การสำรวจรวบรวมแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนอิสระ

Survey and Collection of Non-Symbiotic N_2-fixing Bacteria in Thailand

สมปอง หมื่นแจ้ง[1] และ กัลป์ยกร โปร่งจันทึก[1]

กลุ่มวิจัยปฐพีวิทยา สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

.....

บทคัดย่อ

เก็บตัวอย่างดิน ราก ลำต้น ใบ เพื่อแยกแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนอิสระ โดยสุ่มเก็บตัวอย่างดินและพืชในภาคภาคเหนือ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ภาคกลาง และภาคตะวันออก รวมทั้งหมด 75 ตัวอย่าง จากพืชอาศัยที่แตกต่างกัน ทั้งพืชไร่ พืชสวนและพืชอื่นๆ โดยเก็บตัวอย่างดินประมาณ 1 กิโลกรัม และตัวอย่างรากต้น และใบ พืชเป้าหมายใส่ถุงพลาสติกสำหรับเก็บตัวอย่างให้มิดชิด ใส่กระติกน้ำแข็ง ดำเนินการนับและแยกเชื้อในห้องปฏิบัติการ ผลการดำเนินงานตั้งแต่ ปี 2549-2553 ได้เชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนอิสระแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนอิสระทั้งสิ้น 350 ไอโซเลท แยกเป็น 3 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ 1 คล้ายแบคทีเรียสกุล *Azotobacter* spp. มีทั้งหมด 100 ไอโซเลท คัดเลือกไอโซเลทที่มีศักยภาพในการตรึงไนโตรเจนสูงที่สุด 1 ไอโซเลท คือ DASF 02007 ซึ่งเก็บจากดินรอบรากชา ในแปลงรวบรวมพันธุ์ชาโครงการหลวง ต.แม่วิน อ.แม่วาง จ. เชียงใหม่ มีศักยภาพในการตรึงไนโตรเจน 1,500 $\pm$ 297 nmole $C_2H_4/10^9$CFU/h^{-1} กลุ่มที่ 2 คล้ายแบคทีเรียสกุล *Azospirillum* spp. มีทั้งหมด 215 ไอโซเลท คัดเลือกไอโซเลทที่มีศักยภาพในการตรึงไนโตรเจนสูงที่สุด คือ DASF 04178 ซึ่งเก็บจากดินรอบรากหน่อไม้ฝรั่งอินทรีย์ของเกษตรกร ต.ทัพพริก อ. อรัญประเทศ จ.สระแก้ว มีศักยภาพในการตรึงไนโตรเจน 189 $\pm$ 3.2 nmole C_2H_4/tube/h^{-1} และ กลุ่มที่ 3 คล้ายแบคทีเรียสกุล *Beijerinckia* spp. มีทั้งหมด 35 ไอโซเลท คัดเลือกไอโซเลทที่มีศักยภาพในการตรึงไนโตรเจนสูงที่สุด คือ DASF 06026 ซึ่งเก็บจากแปลงเงาะอินทรีย์ของเกษตรกร ต.นาขวัญ อ.เมือง จ.ระยอง มีศักยภาพในการตรึงไนโตรเจน 1,800 $\pm$ 147 nmole$C_2H_4/10^9$ CFU/h^{-1}

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

ทะเบียนวิจัย 09-02-49-01-02-01-01-49

[1] กลุ่มงานวิจัยจุลินทรีย์ดิน กลุ่มวิจัยปฐพีวิทยา สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร จตุจักร กรุงเทพฯ 10900

บทนำ

จุลินทรีย์เป็นทรัพยากรสิ่งมีชีวิตที่มีคุณค่าและมีบทบาทสำคัญมากต่อวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิตต่างๆ ในโลก จุลินทรีย์มีการกระจายไปอยู่ในสภาวะแวดล้อมที่มีความหลากหลายมากที่สุดและสามารถดำรงชีวิตและเจริญอยู่ในสภาวะแวดล้อมต่าง ๆได้ดี ทั้งสภาพแวดล้อมที่เหมาะสม หรือสภาพแวดล้อมที่มีความหลากหลาย เช่น บริเวณปล่องภูเขาไฟ บริเวณน้ำแข็งทั่วโลก 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 รวบรวมและคัดเลือกอีกมากมาย จุลินทรีย์เหล่านี้มีรายงานว่าอาศัยอยู่กับพืชเศรษฐกิจที่สำคัญได้แก่ ข้าว ข้าวป่า อ้อย สับปะรด และไม้ผลบางชนิด จากการศึกษาพบว่า จุลินทรีย์เป็นสิ่งมีชีวิตที่มีการกลายพันธุ์หรือมีประสิทธิภาพการทำงานของยีน (gene) ที่เปลี่ยนแปลงได้ง่ายตามสภาพแวดล้อม ดังนั้น งานค้นคว้า รวบรวม สำรวจ คัดเลือก จำแนก ตลอดจนการเก็บรักษาจุลินทรีย์เพื่อการใช้ประโยชน์อย่างยั่งยืน ยังคงต้องดำเนินต่อไป โดยจะดำเนินงานค้นคว้าเกี่ยวกับจุลินทรีย์ที่เป็นประโยชน์กับพืชเศรษฐกิจที่สำคัญมากขึ้น การรวบรวมคัดเลือกจุลินทรีย์ตรึงไนโตรเจนอิสระในพืช คือ ข้าว ข้าวโพด ข้าวฟ่าง อ้อย สับปะรด

วิธีการดำเนินการและอุปกรณ์

อุปกรณ์

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

วิธีการดำเนินงาน

การเก็บตัวอย่าง เก็บตัวอย่างดิน ราก ลำต้น ใบ เพื่อแยกแบคทีเรียที่เรียตรึงไนโตรเจนอิสระ 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).

การแยกเชื้อแบคทีเรียที่เรียตรึงไนโตรเจนอิสระ ดำเนินการในอาหารจำเพาะของแบคทีเรียแต่ละสกุล ตามรายงานของ Dobereiner,(1980).กล่าวคือ สกุล *Azotobacter* ใช้อาหารแข็งปราศจากไนโตรเจน (LG medium) *Beijerinckia* ใช้อาหารแข็งปราศจากไนโตรเจน (BG medium) ส่วนสกุล *Azospirillum* ใช้อาหารปราศจากไนโตรเจนกึ่งเหลว (Nfb semisolid medium) ทั้งนี้ รูปแบบอาหารเลี้ยงเชื้อมีความแตกต่างกันตามปริมาณอ๊อกซิเจนที่แบคทีเรียแต่ละกลุ่มใช้ในการตรึงไนโตรเจน การนับปริมาณเชื้อจากตัวอย่างดิน ราก และลำต้น สำหรับ *Azotobacter* และ *Beiejrinckia* ใช้วิธี Plate count มีหน่วยเป็น Colony Forming Unit (CFU) ต่อกรัมตัวอย่างสด ส่วน *Azospirillum* ใช้วิธี MPN มีหน่วยเป็นเซลล์ต่อกรัมตัวอย่างสด โดยตัวอย่างก่อนตรวจนับและแยกเชื้อต้องทำการเจือจางแบบ 10 เท่า ตามหลักการ serial dilution (Zuberer. 1994)

การประเมินประสิทธิภาพในการตรึงไนโตรเจนของเชื้อโดยการวิเคราะห์ประสิทธิภาพในการเปลี่ยนรูปแก๊ส C_2H_2 เป็น C_2H_4 ตามวิธี Acetylene Reduction Activity ที่กล่าวถึงโดย Meunchang *et al.*, 2004. โดยทำ 4 ซ้ำ วิเคราะห์ความคลาดเคลื่อนทางสถิติโดยใช้ standard deviation (SD) โดยเก็บรวบรวมเชื้อทั้ง 3 สกุลได้ทั้งหมด 350 ไอโซเลท เก็บรักษาไว้ใน glycerol 10% ในตู้เย็นอุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส

ระยะเวลา เดือน

1 ตุลาคม 2548 – 30 กันยายน 2553

สถานที่ทำการทดลอง

กลุ่มงานวิจัยจุลินทรีย์ดิน กลุ่มวิจัยปฐพีวิทยา สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร
กรมวิชาการเกษตร

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

การสำรวจรวบรวมแบคทีเรียตรึงไนโตรเจน 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 ได้เชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนทั้งสิ้น 350 ไอโซเลท สามารถจัดกลุ่มเป็น 3 สกุลโดยใช้อาหารจำเพาะ และจำแนกตามหลักการจำแนกแบคทีเรียเบื้องต้นของ Bergey's manual of SYSTEMATIC BACTERIOLOGY 2005. สามารถจำแนกแบคทีเรียทั้งหมดได้เป็น 3 กลุ่ม คือ

กลุ่มที่ 1 คล้ายแบคทีเรียสกุล *Azotobacter* spp. มีทั้งหมด 100 ไอโซเลท รหัส DASF 02001 ถึง DASF 02100 มีศักยภาพในการตรึงไนโตรเจน 0-1,500 nmole $C_2H_4/10^9CFU/h^{-1}$ ไอโซเลทที่มีศักยภาพในการตรึงไนโตรเจนสูงที่สุด คือ DASF 02007 ซึ่งเก็บจากดินรอบรากชา ในแปลงรวบรวมพันธุ์ชา โครงการหลวง ต.แม่วิน อ.แม่วาง จ.เชียงใหม่ สามารถตรึงไนโตรเจนได้ 1500 $\pm$ 297 nmole $C_2H_4/10^9CFU/h^{-1}$(ไม่ได้แสดงตาราง)

กลุ่มที่ 2 คล้ายแบคทีเรียสกุล *Azospirillum* spp. มีทั้งหมด 215 ไอโซเลท รหัส DASF 04001 ถึง DASF 04215 มีศักยภาพในการตรึงไนโตรเจน 0-189 nmole $C_2H_4/tube/h^{-1}$ ไอโซเลทที่มีศักยภาพในตรึงไนโตรเจนสูงที่สุด คือ DASF 04178 ซึ่งเก็บจากดินรอบรากหน่อไม้ฝรั่ง ในแปลงหน่อไม้ฝรั่งอินทรีย์ของเกษตรกร ต.ทัพพริก อ.อรัญประเทศ จ.สระแก้ว ตรึงไนโตรเจนได้ 189 $\pm$ 3.2 nmole $C_2H_4/tube/h^{-1}$ (ไม่ได้แสดงตาราง)

กลุ่มที่ 3 คล้ายแบคทีเรียสกุล *Beijerinckia* spp. มีทั้งหมด 35 ไอโซเลท รหัส DASF 06001 ถึง DASF 06035 มีศักยภาพในการตรึงไนโตรเจน 0-1,800 nmole $C_2H_4/10^9CFU/h^{-1}$ ไอโซเลทที่มีศักยภาพในการตรึงไนโตรเจนสูงที่สุด คือ DASF 02026 ซึ่งเก็บจากดินรอบรากเงาะ ในแปลงเงาะอินทรีย์ของเกษตรกร ต.นาขวัญ อ.เมือง จ.ระยอง สามารถตรึงไนโตรเจนได้ 1,800 $\pm$ 147 nmole $C_2H_4/10^9CFU/h^{-1}$(ไม่ได้แสดงตาราง)

ผลจากการทดลองทำให้สามารถรวบรวมแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนอิสระได้ 3 สกุล รวมทั้งสิ้น 350 ไอโซเลท และสามารถคัดเลือกเชื้อที่มีประสิทธิภาพในแต่ละสกุลได้จำนวน 1 ไอโซเลท รวมทั้งสิ้น 3 ไอโซเลท เพื่อใช้ในการวิจัยและพัฒนาปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์ต่อไป

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

ผลจากการทดลองทำให้สามารถรวบรวมแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนอิสระได้รวม 3 สกุล 350 ไอโซเลท และสามารถคัดเลือกเชื้อที่มีประสิทธิภาพในแต่ละสกุลได้จำนวน 1 ไอโซเลท รวมทั้วสิ้น 3 ไอโซเลท เพื่อใช้ในการวิจัยและพัฒนาปุ๋ยชีวภาพต่อไป

การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

นำไปใช้เป็นแหล่งเชื้อพันธุ์ในการวิจัยพัฒนาการผลิตปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์สำหรับการผลิตพืชชนิดต่างๆ

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. 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.