

การใช้แอกติโนแบคทีเรียในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของทานตะวันเพื่อการบำบัดแคดเมียม

Utilization of Actinobacteria on Promotion of Sunflower Growth for Cadmium Remediation

อลิษา มะตะโก (Alisa Matakko) * ดร. วสุ ปฐมอารีย์ (Dr. Wasu Pathom-aree)**

บทคัดย่อ

ในงานวิจัยนี้ได้ศึกษาผลของการใช้แอกติโนแบคทีเรียไอโซเลต COS4 ที่แยกได้จากดินปลูกบริเวณรอบรากต้นดาวกระจาย เพื่อส่งเสริมการเจริญเติบโตของต้นอ่อนทานตะวันในการบำบัดแคดเมียมความเข้มข้น 10 mg/L เทียบกับชุดควบคุม ผลการศึกษาพบว่า แอกติโนแบคทีเรียไอโซเลต COS4 ช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของต้นอ่อนทานตะวัน โดยให้ผลความยาวราก น้ำหนักแห้งลำต้น และน้ำหนักแห้งลำต้นรวมราก สูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($P \leq 0.05$) นอกจากนี้พบว่าต้นอ่อนทานตะวันที่แช่ด้วยเชื้อ สามารถทนต่อสภาวะเครียดที่เกิดจากการปนเปื้อนของแคดเมียมได้ดี โดยต้นอ่อนทานตะวันสามารถดูดซับและเก็บกักแคดเมียมไว้ในรากและลำต้น และลดปริมาณแคดเมียมจากความเข้มข้นเริ่มต้นในอาหารเพาะเลี้ยงได้ถึง 39.7 %

ABSTRACT

In this research, effect of actinobacteria isolate COS4 isolated from rhizosphere soil surrounding root of cosmos (*Cosmos sulphureus*) to promote growth of sunflower seedlings for cadmium remediation at concentration of 10 mg/L was investigated in comparison with the control. It was found that isolate COS4 could significantly promote the growth parameters of sunflower seedlings including root long length, stem dried weight and total dried weight ($P \leq 0.05$). Moreover, inoculated plants could be survived under stress condition from cadmium contamination. Cadmium could be absorbed and accumulated by root and stem of plant seedling, decreased by 39.7 % level from the initial concentration of cultured medium.

คำสำคัญ: ทานตะวัน แอกติโนแบคทีเรีย แคดเมียม

Keywords: Sunflower, Actinobacteria, Cadmium

*นักศึกษา หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

**ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

บทนำ

แคดเมียม (Cd) เป็นโลหะหนักชนิดหนึ่งที่สามารถพบได้ทั่วไปในธรรมชาติเช่น ดิน และหินต่างๆ แต่ในพบในธรรมชาติในปริมาณน้อย โดยทั่วไปจะพบในระดับความเข้มข้นไม่เกิน 1 ส่วนในล้านส่วน แต่มีความเป็นพิษสูงต่อสิ่งมีชีวิต แคดเมียมถูกสกัดและนำมาใช้ประโยชน์ทางอุตสาหกรรมมากขึ้น โดยเฉพาะอย่างยิ่งในอุตสาหกรรมอิเล็กทรอนิกส์และพลาสติก เช่น การใช้แคดเมียมเป็นวัตถุดิบในการผลิตแบตเตอรี่ อุปกรณ์ไฟฟ้า อะไหล่รถยนต์ โลหะผสม และ พลาสติก ส่งผลให้เกิดการรั่วไหลสู่สิ่งแวดล้อมสูงขึ้น แคดเมียมในสิ่งแวดล้อมสามารถเคลื่อนย้ายเข้าสู่เนื้อเยื่อพืชได้เช่นเดียวกับแร่ธาตุอื่นๆ และจะเกิดความเป็นพิษเมื่อได้รับในปริมาณสูง ส่งผลเสียต่อพืชคือ ทำให้เกิดการลดลงของการดูดซึมน้ำและสารอาหาร ลดอัตราการเจริญโดยยับยั้งการเจริญของรากและส่วนต่างๆของพืช ในขณะที่อาการที่พบในคนคือ คอแห้ง แน่นหน้าอก อาเจียน ความดันโลหิตสูง ไปจนถึงการรับแคดเมียมระยะเรื้อรังจนทำให้เกิดอาการกระดูกเปราะ ปวดข้อรุนแรงหรือที่เรียกว่าโรคอิไต อิไต (Itai Itai disease) (อิลิยา, 2554; Baker, Brooks, 1989; Sanita, Gabrielli, 1999)

การบำบัดสารพิษในดินทางชีวภาพอย่างหนึ่งอาศัยพืชเป็นตัวกลางในการบำบัดเรียกว่า Phytoremediation กล่าวคือเป็นการบำบัดสารพิษในดิน น้ำ โคลน ตะกอน โดยอาศัยกระบวนการดึงดูดน้ำไปเลี้ยงส่วนต่างๆของพืช ดังนั้นสารพิษในดินจะถูกลำเลียงขึ้นไปสะสมยังส่วนต่างๆของพืชพร้อมกับน้ำ จึงเป็นการเคลื่อนย้าย เก็บ บำบัด และลดอันตรายจากการสะสมและปนเปื้อนสู่สิ่งแวดล้อม Phytoremediation เป็นเทคโนโลยีที่ถูกนำเสนอโดย Chaney (1983) ซึ่งเป็นแนวคิดที่ได้รับการยอมรับอย่างกว้างขวาง เนื่องจากสามารถประยุกต์ใช้ได้ในพื้นที่กว้าง มีประสิทธิภาพ เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม และมีค่าใช้จ่ายต่ำกว่าวิธีการอื่น ซึ่งวิธีการนี้นอกจากจะช่วยบำบัดสารมลพิษในดินแล้วนั้น ยังช่วยปรับปรุงคุณภาพดินให้ดีขึ้นเพื่อนำไปปลูกพืชที่มีมูลค่าต่อไปได้ อีกทั้งยังสามารถนำไปสกัดสารโลหะเช่น นิเกิล เทลลูเรียม และทองคำ เป็นต้น (อิลิยา, 2554; พันธวิศ, 2558; Ali et al., 2013)

ทานตะวัน (Sunflower) เป็นพืชเศรษฐกิจชนิดหนึ่งของไทยที่มีการส่งออกสูงรองจากข้าวเหลืองและปาล์มน้ำมัน สามารถเจริญได้ในทุกสภาวะแวดล้อม โดยมีอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญที่ 18-35 องศาเซลเซียส ซึ่งเป็นอุณหภูมิเฉลี่ยโดยทั่วไปในทุกภาคของประเทศไทย นอกจากนี้ ทานตะวันยังสามารถเจริญได้ดีในดินที่มีการปนเปื้อนของโลหะหนัก อีกทั้งยังสามารถดูดซับ และกักเก็บสารโลหะหนักไว้ในส่วนต่างๆ ไม่ว่าจะเป็นราก ลำต้น หรือใบ Lin et al. (2009) พบว่าทานตะวันสามารถให้ผลผลิตและชีวมวลที่สูงในดินปลูกที่มีการปนเปื้อนของตะกั่วในปริมาณสูง ทานตะวันจึงถูกใช้เป็นพืชตัวแทนในการศึกษาการบำบัดสารโลหะหนักในดิน ซึ่งมีผลการวิจัยที่ให้ผลสอดคล้องกันในการศึกษาการบำบัดสารโลหะหนักอื่นในงานวิจัยต่อมา เช่นงานวิจัยของ Hao et al. (2012) และ Marques et al. (2013) เป็นต้น

ปัจจัยหนึ่งที่มีความสำคัญต่อการเจริญของพืชคือแบคทีเรียที่ทำหน้าที่ส่งเสริมการเจริญของพืช หรือ Plant Growth Promoting Bacteria (PGPB) ซึ่งสามารถทำให้พืชเจริญได้ดีขึ้นทั้งทางตรงและทางอ้อม โดยทางตรงนั้นจุลินทรีย์กลุ่ม PGPB จะสร้างสารที่ส่งผลต่อระดับฮอร์โมนพืช เช่น siderophore, indole-3-acetic acid (IAA) และ 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) ช่วยในการละลายฟอสเฟตในดิน ช่วยตรึงไนโตรเจน ช่วยแตกประจุของธาตุเหล็ก (Fe) รวมถึงการปรับระดับเอทิลีน (ethylene) ส่วนในทางอ้อมจุลินทรีย์กลุ่ม PGPB จะผลิตสารปฏิชีวนะทั้งที่อยู่ในรูปสารระเหยและไม่ใช่ว่าระเหย หรือช่วยให้พืชจับกับธาตุอาหารในดินได้ดีขึ้น หลังเอนไซม์ไลติก (lytic enzymes) ตลอดจนช่วยกระตุ้นการทำงานของระบบภูมิคุ้มกัน Induced Systemic Resistance (ISR) ของพืช (Glick, 2012) จุลินทรีย์กลุ่ม PGPB นี้ยังช่วยทำให้กระบวนการบำบัดสารมลพิษโลหะหนักในดินของพืชมีประสิทธิภาพดีขึ้น โดยจะสร้างสารไซเดอโรฟอร์ (siderophore) กรดอินทรีย์ สารลดแรงตึงผิว (biosurfactant) และ phytochelatin (PCs) synthase แบคทีเรียบางชนิดสามารถสังเคราะห์เอนไซม์ phytochelatin synthase ที่จะทำงานเมื่ออยู่ในสภาวะที่มีโลหะ

หนัก เช่น ทองแดง แคลเซียม ตะกั่ว และปรอท ที่ความเข้มข้นสูง เอนไซม์จะจับกับโลหะหนักและเกิดเป็น thiolate complex ที่ทำให้เกิดก้อนที่โตขึ้น (Ullah et al., 2015)

แอคติโนแบคทีเรียเป็นจุลินทรีย์กลุ่มสำคัญกลุ่มหนึ่งที่สามารถผลิตสารบางชนิดที่ส่งผลต่อการเจริญเติบโตของพืช ไม่ว่าจะเป็นฮอร์โมนพืชหรือเอนไซม์ ACC deaminase จัดเป็นจุลินทรีย์ในกลุ่มที่ทำหน้าที่ส่งเสริมการเจริญของพืช มีลักษณะคือ เป็นแบคทีเรียแกรมบวก ต้องการอากาศ (Franco-Correa et al., 2010) พบทั่วไปในธรรมชาติไม่ว่าจะเป็น น้ำ บึง และโดยเฉพาะในดิน มีลักษณะแตกต่างจากแบคทีเรียทั่วไปคือมีปริมาณเบสกวีนีน (G)+ไซโตซีน(C) มากกว่า 55% ในดีเอ็นเอ สามารถผลิตสารปฏิชีวนะ เช่น streptomycin, erythromycin และ methicillin ซึ่งเป็นสารที่มีมูลค่าทางเศรษฐกิจสูง โดยจะพบสารเหล่านี้ในธรรมชาติซึ่งแยกได้จากแอคติโนแบคทีเรียมากกว่า 70% (Bizuye et al., 2013) ในธรรมชาติสามารถพบแอคติโนแบคทีเรียประมาณ 10^6 ต่อน้ำหนักดินแห้ง 1 กรัม ในดินที่มีช่วง pH 5.0-9.0 และความชื้นต่ำ กลุ่มที่รู้จักกันโดยทั่วไปได้แก่ *Streptomyces* ซึ่งผลิตสารชีวภาพมากถึง 75% (Franco-Correa et al., 2010) บางชนิดสามารถเจริญได้ในแหล่งที่มีการปนเปื้อนของสารพิษ สามารถเจริญในที่ปนเปื้อนสารไฮโดรคาร์บอนจากอุตสาหกรรมปิโตรเลียม หรือที่ปนเปื้อน Polychlorinated biphenyls (PCBs) (Zhuang et al., 2007) นอกจากนี้ยังมีรายงานการศึกษา แอคติโนแบคทีเรียหลายชนิดที่แยกได้จากแหล่งที่มีการปนเปื้อนของโลหะหนัก เช่น *Arthrobacter*, *Microbacterium* และ *Nocardioides* (Schmidt et al., 2009) แอคติโนแบคทีเรียบางชนิดมีส่วนช่วยในการบำบัดโลหะหนักโดยการเปลี่ยนรูปของโลหะหนักให้อยู่ในรูปที่ไม่เป็นพิษต่อสิ่งมีชีวิต รวมถึงกลุ่มที่สามารถละลายฟอสเฟตได้ หรือที่เรียกว่า Phosphate Solubilizing Microbe (PSM) ที่สามารถเปลี่ยนรูปฟอสเฟตให้ละลายและพืชสามารถนำไปใช้ได้ ซึ่งกระบวนการของจุลินทรีย์เหล่านี้ส่งผลให้พืชสามารถดำรงชีวิตในสภาวะปนเปื้อนโลหะหนักได้ ทำให้กระบวนการบำบัดโลหะหนักโดยพืชมีประสิทธิภาพมากขึ้นเมื่อเทียบกับการใช้พืชหรือจุลินทรีย์ในการบำบัดเพียงชนิดเดียว (Gupta, Kumar, 2017)

ตัวอย่างงานวิจัยที่ใช้จุลินทรีย์ส่งเสริมการเจริญร่วมกับพืชในการบำบัดสารมลพิษโลหะหนักเช่น งานวิจัยของ Schutze et al (2014) ได้ศึกษาประสิทธิภาพการบำบัดโลหะหนักของข้าวฟ่าง (*Sorghum bicolor*) โดยใช้แอคติโนแบคทีเรีย *Streptomyces mirabilis* P16B-1 ส่งเสริมการเจริญของข้าวฟ่าง เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ใช้แอคติโนแบคทีเรีย *Streptomyces lividans* TK24 ซึ่งเป็นแอคติโนแบคทีเรียที่ใช้ในงานวิจัยก่อนหน้านี้ ผู้วิจัยพบว่า *Streptomyces mirabilis* P16B-1 ช่วยส่งเสริมให้การบำบัดโลหะหนักในดินของข้าวฟ่างมีประสิทธิภาพดีขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยชุดการทดลองที่ใช้ *Streptomyces mirabilis* P16B-1 ให้ผลการเจริญของรากและน้ำหนักแห้งของต้นข้าวฟ่างสูงกว่าชุดควบคุม และส่งผลให้ข้าวฟ่างดูดซับโลหะหนักในดินได้ดีขึ้น ปริมาณโลหะหนักในดินลดลงอย่างมีนัยสำคัญ

วัตถุประสงค์การวิจัย

1. เพื่อศึกษาผลของการใช้แอคติโนแบคทีเรียต่อการส่งเสริมการเจริญเติบโตของทานตะวัน
2. เพื่อศึกษาการบำบัดแคดเมียมโดยทานตะวันร่วมกับการใช้แอคติโนแบคทีเรีย

วิธีการวิจัย

การคัดแยกแอคติโนแบคทีเรียจากธรรมชาติ

การคัดแยกจุลินทรีย์จากดินบริเวณรอบรากต้นบานชื่นและดาวกระจาย นำดินบริเวณรอบรากพืชฝังลมให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง ชั่งดิน 1.0 กรัม เติมน้ำใน 0.85% NaCl ปริมาตร 9.0 มิลลิลิตร ทำการเจือจางให้ลดลงครึ่งละ 10 เท่า นอกจากนี้ยังคัดแยกแบคทีเรียเอนโดไฟต์ โดยนำดินบานชื่นและดาวกระจายมาล้างทำความสะอาด ตัดแบ่งส่วนราก

และลำต้นเป็นชิ้นเล็กประมาณ 1 เซนติเมตร นำเชื้อบริเวณผิวโดยประยุกต์วิธีการของ Tiwari et al. (2012) โดยแช่ชิ้นส่วนพืชใน Ethanol 70% 1 นาที ตามด้วย NaClO 6% (v/v) 10 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว 3-5 ครั้ง ทิ้งไว้ในโถดูดความชื้นจนแห้ง หลังจากชิ้นส่วนพืชแห้งแล้ว เติมน้ำ NaCl 0.85% แล้วทำการบดชิ้นส่วนพืช ทำการเจือจางให้ลดลงครึ่งละ 10 เท่า ดูดตัวอย่างดินแขวนลอย และน้ำบดชิ้นส่วนพืชที่เจือจางปริมาตร 100 ไมโครลิตรถ่ายลงบนอาหารแข็ง Humic Acid Vitamin Agar (Zhang, 2011) และ Starch Casein Agar (Mohseni et al., 2013) และเกลี่ยเชื้อให้ทั่วอาหารด้วยเทคนิค spread plate ทิ้งไว้ 15-30 วัน เพื่อให้เชื้อเจริญ คัดเลือกแอคติโนแบคทีเรียที่มีลักษณะ โคลนต่างกัน ย้ายลงอาหาร ISP2 (Shepherd et al., 2010) เมื่อเชื้อสร้างสปอร์แล้วจึงเก็บเชื้อในกลีเซอรอลความเข้มข้น 25% ที่อุณหภูมิ 4°C ในรูปของสปอร์แขวนลอย

การทดสอบการเจริญของแอคติโนแบคทีเรียในอาหารเหลวที่มีแคดเมียม

ถ่ายสปอร์แขวนลอยที่มีปริมาณความเข้มข้น 10^8 CFU/mL ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงในอาหารเหลว ISP2 100 มิลลิกรัม ผสมแคดเมียมที่มีความเข้มข้น 150 มิลลิกรัมต่ออาหารเหลว 1 ลิตร บ่มโดยให้อากาศที่อุณหภูมิ 28°C 200 rpm เป็นเวลา 72 ชั่วโมง วัดความขุ่นที่ค่าการดูดกลืนแสง 600 นาโนเมตร ทุกๆ 24 ชั่วโมง คัดเลือกเชื้อที่สามารถเจริญได้ดีในอาหารที่ผสมแคดเมียม 150 มิลลิกรัม มาทดสอบการเจริญอีกครั้งในอาหารเหลว ISP2 ผสมแคดเมียมที่มีความเข้มข้น 0, 10, 50, 100 และ 150 มิลลิกรัมต่ออาหารเหลว 1 ลิตร บ่มโดยให้อากาศที่อุณหภูมิ 28°C 200 rpm เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ชั่งน้ำหนักแห้งของมวลเซลล์ที่ได้

การทดสอบการเจริญของพืชและการวัดปริมาณแคดเมียมที่สะสมในพืช

เตรียมอาหารกึ่งเหลวสำหรับเพาะเลี้ยงพืชตามวิธีการของ วรณธนา และคณะ (2017) และผสมแคดเมียมที่มีความเข้มข้นระดับ 10 มิลลิกรัมต่ออาหาร 1 ลิตร ทำการฆ่าเชื้อที่ผิวเมล็ดทานตะวันเช่นเดียวกับวิธีการเตรียมชิ้นส่วนพืชสำหรับคัดแยกเอนโดไฟต์ เชื้อเมล็ดทานตะวันที่ทำการฆ่าเชื้อที่ผิวแล้วในสปอร์แขวนลอย ที่มีความเข้มข้น 10^8 CFU/mL เป็นเวลา 2 ชั่วโมง วางเมล็ดลงบนอาหารเพาะเลี้ยง วัดผลการเจริญและวัดปริมาณแคดเมียมที่สะสมในต้นอ่อนทานตะวันหลังจากเพาะเลี้ยงในสภาวะที่มีแสงเป็นเวลา 15 วัน โดยวัดความสูงลำต้น ความยาวราก น้ำหนักสด และน้ำหนักแห้ง ตรวจวัดปริมาณแคดเมียมที่สะสมในรากและส่วนเหนือราก และปริมาณแคดเมียมที่เหลือในอาหารเพาะเลี้ยง โดยตัวอย่างที่ตรวจวัดจะถูกย่อยด้วยกรดไนตริกตามวิธีการของ USEPA (Method 3051a) (USEPA, 2007) และตรวจวัดโดยเครื่อง Atomic Absorption Spectroscopy

ผลการวิจัย

การคัดแยกแอคติโนแบคทีเรียจากธรรมชาติ

การคัดแยกแอคติโนแบคทีเรียจากดิน และเอนโดไฟต์จากแอคติโนแบคทีเรียโดยใช้อาหารสำหรับคัดแยก 2 ชนิด คือ Humic Acid Vitamin Agar และ Starch Casein Agar เมื่อครบ 30 วัน สามารถแยกเชื้อแอคติโนแบคทีเรียจากลักษณะโคลนที่เจริญบนอาหารต่างกัน โดยแบ่งเป็นแอคติโนแบคทีเรียที่แยกได้จากบนชิ้นรวมทั้งสิ้น 19 ไอโซเลท ดาวกระจายรวมทั้งสิ้น 23 ไอโซเลท ดังแสดงในตาราง 1

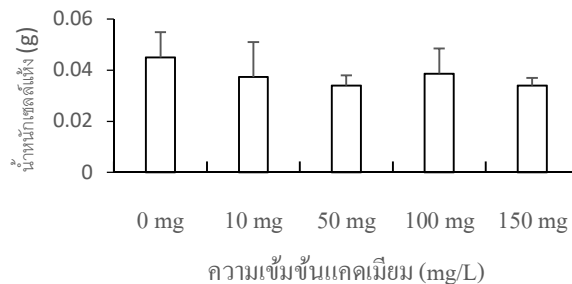
ตารางที่ 1 จำนวนแอคติโนแบคทีเรียที่แยกได้

พืช	จำนวน (ไอโซเลต)			รวม
	อาหาร	ดิน	เอนโดไฟต์	
بانขึ้น	HVA	4	1	5
	SCA	14	0	14
ดาวกระจาย	HVA	6	1	7
	SCA	12	4	16

HVA = อาหาร Humic Acid Vitamin Agar และ SCA = อาหาร Starch Casein Agar

การทดสอบการเจริญของแอคติโนแบคทีเรียในอาหารเหลวที่มีเคดเมียม

จากเชื้อทั้งหมดที่แยกได้นั้น นำเชื้อมาทดสอบในอาหารเหลว ISP2 ผสมเคดเมียมความเข้มข้น 150 มิลลิกรัมต่ออาหาร 1 ลิตร จำนวน 5 ไอโซเลตด้วยกัน ได้แก่ COS4, COS18, COS22, COS27 และ COS41 เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวผสมเคดเมียมผ่านไป 72 ชั่วโมง และวัดความขุ่นเพื่อหาแนวโน้มการเจริญของเซลล์ต่างๆ 24 ชั่วโมง พบว่าเชื้อไอโซเลต COS4 ที่แยกได้จากดินปลูกบริเวณรอบรากต้นดาวกระจายยังสามารถเจริญได้ดีเมื่อเปรียบเทียบกับไอโซเลตอื่นที่ทดสอบ จึงนำมาทดสอบการเจริญในอาหารเหลวที่ผสมเคดเมียมที่ความเข้มข้นต่างกันคือ 0, 10, 50, 100 และ 150 มิลลิกรัมต่ออาหารเหลว 1 ลิตร เมื่อผ่านไป 72 ชั่วโมง พบว่ามีการเจริญของมวลเซลล์ (น้ำหนักแห้ง) เฉลี่ย 0.045 g, 0.037 g, 0.034 g, 0.039 g และ 0.034 g กรัม ตามลำดับ ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบทางสถิติแล้วพบว่าแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($P \leq 0.05$) (ภาพที่ 1)

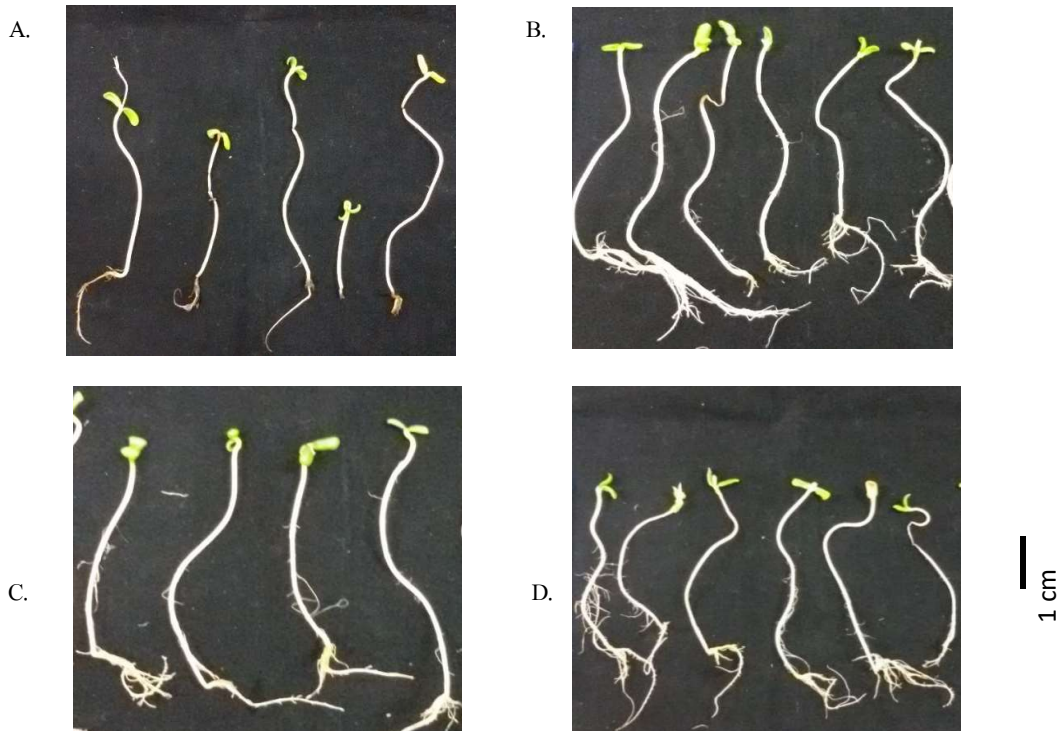


ภาพที่ 1 มวลเซลล์ของแอคติโนแบคทีเรียไอโซเลต COS4 แยกได้จากดินปลูกบริเวณรอบรากต้นดาวกระจาย ที่เลี้ยงในอาหาร ISP2 ผสมเคดเมียมที่ความเข้มข้นต่างๆ เมื่อผ่านไป 72 ชั่วโมง

การทดสอบการเจริญของพืชและการวัดปริมาณเคดเมียมที่สะสมในพืช

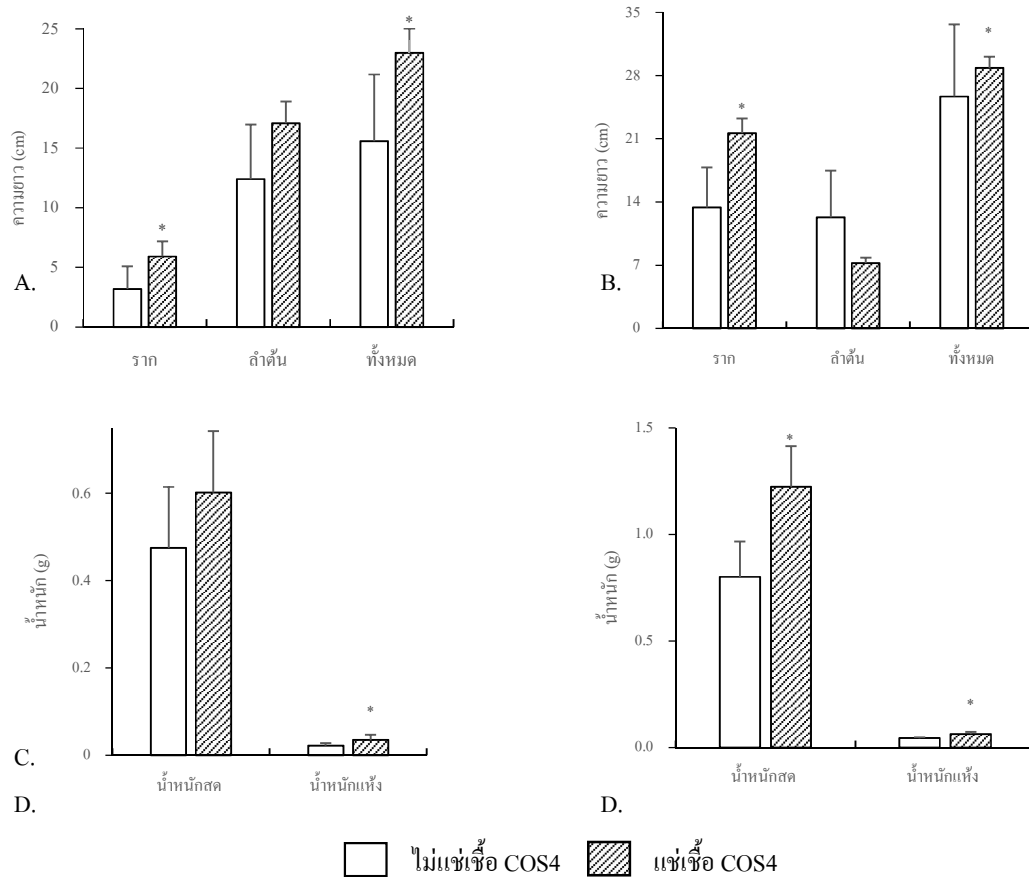
เมื่อทดสอบการเจริญของเชื้อแอคติโนแบคทีเรียไอโซเลต COS4 ในอาหารเหลวที่ผสมเคดเมียมที่ความเข้มข้นต่างกันั้น พบว่าในอาหารที่ผสมเคดเมียมปริมาณสูง เชื้อสามารถเจริญได้ดีไม่ต่างจากชุดควบคุมที่ไม่ได้เติมเคดเมียม จึงนำเชื้อแอคติโนแบคทีเรียไอโซเลต COS4 มาส่งเสริมการเจริญของต้นกล้าทานตะวันในอาหารกึ่งเหลวที่มีเคดเมียมต่อไป หลังจากเพาะเมล็ดบนอาหารกึ่งเหลวผ่านไป 15 วัน พบว่าต้นอ่อนทานตะวันที่แช่ในเชื้อแอคติโนแบคทีเรียก่อนทำการการเพาะเลี้ยง มีการเจริญเติบโตที่ดีกว่าชุดการทดลองที่ไม่มีการแช่แอคติโนแบคทีเรีย ในการทดลองครั้งนี้ได้วัดการเจริญของต้นอ่อนทานตะวัน ในด้านความยาว (cm) น้ำหนักสด (g) และน้ำหนักแห้ง (g) ผลที่ได้คือ ในชุดการทดลองที่ทำการแช่ด้วย

แอคติโนแบคทีเรีย COS4 เป็นเวลา 2 ชั่วโมงก่อนทำการเพาะเลี้ยง พบว่ามีแนวโน้มการเจริญเติบโตที่สูงกว่าชุดควบคุม และเป็นไปในทิศทางเดียวกันเมื่ออยู่ในสภาวะปนเปื้อนแคดเมียมที่ความเข้มข้น 10 mg/L (ภาพที่ 2) โดยมีความยาวราก และความยาวรวม สูงกว่าชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($P \leq 0.05$) ทั้งในชุดการทดลองที่มีแคดเมียมและไม่มีแคดเมียม (ภาพที่ 3; A B) น้ำหนักสดของต้นอ่อนทานตะวันในชุดการทดลองที่ไม่มีแคดเมียมไม่แตกต่างจากชุดควบคุม แต่ในชุดการทดลองที่มีแคดเมียมพบว่าชุดการทดลองที่ใส่ COS4 ให้ผลที่สูงกว่าชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ส่วนน้ำหนักแห้งของต้นอ่อนทานตะวันพบว่ามีความแตกต่างสูงกว่าชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติทั้งในชุดการทดลองที่มีแคดเมียมและไม่มีแคดเมียม (ภาพที่ 3; C D)



ภาพที่ 2 การเจริญเติบโตของต้นอ่อนทานตะวัน หลังจากเพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่ออย่างง่าย เป็นเวลา 15 วัน

A. ชุดควบคุม เพาะเลี้ยงบนอาหารที่ไม่เติมแคดเมียมและไม่ใส่เชื้อ B. ชุดการทดลอง เพาะเลี้ยงบนอาหารที่ไม่เติมแคดเมียมแต่ใส่เชื้อแอคติโนแบคทีเรีย C. ชุดการทดลอง เพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติมแคดเมียมความเข้มข้น 10 mg/L และไม่ใส่เชื้อแอคติโนแบคทีเรีย D. ชุดการทดลอง เพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติมแคดเมียมความเข้มข้น 10 mg/L และมีการใส่เชื้อแอคติโนแบคทีเรีย



ภาพที่ 3 ผลของเชื้อแอคติโนแบคทีเรียไอโซเลท COS4 ต่อการเจริญเติบโตของทานตะวัน (A) ความยาวและความสูงของทานตะวันภายใต้สภาวะที่ไม่มีแคดเมียม (B) ความยาวและความสูงของทานตะวันภายใต้สภาวะที่ปนเปื้อนแคดเมียม 10 mg/L (C) น้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งของทานตะวันเฉลี่ยภายใต้สภาวะที่ไม่มีแคดเมียม (D) น้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งของทานตะวันเฉลี่ยภายใต้สภาวะที่ปนเปื้อนแคดเมียม 10 mg/L

เมื่อตรวจวัดปริมาณแคดเมียมในอาหารเพาะเลี้ยงทั้งก่อนและหลังการเพาะปลูกเมล็ดทานตะวันหลังจากเมล็ดทานตะวันงอกเป็นเวลา 15 วันด้วยเครื่อง Atomic Absorption Spectroscopy แล้ว พบว่า ปริมาณแคดเมียมที่ตรวจพบในอาหารเพาะเลี้ยงหลังการปลูกลดลงอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($P \leq 0.05$) โดยมีปริมาณแคดเมียมในอาหารเพาะเลี้ยงเหลืออยู่ 6.03 mg/L คิดเป็น 60.3 % จากปริมาณแคดเมียมที่เติมลงไปก่อนเพาะเลี้ยง และปริมาณแคดเมียมที่ถูกพืชดูดซับไปคิดเป็น 39.7 % ดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ปริมาณแคดเมียมที่เหลือในอาหารเพาะเลี้ยง และปริมาณแคดเมียมที่พืชดูดซับ

สภาวะที่ตรวจสอบ	ปริมาณ แคดเมียมที่ ตรวจพบ (mg/L)	ปริมาณแคดเมียมที่ เหลือในอาหาร เพาะเลี้ยง (%)	ปริมาณแคดเมียมที่ พืชสามารถดูดซับไป ได้ (%)
ในอาหารเพาะเลี้ยงก่อน ปลูกพืช	10	ND	ND
ในอาหารเพาะเลี้ยงหลัง ปลูกพืช	6.03	60.3	39.7

ND= not determine

อภิปรายและสรุปผลการวิจัย

จากผลการทดลองที่ได้ พบว่าแอคติโนแบคทีเรียไอโซเลท COS4 ที่แยกได้จากธรรมชาติ นั้น สามารถส่งเสริมการเจริญเติบโตของต้นอ่อนทานตะวัน โดยส่งผลต่อความยาวลำต้น น้ำหนักสด และน้ำหนักแห้ง กล่าวคือให้ค่าเฉลี่ยของการเจริญเติบโตของต้นอ่อนทานตะวันที่มีแนวโน้มสูงกว่าชุดควบคุม โดยให้ผลไปในทิศทางเดียวกันแม้เพาะเลี้ยงในสภาวะที่ปนเปื้อนโลหะหนักแคดเมียม โดยที่ต้นอ่อนทานตะวันมีความยาวราก น้ำหนักสด และน้ำหนักแห้งสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($P \leq 0.05$) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Salla et al. (2014) ซึ่งได้ศึกษาการส่งเสริมการเจริญของเชื้อ *Streptomyces* ที่เป็นประชากรกลุ่มหลักของเชื้อกลุ่มแอคติโนแบคทีเรีย ซึ่งมีผลต่อการเจริญเติบโตของต้นอ่อนทานตะวันที่เพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการเป็นเวลา 15 วันพบว่า เชื้อ *Streptomyces* ส่งผลต่อการเจริญของรากต้นอ่อนทานตะวันได้ดี เนื่องจากสามารถผลิตสาร indole-3-acetic acid, IAA และส่งผลต่อการผลิตเมแทบอไลต์ทุติยภูมิของพืช

เชื้อแอคติโนแบคทีเรียไอโซเลท COS4 สามารถเจริญได้ดีในอาหารที่ผสมแคดเมียมปริมาณสูงถึง 150 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยให้มวลเซลล์ไม่แตกต่างจากชุดควบคุมที่ไม่มีการผสมแคดเมียมลงไป ทำให้เชื้ออยู่รอดและช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของต้นอ่อนทานตะวันได้ปกติ ส่งผลให้ต้นอ่อนทานตะวันมีความแข็งแรง ให้ผลการเจริญเติบโตของต้นอ่อนทานตะวันที่เพาะเลี้ยงในสภาวะมีแคดเมียมมากกว่าชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ทั้งความยาว น้ำหนักสด และน้ำหนักแห้ง และมีประสิทธิภาพการดูดซับแคดเมียมดียิ่งขึ้น

ส่วนผลการตรวจวัดปริมาณแคดเมียมในอาหารเพาะเลี้ยง และในส่วนรากและดินของต้นอ่อนทานตะวัน หลังจากปลูกเป็นเวลา 15 วัน พบว่าปริมาณแคดเมียมในอาหารเพาะเลี้ยงลดลงอย่างมีนัยสำคัญที่ความเชื่อมั่น 95% ($P \leq 0.05$) โดยปริมาณแคดเมียมในอาหารเพาะเลี้ยงลดลงถึง 39.7 % ซึ่งคาดว่าระดับแคดเมียมที่ลดลงนั้นเป็นผลจากการดูดซับแคดเมียมของต้นอ่อนทานตะวัน จากผลการทดลองที่ได้ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Schutze et al (2014) ได้ศึกษาประสิทธิภาพการบำบัดโลหะหนักของข้าวฟ่าง (*Sorghum bicolor*) โดยใช้แอคติโนแบคทีเรีย *Streptomyces mirabilis* P16B-1 ส่งเสริมการเจริญเติบโตของข้าวฟ่าง คือพบว่า *Streptomyces mirabilis* P16B-1 ช่วยส่งเสริมให้การเจริญเติบโตของรากและน้ำหนักแห้งสูงกว่าชุดควบคุม และข้าวฟ่างที่ปลูกร่วมกับแอคติโนแบคทีเรียดูดซับโลหะหนักในดินได้ดีขึ้น การนำแอคติโนแบคทีเรียมาช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชในการบำบัดแคดเมียมในดินจึงนับเป็นทางเลือกที่ดี ซึ่งจะได้ทดลองในระดับกระถางและสภาพแปลงทดลองต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ โครงการพัฒนานักวิจัยรุ่นกลาง มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ที่ให้การสนับสนุน ช่วยเหลือให้งานวิจัยนี้ผ่านไปได้ด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

- พันธวัช สัมพันธ์พานิช. การฟื้นฟูปื้นที่ปนเปื้อนโลหะหนักด้วยพืช Phytoremediation. กรุงเทพฯ: จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย; 2558.
- วรรณษา จะหนู, กิตติศักดิ์ โชติเดชานรงค์, ดาราลักษณ์ เขียวภาลัยโสภณ และ ศิริสุลักษ์ณ์ ชีรานุพัฒนา. อาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชต้นทุนต่ำเพื่อการขยายพันธุ์เหู้าหวาน, Low Cost Plant Tissue Culture Media for Micropropagation of *Stevia rebaudiana* Bertoni. วารสารบทคัดย่อกลุ่มวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 2560; 401-411.
- อลิษา วัังโน. การบำบัดสารมลพิษทางชีวภาพ Bioremediation. พิมพ์ครั้งที่ 3. กรุงเทพฯ:จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย; 2554.
- Ahmad I, Akhtar M J, Asghar H N, Ghafoor U and Shahid M. Differential Effects of Plant Growth-Promoting Rhizobacteria on Maize Growth and Cadmium Uptake. Journal Plant Growth Regulation 2016; 35: 303-315.
- Ali H, Khan E and Sajad M A. Phytoremediation of heavy metals-Concepts and applications. Chemosphere 2013; 91: 869-881.
- Baker AJM, Brooks RR. Terrestrial higher plants which hyperaccumulate metallic elements. A review of their distribution, ecology and phytochemistry. Biorecovery 1989; 1: 81-126.
- Bizuye A, Moges F, Andualem B. Isolation and screening of antibiotic producing actinomycetes from soils in Gondar town, North West Ethiopia. Asian Pacific Journal of Tropical Disease 2013; 3(5): 375-381.
- Chaney RL. Land Treatment of Hazardous Wastes. Noyes Data Corp. Park Ridge. NJ. 1983: 5076.
- Franco-Correa M, Quintana A, Duque C, Suarez C, Rodriguez M X, Barea J. Evaluation of actinomycete strains for key traits related with plant growth promotion and mycorrhiza helping activities. Applied Soil Ecology 2010; 45: 209-217.
- Glick BR. Plant Growth-Promoting Bacteria: Mechanisms and Applications (Review Article). Scientia 2012; 15.
- Gupta P, Kumar V. Value added phytoremediation of metal stressed soils using phosphate solubilizing microbial consortium. World Journal of Microbiology and Biotechnology 2017; 33: 9.
- Hao XZ, Zhou DM, Li D D, Jiang P. Growth, Cadmium and Zinc Accumulation of Ornamental Sunflower (*Helianthus annuus* L.) in Contaminated Soil with Different Amendments. Pedosphere 2012; 22(5): 631-639.
- Hassan SE, Hijri M, St-Arnaud M. Effect of arbuscular mycorrhizal fungi on trace metal uptake by sunflower plants grown on cadmium contaminated soil. New Biotechnology 2013; 30: 780-787.
- Lin C, Liu J, Liu L, Zhu T, Sheng L, Wang D. Soil amendment application frequency contributes to phytoextraction of lead by sunflower at different nutrient levels. Environmental and Experimental Botany 2009; 65(2-3): 410-416.

- Liu LH, Gong ZQ, Zhang YL, Li PJ. Growth, Cadmium Accumulation and Physiology of Marigold (*Tagetes erecta* L.) as Affected by Arbuscular Mycorrhizal Fungi. *Pedosphere* 2011; 21(3): 319–327.
- Marques APGC, Moreira H, Franco AR, Rangel AOSS, Castro PML. Inoculating *Helianthus annuus* (sunflower) grown in zinc and cadmium contaminated soils with plant growth promoting bacteria – Effects on phytoremediation strategies. *Chemosphere* 2013; 92: 74–83.
- Mohseni M, Norouzi H, Hamed J and Roohi A. Screening of Antibacterial Producing Actinomycetes from Sediments of the Caspian Sea. *International Journal of Molecular and Cellular Medicine* 2013; 2(2): 64-71.
- Salla T D, Silva T R and Astarita L V. Streptomyces rhizobacteria modulate the secondary metabolism of Eucalyptus plants. *Plant Physiology and Biochemistry* 2014; 85: 14-20.
- Sanita di Toppi L. and Gabbrielli R. Response to cadmium in higher plants. *Environmental and Experimental Botany* 1999. 41: 105-130.
- Schmidt A, Haferburg G, Schmidt A, Lischke U, Merten D, Ghergel F, Georg B, Kothe E. Heavy metal resistance to the extreme: *Streptomyces* strains from a former uranium mining area. *Chemie der Erde* 2009; 69(2): 35–44.
- Schutze E, Klose M, Merten D, Nietzsche S, Senfleben D, Roth M and Kothe E. Growth of streptomycetes in soil and their impact on bioremediation. *Journal of Hazardous Materials* 2014; 267: 128-135.
- Shepherd M D, Kharel M K, Bosserman M A and Rohr J. Laboratory Maintenance of Streptomyces species. *Current Protocols in Microbiology* 2010; 1-10.
- Tiwari S, Arya A, and Kumar S. Standardizing Sterilization Protocol and Establishment of Callus Culture of Sugarcane for Enhanced Plant Regeneration in vitro. *Research Journal of Botany* 2012; 7(1): 1-7.
- Ullah A, Heng S, Munis M S H, Fahad S and Yang X. Phytoremediation of heavy metals assisted by plant growth promoting (PGP) bacteria: A review. *Environmental Botany* 2015; 117: 28-40.
- USEPA. Method 3051a: Microwave Assisted Acid Digestion of Sediments, Sludge, Soil, and Oil, in Test Method for Evaluating Solid Waste. EPA. 2007.
- Zhang J. Improvement of an Isolation Medium for Actinomycetes. *Modern Applied Science* 2011; 5(2): 124-127.
- Zhuang X, Chen J, Shim H, Bai Z. New advances in plant growth-promoting rhizobacteria for bioremediation. *Environment International* 2007; 33: 406–413.