

ส่วนที่ 2

รายงานผลการวิจัยฉบับสมบูรณ์ โครงการวิจัยทุนอุดหนุนวิจัย มก. ปีงบประมาณ 2557 โครงการวิจัยรหัส (ก-ช(ด)3.57)

โครงการวิจัยบทบาทของไรโซแบคทีเรียและศักยภาพในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชใน

พื้นที่การเกษตรที่มีการปนเปื้อนโลหะหนัก

เพชรดา ปินใจ⁽¹⁾, พงศกร ตันตราวงศา⁽¹⁾, ธนาภรณ์ ธนะศรีรางกุล⁽¹⁾, ภูษณิศา หีบเงิน⁽²⁾

Pechrada Pinjai⁽¹⁾, Phongsakorn Tantarawongsa⁽¹⁾, Thanapron Thanasirangkul⁽¹⁾, Pusanisa Heepngoen⁽²⁾

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์ของการวิจัยในครั้งนี้จึงเพื่อคัดแยกแบคทีเรียแบคทีเรียต้านทานสารหนูจากดินบริเวณรอบรากพืชหลากหลายชนิดในบริเวณเหมืองแร่เก่าที่มีการเปลี่ยนเป็นพื้นที่เกษตรกรรม ซึ่งตั้งอยู่ที่จังหวัดราชบุรี กาญจนบุรี และชลบุรี ประเทศไทย และนำมาทดสอบกิจกรรมการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชกิจกรรมต่างๆ เพื่อที่จะนำไปใช้ประโยชน์ในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชที่ในดินที่มีปัญหาทางการเกษตร รวมทั้งใช้ประโยชน์ในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชบำบัดด้วย ผลการศึกษาสามารถคัดเลือกแบคทีเรียต้านทานสารหนูในรูปอาร์เซนไนด์ได้จำนวน 76 ไอโซเลต เมื่อนำไปทดสอบความสามารถในการต้านทานสารหนูในรูปอาร์เซนไนด์และอาร์เซเนตที่ระดับความเข้มข้น 2-20 mM และทำการจัดกลุ่มสามารถคัดเลือกตัวแทนแบคทีเรียที่มีความสามารถต้านทานสารหนูได้ในระดับสูง จำนวน 38 ไอโซเลต ทั้งนี้แบคทีเรียตัวแทนทั้งหมดสามารถตรวจพบกิจกรรมของการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชทุกกิจกรรมที่ทดสอบ (การตรึงไนโตรเจน การผลิตฮอร์โมนพืช การผลิตซิเดอรိုฟอร์และการผลิตเอนไซม์เอซีซี ดีอะมิเนส) ยกเว้นกิจกรรมการละลายฟอสเฟต โดยกิจกรรมการตรึงไนโตรเจนสามารถพบได้มากที่สุด 23 ไอโซเลต ในขณะที่การผลิตฮอร์โมนออกซินและการผลิตเอนไซม์เอซีซี ดีอะมิเนส พบ 13 และ 2 ไอโซเลต ตามลำดับ ส่วนการผลิตซิเดอรိုฟอร์พบแบคทีเรีย CB1-007 เพียงแค่ 1 ไอโซเลต ทั้งนี้แบคทีเรียตัวแทนที่น่าจะมีศักยภาพในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชในพื้นที่ปนเปื้อนสารหนูจำนวน 5 ไอโซเลต คือ KB3-006 KB1-010 KB3-010 RB1-005 และ CB1-007

คำสำคัญ: สารหนู แบคทีเรียต้านทานสารหนู ไรโซสเฟียร์ แบคทีเรียส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช

⁽¹⁾ ภาควิชาปฐพีวิทยา คณะเกษตร ม. เกษตรศาสตร์

⁽¹⁾ Department of Soil Science, Faculty of Agriculture, Kasetsart university

⁽²⁾ กรมควบคุมมลพิษ

⁽²⁾ Pollution Control Department

Abstract

The objective of this research was to isolate arsenic resistant bacteria from the rhizosphere of which several plant species are grown on, located in different areas of the old mine areas in Ratchaburi, Kanchanaburi and Chonburi provinces, Thailand. All bacterial isolates were then tested on their activities in plant-growth promotion in order to support growth of the plants cultivated on agricultural-problematic soils as well as the plants used for phytoremediation. The results show 76 bacterial strains resistant to arsenite. All strains were evaluated for resistance to both arsenate and arsenite at 2-20 mM. The arsenic resistance patterns divided the strains into 38 bacterial isolates which resist to a high arsenic level. Plant growth activities had been tested under various activity conditions and theirs showed N-fixation, plant hormones production, siderophore and ACC deaminase activity except P-solubilization. The results revealed that 23 isolates could be nitrogen fixation activity, 13 isolates could produce Indole Acetic Acid (IAA) and 2 isolates could able to produce ACC Deaminase activity. Additional, only one isolates (CB1-007), which had ability to produce siderophore. In this case, five bacterial isolates were representing as potential to plant growth promoting bacteria in arsenic contaminated soil include isolates KB3-006 KB1-010 KB3-010 RB1-005 and CB1-007.

Keywords: Arsenic, Arsenic-resistant bacteria, Rhizosphere, Plant growth promoting bacteria

บทนำ

โลหะหนักเป็นธาตุที่เกิดขึ้นตามธรรมชาติ ซึ่งหากพบในปริมาณสูงอาจทำให้เป็นพิษต่อมนุษย์ สัตว์ พืช หรือสิ่งมีชีวิตในดินได้ โลหะหนักพบทั่วไปในดินทุกชนิด แต่ปริมาณจะต่างกันไปตามวัตถุดิบกำเนิดดิน นอกจากนี้โลหะหนักในดินอาจได้มาจากวัสดุหรือสารต่างๆที่ใส่ลงไปในดิน เช่น ปุ๋ยเคมี ปุ๋ยคอก ปุ๋ยหมัก สารกำจัดศัตรูพืช วัสดุปรับปรุงดิน และวัสดุเหลือใช้ที่ใส่เพื่อปรับปรุงดิน รวมทั้งสารที่ปะปนอยู่ในบรรยากาศ จะเห็นได้ว่าโลหะหนักเป็นมลพิษทางสิ่งแวดล้อมที่ถือว่ามีโอกาสปนเปื้อนได้ในหลายพื้นที่ ทั้งในพื้นที่อุตสาหกรรมเหมืองแร่และโดยเฉพาะอย่างยิ่งในพื้นที่เกษตรกรรม สำหรับพื้นที่เกษตรกรรมที่มีการปนเปื้อนโลหะหนักนั้นถือว่าเป็นพื้นที่ที่ควรให้ความสำคัญ เนื่องจากพื้นที่เหล่านี้มีการปลูกพืชเพื่อการบริโภคเป็นหลัก ซึ่งอาจทำให้เกิดการตกค้างของโลหะหนักในผลผลิตและแพร่กระจายไปยังพื้นที่อื่นเพิ่มมากขึ้น ผลของการปนเปื้อนโลหะหนักในดินไม่เพียงส่งผลต่อระบบนิเวศของสิ่งมีชีวิตต่างๆ แต่ยังมีผลต่อกระบวนการต่างๆ ของจุลินทรีย์ในดิน ทั้งนี้ในระยะยาวโลหะหนักสามารถส่งผลต่อปริมาณและโครงสร้างประชากรของจุลินทรีย์ดิน ลดกิจกรรมและความหลากหลายของจุลินทรีย์ดิน สำหรับแนวทางในการลดการปนเปื้อนของโลหะหนักในดินทำได้หลายวิธี เช่น การนำดินของออกจากพื้นที่ การใช้วิธีทางเคมีและกายภาพ หรือการบำบัดโดยพืชและจุลินทรีย์ และจากความก้าวหน้าของเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตรในปัจจุบัน ทำให้มีการส่งเสริมการบำบัดโดยพืชและจุลินทรีย์อย่างแพร่หลาย เนื่องจากเชื่อว่าการใช้จุลินทรีย์ที่มีประโยชน์เหล่านี้จะเป็นการพัฒนาทรัพยากรดินและช่วยลดปัญหาทางด้านสิ่งแวดล้อมที่ยั่งยืน ซึ่งการศึกษาส่วนใหญ่จะเน้นจุลินทรีย์ที่อยู่บริเวณรอบรากพืชที่เรียกว่า ไรโซแบคทีเรีย เนื่องจากมักเป็นจุลินทรีย์ที่เป็นประโยชน์ต่อพืชในหลายๆ ด้าน ทั้งทางตรงและทางอ้อม ผลทางตรงคือ การกระตุ้นการเจริญเติบโตของพืช ซึ่งกลไกในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชมีหลายประการ เช่น สร้างธาตุอาหารไนโตรเจน ช่วยละลายธาตุอาหารฟอสฟอรัส โพแทสเซียม สร้างฮอร์โมนพืช สร้างซิเตอร์โรฟอรัส ส่วนผลทางอ้อมคือ สามารถใช้ควบคุมเชื้อสาเหตุโรคพืช และทำให้เกิดการชักนำให้พืชต้านทานโรคได้ (Mayak et al., 2004) ซึ่งแบคทีเรียเหล่านี้เรียกว่า แบคทีเรียส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช (Plant growth-promoting rhizobacteria) หรือ PGPR การส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชที่พบในจุลินทรีย์พวกไรโซแบคทีเรียส่วนใหญ่มักเป็นการสร้างไนโตรเจนและสร้างฮอร์โมนพืช เช่น auxins, cytokinins, gibberellins และ indole-3-acetic acid (IAA) ทั้งนี้ IAA ถือเป็นฮอร์โมนพืชที่มีความสำคัญมาก เนื่องจากช่วยในการงอกของเมล็ด และการเจริญของราก ซึ่งมีผลต่อการเจริญและพัฒนาของพืช

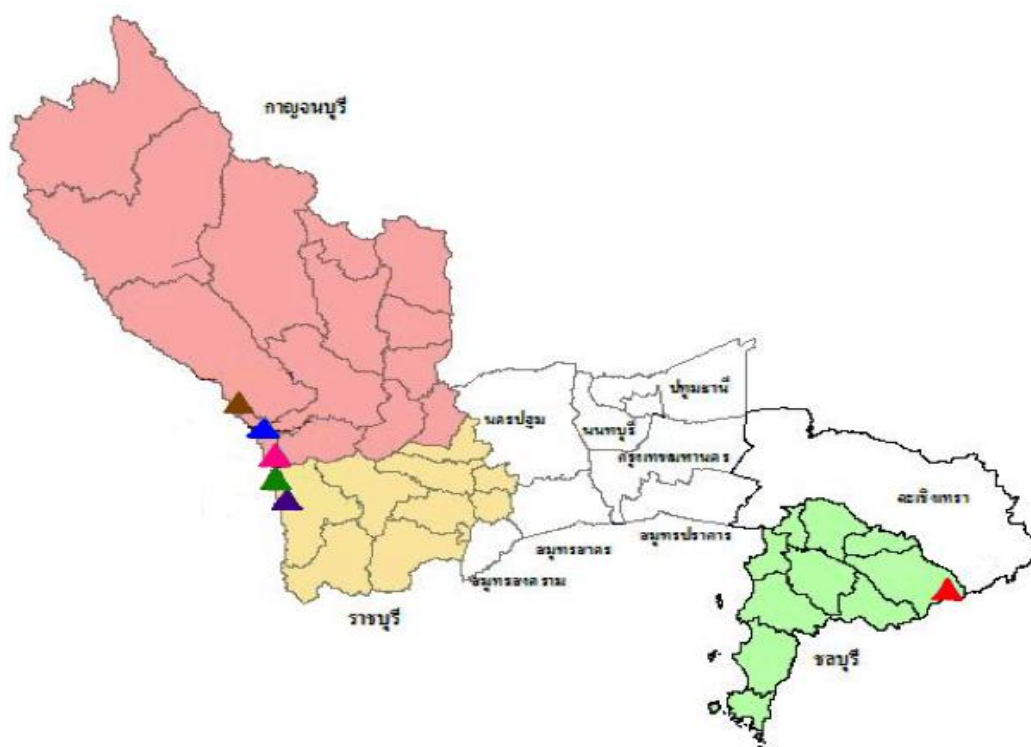
จะเห็นได้ว่าการศึกษาแบคทีเรียส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช (PGPR) จากดินหรือพืชส่วนใหญ่เป็นการศึกษาในแง่การส่งเสริมหรือเพิ่มผลผลิตให้กับพืชทั่วไป แต่การศึกษาแบคทีเรียที่ส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช หรือจุลินทรีย์ที่กระตุ้นการทำงานของพืชบำบัด โดยการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างพืชและจุลินทรีย์บริเวณรากพืช ที่สามารถแปลงรูปโลหะหนักและผลิตสารส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชเพื่อนำมาใช้ประโยชน์ในการบำบัดดินทางชีวภาพยังถือว่ามียุ่่น้อย จึงน่าจะมีการศึกษาแบคทีเรียเหล่านี้และนำไปใช้ประโยชน์กับการเพิ่มประสิทธิภาพในการบำบัดดินทางชีวภาพสำหรับพื้นที่ปนเปื้อนโลหะหนักต่อไป การศึกษารุ่นนี้จึงเป็นการแยกและคัดเลือกไรโซแบคทีเรียจากดินปนเปื้อนโลหะหนักซึ่งเปลี่ยนมาเป็นพื้นที่เกษตรกรรม เพื่อนำมาศึกษาความสามารถในการต้านทานโลหะหนักและความสามารถในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช และนำผลการศึกษาที่ได้มาประกอบการคัดเลือกแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพสูงในการต้านทานโลหะหนักและส่งเสริมการ

เจริญเติบโตของพืชเพื่อนำมาใช้ประโยชน์ในการบำบัดดินโดยพืชในพื้นที่เกษตรกรรมที่มีการปนเปื้อนโลหะหนัก รวมทั้งนำไปใช้กับพื้นที่ที่มีการปนเปื้อนอื่นๆ ทั้งในเขตอุตสาหกรรมและเหมืองแร่อื่นๆ ด้วย

วิธีการทดลอง

1. การเก็บตัวอย่างดิน

เก็บตัวอย่างดินบริเวณรอบรากพืชจากพื้นที่เกษตรกรรม และพืชพรรณธรรมชาติ จากพื้นที่ศึกษาที่ระดับความลึกประมาณ 20 เซนติเมตรจากผิวดิน พื้นที่ศึกษาเป็นพื้นที่เหมืองแร่เก่าที่มีรายงานการปนเปื้อนของโลหะหนักในระดับเกินมาตรฐานจำนวน 6 เหมืองในจังหวัดชลบุรี กาญจนบุรี และราชบุรี (ตารางที่ 1) โดยสุ่มเก็บตัวอย่างแบบกระจายให้ทั่วพื้นที่ ใส่ในถุงพลาสติกและนำไปแช่ในน้ำแข็งเพื่อรักษาสภาพตัวอย่างดิน เมื่อถึงห้องปฏิบัติการแบ่งดินออกเป็น 2 ส่วนสำหรับศึกษาทางจุลินทรีย์ และวิเคราะห์สมบัติทางกายภาพและเคมี โดยตัวอย่างดินสำหรับศึกษาจุลินทรีย์จะนำไปเก็บไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อรอการแยกแบคทีเรียต้านทานโลหะหนัก ส่วนตัวอย่างที่จะนำมาวิเคราะห์สมบัติทางกายภาพ และเคมี จะนำไปตากในที่ร่ม และนำไปร่อนผ่านตะแกรง ขนาด 0.5 และ 2.0 มิลลิเมตร เพื่อวิเคราะห์ต่อไป



ภาพที่ 1 แผนที่แสดงตำแหน่งเหมือง และพื้นที่จุดเก็บตัวอย่าง
ที่มา : ดัดแปลงจาก <https://www.google.co.th/maps>

ตารางที่ 1 พิกัด สถานที่ตั้งของพื้นที่เก็บตัวอย่างในบริเวณเหมืองแร่เก่า

รหัส	ชื่อเหมือง	เหมืองแร่	สถานที่ตั้ง	พิกัด
CB1	พรวัฒนาไมนิ่ง	พลวง	ต.พลวงทอง อ.บ่อทอง จ.ชลบุรี	13° 11' 41.97"N 101° 39' 52.34"E
KB1	สมพงษ์	ดีบุก	ต.ศรีมงคล อ.ไทรโยค จ.กาญจนบุรี	14° 0' 29.50"N 99° 2' 39.25"E
KB2	จรินทร์	ดีบุก	ต.บ้านเก่า อ.เมือง จ.กาญจนบุรี	14° 1' 22.23"N 99° 4' 58.22"E
KB3	องค์การทหารผ่านศึก	ดีบุก	ต.จระเข้เผือก อ.ด่านมะขามเตี้ย จ.กาญจนบุรี	13° 46' 54.65"N 99° 10' 35.46"E
RB1	แร่แหลมพิชัย	ดีบุก เฟลตสปาร์ และควอทซ์	ต.สวนผึ้ง อ.สวนผึ้ง จ.ราชบุรี	13° 40' 31.32"N 99° 10' 41.50"E
RB2	แร่สินสยาม	ดีบุก	ต.สวนผึ้ง อ.สวนผึ้ง จ.ราชบุรี	13° 35' 24.24"N 99° 13' 0.40"E

2. การวิเคราะห์สมบัติดินทางกายภาพและเคมี

นำตัวอย่างดินที่ร่อนผ่านตะแกรงขนาดรูตะแกรง 0.5 และ 2 มิลลิเมตรไปวิเคราะห์คุณสมบัติทางกายภาพและเคมีโดยทำการวิเคราะห์ตามวิธีมาตรฐาน ดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2 วิธีวิเคราะห์ตัวอย่างดินทางกายภาพและเคมี

สมบัติที่วิเคราะห์	วิธีวิเคราะห์	อ้างอิง
เนื้อดิน	Pipette method	Gee and Bauder (1986)
ความเป็นกรด-ด่าง	pH Meter อัตราส่วนดินต่อน้ำ 1:1	Peech (1965)
ปริมาณอินทรีย์วัตถุ	Walkley-Black method	Walkey and Black (1947)
ความจุในการแลกเปลี่ยนประจุบวก	สกัดด้วย NH ₄ OAc	Chapman (1965)
EC	Electrical conductivity meter	Allen (1989)

Total N	Kjeldahl	Bremner (1965)
Available P	Bray II	Bray and Kurt (1945)
Available K	สกัดด้วยNH ₄ OAc	Allen (1989)
Total Ca, Mg, Na, Fe, Al, Mn, Cu, Zn, Cr, Ni, Pb, Cd	Flame Atomic Absorption Spectrophotometer	Hesse (1971)
Total Hg, As	AAS-Hydride	Hesse (1971)

3. การแยกแบคทีเรียจากดินบริเวณไรโซสเฟียร์

ทำการแยกแบคทีเรียจากดินบริเวณไรโซสเฟียร์โดยดัดแปลงจากวิธีการของ Markowicz et al. (2010) ชั่งตัวอย่างดิน 10 กรัม เจือจางด้วย 0.85 % NaCl ปริมาตร 90 มิลลิลิตร นำไปเขย่าที่ความเร็ว 130 rpm เป็นเวลา 60 นาที ทำการเจือจาง (dilution) โดยนำ soil suspension ที่ได้ปริมาตร 1 มิลลิลิตรใส่ใน 0.85 % NaCl ปริมาตร 9 มิลลิลิตร (เจือจางครั้งละสิบเท่า) เจือจางให้ได้ระดับความเข้มข้น 10^{-1} - 10^{-5} จากนั้นนำสารละลายแต่ละระดับการเจือจางปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร หยดบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptic Aoy agar (TSA) (Difco) ที่เติมโซเดียมอาร์เซไนต์ (NaAsO₂) ความเข้มข้น 1 mM ทำการ spread plate ให้ตัวอย่างกระจายให้ทั่วจานอาหารเลี้ยงเชื้อ ทำตัวอย่างละ 3 ซ้ำ หลังจากนั้นนำจานอาหารเลี้ยงเชื้อไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ทำการนับจำนวนแบคทีเรียและคำนวณ CFU

4. การคัดเลือกและแยกแบคทีเรียให้บริสุทธิ์

คัดเลือกแบคทีเรียที่เจริญบนอาหารที่มีการเติมสารหนูแล้วนำไปแยกเชื้อบริสุทธิ์ โดยการ cross streak บนอาหารแข็ง TSA ที่เติมโซเดียมอาร์เซไนต์ (NaAsO₂) ความเข้มข้น 1 mM บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง เมื่อได้โคโลนีเดี่ยวแล้วนำไป streak ซ้ำอีกครั้งบนอาหารเติมเพื่อให้ได้เชื้อบริสุทธิ์ หลังจากนั้นนำโคโลนีเดี่ยวที่ได้ไปเลี้ยงในอาหารเหลว nutrient broth (NB) บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง จากนั้นเก็บเซลล์แบคทีเรียแต่ละไอโซเลตปริมาตร 0.5 มิลลิลิตรไว้ใน 50% glycerol ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร และเก็บเชื้อไว้ที่อุณหภูมิ -21 องศาเซลเซียส เพื่อเก็บเป็น stock culture สำหรับนำไปทดสอบความสามารถในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชต่อไป

ตารางที่ 3 องค์ประกอบของอาหาร TSA (Tryptic Soy Agar)

องค์ประกอบ	ปริมาณ (กรัม/ลิตร)
Casein	15.0
Soybean	5.0
Sodium Chloride	5.0
Agar	15.0

ปรับปริมาตรเป็น 1000 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่นแล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ ที่อุณหภูมิ 121 °C 15 นาที

ตารางที่ 4 องค์ประกอบของอาหาร NB (Nutrient broth) สำหรับการเก็บ stock culture

องค์ประกอบ	ปริมาณ (กรัม/ลิตร)
Beef extract	3.0
Peptone	5.0

ปรับปริมาตรเป็น 1000 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่นแล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ ที่อุณหภูมิ 121 °C เป็นเวลา 15 นาที (pH 6.8-7.0)

5. การทดสอบระดับความสามารถในการต้านทานสารหนูของแบคทีเรีย

ทำการทดสอบความสามารถในการต้านทานสารหนูของแบคทีเรียที่คัดแยกได้ โดยทดสอบบนอาหารแข็ง TSA ที่มีการเติมโซเดียมอาร์เซไนต์ (NaAsO_2) และโซเดียมอาร์เซเนต ($\text{NaHASO}_2 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) ที่ระดับความเข้มข้น 2, 5, 10, 15 และ 20 mM ด้วยการนำเชื้อบริสุทธิ์จาก Stock culture มา streak ลงบนอาหารแข็ง TSA ที่เติมโซเดียมอาร์เซไนต์ความเข้มข้น 1 mM บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส 72 ชั่วโมง จากนั้นนำโคโลนีเดี่ยวมาเลี้ยงในอาหารเหลว NB เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ดูตัวอย่างแบคทีเรียนำมาเจือจางด้วย 0.85% NaCl ใน 96-well ให้ได้ระดับความเข้มข้นเชื้อต่ำสุดที่ 10 100 และ 1000 เท่า จากนั้นใช้ replicator pump บ่มแบคทีเรียแต่ละความเข้มข้นลงบนอาหารแข็ง NA ที่เติมสารหนูที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ (2, 5, 10, 15 และ 20 mM) บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน (Pires, 2010) สังเกตการเจริญของแบคทีเรียบนอาหารทุกวัน โดยเปรียบเทียบกับ control (แบคทีเรียเจริญบนอาหารที่ไม่เติมสารหนู) บันทึกผลการทดลองโดยสังเกตจากการเจริญของแบคทีเรียโดยบันทึกเป็นตัวเลข (หมายเลข 0 คือ ไม่สามารถเจริญในอาหารที่ทดสอบ หมายเลข 1 คือ สามารถเจริญในอาหารได้เจริญได้ดี (เพชรดา, 2554)

6. การทดสอบความสามารถของแบคทีเรียในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช

6.1 ความสามารถในการละลายฟอสเฟตของแบคทีเรีย

ศึกษาความสามารถในการละลายฟอสเฟตของแบคทีเรีย โดยนำแบคทีเรียจาก stock มาเลี้ยงบนอาหาร nutrient agar (NA) จากนั้นจึงนำมาทดสอบบนอาหารแข็ง National Botanical Research Institute's phosphate growth medium (NBRI) (ตารางที่ 5) ซึ่งมี Tricalcium phosphate เป็นองค์ประกอบ โดยวิธี streak plate บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7-14 วัน และสังเกตผลการละลายฟอสเฟตโดยแบคทีเรียที่มีความสามารถละลายฟอสเฟตจะสังเกตเห็นบริเวณใสรอบโคโลนี แสดงว่าแบคทีเรียสามารถละลายฟอสเฟตได้ (Nautiyal, 1999)

6.2 ความสามารถในการผลิตซิติเดอโรฟอรัสของแบคทีเรีย

ทดสอบแบคทีเรียที่มีความสามารถในการสร้างซิติเดอโรฟอรัส บน chrome azurol S medium (CAS-medium) (ตารางที่ 6) โดยนำแบคทีเรียมาเลี้ยงในอาหาร NA หลังจากนั้นนำไป Cross streak บนอาหาร CAS-medium บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 72 ชั่วโมง สังเกตการเปลี่ยนแปลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยแบคทีเรียที่สามารถสร้างซิติเดอโรฟอรัสจะเจริญบนอาหารชนิดนี้และสร้าง halo zone ซึ่งมีสีเหลืองหรือส้มรอบๆ โคโลนี (Alexander, 1991)

ตารางที่ 5 องค์ประกอบของอาหาร NBRI (National Botanical Research Institute's phosphate growth medium) สำหรับทดสอบความสามารถในการละลายฟอสเฟต (Nautiyal, 1999)

องค์ประกอบ	ปริมาณ (กรัม/ลิตร)
Glucose	10.0
Ca ₃ (PO ₄) ₂	5.0
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.1
KCl	0.2
MgSO ₄ • 7H ₂ O	0.25
MgCl ₂ • 6H ₂ O	5.0
Agar	15.0

ปรับ pH เท่ากับ 7.0 และปรับปริมาตรเป็น 1000 ml ینگฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

ตารางที่ 6 องค์ประกอบของอาหาร Chrome azurol S agar medium (Alexander, 1991) ประกอบด้วย 4 solution

solutions 1 (Fe-CAS indicator solutions)	ปริมาณ
FeCl ₃ .6H ₂ O	1 มิลลิโมล
HCl	10 มิลลิโมล
CAS	1.21 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร
hexadecyl-trimethyl ammonium bromide	1.20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร
เตรียมสารละลาย 1 mM FeCl ₃ .6H ₂ O ใน 10 mM HCl ปริมาตร 10 มิลลิลิตร เติมสารละลาย CAS ความเข้มข้น 1.21 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลาย HDTMA ความเข้มข้น 1.20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 40 มิลลิลิตร นิ่งฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที	
solutions 2 (buffer solutions)	ปริมาณ
1) peperazine-N,N-bis[2-ethanesulfonic	30.24 กรัม
2) salt solution	750 มิลลิลิตร
3) agar	15 กรัม
เตรียม PIPES buffer โดยชั่ง PIPES 30.24 กรัม เติม salt solution 750 มิลลิลิตร ปรับ pH 6.8 ด้วย 10 M NaOH (Chaitanya.,2014) จากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 800 มิลลิลิตร เติมวุ้น 15 กรัม นิ่งฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที	
solutions 3	ปริมาณ
1) glucose	2 กรัม
2) mannitol	2 กรัม
3) trace elements	
ชั่ง glucose 2 กรัม และ mannitol 2 กรัม จากนั้นเติม trace elements ที่ละลายในน้ำกลั่น	
solutions 4	ปริมาณ
1) 10% (w:v) casamino acid	30 มิลลิลิตร
เตรียม 10 % casamino acid ปริมาตร 30 มิลลิลิตร ทำให้ปลอดเชื้อโดยการกรอง	

วิธีการเตรียม นำ solution 2 ที่ผ่านการนิ่งฆ่าเชื้อมีอุณหภูมิลดลงเหลือประมาณ 50 องศาเซลเซียส แล้วมาเติม solution 3 และ 4 จากนั้นเติม solutions 1 และผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน ซึ่งสารละลายผสมที่ได้จะมีสีน้ำตาลหรือสีเขียวอมน้ำเงิน

6.3 ความสามารถในการผลิตฮอร์โมนพืชออกซิน (IAA)

ความสามารถของแบคทีเรียในการผลิต IAA สามารถทดสอบตามวิธีการของ Glickman และ Dessaux (1995) โดยเลี้ยงแบคทีเรียในอาหารเหลว LB ปริมาตร 10 มิลลิลิตร และเติม tryptophan 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มเชื้อในที่มืด เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยเขย่าที่ความเร็ว 180 rpm จากนั้นดูด cell suspension 1.5 มิลลิลิตรใส่ในหลอด และทำการตกตะกอนเซลล์โดยเครื่อง centrifuged ที่ความเร็ว 10,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำ 1 มิลลิลิตร cell suspension ผสมกับ 1 มิลลิลิตรของ Salkowski's reagent (300 mL H₂SO₄, 15 mL 0.5 M FeCl₃·6H₂O และ 500 mL distilled H₂O) ที่ไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 25 นาที และสังเกตสารละลายเป็นสีชมพูที่เกิดขึ้น (Wevar Oller et.al, 2013)

ตารางที่ 7 องค์ประกอบของ Salkowski reagent (Bano and Musarrat, 2003)

องค์ประกอบ	ปริมาณ (มิลลิลิตร)
H ₂ SO ₄	300
0.5 M FeCl ₃ ·6H ₂ O	15
distilled H ₂ O	500

6.4 ทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์ 1-amino-cyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) deaminase

ทดสอบความสามารถแบคทีเรียในการผลิตเอนไซม์ ACC (1-aminocyclopropane -1-carboxylate) deaminase ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่มีคุณสมบัติในการลดปริมาณเอซิลินที่พืชผลิตในสภาวะเครียด (Glick et al., 2007) โดยการทดสอบการเจริญของเชื้อบนอาหารแข็ง Dworkin and Foster (DF) minimal salts (Dworkin and Foster, 1958) ที่มีการเติม 3 mM ACC ซึ่ง ACC จะถูกใช้เป็นแหล่งไนโตรเจน โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ DF salts minimal medium ที่ไม่มี ACC เป็น Negative control และอาหารที่มี (NH₄)₂SO₄ (0.2% w/v) เป็น Positive control ทำการบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง สังเกตการเจริญของเชื้อบนอาหาร DF medium ที่เติม ACC แบคทีเรียที่สามารถเจริญได้ แสดงว่าสามารถผลิต ACC deaminase (Ali et.al, 2013)

ตารางที่ 8 องค์ประกอบของอาหาร DF salts minimal medium (Dworkin and Foster, 1958)

องค์ประกอบ	ปริมาณ (กรัม/ลิตร)
KH_2PO_4	1.36
Na_2HPO_4	2.13
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.2
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.7
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.2
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.04
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0.02
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.02
H_3BO_3	0.003
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.007
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.004
Glucose	1.0%

6.5 ความสามารถในการตรึงไนโตรเจน

ทำการคัดเลือกแบคทีเรียที่สามารถตรึงไนโตรเจนได้โดยการนำแบคทีเรียจาก stock culture มาเลี้ยงในอาหารแข็ง NA เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นนำเชื้อแบคทีเรียลงในอาหารเหลว NB ดูดเซลล์แบคทีเรียจากอาหารลงใน 96 well plate จากนั้นใช้ replicator pump ป้อนเชื้อแบคทีเรียลงในอาหารแข็ง Nitrogen-free culture media (Okon, 1997) ทำการบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน สังเกตการเจริญของแบคทีเรียที่ขึ้นบนอาหารแข็ง Nitrogen-free culture media

ตารางที่ 9 องค์ประกอบของอาหาร Nitrogen-free culture media (Okon, 1997)

องค์ประกอบ	ปริมาณ
K ₂ HPO ₄	0.5 กรัม
NaCl	0.22 กรัม
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.02 กรัม
CaCO ₃	5.0 กรัม
CaSO ₄	0.1 กรัม
Glucose	10.0 กรัม
FeSO ₄	4.0 ppm
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	2.0 ppm

7. ระบุชนิดแบคทีเรียโดยวิธีการหาลำดับเบสของยีนบริเวณ 16S rDNA

ศึกษาชนิดของแบคทีเรียด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยา และการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนบริเวณ 16S rDNA โดยนำแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพสูงในการต้านทานสารหนูมาเลี้ยงในอาหารแข็ง Luria Bertani (LB) ที่ไม่มีการเติมโซเดียมอาร์เซไนต์ บ่มทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง หลังจากนั้นใช้หลอดเชื้อเชื้อโคโลนีเดี่ยวลงหลอดขนาด 1.5 mL ที่มี NaOH ความเข้มข้น 0.05M นำสารละลายเซลล์แบคทีเรียที่ได้มาสกัดดีเอ็นเอด้วยการใช้ความร้อน หรือ Boiling ที่อุณหภูมิ 95°C เป็นเวลา 15 นาที และนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 6,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที หลังจากนั้นเก็บตัวอย่างดีเอ็นเอที่ได้ เพื่อใช้ในการทำปฏิกิริยา PCR ต่อไป

การทำปฏิกิริยา PCR นำดีเอ็นเอของแบคทีเรียที่เตรียมได้มาทำปฏิกิริยา PCR ในปริมาตรรวม 50 ไมโครลิตร ซึ่งมีส่วนประกอบดังนี้ ดีเอ็นเอ ปริมาตร 1 µL, dNTPs (dATP, dCTP, dTTP และ dGTP) ความเข้มข้น 100 mM ปริมาตร 0.4 µL, 10X buffer ปริมาตร 5 µL, MgCl₂ ความเข้มข้น 25 mM ปริมาตร 3 µL, universal primer ความเข้มข้น 100 µM (27F/1492R) ปริมาตร 0.5 µL และ Taq DNA Polymerase ความเข้มข้น 5 U ปริมาตร 0.25 µL ปฏิกิริยาสังเคราะห์ดีเอ็นเอตามวิธีการของ Jinbo Xiong (2006) โดยใช้เครื่อง Veriti® Thermal Cycler ผลิตดีเอ็นเอจากปฏิกิริยา PCR ที่ได้ปริมาตร 5 ไมโครลิตร นำมาวิเคราะห์ด้วยเทคนิค gel electrophoresis บน agarose gel ความเข้มข้น 1% ใน 1X TAE buffer

ผลิต PCR นำไปวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ MacroGen (Seoul, Korea) หลังจากนั้นนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์เพื่อบ่งชี้ชนิดของแบคทีเรียโดยการเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอ

ไต่จากฐานข้อมูลของ Genebank ด้วยโปรแกรม Blast search (Basic Local Alignment Search Tools) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)

ผลการทดลอง

1. การเก็บตัวอย่างดิน

เก็บตัวอย่างดินในบริเวณเหมืองแร่เก่า ในพื้นที่ 3 จังหวัด จำนวน 6 เหมือง สามารถเก็บตัวอย่างในการศึกษาได้ทั้งหมด 15 ตัวอย่าง โดยเก็บตัวอย่างจากจังหวัดชลบุรี (CB) จากเหมืองพัฒนาไผ่หนึ่ง จำนวน 2 ตัวอย่าง (CB-Cas และ CB-Cal) จังหวัดกาญจนบุรี (KB) จากเหมืองสมพงษ์ จำนวน 4 ตัวอย่าง (KB1-Cas, KB1-Mim, KB1-Sug และ KB1-Cas2) เหมืองจรีนทร์ จำนวน 1 ตัวอย่าง (KB2-Hyp) และ เหมืององค์การทหารผ่านศึกจำนวน 2 ตัวอย่าง (KB3-Sug และ KB3-Cas) เก็บตัวอย่างในเหมืองจากจังหวัดราชบุรี จำนวน 6 ตัวอย่าง จากเหมืองแหลมพิชัย จำนวน 2 ตัวอย่าง (RB1-Tit และ RB1-Ban) และเหมืองสินสยาม จำนวน 4 ตัวอย่าง (RB2-Euc, RB2-Gas, RB2-Leu และ RB2-Sen) โดยตัวอย่างดินบริเวณไรโซสเฟียร์ที่เก็บนั้นจะมีลักษณะของพืชพรรณที่แตกต่างกัน คือ อ้อย มันสำปะหลัง กัญชง ยูคาลิปตัส และพืชพรรณตามธรรมชาติอื่นๆ เช่น หญ้าดอกขาว บัวตอง และขี้เหล็ก (ตารางที่ 10) ทั้งนี้เพื่อให้ได้ความหลากหลายของจุลินทรีย์จากพืชต่างชนิดกันในการทดลอง

2. สมบัติทางกายภาพ และเคมีของดิน

ผลการวิเคราะห์สมบัติทางกายภาพ และเคมีของตัวอย่างดิน พบว่าตัวอย่างดินส่วนใหญ่มีลักษณะเนื้อดินเป็นกลุ่มเนื้อดินหยาบและค่อนข้างหยาบ โดยมีร้อยละของดินเนื้อหยาบและปานกลางมากกว่าร้อยละ 95 และมีร้อยละของเนื้อดินละเอียดต่ำไม่ถึงร้อยละ 1 เมื่อประเมินประเภทของเนื้อดินได้เป็นดินร่วน/ดินร่วนปนทรายแป้ง ยกเว้นในตัวอย่าง CB-Cas และ KB2-Hyp จะมีเนื้อดินเป็นดินร่วนปนทราย และตัวอย่าง KB1-Min, RB2-Euc และ RB2-Gas เป็นดินทรายแป้ง ดินมีค่าปฏิกิริยาดินเป็นกลางถึงกรดอ่อน คือ pH อยู่ในช่วง 5.5-7.6 ดินมีความอุดมสมบูรณ์ต่ำถึงปานกลาง โดยมีอินทรีย์วัตถุในช่วง 0.73-1.82 % มีค่าความจุแลกเปลี่ยนไอออนบวก (CEC) ตั้งแต่ 24-235 cmol/kg ปริมาณธาตุอื่นๆ และปริมาณโลหะอื่นๆ ค่อนข้างต่ำ ยกเว้น Mn ที่มีปริมาณสูงเกินค่ามาตรฐานที่กำหนดในดินเขตกรรม (ตารางที่ 12) ที่กำหนดไว้ที่ 1800 mg/kg ในตัวอย่าง CB-Cal ปริมาณ Pb สูงเกินค่ามาตรฐานที่กำหนดในดินเขตกรรม 400 mg/kg ในตัวอย่าง RB1-Ban และปริมาณของ As ในตัวอย่าง KB2-Hyp และ RB2-Leu ($As > 3.9$ mg/kg) (กรมควบคุมมลพิษ, 2547) รายละเอียดค่าวิเคราะห์ดังตารางที่ 12 และ 13

ตารางที่ 10 ลักษณะทั่วไปและพืชพรรณของตัวอย่างดินบริเวณรอบรากพืชที่นำมาคัดแยกแบคทีเรียบริเวณไรโซสเฟียร์

ตัวอย่างดิน	รหัส	พืชพรรณ	ลักษณะทั่วไป
1	CB-Cas	มันสำปะหลัง	ดินมีสีน้ำตาลเหลือง
2	CB-Cal	หญ้าดอกขาว	ดินมีสีน้ำตาลเหลือง
3	KB1-Cas	มันสำปะหลัง	ดินสีเทาดำ
4	KB1-Mim	ไมยราบไร้หนาม	ดินมีสีน้ำตาลเหลือง
5	KB1-Sug	อ้อย	ดินสีน้ำตาลดำ
6	KB1-Cas(2)	มันสำปะหลัง	ดินมีสีน้ำตาลเหลือง
7	KB2-Hyp	แมงลักคา	ดินมีสีน้ำตาลเหลือง
8	KB3-Sug	อ้อย	ดินมีสีน้ำตาลเทา
9	KB3-Cas	มันสำปะหลัง	ดินมีสีดำ
10	RB1-Tit	บัวตอง	ดินมีสีน้ำตาลเหลือง
11	RB1-Ban	กล้วยน้ำว้า	ดินมีสีน้ำตาลเทา
12	RB2-Euc	ยูคาลิปตัส	ดินมีสีน้ำตาล
13	RB2-Gas	หญ้าขจรจบ	ดินมีสีน้ำตาลดำ
14	RB2-Leu	กระถิน	ดินมีสีน้ำตาลดำ
15	RB2-Sen	ขี้เหล็ก	ดินมีสีน้ำตาลเทา

ตารางที่ 11 ค่ามาตรฐานโลหะหนักในดิน

ดัชนีคุณภาพดิน	ค่ามาตรฐาน	
	ดินที่ใช้ประโยชน์เพื่อการอยู่อาศัยและเกษตรกรรม	ดินที่ใช้ประโยชน์นอกเหนือจากการอยู่อาศัยและเกษตรกรรม
1) สารหนู (Arsenic)	ไม่เกิน 3.9 mg/kg	ไม่เกิน 27 mg/Kg
2) แคดเมียมและสารประกอบแคดเมียม (Cadmium and compounds)	ไม่เกิน 37 mg/kg	ไม่เกิน 810 mg/Kg
3) โครเมียมชนิดเฮกซะวาเลนต์ (Hexavalent Chromium)	ไม่เกิน 300 mg/kg	ไม่เกิน 640 mg/Kg
4) ตะกั่ว (Lead)	ไม่เกิน 400 mg/kg	ไม่เกิน 750 mg/Kg
5) แมงกานีสและสารประกอบแมงกานีส (Manganese and compounds)	ไม่เกิน 1,800 mg/kg	ไม่เกิน 32,000 mg/Kg
6) ปรอทและสารประกอบปรอท (Mercury and compounds)	ไม่เกิน 23 mg/kg	ไม่เกิน 610 mg/Kg
7) นิกเกิลในรูปของเกลือที่ละลายน้ำได้ (Nickel, soluble salts)	ไม่เกิน 1,600 mg/kg	ไม่เกิน 41,000 mg/Kg
8) ซีลีเนียม (Selenium)	ไม่เกิน 390 mg/kg	ไม่เกิน 10,000 mg/Kg

ที่มา: กรมควบคุมมลพิษ, 2547

ตารางที่ 12 ค่าวิเคราะห์สมบัติดินทางกายภาพและเคมีของตัวอย่างดินบริเวณเหมืองแร่

ตัวอย่างดิน	Soil distribution (%)			Texture	pH	OM (%)	CEC (cmol/kg)	EC (dS/cm ³)	Total N (----- mg/kg -----)	Avail. P	Avail. K	Total Ca	Total Mg	Total Na
	sand	silt	clay											
CB-Cas	47.45	52.09	0.46	sandy loam	6.7	1.39	130	0.08	0.08	88	367	454	440	238
CB-Cal	24.47	75.21	0.32	silt loam	6.9	1.15	235	0.04	0.04	3	259	82	205	205
KB1-Cas	23.68	76.06	0.26	silt loam	7.5	1.34	49	0.07	0.00	9	998	294	590	183
KB1-Mim	5.34	94.56	0.10	silt	7.6	0.89	24	0.07	0.02	10	514	1035	326	240
KB1-Sue	26.42	73.30	0.28	silt loam	7.5	0.73	57	0.06	0.03	6	846	387	1248	158
KB1-Cas(2)	39.99	59.64	0.37	silt loam	6.6	1.52	62	0.05	0.04	11	1194	537	1340	161
KB2-Hyp	61.28	38.03	0.69	sandy loam	7.2	0.90	76	0.06	0.03	8	711	156	215	165
KB3-Sue	24.17	75.54	0.29	silt loam	5.9	1.43	54	0.05	0.03	5	1066	639	731	169
KB3-Cas	24.42	75.30	0.28	silt loam	5.5	1.60	63	0.05	0.04	6	958	241	426	173
RB1-Tit	37.21	62.39	0.40	silt loam	6.0	1.53	59	0.04	0.07	15	604	168	264	178
RB1-Ban	22.25	77.50	0.25	silt loam	6.7	1.46	53	0.05	0.05	26	851	500	648	182
RB2-Euc	10.08	89.77	0.15	silt	6.0	1.42	57	0.04	0.05	10	1850	365	1678	186
RB2-Gas	15.22	84.59	0.19	silt	6.4	1.56	45	0.03	0.06	10	1573	408	1283	169
RB2-Leu	32.28	67.48	0.24	silt loam	6.6	1.82	136	0.06	0.16	3	2370	1089	3440	178
RB2-Sen	23.73	76.08	0.19	silt loam	6.9	1.59	68	0.04	0.08	5	2335	656	2566	173

ตารางที่ 13 ค่าวิเคราะห์ปริมาณโลหะหนักด้วยวิธีมาตรฐานของตัวอย่างดินบริเวณเหมืองแร่ (หน่วย: mg/kg)

ลำดับที่	เหมือง	ตัวอย่างดิน	Fe (%)	Al (%)	Zn	Mn	Cu	Pb	Cd	Cr	Ni	Hg	As
1	เหมืองพรวัฒนาไผ่นิ่ง	CB-Cas	436	95	93	1754	26	44	0.84	12.32	15	0.27	2.8
2		CB-Cal	610	88	72	2134	189	49	1.38	11.30	14	0.29	1.5
3	เหมืองสมพงษ์	KB1-Cas	94	81	42	430	4	28	0.31	0.00	4	0.03	0.7
4		KB1-Mim	90	40	36	171	1	23	0.40	0.00	2	0.02	0.6
5		KB1-Sug	193	82	23	237	8	41	0.00	2.36	12	0.00	2.7
6		KB1-Cas(2)	279	88	28	255	10	44	0.00	7.10	13	0.02	2.7
7	เหมืองจรินทร์	KB2-Hyp	555	96	39	165	24	74	0.64	25.36	23	0.04	4.3
8	เหมืององค์การทหารผ่านศึก	KB3-Sug	95	127	39	269	3	39	0.00	0.25	4	0.00	1.1
9		KB3-Cas	94	91	25	192	0	35	0.00	0.00	2	0.01	0.8
10	เหมืองแร่แหลมพิชัย	RB1-Tit	97	133	58	363	13	46	0.00	0.00	4	0.03	1.6
11		RB1-Ban	255	120	224	419	90	543	0.00	7.58	30	0.03	1.8
12	เหมืองสมพงษ์	RB2-Euc	154	108	39	235	4	47	0.43	0.00	5	0.05	3.0
13		RB2-Gas	111	92	29	237	4	37	0.00	0.00	4	0.09	3.1
14	เหมืองสินสยาม	RB2-Leu	370	184	77	593	22	75	0.17	15.20	26	0.04	4.3
15		RB2-Sen	133	209	49	283	11.75	51	0.32	3.24	15	0.07	3.9

ตารางที่ 14 การประเมินระดับความอุดมสมบูรณ์ของดินเพื่อศักยภาพในการผลิตพืชของตัวอย่างดินบริเวณเหมืองแร่

เหมือง	ตัวอย่างดิน	ชนิดของพืช	OM	CEC	BS	P	K	รวม	ระดับความอุดมสมบูรณ์
เหมืองพรวัฒนาไผ่หนึ่ง	CB-Cas	มันสำปะหลัง	1	3	1	3	3	11	ปานกลาง
	CB-Cal	หญ้าดอกขาว	1	3	1	1	3	9	ปานกลาง
เหมืองสมพงษ์	KB1-Cas	มันสำปะหลัง	1	3	2	1	3	10	ปานกลาง
	KB1-Mim	ไมยราบไร้หนาม	1	3	3	2	3	12	ปานกลาง
	KB1-Sug	อ้อย	1	3	2	1	3	10	ปานกลาง
	KB1-Cas(2)	มันสำปะหลัง	2	3	2	2	3	12	ปานกลาง
เหมืองจรินทร์	KB2-Hyp	แมงลักคา	1	3	1	1	3	9	ปานกลาง
เหมืององค์การทหารผ่านศึก	KB3-Sug	อ้อย	1	3	2	1	3	10	ปานกลาง
	KB3-Cas	มันสำปะหลัง	2	3	1	1	3	10	ปานกลาง
เหมืองแร่แหลมพิชัย	RB1-Tit	บัวตอง	2	3	1	2	3	11	ปานกลาง
	RB1-Ban	กล้วยน้ำว้า	1	3	2	3	3	12	ปานกลาง
เหมืองสมพงษ์	RB2-Euc	ยูคาลิปตัส	1	3	3	2	3	12	ปานกลาง
	RB2-Gas	หญ้าขจรจบ	2	3	3	2	3	13	สูง
เหมืองสินสยาม	RB2-Leu	กระถิน	2	3	2	1	3	11	ปานกลาง
	RB2-Sen	ชี้เหล็ก	2	3	1	1	3	10	ปานกลาง

จากการสำรวจและเก็บตัวอย่างในพื้นที่พบว่าพื้นที่เหมืองแร่เก่าถูกเปลี่ยนเป็นพื้นที่เกษตรกรรมโดยส่วนใหญ่ ซึ่งพืชที่นิยมปลูกคือ มันสำปะหลังและอ้อยเป็นหลัก ดังนั้นหากจะทำการประเมินศักยภาพของดินในการปลูกพืชของดินบริเวณเหมืองแร่เก่า สามารถพิจารณาจากค่าวิเคราะห์ดินและประเมินเป็นระดับความอุดมสมบูรณ์ของดินตามค่าวิเคราะห์มาตรฐาน 5 ค่า คือ ความจุแลกเปลี่ยนไอออนบวก (CEC), ร้อยละความอิ่มตัวด้วยต่าง (BS), ปริมาณอินทรีย์วัตถุ (OM) ปริมาณฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์ (avail. P) และโพแทสเซียมที่เป็นประโยชน์ (avail. K) (ตารางที่ 14) จะพบว่าดินส่วนใหญ่มีระดับความอุดมสมบูรณ์ในระดับปานกลาง ยกเว้นในตัวอย่างดิน RB2-Gas เป็นดินบริเวณทุ่งหญ้าจะมีระดับความอุดมสมบูรณ์ที่สูง ซึ่งอาจเป็นผลมาจากปริมาณอินทรีย์วัตถุร้อยละความอิ่มตัวด้วยต่างจึงทำให้ประเมินได้เป็นความอุดมสมบูรณ์สูง ทั้งนี้เกณฑ์ในการประเมินระดับความอุดมสมบูรณ์ของดินมีหลักเกณฑ์ดังตารางที่ 16 และประเมินระดับความอุดมสมบูรณ์ของดินผลรวมของคะแนน 5 ค่าวิเคราะห์ดังกล่าวมาข้างต้น คือ ผลรวมคะแนน 7 หรือน้อยกว่า 7 ระดับความอุดมสมบูรณ์ต่ำ ผลรวมคะแนน 8-12 ระดับความอุดมสมบูรณ์ ปานกลาง ผลรวมคะแนน 13 หรือมากกว่า ระดับความอุดมสมบูรณ์ สูง

ตารางที่ 15 การประเมินระดับความอุดมสมบูรณ์ของดินตามค่าวิเคราะห์

ระดับความ อุดมสมบูรณ์	OM (%)	CEC (cmol kg ⁻¹)	BS (%)	Available P (mg/kg)	Available K (mg/kg)
ต่ำ	< 1.5	<10	<35	<10	<60
ปานกลาง	1.5-3.5	10-20	35-70	10-25	60-90
สูง	> 3.5	> 20	> 70	> 25	> 90

ที่มา: คณาจารย์ปฐพีวิทยา (2556)

3. การแยกแบคทีเรียด้านทานสารหนู และแยกเชื้อบริสุทธิ์

เนื่องด้วยผลค่าวิเคราะห์ปริมาณโลหะหนักในดินที่วิเคราะห์ได้ส่วนใหญ่ไม่เกินค่ามาตรฐานกำหนด (ตารางที่ 11) และค่ามาตรฐานที่กำหนดไว้อยู่ในอัตราที่สูงกว่าค่าที่วิเคราะห์ได้มาก ยกเว้นโลหะหนักพวกสารหนูที่มีค่ามาตรฐานกำหนดไว้เพียงที่ระดับ 3.9 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ซึ่งตัวอย่างดินที่ใช้ในการวิจัยมีค่าเท่ากับและเกินมาตรฐานที่กำหนดจำนวน 3 เหมือง และมีค่าใกล้เคียงกับค่ามาตรฐานกำหนดจำนวน 4 เหมือง รวมทั้งสิ้นมีดินที่เสี่ยงต่อการปนเปื้อนและเป็นอันตรายจำนวน 7 เหมือง ดังนั้นการคัดแยกแบคทีเรียด้านทานโลหะหนักจึงเน้นในการคัดแยกแบคทีเรียด้านทานสารหนู ซึ่งผลการคัดแยกแบคทีเรียด้านทานสารหนูจากดินตัวอย่างที่ระดับเจือจางต่างๆ (10⁻¹-10⁻⁵) บนอาหารแข็ง TSA ที่มีระดับความเข้มข้นของโซเดียมอาร์เซไนต์ที่ 1 mM สามารถคัดแยกแบคทีเรียได้ตารางที่ 16 โดยจำนวนแบคทีเรียในตัวอย่างดินบริเวณไรโซสเฟียร์ที่มีการปนเปื้อนของสารหนูสูงจะมีจำนวนแบคทีเรียที่น้อยกว่าตัวอย่างดินบริเวณไรโซสเฟียร์ที่มีปริมาณสารหนูน้อย ยกเว้นตัวอย่าง RB2-Leu ที่มีจำนวนแบคทีเรียสูงกว่าทั้งนี้อาจเป็นผลมาจากดินมีแบคทีเรียที่มีความสามารถด้านทานสารหนูได้ในปริมาณ ผลการทดลองจะเห็นได้ว่าจำนวนแบคทีเรียที่นับได้จากดินเหมืองแร่เก่าที่เก็บในจังหวัดราชบุรี (RB) จะมีจำนวนแบคทีเรียสูงกว่าตัวอย่างดินที่เก็บจากบริเวณอื่น ยกเว้นตัวอย่างดิน RB-Tit

RB-Ban และ RB-Ses ทั้งนี้หมืองแร่ในจังหวัดราชบุรีที่มีปริมาณสารหนูตั้งแต่ 1.6-4.3 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม จะพบจำนวนแบคทีเรียได้มากกว่าหมืองแร่ในจังหวัดอื่นๆ อยู่ในช่วง 21.1×10^3 – 130.8×10^3 CFU/ml สำหรับดินบริเวณไรโซสเฟียร์ที่มีชนิดของพืชพรรณที่ต่างกันไปในนั้นมีผลต่อปริมาณเชื้อที่นับจำนวนได้ไม่ชัดเจน ทั้งนี้จะขึ้นกับสมบัติทางดินอย่างอื่นด้วย ยกตัวอย่างเช่น CB-Cas และ CB-Cal เป็นตัวอย่างดินจากหมืองเดียวกันแต่มีชนิดพืชต่างกันแต่สามารถนับจำนวนแบคทีเรียได้ไม่แตกต่างกัน ในขณะที่ KB1-Sug และ KB3-Sug เป็นหมืองที่มีที่ตั้งต่างกันแต่เป็นพืชชนิดเดียวกัน พบมีจำนวนแบคทีเรียต่างกันคือ 69.0×10^2 และ 35.5×10^2 ตามลำดับ อย่างไรก็ตามเมื่อพิจารณาจำนวนแบคทีเรียที่นับได้จะเห็นได้ว่ามีจำนวนค่อนข้างน้อย เนื่องจากแยกเชื้อที่ระดับความเข้มข้นสารหนูเพียง 1 mM ซึ่งจากการทดลองของ เพชรดาและคณะ (2556) สามารถนับจำนวนแบคทีเรียในหมืองแร่บริเวณคุ้มหมืองใหม่พัฒนา ต.หนองจอก อ.บ้านไร่ จ.อุทัยธานี และได้แบคทีเรียมากกว่า 60×10^6 CFU/ml เมื่อนำมาแยกแบคทีเรียด้วยเทคนิค dilution and plate ที่มีการเติมโซเดียมอาร์เซไนต์ที่ระดับ 10 mM ซึ่งแสดงให้เห็นว่าอิทธิพลของปัจจัยทางดินมีผลต่อจำนวนแบคทีเรีย นอกจากพืชเพียงอย่างเดียว อย่างไรก็ตามเมื่อนำแบคทีเรียมาคัดเลือกและแยกเชื้อบริสุทธิ์ในอาหาร NA ที่มีการเติมสารหนูอาร์เซไนต์ 1 mM สามารถคัดเลือกแบคทีเรียได้ทั้งหมด 76 ไอโซเลต (ตารางที่ 16)

ตารางที่ 16 Colony forming unit (CFU/ml) ของแบคทีเรียด้านทานสารหนูที่คัดแยกได้ ที่ระดับความเข้มข้นของสารหนูอาร์เซไนต์ 1 mM

ตัวอย่างดิน	จำนวนแบคทีเรีย (CFU/ml)	ตัวอย่างดิน	จำนวนแบคทีเรีย (CFU/ml)
CB-Cas	25.2×10^3	KB3-Cas	14.7×10^3
CB-Cal	24.2×10^3	RB1-Tit	73.3×10^2
KB1-Cas	49.6×10^2	RB1-Ban	22.3×10^3
KB1-Mim	15.8×10^3	RB2-Euc	130.8×10^3
KB1-Sug	69.0×10^2	RB2-Gas	92.8×10^3
KB1-Cas(2)	50.3×10^2	RB2-Leu	103.3×10^3
KB2-Hyp	37.5×10^2	RB2-Sen	21.1×10^3
KB3-Sug	35.5×10^2		

ตารางที่ 17 จำนวนแบคทีเรียต้านทานสารหนูที่แยกได้จากดินบริเวณไรโซสเฟียร์ในเหมืองแร่ต่างๆ

ตัวอย่าง	จำนวนแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ (ไอโซเลต)
CB-Cas	4
CB-Cal	6
KB1-Cas	2
KB1-Mim	4
KB1-Sug	5
KB1-Cas(2)	1
KB2-Hyp	8
KB3-Sug	4
KB3-Cas	8
RB1-Tit	4
RB1-Ban	9
RB2-Euc	7
RB2-Gas	2
RB2-Leu	5
RB2-Sen	7
รวม	76

4. การทดสอบระดับความสามารถในการต้านทานสารหนูของแบคทีเรีย

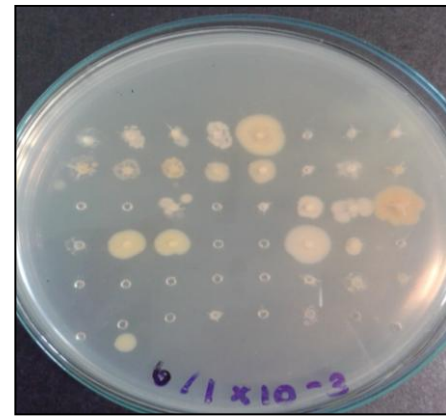
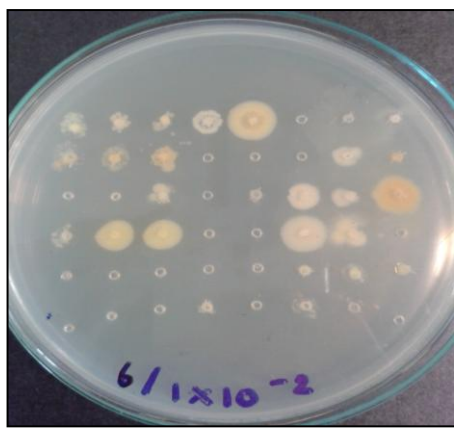
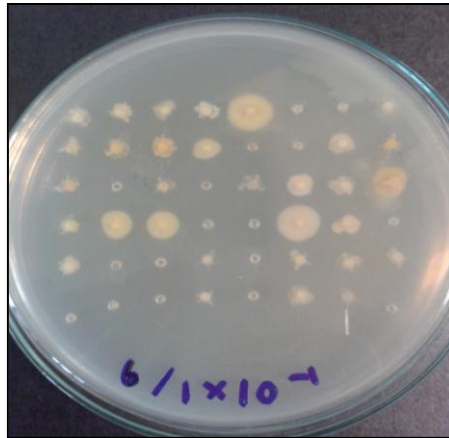
การทดสอบระดับความสามารถในการต้านทานสารหนู บนอาหารแข็งเชื้อ TSA ที่มีระดับความเข้มข้นสารหนูต่างๆ (โซเดียมอาร์เซไนต์และโซเดียมอาร์เซเนต ที่ความเข้มข้น 2, 5, 10, 15 และ 20 mM) พบว่าแบคทีเรียมีความสามารถในการต้านทานสารหนูในรูปอาร์เซไนต์และอาร์เซเนตได้แตกต่างกันไปขึ้นกับระดับความเข้มข้นของสารหนูที่ทดสอบ และแบคทีเรียสามารถต้านทานสารหนูในรูปอาร์เซเนตได้มากกว่าในรูปอาร์เซไนต์ เนื่องจากสารหนูในรูปอาร์เซเนตมีความเป็นพิษน้อยกว่าสารหนูในรูปอาร์เซไนต์ (Ehrlich, 1996)

อย่างไรก็ตามแบคทีเรียที่ต้านทานสารหนูได้ในแต่ละความเข้มข้นจะมีความสามารถในการต้านทานลดลงเมื่อความเข้มข้นของสารหนูเพิ่มขึ้น ดังตารางที่ 18

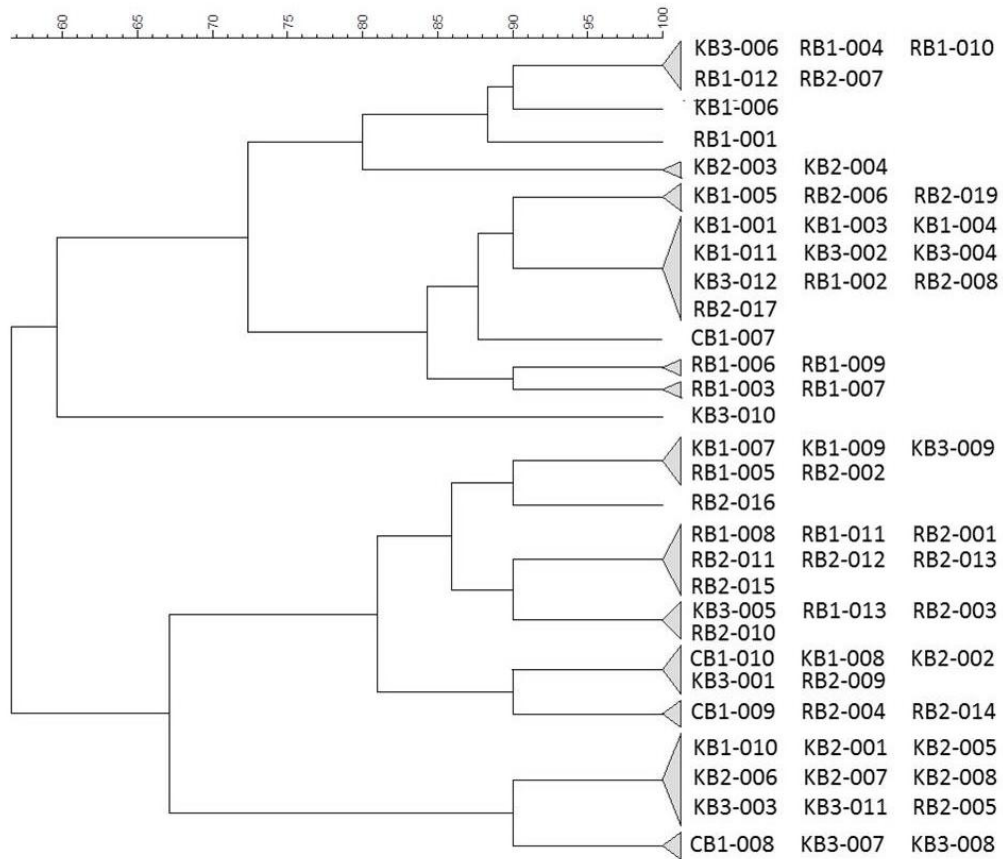
ทั้งนี้ได้เมื่อทำการวิเคราะห์ความหลากหลายของแบคทีเรียที่ต้านทานสารหนู ด้วยการวิเคราะห์ UPGMA โดยใช้ simple matching binary coefficient เพื่อสร้าง dendrogram โดยอาศัยข้อมูลความสามารถในการต้านทานสารหนูที่เติมลงไป คือ โซเดียมอาร์เซไนต์และโซเดียมอาร์เซเนต ที่ระดับความเข้มข้น 2, 5, 10, 15 และ 20 mM สามารถแบ่งแบคทีเรียที่ต้านทานสารหนูในรูปอาร์เซไนต์ทั้งหมดเป็น 2 clusters ที่ระดับความคล้ายคลึงสูงสุด 80% โดย cluster I เป็นกลุ่มแบคทีเรียที่มีความสามารถต้านทานสารหนูสูง และ cluster II เป็นกลุ่มแบคทีเรียที่มีความสามารถต้านทานสารหนูต่ำ ซึ่งทำให้สามารถคัดเลือกตัวแทนจากการจัดกลุ่มดังกล่าวนี้โดยอาศัยความสามารถในการต้านทานสารหนูสูงสุดดังกล่าว ได้แบคทีเรียตัวแทนใน 17 กลุ่ม จำนวน 38 ไอโซเลต (ภาพที่ 3)

ตารางที่ 18 จำนวนแบคทีเรียที่ระดับความเข้มข้น 10 เท่า ที่มีความสามารถในการต้านทานสารหนูอาร์เซไนต์และอาร์เซเนตที่ความเข้มข้นระดับต่างๆ

ความเข้มข้นของสารหนู (mM)	จำนวนแบคทีเรียที่ต้านทานสารหนู	
	สารหนูอาร์เซไนต์	สารหนูอาร์เซเนต
2	59	59
5	22	59
10	10	47
15	4	30
20	2	25



ภาพที่ 2 ความสามารถในการต้านทานสารหนูของแบคทีเรียต้านทานสารหนูอาร์เซนไนด์
ที่ระดับการเจือจางของเชื้อ 10 100 และ 1000 เท่า



ภาพที่ 3 dendrogram แสดงความหลากหลายของแบคทีเรียด้านทานของสารหนู โดยการวิเคราะห์ UPGMA simple matching binary coefficient

5. การทดสอบกิจกรรมการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชและระบุชนิดของแบคทีเรีย

เมื่อนำข้อมูลความสามารถในการต้านทานสารหนูในรูปอาร์เซนไนต์และอาร์เซนเต จากภาพที่ 3 สามารถคัดเลือกแบคทีเรียตัวแทนได้ 38 ไอโซเลต ซึ่งเลือกจากแบคทีเรียที่มีความสามารถในการต้านทานสารหนูในรูปอาร์เซนไนต์หรืออาร์เซนเตในระดับสูงสุด และนำแบคทีเรียตัวแทนดังกล่าวมาศึกษากิจกรรมการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช 5 กิจกรรม คือ การตรึงไนโตรเจน การละลายฟอสเฟต การผลิตฮอร์โมนพืช ออกซิน (IAA) กิจกรรมของเอนไซม์ 1-amino-cyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) deaminase และการผลิตซิเดอโรฟออร์ จากการศึกษากิจกรรมการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชทั้ง 5 กิจกรรม (ตารางที่ 19) พบว่าแบคทีเรียส่วนใหญ่มีความสามารถในการส่งเสริมในกิจกรรมการตรึงไนโตรเจน จำนวน 13 ไอโซเลต คิดเป็น 34% จากแบคทีเรียทั้งหมด รองลงมาคือแบคทีเรียที่มีความสามารถในการสร้างฮอร์โมนพืช indole-3-acetic acid (IAA) จำนวน 15 ไอโซเลต คิดเป็น 35% จากแบคทีเรียทั้งหมด ในขณะที่แบคทีเรียที่มี

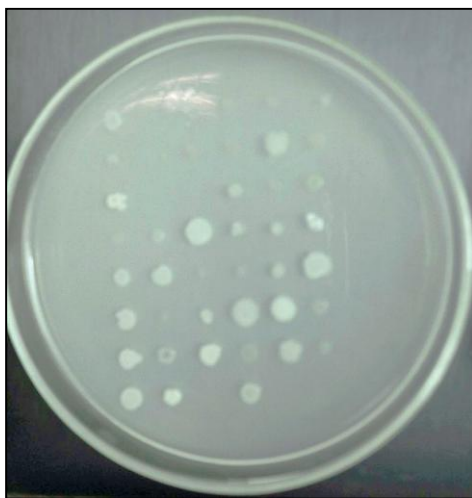
ความสามารถในการส่งเสริมการสร้างฮอร์โมนพืช indole-3-acetic acid (IAA) มีจำนวน 6 ไอโซเลต คิดเป็น 16% ของแบคทีเรียทั้งหมด สำหรับการผลิต ACC มีจำนวน 2 ไอโซเลต คือ CB1-007 และ KB1-010 ส่วนความสามารถในการสร้างซีเตอรโรฟอร์มีเพียง 1 ไอโซเลต คือ CB1-007 ซึ่งไอโซเลตนี้สามารถเกิดกิจกรรมร่วมกับการผลิต ACC ได้ด้วย

ตารางที่ 19 แบคทีเรียตัวแทนจำนวน 38 ไอโซเลต ที่มีความสามารถในการต้านทานสารหนูที่ความเข้มข้นสูงสุด และมีความสามารถในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช

ลำดับ	ไอโซเลต	ระดับความสามารถในการต้านทานสารหนูสูงสุด(mM)		กิจกรรมส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช			
		อาร์เซนไนต์	อาร์เซนต	N-fixation	IAA production	Siderofore production	ACC
1	CB1-007	1	20	1	-	1	1
2	CB1-008	1	1	-	-	-	-
3	CB1-009	5	10	-	-	-	-
4	CB1-010	5	5	1	1	-	-
5	KB1-003	2	20	1	-	-	-
6	KB1-005	2	15	1	-	-	-
7	KB1-006	15	15	1	-	-	-
8	KB1-007	1	10	-	-	-	-
9	KB1-008	5	5	-	-	-	-
10	KB1-010	2	1	1	-	-	1
11	KB2-002	5	5	1	1	-	-
12	KB2-004	20	20	1	-	-	-
13	KB2-005	2	1	1	-	-	-
14	KB3-001	5	5	-	1	-	-
15	KB3-002	2	20	-	-	-	-
16	KB3-003	2	1	-	1	-	-

ลำดับ	ไอโซเลต	ระดับความสามารถในการ ต้านทานสารหนูสูงสุด(mM)		กิจกรรมส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช			
		อาร์เซนไนต์	อาร์เซนเตต	N- fixation	IAA production	Siderofore production	ACC
17	KB3-005	2	5	-	1	-	-
18	KB3-006	10	20	-	1	-	-
19	KB3-007	1	1	1	1	-	-
20	KB3-009	1	10	1	-	-	-
21	KB3-010	15	10	1	-	-	-
22	RB1-001	10	20	1	1	-	-
23	RB1-002	2	20	1	1	-	-
24	RB1-003	5	20	1	-	-	-
25	RB1-004	10	20	1	1	-	-
26	RB1-005	1	10	1	-	-	-
27	RB1-006	5	15	1	-	-	-
28	RB1-008	2	10	1	-	-	-
29	RB1-013	2	5	1	1	-	-
30	RB2-001	2	10	1	-	-	-
31	RB2-002	1	10	-	-	-	-
32	RB2-005	2	1	-	1	-	-
33	RB2-007	10	20	1	1	-	-
34	RB2-009	5	5	-	1	-	-
35	RB2-010	2	5	-	-	-	-
36	RB2-014	5	10	1	1	-	-
37	RB2-016	1	5	-	-	-	-
38	RB2-017	2	20	1	-	-	-

ทั้งนี้แบคทีเรียตัวแทนจำนวน 38 ไอโซเลต ที่มีคุณสมบัติส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชด้านต่างๆ จะนำมาจัดกลุ่มอีกครั้งโดยนำข้อมูลการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชในกิจกรรมต่างๆ มาสร้าง dendrogram พบว่า สามารถแบ่งแบคทีเรียที่เรียกด้านทานสารหนูอาร์เซนไนด์และอาร์เซนเนตที่มีกิจกรรมส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชต่างๆ ดังภาพที่ 4 ได้เป็น 2 clusters โดย cluster I เป็นกลุ่มแบคทีเรียที่มีความสามารถในการต้านทานสารหนูอาร์เซนไนด์และอาร์เซนเนตสูงสุด 15 mM และ 20 mM ตามลำดับ ซึ่งมีจำนวน 14 ไอโซเลต คิดเป็น 37% ของแบคทีเรียตัวแทนทั้งหมด (38 ไอโซเลต) โดยแบคทีเรีย cluster เป็นแบคทีเรียที่สามารถส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชได้ 3 กลุ่ม คือ การตรึงไนโตรเจน การสร้างซิงเดอโรฟอรัส และกิจกรรมของเอนไซม์ 1-amino-cyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) deaminase ในขณะที่ cluster II มีความสามารถในการต้านทานสารหนูอาร์เซนไนด์และอาร์เซนเนตสูงสุด 10 mM และ 20 mM ตามลำดับ ซึ่งมีความสามารถในการต้านทานสารหนูอาร์เซนไนด์ต่ำกว่า cluster I และสามารถส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชได้ 2 กลุ่ม คือ การตรึงไนโตรเจนและการสร้างฮอร์โมนพืช indole-3-acetic acid (IAA) มีจำนวนรวมทั้งสิ้น 24 ไอโซเลต คิดเป็น 63% ของแบคทีเรียตัวแทนทั้งหมด จากผลการทดลองทำให้สามารถคัดเลือกแบคทีเรียตัวแทนจากการจัดกลุ่มดังกล่าวนี้โดยอาศัยความสามารถในการต้านทานสารหนูสูงสุดและความสามารถในการส่งเสริมกิจกรรมการเจริญเติบโตของพืชของแต่ละกิจกรรมได้แบคทีเรียตัวแทน จำนวน 5 ไอโซเลต (ตารางที่ 20) คือ KB3-006 KB1-010 RB1-005 KB3-010 และ CB1-007

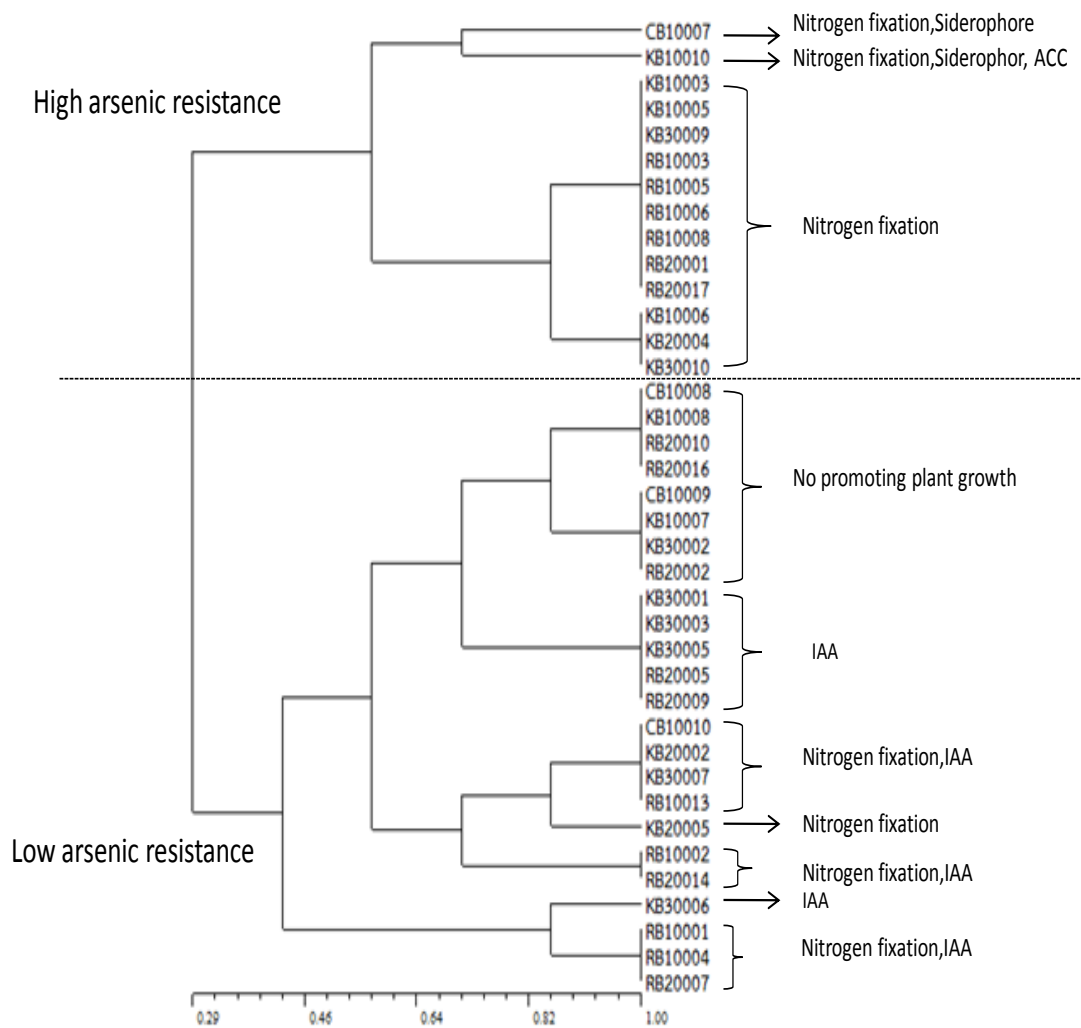


A.



B.

ภาพที่ 4 กิจกรรมการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชของแบคทีเรียที่เรียกด้านทานสารหนู (A. ตรึงไนโตรเจนและ B. การสร้างฮอร์โมน IAA)



ภาพที่ 5 dendrogram แสดงความหลากหลายของแบคทีเรียด้านทานของสารหนูและการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช โดยการวิเคราะห์ UPGMA simple matching binary coefficient

จากผลการทดลองพบแบคทีเรียที่มีความสามารถในการต้านทานสารหนูสูงสุด (ในรูปอาร์เซนไนต์หรืออาร์เซนเตต) ที่มีศักยภาพในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชในด้านต่างๆ ดังตารางที่ 20 ซึ่งแบคทีเรียทั้ง 5 ไอโซเลตนี้เมื่อนำมาวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยใช้ผลผลิตดีเอ็นเอขนาดประมาณ 1000-1500 bp ซึ่งคิดพบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของแบคทีเรียมีความคล้ายคลึงกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของแบคทีเรียในฐานข้อมูลของ GenBank จำนวน 4 ชนิด ซึ่งอยู่ใน 2 ไฟลัม คือ Firmicutes และ Proteobacteria โดยในไฟลัม Firmicutes พบอยู่ในสกุล *Bacillus* 3 ไอโซเลต คือ KB3-010 KB1-010 และ KB3-006 มีลำดับนิวคลีโอไทด์คล้ายคลึงกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA ของ *Bacillus magisterium* และ *Bacillus* sp. ที่ระดับความคล้ายคลึง 99% 99% และ 100% ตามลำดับ ในขณะที่พบแบคทีเรียในสกุล 1 ไอโซเลต คือ CB1-007 มีลำดับนิวคลีโอไทด์คล้ายคลึงกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA ของ *Acinetobacter baumannii* ที่ระดับความคล้ายคลึง 99% ส่วนไฟลัม Proteobacteria พบอยู่ในสกุล *Acinetobacter* เพียง 1 ไอโซเลต คือ RB1-005 มีลำดับนิวคลีโอไทด์คล้ายคลึงกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA ของ *Acinetobacter baumannii* ที่ระดับความคล้ายคลึง 99% รายละเอียดการระบุชนิดของแบคทีเรีย 5 ไอโซเลต ดังตารางที่ 21 อย่างไรก็ตามการนำแบคทีเรียที่มีศักยภาพในการต้านทานสารหนูและส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชไปใช้ประโยชน์ในพื้นที่จริงนั้น ควรจะต้องมีการทดลองเพิ่มเติมในดินจำลอง และในโรงเรือนก่อนเนื่องจากการทดลองในห้องปฏิบัติการมีสภาวะแวดล้อมทั้งด้านของอาหาร พลังงานและสภาพแวดล้อมที่เอื้อต่อการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย ในขณะที่การนำแบคทีเรียไปใช้ในพื้นที่จริงนั้น จะมีปัจจัยภายนอกและปัจจัยแวดล้อมอื่นๆ ที่ไม่สามารถควบคุมได้ การทดลองเพิ่มเติมจึงจะช่วยให้เกิดความแม่นยำและความเชื่อมั่นในการนำแบคทีเรียไปใช้ประโยชน์ได้จริง ซึ่งจะทำให้การนำแบคทีเรียต่างๆ ไปใช้เกิดประโยชน์ได้อย่างแท้จริงและยั่งยืน

ตารางที่ 20 แบคทีเรียตัวแทนจำนวน 5 ไอโซเลต ที่มีความสามารถในการต้านทานสารหนูสูงสุดและมีความสามารถส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช

ไอโซเลต	การต้านทานสาร หนูอาร์เซนไนต์สูงสุด (mM)	การต้านทานสารหนู อาร์เซนเตตสูงสุด (mM)	กิจกรรมส่งเสริมการเจริญเติบโต ของพืช
RB1-005	10	20	ตรึงไนโตรเจน, IAA
KB3-010	15	10	ตรึงไนโตรเจน
KB3-006	10	20	IAA
CB1-007	1	20	ผลิตซิเคอร์โรฟอร်
KB1-010	2	1	ผลิตซิเคอร์โรฟอร်, ACC

ตารางที่ 21 การระบุชนิดของแบคทีเรียต้านทานสารหนูที่สามารถส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชได้ ด้วยวิธีการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA

ลำดับ	ไอโซเลต	ชนิดของแบคทีเรีย	% Similarlity	Acession no.
1	RB1-005	<i>Acinetobacter baumannii</i> strain AC29	99	CP007535.1
2	KB3-010	<i>Bacillus megaterium</i> QM B1551	99	CP001983.1
3	KB3-006	<i>Bacillus</i> sp. BAB-3422	100	KF917152.1
4	CB1-007	<i>Lysinibacillus xylanilyticus</i> strain GT18	100	JQ677989.1
5	KB1-010	<i>Bacillus megaterium</i> strain KL-197	99	AY030338.1

สรุปผลการทดลอง

จากการเก็บตัวอย่างดินและประเมินค่าวิเคราะห์ดินทางเคมีและกายภาพของการปนเปื้อนโลหะหนักในพื้นที่เหมืองแร่ในจังหวัดราชบุรีและกาญจนบุรี พบว่าดินในบริเวณเหมืองแร่มีลักษณะของดินที่เป็นเนื้อหยาบมากกว่า 80% และมีสัดส่วนของดินเนื้อละเอียดน้อยมาก อย่างไรก็ตามเนื่องจากเกษตรกรมีการนำพื้นที่เหมืองแร่ร้างไปทำการเกษตร เมื่อประเมินศักยภาพของดินในการปลูกพืชโดยประเมินจากค่าวิเคราะห์ดิน 5 ดัชนี (ความจุแลกเปลี่ยนไอออนบวก (CEC), ร้อยละความอิ่มตัวด้วยต่าง (BS), ปริมาณอินทรีย์วัตถุ (OM) ปริมาณฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์ (avail. P) และโพแทสเซียมที่เป็นประโยชน์ (avail. K)) ดินส่วนใหญ่มีความอุดมสมบูรณ์ในระดับปานกลาง ทั้งนี้อาจเป็นผลมาจากการใส่ปุ๋ยเคมีและอินทรีย์ของเกษตรกร ซึ่งเมื่อพิจารณาสมบัติทางกายภาพแล้วดินมีการระบายน้ำดีเกินไปและไม่อุ้มน้ำ เนื้อดินหยาบจึงเหมาะสมต่อการปลูกพืชน้อยหรือต้องเลือกพืชในการปลูกให้เหมาะสม สำหรับการวิเคราะห์ปริมาณโลหะหนักต่างๆ จากดินบริเวณเหมืองแร่ พบการปนเปื้อนโลหะหนักหลายชนิด คือ Zn Mn Cu Pb Cd Cr Ni และ As และแทบไม่มีการปนเปื้อนของ Hg และ cd เลย อย่างไรก็ตามแม้จะพบการปนเปื้อนของโลหะต่างๆ ในดินซึ่งได้เปลี่ยนแปลงเป็นพื้นที่การเกษตรเป็นส่วนใหญ่แล้วในปัจจุบัน แต่ระดับการปนเปื้อนยังอยู่ในเกณฑ์ที่ไม่เกินมาตรฐานกำหนด ยกเว้นในบางพื้นที่ (3 เหมืองแร่) จะพบการปนเปื้อนของสารหนูที่เกินมามาตรฐาน ดังนั้นในการศึกษานี้จึงเน้นในการคัดเลือกไรโซแบคทีเรียที่มีความสามารถในการต้านทานสารหนู ซึ่งจากการศึกษาสามารถคัดเลือกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการต้านทานสารหนูได้ 76 ไอโซเลต และจากการวิเคราะห์ข้อมูล minimum inhibitory concentration (MIC) ของการต้านทานสารหนูในรูปอาร์เซนไนต์และอาร์เซนเตต พบว่าแบคทีเรียจะสามารถต้านทานสารหนูได้ลดลงตามความเข้มข้นของสารหนูที่เพิ่มขึ้นและความเข้มข้นของเชื้อที่ลดลง อย่างไรก็ตามแบคทีเรียที่คัดเลือกได้สามารถต้านทานสารหนูในรูปอาร์เซนไนต์และอาร์เซนเตต ได้มากที่สุดเท่ากับ 15 mM 20 mM ตามลำดับซึ่งเมื่อทำการจัดกลุ่มโดยใช้ข้อมูลการความสามารถในการต้านทานสารหนูในรูปอาร์เซนไนต์และอาร์เซนเตตที่ระดับ 2, 5, 10, 15 และ 20 mM ทำให้สามารถคัดเลือกแบคทีเรียตัวแทนได้ 38 ไอโซเลต ซึ่งแบคทีเรียแต่ละไอโซเลตมีความสามารถในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช 4 กิจกรรม จาก 5 กิจกรรมที่ทดสอบ คือ การตรึงไนโตรเจน การผลิตฮอร์โมนพืชออกซิน (IAA) กิจกรรมของเอนไซม์ 1-amino-cyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) deaminase และการผลิตซิเดอรอฟอร์ โดยไม่พบกิจกรรมการ

ละลายฟอสเฟต อย่างไรก็ตามสามารถคัดเลือกตัวแทนแบคทีเรียที่มีความสามารถด้านทานสารหนูในระดับสูงสุดและมีกิจกรรมการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชที่น่าสนใจ จำนวน 5 ไอโซเลต คือ KB3-006 KB1-010 RB1-005 KB3-010 และ CB1-007 ซึ่งสามารถระบุชนิดของแบคทีเรียได้เป็น *Acinetobacter baumannii*, *Bacillus magaterium*, *Bacillus* sp., *Acinetobacter baumannii* และ *Bacillus magaterium* ตามลำดับ ทั้งนี้แบคทีเรียทั้ง 5 ไอโซเลต น่าจะมีศักยภาพในการนำไปใช้ประโยชน์ในพื้นที่การเกษตรที่มีการปนเปื้อนได้

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

- กรมควบคุมมลพิษ. 2547. ประกาศราชกิจจานุเบกษาตามคณะกรรมการสิ่งแวดล้อมแห่งชาติ ฉบับที่ 25 เรื่อง กำหนดมาตรฐานคุณภาพดิน. แหล่งที่มา: http://www.pcd.go.th/info_serv/reg_std_soil01.html
- คณาจารย์ภาควิชาปฐพีวิทยา. 2556. หนังสือปฏิบัติการปฐพีวิทยาเบื้องต้น. พิมพ์ครั้งที่ 10. สำนักพิมพ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
- เพชรดา เจริญมิตร. 2554. การแปลงและการจัดพืชสารประกอบสารหนูโดยจุลินทรีย์ดิน. วิทยานิพนธ์ปริญญาเอก, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- เพชรดา ปินใจ, นันทิกา จันทรภาพ, พงศกร ตันตราวงศา และ กรรณิการ์ สัจจาพันธ์. 2556. ประสิทธิภาพการแปลงสารหนูของแบคทีเรียที่แยกได้จากดินประเทศไทย. รายงานผลการวิจัยฉบับสมบูรณ์ โครงการวิจัยทุนอุดหนุนวิจัย มก.
- นันทิกา จันทรภาพ, เพชรดา ปินใจ, กรรณิการ์ สัจจาพันธ์, และไมเคิล เจ สตาร์วส์กีร์. 2556. การคัดแยกและจำแนกแบคทีเรียแปลงสารหนูจากบริเวณปนเปื้อนสารหนูในประเทศไทย. ใน การประชุมวิชาการเกษตรแห่งชาติ มหาวิทยาลัยวินเรศวร ครั้งที่ 11, 21-22 กรกฎาคม 2556.
- Alef, Y. and P. Nannipieri. 1996. Methods in applied soil microbiology and biochemistry. Academic Press. London.
- Alexander, D.B. and D.A. Zuberer. 1991. Use of chrome azurol S reagents to evaluate siderophore production by rhizosphere bacteria. Biol. Fertil Soils. 2: 39-45.
- Ali, S.Z., Sandhya V. and L.V. Rao. 2013. Isolation and characterization of drought-tolerant ACC deaminase and exopolysaccharide-producing fluorescent *Pseudomonas* sp. Annals of Microbiology. 64:493-502.
- Allen, S.E. 1989. Chemical analysis of ecological material. Australia: Blackwell scientific publications. UK, 565 pp.

- Bray, R.H. and L.T. Kurt. 1945. Determination of total organic and Available forms of phosphorus in soils. *Soil science* 59:39-45.
- Chaitanya, K., Mahmood, S.K., Ranakausar and N. Sunil Kamur. 2014. Polymer producing bacteria showing siderophore activity with chrome zurlo S (CAS) agar plate assay. *International Journal of Scientific and Research Publications*. 4:1-4. Available source <http://www.ijsrp.org/research-paper-1214/ijsrp-p36109.pdf> (15/02/15)
- Chapman, H.D. 1965. Cation exchange capacity, pp. 891-901. *In* C.A. Black (ed.), *Methods of Soil Analysis. Part II. Chemical and Microbiological Properties*. Amer. Soc. Agron. Inc., Madison, Wisconsin, USA.
- Dworken, M. and J. Foster. 1958. Experiments with some microorganisms which utilize ethane and hydrogen. *J. Bacteriol.* 75: 592-601.
- Ehrlich, H.L. 1996. Geomicrobial interactions with arsenic and antimony, pp. 276-293. *In* Ehrlich H.L. (ed) *Geomicrobiology*, 3rd edn. New York, NY: Marcel Dekker Inc.
- Gee, G.W. and J.W. Bauder 1986. Particle-size analysis, pp. 961-1010. *In* A. Klute (ed.), *Methods of Soil Analysis. Part I. Physical and Mineralogical Methods*. Amer. Soc. Agron. Inc., Madison, Wisconsin, USA.
- Glickman, E. And Y. Dessaux. 1995. A critical examination of the specificity of the Salkowski reagent for indolic compounds produced by phytopathogenic bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 61:793-796.
- Gothwal, R.K., NIGAM, V.K., MOHAN, M.K., SASMAL, D. and P. GHOSH 2007. Screening of nitrogen fixers from rhizospheric bacterial isolates associated with important desert plants. *Appl. Ecolo. Environ. Res.* 6:101-109.
- Hesse, P.R. 1971. *A textbook of soil chemical analysis*. Chemical Publishing. New York, 520 pp.
- Jareonmit, P., Sajjaphan, K. and J.M. Sadowsky. 2010. Structure and Diversity of Arsenic Resistant Bacteria in an old Tin Mined Area of Thailand. *J. Microbial. Biotechnol.* 20: 169-178.
- Markowicz, A., Plociniczak, T. and Z. Piotrowska-Seget. 2010. Response of bacteria to heavy metals mass changes in FAME profiles. *Polish J. of Environ. Stud.* 19:957-965.
- Nautiyala, C.S. 1999. An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. *FEMS Microbiology Letters.* 170: 265-270.

- Okon, Y., Albrecht, S.L. and R.H. Burris. 1977. Methods of growing *Spirillum lipoferum* and for counting it in pure culture and in association with plants. *Appl. Environ. Microbiol.* 33: 85-88.
- Peech, M. 1965. Hydrogen-ion Activity. *In* C.A. Black (ed). *Methods of oil nalysis, Part 2, Chemical and Microbiological Properties*, Amer. Soc. Agron. Madison, Wisconsin., pp 914-925.
- Pires, C. 2010. *Bacteria in heavy metal contaminated soil: Diversity. Tolerance and Use in Remediation Systems*. Cranfield University, UK.
- Walkley, A. 1947. A Critical Examination of a Rapid Method for Determination of Organic Carbon in Soils - Effect of Variations in Digestion Conditions and of Inorganic Soil Constituents. *Soil Sci.* 63:251-257.
- Wevar Oller, A.L., Talano, M.A. and E. Agostini. 2013. Screening of plant growth-promoting traits in arsenic-resistant bacteria isolated from the rhizosphere of soybean plants from Argentinean agricultural soil. *Plant Soil* 369:93-102.