

บทนำ

1. อ้อย

อ้อย (*Saccharum officinarum* L.) จัดเป็นพืชในวงศ์ Gramineae ซึ่งเป็นพืชตระกูลเดียวกับหญ้า ข้าว ข้าวโพด และข้าวฟ่าง ฯลฯ จัดเป็นพืชชนิดหนึ่งที่มีความสำคัญต่อมนุษย์มากในแง่ของการใช้เป็นอาหาร อ้อยนับเป็นพืชสำคัญอันดับ 4 ของโลก รองจากข้าวสาลี ข้าวโพด และข้าว อ้อยชอบอากาศร้อนและชุ่มชื้น ดังนั้นประเทศที่ปลูกอ้อยส่วนใหญ่จึงอยู่ในแถบร้อนและชุ่มชื้นรวมทั้งประเทศไทยด้วย ประเทศไทยเป็นประเทศที่จัดอยู่ในหนึ่งในสิบของโลกที่ผลิตอ้อยได้ในปริมาณมาก โดยประเทศที่ผลิตอ้อยได้มากที่สุดในโลก คือ บราซิล อินเดีย ไทย และจีน อ้อยเป็นวัตถุดิบที่มีความสำคัญต่อการผลิตน้ำตาล ซึ่งประเทศไทยเป็นผู้ส่งออกน้ำตาลทรายรายใหญ่ซึ่งเป็นอันดับ 2 ของโลก นอกจากนี้ประเทศไทยส่งน้ำตาลเป็นสินค้าออกที่นับเป็นรายได้อันดับ 3 รองจากข้าวและมันสำปะหลัง อ้อยจึงจัดเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศไทย

1.1 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์

อ้อย (sugarcane) จัดเป็นพืชในวงศ์ Gramineae สกุล *Saccharum* สามารถจำแนกออกเป็น 6 ชนิด (species) คือ *S. officinarum*, *S. sinense*, *S. barberi*, *S. spontaneum*, *S. edule* และ *S. robustum* สำหรับอ้อยที่ปลูกเป็นการค้า (*S. officinarum*) มีแหล่งกำเนิดที่เกาะนิวกินี ในคาบสมุทรแปซิฟิกตอนใต้ มีลักษณะทางพฤกษศาสตร์ (Backer และ Bakhuizen, 1968; Moore และ Nuss, 1987) ดังนี้

ราก เป็นระบบรากฝอยส่วนใหญ่กระจายอยู่ในผิวน้ำดิน ลึก 60 เซนติเมตร

ลำต้น เป็นลำเดี่ยว ๆ ไม่มีกิ่งก้าน ประกอบด้วย ปล้อง ข้อ และตา ต้นสูง 2-6 เมตร มีลักษณะแข็งตั้งตรง เปลือกเรียบมีไขเคลือบ โดยทั่วไป แต่ละข้อมีตาเกิดสลับกัน นอกจากนี้ยังประกอบไปด้วยวงเจริญและปุ่มกำเนิดราก

ใบ เป็นใบเดี่ยวเกิดสลับกันเป็น 2 แถวอยู่ตรงข้ามกัน แบ่งเป็น 3 ส่วนคือ กาบใบ เป็นส่วนที่หุ้มลำต้น แผ่นใบ และคอใบซึ่งเป็นส่วนที่เชื่อมระหว่างแผ่นใบและกาบใบ สำหรับแผ่นใบมีรูปร่างเรียวยาว มีเส้นกลางใบหนา ใบยาวประมาณ 1 เมตร และกว้างสุดประมาณ 10 เซนติเมตร

ดอก มีลักษณะเป็นช่อแบบ panicle แกนช่อดอกยาวประมาณ 30-60 เซนติเมตร ช่อดอกย่อย (spikelet) เกิดเป็นคู่ ประกอบด้วยช่อดอกย่อยที่ไม่มีก้าน (sessile spikelet) และช่อดอกย่อยที่มีก้าน (pedicelled spikelet) แต่ละช่อดอกย่อยประกอบด้วยดอกย่อย 2 ชนิด คือ lower floret ซึ่งลดรูปเหลือเพียง bract เรียก sterile lemma และ upper floret เป็นดอกสมบูรณ์เพศ ประกอบด้วย bract ที่เรียกว่า fertile lemma และ palea ส่วนของ perianth ลดรูปเหลือเพียงแผ่นเล็ก ๆ 2 อัน เรียก lodicule เกสรตัวผู้มีจำนวน 3 อัน ส่วนเกสรตัวเมียมีลักษณะคล้ายแปรงขนนก มีก้านชู 2 อัน และ 1 รังไข่

1.2 การปลูกอ้อยในประเทศไทย

อ้อยเป็นพืชชนิดหนึ่งที่มีความสำคัญต่อเศรษฐกิจของประเทศไทย เพราะประเทศไทยเป็นประเทศผู้ส่งออกน้ำตาลทราย รวมทั้งกากน้ำตาลมากเป็นอันดับหนึ่งในสิบของโลก ผลผลิตอ้อยส่วนใหญ่ถูกใช้ในการผลิตน้ำตาลทรายเพื่อการบริโภค และส่งออกไปขายในตลาดโลก โดยในปี พ.ศ. 2550-2551 ประเทศไทยมีพื้นที่ปลูกอ้อยประมาณ 6.5 ล้านไร่ ได้ผลผลิตทั้งหมด 73 ล้านตัน ผลผลิตเฉลี่ย 11.81 กก.ต่อไร่ ส่วนมากปลูกในเขตภาคกลาง ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ และภาคเหนือ ตามลำดับ จังหวัดที่มีการปลูกมากที่สุดคือ จ.กาญจนบุรี จังหวัดที่ผลิตอ้อยในแต่ละภาคเรียงตามปริมาณการผลิตมากไปหาน้อย มีดังนี้

ภาคกลาง ได้แก่ กาญจนบุรี สุพรรณบุรี ราชบุรี ประจวบคีรีขันธ์ นครปฐม เพชรบุรี อุทัยธานี ชัยนาท ลพบุรี อ่างทอง สิงห์บุรี เพชรบูรณ์ และสระบุรี ผลิตอ้อยได้รวมกันคิดเป็นร้อยละ 66.16 ของทั้งประเทศ ภาคตะวันออก ได้แก่ ชลบุรี ระยอง ฉะเชิงเทรา และจันทบุรี ผลิตอ้อยได้รวมกันคิดเป็นร้อยละ 17.58 ของทั้งประเทศ ภาคเหนือ ได้แก่ อุดรดิตถ์ กำแพงเพชร นครสวรรค์ ลำปาง สุโขทัย พิษณุโลก พิจิตร และเชียงใหม่ ผลิตอ้อยได้รวมกันคิดเป็นร้อยละ 9.39 ของทั้งประเทศ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ได้แก่ อุดรธานี ขอนแก่น บุรีรัมย์ นครพนม กาฬสินธุ์ สกลนคร ชัยภูมิ มหาสารคาม เลย และหนองคาย ผลิตอ้อยได้รวมกันคิดเป็นร้อยละ 6.87 ของทั้งประเทศ

ลักษณะดินที่ใช้ในการปลูกอ้อยในประเทศไทย คือ ดินลึกประมาณ 50-100 เซนติเมตร มีการระบายน้ำดี มีโครงสร้างแบบเม็ดกลมหรือก้อนเหลี่ยมมุมมน มีเนื้อดินแบบดินร่วน ดินร่วนเหนียวปนทราย ดินร่วนเหนียวปนทรายแฉะ และดินเหนียว มีช่องในดินประมาณร้อยละ 50 มีระดับน้ำใต้ดินลึกประมาณ 1.5-2.0 เมตร มีความอุดมสมบูรณ์ปานกลางถึงสูง มีความเป็นกรดเป็นด่าง 6.0-7.5 และไม่เป็นดินเค็ม (Landon, 1991) ได้แก่ ชุดดินกำแพงแสน ชุดดินบ้านบึง ชุดดินโคราช ชุดดินวาริน ชุดดินยโสธร ชุดดินจตุรัส และชุดดินตาคลี

1.3 พันธุ์อ้อยในประเทศไทย (เกษม, 2527)

พันธุ์อ้อยที่ปลูกเป็นการค้าในประเทศไทยแบ่งออกเป็น 2 พวก คือ อ้อยเคี้ยว (chewing cane) และ อ้อยสำหรับทำน้ำตาล (industrial cane)

1.3.1 อ้อยเคี้ยว ได้แก่ อ้อยที่มีเปลือกนิ่ม ขานนิ่ม มีความหวานปานกลางถึงค่อนข้างสูง ปลูกเพื่อหีบเอาน้ำอ้อยสำหรับบริโภคโดยตรง หรือใช้สำหรับรับประทานสด อ้อยเคี้ยวที่นิยมปลูกกันมี 3 ชนิด ได้แก่ อ้อยสิงคโปร์ หรืออ้อยสำลิมิขานนิ่มมาก ลำต้นสีเหลืองอมเขียวเมื่อหีบแล้วได้น้ำอ้อยสีสายนารับประทาน พันธุ์มอริเชียส ลำต้นสีม่วงแดงไม่เหมาะสำหรับทำน้ำอ้อย จึงใช้สำหรับบริโภคโดยตรง อ้อยพันธุ์นี้เป็นที่นิยมมาก ส่วนใหญ่ปลูกในจังหวัดราชบุรีและนครปฐม และพันธุ์บาดาลา ลำต้นสีม่วงดำ แม้ว่าจะเป็นอ้อยเคี้ยวแต่ไม่ค่อยนิยมปลูกกันเพราะโตช้า และปล้องสั้นมาก อ้อยทั้ง 3 ชนิดนี้จัดเป็นพวกอ้อยดั้งเดิม ซึ่งมีถิ่นกำเนิดแถบเกาะนิวกินี นอกจากนี้ก็มีอ้อยน้ำผึ้งและอ้อยขาไก่ ซึ่งยังคงมีปลูกในที่บางแห่ง และอ้อยชนิดอื่นๆ อาจจัดเป็นอ้อยเคี้ยวได้หากมีความหวานพอและไม่แข็งจนเกินไป

1.3.2 อ้อยทำน้ำตาล อ้อยพวกนี้เป็นอ้อยลูกผสมซึ่งเกิดขึ้นโดยนักผสมพันธุ์อ้อยของประเทศต่าง ๆ ทั่วโลก พันธุ์อ้อยเหล่านี้ได้ถูกนำเข้าไปยังประเทศต่าง ๆ สำหรับประเทศไทยได้มีการนำพันธุ์อ้อยลูกผสมเข้ามาจากต่างประเทศตั้งแต่อดีตจนถึงปัจจุบัน รวมประมาณ 220 พันธุ์ ในจำนวนนี้มีเพียง 20 พันธุ์เท่านั้นที่ปลูกเป็นการค้าอยู่ในภาคต่าง ๆ พันธุ์เหล่านี้ได้แก่ ปี 4098, ซีบี 38-22, ซีโอ 419, ซีโอ 421, เอฟ 108, เอฟ 134, เอฟ 137, เอฟ 138, เอฟ 140, เอฟ 148, เอฟ 152, เอฟ 153, เอฟ 154, เอฟ 156, เอช 58-3166 แอลพี (ลำปาง) 2495/4, เอ็นซีโอ 310, พีโอเจ 2878, พินดาร์, คิว 83 และแร็กนาร์

ลักษณะของอ้อยทำน้ำตาลพันธุ์ต่างๆ มีดังนี้

อ้อยพันธุ์อุทอง 9 อ้อยพันธุ์นี้มีการเจริญเติบโตเร็ว ไวต่อดี และสามารถแตกกอได้ดี (5-6 ลำ/กอ) สามารถต้านทานโรคเหี่ยวเน่าแดงได้ ผลผลิตที่ได้ในเขตชลประทานอยู่ที่ 17.5 ตัน/ไร่ และในเขตใช้น้ำฝน 11.67 ตันต่อไร่ ส่วนความหวานในเขตชลประทานอยู่ที่ 14 CCS ในเขตใช้น้ำฝน 12.62 ตัน/ไร่ เหมาะสำหรับการเพาะปลูกในดินร่วน และดินร่วนปนทราย (ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรสุพรรณบุรี กรมวิชาการเกษตร, มปป.)

อ้อยพันธุ์ LK 92-11 อ้อยพันธุ์นี้มีการเจริญเติบโตงอกเร็ว แต่ในช่วง 4 เดือนแรกจะโตช้า ไวต่อดี สามารถแตกกอได้ดีมาก (6-8 ลำ/กอ) อายุเก็บเกี่ยว 12-13 เดือน ผลผลิตที่ได้ในเขตชลประทานอยู่ที่ 17-18 ตัน/ไร่ มีแป้งในน้ำอ้อยน้อย มีค่าความหวาน 12-14 CCS เหมาะสำหรับการเพาะปลูกในดินร่วนปนทราย ดินร่วนเหนียว ไม่ชอบที่ดอนสูง สามารถทนแล้วได้ปานกลาง (สำนักงานคณะกรรมการอ้อยและน้ำตาลทราย, มปป.)

อ้อยพันธุ์สุพรรณบุรี 80 อ้อยพันธุ์นี้ทรงกอตั้งตรง ลำต้นมีขนาดปานกลางถ้าไม่ถูกแดดจะมีสีเขียวอมเหลือง แต่ถ้าถูกแดดจะมีสีส้มม่วงอมเหลือง คอใบมีสีน้ำตาลแดงอ่อน มีอายุเก็บเกี่ยว 12-13 เดือน ผลผลิตที่ได้ในเขตชลประทานอยู่ที่ 17-18 ตัน/ไร่ ให้ผลผลิตน้ำตาลเฉลี่ย 2.66 CCS ตัน/ตันโรคเหี่ยวเน่าแดงและโรคแสดำได้ปานกลาง (กรมวิชาการเกษตร, มปป.)

2 การเจริญเติบโตและธาตุอาหารของอ้อย

3

2.1 ระยะการเจริญเติบโตของอ้อย

อ้อยมีการเจริญเติบโตตามลำดับ แบ่งออกได้เป็น 4 ระยะ (เกษม, 2527; คณาจารย์ภาควิชาพืชไร่ฯ, 2527; ประเสริฐ, 2542) คือ

2.1.1 ระยะงอก (germination phase) ระยะนี้เริ่มตั้งแต่ปลูกจนกระทั่งหน่อโผล่พ้นดิน ซึ่งจะใช้เวลาประมาณ 2-3 สัปดาห์ ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายอย่าง เช่น พันธุ์ การปฏิบัติต่อท่อนพันธุ์และความหนาของดินที่กลบท่อนพันธุ์ เป็นต้น หน่อที่เกิดจากตาของท่อนพันธุ์ เรียกว่า หน่อแรกหรือหน่อแม่ จำนวนท่อนพันธุ์ที่งอกต่อไร่จะเป็นตัวกำหนดจำนวนกออ้อยในพื้นที่นั้น

2.1.2 ระยะแตกกอ (tillering phase) ในระยะงอกนั้นอ้อยแต่ละตาจะงอกขึ้นมาเพียงต้นเดียวเท่านั้น และเมื่อเติบโตพอสมควรจึงจะมีการแตกกอ การแตกกอเป็นลักษณะสำคัญของพืชตระกูลหญ้ารวมทั้งอ้อยเกิดขึ้นเนื่องจากตาที่อยู่ส่วนโคนของลำต้นใต้ดินของหน่อแรกเจริญออกมาเป็นหน่อชุดที่สอง และจากหน่อชุดที่สองก็เจริญเป็นหน่อชุดที่สาม หรืออาจจะมีหน่อชุดต่อไปอีกทำให้มีจำนวนหน่อหรือลำต้นเพิ่มขึ้น ในระยะนี้อิทธิพลของยอดอ้อยมีน้อยมาก จึงไม่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของตาที่อยู่ส่วนโคนได้ ระยะแตกกอเป็นระยะต่อเนื่องกับระยะงอก การแตกกอจะเริ่มเมื่ออายุประมาณ 1.5 เดือน เป็นต้นไป แต่ระยะที่มีการแตกกอมากที่สุดอยู่ระหว่าง 2.5-4 เดือน ซึ่งก็ขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายอย่างตามที่กล่าวมาแล้ว หน่อที่แตกออกมาทั้งหมดในระยะแตกกอนี้จะเหลือเพียงประมาณครึ่งหนึ่งเมื่อถึงเวลาเก็บเกี่ยว หน่อที่อ่อนแอกว่าตายไป เพราะการแข่งขันกันเพื่อปัจจัยในการเจริญเติบโต เช่น แสงแดด น้ำ และธาตุอาหาร เป็นต้น จำนวนลำต้นต่อกอขณะเก็บเกี่ยวขึ้นอยู่กับจำนวนหน่อในระยะแตกกอ

2.1.3 ระยะย่นปล้อง (stalk elongation phase) เป็นระยะต่อเนื่องกับการแตกกอ ระยะนี้จะมีการเพิ่มขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางและความยาวของปล้องอย่างรวดเร็ว ทำให้อ้อยทั้งลำต้นเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วด้วย ซึ่งจะเริ่มตั้งแต่อายุประมาณ 3-4 เดือน จนถึงอายุประมาณ 7-8 เดือน หลังจากนั้นการเจริญเติบโตจะมีน้อยลง และจะเริ่มมีการสะสมน้ำตาลเพิ่มขึ้น ขนาดและความยาวของแต่ละต้นในระยะนี้มีความสัมพันธ์โดยตรงกับน้ำหนักของแต่ละลำต้น และน้ำหนักแต่ละลำต้นมีผลโดยตรงต่อผลผลิตน้ำหนักของอ้อยทั้งไร่เมื่อเก็บเกี่ยว

2.1.4 ระยะแก่และสุก (maturity and ripening phase) ระยะแก่ คือ ระยะที่มีอัตราการเจริญเติบโตช้าลงมากเมื่อเปรียบเทียบกับระยะต่าง ๆ ตามที่ได้กล่าวแล้ว เมื่อการเจริญเติบโตเริ่มช้าลง น้ำตาลที่ใบสร้างขึ้นจากการสังเคราะห์แสงก็จะถูกใช้น้อยลงและมีเหลือเก็บสะสมในลำต้นมากขึ้น ซึ่งเป็นการเริ่มต้นของระยะสุกนั่นเอง การสะสมน้ำตาลจะเริ่มจากส่วนโคนไปหาปลาย ดังนั้นส่วนโคนจึงหวานก่อน และมีความหวานมากกว่าส่วนปลาย การสะสมน้ำตาลจะมีมากขึ้นตามลำดับ จากส่วนโคนไปส่วนกลาง แต่ส่วนปลายมีความหวานใกล้เคียงกัน เรียกว่า สุก การเจริญเติบโตและการสะสมน้ำตาลของอ้อยมิได้เกิดขึ้นพร้อม ๆ กันในขณะที่มีการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วนั้น น้ำตาลที่ใบสร้างขึ้นส่วนใหญ่จะถูกใช้ไปเพื่อการเจริญเติบโตจึงเหลือเก็บสะสมไว้ภายในลำต้นเพียงส่วนน้อย เมื่อการเจริญเติบโตช้าลง การสะสมน้ำตาลจึงมีมากขึ้น

2.2 สภาพแวดล้อมที่เหมาะสม

สภาพแวดล้อมที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของอ้อย ขึ้นอยู่กับปัจจัยต่าง ๆ ดังนี้

2.2.1 ความชื้น เมื่อความชื้นในอากาศหรือความชื้นสัมพัทธ์ที่สูง จะส่งผลให้อ้อยใช้น้ำในดินน้อยลง และช่วยให้กิจกรรมการสังเคราะห์แสงดำเนินไปได้ด้วยดีเนื่องจากปากใบยังคงเปิดตามปกติ

2.2.2 ความเร็วลม มีอิทธิพลต่อการถ่ายเทอากาศภายในแปลงอ้อย อ้อยสามารถเจริญเติบโตได้ดีขึ้นเมื่อมีลมอ่อน ๆ พัดผ่าน ส่วนลมที่พัดแรงจะทำให้อ้อยเกิดการคายน้ำมากขึ้นและสูญเสียน้ำในลำต้นเร็ว หากในดินมีน้ำไม่เพียงพอกับความต้องการของอ้อยจะมีผลให้ใบอ้อยเหี่ยวได้ และลมที่แรงมาก ๆ จะทำให้ใบอ้อยฉีกขาดเสียหายได้

2.2.3 ปริมาณน้ำฝน อ้อยต้องการน้ำตั้งแต่ปลูกจนกระทั่งเก็บเกี่ยว ไม่น้อยกว่า 1,000 มิลลิเมตร ปริมาณน้ำที่ได้มาจากแหล่งน้ำชลประทานและน้ำฝน ซึ่งพื้นที่ปลูกอ้อยของเกษตรกรส่วนใหญ่มักอาศัยน้ำฝนเป็นหลัก โดยความต้องการน้ำของอ้อยมากหรือน้อย ขึ้นอยู่กับระยะของการเจริญเติบโต ซึ่งอ้อยที่ปลูกใหม่จะต้องการน้ำเพื่อการงอกน้อย แต่เมื่ออ้อยเจริญเติบโตมากขึ้นก็ต้องการน้ำมากขึ้นตามลำดับ ดังนั้นในเขตปลูกอ้อยที่อาศัยน้ำฝน จึงจำเป็นต้องจัดการการปลูกอ้อยให้เหมาะสมกับปริมาณน้ำฝน

2.2.4 ความยาวแสง อ้อยเป็นพืชเขตร้อนที่ต้องการแสงแดดมา ความยาวช่วงวันประมาณ 11.5-12.5 ชั่วโมง ในสภาพที่มีแสงแดด และความยาวของช่วงแสงมาก จะทำให้อ้อยเจริญเติบโตได้ดีและให้ผลผลิตคุณภาพสูง

2.2.5 อุณหภูมิ การเจริญเติบโตของอ้อยเริ่มตั้งแต่งอกจนอายุประมาณ 7 เดือน จะต้องการอุณหภูมิสูงประมาณ 30-35 องศาเซลเซียส แต่เมื่อถึงช่วงที่อ้อยแก่หรือมีอายุมากกว่า 7 เดือน อ้อยจะต้องการอุณหภูมิต่ำประมาณ 18-24 องศาเซลเซียส เพื่อการสะสมน้ำตาลและควรมีเวลาน้อย 4-6 สัปดาห์ ซึ่งจะช่วยให้อ้อยหวานยิ่งขึ้น อุณหภูมิเฉลี่ยที่เหมาะสมตลอดฤดูการปลูก ประมาณ 26-30 องศาเซลเซียส

2.2.6 ชนิดของดิน สามารถปลูกในดินที่เป็นทรายจัดจนถึงดินเหนียวจัด แต่ดินที่เหมาะสมสำหรับการปลูกอ้อย คือ ดินร่วนทราย หรือดินร่วนเหนียว มีค่าพีเอช ตั้งแต่ 4.5-8.5 มีหน้าดินลึกและระบายน้ำหรืออากาศดี จนถึงปานกลาง

2.3 ธาตุอาหารของอ้อย

อ้อยเหมือนพืชทั่ว ๆ ไป ที่ต้องการธาตุอาหารที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโต และใช้สะสมน้ำตาลสำหรับธาตุอาหารหลักคือ ไนโตรเจน (N) ฟอสฟอรัส (P) และโพแทสเซียม (K) เป็นธาตุอาหารที่ทำให้อ้อยให้ผลผลิตสูง ซึ่งโดยทั่วไปอ้อยจะแสดงอาการขาดให้เห็นอยู่เสมอ

2.3.1 ไนโตรเจน เป็นธาตุที่ช่วยให้อ้อยเจริญเติบโตทางด้านลำต้นและใบ ทำให้อ้อยแตกกอดีมีจำนวนลำมากทำให้น้ำหนักอ้อยเมื่ออ้อยขาดไนโตรเจนจะแสดงอาการที่ใบ โดยใบจะเปลี่ยนเป็นสีเหลือง มีคลอโรฟิลล์ต่ำ ใบอ่อนจะมีสีจาง ลำต้นแคระแกร็น การเจริญเติบโตลดลง อ้อยแตกกอน้อย อ้อยจะมีอัตราส่วนระหว่างซูโครส กับรีดิวซึ่งสูง การสูง เพราะอ้อยขาดไนโตรเจนจะสร้างซูโครสมาก แต่จะสร้างเนื้อเยื่อเพื่อการเจริญเติบโตลดลง เมื่ออ้อยได้รับไนโตรเจนมากเกินไป อ้อยจะมีลำต้นอวบ มีการเจริญเติบโตด้านโครงสร้างและคุณภาพลดลง การใส่ปุ๋ยไนโตรเจนเกินพอดี ทำให้ปริมาณของไฟเบอร์ลดลง อ้อยจะลุ่มง่าย

2.3.2 ฟอสฟอรัส เป็นธาตุที่ช่วยกระตุ้นการเจริญเติบโตของรากอ้อย และการแตกกอ อ้อยที่ขาดฟอสฟอรัส จะเป็นโรคได้ง่าย อ้อยแคระแกร็น โตช้า ปล้องสั้น การแตกหน่อลดลง ใบจะมีสีม่วงขอบใบแห้ง ดินที่ใช้ปลูกอ้อยส่วนใหญ่ จะมีฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์แก่พืชน้อย ยกเว้นชุดดินกำแพงแสน จึงต้องใส่ปุ๋ยฟอสฟอรัสโดยแนะนำให้ใส่พร้อมปลูกโดยใส่รองก้นหลุม

2.3.3 โพแทสเซียม ธาตุนี้จำเป็นต่อกระบวนการเจริญเติบโตของอ้อย โดยเฉพาะขบวนการสร้างแป้งและน้ำตาล แล้วเคลื่อนย้ายไปเก็บไว้ในลำต้น อ้อยที่ขาดธาตุโพแทสเซียม จะลุ่มง่าย ความหวานลดลง ไม่

ด้านทานโรค อ้อยจะแสดงอาการที่ใบแก่ โดยปลายใบ และขอบใบจะไหม้ ส่วนบนของเส้นกลางใบจะมีสีแดง ดินส่วนใหญ่จะมีโพแทสเซียมอยู่มาก ยกเว้นดินทราย ทางภาคตะวันออก และภาคตะวันออกเฉียงเหนือ

นอกจากนี้อ้อยยังต้องการธาตุอาหารรองด้วยซึ่งได้แก่ แคลเซียม (Ca) แมกนีเซียม (Mg) กำมะถัน (S) สังกะสี (Zn) โบรอน (B) ทองแดง (Cu) โมลิบดีนัม (Mo) และซิลิคอน (Si)

ถึงแม้ว่าอ้อยเป็นพืชที่ดูดธาตุอาหารจากดินในปริมาณค่อนข้างสูง และดินที่ใช้ในการเพาะปลูกอ้อยส่วนใหญ่ประสบปัญหาการขาดธาตุอาหารหลัก ดังนั้นในพื้นที่ที่มีการปลูกอ้อย จึงต้องมีการให้ธาตุอาหาร โดยเฉพาะอย่างยิ่งธาตุไนโตรเจน

3 แหล่งที่มาของไนโตรเจนในดิน

คณาจารย์ภาควิชาปฐพีวิทยา (2541) ได้กล่าวถึงแหล่งที่มาของไนโตรเจนในดิน 3 แหล่งใหญ่ๆ ด้วยกัน คือ

3.1 การตรึงแก๊สไนโตรเจนจากอากาศโดยจุลินทรีย์ การตรึงทางชีวภาพมีความสำคัญมากเนื่องจาก 90% ของไนโตรเจนที่ตรึงได้โดยกระบวนการตามธรรมชาติมาจากกิจกรรมการตรึงของจุลินทรีย์ดิน เอนไซม์ที่มีบทบาทในการตรึงไนโตรเจนของจุลินทรีย์เหล่านี้คือ เอนไซม์ไนโตรจีเนส (nitrogenase enzyme)

3.2 การเกิดฟ้าแลบ (lightning) ทำให้แก๊สไนโตรเจน (N_2) ในอากาศถูกออกซิไดส์ให้กลายเป็นไนตรัสออกไซด์ (N_2O) และไนตริกออกไซด์ (NO) ซึ่งจะละลายในน้ำฝนและตกลงมายังผิวดิน มีผู้คำนวณว่าปีหนึ่ง ๆ ไนโตรเจนในดินที่มาจากกระบวนการนี้มีปริมาณ 0.8 กก./ไร่/ปี ในรูปของแอมโมเนียมไอออน (NH_4^+) และ 0.3 กิโลกรัม/ไร่/ปี ในรูปไนเตรตไอออน (NO_3^-)

3.3 การใส่ปุ๋ยให้แก่ดินและพืช ปุ๋ยเคมีซึ่งเป็นสารเคมีที่สังเคราะห์ขึ้นจากแก๊สไนโตรเจนในอากาศจัดว่าเป็นแหล่งที่สำคัญแหล่งหนึ่งของไนโตรเจนในดิน นอกจากนี้ยังรวมถึง ปุ๋ยคอก ปุ๋ยพืชสด และปุ๋ยอินทรีย์ไนโตรเจนอื่นๆ

4 ปุ๋ยไนโตรเจน

ธาตุไนโตรเจนเป็นธาตุที่พืชมีความต้องการสูงที่สุดธาตุหนึ่ง แต่เป็นธาตุอาหารพืชที่มีประสิทธิภาพการใช้ อยู่ในระดับต่ำมาก โดยทั่วไปธาตุไนโตรเจนจะเป็นธาตุอาหารพืชตัวแรกที่จำกัดผลผลิตของพืช ทั้งนี้เนื่องจากพืชต้องการธาตุไนโตรเจนปริมาณมาก ในขณะที่ไนโตรเจนมีการเปลี่ยนรูปอยู่ตลอดเวลา การทำการเกษตรในเขตร้อนทั่วไปในปัจจุบันจำเป็นต้องใช้ปุ๋ยไนโตรเจน โดยประเทศไทยมีการนำเข้าในรูปของปุ๋ยเคมีประเภทต่างๆ ในปริมาณมาก โดยเฉพาะปุ๋ยไนโตรเจนดังแสดงไว้ในตารางที่ 1 ทั้งนี้เนื่องจากปริมาณไนโตรเจนในธรรมชาติที่ได้จากอินทรีย์วัตถุนั้นไม่เพียงพอต่อความต้องการของพืช จากการศึกษาเพื่อทราบประสิทธิภาพการใช้ปุ๋ยไนโตรเจนโดยวิธีการรังสีไอโซโทปของ Saffinga (1996) พบว่า อ้อยมีการสูญเสียไนโตรเจนมากกว่าร้อยละ 82 และ 72 ถ้าใส่ปุ๋ยแบบหว่านบนผิวดินและใส่แบบกลบปุ๋ย ตามลำดับ ซึ่งการสูญเสียของปุ๋ยไนโตรเจนอาจเกิดจากกระบวนการระเหยของแอมโมเนีย (volatile) หรือการสูญเสียในรูปแก๊สไนโตรเจน (denitrification) หรือสูญเสียไปกับน้ำ (leaching) หรือถูกตรึงโดยจุลินทรีย์ในกระบวนการ Immobilization ระดับความรุนแรงของการขาดธาตุไนโตรเจนขึ้นอยู่กับสภาพภูมิอากาศ ระบบการจัดการผลิตพืช และสภาพลักษณะของดิน ในประเทศไทยพบว่าอ้อยปลูกควรใส่ไนโตรเจน 8-12 กก./ไร่ ส่วนอ้อยต่อที่ไม่มีมีการให้น้ำชลประทานและมีการให้น้ำชลประทานประมาณ 12 และ 12-24 กก./ไร่ ตามลำดับ แต่อย่างไรก็ตาม อรรถสิทธิ์ และคณะ (2539) พบว่าการแบ่งใส่ปุ๋ยแอมโมเนียมซัลเฟตไม่ช่วยเพิ่มผลผลิตอ้อย โดยการแบ่งใส่ปุ๋ย 1-5 ครั้งไม่ทำให้ผลผลิตอ้อยแตกต่าง

กันทางสถิติทั้งในอ้อยปลูก อ้อยต่อปี 1 และ 2 การเพิ่มอัตราปุ๋ยทำให้ผลผลิตอ้อยเพิ่มขึ้นเป็นเส้นตรงในอ้อยทั้ง 3 ต่อ โดยในอ้อยปลูกตอบสนองต่อการใส่ปุ๋ยสูงกว่าในอ้อยต่อ

ตารางที่ 1 ปริมาณการนำเข้าปุ๋ยเคมีประเภทต่างๆ ปี พ.ศ. 2549 และ พ.ศ. 2550

รายการสินค้า	2549		2550	
	ปริมาณ (ตัน)	มูลค่า (ล้านบาท)	ปริมาณ (ตัน)	มูลค่า (ล้านบาท)
ปุ๋ยที่มีธาตุไนโตรเจน	1,805,948	16,917,040	2,118,475	22,021,605
ปุ๋ยที่มีธาตุฟอสฟอรัส	51,908	391,037	15,517	164,276
ปุ๋ยที่มีธาตุโพแทสเซียม	375,251	3,336,044	481,030	4,175,222
ปุ๋ยที่มีธาตุไนโตรเจนและ ฟอสฟอรัส	305,096	2,487,017	409,871	3,829,171
ปุ๋ยที่มีธาตุไนโตรเจน, ฟอสฟอรัสและโพแทสเซียม	625,074	6,451,307	741,713	7,765,813
ปุ๋ยอื่น ๆ	520,902	5,795,122	561,690	7,947,626
รวม		35,377,567		45,903,712

ที่มา: สำนักงานเศรษฐกิจ (2550)

5 ความสำคัญของไนโตรเจนต่ออ้อย

อ้อยต้องการไนโตรเจนในปริมาณที่สม่ำเสมอในขณะที่มีการเจริญเติบโตโดยมีความต้องการมากที่สุดเมื่ออ้อยอายุ 2.5-5 เดือน เมื่ออ้อยอายุ 4 เดือนไปแล้วอ้อยเริ่มย่างปล้องการเจริญเติบโตในช่วงนี้รวดเร็วมาก จึงต้องการน้ำและธาตุไนโตรเจนมากถ้าขาดจะแสดงอาการที่ใบ ใบจะมีสีเขียวอมเหลืองใบอ่อนสีจาง ลำต้นเล็ก แคระแกร็น การเจริญเติบโตลดลงอ้อยแตกกออ่อน อ้อยจะมีอัตราส่วนระหว่างซูโครสและรีดิวซึ่งสูงคาร์สูง แต่จะสร้างเนื้อเยื่อเพื่อการเจริญเติบโตลดลงเมื่ออ้อยโตเต็มที่ประมาณ 8 เดือนขึ้นไปแล้วอ้อยจะหยุดการเจริญเติบโตและสะสมน้ำตาล อย่างไรก็ตามเมื่อถึงใกล้เวลาเก็บเกี่ยวไม่ควรให้อ้อยได้รับไนโตรเจนมากเกินไป ถ้าได้รับไนโตรเจนมากเกินไปในช่วงนี้อ้อยจะมีลำต้นอวบ มีการเจริญเติบโตด้านโครงสร้างและเนื้อเยื่อมากอ้อยจะดูดน้ำมาก ทำให้น้ำตาลซูโครสในน้ำอ้อยลดลง อ้อยจะแก่ช้าและคุณภาพลดลง การใส่ปุ๋ยไนโตรเจนเกินพอดีทำให้ปริมาณของไฟเบอร์ลดลงอ้อยจะล้มง่าย การจัดการใช้ปุ๋ยไนโตรเจนให้กับอ้อยนั้น ต้องคำนึงถึงอัตรา ชนิด เวลา ใส่ และวิธีใส่ เพื่อให้ได้มาซึ่งประสิทธิภาพสูงสุด รูปของปุ๋ยไนโตรเจนที่นิยมใช้ในเขตร้อน คือ ยูเรีย และแอมโมเนียมซัลเฟต

6. การใช้ประโยชน์จากจุลินทรีย์ในการเกษตร

จุลินทรีย์ที่นำมาใช้ประโยชน์ทางการเกษตร แบ่งออกเป็น 5 ประเภทดังต่อไปนี้คือ 1) จุลินทรีย์เพิ่มธาตุอาหารพืช 2) จุลินทรีย์ที่ช่วยให้ธาตุอาหารเป็นประโยชน์กับพืช 3) จุลินทรีย์ส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช 4) จุลินทรีย์เร่งปุ๋ยหมัก และ 5) จุลินทรีย์ย่อยสลายสารพิษในดิน สำหรับ 3 ประเภทแรกเรียกรวมกันว่าปุ๋ยชีวภาพ เนื่องจากปุ๋ยชีวภาพหมายถึง ปุ๋ยซึ่งประกอบด้วยจุลินทรีย์ที่คัดเลือกแล้วว่าเป็นสายพันธุ์ดีและมีปริมาณมาก เมื่อใช้คลุกเมล็ด ใส่ให้ติดผิวรากหรือท่อนพันธุ์ หรือใส่ลงในดิน จุลินทรีย์เหล่านั้นจะเพิ่มประชากรและสร้างกลุ่มหรือโคโลนีในดินรอบผิวราก ที่ผิวรากและ/หรือในราก แล้วส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช โดยช่วยให้พืชได้รับธาตุอาหารมากขึ้น จุดเน้นของคานิยามมี 2 ประเด็นคือ 1) ปุ๋ยชีวภาพต้องประกอบด้วยจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพ

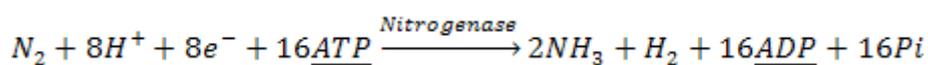
ในปริมาณมากพอ โดยต้องระบุชื่อและสายพันธุ์จุลินทรีย์ได้ และ 2) ใช้แล้วทำให้พืชได้รับธาตุอาหารเพิ่มขึ้นอย่างมีประสิทธิภาพจากสภาวะที่จุลินทรีย์นั้นอยู่ในดินหรืออยู่ร่วมกับพืช

6.1 จุลินทรีย์เพิ่มธาตุอาหารพืช

จุลินทรีย์ที่สามารถเพิ่มอาหารพืชในดินได้คือ จุลินทรีย์ตรึงไนโตรเจน (nitrogen-fixer) ประกอบด้วยแบคทีเรียและแอกทีโนมัยซีต จุลินทรีย์ในกลุ่มนี้จะผลิตเอนไซม์ไนโตรจีเนสซึ่งมีหน้าที่ในการเปลี่ยนแก๊สไนโตรเจน (N_2) ให้เป็นแอมโมเนีย (NH_3) อากาศที่เราหายใจเข้าไปจะมีแก๊สไนโตรเจนเป็นส่วนประกอบอยู่ประมาณร้อยละ 79 โดยปริมาตร ถึงแม้ว่าแก๊สไนโตรเจนจะมีอยู่มากในอากาศ แต่เป็นรูปที่พืชนำไปใช้ประโยชน์ไม่ได้ มีเพียงจุลินทรีย์บางชนิดเท่านั้นที่สามารถตรึงไนโตรเจนจากอากาศให้มาอยู่ในรูปของแอมโมเนีย ซึ่งเป็นรูปที่พืชสามารถนำไปใช้ในการเจริญเติบโตได้

6.1.1 กระบวนการตรึงไนโตรเจนทางชีวภาพ

เป็นกระบวนการทำงานของจุลินทรีย์ที่สามารถเปลี่ยนแก๊สไนโตรเจน (N_2) จากบรรยากาศไปเป็นแอมโมเนีย (NH_3) ด้วย electron reduction และ protonation ของแก๊สไนโตรเจน ซึ่งเป็นผลจากกิจกรรมของเอนไซม์ nitrogenase ดังสมการ และสามารถเปลี่ยนเป็นไนโตรเจนในรูปที่เป็นประโยชน์แก่พืช เช่น NH_4^+ และ NO_3^- โดยอาศัยจุลินทรีย์ในแต่ละกลุ่มที่แตกต่างกัน (David, 2007)



ในส่วนของการตรึงไนโตรเจนทางชีวภาพนั้น Karl and. Newton (2002) ได้แบ่งแบคทีเรียออกเป็น 3 กลุ่ม โดยพิจารณาถึงความสัมพันธ์ระหว่างแบคทีเรียดินกับพืช คือ

1. แบคทีเรียตรึงไนโตรเจนที่มีภาวะอยู่ร่วมกับรากพืช (symbiotic nitrogen-fixing bacteria) แบคทีเรียในกลุ่มนี้ใช้ซูโครสและเมแทบอลิต์จากรากพืชอาศัย (host) เป็นแหล่งพลังงาน เช่น ไรโซเบียม ซึ่งอยู่ร่วมกับรากพืชตระกูลถั่ว สามารถตรึงไนโตรเจนได้ประมาณปีละ 10-60 กก.N/ไร่ เมื่อตรึงไนโตรเจนได้แล้ว ก็เคลื่อนย้ายสารประกอบไนโตรเจนออกมายังเซลล์รากของพืชอาศัยอย่างรวดเร็ว ในระบบนี้พืชตรึงไนโตรเจนที่ตรึงแล้วมาใช้ประมาณ 90 % จุลินทรีย์ที่ตรึงไนโตรเจนเมื่ออยู่ในปมรากพืชตระกูลถั่ว ได้แก่ ไรโซเบียม (*Rhizobium*) ซึ่งเจริญเติบโตเร็ว และแบคทีเรียไรโซเบียม (*Bradyrhizobium*) ซึ่งเจริญเติบโตช้า เป็นต้น

2. แบคทีเรียตรึงไนโตรเจนที่อยู่ใกล้ชิดกับรากพืช (associative nitrogen-fixing bacteria) แบคทีเรียในกลุ่มนี้ใช้สารที่ปลดปล่อยออกจากรากพืช root exudates เป็นแหล่งพลังงาน เช่น *Azospirillum* และ *Azotobacter* แบคทีเรียกลุ่มนี้สามารถตรึงไนโตรเจนได้ประมาณปีละ 2-30 กก.N/ไร่ จุลินทรีย์เหล่านี้ไม่ได้สร้างปมรากเพียงแต่อาศัยอยู่ตามผิวรากหรือช่องระหว่างเซลล์ในชั้นคอร์เทกซ์ พืชจะได้รับประโยชน์จากไนโตรเจนที่จุลินทรีย์ตรึงประมาณ 90 % เมื่อจุลินทรีย์เหล่านั้นตายแล้ว

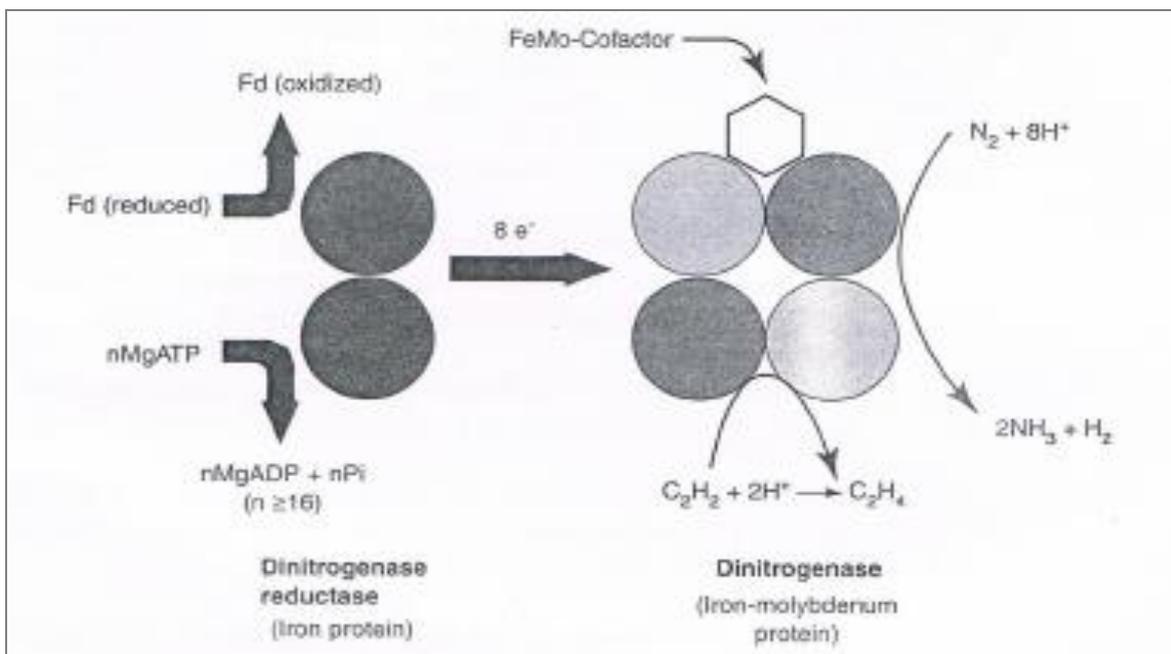
3. แบคทีเรียตรึงไนโตรเจนที่ดำรงชีพอย่างอิสระ (free living nitrogen-fixing bacteria) มีทั้งพวกที่ใช้อินทรีย์วัตถุในดินเป็นแหล่งพลังงาน (heterotroph) สำหรับแบคทีเรียกลุ่มนี้ เช่น *Azotobacter* ซึ่งอยู่ในธรรมชาติได้รับอินทรีย์สารมาเป็นอาหารน้อยจึงสามารถตรึงไนโตรเจนได้ในปริมาณค่อนข้างต่ำ คือปีละ 0.15-0.3 กก./ไร่ และพวกที่สังเคราะห์แสงได้ สามารถตรึงไนโตรเจนได้ประมาณปีละ 1.5-12 กก.N/ไร่ ในพื้นที่ของทวีปเอเชียมีสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน (cyanobacteria) ทำหน้าที่ตรึงไนโตรเจน จึงช่วยเพิ่มธาตุไนโตรเจนในดินนาซึ่งใช้ปลูกข้าวได้เป็นอย่างดีดินนอกจากดินนาจะมีสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินที่ดำรงชีพแบบอิสระแล้วยังมี *Anabaena azollae* ซึ่งอยู่ร่วมกับเฟิร์นน้ำชื่อ *Azolla* (แห่นางดำ) ช่วยตรึงไนโตรเจนอีกด้วย

6.1.2 กลไกการตรึงไนโตรเจน

การตรึงไนโตรเจนโดยแบคทีเรียที่มีความสามารถเปลี่ยนแก๊สไนโตรเจนในบรรยากาศ (N₂) ให้อยู่ในรูปของแอมโมเนีย ซึ่งจะกลายเป็นสารประกอบอินทรีย์ไนโตรเจน (organic nitrogen) ในแบคทีเรียต่อไป แบคทีเรียสามารถตรึงไนโตรเจนได้เนื่องจาก กิจกรรมของเอนไซม์ไนโตรจีเนส (nitrogenase) กระบวนการตรึงไนโตรเจนที่เกิดขึ้นถูกกระตุ้นโดย เอนไซม์ไนโตรจีเนสแสดงดังนี้



เอนไซม์ไนโตรจีเนสประกอบไปด้วยโปรตีน 2 ชนิด คือ โปรตีนที่มีเหล็กเป็นองค์ประกอบ (iron protein หรือ Fe-protein) และโปรตีนที่มีโมลิบดีนัมและเหล็กเป็นองค์ประกอบ (molybdenum-iron protein) ซึ่งในขั้นแรก Fe-protein จะถูกรีดิวส์โดย ferredoxin ต่อมา Fe-protein ที่ถูกรีดิวส์จะเข้าจับกับ ATP และไปรีดิวส์ molybdenum-iron protein และให้อิเล็กตรอนกับ N₂ และเกิดเป็น NH=NH และถูกรีดิวส์ต่อไปเรื่อยๆโดยรับอิเล็กตรอนจาก ferredoxin จนกลายเป็น 2NH₃ โดยกลไกปฏิกิริยาแสดงดังภาพที่ 1



ภาพที่ 1 ปฏิกิริยารีดักชันระหว่างกระบวนการตรึงไนโตรเจนโดยเอนไซม์ไนโตรจีเนส
ที่มา: David (2007)

การวิเคราะห์หาประสิทธิภาพในการตรึงไนโตรเจน อาจทำได้หลายวิธีทั้งทางตรง และทางอ้อม (Burriss and Wilson, 1957) ได้แก่

1. การวิเคราะห์หาไนโตรเจนรวมที่ตรึงได้โดยวิธี Kjeldahl การวิเคราะห์หาไนโตรเจนรวม (total nitrogen) จากพืชโดยวิธี Kjeldahl ได้รับความนิยมมากเนื่องจากเป็นวิธีการวิเคราะห์หาสารประกอบไนโตรเจนโดยตรงที่ให้ผลดีพอสมควร ถึงแม้ว่าไม่สะดวกและเสียเวลามาก

2. การวิเคราะห์ไนโตรเจนโดยวิธีไอโซโทป ในสภาพธรรมชาติไนโตรเจนปรากฏอยู่ในสภาพ 2 ไอโซโทป (isotope) ได้แก่ ¹⁴N และ ¹⁵N ไนโตรเจน ทั้งสองไอโซโทปนี้อยู่ในอากาศในสัดส่วนที่คงที่ คือจะมี ¹⁵N อยู่ในอัตรา 0.3663 อะตอมไนโตรเจน (โดยจะมีค่าผันแปรอยู่ระหว่าง 0.36628-0.36632 อะตอมต่อร้อยละ

อะตอมไนโตรเจน) การวัดอัตราของ ^{15}N ซึ่งมีอยู่ในอัตราที่ต่ำมากนี้ต้องใช้เครื่องมือที่มีความไวและแม่นยำเป็นกรณีพิเศษในการวัดกัมมันตภาพรังสี ซึ่งได้แก่ isotope ratio mass spectrometer

3. การวิเคราะห์ด้วยอะเซทิลรีดักชัน (Acetylene-reduction assay) การวัดประสิทธิภาพของการตรึงไนโตรเจนโดยวิธีนี้ เป็นการวัดความแตกต่างปริมาณของอะเซทิลีนที่ถูกรีดิวซ์หรือวัดเอทีลีนที่เกิดขึ้นแล้วคำนวณกลับไปเป็นรูปของไนโตรเจนที่ถูกตรึงโดยอาศัยหลักการการทำงานของเอนไซม์ไนโตรจีเนสที่กระตุ้นการรีดิวซ์ออกซิเจนของแก๊สไนโตรเจน(N_2) จากอากาศนั้น สามารถรีดิวซ์หรือถ่ายทอดอิเล็กตรอนให้กับอะเซทิลีน(C_2H_2) ได้ด้วยและผลที่ได้ก็คือเอทีลีน (C_2H_4) ปัจจุบันการประเมินประสิทธิภาพในการตรึงไนโตรเจนจากอากาศไม่นิยมวัดปริมาณไนโตรเจนโดยตรง เพราะทำได้ยากและเสียเวลามาก ดังนั้นการวัดประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจนโดยวิธีนี้จึงเป็นวิธีที่สะดวก เสียเวลาน้อย และวัดได้หลาย ๆ ตัวอย่างต่อวัน

นอกจากนี้ยังมีการใช้เทคนิคทางชีววิทยาระดับโมเลกุลเพื่อตรวจสอบการทำงานของเอนไซม์ไนโตรจีเนส ด้วยวิธีการ immunolabelling in situ hybridization โดยสังเกตการทำงานของ reporter genes และ nitrogenase-encoding (*nif*) genes โดยที่มีการศึกษาพบว่า reporter genes มีความเกี่ยวข้องกับความแตกต่างของ *nif* genes ที่แสดงออกมาของ *nifA* (gene expression) (Katupitiya et al., 1995) และ *nifH* (Vande Broek et al., 1993) ของ *A. brasilense* ที่ได้จากบริเวณผิวรากของข้าวสาลี ในกรณีของข้าว พบการแสดงออกของ *nifH* ของพวกเอนโดไฟต์ *Alcaligenes faecalis* A15 และ *Azospirillum irakense* ภายใน epidermal cells ของราก (Vermeiren et al., 1998) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Hurek และคณะ ในปี ค.ศ. 1997 พบการแสดงออกของ *nifH* ของ *Azoarcus* ในรากพืช ด้วยวิธีการ in situ hybridization โดยใช้ antisense *nifH* probes ในรากหญ้า และเมื่อไม่นานมานี้สถาบันวิจัยข้าวนานาชาติ (IRRI) ได้ทำการศึกษาแบคทีเรียที่สามารถตรึงไนโตรเจนสายพันธุ์ *Serratia marcescens* ที่แยกได้จากพื้นที่ที่มีการทำนาข้าว มีการแสดงออกของ *nifH* และ เอนไซม์ไนโตรจีเนส ขณะที่มีการเข้าอาศัยของแบคทีเรีย บริเวณ aerenchyma และ xylem vessels ของเมล็ดข้าวที่มีการใส่แบคทีเรีย

แต่ในทางตรงกันข้าม ในการศึกษา *Herbaspirillum* ไม่พบหลักฐานการแสดงออกของยีน *nif* หรือเอนไซม์ไนโตรจีเนส (Olivares et al., 1997) คล้ายคลึงกับการศึกษาของ Fuentes-Ramirez และคณะ ในปี ค.ศ.1999 ซึ่งจากการตรวจสอบไม่พบการแสดงออกของยีน *nif* (gene expression) และการเข้าอาศัยในพืช ที่ทำการศึกษา หลังจากการใส่แบคทีเรีย *A. diazotrophicus* strain *nifH*-GUS

6.2. จุลินทรีย์ที่ช่วยให้ธาตุอาหารเป็นประโยชน์กับพืช

6.2.1 จุลินทรีย์ละลายฟอสเฟต

ฟอสฟอรัสเป็นธาตุอาหารหลักชนิดหนึ่งที่มีความสำคัญต่อการเจริญเติบโตและการพัฒนาของพืช (Ehrlich, 1990) ฟอสฟอรัสจะพบอยู่ในนิวเคลียสของเซลล์ และโครโมโซม เป็นส่วนประกอบของ DNA และ RNA ซึ่งมีส่วนสำคัญในกระบวนการหายใจ สังเคราะห์แสง สังเคราะห์แป้ง โปรตีนและไขมัน ส่งผลให้ฟอสฟอรัสมีผลต่อกระบวนการงอกของราก การออกดอก การสร้างหัวและการสุกของผล ฟอสฟอรัสเป็นธาตุอาหารที่พืชต้องการในปริมาณมากรองจากไนโตรเจน แต่จากการศึกษาพบว่าในดินมีฟอสฟอรัสอยู่ในระดับที่ต่ำปริมาณ 400-1200 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมของดิน ในดินส่วนมากจะมีฟอสฟอรัสในรูปอินทรีย์และอนินทรีย์ฟอสฟอรัสที่ละลายยาก หรือไม่ละลาย และเป็นฟอสฟอรัสที่พืชไม่สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ โดยส่วนใหญ่สารละลายฟอสฟอรัสในดินจะมีความเข้มข้นต่ำมากโดยประมาณ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร หรือน้อยกว่า (Goldstein, 1994) พืชสามารถใช้ประโยชน์จากฟอสฟอรัสได้ในรูปแอนไอออนของกรดอโทฟอสฟอริก (H_3PO_4) โดยเฉพาะในรูปของ HPO_4^{2-} หรือ H_2PO_4^- (Beever and Burns, 1980) แหล่งของฟอสฟอรัสในดินส่วนใหญ่จะได้อมาจากหินที่มีฟอสเฟตเป็นองค์ประกอบ เช่น แร่อะพาไทต์ปฐมภูมิ (primary apatite) และแร่ปฐมภูมิอื่นๆ และการสลายตัวของสารอินทรีย์วัตถุในดินที่มีฟอสฟอรัสเป็นองค์ประกอบ จากการศึกษพบว่าปุ๋ยฟอสฟอรัสที่ใส่ลงในดินให้กับพืช

นั้น พืชสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้เพียง 5% ของปุ๋ยฟอสฟอรัสที่ถูกใส่ลงไปเท่านั้น ส่วนที่เหลือจะถูกตรึงให้อยู่ในรูปฟอสฟอรัสอนินทรีย์ที่ไม่ละลายน้ำ และทำให้เกิดการสะสมของฟอสฟอรัสโดยเฉพาะดินเกษตรกรรมที่มีการใส่ปุ๋ยอย่างต่อเนื่อง การตรึงฟอสฟอรัสในดินขึ้นอยู่กับ pH และชนิดของดิน ในดินที่มี pH เป็นกรดฟอสฟอรัสจะถูกตรึงด้วยออกไซด์และไฮดรอกไซด์ของเหล็กและอะลูมิเนียม ในขณะที่ปฏิกิริยาดินเป็นด่างฟอสฟอรัสจะถูกตรึงด้วยแคลเซียมทำให้ประสิทธิภาพการละลายของฟอสฟอรัสต่ำ (Goldstein, 1986; Goldstein, 1994; Jones *et al.*, 1991) พืชจะใช้ประโยชน์ฟอสฟอรัสได้ก็ต่อเมื่อฟอสฟอรัสถูกปลดปล่อยออกมาจากรูปดังกล่าว ปัจจุบันพบว่า มีจุลินทรีย์ดินหลายชนิด ทั้งแบคทีเรีย และราที่สามารถเปลี่ยนรูปอนินทรีย์ฟอสเฟตให้อยู่ในรูปที่เป็นประโยชน์ต่อพืชได้

จุลินทรีย์นั้นว่ามีบทบาทสำคัญต่อวัฏจักรฟอสฟอรัสในธรรมชาติเป็นอย่างมาก เนื่องจากการดำเนินกิจกรรมของจุลินทรีย์ทำให้เกิดกระบวนการออกซิเดชัน (oxidation) และรีดักชัน (reduction) ของสารประกอบฟอสฟอรัส เกิดการเคลื่อนย้ายอิเล็กตรอนจากแก๊สฟอสฟีน (phosphine) ซึ่งมีประจุ-3 ไปเป็นฟอสเฟต (phosphate) ที่มีประจุเป็น+5 (Rodriguez and Fraga, 1999) ในกระบวนการถ่ายเทอิเล็กตรอนจากการศึกษาพบความสามารถในการละลายสารประกอบอนินทรีย์ฟอสเฟตของแบคทีเรียหลากหลายสายพันธุ์ เช่น ความสามารถในการละลายไตรแคลเซียมฟอสเฟต (tricalcium phosphate) ไดแคลเซียมฟอสเฟต (dicalcium phosphate) ไฮดรอกซีอะพาไทต์ (hydroxyapatite) และหินฟอสเฟต (rock phosphate) (Goldstein, 1986) ตัวอย่างของแบคทีเรียที่มีความสามารถในการละลายฟอสเฟต เช่น *Pseudomonas* *Bacillus* *Rhizobium* *Burkholderia* *Achromobacter* *Agrobacterium* *Micrococcus* *Aerobacter* *Flavobacterium* และ *Erwinia* ซึ่งแบคทีเรียละลายฟอสเฟตเหล่านี้สามารถพบได้ในดินและในบริเวณไรโซสเฟียร์ (Sperberg, 1958; Katznelson *et al.*, 1962; Raghu and MacRae, 1966; Alexander, 1977) ทั้งแบคทีเรียที่ใช้ออกซิเจน และแบคทีเรียที่ไม่ใช้ออกซิเจน และพบแบคทีเรียละลายฟอสเฟตในดินบริเวณไรโซสเฟียร์มากกว่าในดินที่ห่างไกลออกไป (Katznelson *et al.*, 1962; Raghu and MacRae, 1966) การละลายฟอสเฟตโดยจุลินทรีย์มีกลไกที่แตกต่างกันออกไป (Salehrastin, 1999) เช่น กระบวนการทำให้เกิดกรด กระบวนการเกิดคีเลต และกระบวนการแลกเปลี่ยน การสังเคราะห์เอนไซม์ฟอสฟาเตส (Yadav and Dadarwal, 1997) แต่ส่วนใหญ่ความสามารถในการละลายฟอสเฟตของแบคทีเรียจะเกิดจากการผลิตกรดอินทรีย์มวลโมเลกุลต่ำออกมา ผลจากการผลิตกรดอินทรีย์ทำให้เซลล์ของแบคทีเรียและสิ่งแวดล้อมมีความเป็นกรดเพิ่มขึ้น ดังในการศึกษาของ Chen *et al.* (2006) ที่พบความสัมพันธ์เกี่ยวเนื่องกันระหว่าง pH ของอาหารเลี้ยงแบคทีเรีย และปริมาณการละลายฟอสเฟต บ่งชี้ว่ากรดอินทรีย์ที่ถูกผลิตขึ้นโดยแบคทีเรียละลายฟอสเฟตมีผลทำให้อาหารเป็นกรดเพิ่มมากขึ้น ส่งผลให้มีการละลายของฟอสเฟต

กรด gluconic acid เป็นกรดอินทรีย์ที่แบคทีเรียละลายฟอสเฟตส่วนใหญ่ผลิตขึ้น เช่น พบการผลิตใน *Pseudomonas* sp. (Illmer and Schinner, 1992) *Erwinia herbicola* (Liu *et al.*, 1992) *Pseudomonas cepacia* (Goldstein *et al.* 1993) และ *Burkholderia cepacia* ส่วนกรดอื่นๆ ที่พบว่ามีการผลิตขึ้นในแบคทีเรียละลายฟอสเฟต คือ 2-ketogluconic acid พบใน *Rhizobium leguminosarum* (Halder *et al.*, 1990) *Rhizobium meliloti* (Halder and Chakrabartty, 1993) *Bacillus firmus* (Banik and Dey, 1982) และพบการผลิต lactic isovaleric isobutyric และ acetic acids ที่พบใน *Bacillus licheniformis* และ *Bacillus amyloliquefaciens* นอกจากแบคทีเรียละลายฟอสเฟตจะช่วยให้ฟอสฟอรัสอยู่ในรูปที่เป็นประโยชน์ต่อพืชมากขึ้นแล้ว แบคทีเรียละลายฟอสเฟตยังสามารถผลิตสารที่ช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชได้อีกด้วย เช่น ฮอโมนพืช (phytohormone) สารปฏิชีวนะ และซิเดอโรฟออร์ (Klopper *et al.*, 1988; Gaur and Ostwal, 1972; Subba Rao, 1982; Gerretsen, 1948; Kucey *et al.*, 1989)

6.2.2 จุลินทรีย์ที่ช่วยเพิ่มศักยภาพในการดูดซึมธาตุอาหารพืช

เชื้อราบางชนิดอาศัยอยู่ในรากพืชเรียกว่า เชื้อราไมคอร์ไรซา โดยมีความสัมพันธ์แบบพึ่งพาอาศัยกันระหว่างราชนิดนั้นกับรากของพืชชั้นสูง ทำให้สิ่งมีชีวิตทั้งสองชนิดได้รับประโยชน์จากความสัมพันธ์นี้ คือ เชื้อราจะได้รับอาหารในรูปของคาร์โบไฮเดรต (แป้งและน้ำตาล) จากการสังเคราะห์แสงของพืช ส่วนพืชก็ได้รับประโยชน์จากเชื้อรา โดยเส้นใยของเชื้อราเจริญออกจากรากพืชสู่ดินและแตกแขนงเพิ่มมากมาย จึงเพิ่มพื้นที่ผิวสัมผัสกับผิวนุภาคดินได้เป็นบริเวณกว้างขึ้น ขณะเดียวกันใยรายังทำหน้าที่แทนรากในการดูดธาตุอาหารและน้ำแล้วส่งกลับมาให้รากพืช ความสัมพันธ์ในลักษณะนี้ช่วยเพิ่มศักยภาพในการดูดธาตุอาหารและน้ำของพืชให้อาศัยอย่างมาก

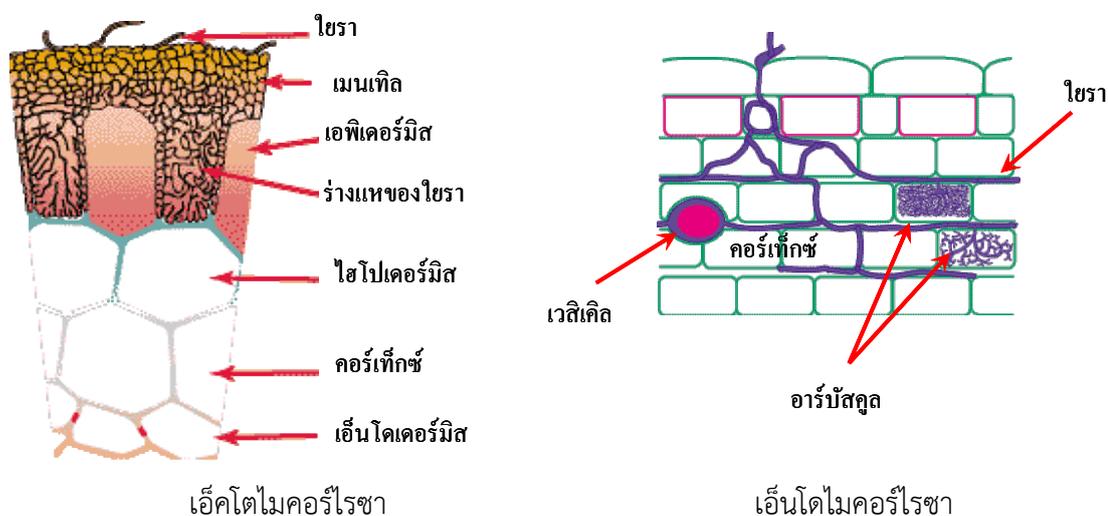
การจัดจำแนกเชื้อราไมคอร์ไรซา

เชื้อราที่สร้างความสัมพันธ์แบบไมคอร์ไรซากับพืชแบ่งออกได้เป็น 3 ชนิด แต่ที่พบโดยทั่วไปจะมีอยู่ 2 ชนิด คือ เอ็คโตไมคอร์ไรซา และเอ็นโดไมคอร์ไรซา เชื้อราทั้ง 3 กลุ่มจะมีลักษณะที่แตกต่างกัน คือ

1) **เอ็คโตไมคอร์ไรซา** เชื้อราในกลุ่มนี้สร้างใยรารอบๆ รากพืช มีลักษณะอัดกันแน่นครอบคลุมผิวรากคล้ายกับเปลือกของรากอีกชั้นหนึ่ง เรียกโครงสร้างนี้ว่าแมนเทิล ใยราบางส่วนจะเจริญเข้าไปอยู่ระหว่างเซลล์รากในชั้นคอร์เท็กซ์ แต่บางส่วนเจริญและคลุมผิวรากอย่างหนาแน่น เกิดลักษณะที่เป็นร่างแหเรียกว่า ฮาร์ดิกเนต (ภาพที่ 2)

2) **เอ็นโดไมคอร์ไรซา** เชื้อราในกลุ่มนี้จะสร้างใยสานกันอย่างหลวมๆ อยู่รอบๆ รากพืช บางส่วนเจริญเข้าไปภายในรากพืชโดยอยู่ระหว่างเซลล์ แต่บางส่วนแทรกเข้าไปในเซลล์ของชั้นคอร์เท็กซ์ ใยราที่อยู่ภายในเซลล์จะพัฒนาตัวเองเป็นโครงสร้างซึ่งทำหน้าที่แลกเปลี่ยนอาหาร 2 แบบ คือ แบบแตกแขนงคล้ายพุ่มไม้ เรียกว่า อาร์บัสคูล และแบบกลมคล้ายรูปไข่ เรียกว่า เวสิเคิล (ภาพที่ 2) บางครั้งอาจพบทั้ง 2 โครงสร้างในรากเดียวกัน

3) **เอ็คเทินโดไมคอร์ไรซา** เป็นเชื้อราที่มีลักษณะอยู่ระหว่างเอ็คโตไมคอร์ไรซาและเอ็นโดไมคอร์ไรซา โดยทั่วไปเชื้อราชนิดนี้จะเกาะอยู่บริเวณรากพืชเป็นเยื่อบางๆ และเจริญเข้าไปในรากทั้งในบริเวณระหว่างเซลล์ และอยู่ภายในเซลล์ของชั้นคอร์เท็กซ์



ภาพที่ 2 เปรียบเทียบลักษณะของเชื้อราในลักษณะความสัมพันธ์แบบเอ็คโตไมคอร์ไรซาและเอ็นโดไมคอร์ไรซา (ดัดแปลงมาจาก <http://www.ffp.csiro.au/research/mycorrhiza/index.html>)

6.3 จุลินทรีย์ส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช

ปัจจุบันจุลินทรีย์ส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชหรือ ฟิซีฟิอาร์ ได้รับความสนใจเป็นอย่างมากในการใช้เป็นตัวควบคุมสาเหตุของโรคพืช จุลินทรีย์ในกลุ่มนี้อาศัยอยู่ในดินบริเวณที่ใกล้ผิวรากพืช (rhizosphere) (ภาพที่ 3) บางชนิดจะอาศัยอยู่ภายในรากพืช เป็นจุลินทรีย์ที่เป็นประโยชน์ต่อพืช 2 ลักษณะ คือ 1) ส่งเสริมการเจริญเติบโตโดยตรง ซึ่งเป็นประโยชน์ที่สามารถมองเห็นได้ จึงเรียกแบคทีเรียในกลุ่มนี้ว่าปุ๋ยชีวภาพฟิซีฟิอาร์ และ 2) โดยทางอ้อมจะเป็นตัวช่วยควบคุมโรคพืช ทำให้พืชเป็นโรคน้อยลง จึงเรียกจุลินทรีย์ในกลุ่มนี้ว่า สารกำจัดศัตรูพืชชีวภาพ (biopesticide) การวิจัยและพัฒนาทั้งสองส่วนนี้ก้าวหน้าไปมาก คาดว่าเมื่อการทดสอบในภาคสนามได้ผลชัดเจนกับพืชชนิดใดชนิดหนึ่ง ในอนาคตคงจะมีการนำมาใช้ประโยชน์ในระดับไร่นาได้

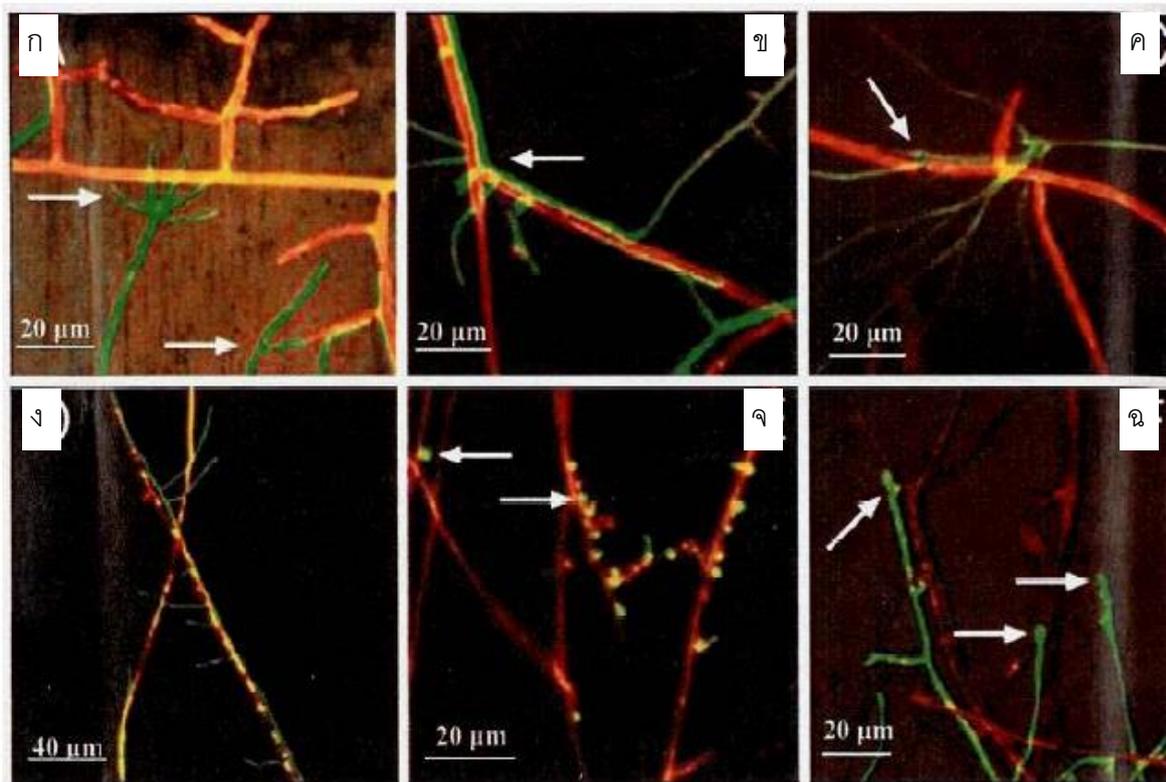
6.3.1 ปุ๋ยชีวภาพฟิซีฟิอาร์มีคุณสมบัติดังนี้

- 1) เพิ่มธาตุไนโตรเจนแก่พืชโดยการตรึงไนโตรเจน
- 2) เพิ่มธาตุฟอสฟอรัส กำมะถันและเหล็ก โดยการเปลี่ยนรูปฟอสฟอรัส กำมะถันและเหล็กจากรูปที่พืชใช้ประโยชน์ไม่ได้ให้อยู่ในรูปที่พืชใช้ประโยชน์ได้
- 3) ผลิตฮอร์โมนพืช จึงส่งเสริมการเจริญและเพิ่มพื้นที่ผิวของรากพืช
- 4) ส่งเสริมจุลินทรีย์อื่น ๆ ที่มีประโยชน์ต่อพืช

6.3.2 สารกำจัดศัตรูพืชชีวภาพ

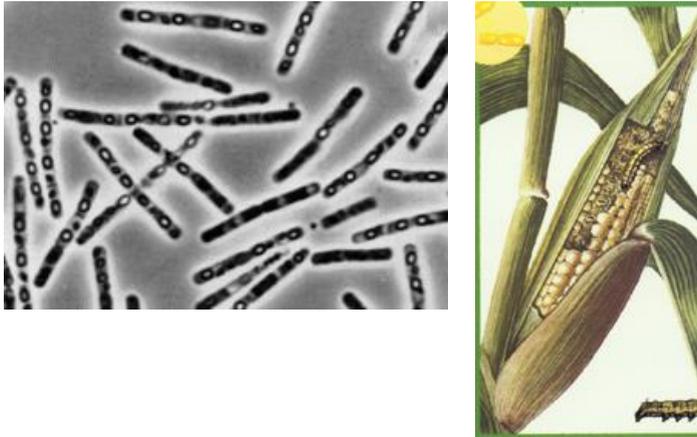
สารกำจัดศัตรูพืชชีวภาพมีคุณสมบัติดังนี้

- 1) เป็นสารกำจัดเชื้อราที่เป็นสาเหตุของโรคพืช จุลินทรีย์กลุ่มนี้มีกลไกหลายอย่างด้วยกันในการกำจัดเชื้อราสาเหตุของโรคพืช เช่น ใช้วิธีการแข่งขันและแย่งธาตุอาหารกับเชื้อราชนิดอื่น การสร้างสารปฏิชีวนะหรือสารชีวพิษ(toxin) ออกมาทำลายหรือยับยั้งเชื้อราคู่แข่ง เหนียวน้ำให้พืชสร้างระบบภูมิคุ้มกันต้านทาน หรือเข้าทำลายเชื้อโรคโดยตรง ตัวอย่างเช่น เชื้อราไตรโคเดอร์มาเข้าทำลายเชื้อราที่เป็นสาเหตุของโรคพืช ดังภาพที่ 3



ภาพที่ 3 เชื้อราไตรโคเดอร์มา (สีเขียว) เข้าทำลายเชื้อราสาเหตุของโรคพืช (สีแดง)

2) เป็นสารกำจัดแมลงศัตรูพืช โดยการสร้างสารชีวพิษทำลายแมลง ตัวอย่างเช่น แบคทีเรีย *Bacillus thuringiensis* ที่สร้างสารชีวพิษทำลายหนอนเจาะฝักข้าวโพด ดังภาพที่ 4



ภาพที่ 4 ภาพซ้าย: เชื้อ *Bacillus thuringiensis* ภาพขวา: เชื้อผลิตสารชีวพิษทำลายหนอนเจาะฝักข้าวโพด

3) เป็นสารกำจัดวัชพืช

6.4 จุลินทรีย์เร่งปุ๋ยหมัก

โดยปกติแล้วในดินทั่วไปมีจุลินทรีย์หลายชนิด ที่สามารถย่อยสลายอินทรีย์สารต่างๆ เช่น ซากพืช ซากสัตว์ หรือจุลินทรีย์ที่ตายแล้ว ให้กลายเป็นอินทรีย์วัตถุในดิน ผลจากการย่อยสลายดังกล่าวจะเป็นการปลดปล่อยธาตุอาหารต่างๆ ให้ลงสู่ดินหรือสภาพแวดล้อม และได้อินทรีย์วัตถุที่จะช่วยปรับปรุงบำรุงดิน จุลินทรีย์ที่มีบทบาทสำคัญในการย่อยสลายอินทรีย์สารเหล่านี้ ได้แก่ เชื้อรา แบคทีเรีย และ แอคทิโนมัยซีต

การทำปุ๋ยหมักก็มีกระบวนการย่อยสลายอินทรีย์วัตถุคล้ายกับที่เกิดขึ้นในธรรมชาติ แต่การทำปุ๋ยหมักเกิดขึ้นจากการจัดการของมนุษย์ โดยการนำวัสดุอินทรีย์ต่างๆ มากองรวมกัน แล้วปล่อยให้สลายตัวกลายเป็นปุ๋ยเพื่อใช้ในการปรับปรุงบำรุงดิน แต่การปล่อยให้อินทรีย์สารย่อยสลายตามธรรมชาติเช่นนี้จะใช้เวลานาน จึงได้พัฒนาวิธีการหมัก โดยคัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายวัสดุอินทรีย์ มาช่วยให้การย่อยสลายเกิดขึ้นเร็วและได้ปุ๋ยหมักที่ดีในเวลาที่น้อยกว่าเดิม เรียกจุลินทรีย์ที่พัฒนาขึ้นนี้ว่า เชื้อจุลินทรีย์เร่งปุ๋ยหมัก อย่างไรก็ตามการทำปุ๋ยหมักให้มีประสิทธิภาพนั้น นอกจากจะใช้จุลินทรีย์ที่ดีในการย่อยสลายแล้ว ยังต้องควบคุมปัจจัยอื่นๆ เช่น ความชื้นและการถ่ายเทอากาศของกองวัสดุอย่างเหมาะสมอีกด้วย เพื่อให้เกิดปุ๋ยหมักในช่วงเวลาที่กำหนด

6.5 จุลินทรีย์ย่อยสลายสารพิษในดิน

การค้นพบสารเคมีกำจัดศัตรูพืช ทำให้มนุษย์มีศักยภาพสูงในการควบคุมโรค แมลงและสัตว์ที่เป็นศัตรูต่อพืช รวมทั้งวัชพืชในพื้นที่เกษตรกรรม สารเคมีกำจัดศัตรูพืชมีบทบาทสำคัญในการป้องกันและควบคุมโรคในการผลิตทางการเกษตร เนื่องจากมีประสิทธิภาพสูง ใช้ง่าย และสะดวกในการควบคุมศัตรูพืช อย่างไรก็ตามการใช้สารเคมีเหล่านี้ในปริมาณมากหรืออย่างไม่ถูกต้องก็จะก่อให้เกิดปัญหาด้านสิ่งแวดล้อม และเป็นการเพิ่มต้นทุนในการผลิต โดยเฉพาะอย่างยิ่งถ้าเกิดการดื้อสารเคมีของศัตรูพืชก็ต้องใช้ในปริมาณเพิ่มมากขึ้น ปริมาณสารเคมีที่ตกค้างในดินก็อาจมีเพิ่มมากขึ้น

ในธรรมชาติจะมีจุลินทรีย์บางชนิดที่สามารถปรับตัวให้มีความสามารถในการใช้สารเคมีต่างๆ เหล่านี้เป็นแหล่งอาหารและพลังงาน จึงทำให้สารเคมีเหล่านี้ลดความเป็นพิษหรือถูกสลายหมดไปจากสิ่งแวดล้อม ดังนั้นการแปรสภาพของสารกำจัดศัตรูพืชโดยจุลินทรีย์จึงมีความสำคัญต่อการปกป้องสิ่งแวดล้อมจากการสะสมของสารเคมีอันเนื่องมาจากการใช้หรือการทำให้เกิดการปนเปื้อนโดยวิธีอื่นๆ เป็นอย่างยิ่ง ดังจะขอยกตัวอย่างกรณีศึกษาการย่อยสลายสารกำจัดวัชพืชอะทราซีน

อะทราซีนเป็นสารกำจัดวัชพืชที่ถูกสังเคราะห์ขึ้นมาประมาณ 50 ปีที่แล้ว เพื่อใช้เป็นสารกำจัดวัชพืชใบกว้างในแปลงข้าวโพด ข้าวฟ่าง อ้อย และพืชอื่นๆ ประเทศไทยก็นิยมใช้สารชนิดนี้และปริมาณการนำเข้าเพิ่มขึ้นทุกปี ในช่วงแรกๆของการนำสารนี้เข้ามาใช้ในการผลิตทางการเกษตร ก็ได้มีนักวิทยาศาสตร์ชาวอเมริกันพยายามค้นหาจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายสารนี้กันเป็นจำนวนมากเนื่องจากพบว่าสารนี้ปนเปื้อนในแหล่งน้ำใต้ดินและน้ำผิวดินหลายแห่ง แต่ยังไม่สามารถค้นหาเชื้อจุลินทรีย์ที่ย่อยสลายอะทราซีนได้ จนกระทั่งประมาณ 10 ปีที่แล้วเริ่มมีการค้นพบจุลินทรีย์หลายชนิดที่สามารถย่อยสลายสารอะทราซีน ทั้งเชื้อราและแบคทีเรีย แต่ละชนิดก็มีความสามารถในการย่อยสลายหรือเปลี่ยนรูปแตกต่างกันไป หนึ่งในจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายสารอะทราซีนได้คือ *Pseudomonas* sp. strain ADP (ภาพที่ 9) สามารถย่อยสลายสารอะทราซีนให้กลายเป็นแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์กับแอมโมเนีย หลังจากนั้นนักวิทยาศาสตร์ก็ได้ทำการศึกษาจุลินทรีย์เหล่านี้ในรายละเอียดทั้งในเรื่องของ พันธุกรรม และเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายสารอะทราซีน

7. แบคทีเรียผลิตฮอร์โมนพืช (Phytohormones producing bacteria)

ในช่วงเวลาหลายปีที่ผ่านมาได้มีการศึกษาเกี่ยวกับฮอร์โมนพืชที่จุลินทรีย์ผลิตขึ้นเพิ่มมากขึ้น และถูกนำมาใช้ประโยชน์ในการเกษตรอย่างแพร่หลาย จากการศึกษาจะพบว่าแบคทีเรียหลากหลายสายพันธุ์ที่มีความสามารถในการผลิตฮอร์โมนพืช ทั้งที่อาศัยอยู่อย่างอิสระในดินหรือพวกที่มีอันตรกิริยากับพืช (ตารางที่ 1) ตัวอย่างฮอร์โมนพืชที่แบคทีเรียผลิตขึ้น เช่น ออกซิน (auxin) จิบเบอเรลลิน (Gibberellin) ไซโตไคนิน (cytokinin) เอทิลีน (ethylene) และกรดแอบไซซิก (abscisic acid) เป็นต้น การผลิตฮอร์โมนพืชของจุลินทรีย์มีส่วนในการควบคุมการเจริญเติบโตของพืชในด้านต่างๆ เช่น การเจริญของต้นพืช การติดดอกออกผล และการหลุดร่วงของใบดอกผลของพืช เป็นต้น กลุ่มของฮอร์โมนพืชที่ได้รับความสนใจในการศึกษามากและนำมาใช้ทางการเกษตรมากที่สุด คือ ฮอร์โมนพืชออกซิน และจิบเบอเรลลิน

ตารางที่ 1 การผลิตฮอร์โมนพืชของแบคทีเรียชนิดต่างๆ ในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช

ฮอร์โมนพืช	แบคทีเรีย	ชนิดพืช
ออกซิน (Auxin)	<i>Aeromonas veronii</i>	ข้าว
	<i>Agrobacterium</i> sp.	กะหล่ำ
	<i>Alcaligenes piechaudii</i>	กะหล่ำ
	<i>Azospirillum brasilense</i>	ข้าวสาลี
	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	Radish
	<i>Comaninas acidovorans</i>	กะหล่ำ
	<i>Enterobacter cloacae</i>	ข้าว
	<i>Enterobacter</i> sp.	อ้อย
	<i>Rhizobium leguminosarum</i>	Radish
	ไซโทไคนิน (Cytokinin)	<i>Paenibacillus polymyxa</i>
<i>Pseudomonas fluorescens</i>		ถั่วเหลือง
<i>Rhizobium leguminosarum</i>		กะหล่ำ
<i>Gibberellin</i>		กะหล่ำ
<i>Bacillus</i> sp.		Alder
<i>Alcaligenes</i> sp.		มันฝรั่ง
เอนไซม์ ACC deaminase	<i>Bacillus pumilus</i>	มันฝรั่ง
	<i>Enterobacter cloacae</i>	มันฝรั่ง
	<i>Pseudomonas cepacia</i>	ถั่วเหลือง
	<i>Pseudomonas putida</i>	ถั่วเขียว
	<i>Pseudomonas</i> sp.	มันฝรั่ง
	<i>Variovorax paradoxus</i>	มันฝรั่ง

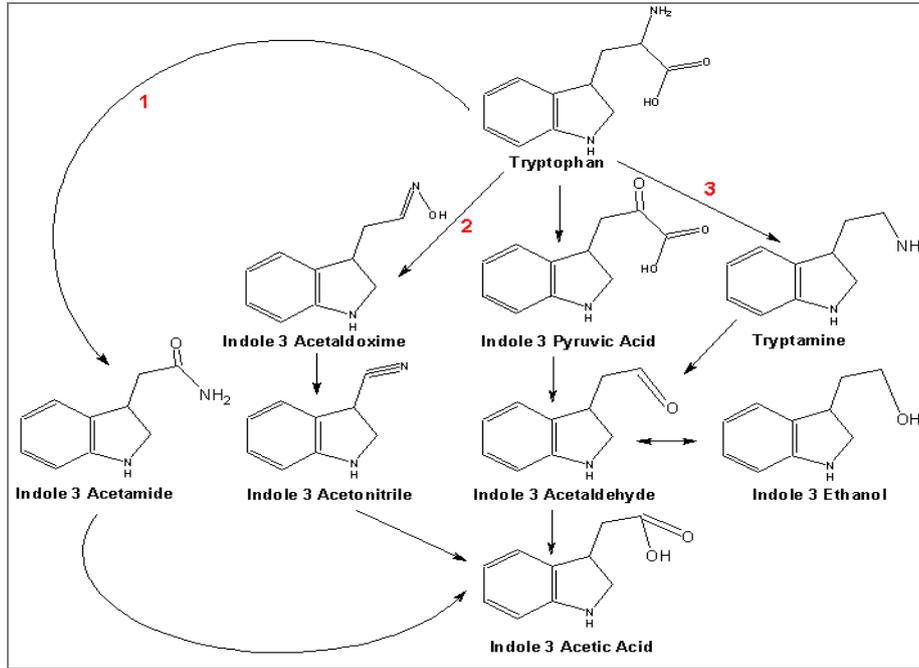
ที่มา: Glick *et al.* (1995)

7.1 แบคทีเรียผลิตฮอร์โมนพืชออกซิน (Auxin producing bacteria)

ออกซินเป็นฮอร์โมนพืชที่อยู่ในรูปสารเคมีที่เรียกว่า กรดอินโดล-3-แอซิติค (Indole-3-acetic acid) เป็นส่วนใหญ่ ฮอร์โมนพืชออกซินจะสร้างขึ้นบริเวณที่ปลายยอด ใบอ่อน และเมล็ด (Ribincky *et al.*, 2002) มีสมบัติเป็นฮอร์โมนควบคุมการเจริญเติบโตของพืชประเภทกระตุ้นการเจริญเติบโตทำให้พืชเกิดการแบ่งตัว กระตุ้นการขยายขนาดของเซลล์ และยึดตัวของเซลล์ในส่วนลำต้นของพืช (Tanimoto, 2005) สารออกซินอาจจะพบในรูปสารประกอบเชิงเดี่ยว (free compound) และในรูปที่รวมกับสารอื่นๆ เช่น IAA-insital IAA-glucose และ IAA-aspartate แต่สาร IAA ในรูปที่รวมกับสารอื่นนี้ อาจจะไม่มผลในการกระตุ้นการเจริญเติบโตของพืช (Cohen and Gray, 2006)

ฮอร์โมนพืชออกซินสามารถสังเคราะห์โดยใช้กรดอะมิโนทริปโตเฟนเป็นสารตั้งต้น (Cohen *et al.*, 2003) โดยกรดอะมิโนทริปโตเฟนเปลี่ยนไปเป็นออกซินโดยผ่านสารตัวกลางต่างๆ ด้วย 3 กระบวนการ (Woodward and Bartel, 2005) คือ กรดอะมิโนทริปโตเฟนเปลี่ยนเป็นอินโดลไพริเวต (ภาพที่ 5) โดยกระบวนการตีอะมิเนชัน หลังจากนั้นจะเกิดกระบวนการดีคาร์บอกซิเลชัน ดึงคาร์บอนไดออกไซด์ออกจากอินโดลไพริเวตทำให้เกิดสารตัวกลางใหม่ คือ อินโดลอะเซทาลดีไฮด์ จากนั้นหมู่อัลดีไฮด์ของอินโดลอะเซทาลดีไฮด์จะถูกออกซิไดซ์ให้กลายเป็นออกซิน (Bartel, 1997) การสังเคราะห์ฮอร์โมนพืชออกซินจากทริปโตเฟนโดยผ่านสารตัวกลางทริปทามีนด้วยกระบวนการดีคาร์บอกซิเลชัน จากนั้นทริปทามีนจะเปลี่ยนเป็นออกซินโดยกระบวนการ

การออกซิเดทีฟดีอะมีเนชัน (oxidative deamination) และการสังเคราะห์ออกซินโดยผ่านสารตัวกลางอินโดลอะซิโตไนทริล ทริปโตเฟนเปลี่ยนไปเป็นไทโอกลูโคไซด์ และกลูโคบราสซิซิน สารดังกล่าวจะเปลี่ยนไปเป็นอินโดลอะซิโตไนทริล และในที่สุดจะเปลี่ยนไปเป็นออกซิน โดยอาศัยกิจกรรมของโคเอนไซม์ไนทริน (Frankenberger and Arshad, 1995)



ภาพที่ 5 การสังเคราะห์ออกซินโดยใช้กรดอะมิโนทริปโตเฟนเป็นสารตั้งต้น 3 วิธี
ที่มา: Zhao et al. (2001)

ผลของออกซินต่อการเจริญเติบโตของพืชมีดังนี้ (Hedden and Thomas, 2006)

- 1) กระตุ้นการแบ่งเซลล์ ฮอร์โมนพืชออกซินช่วยกระตุ้นการแบ่งเซลล์แคมเปียมทำให้พืชมีเนื้อไม้มากขึ้น และเกิดการเจริญเติบโตด้านข้างเพิ่มขึ้น
- 2) เร่งการขยายตัวของเซลล์ ฮอร์โมนพืชออกซินช่วยให้เซลล์ในส่วนต่างๆ ของพืชยืดยาวโดยการกระตุ้นให้ เซลล์สร้างผนังเซลล์มากขึ้น
- 3) ควบคุมการแตกของราก ฮอร์โมนพืชออกซินสามารถกระตุ้นการเกิดของรากของกิ่งตอนหรือกิ่งปักชำของพืชได้หลายชนิด โดยฮอร์โมนพืชออกซินสามารถกระตุ้นให้เกิดรากพิเศษ (adventitious root) และกระตุ้นการเกิดเนื้อเยื่อเจริญของราก
- 4) ยับยั้งการเจริญของตาข้างและกิ่ง แผลงที่สำคัญของฮอร์โมนพืชออกซิน คือ บริเวณยอดอ่อน ที่จะผลิตฮอร์โมนพืชออกซินแล้วส่งไปยังส่วนต่างๆ ของพืช การเคลื่อนที่ของฮอร์โมนพืชออกซินลงมาด้านล่าง (basipetal movement) จะมีผลต่อการเจริญเติบโตของตาข้าง (lateral buds) โดยตาข้างไม่สามารถเจริญเติบโตได้เต็มที่ที่ทราบได้ที่ตาข้างยังได้รับฮอร์โมนพืชออกซินจากยอด แต่ถ้าตัดยอดทิ้งไปตาข้างซึ่งอยู่ถัดไปจะเจริญเติบโตขึ้นมาทันที (Macadam, 2009)
- 5) ควบคุมการร่วงของใบ ดอก และผล เมื่ออวัยวะดังกล่าวแก่ตัวลง เพราะการสร้างฮอร์โมนพืชออกซินในส่วนดังกล่าวจะน้อยลงซึ่งจะน้อยกว่าส่วนอ่อนและลำต้น
- 6) การเพิ่มการติดผล มีการทดลองใช้สารฮอร์โมนพืชออกซินกับพืชบางชนิด ปรากฏว่าสารในกลุ่มฮอร์โมนพืชออกซินสามารถที่จะเพิ่มการติดผลของพืชได้

ฮอร์โมนพืชออกซินสามารถสังเคราะห์ขึ้นได้ทั้งในพืชและจุลินทรีย์ การสังเคราะห์โดยจุลินทรีย์นั้นจะพบมากในจุลินทรีย์ที่อยู่ในบริเวณไรโซเฟียร์ของพืช เช่น *Pseudomonas* spp. *Bacillus* sp. และ *Rhizobium* spp. (Patten and Glick, 2002) จากการศึกษพบว่า *Azotobacter* และ Fluorescent *Pseudomonads* ผลิตฮอร์โมนพืชออกซินเพิ่มขึ้นเมื่อเติมทริปโตเฟนในอาหารเลี้ยงแบคทีเรีย โดยจะผลิตฮอร์โมนพืชออกซินสูงสุด 7.3-32.8 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อมีการเติมทริปโตเฟนความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร (Ahmad *et al.*, 2005) การศึกษาการผลิตฮอร์โมนพืชออกซินของแบคทีเรียโดย Sequeira and Williams (1964) พบว่ามีฮอร์โมนพืชออกซินระดับสูงในต้นของโบบาสุบที่มีการเข้าอยู่อาศัยของจุลินทรีย์สาเหตุโรคพืช *Pseudomonas solanacearum* มากกว่าในต้นโบบาสุบปกติ นอกจากนี้ Joseph *et al.* (2007) แยกแบคทีเรียบริเวณไรโซสเฟียร์ของต้นถั่วลูกไก่ พบ *Bacillus* *Pseudomonas* และ *Azotobacter* มีความสามารถในการผลิตออกซิน นอกจากนี้ยังมีการศึกษาการนำแบคทีเรียผลิตฮอร์โมนพืชออกซินไปใช้ในทางการเกษตรพบว่าการใช้ *Pseudomonas putida* หรือ *Trichoderma* ที่มีความสามารถในการผลิตฮอร์โมนพืชออกซินร่วมกับการปลูกมะเขือเทศทำให้น้ำหนักสดและความยาวรากของมะเขือเทศเพิ่มขึ้น (Gravel *et al.*, 2007)

การวัดปริมาณออกซินทำได้หลายวิธี ดังนี้

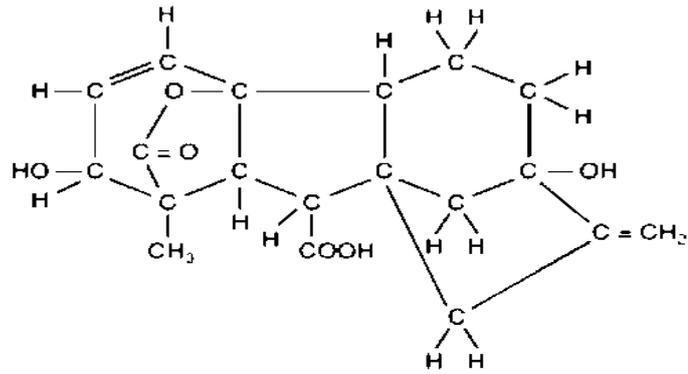
1) Bioassay คือ การวัดปริมาณออกซินโดยใช้ชิ้นส่วนของพืช เช่น โคลิออปไทล์ของข้าวโอ๊ตหรือใบเลี้ยงเดี่ยวอื่น ๆ แล้ววัดความโค้งงอของยอดโดยการวางออกซินได้โดยเปรียบเทียบกับเส้นมาตรฐาน (Standard Curve) (Went, 1926)

2) การวัดจากคุณสมบัติทางฟิสิกส์ คือ การวัดปริมาณของออกซินโดยใช้การดูดกลืนแสงของ IAA ซึ่งเมื่อมีความเข้มข้นต่างกันจะดูดกลืนแสงได้ต่างกัน โดยใช้ความยาวคลื่นแสงที่ 280 nm หรือสกัดเป็นสารบริสุทธิ์แล้วจึงใช้เครื่อง Gas Chromatography ร่วมกับ Mass Spectrometry (GC-MS) ในการจำแนกและหาปริมาณ วิธีนี้มีประสิทธิภาพในการวัดปริมาณออกซิน 500 fg ที่เนื้อเยื่อโบบาสุบ 1 mg ผลิตขึ้น (Edlund *et al.*, 1995)

3) การวัดโดยวิธีเคมี โดยให้ออกซินทำปฏิกิริยากับ Salkowskis Reagent (acidifies ferric Horide) หรือใช้ Ehrlichs Reagent ซึ่งเกิดสีขึ้นมา จากนั้นวัดความเข้มของสีแล้วเปรียบเทียบกับเส้นมาตรฐาน (Meudt and Gaines, 1967)

7.2 แบคทีเรียผลิตฮอร์โมนพืชจิบเบอเรลลิน (Gibberellin producing bacteria)

จิบเบอเรลลิน (Gibberellin) เป็นฮอร์โมนพืช ที่สามารถควบคุมการเจริญเติบโตของพืชชนิดหนึ่ง เป็นสารประกอบอินทรีย์กลุ่มเตตราไซคลิก ไดเทอร์พีนอยด์ (tetracyclic diterpenoid) ที่มีโครงสร้างโมเลกุลขนาดใหญ่ ประกอบด้วยไอโซพรีน 4 โมเลกุล มาเรียงกันเป็นโครงสร้าง 3 วง โครงสร้างนี้เรียกว่า ent-gibberellane หรือ tetra-carboxylic gibbane ซึ่งเป็นโครงสร้างหลักของจิบเบอเรลลิน (Leopold and Kriedemann, 1975; Crozier *et al.*, 2000) จิบเบอเรลลินถูกค้นพบครั้งแรกที่ประเทศญี่ปุ่น จากการเกิดโรคระบาดของข้าวที่เป็นโรคอดฝักดาบ (Yabuta and Sumiki, 1938) ซึ่งต้นข้าวมีลักษณะสูงผอมผิดปกติ เนื่องจากรา *Gibberella fujikuroi* เมื่อสกัดสารที่ราสร้างขึ้นและนำไปทดสอบกับพืชชนิดอื่น พบว่าทำให้พืชนั้นๆ มีอาการอย่างเดียวกันคือ ต้นผอม สูง จึงตั้งชื่อสารที่พบนี้ว่า จิบเบอเรลลิน ต่อมาพบกรดจิบเบอเรลลิน และอนุพันธ์ของกรดจิบเบอเรลลิน จากราอื่นๆ อีกมากกว่า 136 ชนิด (Tudzynski, 2005) และยังพบการผลิตในพืช (Macmillan, 2001) และแบคทีเรียอีกด้วย (Bottini, *et al.*, 2004) โดยทุกชนิดเรียกชื่อเหมือนกัน คือ จิบเบอเรลลินเอ หรือ GA แต่มีหมายเลขห้อยท้ายตามลำดับการค้นพบคือ GA₁, GA₂, GA₃, ..., GA₇₉ จิบเบอเรลลินแต่ละชนิดต่างกันเล็กน้อยที่ตำแหน่งพันธะคู่ และหมู่ไฮดรอกซิล ส่วนคุณสมบัติในการกระตุ้นการเจริญเติบโตของพืชนั้นจะแตกต่างกัน แต่ชนิดที่เป็นประโยชน์ในทางการเกษตรมาก คือ GA₃ ซึ่งมีชื่อสามัญว่า กรดจิบเบอเรลลิน มีสูตรโมเลกุล C₁₉H₂₂O₆ (ภาพที่ 6)



ภาพที่ 6 โครงสร้างโมเลกุลของจิบเบอเรลลิน

ที่มา: Ingels (2009)

การศึกษาการผลิตจิบเบอเรลลินในแบคทีเรียรายงานครั้งแรกโดย Atzorn *et al.* (1988) ซึ่งพบการผลิตจิบเบอเรลลินประเภท GA₁, GA₄, GA₉ และ GA₂₀ ใน *Rhizobium meliloti* ต่อมา มีรายงานการค้นพบการผลิตจิบเบอเรลลินอย่างต่อเนื่อง เช่น พบการผลิต GA₁, GA₃, GA₉, GA₁₉ และ GA₂₀ จาก *Azospirillum lipoferum* (Bottini *et al.*, 1989) และ GA₁ กับ GA₃ จาก *Azospirillum brasilense* (Janzen *et al.*, 1992). นอกจากนี้ยังมีรายงานการผลิตกรดจิบเบอเรลลินใน *Bradyrhizobium japonicum* (Boiero *et al.*, 2007) *Rhizobium phaseoli* (Atzorn *et al.*, 1988) และ *Bacillus* spp. (Probanza *et al.*, 1996)

ผลของจิบเบอเรลลินต่อการเจริญเติบโตของพืชมีดังนี้ (Stowe and Yamaki, 1957)

1) กระตุ้นการขยายตัวของเซลล์ โดยการเพิ่มความยืดหยุ่นของผนังเซลล์ ทำให้เซลล์มีรูปร่างยืดยาวขึ้น กระตุ้นการยืดตัวของข้อและการแผ่ขยายของใบ กระตุ้นการงอกของเมล็ด การเจริญของรากแรกเกิด (radicle root)

2) จิบเบอเรลลินมีผลต่อการพัฒนาการของดอกโดยเฉพาะพัฒนาการของก้านชูเกสรตัวผู้และกลีบดอก กระตุ้นการติดผลในพืชหลายชนิด เช่น ส้ม มะเขือเทศ องุ่น การได้รับจิบเบอเรลลินช่วยให้เกิดการติดผลโดยไม่ต้องผสมเกสรได้ กระตุ้นการเปลี่ยนเพศดอก เช่น ทำให้พืชตระกูลแตงหรือพืชที่แยกดอกตัวผู้และดอกตัวเมีย เกิดดอกตัวผู้มากขึ้นได้

3) การกระตุ้นการงอกของพืช จิบเบอเรลลินช่วยทำลายระยะพักตัวของพืชทั้งการพักตัวของตาและเมล็ด โดยการยับยั้งการออกฤทธิ์ของกรดแอบไซซิกที่ทำให้เกิดระยะพักตัว และการควบคุมให้พืชอยู่ในสภาวะอ่อนวัย

ในการศึกษา *Azotobacter chroococcum* ที่อาศัยอยู่ร่วมกับข้าวโพดแบบสมชีพพบว่า *A. chroococcum* สามารถสังเคราะห์ฮอร์โมนพืชออกซิน จิบเบอเรลลิน และไซโตไคนิน ซึ่งส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช Bottini *et al.* (1989) พบว่าการใช้ *Azospirillum* spp. ร่วมกับการปลูกหญ้าสามารถเพิ่มผลผลิตของหญ้าเพราะการผลิตฮอร์โมนพืชจิบเบอเรลลินจากแบคทีเรีย และในการศึกษาของ Karadeniz *et al.* (2006) พบว่า *Proteus mirabilis*, *P. vulgaris*, *Klebsiella pneumoniae*, *Bacillus megaterium*, *B. cereus*, *Escherichia coli* มีความสามารถในการผลิตฮอร์โมนพืชออกซิน จิบเบอเรลลิน ไซโตไคนิน และกรดแอบไซซิก

การหาตรวจสอบจิบเบอเรลลินสามารถทำได้โดย

- 1) วิธีโครมาโตกราฟี เช่น GC หรือ Gas Chromatograph และ Paper Chromatograph
- 2) วิธี Spectrophotometric method เป็นวิธีที่ใช้วัดปริมาณ GA₃ ที่เชื้อจุลินทรีย์ผลิตขึ้น ด้วยการอัตราการเกิดปฏิกิริยาการเปลี่ยนกรดจิบเบอเรลลิน (GA) ให้เป็นกรดจิบเบอเรลลินิก (GE) โดยการเติม HCl และ

นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 254 nm ทุก 20 วินาที (Holbrook et al, 1961 in Berrios et al, 2004)

3) ใช้วิธี Bioassay โดยการที่จิบเบอเรลลินสามารถทำให้พืชแคระ (ข้าวโพดและถั่ว) เจริญ เป็นต้น ปกติได้หรือโดยการที่จิบเบอเรลลินสามารถป้องกันการเกิดการเสื่อมสลาย (Senescence) หรือโดยหาปริมาณ จิบเบอเรลลินจากการกระตุ้นให้เมล็ดข้าวบาร์เลย์สร้างเอนไซม์แอลฟา-อะมัยเลส (alpha-amylase) ในอาหาร ส้ารอง (สมบุญ,2548)

8. แบคทีเรียเอนโดไฟต์

เอนโดไฟต์ (Endophyte) หมายถึง สิ่งที่มีชีวิตบางจำพวกที่อาศัยอยู่ภายในเนื้อเยื่อพืช หรือ สิ่งมีชีวิต อาศัยอยู่ในเนื้อเยื่อพืช อย่างไรก็ตามคำจำกัดความที่ใช้ในปัจจุบันมักหมายถึงทุกๆ สิ่งมีชีวิตที่ใช้ชีวิตทั้งหมดหรือ บางช่วงอยู่ในเนื้อเยื่อพืช ที่อาจเป็นอันตรายหรือก่ออุปสรรคให้กับพืชอาศัย ปัจจุบันมีสิ่งมีชีวิตหลายชนิดที่เป็น เอนโดไฟต์ไม่ว่าจะเป็น เชื้อราหรือแบคทีเรีย

เอนโดไฟติกแบคทีเรีย (Endophytic bacteria) แบคทีเรียที่อยู่ภายในเนื้อเยื่อพืชโดยไม่ก่อให้เกิดอันตรายให้กับพืชอาศัย คัดแยกได้จากชิ้นส่วนพืช โดยฆ่าเชื้อที่ผิวก่อนแล้วคัดแยกแบคทีเรียออกมาจากเนื้อเยื่อ ภายในพืช ในธรรมชาติมีพืชหลายชนิดที่มีเอนโดไฟติกแบคทีเรียอาศัยอยู่ภายในเนื้อเยื่อพืช (Hallmann et al., 1997 Pleban et al, 1995; Samish et al, 1963 ใน Wulff et al, 2003) เอนโดไฟติกแบคทีเรียถูกใช้ประโยชน์ ในการปรับปรุงการเจริญเติบโตของพืช มีทั้งจำพวกเอนโดไฟติกแบคทีเรียที่ตรึงไนโตรเจนและไม่ตรึงไนโตรเจน ซึ่ง สามารถแยกได้จากพืชชนิดต่าง ๆ (Ladha and Reddy, 2000 ใน Jha and Kumar,2009)

เอนโดไฟติกแบคทีเรียอาศัยอยู่ในพืชเกือบทุกชนิด บางชนิดอยู่แบบแฝงและบางชนิดอาจแสดงกิจกรรม อยู่ในเนื้อเยื่อพืช มีประโยชน์ต่อพืช เช่น กระตุ้นการเจริญเติบโตของพืช ตรึงไนโตรเจน และชักนำให้เกิดความ ต้านทานต่อเชื้อสาเหตุโรคพืช (Elbeltagya et al, 2002)

หนึ่ง (2546) รายงานว่าเอนโดไฟติกแบคทีเรียแบ่งออกเป็น 4 กลุ่ม ดังนี้

- 1) Aerobes เช่น Azotobacter, Beijerinckia, Derxia
- 2) Facultative anaerobes เช่น Clostridium, Pseudomonas, Rhizobium
- 3) Heterotrophs เช่น Klebsiella, Enterobacter
- 4) Phototrophs เช่น Anabaena Azospirillum Nostoc

8.1 บทบาทของแบคทีเรียเอนโดไฟต์ต่อการเจริญเติบโตของพืช

เอนโดไฟติกแบคทีเรียมีบทบาทต่อการเจริญเติบโตของพืชดังต่อไปนี้

- 1) ย่อยสลายสารอินทรีย์ให้มีขนาดของโมเลกุลเล็กกลง
- 2) ตรึงไนโตรเจนจากอากาศให้อยู่ในรูปที่เป็นประโยชน์ต่อพืช
- 3) เปลี่ยนแปลงรูปของธาตุอาหารพืช เช่น เปลี่ยนจากรูปที่เป็นสารอินทรีย์ไปเป็นสารอนินทรีย์เพิ่มความ เป็นประโยชน์ของธาตุอาหารพืช เปลี่ยนฟอสเฟตให้อยู่ในรูปที่เป็นประโยชน์ต่อพืช เป็นต้น
- 4) สร้างสารกระตุ้นการเจริญเติบโตของพืช (plant growth regulators) เช่น ออกซิน จิบเบอเรลลิน และไซโตไคนิน บางชนิดสามารถกระตุ้นการงอกของเมล็ดได้
- 5) กำจัดและยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ชนิดอื่น รวมทั้งจุลินทรีย์ที่เป็นสาเหตุของโรคพืช ทำให้ลดการระบาดของโรคพืชบางชนิดได้
- 6) บางชนิดสามารถผลิตและปลดปล่อยสารปฏิชีวนะ (Antibiotic substance) ซึ่งนำไปสู่การผลิต ในระดับอุตสาหกรรมได้

7) เพิ่มความสามารถในการทนต่อสภาพแห้งแล้งให้กับพืช (ธงชัย,2550;Hung and Annapurna, 2004)

8.2 ผลของการศึกษาแบคทีเรียเอนโดไฟต์ต่อการเจริญเติบโตของพืช

แบคทีเรียตรึงไนโตรเจนเอนโดไฟต์มีประโยชน์มากในระบบการเกษตร เนื่องจากมีความสามารถในการช่วยตรึงไนโตรเจนโดยชีววิธี (Biological Nitrogen Fixation: BNF) และได้มีการศึกษาวิจัยถึงประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจนของแบคทีเรียเอนโดไฟต์ ดังตัวอย่างงานวิจัยที่มีการทดลองปลูกเชื้อ *Herbaspirillum* spp. ในดินที่ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อ พบว่าเพิ่มการตรึงไนโตรเจนในพืชได้ถึง 40% (Dobereiner *et al.*, 1993) Boddey *et al.*, (1995) ได้ทำการศึกษาด้วยวิธี N-15 isotope และ N balance ถึงการใช้ *Acetobacter diazotrophicus* ที่เป็นแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนเอนโดไฟต์ ให้ตรึงไนโตรเจนในแปลงปลูกอ้อยในประเทศบราซิล พบว่าสามารถให้ไนโตรเจนได้ถึง 60% ของความต้องการไนโตรเจนของอ้อยได้ Hurek and Reinhold-Hurek, (2003) ทำการทดลองแบคทีเรีย *Azoarcus* เพื่อช่วยเพิ่มผลผลิตหญ้า Kallar ซึ่งได้ผลผลิต 20-40 ตันต่อเฮกตาร์ต่อปี เพื่อใช้เป็นอาหารสัตว์โดยไม่ต้องให้ปุ๋ยไนโตรเจน และ Pedraza *et al.*, (2009) ได้ศึกษาการเปรียบเทียบใส่แบคทีเรีย *Azospirillum* และการใส่ปุ๋ยไนโตรเจน ต่อผลผลิตของข้าว พบว่าดำรับการทดลองที่ใส่แบคทีเรียร่วมกับการใส่ปุ๋ยไนโตรเจนให้ผลผลิตข้าวสูงกว่าดำรับการทดลองที่ใส่แบคทีเรีย และใส่ปุ๋ยไนโตรเจนเพียงอย่างเดียว แต่ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดในเมล็ดข้าวพบว่าดำรับที่ใส่แบคทีเรียเพียงอย่างเดียวมีปริมาณไนโตรเจนในเมล็ดข้าวสูงกว่าดำรับการทดลองอื่นๆ

นอกจากคุณสมบัติในการตรึงไนโตรเจนแล้ว แบคทีเรียตรึงไนโตรเจนเอนโดไฟต์ยังมีคุณสมบัติที่ช่วยกระตุ้นการเจริญเติบโตของพืชได้ เนื่องจากช่วยให้พืชหลั่งฮอร์โมน (phytohormones) ไปสู่พื้นผิวราก ทำให้เพิ่มการดูดซึมธาตุอาหาร เช่น จากการศึกษาของนักวิจัยที่ใส่เชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟต์ *Herbaspirillum seropediae* Z67 (James, 1997) *Herbaspirillum seropediae* B501 (Zakria *et al.*, 2007) และ *serratia marcescens* IRBG 500 (Gyaneshwar, 2001) โดยใส่ในระยะต้นกล้าของข้าวพบว่าการเพิ่มขึ้นของน้ำหนักข้าวเมื่อเปรียบเทียบกับดำรับการทดลองควบคุม Siegel *et al.* (1987) ได้ทำการทดลองในโรงเรือนโดยได้ใส่เชื้อร่วมกับ *Rhizobium legume hosarum* bv *phaseoli* พบว่าสามารถเพิ่มมวลชีวภาพ และผลผลิตข้าวอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และ Feng *et al.* (2006) ได้ทำการศึกษาเชื้อ *Pantoea agglomerans* YS 19 ที่มีความสามารถในการตรึงไนโตรเจนได้ โดยได้ทำการเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่มีไนโตรเจน สามารถจำแนกฮอร์โมนพืช(phytohormones) ได้ 4 ชนิด คือ Indole-3-acetic acid abscisic acid gibberellic acid และ cytokinin ซึ่งฮอร์โมนนี้จะสามารถช่วยเพิ่มมวลชีวภาพของข้าวในระยะต้นกล้าได้

วิธีวิจัย

1. การเก็บตัวอย่างรากอ้อย

สำหรับการศึกษาในครั้งนี้ทำการเก็บตัวอย่างรากอ้อยจาก 2 พื้นที่ คือ พื้นที่ปลูกอ้อยจังหวัดสุพรรณบุรี และพื้นที่ปลูกอ้อยจังหวัดลพบุรี โดยสุ่มเก็บตัวอย่างอ้อยที่มีอายุการปลูก 2-4 เดือนสายพันธุ์ต่างๆ จาก 2 ชุมชน ได้แก่ อ้อยสายพันธุ์ LK 92-11 จากชุมชนตาคลี และอ้อยสายพันธุ์ LK 92-11 อู่ทอง 9 และ สุพรรณบุรี 80 จากชุมชนกำแพงแสน โดยมีรายละเอียดดังแสดงตารางที่ 2 ทำการเก็บตัวอย่างรากโดยการถอนต้นอ้อย และนำรากที่ถอนได้เก็บใส่ถุงพลาสติก เพื่อนำไปคัดแยกแบคทีเรียในห้องปฏิบัติการต่อไป

ตารางที่ 2 ข้อมูลการเก็บตัวอย่างรากอ้อยพันธุ์ต่าง ๆ ในแต่ละชุมชน

ชุมชน	พิกัด GPS	พันธุ์อ้อย	ระยะเวลาในการปลูก	สถานที่
ตาคลี (Tk)	47P 0685714 UTM 1637390	LK 92-11	3 เดือน	บ้านท่าเตือใหญ่ อ.เมือง จ. ลพบุรี
กำแพงแสน (Ks)	47P 0578582 UTM 1637906	LK 92-11	2 เดือน	อ. หนองหญ้าไทร จ. สุพรรณบุรี
	47 P 0578580 UTM 1637938	อู่ทอง 9	3 เดือน	อ. หนองหญ้าไทร จ. สุพรรณบุรี
	47P 0578580 UTM 1637939	สุพรรณ 80	4 เดือน	อ. หนองหญ้าไทร จ. สุพรรณบุรี

2. อาหาร และสารละลายที่ใช้ในการแยกแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนเอนโดไฟต์

อาหารที่นำมาใช้เลี้ยงแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนเอนโดไฟต์ คือ

2.1 อาหาร Nitrogen - free solid malad-glucose medium (NFMM) ดัดแปลงมาจาก Guang Hu Xie และคณะ (2003) มีส่วนประกอบดังนี้

Glucose	10	กรัม
L-malic acid	5.0	กรัม
MgSO ₄ ·H ₂ O	0.2	กรัม
FeCl ₃	0.01	กรัม
NaCl	0.1	กรัม
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0.02	กรัม
K ₂ HPO ₄	0.1	กรัม
KH ₂ PO ₄	0.4	กรัม
Na ₂ MoO ₄ ·H ₂ O	0.002	กรัม
0.5% Bromothymolblue	5	มิลลิลิตร

Agar 17 กรัม สำหรับอาหารแข็ง (solid medium) และ 1.75 กรัม สำหรับอาหารกึ่งแข็งกึ่งเหลว เติมน้ำกลั่นเพื่อปรับปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร ปรับ pH 6.8 ด้วย 1 N NaOH แล้วนำไปฆ่าเชื้อ โดยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ ที่อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 20 นาที

2.2 อาหาร Tryptone Yeast Extract (TY) มีส่วนประกอบดังนี้

Tryptone	8	กรัม
Yeast Extract	5.0	กรัม
Nacl	2.5	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

เติมน้ำกลั่นเพื่อปรับปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร แล้วนำไปฆ่าเชื้อ โดยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ ที่อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 20 นาที

2.3 อาหาร a modified Rennie (RMR) medium โดยการนำสารละลาย A และ B มาผสมให้เข้ากัน และเติม biotin ปริมาตร 50 µl/1000 ml ซึ่งสารละลาย A และ B มีส่วนประกอบดังนี้

สารละลาย A (pH 7.0)

K ₂ HPO ₄	0.8	กรัม
KH ₂ PO ₄	0.2	กรัม
NaCl	0.1	กรัม
Na ₂ FeEDTA	28	มิลลิกรัม
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	25	มิลลิกรัม
Yeast Extract	100	มิลลิกรัม
Mannitol	3.0	กรัม
Sucrose	5.0	กรัม
60% (Vol/Vol) Sodium lactate	0.5	มิลลิลิตร
Sodium malate	2.0	กรัม
Agar	15	กรัม

เติมน้ำกลั่นเพื่อปรับปริมาตรเป็น 900 มิลลิลิตร แล้วนำไปฆ่าเชื้อโดยหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 20 นาที

สารละลาย B

MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.2	กรัม
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0.06	กรัม
distilled water	100	มิลลิลิตร

นำไปฆ่าเชื้อ โดยหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 20 นาที

2.4 การเตรียม Phosphate buffer saline (PBS)

NaCl	8.0	กรัม
KCl	0.2	กรัม
Na ₂ HPO ₄	1.6	กรัม
KH ₂ PO ₄	0.2	กรัม

จากนั้นละลายในน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร ปรับ pH ให้เท่ากับ 7.2 แล้วนำไปฆ่าเชื้อ โดยหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121°C 20 นาที

3. การแยกแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนเอนโคไฟต์ และทำให้บริสุทธิ์

นำตัวอย่างรากอ้อยมาฆ่าเชื้อบริเวณผิวรากด้วย 70 % alcohol และล้างด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว นำรากอ้อยไปแช่ใน clorox เป็นเวลา 15 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่น และ phosphate buffer saline ตามลำดับ หลังจากฆ่าเชื้อบริเวณผิวรากอ้อยแล้วนำรากอ้อยน้ำหนัก 1 กรัม มาบดในโกร่งที่ผ่านการฆ่าเชื้อที่มีการเติม phosphate buffer saline (PBS) ปริมาณ 9 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปแยกแบคทีเรียโดยใช้อาหาร NFMM เป็น selective medium นำตัวอย่างรากอ้อยที่บดแล้วมาเจือจางที่ความเข้มข้น 10^{-1} - 10^{-4} ด้วย PBS และ spread plate บนอาหารแข็ง NFMM นำไปบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน สังเกตลักษณะของโคโลนี และนับจำนวนแบคทีเรียที่เจริญบนอาหาร NFMM จากนั้นนำไป re-streak บนอาหารแข็ง NFMM จนกระทั่งได้โคโลนีเดี่ยว นำโคโลนีเดี่ยวที่ได้ไปเลี้ยงในอาหารเหลว NFMM เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นจึงนำแบคทีเรียที่เจริญในอาหารเหลวมาไว้ใน 25% glycerol ที่อุณหภูมิ -21 องศาเซลเซียสเพื่อรอการศึกษาในลำดับต่อไป

เมื่อนำแบคทีเรียที่เก็บรักษาไว้ใน 25% glycerol ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส มาเลี้ยงบนอาหารที่ใช้ในการแยก คือ NFMM ปรากฏว่าแบคทีเรียเจริญได้ไม่ดีจึงได้เปลี่ยนอาหารที่ใช้เลี้ยงแบคทีเรียเป็น TY และนำแบคทีเรียที่สามารถเจริญได้ในอาหาร TY ไปทำการศึกษาต่อไป

4. การทดสอบความสามารถในการตรึงไนโตรเจนของแบคทีเรียที่แยกได้ด้วยอาหาร RMR

การศึกษาประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจนของแบคทีเรีย โดยการนำแบคทีเรียมา re-streak บนอาหารแข็ง RMR แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน จากนั้นนำแบคทีเรียที่เจริญบนอาหารแข็ง RMR จำนวนหนึ่งโคโลนีมาเลี้ยงในอาหารเหลว RMR แล้วสังเกตการเจริญ และคัดเลือกแบคทีเรียที่สามารถเจริญในอาหารเหลว RMR ได้นำไปทดสอบประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจนในขั้นต่อไป

5. การวัดประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจน

การศึกษาประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจนโดยวิธี acetylene reduction activity assay (Burriss, 1975) โดยนำแบคทีเรียตัวแทนทำการแยกโคโลนีเดี่ยวในอาหารเลี้ยงเชื้อและย้ายลงหลอดทดลองโดยใช้อาหารเหลว RMR ปริมาตร 50 มิลลิลิตร เขย่าที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 วัน เปลี่ยนจุกสำลีที่ปิดไว้ในชั้นแรกเป็นจุกยางปิดหลอดให้แน่น ดูดอากาศออก 10% และใช้เข็มฉีดยาฉีด acetylene เข้าไป 10 % โดยปริมาตร

บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง วัดปริมาณ ethylene โดยเครื่อง gas chromatography รุ่น HP5890 series II มีเครื่องตรวจจับ (Detector) เป็นแบบ Flame ionization คอลัมน์(column) ที่ใช้เป็น HP Porapak N ขนาดช่อง (80/100 เมซ) ความยาว 1.8 เมตร เส้นผ่านศูนย์กลางขนาด 2 มิลลิเมตร (1.8 m x 2 mm.) โดยกำหนดให้อุณหภูมิของ injection detector 110°C อุณหภูมิของcolumn 80°C โดยมีแก๊สไนโตรเจนเป็นแก๊สตัวพา มีอัตราการไหล 30 มิลลิเมตรต่อนาที ใช้ปริมาตรของการฉีดตัวอย่าง (Inject volume) ครั้งละ 1 มิลลิตร คำนวณหาปริมาณ acetylene reduction activity (ARA) จากสมการดังนี้

$$\text{ARA } (\mu\text{mol C}_2\text{H}_4 \cdot \text{H}^{-1} \cdot \text{culture}^{-1}) = \frac{1000}{V_{st}} \times \frac{A_{sa} \times V_{tu}}{A_{st} \times H \times 22.4}$$

V_{st} = ปริมาตรของ standard gas (ml)

V_{tu} = ปริมาตรของหลอดที่ใช้ (ml)

A_{sa} = พื้นที่ใต้กราฟของ C_2H_4 ที่เกิดขึ้น (cm^2)

A_{st} = พื้นที่ใต้กราฟของ standard gas (cm^2)

H = เวลาในการบ่มเชื้อ

6. ความสามารถของการผลิตสารส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชของแบคทีเรียที่แยกได้

6.1 การทดสอบความสามารถในการผลิตฮอร์โมนพืชออกซิน

นำแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนเอนโดไฟต์มา streak บนอาหารแข็ง TY แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นใช้หลอดเขี่ยเชื้อที่ปลอดเชื้อแต่ละโคโลนีเดี่ยวของแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนเอนโดไฟต์ 1 โคโลนี นำมาเลี้ยงเพื่อเป็นเซลล์เริ่มต้นในอาหารเหลว TY ปริมาตร 5 มิลลิตร บ่มเชื้อในเครื่องเขย่าความเร็ว 180 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 x g ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เทสารละลายส่วนใสทิ้งแล้วล้างตะกอนเซลล์ด้วย 0.85% NaCl จำนวน 3 ครั้ง ปรับค่าความขุ่นของเซลล์แบคทีเรียตรึงไนโตรเจนเอนโดไฟต์ด้วยเครื่อง spectrophotometer รุ่น T60 ให้มีค่า O.D. ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร เท่ากับ 1.0 โดยใช้ 0.85%NaCl ในการเจือจาง นำเซลล์เริ่มต้นปริมาตร 0.25 มิลลิตรถ่ายอาหารเหลว TY ปริมาตร 5 มิลลิตร หลอดใหม่ นำไปเขย่าด้วยความเร็ว 180 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส จากนั้นเมื่อครบ 48 ชั่วโมง เติมหริบิโตเฟน (ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 5 มิลลิโมล) (Brick, *et al.*, 1991) เพื่อเป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์ออกซิน บ่มเชื้อต่อเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 x g เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นำสารละลายส่วนใสมาทดสอบการผลิตออกซินด้วยการเติม Salkowsky' reagent ในอัตราส่วนของสารละลายส่วนใสต่อ Salkowsky' reagent เท่ากับ 1:1.5 มิลลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง (30 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 30 นาที แล้วสังเกตการเปลี่ยนจากสีเหลืองของอาหารเลี้ยงแบคทีเรียกลายเป็นสีแดง และวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายด้วยเครื่อง spectrophotometer รุ่น T60 ที่ความยาวคลื่น 530 นาโนเมตร นำค่าที่ได้ไปเปรียบเทียบกับกราฟความเข้มข้นมาตรฐาน (calibration curve) (Gordon and Weber, 1951; Glickmann and Dessaux, 1995)

6.2 การทดสอบความสามารถในการผลิตฮอร์โมนพืชจิบเบอเรลลิน

นำแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนเอนโดไฟต์จาก stock culture มา streak บนอาหารแข็ง TY แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นใช้ลวดเขี่ยเชื้อที่ปลอดเชื้อและโคโลนีเดียวของแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนเอนโดไฟต์ 1 โคโลนี นำมาเลี้ยงเพื่อเป็นเซลล์เริ่มต้นในอาหารเหลว TY ปริมาตร 5 มิลลิลิตร บ่มเชื้อในเครื่องเขย่าความเร็ว 180 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว $8,000 \times g$ ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เทสารละลายส่วนใสทิ้งแล้วล้างตะกอนเซลล์ด้วย 0.85% NaCl จำนวน 3 ครั้ง ปรับค่าความขุ่นของเซลล์แบคทีเรียตรึงไนโตรเจนเอนโดไฟต์ด้วยเครื่อง spectrophotometer รุ่น T60 ให้มีค่า O.D. ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร เท่ากับ 1.0 โดยใช้ 0.85% NaCl ในการเจือจาง นำเซลล์เริ่มต้นปริมาตร 0.25 มิลลิลิตร มาใส่อาหารเหลว TY ปริมาตร 5 มิลลิลิตร หลอดใหม่ นำไปเขย่าด้วยความเร็ว 180 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส จากนั้นเมื่อครบ 48 ชั่วโมง เติมหิริบิโตเฟนความเข้มข้น 200 มิลลิโมลาร์ เพื่อเป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์จิบเบอเรลลิน บ่มเชื้อต่อเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว $8,000 \times g$ เป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นำสารละลายส่วนใสมาทดสอบการผลิตปริมาณการผลิตจิบเบอเรลลินด้วยวิธีการของ Paleg (1965) นำสารละลายส่วนใส 2.5 มิลลิลิตร เติมลงในหลอดทดลองที่มี 0.5 M zing acetate 0.2 มิลลิลิตร บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที แล้วนำมาเติม 0.5 M potassium ferrocyanide 0.2 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว $10,000 \times g$ เป็นเวลา 10 นาที นำสารละลายส่วนใสมาเติม 5% HCl ในอัตราส่วน 1:1 นำไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 75 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายด้วยเครื่อง spectrophotometer รุ่น T60 ที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร โดยใช้ 5% HCl เป็น blank ในการวัดปริมาณการผลิตจิบเบอเรลลิน นำค่าที่ได้ไปเปรียบเทียบกับกราฟความเข้มข้นมาตรฐาน (calibration curve) (Glick et al. 1995; Vikram et al., 2007)

6.3 การทดสอบความสามารถในการละลายฟอสเฟต

การศึกษาความสามารถในการละลายฟอสเฟตโดยนำแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนเอนโดไฟต์จาก stock culture มา streak บนอาหารแข็ง TY แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นใช้ลวดเขี่ยเชื้อที่ปลอดเชื้อและโคโลนีเดียวของแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนเอนโดไฟต์ 1 โคโลนี streak บนอาหารแข็ง National Botanical Research Institute's Phosphate growth medium (NBRIP) (Nautiyal, 1999) แล้วบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นสังเกตการเปลี่ยนของอาหารรอบโคโลนี (วงใสรอบโคโลนี) ที่เกิดขึ้นเนื่องจากการละลายแคลเซียมฟอสเฟตของแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนเอนโดไฟต์

จากนั้นนำแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนเอนโดไฟต์ที่มีความสามารถในการละลายฟอสเฟตที่ได้จากการทดสอบข้างต้นมาวัดปริมาณการละลายฟอสเฟตด้วยวิธี Vanadomolybdophosphoric acid (Kumar et al., 2009; Ribeiro and Cardoso, 2012) โดยนำแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนเอนโดไฟต์มา streak บนอาหารแข็ง NBRIP ที่ใช้ K_2HPO_4 เป็นแหล่งของฟอสเฟตแทน $Ca_3(PO_4)_2$ แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นใช้ลวดเขี่ยเชื้อที่ปลอดเชื้อและโคโลนีของแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนเอนโดไฟต์มา 1 โคโลนี นำมาเลี้ยงเพื่อเป็นเซลล์เริ่มต้นในอาหารเหลว NBRIP (ใช้ K_2HPO_4 เป็นแหล่งของฟอสเฟตแทน $Ca_3(PO_4)_2$) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร บ่มเชื้อในเครื่องเขย่าความเร็ว 180 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว $8,000 \times g$ ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เทสารละลายส่วนใสทิ้งแล้วล้างตะกอนเซลล์จำนวน 3 ครั้ง ด้วย 0.85% NaCl ปรับค่าความขุ่นของเซลล์แบคทีเรียตรึงไนโตรเจนเอนโดไฟต์ด้วยเครื่อง spectrophotometer รุ่น T60 ให้มีค่า O.D. ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร เท่ากับ 1.0 โดยใช้ 0.85% NaCl ในการเจือจาง แล้วนำเซลล์เริ่มต้นมา 0.25 มิลลิลิตรใส่อาหารเหลว NBRIP ปริมาตร 5 มิลลิลิตร หลอดใหม่ นำไปเขย่าด้วยความเร็ว 180 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศา

เซลเซียส จากนั้นเมื่อครบ 48 ชั่วโมง นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 x g ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที นำสารละลายส่วนใสมาทดสอบการละลายแคลเซียมฟอสเฟตด้วยการเติม 1N HCl ในอัตราส่วน 1:1 แล้วนำไปเติม vanadate-molybdate reagent ในอัตราส่วน 3.5:1 ปริมาตรเป็น 5 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง (30 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 10 นาที (Mehta and Nautiyal, 2001) สังเกตการเปลี่ยนสีที่เกิดขึ้น และวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายด้วยเครื่อง spectrophotometer รุ่น T60 ที่ความยาวคลื่น 470 นาโนเมตร นำค่าที่ได้ไปเปรียบเทียบกับกราฟความเข้มข้นมาตรฐาน (calibration curve)

ผลและวิจารณ์

1. การแยกแบคทีเรียจากรากอ้อยและการทำให้บริสุทธิ์

การแยกแบคทีเรียจากรากอ้อยที่ปลูกในชุดดินตาคลีและกำแพงแสน โดยใช้อาหาร NFMM สามารถแยกแบคทีเรียได้จำนวน 120 ไอโซเลต หลังจากนั้นเก็บรักษาไว้ใน 25% glycerol ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส แต่อย่างไรก็ตามเมื่อนำแบคทีเรียเอนโดไฟต์ในจำนวนนี้มาเลี้ยงในอาหาร NFMM อีกครั้งปรากฏว่าแบคทีเรียเจริญได้ไม่ดีเท่าที่ควร จึงได้เปลี่ยนอาหารที่ใช้เลี้ยงเป็น TY ซึ่งสามารถแยกแบคทีเรียได้จำนวน 80 ไอโซเลต (ตารางที่ 3) โดยชุดดินตาคลีสามารถแยกแบคทีเรียจากรากอ้อยพันธุ์ LK 92-11 ได้ จำนวน 25 ไอโซเลต ชุดดินกำแพงแสนแยกแบคทีเรียจากรากอ้อยพันธุ์ LK 92-11 จำนวน 40 ไอโซเลต อุ๋ทอง 9 จำนวน 1 ไอโซเลต และ สุพรรณบุรี 80 ได้จำนวน 14 ไอโซเลต จะเห็นได้ว่าสามารถแยกแบคทีเรียเอนโดไฟต์จากรากอ้อยพันธุ์ LK 92-11 ได้มากกว่าพันธุ์อื่นๆ จำนวน 65 ไอโซเลต และในชุดดินกำแพงแสนสามารถแยกแบคทีเรียเอนโดไฟต์จากรากอ้อยพันธุ์ LK 92-11 ได้มากกว่าชุดดินตาคลี

ตารางที่ 3 จำนวนแบคทีเรียที่แยกได้จากรากอ้อยสายพันธุ์ต่างๆ ในแต่ละชุดดิน

ชุดดิน	พันธุ์อ้อย	จำนวนแบคทีเรีย
ตาคลี (Tk)	LK 92-11	25
กำแพงแสน (Ks)	LK 92-11	40
	อุ๋ทอง 9	1
	สุพรรณบุรี 80	14
รวม		80

2. การทดสอบความสามารถในการตรึงไนโตรเจนของแบคทีเรียที่แยกได้

การทดสอบความสามารถในการเจริญบนอาหาร RMR ของแบคทีเรียที่แยกได้จากรากอ้อยที่ปลูกในชุดดินตาคลีและกำแพงแสน พบแบคทีเรียเอนโดไฟต์ที่แยกได้จำนวน 25 ไอโซเลต ซึ่งแยกได้จากรากอ้อยพันธุ์ LK 92-11 ในชุดดินตาคลีจำนวน 12 ไอโซเลต รองลงมาได้แก่ แบคทีเรียจากรากอ้อยพันธุ์ LK 92-11 จำนวน 11 ไอโซเลต ชุดดินกำแพงแสน และจากอ้อยสุพรรณบุรี 80 จำนวน 1 ไอโซเลต และจากอ้อยพันธุ์อุ๋ทอง 9 จำนวน 1 ไอโซเลต ตามลำดับ จำนวนแบคทีเรียที่เจริญในอาหาร RMR ของรากอ้อยพันธุ์ต่างๆ ในแต่ละชุดดินแสดงในตารางที่ 4

ตารางที่ 4 จำนวนแบคทีเรียที่สามารถเจริญได้บนอาหาร RMR ที่พบในรากอ้อยสายพันธุ์ต่างกันโดยปลูกในชุดดินตาคลี และชุดดินกำแพงแสน

ลำดับ	ชุดดิน	สายพันธุ์อ้อย	จำนวนไอโซเลต รวม
1	ตาคลี	LK 92-11	12
2	กำแพงแสน	LK 92-11	11
3	กำแพงแสน	สุพรรณบุรี 80	1
4	กำแพงแสน	พันธุ์อุ๋ทอง 9	1
รวม			25

3. การวัดประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจน

การทดสอบความสามารถในการตรึงไนโตรเจนของแบคทีเรียที่แยกได้จากรากอ้อยที่ปลูกในชุดดินตาคลี และกำแพงแสน โดยใช้อาหาร RMR พบแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนเอนโดไฟต์ได้จำนวน 25 ไอโซเลต โดยนำมาเลี้ยงขยายหัวเชื้อในอาหารเหลว RMR เพื่อศึกษาประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจนโดยการวัดอัตราการตรึงไนโตรเจนของเอ็นไซม์ไนโตรจีเนส โดยวิธี Acetylene Reduction Assay (ARA) ของแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนในรากอ้อยสายพันธุ์ต่าง ๆ ในทั้งสองชุดดินแสดงในตารางที่ 5 พบว่าแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนในรากอ้อยพันธุ์ LK 92-11 ในชุดดินตาคลี มีประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจนสูงที่สุดประมาณ 75.10 นาโนโมลเอทิลีนต่อชั่วโมงต่อตัวอย่าง

4. ความสามารถในการผลิตสารส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชของแบคทีเรียที่แยกได้

4.1 การทดสอบความสามารถในการผลิตฮอร์โมนพืชออกซิน

การทดสอบความสามารถในการผลิตฮอร์โมนพืชออกซินของแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนเอนโดไฟต์ โดยการทดสอบด้วย Salkowsky' reagent พบว่าสีเหลืองของสารละลายเปลี่ยนเป็นสีแดงหรือสีชมพู แสดงว่าแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนเอนโดไฟต์ ที่นำมาทดสอบส่วนใหญ่มีความสามารถในการผลิตฮอร์โมนพืชออกซิน จากการศึกษาแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนเอนโดไฟต์มีความสามารถในการผลิตฮอร์โมนพืชออกซินพบว่าแบคทีเรียเอนโดไฟต์ทุกไอโซเลต (80 ไอโซเลต) สามารถผลิตฮอร์โมนพืชออกซินได้ โดยพบปริมาณการผลิตอยู่ในช่วงระหว่าง 2.26 -16.30 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ตารางที่ 5) โดยพบว่าปริมาณการผลิตฮอร์โมนพืชออกซิน สูงสุดในแบคทีเรีย LK-KS 022 คือ 16.30 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งแยกได้จากอ้อยสายพันธุ์ LK 92-11 รองลงมาคือ 15.98 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากแบคทีเรีย AU-KS001 ซึ่งแยกได้จากอ้อยสายพันธุ์อุทอง 9 และ 14.40 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากแบคทีเรีย LK-KS034 ซึ่งแยกได้จากอ้อยสายพันธุ์ LK 92-11 ที่ปลูกอยู่ในชุดดินกำแพงแสน ปริมาณการผลิตฮอร์โมนพืชออกซินมีความแตกต่างกันออกไปในแต่ละไอโซเลตและความสามารถในการผลิตฮอร์โมนพืชออกซินของแต่ละไอโซเลตไม่ขึ้นกับพันธุ์อ้อยที่แยกแบคทีเรียได้ จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่ามีจุลินทรีย์หลายชนิดที่แยกได้จากดินบริเวณไรโซสเฟียร์มีความสามารถผลิตฮอร์โมนพืชออกซินได้โดยจากการศึกษาของ Ahmad *et al.* (2008) พบการผลิตฮอร์โมนพืชออกซินอยู่ในระดับ 2.13-3.6 ไมโครลิตรต่อมิลลิลิตร จาก *Azotobacter* และ *Pseudomonas* และ Gravel *et al.*, (2007) พบการผลิตอยู่ในระดับ 3.3-6.2 ไมโครลิตรต่อมิลลิลิตร ใน *P. putida* และ *Trichoderma atroviride* นอกจากนี้ Marques *et al.* (2010) รายงานการผลิตในระดับ 2.9-17 ไมโครลิตรต่อมิลลิลิตร ใน *Chryseobacterium* sp. *Bacillus* sp. *Achromobacter* sp. และ *Ralstonia eutropha* (Husen 2003; Yasmin *et al.*, 2007; Vasconcellos *et al.*, 2010; Ribeiro and Cardoso, 2012)

ฮอร์โมนพืชออกซินที่ผลิตขึ้นโดยแบคทีเรียส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชมีผลต่อระบบรากของพืชในการเพิ่มขนาดและปริมาณของรากฝอย การเพิ่มการแตกราก ซึ่งเป็นเพิ่มพื้นที่ผิวสัมผัสรากกับดินในการดูดใช้ธาตุอาหารพืชและน้ำทำให้พืชรับธาตุอาหารและน้ำเพิ่มขึ้น แต่อย่างไรก็ตามผลของฮอร์โมนพืชออกซินต่อพืชนั้นขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของออกซิน ชนิด และสายพันธุ์ของพืช นอกจากนี้ฮอร์โมนพืชออกซินอาจจะยับยั้งการเจริญเติบโตของพืชได้ (Solano *et al.*, 2008) เพราะเมื่อความเข้มข้นของฮอร์โมนพืชออกซินมีปริมาณน้อยจะช่วยให้ส่งเสริมการเจริญของพืชแต่เมื่อมีความเข้มข้นของฮอร์โมนพืชออกซินในปริมาณมากจะยับยั้งการเจริญเติบโตของพืช (Xie *et al.*, 1996) ในการศึกษาพบปริมาณการผลิตฮอร์โมนพืชของแบคทีเรียในปริมาณปานกลางถึงสูงจึงเหมาะสมที่จะนำแบคทีเรียเหล่านี้ไปใช้ในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช

4.2 การทดสอบความสามารถในการผลิตฮอร์โมนพืชจิบเบอเรลลิน

จากการศึกษาความสามารถในการผลิตฮอร์โมนพืชจิบเบอเรลลินของแบคทีเรีย พบว่าแบคทีเรียทุกไอโซเลตมีความสามารถในการผลิตฮอร์โมนพืชจิบเบอเรลลิน โดยปริมาณการผลิตมากน้อยแตกต่างกันไปในแต่ละสายพันธุ์และชุดดินดังแสดงในตารางที่ 5 ซึ่งปริมาณการผลิตจิบเบอเรลลินในช่วง 197.08-455.69 ไมโครกรัม

ต่อมิลลิลิตร และพบว่าปริมาณการผลิตฮอร์โมนพืชจิบเบอเรลลินสูงสุดในแบคทีเรีย LK-KS 010 คือ 455.69 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งแยกได้จากอ้อยสายพันธุ์ LK 92-11 ที่ปลูกอยู่ในชุดดินกำแพงแสน และปริมาณการผลิตฮอร์โมนพืชจิบเบอเรลลินต่ำสุดในแบคทีเรีย LK-KS 021 คือ 197.08 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งแยกได้จากอ้อยสายพันธุ์ LK 92-11 ที่ปลูกอยู่ในชุดดินกำแพงแสนเช่นเดียวกัน จากการศึกษาพบแบคทีเรียที่แยกได้จากดินบริเวณไรโซสเฟียร์มีความสามารถในการผลิตฮอร์โมนพืชจิบเบอเรลลินจึงมีศักยภาพที่จะนำไปใช้ในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช เนื่องจากฮอร์โมนพืชจิบเบอเรลลินเป็นฮอร์โมนที่ได้มีการศึกษา และสกัดกรดจิบเบอเรลลินมาใช้ในทางการเกษตรมาเป็นเวลานาน และสารสกัดกรดจิบเบอเรลลินที่จำหน่ายกันในทางการค้าส่วนใหญ่มีราคาแพง จึงมีนักวิทยาศาสตร์หันมาสนใจในการที่ศึกษาแบคทีเรียดินที่มีความสามารถในการผลิตฮอร์โมนพืชจิบเบอเรลลินเพื่อนำมาใช้ในทางการเกษตร แต่การศึกษาส่วนใหญ่ยังเป็นการศึกษาการผลิตฮอร์โมนจิบเบอเรลลินในเชื้อรา เช่น ในการศึกษาของ Muhammad *et al.* (2009) พบ *Scolecobasidium tshawytschae* มีความสามารถในการผลิตฮอร์โมนพืชออกซิน 17.84 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร มีเพียงส่วนน้อยเท่านั้นที่ศึกษาความสามารถในการผลิตฮอร์โมนพืชจิบเบอเรลลินในแบคทีเรีย และนำแบคทีเรียผลิตฮอร์โมนพืชจิบเบอเรลลินมาใช้ในทางการเกษตร เช่น Karako and Aksoz (2005) รายงานว่าพบแบคทีเรีย *Pseudomonas* sp. มีความสามารถในการผลิตฮอร์โมนพืชจิบเบอเรลลิน 285.06 มิลลิกรัมต่อลิตร Cassana *et al.* (2009) พบ *Azospirillum brasilense* Az39 และ *Bradyrhizobium japonicum* E109 มีความสามารถในการผลิตฮอร์โมนพืชจิบเบอเรลลิน 0.95 และ 0.39 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ เมื่อนำแบคทีเรียทั้งสองชนิดไปทดสอบความสามารถในการส่งเสริมการงอกและการเจริญของต้นอ่อนข้าวโพด และถั่วเหลือง พบว่าการใช้แบคทีเรียทั้งสองชนิดร่วมกันหรือการใช้แบคทีเรียเพียงชนิดเดียวในการคลุกเมล็ดก่อนปลูกมีผลทำให้เปอร์เซ็นต์ของการงอกและการเจริญของต้นอ่อนเพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับตำรับการทดลองควบคุม เนื่องจากการผลิตฮอร์โมนจิบเบอเรลลินของแบคทีเรียดังกล่าว

4.3 การทดสอบความสามารถในการละลายฟอสเฟต

เมื่อนำแบคทีเรียมาเลี้ยงบนอาหาร NBIRP เพื่อทดสอบความสามารถในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชโดยการผลิตสารออกมาเพื่อละลายฟอสเฟต พบแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนเอนโดไฟต์ 16 ไอโซเลตมีความสามารถในการละลายฟอสเฟตโดยเกิดเคลียร์โซรอบๆ โคลนินบนอาหาร NBIRP และการเกิดวงใสรอบโคลนินมีขนาดแตกต่างกันไปในแต่ละไอโซเลตบ่งชี้ว่าแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนเอนโดไฟต์แต่ละไอโซเลตมีประสิทธิภาพในการละลายแคลเซียมฟอสเฟตได้แตกต่างกัน จึงได้มีการทดลองในขั้นต่อไปเพื่อศึกษาปริมาณการละลายแคลเซียมฟอสเฟตของแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนเอนโดไฟต์แต่ละไอโซเลตตามวิธีการของ Mehta and Nautiyal (2001) พบปริมาณการละลายแคลเซียมฟอสเฟตมีความสัมพันธ์กับวงใสรอบโคลนินพบปริมาณการละลายแคลเซียมฟอสเฟตของแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนเอนโดไฟต์อยู่ในช่วงระหว่าง 86.22 – 180.86 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ดังตารางที่ 4 โดยแบคทีเรีย AU-KS 001 มีความสามารถในการละลายฟอสเฟตสูงสุดที่ความเข้มข้น 180.86 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งแยกได้จากอ้อยสายพันธุ์อู่ทอง ที่ปลูกในชุดดินกำแพงแสน ในการศึกษาก่อนหน้านี้ของ สุภาพร 2553 ที่สามารถแยกแบคทีเรีย *Burkholderia multivorans* Rs01 จากดินนากรดกำแพงแสน ซึ่งเป็นชุดดินรังสิต เมื่อทดสอบปริมาณการละลายแคลเซียมฟอสเฟตด้วยวิธี molybdenum blue method พบแบคทีเรียสามารถละลายแคลเซียมฟอสเฟตได้สูงสุด 287.5 มิลลิกรัมต่อลิตร Ribeiro and Cardoso (2012) แยกแบคทีเรียละลายฟอสเฟตจากดินบริเวณไรโซสเฟียร์ของ *Araucaria angustifolia* พบแบคทีเรีย *Enterobacter aerogenes* มีความสามารถในการละลายแคลเซียมฟอสเฟต 450 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อวัดปริมาณการละลายแคลเซียมฟอสเฟตด้วยวิธี vanadomolybdophosphoric acid

ถึงแม้ว่าแบคทีเรียละลายฟอสเฟตจะพบได้ทั่วไปในดินบริเวณไรโซสเฟียร์ แต่ก็ยังมีจำนวนประชากรไม่สูงนักเมื่อเปรียบเทียบกับแบคทีเรียอื่นๆ ไปในดิน (Skrary and Cameron, 1998; Azeem *et al.*, 2007) ดังในการศึกษาก่อนหน้านี้ Hameeda *et al.* (2008) แยกแบคทีเรียละลายฟอสเฟตเพื่อนำไปใช้ในการส่งเสริมการ

เจริญเติบโตของอ้อย พบแบคทีเรียละลายฟอสเฟต 5 ไอโซเลต เท่านั้น จากแบคทีเรียที่แยกได้ทั้งหมด 207 ไอโซเลต Ribeiro and Cardoso (2012) แยกแบคทีเรียละลายฟอสเฟตได้จำนวน 27 ไอโซเลต จากแบคทีเรียที่แยกได้จากดินบริเวณไรโซเฟียร์ของ *Araucaria angustifolia* ทั้งหมด 97 ไอโซเลต เนื่องจากดินที่นำมาทำการศึกษานี้มี pH ของดินค่อนข้างสูงจึงทำให้มีโอกาสที่จะพบแบคทีเรียละลายฟอสเฟตได้ นอกจากนี้ยังพบว่าความสามารถในการละลายฟอสเฟตและความสามารถในการผลิตซิเดอโรฟอรัสของแบคทีเรียมีความสัมพันธ์กันโดยความสามารถในการผลิตซิเดอโรฟอรัสสามารถพบได้ในแบคทีเรียที่มีความสามารถในการละลายฟอสเฟตในปริมาณสูง สอดคล้องกับความจริงที่ว่าแบคทีเรียผลิตซิเดอโรฟอรัสจะมีกลไกในการผลิตซิเดอโรฟอรัสและการผลิตกรดอินทรีย์ที่ใช้ในการละลายฟอสเฟตอยู่ด้วย (Vassilev *et al.*, 2006) และใช้กลไกนี้ในการตอบสนองต่อสภาวะที่ขาดแคลนเหล็ก (Guerinot *et al.*, 1990; Machuca *et al.*, 2001) ดังการรายงานของ Kloepper *et al.* (1988) และ Glick (1995) ที่พบว่าผลผลิตของพืชเพิ่มขึ้นเมื่อมีการใส่แบคทีเรียที่มีความสามารถทั้งการผลิตซิเดอโรฟอรัสและการละลายฟอสเฟต

ตารางที่ 5 การผลิตสารส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชของแบคทีเรียที่แยกได้

ลำดับ	ชุดดิน	พันธุ์อ้อย	ไอโซเลต	การตรึงไนโตรเจน ($\text{nmol C}_2\text{H}_4 \cdot \text{H}^{-1} \cdot \text{tube}^{-1}$)	การละลาย ฟอสเฟต ($\mu\text{g/ml}$)	ออกซิน ($\mu\text{g/ml}$)	จิบเบอ เรลลิน ($\mu\text{g/ml}$)
1	ตาคลี	LK 92-11	LK-TK001	25.32	152.87	3.59	191.61
2	ตาคลี	LK 92-11	LK-TK002	26.72	0	5.24	121.45
3	ตาคลี	LK 92-11	LK-TK003	26.47	0	7.03	428.25
4	ตาคลี	LK 92-11	LK-TK004	-	0	3.65	247.91
5	ตาคลี	LK 92-11	LK-TK005	75.10	0	5.53	252.54
6	ตาคลี	LK 92-11	LK-TK006	30.26	128.42	4.51	276.07
7	ตาคลี	LK 92-11	LK-TK007	26.47	123.69	4.04	264.30
8	ตาคลี	LK 92-11	LK-TK008	26.76	0	9.81	265.15
9	ตาคลี	LK 92-11	LK-TK009	-	0	3.61	234.47
10	ตาคลี	LK 92-11	LK-TK010	33.82	141.96	4.73	265.15
11	ตาคลี	LK 92-11	LK-TK011	25.54	0	6.15	261.78
12	ตาคลี	LK 92-11	LK-TK012	-	0	3.89	383.93
13	ตาคลี	LK 92-11	LK-TK013	22.01	133.68	2.78	257.16
14	ตาคลี	LK 92-11	LK-TK014	-	0	3.34	399.01
15	ตาคลี	LK 92-11	LK-TK015	-	0	3.91	288.25
16	ตาคลี	LK 92-11	LK-TK016	-	0	2.91	414.22
17	ตาคลี	LK 92-11	LK-TK017	-	0	4.63	352.41
18	ตาคลี	LK 92-11	LK-TK018	28.06	125.92	2.91	207.16
19	ตาคลี	LK 92-11	LK-TK019	-	0	11.08	269.35
20	ตาคลี	LK 92-11	LK-TK020	-	0	6.09	273.55
21	ตาคลี	LK 92-11	LK-TK021	23.30	0	9.48	260.52
22	ตาคลี	LK 92-11	LK-TK022	-	0	3.67	371.83

ลำดับ	ชุดดิน	พันธุ์อ้อย	ไอโซเลต	การตรึงไนโตรเจน ($\text{nmol C}_2\text{H}_4 \cdot \text{H}^{-1} \cdot \text{tube}^{-1}$)	การละลาย ฟอสเฟต ($\mu\text{g/ml}$)	ออกซิน ($\mu\text{g/ml}$)	จิบเบอ เรลลิน ($\mu\text{g/ml}$)
23	ตาคลี	LK 92-11	LK-TK023	-	0	3.78	293.71
24	ตาคลี	LK 92-11	LK-TK024	-	0	4.39	378.67
25	ตาคลี	LK 92-11	LK-TK025	-	0	5.26	253.38
26	กำแพงแสน	LK 92-11	LK-KS001	-	0	4.14	239.51
27	กำแพงแสน	LK 92-11	LK-KS002	24.60	0	3.90	239.09
28	กำแพงแสน	LK 92-11	LK-KS003	28.68	106.20	3.50	255.90
29	กำแพงแสน	LK 92-11	LK-KS004	-	0	4.88	406.11
30	กำแพงแสน	LK 92-11	LK-KS005	32.69	0	6.46	279.43
31	กำแพงแสน	LK 92-11	LK-KS006	-	0	2.65	261.78
32	กำแพงแสน	LK 92-11	LK-KS007	-	0	3.76	257.58
33	กำแพงแสน	LK 92-11	LK-KS008	-	0	6.06	260.52
34	กำแพงแสน	LK 92-11	LK-KS009	-	0	7.52	198.76
35	กำแพงแสน	LK 92-11	LK-KS010	-	0	4.91	455.69
36	กำแพงแสน	LK 92-11	LK-KS011	-	0	4.74	388.47
37	กำแพงแสน	LK 92-11	LK-KS012	-	0	6.18	278.59
38	กำแพงแสน	LK 92-11	LK-KS013	32.69	0	3.59	361.36
39	กำแพงแสน	LK 92-11	LK-KS014	-	116.46	2.67	228.17
40	กำแพงแสน	LK 92-11	LK-KS015	26.50	0	4.23	365.40
41	กำแพงแสน	LK 92-11	LK-KS016	-	86.22	4.15	223.55
42	กำแพงแสน	LK 92-11	LK-KS017	23.57	0	4.83	406.57
43	กำแพงแสน	LK 92-11	LK-KS018	-	0	2.26	373.13
44	กำแพงแสน	LK 92-11	LK-KS019	-	0	4.57	357.41
45	กำแพงแสน	LK 92-11	LK-KS020	-	146.56	5.15	374.14
46	กำแพงแสน	LK 92-11	LK-KS021	-	0	4.72	197.08
47	กำแพงแสน	LK 92-11	LK-KS022	32.04	0	16.30	393.34
48	กำแพงแสน	LK 92-11	LK-KS023	-	155.10	3.01	251.28
49	กำแพงแสน	LK 92-11	LK-KS024	-	0	2.71	411.57
50	กำแพงแสน	LK 92-11	LK-KS025	-	0	2.85	430.40
51	กำแพงแสน	LK 92-11	LK-KS026	26.71	0	3.56	381.49
52	กำแพงแสน	LK 92-11	LK-KS027	-	0	4.97	443.97
53	กำแพงแสน	LK 92-11	LK-KS028	-	0	3.27	448.55
54	กำแพงแสน	LK 92-11	LK-KS029	28.63	0	6.27	259.68
55	กำแพงแสน	LK 92-11	LK-KS030	-	0	3.87	225.65
56	กำแพงแสน	LK 92-11	LK-KS031	-	145.90	7.34	252.12

ลำดับ	ชุดดิน	พันธุ์อ้อย	ไอโซเลต	การตรึงไนโตรเจน ($\text{nmol C}_2\text{H}_4 \cdot \text{H}^{-1} \cdot \text{tube}^{-1}$)	การละลาย ฟอสเฟต ($\mu\text{g/ml}$)	ออกซิน ($\mu\text{g/ml}$)	จิบเบอ เรลลิน ($\mu\text{g/ml}$)
57	กำแพงแสน	LK 92-11	LK-KS032	-	122.31	4.48	252.12
58	กำแพงแสน	LK 92-11	LK-KS033	-	150.11	5.21	266.82
59	กำแพงแสน	LK 92-11	LK-KS034	-	0	14.40	277.33
60	กำแพงแสน	LK 92-11	LK-KS035	11.02	0	5.07	255.90
61	กำแพงแสน	LK 92-11	LK-KS036	-	0	3.78	284.89
62	กำแพงแสน	LK 92-11	LK-KS037	25.01	0	7.48	282.37
63	กำแพงแสน	LK 92-11	LK-KS038	-	0	3.13	272.28
64	กำแพงแสน	LK 92-11	LK-KS039	-	0	2.76	258.42
65	กำแพงแสน	LK 92-11	LK-KS040	-	148.13	4.21	223.13
66	กำแพงแสน	สุพรรณบุรี 80	SP-KS001	-	0	3.21	250.44
67	กำแพงแสน	สุพรรณบุรี 80	SP-KS002	-	0	4.06	292.45
68	กำแพงแสน	สุพรรณบุรี 80	SP-KS003	26.07	0	8.68	337.75
69	กำแพงแสน	สุพรรณบุรี 80	SP-KS004	-	0	4.70	372.88
70	กำแพงแสน	สุพรรณบุรี 80	SP-KS005	-	0	4.52	294.97
71	กำแพงแสน	สุพรรณบุรี 80	SP-KS006	-	0	5.17	219.34
72	กำแพงแสน	สุพรรณบุรี 80	SP-KS007	-	0	3.41	228.17
73	กำแพงแสน	สุพรรณบุรี 80	SP-KS008	-	0	3.78	258.42
74	กำแพงแสน	สุพรรณบุรี 80	SP-KS009	-	0	3.13	242.03
75	กำแพงแสน	สุพรรณบุรี 80	SP-KS010	-	0	3.78	265.99
76	กำแพงแสน	สุพรรณบุรี 80	SP-KS011	-	0	3.97	234.47
77	กำแพงแสน	สุพรรณบุรี 80	SP-KS012	-	0	3.50	264.72
78	กำแพงแสน	สุพรรณบุรี 80	SP-KS013	-	0	4.80	264.72
79	กำแพงแสน	สุพรรณบุรี 80	SP-KS014	-	0	3.97	253.38
80	กำแพงแสน	อุทอง 9	AU-KS001	29.11	180.86	15.98	372.33

สรุปและเสนอแนะ

การแยกแบคทีเรียจากรากอ้อยที่ปลูกในชุดดินตาคลีและกำแพงแสนสามารถแยกแบคทีเรียได้จำนวน 80 ไอโซเลต พบแบคทีเรียมากที่สุดในรากอ้อยสายพันธุ์ LK 92-11 ที่ปลูกในชุดดินกำแพงแสนจำนวน 40 ไอโซเลต เมื่อนำแบคทีเรียมาทดสอบความสามารถในการเจริญอาหาร RMR พบว่า แบคทีเรียตรึงไนโตรเจนเอนโดไฟต์จำนวน 25 ไอโซเลต ผลของการศึกษาประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจนโดยการวัดอัตราการตรึงไนโตรเจนของเอ็นไซม์ไนโตรจีเนส โดยวิธี Acetylene Reduction Assay (ARA) ของแบคทีเรียที่แยกได้ 25 ไอโซเลตจากรากอ้อยสายพันธุ์ต่างๆ ในทั้งสองชุดดิน พบว่าแบคทีเรียไอโซเลต LK-TH005 จากอ้อยพันธุ์ LK 92-11 ในชุดดินตาคลีมีประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจนสูงที่สุดประมาณ 75.10 นาโนโมลเอทิลีนต่อชั่วโมงต่อตัวอย่าง และเมื่อนำแบคทีเรียที่แยกได้จำนวน 80 ไอโซเลตมาทดสอบความสามารถในการผลิตฮอร์โมนพืชออกซิน พบปริมาณการผลิตอยู่ในช่วง 2.26-16.30 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยพบการผลิตฮอร์โมนพืชออกซินสูงสุดในแบคทีเรียไอโซเลต LK-KS 022 คือ 16.30 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งแยกได้จากอ้อยสายพันธุ์ LK 92-11 ที่ปลูกอยู่ในชุดดินกำแพงแสน และพบว่าปริมาณการผลิตฮอร์โมนพืชจิบเบอเรลลินอยู่ในช่วง 121.45-455.69 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งพบการผลิตฮอร์โมนพืชจิบเบอเรลลินสูงสุดในแบคทีเรียไอโซเลต LK-KS 010 คือ 455.69 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งแยกได้จากอ้อยสายพันธุ์ LK 92-11 ที่ปลูกอยู่ในชุดดินกำแพงแสน ปริมาณการละลายฟอสเฟตพบอยู่ในช่วงระหว่าง 86.22 – 180.86 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยแบคทีเรียไอโซเลต AU-KS 001 มีความสามารถในการละลายฟอสเฟตสูงสุดที่ความเข้มข้น 180.86 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งแยกได้จากอ้อยสายพันธุ์อู่ทอง ที่ปลูกในชุดดินกำแพงแสน จากการทดลองพบแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนเอนโดไฟต์ทั้งหมด 7 ไอโซเลตที่มีประสิทธิภาพในการตรึงไนโตรเจน ละลายฟอสเฟต ผลิตฮอร์โมนพืชออกซิน และจิบเบอเรลลิน ซึ่งส่วนใหญ่เป็นแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนเอนโดไฟต์ที่ได้จากรากอ้อยสายพันธุ์ LK 92-11 ที่ปลูกในชุดดินตาคลี

เอกสารอ้างอิง

- กรมวิชาการเกษตร, มปป. อ้อย ชื่อพันธุ์ :สุพรรณบุรี 80 แหล่งที่มา <http://it.doa.go.th/cv/view2.php?id=241>, 5 พฤศจิกายน 2558
- เกษม สุขสถาน. 2527. อ้อย. ใน พืชเศรษฐกิจ เล่ม 2 ภาควิชาพืชไร่นา คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
- คณาจารย์ภาควิชาปฐพีวิทยา. 2541. ปฐพีวิทยาเบื้องต้น. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
- คณาจารย์ภาควิชาพืชไร่นา. 2527. พฤกษศาสตร์พืชเศรษฐกิจ. เล่ม 1. ภาควิชาพืชไร่นา คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
- ประเสริฐ ฉัตรวชิรวงษ์. 2542. อ้อย, น.270-295 ใน ภาควิชาพืชไร่นา คณะเกษตร. พืชเศรษฐกิจ.มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
- ธงชัย มาลา. 2550. ปุ๋ยอินทรีย์และปุ๋ยชีวภาพ: เทคนิคการผลิตและการใช้ประโยชน์. สำนักพิมพ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
- ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรสุพรรณบุรี กรมวิชาการเกษตร, มปป. พันธุ์อ้อยที่ผ่านการรับรองจากกรมวิชาการเกษตร แหล่งที่มา: http://www.doa.go.th/ardc/suphan/variety_SC.htm, 5 พฤศจิกายน 2558
- สมบุญ เตชะภิญญาวัฒน์. 2548. สรีรวิทยาของพืช, พิมพ์ครั้งที่ 4. จามจุรีโปรดักท์, กรุงเทพฯ.
- สำนักงานคณะกรรมการอ้อยและน้ำตาลทราย, มปป. พันธุ์อ้อย แหล่งที่มา <http://ipc.ocsb.go.th/Indexipc.aspx?whatdo=1>, 5 พฤศจิกายน 2558
- สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. 2551. มูลค่าส่งออกและนำเข้าสินค้าเกษตร. แหล่งที่มา: http://www.oae.go.th/oae_website/oae_imex.php, 20 มกราคม 2551.
- อรรถสิทธิ์ บุญธรรม, ปรีชา พรหมณีย์, จรัญ อารีย์, เจริญ บัวคงดี และสมพงษ์ กาทอง. 2539. การเพิ่มจำนวนครั้งและปริมาณปุ๋ยไนโตรเจนเพื่อเพิ่มผลผลิตอ้อยในเขตอาศัยน้ำฝน, น. 324-332. ใน รายงานผลการทดลอง ปี 2539 อ้อย เล่ม 1 ศูนย์วิจัยพืชไร่สุพรรณบุรี, สถาบันวิจัยพืชไร่ กรมวิชาการเกษตร.
- Ahmad F., I. Ahmad and M.S. Khan. 2005. Indole acetic acid production by the indigenous isolates of azotobacter and fluorescent pseudomonas in the presence and absence of tryptophan. Turk. J. Biol. 29: 29-34.
- Ahmad, F., I. Ahmad and M.S. Khan. 2008. Screening of free living rhizospheric bacteria for their multiple plant growth promoting activities. Microbiol. Res. 163: 173-181.

- Atzorn R., A. Crozier, C.T. Wheeler and G. Sandberg. 1988. Production of gibberellins and indole-3-acetic acid by *Rhizobium phaseoli* in relation to nodulation of *Phaseolus vulgaris* roots. *Planta*. 175: 532–538.
- Azeem, S.A.M., E.L. ABD, T.A. Mehana and A.A. Shabayek. 2007. Some plant growth promoting traits of rhizobacteria isolated from Suez Canal region, Egypt. *Afr. Crop. Sci. J.* 8: 1517-1525.
- Alexznder M. 1977. Introduction to Soil Microbiology. 2nd ed. Wiley, New York.
- Backer, C.A. and R.C. Bakhuizen van den brink. 1968. Flora of Java. V. 3 Gronigon: N.V.P. Noordhofl, Netherland.
- Banik S. and B.K. Dey. 1982. Available phosphate content of an alluvial soil as influenced by inoculation of some isolated phosphate solubilizing microorganisms. *Plant Soil* 69: 353–364.
- Bartel B. 1997. Auxin biosynthesis. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 48: 51–66.
- Beever R.E. and D.J.W. Burns. 1980. P uptake, storage and utilization by fungi. *Adv Bot Res.* 8: 127–219.
- Boddey, R.M., O.C. de Oliveira, S. Urquiaga, V.M. Reis, F.L. de Olivares, V.L.D. Baldani and J. Dobereiner. 1995. Biological nitrogen fixation associated with sugar cane and rice: contributions and prospects for improvement. *Plant Soil*. 174: 195-209.
- Boiero L., D. Perrig, O. Masciarelli, C. Penna, F. Cassan and V. Luna. 2007. Phytohormone production by three strains of *Bradyrhizobium japonicum* and possible physiological and technological implications. *J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 74: 874–880.
- Bottini R., F. Cassan and P. Picolli. 2004. Gibberellin production by bacteria and its involvement in plant growth promotion. *Appl Microbiol Biotechnol.* 65: 497–503.
- Bottini, R., M. Fulchieri, D. W. Pearce and R. P. Pharis. 1989. Identification of Gibberellins A1, A3, and iso- A3 in cultures of *Azospirillum lipoferum*. *Plant Physiol.* 90: 45-47.

- Brick, J.M., R.M. Bostock and S.E. Silverstone. 1991. Rapid in situ assay for indole-acetic acid production by bacteria immobilized on nitrocellulose membrane. *Appl. Environ. Microbiol.* 57: 535–538.
- Burris, R.H. 1975. The acetylene-reduction technique. pp. 249 -258. *In* W.D.P. Stewart, ed. *Nitrogen Fixation by Free-living Microorganisms*. Cambridge University Press, London.
- Burris, R. H. and P. W. Wilson. 1957. Methods for measurement of nitrogen fixation. pp. 355-367. *In* S. P. Colowick and N. O. Kaplan, eds. *Methods in Enzymology*. Academic Press, New York.
- Cassana, F., D. Perriga, V. Sgroya, O. Masciarellia, C. Pennab and V. Lunaa. 2009. *Azospirillum brasilense* Az39 and *Bradyrhizobium japonicum* E109, inoculated singly or in combination, promote seed germination and early seedling growth in corn (*Zea mays* L.) and soybean (*Glycine max* L.). *Eur. J. Soil Biol.* 45: 28–35.
- Chen, B.E., M. Kondo, A. Garnier, F.L. Watson, R. Puettmann-Holgado, D.R. Lamar, D. Schmucker. 2006. The molecular diversity of Dscam is functionally required for neuronal wiring specificity in *Drosophila*. *Cell.* 125(3): 607--620.
- Cohen J.D., and W.M. Gray. 2006. Auxin metabolism and signaling, pp.37-66. *In* P. Hedden and S.G. Thomas, eds. *Plant Hormone Signaling*. Blackwell Publishing Ltd, Oxford, UK:
- Cohen J.D., J.P. Slovin and A.M. Hendrickson. 2003. Two genetically discrete pathways convert tryptophan to auxin: more redundancy in auxin biosynthesis. *Trends Plant Sci.* 8: 197-199.
- Crozier A., Y. Kamiya, G. Bishop and T. Yokota. Biosynthesis of hormones and elicitor molecules, pp.850-929. *In*: B.B. Buchanan, W. Gruissem and R.L. Jones, eds. *Biochemistry and molecular biology of plants*. American Society of Plant Physiology, Rockville.
- Dobereiner J., V.M. Reis, M.A. Paula and F. Olivares. 1993. Endophytic diazotrophs in sugar cane, cereals and tuber plants, pp. 617-676. *In* R. Palacios et. al., eds. *New horizons in nitrogen fixation*. Kluwer Academic Publishers, The Netherlands.
- Edlund A., S. Eklof, B. Sundberg, T. Moritz and G. Sandberg 1995. A microscale technique for gas-chromatography mass-spectrometry measurements of picogram amounts of Indole-3-Acetic-Acid in plant-tissues. *Plant Physiol.* 108: 1043–1047.
- Ehrlich, H.L. 1990. *Geomicrobiology*. 2nd ed. Marcel Dekker, Inc. New York.

- Elbeltagy A., K. Nishioka, T. Sato, H. Suzuki, B. Ye, T. Hamada, T. Isawa, H. Mitsui and K. Minamisawa. 2001. Endophytic colonization and in planta nitrogen fixation by a *Herbaspirillum* sp. isolated from wild rice species. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 5285–5293
- Feng Y., D. Shen and W. Song. 2006. Rice endophyte *Pantoea agglomerans* YS19 promotes host plant growth and affects allocations of host photosynthates. *J. Appl. Microbiol.* 100(5): 938-945.
- Fisher K. and W.E. Newton. 2002. Nitrogen Fixation---A General Overview. pp. 1-34. *In* G.J. Leigh, ed. *Nitrogen Fixation at the Millennium*. Elsevier. Amsterdam.
- Frankenberger, W.T. Jr. and M. Arshad. 1995. *Phytohormones in Soil: Microbial production and function*. Marcel Dekker Inc., New York, USA.
- Gaur, A.C. and K.P. Ostwal. 1972. Influence of phosphate dissolving Bacilli on yield and phosphate uptake of wheat crop. *Indian J. Exp. Biol.* 10: 393-394.
- Gerretsen, F.C. 1948. The influence of microorganisms on the phosphate intake by the plant. *Plant Soil.* 1: 51-81.
- Glick, B.R. 1995. The enhancement of plant growth by free-living bacteria. *Can. J. Microbiol.* 41: 109–117.
- Glick, B.R., D.M. Karaturovic and P.C. Newel. 1995. A novel procedure for rapid isolation of plant growth promoting *Pseudomonas*. *Can. J. Microbiol.* 41: 533–536.
- Glickmann, E. and Y. Dessaux. 1995. A critical examination of the specificity of the Salkowski reagent for indolic compounds produced by phytopathogenic bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 793–796.
- Goldstein, A. H. 1986. Bacterial solubilization of mineral phosphates: historical perspective and future prospects. *American Journal of Alternative Agriculture.* 1: 51-57.
- Goldstein, A. H. 1994. Involvement of the quinoprotein glucose dehydrogenases in the solubilization of exogenous phosphates by gram-negative bacteria, pp. 197-203. *In* A. Torriani Gorini, E. Yagil and S. Silver, eds. *Phosphate in Microorganisms: Cellular and Molecular Biology*. ASM Press, Washington, D. C.

- Goldstein A.H., R.D. Rogers and G. Mead. 1993. Mining by microbe. *Bio. Technol.* 11: 1250–1254.
- Gordon, S.A. and R.P. Weber. 1951. Colorimetric estimation of indolacetic acid. *Plant Physiology.* 26: 192–195.
- Gravel, V., A.H. Antoun, and R.J. Tweddell. 2007. Effect of indole-acetic acid (IAA) on the development of symptoms caused by *Pythium ultimum* on tomato plants. *Eur. J. Plant Pathol.* 119: 457–462.
- Gravel, V., H. Antoun and R.J. Tweddell. 2007. Growth stimulation and fruit yield improvement of greenhouse tomato plants by inoculation with *Pseudomonas putida* or *Trichoderma atroviride*: Possible role of indole acetic acid (IAA). *Soil Biol. Biochem.* 39: 1968–1977.
- Guerinot, M.L., E.J. Meidl and O. Plessner. 1990. Citrate as a siderophore in *Bradyrhizobium japonicum*. *J. Bacteriol.* 172: 3298–3303.
- Gyaneshwar, P., E. K. James, N. Mathan, P. M. Reddy, B. Reinhold-hurek and J.K. Ladha. 2001. Endophytic colonization of rice by a diazotrophic strain of *Serratia marcescens*. *J. of Bacteriol.* 183: 2634–2645.
- Hallmann, J., R. Rodriguez-Kabana, J. W. Kloepper, A. Quadt-Hallmann, W.F. Mahaffee and J.W. Kloepper. 1997. Bacterial endophytes in agricultural crops. *Can. J. Microbiol.* 43: 895-914.
- Hameeda, B., G. Harini, O.P. Rupela, S.P. Wani and G. Reddy. 2008. Growth promotion of maize by phosphate solubilizing bacteria isolated from composts and macrofauna. *Microbiol. Res.* 163: 234-242.
- Halder A.K. and P.K. Chakrabarty. 1993. Solubilization of inorganic phosphate by *Rhizobium*. *Folia Microbiol.* 38: 325–330.
- Halder, A.K., A.K. Mishra, P. Bhattacharya and P.K. Chakrabarty. 1990. Solubilization of rock phosphate by *Rhizobium* and *Bradyrhizobium*. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 36: 81–92.
- Holbrook, A., W. Edge, and F. Bailey. 1961. Spectrophotometric method for determination of gibberellic acid. *Adv Chem Ser.* 28: 159-167.
- Hung P.Q. and K. Annapurna. 2004. Isolation and characterization of endophytic bacteria in soybean (*Glycine* sp.). *Omonrice.* 12: 92-101.

- Husen, E. 2003. Screening of soil bacteria for plant growth promotion activities in vitro. Indon. J. Agric. Sci. 4: 27–31.
- Hurek, T. and B. R. Hurek. 2003. *Azoarcus* sp. strain BH72 as a model for nitrogen-fixing grass endophytes. J. of Biotechnol. 106: 169–178.
- Illmer, P. and E. Schinner, 1992. Solubilization of inorganic phosphates by microorganisms isolated from forest soils. Soil Biol. Biochem. 24: 389-395.
- Ingels, J.E. 2009. Ornamental horticulture science, operations and management. Reputable Publ. Inc., USA.
- James, E.K., F.L. Olivares, J.I. Baldani and J. Dobereiner. 1997. *Herbaspirillum*, an endophytic diazotroph colonizing vascular tissue in leaves of *Sorghum bicolor* L. Moench. J. Exp.Bot. 48: 785-797.
- Jansen, R., S. Rood, J. Dormar and W. McGill. 1992. *Azospirillum brasilense* produces gibberellins in pure culture and chemically-medium and in co-culture on straw. Soil Biol. Biochem. 24: 1061-1064.
- Jones, R.I. 1991. Advantages of diurnal vertical migrations to phytoplankton in sharply stratified, humic forest lakes. Arch. Hydrobiol. 120: 257-266.
- Joseph, B., R.R. Patra and R. Lawrence. 2007. Characterization of plant growth promoting rhizobacteria associated with chickpea (*Cicer arietinum* L.). Int. J. Plant Prod. 2:141-152.
- Karadeniz A., S.F. Topcuoglu and S. Inan. 2006. Auxin, gibberellin, cytokinin and abscisic acid production in some bacteria. World J. Microbial. Biotechnol. 22: 1061-1064.
- Katupitiya S., P.B. New, C. Elmerich and I.R. Kennedy. 1995. Improved nitrogen fixation in 2,4-D treated wheat roots associated with *Azospirillum lipoferum*: colonization using reporter genes. Soil Biology and Biochemistry. 27: 447–452.
- Karako, S. and N. Aksoz. 2005. Some optimal cultural parameters for gibberellic acid biosynthesis by *pseudomonas* sp. Turk. J. Biol. 30: 81-85.
- Katznelson H., E.A. Peterson and J.W. Rovatt. 1962. Phosphate dissolving microorganisms on seed and in the root zone of plants. Can. J. Bot. 40: 1181 1186.

- Kloepper, J.W., K. Lifshitz and M.N. Schroth. 1988. *Pseudomonas* inoculants to benefit plant production. ISI Atlas Sci. Animal Plant Sci. 1: 60–64.
- Kucey R.M.N., H.H. Janzen and M.E. Leggett. 1989. Microbially mediated increases in plant-available phosphorus. *Adv Agron* 42: 199–228.
- Kumar, K.V., S. Srivastava, N. Singh and H.M. Behl, 2009. Role of metal resistant plant growth promoting bacteria in ameliorating fly ash to the growth of *Brassica juncea*. *J. Hazardous Materials*. 170: 51-57.
- Ladha, J.K. and P.M. Reddy. 2000. The quest for nitrogen fixation in rice. Proceedings of the Third Working Group Meeting on Assessing Opportunities for Nitrogen Fixation in Rice, 9–12 Aug. 1999, IRRI, Los Banos, Laguna, Philippines.
- Landon, J.R. 1991. *Booker Tropical Soil Manual: A handbook for soil survey and agricultural land evaluation in the tropics and subtropics*. Paperback Edition. Booker Agriculture.
- Leopold, A.C. and P.E. Kriedemann. 1975. *Plant growth and development*. McGraw-Hill Book Co., New York.
- Liu, T.S., L.Y. Lee, C. Y. Tai., C. H. Hung, Y. S. Chang, J. H. Wolfram, R. Rogers and A. H. Goldstein, 1992. Cloning of an *Erwinia carotovora* gene necessary for gluconic acid production and enhanced mineral phosphate solubilization in *Escherichia coli* HB101: Nucleotide sequence and probable involvement in biosynthesis of the coenzyme pyrroloquinoline quinone, *J. Bacteriol.* 174:5814–5819.
- Machuca, R., L.B Jorgensen, P. Theilade and C. Nielsen. 2001. Molecular investigation of transmission of human immune deficiency virus type 1 in a criminal case. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 8: 884-890.
- Macadam, J. 2009. *Structure and function of plants*. Wiley-Blackwell Inc., Ames, IA.
- Marques, A., C. Pires, H. Moreira, A.O.S. Rangel and P.M.L. Castro. 2010. Assessment of the plant growth promotion abilities of six bacterial isolates using *Zea mays* as indicator plant. *Soil Biol. Biochem.* 42: 1229-1235.
- Metha, S. and C.S. Nautiyal. 2001. An efficient method for qualitative screening of phosphate-solubilizing bacteria. *Curr. Microbiol.* 43: 51-56.

- Meudt, W.J. and T.P. Gaines. 1967. . Studies on the oxidation of indole-3-acetic acid by peroxidase enzymes. I. Colorimetric determination of indole-3-acetic acid oxidation products. *Pl. Physiol.* 42: 1395–1399.
- Muhammad, H., S.A.Khan, H.Y. Kim, M.F. Chaudhary, Y.H. Hwang, D.H. Shin, I.K. Kim, B.H. Lee and I.J. Lee. 2009. Gibberellin production and plant growth enhancement by newly isolated strain of *scolecobasidium tshawytschae*. *J. Microbiol. Biotechnol.* 19: 560–565
- Moore, O.H. and K.J. Nuss. 1987. Flowering and flower Synchronization.pp. 273-311. *In* D.J. Heinz (ed.) *Development in crop Sci. II : Sugarcane Improvement through Breeding*. Elsevier Science Publishing Company Inc., New York, USA.
- Olivares F.L., E.K. James, J.I. Baldani and J. Ddbereiner. 1997. Infection of mottled stripe disease-susceptible and resistant sugar cane varieties by the endophytic diazotroph *Herbaspirillum*. *New Phytologist.* 135: 723-737.
- Paleg, L.G. 1965. Physiological effect of gibberellins. *Ann. Rev. Plant physiol.* 16: 291-293.
- Patten C.L. and B.R. Glick. 2002. Role of *Pseudomonas putida* indoleacetic acid in development of the host plant root system. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 3795–3801.
- Pedraza R.O., C.H. Bellone, E.S.C. Bello, P.M.F. Boa sorte and R.S. Teixeira. 2009. *Azospirillum* inoculation and nitrogen fertilization effect on grain yield and on the diversity of endophytic bacteria in the phyllosphere of rice rainfed crop. *Eur. J. of Soil Biol.* 45: 36-43.
- Pleban, S., F. Ingel and I. Chet. 1995. Control of *Rhizoctonia solani* and *Sclerotium rolfsii* in the greenhouse using endophytic *Bacillus* spp. *Eur. J. Plant Pathol.* 101: 665 -672.
- Probanza, A., J.A. Lucas, N. Acero and F.J. Gutiérrez Mañero. 1996. The influence of native rhizobacteria on european alder [*Alnus glutinosa* (L.) Gaertn.] growth. I. Characterization of growth promoting and growth inhibiting bacterial strains. *Plant and Soil.* 182: 59-66.
- Raghu K., and I.C. MacRae. 1966. Occurrence of phosphate-dissolving microorganisms in the rhizosphere of rice plants and in submerged soils. *J Appl Bacteriol.* 29: 582–586.
- Ribeiro, C.M. and E.J.B.N. Cardoso. 2012. Isolation, selection and characterization of root-associated growth promoting bacteria in Brazil Pine (*Araucaria angustifolia*). *Microbiol. Res.* 167: 69-78.

- Ribnicky, D., J. Cohen, W.S. Hu and T. Cooke. 2002. An extraordinary auxin surge following fertilization in carrot: its significance for plant totipotency. *Planta*. 214: 505-509.
- Rodriguez H. and R. Fraga. 1999. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. *Biotechnol. Adv.* 17: 319–339.
- Samish, Z., R. Etinger-Tulczynsky and M. Bick. 1963. The microflora within the tissue of fruits and vegetables. *J. Food Sci.* 28: 259-266.
- Sequeira, L. and P.H. Williams. 1964. Synthesis of indoleacetic acid by *Pseudomonas solanacearum*. *Phytopathology*. 54: 1240-1246.
- Skrary, F.A. and D.C. Cameron. 1998. Purification and characterization of a *Bacillus licheniformis* phosphatase specific for d-alpha-glycerophosphate. *Arch. Biochem. Biophys.* 349: 273-35.
- Solano, B.R., J. Barriuso and F.J.G. Manero. 2008. Physiological and molecular mechanisms of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR), pp. 41–54. *In* I. Ahmad, J. Pichtel and S. Hayat, eds. *Plant bacteria interactions: strategies and techniques to promote plant growth*. Wiley-VCH, Weinheim.
- Sperberg J.I. 1958. The incidence of apatite-solubilizing organisms in the rhizosphere and soil. *Aust. J. Agric. Res.* 9: 778.
- Stowe B. B. and T. Yamaki. 1957. The history and physiological action of the gibberellins. *Annual Review of Plant Physiology*. 8: 181-216.
- Subba, R.N.S. 1982. Advances in agricultural microbiology, pp.295-303. *In* N.S. Subba Rao. ed. *Studied in the Agricultura and Food Sciences*. Butterworth Scientific, London.
- Tanimoto E., 2005. Regulation of Root Growth by Plant Hormones -- Roles for Auxin and Gibberellin. *Critical Reviews in Plant Sciences*. 24: 249-265.
- Tudzynski, B. 2005. Gibberellin biosynthesis in fungi: genes, enzymes, evolution, and impact on biotechnology. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 66: 597-611.
- Vande Broek, A., J. Michiels, A. Van Gool, and J. Vanderleyden. 1993. Spatial-temporal colonization patterns of *Azospirillum brasilense* on the wheat root surface and expression of the bacterial *nifH* gene during association. *Mol Plant Microbe Interact.* 6: 592–600.

- Vasconcellos, R.L.F., M.C.P. Silva, C.M.R. Ribeiro and E.J.B.N. Cardoso. 2010. Isolation and screening for plant growth-promoting (PGP) actinobacteria from *Araucaria angustifolia* rhizosphere. *Soil. Sci. Agric.* 67: 743–746.
- Vassilev, N., A. Medina, R. Azcon and M. Vasslev. 2006. Microbial solubilization of rock phosphate media containing agro-industrial wastes and effect of the resulting products on plant growth and P uptake. *Plant Soil.* 287: 77-84.
- Vermeiren, H., J. Vanderleyden and W. Hai. 1998. Colonization and nifH expression on rice roots by *Alcaligenes faecalis* A15, pp. 287-305. *In* K.A. Malik et al., eds. *Nitrogen Fixation with NonLegumes*. Kluwer, Dordrecht.
- Vikram, A., H. Jamzhezarghani, A.R. Alagawadi, P.U. Krishnaraj and B.S. Chandrashekar. 2007. Production of plant growth promoting substances by phosphate solubilizing bacteria isolated from Vertisols. *J. Plant sci.* 2: 326-333.
- Went F.W. 1926. On growth-accelerating substances in the coleoptile of *Avena sativa*. *Proc. Kon. Ned. Akad. Wet.* 30: 10–19.
- Woodward A.W. and B. Bartel. 2005. Auxin: regulation, action, and interaction. *Ann. Bot.* 95: 707–735.
- Xie, G.H., J.J. Pasternak and B.R. Glick. 1996. Isolation and characterization of mutants of the plant growth promoting rhizobacterium *Pseudomonas putida* GR12-2 that overproduce indole acetic acid. *Curr. Microbiol.* 32: 67-70.
- Xie, G.H., M. Y. Cai, G. C. Tao and Y. Steinberger. 2003. Cultivable heterotrophic N₂-fixing bacterial diversity in rice fields in the Yangtze River Plain. *Biol. Fertil. Soils.* 37: 29-38.
- Yabuta, T. and Y. Sumiki. 1938. On the crystal of gibberellin, a substance to promote plant growth. *J. Agric. Chem. Soc. Jpn.* 14: 1526.
- Yasmin, F., R. Othman, M.S. Saad and K. Sijam. 2007. Screening for beneficial properties of rhizobacteria isolated from sweet potato rhizosphere. *Biotechnology.* 6: 49–52.
- Yadav K.S. and K.R. Dadarwal. 1997. Phosphate solubilization and mobilization through soil microorganisms, pp. 293-308. *In* biotechnological approaches in soil microorganisms for sustainable crop production. K.R. Dadarwal, ed. Scientific Publishers, Jodhpur.

Zakria, M., J. Njoloma, Y. Saeki and S. Akao. 2007. Colonization and nitrogen-fixing ability of *Herbaspirillum* sp. Strain B501 *gfp 1* and assessment of its growth-promoting ability in cultivated rice. *Microbes Environ.* 22: 197-206.

Zhao Y., S.K. Christensen, C. Fankhauser, J.R. Cashman, J.D. Cohen, D. Weigel and J. Chory. 2001. A role for flavin monooxygenase-like enzymes in auxin biosynthesis. *Science.* 291: 306–309.

ภาคผนวก

ตารางที่ภาคผนวก 1 การเจริญในอาหาร RMR และความสามารถในการผลิตฮอร์โมนออกซินของแบคทีเรีย
เอนโดไฟต์

ลำดับ	ชนิดดิน	สายพันธุ์อ้อย	ไอโซเลต	การเจริญในอาหารRMR
1	ตาคลี	LK 92-11	LK-TK001	+
2	ตาคลี	LK 92-11	LK-TK002	+
3	ตาคลี	LK 92-11	LK-TK003	+
4	ตาคลี	LK 92-11	LK-TK004	-
5	ตาคลี	LK 92-11	LK-TK005	+
6	ตาคลี	LK 92-11	LK-TK006	+
7	ตาคลี	LK 92-11	LK-TK007	+
8	ตาคลี	LK 92-11	LK-TK008	+
9	ตาคลี	LK 92-11	LK-TK009	-
10	ตาคลี	LK 92-11	LK-TK010	+
11	ตาคลี	LK 92-11	LK-TK011	+
12	ตาคลี	LK 92-11	LK-TK012	-
13	ตาคลี	LK 92-11	LK-TK013	+
14	ตาคลี	LK 92-11	LK-TK014	-
15	ตาคลี	LK 92-11	LK-TK015	-
16	ตาคลี	LK 92-11	LK-TK016	-
17	ตาคลี	LK 92-11	LK-TK017	-
18	ตาคลี	LK 92-11	LK-TK018	+
19	ตาคลี	LK 92-11	LK-TK019	-
20	ตาคลี	LK 92-11	LK-TK020	-
21	ตาคลี	LK 92-11	LK-TK021	+
22	ตาคลี	LK 92-11	LK-TK022	-
23	ตาคลี	LK 92-11	LK-TK023	-
24	ตาคลี	LK 92-11	LK-TK024	-
25	ตาคลี	LK 92-11	LK-TK025	-
26	กำแพงแสน	LK 92-11	LK-KS001	-
27	กำแพงแสน	LK 92-11	LK-KS002	+
28	กำแพงแสน	LK 92-11	LK-KS003	+
29	กำแพงแสน	LK 92-11	LK-KS004	-
30	กำแพงแสน	LK 92-11	LK-KS005	+
31	กำแพงแสน	LK 92-11	LK-KS006	-
32	กำแพงแสน	LK 92-11	LK-KS007	-
33	กำแพงแสน	LK 92-11	LK-KS008	-

ลำดับ	ชุดดิน	สายพันธุ์อ้อย	ไอโซเลต	การเจริญในอาหารRMR
34	กำแพงแสน	LK 92-11	LK-KS009	-
35	กำแพงแสน	LK 92-11	LK-KS010	-
36	กำแพงแสน	LK 92-11	LK-KS011	-
37	กำแพงแสน	LK 92-11	LK-KS012	-
38	กำแพงแสน	LK 92-11	LK-KS013	+
39	กำแพงแสน	LK 92-11	LK-KS014	-
40	กำแพงแสน	LK 92-11	LK-KS015	+
41	กำแพงแสน	LK 92-11	LK-KS016	-
42	กำแพงแสน	LK 92-11	LK-KS017	+
43	กำแพงแสน	LK 92-11	LK-KS018	-
44	กำแพงแสน	LK 92-11	LK-KS019	-
45	กำแพงแสน	LK 92-11	LK-KS020	-
46	กำแพงแสน	LK 92-11	LK-KS021	-
47	กำแพงแสน	LK 92-11	LK-KS022	+
48	กำแพงแสน	LK 92-11	LK-KS023	-
49	กำแพงแสน	LK 92-11	LK-KS024	-
50	กำแพงแสน	LK 92-11	LK-KS025	-
51	กำแพงแสน	LK 92-11	LK-KS026	+
52	กำแพงแสน	LK 92-11	LK-KS027	-
53	กำแพงแสน	LK 92-11	LK-KS028	-
54	กำแพงแสน	LK 92-11	LK-KS029	+
55	กำแพงแสน	LK 92-11	LK-KS030	-
56	กำแพงแสน	LK 92-11	LK-KS031	-
57	กำแพงแสน	LK 92-11	LK-KS032	-
58	กำแพงแสน	LK 92-11	LK-KS033	-
59	กำแพงแสน	LK 92-11	LK-KS034	-
60	กำแพงแสน	LK 92-11	LK-KS035	+
61	กำแพงแสน	LK 92-11	LK-KS036	-
62	กำแพงแสน	LK 92-11	LK-KS037	+
63	กำแพงแสน	LK 92-11	LK-KS038	-
64	กำแพงแสน	LK 92-11	LK-KS039	-
65	กำแพงแสน	LK 92-11	LK-KS040	-
66	กำแพงแสน	สุพรรณบุรี 80	SP-KS001	-
67	กำแพงแสน	สุพรรณบุรี 80	SP-KS002	-
68	กำแพงแสน	สุพรรณบุรี 80	SP-KS003	+
69	กำแพงแสน	สุพรรณบุรี 80	SP-KS004	-

ลำดับ	จุดดิน	สายพันธุ์อ้อย	ไอโซเลต	การเจริญในอาหารRMR
70	กำแพงแสน	สุพรรณบุรี 80	SP-KS005	-
71	กำแพงแสน	สุพรรณบุรี 80	SP-KS006	-
72	กำแพงแสน	สุพรรณบุรี 80	SP-KS007	-
73	กำแพงแสน	สุพรรณบุรี 80	SP-KS008	-
74	กำแพงแสน	สุพรรณบุรี 80	SP-KS009	-
75	กำแพงแสน	สุพรรณบุรี 80	SP-KS010	-
76	กำแพงแสน	สุพรรณบุรี 80	SP-KS011	-
77	กำแพงแสน	สุพรรณบุรี 80	SP-KS012	-
78	กำแพงแสน	สุพรรณบุรี 80	SP-KS013	-
79	กำแพงแสน	สุพรรณบุรี 80	SP-KS014	-
80	กำแพงแสน	อุทอง 9	AU-KS001	+