บทคัดย่อ

180160

แบคทีเรียบางชนิดที่อาศัยอยู่ในเนื้อเยื่อพืชมีความสามารถตรึงไนโตรเจนให้กับพืชอาศัยช่วยให้พืชเจริญเติบโตได้ในธรรมชาติ ในบรรดาพืชเหล่านี้กล้วยไม้อากาศบางชนิดมีแบคทีเรียชนิดนี้อาศัยอยู่ (เฉลิม, 2548) โดยเฉพาะกล้วยไม้สกุลหวายในกลุ่มเอื้องสายสามสี จึงได้ทำการแยกเชื้อจุลินทรีย์จากเนื้อเยื่อกล้วยไม้ส่วนลำลูกกล้วย โดยฆ่าเชื้อที่ผิวด้วย เอทานอล 70 % และโซเดียมไฮโปคลอไรท์ 3 % จากนั้นนำไปบดใน น้ำเกลือ (NaCl) 0.85% นำน้ำสกัดที่ได้ใส่ในอาหารกึ่งแข็ง Modified Rennie Medium (RM) 100 µl นำหลอดอาหารที่มีการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์มาตรวจวัดประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจนด้วยวิธี Acetylene Reduction Assay (ARA) นำหลอดที่พบการตรึงไนโตรเจน มาแยกเชื้อให้บริสุทธิ์ซึ่งสามารถแยกเชื้อจุลินทรีย์กลุ่ม aerobe ที่มีความสามารถในการตรึงไนโตรเจนทั้งหมด 7 ไอโซเลท นำเชื้อแต่ละไอโซเลทตรวจวัดประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจน พบว่าเชื้อทั้ง 7 ไอโซเลท มีอัตราการตรึงไนโตรเจนระหว่าง 0.024-6.234 nmol C_2H_4/ 10^6cells/ hr. โดยไอโซเลท ESS 3 มีประสิทธิภาพในการตรึงไนโตรเจนสูงสุด เชื้อทั้ง 7 ไอโซเลท มีลักษณะโคโลนีที่แตกต่างกันและ เมื่อทำการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียที่พบ ส่วนใหญ่เป็นแบคทีเรียแกรมลบ มีทั้งรูปร่างเป็นแท่ง (rod shape) และกลม (coccus) จากการทดสอบความสามารถในการใช้แหล่งคาร์บอนที่ต่างกัน พบว่าเชื้อ ไอโซเลท ESS 3, ESS 5 และ ESS 7 สามารถเจริญบนอาหารที่มี arabinose, glucose, malate และ mannitol ในขณะที่เชื้อไอโซเลท ESS 1 ไม่สามารถเจริญบนอาหารที่มี glucose เชื้อไอโซเลท ESS 6 สามารถเจริญได้เฉพาะบนอาหารที่มี glucose และ manitol และเชื้อไอโซเลท ESS 2 และ ESS 4 ไม่สามารถเจริญบนอาหารที่มี arabinose, glucose, malate และ manitol จากการตรวจสอบความสามารถในการสร้าง Indole Acetic Acid (IAA) ซึ่งเป็นสารประกอบช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโต (plant growth promoting substances) พบว่าเชื้อไอโซเลท ESS 3 และ ESS 6 สามารถผลิต IAA ได้ดีที่สุด จากการทดสอบความสามารถในการย่อยสลายเซลลูโลสพบว่า ไอโซเลท ESS 2, ESS 3, ESS 4 และ ESS 7 สามารถย่อยสลายเซลลูโลสได้ เมื่อนำเชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนไอโซเลท ESS 2 และ ESS 3 ไปปลูกถ่าย (Inoculation) ให้กับกล้วยไม้พันธุ์เอื้องสายสามสีและพันธุ์ลูกผสม (White Fairy; W.F) ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ พบว่ากล้วยไม้ที่ได้รับการปลูกถ่ายเชื้อในส่วนบริเวณรากและส่วนเหนือราก (ลำต้นและใบ) มีการตรึงไนโตรเจนแตกต่างกับกล้วยไม้ที่ไม่ได้รับการปลูกถ่ายเชื้ออย่างเด่นชัด ในส่วนการจำแนกเชื้อเอนโดไฟท์ทั้ง 7 ไอโซเลท ด้วยเทคนิค 16S rDNA Sequencing สามารถระบุได้ดังนี้ คือ เชื้อ ESS 1 มีลำดับเบสใกล้เคียงกับ เชื้อ *Methylobacterium fujisawae* (Identities = 98.8 %), เชื้อ ESS 2 มีลำดับเบสใกล้เคียงกับ เชื้อ *Friedmanniella spumicola* (Identities = 97.4 %), เชื้อ ESS 3 มีลำดับเบสใกล้เคียงกับ เชื้อ *Bacillus subtilis* (Identities = 99.8 %), เชื้อ ESS 4, 5 และ 6 มีลำดับเบสใกล้เคียงกับ เชื้อ *Chelatococcus asaccharovorans* (Identities = 97.0 %) และเชื้อ ESS 7 มีลำดับเบสใกล้เคียงกับ เชื้อ *Cellulosimicrobium* sp. (Identities = 99.0 %).

Abstract

180160

Endophytic diazotrophic bacteria generally reside in the internal portion of the host plant without trigger harmful reaction or disease symptoms. They were reported to be a potential microorganism on encouraging the growth of many field crops by producing plant growth-promoting substances and fixing nitrogen from the atmosphere. The aims of the study were to evaluate nitrogen fixing efficiency of the microbes isolated from naturally grown *Dendrobium* sp. and the ability of colonization by reinnoculation into orchid tissue culture plantlets. Endophytic diazotrophic bacteria were isolated from *Dendrobium crystallinum.* The orchid shoot was previously surface sterilized using ethanol 70% and sodium hypochloride 3 % and extracted with 0.85 % sodium chloride. The extracted solution was cultured in modified Rennie medium (RM). The isolated endophytic bacteria were investigated for determination of growth and N_2-fixing efficiency on N depleted (RM) medium. The nitrogen fixation was evaluated by Acetylene Reduction Assay (ARA) technique. Seven isolates of bacteria were found after purifying by streak plate method with the quantity of 0.024-6.234 nmolC_2H_4/ 10^6 cells/ 24 hr. The morphological characteristic were gram negative and most isolates were rod shaped. The biochemical assays such as utilization of various sole carbon sources, cellulase assay and IAA production were also determined. Results indicated that the isolates ESS 3, ESS 5 and ESS 7 could utilize arabinose, glucose, malate and mannitol while ESS 2 and ESS 4 could not utilize arabinose, glucose, malate and mannitol. In addition, all isolates were able to produce the plant growth promoting substance, Indole Acetic Acid (IAA) and four of the seven isolates were produced cellulase. More experiment was carried out by inoculating the isolated endophytic diazotrophic bacteria, ESS2 and ESS3 into *D. crystallinum* and the hybrid *Dendrobium* sp., White Fairy (W.F.), plantlets from tissue culture. Inoculating sites were at the roots, and shoots and leaves parts, separately. Results showed that the inoculated plantlets had more nitrogen fixing efficiency than uninoculated plants, significantly. However, the different inoculated plant parts of orchid were not differed on nitrogen fixing efficiency. For genetically characterization of the bacteria by using 16S rDNA technique found that nucleotide base sequences of ESS 1 was similar with *Methylobacterium fujisawae* (Identities = 98.8 %), ESS 2 was similar with *Friedmanniella spumicola* (Identities = 97.4 %), ESS 3 was similar with *Bacillus subtilis* (Identities = 99.8 %), ESS 4, ESS 5 and ESS 6 was similar with *Chelatococcus asaccharovorans* (Identities = 97.0 %) and ESS 7 *Cellulosimicrobium* sp. (Identities = 99.0 %)