# บทที่ 3

# ผลการวิจัย

## 3.1 การสำรวจและเก็บตัวอย่างดิน ราก และลำต้นอ้อยจากแปลงปลูกอ้อย

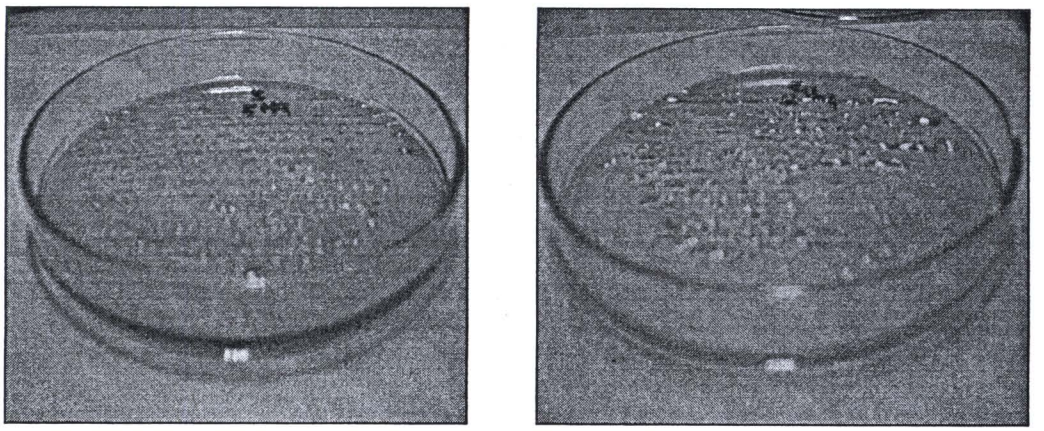
การสำรวจไร่อ้อยที่ปลูกโดยไม่ใช้ปุ๋ยเคมี ซึ่งคาดว่าน่าจะมีเชื้อแบคทีเรียที่ต้องการ จึงเก็บตัวอย่างดิน รากและลำต้นของอ้อยจาก 3 แหล่ง ได้แก่ ไร่เทียมพืชผลและโรงงานน้ำตาลอุดร จังหวัดอุดรธานี ไร่จากโรงงานน้ำตาลขอนแก่น จังหัดขอนแก่น และไร่จากโรงงานน้ำตาลวังขนาย จังหวัดนครราชสีมา

## 3.2 การคัดแยกเชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนที่เป็น free living และที่เป็น endophyte ในขั้นปฐมภูมิ

การคัดแยกเชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนขั้นปฐมภูมิจะใช้อาหาร LGIP medium ซึ่งเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่มีส่วนประกอบของแหล่งไนโตรเจน ดังนั้นแบคทีเรียที่สามารถเจริญบนอาหารดังกล่าวได้จะต้องมีความสามารถในการตรึงไนโตรเจนจากอากาศมาใช้ ในขั้นตอนนี้สามารถคัดแยกเชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนที่เป็น free living และ endophyte ได้ทั้งหมด 18 และ 30 ไอโซเลท ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 1 โดยโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียที่เจริญบนอาหารดังกล่าวจะมีลักษณะเยิ้ม ใส บางไอโซเลทอาจมีสีเหลืองปนเขียว (รูปที่ 1) ในกรณีที่ pH ของอาหารเริ่มต้นเป็นกรด (pH 5.5) อาหารเลี้ยงเชื้อจะเปลี่ยนเป็นสีเหลือง (ไม่ได้แสดงรูป)

**ตารางที่ 1** จำนวนไอโซเลทของเชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนที่คัดแยกได้โดยใช้อาหาร LGIP จากดินและส่วนต่างๆ ของอ้อยจากแต่ละจังหวัด

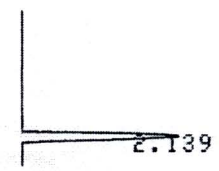
| Province | Isolates number of nitrogen fixing bacteria | | | | Total |
|---|---|---|---|---|---|
| | Soil | Stem | Leaf | Apical | |
| Udorn-thani | 2 | 4 | NG | NG | 6 |
| Khon Kaen | 12 | 2 | NG | 5 | 19 |
| Nakornrachasima | 4 | 13 | 1 | 5 | 23 |
| Total | 18 | 19 | 1 | 10 | 48 |



**รูปที่ 1** โคโลนีของเชื้อแบคทีเรียที่เจริญบนอาหาร LGIP มีลักษณะเยิ้ม ใส บางไอโซเลทมีสีเหลือง-เขียว

### 3.3 การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนขั้นทุติยภูมิ

การฉีดแก๊ส ethylene และ acetylene มาตรฐานเข้าเครื่อง GC และวิเคราะห์ด้วย FID ในสภาวะการทดลองที่ใช้ พบว่าเวลาที่แก๊ส ethylene และ acetylene มาตรฐานถูกปล่อยออกมาจากเครื่อง GC (retention time) คือ 2.139-2.325 และ 2.927-2.931 min ตามลำดับ (รูปที่ 2-4) ดังนั้นเมื่อวิเคราะห์การรีดิวส์แก๊ส acetylene ของเชื้อแบคทีเรียและตรวจวิเคราะห์แก๊ส ethylene ที่เกิดขึ้น เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน พบเชื้อแบคทีเรียที่มีกิจกรรมของ nitrogenase enzyme 15 ไอโซเลทโดยเชื้อ 3KLW, 1LS6pH7w และ 2LAPh7w มีกิจกรรมของ nitrogenase enzyme เมื่อคิดเป็น nmol ethylene/hr สูงสุด (รูปที่ 5) แต่ถ้าเปรียบเทียบกิจกรรมของเอนไซม์ต่อ mg protein ในอาหารเลี้ยงเชื้อพบว่าเชื้อ 1LSO1, 1LS7 และ 3KLW มีค่ากิจกรรมของ nitrogenase enzyme/mg protein สูงสุด (รูปที่ 6)



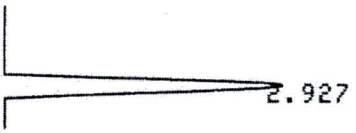

CHROMATOGRAM 1 MEMORIZED

C-R5A CHROMATOPAC

CHANNEL NO 1 FILE 1
SAMPLE NO 0 METHOD 41
REPORT NO 55

| PKNO | TIME | AREA | MK | IDNO | CONC | NAME |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | 2.139 | 13741 | | | 100 | |
| | TOTAL | 13741 | | | 100 | |

**รูปที่ 2** Chromatogram, retention time และ peak area ของแก๊ส ethylene เมื่อฉีด ethylene อย่างเดียว



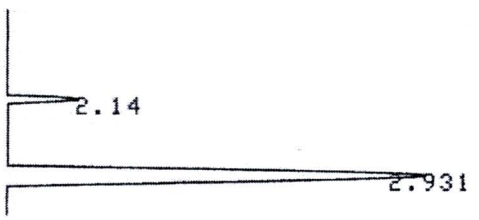

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ห้องสมุดงานวิจัย

CHROMATOGRAM 1 MEMORIZED

C-R5A CHROMATOPAC
CHANNEL NO 1 FILE 1
SAMPLE NO 0 METHOD 41
REPORT NO 39

| PKNO | TIME | AREA | MK | IDNO | CONC | NAME |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | 2.927 | 18171 | | | 100 | |
| | TOTAL | 18171 | | | 100 | |

**รูปที่ 3** Chromatogram, retention time และ peak area ของแก๊ส acetylene เมื่อฉีด acetylene อย่างเดียว



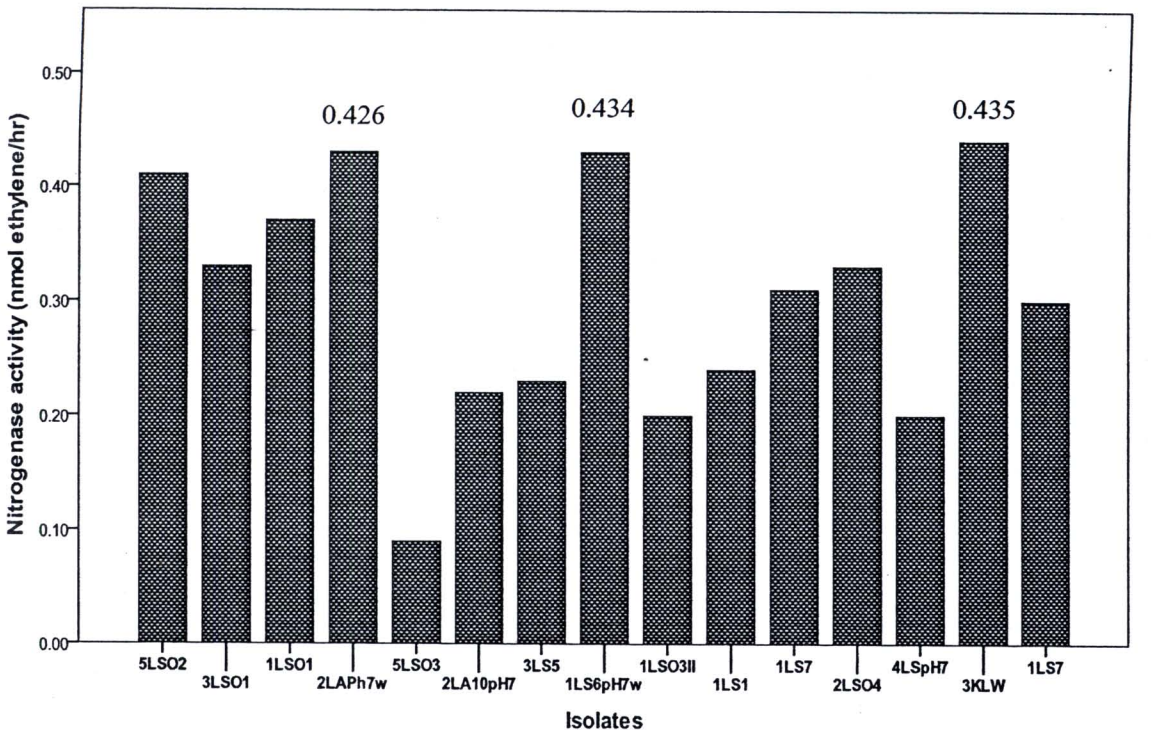

CHROMATOGRAM 1 MEMORIZED

C-R5A CHROMATOPAC
CHANNEL NO 1 FILE 1
SAMPLE NO 0 METHOD 41
REPORT NO 54

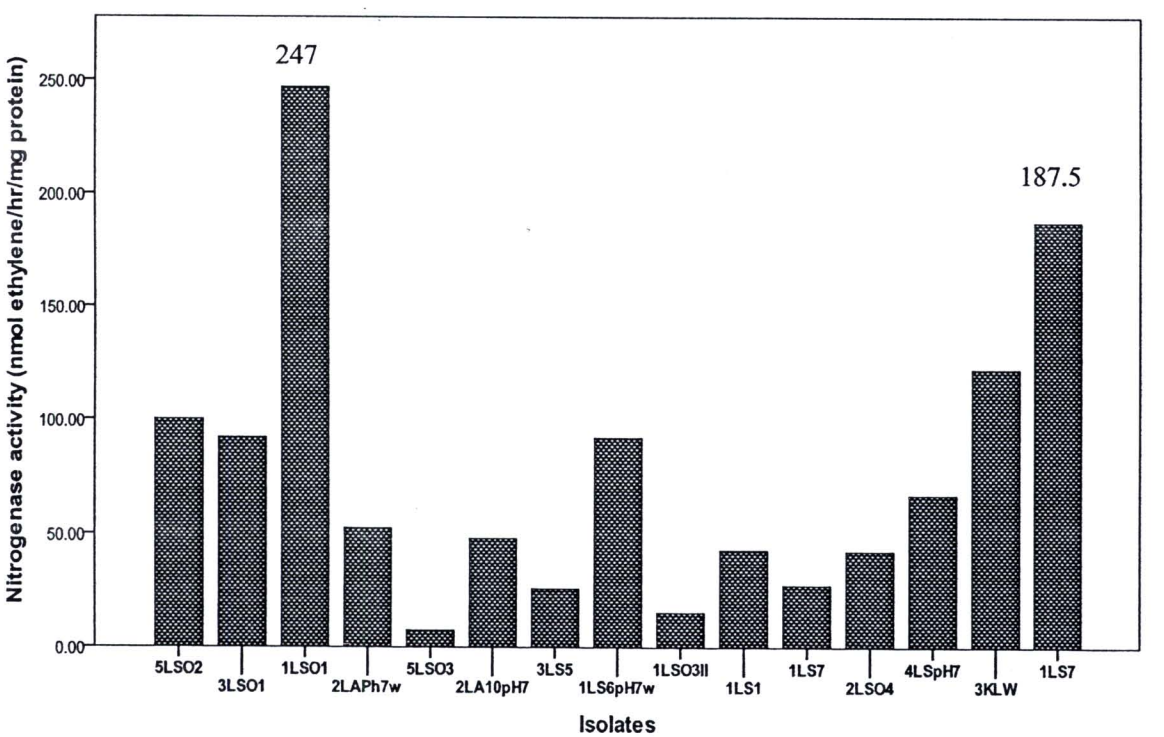
| PKNO | TIME | AREA | MK | IDNO | CONC | NAME |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | 2.14 | 12159 | | | 28.4772 | |
| 2 | 2.931 | 30538 | | | 71.5227 | |
| | TOTAL | 42697 | | | 100 | |

**รูปที่ 4** Chromatogram, retention time และ peak area ของแก๊ส ethylene และ acetylene เมื่อฉีด thylene และ acetylene ร่วมกัน

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
ห้องสมุดงานวิจัย
วันที่ 01 ก.ค. 2555
เลขทะเบียน 247397
เลขเรียกหนังสือ



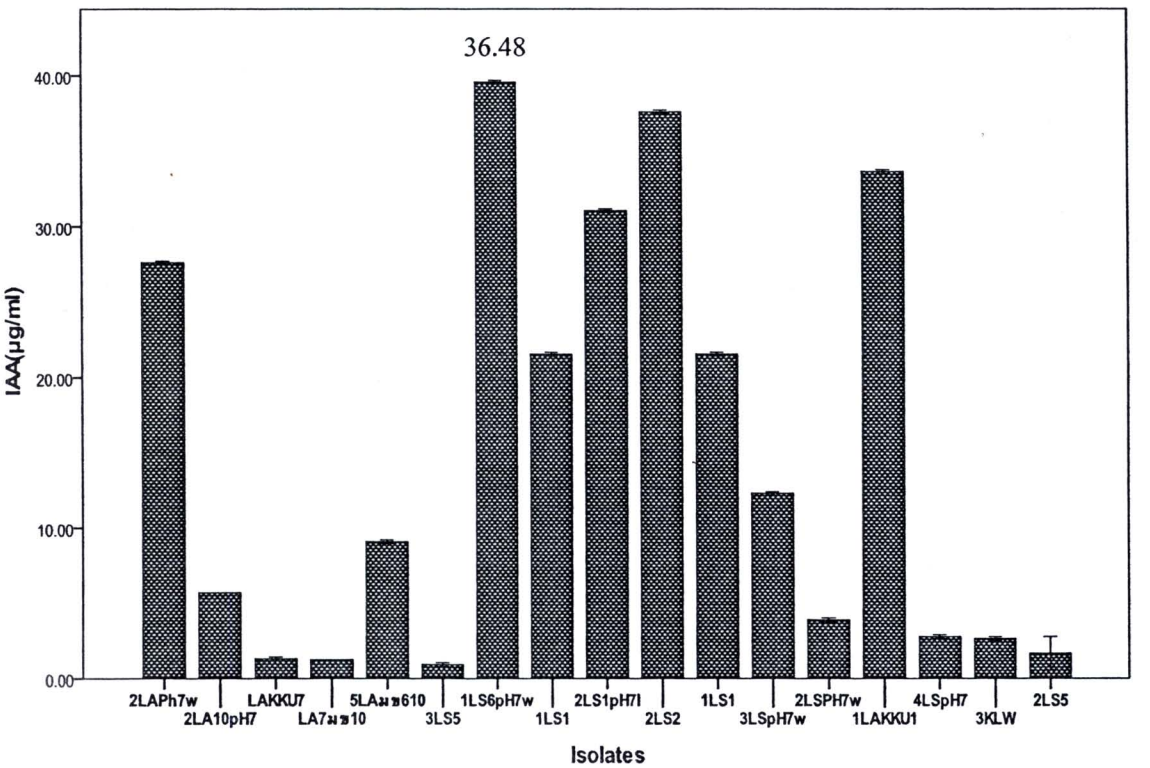

**รูปที่ 5** Nitrogenase activity ของเชื้อแบคทีเรียแต่ละไอโซเลท หน่วยเป็น nmol ethylene/hr เมื่อตรวจสอบด้วย Acetylene Reduction Assay



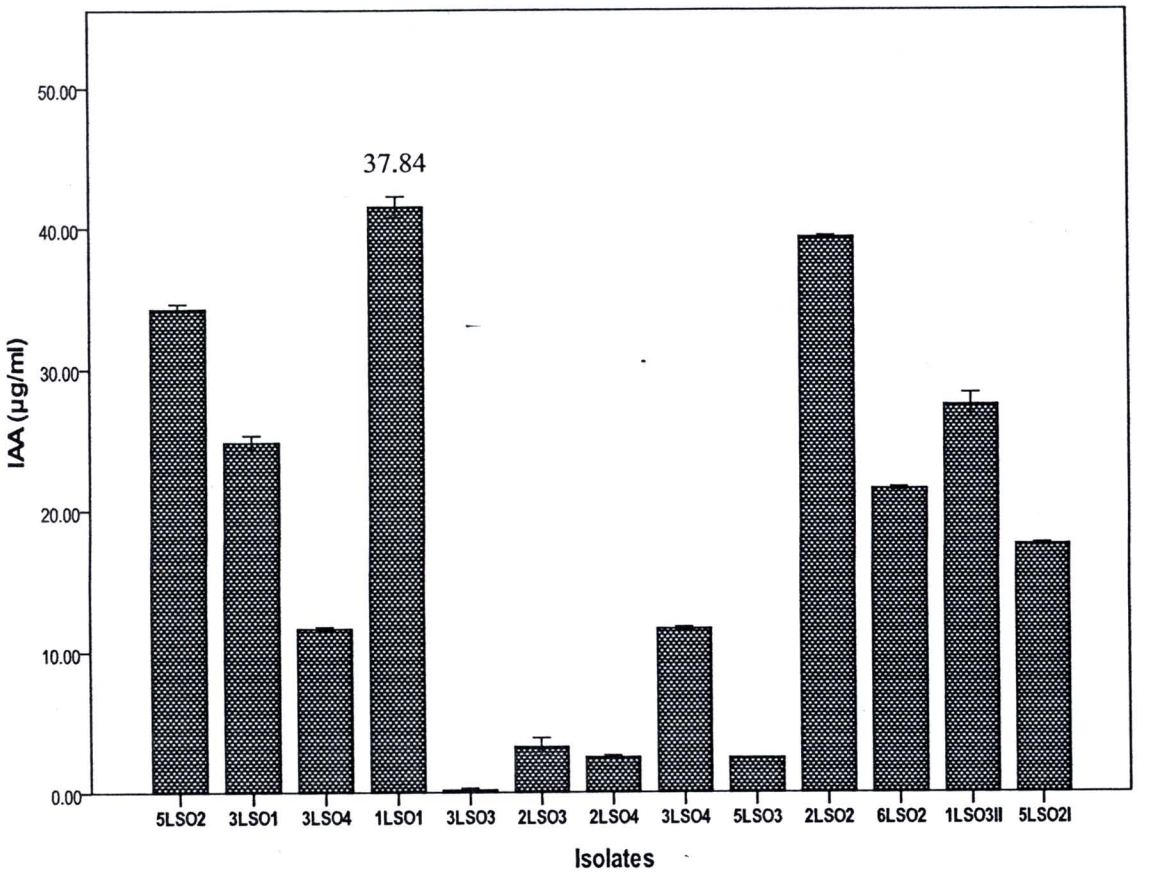

**รูปที่ 6** Nitrogenase activity ของเชื้อแบคทีเรียแต่ละไอโซเลท หน่วยเป็น nmol ethylene/hr/mg protein เมื่อตรวจสอบด้วย Acetylene Reduction Assay

### 3.4 การศึกษาการสร้าง Indole-3 acetic acid (IAA) ของเชื้อแบคทีเรีย

นำเชื้อแบคทีเรียทั้งหมดที่คัดแยกได้จาก LGIP medium มาตรวจสอบคุณสมบัติการสร้างสาร IAA พบเชื้อแบคทีเรียที่เป็น free living และ endophyte จำนวน 17 และ 12 ไอโซเลท รวมทั้งสิ้น 29 ไอโซเลทที่สร้าง IAA โดยเชื้อไอโซเลท 1LS6pH7w และ 1LSO1 ซึ่งเป็น endophyte และ free living bacteria สร้าง IAA มีปริมาณสูงสุดคือ 36.48 และ 37.84 µg/ml ตามลำดับ (รูปที่ 7 และ 8)




**รูปที่** 7 ปริมาณสาร Indole-3 acetic acid ที่สร้างโดยเชื้อแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากอ้อยที่เป็น endophytic bacteria (แสดงค่า Mean ของปริมาณ IAA และ Error bars)




**รูปที่ 8** ปริมาณสาร Indole-3 acetic acid ที่สร้างโดยเชื้อแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากดินรอบรากอ้อยที่เป็น Free living bacteria (แสดงค่า Mean ของปริมาณ IAA และ Error bars)

### 3.5 การคัดแยกเชื้อแบคทีเรียละลายฟอสเฟต

การคัดแยกเชื้อแบคทีเรียจากตัวอย่างดินรอบรากอ้อย และตัวอย่างอ้อยบน Nutrient agar ได้แบคทีเรียที่อยู่เป็นอิสระและแบคทีเรียแบบพึ่งพากัน 36 และ 36 ไอโซเลท ตามลำดับ และใน King's B medium ได้เชื้อแบคทีเรียที่อยู่เป็น free living และ endophyte จำนวน 36 และ 59 ไอโซเลท ตามลำดับ รวมได้เชื้อแบคทีเรียทั้งหมด 167 ไอโซเลท ดังแสดงในตารางที่ 2

**ตารางที่ 2** จำนวนไอโซเลทของเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้โดยใช้อาหาร Nutrient agar และ King's B medium จากดินและส่วนต่างๆ ของอ้อยจากแต่ละจังหวัด (ND = Not Done, NG = No Growth)

| Province | Isolates of bacteria on each medium and each parts of sugarcane | | | | | | | | Total |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Nutrient agar | | | | King's B medium | | | | |
| | Soil | Stem | Leaf | Apical | Soil | Stem | Leaf | Apical | |
| Udonthani | 18 | 15 | ND | ND | 13 | 28 | ND | ND | 74 |
| Khonkaen | 10 | 10 | ND | 3 | 16 | 14 | ND | 6 | 59 |
| Nakonratchasima | 8 | 6 | 2 | NG | 7 | 6 | 4 | 1 | 34 |
| Total | 36 | 31 | 2 | 3 | 36 | 48 | 4 | 7 | 167 |

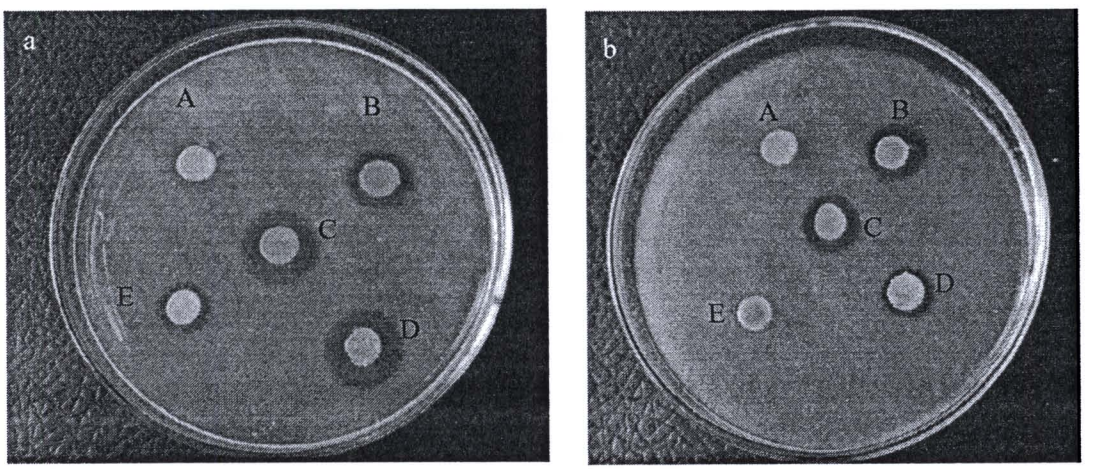
เมื่อนำแบคทีเรียทั้งหมดที่แยกได้มาทดสอบความสามารถในการละลายฟอสเฟตโดยใช้ Pikovskaya's agar ที่เป็นอาหารชั้นเดียว (20 ml) พบว่าเชื้อเจริญช้าและต้องใช้เวลานาน 7-10 วัน จึงจะเห็น halo/clear zone หรืออาจไม่เห็น zone เลย นอกจากนี้การบ่มอาหารนานเกินไปก็อาจทำให้อาหารแห้งได้ ดังนั้นจึงได้ปรับปรุงวิธีการใหม่โดยใช้อาหาร Pikovskaya's agar ที่เป็น 2 ชั้น ชั้นล่าง (10 ml) ไม่ใส่ tricalcium phosphate หรือใช้อาหาร Pikovskaya's agar ที่เป็นชั้นเดียว แต่ใส่ tricalcium phosphate เพียงครึ่งเดียว (half strength tricalcium phosphate) และเทอาหารให้มีปริมาตรลดลงครึ่งหนึ่ง พบว่าวิธีนี้เชื้อแบคทีเรียเจริญได้ดีขึ้นและใช้เวลาเพียง 1-3 วันเท่านั้น ก็เห็น halo/clear zone ได้แล้ว (ตารางที่ 3 และรูปที่ 9) โดยวิธีนี้สามารถแยกเชื้อแบคทีเรียที่ละลายฟอสเฟตได้จำนวน 30 ไอโซเลท โดยเชื้อแบคทีเรียไอโซเลท 4LSpH7 เป็น endophytic bacteria ที่คัดแยกได้จากส่วนของลำต้นของอ้อย และเชื้อแบคทีเรียไอโซเลท 3LSO4 เป็น free living bacteria ที่คัดแยกได้จากดินรอบรากอ้อยมีความสามารถในการละลายฟอสเฟตได้สูงสุด โดยให้ค่า SI เท่ากับ 3.66 และ 2.5 ตามลำดับ

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ห้องสมุดงานวิจัย

**ตารางที่ 3** ค่า Solubilization index (SI) ของเชื้อแบคทีเรียที่ละลายฟอสเฟตได้บางไอโซเลทที่เจริญบนอาหาร double-layer Pikovskaya's agar เป็นระยะเวลา 7 วัน

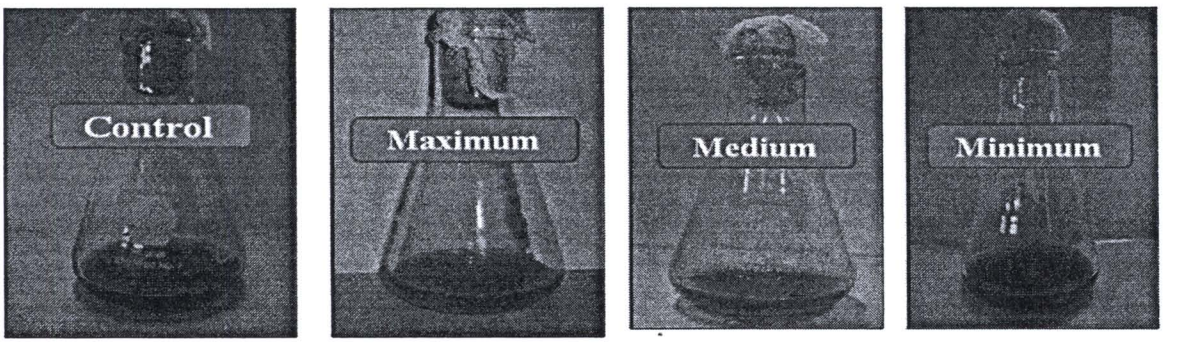
| Isolate | Solubilization index* | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Day1 | day2 | day3 | day4 | day5 | day6 | day7 |
| E16 | 0.00 | 1.80 | 1.80b | 1.85bc | 1.95bc | 1.95b | 2.05bc |
| A14 | 0.00 | 1.80 | 1.75ab | 1.80b | 1.90b | 2.00b | 2.00b |
| B8 | 0.00 | 1.70 | 1.70a | 1.70a | 1.70a | 1.80a | 1.80a |
| B13 | 1.60 | 1.80 | 1.80b | 1.90c | 2.00c | 2.00b | 2.10c |
| E2 | 0.00 | 2.06 | 2.06c | 2.06d | 2.11d | 2.28c | 2.28d |

*ค่าเฉลี่ยของ SI แต่ละวันในแนวตั้ง ตัวอักษรที่เหมือนกันไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ทดสอบโดย Duncan test




**รูปที่ 9** การเจริญของเชื้อแบคทีเรียที่ละลายฟอสเฟตบนอาหาร Pikovskaya's agar เมื่อเวลาผ่านไป 3 วัน โดยรูป a เป็น doublelayer Pikovskaya's agar (อาหารชั้นล่างปริมาตร 10 ml ไม่ใส่ tricalcium phosphate ส่วนอาหารชั้นบน 10 ml ใส่ tricalcium phosphate ครึ่งหนึ่งของสูตรอาหาร) ส่วนรูป b เป็น monolayer Pikovskaya's agar (อาหารมีปริมาตร 10 ml ใส่ tricalcium phosphate ครึ่งหนึ่งของสูตรอาหาร) A, B, C, D และ E แทนเชื้อแบคทีเรียไอโซเลท E1, F1, B5, A7 และ A1 ตามลำดับ

นอกจากนี้ยังได้ทดสอบความสามารถในการละลายฟอสเฟตโดยใช้ อาหาร NBRIP ที่มี Bromophenol blue เป็น indicator สังเกตการเปลี่ยนสีของอาหารเลี้ยงเชื้อและวัดค่า pH ที่เปลี่ยนแปลงไป พบว่าการสังเกตสีของอาหาร สังเกตได้ยาก เนื่องจากเชื้อบางชนิดสร้างเม็ดสีได้ (รูปที่ 10) และอาจใช้เวลาตั้งแต่ 1-7 วัน โดย pH และสีของอาหารที่เปลี่ยนแปลงไปไม่มีความสัมพันธ์กันเลย (ตารางที่ 4)




**รูปที่ 10** การเปลี่ยนสีของอาหาร NBRIP ที่มี Bromophenol blue เป็น indicator โดย flask ควบคุมที่ไม่ได้ใส่แบคทีเรีย อาหารจะมีสีน้ำเงิน ส่วน flask ที่ใส่เชื้อลงไป ถ้าเชื้อละลายฟอสเฟตได้จะเปลี่ยนสีอาหารเป็นสีเหลือง เขียว หรือน้ำเงินจางๆ ตามความสามารถของเชื้อในการละลายฟอสเฟตได้มาก ปานกลาง และน้อย ตามลำดับ

**ตารางที่ 4** การเปลี่ยนสีและค่า pH ในการทดสอบการละลายฟอสเฟตในอาหาร NBRIP medium

| Isolate | Detail | NBRIP medium(Decolorize) | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | Maximum | Medium | Minimum | pH |
| D10 | 1NS2 | - | - | / | 5.24 |
| D14 | 2NSO1 | - | - | / | 5.24 |
| D16 | 1KSO3 I | | / | - | 5.67 |
| D18 | 2KSO3 | / | | - | 4.68 |
| D20 | 6NSO4 | | | / | 5.06 |
| E2 | 7NSO4 | / | | - | 5.03 |
| E3 | 8NS3 | | | / | 4.79 |
| E6 | 1KA1 | | | / | 4.79 |
| E7 | 3NS3 | | | / | 5.04 |
| E8 | 6KA1 | | | / | 4.93 |
| E9 | 2NSO8 | / | | - | 4.16 |
| E10 | 5KSO4 | / | | - | 5.1 |
| E11 | 3KSO4 | - | - | - | 5.25 |

เมื่อเปรียบเทียบผลที่ได้โดยวิธีที่ใช้อาหาร Pikovskaya's agar 2 ชั้นกับการเปลี่ยนสีและวัดค่า pH ของอาหาร NBRIP ก็ไม่สัมพันธ์กันเลย (ตารางที่ 5)

**ตารางที่ 5** ความสัมพันธ์ของผลการทดสอบในอาหาร Pikovskaya's agar 2 ชั้นและ NBRIP medium

| Isolate | SI | Decolorize | pH |
|---|---|---|---|
| A1 | 2.1 | - | 6.31 |
| A2 | 2.1 | - | 6.66 |
| A3 | 2.2 | - | 6.31 |
| A4 | 2.0 | - | 6.21 |
| A5 | 2.2 | - | 6.14 |
| A6 | 2.6 | - | 6.26 |
| A15 | 2.5 | - | 5.01 |
| D1 | 2.1 | - | 4.94 |
| D14 | - | Minimum | 5.24 |
| D16 | 2.4 | Medium | 5.67 |
| D18 | 2.1 | Maximum | 4.68 |
| D20 | - | Minimum | 5.06 |
| **E2** | **3.6** | **Maximum** | **5.03** |
| E3 | - | Minimum | 4.79 |
| E6 | - | Minimum | 4.79 |
| E7 | - | Minimum | 5.04 |
| E8 | - | Minimum | 4.93 |
| E9 | - | Maximum | 4.16 |
| E10 | 2.2 | Maximum | 5.1 |
| E12 | 2.9 | Maximum | 4.92 |

### 3.6 สรุปคุณสมบัติโดยรวมของเชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจน

สรุปคุณสมบัติในการสร้างสาร IAA และละลายฟอสเฟตของเชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนที่มีประสิทธิภาพสูงได้ผลดังตารางที่ 6

**ตารางที่ 6** คุณสมบัติโดยรวมของเชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจน

| Isolate | Nitrogenase activity (nmol ethylene/ hr/ mg protein) | IAA (µg/ml) | Phosphate solubilized Index (SI) |
|---|---|---|---|
| 5LSO2 | 100 | 31.36 | - |
| 3LSO1 | 92 | 23.07 | - |
| **1LSO1** | 247 | **37.84** | - |
| 2LAPh7w | 52.44 | 25.34 | - |
| 5LSO3 | 7.44 | 2.27 | - |
| 2LA10pH7 | 48 | 5.31 | - |
| 3LS5 | 26 | 0.90 | - |
| 1LS6pH7w | 92 | 36.48 | - |
| 1LSO3II | 15.3 | 25.68 | 2.625 |
| 1LS1 | 43 | 19.89 | - |
| 1LS7 | 27.43 | - | - |
| 2LSO4 | 42.4 | - | - |
| 4LSpH7 | 67 | 2.61 | 3.66 |
| 3KLW | 122.22 | 2.61 | - |
| 1LS7 | 187.5 | - | - |