

ความสามารถของแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนในการส่งเสริมการเจริญเติบโต ของต้นกล้ากาแฟอาราบิกา

Abilities of Nitrogen Fixing Bacteria in Enhancing Growth of Arabica Coffee Seedling

อนันญพร ทำขงดี กวิพร จินะจันตา ยูปา จอมแก้ว ฟ้าไพลิน ไชยวรรณ และ อรวรรณ ฉัตรสีรุ่ง*
Ananyaphon Thamkhongdee, Kawiporn Chinachanta, Yupa Chromkaew, Fapailin Chaiwan
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: 1 April 2019; Accepted: 18 June 2019)

Abstract: Nitrogen is an important element for coffee production since it is the component of caffeine. The use of chemical nitrogen fertilizer poses a high risk to environmental pollution. The application of N_2 fixing bacteria is an alternative to reduce the use of chemical fertilizer. Therefore, in the present study, bacteria were isolated from rhizosphere soils and rhizoplane of coffee grown in two site plantations. Sixty-five isolates of N_2 fixing bacteria were obtained, accounting for 41.9 % of the total isolates (155 isolates). There were only 23 isolates of N_2 fixing bacteria that showed dual abilities in phosphate and potassium solubilization. These isolates could release phosphate both from $Ca_3(PO_4)_2$ and $AlPO_4$ with values of 103.58-406.11 and 8.86-183.82 mg P/L, respectively. The value of solubilized potassium was 23.41-44.67 mg K/L. Isolate S2-4a1 and S1-2a4 showed highest ability in solubilizing two phosphate sources, and potassium, respectively. All the N_2 fixing bacterial isolates were able to produce Indole 3-acetic acid (IAA) (0.58-22.80 mg IAA/L). Eight isolates that showed different potential in phosphate and potassium solubilization, and IAA production were selected to test their effectiveness with coffee seedlings. The results indicated that isolate S2-4a1 gave significantly higher root and leaves growth, and nutrients uptake than the control. This isolate also exhibited 76, 211 and 252 % higher N, P and K uptake than the control, respectively.

Keywords: Arabica coffee, N_2 fixing bacteria, phosphate solubilization, potassium solubilization

บทคัดย่อ: ไนโตรเจนเป็นธาตุที่มีความสำคัญมากในการผลิตกาแฟ เนื่องจากเป็นองค์ประกอบของคาเฟอีน การใช้ปุ๋ยเคมีไนโตรเจน บนพื้นที่สูงซึ่งเป็นแหล่งผลิตกาแฟมีความเสี่ยงทำให้เกิดมลพิษต่อสิ่งแวดล้อม การใช้แบคทีเรียตรึงไนโตรเจนจึงเป็นทางเลือกในการลดการใช้ปุ๋ยเคมี การทดลองครั้งนี้จึงได้ทำการแยกแบคทีเรียจากดินรอบรากและเนื้อเยื่อผิวรากกาแฟจากพื้นที่ปลูกกาแฟ 2 พื้นที่ ได้แบคทีเรียตรึงไนโตรเจน 65 ไอโซเลท คิดเป็น 41.9 % ของไอโซเลททั้งหมด (155 ไอโซเลท) แบคทีเรียตรึงไนโตรเจนที่มีความสามารถทั้งละลายฟอสเฟต และ โฟแทสเซียม ได้มีเพียง 23 ไอโซเลท เท่านั้น โดยเชื้อกลุ่มนี้สามารถปลดปล่อยฟอสเฟตจากทั้ง $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ และ AlPO_4 ได้ 103.58-406.11 และ 8.86-183.82 mg P/L ตามลำดับ ส่วนการละลายโฟแทสเซียมมีค่า 23.41-44.67 mg K/L โดยที่ไอโซเลท S2-4a1 มีความสามารถละลายฟอสเฟตจากทั้งสองแหล่งได้สูงที่สุด ในขณะที่ S1-2a4 มีความสามารถละลายโฟแทสเซียมได้สูงที่สุด แบคทีเรียตรึงไนโตรเจนทุกไอโซเลทมีความสามารถในการสร้าง Indole 3-acetic acid (IAA) ได้ (0.58-22.80 mg IAA/L) เมื่อคัดเลือกแบคทีเรียที่มีศักยภาพในการละลายฟอสเฟต โฟแทสเซียม และการสร้าง IAA ที่ต่างกัน 8 ไอโซเลท มาทดสอบประสิทธิภาพกับต้นกล้ากาแฟพบว่า ไอโซเลท S2-4a1 ให้ค่าการเจริญเติบโตของรากและใบสูง รวมทั้งการดูดใช้ธาตุอาหารสูงกว่า กรรมวิธีควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยให้ N, P และ K uptake สูงกว่ากรรมวิธีควบคุม 76, 211 และ 252% ตามลำดับ

คำสำคัญ: กาแฟอะราบิกา แบคทีเรียตรึงไนโตรเจน การย่อยละลายฟอสฟอรัส การย่อยละลายโฟแทสเซียม

คำนำ

กาแฟเป็นพืชที่อยู่ในวงศ์ Rubiaceae ซึ่งมีประมาณ 650 สกุล และมีมากกว่า 13,000 ชนิด (Delprete and Jardim, 2012) กาแฟที่ปลูกกันอย่างแพร่หลายในประเทศไทย คือ กาแฟอะราบิกา (*Coffea arabica* L.) และ กาแฟโรบัสตา (*Coffea canephora* var. *robusta*) กาแฟอะราบิกาได้รับความนิยมมากกว่าโรบัสตา และให้มูลค่าที่สูงกว่าทางเศรษฐกิจ เนื่องจากปริมาณคาเฟอีนของ อะราบิกามี้น้อยกว่าโรบัสตา อีกทั้งกาแฟอะราบิกายังให้ความรู้สึกดีต่อประสาทสัมผัส มีรสชาติดี มีกลิ่นหอม ภูมิประเทศที่เหมาะสมสำหรับการปลูกกาแฟอะราบิกาต้องมีระดับความสูงเหนือระดับน้ำทะเล 700 เมตรขึ้นไป จึงจะทำให้ได้กาแฟคุณภาพดี ทำให้แหล่งปลูกของกาแฟอะราบิกาส่วนใหญ่จึงอยู่ในพื้นที่ภาคเหนือของประเทศไทย กาแฟอะราบิกาปัจจุบันมีแหล่งปลูกที่สำคัญ อยู่ในจังหวัดเชียงใหม่ เชียงราย และ แม่ฮ่องสอน และด้วยลักษณะของพื้นที่ซึ่งมีความลาดชันสูงการใส่ปุ๋ยในรูปของปุ๋ยเคมี มักส่งผลต่อสิ่งแวดล้อมในระยะยาว เช่น เกิดการปนเปื้อนสู่สิ่งแวดล้อมตกค้างในดิน ส่งผลต่อการอาศัยอยู่ร่วมกันของของสิ่งมีชีวิตในดินและระบบนิเวศต่าง ๆ ในดิน จากการวิจัยประสิทธิภาพการผลิตกาแฟบนพื้นที่สูงในภาคเหนือของประเทศไทยยังพบว่า ปัจจัยการผลิต เช่น

ปริมาณปุ๋ยที่ใส่ยังอยู่ในระดับที่สูงกว่าระดับเหมาะสม โดยการใส่ปุ๋ยไนโตรเจนที่ใช้ในแปลงปลูกกาแฟจะขึ้นอยู่กับอายุกาแฟ ซึ่งปริมาณการใส่ตั้งแต่ 36-180 กิโลกรัมต่อไร่ต่อปี (Angkasith and Yimyam, 2000) ซึ่งเกษตรกรยังขาดความรู้ความเข้าใจในการใช้ปุ๋ย ทำให้เกิดการเพิ่มขึ้นของต้นทุนการผลิต และผลผลิตที่ไม่มีความสมบูรณ์ในระยะเก็บเกี่ยว (Suwanwisolkiet, 2011)

ดังนั้นจุลินทรีย์ตรึงไนโตรเจน ที่สามารถย่อยละลายฟอสฟอรัส และโฟแทสเซียม รวมทั้งสร้างฮอร์โมนพืช เช่น กรดอินโดล-3-อะซีติก (indole-3-acetic acid: IAA) จึงมีความสำคัญอย่างมากต่อการปลูกกาแฟบนพื้นที่สูง เนื่องจากช่วยลดการใช้ปุ๋ยเคมี และลดการปนเปื้อนของสารเคมีสู่สิ่งแวดล้อมได้ อีกทั้งยังช่วยลดต้นทุนในการผลิตทำให้เกษตรกรสามารถได้กำไรจากการผลิตมากขึ้น Wedhastri *et al.* (2012) ได้ทดลองใช้เชื้อจุลินทรีย์ที่แยกได้จากบริเวณรอบรากกาแฟในการเพิ่มการเจริญเติบโตของต้นกล้ากาแฟ พบว่า *Achromobacter* sp., *Stenotrophomonas maltophilia* และ *Leifsonia aquatica* ที่แยกได้บริเวณรอบรากกาแฟมีความสามารถในการตรึงไนโตรเจนได้ และช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของต้นกล้ากาแฟอะราบิกาที่ปลูกในโรงเรือนมากกว่าการไม่ใส่เชื้อ Yiam-on *et al.* (2012) พบว่าแบคทีเรีย 4 ไอโซเลทที่คัดแยกได้จากอ้อยมีความสามารถในการละลายฟอสเฟตสูง

(179-196 mg P/L) และการปลูกย่อยโดยใช้แบคทีเรียร่วมกับการใช้ปุ๋ยหินฟอสเฟต ทำให้ย่อยมีการเจริญเติบโตในทุกด้านและมีการสะสมธาตุฟอสฟอรัสในลำต้นสูงกว่าย่อยชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ Huangmee *et al.* (2016) พบว่าการบ่มดินด้วยเชื้อแบคทีเรียละลายโพแทสเซียม (potassium solubilizing bacteria: KSB) ที่คัดเลือกจากดินบริเวณรากข้าว ร่วมกับแร่ไมก้าสามารถละลายโพแทสเซียมออกมาได้สูงสุด (126.15 mg/kg) การใช้เชื้อ KSB ร่วมกับแร่ไมก้าในดินจึงสามารถช่วยเพิ่มความเป็นประโยชน์ของโพแทสเซียมในดินได้ Hartono *et al.* (2016) พบว่าการใส่เชื้อแบคทีเรีย ที่แยกได้จากบริเวณรอบรากข้าวโพด ซึ่งมีความสามารถในการตรึงไนโตรเจน ผลิตภัณฑ์อินทรีย์ indole-3-acetic acid (IAA) และละลายฟอสเฟตได้ ช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของข้าวได้ดี

การศึกษาวิจัยครั้งนี้ จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อทำการแยกและคัดกรองแบคทีเรีย จากดินบริเวณรอบราก (rhizosphere soils: RS soils) และจากเนื้อเยื่อผิวราก (rhizoplane: RP) ของกาแฟอาราบิก้า ที่มีความสามารถในการตรึงไนโตรเจน แล้วจึงทำการทดสอบศักยภาพของแบคทีเรียที่ตรึงไนโตรเจนได้ ในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชด้านอื่น ได้แก่ การละลายฟอสเฟตและโพแทสเซียม และการสร้าง IAA แล้วจึงทำการคัดเลือกไอโซเลท ที่มีศักยภาพสูงในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชไปทดสอบประสิทธิภาพในการเพิ่มการเจริญเติบโตของต้นกล้ากาแฟอาราบิก้า แบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพสูงสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการส่งเสริมการเจริญเติบโตและลดการใช้ปุ๋ยเคมีของกาแฟบนพื้นที่สูงต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

พื้นที่และการเก็บตัวอย่างดินและราก

พื้นที่ปลูกกาแฟอาราบิก้าที่ได้คัดเลือกเพื่อเก็บตัวอย่างดินและรากของกาแฟอาราบิก้า มี 2 พื้นที่ ได้แก่ พื้นที่ปลูกกาแฟโดยใช้ปุ๋ยอินทรีย์-ชีวภาพ ผสม กับปุ๋ยเคมีเกรด 16-20-0 (สัดส่วน 2:1 v/v) โดยใส่ก่อนปลูกอัตรา 1 kg/tree อายุต้นกาแฟเฉลี่ย 12 ปี (site1: S1) N 18° 92'32

N 99° 32'81 E และ พื้นที่ปลูกกาแฟที่ปล่อยทิ้งตามธรรมชาติโดยไม่มีการใส่ปุ๋ยมากกว่า 17 ปี อายุต้นกาแฟเฉลี่ย 20 ปี (site 2: S2) 18° 92'37 N 99° 32'78 E ทั้งสองพื้นที่อยู่ในเขตตำบลเทพเสด็จ อำเภอคลองยสะเกิด จังหวัดเชียงใหม่

การเก็บดินและรากจากต้นกาแฟ ทำโดยการขุดดินบริเวณราก ได้ทรงพุ่มจำนวน 5 ต้น ต่อ พื้นที่ ต้นละ 3 ซ้ำ แล้วนำมาผสมกันเป็น 1 ตัวอย่างต่อต้น นำตัวอย่างใส่ในกล่องที่บรรจุน้ำแข็ง แล้วนำมาแยกดินและรากในห้องปฏิบัติการ ทำการแยกเชื้อแบคทีเรียจากดินรอบรากและ รากฝอย นำดินส่วนที่เหลือนำไปดำเนินการวิเคราะห์สมบัติทางเคมี

การคัดแยกเชื้อไรโซแบคทีเรียจากผิวรากกาแฟ

คัดแยกเชื้อไรโซแบคทีเรียจากผิวรากกาแฟ (Rhizoplane) (Yupa, 2017) โดยทำการตัดตัวอย่างปลายรากยาว 1 mm ใส่ใน microcentrifuge tube (1.5 mL) เติมน้ำกลั่น 30 µL ใช้แท่งแก้วที่ผ่านการฆ่าเชื้ออบรากเบา ๆ นำแท่งแก้วที่มี root suspension ติดปลายแท่งมาขีดเป็นแนว (streak) ในจานอาหาร tryptic soy agar (TSA) ทำการบ่ม (incubate) จานอาหารไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน เมื่อครบกำหนด ทำการแยกเชื้อบริสุทธิ์อีกครั้งโดยวิธี streak plate บนในอาหาร TSA ซึ่งประกอบด้วย (g/L); 3 g glucose, K₂HPO₄ 2.5 g, NaCl 5 g, Soy 3 g, trypton 7g และ วุ้น (agar) 15 g ปรับ pH เป็น 7.0 ± 0.2

การคัดแยกแบคทีเรียจากตัวอย่างดินบริเวณรอบรากกาแฟ

คัดแยกแบคทีเรียจากตัวอย่างดินบริเวณรอบรากกาแฟ (Rhizosphere) (Yupa, 2017) โดยทำการชั่งดินบริเวณรอบรากกาแฟ (rhizosphere soil) ตัวอย่างละ 10 กรัม นำไปทำชุดสารละลายดินเจือจางตั้งแต่ 10⁻¹ ถึง 10⁻⁵ แล้วนำเฉพาะ 10⁻³, 10⁻⁴ และ 10⁻⁵ ปริมาตร 0.1 mL หยดลงบนอาหาร TSA แล้วใช้แท่งแก้วที่ผ่านการฆ่าเชื้อเกลี่ยให้ทั่วจานเพาะเชื้อ โดยทำความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ ทำการบ่ม ไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน เมื่อครบกำหนด ทำการแยกเชื้อบริสุทธิ์ในอาหาร TSA โดยวิธี streak plate

การวิเคราะห์ตัวอย่างดิน

ทำการวิเคราะห์สมบัติดิน ได้แก่ ความเป็นกรดต่าง (pH) โดยใช้ pH meter อินทรีย์วัตถุ (organic matter: OM) โดยวิธี Walkley & Black ฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์ (available phosphorus: Available P) โดยวิธี Bray II และโพแทสเซียมที่แลกเปลี่ยนได้ (exchangeable potassium: Extractable K) โดยใช้ NH_4OAc เป็นน้ำยาสกัด (Land Development Department, 2010)

การคัดกรองความสามารถในการตรึงไนโตรเจน

นำเชื้อบริสุทธิ์ที่แยกได้ทั้งหมดมาทำการคัดกรองความสามารถในการตรึงไนโตรเจน (Weaver and Danso, 1994) โดยเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว tryptic soil broth (TSB) หลังการบ่มเชื้อได้ 3 วัน เชื้อจะมีความขุ่นสูงสุด (Yupa, 2017) นำเชื้อที่เจริญเต็มที่ มาทำการหยดลงบนอาหารที่ปราศจากไนโตรเจน คือ Burk's N free medium ซึ่งประกอบด้วย (g/L); glucose 10 g, KH_2PO_4 0.41 g, K_2HPO_4 0.52 g, Na_2SO_4 0.05 g, CaCl_2 0.2 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1 g, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.005 g, $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.0025 g และ agar 15 g ปรับ pH เป็น 7.2 ± 0.2 โดยทำการหยดไอโซเลทละ 3 หยดต่อจานอาหาร ปริมาตรหยดละ 0.02 mL บ่มที่อุณหภูมิ 28-30 °C เป็นเวลา 7 วัน แล้วจึงคัดเลือกเชื้อที่สามารถเจริญบนอาหาร Burk's N free medium ได้ ไปทำการทดสอบขั้นต่อไป

การประเมินความสามารถเชิงคุณภาพในการละลายฟอสเฟต

นำเชื้อแบคทีเรียบริสุทธิ์เฉพาะไอโซเลทที่สามารถเจริญบนอาหาร Burk's N free medium มาทดสอบความสามารถในการละลายฟอสเฟต (Gaur, 1990) โดยนำเชื้อเหลวที่เจริญเต็มที่ในอาหาร TSB 0.02 mL หยดลงบนอาหาร Pikovskaya agar medium (PVKA) ซึ่งประกอบด้วย (g/L); glucose 10 g, CaHPO_4 5 g, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.5 g, NaCl 0.2 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1 g, KCl 0.2 g, yeast extract 0.5 g, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.002 g, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.002 g โดยมี AlPO_4 หรือ $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ เป็น

แหล่งฟอสเฟต โดยปรับ pH อาหารเป็น 4.8 และ 7.0 ตามลำดับ บ่มที่อุณหภูมิ 28-30 °C เป็นเวลา 7 วัน

การประเมินความสามารถเชิงปริมาณในการละลายฟอสเฟต

ทำการคัดเลือกเฉพาะไอโซเลทที่สามารถเจริญได้ดีบน PVKA มาทำการประเมินความสามารถเชิงปริมาณในการละลายฟอสเฟตในอาหารเหลว Pikovskaya broth (PVKB) 25 mL ที่เติมฟอสเฟตในรูป $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ หรือ AlPO_4 5 g/L โดยทำชุดควบคุมที่ไม่มีการเติมเชื้อแบคทีเรีย ทำการทดลอง 3 ซ้ำ นำไปเขย่าด้วยความเร็ว 125 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 วัน แยกเฉพาะส่วนใส (supernatant) โดยปั่นเหวี่ยงที่ 4,500 รอบต่อนาที 10 นาที วัดฟอสฟอรัสใน supernatant โดยใช้เครื่อง spectrophotometer ที่ wavelength 820 nm (ดัดแปลงจากวิธีของ Gaur, 1990) ทำการลบค่าดูดกลืนแสงของชุดควบคุมจากทุกตัวอย่างก่อนการคำนวณ

การประเมินความสามารถเชิงคุณภาพในการละลายโพแทสเซียม

ทำการคัดเลือกเฉพาะไอโซเลทที่สามารถเจริญได้ดีบนอาหาร PVKA (AlPO_4 และ $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) โดยนำเชื้อเหลวที่เจริญเต็มที่ในอาหาร TSB มาทำการหยดเชื้อเหลว 0.02 mL ไอโซเลทละ 3 หยด ลงบนอาหารแข็ง silicate bacteria agar medium (SBA) ซึ่งประกอบด้วย (g/L); Na_2HPO_4 2 g, CaCO_3 5 g, $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g, yeast extract 0.5 g, $\text{FeCl}_6 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.005 g, แร่ feldspar 5.88 g pH 7 ± 0.2 บ่มที่อุณหภูมิ 28-30 °C เป็นเวลา 7 วัน

การประเมินความสามารถเชิงปริมาณในการละลายโพแทสเซียม

ทำการคัดเลือกเฉพาะไอโซเลทที่สามารถเจริญได้ดีบนอาหาร SBA มาทำการประเมิน ความสามารถเชิงปริมาณในการละลายโพแทสเซียมจากแร่ feldspar (ดัดแปลงจากวิธีการของ Hebei Academic of Sciences (1996)) เลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว 25 mL ที่มีการเติมแร่ feldspar เป็นแหล่งให้โพแทสเซียม (0.15 g/L) และทำชุดควบคุม โดยไม่มีการเติมเชื้อแบคทีเรีย ทำการทดลอง 3

ซ้ำ นำเชื้อไปบ่มที่ความเร็ว 125 รอบ/นาที เป็นระยะเวลา 3 วัน วัดความเข้มข้นของโพแทสเซียมที่ละลายได้ใน supernatant โดยใช้ atomic absorption spectrophotometer ที่ wavelength 766.5 nm ทำการลบค่าดูดกลืนแสงของชุดควบคุมจากทุกตัวอย่างก่อนการคำนวณ

การประเมินความสามารถในผลิต Indole 3-acetic acid (IAA)

ทำการคัดเลือกเฉพาะแบคทีเรียไฮโซเลทที่สามารถเจริญได้บนอาหารแข็ง PVKA และ SBA มาประเมินความสามารถในการผลิต IAA (ดัดแปลงจากวิธีของ Gordon and Weber, 1951) โดยเลี้ยงเชื้อในอาหาร NB 25 mL ที่เติม L-tryptophan 0.2 g/L หลังจากนั้นนำไปเขย่าด้วยความเร็ว 125 รอบต่อนาที วัดปริมาณ IAA ที่เกิดขึ้นหลังจากบ่มเป็นระยะเวลา 3 วัน ซึ่งจะทำให้การวัด IAA ที่เกิดขึ้นใน supernatant โดยใช้ spectrophotometer ที่ wavelength 530 nm

การทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียต่อการเจริญเติบโตของต้นกล้ากาแฟ

พันธุ์กาแฟอะราบิกาที่ใช้ทดสอบคือ เชียงใหม่ 80 โดยก่อนทำการเพาะเมล็ด ทำการฆ่าเชื้อที่ผิวเมล็ดโดยแช่ในสารละลาย 3% hydrogen peroxide เป็นเวลา 3 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ 3 ครั้ง หลังจากนั้นนำเมล็ดกาแฟที่ผ่านการเชื้อแล้วไปเพาะในกระบะทรายที่ผ่านการฆ่าเชื้อ เป็นระยะเวลา 1 เดือน หลังจาก ครบ 1 เดือน คัดเลือกต้นที่มีการเจริญเติบโตส่วนรากและส่วนใบเท่ากัน มาทำการทดลอง วัสดุที่ใช้ปลูกคือ วัสดุปลูกผสมทรายในอัตราส่วน 1:1 (วัสดุปลูก w/w: ขุยมะพร้าว 70.5% แหะ 2.5% ปุ๋ยหมัก 15% มูลค่างควา 0.5% ฮิวมัส 1.5% ไดอะตอมไมค์ 10%) สำหรับแบคทีเรียที่ใช้ในการทดลอง ได้คัดเลือกจากแบคทีเรียที่มีศักยภาพในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชต่างกัน มาทดสอบประสิทธิภาพในการเจริญเติบโตของต้นกล้ากาแฟ ทำการทดลองในกระถางขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 10 cm กรรมวิธีละ 3 ซ้ำ วางแผนการทดลองแบบ randomized complete block design (RCBD) และเมื่อครบ 1 เดือน ทำการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกในอาหารเหลว NB ให้ได้ปริมาณเชื้อ

สูงสุด (10^9 cfu/g) แล้วเจือจางด้วยน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้วอัตรา 1:50 (v/v) ใส่ลงในต้นกล้ากาแฟที่คัดเลือกไว้ต้นละ 1 mL ทำการใส่เชื้อเพิ่มต้นละ 1 mL ตามกรรมวิธีทุก 1 เดือน เมื่อครบ 6 เดือน บันทึกการเจริญเติบโตของต้นกล้ากาแฟ โดยทำการวัด ความสูงต้น ความยาวราก น้ำหนักแห้งใบ น้ำหนักแห้งราก และทำการวิเคราะห์ความเข้มข้นของธาตุไนโตรเจน (% total N) โดยวิธี mixed Kjeldahl catalyst (Bremner, 1965) ฟอสฟอรัส (% total P) และโพแทสเซียม (%total K) (Land Development Department, 2010) นำผลไปคำนวณหาการดูดใช้ธาตุอาหารในใบกาแฟ ดังสมการ (น้ำหนักใบแห้ง x ความเข้มข้นของธาตุอาหาร)/100

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

นำข้อมูลที่ได้เก็บบันทึกมาวิเคราะห์ความแปรปรวน โดยวิธี analysis of variance (ANOVA) และเปรียบเทียบความแตกต่างค่าเฉลี่ยของกรรมวิธีทดลองโดยใช้วิธี least significant difference (LSD) ที่ค่าความเชื่อมั่น 95% โดยใช้โปรแกรม statistic for window version 8

ผลการทดลอง

ผลการวิเคราะห์ดินกาแฟจากพื้นที่ศึกษา

ผลการวิเคราะห์สมบัติของดินในพื้นที่แปลงกาแฟอะราบิกา ที่มีการใส่ทั้งปุ๋ยอินทรีย์และปุ๋ยเคมี (site 1) มีค่า pH เฉลี่ย 4.98 โดยมีความเป็นกรดมากกว่าดินในพื้นที่ปลูกกาแฟที่ปล่อยทิ้งตามธรรมชาติโดยไม่มีการใส่ปุ๋ยมานาน (site 2) ซึ่งมีค่า pH เฉลี่ย 5.93 (Table 1) เปรียบอินทรียวัตถุ (OM) ของทั้งสองพื้นที่ไม่แตกต่างกันมากนัก site 1 มีอินทรียวัตถุ 0.7% ส่วน site 2 มีอินทรียวัตถุ 0.8% สำหรับความเข้มข้นของ available P ของดินพบว่า site 1 มีค่าเฉลี่ย 220.64 mg/kg ส่วนดินพื้นที่ site 2 มีค่าเฉลี่ย 12.11 mg/kg ซึ่งแตกต่างกันมากเกือบ 20 เท่า ส่วนความเข้มข้นของ extractable K site 1 มีเฉลี่ย (174.57 mg/kg) ซึ่งสูงกว่าค่าของ site 2 มากกว่า 2 เท่า (71.60 mg/kg)

การแยกแบคทีเรียจากดินและรากกาแฟ

การแยกเชื้อแบคทีเรียจากดินบริเวณรอบราก (rhizosphere soils: RS soils) และจากเนื้อเยื่อผิวราก (rhizoplane: RP) ของกาแฟจำนวน 2 พื้นที่ สามารถแยกแบคทีเรียได้ทั้งหมด 155 ไอโซเลท (Table 2) แยกเป็นไอโซเลทจาก RS soils ของ site1 และ 2 จำนวน 70 และ 25 ไอโซเลทตามลำดับ และเป็นไอโซเลทจาก RP ของ site 1 และ 2 จำนวน 41 และ 19 ไอโซเลทตามลำดับ

การคัดกรองความสามารถในการตรึงไนโตรเจนของไรโซแบคทีเรียในอาหาร Burk's N-free media

จากการทดลองนี้พบว่าไอโซเลทที่สามารถเจริญในอาหาร Burk's N-free media มีจำนวนทั้งหมด 65 ไอโซเลท จาก 155 ไอโซเลทที่คัดแยกได้จาก RS soils และ RP ซึ่งถือว่าเป็นแบคทีเรียที่สามารถตรึงไนโตรเจนได้เนื่องจาก

สามารถเจริญได้บนอาหารที่ปราศจากไนโตรเจน สำหรับ site 1 ได้แบคทีเรียตรึงไนโตรเจนจำนวน 28 ไอโซเลท จากทั้งหมด 111 ไอโซเลท คิดเป็น 25.2 % ของไอโซเลททั้งหมดที่คัดแยกได้ ส่วน site 2 ได้แบคทีเรียตรึงไนโตรเจนจำนวน 37 ไอโซเลท จากทั้งหมด 44 ไอโซเลท คิดเป็น 84 % ของไอโซเลททั้งหมดที่คัดแยกได้ (Table 2, 3)

การคัดกรองจุลินทรีย์ละลายฟอสเฟตและโพแทสเซียม

นำไอโซเลทที่สามารถเจริญบนอาหาร Burk's N-free media ได้ (N_2 fixing isolates) ทั้งหมด 65 ไอโซเลทไปทดสอบความสามารถในการเจริญบนอาหาร PVK พบว่า ไอโซเลทที่สามารถเจริญบนอาหาร PVK+ $Ca_3(PO_4)_2$ มีทั้งหมด 42 ไอโซเลท แยกเป็นไอโซเลทจาก RS soils และ RP 19 และ 23 ไอโซเลท ตามลำดับ และ

Table 1. Chemical properties of the soil samples

Site ¹	Agricultural practice	pH ²	OM ² (%)	Available P ² (mg/kg)	Extractable K ² (mg/kg)
1	Compost + Bio-organic fertilizer + Chemical fertilizer	4.9 ± 0.2 ³	0.7 ± 0.2	220.6 ± 4.5	174.5 ± 15.8
2	No fertilization for > 17 years	5.9 ± 0.1	0.8 ± 0.2	12.1 ± 2.1	71.6 ± 7.4

¹ Site 1 = Coffee plantation with the application of compost and bio-organic fertilizer; Site 2 = Abandoned coffee plantations without fertilization more than 17 years

² Mean from 5 replications

³ Standard deviation (SD)

Table 2. Number of bacteria isolated from rhizosphere soil and coffee root

Coffee Tree	Number of bacterial Isolates			
	Rhizosphere soil samples		Root samples	
	Site 1	Site 2	Site 1	Site 2
Tree 1	19	6	7	6
Tree 2	20	2	6	5
Tree 3	15	9	12	2
Tree 4	12	4	9	3
Tree 5	4	4	7	3
	70	25	41	19
Total	95		60	

Site 1 = Coffee plantation with the application of compost and bio-organic fertilizer; Site 2 = Abandoned coffee plantations without fertilization more than 17 years

ไอโซเลทที่เจริญบนอาหาร PVK+AlPO₄ มีทั้งหมด 28 ไอโซเลท แยกเป็นไอโซเลทจาก RS soils และ RP 18 และ 10 ไอโซเลท ตามลำดับ (Table 3) เมื่อนำ ทั้ง 65 ไอโซเลท มาทดสอบโดยใช้อาหารที่มีแร่ฟอสเฟตสปาร์เป็นแหล่ง โฟสเฟสเทียมพบว่า มี 23 ไอโซเลท ที่สามารถเจริญได้บน อาหารโฟสเฟสเทียม แยกเป็นไอโซเลทจาก RS soils 16 ไอโซเลทและจาก RP 7 ไอโซเลท จากผลการทดลองนี้ มี 23 ไอโซเลทที่สามารถเจริญได้ดีในทุกอาหารที่ใช้ทดสอบจึง ได้คัดเลือกไปทำการทดลองขั้นต่อไป

ผลการทดลองครั้งนี้ยังพบว่าจำนวนของ N₂ fixing bacteria ที่แยกได้จาก RS soils และ RP ที่มีความสามารถในการละลายธาตุฟอสฟอรัสและ โฟสเฟสเทียมในอาหารแข็งมีความแตกต่างกัน (Table 3) โดยพบว่า แบคทีเรียที่แยกได้จาก RS soils เจริญได้ดีบนอาหาร PVK+AlPO₄ (51.4% ของไอโซเลททั้งหมดจาก RS soils) มากกว่าแบคทีเรียที่แยกได้จาก RP (33.3% ของ ไอโซเลททั้งหมดจาก RP) ในทำนองเดียวกันแบคทีเรียที่แยกได้จาก RS soils เจริญได้บนอาหาร silicate bacteria medium (45.7% ของไอโซเลททั้งหมดจาก RS soils) มากกว่าแบคทีเรียที่แยกได้จาก RP (23.3% ของไอโซเลททั้งหมดจาก RP) ในทางกลับกันพบว่า แบคทีเรียที่แยกได้จาก RP เจริญได้ดีบนอาหาร PVK+ Ca₃(PO₄)₂ (76.7% ของไอโซเลททั้งหมดจาก RP) มากกว่าแบคทีเรียที่แยกได้จาก RS soils (54.2% ของไอโซเลททั้งหมดจาก RS soils)

ผลการประเมินความสามารถเชิงปริมาณในการ ย่อยละลายฟอสเฟต ของ N₂ fixing isolates ที่คัดเลือกมา 23 ไอโซเลท พบว่า ทุกไอโซเลทสามารถย่อยละลาย ฟอสเฟตได้จากทั้งสองแหล่ง (Ca₃(PO₄)₂ และ AlPO₄) โดยค่าการละลายของ Ca₃(PO₄)₂ อยู่ในช่วง 101.7 - 406.1 mgP/L ส่วนค่าการละลายของ AlPO₄ อยู่ในช่วง 8.9-183.8 mgP/L ไอโซเลทที่สามารถย่อยฟอสเฟตได้สูง ที่สุดทั้งจาก Ca₃(PO₄)₂ และ Al(PO₄)₂ เป็นเชื้อเดียวกันคือ S2-4a1 (406.11 และ 183.82 mgP/L ตาม ลำดับ) (Figure 1) โดยที่ค่าการละลายนี้สูงกว่าไอโซเลทอื่น ๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ สำหรับค่าการละลาย Ca₃(PO₄)₂ และ Al(PO₄)₂ ต่ำที่สุดได้จากไอโซเลท R1-1a1 (101.7 mgP/L) และ R2-3b1 (8.9 mgP/L) ตามลำดับ

ส่วนความสามารถในการละลายโฟสเฟสเทียม ของเชื้อคัดเลือก พบว่า อยู่ในช่วง 23.41-44.67 mg K/L ไอโซเลทที่สามารถละลายโฟสเฟสเทียมได้สูงที่สุดคือ S1-2a4 เท่ากับ 44.67 mg/L รองลงมาที่มีความสามารถย่อย ละลายโฟสเฟสเทียมได้ใกล้เคียงกัน ได้แก่ R1-1a3, R1-3b2, R2-4a2, S1-1b1 และ S1-1a5 โดยสามารถละลาย โฟสเฟสเทียมได้ 44.3, 43.41, 42.28, 41.93 และ 41.77 mg K/L ตามลำดับ และ ไอโซเลทที่ละลายโฟสเฟสเทียมได้ น้อยที่สุดคือ S1-4b7 (23.41 mg K/L) (Figure 2)

Table 3. Number of N₂ fixing isolates¹ that exhibited phosphate and potassium solubilizing abilities

Site ²	Number of isolates							
	Isolated from soil sample (rhizosphere)				Isolated from root sample (rhizoplane)			
	Total	Phosphate		Potassium	Total	Phosphate		Potassium
	tested	solubilizing ability		solubilizing	tested	solubilizing ability		solubilizing
isolates ²	Ca ₃ (PO ₄) ₂	AlPO ₄	ability	isolates ²	Ca ₃ (PO ₄) ₂	AlPO ₄	ability	
1	15	10 (66.7) ⁴	7 (46.7)	13 (86.7)	13	8 (61.5)	8 (61.5)	4 (30.8)
2	20	9 (45.0)	11 (55.0)	3 (15.0)	17	15 (88.2)	2 (11.8)	3 (33.3)
Total	35	19 (54.3)	18 (51.4)	16 (45.7)	30	23 (76.7)	10 (33.3)	7 (33.3)

¹ Isolates that could grow on Burk's N-free media

² Site; 1 = Coffee plantation with the application of chemical fertilizer, compost and bio-organic fertilizer; Site 2 = Abandoned coffee plantations without fertilization more than 17 years

³ Nitrogen fixing isolates; 35 isolates from rhizosphere soils and 65 isolates from rhizoplane

⁴ Percent of total tested isolates

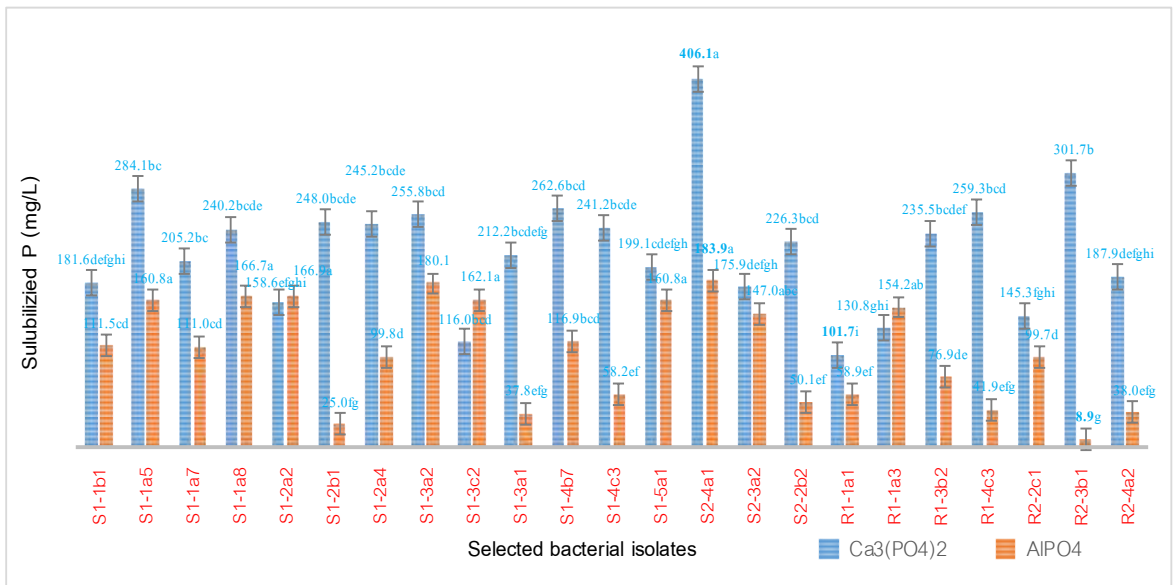


Figure 1. Phosphate solubilizing ability of selected nitrogen fixing bacteria

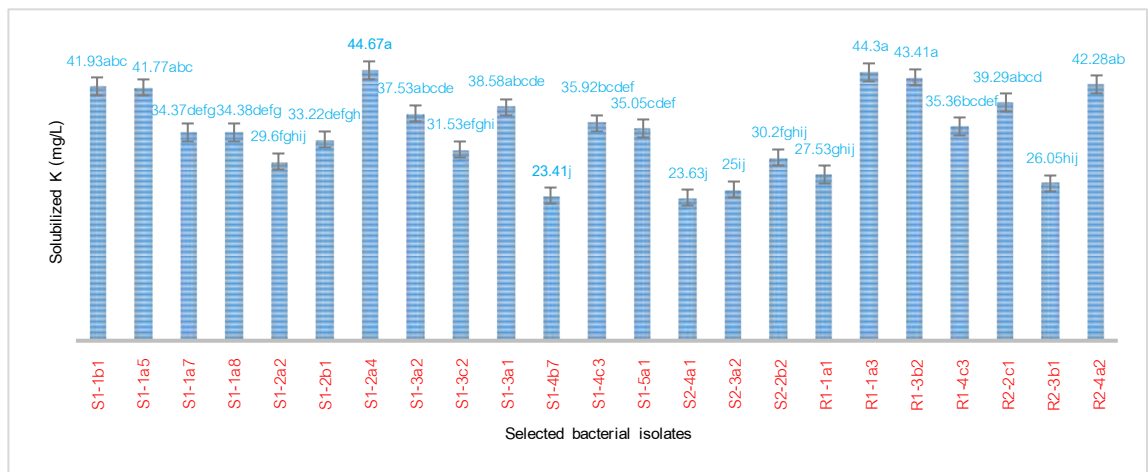


Figure 2. Potassium solubilizing ability of selected nitrogen fixing bacteria

จากการทดลองความสามารถในการสร้างฮอร์โมนพืช IAA พบว่าอยู่ในช่วงระหว่าง 0.58-22.80 mg/L โดยไอโซเลทที่สามารถสร้างฮอร์โมนพืชได้สูงที่สุดคือ S1-1a7 เท่ากับ 22.90 mg/L รองลงมาได้แก่ S1-2a4 และ R1-1a3 เท่ากับ 20.80 และ 19.74 mg/L ตามลำดับ ซึ่งค่าการผลิต IAA ของทั้งสามไอโซเลทนี้สูงกว่าไอโซเลทที่เหลืออย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ส่วนไอโซเลทที่ผลิต IAA ได้ต่ำที่สุดคือ R1-1a1 เท่ากับ 0.58 mg/L (Figure 3)

หลังจากได้นำ N₂ fixing isolates ที่คัดเลือก 23 ไอโซเลท มาประเมินความสามารถในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชแล้ว แล้วจึงได้คัดเลือกไอโซเลทที่มีความแตกต่างของความสามารถในการละลายฟอสฟอรัสละลายโพแทสเซียม และสร้างฮอร์โมนพืช (IAA) รวมถึงลักษณะที่แตกต่างกันทางกายภาพบนจานอาหารของเชื้อแบคทีเรีย มาทดสอบประสิทธิภาพต่อการส่งเสริมการเจริญเติบโตของกล้ากาแฟ แบคทีเรียที่ได้คัดเลือกมีจำนวน 8 ไอโซเลท ได้แก่ S1-1a5, S2-4a1, S1-2a4, R1-1a1, R2-3b1, S1-1a7, R1-1a3 และ R2-2c1 (Figure 4)

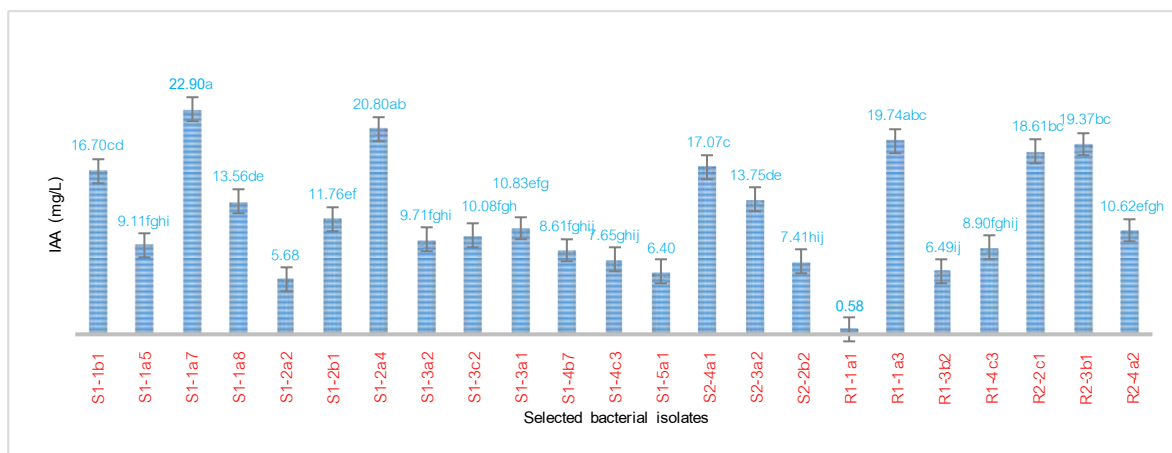


Figure 3. The amount of IAA produced by selected nitrogen fixing bacteria

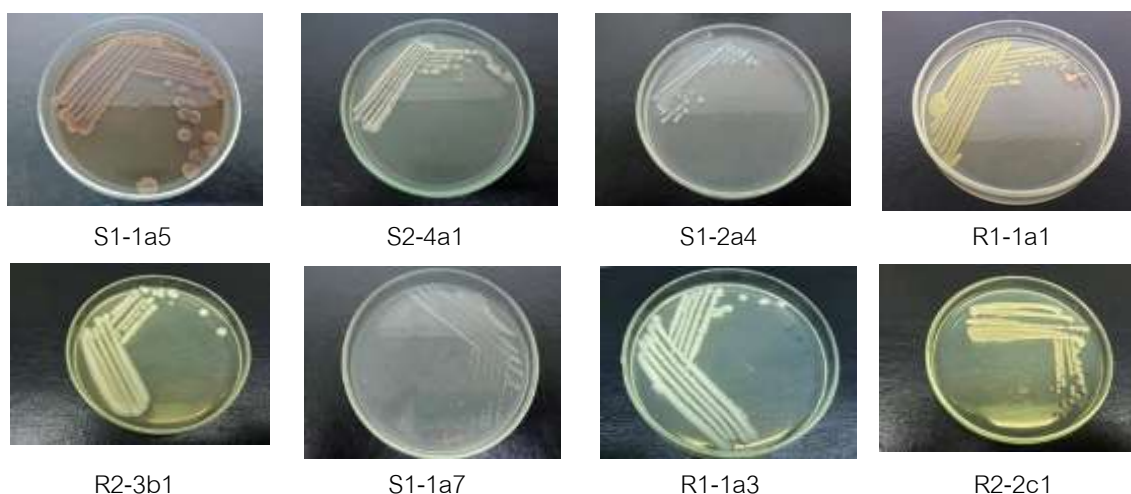


Figure 4. Selected bacterial isolates from rhizosphere soil and rhizoplane for coffee seedling experiment

การทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียต่อการเจริญเติบโตของกล้ากาแฟและการดูดใช้ธาตุอาหาร

ผลการประเมินประสิทธิภาพของ N_2 fixing isolates ที่คัดเลือก พบว่าการใช้ N_2 fixing isolates ที่คัดเลือกทำให้การเจริญเติบโตของต้นกล้ากาแฟและราก แตกต่างกับกรรมวิธีควบคุม อย่างชัดเจน โดยเฉพาะ T2 (S2-4a1) และ T5 (R2-3b1) (Figure 5) และเมื่อทำการวัดการเจริญเติบโตของต้นกล้ากาแฟพบว่าการใส่เชื้อแบคทีเรียคัดเลือก ทุกไฮโซเลท โดยเฉลี่ยแล้ว ให้ค่าความยาวราก ความสูง น้ำหนักแห้ง ของรากและใบ รวมทั้งการดูดใช้ธาตุอาหาร ไนโตรเจน (N uptake) ฟอสฟอรัส (P uptake) และ โพแทสเซียม (K uptake) สูงกว่ากรรมวิธีควบคุมที่ไม่ใส่เชื้อ (Table 4)

การใส่เชื้อ S2-4a1 ให้ค่า ความยาวราก ความสูง น้ำหนักแห้ง ของราก และ ใบ สูงที่สุด โดยมีความสามารถส่งเสริมการเจริญเติบโตของต้นกล้ากาแฟ ได้ใกล้เคียงกันกับ R2-3b1 และสูงกว่ากรรมวิธีควบคุมที่ไม่ใส่เชื้อ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Table 4) นอกจากนี้ S2-4a1 และ R2-3b1 ยังให้ ค่า N uptake (226.9 และ 198.4 mg N/3 plants, ตามลำดับ) สูงกว่าไฮโซเลทอื่น และสูงกว่ากรรมวิธีควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ สำหรับ P uptake ไฮโซเลท S2-4a1 ให้ค่าสูงที่สุด (15.46 mg P/3 plants) รองลงมา ได้แก่ S1-1a5 (14.28 mg P/3 plants) การใช้เชื้อแบคทีเรียคัดเลือกทุกไฮโซเลท ยังส่งผลให้ K uptake ของต้นกล้ากาแฟ สูงกว่ากรรมวิธีควบคุม



Figure 5. Coffee seedlings inoculated with selected N_2 fixing isolates; control = no inoculation; T1 = S1-1a5; T2= S2-4a1; T3= S1-2a4; T4= R1-1a1; T5=R2-3b1; T6=S1-1a7; T7= R1-1a3 and T8= R2-2c1

Table 4. Effect of bacterial inoculation on growth and nutrients content of coffee seedling

Treatment	Root length (cm)	Plant height (cm)	Dry weight (g/plant)		Nutrient uptake (mg/plant)		
			Root	Shoot	N	P	K
Control	9.16c	6.16c	1.94de	1.71c	112.5d	4.97d	28.46f
S1-1a5	13.83ab	11.66ab	2.16bc	3.92a	191.8abc	14.28ab	114.07a
S2-4a1	14.5 ab	13.0 a	2.37a	3.83a	198.4ab	15.46a	100.25ab
S1-2a4	10.0 bc	9.0 bc	2.11bcd	2.71b	167.0bc	9.77c	74.84cd
R1-1a1	12.83abc	10.0 abc	1.95de	2.35bc	146.8cd	8.10cd	82.82bcd
R2-3b1	14.83a	13.0 a	2.27ab	3.52a	226.9a	8.62cd	94.22abc
R1-1a7	12.0 abc	8.0 bc	1.91e	2.25bc	169.9bc	9.80c	84.55bc
R1-1a3	10.0 bc	7.66 c	2.03cde	2.27bc	146.0cd	10.50bc	62.62de
R2-2c1	14.0 a	8.0 bc	1.99cde	2.29bc	161.6bc	10.10bc	50.15e
Average	12.35	9.65	2.08	2.76	168.98	10.17	76.88
F-test	*	*	*	*	*	*	*
CV (%)	21.46	23.59	4.75	14.49	15.87	24.53	10.16

¹ Means within the same column follow by different letters showed significantly difference between treatment by LSD test at $P \leq 0.05$

อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยค่า K uptake ที่เพิ่มขึ้นสูงกว่ากรรมวิธีควบคุมประมาณ 2 ถึง 4 เท่า

วิจารณ์

การจัดการปลูกกาแฟที่แตกต่างกันของพื้นที่เก็บตัวอย่างในการทดลองนี้ ส่งผลให้มีสมบัติของดินและความเป็นประโยชน์ของธาตุอาหารต่างกัน site 1 (pH 4.98)

มีการใช้การใส่ปุ๋ยอินทรีย์-ชีวภาพ ร่วมกับปุ๋ยเคมี อาจมีส่วนทำให้ค่า pH ของดินต่ำมากกว่า site 2 (pH 5.98) ซึ่งปล่อยให้กาแฟเจริญเติบโตในธรรมชาติเองโดยไม่มีการใส่ปุ๋ยเลย สำหรับความเข้มข้นของ available P ของดินพบว่า site 1 สูงกว่า site 2 มาก ประมาณ 20 เท่า (Table 1) ซึ่งแสดงให้เห็นว่ามีการใส่ปุ๋ยเคมีทำให้มีฟอสฟอรัสตกค้างในดินสูงมาก โดยเฉลี่ยแล้วได้จำนวนไอโซโทปจาก site 1 ทั้งจากดินและรากมากกว่า site 2 ซึ่งอาจเป็นเพราะ

ดิน site 1 มีการใส่ทั้งปุ๋ยเคมี ปุ๋ยหมัก และปุ๋ยอินทรีย์-ชีวภาพ ประกอบกับมีอายุของต้นกาแฟน้อยกว่า site 2 อย่างไรก็ตามถึงแม้ site 1 จะมีจำนวนแบคทีเรียที่แยกได้มากกว่า site 2 ผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าเปอร์เซ็นต์ของแบคทีเรียที่ตรึงไนโตรเจนได้ใน site 2 (84%) มีสูงกว่า site 1 (25%) ประมาณ 3 เท่า ซึ่งอาจเป็นผลมาจากการที่ site 2 มีการใส่ปุ๋ยเคมีทำให้มีปริมาณไนโตรเจนที่เป็นประโยชน์สูง ซึ่งปริมาณของ แอมโมเนียม (NH_4^+) ไนเตรต (NO_3^-) และสารประกอบไนโตรเจนอื่น ๆ มีผลต่อการตรึงไนโตรเจน ถ้ามีปริมาณมากเกินไปในดิน จุลินทรีย์จะไม่ตรึงไนโตรเจนจากอากาศเนื่องจากใช้สารประกอบในดินง่ายกว่า Wang-nai (1985) ดังนั้นแบคทีเรียที่แยกได้จาก site 1 บางไอโซเลทอาจสูญเสียความสามารถในการตรึงไนโตรเจนไป

N_2 fixing bacteria ที่แยกได้จากดินรอบรากพืช (RS soils) (35 ไอโซเลท) ซึ่งมีความสามารถในการย่อยละลายฟอสเฟต ในอาหาร PVK+ $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ มีเปอร์เซ็นต์จาก N_2 fixing bacteria ทั้งหมด (54.3%) ใกล้เคียงกับในอาหาร PVK+ AlPO_4 (51.4%) และมีความแตกต่างเล็กน้อยเมื่อเปรียบเทียบกับเปอร์เซ็นต์ดังกล่าวระหว่างพื้นที่แยกเชื้อ (Table 3) อย่างไรก็ตาม พบว่าเปอร์เซ็นต์ของ N_2 fixing bacteria ที่แยกได้จากบริเวณเนื้อเยื่อผิวราก (rhizoplane: RP) ที่สามารถย่อยละลายฟอสเฟตจาก $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ของ site 2 (88.2%) สูงกว่าของ site 1 (61.5%) ในทางตรงข้ามเมื่อมี AlPO_4 เป็นแหล่งฟอสเฟต เปอร์เซ็นต์ดังกล่าวของ site 1 (61.5%) สูงกว่าของ site 2 (11.8%) อย่างชัดเจนเช่นกัน ซึ่งเปอร์เซ็นต์ที่ต่างกันนี้อาจเป็นผลมาจากการที่ดินของ site 1 มีค่า pH (4.98) ต่ำกว่า pH ของ site 2 (5.98) แล้วส่งผลให้ N_2 fixing bacteria ที่แยกได้จาก RP และซึ่งมีปฏิสัมพันธ์ใกล้ชิดกับรากพืชมีความสามารถละลายฟอสเฟตจากสองแหล่งต่างกัน จากรายงานการวิจัยเกี่ยวกับ phosphate solubilizing bacteria (PSB) ที่แยกได้จากทั้งในดินกรดและดินแคลคาเรียส (calcareous soils) พบว่าแบคทีเรียส่วนใหญ่มีความสามารถในการละลายฟอสเฟตจาก $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ (30.2-523.7 mgP/L) ได้ดีกว่าจาก AlPO_4 (18.5-61.3 mgP/L) หรือ FePO_4 (17.8-103.4 mgP/L) (Lui *et al.*, 2015; Panda *et al.*, 2016) ซึ่งสอดคล้องกับ

งานทดลองครั้งนี้ ที่พบว่า N_2 fixing bacteria มีความสามารถในการละลายของ $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ อยู่ในช่วง 101.7-406.1 mgP/L ส่วนค่าการละลายของ AlPO_4 อยู่ในช่วง 8.9-183.8 mgP/L

นอกจากความสามารถของ N_2 fixing bacteria ในการละลายฟอสเฟตแล้ว ยังมีความสามารถในการย่อยละลายโพแทสเซียมจากแร่ feldspar อีกด้วย (23.41-44.67 mg K/L) ซึ่งสอดคล้องกับงานทดลองของ Parmar and Sindhu (2013) ซึ่งพบว่าค่าการละลายโพแทสเซียมจากไอโซเลทที่แตกต่างกัน โดยใช้ แร่ ไมก้า เป็นแหล่งของโพแทสเซียมอยู่ในช่วงระหว่าง 15-48 mg K/L ส่วนงานทดลองของ Hartono *et al.* (2016) พบว่า N_2 fixing bacteria มีความสามารถในการผลิต IAA ได้ (5-59 mg/L) สำหรับ N_2 fixing bacteria ที่แยกได้จากงานทดลองครั้งนี้สามารถผลิตได้อยู่ในช่วง 0.58-22.80 mg IAA/L

เมื่อทำการคัดเลือกเชื้อ N_2 fixing bacteria ที่มีศักยภาพในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชมาทดสอบประสิทธิภาพกับต้นกล้ากาแฟ พบว่า ทุกไอโซเลทให้การเจริญเติบโตและการดูดใช้ธาตุอาหาร สูงกว่ากรรมวิธีควบคุมที่ไม่ใส่เชื้อ โดยเฉลี่ยแล้วไอโซเลท S2-4a1 มีความโดดเด่นกว่าไอโซเลทอื่น ๆ โดยสามารถเพิ่ม N, P และ K uptake สูงกว่า กรรมวิธีควบคุม โดยคิดเป็น 76, 211 และ 252% ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับงานทดลองของ Wedhastri *et al.* (2012) ได้ทำการทดลองใช้เชื้อจุลินทรีย์ที่แยกได้จากบริเวณรอบรากกาแฟในการเพิ่มการเจริญเติบโตของต้นกล้ากาแฟในโรงเรือน ในประเทศอินโดนีเซียและพบว่าจุลินทรีย์ชนิด *Achromobacter* sp., *Stenotrophomonas maltophilia* และ *Leifsonia aquatica* ที่แยกได้บริเวณรอบรากกาแฟมีความสามารถในการตรึงไนโตรเจนได้ และช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของต้นกล้ากาแฟกาแฟอะราบิกาที่ปลูกในโรงเรือนมากกว่าต้นกล้ากาแฟอะราบิกาที่ไม่ได้ใส่เชื้อ จากผลการทดลองครั้งนี้แสดงให้เห็นว่า N_2 fixing bacteria ไอโซเลท S2-4a1 สามารถนำไปพัฒนาเป็นปุ๋ยชีวภาพสำหรับการผลิตต้นกล้ากาแฟและการปลูกกาแฟในพื้นที่สูงได้ อย่างไรก็ตามควรนำไปทดสอบประสิทธิภาพในโรงเรือนและภาคสนามเพื่อยืนยันประสิทธิภาพของการใช้ N_2 fixing bacteria ก่อนนำไปผลิตเป็นปุ๋ยชีวภาพสำหรับการปลูกกาแฟ

สรุป

แบคทีเรียตรึงไนโตรเจน (N_2 fixing bacteria) ที่คัดแยกได้มีประมาณ 42% (65 ไอโซเลท) ของแบคทีเรียที่แยกได้ทั้งหมด (155 ไอโซเลท) site 1 ได้แบคทีเรียตรึงไนโตรเจน จำนวน 28 ไอโซเลท จากจำนวน ไอโซเลททั้งหมด 111 ไอโซเลท คิดเป็น 25.2 % ส่วน site 2 ได้แบคทีเรียตรึงไนโตรเจนจำนวน 37 ไอโซเลท จากทั้งหมด 44 ไอโซเลท คิดเป็น 84 % มี N_2 fixing bacteria เพียง 23 ไอโซเลท ที่สามารถย่อยละลายทั้งฟอสเฟต และ โพแทสเซียม ได้ ความสามารถในการละลายธาตุอาหารนี้มีความแปรผันค่อนข้างสูงขึ้นอยู่กับ ชนิดของแบคทีเรีย และ แหล่งของฟอสเฟต หรือ โพแทสเซียม (8.86-406.11 mg P/L และ 23.41-44.67 mg K/L ตามลำดับ) การสร้าง IAA ก็มีความแปรผันสูงเช่นกันตามชนิดของแบคทีเรีย (0.58-22.80 mg IAA/L) เมื่อคัดเลือกเชื้อ 8 ไอโซเลท ที่มีศักยภาพต่างกัน ในการละลายฟอสเฟต โพแทสเซียม และ สร้าง IAA มาทดสอบประสิทธิภาพกับต้นกล้ากาแฟพบว่า S2-4a1 และ R2-3b1 ให้ค่าความสูง น้ำหนักแห้งของราก และใบสูงที่สุดใกล้เคียงกัน และให้ค่า N, P และ K uptake สูงกว่ากรรมวิธีควบคุมประมาณ 2 ถึง 3.5 เท่า และเมื่อเทียบกันระหว่าง 2 ไอโซเลทจะเห็นว่า S2-4a1 มีศักยภาพสูงโดดเด่นที่สุดในการนำไปประยุกต์ใช้เป็นปุ๋ยชีวภาพสำหรับการผลิตกาแฟเพื่อลดปริมาณการใช้ปุ๋ยเคมี อย่างไรก็ตาม ควรนำไอโซเลทที่มีศักยภาพสูงนี้ไปทดสอบในภาคสนามเพื่อเป็นการยืนยันผลของการใช้แบคทีเรียเพื่อส่งเสริมการเจริญเติบโตของต้นกล้ากาแฟ แล้วจึงสามารถนำไปสู่การประยุกต์ใช้ในการผลิตกาแฟเพื่อลดปริมาณการใช้ปุ๋ยเคมีได้ต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

การศึกษานี้ได้รับทุนสนับสนุนจากสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา (สกอ.) มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ และ กระทรวงการต่างประเทศ ฝรั่งเศส ซึ่งเป็น โครงการวิจัยร่วมภายใต้ความร่วมมือด้านอุดมศึกษาและการวิจัย ระหว่างไทย-ฝรั่งเศสประจำปี 2559-2560 และได้รับทุนสนับสนุนงานวิจัยของนักศึกษา

ระดับบัณฑิตศึกษาจากบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ คณะผู้วิจัยจึงขอขอบคุณอย่างสูงมา ณ โอกาสนี้

เอกสารอ้างอิง

- Angkasith, P. and N. Yimyam. 2000. Cultivation and Production of Arabica Coffee on Highland. Ming Mueang, Chiang Mai, 229 p. (in Thai)
- Bremner, J.M. 1965. Total nitrogen. pp. 1001-1015. *In*: R.W. Weaver, J.S. Angle and P.S. Bottomley (eds.). Methods of Soil Analysis. Part 2: Microbiological and Biochemical Properties. Soil Science Society of America, Inc., Madison, Wisconsin.
- Delprete, P.G. and J.G. Jardim. 2012. Systematics, taxonomy and floristics of Brazilian Rubiaceae: an overview about the current status and future challenges. *Rodriguesia* 63(1): 101-128.
- 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.
- Hartono, N., F. Asnawati, H. Citra, N.I. Hanhayani, M. Junda, A. Ali, Y. Hala and O. Jumadi. 2016. Ability of ammonium excretion, indol acetic acid production, and phosphate solubilization of nitrogen-fixing bacteria isolated from crop rhizosphere and their effect on plant growth. *ARNP Journal of Engineering and Applied Sciences* 11(19): 11735-11741.

-
- Hebei Academy of Sciences. 1996. Bio-fertilizer Production. The International Science and Technology Cooperation. The Institute of Microbiology, Hebei. 25 p.
- Huangmee, K., T. Punsak, P. Kanghae, W. Homhaul and W. Punsak. 2016. The influence of potassium-solubilizing bacteria to release exchangeable K. pp. 1-7. *In: Proceedings of 14th National Conference "Naresuan Research". Naresuan University, Phitsanulok.* (in Thai)
- Land Development Department. 2010. Handbook of Soil Chemical Analysis. Document No. OSD-03. Land Development Department, Bangkok. 52 p. (in Thai)
- Liu, Z., Y.C. Li, S. Zhang, Y. Fu, X. Fan, J.S. Patel and M. Zhang. 2015. Characterization of phosphate-solubilizing bacteria isolated from calcareous soils. *Applied Soil Ecology* 96: 217-224.
- Panda, B., H. Rahman and J. Panda. 2016. Phosphate solubilizing bacteria from the acidic soils of eastern Himalayan region and their antagonistic effect on fungal pathogens. *Rhizosphere* 2: 62-71.
- Parmar, P. and S.S. Sindhu. 2013. Potassium solubilization by rhizosphere bacteria: Influence of nutritional and environmental conditions. *Journal of Microbiology Research* 3(1): 25-31.
- Suwanwisolkrit, P. 2011. Efficiency of arabica coffee production in northern Thailand. Research report. Highland Research and Training Center, Faculty of Agriculture, Chiang Mai University, Chiang Mai. 68 p. (in Thai)
- Wang-nai, S. 1985. Soil Microorganism and Activity in Soil. Thai Watana Panich, Bangkok 193 p. (in Thai)
- Weaver, R.W. and Seth K.A Danso. 1994. Dinitrogen fixation. pp. 1019-1043. *In: R.W. Weaver, J.S. Angle and P.S. Bottomley (eds.). Methods of Soil Analysis. Part 2: Microbiological and Biochemical Properties. Soil Science Society of America, Inc., Madison, Wisconsin.*
- Wedhastri, S., N.F. Yudianti, J. Widada and J.B. Baon. 2012. Ability of non-symbiotic nitrogen-fixing bacteria isolated from coffee plant rhizosphere and their effects on robusta coffee seedlings. *Journal of Agricultural Science and Technology A* 2(5): 660-666.
- 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)
- Yupa, C. 2017. Isolation and characterization of rhizobacteria obtained from arabica coffee. Progress report. PHC SIAM Program 2016-2017. Faculty of Agriculture, Chiang Mai University, Chiang Mai. 10 p.
-