การคัดกรองและการประเมินประสิทธิภาพของไรโซแบคทีเรีย เพื่อการส่งเสริมการเจริญเติบโตของต้นกล้าข้าว

Screening and Efficiency Assessment of Rhizobacteria for Growth Enhancement of Rice Seedlings

อนุสรา พิศน้อย และ อรวรรณ ฉัตรสีรุ้ง*

Anusara Pidnoi and Arawan Shutsrirung*

ภาควิชาพืชศาสตร์และปฐพีศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ จ. เชียงใหม่ 50200

Department of Plant and Soil Sciences, Faculty of Agriculture, Chiang Mai University, Chiang Mai 50200, Thailand

**Corresponding author: Email: arawan.s@cmu.ac.th*

(Received: 17 December 2018; Accepted: 3 April 2019)

Abstract: Rice (*Oryza sativa* L.) is one the most important economic crop of Thailand and high input of chemical fertilizers is a common practice for rice production. This practice has given rise to several problems such as contamination of water, degradation of soil and loss of biodiversity ultimately leading to health risks for humans. The use of beneficial bacteria is an alternative to reduce the mention problems. Therefore, in the present study, rhizobacteria were isolated from 4 organic rice locations in Chiang Mai province i.e. Mae Wang district (2 sites), Mae Taeng district (1 site) and Phrao district (1 site). A total of 56 isolates of rhizobacteria was obtained. After preliminary qualitative-screening on agar plate, only 13 isolates showed promising abilities in nitrogen fixing and phosphate solubilizing abilities. The results of quantitative-screening in broth culture indicated that isolate RMW_4NF1 showed highest ability in nitrogen fixation followed by RMT_2NF4 (887.4 and 822.9 nmol C_2H_4/tube/24hr, respectively), and RMW_4NF1 exhibited highest ability in phosphate solubilization with value of 181.46 mgP/L. Evaluation of indole-3-acetic acid (IAA) indicated that RMW_3NF4 could produce highest amount of IAA followed by RMT_2NF4 (34.93 and 31.05 mg IAA/L, respectively). From all the evaluations of plant growth promoting potential, six isolates i.e. RMW_2Egg2, RMW_2Egg8, RMW_4Egg5, RMW_4NF1, RMT_2Egg2 and RMT_2NF4 were selected to test their effectiveness on growth and nutrients uptake of rice seedlings. The results showed that the application of almost all the isolates gave significantly higher growth and nutrients uptake than the control. Isolate RMT_2NF4 gave 214 and 74% higher nitrogen and phosphorus uptake than the control, respectively. Therefore, this isolate has a high potential to be developed as biofertilizer for rice.

Keywords: Rice, rhizosphere soils, nitrogen fixing bacteria, phosphate solubilizing bacteria

Copyright @ Journal of Agriculture, Faculty of Agriculture, Chiang Mai University. All rights reserved.

บทคัดย่อ: ข้าว (*Oryza sativa* L.) เป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญพืชหนึ่งของประเทศไทยและการใช้ปุ๋ยเคมีในการปลูกข้าวก็ได้มีการปฏิบัติกันอย่างแพร่หลาย ซึ่งทำให้ก่อให้เกิดปัญหาหลายประการ เช่น การปนเปื้อนมลพิษในแหล่งน้ำ การเสื่อมโทรมของดิน และการสูญเสียความหลากหลายทางชีวภาพ ส่งผลให้มีความเสี่ยงต่อสุขภาพของมนุษย์ การใช้แบคทีเรียที่เป็นประโยชน์ในการปลูกข้าวจึงเป็นทางเลือกหนึ่งในการลดปัญหาดังกล่าว ดังนั้นในการทดลองนี้จึงได้ทำการแยกแบคทีเรียจากดินรอบรากข้าว จากพื้นที่ปลูกข้าวแบบเกษตรอินทรีย์จำนวน 4 พื้นที่ในจังหวัดเชียงใหม่ ได้แก่ อำเภอแม่วาง 2 พื้นที่ อำเภอแม่แตง 1 พื้นที่ และอำเภอพร้าว 1 พื้นที่ ได้ไรโซแบคทีเรียจำนวน 56 ไอโซเลท ทำการคัดกรองเชื้อที่มีความสามารถตรึงไนโตรเจนและย่อยละลายฟอสเฟตเบื้องต้นเชิงคุณภาพบนอาหารแข็ง โดยคัดเลือกไอโซเลทที่มีความสามารถสูงได้ 13 ไอโซเลท ผลของการคัดกรองเชิงปริมาณในอาหารเหลวพบว่า ไอโซเลท RMW_4NF1 มีความสามารถในการตรึงไนโตรเจนสูงที่สุด รองลงมาคือ RMT_2NF4 (887.4 และ 822.9 นาโนโมล C_2H_4/หลอด/24 ชั่วโมง ตามลำดับ) และ RMW_4NF1 สามารถละลายฟอสเฟตได้สูงสุดถึง 181.46 มิลลิกรัม P/ลิตร เมื่อทำการประเมินการผลิต indole-3-acetic acid (IAA) พบว่า RMW_3NF4 สามารถผลิต IAA ได้สูงที่สุดรองลงมาคือ RMT_2NF4 (34.93 และ 31.05 มิลลิกรัม IAA/ลิตร ตามลำดับ) จากศักยภาพในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชทั้งหมดที่ได้ประเมินจึงได้คัดเลือกไอโซเลทได้จำนวน 6 ไอโซเลท คือ RMW_2Egg2, RMW_2Egg8, RMW_4Egg5, RMW_4NF1, RMT_2Egg2 และ RMT_2NF4 มาทดสอบประสิทธิภาพต่อการเจริญเติบโตและการดูดใช้ธาตุอาหารของต้นกล้าข้าว พบว่า การใช้ไรโซแบคทีเรียส่งเสริมการเจริญของต้นกล้าข้าวและการดูดใช้ธาตุอาหารเกือบทุกไอโซเลทให้ค่าสูงกว่ากรรมวิธีควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยที่ไอโซเลท RMT_2NF4 ให้ค่าการดูดใช้ไนโตรเจนและฟอสฟอรัสสูงกว่ากรรมวิธีควบคุม 214 และ 74 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ดังนั้นไอโซเลทนี้จึงมีศักยภาพสูงในการนำมาพัฒนาเป็นปุ๋ยชีวภาพสำหรับข้าว

คำสำคัญ: ข้าว ดินรอบรากพืช แบคทีเรียตรึงไนโตรเจน แบคทีเรียย่อยละลายฟอสเฟต

คำนำ

ข้าวเป็นธัญพืชที่อยู่ในวงศ์ Gramineae มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Oryza sativa* L. นอกจากข้าวจะเป็นอาหารหลักของชาวไทยแล้ว ข้าวยังถือว่าเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญยิ่งของประเทศไทย ในการผลิตข้าวนั้นเกษตรกรส่วนใหญ่ได้มีการใช้ปุ๋ยเคมีในปริมาณสูงในนาข้าวอย่างต่อเนื่องเป็นระยะเวลายาวนาน โดยเฉพาะปุ๋ยเคมีไนโตรเจนและฟอสฟอรัส จึงเป็นสาเหตุให้ความอุดมสมบูรณ์ของดินเสื่อมถอยลงมาก ดินมีสภาพเป็นกรดจัด ดินจับตัวกันเป็นก้อนแข็ง และทำให้จุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่ในดิน และสิ่งมีชีวิตอื่น ๆ มีจำนวนลดลงมาก อีกทั้งยังทำให้ต้นทุนในการผลิตเพิ่มสูงขึ้นตามไปด้วย นอกจากนี้ปุ๋ยเคมีไนโตรเจนที่ใช้ในนาข้าวมีการสูญเสียมากกว่า 50% จากกระบวนการต่าง ๆ เช่น volatilization, denitrification และ leaching ซึ่งเป็นสาเหตุให้เกิดปัญหามลพิษสู่สิ่งแวดล้อม นอกจากนี้การใช้ปุ๋ยเคมีไนโตรเจนมากเกินไปจะทำให้เกิดการปนเปื้อนของไนเตรทในแหล่งน้ำใต้ดิน (Wattanaphayapkul, 2015) ดังนั้นการประยุกต์ใช้แบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช จึงเป็นแนวทางเลือกหนึ่งที่เป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม นอกจากแบคทีเรียที่อยู่ภายในพืชที่สามารถส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชแล้ว มีแบคทีเรียอีกกลุ่มหนึ่งที่อาศัยอยู่ในดินบริเวณรอบรากพืช (rhizobacteria) ซึ่งมีความสามารถในการ ตรึงไนโตรเจน ละลายฟอสเฟต สร้างฮอร์โมนพืช หรือ กิจกรรมอื่น ๆ ที่ช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตพืชได้ และมักเรียกรวมกันว่า plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) สำหรับจุลินทรีย์กลุ่มที่ตรึงไนโตรเจนได้ก็เป็นแหล่งที่มาของไนโตรเจนในดินอีกแหล่งหนึ่ง โดยมีทั้งการตรึงไนโตรเจนแบบพึ่งพาอาศัยกันและการตรึงไนโตรเจนแบบอิสระ เช่น การตรึงไนโตรเจนของอะโซโตแบคเตอร์ซึ่งเป็นจุลินทรีย์อิสระที่มีอยู่ในดิน โดยไนโตรเจนที่ตรึงได้นั้นสามารถช่วยลดการใช้ปุ๋ยไนโตรเจนลงได้ (Mala, 2007) ปริมาณไนโตรเจนที่ตรึงได้อาจแตกต่างกันไปตามชนิดของจุลินทรีย์และสภาพแวดล้อมของดิน Yasari *et al.* (2008)

พบว่า จุลินทรีย์อิสระในดินสามารถตรึงไนโตรเจนได้ 10-20 กิโลกรัมไนโตรเจน /เฮกแตร์ จากงานวิจัยของ Wanchai and Ruangsangka (2014) พบว่าสามารถแยกแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพสูงสุดในการละลายฟอสเฟตได้ 2 ชนิด คือ *Burkhoderia* sp. และ *Pantoea dispersa* ส่งผลต่อการเจริญเติบโตของของข้าวพันธุ์ กข47 ทั้งในด้านความสูง จำนวนใบ ความยาวของราก และน้ำหนักแห้งของลำต้นในแต่ละตำรับมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และจากการวิจัยพบว่า เมื่อใส่เชื้อ *Brevibacillus borstelensis*, *Bacillus megaterium* และ *Brevibacillus agri* ซึ่งเป็นเชื้อแบคทีเรียที่สามารถผลิตกรดอินโดล-3-แอซีติก (indole-3-acetic acid: IAA) ซึ่งเป็นฮอร์โมนพืชกลุ่มออกซิน (auxin) โดยมีผลต่อการยืดขยายรากและการเจริญเติบโตของข้าว (Insalud *et al.,* 2015) การใช้แบคทีเรียบริเวณรอบรากพืชกลุ่ม PGPR ซึ่งรวมถึงกลุ่มที่สามารถตรึงไนโตรเจน ละลายฟอสฟอรัส และสร้างฮอร์โมนพืช จึงเป็นทางเลือกที่เหมาะสมและสามารถลดการใช้ปุ๋ยเคมีและลดปัญหามลพิษสู่สิ่งแวดล้อมได้ งานวิจัยนี้จึงทำการแยกไรโซแบคทีเรียจากดินบริเวณรอบรากข้าว ทำการคัดกรองไรโซแบคทีเรียที่มีความสามารถในการตรึงไนโตรเจน คัดเลือกแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนมาประเมินศักยภาพในการละลายฟอสเฟต การสร้าง IAA แล้วจึงมีนำมาทดสอบประสิทธิภาพของไรโซแบคทีเรียในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของข้าวในระยะต้นกล้า เพื่อสามารถคัดเลือกแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพสูงในการประยุกต์ใช้ส่งเสริมการเจริญเติบโตของข้าวในสภาพแปลงต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

การแยกแบคทีเรียจากดินบริเวณรอบรากข้าว

ทำการแยกแบคทีเรียจากดินบริเวณรอบรากข้าว (rhizosphere soils) จากพื้นที่ปลูกข้าวแบบเกษตรอินทรีย์ จำนวน 4 พื้นที่ในจังหวัดเชียงใหม่ ได้แก่ อำเภอแม่วาง 2 พื้นที่ อำเภอแม่แตง 1 พื้นที่ และอำเภอพร้าว 1 พื้นที่ โดยทำการสุ่มเก็บดินบริเวณ rhizosphere พื้นที่ละ 2 ตัวอย่าง ยกเว้นอำเภอพร้าว 1 ตัวอย่าง รวมทั้งหมด 7 ตัวอย่าง ทำการแยกเชื้อด้วยวิธี soil dilution plate method โดยเจือจางที่ระดับ 10^{-1}-10^{-5} จากนั้น ดูดสารละลายดินที่มีความเข้มข้น 10^{-3}, 10^{-4} และ 10^{-5} ความเข้มข้นละ 0.1 มิลลิลิตร นำมาเกลี่ยลงบนผิวอาหารให้สม่ำเสมอโดยวิธี spread plate technique บนอาหาร 2 ชนิด ได้แก่ egg albumin agar (glucose 1.0 กรัม, egg albumin 0.25 กรัม, K_2HPO_4 0.5 กรัม, $MgSO_4.7H_2O$ 0.2 กรัม, $Fe_2(SO_4)_3.9H_2O$ 0.01 กรัม, agar 15 กรัม และ Burk's N-Free medium (Wilson and Knight, 1952) อาหารสองชนิดนี้ใช้สำหรับใช้แยกเชื้อแบคทีเรียทุกกลุ่ม และแบคทีเรียที่ตรึงไนโตรเจน ตามลำดับ บ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน จากนั้นทำการคัดเลือกโคโลนีที่เจริญบนอาหารที่มีลักษณะแตกต่างกัน และทำให้บริสุทธิ์โดยวิธีการ streak plate บนอาหาร nutrient agar (NA) (nutrient broth (NB) ชนิดผงสำเร็จรูป 13 กรัม, agar 15 กรัม ปรับ pH เท่ากับ 7.0 ± 0.2 แล้วปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร)

การคัดกรองแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนและแบคทีเรียย่อยละลายฟอสเฟต

นำแบคทีเรียที่คัดแยกให้บริสุทธิ์ได้ทั้งหมด มาเพิ่มปริมาณเพื่อทำการคัดกรองความสามารถเชิงคุณภาพในการตรึงไนโตรเจนและละลายฟอสเฟต ด้วยวิธี drop plate technique โดยนำสารละลายเชื้อแบคทีเรียแต่ละไอโซเลท ปริมาตร 0.02 มิลลิลิตร หยดลงบนอาหาร Burk's N-free medium และ Czapek's agar (sucrose 30 กรัม, $NaNO_3$ 2 กรัม, $Ca_3(PO_4)_2$ 0.9 กรัม, KCl 1.36 กรัม, $MgSO_4.7H_2O$ 0.50 กรัม, $FeSO_4.7H_2O$ 0.01 กรัม, Congo red 0.25% 10 มิลลิลิตร, agar 15 กรัม ปรับ pH เท่ากับ 7.3 ± 0.2 แล้วปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร) เชื้อละ 3 ซ้ำ บ่มที่อุณหภูมิ 28-30 °C เป็นเวลา 7 วัน คัดเลือกเชื้อที่เจริญได้ดีทั้งบนอาหาร Burk's N-free medium และ เชื้อที่เจริญได้ดีและทำให้เกิดวงใสรอบโคโลนี (clear zone) บน Czapek's agar ได้มาก เพื่อใช้ในการทดลองขั้นต่อไป โดยคำนวณค่าประสิทธิภาพการย่อยละลายฟอสเฟต (clear zone ratio) เชื้อแบคทีเรียใดให้ค่าเฉลี่ยของ clear zone ratio สูง แสดงว่ามีกิจกรรมการละลายฟอสเฟตได้ดี คัดเลือกมาทดสอบประสิทธิภาพการละลายฟอสเฟตในอาหารเหลวต่อไป

การประเมินความสามารถเชิงปริมาณในการตรึงไนโตรเจนของแบคทีเรีย

คัดเลือกแบคทีเรียที่เจริญได้ดีจากวิธี drop plate technique มาทำการประเมินความสามารถในการตรึงไนโตรเจน โดยวิธี acetylene reduction assay (ARA) ตามวิธีของ Weaver and Danso (1994) โดยเลี้ยงเชื้อในหลอดทดลองที่มีอาหารวุ้นเอียง (agar slant) 5 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน เมื่อครบกำหนดเปลี่ยนฝาหลอดทดลองให้เป็นจุกยาง เพื่อดูดอากาศภายในออก 10% ของปริมาตรส่วนช่องว่างที่เหลือ เมื่อดูดอากาศออกแทนที่ด้วยก๊าซ acetylene ในปริมาตรที่เท่ากัน บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 24 ชั่วโมง แล้วอ่านค่า ethylene (C_2H_4) ที่เกิดจากการ reduce ก๊าซ acetylene (C_2H_2) จากกิจกรรมของเอนไซม์ไนโตรจีเนส (nitrogenase) โดยใช้เครื่อง gas chromatography (GC) ตัวอย่างเชื้อที่สามารถทำให้เกิดก๊าซ ethylene (C_2H_4) นำพื้นที่ใต้กราฟไปคำนวณหาปริมาณก๊าซ ethylene (C_2H_4) (Somasegaran and Hoben, 1994) ที่เกิดขึ้น

การประเมินความสามารถเชิงปริมาณในการละลายฟอสเฟตของแบคทีเรีย

นำเชื้อที่แยกได้ทั้งหมดจากการประเมินศักยภาพเชิงคุณภาพ มาทดสอบความสามารถในการละลายฟอสเฟต โดยเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวในขวด Erlenmeyer flask ขนาด 50 มิลลิลิตร ที่บรรจุ Pikovskaya (PVK) medium (Surange *et al*., 2013) 25 มิลลิลิตร นำไปบ่มโดยเขย่าด้วยความเร็ว 125 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3 วัน ทำการวิเคราะห์ปริมาณฟอสฟอรัส ดัดแปลงจากวิธีของ Gaur (1990) โดยแยกเซลล์เชื้อแบคทีเรียออกโดยปั่นเหวี่ยงที่ 4,500 rpm 10 นาที นำส่วนสารละลายใส (supernatant) มาวัดปริมาณฟอสฟอรัสโดยใช้เครื่อง spectrophotometer ที่ wavelength 820 นาโนเมตร และ ทำการลบค่าดูดกลืนแสงของชุดควบคุมที่ไม่มีเชื้อแบคทีเรียจากทุกตัวอย่างก่อนการคำนวณ

การประเมินความสามารถในการผลิต indole 3-acetic acid (IAA) ของแบคทีเรีย

นำเชื้อที่คัดเลือกได้ทั้งหมดมาทดสอบการผลิตฮอร์โมนพืชโดยการวัดปริมาณ IAA ดัดแปลงจากวิธีของ Gorden and Weber (1951) โดยการเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ในอาหาร nutrient broth (NB) 25 มิลลิลิตร ที่ไม่เติม L-tryptophan และเติม L-tryptophan 0.2 กรัม/ลิตร ซึ่งเป็นสารตั้งต้นของ IAA ลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อด้วย หลังจากนั้นจึงทำการบ่มเชื้อดังกล่าวที่อุณหภูมิห้อง เขย่าด้วยความเร็ว 125 รอบต่อนาที วัดปริมาณ IAA ที่เกิดขึ้นหลังจากบ่มเป็นระยะเวลา 3 วัน ซึ่งจะทำการวัด IAA ที่เกิดขึ้นใน supernatant โดยใช้เครื่อง spectrophotometer ที่ wavelength 530 นาโนเมตร ทำการลบค่าดูดกลืนแสงของชุดควบคุมที่ไม่มีเชื้อแบคทีเรียจากทุกตัวอย่าง คำนวณโดยเปรียบเทียบกับชุดสารละลายมาตรฐาน IAA 0, 10, 20, 50, 100 และ 150 μM

การทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียต่อการเจริญเติบโตของต้นกล้าข้าว

พันธุ์ข้าวที่ใช้ในการทดลองนี้ คือ พันธุ์สันป่าตอง 1 ก่อนการเพาะเมล็ดทำการฆ่าเชื้อที่ผิวเมล็ดข้าวโดยแช่ใน สารละลาย 3% hydrogen peroxide เป็นเวลา 3 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง หลังจากนี้ทำการเพาะด้วยการห่อเมล็ดข้าวด้วยผ้าขาวบางที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว นำผ้าขาวบางที่ห่อเมล็ดข้าวไปแช่ในน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว เมื่อครบ 24 ชั่วโมง รินน้ำกลั่นออก ทิ้งไว้อีก 48 ชั่วโมง จึงคัดเลือกเฉพาะเมล็ดข้าวที่มีส่วนรากและส่วนใบเท่ากันมาทำการทดลอง สำหรับเชื้อแบคทีเรียที่ใช้ในการทดลองนี้คัดเลือกจากแบคทีเรียที่มีศักยภาพสูงในการตรึงไนโตรเจน ละลายฟอสเฟต และสร้างสารส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช มาทดสอบประสิทธิภาพในการเจริญเติบโตของข้าวในห้องที่มีการควบคุมอุณหภูมิและแสง (ช่วงแสง:ช่วงมืด 12:12 อุณหภูมิ 25°C ภายใต้ความเข้มแสงประมาณ 5.8 klux) โดยทำการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือก ในอาหาร NB ให้ได้ปริมาณเชื้อสูงสุด ($\approx 10^9$ CFU/g) แล้วเจือจางด้วยน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว อัตรา 1:50 (v/v) แช่เมล็ดข้าวที่ได้ทำการเพาะไว้จนมีรากงอกแล้วประมาณ 1 เซนติเมตร ในสารละลายเชื้อเจือจาง

นี้ เป็นเวลา 2 ชั่วโมง หลังจากนั้นปลูกลงภาชนะที่ประกอบเหมือน Leonard jar (Somasegaran and Hoben, 1994) โดยภาชนะบนบรรจุทรายที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้วปริมาตร 300 มิลลิลิตร และภาชนะล่างบรรจุสารละลายอาหารที่ปราศจากไนโตรเจน (N-free nutrient solution) (Punyadoung, 2007) โดยมีไส้ตะเกียงฝ้ายใส่ระหว่างกลางของภาชนะบนและล่างเพื่อให้สารละลายอาหารดูดซึมไปยังทรายที่ปลูกพืชได้ เติม N-free nutrient solution ภาชนะด้านล่างให้มีระดับที่เหมาะสมตลอดระยะเวลาการทดลอง โดยทำการปลูกภาชนะละ 3 ต้น วางแผนการทดลองแบบ randomized complete block design (RCBD) ทำการทดลอง 3 ซ้ำ ซ้ำละ 9 ต้น เมื่อครบ 30 วัน บันทึกการเจริญเติบโตของกล้าข้าว โดยทำการวัด ความสูงของต้นจากโคนต้นถึงปลายยอดที่ยาวที่สุด วัดความยาวรากจากโคนต้นถึงปลายรากที่ยาวที่สุดของแต่ละต้น ชั่งน้ำหนักสดของต้นและราก น้ำหนักแห้งของต้นและราก และทำการวิเคราะห์ความเข้มข้นของธาตุไนโตรเจน (% total N) และ ฟอสฟอรัส (% total P) ตามวิธีการของ Siwasilp (1984) โดยเปรียบเทียบกรรมวิธีที่ใส่เชื้อแบคทีเรียกับกรรมวิธีควบคุมซึ่งใช้น้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อแทนการใช้เชื้อแบคทีเรีย นำผลไปคำนวณหาการดูดใช้ธาตุอาหารในต้นข้าว ดังนี้ (น้ำหนักแห้ง x ความเข้มข้นของธาตุอาหาร)/100

วิเคราะห์ความแปรปรวนของข้อมูล โดยวิธี analysis of variance (ANOVA) และเปรียบเทียบความแตกต่างค่าเฉลี่ยของกรรมวิธีทดลองโดยวิธี least significant difference (LSD) ที่ค่าความเชื่อมั่น 95% โดยใช้โปรแกรม Statisti for Window version 8

ผลการศึกษา

การแยกแบคทีเรียจากดินบริเวณรอบรากข้าว

การแยกเชื้อจากดินรอบรากข้าวทั้งหมด 4 พื้นที่ สามารถแยกโคโลนีแบคทีเรียที่แตกต่างกันได้ทั้งหมด 94 ไอโซเลท โดยคัดแยกได้จากอาหาร egg albumin agar ได้ทั้งหมด 64 ไอโซเลท จากอาหาร Burk's N-free medium ได้ทั้งหมด 30 ไอโซเลท เมื่อนำไอโซเลทที่แยกได้เบื้องต้นทั้งหมดมาทำให้บริสุทธิ์อีกครั้งในอาหาร NA พบว่ามีเพียง 56 ไอโซเลทเท่านั้นที่สามารถเจริญบนอาหาร NA ได้ดี โดยคิดเป็น 59% ของแบคทีเรียที่คัดแยกได้ทั้งหมด (Table 1) จึงนำไปใช้ทดสอบในขั้นต่อไป

การคัดกรองแบคทีเรียที่มีศักยภาพในการตรึงไนโตรเจนและย่อยละลายฟอสเฟต

นำแบคทีเรีย 56 ไอโซเลท ที่เจริญได้ดีในอาหาร NA ไปทดสอบความสามารถในการตรึงไนโตรเจนและการย่อยละลายฟอสเฟตเบื้องต้น พบว่ามีแบคทีเรียที่สามารถ

Table 1. Rhizobacteria isolated from rice rhizosphere soil of four locations in Chiang Mai

Locations (Chiang Mai)	Isolate code	Number of isolate		Number of isolate showing good growth on nutrient agar
		Egg albumin agar	Burk's N-free medium	
Mae Wang 1	RMW_1	8	4	12
	RMW_2	12	5	
Mae Wang 2	RMW_3	6	4	18
	RMW_4	7	7	
Mae Taeng	RMT_1	9	1	20
	RMT_2	10	5	
Phrao	RP	12	4	6
	Total	64	30	56

เจริญได้บนอาหาร Burk's N-free medium จำนวน 48 ไอโซเลท และแบคทีเรียทั้งหมด 56 ไอโซเลท สามารถขึ้นได้บนอาหาร Czapek's agar แต่ไอโซเลทที่สามารถเจริญได้ดีบนอาหารทั้งสองชนิดและสังเกตเห็น clear zone รอบโคโลนีได้มากและชัดเจนบนอาหาร Czapek's agar (Figure 1) ซึ่งแสดงถึงความสามารถในการย่อยละลายฟอสเฟตได้ดีนั้นมีเพียง 13 ไอโซเลท คิดเป็น 23.2% ของไอโซเลท ที่ทดสอบ โดยผลการวัด clear zone ratio พบว่าค่าอยู่ในช่วง 1.11-4.00 โดยที่ไอโซเลทที่ย่อยละลายฟอสเฟตบนอาหารแข็งได้ดีที่สุด คือ RPEgg10 ให้ค่า clear zone กว้างที่สุด คือ 4.00 และไอโซเลท RMT_2Egg2 ให้ค่า clear zone น้อยที่สุด คือ 1.11 (ไม่ได้แสดงผลทั้งหมด) ดังนั้นจึงเลือกแบคทีเรีย 13 ไอโซเลทนี้เพื่อทำการทดสอบขั้นต่อไป

ศักยภาพเชิงปริมาณในการตรึงไนโตรเจนของแบคทีเรีย

ผลการทดสอบความสามารถในการตรึงไนโตรเจนของแบคทีเรียคัดเลือก 13 ไอโซเลท โดยวิธี acetylene reduction assay (ARA) พบว่าสามารถตรึงไนโตรเจนอยู่ในช่วง 498.6-887.4 นาโนโมล C_2H_4/หลอด/24 ชั่วโมง (Table 2) โดย RMW_4NF1 มีปริมาณการตรึงไนโตรเจนสูงที่สุด 887.4 นาโนโมล C_2H_4/หลอด/24ชั่วโมง และสูงกว่าไอโซเลทอื่น อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ รองลงมาได้แก่ RMT_2NF4 มีความสามารถตรึงได้สูง 822.9 นาโนโมล C_2H_4/หลอด/24ชั่วโมง ส่วนไอโซเลท RMW_3NF3 มีการตรึงไนโตรเจนน้อยที่สุด 498.6 นาโนโมล C_2H_4/หลอด/24ชั่วโมง

ศักยภาพเชิงปริมาณในการย่อยละลายฟอสเฟตของแบคทีเรีย

เมื่อนำแบคทีเรียคัดเลือก 13 ไอโซเลท มาทดสอบความสามารถเชิงปริมาณในการย่อยละลายฟอสเฟต ในอาหาร PVK broth ที่มี $Ca_3(PO_4)_2$ เป็นแหล่งฟอสเฟต พบว่าแบคทีเรียที่คัดเลือก 13 ไอโซเลท สามารถแบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่ม กลุ่มแรกสามารถละลายฟอสเฟตได้มากกว่า 100 มิลลิกรัม P/ลิตร โดยผลิตได้อยู่ในช่วง 111.2-181.4 มิลลิกรัม P/ลิตร กลุ่มที่สองผลิตได้น้อยกว่า 100 มิลลิกรัม P/ลิตร โดยผลิตได้อยู่ในช่วง 37.8-94.3 มิลลิกรัม P/ลิตร โดยที่ RMW_4NF1 มีปริมาณการย่อยละลายฟอสเฟตสูงที่สุดคือ 181.4 มิลลิกรัม P/ลิตร โดยมีค่าสูงกว่าไอโซเลทอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และ RMW_3NF3 ย่อยละลายฟอสเฟตได้น้อยที่สุดคือ 37.8 มิลลิกรัม P/ลิตร (Table 2)

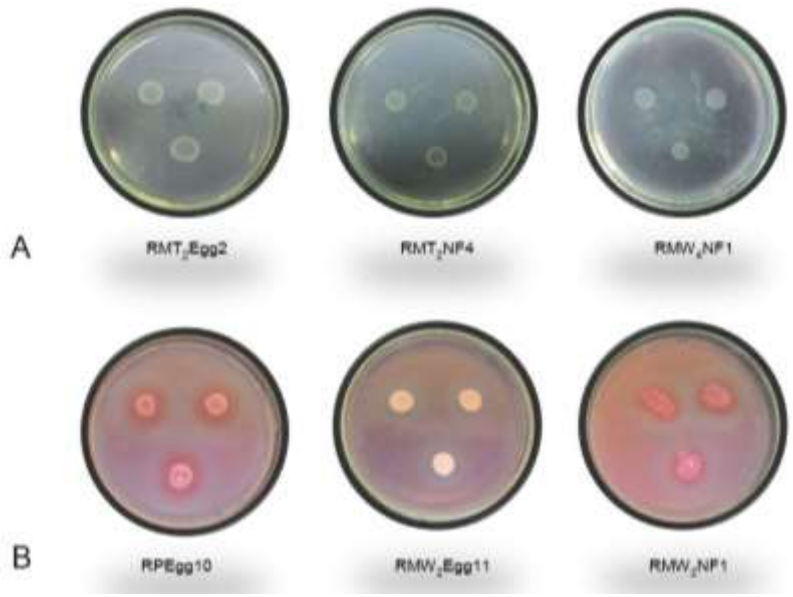

Figure 1. Examples of some bacterial isolates that showed good growth on Burk's N-free medium (A) and Czapek's agar with wide clear zones (B)

Table 2. Abilities of selected bacterial isolates in nitrogen fixation (nitrogenase activity) and phosphate solubilization

Isolate	Nitrogenase activity[1] (nmol C_2H_4/tube/24hr)	Phosphate solubilizing activity[1] (mg P/L)
RMW_1NF2	525.3h	132.7c
RMW_1NF3	531.2gh	113.0e
RMW_2Egg2	611.9e	81.1g
RMW_2Egg8	602.3e	94.3f
RMW_2Egg11	498.6i	39.6i
RMW_2NF1	552.3fg	111.5e
RMW_3NF3	524.7h	37.8i
RMW_3NF4	576.2f	68.3h
RMW_4Egg5	698.6d	146.6b
RMW_4NF1	887.4a	181.4a
RMT_2Egg2	744.1c	125.8d
RMT_2NF4	822.9b	126.4d
RPEgg10	482.5i	111.2e
F-test	*	*
CV (%)	2.45	1.93

[1]Mean values followed by the same letter are not significantly different at $P<0.05$ by LSD

ศักยภาพเชิงปริมาณในการผลิต IAA ของแบคทีเรีย

ทำการทดสอบความสามารถในการผลิตฮอร์โมนพืชโดยการวัดปริมาณ IAA โดยการนำแบคทีเรียคัดเลือก 13 ไอโซเลท มาเลี้ยงในอาหาร NB ที่ไม่เติม L-tryptophan พบว่า สามารถผลิต IAA อยู่ในช่วง 0.13-14.45 มิลลิกรัม IAA/ลิตร โดยไอโซเลทที่ผลิตได้มากที่สุด คือ RMT_2NF4 มีค่าการผลิต IAA เท่ากับ 14.45 มิลลิกรัม IAA/ลิตร และไอโซเลทที่ผลิตได้น้อยที่สุด คือ RMW_1NF2 มีค่าการผลิต IAA เท่ากับ 0.13 มิลลิกรัม IAA/ลิตร และเมื่อเติม L-tryptophan 0.2 กรัม/ลิตร พบว่า แบคทีเรียสามารถผลิต IAA อยู่ในช่วง 0.62-34.93 มิลลิกรัม IAA/ลิตร โดยไอโซเลทที่ผลิตได้มากที่สุด คือ RMW_3NF4 มีค่าการผลิต IAA เท่ากับ 34.93 มิลลิกรัม IAA/ลิตร และไอโซเลทที่ผลิตได้น้อยที่สุด คือ RMW_2NF1 มีค่าการผลิต IAA เท่ากับ 0.62 มิลลิกรัม IAA/ลิตร (Figure 2)

การทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียต่อการเจริญเติบโตของต้นกล้าข้าวและการดูดใช้ธาตุอาหาร

การทดลองนี้ใช้สารละลายที่ปราศจากไนโตรเจนในการทดสอบการเจริญเติบโตของต้นกล้าข้าว โดยคัดเลือกแบคทีเรียที่มีศักยภาพสูงในการตรึงไนโตรเจน (Table 2) เพื่อทดสอบประสิทธิภาพต่อการเจริญเติบโตของต้นกล้าข้าวและการดูดใช้ธาตุอาหารในห้องปฏิบัติการได้ 6 ไอโซเลท ได้แก่ RMW_2Egg2, RMW_2Egg8, RMW_4Egg5, RMW_4NF1, RMT_2Egg2 และ RMT_2NF4 ผลการทดลองพบว่า การใช้เชื้อไรโซแบคทีเรียคัดเลือกทำให้การเจริญเติบโตของต้นกล้าข้าวและรากดีกว่ากรรมวิธีควบคุม อย่างชัดเจน (Figure 3) เมื่อวัดการเจริญเติบโตของต้นกล้าข้าว พบว่า กรรมวิธีที่แช่เมล็ดด้วยเชื้อแบคทีเรียทุกไอโซเลทให้ค่าความสูงต้นและความยาวรากกว่ากรรมวิธีควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ยกเว้นการใส่เชื้อ RMW_2Egg8) โดยที่การใส่เชื้อ

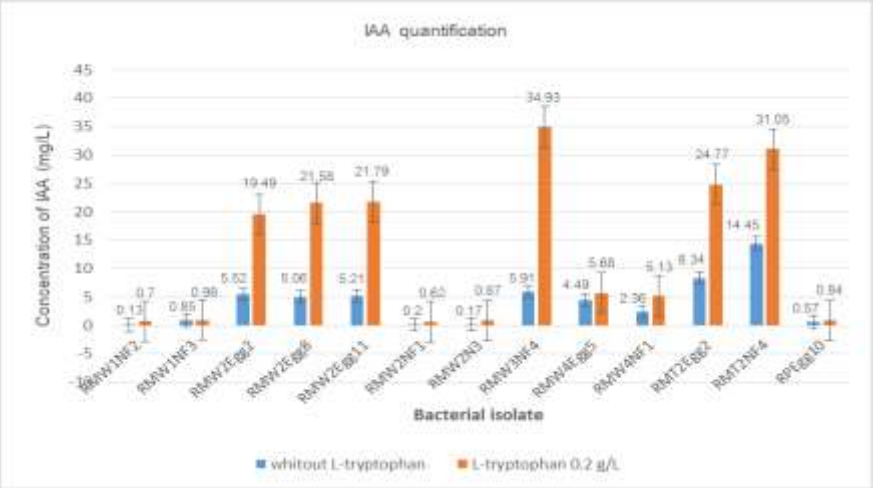

Figure 2. Concentration of IAA produced by selected bacterial isolates in NA medium with and without L-tryptophan

Figure 3. Rice seedlings inoculated with selected rhizobacteria (30 days after planting); Control (A), RMW_2Egg2 (B), RMW_2Egg8 (C), RMW_4Egg5 (D), RMW_4NF1 (E), RMT_2Egg2 (F) and RMT_2NF4 (G)

RMW_4NF1 ให้ค่าความสูงต้นกล้ามากที่สุด รองลงมาได้แก่ RMT_2NF4 และ RMW_2Egg8 ตามลำดับ (30.28, 29.83 และ 29.24 เซนติเมตร ตามลำดับ) และ การใส่เชื้อ RMW_4NF1 ก็ให้ค่าความยาวรากมากที่สุดเช่นกัน (17.56 เซนติเมตร) รองลงมาได้แก่ RMT_2NF4 และ RMW_4Egg5 ตามลำดับ (17.54 และ 16.04 เซนติเมตร ตามลำดับ) (Table 3) อย่างไรก็ตามพบว่าการใส่เชื้อ RMT_2NF4 ให้ค่าน้ำหนักสดของต้นและราก (8.61 และ 13.43 กรัม/ต้น ตามลำดับ) รวมทั้งน้ำหนักแห้งของต้นและราก (1.77 และ 1.18 กรัม/ต้น ตามลำดับ) สูงกว่ากรรมวิธีอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ทุกกรรมวิธีที่ใส่เชื้อให้ค่า N uptake และ P uptake สูงกว่ากรรมวิธีควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยที่การใส่เชื้อ RMT_2NF4 ให้ค่า N uptake และ P uptake (36.29 และ 1.95 มิลลิกรัม/ต้น ตามลำดับ) สูงที่สุด

Table 3. Effect of bacterial inoculation on growth and nutrients content of rice seedlings at 30 day after planting

Treatment	Root length[1] (cm)	Plant height[1] (cm)	Fresh weight[1] (g/9 plants)[2]		Dry weight[1] (g/9 plants)[2]		N uptake[1] (mg/9 plants)[2]	P uptake[1] (mg/9 plants)[2]
			Root	Leaves	Root	Leaves		
Control	15.39d	25.57g	6.94g	5.33g	0.64g	1.12f	11.54g	1.12c
RMW_2Egg2	15.56c	26.73f	8.01f	6.56f	0.74f	1.30e	23.79c	1.45b
RMW_2Egg8	15.26e	29.24c	11.24b	8.06b	1.02b	1.63b	25.27b	1.63b
RMW_4Egg5	16.04b	27.90e	10.49d	6.99d	0.93c	1.49c	18.18e	1.49b
RMW_4NF1	17.56a	30.28a	10.79c	7.87c	0.88d	1.63b	22.17d	1.63b
RMT_2Egg2	16.02b	28.43d	9.88e	6.74e	0.84e	1.32d	17.42f	1.45b
RMT_2NF4	17.54a	29.83b	13.43a	8.61a	1.18a	1.77a	36.29a	1.95a
F-test	*	*	*	*	*	*	*	*
CV (%)	0.13	0.07	0.31	0.38	2.01	1.99	3.6	7.5

[1]Mean values followed by the same letter are not significantly different at $P<0.05$ by LSD

[2]There were 9 seedlings per treatment

วิจารณ์

การศึกษาวิจัยไรโซแบคทีเรียในพืชหลายชนิด เช่น อ้อย (Yiam-on *et al.*, 2012) และข้าว (Maruekarajtinplaeng, 2014; Patel and Desai, 2015) พบว่า มีความสามารถในการตรึงไนโตรเจน และ/หรือย่อยละลายฟอสเฟตได้และอาจเป็นทางเลือกที่ดีเพื่อลดหรือทดแทนการใช้ปุ๋ยเคมี ผลการทดลองครั้งนี้สอดคล้องกับผลการทดลองที่ได้มีการรายงานมา โดยไรโซแบคทีเรียที่แยกได้สามารถขึ้นในอาหารแข็งที่ปราศจากไนโตรเจน (Burk's N-free medium) ได้ประมาณครึ่งหนึ่งของไอโซเลทที่แยกได้ทั้งหมด (48/94 ไอโซเลท) และ ทุกไอโซเลทมีความสามารถในการย่อยละลายฟอสเฟตได้ เมื่อคัดเลือกเฉพาะไอโซเลทที่มีศักยภาพสูงในการตรึงไนโตรเจนและย่อยละลายฟอสเฟตในอาหารแข็ง (13 ไอโซเลท) มายืนยันศักยภาพการตรึงไนโตรเจนโดยวิธี ARA พบว่า RMW_4NF1 และ RMT_2NF4 มีความสามารถตรึงไนโตรเจนได้สูงมากคือ 887.4 และ 822.9 นาโนโมล C_2H_4/หลอด/24 ชั่วโมง ตามลำดับ Koomnok *et al.* (2007) ได้แยกแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนจากข้าว โดยสรุปว่ากิจกรรมของเอนไซม์ไนโตรจีเนสที่วัดโดยวิธี ARA ถือว่าอยู่ในเกณฑ์สูงหากมีค่า >100 นาโนโมล C_2H_4/หลอด/24ชั่วโมง ส่วนงานวิจัยของ Jatupornphipat *et al.* (2011) นำแบคทีเรียที่แยกได้มาทดสอบประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจนด้วยวิธี ARA พบว่า ไอโซเลท SC05N2518 มีประสิทธิภาพในการตรึงไนโตรเจนสูงสุดซึ่งมีค่าเท่ากับ 350.64 นาโนโมล C_2H_4 ต่อมิลลิลิตรของก๊าซตัวอย่าง ในการทดลองนี้นอกจากไอโซเลท RMW_4NF1 และ RMT_2NF4 จะมีความสามารถตรึงไนโตรเจนได้สูงแล้วยังสามารถย่อยละลายฟอสเฟตได้สูงอีกด้วย (181.4 และ 126.4 mg P/L ตามลำดับ) ความสามารถของแบคทีเรียในการย่อยละลายฟอสเฟต สอดคล้องกับงานวิจัยของ El-Komy (2005) ซึ่งรายงานว่า *Pseudomonas fluorescens* และ *Bacillus megaterium* สามารถละลายฟอสเฟต ได้เท่ากับ 126.6 และ 106.5 มิลลิกรัม P/ลิตร ตามลำดับ จะเห็นได้ว่าการแยกแบคทีเรียจากบริเวณรอบรากมาส่งผลให้ได้แบคทีเรียที่มีความสามารถในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช เนื่องจากดินบริเวณไรโซสเฟียร์โดยทั่วไปจะมีความหลากหลายของกลุ่มประชากรจุลินทรีย์แปรผันมากกว่าดินที่ไม่มีการปลูกพืช (Marschner *et al.*, 2001)

นอกจากความสามารถตรึงไนโตรเจนและย่อยละลายฟอสเฟตได้แล้ว ไรโซแบคทีเรียไอโซเลทคัดเลือก

(13 ไอโซเลท) ทุกไอโซเลทยังสามารถผลิตฮอร์โมนพืช IAA ได้ ถึงแม้จะไม่มีการเติม L-tryptophan ซึ่งเป็นสารตั้งต้นในการผลิต IAA ก็ตาม อย่างไรก็ตามเมื่อมีการเติม L-tryptophan พบว่าทุกไอโซเลทสามารถผลิต IAA ได้มากขึ้นอย่างชัดเจนแต่มีบางไอโซเลทเท่านั้นมีสามารถผลิตได้ในปริมาณสูงโดดเด่นมากกว่าไอโซเลทอื่น โดยเฉพาะไอโซเลท RMW_3NF4 และ RMT_2NF4 (34.93 และ 31.05 มิลลิกรัม IAA/ลิตร ตามลำดับ) ในการผลิต IAA ของแบคทีเรียนั้นโดยทั่วไปแล้วต้องการ Tryptophan เป็นสารตั้งต้น ซึ่งกลไกการสังเคราะห์ IAA ในแบคทีเรียมีหลายแบบ นอกจากนี้ยังพบจุลินทรีย์บางกลุ่มที่ผลิต IAA ได้โดยไม่ต้องการ Tryptophan (Sarin *et al*., 2013) ปริมาณการผลิต IAA มีความแตกต่างกันออกไปในแต่ละไอโซเลท จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่ามีจุลินทรีย์หลายชนิดที่แยกได้จากดินบริเวณรอบรากพืชมีความสามารถผลิต IAA ได้ จากการศึกษาของ Ahmad *et al*. (2008) พบว่า *Azotobacter* และ *Pseudomonas* ผลิต IAA อยู่ในช่วง 2.13-3.6 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ *P. putida* และ *Trichoderma atroviride* สามารถผลิต IAA อยู่ในช่วง 3.3-6.2 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร Gravel *et al*. (2007) แสดงความคิดเห็นว่า การนำเอาไรโซแบคทีเรียไปประยุกต์ใช้กับพืช ก็มีความเป็นไปได้ที่ไรโซแบคทีเรียยังสามารถผลิต IAA ได้ เนื่องจากสารประกอบบางชนิดที่พืชขับออกมาจากราก (plant root exudates) มี L-tryptophan รวมอยู่ด้วย ดังนั้นจุลินทรีย์จึงสามารถผลิต IAA ได้โดยใช้สารตั้งต้นนี้ โดยตัวอย่างของผลการวิจัยพบว่าสารประกอบที่ขับออกมาจากรากของต้นกล้ามะเขือเทศและหัวผักกาดแดงมีปริมาณ L-tryptophan 2.8-5.3 และ 290-390 นาโนกรัม/กล้า/วัน ตามลำดับ (Kravchenko *et al*., 2004)

ผลของการใช้ไรโซแบคทีเรียคัดเลือก (6 ไอโซเลท) กับต้นกล้าข้าวแสดงให้เห็นว่า เชื้อแต่ละไอโซเลทให้ผลต่อการเจริญเติบโตและการดูดใช้ธาตุอาหารแตกต่างกัน ไอโซเลท RMW_4NF1 และ RMT_2NF4 ซึ่งมีความสามารถในการตรึงไนโตรเจนได้สูง ส่งเสริมให้ต้นกล้าข้าวมีการเจริญเติบโตทางรากและต้นเหนือดิน โดยเฉลี่ยสูงกว่าการใช้ไอโซเลทอื่น นอกจากนี้ RMT_2NF4 ยังส่งผลให้ต้นกล้าข้าวมีการดูดใช้ไนโตรเจนและฟอสฟอรัสได้สูงที่สุดอีกด้วย ถึงแม้ว่า RMW_4NF1 จะมีความสามารถการตรึงไนโตรเจนได้สูงกว่า RMT_2NF4 แต่ทำให้ต้นกล้าข้าวมีการดูดใช้ไนโตรเจนต่ำกว่า RMT_2NF4 ซึ่งแสดงให้เห็นว่า ปฏิสัมพันธ์ระหว่างพืชกับจุลินทรีย์น่าจะเป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่ทำให้ประสิทธิภาพในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชโดยจุลินทรีย์แตกต่างกัน จากการทดลองครั้งนี้ พบว่า ทุกกรรมวิธี มีค่าเปอร์เซ็นต์ความเข้มข้นของฟอสฟอรัสที่ไม่แตกต่างกันโดยมีค่า 0.10-0.11 เปอร์เซ็นต์ (ไม่ได้แสดงผล) แต่ผลของการดูดใช้ฟอสฟอรัสที่มีความแตกต่างกันนั้นเกิดจากชีวมวลของต้นกล้าข้าวเพิ่มสูงขึ้นจากประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจนของแบคทีเรีย ซึ่งทำให้ต้นกล้าข้าวมีการใช้ฟอสเฟตจาก N free nutrient solution ที่มีฟอสเฟตในรูปที่ใช้ประโยชน์ได้ (KH_2PO_4) เพิ่มสูงขึ้นตามการเจริญเติบโตที่เพิ่มขึ้น ถึงแม้ว่า กรรมวิธีควบคุมนั้นไม่มีการใช้เชื้อไรโซแบคทีเรียให้กับต้นกล้าข้าวแต่พบว่ามีการดูดใช้ไนโตรเจน (ประมาณครึ่งหนึ่งของกรรมวิธีที่ใส่เชื้อ) ซึ่งไม่มีในสารละลายอาหาร จึงอาจกล่าวได้ว่าไนโตรเจนในกรรมวิธีควบคุมนั้นได้มาจากเมล็ด โดยที่เมล็ดข้าวมีความเข้มข้นของไนโตรเจนระหว่าง 1.27-1.53% (In-nok *et al*., 2016; Yesuf and Balcha, 2014) ส่วนการดูดใช้ฟอสฟอรัสของต้นกล้าข้าวในกรรมวิธีควบคุมนั้นได้มาจาก 2 แหล่ง คือ เมล็ดข้าวซึ่งมีความเข้มข้นของฟอสฟอรัส 0.2-0.57% (In-nok *et al*., 2016; Malav and Ramani, 2016) และ KH_2PO_4 ที่เป็นส่วนผสมของ N-Free medium ผลของการดูดใช้ฟอสเฟตที่แตกต่างกันของทั้งกรรมวิธีควบคุมและการใส่เชื้อแบคทีเรียจึงไม่ได้เกิดจากประสิทธิภาพการละลายฟอสเฟตของแบคทีเรีย ดังนั้นจึงควรมีการทดลองในกระถางและมีกรรมวิธีที่ใส่แหล่งของฟอสเฟตที่อยู่ในรูปที่ไม่เป็นประโยชน์หรือเป็นประโยชน์น้อยมาก เพื่อยืนยันความสามารถในการย่อยละลายฟอสเฟตของแบคทีเรียตรึงไนโตรเจน

จากผลการทดลองของ Keyeo *et al*. (2011) สรุปว่า การใช้แบคทีเรีย L2 ส่งเสริมการเจริญเติบโตของต้นกล้าข้าวได้เทียบเท่ากับการใช้ปุ๋ยไนโตรเจน และดีกว่าการใช้แบคทีเรีย L15, Sp7 และ Z78 ซึ่งแสดงให้เห็นว่ามีแบคทีเรียบางไอโซเลทเท่านั้นที่สามารถใช้ลดหรือทดแทนปุ๋ยเคมีไนโตรเจนได้ ถึงแม้ว่าในงานทดลองนี้ไม่มีกรรมวิธี

เปรียบเทียบกับการใช้ไนโตรเจนในสารละลายอาหาร แต่พบว่าแบคทีเรียตรึงไนโตรเจน RMT_2NF4 ที่แยกได้จากการทดลองครั้งนี้และมีความโดดเด่นในการตรึงไนโตรเจน จึงคาดว่าอาจได้ผลของการใช้ RMT_2NF4 ใกล้เคียงกับการใช้ไนโตรเจน ในทำนองเดียวกันกับงานทดลองของ Keyeo *et al*. (2011) อย่างไรก็ตาม ควรมีการนำไอโซเลทนี้ไปทดสอบเพิ่มเติม เพื่อให้สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในภาคสนามได้ นอกจากนี้ RMT_2NF4 ยังสามารถผลิต IAA ได้สูงอีกด้วย (31.05 มิลลิกรัม IAA/ลิตร) ซึ่งได้ส่งผลให้น้ำหนักแห้งของต้นและรากมากกว่ากรรมวิธีอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ IAA เป็นออกซินธรรมชาติที่มีบทบาทในการเจริญของรากมากที่สุดโดยถ้าด้านล่างของรากมีปริมาณ IAA มาก จะมีผลในการกระตุ้นให้รากยาวและเกิดรากแขนงมาก (Tanimoto, 2005) และ IAA ยังมีบทบาทในการขยายตัวของเซลล์ (Boutté *et al*., 2007) ส่งผลต่อความสูงและน้ำหนักสดของต้นกล้าข้าว ผลการทดลองครั้งนี้แสดงให้เห็นถึงผลของการใช้ RMT_2NF4 ที่มีแนวโน้มที่ดีมากต่อการส่งเสริมการเจริญเติบโตและการดูดใช้ธาตุอาหารของต้นกล้าข้าว ซึ่งน่าจะเป็นผลจากการที่ไอโซเลทนี้มีความสามารถในการตรึงไนโตรเจน และสร้างฮอร์โมน IAA ในปริมาณที่เหมาะสม Keyeo *et al*. (2011) แสดงความคิดเห็นว่า การสร้าง IAA ของแบคทีเรีย Sp7 และ Z78 อาจจะสูงเกินไปทำให้ส่งผลในการยับยั้งการเจริญเติบโตของต้นกล้าข้าวและมีค่าต่ำกว่ากรรมวิธีควบคุม

สรุป

การแยกไรโซแบคทีเรียจากข้าวในการทดลองครั้งนี้ พบว่าไอโซเลทส่วนใหญ่มีศักยภาพในการตรึงไนโตรเจนและละลายฟอสเฟตได้ อย่างไรก็ตามมีเพียง 6 ไอโซเลท เท่านั้น คือ RMW_2Egg2, RMW_2Egg8, RMW_4Egg5, RMW_4NF1, RMT_2Egg2 และ RMT_2NF4 ที่มีความสามารถโดดเด่นในการตรึงไนโตรเจน การย่อยละลายฟอสเฟต และการผลิต indole-3-acetic acid (IAA) จึงได้นำไปทดสอบประสิทธิภาพของไรโซแบคทีเรียทั้ง 6 ไอโซเลทนี้ ต่อการเจริญเติบโตและการดูดใช้ธาตุอาหารของต้นกล้าข้าว ผลการทดลองพบว่า การใช้ไรโซแบคทีเรียส่งผลให้การเจริญเติบโตของต้นกล้าข้าวสูงกว่ากรรมวิธีควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ นอกจากนี้การใช้ไรโซแบคทีเรียยังเพิ่มการดูดใช้ไนโตรเจนและฟอสฟอรัส ให้สูงกว่ากรรมวิธีควบคุม 50-215% และ 29.5-74% ตามลำดับ ไรโซแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพสูงนี้จึงสามารถนำไปผลิตเป็นปุ๋ยชีวภาพสำหรับการผลิตข้าวเพื่อลดหรือทดแทนปุ๋ยเคมีได้ อย่างไรก็ตาม ควรทำการศึกษาในภาคสนามโดยการใช้เชื้อเดี่ยวหรือเชื้อผสมทั้งนี้เพื่อยืนยันผลของการใช้แบคทีเรียเพื่อส่งเสริมการเจริญเติบโตและเพิ่มผลผลิตข้าว และเพื่อเป็นแนวทางในการประยุกต์ใช้ผลิตภัณฑ์อินทรีย์จากแบคทีเรียทางด้านการเกษตรต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอแสดงความขอบคุณ บริษัท TRISAP GROUP PTY LTD ที่สนับสนุนทุนวิจัยในครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

Ahmad, F., I. Ahmad and M.S. Khan. 2008. Screening of free-living rhizospheric bacteria for their multiple plant growth promoting activities. Microbiological Research 163(2): 173-181.

Boutté, Y., Y. Ikada and M. Grebe. 2007. Mechanisms of auxin-dependent cell and tissue polarity. Current Opinion in Plant Biology 10(6): 616-623.

El-Komy, H.M.A. 2005. Co-immobilization of *Azospirillum lipoferum* and *Bacillus megaterium* for successful phosphorus and nitrogen nutrition of wheat plants. Food Technology Biotechnology 43(1): 19-27.

Gaur, A.C. 1990. Physiological functions of phosphate solubilizing micro-organisms. pp. 16-72. *In*: A.C. Gaur (ed.). Phosphate Solubilizing Micro-organisms as

Biofertilizers. Omega Scientific Publishers, New Delhi.

Gordon, S.A. and R.P. Weber. 1951. Colorimetric estimation of indole acetic acid. Plant Physiology 26(1): 192-195.

Gravel, V., H. Antoun and R.J. Tweddell. 2007. Growth stimulation and fruit yield improvement of greenhouse tomato plants by inoculation with *Pseudomonas putida* or *Trichoderma atroviride*: Possible role of indole acetic acid (IAA). Soil Biology and Biochemistry 39(8): 1968-1977.

In-nok, A., P. Poomipan and O. Thepsilvisut. 2016. Comparison on quality of rice var. Khao Dawk Mali 105 planted by using chemical and organic fertilizers in Surin province. Thai Science and Technology Journal 24(5): 766-776. (in Thai)

Insalud, N., P. Sangruan and K. Leechaikul. 2015. The influence of IAA producing bacteria on the stimulation of growth in rice. Agricultural Science Journal 46(3): 625-628. (in Thai)

Jatupornpipat, M., A. Rittiboon and C. Nopparat. 2011. Evaluation of nitrogen fixing efficiency of bacteria isolated from soils by acetylene reduction assay. pp. 1-6. *In:* Proceedings of the 21st Thai Institute of Chemical Engineering and Applied Chemistry. Prince of Songkla University, Songkhla. (in Thai)

Keyeo, F., O. Noor Ai'shah and H.G. Amir. 2011. The effects of nitrogen fixation activity and phytohormone production of diazotroph in promoting growth of rice seedlings. Biotechnology 10(3): 267-273.

Koomnok, C., N. Teaumroong, B. Rerkasem and S. Lumyong. 2007. Diazotroph endophytic bacteria in cultivated and wild rice in Thailand. ScienceAsia 33: 429-435.

Kravchenko, L.V., T.S. Azarova, N.M. Makarova and I.A. Tikhonovich. 2004. The effect of tryptophan present in plant root exudates on the phytostimulating activity of rhizobacteria. Microbiology 73(2): 156-158.

Mala, T. 2007. Organic Fertilizer and Biofertilizer: Production Techniques and Application. 2nd ed. Kasetsart University Press, Bangkok. 300 p. (in Thai)

Malav, K.J. and V.P. Ramani. 2016. Yield and nutrient content of rice as influenced by silicon and nitrogen application. Research Journal of Chemical and Environmental Sciences 4(4): 46-49.

Marschner, P., C.H. Yang, R. Lieberei and D.E. Crowley. 2001. Soil and plant specific effects on bacterial community composition in the rhizosphere. Soil Biology and Biochemistry 33(11): 1437-1445.

Maruekarajtinplaeng, S. 2014. Diversity of nitrogen fixing bacteria isolated from rice rhizosphere soil in Phranakhon Si Ayutthaya province. VRU Research and Development Journal Science and Technology 9(3): 72-83. (in Thai)

Patel, P.V. and P.B. Desai. 2015. Isolation of rhizobacteria from paddy field and their traits for plant growth promotion. Research Journal of Recent Sciences 4: 34-41.

Punyadoung, C. 2007. Production of soybean-rhizobium inoculum by spray-drying. M.S. Thesis. Chiang Mai University, Chiang Mai. 98 p. (in Thai)

Sarin, S., T. Prombunchachai, N. Nakaew and A. Chidburee. 2013. Isolation of indole acetic acid producing pink pigmented facultative methylotrophs (PPFMs) from *Murdannia loriformis* (Hassk.) R. Rao & Kammathy.

Naresuan University Journal 21(2): 12-24. (in Thai)

Siwasilp, N. 1984. Handbook of Soil, Plant and Fertilizer Analysis. Department of Soil Science and Conservation, Faculty of Agriculture, Chiang Mai University, Chiang Mai. 138 p. (in Thai)

Somasegaran, P. and H.J. Hoben. 1994. Handbook for Rhizobia: Methods in Legume-Rhizobium Technology. Springer-Verlag, New York. 397 p.

Surange, S., A.G. Wollum II, N. Kumar and C.S. Nautiyal. 1997. Characterization of rhizobium from root nodules of leguminous tree growing in alkaline soils. Canadian Journal of Microbiology 43(9): 891-894.

Tanimoto, E. 2005. Regulation of root growth by plant hormones- role for auxin and gibberellins. Critical Reviews in Plant Sciences 24(4): 249-265.

Wanchai, K. and S. Ruangsangka. 2014. Effect of phosphate-solubilizing bacteria immobilized on rice husk ash, on growth of RD47 rice. Agricultural Science Journal 45(2)(Suppl.): 513-516. (in Thai)

Wattanaphayapkul, W. 2015. Effects of wood vinegar and manure on growth, yield and seed quality of Hom Mali rice. Journal of Agriculture 31(3): 269-279. (in Thai)

Weaver, R.W. and S.K.A. Danso. 1994. Dinitrogen fixation. pp. 1019 -1046. *In*: R.W. Weaver, J.S. Angle, P.S. Bottomley, D. Bezdicek, S. Smith, A. Tabatabai and A. Wollom. (eds.). Methods of Soil Analysis. Part 2: Microbiological and Biochemical Properties. Soil Science Society of America, Inc., Madison, Wisconsin.

Wilson, P.W. and S.G. Knight. 1952. Experiments in Bacterial Physiology. Burgess, Minneapolis. Minnesota, 49 p.

Yasari, E., A.M.E. Azadgoleh, H. Pirdashti and S. Mozafari. 2008. *Azotobacter* and *Azospirillum* inoculants as biofertilizers in canola (*Brassica napus* L.) cultivation. Asian Journal of Plant Sciences 7(5): 490-494.

Yesuf, E. and A. Balcha. 2014. Effect of nitrogen application on grain yield and nitrogen efficiency of rice (*Oryza sativa* L.). Asian Journal of Crop Science 6(3): 273-280.

Yiam-on, T., N. Riddech, P. Jaisil and S. Boonlue. 2012. Growth promotion of sugarcane by phosphate solubilizing bacteria in green house condition. Khon Kaen Agricultural Journal 40(Suppl. 3): 185-193. (in Thai)