ผลของระบบเกษตรกรรมต่อความหลากหลายของชนิดจุลินทรีย์ในดินในพื้นที่ปลูกผัก จังหวัดนครปฐม

The Effects of Agricultural Systems on Microbial Species Diversity in Soil in Vegetables Growing Areas of Nakhon Pathom Province

เมธานี หอมทอง* วันเพ็ญ แก้วพุก สุกัญญา แย้มสรวล และ อนัญญา ทองสิมา
Methanee Homthong*, Wanphen Kaewpuk, Sukanya Yamsuan and Anunya Thongsima
สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏนครปฐม
Division of Biology, Faculty of Science and Technology, Nakhon Pathom Rajabhat University, Nakhon Pathom, 73000
***Corresponding author; E-mail:** methanee@webmail.npru.ac.th

บทคัดย่อ

จุลินทรีย์ในดินมีบทบาทสำคัญช่วยเพิ่มแร่ธาตุในดิน และการจัดการดินทางการเกษตรมีอิทธิพลต่อองค์ประกอบทางชีวภาพของจุลินทรีย์ในดิน การวิจัยครั้งนี้ได้ทำการศึกษาความหลากหลายของชนิดแบคทีเรียและเชื้อราจากระบบเกษตรกรรม 3 ระบบ ตัวอย่างดินที่นำมาศึกษาเก็บรวบรวมจากแปลงผักทั้ง 3 ระบบ คือ เกษตรอินทรีย์ การเกษตรปลอดภัย (GAP) และเกษตรใช้สารเคมี ในพื้นที่ 3 อำเภอของจังหวัดนครปฐม คือ อำเภอดอนตูม อำเภอกำแพงแสน และอำเภอเมืองนครปฐม ทำการวิเคราะห์ปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดบนอาหารเลี้ยงเชื้อ 2 ชนิด คือ Tryptic soy agar (TSA) และ Pikovskaya agar (PVK) ผลการวิจัยพบว่า ระบบ GAP มีปริมาณแบคทีเรียสูงสุดใน TSA และ PVK โดยมีค่า 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 จากอำเภอดอนตูม 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 ไอโซเลตสามารถสร้างบริเวณใสได้ จากนั้นจำแนกชนิดเชื้อราโดยวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 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%) ตามลำดับ

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 microorganisms. In this research, we studied the diversity of bacterial and fungal species from 3 agricultural systems; 1) organic farming, 2) good agriculture practices (GAP) farming and 3) chemical farming. Soil samples were collected from 3 agricultural systems in 3 districts of Nakhon Pathom Province; 1) Don Tum district, 2) Kamphaeng Saen district and 3) Mueang Nakhon Pathom district. When using soil to analyze all bacteria on 2 media types; tryptic soy agar (TSA) and Pikovskaya agar (PVK), the results revealed that the GAP system showed the highest bacterial count in TSA and PVK agar with 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 from Don Tum district, Kamphaeng Saen district and Mueang Nakhon Pathom district, respectively. When analyzing all fungi on rose bengal agar, 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, 23 isolates were found. Then, the 23 isolates were investigated for cellulase producer by the observation of clear zone on the carboxyl methyl cellulose agar using congo red method. Three isolates showed the clear zone around colony. These isolates were classified based on the molecular characteristics using Internal Transcribed Spacer (ITS) by PCR and sequencing of 18S rDNA. Obtained base sequence was compared to the Genbank database. The isolates G01-4F, O03-7F and G01-8F were similar to *Lasiodiplodia theobromae* (100%), *Aspergillus aculeatus* (99%) and *Aspergillus fumigatus* (100%), respectively.

Keywords : agricultural systems, cellulolytic fungi, microbial species diversity

บทนำ

ประเทศไทยเป็นประเทศเกษตรกรรมซึ่งประชากรส่วนใหญ่ของประเทศมีอาชีพเป็นเกษตรกร และการทำการเกษตรในปัจจุบันมีหลายรูปแบบ เช่น การเกษตรอินทรีย์ การเกษตรปลอดภัย (GAP) การเกษตรใช้สารเคมี การเกษตรผสมผสาน และการเกษตรทฤษฎีใหม่ เป็นต้น ซึ่งทำให้เกิดความหลากหลายของระบบนิเวศเกษตร โดยการเกษตรอินทรีย์เป็นการจัดการด้านเกษตรที่สร้างผลผลิตที่มีความปลอดภัยจากสารเคมีตกค้างโดยการลดมลภาวะต่อพื้นที่เพาะปลูก และระบบนิเวศ ลดการใช้สารเคมีรวมทั้งยาฆ่าแมลงที่เป็นอันตราย ลดการใช้ปุ๋ยเคมี ลดปัญหาการเกิดโรคและแมลง

ระบาด ลดการปนเปื้อนสารเคมีในแหล่งน้ำ ลดปัญหาความเสื่อมโทรมของดิน ลดต้นทุน และสามารถขายผลผลิตได้ราคาสูงขึ้น นอกจากนี้การเลือกใช้ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากจุลินทรีย์กลุ่มที่มีความสามารถยับยั้งเชื้อโรคพืช หรือจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ในการช่วยให้พืชแข็งแรงนั้นก็เพื่อหลีกเลี่ยงอันตรายที่เกิดจากการใช้สารเคมี เนื่องจากจุลินทรีย์บางชนิดมีความสามารถผลิตสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรคและแมลง เช่น การใช้เชื้อรา *Metarhizium anisopliae* PSUM04 เพื่อควบคุมเพลี้ยอ่อนผัก [1] เชื้อราขาว *(Beauveria bassiana)* ป้องกันกำจัดเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล [2] เป็นต้น ส่วนเกษตรปลอดภัย หรือมีชื่อเรียกย่อๆ ว่า การเกษตรแบบ GAP (good agricultural practices) คือ การปฏิบัติเพื่อป้องกันหรือลดความเสี่ยงของอันตรายที่เกิดขึ้นระหว่างการเพาะปลูก การเก็บเกี่ยว และหลังการเก็บเกี่ยวเพื่อให้ได้ผลผลิตที่มีคุณภาพ ปลอดภัยและเหมาะสมต่อการบริโภค [3] ซึ่งอาจมีการใช้สารเคมีร่วมกับผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติแต่เป็นไปตามที่มาตรฐานกำหนด ในขณะที่เกษตรใช้สารเคมี คือ แปลงเกษตรที่มีการใช้สารเคมีตามปกติ

จะเห็นได้ว่าจุลินทรีย์ในดินมีบทบาทที่สำคัญต่อคุณภาพของดิน นอกจากเกี่ยวข้องกับการควบคุมโรค จุลินทรีย์บางกลุ่มยังสามารถสร้างสารที่มีผลต่อการเจริญของพืช เช่น ทำหน้าที่ย่อยสลายอินทรียสารเพิ่มธาตุอาหารในดิน ช่วยตรึงไนโตรเจน ช่วยละลายฟอสเฟตให้อยู่ในรูปที่พืชสามารถนำไปใช้ได้ [4, 5, 6] และพบว่ากลุ่มของแบคทีเรียที่อยู่บริเวณรากพืชในกลุ่ม plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) เกี่ยวข้องทั้งทางตรงและทางอ้อมต่อการเจริญเติบโตของพืช เช่น ทำให้พืชทนแล้งได้ หรือสร้างฮอร์โมนพืชที่กระตุ้นการเจริญเติบโต เช่น สร้างฮอร์โมนออกซิน (auxins) กรดแอบไซซิก (abscisic acid) จิบเบอเรลลิน (gibberellin) และไซโตไคนิน (cytokinins) เป็นต้น [7, 8] จากการศึกษาความหลากหลายของจุลินทรีย์ ในดินจากบริเวณที่ทำการเกษตรเทียบกับแหล่งอื่นๆ ไม่พบความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ [9] อีกทั้งยังพบว่าการจัดการพื้นที่เกษตรมีผลต่อคุณภาพของดินและความหลากหลายของเชื้อจุลินทรีย์ เช่น การไถพรวนดิน การปลูกพืชหมุนเวียน ปลูกพืชคลุมดินและการใส่ปุ๋ยคอกปุ๋ยหมัก ล้วนมีผลต่อค่าพารามิเตอร์ต่างๆ ในดิน เช่น ปริมาณแก๊สออกซิเจนในดิน ความชื้น การอุ้มน้ำ สารอาหาร และแร่ธาตุต่างๆ เป็นต้น รวมทั้งปริมาณและความหลากหลายของจุลินทรีย์ในดินด้วย [10, 11] ดังนั้น การวิจัยครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความหลากหลายทางชีวภาพของแบคทีเรียและเชื้อราในดินในพื้นที่ทำการเกษตร 3 ระบบ คือ การเกษตรอินทรีย์ การเกษตรปลอดภัย (GAP) และการเกษตรใช้สารเคมีที่ปลูกผักในจังหวัดนครปฐม และคัดแยกสายพันธุ์เชื้อราที่สามารถย่อยเซลลูโลสได้

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

1. การเก็บตัวอย่างดิน

เลือกเก็บตัวอย่างดินจากพื้นที่ปลูกผักเศรษฐกิจในจังหวัดนครปฐม 3 ระบบ คือ การเกษตรอินทรีย์ การเกษตรปลอดภัย และการเกษตรใช้สารเคมี โดยแปลงเกษตรอินทรีย์ และแปลงเกษตรปลอดภัยนั้นได้เลือกแปลงปลูกที่ได้รับใบรับรองและมีตลาดรองรับที่แน่นอน โดยทำเกษตรในระบบดังกล่าวมาแล้วไม่น้อยกว่า 3 ปี ซึ่งแปลงเกษตรที่ทำการศึกษามาจาก 3 อำเภอ คือ อำเภอเมืองนครปฐม อำเภอดอนตูม และ อำเภอกำแพงแสน จากนั้นการสำรวจและเก็บตัวอย่างดินจากแปลงเกษตรทั้ง 3 ระบบในแต่ละอำเภอๆ ละ 3 แปลง การเก็บตัวอย่างดินแต่ละแปลงสุ่มเก็บตัวอย่างดินกระจายให้ครอบคลุมทั่วพื้นที่ในแต่ละแปลงๆ ละ 20 จุด (ก่อนขุดดินจะต้องถางหญ้า กวาดเศษพืชหรือวัสดุ

หน้าดินออกก่อน อย่าแซะหรือปาดหน้าดินออก) ใช้เสียม พลั่ว หรือจอบขุดเป็นรูปตัว V ให้ลึกในแนวดิ่งประมาณ 15 เซนติเมตร นำดินในแต่ละจุดมาผสมรวมกันในถุงพลาสติกเดียวกัน คลุกเคล้าให้เข้ากันแบ่งดินแต่ละแปลงเพื่อวิเคราะห์ โดยเกลี่ยตัวอย่างดินทั้งหมดของแต่ละแปลงให้เป็นรูปวงกลมแล้วแบ่งผ่ากลางออกเป็น 4 ส่วนเท่ากัน เก็บดินมาเพียง 2 ส่วน หนักประมาณ 500 กรัม และปิดปากถุงให้สนิท เก็บตัวอย่างดินนำกลับมาแยกเชื้อที่ห้องปฏิบัติการต่อไป [12] รวมจำนวนตัวอย่างทั้งหมด 9 ตัวอย่าง และเก็บรักษาตัวอย่างดินในตู้เย็นอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อรอทำการวิเคราะห์ต่อไป นำไปคัดแยกแบคทีเรียและเชื้อราในห้องปฏิบัติการไม่ควรเก็บไว้นานเกิน 2 สัปดาห์

2. การศึกษาความหลากหลายของจุลินทรีย์ในดิน

นำตัวอย่างดิน 1 กรัม ผสมกับน้ำนึ่งฆ่าเชื้อ 9 มิลลิลิตร ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน มาเขย่าในน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ 10 มิลลิลิตร เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นนำมาเจือจางเพิ่มที่ระดับความเข้มข้น 10-2-10-5 แล้วหยดดินแขวนลอยปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในจานเลี้ยงเชื้อ จำนวน 3 จานเลี้ยงเชื้อต่อ 1 ตัวอย่าง มาเกลี่ยลงบนอาหาร Tryptic soy agar (TSA), Pikovskaya agar (PVK) และอาหาร Rose Bengal Agar จนแห้ง นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3-7 วัน แล้วนับจำนวนโคโลนีที่ปรากฏในจานเลี้ยงเชื้อในแต่ละความเข้มข้น เลือกศึกษาเฉพาะที่ความเข้มข้นที่ทำให้มีจำนวนโคโลนีในแต่ละจานของอาหารเลี้ยงเชื้อที่นับจำนวนโคโลนีได้อยู่ระหว่าง 20 - 30 โคโลนี มาคำนวณหาปริมาณเชื้อในหน่วย log CFU/g ซึ่งคำนวณได้จากสูตร จำนวนเชื้อ = log(10) {ค่าเฉลี่ยของจำนวนโคโลนีต่อจานอาหาร x (1/ความเจือจาง) / ดิน 1 กรัม} จากนั้นใช้เข็มเขี่ยย้ายทุกโคโลนีไปเลี้ยงต่อจนได้เชื้อที่บริสุทธิ์ด้วยวิธี subculture

3. การทดสอบการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส

การทดสอบการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสบนอาหาร Carboxyl methyl cellulose (CMC) [13] 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

นำโคโลนีของเชื้อราที่สามารถสร้าง เอนไซม์เซลลูเลสได้มาเลี้ยงต่อจนได้เส้นใยเป็นเวลา 5 วัน แล้วเจาะส่วนขอบโคโลนีเชื้อราด้วย cork borer ที่ปลอดเชื้อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 มิลลิเมตร นำชิ้นวุ้นที่มีเชื้อรา 3 ชิ้น ใส่ในอาหาร potato dextrose broth (PDB) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ลงในขวดรูปชมพู่ (flask) ขนาด 100 มิลลิลิตร บ่มเชื้อบนเครื่องเขย่าด้วยความเร็ว 180 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน แล้ว สกัดดีเอ็นเอจากเส้นใยรา โดยดัดแปลงจากวิธี CTAB nucleic acid extraction ของ Taylor and Powell [14] 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 ปฏิกิริยาพีซีอาร์ประกอบด้วยสารละลายดีเอ็นเอ ความเข้มข้น 60 ng/μl ปริมาตร 4.0 ไมโครลิตร, ไพรเมอร์ ITS1 และ ITS4 ความเข้มข้น 5 pmol/μl ปริมาตรอย่างละ 2.0 ไมโครลิตร, dNTP ความเข้มข้น 2 mM ปริมาตร 5 ไมโครลิตร, $MgCl_2$ ความเข้มข้น 50 mM ปริมาตร 2 ไมโครลิตร, Taq DNA polymerase (5 unit/μl) ปริมาตร 0.4 ไมโครลิตร และเติมน้ำกลั่น

บริสุทธิ์ (ultra-pure) ให้มีปริมาตรรวม 25 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 ในแผ่นเจลอะกาโรส (agarose gel) ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ย้อมเจลด้วย ethidium bromide เป็นเวลา 10 นาที ตรวจสอบแถบสีของดีเอ็นเอด้วยแสงอัลตราไวโอเลต บันทึกภาพเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน จากนั้นนำมาทำให้บริสุทธิ์ เพื่อกำจัดไพรเมอร์ส่วนที่เหลือ บัฟเฟอร์และเกลือต่างๆ ออกโดยใช้ชุดสำเร็จ Favor PrepTM GEL/PCR purification kit (Favorgen, Taiwan) ส่งผลผลิต PCR ไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์และนำไปวิเคราะห์ผลเพื่อจำแนกชนิดของเชื้อราโดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ การตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์จากโคลนที่ได้ว่ามีความเหมือนหรือความคล้ายคลึงกับดีเอ็นเอของเชื้อราชนิดใดในฐานข้อมูล NCBI โดยใช้โปรแกรม BLAST (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/blast.cgi)

5. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

การดำเนินการทดลองได้ทำการสุ่มเก็บตัวอย่างดินจากแปลงปลูกผักทั้ง 3 ระบบ คือ แปลงเกษตรอินทรีย์ แปลงเกษตรปลอดภัย และแปลงเกษตรใช้สารเคมีในจังหวัดนครปฐม จำนวนแปลงละ 3 ตัวอย่าง (ซ้ำ) การตรวจหาปริมาณเชื้อและการทดลองในการวิจัยทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ ในแต่ละการทดลอง แล้วค่าที่ได้จากการทดลองรายงานเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน โดยใช้โปรแกรม SPSS เวอร์ชัน 17 วิเคราะห์ค่าทางสถิติและเปรียบค่าเฉลี่ยโดยใช้วิธี Duncan's Multiple Range Test (DMRT)

ผลการทดลอง

1. การศึกษาปริมาณแบคทีเรียและเชื้อราในตัวอย่างดิน

จากการแยกแบคทีเรียและเชื้อราด้วยวิธี dilution pour plate จากตัวอย่างดินในพื้นที่ แปลงเกษตร 3 ระบบ คือ แปลงเกษตรอินทรีย์ แปลงเกษตรปลอดภัย และแปลงเกษตรใช้สารเคมี จากพื้นที่ 3 อำเภอ พบแบคทีเรียจากแปลงเกษตรทั้ง 3 ระบบ มีปริมาณมากกว่าเชื้อรา ส่วนปริมาณแบคทีเรียบนอาหาร TSA และอาหาร PVK ของการเกษตรปลอดภัย (GAP) ทุกๆ อำเภอมีค่ามากกว่าระบบอื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05 ดังนี้ บนอาหาร Tryptic soy agar มีค่าเท่ากับ log 4.24 ± 0.04, log 4.22 ± 0.03 และ log 4.13 ± 0.11 CFU/g ของอำเภอดอนตูม อำเภอกำแพงแสน และอำเภอเมืองนครปฐม ตามลำดับ บนอาหาร Pikovskaya agar มีค่าเท่ากับ log 3.79 ± 0.15, log 4.11 ± 0.07 และ log 4.02 ± 0.04 CFU/g จากอำเภอดอนตูม อำเภอกำแพงแสน และอำเภอเมืองนครปฐม ตามลำดับ และเชื้อราบนอาหาร Rose Bengal Agar มีค่าเท่ากับ 2.68 ± 0.17, 2.59 ± 0.26 และ 2.66 ± 0.10 CFU/g จากอำเภอดอนตูม อำเภอกำแพงแสน และอำเภอเมืองนครปฐม ตามลำดับ นอกจากนี้พบว่าอำเภอดอนตูมมีปริมาณแบคทีเรียที่ขึ้นบนอาหาร TSA สูงที่สุด (Table 1) ขณะที่ปริมาณแบคทีเรียที่ขึ้นบนอาหาร PVK พบว่า พื้นที่อำเภอกำแพงแสนมีปริมาณแบคทีเรียมากที่สุด โดยมีค่าเท่ากับ log 3.89±0.07, 4.11±0.07 และ log 3.99±0.05 CFU/g ของแปลงเกษตรอินทรีย์ แปลงเกษตรปลอดภัย และแปลงเกษตรใช้สารเคมี ตามลำดับ แต่ไม่มากกว่าพื้นที่อำเภออื่นๆ ในระบบเดียวกันอย่างมีนัยสำคัญทาง

สถิติที่ระดับ 0.05 (Table 2) ส่วนปริมาณของเชื้อราที่แยกได้จาก แปลงเกษตรทุกระบบในแต่ละอำเภอ พบว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05 นั่นคือการจัดการด้านการเกษตรที่แตกต่างกันไม่มีผลทำให้จำนวนเชื้อมีปริมาณแตกต่างกัน (Table 3)

จากนั้นนำแบคทีเรียที่ขึ้นบนอาหารทั้งหมดมาคัดแยกโคโลนีที่แตกต่างกันจนได้ colony ที่บริสุทธิ์ด้วยวิธี subculture 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 (Figure 1) จะเห็นบริเวณใส (clear zone) รอบโคโลนีของเชื้อราที่เจริญบนอาหาร CMC ที่เททับด้วย congo red ไอโซเลต G01-4F สามารถสร้างวงใสได้มากที่สุด

Table 1. Colony of bacteria isolated from organic farming, good agriculture practices (GAP) farming and chemical farming on Tryptic soy agar

Plot	Colony of Bacteria (log CFU/g)		
	Organic farming	GAP farming	Chemical-based farming
Don Tum	3.65 ± 0.09[a]	4.24 ± 0.04[b]	3.24 ± 0.10[a]
Kamphaeng Saen	3.07 ± 0.40[a]	4.22 ± 0.03[b]	3.92 ± 0.17[a]
Mueang	3.00 ± 0.15[a]	4.13 ± 0.11[b]	3.41 ± 0.33[a]

Mean values followed by different letters are significantly different within a row or column at $p \leqslant 0.05$ according to Duncan Multiple Range test (DMRT)

Table 2. Colony of bacteria isolated from organic farming, good agriculture practices (GAP) farming and chemical farming on Pikovskaya agar

Plot	Colony of Bacteria (log CFU/g)		
	Organic farming	Organic farming	Organic farming
Don Tum	3.58 ± 0.07[a]	3.79 ± 0.15[b]	3.40 ± 0.09[a]
Kamphaeng Saen	3.89 ± 0.07[a]	4.11 ± 0.07[b]	3.99 ± 0.05[a]
Mueang	3.59 ± 0.15[a]	4.02 ± 0.04[b]	3.20 ± 0.39[a]

Mean values followed by different letters are significantly different within a row or column at $p \leqslant 0.05$ according to Duncan Multiple Range test (DMRT)

Table 3. Colony of fungi isolated from organic farming, good agriculture practices (GAP) farming and chemical farming on Rose Bengal Agar

Plot	Fungi (log CFU/g)		
	Organic farming	GAP farming	Chemical-based farming
Don Tum	3.03 ± 0.17[a]	2.68 ± 0.17[a]	2.10 ± 0.17[a]
Kamphaeng Saen	2.72 ± 0.20[a]	2.59 ± 0.26[a]	2.91 ± 0.13[a]
Mueang	2.10 ± 0.17[a]	2.66 ± 0.10[a]	2.30 ± 0.00[a]

Mean values followed by different letters are significantly different within a row or column at $p \leqslant 0.05$ according to Duncan Multiple Range test (DMRT)

หลังจากนั้นนำเชื้อราทั้ง 3 ไอโซเลต ไปสกัดดีเอ็นแล้วเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ Internal Transcribed Spacer (ITS) จากนั้นหาลำดับนิวคลีโอไทด์ เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ไปเทียบกับฐานข้อมูลใน GenBank พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของไอโซเลต G01-4F แสดงร้อยละความเหมือนสูงสุดร้อยละ 100 กับ *Lasiodiplodia theobromae* (Accession no. KR709026.1) ไอโซเลต O03-7F แสดงร้อยละความเหมือนสูงสุดร้อยละ 99 กับ *Aspergillus aculeatus* (Accession no. KM979737.1) และไอโซเลต G01-8F แสดงร้อยละความเหมือนสูงสุดร้อยละ 100 กับ *Aspergillus fumigatus* (Accession no. MF379664.1)

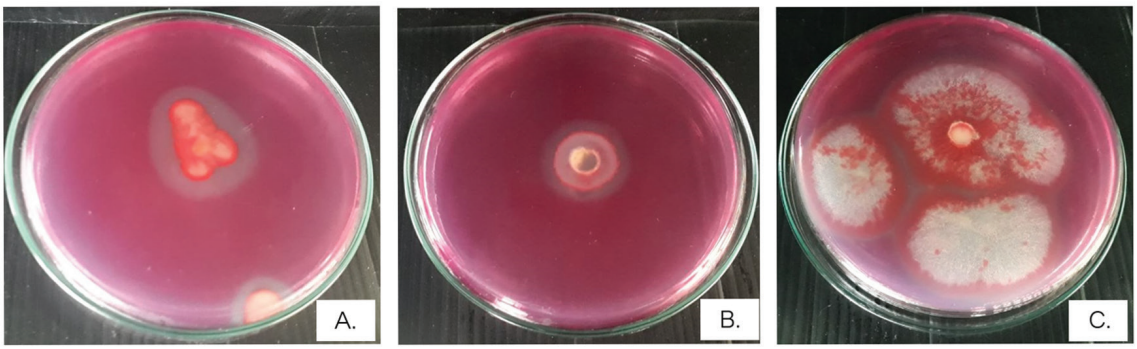

Figure 1. Clearing zone by Congo red assay on CMC agar of isolates (A) G01-4F, (B) O03-7F and (C) G01-8F

อภิปรายผล

การศึกษาความหลากหลายทางชีวภาพของแบคทีเรีย และเชื้อราในแปลงปลูกผักในจังหวัดนครปฐม 3 อำเภอ คือ อำเภอดอนตูม อำเภอกำแพงแสน และอำเภอเมืองนครปฐม พบว่าปริมาณจุลินทรีย์ที่คัดแยกในอาหาร TSA และปริมาณจุลินทรีย์ที่คัดแยกในอาหาร PVK จากแปลงเกษตรปลอดภัยทุกพื้นที่มีปริมาณจุลินทรีย์ทั้งสองกลุ่มมากที่สุด เมื่อเทียบกับแปลงเกษตรอินทรีย์ และแปลงเกษตรใช้สารเคมี โดยอำเภอกำแพงแสนพบปริมาณจุลินทรีย์ทั้งสองกลุ่มมากที่สุด ส่วนอำเภอดอนตูมและอำเภอเมืองนครปฐมมีปริมาณจุลินทรีย์ทั้งสองกลุ่มน้อยกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่ปริมาณจุลินทรีย์ทั้งสองกลุ่มในอำเภอดอนตูมและอำเภอเมืองนครปฐมไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ส่วนปริมาณเชื้อราของระบบเกษตรทุกระบบของทุกๆ อำเภอไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ จากรายงานการวิจัยของ ไพรัตน์ พิมพ์ศิริกุล และคณะ [15] พบว่าปริมาณอินทรียวัตถุในดินและค่า pH ของดินมีผลต่อปริมาณจุลินทรีย์ในดิน รวมถึงชนิดของดินและการทำเกษตรกรรมที่ต่างกันมีผลต่อปริมาณแบคทีเรียละลายฟอสเฟตในดิน และการใส่ปุ๋ยอินทรีย์จะช่วยให้ดินมีคุณสมบัติทางกายภาพดีเหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของพืชแต่อาจทำให้ได้ผลผลิตของพืชตกต่ำและไม่ดีเท่าที่ควรเนื่องจากปุ๋ยอินทรีย์นั้นมีปริมาณธาตุอาหารต่ำ ดังนั้น ปุ๋ยเคมีจึงยังคงมีบทบาทในการเพิ่มผลผลิตพืช แต่การใช้ปุ๋ยเคมีเพียงอย่างเดียวก็อาจส่งผลให้เกิดผลเสียในระยะยาว ส่วนปุ๋ยชีวภาพมักมีข้อจำกัดในการนำไปใช้ค่อนข้างมาก [16] ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลอง เนื่องจากพบปริมาณจุลินทรีย์ทั้งสองกลุ่มมากที่สุดในระบบการเกษตรปลอดภัยอันเนื่องมาจากเกษตรปลอดภัยหมายถึงการปฏิบัติเพื่อป้องกัน หรือลดความเสี่ยงของอันตรายที่เกิดขึ้นระหว่างการเพาะปลูก การเก็บเกี่ยวและการจัดการหลังการเก็บเกี่ยวเพื่อให้ได้ผลิตผลที่มีคุณภาพ ปลอดภัย และเหมาะสมต่อการบริโภค มีการใช้สารเคมีแต่ควบคุมปริมาณสารเคมีตกค้างให้อยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ว่าปลอดภัยต่อการบริโภค และใช้ปุ๋ยเคมีร่วมกับปุ๋ยอินทรีย์ (ปุ๋ยคอก และปุ๋ยหมัก) และปุ๋ยชีวภาพเพื่อปรับปรุงสภาพดิน ส่วนการเกษตรอินทรีย์หมายถึงระบบเกษตรที่ผลิตอาหาร หรือผลิตผลที่ปลอดภัย และในขบวนการผลิตจะต้องมีผลกระทบต่อเกษตรกรและสิ่งแวดล้อม ดังนั้น ข้อกำหนดที่สำคัญของการเกษตรอินทรีย์คือห้ามใช้สารเคมีและสารสังเคราะห์ทุกชนิดในการผลิต และพื้นที่การเกษตรอินทรีย์จะต้องปลอดจากการปนเปื้อนของดิน น้ำ และอากาศ ซึ่งจากรายงานการวิจัยของ สายชล พรมีอยู่ และคณะ [17] ศึกษาเปรียบเทียบการเจริญเติบโตของผักบุ้งจีนเมื่อใช้ปุ๋ยมูลวัว ปุ๋ยหมัก และปุ๋ยเคมีในอัตราต่างๆ พบว่า ทรีตเมนต์ที่ไม่ใส่ปุ๋ยเคมีผักบุ้งจีนมีการเจริญเติบโตต่ำกว่าที่ใส่ปุ๋ยเคมี และมีการเจริญเติบโตได้สูงที่สุดในทรีตเมนต์ที่ใส่ปุ๋ยเคมีร่วมกับมูลวัว ส่วนจากรายงานการวิจัยของ นิจพร ณ พัทลุง [18] ศึกษาผลของปุ๋ยอินทรีย์ ปุ๋ยเคมี และปุ๋ยชีวภาพต่อการเจริญเติบโต และผลผลิตของมะเขือเทศสีดา พบว่าการใส่ปุ๋ยอินทรีย์อัตรา 4 ตันต่อไร่ จะทำให้มะเขือเทศสีดามีการเจริญเติบโตและผลผลิต (ผลผลิต 1,920 กิโลกรัมต่อไร่) มากกว่าการใส่ปุ๋ยเคมีอัตรา 100 กิโลกรัมต่อไร่ (ผลผลิต 1,463 กิโลกรัมต่อไร่) แต่เมื่อพิจารณาความคุ้มค่าในการลงทุนแล้ว การใช้ปุ๋ยเคมีเสริมอินทรีย์อัตรา 100 กิโลกรัมต่อไร่ จะทำให้เกษตรกรมีกำไรในการผลิตมะเขือเทศมากที่สุด อีกทั้งการใส่ปุ๋ยอินทรีย์ในดินที่มีอินทรียวัตถุต่ำหรือปานกลาง เป็นการช่วยเพิ่มแหล่งอาหารของจุลินทรีย์ในดินเพิ่มปริมาณมากขึ้น และพบว่ากิจกรรมของจุลินทรีย์ในดินเพิ่มขึ้น

สรุป

การจัดการเกษตรมีผลต่อความหลากหลายของแบคทีเรีย โดยพบว่าการจัดการเกษตรแบบการเกษตรปลอดภัยที่มีการเติมอินทรีย์สารจำพวก ปุ๋ยคอก ปุ๋ยหมักลงสู่ดินร่วมกับการใช้สารเคมี เป็นระบบที่พบความหลากหลายและปริมาณของแบคทีเรียมากที่สุด ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Yang et al. [19] พบว่าเชื้อมีความหลากหลายมากขึ้น เมื่อมีการเติมปุ๋ยคอกและปุ๋ยหมัก

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณสำนักงานสนับสนุนงานวิจัย (สกว.) สำหรับเงินทุนในการทำวิจัย ขอบคุณมหาวิทยาลัยราชภัฏนครปฐม รวมทั้งเกษตรกรในอำเภอดอนตูม อำเภอกำแพงแสน และอำเภอเมืองนครปฐม จังหวัดนครปฐมที่มีส่วนร่วมในการเอื้อเฟื้อสถานที่และอำนวยความสะดวกในการเก็บตัวอย่าง

เอกสารอ้างอิง

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

[2] เอกรัฐ ปั่นกำจร, สมเกียรติ ปั้นแดง และกฤษณา บุญศิริ. 2555. ความเข้มข้นของเชื้อราบิวเวอร์เรียในการป้องกันกำจัดเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลในกล้าข้าวพันธุ์ปทุมธานี. *วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร* 43: 273 -276.

[3] นลินทิพย์ เพณี สำนักงานมาตรฐานสินค้าและอาหารแห่งชาติ (มกอช.) การปฏิบัติทางการเกษตรที่ดี (GAP) พืชอาหาร. [online] เข้าถึงได้จาก: http://www.acfs.go.th/news/docs/acfs_03-08-54-002.pdf. 2560.

[4] Boddey, R, M. and Dobereiner, J. 1995. Nitrogen fixation associated with grasses and cereals: recent progress and perspectives for the future. *Fertilizer Research.* 42: 241-250.

[5] Hussain, Z, A., Hegazy, W, K., Abdel-Salam, M, S. and Hafez, S, S. 2017. Optimization and molecular identification of novel cellulose degrading bacteria isolated from Egyptian environment. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology.* 15: 77-85.

[6] Nautiyal, C, S. 1999. An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. *FEMS Microbiology Letters.* 170: 265-270.

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

[8] Vurukonda, S, S, K, P., Vardharajula, S., Shrivastava, M. and SkZ, A. 2016. Enhancement of drought stress tolerance in crops by plant growth promoting rhizobacteria. *Microbiological Research.* 184: 13-24.

[9] เลขา มาโนช, อรอุมา เจียมจิตต์, ธิดา เดชฮวบ, ผจงจิต ภูจิญญาณ์ และ ยุพดี เผ่าพันธุ์. 2548. ชนิดและการแพร่กระจายของเชื้อราจากดินบริเวณน้ำพุร้อน ดินทำการเกษตร และดินจากแหล่งอื่นๆ.

รายงานการประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 43: สาขาพืช. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ. 737-746.

[10] Bailey, K, L. and Lazarovits, G. 2003. Suppressing soil-borne diseases with residue management and organic amendments. *Soil & Tillage research.* 72: 169-180.

[11] Doran, J, W. and Zeiss, M, R. 2000. Soil health and sustainability: managing the biotic component of soil quality. *Applied Soil Ecology.* 15: 3-11.

[12] กรมพัฒนาที่ดิน. 2551. โปรแกรมดินไทยและธาตุอาหารพืชและการจัดการดินและปุ๋ยรายแปลง. กรมพัฒนาที่ดิน กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.

[13] Pointing, S, B. 1999. Qualitative methods for the determination of lignocellulolytic enzyme production by tropical fungi. *Fungal Diversity.* 2: 17-33.

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

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

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

[17] สายชล พรมีอยู่, อัจฉรา จิตตลดากรม และหฤษฎี ภัทรดิลก. 2555. ผลของการใช้ปุ๋ยมูลวัว ปุ๋ยหมัก และปุ๋ยเคมีต่อการผลิตผักบุ้งจีน. รายงานการประชุมเสนอผลงานวิจัยระดับบัณฑิตศึกษามหาวิทยาลัยสุโขทัยธรรมาธิราช ครั้งที่ 2.มหาวิทยาลัยสุโขทัยธรรมาธิราช. กรุงเทพฯ:

[18] นิจพร ณ พัทลุง. 2552. ผลของปุ๋ยอินทรีย์ เคมี และชีวภาพต่อการเจริญเติบโตและผลผลิตของมะเขือเทศสีดา. *วารสารวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยราชภัฏบุรีรัมย์* 4: 7-18.

[19] Yang, Y, J., Dungan, R, S., Ibekwe, A, M., Valenzuela-Solano, C., Crohn, D, M. and Crowley, D, E. 2003. Effect of organic mulches on soil bacterial communities one year after application. *Biology and fertility of soils.* 38: 273-281.