การสำรวจและรวบรวมแบคทีเรียผลิตสารส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช

Survey and Collection of Plant Growth Promoting Rhizobacteria

สมปอง หมื่นแจ้ง[1] และ กัลยกร โปร่งจันทึก[1]

กลุ่มวิจัยปฐพีวิทยา สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

.....

บทคัดย่อ

เก็บตัวอย่างดิน ราก ลำต้น ใบ เพื่อแยกแบคทีเรียผลิตสารส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช (พีจีพีอาร์) โดยสุ่มเก็บตัวอย่างดินและพืช ในภาคเหนือ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ภาคกลาง และภาคตะวันออก รวมทั้งหมด 75 ตัวอย่าง จากพืชอาศัยที่แตกต่างกัน ทั้งพืชไร่ พืชสวนและพืชอื่นๆ โดยเก็บตัวอย่างดินประมาณ 1 กิโลกรัม และตัวอย่างราก ต้น และใบ พืชเป้าหมายใส่ถุงพลาสติกสำหรับเก็บตัวอย่างให้มิดชิด ใส่กระติกน้ำแข็ง ดำเนินการนับและแยกเชื้อในห้องปฏิบัติการ ผลการดำเนินงานตั้งแต่ ปี 2549-2553 ได้เชื้อพีจีพีอาร์ทั้งสิ้น 350 ไอโซเลท แยกเป็น 3 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ 1 คล้ายแบคทีเรียสกุล *Azotobacter* spp. มีทั้งหมด 100 ไอโซเลท คัดเลือกไอโซเลทที่มีศักยภาพในการผลิต IAA สูงที่สุด 1 ไอโซเลท คือ DASF 02082 ซึ่งเก็บจากดินรอบรากหน่อไม้ฝรั่ง ในแปลงหน่อไม้ฝรั่งอินทรีย์ของเกษตรกร ต.วังสมบูรณ์ อ.วังสมบูรณ์ จ.สระแก้ว สามารถผลิต IAA ได้ 56.6 $\pm$ 5 มก./ลิตร กลุ่มที่ 2 คล้ายแบคทีเรียสกุล *Azospirillum* spp. มีทั้งหมด 215 ไอโซเลท คัดเลือกไอโซเลทที่มีศักยภาพในการผลิต IAA สูงที่สุด คือ DASF 04153 ซึ่งเก็บจากดินรอบรากเงาะในแปลงผลิตเงาะอินทรีย์ของเกษตรกร ต.นาขวัญ อ.เมือง จ.ระยอง ผลิต IAA ได้ 90.5 $\pm$ 0.1 มก./ลิตร และ กลุ่มที่ 3 คล้ายแบคทีเรียสกุล *Beijerinckia* spp. มีทั้งหมด 35 ไอโซเลท คัดเลือกไอโซเลทที่มีศักยภาพในการผลิต IAA สูงที่สุด คือ DASF 06020 ซึ่งเก็บจากต้นข้าว ในแปลงเกษตรกร ต.หนองแวงโสพระ อ.พล จ.ขอนแก่น ผลิต IAA ได้ 20.1 $\pm$ 0.3 มก./ลิตร

ผลจากการทดลองทำให้สามารถรวบรวมแบคทีเรียส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชได้รวม 3 สกุล 350 ไอโซเลท และสามารถคัดเลือกเชื้อที่มีประสิทธิภาพในแต่ละสกุลได้จำนวน 1 ไอโซเลท รวม 3 ไอโซเลท เพื่อใช้ในการวิจัยและพัฒนาปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์ต่อไป

ทะเบียนวิจัย 09-02-49-01-02-01-02-49

[1] กลุ่มงานวิจัยจุลินทรีย์ดิน กลุ่มวิจัยปฐพีวิทยา สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร จตุจักร กรุงเทพฯ 10900

บทนำ

จุลินทรีย์เป็นทรัพยากรสิ่งมีชีวิตที่มีคุณค่าและมีบทบาทสำคัญมากต่อวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิตต่างๆ ในโลก จุลินทรีย์มีการกระจายไปอยู่ในสภาวะแวดล้อมที่มีความหลากหลายมากที่สุดและสามารถดำรงชีวิตและเจริญอยู่ในสภาวะแวดล้อมต่าง ๆได้ดี ทั้งสภาพแวดล้อมที่เหมาะสม หรือสภาพแวดล้อมที่มีความหลากหลาย เช่น บริเวณปล่องภูเขาไฟ บริเวณน้ำแข็งขั้วโลก หรือบริเวณก้นทะเลลึก เป็นต้น แสดงว่าจุลินทรีย์เหล่านี้ต้องมีสมบัติพิเศษที่ถูกกำหนดโดยพันธุกรรมที่ไม่อาจพบในสิ่งมีชีวิตอื่นได้ จึงอาจกล่าวได้ว่าจุลินทรีย์เป็นทรัพยากรชีวภาพที่มีจำนวนและคุณค่ามหาศาล ที่สามารถนำมาใช้ประโยชน์ในด้านต่างๆ ได้ เมื่อจุลินทรีย์เกิดขึ้นมาในโลก มีการแพร่กระจายไปยังสิ่งแวดล้อมที่แตกต่างกันไปทั่วโลก ทำให้เกิดมีวิวัฒนาการแยกออกเป็นชนิดต่าง ๆ เพื่อให้เหมาะกับการดำรงชีวิตในสภาพแวดล้อมนั้นๆ มีขบวนการต่างๆ มากมายเกิดขึ้น เนื่องจากจุลินทรีย์มีบทบาททั้งทางด้าน กายภาพ เคมี และชีวเคมี จึงอาจกล่าวได้ว่าจุลินทรีย์เป็นสิ่งมีชีวิตชนิดแรกที่ได้อุ้มชูสิ่งมีชีวิตชนิดอื่น ให้เกิดมีวิวัฒนาการต่อมาถึงปัจจุบันและต่อเนื่องไปในอนาคต

จุลินทรีย์เป็นแหล่งความหลากหลายของปฏิกิริยาทางเคมีและชีวเคมี มีขบวนการสังเคราะห์และย่อยสลายทางเคมีและชีวเคมีที่ควบคุมโดยเอนไซม์ที่ผลิตขึ้นมาโดยจุลินทรีย์ บางชนิดผลิตสารสำคัญที่สามารถนำมาใช้ประโยชน์หรือเพื่อพัฒนาต่อยอดไปใช้ประโยชน์ เช่น สารปฏิชีวนะ สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ และสารที่เป็นประโยชน์ทางด้านการเกษตรกรรม อุตสาหกรรม ทางการแพทย์ เป็นต้น

วิสุทธิ์ (2542, 2544) กล่าวว่า การสูญเสียความหลากหลายทางชีวภาพแม้เพียงน้อยนิดในระดับพันธุกรรม หรือระดับชนิด ไปจนถึงการกระทบกระเทือนของระบบนิเวศน์ ย่อมหมายถึงการสูญเสียโอกาสและทางเลือกของสิ่งมีชีวิตที่จะปรับตัวให้เข้ากับสภาวะเปลี่ยนแปลงของบรรยากาศโลก ทั้งในระยะสั้นและระยะยาว ดังนั้นทุกคนต้องใส่ใจ และช่วยกันอนุรักษ์ทรัพยากรชีวภาพอันทรงคุณค่าต่อนิเวศวิทยา และต่อการอยู่รอดของมนุษย์ให้คงอยู่คู่โลกนี้ต่อไป

จุลินทรีย์ที่เป็นประโยชน์ในด้านการเพิ่มความอุดมสมบูรณ์ของดินหรือเรียกว่า ปุ๋ยชีวภาพ มีความสำคัญในระบบการผลิตทางการเกษตรทั้งด้าน การเพิ่มผลผลิต ช่วยลดปริมาณการใช้ปุ๋ยเคมี นอกจากนี้ จุลินทรีย์บางชนิดยังสามารถผลิตสารกระตุ้นการเจริญเติบโตของพืช จุลินทรีย์ที่เป็นประโยชน์สามารถรักษาสมดุลธรรมชาติในระบบนิเวศ จึงช่วยเพิ่มผลผลิตทางการเกษตรได้ จุลินทรีย์ตรึงไนโตรเจน เป็นกลุ่มจุลินทรีย์ที่สามารถตรึงไนโตรเจนจากอากาศมาเปลี่ยนเป็นรูปอินทรีย์ไนโตรเจน เพื่อเป็นอาหารของจุลินทรีย์เอง และสามารถปลดปล่อยให้กับพืชอาศัยได้ การตรึงไนโตรเจนนี้ แบ่งเป็น 2 ประเภท คือ 1) จุลินทรีย์อยู่ร่วมกับพืชอาศัยแบบจำเพาะเจาะจง พึ่งพาอาศัยซึ่งกันและกัน ได้แก่ แบคทีเรียกลุ่มไรโซเบียมกับพืชตระกูลถั่ว และ 2) จุลินทรีย์ตรึงไนโตรเจนที่อาศัยอยู่ในดินและพืชแบบอิสระ ปัจจุบันพบว่ามีจุลินทรีย์ตรึงไนโตรเจนชนิดใหม่ที่อาศัยอยู่ในเนื้อเยื่อของพืช (Endophyltic N_2-fixing Bacteria) ซึ่งรอการค้นพบ รวบรวม และคัดเลือกอีกมากมาย จุลินทรีย์เหล่านี้มีรายงานว่าอาศัยอยู่กับพืชเศรษฐกิจที่สำคัญได้แก่ ข้าว ข้าวป่า อ้อย สับปะรด และไม้ผลบางชนิด จากการศึกษาพบว่า จุลินทรีย์เป็นสิ่งมีชีวิตที่มีการกลายพันธุ์หรือมีประสิทธิภาพการทำงานของยีน (gene) ที่เปลี่ยนแปลงได้ง่ายตามสภาพแวดล้อม ดังนั้นงานค้นคว้า รวบรวม สำรวจ คัดเลือก จำแนก ตลอดจนการเก็บรักษาจุลินทรีย์เพื่อการใช้ประโยชน์อย่างยั่งยืน ยังคงต้องดำเนินต่อไป เพื่อค้นคว้าเกี่ยวกับจุลินทรีย์ที่เป็นประโยชน์กับพืชเศรษฐกิจที่สำคัญมากขึ้น การรวบรวมคัดเลือกจุลินทรีย์ตรึงไนโตรเจนอิสระในพืช คือ ข้าว ข้าวโพด ข้าวฟ่าง อ้อย สับปะรด

วิธีการดำเนินการและอุปกรณ์

อุปกรณ์

1. สารเคมีและเครื่องแก้ว
2. อุปกรณ์สำหรับนึ่งฆ่าเชื้อ
3. ตู้ปลอดเชื้อ
4. ตู้บ่มเชื้อ
5. ตู้เก็บเชื้ออุณหภูมิต่ำ -80 °C

วิธีการดำเนินงาน

การเก็บตัวอย่าง เก็บตัวอย่างดิน ราก ลำต้น ใบ เพื่อแยกแบคทีเรียผลิตสารส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช 3 สกุล คือ สกุล *Azotobacter Beijerinckia* และ *Azospirillum* โดยสุ่มเก็บตัวอย่าง ในภาคภาคเหนือ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ภาคกลาง และภาคตะวันออก รวมทั้งหมดประมาณ 75 ตัวอย่าง จากพืชอาศัยที่แตกต่างกัน ทั้งพืชไร่ พืชสวนเศรษฐกิจ และพืชอื่นๆ โดยเก็บตัวอย่างดินประมาณ 1 กิโลกรัม และตัวอย่างรากต้น และใบพืชเป้าหมายใส่ถุงพลาสติกสำหรับเก็บตัวอย่างให้มิดชิด ใส่กระติกน้ำแข็ง ส่งเข้าแยกเชื้อในห้องปฏิบัติการ ตามวิธี ของ Dobereiner, (1980).

การแยกเชื้อแบคทีเรียส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช ดำเนินการในอาหารจำเพาะของแบคทีเรียแต่ละสกุล ตามรายงานของ Dobereiner (1980) โดยแบคทีเรียคล้ายสกุล *Azotobacter* ใช้อาหารแข็งปราศจากไนโตรเจน (LG medium) *Beijerinckia* ใช้อาหารแข็งปราศจากไนโตรเจน (BG medium) และ *Azospirillum* ใช้อาหารปราศจากไนโตรเจนกึ่งเหลว (Nfb semisolid medium) ทั้งนี้ รูปแบบอาหารเลี้ยงเชื้อมีความแตกต่างกันตามปริมาณ อ๊อกซิเจนที่แบคทีเรียแต่ละกลุ่มใช้ในการตรึงไนโตรเจน การนับปริมาณเชื้อจากตัวอย่างดิน รากและลำต้น สำหรับ *Azotobacter* และ *Beijerinckia* ใช้วิธี Plate count มีหน่วยเป็น Colony Forming Unit (CFU) ต่อกรัมตัวอย่างสดส่วน *Azospirillum* ใช้วิธี MPN มีหน่วยเป็นเซลล์ต่อกรัมตัวอย่างสด โดยตัวอย่างก่อนตรวจนับและแยกเชื้อต้องทำการเจือจางแบบ 10 เท่า ตามหลักการ serial dilution (Zuberer. 1994)

การประเมินประสิทธิภาพในการผลิตสารส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช โดยการวิเคราะห์ประสิทธิภาพในการผลิตสาร indole acetic acid (IAA) ตามวิธีที่กล่าวถึงโดย Meunchang et al.,2004. โดยทำ 4 ซ้ำวิเคราะห์ความคลาดเคลื่อนทางสถิติโดยใช้ standard deviation (SD) เก็บรวบรวมเชื้อทั้ง 3 สกุล ได้ทั้งหมด 350 ไอโซเลท เก็บรักษาไว้ใน glycerol 10% ในตู้เย็นอุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส

ระยะเวลา เดือน

1 ตุลาคม 2548 – 30 กันยายน 2553

สถานที่ทำการทดลอง

กลุ่มงานวิจัยจุลินทรีย์ดิน กลุ่มวิจัยปฐพีวิทยา สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร
กรมวิชาการเกษตร

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

การสำรวจรวบรวมแบคทีเรียส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช จากตัวอย่างดินรอบๆ ราก ต้น และใบพืช ได้ดำเนินการในพื้นที่เกษตรกรรมในภาคเหนือ ภาคกลาง ภาคตะวันออกและภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ตัวอย่างดินและต้นพืชที่เก็บได้แก่ ข้าว อ้อย ข้าวโพดหวาน ข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ ต้นหญ้าป่า กะหล่ำปลี หน่อไม้ฝรั่ง มะเขือเทศ องุ่น ชา กาแฟ เงาะ และมังคุด เก็บจากพื้นที่ต่างๆ รวมปีละ 15 ตัวอย่าง ดำเนินการตั้งแต่ ปี 2549-2553 รวมทั้งสิ้น 75 ตัวอย่าง ได้เชื้อพีจีพีอาร์ ทั้งสิ้น 350 ไอโซเลท สามารถจัดกลุ่มเป็น 3 สกุล ตามชนิดอาหารจำเพาะและจำแนกตามหลักการจำแนกแบคทีเรียเบื้องต้นของ Bergey's manual of SYSTEMATIC BACTERIOLOGY 2005. สามารถจัดกลุ่มแบคทีเรียส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชที่แยกได้เป็น 3 กลุ่ม คือ

กลุ่มที่ 1 คล้ายแบคทีเรียสกุล *Azotobacter* spp. มีทั้งหมด 100 ไอโซเลท รหัส DASF 02001 ถึง DASF 02100 มีศักยภาพในการผลิต indole acetic acid (IAA) 0-56.6 $\pm$ 5 มก./ลิตร ไอโซเลทที่มีศักยภาพในการผลิต IAA สูงที่สุด คือ DASF 02082 ซึ่งเก็บจากดินรอบรากหน่อไม้ฝรั่ง ในแปลงหน่อไม้ฝรั่งอินทรีย์ของเกษตรกร ต.วังสมบูรณ์ อ.วังสมบูรณ์ จ.สระแก้ว สามารถผลิต IAA ได้ 56.6 $\pm$ 5 มก./ลิตร (ไม่ได้แสดงตาราง)

กลุ่มที่ 2 คล้ายแบคทีเรียสกุล *Azospirillum* spp. มีทั้งหมด 215 ไอโซเลท รหัส DASF 04001 ถึง DASF 04215 มีศักยภาพในการผลิต IAA 0-90.5 $\pm$ 5 มก./ลิตร ไอโซเลทที่มีศักยภาพในการผลิต IAA สูงที่สุด คือ DASF 04153 ซึ่งเก็บจากดินรอบรากเงาะในแปลงผลิตเงาะอินทรีย์ของเกษตรกร ต.นาขวัญ อ.เมือง จ.ระยอง ผลิต IAA ได้ 90.5 $\pm$ 0.1 มก./ลิตร (ไม่ได้แสดงตาราง)

กลุ่มที่ 3 คล้ายแบคทีเรียสกุล *Beijerinckia* spp. มีทั้งหมด 35 ไอโซเลท รหัส DASF 06001 ถึง DASF 06035 มีศักยภาพในการผลิต IAA 0-20.1 $\pm$ 0.3 มก./ลิตร ไอโซเลทที่มีศักยภาพในการผลิต IAA สูงที่สุด คือ DASF 06020 ซึ่งเก็บจากต้นข้าว ในแปลงเกษตรกร ต.หนองแวงโสพระ อ.พล จ.ขอนแก่น ผลิต IAA ได้ 20.1 $\pm$ 0.3 มก./ลิตร (ไม่ได้แสดงตาราง)

ผลจากการทดลองทำให้สามารถรวบรวมแบคทีเรียส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชได้รวม 3 สกุล 350 ไอโซเลท และสามารถคัดเลือกเชื้อที่มีประสิทธิภาพในแต่ละสกุลได้จำนวน 1 ไอโซเลทรวม 3 ไอโซเลท เพื่อใช้ในการวิจัยและพัฒนาปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์ต่อไป

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

ผลจากการทดลองทำให้สามารถรวบรวมแบคทีเรียส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชได้รวม 3 สกุล 350 ไอโซเลท และสามารถคัดเลือกเชื้อที่มีประสิทธิภาพในแต่ละสกุลได้จำนวน 1 ไอโซเลท รวม 3 ไอโซเลท เพื่อใช้ในการวิจัยและพัฒนาปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์สำหรับพืชชนิดต่างๆต่อไป

การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

นำไปใช้ประโยชน์เป็นแหล่งเชื้อพันธุ์ในการวิจัยพัฒนาการผลิตปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์สำหรับการผลิตพืชชนิดต่างๆ

เอกสารอ้างอิง

วิสุทธิ์ ใบไม้. 2542. รายงานผลการวิจัยด้านความหลากหลายทางชีวภาพในประเทศไทย. การประชุมวิชาการประจำปีโครงการ BRT ครั้งที่ 3, 11-14 ตุลาคม 2542 ณ โรงแรมเจ. บี หาดใหญ่ สงขลา

Döbereiner J. 1980. Forages grasses and grain crops. *In* Methods for evaluating biological nitrogen fixation. pp 535-555. Ed. F.J. Bergersen. John Wiley & Sons Ltd., New York.

Meunchang, S., Panichsakpatana, S., Ando, S., Yokoyama, T. 2004. Phylogenetic and physiological characterization of indigenous *Azospirillum* isolates in Thailand. Soil Sci. Plant Nutr., 50 (3), 413-421.

Zuberer D. 1994. Recovery and numeration of viable bacteria pp.118-144. In R.W. Weaver *et al.*, eds. Method of Soil Analysis Part 2 Microbiological and Biochemical Properties. Soil Science Society of America, Madison, WI. USA.