บทที่ 5
สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

สรุปผลการวิจัย

การคัดแยกแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนที่ดำรงชีพแบบอิสระจากนาข้าวใน 5 จังหวัด ได้แก่ กรุงเทพมหานคร ฉะเชิงเทรา ราชบุรี สุพรรณบุรี และชัยนาท คัดแยกได้ 106 ไอโซเลต แยกได้จากจังหวัดฉะเชิงเทรามากที่สุด 60 ไอโซเลต รองลงมาเป็นจังหวัดสุพรรณบุรี 31 ไอโซเลต กรุงเทพฯ 10 ไอโซเลต ชัยนาท 4 ไอโซเลต และราชบุรี 1 ไอโซเลต แบคทีเรียที่คัดแยกได้จากรากข้าว 82 ไอโซเลต และดินนาข้าว 24 ไอโซเลต เป็นแบคทีเรียแกรมบวก 43 ไอโซเลต แกรมลบ 63 ไอโซเลต รูปร่างของแบคทีเรียส่วนใหญ่เป็นแท่งและแท่งสั้น 98ไอโซเลต เส้นสาย 6 ไอโซเลต และรูปร่างกลม 2 ไอโซเลต ประสิทธิภาพในการตรึงไนโตรเจนวัดจากปริมาณแอมโมเนีย-ไนโตรเจน แบ่งได้เป็น

แบคทีเรียตรึงไนโตรเจนได้ปริมาณแอมโมเนีย-ไนโตรเจนมากกว่า 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร มี 4 ไอโซเลต ได้แก่ CShang3 จากตำบลหนองแหน CSban21 CSban22 และ CSban3 จากตำบลบ้านซ่อง จังหวัดฉะเชิงเทรา ให้ปริมาณแอมโมเนีย-ไนโตรเจน 5.144 ±0.128, 8.118 ±0.457 5.223 ±0.197 และ 5.116 ±0.423 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ

ปริมาณแอมโมเนีย-ไนโตรเจน อยู่ระหว่าง 4.0 – 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร มี 3 ไอโซเลต ได้แก่ Bsin1 นาบ้านสินอนันต์ เขตหนองจอก กรุงเทพมหานคร CSku28 จากตำบลคู้ยายหมี และ CSban17 จากตำบลบ้านซ่อง จังหวัดฉะเชิงเทรา ให้ปริมาณแอมโมเนีย-ไนโตรเจน 4.129 ±0.253, 4.293 ±0.119 และ 4.255 ±0.553 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ

ปริมาณแอมโมเนีย-ไนโตรเจน อยู่ระหว่าง 3.0 – 4.0 มิลลิกรัมต่อลิตร มี 9 ไอโซเลต

ปริมาณแอมโมเนีย-ไนโตรเจน อยู่ระหว่าง 2.5 – 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร มี 13 ไอโซเลต

ปริมาณแอมโมเนีย-ไนโตรเจน อยู่ระหว่าง 2.1 – 2.5 มิลลิกรัมต่อลิตร มี 25 ไอโซเลต

ปริมาณแอมโมเนีย-ไนโตรเจน อยู่ระหว่าง 1.0 – 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร มี 38 ไอโซเลต

ปริมาณแอมโมเนีย-ไนโตรเจน อยู่ระหว่าง 0.0 – 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร มี 14 ไอโซเลต

ผลการศึกษาภาวะทนกรด และทนโลหะหนักของแบคทีเรียที่ให้ปริมาณแอมโมเนียสูงสุด 25 ไอโซเลทจาก 106 ไอโซเลท พบว่า ไอโซเลทที่ CShang3 (10), CSban3 (13), CSban21 (18) และ CSban22 (19) เจริญได้ดี และให้ปริมาณแอมโมเนียสูงสุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ p value < 0.05 ที่ pH 4.0 – 7.0 และในภาวะที่มีโลหะหนักคอปเปอร์ แคดเมี่ยม นิกเกิล ตะกั่ว โครเมี่ยม และสังกะสีละลายอยู่ทุกความเข้มข้น ผลการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นส่วน 16S rDNA ของ CSban21(18) มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับ *Nguyenibacter vanlangensis* ไอโซเลตที่ CShang3(10), CSban3(13) และ CSban22(19) มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับ *Bacillus aryabhattai* เช่นเดียวกัน

ไอโซเลทที่ Bsin1 (1) และ CSku28 (9) ให้ปริมาณแอมโมเนียได้สูง อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ p value <0.05 ในทุก pH ตั้งแต่ 4.0–7.0 และที่มีโลหะคอปเปอร์ นิเกิล ตะกั่ว และโครเมี่ยม ละลายทุกความเข้มข้น ผลการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นส่วน 16S rDNA ของไอโซเลตที่ Bsin1

(1) และ CSku28 (9) มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับ *Bordetella petrii* และ *Ensifer mexicanus* ตามลำดับ

ไอโซเลตที่ CSku24 (6), CSku26 (8) และShuaS3 (25) ให้ปริมาณแอมโมเนียได้สูงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ p value < 0.05 เฉพาะที่ pH 5.0 และที่มีโลหะคอปเปอร์ ความเข้มข้น 12.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ตะกั่ว ความเข้มข้น 2.8 มิลลิกรัมต่อลิตร และโครเมี่ยม ความเข้มข้น 4.0 มิลลิกรัมต่อลิตรละลาย ผลการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของส่วน 16S rDNA ของไอโซเลตที่ CSku24(6), CSku 26(8) และShuaS3(25)มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับ*Streptomyces cellulosae, Streptomyces werraensis* และ *Streptomyces gancidicus* ตามลำดับ

อภิปรายผล

แบคทีเรียตรึงไนโตรเจนที่คัดแยกจากรากข้าว และดินนาข้าวเป็นกลุ่มของไรโซแบคทีเรียช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช หรือพีจีพีอาร์ (PGPR: Plant Growth Promoting Rhizobacteria) ซึ่งมีคุณสมบัติทางตรงในการตรึงไนโตรเจนจากบรรยากาศ การละลายธาตุอาหาร เช่น ฟอสฟอรัส การสร้างซิเดอร์โรฟอร์ (Siderophore) และสังเคราะห์ฮอร์โมนส่งเสริมการเจริญของพืช เช่น กรดอินโดล-3-แอซีติก (Indole-3-Acetic Acid: IAA) จิบเบอเรลลิน (Gibberellin Acid) และเอทิลีน (Ethylene) ทางอ้อมเป็นการป้องกันพืชจากจุลินทรีย์ก่อเกิดโรคด้วยการสร้างสารออกฤทธิ์ยับยั้ง (Antibiotics) (Singh & Padmavathy, 2014; Gupta et. al. 2015) แบคทีเรียที่คัดแยกได้จากแต่ละพื้นที่มีจำนวนแตกต่างกันเนื่องจากสภาพของดินที่ผ่านการจัดการความอุดมสมบูรณ์ของดิน (Fertility Management) การอารักขาพืช (Crop Protection) และการปลูกพืชหมุนเวียน (Crop Rotation) แตกต่างกัน ปัจจัยเหล่านี้มีผลต่อประชากรจุลินทรีย์ในดิน(Soil Microbial Community) (Orr et. al. 2012) ดินที่มีปริมาณคาร์บอนอินทรีย์มาก มีค่า pH เป็นกลางจะส่งเสริมการเจริญของแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนที่ดำรงชีพแบบอิสระ (Orr et. al., 2011)

แบคทีเรียตรึงไนโตรเจนที่ดำรงชีพแบบอิสระส่วนใหญ่แยกได้จากรากข้าว 82 ไอโซเลต และดินนาข้าว 24 ไอโซเลต เนื่องมาจากบริเวณราก (Rhizosphere) มีการปลดปล่อยธาตุอาหารของพืช ซึ่งแบคทีเรียสามารถนำมาใช้ในการเจริญเติบโต (Mendes, Garbeva, & Raaijmakers, 2013) สอดคล้องกับการตรวจหา *nifH* gene ซึ่งเป็นยีนที่แสดงออกถึงรหัสโปรตีนที่มีเหล็กอยู่ในโมเลกุลของเอนไซม์ไนโตรจีเนส อันบ่งบอกถึงปริมาณแบคทีเรียตรึงไนโตรเจน โดยตรวจพบได้มากในดินบริเวณรอบรากข้าวมากกว่าดินนาข้าว (Shu et. al., 2012)

แบคทีเรียตรึงไนโตรเจนที่ดำรงชีพแบบอิสระ จะมีเอนไซม์ไนโตรจีเนสช่วยรีดิวซ์ไนโตรเจน (N_2) ในบรรยากาศให้เปลี่ยนเป็นแอมโมเนียไนโตรเจน (NH_3) (Pedraza, 2008) แบคทีเรียกลุ่มนี้ได้แก่ *Burkholderia,Azotobacter,Azospirillum,Bacillus* และ*Clostridium*(Dahal, 2016) ตัวอย่างแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนที่ดำรงชีพแบบอิสระที่คัดแยกจากสิ่งแวดล้อมได้แก่ *Pseudomonas* sp. และ *Paenibacillus borealis* ที่คัดแยกได้จากดินอัลคาไลน์ (Smita, & Goyal, 2017) *Azotobacter tropicalis* ที่คัดแยกได้จากดินพื้นที่ทางการเกษตรอำเภอธัญบุรี จังหวัดปทุมธานี (Prajankate, Saphan, & Sriyapai, 2015) *Azotobacter chroococcum* spp. เป็นแบคทีเรียตรึง

ไนโตรเจนที่มีประสิทธิภาพช่วยเพิ่มผลผลิตข้าว ข้าวโพด อ้อย ข้าวฟ่าง และ ผัก เป็นต้น (Wani, Chand, & Ali, 2013) *Agrobaacterium* sp., *Agrobacterium tumefaciens*, *Burkholderia kururiensis*, *Bacillus megaterium* และ *Microbacteriaceae bacterium* ที่แยกจากดินบริเวณรอบรากข้าวในจังหวัดพระนครศรีอยุธยา (สุจิตกัลยา มฤครัฐอินแปลง. 2557)

การศึกษาที่ผ่านมาพบว่า *Pseudomonas putida* ที่คัดแยกจากดินทางการเกษตร สามารถตรึงไนโตรเจนจากบรรยากาศแล้วผลิตเป็นแอมโมเนีย วิเคราะห์แอมโมเนียด้วย Nessler's Reagent ตามวิธีของ Cappuccino & Sherman, 1992 ที่สารละลายเปลี่ยนจากสีเหลืองจางๆ เป็นสีน้ำตาลเข้ม (Naphade & Hussain, 2014) การคัดแยกแบคทีเรียตรึงไนโตรเจน แบบใช้ออกซิเจนจากบริเวณรากของต้นกาแฟใน Jember, East Java สามารถคัดแยกได้ 64 ไอโซเลท มี 4 ไอโซเลท ได้แก่ Ab Kws.1, AsmE6s.3.a, AsmBs1.1 และAsmE6s สามารถตรึงไนโตรเจนได้สูง และปล่อยแอมโมเนียความเข้มข้น 129.6-239.8 μM/mg dry weight cell. AbKws.1 มีความคล้ายคลึงกับ *Achromobacter* sp. ไอโซเลท AsmE6s.1 และ AsmE6s.3. มีความคล้ายคลึงกับ *Stenotrophomonas maltophilia* Ab Kws.1 มีความคล้ายคลึงกับ *Leifsonia aquatic* (Wedhastri et. al. 2012) *Azotobacter vinelandii* สามารถปลดปล่อยแอมโมเนียได้สูงถึง 260.251 μM (Gordon & Moore, 1981). *Azospirillum brasilence* สามารถปลดปล่อยแอมโมเนียได้ 1.2 ng/h/mg (Christiansen-Weninger, & Van Veen, 1991). Bali et. al. (1992) รายงานว่า *Azotobacter vinelandii* UW136 ปลดปล่อยแอมโมเนียได้ 200 μM หลังบ่มนาน 48 ชั่วโมง Iwata et. al. 2010 รายงานว่า *Lysobacter* sp. E4 ปลดปล่อยแอมโมเนียได้ 1,600 μM หลังบ่มนาน 8 วัน ความสามารถของแบคทีเรียในการปลดปล่อยแอมโมเนีย ที่เป็นผลจากการตรึงไนโตรเจน ขึ้นอยู่กับชนิดของแบคทีเรีย และสภาพแวดล้อม (Conalghi et. al. 1997) *Azotobacter chroococcum* ผลิตแอมโมเนียได้สูงสุด 9.05 มิลลิกรัมต่อลิตร ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี olive mill wastewater 5% (Gul Fidan, 2003) *Azotobacter tropicalis* ผลิตแอมโมเนียได้ 2.47 มิลลิกรัมต่อลิตร นำไปใช้ปรับปรุงคุณภาพดินเสื่อมสภาพทางการเกษตรได้ (ประดับรัฐ ประจันเขตต์, สุทธวรรณ สุพรรณ และ ทายาท ศรียาภัย. 2558) *Rhizobium* strain NA2 ที่คัดแยกได้จากปมรากของต้น *Phaseolus vulgaris* สามารถผลิตแอมโมเนียได้ 8.58 μg/ml หลังบ่มนาน 96 ชั่วโมง (Karthik et. al., 2016) ความ สามารถของแบคทีเรียในการปลดปล่อยแอมโมเนียจากการตรึงไนโตรเจนขึ้นกับชนิดของแบคทีเรียและสภาพสิ่งแวดล้อม (Conalghi et. al., 1997)

การศึกษาการเจริญเติบโตของแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการตรึงไนโตรเจนสูงภายใต้สภาพดินนาข้าวของประเทศไทย สภาพดินนาข้าวในแหล่งผลิตข้าวในอำเภอแม่สาย จังหวัดเชียงราย อำเภอแม่ใจ และปง จังหวัดพะเยา อำเภอชุมแสง พยุหะคีรี และเก้าเลี้ยว จังหวัดนครสวรรค์ อำเภอลาดหลุมแก้ว จังหวัดปทุมธานี และนาข้าวในจังหวัดสุโขทัย และชัยนาท พบว่าดินส่วนใหญ่มีความเป็นกรด pH เท่ากับ 5.6 – 6.8 (Doi & Pitiwut, 2014) และค่า pH ของดินก่อนปลูกข้าวในนาทดลอง 4 แปลง ภายในศูนย์วิจัยข้าวจังหวัดปทุมธานี มีค่า pH เท่ากับ 4.47–6.86 (Sampanpanisha, 2012) นอกจากนี้ยังพบการปนเปื้อนโลหะหนักในนาข้าวอินทรีย์ ได้แก่ แคดเมี่ยม 0–0.0727 mg Cd/kg, โครเมี่ยม 0–1.92 mg Cr/kg ตะกั่ว 0.186–1.39 mg Pb/kg นิกเกิล 0.372–2.57 mg Ni/kg คอปเปอร์ 0.698–2.90 mg Cu/kg และสังกะสี 0.987–14.4 mg Zn/kg (Chinoim

& Sinbuathong, 2010) การศึกษานี้จึงทดสอบการเจริญเติบโตของแบคทีเรียที่ pH 4.0 - 6.5 โลหะหนักคอปเปอร์ ความเข้มข้น 0.75 – 12.0 มิลลิกรัมต่อลิตร นิกเกิล ความเข้มข้น 0.65 – 10.4 มิลลิกรัมต่อลิตร ตะกั่ว ความเข้มข้น 0.35 – 2.8 มิลลิกรัมต่อลิตร โครเมี่ยม ความเข้มข้น 0.5 – 4.0 มิลลิกรัมต่อลิตร แคดเมี่ยม ความเข้มข้น 0.02 – 0.8 มิลลิกรัมต่อลิตร และสังกะสี ความเข้มข้น 3.5 - 28 มิลลิกรัมต่อลิตร

แบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการตรึงไนโตรเจนสูงภายใต้สภาวะเป็นกรด และปนเปื้อนโลหะหนัก ได้แก่ ไอโซเลทBsin1(1) CSku24(6) CSku26(8) CSku28(9) CShang3(10) CSban3(13) CSban21(18) CSban22(19) และ ShuaS3(25)

ไอโซเลท CSban21 (18) จำแนกสายพันธุ์ด้วยเทคนิค 16S rDNA พบว่า มีความใกล้เคียงกับลำดับนิวคลิโอไทด์ของ *Nguyenibacter vanlangensis* คัดแยกครั้งแรกได้จากบริเวณรากข้าวในทวีปเอเชีย ที่ Long Thanh Trung Commune, อำเภอ Hoa Thanh จังหวัด Tay Ninh ประเทศเวียดนาม เป็นแบคทีเรียแกรมลบ เคลื่อนที่ด้วย Peritrichous Flagella มีขนาดกว้าง 0.6 - 0.8 ยาว 1.0 - 1.6 ไมโครเมตร เจริญบนอาหาร Nitrogen-Free LGI Medium เจริญได้น้อยในที่มีกรดอะซิติกร้อยละ 0.35 (w/v) (Vu et. al. 2013) ต่อมาคัดแยกได้จากรากต้นมันสำปะหลัง ซึ่งเป็นพืชปลูกแซมการปลูกยาง (Intercropping With Cassava Under Rubber Tree Plantations) เป็น Free Living Bacteria ละลายฟอสเฟตในรูป $AlPO_4$ ได้ 230.02 มิลลิกรัมฟอสเฟตต่อลิตร ไม่ผลิต Indole Acetic Acid (IAA) (Sungthongwises, 2016)

ไอโซเลท CShang3(10) CSban3(13) และ CSban22(19) จำแนกสายพันธุ์ด้วยเทคนิค 16S rDNA พบว่า มีความใกล้เคียงกับลำดับนิวคลิโอไทด์ของ *Bacillus aryabhattai* คัดแยกได้ครั้งแรกจากหลอดพลาสติกทนความเย็นสูง (Cryotube) ที่ใช้สำหรับเก็บอากาศในบรรยากาศชั้นบนความสูง 27 และ 41 กิโลเมตร เป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปท่อน เคลื่อนที่ได้ (Motile) เจริญที่ pH 6.0 – 10.0 (Shivaji et. al., 2009) ต่อมาคัดแยกได้จากน้ำทะเลลึกในทะเลจีนใต้ (The Deep-Sea of The South China Sea) ย่อยสลายชานอ้อยได้น้ำตาลกลูโคส และฟรุคโตส (Wen et. al., 2015) และคัดแยกจากหลอดบรรจุเซลล์ทนเย็นที่ปนเปื้อน (The Storage Contaminated Cryovials) โดย *B. aryabhattai* เจริญได้ดีที่ neutral and basic pH value 7.0 - 10.0 (Paz et. al. 2016) แต่จากผลการทดลอง *B. aryabhattai* เจริญ และผลิตแอมโมเนียได้ที่ pH 4.0 – 7.0 และผลิตแอมโมเนียได้สูงสุดที่ pH 7.0

ส่วนที่คัดแยกได้จากดิน ได้แก่ ที่ความสูง 4,123 เมตร ใน Shigatse, Tibetan Plateau หรือที่เรียกว่า หลังคาของโลก (Yan et. al., 2016) คัดแยกจากดินในสิ่งแวดล้อม ได้แก่ นาข้าว ป่าไม้ เส้นทางที่น้ำไหลผ่านระบบบำบัดน้ำเสียในท้องถิ่นและปากน้ำ Kerala ประเทศอินเดีย (Pillai et. al., 2017) คัดแยกจากดินในบริเวณ Kurukshetra รัฐหรยาณา (Haryana) ในประเทศอินเดีย (Sharma, Kumar & Gupta, 2014)

ส่วนที่คัดแยกได้จากราก (Rhizosphere) ได้แก่ รากของ *Cereus jamacaru* ในบริเวณกึ่งแห้งแล้ง Brazilian Caatinga Biome ทางตอนเหนือของประเทศบราซิล (Kavamura et. al., 2017) และคัดแยกจากบริเวณราก *Lemna* sp. ในพื้นที่ชุ่มน้ำกัลกาตาทางตะวันออก (The East Kolkata Wetlands) ประเทศอินเดีย (Ray et. al., 2012)

B. aryabhattai คัดแยกจากบริเวณรากต้นถั่วเหลืองในฟาร์มทดลอง เมือง Indore ของประเทศอินเดีย และใช้เป็น Inoculation สำหรับเปลี่ยนรูปสังกะสีในดินจากรูป unavailable forms of soil zinc เช่น ZnO, $ZnCO_3$ และ $Zn(PO_4)_2$ ให้เป็น plant available zinc เพื่อให้พืชนำไปใช้ในการเจริญเติบโต (Ramesha et. al., 2014)

โลหะที่ส่งเสริมการเจริญเติบโตของ *B. aryabhattai* ได้แก่ Ca^{2+}, Mg^{2+} และ Mn^{2+} ส่วนโลหะที่ยับยั้งการเจริญเติบโต ได้แก่ Na^{+}, K^{+}, Cu^{2+}, Fe^{2+}และ Zn^{2+}ที่ความเข้มข้น 5 mM (Sharma, Kumar & Gupta, 2014) และทนต่อ Cu^{2+}และCd^{2+} ที่ความเข้มข้น 0.019–40.0 mM (Tendulkar, Wei & Murali, 2016) แต่ในการทดลอง Zn^{2+} Cd^{2+} และ Cu^{2+} มีความเข้มข้น 0.035 - 0.4281, 0.0002 – 0.0071 และ 0.0118 - 0.1889 mM ตามลำดับ ซึ่งมีความเข้มข้นต่ำจึงไม่กระทบต่อเจริญเติบโตของ *B. aryabhattai* นอกจากนี้ *B. aryabhattai* ที่คัดแยกจากบริเวณราก *Lemna* sp. ในพื้นที่ชุ่มน้ำกัลกาตาทางตะวันออก (The East Kolkata Wetlands) ซึ่งเป็นแหล่งรองรับน้ำเสียจากโรงงานฟอกหนังโดยรอบบริเวณ น้ำปนเปื้อนโลหะหนักหลายชนิด ได้แก่ Cr^{3+}, Cd^{2+}, Ni^{2+}, Ti^{3+} เป็นต้น สามารถ Uptake Hexavalent Chromium ที่ความเข้มข้นต่ำ 0.44 mg/L (0.0085 mM) และเจริญได้ในที่ปนเปื้อน Cr^{3+} ได้ (Ray et. al., 2012) ซึ่งสอดคล้องกับผลที่ *B. aryabhattai* เจริญได้ที่ Cr^{6+}ความเข้มข้น 0.5 mg/L (0.0096mM) ในการคัดแยก *Paeni- bacillus barcinonensis* และ *Bacillus megaterium* ซึ่งเป็นแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนคัดแยกจากดินที่ปนเปื้อนโครเมี่ยมที่ความลึก 40 เซนติเมตร มีค่า Minimum Inhibitory Concentration (MIC) ต่อโลหะโครเมี่ยมที่ 0.7 – 1.65 ตะกั่ว 0.85 – 1.05 และคอปเปอร์ 0.7 – 0.85 มิลลิกรัมต่อลิตร (Aslam et. al., 2014)

ไอโซเลท Bsin1 (1) จำแนกสายพันธุ์ด้วยเทคนิค 16S rDNA พบว่ามีความใกล้เคียงกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *Bordetella petrii* แบคทีเรียนี้พบได้ทั่วไปในดิน น้ำ ตะกอนดิน และในพืช (Soumana, Linz & Harvill, 2017) เป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปท่อนสั้นถึงกลม (Short or Coccoid Rods) กว้าง 0.6 ไมโครเมตร ยาว 1.5 ไมโครเมตร บางครั้งต่อเป็นสาย (Chain) ไม่เคลื่อนที่ เจริญภายใต้สภาวะมีออกซิเจน (Aerobic Condition) หรือมีออกซิเจนเล็กน้อย (Microaerophilic condition) และไม่มีออกซิเจน (Anaerobic condition) *B. petrii* คัดแยกได้ครั้งแรกจากถังปฏิกรณ์ลดปริมาณคลอรีน แบบไร้ออกซิเจน (Anaerobic, Dechlorinating bioreactor) หัวเชื้อในถังปฏิกรณ์มาจากตะกอนแม่น้ำ Saale ใกล้เมือง Jena ประเทศเยอรมัน *B. petrii* ลด Selenate ให้เป็นธาตุซิเลเนียม (Wintzingerode et. al,. 2001) ต่อมาคัดแยกได้จากดินที่ปนเปื้อนคลอริเนตเบนซิน (chlorinated benzenes) นานกว่า 25 ปี สามารถย่อยสลาย 1, 2, 4-trichlorobenzene (1,2,4-TCB) ได้อย่างสมบูรณ์ ในสภาวะที่มีออกซิเจน (Wang et. al., 2007)

ไอโซเลท CSku28(9) จำแนกสายพันธุ์ด้วยเทคนิค 16S rDNA พบว่า มีลำดับนิวคลีโอไทด์ใกล้เคียง *Ensifer mexicanus* เดิมเป็นแบคทีเรียสกุล *Sinorhizobium* ได้มีการจำแนกใหม่เป็นแบคทีเรียสกุล *Ensifer* เป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปท่อน เคลื่อนที่ได้ ไม่สร้างสปอร์ ต้องการออกซิเจนในการเจริญเติบโต (Gehlot et. al., 2016) การศึกษาที่ผ่านมา *Ensifer mexicanus* sp. nov. คัดแยกได้จากปมรากถั่ว *Acacia angustissima* ในป่าไม้เขตร้อน Chiapas and Morelos ประเทศเม็กซิโก (Lloreta et. al., 2007) *Ensifer* คัดแยกจากปมรากของ Woody Legumes ทางตอนใต้ของประเทศเอธิโอเปีย ซึ่งพบร่วมกับกลุ่ม *Rhizobium*, *Mesorhizobium* และ *Bradyrhizobium*

(Degefu, Wolde-meskel & Frostegard, 2012) *Ensifer terangae*, *Ensifer garamanticus* และ *Ensifer adhaerens* คัดแยกได้จากปมรากพืชตระกูลถั่วพื้นเมืองในมณฑลยูนนาน ประเทศจีน (Wang et. al., 2013) *Ensifer* sp. PC2 คัดแยกจากปมรากของ *Prosopis cineraria* (L.) Druce (Khejri) เป็นพืชที่เจริญในแห้งแล้ง และกึ่งแห้งแล้งในเขต Indian Thar Desert อยู่ทางตะวันตกของรัฐราชสถาน ประเทศอินเดีย เจริญได้ที่ pH 5.0-9.5 pH ที่เหมาะสมอยู่ที่ 6.5–8.0 (Gehlot et. al., 2016) ในการศึกษาครั้งนี้คัดแยกจากรากข้าว เป็น Free living ที่เจริญได้ที่ pH 4.0 – 7.0 เจริญและผลิตแอมโมเนียได้ดีที่ pH 7.0

ไอโซเลท CSku24 (6) จำแนกสายพันธุ์ด้วยเทคนิค 16S rDNA พบว่ามีความใกล้เคียงกับลำดับนิวคลิโอไทด์ของ *Streptomyces cellulosae* การศึกษาที่ผ่านมาคัดแยกได้จากดินปนเปื้อนน้ำมันในเมือง Basra ประเทศอิรัก (Burghal, Mahdi & Al-Mudaffar, 2015) ดินรอบรากของต้น *Argania spinosa* L. (Bouizgarne, Hadrami & Ouhdouch, 2006) ดินจากป่าชายเลน เมือง Guntur ประเทศอินเดีย ซึ่ง *S. cellulosae* สามารถเจริญได้ที่ pH 5.0 – 10.0 เจริญได้สูงสุดที่ pH 7.0 (Indupalli, Muvva & Munaganti, 2015) และการคัดแยกได้จากดินหุบเขาเมือง Sana ซึ่ง *S. cellulosae* เจริญบนอาหาร starch and casein ที่ pH3.0,5.0,9.0และ11.0 (Abdullah et. al., 2016) แต่ผลการทดลองพบว่า *S. cellulosae* สามารถเจริญ และผลิตแอมโมเนียได้ที่ pH 4.5 – 7.0 เนื่องมาจากอาหารที่ใช้เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อปราศจากไนโตรเจนซึ่งมีสารอาหารน้อยกว่า starch and casein (Kontro, et. al., 2005) และผลการทดลองนี้สอดคล้องกับ pH ที่มีต่อการเจริญ และการสร้างสปอร์ของ 10 *Streptomyces* spp. ที่ว่า *Streptomyces* spp. เจริญได้ดีที่ pH กลาง และด่าง (Neutrophile and Alkalophile) (Kontro, et. al., 2005) เพราะสามารถเจริญ และผลิตแอมโมเนียที่ pH 7.0 ได้เท่ากับ 3.671 ±0.145 มิลลิกรัมต่อลิตร สูงกว่าที่ pH 6.5, 6.0, 5.5, 5.0, 4.5 และ 4.0 ที่ได้เท่ากับ 3.564 ±0.328, 3.189 ±0.183, 2.541 ±0.267, 1.872 ±0.064, 1.483 ±0.06 และ 0.645 ±0.125 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ

ไอโซเลท CSku26 (8) จำแนกสายพันธุ์ด้วยเทคนิค 16S rRNA พบว่ามีความใกล้เคียงกับลำดับนิวคลิโอไทด์ของ *Streptomyces werraensis* เป็นแอคติโนมัยซีท แบคทีเรียแกรมบวก จากการทดลองพบว่าสามารถผลิตแอมโมเนียได้ที่ pH 4.5 – 7.0 ในการคัดแยก *S. Werraensis* จากดินในมหาวิทยาลัย Saurashtra เมือง Gujirat ประเทศอินเดีย พบว่าสามารถผลิตแอมโมเนียได้เช่นเดียวกัน เจริญได้ที่ pH 6.0 – 9.0 เจริญได้น้อยที่ pH ต่ำกว่า 6.0 เจริญสูงสุดที่ pH 9.0 และไม่เจริญที่ pH10.0 จัดเป็นพวกเจริญได้ดีที่ pHเป็นด่าง (Alkaline Environment) (Sanghvi, et. al., 2014) ส่วน *S. werraensis* ที่คัดแยกได้จากดินที่ท่าเรือมุมไบประเทศอินเดีย เจริญที่ pH 5.0 – 10.0 ไม่เจริญที่ pH 4.0 และสร้างสาร antibiotic ได้สูงสุดที่ pH 8.0 และในเจริญในที่มีโลหะ $ZnSO_4$ 25 mM (Bhosale, et. al., 2015) ตามผลการทดลอง *S. Werraensis* จึงเจริญได้ในที่มี Zn ความเข้มข้น 0.0535 – 0.4281 mM ในการศึกษา *S. werraensis* LD22 ที่คัดแยกจากมูลไก่ และมูลแพะ มีค่า Maximum Tolerance Concentration ของโครเมี่ยม ($K_2Cr_2O_7$) 200–250 มิลลิกรัมต่อลิตร ตะกั่ว ($PbNO_3$) 100–250 มิลลิกรัมต่อลิตร นิกเกิล ($NiCl_2$) สังกะสี ($ZnCl_2$) และคอปเปอร์ ($CuSO_4$) 50–250 มิลลิกรัมต่อลิตร (Latha, Vinothini & Dhanasekaran, 2015) สอดคล้องกับผลการทดลองที่ *S. werraensis* เจริญได้ดีในที่มีโลหะโครเมี่ยม 0.5–4.0 ตะกั่ว 0.35–2.8 นิกเกิล 0.65–10.4

สังกะสี 3.5 – 28.0 และคอปเปอร์ 0.75-12.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้ปริมาณแอมโมเนียที่ 3.364-2.567, 3.288-2.586, 3.375-2.775, 3.411-2.838 และ 3.418-2.712 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ

ไอโซเลท ShuaS3 (25) จำแนกสายพันธุ์ด้วยเทคนิค 16S rDNA พบว่ามีความใกล้เคียงกับลำดับนิวคลิโอไทด์ของ *Streptomyces gancidicus* เป็นแอคติโนมัยซีท แบคทีเรียแกรมบวก การศึกษาที่ผ่านมาพบว่าสามารถคัดแยกได้ตั้งแต่ปี ค.ศ. 1957จากดิน Bhitar Kanika เมือง Odissha ประเทศอินเดีย(Kumar, et. al., 2013) คัดแยกได้จากดินสวนมะพร้าวใน Andhra Pradesh ประเทศอินเดีย (Ellaiah & Rao, 2014) คัดแยกได้จากตะกอนสมุทร (Marine Sediment) เกาะอันดามันและนิโคบา ซึ่งสามารถเจริญได้ที่ pH 5.5 – 9.0 เจริญได้ดีที่สุดที่ pH 7.0 (Krishnan & Kumar, 2015) และสามารถผลิตเอนไซม์อะไมเลสได้ดีที่ pH 7.1 (Ashwini, 2016) จากการทดลองพบว่า *S.gancidicus* สามารถเจริญและผลิตแอมโมเนียได้ดีที่ pH 7.0 รองลงมาเป็น 6.5, 6.0 และ 5.5 ซึ่งมีค่าเท่ากับ 3.494 ±0.155, 3.326 ±0.243, 2.885 ±0.442 และ 2.334 ±0.126 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ

การศึกษาภาวะทนโลหะหนักของ *Streptomyces* strains พบว่า *Streptomyces* 8 strains ที่คัดแยกได้จากดินปนเปื้อนน้ำมันดีเซล เบนซิน และน้ำมันก๊าด ในอำเภอ Vellore จังหวัด Tamilnadu ประเทศอินเดีย สามารถทนต่อคอปเปอร์ ($CuSO_4$) ความเข้มข้น 10mM, 50mM, 100mM, 500mM, 1,000mM, 5M และ 10M ได้ดี (Deepa, Vidhya & Arunadevi, 2015) *Streptomyces* คัดแยกได้จากตะกอนสมุทรทะเล Caspian 41 ไอโซเลท มี 7 strains ทนต่อคอปเปอร์ 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร (Koushalshahi et. al., 2012)

Streptomyces mirabilis คัดแยกได้จากเหมืองยูเรเนียม ประเทศเยอรมันสามารถเจริญในที่นิกเกิลสูงกว่า 100 mmol/l และสังกะสีที่ความเข้มข้น 100 mmol/l (Schmidt et. al., 2009)

Streptomyces spp. VITSVK5 เป็น Marine actinomycetes คัดแยกตะกอนสมุทรเขตMarakkanam ชายฝั่งอ่าวเบงกอล ประเทศอินเดีย ทนต่อ Cr^{6+} และCr^{3+} 100 – 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร ทนต่อตะกั่วที่ความเข้มข้นต่ำกว่า 100 มิลลิกรัมต่อลิตร (Saurav & Kannabiran, 2009)

Streptomyces orientalis และ *Streptomyces aureomonopodiales* คัดแยกจากดินสมุทรที่ Ennore saltpan ประเทศอินเดีย ทนต่อโลหะหนักแคดเมี่ยม สังกะสี และตะกั่วที่ความเข้มข้น 10, 50, 100, 500, 1,000 mM 5 and 10 M (Deepika & Kannabiran, 2010)

จากการทดลอง *Streptomyces* 3strains ที่คัดแยกได้สามารถเจริญ และผลิตแอมโมเนียได้สูงใน Nitrogen Free Medium ที่มีโลหะคอปเปอร์ ความเข้มข้น 12.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ตะกั่วความเข้มข้น 2.8 มิลลิกรัมต่อลิตร และโครเมี่ยม ความเข้มข้น 4.0 มิลลิกรัมต่อลิตรละลายอยู่ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05 เมื่อวิเคราะห์ความแตกต่างของปริมาณแอมโมเนีย ด้วย One Way ANOVA

ความหลากหลายของแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนบริเวณรอบรากข้าว (Rhizosphere) และในดินนาข้าว (Bulk) ที่คัดแยกได้นี้พบว่า *Nguyenibacter vanlangensis* และ *Ensifer mexicanus* อยู่ใน Phylum *Proteobacteria* Class *Alphaproteobacteria* เช่นเดียวกัน *Bordetella hinzii* ที่อยู่ใน Phylum *Proteobacteria* แต่อยู่ใน Class *Betaproteobacteria* สอดคล้องกับผลการศึกษาความหลากหลายของแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนในนาแบบเกษตรอินทรีย์ ที่ระยะเวลา 5 ปี ที่

ได้แยก Phylogenetic Distribution แล้วพบว่า Taxonomic Group ประกอบด้วย *Alphaproteo bacteria* (27.6%) และ*Betaproteobacteria* (24.1%) (Shu et. al., 2012) ส่วน *Bacillus aryabhattai* อยู่ใน Phylum *Firmicutes*และ *Streptomyces* bacteria อยู่ใน Phylum *Actino-bacteria* Class *Actinobacteria*

ข้อเสนอแนะในการนำผลการวิจัยไปใช้

Nguyenibacter vanlangensis และ *Bacillus aryabhattai* มีศักยภาพสูงในการตรึงไนโตรเจน ให้ปริมาณแอมโมเนียได้มากถึง 8.237 ±0.295 และ5.254 ±0.153 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ สามารถนำไปใช้ร่วมกับปุ๋ยชีวภาพ เพื่อเพิ่มผลผลิตข้าว

ข้อเสนอแนะในการทำวิจัยครั้งต่อไป

ควรศึกษาสภาวะการเจริญเติบโตของแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนที่ดำรงชีพแบบอิสระ ในดินเปรี้ยว ดินทราย และดินเค็ม เป็นต้น เพื่อนำไปสู่การประยุกต์ใช้กับสภาพดินนาในภาคต่างๆ ของประเทศไทย