

**บทความวิจัย (Research Article)****การคัดเลือกแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนอิสระเพื่อส่งเสริมการเจริญเติบโตของข้าว**จตุพร บุญณาดากุล<sup>1</sup>, ศิราภรณ์ ชื่นบาล<sup>2\*</sup>, จุปน ชื่นบาล<sup>2</sup>, ศรีกาญจนา คล้ายเรือง<sup>1</sup>, ศุภริตา อ่าทอง<sup>3</sup>**Selection of free-living nitrogen fixing bacteria to promote on rice growth**Chatuporn Boonnadaku<sup>1</sup>, Siraporn Cheunbarn<sup>2\*</sup>, Tapan Cheunbarn<sup>2</sup>, Srikanjana Klayraung<sup>1</sup>, Supatida Aumtong<sup>3</sup><sup>1</sup> Department of Biotechnology, Faculty of Science, Maejo University, Chiangmai Province 50290<sup>2</sup> Department of Environmental Technology, Faculty of Science, Maejo University, Chiangmai Province 50290<sup>3</sup> Department of Soil Science, Faculty of Agricultural Production, Maejo University, Chiangmai Province 50290

\* Correspondence to E-mail: siraporn@mju.ac.th

**Naresuan Phayao J.** 2019;12(2):32-40.

Received: 2 July 2019, Revised: 22 August 2019, Accepted: 25 August 2019

**บทคัดย่อ**

การศึกษามุ่งหมายเพื่อแยกแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนอิสระจากตัวอย่างดินรอบรากข้าว มีแบคทีเรีย 310 กลุ่มแยกเดี่ยว พร้อมด้วยแบคทีเรียตรึงไนโตรเจน 26 กลุ่มแยกเดี่ยว การทดสอบคุณสมบัติแสดงให้เห็นแบคทีเรีย 10 กลุ่มแยกเดี่ยว มีประสิทธิภาพตรึงไนโตรเจนสูง และผลิตอินโดลอะซีติก จำแนกแบคทีเรียคัดเลือกได้ อาศัยการวิเคราะห์ลำดับยีน 16S rRNA บ่งชี้ 3 สายพันธุ์ อย่างเช่น *Bacillus altitudinis* CM2-2, *Bacillus aryabhatai* LP1-5 และ *Pseudomonas nitroreducens* PY7-6 ผลิตสารประกอบไนโตรเจนสูง  $15.60 \pm 0.40$ ,  $7.70 \pm 0.70$  และ  $6.30 \pm 0.10$  มก. ต่อลิตร ตามลำดับ นอกจากนี้แล้ว *Pseudomonas nitroreducens* PY7-6 ให้อินโดลอะซีติกสูงสุด  $23.90 \pm 0.20$  มก. ต่อลิตร ใส่ปุ๋ยเคมี NPK และแบคทีเรียเพาะเลี้ยงลงในกระถางข้าวต้นอ่อนอายุ 30 วัน การใส่ปุ๋ย NPK และ *Bacillus altitudinis* CM2-2 เป็นกรรมวิธีที่ดีที่สุดต่อการเจริญของข้าว ประกอบด้วย ความสูงลำต้น ความยาวราก จำนวนใบ น้ำหนักสดและน้ำหนักแห้ง แตกต่างจากอย่างมีนัยสำคัญเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม อย่างไรก็ตาม ไม่มีความแตกต่างเกี่ยวกับปริมาณไนโตรเจน สรุป *Bacillus altitudinis* CM2-2 อาจพัฒนาเป็นปุ๋ยชีวภาพ

**คำสำคัญ :** แบคทีเรียตรึงไนโตรเจน ดินรอบรากข้าว ปุ๋ยชีวภาพ การใส่เชื้อ**Abstract**

The study was aimed to isolate the bacteria from rice rhizosphere soil samples, and selected the free-living nitrogen fixing bacteria. There were totally 310 isolates with 26 isolates for nitrogen fixing bacteria. The qualification testing showed 10 bacterial isolates, with the high effectiveness of nitrogen fixation and indole-3-acetic acid (IAA) production. Identification of selected bacteria using analyzing the 16S rRNA genes sequence indicated three species such as *Bacillus altitudinis* CM2-2, *Bacillus aryabhatai* LP1-5 and *Pseudomonas nitroreducens* PY7-6, which had produced high nitrogen compounds at  $15.60 \pm 0.40$ ,  $7.70 \pm 0.70$  and  $6.30 \pm 0.10$  mg/L respectively.

<sup>1</sup> สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ อำเภอสันทราย จังหวัดเชียงใหม่ 50290<sup>2</sup> สาขาวิชาเทคโนโลยีสิ่งแวดล้อม คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ อำเภอสันทราย จังหวัดเชียงใหม่ 50290<sup>3</sup> สาขาวิชาปฐพีศาสตร์ คณะผลิตกรรมการเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้ อำเภอสันทราย จังหวัดเชียงใหม่ 50290

Beside, *Pseudomonas nitroreducens* PY7-6 had provided the highest amount of IAA at  $23.90 \pm 0.20$  mg/L. The NPK chemical fertilizer and isolated bacteria had been applied into the rice pot during the 30-day seedling period. The NPK and *Bacillus altitudinis* CM2-2 was the most treatment for the rice growth including the stem height, root length, leaf number, and fresh and dry weight, significant differences compared with the control. However, there was no significant difference of the nitrogen contents. In conclusion, *Bacillus altitudinis* CM2-2 might be developed as bio-fertilizer.

**Keywords:** Nitrogen fixing bacteria, rice rhizosphere soil, bio-fertilizer

## คำนำ

ข้าว (*Oryza sativa* L.) เป็นพืชอาหารสำคัญชนิดหนึ่งของโลก โดยเฉพาะประเทศในภูมิภาคเอเชีย นิยมรับประทานข้าวเป็นอาหารประจำวันมากกว่าในทวีปอื่นๆ สำหรับประเทศไทย ข้าวเป็นพืชเศรษฐกิจสำคัญเป็นอันดับหนึ่ง พื้นที่ปลูกข้าวแพร่หลายมีทั่วทั้งประเทศ ในปี พ.ศ. 2561 พื้นที่เพาะปลูกข้าวนาปี และข้าวนาปรัง 58.982 และ 12.840 ล้านไร่ ผลผลิตข้าวนาปี และข้าวนาปรัง 26.100 และ 8.552 ล้านตัน อย่างไรก็ตาม การผลิตข้าวของประเทศไทยยังคงประสบปัญหาผลผลิตต่ำ ปี พ.ศ. 2560 ถึง 2561 เมื่อเปรียบเทียบกับผลผลิตข้าวสารของกลุ่มประเทศผู้ผลิตข้าวสำคัญ 10 อันดับแรก เรียงลำดับจากมากไปหาน้อย ดังนี้ ญี่ปุ่น จีน บราซิล เวียดนาม อินโดนีเซีย บังกลาเทศ อินเดีย ฟิลิปปินส์ ไทย พม่า และประเทศอื่น ผลผลิตข้าวสารเท่ากับ 779, 774, 626, 589, 485, 467, 403, 399, 316, 292 และ 382 กก. ต่อไร่ ตามลำดับ ประเทศผลผลิตข้าวสูงสุดเป็นอันดับ 1 คือ ญี่ปุ่น (779 กก. ต่อไร่) ส่วนประเทศไทย ผลผลิตข้าวอยู่ในอันดับที่ 9 (316 กก. ต่อไร่) รองสุดท้ายจากประเทศพม่า [1] สาเหตุสำคัญเนื่องจากพื้นที่ปลูกข้าวส่วนใหญ่ขาดธาตุอาหารโดยเฉพาะธาตุไนโตรเจน อันเป็นธาตุอาหารจำเป็นสำหรับการเจริญเติบโตของข้าว โดยข้าวดูดซับธาตุไนโตรเจนในรูปเป็นประโยชน์ ได้แก่ ไนเตรท ( $\text{NO}_3^-$ ) และแอมโมเนียม ( $\text{NH}_4^+$ ) [2] ความต้องการธาตุไนโตรเจนเป็นเหตุใช้ปุ๋ยเคมี เพื่อเพิ่มธาตุอาหารแก่พืชปริมาณมากและติดต่อกันระยะเวลานาน เกิดผลกระทบต่อโครงสร้างของดิน ดินขาดอินทรีย์วัตถุ ต้นข้าวดูดซับธาตุอาหารได้น้อยและอ่อนแอ เกิดโรคแมลงระบาดง่าย [3]

ปัญหาของผลกระทบดังกล่าวปรากฏ การศึกษาแบคทีเรียเพิ่มธาตุอาหารแก่พืชอย่างแพร่หลาย ได้แก่ แบคทีเรียตรึงไนโตรเจนอิสระ (free-living nitrogen fixing bacteria) เพื่อพืชดูดซับธาตุไนโตรเจนสำหรับการเจริญเติบโต นอกจากนี้แบคทีเรียตรึงไนโตรเจนสามารถสร้างฮอร์โมนพืชได้ เช่น ออกซิน จิบเบอเรลลิน และไซโตไคนิน ส่งเสริมการเจริญของพืช [4] แบคทีเรียบริเวณรอบรากพืชส่งผลต่อการเจริญเติบโตของพืช เพราะเกิดปฏิกิริยาเคมีหลากหลายในดินอย่างหลากหลาย และแบคทีเรียแยกได้จากดินรอบรากพืช พบได้ทั่วไป ได้แก่ *Azotobacter* sp., *Bacillus* sp., *Pseudomonas* sp. และ *Azospirillum* sp. เป็นต้น [5] แบคทีเรียตรึงไนโตรเจนบางสายพันธุ์สามารถผลิตฮอร์โมนได้ ฮอร์โมนกระตุ้นการเจริญเติบโตของพืช ได้แก่ กรดอินโดลอะซิติก (indole-3-acetic acid - IAA) กรดจิบเบอเรลลิน (gibberellic acid -  $\text{GA}_3$ ) เป็นต้น [6,4] มีบทบาทสำคัญต่อการงอกของเมล็ด [7] การยืดยาวของราก [8,9] การยืดยาวของเซลล์ และการแบ่งเซลล์ [10]

แบคทีเรียหลายสกุลสามารถผลิตกรดอินโดลอะซิติก ประกอบด้วย *Bacillus* sp., *Microbacterium* sp., *Methylophaga* sp., *Agromyces* sp., *Paenibacillus* sp., *Pseudomonas* sp. และ *Azospirillum* sp. [11,12] ส่วนแบคทีเรีย *Azotobacter vinelandii* และ *Azotobacter chroococcum* สามารถผลิตฮอร์โมนออกซินส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช [13] แบคทีเรียหลายชนิดส่งเสริมพืชเจริญเติบโตและเพิ่มผลผลิตโดยผ่านกลไกซับซ้อนต่างๆ อย่างเช่นกระบวนการตรึงไนโตรเจน (nitrogen fixation) จากชั้นบรรยากาศ เปลี่ยนไนโตรเจนเป็นรูปเป็นประโยชน์ต่อพืช

การศึกษาสายงานแบคทีเรีย *Azospirillum lipoferum* strain RSWT1 และ *Pseudomonas* strain Ky1 ส่งเสริมการเจริญเติบโตของข้าว JP5 และเพิ่มผลผลิตข้าวร้อยละ 18 และ 13.8 [14] แบคทีเรียตรึงไนโตรเจนอิสระหลายชนิดมีคุณสมบัติหลากหลายสามารถนำมาประยุกต์ทำปุ๋ยชีวภาพส่งเสริมพืชเจริญเติบโต แม้ยังไม่ทราบกลไกการทำงานระดับโมเลกุลของฮอริโมนในแบคทีเรียอย่างชัดเจน [15]

การศึกษามุ่งหมายคัดเลือกแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนอิสระ แยกจากดินรอบรากข้าวเกี่ยวกับประสิทธิภาพตรึงไนโตรเจนและผลิตกรดอินโดลอะซีติก

## วัสดุและวิธีการ

### การแยกแบคทีเรียและทดสอบการตรึงไนโตรเจน

เก็บตัวอย่างดินรอบรากข้าวบริเวณแปลงปลูกข้าว 4 จังหวัดในภาคเหนือ ได้แก่ เชียงใหม่ เชียงราย พะเยา และลำพูน แยกแบคทีเรียโดยเฉพาะเลี้ยงในสารอาหาร (ผสมวุ้น) tryptic soy คัดแยกจนได้เชื้อบริสุทธิ์ ถ่ายแบคทีเรียลงในสารอาหารเหลวปราศจากไนโตรเจน (N-free medium) ทดสอบการตรึงไนโตรเจนวัดการเจริญเติบโตของแบคทีเรียที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร อาศัยเครื่องเทียบความทึบแสง (spectrophotometer) ปรับค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 0.1 และถ่ายแบคทีเรียแต่ละกลุ่มแยกเดี่ยวปริมาณ 0.2 มล. ลงสารอาหารโบรโมไทมอลบลูปราศจากไนโตรเจน (N-free bromothymol blue medium) ปริมาตร 3 มล. บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 7 วัน สังเกตการเปลี่ยนแปลงสีสารตัวบ่งชี้โบรโมไทมอลบลู [16]

### การทดสอบการผลิตกรดอินโดลอะซีติก

บ่มแบคทีเรียในสารอาหารเหลว (broth) tryptic soy ซึ่งเติมทริปโตเฟน (tryptophan) ความเข้มข้น 600 ไมโครกรัม ต่อมล. วิเคราะห์ปริมาณกรดอินโดลอะซีติก ด้วยสาร Salkowski coloring ปั่นเหวี่ยงตัวอย่างด้วยความเร็ว 4,000 รอบต่อนาที นาน 30 นาที ณ อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส เก็บสารละลายใส ปริมาตร 0.5 มล. เติมน้ำ Salkowski coloring ปริมาตร 0.5 มล. ( $\text{FeCl}_3$  0.5 โมล ละลายใน  $\text{HClO}_4$  ร้อยละ 35) บ่มที่อุณหภูมิห้องในที่มืดนาน 30 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายที่ความยาวคลื่น 535 นาโน

เมตร อาศัยเครื่องเทียบความทึบแสง เปรียบเทียบกับกราฟค่ามาตรฐาน จากนั้นทดสอบการผลิตกรดอินโดลอะซีติก ด้วยทริปโตเฟนความเข้มข้นแตกต่างกัน ได้แก่ 200, 400, 600, 800 และ 1,000 ไมโครกรัม ต่อมล. ปริมาตร 5 มล. บ่มนาน 3 วัน วิเคราะห์ปริมาณกรดอินโดลอะซีติกด้วยสาร Salkowski colouring reagent [17,18]

### การจำแนกชนิดแบคทีเรียอาศัยการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นส่วน 16S rRNA

สกัดสารพันธุกรรม (DNA) แบคทีเรียด้วยชุดสกัดสารพันธุกรรมสำเร็จรูป (protein precipitation solution รหัส A7951, บริษัท Promega corporation, ประเทศสหรัฐอเมริกา) เพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมทั้งหมดด้วยวิธี polymerase chain reaction - PCR) ใช้ primer 27F(5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') และ 1522R(5'-AAGGAGGTGATCCGCCGA-3') นำตรวจสอบขนาดของดีเอ็นเอของผลผลิต PCR ด้วยการแยกทางไฟฟ้าด้วยเจลอะกาโรส (agarose gel electrophoresis) ทำชิ้นส่วน 16S rRNA ของผลผลิต PCR ให้บริสุทธิ์ ด้วยชุดสำเร็จรูป GEL/PCR DNA fragments extraction (รุ่น 70 bp-20 kb DNA fragments, Cat. number GMB 100, บริษัท Geneaid biotech Ltd., ประเทศไต้หวัน) ส่งสารพันธุกรรมบริสุทธิ์วิเคราะห์หาลำดับเบส ณ บริษัท First Base Laboratories ประเทศมาเลเซีย นำลำดับเบสเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลอาศัยโปรแกรมประมวลผล BLAST ของ The National Center for Biotechnology Information (NCBI) ระบุสายพันธุ์ของแบคทีเรีย

วางแผนศึกษาประสิทธิภาพของแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนกับข้าวระยะต้นอ่อน ออกแบบสุ่มสมบูรณ์ (completely randomized design - CRD) 7 กรรมวิธี แต่ละกรรมวิธีทำ 6 ซ้ำ

กรรมวิธี 1 ใส่แบคทีเรียกลุ่มแยกเดี่ยว 1 + ปุ๋ยไนโตรเจน-ฟอสฟอรัส-โปแตสเซียม (NPK)

กรรมวิธี 2 ใส่แบคทีเรียกลุ่มแยกเดี่ยว 2 + NPK

กรรมวิธี 3 ใส่แบคทีเรียกลุ่มแยกเดี่ยว 3 + NPK

กรรมวิธี 4 ใส่แบคทีเรียผสม 3 กลุ่มแยกเดี่ยว อัตราส่วน (1:1:1) + NPK

กรรมวิธี 5 ใส่แบคทีเรียผสม 3 กลุ่มแยกเดี่ยว ในอัตราส่วน (1:1:1)

กรรมวิธี 6 ใส่ NPK

กรรมวิธี 7 กรรมวิธีควบคุม

เตรียมดินปลอดเชื้อโดยอบลมร้อน ณ อุณหภูมิ 82 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที ใส่ดินปลอดเชื้อ 1 กก. ต่อกระถางพลาสติกปราศจากรอยรื้อรื้อขนาด (กว้าง x ยาว) 16 x 16 ซม. ส่วนเมล็ดพันธุ์โรซเบอรี่ปลอดเชื้อ โดยแช่เมล็ดพันธุ์ในแมกคิวริคคลอไรด์ ( $HgCl_2$ ) ร้อยละ 0.2 นาน 8 นาที จากนั้นแช่น้ำลดการปนเปื้อน (น้ำต้มเดือด นาน 30 นาที) นาน 25 นาที พักให้เย็น ล้างด้วยน้ำอีก 3 ครั้ง [19] หลังจากนั้นแช่น้ำนาน 12 ชม. ห่อผ้าชุบน้ำ พักไว้ 12 ชม. ปลูกต่อเมื่อเมล็ดข้าวเริ่มงอก

คำนวณปริมาณธาตุอาหารเพียงพอต่อข้าว เจริญเติบโตตามอัตราแนะนำ [20] ปลูกข้าว 25 ต้น ต่อกระถาง ใส่ปุ๋ย 2 ครั้ง ครั้งแรก เมื่อข้าวอายุ 10 วัน ใส่ปุ๋ย NPK 16-20-0 ปริมาณ 480 มก. ต่อกระถาง (30 กก. ต่อไร่) และใส่แบคทีเรีย 6 มล. ต่อกระถาง (ความเข้มข้น  $10^9$  เซลล์ ต่อมล.) ครั้งที่ 2 เมื่อข้าวอายุ 20 วัน ใส่ปุ๋ย NPK 46-0-0 ปริมาณ 140 มก. ต่อกระถาง (9 กก. ต่อไร่) และใส่แบคทีเรีย 6 มล. ต่อกระถาง (ความเข้มข้น  $10^9$  เซลล์ ต่อมล.) ใส่ น้ำ ปลอดเชื้อเท่ากันทุกกระถาง

วิเคราะห์ปริมาณสารประกอบไนโตรเจนใน ข้าว เมื่อข้าวอายุ 30 วัน ตัดโคนต้นทิ้ง อบต้นข้าว ณ อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส จนแห้งสนิทและน้ำหนักคงที่ และบดละเอียดตัวอย่าง ชั่งน้ำหนัก 50 มก. ต่อตัวอย่าง วิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจนในข้าว ด้วยวิธี Kjeldahl [21] ใส่ตัวอย่างขวดแก้วคอยาวกันปอง Kjeldahl เติมโปแตสเซียมซัลเฟต ( $K_2SO_4$ ) 1.5 กรัม และกรดซัลฟิวริก ( $H_2SO_4$ ) ปริมาตร 4 มล. ต้มนาน 1 ชั่วโมง ทิ้งไว้ให้เย็น เจือจางด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 50 มล. เติมสารละลาย โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ร้อยละ 40 ปริมาตร 15 มล. กลั่นและรองรับสิ่งกลั่นลงภาชนะบรรจุสารละลายกรด บอริก ( $H_3BO_3$ ) ร้อยละ 0.2 ผสมสารตัวบ่งชี้ รวมปริมาตร

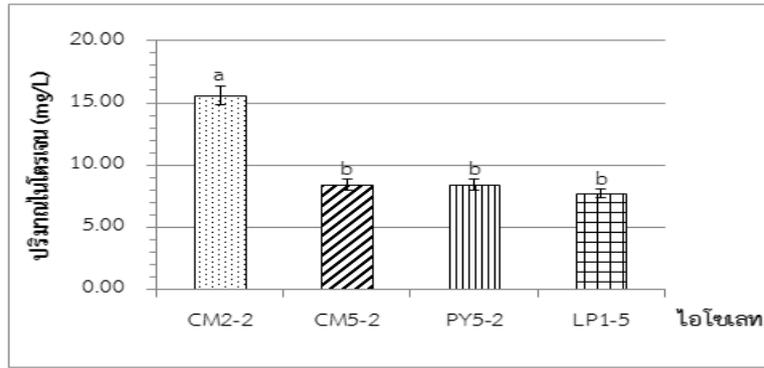
15 มล. หาความเข้มข้นของสารละลาย (titrate) กับ สารละลายกรดมาตรฐานไฮโดรคลอริก (HCl) ความเข้มข้น 0.0196 โมล จัดทำสารละลายโดยไม่ใส่ตัวอย่าง ความคู่ไปกับการวิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจน คำนวณปริมาณ ไพรตีนในตัวอย่าง โดยใช้ตัวคูณด้วยค่า 6.25 เนื่องจาก ไพรตีนมีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบร้อยละ 16 เพื่อหา ปริมาณของไพรตีนเป็นร้อยละ

เก็บข้อมูลข้าวเจริญเติบโต เมื่อข้าวอายุ 30 วัน ประกอบด้วย ความสูงลำต้น ความยาวราก จำนวนใบ น้ำหนักสดและน้ำหนักแห้ง ใช้สถิติวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียว (one-way analysis of variance - ANOVA) และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ย ด้วย Duncan's new multiple range test ( $p < 0.05$ )

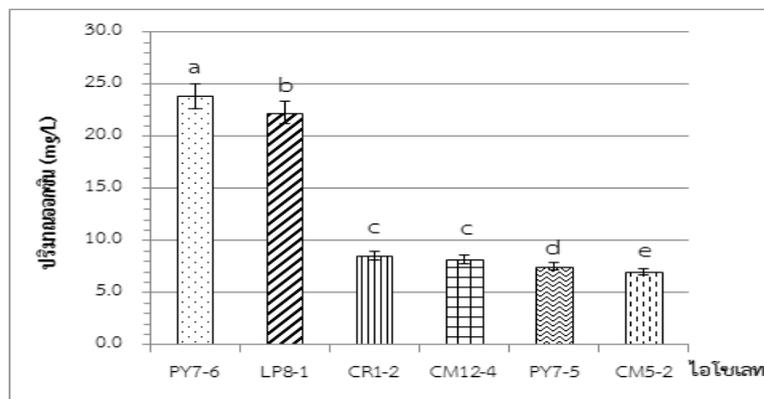
## ผลการศึกษา

ตัดแยกแบคทีเรียจากดินรอบรากข้าวได้ จำนวน 310 กลุ่มแยกเดี่ยว และคัดเลือกแบคทีเรียตรึง ไนโตรเจนได้ จำนวน 26 กลุ่มแยกเดี่ยว พบแบคทีเรีย สามารถผลิตไนโตรเจนได้สูงมี 4 กลุ่มแยกเดี่ยว ได้แก่ CM2-2, CM5-2, PY5-2 และ LP1-5 ผลิตไนโตรเจนได้  $15.60 \pm 0.40$ ,  $8.40 \pm 0.00$ ,  $8.40 \pm 0.00$  และ  $7.70 \pm 0.70$  มก. ต่อดิลูทร ตามลำดับ รูป 1

ทดสอบแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนจำนวน 26 กลุ่มแยกเดี่ยวสามารถผลิตกรดอินโดลอะซีติก โดยใช้ทริปโตเฟนเป็นสารตั้งต้นความเข้มข้นแตกต่างกัน 200, 400, 600, 800 และ 1,000 ไมโครกรัม ต่อมล. แบคทีเรีย สามารถผลิตกรดอินโดลอะซีติกสูงสุดด้วยทริปโตเฟน ความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัม ต่อมล. มีจำนวน 6 กลุ่มแยกเดี่ยว ประกอบด้วย PY7-6 ผลิตกรดอินโดลอะซีติก สูงสุดเท่ากับ  $23.90 \pm 0.20$  มก. ต่อดิลูทร รองลงมาได้แก่ LP8-1, CR1-2 และ CM12-4 ทั้งสองกลุ่มแยกเดี่ยวไม่แตกต่างกัน PY7-5 และ CM5-2 สามารถผลิตกรดอินโดลอะซีติกเท่ากับ  $22.33 \pm 0.38$ , ( $8.23 \pm 0.06$  ถึง  $8.50 \pm 0.40$ ),  $7.50 \pm 0.17$  และ  $7.00 \pm 0.31$  มก. ต่อดิลูทร ตามลำดับ รูป 2



รูป 1 ปริมาณไนโตรเจนแยกแยะตามแบคทีเรีย 4 กลุ่มแยกเดี่ยว



รูป 2 สารตั้งต้นทริปโตเฟน 1,000 ไมโครกรัม ต่อ มล. และปริมาณกรดอินโดลอะซีติกแยกแยะตามแบคทีเรีย 6 กลุ่มแยกเดี่ยว

แบคทีเรียตรึงไนโตรเจน 10 กลุ่มแยกเดี่ยว ประกอบด้วย *Bacillus altitudinis* CM2-2, *Bacillus aryabhattai* LP1-5 และ *Pseudomonas nitroreducens* 4 กลุ่มแยกเดี่ยว ได้แก่ PY7-6, CM5-2, PY5-2 และ CR1-2 รวมถึงจุลชีพก่อโรค (pathogen) อย่างเช่น *Bacillus cereus* PY7-5, *Pantoea agglomerans* CM12-4 และ *Stenotrophomonas maltophilia* LP8-1, CR6-7 คัดเลือกแบคทีเรียสายพันธุ์แนวโน้มนำส่งเสริมข้าวเจริญเติบโต 3 สายพันธุ์ ได้แก่ *B. altitudinis* CM2-2, *B. aryabhattai* LP1-5 และ *P. nitroreducens* PY7-6

*B. altitudinis* CM2-2 ผลิตไนโตรเจนสูงสุด 15.60 ± 0.40 มก. ต่อลิตร รองลงมาได้แก่ *B. aryabhattai* LP1-5 และ *P. Nitroreducens* PY7-6 ผลิตไนโตรเจน 7.70 ± 0.70 และ 6.30 ± 0.10 มก. ต่อลิตร ส่วน *P. Nitroreducens* PY7-6 สามารถผลิตกรดอินโดลอะซีติกสูงสุด 23.90 ±

0.20 มก. ต่อลิตร อีกทั้งเป็นแบคทีเรียผลิตกรดอินโดลอะซีติกเพียงชนิดเดียว ตาราง 1

แบคทีเรียตรึงไนโตรเจนและผลต่อข้าวเจริญเติบโตระยะต้นอ่อน กรรมวิธี 1 (CM2-2 + NPK) ความสูงลำต้นสูงที่สุด เฉลี่ย 48.53 ± 0.37 ซม. แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญจากกรรมวิธี 2 ถึง 5 ขณะที่กรรมวิธี 7 (ควบคุม) ความสูงลำต้นน้อยที่สุด เฉลี่ย 34.25 ± 2.32 ซม. ส่วนความยาวราก กรรมวิธี 1 ความยาวรากสูงสุด เฉลี่ย 12.85 ± 0.54 ซม. รองลงมา ได้แก่ กรรมวิธี 2, 4 และ 5 สำหรับกรรมวิธี 3 และ 6 ความยาวรากค่าเฉลี่ยไม่แตกต่าง หนึ่ง กรรมวิธีที่ 7 (ควบคุม) ความยาวรากน้อยที่สุดแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีอื่น ( $p < 0.05$ )

ตาราง 1 เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rRNA และปริมาณไนโตรเจนแยกแยะตามชนิดของแบคทีเรีย

ลำดับ	กลุ่มแยกเดี่ยว	จำแนกสายพันธุ์	ปริมาณไนโตรเจน (มก. ต่อลิตร)	ปริมาณกรดอิน โดลอะซีติก (มก. ต่อลิตร)
1*	CM2-2	<i>Bacillus altitudinis</i>	15.60 ± 0.40 <sup>a</sup>	-
2	LP1-5	<i>Bacillus aryabhatai</i>	7.70 ± 0.70 <sup>b</sup>	-
3	PY7-5	<i>Bacillus cereus</i>	4.90 ± 0.70 <sup>de</sup>	7.50 ± 0.17 <sup>d</sup>
4	CM12-4	<i>Pantoea agglomerans</i>	4.20 ± 1.40 <sup>ef</sup>	8.23 ± 0.06 <sup>c</sup>
5	PY7-6	<i>Pseudomonas nitroreducens</i>	6.30 ± 0.10 <sup>c</sup>	23.0 ± 0.20 <sup>a</sup>
6	CM5-2	<i>Pseudomonas nitroreducens</i>	8.40 ± 0.00 <sup>b</sup>	7.00 ± 0.31 <sup>e</sup>
7	PY5-2	<i>Pseudomonas nitroreducens</i>	8.40 ± 0.00 <sup>b</sup>	-
8	CR1-2	<i>Pseudomonas nitroreducens</i>	1.40 ± 0.00 <sup>i</sup>	8.50 ± 0.40 <sup>c</sup>
9	LP8-1	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	4.20 ± 0.00 <sup>ef</sup>	22.33 ± 0.38 <sup>b</sup>
10	CR6-7	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	6.30 ± 0.70 <sup>c</sup>	-

\* นัยสำคัญทางสถิติ

กรรมวิธี 1 น้ำหนักสด/แห้งมากที่สุด เฉลี่ย 1.40 ± 0.11 กรัม แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเปรียบเทียบกับกรรมวิธีอื่น ( $p < 0.05$ ) รองลงมา ได้แก่ กรรมวิธี 2 ถึง 4 ไม่แตกต่างกัน ส่วนกรรมวิธี 7 น้ำหนักสดน้อยที่สุด

กรรมวิธีที่ 1 น้ำหนักแห้งมากที่สุด ค่าเฉลี่ย 0.42 ± 0.02 กรัม แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเปรียบเทียบกับกรรมวิธีอื่น ( $p < 0.05$ ) รองลงมา ได้แก่ กรรมวิธีที่ 2 ถึง 6 ไม่แตกต่างกัน ส่วนกรรมวิธี 7 (ควบคุม) น้ำหนักแห้งน้อยที่สุด คือ 0.25 ± 0.01 กรัม ซึ่งแตกต่างจากกรรมวิธีอื่นๆ ( $p < 0.05$ )

ปริมาณไนโตรเจนไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ อย่างไรก็ตาม กรรมวิธี 1 ปริมาณไนโตรเจนแนวโน้มมากกว่ากรรมวิธีอื่น ส่วนกรรมวิธี 7 (ควบคุม) ปริมาณไนโตรเจนน้อยที่สุด ตาราง 2

### วิจารณ์

แบคทีเรียตรึงไนโตรเจนอิสระ 3 ชนิด มีศักยภาพและเหมาะสมสำหรับการศึกษาต่อไป ประกอบด้วย *Bacillus altitudinis* CM2-2, *Bacillus aryabhatai* LP1-5 และ *Pseudomonas nitroreducens* PY7-6 สำหรับ *B. altitudinis* CM2-2 ตรึงไนโตรเจนสูงสุด รองลงมาคือ *B. aryabhatai* LP1-5 และ *P. nitroreducens* PY7-6 ผลิตรกรดอินโดลอะซีติกสูงสุด 15.60 ± 0.40 มก. ต่อลิตร มีศักยภาพเป็นปุ๋ยชีวภาพมากกว่า แตกต่างจากการศึกษาของ Singh และ Prasad [22] ระหว่าง 0.54 ถึง 14.05 ไมโครกรัม ต่อมล. ส่วนการศึกษา *P. nitroreducens* PY7-6 ผลิตรกรดอินโดลอะซีติก IAA มากกว่า

*B. altitudinis* CM2-2 ร่วมกับปุ๋ย NPK เป็นกรรมวิธีที่ดีที่สุดต่อข้าวเจริญเติบโต และดูดซับไนโตรเจนในรูปเป็นประโยชน์ดีกว่ากรรมวิธีอื่น ความสูงลำต้น ความยาวราก จำนวนใบ น้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งของต้นและราก แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเปรียบเทียบกับกรรมวิธีอื่น อย่างไรก็ตาม ปริมาณไนโตรเจนในข้าวไม่แตกต่าง กระนั้น กรรมวิธี 1 แนวโน้มศักยภาพปริมาณไนโตรเจนมากกว่ากรรมวิธีอื่น

ตาราง 2 ขั้วระยะต้นอ่อนอายุ 30 วันและลักษณะเจริญเติบโต

กรรมวิธี	ความสูงลำต้น (ซม)	จำนวนใบ	ความยาวราก (ซม)	น้ำหนักสด (กรัม)	น้ำหนักแห้ง (กรัม)	ไนโตรเจนในข้าว (ร้อยละ)
1*	48.53 ± 0.37 <sup>a</sup>	6.83 ± 0.41 <sup>a</sup>	12.85 ± 0.54 <sup>a</sup>	1.40 ± 0.11 <sup>a</sup>	0.42 ± 0.02 <sup>a</sup>	2.08 ± 0.15 <sup>a</sup>
2	44.23 ± 1.83 <sup>b</sup>	6.67 ± 0.52 <sup>a</sup>	10.58 ± 0.75 <sup>b</sup>	1.31 ± 0.19 <sup>c</sup>	0.33 ± 0.02 <sup>c</sup>	1.95 ± 0.23 <sup>ab</sup>
3	42.95 ± 4.16 <sup>bc</sup>	6.67 ± 0.52 <sup>a</sup>	10.35 ± 0.55 <sup>c</sup>	1.33 ± 0.21 <sup>c</sup>	0.33 ± 0.01 <sup>c</sup>	1.96 ± 0.10 <sup>ab</sup>
4	43.90 ± 2.22 <sup>b</sup>	6.67 ± 0.52 <sup>a</sup>	10.53 ± 0.52 <sup>b</sup>	1.32 ± 0.21 <sup>c</sup>	0.32 ± 0.01 <sup>c</sup>	1.93 ± 0.15 <sup>ab</sup>
5	43.85 ± 5.02 <sup>b</sup>	7.00 ± 0.00 <sup>a</sup>	10.62 ± 0.75 <sup>b</sup>	1.35 ± 0.10 <sup>b</sup>	0.36 ± 0.02 <sup>b</sup>	2.03 ± 0.20 <sup>a</sup>
6	39.38 ± 3.88 <sup>c</sup>	6.50 ± 0.55 <sup>a</sup>	10.18 ± 0.98 <sup>d</sup>	1.26 ± 0.23 <sup>d</sup>	0.29 ± 0.02 <sup>d</sup>	1.95 ± 0.11 <sup>ab</sup>
7	34.25 ± 2.32 <sup>d</sup>	5.50 ± 0.55 <sup>b</sup>	6.25 ± 0.54 <sup>e</sup>	1.22 ± 0.19 <sup>e</sup>	0.24 ± 0.01 <sup>e</sup>	1.77 ± 0.15 <sup>b</sup>

\* นัยสำคัญทางสถิติ

กระบวนการตรึงไนโตรเจนเกิดมากถึงร้อยละ 30-50 ต่อฤดูกาล [23] ดูดซับไนโตรเจนอย่างต่อเนื่องประมาณ 0.08 กก. ต่อไร่ ต่อวัน [24] ข้าวได้รับไนโตรเจนมากกว่า 10.08 กก. ต่อไร่ ต่อฤดูกาล [25] สอดคล้องกับการศึกษาใส่แบคทีเรียตรึงไนโตรเจนจากดินรอบรากพืช 7 ชนิด แยกแบคทีเรีย *Bacillus altitudinis* strain JR4 และ *Rhizobium daejeonense* strain JR5 พัฒนาเป็นปุ๋ยชีวภาพ [26] เช่นเดียวกับการใส่ *B. aryabhatai* แก่ข้าวโพดระยะต้นอ่อนมีผลต่อทุกปัจจัยเสริมข้าวโพดเจริญเติบโต [27] โดยสรุป *B. altitudinis* CM2-2 +NPK มีผลต่อข้าวเจริญเติบโต และสรุป *Bacillus altitudinis* CM2-2 อาจพัฒนาเป็นปุ๋ยชีวภาพ

### กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้พิมพ์ขอขอบคุณสาขาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ สาขาวิชาปฐพีศาสตร์ คณะผลิตกรรมการเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้ และสถาบันบริการตรวจสอบคุณภาพและมาตรฐานผลิตภัณฑ์ผู้สนับสนุนและอำนวยความสะดวกการศึกษา

### เอกสารอ้างอิง

- Office of Agricultural Economics. Agricultural statistics of Thailand 2017. [Internet]. 2017 [cited 2018 May 15]. Available from: <http://www.oae.go.th/assets/portals/1/files/yearbook60.pdf>
- Osotsapar Y. Plant Nutrient. Bangkok: Kasetsart University Press; 2009.
- Magrin G, García CG, Choque DC, Giménez JC, Moreno AR, Nagy GJ, et al. Latin America. Climate change 2007: Impacts, adaptation and vulnerability. Contribution of working Group II to the fourth assessment report of the intergovernmental panel on climate change. In: Parry ML, Canziani OF, Palutikof JP, van der Linden PJ, Hanson CE, editors. Cambridge: Cambridge University Press; 2007. p. 581-615.
- Feng Y, Shen D, Song W. Rice endophyte *Pantoea agglomerans* YS19 promotes host plant growth and affects allocations of host photosynthates. J Appl microbial. 2006;100(5): 938-945

5. Glick BR, Bashan Y. Genetic manipulation of plant growth-promoting bacteria to enhance biocontrol of phytopathogens. *Biotechnol Adv.* 1997;15(2):353-378.
6. Laskar F, Sharma GD. Isolation and characterisation of Diazotrophic bacteria from rhizosphere of different rice cultivars of south Assam, India. *Curr World Environ.* 2013;8(1): 157-163.
7. Slavov S, Van Onckelen H, Batchvarova R, Atanassov A, Prinsen E. IAA production during germination of *Orobanche* spp. Seeds. *J Plant Physiol.* 2004;161(7):847-853.
8. San-Francisco S, Houdusse F, Zamarreño AM, Garnica M, Casanova E, García-Mina JM. Effects of IAA and IAA precursors on the development, mineral nutrition, IAA content and free polyamine content of pepper plants cultivated in hydroponic conditions. *Sci Hortic.* 2005;106(1):38-52.
9. Khan MM, Khatun A, Islam MT. Promotion of plant growth by phytohormone producing bacteria. In: Garg N, Aeron A, editors. *Microbes in Action.* USA: Nova Science Publishers; 2016. p. 45-76.
10. Davies PJ. *Plant hormones and their role in plant growth and development.* The Netherland: Dordrecht; 1990.
11. Bal HB, Nayak L, Das S, Adhya TK. Isolation of ACC deaminase producing PGPR from rice rhizosphere and evaluating their plant growth promoting activity under salt stress. *Plant Soil.* 2013;366(1-2):93-105.
12. Lavakush Yadav J, Verma JP, Jaiswal KD, Kumar A. Evaluation of PGPR and different concentration of phosphorus level on plant growth, yield and nutrient uptake of rice (*Oryzasativa*). *Ecol Eng.* 2014;62:123-128.
13. Thazin NA, Nourmohammadi S, Sunitha EM, Myint M. Isolation of endophytic bacteria from green gram and study on their plant growth promoting activities. *Inter J Appl Biol Phar Technol.* 2011;2(3):525-537.
14. Bashir A, Midrarullah, Mirza MS. Effects of inoculation with plant growth promoting rhizobacteria (PGPRs) on different growth parameters of cold area rice variety, Fakremalakand. *Afr J Microbiol Res.* 2013;7 (17):1651-1656.
15. Babalola OO. Beneficial bacteria of agricultural importance. *Biotechnol Lett.* 2010;32(11): 1559-1570.
16. Dobereiner J, Marriel IE, Nery M. Ecological distribution of *Spirillum lipoferum* Beijerinck. *Can Microbiol.* 1976;22(10):1464-1473.
17. Ahmad F, Ahmad I, Khan MS. Screening of free-living rhizospheric bacteria for their multiple plant growth promotion activities. *Microbiol Research.* 2008;163(2):173-181.
18. Bharucha U, Patel K, Trivedi UB. Optimization of indole acetic acid production by *Pseudomonas putida* UB1 and its effect as plant growth-promoting rhizobacteria on mustard (*Brassica nigra*). *Agri Res.* 2013;2 (23): 215-221.
19. Ahmad M, Nangyal H, Imran M, Ullah F. Optimization of protocol for surface sterilization and callus induction for three rice varieties. *Am-Eurasian J Agri Environ Sci.* 2016;16(2): 357-361.
20. Division of Rice Research and Development Rice department. Planting, maintenance and fertilizer use in rice fields. [Internet]. 2012 [cited 2014 Nov 21]. Available from: <http://www.ricethailand.go.th/Rkb/management/index.php.htm>

21. Longtonglang A. Nitrogen fixation efficiency of *Azospirillum largimobile* and *Azotobacter vinelandii* in system of rice intensification. [Thesis]. Nakhon Ratchasima: Suranaree University of Technology; 2010.
22. Ritesh Singh, Prasad MP. Screening for siderophore and ammonia production from rhizosphereisolates of *oryza sativa*. *World J Phar Res.* 2014;3(9):1458-1465.
23. Ormeño-Orrillo E, Hungria M, Martinez-Romero E. Dinitrogen-fixing prokaryotes. In: Rosemberg E, de Long EF, Lory S, Stackbrandt E, Thonpson F, editors. *The Prokaryotes: Prokaryotic physiology and biochemistry*, 2013. p. 427-451.
24. Watanabe I, Lee KK, Alimagno BV, Sato M, Del Rosario DC, De Guzmán MR. Biological nitrogen fixation [of rice] in paddy field studied by in situ acetylene-reduction assays. *IRRI Research Paper Series (Philippines)*, 1977; (3).
25. Yoshida T, Ancajas R.R. The fixation of atmospheric nitrogen in the ricerhizosphere. *Soil Biol Biochem.* 1973;5:153-155.
26. Habibi S, Djedidi S, Prongjunthuek K, Mortuza MF, Ohkama-Ohtsu N, Sekimoto H, et al. Physiological and genetic characterization of rice nitrogen fixer PGPR isolated from rhizosphere soils of different crops. *Plant Soil.* 2014;379(1-2):51-66.
27. Bhattacharyya C, Bakshi U, Mallick I, Mukherji S, Bera B, Ghosh A. Genome-guided insights into the plant growth promotion capabilities of the physiologically versatile *Bacillus aryabhatai* strain AB211. *Front Microbiol.* 2017;(8):411. doi: 10.3389/fmicb.2017.00411.