

<http://journal.rmutp.ac.th/>

การคัดแยกแบคทีเรียส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชจากดินบริเวณรอบ รากต้นกระดุมทองเลื้อย (*Wedelia trilobata* (L.) A.S. Hitchcock)

วารภรณ์ สุทธิสา* และ ศิริประภา คำจันดี

คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม

ตำบลขามเรียง อำเภอกันทรวิชัย จังหวัดมหาสารคาม 44150

รับบทความ 12 มีนาคม 2562 แก้ไขบทความ 11 พฤษภาคม 2562 ตอปรับบทความ 26 มิถุนายน 2562

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อคัดแยกแบคทีเรียที่มีสมบัติส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชจากดินบริเวณรอบรากต้นกระดุมทองเลื้อย และทดสอบสมบัติเบื้องต้นในการเป็นแบคทีเรียส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชด้านความสามารถในการตรึงไนโตรเจน การสร้างสารซีเคอร์โรฟอร์ การละลายฟอสเฟต และการสร้างกรดอินโดล-3-แอซิดิก โดยแยกและคัดเลือกแบคทีเรียได้ทั้งหมด 47 ไอโซเลต เป็นแบคทีเรียแกรมบวก 26 ไอโซเลต แบคทีเรียแกรมลบ 18 ไอโซเลต และแอคติโนแบคทีเรีย 3 ไอโซเลต จากนั้นคัดเลือก 8 ไอโซเลต ที่ให้รหัส คือ BWTM1_MSU, BWTM2_MSU, BWTM5_MSU, BWTM6_MSU, BWWM6_MSU, BWWM8_MSU, BWWM9_MSU และ BWWM16_MSU จากการศึกษาสมบัติการครอบครองบริเวณรากและการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช พบว่า ไอโซเลต BWTM5_MSU สามารถส่งเสริมการเจริญเติบโตของข้าวได้ชัดเจน โดยมีร้อยละของการงอกมากที่สุดที่ 63.33 ความยาวรากและต้นข้าวอยู่ในระดับที่สูง คือ 6.11 เซนติเมตร และ 3.89 เซนติเมตร ตามลำดับ ส่งผลให้น้ำหนักสดของรากและลำต้นสูงถึง 9.56 มิลลิกรัม และ 11.33 มิลลิกรัม ตามลำดับ อีกทั้งยังสามารถผลิตกรดอินโดล-3-แอซิดิกได้มากที่สุดถึง 421.29 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และสามารถตรวจนับแบคทีเรียจากบริเวณผิวรากและบริเวณดินรอบรากข้าวได้ 9.67×10^6 CFUต่อกรัมราก และ 1.64×10^{10} CFUต่อกรัมดิน ตามลำดับ หลังจากปลูกข้าว 7 วันภายใต้สภาวะปลอดเชื้อ

คำสำคัญ : กรดอินโดล-3-แอซิดิก; ข้าว; ดินบริเวณรอบราก; ต้นกระดุมทองเลื้อย; แบคทีเรียส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช

* ผู้นิพนธ์ประสานงาน โทร: +668 1545 3454, ไปรษณีย์อิเล็กทรอนิกส์: waraporn.s@msu.ac.th

<http://journal.rmutp.ac.th/>

Isolation and Selection of Plant Growth Promoting Rhizobacteria from *Wedelia trilobata* (L.) A.S. Hitchcock Rhizosphere

Waraporn Sutthisa* and Siriprapa Khamjandee

Faculty of Science, Mahasarakham University
Khamriang, Kantarawichai, Mahasarakham, 44150

Received 12 March 2019; Revised 11 May 2019 ; Accepted 26 June 2019

Abstract

The objective of this research was to isolate plant growth promoting rhizobacteria from *Wedelia trilobata* (L.) A.S. Hitchcock rhizosphere, and preliminarily test their plant growth promoting properties such as nitrogen fixation, siderophore production, phosphate solubilization and indole-3-acetic acid production. Forty-seven bacterial isolates were obtained including 26 isolates of gram positive, 18 isolates of gram negative and 3 isolates of actinobacteria. After that 8 isolates (including BWTM1_MSU, BWTM2_MSU, BWTM5_MSU, BWTM6_MSU, BWWM6_MSU, BWWM8_MSU, BWWM9_MSU and BWWM16_MSU) were selected for studying on root colonization and plant growth promoting properties under aseptic condition. The results showed that BWTM5_MSU had the evident on the promotion of plant growth with the most percentage of rice seed germination (63.33%), high level of root and shoot length with 6.11 cm and 3.89 cm, respectively. As a result, the root and shoot fresh weight was as high as 9.56 mg and 11.33 mg, respectively. It also correlated with the highest production of indole-3-acetic acid up to 421.29 ug/ml. The root colonization was studied by counting rhizobacteria isolate BWTM5_MSU from rice rhizoplane and rhizosphere with presented bacterial number at 9.67×10^6 CFU/g root and 1.64×10^{10} CFU/g soil, respectively.

Keywords : Indole-3-acetic Acid; Rice; Rhizosphere Soil; *Wedelia trilobata* (L.); Plant Growth Promoting Rhizobacteria

* Corresponding Author. Tel.: +668 1545 3454, E-mail Address: waraporn.s@msu.ac.th

1. บทนำ

กระดุมทองเลื้อย เป็นไม้พุ่มขนาดเล็ก เป็นพืชข้ามปีในวงศ์ทานตะวันที่นิยมปลูกเพื่อเป็นไม้ดอกไม้ประดับเป็นหลัก ส่วนดอกและลำต้นยังสามารถใช้เป็นสมุนไพรหรือใช้ประโยชน์ในด้านอื่น ๆ อาทิ สีส้มอาหาร และสีย้อมผ้า เป็นต้น ซึ่งพืชชนิดนี้มีถิ่นกำเนิดในทวีปอเมริกา พบมากในแถบประเทศอบอุ่น และเขตร้อนชื้น รวมถึงประเทศไทยด้วย เป็นพืชที่เติบโตเร็วและเติบโตได้ดีบริเวณดินชื้นแฉะ สามารถแตกกิ่งก้านและเหง้าใหม่ขยายคลุมหน้าดินได้เป็นบริเวณกว้างภายในไม่กี่เดือนจนมีศักยภาพเป็นพืชกรรณชนิดหนึ่ง การศึกษาผลของสารสกัดหยาบจากกระดุมทองเลื้อยที่มีต่อการงอกของเมล็ดและการเจริญเติบโตของต้นกล้าในพืช 2 กลุ่มคือ พืชปลูก ได้แก่ ข้าว (*Oryza sativa* L.) ผักบุ้ง (*Ipomoea aquatica* Forsk.) และผักกวางตุ้ง (*Brassica chinensis* L.) และวัชพืช ได้แก่ หญ้ารงนก (*Chloris barbata* Sw.) หญ้าบั้ง (*Cenchrus echinatus* L.) ตีนตุ๊กแก (*Tridax procumbens* L.) และไมยราบ (*Mimosa pudica* L.) โดยใช้สารสกัดหยาบที่ระดับความเข้มข้น 0, 0.25, 0.50, 1.00 และ 2.00 กรัมต่อลิตร สำหรับพืชปลูกพบว่าสารสกัดหยาบไม่มีผลต่อการงอกของเมล็ดพืชปลูกทั้ง 3 ชนิด และไม่มีผลต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของต้นกล้าข้าวและผักบุ้ง สารสกัดหยาบที่ระดับความเข้มข้น 1.00 และ 2.00 กรัมต่อลิตร สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของรากและส่งเสริมการเจริญเติบโตของยอดของผักกวางตุ้ง สำหรับวัชพืชพบว่าสารสกัดหยาบสามารถยับยั้งการงอกของเมล็ดวัชพืชได้ทั้ง 4 ชนิด และสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของรากและยอดของหญ้ารงนก ตีนตุ๊กแก และไมยราบ ได้ [1]

ต้นกระดุมทองเลื้อยเป็นพืชสมุนไพร บริเวณรอบรากอาจจะมีจุลินทรีย์ที่มีคุณสมบัติส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช (Plant Growth Promoting Rhizobacteria; PGPB) ซึ่งมีผลงานวิจัยที่ได้แยกจุลินทรีย์ที่มีคุณสมบัติส่งเสริมจากเจริญเติบโตของพืช

จากพืชสมุนไพรอย่างแพร่หลาย โดย A. Kumar et al. [2] ได้ทำการแยกจุลินทรีย์ที่มีคุณสมบัติส่งเสริมจากเจริญเติบโตของพืชบริเวณรอบ ๆ รากต้นขมิ้นชัน เพื่อส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชทนเค็ม และศึกษาประสิทธิภาพในการเป็นยาปฏิชีวนะ ยาต้านจุลชีพ โดยสามารถแยกได้เชื้อ *Bacillus subtilis*, *Bacillus* sp., *Burkholderia thailandensis*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Klebsiella* sp., *Bacillus cereus*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas fluorescens* และ *Azotobacter chroococum* พบว่า ทุกสายพันธุ์สามารถละลายแคลเซียมฟอสเฟต และผลิตอินโดล และสามารถยับยั้ง *Escherichia coli*, *Aspergillus niger* และ *Alternaria alternate* ได้อย่างมีประสิทธิภาพ อีกทั้งยังมีการคัดเลือก *Bacillus* spp. และ *Pseudomonas* spp. จากดินบริเวณรอบรากของว่านหางจระเข้เพื่อทดสอบประสิทธิภาพการละลายฟอสฟอรัสในดินด้วย [3] การศึกษาวิจัยนี้จึงได้ทำการแยกและศึกษาคุณสมบัติในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชของแบคทีเรียที่แยกได้จากดินบริเวณรอบรากต้นกระดุมทองเลื้อย เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานและสามารถนำไปใช้ประโยชน์ทางการเกษตรต่อไป

2. ระเบียบวิธีวิจัย

2.1 การเก็บตัวอย่างและการคัดแยกเชื้อแบคทีเรียจากต้นกระดุมทองเลื้อย

เก็บตัวอย่างดินบริเวณรอบรากต้นกระดุมทองเลื้อยโดยการถอนขึ้นมาทั้งต้น จาก 3 พื้นที่ ของ อ.กันทรวิชัย จ.มหาสารคาม ได้แก่ โครงการบริหารจัดการขยะ พิพิธภัณฑสถานบ้านเรือนไทย และสวนสนุกเก่า โรงเรียนสาธิตมหาสิริมหาสารคามฝ่ายมัธยม บริเวณละ 10 ต้น นำดินที่ได้ผึ่งลมให้แห้ง แล้วสุ่มมา 10 กรัม ใส่ลงในน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 90 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ทำการเจือจางที่ระดับความเข้มข้น 10^{-3} , 10^{-4} และ 10^{-5} จากนั้นนำไปเกลี่ยด้วยเทคนิค Spread Plate ลงบน

จานอาหาร Nutrient Agar (NA) ประกอบด้วย Peptone 5 กรัม Beef Extract 3 กรัม Agar 15 กรัม น้ำกลั่น 1 ลิตร ปรับ pH ให้อยู่ระหว่าง 6.8-7.2 [4] ค่าความเจือจางละ 3 ซ้ำ บ่มในสภาวะที่มีออกซิเจน ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง คัดแยก โคโลนีที่มีสี ขนาด และรูปร่างโคโลนีแตกต่างกันแยก เชื้อให้บริสุทธิ์ และเก็บรักษาในกลีเซอรอลร้อยละ 20 ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำไปศึกษาต่อ การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา โดยนำ แยกที่แยกได้ทั้งหมดมาถ่ายเชื้อลงบนจานอาหาร NA แล้วจึงนำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง ตรวจสอบลักษณะโคโลนี (ขนาด สี ผิวหน้า ขอบ ความสูง) และทำการย้อมสีแบบแกรม (Gram Stain) จากนั้นนำไปตรวจสอบลักษณะ สีแกรม รูปร่าง ของเซลล์ ขนาดภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 1000 เท่า [5]

2.2 การทดสอบคุณสมบัติการส่งเสริมการ เจริญเติบโตของพืช

2.2.1 การสร้างสารประกอบซิดอโรฟอรั

(Siderophore)

นำเชื้อแบคทีเรียทดสอบมาชิตลงบนอาหาร Chrome Azurol S (CAS) Agar ประกอบด้วย CAS 60.5 มิลลิกรัม ละลายในน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 50 มิลลิลิตร และผสมกับ 10 มิลลิลิตร ของ Fe^{3+} Solution ($1 \text{ mmol L}^{-1} FeCl_3 \cdot 6H_2O$, $10 \text{ mmol L}^{-1} HCl$) และเติม 72.9 มิลลิกรัม Hexadecyltrimethylammonium bromide (HDTMA) ที่ละลายในน้ำ 40 มิลลิลิตร [6] ตามวิธีการของ Bakthavatchalu and Shivakumar [7] โดยชิตเชื้อยาว 2 เซนติเมตร 6 ไอโซเลตต่อจาน ไอโซเลตละ 3 ซ้ำ บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน ตรวจสอบผล โดยแบคทีเรียที่สร้างสาร ซิดอโรฟอรัจะเปลี่ยนสีอาหารบริเวณรอบ ๆ รอยชิต เชื้อจากสีน้ำเงินเป็นสีส้ม

2.2.2 การตรึงไนโตรเจนจากอากาศ (Nitrogen Fixing Bacteria: NFB)

นำเชื้อแบคทีเรียทดสอบโดยดัดแปลงจากวิธีการของ A. Grobelak et al. [8] มาเลี้ยงบนอาหาร Nitrogen Free Solid Malate Medium (NFM) ประกอบด้วย Malic acid 5 กรัม K_2HPO_4 0.6 กรัม KH_2PO_4 1.8 กรัม $MgSO_4 \cdot 4H_2O$ 0.2 กรัม NaCl 0.1 กรัม $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 0.2 กรัม Bromothymol blue (BTB) 2 มิลลิลิตร Vitamins 0.5 มิลลิลิตร microelements 1 มิลลิลิตร น้ำกลั่น 1 ลิตร โดยชิตเชื้อที่เจริญในอาหาร NA อายุ 18-24 ชั่วโมง ลงบน จานอาหาร โดยชิตยาว 2 เซนติเมตร ห่างจากขอบจาน 1.5 เซนติเมตร 4 ไอโซเลตต่อจาน ไอโซเลตละ 3 ซ้ำ บ่มที่อุณหภูมิห้อง ในสภาวะที่มีออกซิเจน เป็นเวลา 3 วัน แยกที่เรียกที่ตรึงไนโตรเจนได้จะเปลี่ยนสีของ อาหาร NFM ที่มี Bromothymol Blue ให้เป็นสีน้ำเงิน

2.2.3 การละลายฟอสเฟต (phosphate solubilizing bacteria: PSB)

การทดสอบคุณสมบัติการละลายฟอสเฟต โดย ชิตเชื้อที่เจริญในอาหาร NA อายุ 18-24 ชั่วโมง ลงบน อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร Pikovskaya's Agar [9] ที่เติม Tricalcium Phosphate เป็นแหล่งอนินทรีย์ฟอสเฟต จานละ 4 ไอโซเลต ไอโซเลตละ 3 ซ้ำ บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3-7 วัน จากนั้นตรวจสอบผลโดยนับจำนวน โคโลนีที่มีการสร้างวงใสรอบโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ

2.2.4 การสร้างฮอโรโมน กรดอินโดล-3-แอซีติก (Indole-3-acetic Acid: IAA)

นำแบคทีเรียที่แยกได้มาทดสอบการสร้างกรด อินโดล-3-แอซีติก ตามวิธีการของ T. Seangsanga [10] บนอาหารแข็ง ประกอบด้วย peptone 10 กรัมต่อลิตร L-tryptophan 1 กรัมต่อลิตร NaCl 5 กรัมต่อลิตร Yeast Extract 6 กรัมต่อลิตร และวุ้น 15 กรัมต่อลิตร, pH 7.6) นำเซลล์แขวนลอยแบคทีเรียที่ความเข้มข้น

1.5x10⁸ CFU ต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 50 ไมโครลิตร หยดลงหลุมขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 9 มิลลิเมตร 4 ไอโซเลตต่อจาน และมีน้ำกลั่นปลอดเชื้อเป็นชุดควบคุมทางลบอยู่ตรงกลาง บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง จากนั้นหยดสารละลาย Salkowski's Reagent (50 มิลลิลิตร ของร้อยละ 35 Perchloric acid และ 1 มิลลิลิตร ของ 0.5 M FeCl₃) ปริมาตร 50 ไมโครลิตร บ่มในที่มืด 1 ชั่วโมง จะเห็น Halo Zone สีชมพู ส้ม รอบ ๆ โคโลนีแบคทีเรียที่สร้างกรดอินโดล-3-แอซิดิก [11] จากนั้นนำไอโซเลตที่ให้ผลบวกไปเลี้ยงในอาหารเหลวเพื่อวัดปริมาณการผลิตกรดอินโดล-3-แอซิดิก โดยเลี้ยงแบคทีเรียในอาหารเหลวที่ประกอบด้วย Peptone 10 กรัมต่อลิตร L-tryptophan 1 กรัมต่อลิตร NaCl 5 กรัมต่อลิตร Yeast Extract 6 กรัมต่อลิตร และปรับ pH เป็น 7.6 ด้วย KOH วัดการสร้าง IAA ตาม Salkowski Colorimetric Technique [12] โดยปั่นเซลล์แล้วนำส่วนใส ปริมาณ 1.5 มิลลิลิตร เติม Orthophosphoric Acid ปริมาตร 100 ไมโครลิตร และ Salkowski's Reagent ปริมาตร 3 มิลลิลิตร บ่มในที่มืด 1 ชั่วโมง แล้วนำสารละลายไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 535 นาโนเมตร ด้วย Spectrophotometer คำนวณปริมาณ IAA ที่แบคทีเรียสร้างเทียบกับกราฟมาตรฐานของกรดอินโดล-3-แอซิดิก [13]

2.2.5 การครอบครองบริเวณรอบรากพืช (Root Colonization)

เตรียมเมล็ดข้าวขาวดอกมะลิ 105 ที่ต้องการทดสอบมาล้างด้วยแอลกอฮอล์ร้อยละ 70 จากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ และล้างด้วยคลอโรกซ์ร้อยละ 5 ล้างด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้ออีก 3-4 ครั้ง และซบให้แห้งเตรียมเซลล์แขวนลอยเชื้อแบคทีเรียทดสอบ ให้มีความเข้มข้น 1.5x10⁸ CFU ต่อมิลลิลิตร จากนั้นนำเมล็ดข้าวที่เตรียมไว้ 15 เมล็ด แช่ลงในสารละลายเชื้อแต่ละไอโซเลต เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ผึ่งให้แห้ง แล้วนำมาปลูก

ลงในกระถางที่บรรจุดินปลูก (150 กรัม) ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 2 ครั้ง จากนั้นรดด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อทุกวัน สังเกตการงอกของเมล็ดต่อเนื่องนาน 7 วัน แล้วนำดินบริเวณรอบรากมาเจือจางที่ 10⁻⁹, 10⁻¹⁰ และ 10⁻¹¹ จากนั้นนำดินแขวนลอยปริมาณ 0.1 มิลลิลิตร เกลี่ยลงบนจานอาหาร NA ไอโซเลตละ 3 ซ้ำ บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง นับจำนวนเปรียบเทียบกับความเข้มข้นเชื้อเริ่มต้น และนำรากของต้นกล้าข้าวมา 1 กรัม [14] ล้างด้วยคลอโรกซ์ร้อยละ 5 จำนวน 1 ครั้ง และล้างด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 3-4 ครั้ง ใส่ลงในน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 9 มิลลิลิตร ทำการเจือจางที่ 10⁻⁵, 10⁻⁶ และ 10⁻⁷ แล้วจึงดูมา 0.1 มิลลิลิตร เกลี่ยลงบนจานอาหารแข็ง NA ไอโซเลตละ 3 ซ้ำ บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง นับจำนวนเปรียบเทียบกับความเข้มข้นเชื้อเริ่มต้น โดยมีชุดควบคุมเป็นน้ำกลั่นปลอดเชื้อ การวัดการเจริญของต้นข้าว หลังจากการทดลอง 7 วัน ถอนต้นกล้าข้าวมาล้างน้ำให้สะอาด และนำมาวัดความยาวรากและความยาวต้น หลังจากนั้นนำไปชั่งน้ำหนักรากและน้ำหนักลำต้นต่อไป

2.3 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

นำข้อมูลไปวิเคราะห์ผลทางสถิติโดยใช้โปรแกรม SPSS เปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างทรีทเมนต์ด้วย One-way ANOVA และเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของแต่ละชุดทดลองด้วย Least Significant Different ที่ระดับนัยสำคัญทางสถิติ ($P = 0.05$)

3. ผลการศึกษาและอภิปรายผล

3.1 การเก็บตัวอย่างและการคัดแยกเชื้อแบคทีเรียจากต้นกระตุมทองเลี้ยง

ตัวอย่างดินจากบริเวณโครงการบริหารจัดการขยะ มีลักษณะร่วน มีสีน้ำตาลเข้ม และมีซากพืชเป็นจำนวนมากปะปนอยู่ บริเวณพิพิธภัณฑสถานบ้านเรือนไทย ดินมีลักษณะ ค่อนข้างแข็ง สีส้มอิฐ และมีซากพืช

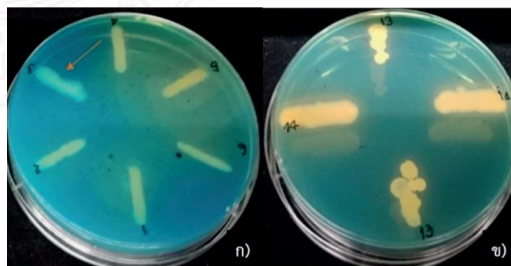
ปะปน และบริเวณสวนสนุกเก่าโรงเรียนสาธิตฝ่ายมัธยม มหาวิทยาลัยมหาสารคาม ดินมีลักษณะดินเหนียวปนทราย สีนํ้าตาล และมีความชุ่มชื้น การแยกเชื้อแบคทีเรียจากดินบริเวณรอบบรากต้นกระดุมทองเลื้อยสามารถนับจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดได้ดังนี้ โครงการบริหารจัดการขยะ 9.3×10^5 CFUต่อมิลลิตร บริเวณพิพิธภัณฑสถานบ้านเรือนไทย 1.48×10^6 CFUต่อมิลลิตร และสวนสนุกเก่า 8.67×10^5 CFUต่อมิลลิตร ซึ่งได้ทำการคัดเลือกแบคทีเรีย 47 ไอโซเลต ที่มีสี ขนาด และรูปร่าง โคลนที่แตกต่างกันมาทดสอบ ประกอบด้วย แอคติโนแบคทีเรีย 3 ไอโซเลต แบคทีเรียแกรมบวก 26 ไอโซเลต แบ่งเป็นแบคทีเรียที่มีรูปร่างท่อนยาว สร้างเอนโดสปอร์ 15 ไอโซเลต แบคทีเรียรูปร่างท่อนรี สร้างเอนโดสปอร์ 8 ไอโซเลต แบคทีเรียรูปร่างท่อนสั้น ไม่สร้างเอนโดสปอร์ 3 ไอโซเลต และแบคทีเรียแกรมลบ ทั้งหมด 18 ไอโซเลต แบ่งเป็นแบคทีเรียที่มีรูปร่างท่อนยาว เปลี่ยนสีอาหาร NA เป็นสีเขียว 1 ไอโซเลต แบคทีเรียที่มีรูปร่างท่อนยาวเล็ก 4 ไอโซเลต และแบคทีเรียท่อนสั้น 14 ไอโซเลต โดยพบว่าแบคทีเรีย แกรมบวก รูปร่างท่อน สร้างเอนโดสปอร์มีจำนวนมากที่สุด สอดคล้องกับงานวิจัยของ R. Singh and M.P. Prasad [15] ซึ่งทำการเก็บตัวอย่างดินบริเวณรอบบรากข้าวจาก 9 พื้นที่ของจังหวัด Kolar, Hoskote, Ramnagar และ Mysore มาเจือจางและแยกเชื้อบนอาหาร nutrient agar การจำแนกชนิดเบื้องต้นโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา ร่วมกับลักษณะทางชีวเคมี พบว่าเป็นแบคทีเรียแกรมบวกมากที่สุด ประกอบด้วย แบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างท่อน 57 ไอโซเลต แกรมบวก รูปร่างกลม 47 ไอโซเลต แบคทีเรียแกรมลบ รูปร่างท่อน 6 ไอโซเลต และแอคติโนแบคทีเรีย 6 ไอโซเลต การแยกเชื้อจากดินบริเวณพิพิธภัณฑสถานบ้านเรือนไทย มีจำนวนแบคทีเรียมากที่สุด และพบว่าไอโซเลต BWTM_MSU5 ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปร่างท่อนสั้น มีลักษณะโคลนีสีเหลือง กลม ขอบเรียบ ผิวหน้าเรียบ นูนจากผิวหน้าอาหาร มีความสามารถในการผลิตกรดอินโดล-3-แอซิดิก ได้มากที่สุดถึง 421.285 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร

เนื่องจากดินบริเวณนี้มีลักษณะสีน้ำตาลปนทราย มีความชุ่มชื้น แสดงให้เห็นว่าในดินมีแร่ธาตุสูง และมีน้ำที่ช่วยในการเจริญของแบคทีเรีย เนื่องจากแบคทีเรียจำเป็นต้องใช้แร่ธาตุและน้ำในการเจริญ [16]

3.2 การทดสอบคุณสมบัติการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช

3.2.1 การสร้างสารประกอบซิดอร์โรฟอรัส (Siderophore)

จากการทดสอบการสร้างสารประกอบซิดอร์โรฟอรัส บนอาหาร CAS Agar มีแบคทีเรียที่สามารถผลิตสารซิดอร์โรฟอรัส ซึ่งพบว่ารอบๆ โคลนีสีเหลือง ส้มหรือนํ้าตาล ทั้งหมด 21 ไอโซเลต ได้แก่ ไอโซเลต BWWMSU1, BWWMSU5, BWWMSU6, BWWMSU7, BWWMSU8, BWWMSU9, BWWMSU10, BWWMSU16, BWTM_MSU1, BWTM_MSU2, BWTM_MSU4, BWTM_MSU5, BWTM_MSU6, BWTM_MSU7, BWTM_MSU13, BWTM_MSU14, BWAP_MSU1, BWAP_MSU2, BWAP_MSU3, BWAP_MSU8, BWAP_MSU9 และ BWAP_MSU14 (รูปที่ 1, ตารางที่ 1) เนื่องจากซิดอร์โรฟอรัสเป็นสารที่สร้างขึ้นในสภาวะสภาวะของธาตุเหล็กต่ำ ซึ่งทำหน้าที่เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาซิดอร์โรฟอรัสที่ผลิตขึ้นบนงาน CAS Agar เกิดจากการเปลี่ยนสีของ Chrom-Azurool จากสีฟ้าเป็นสีแดงส้ม [7]



รูปที่ 1 ลักษณะการทดสอบการสร้างสารซิดอร์โรฟอรัสด้วยอาหาร Chrome Azural S (CAS)
 ก) ให้ผลลบ ไม่ปรากฏโซนสีรอบรอยขีด
 ข) ให้ผลบวก ปรากฏโซนสีรอบรอยขีด

ตารางที่ 1 การทดสอบคุณสมบัติการเป็นแบคทีเรียสังเคราะห์ไนโตรเจนและการเจริญเติบโตของพืชของเชื้อที่แยกได้จากบริเวณรอบรากต้นกระดุมทองเลื้อย

Bacterial Isolates code	Nitrogen fixation		Siderophore		indole-3-acetic acid	
	Growth	Color change	Growth	Color change	Quality	Quantity ($\mu\text{g/ml}$) ^{1/}
BWWM_MSU1	-	-	+++	++	+	18.10 \pm 0.74 ^{onml}
BWWM_MSU2	-	-	++	-	+	18.56 \pm 0.36 ^{onml}
BWWM_MSU3	-	-	++	-	+	18.36 \pm 0.69 ^{onml}
BWWM_MSU4	-	-	++++	-	+	-
BWWM_MSU5	+	++	+++	++	+	20.75 \pm 0.26 ^{onmlk}
BWWM_MSU6	+	+++	++	++	+	16.91 \pm 0.33 ^{onml}
BWWM_MSU7	+	-	++	+	+	17.71 \pm 0.07 ^{onml}
BWWM_MSU8	++	+++	+++	+++	+	19.08 \pm 1.69 ^{onml}
BWWM_MSU9	+	++	+++	+++	+	24.72 \pm 0.23 ^{lk}
BWWM_MSU10	+	+	+++	+++	+	21.94 \pm 0.75 ^{mlk}
BWWM_MSU11	-	-	++	-	+	20.66 \pm 0.30 ^{onmlk}
BWWM_MSU12	+	-	+	-	+	21.62 \pm 0.19 ^{onml}
BWWM_MSU13	-	-	++	-	+	17.57 \pm 0.89 ^{onml}
BWWM_MSU14	+	-	+	-	-	-
BWWM_MSU15	+	-	+++	-	+	-
BWWM_MSU16	+	++	++++	++	+	21.16 \pm 0.54 ^{onml}
BWWM_MSU17	-	-	-	-	+	12.08 \pm 1.09 ^{onm}
BWWM_MSU18	-	-	+	-	-	-
BWTM_MSU1	++	+++	+++	+++	+	292.73 \pm 28.15 ^c
BWTM_MSU2	++	+++	+++	++	+	140.51 \pm 2.79 ^h
BWTM_MSU3	+	-	++	-	+	135.10 \pm 3.34 ^h
BWTM_MSU4	++	++	++++	+	+	29.50 \pm 1.15 ^k
BWTM_MSU5	++	+++	+++	++	+	421.29 \pm 3.30 ^a
BWTM_MSU6	++	+++	++	+	+	303.51 \pm 8.64 ^b
BWTM_MSU7	-	-	+++	++	+	189.11 \pm 5.65 ^f
BWTM_MSU8	+	-	+++	-	+	90.05 \pm 4.19 ^l
BWTM_MSU9	-	-	+++	-	+	173.46 \pm 3.85 ^g
BWTM_MSU10	+	+	+++	-	+	261.87 \pm 6.67 ^d
BWTM_MSU11	++	++	++++	-	+	24.67 \pm 0.52 ^{lk}
BWTM_MSU12	+	+	++	-	+	211.91 \pm 4.03 ^e
BWTM_MSU13	-	-	++	+	+	257.81 \pm 2.18 ^d
BWTM_MSU14	+	-	++++	+	+	77.76 \pm 0.53 ^l

ตารางที่ 1 การทดสอบคุณสมบัติการเป็นแบคทีเรียสังเคราะห์ไนโตรเจนเติบโตของพืชของเชื้อที่แยกได้จากบริเวณรอบรากต้นกระดุมทองเลื้อย (ต่อ)

Bacterial Isolates code	Nitrogen fixation		Siderophore		indole-3-acetic acid	
	Growth	Color change	Growth	Color change	Quality	Quantity ($\mu\text{g/ml}$) ^{1/}
BWTM_MSU15	-	-	++	-	+	287.95 \pm 2.21 ^c
BWAP_MSU1	-	-	+	+++	-	-
BWAP_MSU2	-	-	+++	++	+	12.71 \pm 0.19 ^{onm}
BWAP_MSU3	+	+	+++	++	+	12.35 \pm 1.76 ^{onm}
BWAP_MSU4	-	-	-	-	+	-
BWAP_MSU5	-	-	-	-	+	-
BWAP_MSU6	+	-	++++	-	+	11.04 \pm 1.39 ^{on}
BWAP_MSU7	-	-	-	-	-	-
BWAP_MSU8	++	++	++	+	-	-
BWAP_MSU9	-	-	+++	++	-	-
BWAP_MSU10	+	+++	++	-	+	12.88 \pm 1.14 ^{onm}
BWAP_MSU11	-	-	-	-	-	-
BWAP_MSU12	+	-	++++	-	+	10.08 \pm 0.36 ^o
BWAP_MSU13	-	-	++	-	-	-
BWAP_MSU14	++	+++	+++	++	+	11.50 \pm 0.33 ^{onm}

^{1/} ค่าเฉลี่ย(n=3) ที่ตามหลังด้วยตัวอักษรที่เหมือนกันไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติตามวิธี Least significant differences ($P= 0.05$) โดย - คือไม่เจริญ/ไม่เปลี่ยนสีอาหาร, + คือเจริญน้อย/บริเวณใสหรือการเปลี่ยนสีอาหารรอบโคโลนีน้อย, ++ คือเจริญปานกลาง/บริเวณใสหรือการเปลี่ยนสีอาหารรอบโคโลนีปานกลาง และ +++ คือเจริญมาก/บริเวณใสหรือการเปลี่ยนสีอาหารรอบโคโลนีมากเมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุม

3.2.2 การตรึงไนโตรเจนจากอากาศ (Nitrogen Fixing Bacteria: NFB)

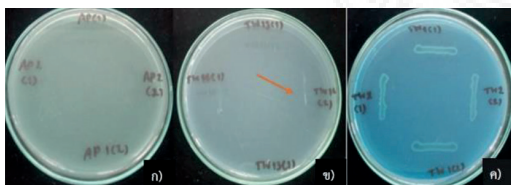
การทดสอบการตรึงไนโตรเจนบนอาหาร NFM พบว่ามีแบคทีเรียทั้งหมด 27 ไอโซเลต ที่สามารถตรึงไนโตรเจนในอากาศได้ เนื่องจากสามารถเจริญบนอาหาร NFM ที่ไม่มีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบ โดยแบ่งเป็น 9 ไอโซเลต ที่เจริญบนอาหาร NFM ได้แต่ไม่เปลี่ยนสีของ bromothymol blue จากสีเขียวเป็นสีน้ำเงิน ได้แก่ BWWM_MSU7, BWWM_MSU12, BWWM_MSU14, BWWM_MSU15, BWTM_MSU3, BWTM_MSU8, BWTM_MSU14, BWAP_MSU6 และ BWAP_MSU12 และมี 18 ไอโซเลต ที่สามารถ

เปลี่ยนสีของ bromothymol blue จากสีเขียวเป็นสีน้ำเงิน คือ BWWM_MSU5, BWWM_MSU6, BWWM_MSU8, BWWM_MSU9, BWWM_MSU10, BWWM_MSU16, BWTM_MSU1, BWTM_MSU2, BWTM_MSU4, BWTM_MSU5, BWTM_MSU6, BWTM_MSU10, BWTM_MSU11, BWTM_MSU12, BWAP_MSU3 และ BWAP_MSU8 (รูปที่ 2, ตารางที่ 1) ซึ่งแบคทีเรียที่สามารถเปลี่ยนสีอาหารได้นั้นเนื่องมาจากสามารถตรึงก๊าซไนโตรเจนจากชั้นบรรยากาศและเปลี่ยนให้อยู่ในรูปสารประกอบไนโตรเจน ได้แก่ แอมโมเนียม (NH_4^+) ไนไตรท์ (NO_2^-) และไนเตรท (NO_3^-) [17] สารพวกนี้มีความเป็นเบสเมื่อมีปริมาณมากพอ

จึงเปลี่ยนสีอินดิเคเตอร์ในอาหาร คือ Bromothymol Blue จากสีเขียวเป็นสีน้ำเงินได้

3.2.3 การละลายฟอสเฟต (Phosphate Solubilizing Bacteria: PSB)

จากการทดสอบความสามารถในการการละลายฟอสเฟต พบว่าแบคทีเรียทั้ง 47 ไอโซเลต ไม่สามารถละลายฟอสเฟตบนอาหาร Pikovskaya's Agar ที่เติม Tricalcium Phosphate เป็นแหล่งอนินทรีย์ฟอสเฟตได้ในขณะที่ A. Thakur and S.C. Parikh [18] คัดแยกจากบริเวณรอบรากถั่วลิสง (*Arachis hypogaea* L.) ที่ปลูกในจังหวัด Sabarkantha ใน Gujarat และประเมินความสามารถในการละลายฟอสเฟต พบว่ามี 29 ไอโซเลตที่พบโซนใสเส้นผ่านศูนย์กลางมากกว่า 5 มิลลิเมตร เมื่อนำไปทดสอบบนอาหาร Pikovskaya agar medium ที่เติมและไม่เติม bromophenol blue พบว่าทั้ง 29 ไอโซเลต มีประสิทธิภาพในการการละลายฟอสเฟตอยู่ระหว่างร้อยละ 62.31 ถึงร้อยละ 289.26 และ จาก 2.92 µg P/ml ถึง 40.54 µg P/ml ตามลำดับ และ Md.T. Islama et al. [19] ทำการแยกแบคทีเรียจากผิวน้ำข้าวสายพันธุ์ BR29 ที่ปลูกในบังคลาเทศ 30 ไอโซเลต พบว่ามี 6 ไอโซเลต ที่มีกิจกรรมการละลายฟอสเฟตได้สูงทั้งในอาหารแข็งและอาหารเหลวโดยใช้อาหาร National Botanical Research Institute's Phosphate Medium



รูปที่ 2 ผลการทดสอบการตรึงไนโตรเจนบนอาหาร Nitrogen Free Solid Malate Medium (NFM) ก) ให้ผลลบ ไม่เจริญ ข) ให้ผลบวก เจริญ และ ค) ให้ผลบวก เจริญ และมีความสามารถเปลี่ยนสีของ Bromothymol Blue จากสีเขียวเป็นสีน้ำเงิน

3.2.4 การสร้างฮอร์โมน กรดอินโดล-3-แอซิดิก (indole-3-acetic acid: IAA)

พบว่ามีแบคทีเรีย 37 ไอโซเลตที่สามารถผลิตกรดอินโดล-3-แอซิดิกได้ โดยจะปรากฏโซนสีชมพูรอบโคโลนี เมื่อนำไอโซเลตที่ให้ผลบวกนำไปเลี้ยงในอาหารเหลวเพื่อวัดปริมาณการผลิตกรดอินโดล-3-แอซิดิก พบว่าไอโซเลตที่ผลิต IAA ได้มากที่สุดคือ BWTM_MSU5 ผลิตได้ 421.285 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อเทียบกับกราฟมาตรฐานกรดอินโดล-3-แอซิดิก (ตารางที่ 1)

3.2.5 การครอบครองบริเวณรอบรากพืช (Root Colonization)

จากทดสอบการครอบครองรากพืชโดยเลือกไอโซเลตที่มีความสามารถหลากหลาย คือ มีความสามารถทั้งการตรึงไนโตรเจน การสร้างสารชีเคอร์โรฟอร์ และการสร้างกรดอินโดล-3-แอซิดิก ในแบคทีเรียชนิดเดียว จากนั้นเลือกการสร้างสารชีเคอร์โรฟอร์เป็นเกณฑ์ เนื่องจากสารชีเคอร์โรฟอร์ มีความสามารถในการจับเหล็กให้แก่พืชโดยตรง อีกทั้งยังสามารถแย่งจับเหล็กแข่งกับเชื้อก่อโรคพืช ทำให้เชื้อก่อโรคพืชไม่สามารถนำธาตุเหล็กไปใช้ในการเจริญเติบโตเข้าทำลายพืช ซึ่งธาตุเหล็กมีความสำคัญด้านเป็นแหล่งพลังงานและมีความจำเป็นต่อกระบวนการทางชีวภาพของจุลินทรีย์แทบทุกชนิด [20] โดยคัดเลือกมาทั้งหมด 8 ไอโซเลต หลังจากเพาะเมล็ดข้าวนาน 7 วัน พบว่าการแช่เมล็ดข้าวในแบคทีเรียไอโซเลต BWTM5_MSU ก่อนปลูก ทำให้เมล็ดข้าวมีอัตราการงอกสูงสุดถึงร้อยละ 66.33 ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับการใช้น้ำกลั่นที่ระดับความเชื่อมั่นที่ร้อยละ 95 ซึ่งพบว่าอัตราการงอกเพียงร้อยละ 0.67 (ตารางที่ 2) เมื่อนำมาวัดความยาวรากและลำต้นข้าว พบว่า ไอโซเลตที่ส่งผลให้รากของข้าว มีความยาวมากที่สุด คือไอโซเลต BWWM8_MSU โดยมีความยาวรากเท่ากับ 7.19 เซนติเมตร และน้ำกลั่นส่งผลให้ความยาวรากน้อยที่สุด คือ 0.91 เซนติเมตร

ซึ่งแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นที่ร้อยละ 95 กับกรรมวิธีอื่น ๆ และจากการวัดขนาดของความยาวลำต้นข้าว พบว่าไอโซเลตที่ส่งผลให้ลำต้นของข้าวมีความยาวมากที่สุด คือไอโซเลต BWWM8_MSU, BWWM9_MSU, BWWM5_MSU และ BWWM6_MSU มีความยาวของลำต้น 4.78, 4.30, 3.89 และ 3.74 เซนติเมตร ตามลำดับ (ตารางที่ 3) เมื่อทำการชั่งน้ำหนักสดรากพบว่า ไอโซเลต BWWM9_MSU มีน้ำหนักสดรากมากที่สุด เท่ากับ 13.56 มิลลิกรัม รองลงมาคือ BWWM8_MSU, BWWM5_MSU, BWWM6_MSU, BWWM2_MSU,

BWWM6_MSU โดยมีน้ำหนักเป็น 13.44, 9.56, 8.78, 6.56 และ 2.89 มิลลิกรัม ตามลำดับ และน้ำหนักแห้งให้ผลของน้ำหนักสดรากน้อยที่สุดคือ 0.1 มิลลิกรัม ในขณะเดียวกัน ไอโซเลตที่ส่งผลให้น้ำหนักของลำต้นมากที่สุด ได้แก่ ไอโซเลต BWWM5_MSU, BWWM8_MSU, BWWM6_MSU, BWWM16_MSU, BWWM9_MSU และ น้ำหนัก โดย มีน้ำหนักเท่ากับ 11.33, 9.67, 7.33, 7.00, 6.44, 5.67, 5.11, 3.00 และ 0.1 มิลลิกรัม ตามลำดับ โดยแต่ละไอโซเลตมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่นที่ร้อยละ 95 (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 2 ผลของแบคทีเรียส่งเสริมการเจริญเติบโตของข้าวต่อการงอกและการเจริญครอบครองรากข้าว หลังการปลูกข้าวในสภาวะปลอดเชื้อนาน 7 วัน

Treatment	Seed germination ^{1/}	Colonization (cfu/ml)	
		Rhizoplane ^{1/}	Rhizosphere ^{1/}
Control (dH ₂ O)	0.67 ±11.15 ^c	0 ^f	0 ^f
BWWM1_MSU	40.00 ±20.00 ^{ab}	1.14×10 ⁸ ±0.11 ^e	9.15×10 ¹⁰ ±0.28 ^{bc}
BWWM2_MSU	33.33 ±5.77 ^{ab}	1.04 ×10 ⁸ ±0.12 ^e	1.13×10 ¹¹ ±0.12 ^b
BWWM5_MSU	63.33 ±23.09 ^a	9.67×10 ⁶ ±2.08 ^a	1.64×10 ¹⁰ ±0.11 ^d
BWWM6_MSU	50.00 ±0.00 ^{ab}	1.53×10 ⁷ ±0.58 ^e	6.84×10 ¹⁰ ±2.36 ^c
BWWM6_MSU	26.67 ±11.55 ^b	4.93×10 ⁸ ±0.15 ^b	5.91×10 ¹⁰ ±0.80 ^b
BWWM8_MSU	42.33 ±19.66 ^{ab}	3.00×10 ⁶ ±2.00 ^c	4.89×10 ¹¹ ±0.30 ^a
BWWM9_MSU	46.67 ±5.77 ^{ab}	2.33×10 ⁷ ±1.53 ^d	2.37×10 ¹⁰ ±1.24 ^d
BWWM16_MSU	36.67 ±25.17 ^{ab}	2.52×10 ⁸ ±0.32 ^d	1.30×10 ⁹ ±3.08 ^d

^{1/} ค่าเฉลี่ย(n=3) ที่ตามหลังด้วยตัวอักษรที่เหมือนกันไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติตามวิธี Least significant differences ($P=0.05$)

การแยกเชื้อแบคทีเรียจากบริเวณผิวรากและดินบริเวณรอบราก เพื่อดูความสามารถในการครอบครองราก หลังจากเพาะเมล็ดข้าวนาน 7 วัน ในสภาวะปลอดเชื้อพบว่า ไอโซเลต BWWM6_MSU สามารถแยกเชื้อกลับมาได้มากที่สุดในบริเวณผิวราก (rhizoplane) ถึง 4.93×10⁸ CFUต่อกรัมของราก

รองลงมาคือ BWWM16_MSU แยกได้ 2.52×10⁸ CFUต่อกรัมของราก และ BWWM9_MSU แยกเชื้อได้น้อยที่สุด เท่ากับ 3×10⁶ CFUต่อกรัมของราก ในขณะที่ ไอโซเลตที่มีความสามารถในการครอบครองบริเวณดินรอบราก (rhizosphere) ได้แก่ BWWM8_MSU แยกได้ 4.89×10¹¹ CFUต่อกรัมของดิน รองลง

มาเป็นไอโซเลต BWTM2_MSU แยกได้ 1.13×10^{11} CFU ต่อกรัมของดิน และไอโซเลต BWTM1_MSU แยกได้ 9.15×10^{10} CFU ต่อกรัมของดิน (ตารางที่ 2) เช่นเดียวกับงานวิจัยของ N. Rongsawat [21] ที่แยกแบคทีเรียบริเวณรากพืชจากตัวอย่างดิน 2 ชุดเพื่อคัดเลือกแบคทีเรียที่ ส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช (PGPR) โดยการทดสอบความสามารถในการครอบครองรากของข้าวโพดฝักอ่อน พบว่าทุกไอโซเลตมีประสิทธิภาพในการครอบครองรากได้แตกต่างกัน ซึ่งไอโซเลต A7 มีประสิทธิภาพในการครอบครองรากมากที่สุดโดยมีปริมาณเชื้อ 5.73×10^8 CFU ต่อกรัม และ N. Kongpet [22] ได้ทำการแยกแบคทีเรียบริเวณรากพืชจากดินปลูกพืชต่าง ๆ จำนวน 23 ไอโซเลต เมื่อทำการทดสอบประสิทธิภาพในการครอบครองรากกับมะเขือเทศอายุ 15 วัน พบว่าแบคทีเรียไอโซเลต B2-1 ครอบครองรากมะเขือเทศได้ดีกว่าไอโซเลตอื่น ๆ โดยมีปริมาณเชื้อบนบริเวณรากมะเขือเทศ 5.27×10^6 CFU ต่อกรัม

จากการทดลองทั้งหมด พบว่าแบคทีเรียที่มีการผลิตกรดอินโดล-3-แอซิดิกได้คิดเป็นร้อยละ 78.72 ซึ่งการผลิตกรดอินโดล-3-แอซิดิก ของแบคทีเรีย มีผลต่อความสมดุลของฮอโมนในพืชและมีอิทธิพลต่อการเจริญเติบโตของพืช เช่นในแบคทีเรีย ไอโซเลต BWTM5_MSU ซึ่งสามารถผลิตกรดอินโดล-3-แอซิดิกได้มากที่สุดถึง 421.29 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม ซึ่งส่งผลกระทบต่อรากของเมล็ดข้าวมากที่สุดที่ร้อยละ 63.33 ความยาวของรากและลำต้นข้าวอยู่ในระดับที่มากที่สุดคือ 6.11 เซนติเมตร และ 3.89 เซนติเมตร ตามลำดับส่งผลให้น้ำหนักของรากและลำต้นสูงถึง 9.56 มิลลิกรัมต่อต้น และ 11.33 มิลลิกรัมต่อต้น ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ A. Grobelak et al. [8] ซึ่งได้แยกแบคทีเรียบริเวณรากหญ้า *Agrostis capillaris* L. ในพื้นที่ที่มีความปนเปื้อนของโลหะหนัก พบว่าการเจริญของหญ้า Fescue (หญ้าเลี้ยงสัตว์) และ ผักกาดกวางตุ้ง (ใบเล็ก) ที่ทดลองความสัมพันธ์กับการผลิตกรดอินโดล-3-แอซิดิกที่แบคทีเรียสร้างขึ้น

ตารางที่ 3 ผลของแบคทีเรียส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชต่อการเจริญของข้าว หลังจากปลูกข้าวในสภาวะปลอดเชื้อนาน 7 วัน

Treatment	Length (cm) ^{1/}		Fresh Weight (mg) ^{1/}	
	Root	Shoot	Root	Shoot
Control (dH ₂ O)	0.93±0.31 ^s	0.31±0.15 ^d	0.08±0.02 ^h	0.08±0.01 ⁱ
BWTM1_MSU	3.82 ±2.73 ^{de}	2.21±1.13 ^b	0.76 ±0.10 ^s	6.44 ±1.21 ^e
BWTM2_MSU	2.80 ±1.27 ^{ef}	1.13±0.37 ^{bc}	6.55 ±0.85 ^e	3.10 ±0.78 ^h
BWTM5_MSU	6.11 ±2.59 ^{ab}	3.89 ±1.44 ^a	9.50 ±1.12 ^c	11.53 ±0.83 ^a
BWTM6_MSU	5.72 ±2.31 ^{bcd}	3.74 ±1.59 ^a	8.73 ±1.08 ^d	5.67 ±1.13 ^f
BWWM6_MSU	2.71 ±2.08 ^{ef}	1.63 ±1.34 ^{bc}	2.68 ±0.57 ^f	7.18 ±1.04 ^d
BWWM8_MSU	7.19 ±2.48 ^a	4.78 ±1.01 ^a	13.49±1.97 ^b	9.63 ±1.52 ^b
BWWM9_MSU	4.79 ±2.25 ^{cde}	4.30 ±1.02 ^a	13.55±1.53 ^a	7.52 ±1.42 ^c
BWWM16_MSU	1.36±0.96 ^f	0.78 ±0.61 ^c	0.78±0.22 ^s	5.11 ±1.19 ^g

^{1/} ค่าเฉลี่ย (n=3) ที่ตามหลังด้วยตัวอักษรที่เหมือนกันไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติตามวิธี Least significant differences (P= 0.05)

4. สรุป

การคัดแยกแบคทีเรียจากดินบริเวณรอบรากต้นกระตุมทองเลื้อย สามารถแยกและคัดเลือกแบคทีเรียได้ทั้งหมด 47 ไอโซเลต ประกอบด้วย แบคทีเรียแกรมบวก 26 ไอโซเลต แบคทีเรียแกรมลบ 18 ไอโซเลต และแอคติโนมัยแบคทีเรีย 3 ไอโซเลต พบว่าแบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างท่อน สร้างเอนโดสปอร์มีจำนวนมากที่สุด การทดสอบการตรึงไนโตรเจนบนอาหาร NFM พบว่ามีทั้งหมด 27 ไอโซเลต ที่สามารถตรึงไนโตรเจนในอากาศได้ จึงเจริญบนอาหาร NFM ที่ไม่มีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบ โดยแบ่งเป็น 9 ไอโซเลต ที่เจริญบนอาหาร NFM ได้แต่ไม่สามารถเปลี่ยนสีของ Bromothymol Blue ได้ และมี 18 ไอโซเลต ที่เปลี่ยนสีของ Bromothymol blue จากสีเขียวเป็นสีน้ำเงิน มี 21 ไอโซเลต ที่สามารถผลิตสารซีเดอรโรฟอร์ได้ และมีแบคทีเรีย 37 ไอโซเลตที่มีความสามารถผลิตกรดอินโดล-3-แอซีติก โดยไอโซเลตที่ผลิตมากที่สุดคือ BWTM_MSU5 ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปร่างท่อนสั้น มีลักษณะโคโลนีสีเหลือง กลม ขอบเรียบ ผิวหน้าเรียบ อนุจากผิวหน้าอาหาร จากการวิจัยพบว่าแบคทีเรียไอโซเลต BWTM5_MSU มีความสามารถในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของข้าวได้ชัดเจน โดยมีอัตราของการงอกของข้าวมากที่สุด ความยาวของรากและลำต้นข้าวอยู่ในระดับที่มากที่สุด ส่งผลให้น้ำหนักของรากและลำต้นสูง อีกทั้งยังมีความสัมพันธ์กับปริมาณการผลิต กรดอินโดล-3-แอซีติก ที่มีมากที่สุดด้วย

5. กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม ที่ให้ทุนสนับสนุนการวิจัยในครั้งนี้

6. เอกสารอ้างอิง

- [1] U. Winai, "Effects of *Wedelia trilobata* (L.) A.S. Hitchcock) on seed germination and cultivate plants and weed growth," B.Sc. special problem, Faculty of Science, Kasetsart University, 2002.
- [2] A. Kumar, V. Dana, M.K. Singh, P.P. Ratap, S.S.D. Kumar, S.P. Kumar, S. Kapil and D. Pandey, "Isolation of plant growth promoting rhizobacteria and their impact on growth and curcumin content in *Curcuma longa* L.," *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, vol. 8, pp. 1–7, Oct. 2016.
- [3] D. Thakur, M. Kaur and A. Mishra, "Isolation and screening of plant growth promoting *Bacillus* spp. and *Pseudomonas* spp. and their effect on growth, rhizospheric population and phosphorous concentration of *Aloe vera*," *Journal of Medicinal Plants Studies*, vol. 5, no. 1, pp.187–192, Jan. 2017.
- [4] N. Suwanpinit and P. Suwanpinit, *General Microbiology*, 5th ed. Bangkok: Chulalongkorn University Press, 2005.
- [5] W. Sutthisa and P. Namsang, "Screening of phylloplane bacteria from tomato leaves to control *Stemphylium* sp., a causal agent of gray leaf spot disease," *Burapha Science Journal*, vol. 22 (special), pp. 73-83, July 2017.
- [6] P.T. Lacava, M.E. Silva-Stenico, W.L. Araújo, A.V.C. Simionato, E. Carrilho, S.M. Tsai and J.L. Azevedo, "Detection of siderophores in endophytic bacteria

- Methylobacterium* spp. associated with *Xylella fastidiosa* subsp. *pauca*,” *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, vol. 43, no. 4, pp. 521-528, 2008.
- [7] S. Bakthavatchalu and S. Shivakumar, “Siderophore production by *Pseudomonas aeruginosa* FP6, a biocontrol strain for *Rhizoctonia solani* and *Colletotrichum gloeosporioides* causing diseases in chilli,” *Agriculture and Natural Resources*, vol. 50, no. 4, pp. 250-256, July 2016.
- [8] A. Grobelak, A. Napora and M. Kacprzak, “Using plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) to improve plant Growth,” *Ecological Engineering*, vol. 8, no. 4, pp. 22 – 28, Nov. 2015.
- [9] J.P. Dubey and A.N. Hamir, “Experimental toxoplasmosis in budgerigars (*Melopsittacus undulates*),” *Journal of Parasitology*, vol. 88, no. 3, pp. 514–519, Jan. 2002.
- [10] T. Seangsanga, “Biosynthesis of indole-3-acetic acid (IAA) of nitrogen fixing bacteria isolated from rubber tree *Hevea brasiliensis* Mull-Arg,” in *Proceedings The 7th National Science Research Conference*, Naresuan University, 2015, pp. 1-6.
- [11] U.P. Shrivastava and A. Kumar, “A simple and rapid plate assay for the screening of indole-3-Acetic acid (IAA) producing microorganisms,” *International Journal of Applied Biology and Pharmaceutical Technology*, vol. 2, no. 1, pp. 120-123, Jan. 2011.
- [12] E. Glickmann and Y. Dessaux, “A Critical Examination of the Specificity of the Salkowski reagent for indolic compounds produced by phytopathogenic bacteria,” *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 61, no. 2, pp. 793–796.
- [13] E. Bharucha, J.H. Pemberton and G.L. Richard, “American gastroenterological association technical review on constipation,” *Gastroenterology*, vol. 144, no. 1, pp. 218-238, Jan. 2013.
- [14] C. Kittiwongwattana, D. Thanaboripat, C. Laosinwattana, P. Koohakan, N. Parinthawong and C. Thawai, “Isolation of plant-growth-promoting bacteria from rice (*Oryza sativa*),” *Journal of Science Ladkrabang*, vol. 25, no. 1, pp. 60-74, Jan.-June. 2016.
- [15] R. Singh and M.P. Prasad, “Isolation and screening of Rice Rhizosphere Soil microorganisms for the production of IAA,” *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, vol. 3, no. 9, pp. 993-998, 2014.
- [16] R. Dick, *Lecture on Soil Bacteria in Soil Microbiology*, The Ohio State University School of Environment and Natural Resources, Columbus, Ohio, 2009.
- [17] K. Kanimozhi and A. Panneerselvam, “Studies on isolation and nitrogen fixation ability of *Azospirillum* spp. isolated from Thanjavur district.,” *Pelagia Research*

- Library, vol. 1, no. 3, pp. 138-145, 2010.
- [18] A. Thakur and S.C. Parikh, "Isolation and characterization of phosphate solubilizing bacteria associated with groundnut rhizosphere," *International Journal of Agricultural Science and Research*, vol. 6, no. 5, pp. 243-260, Oct. 2016.
- [19] Md. T. Islama, A. Deoraa, Y. Hashidokoa, A. Rahmana, T. Itoa and S. Tahara, "Isolation and identification of potential phosphate solubilizing bacteria from the rhizosphere of *Oryza sativa* L. cv. BR29 of Bangladesh," *Zeitschrift für Naturforschung*, vol. 62, pp. 103-110, 2007.
- [20] T. Fang, D. Yangin, Z. Hui, Y. Liangtog and D. Binghai, "Genetic diversity of siderophore-producing bacteria of tobacco rhizosphere," *Brazilian Journal of Microbiology*, vol. 40, no.2 pp. 276-284, Apr.-Jun. 2009.
- [21] N. Rongsawat, "Selection of rhizobacteria in promoting growth of baby corn (*Zea mays* L.)," B.S. (Agric.) special problem, Dept. Agri. Biotech., Kasetsart Univ., Nakornpathom, Thailand, 2004.
- [22] N. Kongpet, "Selection of rhizobacteria in promoting growth of tomato," B.S. (Agric.) special problem, Dept. Agri. Biotech., Kasetsart Univ., Nakornpathom, Thailand, 2004.

