลการศึกษาที่สุด โดยการอภิปรายข้อมูลในแต่ละส่วนจะอยู่ในส่วนของผลการทดลองเป็นหลัก

ข้อเสนอแนะในการนำผลการวิจัยไปใช้

จากองค์ความรู้ที่ได้สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ 2 ทางหลักๆ อันประกอบไปด้วย 1) องค์ความรู้เรื่องการเหนี่ยวนำการดื้อยาด้วยสารเคมีจากกิจกรรมทางการเกษตรในพื้นที่เพาะปลูก และการกระจายตัวของแบคทีเรียดังกล่าวสู่ชุมชนใกล้เคียง สามารถนำไปใช้ต่อยอดงานวิจัยเชิงลึกเรื่องต่างๆได้ อาทิเช่น การปนเปื้อนของแบคทีเรียก่อโรคประเภทต่างๆในชุมชน, การสร้างคุณสมบัติก่อโรคต่างๆเมื่อถูกเหนี่ยวนำด้วยสารเคมีทางการเกษตร, สารต่างๆที่มีอิทธิพลเหนี่ยวนำให้เกิดการดื้อยา, การเปลี่ยนแปลงกลุ่มประชากรแบคทีเรียในดินที่ทำการเพาะปลูก หรือ การแพร่กระจายของสารมลพิษที่สำคัญ เป็นต้น และ 2) องค์ความรู้ที่ได้ ทำให้ทราบถึงแนวทางเบื้องต้นที่จะช่วยลดปัญหาแบคทีเรียดื้อยา ซึ่งอาจก่อให้เกิดปัญหาต่อสุขภาพตามมา โดยแนวทางดังกล่าวจะเป็นประโยชน์แก่ผู้คนในชุมชน รวมทั้งชุมชนอื่นๆที่มีลักษณะใกล้เคียงกับพื้นที่ที่ศึกษา โดยแนวทางที่สามารถกระทำได้ประกอบไปด้วย

- การลดการใช้สารเคมีทางการเกษตรลง ใช้เท่าที่จำเป็น หรือมีการใช้ร่วมกับสารชีวภาพประเภทต่างๆ หรือมีการทำการเกษตรอินทรีย์
- การทิ้งช่วงเพื่อพักดินเพาะปลูกก่อนการเริ่มการเพาะปลูกรอบใหม่ น่าจะช่วยลดระดับความรุนแรงของอุบัติการณ์ที่จะเกิดขึ้นได้
- การสร้างระบบการจัดการขยะมูลฝอย และการจัดการน้ำเสียในชุมชนอย่างง่ายจะช่วยลดระดับการดื้อยาลงได้
- เพื่อป้องกันการได้รับแบคทีเรียดื้อยาเข้าสู่ร่างกายโดยตรง หากมีการนำน้ำนั้นมาใช้บริโภค ควรจะมีการฆ่าเชื้อเบื้องต้นก่อน เช่น การต้ม หรือเพื่อความปลอดภัยเบื้องต้นเมื่อนำน้ำมาใช้ใน

กิจกรรมต่างๆควรมีการเก็บกักน้ำในถังที่สะอาด และตั้งทิ้งไว้ในลักษณะระบบเปิดให้ตกตะกอน (หรืออาจใช้สารส้มร่วม) เนื่องจากพลังงานแสงอาทิตย์มีส่วนช่วยในการกำจัดแบคทีเรีย

ข้อเสนอแนะในการทำวิจัยครั้งต่อไป

เพื่อเป็นการป้องกันปัญหาสุขภาพ และสิ่งแวดล้อม ที่เกิดจากการแพร่กระจายแบคทีเรียดื้อยาปฏิชีวนะอย่างยั่งยืน ทางคณะผู้วิจัยมีความเห็นว่าควรดำเนินการศึกษาเชิงลึกถึงปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการพัฒนาการดื้อยาในพื้นที่ รวมทั้งศึกษาวิธีการ หรือสร้างนวัตกรรมที่จะช่วยลดอุบัติการณ์ดังกล่าว เพื่อการแก้ไขปัญหาอย่างตรงประเด็นให้มากที่สุด

บรรณานุกรม

บรรณานุกรมภาษาไทย

- กรมควบคุมมลพิษ. (2554). *สารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชและสัตว์ค้ำค่าง*. ส่วนสารอันตราย, สำนักจัดการกากของเสียและสารอันตราย, กรมควบคุมมลพิษ.
- ดวงพร คันธโชติ. (2545). *นิเวศวิทยาของจุลินทรีย์*. โอเดียนสโตร์. กรุงเทพฯ.
- นพรัตน์ พิชณีย์. (2554). *การกำจัดโคลิฟอร์ม และอีโคไลที่ดื้อยาปฏิชีวนะในระบบตะกอนเร่งที่บำบัดน้ำเสียชุมชน*. ปรินญาวิศวกรรมศาสตรมหาบัณฑิต (วิศวกรรมสิ่งแวดล้อม). มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- นียดา เกียรติยิ่งอังสุลี. (2554). *วิกฤตสถานการณ์เชื้อดื้อยาในไทย*. *Health Today*, 11(126), 70-73.
- แผนงานสร้างกลไกเฝ้าระวังและพัฒนาระบบยา. (2554). *รายงานสถานการณ์ระบบยาประจำปี 2553: สถานการณ์เชื้อดื้อยาและปัญหาการใช้ยาปฏิชีวนะ*. คณะเภสัชศาสตร์. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- พิณทิพย์ พงษ์เพ็ชร. (2544). *แบคทีเรียดื้อยา*. แหล่งที่มา: http://www.pharm.chula.ac.th/clinic101_5/article/bacteria.htm, 3 กรกฎาคม 2553.
- ภัทรชัย กิรติสิน. (2549). *ตำราวิทยาแบคทีเรียการแพทย์*. ภาควิชาจุลชีววิทยา, คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล, มหาวิทยาลัยมหิดล.
- วีรานุช หลาง. (2554). *จุลชีววิทยาล้างแวดล้อม*. คณะศิลปศาสตร์และวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- ศิริพร วงศ์ดินดำ. (2548). *การเปรียบเทียบวิธีการตรวจหา ESBLs และ AmpC และอุบัติการณ์ของ CTX-M gene ในเชื้อ Enterobacteriaceae ที่แยกได้จากโรงพยาบาลรามารามธิบดี*. วิทยานิพนธ์ระดับปริญญาโท, มหาวิทยาลัยมหิดล.
- สินันต์ ศรีเดช, วรรณณา แสนใจกล้า และจุฑารัตน์ ศรีชูเปี่ยม. (2556). *พฤติกรรมของเกษตรกรในการใช้สารเคมีกำจัดแมลง และศัตรูพืชที่มีผลกระทบต่อคุณภาพดิน และน้ำของชุมชนโดยรอบอุทยานแห่งชาติพุเตย จังหวัดสุพรรณบุรี*. มหาวิทยาลัยราชภัฏสวนดุสิต.
- สุภัณฑิตา นิรมรัตน์. (2552). *จุลชีววิทยาและการจัดการมลภาวะทางน้ำและดิน*. สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- สำนักงานอุทยานแห่งชาติ. (2556). *พุเตย*. ศูนย์ข้อมูลสารสนเทศอุทยานแห่งชาติ, กรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่าและพันธุ์พืช. วันที่ทำการสืบค้น 2 กุมภาพันธ์ 2556. http://park.dnp.go.th/visitor/nationparkshow.php?PTA_CODE=1084
- อภิชัย กิรติสิน และอนุชา อภิสารธนรักษ์. (2555). *Beta-lactamase ในแบคทีเรียกรมลอบ จากพื้นฐานสู่เวชปฏิบัติ*. พิมพ์ครั้งที่ 1. วี. เจ. พรินติ้ง. กรุงเทพฯ.

บรรณานุกรมภาษาต่างประเทศ

- APHA, AWWA, WEF, 2005. Standard methods for the examination of water and wastewater. 21st ed. American Public Health Association, Washington, D.C.
- Babai, R. & Ron, E. Z. (1998). An *Escherichia coli* gene responsive to heavy metals. *FEMS Microbiology Letters*, 167, 107-111.
- Bahig, A., Aly, E. A. & Amel, K. A. (2008). Isolation, characterization and application of bacterial population from agricultural soil at Sohag province, Egypt. *Malaysian Journal of Microbiolog*, 4(2), 42-50.
- Baker-Austin, C., Wright, M. S., Stepanauskas, R., & McArthur J. V. (2006). Co-selection of antibiotic and metal resistance. *TRENDS in Microbiology*, 14(4), 176-182.
- Baum, H. V., & Marre, R. (2005). Antimicrobial resistance of *Escherichia coli* and therapeutic implications. *International Journal of Medical Microbiology*, 295, 503-511.
- Berge, A. C. B., Atwill, E. R., & Sischo, W. M. 2003. Assessing antibiotic resistance in fecal *Escherichia coli* in young calves using cluster analysis techniques. *Preventive Veterinary Medicine*, 61, 91-102.
- Bouki, C., Venieri, D., & Diamadopoulou, E. (2013). Detection and fate of antibiotic resistant bacteria in wastewater treatment plants: A review. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 91, 1-9.
- Braconi, D., Bernardini, G. and Santucci, A. (2011). Linking protein oxidation to environmental pollutants: redox proteomic approaches. *Journal of Proteomics*, 74, 2324-2337.
- Bravo, S., Amorós, J.A., Pérez-de-los-Reyes, C., García, F.J., Morena, M.M., Sánchez-Ormeño, M. and Higuera P. (2015). Influence of the soil pH in the uptake and bioaccumulation of heavy metals (Fe, Zn, Cu, Pb and Mn) and other elements (Ca, K, Al, Sr and Ba) in vine leaves, Castilla-La Mancha (Spain). *Journal of Geochemical Exploration*, doi:10.1016/j.gexplo.2015.12.012.
- Breazeal, M. V. R., Novak, J. T., Vikesland, P. J., & Pruden, A. (2013). Effect of wastewater colloids on membrane removal of antibiotic resistance genes. *Water Research*, 47, 130-140.
- Chai, Y., Guo, J., Chai, S., Cai, J., Xue L., & Zhang, Q. (2015). Source identification of eight heavy metals in grassland soils by multivariate analysis from the Baicheng-Songyuan area, Jilin province, northeast China. *Chemosphere*, 134, 67-75.

- Chee-Stanford, J. C., Mackie, R. I., Koike, S., Krapac, I. G., Lin, Y. F., Yannarell, A. C., Maxwell, S., & Aminov, R. I. (2009). Fate and transport of antibiotic residues and antibiotic resistance genes following land application of manure waste. *Journal of Environmental Quality*, 38, 1086-1108.
- CLSI. (2012). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; twenty-second informational supplement. *Clinical and Laboratory Standards Institute*, PA, USA.
- Davies, J. and Davies, D. (2010). Origins and evolution of antibiotic resistance. *Microbiol. Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 74(3), 417-433.
- Dolejšká, M., Šenk, D., Čížek, A., Rybáříková, J., Sychra, O., & Literák, I. (2008). Antimicrobial resistant *Escherichia coli* isolates in cattle and house sparrows on two Czech dairy farms. *Research in Veterinary Science*, 85, 491-494.
- Giller, K. E., Witter, E., & Mcgrath, S. P. (1998). Toxicity of heavy metals to microorganisms and microbial processes in agricultural soils: a review. *Soil Biology & Biochemistry*, 30(10/11), 1389-1414.
- Guilfoile, P. G. (2007). Antibiotic-Resistant Bacteria. *Chelsea House publishing*, NY, USA.
- Habi, S., & Daba, H. (2009). Plasmid incidence, antibiotic and metal resistance among *Enterobacteriaceae* isolated from Algerian streams. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 12(22), 1474-1482.
- Harwalkar, A., Sataraddi, J., Gupta, S., Yoganand, R., Rao, A., & Srinivasa, H. (2013). The detection of ESBL-producing *Escherichia coli* in patients with symptomatic urinary tract infections using different diffusion methods in a rural setting. *Journal of Infection and Public Health*, 6, 108-114.
- Hirsch, R., Ternes, T., Haberer, K., & Kratz, K. L. (1999). Occurrence of antibiotics in the aquatic environment. *The Science of the Total Environment*, 225, 109-118.
- Ishii, S., & Sadowsky, M. J., (2008). *Escherichia coli* in environmental: implication for water quality and human health. *Microbes and Environments*, 23(2), 101-108.
- Jarlier, V., Nicolas, M. H., Fournier, G., & Philippon, A. (1988). Extended broad-spectrum beta-lactamases conferring transferable resistance to newer beta-lactam agents in *Enterobacteriaceae*: hospital prevalence and susceptibility patterns. *Reviews of Infection Diseases*, 10(4), 867-878.
- Ji, X., Shen, Q., Liu, F., Ma, J., Xu, G., Wang, Y., & Wu, M. (2012). Antibiotic resistance gene abundances associated with antibiotics and heavy metals in animal manures and agricultural soils adjacent to feedlots in Shanghai. *Journal of Hazardous Materials*, 235-236, 178-185.

- Jury, K. L., Vancov, T., Stuetz, R. M., & Khan, S. J. (2010). Antibiotic resistance dissemination and sewage treatment plants. *Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology*, ed, Mendez-Vilas A., editor. (Badajoz: Formatex Research Center;), 509–519.
- Kelly, B. G., Vespermann, A., & Bolton, D. J. (2009). Horizontal gene transfer of virulence determinants in selected bacterial foodborne pathogens. *Food and Chemical Toxicology*, 47, 969-977.
- Korzeniewska, E., & Harnisz, M., (2013). Extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-positive Enterobacteriaceae in municipal sewage and their emission to the environment. *Journal of Environmental Management*, 128, 904-911.
- Krumperman, P. H. (1983). Multiple antibiotic resistance indexing of *Escherichia coli* to identify high-risk sources of fecal contamination of food. *Applied and Environmental Microbiology*, 46, 165-170.
- Łuczkiwicz, A., Jankowska, K., Fudala-Ksiazek, S., & Olanczuk-Neyman, K. (2010). Antimicrobial resistance of fecal indicators in municipal wastewater treatment plant. *Water research*, 44, 5089-5097.
- Maal-Bared, R., Bartlett, K. H., Bowie, W. R., & Hall, E. R. (2013). Phenotypic antibiotic resistance of *Escherichia coli* and *E. coli* O157 isolated from water, sediment and biofilms in an agricultural watershed in British Columbia. *Science of the Total Environment*, 443, 315-323.
- Martinez, J.L. (2009). Environmental pollution by antibiotics and by antibiotic resistance determinants. *Environmental Pollution*, 157, 2893-2902.
- McMahon, M. A. S., Xu, J., Moore, J. E., Blair, I. S., & McDowell, D. A., (2007). Environmental stress and antibiotic resistance in food-related pathogens. *Applied and environmental microbiology*, 73(1), 211-217.
- Matyar, F., Kaya, A., & Dinçer, S. (2008). Antibacterial agents and heavy metal resistance in Gram-negative bacteria isolated from seawater, shrimp and sediment in Iskenderun Bay, Turkey. *Science of the Total Environment*, 407, 279-285.
- Mesa, R. J., Blanc, V., Blanch, A. R., Cortés, P., Genzález, J. J., Lavilla, S., Miró, E., Muniesa, M., Saco, M., Tórtola, M. T., Mirelis, B., Coll, P., Llagostera, M., Prats, G., & 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.

- Morente, E. O., Fernández-Fuentes, M. A., Burgos, M. J. G., Abriouel, H., Pulido, R. P., & Gálvez, A. (2013). Biocide tolerance in bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 162, 13-25.
- Mooi, E., & Sarstedt, M. (2011). A concise guide to market research: the process, data, and methods using IBM SPSS statistics. Springer, Heidelberg.
- Negreanu, Y., Pasternak, Z., Jurkevitch, E., & Cytryn, E. (2012). Impact of treated wastewater irrigation on antibiotic resistance in agricultural soils. *Environmental Science and Technology*, 46, 4800-4808.
- Nies, D. H. (1999). Microbial heavy-metal resistance. *Apply Microbiology and Biotechnology*, 51, 730-750.
- Parajuli, P. B., Mankin, K. R., & Barnes, P. L. (2009). Source specific fecal bacteria modeling using soil and water assessment tool model. *Bioresource technology*, 100, 953-963.
- Peltier, E., Vincent, J., Finn, C. and Graham, D.W. (2010). Zinc-induced antibiotic resistance in activated sludge bioreactors. *Water Research*, 44, 3829-3836.
- Poole, K. (2012). Stress responses as determinants of antimicrobial resistance in Gram-negative bacteria. *Trends in Microbiology*, 20(5), 227-234.
- Rupp, M. E., & Fey, P. D. (2003). Extended spectrum β -lactamase (ESBL)-producing Enterobacteriaceae considerations for diagnosis, prevention and drug treatment. *Drugs*, 63(4), 353-365.
- Santamaria, J., & Toranzos, G. A. (2003). Enteric pathogens and soil: a short review. *International Microbiology*, 6, 5-9.
- Seiler, C., & Berendonk, T. U. (2012). Heavy metal driven co-selection of antibiotic resistance in soil and water bodies impacted by agriculture and aquaculture. *Frontier in Microbiology*, December (3), Article399, 1-10.
- Taylor, N. G. H., Verner-Jeffreys, D. W., & Baker-Austin, C. (2011). Aquatic systems: maintaining, mixing and mobilising antimicrobial resistance? *Trends in Ecology and Evolution*, 26(6), 278-284.
- Unno, T., Han, D., Jang, J., Lee, S. N., Kim, J. H., Ko, G., Kim, B. G., Ahn, J. H., Kanaly, R. A., Sadowsky, M. J., & Hur, H. G. (2010). High diversity and abundance of antibiotic-resistant *Escherichia coli* isolated from humans and farm animal hosts in Jeonnam Province, South Korea. *Science of the Total Environment*, 408, 3499-3506.

- Webster, L. F., Thompson, B. C., Fulton, M. H., Chestnut, D. E., Van Dolah, R. F., Leight, A. K., & Scott, G. I. (2004). Identification of sources of *Escherichia coli* in South Carolina estuaries using antibiotic resistance analysis. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 298, 179-195.
- Zhang, X. X. & Zhang, T. (2011). Occurrence, abundance, and diversity of tetracycline resistance genes in 15 sewage treatment plants across China and other global locations. *Environmental Science and Technology*, 45, 2598-2604.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

ภาพการเก็บตัวอย่าง

ภาพคณะผู้วิจัยลงพื้นที่เพื่อเก็บตัวอย่าง ณ ชุมชนชาวกระเหรี่ยง หมู่บ้านตะเพินคี
จังหวัดสุพรรณบุรี



ภาพคณะผู้วิจัยลงพื้นที่เพื่อเก็บตัวอย่าง ณ ชุมชนชาวกระเหรี่ยง หมู่บ้านตะเพินคี
จังหวัดสุพรรณบุรี (ต่อ)



ภาพคณะผู้วิจัยลงพื้นที่เพื่อเก็บตัวอย่าง ณ ชุมชนชาวกระเหรี่ยง หมู่บ้านตะเพินคี
จังหวัดสุพรรณบุรี (ต่อ)



ภาคผนวก ข

แผ่นพับเผยแพร่ความรู้

อีโคไลมีชื่อเต็มๆว่า เอสเชอริเชีย โคลิ (Escherichia coli) เป็นเชื้อแบคทีเรียประจำถิ่นที่พบได้ในลำไส้ของคนและสัตว์เลือดอุ่นทั่วไป จึงตรวจพบได้จากอุจจาระในปริมาณมาก โดยปกติอีโคไลประจำถิ่นเป็นสายพันธุ์ที่ไม่ก่อโรค แต่อาจฉวยโอกาสก่อโรคในคนที่มีภูมิคุ้มกันบกพร่องได้

อีโคไลชนิดก่อโรค

อีโคไลที่เป็นสาเหตุของโรคอุจจาระร่วงในคนสามารถจำแนกได้เป็นกลุ่มต่างๆ ตามลักษณะการก่อโรคได้แก่

เอนเทอโรท็อกซิเจนิก อีโคไล (Enterotoxigenic E. coli) สายพันธุ์นี้ทำให้เกิดอาการท้องร่วง เป็นน้ำขาวขาวคล้ายอหิวาตกโรค

เอนเทอโรเพโทเจนิ อีโคไล (Enteropathogenic E. coli) สายพันธุ์นี้ทำให้เกิดอาการท้องร่วงอย่างรุนแรงเชื่อนี้ทำให้เกิดโรคอุจจาระร่วงแบบเรื้อรัง และทำให้ถึงตาย

เอนเทอโรอินเวซีฟ อีโคไล (Enteroinvasive E. coli) สายพันธุ์นี้ทำให้เกิดอาการคล้ายบิดจากเชื้อซิเจลลา แต่มักไม่เข้าสู่กระแสเลือด

เอนเทอโรฮีโมเรจิก อีโคไล (Enterohemorrhagic E. coli) สายพันธุ์นี้ทำให้เกิดอาการท้องร่วงอย่างรุนแรงอาจมีเลือดปน อาจมีไข้หรือไม่มีไข้ได้ อาเจียน สร้างสารพิษที่ทำลายเซลล์

กลไกการเกิดโรค

เชื้อสามารถสร้างสารพิษซิกา ซึ่งแบ่งย่อยออกเป็น 2 กลุ่ม คือ Shiga toxin 1 (STX1) และ Shiga toxin 2 (STX2) นอกจากนั้น เชื้อสร้างโปรตีนอินติมิน (Intimin) ซึ่งเชื้อใช้ในการเกาะติดกับเซลล์เยื่อผนังลำไส้ และสร้างสารพิษชนิดเอนเทอโรฮีโมลัยซิน (enterohaemolysin) ซึ่งมีผลต่อภาวะเม็ดเลือดแดงแตกและไตวาย

การป้องกันการติดเชื้อ

ป้องกันการติดเชื้อได้โดยการรับประทานอาหารปรุงสุก ส่วนผัก ผลไม้ ต่างๆ ต้องล้าง ด้วยน้ำสะอาดหลายๆ ครั้ง หรือแช่ผัก ผลไม้ในน้ำด่างทับทิม น้ำส้มสายชู ยาล้างผักแช่ทิ้งไว้ ประมาณ 15 นาที แล้วล้างด้วยน้ำสะอาด ก็จะสามารถชะล้างเชื้อจุลินทรีย์ทุกชนิดที่ปนเปื้อนได้ ดังนั้น การดูแลสุขอนามัย โดยเฉพาะการดื่มน้ำ อาหารที่สะอาด ปรุงสุก ตลอดจนนอนามัยส่วนบุคคล เช่น ล้างมือให้สะอาดทุกครั้งหลังเข้าห้องน้ำ ก่อนรับประทานอาหาร ก่อนปรุงอาหารให้ผู้อื่น สามารถป้องกันการติดเชื้อและการแพร่เชื้อโรคให้ผู้อื่นได้ และที่สำคัญ ควรหลีกเลี่ยงการบริโภคผัก ผลไม้ และเนื้อสัตว์ที่นำเข้ามาจากต่างประเทศ เพราะจนกระทั่งปัจจุบัน ยังไม่สามารถพบแหล่งที่มาของเชื้อ

ที่มา : รศ. ดร. จันทร์เพ็ญ วิวัฒน์

ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

การเกิดการดื้อยาของแบคทีเรียเกิดขึ้นได้ 2 แนวทางคือ

1. เกิดจากการเลือกสรรตามธรรมชาติ (Natural selection) แบคทีเรียแต่ละชนิดจะมียีนดื้อยาอยู่ในตัวอยู่แล้วตามธรรมชาติ เมื่อแบคทีเรียมีการสัมผัสกับยาปฏิชีวนะมากและนานขึ้น ยาจะทำลายเชื้อที่ไม่ดื้อยาจนหมด และไม่สามารถทำลายส่วนที่ดื้อต่อยาได้ ดังนั้นจึงมีการเพิ่มจำนวนและแสดงออกเป็นแบคทีเรียดื้อยาอย่างสมบูรณ์

2. เกิดจากการเหนี่ยวนำให้เกิดโดยการใช้ยาปฏิชีวนะ แต่ละชนิดจะมีความไวต่อยาปฏิชีวนะ แต่เมื่อมีโอกาสสัมผัสกับยาปฏิชีวนะ โดยเฉพาะในขนาดและระยะเวลาในการให้ที่ไม่เหมาะสมที่จะทำลายเชื้อได้หมด เชื้อก็จะพัฒนาการเปลี่ยนแปลงสารพันธุกรรมให้สามารถทนทานต่อการทำลายของยาได้ เชื้อดื้อยาเหล่านี้ อาจเกิดจากการได้รับยีนดื้อยาจากเชื้ออื่น ด้วยกระบวนการต่างๆ (Horizontal gene transfer, HGT) ผ่านสารพันธุกรรมชนิดเคลื่อนที่ได้ (Mobile genetic elements) (Jury et al., 2010; Taylor et al., 2011)

ประวัติผู้วิจัย

ที่ปรึกษาโครงการวิจัย

1. ชื่อ - นามสกุล (ภาษาไทย) รศ.ดร.วิไล เจียมไชยศรี
(ภาษาอังกฤษ) Assoc.Prof.Wilai Chiemchaisri

2. หน่วยงานและที่อยู่

ภาควิชาวิศวกรรมสิ่งแวดล้อม คณะวิศวกรรมศาสตร์
มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ จตุจักร กรุงเทพฯ 10900
โทร 02-7970999 ต่อ 1015
โทรสาร 02-579-0730
อีเมลล์: fengwlc@ku.ac.th

3. ประวัติการศึกษา

2530 วิทยาศาสตร์บัณฑิต (เทคนิคการแพทย์) มหาวิทยาลัยมหิดล
2536 Master of Science (Water and Wastewater Engineering)
Asian Institute of Technology, Thailand
2543 Doctor of Technical Science (Environmental Technology and
Management), Asian Institute of Technology, Thailand

4. ประวัติการทำงาน

2549-ปัจจุบัน รองศาสตราจารย์ ภาควิชาวิศวกรรมสิ่งแวดล้อม คณะวิศวกรรมศาสตร์
มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
2546-2548 ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ภาควิชาวิศวกรรมสิ่งแวดล้อม คณะวิศวกรรมศาสตร์
มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
2540-2546 อาจารย์ ภาควิชาวิศวกรรมสิ่งแวดล้อม คณะวิศวกรรมศาสตร์
มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
2539 อาจารย์ ภาควิชาเคมีทรัพยากรสิ่งแวดล้อม คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหาร ลาดกระบัง
2538 รองนักวิจัย สถาบันสิ่งแวดล้อมไทย
2531-2536 ผู้ช่วยวิจัย/รองนักวิจัย
ภาควิชาวิศวกรรมกรรมสิ่งแวดล้อม สถาบันเทคโนโลยีแห่งเอเชีย

5. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ

การศึกษาการย่อยสลายก๊าซมีเทนเพื่อลดโลกร้อนในหน้าดินหลุมฝังกลบมูลฝอย การบำบัด
ของเสียและน้ำเสียทางชีวภาพ การศึกษาจุลินทรีย์ในระบบบำบัดของเสียทางชีวภาพ
การศึกษาความเป็นพิษของสารย่อยสลายยากและยาปฏิชีวนะในน้ำเสีย

6. ประสบการณ์ในการสอนในระดับอุดมศึกษา

- 1) 01210434 วิศวกรรมนิเวศวิทยา ภาควิชาวิศวกรรมสิ่งแวดล้อม คณะวิศวกรรมศาสตร์ 2543-ปัจจุบัน
- 2) 01210314 ปฏิบัติการวิศวกรรมสิ่งแวดล้อม ภาควิชาวิศวกรรมสิ่งแวดล้อม คณะวิศวกรรมศาสตร์ 2543-ปัจจุบัน
- 3) 01210517 วิศวกรรมบำบัดแบบธรรมชาติ ภาควิชาวิศวกรรมสิ่งแวดล้อม คณะวิศวกรรมศาสตร์ 2551-ปัจจุบัน
- 4) 01210575 Environmental and Health Risk Assessment ภาควิชาวิศวกรรมสิ่งแวดล้อม คณะวิศวกรรมศาสตร์ 2554-ปัจจุบัน
- 5) 01210591 ระเบียบวิธีวิจัยทางวิศวกรรมสิ่งแวดล้อม ภาควิชาวิศวกรรมสิ่งแวดล้อม คณะวิศวกรรมศาสตร์ 2543-ปัจจุบัน
- 6) 01210514 การประเมินความเสี่ยงทางสิ่งแวดล้อม ภาควิชาวิศวกรรมความปลอดภัย คณะวิศวกรรมศาสตร์ 2543-ปัจจุบัน

7. การฝึกอบรมทางวิชาชีพ

- 1) โครงการ “Waste Audit and Reduction Workshop for Small Scale and Medium Scale Textile Dyeing Industries” โดย Canadian International Development Agency (CIDA) ที่ประเทศไทย ระหว่างวันที่ 19-22 ธันวาคม 2536
- 2) โครงการ “Application of Remote Sensing and GIS for Environmental Management of Lake and Lake Basin” โดย ILEC, UNEP and AIT ที่ประเทศไทย ระหว่างวันที่ 4-22 ตุลาคม 2536
- 3) โครงการ “Program on Industry and Environmental Protection-ASEAN” โดย Association for Oversea Technical Scholarship (AOTS) ที่ประเทศญี่ปุ่น ณ เมืองโยโกฮามา ระหว่างวันที่ 28 กุมภาพันธ์ 2537 ถึง 18 มีนาคม 2537
- 4) โครงการ “Environmental Modeling Workshop: Application of Mathematical Modeling on Environmental Planning and Management” โดยสถาบันวิจัยสภาวะแวดล้อม (Environmental Research Institute) จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ระหว่างวันที่ 24-25 มิถุนายน 2545
- 5) โครงการ “International Short-Term Training Course on Toxicology of Pesticides and Industrial Chemicals; Occupational Health and Safety” โดยสถาบันวิจัยจุฬาภรณ์ (CRI) ภายใต้การสนับสนุนของ ASEAN Foundation ณ กรุงเทพมหานคร ระหว่างวันที่ 17-21 กุมภาพันธ์ 2546
- 6) โครงการ “Water Reuse Technology” โดยการสนับสนุนจาก Japan International Cooperation Agency (JICA) ที่ประเทศ ญี่ปุ่น ณ กรุงโตเกียว ระหว่างวันที่ 11-18 มิถุนายน 2552

7) โครงการ “Latest Membrane Technology and Water Reuse Management” โดย Japan International Cooperation Agency (JICA) ที่ประเทศ ญี่ปุ่น ณ กรุงโตเกียว ระหว่างวันที่ 9-16 สิงหาคม 2553

8. ประสบการณ์ในการทำโครงการวิจัยในฐานะหัวหน้าโครงการ

- 1) ชื่อโครงการวิจัย การผลิตเมทานอลจากมีเทนโดยกระบวนการทางชีวภาพ (Biological Methanol Production from Methane) ทุนวิจัย สวพ. ปีงบประมาณ 2549 รหัสโครงการ รหัสโครงการ ว-ท (ด) 47.49
- 2) โครงการวิจัย การบำบัดน้ำชะมูลฝอยโดยระบบบำบัดด้วยดินแบบประดิษฐ์.(Treatment of Solid Waste Leachate by Modified-Land Treatment System) ทุนวิจัย สวพ. ปีงบประมาณ 2549 รหัสโครงการ ว-ท (ด) 43.50
- 3) การใช้สิ่งมีชีวิตติดตามผลกระทบสิ่งแวดล้อมของก๊าซและน้ำชะจากพื้นที่ฝังกลบมูลฝอยชุมชนโดยวิธีโคเมทในพีช (Biomonitoring of Environmental Impact of Landfill Gas and Leachate from Municipal Solid Waste Landfill by Plant Comet Assay) ทุนวิจัย สวพ. ปีงบประมาณ 2550 รหัสโครงการ ว-ท (ด) 72.51 จำนวน
- 4) การบำบัดดินปนเปื้อนน้ำมันหล่อลื่นด้วยพืช (Phytoremediation of Lubricant Contaminated Soil) ทุนวิจัย สวพ. ปีงบประมาณ 2552 รหัสโครงการ ว-ท (ด) 69.52
- 5) การติดตามทางชีวภาพของผลกระทบของสารอินทรีย์ระเหยจากพื้นที่กำจัดมูลฝอยด้วยวิธีโคเมทในพีช ทุนวิจัย สวพ. ปีงบประมาณ 2553 รหัสโครงการ พ-ท (ด) 105.53
- 6) ศักยภาพของจุลินทรีย์เมทาโนโทรฟในการย่อยสลายขยะพลาสติกในหลุมฝังกลบแบบกึ่งมีอากาศ ปีงบประมาณ 2556 รหัสโครงการ พ-ท (ด) 159.56
- 7) การกำจัดเชื้อแบคทีเรียดื้อยาปฏิชีวนะในถังปฏิกรณ์เยื่อกรองแบบสองชั้นที่บำบัดน้ำชะมูลฝอยจากหลุมฝังกลบ ปีงบประมาณ 2557 รหัสโครงการ ว-ท (ด) 79.57

9. ประสบการณ์การทำวิจัยร่วมกับต่างประเทศ

- 1) โครงการวิจัย เรื่อง: Sustainable Solid Waste Landfill Management in Asia Phase I ได้รับทุนวิจัยจาก Swedish International Development Cooperation Agency ปี พ.ศ. 2544-2546 (ในฐานะผู้ร่วมวิจัย)
- 2) โครงการวิจัย เรื่อง: Sustainable Solid Waste Landfill Management in Asia Phase II ได้รับทุนวิจัยจาก Swedish International Development Cooperation Agency ระยะเวลาทำวิจัย: ระหว่างมิถุนายน พ.ศ.2548 ถึงเดือน พฤษภาคม พ.ศ.2550 (ในฐานะผู้ร่วมวิจัย)
- 3) การพัฒนาและวิจัยเทคโนโลยีนำน้ำกลับมาใช้ใหม่ในภูมิภาคเขตร้อนชื้น ทุนวิจัยจาก JICA ปี 2552-2556 (ในฐานะผู้ร่วมวิจัย)
- 4) โครงการความร่วมมือกับต่างประเทศ(ไทย – ญี่ปุ่น) ประจำปีงบประมาณ 2556 เรื่อง การเปลี่ยนแปลงรูปแบบการติ้อยาของอีโคไลในถังชีวปฏิกรณ์เยื่อกรองชนิดเอสพีเอ็มบีอาร์ที่

บ ำ บ ั ด น ้ำ เ ลี ย ชู ม ช น (Changes Antibiotic Resistant Pattern of *E.coli* in the Membrane Bioreactor (SB-MBR) Treating Domestic Wastewater) ภายใ ต้ แผนงาน วิจัย การอนุรักษ์สภาพแวดล้อมและฟื้นฟูทางน้ำในเขตเมืองของภูมิภาคเอเชีย ทุนจาก คณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ปีงบประมาณ 2556 (ในฐานะผู้ร่วมวิจัย)

10. ผลงานและสิ่งตีพิมพ์ในฐานะผู้เขียนหลัก 5 ปี ย้อนหลัง (2554-2558)

- 1) **Chiemchaisri, W.**, Chiemchaisri, C., Dumrongsukit, C., Threedeach, S., Ngo, H.H., Vigneswaran, S., (2011). Removal of water-borne microorganisms in floating media filter-microfiltration system for water treatment, *Bioresource Technology*, 102, pp. 5438-5443.
- 2) Na roi-et, V., **Chiemchaisri, W.**, Chiemchaisri, C., Yamamoto, K. (2012). Assessment of genotoxicity of landfill leachates by comet assay using golden pothos (*Epipremnum aureum*). 15, nos.3/4/5/6, 247-260.
- 3) Threedeach, S., **Chiemchaisri, W.**, Watanabe, T., Chiemchaisri, C., Honda, R., Yamamoto, K., (2012). Antibiotic resistance of *Escherichia coli* in leachates from municipal solid waste landfills: Comparison between semi-aerobic and anaerobic operations. *Bioresource Technology*, 113, 253-258.
- 4) **Chiemchaisri, W.**, Chiemchaisri, C., Boonchaiyuttasak, J. (2013). Utilization of stabilized wastes for reducing methane emission from municipal solid waste disposal. *Bioresource Technology*, 141, 199-204.
- 5) Kumjaroen T, **W. Chiemchaisri***, C. Chiemchaisrim (2014) Colonization of Microbial Biofilms in Pipeline of Water Reuse, *Environ. Eng. Res.* 19(3): 275-281.
- 6) Polngam, P, **W. Chiemchaisri***, A. Kaewmanee, C. Chiemchaisri, K.Yamamoto (2015) Chemical characterization in correlation to toxicity evaluation for water reuse of solid waste leachates in the itMBR-RO system, *J Mater Cycles Waste Manag*, Vol.17 No.2 237-248.
- 7) Muenmee S, **W. Chiemchaisri***, C. Chiemchaisri (2015) Microbial consortium involving biological methane oxidation in relation to the biodegradation of waste plastics in a solid waste disposal open dump site, *International Biodeterioration & Biodegradation*, (102) 172-181

7.4 หัวหน้าโครงการวิจัย : การพัฒนาสูตรปุ๋ยสำหรับเร่งผล เร่งใบ และเร่งดอก และทดสอบการย่อยสลายเสร็จสมบูรณ์ของกากตะกอนจากระบบบำบัดน้ำเสีย

7.5 หัวหน้าโครงการวิจัย : ระบบและกลไกการพัฒนาที่สะอาดด้านการพัฒนาเทคโนโลยีของโรงงานอุตสาหกรรมผลิตข้อต่อเหล็กต้นแบบโดยอาศัยกลไกพัฒนาที่สะอาดเพื่อลดก๊าซเรือนกระจก

7.6 หัวหน้าโครงการวิจัย : การจัดการสิ่งแวดล้อมและศิลปวัฒนธรรม โดยเน้นการมีส่วนร่วมของชุมชนต้นแบบ : ชุมชนคลองจวน เขตสวนหลวง กรุงเทพมหานคร

7.7 หัวหน้าโครงการวิจัย : พฤติกรรมของเกษตรกรในการใช้สารเคมีกำจัดแมลง และศัตรูพืชที่มีผลกระทบต่อคุณภาพดิน และน้ำของชุมชนโดยรอบอุทยานแห่งชาติพุเตย จังหวัดสุพรรณบุรี

8. ผลงานวิจัย/งานโครงการที่อยู่ระหว่างการดำเนินงาน

8.1 หัวหน้าโครงการวิจัย : ผลกระทบจากการใช้สารเคมีทางการเกษตรที่มีต่อการดื้อยาปฏิชีวนะของแบคทีเรียในดิน เพาะปลูกและในพื้นที่ชุมชนชาวกระเหรี่ยง หมู่บ้านตะเพินคี จังหวัดสุพรรณบุรี แห่งทุน : สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ สถานภาพในการทำวิจัย : 50 %

8.2 หัวหน้าโครงการวิจัย : การศึกษาประสิทธิภาพการกำจัดพาราควอทโดยกระบวนการโฟโตคะตะไลติก แห่งทุน : สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ สถานภาพในการทำวิจัย : 50 %

9. ผลงานวิจัยที่เคยตีพิมพ์

9.1 C. Chiemchaisri, W. Chiemchaisri, J. Junsod, S. Threedeach and P.N. Wicranarachchi. (2009) Leachate treatment and greenhouse gas emission in subsurface horizontal flow constructed wetland. *Bioresource Technology*. 100 (16): pp. 3808-3814

9.2 W. Chiemchaisri, C. Chiemchaisri, P. Somkliang and S. Threedeach. (2006). Detection and enumeration of methanotrophs in acidic landfill cover soil by FISH technique. *Journal of research in engineering and technology*. 3(3), 229-239.

9.3 C. Chiemchaisri, W. Chiemchaisri, J. Junsod, S. Threedeach, T. Kootatep and C. Visvanathan. (2006). Treatment performance and bacterial populations in subsurface horizontal flow constructed wetland system treating young and stabilized waste leachate. IWA conference, September 2006.

9.4 N. Patchanee, T. Watanabe, W. Chiemchaisri, S. Threedeach, R. Honda and C. Chiemchaisri. Behavior of antibiotic resistant *Escherichia coli* in activated sludge process for municipal wastewater treatment in tropical regions. The 16th International Symposium on Health-Related Water Microbiology (WaterMicro 2011) (Rotorua, New Zealand), L8, September 2011

ผู้ร่วมวิจัย

1. ชื่อ - นามสกุล (ภาษาไทย) นางสาวเพ็ญกมล ยูวานนท์
(ภาษาอังกฤษ) Miss Piangkamon Yuvananont

2. เลขหมายบัตรประจำตัวประชาชน 3-8601-00699-88-7

3. ตำแหน่งปัจจุบัน

หัวหน้างานทดสอบมูลฝอย
นักวิทยาศาสตร์เทคนิค

4. หน่วยงานและที่อยู่

ศูนย์สิ่งแวดล้อม/หลักสูตรการจัดการสิ่งแวดล้อมเมืองและอุตสาหกรรม
มหาวิทยาลัยราชภัฏสวนดุสิต
228-228/113 ถนนสีรินธร เขตบางพลัด กรุงเทพฯ 10700
โทรศัพท์ 02- 423-9407-10 โทรสาร 02-423-9409
E-mail : yuvananont@hotmail.com

5. ประวัติการศึกษา

วท.บ (วิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม) มหาวิทยาลัยราชภัฏสวนดุสิต

6. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ

การวิเคราะห์คุณภาพสิ่งแวดล้อม (คุณภาพมูลฝอย ดินและน้ำ)
การประเมินผลกระทบสิ่งแวดล้อม
การตรวจติดตามคุณภาพสิ่งแวดล้อม ISO/IEC 17025

7. ผลงานวิจัย/งานโครงการที่ทำเสร็จแล้ว

ผู้ร่วมวิจัย

ปี	หัวข้องานวิจัย	แหล่งทุน
2548	การศึกษาพฤติกรรมการมีส่วนร่วมในการส่งเสริมและรักษาสิ่งแวดล้อมชุมชนของประชาชนในเขตกรุงเทพมหานคร	อนุกรมวิธานการมีส่วนร่วม ด้านเศรษฐกิจ เทคโนโลยี และสิ่งแวดล้อม วุฒิสภา
2549	การศึกษาพฤติกรรมการมีส่วนร่วมในการส่งเสริมและรักษาสิ่งแวดล้อมชุมชนของประชาชนในจังหวัดนนทบุรี	สำนักงานคณะกรรมการวิจัย แห่งชาติ
2549	การพัฒนาองค์ความรู้เพื่อบริหารจัดการทรัพยากรในพื้นที่ส่วนขยายของเมือง จังหวัดนนทบุรี	สำนักงานคณะกรรมการวิจัย แห่งชาติ
2550	การศึกษาคุณภาพน้ำและแนวทางการจัดการน้ำอย่างยั่งยืน จังหวัดนนทบุรี	สำนักงานคณะกรรมการวิจัย แห่งชาติ
2551-2552	แนวทางการมีส่วนร่วมและการประยุกต์ใช้แบบจำลองในการจัดการสิ่งแวดล้อม จังหวัดนนทบุรี	สำนักงานคณะกรรมการวิจัย แห่งชาติ
2552	การพัฒนาความเข้มแข็งของชุมชนอย่างยั่งยืนโดยการประยุกต์ใช้กากตะกอนจากระบบบำบัดน้ำเสียระยะที่ 1-2 เพื่อทำปุ๋ยและผลิตภัณฑ์	สำนักงานคณะกรรมการวิจัย แห่งชาติ
2553	การพัฒนาการจัดการระบบสิ่งแวดล้อมเพื่อการผลิตอย่างยั่งยืนของโรงงานอุตสาหกรรมผลิตข้อต่อท่อประปาเหล็ก กรณีศึกษา โรงงานปิสไฟฟ์ พิตตั้งอินตัสตรี จำกัด จังหวัดสมุทรสาคร	สำนักงานคณะกรรมการวิจัย แห่งชาติ