



รายงานการวิจัย เรื่อง

ความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อไรโซเบียมถั่วแดงหลวง
และผลจากการใส่เชื้อไรโซเบียมถั่วแดงหลวงร่วมกับเชื้อแบคทีเรียละลายฟอสเฟต
ต่อการเพิ่มผลผลิตทางการเกษตร

Genetic Diversity of Rhizobia Nodulating *Phaseolus vulgaris*
and Effects of Co-inoculation with Rhizobia and Phosphate-Solubilizing Bacteria
on Agricultural Product Improvement

โดย

รองศาสตราจารย์ ดร. นีลวรรณ พงศ์ศิลป์
(Associate Professor Dr. Neelawan Pongsilp)
ภาควิชาจุลชีววิทยา มหาวิทยาลัยศิลปากร

และ

ดร. อัจฉรา นันทกิจ
(Dr. Achara Nuntagij)
สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร
กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก
สถาบันวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยศิลปากร ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2555

ปีที่ดำเนินการเสร็จ พ.ศ. 2557

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจาก สถาบันวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยศิลปากร ประจำปี
งบประมาณ พ.ศ. 2555

แบบฟอร์มบทคัดย่อ

ภาษาไทย

ส่วนที่ 1

ชื่อโครงการ ความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อไรโซเปียมถั่วแดงหลวง และผลจากการใส่เชื้อไรโซเปียมถั่วแดงหลวงร่วมกับเชื้อแบคทีเรียละลายฟอสเฟตต่อการเพิ่มผลผลิตทางการเกษตร

ชื่อผู้วิจัย 1. รองศาสตราจารย์ ดร. นิลวรรณ พงศ์ศิลป์ (หัวหน้าโครงการ)
คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร
2. ดร. อัจฉรา นันทกิจ (ผู้ร่วมวิจัย)
กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์

แหล่งทุนอุดหนุนการวิจัย งบประมาณแผ่นดินประจำปี 2555
สถาบันวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยศิลปากร

ปีที่เสร็จ พ.ศ. 2557

ประเภทการวิจัย การวิจัยประยุกต์

สาขาวิชา (อ้างอิงตามวช.) เกษตรศาสตร์และชีววิทยา

ส่วนที่ 2 บทคัดย่อ

เชื้อไรโซเปียมถั่วแดงหลวง 28 สายพันธุ์ มีรูปแบบ random amplified polymorphic DNA (RAPD) แตกต่างกัน และมีรูปแบบ two-primers RAPD (TP-RAPD) 11 รูปแบบ แสดงว่าเป็นเชื้อแบคทีเรีย 11 ชนิด (species) การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของยีน 16S rDNA พบว่าเชื้อไรโซเปียมถั่วแดงหลวงมีความใกล้เคียงกับเชื้อใน 3 สกุล (genus) ได้แก่ *Bradyrhizobium*, *Rhizobium* และ *Bacillus* โดยมีค่า % identity อยู่ระหว่าง 97%-99% การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของยีน *nodC* ของเชื้อ 2 สายพันธุ์ในกลุ่ม *Bacillus* แสดงว่าใกล้เคียงกับยีน *nodC* ของ *Rhizobium* และ *Mesorhizobium* โดยมีค่า % identity อยู่ระหว่าง 89%-100% ในการทดสอบการเกิดปม พบว่าน้ำหนักแห้งต้นพืช และค่า acetylene reduction activity (ARA) ของต้นพืชมีค่าเพิ่มขึ้นตั้งแต่ 2.39 ถึง 3.89 เท่า และ 5.00 ถึง 7.19 เท่า ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับต้นที่ไม่ได้ใส่เชื้อ เชื้อทุกสายพันธุ์แสดงคุณลักษณะเฉพาะตัวและมีความแตกต่างกันในการสังเคราะห์สารส่งเสริมการเจริญของพืช รูปแบบการสังเคราะห์เอนไซม์ urease ของ *Bradyrhizobium* spp. และ *Bacillus* sp. มีความแตกต่างกัน ในขณะที่กระบวนการ ammonification ของ *Bradyrhizobium* spp. และ *Bacillus* spp. มีรูปแบบเดียวกัน ปัจจัยต่างๆ ได้แก่ yeast extract, peptone, NH_4Cl , NaNO_3 , Ni และ Co มีผลต่อกิจกรรมของเอนไซม์ urease ของ *Bradyrhizobium* spp. และ *Bacillus* sp. แตกต่างกัน 0.2 mM Cu และ 0.2 mM Zn ลดกระบวนการ ammonification ของ *Bradyrhizobium* spp. และ *Bacillus* spp. จากการใส่เชื้อร่วมกันระหว่างเชื้อแบคทีเรียละลายฟอสเฟต *Bacillus* sp. PSP 011 กับเชื้อใดเชื้อหนึ่งของเชื้อไรโซเปียมถั่วแดงหลวงใน 3 สกุล พบว่าน้ำหนักแห้งต้นพืช, ค่า ARA และปริมาณฟอสฟอรัสในเนื้อเยื่อพืชของถั่วแดงหลวงที่ปลูกในสภาวะที่มีฟอสฟอรัสที่ไม่ละลายน้ำ เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเปรียบเทียบกับต้นที่ไม่ได้ใส่เชื้อ

คำสำคัญ : ไโรโซเปียมถั่วแดงหลวง; ลักษณะทางพันธุกรรม; ลักษณะทางชีวเคมี; แบคทีเรียละลายฟอสเฟต; การตรึงไนโตรเจนทางชีววิธี; ปริมาณฟอสฟอรัส; การใส่เชื้อหลายชนิดร่วมกัน; ยีน 16S ribosomal RNA (16S rDNA); random amplified polymorphic DNA (RAPD); two-primers RAPD (TP-RAPD)

ภาษาอังกฤษ

ส่วนที่ 1

Research Title Genetic Diversity of Rhizobia Nodulating *Phaseolus vulgaris* and Effects of Co-inoculation with Rhizobia and Phosphate-Solubilizing Bacteria on Agricultural Product Improvement

Researcher 1. Associate Professor Neelawan Pongsilp (Project Leader)

Faculty of Science, Silpakorn University

2. Dr. Achara Nuntagij (Co-Researcher)

Department of Agriculture, Ministry of Agriculture and Cooperatives

Research Grants Fiscal Year 2012

Research and Development Institute, Silpakorn University

Year of completion 2014

Type of research Applied research

Subjects (based NRCT) Agriculture and Biology

ส่วนที่ 2 Abstract (ไม่เกิน 250 คำ)

The 28 rhizobial strains nodulating *Phaseolus vulgaris* (red kidney bean) presented different random amplified polymorphic DNA (RAPD) profiles and 11 two-primers RAPD (TP-RAPD) profiles, indicating 11 bacterial species. The partial sequences of the 16S rDNA of these strains revealed that the strains were related to members of 3 distinct genera including *Bradyrhizobium*, *Rhizobium* and *Bacillus* with 97%-99% identity. The partial *nodC* gene of 2 strains of *Bacillus* showed 89%-100% identity with the *nodC* gene of *Rhizobium* and *Mesorhizobium*. In a nodulation test, plant dry weight and acetylene reduction activity (ARA) of plants were increased ranging from 2.39 to 3.89-fold and 5.00 to 7.19-fold, respectively, when compared to the uninoculated controls. All strains exhibited particular features and varied in their ability to produce plant-growth promoting substances. A different trend of urease production was observed between *Bradyrhizobium* spp. and *Bacillus* sp., while similar profiles were observed from ammonification of *Bradyrhizobium* spp. and *Bacillus* spp. Factors including yeast extract, peptone, NH₄Cl, NaNO₃, Ni and Co differently affected the activity of urease produced by *Bradyrhizobium* spp. and *Bacillus* spp. 0.2 mM Cu and 0.2 mM Zn reduced ammonification of *Bradyrhizobium* spp. and *Bacillus* spp. Co-inoculations of a phosphate solubilizing bacterium, *Bacillus* sp. PSP 011, with each of *P. vulgaris*-nodulating rhizobia in 3 different genera significantly increased plant dry weight, ARA and phosphorus content of

P. vulgaris grown in insoluble phosphorus supply as compared to the uninoculated controls.

Key words : rhizobia nodulating *Phaseolus vulgaris*; genotypic characteristic; biochemical characteristic; phosphate-solubilizing bacteria; biological nitrogen fixation; phosphorus content; co-inoculation; 16S ribosomal RNA gene (16S rDNA); random amplified polymorphic DNA (RAPD); two-primers RAPD (TP-RAPD)

สารบัญเรื่อง

	หน้า
บทนำ	1
คำสำคัญ (keyword)	2
ทฤษฎี สมมติฐาน และกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย	3
วิธีการดำเนินการวิจัย	5
ผลการวิจัยและวิจารณ์	11
สรุปผลการวิจัย	53
บรรณานุกรม	57
ประวัติและผลงานวิจัยที่สำคัญของนักวิจัย	70

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1: ลักษณะทางกายภาพ และลักษณะทางเคมีของตัวอย่างดินที่เก็บจากแปลงปลูกถั่วเขียวใน จ. สระบุรี	11
2: ลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ของเชื้อไรโซเปียมถั่วแดงหลวง	13
3: ผลการเปรียบเทียบ % identity ของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA จากเชื้อ ไรโซเปียมถั่วแดงหลวง	21
4: จำนวนปม, น้ำหนักปมแห้ง, น้ำหนักต้นแห้ง และค่า ARA ของถั่วแดงหลวงที่ได้รับการใส่เชื้อไรโซเปียมถั่วแดงหลวงแต่ละสายพันธุ์	23
5: ความต้านทานและความไวต่อสารปฏิชีวนะของเชื้อไรโซเปียมถั่วแดงหลวง	24
6: การเจริญของเชื้อไรโซเปียมถั่วแดงหลวงบนอาหาร BSM ดัดแปลงที่มีวิตามินแต่ละชนิด หลังจากบ่มที่ 30°C เป็นเวลา 5 วัน	26
7: ชนิดของวิตามินที่ต้องการสำหรับการเจริญของเชื้อไรโซเปียมถั่วแดงหลวงแต่ละสายพันธุ์	27
8: การเจริญของเชื้อไรโซเปียมถั่วแดงหลวงในอาหาร YMB ที่ระดับ pH และอุณหภูมิต่างๆ เซย่าที่อัตราเร็ว 200 rpm อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 1-5 วัน	29
9: การเจริญของเชื้อไรโซเปียมถั่วแดงหลวงในอาหาร YMB ที่มี Cd, Co, Cu และ Zn ที่ความเข้มข้น 50 µg/ml เซย่าที่อัตราเร็ว 200 rpm อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 1-5 วัน	30
10: ความเข้มข้นของ IAA, ซิเดอรโอฟอร์ประเภท catechol / hydroxamate และแอมโมเนีย ที่สังเคราะห์ได้จากเชื้อไรโซเปียมถั่วแดงหลวง	33
11: ค่า index ของการละลายฟอสเฟตบนอาหาร Pikovskaya ของเชื้อไรโซเปียมถั่วแดงหลวง หลังจากบ่มที่ 30°C เป็นเวลา 5 วัน	35
12: ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ phosphatase, urease และ protease ของเชื้อไรโซเปียม ถั่วแดงหลวง	38
13: จำนวนเซลล์ของเชื้อไรโซเปียมถั่วแดงหลวงที่เจริญในอาหาร BSM, อาหาร BSM ที่เติม สารสกัดจากดิน และอาหาร BSM ที่เติมสารสกัดจากเมล็ดถั่วแดงหลวง	51
14: จำนวนปม, น้ำหนักปมแห้ง, น้ำหนักต้นแห้ง และค่า ARA ของถั่วแดงหลวงที่ได้รับการ ใส่เชื้อไรโซเปียมถั่วแดงหลวงและการใส่เชื้อไรโซเปียมถั่วแดงหลวงร่วมกับเชื้อแบคทีเรีย ละลายฟอสเฟต	52

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
1: ปมรากของถั่วแดงหลวงที่เกิดจากการใส่เชื้อไรโซเปียม	12
2: dendrogram ที่สร้างจากรูปแบบ RAPD ของเชื้อไรโซเปียมถั่วแดงหลวง	15
3: รูปแบบ TP-RAPD ของเชื้อไรโซเปียมถั่วแดงหลวงและเชื้ออ้างอิง	18
4: การเจริญและกัมมันตภาพของเอนไซม์ urease ของเชื้อสายพันธุ์ PV 14 เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหาร Christensen's urea broth บ่มที่อุณหภูมิ 30°C และเขย่าที่อัตราเร็ว 200 rpm	39
5: การเจริญและกัมมันตภาพของเอนไซม์ urease ของเชื้อสายพันธุ์ DASA 02010 เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหาร Christensen's urea broth บ่มที่อุณหภูมิ 30°C และเขย่าที่อัตราเร็ว 200 rpm	40
6: การเจริญและกัมมันตภาพของเอนไซม์ urease ของเชื้อสายพันธุ์ DASA 02068 เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหาร Christensen's urea broth บ่มที่อุณหภูมิ 30°C และเขย่าที่อัตราเร็ว 200 rpm	40
7: การเจริญและค่ากัมมันตภาพของเอนไซม์ urease ของเชื้อสายพันธุ์ PV 14 เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหาร Christensen's urea broth ที่มีการเติมปัจจัยต่างๆ บ่มที่อุณหภูมิ 30°C และเขย่าที่อัตราเร็ว 200 rpm เป็นเวลา 3 วัน	42
8: การเจริญและค่ากัมมันตภาพของเอนไซม์ urease ของเชื้อสายพันธุ์ DASA 02010 เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหาร Christensen's urea broth ที่มีการเติมปัจจัยต่างๆ บ่มที่อุณหภูมิ 30°C และเขย่าที่อัตราเร็ว 200 rpm เป็นเวลา 5 วัน	42
9: การเจริญและค่ากัมมันตภาพของเอนไซม์ urease ของเชื้อสายพันธุ์ DASA 02068 เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหาร Christensen's urea broth ที่มีการเติมปัจจัยต่างๆ บ่มที่อุณหภูมิ 30°C และเขย่าที่อัตราเร็ว 200 rpm เป็นเวลา 5 วัน	43
10: การเจริญและความเข้มข้นของแอมโมเนียจากกระบวนการ ammonification ของเชื้อสายพันธุ์ PV 09 เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหาร peptone water บ่มที่อุณหภูมิ 30°C และเขย่าที่อัตราเร็ว 200 rpm	44
11: การเจริญและความเข้มข้นของแอมโมเนียจากกระบวนการ ammonification ของเชื้อสายพันธุ์ DASA 02009 เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหาร peptone water บ่มที่อุณหภูมิ 30°C และเขย่าที่อัตราเร็ว 200 rpm	44
12: การเจริญและความเข้มข้นของแอมโมเนียจากกระบวนการ ammonification ของเชื้อสายพันธุ์ DASA 02068 เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหาร peptone water บ่มที่อุณหภูมิ 30°C และเขย่าที่อัตราเร็ว 200 rpm	45
13: การเจริญและความเข้มข้นของแอมโมเนียจากกระบวนการ ammonification ของเชื้อสายพันธุ์ DASA 02077 เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหาร peptone water บ่มที่อุณหภูมิ 30°C และเขย่าที่อัตราเร็ว 200 rpm	45
14: การเจริญและความเข้มข้นของแอมโมเนียจากกระบวนการ ammonification ของเชื้อสายพันธุ์ DASA 06006 เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหาร peptone water บ่มที่อุณหภูมิ 30°C และเขย่าที่อัตราเร็ว 200 rpm	46

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
15: การเจริญและความเข้มข้นของแอมโมเนียจากกระบวนการ ammonification ของเชื้อสายพันธุ์ PV 09 เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหาร peptone water ที่มีการเติมปัจจัยต่างๆ บ่มที่อุณหภูมิ 30°C และเขย่าที่อัตราเร็ว 200 rpm เป็นเวลา 5 วัน	47
16: การเจริญและความเข้มข้นของแอมโมเนียจากกระบวนการ ammonification ของเชื้อสายพันธุ์ DASA 02009 เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหาร peptone water ที่มีการเติมปัจจัยต่างๆ บ่มที่อุณหภูมิ 30°C และเขย่าที่อัตราเร็ว 200 rpm เป็นเวลา 5 วัน	48
17: การเจริญและความเข้มข้นของแอมโมเนียจากกระบวนการ ammonification ของเชื้อสายพันธุ์ DASA 02068 เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหาร peptone water ที่มีการเติมปัจจัยต่างๆ บ่มที่อุณหภูมิ 30°C และเขย่าที่อัตราเร็ว 200 rpm เป็นเวลา 5 วัน	48
18: การเจริญและความเข้มข้นของแอมโมเนียจากกระบวนการ ammonification ของเชื้อสายพันธุ์ DASA 02077 เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหาร peptone water ที่มีการเติมปัจจัยต่างๆ บ่มที่อุณหภูมิ 30°C และเขย่าที่อัตราเร็ว 200 rpm เป็นเวลา 4 วัน	49
19: การเจริญและความเข้มข้นของแอมโมเนียจากกระบวนการ ammonification ของเชื้อสายพันธุ์ DASA 06006 เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหาร peptone water ที่มีการเติมปัจจัยต่างๆ บ่มที่อุณหภูมิ 30°C และเขย่าที่อัตราเร็ว 200 rpm เป็นเวลา 5 วัน	49

บทนำ

ถั่วแดงหลวง (red kidney bean; *Phaseolus vulgaris*) จัดเป็นธัญพืชซึ่งเป็นแหล่งอาหารที่สำคัญ เนื่องจากมีคุณค่าทางโภชนาการสูง, เป็นแหล่งโปรตีนที่สำคัญ และยังเป็นพืชที่ทำรายได้ให้ประเทศไทยได้ในระดับหนึ่ง ซึ่งในปัจจุบันมีความต้องการบริโภคถั่วแดงหลวงมากขึ้น แต่ผลผลิตที่ได้กลับไม่เพียงพอต่อความต้องการของผู้บริโภค เนื่องจากสภาพแวดล้อมที่เปลี่ยนแปลงไป และสภาพของดินในแหล่งเกษตรกรรมเสื่อมลง หลังจากมีการใช้ปุ๋ยเคมีในการเพาะปลูกสะสมมานาน

นอกจากการใช้ปุ๋ยเคมีแล้ว ยังมีการใส่เชื้อ (inoculate) แบคทีเรียกลุ่มไรโซเบียม (rhizobia) เพื่อตรึงไนโตรเจน (nitrogen; N) และเพิ่มผลผลิตทางการเกษตรของพืชตระกูลถั่ว แต่เนื่องจากเชื้อไรโซเบียมมีความจำเพาะ (specificity) ต่อพืชอาศัย และการใส่เชื้อไรโซเบียมเพียงชนิดเดียวอาจให้ผลดีต่อพืชเฉพาะการเพิ่มธาตุอาหารไนโตรเจน จากรายงานพบว่าการใส่เชื้อจุลินทรีย์มากกว่า 1 ชนิดร่วมกัน เพื่อให้เกิดผลดีต่อการเจริญของพืชในหลายด้าน ในปัจจุบันเริ่มนิยมการใส่เชื้อจุลินทรีย์หลายชนิดร่วมกัน เช่น การใส่เชื้อไรโซเบียมร่วมกับเชื้อจุลินทรีย์ละลายฟอสเฟต (phosphate-solubilizing microorganism) จากการทดลองของ Ravindar and Chandra (2008) พบว่าการใส่เชื้อ *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* (ไอโซเลท LB-4) และ *Bacillus megaterium* ซึ่งเป็นแบคทีเรียละลายฟอสเฟต (phosphate-solubilizing bacteria; PSB) ส่งผลให้พืชตระกูลถั่วมีการดูดซึมธาตุไนโตรเจน และฟอสฟอรัส (phosphorus; P) มากขึ้น และยังพบว่าการเกิดปม และเพิ่มน้ำหนักแห้งของต้นพืชมากขึ้นกว่าการใส่เชื้อเพียงชนิดเดียว นอกจากนี้ ยังมีแนวทางการใส่เชื้อไรโซเบียมร่วมกับจุลินทรีย์ทนเกลือ หรือการใส่เชื้อไรโซเบียมร่วมกับเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ (antagonistic microorganism) ที่ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคพืช เป็นต้น พบว่าการใส่เชื้อจุลินทรีย์หลายชนิดร่วมกันดังกล่าว สามารถส่งเสริมให้พืชเจริญได้ในดินเค็ม หรือ ช่วยกำจัดเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคพืช โดยการสังเคราะห์สารปฏิชีวนะ หรือสารกลุ่มอื่นๆ

โครงการวิจัยนี้ เป็นการศึกษาเพื่อแยกเชื้อไรโซเบียมถั่วแดงหลวงจากตัวอย่างดินและปมราก รวมทั้งคัดเลือกสายพันธุ์ของเชื้อไรโซเบียมถั่วแดงหลวง โดยศึกษาลักษณะทางกายภาพและลักษณะชีวเคมี ซึ่งประกอบด้วย 1) ความต้านทานของเชื้อต่อสารปฏิชีวนะและโลหะหนัก 2) ความต้องการวิตามินในการเจริญ 3) สภาวะที่มีผลต่อการเจริญของเชื้อ 4) การสังเคราะห์กรดอินโดล อะซิติก (indole acetic acid; IAA), ซิเดอโรฟอร์ (siderophore) และแอมโมเนีย (ammonia; NH_3) 5) ความสามารถในการละลายฟอสเฟต 6) การสังเคราะห์เอนไซม์ ได้แก่ เอนไซม์ฟอสฟาเตส (phosphatase), เอนไซม์ยูรีเอส (urease) และ เอนไซม์โปรตีเอส (protease) 7) ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญ, กิจกรรมของเอนไซม์ urease และการสังเคราะห์แอมโมเนีย 8) ผลของสารสกัดจากดินและสารสกัดจากเมล็ดถั่วแดงหลวงต่อการเจริญของเชื้อ นอกจากนี้ ยังได้ศึกษาลักษณะทางพันธุกรรม ซึ่งประกอบด้วย 1) ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (DNA fingerprint) จากเทคนิค random amplified polymorphic DNA (RAPD) 2) การจัดกลุ่มชนิด (species) ของเชื้อด้วยเทคนิค two-primers RAPD (TP-RAPD) 3) รูปแบบของพลาสมิด (plasmid) 4) การระบุสกุล (genus) โดยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ (nucleotide) ของยีน 16S ribosomal RNA (16S rDNA) ในด้านการส่งเสริมการเจริญของพืช ได้ทำการทดสอบประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจนของเชื้อไรโซเบียมถั่วแดงหลวง และผลของการใช้เชื้อไรโซเบียมถั่วแดงหลวงร่วมกับเชื้อแบคทีเรียละลายฟอสเฟตต่อการตรึง

ไนโตรเจน, การเพิ่มผลผลิตของพืช และปริมาณฟอสฟอรัสในเนื้อเยื่อพืช ซึ่งเชื้อที่มีประสิทธิภาพจะถูกนำไปใช้ในเพิ่มผลผลิตทางการเกษตรต่อไป

ทฤษฎี สมมติฐาน และกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย

ดินบริเวณรอบรากพืช (rhizosphere) เป็นดินบริเวณที่ได้รับอิทธิพลจากสารที่ปลดปล่อยจากราก (root exudate) ใน root exudate ประกอบด้วยสารประกอบหลากหลายชนิด เช่น น้ำตาล, กรดอะมิโน, กรดอินทรีย์, กรดไขมัน, สารส่งเสริมการเจริญเติบโต, เอนไซม์ และสารประกอบอื่นๆ สันนิษฐานว่า สารประกอบต่างๆ เหล่านี้ มีผลต่อจำนวนและความหลากหลายของประชากรแบคทีเรีย โดยอาจเพิ่มจำนวนและความหลากหลายของแบคทีเรีย เนื่องจากมีสารอาหารที่อุดมสมบูรณ์ต่อการเจริญของแบคทีเรีย หรืออาจเป็นปัจจัยจำกัดการเจริญ และลดความหลากหลายของประชากรแบคทีเรีย เนื่องจากการคัดเลือกเฉพาะเชื้อแบคทีเรียที่สามารถใช้สารอาหารเหล่านั้นได้ (Coutinho et al. 1999; Lemanceau et al. 1995; Nannipieri et al. 2008) ในการใช้เชื้อไรโซเปียมเพื่อเพิ่มผลผลิตพืชในสภาวะแวดล้อมต่างๆ ปัจจัยเหล่านี้ย่อมมีผลต่อการอยู่รอด รวมถึงประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจนของเชื้อไรโซเปียม ในการศึกษาครั้งนี้ จึงสนใจที่จะทำการศึกษาลักษณะของเชื้อไรโซเปียมที่เกิดปมและตรึงไนโตรเจนกับถั่วแดง-หลวง ทั้งลักษณะทางชีวเคมี ได้แก่ ความต้านทานต่อสารปฏิชีวนะ, ความต้องการวิตามินในการเจริญ, ความต้านทานต่อโลหะหนัก, การเจริญที่ระดับ pH และอุณหภูมิต่างๆ, การสังเคราะห์ IAA, ซิเดอรโอโพร และแอมโมเนีย, ความสามารถในการละลายฟอสเฟต, การสังเคราะห์เอนไซม์ต่างๆ รวมถึงความต้านทานต่อสารสกัดจากดินและสารสกัดจากเมล็ด ข้อมูลเหล่านี้จะมีประโยชน์ในการพิจารณาการใช้เชื้อไรโซเปียม ถั่วแดงหลวงในสภาวะแวดล้อมที่แตกต่างกัน การศึกษาการสังเคราะห์ซิเดอรโอโพรและการสังเคราะห์เอนไซม์ชนิดต่างๆ ได้แก่ เอนไซม์ phosphatase, เอนไซม์ urease และ เอนไซม์ protease จะทำให้ได้ข้อมูลที่น่าไปประยุกต์ใช้เชื้อในรูปแบบอื่นๆ เช่น การสังเคราะห์ซิเดอรโอโพรเป็นคุณลักษณะที่สำคัญประการหนึ่งของการใช้เชื้อจุลินทรีย์ในการควบคุมจุลินทรีย์ก่อโรคพืชทางชีววิธี (Bar-Ness et al. 1991; Compant et al. 2010) การสังเคราะห์เอนไซม์ phosphatase เป็นกระบวนการสำคัญของการละลายฟอสเฟตให้อยู่ในรูปที่พืชสามารถนำไปใช้ได้ (Ponmurugan and Gopi 2006) เอนไซม์ urease ย่อยสลายยูเรีย (urea) ได้แอมโมเนียซึ่งเป็นแหล่งไนโตรเจนสำหรับพืช และเอนไซม์ protease ย่อยสลายโปรตีนได้กรดอะมิโนซึ่งพืชสามารถนำไปใช้ได้ ดังนั้นเอนไซม์เหล่านี้จึงมีความสำคัญต่อการย่อยสลายสารตั้งต้นชนิดต่างๆ ซึ่งจะได้สารผลิตภัณฑ์เป็นแหล่งอาหารสำหรับพืช การสังเคราะห์ฮอร์โมนพืชสามารถเพิ่มการเจริญของพืชได้เช่นกัน IAA มีบทบาทในกระบวนการทางสรีรวิทยาของพืช เช่น กระตุ้นการเพิ่มจำนวนราก, การแบ่งเซลล์ และการเจริญของต้น (Davies 1995; Lambrecht et al. 2000) Nimnoi and Pongsilp (2009) ทำการแยกเชื้อแบคทีเรียสังเคราะห์ IAA และศึกษาผลของการใช้เชื้อแบคทีเรียสังเคราะห์ IAA ต่อการเจริญของพืช พบว่าสามารถเพิ่มน้ำหนักของต้นและรากของต้นคะน้า (*Brassica oleraceae*) และต้นผักกาดหัว (*Raphanus sativus*) ได้ถึง 2.95- 5.63 เท่าของต้นที่ไม่ได้รับการใส่เชื้อ และเทียบเท่าต้นที่ได้รับ IAA สังเคราะห์ ในการศึกษาลักษณะทางพันธุกรรม จะสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอและประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อไรโซเปียมถั่วแดงหลวง, การจัดกลุ่มชนิดของเชื้อ รวมถึงระบุสกุลของเชื้อที่แยกได้ จากรายงานที่มีมาก่อน พบว่าไรโซเปียมถั่วแดงหลวงมีความหลากหลายทางอนุกรมวิธาน (taxonomy) เป็นอย่างมาก พบว่ามีถึง 34 ชนิด ใน 11 สกุล ดังนั้นจึงน่าสนใจที่จะระบุสกุลของเชื้อไรโซเปียมถั่วแดงหลวงที่มีถิ่นกำเนิดในประเทศไทย และยังมีความเป็นไปได้ที่จะพบเชื้อไรโซเปียมถั่วแดงหลวงในสกุลอื่นๆ ซึ่งจะแสดงถึงกลไกการปรับตัวหรือการถ่ายโอนยีนในธรรมชาติ สำหรับการเพิ่มผลผลิตพืชจากการใช้เชื้อไรโซเปียม นอกจากการตรึงไนโตรเจนซึ่งเป็นบทบาทสำคัญของเชื้อไรโซเปียมแล้วยังสนใจที่จะใช้เชื้อแบคทีเรียในการเพิ่มธาตุอาหารฟอสฟอรัส เนื่องจากฟอสฟอรัสจัดเป็นธาตุอาหารหลัก

อีกชนิดหนึ่งของพืช แต่มักมีปัญหาในการใช้ปุ๋ยฟอสเฟต เนื่องจากในดิน ฟอสเฟตจะรวมตัวกับธาตุอื่นๆ ในดิน เช่น แคลเซียม (calcium; Ca), เหล็ก (iron; Fe) และอลูมิเนียม (aluminium; Al) เกิดเป็นสารประกอบที่ไม่ละลายน้ำ พืชจึงไม่สามารถนำธาตุฟอสฟอรัสไปใช้ได้ จึงเป็นปัจจัยที่จำกัดการเจริญของพืช (Ponmurugan and Gopi 2006) ในโครงการวิจัยนี้จะได้ทดสอบการใส่เชื้อไรโซเบียมถั่วแดงหลวงร่วมกับแบคทีเรียละลายฟอสเฟตในสภาวะที่ขาดแคลนฟอสฟอรัส เพื่อประเมินประสิทธิภาพของการตรึงไนโตรเจน, ผลผลิตพืช และปริมาณฟอสฟอรัสในเนื้อเยื่อพืช จากรายงานของ Pantujit and Pongsilp (2010) ซึ่งทำการคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียละลายฟอสเฟต พบว่าเชื้อแบคทีเรียละลายฟอสเฟตหลายสายพันธุ์สามารถเพิ่มผลผลิต และปริมาณฟอสฟอรัสในข้าวโพดที่ปลูกในสภาวะที่ขาดแคลนฟอสฟอรัสได้ ดังนั้น คาดว่าการใช้เชื้อไรโซเบียมถั่วแดงหลวงร่วมกับแบคทีเรียละลายฟอสเฟตนี้ จะส่งผลให้พืชได้รับธาตุอาหารหลัก ทั้งไนโตรเจนและฟอสฟอรัสเพื่อเพิ่มผลผลิตให้แก่พืช และขยายขอบเขตการประยุกต์ใช้เกษตรกรอินทรีย์

วิธีการดำเนินการวิจัย

1. การเก็บตัวอย่างดิน และการวิเคราะห์ลักษณะทางกายภาพและลักษณะทางเคมีของตัวอย่างดิน

เก็บตัวอย่างดินจากแปลงปลูกถั่วเขียว (*mungbean*; *Vigna radiata*) จาก จ. สระบุรี มาวิเคราะห์ลักษณะทางกายภาพและลักษณะทางเคมีของดิน ได้แก่ การวัดค่า pH ของดิน ตามวิธีการของ Renshaw et al. (2003), การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ alkaline phosphatase ตามวิธีการของ Eivazi and Tabatabai (1977), การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ urease ตามวิธีการของ Pongsilp et al. (2012) และการตรวจหาเอนไซม์ 19 ชนิดในดิน โดยใช้ชุดวิเคราะห์ Api[®] Zym enzymatic quantification test (BioMerieux, Marcy-L'Etoile, France) ตามที่บรรยายโดย Pongsilp et al. (2012)

2. การแยกเชื้อไรโซเบียมถั่วแดงหลวงจากตัวอย่างดินและจากปมรากพืชตระกูลถั่ว

แยกเชื้อไรโซเบียมจากตัวอย่างดิน โดยชั่งดิน 10 กรัม เติมน้ำละลาย 0.2% sodium pyrophosphate ($\text{Na}_2\text{P}_2\text{O}_7$) (pH 8.5) ปริมาตร 100 มล. จากนั้นเขย่าโดยใช้เครื่องเขย่า (shaker) ที่อัตราเร็ว 200 รอบต่อนาที (rpm) เป็นเวลา 30 นาที เหยี่ยงปั่นที่อัตราเร็ว 600 rpm เป็นเวลา 5 นาที หลังจากนั้นนำส่วน supernatant มาทำ serial dilution เพื่อประเมินจำนวนเชื้อไรโซเบียมถั่วแดงหลวงโดยวิธี Most Probable Number (MPN) ปิเปตสารแขวนลอยดิน (soil suspension) ลงบนรากของเมล็ดถั่วแดงหลวง ซึ่งปลูกใน growth pouch ที่เติมน้ำอาหารพืชที่ไม่มีไนโตรเจน (nitrogen-free nutrient solution) ปลูกพืชเป็นเวลา 3-4 สัปดาห์ นับจำนวนต้นที่เกิดปม และเทียบหาจำนวนเชื้อไรโซเบียมถั่วแดงหลวงต่อกรัมดินจากตาราง MPN (Somasegaran and Hoben 1994) จากนั้นจึงแยกเชื้อไรโซเบียมจากปมรากถั่วแดงหลวงที่เกิดขึ้น รวมทั้งแยกเชื้อไรโซเบียมจากปมรากถั่วแดงหลวงและถั่วเขียวที่เก็บจากแหล่งพื้นที่ตามธรรมชาติ ตามวิธีการของ Somasegaran and Hoben (1994) ทดสอบการเกิดปมของเชื้อที่แยกได้กับถั่วแดงหลวง บันทึกการเกิดปม เปรียบเทียบกับ negative control ที่ไม่ได้ใส่เชื้อ คัดเลือกเชื้อที่เกิดปมมาศึกษาลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ได้แก่ รูปร่างของเซลล์, การติดสีแกรม (Gram staining), การติดสีแกรมเอนโดสปอร์ (endospore) และการติดสีแกรม carbol fuchsin เก็บเชื้อไรโซเบียมถั่วแดงหลวงในอาหาร yeast mannitol agar (YMA) (Keele et al. 1969) ที่อุณหภูมิ 4°C และใน 20% glycerol ที่อุณหภูมิ -80°C

3. การศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเชื้อไรโซเบียมถั่วแดงหลวงด้วยเทคนิค RAPD

นำเชื้อไรโซเบียมถั่วแดงหลวงมาเลี้ยงในอาหาร yeast mannitol broth (YMB) เขย่าที่อัตราเร็ว 200 rpm อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 1-5 วัน ให้เจริญถึงระยะ mid-log phase เหยี่ยงปั่นที่อัตราเร็ว 6,000 rpm เก็บตะกอนเซลล์ จากนั้นสกัด total genomic DNA โดยใช้ Wizard[®] genomic DNA purification kit (Promega, Madison, WI) นำ total genomic DNA ที่สกัดได้ มาทำการวิเคราะห์ RAPD โดยใช้ arbitrary primer 1 สาย คือ primer 2 (5' GTT TCG CTC C 3') (Nuntagij et al. 1997) หลังจากนั้นตรวจผลของปฏิกิริยา polymerase chain reaction (PCR) ใน 1% agarose gel electrophoresis นำ

รูปแบบ RAPD มาสร้าง dendrogram โดยใช้โปรแกรม Image Master 1D Elite Software version 5.20 (Amersham, Buckinghamshire, UK) ตามวิธีการที่บรรยายโดย Nimnoi et al. (2010); Nimnoi and Pongsilp (2009); Pongsilp et al. (2012); Pongsilp and Nuntagij (2009) คัดเลือกเชื้อโรโซเปียมถั่วแดงหลวงที่มีรูปแบบ RAPD แตกต่างกัน เพื่อใช้ศึกษาในขั้นตอนต่อไป

4. การจัดกลุ่มชนิดของเชื้อโรโซเปียมถั่วแดงหลวงด้วยเทคนิค TP-RAPD

นำ total genomic DNA ของเชื้อโรโซเปียมถั่วแดงหลวง มาวิเคราะห์รูปแบบ TP-RAPD ซึ่งเป็นรูปแบบเฉพาะสำหรับเชื้อแต่ละชนิด โดยใช้ primer 1 คู่ ได้แก่ 8F (5' AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG 3') และ 1522R (5' AAG GAG GTG ATC CAN CCR CA 3') (R = C/T; N = A/G/C/T) ตามวิธีการที่บรรยายโดย Rivas et al. (2002) หลังจากนั้นตรวจสอบผลของปฏิกิริยา PCR ใน 1% agarose gel electrophoresis

5. การศึกษารูปแบบพลาสมิดของเชื้อโรโซเปียมถั่วแดงหลวง

นำเชื้อโรโซเปียมถั่วแดงหลวงมาเลี้ยงในอาหาร YMB เขย่าที่อัตราเร็ว 200 rpm อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 1-5 วัน ให้เจริญถึงระยะ mid-log phase เหยี่ยงปั่นที่อัตราเร็ว 6,000 rpm เก็บตะกอนเซลล์จากนั้นสกัดพลาสมิดโดยใช้ GF-1 plasmid extraction kit (Vivantis, Selangor Darul Ehsan, Malaysia) ตรวจสอบรูปแบบของพลาสมิดใน 1.0% agarose gel electrophoresis

6. การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA ของเชื้อโรโซเปียมถั่วแดงหลวง

นำ total genomic DNA ของเชื้อโรโซเปียมถั่วแดงหลวง มาทำการเพิ่มจำนวนยีน 16S rDNA โดยใช้ primer 1 คู่ ได้แก่ Un 16S 926f (5' AAA CTY AAA KGA ATT GAC GG 3') และ Un 16S 1392r (5' ACG GGC GGT GTG TRC 3') (Y = C/T; K = G/T; R = A/G) (Lane 1991) โดยเทคนิค PCR หลังจากนั้นตรวจสอบผลของปฏิกิริยา PCR ใน 1% agarose gel electrophoresis ทำการสกัดแถบดีเอ็นเอ (band) ขนาดประมาณ 500 คู่เบส (base pairs; bp) ออกจาก agarose โดยใช้ QIA quick gel extraction kit (Qiagen, Valencia, CA) นำแถบดีเอ็นเอที่แยกได้มาทำการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA (BioBasic Inc., Markham, Canada) และทำการเปรียบเทียบ (alignment) กับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูลของ GenBank (National Center for Biotechnology Information; NCBI) โดยใช้โปรแกรม BLASTN (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)

7. การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *nodC* ของเชื้อโรโซเปียมถั่วแดงหลวง

นำ total genomic DNA ของเชื้อโรโซเปียมถั่วแดงหลวง มาทำการเพิ่มจำนวนยีน *nodC* โดยใช้ primer 1 คู่ ได้แก่ *nodCF* (5' AYG THG TYG AYG ACG GTT 3') และ *nodCI* (5' CGY GAC AGC CAN TCK CTA TTG3') (Y = C/T; H = A/C/T K = G/T; N = A/G/C/T) (Laguerre et al. 2001) โดยเทคนิค PCR หลังจากนั้นตรวจสอบผลของปฏิกิริยา PCR ใน 1% agarose gel electrophoresis (Pongsilp

et al. 2002) ทำการสกัดแอมป์ดีเอ็นเอขนาดประมาณ 930 bp ออกจาก agarose โดยใช้ QIA quick gel extraction kit (Qiagen, Valencia, CA) นำแอมป์ดีเอ็นเอที่แยกได้มาทำการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *nodC* (BioBasic Inc., Markham, Canada) และเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูลของ GenBank โดยใช้โปรแกรม BLASTN (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)

8. การประเมินประสิทธิภาพในการตรึงไนโตรเจนของเชื้อไรโซเบียมถั่วแดงหลวง

ทำการฆ่าเชื้อที่ผิวเมล็ดถั่วแดงหลวง เพาะเมล็ดบนจานสำลีที่ชุ่มน้ำให้งอกราก จากนั้นนำเมล็ดที่งอกรากมาเพาะในถุง growth pouch เติมน้ำอาหารพืชที่ไม่มีไนโตรเจน แล้วจึงใส่สารแขวนลอยเชื้อ (cell suspension) ปริมาตร 1 มล. ต่อเมล็ด ปลูกพืชเป็นเวลา 3-4 สัปดาห์ เมื่อครบกำหนด บันทึกจำนวนปมที่เกิดขึ้น, ชั่งน้ำหนักแห้งของปมและต้นพืช รวมทั้งวิเคราะห์ประสิทธิภาพในการตรึงไนโตรเจนโดยวิธีการ acetylene reduction assay (ARA) (Somasegaran and Hoben 1994)

9. การศึกษาลักษณะทางสรีระวิทยา และลักษณะทางชีวเคมีของเชื้อไรโซเบียมถั่วแดงหลวง

ทำการศึกษาลักษณะทางสรีระวิทยา และลักษณะทางชีวเคมีของเชื้อไรโซเบียมถั่วแดงหลวง ได้แก่ 1) ความต้านทานต่อสารปฏิชีวนะ 10 ชนิด ได้แก่ ampicillin, chloramphenicol, cefotaxime, ceftazidime, gentamicin, kanamycin, novobiocin, spectinomycin, streptomycin และ tetracycline 2) ความต้องการวิตามิน 8 ชนิด ได้แก่ ascorbic acid (vitamin C), biotin (vitamin B7), folic acid (vitamin B9), myo-inositol (vitamin B8), nicotinic acid (vitamin B3), calcium panthothenate (vitamin B5), riboflavin (vitamin B2) และ thiamine hydrochloride (vitamin B1) 3) การเจริญในอาหาร YMB ที่ pH 5.0, 6.5 และ 8.0 4) การเจริญในอาหาร YMB ที่อุณหภูมิ 20°C, 30°C และ 40°C 5) ความต้านทานต่อโลหะหนัก 4 ชนิด ได้แก่ แคดเมียม (cadmium; Cd), โคบอลต์ (cobalt; Co), ทองแดง (copper; Cu) และสังกะสี (zinc; Zn) ที่ความเข้มข้น 50 µg/ml 6) การสังเคราะห์ IAA 7) การสังเคราะห์ซีเตอร์โรฟอร์ประเภท catechol และ hydroxamate 8) การสังเคราะห์แอมโมเนีย 9) ความสามารถในการละลายฟอสเฟต 10) กิจกรรมของเอนไซม์ phosphatase 11) กิจกรรมของเอนไซม์ urease และ 12) กิจกรรมของเอนไซม์ protease สำหรับวิธีการทดลองในการศึกษาลักษณะทางสรีระวิทยา และลักษณะทางชีวเคมีดำเนินการตามที่บรรยายโดย Leelahawong et al. (2010); Nimnoi et al. (2010); Nimnoi and Pongsilp (2009); Pantujit and Pongsilp (2010); Pongsilp et al. (2012); Pongsilp et al. (2010); Pongsilp and Leelahawong (2010); Pongsilp and Nuntagij (2007)

10. การทดสอบผลของปัจจัยต่างๆ ต่อการเจริญ และกิจกรรมของเอนไซม์ urease ของเชื้อไรโซเบียมถั่วแดงหลวง

คัดเลือกเชื้อที่มีกิจกรรมของเอนไซม์ urease จำนวน 3 สายพันธุ์ มาทำการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ urease ควบคู่กับการเจริญ โดยเลี้ยงเชื้อให้เจริญในอาหาร YMB เพื่อใช้เป็นก้ำเชื้อ (inoculum) แล้วนับจำนวนเซลล์โดยวิธี standard total plate count ปิเปต inoculum ลงในอาหาร Christensen's

urea broth (Christensen 1946) กำหนดปริมาณเชื้อเริ่มต้นเท่ากับ 1.00×10^5 colony forming unit (CFU)/ml เชย้าที่อัตราเร็ว 200 rpm อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 5 วัน ในแต่ละวัน วัดกิจกรรมของเอนไซม์ urease และนับจำนวนเซลล์โดยวิธี standard total plate count ในการวัดกิจกรรมของเอนไซม์ urease ปิเปตสารแขวนลอยเซลล์ 1 มล. ใส่ eppendorf แล้วเหวี่ยงปั่นที่อัตราเร็ว 10,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที นำ supernatant มาวัดปริมาณแอมโมเนียก่อนและหลังบ่มกับ urea ที่ 37°C เป็นเวลา 3 ชั่วโมง โดยทำปฏิกิริยากับ citrate buffer (pH 6.7), สารละลาย sodium phenolate และสารละลาย 0.9% sodium hypochlorite วัดค่าการดูดกลืนแสง (absorbance) ที่ 578 นาโนเมตร (nanometer; nm) แล้วหาปริมาณแอมโมเนีย (หน่วยเป็น $\mu\text{g}/\text{ml}$ supernatant) จากกราฟมาตรฐาน (standard curve) (Chuntanom and Pongsilp 2011) ได้ปริมาณของแอมโมเนียที่เกิดขึ้นจากกิจกรรมของเอนไซม์ urease ระหว่างการบ่ม และคำนวณค่ากิจกรรมของเอนไซม์ urease หน่วยเป็น unit/ml supernatant (Starnes et al. 1984) ในการศึกษาผลของปัจจัยต่างๆ ต่อการเจริญ และกิจกรรมของเอนไซม์ urease ทำการวิเคราะห์โดยปิเปต inoculum ลงในอาหาร Christensen's urea broth ที่มีการเติมปัจจัยต่างๆ ได้แก่ ชนิดของสารประกอบไนโตรเจน [yeast extract (1 กรัม/ลิตร); peptone (5 กรัม/ลิตร); ammonium chloride (NH_4Cl) (10 mM); sodium nitrate (NaNO_3) (10 mM)] และโลหะหนัก [นิกเกิล (nickel; Ni) (0.1 mM) และ Co (0.1 mM)] กำหนดปริมาณเชื้อเริ่มต้นเท่ากับ 1.00×10^5 CFU/ml เชย้าที่อัตราเร็ว 200 rpm อุณหภูมิ 30°C วัดกิจกรรมของเอนไซม์ urease ในวันที่เชื้อมีกิจกรรมของเอนไซม์ urease สูงสุด และนับจำนวนเซลล์โดยวิธี standard total plate count เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่มีการเติมปัจจัยต่างๆ (control)

11. การทดสอบผลของปัจจัยต่างๆ ต่อการเจริญ และการสังเคราะห์แอมโมเนียของเชื้อไรโซเบียม ถั่วแดงหลวง

คัดเลือกเชื้อที่มีการสังเคราะห์แอมโมเนีย จำนวน 5 สายพันธุ์ มาทำการวิเคราะห์การสังเคราะห์แอมโมเนียควบคู่กับการเจริญ โดยเลี้ยงเชื้อให้เจริญในอาหาร YMB เพื่อใช้เป็น inoculum แล้วนับจำนวนเซลล์โดยวิธี standard total plate count ปิเปต inoculum ลงในอาหาร peptone broth กำหนดปริมาณเชื้อเริ่มต้นเท่ากับ 1.00×10^5 CFU/ml เชย้าที่อัตราเร็ว 200 rpm อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 5 วัน ในแต่ละวัน วัดปริมาณแอมโมเนียในอาหารเลี้ยงเชื้อ และนับจำนวนเซลล์โดยวิธี standard total plate count ในการวัดปริมาณแอมโมเนีย ปิเปตสารแขวนลอยเซลล์ 1 มล. ใส่ eppendorf เหวี่ยงปั่นที่อัตราเร็ว 10,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที นำ supernatant มาวัดปริมาณแอมโมเนีย จากการทำปฏิกิริยากับ Nessler's reagent วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 395 nm หาปริมาณแอมโมเนีย (หน่วยเป็น μM) จากกราฟมาตรฐาน (Cappucino and Sherman 1992; Liotenburg et al. 1996) ในการศึกษาผลของปัจจัยต่างๆ ต่อการเจริญ และการสังเคราะห์แอมโมเนีย ทำการวิเคราะห์โดยปิเปต inoculum ลงในอาหาร peptone broth ที่มีการเติมปัจจัยต่างๆ ได้แก่ โลหะหนัก Cu และ Zn ที่ระดับความเข้มข้น 0.2 mM และ 2.0 mM กำหนดปริมาณเชื้อเริ่มต้นเท่ากับ 1.00×10^5 CFU/ml เชย้าที่อัตราเร็ว 200 rpm อุณหภูมิ 30°C วัดปริมาณแอมโมเนียในวันที่เชื้อมีการสังเคราะห์แอมโมเนียสูงสุด และนับจำนวนเซลล์โดยวิธี standard total plate count เปรียบเทียบกับ control

12. การศึกษาผลของสารสกัดจากดิน และสารสกัดจากเมล็ดต่อการเจริญของเชื้อไรโซเบียม ถั่วแดงหลวง

คัดเลือกเชื้อตัวแทน จำนวน 2 สายพันธุ์ มาทำการศึกษาผลของสารสกัดจากดิน และสารสกัดจากเมล็ดต่อการเจริญของเชื้อ เตรียมสารสกัดจากดินโดยชั่งดิน 10 กรัม เติมน้ำ deionized water (DI) 100 มิลลิลิตร เขย่าที่อัตราเร็ว 180 rpm เป็นเวลา 30 นาที เหยี่ยงปั่นที่อัตราเร็ว 600 rpm เป็นเวลา 10 นาที ปิเปตส่วน supernatant ออก กรองจุลินทรีย์ออกจาก supernatant โดยใช้กระดาษกรอง ขนาดรูพรุน 0.45 ไมโครเมตร (micrometer; μm) (Tungao et al. 2012) เตรียมสารสกัดจากเมล็ดโดยอบเมล็ดโดยอบเมล็ดที่ 60°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ชั่งเมล็ด 20 กรัม แช่เมล็ดข้ามคืนในน้ำเย็นและ 80% ethanol ตามลำดับ ปิเปตส่วน supernatant ออก กรองจุลินทรีย์ออกจาก supernatant โดยใช้กระดาษกรอง ขนาดรูพรุน 0.45 μm (Iyawe et al. 2007) เลี้ยงเชื้อให้เจริญในอาหาร YMB เพื่อใช้เป็น inoculum แล้วนับจำนวนเซลล์โดยวิธี standard total plate count ปิเปต inoculum ลงในอาหาร Bergersen's synthetic medium (BSM) (Bergersen 1961), อาหาร BSM ที่เติมสารสกัดจากดินที่ทำให้ปลอดเชื้อโดยการกรอง และอาหาร BSM ที่เติมสารสกัดจากเมล็ดถั่วแดงหลวงที่ทำให้ปลอดเชื้อโดยการกรอง สำหรับสารสกัดจากดินนั้น ใช้ดิน 2 ตัวอย่าง ได้แก่ ดินบริเวณรอบรากถั่วแดงหลวง และดินที่ไม่ปลูกพืช (bulk soil) กำหนดปริมาณเชื้อเริ่มต้นเท่ากับ 1.00×10^5 CFU/ml เขย่าที่อัตราเร็ว 200 rpm อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 1-7 วัน ให้เจริญถึงระยะ late-log phase นับจำนวนเซลล์ของเชื้อโดยวิธี standard total plate count

13. การศึกษาผลของการใช้เชื้อไรโซเบียมถั่วแดงหลวงร่วมกับแบคทีเรียละลายฟอสเฟตต่อการ ตรึงไนโตรเจน และปริมาณฟอสฟอรัสในเนื้อเยื่อพืช

เลี้ยงเชื้อไรโซเบียมถั่วแดงหลวงในอาหาร YMB เขย่าที่อัตราเร็ว 200 rpm อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 1-5 วัน ให้เจริญถึงระยะ mid-log phase และเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียละลายฟอสเฟต *Bacillus* sp. PSP 011 (Pantujit and Pongsilp 2010) ในอาหาร nutrient broth (NB) เขย่าที่อัตราเร็ว 200 rpm อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 1 วัน เพาะเมล็ดถั่วแดงหลวงและปลูกใน growth pouch ตามวิธีการของ Somasegaran and Hoben (1994) โดยใส่เชื้อไรโซเบียมถั่วแดงหลวงร่วมกับ *Bacillus* sp. PSP 011 ทำการทดสอบเปรียบเทียบการปลูกถั่วแดงหลวงในสภาวะที่ไม่มีฟอสฟอรัส, สภาวะที่มีฟอสฟอรัสในรูปที่ไม่ละลายน้ำ และสภาวะที่มีฟอสฟอรัสในรูปที่ละลายน้ำ ปลูกพืชเป็นเวลา 3-4 สัปดาห์ เมื่อครบกำหนดบันทึกจำนวนปมที่เกิดขึ้น, ชั่งน้ำหนักแห้งของปมและต้นพืช, วิเคราะห์ประสิทธิภาพในการตรึงไนโตรเจนโดยวิธีการ ARA และวิเคราะห์ปริมาณฟอสฟอรัสในเนื้อเยื่อพืชโดยการทำปฏิกิริยากับ vanado molybdate reagent วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 420 nm หาปริมาณฟอสฟอรัสโดยเทียบกับกราฟมาตรฐานของ potassium dihydrogen phosphate (KH_2PO_4) คำนวณปริมาณฟอสฟอรัสในเนื้อเยื่อพืช (หน่วยเป็น part per million; ppm) (Pantujit and Pongsilp 2010; Tso and Chen 1997)

14. การวิเคราะห์ทางสถิติ

วิเคราะห์ค่าทางสถิติและความแตกต่างทางสถิติโดยใช้โปรแกรม SPSS version 16.0 (SPSS Inc., Chicago, IL)

ผลการวิจัยและวิจารณ์

1. การเก็บตัวอย่างดิน และการวิเคราะห์ลักษณะทางกายภาพและลักษณะทางเคมีของตัวอย่างดิน

จากการวัดค่า pH, การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ alkaline phosphatase และเอนไซม์ urease รวมถึงการตรวจสอบเอนไซม์ 19 ชนิด ในดินที่เก็บจากแปลงปลูกถั่วเขียวใน จ. สระบุรี ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1. ลักษณะทางกายภาพ และลักษณะทางเคมีของตัวอย่างดินที่เก็บจากแปลงปลูกถั่วเขียวใน จ. สระบุรี

ลักษณะทางกายภาพ และลักษณะทางเคมีของตัวอย่างดิน	ผลการวิเคราะห์
ค่า pH	7.63 ± 0.01
กิจกรรมของเอนไซม์ alkaline phosphatase	58.50 ± 2.10 milliunit/กรัม ดิน
กิจกรรมของเอนไซม์ urease	86.30 ± 15.64 unit/กรัม ดิน
การตรวจสอบเอนไซม์ 19 ชนิด	
alkaline phosphatase, esterase (C4) และ naphthol-AS-B1-phosphohydrolase	+(S)
acid phosphatases, N-acetyl-β-glucosaminidase, esterase lipase (C8), lipase (C14), cystine acrylamidase, leucine acrylamidase, valine acrylamidase, α-fucosidase, α-galactosidase, β-galactosidase, β-glucuronidase, α-glucosidase, β-glucosidase, α-mannosidase, trypsin และ α-chymotrypsin	-

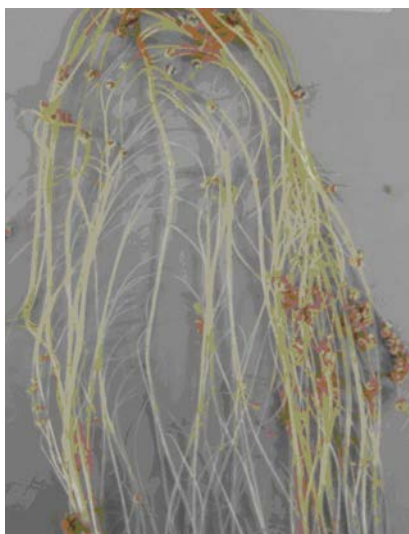
ค่าที่รายงานเป็นค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 ซ้ำ ± ค่า standard deviation

+(S): strong positive; -: negative

2. การแยกเชื้อไรโซเบียมถั่วแดงหลวงจากตัวอย่างดิน และจากปมรากพืชตระกูลถั่ว

จากการประเมินจำนวนเชื้อไรโซเบียมถั่วแดงหลวงในตัวอย่างดิน โดยวิธี MPN พบว่ามีจำนวนเชื้อไรโซเบียมถั่วแดงหลวงประมาณ 1.00×10^3 เซลล์/กรัมดิน แยกเชื้อไรโซเบียมจากตัวอย่างดิน และจากปมรากพืชตระกูลถั่ว ได้แก่ ถั่วแดงหลวง และถั่วเขียวที่เก็บได้จากแหล่งพื้นที่ตามธรรมชาติ ทำการทดสอบการเกิดปมของเชื้อที่แยกได้กับถั่วแดงหลวง (ปมรากของถั่วแดงหลวงแสดงในภาพที่ 1) และศึกษาลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ของเชื้อที่เกิดปมกับถั่วแดงหลวง จำนวน 28 ไอโซเลท (isolate) ซึ่งได้ผลดังแสดงในตารางที่ 2 เก็บเชื้อไรโซเบียมถั่วแดงหลวงในอาหาร yeast mannitol agar (YMA) (Keele et al. 1969)

ที่อุณหภูมิ 4°C และใน 20% glycerol ที่อุณหภูมิ -80°C ณ สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์



ภาพที่ 1. ปมรากของถั่วแดงหลวงที่เกิดจากการใส่เชื้อไรโซเปียม

3. การศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเชื้อไรโซเปียมถั่วแดงหลวงด้วยเทคนิค RAPD

จากการวิเคราะห์รูปแบบ RAPD ของเชื้อไรโซเปียมถั่วแดงหลวง พบว่าได้รูปแบบ RAPD 28 รูปแบบ มีจำนวนแถบดีเอ็นเอ (band) 1-8 แถบ มีขนาดตั้งแต่น้อยกว่า 500 bp - 3.0 กิโลเบส (kilobase: kb) สำหรับ dendrogram ที่สร้างจากรูปแบบ RAPD นั้น แสดงว่าเชื้อไรโซเปียมถั่วแดงหลวงความหลากหลายทางพันธุกรรมสูง เนื่องจากมีค่า % similarity น้อยกว่า 5% ดังแสดงในภาพที่ 2 เชื้อทุกไอโซเลทตาม dendrogram ในภาพที่ 2 มีรูปแบบ RAPD แตกต่างกัน แสดงว่าเป็นเชื้อต่างสายพันธุ์กัน ดังนั้น จึงคัดเลือกเชื้อ 28 สายพันธุ์ สำหรับใช้ในการศึกษาในขั้นตอนต่อไป

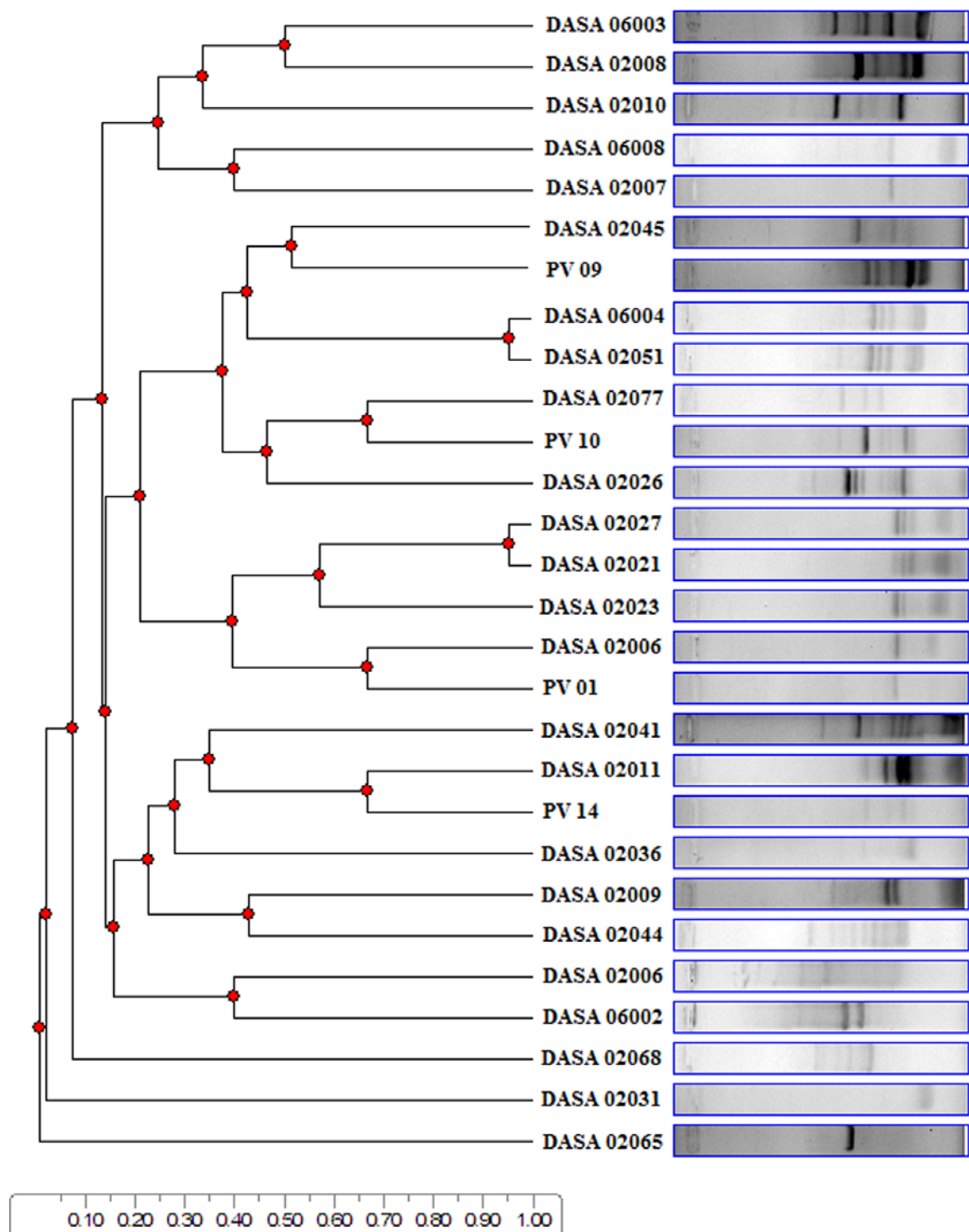
ตารางที่ 2. ลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ของเชื้อไรโซเปียมถั่วแดงหลวง

ไอโซเลท	แหล่งที่แยกเชื้อ	ลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์		
		รูปร่างและการติดสีย้อมแกรม	การติดสีย้อมเอนโดสปอร์	การติดสีย้อม carbol fuchsin
PV 01	ดินรอบรากถั่วเขียว	เป็นท่อน ติดสีแกรมบวก	มีเอนโดสปอร์	มี granule ของ PHB
PV 09	ดินรอบรากถั่วเขียว	เป็นท่อน ติดสีแกรมบวก	มีเอนโดสปอร์	มี granule ของ PHB
PV 10	ดินรอบรากถั่วเขียว	เป็นท่อน ติดสีแกรมบวก	มีเอนโดสปอร์	มี granule ของ PHB
PV 14	ดินรอบรากถั่วเขียว	เป็นท่อน ติดสีแกรมบวก	มีเอนโดสปอร์	มี granule ของ PHB
DASA 02006	ปมรากถั่วเขียว	เป็นท่อน ติดสีแกรมลบ	ไม่มีเอนโดสปอร์	มี granule ของ PHB
DASA 02007	ปมรากถั่วเขียว	เป็นท่อน ติดสีแกรมลบ	ไม่มีเอนโดสปอร์	มี granule ของ PHB
DASA 02008	ปมรากถั่วเขียว	เป็นท่อน ติดสีแกรมลบ	ไม่มีเอนโดสปอร์	มี granule ของ PHB
DASA 02009	ปมรากถั่วเขียว	เป็นท่อน ติดสีแกรมลบ	ไม่มีเอนโดสปอร์	มี granule ของ PHB
DASA 02010	ปมรากถั่วเขียว	เป็นท่อน ติดสีแกรมลบ	ไม่มีเอนโดสปอร์	มี granule ของ PHB
DASA 02011	ปมรากถั่วเขียว	เป็นท่อน ติดสีแกรมลบ	ไม่มีเอนโดสปอร์	มี granule ของ PHB
DASA 02021	ปมรากถั่วเขียว	เป็นท่อน ติดสีแกรมบวก	มีเอนโดสปอร์	มี granule ของ PHB
DASA 02023	ปมรากถั่วเขียว	เป็นท่อน ติดสีแกรมบวก	มีเอนโดสปอร์	มี granule ของ PHB
DASA 02026	ปมรากถั่วเขียว	เป็นท่อน ติดสีแกรมบวก	มีเอนโดสปอร์	มี granule ของ PHB
DASA 02027	ปมรากถั่วเขียว	เป็นท่อน ติดสีแกรมบวก	มีเอนโดสปอร์	มี granule ของ PHB
DASA 02031	ปมรากถั่วเขียว	เป็นท่อน ติดสีแกรมบวก	มีเอนโดสปอร์	มี granule ของ PHB
DASA 02036	ปมรากถั่วเขียว	เป็นท่อน ติดสีแกรมบวก	มีเอนโดสปอร์	มี granule ของ PHB
DASA 02041	ปมรากถั่วเขียว	เป็นท่อน ติดสีแกรมบวก	มีเอนโดสปอร์	มี granule ของ PHB
DASA 02044	ปมรากถั่วเขียว	เป็นท่อน ติดสีแกรมลบ	ไม่มีเอนโดสปอร์	มี granule ของ PHB
DASA 02045	ปมรากถั่วเขียว	เป็นท่อน ติดสีแกรมลบ	ไม่มีเอนโดสปอร์	มี granule ของ PHB

ตารางที่ 2. (ต่อ)

ไอโซเลท	แหล่งที่แยกเชื้อ	ลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์		
		รูปร่างและการติดสีแกรม	การติดสีเอนโดสปอร์	การติดสี carbol fuchsin
DASA 02051	ปมรากกล้วยเขียว	เป็นท่อน ติดสีแกรมบวก	มีเอนโดสปอร์	มี granule ของ PHB
DASA 02065	ปมรากกล้วยเขียว	เป็นท่อน ติดสีแกรมลบ	ไม่มีเอนโดสปอร์	มี granule ของ PHB
DASA 02068	ปมรากกล้วยเขียว	เป็นท่อน ติดสีแกรมลบ	ไม่มีเอนโดสปอร์	มี granule ของ PHB
DASA 02077	ปมรากกล้วยเขียว	เป็นท่อน ติดสีแกรมบวก	มีเอนโดสปอร์	มี granule ของ PHB
DASA 06002	ปมรากกล้วยแดงหลวง	เป็นท่อน ติดสีแกรมลบ	ไม่มีเอนโดสปอร์	มี granule ของ PHB
DASA 06003	ปมรากกล้วยแดงหลวง	เป็นท่อน ติดสีแกรมลบ	ไม่มีเอนโดสปอร์	มี granule ของ PHB
DASA 06004	ปมรากกล้วยแดงหลวง	เป็นท่อน ติดสีแกรมบวก	มีเอนโดสปอร์	มี granule ของ PHB
DASA 06006	ปมรากกล้วยแดงหลวง	เป็นท่อน ติดสีแกรมบวก	มีเอนโดสปอร์	มี granule ของ PHB
DASA 06008	ปมรากกล้วยแดงหลวง	เป็นท่อน ติดสีแกรมลบ	ไม่มีเอนโดสปอร์	มี granule ของ PHB

PHB: polyhydroxybutyrate



ภาพที่ 2. dendrogram ที่สร้างจากรูปแบบ RAPD ของเชื้อไวรัสเป็ยมีถั่วแดงหลวง

เทคนิค RAPD เป็นการใช้หลักการของ PCR ในการสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเชื้อแบคทีเรีย โดยใช้ arbitrary primer 1 สาย ขนาดประมาณ 8-12 bp ซึ่งไม่จำเพาะกับยีนใดๆ บนจีโนม (genome) ของเชื้อแบคทีเรีย และมีค่า guanine-cytosine (GC) ประมาณ 60%-70% arbitrary primer จะจับ (anneal) ดีเอ็นเอแม่แบบ (target DNA) บริเวณที่เป็นเบสคู่สม (complementary base) ต่อกัน การใช้ arbitrary primer 1 สาย ทำหน้าที่เป็นทั้ง forward primer และ reverse primer เป็นการเพิ่มโอกาสในการจับบน genome ของกลุ่มประชากรแบคทีเรียที่มีความหลากหลายทางอนุกรมวิธาน ในเทคนิค RAPD ยังใช้ annealing temperature ต่ำ ประมาณ 36°C เพื่อเพิ่มโอกาสที่ arbitrary primer เข้าจับกับ target DNA ที่ไม่ได้เป็นเบสคู่สมต่อกัน 100% ในช่วงการสังเคราะห์สายดีเอ็นเอ (elongation หรือ extension) จะเกิดการสังเคราะห์สายดีเอ็นเอบริเวณระหว่างกลางที่ primer เข้าจับสาย target DNA 2 สาย การที่เชื้อแบคทีเรียต่างสายพันธุ์มีลำดับนิวคลีโอไทด์บน genome แตกต่างกัน ทำให้ arbitrary primer เข้าจับ target DNA ที่ตำแหน่งต่างกัน และจำนวนของตำแหน่งที่ arbitrary primer เข้าจับแตกต่างกัน ส่งผลให้ได้ PCR product ที่มีจำนวนและขนาดของ PCR product แต่ละชิ้นแตกต่างกัน เมื่อแยกขนาดของ PCR product โดยวิธี gel electrophoresis จึงได้รูปแบบ RAPD ที่แตกต่างกัน (Pongsilp 2012) รูปแบบ RAPD สามารถใช้จำแนกความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์ของเชื้อแบคทีเรีย สำหรับเชื้อแบคทีเรียกลุ่มไรโซเบียมมีการใช้รูปแบบ RAPD ในการประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรม ตัวอย่างเช่น ไรโซเบียมจากปมรากของพืชสมุนไพรรไทย 3 ชนิด ได้แก่ *Derris elliptica* (โลตัส หรือ หางไหล), *Indigofera tinctoria* (คราม) และ *Pueraria mirifica* (กวาวเครือขาว) (Pongsilp and Nuntagij 2009), *Bradyrhizobium* spp. (Lunge et al. 1994; Nishi et al. 1996; Nuntagij et al. 1997; Pongsilp and Nuntagij 2009), *Ensifer meliloti* (ชื่อเดิม *Rhizobium meliloti*) (Pafetti et al. 1996), *Rhi. leguminosarum* (de Oliveira et al. 2000), *Rhizobium tropici* (de Oliveira et al. 2000; Valverde et al. 2011), *Rhizobium lusitanum* (Valverde et al. 2011) และ *Mesorhizobium* spp. (Rivas et al. 2006)

4. การจัดกลุ่มชนิดของเชื้อไรโซเบียมถั่วแดงหลวงด้วยเทคนิค TP-RAPD

จากการวิเคราะห์รูปแบบ TP-RAPD ของเชื้อไรโซเบียมถั่วแดงหลวง 28 สายพันธุ์ ซึ่งพบว่ามีรูปแบบ TP-RAPD 11 รูปแบบ และเชื้ออ้างอิง (reference strain) 4 ชนิด ได้แก่ *Bradyrhizobium japonicum* USDA 110, *Ensifer fredii* USDA 205, *Bacillus subtilis* และ *Bacillus cereus* รูปแบบ TP-RAPD ของเชื้อไรโซเบียมถั่วแดงหลวงและเชื้ออ้างอิง มีจำนวนแถบดีเอ็นเอ 1-4 แถบ มีขนาดตั้งแต่ 500 bp-3.0 kb ดังแสดงในภาพที่ 3

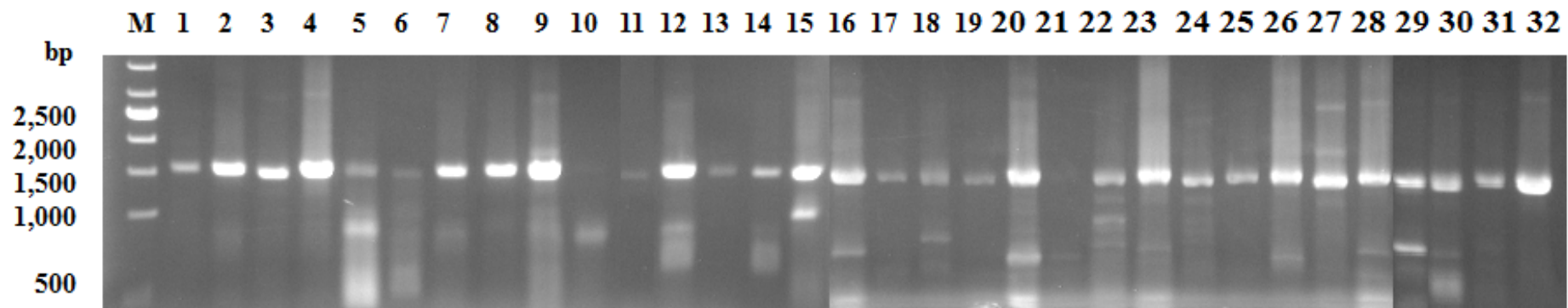
เทคนิค TP-RAPD เป็นการใช้หลักการของเทคนิค PCR โดยใช้ primer 1 คู่ primer แต่ละสายมีขนาด 20 bp รูปแบบ TP-RAPD มีความสัมพันธ์กับการจัดจำแนกทางอนุกรมวิธานของเชื้อแบคทีเรีย โดยเชื้อแบคทีเรียชนิดเดียวกันจะมีรูปแบบ TP-RAPD เหมือนกัน (Rivas et al. 2001; 2004; Valverde et al. 2006) เชื้อแบคทีเรียชนิดเดียวกัน ถึงแม้จะมีรูปแบบพลาสมิดต่างกันก็มีรูปแบบ TP-RAPD เหมือนกัน (Rivas et al. 2001) รูปแบบ TP-RAPD ใช้เป็นข้อมูลสำคัญในการสนับสนุนการตั้งเชื้อแบคทีเรียชนิดใหม่ เช่น *Shinella kummerowiae* ซึ่งมีรูปแบบ TP-RAPD แตกต่างจาก *Shinella* 2 ชนิดที่มีอยู่เดิม (Lin et al. 2008) ถึงแม้ว่าจะมีรายงานว่าเทคนิค TP-RAPD เหมาะสมในการใช้ระบุชนิดของเชื้อแบคทีเรีย จากภาพที่ 3 จะเห็นว่ารูปแบบ TP-RAPD ยังไม่สามารถจัดจำแนกเชื้อบางชนิดได้ชัดเจน เนื่องจากรูปแบบ TP-

RAPD นั้น แลบดีเอ็นเอมีจำนวนน้อย, ขนาดใกล้เคียงกัน และแลบดีเอ็นเอบางแถบจาง เช่น *Bac. subtilis* และ *Bac. cereus* มีรูปแบบ TP-RAPD คล้ายกันมาก ตัวอย่างรูปแบบ TP-RAPD ของ *Shinella*, *Rhizobium*, *Ensifer* และ *Mesorhizobium* มีแลบดีเอ็นเอ 2-5 แถบ ขนาดตั้งแต่น้อยกว่า 300 bp - 1 kb (Lin et al. 2008) เชื้อไรโซเปียมถั่วแดงหลวงที่มีรูปแบบ TP-RAPD เหมือนกับ *Bac. subtilis* มีจำนวน 8 สายพันธุ์ ได้แก่ PV 01, PV 09, PV 10, DASA 02021, DASA 02026, DASA 02041, DASA 02045 และ DASA 06003 แต่เนื่องจากรูปแบบ TP-RAPD ของ *Bac. subtilis* มีแลบดีเอ็นเอเพียง 1 แถบ ขนาดประมาณ 1.5 kb ดังนั้น จึงต้องใช้การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA ในการระบุสกุลของเชื้อก่อนว่าเป็นเชื้อที่อยู่ในสกุล *Bacillus* จากนั้นจึงพิจารณารูปแบบ TP-RAPD ในการระบุชนิด เชื้อไรโซเปียมถั่วแดงหลวงที่มีรูปแบบ TP-RAPD เหมือนกับ *Bac. cereus* มีจำนวน 1 สายพันธุ์ คือ PV 14 เชื้อไรโซเปียมถั่วแดงหลวงที่มีรูปแบบ TP-RAPD เหมือนกับ *Bra. japonicum* USDA 110 มีจำนวน 1 สายพันธุ์ คือ DASA 02044

5. การศึกษารูปแบบพลาสมิดของเชื้อไรโซเปียมถั่วแดงหลวง

จากการวิเคราะห์รูปแบบของพลาสมิดขนาดเล็กของเชื้อไรโซเปียมถั่วแดงหลวง 28 สายพันธุ์ พบว่ามีเชื้อที่มีพลาสมิดมีจำนวน 5 สายพันธุ์ ได้แก่ DASA 02051 มีพลาสมิด 2 ชั้น ขนาดประมาณ 2.1 และ 1.4 kb, DASA 06002 มีพลาสมิด 2 ชั้น ขนาดประมาณ 3.2 และ 1.7 kb, DASA 06003 มีพลาสมิด 2 ชั้น ขนาดประมาณ 3.0 และ 1.6 kb, DASA 06004 มีพลาสมิด 1 ชั้น ขนาดประมาณ 1.5 kb และ DASA 06006 มีพลาสมิด 1 ชั้น ขนาดประมาณ 1.6 kb

ลักษณะโดยทั่วไปของเชื้อในสกุล *Rhizobium* คือการมีพลาสมิด ซึ่งมีจำนวนและขนาดแตกต่างกันไปในแต่ละสายพันธุ์ จำนวนมีตั้งแต่ 1-10 ชั้น และส่วนมากมักเป็นพลาสมิดขนาดใหญ่ (megaplasmid) ขนาด 100-300 เมกะดาลตัน (megadalton; Mda) (Mercado-Blanco and Toro 1996) จากการศึกษา *Bra. Japonicum* และ *Bra. elkanii* 46 สายพันธุ์ ซึ่งแยกได้จากในประเทศสหรัฐอเมริกา, จีน และไทย พบว่า 11 สายพันธุ์มีพลาสมิดที่มีขนาดตั้งแต่ 75-300 kb (Cytryn et al. 2008) จากการศึกษาเชื้อแบคทีเรียปมรากของพืชสมุนไพรไทย 3 ชนิด ได้แก่ *Der. elliptica* (โล่ตีน หรือ หางไหล), *Ind. tinctoria* (คราม) และ *Pue. mirifica* (กวาวเครือขาว) จำนวน 56 สายพันธุ์ พบว่า *Rhizobium* 3 สายพันธุ์ มีพลาสมิดขนาดเล็ก จำนวน 2 ชั้น ขนาด 900 bp และ 1.5 kb *Rhizobium* 4 สายพันธุ์ และ *Sinorhizobium* 1 สายพันธุ์ มีพลาสมิดขนาดใหญ่ ขนาดตั้งแต่ มากกว่า 57-600 Mda (Pongsilp and Nuntagij 2009)



ภาพที่ 3. รูปแบบ TP-RAPD ของเชื้อไรโซเบียมถั่วแดงหลวงและเชื้ออ้างอิง

Lane M: 1 kb DNA ladder; 1: PV 01; 2: PV 09; 3: PV 10; 4: PV 14; 5: DASA 02006; 6: DASA 02007; 7: DASA 02008; 8: DASA 02009; 9: DASA 02010; 10: DASA 02011; 11: DASA 02021; 12: DASA 02023; 13: DASA 02026; 14: DASA 02027; 15: DASA 02031; 16: DASA 02036; 17: DASA 02041; 18: DASA 02044; 19: DASA 02045; 20: DASA 02051; 21: DASA 02065; 22: DASA 02068; 23: DASA 02077; 24: DASA 06002; 25: DASA 06003; 26: DASA 06004; 27: DASA 06006; 28: DASA 06008; 29: *Bra. japonicum* USDA 110; 30: *Ens. fredii* USDA 205; 31: *Bac. subtilis*; 32: *Bac. cereus*

6. การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA ของเชื้อไรโซเบียมถั่วแดงหลวง

จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA ของเชื้อไรโซเบียมถั่วแดงหลวง 28 สายพันธุ์ เพื่อระบุสกุลของเชื้อโดยเพิ่มจำนวนยีน 16S rDNA ด้วยเทคนิค PCR หลังจากนั้นตรวจสอบผลของปฏิกิริยา PCR พบว่าได้แถบดีเอ็นเอเพียงแถบเดียว ขนาดประมาณ 500 bp เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อแต่ละสายพันธุ์มาทำการเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA ของเชื้อแบคทีเรียในฐานข้อมูลของ GenBank โดยใช้โปรแกรม BLASTN พบว่าเชื้อไรโซเบียมถั่วแดงหลวงมีลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA ใกล้เคียงกับเชื้อใน 3 สกุล ได้แก่ *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* และ *Bacillus* ซึ่งมี % ความเหมือน (% identity) อยู่ระหว่าง 97% - 100% ผลการเปรียบเทียบ % identity ของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA จากเชื้อไรโซเบียมถั่วแดงหลวงแสดงในตารางที่ 3

จากรายงานที่มีมาก่อน พบว่าไรโซเบียมถั่วแดงหลวงมีความหลากหลายทางอนุกรมวิธานเป็นอย่างมาก พบว่ามีถึง 34 ชนิด ใน 11 สกุล ได้แก่ 1) *Rhizobium alkalosoli* 2) *Rhizobium etli* 3) *Rhizobium gallicum* 4) *Rhizobium giardinii* 5) *Rhizobium huautlense* 6) *Rhizobium leguminosarum* 7) *Rhizobium leucaenae* 8) *Rhizobium lusitanum* 9) *Rhizobium mesoamericanum* 10) *Rhizobium miluonense* (เกิดปมที่ไม่มีประสิทธิภาพในการตรึงไนโตรเจน; ineffective) 11) *Rhizobium phaseoli* 12) *Rhizobium tibeticum* 13) *Rhizobium tropici* 14) *Rhizobium vallis* 15) *Rhizobium yanglingense* (ineffective) 16) *Rhizobium* spp. (มีทั้งที่มีประสิทธิภาพในการตรึงไนโตรเจน; effective และ ineffective) 17) *Ensifer fredii* (effective และ ineffective) 18) *Ensifer medicae* (ineffective) 19) *Ensifer meliloti* (ineffective) 20) *Ensifer* spp. (ineffective) 21) *Sinorhizobium* spp. (ineffective) 22) *Bra. japonicum* (ineffective) 23) *Bradyrhizobium liaoningense* 24) *Mesorhizobium caraganae* 25) *Mesorhizobium septentrionale* 26) *Mesorhizobium shangrilense* 27) *Mesorhizobium temperatum* 28) *Azorhizobium caulinodans* (ineffective) 29) *Azorhizobium doebereineriae* (ineffective) 30) *Methylobacterium* spp. 31) *Cupriavidus* spp. 32) *Ralstonia* spp. 33) *Burkholderia phymatum* และ 34) *Herbaspirillum lusitanum* (Pongsilp 2012) จากการศึกษาครั้งนี้ พบว่าเชื้อไรโซเบียมถั่วแดงหลวงจากถิ่นกำเนิดในประเทศไทยเป็นเชื้อในสกุล *Rhizobium* และ *Bradyrhizobium* ซึ่งมักเป็นเชื้อไรโซเบียมที่เกิดปมและตรึงไนโตรเจนกับพืชตระกูลถั่วหลากหลายชนิด นอกจากนี้ ยังพบสายพันธุ์ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA ใกล้เคียงกับสกุล *Bacillus* ซึ่งไม่เคยมีรายงานมาก่อน โดยเชื้อทั้ง 3 สกุลเกิดปมและตรึงไนโตรเจนกับถั่วแดงหลวง การเกิดปมและการตรึงไนโตรเจนของแบคทีเรียต่างสกุลกับพืชตระกูลถั่วชนิดเดียวกันสามารถพบได้ทั่วไป สันนิษฐานว่าเป็นผลมาจากความหลากหลายทางพันธุกรรม, การปรับตัวของแบคทีเรียให้เข้ากับสภาวะแวดล้อม และมีการถ่ายโอนยีนที่ควบคุมกระบวนการอยู่อาศัยแบบซิมไบโอซิส (symbiosis) กับพืชตระกูลถั่วให้กับเชื้อแบคทีเรียในสกุลอื่นๆ (Fuentes et al. 2002) สำหรับ *Bacillus* เคยมีรายงานว่า เป็นเชื้อที่อาศัยในเซลล์พืช (endophyte) แต่ไม่มีความสัมพันธ์แบบ symbiosis กับพืช Li et al. (2008) รายงานว่า การใส่เชื้อ *Bacillus* spp. ซึ่งเป็น endophyte ในปมรากถั่วเหลือง ไม่ได้ให้ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญต่อการเจริญและการเกิดปมของถั่วเหลือง แต่เชื้อสามารถสังเคราะห์ IAA, ละลายฟอสเฟต และตรึงไนโตรเจน และยังพบว่ายีน *nifH* (nitrogen fixation) ซึ่งควบคุมการสังเคราะห์หน่วยย่อยของเอนไซม์ nitrogenase ในกระบวนการตรึง

ไนโตรเจน มี % identity เท่ากับ 99% กับยีน *nifH* ของ *Bra. japonicum* สันนิษฐานว่าเกิดการถ่ายโอนยีนจาก *Bra. japonicum* ให้แก่ *Bacillus* spp. Stajkovic et al. (2009) รายงานว่า *Bac. megaterium* เป็น endophyte ในปมรากถั่ว alfalfa (*Medicago sativa* L.) โดยไม่ได้ชักนำให้เกิดปม ในการศึกษาครั้งนี้ พบว่า *Bacillus* spp. ทั้ง 15 สายพันธุ์ สามารถชักนำให้เกิดปมรากถั่วแดงหลวง จึงจะทำการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *nodC* (nodulation) ซึ่งควบคุมการสังเคราะห์เอนไซม์ chitin synthase หรือ N-acetyl glucosaminyl transferase ในกระบวนการเกิดปมในขั้นตอนต่อไป ทั้งนี้ ในข้อมูล complete genome ของ *Bac. cereus* สายพันธุ์ 03BB87 (GenBank Accession number CP009941) (Johnson et al. 2015) พบว่ามียีน *nodC* ด้วยเช่นกัน

7. การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *nodC* ของเชื้อไรโซเบียมถั่วแดงหลวง

คัดเลือกเชื้อสายพันธุ์ DASA 06004 และ DASA 06006 ซึ่งลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA ใกล้เคียงกับสกุล *Bacillus* ซึ่งไม่เคยมีรายงานมาก่อนว่าอยู่ในกลุ่มเชื้อไรโซเบียม มาทำการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *nodC* โดยเพิ่มจำนวนยีน *nodC* ในเทคนิค PCR หลังจากนั้นตรวจสอบผลของปฏิกิริยา PCR พบว่า ได้แถบดีเอ็นเอหลายแถบ เลือกตัดแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 930 bp แยกออกจาก agarose เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *nodC* เปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูลของ GenBank โดยใช้โปรแกรม BLASTN พบว่ายีน *nodC* ของเชื้อสายพันธุ์ DASA 06004 และ DASA 06006 ใกล้เคียงกับยีน *nodC* ของไรโซเบียม โดยยีน *nodC* ของเชื้อสายพันธุ์ DASA 06004 ใกล้เคียงมากที่สุดกับยีน *nodC* ของ *Rhizobium* ที่ 89%-94% identity และ ยีน *nodC* ของเชื้อสายพันธุ์ DASA 06006 ใกล้เคียงมากที่สุดกับยีน *nodC* ของ *Rhizobium* และ *Mesorhizobium* ที่ 91%-100% identity

การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *nodC* เป็นการยืนยันทางพันธุกรรมของความสามารถในการเกิดปมของเชื้อแบคทีเรีย เนื่องจากเป็นยีนควบคุมการสังเคราะห์เอนไซม์ chitin synthase หรือ N-acetyl glucosaminyl transferase ซึ่งจำเป็นต่อการสังเคราะห์ Nod factor (Geremia et al. 1994) ทำหน้าที่กระตุ้นขั้นตอนต่างๆ ในการเกิดปม เช่น การเพิ่มจำนวนเซลล์รากพืช, การเปลี่ยนแปลงรูปร่างของรากขนอ่อน (root hair deformation) และควบคุมกระบวนการถอดรหัส (transcription) ของยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการเกิดปม (Angelini et al. 2003) และเป็นยีนที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ใกล้เคียงกัน (conserve) ในไรโซเบียมต่างสกุล (Ruvkun and Ausubel 1980; Geremia et al. 1994; Zhang et al. 2000)

ตารางที่ 3. ผลการเปรียบเทียบ % identity ของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA จากเชื้อไรโซเบียม ถั่วแดงหลวง

สายพันธุ์	สกุลของเชื้อที่มีความใกล้เคียงของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA	% identity
PV 01	<i>Bacillus</i>	97%
PV 09	<i>Bacillus</i>	99%
PV 10	<i>Bacillus</i>	99%
PV 14	<i>Bacillus</i>	99%
DASA 02006	<i>Bradyrhizobium</i>	100%
DASA 02007	<i>Bradyrhizobium</i>	99%
DASA 02008	<i>Bradyrhizobium</i>	98%
DASA 02009	<i>Bradyrhizobium</i>	99%
DASA 02010	<i>Bradyrhizobium</i>	99%
DASA 02011	<i>Bradyrhizobium</i>	98%
DASA 02021	<i>Bacillus</i>	99%
DASA 02023	<i>Bacillus</i>	99%
DASA 02026	<i>Bacillus</i>	99%
DASA 02027	<i>Bacillus</i>	99%
DASA 02031	<i>Bacillus</i>	99%
DASA 02036	<i>Bacillus</i>	99%
DASA 02041	<i>Bacillus</i>	99%
DASA 02044	<i>Bradyrhizobium</i>	97%
DASA 02045	<i>Bradyrhizobium</i>	99%
DASA 02051	<i>Bacillus</i>	99%
DASA 02065	<i>Bradyrhizobium</i>	99%
DASA 02068	<i>Bradyrhizobium</i>	97%
DASA 02077	<i>Bacillus</i>	99%
DASA 06002	<i>Bradyrhizobium</i>	98%
DASA 06003	<i>Bradyrhizobium</i>	100%
DASA 06004	<i>Bacillus</i>	99%
DASA 06006	<i>Bacillus</i>	99%
DASA 06008	<i>Rhizobium</i>	99%

8. การประเมินประสิทธิภาพในการตรึงไนโตรเจนของเชื้อไรโซเบียมถั่วแดงหลวง

ทำการประเมินประสิทธิภาพในการตรึงไนโตรเจนของเชื้อไรโซเบียมถั่วแดงหลวง จากจำนวนปม, น้ำหนักปมแห้ง, น้ำหนักต้นแห้ง และค่า ARA พบว่าเชื้อไรโซเบียมถั่วแดงหลวงทั้ง 28 สายพันธุ์ เกิดปมรากกับถั่วแดงหลวง รวมทั้งให้ค่าน้ำหนักต้นแห้ง และค่า ARA มากกว่าชุดควบคุมที่ไม่ได้รับการใส่เชื้ออย่างมีนัยสำคัญ ต้นพืชที่มีการใส่เชื้อไรโซเบียมถั่วแดงหลวงมีน้ำหนักแห้งเพิ่มขึ้น 2.39 เท่า ถึง 3.89 เท่า และมีค่า ARA เพิ่มขึ้น 5.00 เท่า ถึง 7.19 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับ control ที่ไม่ได้ใส่เชื้อ ตารางที่ 4 แสดงจำนวนปม, น้ำหนักปมแห้ง, น้ำหนักต้นแห้ง และค่า ARA ของถั่วแดงหลวงที่ได้รับการใส่เชื้อไรโซเบียมถั่วแดงหลวงแต่ละสายพันธุ์

9. การศึกษาลักษณะทางสรีระวิทยา และลักษณะทางชีวเคมีของเชื้อไรโซเบียมถั่วแดงหลวง

ผลการศึกษาลักษณะทางสรีระวิทยา และลักษณะทางชีวเคมีของเชื้อไรโซเบียมถั่วแดงหลวง ประกอบด้วย

1) ความต้านทานต่อสารปฏิชีวนะ 10 ชนิด

จากการศึกษาความต้านทานต่อสารปฏิชีวนะ 10 ชนิด ได้แก่ ampicillin, chloramphenicol, cefotaxime, ceftazidime, gentamicin, kanamycin, novobiocin, spectinomycin, streptomycin และ tetracycline โดย spread สารแขวนลอยเชื้อบนอาหาร YMA วางแผ่นซุบสารปฏิชีวนะ (antibiotic disc) (Oxoid, Basingstoke, UK) บนผิวหน้าอาหาร บ่มที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 5 วัน บันทึกบริเวณใส (clear zone) รอบ antibiotic disc ซึ่งแสดงถึงความไว (sensitivity) ของเชื้อต่อสารปฏิชีวนะ จากการศึกษาความต้านทานต่อสารปฏิชีวนะของเชื้อไรโซเบียมถั่วแดงหลวง 28 สายพันธุ์ พบว่าไม่มีเชื้อสายพันธุ์ใดที่มีความต้านทานต่อสารปฏิชีวนะทุกชนิด และเชื้อที่มีความไวต่อสารปฏิชีวนะทุกชนิด มีจำนวน 9 สายพันธุ์ ได้แก่ PV 09, PV 10, PV 14, DASA 02026, DASA 02027, DASA 02036, DASA 02041, DASA 02044 และ DASA 02065 เชื้อที่มีความต้านทานต่อสารปฏิชีวนะได้มากที่สุด คือ สายพันธุ์ DASA 06003 ต้านทานต่อสารปฏิชีวนะ 7 ชนิด ได้แก่ ampicillin, chloramphenicol, cefotaxime, ceftazidime, gentamicin, streptomycin และ tetracycline ผลการทดสอบความต้านทานต่อสารปฏิชีวนะแสดงในตารางที่ 5

ตารางที่ 4. จำนวนปม, น้ำหนักปมแห้ง, น้ำหนักต้นแห้ง และค่า ARA ของถั่วแดงหลวงที่ได้รับการใส่เชื้อไรโซเบียมถั่วแดงหลวงแต่ละสายพันธุ์

สายพันธุ์	ค่าที่ใช้ประเมินประสิทธิภาพในการตรึงไนโตรเจน			
	จำนวนปม	น้ำหนักปมแห้ง (มิลลิกรัม/ต้น)	น้ำหนักต้นแห้ง (มิลลิกรัม/ต้น)	ค่า ARA (μmol ethylene/ต้นพืช/ชม.)
ชุดควบคุมที่ไม่ได้ใส่เชื้อ	0.00 $\pm$ 0.00	0.00 $\pm$ 0.00	138.66 $\pm$ 38.73	0.36 $\pm$ 0.03
PV 01	30.67 $\pm$ 6.81	99.00 $\pm$ 7.21	432.33 $\pm$ 10.60	2.21 $\pm$ 0.59
PV 09	53.67 $\pm$ 5.51	189.67 $\pm$ 23.12	514.00 $\pm$ 15.72	2.37 $\pm$ 0.38
PV 10	13.33 $\pm$ 6.81	75.33 $\pm$ 4.16	355.67 $\pm$ 23.03	1.78 $\pm$ 0.45
PV 14	21.67 $\pm$ 4.04	81.67 $\pm$ 8.74	365.33 $\pm$ 48.95	2.04 $\pm$ 0.03
DASA 02006	24.67 $\pm$ 3.79	104.00 $\pm$ 16.37	348.00 $\pm$ 37.59	2.13 $\pm$ 0.02
DASA 02007	19.33 $\pm$ 3.51	121.33 $\pm$ 10.97	351.00 $\pm$ 24.88	2.15 $\pm$ 0.32
DASA 02008	36.33 $\pm$ 10.50	136.00 $\pm$ 22.72	380.67 $\pm$ 33.83	2.07 $\pm$ 0.06
DASA 02009	32.33 $\pm$ 9.02	135.67 $\pm$ 42.36	362.00 $\pm$ 47.09	1.80 $\pm$ 0.41
DASA 02010	25.00 $\pm$ 6.00	105.00 $\pm$ 8.89	344.33 $\pm$ 27.06	2.29 $\pm$ 0.18
DASA 02011	16.67 $\pm$ 5.13	68.67 $\pm$ 13.65	380.41 $\pm$ 49.80	2.22 $\pm$ 0.13
DASA 02021	36.00 $\pm$ 10.58	141.00 $\pm$ 25.63	389.00 $\pm$ 38.69	2.02 $\pm$ 0.33
DASA 02023	32.33 $\pm$ 4.73	128.00 $\pm$ 5.00	373.67 $\pm$ 44.28	2.14 $\pm$ 0.02
DASA 02026	20.67 $\pm$ 9.07	74.67 $\pm$ 29.37	352.33 $\pm$ 50.00	2.15 $\pm$ 0.15
DASA 02027	21.67 $\pm$ 4.04	86.33 $\pm$ 2.08	388.00 $\pm$ 27.73	2.10 $\pm$ 0.07
DASA 02031	32.67 $\pm$ 4.04	126.00 $\pm$ 5.29	332.00 $\pm$ 12.77	2.30 $\pm$ 0.25
DASA 02036	32.00 $\pm$ 4.00	125.00 $\pm$ 10.54	351.00 $\pm$ 34.04	2.25 $\pm$ 0.31
DASA 02041	28.33 $\pm$ 5.51	108.33 $\pm$ 9.07	371.00 $\pm$ 26.89	2.18 $\pm$ 0.38
DASA 02044	38.00 $\pm$ 8.33	147.33 $\pm$ 16.50	360.33 $\pm$ 44.50	2.44 $\pm$ 0.27
DASA 02045	33.33 $\pm$ 5.51	131.67 $\pm$ 3.51	356.50 $\pm$ 46.26	2.10 $\pm$ 0.07
DASA 02051	23.33 $\pm$ 4.51	92.67 $\pm$ 8.02	380.00 $\pm$ 40.84	1.80 $\pm$ 0.43
DASA 02065	23.00 $\pm$ 4.58	92.00 $\pm$ 6.00	354.33 $\pm$ 24.11	2.25 $\pm$ 0.31
DASA 02068	36.00 $\pm$ 3.61	139.33 $\pm$ 6.43	340.67 $\pm$ 29.74	2.51 $\pm$ 0.27
DASA 02077	48.67 $\pm$ 15.14	165.67 $\pm$ 55.54	395.00 $\pm$ 33.65	2.44 $\pm$ 0.36
DASA 06002	13.33 $\pm$ 5.51	44.67 $\pm$ 12.50	352.67 $\pm$ 22.37	2.09 $\pm$ 0.11
DASA 06003	32.67 $\pm$ 14.01	104.33 $\pm$ 34.00	385.33 $\pm$ 22.30	2.12 $\pm$ 0.62
DASA 06004	48.66 $\pm$ 7.02	184.67 $\pm$ 25.48	354.67 $\pm$ 32.56	1.92 $\pm$ 0.57
DASA 06006	52.67 $\pm$ 13.80	183.00 $\pm$ 28.16	364.67 $\pm$ 9.29	2.06 $\pm$ 0.49
DASA 06008	53.67 $\pm$ 12.67	189.00 $\pm$ 27.87	539.00 $\pm$ 96.27	2.59 $\pm$ 0.36

ค่าที่รายงานเป็นค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 ซ้ำ $\pm$ ค่า standard deviation

ตารางที่ 5. ความต้านทานและความไวต่อสารปฏิชีวนะของเชื้อไรโซเบียมถั่วแดงหลวง

สายพันธุ์	ความต้านทานต่อสารปฏิชีวนะ									
	AMP	C	CTX	CAZ	CN	K	NV	SH	S	TE
PV 01	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-
PV 09	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PV 10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PV 14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
DASA 02006	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-
DASA 02007	+	+	-	+	-	-	-	+	-	+
DASA 02008	-	+	-	+	+	-	-	-	-	+
DASA 02009	-	+	-	+	+	-	-	+	-	+
DASA 02010	-	+	-	+	+	-	-	+	-	+
DASA 02011	-	+	-	+	-	-	-	+	+	+
DASA 02021	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-
DASA 02023	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
DASA 02026	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
DASA 02027	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
DASA 02031	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
DASA 02036	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
DASA 02041	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
DASA 02044	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
DASA 02045	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-
DASA 02051	-	+	-	+	+	+	-	-	-	-
DASA 02065	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
DASA 02068	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-
DASA 02077	-	+	-	+	+	+	-	-	-	-
DASA 06002	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-
DASA 06003	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+
DASA 06004	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
DASA 06006	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-
DASA 06008	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-

+ หมายถึง เชื้อมีความต้านทานต่อสารปฏิชีวนะ, - หมายถึง เชื้อมีความไวต่อสารปฏิชีวนะ

AMP: ampicillin (10 µg); C: chloramphenicol (30 µg); CTX: cefotaxime (30 µg); CAZ: ceftazidime (30 µg); CN: gentamicin (120 µg); K: kanamycin (30 µg); NV: novobiocin (30 µg); SH: spectinomycin (10 µg); S: streptomycin (10 µg); TE: tetracycline (30 µg)

รูปแบบความต้านทานต่อสารปฏิชีวนะ 10 ชนิดของเชื้อไรโซเบียมถั่วแดงหลวง 28 สายพันธุ์ มีทั้งสิ้น 18 รูปแบบ แสดงถึงความหลากหลายทางสรีรวิทยาของเชื้อ จากข้อมูลแสดงว่า แม้แต่เชื้อในสกุลเดียวกันก็มีรูปแบบความต้านทานต่อสารปฏิชีวนะแตกต่างกัน นอกจากนี้ รูปแบบความต้านทานต่อสารปฏิชีวนะ ยังสามารถใช้เป็นข้อมูลคัดเลือกเชื้อในการประยุกต์ใช้เป็นปุ๋ยชีวภาพในพื้นที่ทางการเกษตร เนื่องจากประสิทธิภาพการเข้าอยู่อาศัยของเชื้อกลุ่มไรโซเบียมกับรากพืชตระกูลถั่ว และการตรึงไนโตรเจนแบบ symbiosis นั้น ต้องการเชื้อที่สามารถอยู่รอดในสภาวะแวดล้อมและเพิ่มจำนวนเชื้อได้เพียงพอ ในขณะที่ดินในพื้นที่ทางการเกษตรจะมีกลุ่มประชากรจุลินทรีย์ที่หลากหลาย และสามารถสังเคราะห์สารปฏิชีวนะชนิดต่างๆ เพื่อยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ เพิ่มความได้เปรียบในการแข่งขันแย่งสาร

อาหารและการครอบครองพื้นที่ ดังนั้นความต้านทานต่อสารปฏิชีวนะจึงเป็นลักษณะทางสรีระวิทยาที่สำคัญ ซึ่งช่วยให้เชื้อที่คัดเลือกใช้เป็นปุ๋ยชีวภาพสามารถปรับตัวและอยู่รอดได้ในสภาวะแวดล้อม

2) ความต้องการวิตามิน 8 ชนิด

ในการศึกษาความต้องการวิตามิน 8 ชนิด ได้แก่ ascorbic acid (vitamin C), biotin (vitamin B7), folic acid (vitamin B9), myo-inositol (vitamin B8), nicotinic acid (vitamin B3), calcium pantothenate (vitamin B5), riboflavin (vitamin B2) และ thiamine hydrochloride (vitamin B1) โดย streak เชื้อบนอาหาร BSM ซึ่งเป็น minimal medium ที่ไม่เติม glutamic acid, thiamine และ biotin และใช้ agarose แทน agar ดังนั้น อาหาร BSM ที่ใช้ทดสอบจะมีเฉพาะแหล่งคาร์บอน, แหล่งไนโตรเจน และแร่ธาตุ ได้แก่ โซเดียม (sodium; Na), แมกนีเซียม (magnesium; Mg), ซัลเฟอร์ (sulfur; S), Fe, Ca และคลอไรด์ (chloride; Cl) เปรียบเทียบกับอาหาร BSM ที่เติมวิตามินแต่ละชนิดที่ทดสอบ ที่ระดับความเข้มข้น 500 µg/ml บ่มที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 5 วัน บันทึกการเจริญเป็นโคโลนีบนอาหาร BSM และอาหาร BSM ที่เติมวิตามินแต่ละชนิด เชื้อที่เจริญได้บนอาหาร BSM ที่ไม่เติมวิตามินจัดเป็น vitamin prototroph สามารถสังเคราะห์วิตามินที่จำเป็นต่อการเจริญได้เอง เชื้อที่ไม่เจริญบนอาหาร BSM ที่ไม่เติมวิตามินจัดเป็น vitamin auxotroph ไม่สามารถสังเคราะห์วิตามินที่จำเป็นต่อการเจริญได้เอง เชื้อที่ไม่เจริญบนอาหาร BSM ที่ไม่เติมวิตามิน แต่เจริญได้เมื่อมีการเติมวิตามิน แสดงว่าเชื้อต้องการวิตามินชนิดนั้นในการเจริญ จากการศึกษาความต้องการวิตามินของเชื้อไรโซเบียมถั่วแดงหลวง 28 สายพันธุ์ พบว่า เชื้อที่ไม่ต้องการวิตามิน (เป็น vitamin prototroph) มีจำนวน 7 สายพันธุ์ ได้แก่ DASA 02006, DASA 02008, DASA 02009, DASA 02010, DASA 02041, DASA 02045 และ DASA 06006 เชื้อที่ต้องการวิตามินชนิดใดชนิดหนึ่งที่ทดสอบสำหรับการเจริญ มีจำนวน 15 สายพันธุ์ ได้แก่ PV 01, PV 10, PV 14, DASA 02007, DASA 02011, DASA 02023, DASA 02036, DASA 02044, DASA 02051, DASA 02068, DASA 02077, DASA 06002, DASA 06003, DASA 06004 และ DASA 06008 เชื้อที่ต้องการวิตามินอื่นนอกเหนือจากวิตามินที่ทดสอบ มีจำนวน 6 สายพันธุ์ ได้แก่ PV 09, DASA 02021, DASA 02026, DASA 02027, DASA 02031 และ DASA 02065 ผลของวิตามินที่มีต่อการเจริญของเชื้อไรโซเบียมถั่วแดงหลวงแสดงในตารางที่ 6 และชนิดของวิตามินที่จำเป็นสำหรับการเจริญของเชื้อไรโซเบียมถั่วแดงหลวงแต่ละสายพันธุ์ แสดงในตารางที่ 7

Watson et al. (2001) ให้ข้อสรุปว่าความต้องการ biotin เป็นลักษณะของสายพันธุ์ *Sinorhizobium meliloti* (ปัจจุบันเป็น *Ens. meliloti*) เป็นส่วนใหญ่ Striet et al. (1996) รายงานว่าการสังเคราะห์และการดูดซึม biotin ของ *Rhi. meliloti* (ปัจจุบันเป็น *Ens. meliloti*) ส่งเสริมการเข้าเกาะของเชื้อกับรากของพืชอาศัย (ถั่ว alfalfa) เนื่องจากเชื้อกลายพันธุ์ (mutant) ที่ไม่สังเคราะห์ biotin มีความสามารถในการแข่งขันเพื่อเข้าเกาะกับรากของพืชอาศัยได้น้อยมาก เมื่อเปรียบเทียบกับเชื้อสายพันธุ์ดั้งเดิม (wild type) ที่สังเคราะห์ biotin Sullivan et al. (2001) รายงานว่าความสามารถในการสังเคราะห์ biotin และ nicotinic acid ของ *Mesorhizobium* sp. ไม่จำเป็นต่อการตรึงไนโตรเจนแบบ symbiosis หรือการเข้าอยู่อาศัยในบริเวณ rhizosphere แต่สันนิษฐานว่ามีบทบาทต่อปฏิสัมพันธ์ระหว่างเชื้อกับพืชอาศัย เนื่องจากยีนควบคุมการสังเคราะห์วิตามินมีตำแหน่งอยู่บน symbiosis island

ตารางที่ 6. การเจริญของเชื้อไรโซเบียมถั่วแดงหลวงบนอาหาร BSM ดัดแปลงที่มีวิตามินแต่ละชนิด หลังจากบ่มที่ 30°C เป็นเวลา 5 วัน

สายพันธุ์	การเจริญบนอาหาร BSM ที่เติม								
	ไม่มี วิตามิน	ascorbic acid	biotin	folic acid	myo- inositol	nicotinic acid	pantho- thenate	ribo- flavin	thiamine
PV 01	-	-	-	-	-	-	-	-	+
PV 09	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PV 10	-	+	+	-	+	-	-	-	+
PV 14	-	+	+	-	+	+	-	-	+
DASA 02006	+	+	+	+	+	+	+	+	+
DASA 02007	-	+	+	+	+	+	+	+	+
DASA 02008	+	+	+	+	+	+	+	+	+
DASA 02009	+	+	+	+	+	+	+	+	+
DASA 02010	+	+	+	+	+	+	+	+	+
DASA 02011	-	+	+	+	+	+	+	+	+
DASA 02021	-	-	-	-	-	-	-	-	-
DASA 02023	-	-	+	-	+	+	-	-	-
DASA 02026	-	-	-	-	-	-	-	-	-
DASA 02027	-	-	-	-	-	-	-	-	-
DASA 02031	-	-	-	-	-	-	-	-	-
DASA 02036	-	+	+	-	+	-	+	-	-
DASA 02041	+	+	+	+	+	+	+	+	+
DASA 02044	-	-	+	-	-	-	-	+	+
DASA 02045	+	+	+	+	+	+	+	+	+
DASA 02051	-	-	-	+	-	+	+	+	+
DASA 02065	-	-	-	-	-	-	-	-	-
DASA 02068	-	+	+	+	+	+	+	+	+
DASA 02077	-	+	+	+	-	+	+	-	-
DASA 06002	-	+	+	-	+	+	+	+	+
DASA 06003	-	+	+	+	+	+	+	+	+
DASA 06004	-	+	+	+	+	+	+	+	+
DASA 06006	+	+	+	+	+	+	+	+	+
DASA 06008	-	+	+	+	+	-	+	+	+

- หมายถึง ไม่มีการเจริญของเชื้อ; + หมายถึง มีการเจริญของเชื้อ

ตารางที่ 7. ชนิดของวิตามินที่ต้องการสำหรับการเจริญของเชื้อไรโซเปียมถั่วแดงหลวงแต่ละสายพันธุ์

สายพันธุ์	ชนิดของวิตามินที่ต้องการสำหรับการเจริญ
DASA 02006, DASA 02008, DASA 02009, DASA 02010, DASA 02041, DASA 02045 และ DASA 06006	ไม่ต้องการวิตามิน
PV 09, DASA 02021, DASA 02026, DASA 02027, DASA 02031 และ DASA 02065	ต้องการวิตามินอื่นนอกเหนือจากที่ทดสอบ
PV 01	thiamine
PV 10	ascorbic acid, biotin, myo-inositol หรือ thiamine
PV 14	ascorbic acid, biotin, myo-inositol, nicotinic acid หรือ thiamine
DASA 02007, DASA 02011, DASA 02068, DASA 06003 และ DASA 06004	ascorbic acid, biotin, folic acid, myo-inositol, nicotinic acid, panthothenate, riboflavin หรือ thiamine
DASA 02023	biotin, myo-inositol หรือ nicotinic acid
DASA 02036	ascorbic acid, biotin, myo-inositol หรือ panthothenate
DASA 02044	biotin, riboflavin หรือ thiamine
DASA 02051	folic acid, nicotinic acid, panthothenate, riboflavin หรือ thiamine
DASA 02077	ascorbic acid, biotin, folic acid, nicotinic acid หรือ panthothenate
DASA 06002	ascorbic acid, biotin, myo-inositol, nicotinic acid, panthothenate, riboflavin หรือ thiamine
DASA 06008	ascorbic acid, biotin, folic acid, myo-inositol, panthothenate, riboflavin หรือ thiamine

3) การเจริญในอาหาร YMB ที่ pH 5.0, 6.5 และ 8.0

จากการศึกษาการเจริญของเชื้อไรโซเปียมถั่วแดงหลวง 28 สายพันธุ์ ที่ระดับ pH ต่างๆ ได้แก่ pH 5.0, 6.5 และ 8.0 โดยเลี้ยงเชื้อให้เจริญในอาหาร YMB เพื่อใช้เป็น inoculum แล้วนับจำนวนเซลล์โดยวิธี standard total plate count ปิเปต inoculum ลงในอาหาร YMB ที่ควบคุมระดับ pH ด้วย 0.1 M HEPES buffer กำหนดปริมาณเชื้อเริ่มต้นเท่ากับ 1.00×10^5 CFU/ml เขย่าที่อัตราเร็ว 200 rpm อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 1-5 วัน ให้เจริญถึงระยะ mid-log phase วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 nm แสดงถึงการเจริญของเชื้อ พบว่า เชื้อที่มีการเจริญได้ที่ระดับ pH 5.0 มีจำนวน 26 สายพันธุ์ ได้แก่ PV 01, PV 09, PV 10, PV 14, DASA 02006, DASA 02007, DASA 02008, DASA 02009, DASA 02010, DASA 02011, DASA 02021, DASA 02023, DASA 02026, DASA 02027, DASA 02031, DASA 02036, DASA 02041, DASA 02044, DASA 02045, DASA 02051, DASA 02065, DASA 02068, DASA 02077, DASA 06003, DASA 06006 และ DASA 06008 เชื้อที่มีการเจริญได้ที่ระดับ pH 8.0 มีจำนวน 20 สายพันธุ์ ได้แก่ PV 01, PV 09, PV 10, DASA 02006, DASA 02007, DASA 02008, DASA 02009, DASA 02010, DASA 02011, DASA 02021, DASA 02023, DASA 02026, DASA 02027, DASA 02031, DASA 02036, DASA 02041, DASA 02044, DASA 02077, DASA 06002 และ DASA 06006 การเจริญของเชื้อไรโซเปียมถั่วแดงหลวงที่ระดับ pH 5.0, 6.5 และ 8.0 แสดงในตารางที่ 8 จากผลการศึกษา พบว่าเชื้อไรโซเปียมถั่วแดงหลวงมีความหลากหลายในการตอบสนองต่อระดับ pH

4) การเจริญในอาหาร YMB ที่อุณหภูมิ 20°C, 30°C และ 40°C

จากการศึกษาการเจริญของเชื้อไรโซเบียมถั่วแดงหลวง 28 สายพันธุ์ ที่ระดับอุณหภูมิต่างๆ ได้แก่ 20°C, 30°C และ 40°C โดยเลี้ยงเชื้อให้เจริญในอาหาร YMB เพื่อใช้เป็น inoculum แล้วนับจำนวนเซลล์โดยวิธี standard total plate count ปิเปิด inoculum ลงในอาหาร YMB ที่ควบคุมระดับ pH เท่ากับ 7.00 ด้วย 0.1 M HEPES buffer กำหนดปริมาณเชื้อเริ่มต้นเท่ากับ 1.00×10^5 CFU/ml เชื้อที่อัตราเร็ว 200 rpm อุณหภูมิตามที่กำหนด เป็นเวลา 1-5 วัน ให้เจริญถึงระยะ mid-log phase วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 nm แสดงถึงการเจริญของเชื้อ พบว่า เชื้อที่มีการเจริญได้ที่ 20°C มีจำนวน 20 สายพันธุ์ ได้แก่ PV 01, PV 09, PV 14, DASA 02006, DASA 02008, DASA 02009, DASA 02010, DASA 02011, DASA 02023, DASA 02027, DASA 02041, DASA 02044, DASA 02045, DASA 02051, DASA 02068, DASA 06002, DASA 06003, DASA 06004, DASA 06006 และ DASA 06008 เชื้อที่มีการเจริญได้ที่ระดับ 40°C มีจำนวน 18 สายพันธุ์ ได้แก่ PV 09, PV 10, PV 14, DASA 02006, DASA 02007, DASA 02008, DASA 02009, DASA 02010, DASA 02011, DASA 02021, DASA 02023, DASA 02027, DASA 02031, DASA 02041, DASA 02044, DASA 02065, DASA 02077 และ DASA 06002 การเจริญของเชื้อไรโซเบียมถั่วแดงหลวงที่ระดับอุณหภูมิ 20°C, 30°C และ 40°C แสดงในตารางที่ 8 จากผลการศึกษา พบว่าเชื้อไรโซเบียมถั่วแดงหลวงมีความหลากหลายในการตอบสนองต่อระดับอุณหภูมิ เช่นเดียวกับระดับ pH ส่วนเชื้อที่สามารถเจริญได้ในทุกระดับ pH และอุณหภูมิที่ทำการทดสอบ มีทั้งสิ้น 10 สายพันธุ์ ได้แก่ PV 09, DASA 02006, DASA 02008, DASA 02009, DASA 02010, DASA 02011, DASA 02023, DASA 02027, DASA 02041 และ DASA 02044

5) ความต้านทานต่อโลหะหนัก 4 ชนิด

จากการศึกษาความต้านทานต่อโลหะหนัก 4 ชนิด ได้แก่ Cd, Co, Cu และ Zn ที่ความเข้มข้น 50 µg/ml ของเชื้อไรโซเบียมถั่วแดงหลวง 28 สายพันธุ์ โดยเลี้ยงเชื้อให้เจริญในอาหาร YMB เพื่อใช้เป็น inoculum แล้วนับจำนวนเซลล์โดยวิธี standard total plate count ปิเปิด inoculum ลงในอาหาร YMB ที่ควบคุมระดับ pH เท่ากับ 7.00 ด้วย 0.1 M HEPES buffer และเติมสารประกอบโลหะหนักที่ทำให้ปลอดเชื้อโดยการกรอง กำหนดปริมาณเชื้อเริ่มต้นเท่ากับ 1.00×10^5 CFU/ml เชื้อที่อัตราเร็ว 200 rpm อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 1-5 วัน ให้เจริญถึงระยะ mid-log phase วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 nm แสดงถึงการเจริญของเชื้อ พบว่า เชื้อที่ต้านทานต่อ Cd คือ สายพันธุ์ DASA 02009 เชื้อที่ต้านทานต่อ Co มีจำนวน 2 สายพันธุ์ ได้แก่ DASA 02008 และ DASA 02011 เชื้อที่ต้านทานต่อ Cu คือ สายพันธุ์ DASA 02011 และเชื้อที่ต้านทานต่อ Zn มีจำนวน 19 สายพันธุ์ ได้แก่ PV 01, PV 09, PV 10, DASA 02008, DASA 02009, DASA 02011, DASA 02021, DASA 02023, DASA 02026, DASA 02027, DASA 02031, DASA 02036, DASA 02041, DASA 02044, DASA 02051, DASA 02065, DASA 02077, DASA 06006 และ DASA 06008 การเจริญของเชื้อไรโซเบียมถั่วแดงหลวงในอาหารที่มี Cd, Co, Cu และ Zn ที่ความเข้มข้น 50 µg/ml แสดงในตารางที่ 9

ตารางที่ 8. การเจริญของเชื้อไรโซเปียมถั่วแดงหลวงในอาหาร YMB ที่ระดับ pH และอุณหภูมิต่างๆ เชื้อที่
อัตราเร็ว 200 rpm อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 1-5 วัน

สายพันธุ์	การเจริญที่สภาวะ					
	pH 5.0	pH 6.5	pH 8.0	20°C	30°C	40°C
PV 01	+	+	+	+	+	-
PV 09	+	+	+	+	+	+
PV 10	+	+	+	-	+	+
PV 14	+	+	-	+	+	+
DASA 02006	+	+	+	+	+	+
DASA 02007	+	+	+	-	+	+
DASA 02008	+	+	+	+	+	+
DASA 02009	+	+	+	+	+	+
DASA 02010	+	+	+	+	+	+
DASA 02011	+	+	+	+	+	+
DASA 02021	+	+	+	-	+	+
DASA 02023	+	+	+	+	+	+
DASA 02026	+	+	+	-	+	-
DASA 02027	+	+	+	+	+	+
DASA 02031	+	+	+	-	+	+
DASA 02036	+	+	+	-	+	-
DASA 02041	+	+	+	+	+	+
DASA 02044	+	+	+	+	+	+
DASA 02045	+	+	-	+	+	-
DASA 02051	+	+	-	+	+	-
DASA 02065	+	+	-	-	+	+
DASA 02068	+	+	-	+	+	-
DASA 02077	+	+	+	-	+	+
DASA 06002	-	+	+	+	+	+
DASA 06003	+	+	-	+	+	-
DASA 06004	-	+	-	+	+	-
DASA 06006	+	+	+	+	+	-
DASA 06008	+	+	-	+	+	-

- หมายถึง ไม่มีการเจริญของเชื้อ; + หมายถึงมีการเจริญของเชื้อ

ตารางที่ 9. การเจริญของเชื้อไรโซเบียมถั่วแดงหลวงในอาหาร YMB ที่มี Cd, Co, Cu และ Zn ที่ความเข้มข้น 50 $\mu\text{g/ml}$ เชื้อที่อัตราเร็ว 200 rpm อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 1-5 วัน

สายพันธุ์	การเจริญของเชื้อในอาหารที่มีโลหะหนักที่ระดับความเข้มข้น 50 $\mu\text{g/ml}$			
	Cd	Co	Cu	Zn
PV 01	-	-	-	+
PV 09	-	-	-	+
PV 10	-	-	-	+
PV 14	-	-	-	-
DASA 02006	-	-	-	-
DASA 02007	-	-	-	-
DASA 02008	-	+	-	+
DASA 02009	+	-	-	+
DASA 02010	-	-	-	-
DASA 02011	-	+	+	+
DASA 02021	-	-	-	+
DASA 02023	-	-	-	+
DASA 02026	-	-	-	+
DASA 02027	-	-	-	+
DASA 02031	-	-	-	+
DASA 02036	-	-	-	+
DASA 02041	-	-	-	+
DASA 02044	-	-	-	+
DASA 02045	-	-	-	-
DASA 02051	-	-	-	+
DASA 02065	-	-	-	+
DASA 02068	-	-	-	-
DASA 02077	-	-	-	+
DASA 06002	-	-	-	-
DASA 06003	-	-	-	-
DASA 06004	-	-	-	-
DASA 06006	-	-	-	+
DASA 06008	-	-	-	+

- หมายถึง ไม่มีการเจริญของเชื้อ; + หมายถึงมีการเจริญของเชื้อ

จากเชื้อไรโซเบียมถั่วแดงหลวง 28 สายพันธุ์ ในสกุล *Bradyrhizobium*, *Rhizobium* และ *Bacillus* พบว่ามีเฉพาะ *Bradyrhizobium* spp. ที่ต้านทานต่อ Cd, Co และ Cu ที่ความเข้มข้น 50 $\mu\text{g/ml}$ ในขณะที่ *Bradyrhizobium* spp., *Rhizobium* sp. และ *Bacillus* spp. ต่างก็ต้านทานต่อ Zn ที่ความเข้มข้น 50 $\mu\text{g/ml}$ โดยทั่วไป ดินมักปนเปื้อนโลหะหนักหลายชนิดจากแหล่งอุตสาหกรรม เช่น โรงงานหลอมโลหะ, เหมืองแร่, โรงไฟฟ้า, โรงงานอุตสาหกรรม รวมทั้งโลหะหนักที่ปนเปื้อนในสารกำจัดศัตรูพืช, ปุ๋ย และกากอุตสาหกรรม (Abd-Alla et al. 2000) มีรายงานแบคทีเรียซึ่งรวมทั้ง *Bradyrhizobium*, *Rhizobium* และ *Bacillus* ที่ต้านทานต่อโลหะหนัก เช่น *Bradyrhizobium* spp. 40 ไอโซเลต ต้านทานต่อโลหะหนักอย่างน้อย 1 ชนิดในโลหะหนักที่ทดสอบ ได้แก่ Cd, Co, Cu, Zn, ตะกั่ว (lead; Pb), ปรอท (mercury; Hg), โครเมียม (chromium; Cr) และ Ni ที่ความเข้มข้นมากกว่า 200 $\mu\text{g/ml}$ โดยพบว่าความต้านทานต่อโลหะหนักหลายชนิดเป็นลักษณะที่พบได้โดยทั่วไปของเชื้อกลุ่มดังกล่าว

(Ahmad et al. 2001), *Rhizobium* spp. 20 ไอโซเลท ด้านทานต่อแมงกานีส (manganese; Mn) ที่ความเข้มข้น 0.75 มิลลิโมล (millimol; mmol), Cu ที่ความเข้มข้น 0.5 mmol, Zn ที่ความเข้มข้น 0.125 และ 0.250 mmol และ Cd ที่ความเข้มข้น 0.065 mmol (Cevheri et al. 2011), สายพันธุ์ของ *Rhizobium metallidurans* ด้านทานต่อ Zn และ Cd ที่ความเข้มข้น 35 และ 0.5 มิลลิโมลาร์ (millimolar; mM) ตามลำดับ (Grisson et al. 2015), ไอโซเลทของ *Rhi. leguminosarum* bv. *viciae* ทนต่อแบเรียม (barium; Ba), Zn, Co, อลูมิเนียม (aluminium; Al), Ni และ Cd ที่ความเข้มข้น 80, 70, 50, 40, 30 และ 10 ppm ตามลำดับ จึงประยุกต์ใช้เป็นตัวดูดซับ Cd และ Co จากสารละลาย (Abd-Alla et al. 2012) *Bac. cereus* สายพันธุ์ SIU1 ด้านทานต่อสารหนู (arsenic; As), ซีเซียม (caesium; Cs), Pb, Co, Ni, Cr, ซีลีเนียม (selenium; Se) และ Hg ที่ความเข้มข้น 2,300, 2,100, 600, 225, 175, 125, 25 และ 20 $\mu\text{g/ml}$ ตามลำดับ (Singh et al. 2010)

6) การสังเคราะห์ IAA

จากการศึกษาการสังเคราะห์ IAA ของเชื้อไรโซเบียมถั่วแดงหลวง 28 สายพันธุ์ ในอาหาร Tris-TMRT broth (Nuntagij et al. 1997) เขย่าที่อัตราเร็ว 200 rpm อุณหภูมิ 30°C ในที่มืด เป็นเวลา 1-5 วัน ให้เจริญถึงระยะ mid-log phase วัดปริมาณ IAA ในอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยวิธี colorimetric (Gordon and Weber 1951) เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของ IAA พบว่า เชื้อ 17 สายพันธุ์สังเคราะห์ IAA ในระดับความเข้มข้นต่ำกว่า 1 $\mu\text{g/ml}$ เชื้ออีก 17 สายพันธุ์สังเคราะห์ IAA อยู่ระหว่าง 1.54 ± 0.44 ถึง $32.21 \pm 1.12 \mu\text{g/ml}$ เชื้อที่สังเคราะห์ IAA ที่ความเข้มข้นสูงสุด คือ สายพันธุ์ DASA 06006 ความเข้มข้นของ IAA ที่สังเคราะห์ได้จากเชื้อแต่ละสายพันธุ์แสดงในตารางที่ 10

การสังเคราะห์ IAA เป็นคุณลักษณะที่สำคัญสำหรับการคัดเลือกแบคทีเรียส่งเสริมการเจริญของพืช (plant growth promoting rhizobacteria; PGPR) เนื่องจาก IAA มีบทบาทในกระบวนการทางสรีรวิทยาของพืช เช่น กระตุ้นการเพิ่มจำนวนราก, การแบ่งเซลล์ และการเจริญของต้น (Davies 1995; Lambrecht et al. 2000) Nimnoi and Pongsilp (2009) ทดสอบการสังเคราะห์ IAA ของเชื้อแบคทีเรีย 307 ไอโซเลท พบว่า 72 ไอโซเลท สังเคราะห์ IAA ได้ตั้งแต่ 1.26 ± 0.14 ถึง $19.15 \pm 0.39 \mu\text{g IAA equivalent/ml culture}$ จึงคัดเลือกเชื้อแบคทีเรีย 20 ไอโซเลท ซึ่งสังเคราะห์ IAA ได้ปริมาณสูงสุด เมื่อระบุสกุล-ชนิดของเชื้อ พบว่าเป็น *Agrobacterium tumefaciens*, *Bacillus*, *Bifidobacterium*, *Brevibacterium*, *Mesorhizobium*, *Pseudomonas*, *Rhizobium* และ *Sinorhizobium* จากการศึกษาผลของการใช้เชื้อแบคทีเรียสังเคราะห์ IAA ต่อการเจริญของพืช พบว่าสามารถเพิ่มน้ำหนักของต้นและรากของต้นคะน้า (*Bra. oleraceae*) และต้นผักกาดหัว (*Rap. sativus*) ได้ถึง 2.95- 5.63 เท่าของต้นที่ไม่ได้รับการใส่เชื้อ และเทียบเท่ากับต้นที่ได้รับ IAA ที่ความเข้มข้น 50 $\mu\text{g/ml}$

7) การสังเคราะห์ซีเคอร์โรฟอรัสประเภท catechol และ hydroxamate

จากการศึกษาการสังเคราะห์ซีเคอร์โรฟอรัสประเภท catechol และ hydroxamate ของเชื้อไรโซเบียมถั่วแดงหลวง 28 สายพันธุ์ โดยเลี้ยงเชื้อในอาหาร Gaus No. 1 broth (You et al. 2004) เขย่าที่อัตราเร็ว 200 rpm อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 1-5 วัน ให้เจริญถึงระยะ mid-log phase วัดปริมาณ

ซิดอร์โรฟอร์ประเภท catechol ตามวิธีการของ Arnow (1937) เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของ 2,3-dihydroxybenzoic acid และวัดปริมาณซิดอร์โรฟอร์ประเภท hydroxamate ตามวิธีการของ Csaky (1984) เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของ deferoxamine mesylate ผลการศึกษาพบว่า เชื้อ 22 สายพันธุ์สังเคราะห์ catechol ในระดับความเข้มข้นต่ำกว่า $1 \mu\text{mol/L}$ เชื้ออีก 6 สายพันธุ์สังเคราะห์ catechol อยู่ระหว่าง 1.09 ± 0.11 ถึง $9.08 \pm 1.28 \mu\text{mol/L}$ เชื้อที่สังเคราะห์ catechol ที่ความเข้มข้นสูงสุด คือ สายพันธุ์ DASA 02031 สำหรับ hydroxamate ที่เชื้อไรโซเบียม 28 สายพันธุ์สังเคราะห์ขึ้น มีความเข้มข้นอยู่ระหว่าง 0.91 ± 0.80 ถึง $45.92 \pm 12.33 \mu\text{mol/L}$ เชื้อที่สังเคราะห์ hydroxamate ที่ความเข้มข้นสูงสุด มีจำนวน 4 สายพันธุ์ ได้แก่ DASA 06002 ($45.92 \pm 12.33 \mu\text{mol/L}$), DASA 02026 ($31.41 \pm 15.69 \mu\text{mol/L}$), DASA 02021 ($25.86 \pm 10.88 \mu\text{mol/L}$) และ DASA 02077 ($19.70 \pm 13.91 \mu\text{mol/L}$) ซึ่งให้ค่าไม่ต่างกันทางสถิติ ความเข้มข้นของซิดอร์โรฟอร์ประเภท catechol และ hydroxamate ที่สังเคราะห์ได้จากเชื้อแต่ละสายพันธุ์แสดงในตารางที่ 10

ซิดอร์โรฟอร์เป็นสารประกอบที่แบคทีเรียบางชนิดสังเคราะห์ขึ้น และปลดปล่อยออกจากเซลล์เมื่อเจริญในสภาวะที่ขาดแคลนธาตุเหล็ก ทำหน้าที่จับสารประกอบธาตุเหล็กและละลาย ferric ion (Fe^{3+}) (Xiao and Kisaalita 1997) เชื้อกลุ่มไรโซเบียมที่สังเคราะห์ซิดอร์โรฟอร์ มีบทบาทสนับสนุนการตรึงไนโตรเจนของเชื้อในสภาวะแวดล้อมที่ขาดแคลนธาตุเหล็ก ซึ่งมีความสำคัญทั้งต่อการเจริญของเชื้อและเป็นส่วนประกอบของเอนไซม์ nitrogenase และ hydrogenase รวมทั้งโปรตีน ferredoxin ในกระบวนการตรึงไนโตรเจน (Lynch et al. 2001) การสังเคราะห์ซิดอร์โรฟอร์โดยเชื้อแบคทีเรีย พบว่ามีบทบาทต่อความสามารถของเชื้อในการส่งเสริมการเจริญของพืช ข้าวและถั่วเขียวที่ได้รับการใส่เชื้อสายพันธุ์ดั้งเดิมของ *Streptomyces* sp. ซึ่งสังเคราะห์ซิดอร์โรฟอร์ เพิ่มการเจริญและชีวมวลของรากและลำต้นพืชได้มากกว่าอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเปรียบเทียบกับเชื้อกลายพันธุ์ที่สูญเสียความสามารถในการสังเคราะห์ซิดอร์โรฟอร์ และต้นที่ไม่ได้รับการใส่เชื้อ (Rungin et al. 2012)

8) การสังเคราะห์แอมโมเนีย

จากการศึกษาการสังเคราะห์แอมโมเนียของเชื้อไรโซเบียมถั่วแดงหลวง 28 สายพันธุ์ โดยเลี้ยงเชื้อในอาหาร peptone water (Vosti 1979) เขย่าที่อัตราเร็ว 200 rpm ที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 1-5 วัน ให้เจริญถึงระยะ mid-log phase วัดปริมาณแอมโมเนียในอาหารเลี้ยงเชื้อ และสร้างกราฟมาตรฐานตามที่บรรยายโดย Pongsilp et al. (2012) พบว่า เชื้อมีการสังเคราะห์แอมโมเนียที่ระดับความเข้มข้นอยู่ระหว่าง 70.10 ± 15.56 ถึง $266.35 \pm 23.83 \mu\text{M}$ เชื้อที่สังเคราะห์แอมโมเนียที่ความเข้มข้นสูงสุด มีจำนวน 4 สายพันธุ์ ได้แก่ DASA 02077 ($266.35 \pm 23.83 \mu\text{M}$), DASA 02009 ($252.71 \pm 29.36 \mu\text{M}$), DASA 02068 ($233.75 \pm 59.72 \mu\text{M}$) และ DASA 02010 ($223.75 \pm 64.94 \mu\text{M}$) ซึ่งให้ค่าไม่ต่างกันทางสถิติ ความเข้มข้นของแอมโมเนียที่สังเคราะห์ได้จากเชื้อแต่ละสายพันธุ์แสดงในตารางที่ 10

นอกเหนือจากการตรึงไนโตรเจน เชื้อกลุ่มไรโซเบียมยังให้แอมโมเนียแก่สภาวะแวดล้อมโดยการสังเคราะห์แอมโมเนีย หรือ กระบวนการ ammonification ซึ่งเกิดจากการย่อยสลายสารประกอบไนโตรเจน เช่น nitrate, casamino acid และ trypticase peptone (Pongsilp 2012) *Bacillus macerans* และ *Bac. subtilis* ก็มีกระบวนการ ammonification จากการย่อยสลาย nitrate ภายใต้สภาวะการเจริญแบบไม่ใช้ออกซิเจน (Hoffmann et al. 1998; Marino et al. 2000; Schirawski and Unden 1995)

ตารางที่ 10. ความเข้มข้นของ IAA, ซิเตอร์โรฟอร์ประเภท catechol / hydroxamate และแอมโมเนียที่สังเคราะห์ได้จากเชื้อไรโซเบียมถั่วแดงหลวง

สายพันธุ์	ความเข้มข้นของ IAA, ซิเตอร์โรฟอร์ และแอมโมเนียในอาหารเลี้ยงเชื้อ			
	IAA ($\mu\text{g/ml}$)	catechol ($\mu\text{mol/l}$)	hydroxamate ($\mu\text{mol/l}$)	แอมโมเนีย (μM)
PV 01	7.74 ± 0.25	0.61 ± 0.16	1.41 ± 1.06	119.22 ± 23.20
PV 09	0.05 ± 0.07	2.39 ± 0.15	12.63 ± 6.24	187.40 ± 31.96
PV 10	0.02 ± 0.03	6.67 ± 0.86	6.51 ± 0.39	161.15 ± 6.51
PV 14	6.40 ± 0.46	0.79 ± 0.16	3.70 ± 1.03	70.10 ± 15.56
DASA 02006	0.69 ± 0.48	0.93 ± 0.45	1.01 ± 0.23	112.89 ± 6.47
DASA 02007	11.45 ± 0.72	0.39 ± 0.22	3.59 ± 0.97	106.98 ± 35.84
DASA 02008	2.36 ± 0.53	0.34 ± 0.08	4.05 ± 1.09	199.17 ± 36.41
DASA 02009	0.04 ± 0.05	0.25 ± 0.22	13.03 ± 3.97	252.71 ± 29.36
DASA 02010	0.43 ± 0.10	0.34 ± 0.18	1.95 ± 1.70	223.75 ± 64.94
DASA 02011	5.98 ± 0.35	0.14 ± 0.14	0.91 ± 0.80	218.23 ± 21.94
DASA 02021	0.05 ± 0.04	2.89 ± 0.08	25.86 ± 10.88	114.30 ± 6.44
DASA 02023	0.02 ± 0.03	0.14 ± 0.06	2.66 ± 1.91	97.57 ± 10.11
DASA 02026	0.05 ± 0.04	4.59 ± 0.18	31.41 ± 15.69	110.71 ± 4.96
DASA 02027	0.03 ± 0.03	0.11 ± 0.04	2.45 ± 1.32	90.48 ± 9.79
DASA 02031	0.09 ± 0.03	9.08 ± 1.28	10.10 ± 3.49	117.09 ± 17.48
DASA 02036	0.05 ± 0.02	0.46 ± 0.16	3.73 ± 0.80	114.49 ± 3.54
DASA 02041	2.01 ± 0.34	0.71 ± 0.19	3.43 ± 1.55	106.76 ± 2.19
DASA 02044	4.39 ± 0.65	0.23 ± 0.07	1.91 ± 0.99	111.84 ± 7.42
DASA 02045	0.06 ± 0.05	0.20 ± 0.08	3.01 ± 0.93	106.94 ± 1.23
DASA 02051	1.54 ± 0.44	0.19 ± 0.11	1.70 ± 1.06	107.52 ± 1.36
DASA 02065	0.04 ± 0.04	0.28 ± 0.08	1.60 ± 0.86	109.94 ± 1.25
DASA 02068	0.09 ± 0.06	0.39 ± 0.14	1.18 ± 0.52	233.75 ± 59.72
DASA 02077	0.04 ± 0.03	1.09 ± 0.11	19.70 ± 13.91	266.35 ± 23.83
DASA 06002	4.37 ± 0.60	0.28 ± 0.15	45.92 ± 12.33	109.43 ± 7.89
DASA 06003	0.25 ± 0.07	0.33 ± 0.08	2.95 ± 1.63	114.01 ± 1.51
DASA 06004	0.17 ± 0.03	0.17 ± 0.09	3.46 ± 1.27	110.97 ± 3.31
DASA 06006	32.21 ± 1.12	0.22 ± 0.09	2.06 ± 1.29	173.96 ± 22.42
DASA 06008	25.72 ± 1.56	0.25 ± 0.09	1.62 ± 0.57	99.17 ± 63.99

ค่าที่รายงานเป็นค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 ซ้ำ $\pm$ ค่า standard deviation

9) ความสามารถในการละลายฟอสเฟต

ประเมินความสามารถในการละลายฟอสเฟตของเชื้อไรโซเบียมถั่วแดงหลวง 28 สายพันธุ์ โดย point inoculate เชื้อบนอาหารแข็ง Pikovskaya (Pikovskaya 1948) บ่มที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 5 วัน บันทึก clear zone ที่เกิดขึ้นรอบโคโลนี เนื่องจากเชื้อละลาย tricalcium phosphate $[\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2]$ ซึ่งเป็นสารประกอบฟอสเฟตที่ไม่ละลายน้ำในอาหารเลี้ยงเชื้อ คำนวณค่า index ซึ่งแสดงถึงความสามารถในการละลายฟอสเฟตจากสูตร

$$\text{index} = \frac{\text{เส้นผ่านศูนย์กลางของ clear zone (มม.)}}{\text{เส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนี (มม.)}}$$

จากผลการศึกษา พบว่าเชื้อไรโซเบียมถั่วแดงหลวง 28 สายพันธุ์ สามารถละลายฟอสเฟต แต่ส่วนมาก (24 สายพันธุ์) เกิด clear zone เฉพาะบริเวณรอบโคโลนี เชื้อที่ให้ค่า index ของการละลายฟอสเฟตสูงสุด มีจำนวน 2 สายพันธุ์ ได้แก่ DASA 02077 (2.50 ± 0.25) และ DASA 02021 (1.99 ± 0.36) ซึ่งให้ค่าไม่ต่างกันทางสถิติ ค่า index ของการละลายฟอสเฟตของเชื้อไรโซเบียมถั่วแดงหลวง แสดงในตารางที่ 11

ความสามารถในการละลายฟอสเฟตเป็นคุณลักษณะที่สำคัญของ PGPR ในการเพิ่มฟอสฟอรัสซึ่งเป็นธาตุอาหารหลักให้แก่พืช สารประกอบฟอสฟอรัสมีอยู่ใน 2 รูป ได้แก่ รูปที่ละลายน้ำซึ่งเซลล์ของสิ่งมีชีวิตสามารถนำไปใช้ได้ และรูปที่ไม่ละลายน้ำซึ่งเซลล์ของสิ่งมีชีวิตไม่สามารถนำไปใช้ได้ โดยทั่วไป ในดินมักจะมีฟอสฟอรัสในรูปที่ละลายน้ำอยู่น้อยมาก ส่วนใหญ่น้อยกว่า 1 ppm (Goldstein 1994) เมื่อเติมปุ๋ยฟอสฟอรัสลงในดิน สารอนินทรีย์ฟอสฟอรัสที่ละลายน้ำจะจับกับธาตุเหล็ก, อลูมิเนียม และแคลเซียมที่มีอยู่ในดินอย่างรวดเร็ว กลายเป็นสารประกอบฟอสฟอรัสในรูปที่ไม่ละลายน้ำ (Ponmurugan and Gopi 2006) ความสามารถในการละลายฟอสเฟตของจุลินทรีย์เป็นผลมาจากการหลั่งกรดอินทรีย์ที่มีมวลโมเลกุลต่ำ ซึ่งจะใช้หมู่ hydroxyl หรือ carboxyl จับอนุภาคประจุบวกที่สร้างพันธะกับหมู่ฟอสเฟตออกมา (Kpombekou-A and Tabatabai 1994) หรือกิจกรรมของเอนไซม์ phosphatase ที่ดึงฟอสฟอรัสออกจากสารประกอบอินทรีย์โดยกระบวนการ dephosphorylation ที่พันธะ phospho-ester หรือ phospho-anhydride (Rodriguez et al. 2006) จากการใส่เชื้อแบคทีเรียละลายฟอสเฟต ได้แก่ *Bacillus* sp., *Burkholderia* sp., *Flavobacterium* sp. และ *Pseudomonas* spp. ให้แก่ข้าวโพดที่ปลูกในกระถาง พบว่าแบคทีเรียละลายฟอสเฟตเพิ่มความสูงของต้น, ความยาวของราก, น้ำหนักแห้งของต้น, น้ำหนักแห้งของราก และผลผลิตของเมล็ด ได้มากถึง 16%, 11%, 42%, 29% และ 33% ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับต้นที่ไม่ได้ใส่เชื้อแต่ใส่ปุ๋ยคอก นอกจากนี้ ฟอสฟอรัสในรูปที่ละลายน้ำได้ยังเพิ่มขึ้น 62% เมื่อเปรียบเทียบกับต้นที่ไม่ได้ใส่เชื้อแต่ใส่ปุ๋ยคอก (Hussain et al. 2013)

ตารางที่ 11. ค่า index ของการละลายฟอสเฟตบนอาหาร Pikovskaya ของเชื้อไรโซเบียมถั่วแดงหลวง หลังจากบ่มที่ 30°C เป็นเวลา 5 วัน

สายพันธุ์	ค่า index ของการละลายฟอสเฟต
PV 01, PV 09, PV 10, PV14, DASA 02006, DASA 02007, DASA 02008, DASA 02009, DASA 02010, DASA 02011, DASA 02026, DASA 02027, DASA 02031, DASA 02036, DASA 02041, DASA 02044, DASA 02045, DASA 02051, DASA 02068, DASA 06002, DASA 06003, DASA 06004, DASA 06006 และ DASA 06008	1.20 ± 0.00
DASA 02021	1.99 ± 0.36
DASA 02023	1.73 ± 0.46
DASA 02065	1.79 ± 0.38
DASA 02077	2.50 ± 0.25

ค่าที่รายงานเป็นค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 ซ้ำ ± ค่า standard deviation

10) กิจกรรมของเอนไซม์ phosphatase

จากการศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ extracellular alkaline phosphatase ของเชื้อไรโซเบียมถั่วแดงหลวง 28 สายพันธุ์ โดยเลี้ยงเชื้อในอาหาร Pikovskaya เขย่าที่อัตราเร็ว 200 rpm อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 1-5 วัน ให้เจริญถึงระยะ mid-log phase วัดกิจกรรมของเอนไซม์ extracellular alkaline phosphatase และสร้างกราฟมาตรฐานของ p-nitrophenol ตามที่บรรยายโดย Pantujit and Pongsilp (2010) กำหนดค่า 1 unit ของเอนไซม์ phosphatase เท่ากับเอนไซม์ที่ย่อยสลาย p-nitrophenyl phosphate ได้ p-nitrophenol 1 μmol ในเวลา 1 นาที (Tso and Chen 1997) ผลการศึกษาพบว่า เชื้อสังเคราะห์ extracellular alkaline phosphatase อยู่ระหว่าง 3.68 ± 0.51 ถึง 15.04 ± 0.65 milliunit/ml supernatant เชื้อที่สังเคราะห์ extracellular alkaline phosphatase สูงสุด คือ สายพันธุ์ DASA 02077 ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ phosphatase จากเชื้อแต่ละสายพันธุ์แสดงในตารางที่ 12

ฟอสฟอรัสเป็นธาตุอาหารหลักสำหรับการเจริญของสิ่งมีชีวิต (Hu et al. 2006) ฟอสฟอรัสมีทั้งอยู่ในรูปสารประกอบที่ละลายน้ำ และสารประกอบที่ไม่ละลายน้ำ ฟอสฟอรัสในรูปสารประกอบที่ไม่ละลายน้ำ เช่น $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, iron phosphate (FePO_4) และ aluminium phosphate (AlPO_4) จุลินทรีย์และพืชไม่สามารถนำไปใช้ได้ จุลินทรีย์หลายชนิดมีบทบาทในการละลายสารประกอบฟอสเฟตที่ไม่ละลายน้ำให้ได้ฟอสฟอรัสในรูปที่ละลายน้ำ จุลินทรีย์ที่มีคุณสมบัติเช่นนี้เรียกว่า “จุลินทรีย์ละลายฟอสเฟต” ซึ่งมีทั้งแบคทีเรียและเชื้อรา สำหรับแบคทีเรียละลายฟอสเฟต มีตัวอย่างเช่น *Agrobacterium* sp. (Goldstein 1986), *Arthrobacter ureafaciens* (Chen et al. 2006), *Bacillus firmus* (Datta et al. 1982), *Bacillus* sp. (Chen et al. 2006; Goldstein 1986), *Bradyrhizobium* (Leelahawong and Pongsilp 2009), *Chryseobacterium* sp. (Chen et al. 2006), *Cupriavidus* (Leelahawong and

Pongsilp 2009), *Delftia* sp. (Chen et al. 2006), *Enterobacter agglomeran* (Kim et al. 1998), *Enterobacter* sp. (Chung et al. 2005), *Flavobacterium* sp. (Goldstein 1986), *Gordonia* sp. (Chen et al. 2006), *Klebsiella* sp. (Chung et al. 2005), *Paenibacillus* sp. (Hu et al. 2006), *Pantoea* sp. (Chung et al. 2005), *Phyllobacterium myrsina* (Chen et al. 2006), *Pseudomonas* sp. (Goldstein 1986), *Rhizobium* sp. (Goldstein 1986 ; Leelahawong and Pongsilp 2009), *Rhodococcus erythropolis* (Chen et al. 2006), *Serratia marcescens* (Chen et al. 2006) และ *Sinorhizobium* (Leelahawong and Pongsilp 2009) สำหรับเชื้อราละลายฟอสเฟต มีตัวอย่างเช่น *Aspergillus niger* (El-Azouni 2008), *Penicillium italicum* (El-Azouni 2008) และ *Trichoderma* sp. (Kapri and Tewari 2010) การละลายฟอสเฟตโดยจุลินทรีย์เกิดจากการหลังกรดอินทรีย์ที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ (Chen et al. 2006) หรือเอนไซม์ phosphatase (Kim et al. 1998; Ponmurugan and Gopi 2006; Relwani et al. 2008 Sabannavar and Lakshman 2009) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ดึงฟอสฟอรัสออกจากสารประกอบอินทรีย์โดยกระบวนการ dephosphorylation ที่พันธะ phospho-ester หรือ phospho-anhydride (Rodriguez et al. 2006) Leelahawong and Pongsilp (2009) ศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ acid-, neutral- และ alkaline phosphatase ของเชื้อไรโซเบียม 56 สายพันธุ์ที่แยกได้จากพืชสมุนไพร 3 ชนิด ได้แก่ *Pue. mirifica* (กวาวเครือขาว), *Der. elliptica* (โลชั่น หรือ หางไหล) และ *Ind. tinctoria* (คราม) จากการระบุสกุลของเชื้อพบว่า *Bradyrhizobium*, *Ralstonia* (*Cupriavidus*), *Rhizobium*, *Sinorhizobium* และเชื้อที่ไม่ได้ระบุสกุล ทุกสายพันธุ์สังเคราะห์เอนไซม์ extracellular phosphatase กิจกรรมของ acid phosphatase อยู่ระหว่าง 2.81 ± 0.17 ถึง 7.86 ± 0.26 mU/ml supernatant กิจกรรมของ neutral phosphatase อยู่ระหว่าง 2.46 ± 0.14 ถึง 5.88 ± 0.01 mU/ml supernatant และกิจกรรมของ alkaline phosphatase อยู่ระหว่าง 2.96 ± 0.28 ถึง 12.65 ± 0.13 mU/ml supernatant ในขณะที่มีกิจกรรมของเอนไซม์ cell-bound phosphatase ในระดับต่ำ การศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ phosphatase จะเป็นประโยชน์ในการประยุกต์ใช้จุลินทรีย์เพื่อเพิ่มธาตุอาหารฟอสฟอรัสให้แก่พืช Pantujit and Pongsilp (2010) คัดเลือกเชื้อแบคทีเรียละลายฟอสเฟต และระบุสกุล-ชนิดได้เป็น *Agr. tumefaciens*, *Bacillus* sp., *Mesorhizobium* spp. และ *Sinorhizobium* spp. พบว่าทุกสายพันธุ์สังเคราะห์เอนไซม์ acid- และ alkaline phosphatase ในการละลายฟอสเฟต สายพันธุ์ของ *Sinorhizobium* มีกิจกรรมของเอนไซม์ acid phosphatase สูงสุดที่ 172.57 ± 8.28 mU/ml supernatant เมื่อเจริญในอาหาร Pikovskaya ที่มี $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ เป็นแหล่งฟอสฟอรัส *Mesorhizobium* มีกิจกรรมของเอนไซม์ alkaline phosphatase สูงสุดที่ 165.96 ± 9.61 mU/ml supernatant เมื่อเจริญในอาหาร Pikovskaya ที่มี $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ เป็นแหล่งฟอสฟอรัส สายพันธุ์ของ *Sinorhizobium* เพิ่มน้ำหนักแห้งของข้าวโพดได้สูงสุด เป็น 2.56-3.86 เท่าของต้นควบคุมที่ใส่เชื้อ *Escherichia coli* DH5 α สายพันธุ์ของ *Agr. tumefaciens*, *Mesorhizobium* และ *Sinorhizobium* เพิ่มปริมาณฟอสฟอรัสในต้นข้าวโพดอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเปรียบเทียบกับต้นควบคุมที่ใส่เชื้อ *Esc. coli* DH5 α

11) กิจกรรมของเอนไซม์ urease

จากการศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ urease ของเชื้อไรโซเบียมถั่วแดงหลวง 28 สายพันธุ์ โดยเลี้ยงเชื้อในอาหาร Christensen's urea broth เขย่าที่อัตราเร็ว 200 rpm อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 1-5 วัน

ให้เจริญถึงระยะ mid-log phase เหยี่ยงปั่นเก็บตะกอนเซลล์ และ supernatant ใช้เครื่องกำเนิดคลื่นเสียง (sonicator) ทำให้ตะกอนเซลล์แตก เพื่อวัดกิจกรรมของ intracellular และ surface-associated urease สำหรับ supernatant ใช้วัดกิจกรรมของ extracellular urease ตามวิธีการของ Chuntanom and Pongsilp (2011) วัดปริมาณแอมโมเนียที่เกิดจากกิจกรรมของเอนไซม์ urease กำหนดค่า 1 unit ของเอนไซม์ urease เท่ากับเอนไซม์ที่ย่อยสลาย urea 0.5 μmol ได้แอมโมเนีย 1.0 μmol ในเวลา 1 นาที ที่ 37°C (Starnes et al. 1984) พบว่าเชื้อทุกสายพันธุ์มีกิจกรรมของ extracellular urease เป็นหลัก และมีกิจกรรมของ intracellular และ surface-associated urease ในระดับต่ำ กิจกรรมของ extracellular urease อยู่ระหว่าง 5.46 ± 1.02 ถึง 35.12 ± 2.14 unit/ml supernatant เชื้อที่มีกิจกรรมของ extracellular urease สูงสุด คือ สายพันธุ์ DASA 02036 (35.12 ± 2.14 unit/ml supernatant) และ DASA 02065 (33.20 ± 4.82 unit/ml supernatant) ซึ่งให้ค่าไม่ต่างกันทางสถิติ ในขณะที่กิจกรรมของ intracellular และ surface-associated urease อยู่ระหว่าง 0.20 ± 0.01 ถึง 0.99 ± 0.49 unit/mg cell ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ urease จากเชื้อแต่ละสายพันธุ์แสดงในตารางที่ 12

การสังเคราะห์เอนไซม์ urease เป็นอีกกระบวนการหนึ่งที่ทำให้แอมโมเนีย โดยเอนไซม์ urease เป็นเอนไซม์ที่ประกอบด้วยหน่วยย่อยหลายหน่วย และมีนิกเกิล (nickel; Ni) เป็นองค์ประกอบ (nickel-containing, multisubunit enzyme) ทำหน้าที่กระตุ้นกระบวนการย่อยสลาย (hydrolysis) urea ได้แอมโมเนียและ carbonic acid (Morou-Bermudez and Burne 1999) กิจกรรมของเอนไซม์ urease ของเชื้อแบคทีเรียมักจะถูกควบคุมโดยเกี่ยวข้องกับกระบวนการตอบสนองต่อสภาวะแวดล้อม เช่น ปริมาณไนโตรเจนที่นำไปใช้ได้ (nitrogen availability) และค่า pH (Mobley et al. 1995) ในการศึกษาครั้งนี้ พบว่าเชื้อไรโซเปียมถั่วแดงหลวงทุกสายพันธุ์มีกิจกรรมของ extracellular urease เป็นหลัก การสังเคราะห์ extracellular urease มีรายงานว่าพบในแบคทีเรียหลายชนิด เช่น *Lactobacillus* sp. และ *Helicobacter pylori* (Marcus and Scott 2001; Moreau et al. 1976)

12) กิจกรรมของเอนไซม์ protease

จากการศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ protease ของเชื้อไรโซเปียมถั่วแดงหลวง 28 สายพันธุ์ โดยเลี้ยงเชื้อในอาหาร skim milk broth (Nimnoi et al. 2010) เขย่าที่อัตราเร็ว 200 rpm อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 1-5 วัน ให้เจริญถึงระยะ mid-log phase วัดกิจกรรมของเอนไซม์ protease โดยวิธีการ azocasein protease assay (Secades and Guijarro 1999) ซึ่งกำหนดค่า 1 unit เท่ากับเอนไซม์ที่ให้ค่าการดูดกลืนแสงที่ 420 nm เป็น 0.01 จากการบ่มเอนไซม์กับสารตั้งต้น (substrate) เป็นเวลา 30 นาที ที่ 30°C กิจกรรมของ protease มีตั้งแต่ไม่สามารถตรวจพบ ถึง 74.21 ± 15.09 unit/ml supernatant เชื้อที่มีกิจกรรมของ protease สูงสุด มีจำนวน 2 สายพันธุ์ ได้แก่ PV 10 (74.21 ± 15.09 unit/ml supernatant) และ DASA 02027 (57.46 ± 2.17 unit/ml supernatant) ซึ่งให้ค่าไม่ต่างกันทางสถิติ ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ protease จากเชื้อแต่ละสายพันธุ์แสดงในตารางที่ 12

เอนไซม์ protease ทำหน้าที่กระตุ้นกระบวนการย่อยสลายโปรตีน de Oliveira et al. (2010) ศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ alkaline protease ที่สังเคราะห์ขึ้นจาก *Bradyrhizobium* sp. และ *Rhizobium* sp. พบว่ากิจกรรมของเอนไซม์ protease สูงสุดเมื่อเซลล์เข้าสู่การเจริญระยะ stationary

phase สายพันธุ์ของ *Bradyrhizobium* มีกิจกรรมของเอนไซม์ protease สูงสุดเท่ากับ 88 unit/ml ในขณะที่สายพันธุ์ของ *Rhizobium* กิจกรรมของเอนไซม์ protease สูงสุดเท่ากับ 15 unit/ml เอนไซม์ protease ที่สังเคราะห์โดยสายพันธุ์ของ *Bradyrhizobium* ทนต่อสภาวะความเป็นด่างได้มากกว่าเอนไซม์ protease ที่สังเคราะห์โดยสายพันธุ์ของ *Rhizobium* เอนไซม์ protease ที่สังเคราะห์โดยสายพันธุ์ของ *Rhizobium* มีกิจกรรมของเอนไซม์ที่ค่า pH อยู่ระหว่าง 6-11 โดยมีกิจกรรมสูงสุดเมื่อค่า pH อยู่ระหว่าง 10-11 และที่อุณหภูมิ 35°C ในขณะที่เอนไซม์ protease ที่สังเคราะห์โดยสายพันธุ์ของ *Bradyrhizobium* มีกิจกรรมของเอนไซม์ที่ค่า pH อยู่ระหว่าง 9-10 และมีกิจกรรมสูงสุดที่อุณหภูมิ 55°C

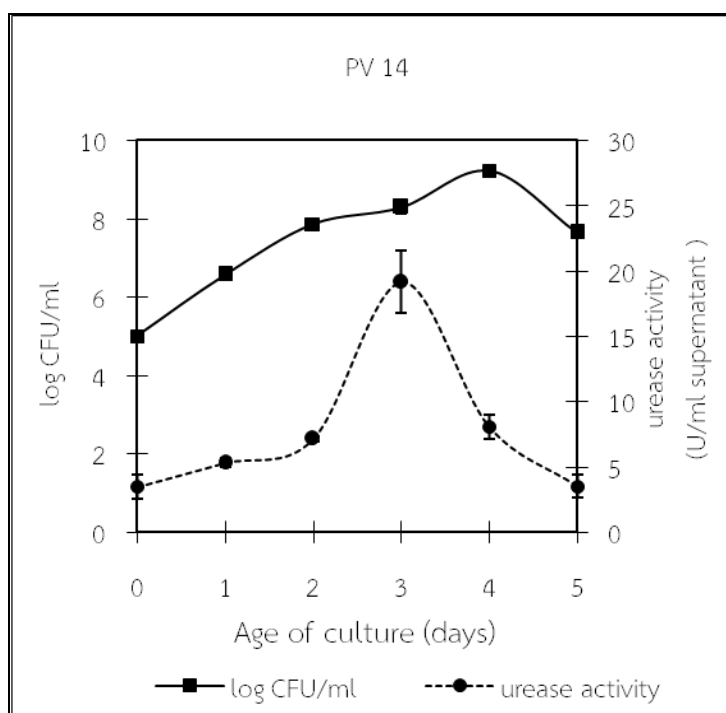
ตารางที่ 12. ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ phosphatase, urease และ protease ของเชื้อไรโซเปียมถั่วแดง-หลวง

สายพันธุ์	ค่ากิจกรรมของเอนไซม์			
	extracellular phosphatase (milliunit/ml supernatant)	extracellular urease (unit/ml supernatant)	intracellular urease (unit/mg cell)	extracellular protease (unit/ml supernatant)
PV 01	4.06 ± 0.64	10.63 ± 1.57	0.37 ± 0.09	47.03 ± 4.18
PV 09	3.68 ± 0.51	17.50 ± 4.91	0.55 ± 0.07	4.73 ± 0.25
PV 10	7.09 ± 0.23	8.85 ± 0.92	0.30 ± 0.05	74.21 ± 15.09
PV 14	5.69 ± 0.39	27.95 ± 2.83	0.43 ± 0.03	12.63 ± 0.98
DASA 02006	5.18 ± 0.60	21.06 ± 2.47	0.72 ± 0.18	22.70 ± 0.78
DASA 02007	7.13 ± 0.27	6.78 ± 2.48	0.35 ± 0.04	0.00 ± 0.00
DASA 02008	5.43 ± 0.53	7.68 ± 1.16	0.47 ± 0.08	2.09 ± 0.62
DASA 02009	6.05 ± 0.61	11.01 ± 1.72	0.48 ± 0.21	4.75 ± 0.91
DASA 02010	7.05 ± 0.83	17.27 ± 5.36	0.36 ± 0.09	44.79 ± 0.95
DASA 02011	4.82 ± 0.44	5.46 ± 1.02	0.20 ± 0.01	7.65 ± 0.47
DASA 02021	13.07 ± 0.86	29.53 ± 1.54	0.83 ± 0.39	6.78 ± 2.39
DASA 02023	10.06 ± 0.29	14.91 ± 0.89	0.99 ± 0.49	46.02 ± 0.92
DASA 02026	5.97 ± 0.71	4.01 ± 1.13	0.55 ± 0.13	13.97 ± 0.80
DASA 02027	7.47 ± 1.10	26.20 ± 2.70	0.85 ± 0.37	57.46 ± 2.17
DASA 02031	6.88 ± 0.44	29.36 ± 2.40	0.83 ± 0.35	0.19 ± 0.06
DASA 02036	4.36 ± 0.72	35.12 ± 2.14	0.78 ± 0.38	1.56 ± 1.74
DASA 02041	7.46 ± 0.99	22.30 ± 1.20	0.61 ± 0.19	12.56 ± 3.14
DASA 02044	5.38 ± 0.92	25.75 ± 8.98	0.72 ± 0.19	41.57 ± 0.86
DASA 02045	5.86 ± 0.16	19.48 ± 0.85	0.79 ± 0.16	50.02 ± 2.04
DASA 02051	7.17 ± 0.62	19.70 ± 2.55	0.55 ± 0.12	33.12 ± 3.41
DASA 02065	13.21 ± 0.91	33.20 ± 4.82	0.60 ± 0.19	15.80 ± 5.61
DASA 02068	7.52 ± 0.79	12.70 ± 2.14	0.62 ± 0.02	2.15 ± 2.26
DASA 02077	15.04 ± 0.65	6.21 ± 1.11	0.35 ± 0.02	23.60 ± 0.81
DASA 06002	4.91 ± 0.82	31.05 ± 1.81	0.73 ± 0.20	14.03 ± 0.75
DASA 06003	6.81 ± 0.84	6.44 ± 0.74	0.72 ± 0.25	3.15 ± 1.03
DASA 06004	4.08 ± 1.59	26.20 ± 1.44	0.82 ± 0.29	8.15 ± 0.69
DASA 06006	4.45 ± 0.90	14.82 ± 1.47	0.53 ± 0.02	16.13 ± 0.63
DASA 06008	6.87 ± 0.90	12.85 ± 1.23	0.44 ± 0.04	0.06 ± 0.11

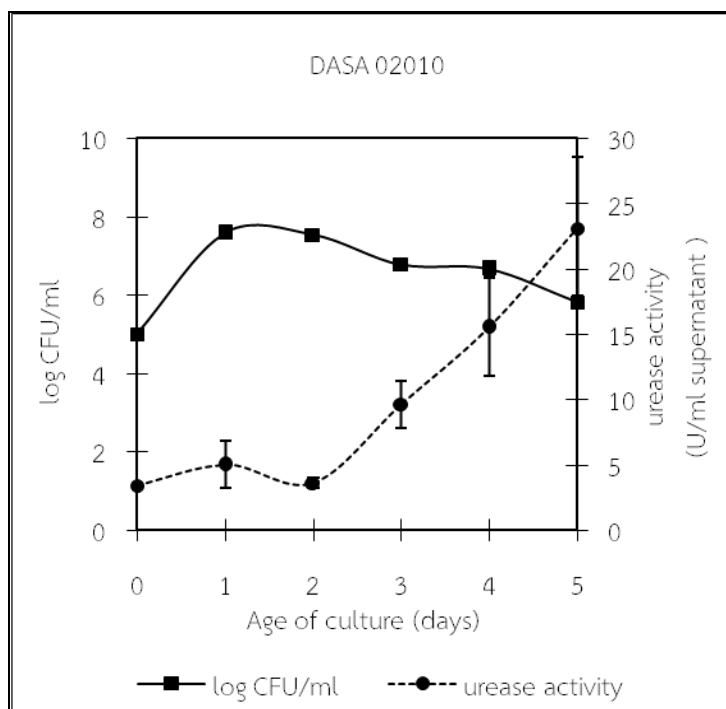
ค่าที่รายงานเป็นค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 ซ้ำ ± ค่า standard deviation

10. การทดสอบผลของปัจจัยต่างๆ ต่อการเจริญ และกิจกรรมของเอนไซม์ urease ของเชื้อไรโซเปียมถั่วแดงหลวง

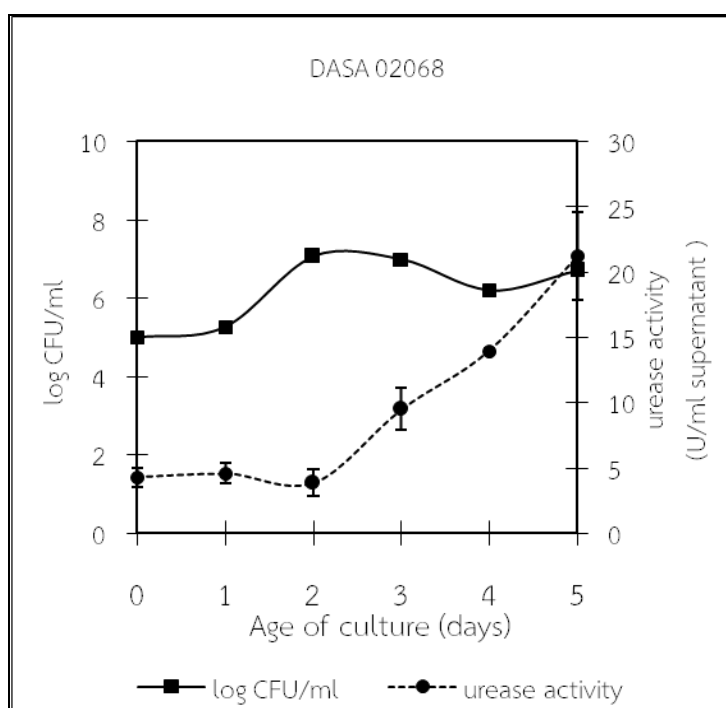
คัดเลือกเชื้อที่มีกิจกรรมของเอนไซม์ urease จำนวน 3 สายพันธุ์ ได้แก่ PV 14, DASA 02010 และ DASA 02068 มาทำการวิเคราะห์กิจกรรมของ extracellular urease ควบคู่กับการเจริญ เนื่องจากพบว่าเชื้อไรโซเปียมถั่วแดงหลวงมีกิจกรรมของ extracellular urease เป็นหลัก จากการศึกษา พบว่ามีกิจกรรมของเอนไซม์ urease ใน 2 รูปแบบ สำหรับเชื้อสายพันธุ์ PV 14 ซึ่งมีลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA ใกล้เคียงกับ *Bacillus* พบว่ากิจกรรมของเอนไซม์ urease ค่อยๆ เพิ่มขึ้นในช่วง 2 วันแรกของการเจริญ และเพิ่มมากที่สุดในวันที่ 3 ของการเจริญ หลังจากนั้น กิจกรรมของเอนไซม์ urease ค่อยๆ ลดลงอย่างชัดเจน โดยกิจกรรมของเอนไซม์ urease มีค่าสูงสุด เมื่อเชื้ออยู่ในช่วงการเจริญระยะ mid-log phase ถึง late-log phase ในขณะที่เชื้อสายพันธุ์ DASA 02010 และ DASA 02068 ซึ่งมีลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA ใกล้เคียงกับ *Bradyrhizobium* กิจกรรมของเอนไซม์ urease ในช่วงการเจริญ 2 วันแรกไม่ต่างกันทางสถิติ หลังจากนั้น กิจกรรมของเอนไซม์ urease เพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องจนถึงวันสุดท้ายของการเลี้ยงเชื้อ ซึ่งเชื้ออยู่ในช่วงการเจริญระยะ stationary phase รูปแบบที่แตกต่างกันนี้ พบใน *Actinobacillus* ซึ่งมีกิจกรรมของเอนไซม์ urease ในช่วงระยะเริ่มแรกของการเจริญ ในขณะที่ *Lactobacillus* กลับมีกิจกรรมของเอนไซม์ urease เฉพาะในช่วงระยะสิ้นสุดของ exponential phase (Moreau et al. 1976) ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ urease ระหว่างการเจริญของเชื้อไรโซเปียมถั่วแดงหลวง สายพันธุ์ PV 14, DASA 02010 และ DASA 02068 แสดงในภาพที่ 2, 3 และ 4 ตามลำดับ



ภาพที่ 4. การเจริญและกิจกรรมของเอนไซม์ urease ของเชื้อสายพันธุ์ PV 14 เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหาร Christensen's urea broth บ่มที่อุณหภูมิ 30°C และเขย่าที่อัตราเร็ว 200 rpm
ค่าที่รายงานเป็นค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 ซ้ำ error bar แสดงค่า standard deviation

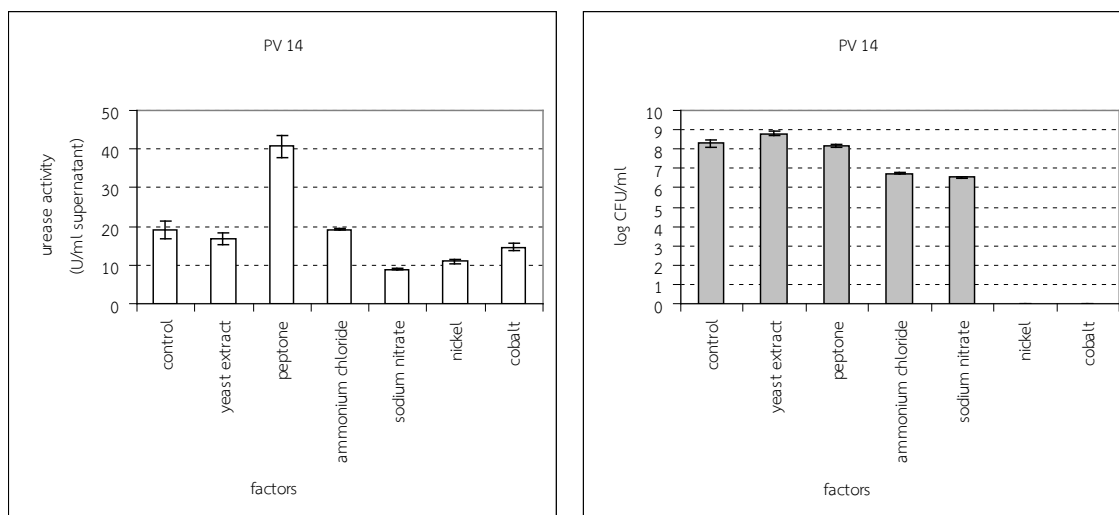


ภาพที่ 5. การเจริญและกิจกรรมของเอนไซม์ urease ของเชื้อสายพันธุ์ DASA 02010 เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหาร Christensen's urea broth บ่มที่อุณหภูมิ 30°C และเขย่าที่อัตราเร็ว 200 rpm ค่าที่รายงานเป็นค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 ซ้ำ error bar แสดงค่า standard deviation



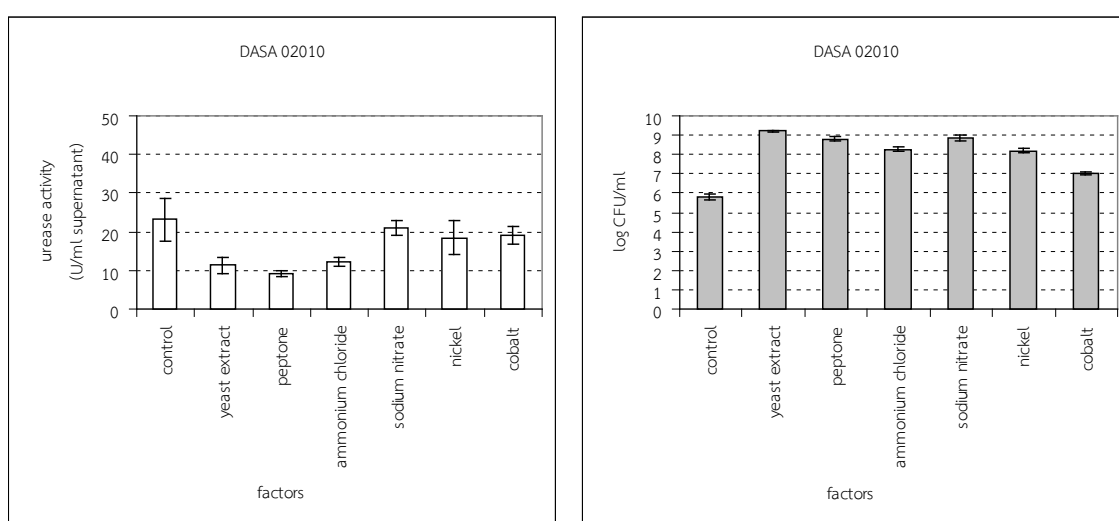
ภาพที่ 6. การเจริญและกิจกรรมของเอนไซม์ urease ของเชื้อสายพันธุ์ DASA 02068 เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหาร Christensen's urea broth บ่มที่อุณหภูมิ 30°C และเขย่าที่อัตราเร็ว 200 rpm ค่าที่รายงานเป็นค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 ซ้ำ error bar แสดงค่า standard deviation

ในการศึกษาผลของปัจจัยต่างๆ ต่อการเจริญ และกิจกรรมของเอนไซม์ urease ซึ่งทำการวิเคราะห์โดยเลี้ยงเชื้อในอาหาร Christensen's urea broth ที่มีการเติมปัจจัยต่างๆ ได้แก่ yeast extract, peptone, NH_4Cl , NaNO_3 , Ni และ Co วัดกิจกรรมของเอนไซม์ urease และนับจำนวนเซลล์ ในวันที่เชื้อมีกิจกรรมของเอนไซม์ urease สูงสุด เปรียบเทียบกับ control พบว่าผลของปัจจัยต่างๆ ต่อการเจริญ และกิจกรรมของเอนไซม์ urease แตกต่างกันไปในแต่ละสายพันธุ์ NaNO_3 , Ni และ Co ลดกิจกรรมของเอนไซม์ urease ของเชื้อสายพันธุ์ PV 14 โดย NaNO_3 มีผลลดกิจกรรมของเอนไซม์ urease ได้มากที่สุด ในขณะที่ peptone เพิ่มกิจกรรมของเอนไซม์ urease ของเชื้อสายพันธุ์ PV 14 แต่ลดกิจกรรมของเอนไซม์ urease ของเชื้อสายพันธุ์ DASA 02010 และไม่มีผลแตกต่างทางสถิติสำหรับเชื้อสายพันธุ์ DASA 02068 นอกจากนี้ yeast extract ลดกิจกรรมของเอนไซม์ urease ของเชื้อสายพันธุ์ DASA 02010 และ DASA 02068 ทั้งนี้ สันนิษฐานว่าความแตกต่างของผลของสารประกอบไนโตรเจนต่อกิจกรรมของเอนไซม์ urease ขึ้นอยู่กับวิถีการย่อยสลายสารประกอบไนโตรเจน (nitrogen catabolic pathway) ที่แตกต่างกันของเชื้อแต่ละสายพันธุ์ (Levican et al. 2008) โลหะหนักยับยั้งการเจริญของเชื้อบางสายพันธุ์ Ni และ Co ยับยั้งการเจริญของเชื้อสายพันธุ์ PV 14 และยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ urease อย่างสิ้นเชิง ในขณะที่ Ni และ Co ไม่มีผลยับยั้งการเจริญของเชื้อสายพันธุ์ DASA 02010 และ DASA 02068 รวมถึงไม่มีผลแตกต่างทางสถิติของกิจกรรมของเอนไซม์ urease ถึงแม้ว่า Ni จะเป็น co factor ของเอนไซม์ urease ของแบคทีเรียบางชนิด เช่น *Hel. pylori* (Schauer et al. 2010) แต่ก็เป็นพิษต่อแบคทีเรียบางชนิด เช่น *Esc. coli* (Perrin et al. 2009) มีรายงานเกี่ยวกับปัจจัยต่างๆ ที่มีผลต่อการสังเคราะห์เอนไซม์ urease ของเชื้อแบคทีเรีย ตัวอย่างเช่น การเติม Ni ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ มีผลกระตุ้นกิจกรรมของเอนไซม์ urease ของเชื้อ *Anabaena cylindrica* ซึ่งเป็นไซยาโนแบคทีเรีย (cyanobacterium) (Mackerras and Smith 1986) เช่นเดียวกับการเติม Ni ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ *Hel. pylori* ที่สามารถเพิ่มการแสดงออกของยีนควบคุมการสังเคราะห์ UreA และ UreB ซึ่งเป็นหน่วยย่อยของเอนไซม์ urease ได้ถึง 3.5 เท่า (van Vliet et al. 2001) ปัจจัยที่ยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ urease ของเชื้อ *Campylobacter pylori* ได้แก่ acetohydroxamic acid (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$), hydroxyurea (85 $\mu\text{g}/\text{ml}$), fluoroamide (0.05 $\mu\text{g}/\text{ml}$) และ EDTA (8 mM) (Mobley et al. 1988) อุณหภูมิและ urea มีผลต่อการแสดงออกของยีนควบคุมการสังเคราะห์เอนไซม์ urease ในเชื้อ *Proteus mirabilis* (Poore and Mobley 2003) เกลือโคบอลต์สามารถยับยั้ง intracellular urease ของเชื้อรา *Rhizopus oryzae* (Geweely 2006) การเจริญและค่ากิจกรรมของเอนไซม์ urease ของเชื้อไรโซเปียมถั่วแดงหลวงสายพันธุ์ PV 14, DASA 02010 และ DASA 02068 เมื่อมีการเติมปัจจัยต่างๆ แสดงในภาพที่ 7, 8 และ 9 ตามลำดับ



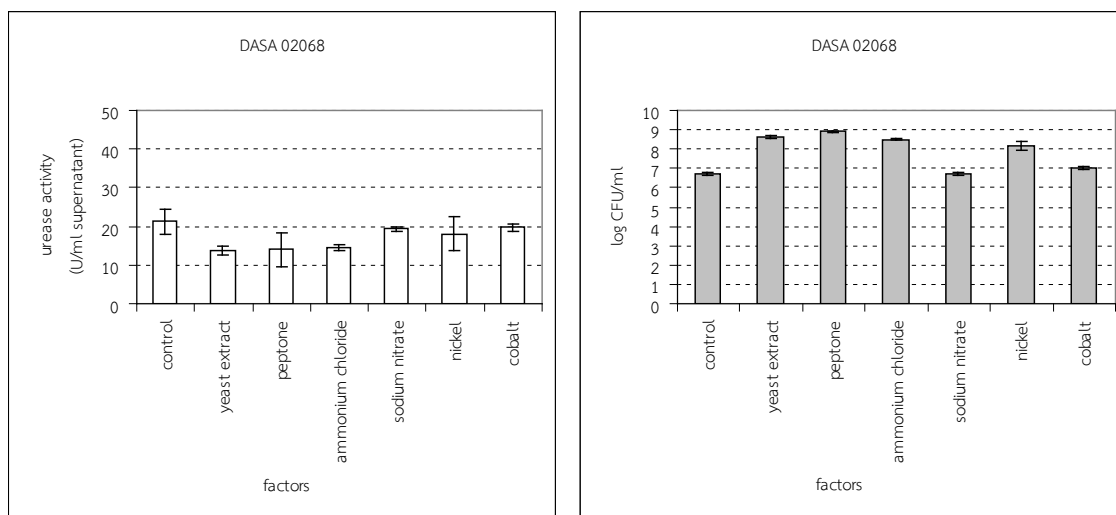
ภาพที่ 7. การเจริญและค่ากิจกรรมของเอนไซม์ urease ของเชื้อสายพันธุ์ PV 14 เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหาร Christensen's urea broth ที่มีการเติมปัจจัยต่างๆ บ่มที่อุณหภูมิ 30°C และเขย่าที่อัตราเร็ว 200 rpm เป็นเวลา 3 วัน

ค่าที่รายงานเป็นค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 ซ้ำ error bar แสดงค่า standard deviation



ภาพที่ 8. การเจริญและค่ากิจกรรมของเอนไซม์ urease ของเชื้อสายพันธุ์ DASA 02010 เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหาร Christensen's urea broth ที่มีการเติมปัจจัยต่างๆ บ่มที่อุณหภูมิ 30°C และเขย่าที่อัตราเร็ว 200 rpm เป็นเวลา 5 วัน

ค่าที่รายงานเป็นค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 ซ้ำ error bar แสดงค่า standard deviation

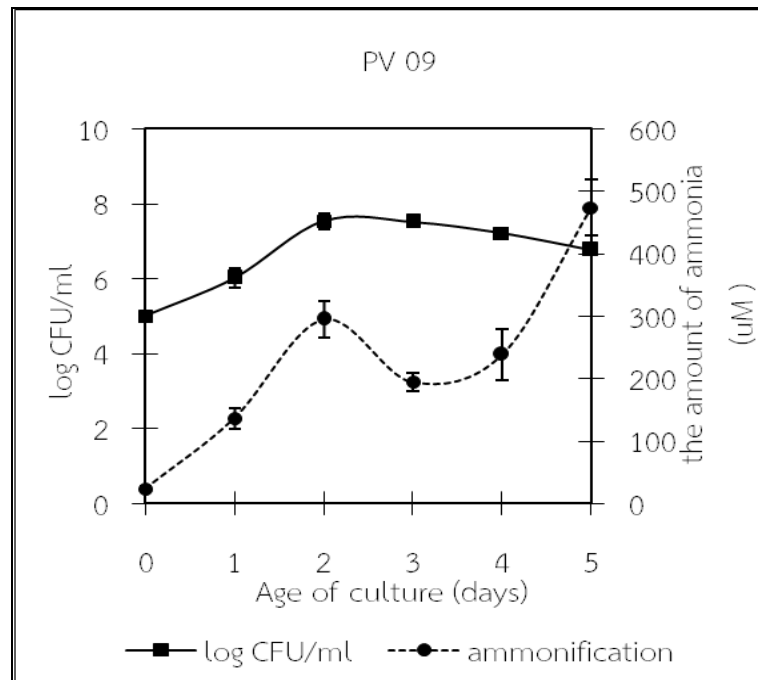


ภาพที่ 9. การเจริญและค่ากิจกรรมของเอนไซม์ urease ของเชื้อสายพันธุ์ DASA 02068 เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหาร Christensen's urea broth ที่มีการเติมปัจจัยต่างๆ บ่มที่อุณหภูมิ 30°C และเขย่าที่อัตราเร็ว 200 rpm เป็นเวลา 5 วัน

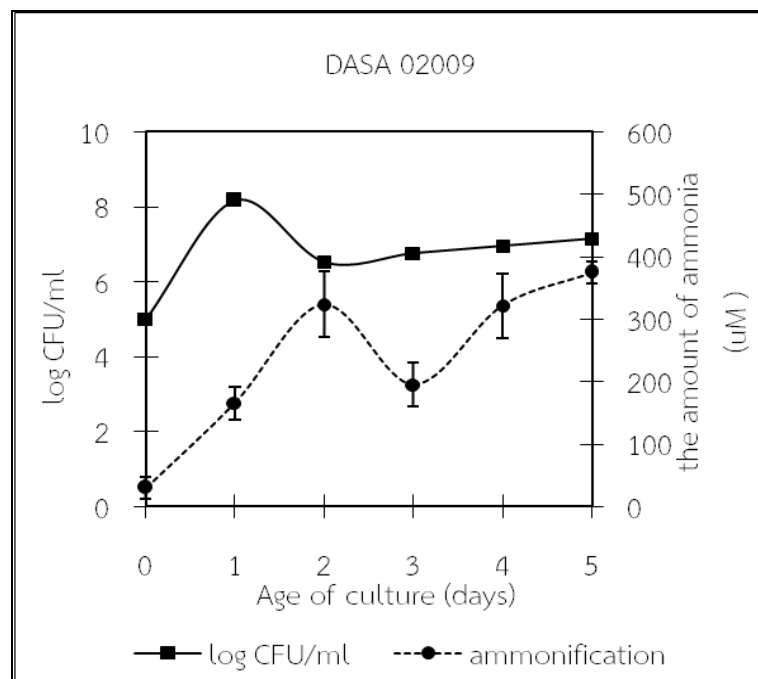
ค่าที่รายงานเป็นค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 ซ้ำ error bar แสดงค่า standard deviation

11. การทดสอบผลของปัจจัยต่างๆ ต่อการเจริญ และการสังเคราะห์แอมโมเนียของเชื้อไรโซเบียม ถั่วแดงหลวง

คัดเลือกเชื้อที่มีการสังเคราะห์แอมโมเนีย จำนวน 5 สายพันธุ์ ได้แก่ PV 09, DASA 02009, DASA 02068, DASA 02077 และ DASA 06006 มาทำการวิเคราะห์การสังเคราะห์แอมโมเนียควบคู่กับการเจริญ พบว่าการสังเคราะห์แอมโมเนียโดยกระบวนการ ammonification เพิ่มขึ้นตามการเจริญของเชื้อ จนถึงเมื่อเชื้อเข้าสู่การเจริญระยะ stationary phase ความเข้มข้นของแอมโมเนียจากกระบวนการ ammonification ระหว่างการเจริญของเชื้อไรโซเบียมถั่วแดงหลวงสายพันธุ์ PV 09, DASA 02009, DASA 02068, DASA 02077 และ DASA 06006 แสดงในภาพที่ 10, 11, 12, 13 และ 14 ตามลำดับ

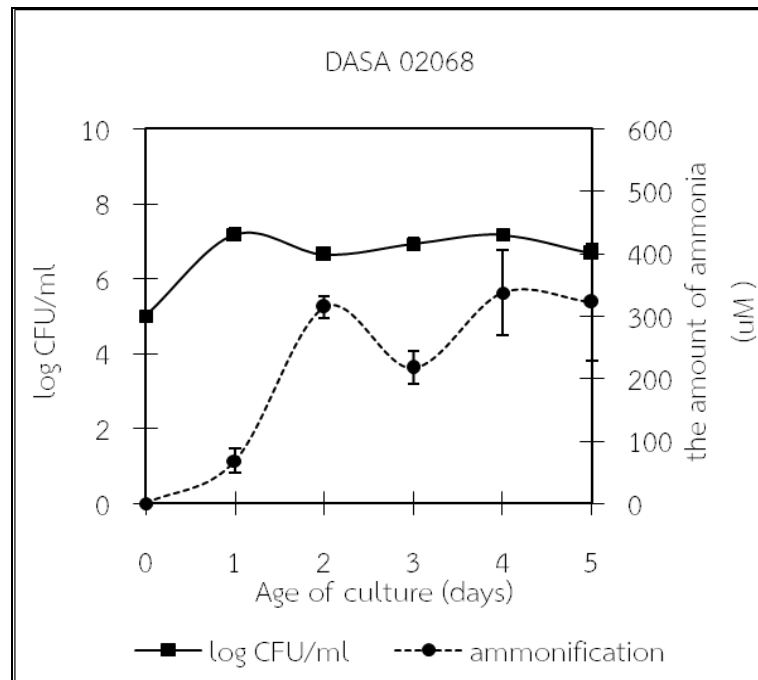


ภาพที่ 10. การเจริญและความเข้มข้นของแอมโมเนียจากกระบวนการ ammonification ของเชื้อสายพันธุ์ PV 09 เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหาร peptone water บ่มที่อุณหภูมิ 30°C และเขย่าที่อัตราเร็ว 200 rpm ค่าที่รายงานเป็นค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 ซ้ำ error bar แสดงค่า standard deviation



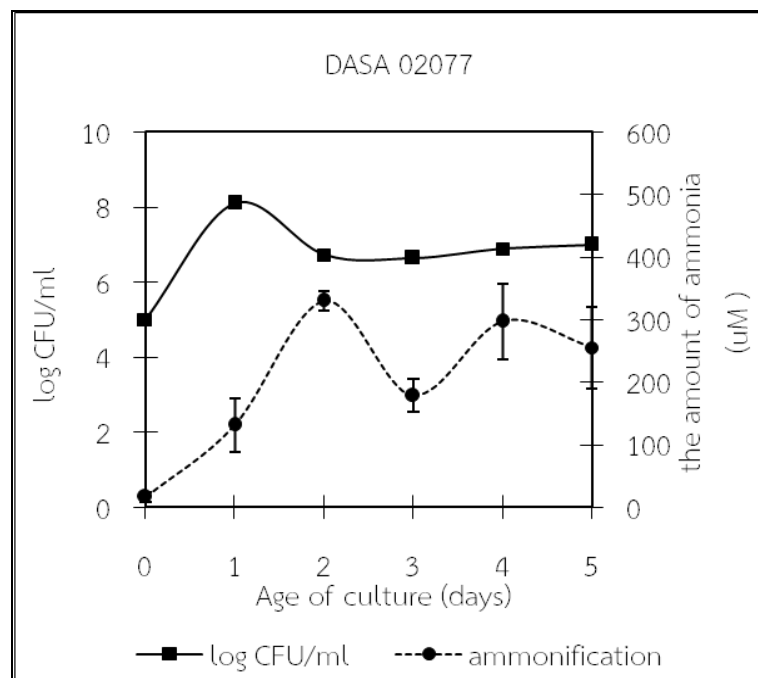
ภาพที่ 11. การเจริญและความเข้มข้นของแอมโมเนียจากกระบวนการ ammonification ของเชื้อสายพันธุ์ DASA 02009 เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหาร peptone water บ่มที่อุณหภูมิ 30°C และเขย่าที่อัตราเร็ว 200 rpm

ค่าที่รายงานเป็นค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 ซ้ำ error bar แสดงค่า standard deviation



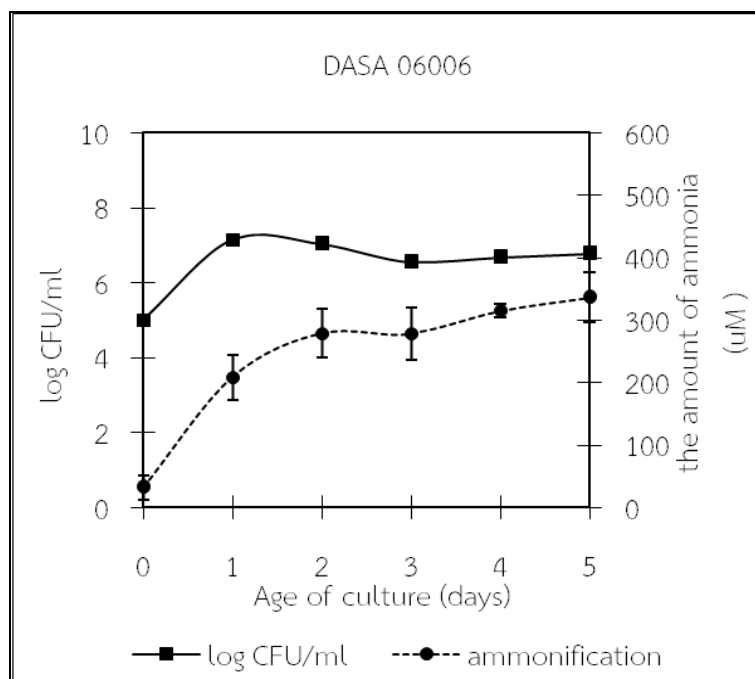
ภาพที่ 12. การเจริญและความเข้มข้นของแอมโมเนียจากกระบวนการ ammonification ของเชื้อสายพันธุ์ DASA 02068 เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหาร peptone water บ่มที่อุณหภูมิ 30°C และเขย่าที่อัตราเร็ว 200 rpm

ค่าที่รายงานเป็นค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 ซ้ำ error bar แสดงค่า standard deviation



ภาพที่ 13. การเจริญและความเข้มข้นของแอมโมเนียจากกระบวนการ ammonification ของเชื้อสายพันธุ์ DASA 02077 เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหาร peptone water บ่มที่อุณหภูมิ 30°C และเขย่าที่อัตราเร็ว 200 rpm

ค่าที่รายงานเป็นค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 ซ้ำ error bar แสดงค่า standard deviation

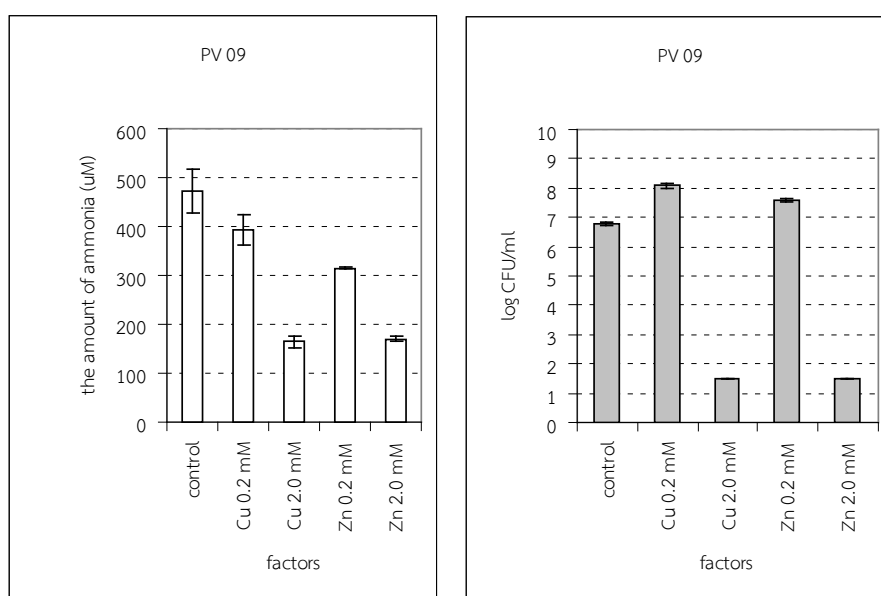


ภาพที่ 14. การเจริญและความเข้มข้นของแอมโมเนียจากกระบวนการ ammonification ของเชื้อสายพันธุ์ DASA 06006 เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหาร peptone water บ่มที่อุณหภูมิ 30°C และเขย่าที่อัตราเร็ว 200 rpm

ค่าที่รายงานเป็นค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 ซ้ำ error bar แสดงค่า standard deviation

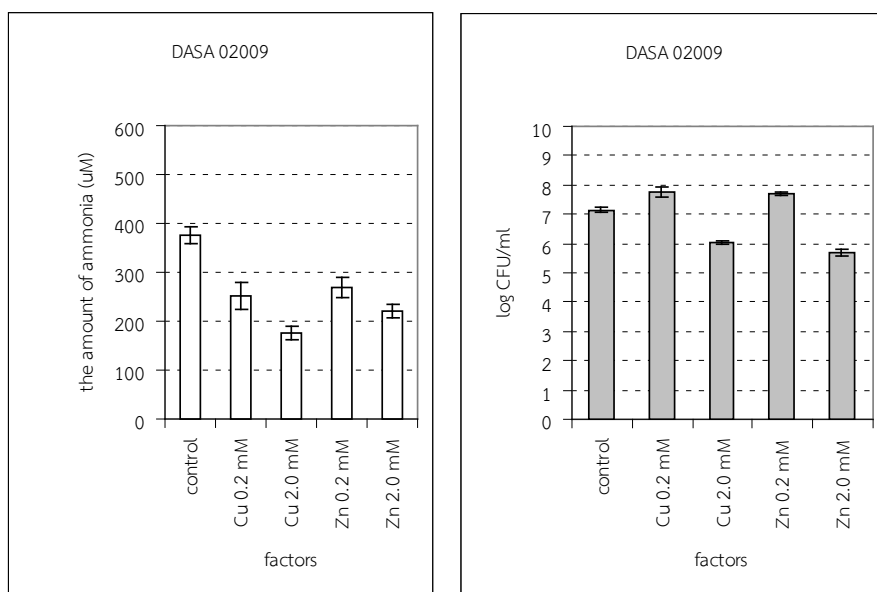
ในการศึกษาผลของปัจจัยต่างๆ ต่อการเจริญและการสังเคราะห์แอมโมเนีย ซึ่งทำการวิเคราะห์โดยเลี้ยงเชื้อในอาหาร peptone broth ที่มีการเติมปัจจัยต่างๆ ได้แก่ Cu 0.2 mM, Cu 2.0 mM, Zn 0.2 mM และ Zn 2.0 mM วัดปริมาณแอมโมเนียที่สังเคราะห์ขึ้น และนับจำนวนเซลล์ในวันที่เชื้อมีการสังเคราะห์แอมโมเนียสูงสุดเปรียบเทียบกับ control พบว่า Cu 0.2 mM ลดการสังเคราะห์แอมโมเนียโดยเชื้อสายพันธุ์ PV 09, DASA 02009, DASA 02068 และ DASA 02077 ลงประมาณ 17% ถึง 57% เมื่อเปรียบเทียบกับ control ซึ่งการลดการสังเคราะห์แอมโมเนียไม่ได้มีผลมาจากการยับยั้งการเจริญของเชื้อเหล่านี้ นอกจากนี้ Zn 0.2 mM ลดการสังเคราะห์แอมโมเนียโดยเชื้อสายพันธุ์ PV 09, DASA 02009 และ DASA 02077 ลงประมาณ 28% ถึง 63% เมื่อเปรียบเทียบกับ control สำหรับ Cu 2.0 mM มีผลยับยั้งการเจริญของเชื้อ 4 สายพันธุ์ ได้แก่ PV 09, DASA 02068, DASA 02077 และ DASA 06006 Zn 0.2 mM ยับยั้งการเจริญของเชื้อ 2 สายพันธุ์ ได้แก่ DASA 02068 และ DASA 06006 Zn 2.0 mM มีผลยับยั้งการเจริญของเชื้อ 3 สายพันธุ์ ได้แก่ PV 09, DASA 02068 และ DASA 06006 Cu 2.0 mM, Zn 0.2 mM และ Zn 2.0 mM ยับยั้งการเจริญของเชื้อสายพันธุ์ DASA 06006 โดยจำนวนเซลล์ในวันที่ 5 ของการเลี้ยงเชื้อ น้อยกว่า 1.00×10^5 CFU/ml ซึ่งเป็นปริมาณเชื้อเริ่มต้น แต่มีปริมาณแอมโมเนียในอาหาร peptone broth คาดว่าเป็นผลมาจากกิจกรรมของเซลล์ที่เกิดขึ้นก่อนวันที่ 5 ของการเลี้ยงเชื้อ ซึ่งเซลล์ยังอาจมีชีวิตอยู่ การเจริญและความเข้มข้นของแอมโมเนียจากกระบวนการ ammonification ของเชื้อไรโซเบียมถั่วแดงหลวงสายพันธุ์ PV 09, DASA 02009, DASA 02068, DASA 02077 และ DASA 06006 เมื่อมีการเติมปัจจัยต่างๆ แสดงในภาพที่ 15, 16, 17, 18 และ 19 ตามลำดับ

จากการศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อกระบวนการ ammonification พบว่า ระดับความเข้มข้นของ trichloroethylene (TCE) ไม่มีผลต่อกระบวนการ arginine ammonification ของจุลินทรีย์ในดิน (Fuller and Scow 1997) และ aldrin มีผลต่อ peptone ammonification เพียงเล็กน้อยและไม่คงที่ (Fletcher and Bollen 1954) มีรายงานผลของโลหะหนัก Cu และ Zn ต่อกระบวนการ ammonification ในดิน โดยพบว่า ในสภาวะที่มีออกซิเจน Cu ที่ 100 ppm เพิ่มกระบวนการ ammonification แต่ Cu ที่ 1,000 ppm ไม่มีผลต่อกระบวนการ ammonification รวมถึง Zn ที่ 100 และ 10,000 ppm ลดกระบวนการ ammonification แต่ Zn ที่ 1,000 ppm ไม่มีผลต่อกระบวนการ ammonification (Premi and Cornfield 1969)



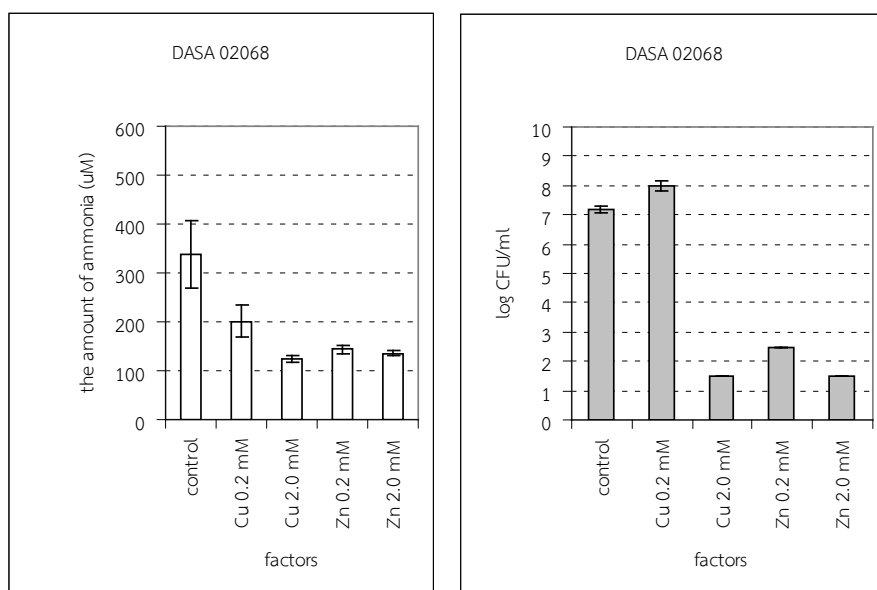
ภาพที่ 15 การเจริญและความเข้มข้นของแอมโมเนียจากกระบวนการ ammonification ของเชื้อสายพันธุ์ PV 09 เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหาร peptone water ที่มีการเติมปัจจัยต่างๆ บ่มที่อุณหภูมิ 30°C และเขย่าที่อัตราเร็ว 200 rpm เป็นเวลา 5 วัน

ค่าที่รายงานเป็นค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 ซ้ำ error bar แสดงค่า standard deviation



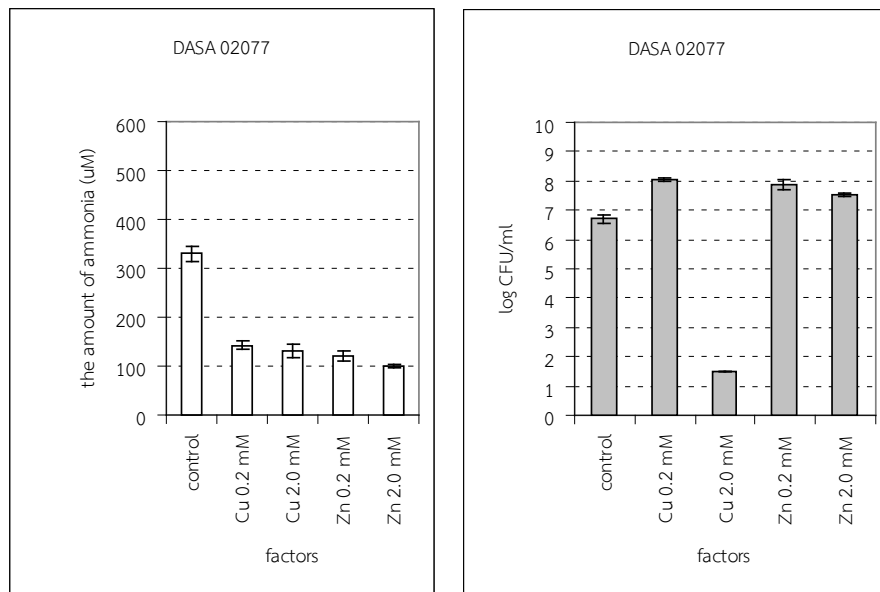
ภาพที่ 16. การเจริญและความเข้มข้นของแอมโมเนียจากกระบวนการ ammonification ของเชื้อสายพันธุ์ DASA 02009 เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหาร peptone water ที่มีการเติมปัจจัยต่างๆ บ่มที่อุณหภูมิ 30°C และเขย่าที่อัตราเร็ว 200 rpm เป็นเวลา 5 วัน

ค่าที่รายงานเป็นค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 ซ้ำ error bar แสดงค่า standard deviation



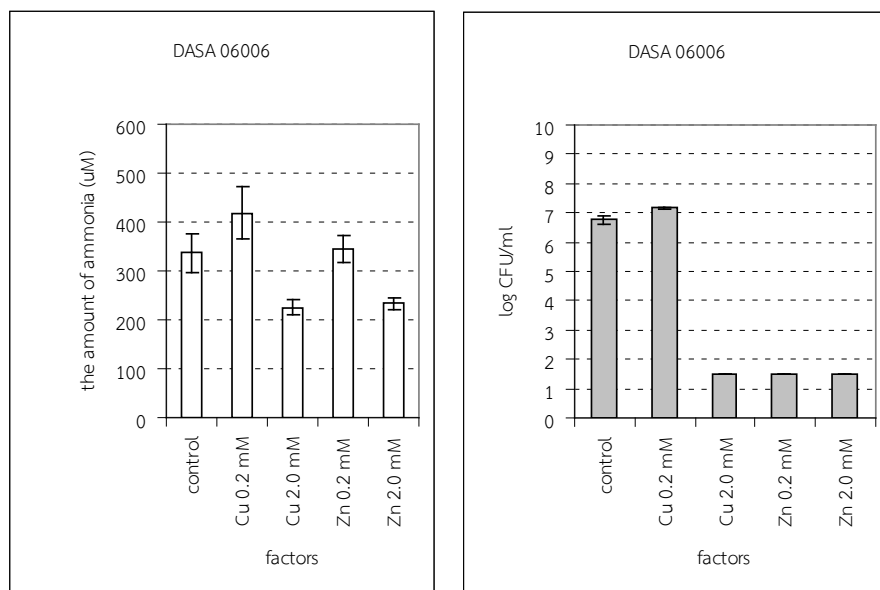
ภาพที่ 17. การเจริญและความเข้มข้นของแอมโมเนียจากกระบวนการ ammonification ของเชื้อสายพันธุ์ DASA 02068 เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหาร peptone water ที่มีการเติมปัจจัยต่างๆ บ่มที่อุณหภูมิ 30°C และเขย่าที่อัตราเร็ว 200 rpm เป็นเวลา 5 วัน

ค่าที่รายงานเป็นค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 ซ้ำ error bar แสดงค่า standard deviation



ภาพที่ 18. การเจริญและความเข้มข้นของแอมโมเนียจากกระบวนการ ammonification ของเชื้อสายพันธุ์ DASA 02077 เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหาร peptone water ที่มีการเติมปัจจัยต่างๆ บ่มที่อุณหภูมิ 30°C และเขย่าที่อัตราเร็ว 200 rpm เป็นเวลา 4 วัน

ค่าที่รายงานเป็นค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 ซ้ำ error bar แสดงค่า standard deviation



ภาพที่ 19. การเจริญและความเข้มข้นของแอมโมเนียจากกระบวนการ ammonification ของเชื้อสายพันธุ์ DASA 06006 เมื่อมีการเติมปัจจัยต่างๆ เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหาร peptone water ที่มีการเติมปัจจัยต่างๆ บ่มที่อุณหภูมิ 30°C และเขย่าที่อัตราเร็ว 200 rpm เป็นเวลา 5 วัน

ค่าที่รายงานเป็นค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 ซ้ำ error bar แสดงค่า standard deviation

12. การศึกษาผลของสารสกัดจากดิน และสารสกัดจากเมล็ดต่อการเจริญของเชื้อไรโซเปียมถั่ว-แดงหลวง

จากการศึกษาผลของสารสกัดจากดิน และสารสกัดจากเมล็ดต่อการเจริญของเชื้อไรโซเปียมถั่ว-แดงหลวง จำนวน 2 สายพันธุ์ ได้แก่ DASA 06002 และ DASA 06008 โดยเปรียบเทียบจำนวนเซลล์ของเชื้อที่เจริญในอาหาร BSM, อาหาร BSM ที่เติมสารสกัดจากดินบริเวณรอบรากถั่วแดงหลวง, อาหาร BSM ที่เติมสารสกัดจากดินที่ไม่ปลูกพืช และอาหาร BSM ที่เติมสารสกัดจากเมล็ดถั่วแดงหลวง พบว่าผลการศึกษาที่ได้จากทั้ง 2 สายพันธุ์ สอดคล้องกัน โดยสารสกัดจากดินบริเวณรอบรากถั่วแดงหลวงมีผลลดการเจริญของเชื้อ สารสกัดจากดินที่ไม่ปลูกพืชไม่มีผลต่อการเจริญของเชื้อ และสารสกัดจากเมล็ดถั่วแดงหลวงมีผลเพิ่มการเจริญของเชื้อ จำนวนเซลล์ของเชื้อไรโซเปียมถั่วแดงหลวงที่เจริญในอาหาร BSM, อาหาร BSM ที่เติมสารสกัดจากดิน และอาหาร BSM ที่เติมสารสกัดจากเมล็ดถั่วแดงหลวงแสดงในตารางที่ 13

ในการศึกษาผลของสารสกัดจากดิน ใช้ดิน 2 ตัวอย่าง ได้แก่ ดินบริเวณรอบรากถั่วแดงหลวง และดินที่ไม่ปลูกพืช ดินบริเวณรอบรากพืชเป็นดินที่ได้รับอิทธิพลจาก root exudate ซึ่งประกอบด้วยแหล่งคาร์บอน และสาร metabolite เช่น น้ำตาล, กรดอะมิโน และกรดอินทรีย์ (Jones et al. 2004) ทั้งนี้ องค์ประกอบของ root exudate พบว่าแตกต่างกัน ขึ้นอยู่กับชนิดของพืช, พันธุ์พืช และระยะการเจริญของพืช (Xu et al. 2009) ในทางตรงข้าม ดินที่ไม่ปลูกพืช เป็นดินที่ไม่ได้รับอิทธิพลจากรากพืช ทำให้มีแหล่งคาร์บอนสำหรับการเจริญของจุลินทรีย์อยู่อย่างจำกัด (Mirleau et al. 2005) จากการศึกษาพบว่าสารสกัดจากดินบริเวณรอบรากถั่วแดงหลวงมีผลลดการเจริญของเชื้อ สันนิษฐานว่าใน root exudate ของถั่วแดงหลวงมีสารยับยั้งการเจริญของเชื้อที่ทำการทดสอบ มีรายงานผลของสารสกัดจากรากถั่วแดงหลวงที่ยับยั้งการเจริญของเชื้อกลายพันธุ์ของ *Rhizoctonia solani* (Eisenschenk et al. 1994)

จากผลการทดลองพบว่า สารสกัดจากเมล็ดถั่วแดงหลวงมีผลเพิ่มการเจริญของเชื้อทดสอบทั้ง 2 สายพันธุ์ สันนิษฐานว่าเป็นผลมาจากการที่สารสกัดจากเมล็ดถั่วแดงหลวงมีโปรตีนและ reducing sugar ซึ่งเป็นสารอาหาร ตัวอย่างสารประกอบที่มีอยู่ในเมล็ดถั่วแดงหลวง เช่น โปรตีน, lectin, เอนไซม์, สารยับยั้งเอนไซม์, โปรตีนยับยั้งเชื้อรา และ phytohaemagglutinin (Alizadeh 2011) ผลของสารสกัดจากเมล็ดต่อการเจริญของจุลินทรีย์มีความแตกต่างกัน ขึ้นอยู่กับชนิดของพืช, ตัวทำละลายที่ใช้สกัด และจุลินทรีย์ที่ทดสอบ เช่น สารสกัดจากเมล็ดถั่วแดงหลวงมีสาร homodimeric lectin ยับยั้งเชื้อ *Coprinus comatus* และเชื้อราก่อโรคพืช *Fusarium oxysporum* และ *Rhizoctonia solani* (Ye et al. 2001) สารสกัดจากเมล็ดมะละกอซึ่งสกัดโดยใช้ methanol ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรค *Salmonella typhi* (Yismaw et al. 2008), สารสกัดจากเมล็ดอะโวคาโดซึ่งสกัดโดยใช้ absolute ethanol และน้ำกลั่น ยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *Listeria monocytogenes* และ *Staphylococcus epidermidis* รวมถึงเชื้อยีสต์ *Zygosaccharomyces bailii* แต่ไม่ยับยั้งเชื้อรา *Aspergillus flavus* และ *Penicillium* spp. (Raymond Chia and Dykes 2010), สารสกัดจากเมล็ดจันทน์เทศซึ่งสกัดโดยใช้ ethanol และ acetone ยับยั้ง *Bac. subtilis* และ *Staphylococcus aureus* แต่สารสกัดจากเมล็ดจันทน์เทศโดยใช้น้ำกลั่น ไม่มีผลยับยั้งเชื้อทั้ง 2 ชนิด (Ibrahim et al. 2013) สารสกัดจากเมล็ดองุ่น ซึ่งมีองค์ประกอบหลัก ได้แก่ gallic acid, catechin และ epicatechin ยับยั้งการเจริญและการสร้าง biofilm ของเชื้อแบคทีเรีย *Streptococcus mutans* (El-Adawi 2012)

ตารางที่ 13. จำนวนเซลล์ของเชื้อไรโซเบียมถั่วแดงหลวงที่เจริญในอาหาร BSM, อาหาร BSM ที่เติมสารสกัดจากดิน และอาหาร BSM ที่เติมสารสกัดจากเมล็ดถั่วแดงหลวง

สายพันธุ์	จำนวนเซลล์ของเชื้อในอาหาร			
	BSM	BSM ที่เติมสารสกัดจากดินบริเวณรอบรากถั่วแดงหลวง	BSM ที่เติมสารสกัดจากดินที่ไม่ปลูกพืช	BSM ที่เติมสารสกัดจากเมล็ดถั่วแดงหลวง
DASA 06002	$2.04 \times 10^8 \pm 8.00 \times 10^6$ d	$3.53 \times 10^7 \pm 4.50 \times 10^6$ a	$1.55 \times 10^8 \pm 5.13 \times 10^7$ cd	$2.74 \times 10^9 \pm 1.25 \times 10^8$ e
DASA 06008	$1.61 \times 10^8 \pm 9.86 \times 10^6$ c	$7.20 \times 10^7 \pm 2.00 \times 10^6$ b	$1.26 \times 10^8 \pm 5.29 \times 10^7$ c	$2.63 \times 10^9 \pm 3.55 \times 10^8$ e

ค่าที่รายงานเป็นค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 ซ้ำ $\pm$ ค่า standard deviation

ค่าที่ตามด้วยตัวอักษรเดียวกันไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

13. การศึกษาผลของการใช้เชื้อไรโซเบียมถั่วแดงหลวงร่วมกับแบคทีเรียละลายฟอสเฟตต่อการตรึงไนโตรเจน และปริมาณฟอสฟอรัสในเนื้อเยื่อพืช

คัดเลือกเชื้อไรโซเบียมถั่วแดงหลวง 3 สายพันธุ์ ได้แก่ PV 09, DASA 06003 และ DASA 06008 ซึ่งมีลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA ใกล้เคียงกับเชื้อแบคทีเรียในสกุล *Bacillus*, *Bradyrhizobium* และ *Rhizobium* ตามลำดับ และให้น้ำหนักแห้งของต้นพืชสูงสุดจากการประเมินประสิทธิภาพในการตรึงไนโตรเจน มาศึกษาผลของการใส่เชื้อไรโซเบียมถั่วแดงหลวงเพียงชนิดเดียวเปรียบเทียบกับการใส่เชื้อไรโซเบียมถั่วแดงหลวงร่วมกับเชื้อแบคทีเรียละลายฟอสเฟต *Bacillus* sp. PSP 011 ในสภาวะที่ไม่มีฟอสฟอรัส (ไม่เติม KH_2PO_4 ในสารอาหารพืชที่ไม่มีไนโตรเจน), สภาวะที่มีฟอสฟอรัสในรูปที่ไม่ละลายน้ำ (เติม $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ แทน KH_2PO_4 ในสารอาหารพืชที่ไม่มีไนโตรเจน) และสภาวะที่มีฟอสฟอรัสในรูปที่ละลายน้ำ (เติม KH_2PO_4 ในสารอาหารพืชที่ไม่มีไนโตรเจน) นับจำนวนปมที่เกิดขึ้น, ชั่งน้ำหนักแห้งของปมและต้นพืช, วิเคราะห์ประสิทธิภาพในการตรึงไนโตรเจนโดยวิธีการ ARA และวิเคราะห์ปริมาณฟอสฟอรัสในเนื้อเยื่อพืช พบว่าการใส่เชื้อไรโซเบียมถั่วแดงหลวงเพียงชนิดเดียว และการใส่เชื้อไรโซเบียมถั่วแดงหลวงร่วมกับเชื้อแบคทีเรียละลายฟอสเฟต *Bacillus* sp. PSP 011 ให้กับต้นถั่วแดงหลวงที่ปลูกในสภาวะที่มีฟอสฟอรัสในรูปที่ไม่ละลายน้ำ สามารถเพิ่มจำนวนปม, น้ำหนักแห้งของปมและต้นพืช, ค่า ARA และปริมาณฟอสฟอรัสในเนื้อเยื่อพืช ได้มากกว่าการใส่เชื้อให้กับต้นถั่วแดงหลวงที่ปลูกในสภาวะที่ไม่มีฟอสฟอรัส โดยมีความแตกต่างทางสถิติ แสดงถึงความสามารถในการละลายฟอสฟอรัสในรูปที่ไม่ละลายน้ำให้อยู่ในรูปที่พืชสามารถนำไปใช้ได้ และฟอสฟอรัสมีผลต่อประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจนของเชื้อไรโซเบียม ตารางที่ 14 แสดงจำนวนปม, น้ำหนักปมแห้ง, น้ำหนักต้นแห้ง และค่า ARA ของถั่วแดงหลวงที่ได้รับการใส่เชื้อไรโซเบียมถั่วแดงหลวงและการใส่เชื้อไรโซเบียมถั่วแดงหลวงร่วมกับเชื้อแบคทีเรียละลายฟอสเฟต

ตารางที่ 14. จำนวนปม, น้ำหนักปมแห้ง, น้ำหนักต้นแห้ง และค่า ARA ของถั่วแดงหลวงที่ได้รับการใส่เชื้อไรโซเบียมถั่วแดงหลวงและการใส่เชื้อไรโซเบียมถั่วแดงหลวงร่วมกับเชื้อแบคทีเรียละลายฟอสเฟต

สายพันธุ์	สถานะที่ทำการทดสอบ	ค่าที่ใช้ประเมินประสิทธิภาพในการตรึงไนโตรเจน				ปริมาณฟอสฟอรัสในเนื้อเยื่อพืช (ppm)
		จำนวนปม	น้ำหนักปมแห้ง (มิลลิกรัม/ต้น)	น้ำหนักต้นแห้ง (มิลลิกรัม/ต้น)	ค่า ARA (μmol ethylene/ต้นพืช/ชม.)	
ชุดควบคุมที่ไม่ได้ใส่เชื้อ	ไม่มีฟอสฟอรัส	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	118.67 ± 11.93	0.31 ± 0.14	56.00 ± 8.89
	มีฟอสฟอรัสที่ไม่ละลายน้ำ	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	107.67 ± 13.65	0.17 ± 0.04	61.00 ± 7.00
	มีฟอสฟอรัสที่ละลายน้ำ	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	151.66 ± 17.95	0.36 ± 0.05	178.33 ± 9.71
PV 09	ไม่มีฟอสฟอรัส	13.00 ± 3.61	35.00 ± 10.82	122.00 ± 14.11	0.23 ± 0.04	58.33 ± 5.51
	มีฟอสฟอรัสที่ไม่ละลายน้ำ	42.00 ± 3.00	132.67 ± 14.05	411.67 ± 18.18	1.70 ± 0.18	267.33 ± 18.72
	มีฟอสฟอรัสที่ละลายน้ำ	53.67 ± 5.51	189.67 ± 23.12	514.00 ± 15.72	2.37 ± 0.38	339.67 ± 31.66
PV 09 + PSP 011	ไม่มีฟอสฟอรัส	24.00 ± 7.00	35.00 ± 11.53	125.33 ± 18.45	0.34 ± 0.15	50.33 ± 12.66
	มีฟอสฟอรัสที่ไม่ละลายน้ำ	55.33 ± 6.03	176.67 ± 11.72	459.33 ± 14.57	2.27 ± 0.09	284.00 ± 9.54
	มีฟอสฟอรัสที่ละลายน้ำ	56.33 ± 9.07	179.67 ± 16.04	516.67 ± 24.58	2.45 ± 0.04	329.67 ± 20.79
DASA 06003	ไม่มีฟอสฟอรัส	13.00 ± 5.57	18.67 ± 3.06	119.00 ± 13.53	0.38 ± 0.06	53.00 ± 12.12
	มีฟอสฟอรัสที่ไม่ละลายน้ำ	25.33 ± 3.51	92.00 ± 14.00	322.00 ± 17.58	1.98 ± 0.06	306.00 ± 18.03
	มีฟอสฟอรัสที่ละลายน้ำ	32.67 ± 14.01	104.33 ± 34.00	385.33 ± 22.30	2.12 ± 0.62	293.33 ± 18.01
DASA 06003 + PSP 011	ไม่มีฟอสฟอรัส	7.33 ± 4.16	26.33 ± 9.29	104.67 ± 12.66	0.20 ± 0.06	68.33 ± 6.03
	มีฟอสฟอรัสที่ไม่ละลายน้ำ	41.67 ± 4.93	128.00 ± 11.00	371.67 ± 20.84	2.59 ± 0.4	258.67 ± 28.75
	มีฟอสฟอรัสที่ละลายน้ำ	42.33 ± 3.51	134.33 ± 15.63	391.67 ± 15.63	2.47 ± 0.10	257.67 ± 16.50
DASA 06008	ไม่มีฟอสฟอรัส	10.00 ± 2.65	43.33 ± 6.66	97.66 ± 14.57	0.71 ± 0.12	89.67 ± 6.51
	มีฟอสฟอรัสที่ไม่ละลายน้ำ	35.03 ± 7.09	158.33 ± 26.50	359.67 ± 22.59	1.36 ± 0.13	279.33 ± 16.50
	มีฟอสฟอรัสที่ละลายน้ำ	53.67 ± 12.67	189.00 ± 27.87	539.00 ± 96.27	2.59 ± 0.36	292.33 ± 15.31
DASA 06008 + PSP 011	ไม่มีฟอสฟอรัส	16.33 ± 6.51	54.33 ± 10.97	118.67 ± 16.80	0.55 ± 0.19	120.00 ± 16.10
	มีฟอสฟอรัสที่ไม่ละลายน้ำ	49.67 ± 8.62	188.67 ± 17.01	464.00 ± 13.53	2.64 ± 0.19	286.67 ± 18.56
	มีฟอสฟอรัสที่ละลายน้ำ	54.00 ± 6.24	177.00 ± 15.13	527.00 ± 19.00	2.81 ± 0.11	260.67 ± 18.45

ค่าที่รายงานเป็นค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 ซ้ำ $\pm$ ค่า standard deviation

สรุปผลการวิจัย

1. แยกเชื้อไรโซเบียมถั่วแดงหลวงจากตัวอย่างดิน, ปมรากถั่วแดงหลวง และปมรากถั่วเขียว ได้เชื้อ 28 ไอโซเลท จากการวิเคราะห์รูปแบบ RAPD พบว่าทุกเชื้อให้รูปแบบ RAPD แตกต่างกัน แสดงว่าเป็นเชื้อต่างสายพันธุ์ โดยมีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูง เนื่องจาก dendrogram ที่สร้างจากรูปแบบ RAPD มีค่า % similarity น้อยกว่า 5%

2. เชื้อไรโซเบียมถั่วแดงหลวง 28 สายพันธุ์ มีรูปแบบ RAPD 11 รูปแบบ แสดงว่าเป็นเชื้อ 11 ชนิด โดย 9, 1 และ 1 สายพันธุ์ มีรูปแบบ TP-RAPD เหมือนกับ *Bac. subtilis*, *Bac. cereus* และ *Bra. japonicum* ตามลำดับ อีก 17 สายพันธุ์มีรูปแบบ TP-RAPD แตกต่างจากเชื้ออ้างอิง

3. เชื้อไรโซเบียมถั่วแดงหลวง 28 สายพันธุ์ พบเชื้อที่มีพลาสมิดขนาดเล็ก จำนวน 5 สายพันธุ์ โดยมีจำนวนพลาสมิด 1-2 ชิ้น ขนาดตั้งแต่ 1.4-3.2 kb

4. จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA ของเชื้อไรโซเบียมถั่วแดงหลวง 28 สายพันธุ์ เพื่อระบุสกุลของเชื้อ พบว่า 15, 12 และ 1 สายพันธุ์ มีลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA ใกล้เคียงกับ *Bacillus*, *Bradyrhizobium* และ *Rhizobium* ตามลำดับ โดยมี % identity อยู่ระหว่าง 97%-100% ซึ่ง *Bacillus* ไม่เคยมีรายงานก่อนว่าอยู่ในกลุ่มเชื้อไรโซเบียม แต่เคยมีรายงานเป็น endophyte ในปมรากพืชตระกูลถั่ว และมียีน *nifH* ซึ่งควบคุมการสังเคราะห์หน่วยย่อยของเอนไซม์ nitrogenase ในกระบวนการตรึงไนโตรเจน

5. พบว่า *Bacillus* spp. ที่แยกได้มียีน *nodC* ซึ่งควบคุมการสังเคราะห์เอนไซม์ chitin synthase หรือ N-acetyl glucosaminyl transferase ในกระบวนการเกิดปม โดยยีน *nodC* ของ *Bacillus* spp. มี % identity อยู่ระหว่าง 89% - 100% กับยีน *nodC* ของ *Rhizobium* และ *Mesorhizobium* แสดงว่า *Bacillus* เป็นสมาชิกใหม่ในกลุ่มไรโซเบียม

6. เชื้อไรโซเบียมถั่วแดงหลวง 28 สายพันธุ์ เกิดปมรากกับถั่วแดงหลวง และมีประสิทธิภาพในการตรึงไนโตรเจน ต้นพืชที่มีการใส่เชื้อไรโซเบียมถั่วแดงหลวงมีน้ำหนักแห้งเพิ่มขึ้น 2.39 เท่า ถึง 3.89 เท่า และมีค่า ARA เพิ่มขึ้น 5.00 เท่า ถึง 7.19 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับ control ที่ไม่ได้ใส่เชื้อ โดย *Rhizobium* sp. DASA 06008 ให้ค่าเฉลี่ยน้ำหนักแห้งต้นพืชและค่าเฉลี่ย ARA สูงสุด

7. ข้อมูลที่ได้จากการศึกษาลักษณะทางสรีระวิทยา และลักษณะทางชีวเคมีของเชื้อไรโซเบียมถั่วแดงหลวง 28 สายพันธุ์ มีดังนี้

- ไม่มีเชื้อสายพันธุ์ใดที่มีความต้านทานต่อสารปฏิชีวนะทั้ง 10 ชนิดที่ทดสอบ และเชื้อที่มีความไวต่อสารปฏิชีวนะทุกชนิด มีจำนวน 9 สายพันธุ์ เชื้อที่มีความต้านทานต่อสารปฏิชีวนะได้มากที่สุด คือ *Bradyrhizobium* sp. DASA 06003 ซึ่งต้านทานต่อสารปฏิชีวนะ 7 ชนิด

- เชื้อ 7 สายพันธุ์เป็นเชื้อที่ไม่ต้องการวิตามินในอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการเจริญ (เป็น vitamin prototroph) และเชื้อ 21 สายพันธุ์เป็นเชื้อที่ต้องการวิตามินในอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการเจริญ (เป็น vitamin auxotroph)
- เชื้อ 26 สายพันธุ์เจริญได้ที่ระดับ pH 5.0, เชื้อ 20 สายพันธุ์เจริญได้ที่ระดับ pH 8.0, เชื้อ 20 สายพันธุ์เจริญได้ที่ 20°C และเชื้อ 18 สายพันธุ์เจริญได้ที่ 40°C
- เชื้อ 1 สายพันธุ์ต้านทานต่อ Cd ที่ความเข้มข้น 50 µg/ml, เชื้อ 2 สายพันธุ์ต้านทานต่อ Co ที่ความเข้มข้น 50 µg/ml และเชื้อ 19 สายพันธุ์ต้านทานต่อ Zn ที่ความเข้มข้น 50 µg/ml
- เชื้อ 17 สายพันธุ์สังเคราะห์ IAA ในระดับความเข้มข้นต่ำกว่า 1 µg/ml เชื้อ 11 สายพันธุ์สังเคราะห์ IAA อยู่ระหว่าง 1.54 ± 0.44 ถึง 32.21 ± 1.12 µg/ml เชื้อที่สังเคราะห์ IAA ที่ความเข้มข้นสูงสุด คือ *Bacillus* sp. DASA 06006
- เชื้อ 22 สายพันธุ์สังเคราะห์ซีเตอร์โรฟอร์ประเภท catechol ในระดับความเข้มข้นต่ำกว่า 1 µmol/l เชื้อ 6 สายพันธุ์สังเคราะห์ catechol อยู่ระหว่าง 1.09 ± 0.11 ถึง 9.08 ± 1.28 µmol/l เชื้อที่สังเคราะห์ catechol ที่ความเข้มข้นสูงสุด คือ *Bacillus* sp. DASA 02031 เชื้อ 28 สายพันธุ์สังเคราะห์ซีเตอร์โรฟอร์ประเภท hydroxamate อยู่ระหว่าง 0.91 ± 0.80 ถึง 45.92 ± 12.33 µmol/l เชื้อที่สังเคราะห์ hydroxamate ที่ความเข้มข้นสูงสุด ได้แก่ *Bradyrhizobium* sp. DASA 06002 และ *Bacillus* spp. DASA 02021, DASA 02026 และ DASA 02077
- เชื้อ 28 สายพันธุ์สังเคราะห์แอมโมเนียที่ระดับความเข้มข้นอยู่ระหว่าง 70.10 ± 15.56 ถึง 266.35 ± 23.83 µM เชื้อที่สังเคราะห์แอมโมเนียที่ความเข้มข้นสูงสุด ได้แก่ *Bacillus* sp. DASA 02077 และ *Bradyrhizobium* spp. DASA 02009, DASA 02010 และ DASA 02068
- เชื้อ 28 สายพันธุ์สามารถละลายฟอสเฟต เชื้อที่ให้ค่า index ของการละลายฟอสเฟตสูงสุด ได้แก่ *Bacillus* spp. DASA 02021 และ DASA 02077
- เชื้อ 28 สายพันธุ์สังเคราะห์ extracellular alkaline phosphatase อยู่ระหว่าง 3.68 ± 0.51 ถึง 15.04 ± 0.65 milliunit/ml supernatant เชื้อที่สังเคราะห์ extracellular alkaline phosphatase สูงสุด คือ *Bacillus* sp. DASA 02077

- เชื้อ 28 สายพันธุ์มีกิจกรรมของ extracellular urease เป็นหลัก และมีกิจกรรมของ intracellular และ surface-associated urease ในระดับต่ำ กิจกรรมของ extracellular urease อยู่ระหว่าง 5.46 ± 1.02 ถึง 35.12 ± 2.14 unit/ml supernatant เชื้อที่มีกิจกรรมของ extracellular urease สูงสุด ได้แก่ *Bacillus* sp. DASA 02036 และ *Bradyrhizobium* sp. DASA 02065
- เชื้อ 28 สายพันธุ์มีกิจกรรมของ protease มีตั้งแต่ไม่สามารถตรวจพบ ถึง 74.21 ± 15.09 unit/ml supernatant เชื้อที่มีกิจกรรมของ protease สูงสุด ได้แก่ *Bacillus* spp. PV 10 และ DASA 02027

8. สำหรับ *Bacillus* sp. PV 14 กิจกรรมของเอนไซม์ urease ค่อยๆ เพิ่มขึ้นในช่วง 2 วันแรกของการเจริญ และเพิ่มมากที่สุดในวันที่ 3 ของการเจริญ หลังจากนั้น กิจกรรมของเอนไซม์ urease ค่อยๆ ลดลงอย่างชัดเจน โดยกิจกรรมของเอนไซม์ urease มีค่าสูงสุด เมื่อเชื้ออยู่ในช่วงการเจริญระยะ mid-log phase ถึง late-log phase ในขณะที่ *Bradyrhizobium* spp. DASA 02010 และ DASA 02068 กิจกรรมของเอนไซม์ urease ในช่วงการเจริญ 2 วันแรกไม่ต่างกันทางสถิติ หลังจากนั้น กิจกรรมของเอนไซม์ urease เพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องจนถึงวันสุดท้ายของการเลี้ยงเชื้อ ซึ่งเชื้ออยู่ในช่วงการเจริญระยะ stationary phase

9. ผลของปัจจัยต่อกิจกรรมของเอนไซม์ urease ของ *Bacillus* sp. PV 14 และ *Bradyrhizobium* spp., DASA 02010 และ DASA 02068 เป็นดังนี้

- yeast extract ลดกิจกรรมของเอนไซม์ urease ของ *Bradyrhizobium* spp. แต่ไม่มีผลต่อกิจกรรมของเอนไซม์ urease ของ *Bacillus* sp.
- peptone เพิ่มกิจกรรมของเอนไซม์ urease ของ *Bacillus* sp. แต่ลดกิจกรรมของเอนไซม์ urease ของ *Bradyrhizobium* sp. DASA 02010 และไม่มีผลแตกต่างทางสถิติสำหรับ *Bradyrhizobium* sp. DASA 02068
- NH_4Cl ไม่มีผลต่อกิจกรรมของเอนไซม์ urease ของ *Bacillus* sp. แต่ลดกิจกรรมของเอนไซม์ urease ของ *Bradyrhizobium* spp. DASA 02010 และ DASA 02068
- NaNO_3 , Ni และ Co ลดกิจกรรมของเอนไซม์ urease ของ *Bacillus* sp. ในขณะที่ไม่มีผลแตกต่างทางสถิติสำหรับ *Bradyrhizobium* spp.

10. Cu 0.2 mM ลดการสังเคราะห์แอมโมเนียโดย *Bacillus* spp. PV 09 และ DASA 02077 และ *Bradyrhizobium* spp. DASA 02009 และ DASA 02068 ลงประมาณ 17% ถึง 57% เมื่อเปรียบเทียบกับ control Zn 0.2 mM ลดการสังเคราะห์แอมโมเนียโดย *Bacillus* spp. PV 09 และ DASA 02077 และ *Bradyrhizobium* spp. DASA 02009 ลงประมาณ 28% ถึง 63% เมื่อเปรียบเทียบกับ control

11. สารสกัดจากดินบริเวณรอบรากถั่วแดงหลวงมีผลลดการเจริญของ *Bradyrhizobium* sp. DASA 06002 และ *Rhizobium* sp. DASA 06008 ในขณะที่สารสกัดจากดินที่ไม่ปลูกพืชไม่มีผลต่อการเจริญของเชื้อ และสารสกัดจากเมล็ดถั่วแดงหลวงมีผลเพิ่มการเจริญของเชื้อทั้ง 2 สายพันธุ์

12. การใส่เชื้อไรโซเบียมถั่วแดงหลวง *Bacillus* sp. PV 09, *Bradyrhizobium* sp. DASA 06003 หรือ *Rhizobium* sp. DASA 06008 ร่วมกับเชื้อแบคทีเรียละลายฟอสเฟต *Bacillus* sp. PSP 011 ให้กับต้นถั่วแดงหลวงที่ปลูกในสภาวะที่มีฟอสฟอรัสในรูปที่ไม่ละลายน้ำ สามารถเพิ่มจำนวนปม, น้ำหนักแห้งของปมและต้นพืช, ค่า ARA และปริมาณฟอสฟอรัสในเนื้อเยื่อพืช ได้มากกว่าการใส่เชื้อให้กับต้นถั่วแดงหลวงที่ปลูกในสภาวะที่ไม่มีฟอสฟอรัส

บรรณานุกรม

- Abd-Alla M.H., Omar S.A. and Karanxha S. 2000. The impact of pesticide on arbuscular mycorrhizal and nitrogen fixing symbioses in legumes. *Appl. Soil Ecol.* 14: 191e200.
- Abd-Alla M.H., Morsy F.M., El-Enany A.W. and Ohyama T. 2012. Isolation and characterization of a heavy-metal-resistant isolate of *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* potentially applicable for biosorption of Cd^{2+} and Co^{2+} . *Int. Biodeter. Biodegr.* 67: 48-55.
- Ahmad I., Hayat S., Ahmad A., Inam A. and Samiullah. 2001. Metal and antibiotic resistance traits in *Bradyrhizobium* sp. (cajanus) isolated from soil receiving oil refinery wastewater. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 17: 379-384.
- Alizadeh, H. 2011. An Investigation into bioactive proteins and their changes during imbibition, germination and development of red kidney bean seeds (*Phaseolus vulgaris* L.). Ph.D. Thesis. University of Canterbury, Christchurch, New Zealand.
- Angelini J., Castro S. and Fabra A. 2003. Alteration in root colonization and *nodC* gene induction in the peanut-rhizobia interaction under acidic conditions. *Plant Physiol. Biochem.* 41: 289-294.
- Arnow L.E. 1937. Colorimetric estimation of the components of 3, 4-dihydroxy phenylalanine tyrosine mixtures. *J. Biol. Chem.* 118: 531-535.
- Bar-Ness E., Chen Y., Hadar Y., Maarschner H. and Römheld V. 1991. Siderophores of *Pseudomonas putida* as an iron source for dicot and monocot plants. *Plant Soil.* 130: 231-241.
- Bergersen F.J. 1961. The growth of *Rhizobium* on synthetic medium. *Aust. J. Biol. Sci.* 14: 349-360.
- Cappucino J.C. and Sherman N. 1992. *Microbiology: A Laboratory Manual*. Benjamin/Cummings Publishing Co., New York.
- Cevheri C., Kucuk C. and Cetin E. 2011. Fungicide, antibiotic, heavy metal resistance and salt tolerance of root nodule isolates from *Vicia palaestina*. *Afr. J. Biotechnol.* 10: 2423-2429.

- Chen Y.P., Rekha P.D., Arun A.B., Shen F.T., Lai W.A. and Young C.C. 2006. Phosphate solubilizing bacteria from subtropical soil and their tricalcium phosphate solubilizing abilities. *Appl. Soil Ecol.* 34: 33-41.
- Christensen W.B. 1946. Urea decomposition as a means of differentiating *Proteus* and paracolon cultures from each other and from *Salmonella* and *Shigella* types. *J. Bacteriol.* 52: 461-466.
- Chung H., Park M., Madhaiyan M., Seshadri S., Song J., Cho H. and Sa T. 2005. Isolation and characterization of phosphate solubilizing bacteria from the rhizosphere of crop plants of Korea. *Soil Biol. Biochem.* 37: 1970-1974.
- Chuntanom S. and Pongsilp N. 2011. Environmental parameters affecting urease production and ammonification in *Phaseolus vulgaris*-nodulating rhizobia and *Vigna radiata*-nodulating rhizobia. *Int. J. Microbiol. Res.* 2: 222-232.
- Compant S., Clément C. and Sessitsch A. 2010. Plant growth-promoting bacteria in the rhizo- and endosphere of plants: Their role, colonization, mechanisms involved and prospects for utilization. *Soil Biol. Biochem.* 42: 669-678.
- Coutinho H.L.C., Oliveira V.M., Lovato A., Maia A.H.N. and Manfio G.P. 1999. Evaluation of the diversity of rhizobia in Brazilian agricultural soils cultivated with soybeans. *Appl. Soil Ecol.* 13: 159-167.
- Csaky T. 1984. On the estimation of bound hydroxylamine. *Acta. Chem. Scand.* 2: 450-454.
- Cytryn E.J., Jitackorn S., Giraud E. and Sadowsky M.J. 2008. Insights learned from pBTAi1, a 229-kb accessory plasmid from *Bradyrhizobium* sp. strain BTAi1 and prevalence of accessory plasmids in other *Bradyrhizobium* sp. strains. *ISME J.* 2: 158-170.
- Datta M., Banish S. and Gupta R.K. 1982. Studies on the efficacy of a phytohormone producing phosphate solubilizing *Bacillus firmus* in augmenting paddy yield in acid soils of Nagaland. *Plant Soil* 69: 365-373.
- Davies P.J. 1995. The plant hormone concept: concentration, sensitivity, and transport. *In* Plant hormones: Physiology, biochemistry and molecular biology. Davies P.J. (Ed.). pp. 13-18. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.

- de Oliveira I.R., Vasconcellos M.J., Seldin L., Paiva E., Varga M.A.T. and Sa N.M.H. 2000. Random amplified polymorphic DNA analysis of effective *Rhizobium* sp. associated with beans cultivated in Brazil Cerrado soils. *Braz. J. Microbiol.* 31: 39-44.
- de Oliveira A.N., de Oliveira L.A. and Andrade J.S. 2010. Production and some properties of crude alkaline proteases of indigenous Central Amazonian rhizobia strains. *Braz. Arch. Biol. Technol.* 53: 1185-1195.
- Eisenschenk L., Diebold R., Perez-Lesher J., Peterson A.C., Peters N.K. and Noel K.D. 1994. Inhibition of *Rhizobium etli* polysaccharide mutants by *Phaseolus vulgaris* root compounds. *Appl. Envir. Microbiol.* 60: 3315-3322.
- Eivazi F. and Tabatabai M.A. 1977. Phosphatases in soils. *Soil Biol. Biochem.* 9: 167-172.
- El-Adawi H. 2012. Inhibitory effect of grape seed extract (GSE) on cariogenic bacteria. *J. Med. Plant Res.* 6: 4883-4891.
- El-Azouni I.M. 2008. Effect of phosphate solubilizing fungi on growth and nutrient uptake of soybean (*Glycine max* L.) plants. *J. Appl. Sci. Res.* 4: 592-598.
- Fletcher D.W. and Bollen W.B. 1954. The effects of aldrin on soil microorganisms and some of their activities related to soil fertility. *Appl. Envir. Microbiol.* 2: 349-354.
- Fuentes J.B., Abe M., Uchiumi T., Suzuki A. and Higashi S. 2002. Symbiotic root nodule bacteria isolated from yam bean (*Pachyrhizus erosus*). *J. Gen. Appl. Microbiol.* 48: 181-191.
- Fuller M.E. and Scow K.M. 1997. Impact of trichloroethylene and toluene on nitrogen cycling in soil. *Appl. Envir. Microbiol.* 63: 4015-4019.
- Geremia R.A., Mergaert P., Geelen D., van Montagu M. and Holsters M. 1994. The NodC protein of *Azorhizobium caulinodans* is an N-acetylglucosaminyl transferase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 91: 2669-2673.
- Geweely N.S.I. 2006. Purification and characterization of intracellular urease enzyme isolated from *Rhizopus oryzae*. *Biotechnol.* 5: 358-364.

- Goldstein A.H. 1986. Bacterial solubilization of mineral phosphates: Historical perspectives and future prospects. *Amer. J. Altern. Agric.* 1: 51-57.
- Goldstein A.H. 1994. Involvement of the quinoprotein glucose dehydrogenase in the solubilization of exogenous phosphates by gram-negative bacteria. *In* Phosphate in microorganisms: Cellular and molecular biology. Torriani-Gorini A., Yagil E., Silver S. (Eds.). pp. 197-203. ASM Press, Washington D.C.
- Gordon, S.A. and Weber R.P. 1951. Colorimetric estimation of indole-acetic acid. *Plant Physiol.* 26: 192-195.
- Grison C.M., Jackson S., Merlot S., Dobson A. and Grison C. 2015. *Rhizobium metallidurans* sp. nov., a symbiotic heavy metal resistant bacterium isolated from the *Anthyllis vulneraria* Zn-hyperaccumulator. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 65: 1525-1530.
- Hoffmann T., Frankenberg N., Marino M. and Jahn D. 1998. Ammonification in *Bacillus subtilis* utilizing dissimilatory nitrite reductase is dependent on *resDE*. *J. Bacteriol.* 180: 186-189.
- Hu X., Chen J. and Guo J. 2006. Two phosphate- and potassium-solubilizing bacteria isolated from Tianmu Mountain, Zhejiang, China. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 22: 983-990.
- Hussain M.I., Asghar H.N., Akhtar M.J. and Arshad M. 2013. Impact of phosphate solubilizing bacteria on growth and yield of maize. *Soil Environ.* 32: 71-78.
- Ibrahim, K.M., Naem R.K. and Abd-Sahib A.S. 2013. Antibacterial activity of nutmeg (*Myristica fragrans*) seed extracts against some pathogenic bacteria. *J. Al-Nahrain Univ.* 16: 188-192.
- Iyawe H.O.T., Osagie V.E., Esekheigbe A. and Azih M.C. 2007. Nutrient composition and effect of seed extracts of African black pear (*Darcryodes edulis*) on rats. *Asian J. Plant Sci.* 6: 878-880.

- Johnson S.L., Minogue T.D., Teshima H., Davenport K.W., Shea A.A., Miner H.L., Wolcott M.J. and Chain P.S. 2015. Finished genome sequence of *Bacillus cereus* strain 03BB87, a clinical isolate with *B. anthracis* virulence genes. *Genome Announc.* 3(1).
- Jones D.L., Hodge A. and Kuzyakov Y. 2004. Plant and mycorrhizal regulation of rhizodeposition. *New Phytol.* 163: 459-480.
- Kapri A. and Tewari L. 2010. Phosphate solubilization potential and phosphatase activity of rhizospheric *Trichoderma* spp. *Braz. J. Microbiol.* 41: 787-795.
- Keele Jr B.B., Hamilton P.B. and Elkan G.H. 1969. Glucose catabolism in *Rhizobium japonicum*. *J. Bacteriol.* 97: 1184-1191.
- Kim K.Y., Jordan D. and Mc Donald G.A. 1998. *Enterobacter agglomerans*, phosphate solubilizing bacteria, and microbial activity in soil: Effect of carbon sources. *Soil Biol. Biochem.* 30: 995-1003.
- Kpombrekou A.K. and Tabatabai M.A. 1994. Effect of organic acids on release of phosphorus from phosphate rocks. *Soil Sci.* 158: 442-453.
- Laguerre G., Nour S.M., Macheret V., Sanjuan J., Drouin P. and Amarger N. 2001. Classification of rhizobia based on *nodC* and *nifH* gene analysis reveals a close phylogenetic relationship among *Phaseolus vulgaris* symbionts. *Microbiol.* 147: 981-993.
- Lambrecht M., Okon Y., Broek A.V. and Vanderleyden J. 2000. Indole-3-acetic acid: A reciprocal signaling molecule in bacteria-plant interactions. *Trends Microbiol.* 8: 298-300.
- Lane D.J. 1991. 16S/23S rRNA sequencing. *In* Nucleic acid techniques in bacterial systematic. Stackebrandt E. and Goodfellow M. (Eds). pp. 115-175. John Wiley & Sons, New York.
- Leelahawong C. and Pongsilp N. 2009. Phosphatase activities of root-nodule bacteria and nutritional factors affecting production of phosphatases by representative bacteria from three different genera. *KMITL Sci. Tech. J.* 9: 65-83.

- Leelahawong C., Nuntagij A., Teaumroong N., Boonkerd N. and Pongsilp N. 2010. Characterization of root-nodule bacteria isolated from the medicinal legume *Indigofera tinctoria*. *Ann. Microbiol.* 60: 65-74.
- Lemanceau P., Corberand T., Garden L., Laguerre G., Latour X., Boeyufas J.M. and Alabouvette C. 1995. Effect of two plant species flax (*Linum usitatissimum* L.) and tomato (*Lycopersion esculentum* Mill.) on the diversity of soil population of fluorescent pseudomonads. *Appl. Envir. Microbiol.* 61: 1004-1012.
- Levican G., Ugalde J.A., Ehrenfeld N., Mass A. and Parada P. 2008. Comparative genomic analysis of carbon and nitrogen assimilation mechanisms in three indigenous bioleaching bacteria: predictions and validations. *BMC Genomics.* 9: 581.
- Li J.H., Wang E.T., Chen W.F. and Chen W.X. 2008. Genetic diversity and potential for promotion of plant growth detected in nodule endophytic bacteria of soybean grown in Heilongjiang province of China. *Soil. Biol. Biochem.* 40: 238-246.
- Lin D.X., Wang E.T., Tang H., Han, T.X., He Y.R., Guan S.H. and Chen W.X. 2008. *Shinella kummerowiae* sp. nov., a symbiotic bacterium isolated from root nodules of the herbal legume *Kummerowia stipulacea*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 58: 1409-1413.
- Liotenberg S., Campbell D., Rippka R., Houmard J. and de Marsac N.T. 1996. Effect of the nitrogen source on phycobiliprotein synthesis and cell reserves in a chromatically adapting filamentous cyanobacterium. *Microbiol.* 142: 611-622.
- Lunge V.R., Ikuta N., Fonseca A.S.K., Hirigoyan D., Stoll M., Bonatto S. and Ozaki L.S. 1994. Identification and inter relationship analysis of *Bradyrhizobium japonicum* strains by restriction fragment length polymorphism (RFLP) and random amplified polymorphic DNA (RAPD). *World J. Microbiol. Biotechnol.* 10: 648-52.
- Lynch D., O'Brien J., Welch T., Clarke P., O'Cuiv P., Crosa J.H. and O'Connell M. 2001. Genetic organization of the region encoding regulation, biosynthesis, and transport of rhizobactin 1021, a siderophore produced by *Sinorhizobium meliloti*. *J. Bacteriol.* 183: 2576-2585.
- Mackerras A.H. and Smith G.D. 1986. Urease activity of the cyanobacterium *Anabaena cylindrica*. *J. Gen. Microbiol.* 132: 2749-2752.

- Marcus E.A. and Scott D.R. 2001. Cell lysis is responsible for the appearance of extracellular urease in *Helicobacter pylori*. *Helicobacter* 6: 93-99.
- Marino M., Hoffmann T., Schmid R., Mobitz H. and Jahn D. 2000. Changes in protein synthesis during the adaptation of *Bacillus subtilis* to anaerobic growth conditions. *Microbiol.* 146: 97-105.
- Mercado-Blanco J. and Toro N. 1996. Plasmids in rhizobia: The role of nonsymbiotic plasmids. *MPMI* 9: 535-545.
- Mirleau P., Wogelius R., Smith A. and Kertesz M.A. 2005. Importance of organosulfur utilization for survival of *Pseudomonas putida* in soil and rhizosphere. *Appl. Envir. Microbiol.* 71: 6571-6577.
- Mobley H.L., Cortesia M.J., Rosenthal L.E. and Jones B.D. 1988. Characterization of urease from *Campylobacter pylori*. *J. Clin. Microbiol.* 26: 831-836.
- Mobley H.L., Island M.D. and Hausinger R.P. 1995. Molecular biology of microbial ureases. *Microbiol. Rev.* 59: 451-480.
- Moreau M.C., Ducluzeau R. and Raibaud P. 1976. Hydrolysis of urea in the gastrointestinal tract of "monoxenic" rats: Effect of immunization with strains of ureolytic bacteria. *Infect. Immun.* 13: 9-15.
- Morou-Bermudez E. and Burne R.A. 1999. Genetic and physiologic characterization of urease of *Actinomyces naeslundii*. *Infect. Immun.* 67: 504-512.
- Nannipieri P., Pietramellara G., Renella G. and Valori F. 2008. Effects of root exudates in microbial diversity and activity in rhizosphere soils. *Soil Biol.* 15: 339-365.
- Nimnoi P. and Pongsilp N. 2009. Genetic diversity and plant-growth promoting ability of the indole-3-acetic acid (IAA) synthetic bacteria isolated from agricultural soil as well as rhizosphere, rhizoplane and root tissue of *Ficus Religiosa* L., *Leucaena Leucocephala* and *Piper Sarmentosum* Roxb. *Res. J. Agric. Biol. Sci.* 5: 29-41.
- Nimnoi P., Pongsilp N., Lumyong S. 2010. Endophytic actinomycetes isolated from *Aquilaria crassna* Pierre ex Lec and screening of plant growth promoters production. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 26: 193-203.

- Nishi C.Y.M., Boddey L.H., Vargas M.A.T. and Hungria M. 1996. Morphological, physiological and genetic characterization of two new *Bradyrhizobium* strains recently recommended as Brazilian commercial inoculants for soybean. *Symbiosis* 20: 147-162.
- Nuntagij, A., Abe M., Uchiumi T., Seki Y., Boonkerd N. and Higashi S. 1997. Characterization of *Bradyrhizobium* strains isolated from soybean cultivation in Thailand. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 43: 183-187.
- Paffetti D., Scotti C., Gnocchi S. Fancelli S. and Bazzicalupo M. 1996. Genetic diversity of an Italian *Rhizobium meliloti* population from different *Medicago sativa* varieties. *Appl. Envir. Microbiol.* 62: 2279-2285.
- Pantujit S. and Pongsilp N. 2010. Phosphatase activity and affects of phosphate-solubilizing bacteria on yield and uptake of phosphorus in corn. *World Appl. Sci. J.* 8: 429-435.
- Perrin C., Briandet R., Jubelin G., Lejeune P., Mandrand-Berthelot M., Rodrigue A. and Dorel C. 2009. Nickel promotes biofilm formation by *Escherichia coli* K-12 strains that produce curli. *Appl. Envir. Microbiol.* 75: 1723-1733.
- Pikovskaya R.I. 1948. Mobilization of phosphorus in soils in connection with vital activity of some microbial species. *Microbiologia.* 17: 362-370.
- Ponmurugan P. and Gopi C. 2006. *In vitro* production of growth regulators and phosphate activity by phosphate solubilizing bacteria. *Afr. J. Biotechnol.* 5: 348-350.
- Pongsilp N. 2012. Phenotypic and genotypic diversity of rhizobia. Bentham Science Publishers, Dubai, U.A.E.
- Pongsilp N. and Leelahawong C. 2010. Root-nodule symbionts of *Derris elliptica* Benth. are members of three distinct genera *Rhizobium*, *Sinorhizobium* and *Bradyrhizobium*. *Int. J. Integra. Biol.* 9: 37-42.
- Pongsilp N. and Nuntagij A. 2007. Selection and characterization of mungbean root nodule bacteria based on their growth and symbiotic ability in alkaline conditions. *Suranaree J. Sci. Technol.* 14: 277-286.

- Pongsilp N. and Nuntagij A. 2009. Genetic diversity and metabolites production of root-nodule bacteria isolated from medicinal legumes *Indigofera tinctoria*, *Pueraria mirifica* and *Derris elliptica* Benth. grown in different geographic origins across Thailand. Am-Eur. J. Agric. Biol. Sci. 6: 26-34.
- Pongsilp N., Teaumroong N., Nuntagij A., Boonkerd N. and Sadowsky M.J. 2002. Genetic structure of indigenous non-nodulating and nodulating populations of *Bradyrhizobium* in soils from Thailand. Symbiosis 33: 39-58.
- Pongsilp N., Leelahawong C., Nuntagij A., Teaumroong N. and Boonkerd N. 2010. Characterization of *Pueraria mirifica*-nodulating rhizobia present in Thai soil. Afr. J. Microbiol. Res. 4: 1307-1313.
- Pongsilp N., Nimnoi P. and Lumyong S. 2012. Genotypic diversity among rhizospheric bacteria of three legumes assessed by cultivation-dependent and cultivation-independent techniques. World J. Microbiol. Biotechnol. 28: 615-626.
- Ponmurugan P. and Gopi C. 2006. *In vitro* production of growth regulators and phosphate activity by phosphate solubilizing bacteria. Afr. J. Biotechnol. 5: 348-350.
- Poore C.A. and Mobley H.L.T. 2003. Differential regulation of the *Proteus mirabilis* urease gene cluster by UreR and H-NS. Microbiol. 149: 3383-3394.
- Premi P.R. and Cornfield A.H. 1969. Effects of addition of copper, manganese and chromium compounds on ammonification and nitrification during incubation of soil. Plant Soil 31: 345-352.
- Ravindar K. and Chandra R. 2008. Influence of PGPR and PSB on *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* strain competition and symbiotic performance in lentil. World J. Agric. Sci. 4: 297-230.
- Raymond Chia T.W. and Dykes G.A. 2010. Antimicrobial activity of crude epicarp and seed extracts from mature avocado fruit (*Persea americana*) of three cultivars. Pharm. Biol. 48: 753-756.

- Relwani L., Krishna P. and Reddy M.S. 2008. Effect of carbon and nitrogen sources on phosphate solubilization by a wild-type strain and UV-induced mutants of *Aspergillus tubingensis*. *Curr. Microbiol.* 57: 401-406.
- Renshaw J.C., Halliday V., Robson G.D., Trinci A.P.J., Wiebe M.G., Livens F.R., Collison D. and Taylor R.J. 2003. Development and application of an assay for uranyl complexation by fungal metabolites, including siderophores. *Appl. Envir. Microbiol.* 69: 3600-3606.
- Rivas, R., Velazquez E., Valverde A., Mateos P.F. and Martinez-Molina E. 2001. A two primers random amplified polymorphic DNA procedure to obtain polymerase chain reaction fingerprints of bacterial species. *Electrophoresis* 22: 1086-1089.
- Rivas R., Velazquez E., Palomo J.L., Mateos P.F., Garcia-Benavides P. and Martinez-Molina E. 2002. Rapid identification of *Clavibacter michiganensis* subspecies *sepedonicus* using two primers random amplified polymorphic DNA (TP-RAPD) fingerprints. *Eur. J. Plant Pathol.* 108: 179-184.
- Rivas, R., Abril A., Trujillo M.E. and Velazquez E. 2004. *Sphingomonas phyllosphaerae* sp. nov., from the phyllosphere of *Acacia caven* in Argentina. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 54: 2147-2150.
- Rivas R., Peix A., Mateos P.F., Trujillo M.E., Martinez-Molina and E. Velazquez E. 2006. Biodiversity of populations of phosphate solubilizing rhizobia that nodulates chickpea in different Spanish soils. *Plant Soil* 287: 23-33.
- Rodriguez H., Fraga R., Gonzalez T. and Bashan Y. 2006. Genetics of phosphate solubilization and its potential applications for improving plant growth-promoting bacteria. *Plant Soil.* 287: 15-21.
- Rungin S., Indananda C., Suttiviriya P., Kruasuwan W., Jaemsaeng R. and Thamchaiopenet A. 2012. Plant growth enhancing effects by a siderophore-producing endophytic streptomycete isolated from a Thai jasmine rice plant (*Oryza sativa* L. cv. KDML105). *Antonie Van Leeuwenhoek.* 102: 463-472.
- Ruvkun G.B. and Ausubel F.M. 1980. Interspecies homology of nitrogenase genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 77: 191-195.

- Sabannavar S.J. and Lakshman H.C. 2009. Effect of rock phosphate solubilization using mycorrhizal fungi and phosphobacteria on two high yielding varieties of *Sesamum indicum* L. World J. Agric. Sci. 5: 470-479.
- Schauer K., Muller C., Carrière M., Labigne A., Cavazza C. and de Reuse H. 2010. The *Helicobacter pylori* GroES cochaperonin HspA functions as a specialized nickel chaperone and sequestration protein through its unique C-terminal extension. J. Bacteriol. 192: 1231-1237.
- Schirawski J. and Uden G. 1995. Anaerobic respiration of *Bacillus macerans* with fumarate, TMAO, nitrate and nitrite and regulation of the pathways by oxygen and nitrate. Arch. Microbiol. 163: 148-154.
- Secades P. and Guijarro J.A. 1999. Purification and characterization of an extracellular protease from fish pathogen *Yesinia ruckeri* and effect of culture conditions on production. Appl. Envir. Microbiol. 65: 3969-3975.
- Singh S.K., Tripathi V.R., Jain R.K., Vikram S. and Garg S.K. 2010. An antibiotic, heavy metal resistant and halotolerant *Bacillus cereus* SIU1 and its thermoalkaline protease. Microb. Cell Fact. 9: 59.
- Somasegaran P. and Hoben H.J. 1994. Handbook for rhizobia: Methods in legume-*Rhizobium* technology. NIFTAL Project, University of Hawaii, Paia.
- Stajkovic O., de Meyer S., Milicic B., Willems A. and Delic D. 2009. Isolation and characterization of endophytic non-rhizobial bacteria from root nodules of alfalfa (*Medicago sativa* L.). Bot. Serb. 33: 107-114.
- Starnes S.R., Spears J.W., Froetschel M.A. and Croom W.J., Jr. 1984. Influence of monensin and lasalocid on mineral metabolism and ruminal urease activity in steers. J. Nutr. 114: 518-525.
- Streit W.R., Joseph C.M. and Phillips D.A. 1996. Biotin and other water-soluble vitamins are key growth factors for alfalfa root colonization by *Rhizobium meliloti* 1021. MPMI 9: 330-338.

- Sullivan, J.T., Brown S.D., Yocum R.R. and Ronson C.W. 2001. The *bio* operon on the acquired symbiosis island of *Mesorhizobium* sp. strain R7A includes a novel gene involved in pimeloyl-CoA synthesis. *Microbiol.* 147: 1315-1322.
- Tungao W., Nimnoi P. and Pongsilp N. 2012. Determination of bacterial diversity in bulk soil and rhizospheres using molecular fingerprintings and phenotypic features. *World Appl. Sci. J.* 19: 1613-1620.
- Tso S.C. and Chen Y.R. 1997. Isolation and characterization of a group III isozyme of acid phosphatase from rice plants. *Bot. Bull. Acad. Sin.* 38: 245-250.
- Valverde, A., Igual J.M., Peix A., Cervantes E. and Velazquez E. 2006. *Rhizobium lusitanum* sp. nov. a bacterium that nodulates *Phaseolus vulgaris*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 56: 2631-2637.
- Valverde A., Velazquez E., Cervantes E., Igual J.M. and van Berkum P. 2011. Evidence of an American origin for symbiosis related genes in *Rhizobium lusitanum*. *Appl. Envir. Microbiol.* 77: 5665-5670.
- van Vliet A.H.M., Kuipers E.J., Waidner B., Davies B.J., de Vries N., Penn C.W., Vandenbroucke-Grauls C.M.J.E., Kist M., Bereswill S. and Kusters J.G. 2001. Nickel-responsive induction of urease expression in *Helicobacter pylori* is mediated at the transcriptional level. *Infect. Immun.* 69: 4891-4897.
- Vosti K.L. 1979. Relationship of hemagglutination to other biological properties of serologically classified isolates of *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 25: 507-512.
- Watson R.J., Heys R., Martin T. and Savard M. 2001. *Sinorhizobium meliloti* cells require biotin and either cobalt or methionine for growth. *Appl. Envir. Microbiol.* 67: 3767-3770.
- Xiao R. and Kisaalita WS. 1997. Iron acquisition from transferrin and lactoferrin by *Pseudomonas aeruginosa* pyoverdin. *Microbiol.* 143: 2509-2515.
- Xu Y., Wang G., Jin J., Liu J., Zhang Q. and Liu X. 2009. Bacterial communities in soybean rhizosphere in response to soil type, soybean genotype, and their growth stage. *Soil Boil. Biochem.* 41: 919-925.

- Ye X.Y., Ng T.B., Tsang P.W. and Wang J. 2001. Isolation of a homodimeric lectin with antifungal and antiviral activities from red kidney bean (*Phaseolus vulgaris*) seeds. J. Protein Chem. 20: 367-375.
- Yismaw G., Tessema B., Mulu A. and Tiruneh M. 2008. The invitro assessment of antibacterial effect of papaya seed extract against bacterial pathogens isolated from urine, wound and stool. Ethiop. Med. J. 46: 71-77.
- You J.L., Cao L.X., Liu G.F., Zhou S.N., Tan H.M. and Lin Y.C. 2004. Isolation and characterization of actinomycetes antagonistic to pathogenic *Vibrio* spp. from nearshore marine sediments. World J. Microbiol. Biotechnol. 21: 679-682.
- Zhang X.X., Turner S.L., Guo X.W., Yang H.J., Debelle F., Yang G.P., Denarie J., Young J.P.W. and Li F.D. 2000. The common nodulation genes of *Astragalus sinicus* rhizobia are conserved despite chromosomal diversity. Appl. Envir. Microbiol. 66: 2988-2995.

ประวัติและผลงานวิจัยที่สำคัญของนักวิจัย

1. รองศาสตราจารย์ ดร. นีลวรรณ พงศ์ศิลป์ (Associate Professor Dr. Neelawan Pongsilp)

หน่วยงานและสถานที่ติดต่อ

ภาควิชาจุลชีววิทยา มหาวิทยาลัยศิลปากร
โทรศัพท์ 034-245336-7, 034-245300 ต่อ 28815
โทรสาร 034-245336
e-mail pongsilp_n@su.ac.th

ประวัติการศึกษา

วุฒิการศึกษา	สถาบัน	ปี พ.ศ. ที่จบ
วิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)	สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าฯ เจ้าคุณทหาร ลาดกระบัง	2536
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)	มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์	2540
วิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)	มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี	2545

ประวัติการทำงาน

นักวิจัยหลังปริญญาเอก Department of Agronomy, College of Agricultural & Life Sciences
University of Wisconsin-Madison, Madison, Wisconsin, USA.

อาจารย์ ภาควิชาชีววิทยา มหาวิทยาลัยศิลปากร

อาจารย์ ภาควิชาจุลชีววิทยา มหาวิทยาลัยศิลปากร

สาขาวิชาการที่มีความเชี่ยวชาญพิเศษ

Biological Nitrogen Fixation, Plant-Microbe Interaction, Plant-Associated Microorganisms,
Microbial Ecology, Microbial Diversity, Molecular Microbiology

หนังสือ-ตำรา

นีลวรรณ พงศ์ศิลป์. 2557. อนุพันธุศาสตร์และพันธุวิศวกรรม. มหาวิทยาลัยศิลปากร. 159 น.

Pongsilp, N. 2012. Phenotypic and Genotypic Diversity of Rhizobia. Bentham Science Publishers, U.A.E. 194 p.

นิตยสาร พงศ์ศิลป์. 2548. จุลชีววิทยาทางการเกษตร. มหาวิทยาลัยศิลปากร. 220 น.

ผลงานวิจัย

Pongsilp, N., P. Nimnoi and S. Lumyong. 2016. Community structures of total bacterial DNA, cultivable bacteria and prototrophs in bulk soil and rhizospheres. *Malaysian Journal of Microbiology*. 12(1): 1-14.

Nimnoi, P., **N. Pongsilp** and S. Lumyong. 2015. Utilization of agro-industrial products for increasing red pigment production of *Monascus purpureus* AHK12. *Chiang Mai Journal of Science*. 42(2): 331-338.

Nimnoi P., **N. Pongsilp** and S. Lumyong. 2014. Co-inoculation of soybean (*Glycine max*) with *Actinomyces* and *Bradyrhizobium japonicum* enhances plant growth, nitrogenase activity and plant nutrition. *Journal of Plant Nutrition*. 37(3): 432-446.

Tungao W., P. Nimnoi, S. Lumyong and **N. Pongsilp**. 2012. Determination of bacterial diversity in bulk soil and rhizospheres using molecular fingerprintings and phenotypic features. *World Applied Science Journal*. 19(11): 1613-1620.

Pongsilp N., P. Nimnoi and S. Lumyong. 2012. Genotypic diversity among rhizospheric bacteria of three legumes assessed by cultivation-dependent and cultivation-independent techniques. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*. 28(2): 615-626.

Pongsilp N. and N. Boonkerd. 2011. Transposon mutant of *Vigna radiata*-nodulating *Bradyrhizobium* sp. impaired in both resistance to stress conditions and symbiotic performance. *African Journal of Microbiology Research*. 5(25): 4303-4309.

Nimnoi P., **N. Pongsilp** and S. Lumyong. 2011. Actinobacterial community and diversity in rhizosphere soils of *Aquilaria crassna* Pierre ex Lec assessed by RT-PCR and PCR DGGE. *Biochemical Systematics & Ecology*. 39(4-6): 509-519.

Chuntanom S. and **N. Pongsilp**. 2011. Environmental parameters affecting urease production and ammonification in *Phaseolus vulgaris*-nodulating rhizobia and *Vigna radiata*-nodulating rhizobia. *International Journal of Microbiological Research*. 2(3): 222-232.

- Nimnoi P., S. Lumyong and **N. Pongsilp**. 2011. Impact of rhizobial inoculants on rhizosphere bacterial communities of three medicinal legumes assessed by denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE). *Annals of Microbiology*. 61(2): 237-245.
- Noisangiam R., A. Nuntagij, **N. Pongsilp**, N. Boonkerd, J. Denduangboripant, C. Ronson and N. Teaumroong. 2010. Heavy metal tolerant *Metalliresistens boonkerdii* gen. nov., sp. nov., a new genus in the family *Bradyrhizobiaceae* isolated from soil in Thailand. *Systematic & Applied Microbiology*. 33(7): 374-382.
- Nimnoi P., **N. Pongsilp** and S. Lumyong. 2010. Genetic diversity and community of endophytic actinomycetes within the roots of *Aquilaria crassna* Pierre ex Lec assessed by *Actinomycetes*-specific PCR and PCR-DGGE of 16S rRNA gene. *Biochemical Systematics & Ecology*. 38(4): 595-601.
- Pongsilp N.**, C. Leelahawongse, A. Nuntagij, N. Teaumroong and N. Boonkerd. 2010. Characterization of *Pueraria mirifica*-nodulating rhizobia present in Thai soil. *African Journal of Microbiology Research*. 4(12): 1307-1313.
- Pantujit S. and **N. Pongsilp**. 2010. Phosphatase activity and affects of phosphate-solubilizing bacteria on yield and uptake of phosphorus in corn. *World Applied Science Journal*. 8(4): 429-435.
- Leelahawongse C., A. Nuntagij, N. Teaumroong, N. Boonkerd and **N. Pongsilp**. 2010. Characterization of root-nodule bacteria isolated from the medicinal legume *Indigofera tinctoria*. *Annals of Microbiology*. 60(1): 65-74.
- Pongsilp N.** and C. Leelahawongse. 2010. Root-nodule symbionts of *Derris elliptica* Benth. are members of three distinct genera *Rhizobium*, *Sinorhizobium* and *Bradyrhizobium*. *International Journal of Integrative Biology*. 9(1): 37-42.
- Nimnoi P., **N. Pongsilp** and S. Lumyong. 2010. Endophytic actinomycetes isolated from *Aquilaria crassna* Pierre ex Lec and screening of plant growth promoters production. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*. 26(2): 193-203.

- Leelahawong C. and **N. Pongsilp**. 2009. Phosphatase activities of root-nodule bacteria and nutritional factors affecting production of phosphatases by representative bacteria from three different genera. *KMITL Science & Technology Journal*. 9(2): 65-83.
- Pongsilp N.** and A. Nuntagij. 2009. Genetic diversity and metabolites production of root-nodule bacteria isolated from medicinal legumes *Indigofera tinctoria*, *Pueraria mirifica* and *Derris elliptica* Benth. grown in different geographic origins across Thailand. *American-Eurasian Journal of Agricultural & Environmental Science*. 6(1): 26-34.
- Leelahawong C., A. Nuntagij and **N. Pongsilp**. 2009. Factors influencing indole-3-acetic acid biosynthesis of root-nodule bacteria isolated from various leguminous plants. *Thammasat International Journal of Science & Technology*. 14(2): 1-12.
- Nimnoi P. and **N. Pongsilp**. 2009. Genetic diversity and plant-growth promoting ability of the indole-3-acetic acid (IAA) synthetic bacteria isolated from agricultural soils as well as rhizosphere, rhizoplane and root tissue of *Ficus religiosa* L., *Leucaena leucocephala* and *Piper sarmentosum* Roxb. *Research Journal of Agriculture & Biological Sciences*. 5(1): 29-41.
- Sudto A., Y. Punyathiti and **N. Pongsilp**. 2008. The use of agricultural wastes as substrates for cell growth and carboxymethyl cellulase (CMCase) production by *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* and *Rhizobium* sp. *KMITL Science & Technology Journal*. 8(2): 84-92.
- Pongsilp N.** and N. Boonkerd. 2007. Research techniques for estimating phenotypic and genotypic diversity of root- and stem-nodule bacteria. *Suranaree Journal of Science & Technology*. 14(3): 297-308.
- Pongsilp N.** and A. Nuntagij. 2007. Selection and characterization of mungbean root nodule bacteria based on their growth and symbiotic ability in alkaline conditions. *Suranaree Journal of Science & Technology*. 14(3): 277-286.
- Pongsilp N.**, E.W. Triplett and M.J. Sadowsky. 2005. Detection of homoserine lactone-like quorum sensing molecules in *Bradyrhizobium* strains. *Current Microbiology*. 51(4):250-254.

Pongsilp N., N. Teaumroong, A. Nuntagij, N. Boonkerd and M.J. Sadowsky. 2002. Genetic structure of indigenous non-nodulating and nodulating populations of *Bradyrhizobium* in soils from Thailand. *Symbiosis* 33: 39-58.

2. ดร. อัจฉรา นันทกิจ (Dr. Achara Nuntagij)

หน่วยงานและสถานที่ติดต่อ

สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์

โทรศัพท์ 02-5790065

โทรสาร 02-5614763

e-mail waew_32@hotmail.com

ประวัติการศึกษา

วุฒิการศึกษา	สถาบัน	ปี พ.ศ. ที่จบ
วิทยาศาสตร์บัณฑิต (ปฐพีวิทยา)	มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์	2519
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (ปฐพีวิทยา)	มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์	2522
Doctorat in Soil Microbiology	Institute of Polytechnique of Agriculture (ประเทศฝรั่งเศส)	2532

ประวัติการทำงาน

นักวิชาการเกษตร กรมพัฒนาที่ดิน กระทรวงเกษตรและสหกรณ์

นักวิชาการเกษตร ชำนาญการพิเศษ สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์

ผลงานวิจัย

Noisangiam R., **A. Nuntagij**, N. Pongsilp, N. Boonkerd, J. Denduangboripant, C. Ronson and N. Teaumroong. 2010. Heavy metal tolerant *Metalliresistens boonkerdii* gen. nov., sp. nov., a new genus in the family *Bradyrhizobiaceae* isolated from soil in Thailand. *Systematic & Applied Microbiology*. 33(7): 374-382.

Pongsilp N., C. Leelahawong, **A. Nuntagij**, N. Teaumroong and N. Boonkerd. 2010. Characterization of *Pueraria mirifica*-nodulating rhizobia present in Thai soil. *African Journal of Microbiology Research*. 4(12): 1307-1313.

- Leelahawong C., **A. Nuntagij**, N. Teaumroong, N. Boonkerd and N. Pongsilp. 2010. Characterization of root-nodule bacteria isolated from the medicinal legume *Indigofera tinctoria*. *Annals of Microbiology*. 60(1): 65-74.
- Pongsilp N. and **A. Nuntagij**. 2009. Genetic diversity and metabolites production of root-nodule bacteria isolated from medicinal legumes *Indigofera tinctoria*, *Pueraria mirifica* and *Derris elliptica* Benth. grown in different geographic origins across Thailand. *American-Eurasian Journal of Agricultural & Environmental Science*. 6(1): 26-34.
- Leelahawong C., **A. Nuntagij** and N. Pongsilp. 2009. Factors influencing indole-3-acetic acid biosynthesis of root-nodule bacteria isolated from various leguminous plants. *Thammasat International Journal of Science & Technology*. 14(2): 1-12.
- Pongsilp N. and **A. Nuntagij**. 2007. Selection and characterization of mungbean root nodule bacteria based on their growth and symbiotic ability in alkaline conditions. *Suranaree Journal of Science & Technology*. 14(3): 277-286.
- Pongsilp N., N. Teaumroong, **A. Nuntagij**, N. Boonkerd and M.J. Sadowsky. 2002. Genetic structure of indigenous non-nodulating and nodulating populations of *Bradyrhizobium* in soils from Thailand. *Symbiosis* 33: 39-58.
- Nuntagij A.**, M. Abe, T. Uchiumi, Y. Seki, N. Boonkerd and S. Higashi. 1997. Characterization of *Bradyrhizobium* strains isolated from soybean cultivation in Thailand. *Journal of General and Applied Microbiology* 43: 183-187.
- Nuntagij A.**, M. Kaemmerer, J.R. Baily and L. Andre. 1990. Composes phenoliques et fixation non symbiotique d'azote au cours de la biodegradation de composes lignocellulosiques. *Agrochimica XXXIV N. 4*: 311-320.
- Nuntagij A.**, C. de Lassus, D. Sayag and L. Andre. 1989. Aerobic nitrogen fixation during the biodegradation of lignocellulosic wastes. *Biological Wastes* 29: 43-61.