บทที่ 2
ทบทวนเอกสาร

อ้อยเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญในอุตสาหกรรมการผลิตน้ำตาล สามารถแปรรูปเป็นแอลกอฮอล์ นอกจากนี้ยังใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตสารเคมีหลายชนิด เช่น ผงซักฟอก สารเคลือบผิว และสารประกอบทางเคมี รวมทั้งชานอ้อย (bagasse) สามารถใช้เป็นเชื้อเพลิงในการผลิตพลังงาน ผลิตเยื่อกระดาษ พลาสติก วัสดุก่อสร้าง หมึกพิมพ์ และปุ๋ยกากน้ำตาล (molasses) ซึ่งนำมาใช้ประโยชน์ได้อย่างกว้างขวาง สามารถใช้เป็นอาหารสัตว์และวัตถุดิบในกระบวนการหมักของยีสต์ กากตะกอน (filter mud หรือ filter cake) สามารถทำปุ๋ยได้ การบริโภคน้ำตาลภายในประเทศไทยประมาณ 1.6-1.7 ล้านตันต่อปี มูลค่า 17,000-19,000 ล้านบาท และส่งออกน้ำตาลมากเป็นอันดับ 3 ของโลก ประมาณ 3 ล้านตันต่อปี มูลค่า 20,000-30,000 ล้านบาท รองจากประเทศบราซิล และสหภาพยุโรป แต่บางปีอาจเป็นอันดับ 4 รองจากประเทศออสเตรเลีย โดยมีสัดส่วนตลาดร้อยละ 9.5 ของโลก ประเทศผู้นำเข้าน้ำตาลที่สำคัญของประเทศไทย ได้แก่ อินโดนีเซีย ญี่ปุ่น และเกาหลีใต้ ซึ่งสร้างรายได้แก่เกษตรกรผู้ปลูกอ้อยจากการจำหน่ายอ้อยทั้งหมดประมาณ 30,000 ล้านบาท คิดเป็นร้อยละ 4 ของรายได้ภาคการเกษตรทั้งหมด (กรมวิชาการเกษตร, 2551)

อ้อยเป็นพืชในวงศ์ Poaceae สกุล *Saccharum* สามารถจำแนกได้หลายชนิด โดยแต่ละชนิดมีถิ่นกำเนิดและลักษณะทั่วไป ดังนี้ (คณาจารย์ภาควิชาพืชไร่นา, 2542)

1. อ้อยปลูกดั้งเดิม (*Saccharum officinarum* L.) มีถิ่นกำเนิดในแถบเกาะนิวกินี ลักษณะสำคัญ คือ ลำใหญ่ ใบยาวและกว้าง มีน้ำตาลมาก เปลือกและเนื้อนิ่ม โดยทั่วไปมักเรียกว่า อ้อยเคี้ยว ที่เพาะปลูกในประเทศไทย ได้แก่ อ้อยมอริเชียส (Mauritius) และอ้อยบาดิลา (Badila) สมัยแรกอ้อยชนิดนี้มีบทบาทสำคัญต่ออุตสาหกรรมน้ำตาลทรายของโลกเป็นอย่างมาก ซึ่งอ้อยที่ปลูกเป็นการค้าในปัจจุบันมักมีพันธุกรรมมาจากอ้อยชนิดนี้

2. อ้อยป่าแถบร้อน (*Saccharum spontaneum* L.) พบทั่วไปในแถบร้อนและชุ่มชื้น มีอยู่หลายร้อยชนิดแตกต่างกันตามแหล่งกำเนิด แต่มีลักษณะที่สำคัญคล้ายคลึงกัน คือ มีอายุหลายปี เจริญอยู่เป็นกอ มีลำต้นใต้ดิน ลำต้นเหนือดินผอมและแข็ง ไส้กลวง มีความหวานน้อย ในประเทศไทยเรียกว่า แขมพงหรืออ้อยป่า (Wild cane)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3. อ้อยอินเดีย (*Saccharum barberi* Jeswiet) มีถิ่นกำเนิดในอินเดียตอนเหนือ นักวิชาการเชื่อว่าเป็นสายพันธุ์ที่เกิดจากการผสมตามธรรมชาติระหว่างอ้อยปลูกและอ้อยป่าแถบร้อน มีลำต้นเล็ก ใบเล็ก ข้อโป่ง มีความหวานสูง เปลือกและเนื้อนิ่ม ที่เพาะปลูกในประเทศไทย ได้แก่ อ้อยขาไก่

4. อ้อยป่านิวกินี (*Saccharum robustum* Brandes et Jeswiet Ex Grassl) เป็นอ้อยป่าที่เพาะปลูกบนเกาะนิวกินี ลักษณะสำคัญ คือ เปลือกแข็ง ไส้ฟ่าม มีลำต้นใหญ่ แข็งแรง อาจสูงถึง 10 เมตร มีความหวานต่ำ อ้อยชนิดนี้ไม่พบในประเทศไทย นักวิชาการเชื่อว่าเป็นต้นตระกูลของอ้อยปลูกดั้งเดิม

5. อ้อยจีน (*S. sinense* Roxb. Amend, Jeswist) ลักษณะสำคัญ คือ มีลำต้นแข็งแรง ทนทานต่อสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม มีปริมาณน้ำตาลซูโครสค่อนข้างสูง และต้านทานต่อโรคบางชนิด แต่ผลผลิตมักต่ำมาก อ้อยจีนเป็นอ้อยที่ออกดอกน้อยและมักเป็นหมัน

นอกจากนี้พันธุ์อ้อยที่ปลูกเป็นการค้าเพื่ออุตสาหกรรมน้ำตาลส่วนใหญ่ปัจจุบันเป็นลูกผสมที่เกิดจากการผสมระหว่าง *S. spontaneum* กับอ้อยชนิดอื่นๆ ในสกุล *Saccharum* ที่เป็นอ้อยป่า เช่น *S. spontaneum* และ *S. robustum* รวมทั้งในสกุลใกล้เคียง

บทบาทของธาตุไนโตรเจนในพืช

อินทรียสารที่มีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบ ได้แก่

1. โปรตีนประกอบด้วยกรดอะมิโน (amino acid) ชนิดต่างๆ เรียงต่อกันอย่างมีแบบแผน ตั้งแต่ 50 – 100 หน่วย โดยกรดอะมิโนเชื่อมต่อกันด้วยพันธะเปบไทด์ (peptide bond) โดยโปรตีนมีหน้าที่สำคัญในเซลล์ ซึ่งเป็นองค์ประกอบในโครงสร้างของไซโตพลาซึม (cytoplasm) เยื่อต่างๆ (membranes) โดยเป็นทั้งโครงสร้างและพาหะในการเคลื่อนย้ายสารผ่านเยื่อ รวมทั้งเอนไซม์ ซึ่งทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาชีวเคมีจึงมีบทบาทเกี่ยวข้องกับกระบวนการเมตาบอลิซึม (metabolism)

2. คลอโรฟิลล์ (chlorophyll) เป็นสารประกอบที่มีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบในโครงสร้าง พบได้ในส่วนที่มีสีเขียวของพืชโดยพบมากที่ใบ คลอโรฟิลล์ทำหน้าที่เป็นโมเลกุลรับพลังงานจากแสง และนำไปใช้สร้างพลังงานเคมีโดยกระบวนการสังเคราะห์แสง ในธรรมชาติมีคลอโรฟิลล์อยู่หลายชนิด เช่น คลอโรฟิลล์ เอ (สูตรโมเลกุล $C_{55}H_{72}O_5N_4Mg$) และคลอโรฟิลล์ บี (สูตรโมเลกุล $C_{55}H_{70}O_6N_4Mg$) (Wikipedia, 2011)

3. ฮอร์โมนพืช (phytohormone) เป็นสารที่เกิดจากพืชสังเคราะห์ขึ้นและมีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบ ได้แก่ ออกซิน (auxins) และไซโตไคนิน (cytokinins) โดยที่ indole-3-acetic acid (IAA) เป็นออกซินที่พืชสังเคราะห์ได้จากกรดอะมิโนทริพโทเฟน (typtophane) ซึ่ง IAA มีบทบาทสำคัญต่อการเจริญเติบโตของพืช ได้แก่ กระตุ้นการแบ่งเซลล์ เร่งการขยายขนาดของเซลล์ ควบคุม

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การแตกราก ยับยั้งการเจริญของตาข้าง ป้องกันการร่วงของใบ กิ่งและผล ส่วนโซโตไคนินเป็นฮอร์โมนพืชที่ส่งเสริมการแบ่งเซลล์ การขยายขนาดเซลล์ ส่งเสริมการสร้างและการเจริญของตา ช่วยในการงอกของเมล็ด ส่งเสริมการสร้างโปรตีน ชะลอความเสื่อมอายุของใบ (senescence) และช่วยในการเคลื่อนย้ายธาตุอาหาร

4. กรดนิวคลีอิค (ucleic acids) มี 2 ชนิด คือ ribonucleic acid (RNA) ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์โปรตีน และ deoxyribo nucleic acid (DNA) ทำหน้าที่เป็นศูนย์ข้อมูลทางพันธุกรรม

5. สารประกอบไนโตรเจนอื่นๆ ได้แก่ adenosine triphosphate (ATP) co-enzymes เช่น NAD (nicotinamide adenine dinucleotide) และ NADP (nicotinamide adenine dinucleotide phosphate)

6. สารประกอบไนโตรเจนที่พืชสะสมไว้หรือทำหน้าที่ป้องกัน เช่น แอลคาลอยด์ (alkaloids) ได้แก่ นิโคติน (nicotine) จากใบยาสูบ และมอร์ฟีน (morphine) จากฝิ่น เป็นต้น (Hewitt, 1984)

บทบาทของธาตุไนโตรเจนต่อการเจริญของอ้อย

อ้อยเป็นพืชที่ใช้ธาตุอาหารจากดินในปริมาณค่อนข้างสูง อ้อยแต่ละพันธุ์จะใช้ธาตุอาหารในปริมาณที่แตกต่างกัน ธาตุไนโตรเจนมีความสำคัญอย่างมากต่อการเพาะปลูกอ้อยเนื่องจากเป็นธาตุอาหารที่ช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตในส่วนลำต้นและใบ ส่งผลให้อ้อยแตกกอและมีจำนวนลำมาก ส่งผลให้มีปริมาณน้ำหนักอ้อยมากขึ้นด้วย ถ้าอ้อยขาดธาตุไนโตรเจนจะแสดงอาการที่ใบ เนื่องจากปริมาณคลอโรฟิลล์ในใบลดลง ส่งผลให้เกิดอาการใบเหลืองหรือเกิดภาวะพร่องของคลอโรฟิลล์ในใบพืช (chlorosis) รวมทั้งส่งผลให้ลำต้นแคระแกร็น การแตกกอน้อยลง อัตราส่วนระหว่างซูโครสและน้ำตาลรีดิวซ์สูง (reducing sugar) เนื่องจากเมื่ออ้อยขาดธาตุไนโตรเจนจะสร้างน้ำตาลซูโครสมากแต่การสร้างเนื้อเยื่อเพื่อการเจริญเติบโตลดลง (ปรีชาและคณะ, 2543)

การตรึงไนโตรเจน

ก๊าซไนโตรเจนในบรรยากาศมีปริมาณมากถึง 78% แต่พืชไม่สามารถนำมาใช้ประโยชน์ได้ ไนโตรเจนอาจเปลี่ยนแปลงทางเคมีโดยกระบวนการทางธรรมชาติเป็นแอมโมเนีย (NH_3) หรือไนเตรท (NO_3^-) โดยกระบวนการตรึงไนโตรเจน (nitrogen fixation) (ยงยุทธ, 2543) ได้แก่

1. ออกซิเดชันของก๊าซไนโตรเจนในอากาศ เมื่อฟ้าแลบก๊าซไนโตรเจน ออกซิเจน และไอน้ำจะทำปฏิกิริยากันได้กรดไนตริก (HNO_3) ซึ่งละลายในน้ำฝนตกสู่พื้นดิน โดยเป็น 10% ของการตรึงไนโตรเจนทั้งหมด

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2. การตรึงไนโตรเจนโดยชีววิธี (Biological nitrogen fixation) ซึ่งเป็น 90% ของการตรึงไนโตรเจนทั้งหมด เกิดจากกิจกรรมการตรึงไนโตรเจนของจุลินทรีย์ โดยอาศัยบทบาทของเอนไซม์ไนโตรจีเนส (nitrogenase) ซึ่งกิจกรรมของเอนไซม์จะถูกยับยั้งได้โดยออกซิเจน ดังนั้นการตรึงไนโตรเจนจึงเกิดภายในเซลล์ภายใต้สภาวะที่ไม่มีออกซิเจน จุลินทรีย์ตรึงไนโตรเจนสามารถทำให้เกิดสภาวะดังกล่าวได้โดย

(1) จุลินทรีย์กลุ่มไซยาโนแบคทีเรียมีเซลล์เฉพาะ คือ heterocyst ซึ่งมีผนังเซลล์หนา รวมทั้งไม่มีระบบแสง II (Photosystem II) ซึ่งจะปลดปล่อยออกซิเจน

(2) จุลินทรีย์กลุ่มไซยาโนแบคทีเรียที่ไม่มี heterocyst สามารถตรึงไนโตรเจนได้ในสภาวะแวดล้อมที่ไม่มีออกซิเจน เช่น ในน้ำ รวมทั้งจุลินทรีย์บางกลุ่มอยู่ในดินที่ไม่มีออกซิเจน เช่น *Clostridium*

(3) Leghemoglobin ในปมรากพืชตระกูลถั่ว ทำหน้าที่จับออกซิเจนได้

(4) การใช้เอนไซม์เพื่อกำจัด superoxide ($O.^-_2$) และ hydrogen peroxide (H_2O_2) ไม่ให้เป็นพิษแก่เซลล์ เช่น ascorbate และ peroxidase ในปมรากถั่ว

(5) แบคทีเรียที่ดำรงชีวิตในสภาวะที่มีออกซิเจนแต่สามารถทำให้สภาพภายในเซลล์ส่วนที่มีเอนไซม์ไนโตรนีเนสมีปริมาณออกซิเจนต่ำ เช่น *Azotobacter* จะมีอัตราการหายใจสูงเพื่อเร่งให้เกิดการใช้ออกซิเจนอย่างรวดเร็ว *Gloeotrichia* สังเคราะห์แสงและปลดปล่อยออกซิเจนในเวลากลางวันจึงตรึงไนโตรเจนเฉพาะเวลากลางคืน

(6) โคโลนีของแบคทีเรียที่เจริญบนอาหาร nitrogen free agar ในภาวะที่มีออกซิเจนมักมีขนาดใหญ่และสร้างสารเมือกหุ้มป้องกันการแพร่ของออกซิเจน

เอนไซม์ไนโตรจีเนสประกอบด้วยโปรตีนสองส่วน ซึ่งรวมเรียกว่า nitrogenase enzyme complex โดย molybdenum – iron (MoFe) protein ทำหน้าที่เป็นเอนไซม์ dinitrogenase และ iron (Fe) protein ทำหน้าที่เป็นเอนไซม์ dinitrogenase reductase รวมทั้งจำเป็นต้องใช้ adenosine triphosphate (ATP) เป็นแหล่งพลังงาน และ Mg^{2+} เพื่อกระตุ้นการทำงาน ซึ่งเอนไซม์สามารถรีดิวซ์ได้ทั้ง dinitrogen ($N \equiv N$) ได้เป็น NH_3 และ H_2 และโมเลกุลพันธะสามขนาดเล็กอื่นๆ เช่น nitrous oxide ($N \equiv N^+ - O^-$) ได้เป็น N_2 และ H_2O, acetylene ($HC \equiv CH$) ได้เป็น ethylene ($H_2C = CH_2$) รวมทั้ง proton (H^+) ได้เป็น H_2 ในกรณีที่มี dinitrogen (Stewart, 1975) สมการสรุปการตรึงไนโตรเจน คือ

$$N_2 + 8H^+ + 8e^- + 16MgATP \longrightarrow 2NH_3 + H_2 + 16MgADP + 16Pi$$

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ความสัมพันธ์ระหว่างจุลินทรีย์ตรึงไนโตรเจนกับพืชอาจแบ่งจุลินทรีย์ได้ 3 กลุ่ม (ยงยุทธ, 2543) คือ

1. จุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่ร่วมกับพืช โดยจะใช้น้ำตาลซูโครสและสารเมตาโบไลท์ที่ได้รับจากพืชอาศัย (host) เป็นแหล่งพลังงาน เช่น ไรโซเบียมที่อยู่ร่วมกับรากพืชตระกูลถั่ว ซึ่งจะใช้พลังงานจากคาร์โบไฮเดรทของพืชเจ้าบ้าน รวมทั้งอยู่ในสภาวะที่เหมาะสมสำหรับกิจกรรมการตรึงไนโตรเจน เมื่อตรึงไนโตรเจนแล้วจึงเคลื่อนย้ายสารผลิตภัณฑ์ออกสู่เซลล์รากพืชได้อย่างรวดเร็ว โดยพืชสามารถนำไนโตรเจนที่จากกระบวนการตรึงของจุลินทรีย์มาใช้ประมาณ 90% จุลินทรีย์ที่อยู่ร่วมกับพืชและสามารถตรึงไนโตรเจน ได้แก่ *Rhizobium* และ *Bradyrhizobium* อยู่ร่วมกับพืชตระกูลถั่ว *Parasponia* และ *Frankia* อยู่ร่วมกับไม้ยืนต้น (Alder) และไม้พุ่ม (*Ceonothus*) *Azospirillum* อยู่ร่วมกับหญ้าในแถบร้อนชื้น *Anabaena* อยู่ร่วมกับแหนแดง (*Azolla*) เป็นต้น

2. จุลินทรีย์ที่อยู่ใกล้ชิดกับรากพืชจะใช้สารที่หลั่งออกมาจากรากพืช (root exudate) เป็นแหล่งพลังงาน เช่น *Azospirillum* และ *Azotobacter* ซึ่งจุลินทรีย์กลุ่มนี้ไม่สามารถสร้างปมราก ดังนั้นจึงอาศัยอยู่บริเวณผิวรากหรือช่องว่างระหว่างเซลล์ในชั้นคอร์เทกซ์ (cortex) โดยพืชจะได้รับประโยชน์จากไนโตรเจนที่จุลินทรีย์ตรึงประมาณ 90% เมื่อจุลินทรีย์เหล่านั้นตาย

3. จุลินทรีย์ที่ดำรงชีวิตอย่างอิสระในดินหรือในน้ำ ซึ่งต้องการสารประกอบไนโตรเจน สารอนินทรีย์ ได้แก่ แคลเซียม แมกนีเซียม และโมลิบดีนัม เป็นต้น รวมทั้ง pH ที่เหมาะสมต่อการเจริญ ซึ่งจุลินทรีย์ดังกล่าวสามารถดำรงชีวิตและดำเนินกิจกรรมได้โดยไม่ต้องอาศัยสิ่งมีชีวิตอื่นๆ ได้แก่

3.1 จุลินทรีย์ที่ใช้อินทรียวัตถุในดินเป็นแหล่งพลังงาน (heterotroph) ซึ่งอยู่ในธรรมชาติจะได้รับอินทรียสารที่ใช้เป็นแหล่งพลังงานน้อยจึงตรึงไนโตรเจนได้ค่อนข้างต่ำ แบ่งได้ 3 กลุ่ม คือ แบคทีเรียกลุ่มที่ต้องการออกซิเจน (aerobe) เช่น *Azotobacter*, *Beijerinckia*, *Derxia* แบคทีเรียกลุ่มที่ต้องการหรือไม่ต้องการออกซิเจน (facultative anaerobe) เช่น *Bacillus*, *Klebsiella* แบคทีเรียกลุ่มที่ไม่ต้องการออกซิเจน (anaerobe) ทั้งที่สังเคราะห์แสงได้ เช่น *Rhodospirillum*, *Chromatium* และไม่สามารถสังเคราะห์แสงได้ เช่น *Clostridium*, *Methanococcus* เป็นต้น

3.2 จุลินทรีย์ที่สังเคราะห์แสงได้ ได้แก่ ไซยาโนแบคทีเรีย (cyanobacteria) หรือสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน (blue green algae) เช่น *Nostoc*, *Anabaena*, *Calothrix*

เมื่อเปรียบเทียบปริมาณไนโตรเจนที่ตรึงได้จากจุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่ร่วมกับพืช (symbiotic microorganisms) มีประมาณ 70% และกลุ่มที่ไม่ได้อยู่ร่วมกับพืช (nonsymbiotic microorganisms) จะมีประมาณ 30%

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ปัจจัยที่มีผลต่อการตรึงไนโตรเจน

อุณหภูมิ

อุณหภูมิเป็นปัจจัยที่มีผลกระทบต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไนโตรจีเนส โดยในสภาวะที่อุณหภูมิต่ำกิจกรรมของเอนไซม์ไนโตรจีเนสจะเกิดขึ้นได้เพียงเล็กน้อย แต่จะเพิ่มขึ้นเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้น และกิจกรรมของเอนไซม์ไนโตรจีเนสจะเกิดได้ดีที่สุดในช่วงอุณหภูมิที่เหมาะสม (Alexander, 1977) ตัวอย่างเช่น *Azotobacter* สามารถรีดิวซ์ก๊าซ acetylene ให้เปลี่ยนเป็นก๊าซ ethylene ได้เพิ่มขึ้นในช่วงอุณหภูมิระหว่าง 10 – 30 ˚C แต่ช่วงอุณหภูมิที่เหมาะสมที่สุดของกิจกรรมเอนไซม์ไนโตรจีเนสอยู่ระหว่าง 20 – 25 ˚C (Hardy *et al*., 1968) Postgate (1974) ทดลองเลี้ยงเชื้อ *Klebsiella pneumoniae* strain M 5a1 ในอาหารที่มี NH_4^+ เชื้อจะเจริญได้ตามปกติที่อุณหภูมิ 37˚C แต่ที่อุณหภูมินี้เชื้อแบคทีเรียไม่สามารถตรึงไนโตรเจนได้ ซึ่งการตรึงไนโตรเจนจะเกิดได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 30˚C *Azospirillum* sp. จะเจริญเติบโตได้ช้าที่อุณหภูมิต่ำกว่า 24˚C และหยุดการเจริญเติบโตเมื่ออุณหภูมิต่ำกว่า 18˚C รวมทั้งเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นถึง 42˚C กิจกรรมของเอนไซม์ไนโตรจีเนสจะไม่เกิดขึ้น แต่การเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียจะเกิดขึ้นเพียงเล็กน้อย (Day, 1975)

ออกซิเจน

แบคทีเรียตรึงไนโตรเจนอย่างอิสระบางชนิดต้องการออกซิเจนเพื่อเป็นแหล่งพลังงานสำหรับการเจริญเติบโตและในการตรึงไนโตรเจน แต่เอนไซม์ไนโตรจีเนสจะถูกยับยั้งได้โดยออกซิเจน กระบวนการตรึงไนโตรเจนจะเกิดขึ้นได้ก็ต่อเมื่อไม่มีออกซิเจนมารบกวน แบคทีเรียตรึงไนโตรเจนกลุ่ม anaerobe และ facultative anaerobe สามารถเจริญเติบโตโดยไม่อาศัยออกซิเจน ดังนั้นแบคทีเรียกลุ่มนี้จึงไม่ประสบปัญหาการถูกยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ไนโตรจีเนสโดยออกซิเจน แต่แบคทีเรียกลุ่ม aerobe ที่ต้องการออกซิเจนในการดำรงชีวิต แบคทีเรียกลุ่มนี้เจริญเติบโตได้ในสภาวะที่มีอากาศ ซึ่งจำเป็นต้องใช้ออกซิเจนเป็นตัวรับอิเล็คตรอนตัวสุดท้าย (terminal electron acceptor) โดยกิจกรรมของเอนไซม์ไนโตรจีเนสของแบคทีเรียกลุ่ม aerobe จะสูงเมื่ออยู่ในสภาวะที่มีความดันออกซิเจนต่ำกว่า 0.2 บรรยากาศ ได้แก่ *Azotobacter chroococcum* จะมีกิจกรรมของเอนไซม์ไนโตรจีเนสสูงในช่วงที่มีความดันออกซิเจนระหว่าง 0.04 – 0.08 บรรยากาศ *Azospirillum* จะตรึงไนโตรเจนได้สูงที่สุดเมื่ออยู่ในสภาวะที่มีความดันออกซิเจน 0.0050 – 0.0075 บรรยากาศ ดังนั้นจึงต้องมีกลไกเพื่อป้องกันผลกระทบจากออกซิเจน เช่น *Azotobacter chroococcum* เอนไซม์ไนโตรจีเนสจะมีการจัดเรียงตัวใหม่ของโครงสร้างทางฟิสิกส์ มีการสร้างเนื้อเยื่อล้อมรอบเอนไซม์

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ไนโตรจีเนสเพื่อป้องกันการถูกทำลายโดยออกซิเจน รวมทั้งจะมีอัตราการหายใจเพิ่มสูงขึ้นเพื่อเร่งการใช้ออกซิเจน และมีการสร้างเมือกในปริมาณมากล้อมรอบเซลล์เพื่อป้องกันให้ออกซิเจนแพร่เข้าสู่เซลล์ได้น้อยที่สุด (Mulder and Brotonegoro, 1974; Dobereiner *et al*., 1973)

สารประกอบไนโตรเจน

แบคทีเรียตรึงไนโตรเจนจะได้รับไนโตรเจนทั้งในรูปก๊าซและสารประกอบไนโตรเจน เช่น แอมโมเนียม (ammonium, NH_4^+) และไนเตรท (nitrate, NO_3^-) เมื่อแบคทีเรียอยู่ในสิ่งแวดล้อมที่มีสารประกอบไนโตรเจนปริมาณมาก กิจกรรมการตรึงไนโตรเจนจะไม่เกิดขึ้น เนื่องจากแบคทีเรียสามารถใช้สารประกอบไนโตรเจนได้ทันทีซึ่งดีกว่าไนโตรเจนในสภาวะก๊าซ (Alexander, 1977) สารประกอบไนโตรเจนมีผลต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไนโตรจีเนส เนื่องจากเกิดการแย่งพลังงานระหว่างกิจกรรมของเอนไซม์ไนโตรจีเนสกับกระบวนการเปลี่ยนแปลงแอมโมเนียมให้เป็นกรดอะมิโน (Hardy *et al*., 1973; Mulder, 1975) Brotonegoro (1974) ทดลองเลี้ยงเชื้อ *Azotobacter chroococcum* โดยให้เกลือแอมโมเนียมปริมาณ 5 mM และตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์ไนโตรจีเนสจากแบคทีเรียทั้งที่มีชีวิตและที่สกัดเอนไซม์ออกมาจากเซลล์ พบว่าในเซลล์ที่มีชีวิตกิจกรรมของเอนไซม์ไนโตรจีเนสจะลดลงอย่างรวดเร็ว แต่เอนไซม์ที่สกัดออกมาจากเซลล์กิจกรรมของเอนไซม์ไนโตรจีเนสลดลงเพียงเล็กน้อย รวมทั้งได้เสนอว่าการที่กิจกรรมของเอนไซม์ไนโตรจีเนสจากเซลล์ที่มีชีวิตลดลงอย่างรวดเร็วนั้น อาจมีสาเหตุมาจากการแย่งพลังงานกันระหว่างกิจกรรมของเอนไซม์ไนโตรจีเนสและกระบวนการนำแอมโมเนียมเข้าสู่เซลล์ Okon *et al*., (1976) ได้ทดลองใส่แอมโมเนียมแก่เชื้อ *Azospirillum lipoferum* เมื่อเวลาผ่านไป 1 ชั่วโมง พบว่ากิจกรรมการตรึงไนโตรเจนจะต่ำกว่าการตรึงไนโตรเจนภายหลังการใส่แอมโมเนียม 5.5 – 7 ชั่วโมง ถึง 2 เท่า ไนเตรท (NO_3^-) สามารถยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ไนโตรจีเนสของเชื้อ *Azospirillum brasilense* (Nelson and Knowles, 1978) การทดลองของ Watanabe and Barraquio (1979) ซึ่งแยกเชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนบริเวณรากข้าวและศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ไนโตรจีเนส พบว่า แบคทีเรียที่เจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแอมโมเนียมคลอไรด์ (ammonium chlororide; NH_4Cl) ปริมาณ 16 mg/L จะไม่มีกิจกรรมของเอนไซม์ไนโตรจีเนส Klugkist and Haaker (1984) รายงานว่าอัตราการหายใจของแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนสามารถช่วยลดอิทธิพลของแอมโมเนียมที่มีผลต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไนโตรจีเนสได้ โดยพบว่า *Azotobacter vinelandii* เมื่อเจริญในอาหารที่มีออกซิเจนพอเหมาะและอัตราการหายใจของเชื้อสูงขึ้น แอมโมเนียมคลอไรด์ในอัตรา 28 และ 56 ppm มีผลยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ไนโตรจีเนสได้น้อยมาก แต่ถ้าเชื้อนี้เจริญในสภาวะที่ออกซิเจนไม่เพียงพอและอัตราการหายใจของเชื้อต่ำ แอมโมเนียมคลอไรด์จะมีผลยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ไนโตรจีเนส

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ได้อย่างมาก Medeiros *et al*. (2006) ศึกษาผลของแคลเซียมไนเตรต (calcium nitrate, $Ca(NO_3)_2$) และแอมโมเนียมซัลเฟต (ammonium sulfate, $(NH_4)_2SO_4$) ต่อประชากรของ *Gluconacetobacter diazotrophicus* รวมทั้งกิจกรรมของเอนไซม์ไนโตรจีเนสและการสะสมไนโตรเจนของอ้อย 2 สายพันธุ์ คือ SP 701143 และ SP 792312 พบว่า เมื่อมีปริมาณไนโตรเจนเพิ่มขึ้นจะมีผลยับยั้งจำนวนประชากรของ *G. diazotrophicus* รวมทั้งยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ไนโตรจีเนสของแบคทีเรียในอ้อยทั้ง 2 สายพันธุ์

ธาตุอาหาร

แมกนีเซียม (Magnesium)

แมกนีเซียมจำเป็นต่อกระบวนการตรึงไนโตรเจน รวมทั้งทำหน้าที่เป็น Co-factor ในปฏิกิริยาของเอนไซม์อื่นๆ หลายชนิด ซึ่งแมกนีเซียมไอออนจำเป็นสำหรับการกระตุ้น ATP เพื่อให้พลังงานสำหรับการตรึงไนโตรเจนได้อย่างเต็มที่ (สมศักดิ์, 2541)

แคลเซียม (Calcium)

แคลเซียมจำเป็นต่อการเจริญเติบโตและการตรึงไนโตรเจนของแบคทีเรีย เช่น การศึกษาใน *Azotobacter chroococcum* และ *A. vinelandii* ซึ่งต้องการแคลเซียมปริมาณเล็กน้อยในขณะที่เชื้อกำลังเจริญเติบโต (Norris and Jensen, 1958; Jakobsons *et al.,* 1962) การทดลองของ Brotonegoro (1974) โดยย้าย *A. chroococcum* จากอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแคลเซียมไปยังอาหารเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากแคลเซียม พบว่าเชื้อแบคทีเรียไม่มีการเจริญเติบโตและการตรึงไนโตรเจนเกิดขึ้น

เหล็ก (Iron)

เหล็กเป็นองค์ประกอบที่สำคัญของเอนไซม์ไนโตรจีเนส โดยอยู่ในส่วนของ iron (Fe) protein ซึ่งทำหน้าที่เป็นเอนไซม์ dinitrogenase reductase รวมทั้งเป็นองค์ประกอบของ ferredoxin และ cytochrome ซึ่งมีหน้าที่ถ่ายทอดอิเล็คตรอน (Mulder, 1975)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

โมลิบดีนัม (Molybdenum)

โมลิบดีนัมเป็นองค์ประกอบที่สำคัญของเอนไซม์ไนโตรจีเนส โดยเป็นองค์ประกอบในส่วนของ molybdenum-iron (MoFe) protein ซึ่งทำหน้าที่เป็นเอนไซม์ dinitrogenase แต่ในแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนบางชนิดสามารถใช้วานาเดียม (vanadium) แทนโมลิบดีนัม ได้แก่

Azotobacter chroococcum และ *A. vinelandii* แต่ *A. agilis* และ *Beijerinckia* spp. ไม่สามารถใช้วานาเดียมแทนได้ (Becking, 1962) แต่ *Clostridium butyricum* สามารถใช้ได้ทั้งโมลิบดีนัมและวานาเดียมในการตรึงไนโตรเจน (Jensen and Spencer, 1947)

แบคทีเรียตรึงไนโตรเจนที่มีความสัมพันธ์กับพืช

เอนโดไฟท์ (Endophyte) หมายถึงสิ่งมีชีวิตที่อาศัยอยู่ภายในเนื้อเยื่อพืชหรืออาจหมายถึงสิ่งมีชีวิตที่ใช้ชีวิตทั้งหมดหรือบางช่วงอาศัยอยู่ในเนื้อเยื่อพืช แบคทีเรียเอนโดไฟท์ (endophytic bacteria) เป็นแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ภายในเนื้อเยื่อพืชโดยไม่ก่อให้เกิดอันตรายต่อพืชอาศัย (host) (Hallmann *et al*., 1997) จุลินทรีย์เหล่านี้มีบทบาทสำคัญในการให้ประโยชน์ต่อพืชทางการเกษตร (Mengoni *et al*., 2003) เนื่องจากแบคทีเรียเอนโดไฟท์เหล่านี้สามารถส่งเสริมการเจริญของพืชโดยการสร้างฮอร์โมนพืช (phytohormone) (Feng *et al*., 2006) และ siderophore (Burd *et al*., 1998) ช่วยเพิ่มความต้านทานต่อเชื้อก่อโรค (pathogen) (Reiter *et al*., 2002) และพาราสิต (parasite) (Hallmann *et al*., 1997) รวมทั้งส่งเสริมกระบวนการตรึงไนโตรเจน (Baldani *et al*., 1986) และการผลิตสารปฏิชีวนะ (antibiotic) (Strobel and Daisy, 2003) nitrogen fixing bacteria หรือ diazotrophic bacteria หมายถึง แบคทีเรียที่สามารถเปลี่ยนก๊าซไนโตรเจนจากบรรยากาศเพื่อได้เป็นแอมโมเนีย (NH_3) ซึ่งเป็นผลจากกิจกรรมของ nitrogenase enzyme complex ที่อยู่ภายในแบคทีเรียตรึงไนโตรเจน (Unkovich *et al*., 2008) แบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่ตรึงไนโตรเจนเป็นแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ภายในเนื้อเยื่อของพืชและสามารถตรึงไนโตรเจนที่เป็นประโยชน์แก่พืชอาศัย แบคทีเรียกลุ่มนี้ยังมีความสัมพันธ์กับพืชได้หลายสายพันธุ์และมีประสิทธิภาพสูงในการตรึงไนโตรเจน ซึ่งการอาศัยภายในเนื้อเยื่อพืชของแบคทีเรียเหล่านี้จะช่วยป้องกันผลกระทบจากออกซิเจนและปัจจัยอื่นๆ ที่มีผลยับยั้งกระบวนการตรึงไนโตรเจน (Baldani *et al*., 1997) รวมทั้งยังช่วยพัฒนาการเจริญเติบโตของอาศัย (Sevilla *et al*., 2001) แบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่ตรึงไนโตรเจนในพืช ได้แก่

Azospirillum

เซลล์มีลักษณะโค้ง (vibrioid) หรือแท่งตรง (straight rod) เซลล์มีขนาดกว้าง 0.9 – 1.2 µm ติดสีแกรมลบหรือแกรมไม่แน่นอนภายในเซลล์พบแกรนูลที่เป็น poly-ß-hydroxybutyrate เคลื่อนที่ได้โดย single polar flagellum อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญอยู่ระหว่าง 34 – 37°C แบคทีเรียจีนัส *Azospirillum* ได้แก่ *A. lipoferum* และ *A. brasilense* (Tarrand *et al*., 1978) *A. amazonense* (Magalhaes *et al*., 1983) *A. irakense* (Khammas *et al*., 1989) *A. halopraeferens* (Reinhold *et al*., 1987) *A. largimobile* (Sly and Stackebrandt, 1999) *A. oryzae* (Xie and Yokota, 2005) และ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

A. doebereinerae (Eckert *et al*., 2001) โดยส่วนมากพบแบคทีเรียมีความสัมพันธ์ร่วมกับรากพืช รวมทั้งพบแบคทีเรียกลุ่มนี้ได้ในดินบริเวณรอบรากพืชตระกูลหญ้าหลายชนิด เช่น ข้าวโพด ข้าว หญ้าอาหารสัตว์ อ้อย และปาล์มน้ำมัน ซึ่งแบคทีเรียสามารถเข้าอาศัยภายในพืชและเพิ่มจำนวนภายในเนื้อเยื่อพืชได้ (Schloter *et al*., 1994) รวมทั้งแบคทีเรียสามารถสร้างสารส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช เช่น indole-3-acetic acid (IAA) และ gibberelline (Okon, 1994; Dobbelaere and Okon, 2007) ซึ่งช่วยพัฒนาระบบรากโดยมีผลให้ปริมาณรากแขนงเพิ่มขึ้น (lateral root) และเพิ่มขนาดของขนราก ส่งผลให้อัตราของการดูดซึมน้ำและแร่ธาตุดีขึ้น การทดลองใส่เชื้อแบคทีเรียชนิดนี้ให้กับพืชพบว่าช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตและเพิ่มผลผลิตให้กับพืชได้ถึง 5 – 30% (Steenhoudt *et al*., 2000; Dobbelaere *et al*., 2001)

Herbaspirillum

เซลล์มีลักษณะโค้ง (vibrioid) หรืออาจมีลักษณะเป็นเกลียว (helical) เซลล์มีขนาดกว้าง 0.6 – 0.7 μm ติดสีแกรมลบ เคลื่อนที่ได้โดย flagellum 1 – 3 เส้น pH ที่เหมาะสมต่อการเจริญอยู่ระหว่าง 5.3 – 8.0 ได้แก่ *H. seropedicae* พบได้จากดินบริเวณรอบราก ภายในรากของข้าวโพด ข้าวฟ่างและข้าว (Baldani *et al*., 1986) ภายในราก ลำต้นและใบอ้อย (Baldani *et al*., 1996) รวมทั้งในลำต้นของกล้วยและสับปะรด (Cruz *et al*., 2001) *H. seropedicae* และ *H. rubrisubalbicans* เป็นแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนที่มีลักษณะทางสรีรวิทยาคล้ายคลึงกันมาก แต่มีลักษณะบางประการที่แตกต่างกัน ได้แก่ *H. seropedicae* สามารถใช้ N-acetylglucosamine เป็นเป็นแหล่งคาร์บอนเพียงแหล่งเดียว (sole carbon source) อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญ คือ 34°C สามารถแยกได้จากอ้อย ข้าวฟ่าง ข้าว ปาล์ม และหญ้ามิสแคนทัส (*Miscanthus*) (Hale and Wikie, 1972b; Baldani *et al*., 1997) ส่วน *H. rubrisubalbicans* สามารถใช้ meso-erythritol เป็นเป็นแหล่งคาร์บอนเพียงแหล่งเดียว อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญ คือ 30°C สามารถแยกได้จากอ้อยและหญ้ามิสแคนทัส (Kirchhof *et al*., 1997) *H. frisingense* แยกได้จากรากและลำต้นของหญ้าเนเปียร์ (*Pennisetum purpureum*) ในประเทศบราซิลและหญ้ามิสแคนทัสซูซูกิ (*Miscanthus sinensis*) ในประเทศเยอรมัน (Kirchhof *et al*., 2001) *H. hiltneri* แยกได้จากลำต้นของข้าวสาลี แต่ไม่พบยีน *nif* ในแบคทีเรียนี้ (Rothballer *et al*., 2006)

Gluconacetobacter

เซลล์มีลักษณะเป็นแท่งรี หรือตรง หรือโค้งเล็กน้อย เซลล์มีขนาดกว้าง 0.6 – 0.8 μm และยาว 1.0 – 1.4 μm ลักษณะเป็นเซลล์เดี่ยว คู่ หรือลูกโซ่ เซลล์เคลื่อนที่ได้โดย peritrichous หรือ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

แฟลกเจลลาด้านข้าง (lateral flagella) หรืออาจเคลื่อนที่ไม่ได้ ติดสีแกรมลบหรืออาจเกิดแกรมไม่แน่นอน อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญอยู่ระหว่าง 25 – 30°C pH ที่เหมาะสมต่อการเจริญอยู่ระหว่าง 5.4 – 6.3 แบคทีเรียชนิดนี้สามารถเจริญได้ดีที่สุดที่ความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครส 10% และ pH 5.5 โดยที่ความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสสูงแบคทีเรียจะผลิตกรดส่งผลให้ pH ต่ำลงถึง 3.0 ดังนั้นแบคทีเรียชนิดนี้จึงสามารถใช้แหล่งน้ำตาลในอ้อยเพื่อเป็นแหล่งพลังงานในการตรึงไนโตรเจน และการตรึงไนโตรเจนถูกยับยั้งได้โดยแอมโมเนียม (Cavalcante and Dobereiner, 1988; Stephan *et al*., 1991) รวมทั้งแบคทีเรียชนิดนี้สามารถรอดชีวิตในดินหรือดินบริเวณรอบรากโดยไม่มีพืชอาศัยได้ค่อนข้างต่ำมาก (Baldani *et al*., 1997) ตัวอย่างแบคทีเรียในจีนัส *Gluconacetobacter* ได้แก่ *G. diazotrophicus* สามารถแยกได้จากส่วนราก ลำต้น และใบของอ้อยในปริมาณมากถึง 10^6 เซลล์ต่อกรัมน้ำหนักสด (Reis *et al*., 1994) ใน xylem vessels (Sevilla *et al*., 2001) และ apoplast space (Dong *et al*., 1994) รวมทั้งยังพบในหญ้าเนเปียร์ (*Pennisetum purpureum*) (Reis *et al*., 1994) มันเทศ (Paula *et al*., 1991) กาแฟ (Jiménez-Salgado *et al*., 1997) สับปะรด (Tapia-Hernandez *et al*., 2000) ข้าวป้างสามง่าม *(Eleusine coracana)* (Loganathan *et al*., 1999) ในส่วนรากของชา ผลของมะม่วง รากกล้วย รากและลำต้นของข้าวฟ่างนิ้วมือ (Ragi) (Muthukumarasamy *et al*., 2002) *G. diazotrophicus* สามารถผลิต IAA ที่ความเข้มข้น 0.14-2.42 µg/ml (Fuentes-Ramírez *et al*., 1993) รวมทั้งสามารถผลิต bacteriocin มีผลในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *Xanthomonas albilineans* ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคใบวงสีน้ำตาล (Leaf Scald) ในอ้อย (Piñon *et al*., 2002) และยังเป็นเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ของเชื้อรา *Collelotrichum falcatum* ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคเหี่ยวเน่าแดงของอ้อย (Red rot) (Muthukumarasamy *et al*., 2000) แบคทีเรียในจีนัส *Gluconacetobacter* ชนิดอื่นๆ ได้แก่ *G. johannae* และ *G. azotocaptans* ซึ่งแยกได้จากเมล็ดกาแฟและสับปะรดแต่ยังไม่มีรายงานว่าพบในอ้อย (Fuentes-Ramirez *et al*., 2001a)

Klebsiella

เซลล์มีลักษณะเป็นแท่งตรง เซลล์มีขนาดกว้าง 0.3 – 1.0 µm และยาว 0.6 – 6.0 µm ลักษณะเป็นเซลล์เดี่ยว คู่ หรือลูกโซ่สั้นๆ ไม่สามารถเคลื่อนที่ได้ ติดสีแกรมลบ อยู่ในกลุ่ม facultative anaerobe อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญอยู่ระหว่าง 34°C ได้แก่ *Klebsiella* sp. พบในส่วนลำต้นของมันเทศ (Asis and Adachi, 2003) ส่วนราก ลำต้น และใบกล้วย (Martínez *et al*., 2003) *K. pneumoniae* ซึ่งพบอยู่ในดินบริเวณรอบรากพืชและภายในต้นอ่อนของพืชตระกูลถั่ว เช่น ถั่วอัลฟัลฟา (Alfalfa) (*Medicago sativa* และ *Medicago truncatula*) รวมทั้งใน *Arabidopsis thaliana* ข้าว (*Oryza sativa*) ข้าวสาลี (*Triticum aestivum*) และอ้อย (Dong *et al*., 2002;

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Govindarajan *et al*., 2007) การทดลองของ Iniguez *et al*. (2004) พบว่า *K. pneumonia* สามารถตรึงไนโตรเจนให้แก่พืชและเพิ่มปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดในต้นข้าวสาลีทั้งในเนื้อเยื่อและคลอโรฟิลล์ เมื่อตรวจสอบโดยวิธี ^{15}N isotope dilution technique *K. variicola* พบได้จากกล้วย ข้าว ข้าวโพดและอ้อย (Rosenblueth *et al*., 2004) *K. oxytoca* พบได้จากในส่วนรากของมันเทศ รวมทั้งในส่วนรากและลำต้นของหญ้าในสกุลธูปฤษี (*Typha australis*) (Adachi *et al*., 2002; Jha and Kumar, 2007)

Burkholderia

เซลล์มีลักษณะเป็นแท่งตรง สามารถเคลื่อนที่ได้ เป็นแบคทีเรียแกรมลบและต้องการออกซิเจนในการเจริญ Weber *et al*. (1999) แยก *Burkholderia* sp. ได้จากส่วนราก ลำต้น ใบ และผล ของกล้วยและสับปะรด *B. vietnamiensis* แยกได้จากรากข้าวของประเทศเวียดนาม รวมทั้งในรากข้าวโพด ดินบริเวณรอบรากและบริเวณผิวของรากพืช (rhizoplane) ของข้าวโพดและกาแฟ ซึ่งมีรายงานว่าแบคทีเรียชนิดนี้ช่วยส่งเสริมการเจริญของพืชและเพิ่มผลผลิตของเมล็ดข้าว (Estrada-De Los Santos *et al*., 2001) Xin *et al*. (2009) สามารถแยก *B. vietnamiensis* ได้จากส่วนลำต้นของต้นฝ้ายป่า (wild cottonwood; *Populus trichocarpa*) โดยแบคทีเรียสามารถผลิต IAA ซึ่งเป็น phytohormone ช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช รวมทั้งพบได้ในส่วนรากของต้นจาก (*Nypa fruticans*) ของประเทศมาเลเซีย (Tang *et al*., 2010) Reis *et al*., 2004 แยก *B. tropica* ได้จากอ้อยของประเทศบราซิลและแอฟฟริกาเหนือ รวมทั้งจากข้าวโพดและข้าวโพดป่า (teosinte) ของประเทศเม็กซิโก *B. cepacia* แยกได้จากส่วนรากอ้อยและข้าว (Mendes *et al*., 2007; Singh *et al*., 2011) Mattos *et al*. (2008) รายงานถึง *B. kururiensis* ที่สามารถเข้าไปอาศัยและเพิ่มจำนวนภายในต้นข้าวและช่วยส่งเสริมการเจริญรวมทั้งเพิ่มผลผลิตของเมล็ดข้าว

Pantoea

ลักษณะเซลล์เป็นแท่งตรง เซลล์มีขนาดกว้าง 0.5 – 1.0 μm และยาว 1.0 – 3.0 μm เคลื่อนที่ได้โดย peritrichous flagella ติดสีแกรมลบ อยู่ในกลุ่ม facultative anaerobe อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญ คือ 30°C ได้แก่ *P. agglomerans* พบในส่วนลำต้นและรากของข้าวโพดและฝ้าย (McInroy and Kloepper, 1995) รากข้าวและลำต้นข้าวสาลี (Ruppel *et al*., 1992) Scholz-Seidel and Ruppel (1992) พบว่า *P. agglomerans* ช่วยเพิ่มความยาวของรากและผลผลิตของข้าวสาลี รวมทั้งพบได้ในส่วนลำต้นของมันเทศ (Asis and Adachi, 2003) Feng *et al*. (2006) ทดลองใส่เชื้อ *P. agglomerans* YS19 ให้แก่ต้นกล้าข้าว พบว่าช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตและมีผลต่อ photosynthate ของพืชเจ้าบ้าน แบคทีเรียนี้ยังสามารถผลิต abscisic acid (ABA) ซึ่งเป็นฮอร์โมนพืช เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหาร LB

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

medium ในปริมาณถึง 675 ng ml/1 Loiret *et al*. (2004) แยก *Pantoea* sp. จากลำต้นอ้อยของประเทศคิวบา ซึ่งพบว่าแบคทีเรียไอโซเลทนี้สามารถเจริญได้ในช่วงอุณหภูมิระหว่าง 20 – 42˚C รวมทั้งเจริญได้ใน pH และความเข้มข้นของเกลือในช่วงกว้าง

การศึกษาแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนที่อาศัยอยู่ภายในพืชบางชนิด

อ้อย

การรายงานถึงแบคทีเรียเอนโดไฟท์ตรึงไนโตรเจนที่พบในอ้อย ได้แก่ *Gluconacetobacter diazotrophicus*, *Herbaspirillum rubrisubalbicans*, *H. seropedicae*, *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella oxytoca*, *Pantoea* sp., *Burkholderia unamae*, *B. tropica* (Baldani *et al*.,1997; James, 2000; Boddey *et al*.,2003; Mirza *et al*., 2001; Loiret *et al*., 2004; Perin *et al*., 2006) *G. diazotrophicus* (ชื่อเดิม *Acetobacter diazotrophicus*) เป็นแบคทีเรียในกลุ่มของ acetic acid bacteria ซึ่งมีความสัมพันธ์อย่างจำเพาะกับพืชที่มีปริมาณน้ำตาลสูง แยกเชื้อได้ครั้งแรกจากเนื้อเยื่อราก ลำต้นและใบของอ้อย (Cavalcante and Döbereiner, 1988) Stephan *et al*. (1991) พบว่าเชื้อ *G. diazotrophicus* สามารถเจริญได้ในสภาวะที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลสูง (10%) อีกทั้งสามารถผลิตกรด gluconic เป็นสาเหตุให้ pH ลดลงต่ำกว่า 3.0 แต่แบคทีเรียยังสามารถเกิดกระบวนการตรึงไนโตรเจนได้ การใช้เชื้อผสมระหว่าง *G. diazotrophicus* และ *Herbaspirillum* sp. สามารถส่งเสริมผลผลิตอ้อยสายพันธุ์ Co 86032 ภายใต้สภาวะที่มีปริมาณไนโตรเจนจำกัด (Muthukumarasamy *et al*., 2006) Oliveira *et al.* (2002) ทดลองใส่เชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนชนิดต่างๆ ให้กับอ้อย ได้แก่ *G. diazotrophicus*, *H. seropedicae*, *H. rubrisubalbicans*, *A. amazonense* และ *Burkholderia* sp. ในลักษณะของเชื้อผสมแบ่งเป็น 7 ทรีทเม้นต์ พบว่าเชื้อแบคทีเรียช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช รวมทั้งเมื่อแยกเชื้อแบคทีเรียที่ใส่ให้กับพืชพบว่ามีปริมาณเชื้อแบคทีเรียในเนื้อเยื่อพืชมากกว่าในชุดที่ไม่ได้ใส่เชื้อ โดยทรีทเม้นต์ที่มีแบคทีเรียทดสอบทั้ง 5 ชนิดช่วยส่งเสริมการเจริญของพืชได้ดีที่สุด ซึ่งแสดงให้เห็นว่าการใช้เชื้อผสมนั้นเป็นวิธีการที่ดีเพื่อเพิ่มผลผลิตอ้อย Carrizo de Bellone and Bellone (2006) ศึกษาแบคทีเรียเอนโดไฟท์ในน้ำอ้อยจากลำต้นอ้อยที่มีอายุ 3 และ 5 เดือน พบแบคทีเรีย *G. diazotrophicus*, *H. seropedicae* และ *A. brasilense* ซึ่งพบว่าแบคทีเรียเหล่านี้ใช้กรดอินทรีย์ในน้ำอ้อยเป็นแหล่งพลังงาน การกระจายตัวของแบคทีเรียนั้นจะขึ้นอยู่กับชนิดของกรดอินทรีย์ที่แตกต่างกันและความเข้มข้นของน้ำตาลในระหว่างการเจริญเติบโตของอ้อย ซึ่งในลำต้นอ้อยที่มีอายุมากจะพบ *G. diazotrophicus* มากกว่า *H. seropedicae* และ *A. brasilense* Mendes *et al.* (2007) แยกเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์จากภายในรากและลำต้นอ้อยที่ปลูกในประเทศบราซิล โดยพบว่าปริมาณเชื้อแบคทีเรียในส่วนรากจะมีมากกว่าในลำต้น รวมทั้งแบคทีเรียส่วนใหญ่ที่แยกได้จากลำ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ต้นนั้นสามารถผลิต IAA การจำแนกชนิดแบคทีเรียโดยการเปรียบเทียบลำดับเบสของยีน 16S rRNA พบเป็นจีนัส *Burkholderia*, *Pantoea*, *Pseudomonas* และ *Microbacterium* โดยแบคทีเรียในจีนัส *Burkholderia* จำนวนหลายไอโซเลท สามารถผลิตสาร Pyrrolnitrin ซึ่งเป็นสารปฏิชีวนะที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Fusarium moniliforme* และแบคทีเรียชนิดนี้เจริญได้ที่อุณหภูมิ 37°C การวิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของยีน 16S rRNA และ *recA* พบว่าเป็น *B. cepacia* Govindarajan *et al.* (2007) แยกเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์จากส่วนลำต้นและรากอ้อยของประเทศอินเดีย คัดเลือกแบคทีเรียจำนวน 4 ไอโซเลทที่มีกิจกรรมของเอนไซม์ไนโตรจีเนสสูงและมียีน *nifD* รวมทั้งสามารถผลิต IAA จำแนกชนิดแบคทีเรียโดยเปรียบเทียบลำดับเบสของยีน 16S rRNA ได้เป็น *Pseudomonas* sp. pDL01จำนวน 2 ไอโซเลท *B. vietnamiensis* และ *K. pneumoniae* รวมทั้งคัดเลือกไอโซเลท GR9 สำหรับการศึกษาต่อไป ซึ่งจำแนกได้เป็น *K. pneumoniae* โดยใส่เชื้อกลับให้ท่อนพันธุ์อ้อยและต้นกล้าข้าวเปรียบเทียบกับเชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนชนิดอื่นๆ พบว่าการใช้เชื้อผสมช่วยส่งเสริมการตรึงไนโตรเจนให้กับพืชได้ดีขึ้น Magnani *et al.* (2010) แยกเชื้อแบคทีเรียจากส่วนลำต้นและใบอ้อยที่ปลูกในประเทศบราซิลโดยใช้อาหาร potato-agar medium ได้แบคทีเรียจำนวน 32 ไอโซเลท แต่มีเพียง 4 ไอโซเลทที่มีกิจกรรมของเอนไซม์ไนโตรจีเนส ได้แก่ จีนัส *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Pantoea* และ*Pseudomonas* รวมทั้งพบว่าแบคทีเรียที่แยกได้จากส่วนลำต้นมีความหลากหลายกว่าส่วนใบ โดยแบคทีเรียส่วนใหญ่ที่พบในลำต้นและใบอยู่ในกลุ่ม Enterobacteriaceae และ Pseudomonaceae ตามลำดับ

ข้าว

แบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่พบในข้าว ได้แก่ *Azospirillum*, *Herbaspirillum* และ *Azoarcus* ซึ่งพบมากในข้าวที่เพาะปลูกในเขตร้อน *Azospirillum* พบได้มากในรากบริเวณ elongation zone และขนราก ได้แก่ *A. lipoferum* และ *A. brasilense* ซึ่งมีกิจกรรมการตรึงไนโตรเจนและสามารถผลิตฮอร์โมนออกซิน (auxin) ที่ช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช (Costacurta and Vanderleyden, 1995; Baldani *et al*., 1997) *A. brasilense* สามารถเข้าไปอาศัยอยู่ภายในเนื้อเยื่อพืชได้หลายส่วน แต่บางสายพันธุ์อาจอยู่เฉพาะบนผิวรากขณะที่สายพันธุ์อื่นอาจเข้าไปอาศัยอยู่ภายในช่องว่างระหว่างเซลล์หรือภายในเนื้อเยื่อท่อลำเลียง (James and Olivares, 1998) Elbaltagy *et al.* (2001) แยกเชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนจากลำต้นของข้าวป่าและข้าวปลูกโดยใช้อาหาร modified Rennie medium พบแบคทีเรียในจีนัส *Herbaspirillum*, *Ideonella*, *Enterobacter* และ *Azospirillum* และเลือกแบคทีเรียในจีนัส *Herbaspirillum* strain B501 ที่แยกได้จากข้าวป่า (*Oryza officinalis*) สำหรับการศึกษาต่อไป ติดตามการเข้าภายในเนื้อเยื่อของแบคทีเรียโดยใช้ GFP (Green Fluorescent

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

protein) ซึ่งพบว่าแบคทีเรียชนิดนี้จะอยู่บริเวณช่องว่างระหว่างเซลล์ภายในใบของข้าวพันธุ์ป่ามากกว่าในข้าวปลูก Koomnok *et al*. (2007) ศึกษาแบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่ตรึงไนโตรเจนจากข้าวป่า 4 สายพันธุ์ และข้าวปลูก 3 สายพันธุ์ของประเทศไทย พบว่าแบคทีเรียที่แยกได้จากข้าวป่า (*Oryza rufipogon*) มีปริมาณของเชื้อแบคทีเรียสูงที่สุดในส่วนราก และแบคทีเรียกลุ่มนี้มีกิจกรรมของเอนไซม์ไนโตรจีเนสสูงที่สุด รวมทั้งไม่พบกิจกรรมของเอนไซม์ไนโตรจีเนสจากแบคทีเรียที่แยกได้จากข้าวปลูก การบ่งชนิดของแบคทีเรียไอโซเลทที่แยกได้พบเป็นแบคทีเรียในจีนัส *Azospirillum*, *Herbaspirillum*, *Beijerinckia* และ *Pseudomonas* ซึ่งทุกไอโซเลทเป็นแบคทีเรียแกรมลบ สามารถเคลื่อนที่ได้ รวมทั้งสามารถผลิตเอนไซม์เพคติเนส (pectinase) และเซลลูเลส (cellulase) Govindarajan *et al*. (2008) แยกแบคทีเรียเอนโดไฟท์จากรากและลำต้นของข้าวที่ปลูกในประเทศอินเดียได้จำนวน 13 ไอโซเลท ซึ่งพบว่าทุกไอโซเลทสามารถผลิต IAA และมีกิจกรรมของเอนไซไนโตรจีเนส เมื่อตรวจสอบการมียีน *nifH* ลักษณะทางสัณฐานวิทยา ชีวเคมี และเปรียบเทียบลำดับเบสของยีน 16S rRNA พบว่าทุกไอโซเลทอยู่ในจีนัส *Burkholderia* คัดเลือกไอโซเลท MGK3 ซึ่งจำแนกได้เป็น *B. vietnamiensis* เมื่อทดลองใส่เชื้อให้แก่ต้นกล้าเปรียบเทียบกับเชื้อแบคทีเรียชนิดอื่นๆ โดยใช้ในรูปเชื้อเดี่ยวและเชื้อผสม พบว่าการใช้เชื้อเดี่ยวช่วยเพิ่มผลผลิตได้น้อยกว่าการใช้เชื้อผสมซึ่งอยู่ในช่วงระหว่าง 5.6% - 12.6% และ 9.5% – 23.6% ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม Prakamhang *et al*. (2009) รายงานถึงประชากรแบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่มีชีวิตภายในแต่ละส่วนของข้าวในระยะต่างๆ ของการเจริญภายใต้สภาพดินที่แตกต่างกันของข้าวปลูก (*O. sativa* L. cultivar KDML-105) ซึ่งแบคทีเรียที่พบนั้นมีทั้งกลุ่มที่ยับยั้งและกลุ่มที่ส่งเสริมการตรึงไนโตรเจน ได้แก่ *Enterobacter dissolvens*, *Brevundimonas aurantiaca*, *Pantoea agglomerans*, *Pseudomonas* spp., *Rheinheimera* sp. และแบคทีเรียในวงศ์ Enterobacteriaceae Singh *et al*. (2011) แยกเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์จากส่วนรากของข้าวพันธุ์ HUR-36 จากประเทศอินเดียคัดเลือกแบคทีเรียไอโซเลท RREM25 ซึ่งมีกิจกรรมของเอนไซม์ไนโตรจีเนสและสามารถเกิด phosphate solubilization รวมทั้งสามารถผลิต IAA ได้ เปรียบเทียบลำดับเบสของยีน 16S rRNA และวิเคราะห์ยีน *nifH* โดยวิธี Western blot ได้เป็น *B. cepacia* ทดลองใส่เชื้อแบคทีเรียให้กับต้นข้าวและติดตามเชื้อแบคทีเรียโดย *gfp/gusA* reporter gene พบว่าแบคทีเรียสามารถเข้าไปอยู่ภายในเนื้อเยื่อส่วนรากบริเวณช่องว่างระหว่างเซลล์และเนื้อเยื่อท่อลำเลียง รวมทั้งส่งผลให้ความสูงของต้นข้าว น้ำหนักแห้งในส่วนยอดและส่วนราก ปริมาณคลอโรฟิลล์ ปริมาณไนโตรเจนเพิ่มสูงขึ้น และช่วยเพิ่มกิจกรรมของเอนไซม์ไนโตรจีเนสเมื่อตรวจสอบในรากข้าวที่ใส่เชื้อแบคทีเรียชนิดนี้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

หญ้า

หญ้า kallar (*Leptochloa fusca*) เป็นพืชที่ทนต่อดินเค็มและเจริญได้ดีในสภาวะที่มีน้ำขัง *Azoarcus* เป็นแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนที่พบได้ในช่องว่างระหว่างเซลล์ของเนื้อเยื่อไซเล็ม รวมทั้งในเซลล์รากที่ตายแล้ว ซึ่งแบคทีเรียจะแพร่กระจายผ่านภายในพืชผ่านทางไซเล็ม (Hurek *et al*., 1994) *Azoarcus* sp. strain BH72 ที่แยกได้จากส่วนรากของหญ้า kallar ที่ปลูกในประเทศปากิสถาน Hurek *et al*., 2002 ได้ทดลองปลูกหญ้า kallar ในกระถาง พบว่ามีประมาณไนโตรเจนจากการตรึงไนโตรเจนของแบคทีเรียชนิดนี้ถึง 34 kg N/ hectare/ ปี ประทีป และคณะ 2542 ศึกษาการแยกเชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนแบบอิสระและแบบสัมพันธ์กับพืชที่มีความสัมพันธ์กับหญ้าแฝก ซึ่งแบ่งแบคทีเรียเป็น 3 กลุ่ม ได้แก่ *Azotobacteraceae, Enterobacteraceae* และ *Spirillaceae* ทดลองใส่เชื้อแบคทีเรียให้แก่หญ้าแฝกพบว่าลำต้นและรากมีน้ำหนักแห้งเพิ่มขึ้น รวมทั้งมีการสร้างรากฝอยเพิ่มขึ้น การศึกษาแบคทีเรียเอนโดไฟท์ในหญ้ากากน้ำตาล (Molasses grass; *Melinis minutiflora*) ซึ่งเป็นหญ้าอาหารสัตว์ของประเทศในเขตร้อน โดยหญ้าชนิดนี้สามารถทนต่อความแห้งแล้งและเจริญได้ในสภาพดินที่มีความอุดมสมบูรณ์ค่อนข้างต่ำ จึงอาจเป็นผลจากแบคทีเรียตรึงไนโตรเจน Peng *et al*., 2006 แยกแบคทีเรียจากส่วนรากและลำต้นของหญ้ากากน้ำตาลได้จำนวน 15 ไอโซเลทโดยใช้อาหาร nitrogen-free semi-solid media และยืนยันว่าเป็นแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนโดยวิธี acetylene reduction assay และการตรวจสอบยีน *nifH* บ่งชนิดแบคทีเรียที่คัดเลือกจำนวน 4 ไอโซเลทโดยเปรียบเทียบลำดับเบสของยีน 16S rRNA และการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการพบว่าทุกไอโซเลทอยู่ในจีนัส *Azospirillum* รวมทั้งพบแบคทีเรียชนิดใหม่ คือ *Azospirillum melinis* sp. nov.

มันเทศ

Asis and Adachi (2003) แยกแบคทีเรียเอนโดไฟท์จากลำต้นของมันเทศ โดยใช้อาหาร semi-solid modified Rennie (MR) medium ได้จำนวน 12 ไอโซเลท ซึ่งแบคทีเรียจำนวน 9 ไอโซเลทมีกิจกรรมของเอนไซม์ไนโตรนีเนส และอีก 3 ไอโซเลทไม่มีกิจกรรมของเอนไซม์ดังกล่าว บ่งชนิดของแบคทีเรียโดย API 20E diagnostic kit พบว่าแบคทีเรียที่มีกิจกรรมของเอนไซม์ไนโตรจีเนสอยู่ในจีนัส *Pantoea* spp. และ *Klebsiella* spp. ส่วนแบคทีเรียที่ไม่มีกิจกรรมของเอนไซม์ไนโตรนีเนสอยู่ในจีนัส *Enterobacter* spp. รวมทั้งได้บ่งชนิดของแบคทีเรีย 2 ไอโซเลทที่มีและไม่มีกิจกรรมของเอนไซม์ไนโตรจีเนสโดยเปรียบเทียบลำดับเบสของยีน 16S rRNA พบว่าเป็น *Pantoea agglomerans* ATCC 27155 และ *Enterobacter asburiae* ATCC 35953 ตามลำดับ การศึกษาแบคทีเรียเอนโดไฟท์ในมันเทศของ Khan and Doty (2009) ซึ่งแยกแบคทีเรียได้จำนวน 11 ไอโซเลท และมี 2 ไอโซเลทที่สามารถเจริญบนอาหาร nitrogen-free medium เมื่อ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตรวจสอบโดยวิธี nested PCR พบยีน *nifH* เพียง 1 ไอโซเลท และได้บ่งชนิดโดยเปรียบเทียบลำดับเบสของยีน 16S rRNA ได้เป็น *Stenotrophomonas maltophilia* ซึ่งแบคทีเรียจีนัสนี้มีรายงานว่าพบได้จากดินบริเวณรอบรากพืช (Berg *et al.,* 2005) รวมทั้งเป็นแบคทีเรียเอนโดไฟท์ในเมล็ดกาแฟ (Vega *et al.,* 2005)

กล้วยและสับปะรด

การศึกษาแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนจากกล้วยและสับปะรดซึ่งเป็นพืชที่ปลูกมากในประเทศเขตร้อน Weber *et al.* (1999) แยกแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนจากส่วนราก ลำต้น และใบของกล้วย (*Musa* spp.) รวมทั้งสับปะรด (*Ananas comosus* (L.) Merril) ที่ปลูกในประเทศบราซิล โดยใช้อาหาร semi-specific semi-solid media แบ่งแบคทีเรียที่แยกได้เป็น 7 กลุ่มตามลักษณะทางสัณฐานวิทยาและสรีรวิทยา รวมทั้งความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการโดยอาศัย group- และ species-specific oligonucleotide probe บ่งชนิดของแบคทีเรียที่พบทั้งในกล้วยและสับปะรดได้เป็น *A. amazonense, A. lipoferum, Burkholderia* sp. รวมทั้งกลุ่มที่คล้ายกับแบคทีเรียในจีนัส *Herbaspirillum* แบคทีเรียที่พบเฉพาะในกล้วย ได้แก่ *A. brasilense* และ *H. seropedicae* Cruz *et al*. (2001) แยกแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนจากกล้วยและสับปะรดในส่วนราก ลำต้น และใบ โดยการวิเคราะห์ด้วย 16S rDNA restriction และ 16S rRNA sequence บ่งชนิดของแบคทีเรียได้เป็น *H. seropedicae*, *H. rubrisubalbicans, B. brasilensis* และ *B. tropicalis* รวมทั้งแบคทีเรียที่ใกล้เคียงกับแบคทีเรียในกลุ่ม alpha และ beta proteobacteria จำนวน 8 ชนิด Martinez *et al.* (2003) แยกแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนในกล้วย (*Musa* spp.) ที่ปลูกโดยใช้และไม่ใช้ปุ๋ยเคมีโดยศึกษาจากส่วนราก ลำต้น และใบ แยกแบคทีเรียได้จำนวน 1453 ไอโซเลท ซึ่งแบคทีเรียที่มีกิจกรรมของเอนไซม์ไนโตรจีเนสมีจำนวน 57 ไอโซเลท แบ่งกลุ่มของแบคทีเรียโดย alloenzyme profile การทดสอบทางชีวเคมี 16S rRNA, *rpoB* partial gene sequence และ plasmid profile สามารถบ่งชนิดของแบคทีเรียได้เป็น *E. cloacae*, *Klebsiella* spp. และ *Rhizobium* sp. โดย *Klebsiella* spp. จะแยกได้จากส่วนรากและลำต้นของกล้วยที่ปลูกทั้งในพื้นที่ที่ใช้และไม่ใช้ปุ๋ยเคมี *Rhizobium* sp. แยกได้จากพื้นที่ที่ใช้ปุ๋ยเคมี รวมทั้งได้นำแบคทีเรียในกลุ่ม *Enterobacter cloacae* และ *Rhizobium* sp. ปลูกถ่ายเชื้อให้กับต้นกล้วยอีกครั้งพบว่าช่วยเพิ่มน้ำหนักสดในส่วนลำต้นและใบได้ถึง 60 %

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

กล้วยไม้

เฉลิม (2548) แยกเชื้อแบคทีเรียจากส่วนยอดของกล้วยไม้สกุลหวายโดยใช้อาหาร semi-solid modified Rennie medium จากเชื้อแบคทีเรียสองกลุ่ม คือ กลุ่มที่เจริญได้ในสภาวะที่มีออกซิเจน และกลุ่มที่เจริญได้ในสภาวะไร้ออกซิเจน คัดเลือกแบคทีเรียที่มีกิจกรรมของเอนไซม์ไนโตรจีเนส และบ่งชนิดของแบคทีเรียโดยการเปรียบเทียบลำดับเบสของยีน 16S rDNA พบว่ากลุ่มที่เจริญได้ในสภาวะที่มีออกซิเจนมีสถานะทางอนุกรมวิธานใกล้เคียงกับเชื้อ *Bacillus circulans*, *Microbacterium oleovorans*, *Staphylococcus pasteuri*, *Rhizobium huautlense*, *Alcaligenes faecalis* และ *B. subtilis* และกลุ่มที่เจริญได้ในสภาวะไร้ออกซิแจนมีสถานะทางอนุกรมวิธานใกล้เคียงกับเชื้อ *S. pasteuri* และ *B. fusiformis* วรยุวัน (2549) แยกเชื้อแบคทีเรียจากเนื้อเยื่อส่วนลำลูกกล้วยของกล้วยไม้พันธุ์เอื้องสามสี พบแบคทีเรียมีลักษณะโคโลนีที่แตกต่างกันจำนวน 7 ไอโซเลท โดยแบคทีเรียที่พบส่วนใหญ่ติดสีแกรมลบ รูปแท่งหรือกลม ตรวจสอบความสามารถในการตรึงไนโตรเจนโดยวิธี acetylene reduction assay พบว่าแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนได้ระหว่าง 0.0045 – 6.234 nmol $C_2H_4/10^6$cells/hr รวมทั้งผลิต IAA ได้อยู่ระหว่าง 0.00047 – 0.04509 µmol/10^6cells การบ่งชนิดของแบคทีเรียโดยการเปรียบเทียบลำดับเบสของยีน 16S rDNA พบว่ามีสถานะทางอนุกรมวิธานใกล้เคียงกับ *Methylobacterium fujisawae*, *Friedmanniella spumicola*, *B. subtilis*, *Cellulosimicrobium* sp. ชนิดละ 1 ไอโซเลท และ *Chelatococcus asaccharovorans* จำนวน 3 ไอโซเลท

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved