รหัสโครงการ SUT1-104-51-36-21

**รายงานการวิจัย**

# การเพิ่มประสิทธิภาพของพฤกษบำบัดในการกำจัดโลหะหนักโดยใช้ไรโซแบคทีเรียที่ส่งเสริมการเจริญของพืช

# Increase of efficiency of phytoremediation for heavy metal removal by plant-growth promoting rhizobacteria


**คณะผู้วิจัย**

**หัวหน้าโครงการ**

**ผศ. ดร. เบ็ญจมาศ จิตรสมบูรณ์**

สาขาวิชา ปรีคลินิก

สำนักวิชา วิทยาศาสตร์

**ผู้ร่วมวิจัย**

**รศ. ดร. เสาวนิต ทองพิมพ์**



มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี



**ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ 2551**

**ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว**

พฤษภาคม/2561

# กิตติกรรมประกาศ

การวิจัยครั้งนี้ ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ พ.ศ. 2551-2553 คณะผู้วิจัยขอขอบคุณมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ที่เล็งเห็นความสำคัญและให้ทุนสนับสนุนในโครงการนี้ ขอขอบคุณศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำหรับสถานที่ทำการวิจัย อุปกรณ์และเครื่องมือต่างๆ ที่ใช้ในงานวิจัย

ขอขอบคุณ ดร.พิทยากร ลิ่มทอง สถาบันวิจัยหญ้าแฝก กรมพัฒนาที่ดิน กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ ที่ให้ความช่วยเหลือ คอยอำนวยความสะดวกในการเตรียมตัวอย่าง และอนุเคราะห์สารเคมีในการเตรียมการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของหญ้าแฝกสายพันธุ์ต่างๆ และขอขอบคุณ กรมวิทยาศาสตร์ทหารบก ที่อนุเคราะห์หญ้าแฝกเพื่อใช้ในงานวิจัย ขอขอบคุณรศ.ดร.เสาวนิต ทองพิมพ์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ผู้ร่วมวิจัยที่ให้ข้อแนะนำและความช่วยเหลืองานด้านจุลชีววิทยาอย่างดีเยี่ยมเสมอมา

โครงการวิจัยนี้จะสำเร็จลุล่วงไปไม่ได้ ถ้าปราศจากการทำงานอย่างแข็งขัน อดทน และใฝ่รู้ของดร. เอกสิทธิ์ อักษร (ซึ่งในขณะนั้นเป็นทั้งนักศึกษาปริญญาเอกและผู้ช่วยวิจัยในโครงการ)

ท้ายสุดขอกราบบูชาพระคุณของคุณพ่อ-คุณแม่ ที่ให้ความรัก ความอบอุ่น อบรมสั่งสอนและดูแลลูกอย่างดีตลอดมา ขอกราบขอบพระคุณครูอาจารย์ทุกท่านที่ให้ความรู้ ความรัก และอบรมสอนสั่งศิษย์ด้วยความเมตตาเสมอมา ท้ายสุดขอขอบคุณครอบครัว รศ. ดร. ทวิช จิตรสมบูรณ์และนายโพธิพล จิตรสมบูรณ์ที่เป็นขวัญและกำลังใจ เป็นน้ำหล่อเลี้ยงให้มีพลังในการทำงาน ทำให้สามารถฟันฝ่าอุปสรรคทั้งปวงจนงานสำเร็จได้ในที่สุด

เบ็ญจมาศ จิตรสมบูรณ์

หัวหน้าโครงการวิจัย

# บทคัดย่อ

แบคทีเรียกลุ่มส่งเสริมการเจริญของพืช (plant growth promoting rhizobacteria; PGPR) 6 isolates (1RER2, 25R463, 27RER2, 39SHR, 53S462 และ 65R471) ที่คัดกรองจาก 521 โคโลนีของแบคทีเรียซึ่งคัดแยกจากดินที่ปนเปื้อนด้วยแคดเมียมของบริเวณแม่ตาว อำเภอแม่สอด จังหวัดตาก ถูกนำมาศึกษาผลกระทบของแคดเมียม ตะกั่ว และสังกะสี ต่อคุณลักษณะการสร้างสารที่ส่งเสริมความเจริญของพืช (PGP traits) และศึกษาผลของ PGPR ที่คัดเลือกต่อการเจริญและการดูดซับโลหะหนักของหญ้าแฝกเมื่อทดลองภายใต้สภาวะ axenic culture และเมื่อทดลองโดยปลูกลงดินในกระถาง ผลการวิจัยพบว่า ทั้ง 6 isolates ที่คัดเลือกเป็น PGPR ที่ทนทานต่อโลหะหนัก และยังคงรักษาคุณสมบัติของ PGP ได้ในสภาวะของความเครียดจากโลหะหนัก โดยเฉพาะ 53S462 และ 65R471 ที่มีความสามารถสร้าง indole-3-acetic acid และ siderophore ได้สูง แต่การสลายฟอสเฟต การสร้าง gibberellin และ 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase มีค่าลดลง เมื่อเทียบกับภาวะที่ไม่มีโลหะหนัก ($p < 0.05$) การตรวจสอบลำดับเบสและวิเคราะห์ 16S rDNA ชี้แนะว่าทั้ง 53S462 และ 65R471 เป็น PGPR ในกลุ่ม *Pseudomonas* sp. ภายใต้สภาวะที่มีการปนเปื้อนของโลหะหนัก ทั้งสอง isolate ของ PGPR สามารถอยู่และเจริญในบริเวณรากและส่งเสริมการเจริญของหญ้าแฝกดอน (*Vetiveria nemoralis* พันธุ์ราชบุรี) โดย 65R471 และ 1RER2 สามารถเพิ่มประสิทธิภาพการดูดซับทั้งแคดเมียมและสังกะสีของหญ้าแฝกเมื่อทดลองภายใต้สภาวะ axenic culture ส่วนการทดลองในกระถาง ที่ปลูกหญ้าแฝกลงดินที่ผสมด้วยแคดเมียม ตะกั่ว และสังกะสี 3 ชนิดร่วมกัน พบว่า ทั้ง 53S462 และ 65R471 ช่วยส่งเสริมการดูดซับสังกะสีของหญ้าแฝกโดยดักจับไว้ที่ส่วนรากเป็นหลัก และสามารถลดการเคลื่อนย้ายของสังกะสีจากส่วนรากสู่ยอด ดังมีค่า transportation factor (TF) ของสังกะสีลดลง ($p< 0.05$) นอกจากนั้น 65R471 ยังสามารถเพิ่มค่า TF ของแคดเมียม เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับ 53S462 และกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับ PGPR ($p< 0.05$)

จากคุณลักษณะและความสามารถอันหลากหลาย 65R471 ที่คัดเลือกได้จึงเป็น PGPR isolate ที่เหมาะสมสำหรับการประยุกต์ใช้ร่วมกับหญ้าแฝกในเชิงพฤกษบำบัดเพื่อดักจับโลหะหนักสำหรับการศึกษาและวิจัยต่อยอดในอนาคต

# Abstract

Six isolates (1RER2, 25R463, 27RER2, 39SHR, 53S462, and 65R471) of plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) were obtained by screening of 521 colonies of bacteria isolated from heavily cadmium-contaminated soil at of Mae-Taew site, Mae-Sot district in Tak province. The quantification of plant growth promoting (PGP) traits of the six isolates under heavy metal stress was evaluated. The effects of the selected PGPR on promoting vetiver growth and heavy metal uptake were also investigated using both the axenic culture and the pot experiment. The results revealed that all six selected isolates of PGPR possessed the capability of cadmium-, lead- and zinc-tolerance, while still maintained most of their PGP traits under the heavy metal stress. In particular, 53S462 and 65R471 isolates significantly increased the indole-3-acetic acid and siderophores production ($p< 0.05$) while decreased the phosphate solubilization, gibberellin and 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase production ($p< 0.05$). Analysis of 16S rDNA partial sequencing suggested that 53S462 and 65R471 belong to the genus of *Pseudomonas*. Both isolates of PGPR exhibited the capability of root colonization and growth promotion of the inoculated host plant, *V. nemoralis* (Ratcahburi ecotype), when grown under heavy metal stress. Under axenic culture, the inoculated 65R471 and 1RER2 enhanced the efficiency of cadmium and zinc uptake of the vetiver. However, in the pot experiment, when the vetiver was grown under the soil spiked with the mixture of cadmium, lead and zinc, the inoculation of 53S462 and 65R471 enhanced only the zinc uptake, with the bulk content of zinc remained in roots. In addition, both inoculants could reduce the movement of zinc from roots to shoots as suggested by the lower transportation factor (TF) value of zinc. Moreover, 65R471 could significantly enhanced the TF of cadmium compared to 53S462 inoculation and the un-inoculated control group ($p< 0.05$).

Owing to its wide multifarious actions, the metal resistant 65R471 might serve as a good candidate for metal sequestration and growth-promoting bioinoculant for vetivers in phytoremediating heavy metal contaminated soil for future studies.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

# สารบัญ

| | หน้า |
|---|---|
| กิตติกรรมประกาศ | ก |
| บทคัดย่อภาษาไทย | ข |
| บทคัดย่อภาษาอังกฤษ | ค |
| สารบัญ | ง |
| สารบัญตาราง | ซ |
| สารบัญภาพ | ฌ-ญ |
| บทที่ 1 บทนำ | |
| ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย | 1-2 |
| วัตถุประสงค์ของการวิจัย | 3 |
| ขอบเขตของการวิจัย | 3 |
| ประโยชน์ที่ได้รับจากการวิจัย | 3-4 |
| บทที่ 2 การวิจัยที่เกี่ยวข้อง | |
| แหล่งกำเนิดและพิษของแคดเมียม ตะกั่ว และสังกะสี | 5-7 |
| ปัญหาการปนเปื้อนของแคดเมียมในประเทศไทย | 8 |
| พฤกษบำบัด (Phytoremediation) | 8-12 |
| หญ้าแฝก (Vetiver grass) | 12-17 |
| กลุ่ม rhizobacteria ที่ส่งเสริมการเจริญของพืช | 17-26 |
| บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย | |
| การสกัดและการคัดแยกจุลินทรีย์กลุ่ม PGPR จากดินในพื้นที่ปนเปื้อนแคดเมียม | 27-29 |
| ศึกษาการคงคุณสมบัติของ PGPR ของแบคทีเรียที่คัดเลือกเมื่ออยู่ในสภาวะที่มีโลหะหนัก | 29-32 |
| การคัดเลือก PGPR ที่สามารถทนต่อพิษของแคดเมียม ตะกั่ว และสังกะสีสูง และระบุชนิดของ PGPR ที่คัดเลือก | 32-34 |
| การทดสอบความไวของแบคทีเรียที่คัดเลือกต่อยาปฏิชีวนะ (Antibiotic Sensitivity Test) | 35 |
| การศึกษาผลของ PGPR ที่คัดเลือกต่อการเจริญเติบโตและการดูดซับโลหะหนักในหญ้าแฝก | 35-39 |
| บทที่ 4 ผลการวิจัย | |
| การแยกและคัดเลือกจุลินทรีย์กลุ่ม PGPR จากดินในพื้นที่ปนเปื้อนแคดเมียม | 40-43 |
| การคัดเลือกกลุ่ม PGPR ที่คงไว้ซึ่งคุณสมบัติในสภาวะที่มีโลหะหนัก | 44-55 |
| การคัดเลือก PGPR ที่สามารถทนต่อความเป็นพิษของแคดเมียม ตะกั่ว และสังกะสีสูงและระบุชนิด PGPR ที่คัดเลือก | 56-61 |

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

# สารบัญ (ต่อ)

**หน้า**

ผลการทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะของ PGPR ที่คัดเลือก................................ 61-62
ผลของ PGPR ที่คัดเลือกต่อการเจริญเติบโต และการดูดซับโลหะหนัก
ของหญ้าแฝก.................................................................................................... 62-69
บทที่ 5 การวิจารณ์ผลการทดลอง .............................................................................. 70-79
บทที่ 6 บทสรุป
สรุปผลการวิจัย ........................................................................................... 80
ข้อเสนอแนะการวิจัย ...................................................................................80-81
บรรณานุกรม ...........................................................................................................82-97
ภาคผนวก ผลงานตีพิมพ์ ........................................................................................ 98-110
ประวัติผู้วิจัย ............................................................................................................. 111

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

# สารบัญตาราง

**ตารางที่** **หน้า**


2.1 เปรียบเทียบลักษณะทั่วไประหว่างหญ้าแฝกลุ่มและหญ้าแฝกดอน .................... 14
2.2 ตัวอย่างการใช้ rhizobacteria ที่ส่งเสริมการเจริญของพืชร่วมกับงาน
ทางพฤกษบำบัด .............................................................................................. 23-26
3.1 Primers สำหรับปฏิกริยา PCR และการหาลำดับเบสของ 16S rDNA ............ 34
4.1 คุณสมบัติของดิน และตะกอนดิน..................................................................... 40-41
4.2 ความสามารถของแบคทีเรียในการทนต่อพิษของโลหะหนัก........................... 56
4.3 สัณฐานวิทยาของแบคทีเรียแต่ละ isolate ที่คัดเลือก..................................... 58-59
4.4 แสดงผลการทดสอบลักษณะทางชีวเคมีของ PGPR ที่คัดเลือก....................... 59-60
4.5 การจำแนกชนิดของแบคทีเรีย........................................................................... 61
4.6 การทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะของกลุ่ม PGPR แบคทีเรียที่คัดเลือก......... 62
4.7 แสดงปริมาณของ PGPR แบคทีเรียที่ทนต่อโลหะหนักและสามารถ colonize
ที่รากของหญ้าแฝก และแสดงปริมาณ chlorophyll ของพืช......................... 66
4.8 ปริมาณสะสมโลหะหนักและปริมาณคลอโรฟิลล์............................................ 69


มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

# สารบัญภาพ


ภาพที่ หน้า

2.1 แสดงส่วนที่เป็นรากและลำต้น (ประกอบด้วยใบ) ของหญ้าแฝก (A) และลักษณะทั่วไปของการเจริญเป็นกอของหญ้าแฝก (B). ............................... 12-13

2.2 แสดงลักษณะทั่วไปของหญ้าแฝกลุ่ม (A) และ หญ้าแฝกดอน (B).................... 15

4.1 โคโลนีของแบคทีเรียในอาหารเพาะเลี้ยงที่แตกต่างกัน (A) PSA (B) TSA และ (C) AZA.................................................................... 41-42

4.2 ร้อยละความสามารถสร้างคุณลักษณะ PGP ในอาหารเลี้ยงเชื้อ (A) AZA (B) PSA และ (C) TSA................................................................... 43

4.3 ความสามารถของแบคทีเรียในการสร้าง hydroxamate type ภายใต้สภาวะอาหารที่ผสมโลหะหนัก.......................................................... 44

4.4 ความสามารถของแบคทีเรียในการสร้าง hydroxamate type ภายใต้สภาวะที่ผสมโลหะหนัก.................................................................... 45

4.5 ความสามารถของแบคทีเรียในการสร้าง catecholate type ภายใต้สภาวะที่ผสมโลหะหนัก.................................................................... 46

4.6 ความสามารถของแบคทีเรียในการสร้าง catecholate type ภายใต้สภาวะที่ผสมโลหะหนัก .................................................................. 46

4.7 ความสามารถของแบคทีเรียในการสร้าง gibberellin ภายใต้สภาวะที่ผสมโลหะหนัก.................................................................................... 47

4.8 ความสามารถของแบคทีเรียในการสร้าง gibberellin ภายใต้สภาวะที่ผสมโลหะหนัก.................................................................................... 48

4.9 ความสามารถของแบคทีเรียในการสร้าง IAA ภายใต้สภาวะที่ผสมโลหะหนักและผสม L-tryptophan.......................................................................... 49

4.10 ความสามารถของแบคทีเรียในการสร้าง IAA ภายใต้สภาวะที่ผสมโลหะหนักและผสม L-tryptophan.......................................................................... 49

4.11 ความสามารถของแบคทีเรียในการสร้าง IAA ภายใต้สภาวะที่ผสมโลหะหนักและไม่ผสม L-tryptophan...................................................................... 50

4.12 ความสามารถของแบคทีเรียในการสร้าง IAA ภายใต้สภาวะที่ผสมโลหะหนักและไม่ผสม L-tryptophan...................................................................... 50

4.13 ความสามารถของแบคทีเรียในการละลายฟอสเฟตภายใต้สภาวะที่ผสมโลหะหนัก.................................................................................... 51

4.14 ความสามารถของแบคทีเรียในการละลายฟอสเฟตภายใต้สภาวะที่ผสมโลหะหนัก.................................................................................... 52

4.15 ความสัมพันธ์ระหว่างฟอสเฟตและความเป็นกรด-ต่าง ในสภาวะที่ผสมโลหะหนักต่างๆ (A) ควบคุม (B) แคดเมียม (C) ตะกั่ว และ (D) สังกะสี........... 52-54


มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

# สารบัญภาพ (ต่อ)

| ภาพที่ | หน้า |
|---|---|
| 4.16 ความสามารถของแบคทีเรียในสร้าง ACC deaminase ภายใต้สภาวะที่ผสมโลหะหนัก | 55 |
| 4.17 ความสามารถของแบคทีเรียในสร้าง ACC deaminase ภายใต้สภาวะที่ผสมโลหะหนัก | 55 |
| 4.18 ผลลัพธ์ของปฏิกริยา PCR | 60 |
| 4.19 การสะสมโลหะหนักของแฝกลุ่ม (ST) และแฝกดอน (RT) ที่ไม่ได้รับ หรือ ได้รับPGPR ที่คัดเลือก เมื่อเจริญในอาหารที่มีแคดเมียม (A) ตะกั่ว (B) และ สังกะสี (C) | 63-64 |
| 4.20 แสดงภาพถ่ายจากกล้องอิเล็คตรอนแบบส่องกราดของการอยู่ร่วมของ PGPR แบคทีเรีย (A) RER2, (B) 25R463, (C) 27RER2, (D) 39SHR, (E) 53S462 และ (F) 65R47 ที่รากของ *V. nemoralis* (RC ecotype) | 65-66 |
| 4.21 ความสามารถของ *V. zizanioides* ในการสะสมโลหะหนัก ในกรณีของกลุ่มควบคุมที่ไม่ใส่เชื้อแบคทีเรีย (A) กลุ่มทดลองที่ใส่เชื้อแบคทีเรียชนิด 53S462 (B) และ ใส่เชื้อแบคทีเรียชนิด 65R471 (C) | 67 |
| 4.22 ความสามารถของแบคทีเรียในการส่งเสริมการะสะสมโลหะหนักในหญ้าแฝก *V. nemoralis* | 68 |

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

# บทที่ 1

# บทนำ

## 1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

การปนเปื้อนของโลหะหนักในสภาวะแวดล้อมจัดเป็นปัญหาสำคัญที่หลายประเทศทั่วโลก ประสบรวมทั้งประเทศไทย เนื่องจากโลหะหนักมีความคงตัวสูง ย่อยสลายยาก สามารถถ่ายทอดผ่านห่วงโซ่อาหาร และการสะสมในปริมาณสูงมีพิษต่อสิ่งมีชีวิต การปนเปื้อนของโลหะหนักในสภาวะแวดล้อมจึงเป็นปัญหาทั้งต่อระบบนิเวศและสุขอนามัย นักวิทยาศาสตร์นานาประเทศได้เล็งเห็นความสำคัญและพยายามค้นหาวิธีที่เหมาะสมในการดูดซับ หรือกำจัดโลหะหนักออกจากสิ่งแวดล้อม โดยเฉพาะการใช้พืชในการบำบัด เนื่องจากโลหะหนักมีคุณลักษณะต่างจากมลพิษอื่นที่เป็นสารอินทรีย์ (organic pollutants) ซึ่งไม่สามารถถูกย่อยสลายให้สมบูรณ์ เช่นเป็น carbon dioxide เป็นต้น (Burd et al., 1998) โลหะหนักจึงสะสมและปนเปื้อนในสภาวะแวดล้อมตราบนานเท่านาน และยากยิ่งต่อการบำบัดและฟื้นฟูบริเวณที่ปนเปื้อนให้กลับมาใช้ประโยชน์ได้ดังเดิม

พฤกษบำบัด (phytoremediation) หมายถึงการใช้พืชที่สามารถดูดซับ ทำลาย หรือป้องกันการแพร่กระจายของมลพิษต่าง ๆ ในสภาวะแวดล้อม เพื่อฟื้นฟูบริเวณที่ปนเปื้อน พฤกษบำบัดเป็นวิธีการที่ประหยัด มีประสิทธิภาพสูง เป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อมและมีผลกระทบต่อสุขอนามัยน้อย โดยเฉพาะเมื่อเปรียบเทียบกับวิธีอื่นของการกำจัดโลหะหนัก เช่นการฝังกลบสารพิษ (landfill) การตกตะกอนด้วยสารเคมี (chemical precipitation) ที่มีค่าใช้จ่ายสูง ส่งผลเสียต่อสภาพดิน จุลินทรีย์ และสิ่งมีชีวิตในดิน และก่อให้เกิดปัญหาสุขอนามัย หรือเมื่อเทียบกับการใช้จุลินทรีย์ตกแต่งทางพันธุกรรม (genetically modified microorganism; GMO) เพื่อย่อยสลายสารพิษ ในปัจจุบันก็ยังมีข้อโต้แย้งมากมายเกี่ยวกับผลกระทบ และความปลอดภัยในระยะยาวของจุลินทรีย์กลุ่ม GMO ในทางพฤกษบำบัด พืชที่ใช้ดูดซับโลหะหนัก สามารถถูกเก็บเกี่ยวได้ง่าย และอาจถูกนำมาใช้ประโยชน์ต่าง ๆ เช่น ประดิษฐ์สิ่งของเครื่องใช้ หรือบำบัดโลหะหนักที่ถูกดูดซับในพืชให้ถูกวิธี หรือสกัดโลหะหนักจากพืชเพื่อนำกลับมาใช้ประโยชน์ใหม่ (phytomining) (Burd et al., 1998; Ghosh and Singh, 2005)

อย่างไรก็ดี ข้อจำกัดของการใช้พืชในการบำบัดสารพิษต่าง ๆ รวมทั้งโลหะหนัก คือ พืชไม่สามารถเจริญได้ดีในบริเวณที่เกิดการปนเปื้อนของมลพิษสูง ทำให้ประสิทธิภาพในการดูดซับ หรือการทำลายมลพิษมีค่าลดน้อยลง (Bingham et al., 1986; Foy et al., 1978) ทั้งนี้ เนื่องจากโลหะหนักทุกชนิดเมื่อสะสมในปริมาณสูง จะก่อให้เกิดอนุมูลอิสระ (free radicals) มีพิษต่อเซลล์ หรืออาจไปแทนที่

โลหะอื่นซึ่งจำเป็นและสำคัญต่อพืช เช่นไปแทนที่โลหะในรงควัตถุ หรือในเอนไซม์ต่าง ๆ เป็นต้น (Ghosh and Singh, 2005) ดังมีรายงานว่า เมื่อปริมาณทองแดงสูงขึ้นในพืช ส่งผลให้ขาดธาตุเหล็ก เกิดความเสียหายต่อเยื่อหุ้มเซลล์ ยับยั้งการเจริญของราก ทำให้พืชเจริญได้ช้า หรือหยุดการเจริญ เกิดการสูญเสีย chlorophyll (chlorosis) (Reed and Glick, 2005) แคดเมียม สามารถยับยั้งการเจริญของรากและหน่อของพืช ส่งผลต่อการดูดซึมแร่ธาตุและการรักษาความสมดุลในพืช (Belimov et al., 2005) เป็นต้น

จุลินทรีย์กลุ่มไรโซแบคทีเรียที่ส่งเสริมการเจริญของพืช (Plant Growth Promoting Rhizobacteria; PGPR) มีคุณสมบัติพิเศษที่ช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชภายใต้สภาวะความเครียดต่างๆ เช่น สภาวะน้ำท่วม ความเป็นกรด หรือ อุณหภูมิสูง รวมทั้งสภาวะดินที่ปนเปื้อนด้วยมลพิษต่าง ๆ (Lucy et al., 2004) PGPR สามารถส่งเสริมการเจริญของพืชได้หลายวิธี เช่น กระตุ้นอัตราการงอกของเมล็ดและผลผลิต เพิ่มพื้นที่ผิวของใบ ปริมาณคลอโรฟิลล์ โปรตีน แมกนีเซียม และไนโตรเจน ช่วยละลายแร่ธาตุต่าง ๆ ในดิน เพิ่มกระบวนการตรึงไนโตรเจนในพืช นอกจากนั้น ยังสามารถเพิ่มความต้านทานของพืชต่อจุลินทรีย์ก่อโรค (Lucy et al., 2004) ด้วยคุณสมบัติดังกล่าว ในปัจจุบัน PGPR จึงถูกนำมาใช้ประโยชน์ในด้านต่าง ๆ มากมาย เช่น การเกษตรกรรม การทำพืชสวน (horticulture) การปลูกป่า (forestry) และการฟื้นฟูสภาวะแวดล้อม (environmental restoration) โดยเฉพาะการใช้ร่วมกับวิธีพฤกษบำบัด (Lucy et al., 2004; Okon และ Labandera-Gonzalez, 1994; Vedder-Weiss et al., 1999; Hamaoui et al., 2001) ตัวอย่าง PGPR ที่มีการศึกษาวิจัยและถูกนำมาใช้ประโยชน์ในงานวิจัยต่าง ๆ ได้แก่ *Azospirillum brasilense, Azotobacter chroococcum, Bacillus amyliquefaciens, Bacillus subtilis* และ *Bacillus cereus, Pseudomonas corrugate, Pseudomonas cepacia,* และ *Pseudomonas putida* เป็นต้น (Lucy et al., 2004)

ในประเทศไทย ได้เริ่มมีงานวิจัยใช้แบคทีเรียกลุ่ม PGPR ส่งเสริมการเจริญของพืชกลุ่มเศรษฐกิจบ้างแล้ว แต่ยังไม่มีการศึกษาการประยุกต์ใช้ PGPR ในทางพฤกษบำบัดเพื่อลดการปนเปื้อนของมลพิษในสภาวะแวดล้อม โครงการวิจัยนี้จึงเสนอที่จะประยุกต์ใช้ PGPR ร่วมกับหญ้าแฝก *(Vetiveria nemoralis* A. Camus) ซึ่งเป็นพืชท้องถิ่นในประเทศไทยและเป็นพืชในโครงการพระราชดำริที่ใช้อนุรักษ์ดินและน้ำ และเคยมีรายงานของการใช้กำจัดโลหะหนักที่ปนเปื้อนในดินและน้ำ ทั้งนี้ เพื่อศึกษาความสามารถของ PGPR ในการส่งเสริมหญ้าแฝกให้เจริญได้ดีในบริเวณที่ปนเปื้อนทนต่อพิษของโลหะหนักในปริมาณสูงได้ และเพิ่มประสิทธิภาพของพืชในการดูดซับ หรือกำจัดโลหะหนัก โดยมีจุดมุ่งหมายเพื่อฟื้นฟูสภาพดินที่เกิดการปนเปื้อนโลหะหนักให้กลับมาใช้ประโยชน์ อันเป็นปัญหาหนึ่งที่สำคัญยิ่งของประเทศที่ต้องเร่งแก้ไข โครงการวิจัยนี้จึงมีความจำเป็นที่ควรกระทำและได้รับการสนับสนุน

## 1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1.2.1 แยกและคัดเลือกจุลินทรีย์กลุ่ม PGPR จากดินในพื้นที่ปนเปื้อนแคดเมียมในบริเวณแม่ตาว อำเภอแม่สอด จังหวัดตาก

1.2.2 คัดเลือก PGPR ที่สามารถทนต่อความเป็นพิษของแคดเมียม ตะกั่ว และสังกะสีสูงและระบุชนิด PGPR ที่คัดเลือก

1.2.1 ศึกษาผลของโลหะหนักต่อคุณลักษณะของการส่งเสริมการเจริญของพืชใน PGPR ที่คัดเลือก

1.2.2 ศึกษาผลของ PGPR ที่คัดเลือกต่อการเจริญเติบโต การทนทานต่อพิษ และการดูดซับแคดเมียม ตะกั่ว และสังกะสีในหญ้าแฝก

## 1.3 ขอบเขตโครงการวิจัย

โครงการนี้จำกัดการคัดเลือก PGPR จากดินในบริเวณใกล้รากของพืชที่พบในพื้นที่แม่ตาว อำเภอแม่สอด จังหวัดตากที่มีการปนเปื้อนของแคดเมียมในดินสูง และจำกัดการศึกษาผลของ PGPR ต่อการเจริญและการดูดซับโลหะหนักในหญ้าแฝก ชนิดของโลหะหนักที่ใช้ในงานทดลองเรื่องการดูดซับโดยหญ้าแฝกจะใช้เฉพาะแคดเมียม ตะกั่ว และสังกะสีเท่านั้น

## 1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ได้ข้อมูลเกี่ยวกับ ชนิด คุณสมบัติ และคุณลักษณะของแบคทีเรียที่ส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชในประเทศไทย

2. ได้แบคทีเรียที่สามารถนำไปประยุกต์ใช้ร่วมกับพืช หรือใช้แบคทีเรียโดยตรงในการฟื้นฟูสภาพดินที่มีการปนเปื้อนโลหะหนัก และมีศักยภาพของการขยายผลสู่การบำบัดมลพิษชนิดอื่นในโครงการต่อยอดในอนาคต

3. เป็นการวิจัยที่ช่วยส่งเสริมเศรษฐกิจของชาติ ลดภาระค่าใช้จ่ายในการฟื้นฟูพื้นที่ปนเปื้อนโลหะหนัก ไม่ต้องเสียดุลการค้าเพื่อสั่งซื้อแบคทีเรียจากต่างชาติ หรือซื้อสารเคมีเพื่อนำมาบำบัดโลหะหนัก นอกจากนั้น ถ้าแบคทีเรียที่คัดเลือกได้มีศักยภาพสูง อาจสามารถจำหน่ายและทำรายได้ให้ประเทศ หรือนำมาซึ่งทรัพย์สินทางปัญญาได้ในอนาคต

4. เป็นงานวิจัยที่ช่วยอนุรักษ์ทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม เพราะช่วยลดปัญหาการบำบัดโลหะหนักด้วยวิธีที่มีราคาแพง และการบำบัดซึ่งอาศัยสารเคมีที่ส่งผลกระทบต่อทรัพยากรธรรมชาติ สิ่งแวดล้อมและก่อให้เกิดปัญหาสุขอนามัย

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

5. ได้ข้อมูลส่งเสริมการปรับปรุงหญ้าแฝกเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการกำจัดโลหะหนัก

6. เป็นงานวิจัยที่ส่งเสริมการศึกษาด้านความหลากหลายทางชีวภาพในประเทศไทย

7. ได้ฐานความรู้ใหม่เกี่ยวกับบทบาทและความสัมพันธ์ระหว่างแบคทีเรียกับพืชในการส่งเสริมซึ่งกันและกัน เพื่อประยุกต์ใช้ในด้านพฤกษบำบัด รวมทั้งได้องค์ความรู้ที่สามารถขยายผลสู่งานวิจัยต่อยอดมากมายในอนาคต เช่นใช้ร่วมกับพืชชนิดอื่น หรือใช้ในการกำจัดมลพิษอื่นที่ไม่ใช่โลหะหนัก เป็นต้น

8. ได้ความรู้ซึ่งสามารถถ่ายทอดแก่นักศึกษา ประชาชนท้องถิ่น และหน่วยงานการศึกษาทั้งภาครัฐและเอกชนที่สนใจ

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

# บทที่ 2

## งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

### 2.1 แหล่งกำเนิดและพิษของแคดเมียม ตะกั่ว และสังกะสี

แคดเมียม (Cd) เป็นโลหะหนักที่ถูกปล่อยสู่สิ่งแวดล้อมจากแหล่งกำเนิดตามธรรมชาติ และจากกิจกรรมของมนุษย์ ตัวอย่างแหล่งกำเนิดตามธรรมชาติของแคดเมียม ได้แก่ การระเบิดของภูเขาไฟ การสึกกร่อน (weathering) ของหินทำให้เกิดการเคลื่อนที่ของแคดเมียมจากเปลือกโลกเข้าสู่ดินและแหล่งน้ำ เป็นต้น (WHO, www, 2000) ส่วนแคดเมียมที่เกิดจากกิจกรรมของมนุษย์ (anthropogenic source) มักถูกปล่อยออกจากโรงงานต่างๆ เช่น โรงงานไฟฟ้า ระบบความร้อน โรงงานอุตสาหกรรม เตาเผา และการทำเหมืองแร่โดยเฉพาะในขั้นตอนของการถลุงแร่ (smelting) และการทำให้บริสุทธิ์ (refining) ของแร่สังกะสี และตะกั่ว เป็นต้น เพราะโดยปกติแคดเมียมมักเกาะหรือจับกับ ตะกั่ว และสังกะสี จึงมักพบแคดเมียมเมื่อทำการปรับปรุงคุณภาพ (beneficiation) และในกระบวนการ refining ของแร่ตะกั่ว (lead ores) แร่เชิงซ้อนระหว่างทองแดงและสังกะสี (complex copper-Zn ores) รวมทั้งในการทำเหมืองแร่ตะกั่ว ทองแดง และสังกะสี โดยทั่วไป (WHO, 1992; Sanita di Toppi and Gabbrielli, 1999) ซึ่งการทำเหมืองดังกล่าวมักก่อให้เกิดปัญหาผลกระทบต่อระบบนิเวศ และบริเวณใดที่มีการปนเปื้อนของแคดเมียม มักมีปัญหาการปนเปื้อนของตะกั่วและสังกะสีร่วมด้วย จากการวิจัย พบว่าในหลายประเทศ มีการปนเปื้อนของแคดเมียมในแหล่งน้ำ และดิน โดยทั่วไปแคดเมียมในรูปอิออนอิสระ $Cd^{2+}$ มักถูกดูดซับ (adsorbed) ที่ผิวของดินได้ดีกว่าแคดเมียมในรูปที่เป็นกลาง (neutral) หรือในรูปของ anionic species อย่างไรก็ตาม แคดเมียมก็สามารถเกิดเป็น complex ions เช่น $CdCl^{+}$, $CdOH^{+}$, $CdHCO_3^{+}$, $CdCl_3^{-}$, $CdCl_4^{2-}$, $Cd(OH)_3^{-}$ และ $Cd(OH)_4^{2-}$ เมื่ออยู่ร่วมกับสารประกอบอินทรีย์เชิงซ้อนต่างๆ (Kabata-pendias and Pendias, 1992) Mattigold and Sposito (1970) ระบุว่า ในสภาวะที่ดินเป็นกรด รูปทางเคมี (chemical species) ของแคดเมียมที่พบลดหลั่นตามลำดับคือ Cd(II), CdSO4(0), และ $CdCl_4^{+}$ ในขณะที่ในสภาวะที่ดินเป็นด่าง รูปทางเคมีที่พบมากคือ Cd(II), $CdCl^{+}$, CdSO4(0), และ $CdHCO^{+}$ การดูดซับของแคดเมียมในดินขึ้นกับ pH ธรรมชาติของ chemical species ของแคดเมียม เสถียรภาพของ Cd complex ค่ากำลังการจับ (binding power) ของ functional group ค่า ionic strength ของสารละลาย และ ions อื่นๆ ที่มาแย่งจับ (competing ions) กับอนุภาคดิน (Pickering, 1980) ผลจากงานวิจัยพบว่า บริเวณใดที่มีการปนเปื้อนของแคดเมียมในดินสูง จะมีปริมาณของแคดเมียมในพืชสูงตามด้วย ดังเช่น กรณีของเมือง Toyoma ในประเทศญี่ปุ่นที่อยู่ส่วนใต้ของบริเวณที่ทำเหมืองแร่ แคดเมียมจากเหมืองถูกชะลงมาตามแม่น้ำ Jinzu และสะสมในดิน เมื่อปลูกข้าวในบริเวณนั้น พบว่ามีปริมาณของแคดเมียมในข้าวสูงมาก เป็นผลให้คนที่บริโภคข้าวจากบริเวณนั้นป่วยเป็นโรคพิษจากแคดเมียม เรียกว่า อิไต-อิไต (Itai-Itai

disease) กันมากมาย ผู้ป่วยมีอาการคลื่นไส้ อาเจียน ท้องเสีย ปวดศีรษะ ปวดกล้ามเนื้อ น้ำลายไหล ปวดท้อง หมดสติ (shock) ตับ ไต และ กระดูกถูกทำลาย เป็นต้น (Kobayashi, 1978

ตะกั่วเป็นโลหะหนักที่มักพบร่วมกับการปนเปื้อนของแคดเมียม ตะกั่วเป็นโลหะหนักที่พบมากสุดและมีพิษสูงสุดในสิ่งแวดล้อม (Liang and Mao, 2016) ตะกั่วที่พบมากที่สุดในธรรมชาติอยู่ในรูปของ galena ซึ่งมักเกี่ยวข้องกับ sphalerite (ZnS), pyrite ($FeS_2$), chalcopyrite ($CuFeS_2$) และเกลือของ sulfur อื่น ๆ แหล่งการปนเปื้อนของตะกั่วในดินที่เกิดจากกิจกรรมของมนุษย์มีมากมาย เช่น การทำเหมืองแร่ การถลุงแร่ การปนเปื้อนในขยะ (sewage sludge) กิจกรรมทางเกษตรกรรม อุตสาหกรรมที่ใช้แบตเตอรี่ สีทาบ้าน สีในภาชนะเครื่องดินเผา เครื่องสำอางค์ ควันไอเสียจากการจราจรเพราะมีตะกั่วใน gasoline อันเป็นผลจากการใช้ตะกั่วในรูปสารอินทรีย์คือ tetramethyl lead และ tetraethyl lead เป็น antiknock additive เป็นต้น สำหรับการประยุกต์ใช้ตะกั่วในรูปแบบใหม่ที่อาจนำไปสู่อันตรายในสภาวะแวดล้อม ได้แก่การใช้ตะกั่วเป็นเกราะกำบัง (protection shielding) การรับรังสี (radiation exposure) ในเครื่องคอมพิวเตอร์ และโทรทัศน์ รวมทั้งในเครื่องมือแพทย์เฉพาะชนิด นอกจากนั้น ยังพบการใช้ตะกั่วในรูปของโลหะผสม (alloy) ในการบัดกรี (solder) เป็นส่วนผสมใน super conductor, เครื่อง ceramics และผลิตภัณฑ์ทางด้านแก้ว รวมทั้งอุตสาหกรรมการผลิตพลังงาน (energy generation) เป็นต้น (Rotkittikhun et al., 2006; Klassen 2008) ปัญหาการปนเปื้อนของตะกั่วก่อให้เกิดผลกระทบมากมาย เนื่องจากความเป็นพิษสูงของตะกั่วและคุณสมบัติความคงตัวสูง (high persistency) ความสามารถในการละลายน้ำต่ำ ทำให้ถูกย่อยสลายโดยจุลินทรีย์ได้ยาก ตะกั่วที่ปนเปื้อนในดิน จะถูกเปลี่ยนแปลงอย่างช้า ๆ ให้อยู่ในรูปที่ไม่ละลายน้ำ เช่น sulfate, sulfide, oxide และ phosphate salts (Rotkittikhun et al., 2006) กระบวนการที่จำกัดการนำตะกั่วไปใช้งาน (availability) ในพืชเกิดจาก 1) การ adsorption ที่ mineral surface หรือ hydrous iron oxide 2) การสร้างสารประกอบอินทรีย์เชิงซ้อนที่เสถียรของตะกั่ว และ 3) การตกตะกอน (precipitation) ของสารประกอบตะกั่วที่ไม่ค่อยละลายน้ำในรูปของ sulfates, phosphates และ carbonates (Gerhardsson, 2004) ตะกั่วมีความเป็นพิษสูง ก่อให้เกิดผลกระทบต่อร่างกายเกือบทุกอวัยวะ พิษเรื้อรังของตะกั่ว ก่อให้เกิดอันตรายต่อร่างกายมากมาย เพราะตะกั่วจัดเป็นสารก่อกลายพันธุ์ (mutagen) สารก่อลูกวิรูป (teratogen) สารก่อมะเร็ง (carcinogen) และถ้าได้รับพร้อมสารก่อมะเร็ง จะทำให้การเกิดมะเร็งรวดเร็วและรุนแรงขึ้น คือมีคุณสมบัติเป็น cocarcinogen ร่วมด้วย ตะกั่วมีพิษต่อระบบเลือด ทำให้เกิดโรคโลหิตจาง มีพิษต่อระบบสืบพันธุ์ ระบบประสาทและการพัฒนาของเซลล์ประสาท รบกวนการทำงานของตับ ไต และ thyroid รวมทั้งสามารถกดการทำงานของระบบภูมิคุ้มกัน (Papanikolaou et al., 2005; Klassen, 2008; USEPA, 1979)

สังกะสีเป็นอีกหนึ่งโลหะหนักที่มักพบร่วมกับการปนเปื้อนของแคดเมียม ส่วนใหญ่ของสังกะสีที่เกิดตามธรรมชาติมักอยู่ในรูปของ ZnS, sphalerite และ wurtzite ที่พบมากรองลงมาคือ

smithsonites, willemite, zincite, xinkosite, franklinite และ hopeite (Lindsay, 1972) อย่างไรก็ตาม แหล่งการปนเปื้อนของสังกะสีในดินมาจากกิจกรรมของมนุษย์ เช่น การชุบโลหะด้วยไฟฟ้า (electroplating) การหลอม ถลุงแร่ และกระบวนการของสินแร่ (smelting and ore processor) การระบายน้ำออกจากการทำเหมืองแร่ ขยะจากบ้านเรือน หรือ อุตสาหกรรมต่าง ๆ การเผาไหม้ของเชื้อเพลิงฟอสซิล (fossil fuels) การผุกร่อน (corrosion) ของ Zn alloys และ galvanized surfacers รวมทั้งการกัดกรอน (erosion) จากหน้าดินทำการเกษตร เป็นต้น (Spear, 1981; Mirenda, 1986) โดยธรรมชาติ ปริมาณสังกะสีในดินขึ้นกับชนิดของดิน เช่น มีสังกะสี 40 mg/kg ใน acid rocks (granite), 100 mg/kg ใน basaltic rocks, 80-120 mg/kg ในตะกอนที่เป็นหินดินดาน (shales sediment) และ ดินเหนียว (clay sediment) และ 10-30 mg/kg ในหินทราย (sandstones) หินปูน (limestones) และในแร่ dolomites (Lindsay, 1991; Kabata-pendias and Pendias, 1992) สังกะสีที่พบในดินอาจอยู่ในรูปของ 1) อิออนอิสระ (free ions; $Zn^{2+}$) หรืออยู่ร่วมกับสารอินทรีย์เป็นสารประกอบเชิงซ้อน (organo-zinc complex) ในสารละลายในดิน (soil solution) 2) ถูกดูดซับและแลกเปลี่ยนในส่วนที่เป็น colloid, องค์ประกอบของอนุภาคดินเหนียว (clay particles), สารประกอบ humic, รวมทั้ง Fe และ Al hydroxides และ 3) แร่ทุติยภูมิ (secondary mineral) และสารประกอบเชิงซ้อนที่ไม่ละลายน้ำในส่วนที่เป็น solid phase ของดิน แม้ว่าการละลายของสังกะสีในดินจะต่ำมาก แต่ Zn chlorate, Zn chloride, Zn sulfates และ Zn nitrates สามารถละลายน้ำได้ดี ในขณะที่ $Zn^{2+}$ อิสระในสารละลายของดิน เมื่อทำปฏิกิริยากับ hydroxides, carbonates, phosphates, sulphides, molybdates และ anions อื่น ๆ รวมทั้ง humates, fulvates ligands อื่น ๆ จะเกิดการตกตะกอนเกิดขึ้น การละลายของสังกะสีในดินจะเพิ่มขึ้น ถ้าค่าของ pH ในดินลดลง (Alloway, 1995) ในด้านผลกระทบต่อสุขภาพ แม้สังกะสีจัดเป็นธาตุที่จำเป็นต่อร่างกายที่ต้องการในปริมาณน้อย (essential trace element) แต่การรับสังกะสีในปริมาณมากเกินไปทำความเสียหายต่อระบบทางเดินอาหารส่วนบน (upper alimentary tract) และทำให้เกิดอาการ shock ได้ เนื่องจากปริมาณที่สูงเกินไปของสังกะสีจะรบกวน metabolism ของทองแดง ก่อให้เกิดความรุนแรงของการขาดทองแดง (Patterson et al., 1985) และสังกะสีทำลายระบบภูมิคุ้มกันโดยลดการตอบสนองของเซลล์เม็ดเลือดขาวเมื่อถูกกระตุ้น ลดความสามารถในการตอบสนองต่อสารเคมี (chemotaxis) ของ lymphocytes และการกลืนกิน (phagocytosis) ของ granulocytes (Zelicoff and Thomas, 1998) นอกจากนั้น การหายใจเอาฝุ่นของ Zn oxide เป็นสาเหตุสำคัญของการเกิด metal fume fever ซึ่งผู้ป่วยมีอาการเจ็บคอ ไอ อ่อนเพลีย ปวดกล้ามเนื้อ (myalgias) และมีไข้ (Merian et al., 2004)

## 2.2 ปัญหาการปนเปื้อนของแคดเมียมในประเทศไทย

ในประเทศไทย ดร.โรเบิร์ต ซิมมอนส์ และคณะ (Simmons et al., 2005) ได้ทำการตรวจวัดระดับสารแคดเมียมในดินและข้าว รวมทั้งศึกษาแหล่งกำเนิดของสารแคดเมียม ณ บริเวณ ต พระธาตุผาแดง ต แม่กุต แม่ตาว อำเภอแม่สอด จังหวัดตาก ในปี พ.ศ. 2541-2546 พบว่าแหล่งกำเนิดของสารแคดเมียม เกิดจากการที่ฝนตกชะหน้าดินซึ่งอุดมด้วยแร่สังกะสีและแคดเมียม ไหลลงสู่ต้นน้ำของลำน้ำธรรมชาติ คือห้วยแม่ตาว และมีการปนเปื้อนแคดเมียมในดินสูงถึง 72 เท่าของค่ามาตรฐานความปลอดภัยยุโรป ขณะที่กว่าร้อยละ 80 ของตัวอย่างข้าวมีค่าสูงกว่าค่ามาตรฐานของญี่ปุ่นและ FAO จากการศึกษาแปลงนาจำนวน 154 แปลง บริเวณ ตำบลพะเด๊ะ อำเภอแม่สอด จังหวัดตาก พบสารแคดเมียมอยู่ในช่วง 3.4 -284 มิลลิกรัมแคดเมียม/กก.ของดิน ซึ่งสูงกว่าค่ามาตรฐานของยุโรปที่กำหนดไว้ 3 มิลลิกรัมแคดเมียม/กก.ของดิน นอกจากนี้การตรวจพืชผลทางการเกษตรพบว่ามีแคดเมียมในเมล็ดข้าวถึง 0.1-44 มิลลิกรัมแคดเมียม/กก.ของข้าว สูงกว่าค่ามาตรฐานของไทยที่กำหนดไว้ที่ 0.043 มิลลิกรัมแคดเมียม/กก.ของข้าว ซึ่งปริมาณแคดเมียมที่พบที่แม่สอด มีค่าในพิสัยเดียวกับข้าวที่ก่อให้เกิดโรคอิไต-อิไต ในประเทศญี่ปุ่น นอกจากนั้น ยังพบการปนเปื้อนแคดเมียมในพืชชนิดอื่น เช่น กระเทียมและถั่วเหลือง สูงเกินมาตรฐานความปลอดภัย 126 เท่า และ 16 เท่า ตามลำดับ ซึ่งจัดเป็นระดับที่สูงมากและเป็นอันตรายต่อผู้บริโภค ผลจากการตรวจระดับแคดเมียมในประชากรเขตตำบลแม่ตาวตั้งแต่เดือนกุมภาพันธ์-พฤษภาคม 2547 พบว่าประชากร 850 ราย มีระดับแคดเมียมค่อนข้างสูงร้อยละ 12.9 และมีระดับแคดเมียมสูงร้อยละ 5.6 (ชุติมา นุ่นมัน 2547) จากผลการศึกษาข้างต้น แคดเมียมนอกจากจะมีผลกระทบต่อสุขภาพอนามัยของประชาชนแล้ว ยังก่อให้เกิดผลเสียต่อผลผลิตทางการเกษตร เนื่องจาก แคดเมียมสามารถสะสมในพืช และยับยั้งการเจริญเติบโตของพืช โดยแคดเมียมสามารถยับยั้งการสังเคราะห์ RNA ยับยั้งกิจกรรมของ ribonuclease ลดการดูดซึม และการขนส่งไนเตรดจากรากสู่ลำต้น โดยยับยั้งการทำงานของ nitrate reductase ที่อยู่บริเวณยอดพืช นอกจากนั้นแคดเมียมยังสามารถยับยั้ง Fe(III) reductase ในรากพืช ทำให้ไม่สามารถดูดซึมเหล็ก ส่งผลกระทบอย่างร้ายแรงต่อกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสง ทำให้เกิดการม้วนของใบ (leaf roll) การสูญเสีย chlorophyll และยับยั้งการเจริญของพืช และส่งผลกระทบด้านลบต่อจุลินทรีย์ในดิน (Shah and Dubey, 1995).

## 2.3 พฤกษบำบัด (Phytoremediation)

### 2.3.1 ความหมายและกลไกการฟื้นฟูมลพิษของพฤกษบำบัด

พฤกษบำบัดหรือ phytoremediation คือการใช้พืชเพื่อบำบัด หรือฟื้นฟูสภาวะแวดล้อมที่ปนปื้อนด้วยมลพิษ (contaminants) ต่าง ๆ โดยใช้กระบวนการของพืชในการดักจับ (sequester) เคลื่อนย้าย (mobilization) เก็บกัก (storage) หรือเปลี่ยนแปลงโครงสร้าง (transformation) สารมลพิษในสิ่งแวดล้อมให้มีปริมาณลดลง หรืออยู่ในรูปที่มีพิษน้อยลง (Suthersan, 1999)

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

การใช้พฤกษบำบัด สามารถลดปัญหาการปนปื้อนของมลพิษในสภาวะแวดล้อมโดยอาศัย 6 กลไกหลักดังนี้ (Schnoor, 2003; วราภรณ์ ฉุยฉาย 2551)

1) การสกัดด้วยพืช (phytoextraction) คือการดูดซึมมลพิษจากดินสู่รากเข้าไปสะสมที่ราก หรือส่วนยอดของพืช เช่น การสะสมโลหะหนัก (ตะกั่ว แคดเมียม สังกะสี และนิเกิล) และสารกัมมันตภาพรังสี เป็นต้น แต่การสะสมโลหะหนักมีข้อเสีย คือโลหะหนักมักส่งผลลด หรือ ยับยั้งการเจริญของพืช และพืชมักจะสามารถสะสมโลหะหนักได้เพียงชนิดเดียว ตัวอย่างพืชที่ใช้กลไกนี้ ได้แก่ indian mustard (*Brassica juncea*) ทานตะวัน (*Helianthus* spp.) และ *Thlaspi carulescens* เป็นต้น

2) การกรองด้วยรากพืช (rhizofiltration) เป็นการดูดซับทางชีวภาพ (biosorption) โดยใช้รากพืชกรอง ดูดซับไว้ในเซลล์ หรือตกตะกอนมลพิษด้วยราก ส่วนใหญ่เป็นพืชน้ำ (aquatic plants) พืชโผล่เหนือน้ำ (emergent) และพืชใต้น้ำ (submergents) ใช้กำจัดพวกโลหะ (ตะกั่ว แคดเมียม ทองแดง นิเกิล และสังกะสี) พวก radionuclides กลุ่มสารอินทรีย์ที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic organics) รวมทั้งสารที่ระเบิดได้ (explosive) ตัวอย่างพืชได้แก่ bulrush, ธูปฤษี (cattail; *Typha angustifolia* L.), coontail, algae, stonewort, parrot feather, พวกสาหร่ายหางกระรอก (*Hydrilla* sp.) เป็นต้น

3) การตรึงด้วยพืช (phytostabilization) การใช้พืชจำกัดการเคลื่อนที่ หรือลดการแพร่กระจายของมลพิษในสภาวะแวดล้อม (Burd et al., 1998) หรืออยู่ในรูปที่สิ่งมีชีวิตนำไปใช้ไม่ได้ในทางปฏิบัติ มีการประยุกต์ใช้พืชที่สามารถทนต่อพิษโลหะหนักเพื่อควบคุมการชะล้างพังทลายของดิน (soil erosion) และป้องกันการแพร่กระจายของโลหะหนักจากกองของเสียของกิจกรรมการทำเหมืองแร่ และดูดซับโลหะหนักจากบริเวณดินที่ปนเปื้อนโดยเฉพาะการใช้พืชที่เป็น hyperaccumulator ที่สามารถสะสมโลหะหนักสูง โดยการดูดซับโลหะหนักทั้งชนิดที่จำเป็นและไม่จำเป็นต่อการเจริญของพืช (Burd et al., 1998; Picard and Bosco, 2003) ตัวอย่างพืชได้แก่กลุ่มพืชที่เป็น phreatophytic trees พืชตระกูลหญ้าที่มีรากฝอย เป็นต้น

4) การทำให้ระเหยด้วยพืช (phytovolatilization) เป็นการทำให้ธาตุโลหะ หรือสารประกอบของโลหะที่ระเหยได้ขึ้นมาจากดินโดยอาศัยแรงดึงจากการคายน้ำ แล้วปล่อยออกทางใบ ใช้กับโลหะที่เมื่ออยู่ในรูปที่เป็นไอแล้วมีความเป็นพิษต่อสิ่งมีชีวิตลดลง เช่น ใช้บำบัด selenium, สารหนู และปรอท เป็นต้น ตัวอย่างพืชได้แก่ *Brassica juncea* กลุ่มพืชชุ่มน้ำ (wetlands plants) และ phreatophytic trees ที่รากหยั่งลึกเพื่อจับมลพิษในแหล่งน้ำใต้ดิน (groundwater capture) เป็นต้น

5) การย่อยสลายด้วยพืช (phytotransformation) คือการที่พืชดูดซึมสารมลพิษเข้าไปแล้ว ทำการย่อยสลายมลพิษด้วยการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของสารโดยกระบวนการ metabolism

ของพืช เพื่อให้สารสลายตัวได้ง่ายขึ้น มีพิษลดลง หรือถูกย่อยสลายโดยจุลินทรีย์ง่ายขึ้น เช่น การประยุกต์ใช้กับสารกลุ่ม chlorinated aliphatics, พวกขยะของเสียที่เป็นอาวุธ (ammunition waste) รวมทั้งสารปราบวัชพืชต่าง ๆ (herbicides) ตัวอย่างพืชได้แก่ พืชกลุ่ม phreatophnytic trees (Salix family, poplar, willow, cottonwood) พืชตระกูลหญ้า (rye, sorghum, switchgrass, reed canary grass) หรือพืชที่มีฝักพวก legumes (clover, alfafa, cowpeas) เป็นต้น

6) การกระตุ้นด้วยพืช (Phytostimulation หรือ rhizosphere bioremediation) คือ กลไกที่รากพืชหลั่งสารออกจากรากพืชที่ยังมีชีวิตอยู่ หรือจากการสลายตัวของรากพืชที่ตายแล้ว เพื่อกระตุ้นการเจริญของแบคทีเรียในดิน หรือเชื้อราไมคอไรซา (mycorrhiza) ที่อยู่ร่วมกับพืชแบบ symbiosis ช่วยให้จุลินทรีย์สลายมลพิษได้ดีขึ้น เป็นกระบวนการที่ใช้กับสารอินทรีย์ที่ถูกย่อยสลายได้ (biodegradable) เช่น petroleum, PCBs (polychlorinated biphenyl compounds) ใช้บำบัดน้ำเสียที่ปล่อยทิ้ง กำจัดโลหะหนัก (ตะกั่ว และ แคดเมียม) หรือใช้บำบัดสารกำจัดศัตรูพืช ตัวอย่างพืชได้แก่จำพวกหญ้าที่มีรากฝอย (fibrous root) เช่น burmuda, ข้าวสาลี (wheat) ไรน์ (rye) พืชที่ปลดปล่อยสารกลุ่ม phenolics (phenolics releasers) เช่น ต้นหม่อน (mulberry), apple, osage orange รวมทั้งพืชที่ปรับสภาพให้ทนแล้งด้วยการมีรากหยั่งลึกสู่แหล่งน้ำ (phreatophytic trees) เช่น ต้นหลิว (willow), cottonwood เป็นต้น

### 2.3.2 ประโยชน์และข้อจำกัดของการใช้พฤกษบำบัด

ข้อได้เปรียบของการใช้พืชในการฟื้นฟูสภาวะแวดล้อมมีดังนี้ (McGrath et al., 1997; Burd et al., 2000) คือ

1. เป็นวิธีการที่สามารถกำจัดมลพิษในบริเวณที่เป็นแหล่งกำเนิด (*in situ*) สามารถฟื้นฟูได้ในบริเวณกว้าง

2. เป็นเทคโนโลยีที่ประหยัด ราคาที่มีการคำนวณในการบำบัดอยู่ประมาณ US$ 0.05 หรือประมาณ 19 บาท ต่อลูกบาศก์เมตร (ใช้อัตรา 1 US = 38 บาท)

3. มีประสิทธิภาพสูง เป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อมและมีความยั่งยืน (environmentally sustainable)

4. การปลูกพืชเพื่อฟื้นฟูสถานที่ปนเปื้อนยังช่วยให้แลดูสวยงาม ผ่อนคลาย มีคุณค่าทางด้านจิตใจ (aesthetic value)

5. การใช้พฤกษบำบัดมีผลกระทบต่อสุขอนามัยน้อย เมื่อเปรียบเทียบกับวิธีอื่น เช่นการฝังกลบสารพิษ (landfill) การตกตะกอนด้วยสารเคมี (chemical precipitation) ที่มีค่าใช้จ่ายสูง ส่งผลเสียต่อสภาพดินและก่อให้เกิดปัญหาสุขอนามัย หรือเมื่อเทียบกับการกำจัดสารพิษโดยใช้จุลินทรีย์ตกแต่งทางพันธุกรรม ที่แม้ในปัจจุบัน ยังมีข้อโต้แย้งมากมายเกี่ยวกับผลกระทบ และความปลอดภัยในระยะยาวของจุลินทรีย์ตกแต่งพันธุกรรม

6. พืชที่ใช้ดูดซับโลหะหนัก หรือมลพิษอื่น สามารถถูกเก็บเกี่ยวได้ง่าย และอาจถูกนำมาใช้ประโยชน์ต่าง ๆ เช่น ประดิษฐ์สิ่งของเครื่องใช้ หรือบำบัดโลหะหนักที่ถูกดูดซับในพืชให้ถูกวิธี หรือสกัดโลหะหนักจากพืชเพื่อนำกลับมาใช้ประโยชน์ใหม่ (phytomining) (Burd et al., 1998; Ghosh and Singh, 2005)

นอกจากประโยชน์โดยตรงตามที่ระบุแล้ว การใช้พืชในการฟื้นฟูสภาวะแวดล้อมยังมีผลประโยชน์ทางอ้อมดังนี้ คือ (Peuke and Rennenberg, 2005)

1.เป็นการเติมอากาศ (aeration) ให้กับดิน ส่งผลให้การย่อยสลายโดยจุลินทรีย์ในดินดีขึ้น ช่วยการนำเข้า (uptake) มลพิษในจุลินทรีย์ง่ายขึ้น และเพิ่มความอุดมสมบูรณ์ของดิน (soil fertility)

2. พืชช่วยยึดเกาะหน้าดิน ป้องกันการสูญเสีย หรือ การพังทลาย หรือ การกร่อนของดิน

3. ส่งเสริมระบบนิเวศน์ของพืช และ สัตว์ชนิดเล็กที่อาศัยบริเวณรากของพืช (rhizopheric micro-fauna and flora) ให้ดีขึ้น

4. สามารถเก็บเกี่ยว biomass จากพืชเพื่อใช้ทำเชื้อเพลิง หรือ ผลิตพลังงานความร้อน (thermal energy production)

5. ในกรณีที่มลพิษเป็นโลหะ สามารถสกัดโลหะ หรือ สินแร่ที่มีค่าซึ่งพืชดูดซับไว้ (bio-ores) เพื่อนำมาใช้ประโยชน์ต่อไป

อย่างไรก็ดี การใช้พืชในการบำบัดสารพิษต่าง ๆ รวมทั้งโลหะหนักมีข้อจำกัดดังนี้คือ (Suthersan, 1999; Ghosh and Singh, 2005)

1. พฤกษบำบัดจะมีประสิทธิภาพสูง ถ้าบริเวณที่ปนเปื้อนมีระดับน้ำใต้ดินตื้น (shallow water table) และการปนเปื้อนในดินไม่สูงนัก

2. การใช้พืชเหมาะสมกับบริเวณที่มีภูมิอากาศอบอุ่น หรือที่เหมาะสมต่อการเจริญของพืช และโดยทั่วไป การใช้พฤกษบำบัดต้องใช้ระยะเวลานานหลายปีจึงเกิดผล

3. ไม่เหมาะสมสำหรับมลพิษที่ไม่ละลายน้ำ หรือเป็น hydrophobic เพราะสารปนเปื้อนเหล่านี้มักเกาะติดอยู่กับอนุภาคของดิน

4. ยังมีข้อข้องใจว่าสารปนเปื้อนที่ดูดซับโดยพืชจะสะสมในส่วนที่เป็นใบ ร่วงลงเป็นขยะใบไม้ (litter) หรือสะสมในเนื้อไม้ (wood) หรือในรูปหญ้าที่คลุมต้นไม้ (mulch)

5. มีความเป็นไปได้ที่มลพิษบางชนิดที่ถูกดูดซับ อาจจับหรือเกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนกับสารที่หลั่งออกจากพืช (exudates) เกิดปัญหาการขนส่งสาร และการปนเปื้อนสู่แหล่งน้ำใต้ดิน

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

6. ยังต้องมีการพัฒนาวิธีการและเทคโนโลยีที่เหมาะสมในการเก็บเกี่ยวและการทำลายพืชที่สามารถดูดซับมลพิษได้สูง (hyperaccumlaor plants)

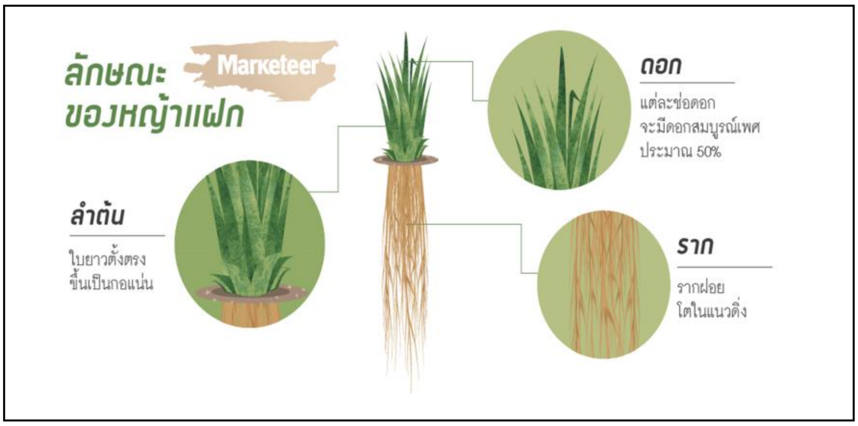
7. พืชไม่สามารถเจริญได้ดีในบริเวณที่เกิดการปนเปื้อนของมลพิษสูง และประสิทธิภาพในการดูดซับ หรือการทำลายมลพิษมักมีค่าลดน้อยลง (Bingham et al., 1986; Foy et al., 1978) ทั้งนี้ในกรณีของโลหะหนัก โลหะทุกชนิดเมื่อสะสมในปริมาณสูง จะก่อให้เกิดอนุมูลอิสระ (free radicals) มีพิษต่อเซลล์ หรืออาจไปแทนที่โลหะอื่นซึ่งจำเป็นและสำคัญต่อพืช เช่นไปแทนที่โลหะในรงควัตถุ หรือในเอนไซม์ต่าง ๆ เป็นต้น (Ghosh and Singh, 2005) ดังมีรายงานว่า ปริมาณทองแดงที่สูงขึ้นในพืชส่งผลให้ขาดธาตุเหล็ก เกิดความเสียหายต่อเยื่อหุ้มเซลล์ ยับยั้งการเจริญของราก ทำให้พืชเจริญได้ช้าหรือหยุดการเจริญ เกิดการสูญเสีย chlorophyll เรียกว่า chlorosis (Reed and Glick, 2005) แคดเมียม สามารถยับยั้งการเจริญของรากและส่วนยอดของพืช ส่งผลต่อการดูดซึมแร่ธาตุและการรักษาความสมดุลในพืช (Belimov et al., 2005) เป็นต้น

## 2.4 หญ้าแฝก (Vetiver grass)

### 2.4.1 ลักษณะของหญ้าแฝก

หญ้าแฝก มีถิ่นกำเนิดในอินเดียตอนเหนือ เอเชียตะวันออกเฉียงใต้ และแพร่กระจายไปยังประเทศต่าง ๆ ในเขตร้อนและกึ่งร้อน หญ้าแฝกเป็นพืชใบเลี้ยงเดี่ยวตระกูลหญ้าชนิดหนึ่ง เป็นพืชล้มลุก มีอายุได้หลายปี สูง 1-1.6 เมตร หญ้าแฝกเป็นหญ้าที่ขึ้นเป็นกอ หน่อเบียดกันแน่น ใบเป็นใบเดี่ยว ลักษณะแคบยาว ใบเป็นรูปขอบขนานแคบ ปลายใบสอบแหลม ยาวประมาณ 30-75 ซม. กว้าง 0.4-1.5 ซม. ผิวด้านล่างเกลี้ยง ขอบใบมีขนสาก ด้านท้องใบมีสีจางกว่าด้านหลังใบ ดอกออกเป็นช่อที่กลางยอด ยาว 15-40 ซม.เป็นดอกย่อย ดอกมีขนาดเล็ก แต่ละช่อดอกมีดอกสมบูรณ์เพศประมาณ 50% จำนวนครึ่งหนึ่งเป็นหมัน ด้านบนสมบูรณ์เพศ เกสรตัวผู้ 3 อัน อับเรณูสีส้ม เกสรตัวเมีย ยอดเกสรสีชพู ดอกด้านล่างฝ่อ เมล็ดมีสีน้ำตาลอ่อน หญ้าแฝกมีระบบรากฝอยที่สานกันแน่นยาว สามารถหยั่งลึกในดินได้ถึง 4 เมตร และโตในแนวดิ่ง แผ่กระจายในดินตรง ๆ (องค์การสวนพฤกษศาสตร์; http://th.wikipedia.org/wiki; http:// marketeer. co.th/archives/97996) (รูปที่ 2.1 A-B)

A



B

**รูปที่ 2.1** แสดงส่วนที่เป็นรากและลำต้น (ประกอบด้วยใบ) ของหญ้าแฝก (A) (http://marketeer.co.th/archives/97996) และลักษณะทั่วไปของการเจริญเป็นกอของหญ้าแฝก (B) (/www.kasetkaoklai.com/home/2017/09/ส่งเสริมปลูกหญ้าแฝก)

### 2.4.2 ชนิดของหญ้าแฝกและ ecotype ของแต่ละชนิด

ในประเทศไทยพบหญ้าแฝกได้ทุกภาคของประเทศจากที่ลุ่มถึงที่ดอน และหญ้าแฝกสามารถขึ้นได้ดีในดินเกือบทุกชนิด จากการสำรวจพบว่าหญ้าแฝกที่กระจายทั่วโลกประมาณ 12 ชนิด และ ในประเทศไทยพบเพียง 2 ชนิด คือหญ้าแฝกลุ่ม และหญ้าแฝกดอน (กรมพัฒนาที่ดิน 2550; Office of the Royal Development, 1997)

1.หญ้าแฝกลุ่ม (lowland vetiver; *Vetiveria zizanioides*) หรือแฝกหอม มีแหล่งกำเนิดในเอเชียกลาง ประเทศอินเดีย มีใบและรากยาวกว่าหญ้าแฝกดอน เนื้อใบเนียน มีไขเคลือบมาก ทำให้เจริญได้ดีในที่มีความชื้นสูง และในน้ำแช่ขัง ใบชี้ตรง เมื่อยาวเต็มที่จะหักพับเป็นมุมแหลม การขยายพันธุ์ด้วยหน่อมีอัตราการรอดสูง ไม่ชอบที่รำไร เจริญเติบโตและขยายกอได้อย่างรวดเร็ว

2.หญ้าแฝกดอน (upperland vetiver; *Vetiveria nemolaris*) แหล่งกำเนิดจากเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ประเทศไทย ลาว เขมร และเวียดนาม พบได้ในที่ค่อนข้างแห้งแล้ง สามารถขึ้นได้ในที่แดดจัดและที่ร่มรำไร กอจะเตี้ยกว่าหญ้าแฝกลุ่ม ใบหยาบมีไขเคลือบน้อย ทำให้ดูกร้าน ใบเมื่อยาวเต็มที่จะโค้งลงคล้ายตะไคร้ หลังปลูก ต้องการการดูแลน้อยกว่าหญ้าแฝกลุ่ม

ข้อแตกต่างของลักษณะทั่วไประหว่างหญ้าแฝกลุ่มและหญ้าแฝกดอนแสดงในตารางที่ 2.1 และรูปที่ 2.2

**ตารางที่ 2.1** เปรียบเทียบลักษณะทั่วไประหว่างหญ้าแฝกลุ่มและหญ้าแฝกดอน (สำนักนิเทศและถ่ายทอดเทคโนโลยีการพัฒนาที่ดิน, 2550; Office of the Royal Development, 1997)

| **หญ้าแฝกลุ่ม** *(Vetiveria zizanioides)* | **หญ้าแฝกดอน** *(Vetiveria nemoralis)* |
|---|---|
| 1. กอมีพุ่มใบยาว ตั้งตรงสูง | 1. กอมีใบยาวแผ่โค้งลง คล้ายตะไคร้ |
| 2. กอสูง 150-200 ซม. | 2. กอสูง 100-150 ซม. |
| 3. ใบยาว 45-100 ซม กว้าง 0.6-1.2 ซม. | 3. ใบยาว 35-80 ซม กว้าง 0.4-0.8 ซม |
| 4. ใบสีเขียวเข้ม หลังใบโค้ง ท้องใบออกสีขาว | 4. ใบสีเขียวเข้ม หลังใบเป็นเส้นแข็งสามเหลี่ยม |
| 5. ใบเนียน มีไขเคลือบมากจึงดูนุ่มมัน | 5. ใบหยาบ สากคาย มีไขเคลือบน้อย ดูกร้านไม่เหลือบมัน |
| 6. มีการแตกตะเกียงและแตกแขนงลำต้น | 6. ไม่มีการแตกตะเกียงและแตกแขนงลำต้น |
| 7. ช่อดอกสูง 150-250 ซม. | 7. ช่อดอกสูง 100-150 ซม. |
| 8. รากหยั่งลึก 100-300 ซม. | 8. รากหยั่งลึก 80-100 ซม. |
| 9. รากมีกลิ่นหอมอ่อน ๆ มีน้ำมันหอมระเหย 1.4-1.6% ต่อน้ำหนักแห้ง | 9. รากไม่มีกลิ่นหอม |

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

หญ้าแฝกทั้ง 2 มีความสามารถปรับตัวอยู่ใน habitat ที่แตกต่างกัน หรือมี ecotype variation และชื่อ ecotype ของหญ้าแฝกเรียกตามชื่อจังหวัดที่พบ ecotype ชนิดนั้นเป็นครั้งแรก โดยแฝกลุ่ม หรือแฝกหอม (*V. zizanioides*) มี 11 ecotype ส่วนแฝกดอน (*V. nemolaris*) มี 17 ecotype แต่ละ ecotype แตกต่างกันที่ความสามารถในการปรับตัวให้เข้ากับชนิดของดิน ecotype ของแฝกลุ่มทั้ง 11 ecotype ได้แก่ กำแพงเพชร 2, เชียงราย, สงขลา 1, สงขลา 2, สงขลา 3, สุราษฎร์ธานี, ตรัง 1, ตรัง 2, ศรีลังกา, แม่ฮ่องสอน, และเชียงใหม่ ส่วนแฝกดอนทั้ง 17 ecotype ได้แก่ อุดรธานี 1,อุดรธานี 2, นครพนม 1, นครพนม 2, ร้อยเอ็ด, ชัยภูมิ, เลย, สระบุรี 1, สระบุรี 2, ห้วยขาแข้ง, กาญจนบุรี, นครสวรรค์, ประจวบคีรีขันธ์, ราชบุรี, จันทบุรี, พิษณุโลก และ กำแพงเพชร 1 (office of the Royal Development, 1997)

A

B

**รูปที่ 2.2** แสดงลักษณะทั่วไปของหญ้าแฝกลุ่ม (A) และ หญ้าแฝกดอน (B) (Chomchlow, 1998)

**2.4.3 การใช้หญ้าแฝกเป็นพฤกษบำบัดโลหะหนัก**

โดยทั่วไป กลไกหลักที่พืชใช้ในการฟื้นฟูดินที่ปนเปื้อนด้วยโลหะหนักคือ phytostabilization และ phytoextraction ตัวอย่างการเกิด phytostabilization ณ ตำแหน่งที่มีการปนเปื้อนโลหะหนักเกี่ยวข้องกับการลดการเคลื่อนที่ (mobilization) ของโลหะหนักโดยลดการชะละลายของดิน (soil erosion) ลดการฟุ้งกระจายของฝุ่นที่พัดพาไปกับลม และลดความสามารถในการละลายของโลหะหนักโดยทำการฟื้นฟูดิน (soil amendments) (Suthersan, 1999) ดังนั้น พืชที่เหมาะสมสำหรับกลไกการบำบัดผ่าน phytostabilization ควรทนทานต่อระดับการปนเปื้อนของโลหะหนักในปริมาณสูง ทนต่อสภาวะความเครียดในสิ่งแวดล้อมต่าง ๆ ของดิน เช่น ค่า pH ในดิน ความเค็ม โครงสร้างของดิน สภาวะแห้งแล้ง เช่น ขาดน้ำ และ อาหารในดิน สารประกอบอินทรีย์ รวมทั้งมีความสามารถต่ำ ในการลำเลียง (poor translocator) โลหะหนักจากรากสู่เนื้อเยื่อเหนือพื้นดิน เช่น ลำต้น ใบ หรือ ยอด ซึ่งอาจก่อให้เกิดปัญหาการบริโภคโลหะหนักของคนและสัตว์ได้ นอกจากนั้น พืชที่ใช้เป็นพฤกษบำบัดควรเป็นไม้โตเร็ว เพื่อคลุมผิวดิน มีระบบรากหนาแน่น รวมทั้งมีระดับความสูง (canopy) ที่หนาแน่นด้วย ส่วนพืชที่ใช้กลไก phytoextraction หรือ phytoaccumulation ขึ้นกับ 2 ปัจจัยหลักคือ พืชต้องสามารถนำเข้าและสะสมโลหะหนักในปริมาณสูง และพืชต้องมี high biomass อย่างไรก็ดี เป็นที่น่าเสียดายว่า การเจริญของพืชที่ทนต่อโลหะหนักและความสามารถในการสะสมโลหะหนักมักถูกยับยั้งเมื่อเติบโตในบริเวณที่มีการปนเปื้อนของโลหะหนักที่ความเข้มข้นสูง (Burd et al., 2000) กระบวนการสะสมโลหะหนัก เกี่ยวข้องกับหลายขั้นตอน นับตั้งแต่การละลายของโลหะจากเนื้อดิน (soil matrix) การนำโลหะเข้าสู่ราก การลำเลียงสู่ใบ การลดความเป็นพิษโดยใช้การจับ (chelation) การยึด (sequestration) และการทำให้ระเหย (volatilization) (Peer et al., 2006)

หญ้าแฝกเป็นพืชที่เหมาะสมสำหรับทางพฤษบำบัด เพราะสามารถใช้ทั้งกลไกของ phytostabilization และ phytoextraction คุณสมบัติของการเป็น phytostabilization ของหญ้า

แฝกคือ มีมวล (mass) สูง ระบบรากสานกันแน่นและสามารถยาวได้ถึง 3-4 เมตรในปีแรก มีความทนทานต่อศัตรูพืช เชื้อโรคต่าง และไฟ ทนทานต่อสภาวะอากาศตั้งแต่หนาวจัดจนถึงร้อนจัด สามารถเจริญได้ในอุณหภูมิตั้งแต่ -15$^{\circ}$C ถึง 55 $^{\circ}$C นอกจากนั้น ยังทนต่อความเป็นกรด ความเป็นด่าง ความเค็ม และ ทนต่อ magnesium (Truong and Baker, 1998) วัชพืช และยากำจัดศัตรูพืช (Pinthong et al., 1998) ทนต่อโลหะหนักหลายชนิด เช่น Al, Mn, As, Cd, Cr, Ni, Pb, Hg, Se และ Zn ในดิน (Truong and Baker, 1998; Truong, 1999, Lai and Chen, 2003) ส่วนคุณสมบัติของหญ้าแฝกที่เป็น phytoextraction คือมีมวลสูง และมีประสิทธิภาพสูงในการดูดซับ nitrogen และ phosphorus ที่ละลายน้ำได้ รวมทั้งทนต่อสารละลายโลหะหนัก Hg, Cd และ Pb จากแหล่งน้ำเสีย (Pinthong et al., 1998) โดยภาพรวม หญ้าแฝกมีลักษณะพิเศษหลายประการ ทำให้เหมาะสมต่อการปลูกไว้เพื่ออนุรักษ์ดินและน้ำดังนี้ (สำนักนิเทศและถ่ายทอดเทคโนโลยีการพัฒนาที่ดิน, 2550) คือ

1. แตกหน่อรวมเป็นกอ เบียดแน่น ไม่แผ่ขยายด้านกว้าง
2. มีการแตกหน่อและใบใหม่เรื่อย ๆ ไม่ต้องดูแลมาก
3. มีข้อที่ลำต้นถี่ สามารถขยายพันธุ์โดยใช้หน่อได้ตลอดปี
4. ปกติไม่ขยายพันธุ์หญ้าแฝกด้วยเมล็ด ทำให้ควบคุมการแพร่ขยายได้
5. ใบยาว ตัดและแตกใหม่ง่าย แข็งแรง ทนต่อการย่อยสลาย
6. ระบบรากยาว สานกันแน่น และช่วยอุ้มน้ำ
7. บริเวณรากเป็นที่อาศัยของจุลินทรีย์
8. ปรับตัวกับสภาพต่าง ๆ ได้ดี ทนทานต่อโรคพืชทั่วไป
9. ส่วนที่เจริญต่ำกว่าผิวดิน ช่วยให้อยู่รอดได้ดีในสภาพต่าง ๆ

แม้งานวิจัยเกี่ยวกับพฤกษบำบัดในประเทศไทยยังมีไม่มากนัก แต่ก็มีรายงานการใช้หญ้าแฝกในการบำบัดแคดเมียม และสารหนูในดิน และใช้กำจัดโครเมียมในน้ำเสีย (ศิริลักษณ์ และ ธนูกอง 2005 และ Srisatit, 2003 และ Srisatit et al., 2003) และ การใช้วัชพืช 6 ชนิดในการกำจัดโครเมียมจากดินโดยใช้หญ้าแฝก *(Vetiveria nemoralis), Cynodon dactylon, Pluchea indica, Phyllanthus reticulates, Echinochloa colonum* และ *Amaranthus viridis* (Sampanpanish et al., 2006) Meepring (2003) เปรียบเทียบความสามารถในการดูดซับ (absorp) และสะสม As, Cd และ Pb ของหญ้าแฝกที่ ecotype แตกต่างกันคือ Monsanto, ราชบุรี และ สุราษฎร์ธานี ผลการวิจัยพบว่าทุก ecotype ของหญ้าแฝกสามารถสะสมโลหะหนัก และการสะสมเกิดสูงสุดที่บริเวณราก Yang et al (2003) ระบุว่า *V. zizanioides* ใช้เพื่อการปลูกพืชทดแทน (revegetation) ของกระสะ (ดิน หรือ หินทรายในบ่อแร่ที่ยังเป็นสินค้าแก่ผู้ทำแร่; mine tailing) ของเหมืองแร่ที่ยังมี Pb, Zn, Cu และ Cd ในปริมาณสูง ซึ่งผลปรากฏว่า *V. zizanioides* สามารถฟื้นฟูดินด้วยการสะสมโลหะหนักเข้าสู่ราก โดยการถ่ายโอน (translocation) จากรากไปสู่ยอด (shoot) มีปริมาณจำกัด นอกจากนั้น หญ้าแฝกสามารถเจริญได้ดีแม้ในสภาวะแวดล้อมที่มีความเข้มข้นของโลหะหนักสูง Chen

et al. (2004) กระทำการทดลองในกระถาง (pot experiment) โดยจำลองสภาวะการฟื้นฟูและบำบัดดินที่ปนเปื้อนโลหะหนักด้วยการใช้ chelating agent คือ EDTA เพื่อเพิ่มชีวประสิทธิผล (bioavailability) ของโลหะหนักในดิน แต่ปัญหาที่เกิดคือโลหะหนักสามารถสร้างสารประกอบเชิงซ้อนกับ EDTA ที่อาจมีพิษต่อพืชและจุลินทรีย์ในดิน และก่อให้เกิดปัญหามลพิษได้ สืบเนื่องจากสารประกอบเชิงซ้อนสามารถชะละลาย (leach) ลงสู่แหล่งน้ำใต้ดิน ผลการทดลองพบว่า *V. zizanioides* สามารถทนทานต่อความเป็นพิษของตะกั่วที่มีความเข้มข้นสูงในดิน และในสภาวะที่มีการใช้ EDTA ในดินที่ปนเปื้อนด้วยตะกั่ว *V. zizanioides* ก็สามารถนำตะกั่วเข้าสู่ราก และการขนส่ง (transport) ตะกั่วจากรากสู่ยอดมีประสิทธิภาพสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อมี EDTA ร่วมกับโลหะหนัก และจากการใช้โมเดลจำลองการชะโลหะหนักสู่แหล่งน้ำใต้ดิน เมื่อน้ำฝนพัดพาชะโลหะหนักผ่านบริเวณที่ได้ปลูกหญ้าแฝก ผลการทดลองพบว่า soil matrix ซึ่งได้ปลูก *V. zizanioides* สามารถดูดซับโลหะหนักที่ถูกชะมาได้ (re-adsorb) และป้องกันการชะละลายของโลหะหนักลงสู่แหล่งน้ำใต้ดิน โดยมีความสามารถ re-adsorb Pb, Cu, Zn และ Cd ได้สูงถึง 98%, 54%, 41%, และ 88% ของปริมาณโลหะหนักที่ใส่เข้าไปครั้งแรกตามลำดับ พีระพัฒน์ ชูกำเนิด (2544) ตรวจสอบความสามารถของหญ้าแฝก 5 ecotype คือ ศรีลังกา, Monto, สุราษฎ์ธานี, กำแพงเพชร 1 และนครสวรรค์ ในการดูดซับ Pb และ Cd ผลการทดลองพบว่า *V nemoralis* มีประสิทธิภาพสูงกว่า *V zizanioides* ในการสะสม Pb และ Cd Ecotype นครสวรรค์ และ กำแพงเพชร 1 สามารถดูดซับ Pb และ Cd จากดินได้สูงกว่า ศรีลังกา, Monto และสุราษฎร์ธานี นอกจากนั้น Mirza et al. (2017) รายงานประสิทธิภาพของ *V. zizanioides* ในการสะสม Sb และ As ที่รากและที่ยอด เมื่อปลูกหญ้าแฝกในบริเวณที่มี Sb หรือ As เพียงชนิดใดชนิดหนึ่ง แต่ถ้ามีทั้ง Sb และ As ปนเปื้อนร่วมกัน (co-contamination) โลหะหนักทั้ง 2 จะสามารถส่งเสริมซึ่งกันและกันในการถูกนำเข้า (uptake) และสะสมภายใน *V. zizanioides* ได้เพิ่มขึ้น

ดังนั้น งานวิจัยเหล่านี้สนับสนุนว่าหญ้าแฝกเป็นพืชทางเลือกที่มีประสิทธิภาพสูงในการใช้เป็นพฤกษบำบัดเพื่อฟื้นฟูสภาวะแวดล้อมที่มีการปนเปื้อนของโลหะหนัก

## 2.5 กลุ่ม rhizobacteria ที่ส่งเสริมการเจริญของพืช

### 2.5.1 ประเภทของ rhizobacteria

มีงานวิจัยที่น่าสนใจมากมายระบุว่ากลุ่ม rhizobacberia ที่ส่งเสริมการเจริญของพืช (plant growth-promoting rhizobacteria; PGPR) อยู่ร่วมกับพืชในสภาวะแวดล้อมของราก ซึ่งเรียกว่า rhizophere สามารถส่งเสริมให้พืชเจริญได้ดี และกลุ่มจุลินทรีย์ PGPR มีบทบาทสำคัญต่อการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชภายใต้สภาวะความเครียดต่างๆ รวมทั้งพื้นที่ซึ่งปนเปื้อนด้วยโลหะหนักชนิดต่างๆ เช่น นิเกิล ตะกั่ว สังกะสี และแคดเมียม (Burd et al., 2000; Burd et al., 1998; Cappuccino and Sherman, 1992; Sheng and Xia, 2006) PGPR สามารถแบ่งได้เป็น 2

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ประเภท ตามบริเวณที่อยู่อาศัยในระบบราก และ rhizosphere ซึ่งได้แก่ intracellular PGPR (iPGPR) และ extracellular PGPR (ePGPR) ตามลำดับ โดย iPGPR คือ กลุ่ม PGPR ที่เข้าอาศัยภายในเซลล์รากพืช สร้างปมราก (nodular structures) และตรึงไนโตรเจนให้แก่พืช เช่น rhizobia ที่พบในปมรากถั่ว และ *Franki*a sp ในปมรากไม้ เป็นต้น ส่วน ePGPR เป็น กลุ่ม PGPR ที่อาศัยใกล้กับราก ติดอยู่ที่ผิวของราก หรือบริเวณระหว่างเซลล์รากในชั้น cortex (หนึ่ง เตียอำรุงและคณะ, 2548; Glick , 1995)

### 2.5.2 กลไกการส่งเสริมการเจริญของพืชโดย PGPR

PGPR สามารถส่งเสริมการเจริญของพืชได้ทั้งทางตรงและทางอ้อม กลไกที่ส่งเสริมโดยตรงของ PGPR ต่อพืช ได้แก่ การลดปริมาณการสังเคราะห์ ethylene ในพืช การตรึงไนโตรเจน การสร้างฮอร์โมนพืช (phytohormone) ต่าง ๆ เช่น auxin, cytokinin, gibberellin การเพิ่มความสามารถของพืชในการดึงฟอสฟอรัส โปตัสเซียม การสังเคราะห์ siderophores ซึ่งสามารถละลายแร่ธาตุอาหารและ ดึงเหล็กจากดินมาใช้ ส่วนกลไกทางอ้อมต่อพืช คือ การควบคุม และป้องกันการเกิดโรคในพืช (Burd et al., 2000; Sharma et al., 2003)

การลดการสร้าง ethylene มีความสำคัญต่อการเจริญเติบโต และพัฒนาการของพืช โดยเฉพาะพืชใบเลี้ยงคู่ เมื่ออยู่ภายใต้สภาวะความเครียดต่างๆ เช่น ได้รับแคดเมียม ความเค็ม (Mayak et al., 2004; Hamaoui et al., 2001) ความแห้งแล้ง ภาวะน้ำท่วม (Grichko and Glick, 2001) และ โรคพืช (Lucy et al., 2004) ภาวะเครียดเหล่านี้สามารถเพิ่มปริมาณการสังเคราะห์ ethylene ซึ่งมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของราก และการงอกของเมล็ดพืช อย่างไรก็ตาม แบคทีเรียบางชนิด เช่น *Pseudomonas brassicacearum*, *Pseudomonas marginalis*, *Pseudomonas oryzihabitans*, *Pseudomonas putida* (Hall et al., 1996), *Pseudomonas* sp., *Alcaligenes xylosoxidans*, *Alcaligenes* sp., *Variovorax paradoxus*, *Bacillus pumilus*, และ *Rhodococcus* sp. (Belimov et al., 2001) สามารถสังเคราะห์เอนไซม์ 1-amino-cyclopropane-1-1carboxylate (ACC) deaminase ซึ่งสามารถทำลาย ACC ที่เป็นสารตั้งต้นการสังเคราะห์ ethylene ที่หลั่งจากพืช โดย ACC deaminase ภายในแบคทีเรียจะตัด ทำลาย ACC ได้แอมโมเนีย และ $\alpha$-ketobutyrate ซึ่งเป็นแหล่งไนโตรเจนสำหรับแบคทีเรีย (Hontzeas et al., 2006) ก่อให้เกิดการกระตุ้นการเจริญของราก และเพิ่มการงอกของเมล็ดพืช ต่างๆ เช่น ถั่ว ข้าวสาลี ผักกาด มะเขือเทศ Indian mustard (*Brassica juncea* L.) ถั่ว pea (*Pisum sativum* L.) ที่เจริญภายใต้สภาวะที่ได้รับความเครียด เนื่องจากสามารถลดการสังเคราะห์ ethylene ในพืชเหล่านั้น (Hall et al., 1996; Belimov et al., 2001; Glick et al., 1998; Lynch and Brown, 1997)

PGPR สามารถสร้างฮอร์โมนที่กระตุ้นการเจริญเติบโตของพืชโดยตรง เช่น auxin, cytokinin และ gibberellins (GA) โดย auxin หรือ indole-3-acetic acid (IAA) เป็นฮอร์โมนที่กระตุ้นการเจริญเติบโตของพืชทั้งระยะสั้น และระยะยาว เร่งการเจริญเติบโตของผล ควบคุมการเกิดราก และกระตุ้นการสังเคราะห์ ethylene รวมทั้งลดการดูดซึมแคดเมียมในข้าวบาร์เล่ย (Belimov and Dietz, 2000; Pishchik et al., 2002) เนื่องจาก ePGPR บางชนิด สามารถสังเคราะห์ IAA ได้ เช่น *Aaospirillum brasilense* สามารถสังเคราะห์ IAA เมื่อได้รับ tryptophan ขณะที่ rhizobacteria สังเคราะห์ ฮอร์โมน cytokinin ซึ่งเป็น N6-substitute aminopurines ที่มีผลต่อการแบ่งเซลล์ การงอกของเมล็ด การยาวของราก และการสะสมคลอโรฟิลล์ (Weidhase et al., 1987; Stenlid, 1982) *Bacillus* spp สามารถสังเคราะห์ GA ซึ่งเป็นฮอร์โมนพืชกระตุ้นการออกดอก และผลิตผลในพริกแดง (*Capsicum annuum* L.) (Joo et al., 2005) และช่วยกระตุ้นการเจริญของลำต้น และยอด ใน *A.glutinosa* (Gutierrez Munero et al., 2001) ปัจจุบันมีการค้นพบ GA เพียง 4 ชนิด คือ $GA_1$ $GA_2$ $GA_3$ และ $GA_4$ ในแบคทีเรีย 7 ชนิด (Mac Millan, 2002)

อีกกลไกสำคัญที่มีส่วนช่วยในการเจริญเติบโตของพืช คือ การดึงธาตุอาหารจากดินโดย PGPR เช่น ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส (Cakmakci et al., 2006) และเหล็ก ทำให้พืชสามารถใช้ธาตุอาหารในดินได้อย่างมีประสิทธิภาพ ตัวอย่างเช่น *Bacillus* sp OSU-142 และ RC07, *Paenibacillus polymyxa* RC05, *Pseudomonas putida* RC06, และ *Rhodobacter capsulatus* RC04 ช่วยให้พืชสามารถดึงไนโตรเจน และฟอสฟอรัสจากดินมาใช้มากขึ้น (Hoflich and Metz, 1997) Sharman et al (2003) พบว่า *Pseudomonas* strain $GRP_3$ สามารถผลิต siderophores ซึ่งมีผลต่อการเจริญเติบโตของพืช โดยกระตุ้น เอนไซม์ peroxidase ยับยั้งเอนไซม์ catalase และเพิ่มปริมาณคลอโรฟิลล์ เนื่องจากเหล็กเป็น coenzyme ในกระบวนการสังเคราะห์ chlorophyll การสังเคราะห์ thyllakoid และการพัฒนาการของ chloroplast นอกจากนั้น _ธาตุเหล็กที่เพียงพอ ทำให้การสะสมของแคดเมียมในข้าวบาร์เร่ลดลง และส่งเสริมการเจริญเติบโต และกิจกรรมด้านชีวเคมีของข้าวบาร์เล่ยได้ (Sharma et al 2004; Siedlecka, A., and Krupa, Z.,1996 และ Cohen et al.,1998) ความสามารถในการสังเคราะห์ siderophore ยังช่วยลดความเป็นพิษของโลหะหนัก ดังการทดลองของ Burd et al (2000) ซึ่งชี้ชัดว่า *Kluyvera ascorbata* SUD165/26 ที่สามารถสังเคราะห์ siderophores ได้มากกว่า *K. ascorbata* SUD165 สามารถป้องกันพืชจากความเป็นพิษของนิเกิล ตะกั่ว และสังกะสี ได้ดีกว่า

นอกจากผลโดยตรง ที่ระบุข้างต้น PGPR ยังมีผลทางอ้อมต่อการกระตุ้นการเจริญเติบโตของพืช เช่น การสร้างสารปฏิชีวนะเพื่อป้องกันการเกิดโรค การกระตุ้นให้พืชสร้างภูมิคุ้มกัน การสร้างสารยับยั้งเชื้อก่อโรค และการสร้างเอนไซม์ย่อยสลายผนังเซลล์ของเชื้อก่อโรค และการแข่งขันกับจุลินทรีย์ก่อโรคในบริเวณราก (Lucy et al., 2004) โดย Adhikari et al (39) พบว่า *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas tolaasii*, *Pseudomonas veronii* และ *Sphingomonas trueperi*

สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Achlya klebsiana* และ *Pythium spinosum* ซึ่งก่อโรคในเมล็ดข้าว

### 2.5.3 คุณสมบัติ PGPR ที่เหมาะสมต่อการใช้พฤกษบำบัดต่อโลหะหนัก

คุณสมบัติที่สำคัญของ PGPR ในการกระตุ้นให้พืชดูดซึมทั้งสารอินทรีย์ และสารอนินทรีย์ ทำให้ PGPR เหมาะสมกับการใช้ร่วมกับพืชในการบำบัด และฟื้นฟูสิ่งแวดล้อมที่มีการปนเปื้อนของสารเคมี โดยหลักการ พืชที่ใช้ใน phytoremediation ควรมีความสามารถสูงในการดูดซึมสารพิษ และเจริญเติบโตได้ดี แต่ในทางปฏิบัติ การเจริญเติบโตของพืชจะลดลงเมื่อปลูกในบริเวณที่มีการปนเปื้อนสารพิษสูง เนื่องจากพื้นที่ดังกล่าวมีความเป็นพิษต่อพืช แต่การใช้ PGPR ร่วมกับพืช สามารถช่วยให้พืชเจริญได้ดี และทนความเป็นพิษของสารเคมีได้สูงขึ้น ทำให้สามารถดูดซับสารพิษได้ดีขึ้น ดังรายงานของ Hoflich and Metz (1997) ที่พบว่า PGPR กลุ่ม *Aqrobacterium* sp. *Pseudomonas* sp. และ *Stenotrophomas* sp ช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโต และเพิ่มการสะสมโลหะหนัก เช่น สังกะสี แคดเมียม ตะกั่ว ทองแดง นิเกล และ โครเมียม ใน ข้าวโพด ข้าวไรด์ และ ถั่ว pea. ยกตัวอย่างเช่น rhizophere bacteria บางชนิดเพิ่มการสะสมสังกะสี (Whitng and Terry, 2001) นิเกิล (Abou-Shanab et al., 2003) และ ซีลีเนียม (Abou-Shanab et al., 2003) ใน *Thalaspi caerulescens*, *Alyssum murale* and *Brassica juncea* ตามลำดับ อย่างไรก็ตาม PGPR บางชนิดช่วยลดการดูดซึมของโลหะหนักในพืชบางชนิด ทำให้พืชทนต่อพิษของโลหะหนักได้สูงขึ้น ดังตัวอย่างของ *Azospirillu.lipoferum* 137 ช่วยลดการดูดซึม ซีเซียม ในข้าวบาร์เร่ (Belimov et al., 1998) ขณะที่ *Brevibacillus* ลดการสะสมของสังกะสีใน *Trifolium repens* (Vivas et al., 2006) ดังนั้น การคัดเลือกชนิดของแบคทีเรียให้เหมาะสมกับชนิดของพืชจึงมีความสำคัญยิ่งในทางพฤกษบำบัด

สำหรับการฟื้นฟูดินที่ปนเปื้อนโลหะหนัก คุณสมบัติสำคัญของ PGPR ที่ประยุกต์ใช้ในทางพฤกษบำบัด ต้องส่งเสริมให้พืชที่ใช้ในการบำบัดเจริญเติบโตได้ดี ทนทานต่อความเป็นพิษและช่วยเพิ่มการดูดซับของโลหะหนัก คุณสมบัติที่สำคัญของ PGPR ที่สามารถเพิ่มประสิทธิภาพของพฤกษบำบัดต่อโลหะหนักได้แก่ 1) สร้างฮอร์โมนพืช เพื่อเร่งการเจริญเติบโตของพืช 2) ช่วยในกระบวนการตรึงไนโตรเจน 3) สร้างปฏิชีวนะเพื่อต่อต้านและป้องกันเชื้อโรคในพืช 4) เพิ่มการละลายของแร่ธาตุ 5) ผลิต siderophores ที่สามารถจับเหล็กที่เป็นส่วนสำคัญในการเจริญของพืช และยังช่วยลดความเป็นพิษ และเพิ่มความทนทานต่อโลหะหนัก (Lucy et al., 2004; Dey et al., 2004) ปฏิกิริยาร่วมกันระหว่างพืชและ PGPR สามารถเพิ่มการสร้าง biomass และความทนทานของพืชต่อโลหะหนัก ซึ่งสามารถประยุกต์ใช้ในการเพิ่มประสิทธิภาพของพฤกษบำบัด (Belimov et al., 2005)

### 2.5.4 การประยุกต์ใช้ PGPR ในงานพฤกษบำบัดของโลหะหนัก

ตัวอย่างแบคทีเรียที่สามารถทนทานต่อพิษของโลหะหนักส่วนใหญ่อาศัยอยู่ใน rhizospere ของพืชที่เป็น hyperaccumulator ได้แก่ *Thalaspe caerulescens, Alyssum bertolonii,* หรือ *Alyssum murale* ซึ่งเจริญในบริเวณดินที่ปนเปื้อนด้วย สังกะสี และ นิเกิล (Delorme et al., 2001, Mengoni et al., 2001, Abou-Shanab et al., 2003) นอกจากนั้น Belimov et al. (2005) รายงานการสกัดและคัดเลือก PGPR ที่ทนต่อพิษของโลหะหนักจากบริเวณรากของ *Brassica juncea* L. Czern ที่เจริญในบริเวณที่ปนเปื้อนด้วยแคดเมียม และ PGPR ที่แยกและคัดเลือกได้ สามารถส่งเสริมการเจริญของรากพืช และเพิ่มความทนทานของพืชใน *in vitro* ต่อพิษของแคดเมียมและโลหะหนักชนิดอื่นที่อยู่ร่วมด้วยคือ สังกะสี ทองแดง นิเกิล และโคบอลต์ ผลการทดลองนี้สนับสนุนงานวิจัยอื่นซึ่งรายงานว่าแบคทีเรียจาก rihizosphere ช่วยให้พืชเพิ่มการดูดซับโลหะหนัก และทนทานต่อความเป็นพิษจากโลหะหนักได้สูงขึ้น (Whiting et al., 2001; Abou-Shanab et al., 2003; Burd et al., 1998) ตารางที่ 2.2. แสดงตัวอย่างงานวิจัยของการใช้ PGPR เพื่อส่งเสริมพฤกษบำบัดต่อโลหะหนัก โดยทดลองปลูกพืชในกระถางที่อยู่ใน green house หรือใน growth chamber

จากคุณสมบัติและศักยภาพของ PGPR ที่เหมาะสมต่อการนำมาประยุกต์ใช้เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพของพฤกษบำบัดในการฟื้นฟูดินที่ปนเปื้อนโลหะหนักดังที่ได้ทบทวนในวรรณกรรม โครงการวิจัยนี้จึงประสงค์ที่จะสกัดและคัดเลือก PGPR จากดินในบริเวณ ต. แม่ตาว จังหวัดตาก ที่มีปัญหาการปนเปื้อนด้วยแคดเมียมในปริมาณสูง เพื่อใช้จุลินทรีย์ PGPR ท้องถิ่นที่สกัดได้ เพิ่มประสิทธิภาพของพฤกษบำบัดในการดูดซับโลหะหนัก เนื่องจากพื้นที่ดังกล่าว ได้รับผลกระทบจากการปนเปื้อนของแคดเมียมในพืช ดินและน้ำ จนไม่สามารถประกอบอาชีพเกษตรกรรมได้ตามปกติ โดยมีสมมติฐานว่า PGPR ที่สกัดจากดินในบริเวณที่มีการปนเปื้อนแคดเมียมสูง น่าจะมีความทนทานสูงต่อความเป็นพิษของแคดเมียม และทนต่อโลหะหนักชนิดอื่นโดยเฉพาะตะกั่วและสังกะสีร่วมด้วย เนื่องจากกิจกรรมของการทำเหมืองแร่ มักก่อให้เกิดการปนเปื้อนของแคดเมียมร่วมกับตะกั่ว และสังกะสีเสมอ PGPR ที่สกัดและคัดเลือกได้น่าจะมีคุณสมบัติช่วยส่งเสริมให้หญ้าแฝกซึ่งเป็นพืชที่นิยมใช้ด้านพฤกษบำบัดในประเทศไทย ให้เจริญได้ดีในบริเวณที่ปนเปื้อนด้วยแคดเมียม สามารถทนทานต่อความเป็นพิษของแคดเมียม ตะกั่วและสังกะสี และเพิ่มประสิทธิภาพของหญ้าแฝกในเชิงพฤกษบำบัดให้ดูดซับแคดเมียม ตะกั่ว และสังกะสีได้ดียิ่งขึ้น ทั้งนี้ โครงการวิจัยนี้หลีกเลี่ยงการใช้ PGPR ที่สั่งซื้อจากต่างประเทศ เพราะPGPR ที่คัดแยกจากประเทศไทย ย่อมมีความสามารถในการปรับตัวให้เข้ากับสิ่งแวดล้อม และอยู่รอดในสภาวะแวดล้อมของประเทศไทยได้ดีกว่า PGPR ที่ซื้อจากต่างประเทศ ที่อาจไม่สามารถเจริญได้ดีในสภาวะแวดล้อมของประเทศไทย นอกจากนั้น ประเทศไทยมีข้อได้เปรียบของความอุดมสมบูรณ์ และความหลากหลายของสายพันธุ์แบคทีเรียสูง จึงมีความเป็นไปได้สูงว่าน่าจะทำให้ค้นพบ PGPR สายพันธุ์ใหม่ๆ ที่สามารถนำมาประยุกต์ใช้ในด้านต่าง ๆ ได้ในอนาคต เป็นการใช้ความ

หลากหลายทางชีวภาพภายในประเทศให้เกิดประโยชน์สูงสุด ดังนั้น การศึกษาวิจัยเพื่อคัดเลือกกลุ่ม PGPR ในประเทศไทยเพื่อนำมาส่งเสริมประสิทธิภาพของการกำจัดโลหะหนักโดยทางพฤกษบำบัดจึงมีความสำคัญและควรค่าต่อการวิจัยยิ่ง

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

**ตารางที่ 2.2** ตัวอย่างการใช้ rhizobacteria ที่ส่งเสริมการเจริญของพืชร่วมกับงานทางพฤกษบำบัด (Lucy et al., 2004)

| แบคทีเรีย | พืช | มลพิษ | สภาวะการทดลอง | ผลการใช้แบคทีเรียร่วมกับพืช |
|---|---|---|---|---|
| *Agrobacterium radiobacter* 10<br>*Arthrobacter mysorens* 7<br>*Azospirillum lipoferum* 137<br>*Flavobacterium* sp. L30 | บาร์เล่ย์ | Cd, Pb | Pot experiments ใน greenhouse | –*Flavobacterium* sp. L30 ถูกยับยั้งโดย Cd<br>–*Flavobacterium* sp. L30 และ *A.mysorens* 7 เพิ่ม grain yield<br>– เพิ่มการสะสมของ Pb ในพืชที่ได้รับ *A. radiobacter* 10 และ *A. mysorens* 7<br>–ทุก strain ของแบคทีเรียสามารถส่งเสริมการเจริญของพืชแม้อยู่ในบริเวณที่มีความเข้มข้นของ Cd สูง |
| *Agrobacterium radiobacter* 10<br>*Arthrobacter mysorens* 7<br>*Azospirillum lipoferum* 137<br>*Flavobacterium* sp. L30 | บาร์เล่ย์ | $^{134}$Cesium | Pot experiments ใน greenhouse | –*Flavobacterium* sp. L30 เพิ่มการนำเข้า $^{134}$Cs โดย บาร์เล่ย แต่ไม่มีนัยสำคัญ เพราะ biomass ที่เพิ่มขึ้นของพืช<br>–*A. lipoferum* 137 ลดการสะสมของ $^{134}$Cs อย่างมีนัยสำคัญ |
| *Agrobacterium radiobacter* 10<br>*Arthrobacter mysorens* 7 | บาร์เล่ย์ | Cd | Pot experiments ใน growth chamber | –เพิ่มการดูดซึมของสารอาหารที่จากอาหารเหลวที่ปนเปื้อน (contaminated growth medium) |

**ตารางที่ 2.2** ตัวอย่างการใช้ rhizobacteria ที่ส่งเสริมการเจริญของพืชร่วมกับงานทางพฤกษบำบัด (Lucy et al., 2004)

| แบคทีเรีย | พืช | มลพิษ | สภาวะการทดลอง | ผลการใช้แบคทีเรียร่วมกับพืช |
|---|---|---|---|---|
| *Azospirillum lipoferum* 137<br>*Flavobacterium* sp. L30 | | | | –กระตุ้นความยาวของรากและ biomass ในอาหารเหลวที่ปนเปื้อน<br>–*A. lipoferum* 137 เพิ่มความเข้มข้นของ Cd ในราก แต่แบคทีเรีย strain อื่นไม่มีผลต่อการนำเข้า (uptake) ของ Cd ในพืช |
| *Agrobacterium* sp.<br>*Pseudomonas* sp.<br>*Stenotrophomas* sp. | ข้าวโพด ไรน์ ถั่ว pea และ lupin, | Cd, Cu, Pb, Ni, Zn, และ Cr | Pot experiments ใน growth chamber | –แบคทีเรียกระตุ้นการเจริญของข้าวโพด และเพิ่มการนำเข้าของโลหะโดยข้าวโพด ซึ่งเกิดได้ดีกว่าในกรณีที่มีการปนเปื้อนของโลหะในดินต่ำเทียบกับดินที่มีการปนเปื้อนสูง<br>–แบคทีเรียที่ inoculate ไม่มีผลต่อการเจริญและการนำเข้าของโลหะใน lupin, ถั่ว pea และไรน์ |
| *Azospirillum brasilense* Cd<br>*Enterobacter cloacae* CAL 2<br>*Pseudomonas putida* UW3 | Tall fescue | Polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) | Pot experiments ใน growth chamber | –การ inoculate แบคทีเรียช่วยเร่งและการนำ PAH ออกจากดินที่ปนเปื้อน<br>-ประสิทธิภาพการกำจัด PAH มีค่าสูงขึ้น เมื่อใช้ดินที่ inoculate ด้วยแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลาย PAH |

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

**ตารางที่ 2.2** ตัวอย่างการใช้ rhizobacteria ที่ส่งเสริมการเจริญของพืชร่วมกับงานทางพฤกษบำบัด (Lucy et al., 2004)

| แบคทีเรีย | พืช | มลพิษ | สภาวะการทดลอง | ผลการใช้แบคทีเรียร่วมกับพืช |
|---|---|---|---|---|
| *Azospirillum brasilense* Cd<br>*Enterobacter cloacae* CAL2<br>*Pseudomonas putida* UW3<br>Kentucky bluegrass, | Tall, fescue, และไรน์ป่า | PAHs | Pot experiments ใน growth chamber | –การกำจัด PAH ออกจากดินสูงขึ้น<br>–การงอกและการเจริญของพืชทั้ง 3 ชนิดเพิ่มขึ้นมากมายเมื่อ inoculate ดินด้วยจุลินทรีย์<br>– ค่า biomass ของรากเพิ่มสูงขึ้นในพืชทุกชนิด |
| *Enterobacter cancerogenes*<br>*Microbacterium saperdae*<br>*Pseudomonas monteilii* | *Thlaspi caerulescens*<br>*Thlaspi arvense* | Zn | Pot experiments ใน growth chamber | –ความเข้มข้นของ Zn ในราก และการสะสมของ Zn ที่ยอดใน *T. caerulescens* เพิ่มขึ้น 2 และ 4 เท่าตามลำดับเมื่อ inoculate พืชด้วยแบคทีเรีย<br>–*T. caerculescens* มีค่า biomass ของยอดเพิ่มขึ้น<br>–*T. arvense* ไม่มีการเจริญเติบโตและสะสมโลหะได้เพิ่มขึ้นเมื่อ inoculate ด้วยแบคทีเรีย |
| *Enterobacter cloacae* CAL2 | Canola | Arsenate | Pot experiments ใน growth chamber | –มีผลยับยั้งของ CAL2 ต่อการงอกของ canola ในภาวะที่มี arsenate |

**ตารางที่ 2.2** ตัวอย่างการใช้ rhizobacteria ที่ส่งเสริมการเจริญของพืชร่วมกับงานทางพฤกษบำบัด (Lucy et al., 2004)

| **แบคทีเรีย** | **พืช** | **มลพิษ** | **สภาวะการทดลอง** | **ผลการใช้แบคทีเรียร่วมกับพืช** |
|---|---|---|---|---|
| | | | | –เมื่ออยู่ร่วมกับพืชตัดแต่งทางพันธุกรรม (transgenic plants) แบคทีเรียชักนำให้น้ำหนักของรากและยอดของพืชเพิ่มขึ้น<br>– ไม่ได้เพิ่มความเข้มข้นของ arsenate ในรากของพืช |
| *Kluyvera ascorbata* SUD165 | Canola, มะเขือเทศ | Nickel | Pot experiments ใน growth chamber | –การ inoculate แบคทีเรียช่วยป้องกันส่วนรากและยอดของพืชจากความเป็นพิษของโลหะ<br>–ลดการสร้าง ethylene ในพืชอย่างมีนัยสำคัญ<br>–การ inoculate แบคทีเรีย ไม่ทำให้มีการเพิ่มขึ้น หรือเปลี่ยนแปลงการนำเข้าของโลหะในพืช |

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

# บทที่ 3

# วิธีการดำเนินงานวิจัย

## 3.1 การสกัดและการคัดแยกจุลินทรีย์กลุ่ม PGPR จากดินในพื้นที่ปนเปื้อนแคดเมียม

### 3.1.1 การเก็บตัวอย่าง

สุ่มเก็บตัวอย่างดินและรากพืช ในบริเวณที่มีการปนเปื้อนโลหะหนักภายในพื้นที่บริษัทผาแดง อินดรัสทรี จำกัด (มหาชน) อำเภอแม่สอด จังหวัดตาก จำนวน 5 จุด โดยทำการเก็บตัวอย่างดังต่อไปนี้

1. เก็บตัวอย่างดิน จำนวน 5 จุดๆละ 1 กิโลกรัมที่ระดับความลึก 10 เซนติเมตรจากผิวดิน และใส่ในถุงพลาสติกสีดำ

2. เก็บตัวอย่างพืช จำนวน 5 จุดๆละ 10 กรัม ทำการสะบัดรากพืชเบาๆ เพื่อเอาดินที่เกาะบริเวณรากพืชออก เก็บใส่ถุงพลาสติก แล้วนำไปแช่ที่ห้องเก็บอุณหภูมิที่ 4 °C

หลังจากนั้นนำตัวอย่างกลับมาวิเคราะห์ที่ห้องปฏิบัติการ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี อำเภอเมือง จังหวัดนครราชสีมา

### 3.1.2 การคัดแยกแบคทีเรียที่ทนต่อแคดเมียม

1. ชั่งดิน 1 กรัม ใส่ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวชนิด Tryptic soy broth (TSB), Azotobacter basal broth (ABB) หรือ Pseudomonases isolation broth (PSB) ที่ผสม 100 µg ต่อ ml ของ cycloheximide เพื่อกำจัดเชื้อรา แล้วนำไปใส่เครื่องเขย่า ที่ตั้งไว้ที่ 30 °C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง

2. ทำการเจือจางสารแขวนลอยจากข้อ 1 ให้มีความเข้มข้น $10^{-6}$-$10^{-8}$ แล้วนำไปป้ายบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งชนิด Tryptic soy broth (TSB), Azotobacter basal broth (ABB) หรือ Pseudomonases isolation broth (PSB) ที่ผสม 100 ไมโครกรัมต่อml ของ cycloheximide และแคดเมียม 50 มิลลิกรัมต่อลิตร นำไปเก็บในตู้เพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

3. ทำการคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียที่สามารถเจริญเติบโตได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อแต่ละชนิด แล้วเก็บใน 15% sterile glycerol ที่อุณหภูมิ -80 °C

### 3.1.3 การคัดเลือกแบคทีเรียกลุ่ม plant growth promoting

ทดสอบคุณสมบัติของจุลินทรีย์กลุ่ม PGPR ในการส่งเสริมการเจริญของพืช โดยวัดการสร้าง indole-3acetic acid (IAA) ตามวิธีของ Wohler (1997) การสร้าง cytokinins และ gibberellins ตามวิธีของ Joo et al. (2004) และ Garcia et al (2001) การสร้าง ACC deaminase ตามวิธีของ Belimov et al. (2005) การสร้าง siderophores ความสามารถในการละลายฟอสเฟต และ ผลิต $NH_3$ ตามวิธีของ Mayak et al (2004)

3.1.3.1 การผลิต Siderophore

1. ดูดสารแขวนลอยของแบคทีเรีย จำนวน 75 µl ใส่ใน 96-well microlitre plate ที่บรรจุ 75 µl ของสารละลาย CAS และ 30 µl ของอาหารเลี้ยงเชื้อ Mineral salt แล้วทำการผสมสารทั้งหมดเข้าด้วยกัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 30 นาที
2. ตรวจดูการเกิดสีส้ม โดยเทียบสีกับสารละลายมาตรฐาน desferrioxamine mesylate (DFB)

3.1.3.2 การผลิต Indole-3-acetic acid (IAA)

1. ดุดสารแขวนลอยของแบคทีเรีย จำนวน 50 µl ใส่ใน 96-well microlitre plate ที่บรรจุ 50 µl ของอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวชนิด TSB ผสมหรือไม่ผสม 500 µgต่อ ml L-tryptophan แล้วนำไปบ่มในตู้เลี้ยงเชื้อเวลา 72 ชั่วโมง

2. หลังจากนั้นใส่ 150 µl Salkoowski's reagent ผสมให้เข้ากัน แล้วทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 20 นาที

3. สังเกตสีชมพูที่เกิดขึ้นเทียบกับ สารมาตรฐาน IAA

3.1.3.3 ความสามารถในการละลายฟอสเฟต

1. หยดสารแขวนลอยของแบคทีเรีย จำนวน 10 µl บนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด National Botanical Research Institute's phosphate growth medium (NBRIP) แล้วนำไปบ่มในตู้เพาะเชื้ออุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 14 วัน

2. สังเกตวงใสรอบโคโลนี (กลุ่มแบคทีเรีย) หากมีวงใสแสดงว่ามีการละลายสารฟอสเฟต

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

3.1.3.4 ความสามารถในการผลิตแอมโมเนีย

1. ดูดสารแขวนลอยของแบคทีเรีย จำนวน 50 µl ใส่ในหลอดแก้วปราศจากเชื้อที่บรรจุ peptone water จำนวน 2 ml แล้วนำไปบ่มในตู้บ่มเชื้ออุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 4 วัน

2. หยดสาร Nessler's reagent จำนวน 0.1 ml สังเกตว่าหากเกิดสีเหลืองน้ำตาล แสดงว่าเกิดแอมโมเนีย

3.1.3.5 การผลิต Cytokinin

1. ดูดสารแขวนลอยของแบคทีเรีย จำนวน 50 µl ใส่ใน 10 มิลลิตร minimal media และนำไปบ่มในตู้เขย่าความเร็ว 150 rpm ที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 168 ชั่วโมง

2. ดูดสารละลายใสส่วนบน และทำการทดสอบหาไซโตไคนินตามวิธีการของ OLCHEMIM Enzyme Immonoassay Kits.

3.1.3.6 การผลิต ACC deaminase

1. ดูดสารแขวนลอยของแบคทีเรีย จำนวน 30 µl ใส่ใน 96-well microlitre plate ที่บรรจุสาร Dworkin and Foster (DF) จำนวน 150 µl ที่ผสม 0.3 mM ACC หรือ 0.1 mM $MgSO_4$

2. ทำการอ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ 405 nm ระหว่างช่วงเวลา 0-120 ชั่วโมง หากพบว่ามีความขุ่นมากขึ้นแสดงว่ามีการผลิตสาร ACC deaminase

## 3.2 ศึกษาการคงคุณสมบัติของ PGPR ของแบคทีเรียที่คัดเลือกเมื่ออยู่ในสภาวะที่มีโลหะหนัก

### 3.2.1 การผลิต Siderophore

ดูดสารแขวนลอยของแบคทีเรีย 0.1 mlจากความเข้มข้นแบคทีเรีย $10^8$ CFUต่อml ใส่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ MM9 ที่ผสมและไม่ผสมโลหะหนัก 0.5 mM $CdCl_2$, 2.5 mM $Pb(NO)_3$ หรือ 5 mM $ZnSO_2.7H_2O$ โดยเลี้ยงเชื้อบนเครื่องเขย่าที่ 150 rpm ที่อุณหภูมิ $30^{O}C$ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้น แยกเฉพาะสารละลายส่วนใสที่แยกแบคทีเรียออกแล้ว เพื่อทำการวิเคราะห์หา hydroxymate และ catechol ตามลำดับ

3.2.1.1 การวิเคราะห์หาปริมาณ Hydroxymate

วิเคราะห์หาปริมาณ hydroxymate ในสารละลายใส โดยวิธี colorimetric assays และตรวจวัดปริมาณ ferric percholate (Duhan et al. 1998) ดูดสารละลายใส จำนวน 2

ml ใส่ในหลอดแก้วขนาด 10 ml ที่ใส่ 2 ml sulfanilic acid (1%, w/v, in 30% acetic acid) และ 1 ml iodine solution (1.3%, w/v, in 100% acetic acid) ต่อจากนั้นทำการกำจัดไอโอดีนส่วนเกิน โดยใส่ 2 ml of 2% (w/v) sodium arsenite solution และ 2 ml 0.5% N-l-naphthylethylenediamine solution หลังจากนั้นตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 30 นาที ทำการเจือจางสารละลายแล้ววัดด้วย 500 nm on spectrophotometer (Benchmark Plus).

3.2.1.2 การวิเคราะห์หาปริมาณ Catechol

วิเคราะห์หาปริมาณ catechol โดยวิธีการของ Arnow's ซึ่งใช้ 2, 3-dihydroxybenzoic acid เป็นสารมาตรฐาน ดูดสารละลายส่วนใสของแบคทีเรีย (culture filtrate) จำนวน 1 ml, 0.1 ml 5 mol/l HCl, 0.5 ml ammonium molybdate reagent (10 กรัม $NaNO_2$ และ $Na_2MoO_4.2H_2O$ ในน้ำกลั่น 50 ml) เมื่อได้สารละลายสีเหลืองแล้ว ทำการเติม 0.1 ml 10 mol/l NaOH (เกิดสารละลายสีแดง) ทำการเจือจางสารละลายและตรวจวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 515 nm. (Benchmark Plus)

### 3.2.2 การผลิตฮอร์โมนพืช

คัดเลือกโคโลนีของแบคทีเรียที่ต้องการ จำนวน 1 โคโลนี ใส่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB จำนวน 10 ml ตั้งทิ้งไว้บนเครื่องเขย่า 150 rpm ที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้น ดูดสารแขวนลอยของแบคทีเรีย จำนวน 0.1 ml ($10^8$ CFU/ml) ใส่ใน 10 ml SMM medium (ที่ผสมและไม่ผสม 500 μg/ml L-tryptophan) ซึ่งประกอบด้วย 0.5 mM $CdCl_2$, 2.5 mM $PbNO_3$ หรือ5.0 mM $ZnSO_2.7H_2O$. หลังจากนั้นตั้งทิ้งไว้บนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 150 rpm อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 72 ชั่วโมง แล้วทำการวิเคราะห์หาปริมาณ gibbererllin และ indole-3-acetic acid

3.2.2.1 การผลิต จิบเบอเรลลิน (Gibberellin; GA)

ทำการวิเคราะห์ปริมาณของ GA โดยวิธีของ Paleg (1965) โดยการดูดสารแขวนลอยแบคทีเรีย จำนวน 5 ml ใส่ในหลอดทดลอง ที่บรรจุ 0.4 ml 1.0 M zinc acetate หลังจากนั้น 2 นาทีใส่ 0.4 ml 1.0 M potassium ferrocyanide และทำการปั่นเหวี่ยง (centrifuge) ที่ความเร็ว 1000 rpm เป็นเวลา 15 นาที แล้วทำการดูด 1.0 ml ของสารละลายใสส่วนบนใส่ในหลอดทดลองที่บรรจุ 1.0 ml 30% HCl แล้วทำการบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 20°C เป็นเวลา 75 นาที หลังจากนั้นทำการวิเคราะห์หาปริมาณ GA ด้วยเครื่อง spectrophotometer วัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 254 nm เปรียบเทียบค่ากับ $GA_3$ ซึ่งใช้เป็นสารมาตรฐาน

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

3.2.2.2 การผลิต Indole-3-acetic acid (IAA)

ทำการวิเคราะห์หาปริมาณ IAA โดยวิธีของ Sarwar and Kremer (1995) โดยการดูดสารแขวนลอยแบคทีเรียจำนวน 150 µl ใส่ใน 96 well microplates แล้วใส่ 100 µl Salkowaki reagent ตั้งทิ้งไว้ 30 นาทีและตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 530 nm ด้วย microplate reader โดยการเปรียบเทียบปริมาณการผลิต IAA กับกราฟของสารมาตรฐาน IAA.

### 3.2.3 ความสามารถในการละลายฟอสเฟต

ศึกษาความสามารถในการละลาย tri-calcium phosphate โดยการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด NBRIP เริ่มด้วยการดูดสารแขวนลอยแบคทีเรีย จำนวน 0.1 ml ($10^8$ CFU/ml) ใส่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ NBRIP medium จำนวน 10 ml ที่ผสม 0.5% tri-calcium phosphate ที่ผสมและไม่ผสมโลหะหนัก 0.5 mM $CdCl_2$, 2.5 mM $PbNO_3$ หรือ 5.0 mM $ZnSO_2.7H_2O$ และทำการบ่มบนเครื่องเขย่าที่มีความเร็ว 150 rpm ที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 144 ชั่วโมง หลังจากนั้น แยกเซลล์แบคทีเรียและสารแขวนลอยด้วยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 4,500 rpm เป็นเวลา 20 นาที ทำการตรวจวัดหาปริมาณ phosphate สารแขวนลอยโดยวิธีการ ascorbic acid method (King, 1932) โดยการผสม 2.5 ml สารแขวนลอยแบคทีเรีย กับ 0.4 ml reagents ตั้งไว้เป็นเวลา 10-20 นาทีจนกระทั่งเกิดสี และทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 880 nm และเปรียบเทียบกับกราฟของสารมาตรฐาน $KH_2PO_4$.

### 3.2.4 การผลิต ACC deaminase

ศึกษาหากิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ ACC deaminase activity โดยการวัดปริมาณของ alpha-ketobutyrate ซึ่งเป็นผลผลิตจากการตัด ACC ด้วยเอนไซม์ ACC deaminase (Penrose and Glick, 2003) โดยการเปรียบเทียบค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 nm ของตัวอย่างกับกราฟของสารมาตรฐาน $\alpha$-ketobutyrate. โดยเตรียมสารมาตรฐาน $\alpha$-ketobutyrate ให้มีความเข้มข้น 0.01 mM-1 mM ด้วยการเจือจางสารมาตรฐานจำนวน 200 µl ด้วย 300 µl 2,4-dinitrophenyl hydrazine reagent (0.2% 2,4-dinitrophenyl hydrazine in 2 M HCl) หลังจากนั้นทำการบ่มที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 30 นาที เมื่อเกิดสีขึ้น ให้หยุดปฏิกิริยาด้วยการเติม 2 ml ของ 2 M NaOH และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 nm.

ศึกษาหากิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ ACC deaminase ในสารแขวนลอยแบคทีเรีย โดยการนำสารแขวนลอยแบคทีเรียที่มีความเข้มข้น $10^8$ CFU/ml เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด TSB. และทำการบ่มบนเครื่องเขย่าที่มีความเร็ว 150 rpm ณ อุณหภูมิห้อง หลังจากนั้นทำการปั่นเหวี่ยงเพื่อคัดแยกเซลล์แบคทีเรียด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูง 4,500 rpm เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4°C แยกเซลล์แบคทีเรียที่ได้และทำการล้างด้วย 5 ml DF salts minimal medium (Dworkin and

Foster, 1958) หลังจากนั้นนำเซลล์แบคทีเรียที่ได้ใส่ใน 7.5 ml DF salts minimal medium ที่ผสมและไม่ผสมโลหะหนัก 0.5 mM $CdCl_2$, 2.5 mM $Pb(NO)_3$ หรือ 5 mM $ZnSO_2.7H_2O$ แล้วทำการเติม 45 µl 0.5 M ACC solution จนได้ความเข้มข้นสุดท้ายของ ACC เป็น 3 mM และทำการเขย่าบนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิห้อง ทำการแยกเซลล์แบคทีเรียโดยการปั่นด้วยเครื่องปั่นความเร็วสูงด้วยอัตราเร็ว 4500 g เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4°C. นำเซลล์ที่คัดแยกได้ล้างด้วย 1 ml 0.1M Tris-HCl pH 7.6 ในหลอด microcentrifuge tube ขนาด 1.5 ml แล้วทำการปั่นเวียงด้วยความเร็ว 12,000 g เป็นเวลา 10 นาที และเทสารละลายใสส่วนบนทิ้ง นำเซลล์แบคทีเรียที่แยกได้มาล้างด้วย 600 µl ของ 0.1 M Tris-HCl, pH 8.5. ตามด้วย 30 µl ของ toluene และตามด้วยการ vortex ความเร็วสูงเป็นเวลา 30 วินาที หลังจากนั้น ดูด toluenized cells (เซลล์ที่ถูกทำให้แตกด้วย toluene) จำนวน 100 µl เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4°C เพื่อสำหรับหาปริมาณโปรตีน ส่วน toluenized cell suspension ที่เหลือนำมาหาปริมาณเอนไซม์ ACC deaminase activity ซึ่งกระทำโดยดูด toluenized cells จำนวน 200 µl ใส่ใน microcentrifuge tube ขนาด 1.5 ml เติม 20 µl ของ 0.5 M ACC หลังจากนั้น ผสมให้เข้ากันด้วย vortex ที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 15 นาที และเติม 0.56 M HCl จำนวน 1 ml ทำการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 g เป็นเวลา 5 นาทีที่อุณหภูมิห้อง และดูดสารละลายส่วนใส จำนวน 1 ml และเติม 0.56 M HCl จำนวน 800 µl และเติม 300 µl 0.2% 2,4-dinitrophenyl hydrazine reagent หลังจากนั้นทำการปั่นและบ่มที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 30 นาที และเติม 2 ml 2 N NaOH และทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 nm.

#### 3.2.5 การหาปริมาณโปรตีน

การหาปริมาณโปรตีนกระทำตามวิธีการของ Bradford (1976) โดยการเติม protein reagent จำนวน 1 mlในหลอดทดลองที่บรรจุ 100 µl ตัวอย่าง ตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 2-60 นาที และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 nm และค่าการดูดกลืนแสงที่ได้เทียบกับค่ากราฟมาตรฐานของ Bovine serum albumin ซึ่งมีความเข้มข้นระหว่าง 0-1600 µg/l

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

### 3.3 การคัดเลือก PGPR ที่สามารถทนต่อพิษของแคดเมียม ตะกั่ว และสังกะสีสูงและระบุชนิดของ PGPR ที่คัดเลือก

#### 3.3.1 การทดสอบความทนทานต่อโลหะหนัก และ minimum inhibitory concentration

1. เตรียมเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกได้จากการทดลอง 3.1.3 โดยเลือกแบคทีเรียที่มีลักษณะของ PGPR ตามวิธีการทดสอบได้ครบทุกลักษณะ (ผลิต siderophore, IAA, ละลายฟอสเฟต, ผลิตแอมโมเนีย, cytokinin, และ ACC deaminase) ให้มีความเข้มข้นของเชื้อแบคทีเรีย ประมาณ $10^{-8}$ CFU/ml ในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB

2. ป้ายเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA โดยใช้วิธี three dimension swab technique

3. วางแผนกระดาษกรองขนาด 6 มิลลิเมตร บนจานเลี้ยงเชื้อที่เตรียมไว้ในข้อ 2 จำนวน 6 แผ่นต่อจานเลี้ยงเชื้อ

4. หยดสารละลายโลหะ คือ $CdCl_2$ (0.1, 0.5 0.1 1.5 2.0 2.5 3.0 3.5 4 mM) $Pb(NO_3)_2$ (1 3 5 7 9 11 13 15 mM) หรือ $ZnSO_2.7H_2O$ (1 5 10 15 20 25 30 35 mM) จำนวน 20 μl บนแผ่นกระดาษกรองที่เตรียมไว้ โดย 1 ความเข้มข้นของโลหะต่อแผ่นกรอง

5. นำไปเก็บไว้ในตู้เลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

6. เมื่อเสร็จสิ้นการทดลอง หาค่าของ minimal inhibitory concentration (MIC) โดยค่าของ MIC หมายถึงความเข้มข้นต่ำสุดของโลหะหนักที่ยับยั้งการเจริญ หรือ ทำลายจุลินทรีย์ ทำให้เห็นเป็นวงใส (clear zone) รอบแผ่นกระดาษกรอง

### 3.3.2 การระบุชนิดของแบคทีเรียที่คัดเลือก

ลักษณะทาง phenotype ของ PGPR bacteria ถูกตรวจสอบโดยเปรียบเทียบจากข้อมูลอ้างอิงตามที่ระบุใน Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (Krieg et al., 2001), Microbiology: A Laboratory Manual (Cappuccino and Sherman, 1999) และ Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (Holt et al., 1994) ลักษณะที่ตรวจสอบคือ

3.3.2.1 การตรวจสอบลักษณะทางกายภาพ ทำการทดสอบ Gram stain reaction, motility, และ cell morphology ตามวิธีการของ Cappuccino and Sherman (1999)

3.3.2.2 การตรวจสอบลักษณะทางชีวเคมี ทำการทดสอบ oxidase, catalase, indole, citrate utilization, methyl red, voges proskauer, O-F test, nitrate reduction, lysine และ triple sugar iron ตามวิธีของ Krieg et al (2001) และ Holt et al. (1994)

3.3.2.3 การตรวจสอบลักษณะทางพันธุกรรม กระทำโดยการวิเคราะห์หา 16S rRNA gene sequence ของ isolate PGPR ที่คัดเลือกได้ มีขั้นตอนหลักดังนี้

1. การสกัด genomic DNA งานวิจัยนี้สกัด genomic DNA ของแบคทีเรียตามวิธีที่ระบุโดย Rattanasuk and Ketudat-Cairns (2009) ดังมีรายละเอียดดังนี้คือ นำแบคทีเรียไปเพาะเลี้ยงที่ 30°C ใน TSB agar ข้ามคืน นำ colony เดี่ยวที่ได้ใส่ใน 50 μl น้ำกลั่น ทำให้เซลล์แบคทีเรียแตกโดยต้มที่ 100 °C เป็นเวลา 5 นาที นำ cell lysate ไปปั่นเหวี่ยงที่ 4,000 rpm 2 นาที นำ 5 μl ของ supernatant ไปขยายโดยใช้ polymerase chain reaction (PCR) ในขั้นตอนต่อไป

2. การขยาย 16S rDNA ของแบคทีเรียโดยใช้วิธี PCR ปฏิกริยาของ PCR amplification ที่มีปริมาตรรวม 25 μl มีส่วนประกอบดังนี้คือ

| | | |
|---|---|---|
| Genomic DNA | 2.5 | µl |
| MilliQ water | 14.25 | µl |
| [1]10X buffer | 2.5 | µl |
| MgCl2 (25 mM) | 2.0 | µl |
| [2]dNTP mix (10 mM) | 0.25 | µl |
| [3]fD1 primer (10 µM/µl) | 1.25 | µl |
| [4]rp2 primer(10 µM/µl) | 1.25 | µl |
| Taq DNA polymerase | 1.0 | µl |
| รวม | 25.0 | µl |

[1]10x buffer คือ 100 mM Tris-HCl, pH 9.1, 500 mM KCl และ 0.1% Triton™ X-100
[2]dNTP mix คือส่วนผสมของ dATP, dCTP, dGTP,DTTP ที่ความเข้มข้น 10 mM
[3]fD1 คือ forward primer และ [4]rp2 คือ reverse primer (รายละเอียดแสดงในตารางที่ 3.1)

ปฏิกริยา PCR กระทำใน ThermoHybaid PX2 (Thermo Scientific, USA) โดยใช้ initial denaturation ที่ $94^{\circ}C$ 2 นาที ตามด้วย 35 cycle ของ denaturation ที่ $94^{\circ}C$ (45 วินาที), annealing ที่ $55^{\circ}C$ (45 วินาที) และ extension ที่ $72^{\circ}C$ (2 นาที) ปิดท้ายด้วย final extension ที่ $72^{\circ}C$ (10 นาที) PCR amplified fragment 16S rRNA gene มีขนาด 1,500 bp ซึ่งสามารถตรวจสอบได้ใน 1% agarose gel electrophoresis และย้อม gel ด้วย 10 µg/ml ethidium bromide และถ่ายภาพภายใต้แสง UV transilluminator (Bio-imaging systems minus pro)

3. การ sequence PCR product งานวิจัยนี้หาลำดับเบส (sequence) ของ PCR product โดยส่งไปที่บริษัท Macrogen Inc. ประเทศเกาหลี ซึ่งหาลำดับเบสโดยใช้ DNA sequencing software ของ AB1377 Automated DNA Sequencer และเปลี่ยนเป็นรหัสพันธุกรรม โดย Chromas 1.56 program ลำดับเบสที่ได้ถูกนำมาเทียบกับ GenBank database ใช้ โปรแกรม BLAST (Basic Local Alignment Search Tool version 2.2.9 ของ National Center for Biotechnology Information (http://www.ncbi.nlm.nigh.gov/blast/Blast.cgi) สร้าง Phylogenetic tree โดยวิธี Maximum Pasimoney โดย software MEGA version 3.1 (Kumar et al., 2004) stability relationship ประเมินโดยใช้ boot strap analysis ของ 1,000 replication

**ตารางที่ 3.1** Primers สำหรับปฏิกริยา PCR และการหาลำดับเบสของ 16S rDNA.

| Primer | Primer sequence (5' to 3') | Target region[a] | Reference |
|---|---|---|---|
| fD1 | AGAGTTTGATCCTGGCTCAG | 339-357 | Weisburg *et al.* (1991 |
| rP2 | ACGGCTACCTTGTTACGACTT | 1392-1406 | Weisburg *et al.* (1991) |

[a] *Escherichia coli* numbering

### 3.4 การทดสอบความไวของแบคทีเรียที่คัดเลือกต่อยาปฏิชีวนะ (Antibiotic Sensitivity Test)

การทดสอบความไวของแบคทีเรีย PGPR ที่คัดเลือกทั้ง 6 isolates ต่อยาปฏิชีวนะกระทำบนอาหาร TSA ที่วางแผ่น disk ที่เคลือบยาปฏิชีวนะ ตามวิธีของ Bauer et al. (1966) โดยใช้เทคนิคปลอดเชื้อ สำหรับยาปฏิชีวนะที่เคลือบแผ่น disk ที่ใช้ในการทดลองนี้คือ neomycin (30 μg), tetracycline (30 μg), chloramphenicol (30 μg), colistin sulphate (10 μg), streptomycin (10 μg), และ erythromycin (15 μg) ขั้นตอนการทดลองมีดังนี้คือ นำแบคทีเรียแต่ละ isolate ที่เจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB broth ในระยะ mid log phase ($10^8$ CFU) ไปเกลี่ยบนผิวอาหาร TSA ในจานเพาะเชื้อให้คลุมพื้นที่ผิวให้ทั่ว โดยใช้เทคนิคการเกลี่ยทั้ง 3 ระนาบ (three dimension swab technique) (เกลี่ยเชื้อ 1 isolate ต่อ 1 จาน) เสร็จแล้วนำแผ่น disk ที่เคลือบด้วย antibiotic วางบนผิวอาหาร โดยใช้ antibiotic ทั้ง 7 ชนิด (7 disk ) ต่อ 1 จานเพาะเชื้อ (ขนาด 100 mm) โดยวางแต่ละแผ่น disk ให้ห่างจากขอบจานประมาณ 15 mm และ มี 1 disk วางที่ตำแหน่งกึ่งกลางจาน กดแผ่น disk เบา ๆ เพื่อแน่ใจว่าได้สัมผัสกับผิวอาหาร ผึ่งจานเพาะเชื้อที่ได้เกลี่ยเชื้อและวางแผ่น disk ที่เคลือบยาปฏิชีวนะเรียบร้อยแล้วที่อุณหภูมิห้องประมาณ 3-5 นาที เพื่อให้แห้ง ก่อนที่จะนำเข้าบ่มที่ตู้บ่มเชื้อที่มีอุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 24 ชม. เมื่อสิ้นสุดการบ่ม วัดเส้นผ่าศูนย์กลางของบริเวณใสรอบแผ่น disk (clear zone หรือ inhibitory zone) เพื่อประเมินความสามารถของยาปฏิชีวนะแต่ละชนิดในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย บันทึกผลว่าจุลินทรีย์แต่ละชนิดมีความไว หรือ ความทนทานต่อยาปฏิชีวนะแต่ละชนิด อ้างอิงตาม guideline ที่กำหนดโดย National Committee for Clinical Laboratory Standard’s (NCCLS) ที่มาพร้อมกับชุด kit (Himedia, PA, USA)

### 3.5 การศึกษาผลของ PGPR ที่คัดเลือกต่อการเจริญเติบโตและการดูดซับโลหะหนักในหญ้าแฝก

การศึกษาผลของแบคทีเรีย PGPR ที่คัดเลือกต่อประสิทธิภาพของการเป็นพฤกษบำบัดของหญ้าแฝก ประเมินโดยวัดผลของแบคทีเรียต่อการเจริญเติบโต และความสามารถในการดูดซับโลหะหนักในหญ้าแฝกใน 2 สภาวะคือ หญ้าแฝกที่เพาะเลี้ยงในอาหารกึ่งแข็งปลอดเชื้อในห้องปฏิบัติการ (axenic culture) และหญ้าแฝกที่ปลูกลงดินในกระถาง (pot experiment) พร้อมทั้งตรวจสอบความสามารถในการอยู่ร่วม (colonize) ของ PGPR แบคทีเรียกับหญ้าแฝกด้วย

#### 3.5.1 ผลของ PGPR ที่คัดเลือกต่อการดูดซับโลหะของหญ้าแฝกใน axenic culture

การศึกษาผลของ PGPR ต่อการเจริญและการดูดซับโลหะหนักของหญ้าแฝกใน axenic culture กระทำโดยเปรียบเทียบผลของ PGPR ทั้ง 6 isolates ต่อหญ้าแฝกทั้งชนิดลุ่ม (*V. ziznioides*, สุราษฎร์ธานี ecotype) และ ชนิดดอน (*V. nemoralis*, ราชบุรี ecotype) เพื่อคัดเลือก isolate ของ PGPR และ ชนิดของหญ้าแฝกที่เหมาะสมไปทำการศึกษาต่อไปใน pot experiment ขั้นตอนของการทดลองมีรายละเอียดดังนี้คือ

1. เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ (tissue culture) ของหญ้าแฝก *V. zizanioides* และ *V. nemoralis* ใน 10 ml Musashige and Skoog agar medium

2. ย้ายหญ้าแฝกไปยังขวดปลอดเชื้อที่บรรจุอาหารกึ่งเหลว 0.7% agar medium of Musashige and Skoog ซึ่งใส่โลหะหนักแต่ละชนิด (0.5 mM $CdCl_2$, 5 mM $ZnSO_2.7\ H_2O$, หรือ 2.5 mM $PbNO_3$) โดยสารละลายโลหะหนักแต่ละชนิดถูก spike ด้วย 0.1 ml $10^8$ CFU/ml ของแบคทีเรียแต่ละ isolate กลุ่มที่ไม่ได้ spiked ด้วยแบคทีเรีย (แต่มีโลหะหนัก) เป็นกลุ่มควบคุม

3. นำ culture ของหญ้าแฝกไปบ่มใน growth chamber ที่ 23-28$^{\circ}$C เป็นเวลา 14 วัน

4. เมื่อสิ้นสุดการทดลอง วัดความเข้มข้นของโลหะหนักตามวิธีของ Farwell et al (2006) ดังนี้

4.1 ล้างต้นหญ้าแฝกโดยเทสารละลาย 0.01 M EDTA ผ่านหลาย ๆ ครั้งตามด้วยเทน้ำกลั่นผ่านอีก 3-4 รอบ เพื่อชะโลหะหนัก และแบคทีเรียที่อาจติดผิวด้านนอกออก (ส่วนที่ไม่ได้ถูกดูดซับเข้าสู่พืช)

4.2 แยกส่วนพืชออกเป็นส่วนยอด และ ส่วนราก ก่อนนำเข้าอบแห้งใน hot oven ที่อุณหภูมิ 65$^{\circ}$C เป็นเวลา 1วัน และสับเป็นชิ้นเล็ก ๆ

4.3 นำหญ้าแฝกที่แห้งและสับละเอียดไปย่อยต่อด้วยการเติม 0.8 ml $HNO_3$ แล้วนำเข้มบ่มในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 65$^{\circ}$ C เป็นเวลา 3 ชม. นำสารละลายส่วนใส (supernatant) ไปหาปริมาณโลหะหนักโดยใช้ graphite furnace atomic absorption (GFAAS)

### 3.5.2 ความสามารถของ inoculated PGPR ในการอยู่ร่วมกับหญ้าแฝก

การตรวจสอบความสามารถของ PGPR แบคทีเรียในการอยู่ร่วม (colonize) กับหญ้าแฝกใช้เทคนิคทาง scanning electron microscpy ดังมีขั้นตอนการทดสอบดังนี้

1. นำหญ้าแฝกที่เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ย้ายไปหลอดทดลองที่มีอาหารสูตร Murashige และ Skoog ที่ใส่เชื้อแบคทีเรียแต่ละ isolate โดยใช้ $10^8$ CFU ต่อ ml บ่มหญ้าแฝกร่วมกับแบคทีเรียเป็นเวลา 15 วัน

2. เมื่อครบกำหนด 15 วัน ค่อย ๆ ถอนหญ้าแฝกออกจากวุ้นอาหารอย่างนุ่มนวล

3. จุ่มส่วนรากในน้ำกลั่นปลอดเชื้อ เขย่าเบา ๆ เพื่อกำจัดวุ้นอาหาร (agar) ที่ยังอาจคงติดส่วนผิวรากออกไป

4. แบ่งหญ้าแฝกเป็น 2 ส่วน คือ ส่วนยอด และ ส่วนราก นำส่วนยอดไปวิเคราะห์หาปริมาณ chlorophyll ส่วนรากนำไปศึกษาความสามารถของแบคทีเรียในการอยู่ร่วมกับหญ้าแฝก

5. เตรียมหลอดทดลอง (polyethylene centrifuge tube) ที่มีน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 10 ml หลาย ๆ หลอดวางเรียงกันเป็นชุด (series) นำส่วนรากไปจุ่มในหลอดทดลองหลอดแรก แล้วนำ

หลอดไปเขย่าใน vortex เป็นเวลา 5 นาที เพื่อปลอดปล่อยแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ที่พื้นผิวของรากพืช (rhizoplane bacteria) เสร็จแล้วนำรากไปจุ่มในหลอดทดลองที่สองถัดไป เขย่าด้วยการ vortex 5 นาที ก่อนนำรากไปจุ่มในหลอดทดลองใหม่ที่สามถัดไป ทำเช่นนี้เรื่อย ๆ จนกระทั่งครบหลอดสุดท้ายในชุดนั้น

6. นำหลอดทดลองแต่ละหลอดที่ผ่านการจุ่มของรากแล้ว ไปทำการ spread plate บนวุ้นอาหารแข็ง TSA ที่บรรจุในจานเพาะเชื้อ ซึ่งใส่ยากันเชื้อรา ผึ่งให้แห้งสัก 2-3 นาที ก่อนนำจานเพาะเชื้อเข้าบ่มในตู้บ่มเชื้อที่ 30 $^{\circ}$C

7. วันรุ่งขึ้น นับจำนวน colony ที่ได้ในแต่ละจานเพาะเชื้อ PGPR ที่ยังสามารถพบได้ในหลอดทดลองหลัง ๆ ของ series นั้น ๆ แสดงว่ามีความสามารถในการอยู่ร่วมกับหญ้าแฝกที่ดีกว่า หรือ เป็น better colonizer เมื่อเทียบกับ isolate ของแบคทีเรียที่สามารถพบได้เพียงเฉพาะหลอดต้น ๆ เท่านั้น รายงานผลของปริมาณแบคทีเรียที่พบเป็นค่า log number ของเซลล์ต่อกรัมน้ำหนักแห้ง (Log CFU/g DW) ของราก

8. สำหรับการตรวจสอบรูปร่าง ลักษณะของแบคทีเรียที่ colonize ที่ราก กระทำโดยนำรากไปตรึง (fix) ใน 2.5% glutaraldehyde ใน 0.2 M phosphate buffer, pH 7.2 เป็นเวลา 2 ชม. ที่อุณหภูมิห้อง ล้างด้วยสารละลาย buffer เดียวกันเป็นเวลา 1 ชม. 4$^{\circ}$ C และดึงน้ำออก (dehydrated) โดยจุ่มผ่านสารละลายของ acetone ที่มีอุณหภูมิ 4$^{\circ}$ C และมีความเข้มข้นเพิ่มสูงขึ้นตามลำดับ คือ 50%, 70%, 95% และ 100% ตามลำดับ ตัวอย่างถูกทำให้แห้งใน critical-point dryer ติด (affix) กับ stub ด้วย carbon cement และเคลือบด้วยทองหนา 30 nm และตรวจด้วยการใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็คตรอยแบบส่องกราด (scanning electron microscopy) (Hitachi S570 SEM) ที่ 15 KV

9. สำหรับส่วนยอดของหญ้าแฝกที่ถูกแยกออก นำมาหาค่าปริมาณ chlorophyll ตามวิธีที่ระบุโดย Inskeep and Bloom (1985) โดยนำส่วนยอดมาสับเป็นชิ้นเล็ก ๆ ให้ละเอียด แล้วแช่ใน 1 ml N,N-dimethyformamide (DMF) เป็นเวลา 48 ชม. ที่ 4$^{\circ}$C ในที่มืด นำค่า supernatant มาอ่านค่าที่ 647 nm และ 664.5 nm ใน Beckman model 25 spectrophotometer ปริมาณ chlorophyll คำนวณจากสูตรดังนี้

Chlorophyll b (Chl b) = 20.70A467-4.62A664.5

Chlorophyll a (Chl a) = 12.70A644.5-2.79A647

Total chlorophyll (Total Chll) = 17.90A647 + 8.08A664.5

### 3.5.3 ผลของ PGPR ที่คัดเลือกต่อการเจริญและดูดซับโลหะของหญ้าแฝกใน pot experiment

การศึกษาผลของ PGPR ต่อบทบาทของหญ้าแฝกในการดูดซับโลหะหนัก ประเมินโดยวัดผลของแบคทีเรียต่อการเจริญเติบโต การทนทานต่อพิษโลหะหนัก และความสามารถในการดูดซับโลหะหนักในหญ้าแฝก ตามวิธีที่ดัดแปลงจาก Sheng และ Xia (2006) ดังมีขั้นตอนดังนี้

1. เก็บตัวอย่างดินจากพื้นที่ไม่ปนเปื้อนโลหะหนัก (บริเวณมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี) ผสมดินให้เข้ากัน ร่อนผ่านตะแกรง 2 mm และนึ่งฆ่าเชื้อด้วยการใช้ความดันไอ (autoclave) ที่ 121° C 1 ชม. ทุกวัน เป็นเวลา 3 วันติดกัน ตรวจว่าดินปลอดเชื้อจริงโดยใช้ดินที่ผ่านการ autoclave 3 วันแล้วชั่งมา 1 กรัม ผสมใน 100 ml น้ำปลอดเชื้อ และ plate ในจานอาหารเพาะเชื้อ นำเข้าบ่มค้างคืนที่อุณหภูมิ 30° C

2. นำดินที่ผ่านการยืนยันว่าปลอดเชื้อต่าง ๆ จริง มาทำให้ปนเปื้อนด้วยสารละลายโลหะหนักที่ปลอดเชื้อ คือใส่ 40 mg/kg แคดเมียม, ตะกั่ว (600 mg/kg) และสังกะสี (400 mg/kg) และเก็บดินที่ปนเปื้อนด้วยโลหะหนักที่ green house ต่ออีก 3 สัปดาห์ เพื่อความเสถียรของโลหะหนัก ก่อนนำมาปลูกลงกระถาง

3. ทำให้กระถางปลูกปลอดเชื้อโดยล้างด้วย 10% sodium hypochlorite ตามด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อก่อนนำมาเพาะปลูก นำเมล็ดหญ้าแฝกที่ผ่านการฆ่าเชื้อด้วย 15 % sodium hypochlorite แล้ว จำนวน 10 เมล็ดต่อกระถาง เพาะใส่ดินลึกประมาณ 2 ซม. ออกแบบกลุ่มการทดลองเป็นแบบ randomized block design ใน green house โดยมีจำนวนซ้ำของแต่ละกลุ่มการศึกษาเท่ากับ 3 ซ้ำ โดยหญ้าแฝกในทุกกลุ่มปลูกในดินที่ปนเปื้อนด้วยโลหะหนักทั้ง 3 ชนิดร่วมกัน เพียงแต่ไม่ได้รับ (กลุ่มควบคุม) หรือ ได้รับ (กลุ่มทดลอง) แบคทีเรีย PGPR

4. รักษาความชื้นในดินให้อยู่ประมาณ 60% ด้วยการรดน้ำทุกวันด้วยน้ำที่ถูก deionized สำหรับกลุ่มทดลอง ได้รับ 1 ml ของ PGPR แบคทีเรียที่คัดเลือกไว้แต่ละ isolate ($10^8$ CFU/ml/กระถาง) ที่ spot ที่ราก หรือ ที่ดินบริเวณลำต้น ในขณะที่กลุ่มควบคุม ไม่ได้รับแบคทีเรีย แต่ได้รับ 1 ml media ที่ใช้ในการเจือจางแบคทีเรียแทน

5. หญ้าแฝกที่ได้รับ หรือ ไม่ได้รับ PGPR ถูกเพาะเลี้ยงในกระถางเป็นเวลาต่อเนื่อง 1 เดือน (Hweiitt, 1952) โดยรดน้ำทุกวัน

6. เมื่อครบกำหนดเวลา นำต้นหญ้าแฝกออกจากดินด้วยความระมัดระวัง วัดการเจริญของหญ้าแฝกโดยหาปริมาณของ chlorophyll แบ่งส่วนที่รากและยอดออกจากกัน ล้างชิ้นส่วนพืชให้ปราศจากโลหะหนักที่อาจเกาะที่ผิวโดยล้างผ่าน 0.01 M EDTA 3 ครั้ง ตามด้วยน้ำกลั่นอีก 2 ครั้ง ก่อนนำไปอบแห้ง (70° C) ชั่งน้ำหนักอีกครั้ง และบดเป็นผง

5. หาความเข้มข้นของแคดเมียม ตะกั่ว และสังกะสีที่ถูกดูดซับในส่วนที่เป็นราก และส่วนที่เป็นยอด ด้วยวิธี wet digestion โดยใช้ $HNO_3$ และวิเคราะห์ด้วยการใช้ GFAAS แสดงผลการ

ดูดซับโลหะหนักของหญ้าแฝกโดยรายงานเป็นค่าการสะสมโลหะต่อวัน (total accumulation rate; TAR) และ ปริมาณที่ลำเลียงจากรากสู่ยอด (transport factor; TF) โดยคำนวณจากสูตรของ Sol´ıs-Dom´ınguez et al. (2007)

$$TF = \frac{\text{ความเข้มข้นโลหะหนักที่ยอด } \left(\frac{\mu g}{g}\right)}{\text{ความเข้มข้นโลหะหนักที่ราก } \left(\frac{\mu g}{g}\right)} \times 100$$

$$TAR = \frac{(\text{น้ำหนักแห้งยอด } (g) \times \text{ความเข้มข้นโลหะหนักที่ยอด } (\mu g/g)) + (\text{น้ำหนักแห้งราก } (g) \times \text{ ความเข้มข้นโลหะหนักที่ราก} (\mu g/g))}{(\text{น้ำหนักแห้งยอด } (g) + \text{น้ำหนักแห้งราก } (g)) \times \text{จำนวนวันของการเก็บเกี่ยว}}$$

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

# บทที่ 4

## ผลการศึกษา

### 4.1 การแยกและคัดเลือกจุลินทรีย์กลุ่ม PGPR จากดินในพื้นที่ปนเปื้อนแคดเมียม

#### 4.1.1 การเก็บตัวอย่าง

จากการเก็บตัวอย่างดิน แบคทีเรียในดิน และแบคทีเรียในรากพืช ในพื้นที่ของบริษัทผาแดง อินดัสทรีย์ จำกัด (มหาชน) ตั้งอยู่ในหมู่ที่ 4 และ 8 ตำบลผาแดง อำเภอแม่สอด จังหวัดตาก จำนวน 5 จุด คือ จุดที่ 1 บ่อตกตะกอน จุดที่ 2 พื้นที่ฟื้นฟู จุดที่ 3 พื้นที่ทำเหมือง จุดที่ 4 กองกากขี้แร่ที่มีความเข้มแร่ต่ำ และจุดที่ 5 กองกากขี้แร่ ที่มีความเข้มข้นแร่สูง ผลการตรวจสอบคุณสมบัติทางกายภาพของดินและตะกอนดิน (sediment) พบว่า ลักษณะของดินเป็นดินร่วนปนทราย (sandy loam) และตะกอนดินมีลักษณะเป็นดินร่วนปนเหนียว (clay loam) โดยดินและตะกอนดินประกอบด้วยดินเหนียว (clay) 13% และ 35% ตามลำดับ ความชื้นของดิน และตะกอนดินมีค่าใกล้เคียงกัน คือประมาณ 10 และ 11% ตามลำดับ ส่วนโลหะหนัก แคดเมียม ตะกั่ว และสังกะสีในดินมีปริมาณสูงกว่าในตะกอนดิน โดย แคดเมียม ตะกั่ว และสังกะสีที่พบในดินมีค่าประมาณ 13, 10 และ 51 เท่าของที่พบในตะกอนดิน นอกจากนั้น ความสามารถในการแลกเปลี่ยนประจุในดินของโลหะหนักทั้ง 3 ชนิดมีค่าสูงกว่าในตะกอนดินเช่นกัน ส่วนธาตุต่าง ๆ ในดินและตะกอนดิน มีค่าไม่แตกต่างกันมากนัก คือ N มีปริมาณเท่ากัน ส่วน P ในดินมีค่าเป็น 2 เท่าของตะกอนดิน ในขณะที่ K ที่พบในตะกอนดินมีค่าเป็น 2 เท่าของในดิน (ตารางที่ 4.1)

**ตารางที่ 4.1** คุณสมบัติของดิน และตะกอนดิน

| Parameters | ดิน | ตะกอนดิน |
|---|---|---|
| Type of soil matrix | Sandy loam | Clay loam |
| Moisture content (%) | 10.31 | 11.36 |
| pH | 7.80±0.2 | 7.50±0.2 |
| EC (dS/m) | 1.33 | 0.54 |
| Total N (%) | 0.04 | 0.04 |

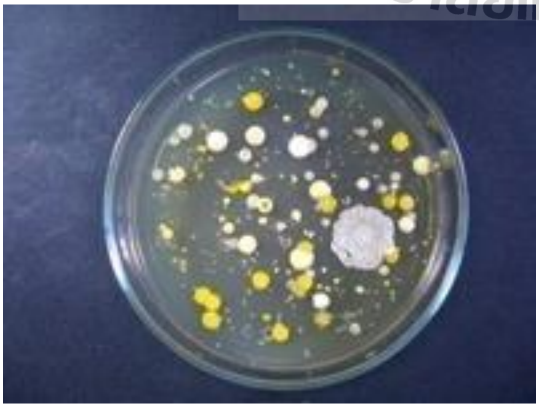
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

**ตารางที่ 4.1** (ต่อ) คุณสมบัติของดินและตะกอนดิน

| Parameter | ดิน | ตะกอนดิน |
|---|---|---|
| Total P (mg/l) | 200 | 100 |
| Total K (mg/l) | 620 | 1,390 |
| Total Cd (mg/l) | 6,250 | 501 |
| Total Pb (mg/l) | 1,103 | 114 |
| Total Zn (mg/l) | 368,856 | 7,223 |
| Exchangeable Cd (mg/l) | 8.15 | 5 |
| Exchangeable Pb (mg/l) | 0.34 | 0.27 |
| Exchangeable Zn (mg/l) | 25 | 8 |

**4.1.2 การคัดแยกแบคทีเรียที่ทนต่อแคดเมียม**

จากการคัดเลือกแบคทีเรียในดินและตะกอนดินในพื้นที่ปนเปื้อนแคดเมียม โดยการเลี้ยงแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อที่แตกต่างกันและผสมแคดเมียม จำนวน 50 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม พบว่า สามารถแยกแบคทีเรียที่ความทนทานต่อแคดเมียม ได้จำนวน 521 สายพันธุ์ โดยอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียชนิด TSA มีจำนวน 207 โคโลนี อาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย ชนิด PSA มีจำนวน 203 โคโลนี และอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย AZA มีจำนวน 211 โคโลนี (รูปที่ 4.1)



(A)

(B)

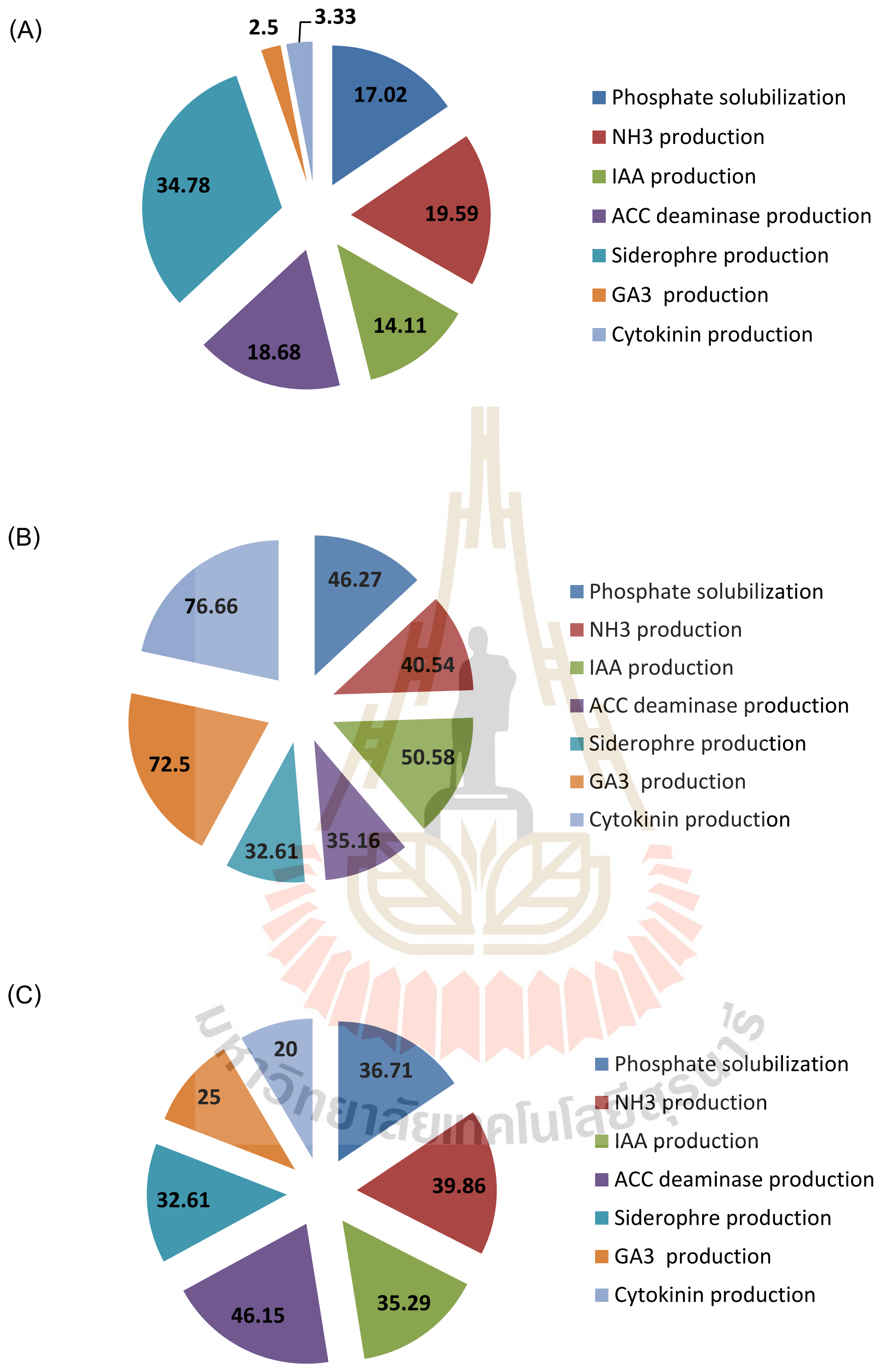
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

(C)

**รูปที่ 4.1** โคโลนีของแบคทีเรียในอาหารเพาะเลี้ยงที่แตกต่างกัน (A) PSA (B) TSA และ (C) AZA

**4.1.3 การคัดเลือกจุลินทรีย์กลุ่ม PGPR จากดินที่ปนเปื้อนแคดเมี่ยม**

จากการศึกษาคุณสมบัติในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช (plant growth promoting traits) คือ ความสามารถในการสร้างฮอร์โมนพืช (gibberellins และ cytokinins) ความสามารถในการละลาย phosphate ความสามารถสร้าง $NH_3$ ความสามารถในการสร้าง ACC deaminase และความสามารถในการสร้าง siderophore ของแบคทีเรียทั้ง 521 โคโลนีที่แยกจากดินที่ปนเปื้อนด้วย Cd ผลการศึกษาพบว่า กลุ่มแบคทีเรียที่มีลักษณะของ PGPR สามารถเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด PSA ได้ดีที่สุด ตามด้วยอาหารชนิด TSA และ AZA ตามลำดับ โดยกลุ่มจุลินทรีย์ที่เจริญบนอาหารชนิด PSA มีความโดดเด่นเหนือกว่ากลุ่มจุลินทรีย์ที่เจริญในอาหาร TSA และ AZA ในด้านของการสร้าง gibberellins และ cytokinins เพราะสามารถพบได้มากถึงเกือบ 73% และ 77% ตามลำดับ หรือพบประมาณ 3 ใน 4 ส่วนของแบคทีเรียที่เจริญในอาหาร ในขณะที่ใน TSA พบแบคทีเรียที่สามารถสร้างฮอร์โมนทั้งสองชนิดเพียงประมาณ 25% และในอาหาร AZA พบได้ไม่ถึง 5% เช่นเดียวกับความสามารถในการสร้าง IAA ที่พบได้ในกลุ่มแบคทีเรียที่เจริญใน PSA ประมาณ 50% ซึ่งสูงกว่าที่พบใน TSA (35%) และ AZA (14%) ในทางตรงข้ามไม่พบความแตกต่างของความสามารถในการสร้าง siderophore ของแบคทีเรียในกลุ่มที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อทั้ง 3 ชนิด (รูปที่ 4.2)



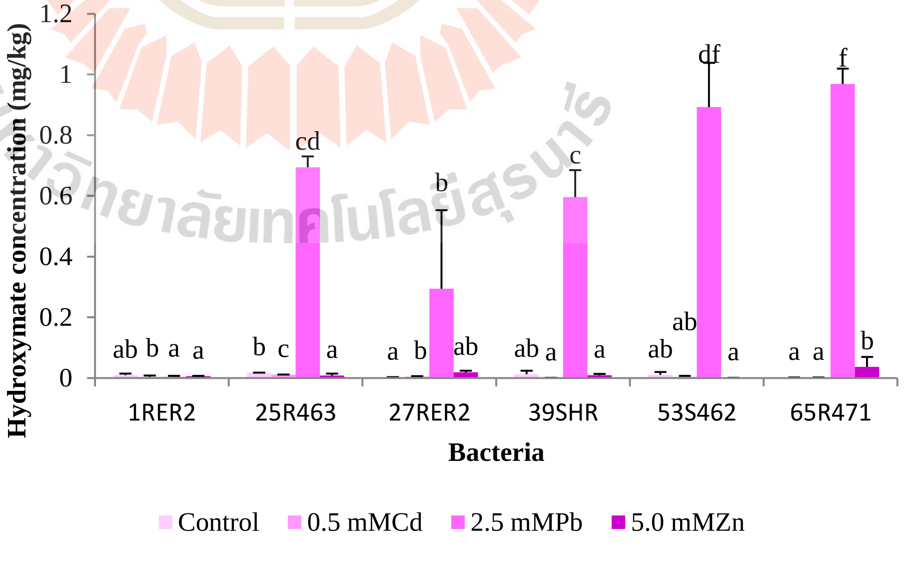

**รูปที่ 4.2** ร้อยละความสามารถสร้างคุณลักษณะ PGP ในอาหารเลี้ยงเชื้อ (A) AZA (B) PSA และ (C) TSA

## 4.2 การคัดเลือกกลุ่ม PGPR ที่คงไว้ซึ่งคุณสมบัติในสภาวะที่มีโลหะหนัก

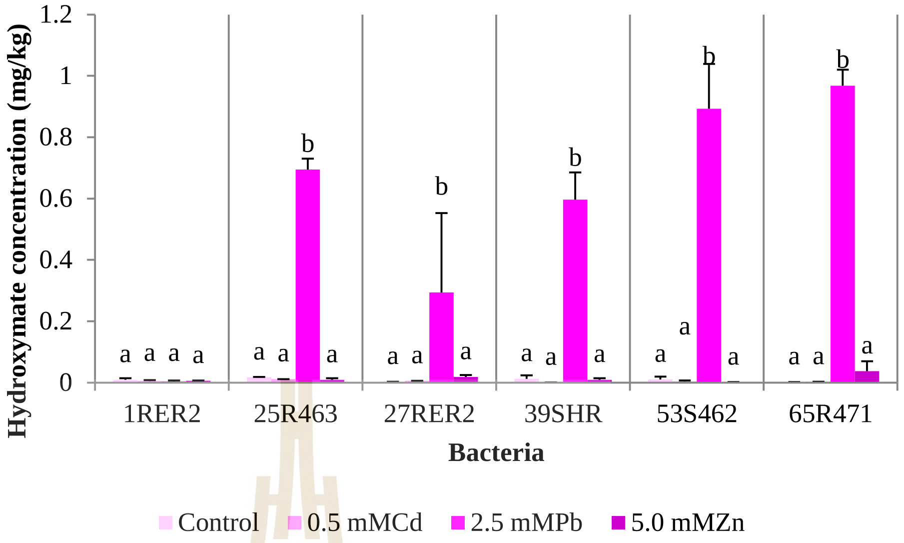
เพื่อทดสอบแบคทีเรียกลุ่ม PGPR ว่ายังคงรักษาคุณสมบัติของ PGP trait ภายใต้สภาวะแวดล้อมที่มีโลหะหนัก จึงได้ทำการสุ่มเลือกแบคทีเรีย 6 isolates ที่แยกได้จากดินแม่สอดที่ปนเปื้อนด้วยแคดเมียม (ในการทดลองที่ 4.1) เพื่อนำมาทดสอบคุณสมบัติของ PGP trait คือ siderophore, ฮอร์โมนพืช, ACC deaminase และความสามารถในการละลายฟอสเฟสในสภาวะแวดล้อมที่มีโลหะหนัก

### 4.2.1 การผลิต Siderophore

การหาปริมาณ siderophore (ชนิด hydroxamate และ catechol) กระทำโดยการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกทั้ง 6 ชนิด (1RER2, 25R463, 27RER2, 39SHR, 53S462 และ 65R471) บนอาหารเลี้ยงเชื้อ MM9 ที่ผสม 0.5 mM $CdCl_2$, 2.5 mM $Pb(NO)_3$ หรือ 5 mM $ZnSO_2.7H_2O$ และไม่ผสมโลหะหนักเพื่อใช้เป็นกลุ่มควบคุม ผลการทดลองพบว่า ตะกั่วเป็นโลหะหนักชนิดเดียวที่สามารถกระตุ้นให้เกิดการสร้าง hydroxymate ทุก isolates ของ PGPR (ยกเว้น 1RER2 เพียง isolate เดียว) สามารถถูกกระตุ้นโดย 2.5 mM ตะกั่ว ให้สร้าง hydroxymate สูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ในขณะที่โลหะหนักชนิดอื่น (0.5 mM Cd และ 5.0 mM Zn) ไม่มีผลกระทบต่อการสร้าง hydroxymate แต่อย่างใด (รูปที่ 4.4) รูปที่ 4.3 แสดงว่า ทั้ง isolates 53S462 และ 65R471 สามารถสร้าง hydroxymate ได้ทัดเทียมกันและมีค่าสูงกว่า isolates อื่นในสภาวะแวดล้อมที่มีตะกั่ว ($p <0.05$) ในขณะที่ 1RER2 สร้าง hydroxymate ได้น้อยที่สุด

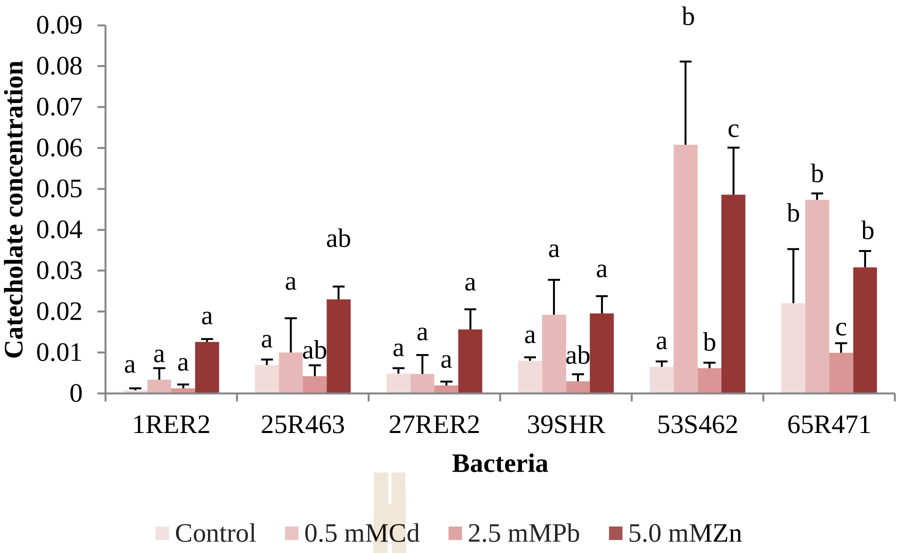



**รูปที่ 4.3** ความสามารถของแบคทีเรียในการสร้าง hydroxamate type ภายใต้สภาวะอาหารที่ผสมโลหะหนัก กราฟแท่งของโลหะหนักชนิดเดียวกันที่มีอักษรต่างกันมีค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$)

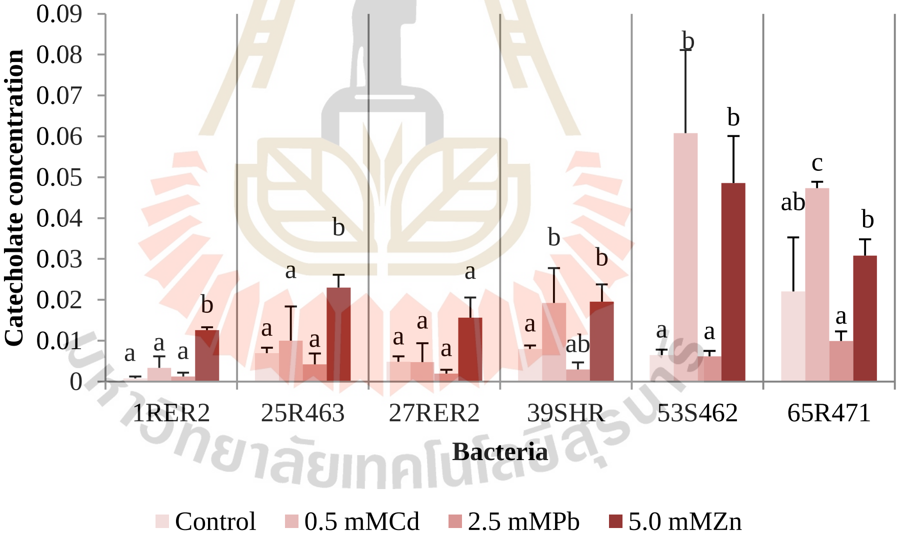



**รูปที่ 4.4** ความสามารถของแบคทีเรียในการสร้าง hydroxamate type ภายใต้สภาวะที่ผสมโลหะหนัก กราฟแท่งของแต่ละ isolate ของแบคทีเรียที่มีอักษรต่างกันมีค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$)

ในสภาวะปกติตามธรรมชาติ ที่ไม่ได้เติมโลหะหนักในอาหารเลี้ยงเชื้อ isolate 65R471 มีความสามารถสร้าง catecholate ได้ในปริมาณสูงสุด เมื่อเทียบกับ isolate อื่น (รูปที่ 4.5) เมื่ออยู่ภายใต้สภาวะที่มีโลหะหนักทั้ง 3 ชนิดคือ 0.5 mM แคดเมียม, 2.5 mM ตะกั่ว, และ 5 mM สังกะสี พบว่า isolates 1RER2, 25R463, 27RER2 และ 39SHR สามารถสร้าง catecholate ได้ทัดเทียมกัน ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญแต่อย่างใด ($p < 0.05$) แต่ในภาวะที่มีแคดเมียม มีเพียง 53S462 และ 65R471 isolates ที่สามารถสร้าง catecholate ได้ทัดเทียมกันและสูงกว่า isolates อื่น ๆ อย่างมีนัยสำคัญ ($p< 0.05$) (รูปที่ 4.5) ดังนั้น จึงสามารถจัดลำดับความสามารถของแบคทีเรียที่คัดเลือกในการสร้าง catecholate ในสภาวะที่มีแคดเมียมได้ดังนี้ 53S462, 65R471 > 39SHR, 25R463, 27RER2, 1RER2. 53S462 ภายใต้สภาวะที่มีตะกั่ว isolate 65R471 สร้าง catecholate ได้สูงสุด ในขณะที่เมื่อมีสังกะสี isolate 53S462 สร้าง catecholate ได้สูงสุด (รูปที่ 4.5) เมื่อวิเคราะห์ความสามารถของแต่ละ isolate ของแบคทีเรียในการสร้าง catecholate ภายใต้แต่ละโลหะหนักทั้ง 3 ชนิด (รูปที่ 4.6) พบว่าสังกะสี มีผลให้แบคทีเรียที่คัดเลือกแทบทุก isolates (ยกเว้น 27RER2 และ 65R471) สามารถสร้าง catecholate ได้เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ($p< 0.05$) จากกลุ่มควบคุมที่ไม่มีโลหะหนัก ในขณะที่ แคดเมี่ยม สามารถกระตุ้นให้ isolates 39SHR, 52S462 และ 65R471 สร้าง catecholate ให้สูงขึ้น ($p <0.05$) (รูปที่ 4.6)




**รูปที่ 4.5** ความสามารถของแบคทีเรียในการสร้าง catecholate type ภายใต้สภาวะที่ผสมโลหะหนัก โดยกราฟแท่งของโลหะหนักแต่ละชนิดที่มีอักษรต่างกัน มีค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$)

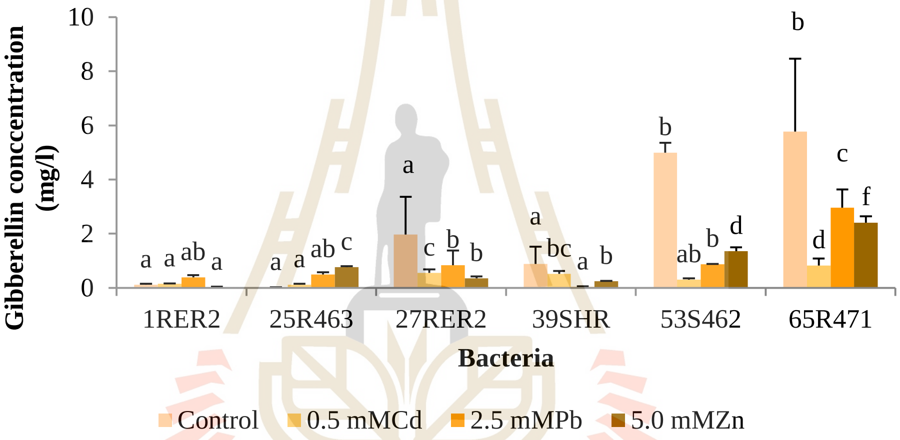



**รูปที่ 4.6** ความสามารถของแบคทีเรียในการสร้าง catecholate type ภายใต้สภาวะที่ผสมโลหะหนัก กราฟแท่งของแบคทีเรียแต่ละ isolate ที่มีอักษรต่างกัน มีค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$)

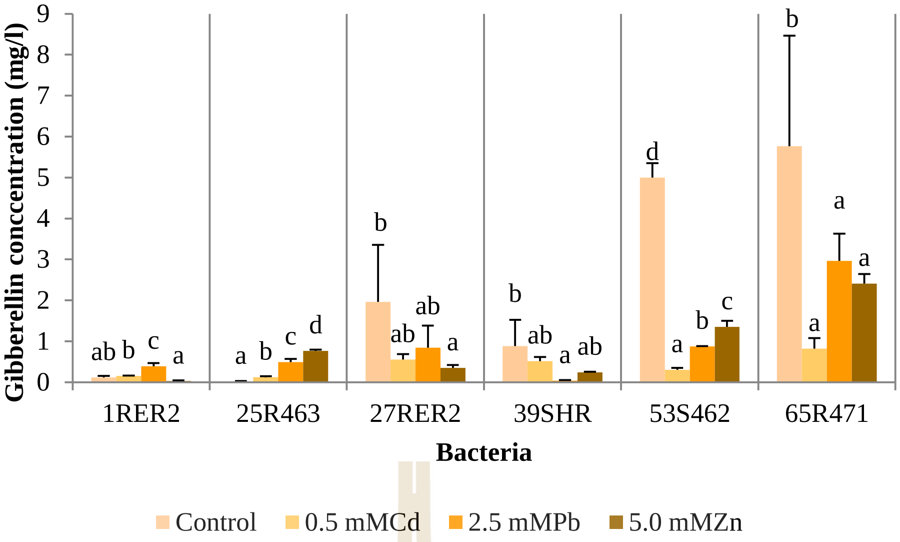
### 4.2.2 การผลิตฮอร์โมนพืช

ทำการทดสอบความสามารถของแบคทีเรียที่คัดเลือกทั้ง 6 ชนิด (1RER2, 25R463, 27RER2, 39SHR, 53S462, and 65R471) ในการสร้างฮอร์โมนพืช คือ IAA และ gibberellin (GA)

โดยนำไปเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด SMM เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ที่ผสมโลหะหนัก 0.5 mM Cd, 2.5 mM Pb หรือ 5.0 mM Zn. ผลการทดลองพบว่า ในภาวะปกติ ที่อาหารเลี้ยงเชื้อไม่มีโลหะหนัก isolate ของแบคทีเรียที่ผลิต GA ได้สูงสุดทัดเทียมกันคือ 53S462 และ 65R471 ซึ่งผลิตได้สูงถึง 4.99±0.35 และ 5.76±2.69 mg/l ตามลำดับ (รูปที่ 4.7) ในสภาวะที่มีโลหะหนัก ผลการสร้าง GA มีแนวโน้มลดลงเกือบทุก isolates ยกเว้น 1RER2 ที่แคดเมียมและสังกะสีไม่มีผลกระทบต่อการสร้าง GA และ 25R463 ที่สามารถสร้าง GA ได้เพิ่มขึ้นภายใต้สภาวะที่มีแคดเมียม ตะกั่ว และ สังกะสี ($p < 0.05$) อย่างไรก็ตาม 53S462 and 65R471 ที่ผลิต GA ในภาวะปกติที่ไม่มีโลหะหนักได้สูงสุด ก็ยังคงสามารถสร้าง GA ในสภาวะที่มีโลหะหนักทั้ง 3 ชนิดได้ แม้ปริมาณ GA ที่ผลิตจะลดลงมากก็ตาม แต่ก็ยังถือว่าสามารถผลิต GA ได้สูงกว่า isolate อื่น ภายใต้สภาวะของความเครียดของโลหะหนัก (รูปที่ 4.7-4.8)

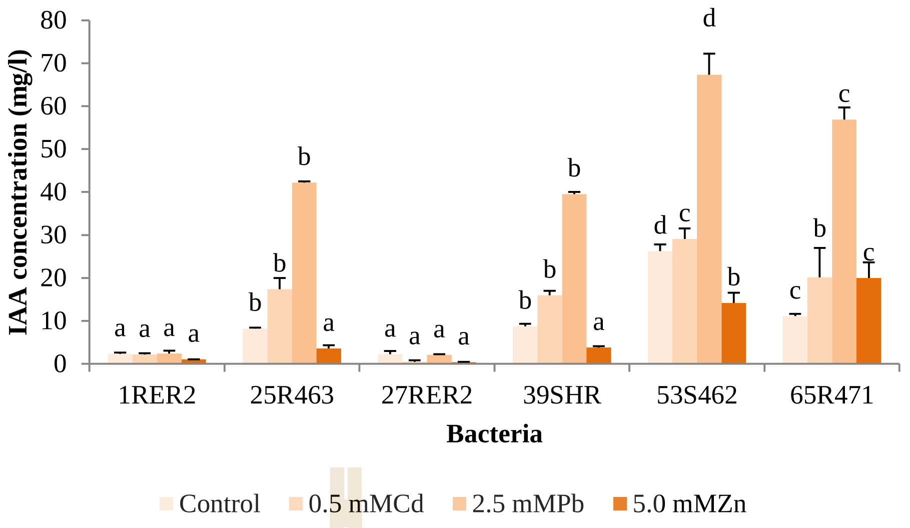



**รูปที่ 4.7** ความสามารถของแบคทีเรียในการสร้าง gibberellin ภายใต้สภาวะที่ผสมโลหะหนัก โดยกราฟแท่งที่ไม่มีโลหะหนัก หรือมีโลหะหนักแต่ละชนิดที่มีอักษรต่างกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$)

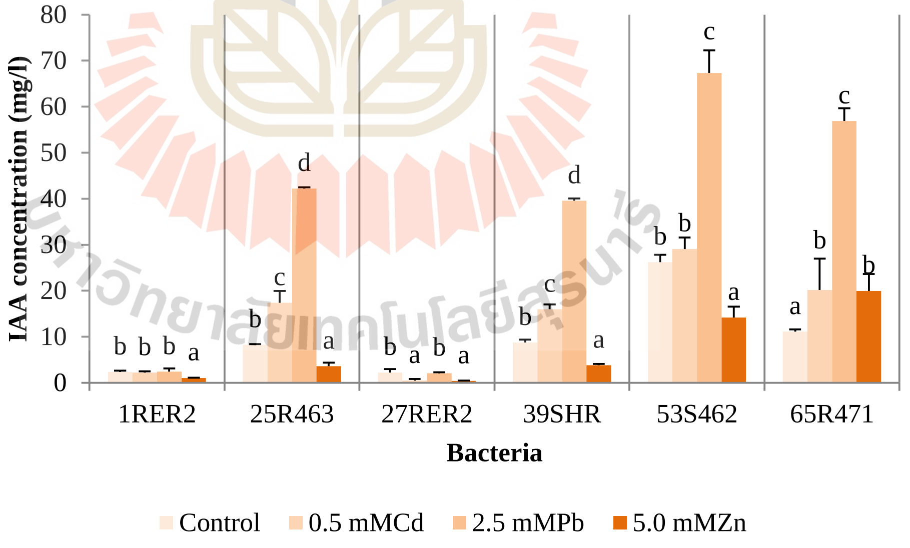



**รูปที่ 4.8** ความสามารถของแบคทีเรียในการสร้าง gibberellin ภายใต้สภาวะที่ผสมโลหะหนัก โดยกราฟแท่งของแต่ละ isolate ของแบคทีเรียที่มีอักษรต่างกันมีค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$)

การศึกษาปริมาณของ IAA ของแบคทีเรียที่คัดเลือกในสภาวะที่มี หรือ ไม่มี มี 500 µg/ml L-tryptophan พบว่า ในสภาวะที่มี L-tryptophan แบคทีเรียสามารถสร้าง IAA ได้สูงกว่าเมื่อไม่มี L-tryptophan ซึ่งเป็นไปตามความคาดหมาย แต่แม้ในสภาวะที่ไม่มี L-tryptophan แบคทีเรียที่คัดเลือกไว้ทั้ง 6 isolates ก็ยังสามารถสร้าง IAA ได้ แต่ในปริมาณที่น้อยกว่าเมื่อมี L-trytophan หลายเท่าตัว (รูปที่ 4.9 และ 4.11) ในสภาวะที่มี L-trytophan isolate ของแบคทีเรียที่มีความสามารถสร้าง IAA สูงสุดทั้งในสภาวะปกติที่ไม่มี หรือ มีโลหะหนักเรียงลำดับจากมากสุดไปน้อยสุดคือ 53S462 > 65E471 > 39SHR, 25R463 > 27RER2, 1RER2 (รูปที่ 4.9) ส่วนในภาวะที่ไม่มี L-tryptophan isolate 53S462 ก็ยังคงความสามารถสูงสุดในการสร้าง IAA ทั้งในภาวะที่ไม่มี หรือ มีโลหะหนักอยู่เช่นเดิม (รูปที่ 4.11) แต่เมื่อไม่มี L-tryptophan isolate ที่เหลือเกือบทั้งหมดไม่ค่อยมีความแตกต่างในการสร้าง IAA ไม่ว่าจะมี หรือ ไม่มีโลหะหนัก ยกเว้น isolate 65R471 ที่สามารถสร้าง IAA ได้สูงเป็นอันดับสอง รองจาก 53S462 ภายใต้ภาวะที่มีสังกะสี (รูปที่ 4.11) นอกจากนั้น ข้อมูลในรูปที่ 4.10 ชี้แนะว่า ในสภาวะที่มี L-tryptophan แบคทีเรียที่คัดเลือกส่วนใหญ่สร้าง IAA ได้เพิ่มขึ้นภายใต้ภาวะที่มีโลหะหนัก โดยเฉพาะ isolates 53S462, 65R471, 39SHR และ 25R463 ที่เพิ่มการสร้าง IAA เมื่ออาหารเลี้ยงเชื้อผสมตะกั่ว และแคดเมียม (ยกเว้น 53S462 ที่ไม่มีการสร้างเพิ่มขึ้นเมื่อมีแคดเมียม) (รูปที่ 4.10) แต่ในทางตรงกันข้าม ในภาวะที่ไม่มี L-tryptophan การสร้าง IAA ของ isolate ส่วนใหญ่มีค่าไม่เปลี่ยนแปลง หรือ ลดลงเมื่อมีโลหะหนักผสมในอาหาร (รูปที่ 4.12)

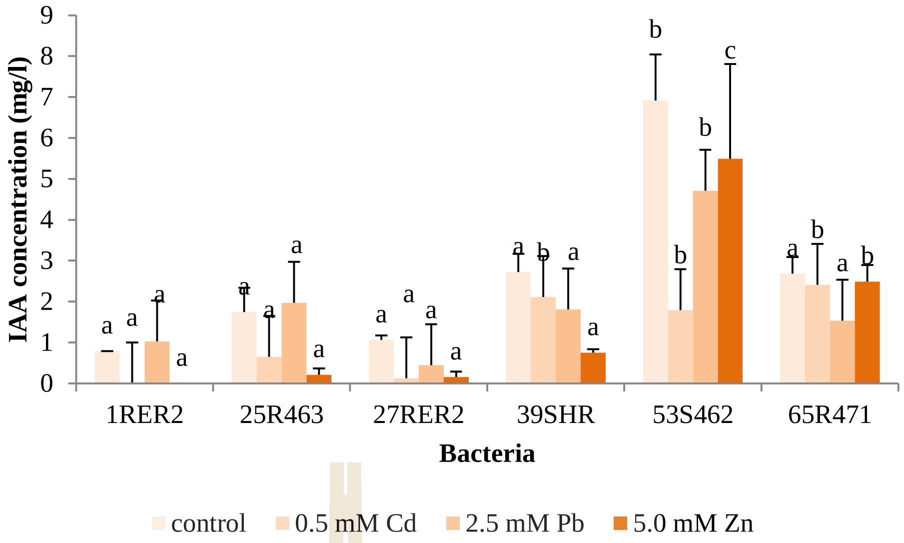



**รูปที่ 4.9** ความสามารถของแบคทีเรียในการสร้าง IAA ภายใต้สภาวะที่ผสมโลหะหนัก และผสม L-tryptophan โดยกราฟแท่งของ isolate ที่ไม่มี หรือ มีโลหะหนักชนิดเดียวกันที่มีอักษรต่างกันมีค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$)

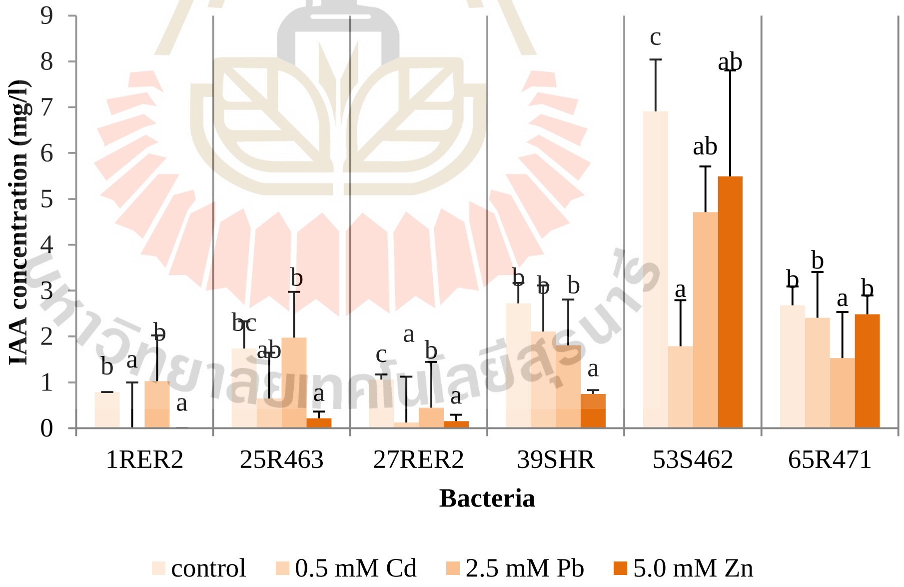



**รูปที่ 4.10** ความสามารถของแบคทีเรียในการสร้าง IAA ภายใต้สภาวะที่ผสมโลหะหนัก และผสม L-tryptophan โดยกราฟแท่งของแต่ละ isolate ของแบคทีเรียที่มีอักษรต่างกันมีค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$)

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี




**รูปที่ 4.11** ความสามารถของแบคทีเรียในการสร้าง IAA ภายใต้สภาวะที่ผสมโลหะหนัก และไม่ผสม L-tryptophan โดยกราฟแท่งของ isolate ที่ไม่มี หรือ มีโลหะหนักชนิดเดียวกันที่มีอักษรต่างกันมีค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$)

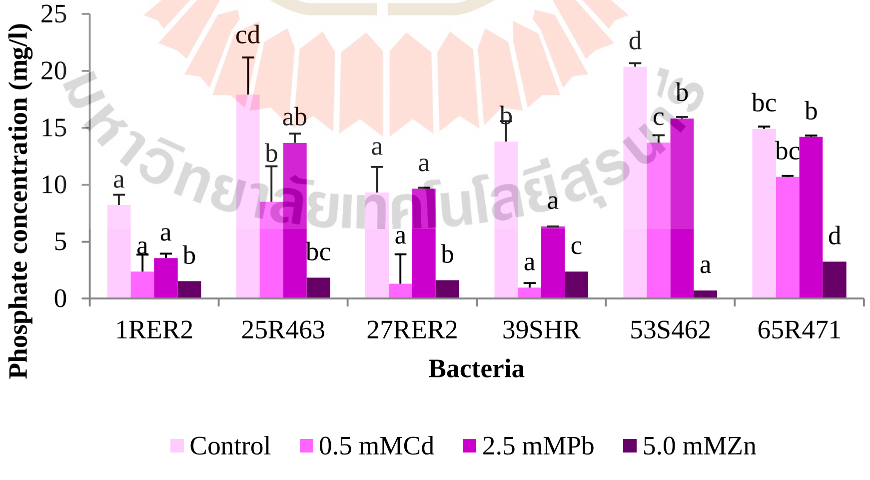



**รูปที่ 4.12** ความสามารถของแบคทีเรียในการสร้าง IAA ภายใต้สภาวะที่ผสมโลหะหนัก และไม่ผสม L-tryptophan โดยกราฟแท่งของแต่ละ isolate ของแบคทีเรียที่มีอักษรต่างกันมีค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$)

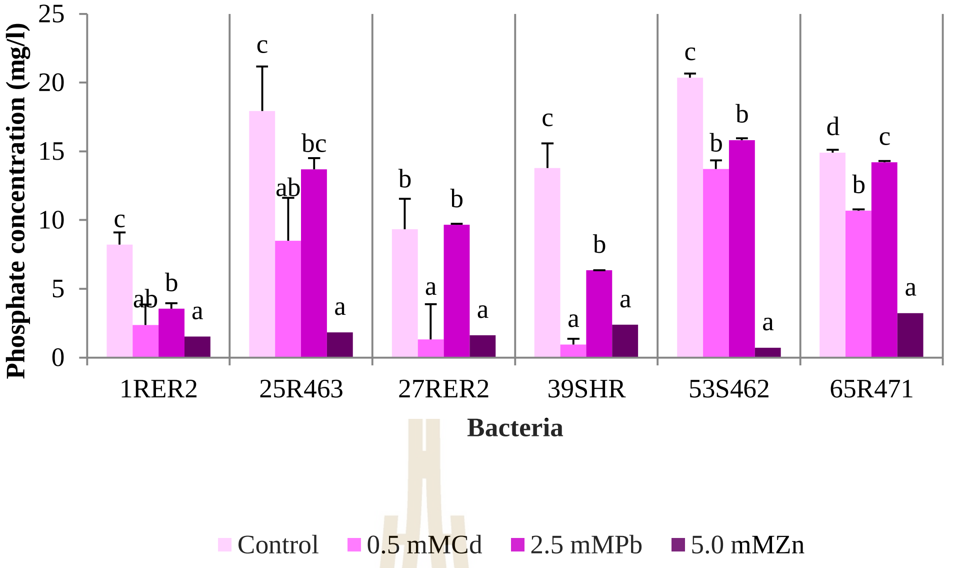
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

### 4.2.3 ความสามารถในการละลายฟอสเฟต

การหาศึกษาความสามารถของแบคทีเรียที่คัดเลือกในการละลายฟอสเฟส กระทำโดยการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกทั้ง 6 ชนิด (1RER2, 25R463, 27RER2, 39SHR, 53S462 และ 65R471) บนอาหารเลี้ยงเชื้อ NBRIP ที่ผสม 0.5 mM $CdCl_2$, 2.5 mM $Pb(NO)_3$ หรือ 5 mM $ZnSO_2.7H_2O$ หรือไม่ผสมโลหะหนักในกลุ่มควบคุม (รูปที่ 4.13) ผลการตรวจสอบปริมาณฟอสเฟตที่หลั่งสู่อาหารเลี้ยงเชื้อ สืบเนื่องจากความสามารถของแบคทีเรียในการละลาย tri-calcium phosphate พบว่าทุก isolates ของแบคทีเรียมีศักยภาพในการละลายฟอสเฟต แต่มากน้อยต่างกัน เมื่อไม่มีโลหะหนัก แบคทีเรีย isolates 25R463, 53S462 มีความสามารถละลายฟอสเฟตได้ทัดเทียมกัน และมากกว่า isolate อื่น โดย isolate 25R463 มีศักยภาพใกล้เคียงกับ 65R471 ด้วย (รูปที่ 4.13) ในสภาวะที่ผสมด้วยแคดเมียม และ ตะกั่ว isolates 53S462 และ 65R471 สามารถละลายฟอสเฟตได้ทัดเทียมกัน และสูงกว่า isolate อื่น ในขณะที่เมื่อมีสังกะสี 65R471 มีประสิทธิภาพสูงสุดในการละลายฟอสเฟต อย่างไรก็ตาม ในสภาวะที่มีความเครียดของโลหะหนัก ความสามารถในการละลายฟอสเฟตของแบคทีเรียทุก isolates มีค่าลดลงจากสภาวะปกติ ที่ไม่มีโลหะหนัก ยกเว้น isolates 25R463 และ27RER2 ที่ตะกั่วไม่มีผลต่อความสามารถดั้งเดิมในการละลาย phosphate ของแบคทีเรีย (รูปที่ 4.14) อนึ่ง ความแตกต่างในการละลายฟอสเฟตของแบคทีเรียไม่ได้ขึ้นกับค่า pH ของอาหาร ไม่ว่าจะมี (รูปที่ 4.15 A) หรือ ไม่มีโลหะหนัก (รูปที่ 4.15 B-D ) โดยค่า pH ของอาหารที่ inoculate ด้วยแต่ละ isolate มีค่าค่อนข้างใกล้เคียงกันคือประมาณ 5-6 (รูปที่ 4.15)

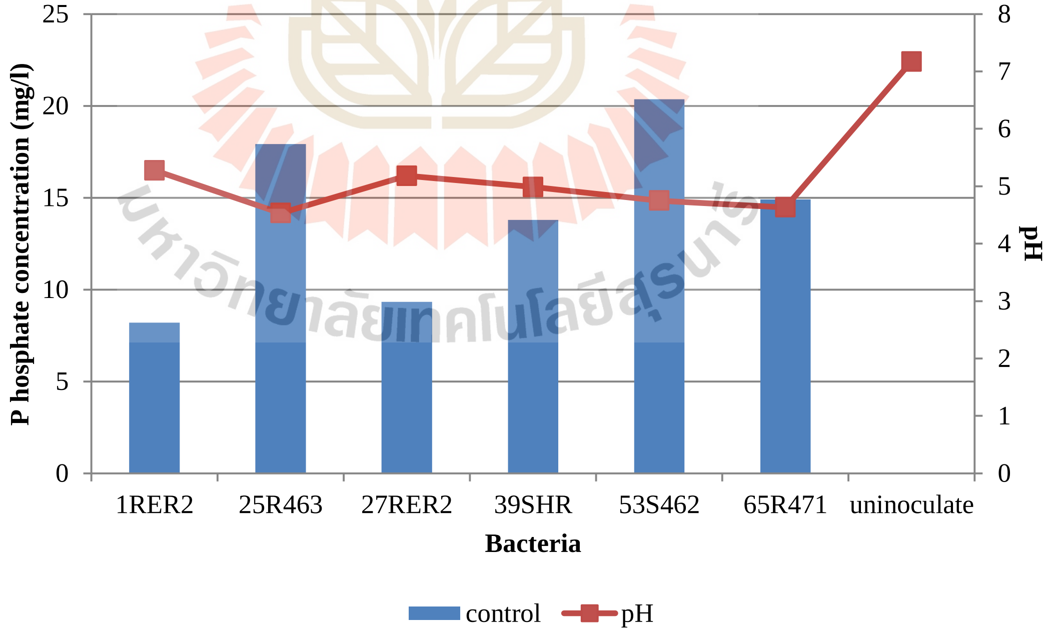



**รูปที่ 4.13** ความสามารถของแบคทีเรียในการละลายฟอสเฟตภายใต้สภาวะที่ผสมโลหะหนัก กราฟแท่งที่ไม่มีโลหะหนัก หรือ ที่มีโลหะหนักชนิดเดียวกันที่มีอักษรต่างกัน มีค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$)



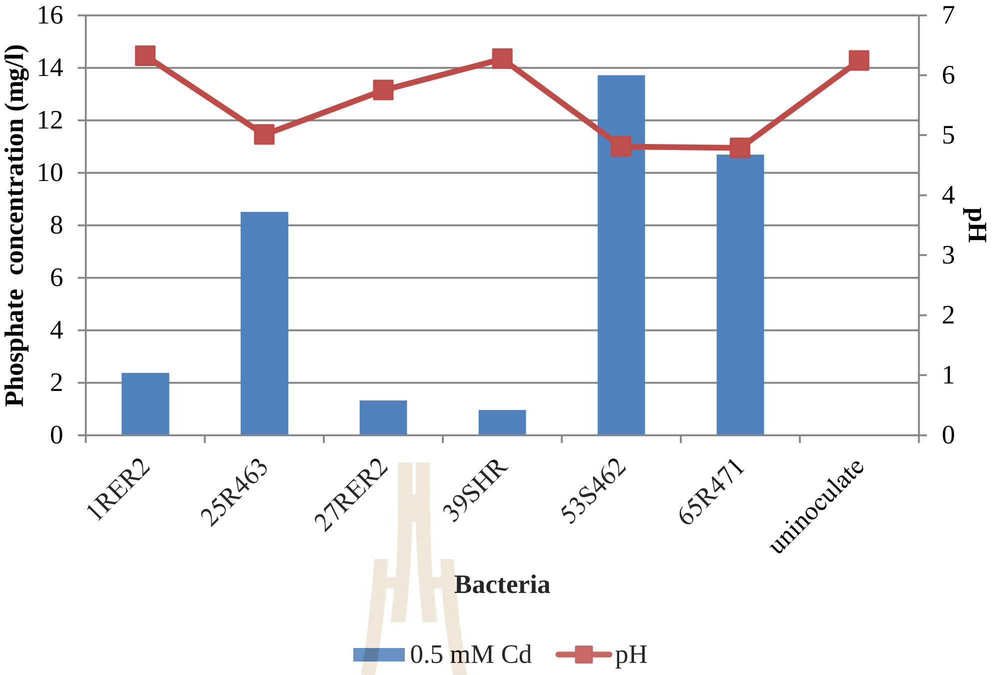

**รูปที่ 4.14** ความสามารถของแบคทีเรียในการละลายฟอสเฟตภายใต้สภาวะที่ผสมโลหะหนัก โดยกราฟแท่งของแต่ละ isolate ของแบคทีเรียที่มีอักษรต่างกันมีค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$)

(A)

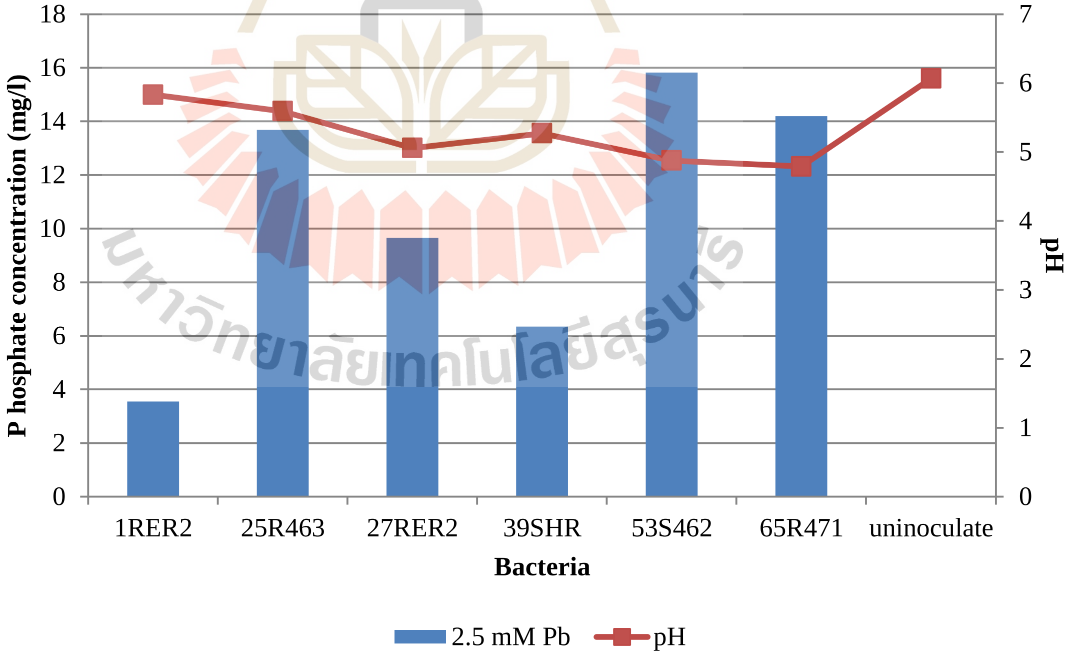



มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

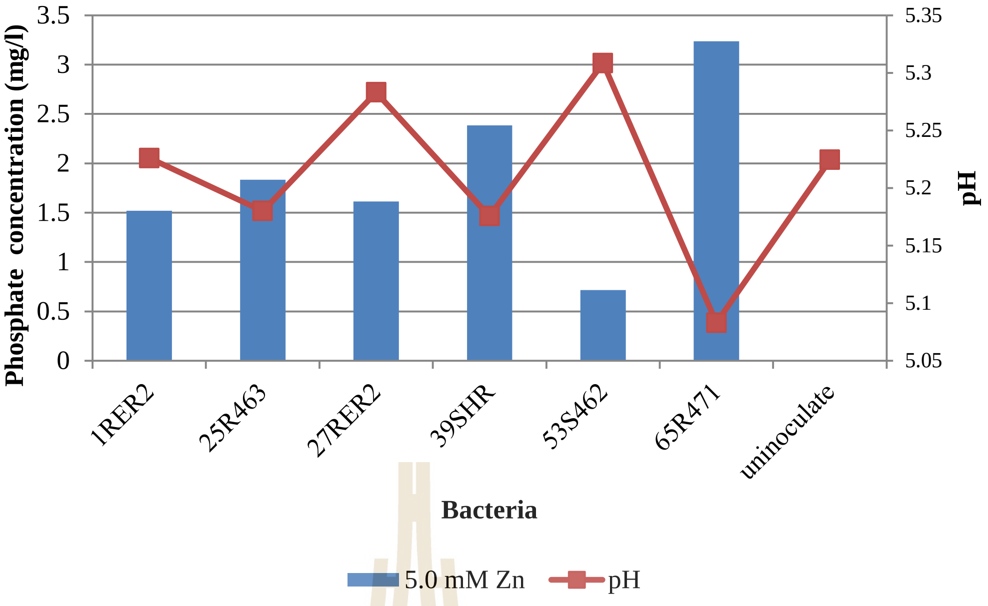
(B)


16
14
12
10
8
6
4
2
0
Phosphate concentration (mg/l)
7
6
5
4
3
2
1
0
pH
1RER2
25R463
27RER2
39SHR
53S462
65R471
uninoculate
Bacteria
0.5 mM Cd
pH

(C)


18
16
14
12
10
8
6
4
2
0
P hosphate concentration (mg/l)
7
6
5
4
3
2
1
0
pH
1RER2
25R463
27RER2
39SHR
53S462
65R471
uninoculate
Bacteria
2.5 mM Pb
pH

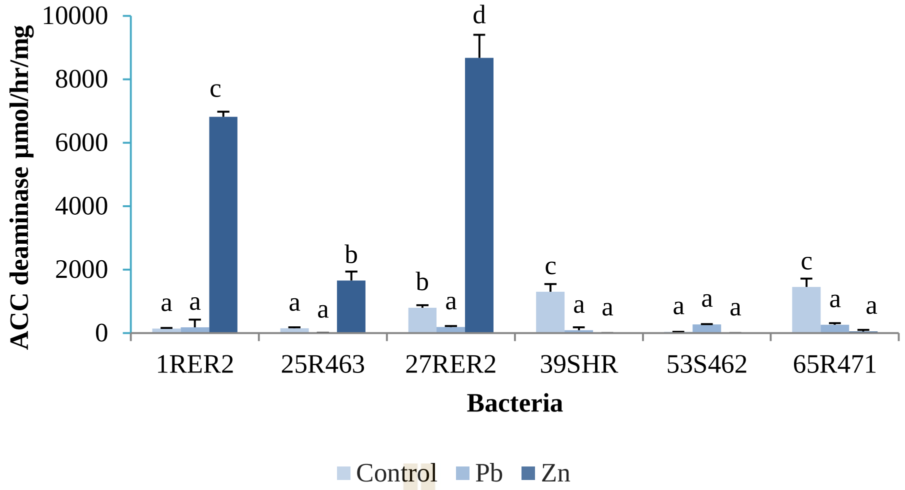
(D)



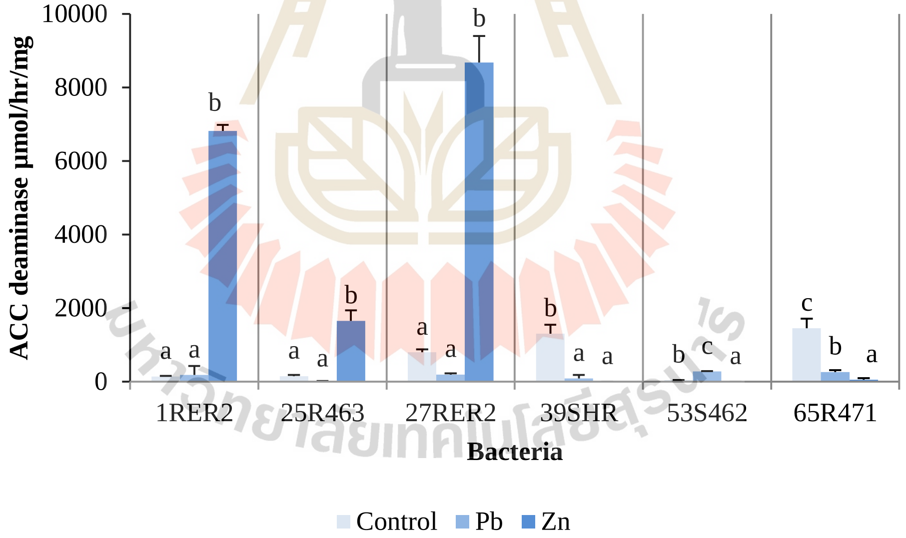

**รูปที่ 4.15** ความสัมพันธ์ระหว่างฟอสเฟตและความเป็นกรด-ด่าง ในสภาวะที่ผสมโลหะหนักต่างๆ (A) ควบคุม (B) แคดเมียม (C) ตะกั่ว และ (D) สังกะสี

### 4.2.4 การผลิต ACC deaminase

การศึกษากิจกรรมของ ACC deaminase (Penrose and Glick, 2003) กระทำโดยหาปริมาณ $\alpha$ –ketobutyrate ภายใต้สภาวะการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร ผลการศึกษา (รูปที่ 4.16) พบว่าแบคทีเรียทั้งหมดสามารถสร้าง ACC deaminase ได้ในสภาวะที่ไม่มีโลหะหนัก และในสภาวะที่มีโลหะหนัก แบคทีเรียทั้งหมดยังคงสามารถสร้าง ACC deaminase ได้ ยกเว้นในสภาวะที่ผสมแคดเมียม ที่ไม่มี isolate ใดสามารถใช้ ACC เป็นแหล่งกำเนิดของ nitrogen (ไม่ได้แสดงในกราฟ) ในสภาวะที่ผสมสังกะสี (รูปที่ 4.16) พบว่า แบคทีเรียมีความสามารถในการสร้าง ACC deaminase เรียงลำดับจากมากไปน้อยดังนี้คือ 27RER2 > 1RER2 > 25R463 > 65R471, 53S462, และ 39SHR ซึ่งมีค่าของ ACC deaminase ประมาณ 8,671, 6,812, 1,651 และประมาณ 52 μmol/hr/mg ตามลำดับ ในสภาวะที่ผสมตะกั่ว isolate ของแบคทีเรียที่คัดเลือกไว้ทั้งหมดไม่มีความแตกต่างของการสร้าง ACC deaminase (รูปที่ 4.16)รูปที่ 4.17 แสดงชัดว่า isolates 39SHR และ 65R471 มีความสามารถสร้าง ACC deaminase ได้ลดลง เมื่อมีตะกั่วและสังกะสี แต่ isolate 1RER2, 25R463, และ 27RER2 มีความสามารถสร้าง ACC deaminase ได้สูงขึ้นภายใต้สภาวะของสังกะสี ในขณะที่ตะกั่วไม่มีผลกระทบต่อการสร้างแต่อย่างใด (รูปที่ 4.17)




**รูปที่ 4.16** ความสามารถของแบคทีเรียในสร้าง ACC deaminase ภายใต้สภาวะที่ผสมโลหะหนัก กราฟแท่งที่ไม่มีโลหะหนัก หรือ ที่มีโลหะหนักชนิดเดียวกันที่มีอักษรต่างกัน มีค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$)




**รูปที่ 4.17** ความสามารถของแบคทีเรียในสร้าง ACC deaminase ภายใต้สภาวะที่ผสมโลหะหนัก โดยกราฟแท่งของแต่ละ isolate ของแบคทีเรียที่มีอักษรต่างกันมีค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$)

## 4.3 การคัดเลือก PGPR ที่สามารถทนต่อความเป็นพิษของแคดเมียม ตะกั่ว และสังกะสีสูงและระบุชนิด PGPR ที่คัดเลือก

### 4.3.1 การทดสอบความทนทานต่อโลหะหนัก

จากการศึกษาความสามารถของแบคทีเรียที่คัดเลือก ทั้ง 6 ชนิด คือ 1RER2 25R463 27RER2 39SHR 53S462 และ 65R471 ในการทนต่อโลหะหนักทั้ง 3 ชนิด คือ แคดเมียม ตะกั่ว และสังกะสี และรายงานผลเป็นค่าความเข้มข้นต่ำสุดของโลหะหนักที่สามารถยับยั้งการเจริญ (minimum inhibitory concentration; MIC) พบว่าแบคทีเรียทั้ง 6 ชนิด มีความสามารถในการทนต่อพิษของแคดเมียมน้อยสุด รองลงมาคือ ตะกั่ว และสามารถทนต่อสังกะสีได้มากที่สุด ดังมีค่า MIC สำหรับแคดเมียม ตะกั่ว และสังกะสีอยู่ที่ช่วง 0.5-3.5, 3-9 และ 5-10 mM ตามลำดับ (ตารางที่ 4.2) โดย isolate 65R471 มีความสามารถสูงสุดในการทนต่อแคดเมียม (MIC = 3.5 mM) isolate 25R463 และ 27RER2 สามารถทนต่อตะกั่วได้สูงที่สุด (MIC = 9 mM) ในขณะที่ 1RER2, 27RER2, 39SHR และ 53S462 สามารถทนต่อสังกะสีได้สูงสุดและทัดเทียมกันถึง 10 mM (ตารางที่ 4.2)

**ตารางที่ 4.2** ความสามารถของแบคทีเรียในการทนต่อพิษของโลหะหนัก

| Bacteria | MIC (mM) | | |
|---|---|---|---|
| | Cd | Pb | Zn |
| 1RER2 | 1 | 3 | 10 |
| 25R463 | 3 | 9 | 5 |
| 27RER2 | 0.5 | 9 | 10 |
| 39SHR | 0.5 | 3 | 10 |
| 53S462 | 1 | 5 | 10 |
| 65R471 | 3.5 | 7 | 5 |

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

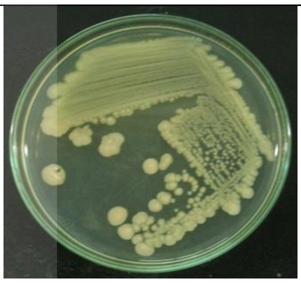
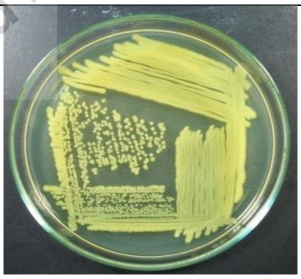
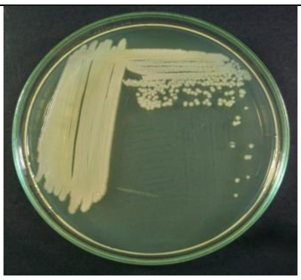
### 4.3.2 การระบุชนิดของแบคทีเรียที่คัดเลือก

การระบุชนิดของแบคทีเรีย PGPR ที่คัดเลือกไว้ 6 ชนิด นอกจากการพิสูจน์ทางสัณฐานวิทยาแล้ว งานวิจัยนี้ได้มีการทดสอบทางพันธุกรรม โดยใช้ 16S rDNA ร่วมด้วย โดยเริ่มต้น ดูจากขนาดของ 16S rDNA ของผลลัพท์ที่ได้จากปฏิกริยา PCR (16S rDNA PCR amplification product) และยืนยันด้วยการหาลำดับเบส (sequence) ของ PCR amplicon (gene product ที่ได้จากปฏิกริยา PCR) ตามด้วยการทำ 16S rDNA sequence analysis โดยใช้ฐานข้อมูล GeneBank (GeneBank database) เพื่อหาชนิดแบคทีเรียที่มีความสอดคล้อง (homology) ใกล้เคียงที่สุดกับ 16S rDNA sequence ที่ได้

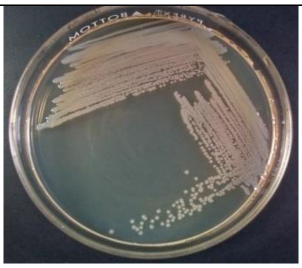
ผลการศึกษาลักษณะรูปร่างและลักษณะทางกายภาพของแบคทีเรีย ทั้ง 6 ชนิด พบว่าแบคทีเรียทั้ง 6 ชนิดเป็นแบคทีเรียแกรมลบ มีลักษณะเป็นแท่งทรงกระบอก ไม่มีการสร้างสปอร์ ไม่มีการเคลื่อนที่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ และมีการสร้าง catalase และสร้าง oxidase (ยกเว้น 27RER2 และ 39SHR ที่ไม่สร้าง oxidase) 25R463 เป็นเพียง isolate เดียวที่สามารถสร้างเอนไซม์ tryptophanase และสลาย tryptophan เกิด indole ได้ 1RER2 และ 53S462 เป็น oxidative ในขณะที่ isolate อื่นเป็น fermentative ในการ metablize glucose ใน O-F test นอกจากนั้น เกือบทุก isolates สามารถ reduce nitrate ได้ มีเพียง 27RER2 และ 39SHR ที่ไม่สามารถสร้างเอนไซม์ nitrate reductase (ตารางที่ 4.3 และตารางที่ 4.4)

ขนาดของ 16S rDNA ของ PCR amplification product ของ PGPR ทั้ง 6 isolates แสดงในรูปที่ 4.18 ซึ่งแสดงว่า 16S rDNA PCR product ที่ได้ของทั้ง 6 isolates มีค่าใกล้เคียงกัน คือ อยู่ที่ประมาณ 1,500 bp ส่วนผลการหาระดับการเรียงตัวของลำดับเบส (sequence) ของยีน และ ผลจากการวิเคราะห์เทียบกับฐานข้อมูล GeneBank พบว่าทั้ง 6 isolates 1RER2, 25R463, 27RER2, 39SHR, 53S462, and 65R471 มีความสอดคล้องหรือใกล้เคียงกับ *Arthrobacter* sp, *Aeromonas* sp, *Arthrobacter* sp, *Microbacterium* sp, *Pseudomonas* sp และ *Pseudomonas* sp ตามลำดับมากที่สุด โดยบางส่วนของลำดับของ 16S rDNA ของ 1RER2 (1456 bp) มีความสอดคล้องร้อยละ 95 กับ *Arthrobacter* sp EH66, 25R463 (1716 bp) มีความสอดคล้องร้อยละ 99 กับ *Aeromonas* sp CECT7082, 27RER2 (1578 bp) มีความสอดคล้องร้อยละ 97 กับ *Arthrobacter* sp MTR44, 39SHR (1422bp) มีความสอดคล้องร้อยละ 98 กับ *Microbacterium paraoxydans* strain M2, 53S462 (1722 bp) มีความสอดคล้องร้อยละ 98 กับ *Pseudomonas* sp. GBA738, และ 65R471 (1714 bp) มีความสอดคล้องร้อยละ 99 กับ *Pseudomonas* sp.J3121 (ตารางที่ 4.5)

**ตารางที่ 4.3** สัณฐานวิทยาของแบคทีเรียแต่ละ isolate ที่คัดเลือก

| Isolate | รูปร่างเซลล์ | ย้อมติดสีแกรม | รูปร่างและลักษณะของโคโลนีบนอาหารแข็ง TSA | |
|---|---|---|---|---|
| 1RER2 | Rod | Positive | White, Circular, Entire, Smooth, Convex | |
| 25R463 | Rod | Negative | White , Circular, Entire, Smooth, Umbonate |  |
| 27RER2 | Rod | Positive | White, Circular, Entire, Smooth, Convex | |
| 39SHR | Rod | Positive | Yellow, Circular, Entire, Smooth, Convex |  |
| 53S462 | Rod | Negative | White, Circular, Entire, Smooth, Umbonate |  |

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

| Isolate | รูปร่างเซลล์ | ย้อมติดสีแกรม | รูปร่างและลักษณะของโคโลนีบนอาหารแข็ง TSA | |
|---|---|---|---|---|
| 65R471 | Rod | Negative | White, Circular, Entire, Smooth, Convex |  |

**ตารางที่ 4.4 แสดง**ผลการทดสอบลักษณะทางชีวเคมีของ PGPR ที่คัดเลือก

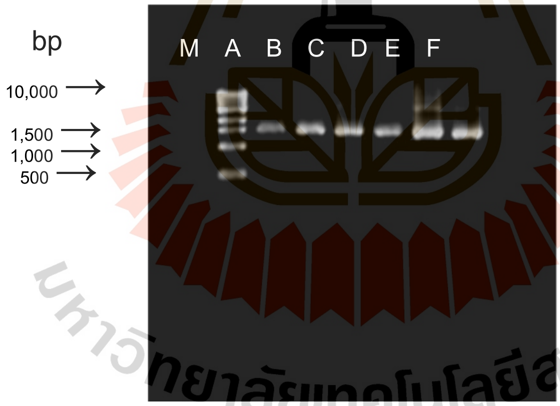
| Characteristics | 1RER2 | 25R463 | 27RER2 | 39SHR | 53S462 | 65R471 |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Catalase | + | + | + | + | + | + |
| Oxidase | + | + | - | - | + | + |
| TSI | NC/K $H_2S$-,g- | A/K $H_2S$-,g+ | A/A $H_2S$-,g- | NC/K $H_2S$-,g- | K/K $H_2S$-,g- | K/K $H_2S$-,g- |
| Lysine | Purple(+) | Yellow(-) | Purple(+) | Purple(+) | Purple(+) | Purple(+) |
| Simmon's Citrate | Green(-) | Blue(+) | Green(-) | Green(-) | Blue(+) | Blue(+) |
| Motile in media | - | - | - | - | - | - |
| Indole | Yellow (-) | Pink(+) | Yellow(-) | Yellow(-) | Yellow(-) | Yellow(-) |
| MR-VP | -/- | -/+ | +/+ | -/- | -/- | -/- |

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ตารางที่ 4.4 (ต่อ)

| Characteristics | 1RER2 | 25R463 | 27RER2 | 39SHR | 53S462 | 65R471 |
|---|---|---|---|---|---|---|
| O-F test | Oxi | Fer | Fer | Fer | Oxi | NGF |
| LST (gas) | – | – | – | – | – | – |
| Nitrate reduction | Pink | Pink | Clear/ Pink | Clear/ Pink | Pink | Pink |

TSI (Triple Sugar Iron Agar): NC/K = no change slant/alkaline bottom, A/K = acid slant/alkaline bottom, K/K = alkaline slant/alkaline bottom, g = gas
MR-VP (Methyl Red-Voges Proskauer), O-F test (Oxidative-Fermentative test): Oxi = oxidative, Fer= fermentative, LST (Lauryl sulphate tryptose broth




**รูปที่ 4.18** ผลลัพธ์ของปฏิกริยา PCR (lane M = marker, A = 1RER2, B = 25R463, C =27RER2, D = 39SHR, E = 53S462 และ F = 65R471)

**ตารางที่ 4.5** การจำแนกชนิดของแบคทีเรีย

| Strain | Closest described relative | Accession No | bp | %Similarity |
|---|---|---|---|---|
| 1RER2 | *Arthrobacter* sp. EH66 | GU339291.1 | 1456 | 95 |
| 25R463 | *Aeromonas tacta* CECT7082 | HQ832416.1 | 1716 | 99 |
| 27RER2 | *Arthrobacter* sp MTR-44 | EU034524.1 | 1578 | 97 |
| 39SHR | *Microbacterium paraoxydans* strain M2 | EU714377 | 1422 | 98 |
| 53S462 | *Pseudomonas plecoglossicida* GBA738 | HM209783.1 | 1722 | 98 |
| 65R471 | *Pseudomonas putida J3121* | EF203210.1 | 1714 | 99 |

### 4.4 ผลการทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะของ PGPR ที่คัดเลือก

การทดสอบความไว (sensitivity) หรือดื้อ (resistance) ต่อยาปฏิชีวนะประเมินจากเส้นผ่าศูนย์กลางของวงใส (inhibition zone) รอบแผ่น disk ที่เคลือบยาปฏิชีวนะตามมาตรฐานของ NCCLS ผลการทดสอบพบว่า ทั้ง 6 isolates ของ PGPR ที่คัดเลือกดื้อต่อยาปฏิชีวนะ colistin sulphate ส่วน isolate 27RER2 มีความไวต่อยาปฏิชีวนะเกือบทั้งหมดที่ทดสอบ (ยกเว้น colistin sulphate) ในขณะที่ทั้ง isolates 53S462 และ 65R471 ดื้อต่อยาปฏิชีวนะที่ทดสอบเกือบทั้งหมด ยกเว้นมีค่าก้ำกึ่งอยู่ระหว่างความไวและการดื้อ (intermediate) ต่อ neomycin (ตารางที่ 4.6)

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

**ตารางที่ 4.6 การทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะของกลุ่ม PGPR แบคทีเรียที่คัดเลือก**

| ยาปฏิชีวนะ (AB) | ปริมาณ AB (µg) | เส้นผ่าศูนย์กลางของ inhibition zone (mm) ของแต่ละ isolate | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | 1RER2 | 25R463 | 27RER2 | 39SHR | 53S462 | 65R471 |
| Chloramphenicol | 30 | 47 (S) | 30(S) | 52 (S) | 21 (I) | 14 (R) | 10 (R) |
| Erythromycin | 15 | 48 (S) | 30(S) | 52 (S) | 45 (S) | NZ (R) | NZ (R) |
| Streptomycin | 10 | 22 (I) | 18 (I) | 28 (S) | 22 (I) | 12 (R) | 11 (R) |
| Neomycin | 30 | 21 (I) | NZ(R) | 27 (S) | 23 (I) | 18 (I) | 18 (I) |
| Colistin sulphate | 10 | 10 (R) | NZ(R) | NZ (R) | NZ (R) | 11 (R) | 7 (R) |
| Tetrycycline | 30 | 16 (I) | 18 (I) | 22 (I) | 10 (R) | NZ (R) | 7 (R) |

NZ = no clear zone, R = resistance, I = intermediate, and S = susceptibility.

## 4.5 ผลของ PGPR ที่คัดเลือกต่อการเจริญเติบโต และการดูดซับโลหะหนักของหญ้าแฝก

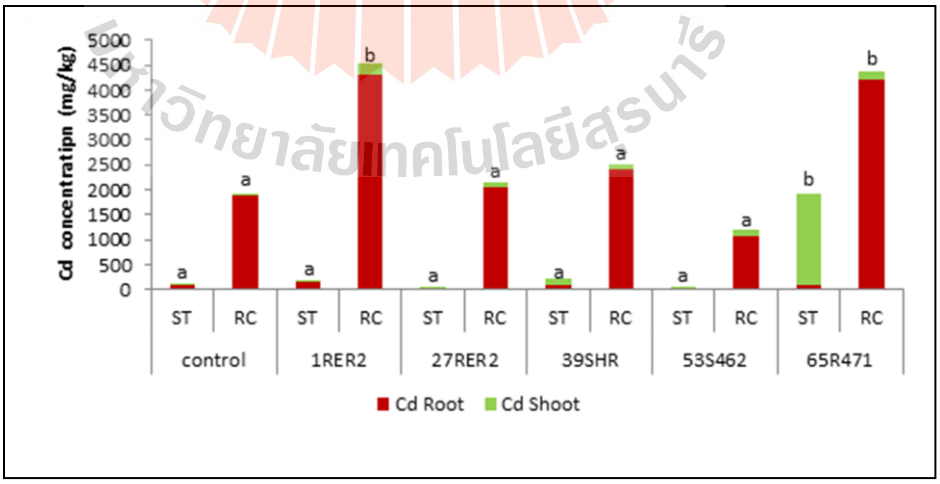
### 4.5.1 ผลของ PGPR ต่อการดูดซับโลหะหนักของหญ้าแฝกใน axenic culture

การตรวจสอบความสามารถของ PGPR ที่คัดเลือกทั้ง 6 isolates ในการส่งเสริมการเจริญและการดูดซับของโลหะหนักของพฤกษบำบัด กระทำการทดลองในหญ้าแฝก โดยเลือก ecotype สุราษฎร์ธานี (ST) เป็นตัวแทนของหญ้าแฝกลุ่ม (*V. zizanioides*) และ ecotype ราชบุรี (RC) เป็นตัวแทนของหญ้าแฝกดอน (*V. nemoralis*) ในเบื้องต้น เลือกใช้สภาวะการทดสอบเป็นแบบ axenic culture ผลการทดลองพบว่าแฝกลุ่ม (ST) สามารถสะสมแคดเมียม ตะกั่ว และสังกะสีไว้ที่ส่วนรากได้สูงกว่าส่วนยอด และการได้รับแบคทีเรีย PGPR ไม่ค่อยมีอิทธิพลต่อลักษณะของการสะสมโละหนักทั้ง 3 ชนิดว่าอยู่ที่ส่วนราก หรือ ส่วนยอดมากกว่ากัน (รูปที่ 4.19 A-C) หญ้าแฝกลุ่มสามารถสะสมแคดเมียมได้ต่ำกว่าหญ้าแฝกดอน การ inoculate isolate 65R471 สามารถเพิ่มการสะสมแคดเมียมในหญ้าแฝกลุ่มให้สูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) โดยเปลี่ยนการสะสมจากส่วนรากไปสู่ยอด (รูปที่ 4.19 A) แต่อย่างไรก็ตาม การ inoculate PGPR ของ isolate ที่เหลือไม่ได้เพิ่มประสิทธิภาพของการสะสมแคดเมียม (รูปที่ 4.19 A) เช่นเดียวกันกับที่ทุก isolates ของ PGPR ไม่มีอิทธิพลต่อการสะสม

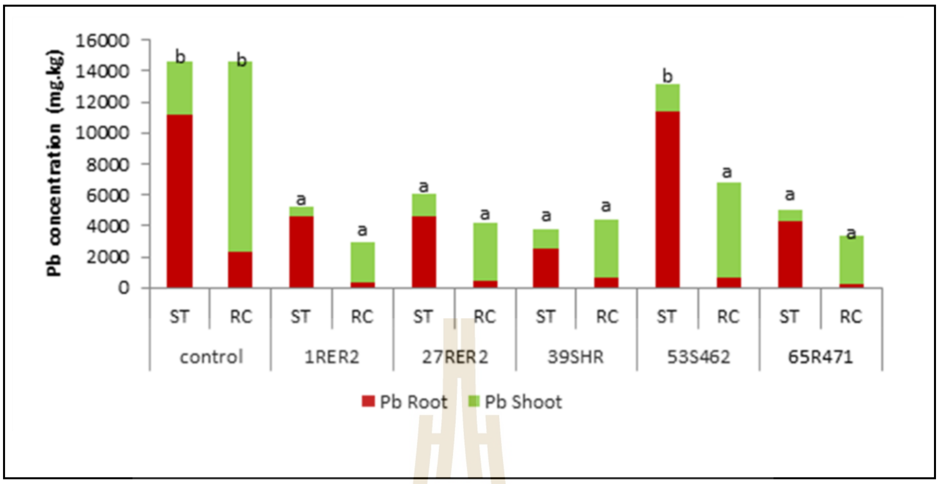
สังกะสีในหญ้าแฝกลุ่มแต่อย่างใด เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับแบคทีเรีย (รูปที่ 4.19 C) มีข้อน่าสังเกตว่า การ inoculate 65R471 ช่วยให้หญ้าแฝกลุ่มสามารถสะสมสังกะสีได้สูงกว่าการ inoculate ด้วย isolate อื่นที่เหลืออย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) (รูปที่ 4.19 C) สำหรับการสะสมตะกั่ว การ inoculate ด้วย PGPR ทุก isolates ที่คัดเลือกสามารถลดการสะสมตะกั่วได้อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับแบคทีเรีย ยกเว้นในกรณีของ 53S462 เพียง isolate เดียวที่ไม่พบการผลกระทบต่อการเปลี่ยนแปลงการสะสมของตะกั่วแต่อย่างใด (รูปที่ 4.19 B)

สำหรับแฝกดอน (RC) สามารถสะสมแคดเมียมที่รากได้สูงกว่าส่วนยอด .และสามารถสะสมตะกั่วและสังกะสีที่ส่วนยอดมากกว่าส่วนราก ไม่ว่าจะได้รับ หรือไม่ได้รับ PGPR แบคทีเรีย และเป็นลักษณะเช่นนี้ เหมือนกันหมดในทุก isolates ของแบคทีเรีย (รูปที่ 4.19 A-C) การ inoculate isolates 1RER2 และ 65R471 ช่วยส่งเสริมการสะสมแคดเมียมให้เพิ่มขึ้นกว่ากลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับแบคทีเรียอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) .ในขณะที่ isolates อื่นที่เหลือ ไม่ได้ช่วยส่งเสริมการสะสมของแคดเมียมแต่อย่างใด (รูปที่ 4.19 A) สำหรับการสะสมตะกั่ว พบว่าให้ผลที่คล้ายกับแฝกลุ่ม ที่แทบทุก isolates ของ PGPR ที่คัดเลือกสามารถลดการสะสมตะกั่วได้อย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ($p < 0.05$) (รูปที่ 4.19 B) ในทางตรงกันข้าม การ inoculate PGPR ทุก isolates ในแฝกดอนสามารถส่งเสริมการสะสมสังกะสีให้เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับแบคทีเรีย ($p < 0.05$) โดยเฉพาะ isolates 1RER2 และ 39SHR มีศักยภาพการสะสมสังกะสีต่อวัน (TAR) ได้สูงสุด (รูปที่ 4.19 C)

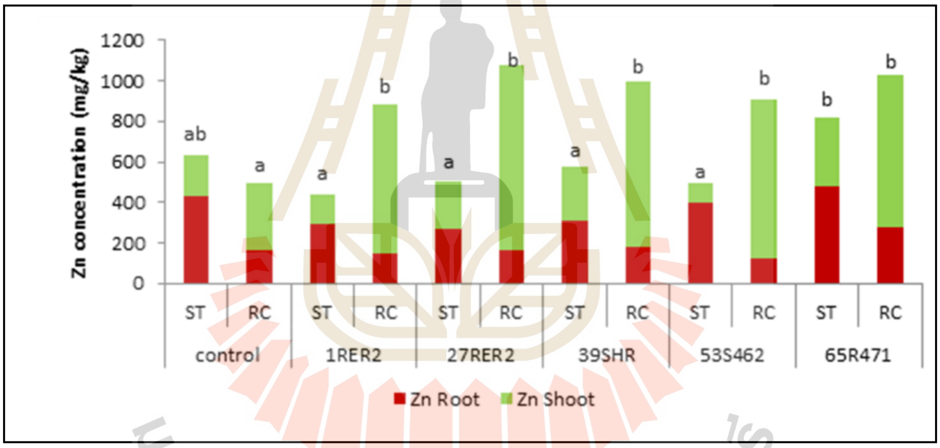
(A)



(B)




(C)



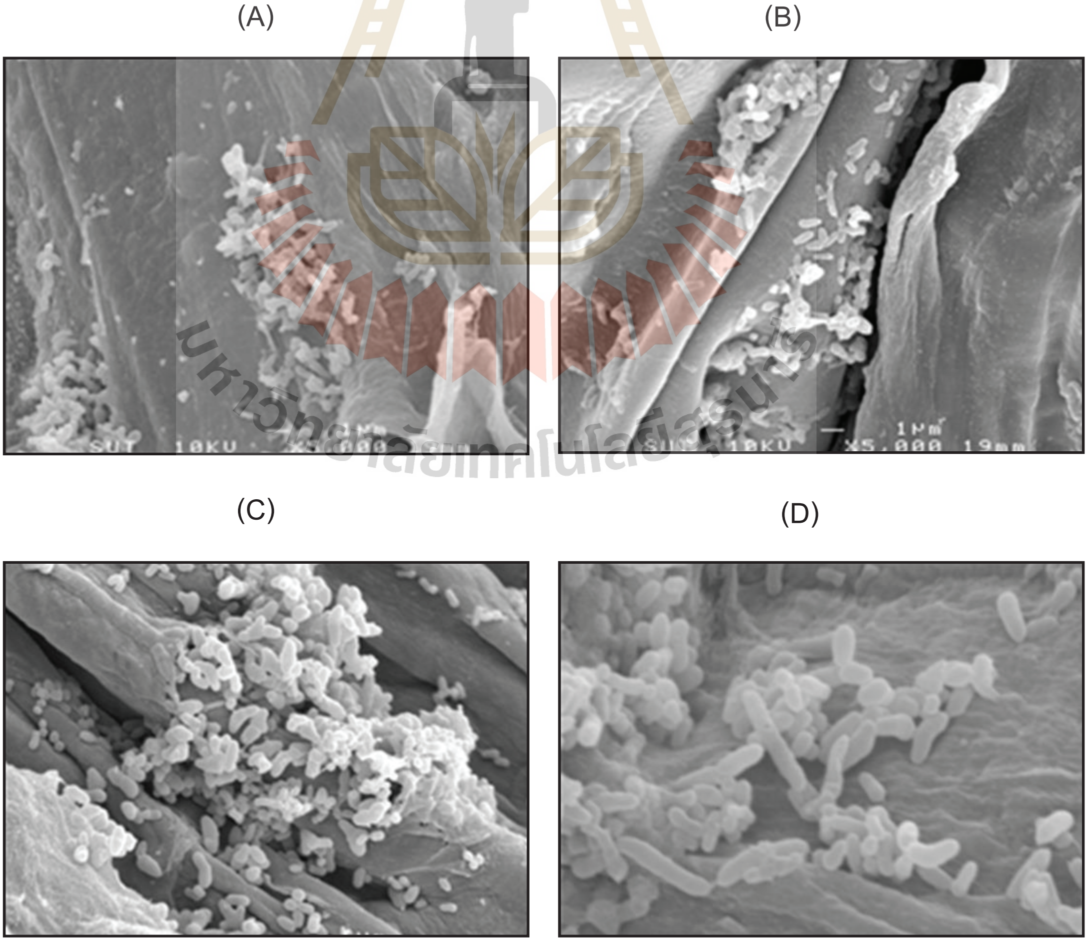

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

**รูปที่ 4.19** การสะสมโลหะหนักของแฝกลุ่ม (ST) และแฝกดอน (RT) ที่ไม่ได้รับ หรือ ได้รับ PGPR ที่คัดเลือก เมื่อเจริญในอาหารที่มีแคดเมียม (A) ตะกั่ว (B) และ สังกะสี (C) กราฟแท่งของecotype เดียวกันของหญ้าแฝกที่มีอักษรต่างกันมีค่าแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$)

### 4.5.2 การอยู่ร่วม (colonization) ของ PGPR ในหญ้าแฝก

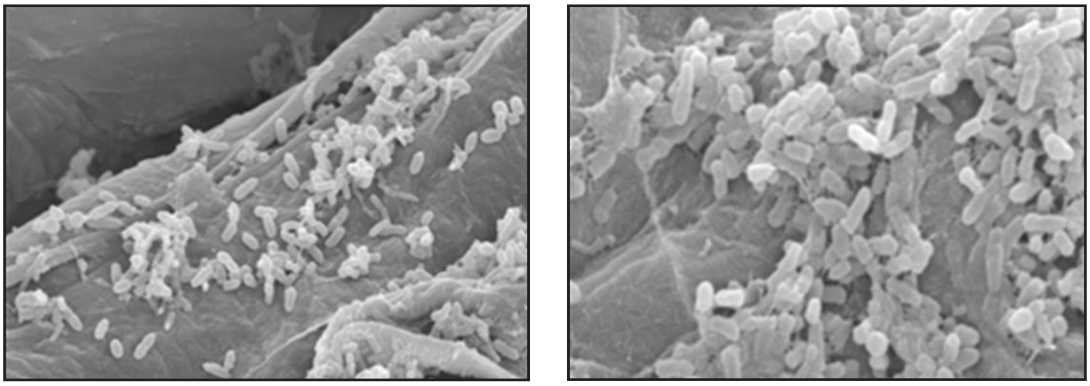
ภายหลังการ inoculate $1x10^8$ CFU/ml ของแต่ละ isolate ของ PGPR ที่หญ้าแฝก (*V. nemoralis*; ราชบุรี ecotype) เป็นเวลา 15 วัน การ colonization ของแบคทีเรียที่ส่วนราก ถูกตรวจสอบและรายงานเป็นค่า log ของจำนวนโคโลนีต่อกรัมน้ำหนักแห้งของราก (log colony

forming unit /gram dry weight; log CFU/g DW) และการเจริญของหญ้าแฝกประเมินด้วยปริมาณ chlorophyll a, chlorophyll b และ ปริมาณ chlorophyll รวม ของส่วนยอด ผลการทดลองในตารางที่ 4.7 แสดงว่า ทุก isolates ของ PGPR ที่คัดเลือก สามารถอยู่ร่วม หรือ colonize ที่รากของหญ้าแฝกได้ โดย isolates 53S462 และ 65R471 มีความสามารถทัดเทียมกันในการ colonize ที่รากของหญ้าแฝกสูงสุด ดังมีค่าของ log CFU/g DW อยู่ที่ 9.26 ± 0.16 และ 9.12 ± 0.25 ตามลำดับ ซึ่งสูงกว่า isolates อื่นอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) isolates อื่นที่เหลือมีค่า log CFU/g DW ใกล้เคียงกัน คือมีค่าตั้งแต่ 7.68-8.17 ซึ่งหมายความว่าสามารถตรวจพบ isolates 53S462 และ 65R471 มากกว่า isolates อื่นที่เหลือตั้งแต่ 10-100 เท่า (ตารางที่ 4.7) รูปที่ 4.20 แสดงรูปถ่ายของ PGPR แต่ละ isolate ที่ colonize ที่รากของหญ้าแฝก ที่ ถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็คตรอนแบบส่องกราด (scanning electron microscope) นอกจากนั้น ผลการทดลองในตารางที่ 4.7 ยังชี้ชัดว่า isolate 65R471 สามารถเร่งการเจริญของหญ้าแฝกได้ดีกว่า isolates อื่น เพราะทั้งปริมาณ chlorophyll รวม , chlorophyll a และ chlorophyll b ของส่วนยอดของหญ้าแฝกที่ inoculate ด้วย isolate นี้มีค่าสูงกว่าค่าที่พบใน isolates อื่นอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ทั้งนี้ ไม่พบความแตกต่างของการเจริญของส่วนยอดในหญ้าแฝกที่ inoculate ด้วย PGPR อีก 5 isolates ที่เหลือ




มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

(E) (F)



**รูปที่ 20** แสดงภาพถ่ายจากกล้องอิเล็คตรอนแบบส่องกราดของการอยู่ร่วมของ PGPR แบคทีเรีย (A) RER2, (B) 25R463, (C) 27RER2, (D) 39SHR, (E) 53S462 และ (F) 65R47 ที่รากของ V. nemoralis (RC ecotype)

**ตารางที่ 4.7** แสดงปริมาณของ PGPR แบคทีเรียที่ทนต่อโลหะหนักและสามารถ colonize ที่รากของหญ้าแฝก และแสดงปริมาณ chlorophyll ของพืช .

| Isolate | Log CFU/g DW | Chlorophyll content (mg/g FW) | | |
|---|---|---|---|---|
| | | Chl a | Chl b | Total chl |
| 1RER2 | 7.75±0.1$^{a}$ | 0.29±0.17$^{a}$ | 0.09±0.06$^{a}$ | 0.39±0.23$^{a}$ |
| 25R463 | 7.68±0.78$^{a}$ | 0.26±0.07$^{a}$ | 0.09±0.02$^{a}$ | 0.35±0.10$^{a}$ |
| 27RER2 | 7.97±0.53$^{a}$ | 0.33±0.13$^{a}$ | 0.11±0.04$^{a}$ | 0.45±0.18$^{ab}$ |
| 39SHR | 8.17±0.11$^{a}$ | 0.23±0.15$^{a}$ | 0.08±0.003$^{a}$ | 0.32±0.01$^{ab}$ |
| 53S462 | 9.26±0.16$^{b}$ | 0.15±0.10$^{a}$ | 0.05±0.04$^{a}$ | 0.21±0.14$^{ab}$ |
| 65R471 | 9.12±0.25$^{b}$ | 0.40±0.29$^{b}$ | 0.14±0.09$^{b}$ | 0.54±0.39$^{b}$ |

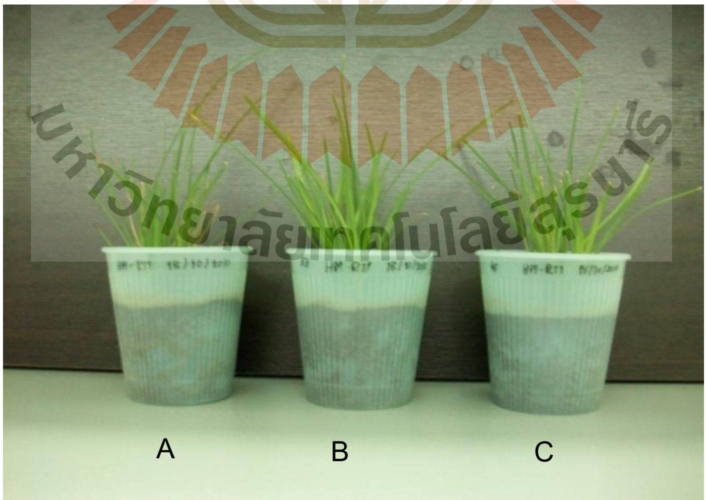
Chl = chlorophyll

**4.5.3** ผลของ PGPR ต่อการเจริญและการดูดซับโลหะหนักจากดินของหญ้าแฝก

จากการนำดินชนิด sandy loam ความเป็นกรด-ด่าง 7.8, EC 2.79 dS/m, total N 0.07%, total P 200 mg/kg และ total K 2000 mg/kg. (ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว) ที่ไม่ใส่เชื้อแบคทีเรีย (กลุ่มควบคุม) และใส่เชื้อแบคทีเรีย (กลุ่มทดลอง) ชนิด 53S462 และ 65R471 และนำหญ้า

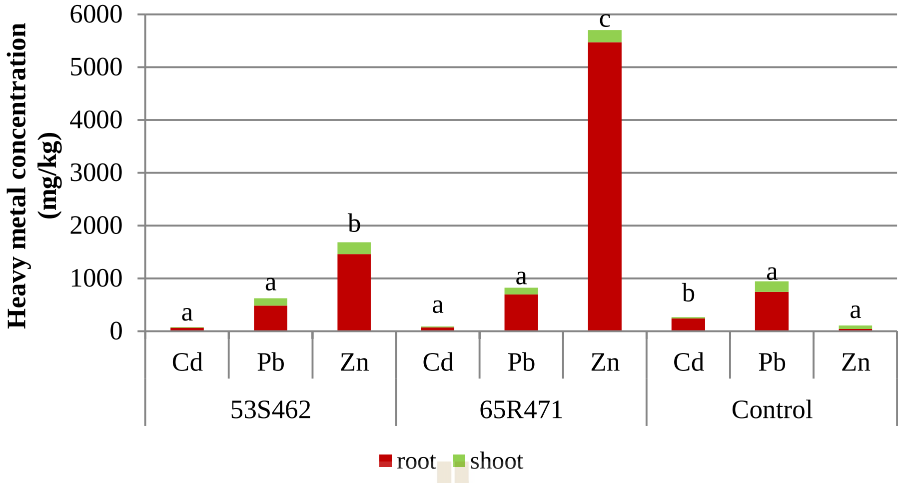
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

แฝก ชนิด *V. nemoralis* มาปลูกในกระถางพลาสติกที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วทั้งชุดควบคุมและชุดทดลอง แล้วทำการผสมโลหะหนัก คือ แคดเมี่ยม (33.57 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม) ตะกั่ว (574.47 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม) และสังกะสี (238.90 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม) ลงในดินรวมกัน ดูแลรดน้ำเป็นเวลา 30 วัน ผลการทดลอง (รูปที่ 4.21 และตารางที่ 4.8) พบว่าการใส่เชื้อแบคทีเรีย PGPR isolates 65R471 และ 53S462 สามารถเพิ่มการสะสมเฉพาะสังกะสีในหญ้าแฝก *V. nemoralis* แต่ไม่มีผลในการสะสมตะกั่ว และลดการสะสมแคดเมียม เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่ได้ใส่เชื้อแบคทีเรีย (รูปที่ 4.22) อย่างไรก็ตาม การใส่แบคทีเรียในชุดทดลองที่ผสมโลหะหนักสามารถเพิ่มปริมาณคลอโรฟิลล์รวมในหญ้าแฝกได้อย่างมีนัยสำคัญ โดยเฉพาะในหญ้าแฝกที่ inoculate ด้วย 53S462 มีการเพิ่มทั้ง chlorphoyll a และ b อย่างมีนัยสำคัญ ($p< 0.05$) ประมาณ 24% และ 29% ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม ส่วนหญ้าแฝกที่ inoculate ด้วย 65R471 มีการเพิ่ม chlorophyll a จากกลุ่มควบคุมถึงเกือบ 58% แต่เป็นการเพิ่มเฉพาะ chlorophyll a เท่านั้น เพราะปริมาณ chlorophyll b ของหญ้าแฝกที่ได้รับ 65R471 ในกลุ่มนี้ กลับมีค่าลดลงประมาณ 13% ($p< 0.05$) ผลการศึกษาความสามารถในการลำเลียงโลหะหนักจากรากสู่ยอด พบว่าค่า translocation factor หรือ TF สำหรับสังกะสีในกลุ่มควบคุมมีค่าสูงกว่ากลุ่มทดลองที่ได้รับแบคทีเรีย PGPR มาก โดยค่า TF ของสังกะสีในกลุ่มควบคุมมีค่าเป็น 11 เท่า และ 28 เท่า (โดยประมาณ) ของกลุ่มทดลองที่ใส่เชื้อ 53S462 และ 65R471 ตามลำดับ อย่างไรก็ตาม ค่า TF ของแคดเมียมในกลุ่มที่ใส่เชื้อ 65R471 มีค่าสูงกว่ากลุ่มควบคุม ประมาณเกือบ 6 เท่า (ตารางที่ 4.9)




**รูปที่ 4.21** ความสามารถของ *V. zizanioides* ในการสะสมโลหะหนัก ในกรณีของกลุ่มควบคุมที่ไม่ใส่เชื้อแบคทีเรีย (A) กลุ่มทดลองที่ใส่เชื้อแบคทีเรียชนิด 53S462 (B) และ ใส่เชื้อแบคทีเรียชนิด 65R471 (C)

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี




**รูปที่ 4.22** ความสามารถของแบคทีเรียในการส่งเสริมการสะสมโลหะหนักในหญ้าแฝก *V.nemoralis* โดยมีค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ตามชนิดของโลหะหนัก

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

**ตารางที่ 4.8** ปริมาณสะสมโลหะหนักและปริมาณคลอโรฟิลล์

| Strain | Translocation and Accumulation efficiency | | | | | | Log CFU/g DW | Chlorophyll content (mg/g FW) | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Cd | | Pb | | Zn | | | | | |
| | TF* | TAR** | TF | TAR | TF | TAR | | Chl a | Chl b | Total chl |
| Uninoculate | 8.29±2.37$^{a}$ | 0.0014±0.0002$^{b}$ | 73.28±113.49$^{a}$ | 0.006±0.001$^{a}$ | 174.93±6.27$^{b}$ | 0.004±0.002$^{a}$ | - | 0.38±0.18$^{a}$ | 0.17±0.02$^{a}$ | 0.54±0.26$^{a}$ |
| 53S462 | 22.69±1.58$^{ab}$ | 0.0007±0.0001$^{a}$ | 26.91±16.01$^{a}$ | 0.006±0.003$^{a}$ | 15.52±0.59$^{a}$ | 0.012±0.004$^{a}$ | 8.91±0.17$^{a}$ | 0.47±0.09$^{b}$ | 0.22±0.07$^{b}$ | 0.65±0.12$^{b}$ |
| 65R471 | 46.84±31.78$^{b}$ | 0.0010±0.0004$^{ab}$ | 17.53±4.07$^{a}$ | 0.007±0.004$^{a}$ | 6.21±2.95$^{a}$ | 0.034±0.03$^{a}$ | 8.79±0.29$^{a}$ | 0.60±0.24$^{c}$ | 0.15±0.07$^{c}$ | 0.82±0.31$^{c}$ |

ค่าในคอลัมน์เดียวกันที่มีอักษรต่างกันมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$).

$$*TF = \frac{\text{ความเข้มข้นโลหะหนักที่ยอด } \left(\frac{\mu g}{g}\right)}{\text{ความเข้มข้นโลหะหนักที่ราก } \left(\frac{\mu g}{g}\right)} \times 100$$

$$**TAR = \frac{(\text{น้ำหนักแห้งยอด (g) x ความเข้มข้นโลหะหนักที่ยอด } (\mu g/g)) + (\text{น้ำหนักแห้งราก (g) x ความเข้มข้นโลหะหนักที่ราก } (\mu g/g))}{(\text{น้ำหนักแห้งยอด (g) + น้ำหนักแห้งราก (g)) x จำนวนวันของการเก็บเกี่ยว}}$$

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

# บทที่ 5

## วิจารณ์ผลการทดลอง

ผลกระทบการทำเหมืองแร่ที่ทำให้เกิดการปนเปื้อนของโลหะหนักในสภาวะแวดล้อมนับเป็นปัญหาสำคัญในระดับกว้าง ที่นักวิทยาศาสตร์ให้ความสำคัญและร่วมหาแนวทางแก้ไขปัญหาดังกล่าวที่ต้องมีทั้งประสิทธิภาพและประสิทธิผล วิธีทางพฤษบำบัดที่ใช้พืชในการลด การย้าย การย่อยสลาย และการป้องกันการเคลื่อนย้ายของโลหะหนักในดิน นับเป็นวิธีหนึ่งที่เหมาะสม เนื่องจากมีความคุ้มค่าทางเศรษฐกิจ และมีประสิทธิภาพดี (Sekhar *et al*., 2005; Fischerová *et al*., 2006). อย่างไรก็ตาม ปัญหาการเจริญเติบโตที่ช้า และมีปริมาณมวลต่ำของพืชในบริเวณที่ปนเปื้อนด้วยโลหะหนักเป็นข้อจำกัดสำคัญยิ่งของการใช้พืชเพื่อบำบัด และ ฟื้นฟูบริเวณที่ปนเปื้อน (Kumar *et al*., 1995; Burd *et al*., 2000) ทั้งนี้อาจเนื่องจากดินมีปริมาณธาตุอาหารต่ำ ขาดความอุดมสมบูรณ์ มีค่าความเป็นกรด-ด่างสูง รวมทั้งมีโลหะหนักที่ปนเปื้อนในปริมาณสูง นักวิทยาศาสตร์จึงได้หาแนวทางแก้ไขโดยใช้กลุ่มแบคทีเรียที่ส่งเสริมการเจริญของพืช เรียกรวมกันว่า plant growth promoting rhizobacteria หรือ PGPR มาประยุกต์ใช้ในการเพิ่มประสิทธิภาพของพฤกษบำบัด โดยส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชในบริเวณที่มีการปนเปื้อน ดังนั้น โครงการวิจัยนี้ จึงทำการคัดเลือกแบคทีเรียกลุ่ม PGPRs จากบริเวณบริษัทผาแดงอินดัสทรี (มหาชน) ที่ปนเปื้อนด้วยแคดเมียม เพื่อให้ได้แบคทีเรียกลุ่ม PGPR ที่สามารถทนต่อพิษโลหะหนัก สามารถเจริญได้ในบริเวณที่ปนเปื้อน และมีคุณสมบัติในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช เพื่อนำมาประยุกต์ใช้ร่วมกับพืชในทางพฤษบำบัด ซึ่งโครงการนี้ เลือกใช้หญ้าแฝกโดยใช้ทั้งหญ้าแฝกลุ่ม (*V. zizanioides*) และหญ้าแฝกดอน (*V nemoralis*) เป็นพืชทดลองในวิธีการทางพฤษบำบัดเพื่อกำจัดโลหะหนัก เพราะหญ้าแฝกเป็นพืชท้องถิ่นในประเทศไทย และเป็นพืชในโครงการพระราชดำริที่ใช้ด้านอนุรักษ์ดินและน้ำอยู่แล้ว หญ้าแฝกมีคุณสมบัติที่เหมาะสม เพราะเจริญได้รวดเร็ว มีรากหยั่งลึก สามารถดูดซับได้สูง ทนแล้ง ทนภาวะน้ำท่วม และสามารถเจริญได้แม้ในภาวะที่ดินขาดความอุดมสมบูรณ์ และที่สำคัญ เคยมีรายงานว่า หญ้าแฝกสามารถกำจัดโลหะหนักที่ปนเปื้อนในดิน งานวิจัยนี้ จึงทำการสกัดคัดแยกแบคทีเรียกลุ่ม PGPR ที่สามารถเจริญได้ดีในบริเวณที่ปนเปื้อนด้วยโลหะหนัก เพื่อตรวจสอบความสามารถของกลุ่มPGPR ที่คัดเลือกได้ ในการส่งเสริมการเจริญ และการดูดซับโลหะหนักของหญ้าแฝกที่เจริญในสภาวะแวดล้อมที่ปนเปื้อนด้วยโลหะหนักในปริมาณสูง อันเป็นการประยุกต์ใช้ PGPR เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพและประสิทธิผลของการใช้หญ้าแฝกทางพฤกษบำบัดให้สามารถฟื้นฟูบริเวณที่ปนเปื้อนโลหะหนักให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

แบคทีเรียกลุ่มที่ทนต่อโลหะหนักที่คัดเลือกได้จากพื้นที่ของบริษัทผาแดงอินดัสทรี (มหาชน) จังหวัดตาก ที่สามารถเจริญได้ใน 50 mg/kg แคดเมียมที่ผสมในอาหารเลี้ยงเชื้อ 3 ชนิดมีทั้งหมด

รวมกันได้ 521 โคโลนี แต่ได้คัดเลือกแบคทีเรียไว้เพียง 6 isolates ที่มีคุณสมบัติของ PGPR ในเกณฑ์ที่ดีคือ 1RER2, 25R463, 27RER2, 39SHR, 53S462 และ 65R471 ซึ่งผลจากการตรวจสอบชนิดของแบคทีเรียทั้งทางกายภาพ คุณสมบัติทางชีวเคมี และทางพันธุกรรมจากการทำ 16S rDNA gene sequencing และ phylogenetic analysis พบว่าทั้ง 6 isolates เป็นแบคทีเรียแกรมบวก 50% แกรมลบ 50% มีรูปร่างเป็นแท่ง (rod shape) ทุก isolates และเป็นแบคทีเรียในกลุ่ม *Pseudomonas* sp., *Aeromonas* sp, *Arthrobacter* sp และ *Microbacterium* sp. ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยที่เคยรายงานมาก่อนว่า กลุ่ม rhizobacteria ที่สามารถส่งเสริมการเจริญของพืชที่คัดแยกจากดิน มักอยู่ใน genera ของ *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Aeromonas, Bacillus*, และ *Agrobacterium* (Aarab et al., 2015; Bumunang and Bahalola., 2014; Lucy et al., 2014; Pindi et al., 2014; Zahid et al., 2015) เนื่องจากมีรายงานว่ามีการประยุกต์ใช้แบคทีเรียกลุ่ม PGPR มาส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชในพื้นที่ซึ่งปนเปื้อนด้วยโลหะหนัก (Abou-Shanab *et al*., 2003; Idris *et al*., 2004; Khan, 2005; Sheng and Xia, 2006) งานวิจัยนี้จึงนำ PGPR ทั้ง 6 isolates ที่คัดเลือกได้ มาศึกษาผลกระทบของโลหะหนักต่อ PGP traits ของ isolates โดยศึกษาผลของโลหะหนักต่อการสร้าง IAA, GA, hydroxymate, pyrocatechol, และ การละลายของ phosphate การวิจัยนี้ถือว่าเป็นการวิจัยแรกที่ให้ความสำคัญในการศึกษาผลของโลหะหนักต่อการสร้างสารที่เป็น PGP traits ของแบคทีเรีย เมื่อได้ isolate ของแบคทีเรียที่ยังคงรักษา PGP traits ได้สูงภายใต้ความเครียดของโลหะหนัก จึงค่อยนำมาศึกษาผลของ PGPR ที่คัดเลือกต่อประสิทธิภาพของการบำบัดโลหะหนักด้วยหญ้าแฝก (*V. zizanioides* และ *V. nemoralis*)

การศึกษาผลกระทบของแคดเมียม ตะกั่ว และสังกะสีต่อการสร้าง siderophores ทั้ง 2 ชนิด คือ hydroxymate และ catecholate พบว่าแบคทีเรียที่คัดเลือกทั้ง 6 isolatesสามารถสร้าง siderophores ได้ทั้ง 2 ชนิดคือ catecholate และ hydroxymate โดยในสภาวะที่ไม่มีโลหะหนัก ปริมาณการสร้าง hydroxymate มีค่าตั้งแต่ 0.003-0.018 mg/l ในขณะที่ปริมาณการสร้าง catecholate มีค่าตั้งแต่ 0.007-0.022 mg/l ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Ma และ Freitas (2009) ที่รายงานว่า PGPR แบคทีเรียสามารถสร้างได้ทั้ง catecholate และ hydroxymate แต่ Ma และ Freitas รายงานว่าปริมาณการสร้าง catecholate มีค่ามากกว่า hydroxymate siderophores และแบคทีเรียสามารถสร้าง catecholate เพิ่มขึ้นภายใต้สภาวะความเครียดจากโลหะหนัก ดังเช่น การชักนำของแคดเมียมทำให้แบคทีเรียในกลุ่ม *Pseudomonas aeruginosa* strain KUCd1 สร้าง pyoverdin siderophore เพิ่มขึ้น ส่งผลให้แบคทีเรียสามารถทนต่อพิษของแคดเมียมในระดับสูงได้ถึง 8 mM (Sinha และ Mukherjee, 2008) ในงานวิจัยนี้ พบว่า ภายใต้ความเครียดของตะกั่ว isolates ของแบคทีเรียเกือบทั้งหมด (ยกเว้น 1RER2) ถูกชักนำให้สร้าง hydroxymate สูงกว่ากลุ่มควบคุมหลายเท่าตัว ($p< 0.05$) (รูปที่ 4.4) ในขณะที่แคดเมียมและสังกะสีสามารถชักนำให้ isolates 39SHR และ 53S462 สร้าง catecholate ให้เพิ่มขึ้น (รูปที่ 4.6) ซึ่งมีงานวิจัยมากมายที่สนับสนุนผลของ

งานวิจัยนี้ ที่แสดงว่าโลหะหนักสามารถชักนำให้ PGPR สร้าง siderophore ให้เพิ่มขึ้น ดังรายงานของ Alexander และ Zuberer, (1991) ที่พบว่าแคดเมียมสามารถทำให้แบคทีเรียที่คัดเลือกสร้าง siderophores ได้สูงขึ้นถึง 56-140 mg/l ในขณะที่สังกะสีก็มีผลต่อการสร้าง pyoverdine siderophore ใน *P. aeruginosa* เช่นกัน ยิ่งไปกว่านั้น สังกะสียังสามารถเพิ่มการสร้าง siderophore pyochelin ในแบคทีเรียชนิด *Azotobacter vinelandii* (Cornish และ Page, 2000) ซึ่ง Dimkpa *et al.* (2008) ได้อธิบายถึงอิทธิพลของโลหะหนักในการกระตุ้น *Streptomyces* sp. ให้เพิ่มการสร้าง siderophore ไว้ว่าเกี่ยวข้องการแย่งจับกับ siderophore ของอิออนของโลหะหนัก ส่งผลให้เกิดอิออนอิสระของเหล็กเกิดขึ้น แบคทีเรียจึงจำเป็นต้องเพิ่มการสร้าง siderophore เพื่อจับกับอิออนอิสระของเหล็กที่เพิ่มขึ้นนั่นเอง

การทดสอบผลของโลหะหนักต่อการสร้างฮอร์โมนพืช พบว่าในสภาวะที่ไม่มีโลหะหนัก 53S462 และ 65R471 มีความสามารถทัดเทียมกันในการสร้าง GA ที่สูงกว่า isolates อื่นๆ (รูปที่ 4.7) แต่ในสภาวะที่โลหะหนัก แม้ทุก isolates ของ PGPR ยังคงความสามารถในการสร้างฮอร์โมนพืช GA แต่ปริมาณของ GA มีค่าลดต่ำกว่ากลุ่มควบคุมทุก isolates ยกเว้น 25R463 เพียง isolate เดียวที่สามารถสร้าง GA ได้เพิ่มขึ้นเมื่อมีแคดเมียม ตะกั่ว และสังกะสี (รูปที่ 4.8) ในกรณีของฮอร์โมน IAA พบว่าแบคทีเรียที่คัดเลือกทั้ง 6 isolates มีความสามารถในการสร้าง IAA ทั้งในสภาวะที่มีและไม่มี tryptophan (รูปที่ 4.7-4.9) และการสร้าง IAA จะเพิ่มขึ้นตามการชักนำของปริมาณ tryptophan ที่สูงขึ้น โดยปริมาณของ IAA ในสภาวะที่มี tryptophan มีค่าสูงกว่าในสภาวะที่ไม่มี tryptophan ซึ่งผลการทดลองนี้สอดคล้องกับการทดลองของ Zaidi et al. (2006) ซึ่งพบว่าแบคทีเรียสามารถสร้าง IAA ได้เท่ากับ 55 µg/ml ในสภาวะที่มี tryptophan, และ 21 µg/ml ในสภาวะที่ไม่มี tryptophan ขณะที่ Thakuria *et al.* (2004) รายงานว่าแบคทีเรียสามารถสร้าง IAA ในช่วงระหว่าง 2.0 ถึง 21.6 mg/l โดยมีแนวโน้มในการสร้าง IAA ได้สูงขึ้นในสภาวะที่มี L-tryptophan สูง และการทดลองของ Wani et al. (2007) ที่รายงานว่าแบคทีเรียชนิด *Bacillus* strains PSB 1, PSB 7, และ PSB 10 สามารถสร้าง IAA ได้ 19.3, 17.7, และ 17.4 µg/ml ตามลำดับ ในสภาวะที่มีการปนเปื้อนของแคดเมียมและตะกั่วและสภาวะแวดล้อมมี tryptophan แบคทีเรียทั้ง 6 isolates ที่คัดเลือกได้ ยังคงความสามารถในการสร้าง IAA ได้ในปริมาณที่สูง โดยเฉพาะ isolates 25R463, 39SHR, 53S462 และ 65R471 ที่สามารถสร้าง IAA ให้เพิ่มขึ้นจากกลุ่มควบคุมที่ไม่มีโลหะหนักอย่างมีนัยสำคัญ ($p< 0.05$) ยกเว้น isolate 53S462 เมื่ออยู่ภายใต้แคดเมียม ที่ไม่ได้เพิ่มการสร้าง IAA แต่ก็ยังคงความสามารถในการสร้าง IAA สูงทัดเทียมกับกลุ่มควบคุม (รูปที่ 4.10) ในทางตรงกันข้าม ในสภาวะที่ไม่มี tryptophan การสร้าง IAA ของเกือบทุก isolates มีค่าลดลงเมื่ออยู่ในสภาวะที่มีโลหะหนัก (รูปที่ 4.12) ซึ่งตรงกับที่รายงานโดย Dimkpa *et al.* (2008) และ Wani et al. (2007) ซึ่งรายงานการลดการสร้าง IAA ภายใต้สภาวะที่มีการเพิ่มความเข้มข้นของ chromium อย่างไรก็ตาม ผลการทดลองใน

งานวิจัยนี้ ไม่ได้ตรวจสอบสภาวะที่อาจเกิดการสร้างสารประกอบเชิงซ้อนระหว่าง IAA และโลหะหนัก (Oota และ Tsudzuki, 1971) อันอาจส่งผลให้ปริมาณของ IAA ในรูปอิสระมีค่าลดลง

อย่างไรก็ตาม แม้ความสามารถในการสร้าง IAA ของ PGPR ที่คัดเลือกจะมีค่าลดลงเมื่ออยู่ภายใต้สภาวะเครียดจากโลหะหนัก แต่คุณลักษณะของแบคทีเรียที่สามารถสร้าง IAA ในสภาวะที่ไม่มี tryptophan มีความสำคัญยิ่ง เพราะจำเป็นต่อการประยุกต์ใช้ในการทดลองภาคสนาม หรือการใช้งานจริงในทางพฤกษบำบัด เพราะในสภาวะที่มีการปนเปื้อนของโลหะหนัก หรือ มลพิษอื่น การเจริญของพืชและการสร้าง auxin หรือสารต่าง ๆ ที่ช่วยเร่งการเจริญบริเวณ root exudates มักถูกจำกัด สืบเนื่องจากความเป็นพิษของโลหะหนัก หรือ มลพิษอื่น รวมทั้งต้องเผชิญกับปัญหาการขาดแคลนความอุดมสมบูรณ์ของดิน สภาพดินที่เสื่อมโทรมส่งผลให้ขาด หรือ มีปริมาณ tryptophan ในดินต่ำ ดังนั้น PGPR ที่สามารถสร้าง IAA ทั้งในสภาวะที่มี และ ไม่มี tryptophan จึงเป็นคุณลักษณะอันพึงประสงค์ในทางพฤกษบำบัด

การศึกษาผลกระทบของโลหะหนักต่อการละลายฟอสเฟตตรวจวัดโดยการวัดปริมาณของฟอสเฟตที่ละลายได้ (soluble phosphate) ที่ถูกหลั่งออกสู่อาหารเลี้ยงเชื้อ สืบเนื่องจากการชักนำให้เกิดการละลายของ tri-calcium phosphate โดยแบคทีเรีย ผลการทดลอง (รูปที่ 4.14) พบว่าในกลุ่มควบคุม (ไม่มีโลหะหนัก) แบคทีเรียทั้ง 6 isolates สามารถละลายฟอสเฟตได้มากกว่าในสภาวะที่มีโลหะหนัก แต่มีข้อน่าสังเกตว่า ค่าความสามารถในการละลายฟอสเฟตของกลุ่มควบคุมในงานวิจัยนี้มีค่า 8.2-20.4 mg/l (รูปที่ 4.13-4.14) ซึ่งมีค่าต่ำกว่าที่รายงานโดยงานวิจัยอื่น ทั้งนี้ อาจเกี่ยวข้องกับค่าความเป็นกรด-ด่างในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีค่าแตกต่างกัน Rajkumar และ Freitas (2008) รายงานว่าแบคทีเรีย *Pseudomonas* sp. PsM6 และ PjM15 มีความสามารถในการละลายฟอสเฟตเท่ากับ 7.11 ± 3.26 และ 88.67 ± 4.46 mg/l, ตามลำดับ Wani et al. (2007) รายงานว่าแบคทีเรีย *Bacillus* strains สามารถละลายฟอสเฟตได้ 375 (PSB 1), 340 (PSB 7), และ 379 (PSB 10) μg/ml ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Pikovskaya broth ที่ไม่ผสมโครเมียม และในสภาวะที่มีโครเมียม 150 μg/ml ความสามารถในการละลายฟอสเฟตมีค่าลดลง 17% (PSB 1), 15% (PSB 7), และ 9% (PSB 10) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ซึ่งมีข้อมูลชี้แนะว่า ความสามารถในการละลายฟอสเฟตมีค่าเพิ่มขึ้นในขณะที่ pH ในอาหารมีค่าลดต่ำลง สืบเนื่องจากเกิดการหลั่ง organic acid สู่อาหาร นอกจากนั้น Zaidi et al. (2006) รายงานว่าแบคทีเรียชนิด PS-1 เมื่อเกิดการปลดปล่อยปริมาณฟอสเฟตที่ละลายได้ 120 μg/ml ส่งผลให้ค่า pH ในอาหารลดลงทันทีจากค่า pH 7.5 เป็น 4.8 จึงกล่าวได้ว่าการเติม PGPR ในดินที่ขาดธาตุอาหารฟอสเฟตทำให้สามารถปรับปรุงคุณภาพดินให้เพิ่มปริมาณ phosphate ได้โดยใช้ PGPR ที่มีคุณสมบัติในการละลาย phosphate เพราะโดยทั่วไปการเจริญของแบคทีเรียชักนำให้ค่า pH ในสภาวะแวดล้อมลดลง

จากการศึกษาความสามารถในการสร้าง ACC deaminase, IAA, GA, hydroxymate, pyrocatechol, และการละลาย phosphate ของแบคทีเรียที่คัดเลือกทั้ง 6 isolates ในสภาวะที่มีการปนเปื้อนของโลหะหนัก พบว่า PGPR แต่ละ isolate มีความแตกต่างกันในการตอบสนองต่อโลหะหนัก ภายใต้ความเครียดจากตะกั่ว และ สังกะสี PGPR ทั้ง 6 isolates ยังคงความสามารถในการสร้าง ACC deaminase แม้ว่า isolates 39SHR, 53S462 และ 65R471 มีการทำงานของ ACC deaminase ลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ($p< 0.05$) แต่ isolates 1RER2, 25R463 และ 27RER2 กลับมีกิจกรรมของ ACC deaminase เพิ่มสูงขึ้นกว่ากลุ่มควบคุมเมื่อได้รับสังกะสี (รูปที่ 4.17) ชี้แนะว่า สังกะสีน่าจะมีส่วนช่วยกระตุ้นให้ PGPR ทั้ง 3 isolates นี้ เกิดการสร้าง ACC deaminase เพิ่มขึ้น ส่วนโลหะหนักที่มีผลกระทบต่อกิจกรรมของ ACC deaminase มากที่สุดคือแคดเมียม เพราะในการทดลอง ไม่สามารถตรวจวัดกิจกรรมของ ACC deaminase ได้ในแบคทีเรียทั้ง 6 isolates (1RER2, 25R463, 27RER2, 39SHR, 53S462, และ 65R471) เมื่อได้รับ 10 mM แคดเมียม ซึ่งสอดคล้องกับ Amico et al. (2005) ที่ พบว่า $Cd^{2+}$ มีผลต่อการทำงานของ ACC deaminase โดยขึ้นกับชนิดของแบคทีเรีย ตัวอย่างเช่น แคดเมียมมีผลต่อการทำงานของ ACCD ใน *Alcaligenes* sp. ZN4 และ *Mycobacterium* sp. ACC14 แต่ ไม่มีผลต่อการทำงานของ ACCD ใน *P. fluorescens* ACC9 และ *P. tolaasii* เนื่องจากแบคทีเรีย PGPR บางชนิดมีเอนไซม์มากกว่า 1 ชนิดที่สามารถตัดยีน ACC deaminase (Shah *et al.* 1998) ในชุดควบคุมของการทดลองนี้ ในสภาวะที่ไม่มีโลหะหนัก การทำงานของ ACC deaminase ของแบคทีเรีย 1RER2, 25R463, 27RER2, 39SHR, 53S462, and 65R471 มีค่าเท่ากับ 141.21, 148.22, 796.15, 1299.20, 40.73, และ 1450.49 µmol/hr/mg, ตามลำดับ ซึ่งมีค่าค่อนข้างสูงเมื่อเทียบกับงานวิจัยของ Rajkumar และ Freitas (2008) ซึ่งรายงานว่า *Pseudomonas* sp and *Pseudomonas jessenii* สามารถสร้าง ACC deaminase เท่ากับ 66.32 และ 34.23 nmol/hr/mg ตามลำดับ

การศึกษาหาความทนทานต่อแคดเมียม ตะกั่ว และสังกะสีของทั้ง 6 isolates ของแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ (1RER2, 25R463, 27RER2, 39SHR, 53S462, และ 65R47) โดยดูจากขนาดของ inhibition zone ของแบคทีเรีย เมื่อได้รับความเข้มข้นของโลหะหนักทั้ง 3 ชนิดที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กันพบว่าทุก isolates มีความสามารถต้านทานต่อโลหะหนักทั้ง 3 ชนิด โดยความสามารถสูงสุดในการต้านทานโลหะหนัก หรือค่า MIC สูงที่สุดของทั้ง 6 isolates ต่อแคดเมียม ตะกั่ว และสังกะสีอยู่ที่ 3.5 mM, 9.0 mM, และ 10 mM ตามลำดับ นั่นหมายถึงแบคทีเรียที่คัดเลือกมีความสามารถทนทานต่อสังกะสีได้มากที่สุด และมีความไวต่อแคดเมียมมากกว่าตะกั่ว (ตารางที่ 4.2) ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Raja et al. (2006) ที่รายงานว่า *Psudomonas aeruginosa* BC15 สามารถทนต่อตะกั่ว > นิเกล > แคดเมียม > โครเมียม บนอาหารเลี้ยงเชื้อ ขณะที่ Jiang et al. (2008) พบว่าแบคทีเรีย J62 สามารถทนต่อ โครเมียม > นิเกล > ทองแดง > สังกะสี > ตะกั่ว > แคดเมียม บนอาหารเลี้ยงเชื้อ ในงานวิจัยนี้ พบว่า แบคทีเรียที่คัดเลือกสามารถทนทานต่อแคดเมียม ตะกั่ว และ

สังกะสีได้มากกว่าที่มีการรายงานของนักวิจัยอื่น เช่น He *et al.* (2010) รายงานว่าแบคทีเรียชนิด SWJ11, MT16, GZC24, และ YAH27 สามารถทนทานต่อทองแดง ตะกั่ว แคดเมียม นิเกล และสังกะสี บนอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยมีค่า MIC ของแคดเมียม ตะกั่วและ สังกะสีเท่ากับ 0.09-0.45 mM, 0.5-4.4 mM และ 0.77-6.15 mM ตามลำดับ ซึ่งค่าของ MIC ต่อโลหะต่ำกว่างานวิจัยนี้ ในทางตรงข้าม การทดลองของ Amico et al. (2005) ที่ศึกษาความทนทานของแบคทีเรียต่อโลหะหนักในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว พบว่า *P. flurescens* ACC9, *P. tolaasii* ACC23, *Mycobacterium* sp. ACC14, และ *Alcaligenes* sp ZN4 มีความทนทานต่อแคดเมียมในระดับ 0.5 ถึง 2.5 mM อย่างไรก็ดี ความสามารถของแบคทีเรียในการทนทานต่อโลหะหนักบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็งจะมีมากกว่าอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว เนื่องจากมีปัจจัยของความสามารถในการแพร่ (diffusion) และการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนของโลหะหนัก ทำให้ค่าชีวประสิทธิผล หรือ bioavailability ของโลหะหนักในอาหารแข็งต่างจากอาหารชนิดเหลว ซึ่งมีผลให้การทดสอบความทนทานของจุลินทรีย์ต่อโลหะหนักระหว่างอาหารแข็ง และ อาหารเหลวมีค่าแตกต่างกัน อย่างไรก็ตาม จากค่า MIC ของงานวิจัยนี้ในตารางที่ 4.2 ชี้แนะว่าแบคทีเรียทั้ง 6 isolates มีความสามารถในการทนทานต่อพิษแคดเมียม ตะกั่ว และสังกะสีในระดับที่น่าพึงพอใจ ความทนทานต่อโลหะหนักของแบคทีเรียสามารถเกิดได้หลายกลไก เช่น การจับของโลหะกับ exopolysaccharides หรือโลหะถูกดักจับที่ผนังเซลล์ของแบคทีเรีย หรือความสามารถของแบคทีเรียในการรีดิวซ์โลหะ (metal reduction) หรือปั๊มโลหะหนักออกนอกเซลล์ (metal efflux) ก่อนที่จะเกิดพิษต่อเซลล์ เป็นต้น ซึ่งบางกลไกเหล่านี้อาจอยู่ใน gene ของ plasmid ซึ่งทำให้แบคทีเรียสามารถถ่ายทอดความทนทานต่อโลหะหนักไปยังแบคทีเรียเซลล์อื่นได้ง่าย (Amico et al. 2005)

ผลการศึกษาความไวต่อยาปฏิชีวนะของ PGPR isolates ทั้ง 6 ที่คัดเลือกในตารางที่ 4.6 แสดงว่า isolates มีการดื้อ และไวต่อยาปฏิชีวนะบางชนิดแตกต่างกัน โดยเฉพาะ 53S462 และ 65R471 ที่มีการดื้อต่อยาปฏิชีวนะหลายชนิด เมื่อเทียบกับ isolates อื่น ซึ่งคุณสมบัติการดื้อต่อยาปฏิชีวนะของ PGPR ที่มีความทนทานต่อโลหะหนักเป็นสิ่งสำคัญ ดังรายงานของ Verma et al (2001) ที่ระบุความเกี่ยวข้องของการทนทานต่อโลหะหนักกับคุณสมบัติการดื้อต่อยาปฏิชีวนะของแบคทีเรีย เช่นเดียวกับ Rosen (1996) และ Hassen et al. (1998) ที่รายงานว่าคุณสมบัติการดื้อยาปฏิชีวนะมีความสัมพันธ์ที่สูง (high correlation) กับความทนทานต่อโลหะหนักของแบคทีเรีย ซึ่งปรากฏการณ์ดังกล่าวอาจเกิดจากการอยู่ร่วมหรือใกล้กันของยีนที่ดื้อต่อยาปฏิชีวนะและยีนที่เกี่ยวกับความทนทานต่อโลหะหนัก (Adarsh et al. 2007) ซึ่งสมมติฐานนี้ สนับสนุนโดยรายงานของ Ghosh et al. (2000) ที่ระบุว่า plasmid จาก *Salmonella abortus equi* strains ที่มียีนดื้อต่อยาปฏิชีวนะ และมียีนที่ทนทานต่อสารหนู โครเมียม แคดเมียม และปรอท

การทดสอบผลของ PGPR ทั้ง 6 isolates ต่อการส่งเสริมการดูดซับโลหะหนักโดยเปรียบเทียบระหว่างหญ้าแฝกลุ่ม และ หญ้าแฝกดอนกระทำในห้องปฏิบัติการโดยใช้หญ้าแฝกจากการ

เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ และทดสอบในสภาวะของ axenic culture (การเพาะเลี้ยงที่ถูกควบคุมให้ได้รับเพียงเชื้อชนิดเดียว) โดยหญ้าแฝกถูกเพาะเลี้ยงในสภาวะปลอดเชื้อ ก่อนถูก inoculate ด้วย PGPR ที่คัดเลือกไว้เพียง isolate เดียว ทั้งนี้ เพื่อยืนยันว่า การเจริญ และ/หรือ การดูดซับโลหะหนักของหญ้าแฝกที่ต่างจากกลุ่มควบคุม (ที่ไม่ได้รับ PGPR) เป็นผลจากPGPR isolate ที่ inoculate เข้าไปเท่านั้น ไม่ใช่เป็นผลจากจุลินทรีย์อื่นที่ปนเปื้อน ซึ่งถ้ากระทำการทดลองในภาคสนาม จะควบคุมอิทธิพลจากการปนเปื้อนของจุลินทรีย์อื่นได้ยาก ผลการทดลองใน axenic culture (รูปที่ 4.19 A-C) บ่งชี้ว่าหญ้าแฝกดอน ecotype ราชบุรี (RC) มีความสามารถดูดซับแคดเมียม และ สังกะสีได้ดีกว่าหญ้าแฝกลุ่ม ecotype สุราษฎร์ธานี ทั้งนี้ เกือบทุก isolates ของ PGPR ที่คัดเลือกได้สามารถชักนำให้หญ้าแฝกดอน (RC) ดูดซับสังกะสีซึ่งเป็นประโยชน์ต่อพืชได้สูงกว่ากลุ่มควบคุม (รูปที่ 4.19 C) โดยเฉพาะ isolates 65R471 และ 1RER2 สามารถเพิ่มการดูดซับของหญ้าแฝกดอนต่อแคดเมียมโดยกักไว้ที่รากร่วมด้วย (รูปที่ 4.19 A) แต่การ inoculate PGPR แทบจะไม่มีอิทธิพลต่อการดูดซับแคดเมียม และสังกะสีในหญ้าแฝกลุ่มแต่อย่างใด (รูปที่ 4.19 A, C) บ่งชี้ว่าการ inoculate PGPR isolate เดียวกันสามารถก่อให้เกิดผลที่ต่างกันต่อการดูดซับโลหะของหญ้าแฝกแต่ละ ecotype ทั้งนี้ อาจจะเกี่ยวข้องกับความแตกต่างในกระบวนการนำเข้าโลหะหนักของแต่ละ ecotype ดัง Peeiulyte et al. (2006) ที่ชี้แนะถึงกลไกที่แตกต่างกันในการนำเข้าโลหะหนักระหว่างข้าวโพดและพืชตระกูลถั่ว (vetch plant) อย่างไรก็ตาม ทุก isolates ของ PGPR ที่คัดเลือกสามารถลดการดูดซับของตะกั่วทั้งในหญ้าแฝกลุ่มและหญ้าแฝกดอน (รูปที่ 4.19 B) ซึ่งการลดการดูดซับโละหนักที่มีพิษสูงเช่นตะกั่วแม้จะไม่ได้ช่วยในการลดปริมาณตะกั่วในบริเวณที่ปนเปื้อนโดยตรง แต่อาจเพิ่มประสิทธิภาพทางอ้อมในทางพฤกษบำบัด เพราะเป็นการลดการนำเข้าตะกั่วซึ่งมีความเป็นพิษต่อพืช เป็นที่ทราบกันดีว่า ตะกั่วมีความเป็พิษสูงในพืช สามารถยับยั้งการเจริญ ทำให้ซีดเหลือง (chlorosis) เพราะยับยั้งการสร้าง chlorophyll ลดกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสง ลดการคายน้ำ ลดกระบวนการงอกของเมล็ด เปลี่ยนแปลงโครงสร้างของเยื่อเมมเบรนและการซึมผ่านของสารผ่านเยื่อ ทั้งนี้ ระบบรากเป็นเป้าหมายที่สำคัญของตะกั่ว เพราะเกิดการสะสม callose เกิด blackening root system รบกวนการดูดซึมเกลือแร่ สารอาหารสำคัญของพืช ส่งผลให้ขาดความสมดุลย์ของน้ำและโปรตีน ยับยั้งการยืดตัวของราก (root elongation) นอกจากนั้น ตะกั่วยังยับยั้งการสร้าง ATP ชักนำให้เกิด lipid peroxidation ทำให้เกิดความเครียดออกซิเดชัน (oxidative stress) ภายในเซลล์พืช (Sharma and Dubey, 2005; Fahr et al., 2013; Pourrut et al., 2011) ดังนั้น การลดการดูดซับตะกั่วเมื่อ inoculate PGPR ที่คัดเลือกน่าจะเป็นผลดีต่อหญ้าแฝกที่ใช้ในการบำบัดแคดเมียมได้

กลุ่ม PGPR นอกจากมีคุณสมบัติด้านส่งเสริมการเจริญของพืช และเพิ่มการดูดซับโลหะหนักของพืชแล้ว ความสามารถในการอยู่ร่วมกับพืชที่ราก หรือ root colonization ก็มีความสำคัญไม่ยิ่งหย่อนกว่ากันในเชิงพฤกษบำบัด Defreitas and Germida (1992) ระบุว่า จุลินทรีย์ที่ส่งเสริมการเจริญของพืชได้ดี จำเป็นที่จะต้องสามารถ colonize ที่ระบบรากของพืชได้อย่างรวดเร็ว ซึ่งจาก

การศึกษา root colonization ของ PGPR ทั้ง 6 isolates พบว่าทุก isolates สามารถ colonize ที่รากของหญ้าแฝกดอนได้ดี (รูปที่ 4.20) โดยเฉพาะ isolates 53S462 และ 65R471 ที่สามารถ colonize ได้สูงใกล้เคียงกันและสูงกว่า isolates อื่นอย่างมีนัยสำคัญ ($p< 0.05$) (ตารางที่ 4.7.) นอกจากนั้นหญ้าแฝกที่ได้รับ 65R471 isolate ยังมีปริมาณ chlorophyll a, chlorophyll b และ total chlorophyll สูงที่สุด ชี้แนะว่า 65R471 สามารถส่งเสริมการเจริญของหญ้าแฝกได้ดีกว่า isolates อื่น ส่วน 53S462 แม้มีความสามารถในการ colonize ที่รากพืชใกล้เคียงกัน แต่ความสามารถในการส่งเสริมการเจริญของพืชกลับมีค่าต่ำกว่า isolates อื่น ดังนั้น แบคทีเรียจำเป็นต้องมีคุณสมบัติหลายอย่างประกอบกัน เช่นมีทั้ง root colonization และ PGP traits เป็นต้นในการส่งเสริมการเจริญของพืช อย่างไรก็ดี มีงานวิจัยมากมายที่ชี้แนะความสำคัญของ root colonization ของแบคทีเรียว่าเป็นสิ่งจำเป็นต่อประสิทธิผลของการประยุกต์ใช้ PGPR ในการส่งเสริมการเจริญของพืช ดังเช่น Defreitas and Germida (1992) ที่แสดงว่า แบคทีเรีย J62 ช่วยเร่งการเจริญของข้าวโพดและมะเขือเทศได้ แต่ไม่มีผลต่อ Indian mustard ใน pot experiment เนื่องจาก J62 สามารถ colonize และเจริญได้ดีที่ rhizosphere ของข้าวโพดและ มะเขือเทศได้เท่านั้น ในทำนองเดียวกัน Bashan และ de-Bashan (2005) และ Lucy et al. (2004) ระบุว่า การ colonization ของ PGPR แบคทีเรียเป็นบันไดขั้นแรก (prerequisite) ที่นำไปสู่ความสำเร็จของการ inoculation PGPR เพื่อประยุกต์ใช้งานในด้านต่าง ๆ เพราะแม้ PGPR ที่มี PGP traits ที่พึงประสงค์ แต่ถ้าไม่สามารถ colonize และอยู่รอดได้ใน rhizosphere ของพืชที่ถูก inoculate (inoculated-host plant) ก็จะไม่เกิดประสิทธิผลของการใช้งานจริง (Benizri et al, 2001)

การทดลองในกระถาง (pot experiment) แบคทีเรีย isolates 53S462 และ 65R4715 ถูกเลือกมาทดลองร่วมกับหญ้าแฝกดอน *V. nemoralis* (ราชบุรี ecotype) ที่การทดลองเบื้องต้นใน axenic culture แสดงว่าการ inoculate ด้วย PGPR สามารถเพิ่มการดูดซับแคดเมียมและสังกะสีได้ดี เหตุผลของการเลือก isolates 53S462 และ 65R4715 มาใช้ใน pot experiment เพราะทั้ง 2 isolates สามารถสร้าง IAA และ siderophores สูง ละลายฟอสเฟตได้ดี มีความทนทานต่อแคดเมียม ตะกั่ว และสังกะสีสูง นอกจากนั้น แบคทีเรียทั้ง 2 isolates ยังสามารถอยู่ร่วม หรือ colonize ที่ระบบรากของหญ้าแฝกได้สูงกว่า isolates อื่น ๆ ผลการทดลองการ inoculate 53S462 และ 65R475 ที่รากของหญ้าแฝกเมื่อปลูกลงดินในกระถาง พบว่า PGPR ทั้ง 2 isolates ช่วยเพิ่มการดูดซับสังกะสีของหญ้าแฝกได้สูงกว่ากลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับการ inoculate ($p< 0.05$) โดยเก็บกักไว้ที่ส่วนรากเป็นหลัก (รูปที่ 4.22) ซึ่งให้ผลคล้ายคลึงกับการทดลองใน axenic culture แต่ในการทดลองในกระถางดิน กลุ่มที่ inoculate ด้วย isolate 65R471 มีความสามารถสูงกว่ากลุ่มที่ inoculate ด้วย 53S462 ในการดูดซับสังกะสีอย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งต่างจากผลการทดลองใน axenic culture ที่การ inoculate ทั้ง 2 isolates มีความสามารถทัดเทียมกันในการส่งเสริมการดูดซับสังกะสี และมีการสะสมสังกะสีไว้ที่ส่วนยอดมากกว่าส่วนราก (รูปที่ 4.19) ในการทดสอบในกระถาง การ inoculate แบคทีเรียทั้ง 2 isolates

ลดการดูดซับของแคดเมียมในหญ้าแฝกและไม่มีผลเปลี่ยนแปลงต่อการดูดซับตะกั่ว (รูปที่ 4.22) ซึ่งแตกต่างจากผลของการทดลองใน axenic culture แม้ผลการทดลองใน pot experiment จะไม่เหมือนกับใน axenic culture ทีเดียว แต่การทดลองทั้งใน axenic cuture และในกระถางให้ผลที่สอดคล้องกันว่า isolate 53S462 และโดยเฉพาะ 65R471 สามารถนำมาประยุกต์ใช้ร่วมกับหญ้าแฝกเพื่อเพิ่มการดูดซับของสังกะสี โดยผ่านกลไกของ photostabilization เพราะมีการเก็บกักสังกะสีไว้ที่ส่วนรากเป็นหลัก (รูปที่ 4.22) ส่วนการลดการดูดซับแคดเมียมของหญ้าแฝกดอนเมื่อถูก inoculate ด้วยแบคทีเรียอาจเป็นผลสืบเนื่องจากการเซลล์ของแบคทีเรียเองอาจสามารถดูดซับ หรือ จับกับแคดเมียมได้โดยตรง หรือแบคทีเรียอาจเปลี่ยนแปลงความสามารถในการละลายของแคดเมียม ทำให้อยู่ในรูปที่ไม่พร้อมต่อการถูกดูดซับเข้าสู่พืช ซึ่งจำเป็นที่จะต้องศึกษากันต่อไป อย่างไรก็ตาม ผลการทดสอบในกระถางพบว่า ทั้ง 53S462 และ 65R471 ยังคงความสามารถในการ colonize ที่รากของหญ้าแฝกได้สูงทัดเทียมกัน คือมีค่า log CFU/g DW เท่ากับ 8.91 ± 0.17 และ 8.79 ± 0.29 ตามลำดับ (ตารางที่ 4.8) ซึ่งใกล้เคียงกับการทดลองใน axenic culture ที่ค่า colonization ของ 53S462 และ 65R471 ที่รากมีค่า log CFU/g DW เท่ากับ 9.26 ± 0.16 และ 9.12 ± 0.25 ตามลำดับ (ตารางที่ 4.7) นอกจากนั้น ทั้ง 2 isolates เมื่อ inoculate สู่รากและดินในกระถาง ยังคงสามารถส่งเสริมการเจริญของหญ้าแฝกภายใต้สภาวะที่มีโลหะหนัก ดังมีการเพิ่มของ chlorophyll a, chlorophyll b และ total chlorophyll ของหญ้าแฝก เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับแบคทีเรีย การ inoculate ทั้ง 2 isolates สามารถลดการลำเลียงสังกะสีจากรากสู่ยอด ซึ่งแสดงด้วยค่า TF ของสังกะสีที่ลดลง และไม่มีผลกระทบต่อการสะสมของตะกั่วและสังกะสีรายวัน ซึ่งแสดงด้วยค่า TAR ที่ไม่มีเปลี่ยนแปลงจากกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับ PGPT นอกจากนั้น การ inoculate 65R471 isolate ยังสามารถเพิ่มค่า TF ของแคดเมียมอย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งชี้แนะว่า ภายหลังการดูดซับแคดเมียมจากดิน มีการเคลื่อนย้ายแคดเมียมจากรากสู่ยอดเพิ่มขึ้น (ตารางที่ 4.8) สำหรับผลของการ inoculate PGPR ที่มีต่อการดูดซับแคดเมียม ตะกั่ว หรือ การสะสมโลหะไว้ในเนื้อเยื่อของพืชที่แตกต่างกันระหว่างการทดลองใน axenic culture และในกระถางไม่เป็นที่น่าแปลกใจมากนัก เนื่องจากการทดลองในกระถางใช้ดินในการปลูกหญ้าแฝกจึงมีหลายปัจจัยเข้ามาเกี่ยวข้องตั้งแต่ส่วนประกอบของเนื้อดิน ความชื้น ค่าความเป็นกรดด่าง และการยากต่อการควบคุมให้มีเพียงจุลินทรีย์เฉพาะชนิดที่ต้องการทดสอบเพียงชนิดเดียวเท่านั้นในดิน ซึ่งต่างจากการทดลองใน axenic culture ที่เพาะเลี้ยงหญ้าแฝกในวุ้นอาหารสังเคราะห์ และสามารถคุมสภาวะปลอดเชื้อเพื่อศึกษาอิทธิพลจากเชื้อชนิดเดียวที่ใช้ในการ inoculate ได้ง่ายกว่า แต่อย่างไรก็ตาม การศึกษาการปลูกหญ้าแฝกลงดินในกระถางร่วมกับแบคทีเรียเป็นการเลียนแบบสภาวะของการประยุกต์ใช้งานแบคทีเรียให้ใกล้เคียงความเป็นจริงที่เกิดในภาคสนามได้มากกว่า มีงานวิจัยมากมาย ที่รายงานผลการทดลองที่แตกต่างกันระหว่างการใช้ axenic culture และการทดลองในกระถาง หรือแม้แต่ใน green house และในภาคสนามจริง เช่น ผลการสะสมและดูดซับสารหนูในพืชที่ inoculate ด้วย PGPR เมื่อทดลองใน axenic culture มีความแตกต่างจากเมื่อทดสอบในกระถาง (Jankong et

al.2007) Brunetti et al. (2011) รายงานค่า TF ของแคดเมียม ตะกั่ว และสังกะสี ใน *Brassica napus* ที่แตกต่างกัน เมื่อทำการทดลองใน green house และในภาคสนาม เพราะแม้จะเป็นจุลินทรีย์ชนิดเดียวกัน หรือเป็น isolate ที่มี PGP traits ที่คล้ายคลึงกันมาก แต่เมื่อ inoculate สู่พืชเจ้าบ้าน (host plants) อาจส่งผลต่อการดูดซับและการสะสมของโลหะหนักในพืชที่แตกต่างกันอย่างสิ้นเชิงได้ ขึ้นกับปัจจัยหลายอย่าง เช่น สภาวะของแบคทีเรียอื่นที่ร่วมอาศัยบริเวณราก (rhizobacteria) หรือการมีพืช หรือ สิ่งมีชีวิตอื่นในบริเวณนั้น ลักษณะจำเพาะทางกายภาพ และเคมีของดินที่แตกต่างกัน รวมทั้งสภาวะภูมิอากาศที่แตกต่างกัน เป็นต้น (Chunilall et al. 2005; Malik et al., 2010) นอกจากนั้น อีกประเด็นที่สำคัญคือ การทดลองใน axenic culture หญ้าแฝกได้รับโลหะแต่ละชนิดแยกกัน ส่วนในการทดลองในกระถาง หญ้าแฝกได้รับโลหะหนักทั้ง 3 ชนิดพร้อมกันในดิน จึงอาจมีปฏิกิริยาร่วมกัน (interaction) ระหว่างโลหะหนัก ที่สามารถส่งผลให้การการดูดซับและการสะสมโลหะหนักในพืชมีความแตกต่างกัน

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

# บทที่ 6

# บทสรุป

## 6.1 สรุปผลการวิจัย

การศึกษาความสามารถของแบคทีเรียที่คัดเลือกจากพื้นที่ซึ่งปนเปื้อนแคดเมียม ในบริเวณแม่ตาว อำเภอแม่สอด จังหวัดตาก เพื่อประยุกต์ใช้ในการส่งเสริมการเจริญและการดูดซับโลหะหนักของหญ้าแฝกที่อยู่ในสภาวะแวดล้อมที่ปนเปื้อนด้วยแคดเมียม ตะกั่วและสังกะสีในปริมาณสูง เพื่อจำลองสถานการณ์ของพืชทางเลือกที่ใช้ฟื้นฟูบริเวณที่ปนเปื้อนทางพฤกษบำบัด สรุปผลการทดลองได้ดังนี้:

1. จากดินที่ปนเปื้อนด้วยแคดเมียมที่ อำเภอแม่สอด จังหวัดตาก สามารถคัดแยกได้แบคทีเรียจำนวน 521 โคโลนีที่สามารถเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผสมแคดเมียม 50 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และผลจากการคัดกรองต่อไปได้แบคทีเรีย จำนวน 6 isolates (1RER2, 25R463, 27RER2, 39SHR, 53S462 และ 65R471) ที่ทนทานต่อโลหะหนัก และมี คุณลักษณะของ PGPR ที่พึงประสงค์ในการประยุกต์ใช้ร่วมกับพืชทางพฤกษบำบัด คือสามารถสร้าง ACC deaminase, auxin, gibberellin, cytokinin และ siderophore สูง และสามารถละลายฟอสเฟส
2. PGPR ทั้ง 6 isolates ที่คัดเลือกมีความทนทานต่อแคดเมียม ตะกั่วและสังกะสี และยังคงรักษาคุณลักษณะของ PGP ภายใต้สภาวะความเครียดจากโลหะหนัก แม้คุณลักษณะอาจมีการปรับเพิ่มขึ้นหรือลดลงบ้าง นอกจากนั้น ทุก isolates สามารถ colonize ที่รากของหญ้าแฝกที่เจริญภายใต้สภาวะแวดล้อมของโลหะหนักได้
3. ผลจากการเปรียบเทียบการใช้ PGPR ที่คัดเลือกร่วมกับหญ้าแฝกลุ่ม และหญ้าแฝกดอนใน axenic culture พบว่า หญ้าแฝกดอน ecotype ราชบุรี ที่ inoculate ด้วย PGPR isolates 1RER2 และ 65R471 มีความสามารถสูงกว่าหญ้าแฝกลุ่ม ecotype สุราษฎร์ธานีในการดูดซับทั้งแคดเมียมและสังกะสี
4. การทดลองในกระถาง พบว่า 65R471 มีความสามารถสูงกว่า 53S462 ในการส่งเสริมการเจริญและการดูดซับสังกะสีของหญ้าแฝกดอน โดยดักจับไว้ที่ส่วนรากเป็นหลัก

## 6.2 ข้อเสนอแนะการวิจัย

1. ศึกษาเพิ่มเติมผลของ PGPR ที่คัดเลือกได้ในการส่งเสริมการเจริญและการดูดซับของโลหะหนัก เมื่อใช้ร่วมกับหญ้าแฝกลุ่มและหญ้าแฝกดอนใน ecotype อื่นๆ เพิ่มเติม
2. ควรมีการศึกษาเพิ่มเติม เพื่อขยายผลการทดลองในกระถางสู่ภาคสนาม (ในบริเวณที่มีการปนเปื้อนของสภาวะแวดล้อมจริง) ว่า PGPR แบคทีเรียที่คัดเลือกได้ทั้ง 2 ชนิดสามารถส่งเสริมการ

เจริญ และเพิ่มประสิทธิภาพการดูดซับโลหะหนักของหญ้าแฝกได้มากน้อยเพียงใด เมื่อเทียบกับหญ้าแฝกที่ไม่ได้รับการ inoculate ด้วยแบคทีเรีย

3. ตรวจสอบความสามารถของ PGPR ที่คัดเลือก เมื่อ inoculate ที่ภาคสนามในบริเวณที่มีการปนเปื้อนของโลหะหนักจริง ว่าแบคทีเรียทีคัดเลือก มีความสามารถในการ colonize อยู่ร่วมกับพืชได้โดยมีปริมาณมากน้อยเพียงใด มีความคงทน (persistency) ยาวนานแค่ไหน และยังคงรักษาคุณลักษณะของ PGP traits ได้หรือไม่ในสภาวะแวดล้อมที่มีการปนเปื้อนนั้น รวมทั้งติดตามความสามารถเหล่านี้ในช่วงอายุที่แตกต่างกันของพืชที่ใช้ในทางพฤกษบำบัด

4. เนื่องจากผลการทดลองที่ปลูกหญ้าแฝกในกระถาง PGPR isolate ที่คัดเลือกได้ ยังไม่มีคุณสมบัติส่งเสริมให้พืชสามารถดูดซับแคดเมียม และตะกั่วได้สูงขึ้น ดังนั้น เพื่อการประยุกต์ใช้ในการบำบัดดินที่ปนเปื้อนด้วยตะกั่ว และ แคดเมียมในอนาคต จึงควรทำการคัดเลือกใหม่ โดยวางแผนการทดลองเพื่อตอบโจทย์ว่าคุณสมบัติใดของ PGP traits ที่ส่งเสริมให้พืชดูดซับแคดเมียม หรือ ตะกั่วได้สูงขึ้นจากดิน เพื่อใช้เป็นแนวทางในการคัดเลือก PGPR ที่มี PGP traits ที่เอื้ออำนวยให้พืชสามารถดูดซับตะกั่ว และแคดเมียมได้ดีขึ้น

5. ศึกษาความสามารถของ PGPR แบคทีเรียที่คัดเลือกในการดูดซับโลหะหนักโดยตรง รวมทั้ง ความสามารถในการเปลี่ยนแปลงรูปของโลหะหนัก (biotransformation) ให้เอื้ออำนวยต่อการดูดซับของพืช

6. ศึกษากลไกในการแสดงออกของโปรตีนต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องกับ PGP traits ของแบคทีเรียภายใต้สภาวะเครียดจากโลหะหนัก เพื่อหากลยุทธ์ในการปรับปรุง PGP traits ที่พึงประสงค์ของแบคทีเรียเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการประยุกต์ใช้ทางพฤษบำบัดให้ดีขึ้น

7. ขยายการทดลองโดยประยุกต์ใช้ PGPR ที่คัดเลือกได้ในการทดลองกับพืชชนิดอื่น ๆ ที่ใช้ทางพฤกษบำบัด หรือใช้กำจัดมลพิษอื่นที่ไม่ใช่โลหะหนัก

8. ประยุกต์ใช้ PGPR ในการส่งเสริมพืชเศรษฐกิจให้ทนทานต่อความเป็นพิษของโลหะหนักหรือมลพิษอื่น

# บรรณานุกรม


ชุติมา นุ่นมัน. (27 มกราคม 2547). แคดเมียม อีกความแปดเปื้อนซ้ำซากประเทศไทย. **มติชนรายวัน**, หน้า 1-2. online: http://www.dmr.go.th/news/27_01_47_2.html

พีระพัฒน์ ชูกำเนิด 2544. **ความสามารถของหญ้าแฝก 5 จีโนไทป์ ในการดูดซับตะกั่วและแคดเมียม**. วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์. กรุงเทพ.

วราภรณ์ ฉุนฉาย 2551. การฟื้นฟูสิ่งแวดล้อมด้วยพืช: phytoremediation. **วารสารวิชาการราชภัฏตะวันตก** 3(1): 134-145.

ศิริลักษณ์ กล้าการขาย ธนูชัย กองแก้ว 2005. **การบำบัดแคดเมียมที่ปนเปื้อนในดินโดยหญ้าแฝก**. 31th Congress on Science and Technology of Thailand. 18-20 October, Nakhon Ratchasima.

สำนักนิเทศและถ่ายทอดเทคโนโลยีการพัฒนาที่ดิน 2550. **สายพันธุ์หญ้าแฝกในการอนุรักษ์ดินและน้ำ**. สนท 030012-2550. www.ldd.go.th/menu_Dataonline/G3/G3 -.pdf

หนึ่ง เตียอำรุง กมลลักษณ์ เทียมไธสง และ นันทกร บุญเกิด 2548. ความรู้ทั่วไปเกี่ยวกับแบคทีเรีย PGPR (Plant Growth Promoting Rhizobacteria) **วารสารเทคโนโลยีสุรนารี** 12(3):249-258

Aarab, S., Ollero, F. J., Megias, M., Laglaoui, A., Bakkali, M., and Arakrak, A. 2015. Isolation and screening of bacteria from rhizospheric soils of rice fields in Northwestern Morocco for different plant growth promotion (PGP) activities: An *in vitro* study. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences** 4(1): 260-269.

Abou-Shanab, R.I., Angle, J.S., Delorme, T.A., Chaney, R.L., van Berkum, P., Moawad, H., Ghanem, K., and Ghozlan, H.A., 2003b. Rhizobacterial effects on nickel extraction from soil and uptake by *Alyssum murale.* **New Phytologist** 158: 219–224.

Adarsh, V.K., Mishra, M., Chowdhury, S., Sudarshan, M., Thakur, A.R., and Chaudhuri, S.R. (2007). Studies on metal microbe interaction of three bacterial isolates from East Calcutta Wetland. **The Journal of Biological Science** 7: 80-88.

Adhikari, T.B., Joseph, C.M., Yang, G., Phillips, D.A., and Nelson, L.M. 2004. Evaluation of bacteria isolated from rice for plant growth promotion and biological control of seedling disease of rice. **Canadian Journal of Microbiology** 47: 916-924.

Alexander, D.B. and Zuberer, D.A. 1991. Use of chrome azurol s reagents to evaluate siderophore production by rhizosphere bacteria. **Biology Fertility and Soils** 2: 39-45.

Alloway, B.J. (1995). Heavy Metals in Soils. ($2^{nd}$ ed.). United Kingdom: Blackie Academic & Professional.

Amico, E.D., Cavalca, L., and Andreoni, V. 2005. Analysis of rhizobacterial communities in perennial *Graminaceae* from polluted water meadow soil, and screening of metal-resistant, potentially plant growth-promoting bacteria. **FEMS Microbiology Ecology** 52(2): 153-162.

Bashan, Y. and de-Bashan, L.E. 2005. Bacteria / Plant growth-promotion. In: D. Hillel (ed.). **Encyclopedia of soils in the environment** (vol. 1, pp. 103-115). Oxford, U.K: Elsevier.

Bauer, A.N., Kirby, W.W., Sherris, I.C., and Turck, N. 1960. Antibiotics susceptibility test by a standardized single disc method. **American Journal of Clinical Pathology** 45: 493-496.

Belimov A.A., Kunakova A.M., Vasilyeva N.D., Kovatcheva T.S., Dritchko V.F., Kuzovatov S.N., Trushkina I.R. and Alekseyev Y.V. 1998. Accumulation of radionuclides by associative bacteria and the uptake of $^{134}Cs$ by the inoculated barley plants. In: Malik et al. (eds.). **Nitrogen Fixation with Non-Legumes** (pp. 275–280). Great Britain: Kluwer Academic Publishers.

Belimov, A.A., and Dietz, K.-J., 2000. Effect of associative bacteria on element composition of barley seedlings grown in solution culture at toxic cadmium concentrations. **Microbiological Research** 155: 113–121.

Belimov, A.A., Hontzeas, N., Safronova, V.I., Demchinskaya, S.V., Piluzza, G., Bullitta, S., and Glick, B.R. 2005. Cadmium-tolerant plant growth-promoting bacteria

associated with the roots of Indian mustard (*Brassica juncea* L. Czern.). **Soil Biology and. Biochemistry** 37:241-250.

Belimov, A.A., Safronova, V.I., Sergeyeva, T.A., Egorova, T.N. Matveyeva, V.A., Tsyganov, V.E., Borisov, A.Y., Tikhonovich, I.A., Kluge, C., Preisfeld, A., Dietz.K.J. and Stepanok, V.V. 2001. Characterization of plant growth promoting rhizobacteia isolated from polluted soils and containing 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase. **Canadian Journal of Microbiology** 47:642-652

Benizri, E., Baudoin, E., and Guckert, A. 2001. Root colonization by inoculate plant growth-promoting rhizobacteria. **Biocontrol Science and Technology** 11: 557-574.

Bingham, F. T. , Pereyea, F. J., and Jarrell, W. M. 1986. Metal toxcity to agricultural crops. **Metal Ions in Biological Systems** 20: 119-156.

Bradford, M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry** 72: 248-258.

Brunetti, B., Farrag, K., Rovira, P.S., Nigro, F., Senesi, N. 2011. Greenhouse and field studies on Cr, Cu, Pb and Zn phytoextraction by Brassica napus from contaminated soils in the Apulia region, Southern Italy. **Geoderma** 160: 517-523.

Bumunang, E.M., and Bahalola, O. 2014. Characterization of rhizobacteria from field grown genetically modified (GM) and non-GM maizes. **Brazilian Archives of Biology and Technology** 57 (1): 1-8.

Burd, G.I., Dixon, D.G., and Glick, B.R. 2000. Plant growth-promoting bacteria that decrease heavy metal toxicity in plants. **Canadian Journal of Microbiology** 46: 237-245.

Burd, G.I., Dixon, D.G., and Glick, B.R., 1998. A plant growth-promoting bacterium that decreases nickel toxicity in seedlings. **Applied Environmental. Microbiology**. 64: 3663–3668.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

Cakmakci, R., Donmez, F., Aydin, A., and Sahin, F. 2006. Growth promotion of plants by plant growth-promoting rhizobacteria under greenhouse and two different field soil conditions. **Soil Biology and Biochemistry** 38: 1482-1487.

Cappuccino, J.C., and Sherman, N., 1992. **Microbiology: A Laboratory Manual**, (3rd ed., pp. 125–179). New York: Benjamin/cummings Pub. Co.

Chen, Y., Shen, Z., and Li, X. 2004. The use of vetiver grass (*Vetiveria zizanioides*) in the phytoremediation of soils contaminated with heavy metals. **Applied Geochemistry** 19: 1553-1565.

Chomchlow, N. 1998. **Amazing Thai vetiver**. Royal Development Project Board. FAO/RAP Publication 1998/40.

Chunilall, V., Kindness, A., and Jonnalagadda, S.B. 2005. Heavy metal uptake by two edible Amaranthus herbs grown on soils contaminated with lead, mercury, cadmium, and nickel. **Journal of Environmental Science and Health** 40(2): 375-384.

Cohen, C.K., Fox, I.C., Garevin, D.F., and Kochian, L.V. 1998. The role of iron deficiency stress responses in stimulating heavy metal transport in plants. **Plant Physiology**. 116: 1063-1072.

Cornish, A.S. and Page, W.J. 2000. Role of molybdate and other transition metal in the accumulation of protochelin by *Azotobacter vinelandii*. **Applied Environmental and Microbiology** 66: 1580-1586.

Defreitas, J.R. and Germida, J.J. 1992 . Growth promotion of winter wheat by fluorescent Pseudomonas under field conditions. **Soil Biology and Biochemistry** 24: 1137-1146.

Delorme, T. A., Gagliardi, J. V. Angle, J. S., Chaney, R. L. 2001. Influence of the zinc hyperaccumulator *Thaspi caerulescens* j. and C. Presl. And the nonmetal accumulator *Trifolium pratense* on soil microbial populations. **Canadian Journal of Microbiology** 47:773-776.

Dey, R., Pal, K. K., Bhatt, D. M. and Chauhan, S. M. 2004. Growth promotion and yield enhancement of peanut (Arachis hypogaea L.) by application of plant growth-promoting rhizobacteria. **Microbiology Research** 159: 371-394.

Dimkpa, C.O., Svatoš, A., Dabrowska, P., Schmidt, A., Boland, W., and Kothe, E. 2008. Involvement of siderophores in the reduction of metal-induced inhibition of auxin synthesis in *Streptomyces* spp. **Chemosphere** 71(1): 19-25.

Duhan

Dworkin, M. and Foster, J. 1958. Experiments with some microorganisms, which utilize ethane and hydrogen. **Journal of Bacteriology** 75: 592-601.

Fahr, M., Laplaze, L., Bendaou, N., Hocher, V., El Mzibri, M., Bogusz, D., and Smouni, A. 2013. Effect of lead on root growth. **Frontiers in Plant Science** 4: 1-7 doi: 10.3389/ fpls.2013.00175

Farwell, A., Nero, V., and Croft, M. 2006. Modified Japanese medaka embryo-larval bioassay for rapid determination of developmental abnormalities. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology** 51: 600-607.

Fischerová, Z., Tlustoš., T., Száková., J., Šichorová, K. 2005. A comparison of phytoremediation capability of selected plant species for given trace elements. **Environmental Pollution** 144: 93-100.

Foy, C.D., Chaney, R. L., and White, M.C. 1978. The physiology of metal toxicity in plants. **Annual Review of Plant Physiology** 29: 511-566.

Garcia de Salamone, I.E., Hynes, R.K., and nelson, L.M. 2001 Cytokini9n production by plant growth promoting rhizobacteria and selected mutants. **Canadian. Journal of Microbiology** 47: 404-411

Gerhardsson, L. (2004). Pb. In: E. Merian (ed.). **Elements and their compounds in the environment: Occurrence, analysis and biological relevance** (2nd ed., pp. 879-900). Germany: WILEY-VCH Verlag GmbH & Co.

Ghosh, A., Singh, A., Ramteke, P.W., and Singh, V.P. (2000). Characterization of large plasmids encoding resistance to toxic heavy metals in *Salmonella abortus equi*. **Biochemical and Biophysical Research Communications** 272: 6-11.

Ghosh, M., and Singh,S.P. 2005. A review on phytoremediation of heavy metals and utilization of its byproducts. **Applied Ecology and. Environmental Research** 3(1): 1-18.

Glick, B.R., 1995. The enhancement of plant growth by free-living bacteria. **Canadian Journal of Microbiology** 41: 109–117.

Glick, B.R., Penrose, D.M., and Li, J. 1998. A model for the lowering of plant ethylene concentrations by plant growth-promoting bacteria. **Journal of Theoretical Biology** 190: 63-68.

Grichko, V.P. and Glick, B.R. 2001. Amelioration of flooding stress by ACC deaminase-containing plant growth-promoting bacteria. **Plant Physiology and Biochemistry** 39: 11–17.

Gutierrez Munero, F.J., Ramos-Solano, B., Probanza, A., Mehouachi, J., Tadeo, F.R., and Talon, M., 2001. The plant-growth-promoting rhizobacteria *Bacillus pumilus* and *Bacillus licheniformis* produce high amounts of physiologically active gibberellins. **Physiologia Plantarum** 111: 206–211.

Hall, J.A., Peirson, D., Ghosh, S., and Glick, B.R. 1996. Root elongation in various agronomic crops by the plant growth promoting rhizobacterium *Pseudomonas putida* GR12–2. Israel. **Journal of Plant Sciences** 44: 37–42.

Hamaoui, B., Abbadi, J.M., Burdman, S., Rashid, A., Sarig, S. and Okon, Y. 2001. Effects of inoculation with *Azospirillum brasilense* on chickpeas _*Cicer arietinum*_ and faba beans _*Viciafaba*_ under different growth conditions. **Agronomie** 21: 553–560.

Hassen, A., Saidi, N., Cherif, M., and Baudabous. A. 1998. Resistance of environmental bacteria to heavy metals. **Bioresource Technology** 64: 7-15.

He, L.Y., Zhang, Y.F., Ma, H.Y., Su, L.N., Chen, Z.J., Wang, Q.Y., and Sheng, X.F. 2010. Characterization of copper-resistant bacteria and assessment of bacterial

communities in rhizosphere soils of copper-tolerant plants. **Applied Soil Ecology** 44(1): 49-55.

Hoflich G and Metz R. 1997. Interactions of plant-microorganism associations in heavy metal containing soils from sewage farms. **Bodenkultur** 48: 239–247.

Holt, J.G., Krieng, N.R., Sneath, P.H.A., Staley, J.T., and Williams, S.T. (1994). **Bergey's Manual of Determinative Bacteriology**. ($9^{nd}$ ed.). Baltimore: Williams & Wilkins.

Hontzeas, N., Hontzeas, C.E., and Glick, B.R. 2006. Reaction mechanisms of the bacterial enzyme 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase. **Biotechnology. Advances** 24:420-426.

Idris, R., Trifonova, R., Puschenreiter, M., Wenzel, W.W., and Sessitsch, A. 2004. Bacterial communities associated with flowering plants of the Ni-hyperaccu- mulator *Thaspi goesingense*. **Applied and Environmental Microbiology** 70: 2667-2677.

Inskeep, W.P. and Bloom, P.R. 1985. Extinction Coefficients of Chlorophyll a and b in N,N-Dimethylformamide and 80% Acetone. **Plant Physiology** 77: 483-485.

Jankong, P., Visoottiviseth, P., and Khongkiattiwong, S. 2007. Enhanced phytoremediation of arsenic contaminated land. **Chemosphere** 68: 1906-1912.

Jiang, C.Y., Sheng, X.F., Qian, M., and Wang, Q.Y. 2008. Isolation and characterization of a heavy metal-resistant *Burkholderia* sp. from heavy metal-contaminated paddy field soil and its potential in promoting plant growth and heavy metal accumulation in metal-polluted soil. **Chemosphere** 72: 157-164.

Joo, G.J., Kim, Y.M., Kim, J.T., Rhee, I.K., Kim, J.H., and Lee, I.J. 2005. Gibberellins-producing rhizobacteria increase endogenous gibberellins content and promote growth of Red pepers. **Journal of Microbiology** 43(6): 510-515.

Joo, G.J., Kim, Y.M.., Lee, I.J., Song, K.S., and Rhee, I.K., 2004. Growth promotinon ofred pepper plug seedlings and the production of gibberellins by *Bacillus cereus*, *Bacillus macroides* and *Bacillus pumilus*. **Biotechnology Letters** 26: 487-491

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

Kabata-pendias, A. and Pendias, H. 1992. **Trace elements in soils and plants** (2nd ed.) Boca Raton, Florida: Lewis Publi. Inc.

Khan, A.G. 2005. Role of soil microbes in the rhizospheres of plants growing on trace metals contaminated soils in phytoremediation. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology** 18: 355-364.

Klassen, C. D., Amdur, M. O., and Doull, J. 1996. **Casarett & Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons** (5th ed.). New York: Macmillan Publishing.

Kobayashi, J. (1978). Pollution by cadmium and the itai-itai disease in Japan. In: F. W. Oehme (ed). **Toxicity of Heavy Metals in The Environment** (pp. 199-260). New York: Marcel Dekker.

Krieg, N.R., Holt, J.G., Boone, D.R., Castenholz, R.W., and Garrity, G.M. 2001. **Bergey's Manual of Determinative Bacteriology**. (2nd ed.). Baltimore: Williams & Wilkins.

Kumar, P.B.A., Dushenkov, V., Motto, H., and Raskin, I. 1995. Phytoextraction: the use of plants to remove heavy metals from soils. **Environmental Science and Technology** 29: 1232-1238.

Lai, H.Y. and Chen, Z.S. (2003). Effects of EDTA on solubility of cadmium, zinc, and Pb and their uptake by rainbow pink and vetiver grass. **Chemosphere** 55: 421-430.

Liang, J. and Mao, J-S. 2016. Risk assessment of lead emmiions from anthropogenic cycle. **Transactions of Nonferrous Metals Society of China** 26:248-255.

Lindsay, W.L. (1972). Zinc in soils and plant nutrition. **Advances in Agronomy** 24: 147-186.

Lindsay, W.L. 1991. Inorganic equilibrium affecting micronutrients in soils. In: J.J. Mortvedt, F.R. Cox, L.M. Shuman, R.M. Welch (eds.) **Micronutrients in Agriculture** (2nd ed., pp 89-112). Madison: Soil Science Society of America.

Lucy, M., Reed, E., and Glick, B.R. 2004. Applications of free living plant growth-promoting rhizobacteria. **Antonie Van Leeuwenhoek** 86:1-25.

Lynch, J., and Brown, K.M. 1997. Ethylene and plant responses to nutritional stress. **Physiologia Plantarum** 100: 613–619.

MacMillan, J. 2002. Occurrence of gibberellins in vascular plants, fungi, and bacteria. **Journal of Plant Growth Regulation** 20: 387-442.

Malik, R.N., S.Z. Husain and I. Nazir, 2010. Heavy metal contamination and accumulation in soil and wild plant species from industrial area of Islamabad, Pakistan. **Pakistan Journal of Botany** 42: 291-301.

Mattigod, S.V. and Sposio, G. 1971. **Chemical modeling in aqueous system**. ed. Jenne, A. American Chemical Society, Washington D.C. 837-856.

Mayak, S., Tirosh, T., and Glick, B.R. 2004. Plant growth –promoting bacteria confer resistance in tomato plants to salt stress. **Plant Physiology and Biochemistry** 42:565-572

McGrath, P., Shen, Z.G., and Zhao, F.J. (1997). Heavy metal uptake and chemical changes in the rhizosphere of *Thlaspi caerulescens* and *Thlaspi ochroleucum* grown in contaminated soils. **Plant and soil** 188: 153-159.

Meepring, A. 2003. **The study on capability of different vetiver grass ecotypes to uptake the heavy metal contaminated soil.** M.Sc. thesis, Mahidol University, Thailand.

Mengoni, A., Barzanti, R., Gonnelli, C., Gabbrielli, R., Bazzicalupo, M. 2001. Characterization of nickel-resistant bacteria isolated from serpentine soil. **Environmental. Microbiology** 11:691-698.

Merian, E., Anke, M., Ihnat, M., and Stoeppler, M 2004. **Elements and their compounds in the environment: Occurrence, analysis and biological relevance.** Germany: Willey-VCH.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

Mirenda, R.J. (1986). Toxicity and accumulation of cadmium in the crayfish, *Orconectes virllis*. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology** 15: 401-407.

Mirza, N., Mubarak, H., Chai, L., Yong, W., Khan, M.J., Khan, Q.U., Hashmi, M.Z., Farooq, U., Sarwar, R., and Yang, Z. 2017. The potential use of *Vetiveria zizanioides* for the phytoremediation of antimony, arsenic and their co-contamination. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology** 99: 511-517.

Office of the Royal Development. (1997). **Factual tips about vetiver grass**. Bangkok. Thailand: Text and Journal Pub.

Okon, Y., Labandera-Gonzalez, C.A. 1994. Agronomic applications of Azospirillium an evaluation of 20 years worldwide field inoculation. **Soil Biology and Biochemistry** 26: 1591-1601.

Oota, Y. and Tsudzuki, T. 1971. Resemblance of growth substances to metal chelators with respect to their actions on duckweed growth. **Plant & Cell Physiology** 12: 619-631.

Papanikolaou, N.C., Hatzidaki, E.G., Belivanis, S., Tzanakakis, G.N., and Tsatsakis, A.M. 2005. Lead toxicity update. A brief review. **Medical Science Monitor** 11(10): RA329-336.

Patterson, W.P., Winkelmann, M., and Perry, M.C. 1985. Zinc-induced copper deficiency: megamineral sideroblastic anemia. **Annual International Medicine** 103: 385-386.

Peeinlyte, D., Repecklene, J., Luganskas, A., Motuzas, A., and Prosycevas, I. 2006. Growth and metal accumulation ability of plants in soil polluted with Cu, Zn and Pb. **Ekologia** 1: 48-52.

Peer, W.A., Baxter, I.R., Richards, E.L., Freeman, J.L., and Murphy, A.S. 2006. Phytoremediation and hyperaccumulator plants. **Topics in Current Genetics** 14: 299-340.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

Penrose, D.M. and Glick, B.R. 2003. Methods for isolating and characterizing ACC deaminase-containing plant growth-promoting rhizobacteria. **Physiology of Plant** 118: 10-15.

Peuke, A.D. and Rennenberg, H. (2005). Phytoremediation: Molecular biology, requirements for application, environmental protection, public attention and feasibility. **EMO reports** 6(6): 497-451.

Picard, C., and Bosco, m. 2003. Soil antimony pollution and plant growth stage affect the biodiversity of auxin-producing bacteria isolated from the rhizosphere of *Achillea ageratum* L. **FEMS Microbiology Ecology** 46:73-80.

Pickering, W. (1980). In J.O. Nriagu (ed.). **Cadmium in the environment. Part 1: Ecological cycling** (pp. 365-397). New York: John Wiley.

Pindi, P. K., Sultana, T., and Vootla, P. K. 2014. Plant growth regulation of Bt-cotton through *Bacillus* species. **3 Biotech** 4: 305-315. Doi 10.1007/s13205-013-0154-0

Pinthong, J., Impithuksa, S., and Ramlee, A. 1998. **The capability of vetiver hedgerows on the decontamination of agro chemical residues: A case study on the production of cabbage at Nong Hoi Development Centre**. Proc. ICV-1, pp. 91-98.ORDPB, Bangkok.

Pishchik, V.N., Vorobyev, N.I., Chernyaeva, I.I., Timofeeva, S.V., Kozhemyakov, A.P., Alexeev, Y.V., and Lukin, S.M. 2002. Experimental and mathematical simulation of plant growth promoting rhizobacteria and plant interaction under cadmium stress. **Plant and Soil** 243: 173–186.

Porrut, B., Shahid, M., Dumat, C., Winterton, P and Pinelli, E. 2011. Lead uptake, toxicity, and detoxification in plants. **Review of Environmental Contamination and Toxicology** 213: 113-136

Raja, C.E., Anbazhagan, K., and Selvam, G.S. 2006. Isolation and characterization of a metal-resistant *Pseudomonas aeruginosa* strain. **World Journal of Microbiology and Biotechnology** 22: 577-585.

Rajkumar, M. and Freitas, H. 2008. Influence of metal-resistant plant growth promoting bacteria on the growth of *Ricinus communis* in soil contaminated with heavy metals. **Chemosphere** 71: 834-842.

Rattanasuk, S. and Ketudat-Cairns, M. 2009. *Chryseobacterium indologenes*, novel mannanase-producing bacteria. Songklanakarin. **Journal of Science and Technology** 31(4): 395-399.

Reed, M.L.E. and Glick, B. 2005 Growth of canola (*Brassica napus*) in the presence of plant growth-promoting bacteria and either copper or polycyclic aromatic hydrocarbons. **Canadian Journal of Microbiology** 51(12): 1061-1069.

Rosen, P.B. 1996. Bacterial resistance to heavy metals and metal contaminated soils. **Microbial Ecology** 37: 218-224.

Rotkittikhun, P., Kruatrachue, M., Chaiyarat, R., Ngernsansaruay, C., Pokethitiyook, P., Paijitprapaporn, A., and Baker, A.J.M. (2006). Uptake and accumulation of Pb by plants from the Bo Ngam Pb mine area in Thailand. **Environmental Pollution** 144: 68

Sampanpanish, P., Pongsapich, W., Khaodhiar, S. and Khan, E. 2006. Chromium removal from soil by phytoremediation with weed plant species in Thailand. **Water, Air & Soil Pollution: Focus** 6(1-2): 191-206.

Sannita di Toppi, L., and Gabbrielli, R. 1999. Response to cadmium in higher plants. **Environmental and Experimental Botany** 41: 105-130.

Sarwar, M. and Kremer, R.J. 1995. Enhanced suppression of plant growth through production of L-tryptophan-derived compounds by deleterious rhizobacteria. **Plant and Soil** 172: 261-269.

Schnoor, J.L. 2003. **Phytoremediation of soil and ground water**. Technology Evaluation Report TE-02-01. USA: Ground-Water Remediation Technologies Analysis Center.

Sekhar, K.C., Kamala, C.T., Chary, N.S., Balaram, V. 2005. Potential of *Hemidesmus indicus* for phytoextraction of lead from industrially contaminated soils. **Chemosphere** 58(4): 507-514.

Shah and Dubey, 1995 Effect of cadmium on RNA level as well as activity and molecular forms of ribonuclease in growing rice seedlings. **Plant Physiology and. Biochemistry** 33: 577–584

Shah, S., Li, J., Moffatt, B.A., and Glick, B.R. 1998. Isolation and characterization of ACC deaminase genes from two different plant growth-promoting rhizobacteria. **Canadian Journal of Microbiology** 44: 833-843.

Sharma, A., Johri, B.N., Sharma, A.K., and Glick, B.R. 2003. Plant growth-promoting bacterium *Pseudomonas* sp. Strain $GRP_3$ influences iron acquisition in mung bean (Vigna radiate L. Wilzeck). **Soil Biology and. Biochemistry** 35:887-894.

Sharma, P. and Dubey, R.S. 2005. Lead toxicity in plants. **Brazilian Journal of Plant Physiology** 17(1): 35-52.

Sharma, S.S., Kaul, S., Metwally, a., Goyal, K.C., Finkemeier, I., and Dietz, K.J. 2004. Cadmium toxicity to barley (Hordeum vulgare) as affected by varying Fe nutritional status. **Plant Science** 166:1287-1295.

Sheng, X.F., and Xia, J.J. 2006. Improvement of rape (*Brassica napus*) plant growth and cadmium uptake by cadmium-resistant bacteria. **Chemophere** 64(6): 1036-1042.

Siedlecka, A., and Krupa, Z. 1996. Interaction between cadmium and iron and its effects on photosynthetic capacity of primary leaves of *Phaseolus vulgaris*. **Plant Physiology and. Biochemistry** 34: 833-841

Simmons, R.W., Pongsakul, P., Saiyasitpanich, D., and Klinphoklap, S. 2005. Elevate levels of cadmium and zinc in paddy soils and elevated levels of cadmium in rice grain downstream of a zinc mineralized area in Thailand: Implications for public health. **Environmental Geochemistry and Health** 27: 501-511.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

Sinha, S. and Mukherjee, S.K. 2008. Cadmium–induced siderophore production by a high Cd resistant bacteria strain relieved Cd-toxicity in plants through root colonization. **Current of Microbiology** 56: 55-60.

Sol´ıs-Dom´ınguez, F.A., Gonz´alez-Ch´avez, M.C., Carrillo- Gonz´alez, R., and Rodr´ıguez-V´azquez, R. 2007. Accumulation and localization of cadmium in *Echinochloa polystachya* grown within a hydroponic system. **Journal of Hazardous Materials** 141: 630-636.

Spear, P.A. (1981). **Zinc in the Aquatic Environment: Chemistry, Distribution and Toxicology**. National Res. Counc. of Canada, NRCC No. 17589. Ottawa, Ont., Canada. 145 pp.1-688.

Srisatit, T. , Kosakul, T., and Dhitivara, D. 2003. Efficiency of arsenic removal from sol by *Vetiveria zizanioides* (Linn) Nash and *Vetiveria nemoralis* (Balansa) Camus. **Science Asia** 29:291-296.

Srisatit, T., W. 2003. Efficiency of Colocasia Esculenta (L.) Schott (Bon Khiew and Bon Cheen Dumm) in **Constructed Wetlands for Chromium Removal of Tannery Post-Treatment Wastewater**. The $11^{th}$ Presentation of Foundation-Assisted Research Findings Overseas “Environmental Research, Engineering Technologies, and Health Sciences”. May 30. Bangkok: Chulalongkorn University.

Stenlid, G. 1982. Cytokinins as inhibitors of root growth. **Physiologia Plantarum** 56: 500–506.

Suthersan, S.S. (1999). **Phytoremediation: remediation engineering-design concepts.** CRC Press LLC.

Thakuria, R.K., Harbir, S., and Tej, S. 2004. Effect of irrigation and antitranspirants on growth and yield of spring sunflower (*Helianthus annuus* L.). **Annual of Agricultural Research** 25: 433-438.

Truong, P. 1999. **Vetiver grass system for mine rehabilitation**. Technical Bulletin No. 1999/2. Pacific Rim Vetiver Network Bangkok, Thailand. Office of the Royal Development Projects Board.

Truong, P.N. and Baker, D. 1998. **Vetiver grass system for environmental protection**. PRVN Technical Bulletin. No. 1998/1. Bangkok: ORDPB.

U.S. Environmental Protection Agency 1979. **The health and environmental impacts of Pb and an assessment of a need for limitations**. U.S. Environ. Protection Agency Rep. 560/2-79-001. 494 pp.

Vedder-Weiss, D. Jurkevitch, E., Burdman, S., Weiss, D., and Okon, Y. 1999. Root growth, respiration and beta-glucosidase activity in maize (*Zea mays*) and common bean (*Phaseolus vulgaris*) inoculated with Azospriillum brasilense. **Symbiosis** 26: 363-377.

Verma, T., Srinath, T., Gadpayle, R.U., Ramieke, P.W., Hans, R.K., and Garg, S.K. 2001. Chromate tolerant bacteria isolated from tannery effluent. **Bioresource Technology** 78: 31-35.

Vivas, a., Biro, B., Ruiz-Lozano, J.M., Barea, J.M., and Azcon, R. 2006. Two bacterial strains isolated from a Zn-polluted soil enhance plant growth and mycorrhizal efficiency under Zn-toxicity. **Chemophere** 62: 1523-1533.

Wani, P.A., Khan, M.S., and Zaidi, A. 2007. Chromium Reduction, Plant Growth Promoting Potentials and Metal Solubilization by *Bacillus* sp. isolated from alluvial soil. **Current Microbiology** 54: 237-243.

Weidhase, R.A., Lehmann, J., Kramell, H., Sembdner, G., and Parthier, B. 1987. Degradation of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase and chlorophyll in senescing barley leaf segments triggered by jasmonic acid methylester, and counteraction by cytokinin. **Physiologia Plantarum** 69: 161–166.

Whiting, S.N., de Souza, M.P., and Terry, N. 2001. Rhizosphere bacteria mobilize Zn for hyperaccumulation by *Thlaspi caerulescens*. **Environmental Science and Technology** 15: 3144–3150.

WHO. 1992. **Cadmium: Environmental health criteria**. No. 134. Geneva, Switzerland: International Programme on Chemical Safety (IPCS).

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

Wohler, I., 1997. Auxin-idole derivatives in soils determined by a colorimetric method and by high performance liquid chromatography. **Microbiology Research** 152: 399-405

Yang, B., Shu, W.S., Ye, Z.H., Lan, C.Y., and Wong, M.H. 2003. Growth and metal accumulation in vetiver and two Sesbania species on Pb/zinc mine tailings. **Chemosphere** 52: 1593-1600.

Zahid, M., Abbasi, M.K., Hameed, S., and Rahim, N. 2015. Isolation and identification of indigenous plant growth promoting rhizobacteria from Himalayan region of Kashmir and their effect on improving growth and nutrient contents of maize (*Zea mays* L.) **Frontiers in Microbiology** 6:1-10. Doi: 10.3389/fmicb.2015.00207.

Zaidi, S., Usmani, S., Singh, B.R., and Musarrat, J. 2006. Significance of *Bacillus subtilis* strain SJ-101as a bioinoculant for concurrent plant growth promotion and nickel accumulation in *Brassica juncea*. **Chemosphere** 64: 991-997.

Zelicoff, J.T. and Thomas, P. 1998. **Immunotoxicology of environmental and occupational metals**. WA (USA): CRC Press, Taylor & Francis Books Ltd.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

# ภาคผนวก

## ผลงานตีพิมพ์

1. Aksorn, E., and **Chitsomboon, B.** (2013). Bioaccumulation of heavy metal uptake by two different Vetiver grass (*Vetiveria zizanioides* and *Vetiveria nemoralis*) species. **African Journal of Agricultural Research** 8(24): 3166-3171.

2. Aksorn, E., and **Chitsomboon, B.** (2013). The Effects of Plant Growth Promoting Traits on Heavy Metal Uptake of Vetiver Grasss. **American-Eurasian Journal of Agricultural & Environmental Science** 13 (4): 465-470.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

academicJournals

Vol. 8(24), pp. 3166-3171, 27 June, 2013
DOI: 10.5897/AJAR12.2066
ISSN 1991-637X ©2013 Academic Journals
http://www.academicjournals.org/AJAR

African Journal of Agricultural Research

*Full Length Research Paper*

# Bioaccumulation of heavy metal uptake by two different Vetiver grass (*Vetiveria zizanioides* and *Vetiveria nemoralis*) species

**Ekkasit Aksorn* and Benjamart Chitsomboon**

Department of Environmental Biology, Institute of Science, Suranaree University of Technology, Nakhonratchasima Province, 30000, Thailand.

Accepted 17 June, 2013

**The efficiency of Cd, Pb and Zn uptake of upland vetiver grass (*Vetiveria nemoralis*) ecotypes as Kamphaeng Phet1, Prajuab Kirikhun, and Ratchaburi and lowland vetiver grass (*Vetiveria zizanioides*) ecotypes consisting of Kamphaeng Phet2, Mae Hongson, and Surat Thani were compared under sterile condition for interferent repudiation. The results showed that the total Cd accumulation of *V. zizanioides* was in the order of Kamphaeng Phet1 > Ratchaburi > Prajuab Kirikhun ecotype and in *V. nemoralis* was Mea Hongson approximately Kamphaeng Phet2 > Surat Thani ($p < 0.05$). All the vetiver grass ecotypes preferentially accumulated Pb in roots than shoots, with the rate of translocation less than 1. However, the efficiency of Cd and Zn translocation was different, depending on each vetiver ecotype. In addition, all vetiver ecotypes, except Kamphaeng Phet1, displayed high capability of Zn uptake in both shoots and roots after 7 days. Therefore, the vetiver plant can be considered a good "hyperaccumulator" only for Zn.**

**Key words:** *Vetiveria zizanioides*, *Vetiveria nemoralis*, total accumulation rate (TAR), transport factor (TF).

## INTRODUCTION

Environmental heavy metal contamination is a major global concern due to the high persistency, potential toxicities and bioaccumulation of metals in living organism (Gardea-Torresdey et al., 2004; Singh et al., 2004). The remediation technologies of heavily heavy metal contaminated soils are generally extremely complicated and expensive. Phytoremediation is an alternative emerging technology utilizing plants to reduce, remove, degrade or immobilize xenobiotics from contaminated environment (Suthersan, 1999). The advantages of phytoremediation are relatively simple, eco-friendly and cost effective compared to other conventional strategies (Burd et al., 2000; Glick, 2003; McGrath et al., 1997). However, in order to survive and be established at the high level of metal-polluted sites, plants must acquire the capabilities to grow, produce high biomass and evolve to tolerate metal toxicities as well as other hostile environment conditions. Having a deep and dense root system, vetiver is a good candidate for phytoremedial work. Vetiver grass which can be taxonomically classified into 2 dominant species namely *Vetiveria nemolaris* as upland vetiver and *Vetiveria zizanioides* as lowland vetiver is well recognized for its effectiveness in soil erosion and sediment control, high tolerance to extreme environmental variations including prolonged drought, flood, extreme fluctuations of temperature (22-60°C), soil pH (3.0-10.5), and most importantly high tolerance to heavy metal stress

*Corresponding author. E-mail: ek_aksorn@yahoo.com. Tel: +66894252011.

(Truong and Baker, 1998). The aims of this study were to compare the uptake efficiency of Cadmium (Cd), Lead (Pb) and Zinc (Zn) on 2 species of vetiver grass, *Vetiver zizanioides* and *Vetiveria nemoralis*, in axenic condition. In addition, the pattern of metal distribution and translocation in plant parts were also investigated.

## MATERIALS AND MEDTHODS

### Plant cultures

One month tissue culture of *V. zizanioides* (Kamphaeng Phet1, Prajuab Kirikhun, and Ratchaburi ecotypes) and *V. nemoralis* (Kamphaeng Phet2, Mae Hongson, and Surat Thani ecotypes) were cultured in sterile 30 cm length glass tubes containing 0.7% agar in Musashige and Skoog medium (as ppm of 1,650.0 $NH_4NO_3$, 6.20 $H_3BO_3$, 332.20 $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, 0.0250 $CoCl_2 \cdot 6H_2O$, 0.0250 $CuSO_4 \cdot 5H_2O$, 37.260 $Na_2EDTA \cdot 2H_2O$, 27.80 $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 2.0 Glycine, 180.70 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 16.90 $MnSO_4 \cdot 4H_2O$, 100.0 myo-Inositol, 0.50 nicotinic acid, 0.830 KI, 1,900.0 $KNO_3$, 170.0 $KH_2PO_4$, 0.50 Pyridoxine hydrochloride, 0.250 $Na_2MoO_4.2H_2O$, 0.10 Thiamine hydrochloride, 8.60 $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$) in the absence or presence of one heavy metal (20 ppm Cd or 500 ppm Zn or 500 ppm Pb). These heavy metal concentrations were chosen as they are the metal tolerance levels in soil of vetiver grass (Truong, 2000). Tubes were closed with sterile cottons and kept in a plant growth chamber at 23 to 28°C for 7 days. Each treatment variable was conducted in triplicates.

### Heavy metal extraction

At the end of experiment, vetivers were weighed for biomass determination, and then heavy metal concentration was determined as described by Farwell et al. (2007). Briefly, plants were extensively rinsed with several changes of 0.01 M EDTA and followed by distilled water to remove some non-specifically bound heavy metal. Afterwards, the separated shoots and roots of grass were dried in a hot air oven at 65°C for 1 day and were finely cut. 30 mg dried plant samples were digested with 0.8 ml of purified $HNO_3$ in an incubator at 65°C for 3 h. The supernatants were determined for heavy metals by Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrophotometry (GFAAS) model Perkin Elmer AAnalyst 100.

The plant heavy metal uptakes were expressed as total accumulation rate (TAR) (Zhu et al., 1999) and transport factor (TF) as described previously (Marchiol et al., 2004) and were calculated by the following formula:

$$TAR = \frac{(\text{Shoot dry weight (g)} \times \text{Shoot HM conc } (\mu g/g)) + (\text{Root dry weight (g)} \times \text{Root HM conc } (\mu g/g))}{((\text{Shoot dry weight (g)} + \text{Root dry weight (g)}) \times \text{days of harvest})}$$

$$TF = \left[\frac{\text{Shoot heavy metal conc } (\mu g/g)}{\text{Root heavy metal conc } (\mu g/g)}\right]$$

HM conc. = heavy metal concentration

### Statistical analysis of data

The results were expressed as mean ± SD from three biological replicates. Data were analyzed by one-way analysis of variance (ANOVA) with means separated using Duncan's multiple range test. $P < 0.05$ was considered statistically significant. All data were analyzed by SPSS 16.0 software.

## RESULTS

### Heavy metal concentration in vetiver

The total Cd accumulation of *V. zizanioides* was in the order of Kamphaeng Phet1 > Ratchaburi > Prajuab Kirikhun ecotypes and for *V. nemoralis* was Mea Hongson approximately Kamphaeng Phet2 > Surat Thani ecotypes ($p < 0.05$). For over all comparison, Kamphaeng Phet1, Mea Hongson and Kamphaeng Phet2 exhibited almost equally highest efficiency of Cd uptake up to 600 ppm (Figure 1). In addition, most of the tested plants stored more Cd in shoots. The total Pb uptake by the tested plants ranges from 381 to 606 ppm. Though Kamphaeng Phet1, Surat Thani, Kamphaeng Phet2 and Mae Hongson ecotypes showed the trend of higher Pb accumulation (>500 ppm), the bioaccumulation levels were not significantly different from Ratchaburi and Prajuab Kirikhun. Notably, the root Pb concentrations of all tested plants were at least 4 times higher than in shoots. The capacity of Zn uptake was in the range of 8,714 to 23,285.4 ppm. All tested plants except Kamphaeng Phet1 were able to uptake and accumulate Zn higher than 10,000 ppm.

### Heavy metal translocation in vetiver

Translocation factor (TF) is the ratio that indicates the relative transportation of metals from roots to shoots of the plants (Mellem et al., 2012). TF values of greater than 1 indicate the greater translocation of metals from root to the shoot part of the plant. In contrast, TF values of less than 1 mean that metals are largely store in the root part of plants (Mellem et al., 2012; Rezvani and Zaefarian, 2011). According to Table 1, ecotypes Mae Hongson, Prajuab Kirikun and Ratchaburi were capable of accumulating Cd higher in the shoot part than in the root part, with the maximum translocation capability (TF > 1) observed in the Ratchaburi ecotype (TF = 1.92±0.02). However, the total metal accumulation rate as indicated by the TAR values in Table 1 suggested no differences in the total accumulation per day of both Cd and Pb in all tested vetiver ecotypes. For Pb, the TF value of less than 1 indicated that all tested ecotypes preferentially accumulated Pb in roots rather than shoots (Table 1). In addition, Surat Thani exhibited higher intrinsic capability of Pb translocation than Ratchaburi and Mae Hongson ecotypes. Kamphaeng Phet2, Ratchaburi and Surat Thani showed bulk Zn contents in shoots rather than roots (TF > 1) suggesting their high potential of Zn translocation. The Ratchaburi and Surat Thani significantly displayed higher potential of Zn translocation than the rest of tested ecotypes ($p < 0.05$). The total Zn

**Table 1.** Heavy metal concentration in different vetiver grass ecotypes grown under heavy metal stress.

| Vetiver | 20 ppm Cd | | 500 ppm Pb | | 500 ppm Zn | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | TF* | TAR** | TF | TAR | TF | TAR |
| Kum Phangphet1 | $0.61\pm0.12^{a}$ | $2.547\pm0.255^{a(c)}$ | $0.26\pm0.06^{ab}$ | $0.03\pm0.013^{a(a)}$ | $0.42\pm0.08^{bc}$ | $1.081\pm0.552^{a(b)}$ |
| Kum Phangphet2 | $0.87\pm0.25^{a}$ | $2.296\pm0.559^{a(c)}$ | $0.28\pm0.08^{ab}$ | $0.034\pm0.001^{a(a)}$ | $2.47\pm0.83^{b}$ | $1.087\pm0.045^{a(b)}$ |
| Mae Hongson | $1.41\pm0.83^{b}$ | $2.293\pm0.622^{a(c)}$ | $0.20\pm0.06^{a}$ | $0.033\pm0.007^{a(a)}$ | $0.70\pm0.33^{ab}$ | $1.557\pm0.458^{b(b)}$ |
| Prajuab Kirikun | $1.80\pm0.74^{b}$ | $1.702\pm0.603^{a(c)}$ | $0.29\pm0.13^{ab}$ | $0.021\pm0.007^{a(a)}$ | $0.31\pm0.26^{a}$ | $0.847\pm0.474^{a(b)}$ |
| Ratchaburi | $1.92\pm0.02^{c}$ | $1.992\pm0.591^{a(b)}$ | $0.21\pm0.16^{a}$ | $0.028\pm0.001^{a(a)}$ | $4.41\pm0.27^{c}$ | $1.884\pm0.596^{b(b)}$ |
| Surat Thani | $0.77\pm0.13^{a}$ | $2.612\pm1.059^{a(c)}$ | $0.45\pm0.07^{b}$ | $0.028\pm0.011^{a(a)}$ | $3.79\pm1.39^{c}$ | $1.197\pm0.428^{a(b)}$ |

Value in the same column with different superscript are significantly different at $p < 0.05$. Value in parentheses ( ) in the same TAR roll with different superscript are significantly different at $p < 0.05$.

$$*TF = \left[\frac{\text{Shoot heavy metal conc } (\mu g/g)}{\text{Root heavy metal conc } (\mu g/g)}\right]$$

$$**TAR = \frac{(\text{Shoot dry weight } (g) \times \text{Shoot HM conc } (\mu g/g)) + (\text{Root dry weight } (g) \times \text{Root HM conc } (\mu g/g))}{((\text{Shoot dry weight } (g) + \text{Root dry weight } (g)) \times \text{days of harvest})}$$

accumulation rate (TAR) of Ratchaburi was more effective than Kamphaeng Phet1, Kamphaeng Phet 2 and Prajuab Kirikun. There were no differences of Zn total accumulation rate among Surat Thani and Mae Hongson ecotypes (Table 1). All the tested vetiver surprisingly showed the best Cd accumulation rate (TAR) followed by Zn and Pb, respectively ($p < 0.05$) as shown in Table 1.

## DISCUSSION

A raising concern regarding human health risks and environmental consequences associated with heavy metal pollution have created a need for efficient and effective remediation strategies. Phytoremediation has recently attracted a great attention as a highly promising strategy because it is relatively inexpensive, environmentally-friendly, and more aesthetically pleasing compared to the other remediation technologies. This study chose upland (*V. zizanioides*) and lowland (*V. nemoralis*) vetiver grass as the test plants for phytoremediation due to their fast growth, high biomass, deep massive and fibrous root system, versatile adaptability under various harsh environmental conditions, and most importantly, high resistance to heavy metal toxicities (Chomchalow, 2011; Roongtanakiat and Chairoj, 2001; Truong and Baker, 1998). At present, there are still very few studies on the potential of vetiver for the use in phytoremediation especially the comparison of metal remediation efficiency among different vetiver ecotypes (Punamiya et al., 2010; Roongtanakiat and Chairoj, 2001, 2002; Roongtanakiat et al., 2007). Therefore, the present study explored the capability and compared the efficiency of heavy metal uptake, translocation and accumulation among different ecotypes of upland and lowland vetivers. The experiments were intentionally conducted under axenic condition to avoid un-estimated effects of other environmental factors that might affect the metal uptake efficiency.

Different ecotypes of vetiver were ranked in descending order of the capability to uptake Cd as follows: Kamphaeng Phet1 ~ Mea Hongson ~ Kamphaeng Phet2 > Ratchaburi ~ Surat Thani > Prajuab Kirikhun (Figure 1). In contrast, Roongtanakiat and Chairoj (2002) reported that there were significantly higher concentrations of cadmium in Ratchaburi ecotype compared to those found in Surat Thani and Kamphaeng Phet ecotypes in the pot experiment. Variations of each vetiver ecotype, soil properties, the existing soil microorganisms (Truong, 1999) and season of planting (Devies, 1997) are among the factors that can affect the heavy metal uptake efficiency. These probably explained the different results obtained in the present study which was conducted under axenic condition. Therefore, the different results observed from the axenic and pot experiments might be caused by various properties of the media and soil which are different under axenic and pot conditions. A variation of plant species also widely exhibited different ability of heavy metal accumulation (Baker and Senft, 1997).

All tested ecotypes in both species of vetiver grass displayed equal capability of Pb uptake when cultured under axenic media supplemented with 500 ppm Pb (Figure 1B), and the uptake was in the range of 400 to 600 ppm Pb. Similarly, Punamiya et al. (2010) studied Pb accumulation by vetiver grass [*Chrysopogon zizanioides* (L.)] in hydroponic solutions supplemented with 2,070, 4,140 and 8,280 ppm Pb. The results found that the corresponded Pb uptakes by the vetiver grass were 600, 900 and 1,400 ppm, respectively. The present study demonstrated that almost all tested vetiver ecotypes, except Kamphaeng Phet1, could be regarded as Zn hyperaccumulator as all displayed a capacity of Zn

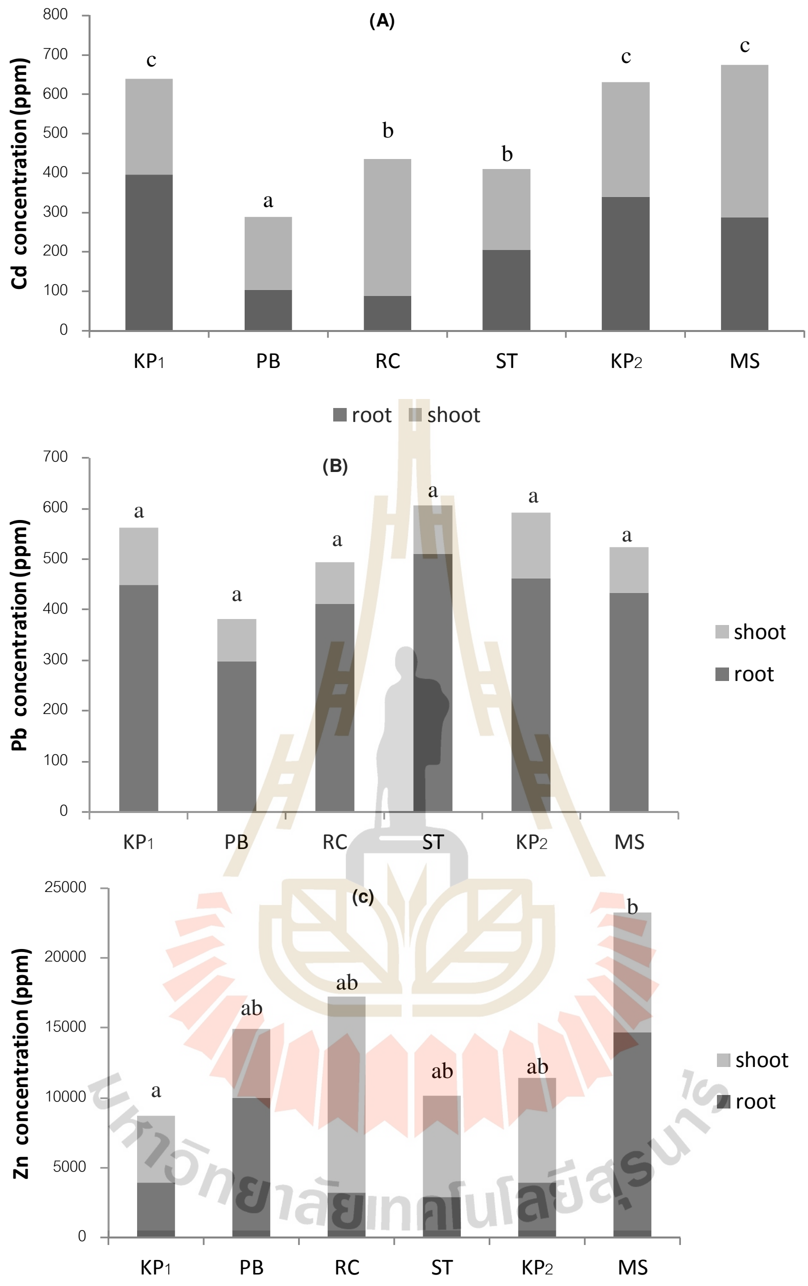



**Figure 1.** Total heavy metal uptake of *V. zizanioides* (Kumphang Phet1 (KP1), Prajuab Kirikhun (PB), and Ratchaburi (RC)) and *V. nemoralis* (Kumphang Phet2 (KP2), Mae Hongson (MS), and Surat Thani (ST)) ecotypes grown under Cd (A), Pb (B), or Zn (C). Bars of each ecotype with different superscript are significantly different at $p < 0.05$.

uptake more than 1% of their dry weight. This agrees to the term defined by Baker and Brooks (1989) who referred plants with a capability to accumulate Zn more than 1% of their dry weight as "hyperaccumulators". The result in Figure 1C also suggested that Mae Hongson ecotype is the best Zn hyperaccumulator while

Kamphaeng Phet1 is the least. In addition, the results showed that the increasing TAR value corresponded with the increasing Zn uptake in vetiver grass in accordance with Kosesakal et al. (2011). They reported that higher metal application rate causes the increasing metal uptake and significantly increase TAR tend. Similar to our results significantly showed the higher TAR value of Cd and Zn application than Pb application. Notably, the capacities of Pb uptake by the vetiver in the study of Punamiya et al. (2010) were all much lower than the supplemented concentrations of metals. On the contrary, the present study demonstrated that all tested ecotypes of both vetiver species could concentrate Cd, Pb and Zn many folds higher than their surrounding (supplemented) metal concentrations.

The capability of vetiver grass to concentrate higher amount of metals than its surrounding environment concentrations and preferentially accumulate higher level of Zn than Pb were also supported by other investigators. Antiochia et al. (2007) reported that *V. zizanioides* could accumulate 6,000 ppm Pb and 9,500 ppm, Zn after 8 days of exposure to 621 ppm Pb and 653 ppm Zn of supplemented soil in the pot study. They concluded that *V. zizanioides* is an effective hyperaccumulator for both Pb and Zn. Ratchaburi ecotype exhibited the highest translocation of Cd from roots to shoots ($p < 0.05$) while Mae Hongson and Prajuab Kirikun showed a trend of higher Cd translocation than the rest of tested ecotypes (Table 1). Similarly, Rezvani and Zaefarian (2011) exhibited the translocation factor of Cd more than one by *Aeluropus littoralis* in pot experiments. Roongtanakiat and Chairoj (2002) also reported that Ratchaburi ecotype preferentially accumulated Cd higher in shoots rather than roots while there were no differences in Pb translocation capability among tested vetiver ecotypes, Ratchaburi and Surat Thani significantly displayed the highest translocation of Zn from the roots to the shoot parts (Table 1). Results from the present study suggested that all tested vetiver ecotypes could effectively act as phytostabilizer for Pb which the metal were mainly retained in the root part of the plants with the TF values of less than 1 (Figure 1B and Table 1). The low metal translocation to their aerial parts or mainly restrict metal in their root call metal excluders (Ghosh and Singh, 2005). In agreement with the present study, Chen et al. (2004) also reported the low translocation of Pb from roots to shoots in *V. zizanioides.* Tang et al. (2009) also pronounced the TF value of *Arabis paniculata* Franch less than one when was supplemented with range of Pb concentration (9-267 µM). Consequently, vetiver grass might be a remediated plant of choice for immobilization of Pb at the contaminated sites. In addition, Ratchaburi ecotype which exhibited the highest Cd translocation could be a good candidate for phytoextraction of Cd-contaminated soils. All tested ecotypes of vetiver except Kamphaeng Phet1 are only good hyperaccumulator for Zn, but not for Cd and Pb. Therefore, different ecotypes of vetiver grass possess distinct capability and efficiency in remediating certain heavy metals through various phytoremedating mechanisms under axenic culture. These differences should be taken under consideration to warranty for a fruitful exploitation of vetiver as remediating plants for heavy metals in further pot and field studies.

**REFERENCES**


Antiochia R, Campanella L, Ghezzi P, Movassaghi K (2007). The use of vetiver for remediation of heavy metal soil contamination. Anal. Bioanal. Chem. 388:947-956.

Baker AJM, Brooks RR (1989). Terrestrial higher plants which hyperaccumulate metalic elements. A review of their distribution, ecology and phytochemistry. Biorecovery 1:81-126.

Baker DE, Senft JP (1997). Copper. In: Alloway BJ (ed).Heavy Metals in Soils, Blackie Academic and Professional, London. pp. 179-205.

Burd GI, Dixon DG, Glick BR (2000). Plant growth-promoting bacteria that decrease heavy metal toxicity in plants. Can. J. Microbiol. 46:237-245.

Chen Y, Shen Z, Li X (2004). The use of vetiver grass (*Vetiveria Zizanioides*) in the phytoremediation of soils contaminated with heavy metals. App. Geochem. 19:1553-1565.

Chomchalow N (2011). Vetiver Research, Development and Applications in Thailand. AU J.T. 14(4):268-274.

Farwell AJ, Vesely S, Nero V, Rodriguez H, McCormack K, Shah S, Dixon DG, Glick BR. (2007). Tolerance of transgenic canola plant (*Brassica napus*) amended with plant growth-bacteria to flooding stress at a metal-contaminated field site. Environ. Pollut. 147:540-545.

Gardea-Torresdey J, Peralta-Videa J, Montes M, De La Rosa G, Corral-Diaz B (2004). Bioaccumulation of Cadmium, Chromium and Copper by *Convolvulus arvensis* L.: impact on plant growth and uptake of nutritional elements. Biores. Technol. 92:229-235.

Ghosh M, Singh SP (2005). A Review on Phytoremediation of Heavy Metals and Utilization of. It's by Products As. J. Energy Env. 6(04):214-231.

Glick B (2003). Phytoremediation: synergistic use of plants and bacteria to clean up the environment. Biot. Adv. 21:383-393.

Kosesakal T, Yuzbasioglu E, Kaplan E, Baris C, Yüzbasioglu S, Belivermis M, Cevahir-Oz G, Unal M (2011). Uptake, accumulation and some biochemical responses in *Raphanus sativus* L. to zinc stress. Afr. J. Biotechnol. 10(32):5993-6000.

Marchiol L, Assolari S, Sacco P, Zerbi G (2004). Phytoextraction of heavy metals by canola (*Brassica napus*) and radish (*Raphanus sativus*) grown on multicontaminated soil. Environ. Poll. 132:21-27.

McGrath P, Shen ZG, Zhao FJ (1997). Heavy metal uptake and chemical changes in the rhizosphere of *Thlaspi caerulescens* and *Thlaspi ochroleucum* grown in contaminated soils. Plant. Soil 188:153-159.

Mellem JJ, Baijnath H, Odhav B (2012). Bioaccumulation of Cr, Hg, As, Pb, Cu and Ni with the ability for hyperaccumuation by *Amaranthus dubius*. Afr. J. Agric. Res. 7(4):591-596.

Punamiya P, Datta R, Sarkar D, Barber S, Patel M, Das P (2010) Symbiotic role of Glomus mosseae in phytoextraction of lead in vetiver grass [*Chrysopogon zizanioides* (L.)] J. Hazard. Mater. 177(1-3):465-474.

Rezvani M, Zaefarian F (2011). Bioaccumulation and translocation factors of cadmium and lead in *Aeluropus littoralis*. Aust. J. Agric. Engin. 2(4):114-119.

Roongtanakiat N, Chairoj P (2001). Uptake potential of some heavy metals by vetiver grass. Kasetsart J. Nat. Sci. 35:46-50.

Roongtanakiat N, Chairoj P (2002). Vetiver grass for the remediation of soil contaminated with heavy metals. 17$^{th}$ WCSS, 14-21 August 2002, Symposium no. 42. Thailand.

Roongtanakiat N, Tangruangkiat S, Meesat R (2007). Utilization of Vetiver Grass (*Vetiveria zizanioides*) for Removal of Heavy Metals from Industrial Wastewaters. Sci. Asia. 33:397-403.

Singh KP, Mohon D, Sinha S, Dalwani R (2004). Impact assessment of

treated untreated wastewater toxicants discharge by sewage treatment plants on health, agricultural, and environmental quality in wastewater disposal area. Chemosphere 55:227-255.

Suthersan SS (1999). Phytoremediation: Remediation engineering-design concepts. CRC Press LLC.

Tang YT, Rong-Liang Qiu RL, Zenga JW, Ying RR, Yu FM, Zhou XY (2009). Lead, zinc, cadmium hyperaccumulation and growth stimulation in *Arabis paniculata* Franch. Environ. Exp. Bot. 66:126-134.

Truong P, Baker D (1998). Vetiver grass for stabilization of acid sulfate soil, Proc. 2nd Nat. Conf. Acid Sulfate Soils. Coffs Harbour, Australia. pp. 196-198.

Truong PNV (1999). Vetiver grass technology for mine rehabilitation. Technical Bulletin No. 1999/2. PRVN/ORDPB, Bangkok. P. 12.

Truong PNV (2000). The global impact of vetiver grass technology on the environment. Proc. 2nd Nat. Conf on Vetiver. PRVN/ORDPB, Bangkok. pp. 48-61.

Zhu YL, Zyaed AM, Qian JH, Souza M, Terry N (1999). Phytoaccumulation of trace elements by wetland plants: II Water hyacinth. J. Environ. Qual. 28:339-344.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

American-Eurasian J. Agric. & Environ. Sci., 13 (4): 465-470, 2013
ISSN 1818-6769
© IDOSI Publications, 2013
DOI: 10.5829/idosi.aejaes.2013.13.04.1948

# The Effects of Plant Growth Promoting Traits on Heavy Metal Uptake of Vetiver Grasss

*E. Aksorn and B. Chitsomboon*

School of Biology, Institute of Science,
Suranaree University of Technology, Nakhon Ratchasima Province, Thailand

**Abstract:** The objects of this research were to study the effect of various growth parameters on heavy metal uptake of vetiver grass in the sterile Laboratory scale. The results showed that the PGP traits stimulated Cd, Pb and Zn uptake in both on *V. zizanioides* and *V. nemoralis*. However, the different vetiver ecotypes showed the different effects of PGP traits. AVG, IAA and pyrocatechol were the proper choices for Cd uptake on *V. zizanioides* while N, IAA and AVG were suitable for *V. nemoralis* compared to control. Zn uptake by *V. nemoralis* was stimulated by Desferroxamine, $GA_3$, IAA, AVG, pyrocatechol and zeatin while phosphate was suitable for *V. zizanioides*. In addition, the different PGP traits effects on Pb accumulation of both ecotypes suggested that $GA_3$ and IAA were suitable for Pb uptake of *V. zizanioides* while AVG, DFB and $GA_3$ enhanced Pb uptake in *V. nemoralis*. Therefore, the appropriated PGP traits enhanced the heavy metal remediation by vetiver grass.

**Key words:** Plant growth promoting (PGP) traits · Vetiver grass · Heavy metal

## INTRODUCTION

Phytoremediation as the friendly remediated technology of heavily heavy metal contaminated soils by using plants to reduce, remove, degrade or immobilise heavy metal from contaminated environment [1]. However, an inhibitory effect on the plant growths was observed under extremely heavy metals stress. The solution of this limitation solve by a large array of bacteria including species of *Pseudomonas, Azospirillum, Azotobacter, Klebsiella, Enterobacter, Alcaligenes, Arthrobacter, Burkholderia, Bacillus* and *Serratia* which reported to enhance plant growth [2, 3]. The exact mechanisms by which PGPR promote plant growth are not fully understood, but are thought to include (i) the ability to produce or change the concentration of plant growth regulators like indoleacetic acid, gibberellic acid, cytokinins and ethylene [4], (ii) asymbiotic $N_2$ fixation, (iii) antagonism against phytopathogenic microorganisms by production of siderophores, antibiotics and cyanide, (iv) solubilization of mineral phosphates and other nutrients [5]. Most the plants must establish and produce high biomass in hostile conditions. Having a deep and dense root system, vetiver is a good candidate for phytoremedial work which recognized for its effectiveness in soil erosion and sediment control, highly tolerance to extreme environmental variations including prolonged drought, flood, submergence, extreme fluctuation of temperature (22-60°C), soil pH (3.0-10.5) and most importantly high resistance to heavy metal toxicities [6].

The aims of this study were to determine the absolutely uptake and distribution efficiency of Cadmium (Cd), Lead (Pb) and Zinc (Zn) on 2 species of vetiver grass consisting of *Vetiveria zizanioides* and *Vetiveria nemoralis* in axenic condition under different plant growth promoting traits supplement.

## MATERIALS AND MEDTHODS

**Plant Cultures:** Tissue culture of vetiver grass both *V. zizanioides* (Kumphang Phet1, Prajuab Kirikhun and Ratchaburi ecotype) and *V. nemoralis* (Kumphang Phet2, Mae Hongson and Suratthani ecotype) were planted in sterile condition. The sterile 30 cm length glass tube contained 0.7% agar of Musashige and Skoog medium supplemented with different heavy metals as follows: 20 mg/kg of Cd, 500 mg/kg of Zn, or 500 mg/kg of Pb. Each supplemented heavy metal was spiked with different

**Corresponding Author:** E. Aksorn, School of Biology, Institute of Science, Suranaree University of Technology, Nakhon Ratchasima Province, Thailand.

*Am-Euras. J. Agric. & Environ. Sci., 13 (4): 465-470, 2013*

constituents, consisting of 30 µM desferrioxamine B mesylated (DFB), 30 µM pyrocatechol, 2.8 µM kinetin riboside (zeatin), 3 µM gibberellic acid ($GA_3$), 5 µM indol acetic acid (IAA), 10 µM aminoethoxyvinylglycine (AVG), 9.0 mM $KNO_3$ and 1.5 mM $KH_2PO_4$. The tube were closed with sterile cotton and kept in a growth chamber at 23-28°C for 7 days. Each treatment and blank in all experiments was tested in five replicates. These heavy metal concentrations were chosen as the lowest toxic levels in soils [7]. As the vetiver plant was died during experiments when exposed by high concentrations of heavy metals.

**Heavy Metal Extraction:** At the end of each experiment, the plants were weighed for biomass determination and then heavy metal concentration was determined as described by Farwell *et al.* [8]. Briefly, plants were extensively rinsed with several changes of 0.01 M EDTA and followed by distilled water to remove some non-specifically bound heavy metal. Afterwards, the separated shoot and root of grass were dried in hot air oven at 65°C for 1 day and were finely cut. The dried plant samples were digested with 0.8 ml of purified $HNO_3$ in incubators at 65°C for 3 h. The supernatants were determined for heavy metals by Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrophotometry (GFAAS).

The absorption of heavy metal from the medium by plants expressed as total accumulation rate (TAR) and transport index (TF), were calculated by the following formula as described by Taylan *et al.* [9] and Mellem *et al.* [10], respectively.

TAR = [(Shoot dry weight (g) x Shoot HM conc (µg/g)) + (Root dry weight g x Root HM conc µg/g)]/[(Shoot dry weight g + Root dry weight g x days of harvest)]
TF = Shoot heavy metal conc (µg/g)/Root heavy metal conc (µg/g)
HM conc. = heavy metal concentration

**Statistical Analysis:** All chemical experiments were analyzed in five replicate. Statistical analysis was evaluated in Completely Randomized Design (CRD). The data were analyzed with analysis of Variance (ANOVA) using SPSS 16.0. Significant differences at $P < 0.05$ were compared using the Duncan's Multiple Range Test.

## RESULTS

For *V. zizanioides*, the results revealed that the most plant growth promoting traits-tested enhanced the total heavy metal uptake when compared to the control

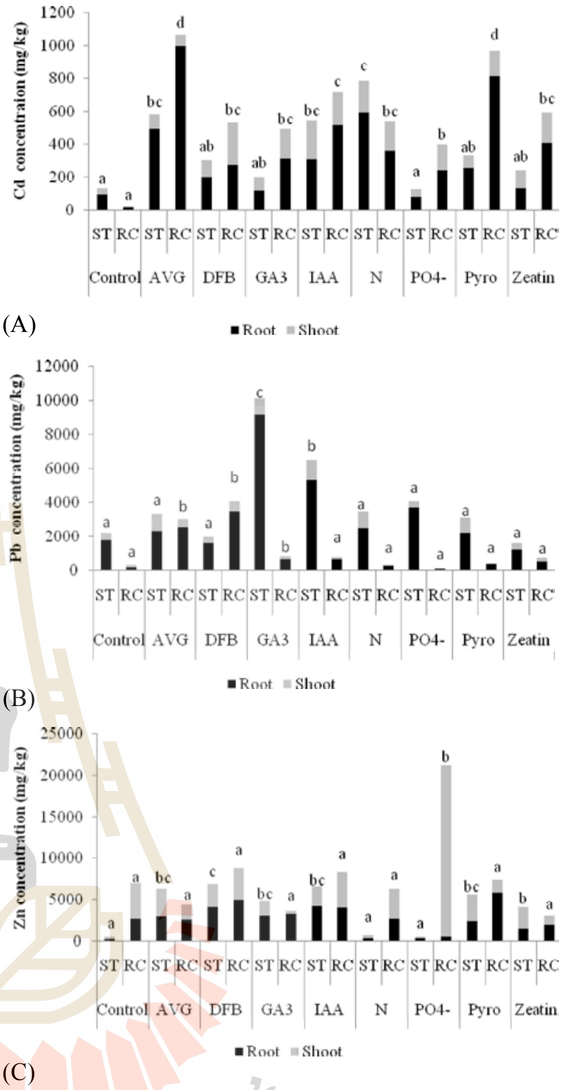



Fig. 1: Total heavy metal uptake of *V. zizanioides* (RC)- and *V. nemoralis* (ST) inoculated with the plant growth promoting traits and grown in the presence of Cd (A), Pb (B), or Zn (C). Bars of each ecotype with different superscript are significant difference ($p < 0.05$).

(Table 1 and Fig. 1, 2, & 3). However, Table 1 showed that the translocation of Cd from root to shoot was rather low in all investigated traits. This was suggested by higher Cd concentration in root than shoot, especially under the influence of AVG, the Cd accumulation in root was 10 times higher than shoot. The amount of total Cd uptake per day (TAR) of *V. zizanioides* under different PGP traits was the same and all were higher than control group.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

*Am-Euras. J. Agric. & Environ. Sci., 13 (4): 465-470, 2013*

Table 1: Cd concentration in *V. zizanioides* grown in the presence of various growth promoting traits

| | Cd concentration in plants (mg/kg) | | | |
|---|---|---|---|---|
| Parameter | Shoot | Root | TF | TAR |
| Control | 6.21±1.79$^{a}$ | 24.591±16.51$^{a}$ | 3.532±2.167$^{a}$ | 0.0015±0.00$^{a}$ |
| AVG | 83.28±38.92$^{b}$ | 1000.95±230.92$^{d}$ | 0.773±0.635$^{ab}$ | 0.03±0.00$^{b}$ |
| Desferosamine | 128.84±35.82$^{bc}$ | 237.45±50.94$^{bc}$ | 8.434±6.286$^{c}$ | 0.037±0.03$^{b}$ |
| Gibberellin | 179.55±44.40$^{c}$ | 314.6±73.50$^{bc}$ | 5.821±1.515$^{bc}$ | 0.03±0.00$^{b}$ |
| IAA | 200.74±47.16$^{c}$ | 516.92±181.71$^{c}$ | 3.784±0.913$^{ab}$ | 0.03±0.01$^{b}$ |
| Nitrogen | 183.65±47.57$^{c}$ | 361.45±177.88$^{bc}$ | 5.432±1.399$^{bc}$ | 0.02±0.01$^{b}$ |
| Phosphorus | 123.68±90.04$^{bc}$ | 243.21±40.27$^{ab}$ | 5.207±3.760$^{bc}$ | 0.02±0.01$^{b}$ |
| Pyrocatechol | 159.38±46.59$^{bc}$ | 813.5±296.72$^{d}$ | 2.117±0.935$^{ab}$ | 0.03±0.01$^{b}$ |
| Zeatin | 182.74±57.25$^{c}$ | 410.59±261.74$^{bc}$ | 5.262±2.141$^{abc}$ | 0.03±0.00$^{b}$ |

Value in the same column with different superscript are significantly difference ($p < 0.05$).

Table 2: Pb concentration in *V. zizanioides* grown in the presence of various growth promoting traits

| | Pb concentration in plants (mg/kg) | | | |
|---|---|---|---|---|
| Parameter | Shoot | Root | TF | TAR |
| Control | 42.03±14.48$^{ab}$ | 164.25±75.72$^{a}$ | 14.236±7.064$^{bc}$ | 0.018±0.02$^{a}$ |
| AVG | 458.04±78.17$^{bc}$ | 2545.49±1593.86$^{b}$ | 1.84±0.725$^{a}$ | 0.11±0.10$^{bc}$ |
| Desferosamine | 626.09±353.37$^{c}$ | 3421.62±1662.75$^{b}$ | 2.21±1.337$^{a}$ | 0.18±0.11$^{c}$ |
| Gibberellin | 202.4±144.03$^{ab}$ | 618.52±459.30$^{a}$ | 4.945±3.869$^{bc}$ | 0.03±0.01$^{ab}$ |
| IAA | 142.07±22.97$^{ab}$ | 597.07±323.05$^{a}$ | 2.807±1.233$^{a}$ | 0.04±0.03$^{ab}$ |
| Nitrogen | 65.46±14.95$^{ab}$ | 239.5±69.22$^{a}$ | 3.195±0.063$^{a}$ | 0.01±0.00$^{a}$ |
| Phosphorus | 22.2±10.45$^{a}$ | 75.82±98.36$^{a}$ | 9.99±1.008$^{c}$ | 0.003±0.00$^{a}$ |
| Pyrocatechol | 40.1±6.71$^{ab}$ | 318.69±37.69$^{a}$ | 1.878±0.201$^{a}$ | 0.01±0.00$^{a}$ |
| Zeatin | 230.48±18.45$^{ab}$ | 488.18±257.59$^{a}$ | 4.394±1.824$^{bc}$ | 0.04±0.02$^{ab}$ |

Value in the same column with different superscript are significantly difference ($p < 0.05$).

Table 3: Zn concentration in *V. zizanioides* grown in the presence of various growths promoting traits

| | Zn concentration in plants (mg/kg) | | | |
|---|---|---|---|---|
| Parameter | Shoot | Root | TF | TAR |
| Control | 3747.00±1489.71$^{a}$ | 1896.6±1307.32$^{abc}$ | 20.618±4.890$^{a}$ | 0.6±0.18$^{a}$ |
| AVG | 1843.12±1268.82$^{a}$ | 2557.12±1066.82$^{abc}$ | 6.634±2.443$^{a}$ | 0.33±0.02$^{a}$ |
| Desferosamine | 3882.45±98.06$^{a}$ | 4921.32±1770.06$^{c}$ | 8.385±2.452$^{a}$ | 0.67±0.16$^{a}$ |
| Gibberellin | 415.48±101.84$^{a}$ | 3152.14±1401.37$^{abc}$ | 1.468±0.688$^{a}$ | 0.18±0.12$^{a}$ |
| IAA | 4325.5±990.88$^{a}$ | 4012.14±908.50$^{bc}$ | 11.546±4.621$^{a}$ | 0.7±.011$^{a}$ |
| Nitrogen | 3700.38±1900.93$^{a}$ | 2579.02±217.32$^{abc}$ | 13.267±9.393$^{a}$ | 0.56±0.26$^{a}$ |
| Phosphorus | 61017.33±40341.78$^{b}$ | 449.23±366.35$^{a}$ | 10,974.125±2,909.431$^{b}$ | 16.88±20.37$^{b}$ |
| Pyrocatechol | 1586.72±1694.43$^{a}$ | 5789.62±4676.67$^{bc}$ | 3.977±3.011$^{a}$ | 0.4±0.34$^{a}$ |
| Zeatin | 1035.92±1003.82$^{a}$ | 1947.29±156.29$^{ab}$ | 15.487±10.826$^{a}$ | 0.217±0.19$^{a}$ |

Value in the same column with different superscript are significantly difference ($p < 0.05$)

Table 4: Cd concentration in *V. nemoralis* grown in the presence of various growth promoting traits

| | Cd concentration in plants (mg/kg) | | | |
|---|---|---|---|---|
| Parameter | Shoot | Root | TF | TAR |
| Control | 41.2±29.16$^{a}$ | 94.156±78.15$^{a}$ | 10.894±10.436$^{a}$ | 0.007±0.003$^{ab}$ |
| AVG | 92.37±74.93$^{a}$ | 494.79±91.48$^{ab}$ | 9.694±1.551$^{a}$ | 0.012±0.005$^{abc}$ |
| Desferosamine | 102.64±33.65$^{a}$ | 200.24±137.02$^{ab}$ | 17.836±9.738$^{a}$ | 0.018±0.005$^{c}$ |
| Gibberellin | 78.309±47.11$^{a}$ | 121.32±80.11$^{a}$ | 7.68±5.299$^{a}$ | 0.013±0.007$^{abc}$ |
| IAA | 240.33±34.62$^{b}$ | 307.56±84.32$^{ab}$ | 8.852±4.864$^{a}$ | 0.036±0.002$^{d}$ |
| Nitrogen | 188.667±63.02$^{b}$ | 597.32±288.71$^{b}$ | 3.743±1.654$^{a}$ | 0.040±0.01$^{d}$ |
| Phosphorus | 48.9±39.01$^{a}$ | 81.88±48.32$^{a}$ | 23.579±4.168$^{a}$ | 0.005±0.004$^{a}$ |
| Pyrocatechol | 75.424±43.46$^{a}$ | 257.26±51.26$^{ab}$ | 8.131±0.975$^{a}$ | 0.015±0.005$^{bc}$ |
| Zeatin | 111.93±51.13$^{a}$ | 132.22±82.77$^{a}$ | 14.932±13.443$^{a}$ | 0.015±0.007$^{bc}$ |

Value in the same column with different superscript are significantly difference ($p < 0.05$)

*Am-Euras. J. Agric. & Environ. Sci., 13 (4): 465-470, 2013*

Table 5: Pb concentration in *V. nemoralis* grown in the presence of various growth promoting traits

| | Pb concentration in plants (mg/kg) | | | |
|---|---|---|---|---|
| Parameter | Shoot | Root | TF | TAR |
| Control | 423.81±65.56$^{a}$ | 1757.62±572.91$^{a}$ | 2.463±0.833$^{abc}$ | 0.1±0.01$^{ab}$ |
| AVG | 970.4±230.08$^{bc}$ | 2303.09±1145.61$^{ab}$ | 5.556±3.066$^{d}$ | 0.17±0.009$^{bcd}$ |
| Desferosamine | 357.66±77.99$^{a}$ | 1571.98±436.63$^{a}$ | 2.288±0.118$^{abc}$ | 0.08±0.02$^{a}$ |
| Gibberellin | 968.5±285.25$^{bc}$ | 9127.426±4517.81$^{c}$ | 1.798±1.028$^{ab}$ | 0.3±0.07$^{f}$ |
| IAA | 1208.62±188.15$^{c}$ | 5279.9±2418.43$^{b}$ | 2.57±0.945$^{abc}$ | 0.24±0.05$^{df}$ |
| Nitrogen | 972.91±125.91$^{bc}$ | 2458.34±445.41$^{ab}$ | 4.125±1.271$^{bcd}$ | 0.19±0.02$^{cd}$ |
| Phosphorus | 309.19±310.2$^{a}$ | 3674.88±2136.17$^{ab}$ | 0.963±0.899$^{a}$ | 0.11±0.08$^{abc}$ |
| Pyrocatechol | 913.73±132.71$^{b}$ | 2196.55±738.54$^{ab}$ | 4.484±1.381$^{cd}$ | 0.17±0.03$^{bcd}$ |
| Zeatin | 409.84±78.12$^{a}$ | 1168.05±214.53$^{a}$ | 3.339±0.505$^{abcd}$ | 0.07±0.01$^{a}$ |

Value in the same column with different superscript are significantly difference ($p < 0.05$)

Table 6: Zn concentration in *V. nemoralis* grown in the presence of various growth promoting traits

| | Zn concentration in plants (mg/kg) | | | |
|---|---|---|---|---|
| Parameter | Shoot | Root | TF | TAR |
| Control | 279.25±215.36$^{a}$ | 230.37±195.23$^{a}$ | 24.551±20.053$^{a}$ | 0.03±0.008$^{a}$ |
| AVG | 3378.97±891.73$^{cd}$ | 2936.57±489.01$^{c}$ | 11.865±4.175$^{a}$ | 0.54±0.29$^{c}$ |
| Desferosamine | 5255.43±3794.9$^{d}$ | 4061.4±778.12$^{d}$ | 15.636±15.51$^{a}$ | 0.58±0.31$^{c}$ |
| Gibberellin | 1774.82±767.58$^{abc}$ | 3039.32±856.21$^{c}$ | 6.333±3.189$^{a}$ | 0.36±0.14$^{bc}$ |
| IAA | 2433.85±1390.77$^{bc}$ | 4124.45±1042.48$^{d}$ | 4.61±3.478$^{a}$ | 0.54±0.29$^{c}$ |
| Nitrogen | 430.01±517.2$^{ab}$ | 269.15±207.98$^{a}$ | 26.966±22.806$^{a}$ | 0.03±0.01$^{a}$ |
| Phosphorus | 169.76±83.9$^{a}$ | 296.53±224.8$^{a}$ | 11.241±11.003$^{a}$ | 0.03±0.02$^{a}$ |
| Pyrocatechol | 3263.85±660.19$^{cd}$ | 2336.626±666.6$^{c}$ | 11.182±1.813$^{a}$ | 0.4±0.15b$^{c}$ |
| Zeatin | 2640.51±1826.88$^{c}$ | 1461.53±769.59$^{b}$ | 15.797±8.527$^{a}$ | 0.25±0.14$^{ab}$ |

Value in the same column with different superscript are significantly difference ($p < 0.05$)

The total Cd accumulations (mg Cd per kg plant dry weight) of Control, AVG, DFB, $GA_3$, IAA, Nitrogen, Phosphorus, Pyrocatechol and Zeatin were 26.15, 1,067.06, 533.07, 494.16, 717.67, 545.1, 400.41, 972.88 and 593.33 mg/kg, respectively. The metal TF as capacity of heavy metal translocation from root to shoot has been determined. The results showed that the TF was highest (8.433) when supplemented with DFB. A significant higher Cd concentration in root than shoot was also observed in all evaluated parameter (Table 1) and all concentration were higher than control group.

Only *V. zizanioides* grown under AVG and DFM significantly displayed higher Pb in root compared to control (Table 2). The total uptake of Pb was in the order of DFB, AVG, $GA_3$ > IAA, Zeatin, Pyrocatechol, N, control and P, respectively (Fig. 1B). TF analysis found no difference between group and each PGP traits in Pb translocation compared to the control. The total concentrations of Zn in *V. zizanioides* was in the order of P > DFB, IAA, Pyrocatechol, control, N, AVG, GA3 and Zeatin, respectively (Fig. 1C). The average maximum TF and TAR was observed in Zn (Table 3). All of the tested PGR traits, except P had no influence of Zn translocation from root to shoot (TF) compared to the control group. Similarly, P also induced the maximum total accumulation of Zn per day (TAR) while the rest of PGR traits had no effect. Notably, the TF and TAR for Zn uptake and accumulation in control or every PGP traits were higher than the other heavy metal.

Heavy metal analysis obtained from the root and shoot of *V. nemoralis* (Tables 4, 5 & 6) revealed that roots Cd concentration was higher than in shoots concentration, especially in AVG, the Cd accumulation in root was about 5 time of shoot (Table 4). The average total Cd accumulation of control, AVG, DFB, $GA_3$, IAA, Nitrogen, Phosphorus, Pyrocatechol and Zeatin, expressed as mg Cd per kg dry plant, were 135.35, 587.16, 302.89, 199.62, 547.89, 785.99, 130.79, 332.68 and 244.15 mg/kg, respectively. There were no effects of PGP traits on Cd translocation from root to shoot in *V. nemoralis*. In addition, the higher Cd accumulation rate than the control group was only deserved under the influence of DFB, IAA and N. Similar to the *V. zizanioides*, the *V. nemoralis* also exhibited higher Pb root concentration than Pb shoot concentration in all parameters-tested, including the control (Table 5). Compared to the control,

the higher Pb total accumulation was only deserved in the presence of the influence of $GA_3$, IAA and N (Fig. 1B and Table 5). In addition, only AVG could increase the translocation from root to shoot higher than the control. The higher total Zn accumulation than the control group was only deserved under the influence of DFB, AVG, $GA_3$, IAA and pyrocatechol (Fig. 1C). Table 6 indicated that most of PGP traits increased the concentrations of Zn in root and shoot compared to the control group. The total rate of Zn accumulation was also higher than control under the influence of AVG, DFB, IAA and pyrocatechol. However, there were no effects of PGP traits on Zn translocation from root to shoot.

## DISCUSSION

PGP traits could be stimulated Cd, Pb and Zn uptake on both *V. zizanioides* and *V. nemoralis*. Belimov *et al.* [11] also reported that AVG, the chemical inhibitors of ethylene biosynthesis, inhibited ACC accumulation in plants which exposed to solutions containing $Cd^{2+}$ brought a significant improvement in the plant growth. Pyrocatechol and desferroxamin as sub-type of siderophore were low molecular mass iron chelators with high association onstants for complexing iron and also form stable complex with other heavy metal such as aluminium, Cd, copper, Pb and Zn. Therefore they promoted the iron uptake by plants in the presence of heavy metal [12]. Wang *et al.* [13] reported that IAA increased Pb accumulation in roots, but significantly decreased Pb accumulation in shoots of maize (*Zea mays* L. cv. TY2) seedlings. Similarly, L´opez *et al.* [14] reported that 0.2 mM Pb plus 10 mM gibberellic acid increased Pb concentration in alfalfa (*Medicago sativa* L.) roots by about 40% compared to treatment with Pb only. The summary could be pronounced that IAA, $GA_3$ and phosphate demonstrated the indirect effects on Pb accumulation because IAA is a molecule that promotes apical dominance, tropism, stem elongation and root formation among others, while $GA_3$ is related to germination and flowering processes.

However, the different vetiver ecotypes showed the different effects on heavy metal uptake by various PGP traits. Therefore, the different results observed in this study might be caused by differing properties of plant variation which supported by Malik *et al.* [15]. They reported that the effects on the bioaccumulation of selected heavy metals by plants have been known to vary greatly depending on the different rhizobacteria, plant species, soil characteristics and climatic conditions.

The comparison of heavy metal uptake by two vetiver ecotypes found that *V. zizanioides* and *V. zizanioides* had no significance for heavy metal uptake. In contrast with Roongtanakiat and Chairoj [16] reported that *V. zizanioides* had significantly higher Mn, Zn and Cd amounts in shoot and root than *V. nemoralis* and Kamphaeng Phet ecotypes on pot experiment.

## CONCLUSIONS

This research was the first report that elucidated the effect of heavy metal on PGP traits and the efficiency of heavy metal uptake by two species of vetiver grass. The results supported that PGP traits could be promote heavy metal uptake of vetiver grass. However, the utilization of various PGP traits on phytoremediation depends upon heavy metal and plant species.

## ACKNOWLEGEMENTS

This work was supported by Nation Research Council of Thailand, Ministry of Science and Technology, Thailand.

## REFERENCES

1. Suthersan, S.S., 1999. Phytoremediation: remediation engineering-design concepts. CRC Press LLC.
2. Kloepper, J.W., R. Lifshitz and R.M. Zablotowixz, 1989. Free-living bacterial inocula for enhancing crop productivity. Trends Biotechnol., 7: 39-43.
3. Glick, B.R., C.L. Patten, G. Holguin and D.M. Penrose, 1999. Biochemical and genetic mechanisms used by plant growth promoting bacteria. London, United Kingdom: Imperial College Press.
4. Arshad, M. and W.T. Jr Frankenberger, 1993. Microbial production of plant growth regulators. In Soil microbial ecology. Applications in agricultural and environmental management, Ed., Metting, F.B. New York: Jr. Marcel Dekker, Inc., pp: 307-343.
5. Defreitas, J.R. and J.J. Germida, 1992. Growth promotion of winter wheat by fluorescent Pseudomonas under field conditions. Soil Biol. and Biochem., 24: 1137-1146.
6. Truong, P. and D. Baker, 1998. Vetiver Grass System for Environmental Protection. Tech. Bull. No.1998/1, PRVN / ORDPB, Bangkok, Thailand.
7. Truong, P.N., 1999. Vetiver Grass Technology for Mine Rehabilitation. Tech. Bull. No. 1999/2, PRVN /ORDPB, Bangkok, Thailand.

8 Farwell, A., V. Nero and M. Croft, 2006. Modified Japanese medaka embryo-larval bioassay for rapid determination of developmental abnormalities. Arch. Envir. Contam. and Toxicol., 51: 600-607.

9. Taylan, K., Y. Elif, K. Eda, B. Çiğdem, Y. Sirri, B. Murat, C. Gül and U. Muammer, 2011. Uptake, accumulation and some biochemical responses in *Raphanus sativus* L. to zinc stress. Afr. J. Biotechnol., 10: 5993-6000.

10 Mellem, J.J., H. Baijnath and B. Odhav, 2012. Bioaccumulation of Cr, Hg, As, Pb, Cu and Ni with the ability for hyperaccumuation by *Amaranthus dubius*. Afr. J. Agric. Res., 7: 591-596.

11. Belimov, A.A., V.I. Safronova, T.A. Sergeyeva, T.N. Egorova, V.A. Matveyeva, V.E. Tsyganov, A.Y. Borisov, I.A. Tikhonovich, C. Kluge, A. Preisfeld, K.J. Dietz and V.V. Stepanok, 2001. Characterization of plant growth promoting rhizobacteia isolated from polluted soils and containing 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase. Canad. J. Microbiol., 47: 642-652.

12. Dimkpa, C.O., A. Svatoš, P. Dabrowska, A. Schmidt, W. Boland and E. Kothe, 2008. Involvement of siderophores in the reduction of metal-induced inhibition of auxin synthesis in *Streptomyces* spp. Chemosphere, 71: 19-25.

13. Wang, H.H., X.Q. Shan, B. Wen, G. Owens, J. Fang and S.Z. Zhang, 2007. Effect of indole-3-acetic acid on lead accumulation in maize (*Zea mays* L.) seedlings and the relevant antioxidant response. Environ. and Expt. Bot., 61: 246-253.

14. L´opez, M.L., J.R. Peralta-Videa, T. Benitez and J.L. Gardea-Torresdey, 2005. Enhancement of lead uptake by alfalfa (*Medicago sativa*) using EDTA and a plant growth promoter. Chemosphere, 61: 595-598.

15. Malik, R.N., S.Z. Husain and I. Nazir, 2010. Heavy metal contamination and accumulation in soil and wild plant species from industrial area of Islamabad, Pakistan. Pak. J. Bot., 42: 291-301.

16 Roongtanakiat, N. and P. Chairoj, 2001. Uptake potential of some heavy metals by vetiver grass. Kasetsart J. Natural Science, 35: 46-50.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

# ประวัตินักวิจัย

ผศ.ดร.เบ็ญจมาศ จิตรสมบูรณ์ เกิดวันที่ 25 พฤษภาคม 2497 จังหวัดกรุงเทพมหานคร จบการศึกษาปริญญาตรีสาขาวิชาวิทยาศาสตร์ทั่วไป (เคมี-ชีววิทยา) คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย (พ.ศ.2516-2520) ได้รับทุนการศึกษารัฐบาลไทย (กรรมการข้าราชการพลเรือน) ไปศึกษาต่อระดับปริญญาโทสาขาวิชา Environmental Health (Toxicology) ที่ University of Michigan ในประเทศสหรัฐอเมริกา (พ.ศ. 2521-2523) และทุนการศึกษาระดับปริญญาเอกสาขาวิชา Toxicology ของมหาวิทยาลัย Utah State University ในประเทศสหรัฐอเมริกา (พ.ศ. 2525-2629) ก่อนปฏิบัติงานที่มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี เคยเป็นผู้ช่วยวิจัยสาขาวิชาชีวเคมี มหาวิทยาลัยมหิดล (พ.ศ. 2525-2529) นักวิจัยสถาบันวิจัยสภาวะแวดล้อม จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย (พ.ศ. 2523-2525) postdoctoral fellow ที่ Medical College of Virginia (พ.ศ. 2529-2532) special fellow ที่ Cleveland Clinic Foundation (พ.ศ. 2529-2532) และ research associate ที่ Case Western Reserve University (พ.ศ. 2533-2537) ประเทศสหรัฐอเมริกา มีความชำนาญพิเศษทางด้าน Immunology และ immunotoxicology

รศ.ดร.เสาวนิต ทองพิมพ์ เกิดวันที่ 28 พฤษภาคม พ.ศ. 2498 จังหวัดสมุทรสงคราม จบการศึกษาปริญญาตรี สาขาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาตร์ (พ.ศ. 2515-2519) ได้รับทุนโครงการพัฒนาอาจารย์ในระดับอุดมศึกษา (University Development Commission) ศึกษาต่อระดับปริญญาโทสาขาจุลชีววิทยา ที่มหาวิทยาลัยเกษตรศาตร์ (พ.ศ. 2519-2521) ตามความต้องการของมหาวิทยาลัยขอนแก่น ได้รับทุนรัฐบาลเนเธอร์แลนด์ (NUFFIC) ระหว่างปีพ.ศ. 2523-2524 ฝึกอบรมด้าน Food microbiology ที่ Wageningen University, The Netherlands ได้รับทุน UNESCO ระหว่างปีพ.ศ. 2528-2529 ศึกษาระดับ Diploma ด้าน Microbiology & Biotechnology ที่ Osaka University และ Kyoto University, Japan ได้รับทุนรัฐบาลแคนาดา (CIDA) ระหว่างปีพ.ศ. 2533-2540 ศึกษาระดับปริญญาเอก ที่ University of Alberta, Canada รับราชการที่มหาวิทยาลัยขอนแก่นในปีพ.ศ. 2521 จนถึงปัจจุบัน มีความชำนาญพิเศษทางด้าน Food microbiology, Probiotics, Plant growth promoting and biocontrol