



การแยกและคัดเลือกรากแบคทีเรียส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช

จากดินบริเวณรอบรากและต้นข้าว

Isolation and screening of plant growth promoting bacteria (PGPB)

from rice (*Oryza sativa*) and rhizosphere soil

จริยา อุบลรัตน์¹ สมพร มุลมั่งมี² นงพงา คุณจักร¹ และ ดวงทิพย์ มุลมั่งมี*

¹ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี

เขตทุ่งครุ กรุงเทพมหานคร 10140

²ศูนย์ความหลากหลายทางชีวภาพ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย

อำเภอคลองหลวง จังหวัดปทุมธานี 12110

*E-mail: duangtip.moo@kmutt.ac.th

บทคัดย่อ

การศึกษานี้เป็นการแยกและคัดเลือกรากแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชจากส่วนของราก ลำต้น และดินบริเวณรอบรากต้นข้าว สามารถแยกเชื้อแบคทีเรียได้ทั้งหมดจำนวน 478 ไอโซเลต ทำการทดสอบประสิทธิภาพในการละลายธาตุฟอสฟอรัสในรูปของไตรแคลเซียมฟอสเฟต ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) และธาตุสังกะสีในรูปของซิงค์ออกไซด์ (ZnO) จากการทดลองพบเชื้อไอโซเลต AS10-1 และ AR9-1 มีประสิทธิภาพในการละลาย $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ และ ZnO ได้สูงที่สุด โดยมีค่าดัชนีวงไสรอบโคโลนีเท่ากับ 1.85 และ 3.43 ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับ *Gluconacetobacter azotocaptans* BCC 36449 และ *G. diazotrophicus* BCC 20215 สายพันธุ์อ้างอิง พบว่าการละลายธาตุฟอสฟอรัสมีค่าดัชนีวงไสรอบโคโลนีเท่ากับ 1.81 และ 1.16 ส่วนการละลายธาตุสังกะสีมีค่าดัชนีวงไสรอบโคโลนีเท่ากับ 2.38 และ 2.57 ตามลำดับ ซึ่งมีค่าต่ำกว่าแบคทีเรียที่คัดเลือกได้จากงานวิจัยนี้ จากนั้นคัดเลือกรากแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการละลายธาตุอาหารทั้งสองได้ดีจำนวน 41 ไอโซเลต เพื่อทดสอบการผลิตกรดอินโดลอะซิติก และการตรึงไนโตรเจนโดยทางอ้อมด้วยวิธี Nessler's reagent พบแบคทีเรียไอโซเลต AB6-3 มีประสิทธิภาพในการผลิตกรดอินโดลอะซิติกได้สูงสุดเท่ากับ 58.25 ไมโครกรัมต่อ

Received: October 03, 2018

Revised: November 18, 2018

Accepted: December 28, 2018

มิลลิเมตร ซึ่งผลิตได้สูงกว่าแบคทีเรียสายพันธุ์อ้างอิง 3 - 4.5 เท่า ตามลำดับ และพบแบคทีเรียไอโซเลท NB3-3 สามารถตรึงไนโตรเจนได้สูงที่สุด และจากการพิสูจน์เอกลักษณ์แบคทีเรียส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช จำนวน 41 ไอโซเลท ด้วยการตรวจวิเคราะห์ลำดับเบสชิ้นส่วนของยีน 16S rDNA จากผลการทดลองสามารถจัดอยู่ในยีนส์ *Gluconacetobacter* sp., *Cosenzaea* sp., *Nguyenibacter* sp., *Serratia* sp., *Ochrobactrum* sp., *Asaia* sp., *Burkholderia* sp. และ *Pseudomonas* sp.

คำสำคัญ: แบคทีเรียส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช การละลายธาตุฟอสฟอรัสและสังกะสี กรดอินโดลอะซิติก การตรึงไนโตรเจน

Abstract

This study was to isolate and screen growth promoting bacteria from root, stem of rice and rhizosphere soil samples. The totally 478 bacterial isolates was isolated and screened for phosphate (P) and zinc (Zn) solubilizing activities using tricalcium phosphate ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) and zinc oxide (ZnO) as the substrates. The results showed that the isolate AS10-1 and AR9-1 were the best of P and Zn solubilizing strains. They had solubilizing clear zone index of 1.85 and 3.43 respectively. When compared to the reference strains of *Gluconacetobacter azotocaptans* BCC 36449 and *G. diazotrophicus* BCC 20215, indicating that the reference strains exhibited P solubilizing clear zone index of 1.81 and 1.16, and Zn solubilizing clear zone index of 2.38 and 2.57 respectively, which lower than the isolated strains in this study. Screening of 41 effective bacterial isolates capable of both P and Zn solubilization for indole acetic acid production was performed and also indirect nitrogen fixation was measured by Nessler's method. It was found that the isolate AB6-3 was the highest of Indole-3-acetic acid production with the yield of 58.25 $\mu\text{g/ml}$. It was interested that this isolate produced 3 and 4.5 times higher than that of two reference strains, respectively. The isolate NB3-3 was found to be the best nitrogen fixing activity. Identification of all 41 plant growth promoting bacteria was done using 16S rRNA gene sequencing. They were classified into 8 genera as of *Gluconacetobacter* sp., *Cosenzaea* sp., *Nguyenibacter* sp., *Serratia* sp., *Ochrobactrum* sp., *Asaia* sp., *Burkholderia* sp. and *Pseudomonas* sp.

Keywords: plant growth promoting bacteria (PGPB), phosphorus and zinc solubilization, indole-3-acetic acid, nitrogen fixation

1. บทนำ

พื้นที่ดินทั่วทุกภูมิภาคของประเทศไทยมีความอุดมสมบูรณ์ และความหลากหลายทางชีวภาพค่อนข้างสูง ส่งผลให้มีความเหมาะสมต่อการประกอบอาชีพเกษตรกรรม เช่น การเพาะปลูกพืชอาหารจำพวก ข้าว มันสำปะหลัง อ้อย เป็นต้น โดยเฉพาะข้าวจัดเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญที่สร้างรายได้เข้าประเทศในแต่ละปีมีมูลค่ามหาศาล [1] ในดินตามธรรมชาติที่เป็นพื้นที่เกษตรกรรมจะมีจุลินทรีย์ซึ่งเป็นสิ่งมีชีวิตขนาดเล็กอยู่เป็นจำนวนมาก จุลินทรีย์เหล่านี้ ได้แก่ แบคทีเรีย รา สาหร่าย โปรโตซัว เป็นต้น ล้วนมีบทบาทสำคัญต่อการใช้ประโยชน์ในระบบนิเวศการเกษตร ซึ่งเป็นตัวบ่งชี้คุณภาพของดินที่มีจุลินทรีย์เจริญอยู่ นอกจากนี้ยังมีบทบาทสำคัญในการควบคุมโรค และส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช ปัจจุบันมีการส่งเสริมให้เกษตรกรหันมาใช้ปุ๋ยชีวภาพ หรือหัวเชื้อจุลินทรีย์ที่ส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช เพื่อทดแทนการใช้ปุ๋ยเคมี และสารเคมีอื่น ๆ ซึ่งการใช้เคมีเกษตรดังกล่าวส่งผลทำให้ผลผลิตข้าวที่ได้มีสารพิษตกค้าง เป็นอันตรายต่อสุขภาพและสิ่งแวดล้อม จึงเป็นสาเหตุให้มีการพัฒนาหัวเชื้อจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพในงานเกษตรกรรมขึ้น [2] จุลินทรีย์ดินจัดเป็นสิ่งมีชีวิตขนาดเล็กที่ช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช ซึ่งนอกจากจะส่งเสริมการเจริญเติบโตแล้ว ยังมีส่วนช่วยในการยึดจับสารอาหารในดินให้คงอยู่ในระยะเวลานาน อีกทั้งยังไปเพิ่มการดูดซึมแร่ธาตุหรือน้ำ สามารถเพิ่มความต้านทานโรคพืช และป้องกันตัวเองจากสารพิษ ซึ่งมีผลกระทบต่อผลผลิต ลักษณะสัญญาณอัตราการงอก ปริมาณสารอาหารที่เพิ่มขึ้น โดยจุลินทรีย์ดินจะมีความสามารถในการตรึง

ไนโตรเจนจากอากาศ ทำให้พืชสามารถดูดซึมสารละลายฟอสฟอรัสและสังกะสี รวมไปถึงกระตุ้นให้พืชมีการผลิตฮอร์โมน และทำให้เกิดการต้านทานโรคพืช ดังนั้นการใช้จุลินทรีย์ดินเพื่อส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชจึงเป็นทางเลือกที่ดี และมีความเหมาะสมอย่างยิ่งสำหรับการเกษตรที่ยั่งยืน [3] ซึ่งเชื้อ *Gluconacetobacter* spp. ซึ่งเป็นแบคทีเรียดินในวงศ์ *Acetobacteraceae* ที่สามารถผลิตกรดอินทรีย์และมีความสามารถในการตรึงไนโตรเจน อาศัยอยู่ในรากและลำต้นของอ้อย มีความทนทานต่อกรด [4] จากรายงานต่าง ๆ ที่ได้ศึกษาการคัดแยกเชื้อจุลินทรีย์ที่มีคุณสมบัติส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช ตรึงก๊าซไนโตรเจนจากบรรยากาศ ช่วยเร่งการผลิตฮอร์โมนในพืช และความสามารถในการละลายธาตุอาหารบางชนิดในดิน [5] โดยปัจจุบันหลายประเทศทั่วโลกให้ความสนใจ จุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ในการทำเกษตรแบบยั่งยืนมากขึ้น เพื่อฟื้นฟูระบบนิเวศที่เสื่อมโทรมลง [6] การทำเกษตรแบบยั่งยืน คือการให้ความสำคัญกับดินมากที่สุด จึงมีการนำจุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่ในพืช และในดินตามธรรมชาติ มาช่วยย่อยสลายสารให้อยู่ในสภาพที่พืชสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในพืชเศรษฐกิจสำคัญ เช่น ข้าว [7]

ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีความน่าสนใจที่จะนำพืชเศรษฐกิจที่สำคัญอย่างต้นข้าว และดินบริเวณรอบรากข้าวมาแยกและคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติที่เหมาะสมเพื่อนำไปประยุกต์ใช้ประโยชน์ในการทำปุ๋ยชีวภาพ สามารถลดต้นทุนในการผลิต ลดการใช้เคมีเกษตร ปลอดภัยต่อเกษตรกรและผู้บริโภคตลอดจนเป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม

2. วัสดุอุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย

2.1 การเก็บตัวอย่าง

เก็บตัวอย่างดินนาข้าวบริเวณรอบรากและต้นข้าว จากพื้นที่ปลูกข้าวในเขตภาคกลาง ได้แก่ อยุธยา เขตภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ได้แก่ ขอนแก่น ชัยภูมิ นครราชสีมา และเขตภาคเหนือ ได้แก่ น่าน โดยเลือกพื้นที่นาที่มีการเพาะปลูกข้าวเป็นจำนวนมาก เก็บตัวอย่างต้นข้าวที่สมบูรณ์ แปลงละ 3 กอ โดยเก็บทั้งต้นและดินบริเวณรอบราก เพื่อนำไปคัดแยกเชื้อแบคทีเรียในลำดับต่อไป

2.2 การแยกและคัดเลือกแบคทีเรียตรึงไนโตรเจน

2.2.1 ตัวอย่างดินบริเวณรอบราก

ทำการแยกเชื้อแบคทีเรียจากตัวอย่างดินบริเวณรอบราก [8] ด้วยการทำ soil dilution plate methods โดย ชั่งตัวอย่างดินบริเวณรอบรากน้ำหนัก 10 กรัม ละลายลงในสารละลายโซเดียม คลอไรด์ ความเข้มข้น 0.85 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 90 มิลลิลิตร โดยเลือกใช้ตัวอย่างดินเจือจางที่ระดับความเข้มข้น 10^{-4} - 10^{-6} มาเกลี่ยเชื้อ (spread plate) ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง NF [9] จำนวน 3 ซ้ำ บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2-3 วัน จากนั้นคัดเลือกโคโลนีของเชื้อเพื่อทำการศึกษาลำดับต่อไป

2.2.2 ตัวอย่างลำต้นและรากข้าว

ทำการแยกเชื้อแบคทีเรียจากตัวอย่างลำต้นและรากข้าว โดยแบ่งตัวอย่างต้นข้าวออกเป็น 2 ส่วน ได้แก่ ส่วนราก และส่วนของลำต้น นำตัวอย่างทั้งสองส่วนไปฆ่าเชื้อพื้นผิวด้วยสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำมาล้างด้วยน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว 2-3 ครั้ง ทำการบดตัวอย่างพืชในแต่ละส่วน จากนั้นนำมาเพิ่มปริมาณเชื้อ (enrichment) โดยการเพาะเลี้ยงเชื้อลงในอาหารเหลวสูตร NF

และ LGI-P [4] ในสภาวะของการเลี้ยงเชื้อ แบบเขย่า ที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2-3 วัน จากนั้นนำมาทำการเจือจางตัวอย่างเชื้อเริ่มต้น และ เกลี่ยเชื้อลงบนอาหารแข็งสูตร NF และ LGI-P บ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2-3 วัน [10] เพื่อคัดเลือกโคโลนีของเชื้อเพื่อทำการศึกษาลำดับต่อไป

2.3 การทดสอบประสิทธิภาพการละลายธาตุฟอสฟอรัสและสังกะสี

2.3.1 ทดสอบความสามารถในการละลาย

ธาตุฟอสฟอรัส นำแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากตัวอย่างข้าวมาเสียบให้ทั่วผิวหน้าอาหาร NF และ LGI-P จากนั้นใช้ คอร์ก บอเรีย (Cork Borer) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร เจาะลงบนจานอาหารวุ้นเลี้ยงเชื้อ นำชิ้นวุ้นวางลงบนอาหาร Pikovskaya's agar ทั้งหมด 3 ซ้ำ เพื่อทดสอบการละลายธาตุฟอสเฟต และตัวอย่างควบคุมเป็นอาหารไม่มีเชื้อทดสอบ นำจานอาหารไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน [11] ทำการวัดส่วนใสรอบโคโลนี (A) และวัดขนาดของโคโลนี (B) จากนั้นนำมาคำนวณจะทำให้ทราบค่าดัชนีวงใสที่เกิดขึ้น [12]

2.3.2 ทดสอบความสามารถในการละลาย

ธาตุสังกะสี นำแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากตัวอย่างข้าว มาเสียบให้ทั่วผิวหน้าอาหาร NF และ LGI-P จากนั้นใช้ คอร์ก บอเรีย ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร เจาะลงบนจานอาหารวุ้นเลี้ยงเชื้อ นำชิ้นวุ้นวางลงบนอาหาร Mineral salt agar [13] ที่ผสม ZnO ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ ทั้งหมด 3 ซ้ำ เพื่อทดสอบการละลายธาตุสังกะสี และตัวอย่างควบคุมเป็นอาหารไม่มีเชื้อทดสอบ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง [14] ทำการวัดเพื่อหาค่าดัชนีวงใสโดยใช้วิธีวัด และหา

ขนาด clear zone ที่เกิดขึ้นตามวิธีการเช่นเดียวกับข้อ 2.3.1

2.4 การจัดจำแนกชนิดของแบคทีเรียด้วยวิธีทางอนุพันธุศาสตร์

ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาเบื้องต้น โดยการศึกษาลักษณะของโคโลนีที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ สีของโคโลนี และการตรวจดูลักษณะรูปร่างและขนาดของเซลล์ การติดสีแกรมของเซลล์ แบคทีเรียภายใต้กล้องจุลทรรศน์ [15] และการจำแนกชนิดของแบคทีเรียด้วยวิธีทางอนุพันธุศาสตร์ โดยวิธีการหาลำดับเบสของชิ้นส่วนของยีน 16S rRNA โดยนำแบคทีเรียที่คัดแยกได้มาทำการสกัดดีเอ็นเอ (chromosomal DNA) โดยใช้ชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป Presto™ Mini gDNA Bacteria Kit จากนั้นนำสารละลายโครโมโซมมาเป็นดีเอ็นเอต้นแบบในการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนของยีน 16S rRNA ของแบคทีเรียตัวอย่างด้วยเทคนิคพีซีอาร์ (PCR) โดยใช้ไพรเมอร์ 27F และ 1525R โดยตั้งโปรแกรม Initial denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส 3 นาที Denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส 60 วินาที Annealing ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส 60 วินาที Extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส 2 นาที และ Final extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส 3 นาที เป็นจำนวน 30 รอบ จากนั้นนำผลผลิตพีซีอาร์มาทำให้บริสุทธิ์และทำการตรวจวิเคราะห์ลำดับเบสเพื่อใช้ในการจัดจำแนกในลำดับต่อไป

2.5 การทดสอบความสามารถในการผลิตสาร indole 3-acetic acid (IAA)

เพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียบริสุทธิ์ที่แยกได้ลงในหลอดอาหารขนาด 15 มิลลิลิตร ที่บรรจุอาหารเหลว NF broth ที่ประกอบด้วย tryptophan ความเข้มข้น 0.1 กรัมต่อลิตร, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1 กรัมต่อ

ลิตร และ Yeast extract 0.2 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ในสภาวะของการเลี้ยงเชื้อแบบเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำการตรวจวิเคราะห์ปริมาณ IAA ตามวิธี Salkowski colorimetric technique [16, 17] ทำการเก็บตัวอย่างส่วนใสอาหารเลี้ยงเชื้อ (culture supernatant) โดยนำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ปิเปิดส่วนใสของอาหารเลี้ยงเชื้อลงใน 96 - เวลเพลท ปริมาตร 100 ไมโครลิตร จากนั้นปิเปิดสารละลาย Salkowski's reagent ผสมลงไป ปริมาตร 100 ไมโครลิตร บ่มไว้ในที่มืดที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ถ้าเชื้อสามารถผลิต IAA ได้หลังจากบ่มจะได้สารละลายสีแดง ชมพู หากไม่พบการผลิต IAA จะแสดงสีเหลืองของ reagent นำมาวัดค่าการดูดกลืน คลื่นแสงที่ความยาวคลื่น 530 นาโนเมตร ด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง โดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของ IAA และคำนวณความเข้มข้นของ IAA ที่แบคทีเรียสามารถผลิตได้ [18]

2.6 การตรวจสอบการตรึงไนโตรเจนทางอ้อม

เพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียทดสอบบริสุทธิ์ในอาหารที่ปราศจากไนโตรเจน NF broth ปริมาตร 4.5 มิลลิลิตร เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อทำการทดสอบประสิทธิภาพในการตรึงไนโตรเจนทางอ้อม เมื่อเพาะเลี้ยงได้ระยะเวลาดังกล่าวให้เก็บตัวอย่างจากอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 3,000 รอบต่อนาที นำส่วนใสมาวิเคราะห์การตรึงไนโตรเจนของเชื้อแบคทีเรีย โดยใช้ส่วนใสปริมาตร 3 มิลลิลิตร นำมาหยดด้วยสารละลาย Nessler's [9] ปริมาตร 60 ไมโครลิตร และวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ในช่วงความยาวคลื่น 560 นาโนเมตร ทำ

การจดบันทึกค่าที่อ่านได้ โดยค่าที่มากที่สุดแสดงถึงความสามารถในการตรึงไนโตรเจนของเชื้อแบคทีเรีย [19]

2.7 การวิเคราะห์ข้อมูลและทดสอบทางสถิติ

ทำการวิเคราะห์ข้อมูลด้วยโปรแกรม Statistic 17.0 โดยวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนของข้อมูลที่ได้ (one-way ANOVA) ทุกลักษณะที่ศึกษาตามแผนการทดลอง Randomized complete block design และทดสอบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's Multiple Range Test (DMRT)

3. ผลการวิจัยและวิจารณ์ผลการวิจัย

3.1 การแยกและคัดเลือกแบคทีเรียตรึงไนโตรเจน

จากการศึกษาการคัดแยกแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนจากตัวอย่างข้าวในส่วนของดินบริเวณรอบราก ลำต้น และรากข้าว ในพื้นที่ 5 จังหวัด จำนวนตัวอย่างทั้งหมด 20 ตัวอย่าง ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ 2 สูตร ได้แก่ NF เป็นอาหารที่ใช้คัดแยกเชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนกลุ่มทั่วไป และ LGI-P ซึ่งเป็นอาหารเฉพาะสำหรับแยกเชื้อจุลินทรีย์ในกลุ่ม *Gluconacetobacter* sp. ที่อาศัยอยู่ในพืชได้เพราะในเนื้อเยื่อพืชจะมีแป้งและน้ำตาลอยู่เป็นจำนวนมาก ผลการคัดแยกแบคทีเรียพบว่าสามารถคัดแยกได้ทั้งสิ้นจำนวน 478 ไอโซเลท เป็นแบคทีเรียที่เจริญบนอาหาร NF ทั้งหมด 253 ไอโซเลท และบนอาหาร LGI-P ทั้งหมด 225 ไอโซเลท แสดงดังตารางที่ 1 ซึ่งมีรายงานว่าเชื้อแบคทีเรียในสภาพแวดล้อมที่อยู่ในดินและอยู่ในเนื้อเยื่อพืชส่วนใหญ่เป็นเชื้อที่มีคุณสมบัติส่งเสริมการเจริญเติบโตพืช เป็นตัวควบคุมระบบนิเวศ และสามารถสร้างสารป้องกันเชื้อโรคให้กับพืชได้ [20]

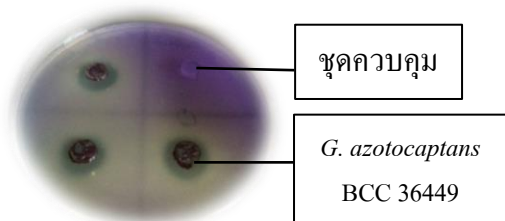
ตารางที่ 1 การคัดแยกแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนจากตัวอย่างดินและส่วนต่างๆของข้าว

อาหาร	ตัวอย่าง			จำนวน (ไอโซเลท)
	ดินรอบราก	ลำต้น	ราก	
NF	73	82	98	253
LGI-P	56	82	87	225

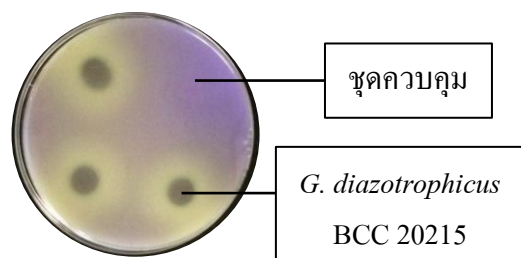
3.2 การทดสอบประสิทธิภาพการละลายธาตุฟอสฟอรัสและสังกะสี

3.2.1 จากการทดสอบประสิทธิภาพการละลายฟอสฟอรัสของแบคทีเรียทั้งหมดจำนวน 478 ไอโซเลท ที่คัดแยกได้จากตัวอย่างข้าว ศึกษาความสามารถในการละลายธาตุอาหารฟอสเฟต บนอาหารทดสอบสูตร Pikovsaya's medium ที่เติม Bromophenolblue และบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน พบว่าเชื้อแบคทีเรียจำนวน 41 ไอโซเลท สามารถเปลี่ยนสีของ Bromophenolblue จากสีม่วงอมฟ้าเป็นสีเหลืองแสดงว่าเชื้อสร้างกรดอินทรีย์ออกมาละลายผลึกของไตรแคลเซียมฟอสเฟต ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) ทำให้เกิดวงใสรอบโคโลนีของเชื้อได้ ผลึกของไตรแคลเซียมฟอสเฟต ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) เปลี่ยนรูปไปเป็นฟอสเฟตไอออนที่สามารถละลายน้ำได้ดี พืชจึงสามารถดูดซึมแร่ธาตุและสารอาหารไปใช้ประโยชน์ได้ ทั้งนี้เมื่อนำมาเปรียบเทียบกับแบคทีเรียสายพันธุ์อ้างอิง 2 สายพันธุ์ ได้แก่ *Gluconacetobacter azotocaptans* BCC 36449 และ *G. diazotrophicus* BCC 20215 ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่มีรายงานว่ามีความสามารถในการละลายธาตุอาหารฟอสฟอรัสได้ มาทดสอบความสามารถในการละลายไตรแคลเซียมฟอสเฟต พบว่า *G. azotocaptans* BCC 36449 สามารถทำให้เกิดดัชนีวงใสรอบโคโลนีเท่ากับ 1.81 ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 1 *G. diazotrophicus* BCC 20215 สามารถทำให้เกิดดัชนีวงใสรอบโคโลนี

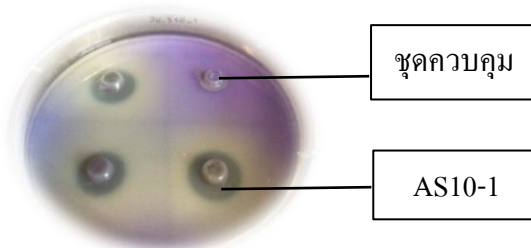
เท่ากับ 1.16 ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 2 เมื่อเปรียบเทียบความสามารถในการละลายไตรแคลเซียมฟอสเฟตของแบคทีเรียสายพันธุ์อ้างอิงทั้ง 2 สายพันธุ์ กับแบคทีเรียทั้ง 41 ไอโซเลตที่ทำให้เกิดวงใสรอบโคโลนีขนาดต่าง ๆ พบว่ามี แบคทีเรียจำนวน 16 ไอโซเลต ที่มีดัชนีวงใสรอบโคโลนีมากกว่า 1.76 และในจำนวนนี้พบว่ามีแบคทีเรียที่มีความสามารถในการละลายไตรแคลเซียมฟอสเฟตได้ดีที่สุด คือ แบคทีเรียไอโซเลต AS10-1 โดยมีดัชนีวงใสรอบโคโลนีเท่ากับ 1.85 ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 3 เมื่อนำมาเปรียบเทียบกับดัชนีวงใสรอบโคโลนีของแบคทีเรีย *G. azotocaptans* BCC 36449 พบว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05 และ *G. diazotrophicus* BCC 20215 พบว่าแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05



รูปที่ 1 ลักษณะการเกิดวงใสรอบโคโลนีของเชื้อ *G. azotocaptans* BCC 36449 เมื่อทดสอบการละลายธาตุฟอสฟอรัส



รูปที่ 2 ลักษณะการเกิดวงใสรอบโคโลนีของเชื้อ *G. diazotrophicus* BCC 20215 เมื่อทดสอบการละลายธาตุฟอสฟอรัส



รูปที่ 3 ลักษณะการเกิดวงใสรอบโคโลนีของเชื้อ ไอโซเลต AS10-1 เมื่อทดสอบการละลายธาตุฟอสฟอรัส

ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Pamachandran ที่ทำการคัดแยกเชื้อแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการละลายธาตุอาหารฟอสเฟตจากดินรอบรากของต้นพริกไทยได้ 5 ไอโซเลต แต่พบเพียง 4 ไอโซเลต ที่ละลายธาตุอาหารฟอสเฟตได้ และทำให้เกิดวงใสขนาด 2.5 – 3.3 [21] และการศึกษาของ Yulianti ที่คัดแยกเชื้อแบคทีเรียทนร้อนและมีประสิทธิภาพในการละลายธาตุอาหารฟอสเฟต ได้ 28 ไอโซเลต พบว่ามี 14 ไอโซเลต สามารถละลายธาตุอาหารฟอสเฟตได้ โดยมีขนาดวงใส ตั้งแต่ 0.5 – 0.21 เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 24 ชั่วโมง [22] จะเห็นได้ว่าประสิทธิภาพในการละลายธาตุอาหารฟอสเฟตเชื้อแบคทีเรียจากแหล่งต่างๆ มีความใกล้เคียงกัน

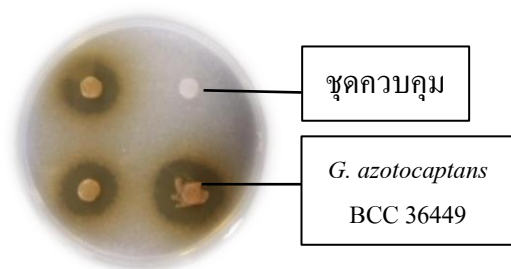
มีรายงานระบุว่าเชื้อราที่คัดแยกได้จากดินบริเวณรอบรากและรากของพริกที่มีความสามารถในการละลายไตรแคลเซียมฟอสเฟตนั้น พบเชื้อจำนวน 6 ไอโซเลตที่สามารถทำให้เกิดวงใสรอบโคโลนีบนอาหาร Pikovskaya's medium ในระยะเวลา 12 วัน ซึ่งวัดดัชนีวงใสจากการคำนวณเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี และเส้นผ่านศูนย์กลางวงใสรอบโคโลนี โดยวัดได้สูงสุด 3.5 และต่ำสุด 0.2 จะเห็นได้ว่าเชื้อแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากข้าวในการทดลองนี้สามารถละลายฟอสฟอรัส และมีค่าดัชนีวงใส 1.85 ในระยะเวลาเพียง 7 วัน และเชื้อรา

ที่คัดแยกจากฟริกกลายฟอสฟอรัสได้ 3.5 ในระยะเวลา 12 วัน จะเห็นได้ว่าเชื้อแบคทีเรียที่แยกจากข้าว และเชื้อราที่แยกจากฟริกมีประสิทธิภาพในการละลายไตรแคลเซียมฟอสเฟตได้ดีเช่นเดียวกัน โดยส่วนใหญ่งานวิจัยในต่างประเทศจะมีการศึกษาใช้เชื้อราเป็นส่วนใหญ่ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากเชื้อรามีความทนทานต่อสภาพแวดล้อมได้ดี แต่มีอัตราการเจริญเติบโตช้ากว่าแบคทีเรีย ซึ่งจะเห็นได้จากผลการศึกษาวิจัยนี้พบว่าแบคทีเรียไอโซเลท AS10-1 มีประสิทธิภาพในการละลายธาตุฟอสฟอรัสโดยใช้เวลาเพียง 7 วันเท่านั้นมีค่าดัชนีวงใส 1.85 (มากกว่าครึ่งหนึ่งของเชื้อรา) เช่นเดียวกับการรายงานการใช้เชื้อแบคทีเรียในการละลายธาตุฟอสฟอรัส โดยเชื้อแบคทีเรียมีการเจริญเติบโตที่รวดเร็ว และสามารถสร้างกรดอินทรีย์ออกมาภายนอกเซลล์ได้ [11] ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาของงานวิจัยนี้ที่รายงานว่าแบคทีเรียที่มีความสามารถในการละลายธาตุอาหารฟอสเฟตได้สูง จะพบจำนวนประชากรของจุลินทรีย์ในบริเวณรอบ ๆ รากพืชมากกว่าบริเวณอื่นๆ เนื่องจากในดินบริเวณรอบรากนี้จะมีธาตุอาหารฟอสเฟต และธาตุอื่น ๆ อยู่เป็นปริมาณมาก ดังนั้นดินบริเวณรอบ ๆ รากจึงมีจุลินทรีย์กลุ่มที่มีความสามารถในการส่งเสริมการเจริญของพืชเป็นจำนวนมาก นอกจากนี้แบคทีเรียที่อาศัยอยู่ร่วมกับพืช หรือที่เรียกว่าแบคทีเรียเอนโดไฟต์จะมีความสามารถในการละลายธาตุอาหารที่ละลายได้ยากเช่นกัน และในสภาพที่แวดล้อมที่มีอุณหภูมิต่ำเป็นสภาวะแวดล้อมที่เป็นการส่งเสริมให้จุลินทรีย์เจริญเติบโตร่วมกับพืชอาศัยแบบภาวะพึ่งพาอาศัยซึ่งกันและกันกับพืชได้ดี ทั้งนี้ธาตุอาหารฟอสเฟตในดินจะอยู่ในรูปของหินฟอสเฟตหรือสารประกอบแคลเซียมฟอสเฟต ซึ่งเติมฟอสฟอรัสอยู่ในรูปที่ละลายน้ำได้น้อยให้เปลี่ยนรูป

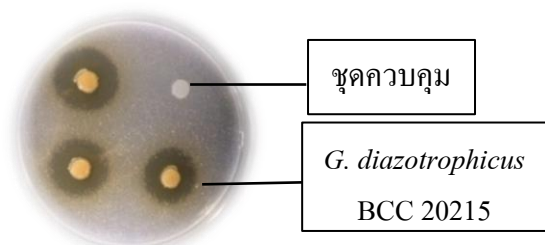
ไปเป็นฟอสเฟตไอออนซึ่งละลายน้ำได้ดี ทำให้พืชสามารถนำธาตุอาหารไปใช้ประโยชน์ได้ [23]

3.2.2 ผลการทดสอบประสิทธิภาพการละลายสังกะสีออกไซด์ของเชื้อแบคทีเรียทั้งหมดจำนวน 478 ไอโซเลท ที่คัดแยกได้จากตัวอย่างข้าวในการละลายธาตุอาหารสังกะสี บนอาหารทดสอบสูตร Mineral Salts agar medium ที่เติมผง ZnO ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบเชื้อแบคทีเรียจำนวน 274 ไอโซเลท จากจำนวน 478 ไอโซเลทสามารถย่อยซิงค์ออกไซด์ได้ และจากการศึกษาเปรียบเทียบแบคทีเรียอ้างอิง *G. azotocaptans* BCC 36449 และ *G. diazotrophicus* BCC 20215 แบคทีเรียสายพันธุ์อ้างอิงทั้ง 2 สายพันธุ์ มีค่าดัชนีวงใสรอบโคโลนีได้เท่ากับ 2.38 และ 2.57 ตามลำดับ ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 4 และ 5 ตามลำดับ ทั้งนี้พบแบคทีเรียจำนวน 31 ไอโซเลท ที่มีความสามารถในการละลายสังกะสีออกไซด์ได้ดี โดยมีค่าดัชนีวงใสรอบโคโลนี 2.23 ขึ้นไป จากการศึกษา พบแบคทีเรียไอโซเลท AR9-1 มีความสามารถในการละลายซิงค์ออกไซด์ได้ดีที่สุด โดยมีค่าดัชนีวงใสรอบโคโลนีเท่ากับ 3.44 ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 6 และมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05 เมื่อนำมาเปรียบเทียบกับค่าดัชนีวงใสรอบโคโลนีของแบคทีเรียสายพันธุ์อ้างอิงทั้ง 2 สายพันธุ์ ซึ่งผลการศึกษาวิจัยที่ผ่านมา มีรายงานผลการวิจัยที่สนับสนุนผลการศึกษา โดยการใส่เชื้อแบคทีเรียที่มีความสามารถในการละลายธาตุสังกะสีให้กับเมล็ดข้าว ส่งผลให้เมล็ดข้าวงอกได้เร็วขึ้น ความยาวราก และน้ำหนักเพิ่มขึ้น ซึ่งนอกจากเมล็ดข้าวแล้ว ยังมีการทดสอบกับเมล็ดถั่วเหลือง เมล็ดข้าวโพดอีกด้วย ดังนั้นการใช้แบคทีเรียที่มีความสามารถในการละลายสังกะสีในดินทาง

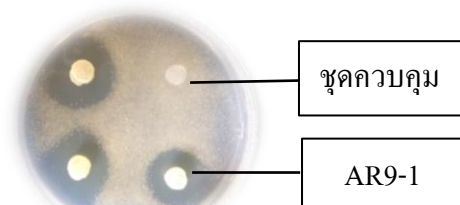
การเกษตรจะช่วยละลายธาตุสังกะสีในดินที่ละลายน้ำได้ยาก ให้ละลายน้ำได้ง่ายขึ้นเพื่อให้พืชดูดซึมและนำไปใช้ในกิจกรรมต่างๆ โดยแบคทีเรียเหล่านี้เป็นแบคทีเรียที่ส่งเสริมการเจริญเติบโตต่อพืช ที่มีถิ่นอาศัยอยู่บริเวณรอบราก จึงสามารถนำไปประยุกต์ใช้เป็นปุ๋ยชีวภาพเพื่อประโยชน์ทางการเกษตรที่ยั่งยืนได้ [12]



รูปที่ 4 ลักษณะการเกิดวงใสรอบโคโลนีของเชื้อ *G. azotocaptans* BCC 36449 เมื่อทดสอบการละลายธาตุสังกะสี



รูปที่ 5 ลักษณะการเกิดวงใสรอบโคโลนีของเชื้อ *G. diazotrophicus* BCC 20215 เมื่อทดสอบการละลายธาตุสังกะสี



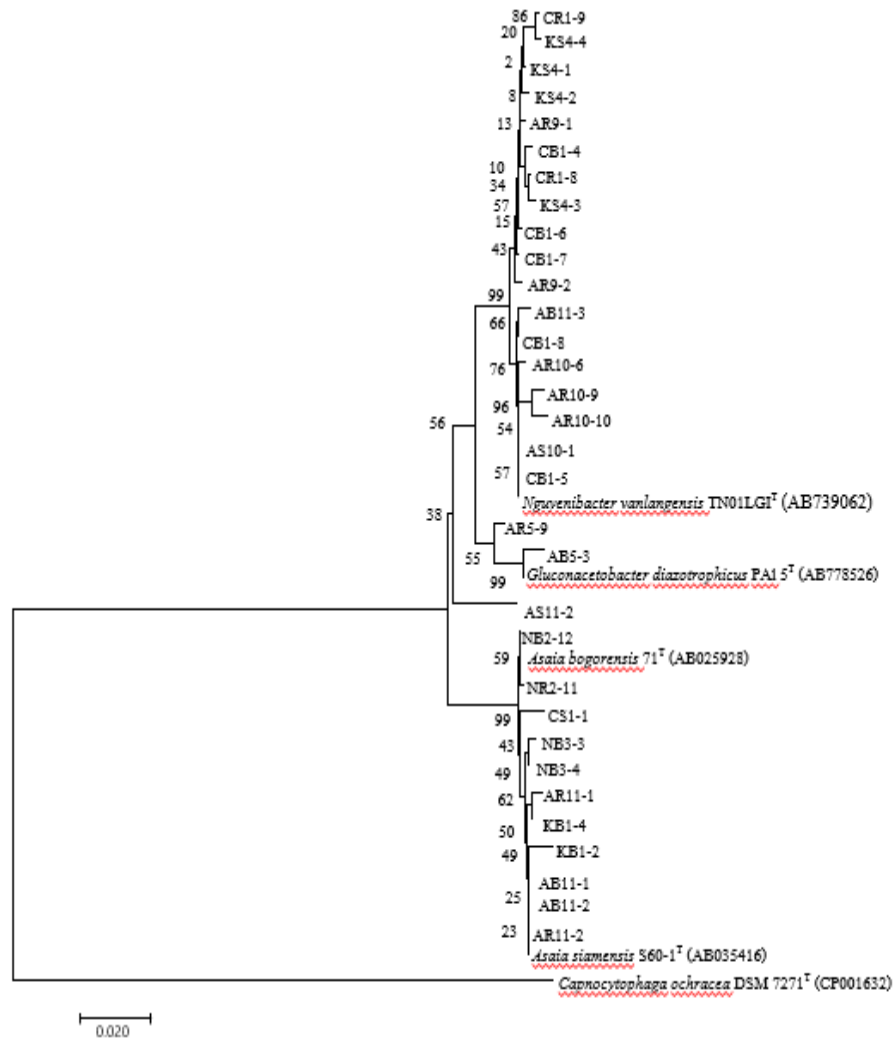
รูปที่ 6 ลักษณะการเกิดวงใสรอบโคโลนีของเชื้อ ไอโซเลต AR9-1 เมื่อทดสอบการละลายธาตุสังกะสี

3.3 การจัดจำแนกชนิดของแบคทีเรียด้วยวิธี

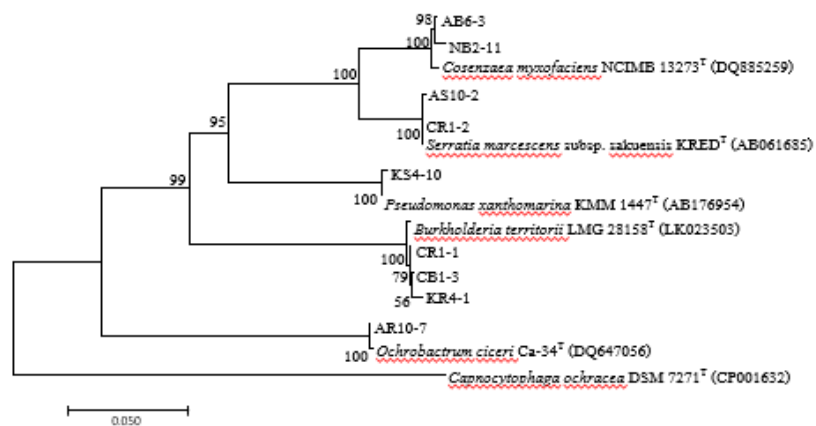
ทางอนุพันธุศาสตร์

นำแบคทีเรียสายพันธุ์คัดเลือกจำนวน 41 ไอโซเลต มาทำการพิสูจน์เอกลักษณ์ในระดับสปีชีส์โดยวิธีการตรวจวิเคราะห์ลำดับเบสชิ้นส่วนของยีน 16S rDNA นำผลการตรวจวิเคราะห์ลำดับเบสที่ได้มาวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ของสายวิวัฒนาการ โดยใช้โปรแกรม EZ Taxon ผลการทดลองพบว่า แบคทีเรียที่มีความสามารถในการตรึงไนโตรเจนได้จำนวนทั้งสิ้น 41 ไอโซเลต สามารถจัดจำแนกอยู่ในจีโนส *Gluconacetobacter* sp., *Cosenzaea* sp., *Nguyenibacter* sp., *Serratia* sp., *Ochrobactrum* sp., *Asaia* sp., *Bukholderia* sp. และ *Pseudomonas* sp. โดยเชื้อแต่ละชนิดมีคุณสมบัติเป็นทั้งเชื้อที่ดำรงชีวิตอิสระในสิ่งแวดล้อม และเป็นเอนโดไฟต์ที่อาศัยอยู่ร่วมกับพืช โดยส่วนใหญ่มีคุณสมบัติเป็นเชื้อที่ส่งเสริมการเจริญเติบโตต่อพืช มีประสิทธิภาพในการละลายธาตุอาหารที่ละลายน้ำได้ยาก การผลิตฮอร์โมน และสามารถตรึงไนโตรเจนได้ ดังนั้นจึงสามารถนำแบคทีเรียเหล่านี้ไปประยุกต์ใช้ในการผลิตปุ๋ยชีวภาพที่ใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมเกษตรอย่างยั่งยืนได้ [24]

จากผลงานวิจัยนี้สามารถจำแนกแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนออกได้เป็น 2 กลุ่ม ได้แก่ แบคทีเรียตรึงไนโตรเจนกลุ่มสร้าง และไม่สร้างกรดอินทรีย์ ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 7 และ 8 ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Vu [25] ที่รายงานว่าสามารถคัดแยกเชื้อแบคทีเรียผลิตกรดอะซิติกได้จากบริเวณรอบรากข้าวในประเทศเวียดนาม เป็นการยืนยันได้ว่าภูมิภาคเอเชียมีความหลากหลายทางชีวภาพสูง



รูปที่ 7 แผนภูมิต้นไม้ของแบคทีเรียที่เรียงในโตรเจนกลุ่มที่สร้างกรดอินทรีย์



รูปที่ 8 แผนภูมิต้นไม้ของแบคทีเรียที่เรียงในโตรเจนกลุ่มที่ไม่สร้างกรดอินทรีย์

3.4 การทดสอบความสามารถในการสร้างสาร indole 3-acetic acid (IAA)

นำเชื้อแบคทีเรียที่สามารถตรึงไนโตรเจนและมีประสิทธิภาพในการละลายธาตุอาหารทั้ง 2 ชนิด จำนวนทั้งสิ้น 41 ไอโซเลท มาทดสอบความสามารถในการผลิตกรดอินโดลอะซิติก โดยวิธีการทดสอบด้วยการหยดสาร Salkowski reagent ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อหลังจากเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 24 ชั่วโมง และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 530 นาโนเมตร พบมีเชื้อแบคทีเรียจำนวนทั้งสิ้น 7 ไอโซเลท ที่มีความสามารถในการผลิต IAA ได้ในปริมาณที่สูงกว่าเชื้อแบคทีเรียอ้างอิง 2 สายพันธุ์ คือ *G. azotocaptans* BCC 36449 สามารถผลิต IAA ได้เท่ากับ 19.28 ไมโครกรัมต่อมิลลิเมตร และ *G. diazotrophicus* BCC 20215 สามารถผลิต IAA ได้เท่ากับ 13.75 ไมโครกรัมต่อมิลลิเมตร ทั้งนี้พบว่าแบคทีเรียไอโซเลท AB6-3 มีประสิทธิภาพในการผลิต IAA ได้สูงที่สุด โดยผลิตได้ 58.25 ไมโครกรัมต่อมิลลิเมตร ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 2 ความสามารถหรือประสิทธิภาพในการผลิตกรดอินโดลอะซิติกของจุลินทรีย์มีคุณสมบัติที่น่าสนใจหลายประการรวมถึงกลไกในการส่งเสริมการเจริญในพืช โดยมีทริปโตเฟนเป็นสารตั้งต้นที่สำคัญที่สุดในการผลิตสารเร่งการเจริญเติบโต นอกจากแบคทีเรียกลุ่มที่ทำการศึกษานี้แล้วยังมีแบคทีเรียกลุ่มแอคติโนมัยซีท์ที่สามารถผลิตกรดอินโดลอะซิติกได้ด้วย จากรายงานผลการคัดแยกเชื้อแบคทีเรียกลุ่มแอคติโนมัยซีท์จากหุบเขาในประเทศอียิปต์ เชื้อจำนวน 210 ไอโซเลท สามารถผลิตกรดอินโดลอะซิติกได้สูงที่สุดเท่ากับ 180 ไมโครกรัมต่อมิลลิเมตร ในวันที่ 13 ของการเพาะเลี้ยงเชื้อ แสดงให้เห็นได้ว่ามีจุลินทรีย์หลายกลุ่มที่สามารถผลิตกรดอินโดลอะซิติกได้ แต่เชื้อแบคทีเรียกลุ่มที่

ศึกษาวิจัยกลุ่มนี้จะใช้ระยะเวลาในผลิต IAA สั้นกว่าเชื้อจุลินทรีย์กลุ่มอื่น ๆ [26]

ตารางที่ 2 การผลิตกรดอินโดลอะซิติกของแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนที่คัดเลือกได้ เปรียบเทียบกับแบคทีเรียสายพันธุ์อ้างอิง

เชื้อแบคทีเรีย ที่คัดแยกได้	การผลิต กรดอินโดลอะซิติก (ไมโครกรัมต่อมิลลิเมตร)
AB6-3	58.25 ± 0.3 ^a
AR10-6	27.67 ± 0.11 ^d
AR10-9	21.91 ± 0.13 ^c
AR10-10	21.23 ± 0.25 ^c
AB11-2	54.74 ± 0.53 ^b
NB2-12	47.89 ± 0.53 ^c
NR2-11	18.85 ± 0.13 ^f
<i>G. azotocaptans</i> BCC 36449	19.28 ± 0.62 ^f
<i>G. diazotrophicus</i> BCC 20215	13.75 ± 0.75 ^g

3.5 การตรึงไนโตรเจนทางอ้อม

จากการทดสอบความสามารถของเชื้อแบคทีเรียในการตรึงไนโตรเจนจำนวนทั้งสิ้น 41 ไอโซเลท เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทดสอบด้วยการหยดสารเคมี Nessler's reagent ลงในอาหารที่ผ่านการเพาะเลี้ยงเชื้อทดสอบและวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 530 นาโนเมตร พบเชื้อแบคทีเรียจำนวน 13 ไอโซเลท ที่มีความสามารถในการตรึงไนโตรเจนได้ดีกว่าแบคทีเรียสายพันธุ์อ้างอิง 2 สายพันธุ์ ได้แก่ *G. azotocaptans* BCC 36449 และ *G. diazotrophicus* BCC 20215 ที่สามารถวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 560 นาโนเมตร มีค่าเท่ากับ 2.61 และ 1.61

ตามลำดับทั้งนี้พบว่าแบคทีเรียไอโซเลท NB3-3 มีประสิทธิภาพในการตรึงไนโตรเจนได้ดีที่สุด ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 3 โดยสามารถวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นเท่ากับ 560 นาโนเมตร มีค่าเท่ากับ 3.39

ตารางที่ 3 ความสามารถในการผลิตแอมโมเนียของแบคทีเรียตรึงไนโตรเจน โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 560 นาโนเมตร

เชื้อแบคทีเรีย ที่คัดแยกได้	ค่าการดูดกลืนแสง (560 นาโนเมตร)
AR9-1	2.21 ± 0.02^g
AR10-10	2.00 ± 0.03^h
AB11-1	2.84 ± 0.09^{cde}
AB11-2	2.9 ± 0.03^{cd}
AR11-2	2.87 ± 0.06^{cd}
KB1-2	2.81 ± 0.07^{de}
KB1-4	2.94 ± 0.05^{bc}
CR1-9	1.83 ± 0.05^i
KS4-4	2.86 ± 0.08^{cd}
NB2-12	2.75 ± 0.1^c
NR2-11	2.63 ± 0.08^f
NB3-3	3.39 ± 0.02^a
NB3-4	2.86 ± 0.06^{cd}
<i>G. azotocaptant</i>	
BCC 36449	2.61 ± 0.02^f
<i>G. diazotrophicus</i>	
BCC 36449	1.61 ± 0.02^j

เมื่อพิจารณาจากลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อในงานวิจัยนี้ พบว่าเชื้อกลุ่มที่มีความสามารถในการผลิตแอมโมเนียเป็นแบคทีเรียแกรมลบ โคโลนีมีลักษณะเป็นเมือก มีความคล้ายคลึงกับเชื้อแบคทีเรีย *Azotobacter* sp. ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัย ที่คัดแยกแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนจากผักตบชวาและศึกษาการตรึงไนโตรเจน โดยการตรวจวัดปริมาณแอมโมเนียในอาหารเหลวที่ปราศจากไนโตรเจน หลังเพาะเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 72 ชั่วโมง พบเชื้อที่แยกได้มีคล้ายคลึงกับ *Azotobacter* sp. มีความสามารถในการตรึงไนโตรเจนได้ดีที่สุด [19] โดยแอมโมเนียเป็นแหล่งไนโตรเจนที่สำคัญสำหรับพืชและจุลินทรีย์ โดยจุลินทรีย์จะเปลี่ยนไนโตรเจนไปเป็นแอมโมเนีย

อย่างไรก็ตามการตรึงไนโตรเจนในกลุ่มแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากตัวอย่างข้าว ทั้งที่สามารถสร้างและไม่สร้างกรดอินทรีย์ และมีความสามารถในการสร้างแอมโมเนียได้ ซึ่งเมื่อนำมาเปรียบเทียบกัน พบว่าแบคทีเรียสายพันธุ์กลุ่มที่สร้างกรดอินทรีย์ จะสามารถตรึงไนโตรเจนได้ดีกว่ากลุ่มที่ไม่สร้างกรดอินทรีย์ ดังนั้นการผลิตแอมโมเนียในแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนจึงมีความแตกต่างกันตามชนิดของแบคทีเรีย เช่น *Nguyenibacter* sp., *Asais* sp., *Paenibacillus* sp., *Rhizobium* sp., *Azotobacter* sp., *Agrobacterium* sp. และ *Klebsiella* sp.

4. สรุปผลการวิจัย

งานวิจัยนี้สามารถแยกเชื้อแบคทีเรียจากตัวอย่างดินรอบรากและส่วนต่างๆของข้าวได้จำนวนทั้งหมด 478 ไอโซเลท สามารถเจริญเติบโต

ได้ในอาหาร NF และ LGI-P จำนวน 253 และจำนวน 225 ไอโซเลท ตามลำดับ ความสามารถในการละลายฟอสเฟตประกอบไตรแคลเซียมฟอสเฟตและซิงค์ออกไซด์ โดยเปรียบเทียบกับแบคทีเรียสายพันธุ์อ้างอิง 2 สายพันธุ์ ได้แก่ *G. azotocaptans* BCC 36449 และ *G. daiazotophicus* BCC 20215 พบว่าแบคทีเรีย ไอโซเลท AS10-1 มีค่าดัชนีการละลายไตรแคลเซียมฟอสเฟตเท่ากับ 1.85 และแบคทีเรีย ไอโซเลท AR9-1 มีค่าดัชนีการละลายของสังกะสีออกไซด์เท่ากับ 3.44 เมื่อนำแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการละลายธาตุอาหารทั้งสองชนิดจำนวน 41 ไอโซเลท มาทำการจัดจำแนกด้วยวิธีทางอนุพันธุศาสตร์ สามารถจำแนกแบคทีเรียออกได้ทั้งหมด 8 สกุล ได้แก่ *Gluconacetobacter* sp., *Cosenzaea* sp., *Nguyenibacter* sp., *Serratia* sp., *Ochrobactrum* sp., *Asaia* sp., *Bukholderia* sp. และ *Pseudomonas* sp. นอกจากนี้ผลการทดสอบความสามารถในการสร้างกรดอินโดลอะซิติก และการตรึงไนโตรเจนพบว่าเชื้อแบคทีเรียไอโซเลท AB6-3 สามารถผลิตกรดอินโดลอะซิติกได้ 58.25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และไอโซเลท NB3-3 มีความสามารถในการตรึงไนโตรเจนได้ดีที่สุด โดยสามารถวัดค่าการดูดกลืนคลีนแสงที่ความยาวคลื่น 560 นาโนเมตรได้เท่ากับ 3.39 โดยทุกผลการทดลองดังกล่าวสรุปข้างต้น ให้ผลแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 0.05 ยกเว้นการละลายฟอสเฟตของแบคทีเรีย ไอโซเลท AS10-1 ที่มีค่าสูงกว่าแบคทีเรียสายพันธุ์อ้างอิงเพียงเล็กน้อย แต่ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 0.05

5. กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยพระจอมเกล้าธนบุรีที่สนับสนุนทุนบัณฑิตคณะวิทยาศาสตร์ และสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.) ที่สนับสนุนทุนโครงการสร้างภาคีบัณฑิตระดับปริญญาโท-เอก ระหว่าง วว. กับสถาบันการศึกษา ที่อนุเคราะห์ในการใช้อุปกรณ์การทดลองและเครื่องมือวิทยาศาสตร์ และอำนวยความสะดวกของสถานที่ทำการทดลองจนทำให้งานวิจัยในครั้งนี้เสร็จสมบูรณ์

6. เอกสารอ้างอิง

- [1] สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. สถิติการเกษตรของประเทศไทย ปี ๒๕๕๕. สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. กรุงเทพฯ. 2559.
- [2] Gholami A., Shahsavani S. and Nezarat S. The effect of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) on germination, seedling growth and yield of maize. *World Academy of Science, Engineering and Technology*. 2009. 49: 19-24.
- [3] Gupta G., Parihar S.S., Ahirwar N.K., Snehi S.K. and Singh, V. Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): Current and future prospects for development of sustainable agriculture. *Journal of Microbial & Biochemical Technology*. 2015. 7: 96-102.
- [4] Cavalcante V.A. and Dobereiner J. A new acid-tolerant nitrogen-fixing bacterium associated with sugarcane. *Plant and Soil*. 1988. 108: 23-31.

- [5] Phornphisutthimas S. Fermented bioextracts and agricultures. *Journal of Research Unit on Science, Technology and Environment for Learning*. 2012. 3: 59–65.
- [6] Raksaphol K. and Phornphisutthimas S. Control of Fusarium wilt on tomato fruit by antagonistic yeasts isolated from natural sources. *The 4 0th National Graduate Research Conference*. Songkla, Thailand. 20-21 October 2016 ; 273-275.
- [7] Chanchaichaovivat A., Kirdtabtim S. and Phornphisutthimas S. Application of microorganism in sustainable agriculture. *Journal of Research Unit on Science, Technology and Environment for Learning*. 2016. 7: 398-413.
- [8] Bal H.B. and Adhya T.K. Diversity of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) in rice soil of Odisha. *Plant Science Research*. 2012. 34: 27-33.
- [9] Cappuccino J.C. and Sherman N. In: *Microbiology: A Laboratory Manual*, 3rd ed. Benjamin/cummings Pub. Co., New York. 1992: 125–179.
- [10] Shrivastaavaaaa U.P. Diversity of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR). *International Journal of Graduate Research and Review*. 2016. 2: 56-64.
- [11] Seshachala U. and Tallapragada P. Phosphate soluilizers from the rhizosphere of *Piper nigrum* L. in Karnataka, India. *Chilean Journal of Agricultural Research*. 2012. 73: 397-403.
- [12] Onyia E.C. and Anyanwu C.U. Comparative study on solubilization of tri-calcium phosphate (TCP) by phosphate solubilizing fungi (PSF) isolated from *Nsukka pepper* plant rhizosphere and root free soil. *Journal of Yeast and Fungal Research*. 2013. 4: 52-57.
- [13] Zajic, J.E. and B. Supplisson. *Emulsification and degradation of "Bunker C" fuel oil by microorganisms*. *Biotechnol. Bioeng.* 1972. 14: 331-343.
- [14] Gontia-Mishra, I., S. Sapre. and S. Tiwari. Zinc solubilizing bacteria from the rhizosphere of rice as prospective modulator of zinc biofortification in rice. *Rhizosphere*. 2017. 3: 185-190.
- [15] Holt J.G., Krieg N.R., Sneathm P.H.A., Staley J.T. and Williams S.T. "*Genus Acetobacter*" *Bergey' s Manual of Determinative Bacteriology*, 9th ed. Baltimore, Williams and Williams, 1994: 71-94.
- [16] Khan A.L., Halo B.A., Elyassi A., Ali S., Al-Hosni K., Hussain J., Al-Harrasi A. and Lee I.N. Indole acetic acid and ACC deaminase from endophytic bacteria improves the growth of *Solanum lycopersicum*. *Electronic Journal of Biotechnology*. 2016. 21: 58-64.
- [17] Lwin K.M., Myint M.M., Tar T. and Aung W.Z.M. Isolation of plant hormone (Indolle-3-acetic acid- IAA) producing rhizobacteria and study on their effects on maize seedling. *Engineering Journal*. 2012. 16: 137-144.
- [18] Khan, A. L., Halo, B. A., Elyassi, A., Ali, S., Hasni, K. A., Hussain, J., Harrasi, A. A. and

- Lee, I. J. Indole acetic acid and ACC deaminase from endophytic bacteria improves the growth of *Solanum lycopersicum*. *Electronic Journal of Biotechnology*. 2016. 21: 58-64.
- [19] สุททวรรณ สุพรรณ, ประดับรัฐ ประจันเขตต์ และ สิริแข พงษ์สวัสดิ์. การใช้แบคทีเรียตรึงไนโตรเจนร่วมกับวัสดุตัวกลางชีวภาพเพื่อการส่งเสริมการเจริญของพืช. *วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มทร ธัญบุรี*. 2559. 6: 17-28.
- [20] Beneduzi A., Ambrosini A. and Passaglia L.M.P. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): Their potential as antagonists and biocontrol agents. *Genetics and Molecular Biology*. 2012. 35: 1044-1051.
- [21] Ramachandran, K., Srinivasan, V., Sramikkall, H. and Anandarij, M. Phosphate solubilizing bacteria isolate from the rhizosphere soil and it growth promotion on back pepper (*Piper nigrum* L.) cutting. *Microbiological Research*. 2007. 72: 325-331.
- [22] Yulianti, E. and Rakhmawati, A. Screening and characterization of phosphate solubilizing bacteria from thermophilic. *The 4th International Conference on Research, Implementation, and Education of Mathematics and Science (4th ICRIEMS)*. Yogyakarta, Indonesia. 15–16 May 2017: 1-8.
- [23] Panhwar Q.A., Othman R., Rahman Z.A., Meon S. and Ismail M.R. Isolation and characterization of phosphate- solubilizing bacteria from aerobic rice. *African Journal of Biotechnology*. 2012. 11: 2711-2719.
- [24] Tilak K.V.B.R., Ranganayaki N., Pal K.K., De R., Saxena A.K., Nautiyal C.S., Mittal S., Triathi A.K. and Johri B.N. Diversity of plant growth and soil health supporting bacteria. *Current Science*. 2005. 89: 139-150.
- [25] V u H . T . L . , Y u k k p h a n P . , Chaipitakchonlatarn W., Malimas T., Muramatsu Y., Bui U.T.T., Tanasupawat S., Duong K.C., Nakagawa Y., Pham H.T. and Yamada Y. *Nguyenibacter vanlangensis* gen. nov., sp. Nov., an unusual acetic acid bacterium in the α -Proteobacteria. *Journal of General and Applied Microbiology*. 2013. 59: 153-166.
- [26] Abd-Alla M.H., El-Sayed E. A. and Rasmey A.M. Indole-3-acetic acid (IAA) production by *Streptomyces atrovirens* isolated from rhizospheric soil in Egypt. *Advances in Biology & Earth Sciences*. 2013. 3: 182-193.