

รูปแบบการใช้น้ำเลี้ยงเซลล์ของ *Streptomyces* sp. ต่อการเจริญในระยะต้นกล้า  
ของข้าวเหนียวพันธุ์ กข 6 ที่เพาะในสภาวะปนเปื้อนฟลูออรีนและฟิแนนทรีน  
Pattern of *Streptomyces* sp. Culture Filtrate Application on Seedling Growth  
of Rice cv. RD6 Cultivated under Fluorene or Phenanthrene Contamination

ขนิษฐา สมตระกูล<sup>1\*</sup> บุษรินทร์ สบู่ทอง<sup>1</sup> พัชรีภรณ์ ศรีน้อย<sup>1</sup> รัชฎาพร ไชยสิทธิ์<sup>1</sup>  
อภิเดช แสงดี<sup>1</sup> และวารภรณ์ ฉุยฉาย<sup>2</sup>

Khanitta Somtrakoon<sup>1\*</sup>, Bussarin Sabutong<sup>1</sup>, Patchariporn Srinoi<sup>1</sup>  
Rachadaporn Chaiyasit<sup>1</sup>, Apidech Sangdee<sup>1</sup> and Waraporn Chouychai<sup>2</sup>

<sup>1</sup>ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม กันทรวิชัย มหาสารคาม 44150

<sup>2</sup>สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏนครสวรรค์ นครสวรรค์ 60000

<sup>1</sup>Department of Biology, Faculty of Science, Mahasarakham University, Kantharawichai, Mahasarakham, Thailand 44150

<sup>2</sup>Biology Program, Faculty of Science and Technology, Nakhonsawan Rajabhat University, Nakhonsawan, Thailand 60000

\*Corresponding author: khanitta.s@msu.ac.th

Received: April 27, 2020

Revised: June 06, 2021

Accepted: September 16, 2021

### Abstract

Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) were toxic to living organisms including microorganism. Using plant growth promoting microorganisms in soil contaminated with PAHs may decrease microorganism's activity. Thus, this study investigated the effect of some PAHs including fluorene and phenanthrene on indole-3-acetic acid production and phosphate solubilization of *Streptomyces* sp. isolate STRM104 and STRM302. The results revealed that phenanthrene decreased phosphate solubilization activity of isolate STRM302. However, decreasing in phosphate solubilization of isolate STRM104 may be caused by dimethylformamide. Phenanthrene and fluorene did not decrease IAA production activity of both isolates. Then, culture filtrate of *Streptomyces* sp. isolate STRM104 and STRM302 were tested for stimulating effects on germination and growth of sticky rice cv. RD6 on 20 mg/l fluorene or phenanthrene contaminated paper. The sticky rice cv. RD6 seeds received culture filtrate via 2 different methods, which seed immersion before germination and direct germination on culture filtrate-soaked paper. The result showed that sticky rice cv. RD6 seedlings derived from seeds immersed in culture filtrate before

germination grew better than those germinated from seeds grown on culture filtrate-soaked paper. Shoot length, shoot weight and root length of sticky rice cv. RD6 seedlings derived from seeds immersed in culture filtrate before germination were higher than those derived from seeds grown on culture filtrate-soaked paper.

**Keywords:** indole-3-acetic acid, phosphate solubilization, plant growth promoting bacteria, polycyclic aromatic hydrocarbons, sticky rice cv. RD6

### บทคัดย่อ

พอลิไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน (พีเอเอช) เป็นพืชต่อสิ่งมีชีวิตรวมทั้งจุลินทรีย์ การใช้จุลินทรีย์ส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชในดินที่ปนเปื้อนพีเอเอชอาจลดกิจกรรมของจุลินทรีย์ลงได้ ดังนั้นการศึกษานี้จึงตรวจสอบผลของพีเอเอชบางชนิด ได้แก่ ฟลูออรีนและพีแนนทรินต่อการผลิตกรดอินโดล-3-อะซีติก และการละลายฟอสเฟตของ *Streptomyces* sp. ไอโซเลต STRM104 และ STRM302 ผลการทดลองพบว่าพีแนนทรินลดความสามารถในการละลายฟอสเฟตของไอโซเลต STRM302 ส่วนการละลายฟอสเฟตที่ลดลงของไอโซเลต STRM104 คาดว่ามาจากผลของไดเมทิลฟออร์มาไมด์ พีแนนทรินและฟลูออรีนไม่ลดการผลิตกรดอินโดล-3-อะซีติกของแบคทีเรียทั้ง 2 ไอโซเลต จากนั้นนำน้ำเลี้ยงเซลล์ของ *Streptomyces* sp. ไอโซเลต STRM104 และ STRM302 มาทดสอบกระตุ้นการงอกและการเจริญเติบโตของข้าวเหนียวพันธุ์ กข 6 ที่เพาะในกระดาดที่ถูกทำให้ปนเปื้อนฟลูออรีนหรือพีแนนทรินความเข้มข้น 20 mg/l โดยเมล็ดที่แช่ข้าวเหนียวพันธุ์ กข 6 ได้รับน้ำเลี้ยงเซลล์ 2 รูปแบบ ได้แก่ การแช่เมล็ดพันธุ์ในน้ำเลี้ยงเซลล์ก่อนเพาะในกระดาด หรือเพาะเมล็ดพันธุ์ในกระดาดที่ชุ่มด้วยน้ำเลี้ยงเซลล์ ผลการทดลองพบว่าต้นกล้าข้าวเหนียวพันธุ์ กข 6 ที่แช่เมล็ดในน้ำเลี้ยงเซลล์ก่อนเพาะในกระดาดเจริญเติบโตได้ดีกว่าเมื่อเทียบกับการเพาะเมล็ดในกระดาดที่ชุ่มด้วยน้ำเลี้ยงเซลล์ ความยาวยอด น้ำหนักยอด และความยาวรากของข้าวเหนียวพันธุ์ กข 6 ที่แช่

เมล็ดในน้ำเลี้ยงเซลล์ก่อนเพาะในกระดาดมีค่ามากกว่าต้นกล้าที่ได้จากการเพาะเมล็ดในกระดาดที่ชุ่มด้วยน้ำเลี้ยงเซลล์

**คำสำคัญ:** กรดอินโดล-3-อะซีติก การละลายฟอสเฟต แบคทีเรียกลุ่มสนับสนุนการเจริญเติบโตของพืช พอลิไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน ข้าวเหนียวพันธุ์ กข 6

### คำนำ

พอลิไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนหรือพีเอเอชเป็นกลุ่มของสารมลพิษอินทรีย์ที่มีโครงสร้างเป็นวงแหวนเบนซีนตั้งแต่ 2 วงขึ้นไปมาเชื่อมต่อกัน พีเอเอชเป็นสารที่มีความสามารถในการละลายน้ำต่ำทำให้มีความคงทนในสิ่งแวดล้อม โดยความเป็นพิษของพีเอเอชมักทำให้เกิดความผิดปกติของตัวอ่อนในครรภ์มารดา เป็นสารก่อการกลายและมีโอกาสก่อให้เกิดมะเร็งได้ (Patel *et al.*, 2020) พีเอเอชมีแหล่งกำเนิดจากทั้งการใช้สารเคมีในอุตสาหกรรม การเผาไหม้ที่ไม่สมบูรณ์ของสารอินทรีย์ การเผาไหม้เชื้อเพลิงเครื่องยนต์ และอุตสาหกรรมที่มีการใช้พลังงานจากถ่านหิน เป็นต้น (Liu *et al.*, 2017) การปลดปล่อยพีเอเอชจากแหล่งกำเนิดต่างๆ เป็นสาเหตุให้เกิดการปนเปื้อนของพีเอเอชในดินที่มีการทำเกษตรกรรมที่ตั้งอยู่โดยรอบ นอกจากพีเอเอชจากเมืองใหญ่และกิจการทางอุตสาหกรรมแล้ว กิจกรรมทางการเกษตร เช่น การเผาตอซังข้าว และการเผาอ้อยในช่วงฤดูเก็บเกี่ยวเป็นสาเหตุให้

ฟิเอเอชปนเปื้อนสู่ดินที่มีการทำเกษตรกรรมได้โดยตรง (Pongpiachan *et al.*, 2017) การปนเปื้อนของฟิเอเอชในสิ่งแวดล้อมพบรายงานทั่วโลก เช่น ดินชั้นบนในพื้นที่เกษตรกรรมซึ่งตั้งอยู่โดยรอบเมืองฉางจี (Changzhi) ซึ่งเป็นเมืองอุตสาหกรรมในประเทศจีนตรวจพบฟิเอเอชทั้ง 16 ชนิด ตามรายการของ US.EPA. ปนเปื้อนในดินเฉลี่ย 917 µg/kg (Liu *et al.*, 2017) ดินชั้นบนในพื้นที่เกษตรกรรมซึ่งตั้งอยู่ใกล้กับแม่น้ำ Shiwuli ซึ่งเป็นแม่น้ำที่ไหลลงสู่ทะเลสาบฉาหวู (Chaohu) มณฑลอันฮุย (Anhui) ประเทศจีน พบการปนเปื้อนของฟิเอเอชเฉลี่ยอยู่ที่ 103.7 µg/kg (Wu *et al.*, 2019) สำหรับการปนเปื้อนของฟิเอเอชในดินของประเทศไทยพบรายงานน้อยกว่าต่างประเทศ ตัวอย่างรายงานการปนเปื้อนฟิเอเอชในประเทศไทย เช่น ดินชั้นบนบริเวณริมถนนในเขตอำเภอเมือง จังหวัดเชียงใหม่ ตรวจพบฟิเอเอชที่มีวงแหวนอะโรมาติก 4-7 วง ในปริมาณ 205-2,196 µg/kg (Amagai *et al.*, 1999) และดินบริเวณเขาหลัก จังหวัดพังงา ซึ่งเป็นบริเวณที่ได้รับผลกระทบจากสึนามิในปี พ.ศ. 2547 ตรวจพบผลรวมของฟิเอเอช 12 ชนิด ในปริมาณ 132.31 µg/kg (Pongpiachan *et al.*, 2013)

ถึงแม้การปนเปื้อนของฟิเอเอชจะไม่ทำให้เกิดความเสียหายอย่างรุนแรงต่อระบบเศรษฐกิจที่คิดเป็นมูลค่าได้อย่างชัดเจน แต่การปนเปื้อนของฟิเอเอชในสิ่งแวดล้อมรวมถึงดินที่มีการทำเกษตรกรรม สามารถเกิดการสะสมของฟิเอเอชในพืชหรือสัตว์ สามารถถ่ายทอดฟิเอเอชเข้าสู่ห่วงโซ่อาหาร และก่อให้เกิดอันตรายในระยะยาวต่อมนุษย์ซึ่งเป็นผู้บริโภคได้ (Zelinkova and Wenzl, 2015) นอกจากนี้ปัญหาคาร์บอนฟิเอเอชในดินที่มีการทำเกษตรกรรมประกอบกับการทำเกษตรกรรมอย่างยั่งยืน ซึ่งนิยมใช้จุลินทรีย์เป็นสารควบคุมชีวภาพและปุ๋ยชีวภาพมากขึ้น (Vejan *et al.*, 2016) การปนเปื้อนสารมลพิษในพื้นที่เกษตรกรรมอาจทำให้ประสิทธิภาพของจุลินทรีย์กลุ่มส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชลดลงได้ เนื่องจากฟิเอเอชมีความเป็นพิษต่อจุลินทรีย์เช่นกัน (Patel *et al.*, 2020) ดังนั้น

การศึกษานี้จึงทดสอบผลของฟิเอเอช ได้แก่ ฟลูออรีนและฟิแนนทรินต่อการผลิต IAA ที่เป็นสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชกลุ่มออกซิน และการละลายฟอสเฟตของแบคทีเรีย *Streptomyces* sp. ไอโซเลต STRM104 และ *Streptomyces* sp. ไอโซเลต STRM302 ซึ่งจากข้อมูลของลำดับเบสบน 16S rDNA พบว่าแบคทีเรียทั้งสองมีความคล้ายคลึงกับ *Streptomyces misionensis* JN869290 ร้อยละ 93.92 และ *Streptomyces morookaense* NR 112529 ร้อยละ 95.07 ตามลำดับ รวมทั้งยังศึกษาวิธีการได้รับน้ำเลี้ยงเซลล์แบคทีเรียต่อการเจริญเติบโตของข้าวเหนียวพันธุ์ กข 6 ที่เพาะในสภาวะที่ปนเปื้อนด้วยฟลูออรีนหรือฟิแนนทรินซึ่งเลือกใช้เป็นแม่แบบในการศึกษานี้ เนื่องจากเป็นฟิเอเอชที่พบปนเปื้อนร่วมกับฟิเอเอชชนิดอื่นๆ ในบริเวณที่ปนเปื้อนและอยู่ในรายการของ US.EPA. ที่ต้องเร่งกำจัดออกจากสิ่งแวดล้อม (Liu *et al.*, 2017) และเลือกใช้ข้าวเป็นพืชต้นแบบเนื่องจากเป็นพืชเศรษฐกิจของประเทศไทยและเป็นกลุ่มของธัญพืชที่เป็นอาหารหลักของคนทั่วโลก (Khunkhet and Remsungnen, 2018) นอกจากนี้ยังมีรายงานการปนเปื้อนของฟิเอเอชของดินในนาข้าวด้วย (Kim *et al.*, 2019) โดยสารในกลุ่มฟิเอเอชมีรายงานว่ามีความเป็นพิษต่อข้าวเหนียวพันธุ์ กข 6 ด้วย เช่น ฟิแนนทรินที่ระดับความเข้มข้น 20 mg/kg ส่งผลให้ดัชนีความแข็งแรงของต้นกล้าข้าวเหนียวพันธุ์ กข 6 ลดลง (Somtrakoon *et al.*, 2011) การปนเปื้อนร่วมกันระหว่างฟลูออรีนและฟลูออแรนที่ระดับความเข้มข้น 2 mg/kg ทำให้ความยาวรากของข้าวเหนียวพันธุ์ กข 6 ลดลง (Somtrakoon *et al.*, 2012) สำหรับประโยชน์ที่ได้จากการศึกษานี้สามารถนำไปใช้เป็นแนวทางในการเตรียมหัวเชื้อขึ้นใช้ในการเกษตรที่เหมาะสมต่อไป

## อุปกรณ์และวิธีการ

### เตรียมหัวเชื้อแบคทีเรีย

แบคทีเรีย *Streptomyces* sp. ไอโซเลต STRM104 และ STRM302 คัดแยกได้จากดินรอบรากมะเขือเทศ

ในจังหวัดมหาสารคาม การเตรียมหัวเชื้อแบคทีเรียทำโดยเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย *Streptomyces* sp. บนจานอาหาร Potato Dextrose Agar ที่ลดความเข้มข้นของสารอาหารลงครึ่งหนึ่ง (1/2PDA) เป็นเวลา 7 วัน ที่อุณหภูมิ 37°ซ. จากนั้นถ่ายเชื้อลงในอาหาร Potato Dextrose Broth ที่ลดความเข้มข้นของสารอาหารลงครึ่งหนึ่ง (1/2PDB) แล้วบ่มในสภาวะนิ่งที่อุณหภูมิ 37°ซ. เป็นเวลา 7 วัน แล้วจึงเก็บเกี่ยวเซลล์มาใช้เป็นหัวเชื้อเริ่มต้นสำหรับทดสอบความสามารถในการผลิต IAA และการละลายฟอสเฟต

### ความสามารถในการผลิต IAA

ถ่ายหัวเชื้อแบคทีเรีย *Streptomyces* sp. ไอโซเลต STRM104 หรือ STRM302 ซึ่งมีปริมาณเซลล์เริ่มต้นเท่ากับ  $2.40 \times 10^4$  และ  $2.33 \times 10^4$  cfu/ml ตามลำดับ ลงสู่อาหาร 1/2 PDB ซึ่งผสมทริปโตเฟนที่ระดับความเข้มข้น 0.2 g/l เติมฟลูออรีนหรือฟิแนนทรีนลงในอาหารทดสอบให้มีความเข้มข้นเป็น 15 และ 20 mg/l แล้วบ่มเชื้อในสภาวะนิ่งที่อุณหภูมิ 37°ซ. เป็นเวลา 10 วัน จากนั้นเก็บเกี่ยวเซลล์ทิ้งไปแล้วดูดส่วนน้ำใสปริมาณ 2 ml มาวิเคราะห์ปริมาณ IAA ตามวิธีการของ Ahmad *et al.* (2008) โดยหยดกรดออกโทฟอสฟอริกลงไป 2 หยด และน้ำยา Salkowski ปริมาตร 4 ml ผสมส่วนผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน จากนั้นตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 30 นาที แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 530 nm วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) เปรียบเทียบระหว่างชนิดและความเข้มข้น 4 ระดับ และชุดควบคุม 2 ระดับ คือชุดควบคุมที่ 1 เพาะเลี้ยงแบคทีเรียในอาหารทดสอบที่ผสมไธมิลฟอร์มาไมด์ซึ่งเป็นตัวทำลายที่ใช้ละลายฟิเอเอช และการทดลองในชุดควบคุมชุดที่ 2 เพาะเลี้ยงแบคทีเรียในอาหาร 1/2PDB เท่านั้น

### ความสามารถในการละลายฟอสเฟต

การทดสอบผลของฟลูออรีนและฟิแนนทรีนต่อความสามารถในการละลายฟอสเฟตของแบคทีเรียทำโดย

เตรียมหัวเชื้อแบคทีเรีย *Streptomyces* sp. ไอโซเลต STRM104 หรือ STRM302 ซึ่งมีปริมาณเซลล์เริ่มต้นเท่ากับ  $1.73 \times 10^5$  และ  $2.46 \times 10^5$  cfu/ml ตามลำดับ และใช้ปริมาณหัวเชื้อ 5  $\mu$ l หยดลงบนผิวหน้าอาหาร Pikovskaya's agar ซึ่งผสมฟลูออรีนหรือฟิแนนทรีนที่ระดับความเข้มข้น 15 และ 20 mg/l บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37°ซ. เป็นเวลา 20 วัน การทดลองชุดควบคุมชุดที่ 1 ทำโดยเพาะเลี้ยงแบคทีเรียในอาหาร Pikovskaya's agar ที่ผสมไธมิลฟอร์มาไมด์ซึ่งเป็นตัวทำลายที่ใช้ละลายฟิเอเอช และการทดลองในชุดควบคุมชุดที่ 2 ทำโดยเพาะเลี้ยงแบคทีเรียในอาหาร Pikovskaya's agar เท่านั้น วางแผนการทดลองแบบ Factorial in CRD 2 ปัจจัย 6x2 ปัจจัยแรก คือ ชนิดและความเข้มข้นของฟิเอเอช มี 6 ระดับ (ฟลูออรีน 15 mg/l ฟลูออรีน 20 mg/l ฟิแนนทรีน 15 mg/l ฟิแนนทรีน 20 mg/l ไธมิลฟอร์มาไมด์ซึ่งเป็นตัวทำลายที่ใช้ละลายฟิเอเอช และ Pikovskaya's agar ที่ไม่ผสมฟิเอเอช) ปัจจัยที่ 2 คือ ระยะเวลา 2 ระยะ คือ 10 และ 20 วัน เปรียบเทียบประสิทธิภาพการละลายฟอสเฟตบนอาหารแข็งด้วยค่า Solubilization Index (SI) โดยวัดรัศมีของบริเวณใส (Clear zone) และรัศมีของโคโลนีเพื่อใช้คำนวณค่า SI ตามวิธีการของ Collavino *et al.* (2010) ดังสูตรต่อไปนี้

$$SI = \frac{(\text{colony diameter} + \text{halozone diameter})}{\text{colony diameter}}$$

**ผลของน้ำเลี้ยงเซลล์ต่อการเจริญในระยะต้นกล้าของข้าวเหนียวพันธุ์ กข 6 ที่เพาะในสภาวะปนเปื้อนฟิเอเอช**

การเตรียมน้ำเลี้ยงเซลล์ใช้ปริมาณเซลล์เริ่มต้นของ *Streptomyces* sp. STRM104 เท่ากับ  $1.73 \times 10^5$  cfu/ml และเซลล์เริ่มต้นของ *Streptomyces* sp. STRM302 เท่ากับ  $2.46 \times 10^5$  cfu/ml การเตรียมน้ำเลี้ยงเซลล์แบคทีเรียทำโดยถ่ายหัวเชื้อแบคทีเรียลงสู่อาหาร

1/2PDB ซึ่งผสมทริปโตเฟนความเข้มข้น 0.2 g/l บ่มเชื้อในสภาวะนิ่งที่อุณหภูมิ 37°C. เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นเก็บเกี่ยวเซลล์โดยนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องเซ็นตริฟิวจ์ความเร็ว 6,000 rpm อุณหภูมิ 4°C. เวลา 10 นาที แล้วดูดส่วนน้ำใสด้านบนมากรองผ่านหัวกรองที่ปราศจากเชื้อซึ่งมีขนาดของรูกรอง 0.45 ไมครอน บรรจุน้ำเลี้ยงเซลล์ในภาชนะที่ปราศจากเชื้อเก็บไว้ใช้งาน และวิเคราะห์ปริมาณ IAA เริ่มต้นในน้ำเลี้ยงเซลล์ โดยปริมาณ IAA ในน้ำเลี้ยงเซลล์ของ *Streptomyces* sp. STRM104 และ *Streptomyces* sp. STRM302 เท่ากับ 3.10 และ 2.34 µg/ml ตามลำดับ

การเตรียมเมล็ดพันธุ์โดยทำความสะอาดพื้นผิวเมล็ดพันธุ์ข้าวเหนียว กข 6 ด้วยการแช่เมล็ดในสารละลายไฮโปคลอไรต์ความเข้มข้นร้อยละ 0.3 จำนวน 2 ครั้ง เป็นเวลา 5 นาที ในระหว่างการแช่เมล็ดพันธุ์ให้เขย่าเป็นครั้งคราว จากนั้นย้ายเมล็ดพันธุ์ข้าวเหนียว กข 6 ลงในน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อ 3 ครั้ง แต่ละครั้งให้เขย่า 1 นาที

การเตรียมกระดาดเพาะที่ปนเปื้อนฟลูออรีนหรือฟิแนนทริน ทำโดยซังฟลูออรีนหรือฟิแนนทรินจากนั้นนำมาละลายในอะซิโตนให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 20 mg/l แล้วจึงปิเปตสารละลายฟิเอเอชแต่ละชนิดปริมาตร 20 ml ลงในกระดาดเพาะที่ปราศจากเชื้อ ผึ่งกระดาดเพาะให้ตัวทำละลายระเหยไปในตู้ควั่นซึ่งใช้เวลาประมาณ 48 ชั่วโมง การทดลองในชุดควบคุมเตรียมกระดาดเพาะเช่นเดียวกันกับในชุดทดลอง แต่เติมอะซิโตนซึ่งเป็นตัวทำละลายลงไปเพียงอย่างเดียวในปริมาณที่เท่ากันและทิ้งไว้ในสภาพแวดล้อมเดียวกันเพื่อให้อะซิโตนระเหยไป

การทดสอบผลของน้ำเลี้ยงเซลล์ของแบคทีเรียซึ่งเตรียมตามวิธีการข้างต้น ต่อการเจริญเติบโตของข้าวเหนียวพันธุ์ กข 6 ในระยะต้นกล้า วางแผนการทดลองแบบ Factorial in CRD 2 ปัจจัย 3x2 ปัจจัยแรก คือ ชนิดของฟิเอเอช ได้แก่ ไม่มีฟิเอเอช ฟลูออรีน และฟิแนนทริน ปัจจัยที่ 2 ได้แก่ วิธีการได้รับน้ำเลี้ยงเซลล์

โดยเมล็ดพันธุ์จะได้รับน้ำเลี้ยงเซลล์แบคทีเรียเพียงครั้งเดียวแต่ต่างวิธี วิธีการได้รับน้ำเลี้ยงเซลล์มี 2 วิธี คือ วิธีที่ 1 แช่เมล็ดพันธุ์ข้าวในน้ำเลี้ยงเซลล์แบคทีเรียก่อนเพาะเป็นเวลา 12 ชั่วโมง และวิธีที่ 2 เพาะเมล็ดพันธุ์ข้าวในน้ำกลั่นเป็นเวลา 12 ชั่วโมง แล้วเพาะลงบนกระดาดเพาะที่รดด้วยน้ำเลี้ยงเซลล์แบคทีเรียจนชุ่ม เพาะต้นกล้า 5 เมล็ดต่อถาดเพาะ 1 ถาด ทดลองทั้งหมด 10 ซ้ำ ตั้งถาดที่เพาะเมล็ดข้าวทั้งหมดในบริเวณที่ให้ได้รับแสงธรรมชาติ รดด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อทุกวันเพื่อรักษาความชื้นในกระดาดเพาะ บันทึกผลการทดลองจนถึงวันที่ 16 ของการทดลอง โดยนับจำนวนต้นกล้าที่งอก และการเจริญเติบโตของพืช ได้แก่ ความยาวราก ความยาวใบ น้ำหนักสด/น้ำหนักแห้งของรากรวมใบเลี้ยง และน้ำหนักสด/น้ำหนักแห้งของยอด คำนวณร้อยละการงอกทั้งหมดและเวลาเฉลี่ยในการงอกตามวิธีของ Calvelo Pereira *et al.* (2010) และ Chuanren *et al.* (2004)

$$\text{การงอกทั้งหมด (G}_T\text{)} = (\text{Ng}/\text{Ns}) \times 100$$

Ng = จำนวนเมล็ดที่งอกภายในระยะเวลาที่กำหนด

Ns = จำนวนเมล็ดที่เริ่มเพาะ

$$\text{เวลาเฉลี่ยในการงอก (Mean Time Germination; MTG)}$$

$$= \sum (g_i \times d_i) / n$$

d<sub>i</sub> = จำนวนวัน

g<sub>i</sub> = จำนวนเมล็ดที่งอกที่วัน d<sub>i</sub>

### การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

วิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติระหว่างทรีทเมนต์ด้วย Two-Way ANOVA และวิเคราะห์ความแตกต่างของความแปรปรวนค่าเฉลี่ยรายคู่ด้วยวิธี Least Significant Difference (LSD) โดยกำหนดระดับนัยสำคัญ P<0.05 การทดสอบผลของฟิเอเอชต่อการสร้าง IAA และในกรณีที่ต้นกล้าข้าวไม่งอกราก วิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติระหว่างทรีทเมนต์ด้วย One-Way ANOVA และวิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยรายคู่ด้วยวิธี LSD

### ผลการวิจัยและวิจารณ์

พอลิไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนเป็นสารที่เป็นพิษต่อจุลินทรีย์ (Patel *et al.*, 2020) ดังนั้นการนำจุลินทรีย์กลุ่มส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชไปใช้ในดินที่ปนเปื้อนพีเอเอชอาจทำให้กิจกรรมส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชโดยจุลินทรีย์ลดลงได้ การศึกษานี้จึงตรวจสอบปริมาณการผลิต IAA และการละลายฟอสเฟตของ *Streptomyces* sp. ไอโซเลต STRM104 และ STRM302 ในสภาวะที่มีการปนเปื้อนจากฟลูออรีนและฟิแนนทรีน รวมทั้งศึกษารูปแบบการให้น้ำเลี้ยงเซลล์ต่อการงอกและการเจริญเติบโตในระยะต้นกล้าของข้าวเหนียวพันธุ์ กข 6 ที่เพาะในสภาวะที่มีการปนเปื้อนจากฟลูออรีนและฟิแนนทรีน ผลการทดลองพบว่าฟลูออรีนและฟิแนนทรีนไม่ส่งผลต่อการผลิต IAA โดยในวันที่ 10 ของการทดลอง *Streptomyces* sp. STRM104 และ *Streptomyces* sp. STRM302 ผลิต IAA ได้เท่ากับ 3.83 และ 4.91  $\mu\text{g/ml}$  ตามลำดับ เมื่อเพาะเลี้ยงแบบคทีเรียในอาหาร 1/2PDB ในขณะที่ผลิต IAA ได้ 0.78-2.38 และ 0.71-2.81  $\mu\text{g/ml}$  สำหรับเชื้อ *Streptomyces* sp. STRM104 และ *Streptomyces* sp. STRM302 ตามลำดับ เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผสมฟลูออรีนหรือฟิแนนทรีนที่ระดับความเข้มข้น 15 และ 20 mg/l (Table 1) ความสามารถในการละลายฟอสเฟตของ *Streptomyces* sp. STRM104 ในวันที่ 10 ของการทดลองคาดว่าลดลงจากผลของโดเมทิลฟอร์มาไมด์ซึ่งเป็นตัวทำลายที่ใช้ในการละลายพีเอเอช ส่วนความสามารถในการละลายฟอสเฟตที่ลดลงของ *Streptomyces* sp. STRM104 ในวันที่ 20 ของการทดลองคาดว่าป็นผลร่วมจากทั้งโดเมทิลฟอร์มาไมด์และฟลูออรีนกับฟิแนนทรีน ในขณะที่ฟลูออรีนและโดเมทิลฟอร์มาไมด์ไม่ส่งผลต่อการละลายฟอสเฟตของ *Streptomyces* sp. STRM302 ส่วนฟิแนนทรีนทั้งที่ระดับความเข้มข้น 15 และ 20 mg/l ทำให้ความสามารถในการละลายฟอสเฟตของแบคทีเรีย *Streptomyces* sp. STRM302 หายไป (Table 1)

ผลการศึกษาของวิธีการได้รับน้ำเลี้ยงเซลล์แบบ คทีเรีย *Streptomyces* sp. STRM104 และ *Streptomyces* sp. STRM302 ส่งผลต่อการงอกและการเจริญเติบโตในระยะต้นกล้าของข้าวเหนียวพันธุ์ กข 6 ที่เพาะในสภาวะที่ปนเปื้อนฟลูออรีนและฟิแนนทรีนแตกต่างกัน การแช่เมล็ดพันธุ์ข้าวเหนียวในน้ำเลี้ยงเซลล์แบบคทีเรียทั้งสองชนิดไม่ว่าจะเป็น *Streptomyces* sp. STRM104 หรือ *Streptomyces* sp. STRM302 กระตุ้นการงอกและการเจริญเติบโตในระยะต้นกล้าของข้าวเหนียวพันธุ์ กข 6 ได้มากกว่าการเพาะเมล็ดพันธุ์ในกระดาดเพาะที่รดด้วยน้ำเลี้ยงเซลล์ การแช่เมล็ดพันธุ์ข้าวเหนียว กข 6 ในน้ำเลี้ยงเซลล์ของ *Streptomyces* sp. STRM104 ส่งเสริมให้การงอกของข้าวเหนียวที่เพาะในกระดาดที่ปนเปื้อนฟลูออรีนหรือฟิแนนทรีนเป็นร้อยละ 100 ในขณะที่การงอกของเมล็ดพันธุ์ข้าวเหนียว กข 6 ที่เพาะในกระดาดที่รดด้วยน้ำเลี้ยงเซลล์มีร้อยละการงอกต่ำกว่าร้อยละ 60 อย่างไรก็ตามการแช่เมล็ดพันธุ์ในน้ำเลี้ยงเซลล์ *Streptomyces* sp. STRM104 มีแนวโน้มว่าเวลาเฉลี่ยในการงอกไม่แตกต่างกันเมื่อเพาะเมล็ดพันธุ์ข้าวเหนียว กข 6 ในสภาวะที่ปนเปื้อนฟลูออรีนและฟิแนนทรีน แต่การเพาะเมล็ดพันธุ์ข้าวเหนียว กข 6 ที่เพาะในกระดาดที่ชุ่มด้วยน้ำเลี้ยงเซลล์ของ *Streptomyces* sp. STRM104 พบว่าเวลาเฉลี่ยในการงอกเกิดได้ช้าที่สุดในสภาวะที่มีการปนเปื้อนจากฟลูออรีน นอกจากนี้การแช่เมล็ดพันธุ์ในน้ำเลี้ยงเซลล์ยังช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตในระยะต้นกล้าของข้าวเหนียวพันธุ์ กข 6 ได้มากกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับการเพาะเมล็ดพันธุ์บนกระดาดเพาะที่ชุ่มไปด้วยน้ำเลี้ยงเซลล์โดยความยาวใบ น้ำหนักสด/น้ำหนักแห้งของยอด ความยาวราก น้ำหนักสด/น้ำหนักแห้งของรากรวมใบเลี้ยงของเมล็ดพันธุ์ข้าวเหนียว กข 6 ที่แช่เมล็ดพันธุ์ในน้ำเลี้ยงเซลล์มีค่ามากกว่าการเจริญเติบโตของต้นกล้าที่แช่เมล็ดพันธุ์ในน้ำกลั่นแล้วเพาะในกระดาดเพาะที่ชุ่มด้วยน้ำเลี้ยงเซลล์ (Table 2)

**Table 1** Indole-3-acetic acid ( $\mu\text{g/ml}$ ) production and phosphate solubilization index (PSI) of *Streptomyces* sp. STRM104 and STRM302 (Data are mean  $\pm$  S.E.)

Treatment	<i>Streptomyces</i> sp. STRM104		<i>Streptomyces</i> sp. STRM302	
	IAA concentration	PSI	IAA concentration	PSI
<b>Day 10</b>				
15 mg/l fluorene	2.38 $\pm$ 0.74	1.39 $\pm$ 0.04b	0.71 $\pm$ 0.48	1.46 $\pm$ 0.02
20 mg/l fluorene	1.72 $\pm$ 1.28	1.31 $\pm$ 0.03b	0.71 $\pm$ 0.48	1.38 $\pm$ 0.13
15 mg/l phenanthrene	0.78 $\pm$ 0.38	1.45 $\pm$ 0.03b	2.81 $\pm$ 2.36	no clear zone
20 mg/l phenanthrene	1.07 $\pm$ 0.26	1.51 $\pm$ 0.10b	0.93 $\pm$ 0.59	no clear zone
dimethylformamide	1.72 $\pm$ 0.51	1.34 $\pm$ 0.05b	2.45 $\pm$ 1.21	1.36 $\pm$ 0.01
PDB or Pikovskaya's agar	3.83 $\pm$ 0.45	1.83 $\pm$ 0.01a	4.91 $\pm$ 0.38	1.37 $\pm$ 0.01
<b>Day 20</b>				
15 mg/l fluorene	N.D.	1.39 $\pm$ 0.04bc	N.D.	1.47 $\pm$ 0.02
20 mg/l fluorene	N.D.	1.31 $\pm$ 0.03c	N.D.	1.55 $\pm$ 0.24
15 mg/l phenanthrene	N.D.	1.46 $\pm$ 0.03bc	N.D.	no clear zone
20 mg/l phenanthrene	N.D.	1.50 $\pm$ 0.10b	N.D.	no clear zone
dimethylformamide	N.D.	1.34 $\pm$ 0.06c	N.D.	1.36 $\pm$ 0.01
PDB or Pikovskaya's agar	N.D.	1.76 $\pm$ 0.02a	N.D.	1.37 $\pm$ 0.01
LSD	<b>3.10</b>	<b>0.23</b>	<b>5.19</b>	<b>0.43</b>
Day/PAHs/day*PAHs	-	ns/**/ns	-	ns/ns/ns

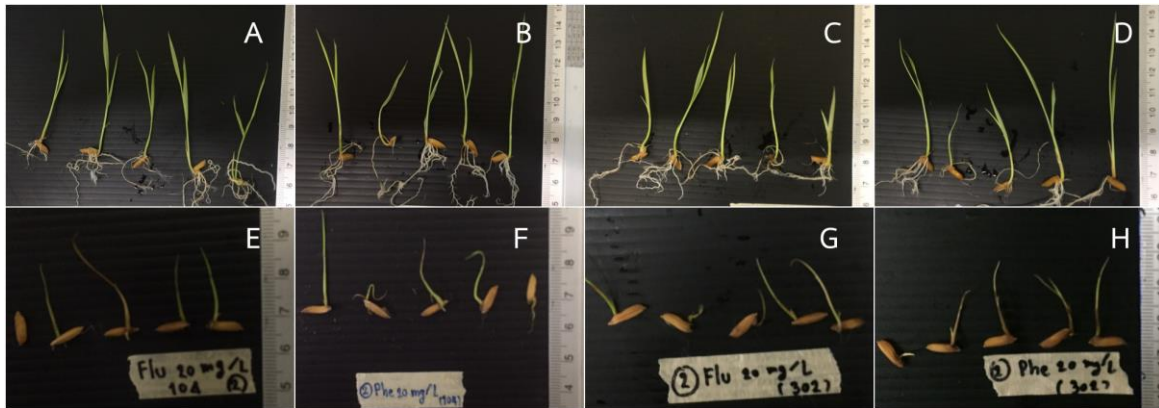
Values with different lowercase letter are statistically different between same day ( $P < 0.05$ ); Values with different capital letter are statistically different between same bacterial strain and different day at 0.05; ns, \*, \*\* denote non-significance ( $P > 0.05$ ), statistically significance ( $P < 0.05$ ), and highly statistically significance ( $P < 0.01$ ) of each factor, respectively. N.D. = not determined

การได้รับน้ำเลี้ยงเซลล์แบคทีเรีย *Streptomyces* sp. STRM302 ให้ผลในลักษณะเดียวกับการได้รับน้ำเลี้ยงเซลล์แบคทีเรีย *Streptomyces* sp. STRM104 โดยการงอกของรากของเมล็ดพันธุ์ข้าวเหนียว กข 6 ที่แช่เมล็ดพันธุ์ในน้ำเลี้ยงเซลล์แบคทีเรีย *Streptomyces* sp. STRM302 ก่อนเพาะมีค่าเป็นร้อยละ 100 การเจริญเติบโตของยอดต้นกล้าข้าวเหนียวพันธุ์ กข 6 ที่แช่เมล็ดพันธุ์ในน้ำเลี้ยงเซลล์ของ *Streptomyces* sp. STRM302

แล้วเพาะในสภาวะที่ปนเปื้อนฟลูออรีนและฟิแนนทรีน มีแนวโน้มมีค่ามากกว่าต้นกล้าข้าวเหนียวที่เพาะเมล็ดในสภาวะที่ปนเปื้อนเช่นกัน แต่เพาะเมล็ดพันธุ์ในกระดาษที่ชุ่มด้วยน้ำเลี้ยงเซลล์ โดยการแช่เมล็ดพันธุ์ข้าวเหนียว กข 6 ในน้ำกลั่นแล้วเพาะในกระดาษชุ่มน้ำเลี้ยงเซลล์ พบว่าไม่เกิดการงอกของรากแต่พบการงอกของใบเท่านั้น (Figure 1 และ Table 2) นอกจากนี้การเจริญเติบโตของข้าวเหนียวพันธุ์ กข 6 ที่เพาะในกระดาษชุ่มน้ำเลี้ยงเซลล์มีลักษณะ

ของต้นกล้าที่ไม่แข็งแรงสมบูรณ์ การเจริญเติบโตของรากข้าวเหนียวพันธุ์กช 6 ที่เพาะเมล็ดพันธุ์ในกระดาดชุ่มน้ำเลี้ยงเซลล์ของ *Streptomyces* sp. STRM302 ไม่สามารถวัดค่าได้ (Figure 1 และ Table 2) โดยการเพาะเมล็ดพันธุ์ในกระดาดที่ชุ่มด้วยน้ำเลี้ยงเซลล์ของ *Streptomyces* sp.

STRM302 พบการเจริญของรากในกระดาดเพาะ ซึ่งคาดว่าจะสาเหตุให้การงอกของเมล็ดถูกขัดขวางได้เนื่องจากในน้ำเลี้ยงเซลล์ของแบคทีเรียทุกไอโซเลตมีส่วนผสมของอาหาร PDB รวมทั้งเมล็ดข้าวสามารถเป็นแหล่งอาหารสำหรับการเจริญของจุลินทรีย์ในธรรมชาติได้



**Figure 1** The 16 days old seedling of rice cv. RD6 grown under different condition; seeds immersion in *Streptomyces* sp. STRM104 culture filtrate and exposed to fluorene (A) and phenanthrene (B) contamination; immersion in *Streptomyces* sp. STRM302 culture filtrate and exposed to fluorene (C) and phenanthrene (D) contamination; germinated in paper soaked with culture of *Streptomyces* sp. STRM104 and exposed to fluorene (E) and phenanthrene (F) contamination; germinated in paper soaked with culture of *Streptomyces* sp. STRM302 culture filtrate and exposed to fluorene (G) and phenanthrene (H) contamination



**Table 2** Germination and growth of shoot (fresh weight/dry weight) and root (fresh weight/dry weight) of rice grown under fluorene or phenanthrene contamination which receiving culture filtrate of *Streptomyces* sp. STRM104 and *Streptomyces* sp. STRM302 (Data are mean  $\pm$  S.E.)

Treatment	Total root germination (%)	Mean time to germinate of root (days)	Shoot length (cm)	Shoot fresh weight (mg)	Shoot dry weight (mg)	Root length (cm)	Root fresh weight + Cotylydon (g)	Root dry weight + Cotylydon (mg)
<b>Immersion (STRM104)</b>								
Acetone	100.00 $\pm$ 0.00	2.12 $\pm$ 0.10a	5.42 $\pm$ 0.21aA	18.4 $\pm$ 0.87aA	5.2 $\pm$ 0.19aA	5.57 $\pm$ 0.34aA	3.9 $\pm$ 0.35aA	2.2 $\pm$ 0.11aA
20 mg/kg fluorene	100.00 $\pm$ 0.00	2.56 $\pm$ 0.12a	4.96 $\pm$ 0.21aA	7.7 $\pm$ 0.45cA	4.2 $\pm$ 0.22bA	4.46 $\pm$ 0.35bA	2.0 $\pm$ 0.16bA	1.6 $\pm$ 0.15bA
20 mg/kg phenanthrene	100.00 $\pm$ 0.00	2.56 $\pm$ 0.06a	5.35 $\pm$ 0.22aA	11.4 $\pm$ 0.70bA	4.4 $\pm$ 0.20bA	5.89 $\pm$ 0.39aA	2.0 $\pm$ 0.13bA	1.5 $\pm$ 0.10bA
<b>Soaked paper (STRM104)</b>								
Acetone	54.28 $\pm$ 8.41	2.57 $\pm$ 0.18b	2.30 $\pm$ 0.16aB	3.1 $\pm$ 0.22abB	1.5 $\pm$ 0.11aB	0.62 $\pm$ 0.10aB	0.6 $\pm$ 0.14aB	0.3 $\pm$ 0.00aB
20 mg/kg fluorene	40.00 $\pm$ 0.00	1.25 $\pm$ 0.00c	1.76 $\pm$ 0.19aB	2.3 $\pm$ 1.92bB	1.2 $\pm$ 0.11aB	0.30 $\pm$ 0.10aB	2.1 $\pm$ 0.00aA	0.6 $\pm$ 0.00aA
20 mg/kg phenanthrene	60.00 $\pm$ 11.55	3.65 $\pm$ 0.90a	2.11 $\pm$ 0.17aB	4.0 $\pm$ 3.58aB	1.3 $\pm$ 0.11aB	0.51 $\pm$ 0.14aB	0.5 $\pm$ 0.07aB	0.4 $\pm$ 0.09aB
LSD		0.75	0.55	1.26	0.4	0.71	0.57	0.31
Method/PAHs/ Method*PAHs	-	ns/**/ns	**/**/ns	**/**/**	**/**/**	**/**/**	**/**/**	**/**/ns
<b>Immersion with (STRM302)</b>								
Acetone	100.00 $\pm$ 0.00	2.50 $\pm$ 0.12	4.85 $\pm$ 0.20A	6.4 $\pm$ 0.52cA	3.3 $\pm$ 0.18cA	4.34 $\pm$ 0.35b	3.2 $\pm$ 0.16a	1.1 $\pm$ 0.07
20 mg/kg fluorene	100.00 $\pm$ 0.00	2.46 $\pm$ 0.04	5.22 $\pm$ 0.20A	12.00 $\pm$ 0.65aA	4.2 $\pm$ 0.19bA	6.34 $\pm$ 0.40a	2.6 $\pm$ 0.13b	3.8 $\pm$ 2.03
20 mg/kg phenanthrene	100.00 $\pm$ 0.00	2.44 $\pm$ 0.04	4.86 $\pm$ 0.22A	9.7 $\pm$ 6.23bA	5.2 $\pm$ 0.30aA	4.68 $\pm$ 0.27b	1.4 $\pm$ 0.11c	1.1 $\pm$ 0.09
<b>Soaked paper (STRM302)</b>								
Acetone	N.G.	N.G.	1.87 $\pm$ 0.12B	2.2 $\pm$ 0.17aB	1.1 $\pm$ 0.07aB	N.G.	N.G.	N.G.
20 mg/kg fluorene	N.G.	N.G.	2.08 $\pm$ 0.12B	2.0 $\pm$ 0.18aB	0.9 $\pm$ 0.11aB	N.G.	N.G.	N.G.
20 mg/kg phenanthrene	N.G.	N.G.	1.72 $\pm$ 0.14B	2.4 $\pm$ 0.21aB	1.1 $\pm$ 0.08aB	N.G.	N.G.	N.G.
LSD		0.23	0.50	1.13	0.40	0.91	1.26	0.40
Method/PAHs/ Method*PAHs	-/-/-	-/ns/-	**/ns/**	**/**/**	**/**/**	-/**/-	-/**/-	-/ns/-

Values with different lowercase letter are statistically different between same method ( $P < 0.05$ ); Values with different capital letter are statistically different between same PAHs and different method at 0.05; ns, \*, \*\* denote non-significance ( $P > 0.05$ ), statistically significance ( $P < 0.05$ ), and highly statistically significance ( $P < 0.01$ ) of each factor, respectively. N.G. = not germinate

## วิจารณ์ผลการวิจัย

การละลายฟอสเฟตที่ลดลงของ *Streptomyces* sp. STRM104 และ *Streptomyces* sp. STRM302 คาดว่าเกิดจากผลกระทบของสารมลพิษต่อวิถีเมแทบอลิซึมภายในเซลล์ที่เกี่ยวข้อง ทำให้คุณลักษณะที่ส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชเปลี่ยนแปลงไป ดังที่มีรายงานว่าสารกำจัดวัชพืชหลายชนิดทำให้การผลิต IAA และการละลายฟอสเฟตของ *Pseudomonas putida* PS9 ลดลง (Ahemad and Khan, 2012) ฟลูออรีนและฟิแนนทรีนทำให้ปฏิกิริยาไนตริฟิเคชันของจุลินทรีย์ในดินลดลง (Sverdrup *et al.*, 2002) พีเอเอชยังมีผลลดกิจกรรมของเอนไซม์ดีไฮโดรจีเนส ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่มีบทบาทสำคัญในปฏิกิริยาออกซิโดรีดักชันภายในเซลล์ของจุลินทรีย์ (Irha *et al.*, 2003) อย่างไรก็ตามพีเอเอชส่งผลต่อการผลิต IAA ของแบคทีเรียไอโซเลต NSRU1 ซึ่งคัดแยกได้จากดินรอบรากหญ้าตีนกา (*Eleusine indica*) และแบคทีเรียไอโซเลต NSRU2 กับ NSRU3 ซึ่งคัดแยกได้จากดินรอบรากสาบเสือ (*Chromolaena odorata*) โดยแบคทีเรียทั้ง 3 ไอโซเลต ผลิต IAA ลดลงเมื่อเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแอนทราซินหรือฟิแนนทรีนที่ระดับความเข้มข้น 100 mg/l (Chouychai *et al.*, 2016)

การใช้แบคทีเรียกลุ่มสนับสนุนการเจริญเติบโตของพืชทางการเกษตรมีหลายรูปแบบ ซึ่งอาจใช้แบคทีเรียในรูปของตัวเซลล์แบคทีเรียหรือน้ำเลี้ยงเซลล์แบคทีเรียก็ได้ (Bakhshandeha *et al.*, 2017; Muniroha *et al.*, 2019) การใช้ตัวเซลล์แบคทีเรียกับดินโดยตรงอาจมีปัญหาด้านการรอดชีวิตของแบคทีเรียในสภาพแวดล้อม (de Souza *et al.*, 2015) ในงานวิจัยของ Bakhshandeha *et al.* (2017) รายงานว่าการเติมหัวเชื้อลงดินโดยตรงทำให้น้ำหนักแห้งของใบและน้ำหนักแห้งของลำต้นข้าว (cv. Tarom Hashemi) ต่ำกว่าการให้ต้นกล้าได้รับหัวเชื้อโดยตรงแล้วจึงย้ายปลูกลงแปลง การเติมจุลินทรีย์ลงสู่ดินโดยตรงอาจเผชิญปัญหาสภาวะแวดล้อมไม่เหมาะสมต่อการเจริญของจุลินทรีย์ และทำให้จุลินทรีย์

ไม่สามารถรอดชีวิตและแสดงกิจกรรมการสนับสนุนการเจริญเติบโตของพืชได้ (de Souza *et al.*, 2015) นอกจากนี้ในการทดลองข้างต้นพบว่าฟลูออรีนและฟิแนนทรีนลดการผลิต IAA และการละลายฟอสเฟตของ *Streptomyces* sp. ทั้งสองสายพันธุ์ ดังนั้นการทดสอบผลการกระตุ้นการงอกและการเจริญเติบโตในระยะต้นกล้าของข้าวเหนียวพันธุ์ กข 6 ที่เพาะในสภาวะปนเปื้อนฟลูออรีนหรือฟิแนนทรีนที่ระดับความเข้มข้น 20 mg/l จึงใช้น้ำเลี้ยงเซลล์แบคทีเรียในการทดสอบแทนการใช้เซลล์จุลินทรีย์โดยตรง

การเติมน้ำเลี้ยงเซลล์ลงในกระดาดเพาะทำให้การงอกและการเจริญเติบโตระยะต้นกล้าของข้าวเหนียวพันธุ์ กข 6 ลดลง โดยเฉพาะการเจริญของราก เป็นไปได้ว่าน้ำเลี้ยงเซลล์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียในอาหาร 1/2PDB ยังคงมีแหล่งคาร์บอนที่จุลินทรีย์ในสิ่งแวดล้อมใช้เป็นสารอาหารได้ ถึงแม้จะผ่านการใช้เป็นอาหารในการเพาะเลี้ยง *Streptomyces* sp. มาแล้ว นอกจากนี้ในน้ำเลี้ยงเซลล์จุลินทรีย์ยังเป็นแหล่งเมแทบอลิซึมจากจุลินทรีย์ที่สำคัญ เช่น สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชและฟลาโวนอยด์ เป็นต้น (Hamayun *et al.*, 2019; Muniroha *et al.*, 2019) ดังนั้นการเติมน้ำเลี้ยงเซลล์ลงในกระดาดเพาะอาจดึงดูดให้จุลินทรีย์อื่นๆ ในสิ่งแวดล้อมเจริญขึ้นจนขัดขวางการงอกของรากและการเจริญเติบโตในระยะต้นกล้าของข้าวพันธุ์ กข 6 ได้ รวมทั้งปริมาณเมแทบอลิซึมที่จุลินทรีย์ผลิต เช่น IAA ในน้ำเลี้ยงเซลล์อาจมีอยู่ไม่เพียงพอต่อการดูดซึมเข้าสู่เมล็ด ในขณะที่การแช่เมล็ดพันธุ์ข้าวเหนียว กข 6 ในน้ำเลี้ยงเซลล์ก่อนเพาะบนกระดาดเพาะ เป็นการได้รับน้ำเลี้ยงเซลล์ในระยะเวลาที่เพียงพอให้เมแทบอลิซึมที่จุลินทรีย์ผลิตถึง IAA ที่เป็นฮอร์โมนสำคัญต่อการพัฒนาของรากในต้นกล้าข้าว (Chhun *et al.*, 2004) ถูกดูดซึมเข้าสู่เมล็ดพืชได้มากกว่าวิธีการใช้น้ำเลี้ยงเซลล์โดยการแช่เมล็ดพันธุ์ในน้ำเลี้ยงเซลล์จึงกระตุ้นการงอกและการเจริญเติบโตของต้นกล้าได้ดีกว่า นอกจากนี้อาจเกี่ยวข้องกับกระบวนการงอกของข้าวซึ่งเป็นพืชใบเลี้ยงเดี่ยว โดยมีรายงานว่าการย่อยสลาย

แบ่งที่สะสมในเอนโดสเปิร์มไปใช้ในกระบวนการงอกของเมล็ดมีความไวต่อความเป็นพิษของสารมลพิษ เช่น เฮกซะคลอโรไซโคลเฮกเซน มากกว่าพืชใบเลี้ยงคู่ (Calvelo Pereira *et al.*, 2010) เมื่อเมล็ดข้าวได้รับ IAA ในขณะที่แช่เมล็ดก่อนจะสัมผัสกับพีเอเออาจช่วยให้เอ็มบริโอของข้าวเกิดการพัฒนารากได้ดีกว่าการที่ได้รับ IAA พร้อมกับการสัมผัสกับพีเอเอ

### สรุปผลการวิจัย

การสัมผัสกับฟลูออรีนและฟีนานทรินของ *Streptomyces* sp. STRM104 และ *Streptomyces* sp. STRM302 ทำให้การละลายฟอสเฟตลดลง การใช้น้ำเลี้ยงเซลล์เพื่อกระตุ้นการงอกและการเจริญเติบโตของข้าวเหนียวพันธุ์ กข 6 จึงมีโอกาสรอบความสำเร็จมากกว่า โดยวิธีการใช้น้ำเลี้ยงเซลล์ของ *Streptomyces* sp. STRM104 และ *Streptomyces* sp. STRM302 ที่เหมาะสมคือ การแช่เมล็ดพันธุ์ข้าวเหนียวพันธุ์ กข 6 แล้วจึงนำไปเพาะ เนื่องจากส่งผลกระตุ้นการงอกและการเจริญเติบโตของต้นกล้าได้มากกว่าการแช่เมล็ดพันธุ์ในน้ำกลั่นแล้วจึงเพาะในวัสดุเพาะที่รดด้วยน้ำเลี้ยงเซลล์

### กิตติกรรมประกาศ

ขอบพระคุณภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม

### เอกสารอ้างอิง

Ahemad, M. and M.S. Khan. 2012. Evaluation of plant-growth-promoting activities of rhizobacterium *Pseudomonas putida* under herbicide stress. **Ann. Microbiol.** 62: 1531-1540.

Ahmad, F., I. Ahmad and M.S. Khan. 2008. Screening of free-living rhizospheric bacteria for their multiple plant growth promoting activities. **Microbiol. Res.** 163: 178-181.

Amagai, T., Y. Takahashi and H. Matsushita. 1999. A survey on polycyclic aromatic hydrocarbon concentrations in soil in Chiang Mai, Thailand. **Environ. Int.** 25: 563-572.

Bakhshandeha, E., H. Pirdashti and K.S. Lendeh. 2017. Phosphate and potassium-solubilizing bacteria effect on the growth of rice. **Ecol. Eng.** 103: 164-169.

Calvelo Pereira, R.C., C. Monterroso and F. Macias. 2010. Phytotoxicity of hexachlorocyclohexane: effect on germination and early growth of different plant species. **Chemosphere** 79: 326-333.

Chhun, T., S. Taketa, S. Tsurumi and M. Ichii. 2004. Different behaviour of indole-3-acetic acid in stimulating lateral root development in rice (*Oryza sativa* L.). **Plant Growth Regul** 43: 135-143.

Chouychai, W., T. Paemsom, C. Pobsuwan, K. Somtrakoon and H. Lee. 2016. Effect of indole-3-acetic acid-producing bacteria on phytoremediation of soil contaminated with phenanthrene and anthracene by mungbean. **Environment Asia** 9(2): 128-133.

- Chuanren, D., W. Bochu, L. Wanqian, C. Jing, L. Jie and Z. Huan. 2004. Effect of chemical and physical factors to improve the germination rate of *Echinaceae angustifolia* seeds. **Colloid Surface B** 37: 101-105.
- Collavino, M.M., P.A. Sansberro, L.A. Mroginski and O.M. Aguilar. 2010. Comparison of *In Vitro* solubilization activity of diverse phosphate-solubilizing bacteria native to acid soil and their ability to promote *Phaseolus vulgaris* growth. **Biol. Fert. Soils** 46: 727-738.
- de Souza, R., A. Ambrosini and L.M.P. Passaglia. 2015. Plant growth-promoting bacteria as inoculants in agricultural soils. **Genet. Mol. Biol.** 38(4): 401-419.
- Hamayun, I.M., A. Hussain, S.A. Khan, A. Iqbal and I.-J. Lee. 2019. *Aspergillus flavus* promoted the growth of soybean and sunflower seedlings at elevated temperature. **BioMed Res. Int.** 2019: 1295457.
- Irha, N., J. Sleta and V. Petersell. 2003. Effect of heavy metals and PAH on soil assessed via dehydrogenase assay. **Environ. Int.** 28: 779-782.
- Khunkhet, S. and T. Remsungnen. 2018. Non-destructive identification of breeding rice seed by using image processing and fuzzy logic. **J. Sci. Eng. Res.** 5(3): 108-121
- Kim, L., H.-J. Jeon, Y.-C. Kim, S.-H. Yang, H. Choi, T.-O. Kim and S.-E Lee. 2019. Monitoring polycyclic aromatic hydrocarbon concentrations and distributions in rice paddy soils from Gyeonggi-do, Ulsan, and Pohang. **App. Biol. Chem** 62: 18.
- Liu, G., W. Guo, J. Niu, X. An and L. Zhao. 2017. Polycyclic aromatic hydrocarbons in agricultural soils around the industrial city of Changzhi, China: characteristics, spatial distribution, hotspots, sources, and potential risks. **J. Soils Sediments** 17: 229-239.
- Muniroha, M.S., S.A. Nusaibah, G. Vadamalai and Y. Siddique. 2019. Proficiency of biocontrol agents as plant growth promoters and hydrolytic enzyme producers in *Ganoderma boninense* infected oil palm seedlings. **Current Plant Biology** 20: 100116.
- Patel, A.B., S. Shaikh, K.R. Jain, C. Desai and D. Madamwar. 2020. Polycyclic aromatic hydrocarbons: sources, toxicity, and remediation approaches. **Front. Microbiol** 11: 562813.
- Pongpiachan, S., D. Tipmadee, W. Deelaman, J. Muprasit, P. Feldensand and K. Schwarzer. 2013. Baseline risk assessment of the presence of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in coastal areas of Thailand affected by the 2004 tsunami. **Mar. Pollut. Bull.** 76: 370-378.

Pongpiachan, S., M. Hattayanone and J. Cao.

2017. Effect of agricultural waste burning season on PM2.5-bound polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) levels in Northern Thailand.

**Atmos. Pollut. Res.** 8: 1069-1080.

Somtrakoon, K., C. Chaimuangkoon, D. Phalaphol

and W. Chouychai. 2011. Phytotoxicity of fluoranthene and phenanthrene contaminants in soil on crop seedling growth. **RMUTI J. Sci. Technol.** 4(1): 19-26. [in Thai].

Somtrakoon, K., C. Chaimuangkoon, D. Phalaphol

and W. Chouychai. 2012. Combined phytotoxicity of phenanthrene, fluorene and fluoranthene in seedling growth of sticky rice cv. RD 6 and water morning glory. **Rajamangala University of Technology Tawan-ok Res. J.** 5(1): 35-45. [in Thai].

Sverdrup, L.E., F. Ekelund, P.H. Krogh, T. Nielsen

and K. Johnsen. 2002. Soil microbial toxicity of eight polycyclic aromatic compounds: effects on nitrification, the genetic diversity of bacteria, and the total number of protozoans. **Environ. Toxicol. Chem.** 21: 1644-1650.

Vejan, P., R. Abdullah, T. Khadiran, S. Ismail and

A.N. Boyce. 2016. Role of plant growth promoting rhizobacteria in agricultural sustainability – A review. **Molecules** 21: 573.

Wu H., B. Sun and J. Li. 2019. Polycyclic aromatic

hydrocarbons in sediments/soils of the rapidly urbanized lower reaches of the river Chaohu, China. **Int. J. Env. Res. Pub. He.** 16: 2302.

Zelinkova, Z. and T. Wenzl. 2015. The occurrence of 16 EPA PAHs in food – A review. **Polycycl. Aromat. Comp.** 35: 248-284.