ผลของระบบเกษตรกรรมต่อความหลากหลายของชนิดจุลินทรีย์ในดิน ในพื้นที่ปลูกผักจังหวัดนครปฐม

The effects of agricultural systems on microbial species diversity in soil in vegetables growing areas of Nakhon Pathom Province

เมธานี หอมทอง[1*] วันเพ็ญ แก้วพุก[1] สุกัญญา แย้มสรวล[1] และอนัญญา ทองสิมา[1]

Methanee Homthong[1*], Wanphen Kaewpuk[1], Sukanya Yamsuan[1] and Anunya Thongsima[1]

[1]*สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏนครปฐม จ.นครปฐม 73000*

[1]*Bachelor of Education , Facluty of Science and Technology, Nakhon Pathom Rajabhat University, Nakhon Pathom 73000*

*To whom correspondence should be addressed. e-mail: mathanee_t12@hotmail.com

Received: 4 February 2019, Revised: 1 March 2019, Accepted: 2 April 2019

บทคัดย่อ

จุลินทรีย์ในดินมีบทบาทสำคัญช่วยเพิ่มแร่ธาตุในดิน และการจัดการดินทางการเกษตรมีอิทธิพลต่อองค์ประกอบทางชีวภาพของจุลินทรีย์ในดิน การวิจัยครั้งนี้ได้ทำการศึกษาความหลากหลายของชนิดแบคทีเรียและเชื้อราจากระบบเกษตรกรรม 3 ระบบ ตัวอย่างดินที่นำมาศึกษาเก็บรวบรวมจากแปลงผักทั้ง 3 ระบบ คือ เกษตรอินทรีย์ เกษตร GAP และเกษตรใช้สารเคมี ในพื้นที่ 3 อำเภอของจังหวัดนครปฐม คือ อำเภอดอนตูม อำเภอกำแพงแสน และอำเภอเมืองนครปฐม การวิเคราะห์ปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดบนอาหารเลี้ยงเชื้อ 2 ชนิด คือ Trypticsoy agar (TSA) และ Pikovskaya agar (PVK) ผลการวิจัยพบว่า ระบบ GAP มีปริมาณแบคทีเรียสูงสุดใน TSA และ PVK ที่มีค่า log 4.24 ± 0.04, 4.22 ± 0.03, 4.13 ± 0.11 และ 3.79 ± 0.15, 4.11 ± 0.07 และ 4.02 ± 0.04 CFU/g อำเภอดอนตูม อำเภอกำแพงแสน และอำเภอเมืองนครปฐม ตามลำดับ การวิเคราะห์ปริมาณเชื้อราทั้งหมดบนอาหาร rose bengal agar (RBA) พบว่า ปริมาณเชื้อราในดินจากทุกระบบการเกษตรไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05 จากนั้นแยกเชื้อราให้บริสุทธิ์บนอาหาร potato dextrose agar (PDA) ได้เชื้อรา 23 ไอโซเลต นำเชื้อราทั้งหมดมาทดสอบการย่อยสลายเซลลูโลสบนอาหาร carboxy methyl cellulose (CMC) พบเชื้อรา 3 ไอโซเลต สามารถสร้างบริเวณใสได้ จากนั้นจำแนกชนิดเชื้อราโดยวิเคราะลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ Internal Transcribed Spacer (ITS) ด้วยการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอและการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ไปเทียบกับฐานข้อมูลใน GenBank พบว่า ไอโซเลต G01-4F, O03-7F และ G01-8F มีความคล้ายคลึงกับ *Lasiodiplodia theobromae* (100%) *Aspergillus aculeatus* (99%) และ *Aspergillus fumigatus* (100%)

คำสำคัญ : ระบบเกษตรกรรม เชื้อราย่อยสลายเซลลูโลส ความหลากหลายของชนิดจุลินทรีย์

Abstract

Soil microorganisms play an important role in increasing minerals for the soil. At the same time, agricultural soil management also influences the biological composition of soil microorganisms, such as the amount, diversity and function of microorganis ms. In this research, we study the diversity of bacterial and fungal species from 3 agri cultural systems; 1) organic, 2) GAP and 3) chemical-based. Soil Samples were collected from 3 agricultural systems in 3 districts of Nakhon Pathom Province; 1) Don Tum District, 2) Kamp haeng Saen District and 3) Mueang District. When using soil to analyze all bacteria on 2 media types; trypticsoy agar (TSA) and Pik ovskaya agar (PVK), the results revealed that the GAP system showed the highest bacterial count in TSA and Pikovskaya agar wit h log values of

4.24 ± 0.04, 4.22 ± 0.03, 4.13 ± 0.11 and 3.79 ± 0.15, 4.11 ± 0.07 and 4.02 ± 0.04 CFU/g, Don Tum District, Kamphaeng Saen District. And Mueang Nakhon Pathom district respectively. When analyzing all fungi on rose bengal agar (RBA), it was found that the amount of fungi in soil from all agricultural systems was not significantly different at the level of 0.05. In addition, when the fungi were purified on potato dextrose agar (PDA), fungi were found 23 isolates. Then, the 23 isolates were investigated for cellulase producer by the observation of clear zone on the carboxyl methyl cellulose agar (CMC agar) using congo red method. Three isolates showed showed the clear zone around colony. These isolates were classified based on the molecular characteristics using Internal Transcribed Spacer (ITS) by a PCR and the sequence of 18S rDNA. Obtained base sequence was compared to the Genbank database, the isolates G01-4F, O03-7F and G01-8F were similar to (related to) *Lasiodiplodia theobromae* (100%), *Aspergillus aculeatus* (99%) and *Aspergillus fumigatus* (100%).

Keywords: agricultural systems, cellulolytic fungi, microbial species diversity

บทนำ

ประเทศไทยเป็นประเทศเกษตรกรรม ซึ่งประชากรส่วนใหญ่ของประเทศมีอาชีพเป็นเกษตรกร และการทำการเกษตรในปัจจุบันมีหลายรูปแบบ เช่น การเกษตรอินทรีย์ การเกษตรปลอดภัย (GAP) การเกษตรใช้สารเคมี การเกษตรผสมผสาน และการเกษตรทฤษฎีใหม่ เป็นต้น ซึ่งทำให้เกิดความหลากหลายของระบบนิเวศเกษตร โดยการเกษตรอินทรีย์เป็นการจัดการด้านเกษตรที่สร้างผลผลิตที่มีความปลอดภัยจากสารเคมีตกค้างโดยการลดมลภาวะต่อพื้นที่เพาะปลูก และระบบนิเวศ ลดการใช้สารเคมีรวมทั้งยาฆ่าแมลงที่เป็นอันตราย ลดการใช้ปุ๋ยเคมี ลดปัญหาการเกิดโรคและแมลงระบาด ลดการปนเปื้อนสารเคมีในแหล่งน้ำ ลดปัญหาความเสื่อมโทรมของดิน ลดต้นทุน และสามารถขายผลผลิตได้ราคาสูงขึ้น นอกจากนี้การเลือกใช้ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากจุลินทรีย์กลุ่มที่มีความสามารถยับยั้งเชื้อโรคพืช หรือจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ในการช่วยให้พืชแข็งแรงนั้นก็เพื่อหลีกเลี่ยงอันตรายที่เกิดจากการใช้สารเคมี เนื่องจากจุลินทรีย์บางชนิดมีความสามารถผลิตสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรคและแมลง เช่น การใช้เชื้อรา *Metarhizium anisopliae* PSUM04 เพื่อควบคุมเพลี้ยอ่อนผัก [1] เชื้อราขาว (*Beauveria bassiana*) ป้องกันกำจัดเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล [8] เป็นต้น ส่วนเกษตรปลอดภัย หรือมีชื่อเรียกย่อๆ ว่า การเกษตรแบบ GAP (good agricultural practices) คือ การปฏิบัติเพื่อป้องกันหรือลดความเสี่ยงของอันตรายที่เกิดขึ้นระหว่างการเพาะปลูก การเก็บเกี่ยว หลังการเก็บเกี่ยวเพื่อให้ได้ผลผลิตที่มีคุณภาพ ปลอดภัยและเหมาะสมต่อการบริโภค [4] ซึ่งอาจมีการใช้สารเคมีร่วมกับผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติแต่เป็นไปตามที่มาตรฐานกำหนด ในขณะที่เกษตรเคมี คือ แปลงเกษตรที่มีการใช้สารเคมีตามปกติ

จะเห็นได้ว่าจุลินทรีย์ในดินมีบทบาทที่สำคัญต่อคุณภาพของดิน นอกจากจะเกี่ยวข้องกับการควบคุมโรคแล้ว จุลินทรีย์บางกลุ่มยังสามารถสร้างสารที่มีผลต่อการเจริญของพืช เช่น การทำหน้าที่ในการย่อยสลายอินทรียสารเพิ่มธาตุอาหารในดิน ช่วยตรึงไนโตรเจน และช่วยละลายฟอสเฟตให้อยู่ในรูปที่พืชสามารถนำไปใช้ได้ [12, 14, 15] และยังพบว่ากลุ่มของแบคทีเรียที่อยู่บริเวณรากพืชในกลุ่ม plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) เกี่ยวข้องทั้งตรงและทางอ้อมในการเจริญเติบโตของพืช เช่น ทำให้พืชทนแล้งได้ หรือสร้างฮอร์โมนพืชที่กระตุ้นการเจริญเติบโต เช่น สร้างฮอร์โมนออกซิน (auxins) กรดแอบไซซิก (abscisic acid) จิบเบอเรลลิน (gibberellin) และไซโตไคนิน (cytokinins) เป็นต้น [10, 16] จากการศึกษาความหลากหลายของจุลินทรีย์ในดินจากบริเวณที่ทำการเกษตรเทียบกับแหล่งอื่นๆ ไม่พบความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ [7] อีกทั้งยังพบว่า การจัดการพื้นที่เกษตรมีผลต่อคุณภาพของดินและความหลากหลายของเชื้อจุลินทรีย์ เช่น การไถพรวนดิน การปลูกพืชหมุนเวียน ปลูกพืชคลุมดินและการใส่ปุ๋ยคอกปุ๋ยหมักล้วนมีผลต่อค่าพารามิเตอร์ต่างๆ ในดิน เช่น ปริมาณแก๊สออกซิเจนในดิน ความชื้น การอุ้มน้ำ สารอาหาร และแร่ธาตุต่างๆ เป็นต้น รวมทั้งปริมาณและความหลากหลายของจุลินทรีย์ในดินด้วย [11, 13] ดังนั้น การวิจัยครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อ ศึกษาความหลากหลายทางชีวภาพของแบคทีเรียและเชื้อราในดินในพื้นที่ทำการเกษตร 3 ระบบ คือ การเกษตรอินทรีย์ การเกษตรปลอดภัย (GAP) และการเกษตรใช้สารเคมี ที่ปลูกผักในจังหวัดนครปฐม รวมถึงคัดแยกสายพันธุ์เชื้อราที่สามารถย่อยเซลลูโลสได้

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

1. การเก็บตัวอย่างดิน

เลือกเก็บตัวอย่างดินจากพื้นที่ปลูกผักเศรษฐกิจในจังหวัดนครปฐม 3 ระบบ คือ การเกษตรอินทรีย์ การเกษตรปลอดภัย และการเกษตรใช้สารเคมี โดยแปลงเกษตรอินทรีย์ และแปลงเกษตรปลอดภัยนั้นได้เลือกแปลงปลูกที่ได้รับใบรองและมีตลาดรองรับที่แน่นอน โดยทำเกษตรในระบบดังกล่าวมาแล้วไม่น้อยกว่า 3 ปี ซึ่งแปลงเกษตรที่ทำการศึกษามาจาก 3 อำเภอ คือ อำเภอเมืองนครปฐม อำเภอดอนตูม และอำเภอกำแพงแสน จากนั้นการสำรวจและเก็บตัวอย่างดินจากแปลงเกษตรทั้ง 3 ระบบในแต่ละอำเภอๆ ละ 3 แปลง การเก็บตัวอย่างดินแต่ละแปลงสุ่มเก็บตัวอย่างดินกระจายให้ครอบคลุมทั่วพื้นที่ในแต่ละแปลงๆ ละ 20 จุด/แปลง (ก่อนขุดดินจะต้องถางหญ้า กวาดเศษพืชหรือวัสดุหน้าดินออกก่อน อย่าแซะหรือปาดหน้าดินออก) ใช้เสียบ พลั่ว หรือจอบขุดเป็นรูปตัว V ให้ลึกในแนวดิ่งประมาณ 15 เซนติเมตร นำดินในแต่ละจุดมาผสมรวมกันในถุงพลาสติกเดียวกัน คลุกเคล้าให้เข้ากัน แบ่งดินแต่ละแปลงเพื่อวิเคราะห์ โดยเกลี่ยตัวอย่างดินทั้งหมดของแต่ละแปลงให้เป็นรูปวงกลมแล้วแบ่งผ่ากลางออกเป็น 4 ส่วนเท่ากัน เก็บดินมาเพียง 2 ส่วน หนักประมาณ 500 กรัม และปิดปากถุงให้สนิท เก็บตัวอย่างดินนำกลับมาแยกเชื้อที่ห้องปฏิบัติการต่อไป [2] รวมจำนวนตัวอย่างทั้งหมด 9 ตัวอย่าง และเก็บรักษาตัวอย่างดินในตู้เย็นอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อรอทำการวิเคราะห์ต่อไป นำไปคัดแยกแบคทีเรียและเชื้อราในห้องปฏิบัติการ ไม่ควรเก็บไว้นานเกิน 2 สัปดาห์

2. การศึกษาความหลากหลายของจุลินทรีย์ในดิน

นำตัวอย่างดิน 1 กรัมผสมกับน้ำนึ่งฆ่าเชื้อ 9 มิลลิลิตร ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน มาเขย่าในน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ 10 มิลลิลิตร เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นนำมาเจือจางเพิ่มที่ระดับความเข้มข้น 10^{-2}-10^{-5} แล้วหยดดินแขวนลอยปริมาตร 1 มิลลิลิตรลงในจานเลี้ยงเชื้อ จำนวน 3 จานเลี้ยงเชื้อต่อ 1 ตัวอย่าง มาเกลี่ยลงบนอาหาร Trypticsoy agar (TSA) Pikovskaya's medium (PVK) และอาหาร Rose Bengal Agar จนแห้ง นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3-7 วัน แล้วนับจำนวนโคโลนีที่ปรากฏในจานเลี้ยงเชื้อในแต่ละความเข้มข้น เลือกศึกษาเฉพาะที่ความเข้มข้นที่ทำให้มีจำนวนโคโลนีในแต่ละจานของอาหารเลี้ยงเชื้อที่นับจำนวนโคโลนีได้อยู่ระหว่าง 20 - 30 โคโลนี มาคำนวณหาปริมาณเชื้อในหน่วย log CFU/g ซึ่งคำนวณได้จากสูตรจำนวนเชื้อ = log(10) {ค่าเฉลี่ยของจำนวนโคโลนีต่อจานอาหาร x (1/ความเจือจาง) / ดิน 1 กรัม} จากนั้นใช้เข็มเขี่ยย้ายทุกโคโลนีไปเลี้ยงต่อจนได้เชื้อที่บริสุทธิ์ด้วยวิธี sub-culture

3. การทดสอบการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส

การทดสอบการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสบนอาหาร Carboxyl methyl cellulose (CMC) [17] โดยเพาะเลี้ยงเชื้อราบนอาหาร CMC ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน เทสารละลาย Congo red ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 ลงบนอาหาร CMC นาน 15 นาที ล้างสีย้อมออกด้วย NaCl ความเข้มข้น 1 นอร์มอล สังเกตการปรากฏบริเวณใส (clear zone)

4. การจำแนกเชื้อราด้วยวิธีทางชีวโมเลกุล

นำโคโลนีของเชื้อราที่สามารถสร้างเอนไซม์เซลลูเลสได้มาเลี้ยงต่อจนได้เส้นใยเป็นเวลา 5 วัน แล้วเจาะส่วนขอบโคโลนีเชื้อราด้วย cork borer ที่ปลอดเชื้อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 มิลลิเมตร นำชิ้นวุ้นที่มีเชื้อรา 3 ชิ้น ใส่ในอาหารเหลว potato dextrose broth (PDB) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ลงในขวดรูปชมพู่ (flask) ขนาด 100 มิลลิลิตร บ่มเชื้อบนเครื่องเขย่าด้วยความเร็ว 180 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน แล้วสกัดดีเอ็นเอจากเส้นใยรา โดยดัดแปลงจากวิธี CTAB nucleic acid extraction ของ Taylor and Powell (1982) จากนั้นเพิ่มปริมาณ 18S rDNA บริเวณ internal transcribed spacer (ITS) ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ (Polymerase Chain Reaction) โดยใช้ไพรเมอร์ ITS1 (5′ TTTCCGTAGGTGAACCTGC 3′) และ ITS4 (5′ TCCTCCGCTTATTGATATGC 3′) ซึ่งเป็น universal primer สำหรับบริเวณ 18S rDNA ปฏิกิริยาพีซีอาร์ประกอบด้วยสารละลายดีเอ็นเอเข้มข้น 60 ng/µl ปริมาตร 4.0 ไมโครลิตร, ไพรเมอร์ ITS1 และ ITS4 เข้มข้น 5 pmol ปริมาตรอย่างละ 2.0 ไมโครลิตร, dNTP เข้มข้น 2 mM ปริมาตร 5 ไมโครลิตร, $MgCl_2$ เข้มข้น 50 mM ปริมาตร 2 ไมโครลิตร, Taq DNA polymerase (5 U/µl)

ปริมาตร 0.4 ไมโครลิตร และเติมน้ำกลั่นบริสุทธิ์ (ultra-pure) ให้มีปริมาตรรวม 29.6 ไมโครลิตร โดยใช้โปรแกรมทำปฏิกิริยา PCR โดยมีขั้นตอน ดังนี้ ขั้นที่ 1 pre-denature 3 นาที 1 รอบ ขั้นที่ 2 denature ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที ตามด้วย annealing ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที และ extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 50 วินาที แล้ววนกลับไปที่ขั้นที่ 2 เป็นจำนวน 35 รอบ ขั้นตอนที่ 3 ทำปฏิกิริยาให้สมบูรณ์ด้วยการ extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที 1 รอบ และเก็บปฏิกิริยาไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส การตรวจสอบผลผลิต PCR ในแผ่นวุ้นอะกาโรส (agarose gel) ที่ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ย้อมเจลด้วย ethidium bromide เป็นเวลา 10 นาที ตรวจสอบแถบสีของดีเอ็นเอด้วยแสงอัลตราไวโอเลต บันทึกภาพเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน จากนั้นนำมาทำให้บริสุทธิ์เพื่อกำจัดไพรเมอร์ส่วนที่เหลือ บัฟเฟอร์และเกลือต่างๆ ออก โดยใช้ชุดสำเร็จ Favor PrepTM GEL/PCR purification kit (Favorgen, Taiwan) ส่งผลผลิต PCR ไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ และนำไปวิเคราะห์ผลเพื่อจำแนกชนิดของเชื้อราโดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ การตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์จากโคลนที่ได้ว่ามีความเหมือนหรือความคล้ายคลึงกับดีเอ็นเอของเชื้อราชนิดใดในฐานข้อมูล NCBI โดยใช้โปรแกรม BLAST (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/blast.cgi)

5. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

การดำเนินการทดลอง ได้ทำการสุ่มเก็บตัวอย่างดินจากแปลงปลูกผักทั้ง 3 ระบบ คือ แปลงเกษตรอินทรีย์ แปลงเกษตรปลอดภัย และแปลงเกษตรใช้สารเคมี ในจังหวัดนครปฐม จำนวนแปลงละ 3 ตัวอย่าง (ซ้ำ) นอกจากนี้การตรวจหาปริมาณเชื้อและการทดลองในการวิจัยทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ ในแต่ละการทดลอง แล้วค่าที่ได้จากการทดลองรายงานเป็น ค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน โดยใช้โปรแกรม SPSS เวอร์ชัน 17 วิเคราะห์ค่าทางสถิติ และเปรียบค่าเฉลี่ยใช้โดยใช้วิธี Duncan's Multiple Range Test (DMRT)

ผลการทดลอง

1. การศึกษาปริมาณแบคทีเรียและเชื้อราในตัวอย่างดิน

จากการแยกแบคทีเรียและเชื้อราด้วยวิธี dilution pour plate จากตัวอย่างดินในพื้นที่แปลงเกษตร 3 ระบบ คือ แปลงเกษตรอินทรีย์ แปลงเกษตรปลอดภัย และแปลงเกษตรใช้สารเคมี จากพื้นที่ 3 อำเภอ พบแบคทีเรียจากแปลงเกษตรทั้ง 3 ระบบ มีปริมาณมากกว่าเชื้อรา ส่วนปริมาณแบคทีเรียบนอาหาร TSA และอาหาร PVK ของการเกษตรปลอดภัย (GAP) ทุกๆ อำเภอมีค่ามากกว่าระบบอื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญ คือมีค่าเท่ากับ log 4.24 ± 0.04, log 4.22 ± 0.03, log 4.13 ± 0.11, log 3.79 ± 0.15, log 4.11 ± 0.07 และ log 4.02 ± 0.04 CFU/g ของอำเภอดอนตูม อำเภอกำแพงแสน และอำเภอเมืองนครปฐม ตามลำดับ นอกจากนี้พบว่าอำเภอดอนตูมมีปริมาณแบคทีเรียที่ขึ้นบนอาหาร TSA สูงที่สุดทุกระบบแปลงเกษตร (ตารางที่ 1) ขณะที่ปริมาณแบคทีเรียที่สามารถละลายฟอสเฟตได้นั้น ถูกคัดเลือกบนอาหาร PVK พบว่า พื้นที่อำเภอกำแพงแสนมีปริมาณแบคทีเรียมากที่สุด คือมีค่าเท่ากับ log 3.89±0.07, 4.11±0.07 และ log 3.99±0.05 CFU/g ของแปลงเกษตรอินทรีย์ แปลงเกษตรปลอดภัย และแปลงเกษตรใช้สารเคมี ตามลำดับ แต่ไม่มากกว่าพื้นที่อำเภออื่นๆ ในระบบเดียวกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05 (ตารางที่ 2) ส่วนปริมาณของเชื้อราที่แยกได้จากแปลงเกษตรทุกระบบในแต่ละอำเภอพบว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05 นั่นคือ การจัดการด้านการเกษตรที่แตกต่างกันไม่มีผลทำให้จำนวนเชื้อมีปริมาณแตกต่างกัน (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 1 ปริมาณโคโลนีของแบคทีเรียที่แยกได้จากดินแปลงเกษตรอินทรีย์ แปลงเกษตรปลอดภัย และแปลงเกษตรใช้สารเคมีบนอาหาร Trypticsoy agar

พื้นที่ผัก	ปริมาณเชื้อ (log CFU/g)		
	แปลงเกษตรอินทรีย์	แปลงเกษตรปลอดภัย	แปลงเกษตรใช้สารเคมี
อำเภอดอนตูม	3.65 ± 0.09[a]	4.24 ± 0.04[b]	3.24 ± 0.10[a]

ตารางที่ 1 ปริมาณโคโลนีของแบคทีเรียที่แยกได้จากดินแปลงเกษตรอินทรีย์ แปลงเกษตรปลอดภัย และแปลงเกษตรใช้สารเคมีบนอาหาร Trypticsoy agar (ต่อ)

พื้นที่ผัก	ปริมาณเชื้อ (log CFU/g)		
	แปลงเกษตรอินทรีย์	แปลงเกษตรปลอดภัย	แปลงเกษตรใช้สารเคมี
อำเภอกำแพงแสน	3.07 ± 0.40 [a]	4.22 ± 0.03 [b]	3.92 ± 0.17 [a]
อำเภอเมืองนครปฐม	3.00 ± 0.15 [a]	4.13 ± 0.11 [b]	3.41 ± 0.33 [a]

[1/] ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรเหมือนกันในแต่ละคอลัมน์ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น $p \leq 0.05$ โดยวิธี DMRT

ตารางที่ 2 ปริมาณโคโลนีของแบคทีเรียที่แยกได้จากดินแปลงเกษตรอินทรีย์ แปลงเกษตรปลอดภัย และแปลงเกษตรใช้สารเคมีบนอาหาร Pikovskaya's medium

พื้นที่ผัก	ปริมาณเชื้อ (log CFU/g)		
	แปลงเกษตรอินทรีย์	แปลงเกษตรปลอดภัย	แปลงเกษตรใช้สารเคมี
อำเภอดอนตูม	3.58 ± 0.07[a]	3.79 ± 0.15 [b]	3.40 ± 0.09 [a]
อำเภอกำแพงแสน	3.89 ± 0.07 [a]	4.11 ± 0.07 [b]	3.99 ± 0.05 [a]
อำเภอเมืองนครปฐม	3.59 ± 0.15 [a]	4.02 ± 0.04 [b]	3.20 ± 0.39 [a]

[1/] ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรเหมือนกันในแต่ละคอลัมน์ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น $p \leq 0.05$ โดยวิธี DMRT

ตารางที่ 3 ปริมาณโคโลนีของเชื้อราที่แยกได้จากดินแปลงเกษตรอินทรีย์ แปลงเกษตรปลอดภัย และแปลงเกษตรใช้สารเคมีบนอาหาร Rose Bengal Agar

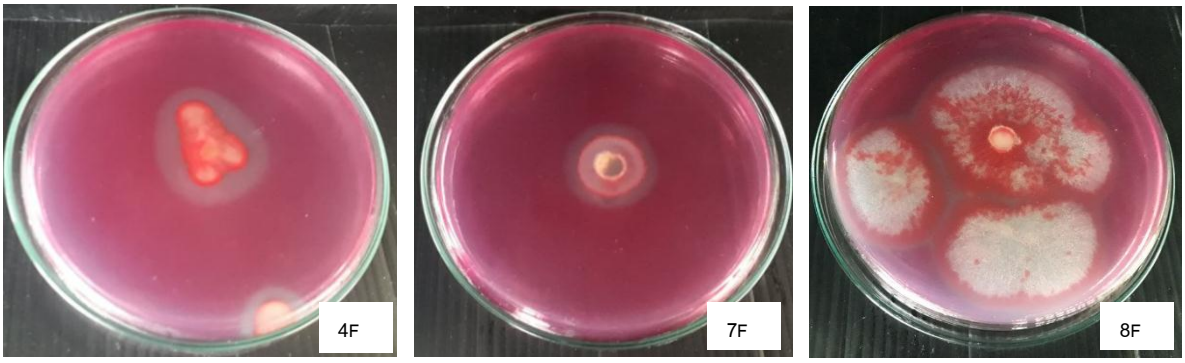
พื้นที่ผัก	ปริมาณเชื้อ (log CFU/g)		
	แปลงเกษตรอินทรีย์	แปลงเกษตรปลอดภัย	แปลงเกษตรใช้สารเคมี
อำเภอดอนตูม	3.03 ± 0.17[a]	2.68 ± 0.17 [a]	2.10 ± 0.17 [a]
อำเภอกำแพงแสน	2.72 ± 0.20 [a]	2.59 ± 0.26 [a]	2.91 ± 0.13 [a]
อำเภอเมืองนครปฐม	2.10 ± 0.17 [a]	2.66 ± 0.10 [a]	2.30 ± 0.00 [a]

[1/] ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรเหมือนกันในแต่ละคอลัมน์ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น $p \leq 0.05$ โดยวิธี DMRT

จากนั้นนำแบคทีเรียที่ขึ้นบนอาหารทั้งหมดมาคัดแยกโคโลนีที่แตกต่างกันจนได้ colony ที่บริสุทธิ์ด้วยวิธี sub-culture พบว่าแยกแบคทีเรียได้ทั้งหมด 65 ไอโซเลต โดยแยกได้จากอำเภอเมืองนครปฐม 25 ไอโซเลต อำเภอกำแพงแสน 22 ไอโซเลต และอำเภอดอนตูม 18 ไอโซเลต แยกเชื้อราบริสุทธิ์ได้ 23 ไอโซเลต จากอำเภอเมืองนครปฐม 9 ไอโซเลต อำเภอกำแพงแสน 8 ไอโซเลต และ อำเภอดอนตูม 6 ไอโซเลต จากนั้นเก็บรักษาจุลินทรีย์ทั้งหมดไว้เพื่อใช้ศึกษาต่อไป

2. การทดสอบเชื้อราผลิตเอนไซม์เซลลูเลสและการจำแนกชนิดเชื้อราโดยวิธีทางชีวโมเลกุล

นำเชื้อราที่แยกได้ทั้งหมด 23 ไอโซเลต มาทดสอบความสามารถในการย่อยสลายเซลลูโลส พบเชื้อราจำนวน 3 ไอโซเลต ที่มีความสามารถย่อยสลายเซลลูโลสได้ คือ G01-4F O03-7F และ G01-8F ภาพที่ 1



ภาพที่ 1 การทดสอบความสามารถในการย่อยสลายเซลลูโลสของเชื้อราที่คัดแยกได้จากดิน บนอาหาร CMC agar

จากภาพที่ 1 จะเห็นบริเวณใส (clear zone) รอบโคโลนีของเชื้อราที่เจริญบนอาหาร CMC ที่เททับด้วย congo red ซึ่งไอโซเลต G01-4F สามารถสร้างวงใสได้มากที่สุด หลังจากนั้นนำเชื้อราทั้ง 3 ไอโซเลต ไปสกัดดีเอ็นแล้วเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ Internal Transcribed Spacer (ITS) จากนั้นหาลำดับนิวคลีโอไทด์ เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ไปเทียบกับฐานข้อมูลใน GenBank พบว่า ลำดับ นิวคลีโอไทด์ของไอโซเลต G01-4F แสดงร้อยละความเหมือนสูงสุด ร้อยละ 100 กับ *Lasiodiplodia theobromae* (Accession no. KR709026.1) ไอโซเลต O03-7F แสดงร้อยละความเหมือนสูงสุด ร้อยละ 99 กับ *Aspergillus aculeatus* (Accession no. KM979737.1) และไอโซเลต G01-8F แสดงร้อยละความเหมือนสูงสุด ร้อยละ 100 กับ *Aspergillus fumigatus* (Accession no. MF379664.1)

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

การศึกษาความหลากหลายทางชีวภาพของแบคทีเรีย และเชื้อราในแปลงปลูกผักในจังหวัดนครปฐม 3 อำเภอ คือ อำเภอดอนตูม อำเภอกำแพงแสน และอำเภอเมืองนครปฐม พบว่า ปริมาณจุลินทรีย์ที่คัดแยกในอาหาร TSA และปริมาณจุลินทรีย์ที่คัดแยกในอาหาร PVK พบว่า แปลงเกษตรปลอดภัยทุกพื้นที่มีปริมาณจุลินทรีย์ทั้งสองกลุ่มมากที่สุด เมื่อเทียบกับแปลงเกษตรอินทรีย์และแปลงเกษตรใช้สารเคมี โดยอำเภอกำแพงแสนพบปริมาณจุลินทรีย์ทั้งสองกลุ่มมากที่สุด ส่วนอำเภอดอนตูมและอำเภอเมืองนครปฐมมีปริมาณจุลินทรีย์ทั้งสองกลุ่มน้อยกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่ปริมาณจุลินทรีย์ทั้งสองกลุ่มในอำเภอดอนตูมและอำเภอเมืองนครปฐมไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ส่วนปริมาณเชื้อราของระบบเกษตรทุกระบบของทุกๆ อำเภอไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ จากการรายงานการวิจัยของไพรัตน์ พิมพ์ศิริกุล และคณะ [9] พบว่า ปริมาณอินทรียวัตถุในดิน ค่า pH ของดินมีผลต่อปริมาณจุลินทรีย์ในดิน รวมถึงชนิดของดินและการทำเกษตรกรรมที่ต่างกันมีผลต่อปริมาณแบคทีเรียละลายฟอสเฟตในดิน และการใส่ปุ๋ยอินทรีย์จะช่วยให้ดินมีคุณสมบัติทางกายภาพดีเหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของพืช แต่อาจทำให้ได้ผลผลิตของพืชตกต่ำและไม่ดีเท่าที่ควร เนื่องจากปุ๋ยอินทรีย์นั้นมีปริมาณธาตุอาหารต่ำ ดังนั้น ปุ๋ยเคมีจึงยังคงมีบทบาทในการเพิ่มผลผลิตพืช แต่การใช้ปุ๋ยเคมีเพียงอย่างเดียวก็อาจส่งผลให้เกิดผลเสียในระยะยาว ส่วนปุ๋ยชีวภาพมักมีข้อจำกัดในการนำไปใช้ค่อนข้างมาก [3] ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองเนื่องจากพบปริมาณจุลินทรีย์ทั้งสองกลุ่มมากที่สุดในระบบการเกษตรปลอดภัย อันเนื่องมาจากเกษตรปลอดภัย หมายถึง การปฏิบัติเพื่อป้องกัน หรือลดความเสี่ยงของอันตรายที่เกิดขึ้นระหว่างการเพาะปลูก การเก็บเกี่ยว และการจัดการหลังการเก็บเกี่ยว เพื่อให้ได้ผลิตผลที่มีคุณภาพ ปลอดภัย และเหมาะสมต่อ การบริโภค มีการใช้สารเคมีแต่ควบคุมปริมาณสารเคมีตกค้างให้อยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ว่าปลอดภัยต่อการบริโภค และใช้ปุ๋ยเคมีร่วมกับปุ๋ยอินทรีย์ (ปุ๋ยคอกและปุ๋ยหมัก) และปุ๋ยชีวภาพเพื่อปรับปรุงสภาพดิน ส่วนการเกษตรอินทรีย์ หมายถึง ระบบเกษตรที่ผลิตอาหารหรือผลิตผลที่ปลอดภัย และในขบวนการผลิตจะต้องมีผลกระทบต่อเกษตรกรและสิ่งแวดล้อม ดังนั้นข้อกำหนดที่สำคัญของการเกษตรอินทรีย์คือ ห้ามใช้สารเคมีและสารสังเคราะห์ทุกชนิดในการผลิต และพื้นที่การเกษตรอินทรีย์จะต้องปลอดจากการปนเปื้อนของดิน น้ำ

และอากาศ ซึ่งจากรายงานการวิจัยของ สายชล พรมีอยู่ และคณะ [6] ศึกษาเปรียบเทียบการเจริญเติบโตของผักบุ้งจีน เมื่อใช้ปุ๋ยมูลวัว ปุ๋ยหมัก และปุ๋ยเคมีในอัตราต่างๆ พบว่า ทรีตเมนต์ที่ไม่ใส่ปุ๋ยเคมีผักบุ้งจีนมีการเจริญเติบโตต่ำกว่าที่ใส่ปุ๋ยเคมี และมีการเจริญเติบโตได้สูงที่สุดในทรีตเมนต์ที่ใส่ปุ๋ยเคมีร่วมกับมูลวัว ส่วนจากรายงานการวิจัยของ นิจพร ณ พัทลุง (2552) ศึกษาผลของปุ๋ยอินทรีย์ ปุ๋ยเคมี และปุ๋ยชีวภาพต่อการเจริญเติบโตและผลผลิตของมะเขือเทศสีดา พบว่าการใส่ปุ๋ยอินทรีย์อัตรา 4 ตันต่อไร่จะทำให้มะเขือเทศสีดามีการเจริญเติบโตและผลผลิต (ผลผลิต 1,920 กิโลกรัมต่อไร่) มากกว่าการใส่ปุ๋ยเคมีอัตรา 100 กิโลกรัมต่อไร่ (ผลผลิต 1,463 กิโลกรัมต่อไร่) แต่เมื่อพิจารณาความคุ้มค่าในการลงทุนแล้ว การใช้ปุ๋ยเคมีเสริมอินทรีย์อัตรา 100 กิโลกรัมต่อไร่จะทำให้เกษตรกรมีกำไรในการผลิตมะเขือเทศมากที่สุด อีกทั้งการใส่ปุ๋ยอินทรีย์ในดินที่มีอินทรียวัตถุต่ำหรือปานกลาง เป็นการช่วยเพิ่มแหล่งอาหารของจุลินทรีย์ในดินเพิ่มปริมาณมากขึ้น และพบว่ากิจกรรมของจุลินทรีย์ในดินเพิ่มขึ้น สรุปได้ว่าการจัดการเกษตรมีผลต่อความหลากหลายของแบคทีเรีย โดยพบว่าการจัดการเกษตรแบบ การเกษตรปลอดภัยที่มีการเติมอินทรีย์สารจำพวกปุ๋ยคอก ปุ๋ยหมัก ลงสู่ดินร่วมกับการใช้สารเคมี เป็นระบบที่พบความหลากหลายและปริมาณของแบคทีเรียมากที่สุด ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Yang et al. [19] พบว่า เชื้อมีความหลากหลากมากขึ้นเมื่อมีการเติมปุ๋ยคอกและปุ๋ยหมัก

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบสำนักงานสนับสนุนงานวิจัย (สกว.) สำหรับเงินทุนในการทำวิจัย ขอบคุณมหาวิทยาลัยราชภัฏนครปฐมรวมทั้งเกษตรกรในอำเภอดอนตูม อำเภอกำแพงแสน และอำเภอเมืองนครปฐม จังหวัดนครปฐมที่มีส่วนร่วมในการเอื้อเผื่อสถานที่และอำนวยความสะดวกในการเก็บตัวอย่าง

เอกสารอ้างอิง

[1] กนกกาญจน์ ตลึงผล และ นริศ ท้าวจันทร์. การใช้เชื้อรา *Metarhizium anisopliae* PSUM04 ควบคุมเพลี้ยอ่อนผัก *Lipaphis erysimi* (Kalt.) (Homoptera: Aphididae) ในผักคะน้าระบบไฮโดรโปนิกส์. วารสารแก่นเกษตร 2557;42: 634 – 638.

[2] กรมพัฒนาที่ดิน. โปรแกรมดินไทยและธาตุอาหารพืชและการจัดการดินและปุ๋ยรายแปลง. กรมพัฒนาที่ดิน กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ 2551.

[3] ธงชัย มาลา. ปุ๋ยอินทรีย์และปุ๋ยชีวภาพ เทคนิคการผลิตและการใช้ประโยชน์. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ : มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์; 2546.

[4] นลินทิพย์ เพณี, สำนักงานมาตรฐานสินค้าและอาหารแห่งชาติ (มกอช.) การปฏิบัติทางการเกษตรที่ดี (GAP) พืชอาหาร [อินเทอร์เน็ต] [เข้าถึงเมื่อ 19 มีนาคม 2560]. เข้าถึงได้จาก: http://www.acfs.go.th/news/docs/acfs_03-08-54-002.pdf

[5] นิจพร ณ พัทลุง. ผลของปุ๋ยอินทรีย์ เคมี และชีวภาพต่อการเจริญเติบโตและผลผลิตของมะเขือเทศสีดา. วารสารวิจัยและพัฒนามหาวิทยาลัยราชภัฏบุรีรัมย์ 2552; 4:7-18.

[6] สายชล พรมีอยู่, อัจฉรา จิตตลดากรม และ หฤษฎี ภัทรดิลก. ผลของการใช้ปุ๋ยมูลวัว ปุ๋ยหมักและปุ๋ยเคมีต่อการผลิตผักบุ้งจีน. รายงานการประชุมเสนอผลงานวิจัยระดับบัณฑิตศึกษา มหาวิทยาลัยสุโขทัยธรรมาธิราช ครั้งที่ 2 มหาวิทยาลัยสุโขทัยธรรมาธิราช. กรุงเทพฯ: 2555.

[7] เลขา มาโนช, อรอุมา เจียมจิตต์, ธิดา เดชฮวบ, ผจงจิต ภูจิญญาณ์ และ ยุพดี เผ่าพันธุ์. ชนิดและการแพร่กระจายของเชื้อราจากดินบริเวณน้ำพุร้อน ดินทำการเกษตร และดินจากแหล่งอื่นๆ. รายงานการประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 43: สาขาพืช. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ. 2548. 737-746..

[8] เอกรัฐ ปั่นกำจร, สมเกียรติ ปั้นแตง และกฤษณา บุญศิริ. ความเข้มข้นของเชื้อราบิวเวอร์เรียในการป้องกันกำจัดเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลในกล้าข้าวพันธุ์ปทุมธานี. วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร 2555; 43:273 -276.

[9] ไพรัตน์ พิมพ์ศิริกุล, กรรณ จินดาประเสริฐ, สมเกียรติ สีสนอง และ อภิศักดิ์ โพธิ์ปั้น. การตรวจหาจุลินทรีย์ในดินปลูกผักระบบเกษตรอินทรีย์. วารสารเกษตรพระจอมเกล้า 2559; 34: 77-84.

[10] Arshad M, Frankenberger WT. Microbial production of plant growth regulators. In: Blaine F Metting Jr (Eds.). Soil Microbial Ecology. Marcel and Dekker Inc; 1993.

[11] Bailey KL, Lazarovits G. Suppressing soil-borne diseases with residue management and organic amendments. Soil Till Res 2003; 72:169–80.

[12] Boddey RM, Dobereiner J. Nitrogen fixation associated with grasses and cereals: recent progress and perspectives for the future. Fert Res 1995; 42:241–50.

[13] Doran JW, Zeiss MR. Soil health and sustainability: managing the biotic component of soil quality. Appl Soil Ecol 2000; 15:3–11.

[14] Hussain, Z.A., Hegazy, W.K., Abdel-Salam, M.S. and Hafez, S.S. Optimization and molecular identification of novel cellulose degrading bacteria isolated from Egyptian environment. JGEB 201; 15:77–85.

[15] Nautiyal CS. An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. FEMS Microbiol Lett 1999; 170:265-270.

[16] Vurukonda SSKP. Vardharajula S. Shrivastava M, SkZ A. Enhancement of drought stress tolerance in crops by plant growth promoting rhizobacteria. Microbiol Res 2016; 184:13–24.

[17] Pointing SB. Qualitative methods for the determination of lignocellulolytic enzyme production by tropical fungi. Fungal Divers 1999; 2:17–33.

[18] Taylor, B. and Powell, A. Isolate of plant DNA and RNA. Focus 1982; 4:4-6.

[19] Yang YJ, Dungan RS, Ibekwe AM, Valenzuela-Solano C, Crohn DM, Crowley DE. Effect of organic mulches on soil bacterial communities one year after application. Biol Fert Soils 200: 38:273–281.