

การศึกษาการสร้างฮอร์โมนออกซิน และการตรึงไนโตรเจน โดยเชื้ออะซิโตแบคเตอร์

The study of auxin production and nitrogen fixation by azotobacter

อรุณี คงสอน^{1*} ศศิธร บุญกอง¹ และ ศุภชัย อัมคำ²
Arunee Kongsorn^{1*} Sasithron Boonkong¹ and Suphachai Amkha²

บทคัดย่อ

จากการศึกษาการสร้างฮอร์โมนออกซิน และการตรึงไนโตรเจน โดยเชื้ออะซิโตแบคเตอร์ด้วยการเก็บตัวอย่างดินแบบ composite sampling ที่ความลึก 15 เซนติเมตร ในพื้นที่เกษตรจังหวัดพระนครศรีอยุธยา (16 ตัวอย่าง) ซึ่งสามารถแยกเป็นเชื้ออะซิโตแบคเตอร์บริสุทธิ์ได้ 16 ไอโซเลต ทดสอบประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจนของเชื้ออะซิโตแบคเตอร์ ด้วยวิธี acetylene reduction โดยวางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (Completely Randomized Design, CRD) จำนวน 4 ซ้ำ พบว่าเชื้ออะซิโตแบคเตอร์ที่สามารถตรึงไนโตรเจนได้สูงที่สุดจำนวน 10 ไอโซเลต คือ A1, A2, A3, A4, A5, A6, A7, A8, A9 และ A10 สามารถตรึงไนโตรเจนได้หลังการเลี้ยงเชื้อ 3 วัน เท่ากับ 0.94, 0.98, 0.98, 0.98, 0.97, 0.96, 0.98, 0.99, 0.96 และ 0.96 มิลลิกรัมไนโตรเจน/ชั่วโมง ตามลำดับ และเชื้ออะซิโตแบคเตอร์ไอโซเลต A10 สามารถสร้างฮอร์โมนออกซินได้สูงที่สุดรองลงมาคือไอโซเลต A4 และ A8 สามารถสร้างฮอร์โมนออกซินได้ 35.00, 20.48 และ 19.76 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ เมื่อนำเชื้อไอโซเลต A10, A4 และ A8 มาทดสอบการเจริญเติบโต

คำสำคัญ : อะซิโตแบคเตอร์ การตรึงไนโตรเจน ออกซิน

Abstract

The study of auxin production and nitrogen fixation by azotobacter was conducted by soil composite sampling of 15 cm. of deep soil from plantation area in Phra Nakhon Si Ayutthaya province (16 samples). The efficiency of 16 isolates was tested using Completely Randomized Design (CRD) with four replications on nitrogen fixation by acetylene reduction. The best ten isolates of nitrogen fixing as A1, A2, A3, A4, A5, A6, A7, A8, A9 and A10, which fixed nitrogen 3 days after incubation gave 0.94, 0.98, 0.98, 0.98, 0.97, 0.96, 0.98, 0.99, 0.96 and 0.96 mg N/hr respectively. Three isolates A10, A4 and A8 of auxin production showed (35.00 20.48 and 19.76 µg/ml) respectively.

Keywords : Azotobacter, Nitrogen fixation, Auxin

¹ สาขาวิชาพืชศาสตร์ คณะเทคโนโลยีการเกษตรและอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลสุวรรณภูมิ พระนครศรีอยุธยา 13000

¹ Department of Plant Science, Faculty of Agriculture and Agro-Industry, Rajamangala University of Technology Suvarnabhumi, Phra Nakhon Si Ayutthaya, 13000

² ภาควิชาปฐพีวิทยา คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน นครปฐม 73140

² Department of Soil Science, Faculty of Agriculture at Kamphaeng Saen, Kasetsart University, Kamphaeng Saen Campus, Nakhonpathom, 73140

* Corresponding author. E-mail: akongsorn@hotmail.com

บทนำ

จุลินทรีย์หลายชนิดมีความสามารถตรึงไนโตรเจนได้โดยกระบวนการตรึงไนโตรเจน (nitrogen fixation) จากอากาศซึ่งอยู่ในรูปแก๊สไนโตรเจนเปลี่ยนเป็นสารประกอบอินทรีย์โดยใช้เอนไซม์ไนโตรจีเนส (nitrogenase) อะซิโตแบคเตอร์เป็นจุลินทรีย์ที่อยู่อย่างอิสระในดิน สามารถตรึงไนโตรเจนได้ 1.6 - 3.2 กิโลกรัมไนโตรเจน/ไร่/ฤดูปลูก (Esmail *et al.*, 2008) ไนโตรเจนเป็นธาตุที่สำคัญและจำเป็นต่อการเจริญเติบโตของพืช เพราะเป็นองค์ประกอบสำคัญของกรดอะมิโน โปรตีน นิวคลีโอไทด์ โดยโปรตีนเป็นส่วนประกอบที่สำคัญที่สุดของโปรโตพลาสซึมและคลอโรฟิลล์ และภายในคลอโรพลาสต์มีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบประมาณ 70 เปอร์เซ็นต์ (Stocking and Ongum, 1962) และมีความสำคัญต่อบทบาทของผลผลิตและคุณภาพในแต่ละฤดูปลูกอีกด้วย (Sisson *et al.*, 1991; Gastal and Lemaire, 2002; Wang *et al.*, 2000) จากรายงานของ Brown *et al.* (1964) เกี่ยวกับการปลูกเชื้ออะซิโตแบคเตอร์ให้กับดินที่ปลูกผักและธัญพืช ส่งผลให้ผลผลิตเพิ่มขึ้นโดยเฉลี่ย 11 เปอร์เซ็นต์ Ridvan (2008) พบว่า *A. Chroococcum* มีผลส่งเสริมผลผลิต และความเข้มข้นไนโตรเจนของข้าวสาลี ได้ดีกว่าการไม่ใส่เชื้อ สอดคล้องกับผลการศึกษาของ Pandey *et al.* (1998) พบว่าการใส่เชื้ออะซิโตแบคเตอร์ สามารถเพิ่มเมล็ด สีของเมล็ดของข้าวสาลี และความเข้มข้นของไนโตรเจนได้เช่นเดียวกัน นอกจากความสามารถในการตรึงไนโตรเจนแล้วยังพบว่า เชื้ออะซิโตแบคเตอร์บางสายพันธุ์มีความสามารถในการสร้างฮอริโมน

ส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช Thazin *et al.* (2011) รายงานว่า *Azotobacter* sp., *A. vinelandii* และ *A. chroococcum* มีความสามารถในการสร้างฮอริโมนออกซิน ซึ่งเป็นสารส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช แสดงให้เห็นว่าเชื้ออะซิโตแบคเตอร์จัดเป็นปุ๋ยชีวภาพอีกชนิดหนึ่งสำหรับการเกษตรปัจจุบันที่สามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการจัดการปุ๋ยเพื่อลดต้นทุนในด้านการใช้ปุ๋ยเคมี

การวิจัยนี้มุ่งศึกษาการคัดเลือกเชื้ออะซิโตแบคเตอร์ ที่มีความสามารถในการตรึงไนโตรเจน และสร้างฮอริโมนออกซิน เพื่อลดต้นทุนด้านการใช้ปุ๋ยในการผลิตพืช

วิธีการศึกษา

การแยกเชื้อบริสุทธิ์ของเชื้อในกลุ่มอะซิโตแบคเตอร์จากดิน

เก็บตัวอย่างดินที่จะนำมาแยกจุลินทรีย์จากแปลงปลูกพืชในจังหวัดพระนครศรีอยุธยา โดยวิธี composite sampling ที่ความลึก 0-15 เซนติเมตร แล้วนำตัวอย่างดินแช่เย็นในถังน้ำแข็งทันที จากนั้นนำมาเก็บในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส แยกเชื้ออะซิโตแบคเตอร์จากดินโดยชั่งดินมา 10 กรัมใส่ใน 0.85 % NaCl 90 มิลลิลิตร ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว จากนั้นนำไปเขย่าเป็นเวลา 30 นาที ด้วยเครื่องเขย่าเพื่อให้ดินแตกกลายเป็นสารละลายดิน ตั้งทิ้งไว้ 15 นาที นำสารละลายใส่มาเจือจางด้วย 0.85 % NaCl แล้วนำมาเกลี่ยให้ทั่วผิวหน้าอาหาร Ashby's medium (อาหาร 1 ลิตร ประกอบด้วย Mannitol 20 กรัม, K_2HPO_4 0.2 กรัม, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.2 กรัม, NaCl 0.2 กรัม, K_2SO_4 0.1 กรัม, $CaCO_3$ 5.0 กรัม,

ผงวุ้น 15 กรัม, น้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร) แล้วเกลี่ยให้ทั่วผิวหน้าอาหาร บ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้อง ประมาณ 2-5 วัน เมื่อมีโคโลนีขึ้นบนอาหาร เลือกลำเชื้อโคโลนีขนาดใหญ่ โดยการเขี่ยในอาหาร Ashby's medium โดยวิธีการ streak plate บ่มเชื้อทิ้งไว้อีก 2 - 5 วัน แยกเชื้ออะซิโตแบคเตอร์ที่เจริญเป็นโคโลนีเดี่ยว แล้วเขี่ยโคโลนีเดี่ยวลงใน slant agar เลี้ยงเชื้อใน slant agar ประมาณ 5 - 7 วัน บันทึกลักษณะของโคโลนีที่พบ และศึกษาสมบัติทางด้านสัณฐานวิทยาของเชื้อภายใต้กล้องจุลทรรศน์ด้วยการย้อมแกรม

การทดสอบประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจนของเชื้ออะซิโตแบคเตอร์

วางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (Completely Randomized Design, CRD) จำนวน 4 ซ้ำ เลี้ยงกล้าเชื้อของอะซิโตแบคเตอร์ ในอาหารเหลว Modified Ashby's Medium (อาหารเหลว 1 ลิตร ประกอบด้วย Mannitol 20 กรัม, K_2HPO_4 0.2 กรัม, NH_4Cl 1.0 กรัม, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.2 กรัม, $NaCl$ 0.2 กรัม, K_2SO_4 0.1 กรัม, $CaCO_3$ 5.0 กรัม, $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ 0.002 กรัม, น้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร) ให้อากาศโดยเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 120 รอบ/นาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำกล้าเชื้อที่ได้มาทำการปั่นเหวี่ยงเอาเฉพาะเซลล์ ล้างเซลล์ด้วย 0.85% $NaCl$ นำเซลล์ที่ได้มาทำเป็นสารละลายใน phosphate buffer โดยปรับค่า optical density (OD) ให้เท่ากับ 0.2 ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ดูดเซลล์ 100 ไมโครลิตร ใส่ในอาหารเหลวสูตร Ashby's medium ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ที่บรรจุอยู่ในขวดชมพู ขนาด 150 มิลลิลิตร ให้อากาศโดยใช้เครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 100

รอบ/นาที ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นทดสอบประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจนด้วยวิธี acetylene reduction (Hardy *et al.*, 1968; Hardy *et al.*, 1973) ที่เวลา 3 วัน โดยเปลี่ยนจากจุกสำลีเป็นจุกยาง ใช้เข็มฉีดยาดูดอากาศออกจากขวดชมพูผ่านทางจุกยาง 10 มิลลิลิตร จากนั้นฉีดแก๊สอะเซทีลีน 10 มิลลิลิตร เข้าไปในขวดโดยเข็มฉีดยา บ่มไว้เป็นระยะเวลา 1 ชั่วโมง แล้วใช้เข็มฉีดยาขนาด 10 มิลลิลิตร ดูดแก๊สในขวดแก้วแล้วนำมาเก็บในหลอดเก็บแก๊ส นำมาวัดปริมาณแก๊สเอทิลีนที่เกิดขึ้นด้วยเครื่อง gas chromatography (SHIMADZU 2010 column Refinery Gas Mix Rt-QS-BOND detector FID)

การทดสอบประสิทธิภาพการสร้างออกซิน

ถ่ายเชื้อแต่ละไอโซเลตจำนวน 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในอาหารเหลวปลอดไนโตรเจน ตามสูตรของ Ashby's อาหารเหลว 1 ลิตร เต็ม tryptophan 50 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร (เดิมเพื่อเป็นสารตั้งต้นในการสร้างฮอร์โมนออกซิน) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ที่บรรจุในขวดรูปชมพูขนาด 125 มิลลิลิตร ให้อากาศด้วยเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 100 รอบ/นาที เป็นเวลา 3 วัน เก็บตัวอย่างทุกวันเพื่อศึกษาปริมาณออกซิน ด้วยวิธี Salkowski colouring reagent (Fernando *et al.*, 2007; Ravikumar *et al.*, 2004) โดยนำตัวอย่างมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 4,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส เก็บส่วนใส 3 มิลลิลิตร เดิม reagent 2 มิลลิลิตร (0.5 M $FeCl_3$ 2 มิลลิลิตร + 35% $HClO_4$ 98 มิลลิลิตร) จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที ในที่มืด แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 535 นาโนเมตร

การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้ออะซิโตแบคเตอร์ต่อการเจริญเติบโตของถั่วเขียว

ทดสอบประสิทธิภาพของเชื้ออะซิโตแบคเตอร์ที่มีความสามารถในการตรึงไนโตรเจน และสร้างฮอร์โมนออกซินในกระถาง โดยปลูกถั่วเขียวพันธุ์กำแพงแสน 2 ในทรายอบฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 180 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมงวางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (Completely Randomized Design; CRD) จำนวน 4 ซ้ำ ทดสอบในพีชเปรียบเทียบ 2 ชุด ที่รดด้วยสารละลายธาตุอาหารสูตรของ นันทนา และ ศุภจิตรา (2542) ที่มีไนโตรเจน และไม่มีไนโตรเจน ประกอบด้วย 4 ตำรับการทดลอง 1) ไม่ใส่เชื้อ 2) ใส่เชื้อ Isolate A4 3) ใส่เชื้อ Isolate A8 4) ใส่เชื้อ Isolate A10 เก็บข้อมูลการเจริญเติบโตที่อายุ 2 สัปดาห์ ทั้งความสูง ความยาวราก น้ำหนักสด และน้ำหนักแห้ง

วิเคราะห์ข้อมูล

วิเคราะห์ค่าความแปรปรวนของข้อมูลและเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยตามวิธีของ Duncan's multiple range test (DMRT)

ผลการศึกษา

การแยกเชื้อบริสุทธิ์ของเชื้อในกลุ่มอะซิโตแบคเตอร์จากดิน

เก็บตัวอย่างดินจากพื้นที่เกษตรของจังหวัดพระนครศรีอยุธยา จาก 16 อำเภอ รวมเป็นจำนวน 16 ตัวอย่าง สามารถแยกเชื้ออะซิโตแบคเตอร์บริสุทธิ์ได้ 16 ไอโซเลต ลักษณะของโคโลนีที่พบมากที่สุดมีสีขาว (สีครีม) ขอบเรียบ สะท้อนแสง

เส้นผ่าศูนย์กลาง 3-8 มิลลิเมตร และโคโลนีมีลักษณะใส แฉววาว สะท้อนแสง ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 2-5 มิลลิเมตร เมื่อศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่าเป็นแบคทีเรียแกรมลบรูปแท่งขนาดสั้นและใหญ่ และแกรมลบรูปแท่งขนาดสั้นและเล็ก นอกจากนี้ยังพบการสร้างเม็ดสีน้ำตาลดำ และสีน้ำตาลปนเหลือง ในเชื้อที่มีอายุมาก (Figure 1)

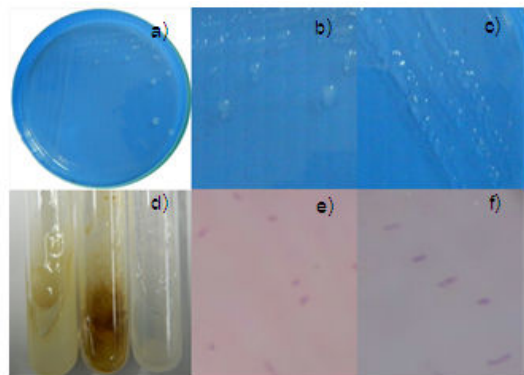


Figure 1 Enrichment, isolation, and screening media for azotobacter; (a, b, c) colonies of azotobacter; (d) yellow brown pigments (Isolate A6); dark brown pigment (Isolate A1); (e, f) cells morphology (100x)

การทดสอบการตรึงไนโตรเจนในอาหารเหลวของเชื้ออะซิโตแบคเตอร์ไอโซเลตต่างๆ

จากการทดสอบการตรึงไนโตรเจนของเชื้ออะซิโตแบคเตอร์แต่ละไอโซเลต ด้วยวิธี acetylene reduction ในอาหารเหลว พบว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ มีค่าการตรึงไนโตรเจนได้อยู่ในช่วง 0.48-0.99 มิลลิกรัมไนโตรเจน/ชั่วโมง เชื้ออะซิโตแบคเตอร์

ที่ตรึงไนโตรเจนได้สูงที่สุดจำนวน 10 ไอโซเลต คือ A1, A2, A3, A4, A5, A6, A7, A8, A9 และ A10 ตรึงไนโตรเจนได้หลังการเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว 3 วัน เท่ากับ 0.94, 0.98, 0.98, 0.98, 0.97, 0.96, 0.98, 0.99, 0.96 และ 0.96 มิลลิกรัมไนโตรเจน/ชั่วโมง ตามลำดับ (Table 1)

ผลการทดสอบประสิทธิภาพการสร้างออกซิน

ปริมาณของออกซินที่สร้างขึ้นโดยเชื้ออะซิโตแบคเตอร์แต่ละไอโซเลต มีความแตกต่างกัน อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เชื้ออะซิโตแบคเตอร์ ไอโซเลต A10 สร้างฮอร์โมนออกซินได้สูงที่สุด รองลงมาคือไอโซเลต A4 และ A8 ซึ่งสร้างฮอร์โมนออกซินได้ 35.00, 20.48 และ 19.76 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ (Table 1)

Table 1 Nitrogen fixation and auxin production activity by various isolates of azotobacter after 3 days.

Isolates	Sampling site	Nitrogen fixation (mg N/hr)	Auxin productive activity (μ g/ml)
A1	Maha Rat	0.94 ^{a1/}	4.64 ^{d1/}
A2	Maha Rat	0.98 ^a	7.62 ^d
A3	Maha Rat	0.98 ^a	7.98 ^d
A4	Phachi	0.98 ^a	20.48 ^b
A5	Phachi	0.97 ^a	18.81 ^b
A6	Phachi	0.96 ^a	17.62 ^{bc}
A7	Phachi	0.98 ^a	17.62 ^{bc}
A8	Phachi	0.99 ^a	19.76 ^b
A9	Bang Sai	0.96 ^a	6.31 ^d
A10	Chiang RakNoi	0.99 ^a	35.00 ^a
A11	PhraNakhon Si Ayutthaya	0.50 ^b	4.81 ^d
A12	Bang Ban	0.57 ^b	5.96 ^d
A13	Bang Ban	0.48 ^b	5.01 ^d
A14	Bang Pahan	0.48 ^b	4.80 ^d
A15	PhakHai	0.53 ^b	8.40 ^d
A16	Bang Pa-in	0.55 ^b	9.91 ^{cd}

*Means in a column followed by the same letter are not significantly different according to DMRT ($p \leq 0.05$)

ผลการทดสอบประสิทธิภาพของเชื้ออะซิโต-แบคทีเรียต่อการเจริญเติบโตของถั่วเขียว

ผลของเชื้ออะซิโตแบคทีเรีย ที่มีต่อความสูงของต้นถั่วเขียว ที่อายุ 14 วัน หลังปลูก พบว่าตำรับที่รดด้วยสารละลายธาตุอาหารที่มีไนโตรเจนไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติของความสูงต้น และความยาวราก แต่ในตำรับที่รดด้วยสารละลายธาตุอาหารที่ไม่มีไนโตรเจน พบความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ เชื้ออะซิโตแบคทีเรียไอโซเลต A4 ส่งเสริมให้ความสูงต้น และความยาวราก ดีที่สุด คือ 24.33 และ 3.91 เซนติเมตร ตามลำดับ และทุกตำรับการ

ทดลองที่ใส่เชื้อมีความสูงมากกว่าการไม่ใส่เชื้อในส่วนของน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งของต้นถั่วเขียวที่รดด้วยสารละลายธาตุอาหารที่มีไนโตรเจน และไม่มีไนโตรเจน ไม่มีความแตกต่างทางสถิติของน้ำหนักสด ของถั่วเขียวที่อายุ 14 วัน หลังปลูก แสดงให้เห็นว่าการใส่เชื้ออะซิโตแบคทีเรียสามารถทดแทนการใส่ปุ๋ยไนโตรเจนได้ นอกจากนี้พบความแตกต่างทางสถิติของน้ำหนักแห้งของต้นถั่วเขียวในการทดลองที่รดด้วยสารละลายธาตุอาหารที่ไม่มีไนโตรเจน การใส่เชื้ออะซิโตแบคทีเรียส่งเสริมให้น้ำหนักแห้งสูงกว่าการไม่ใส่เชื้อ (Table2)

Table 2 Effect of azotobacter on growth of mungbean 14 days after planting.

Treatments	Shoot (cm.)		Root (cm.)		Fresh weight (g/plant)		Dry weight (g/plant)	
	N	-N	N	-N	N	-N	N	-N
non-inoculum	24.91	22.99 ^{b1/}	3.28	3.12 ^{b1/}	1.52	1.46	0.24	0.09 ^{b1/}
A4	23.50	24.33 ^a	3.70	3.91 ^a	1.55	1.41	0.23	0.13 ^a
A8	24.87	23.66 ^{ab}	3.29	3.12 ^b	1.57	1.54	0.24	0.25 ^a
A10	24.25	23.99 ^a	3.45	3.45 ^{ab}	1.69	1.57	0.28	0.17 ^a
F-test	ns	*	ns	*	ns	ns	ns	*
CV (%)	4.47	2.43	14.37	10.35	14.75	13.97	24.99	25.00

^{1/} Means in a column followed by the same letter are not significantly different according to DMRT ($p \leq 0.05$)

N Means nitrogen, -N Means non nitrogen

อภิปรายผล

จากผลการทดลอง พบว่าปริมาณการตรึงไนโตรเจนของเชื้ออะซิโตแบคทีเรียที่คัดเลือกจากพื้นที่เกษตรของจังหวัดพระนครศรีอยุธยา สูงกว่าเชื้ออะซิโตแบคทีเรียที่แยกจากพื้นที่ปลูกพืชของโครงการหลวง ที่สามารถตรึงไนโตรเจนได้ในช่วงทดลองที่ใส่เชื้อมีความสูงมากกว่าการไม่ใส่เชื้อ

0.01-0.20 มิลลิกรัมไนโตรเจน/ชั่วโมง (อรุณี และคณะ, 2555) เนื่องจากประสิทธิภาพของเชื้อที่เจริญในสภาพแวดล้อมที่ต่างกันมีผลต่อกิจกรรมการตรึงไนโตรเจนของเชื้ออะซิโตแบคทีเรีย และเมื่อทดสอบความสามารถในการสร้างฮอร์โมนออกซินจะเห็นว่าเชื้ออะซิโตแบคทีเรียแต่ละไอโซเลตสร้างฮอร์โมนออกซินได้แตกต่างกัน สอดคล้องกับรายงานของ

Shende *et al.* (1977) ที่รายงานว่า *A. chroococcum* สร้างและขับสารต่าง ๆ ออกมามากมาย รวมถึงกรดอินโดนอะซิติก (indole acetic acid) และสร้างสารปฏิชีวนะยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราในดินบางชนิดได้ เมื่อรวมคุณสมบัติต่าง ๆ เข้าด้วยกันสามารถกล่าวได้ว่าเชื้ออะซิโตแบคเตอร์มีผลส่งเสริมการงอกของเมล็ด

เมื่อพิจารณาคุณสมบัติในการตรึงไนโตรเจนและการสร้างออกซิน ทำให้คัดเลือกเชื้ออะซิโตแบคเตอร์ได้ 3 ไอโซเลต คือ A10, A4 และ A8 ซึ่งเมื่อนำเชื้อทั้ง 3 ไอโซเลต มาทดสอบกับถั่วเขียวพันธุ์กำแพงแสน 2 ที่ปลูกโดยรดด้วยสารละลายธาตุอาหารที่มีไนโตรเจน ร่วมกับการใส่เชื้ออะซิโตแบคเตอร์ไม่ส่งผลให้มีความแตกต่างกับการไม่ใส่เชื้อ ในขณะที่การรดด้วยสารละลายธาตุอาหารที่ไม่มีไนโตรเจน พบว่าการใส่เชื้อช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของถั่วเขียวได้ดีกว่าการไม่ใส่เชื้อ ตรงกับลักษณะของเชื้ออะซิโตแบคเตอร์ที่ว่าในสภาพที่มีไนโตรเจนเพียงพอเชื้อจะไม่ดำเนินกิจกรรมการตรึงไนโตรเจน ขณะที่หากอยู่ในสภาพที่ขาดไนโตรเจน เชื้อจะมีกิจกรรมการตรึงไนโตรเจนที่ดีกว่า และส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชได้ดีกว่าการไม่ใส่เชื้อ (ธงชัย, 2546) สอดคล้องกับรายงานของ Munnaza *et al.* (2012) การใส่เชื้ออะซิโตแบคเตอร์สามารถส่งเสริมการงอกของเมล็ดถั่วเขียวได้ดีกว่าการไม่ใส่เชื้อ และพบว่าการใส่เชื้ออะซิโตแบคเตอร์ไอโซเลต Ab-4 (A3) และการใส่เชื้อผสมของอะซิโตแบคเตอร์ไอโซเลต B6, B7 และ B10 ส่งเสริมการเจริญเติบโตของถั่วเขียวได้ดีที่สุด แสดงให้เห็นว่าหากต้องการพัฒนาเชื้ออะซิโตแบคเตอร์เป็นปุ๋ยชีวภาพทำได้ทั้งการผสมเชื้อเพียงไอโซเลต

เดียว หรืออาจใช้เชื้ออะซิโตแบคเตอร์มากกว่าหนึ่งไอโซเลต

สรุป

จากผลการศึกษาคัดเลือกเชื้ออะซิโตแบคเตอร์ได้ 3 ไอโซเลต ซึ่งมีประสิทธิภาพในการตรึงไนโตรเจนและสร้างฮอร์โมนออกซินได้สูง คือ ไอโซเลต A10, A4 และ A8 ตามลำดับ เชื้ออะซิโตแบคเตอร์ทั้ง 3 ไอโซเลตนี้สามารถพัฒนาเป็นปุ๋ยชีวภาพในกลุ่มตรึงไนโตรเจนทั้งแบบเชื้อเดี่ยว หรือเชื้อผสม เพื่อลดปริมาณการใช้ปุ๋ยไนโตรเจนในการปลูกพืชลง

เอกสารอ้างอิง

- นันทนา อังกนันท์ และ ศุภจิตรา ชัชวาลย์. 2542. คู่มือปฏิบัติการสรีรวิทยาของพืช. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. กรุงเทพฯ.
- ธงชัย มาลา. 2546. ปุ๋ยอินทรีย์และปุ๋ยชีวภาพ: เทคนิคการผลิตและการใช้ประโยชน์. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ.
- อรุณี คงสอน พรไพรินทร์ รุ่งเจริญทอง และ ศุภชัย อำคา. 2555. การศึกษาแหล่งเชื้ออะซิโตแบคเตอร์ที่มีประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจนสูงในพื้นที่ปลูกพืชโครงการหลวง. 378-386. ใน : การประชุมวิชาการผลงานวิจัยของมูลนิธิโครงการหลวง ประจำปี 2555. 31 ตุลาคม 2555. เชียงใหม่.
- Brown, M.E., S.K. Burlingham and R.M. Jackson. 1964. Studies on *Azotobacter* species in soil. III. Effects of artificial inoculation on crop yields. *Plant and Soil*. 20: 194-214.
- Esmail, Y. A., M. E. Azadgoleh, H. Pirdashti and S. Mozafari. 2008. *Azotobacter* and *Azospirillum* inoculants as biofertilizer in canola (*Brassica napus* L.) cultivation. *Asian Plant Sci*. 7: 490-494.

- Fernando, L. W. R., P. D. Quadros, F. A. O. Camargo and E. W. Triplett. 2007. Screening of diazotrophic bacteria *Azopirillum* spp. for nitrogen fixation and auxin production in multiple field sites in southern Brazil. *J. Microbiol. Biotechnol.* 23: 1377-1383.
- Gastal, F. and G. Lemaire. 2002. N uptake and distribution in crops: an agronomical and ecophysiological perspective. *J. Exp. Bot.* 53: 789-799.
- Hardy, R. W. F., R. S. Holsten, E. K. Johnson and R. C. Burns. 1968. The acetylene-ethylene assay for N_2 fixation laboratory and field evaluation. *Plant Physiol.* 43: 1185-1270.
- Hardy, R. W. F., R. C. Burns and R. S. Holsten. 1973. Application of acetylene-ethylene assay for measurement of nitrogen fixation. *Soil Biol. Biochem.* 5: 47-48.
- Munnaza, K., S. Afrasayab, Z. Abbas, M. Faisal and S. Hasnain. 2012. Plant growth promoting capability of *Azotobacter* as mono and mix culture on *Vignaradiate*. *Afric. J. Microbiol.* 6: 1291-1296.
- Pandey, A., E. Sharma and L. M. S. Palni. 1998. Influence of bacterial inoculation on maize in upland farming systems of Sikkim Himalaya. *Soil Biol. Biochem.* 30: 379-384.
- Ravikumar S., K. Kathiresan, T. M. Ignatiammal, M. B. Selvam and S. Shanthi. 2004. Nitrogen-fixing azotobacters from mangrove habitat and their utility as marine biofertilizers. *J. Exp. Marine Biol. Ecol.* 312: 5-17.
- Kızılkaya, R. 2008. Yield response and nitrogen concentrations of spring wheat (*Triticumaes-tivum*) inoculated with *Azotobacter chroococcum* strains. *Ecol. Engineer.* 33: 150-156.
- Shende, S. T., R. G. Apte and T. Singh. 1977. Influence of *Azotobacter* on germination of rice and cotton seeds. *Curr. Sci.* 46: 675-676.
- Sisson, V.A., T.W. Rufty and R.E. Williamson. 1991. Nitrogen-use efficiency among fluecured tobacco genotypes. *Crop Sci.* 31: 1615-1620.
- Stocking, C. R. and A. Ongum. 1962. The intracellular distribution of some metabolic elements in leaves. *Am. J. Bot.* 49: 284-289.
- Thazin, N. A., S. Nourmohammadi, E. M. Sunitha and M. Myint. 2011. Isolation of endophytic bacteria from green gram and study on their plant growth promoting activities. *Inter. J. Appl. Biol. Phar. Technol.* 2: 525-537.
- Wang, Z.H., L. Wang, C.Y. He, H. Wang, X.L. Kui and Z.X. Jiang. 2000. Studies on effect of over N fertilization on nitrate accumulation in different vegetables and its regulation. *Agro. environ.* 19: 46-49.