

## ส่วนที่ 2

รายงานผลการวิจัยฉบับสมบูรณ์  
โครงการวิจัยทุนอุดหนุนวิจัย มก. ปีงบประมาณ 2557

โครงการวิจัยรหัส ก-ช(พ-ท(ด)10.56)

การเพิ่มความสามารถในการสะสมแคดเมียมของพืชที่สะสมโลหะหนักในปริมาณสูงโดยใช้จุลินทรีย์  
Enhancing of cadmium accumulation ability of hyperaccumulating plants using microorganisms

(1)กรรณิการ์ สัจจาพันธ์, (2)วุฒิดา รัตนพิไชย, (3)นาง  
สาวสุจิตตรา ปะนันโต

(1)Kannika Sajjaphan, (2)Wutthida Rattanapichai, (3)

บทคัดย่อ

การศึกษาผลกระทบของแคดเมียมและสังกะสีที่ปนเปื้อนดินต่อโครงสร้างประชากรของจุลินทรีย์บริเวณไรโซสเฟียร์โดยใช้วิธีเมตาจีโนมิกส์ โดยเก็บตัวอย่างดินบริเวณไรโซสเฟียร์ 12 ตัวอย่าง จากตำบลพระธาตุผาแดง อำเภอแม่สอด จังหวัดตาก มาวิเคราะห์โครงสร้างประชากรจุลินทรีย์โดยทำการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอที่ตำแหน่ง V6 hypervariable ของยีน 16S rDNA และวิเคราะห์ลำดับเบสด้วยวิธี Illumina sequencing พบว่า สามารถจำแนกจุลินทรีย์ได้ 54,026 OTUs โดยพบแบคทีเรีย 99.74% อาร์เคีย 0.26% และ 0.0001% ไม่สามารถจำแนกได้ และยังพบไฟลัมที่มีลักษณะเด่น 5 ไฟลัม ที่มีจำนวนแบคทีเรียมากที่สุดคือ Proteobacteria Actinobacteria Acidobacteria Fimicutes และ Bacteroidetes ซึ่งใน 5 ไฟลัมนี้มีจำนวนแบคทีเรียทั้งหมด 89.17% จากนั้นทำการวิเคราะห์ดัชนีความหลากหลายทางชีวภาพด้วย ค่า Nonparametric Shannon และ Shannon diversity index แสดงให้เห็นว่าความหลากหลายของแบคทีเรียในดินที่มีแคดเมียมปนเปื้อนในระดับต่ำ (0.1-9.7 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม) มีมากกว่าความหลากหลายของแบคทีเรียในดินที่มีแคดเมียมปนเปื้อนในระดับสูง (72.9-898.2 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม) อย่างมีนัยสำคัญ ( $p < 0.05$ ) การวิเคราะห์ความสามารถในการต้านทานแคดเมียมและสังกะสีของแบคทีเรีย ด้วยวิธีการ MICs พบว่า จากแบคทีเรียที่ได้คัดเลือกมาศึกษาทั้งหมด 1,152 ไอโซเลต (ตัวอย่างดินละ 96 ไอโซเลต) มีแบคทีเรียที่สามารถต้านทานแคดเมียมที่ระดับความเข้มข้น 320 มิลลิกรัมต่อลิตร คิดเป็นร้อยละ 26.7 และพบแบคทีเรียสามารถต้านทานสังกะสีที่ระดับความเข้มข้น 3,200 มิลลิกรัมต่อลิตร คิดเป็นร้อยละ 2.3 และพบว่าความสามารถในการต้านทานแคดเมียมและสังกะสีลดลงเมื่อความเข้มข้นของแคดเมียมและสังกะสีเพิ่มขึ้น การตรวจสอบยีนต้านทานแคดเมียมและสังกะสี *czcD*, *czrC*, *nccA*, *cadA* และ *cadB* พบว่าไพรเมอร์ที่ใช้ไม่สามารถตรวจสอบยีนที่ต้านทานแคดเมียมและสังกะสีในกลุ่มนี้ได้ จากนั้นนำแบคทีเรียต้านทานแคดเมียมตัวแทนและสังกะสีจากกลุ่มประชากรหลักมา 22 ไอโซเลต เพื่อไปทดสอบความสามารถในการผลิตซีเดอโรฟอรัส พบว่าแบคทีเรียสามารถผลิตซีเดอโรฟอรัสได้ 10 ไอโซเลต และสามารถผลิตซีเดอโรฟอรัสได้ในปริมาณ 6.6-60.39% siderophore unit สามารถผลิตออกซิโนยูบินในช่วง 3.76-20.89 มิลลิกรัมต่อลิตร และผลิตจิบเบอเรลลิน อยู่ในช่วง 280.22-326.26 มิลลิกรัมต่อลิตร ผลการศึกษาพบ

ว่า ไอโซเลต TR60004 มีศักยภาพในการนำไปเพิ่มประสิทธิภาพการสะสมโลหะหนักของพืช เนื่องจากสามารถต้านทานแคดเมียมและสังกะสีได้ในระดับสูงที่สุด คือที่ความเข้มข้น 320 และ 3200 มิลลิกรัมต่อลิตร มีความสามารถผลิตซีเดอโรพอรินได้สูงสุดและผลิตฮอริโมนพืชออกซินและจิบเบอเรลลินได้ในระดับสูง การศึกษาผลของจุลินทรีย์ต่อการมีไบโอเซนซันของแคดเมียมและสังกะสีในคอลัมน์ดินปนเปื้อน และการศึกษาศักยภาพของแบคทีเรียในการเพิ่มประสิทธิภาพการสะสมแคดเมียมและสังกะสีในสาบเสือ พบว่า การใส่เชื้อแบคทีเรียไม่ทำให้ปริมาณแคดเมียมและสังกะสีทั้งหมดในดินหลังการชะละลายแตกต่างจากที่ไม่มีการใส่เชื้อ และมีปริมาณแคดเมียมที่ละลายได้ถูกชะออกมาน้อยมาก (0.82-7.4 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม) ผลการศึกษาศักยภาพของแบคทีเรียในการเพิ่มประสิทธิภาพการสะสมสังกะสีในสาบเสือ พบว่า การเจริญเติบโตของต้นสาบเสือ ในสัปดาห์ที่ 1-9 มีการเติบโตใกล้เคียงกันในทุกๆ การทดลอง แต่ในสัปดาห์ที่ 10-12 ตำรับที่ไม่ใส่เชื้อแบคทีเรียการเจริญเติบโตของต้นสาบเสือสูงกว่าในตำรับที่ใส่เชื้อ และสาบเสือที่ปลูกในดินปนเปื้อนแคดเมียมน้อยมีการเจริญเติบโตสูงที่สุด รองลงมาคือสาบเสือที่ปลูกในดินปนเปื้อนแคดเมียมไม่เกินมาตรฐาน และปนเปื้อนสูงเกินมาตรฐานตามลำดับ การใส่เชื้อแบคทีเรียทำให้ปริมาณแคดเมียมและสังกะสีทั้งหมดในดินหลังปลูกลดลงจากที่ไม่มีการใส่เชื้อแต่อย่างไรก็ตามไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ปริมาณแคดเมียมและสังกะสีในดินพืชดูดสะสมไว้ในรากของเป็นส่วนใหญ่ นอกจากนี้การใส่และไม่ใส่เชื้อแบคทีเรียไม่ทำให้การสะสมแคดเมียมและสังกะสีของสาบเสือแตกต่างกัน

คำสำคัญ : แคดเมียม; การฟื้นฟูสิ่งแวดล้อมด้วยพืช; ก

#### ABSTRACT

A metagenomics approach was used to assess the impacts of cadmium and zinc contamination on rhizobacterial population of *Chromolaena odorata* (L.). Twelve rhizosphere soil samples were obtained from Phra That Pha Daeng District, Mae Sot, Tak Province. Bacterial communities were characterized using the V6 hypervariable region of the 16S rDNA gene using Illumina next-generation sequencing technology. Among 54,026 unique OTUs identified, 99.74% was classified as bacteria, 0.26% was classified as archaea and 0.0001% could not be assigned to any kingdom. At all sites, several dominant phyla were observed including Proteobacteria, Actinobacteria, Acidobacteria, Fimicutes and Bacteroidetes. These five Phyla accounted for 89.17% of all OTUs identified among all sites, and only two OTUs could not be classified into any Phylum. Comparison among samples contained low and high level of Cd contamination using the nonparametric Shannon and Shanon diversity indices showed that soils with low level of Cd had obtained higher value in term of species diversity ( $P < 0.05$ ). This result indicated that level of Cd may significantly in bacterial species selection. Cd and Zn resistant bacteria from each sample (n=96 isolates)

were submitted for MICs analysis (Cd; 20, 40, 80, 160, 320 mg/L Zn; 200, 400, 800, 1,600, 3,200 mg/L). A total of 1,152 MIC values were submitted individually to analyze the pattern of gene function by using BioNumeric software. The results showed that 26.7% of the bacteria were resistant to cadmium at concentrations up to 320 mg/L and only 2.3% of bacteria were resistant to zinc at concentration up to 3,200 mg/L. The MICs analyses indicated that cadmium and zinc resistance decreased with increasing cadmium and zinc concentrations and those bacteria resistant to Cd and Zn at the same level of concentration may contain the same group of genes. PCR reactions were performed to identify *czcD*, *czrC*, *nccA*, *cadA* and *cadB*. However, the genes were not detected. Twenty isolates were chosen based on profiles of Cd and Zn resistance. Ten isolates produced siderophore units in the range of 6.6-60.39 % when tested using chrome azurol sulphonate (CAS) assay. The bacteria were also tested for their ability to produce plant growth-promoting factors including auxin and gibberellic acid. All of these isolates were able to produce auxin and gibberellin in the range of 3.76-20.89  $\mu$ g/ml and 280.22-326.26  $\mu$ g/ml, respectively. Isolates TR6004 had ability to resistant to highest amount of Cd and Zn, produced the greatest amount of siderophore units and were best at production of plant growth promoting agents. Mobilization study showed no different effect on leaching of Cd and Zn with or without addition of bacteria to contaminated soil. The mobilizations of Cd and Zn were very low (0.82-7.4  $\mu$ g/Kg). Moreover, to investigate the effects of bacteria on metal uptake by the hyperaccumulating plant, *Chromolaena odorata* (L.), a pot experiment with different concentrations of Cd and Zn was conducted. It was found that the growths of *C. odorata* were no different during 1st-9th weeks. Then, Plants without inoculation of bacteria had higher height that plants with inoculation of bacteria during 10th-12th weeks. The plant grown better in less Cd and Zn contaminated soil. Total Cd and Zn in the soil tend to be decreased when plant grown with inoculation of bacteria. However, there is no statistical difference. We observed that Cd and Zn accumulation in the roots of the plants higher than shoots. The results indicated that Cd and Zn accumulation in plants are no different with inoculation and without inoculation of bacteria.

Key words : cadmium; phytoremediation; phytoextracti

---

(1)ภาควิชาปฐพีวิทยา คณะเกษตร บางเขน

(1)Faculty of Agriculture

(2)คณะเกษตร บางเขน