รายงานฉบับสมบูรณ์

โครงการ

การพัฒนาหัวเชื้อแบคทีเรียผสมเพื่อส่งเสริมการเจริญและการฟื้นตัวของพืชเศรษฐกิจในสภาวะแห้งแล้ง

โดย

รองศาตราจารย์ ดร. เอกวัล ลือพร้อมชัย และคณะ

กันยายน 2560

สัญญาเลขที่ SRI5820206

รายงานฉบับสมบูรณ์

โครงการ

การพัฒนาหัวเชื้อแบคทีเรียผสมเพื่อส่งเสริมการเจริญและการฟื้นตัวของพืชเศรษฐกิจในสภาวะแห้งแล้ง

คณะผู้วิจัย	**สังกัด**
รองศาตราจารย์ ดร. เอกวัล ลือพร้อมชัย	จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ดร. บุญลือ คะเชนทร์ชาติ	มหาวิทยาลัยมหิดล
ดร. รัติยาพร ใจดี	มหาวิทยาลัยราชภัฏเทพสตรี
นางสาวกัลย์สุดา ดวงศรีแก้ว	มหาวิทยาลัยราชภัฏเทพสตรี

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนงานวิจัย

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกว.ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

Executive Summary

1. Details of the project

1.1 Research project

Development of mixed bacterial inoculum for promoting growth and recovery of staple crops under drought condition

1.2 Researcher

Ekawan Luepromchai, Boonlue Kachenchart, Rattiyaporn Jaidee and Kansuda Duangsrikaew

2. Research activity summary

2.1 Rationale

Drought is a major environmental factor that constrains productivity and stability of plants by decrease plant growth and limit crop yields. The drought condition in Thailand is often occurred and led to limited amount of water to use for agricultural management. The development of plant with increase tolerance to drought is necessary. However, the traditional selection methods and genetic engineering require the identification of genetic variability, which take times and cannot meet with the rapidly increasing food demands in the near future. Another major problem is the difficulty in obtaining approvals for field trials of GM plants in Thailand. Rhizosphere bacteria inoculation is an alternative method to enhance drought tolerance in plant. Plant growth promoting rhizobacteria are the soil bacteria living around the root surface. There are directly or indirectly promoting plant growth by inducing the production and secretion of various compounds in the rhizosphere such as nutrients, hormones, enzymes and biofilm. Consequently, the study aimed to identify drought tolerant bacteria with plant growth promoting activities and then develop a mixed bacterial inoculum for promoting growth and recovery of staple crops under drought condition. Rice and fodder corn were used as model for staple crops. The efficiency of bacterial inoculum was tested under laboratory and greenhouse conditions.

2.2 Objectives

1) To screen for drought tolerant bacteria with plant growth promoting properties.
2) To develop a mixed bacterial inoculum for protecting plants from drought stress and for growing in the root zone.
3) To verify the efficiency of mixed bacterial inoculum promoting growth and recovery of staple crops under drought condition.

2.3 Methodology

2.3.1 Screening of drought tolerant bacteria with plant growth promoting properties

Soil samples were collected from the rhizosphere of rice, corn and sugarcane in Lopburi and Roiet provinces. The drought tolerant bacteria were isolated from the ability to cultivate in tryptic soy broth containing 30% and 40% polyethylene glycol 6000 (PEG 6000), which had the osmotic potential of -10.27 and -17.57 MPa, respectively. The drought tolerant bacteria were tested for catalase production, IAA production, phosphate solubilization index, EPS production, ACC deaminase production and surface tension. The bacterial species were identified by 16S rDNA gene sequencing.

2.3.2 Development of a mixed bacterial inoculum for protecting plants from drought stress and for growing in the root zone

Several bacterial isolates were coated on rice and fodder corn seeds before cultured in a hydroponic system to avoid other environmental effects and allow the simulation of drought by lowering water potential by simply adding PEG6000. The drought stress was conducted by transferring the seedlings to 10% PEG6000 for 3 days, 20% PEG6000 for 3 days and 30% PEG6000 for 3 days in Yoshida solution. Finally, the seedlings were transferred to Yoshida solution without PEG6000 for 7 days to study the recovery. The seedlings were measured for shoot and root length, stem circumference, number of root and shoots, and dry weight. Bacterial number on roots were counted on agar plate. The experiments were compared between plants with and without bacteria and under normal and drought conditions.

2.3.3 Verification of the efficiency of mixed bacterial inoculum promoting growth and recovery of staple crops under drought condition.

The rice and fodder corn seeds coated with mixed bacteria were grown in a non-sterilized soil pots. The coating seeds was grown and watered for 25 days before investigating drought stress. In drought treatment pots, the plants were cultured without watering for 11 days and then re-watered to the field capacity. The plant recovery was observed for shoot and root length, stem circumference, number of root and shoots, and dry weight. Bacterial number on roots were counted on agar plate. To increase the bacterial number, the mixed bacteria was applied as liquid inoculum to soil near the plant trunk before the drought stress test. The experiments were compared between plants with and without bacteria and under normal and drought conditions. The final test was carried out in greenhouse with large soil box and tested for drought stress at the plant flowering stage. The plants were later recovered and the yields of rice and fodder corn were monitored.

2.4 Results

This research was begun from the screening of rhizosphere bacteria. There were 112 drought tolerant isolates, of which 78 isolates were from rice, sugarcane and corn rhizosphere soil in Loburi and 34 isolates were from paddy soil in Roi et. From the initial screening, 30 isolates were selected for the bacterial identification and plant growth promoting properties. There were 21 isolates with ACC deaminase. Most of the drought tolerant bacteria had low Phosphate Solubilization Index. Most Gram negative bacteria were able to produce IAA but low exopolysaccharide producing activity. On the other hand, Gram positive bacteria produced low IAA but had high exopolysaccharide producing activity.

The efficiency of drought tolerant bacteria on growth promoting, drought tolerant and recovery of plant seedlings were determined in hydroponic system containing PEG 6000 supplemented nutrients. The plant seedlings from seeds with coated bacteria were stronger than the seeds without. Gram negative bacteria such as *Enterobacter* sp. K1, *Acinetobacter* sp. L9, *Pseudomonas* sp. T8, *Pseudomonas putida* X3 and *Pseudomonas putida* Y9 promoted rice growth in both normal and drought condition. Moreover, the rice seedlings with those bacteria could recovery well after drought. The bacterial efficiency was corresponded to the ability to produce IAA and ACC deaminase. For plant seedlings with Gram positive bacteria, they had slightly better growth in drought condition. The most efficiency bacteria were *Jeotgalicoccus huakuii* RA2, *B. altitudinis* T17 and *B. stratosphericus* L19. The results with corn seedlings showed the same trend of bacterial efficiency.

The following experiment examined the mixture of bacterial inoculum including 3 Gram positive bacteria and 3 Gram positive bacteria as follows; *Bacillus stratosphericus* L19, *Bacillus pumilus* T1, *Bacillus altitudinis* T17, *Acinetobacter* sp. L9, *Pseudomonas* sp. T8 and *Pseudomonas* sp. X3 in soil pots. The results showed that the bacterial inoculum enhanced the growth and recovery of rice in soil after stop watering. The dominant bacterial populations in rhizosphere soil were corresponded with the bacterial types in the inoculum. The results indicated that the bacteria on coated seeds could grow in rhizosphere soil after the seed germination and survive in both normal and drought conditions. Moreover, the bacterial inoculum slightly promoted its growth and recovery of fodder corn. The efficiency of bacterial inoculum in the greenhouse experiment was not clear. This was probably due to the effect of environmental conditions as well as the changes of bacterial strains in the mixed bacterial inoculum. Due to the new regulation of pathogen classification in Thailand, the efficient bacteria from previous experiment were in the genus of potential pathogens so we could not used it in open field.

2.5 Conclusions and recommendations

The overall results indicated that the drought tolerant bacteria from rhizosphere soil had different plant growth promoting activities. Consequently, the screening for efficient bacteria should be made. In addition, the application of bacterial inoculum was suitable for drought sensitive plants such as rice more than fodder corn, which is a natural drought tolerant plant.

Abstract

Development of mixed bacterial inoculum for promoting growth and recovery of staple crops under drought condition

This research was begun from the screening of rhizosphere bacteria. There were 112 drought tolerant isolates, of which 78 isolates were from rice, sugarcane and corn rhizosphere soil in Loburi and 34 isolates were from paddy soil in Roi et. From the initial screening, 30 isolates were selected for the bacterial identification and plant growth promoting properties. There were 21 isolates with ACC deaminase. Most of the drought tolerant bacteria had low Phosphate Solubilization Index. Most Gram negative bacteria were able to produce IAA but low exopolysaccharide producing activity. On the other hand, Gram positive bacteria produced low IAA but had high exopolysaccharide producing activity. The efficiency of drought tolerant bacteria on growth promoting, drought tolerant and recovery of plant seedlings were determined in hydroponic system containing PEG 6000 supplemented nutrients. The plant seedlings from seeds with coated bacteria were stronger than the seeds without. Gram negative bacteria such as *Enterobacter* sp. K1, *Acinetobacter* sp. L9, *Pseudomonas* sp. T8, *Pseudomonas putida* X3 and *Pseudomonas putida* Y9 promoted rice growth in both normal and drought condition. Moreover, the rice seedlings with those bacteria could recovery well after drought. The bacterial efficiency was corresponded to the ability to produce IAA and ACC deaminase. For plant seedlings with Gram positive bacteria, they had slightly better growth in drought condition. The most efficiency bacteria were *Jeotgalicoccus huakuii* RA2, *B. altitudinis* T17 and *B. stratosphericus* L19. The results with corn seedlings showed the same trend of bacterial efficiency.

The following experiment examined the mixture of bacterial inoculum including 3 Gram positive bacteria and 3 Gram positive bacteria as follows; *Bacillus stratosphericus* L19, *Bacillus pumilus* T1, *Bacillus altitudinis* T17, *Acinetobacter* sp. L9, *Pseudomonas* sp. T8 and *Pseudomonas* sp. X3 in soil pots. The results showed that the bacterial inoculum enhanced the growth and recovery of rice in soil after stop watering. The dominant bacterial populations in rhizosphere soil were corresponded with the bacterial types in the inoculum. The results indicated that the bacteria on coated seeds could grow in rhizosphere soil after the seed germination and survive in both normal and drought conditions. Moreover, the bacterial inoculum slightly promoted its growth and recovery of fodder corn. The efficiency of bacterial inoculum in the greenhouse experiment was not clear. This was probably due to the effect of environmental conditions as well as the changes of bacterial strains in the mixed bacterial inoculum. The overall results indicated that the drought tolerant bacteria from rhizosphere soil had different plant growth promoting activities. Consequently, the screening for efficient bacteria should be made. In addition, the application of bacterial inoculum was suitable for drought sensitive plants such as rice more than fodder corn, which is a natural drought tolerant plant.

บทคัดย่อ

การพัฒนาหัวเชื้อแบคทีเรียผสมเพื่อส่งเสริมการเจริญและการฟื้นตัว ของพืชเศรษฐกิจในสภาวะแห้งแล้ง

งานวิจัยนี้เริ่มจากการคัดกรองแบคทีเรียซึ่งคัดแยกจากดินบริเวณรากพืช โดยได้คัดแยกแบคทีเรียทนแล้งรวมทั้งสิ้น 112 ไอโซเลต โดยเป็นแบคทีเรียจากดินรากข้าว อ้อย และข้าวโพด ในจังหวัดลพบุรี จำนวน 78 ไอโซเลต และจากดินนาข้าวจังหวัดร้อยเอ็ด จำนวน 34 ไอโซเลต หลังจากการศึกษาสมบัติเบื้องต้น ได้เลือกแบคทีเรีย 30 ไอโซเลท มาวิเคราะห์ชนิด และทดสอบสมบัติที่เกี่ยวข้องกับการส่งเสริมการเจริญของพืชเพิ่มเติม พบว่ามีแบคทีเรียจำนวน 21 ไอโซเลต ที่ผลิตเอนไซม์ ACC deaminase ได้ แบคทีเรียทนแล้งที่คัดแยกได้มีค่า Phosphate Solubilization Index ต่ำ ส่วนการผลิต IAA พบว่าแบคทีเรียแกรมลบส่วนใหญ่ผลิต IAA ได้ดี แต่ผลิต Exopolysaccharide ได้ต่ำ ในขณะที่แบคทีเรียแกรมบวกผลิต IAA ได้ต่ำ แต่ผลิต Exopolysaccharide ได้ การทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียทนแล้งไอโซเลทต่างๆ ต่อการส่งเสริมการเจริญ การทนแล้ง และการฟื้นตัวของต้นพืชในระยะต้นกล้า ทำโดยจำลองสภาวะแล้งในระบบไฮโดรโปนิกส์ (Hydroponics) ที่ปลูกพืชโดยใช้อาหารที่ผสม PEG 6000 พบว่าต้นกล้าที่ปลูกจากเมล็ดที่เคลือบแบคทีเรียมีลักษณะแข็งแรงกว่าเมล็ดที่ไม่เคลือบเชื้อ ทั้งนี้แบคทีเรียแกรมลบ เช่น *Enterobacter* sp. K1, *Acinetobacter* sp. L9, *Pseudomonas* sp. T8, *Pseudomonas putida* X3 และ *Pseudomonas putida* Y9 ช่วยส่งเสริมการเจริญของต้นกล้าข้าวทั้งเมื่ออยู่ในสภาวะปกติและสภาวะแล้ง ต้นกล้าข้าวที่มีแบคทีเรียดังกล่าว ยังสามารถฟื้นตัวภายหลังสภาวะแล้งได้ดี ทั้งนี้ประสิทธิภาพของแบคทีเรียเหล่านี้สอดคล้องกับความสามารถในการผลิตฮอร์โมน IAA และ ผลิตเอนไซม์ ACC deaminase ส่วนต้นกล้าจากเมล็ดข้าวที่เคลือบด้วยแบคทีเรียแกรมบวกในสภาวะแล้ง พบว่ามีการเจริญดีขึ้นเล็กน้อย โดยแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพสูงได้แก่ *Jeotgalicoccus huakuii* RA2, *B. altitudinis* T17 และ *B. stratosphericus* L19 การทดสอบประสิทธิภาพของหัวเชื้อแบคทีเรียกับต้นกล้าข้าวโพดให้ผลไปในทางเดียวกัน

ต่อมาได้นำหัวเชื้อแบคทีเรียผสมที่ประกอบด้วยแบคทีเรียแกรมบวก 3 ชนิด และแบคทีเรียแกรมลบ 3 ชนิด คือ *Bacillus stratosphericus* L19, *Bacillus pumilus* T1, *Bacillus altitudinis* T17, *Acinetobacter* sp. L9, *Pseudomonas* sp. T8 และ *Pseudomonas* sp. X3 ไปทดสอบประสิทธิภาพต่อพืชที่ปลูกในดินจริงระดับกระถาง พบว่าหัวเชื้อแบคทีเรียช่วยส่งเสริมการเจริญและการฟื้นตัวของข้าวในดินภายหลังการงดให้น้ำ การศึกษาชนิดของประชากรเด่นในดินบริเวณรากพืชพบว่าสอดคล้องกับประชากรในหัวเชื้อแบคทีเรียแบบผสม แสดงว่ากลุ่มแบคทีเรียที่เคลือบเมล็ดข้าวสามารถเจริญในดินรอบรากข้าวภายหลังการงอกของเมล็ดได้ และยังมีชีวิตอยู่ได้ทั้งในสภาวะมีน้ำปกติและสภาวะแล้ง นอกจากนี้พบว่าข้าวโพดเลี้ยงสัตว์หัวเชื้อแบคทีเรียช่วยส่งเสริมการเจริญและการฟื้นตัวของข้าวโพดในดินได้เล็กน้อย สำหรับการทดสอบในระดับโรงเรือนนั้น ไม่เห็นประสิทธิภาพของหัวเชื้อแบคทีเรียที่ชัดเจน ซึ่งอาจจะมาจากผลของสภาพแวดล้อมและการเปลี่ยนชนิดของแบคทีเรียที่ใช้เป็นหัวเชื้อผสม ผลการศึกษาทั้งหมดแสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียทนแล้งที่คัดแยกจากดินบริเวณรากของพืช มีสมบัติในการส่งเสริมการเจริญของพืชแตกต่างกัน จึงจำเป็นต้องคัดกรองเฉพาะแบคทีเรียทนแล้งที่มีคุณสมบัติการผลิตสารส่งเสริมการเจริญของพืชสูงมาใช้ประโยชน์ต่อไป อย่างไรก็ดีการเติมหัวเชื้อแบคทีเรียจะเหมาะสำหรับพืชที่ไวต่อสภาวะแล้ง เช่น ข้าว มากกว่าข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ที่ทนสภาวะแล้งได้ดี

สารบัญ

Executive Summary ..... ข

Abstract ..... จ

บทคัดย่อ ..... ฉ

บทที่ 1 1

บทนำ 1

1.1 ความสำคัญ และที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย 1

1.2 วัตถุประสงค์ 3

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย 4

1.4 ประโยชน์ที่ได้รับ 6

1.5 ผู้มีส่วนได้ส่วนเสีย (Stakeholders) 6

บทที่ 2

ทบทวนวรรณกรรม 7

2.1 กลไกการทนแล้งของพืช 7

2.2 แบคทีเรียส่งเสริมการเจริญของพืช 9

2.3 การคัดแยกแบคทีเรียทนแล้งบริเวณรากพืชที่ช่วยส่งเสริมการเจริญของพืช 14

2.4 การผลิตหัวเชื้อแบคทีเรียเพื่อใช้ส่งเสริมการเจริญของพืช 16

2.5 ปัญหาภัยแล้งต่อการเพาะปลูกข้าวและข้าวโพดในประเทศไทย 19

2.6 ตัวอย่างงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 20

บทที่ 3 24

การคัดกรองแบคทีเรียทนแล้งที่มีสมบัติในการส่งเสริมการเจริญของพืช 24

บทนำ 24

ระเบียบวิธีวิจัย 25

3.1 การคัดแยกแบคทีเรียทนแล้งสายพันธุ์ต่าง ๆ จากดินบริเวณรากพืช 25

3.2 การทดสอบคุณสมบัติการผลิตสารส่งเสริมการเจริญของพืชจากแบคทีเรียทนแล้ง 28

ผลการทดลอง 32

3.1 การคัดแยกแบคทีเรียทนแล้งสายพันธุ์ต่าง ๆ จากดินบริเวณรากพืช 32

3.2 การทดสอบคุณสมบัติการทนเกลือ และอุณหภูมิสูงของแบคทีเรียทนแล้งที่คัดเลือก 53
บทที่ 4 57
การพัฒนาหัวเชื้อแบคทีเรียผสมที่มีประสิทธิภาพในการปกป้องพืช 57
เมื่ออยู่ในสภาวะแล้ง และสามารถอาศัยบริเวณรากพืช 57
บทนำ 57
ระเบียบวิธีวิจัย 58
4.1 การทดสอบประสิทธิภาพเบื้องต้นของแบคทีเรียทนแล้งแบบหัวเชื้อเดี่ยวต่อการปกป้องต้นข้าวหอมมะลิ 105 เมื่ออยู่ในสภาวะแล้ง 58
4.2 การทดสอบประสิทธิภาพของหัวเชื้อแบคทีเรียทนแล้งแบบหัวเชื้อเดี่ยวและหัวเชื้อผสมต่อการปกป้องและการฟื้นตัวของต้นข้าว 2 สายพันธุ์ ในระยะต้นกล้า เมื่ออยู่ในสภาวะแล้ง 59
4.3 การทดสอบประสิทธิภาพของหัวเชื้อแบคทีเรียทนแล้งแบบหัวเชื้อเดี่ยวและหัวเชื้อผสมต่อการปกป้องและการฟื้นตัวของต้นข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ในระยะต้นกล้า เมื่ออยู่ในสภาวะแล้ง 60
ผลการทดลอง 62
4.1 การทดสอบประสิทธิภาพเบื้องต้นของแบคทีเรียทนแล้งแบบหัวเชื้อเดี่ยวต่อการปกป้องต้นข้าวหอมมะลิ 105 เมื่ออยู่ในสภาวะแล้ง 62
4.2 การทดสอบประสิทธิภาพของหัวเชื้อแบคทีเรียทนแล้งแบบหัวเชื้อเดี่ยวและหัวเชื้อผสมต่อการปกป้องและการฟื้นตัวของต้นข้าว 2 สายพันธุ์ ในระยะต้นกล้า เมื่ออยู่ในสภาวะแล้ง 70
4.3 การทดสอบประสิทธิภาพของหัวเชื้อแบคทีเรียทนแล้งแบบหัวเชื้อเดี่ยวและหัวเชื้อผสมต่อการปกป้องและการฟื้นตัวของต้นข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ในระยะต้นกล้า เมื่ออยู่ในสภาวะแล้ง 83
บทที่ 5 88
การทดสอบประสิทธิภาพของหัวเชื้อแบคทีเรียผสมในการส่งเสริมการเจริญและการฟื้นตัวของพืชเศรษฐกิจในสภาวะแห้งแล้ง 88
บทนำ 88
ระเบียบวิธีวิจัย 90
5.1 ประสิทธิภาพเบื้องต้นของหัวเชื้อแบคทีเรียแบบผสมต่อพืชในระยะต้นกล้าในระดับกระถาง 90
5.2 การทดสอบประสิทธิภาพของหัวเชื้อแบคทีเรียแบบผสมต่อการเจริญและการฟื้นตัวของพืชจนถึงระยะเก็บเกี่ยว ในระดับเรือนทดลอง 92
ผลการทดลอง 98
5.1 ประสิทธิภาพเบื้องต้นของหัวเชื้อแบคทีเรียแบบผสมต่อพืชในระยะต้นกล้าในระดับกระถาง 98
5.2 ประสิทธิภาพของหัวเชื้อแบคทีเรียแบบผสมต่อการเจริญและการฟื้นตัวของพืชจนถึงระยะเก็บเกี่ยวในระดับเรือนทดลอง 114
บทที่ 6 133

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ 133
6.1 สรุปผลการทดลอง 133
6.2 ข้อเสนอแนะ 135
เอกสารอ้างอิง 137
ภาคผนวก 146
ภาคผนวก ก. 147
ภาคผนวก ข. 156
ภาคผนวก ค. 161
ภาคผนวก ง. 162
ภาคผนวก จ 166

สารบัญรูป

รูปที่ 2.1 การเจริญเติบโตของพืชในสภาวะปกติและสภาวะเครียด (ดัดแปลงจาก Glick และคณะ, 2007) 8
รูปที่ 2.2 กลไกของพืชในการตอบสนองต่อสภาวะเครียด (Zingaretti และคณะ, 2013) 9
รูปที่ 2.3 แผนผังอธิบายการผลิตเอนไซม์ ACC deaminase ของแบคทีเรีย เพื่อลดระดับเอธิลีนในพืช (Glick และคณะ, 1999) 11
รูปที่ 2.4 กลไกกระตุ้นการทนแล้งของพืชโดยแบคทีเรียบริเวณรากที่ช่วยส่งเสริมการเจริญของพืช (Vurukonda และคณะ, 2016) 14
รูปที่ 2.5 บทบาทของแบคทีเรียในดินต่อการตอบสนองต่อสภาวะเครียดในพืช (Coleman-Derr และ Tringe, 2014) 16
รูปที่ 2.6 วิธีการเตรียมเมล็ดพันธุ์เคลือบหัวเชื้อแบคทีเรีย (Bashan และคณะ, 2014) 17
รูปที่ 2.7 ขั้นตอนการพัฒนาผลิตภัณฑ์หัวเชื้อแบคทีเรียสำหรับใช้ในการเกษตร (Bashan และคณะ, 2014) 18
รูปที่ 2.8 ปริมาณน้ำฝนรายปี พ.ศ. 2550-2559 (กรมอุตุนิยมวิทยา, 2559) 19
รูปที่ 3.1 ตัวอย่างข้าวจากจังหวัดร้อยเอ็ด ได้แก่ ข้าวเหนียว กข 6 (ก), ข้าวหอมมะลิ 105 (ข) ที่เก็บในเดือน 26
รูปที่ 3.2 ตัวอย่างอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA ที่มีแบคทีเรียหลายชนิด ซึ่งได้จากการนำตัวอย่างรากข้าวมาบ่มในอาหารเหลว TSB ที่เติม PEG6000 เพื่อเพิ่มจำนวนแบคทีเรียทนแล้ง (วิธี Enrichment) 27
รูปที่ 3.3 ลักษณะของโคโลนีและการเกิดโซนใสของแบคทีเรียย่อยฟอสเฟต บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PKV 28
รูปที่ 3.4 กราฟมาตรฐาน IAA 29
รูปที่ 3.5 ลักษณะของสีแดงที่เกิดขึ้นจากการผลิตฮอร์โมน IAA ของเชื้อแบคทีเรีย 29
รูปที่ 3.6 การเกิดฟองก๊าซจากเอนไซม์คะตาเลซของแบคทีเรียต่อไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 29
รูปที่ 3.7 ตัวอย่างการทดสอบการเป็นปฏิปักษ์ของแบคทีเรีย 5 ชนิด บนอาหารแข็ง โดย ก. ไม่พบการเป็นปฏิปักษ์กันเลย และ ข. แสดงโซนยับยั้งจากแบคทีเรียที่ขีดเป็นแนวตั้ง (เส้นขวาสุด) ต่อแบคทีเรียที่ขีดเป็นแนวขวาง 31
รูปที่ 3.8 ความสามารถในการผลิตสารส่งเสริมการเจริญของพืช (ก) ฮอร์โมน IAA และ (ข) ดัชนีการละลายฟอสเฟต จากแบคทีเรียทนแล้ง 30 สายพันธุ์ 51
รูปที่ 3.9 ความสามารถในการผลิตสารช่วยในการทนแล้งของพืช (ก) การผลิต Exopolysaccharide และ 52
รูปที่ 3.10 ตัวอย่างการเจริญของแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์หลังจากเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB ที่มีเกลือความเข้มข้นต่างๆ 55
รูปที่ 4.1 การเจริญของเมล็ดข้าวหอมมะลิ 105 อายุ 7 วัน เมื่ออยู่ในสภาวะแห้งแล้ง 62
รูปที่ 4.2 การงอกของเมล็ดข้าวบนอาหาร MS medium ที่เติมและไม่เติม PEG 6000 63
รูปที่ 4.3 ตัวอย่างต้นกล้าข้าวที่ปลูกจากเมล็ดพันธุ์ที่เคลือบและไม่เคลือบแบคทีเรีย ก่อนจะนำมาทดสอบการทนแล้ง (วันที่ 14) 64
รูปที่ 4.4 การเจริญของต้นข้าวที่ปลูกจากเมล็ดพันธุ์ไม่เคลือบเชื้อในสภาวะปกติ ของวันที่ 14 (ซ้าย) และวันที่ 26 (ขวา) (Normal) (a) และต้นข้าวที่ปลูกจากเมล็ดพันธุ์ไม่เคลือบเชื้อในระยะก่อนสภาวะแล้ง ของวันที่ 14 (ซ้าย) กับหลังสภาวะแล้ง (ขวา) วันที่ 26 (Drought) (b) 65
รูปที่ 4.5 การเจริญของต้นข้าวที่ปลูกจากเมล็ดพันธุ์เคลือบแบคทีเรียชนิดต่างๆ ในระยะก่อนสภาวะแล้ง (ซ้าย) กับหลังสภาวะแล้งที่ใช้อาหารผสม PEG6000 10% วันที่ 26 (ขวา) 68

รูปที่ 4.6 ความยาวของยอดและรากต้นข้าวที่ปลูกจากเมล็ดพันธุ์เคลือบแบคทีเรียเมื่อเริ่มสภาวะแล้ง (วันที่ 14) หลังสภาวะแล้งที่ใช้อาหารผสม PEG6000 10% (วันที่ 26) 68
รูปที่ 4.7 ตัวอย่างการเกิด Biofilm ของแบคทีเรียบางชนิดบนผิวรากต้นข้าวที่ปลูกในอาหาร Yoshida + 10% PEG6000 69
รูปที่ 4.8 แบคทีเรียบนผิวรากของต้นข้าวที่เคลือบเมล็ดด้วยแบคทีเรีย T8 69
รูปที่ 4.9 ความยาวยอด ความยาวราก ความยาวรอบลำต้น และ น้ำหนักแห้งเฉลี่ยของต้นข้าว ในวันที่ 30 ของต้นข้าวที่เติมหัวเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ โดยชุด C คือต้นข้าวที่ไม่เติมแบคทีเรีย 73
รูปที่ 4.10 ความยาวยอด ความยาวราก ความยาวรอบลำต้น และ น้ำหนักแห้งเฉลี่ยของต้นข้าว ในวันที่ 33 ของต้นข้าวที่เติมหัวเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกทั้งแบบเดี่ยวและแบบผสม โดยชุด C คือต้นข้าวที่ไม่เติมแบคทีเรีย 77
รูปที่ 4.11 การเพาะต้นกล้าข้าวโพด และการทดสอบในสภาวะแห้งแล้ง 83
รูปที่ 4.12 การเปลี่ยนแปลงของต้นข้าวโพดที่เติมแบคทีเรียแกรมลบแบบเดี่ยวและแบบผสม โดยชุด NC และ DC คือต้นข้าวโพดที่ไม่เติมแบคทีเรีย ที่ปลูกในสภาวะปกติและสภาวะแล้งตามลำดับ ส่วน X4, X5 และ Mix หมายถึง ต้นข้าวโพดจากเมล็ดพันธุ์ที่เคลือบแบคทีเรียแบบเดี่ยวชนิด X4 และ X5 และแบคทีเรียผสม ตามลำดับ โดยทั้งหมดปลูกในสภาวะแล้ง 85
รูปที่ 5.1 ความยาวยอด ความยาวราก ความยาวรอบลำต้น และ น้ำหนักแห้ง ของต้นข้าวหอมมะลิ 105 ที่ไม่เติมและเติมหัวเชื้อแบคทีเรียผสม ในสภาวะการปลูกแบบปกติ และสภาวะแล้ง โดยที่อายุข้าว 42 วัน หมายถึง ข้าวในสภาวะฟื้นตัว หลังจากทิ้งไว้ไม่ให้น้ำ 11 วัน แล้วให้น้ำต่ออีก 7 วัน 101
รูปที่ 5.2 จำนวนราก จำนวนใบ ความกว้างใบ และ น้ำหนักรากของต้นข้าวหอมมะลิ 105 ที่ไม่เติมและเติมหัวเชื้อแบคทีเรียผสม ในสภาวะการปลูกแบบปกติ และสภาวะแล้ง โดยที่อายุข้าว 42 วัน หมายถึง ข้าวในสภาวะฟื้นตัว หลังจากทิ้งไว้ไม่ให้น้ำ 11 วัน แล้วให้น้ำต่ออีก 7 วัน 102
รูปที่ 5.3 ความยาวของต้นข้าวโพดวันที่ 42 ซึ่งผ่านสภาวะแล้งและอยู่ในระยะฟื้นตัว 106
รูปที่ 5.4 ความยาวยอด ความยาวราก ความยาวรอบลำต้น และ น้ำหนักแห้ง ของต้นข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ที่ไม่เติมและเติมหัวเชื้อแบคทีเรียผสม ในสภาวะการปลูกแบบปกติ และสภาวะแล้ง โดยที่อายุข้าวโพด 42 วัน หมายถึง ข้าวโพดในสภาวะฟื้นตัว หลังจากทิ้งไว้ไม่ให้น้ำ 11 วัน แล้วให้น้ำต่ออีก 7 วัน 107
รูปที่ 5.5 ค่าแรงดึงความชื้นในดินเทียบกับค่าที่อ่านได้จากเครื่องมือวัดความชื้น (ที่มา: KS-D1 manual, Delmhorst) 112
รูปที่ 5.6 ลักษณะของดินในกระถางของชุดทดลองภายใต้สภาวะแล้งของ ข้าวหอมมะลิ 105 (ซ้าย) และข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ (ขวา) 113
รูปที่ 5.7 ผลผลิตและความสูงของต้นข้าวพันธุ์ กข 47 อายุ 109 วันที่ปลูกในเรือนทดลอง 120
รูปที่ 5.8 ลักษณะเมล็ดข้าวเมื่อสิ้นสุดการทดลอง 121
รูปที่ 5.9 ค่าการคายระเหยน้ำ (Evapotranspiration ; ET) ของต้นข้าวพันธุ์ กข 47 ที่ปลูกในเรือนทดลอง 122
รูปที่ 5.10 ผลผลิตและความสูงของต้นข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ อายุ 109 วันที่ปลูกในเรือนทดลอง 129
รูปที่ 5.11 ค่าการคายระเหยน้ำ (Evapotranspiration ; ET) ของต้นข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ พันธุ์แปซิฟิก 339 ที่ปลูกในเรือนทดลอง 131
รูปที่ 5.12 อุณหภูมิสูงสุดที่วัดได้ภายในเรือนทดลองในแต่ละวัน 132

สารบัญตาราง

ตารางที่ 2.1 เปรียบเทียบชนิดของแบคทีเรีย ปริมาณฮอร์โมนและสารส่งเสริมการเจริญของพืช 12
ตารางที่ 2.2 ตัวอย่างวิธีการคัดแยกแบคทีเรียทนแล้ง 15
ตารางที่ 3.1 ตำแหน่งที่เก็บตัวอย่างดินสำหรับคัดแยกแบคทีเรียทนแล้งในจังหวัดลพบุรี 26
ตารางที่ 3.2 ตัวอย่างรากพืชจากจังหวัดลพบุรี และการคัดแยกแบคทีเรียทนแล้ง 26
ตารางที่ 3.3 คุณลักษณะเบื้องต้นของแบคทีเรียในอาณาเขตรากของพืชที่คัดแยกได้จากจังหวัดลพบุรี 33
ตารางที่ 3.4 คุณลักษณะเบื้องต้นของแบคทีเรียในอาณาเขตรากของพืชที่คัดแยกได้จากจังหวัดร้อยเอ็ด 42
ตารางที่ 3.5 ชนิดของแบคทีเรียทนแล้งและคุณสมบัติของแบคทีเรียที่คัดเลือกมา 30 ชนิด 46
ตารางที่ 3.6 การทนเกลือของแบคทีเรียแกรมลบที่คัดเลือกในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA เติม NaCl 53
ตารางที่ 3.7 การเจริญของแบคทีเรียแกรมบวกที่คัดเลือกในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB และ TSB + 30%PEG 6000 ที่ความเข้มข้นเกลือต่าง ๆ 54
ตารางที่ 3.8 การเจริญของเชื้อแบคทีเรียที่คัดแยกได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB และ TSB + 30%PEG 6000 ที่อุณหภูมิต่าง ๆ 56
ตารางที่ 4.1 ลักษณะของต้นกล้าข้าวที่ปลูกจากเมล็ดพันธุ์ที่เคลือบและไม่เคลือบแบคทีเรียก่อนนำมาทดสอบการทนแล้ง (วันที่ 14) 65
ตารางที่ 4.2 ลักษณะของต้นข้าวที่ปลูกจากเมล็ดพันธุ์เคลือบแบคทีเรียหลังสภาวะแล้งที่ใช้อาหารผสม PEG6000 10% (วันที่ 26) 66
ตารางที่ 4.3 การเปลี่ยนแปลงของต้นข้าวที่เติมหัวเชื้อแบคทีเรียแกรมลบแบบเดี่ยว 71
ตารางที่ 4.4 ค่าเฉลี่ยจำนวนใบและจำนวนรากของต้นข้าวที่เติมหัวเชื้อแบคทีเรียแกรมลบเมื่อปลูกสภาวะปกติและสภาวะแล้ง 72
ตารางที่ 4.5 จำนวนแบคทีเรียบริเวณรากต้นข้าว ภายหลังการปลูกเป็นเวลา 30 วัน 75
ตารางที่ 4.6 จำนวนแบคทีเรียทั้งหมดที่ได้จากบริเวณรากข้าวอายุ 33 วัน โดยวิธี Plate count บนอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA 79
ตารางที่ 4.7 จำนวนใบ จำนวนราก และน้ำหนักแห้ง ของต้นข้าวที่เคลือบเมล็ดด้วยหัวเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกที่ปลูกในสภาวะปกติและสภาวะแล้ง 80
ตารางที่ 4.8 การเปลี่ยนแปลงของต้นข้าวที่เคลือบเมล็ดด้วยหัวเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกระหว่างการทดลอง 81
ตารางที่ 4.9 การเจริญของต้นกล้าข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ อายุ 10 วัน ก่อนทดสอบสภาวะแล้ง 84
ตารางที่ 4.10 จำนวนใบและจำนวนรากของต้นข้าวโพดที่เติมแบคทีเรียแกรมลบแบบเดี่ยว และแบบผสม และจำนวนโคโลนีของเชื้อบริเวณรากต้นข้าวโพด ภายหลังการปลูกเป็นเวลา 30 วัน 86
ตารางที่ 4.11 การเปลี่ยนแปลงของต้นข้าวโพดที่เติมแบคทีเรียแกรมลบ แบบเดี่ยว และแบบผสม 87
ตารางที่ 5.1 สมบัติของดินนาจาก ต.โพตลาดแก้ว อ.ท่าวุ้ง จ.ลพบุรี 94
ตารางที่ 5.2 สมบัติของดินสำหรับปลูกข้าวโพด จาก ต. ตำบลโคกตูม อ.เมือง จ.ลพบุรี 95
ตารางที่ 5.3 ลักษณะของต้นกล้าข้าวกข 47 ที่เตรียมจากเมล็ดพันธุ์ที่เคลือบหัวเชื้อแบคทีเรียผสม (Mix) และที่ไม่มีแบคทีเรีย (Control) ในการทดลองระดับกระถาง 99
ตารางที่ 5.4 ลักษณะของต้นข้าวกข 47 ที่เตรียมจากเมล็ดพันธุ์ที่เคลือบหัวเชื้อแบคทีเรียผสม (Mix) และที่ไม่มีแบคทีเรีย (Control) เมื่อปลูกในสภาวะปกติและสภาวะแล้ง ในการทดลองระดับกระถาง 99

ตารางที่ 5.5 ลักษณะของต้นกล้าข้าวโพดที่เตรียมจากเมล็ดพันธุ์ที่เคลือบหัวเชื้อแบคทีเรียผสม (Mix) และที่ไม่มีแบคทีเรีย (Control) ในการทดลองระดับกระถาง 104
ตารางที่ 5.6 ลักษณะของต้นข้าวโพดที่เตรียมจากเมล็ดพันธุ์ที่เคลือบหัวเชื้อแบคทีเรียผสม (Mix) และที่ไม่มีแบคทีเรีย (Control) เมื่อปลูกในสภาวะปกติและสภาวะแล้ง ในการทดลองระดับกระถาง 105
ตารางที่ 5.7 จำนวนราก จำนวนใบ ความกว้างของใบ และความยาวรอบลำต้น ของต้นข้าวโพดภายหลังสภาวะแล้ง (วันที่ 42) 108
ตารางที่ 5.8 จำนวนแบคทีเรียทั้งหมดที่ได้จากบริเวณรากพืชโดยวิธี Plate count บนอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA 109

ตารางที่ 5.9 สัดส่วนของประชากรแบคทีเรียกลุ่มเด่นในดินรอบรากของต้นข้าวเมื่อสิ้นสุดการทดลอง และในดินก่อนนำมาปลูกข้าว 110
ตารางที่ 5.10 สัดส่วนของประชากรแบคทีเรียกลุ่มเด่นในดินรอบรากของต้นข้าวโพดเมื่อสิ้นสุดการทดลอง และในดินก่อนนำมาปลูกข้าวโพด 111
ตารางที่ 5.11 ค่าความชื้นในดินของข้าวหอมมะลิ 105 และข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ ในสภาวะแล้ง 113
ตารางที่ 5.12 ลักษณะของต้นกล้าข้าวกข 47 ที่เตรียมจากเมล็ดพันธุ์ที่เคลือบหัวเชื้อแบคทีเรียผสม (Mix) และที่ไม่มีแบคทีเรีย (Control) 115
ตารางที่ 5.13 ลักษณะของต้นข้าวกข 47 ที่เตรียมจากเมล็ดพันธุ์ที่เคลือบหัวเชื้อแบคทีเรียผสม (Mix) และที่ไม่มีแบคทีเรีย (Control) เมื่อปลูกในสภาวะให้น้ำปกติ 116
ตารางที่ 5.14 ลักษณะของต้นข้าวกข 47 ที่เตรียมจากเมล็ดพันธุ์ที่เคลือบหัวเชื้อแบคทีเรียผสม (Mix) และที่ไม่มีแบคทีเรีย (Control) เมื่อใกล้ระยะออกดอกจนถึงระยะเก็บเกี่ยวในสภาวะให้น้ำปกติ เปรียบเทียบกับสภาวะแล้ง 117
ตารางที่ 5.15 จำนวนแบคทีเรียที่รากข้าวและน้ำหนักแห้งของผลผลิตเมื่อสิ้นสุดการทดลอง 120
ตารางที่ 5.16 ลักษณะของต้นกล้าข้าวโพดที่เตรียมจากเมล็ดพันธุ์ที่เคลือบหัวเชื้อแบคทีเรียผสม (Mix) และที่ไม่มีแบคทีเรีย (Control) 124
ตารางที่ 5.17 ลักษณะของต้นข้าวโพดที่เตรียมจากเมล็ดพันธุ์ที่เคลือบหัวเชื้อแบคทีเรียผสม (Mix) และที่ไม่มีแบคทีเรีย (Control) เมื่อปลูกในสภาวะให้น้ำปกติ 125
ตารางที่ 5.18 ลักษณะของต้นข้าวโพดที่เตรียมจากเมล็ดพันธุ์ที่เคลือบหัวเชื้อแบคทีเรียผสม (Mix) และที่ไม่มีแบคทีเรีย (Control) เมื่อใกล้ระยะออกดอกจนถึงระยะเก็บเกี่ยวในสภาวะให้น้ำปกติ เปรียบเทียบกับสภาวะแล้ง 126
ตารางที่ 5.19 จำนวนแบคทีเรียที่รากข้าวโพดและน้ำหนักแห้งของผลผลิตเมื่อสิ้นสุดการทดลอง 130
ตารางที่ 5.20 ลักษณะของฝักข้าวโพดเมื่อสิ้นสุดการทดลอง 130

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความสำคัญ และที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

ประเทศไทยบริเวณ ภาคเหนือ ภาคกลาง ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ภาคตะวันตก และทางตอนเหนือของภาคตะวันออก มีลักษณะภูมิอากาศแบบร้อนชื้น (tropical rainy climates) แบบทุ่งหญ้าเมืองร้อน (savanna climate) ซึ่งมีฝนตกปานกลาง ฤดูแล้งยาวนาน ฤดูฝนสั้น ฝนตกน้อยกว่า 60 มิลลิเมตรต่อเดือน พืชพรรณธรรมชาติเป็นทุ่งหญ้าสลับป่าไม้ ซึ่งพื้นที่ดังกล่าวจะประสบกับความแห้งแล้งซึ่งเป็นปรากฏการณ์ธรรมชาติที่เกิดขึ้นเป็นปรกติ อย่างไรก็ดีพื้นที่แล้งซ้ำซากมีแนวโน้มจะทวีความรุนแรงมากขึ้น เนื่องจากการเปลี่ยนแปลงทางสภาพภูมิอากาศ ปัญหานี้ในปัจจุบันจึงเรียกว่าภัยแล้ง ซึ่งหมายถึง ภัยที่เกิดจากการขาดแคลนน้ำในพื้นที่ใดพื้นที่หนึ่งเป็นเวลานาน ก่อให้เกิดความแห้งแล้ง และส่งผลกระทบต่อชุมชน โดยภัยแล้งในประเทศไทยส่วนใหญ่จะเกิดจากฝนแล้งและทิ้งช่วง ซึ่งฝนแล้งเป็นภาวะปริมาณฝนตกน้อยกว่าปกติหรือฝนไม่ตกต้องตามฤดูกาลโดยแต่ละปีจะเกิดขึ้นได้ 2 ช่วง ได้แก่ช่วงฤดูหนาวต่อเนื่องถึงฤดูร้อน ซึ่งจะเริ่มจากครึ่งหลังของเดือนตุลาคมเป็นต้นไป บริเวณประเทศไทยตอนบน (ภาคเหนือ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ภาคกลาง และภาคตะวันออก) จะมีปริมาณฝนลดลงเป็นลำดับ ยกเว้นภาคใต้ จนกว่าจะย่างเข้าสู่ฤดูฝนในช่วงกลางเดือนพฤษภาคมของปีถัดไป ซึ่งภัยแล้งลักษณะนี้จะเกิดขึ้นเป็นประจำทุกปี ส่วนภัยแล้งอีกช่วงหนึ่งมักเกิดขึ้นในช่วงกลางฤดูฝน คือ ประมาณปลายเดือนมิถุนายนถึงกรกฎาคมจะมีฝนทิ้งช่วง ซึ่งอาจเกิดขึ้นเฉพาะท้องถิ่น แต่บางครั้งก็อาจครอบคลุมพื้นที่กว้างเกือบทั่วประเทศไทย (กรมอุตุนิยมวิทยา, 2542) โดยภัยแล้งเมื่อเกิดขึ้นแล้วจะนำความเสียหายทางเศรษฐกิจและสังคมมาสู่ประเทศชาติและประชาชนเป็นอย่างมาก ทั้งทางด้านการขาดแคลนน้ำเพื่อการอุปโภคบริโภค และด้านการเกษตรที่ต้องต้องพึ่งพาธรรมชาติ ทำให้ผลผลิตการเกษตรเสียหาย

ทั้งนี้กลุ่มป้องกันภัยธรรมชาติและความเสี่ยงทางการเกษตร กรมพัฒนาที่ดิน คาดการณ์ความแห้งแล้งในพื้นที่ทำการเกษตร ปี 2558 ว่าภาคกลางจะประสบความแห้งแล้ง 9 จังหวัด โดยจังหวัดลพบุรีเป็นจังหวัดที่ควรเฝ้าระวังเป็นพิเศษ และมีพื้นที่แล้งซ้ำซากอยู่ที่ระดับความแล้งซ้ำซาก 1-3 ครั้งต่อปี ในอำเภอโคกเจริญ โคกสำโรง ชัยบาดาล พัฒนานิคม และสระโบสถ์ (สำนักป้องกันภัยธรรมชาติและความเสี่ยงทางการเกษตร, 2556) ซึ่งบางส่วนเป็นพื้นที่เกษตรกรรม มีการปลูกพืชเศรษฐกิจหลายชนิด เช่น ข้าว อ้อย มันสำปะหลัง ข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ และทานตะวัน เป็นต้น พืชเหล่านี้มีความต้องการใช้น้ำแตกต่างกัน และขึ้นอยู่กับช่วงระยะเวลาในการเจริญเติบโต โดยจะมีการใช้น้ำเพิ่มขึ้นในระยะหลังของช่วงแตกใบและในช่วงออกดอกพืช ถ้าเกิดปัญหาภัยแล้ง ฝนทิ้งช่วง การเจริญเติบโตของพืชจะหยุดชะงัก ทำให้ผลผลิตลดลง ในโครงการวิจัยนี้ผู้วิจัยจึงใช้จังหวัดลพบุรีเป็นตัวแทนของพื้นที่แห้งแล้งในบริเวณภาคกลาง เนื่องจากลักษณะของดินในจังหวัดลพบุรีและจังหวัดอื่นๆ ในภาคกลางไม่ใช่ดินเค็มจัด ทำให้การเพาะปลูกพืชจะได้รับผลกระทบจากความแห้งแล้งอย่างเดียว ในขณะที่พื้นที่ภาคอื่นๆ อาจจะพบปัญหาดินเค็มร่วมด้วย นอกจากนี้ผู้วิจัยได้ศึกษาแบคทีเรียที่คัดแยกจากดินรากข้าวของจังหวัดร้อยเอ็ดเพิ่มเติม เนื่องจากจังหวัดร้อยเอ็ดเป็นแหล่งปลูกข้าวที่สำคัญของประเทศไทยซึ่งได้รับความเสียหายจากภัยแล้งเป็นอย่างมากเช่นกัน ทั้งนี้ความแห้งแล้งสามารถเกิดขึ้นได้ในทุกระยะของการเพาะปลูกข้าว คือต้นฤดู กลางฤดูหรือปลายฤดูปลูก หรือถ้าปีไหนแล้งจัดก็อาจจะแห้งแล้งทั้งต้นและปลายฤดูปลูก เป็นต้น ซึ่งการเกิดสภาวะแล้งในระยะที่ข้าวกำลังออกรวงนั้นทำให้ผลผลิตข้าวลดลงอย่าง

มาก ซึ่งในปีที่แล้งจัดเกษตรกรอาจจะไม่ได้ผลผลิตข้าวเลย จึงจำเป็นที่จะต้องปรับปรุงวิธีการปลูกข้าว เพื่อให้ข้าวสามารถเจริญเติบโต และให้ผลผลิตได้แม้อยู่ภายใต้สภาพแล้ง

ความแห้งแล้งและภาวะฝนทิ้งช่วง ทำให้พืชเครียด (stress) แล้วมีผลกระทบต่อการเจริญเติบโตและการให้ผลผลิต แม้ว่าพืชมีกลไกลดความเครียดเพื่อป้องกันตัวเอง (drought tolerant mechanism) เช่น การแก่และร่วงของใบ การปิดเปิดของปากใบ และการสังเคราะห์ด้วยแสง อีกกลไกหนึ่งที่เกี่ยวข้องกับการทนแล้งของพืช คือ การเจริญเติบโตของรากและการทำงานของราก ในสภาพที่พืชได้รับน้ำสม่ำเสมอระบบรากส่วนใหญ่จะอยู่ที่ผิวดินชั้นบน แต่เมื่อความชื้นที่ผิวดินลดลง พืชจะมีการเจริญของรากชอนไชไปในดินชั้นล่างเพื่อดูดน้ำมารักษาความสมดุลของน้ำในต้นพืช สภาวะขาดน้ำจึงมีผลให้การดูดธาตุอาหารของพืชลดลงและลดผลผลิตด้วย (สายัณห์ สดุดี, 2556) จะเห็นว่าการปรับตัวในสิ่งแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมทำให้พืชมีช่วงการเจริญเติบโตสลับกับการหยุดการเจริญเติบโต อย่างไรก็ดีกลไกเหล่านี้มีความซับซ้อนและมีการปรับตัวช้า นอกจากนี้ยังขึ้นอยู่กับระดับความรุนแรงของการขาดน้ำ และช่วงเวลาของการขาดน้ำ ซึ่งถ้ามีระยะเวลายาวนานจะทำให้พืชไม่สามารถฟื้นตัวได้และตายไป การปรับปรุงพันธุ์พืชทนแล้งเป็นวิธีการหนึ่งที่นำมาปรับใช้ เพื่อให้พืชมีความต้านทานต่อสภาพอากาศในแถบร้อนชื้น เช่น การคัดเลือกพืชลูกผสมสายพันธุ์ทนแล้ง และการปรับปรุงพันธุกรรมพืช วิธีการเหล่านี้ประสบความสำเร็จอยู่บ้าง แต่มีข้อจำกัดในเรื่องของระยะเวลาในการผลิตพันธุ์พืช เนื่องจากขั้นตอนการหาสายพันธุ์หรือยีนที่เหมาะสมเพื่อทำการปรับปรุงพันธุ์พืชทำได้ยาก เพราะกลไกที่เกี่ยวข้องมีความซับซ้อน และยังมีความสัมพันธ์กับกลไกการตอบสนองของพืชต่อภาวะเครียดอื่นๆ เช่น อุณหภูมิสูง และเกลือ (Timmusk และ Behers, 2012; Naveed และคณะ, 2014) นอกจากนี้ข้อจำกัดที่สำคัญของการเกษตรในประเทศไทย คือ พืชดัดแปลงพันธุกรรมเหล่านี้ ยังไม่ได้รับอนุญาตให้มีการเพาะปลูกในประเทศ ดังนั้นโครงการวิจัยนี้จึงสนใจนำแบคทีเรียที่พบได้จากดินในประเทศไทยมาส่งเสริมการทนแล้งของพืชเศรษฐกิจ ซึ่งจะเป็นแนวทางหนึ่งในการพัฒนาวิธีการเพาะปลูก และเพิ่มผลผลิตในสภาวะอากาศร้อนของประเทศไทยต่อไป

ในปัจจุบันมีรายงานว่าพืชอาศัยกิจกรรมของจุลินทรีย์ในดิน มาส่งเสริมกระบวนการเมแทบอลิซึมที่เกี่ยวกับกลไกการลดความเครียดได้ โดยจุลินทรีย์ที่อยู่ร่วมกันกับพืชเหล่านี้ สามารถเปลี่ยนระดับฮอร์โมนของพืช ช่วยเปลี่ยนโครงสร้างของระบบรากพืชให้ชอนไชไปในดินได้ดีขึ้น สร้างเอนไซม์เพื่อทำลายอนุมูลอิสระที่พืชผลิตขึ้นในสภาวะเครียด และสร้างโพลีแซคคาไรด์ที่ช่วยปรับโครงสร้างดินให้อุ้มน้ำมากขึ้นได้ ดังนั้นในต่างประเทศจึงเริ่มมีการใช้จุลินทรีย์ในดิน เช่น รา arbuscular mycorrhiza (AMF) แบคทีเรียบริเวณรากพืช (rhizobacteria) และแบคทีเรียในเซลล์พืช (endophytic bacteria) มาเป็นหัวเชื้อสำหรับเคลือบเมล็ดพืชหรือใส่ในดินระหว่างการเพาะปลูกพืช โดยพบว่าสามารถส่งเสริมการเจริญของพืชและคงปริมาณผลผลิตของพืชเศรษฐกิจ เมื่อปลูกในสภาวะแห้งแล้งหรือสภาวะที่มีทรัพยากรจำกัดได้ (Dodd และคณะ, 2012; Vurukonda และคณะ, 2016; Kaushal และ Wani, 2016) ทั้งนี้นิยมใช้แบคทีเรียทนแล้ง (drought tolerant bacteria) มาผลิตเป็นหัวเชื้อเพื่อส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชระหว่างการขาดน้ำ เนื่องจากแบคทีเรียมีความหลากหลายของสายพันธุ์มาก สามารถปรับตัวให้เข้ากับสิ่งแวดล้อมได้เร็ว และเพาะเลี้ยงง่าย อย่างไรก็ดีประสิทธิภาพของหัวเชื้อแบคทีเรียส่วนใหญ่ขึ้นกับชนิดของแบคทีเรียที่ใช้และสายพันธุ์ของพืชเป็นหลัก (Naveed และคณะ, 2014) จึงจำเป็นต้องคัดแยกแบคทีเรียจากพืชแต่ละชนิดและศึกษาประสิทธิภาพต่อพืชที่สนใจแต่ละชนิด ในประเทศไทยยังไม่มีการผลิตหัวเชื้อจุลินทรีย์เพื่อใช้ในระบบการผลิตทางการเกษตรภายใต้สภาวะแห้งแล้ง

ผู้วิจัยจึงสนใจคัดกรองแบคทีเรียทนแล้งจากแหล่งที่มาในประเทศ เพื่อให้เชื่อมั่นว่าแบคทีเรียจะสามารถอยู่รอดในสภาพแวดล้อมที่จะนำไปใช้ประโยชน์ได้

ข้าวเจ้า (*Oryza sativa* L.) เป็นพืชเศรษฐกิจ ซึ่งการเจริญเติบมีความผันแปรต่อสภาวะแล้ง โดยเฉพาะเมื่อต้นข้าวระยะตั้งท้อง และดอกบาน-ผสมเกสร ประสบกับสภาวะแล้งจะทำให้ผลผลิตข้าวลดลง ดังนั้นถ้ามีแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติช่วยให้ข้าวทนต่อความเครียดจากสภาวะแล้ง เช่น ความสามารถย่อยสลายฮอร์โมนเอทิลีนเพื่อลดการเหี่ยว การผลิตเอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์เพื่อรักษาน้ำบริเวณราก และการผลิตเอนไซม์คะตะเลสเพื่อลดความเครียดบริเวณรากข้าว ก็คาดว่าจะสามารถส่งเสริมให้ต้นข้าวเจริญต่อไปได้อีกระยะหนึ่ง เมื่อได้น้ำก็จะสามารถฟื้นตัวได้ นอกจากนี้ข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ (*Zea mays* L.) เป็นพืชเศรษฐกิจอีกชนิดที่นิยมปลูกในประเทศไทย จึงได้นำมาเป็นตัวอย่างสำหรับทดสอบไปพร้อมกับข้าวเจ้า จุดมุ่งหมายของโครงการวิจัยนี้ คือ การพัฒนาหัวเชื้อแบคทีเรียผสมสำหรับใช้ส่งเสริมการเจริญเติบโตและการฟื้นตัวของพืชเศรษฐกิจในสภาวะแห้งแล้ง โดยในการศึกษาก่อนหน้านี้ผู้วิจัยได้คัดแยกแบคทีเรียทนแล้งหลากหลายสายพันธุ์จากตัวอย่างดินในพื้นที่แล้งซ้ำซากที่ใช้ในการปลูกข้าว/พืชไร่ ของจังหวัดลพบุรี ดังนั้นในโครงการวิจัยนี้จึงเริ่มจากการคัดกรองแบคทีเรียจากคลังของแบคทีเรียทนแล้งข้างต้น โดยดูจากสมบัติในการส่งเสริมการเจริญของพืช หลังจากนั้นจึงเลือกแบคทีเรียที่มีสมบัติที่ดี 5 - 6 ไอโซเลต มาผสมกันเป็นหัวเชื้อแล้วทดสอบประสิทธิภาพในการปกป้องพืชเมื่ออยู่ในสภาวะแล้ง และความสามารถในการอาศัยบริเวณรากพืช ทั้งนี้มีแนวคิดว่าแบคทีเรียหลายชนิดจะช่วยส่งเสริมประสิทธิภาพและการอยู่รอดในสิ่งแวดล้อมของกันและกัน นอกจากนี้การเติมหัวเชื้อแบคทีเรียผสมระหว่างการปลูกพืชจะช่วยป้องกันบรรเทาปัญหาการชะงักการเจริญเติบโตของพืช จากภาวะความเครียดจากการขาดน้ำในเมื่อปลูกในพื้นที่แล้งซ้ำซาก และเพื่อให้พืชฟื้นตัวได้เร็วเมื่อปลูกในพื้นที่ที่อาศัยน้ำจากน้ำฝนแล้วประสบกับภาวะฝนทิ้งช่วง หรือจากการผันแปรของปริมาณน้ำฝนอันเนื่องมาจากการเปลี่ยนแปลงภูมิอากาศ อย่างไรก็ตามหัวเชื้อแบคทีเรียพร้อมใช้นี้ ไม่ได้มีผลในการช่วยลดการปริมาณการคายระเหยน้ำของพืช แต่จะช่วยให้พืชสามารถคายระเหยน้ำและกระบวนการสังเคราะห์แสงเป็นอัตราปกติ อันเนื่องมาจากภาวะเครียดเมื่อประสบกับการขาดน้ำ เป็นผลให้ผลผลิตคงที่หรือลดลงน้อยที่สุด

ทั้งนี้ความรู้ที่ได้รับจากงานวิจัยนี้และหัวเชื้อแบคทีเรียต้นแบบ จะสามารถนำไปใช้ต่อยอดเพื่อปรับปรุงระบบการผลิตทางการเกษตรภายใต้สภาวะแห้งแล้งของประเทศไทยและประเทศในกลุ่ม AEC ที่มีแนวโน้มจะประสบภัยแล้งเช่นเดียวกัน นอกจากนี้การนำแบคทีเรียท้องถิ่นมาใช้ประโยชน์ ยังเป็นการส่งเสริมให้คนไทยตระหนักถึงความสำคัญของทรัพยากรชีวภาพ ความหลากหลายทางชีวภาพของประเทศ และการพัฒนาเศรษฐกิจจากฐานชีวภาพต่อไป

1.2 วัตถุประสงค์

1) คัดกรองแบคทีเรียทนแล้งที่มีสมบัติในการส่งเสริมการเจริญของพืช

2) พัฒนาหัวเชื้อแบคทีเรียผสมที่มีประสิทธิภาพในการปกป้องพืชเมื่ออยู่ในสภาวะแล้ง และสามารถอาศัยบริเวณรากพืช

3) ทดสอบประสิทธิภาพของหัวเชื้อแบคทีเรียผสมในการส่งเสริมการเจริญและการฟื้นตัวของพืชเศรษฐกิจในสภาวะแห้งแล้ง

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

1) แบคทีเรียทนแล้งที่ใช้ในงานวิจัยนี้มาจากคลังจุลินทรีย์ของภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และคลังจุลินทรีย์ของสาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏเทพสตรี โดยผู้วิจัยได้คัดแยกแบคทีเรียทนแล้งจากตัวอย่างดินที่ใช้ในการปลูกข้าว อ้อย และข้าวโพด ของอำเภอท่าวุ้ง อำเภอชัยบาดาล อำเภอลำสนธิ และอำเภอเมือง จังหวัดลพบุรี และดินบริเวณรากข้าวหอมมะลิ 105 และข้าวเหนียว กข6 จากอำเภอเมือง จังหวัดร้อยเอ็ด รวมทั้งสิ้น 112 ไอโซเลต

2) พืชเศรษฐกิจที่ใช้ในงานวิจัยนี้ ประกอบด้วย

2.1) ข้าวหอมมะลิ 105 เป็นข้าวเจ้าที่มีมูลค่าทางเศรษฐกิจ สูงประมาณ 140 เซนติเมตร ไวต่อช่วงแสง ลำต้นสีเขียวจาง ใบสีเขียวยาวค่อนข้างแคบ ฟางอ่อน ใบธงทำมุมกับคอรวง เมล็ดข้าวรูปร่างเรียวยาว ข้าวเปลือกสีฟาง ทนแล้งได้ดีพอสมควร ทนต่อสภาพดินเปรี้ยว และดินเค็ม (ฐานข้อมูลพันธุ์ข้าวรับรองของไทย, 2560) นำมาใช้สำหรับทดสอบการทนต่อสภาวะแล้งร่วมกับแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบระดับห้องปฏิบัติการด้วยวิธีการปลูกแบบไฮโดรโพนิกส์ และการทดสอบในระดับกระถางพลาสติกใส่ดินขนาด 25.5 เซนติเมตร สูง 18 เซนติเมตร (ปริมาตร 0.0088 ลูกบาศก์เมตร)

2.2) ข้าวขาว กข 47 มีลักษณะประจำพันธุ์ เป็นข้าวเจ้าไม่ไวต่อช่วงแสงอายุ 104-107 วัน (หว่านน้ำตม) และ 112 วัน (ปักดำ) มีลักษณะกอตั้ง ความสูง 90-100 เซนติเมตร ลำต้นแข็งมาก ใบสีเขียว มุมใบธงกว้างปานกลาง (ฐานข้อมูลพันธุ์ข้าวรับรองของไทย, 2560) โดยเป็นข้าวที่นิยมปลูกในจังหวัดลพบุรี นำมาใช้สำหรับทดสอบการทนต่อสภาวะแล้งร่วมกับแบคทีเรียแกรมบวกผสม (6 สายพันธุ์) ระดับห้องปฏิบัติการด้วยวิธีการปลูกแบบไฮโดรโพนิกส์ และการทดสอบในระดับเรือนทดลองด้วยกระถางพลาสติกใส่ดินขนาดกว้าง 39 เซนติเมตร ยาว 58 เซนติเมตร สูง 39.5 เซนติเมตร (ปริมาตร 0.089 ลูกบาศก์เมตร)

2.3) ข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ สายพันธุ์แปซิฟิก 339 เป็นข้าวโพดที่ได้มาจากการผสมข้ามระหว่างพันธุ์แท้ที่ใช้เป็นพันธุ์แม่ คือ 50053 กับพันธุ์แท้ที่เป็นพันธุ์พ่อ คือ 50056 ปัจจุบันนิยมปลูกทั่วไปในจังหวัดลพบุรี นำมาใช้ใช้สำหรับทดสอบการทนต่อสภาวะแล้ง ร่วมกับแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบในระดับกระถางพลาสติกใส่ดินขนาด 25.5 เซนติเมตร สูง 18 เซนติเมตร (ปริมาตร 0.0088 ลูกบาศก์เมตร) และการทดสอบในระดับเรือนทดลองด้วยกระถางพลาสติกใส่ดินขนาดกว้าง 39 เซนติเมตร ยาว 58 เซนติเมตร สูง 39.5 เซนติเมตร (ปริมาตร 0.089 ลูกบาศก์เมตร)

3) การทดสอบประสิทธิภาพในการทนแล้งของแบคทีเรียใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ Trypticase soya broth (TSB) ที่เติม Polyethylene glycol (PEG 6000) ความเข้มข้น 30-40% (w/v) (แรงดันออสโมติก ที่ 25 องศาเซลเซียส คือ -1.027 และ -1.757 MPa ตามลำดับ) (Sandhya และคณะ, 2009; Vardharajula และคณะ, 2011; Ali และคณะ, 2014) โดย PEG 6000 เป็นสารเคมีโพลิเมอร์สังเคราะห์ที่นิยมใช้ในการดัดแปลงค่า osmotic potential ของสารละลายอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อเหนี่ยวนำให้เกิดการขาดน้ำ

4) การคัดกรองแบคทีเรียทนแล้งที่มีสมบัติในการส่งเสริมการเจริญของพืช ดูจากกิจกรรมของแบคทีเรียดังต่อไปนี้ การละลายฟอสเฟต การผลิตกรดอินโดลอะซีติก (IAA) การผลิตเอนไซม์คะตาเลซ (Catalase) การผลิตเอนไซม์เอซีซีดีอะมิเนส (ACC deaminase) การผลิตเอ็กโซโพลีแซ็กคาไรด์ที่เป็นองค์ประกอบของไบโอฟิลม์ และการผลิตสารลดแรงตึงผิวหรือสารก่ออิมัลชัน นอกจากนี้ยังนำแบคทีเรียที่คัดเลือกมาทดสอบการทนเกลือและอุณหภูมิสูง และศึกษาการเป็นปฏิปักษ์ต่อกัน

5) การคัดเลือกแบคทีเรียทนแล้งที่มีสมบัติในการส่งเสริมการเจริญของพืช แล้วนำมาใช้ประโยชน์เป็นหัวเชื้อแบคทีเรียผสมนั้น แบคทีเรียแต่ละไอโซเลตจะต้องเป็นแบคทีเรียที่ไม่ก่อโรคในคนและสัตว์ ซึ่งในขั้นต้นผู้วิจัยจัดจำแนกแบคทีเรียว่าอยู่ในกลุ่มแบคทีเรียก่อโรคหรือไม่ โดยอ้างอิงจากเอกสารเรื่องเชื้อโรคและระดับความเสี่ยง โดยกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข พ.ศ. 2552 แต่ต่อมาทราบว่าพระราชบัญญัติเชื้อโรคและพิษจากสัตว์ พ.ศ. 2558 ให้ใช้ข้อมูลในประกาศของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข เรื่องระดับความเสี่ยงของเชื้อโรคและพิษจากสัตว์ ฉบับลงวันที่ 8 ธันวาคม พ.ศ. 2557 ทำให้งานวิจัยนี้มีการคัดเลือกแบคทีเรียใหม่หลายรอบ และได้ทดสอบประสิทธิภาพของหัวเชื้อแบคทีเรียผสมหลายแบบ

6) การพัฒนาหัวเชื้อแบคทีเรียผสมที่มีประสิทธิภาพในการปกป้องพืชเมื่ออยู่ในสภาวะแล้ง และสามารถอาศัยบริเวณรากพืช ดูจากการเจริญเติบโตของต้นกล้าที่ปลูกจากเมล็ดพันธุ์ที่เคลือบและไม่เคลือบแบคทีเรียในระบบไฮโดรโปนิกส์ (Hydroponics) ซึ่งจำลองภาวะขาดน้ำโดยใช้อาหาร Yoshida (Kim และคณะ, 2005) ที่ผสม PEG 6000 ความเข้มข้นต่างๆ ตั้งแต่ 10% (water potential -0.148 MPa) – 30% (water potential -1.027 Mpa) เพื่อแปรผันความรุนแรงของการขาดน้ำ ทั้งนี้พยายามควบคุมให้เมล็ดพันธุ์และระบบปลูกมีจุลินทรีย์ตามธรรมชาติน้อยที่สุด เพื่อให้สะดวกในการทดลอง และสามารถเห็นผลของหัวเชื้อแบคทีเรียต่อต้นข้าวในเวลารวดเร็ว นอกจากนี้ได้ทดสอบการฟื้นตัวของต้นพืชหลังการขาดน้ำโดยย้ายต้นกล้าไปปลูกในอาหารใหม่ที่ไม่เติม PEG 6000

7) การทดสอบประสิทธิภาพของหัวเชื้อแบคทีเรียผสมในการส่งเสริมการเจริญและการฟื้นตัวของพืชเศรษฐกิจในสภาวะแห้งแล้ง ดูจากการเจริญเติบโตของต้นพืชที่ปลูกจากเมล็ดพันธุ์ที่เคลือบและไม่เคลือบแบคทีเรียในดินระดับกระถาง ซึ่งได้ทำการทดสอบรวม 2 ครั้ง โดยใช้กระถางปลูกต้นไม้ขนาด 0.0088 ลูกบาศก์เมตร ในสภาวะที่ไม่ได้ควบคุมอุณหภูมิ และใช้แสงจากธรรมชาติ และกล่องพลาสติกขนาด 0.0893 ลูกบาศก์เมตร ในระดับโรงเรือน เมื่อพืชมีอายุ 13 วัน เติมหัวเชื้อแบคทีเรียผสม ความเข้มข้น 10^9 CFU ต่อมิลลิลิตร เพิ่มเติมบริเวณดินรอบโคนต้นพืช ทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง แล้วเก็บตัวอย่างรากพืชอายุ 14 วัน มานับจำนวนแบคทีเรียรอบรากพืช สำหรับการทดสอบในเรือนทดลอง ทำการติดตามการเจริญของพืชตั้งแต่ในระยะต้นกล้าจนถึงระยะออกดอก จากนั้นหยุดให้น้ำเพื่อจำลองภาวะขาดน้ำ (ข้าวกข 47 งดให้น้ำ 15 วัน / ข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ งดให้น้ำ 27 วัน) และทดสอบการฟื้นตัวโดยให้น้ำตามปกติ ทั้งนี้ใช้ดินสำหรับปลูกพืช 2 ตัวอย่าง โดยที่

- ดินสำหรับปลูกข้าว เก็บตัวอย่างดินจากดินนาจาก ต.โพตลาดแก้ว อ.ท่าวุ้ง จ.ลพบุรี เนื่องจากเป็นดินที่ใช้ในการเพาะปลูกข้าวนาปีของเกษตรกรในพื้นที่เป็นประจำอยู่แล้ว และยังเป็นพื้นที่ที่ห่างไกลจากระบบน้ำชลประทาน สามารถทำนาได้เพียงปีละ 1 ครั้งเท่านั้น
- ดินสำหรับปลูกข้าวโพดเลี้ยงสัตว์จากจาก ต. ตำบลโคกตูม อ.เมือง จ.ลพบุรี เนื่องจากพื้นที่แถบนี้นิยมปลูกข้าวโพดหวานและข้าวโพดเลี้ยงสัตว์เป็นประจำอยู่แล้ว และสะดวกต่อการขนส่งสำหรับการทดสอบในเรือนทดลอง

8) การเจริญเติบโตของพืชดูจากลักษณะทางกายภาพของพืช เช่น ความยาวยอด ความยาวราก จำนวนใบ จำนวนราก ความกว้างของใบ ความยาวรอบลำต้น และน้ำหนักแห้ง

9) การตรวจติดตามจำนวนแบคทีเรียที่ใช้เป็นหัวเชื้อบริเวณรากพืช และกลุ่มประชากรเด่นในดินที่เปลี่ยนแปลงไปเนื่องจากการปลูกพืชและการเติมหัวเชื้อแบคทีเรีย ใช้วิธีนับจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดโดยการเพาะเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA และวิธีวิเคราะห์ไมโครไบโอมบริเวณรากพืชด้วยวิเคราะห์ลำดับเบสแบบเมตาจีโนมิกส์ของยีน 16s rRNA อย่างไรก็ดีการเก็บตัวอย่างรากพืชทำได้เมื่อเสร็จสิ้นการทดลองเท่านั้น เนื่องจากรากพืชมี

การกระจายทั่วกระถางและรากของแต่ละต้นอาจเจริญและเกี่ยวพันกันซึ่งไม่สามารถมองเห็นได้ ทำให้ไม่สามารถถอนตัวอย่างรากพืชซึ่งอาจเป็นการรบกวนรากพืชระหว่างเพาะเลี้ยง ดังนั้นข้อมูลที่ได้จากงานวิจัยนี้จึงเป็นข้อมูลเบื้องต้นเท่านั้น

10) การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติใช้โปแกรม GraphPad Prism โดยวิเคราะห์เฉพาะข้อมูลลักษณะพืชที่สำคัญ เริ่มจากการวิเคราะห์ความแปรปรวนสองทาง (two-way ANOVA) เมื่อผลการทดสอบสถิติมีนัยสำคัญ ทำการเปรียบเทียบพหุคูณ (multiple comparisons test) โดยวิธี Tukey

1.4 ประโยชน์ที่ได้รับ

1) ต้นแบบของผลิตภัณฑ์หัวเชื้อแบคทีเรียผสม ที่สามารถส่งเสริมการเจริญและบรรเทาภาวะเครียดของพืชเศรษฐกิจเมื่อประสบกับสภาวะแห้งแล้งจากการขาดน้ำชลประทานหรือน้ำฝน
2) วิธีการเตรียมเมล็ดพืชสำหรับปลูกในพื้นที่นอกเขตชลประทานและพื้นที่แล้งซ้ำซาก ซึ่งสามารถป้องกันพืชจากความเครียดในสภาวะแล้ง ที่มีราคาไม่แพง สะดวก และปลอดภัย
3) ข้อมูลเบื้องต้นเกี่ยวกับการใช้วิธีทางชีวภาพเพื่อส่งเสริมการเจริญของพืชที่ปลูกในสภาวะแล้ง และเพื่อพัฒนาระบบการผลิตทางเกษตรภายใต้สภาวะแห้งแล้ง
4) ข้อมูลพื้นฐานเกี่ยวกับชนิดและกิจกรรมของแบคทีเรียทนแล้งที่พบในประเทศไทย ซึ่งสามารถนำไปเปรียบเทียบกับงานวิจัยของต่างประเทศต่อไป
5) ร่างบทความวิชาการเรื่อง Application of drought tolerant bacterial inoculum for promoting growth and recovery of staple crops under drought condition สำหรับตีพิมพ์ในวารสารวิชาการระดับนานาชาติ
6) นิสิตปริญญาเอกและนักวิจัยที่ร่วมทำโครงการวิจัยนี้ จะมีประสบการณ์ด้านการวิจัยเกี่ยวกับความสัมพันธ์ระหว่างแบคทีเรียและพืช และการพัฒนานวัตกรรมจุลินทรีย์สำหรับใช้ในการเกษตร ซึ่งสามารถนำไปพัฒนาองค์ความรู้ใหม่ต่อไป

1.5 ผู้มีส่วนได้ส่วนเสีย (Stakeholders)

ผู้มีส่วนได้ส่วนเสียที่เกี่ยวข้องกับโครงการวิจัยนี้ ได้แก่ เกษตรกรซึ่งมีบทบาทในการปลูกพืชเศรษฐกิจโดยเฉพาะข้าวและข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ที่เลือกมาเป็นตัวแทนของพืชที่ใช้ศึกษา หน่วยงานเอกชนที่เกี่ยวข้องกับการผลิตผลผลิตเกษตรและหน่วยงานราชการ เช่น กรมการข้าว กรมชลประทาน กรมส่งเสริมการเกษตร กรมวิชาการเกษตร กรมพัฒนาที่ดิน และสำนักงานนโยบายและแผนทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม ซึ่งมีบทบาทในการช่วยเหลือเกษตรกร การจัดการน้ำสำหรับทำเกษตรในพื้นที่เพาะปลูกที่เสี่ยงต่อภัยแล้งของประเทศ และการเตรียมความพร้อมเพื่อรองรับปัญหาสิ่งแวดล้อมจากสภาวะแห้งแล้ง นอกจากนี้ผลิตภัณฑ์หัวเชื้อแบคทีเรียที่จะพัฒนาขึ้นยังเป็นการนำทรัพยากรชีวภาพของประเทศมาใช้ประโยชน์ จึงมีความเกี่ยวข้องกับหน่วยงานวิจัยด้านเทคโนโลยีจุลินทรีย์และคลังจุลินทรีย์ บริษัทเอกชนที่สนใจการผลิตและจำหน่ายหัวเชื้อแบคทีเรีย คณะกรรมการอนุรักษ์และใช้ประโยชน์ความหลากหลายทางชีวภาพแห่งชาติ (กอช.) สำนักงานนวัตกรรมแห่งชาติ และสำนักงานพัฒนาเศรษฐกิจจากฐานชีวภาพ (องค์การมหาชน)

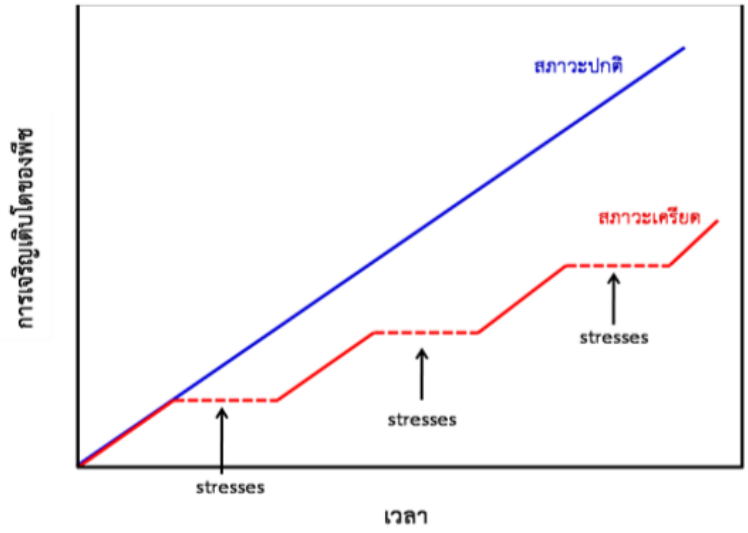
บทที่ 2

ทบทวนวรรณกรรม

2.1 กลไกการทนแล้งของพืช

น้ำเป็นองค์ประกอบสำคัญในส่วนต่าง ๆ ของพืชและจำเป็นต่อกระบวนการทางสรีรวิทยาของพืช ในสภาพธรรมชาติปริมาณน้ำที่มีอยู่ในพืชมีปริมาณน้อยมาก เมื่อเทียบกับปริมาณน้ำที่ถูกดูดไปจากดินผ่านต้นพืชและสูญเสียออกไปโดยการคายน้ำ สภาพที่น้ำในพืชมีการเปลี่ยนแปลงจนลดลงต่ำกว่าระดับที่เหมาะสมจะมีผลทำให้พืชสูญเสียความเต่งของเซลล์ ซึ่งจะส่งผลกระทบต่อกระบวนการทางสรีรวิทยา และสภาวะขาดน้ำเกิดขึ้นอย่างต่อเนื่องจะมีผลทำให้พืชเหี่ยวตายได้ (มนตรี เพ็ชรทองคำ, 2546) ดังนั้นพืชจึงมีกลไกการตอบสนองต่อสภาวะขาดน้ำ ซึ่งมีหลายกระบวนการขึ้นอยู่กับระดับความรุนแรงของการขาดน้ำ และช่วงเวลาของการขาดน้ำ เช่น การแก่และร่วงของใบ การปิดเปิดของปากใบ และการสังเคราะห์ด้วยแสง กลไกเหล่านี้ควบคุมด้วยฮอร์โมนหลายชนิด เช่น IAA (indole-3-acetic acid) มีผลทำให้เกิดการแก่และร่วงของใบซึ่งส่งผลให้พื้นที่ใบลดลง ABA (abscisic acid) มีผลทำให้มีการปิดปากใบเพื่อลดการสูญเสียน้ำของพืช CK (cytokinins) ช่วยชะลอการแก่และร่วงของใบ เอธิลีน (ethylene) ทำให้เกิดการแก่และร่วงของใบเร็วขึ้น และ GA (gibberellins) สภาวะขาดน้ำของพืชมีผลทำให้ปฏิกิริยาของ GA ในใบพืชลดลง ฮอร์โมนพืชเหล่านี้มีปฏิกิริยาสัมพันธ์ในสภาวะขาดน้ำ คือ ABA และ ethylene จะถูกสังเคราะห์มากขึ้นในสภาวะขาดน้ำ แต่ในทางตรงกันข้าม IAA, CK และ GA มีแนวโน้มลดลงในสภาวะขาดน้ำ (สายัณห์ สดุดี, 2556) อีกกลไกหนึ่งที่เกี่ยวข้องกับการทนแล้งของพืช คือ การเจริญเติบโตของรากและการทำงานของราก ในสภาพที่พืชได้รับน้ำสม่ำเสมอระบบรากส่วนใหญ่จะอยู่ที่ผิวดินชั้นบน แต่เมื่อความชื้นที่ผิวดินลดลง พืชจะมีการเจริญของรากชอนไชไปในดินชั้นล่างเพื่อดูดน้ำมารักษาความสมดุลของน้ำในต้นพืช สภาวะขาดน้ำจึงมีผลให้การดูดธาตุอาหารของพืชลดลงด้วย (สายัณห์ สดุดี, 2556)

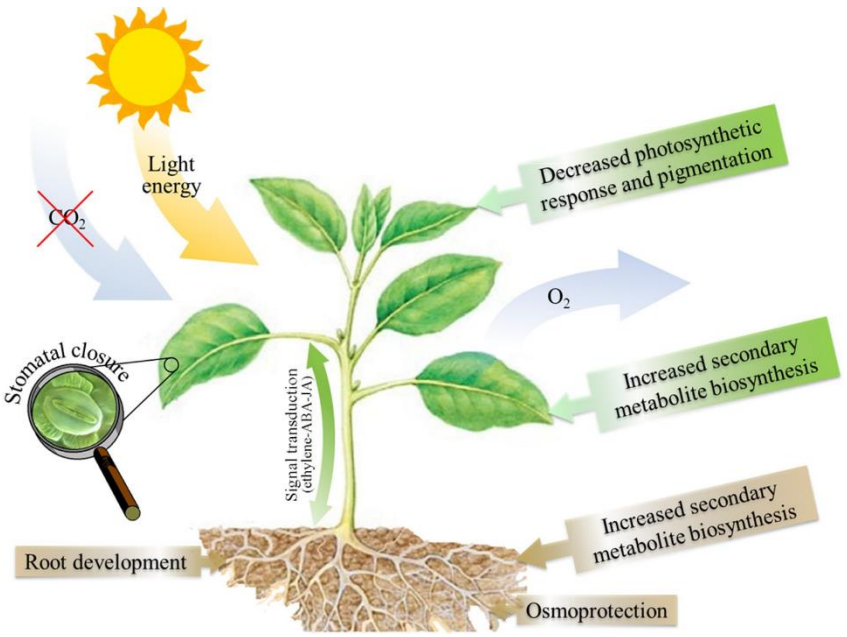
พืชแต่ละชนิดมีความสามารถในการทนต่อความเครียดไม่เท่ากันขึ้นอยู่กับชนิดของพืช การทนต่อสภาวะแล้งของพืชนั้นมีความซับซ้อน เนื่องจากปฏิสัมพันธ์ระหว่างปัจจัยต่าง ๆ ที่ทำให้เกิดความเครียดของพืชต่อพันธุกรรมที่มีในพืชแต่ละชนิด ชีวเคมี และการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพในการเจริญเติบโตของพืช สภาวะแล้งจะทำให้สารอาหารและปัจจัยที่ทำให้พืชเจริญเติบโตเกิดการหยุดชะงัก ทั้งการเจริญที่บริเวณปลายยอดและการเจริญบริเวณด้านข้างลำต้นพืช (Jaleel และคณะ, 2009) สภาวะเครียดจากสิ่งแวดล้อมทั้งไม่มีชีวิตและมีชีวิต (abiotic และ biotic stresses) เป็นปัญหาสำคัญที่ส่งผลต่อการเจริญเติบโตของพืช ในกรณีที่สภาวะเครียดนั้นไม่ก่อให้เกิดการตาย (nonlethal stress) แต่ทำให้การเจริญเติบโตหยุดชะงัก ไม่สม่ำเสมอ พืชจะปรับตัวในวิถีเมแทบอลิซึม (metabolism) บางประการให้ทนทานต่อสภาวะแวดล้อมนั้น ๆ จนกว่าความเครียดนั้นจะหายไป ในสิ่งแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมพืชจึงจะมีช่วงการเจริญเติบโตสลับกับการหยุดการเจริญเติบโต ดังรูปที่ 2.1 (Glick และคณะ, 2007)



รูปที่ 2.1 การเจริญเติบโตของพืชในสภาวะปกติและสภาวะเครียด (ดัดแปลงจาก Glick และคณะ, 2007)

การเกิดสภาวะแล้งนั้นมีผลต่อพืชโดยตรง เนื่องจากน้ำเป็นปัจจัยหลักในการสังเคราะห์ด้วยแสงของพืช และน้ำยังเป็นตัวพาแร่ธาตุต่าง ๆ ในดินเข้าสู่พืชด้วยวิธีการแพร่ เช่น nitrate, sulfate, Ca, Mg, และ Si และสภาวะแล้งยังกระตุ้นการเกิดอนุมูลอิสระ เช่น superoxide radicals, hydrogen peroxide และ hydroxyl radicals และทำให้ค่าคลอโรฟิลล์ภายในเซลล์พืชลดลงภายใต้สภาวะเครียดออกซิเดชัน ดังนั้นการขาดน้ำจึงส่งผลกระทบต่อพืชอย่างมาก (Vurukonda และคณะ, 2016) พืชจึงต้องมีการตอบสนองต่อสภาวะแล้งด้วยวิธีการต่าง ๆ กระบวนการตอบสนองของพืชต่อสภาวะแล้งอาจแตกต่างกัน ขึ้นอยู่กับระดับความรุนแรงและช่วงเวลาการขาดน้ำหรือช่วงอายุของพืช โดยการตอบสนองบางส่วนเป็นกระบวนการที่ทำให้พืชมีการปรับตัวให้มีชีวิตอยู่รอดได้ (Cha-um และคณะ, 2017) เช่น การสร้างเอนไซม์ที่ทำหน้าที่กำจัดสารอนุมูลอิสระ ได้แก่ Superoxide dismutase (SOD) Ascorbate peroxidase (APX) และคะตาเลซ (CAT) (Farooq และคณะ, 2009) รวมไปถึงการสะสมตัวถูกละลายที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ เช่น โพรลีน น้ำตาลแอลกอฮอล์ และน้ำตาลไกลซีนบีเทน เพิ่มสูงขึ้น (Mahajan และ Tuteja, 2005) ซึ่งมีบทบาทสำคัญในการรักษาสมดุลของน้ำในเซลล์ ส่งผลให้พืชสามารถรักษาระดับน้ำในเซลล์ที่ต่ำกว่าระดับน้ำภายนอกเซลล์ทำให้น้ำสามารถเคลื่อนที่เข้าสู่เซลล์อย่างต่อเนื่อง

การปรับปรุงพันธุ์พืชทนแล้งเป็นวิธีการหนึ่งที่นำมาปรับใช้ เพื่อให้พืชมีความต้านทานต่อสภาพอากาศในแถบร้อนชื้น เช่น การคัดเลือกพืชลูกผสมสายพันธุ์ทนแล้ง และการปรับปรุงพันธุกรรมพืช วิธีการเหล่านี้ประสบความสำเร็จอยู่บ้าง แต่มีข้อจำกัดในเรื่องของระยะเวลาในการผลิตพันธุ์พืช เนื่องจากขั้นตอนการหาสายพันธุ์ หรือยีนที่เหมาะสมเพื่อทำการปรับปรุงพันธุ์พืช ทำได้ยาก เพราะกลไกที่เกี่ยวข้องมีความซับซ้อน (Timmusk และ Behers, 2012; Naveed และคณะ, 2014) นอกจากนี้กลไกการตอบสนองของพืชต่อภาวะขาดแคลนน้ำ อุณหภูมิสูง และเกลือ ยังมีความสัมพันธ์กัน ดังตัวอย่างรูปที่ 2.2



รูปที่ 2.2 กลไกของพืชในการตอบสนองต่อสภาวะเครียด (Zingaretti และคณะ, 2013)

2.2 แบคทีเรียส่งเสริมการเจริญของพืช

จุลินทรีย์ที่มีความหลากหลายทั้งทางพันธุกรรมและกิจกรรมในดินไม่เพียงแต่เป็นปัจจัยที่สำคัญในการย่อยสลายและหมุนเวียนแร่ธาตุ แต่ยังมีส่วนช่วยในการส่งเสริมการเจริญเติบโตและป้องกันพืชอีกด้วย จุลินทรีย์ในดินมีหลายชนิด ได้แก่ แบคทีเรีย รา แอคติโนมัยสิต โปรโตซัว และสาหร่าย แต่ชนิดที่พบมากคือ แบคทีเรีย เนื่องจากเจริญได้อย่างรวดเร็ว และมีความสามารถในการใช้คาร์บอนและไนโตรเจนเป็นแหล่งพลังงานได้อย่างหลากหลาย (Govindasamy และคณะ, 2008) เป็นที่รู้กันโดยทั่วไปว่าแบคทีเรียมีบทบาทสำคัญต่อการเจริญเติบโตของพืช การส่งเสริมสารอาหารและการควบคุมโรคพืชทางชีวภาพ ซึ่งข้อดีเหล่านี้ล้วนเกิดจากแบคทีเรียที่เจริญอยู่รอบรากหรืออาศัยอยู่ภายในรากพืช และทำให้เกิดการส่งเสริมการเจริญของพืชด้วยกลไกต่าง ๆ ทั้งโดยทางตรงและทางอ้อม รวมทั้งบทบาทที่ช่วยให้พืชตอบสนองต่อความเครียดทางกายภาพและชีวภาพต่าง ๆ แบคทีเรียส่งเสริมการเจริญของพืช (Plant growth promoting bacteria, PGPB) เป็นแบคทีเรียที่ไม่ก่อให้เกิดโรคแก่พืชอาศัย และมีกลไกสนับสนุนการเจริญของพืชทั้งทางตรงและทางอ้อม โดยพบได้ทั้งในดินบริเวณรอบรากพืช และที่พื้นผิวรากพืช ภายในรากพืชและเนื้อเยื่อพืช (Ahmad และคณะ, 2008) แบคทีเรียเหล่านี้จะอยู่ร่วมกันกับรากพืชแบบพึ่งพาอาศัย (symbiosis) เพื่อเพิ่มโอกาสการอยู่รอดให้กับพืช และจะอาศัยสารอาหารจากพืชในการเจริญเติบโต แบคทีเรียส่งเสริมการเจริญของพืชแบ่งได้เป็น 2 กลุ่ม ได้แก่ 1) กลุ่มที่ดำรงชีวิตอิสระ (free-living bacteria) อาศัยอยู่อย่างอิสระภายนอกเซลล์พืช แต่ยังคงมีความสามารถในการกระตุ้นการเจริญของพืชได้ และ 2) กลุ่มที่อาศัยอยู่ภายในเซลล์พืช (endophyte) แบคทีเรียกลุ่มนี้ อาศัยอยู่ภายในเซลล์พืชซึ่งอาจแพร่กระจายทั่วไปในส่วนต่างๆ ภายในเนื้อเยื่อพืช หรืออาศัยในบริเวณจำเพาะภายในเซลล์พืชก็ได้ เช่น อาศัยในชั้นคอร์เท็กซ์ของราก หรือท่อลำเลียงน้ำของพืช (xylem) (Weyens และคณะ, 2009; Souza และคณะ 2015) แบคทีเรียกลุ่มสนับสนุนการเจริญของพืชที่อาศัยภายในเซลล์พืชยังแบ่งออกเป็น 2

ชนิด ได้แก่ แบคทีเรียกลุ่มที่อาศัยและเพิ่มจำนวนภายในเซลล์พืชอย่างถาวร (obligate endophyte) โดยแบคทีเรียกลุ่มนี้จะแพร่กระจายสู่พืชต้นอื่นโดยอาศัยพาหะหรือ vertically transfer ส่วนแบคทีเรียอีกกลุ่มหนึ่งจะอาศัยอยู่ภายในเซลล์พืชแบบชั่วคราว (facultative endophyte) โดยแบคทีเรียกลุ่มนี้จะมีช่วงชีวิตระยะหนึ่งที่อาศัยอยู่ภายนอกเซลล์พืชได้ (Rajkumar และคณะ, 2009) ตัวอย่างของแบคทีเรียกลุ่มนี้ เช่น *Pseudomonas, Azospirillum*, *Azotobacter*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Alcaligens, Arthobacter*, *Burkholderia*, *Bacillus* และ *Serratia* (Kloepper et al, 1989;. Okon และ Labandera-Gonzalez, 1994; Glick, 1995)

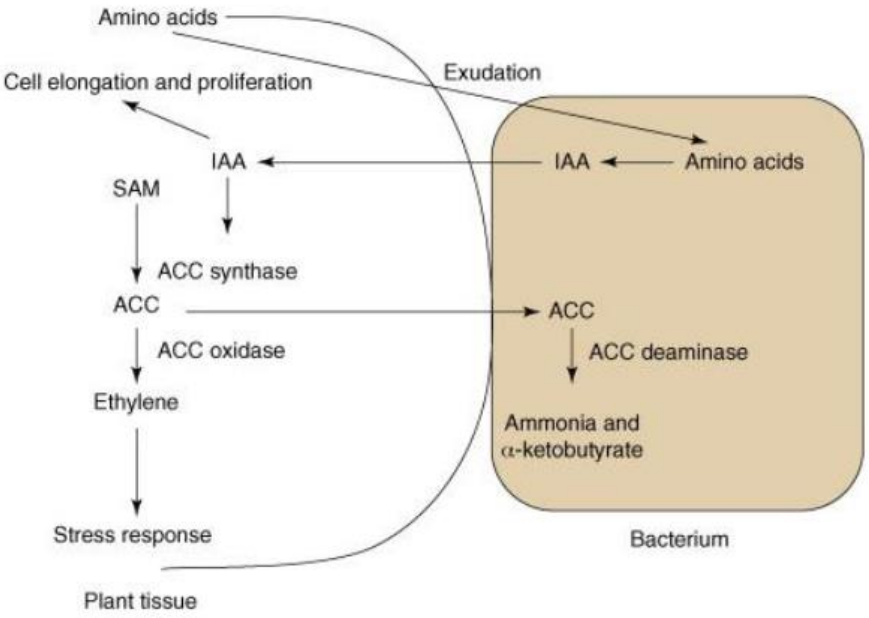
แบคทีเรียมีกลไกส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชที่หลากหลาย เช่น กลไกทางตรงต่อพืช ได้แก่ ช่วยดูดซึมสารอาหารประเภทไนโตรเจน ละลายฟอสฟอรัส ผลิตไฮโดรเจนไซยาไนด์ (HCN) และไซเดอโรฟอร์ (siderophore) ให้แก่พืช บางชนิดมีคุณสมบัติในการเพิ่มกระตุ้นการเจริญของพืชโดยการผลิตฮอร์โมนพืช เช่น IAA, ออกซิน, ไซโตไคนิน และจิบเบอเรลลิน (Vardharajula และคณะ, 2011) และความสามารถในการลดปริมาณเอธิลีนในพืช โดยผลิตเอนไซม์ ACC Deaminase ส่วนกลไกทางอ้อมต่อพืชได้แก่ ความสามารถในการสร้างสารปฏิชีวนะ ความสามารถในการกระตุ้นให้พืชสร้างภูมิคุ้มกัน ความสามารถในการสร้างสารยับยั้งเชื้อราก่อโรค และความสามารถในการสร้างเอนไซม์ย่อยสลายผนังเซลล์ของเชื้อราก่อโรคเป็นต้น (Glick และคณะ, 1999) การอธิบายกลไกต่าง ๆ ที่มีความเป็นไปได้ที่แบคทีเรียรอบรากพืชเหล่านี้มีบทบาทช่วยกระตุ้นการทนแล้งของพืช แสดงดังภาพที่ 2.4 เช่น (1) การผลิตฮอร์โมนพืช เช่น กรดแอบไซซิก กรดจิบเบอเรลลิน ไซโตไคนิน และ กรดอินโดลอะซีติก (2) การผลิตเอนไซม์ ACC deaminase เพื่อลดระดับของเอทิลีนในรากพืช (3) กระตุ้นระบบการทนแล้งด้วยสารที่แบคทีเรียผลิตขึ้น และ (4) การผลิต เอ็กโซโพลีแซ็คคาไรด์ โดยแบคทีเรีย (Vurukonda และคณะ, 2016)

ตัวอย่างฮอร์โมนและสารส่งเสริมการเจริญของพืชที่สำคัญมีดังต่อไปนี้

1) เอธิลีน เป็นฮอร์โมนพืชที่ถูกผลิตขึ้นในสภาวะที่พืชต้องเผชิญกับความเครียดทางด้านชีวภาพและกายภาพในสิ่งแวดล้อม ซึ่งส่งผลต่อพืชหลายประการ ได้แก่ การเปลี่ยนแปลงของลำต้นและราก เร่งความชราและการหลุดร่วงของใบ ดอก และผล ทำให้การเจริญของรากผิดปกติ และส่งผลต่อพัฒนาการของของพืช (Glick และคณะ, 2007; Saleem และคณะ, 2007) การควบคุมระดับเอธิลีนในพืชโดยใช้แบคทีเรียกลุ่มสนับสนุนการเจริญของพืชที่สามารถผลิตเอนไซม์ ACC deaminase ในการย่อยสลาย ACC ที่เป็นสารตัวกลางในการสังเคราะห์เอธิลีน ทำให้ปริมาณเอธิลีนในเซลล์พืชลดลง และพืชยังคงเจริญได้ตามปกติ (Arshad และคณะ, 2007) ดังรูปที่ 2.3

2) จิบเบอเรลลิน เป็นฮอร์โมนพืชกลุ่มที่มีบทบาทสำคัญต่อการแบ่งเซลล์และการยืดยาวของเซลล์ โดยเฉพาะบริเวณลำต้น กระตุ้นการงอกของเมล็ด เป็นต้น (Bottini และคณะ, 2004) จุลินทรีย์แทบทุกกลุ่มผลิตจิบเบอเรลลินได้ ตัวอย่างเช่น *Azotobacter, Azospirillum, Pseudomonas, Bacillus* (Tsavkelova และคณะ, 2006)

3) ไซโทไคนิน เป็นฮอร์โมนพืชที่มีบทบาทกระตุ้นการแตกหนอและแตกกิ่ง การข่มของตายอด (apical dominance) กระตุ้นการขยายของใบพัฒนาการการสืบพันธุ์ และชะลอความชราของพืช รวมทั้งกระตุ้นการสังเคราะห์อาร์เอ็นเอและโปรตีน ควบคุมการสังเคราะห์คลอโรพลาสต์ ควบคุมให้เซลล์ทนทานต่อสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม (Timmusk และคณะ, 1999; Tsavkelova และคณะ, 2006)



รูปที่ 2.3 แผนผังอธิบายการผลิตเอนไซม์ ACC deaminase ของแบคทีเรีย เพื่อลดระดับเอธิลีนในพืช (Glick และคณะ, 1999)

4) กรดแอบไซซิก เป็นฮอร์โมนพืชที่ทำหน้าที่ยับยั้งการเจริญเติบโต และควบคุมกระบวนการทางสรีรวิทยาของพืชให้เกิดช้าลง ควบคุมการปิดปากใบ และตอบสนองต่อความเครียดจากปัจจัยทางกายภาพ (Leung และ Giraudat, 1998) มีรายงานว่าฮอร์โมนชนิดนี้มีปริมาณเพิ่มขึ้นในใบพืชเมื่อพืชได้รับความเครียดจากความแห้งแล้งทำให้ปากใบปิด โดยระดับของไซโทไคนินและกรดแอบไซซิกมีความสัมพันธ์กัน เมื่อกรดแอบไซซิกสูงขึ้น ระดับของไซโทไคนินในพืชจะลดลง วิถีการสังเคราะห์ฮอร์โมนทั้งสองมีวิถีบางส่วนที่เกี่ยวเนื่องกัน (Yang และคณะ, 2009)

5) ฟอสฟอรัส เป็นธาตุอาหารที่เป็นปัจจัยจำกัดในการเจริญเติบโตของพืช การขาดแคลนธาตุชนิดจะรุนแรงมากขึ้นเมื่อในดินมีปริมาณน้ำจำกัด (Wenzel, 2009) โดยฟอสฟอรัสนั้นเป็นธาตุจำเป็นสำหรับสิ่งมีชีวิตทุกชนิด พบในดินในปริมาณที่สูง แต่ฟอสฟอรัสที่อยู่ในรูปละลายน้ำในดิน เช่น โมโนเบสิกฟอสเฟต (H_2PO^{4-}) และ ไดเบสิกฟอสเฟต (HPO_2^{4-}) มีปริมาณต่ำมาก เพียงประมาณ 1 ppm หรือน้อยกว่า ส่วนใหญ่ฟอสฟอรัสมักอยู่ในรูปที่พืชและจุลินทรีย์นำไปใช้งานไม่ได้ ซึ่งมาจากการใส่ปุยฟอสฟอรัสเพื่อเพิ่มธาตุอาหารแก่พืชในดินของเกษตรกร (Rodríguez และ Fraga, 1999) การแก้ปัญหาการขาดแคลนฟอสฟอรัสทำได้โดยใช้แบคทีเรียกลุ่มสนับสนุนการเจริญของพืชที่มีความสามารถในการละลายฟอสเฟตในการเปลี่ยนรูปฟอสฟอรัสในรูปที่ใช้งานไม่ได้มาอยู่ในรูปที่ใช้งานได้โดยอาศัยกลไก เช่น การปรับสภาวะเป็นกรด (Acidification) การคีเลท (Chelation) การแลกเปลี่ยนประจุ (Exchange reaction) การผลิตกรดอินทรีย์หรือการย่อยสลายสารอินทรีย์ที่มีฟอสเฟตเป็นองค์ประกอบ เป็นต้น (Ma และคณะ, 2011)

6) เอ็กโซโพลีแซ็คคาไรด์ (Exopolysaccharides, EPS) แบคทีเรียกลุ่มสนับสนุนการเจริญของพืชจะสะสม EPS เพื่อป้องกันความเป็นพิษลดการนำโซเดียมไอออนเข้าสู่เซลล์และช่วยในการเข้าครอบครองบริเวณรากพืชของแบคทีเรีย ส่งผลให้พืชทนทานต่อความเครียดออสโมติกและความเค็มมากขึ้น (Qurashi และ

คณะ, 2012) ในสภาวะแห้งแล้ง EPS จะมีบทบาทสำคัญ ในการป้องกันอันตรายทั้งในพืชและแบคทีเรียเมื่อเจริญในสภาวะขาดน้ำ เช่น *Azospirillum brasilense* Sp245 สร้าง EPS ที่ประกอบด้วยสารประกอบคาร์โบไฮเดรตเชิงซ้อน ได้แก่ lipopolysaccharide protein complex และ polysaccharide-lipid complex (Bashan และคณะ, 2004) และ *Pseudomonas fluorescens* กระตุ้นการสะสม ajmalicine (antihypertension alkaloid) ในดอกแพงพวย *(Catharanthus roseus*) เพิ่มมากขึ้นเพื่อให้อยู่รอดได้ในสภาวะแห้งแล้ง (Jaleel และคณะ, 2007)

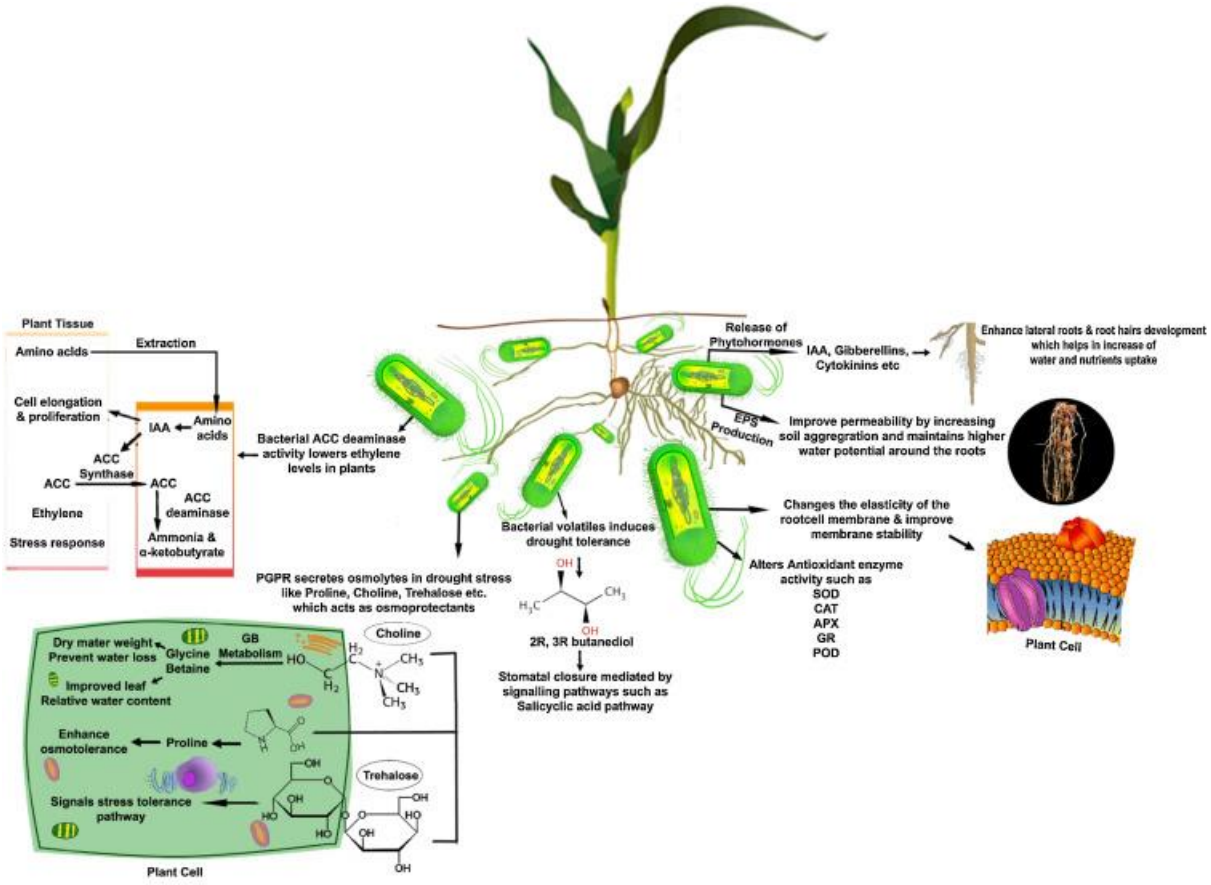
7) กรดอินโดลอะซีติก (Indole-3-Acetic Acid, IAA) เป็นฮอร์โมนพืชกลุ่มออกซิน มีบทบาทต่อการยืดยาวและการแบ่งเซลล์ รวมทั้งช่วยกระตุ้นการเจริญและพัฒนาการเกี่ยวกับกลไกการป้องกันตนเองของพืช ทำให้รากพืชมีพื้นที่ผิวรากเพิ่มขึ้น ความสามารถในการลำเลียงธาตุอาหารก็จะสูงขึ้นตามไปด้วย (Yang และคณะ, 2009)

ตารางที่ 2.1 เปรียบเทียบชนิดของแบคทีเรีย ปริมาณฮอร์โมนและสารส่งเสริมการเจริญของพืช

แบคทีเรีย	IAA ($\mu g\ ml^{-1}$)	ACC deaminase (μM a-ketobutyrate $mg^{-1}\ h^{-1}$)	การใช้งาน	พืชที่นำมาใช้ประโยชน์	อ้างอิง
Bacillus (2), *Microbacterium, Methylophaga, Agromyces,* และ *Paenibacillus*	10.54 - 37.65	0.60 – 1.35	Greenhouse - แช่เมล็ด 1 ชั่วโมง ในแต่ละสารละลายเซลล์ 6 ชนิด	- ข้าว (*cv.* Naveen)	Bal และคณะ (2013)
Enterobacter, Serratia, Klebsiella, และ *Escherichia*	8.7 – 11.5	0.0 – 2.6	Potting experiment - เติมสายแขวนลอยเซลล์	- เมล็ดทานตะวัน (*Helianthus annuus*)	Carlos และคณะ (2016)
Bacillus licheniformis UHI(II)7	28	3.9	-	-	Saharan และคณะ (2014)
Pseudomonas putida REN5 Pseudomonas fluorescens REN1	13.28-15.40	195-267	Greenhouse - เติมสายแขวนลอยเซลล์ (5×10^{8} cells ml^{-1}) ที่ผสม 1% carboxymethylcellulose (CMC)	- ข้าว	Etesami และคณะ (2016)

ตารางที่ 2.1 (ต่อ)

แบคทีเรีย	IAA ($\mu g\ ml^{-1}$)	ACC deaminase (μM a-ketobutyrate $mg^{-1}\ h^{-1}$)	การใช้งาน	พืชที่นำมาใช้ประโยชน์	อ้างอิง
M. luteus I-A-R-2, Pseudomonas sp. *I-A-R-28* และ *S. europaeiscabiei I-A-R-11*	20-89	-	-	-	Szymanska และคณะ (2016)
B. subtilis LK14	579.36	45.85	Greenhouse - เติมสายแขวนลอยเซลล์ 10^8 CFU/mL	- ต้นกล้ามะเขือเทศ	Khan และคณะ (2016)
Bacillus amyloliquefaciens NBRISN13	35.6	0.17	Hydroponic culture - ทดสอบการทนเกลือ Greenhouse - เติมสายแขวนลอยเซลล์ SN13 (1×10^7 CFU/ml) ในดิน	- ข้าว	Nautiyal และคณะ (2013)



รูปที่ 2.4 กลไกกระตุ้นการทนแล้งของพืชโดยแบคทีเรียบริเวณรากที่ช่วยส่งเสริมการเจริญของพืช (Vurukonda และคณะ, 2016)

2.3 การคัดแยกแบคทีเรียทนแล้งบริเวณรากพืชที่ช่วยส่งเสริมการเจริญของพืช

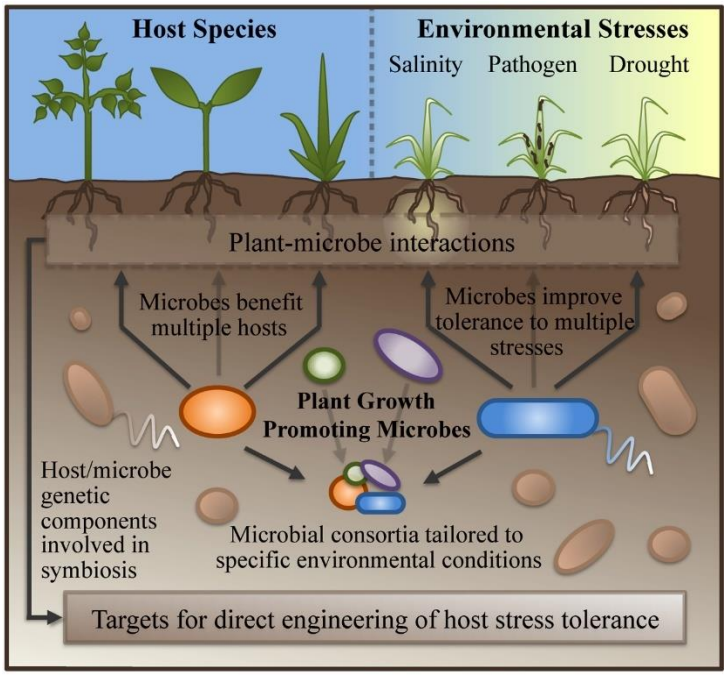
การคัดแยกแบคทีเรียบริเวณรากพืชที่ช่วยส่งเสริมการเจริญของพืช (Plant Growth Promoting Rhizobacteria ; PGPR) ที่สามารถทนต่อความแห้งแล้งได้ ทำได้โดยเพาะเลี้ยงแบคทีเรียจากดินบริเวณรากพืชต่างชนิดกันที่ปลูกในที่ที่มีฝนตกน้อย เช่น กระบองเพชร ข้าวฟ่าง ทานตะวัน ข้าวสาลี และ ข้าวโพด ซึ่งในบริเวณรากพืชแต่ละชนิดนี้ก็จะมีความจำเพาะของแบคทีเรียที่แตกต่างกันไป โดยวิธีที่นิยมเริ่มจากการคัดแยกแบคทีเรียที่ทนต่อสภาวะแล้งโดยเพาะเลี้ยงในอาหาร Tryptic soya broth (TSB) ที่มีความเข้มข้นของ Polyethylene glycol (PEG) 6000 ในช่วง 30-40% ให้ค่าศักย์ของน้ำเป็น คือ -1.027 ถึง -1.757 MPa ทั้งนี้ PEG 6000 เป็นสารเคมีโพลิเมอร์สังเคราะห์ที่มีคุณสมบัติเป็น Hydrophilic มีมวลโมเลกุล 6000 ดาลตัน นิยมใช้ในการดัดแปลงค่า osmotic potential ของสารละลายอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อเหนี่ยวนำให้เกิดการขาดน้ำ และนิยมใช้กับการทดสอบการทนแล้งของพืช (Kumar และคณะ 2011) นอกจาก PEG 6000 แล้ว สารเคมีที่นิยมใช้สร้างสภาวะแล้งอีกชนิดหนึ่ง คือ น้ำตาลซอร์บิทอล (Sorbitol) และ เกลือ (NaCl) ดังตัวอย่างในตารางที่ 2.2 แต่เนื่องจากแบคทีเรียบางชนิดย่อยสลายน้ำตาลนี้ได้ ทำให้ค่า osmotic potential ของอาหารสูงขึ้น จึงไม่เลือกมาใช้ในงานวิจัยนี้ เมื่อพบว่ามีแบคทีเรียสามารถเจริญได้ในอาหาร TSB ที่ผสม PEG 6000 ก็แสดงว่าเป็นแบคทีเรียทนแล้ง

ตารางที่ 2. 2 ตัวอย่างวิธีการคัดแยกแบคทีเรียทนแล้ง

ตัวอย่าง	อาหารเลี้ยงเชื้อ	แบคทีเรีย	พืชที่จะนำมาใช้ประโยชน์	อ้างอิง
ดินบริเวณรากพืชของต้นทานตะวันและข้าวฟ่าง	TSB + PEG 6000	*P. putida* AP-P45	ทานตะวัน	Sandhya และคณะ (2009)
ดินบริเวณรากพืช	TSB + PEG 6000	*Pseudomonas* sp.	-	Ali และคณะ (2014)
ดินบริเวณรากพืชของข้าวฟ่าง ข้าวโพด และทานตะวัน	TSA + PEG 6000	*Bacillus* spp.	ข้าวโพด	Vardharajula และคณะ (2011)
ดินบริเวณรากพืช	Nutrient broth (NB) + PEG 6000	*Bacillus* sp.	โคลเวอร์ขาว	Benabdellah และคณะ (2011)
ดินบริเวณรากพืชของข้าวบาร์เลย์ป่า	เตรียมตัวอย่างโดยใช้ความร้อน 80°C เป็นเวลา 30 นาที และ TSA + NaCl	แบคทีเรียสร้างเอ็นโดสปอร์	ข้าวสาลี	Timmusk และคณะ (2011)
ดินบริเวณรากพืชของกระบองเพชร	TSA + Sorbitol	ส่วนใหญ่เป็น *Bacillus* sp.	ข้าวโพด	Kavamura และคณะ (2013)

เมื่อได้แบคทีเรียทนแล้งแล้ว จะตรวจหาคุณสมบัติเฉพาะของ PGPR เช่น การสร้างเอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์ (exopolysaccharide), ACC deaminase, การผลิต IAA, ไฮโดรเจนไซยาไนด์, ไซเดอโรฟอร์, การสร้างเอนไซม์คะตาเลซ และการละลายของฟอสเฟต ซึ่งลักษณะเฉพาะเหล่านี้เป็นปัจจัยสำคัญที่ช่วยให้พืชสามารถเจริญเติบโตได้ในภาวะแห้งแล้ง (Vardharajula และคณะ, 2011; Chakraborty และคณะ, 2012; Armada และคณะ, 2013; Glick, 2013) เมื่อได้แบคทีเรียทนแล้งที่มีสามารถส่งเสริมการเจริญของพืช จะสามารถนำมาใช้ประโยชน์ได้ โดยนักวิทยาศาสตร์เรียกแนวทางการใช้ประโยชน์นี้ว่า Symbiont-based approaches ซึ่งยังสามารถใช้กับความเครียดแบบอื่นๆ ของพืชด้วย (Coleman-Derr และ Tringe, 2014) ดังตัวอย่างรูปที่ 2.5 โดยจุลินทรีย์มีบทบาทดังนี้

1) จุลินทรีย์ที่อยู่ร่วมกับพืชมักจะสามารถช่วยให้พืชหลากหลายชนิดทนต่อความเครียด โดยจุลินทรีย์ส่งเสริมการเจริญของพืชสามารถทำประโยชน์ให้พืชทั้งในกลุ่มของพืชใบเลี้ยงคู่ และพืชใบเลี้ยงเดี่ยว
2) จุลินทรีย์ส่งเสริมการเจริญของพืชสามารถช่วยให้พืชทนต่อความเครียดได้หลายชนิดพร้อมกัน ทั้งที่เป็นความเครียดจากสิ่งมีชีวิต เช่น เชื้อก่อโรค และไม่มีชีวิต เช่น เกลือ และความแล้ง
3) จุลินทรีย์มีวิวัฒนาการร่วมกับพืชในธรรมชาติมายาวนาน ทำให้มีแหล่งข้อมูลพันธุกรรมขนาดใหญ่ ดังนั้นจุลินทรีย์จึงสามารถเพิ่มความยืดหยุ่นทางพันธุกรรมของพืช ช่วยให้สามารถปรับตัวได้มากขึ้น



รูปที่ 2.5 บทบาทของแบคทีเรียในดินต่อการตอบสนองต่อสภาวะเครียดในพืช (Coleman-Derr และ Tringe, 2014)

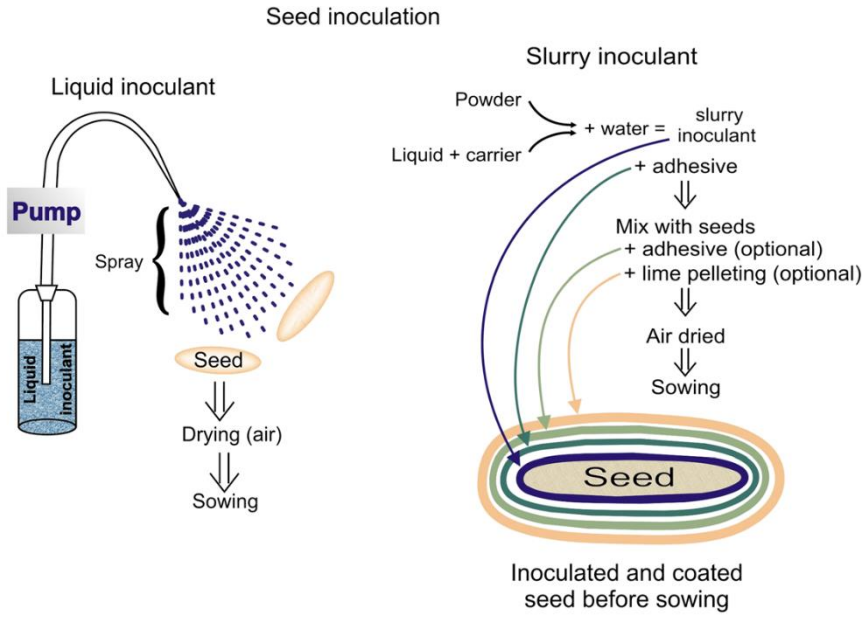
จากที่กล่าวมาข้างต้นจะเห็นว่าความรู้เกี่ยวกับแบคทีเรียในดินต่อการส่งเสริมให้พืชทนแล้งนั้น ยังมีน้อยมาก และกลไกที่จะอธิบายเกี่ยวกับความสัมพันธ์ระหว่างพืชและแบคทีเรียทนแล้งมีความซับซ้อน อย่างไรก็ตามแบคทีเรียเหล่านี้สามารถช่วยปกป้องพืชต่อสภาวะแล้ง ช่วยให้พืชเจริญได้ดี และฟื้นตัวจากสภาวะแล้งได้ดีขึ้น ในประเทศไทยซึ่งเป็นประเทศเกษตรกรรมที่น้ำมีความสำคัญกับภาคการเกษตร ยังมีการศึกษาเรื่องแบคทีเรียทนแล้งไม่มาก ดังนั้นงานวิจัยในครั้งนี้จึงจะนำแบคทีเรียทนแล้งที่กลุ่มผู้วิจัยคัดแยกได้ก่อนหน้านี้ มาทดสอบคุณสมบัติของการทนแล้ง จากนั้นทดสอบประสิทธิภาพการทนแล้งกับพืชเศรษฐกิจ 2 ชนิด คือ ข้าวเจ้าและข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ แล้วนำมาผลิตในรูปแบบหัวเชื้อแบคทีเรียเพื่อให้สะดวกต่อการใช้งาน การผลิต และการจำหน่าย ในอนาคต

2.4 การผลิตหัวเชื้อแบคทีเรียเพื่อใช้ส่งเสริมการเจริญของพืช

หัวเชื้อแบคทีเรียสามารถส่งเสริมประสิทธิภาพของการทำเกษตร โดยลดต้นทุนการผลิตและลดมลพิษสิ่งแวดล้อมจากการลดปริมาณปุ๋ยเคมี อย่างไรก็ดีประสิทธิภาพของหัวเชื้อแบคทีเรียขึ้นกับสารอาหารที่ปล่อยจากรากพืช ความสามารถในการเพิ่มจำนวนบริเวณราก และคุณภาพของดิน (Souza และคณะ, 2015) การผลิตหัวเชื้อแบคทีเรียเพื่อใช้ประโยชน์ทางการเกษตรมีการพัฒนาขึ้นมาใช้อย่างช้านาน เป้าหมายของการใช้งานเพื่อให้แบคทีเรียเหล่านี้ช่วยกระตุ้นการเจริญของพืช คุณสมบัติของหัวเชื้อแบคทีเรียที่ดี จะต้องใช้งานง่าย สามารถใช้กับวัสดุปลูกในระยะการเพาะต้นกล้าได้ สามารถเก็บได้เป็นระยะเวลานาน ใช้ได้ดีกับดินชนิดต่าง ๆ และสภาวะแวดล้อมที่แตกต่างกันไป และปลอดภัยต่อผู้ใช้งาน สูตรการผลิตหัวเชื้อแบคทีเรียสามารถแบ่งได้เป็น 4 รูปแบบคือ หัวเชื้อสูตรน้ำ สูตรข้น (slurry) สูตรเม็ด และสูตรผง ขึ้นอยู่กับการใช้งาน หัวเชื้อสูตรน้ำนั้น

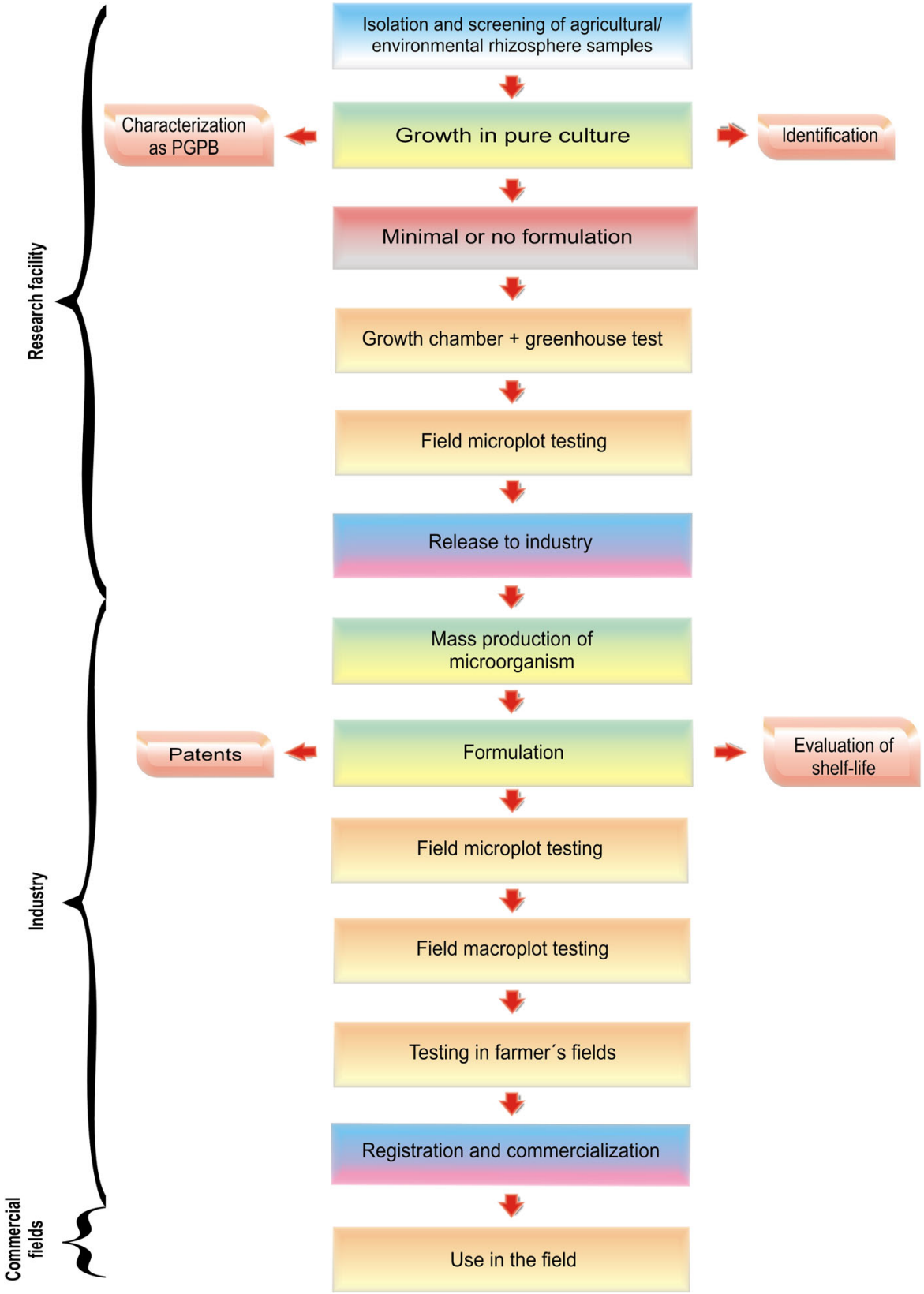
ใช้งานง่าย แต่มีข้อเสียที่อายุการเก็บรักษาสั้น และต้องเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่ำ ในขณะที่การผลิตหัวเชื้อสูตรเม็ดและสูตรผง มีต้นทุนการอัดเม็ดและการทำแห้งที่ค่อนข้างสูง (Bashan และคณะ, 2014)

การใช้หัวเชื้อแบคทีเรียนั้นมีวิธีการหลัก ๆ 2 วิธี ได้แก่การใช้กับเมล็ดและการใช้กับดิน วิธีการใช้หัวเชื้อแบคทีเรียกับเมล็ดนั้นเป็นวิธีที่ง่ายและนิยมใช้กับการเตรียมเมล็ดเพื่อปลูกปริมาณไม่มากนัก อาจใช้มือหรืออุปกรณ์ในการช่วยคลุกหรือแช่เมล็ด เช่น rotating drums ถังผสมซีเมนต์ หรือเครื่องจักรอื่น ๆ ในการเคลือบเมล็ดจะมีการใช้สารเติมแต่งที่ไม่เป็นพิษ เพื่อช่วยให้แบคทีเรียยึดเกาะกับผิวเมล็ดได้ดีขึ้น เช่น gum arabic, carboxy methyl cellulose (CMC), สารละลายซูโครส และน้ำมันพืช เป็นต้น ตัวอย่างวิธีการเตรียมเมล็ดพันธุ์เคลือบหัวเชื้อแบคทีเรียแบ่งเป็น การใช้หัวเชื้อในรูปของเหลว (Liquid inoculant) และรูปของเหลวกึ่งแข็ง (Slurry inoculant) ดังรูปที่ 2.6 (Bashan และคณะ, 2014) ส่วนการใช้หัวเชื้อแบคทีเรียกับดินนั้นนิยมใช้กับฟาร์มขนาดใหญ่ที่มีพื้นที่เพาะปลูกมาก ข้อเสียคือ วิธีการใช้กับดินนั้นต้องการเครื่องมือและอุปกรณ์ที่ยุ่งยากกว่า และยังต้องการปริมาณหัวเชื้อแบคทีเรียมากกว่าวิธีการแรก โครงการวิจัยนี้สนใจการเคลือบเมล็ดพืชด้วยหัวเชื้อแบคทีเรีย เนื่องจากเป็นวิธีที่ยอมรับในอุตสาหกรรมและแบคทีเรียที่ใช้จะสามารถเจริญบริเวณรากพืชที่งอกใหม่ได้ ทำให้มีผลดีต่อพืชโดยตรง (O'Callaghan และคณะ, 2012)



รูปที่ 2.6 วิธีการเตรียมเมล็ดพันธุ์เคลือบหัวเชื้อแบคทีเรีย (Bashan และคณะ, 2014)

สำหรับขั้นตอนการพัฒนาผลิตภัณฑ์หัวเชื้อแบคทีเรียสำหรับใช้ในการเกษตร มีรายละเอียดดังรูปที่ 2.7 โดยขั้นแรกนักวิจัยจะต้องหาแบคทีเรียหรือกลุ่มจุลินทรีย์ที่ดีสำหรับพืชเป้าหมาย ต่อมาคือการร่วมมือกับอุตสาหกรรมเพื่อพัฒนาสูตรหัวเชื้อ (Formulations) สำหรับใช้งานกับพืช และพัฒนาวิธีการใช้สูตรหัวเชื้อให้สะดวกกับการเพาะปลูกพืช ขั้นสุดท้ายคือการพัฒนาธุรกิจเพื่อให้สามารถนำไปสู่การจำหน่ายต่อไป ทั้งนี้ในการประเมินประสิทธิภาพของหัวเชื้อ จะทดสอบตั้งแต่ระดับห้องปฏิบัติการ โรงเรือน แปลงทดลอง ไปจนถึงระดับแปลงปลูกขนาดใหญ่

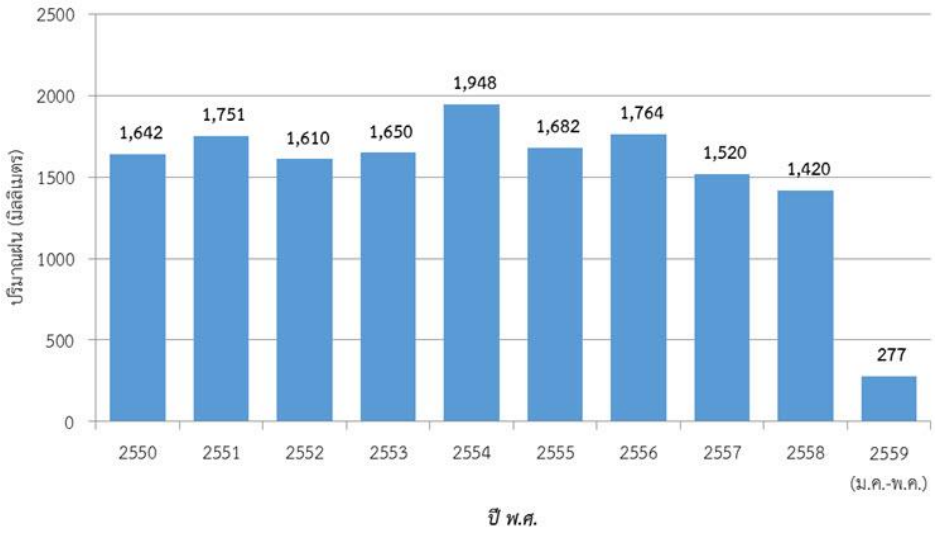


รูปที่ 2.7 ขั้นตอนการพัฒนาผลิตภัณฑ์หัวเชื้อแบคทีเรียสำหรับใช้ในการเกษตร (Bashan และคณะ, 2014)

2.5 ปัญหาภัยแล้งต่อการเพาะปลูกข้าวและข้าวโพดในประเทศไทย

ประเทศไทยจัดอยู่ในเขตภูมิอากาศชื้นและแห้ง ดังนั้นความแห้งแล้งจึงเป็นปรากฏการณ์ธรรมชาติที่เกิดขึ้นเป็นปรกติ ความแห้งแล้งด้านการเกษตร หมายถึง สภาวะที่มีฝนน้อยหรือไม่มีฝน ทำให้เกิดการขาดแคลนน้ำสำหรับพืช ข้าวเป็นอาหารอันดับหนึ่งของโลก การปลูกข้าวในแต่ละท้องถิ่นจะแตกต่างกันไปตามสภาพของดินฟ้าอากาศ และสังคมของท้องถิ่นนั้น ๆ ในแหล่งที่ต้องอาศัยน้ำจากฝนเพียงอย่างเดียว เกษตรกรต้องประมาณระยะเวลาการปลูกข้าวให้เหมาะสมกับช่วงที่มีฝนตกสม่ำเสมอ และเก็บเกี่ยวในช่วงที่ฤดูฝนหมดพอดี (มูลนิธิข้าวไทย ในพระบรมราชูปถัมภ์, 2560) เมื่อประสบปัญหาภัยแล้งจะทำให้ปริมาณและคุณภาพผลผลิตเกิดความเสียหาย ในประเทศไทย ธวัชชัย ณ นคร (2526) รายงานว่าเมื่อต้นข้าวอยู่ในสภาวะการขาดน้ำในระยะที่มีการเจริญเติบโตทางลำต้นและใบ จะทำให้ผลผลิตลดลงประมาณ 17% แต่เมื่อต้นข้าวได้รับสภาวะการขาดน้ำที่ระยะการสร้างรวงอ่อนจนถึงรวงแก่เต็มที่จะส่งผลให้ผลผลิตลดลงถึง 30% ดังนั้นระยะการสร้างรวงข้าวเป็นระยะที่ไวต่อการขาดน้ำมากกว่าระยะการเจริญของต้นกล้า

จากการสำรวจของศูนย์สารสนเทศการเกษตรในปี พ.ศ. 2555 ประเทศไทยมีการใช้ประโยชน์ที่ดินทางการเกษตรที่เกี่ยวข้องกับการเพาะปลูกข้าวทั้งหมดกว่า 69.96 ล้านไร่ ซึ่งเป็นพื้นที่ทำการเกษตรมากกว่าประเภทอื่น แสดงให้เห็นว่าพืชไร่ทางเศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศไทยมาจากการผลิตข้าวเป็นหลัก และข้าวยังเป็นอาหารหลักที่ประชากรส่วนใหญ่บริโภค ในปี พ.ศ. 2557 มีเนื้อที่ในการเพาะปลูกน้อยลง เนื่องจากปริมาณน้ำในเขื่อนใหญ่มีปริมาณลดลง ทำให้ภาคเหนือตอนล่างและภาคกลางตอนบนไม่สามารถทำนาปรังได้หรือปลูกได้เพียงรอบเดียว ส่งผลให้ผลผลิตต่อไร่ลดลง เนื่องจากประสบกับปัญหากับสภาพอากาศที่แห้งแล้งเป็นเวลายาวนาน และปริมาณน้ำฝนลดลง (สำนักเศรษฐกิจการเกษตร, 2558) จากข้อมูลล่าสุดปริมาณฝนรายปีในช่วง พ.ศ. 2550-2559 ที่ผ่านมา พ.ศ. 2558 เป็นปีที่ประเทศไทยมีปริมาณฝนน้อยที่สุด โดยมีปริมาณฝนรวมทั้งปี 1,420 มิลลิเมตร (กรมอุตุนิยมวิทยา, 2559)



รูปที่ 2.8 ปริมาณน้ำฝนรายปี พ.ศ. 2550-2559 (กรมอุตุนิยมวิทยา, 2559)

นอกจากนี้ปัญหาภัยแล้งในปี 2558 ยังส่งผลต่อการปลูกข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ในช่วงปี 2558-2559 เนื่องจากปริมาณน้ำฝนที่ลดลง ทำให้เกษตรกรนอกเขตพื้นที่ชลประทานไม่สามารถปลูกข้าวโพดได้ และเนื้อที่เพาะปลูกลดลง เนื่องจากเกษตรกรปรับเปลี่ยนไปปลูกพืชอื่น เช่น มันสำปะหลังโรงงาน และอ้อยโรงงาน เนื่องจากประสบปัญหาภัยแล้ง สำหรับผลผลิตต่อไร่ลดลง เนื่องจากฝนทิ้งช่วง และกระทบแล้งในช่วงออกดอก ทำให้ฝักแคระแกร็น ในขณะที่ประเทศไทยมีการทำฟาร์มปศุสัตว์เลี้ยงสุกร โค และไก่ เพิ่มมากขึ้น อย่างไรก็ดีมีความต้องการใช้ข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ของไทยปี 2558 จำนวน 5.34 ล้านตัน ซึ่งเพิ่มขึ้นจาก 5.04 ล้านตัน ในปี 2557 หรือเพิ่มขึ้นร้อยละ 5.95 เนื่องจากภาคอุตสาหกรรมการเลี้ยงสัตว์ยังคงขยายตัวเพิ่มขึ้น สถานการณ์ผลผลิตข้าวโพดไทยทั้งประเทศจึงมีแค่พอใช้ปีต่อปี ต้องสั่งนำเข้าจากต่างประเทศทำให้ต้นทุนอาหารสัตว์สูงขึ้น (ไทยรัฐ, 2559; สำนักงานเศรษฐกิจและการเกษตร, 2558) ดังนั้นการหาวิธีส่งเสริมการเจริญของข้าวและข้าวโพดในสภาวะแล้งจึงมีความจำเป็น ทั้งต่อเกษตรกรในภาคต่างๆ อุตสาหกรรมที่เกี่ยวเนื่องกับผลผลิตข้าวและข้าวโพด และระบบเศรษฐกิจโดยรวมของประเทศไทย

2.6 ตัวอย่างงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

อนิสรา สุไลมาน และคณะ (2557) ศึกษาการเจริญเติบโตของข้าวภายใต้สภาวะแล้งที่มีการใช้แบคทีเรีย *Bacillus amyloliquefaciens* HS105 ที่แยกได้จากบ่อน้ำพุร้อนและพิสูจน์แล้วว่ามีคุณสมบัติในการทนอุณหภูมิสูงสุดได้ประมาณ 60°C โดยแบคทีเรียนี้เป็นปฏิปักษ์ต่อ *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (Xoo) ที่เป็นสาเหตุโรคขอบใบแห้งของข้าว เมื่อนำ *Bacillus amyloliquefaciens* HS105 มาใช้เพื่อส่งเสริมให้ต้นข้าวเกิดความทนทานต่อสภาพแล้งน้ำ โดยคลุกหัวเชื้อกับเมล็ดพันธุ์ข้าวหอมปทุมธานี แล้วทดลองในระดับไร่นาโดยงดการให้น้ำ 2 สัปดาห์ ในระยะข้าวออกรวง พบว่า HS105 ยังคงความสามารถในการลดการเกิดโรค การส่งเสริมการเจริญเติบโตพืช และการเพิ่มผลผลิตข้าวได้ในระดับที่ดีเช่นเดียวกับข้าวที่เจริญในสภาพปกติ

Sandhya และคณะ (2009) คัดแยก *Pseudomonas* spp. จากบริเวณอาณาเขตราก (rhizosphere) ของข้าวฟ่างและทานตะวัน ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB ที่เติมสารเคมี polyethylene glycol (PEG 6000) เพื่อกระตุ้นสภาวะแล้ง ผลการทดลองพบว่า ที่ความเข้มข้นสูงสุด 25% PEG 6000 (-0.73 MPa) พบ *Pseudomonas* spp. 26 ไอโซเลท เมื่อวิเคราะห์การผลิต Exopolysaccharide พบว่า *Pseudomonas putida* strain GAP-P45 สามารถผลิต Exopolysaccharide ได้มากที่สุด และเมื่อทดสอบการงอกและการเจริญของเมล็ดทานตะวันในสภาวะแล้ง เปรียบเทียบกับสภาวะปกติ พบว่า GAP-P45 ช่วยให้ทานตะวันสามารถอยู่รอดได้ในสภาวะแล้ง (งดให้น้ำ) เป็นเวลา 4 วัน และยังช่วยกระตุ้นการเจริญของปลายยอดและปลายราก เพิ่มมวลของต้นทานตะวัน และเพิ่มเปอร์เซ็นต์การเกาะของเม็ดดินบริเวณรากอีกด้วย

Vardharajula และคณะ (2011) คัดแยก *Bacillus* spp. จากบริเวณอาณาเขตราก (rhizosphere) ของข้าวฟ่าง ทานตะวัน ข้าวโพด ที่มีคุณสมบัติทนต่อสภาวะแล้งในห้องทดลอง โดยการเติมสารเคมี polyethylene glycol (PEG 6000) ในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA แบคทีเรียที่คัดแยกได้มีคุณสมบัติในการเพิ่มปริมาณกรดอะมิโนอิสระภายในเซลล์, proline, total soluble sugars, และ exopolysaccharides ทดสอบการตอบสนองต่อการงอกของเมล็ดและการเจริญของต้นอ่อนข้าวโพด พบว่าแบคทีเรียที่คัดแยกได้นี้สามารถกระตุ้นการงอกของเมล็ดข้าวโพดได้ดี และยังทำให้ข้าวโพดทนต่อสภาวะแล้ง (งดให้น้ำ) เป็นเวลา 6 วัน โดยเมล็ดข้าวโพดที่คลุกเชื้อก่อนปลูกมี biomass และการเจริญของรากและยอดดีกว่าเมล็ดที่ไม่ได้คลุกเชื้อในสภาวะแล้ง

Kavamura และคณะ (2013) โดยคัดแยกแบคทีเรียจากดินใต้ต้นกระบองเพชรที่เจริญเติบโตในพื้นที่ต่างๆ 5 แหล่ง ของประเทศบราซิล โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีค่า water activity 0.957 โดยการเติม sorbitol 405 กรัม/ลิตร เพื่อจำลองสภาวะการขาดน้ำที่อุณหภูมิ 40 ˚C ซึ่งแบคทีเรียสกุลที่พบมากที่สุด คือ *Bacillus* sp. จากนั้นนำแบคทีเรียที่คัดแยกได้มาทดสอบความสามารถในการทนแล้ง โดยอาหารเลี้ยงเชื้อที่ water activity 0.919 จึงมีแบคทีเรียเพียง 65% ของสายพันธุ์ทั้งหมดที่สามารถเจริญได้ นอกจากนี้พบว่ามีแบคทีเรีย 65% ของสายพันธุ์ทั้งหมด สามารถผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ที่เป็นสารที่ช่วยปกป้องจุลินทรีย์จากการคายน้ำได้ แบคทีเรีย 4% ผลิต IAA ได้มากกว่า 51 μg mL^{-1} ซึ่งเป็นฮอร์โมนพืชที่เกี่ยวกับการเจริญเติบโต ส่วนสายพันธุ์ที่มีการละลายแคลเซียมและฟอสฟอรัสมีเพียง 6% และแบคทีเรียที่ย่อยคาร์บอกซีเซลลูโลสซึ่งเป็นส่วนประกอบของผนังเซลล์รามี 74% นอกจากนี้ *Bacillus* spp. สองสายพันธุ์ คือ *B. subtilis* LMA3 และ LMA52 สามารถส่งเสริมการเจริญเติบโตของต้นข้าวโพดได้ดี โดยทดสอบจากการนำเชื้อแต่ละชนิดใส่ไปบนเมล็ดข้าวโพด แล้วปลูกในสภาพแวดล้อมจำลองภายใต้ความเครียดจากภาวะแห้งแล้ง

Ali และคณะ (2014) คัดแยก *Pseudomonas* sp. จากดินและทดสอบความสามารถในการทนต่อสภาวะแล้งในห้องทดลอง โดยการเติมสารเคมี polyethylene glycol (PEG 6000) ในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB จากการทดลองพบว่า *Pseudomonas* sp. 9 ไอโซเลต สามารถเจริญได้ในอาหารทดลองสูตรดัดแปลงนี้ แสดงว่าทั้ง 9 ไอโซเลตนี้เป็นแบคทีเรียทนต่อความแห้งแล้งได้ดี นอกจากนี้ทั้ง 9 ไอโซเลต ยังพบว่ามีการสร้างเอนไซม์ 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase ทำให้พืชไม่สามารถสร้างฮอร์โมนเอธิลีนได้ จึงลดการแห้งเหี่ยวของพืชได้

Timmusk และคณะ (2014) ได้คัดแยกแบคทีเรียรอบรากพืชตระกูลหญ้าที่ขึ้นบนภูเขาในพื้นที่แห้งแล้ง คือ *Bacillus thuringiensis* AZP2 พบว่าช่วยส่งเสริมการเจริญของต้นข้าวสาลีภายใต้สภาวะแล้งจากการขาดน้ำได้ดี เมื่อเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่เติมแบคทีเรีย ทั้งยังเพิ่มกระบวนการสังเคราะห์แสงและมวลชีวภาพของต้นข้าวสาลี โดยตรวจสอบจากการวัดการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบของสารระเหยและอัตราการปลดปล่อยของสารระเหยจากใบข้าวสาลี ด้วยวิธีการวิเคราะห์ GC-MS ซึ่งเป็นวิธีการใหม่สำหรับตรวจสอบพืชที่ทนต่อสภาวะเครียดที่มีประสิทธิภาพ ทั้งยังสามารถอธิบายประสิทธิภาพของแบคทีเรียแต่ละชนิดในการส่งเสริมให้พืชทนต่อสภาวะเครียด โดยผลการทดลองพบว่าต้นข้าวสาลีที่มีการเติมหัวเชื้อแบคทีเรียลงไปสามารถลดการปลดปล่อยสารระเหยที่นำมาเปรียบเทียบทั้ง 3 ชนิด ได้แก่ benzaldehyde, geranyl acetone และ β-pinene เมื่อเปรียบเทียบกับต้นข้าวสาลีที่ไม่ได้เติมเชื้อแบคทีเรียเมื่ออยู่ภายใต้สภาวะแล้ง และนอกจากนี้อัตราการปลดปล่อยของสารระเหยที่มากขึ้น ส่งผลต่อการรอดชีวิตของของข้าวสาลีลดลงในสภาวะแล้ง

Rolli และคณะ (2015) ศึกษาแบคทีเรียส่งเสริมการเจริญของพืชในสภาวะที่แห้งแล้งซึ่งมีความสัมพันธ์กับระบบรากของต้นองุ่น โดยคัดแยกแบคทีเรียจากดินบริเวณรอบรากต้นองุ่น และในเนื้อเยื่อของราก แล้วศึกษาศักยภาพการส่งเสริมการเจริญเติบโตของต้นองุ่นเมื่ออยู่ในสภาวะเครียดจากการขาดแคลนน้ำ พบว่าแบคทีเรียสายพันธุ์เดี่ยวบางสายพันธุ์ เช่น *Pseudomonas* sp. S1, *Acinetobacter* sp. S2, *Bacillus* sp. S4 และ *Delftia* sp. S6 และแบคทีเรียผสม 6 สายพันธุ์ สามารถเพิ่มน้ำหนักสดของราก ใบ และความสูงของต้นองุ่นได้ การทำงานของแบคทีเรียส่งเสริมการเจริญของพืชจะขึ้นอยู่กับสภาวะเครียดจากการขาดน้ำ ความสามารถในการเกาะติดกับรากต้นองุ่น และการเกาะกันเป็นกลุ่มของแบคทีเรีย ทั้งนี้การใช้หัวเชื้อแบคทีเรียส่งผลต่อความหลากหลายของสังคมแบคทีเรียที่สัมพันธ์กับราก และเมื่อทดสอบในแปลงปลูกพบว่าหัวเชื้อแบคทีเรียสามารถป้องกันต้นองุ่นจากสภาวะแห้งแล้งได้

Kumari และคณะ (2015) ศึกษาการปรับปรุงประสิทธิภาพของ *Pseudomonas simiae* AU ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่ส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช โดยวิธีการกลายพันธุ์ด้วยสาร N-methyl-N-nitro-N-nitrosoguanidine เชื้อสายพันธุ์กลายมี 5 สายพันธุ์ คือ AU-M1, AU-M2, AU-M3, AU-M4 และ AU-M5 พบว่าสายพันธุ์ AU-M4 มีการละลายฟอสเฟต กิจกรรมของเอนไซม์ ACC deaminase และความเข้มข้นของ IAA สูง เมื่อเทียบกับสายพันธุ์ดั้งเดิมและสายพันธุ์กลายอื่นๆ ภายใต้สภาวะแห้งแล้ง เมื่อทำการตรวจสอบผลที่เกิดจากเชื้อสายพันธุ์ดั้งเดิมและสายพันธุ์กลายกับต้นถั่วเขียวภายใต้สภาวะแล้ง พบว่าสายพันธุ์กลาย AU-M4 ที่ใส่ลงไปในพืชส่งเสริมการทนต่อสภาวะแล้ง โดยสังเกตจากมวลชีวภาพของพืช ค่าปริมาณน้ำในพืช และการสะสมโพรลีนที่สูงขึ้น การบาดเจ็บที่เกิดจากความเครียดออสโมติกต่ำลง แบคทีเรียสายพันธุ์กลาย AU-M4 และสายพันธุ์ปกติ AU จะลดระดับเอทิลีนในพืชลงเป็น 59% และ 45% ตามลำดับ เมื่อเทียบกับชุดควบคุมภายใต้สภาวะเครียด นอกจากนี้พบว่าแบคทีเรียที่ใส่ในพืชช่วยลดขนาดของปากใบและค่าการสังเคราะห์แสงสุทธิ ทำให้ในถั่วเขียวมีปริมาณน้ำสูงขึ้น ซึ่งช่วยในการอยู่รอดของพืชในภาวะแล้ง

Ortiz และคณะ (2015) ศึกษาเปรียบเทียบประสิทธิภาพหัวเชื้อจุลินทรีย์จาก 2 แหล่ง คือ จุลินทรีย์จากภายนอก (Allochthonous) และจุลินทรีย์จากบริเวณเพาะปลูกนั้น (Autochthonous) ต่อการเจริญเติบโตของต้นโคลเวอร์ขาว (*Trifolium repens*) ในดินแห้งแล้งปกติ (natural arid soil) ภายใต้สภาวะแล้ง ทั้งนี้เพื่อต้องการเลือกจุลินทรีย์ให้เหมาะสมกับการนำไปใช้ต่อไป ผลการศึกษาพบว่า *Bacillus thuringiensis* (Bt) ที่เป็น Authochthonous และ *Pseudomonas putida* (Psp) ที่เป็น Allochthonous สามารถลดความเครียดจากการขาดน้ำ โดยเพิ่มปริมาณสารอาหารและน้ำ ลดการคายน้ำ ลดการสูญเสียอิเล็คโตรไลต์ และลดโพรลีนและกิจกรรมของเอนไซม์ Ascorbate peroxidase (APX) นอกจากนี้การใช้ราไมคอร์ไรซาช่วยส่งเสริมประสิทธิภาพของแบคทีเรียต่อการลดความเครียดจากการขาดน้ำได้ ทั้งนี้เมื่อนำจุลินทรีย์ที่มาจากคนละแหล่งผสมกัน พบว่าสามารถทำงานร่วมกันในพืชโดยปรับตัวให้เข้ากับการทนต่อภาวะขาดน้ำและลดอันตรายที่เกิดจากความเครียดจากการขาดน้ำ ผลการศึกษาสรุปได้ว่าการทำงานเสริมกัน (synergistic) ของจุลินทรีย์หลายชนิดช่วยใช้พืชเจริญเติบโตภายใต้สภาวะแล้งได้

Marcelino และคณะ (2016) สนใจนำเทคโนโลยีการอัดขึ้นรูป (Extrusion technology) มาผลิตเป็นวัสดุขึ้นรูปที่ย่อยสลายได้ (biodegradable foam) สำหรับใช้เป็นวัสดุตรึงเซลล์แบคทีเรียส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช (PGPB) โดยขึ้นรูปวัสดุตรึงเซลล์ทั้งหมด 6 สูตร ซึ่งมีความแตกต่างของสัดส่วนของวัตถุดิบที่นำมาขึ้นรูป ได้แก่ แป้งมันสำปะหลัง ชานอ้อย กลีเซอรอล หินฟอสเฟต น้ำตาลกรวด หางนมชนิดผง สารสกัดยีสต์ และฟอสเฟตบัฟเฟอร์ โดยวัสดุตรึงเซลล์ที่เหมาะสมมีความหนาแน่นต่ำ มีความพรุนสูง ราคาต่ำ และรักษาแบคทีเรียให้มีชีวิตอยู่ในช่วง 120 วัน จากนั้นเตรียมหัวเชื้อของ *Azospirillum brasilense* ความเข้มข้น $1x10^7$ เซลล์/มล. ในอาหารเหลว MCA4 แล้วใส่ในวัสดุตรึงเซลล์ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วปริมาณ 4 มล. จะได้ปริมาณเซลล์สุดท้ายเป็น $2x10^6$ เซลล์/ก. การวิเคราะห์ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแสดงให้เห็นว่าหัวเชื้อแบคทีเรียเกาะกับวัสดุโดยการสร้างไบโอฟิล์ม เมื่อนำหัวเชื้อแบคทีเรียในวัสดุขึ้นรูปใส่ลงในดิน 10 วัน ก่อนทำการปลูกเมล็ดข้าวโพด เพื่อป้องกันสารอาหารในวัสดุตรึงเซลล์ที่ส่งผลต่อการเจริญของต้นข้าวโพด พบว่าแบคทีเรียสามารถมีชีวิตอยู่ได้ในวัสดุขึ้นรูปชนิดใหม่ และยังคงประสิทธิภาพในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชได้

Kumar และคณะ (2016) ศึกษาการเสริมกันของแบคทีเรีย PGPR 2 ชนิด คือ *Pseudomonas putida* NBRIRA และ *Bacillus amyloliquefaciens* BRISN13 เมื่อใช้ในรูปแบบหัวเชื้อผสม ต่อการลดความเครียดจากการขาดน้ำของต้นถั่วลูกไก่ (chickpea) ในระดับโรงเรือน ผลการทดลองโดยใช้การติดฉลากโปรตีน gfp พบว่า

แบคทีเรียทั้ง 2 ชนิด สามารถเจริญและเพิ่มจำนวนบริเวณรากพืชได้ โดยแบคทีเรียมีบทบาทในการผลิตฮอร์โมนพืชที่ส่งเสริมการเจริญของรากฝอย ซึ่งช่วยให้นำเข้าน้ำและสารอาหารเข้าในเซลล์ แล้วทำให้พืชมีชีวมวลเพิ่มขึ้นและมีความเครียดลดลง โดยการใช้หัวเชื้อแบคทีเรียผสมให้ผลดีกว่าเมื่อใช้แบคทีเรียชนิดใดชนิดหนึ่ง อย่างไรก็ดีจำเป็นต้องศึกษาเพิ่มเติมถึงกระบวนการและการควบคุมความสัมพันธ์ของจุลินทรีย์บริเวณรากพืชและพืช เพื่อให้สามารถสร้างมาตรฐานของการปฏิบัติที่ส่งเสริมการผลิตทางเกษตรที่ยั่งยืนได้

Shahzad และคณะ (2017) คัดแยก *Bacillus amyloliquefaciens* RWL-1 ที่มีความสามารถในการผลิต abscisic acid (ABA) ทั้งในสภาวะปกติและสภาวะเครียดจากความเค็ม ฮอร์โมนดังกล่าวมีหน้าที่ช่วยเหนี่ยวนำให้เกิดการปิดของปากใบ เพื่อลดการคายน้ำ นอกจากนี้ยังสามารถผลิตกรดอะมิโน เช่น กรดกลูตามิก และโพรลีน กรดอะมิโนดังกล่าวเป็นสารป้องกันแรงดันออสโมติก (osmoprotectant) สามารถปกป้องพืชได้โดยตรงหรือเป็นสารตั้งต้นหรือควบคุมการสังเคราะห์สารป้องกันแรงดันออสโมติก ซึ่งช่วยลดความเครียดของพืชที่เกิดจากความแล้งได้ และแบคทีเรียนี้ยังช่วยให้ต้นกล้าข้าวทนต่อสภาวะความเค็มที่มีเกลือ 250 mM ได้ดีกว่าชุดทดลองไม่เติมเชื้อ การส่งเสริมและพัฒนาการใช้ประโยชน์ฮอร์โมนพืชที่ได้จากการผลิตโดยแบคทีเรีย อาจจะทำเป็นปุ๋ยชีวภาพที่เป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม เพื่อให้พืชเจริญเติบโตและทนต่อสภาวะความเค็มได้ดียิ่งขึ้น

บทที่ 3

การคัดกรองแบคทีเรียทนแล้งที่มีสมบัติในการส่งเสริมการเจริญของพืช

3.1 การคัดแยกแบคทีเรียทนแล้งสายพันธุ์ต่าง ๆ จากดินบริเวณรากพืช

3.2 การทดสอบคุณสมบัติการผลิตสารส่งเสริมการเจริญของพืชจากแบคทีเรียทนแล้ง

3.3 การทดสอบคุณสมบัติการทนเกลือ และอุณหภูมิสูงของแบคทีเรียทนแล้งที่คัดเลือก

บทนำ

แบคทีเรียทนแล้งที่ใช้ในโครงการวิจัยนี้ คัดแยกจากตัวอย่างดินที่ใช้ในการปลูกข้าว อ้อย และข้าวโพด ของอำเภอท่าวุ้ง อำเภอชัยบาดาล อำเภอลำสนธิ และอำเภอเมือง จังหวัดลพบุรี (ตารางที่ 3.1) และดินบริเวณรากข้าวหอมมะลิ 105 และข้าวเหนียว กข6 จากอำเภอเมือง จังหวัดร้อยเอ็ด (รูปที่ 3.1) รวมทั้งสิ้น 112 ไอโซเลต ซึ่งทั้ง 2 จังหวัดนี้มีรายงานปัญหาภัยแล้ง โดยข้อมูลของสำนักป้องกันภัยธรรมชาติและความเสี่ยงทางการเกษตร ในปี 2556-2557 พบว่าหลายอำเภอในจังหวัดลพบุรี เช่น ลำสนธิ ชัยบาดาล โคกสำโรง และอำเภอเมืองลพบุรี เป็นอำเภอที่พบพื้นที่แล้งซ้ำซากบ่อยครั้ง โดยเฉพาะอำเภอที่ห่างไกลจากพื้นที่ชลประทาน สำหรับจังหวัดร้อยเอ็ดประสบปัญหาเกี่ยวกับภัยแล้งดังที่สังเกตได้จากปริมาณน้ำฝนเฉลี่ย 10 ปี ระหว่างพ.ศ. 2542-2551 ในแต่ละเดือนของจังหวัดร้อยเอ็ด โดยในเดือนเมษายน มีปริมาณน้ำฝนอยู่ที่เฉลี่ย 93.80 ± 17.30 มิลลิเมตร และเพิ่มมากขึ้นเป็น 217.75 ± 25.88 มิลลิเมตรในเดือนพฤษภาคม ส่วนปริมาณน้ำฝนสูงสุดจะอยู่ในเดือนมิถุนายน (255.90 ± 34.67 มิลลิเมตร) และสิงหาคม (257.18±32.77 มิลลิเมตร) ก่อนที่ปริมาณจะลดลงอย่างรวดเร็วในเดือนตุลาคม และฤดูฝนสิ้นสุดในเดือนพฤศจิกายน ส่วนปริมาณน้ำฝนทั้งปีเฉลี่ยเป็น 1,488.38 ± 252.03 มิลลิเมตร

แบคทีเรียทนแล้งแต่ละไอโซเลตที่เลือกมาศึกษามีลักษณะโคโลนีแตกต่างกัน เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง โดยประสิทธิภาพในการทนแล้งดูจากการเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB ที่เติม PEG 6000 ความเข้มข้น 30 - 40% (w/v) (แรงดันออสโมติก ที่ 25 องศาเซลเซียส คือ -1.027 และ -1.757 MPa ตามลำดับ) (Sandhya และคณะ, 2009; Ali และคณะ, 2014; Vardharajula และคณะ 2011) การคัดกรองแบคทีเรียทนแล้งที่มีสมบัติในการส่งเสริมการเจริญของพืช ดูจากกิจกรรมของแบคทีเรียดังต่อไปนี้ การละลายฟอสเฟต การผลิตกรดอินโดลอะซีติก (IAA) การผลิตเอนไซม์คะตาเลซ (Catalase) การผลิตเอนไซม์เอซีซีดีอะมิเนส (ACC deaminase) การผลิตเอ็กโซโพลีแซ็กคาไรด์ที่เป็นองค์ประกอบของไบโอฟิลม์ และการผลิตสารลดแรงตึงผิวหรือสารก่ออิมัลชัน นอกจากนี้ยังนำแบคทีเรียที่คัดเลือกมาทดสอบการทนเกลือและอุณหภูมิสูง และศึกษาการเป็นปฏิปักษ์ต่อกัน โดยคาดว่าการผลิตเอนไซม์ ACC deaminase จะช่วยลดระดับเอธิลีนที่ปกติทำหน้าที่ยับยั้งการยืดตัวของรากและยับยั้งการเจริญของพืช การผลิต IAA จะช่วยเพิ่มจำนวนรากและปรับกิจกรรมที่เกี่ยวกับการขนส่ง การผลิตเอนไซม์คะตาเลซจะช่วยทำลายอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นในสภาวะแห้งแล้งและลดความเสียหายจากปฏิกิริยาออกซิเดชัน และการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ที่เป็นองค์ประกอบของไบโอฟิลม์สามารถช่วยเพิ่มปริมาณน้ำรอบๆ ราก และทำให้ดินจับตัวดีขึ้น (Glick 2014; Timmusk และคณะ, 2014; Yang และคณะ, 2009, Sandhya และคณะ, 2009; Forchetti และคณะ, 2007) นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าสารลดแรงตึงผิวที่ผลิตจาก

แบคทีเรีย เช่น แรมโนลิพิด ช่วยป้องกันเซลล์ต่อลดความเครียดของปฏิกิริยาออกซิเดชันได้ (Pacheco และคณะ, 2012)

ระเบียบวิธีวิจัย

3.1 การคัดแยกแบคทีเรียทนแล้งสายพันธุ์ต่าง ๆ จากดินบริเวณรากพืช

1) เก็บตัวอย่างดินที่ระดับความลึกจากผิวดิน 0-15 เซนติเมตร จากพื้นที่แล้งซ้ำซากที่ใช้ในการปลูกข้าวและพืชไร่ในจังหวัดลพบุรี ดังตารางที่ 3.1 และเก็บตัวอย่างดินบริเวณรากข้าวหอมมะลิ 105 และข้าวเหนียว กข 6 จากอำเภอเมือง จังหวัดร้อยเอ็ดที่ปลูกต่างบริเวณกัน โดยแปลงข้าวเหนียวและข้าวหอมมะลิอยู่ห่างกัน 500 เมตร สุ่มเก็บต้นข้าวมาชนิดละ 3 กอ โดยจะเก็บตัวอย่างดินจากต้นข้าวในช่วงฤดูฝน (เดือนสิงหาคม พ.ศ. 2558) และในช่วงฤดูหนาว (เดือนธันวาคม พ.ศ. 2558)

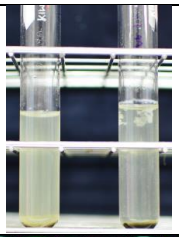
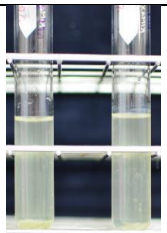
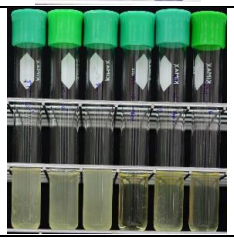
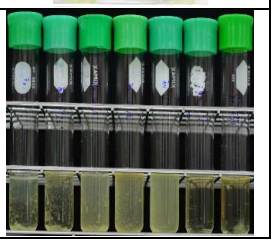
2) การคัดแยกแบคทีเรียจากดินในจังหวัดลพบุรี ใช้วิธีเจือจางตัวอย่างดินแล้วเลี้ยงในอาหารเหลว โดยชั่งตัวอย่างดินแต่ละจุด ๆ ละ 10 กรัม ใส่ลงในขวดรูปชมพู่ที่มีน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อปริมาตร 90 มิลลิลิตร ทำการเจือจางโดยเจือจางครั้งละ 10 เท่า (ten-fold serial dilution) โดยใช้ปิเปตดูดสารแขวนลอยจากหลอดหนึ่งสู่หลอดหนึ่งปริมาตร 1 มิลลิลิตร เขย่าด้วยเครื่อง vortex mixture ก่อนดูดทุกครั้งเพื่อการกระจายตัวของเชื้อจุลินทรีย์ให้ทั่วทั้งหลอด เจือจาง 10^{-1} ถึง 10^{-6} จากนั้นปิเปตสารละลายแบคทีเรียปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงในหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อ Trypticase soya broth (TSB) ที่เติม polyethylene glycol (PEG 6000) ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (Uma และคณะ, 2013; Ali และคณะ, 2014) หลังจากนั้นแยกเชื้อบริสุทธิ์ของแบคทีเรียโดยวิธี streak plate โดยใช้ loop แตะเชื้อแล้วนำมา cross streak บนหน้าอาหารแข็ง NA บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2-3 วัน ทำซ้ำอีก 1-2 ครั้งเพื่อให้ได้เชื้อที่บริสุทธิ์ จากนั้นย้ายเชื้อทั้งหมดลงในหลอดอาหารเอียงแข็ง NA บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เก็บเชื้อที่อุณหภูมิห้อง เขี่ยแยกเชื้อใหม่ (subculture) ทุกเดือนตลอดการทดลอง

3) การคัดแยกแบคทีเรียจากดินในจังหวัดร้อยเอ็ด ใช้วิธี Enrichment ในอาหารเหลว TSB ที่เติม 30% PEG6000 เป็นเวลา 3 สัปดาห์ เพื่อเพิ่มปริมาณแบคทีเรียทนแล้ง โดยนำตัวอย่างดินบริเวณรากข้าวมาจำนวน 5 กรัม ใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว TSB ที่เติม 30% PEG6000 ปริมาตร 50 มิลลิลิตร แล้วเติมสารละลายไนสแตติน ลงไป 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เพื่อเป็นการยับยั้งการเจริญของเชื้อราในดิน จากนั้นบ่มเขย่าที่ 200 รอบต่อนาที 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 สัปดาห์ แล้วถ่ายเชื้อ 5 มิลลิลิตร จากขวดรูปชมพู่เดิมไปใส่ในขวดใหม่ บ่มต่ออีกเป็นเวลา 1 สัปดาห์ ทำแบบนี้ซ้ำอีก 2 รอบ แล้วปิเปตตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร มา spread ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง TSA บ่มที่ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง (Vardharajula และคณะ, 2010; Chakraborty และคณะ, 2012) คัดแยกโคโลนีที่มีลักษณะแตกต่างกันมาขีดลงบน TSA เพื่อเป็นการเก็บเชื้อ แล้วนำไปย้อมแกรมและทดสอบความสามารถของเชื้อแบคทีเรียทนแล้งต่อไป

ตารางที่ 3.1 ตำแหน่งที่เก็บตัวอย่างดินสำหรับคัดแยกแบคทีเรียทนแล้งในจังหวัดลพบุรี

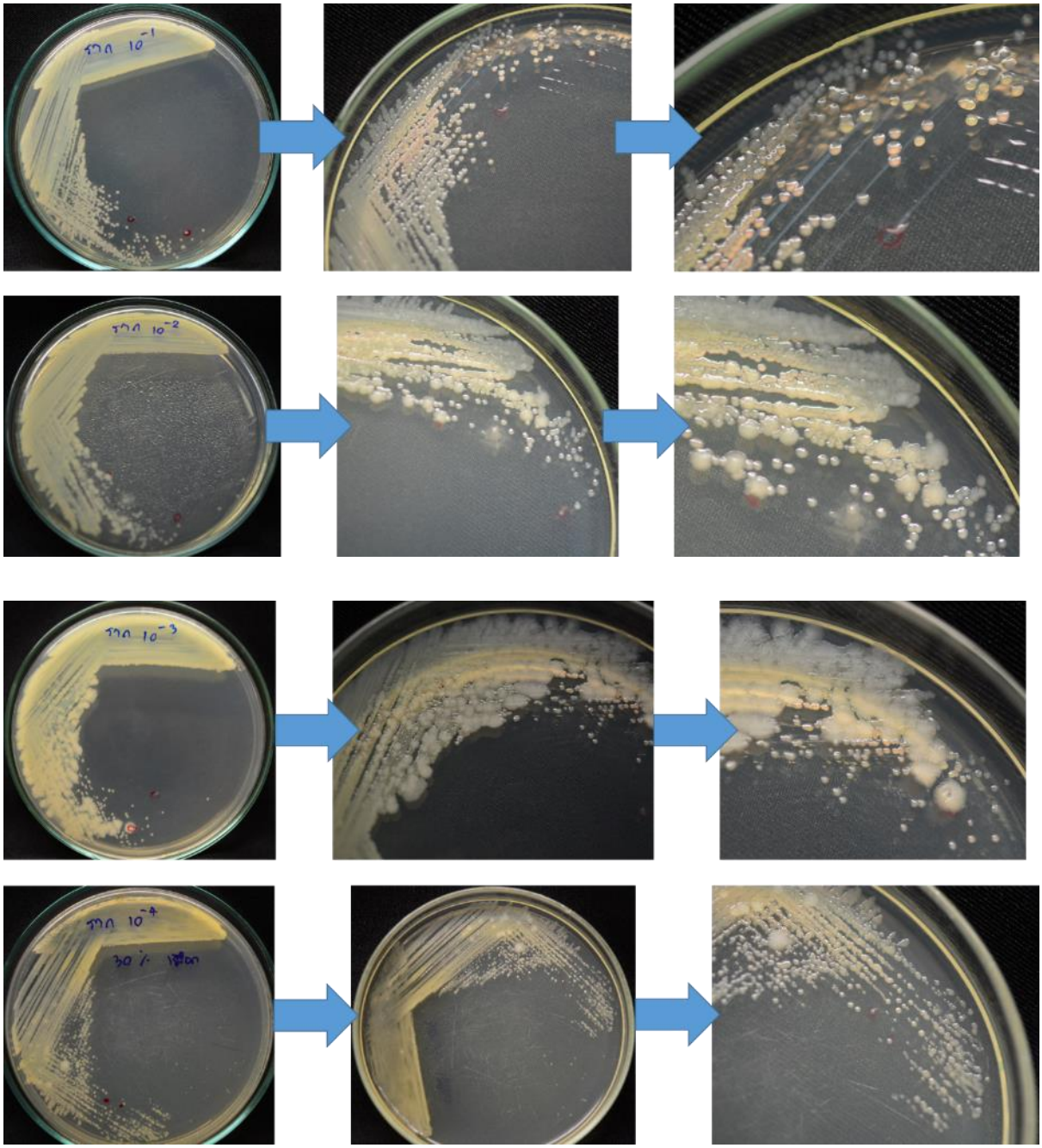
สถานที่	ระยะเวลาเก็บตัวอย่าง	จำนวนแบคทีเรียที่คัดแยกได้ (ไอโซเลต)
1. ไร่อ้อย อ.ลำสนธิ	มกราคม 2558	20
2. ไร่อ้อย ต.ม่วงค่อม, ต.บัวชุม, ต.ชัยนารายณ์ อ.ชัยบาดาล	ธันวาคม 2557	10
3. นาข้าว อ.ท่าวุ้ง	กุมภาพันธ์ 2558	20
4. ไร่ข้าวโพด ต.นิคมสร้างตนเอง อ.เมือง	เมษายน 2558	9
5. ไร่มันสำปะหลัง ต.เขาแหลม อ.ชัยบาดาล	เมษายน 2558	10
6. ไร่อ้อย ต.หนองยายโต๊ะ อ.ชัยบาดาล	เมษายน 2558	9

ตารางที่ 3.2 ตัวอย่างรากพืชจากจังหวัดลพบุรี และการคัดแยกแบคทีเรียทนแล้ง

รากและดินรอบรากพืชในอาหารเหลว TSB ที่เติม PEG6000 (ซ้าย 30% ขวา 40%) ครั้งที่ 1			
เมื่อเลี้ยงครบ 7 วัน ย้ายตัวอย่างลงในอาหารเหลว TSB ที่เติม PEG6000 บ่มต่ออีก 7 วัน			

(ก) (ข) (ค) (ง)

รูปที่ 3.1 ตัวอย่างข้าวจากจังหวัดร้อยเอ็ด ได้แก่ ข้าวเหนียว กข 6 (ก), ข้าวหอมมะลิ 105 (ข) ที่เก็บในเดือนสิงหาคม พ.ศ. 2558 และข้าวเหนียว กข 6 (ค), ข้าวหอมมะลิ 105 (ข) ที่เก็บในเดือนธันวาคม พ.ศ. 2558



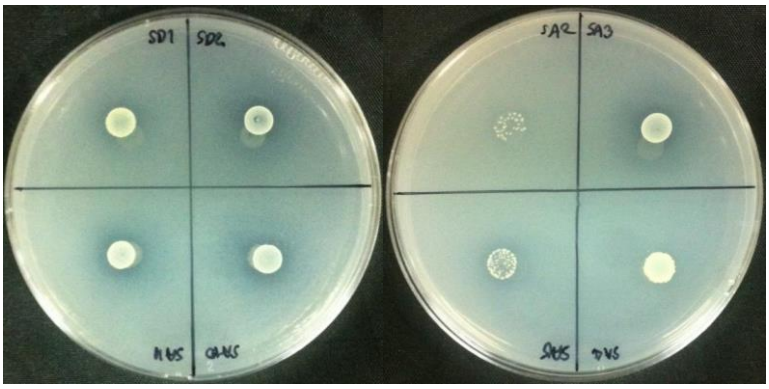
รูปที่ 3.2 ตัวอย่างอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA ที่มีแบคทีเรียหลายชนิด ซึ่งได้จากการนำตัวอย่างรากข้าวมาบ่มในอาหารเหลว TSB ที่เติม PEG6000 เพื่อเพิ่มจำนวนแบคทีเรียทนแล้ง (วิธี Enrichment)

3.2 การทดสอบคุณสมบัติการผลิตสารส่งเสริมการเจริญของพืชจากแบคทีเรียทนแล้ง

ศึกษาสมบัติที่เกี่ยวข้องกับการเจริญของพืชของแบคทีเรียทนแล้ง โดยวิธีดังต่อไปนี้

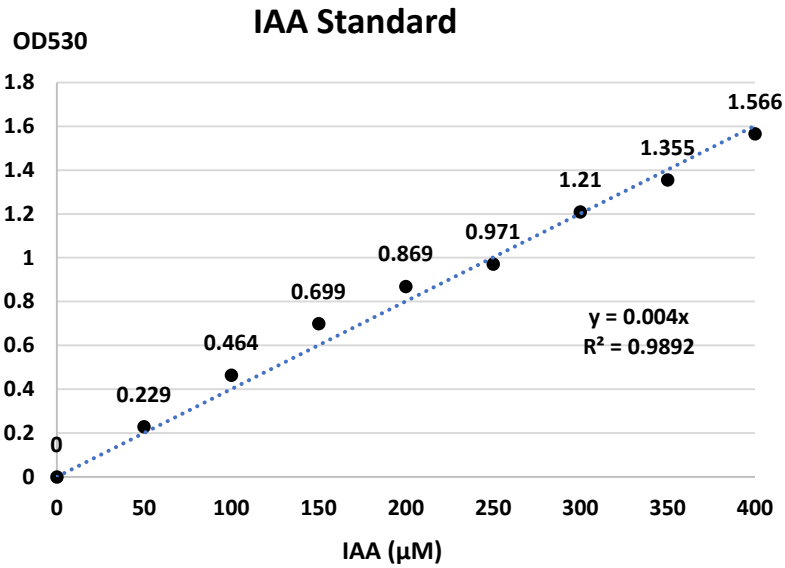
ก. การละลายฟอสเฟต - ทดสอบแบคทีเรียทนแล้งที่คัดแยกได้ต่อการละลาย tri-calcium phosphate (TCP) ในอาหารแข็ง PKV โดยปิเปตสารละลายแบคทีเรียปริมาตร 10 ไมโครลิตร ลงกลางจานอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง PKV บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน บันทึกเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีของเชื้อและเส้นผ่านศูนย์กลางโซนใส บันทึกเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีของเชื้อและเส้นผ่านศูนย์กลางโซนใส (clear zone) เพื่อนำมาคำนวณค่า phosphate solubilisation index (SI) (clear zone) (Paul and Sinha, 2013)

$$\text{Solubilization Index (SI)} = \frac{\text{Colony diameter + Halo zone diameter}}{\text{Colony diameter}}$$

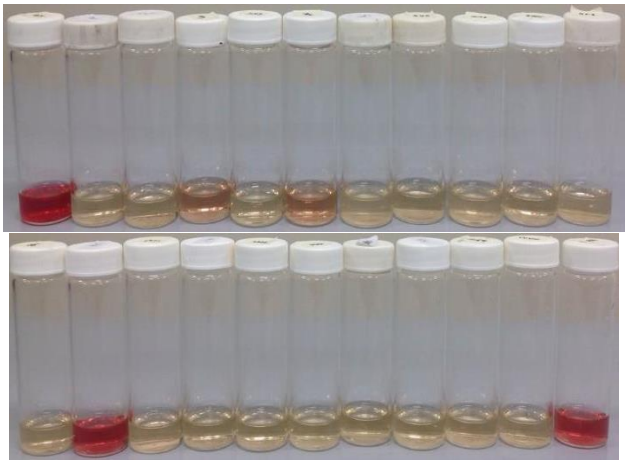


รูปที่ 3.3 ลักษณะของโคโลนีและการเกิดโซนใสของแบคทีเรียย่อยฟอสเฟต บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PKV

ข. การผลิต IAA - ถ่ายเชื้อแบคทีเรียทนแล้งที่คัดแยกได้ลงในอาหาร TSB ที่เติม L-Tryptophan เขย่าในสภาพไร้แสงเป็นเวลา 2 วัน นำมาปั่นแยกเซลล์ที่ 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เก็บส่วนสารละลาย (supernatant) ของแต่ละตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์ปริมาณ IAA โดยใช้น้ำยาทดสอบ Salkovskii reagent แล้ววัดค่าสีที่เกิดขึ้นด้วยเครื่อง Spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 530 นาโนเมตร เปรียบเทียบปริมาณ IAA กับค่าสีของสารละลายมาตรฐาน (Ahmad และคณะ, 2008)



รูปที่ 3.4 กราฟมาตรฐาน IAA



รูปที่ 3.5 ลักษณะของสีแดงที่เกิดขึ้นจากการผลิตฮอร์โมน IAA ของเชื้อแบคทีเรีย

ค. การผลิตเอนไซม์คะตาเลซ - หยดสารละลาย 3% ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ลงบนเชื้อแบคทีเรียที่กระจายบนแผ่นสไลด์ ถ้าพบว่าเกิดฟอง ให้ผลเป็นบวก ถ้าไม่เกิดฟองให้ผลเป็นลบ

รูปที่ 3.6 การเกิดฟองก๊าซจากเอนไซม์คะตาเลซของแบคทีเรียต่อไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์

ง. การทดสอบคุณสมบัติความทนเกลือ - เลี้ยงแบคทีเรียในหลอดอาหาร TSB เติม NaCl ที่ความเข้มข้น 0, 100, 200, 300, 500 และ 1,000 mM บ่มอุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 48 ชั่วโมง หลังจากนั้นนับจำนวนแบคทีเรียด้วยวิธี spread plate หรือการขีดเชื้อที่ความเจือจางต่างๆ บนอาหารแข็ง TSA (Shilev และคณะ, 2012; Lloret และคณะ, 1995)

จ. การทดสอบคุณสมบัติความทนอุณหภูมิ - เลี้ยงแบคทีเรียในหลอดอาหาร TSB แล้วบ่มที่อุณหภูมิต่างๆ คือ 30, 37, 45 และ 55 °C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง หลังจากนั้นนับจำนวนแบคทีเรียด้วยวิธี spread plate หรือการขีดเชื้อที่ความเจือจางต่างๆ บนอาหารแข็ง TSA (Shilev และคณะ, 2012; Lloret และคณะ, 1995)

ฉ. การสร้างไบโอฟิลม์ (EPS production) – เลี้ยงเชื้อแบคทีเรียทนแล้งที่คัดแยกได้ลงในอาหาร TSB ปริมาตร 4 มิลลิลิตร เป็นเวลา 4 วัน จากนั้นเติมสีย้อมอัลเซียนบลู หลอดละ 50 ไมโครลิตร และนำมาปั่นแยกเซลล์ที่ 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เก็บส่วนสารละลาย (supernatant) ของแต่ละตัวอย่างถ่ายใส่หลอดทดลอง วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 606 นาโนเมตร ตามวิธีการของ Chantamalee and Luepromchai (2012)

ช. การผลิต ACC deaminase – เลี้ยงเชื้อแบคทีเรียทนแล้งที่คัดแยกได้ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว DF ที่เติม ACC (1-Aminocyclopropane-1-Carboxylate) เป็นแหล่งไนโตรเจน วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร ตามวิธีการของ Penrose และ Glick (2003)

ซ. Surface tension – วัดค่าแรงตึงผิวของน้ำเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากเซลล์ ซึ่งอาจจะมีสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ถูกปล่อยออกมานอกเซลล์ ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ห้องด้วยเครื่อง tensiometer (Kruss, K100) เทียบกับชุดควบคุมอาหารเลี้ยง Production medium (PM) ที่ปราศจากการเติมเชื้อ อาหารเลี้ยงเชื้อ PM มีค่า Surface tension 42.34±0.044 mN/m

ฌ. E24 - ค่า E24 (Emulsion หลังจาก 24 ชั่วโมง) แสดงถึงคุณสมบัติของน้ำเลี้ยงเชื้อที่มีสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในการก่ออิมัลชัน โดยดัดแปลงจากงานวิจัย Vanavil และคณะ, (2013) นำน้ำมันปาล์ม ปริมาตร 300 ไมโครลิตร ใส่ลงในขวดแก้วจุกพลาสติก (shell vial) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ตามด้วยน้ำเลี้ยงเชื้อปริมาตร 300 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยการใช้เครื่องผสมสารละลาย (vortex mixer) ที่ระดับความเร็วสูงเป็นเวลา 2 นาที จากนั้นนำไปตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 24 ชั่วโมง วัดความสูงชั้นอิมัลชันที่เหลืออยู่ โดยคำนวณความเสถียรการเกิดอิมัลชัน (E24) ดังสูตรต่อไปนี้

$$E_{24} = \frac{H_{emulsion}}{H_{total}} \times 100$$

เมื่อ E24 คือ ความเสถียรของอิมัลชัน

$H_{emulsion}$ คือ ความสูงของชั้นอิมัลชัน

H_{total} คือ ความสูงของของเหลวทั้งหมด

ญ. การเป็นปฏิปักษ์ต่อเชื้อแบคทีเรียทนแล้งชนิดอื่น - เลี้ยงเชื้อแบคทีเรียทนแล้งที่คัดแยกได้ลงในอาหาร TSA ด้วยเทคนิค dual culture เพื่อสังเกตโซนใสที่เกิดขึ้นจากแบคทีเรียทนแล้งที่คัดแยกได้แต่ละไอโซเลตที่จับคู่กัน ถ้ามีโซนใสเกิดขึ้น แสดงว่าแบคทีเรีย 2 ชนิดนั้นต่อต้านกัน ไม่สามารถนำมาจัดกลุ่มร่วมกันในการสร้างกลุ่มแบคทีเรียทนแล้งสำหรับการทดลองปลูกพืชในกระถางและในโรงเรือนทดลองในขั้นต่อไปได้

ก. ข.

รูปที่ 3.7 ตัวอย่างการทดสอบการเป็นปฏิปักษ์ของแบคทีเรีย 5 ชนิด บนอาหารแข็ง โดย ก. ไม่พบการเป็นปฏิปักษ์กันเลย และ ข. แสดงโซนยับยั้งจากแบคทีเรียที่ขีดเป็นแนวตั้ง (เส้นขวาสุด) ต่อแบคทีเรียที่ขีดเป็นแนวขวาง

ฏ. การทนต่อเกลือและอุณหภูมิ – แบคทีเรียแบบเซลล์เดี่ยว ทำโดยนำแบคทีเรียแต่ละชนิดมาเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว TSB 50 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นปั่นแยกเซลล์ด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 °ซ เป็นเวลา 10 นาที และล้างเซลล์ด้วยน้ำเกลือ 0.85 เปอร์เซ็นต์ ทำขั้นตอนดังกล่าวซ้ำ 2 ครั้ง แล้วจึงนำเซลล์ที่ได้มาละลายในน้ำเกลือ 0.85 เปอร์เซ็นต์ และปรับความขุ่นของแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์ให้มีค่าเท่ากับ McFarland standards 0.5 สำหรับแบคทีเรียแบบเซลล์ผสม นำแบคทีเรียแบบเซลล์เดี่ยวทั้ง 6 สายพันธุ์ที่ปรับความขุ่นของแบคทีเรียให้มีค่าเท่ากับ McFarland standards 0.5 ผสมในสัดส่วนที่เท่ากัน หลังจากนั้นนำแบคทีเรียทั้งแบบเซลล์เดี่ยวและเซลล์ผสมมาทดสอบการเจริญในอาหารที่มีเกลือความเข้มข้นต่างๆ 6 ความเข้มข้น ได้แก่ ความเข้มข้น 0, 0.1, 0.5, 1, 3 และ 5% ในอาหารเลี้ยงเชื้อ 2 ชนิด คือ TSB และ TSB+PEG และทดสอบการเจริญของแบคทีเรียที่อุณหภูมิต่างๆ 4 อุณหภูมิ ได้แก่ 30, 37, 45 และ 55ºC ในอาหารเลี้ยงเชื้อ 2 ชนิด คือ TSB และ TSB+PEG โดยทดสอบใน 96 well plate ที่ใส่แบคทีเรียต่ออาหารในอัตราส่วน 1:1 และทำ 10-fold dilution ตั้งแต่ 10^{-1}-10^{-8} บ่มที่อุณหภูมิ 30 ºC สำหรับการทดสอบการเจริญในอาหารที่มีเกลือความเข้มข้นต่างๆ บ่มเป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำแบคทีเรียในแต่ละการเจือจางมาขีดลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง TSA

ผลการทดลอง

3.1 การคัดแยกแบคทีเรียทนแล้งสายพันธุ์ต่าง ๆ จากดินบริเวณรากพืช

จากการคัดแยกแบคทีเรียทนแล้งในอาณาเขตรากของพืช (rhizosphere) ในจังหวัดลพบุรี จำนวน 78 ไอโซเลต และต่อมาได้คัดแยกแบคทีเรียจากดินนาข้าวจังหวัดร้อยเอ็ดเพิ่มเติมในภายหลัง จำนวน 34 ไอโซเลต รวมทั้งสิ้น 112 ไอโซเลต ซึ่งมีลักษณะโคโลนีและการติดสีแกรมของแบคทีเรียจากจังหวัดลพบุรีและจังหวัดร้อยเอ็ด ดังตารางที่ 3.3 และ 3.4 ตามลำดับ โดยงานวิจัยนี้สามารถคัดแยกแบคทีเรียแกรมบวก 43 ไอโซเลต และแกรมลบ 35 ไอโซเลต จากจังหวัดลพบุรี และแบคทีเรียแกรมบวก 31 ไอโซเลต และแกรมลบ 3 ไอโซเลต จังหวัดร้อยเอ็ด สาเหตุที่พบสัดส่วนของแบคทีเรียแกรมบวกในดินจากจังหวัดร้อยเอ็ดมากกว่าแบคทีเรียแกรมลบ ในขณะที่แบคทีเรียจากจังหวัดลพบุรีมีสัดส่วนของแบคทีเรียแกรมบวกและแบคทีเรียแกรมลบใกล้เคียงกัน

การที่ได้ชนิดของแบคทีเรียต่างกันอาจเนื่องมาจากผู้วิจัยใช้วิธีการคัดแยกแบคทีเรียทนแล้งแตกต่างกัน โดยดินจากจังหวัดร้อยเอ็ดจะนำมาเพิ่มปริมาณแบคทีเรียทนแล้งก่อน ด้วยวิธี Enrichment ในอาหารเหลว TSB ที่เติม 30% PEG6000 เป็นเวลา 3 สัปดาห์ ทำให้แบคทีเรียที่ทนแล้งได้นานจริงๆ ถึงจะอยู่รอดได้ ในขณะที่ดินจากจังหวัดลพบุรีนั้น ผู้วิจัยนำดินมาคัดแยกแบคทีเรียทนแล้งโดยตรง จึงทำให้พบแบคทีเรียแกรมลบที่เจริญเร็วได้ โดยรายงานก่อนหน้านี้ เช่น Kavamura และคณะ (2013) และ Vardharajula และคณะ (2011) พบว่าแบคทีเรียทนแล้งส่วนใหญ่อยู่ในกลุ่ม Bacillus ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมบวก แต่ก็มีรายงานที่พบแบคทีเรียทนแล้งชนิดแกรมลบ เช่น *Pseudomonas*, *Enterobacter* และ *Acinetobacter* (Ali และคณะ, 2014; Carlos และคณะ, 2016) อย่างไรก็ดีงานวิจัยนี้เป็นการทดลองเกี่ยวกับแบคทีเรียทนแล้งเรื่องแรกๆ ของประเทศไทย ในเบื้องต้นจึงศึกษาคุณลักษณะเบื้องต้นของแบคทีเรียทั้ง 2 กลุ่ม ดังรายละเอียดในหัวข้อ 3.2 ข้อมูลที่ได้ยังแสดงให้เห็นถึงความหลากหลายของทรัพยากรแบคทีเรียในประเทศด้วย

ตารางที่ 3.3 คุณลักษณะเบื้องต้นของแบคทีเรียในอาณาเขตรากของพืชที่คัดแยกได้จากจังหวัดลพบุรี

ไอโซเลต แบคทีเรีย	แหล่งที่มา	ชนิดของพืช	แกรม	ลักษณะโคโลนี	เอนไซม์คะตาเลซ	การผลิต IAA (μM)	การละลายฟอสเฟต (เส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี, มม.)
L 1	อ.ลำสนธิ จ. ลพบุรี	อ้อย	แกรมบวก	กลม สีขาว ผิวมันวาว	ผลบวก	41.5±2.1	7.3
L 2	อ.ลำสนธิ จ. ลพบุรี	อ้อย	แกรมบวก	กลม สีขาว ผิวมันวาว	ผลบวก	43.9±4.2	7.0
L 3	อ.ลำสนธิ จ. ลพบุรี	อ้อย	แกรมบวก	กลม สีขาวขุ่น	ผลบวก	22.4±3.2	5.6
L 4	อ.ลำสนธิ จ. ลพบุรี	อ้อย	แกรมลบ	สีเหลือง มันวาว	ผลบวก	33.6±7.5	6.0
L 5	อ.ลำสนธิ จ. ลพบุรี	อ้อย	แกรมลบ	สีเหลือง มันวาว	ผลบวก	37.5±3.5	7.0
L 6	อ.ลำสนธิ จ. ลพบุรี	อ้อย	แกรมลบ	กลม สีขาวขุ่น	ผลบวก	37.7±4.9	4.3
L 7	อ.ลำสนธิ จ. ลพบุรี	อ้อย	แกรมลบ	กลม สีขาว ผิวมันวาว	ผลบวก	39.7±8.9	7.0
L 8	อ.ลำสนธิ จ. ลพบุรี	อ้อย	แกรมลบ	กลม สีขาวขุ่น	ผลบวก	40.5±3.2	8.3
L 9	อ.ลำสนธิ จ. ลพบุรี	อ้อย	แกรมลบ	สีเหลือง ผิวมันวาว	ผลบวก	139.4±7.2	8.0

ตารางที่ 3.3 (ต่อ)

ไอโซเลตแบคทีเรีย	แหล่งที่มา	ชนิดของพืช	แกรม	ลักษณะโคโลนี	เอนไซม์คะตาเลซ	การผลิต IAA (µM)	การละลายฟอสเฟต (เส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี, มม.)
L 10	อ.ลำสนธิ จ.ลพบุรี	อ้อย	แกรมบวก	สีเหลือง ผิวมันวาว	ผลบวก	44.1±1.4	8.0
L 11	อ.ลำสนธิ จ.ลพบุรี	อ้อย	แกรมบวก	กลม สีขาวขุ่น	ผลบวก	40.5±2.8	4.0
L 12	อ.ลำสนธิ จ.ลพบุรี	อ้อย	แกรมบวก	กลม สีขาวขุ่น	ผลบวก	39.9±3.7	5.0
L 13	อ.ลำสนธิ จ.ลพบุรี	อ้อย	แกรมบวก	เหลือง ไม่มันวาว	ผลบวก	30.1±2.1	3.0
L 14	อ.ลำสนธิ จ.ลพบุรี	อ้อย	แกรมลบ	กลม สีขาวขุ่น	ผลบวก	30.4±2.1	7.0
L 15	อ.ลำสนธิ จ.ลพบุรี	อ้อย	แกรมบวก	กลม สีขาวขุ่น	ผลบวก	25.5±3.7	4.0
L 16	อ.ลำสนธิ จ.ลพบุรี	อ้อย	แกรมบวก	กลม สีขาวขุ่น	ผลบวก	45.2±1.8	3.6
L 17	อ.ลำสนธิ จ.ลพบุรี	อ้อย	แกรมบวก	กลม สีขาวขุ่น	ผลบวก	40.8±0.4	5.0
L 18	อ.ลำสนธิ จ.ลพบุรี	อ้อย	แกรมบวก	กลม สีขาวขุ่น	ผลบวก	19.1±2.5	4.3

ตารางที่ 3.3 (ต่อ)

ไอโซเลตแบคทีเรีย	แหล่งที่มา	ชนิดของพืช	แกรม	ลักษณะโคโลนี	เอนไซม์คะตาเลซ	การผลิต IAA (μM)	การละลายฟอสเฟต (เส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี, มม.)
L 19	อ.ลำสนธิ จ.ลพบุรี	อ้อย	แกรมบวก	กลม สีขาวขุ่น	ผลบวก	39.3±2.1	18.0
L 20	อ.ลำสนธิ จ.ลพบุรี	อ้อย	แกรมบวก	กลม สีขาวขุ่น	ผลบวก	32.8±0.4	19.3
B 1	อ.ชัยบาดาล จ.ลพบุรี	อ้อย	แกรมบวก	ขอบหยัก สีขาวขุ่น	ผลบวก	31.5±0.2	6.7
B 2	อ.ชัยบาดาล จ.ลพบุรี	อ้อย	แกรมบวก	ขอบหยัก สีขาวขุ่น	ผลบวก	64.6±1.6	6.0
B 3	อ.ชัยบาดาล จ.ลพบุรี	อ้อย	แกรมบวก	ขอบหยัก สีขาวขุ่น	ผลบวก	32.7±0.0	5.0
B 4	อ.ชัยบาดาล จ.ลพบุรี	อ้อย	แกรมบวก	ขอบหยัก สีขาวขุ่น	ผลบวก	29.4±0.4	7.3
B 5	อ.ชัยบาดาล จ.ลพบุรี	อ้อย	แกรมบวก	ขอบหยัก สีขาวขุ่น	ผลบวก	29.2±0.7	13.0
B 6	อ.ชัยบาดาล จ.ลพบุรี	อ้อย	แกรมบวก	ขอบหยัก สีขาวขุ่น	ผลบวก	32.2±1.1	5.0
B 7	อ.ชัยบาดาล จ.ลพบุรี	อ้อย	แกรมบวก	ขอบหยัก สีขาวขุ่นเหนียว	ผลบวก	48.2±0.2	4.3

ตารางที่ 3.3 (ต่อ)

ไอโซเลตแบคทีเรีย	แหล่งที่มา	ชนิดของพืช	แกรม	ลักษณะโคโลนี	เอนไซม์คะตาเลซ	การผลิต IAA (μM)	การละลายฟอสเฟต (เส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี, มม.)
B 8	อ.ชัยบาดาล จ.ลพบุรี	อ้อย	แกรมบวก	ขอบหยัก สีขาวขุ่น ผิวมันวาว	ผลบวก	59.6±0.7	5.0
B 9	อ.ชัยบาดาล จ.ลพบุรี	อ้อย	แกรมบวก	ขอบหยัก สีขาวขุ่น เหนียว	ผลบวก	30.8±0.4	5.6
B 10	อ.ชัยบาดาล จ.ลพบุรี	อ้อย	แกรมลบ	กลม สีขาว ผิวมันวาว	ผลบวก	111.7±4.7	6.0
Y 1	อ.ชัยบาดาล จ.ลพบุรี	อ้อย	แกรมบวก	กลม สีขาว ใส	ผลบวก	46.5±1.1	4.6
Y 2	อ.ชัยบาดาล จ.ลพบุรี	อ้อย	แกรมบวก	กลม สีขาวขุ่น	ผลบวก	53.3±0.4	8.3
Y 3	อ.ชัยบาดาล จ.ลพบุรี	อ้อย	แกรมลบ	กลม สีขาว ใส	ผลบวก	132.6±1.8	8.0
Y 4	อ.ชัยบาดาล จ.ลพบุรี	อ้อย	แกรมบวก	กลม สีขาว ใส	ผลบวก	72.2±1.8	7.0
Y 5	อ.ชัยบาดาล จ.ลพบุรี	อ้อย	แกรมลบ	กลม สีขาวขุ่น	ผลบวก	57.7±0.4	10.0
Y 6	อ.ชัยบาดาล จ.ลพบุรี	อ้อย	แกรมลบ	กลม สีขาว ใส	ผลบวก	132.7±23.5	6.0

ตารางที่ 3.3 (ต่อ)

ไอโซเลตแบคทีเรีย	แหล่งที่มา	ชนิดของพืช	แกรม	ลักษณะโคโลนี	เอนไซม์คะตาเลซ	การผลิต IAA (µM)	การละลายฟอสเฟต (เส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี, มม.)
Y 7	อ.ชัยบาดาล จ.ลพบุรี	อ้อย	แกรมลบ	กลม สีขาว ใส	ผลบวก	100.6±12.9	9.0
Y 8	อ.ชัยบาดาล จ.ลพบุรี	อ้อย	แกรมลบ	กลม สีขาว ใส	ผลบวก	82.5±0.2	5.0
Y 9	อ.ชัยบาดาล จ.ลพบุรี	อ้อย	แกรมลบ	กลม สีขาว ใส	ผลบวก	72.6±1.4	6.0
K 1	อ.ชัยบาดาล จ.ลพบุรี	มันสำปะหลัง	แกรมบวก	กลม สีขาวขุ่น	ผลบวก	71.4±0.2	7.6
K 2	อ.ชัยบาดาล จ.ลพบุรี	มันสำปะหลัง	แกรมบวก	กลม สีขาว ใส	ผลบวก	48.3±9.6	5.0
K 3	อ.ชัยบาดาล จ.ลพบุรี	มันสำปะหลัง	แกรมบวก	กลม สีขาวขุ่น	ผลบวก	52.7±3.5	9.0
K 4	อ.ชัยบาดาล จ.ลพบุรี	มันสำปะหลัง	แกรมลบ	กลม สีขาวขุ่น	ผลบวก	24.1±3.5	8.3
K 5	อ.ชัยบาดาล จ.ลพบุรี	มันสำปะหลัง	แกรมบวก	กลม สีขาวขุ่น	ผลบวก	79.2±0.2	6.0
K 6	อ.ชัยบาดาล จ.ลพบุรี	มันสำปะหลัง	แกรมบวก	กลม สีขาวขุ่น	ผลบวก	39.7±0.2	7.0

ตารางที่ 3.3 (ต่อ)

ไอโซเลตแบคทีเรีย	แหล่งที่มา	ชนิดของพืช	แกรม	ลักษณะโคโลนี	เอนไซม์คะตาเลซ	การผลิต IAA (μM)	การละลายฟอสเฟต (เส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี, มม.)
K 7	อ.ชัยบาดาล จ.ลพบุรี	มันสำปะหลัง	แกรมบวก	กลม สีขาวขุ่น	ผลลบ	50.8±0.9	5.3
K 8	อ.ชัยบาดาล จ.ลพบุรี	มันสำปะหลัง	แกรมบวก	กลม สีขาว ใส	ผลบวก	50.1±1.6	7.0
K 9	อ.ชัยบาดาล จ.ลพบุรี	มันสำปะหลัง	แกรมบวก	กลม สีขาวขุ่น	ผลบวก	43.6±0.9	20.0
K10	อ.ชัยบาดาล จ.ลพบุรี	มันสำปะหลัง	แกรมบวก	กลม สีเหลือง	ผลบวก	46.9±1.1	5.0
X 1	อ.เมือง จ. ลพบุรี	ข้าวโพด	แกรมลบ	กลม สีขาวขุ่น	ผลบวก	57.7±0.7	8.6
X 2	อ.เมือง จ. ลพบุรี	ข้าวโพด	แกรมลบ	กลม สีขาว ใส	ผลบวก	60.2±14.8	6.0
X 3	อ.เมือง จ. ลพบุรี	ข้าวโพด	แกรมลบ	กลม สีขาว ใส	ผลบวก	236.6±32.9	8.6
X 4	อ.เมือง จ. ลพบุรี	ข้าวโพด	แกรมลบ	กลม สีขาว ใส	ผลบวก	71.2±0.4	3.3
X 5	อ.เมือง จ. ลพบุรี	ข้าวโพด	แกรมลบ	กลม สีเหลืองใส	ผลบวก	49.6±21.6	7.0

ตารางที่ 3.3 (ต่อ)

ไอโซเลตแบคทีเรีย	แหล่งที่มา	ชนิดของพืช	แกรม	ลักษณะโคโลนี	เอนไซม์คะตาเลซ	การผลิต IAA (µM)	การละลายฟอสเฟต (เส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี, มม.)
X 6	อ.เมือง จ. ลพบุรี	ข้าวโพด	แกรมลบ	กลม สีขาว ใส	ผลบวก	20.2±1.1	20.0
X 7	อ.เมือง จ. ลพบุรี	ข้าวโพด	แกรมลบ	กลม สีขาว ใส	ผลบวก	28.5±12.7	6.3
X 8	อ.เมือง จ. ลพบุรี	ข้าวโพด	แกรมลบ	กลม สีขาว ใส	ผลบวก	28.1±0.9	9.0
X 9	อ.เมือง จ. ลพบุรี	ข้าวโพด	แกรมลบ	กลม สีขาวขุ่น	ผลบวก	27.4±4.4	4.6
T 1	อ.ท่าวุ้ง จ. ลพบุรี	ข้าว	แกรมลบ	กลม สีขาวขุ่น	ผลบวก	100.9±21.6	5.0
T 2	อ.ท่าวุ้ง จ. ลพบุรี	ข้าว	แกรมบวก	กลม สีขาวขุ่น	ผลบวก	24.9±0.4	5.3
T 3	อ.ท่าวุ้ง จ. ลพบุรี	ข้าว	แกรมบวก	กลม สีขาวขุ่น	ผลบวก	67.1±1.6	7.0
T 4	อ.ท่าวุ้ง จ. ลพบุรี	ข้าว	แกรมลบ	กลม สีขาวขุ่น มันวาว	ผลบวก	84.8±1.6	5.0
T 5	อ.ท่าวุ้ง จ. ลพบุรี	ข้าว	แกรมลบ	กลม สีขาวขุ่น	ผลบวก	67.5±0.7	6.0

ตารางที่ 3.3 (ต่อ)

ไอโซเลตแบคทีเรีย	แหล่งที่มา	ชนิดของพืช	แกรม	ลักษณะโคโลนี	เอนไซม์คะตาเลซ	การผลิต IAA (µM)	การละลายฟอสเฟต (เส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี, มม.)
T 6	อ.ท่าวุ้ง จ. ลพบุรี	ข้าว	แกรมลบ	กลม สีขาว ใส	ผลบวก	34.9±0.2	5.0
T 7	อ.ท่าวุ้ง จ. ลพบุรี	ข้าว	แกรมบวก	กลม สีขาว ใส	ผลบวก	62.9±3.0	4.0
T 8	อ.ท่าวุ้ง จ. ลพบุรี	ข้าว	แกรมลบ	กลม สีขาว ใส	ผลบวก	43.9±0.7	6.3
T 9	อ.ท่าวุ้ง จ. ลพบุรี	ข้าว	แกรมบวก	กลม สีขาวขุ่น	ผลบวก	88.5±6.1	3.4
T 10	อ.ท่าวุ้ง จ. ลพบุรี	ข้าว	แกรมลบ	กลม สีขาวขุ่น	ผลบวก	36.5±0.4	5.0
T 11	อ.ท่าวุ้ง จ. ลพบุรี	ข้าว	แกรมบวก	กลม สีขาวขุ่น	ผลบวก	103.8±4.4	20.6
T 12	อ.ท่าวุ้ง จ. ลพบุรี	ข้าว	แกรมลบ	กลม สีขาวขุ่น	ผลบวก	71.2±0.7	5.0
T 13	อ.ท่าวุ้ง จ. ลพบุรี	ข้าว	แกรมลบ	กลม สีขาวขุ่น	ผลบวก	80.5±5.4	5.0
T 14	อ.ท่าวุ้ง จ. ลพบุรี	ข้าว	แกรมลบ	กลม สีเหลือง	ผลบวก	78.6±3.9	4.3

ตารางที่ 3.3 (ต่อ)

ไอโซเลตแบคทีเรีย	แหล่งที่มา	ชนิดของพืช	แกรม	ลักษณะโคโลนี	เอนไซม์คะตาเลซ	การผลิต IAA (μM)	การละลายฟอสเฟต (เส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี, มม.)
T 15	อ.ท่าวุ้ง จ. ลพบุรี	ข้าว	แกรมลบ	กลม สีขาวขุ่น	ผลบวก	75.7±3.7	6.3
T 16	อ.ท่าวุ้ง จ. ลพบุรี	ข้าว	แกรมบวก	กลม สีขาว ใส	ผลบวก	40.6±0.9	3.4
T 17	อ.ท่าวุ้ง จ. ลพบุรี	ข้าว	แกรมบวก	กลม สีขาวขุ่น	ผลบวก	86.5±4.4	4.3
T 18	อ.ท่าวุ้ง จ. ลพบุรี	ข้าว	แกรมบวก	สีขาวขุ่น มันวาว	ผลบวก	36.2±6.5	4.0
T 19	อ.ท่าวุ้ง จ. ลพบุรี	ข้าว	แกรมลบ	กลม สีขาวขุ่น	ผลบวก	60.7±1.4	8.0
T 20	อ.ท่าวุ้ง จ. ลพบุรี	ข้าว	แกรมบวก	กลม สีขาวขุ่น	ผลบวก	33.6±0.2	4.0

ตารางที่ 3.4 คุณลักษณะเบื้องต้นของแบคทีเรียในอาณาเขตรากของพืชที่คัดแยกได้จากจังหวัดร้อยเอ็ด

ไอโซเลตแบคทีเรีย	แหล่งที่มา	ชนิดของพืช	แกรม	ลักษณะโคโลนี	เอนไซม์คะตาเลซ	การผลิต IAA (μM)	Phosphate Solubilization Index
RA1	อ.เมือง จ.ร้อยเอ็ด	ข้าวหอมมะลิ 105	แกรมบวก	สีขาวขุ่น ขอบหยัก ไม่วาว	ผลบวก	2.63±0.88	2.43±0.14
RA2	อ.เมือง จ.ร้อยเอ็ด	ข้าวหอมมะลิ 105	แกรมบวก	กลม ผิวหน้าเยิ้ม ขอบหยัก	ผลบวก	70.08±8.76	2.71±0.00
RA3	อ.เมือง จ.ร้อยเอ็ด	ข้าวหอมมะลิ 105	แกรมบวก	กลม สีเหลืองใส ผิวนูนวาว	ผลบวก	2.01±0.23	2.71±0.00
RA4	อ.เมือง จ.ร้อยเอ็ด	ข้าวหอมมะลิ 105	แกรมลบ	กลม สีเหลืองเข้ม ผิวนูน	ผลบวก	0.00±0.00	1.00±0.00
RA5	อ.เมือง จ.ร้อยเอ็ด	ข้าวหอมมะลิ 105	แกรมบวก	กลม สีครีม ขอบเรียบ	ผลบวก	0.00±0.00	2.43±0.14
RA6	อ.เมือง จ.ร้อยเอ็ด	ข้าวหอมมะลิ 105	แกรมบวก	กลม สีขาว ผิวนูน	ผลบวก	0.70±0.88	1.00±0.00
RA7	อ.เมือง จ.ร้อยเอ็ด	ข้าวหอมมะลิ 105	แกรมบวก	กลม สีเหลือง ผิวไม่นูนวาว	ผลบวก	0.53±0.88	2.52±0.22
RA8	อ.เมือง จ.ร้อยเอ็ด	ข้าวหอมมะลิ 105	แกรมบวก	กลม สีขาว ผิวไม่นูนวาว	ผลบวก	0.00±0.00	1.00±0.00
RA9	อ.เมือง จ.ร้อยเอ็ด	ข้าวหอมมะลิ 105	แกรมบวก	กลม สีขาวเหลือง ผิววาว	ผลบวก	0.18±0.15	1.00±0.00
RA10	อ.เมือง จ.ร้อยเอ็ด	ข้าวหอมมะลิ 105	แกรมบวก	กลม สีขาว ผิววาว ขอบเรียบ	ผลบวก	0.00±0.00	2.67±0.30
RA11	อ.เมือง จ.ร้อยเอ็ด	ข้าวหอมมะลิ 105	แกรมบวก	กลม สีเหลืองเข้ม ผิวเยิ้ม	ผลบวก	57.99±0.55	2.61±0.13
RD1	อ.เมือง จ.ร้อยเอ็ด	ข้าวหอมมะลิ 105	แกรมบวก	กลม สีขาว ผิวนูนวาว	ผลบวก	21.55±2.10	2.29±0.00
RD2	อ.เมือง จ.ร้อยเอ็ด	ข้าวหอมมะลิ 105	แกรมบวก	กลม สีขาว ผิวไม่นูนวาว	ผลบวก	0.18±0.18	1.00±0.00
RD3	อ.เมือง จ.ร้อยเอ็ด	ข้าวหอมมะลิ 105	แกรมบวก	กลม สีเหลือง ผิวนูน ไม่วาว	ผลบวก	0.61±0.18	2.29±0.00
RD4	อ.เมือง จ.ร้อยเอ็ด	ข้าวหอมมะลิ 105	แกรมบวก	กลม สีครีม ผิวไม่นูนวาว	ผลบวก	0.44±0.26	2.40±0.11
RD5	อ.เมือง จ.ร้อยเอ็ด	ข้าวหอมมะลิ 105	แกรมบวก	กลม สีครีม ผิวมันวาว	ผลบวก	0.00±0.00	2.76±0.22
RD6	อ.เมือง จ.ร้อยเอ็ด	ข้าวหอมมะลิ 105	แกรมบวก	กลม สีเหลือง ผิวไม่วาว	ผลบวก	0.00±0.00	2.18±0.09
SA1	อ.เมือง จ.ร้อยเอ็ด	ข้าวเหนียว กข6	แกรมบวก	กลม สีเหลือง ผิวนูนวาว	ผลบวก	254.04±17.56	2.45±0.04
SA2	อ.เมือง จ.ร้อยเอ็ด	ข้าวเหนียว กข6	แกรมบวก	กลม สีครีม ผิวไม่นูนวาว	ผลบวก	0.44±0.23	1.00±0.00

ตารางที่ 3.4 (ต่อ)

ไอโซเลตแบคทีเรีย	แหล่งที่มา	ชนิดของพืช	แกรม	ลักษณะโคโลนี	เอนไซม์คะตาเลซ	การผลิต IAA (μM)	Phosphate Solubilization Index
SA3	อ.เมือง จ.ร้อยเอ็ด	ข้าวเหนียว กข6	แกรมบวก	กลม สีขาว ผิวนูนวาว	ผลบวก	0.00±0.00	2.65±0.07
SA4	อ.เมือง จ.ร้อยเอ็ด	ข้าวเหนียว กข6	แกรมลบ	กลม สีเหลืองเข้ม ผิวไม่นูนวาว	ผลบวก	9.46±0.93	1.00±0.00
SA5	อ.เมือง จ.ร้อยเอ็ด	ข้าวเหนียว กข6	แกรมบวก	กลม สีครีม ผิวนูนวาว	ผลบวก	0.00±0.00	2.30±0.03
SA6	อ.เมือง จ.ร้อยเอ็ด	ข้าวเหนียว กข6	แกรมบวก	กลม สีขาวครีม ผิวนูนวาว	ผลบวก	11.13±0.32	2.29±0.00
SA7	อ.เมือง จ.ร้อยเอ็ด	ข้าวเหนียว กข6	แกรมบวก	กลม สีเหลืองอ่อน ผิววาว	ผลบวก	10.95±0.84	2.25±0.10
SA8	อ.เมือง จ.ร้อยเอ็ด	ข้าวเหนียว กข6	แกรมบวก	กลม สีขาว ขอบหยัก	ผลบวก	1.05±0.18	2.32±0.09
SA9	อ.เมือง จ.ร้อยเอ็ด	ข้าวเหนียว กข6	แกรมบวก	กลม สีเหลืองมะนาว ผิวนูน	ผลบวก	12.61±0.49	2.62±0.16
SA10	อ.เมือง จ.ร้อยเอ็ด	ข้าวเหนียว กข6	แกรมบวก	กลม สีขาว มีรอยเว้า ตรงกลาง	ผลบวก	0.61±0.15	2.67±0.08
SA11	อ.เมือง จ.ร้อยเอ็ด	ข้าวเหนียว กข6	แกรมบวก	ขอบหยัก สีขาว ผิวไม่นูนวาว	ผลบวก	2.35±0.15	2.59±0.03
SD1	อ.เมือง จ.ร้อยเอ็ด	ข้าวเหนียว กข6	แกรมบวก	กลม สีเหลืองมะนาว ผิววาว	ผลบวก	14.02±0.15	2.43±0.00
SD2	อ.เมือง จ.ร้อยเอ็ด	ข้าวเหนียว กข6	แกรมบวก	กลม สีขาว ผิวมันวาว	ผลบวก	1.05±0.18	2.57±0.14
SD3	อ.เมือง จ.ร้อยเอ็ด	ข้าวเหนียว กข6	แกรมลบ	กลม สีเหลือง ผิวมันวาว	ผลบวก	0.61±0.15	2.14±0.00
SD4	อ.เมือง จ.ร้อยเอ็ด	ข้าวเหนียว กข6	แกรมบวก	กลม สีขาว ผิวนูนวาว	ผลบวก	0.79±0.09	2.41±0.03
SD5	อ.เมือง จ.ร้อยเอ็ด	ข้าวเหนียว กข6	แกรมบวก	กลม สีขาว ขอบหยัก	ผลบวก	0.09±0.09	1.00±0.00
SD6	อ.เมือง จ.ร้อยเอ็ด	ข้าวเหนียว กข6	แกรมบวก	กลม สีขาวครีม ขอบหยัก	ผลบวก	0.00±0.00	1.00±0.00

3.2 การทดสอบคุณสมบัติการผลิตสารส่งเสริมการเจริญของพืชจากแบคทีเรียทนแล้ง

สมบัติของแบคทีเรียที่เกี่ยวข้องกับการเจริญของพืชมีหลากหลายชนิด ซึ่งมีวิธีการศึกษาที่แตกต่างกัน เนื่องจากข้อจำกัดด้านเวลา ในเบื้องต้นของงานวิจัยนี้ศึกษาการละลายฟอสเฟต การผลิตเอนไซม์คะตาเลซ และการผลิต IAA ก่อน เพราะมีวิธีการทดสอบที่ไม่ยุ่งยากและใช้เวลาสั้น ซึ่งพบว่าแบคทีเรียส่วนใหญ่จากจังหวัดลพบุรีสามารถละลายฟอสเฟตได้เล็กน้อย โดยมีเส้นผ่านศูนย์กลางของโซนใสต่ำกว่า 10 มิลลิเมตร ทั้งนี้ความสามารถในการละลายฟอสเฟตจะสัมพันธ์กับการส่งเสริมการเจริญของพืชทั่วไป นอกจากนี้พบว่าแบคทีเรียที่คัดแยกได้เกือบทุกไอโซเลต สามารถผลิตเอนไซม์คะตาเลซ ซึ่งเกี่ยวข้องกับการทำลายอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นในสภาวะแห้งแล้งและลดความเสียหายจากปฏิกิริยาออกซิเดชัน สำหรับการผลิต IAA ที่เกี่ยวข้องกับการเพิ่มจำนวนรากและกิจกรรมที่เกี่ยวกับการขนส่งของพืช พบว่าแบคทีเรียแต่ละไอโซเลตมีความสามารถในการผลิต IAA ที่หลากหลาย โดยอยู่ในช่วงระหว่าง 20-240 µM และเฉลี่ย 56 µM ดังตารางที่ 3.3

ส่วนแบคทีเรียจากจังหวัดร้อยเอ็ดแสดงดังตารางที่ 3.4 พบว่าแบคทีเรียที่คัดแยกได้ส่วนใหญ่สามารถละลายฟอสเฟตได้ ซึ่งไอโซเลตที่ให้ค่า Phosphate solubilization index สูงที่สุดคือ RD5 มีค่า 2.76±0.22 รองลงมาเป็น RA2, RA3 ให้ค่า 2.71±0.00 และ RA10, SA10 ให้ค่า 2.67±0.30, 2.67±0.08 ตามลำดับ ส่วนการสร้าง IAA พบว่ามีแบคทีเรีย 12 ไอโซเลต สามารถผลิต IAA ที่มากกว่า 1.0 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร แต่มีเพียง 7 ไอโซเลต ที่สร้าง IAA สูงและสังเกตเห็นการเปลี่ยนแปลงของสีได้อย่างชัดเจน โดยไอโซเลต SA1 มีปริมาณ IAA สูงที่สุดคือ 254.04 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร รองลงมาคือ RA2, RA11, RD1, SD1, SA6 และ SA4 มีปริมาณ IAA เป็น 70.08±8.76, 57.9±0.55, 21.55±2.10, 14.02±0.15, 11.13±0.32 และ 9.46±0.93 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ นอกจากนี้พบว่าแบคทีเรียที่คัดแยกได้ทุกไอโซเลต สามารถผลิตเอนไซม์คะตาเลซ

อย่างไรก็ดีผลการทดลองในตารางที่ 3.3 และ 3.4 มีการวิเคราะห์ด้วยผู้ช่วยวิจัยคนละคนกัน ทำให้มีค่าที่ไม่แน่นอน นอกจากนี้ยังใช้การคำนวณผลต่างกัน จึงไม่สามารถเปรียบเทียบผลการทดลองได้ ต่อมาผู้วิจัยจึงคัดเลือกแบคทีเรียที่มีสมบัติข้างต้นในเกณฑ์ดีจำนวน 30 ไอโซเลต มาจำแนกสายพันธุ์ด้วยลำดับเบสของ 16S rDNA แล้วทดสอบสมบัติต่างๆ พร้อมกัน โดยใช้ปริมาณเซลล์เริ่มต้นเท่ากัน เพื่อให้ได้ผลการทดลองที่น่าเชื่อถือยิ่งขึ้น นอกจากนี้ได้ศึกษาสมบัติที่เกี่ยวข้องกับการเจริญของพืชและการอาศัยอยู่บริเวณรากพืชเพิ่มเติม ได้แก่ การผลิตเอนไซม์ ACC deaminase การผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ (EPS) ที่เป็นองค์ประกอบของไบโอฟิลม์ การก่ออิมัลชัน (E24) และความสามารถในการลดค่าแรงตึงผิว (Surface tension) พร้อมทั้งทดสอบการเป็นปฏิปักษ์ต่อเชื้อแบคทีเรียชนิดอื่น เพื่อเป็นข้อมูลในการคัดเลือกแบคทีเรียแต่ละไอโซเลตมาผสมเป็นหัวเชื้อผสม ดังแสดงในตารางที่ 3.5

ผลการทดลองพบว่าแบคทีเรียทนแล้ง 30 ไอโซเลต จัดอยู่ในจีนัสดังต่อไปนี้ *Acinetobacter* (2 ไอโซเลต), *Alcaligenes* (1 ไอโซเลต), *Bacillus* (10 ไอโซเลต), *Brevibacterium* (2 ไอโซเลต), *Citrobacter* (1 ไอโซเลต), *Corynebacterium* (1 ไอโซเลต), *Enterobacter* (3 ไอโซเลต), *Jeotgalicoccus* (3 ไอโซเลต), *Leucobacter* (1 ไอโซเลต), และ *Pseudomonas* (6 ไอโซเลต) ทั้งนี้แบคทีเรียส่วนใหญ่คือ *Bacillus* ซึ่งเป็นจีนัสที่สามารถสร้างเอนโดสปอร์ ในปัจจุบันมีการนำแบคทีเรียกลุ่มนี้มาผลิตเป็นหัวเชื้อแบคทีเรียพร้อมใช้ เนื่องจากสามารถพักตัวในสภาพเอนโดสปอร์ จึงทนต่อสภาวะที่ไม่เหมาะสมได้ยาวนาน แบคทีเรียทั้งหมดที่นำมาศึกษาผลิตเอนไซม์คะตาเลซได้ และมีแบคทีเรียจำนวน 21 ไอโซเลต ที่ผลิตเอนไซม์ ACC deaminase ได้ นอกจากนี้พบว่าแบคทีเรียหลายสายพันธุ์สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียชนิดอื่น เช่น *Brevibacterium* sp. RD1 เป็นปฏิปักษ์ต่อ K3, L20, T17, X3, X6, Y2, และ Y8 และ *Jeotgalicoccus huakuii* RA2 เป็นปฏิปักษ์ต่อ SD6,

K3, L20, X3, X6, Y2, และ Y8 (ตารางที่ 3.5) ข้อมูลนี้จึงจะใช้สำหรับการคัดเลือกแบคทีเรียที่ไม่เป็นปฏิปักษ์ต่อกัน แล้วนำมาผลิตเป็นหัวเชื้อผสมต่อไป

โดยทั่วไปแบคทีเรียที่ส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชที่มีประสิทธิภาพสูง จะมีค่า Phosphate Solubilization Index มากกว่า 2 และค่า IAA เท่ากับ 100 µM (Khan et al., 2016; Paul and Sinha, 2017) เมื่อเปรียบเทียบแบคทีเรียทั้งหมด พบว่าแบคทีเรียทนแล้งที่คัดแยกได้มีค่า Phosphate Solubilization Index ต่ำกว่า 2 แต่มีบางไอโซเลตที่มีค่านี้ในช่วง 1.6-1.8 เช่น *Brevibacterium* sp. RD1, *Leucobacter tardus* SD1, *Enterobacter aerogenes* K7, *Enterobacter* sp. K1, *Pseudomonas aeruginosa* K3, *Alcaligenes* sp. X6 และ *Pseudomonas* sp. X3 (รูปที่ 3.8) ส่วนการผลิต IAA พบว่ามีแบคทีเรียส่วนใหญ่ผลิต IAA ได้ดี (ประมาณ 100 µM) และมีไอโซเลตที่ผลิต IAA ได้มากกว่า 150 µM คือ *Enterobacter aerogenes* K7, *Enterobacter* sp. Y7, *Acinetobacter* sp. L9 และ *Citrobacter amalonaticus* Y4 (รูปที่ 3.8)

สำหรับค่าการผลิต Exopolysaccharide และสารลดแรงตึงผิว (Surface tension) ซึ่งเกี่ยวข้องกับการเกาะติดบริเวณรากและการเจริญแบบไบโอฟิล์มของแบคทีเรีย โดยทั่วไปควรมีค่ามากกว่า 60% และต่ำกว่า 35 mN/m ตามลำดับ ผลการทดลองพบว่าแบคทีเรียแกรมบวกส่วนใหญ่ผลิต Exopolysaccharide ได้ และไอโซเลตที่มีประสิทธิภาพสูง ได้แก่ *Brevibacterium* sp. RD1, *Jeotgalicoccus* sp. RA11 และ *Bacillus sonorensis* SA8 (รูปที่ 3.9) แต่แบคทีเรียแกรมลบทั้งหมดมีการผลิต Exopolysaccharide ได้ต่ำ สำหรับการผลิตสารลดแรงตึงผิว พบว่าแบคทีเรียส่วนใหญ่ไม่สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวโดยดูจากค่าแรงตึงผิวที่สูงกว่า 35 mN/m (รูปที่ 3.9) และค่าการก่ออิมัลชันกับน้ำมันพืช (E24) ในช่วงระหว่าง 0-14% ซึ่งจัดว่าไม่เกิดอิมัลชันในระบบทดสอบ (ตารางที่ 3.5) อย่างไรก็ดีมีแบคทีเรียในจีนัส *Pseudomonas* คือ K3, Y2, T8 และ X3 และแบคทีเรียอื่นๆ คือ *Enterobacter aerogenes* K7, *Jeotgalicoccus* sp. SA6 และ *Corynebacterium stationis* SA1 ที่มีแนวโน้มว่าจะสามารถสร้างสารลดแรงตึงผิวได้ (รูปที่ 3.9)

ตารางที่ 3.5 ชนิดของแบคทีเรียทนแล้งและคุณสมบัติของแบคทีเรียที่คัดเลือกมา 30 ชนิด

สายพันธุ์	Catalase test	Phosphate Solubilization Index	EPS production (%)	IAA production (μM)	ACC deaminase production	Surface tension (mN/m)	E24 (%)	การเป็นปฏิปักษ์ต่อเชื้อแบคทีเรียชนิดอื่น
Brevibacterium sp. RD1	ผลบวก	1.64±0.07	75.49±8.62	76.26±2.29	---	42.00±0.095	0.00±0.00	K3, L20, T17, X3, X6, Y2, Y8
Jeotgalicoccus huakuii RA2	ผลบวก	1.58±0.01	54.49±1.67	127.93±13.14	---	35.64±0.099	0.00±0.00	SD6, K3, L20, X3, X6, Y2, Y8
Jeotgalicoccus sp. RA11	ผลบวก	1.00±0.00	78.68±1.01	101.40±1.34	+++	42.24±0.083	0.00±0.00	K3, L20, X3, X6, Y2, Y8
Corynebacterium stationis SA1	ผลบวก	1.14±0.00	70.27±3.10	82.79±0.42	---	31.00±0.031	0.00±0.00	X6, Y2
Brevibacterium epidermidis SA4	ผลบวก	1.40±0.05	68.35±0.56	118.07±1.05	---	38.62±0.098	0.00±0.00	X6, Y2
Jeotgalicoccus sp. SA6	ผลบวก	1.00±0.00	71.00±7.16	76.13±1.10	---	32.05±0.092	10.71±0.00	SA8, T17, X3, Y2

หมายเหตุ:

การทดสอบเอนไซม์ ACC deaminase +++ หมายถึง แบคทีเรียสามารถใช้ ACC ได้, --- หมายถึง แบคทีเรียไม่สามารถใช้ ACC ได้

E24 แสดงค่าความสามารถในการก่ออิมัลชัน โดยในการทดลองนี้ทดสอบน้ำเลี้ยงเชื้อหลังจากเลี้ยงแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อ Productive medium (PM) กับน้ำมันปาล์ม ค่า E24 = 0% หมายถึง แบคทีเรียไม่สร้างสารก่ออิมัลชัน

Surface tension หมายถึง ค่าแรงตึงผิวของน้ำเลี้ยงเชื้อหลังจากเลี้ยงแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อ Productive medium (PM) ซึ่งเดิมมีค่า Surface tension 42.34±0.044 mN/m ดังนั้นแบคทีเรียที่สามารถลดค่าแรงตึงผิวได้ต่ำกว่า 35 mN/m มีแนวโน้มว่าสามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวได้

ตารางที่ 3.5 (ต่อ)

สายพันธุ์	Catalase test	Phosphate Solubilization Index	EPS production (%)	IAA production (µM)	ACC deaminase production	Surface tension (mN/m)	E24 (%)	การเป็นปฏิปักษ์ต่อเชื้อแบคทีเรียชนิดอื่น
Bacillus sonorensis SA8	ผลบวก	1.24±0.16	83.29±3.49	116.68±1.27	---	38.58±0.056	0.00±0.00	SA6, X3, X6, Y2
Leucobacter tardus SD1	ผลบวก	1.72±0.02	60.41±2.95	107.93±1.20	---	42.62±0.091	0.00±0.00	X3, X6, Y2
Bacillus subtilis SD5	ผลบวก	1.25±0.00	66.46±0.97	95.85±1.05	---	43.85±0.080	10.71±0.00	X3, Y2
Bacillus sonorensis SD6	ผลบวก	1.27±0.03	71.61±0.37	102.51±1.58	+++	38.89±0.096	0.00±0.00	RD1, X3, X6, Y2
Bacillus thuringiensis B2	ผลบวก	1.24±0.01	69.74±1.15	90.85±1.34	+++	45.69±0.082	0.00±0.00	-
Enterobacter sp. K1	ผลบวก	1.69±0.08	41.01±6.56	108.63±0.42	+++	38.54±0.083	0.00±0.00	-

หมายเหตุ:

การทดสอบเอนไซม์ ACC deaminase +++ หมายถึง แบคทีเรียสามารถใช้ ACC ได้, --- หมายถึง แบคทีเรียไม่สามารถใช้ ACC ได้

E24 แสดงค่าความสามารถในการก่ออิมัลชัน โดยในการทดลองนี้ทดสอบน้ำเลี้ยงเชื้อหลังจากเลี้ยงแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อ Productive medium (PM) กับน้ำมันปาล์ม ค่า E24 = 0% หมายถึง แบคทีเรียไม่สร้างสารก่ออิมัลชัน Surface tension หมายถึง ค่าแรงตึงผิวของน้ำเลี้ยงเชื้อหลังจากเลี้ยงแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อ Productive medium (PM) ซึ่งเดิมมีค่า Surface tension 42.34±0.044 mN/m ดังนั้นแบคทีเรียที่สามารถลดค่าแรงตึงผิวได้ต่ำกว่า 35 mN/m มีแนวโน้มว่าสามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวได้

ตารางที่ 3.5 (ต่อ)

สายพันธุ์	Catalase test	Phosphate Solubilization Index	EPS production (%)	IAA production (µM)	ACC deaminase production	Surface tension (mN/m)	E24 (%)	การเป็นปฏิปักษ์ต่อเชื้อแบคทีเรียชนิดอื่น
Enterobacter aerogenes K7	ผลบวก	1.73±0.02	0.00±0.00	157.10±0.24	+++	30.83±0.083	0.00±0.00	X6
Acinetobacter sp. L9	ผลบวก	1.56±0.01	11.02±2.19	179.04±2.60	+++	42.71±0.073	0.00±0.00	-
Bacillus stratosphericus L19	ผลบวก	1.57±0.00	45.79±3.28	90.71±1.10	+++	44.64±0.082	0.00±0.00	-
Bacillus altitudinis L20	ผลบวก	1.52±0.08	48.65±3.17	103.76±2.55	+++	42.11±0.078	0.00±0.00	-
Bacillus pumilus T1	ผลบวก	1.08±0.01	59.83±2.94	51.54±0.42	+++	44.81±0.075	0.00±0.00	X6, Y2
Bacillus anthracis T3	ผลบวก	1.55±0.03	44.80±2.04	85.85±1.34	+++	42.66±0.096	0.00±0.00	-

หมายเหตุ:

การทดสอบเอนไซม์ ACC deaminase +++ หมายถึง แบคทีเรียสามารถใช้ ACC ได้, --- หมายถึง แบคทีเรียไม่สามารถใช้ ACC ได้

E24 แสดงค่าความสามารถในการก่ออิมัลชัน โดยในการทดลองนี้ทดสอบน้ำเลี้ยงเชื้อหลังจากเลี้ยงแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อ Productive medium (PM) กับน้ำมันปาล์ม ค่า E24 = 0% หมายถึง แบคทีเรียไม่สร้างสารก่ออิมัลชัน

Surface tension หมายถึง ค่าแรงตึงผิวของน้ำเลี้ยงเชื้อหลังจากเลี้ยงแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อ Productive medium (PM) ซึ่งเดิมมีค่า Surface tension 42.34±0.044 mN/m ดังนั้นแบคทีเรียที่สามารถลดค่าแรงตึงผิวได้ต่ำกว่า 35 mN/m มีแนวโน้มว่าสามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวได้

ตารางที่ 3.5 (ต่อ)

สายพันธุ์	Catalase test	Phosphate Solubilization Index	EPS production (%)	IAA production (μM)	ACC deaminase production	Surface tension (mN/m)	E24 (%)	การเป็นปฏิปักษ์ต่อเชื้อแบคทีเรียชนิดอื่น
Pseudomonas aeruginosa K3	ผลบวก	1.76±0.08	37.96±0.45	89.32±2.06	+++	31.83±0.056	10.71±0.00	SD1, SD5, SD6
Pseudomonas sp. T8	ผลบวก	1.00±0.00	56.08±0.55	127.51±3.07	+++	31.69±0.123	0.00±0.00	X6, Y2, SA8
Bacillus cereus T11	ผลบวก	1.23±0.04	65.98±4.06	100.85±0.64	+++	44.81±0.063	0.00±0.00	Y2
Bacillus altitudinis T17	ผลบวก	1.48±0.04	72.78±1.72	92.79±1.50	+++	37.17±0.099	0.00±0.00	RD1, SA6
Pseudomonas sp. X3	ผลบวก	1.71±0.00	15.44±2.00	120.71±3.70	+++	31.06±0.021	14.29±0.00	RD1, RA2, RA11, SA6, SA8, SD1, SD5, SD6
Alcaligenes sp. X6	ผลบวก	1.71±0.00	60.01±3.57	97.93±1.92	+++	41.12±0.073	0.00±0.00	SA1, SA4, SA8, SD1, SD6, K7, T8, T17

หมายเหตุ:

การทดสอบเอนไซม์ ACC deaminase +++ หมายถึง แบคทีเรียสามารถใช้ ACC ได้, --- หมายถึง แบคทีเรียไม่สามารถใช้ ACC ได้

E24 แสดงค่าความสามารถในการก่ออิมัลชัน โดยในการทดลองนี้ทดสอบน้ำเลี้ยงเชื้อหลังจากเลี้ยงแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อ Productive medium (PM) กับน้ำมันปาล์ม ค่า E24 = 0% หมายถึง แบคทีเรียไม่สร้างสารก่ออิมัลชัน

Surface tension หมายถึง ค่าแรงตึงผิวของน้ำเลี้ยงเชื้อหลังจากเลี้ยงแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อ Productive medium (PM) ซึ่งเดิมมีค่า Surface tension 42.34±0.044 mN/m ดังนั้นแบคทีเรียที่สามารถลดค่าแรงตึงผิวได้ต่ำกว่า 35 mN/m มีแนวโน้มว่าสามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวได้

ตารางที่ 3.5 (ต่อ)

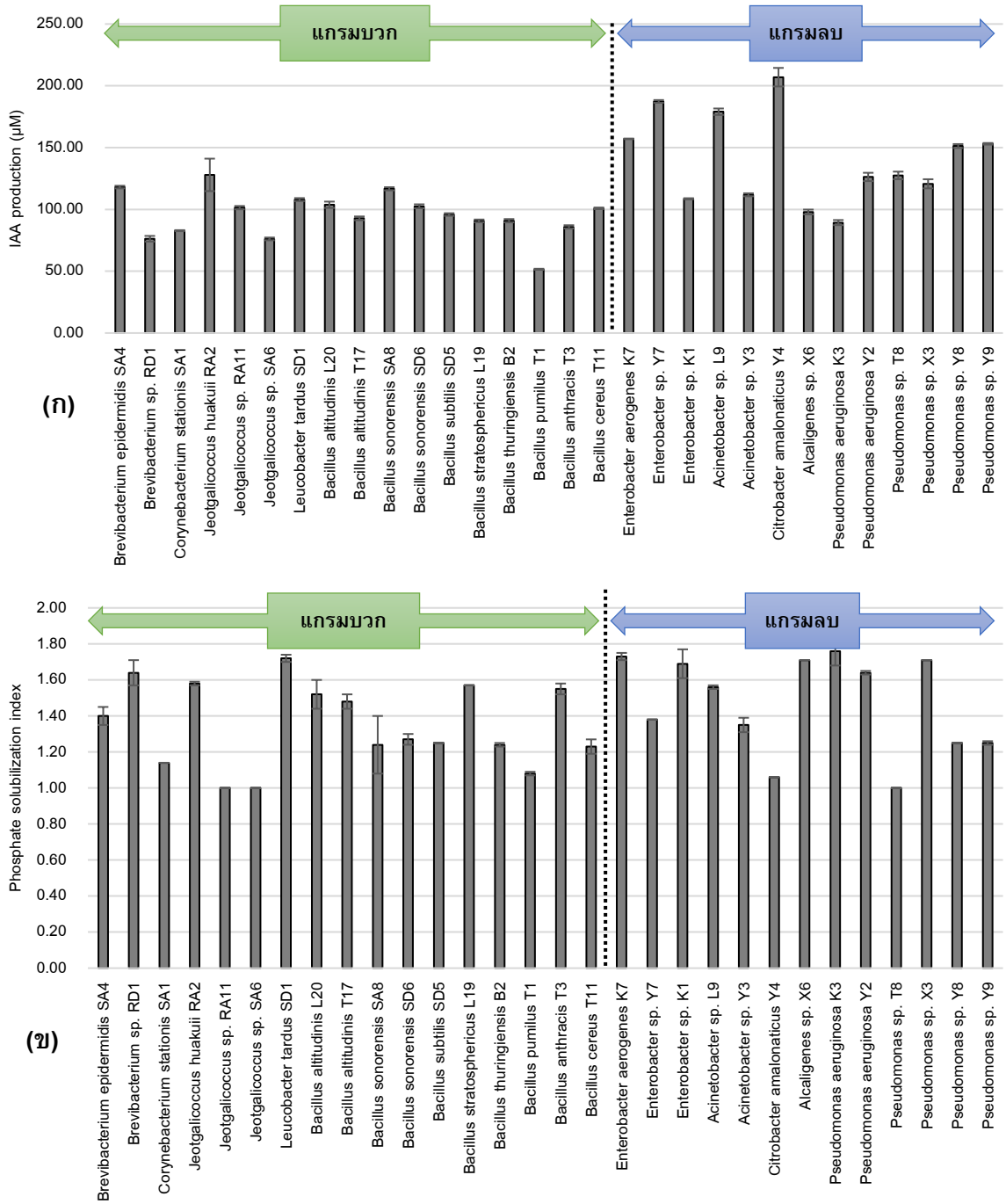
สายพันธุ์	Catalase test	Phosphate Solubilization Index	EPS production (%)	IAA production (µM)	ACC deaminase production	Surface tension (mN/m)	E24 (%)	การเป็นปฏิปักษ์ต่อเชื้อแบคทีเรียชนิดอื่น
Pseudomonas aeruginosa Y2	ผลบวก	1.64±0.01	4.98±0.60	126.26±3.37	---	32.38±0.075	0.00±0.00	RD1, RA2, RA11, SA1, SA4, SA6, SA8, SD1, SD5, SD6, T1, T8, T11
Acinetobacter sp. Y3	ผลบวก	1.35±0.04	21.53±2.80	111.82±1.20	+++	39.63±0.076	0.00±0.00	-
Citrobacter amalonaticus Y4	ผลบวก	1.06±0.00	40.16±2.91	206.96±7.50	+++	43.19±0.076	0.00±0.00	-
Enterobacter sp. Y7	ผลบวก	1.38±0.00	3.49±0.00	187.38±1.10	+++	34.86±0.071	0.00±0.00	-
Pseudomonas sp. Y8	ผลบวก	1.25±0.00	33.56±2.40	151.26±1.58	+++	39.33±0.088	0.00±0.00	RD1, RA2, RA11
Pseudomonas sp. Y9	ผลบวก	1.25±0.01	44.64±7.53	153.07±0.64	+++	35.05±0.016	0.00±0.00	-

หมายเหตุ:

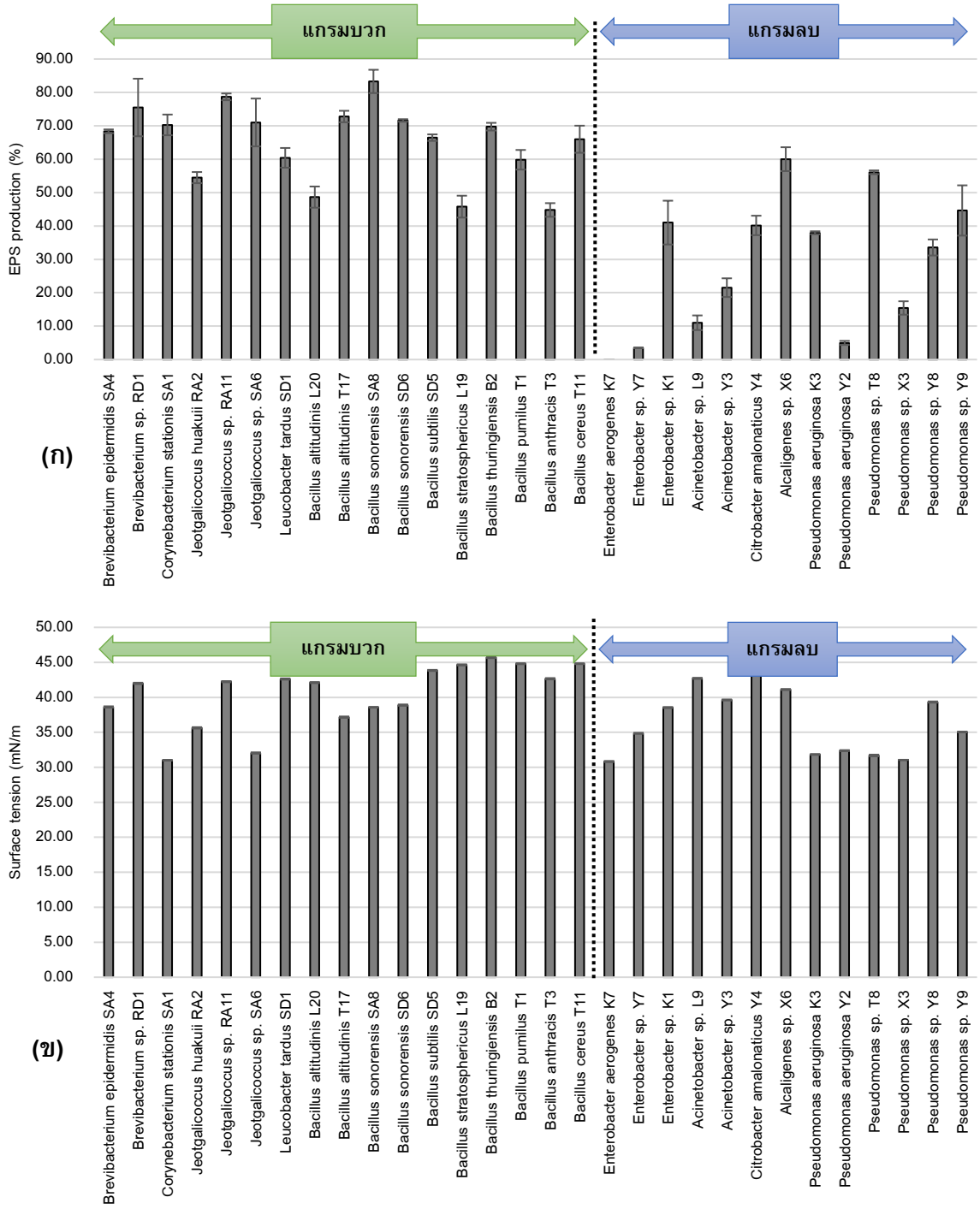
การทดสอบเอนไซม์ ACC deaminase +++ หมายถึง แบคทีเรียสามารถใช้ ACC ได้, --- หมายถึง แบคทีเรียไม่สามารถใช้ ACC ได้

E24 แสดงค่าความสามารถในการก่ออิมัลชัน โดยในการทดลองนี้ทดสอบน้ำเลี้ยงเชื้อหลังจากเลี้ยงแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อ Productive medium (PM) กับน้ำมันปาล์ม ค่า E24 = 0% หมายถึง แบคทีเรียไม่สร้างสารก่ออิมัลชัน

Surface tension หมายถึง ค่าแรงตึงผิวของน้ำเลี้ยงเชื้อหลังจากเลี้ยงแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อ Productive medium (PM) ซึ่งเดิมมีค่า Surface tension 42.34±0.044 mN/m ดังนั้นแบคทีเรียที่สามารถลดค่าแรงตึงผิวได้ต่ำกว่า 35 mN/m มีแนวโน้มว่าสามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวได้



รูปที่ 3.8 ความสามารถในการผลิตสารส่งเสริมการเจริญของพืช (ก) ฮอร์โมน IAA และ (ข) ดัชนีการละลายฟอสเฟต จากแบคทีเรียทนแล้ง 30 สายพันธุ์



รูปที่ 3.9 ความสามารถในการผลิตสารช่วยในการทนแล้งของพืช (ก) การผลิต Exopolysaccharide และ (ข) สารลดแรงตึงผิว จากแบคทีเรียทนแล้ง 30 สายพันธุ์

3.2 การทดสอบคุณสมบัติการทนเกลือ และอุณหภูมิสูงของแบคทีเรียทนแล้งที่คัดเลือก

จากผลการทดลองข้างต้นจะเห็นว่าแบคทีเรียทนแล้งที่คัดแยกได้แต่ละไอโซเลต มีสมบัติที่เกี่ยวข้องกับการส่งเสริมการเจริญของพืชที่แตกต่างกัน อย่างไรก็ดีกลไกที่เกี่ยวกับความสัมพันธ์ระหว่างพืชและแบคทีเรียทนแล้งมีความซับซ้อน และคาดว่าการส่งเสริมการเจริญของพืชในสภาวะแล้งจะเกี่ยวข้องกับกิจกรรมหลายชนิดของแบคทีเรีย ผู้วิจัยจึงมีแนวคิดว่าการเลือกแบคทีเรียจากสมบัติใดสมบัติหนึ่ง อาจจะทำให้พลาดโอกาสพบแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพได้ ดังนั้นงานวิจัยเบื้องต้นจึงคัดเลือกแบคทีเรียแกรมลบ 10 ไอโซเลต ที่คัดแยกจากพื้นที่ต่างกัน รวมถึงมีค่าการละลายฟอสเฟต การผลิตเอนไซม์คะตาเลซ และการผลิต IAA แตกต่างกัน คือ K1 K7 L9 T8 X3 X6 Y3 Y7 Y8 และ Y9 ไปทดสอบต่อ โดยในเบื้องต้นทดสอบความสามารถในการทนเกลือ พบว่าแบคทีเรียทั้ง 10 ชนิด สามารถทนเกลือได้ที่ 100 mM โดยมีจำนวนแบคทีเรียไม่แตกต่างกับเมื่ออยู่ในอาหารที่ไม่มี NaCl (0 mM) (ตารางที่ 3.6) แสดงว่าแบคทีเรียที่สามารถทนแล้งจะสามารถทนเกลือได้ด้วย แบคทีเรียเหล่านี้ได้นำไปศึกษาต่อในบทที่ 4 หัวข้อ 4.2.1

ตารางที่ 3.6 การทนเกลือของแบคทีเรียแกรมลบที่คัดเลือกในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA เติม NaCl

รหัสเชื้อ	การเจริญของแบคทีเรีย (CFU/mL) (OD = 625 nm)					
	0 mM	100 mM	200 mM	300 mM	500 mM	1,000 mM
K1	++++	++++	++++	++++	++++	+++
K7	++++	++++	++++	++++	+++	+++
L9	++++	++++	++++	++++	++	++
T8	++++	++++	+++	+++	+++	++
X3	+++	++++	+++	+++	++++	+++
X6	++++	++++	++++	++++	++++	+++
Y3	++++	+++	+++	+++	++++	+
Y7	+++	++	+++	++	+++	++
Y8	++++	++++	++++	+++	++	++
Y9	++++	++++	++++	++++	++	+

หมายเหตุ: (+) การเจริญของแบคทีเรียอยู่ในช่วง 10^6 CFU/mL, (++) การเจริญของแบคทีเรียอยู่ในช่วง 10^7 CFU/mL, (+++) การเจริญของแบคทีเรียอยู่ในช่วง 10^8 CFU/mL, และ (++++) การเจริญของแบคทีเรียอยู่ในช่วง 10^9 CFU/mL

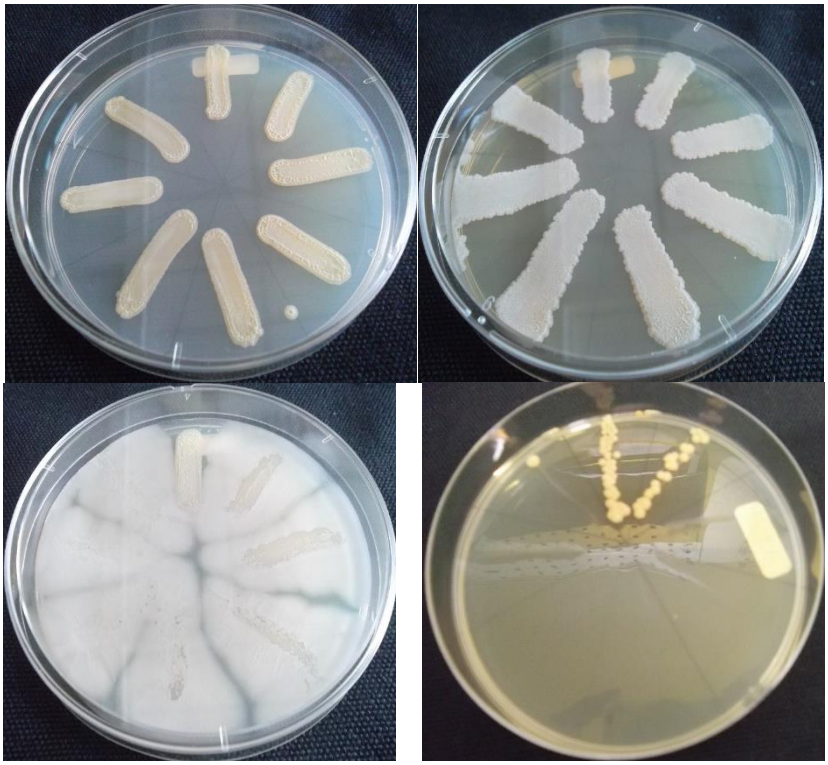
อย่างไรก็ดีแบคทีเรียแกรมลบข้างต้นบางไอโซเลต มีแนวโน้มจะเป็นแบคทีเรียก่อโรคในคนและสัตว์ ดังมีรายชื่อในประกาศของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข เรื่องระดับความเสี่ยงของเชื้อโรคและพิษจากสัตว์ ฉบับลงวันที่ 8 ธันวาคม พ.ศ. 2557 ในการทดลองต่อมาผู้วิจัยจึงได้คัดเลือกแบคทีเรียทนแล้ง

ที่มีสมบัติในการส่งเสริมการเจริญของพืชเพิ่มเติม คือ *B. thuringiensis* B2, *B. stratosphericus* L19, *J. huakuii* RA2, *Jeotgalicoccus* sp. RA11, *B. sonorensis* SA8 และ *B. altitudinis* T17 แล้วนำมาศึกษาการเจริญของแบคทีเรียทั้งแบบเชื้อเดี่ยวและเชื้อผสมในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเกลือความเข้มข้นต่างๆ โดยทดสอบแบคทีเรียทั้งแบบเซลล์เดี่ยวและเซลล์ผสมในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB และ TSB ที่เติม 30% PEG 6000 ที่มีเกลือความเข้มข้นต่างๆ ดังแสดงในตารางที่ 3.7 และรูปที่ 3.10 พบว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ B2, SA8 และ T17 และแบคทีเรียผสม สามารถทนเกลือและเจริญได้ดีที่เกลือความเข้มข้น 5% ส่วนแบคทีเรียสายพันธุ์ L19 สามารถทนเกลือและเจริญได้ดีที่เกลือความเข้มข้น 3% และแบคทีเรียสายพันธุ์ RA2 และ RA11 สามารถทนเกลือและเจริญได้ดีที่ความเข้มข้น 0.5% และเจริญได้ค่อนข้างดีที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 1.5% ผลการทดลองแสดงว่าแบคทีเรียที่คัดเลือกมาสามารถทนเกลือทั้งในสภาวะแล้ง (TSB + 30% PEG6000) และสภาวะน้ำปกติ (TSB) จึงมีแนวโน้มในการนำไปใช้ประโยชน์เพื่อส่งเสริมการเจริญของพืชที่ปลูกในบริเวณที่มีสภาวะดินเค็มได้ การที่แบคทีเรียทนแล้งที่คัดแยกในงานวิจัยนี้สามารถทนเกลือ แม้ว่าจะคัดแยกจากดินที่มีความเค็มปกติ สอดคล้องกับรายงานของ Echigo และคณะ (2005) ที่พบว่าแบคทีเรียทนเกลือสามารถพบได้ในดินทั่วไปไม่ใช่เฉพาะในดินเค็มเท่านั้น และแบคทีเรียกลุ่ม *Bacillaceae* สามารถทนเกลือได้ดีเมื่ออยู่ในรูปของเอนโดสปอร์ สำหรับแบคทีเรียในจีนัส *Jeotgalicoccus* มีรายงานว่าเป็นแบคทีเรียทนเกลือหรือชอบเกลืออยู่แล้ว เช่น Yoon และคณะ (2003) คัดแยก *J. halotolerans* จากตัวอย่างอาหารทะเล Guo และคณะ (2010) คัดแยก *J. huakuii* จากตัวอย่างดินริมทะเล และ Roohi และคณะ (2014) คัดแยก *Jeotgalicoccus* sp. จากบ่อเกลือ แบคทีเรียแกรมบวกเหล่านี้ได้นำไปศึกษาต่อในบทที่ 4 หัวข้อ 4.2.2 และบทที่ 5 หัวข้อ 5.2.1 และ 5.2.2 ด้วย

ตารางที่ 3.7 การเจริญของแบคทีเรียแกรมบวกที่คัดเลือกในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB และ TSB + 30%PEG 6000 ที่ความเข้มข้นเกลือต่าง ๆ

สายพันธุ์	การเจริญของแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB						การเจริญของแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB + 30%PEG 6000					
	NaCl (%)						NaCl (%)					
	0	0.1	0.5	1	3	5	0	0.1	0.5	1	3	5
B2	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++
L19	++++	++++	++++	++++	++++	++	++++	++++	++++	++++	++++	++
RA2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
RA11	++	++	+	+	+	+	++	++	+	+	+	+
SA8	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++
T17	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++
Mix cultures	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++

หมายเหตุ: (+) เชื้อเจริญได้ที่ระดับการเจือจาง 10^{-1} - 10^{-2}, (++) เชื้อเจริญได้ที่ระดับการเจือจาง 10^{-3} -10^{-4}, (+++) เชื้อเจริญได้ที่ระดับการเจือจาง 10^{-5} - 10^{-6}, (++++) เชื้อเจริญได้ที่ระดับการเจือจาง 10^{-7} - 10^{-8}



รูปที่ 3.10 ตัวอย่างการเจริญของแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์หลังจากเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB ที่มีเกลือความเข้มข้นต่าง ๆ

ต่อมาได้ทดสอบการทนต่อความร้อนของ *B. thuringiensis* B2, *B. stratosphericus* L19, *J. huakuii* RA2, *Jeotgalicoccus* sp. RA11, *B. sonorensis* SA8 และ *B. altitudinis* T17 เพิ่มเติม ทั้งแบบเดี่ยวและแบบผสม ทั้งนี้เนื่องจากสภาวะแล้งอาจจะเกิดร่วมกับสภาวะที่มีอุณหภูมิสูง โดยบ่มแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อ 2 ชนิด คือ TSB และ TSB ที่เติม 30%PEG 6000 ที่อุณหภูมิ 30, 37, 45 และ 55 ºC พบว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ B2, SA8, T17 และ L19 และแบคทีเรียผสม เจริญได้ดีทุกอุณหภูมิ ทั้งในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB และ TSB+PEG ส่วนแบคทีเรียสายพันธุ์ RA2 และ RA11 เจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 30 ºC เท่านั้น ดังแสดงในตารางที่ 3.8 จากผลการทดสอบจะเห็นว่าว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ B2, SA8, T17 และ L19 เป็นแบคทีเรียในจีนัส *Bacillus* ซึ่งเอนโดสปอร์ของแบคทีเรียกลุ่มนี้ สามารถทนอุณหภูมิสูงได้มากกว่า 80 ºC เป็นเวลามากกว่า 10 นาที ในขณะที่ RA2 และ RA11 อยู่ในจีนัส *Jeotgalicoccus* ซึ่งไม่สามารถสร้างเอนโดสปอร์

ตารางที่ 3.8 การเจริญของเชื้อแบคทีเรียที่คัดแยกได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB และ TSB + 30%PEG 6000 ที่อุณหภูมิต่าง ๆ

สายพันธุ์แบคทีเรีย	**การเจริญของแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB**				**การเจริญของแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB + 30%PEG 6000**			
	อุณหภูมิ (ºC)				**อุณหภูมิ (ºC)**			
	30	**37**	**45**	**55**	**30**	**37**	**45**	**55**
B2	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++
L19	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++
RA2	+	+	+	+	+	+	+	+
RA11	++	+	+	+	++	+	+	+
SA8	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++
T17	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++
Mix cultures	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++

หมายเหตุ: (+) เชื้อเจริญได้ที่การเจือจาง $10^{-1} – 10^{-2}$, (++) เชื้อเจริญได้ที่การเจือจาง $10^{-3} – 10^{-4}$, (+++) เชื้อเจริญได้ที่การเจือจาง $10^{-5} – 10^{-6}$, (++++) เชื้อเจริญได้ที่การเจือจาง $10^{-7} – 10^{-8}$

บทที่ 4

การพัฒนาหัวเชื้อแบคทีเรียผสมที่มีประสิทธิภาพในการปกป้องพืช เมื่ออยู่ในสภาวะแล้ง และสามารถอาศัยบริเวณรากพืช

4.1 การทดสอบประสิทธิภาพเบื้องต้นของแบคทีเรียทนแล้งแบบหัวเชื้อเดี่ยวต่อการปกป้องต้นข้าวหอมมะลิ 105 เมื่ออยู่ในสภาวะแล้ง

4.1.1 ประสิทธิภาพเบื้องต้นของหัวเชื้อแบคทีเรียต่อต้นข้าวในระยะเพาะเมล็ด

4.1.2 ประสิทธิภาพเบื้องต้นของหัวเชื้อแบคทีเรียต่อต้นข้าวในระยะต้นกล้า

4.2 การทดสอบประสิทธิภาพของหัวเชื้อแบคทีเรียทนแล้งแบบหัวเชื้อเดี่ยวและหัวเชื้อผสมต่อการปกป้องและการฟื้นตัวของต้นข้าว 2 สายพันธุ์ ในระยะต้นกล้า เมื่ออยู่ในสภาวะแล้ง

4.2.1 ประสิทธิภาพของหัวเชื้อแบคทีเรียแกรมลบแบบเดี่ยว ต่อต้นข้าวหอมมะลิ 105

4.2.2 ประสิทธิภาพของหัวเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก ทั้งแบบเดี่ยวและผสมต่อต้นข้าว กข47

4.3 การทดสอบประสิทธิภาพของหัวเชื้อแบคทีเรียทนแล้งแบบหัวเชื้อเดี่ยวและหัวเชื้อผสม ต่อการปกป้องและการฟื้นตัวของต้นข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ในระยะต้นกล้า เมื่ออยู่ในสภาวะแล้ง

บทนำ

ในบทที่ 3 ผู้วิจัยได้จัดจำแนกแบคทีเรียทนแล้งรวมทั้งหมด 112 ไอโซเลต หลังจากนั้นได้คัดกรองแบคทีเรียที่ 30 ไอโซเลต มาทดสอบสมบัติต่างๆ ที่เกี่ยวข้องในการส่งเสริมการเจริญของพืช ได้แก่ การละลายฟอสเฟต การผลิตกรดอินโดลอะซีติก (IAA) การผลิตเอนไซม์คะตาเลซ (Catalase) การผลิตเอนไซม์เอซีซีดีอะมิเนส (ACC deaminase) การผลิตเอ็กโซโพลีแซ็กคาไรด์ที่เป็นองค์ประกอบของไบโอฟิลม์ และการผลิตสารลดแรงตึงผิวหรือสารก่ออิมัลชัน พบว่าแบคทีเรียแต่ละไอโซเลตมีสมบัติแต่ละชนิดแตกต่างกัน ดังนั้นในบทที่ 4 นี้ ผู้วิจัยจึงคัดเลือกแบคทีเรียหลากหลายไอโซเลตทั้งแบคทีเรียแกรมบวก และแกรมลบ มาใช้ทดสอบประสิทธิภาพในการปกป้องพืชเมื่ออยู่ในสภาวะแล้ง โดทำการทดลองระดับห้องปฏิบัติการ

โดยขั้นแรกผู้วิจัยได้ทดสอบหัวเชื้อแบคทีเรียต่อต้นข้าวในระยะเพาะเมล็ด เพื่อให้เห็นแนวโน้มของประสิทธิภาพเบื้องต้น ต่อมาจึงทดสอบต้นข้าวในระยะต้นกล้าโดยจำลองสภาวะแล้งในระบบไฮโดรโปนิกส์ (Hydroponics) ที่ปลูกพืชโดยใช้อาหารที่ผสม PEG 6000 ทั้งนี้ในเบื้องต้นใช้ความเข้มข้นของ PEG 6000 ที่ 10% (water potential -0.148 MPa) เพื่อแทนสภาวะแล้งแบบไม่รุนแรง เมื่อเห็นว่าต้นข้าวสามารถอยู่รอดได้ในการทดสอบต่อมาจึงเพิ่มความรุนแรงของการขาดน้ำ โดยใช้ความเข้มข้นของ PEG 6000 เพิ่มขึ้นเป็นลำดับ

ตั้งแต่ 10% ไปจนถึง 30% (water potential -1.027 MPa) นอกจากนี้ได้ทดสอบการฟื้นตัวของต้นพืชหลังการขาดน้ำโดยย้ายต้นกล้าไปปลูกในอาหารใหม่ที่ไม่เติม PEG 6000 ขั้นตอนการทดลองนี้ได้ดัดแปลงจากงานวิจัยของ Timmusk และคณะ (2014)

การทดลองในขั้นนี้ยังเปรียบเทียบประสิทธิภาพของหัวเชื้อแบคทีเรียทั้งแบบเดี่ยวและแบบผสม และทดสอบประสิทธิภาพการทนแล้งกับพืชเศรษฐกิจ 2 ชนิด คือ ข้าว (ได้แก่ ข้าวหอมมะลิ 105 และข้าวกข 47) และข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ ทั้งนี้ผู้วิจัยติดตามการเจริญเติบโตของต้นกล้าที่ปลูกจากเมล็ดพันธุ์ที่เคลือบและไม่เคลือบแบคทีเรีย โดยพยายามควบคุมให้เมล็ดพันธุ์และระบบปลูกมีจุลินทรีย์ตามธรรมชาติน้อยที่สุด เพื่อให้สะดวกในการทดลอง และสามารถเห็นผลของหัวเชื้อแบคทีเรียต่อต้นข้าวในเวลารวดเร็ว การเคลือบเมล็ดพันธุ์ใช้สาร Carboxy methyl cellulose (CMC) ในการช่วยให้เซลล์แบคทีเรียยึดเกาะกับผิวของเมล็ดพืช ซึ่ง CMC เป็นสารเคมีที่มีความปลอดภัยและนิยมใช้ในปัจจุบัน เช่น Güll และคณะ (2013) เตรียมหัวเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ต่างๆ ในสารละลายที่มี CMC 1.5% ก่อนนำเมล็ดแตงกวามาแช่ 30 นาที ก่อนนำไปปลูก เพื่อให้ต้นแตงกว่าสามารถต้านทานโรคใบเหี่ยว นอกจากนี้ได้ปลูกพืชในสภาวะปกติเพิ่มเติม เพื่อเป็นชุดควบคุมและดูประสิทธิภาพของแบคทีเรียในการส่งเสริมการเจริญของพืชในสภาวะที่ไม่ขาดแคลนน้ำด้วย

ระเบียบวิธีวิจัย

4.1 การทดสอบประสิทธิภาพเบื้องต้นของแบคทีเรียทนแล้งแบบหัวเชื้อเดี่ยวต่อการปกป้องต้นข้าวหอมมะลิ 105 เมื่ออยู่ในสภาวะแล้ง

4.1.1 การทดสอบประสิทธิภาพเบื้องต้นของหัวเชื้อแบคทีเรียต่อต้นข้าวในระยะเพาะเมล็ด

ต้นข้าวในระยะเพาะเมล็ดยังไม่แข็งแรงจึงมีความไวต่อปริมาณน้ำ การทดลองนี้จึงใช้สำหรับทดสอบประสิทธิภาพแบคทีเรียเบื้องต้น ในขั้นแรกคัดเลือกเมล็ดข้าวหอมมะลิ 105 ที่มีน้ำหนักประมาณ 0.2-0.3 กรัม แล้วนำเมล็ดข้าวมาทำให้ปราศจากเชื้อโดยฟอกด้วยเอธานอล 70% เขย่าเป็นเวลา 1 นาที ตามด้วยสารละลายคลอร็อกซ์ 10% เขย่าเป็นเวลา 5 นาที หลังจากนั้นล้างด้วยน้ำสะอาด 3 ครั้ง ต่อมานำเมล็ดข้าวมาแช่สารแขวนลอยแบคทีเรียที่มีจำนวนตั้งต้น 10^8 CFU/มล. เป็นเวลา 3-5 ชั่วโมง โดยเขย่าขวดบรรจุที่ 150 รอบ/นาที ผึ่งให้แห้ง แล้ววางเมล็ดข้าวลงบนอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตร MS (Murashige and Skoog) ที่เติม PEG 10% เพื่อจำลองสภาวะแห้งแล้ง และปิดฝา บ่มในสภาวะที่มีแสง อุณหภูมิห้อง เมื่อครบ 7 วัน นำต้นข้าวที่งอกมาวัดความยาวยอดและราก ทั้งนี้ทำการทดลองชุดละ 3 ซ้ำ

4.1.2 การทดสอบประสิทธิภาพเบื้องต้นของหัวเชื้อแบคทีเรียต่อต้นข้าวในระยะต้นกล้า

ต้นข้าวในระยะต้นกล้ามีความแข็งแรงมากขึ้น การศึกษาต้นกล้าช่วยให้สามารถติดตามการเจริญของข้าวทั้งในสภาวะแล้งและสภาวะฟื้นตัวได้ และเห็นความแตกต่างของการเติมและไม่เติมแบคทีเรียชัดเจนขึ้น เนื่องจากการทดลองนี้เป็นการทดสอบเบื้องต้นจึงใช้สภาวะแล้งแบบไม่รุนแรงมาก โดยปลูกพืชในระบบ hydroponics ที่มีสารอาหารให้พืชเจริญเติบโตได้ดีก่อน แล้วจึงทดสอบสภาวะแล้งโดยใช้อาหารที่เติม PEG6000 10% การทดลองนี้ได้ปรับวิธีการเตรียมหัวเชื้อแบคทีเรียเพื่อให้แบคทีเรียสามารถเกาะเมล็ดข้าวดีขึ้น โดยผสม 1.5% carboxy methyl cellulose (CMC) ในสารแขวนลอยเซลล์ที่มีเชื้อตั้งต้น 10^9 CFU/มล. (Güll และคณะ, 2013) ก่อนนำมาใช้เคลือบเมล็ดข้าวพันธุ์หอมมะลิ 105 นอกจากนี้หลังจากทำให้เมล็ดข้าวปราศจากเชื้อด้วยเอธานอลและคลอร็อกซ์ ได้แช่เมล็ดข้าวในสารต้านเชื้อรา Ketoconasol ความเข้มข้น 20 มก./มล. เขย่า 150 รอบ/นาที ข้ามคืน เพื่อป้องกันรา หลังจากนั้นล้างเมล็ดข้าวด้วยเครื่องล้างอุลตร้าโซนิค (Ultrasonic

Cleaner) เป็นเวลา 10 นาที การทดลองได้แบ่งเมล็ดข้าวเป็น 2 ชุด คือ 1) ชุดควบคุม (ไม่เคลือบเมล็ดด้วยแบคทีเรีย) โดยแช่เมล็ดข้าวด้วยน้ำสะอาด ข้ามคืน (150 รอบ/นาที) และ 2) ชุดทดลอง (เคลือบเมล็ดด้วยแบคทีเรีย) โดยแช่เมล็ดข้าวด้วยสารละลายเชื้อแบคทีเรียที่ผสมสารละลาย 1.5% CMC ข้ามคืน (150 รอบ/นาที) หลังจากนั้นนำเมล็ดข้าวทั้ง 2 ชุด มาเพาะในถาดกระดาษทิชชู่ พรมน้ำให้ชุ่ม บ่มในตู้อุณหภูมิ 25 °C เป็นเวลา 7 วัน รักษาระดับน้ำให้ชุ่มตลอดเวลา ต่อมาคัดเลือกเมล็ดข้าวที่งอกแล้วบนกระดาษทิชชู่มาใส่ฟองน้ำ และนำไปปลูกต่อในถาดอาหาร 1/2 Yoshida เป็นเวลา 7 วัน ในห้องเพาะเลี้ยงที่มีแสงสว่าง รักษาค่า pH ของอาหารให้อยู่ในช่วง 5.5-6.5 ตลอดการทดลอง (รูปที่ 2) อาหาร Yoshida ได้เตรียมตาม Kim และคณะ (2005) ต่อมาทำการทดสอบการทนแล้งของต้นกล้า (อายุรวม 14 วันหลังเพาะเมล็ด) โดยย้ายต้นกล้าไปใส่ในขวดเพาะเลี้ยงที่บรรจุอาหาร Yoshida + PEG6000 10% เพื่อให้เกิดสภาวะแล้งแบบไม่รุนแรงมาก แล้วห่อด้วยกระดาษอลูมิเนียมขวดละ 3 ต้น บ่มที่อุณหภูมิห้อง และให้แสง 40,000 Lux เป็นเวลา 12 วัน ทุกๆ 3 วัน เติมอาหารและปรับ pH ให้อยู่ในช่วง 5.5-6.5 ทั้งนี้ทำการทดลองชุดละ 3 ซ้ำ คือ แต่ละชุดทดลองมีต้นข้าว 3 ขวด รวม 9 ต้น

4.2 การทดสอบประสิทธิภาพของหัวเชื้อแบคทีเรียทนแล้งแบบหัวเชื้อเดี่ยวและหัวเชื้อผสมต่อการปกป้องและการฟื้นตัวของต้นข้าว 2 สายพันธุ์ ในระยะต้นกล้า เมื่ออยู่ในสภาวะแล้ง

4.2.1 ประสิทธิภาพของหัวเชื้อแบคทีเรียแกรมลบแบบเดี่ยว ต่อต้นข้าวหอมมะลิ 105

การทดลองนี้ทำเพื่อยืนยันประสิทธิภาพของหัวเชื้อแบคทีเรียต่อต้นกล้าข้าวหอมมะลิ 105 โดยใช้แบคทีเรียชนิดแกรมลบ 10 ไอโซเลท จากการคัดกรองในเบื้องต้น ซึ่งประกอบด้วย *Enterobacter* sp. K1, *Enterobacter aerogenes* K7, *Acinetobacter* sp. L9, *Pseudomonas* sp. T8, *Pseudomonas putida* X3, *Pseudomonas* sp. X6, *Acinetobacter* sp. Y3, *Enterobacter* sp. Y7, *Pseudomonas* sp. Y8 และ *Pseudomonas putida* Y9 แบบหัวเชื้อเดี่ยว การทดลองครั้งนี้ได้เพิ่มปริมาณหัวเชื้อตั้งต้นอีก 1 Log (จาก 10^8 เป็น 10^9 CFU/มล.) และปลูกข้าวในสภาวะแห้งแล้งสูงกว่าในการทดลอง 4.1.2 เพื่อให้เห็นประสิทธิภาพชัดเจนขึ้น การจำลองสภาวะแล้งจะค่อยๆ ปรับระบบการปลูกให้มีระดับความแล้งค่อยๆ เพิ่มขึ้น นอกจากนี้ติดตามการฟื้นตัวของต้นข้าวโดยนำต้นข้าวไปฟื้นตัวในสภาวะที่มีน้ำปกติ รวมระยะเวลาทดลองทั้งหมด 30 วัน ทั้งนี้ทำการทดลองเปรียบเทียบต้นข้าวที่เจริญในสภาวะปกติ เพื่อให้เห็นประสิทธิภาพของหัวเชื้อแบคทีเรียต่อการส่งเสริมการเจริญของต้นข้าวในสภาวะที่ให้น้ำปกติด้วย

วิธีทำการทดลองมีดังนี้ กำจัดเชื้อจุลินทรีย์บริเวณพื้นผิวเมล็ดข้าวด้วยเอธานอลและคลอร็อกซ์ แล้วแช่เมล็ดข้าวในสารต้านเชื้อรา Ketoconasol ความเข้มข้น 20 มก./มล. เขย่า 150 รอบ/นาที ข้ามคืน เพื่อป้องกันรา หลังจากนั้นล้างเมล็ดข้าวด้วยเครื่องล้างอุลตร้าโซนิค (Ultrasonic Cleaner) เป็นเวลา 10 นาที การทดลองได้แบ่งเมล็ดข้าวเป็น 2 ชุด คือ 1) ชุดควบคุม (ไม่เคลือบเมล็ดด้วยแบคทีเรีย) แช่เมล็ดข้าวด้วยสารละลาย 1.5% CMC ข้ามคืน (150 รอบ/นาที) และ 2) ชุดทดลอง (เคลือบเมล็ดด้วยแบคทีเรีย) โดยแช่เมล็ดข้าวในสารแขวนลอยเซลล์ที่มีเชื้อตั้งต้น 10^9 CFU/มล. (OD = 1) ที่ผสม 1.5% CMC ข้ามคืน (150 รอบ/นาที) หลังจากนั้นนำเมล็ดข้าวทั้ง 2 ชุด มาเพาะในถาดกระดาษทิชชู่ พรมน้ำให้ชุ่ม บ่มในตู้อุณหภูมิ 25 °C เป็นเวลา 7 วัน รักษาระดับน้ำให้ชุ่มตลอดเวลา ต่อมาคัดเลือกเมล็ดข้าวที่งอกแล้วบนกระดาษทิชชู่มาใส่ฟองน้ำ และนำไปปลูกต่อในถาดอาหาร 1/2 Yoshida เป็นเวลา 7 วัน ในห้องเพาะเลี้ยงที่มีแสงสว่าง รักษาค่า pH ของอาหารให้อยู่ในช่วง 5.5-6.5 ตลอดการทดลอง เมื่อต้นข้าวอายุ 14 วัน แบ่งต้นข้าวแต่ละชุดการทดลองออกเป็น 2 กลุ่ม กลุ่มที่ 1) ย้ายลงอาหาร Yoshida สภาวะปกติ กลุ่มที่ 2) ย้ายลงอาหาร Yoshida ที่เติม PEG 6000 เพื่อปรับระดับ

ความแล้งตามลำดับ ได้แก่ 10%, 20% และ 30% PEG 6000 อย่างละ 3 วัน จากนั้นทดสอบการฟื้นตัวของต้นข้าวภายหลังสภาวะแล้ง โดยปลูกข้าวต่ออีก 7 วัน ในอาหาร Yoshida ปกติ ทั้งนี้ทำการทดลองโดยใช้ต้นข้าว 3 ต้นต่อ 1 ซ้ำ และใช้จำนวนซ้ำทั้งหมด 5 ซ้ำ ต่อ 1 การทดลอง

4.2.2 ประสิทธิภาพของหัวเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก ทั้งแบบเดี่ยวและผสมต่อต้นข้าว กข47

ข้าวขาว กข47 เป็นข้าวสายพันธุ์ไม่ไวต่อช่วงแสง ซึ่งมีการปลูกมากในจังหวัดลพบุรี ผู้วิจัยจึงนำมาศึกษาเพิ่มเติมจากข้าวหอมมะลิ 105 การทดลองทำเช่นเดียวกับการทดลองข้อ 4.2.2 โดยใช้ต้นข้าวสายพันธุ์ กข47 จำนวน 3 ต้นต่อ 1 ซ้ำ และใช้จำนวนซ้ำทั้งหมด 5 ซ้ำ ต่อ 1 การทดลอง ตรวจติดตามการเจริญของต้นข้าวทั้งในสภาวะให้น้ำปกติตลอดการทดลอง และสภาวะที่ปล่อยแล้งหลังจากข้าวอายุ 14 วัน ซึ่งหลังจากสภาวะแล้งได้ติดตามการฟื้นตัวของต้นข้าวด้วย

ทั้งนี้แบคทีเรียที่ใช้ในการทดลองนี้ได้แก่แบคทีเรียแกรมบวกที่คัดแยกได้จากดินในจังหวัดลพบุรีและจังหวัดร้อยเอ็ด จังหวัดละ 3 สายพันธุ์ คือ *Jeotgalicoccus huakuii* RA2, *Jeotgalicoccus* sp. RA11, *B. altitudinis* T17, *B. sonorensis* SA8, *B. stratosphericus* L19 และ *B. thuringiensis* B2 และเชื้อผสมของแบคทีเรียทั้ง 6 สายพันธุ์ (Mix) การเลือกเฉพาะแบคทีเรียแกรมบวกมาทดสอบ เนื่องจากเป็นแบคทีเรียที่ไม่อยู่ในประกาศของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข เรื่องระดับความเสี่ยงของเชื้อโรคและพิษจากสัตว์ ฉบับลงวันที่ 8 ธันวาคม พ.ศ. 2557

4.3 การทดสอบประสิทธิภาพของหัวเชื้อแบคทีเรียทนแล้งแบบหัวเชื้อเดี่ยวและหัวเชื้อผสมต่อการปกป้องและการฟื้นตัวของต้นข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ในระยะต้นกล้า เมื่ออยู่ในสภาวะแล้ง

การทดสอบประสิทธิภาพของหัวเชื้อแบคทีเรียต่อการทนแล้งของข้าวโพดในระยะต้นกล้า มีการจำลองสภาวะแล้งแบบเดียวกับในข้อ 4.2 โดยจะค่อยๆ ปรับระบบการปลูกให้มีระดับความแล้งค่อยๆ เพิ่มขึ้น นอกจากนี้ติดตามการฟื้นตัวของต้นข้าวโดยนำต้นข้าวไปฟื้นตัวในสภาวะที่มีน้ำปกติ ทั้งนี้ใช้เมล็ดข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ พันธุ์ แปซิฟิก 339 และทำการทดลองเปรียบเทียบต้นข้าวที่เจริญในสภาวะปกติ เพื่อให้เห็นประสิทธิภาพของหัวเชื้อแบคทีเรียต่อการส่งเสริมการเจริญของต้นข้าวโพดในสภาวะที่ให้น้ำปกติด้วย แบคทีเรียที่ใช้ในการทดสอบได้แก่แบคทีเรียไอโซเลท X4 และ X5 ทั้งแบบเดี่ยวและแบบผสม ซึ่งแบคทีเรีย 2 ไอโซเลท นี้ เป็นแบคทีเรียแกรมลบที่คัดแยกจากดินบริเวณรากพืช ในแปลงปลูกข้าวโพดของเกษตรกร อ.เมือง จ.ลพบุรี จึงนำมาใช้ทดสอบในการทดลองนี้ อย่างไรก็ดีผลการทดลองในบทที่ 3 (ตาราง 3.3) แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียทั้ง 2 ชนิด มีคุณลักษณะที่เกี่ยวข้องกับการส่งเสริมการเจริญของพืชต่ำกว่าแบคทีเรียไอโซเลทอื่นๆ จึงไม่ได้นำไปวิเคราะห์สายพันธุ์และสมบัติอื่นๆ ต่อ

การทดลองเริ่มจากการกำจัดเชื้อจุลินทรีย์บริเวณพื้นผิวเมล็ดข้าวโพดด้วยเอธานอลและคลอรอกซ์ แล้วแช่เมล็ดข้าวในสารต้านเชื้อรา Ketoconasol ความเข้มข้น 20 มก./มล. เขย่า 150 รอบ/นาที ข้ามคืน เพื่อป้องกันรา หลังจากนั้นล้างเมล็ดข้าวโพดด้วยเครื่องล้างอุล ตร้าโซนิค (Ultrasonic Cleaner) เป็นเวลา 10 นาที การทดลองนี้ได้แบ่งเมล็ดข้าวโพดเป็น 2 ชุด คือ 1) ชุดควบคุม (ไม่เคลือบเมล็ดด้วยแบคทีเรีย) แช่เมล็ดข้าวโพดด้วยน้ำสะอาด ข้ามคืน (150 รอบ/นาที) และ 2) ชุดทดลอง (เคลือบเมล็ดด้วยแบคทีเรีย) โดยแช่เมล็ดข้าวโพดในสารแขวนลอยเซลล์ที่มีเชื้อตั้งต้น 10^9 CFU/มล. (OD = 1) ที่ผสมสารละลาย 1.5% CMC ข้ามคืน (150 รอบ/นาที) หลังจากนั้นนำเมล็ดข้าวโพดทั้ง 2 ชุด มาเพาะในถาดทรายปลอดเชื้อ พรมน้ำให้ชุ่ม บ่มในตู้

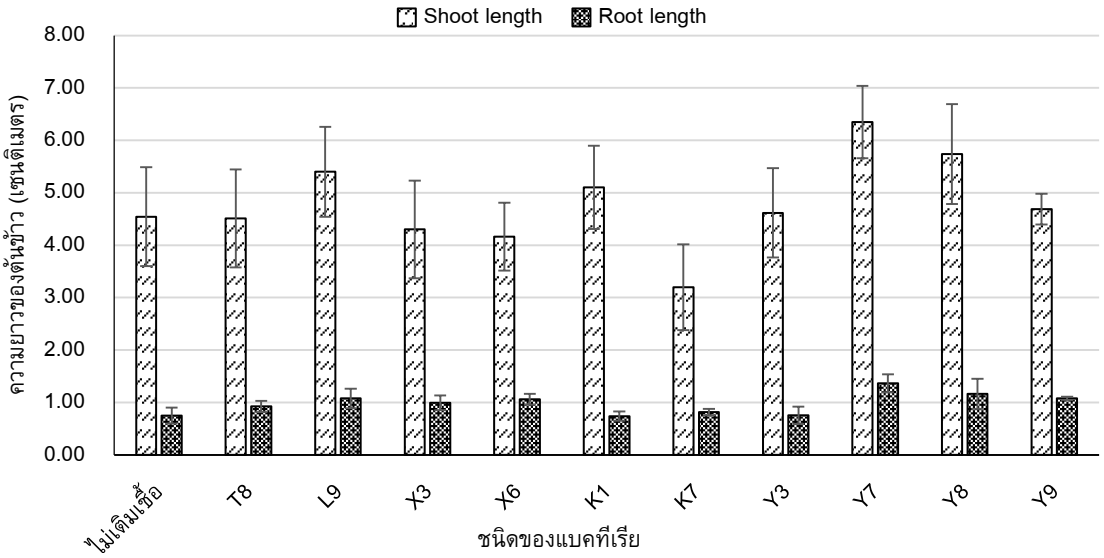
อุณหภูมิ 25 °C เป็นเวลา 5 วัน รักษาระดับน้ำให้ชุ่มตลอดเวลา ต่อมาคัดเลือกเมล็ดข้าวโพดที่งอกใส่ฟองน้ำ และนำไปปลูกต่อในถาดอาหาร 1/2 Hoagland เป็นเวลา 5 วัน ในห้องเพาะเลี้ยงที่มีแสงสว่าง รักษาค่า pH ของอาหารให้อยู่ในช่วง 5.5-6.5 ตลอดการทดลอง เมื่อต้นข้าวโพดอายุ 10 วัน แบ่งต้นข้างแต่ละชุดการทดลองออกเป็น 2 กลุ่ม กลุ่มที่ 1) ย้ายลงอาหาร Hoagland สภาวะปกติ (Normal) กลุ่มที่ 2) ย้ายลงอาหาร Hoagland ที่เติม PEG 6000 เพื่อปรับระดับความแล้งตามลำดับ ได้แก่ 10%, 20% และ 30% PEG 6000 อย่างละ 3 วัน จากนั้นทดสอบการฟื้นตัวของต้นข้าวโพดภายหลังสภาวะแล้ง โดยปลูกข้าวโพดต่ออีก 10 วันในอาหาร Hoagland ปกติ ทั้งนี้ทำการทดลองโดยใช้ต้นข้าวโพด 1 ต้นต่อ 1 ซ้ำ และใช้ทั้งหมด 10 ซ้ำต่อ 1 ชุดการทดลอง

ผลการทดลอง

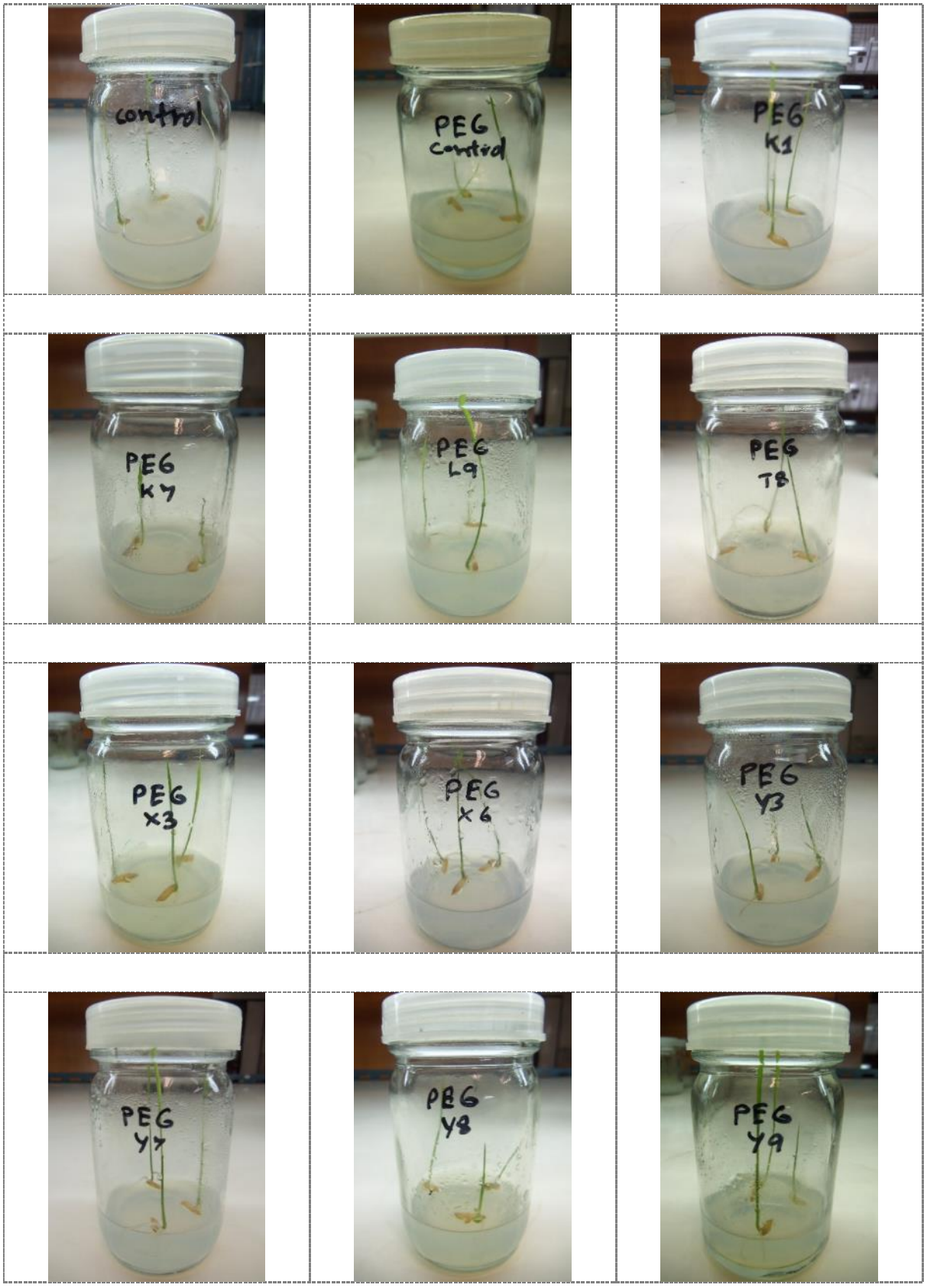
4.1 การทดสอบประสิทธิภาพเบื้องต้นของแบคทีเรียทนแล้งแบบหัวเชื้อเดี่ยวต่อการปกป้องต้นข้าวหอมมะลิ 105 เมื่ออยู่ในสภาวะแล้ง

4.1.1 การทดสอบประสิทธิภาพเบื้องต้นของหัวเชื้อแบคทีเรียต่อต้นข้าวในระยะเพาะเมล็ด

ผลการศึกษาพบว่าเมล็ดข้าวที่เติมแบคทีเรียแล้วเพาะเลี้ยงในสภาวะแห้งแล้งเป็นเวลา 7 วัน มีความยาวของยอดและรากเฉลี่ย 4.8 ± 0.9 และ 1.0 ± 0.2 ซ.ม. ตามลำดับ (รูปที่ 4.1) โดยแบคทีเรีย Y7 ช่วยให้เมล็ดข้าวเจริญดีที่สุดคือ มีความยาวของยอดและรากเฉลี่ย 6.4 และ 1.4 ซ.ม. ตามลำดับ ในขณะที่เมล็ดข้าวไม่เติมแบคทีเรียมีความยาวของยอดและรากเฉลี่ย 4.5 และ 0.8 ซ.ม. ตามลำดับ ดังนั้นแบคทีเรียทนแล้งบางชนิดสามารถช่วยปกป้องข้าวในระยะเพาะเมล็ดได้ อย่างไรก็ดีการเพาะเมล็ดส่วนใหญ่ไม่ต้องใช้น้ำมาก เกษตรกรสามารถรักษาระดับน้ำให้เหมาะสมได้ จึงไม่จำเป็นต้องอาศัยกิจกรรมของแบคทีเรียในระยะนี้



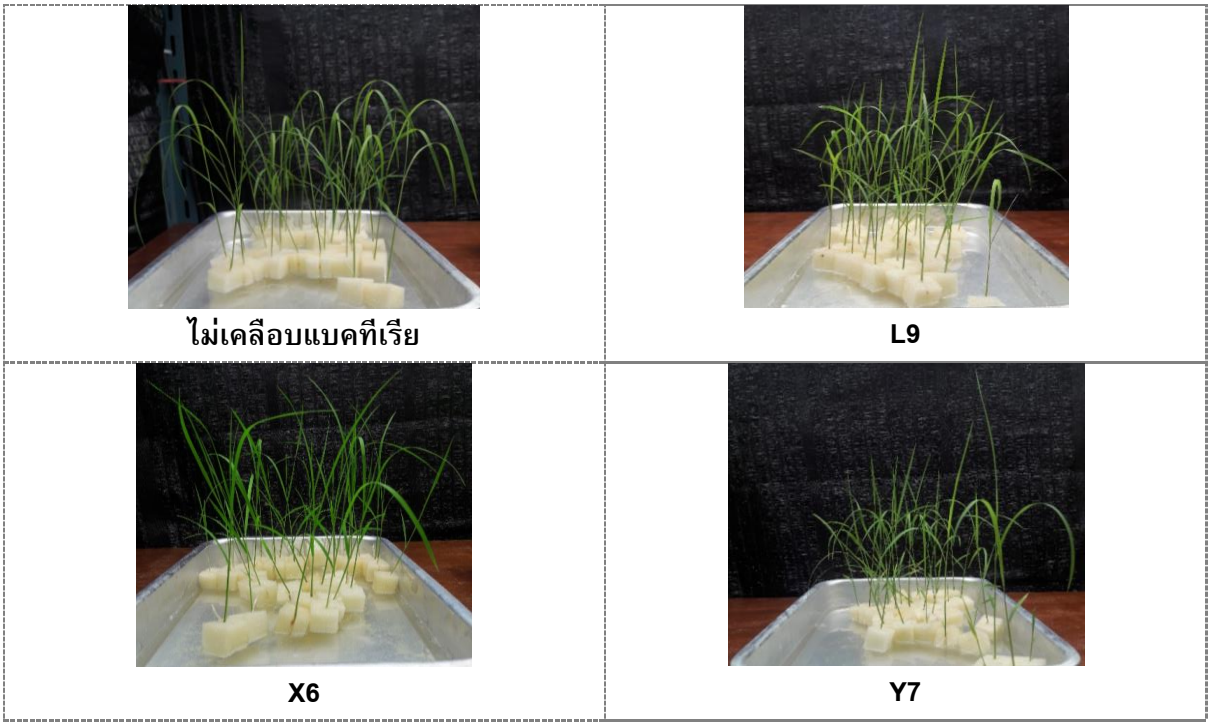
รูปที่ 4.1 การเจริญของเมล็ดข้าวหอมมะลิ 105 อายุ 7 วัน เมื่ออยู่ในสภาวะแห้งแล้ง



รูปที่ 4.2 การงอกของเมล็ดข้าวบนอาหาร MS medium ที่เติมและไม่เติม PEG 6000

4.1.2 การทดสอบประสิทธิภาพเบื้องต้นของหัวเชื้อแบคทีเรียต่อต้นข้าวในระยะต้นกล้า

เมื่อเปรียบเทียบลักษณะของต้นกล้าข้าวอายุ 14 วัน ที่ปลูกจากเมล็ดพันธุ์ที่เคลือบและไม่เคลือบแบคทีเรีย ที่ปลูกในสภาวะให้น้ำปกติ พบว่ามีลักษณะใกล้เคียงกันดังรูปที่ 4.3 นอกจากนี้ผลการทดลองในตารางที่ 4.1 แสดงให้เห็นว่าต้นกล้าทั้งหมดมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางลำต้นและจำนวนใบใกล้เคียงกัน แสดงว่าการเติมหัวเชื้อแบคทีเรียไม่ส่งผลกระทบในแง่ลบต่อการเจริญของข้าว อย่างไรก็ดีพบว่าแบคทีเรียบางไอโซเลทสามารถส่งเสริมให้ต้นกล้ามีจำนวนรากมากขึ้นชัดเจน เช่น L9 Y7 และ Y9 (ตารางที่ 4.1) ทั้งนี้คาดว่าการเพิ่มจำนวนรากสามารถช่วยให้ต้นกล้าข้าวดูดซึมน้ำได้มากขึ้น ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับงานวิจัย Kumar และคณะ (2016) ที่พบว่าหัวเชื้อแบคทีเรียมีบทบาทในการผลิตฮอร์โมนพืชที่ส่งเสริมการเจริญของรากฝอย ซึ่งช่วยให้นำเข้าน้ำและสารอาหารเข้าในเซลล์ แล้วทำให้พืชมีชีวมวลเพิ่มขึ้นและมีความเครียดลดลง



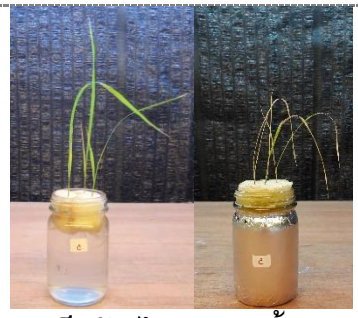
รูปที่ 4.3 ตัวอย่างต้นกล้าข้าวที่ปลูกจากเมล็ดพันธุ์ที่เคลือบและไม่เคลือบแบคทีเรีย ก่อนจะนำมาทดสอบการทนแล้ง (วันที่ 14)

ตารางที่ 4.1 ลักษณะของต้นกล้าข้าวที่ปลูกจากเมล็ดพันธุ์ที่เคลือบและไม่เคลือบแบคทีเรียก่อนนำมาทดสอบการทนแล้ง (วันที่ 14)

ชุดทดลอง	เส้นผ่านศูนย์กลางลำต้น (ซม.)	จำนวนใบ	จำนวนราก
Normal	0.10 ± 0.00	2.0 ± 0.0	4.2 ± 1.5
K1+(10% PEG6000)	0.10 ± 0.05	2.0 ± 0.0	3.1 ± 1.1
K7+(10% PEG6000)	0.10 ± 0.00	2.0 ± 0.0	5.0 ± 1.3
L9+(10% PEG6000)	0.11 ± 0.02	2.0 ± 0.0	5.8 ± 1.1
T8+(10% PEG6000)	0.11 ± 0.02	2.0 ± 0.0	3.6 ± 0.7
X3+(10% PEG6000)	0.11 ± 0.01	2.0 ± 0.0	3.3 ± 1.1
X6+(10% PEG6000)	0.12 ± 0.03	2.0 ± 0.0	4.7 ± 1.6
Y3+(10% PEG6000)	0.11 ± 0.02	2.0 ± 0.0	4.1 ± 1.1
Y7+(10% PEG6000)	0.12 ± 0.03	2.0 ± 0.0	6.3 ± 1.1
Y8+(10% PEG6000)	0.09± 0.04	2.0 ± 0.0	3.4 ± 1.2
Y9+(10% PEG6000)	0.08± 0.02	2.0 ± 0.0	5.2 ± 1.5

เมื่อนำต้นกล้าข้าวมาทดสอบสภาวะแล้งแบบไม่รุนแรงมาก คือ ใช้อาหาร Yoshida + PEG6000 10% เป็นเวลา 12 วัน พบว่าต้นกล้าข้าวที่ไม่ได้เคลือบเมล็ดด้วยแบคทีเรียมีลักษณะต่างจากข้าวที่ปลูกในสภาวะปกติอย่างชัดเจน โดยมีขนาดเล็ก ใบชีด ลีบ และโค้งงอ (รูปที่ 4.4) นอกจากนี้ยังมีเส้นผ่านศูนย์กลางลำต้นขนาดต่ำกว่า และใบและรากจำนวนน้อยกว่าอีกด้วย (ตารางที่ 4.2) ในขณะที่ต้นกล้าข้าวที่ปลูกในสภาวะปกติมีความยาวยอดและรากเพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบระหว่างวันที่ 14 และวันที่ 26 แต่ต้นกล้าข้าวที่ปลูกในสภาวะแล้งมีความยาวยอดและรากค่อนข้างคงที่ (รูปที่ 4.5) แสดงว่าต้นกล้าข้าวพันธุ์หอมมะลิ 105 ไม่สามารถทนความแล้งได้

เมล็ดข้าวปลูกด้วยสภาวะปกติ (a)



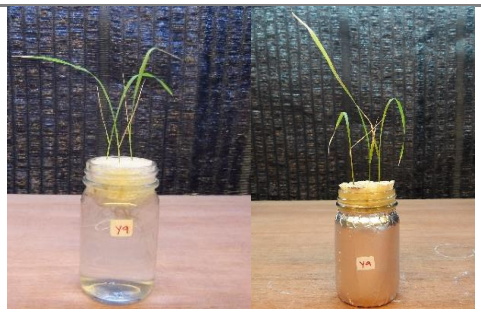
เมล็ดข้าวไม่เคลือบเชื้อ (b)

รูปที่ 4.4 การเจริญของต้นข้าวที่ปลูกจากเมล็ดพันธุ์ไม่เคลือบเชื้อในสภาวะปกติ ของวันที่ 14 (ซ้าย) และวันที่ 26 (ขวา) (Normal) (a) และต้นข้าวที่ปลูกจากเมล็ดพันธุ์ไม่เคลือบเชื้อในระยะก่อนสภาวะแล้ง ของวันที่ 14 (ซ้าย) กับหลังสภาวะแล้ง (ขวา) วันที่ 26 (Drought) (b)

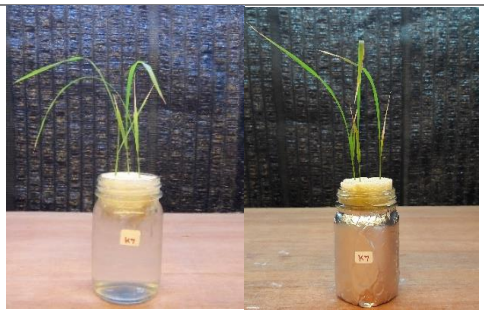
เมื่อเปรียบเทียบรูปที่ 4.4 และ 4.5 พบว่าต้นกล้าข้าวที่ปลูกจากเมล็ดพันธุ์เคลือบแบคทีเรียทุกไอโซเลทมีลักษณะเหี่ยวน้อยกว่าต้นกล้าข้าวที่ไม่ได้เคลือบเมล็ดด้วยแบคทีเรีย นอกจากนี้ยังมีเส้นผ่านศูนย์กลางลำต้นขนาดมากกว่าด้วย (ตารางที่ 4.2) ทั้งนี้พบว่าแบคทีเรีย L9 T8 และ X6 ช่วยให้ต้นกล้าข้าวมีจำนวนใบมากกว่าต้นกล้าข้าวที่ไม่ได้เคลือบเมล็ดด้วยแบคทีเรีย และแบคทีเรีย L9 และ Y7 ช่วยให้ต้นกล้าข้าวมีจำนวนรากมากกว่าต้นกล้าข้าวที่ไม่ได้เคลือบเมล็ดด้วยแบคทีเรีย (ตารางที่ 4.2)

ตารางที่ 4.2 ลักษณะของต้นข้าวที่ปลูกจากเมล็ดพันธุ์เคลือบแบคทีเรียหลังสภาวะแล้งที่ใช้อาหารผสม PEG6000 10% (วันที่ 26)

ชุดทดลอง	เส้นผ่านศูนย์กลางลำต้น (ซม.)	จำนวนใบ	จำนวนราก
Normal	0.10 ± 0.00	3.2 ± 0.8	7.2 ± 1.6
Drought (10% PEG6000)	0.05 ± 0.00	2.0 ± 0.0	4.2 ± 0.8
K1+(10% PEG6000)	0.10 ± 0.05	2.1 ± 0.3	3.1 ± 1.1
K7+(10% PEG6000)	0.10 ± 0.00	2.1 ± 0.3	5.0 ± 1.3
L9+(10% PEG6000)	0.11 ± 0.02	3.1 ± 0.8	5.8 ± 1.1
T8+(10% PEG6000)	0.11 ± 0.02	2.6 ± 0.5	3.7 ± 0.7
X3+(10% PEG6000)	0.11 ± 0.01	2.1 ± 0.3	3.3 ± 1.1
X6+(10% PEG6000)	0.12 ± 0.03	2.8 ± 1.2	4.7 ± 1.6
Y3+(10% PEG6000)	0.11 ± 0.02	2.3 ± 0.5	4.1 ± 1.1
Y7+(10% PEG6000)	0.12 ± 0.03	2.1 ± 0.3	6.3 ± 1.1
Y8+(10% PEG6000)	0.09 ± 0.04	2.3 ± 0.5	3.4 ± 1.3
Y9+(10% PEG6000)	0.08 ± 0.02	2.1 ± 0.3	5.2 ± 1.5


เมล็ดเคลือบแบคทีเรีย Y9

เมล็ดเคลือบแบคทีเรีย K1


เมล็ดเคลือบแบคทีเรีย K7

เมล็ดเคลือบแบคทีเรีย L9

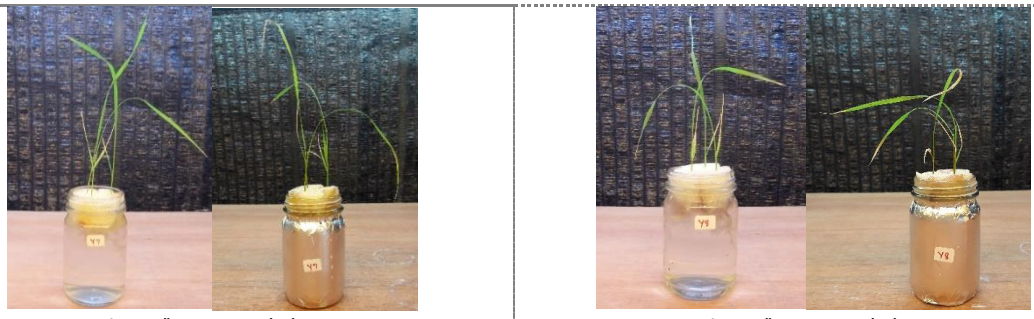
เมล็ดเคลือบแบคทีเรีย T8

เมล็ดเคลือบแบคทีเรีย X3

เมล็ดเคลือบแบคทีเรีย X6

เมล็ดเคลือบแบคทีเรีย Y3

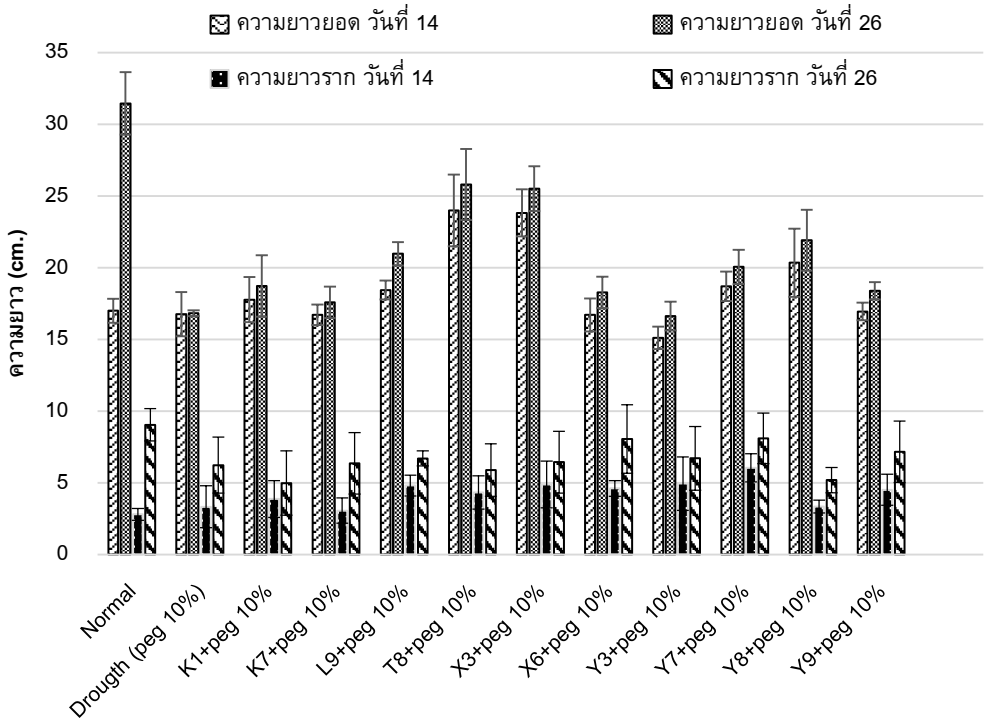
รูปที่ 4.5 การเจริญของต้นข้าวที่ปลูกจากเมล็ดพันธุ์เคลือบแบคทีเรียชนิดต่างๆ ในระยะก่อนสภาวะแล้ง (ซ้าย) กับหลังสภาวะแล้งที่ใช้อาหารผสม PEG6000 10% วันที่ 26 (ขวา)



เมล็ดเคลือบแบคทีเรีย Y7 | เมล็ดเคลือบแบคทีเรีย Y8

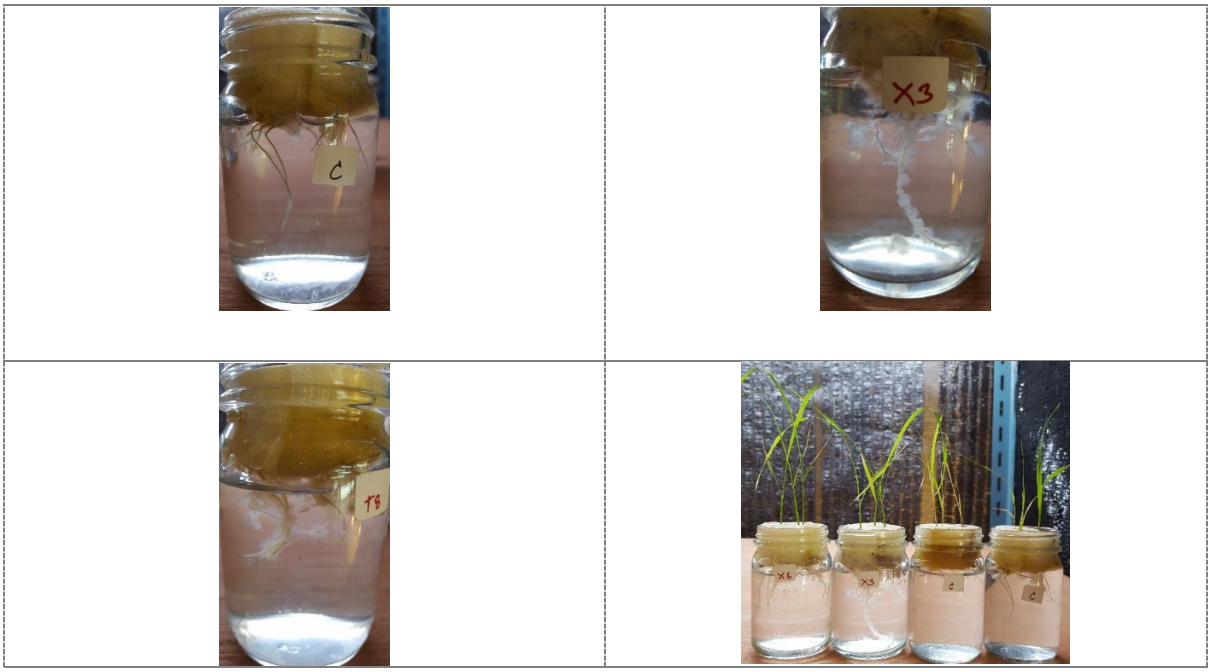
รูปที่ 4.5 (ต่อ) การเจริญของต้นข้าวที่ปลูกจากเมล็ดพันธุ์เคลือบแบคทีเรียชนิดต่าง ๆ ในระยะก่อนสภาวะแล้ง (ซ้าย) กับหลังสภาวะแล้งที่ใช้อาหารผสม PEG6000 10% วันที่ 26 (ขวา)

สำหรับความยาวของยอดและรากของต้นข้าวที่ปลูกจากเมล็ดพันธุ์เคลือบแบคทีเรียทุกชนิด ภายหลังสภาวะแล้ง มีพบว่าค่าค่อนข้างคงที่เช่นเดียวกับต้นกล้าข้าวที่ไม่ได้เคลือบเมล็ดด้วยแบคทีเรีย (รูปที่ 4.5) นอกจากนี้ต้นกล้าข้าวที่ปลูกจากเมล็ดพันธุ์เคลือบแบคทีเรียทุกไอโซเลทในระยะหลังสภาวะแล้ง (วันที่ 26) มีสภาพอ่อนแอกว่าก่อนสภาวะแล้ง (วันที่ 14) แสดงว่าหัวเชื้อแบคทีเรียปกป้องพืชได้ระดับหนึ่ง และเกี่ยวข้องกับลักษณะบางอย่างของพืชเท่านั้น ยังไม่สามารถทำให้ข้าวมีลักษณะเหมือนข้าวที่ปลูกในสภาวะปกติได้ เนื่องจากการศึกษานี้เป็นการศึกษาเบื้องต้นจึงจำเป็นต้องมีการศึกษาพัฒนาต่อไป

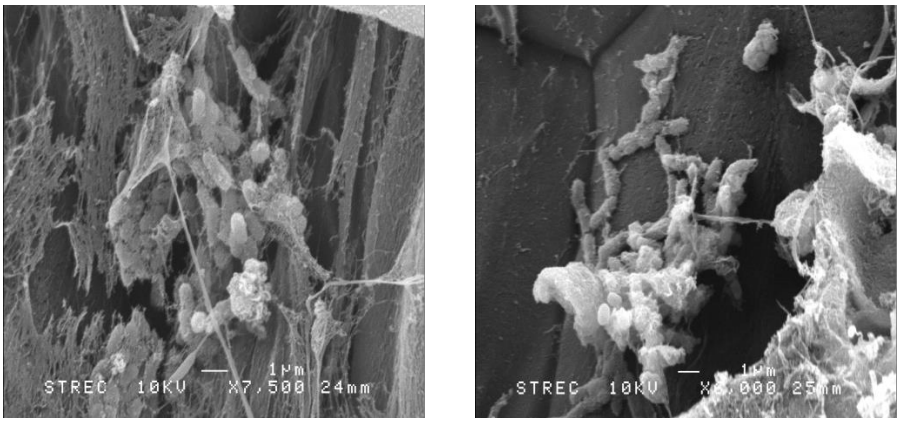


รูปที่ 4.6 ความยาวของยอดและรากต้นข้าวที่ปลูกจากเมล็ดพันธุ์เคลือบแบคทีเรียเมื่อเริ่มสภาวะแล้ง (วันที่ 14) หลังสภาวะแล้งที่ใช้อาหารผสม PEG6000 10% (วันที่ 26)

เมื่อสิ้นสุดการทดลองได้ส่งตัวอย่างของรากข้าวที่เคลือบเมล็ดด้วยแบคทีเรีย T8 ซึ่งมีลักษณะของไบโอฟิลม์บริเวณผิวราก (รูปที่ 4.7) ไปส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็คตรอนชนิดส่องกราด พบว่ามีแบคทีเรียเจริญบริเวณผิวของรากข้าวจริง (รูปที่ 4.8) แสดงว่าแบคทีเรียที่นำมาเคลือบเมล็ดสามารถเจริญเติบโตพร้อมกับต้นข้าวได้ อย่างไรก็ดีตัวอย่างรากข้าวส่วนใหญ่ (มุมอื่นๆ ของตัวอย่าง) ไม่พบแบคทีเรียเกาะ ทั้งนี้เมล็ดข้าวมีขนาดเล็กทำให้มีข้อจำกัดของพื้นที่ที่หัวเชื้อแบคทีเรียจะไปเคลือบบนเมล็ดได้ ดังนั้นในการทดลองต่อไปจึงเพิ่มจำนวนแบคทีเรีย โดยนำต้นกล้าข้าวที่เตรียมจากเมล็ดพันธุ์เคลือบแบคทีเรียไปแช่ในสารแขวนลอยเซลล์ที่มีแบคทีเรียก่อนไปทดสอบการทนแล้ง



รูปที่ 4.7 ตัวอย่างการเกิด Biofilm ของแบคทีเรียบางชนิดบนผิวรากต้นข้าวที่ปลูกในอาหาร Yoshida + 10% PEG6000



รูปที่ 4.8 แบคทีเรียบนผิวรากของต้นข้าวที่เคลือบเมล็ดด้วยแบคทีเรีย T8

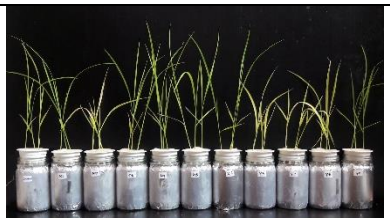
4.2 การทดสอบประสิทธิภาพของหัวเชื้อแบคทีเรียทนแล้งแบบหัวเชื้อเดี่ยวและหัวเชื้อผสมต่อการปกป้องและการฟื้นตัวของต้นข้าว 2 สายพันธุ์ ในระยะต้นกล้า เมื่ออยู่ในสภาวะแล้ง

4.2.1 ประสิทธิภาพของหัวเชื้อแบคทีเรียแกรมลบแบบเดี่ยว ต่อต้นข้าวหอมมะลิ 105

จากการทดลองในบทที่ 3 พบว่า *Enterobacter* sp. K1, *Enterobacter aerogenes* K7, *Acinetobacter* sp. L9, *Pseudomonas* sp. T8, *Pseudomonas putida* X3, *Pseudomonas* sp. X6, *Acinetobacter* sp. Y3, *Enterobacter* sp. Y7, *Pseudomonas* sp. Y8 และ *Pseudomonas putida* Y9 มีสมบัติหลายประการที่เกี่ยวข้องกับการส่งเสริมการเจริญของพืช จึงเลือกมาทดสอบในการทดลองนี้ ตารางที่ 4.3 แสดงการเปลี่ยนแปลงของต้นข้าวที่เวลาต่างๆ ซึ่งพบว่าในสภาวะปกติต้นข้าวมีการเจริญเติบโตดี และแบคทีเรียหลายชนิดยังช่วยส่งเสริมการเจริญของต้นข้าวด้วย โดยต้นกล้าที่ปลูกจากเมล็ดที่เคลือบแบคทีเรียมีลักษณะแข็งแรงกว่าเมล็ดที่ไม่เคลือบเชื้อ (control)

ทั้งนี้ *Enterobacter* sp. K1, *Acinetobacter* sp. L9, *Pseudomonas* sp. T8, *Pseudomonas putida* X3 และ *Pseudomonas putida* Y9 ช่วยส่งเสริมการเจริญของต้นกล้าข้าวทั้งเมื่ออยู่ในสภาวะปกติและสภาวะแล้ง โดยดูจากค่าเฉลี่ยจำนวนใบและจำนวนรากของต้นข้าว (ตารางที่ 4.4) และความยาวยอดในวันที่ 30 (รูปที่ 4.9) นอกจากนี้น้ำหนักแห้งเฉลี่ยและเส้นรอบวงลำต้นของต้นข้าวที่เคลือบหัวเชื้อแบคทีเรียดังกล่าว เมื่อปลูกในสภาวะปกติ ในวันที่ 30 มีค่าที่สูงกว่าต้นกล้าข้าวที่ไม่เติมหัวเชื้อ (ชุดควบคุม) อย่างมีนัยสำคัญ (รูปที่ 4.9) ต้นกล้าข้าวที่มีแบคทีเรียดังกล่าว ยังสามารถฟื้นตัวภายหลังสภาวะแล้งได้ดี และพบว่าต้นกล้าข้าวที่เติมหัวเชื้อแบคทีเรียมีลักษณะทั่วไปที่ดีกว่าต้นกล้าข้าวที่ไม่เติมหัวเชื้อ (ชุดควบคุม) แม้ว่าจะผ่านสภาวะแล้งมาก่อน (ตารางที่ 4.3 และรูปที่ 4.9) ผลการทดลองแสดงว่าสามารถใช้หัวเชื้อแบคทีเรียบางชนิดเพื่อส่งเสริมการเจริญของต้นกล้าข้าวได้ ทั้งนี้ประสิทธิภาพของแบคทีเรียเหล่านี้สอดคล้องกับความสามารถในการผลิตฮอร์โมน IAA และ ผลิตเอนไซม์ ACC deaminase (ตารางที่ 3.5) โดย IAA เป็นฮอร์โมนพืชกลุ่มออกซิน มีบทบาทต่อการยืดยาวและการแบ่งเซลล์ รวมทั้งช่วยกระตุ้นการเจริญและพัฒนาการเกี่ยวกับกลไกการป้องกันตนเองของพืช ทำให้รากพืชมีพื้นที่ผิวรากเพิ่มขึ้น ความสามารถในการลำเลียงธาตุอาหารก็จะสูงขึ้นตามไปด้วย (Yang และคณะ, 2009) ส่วนเอนไซม์ ACC deaminase จะใช้ในการย่อยสลาย ACC ที่เป็นสารตัวกลางในการสังเคราะห์เอธิลีน ทำให้ปริมาณเอธิลีนในเซลล์พืชลดลง จึงลดการแห้งเหี่ยวของพืชได้ (Arshad และคณะ, 2007)

ตารางที่ 4.3 การเปลี่ยนแปลงของต้นข้าวที่เติมหัวเชื้อแบคทีเรียแกรมลบแบบเดี่ยว

สภาวะการปลูกข้าว	สภาวะปกติ	สภาวะแล้ง
วันที่ 14 (ก่อนสภาวะแล้ง, อาหาร Yoshida)		
วันที่ 17 (สภาวะแล้ง, อาหาร 10% PEG 6000 วันที่ 3)		
วันที่ 20 (สภาวะแล้ง, อาหาร 20% PEG 6000 วันที่ 3)		
วันที่ 23 (สภาวะแล้ง, อาหาร 30% PEG 6000 วันที่ 3)		
วันที่ 28 (สภาวะฟื้นตัว, อาหาร Yoshida)		

หมายเหตุ: เรียงขวดทดลองจาก Control, *Enterobacter* sp. K1, *Enterobacter aerogenes* K7, *Acinetobacter* sp. L9, *Pseudomonas* sp. T8, *Pseudomonas putida* X3, *Pseudomonas* sp. X6, *Acinetobacter* sp. Y3, *Enterobacter* sp. Y7, *Pseudomonas* sp. Y8 และ *Pseudomonas putida* Y9 โดยชุด Control คือต้นข้าวที่ไม่เติมแบคทีเรีย

ตารางที่ 4.3 (ต่อ) การเปลี่ยนแปลงของต้นข้าวที่เติมหัวเชื้อแบคทีเรียแกรมลบแบบเดี่ยว

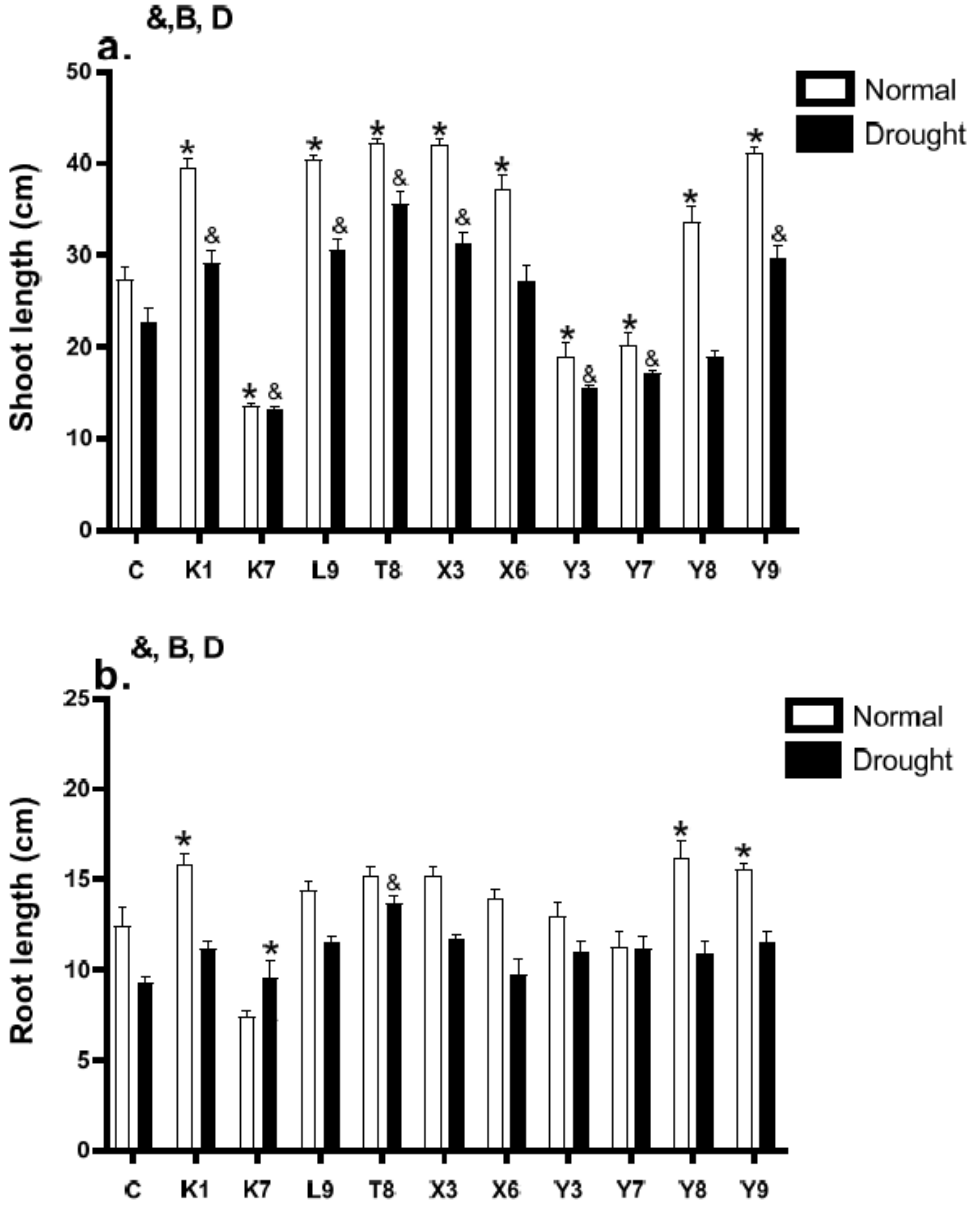
วันที่ 30 (สภาวะฟื้นตัว, อาหาร Yoshida)		

หมายเหตุ: เรียงขวดทดลองจาก Control, *Enterobacter* sp. K1, *Enterobacter aerogenes* K7, *Acinetobacter* sp. L9, *Pseudomonas* sp. T8, *Pseudomonas putida* X3, *Pseudomonas* sp. X6, *Acinetobacter* sp. Y3, *Enterobacter* sp. Y7, *Pseudomonas* sp. Y8 และ *Pseudomonas putida* Y9 โดยชุด Control คือต้นข้าวที่ไม่เติมแบคทีเรีย

ตารางที่ 4.4 ค่าเฉลี่ยจำนวนใบและจำนวนรากของต้นข้าวที่เติมหัวเชื้อแบคทีเรียแกรมลบเมื่อปลูกสภาวะปกติและสภาวะแล้ง

ชนิดแบคทีเรีย	**จำนวนใบ**				**จำนวนราก**			
	สภาวะปกติ		**สภาวะแล้ง**		**สภาวะปกติ**		**สภาวะแล้ง**	
	14 วัน	30 วัน	14 วัน	30 วัน	14 วัน	30 วัน	14 วัน	30 วัน
Control	3.00	4.60	3.00	3.93	3.33	9.67	4.27	9.00
Enterobacter sp. K1	2.93	4.80	3.00	4.90	3.80	15.67	4.27	10.07
Enterobacter aerogenes K7	2.87	2.93	2.67	2.93	3.53	4.13	4.00	4.73
Acinetobacter sp. L9	3.00	4.87	3.00	5.00	4.87	18.67	4.20	11.60
Pseudomonas sp. T8	3.00	5.00	3.00	5.20	5.00	23.87	4.73	15.40
Pseudomonas putida X3	2.73	5.00	2.93	5.00	3.07	18.80	3.80	11.93
Pseudomonas sp. X6	3.00	5.20	3.00	6.53	2.13	18.13	2.60	8.13
Acinetobacter sp. Y3	2.53	3.87	2.73	3.00	1.47	4.60	2.00	3.47
Enterobacter sp. Y7	2.73	3.87	2.73	3.53	2.07	4.20	2.13	4.33
Pseudomonas sp. Y8	2.73	5.13	2.93	3.73	2.93	13.47	2.20	5.47
Pseudomonas putida Y9	3.00	5.60	3.00	4.27	3.47	20.93	3.87	11.33

หมายเหตุ: ต้นข้าวที่อายุ 14 วัน คือ ต้นข้าวที่ช่วงเวลาก่อนทดสอบสภาวะแล้ง และชุด Control คือต้นข้าวที่ไม่เติมแบคทีเรีย

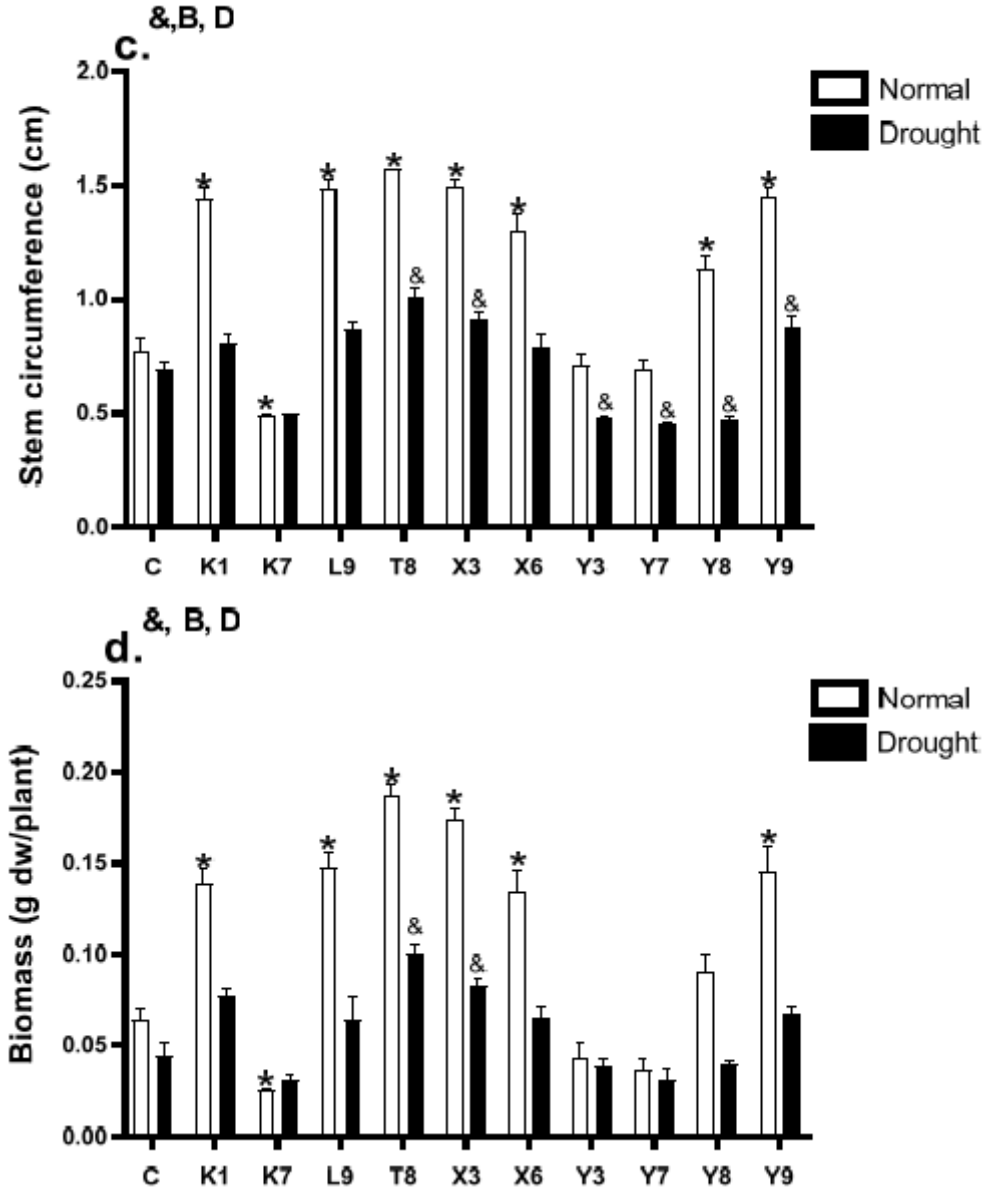


รูปที่ 4.9 ความยาวยอด (a) ความยาวราก (b) ความยาวรอบลำต้น (c) และ น้ำหนักแห้งเฉลี่ยของต้นข้าว (d) ในวันที่ 30 ของต้นข้าวที่เติมหัวเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ โดยชุด C คือต้นข้าวที่ไม่เติมแบคทีเรีย

* หมายถึง ความแปรปรวนของค่าเฉลี่ย กรรมวิธีทดลองควบคุม (C) ในสภาวะปกติ กับ กรรมวิธีทดลองที่เติมแบคทีเรียทนแล้ง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)

& หมายถึง ความแปรปรวนของค่าเฉลี่ย กรรมวิธีทดลองควบคุม (C) ในสภาวะแล้ง กับ กรรมวิธีทดลองที่เติมแบคทีเรียทนแล้ง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)

สัญลักษณ์ $^{\&}$ หมายถึง ปฏิสัมพันธ์ระหว่างความชื้นดิน (สภาวะปกติและสภาวะแล้ง) และแบคทีเรียทนแล้ง (ไม่ใส่และใส่แบคทีเรียทนแล้ง) มีอิทธิพลต่อความแปรปรวนของค่าเฉลี่ย ($p \leq 0.05$) สัญลักษณ์ ^{B} หมายถึง แบคทีเรียทนแล้ง มีอิทธิพลต่อความแปรปรวนของค่าเฉลี่ย ($p \leq 0.05$) สัญลักษณ์ ^{D} หมายถึง ความชื้นในระบบมีอิทธิพลต่อความแปรปรวนของค่าเฉลี่ย ($p \leq 0.05$)



รูปที่ 4.9 (ต่อ) ความยาวยอด (a) ความยาวราก (b) ความยาวรอบลำต้น (c) และ น้ำหนักแห้งเฉลี่ยของต้นข้าว (d) ในวันที่ 30 ของต้นข้าวที่เติมหัวเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ โดยชุด C คือต้นข้าวที่ไม่เติมแบคทีเรีย

* หมายถึง ความแปรปรวนของค่าเฉลี่ย กรรมวิธีทดลองควบคุม (C) ในสภาวะปกติ กับ กรรมวิธีทดลองที่เติมแบคทีเรียทนแล้ง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)

& หมายถึง ความแปรปรวนของค่าเฉลี่ย กรรมวิธีทดลองควบคุม (C) ในสภาวะแล้ง กับ กรรมวิธีทดลองที่เติมแบคทีเรียทนแล้ง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)

สัญลักษณ์ $^{\&}$ หมายถึง ปฏิสัมพันธ์ระหว่างความชื้นดิน (สภาวะปกติและสภาวะแล้ง) และแบคทีเรียทนแล้ง (ไม่ใส่และใส่แบคทีเรียทนแล้ง) มีอิทธิพลต่อความแปรปรวนของค่าเฉลี่ย ($p \leq 0.05$) สัญลักษณ์ ^{B} หมายถึง แบคทีเรียทนแล้ง มีอิทธิพลต่อความแปรปรวนของค่าเฉลี่ย ($p \leq 0.05$) สัญลักษณ์ ^{D} หมายถึง ความชื้นในระบบ มีอิทธิพลต่อความแปรปรวนของค่าเฉลี่ย ($p \leq 0.05$)

นอกจากนี้การตรวจติดตามจำนวนแบคทีเรียบริเวณรากต้นข้าว ภายหลังการปลูกเป็นเวลา 30 วัน พบว่าแบคทีเรียที่คัดเลือกทุกชนิดสามารถเพิ่มจำนวนในสภาวะแล้งได้มากกว่าสภาวะปกติ (ตารางที่ 4.5) มีรายงานเกี่ยวกับประสิทธิภาพของแบคทีเรียแกรมลบต่อการส่งเสริมการเจริญของพืช เช่น Rolli และคณะ (2015) พบว่าแบคทีเรียสายพันธุ์เดี่ยว เช่น *Pseudomonas* sp. S1 และ *Acinetobacter* sp. S2 ช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของต้นอ่อนเมื่ออยู่ในสภาวะเครียดจากการขาดแคลนน้ำ และ Sandhya และคณะ (2009) พบว่า *Pseudomonas putida* strain GAP-P45 ช่วยให้ทานตะวันสามารถอยู่รอดได้ในสภาวะแล้ง (งดให้น้ำ) เป็นเวลา 4 วัน และยังช่วยกระตุ้นการเจริญของปลายยอดและปลายราก เพิ่มมวลของต้นทานตะวัน และเพิ่มเปอร์เซ็นต์การเกาะของเม็ดดินบริเวณรากอีกด้วย

ตารางที่ 4.5 จำนวนแบคทีเรียบริเวณรากต้นข้าว ภายหลังการปลูกเป็นเวลา 30 วัน

ชนิดแบคทีเรีย	**จำนวนโคโลนี (CFU/g)**	
	สภาวะปกติ	**สภาวะแล้ง**
Control	ND	ND
Enterobacter sp. K1	5.12×10^8	9.60×10^8
Enterobacter aerogenes K7	5.64×10^8	$> 10^{10}$
Acinetobacter sp. L9	7.36×10^7	9.52×10^8
Pseudomonas sp. T8	2.17×10^8	1.09×10^9
Pseudomonas putida X3	3.43×10^7	1.18×10^9
Pseudomonas sp. X6	3.27×10^8	7.96×10^8
Acinetobacter sp. Y3	4.72×10^8	$> 10^{10}$
Enterobacter sp. Y7	7.96×10^8	$> 10^{10}$
Pseudomonas sp. Y8	4.16×10^8	$> 10^{10}$
Pseudomonas putida Y9	1.06×10^7	1.00×10^9

หมายเหตุ: ND = Not determined เนื่องจากชุดควบคุม (control) ไม่มีการเติมหัวเชื้อแบคทีเรีย

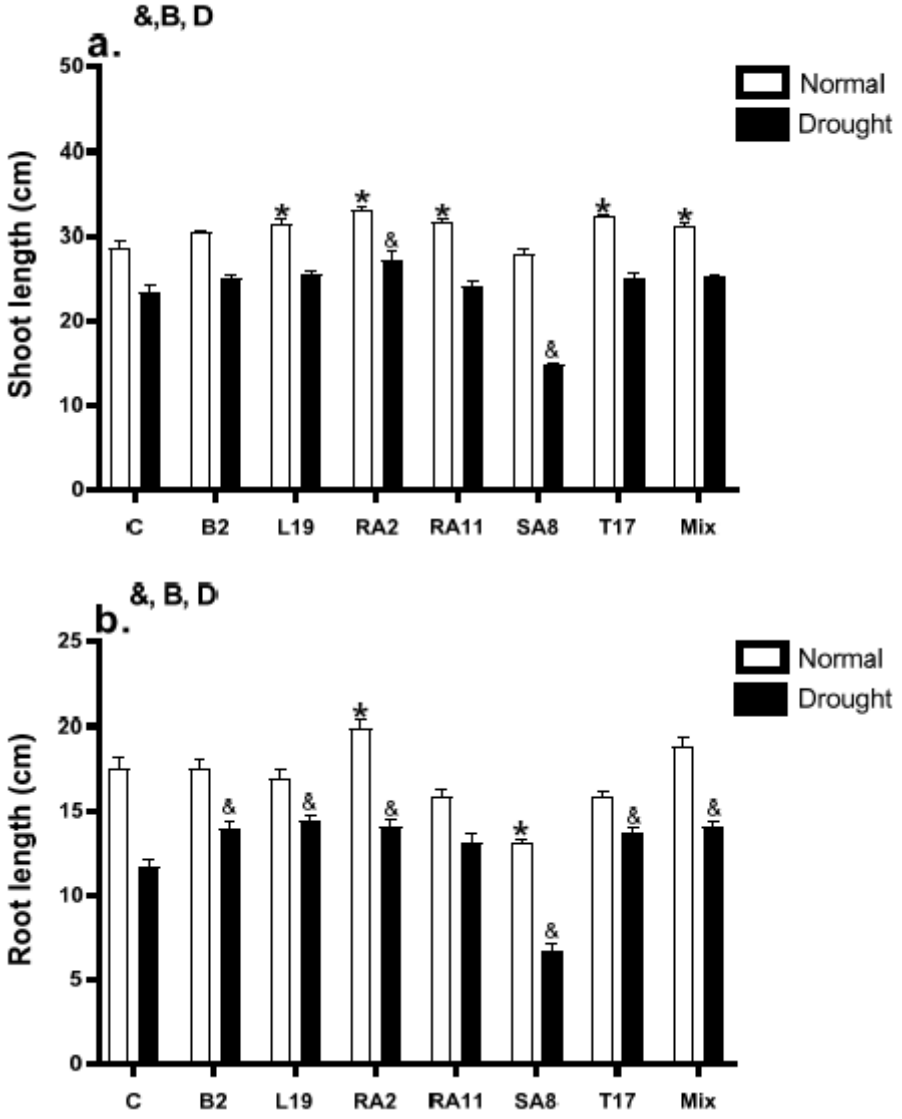
อย่างไรก็ดีเมื่อพิจารณาถึงสปีชีส์ของไอโซเลทข้างต้นว่าจัดเป็นจุลินทรีย์ก่อโรคในคนและสัตว์หรือไม่ ตามเอกสารเรื่อง เชื้อโรคและระดับความเสี่ยง โดยกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข พ.ศ. 2552 ผู้วิจัยจึงจะเลือกเฉพาะ *Acinetobacter* sp. L9, *Pseudomonas* sp. T8, และ *Pseudomonas putida* X3 ไปใช้เป็นหัวเชื้อแบคทีเรียผสมในการทดสอบในดินของบทที่ 5 หัวข้อ 5.1 เนื่องจากจัดอยู่ในสปีชีส์ที่คาดว่าไม่ก่อโรคในคนและสัตว์ นอกจากนี้ผู้วิจัยได้ทดสอบประสิทธิภาพของหัวเชื้อแบคทีเรียแบบผสมสายพันธุ์ต่างๆ ต่อการเจริญและการฟื้นตัวของต้นข้าวภายหลังสภาวะแล้ง (ภาคผนวก ก.) แต่เนื่องจากในช่วงแรกของโครงการวิจัยนี้มีวิธีการทดลองและวิธีศึกษาสมบัติแบคทีเรียที่ไม่ค่อยสมบูรณ์ จึงทำให้ผลการทดลองเหล่านี้สามารถใช้เพื่อแสดงแนวโน้มประสิทธิภาพของหัวเชื้อแบคทีเรียเท่านั้น

4.2.2 ประสิทธิภาพของหัวเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก ทั้งแบบเดี่ยวและผสมต่อต้นข้าว กข47

เนื่องจากข้าวหอมมะลิ 105 เป็นข้าวพันธุ์ไวต่อช่วงแสง ซึ่งจะออกดอกผลิตรวงในช่วงวันที่มีกลางคืนยาวกว่ากลางวันเท่านั้น ซึ่งก็คือช่วงฤดูหนาว แต่ในช่วงที่ทำการทดลองอยู่ในช่วงเดือนกรกฎาคมถึงตุลาคม เกรงว่าการทดสอบการทนแล้งของข้าวในช่วงออกดอกจะมีปัญหาได้ ดังนั้นผู้วิจัยจึงได้เปลี่ยนสายพันธุ์ข้าวเพื่อใช้ทดสอบการทนแล้ง มาเป็นข้าวสายพันธุ์ไม่ไวต่อช่วงแสงได้แก่ ข้าวขาว กข47 ซึ่งมีการปลูกมากในจังหวัดลพบุรีแทนข้าวหอมมะลิ 105 จึงได้ทำการทดสอบการส่งเสริมการเจริญของแบคทีเรีย แกรมบวก 6 สายพันธุ์ คือ *Jeotgalicoccus huakuii* RA2, *Jeotgalicoccus* sp. RA11, *B. altitudinis* T17, *B. sonorensis* SA8, *B. stratosphericus* L19 และ *B. thuringiensis* B2 ทั้งแบบเดี่ยวและผสมกับข้าว กข47 ในระบบ hydroponics ก่อนการปลูกในดินต่อไป

ในวันที่ 33 พบว่าที่สภาวะให้น้ำปกติ ต้นกล้าจากเมล็ดข้าวที่เคลือบด้วยแบคทีเรียเกือบทุกสายพันธุ์ มีความยาวยอดสูงกว่าชุดควบคุมที่ไม่ได้เคลือบแบคทีเรียอย่างมีนัยสำคัญ แต่ความยาวรอบลำต้นและน้ำหนักแห้งใกล้เคียงกัน ส่วนในสภาวะแล้งเมล็ดข้าวที่เคลือบด้วยแบคทีเรียเกือบทุกสายพันธุ์และแบคทีเรียผสมมีความยาวรากสูงกว่าชุดควบคุมที่ไม่ได้เคลือบแบคทีเรียอย่างมีนัยสำคัญ แต่มีน้ำหนักแห้งใกล้เคียงกัน (รูปที่ 4.10) โดยแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพสูงได้แก่ *Jeotgalicoccus huakuii* RA2, *B. altitudinis* T17 และ *B. stratosphericus* L19 อย่างไรก็ตามต้นกล้าจากเมล็ดข้าวที่เคลือบด้วย *B. sonorensis* SA8 มีค่าความยาวยอด ความยาวราก ความยาวรอบลำต้น และ น้ำหนักแห้งเฉลี่ยของต้นข้าวต่ำกว่าชุดควบคุมที่ไม่ได้เคลือบแบคทีเรียอย่างมีนัยสำคัญ ภายหลังจากสภาวะแล้ง (รูปที่ 4.10) เมื่อเปรียบเทียบแบคทีเรียนี้กับแบคทีเรียอื่น พบว่า *B. sonorensis* SA8 เป็นแบคทีเรียที่มีการเจริญช้ากว่าแบคทีเรียที่คัดเลือกมาสายพันธุ์อื่น จากการศึกษาคุณสมบัติในการส่งเสริมการเจริญของพืชพบว่า SA8 มีคุณสมบัติเด่นที่การผลิต Exopolysaccharide เพื่อสร้างเป็นไบโอฟิล์ม และการผลิตฮอร์โมน IAA (ตารางที่ 3.5) อย่างไรก็ตามแบคทีเรียสายพันธุ์นี้ไม่สามารถผลิตเอนไซม์ ACC deaminase ได้ ซึ่งเอนไซม์นี้มีบทบาทในการลดการเหี่ยวเฉาของพืช จึงอาจเป็นปัจจัยหนึ่งที่ทำให้พบว่าผลการทดลองของต้นข้าวที่เคลือบเมล็ดด้วย SA8 ในสภาวะแล้งเจริญได้ไม่ดี ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับหัวข้อ 4.2.1 ที่พบว่าแบคทีเรียแกรมลบที่ส่งเสริมการเจริญของข้าวได้ดี จะมีสมบัติที่สำคัญคือสามารถผลิตเอนไซม์ ACC deaminase

ในปัจจุบันมีงานวิจัยจำนวนมากที่รายงานประสิทธิภาพในการส่งเสริมการเจริญของพืชในสภาวะแล้งของแบคทีเรียในจีนัส Bacillus หลายสายพันธุ์ เช่น Vardharajula และคณะ (2011) พบว่า *Bacillus* spp. จากบริเวณอาณาเขตราก (rhizosphere) ของข้าวฟ่าง ทานตะวัน ข้าวโพด ที่มีคุณสมบัติทนต่อสภาวะแล้ง สามารถกระตุ้นการงอกของเมล็ดข้าวโพดได้ดี และยังทำให้ข้าวโพดทนต่อสภาวะแล้ง โดยมี biomass และการเจริญของรากและยอดดีกว่าเมล็ดที่ไม่ได้คลุกเชื้อในสภาวะแล้ง และ Kavamura และคณะ (2013) พบว่า *B. subtilis* LMA3 และ LMA52 สามารถส่งเสริมการเจริญเติบโตของต้นข้าวโพดภายใต้ความเครียดจากภาวะแห้งแล้ง ในสภาพแวดล้อมจำลอง อย่างไรก็ดียังไม่มีการรายงานถึงประสิทธิภาพของแบคทีเรียในจีนัส *Jeotgalicoccus* ต่อการส่งเสริมการเจริญของพืช จึงควรนำ *Jeotgalicoccus huakuii* RA2 ไปศึกษาเพิ่มเติมถึงกลไกที่เกี่ยวข้องต่อไป

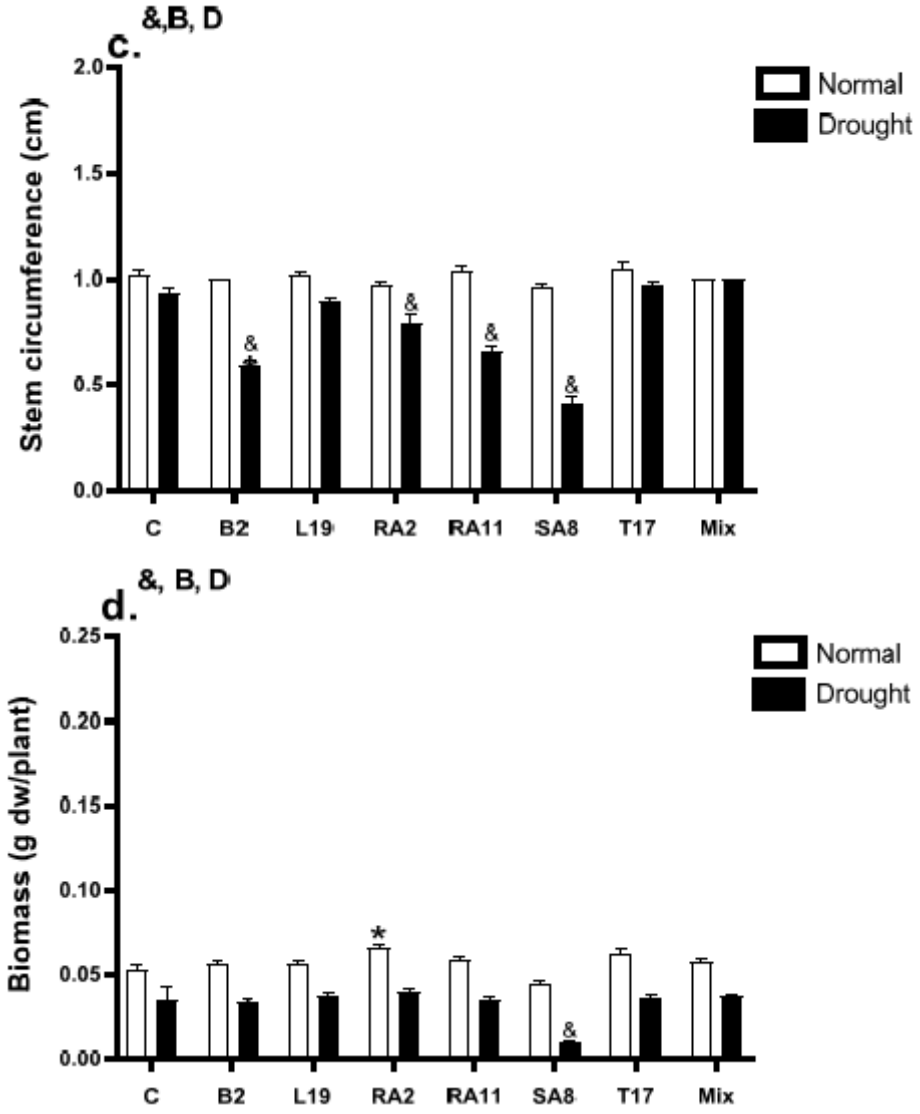


รูปที่ 4.10 ความยาวยอด (a) ความยาวราก (b) ความยาวรอบลำต้น (c) และ น้ำหนักแห้งเฉลี่ยของต้นข้าว (d) ในวันที่ 33 ของต้นข้าวที่เติมหัวเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกทั้งแบบเดี่ยวและแบบผสม โดยชุด C คือต้นข้าวที่ไม่เติมแบคทีเรีย

* หมายถึง ความแปรปรวนของค่าเฉลี่ย กรรมวิธีทดลองควบคุม (C) ในสภาวะปกติ กับ กรรมวิธีทดลองที่เติมแบคทีเรียทนแล้ง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)

& หมายถึง ความแปรปรวนของค่าเฉลี่ย กรรมวิธีทดลองควบคุม (C) ในสภาวะแล้ง กับ กรรมวิธีทดลองที่เติมแบคทีเรียทนแล้ง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)

สัญลักษณ์ [&] หมายถึง ปฏิสัมพันธ์ระหว่างความชื้นดิน (สภาวะปกติและสภาวะแล้ง) และแบคทีเรียทนแล้ง (ไม่ใส่และใส่แบคทีเรียทนแล้ง) มีอิทธิพลต่อความแปรปรวนของค่าเฉลี่ย ($p \leq 0.05$) สัญลักษณ์ [B] หมายถึง แบคทีเรียทนแล้ง มีอิทธิพลต่อความแปรปรวนของค่าเฉลี่ย ($p \leq 0.05$) สัญลักษณ์ [D] หมายถึง ความชื้นในระบบ มีอิทธิพลต่อความแปรปรวนของค่าเฉลี่ย ($p \leq 0.05$)



รูปที่ 4.10 (ต่อ) ความยาวยอด (a) ความยาวราก (b) ความยาวรอบลำต้น (c) และ น้ำหนักแห้งเฉลี่ยของต้นข้าว (d) ในวันที่ 33 ของต้นข้าวที่เติมหัวเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกทั้งแบบเดี่ยวและแบบผสม โดยชุด C คือต้นข้าวที่ไม่เติมแบคทีเรีย

* หมายถึง ความแปรปรวนของค่าเฉลี่ย กรรมวิธีทดลองควบคุม (C) ในสภาวะปกติ กับ กรรมวิธีทดลองที่เติมแบคทีเรียทนแล้ง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)

& หมายถึง ความแปรปรวนของค่าเฉลี่ย กรรมวิธีทดลองควบคุม (C) ในสภาวะแล้ง กับ กรรมวิธีทดลองที่เติมแบคทีเรียทนแล้ง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)

สัญลักษณ์ $^{\&}$ หมายถึง ปฏิสัมพันธ์ระหว่างความชื้นดิน (สภาวะปกติและสภาวะแล้ง) และแบคทีเรียทนแล้ง (ไม่ใส่และใส่แบคทีเรียทนแล้ง) มีอิทธิพลต่อความแปรปรวนของค่าเฉลี่ย ($p \leq 0.05$) สัญลักษณ์ ^{B} หมายถึง แบคทีเรียทนแล้ง มีอิทธิพลต่อความแปรปรวนของค่าเฉลี่ย ($p \leq 0.05$) สัญลักษณ์ ^{D} หมายถึง ความชื้นในระบบ มีอิทธิพลต่อความแปรปรวนของค่าเฉลี่ย ($p \leq 0.05$)

นอกจากที่กล่าวมาแล้ว การทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าต้นข้าวที่เพาะจากเมล็ดเคลือบด้วยเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกผสม 6 สายพันธุ์นี้ มีจำนวนแบคทีเรียบริเวณรากเมื่อผ่านสภาวะแล้งยังสามารถพบได้มากที่สุด (ตารางที่ 4.6) โดยเมื่อดูจากผลความยาวยอด ความยาวราก และเส้นรอบลำต้น เมื่อผ่านสภาวะแล้ง (รูปที่ 4.10) และผลการนับจำนวนใบ และจำนวนราก (ตารางที่ 4.7) พบว่าต้นข้าวข้าวที่เพาะจากเมล็ดเคลือบด้วยเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกผสม มีการเจริญที่ใกล้เคียงกับต้นข้าวที่เติมแบคทีเรียแบบเดี่ยวบางชนิด เช่น *Jeotgalicoccus huakuii* RA2 และ *B. altitudinis* T17 ซึ่งอาจจะเป็นเพราะแบคทีเรียเหล่านี้มีการเจริญมากกว่าแบคทีเรียไอโซเลทอื่น อย่างไรก็ดีเมื่อสิ้นสุดการทดลอง ต้นข้าวที่เคลือบแบคทีเรียแบบผสมมีลำต้นเขียวและดูแข็งแรง เมื่อเทียบกับเมล็ดที่เคลือบจากแบคทีเรียแบบเดี่ยว (ตารางที่ 4.8) ดังนั้นผู้วิจัยจึงได้เลือกแบคทีเรียแกรมบวกผสม 6 สายพันธุ์ นี้ ไปศึกษาต่อในการทดลองระดับโรงเรือน (หัวข้อ 5.2.1) ต่อไป

ตารางที่ 4.6 จำนวนแบคทีเรียทั้งหมดที่ได้จากบริเวณรากข้าวอายุ 33 วัน โดยวิธี Plate count บนอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA

รหัสเชื้อ	**จำนวนเชื้อหลังเคลือบเมล็ด (CFU ต่อกรัมราก)**	**จำนวนเชื้อวันที่ 33**	
		สภาวะปกติ	**สภาวะแล้ง**
Control	$1.32x10^8 \pm 1.22x10^8$	$1.58 \times 10^8 \pm 3.10 \times 10^7$	$1.56 \times 10^8 \pm 9.54 \times 10^6$
B2	$1.40x10^8 \pm 8.52x10^7$	$1.82 \times 10^8 \pm 4.46 \times 10^7$	$5.03 \times 10^8 \pm 5.13 \times 10^7$
L19	$4.97x10^8 \pm 1.17x10^8$	$6.56 \times 10^7 \pm 2.08 \times 10^6$	$1.65 \times 10^8 \pm 1.74 \times 10^7$
RA2	$2.09x10^8 \pm 1.06x10^7$	$1.32 \times 10^9 \pm 1.70 \times 10^8$	$1.30 \times 10^8 \pm 1.53 \times 10^6$
RA11	$6.33x10^8 \pm 6.35x10^7$	$1.30 \times 10^9 \pm 9.29 \times 10^7$	$1.11 \times 10^9 \pm 7.02 \times 10^7$
SA8	$8.03x10^8 \pm 6.66x10^7$	$1.92 \times 10^8 \pm 9.02 \times 10^6$	$1.67 \times 10^8 \pm 1.89 \times 10^7$
T17	$8.30x10^8 \pm 2.59x10^8$	$5.90 \times 10^7 \pm 3.47 \times 10^7$	$1.81 \times 10^8 \pm 4.38 \times 10^7$
Mix	$6.00x10^8 \pm 3.61x10^7$	$1.01 \times 10^9 \pm 6.66 \times 10^7$	$5.59 \times 10^8 \pm 8.08 \times 10^6$

ตารางที่ 4.7 จำนวนใบ จำนวนราก และน้ำหนักแห้ง ของต้นข้าวที่เคลือบเมล็ดด้วยหัวเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก ที่ปลูกในสภาวะปกติและสภาวะแล้ง

รหัสเชื้อ	จำนวนใบ				จำนวนราก				น้ำหนักแห้ง (กรัม/ต้น)	
	สภาวะปกติ		สภาวะแล้ง		สภาวะปกติ		สภาวะแล้ง		สภาวะปกติ	สภาวะแล้ง
	วันที่14	วันที่ 33	วันที่ 14	วันที่ 33	วันที่ 14	วันที่ 33	วันที่ 14	วันที่ 33		
Control	2.13±0.35	5.47±0.64	2.07±0.26	4.87±0.35	4.80±1.21	19.60±3.25	5.47±1.73	13.40±2.72	0.10±0.01	0.10±0.06
B2	2.27±0.46	4.87±0.35	2.47±0.52	5.00±0.00	4.13±1.92	18.87±3.04	3.80±1.78	14.40±2.23	0.10±0.00	0.09±0.05
L19	2.20±0.41	5.20±0.41	2.80±0.41	4.93±0.26	6.47±1.41	16.60±2.03	6.13±1.06	13.00±2.73	0.10±0.01	0.07±0.01
RA2	2.53±0.52	5.60±0.51	2.60±0.51	5.00±0.38	5.40±1.68	19.53±4.78	6.40±0.99	14.87±3.89	0.10±0.01	0.07±0.01
RA11	2.87±0.35	5.67±0.49	2.73±0.46	4.87±0.35	5.87±1.13	22.13±2.85	5.47±1.64	15.53±3.76	0.10±0.01	0.06±0.01
SA8	2.25±0.45	5.47±0.52	2.21±0.67	3.53±0.64	5.33±1.23	15.73±3.90	4.94±1.72	8.20±2.34	0.07±0.01	0.08±0.03
T17	2.80±0.41	5.87±0.35	2.80±0.41	4.87±0.35	4.00±2.39	22.00±3.80	4.07±2.71	14.47±2.77	0.11±0.01	0.07±0.01
Mix	2.20±0.41	5.53±0.52	2.20±0.41	5.07±0.26	5.40±1.68	18.93±2.46	5.80±1.47	14.27±3.06	0.10±0.01	0.07±0.00

ตารางที่ 4.8 การเปลี่ยนแปลงของต้นข้าวที่เคลือบเมล็ดด้วยหัวเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก ในระหว่างการทดลอง

อายุข้าว	Control	B2	L19	Ra2	Ra11	Sa8	T17	Mix 6
ข้าวอายุ 7 วัน								
ข้าวอายุ 14 วัน PEG 10 %								
ข้าวอายุ 17 วัน PEG 20%								
ข้าวอายุ 21 วัน PEG 30%								

หมายเหตุ : ขวดเพาะเลี้ยงต้นข้าวสภาวะแล้ง (ขวามือ) และขวดเพาะเลี้ยงต้นข้าวสภาวะปกติ (ซ้ายมือ)

ตารางที่ 4.8 (ต่อ)

อายุข้าว	Control	B2	L19	Ra2	Ra11	Sa8	T17	Mix 6
ข้าวอายุ 26 วัน PEG 30% วันที่ 5								
ข้าวอายุ 28 วัน PEG 30% วันที่ 7 -> Yoshida								
ข้าวอายุ 42 วัน								

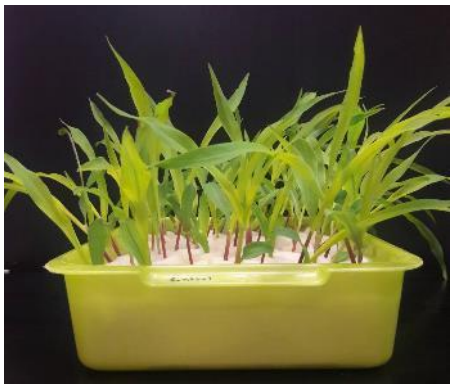
หมายเหตุ : ขวดเพาะเลี้ยงต้นข้าวสภาวะแล้ง (ขวามือ) และขวดเพาะเลี้ยงต้นข้าวสภาวะปกติ (ซ้ายมือ)

4.3 การทดสอบประสิทธิภาพของหัวเชื้อแบคทีเรียทนแล้งแบบหัวเชื้อเดี่ยวและหัวเชื้อผสมต่อการปกป้องและการฟื้นตัวของต้นข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ในระยะต้นกล้า เมื่ออยู่ในสภาวะแล้ง

เนื่องจากข้าวโพดมีวิธีการปลูกและการเจริญต่างจากข้าว ผู้วิจัยจึงต้องหาวิธีการเตรียมต้นกล้าใหม่ โดยเพาะเมล็ดในกระบะทรายก่อนที่จะย้ายต้นกล้าไปใส่ในระบบไฮโดรโปนิกส์ (รูปที่ 4.11) จากลักษณะของต้นกล้าข้าวโพดก่อนนำไปทดสอบการทนแล้ง ที่อายุ 10 วัน แสดงให้เห็นว่าหัวเชื้อแบคทีเรียแกรมลบแบบผสมช่วยให้เมล็ดพันธุ์ข้าวโพดมีการเจริญดีกว่าเล็กน้อย โดยต้นกล้าจากเมล็ดพันธุ์ที่เคลือบหัวเชื้อแบคทีเรียมีความยาวยอด ความยาวราก และจำนวนราก สูงกว่าชุดที่ไม่เคลือบเชื้อ (ตารางที่ 4.9)

เพาะเมล็ดข้าวโพดในกระบะทราย

ข้าวโพดอายุ 3 วัน



ข้าวโพดอายุ 10 วัน

ข้าวโพดวันที่ 11 ทดสอบการทนแล้งขั้นที่ 1 (10% PEG6000)

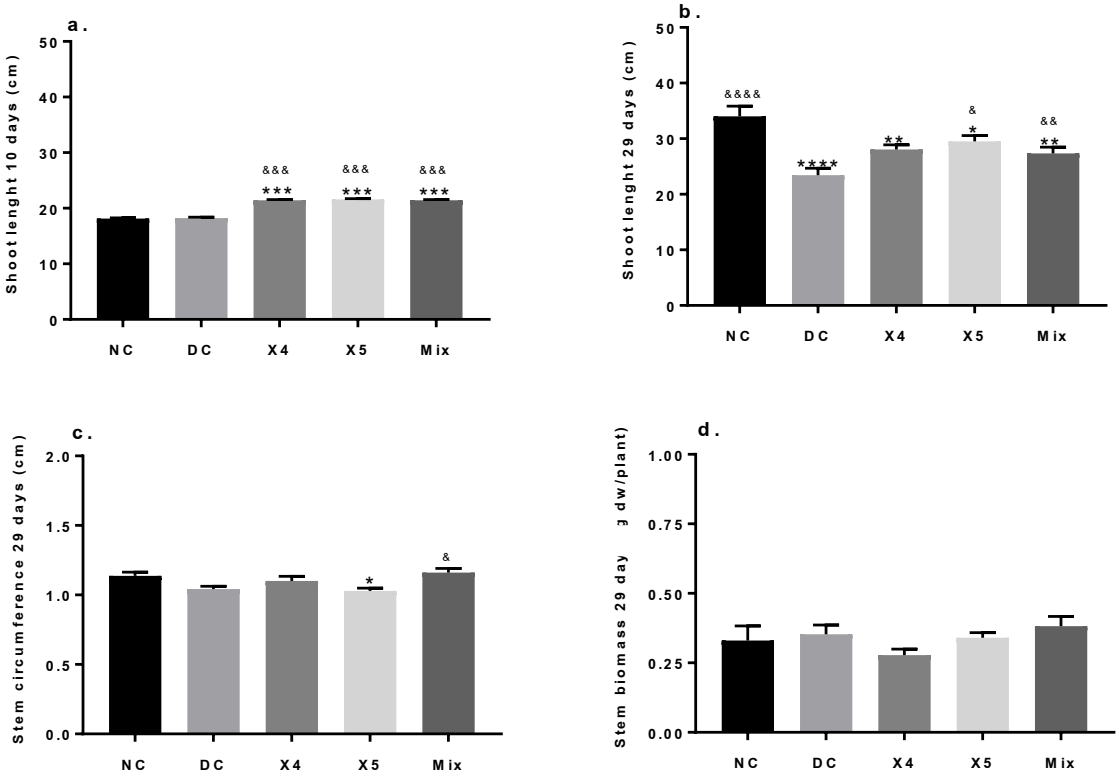
รูปที่ 4.11 การเพาะต้นกล้าข้าวโพด และการทดสอบในสภาวะแห้งแล้ง

ตารางที่ 4.9 การเจริญของต้นกล้าข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ อายุ 10 วัน ก่อนทดสอบสภาวะแล้ง

ชุดทดลอง	ความยาวยอด (ซม.)	ความยาวราก (ซม.)	ความยาวรอบลำต้น (ซม.)	จำนวนใบ	จำนวนราก
ไม่เคลือบเชื้อ	18.18±0.43	13.79±2.31	1.09±0.08	2.67±0.49	6.67±1.45
เชื้อผสม	21.45±0.40	14.35±1.52	1.16±0.10	2.62±0.51	7.46±1.56

ในช่วงแรก (วันที่ 10) พบว่าการเติมหัวเชื้อแบคทีเรียช่วยให้ต้นข้าวโพดมีความยาวยอดสูงกว่าชุดควบคุมที่ไม่เติมแบคทีเรีย (Normal และ Control) แต่ไม่มีผลต่อความยาวราก (รูปที่ 4.12) แต่เมื่อนำต้นข้าวโพดไปทดสอบการทนแล้ง พบว่าข้าวโพดมีความยาวยอดลดลงอย่างมีนัยสำคัญ และการเติมแบคทีเรียผสมช่วยให้ต้นข้าวโพดมีความยาวยอดและเส้นรอบวงลำต้น มากกว่าต้นข้าวโพดจากเมล็ดพันธุ์ที่ไม่เติมแบคทีเรียอย่างมีนัยสำคัญ (รูปที่ 4.12) ส่วนจำนวนใบและจำนวนรากไม่พบความแตกต่างที่ชัดเจน (ตารางที่ 4.10)

ลักษณะของต้นข้าวโพดที่นำไปทดสอบสภาวะแล้ง พบว่าต้นข้าวโพดทั้งหมดเหี่ยวลงในวันที่ 18 และไม่สามารถฟื้นตัวได้เลย (ตารางที่ 4.11) ส่วนข้าวโพดที่ปลูกในสภาวะปกติ (Normal) ก็เจริญไม่ค่อยดีนัก แสดงว่าสภาวะที่ใช้ในการปลูกข้าวโพดนี้ไม่เหมาะสม ขณะนี้สันนิษฐานว่าใบข้าวโพดได้รับความร้อนจากหลอดไฟมากไป ทำให้ใบหงิกงอ และเนื่องจากข้าวโพดเป็นพืชที่มีการเจริญในแนวดิ่ง ทำให้ลำต้นสูงชะลูดอย่างรวดเร็ว แต่ลำต้นจะบางและหักล้มได้ง่ายเมื่อใส่ต้นไว้ในฟองน้ำสำหรับปลูกพืช นอกจากนี้ยังพบปัญหารากเน่าในช่วงระยะต้นกล้าซึ่งอาจจะเกิดจากการมีความร้อนมากเกินไป สารละลายธาตุอาหารที่ใช้เลี้ยงมีอุณหภูมิสูงขึ้น ส่งผลทำให้ปริมาณออกซิเจนในสารละลายลดลง จนเป็นเหตุให้รากพืชอ่อนแอ ดังนั้นผู้วิจัยจะไปทดสอบประสิทธิภาพของหัวเชื้อแบคทีเรียต่อข้าวโพดในดินระดับกระถางเลย เพราะการปลูกในสภาวะโรงเรือนน่าจะเหมาะสมกว่า อย่างไรก็ดีผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าการเติมหัวเชื้อแบคทีเรียช่วยส่งเสริมการเจริญของข้าวโพดได้



รูปที่ 4.62 การเปลี่ยนแปลงของต้นข้าวโพดที่เติมแบคทีเรียแกรมลบแบบเดี่ยวและแบบผสม โดยชุด NC และ DC คือต้นข้าวโพดที่ไม่เติมแบคทีเรีย ที่ปลูกในสภาวะปกติและสภาวะแล้งตามลำดับ ส่วน X4, X5 และ Mix หมายถึง ต้นข้าวโพดจากเมล็ดพันธุ์ที่เคลือบแบคทีเรียแบบเดี่ยวชนิด X4 และ X5 และแบคทีเรียผสม ตามลำดับ โดยทั้งหมดปลูกในสภาวะแล้ง

* หมายถึง การเปรียบเทียบความแปรปรวนทางเดียวของค่าเฉลี่ย ระหว่าง NC กับ DC X4 X5 และ Mix มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)

& หมายถึง เปรียบเทียบความแปรปรวนทางเดียวของค่าเฉลี่ย ระหว่าง DC กับ NC X4 X5 และ Mix มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)

ตารางที่ 4.10 จำนวนใบและจำนวนรากของต้นข้าวโพดที่เติมแบคทีเรียแกรมลบแบบเดี่ยว และแบบผสม และจำนวนโคโลนีของเชื้อบริเวณรากต้นข้าวโพด ภายหลังการปลูกเป็นเวลา 30 วัน

ชนิดแบคทีเรีย	จำนวนใบ 10 วัน	จำนวนใบ 29 วัน	จำนวนราก 10 วัน	จำนวนโคโลนี (CFU/g)
Normal สภาวะปกติ	2.63±0.52	4.00±0.00	6.25±1.16	ND
Control สภาวะแล้ง	2.71±0.49	3.71±0.49	7.14±1.68	ND
X4	2.60±0.51	4.33±0.49	7.27±1.83	$> 10^6$
X5	1.03±0.08	4.00±0.00	8.59±2.67	8.08×10^4
Mix	2.62±0.51	4.00±0.00	7.46±1.56	$> 10^6$

หมายเหตุ: ND = Not determined เนื่องจากชุดควบคุม (control และ normal) ไม่มีการเติมหัวเชื้อแบคทีเรีย และสภาวะปกติ หมายถึง ต้นข้าวโพดอยู่ในอาหารที่ไม่มี PEG 6000

ตารางที่ 4.11 การเปลี่ยนแปลงของต้นข้าวโพดที่เติมแบคทีเรียแกรมลบ แบบเดี่ยว และแบบผสม

สภาวะการปลูก	การเปลี่ยนแปลงของต้นข้าวโพด
วันที่ 11 (สภาวะแล้ง, อาหาร 10% PEG 6000)	
วันที่ 15 (สภาวะแล้ง, อาหาร 20% PEG 6000)	
วันที่ 18 (สภาวะแล้ง, อาหาร 30% PEG 6000)	
วันที่ 23 (สภาวะฟื้นตัว, อาหาร Hoagland)	
วันที่ 29 (สภาวะฟื้นตัว, อาหาร Hoagland)	

หมายเหตุ: เรียงขวดทดลองทีละ 2 ซ้ำ จาก Normal สภาวะปกติ, Control สภาวะแล้ง, X4, X5 และ Mix โดยชุดควบคุม (control และ normal) ไม่มีการเติมหัวเชื้อแบคทีเรีย และสภาวะปกติ หมายถึง ต้นข้าวโพดอยู่ในอาหารที่ไม่มี PEG 6000

บทที่ 5

การทดสอบประสิทธิภาพของหัวเชื้อแบคทีเรียผสมในการส่งเสริมการเจริญและการฟื้นตัวของพืชเศรษฐกิจในสภาวะแห้งแล้ง

5.1 ประสิทธิภาพเบื้องต้นของหัวเชื้อแบคทีเรียแบบผสมต่อพืชในระยะต้นกล้าในระดับกระถาง

5.1.1 ประสิทธิภาพเบื้องต้นของหัวเชื้อแบคทีเรียแบบผสมต่อข้าวหอมมะลิ 105

5.1.2 ประสิทธิภาพเบื้องต้นของหัวเชื้อแบคทีเรียแบบผสมต่อข้าวโพดเลี้ยงสัตว์

5.1.3 การเปลี่ยนแปลงจำนวนแบคทีเรียและความหลากหลายของแบคทีเรียในดินบริเวณรากพืช

5.1.4 การเปลี่ยนแปลงของความชื้นในดินจากกระถางข้าวหอมมะลิ 105 และข้าวโพดเลี้ยงสัตว์เมื่องดให้น้ำ

5.2 ประสิทธิภาพของหัวเชื้อแบคทีเรียแบบผสมต่อการเจริญและการฟื้นตัวของพืชจนถึงระยะเก็บเกี่ยว ในระดับเรือนทดลอง

5.2.1 การทดสอบประสิทธิภาพของหัวเชื้อแบคทีเรียต่อการเจริญและการฟื้นตัวจนถึงระยะเก็บเกี่ยวของข้าว กข 47

5.2.2 การทดสอบประสิทธิภาพของหัวเชื้อแบคทีเรียต่อเจริญและการฟื้นตัวจนถึงระยะเก็บเกี่ยวของข้าวโพดเลี้ยงสัตว์

บทนำ

งานวิจัยในขั้นนี้เพื่อยืนยันประสิทธิภาพของหัวเชื้อแบคทีเรียต่อการเจริญของพืชในดินจริง ซึ่งจะงดการให้น้ำเมื่อต้องการจำลองสภาวะแล้ง การปลูกพืชในดินจะช่วยให้พืชมีการเจริญตามธรรมชาติ เนื่องจากมีสารอาหารและสภาพแวดล้อมใกล้เคียงกับการเพาะปลูกในระดับไร่นา ซึ่งคาดว่าผลที่ได้จะช่วยยืนยันประสิทธิภาพของหัวเชื้อแบคทีเรียผสมได้ดีกว่าการทดลองในบทที่ 4 ซึ่งจำลองสภาวะแล้งในระบบไฮโดรโปนิกส์ (Hydroponics) ที่ปลูกพืชโดยใช้อาหารที่ผสม PEG 6000 เพื่อจำลองสภาวะแล้ง งานวิจัยประกอบด้วยการวิเคราะห์คุณสมบัติของดินที่จะนำมาใช้ทดสอบ การประสิทธิภาพเบื้องต้นของหัวเชื้อแบคทีเรียแบบผสมต่อพืชในระยะต้นกล้าในระดับกระถาง การปลูกพืชในโรงเรือนควบคุมอุณหภูมิ และการพัฒนาวิธีทดสอบปริมาณ

การใช้น้ำของพืช (Evapotranspiration: ET) ซึ่งคุณสมบัติของดินที่นำมาทดลองนี้คัดเลือกจากพื้นที่ที่มีรายงานว่าเป็นพื้นที่แล้งซ้ำซาก ในจังหวัดลพบุรี ตามรายงานของกรมพัฒนาที่ดิน พ.ศ.2557 และเป็นพื้นที่ที่มีการเพาะปลูกพืชชนิดนั้น ๆ เช่น ดินนาสำหรับปลูกข้าว ดินไร่สำหรับปลูกข้าวโพด เป็นต้น

ในการทดสอบประสิทธิภาพเบื้องต้นของหัวเชื้อแบคทีเรียแบบผสมต่อพืชในระยะต้นกล้า ทำการศึกษาในระดับกระถาง ใช้หัวเชื้อแบคทีเรียผสมเป็นแกรมบวก 3 ชนิด และแกรมลบ 3 ชนิด คือ *Bacillus stratosphericus* L19, *Bacillus pumilus* T1, *Bacillus altitudinis* T17, *Acinetobacter* sp. L9, *Pseudomonas* sp. T8 และ *Pseudomonas* sp. X3 เคลือบเมล็ดพันธุ์พืชก่อนปลูก เมื่อต้นกล้าอายุ 25 วัน นำไปทดสอบสภาวะแล้งโดยงดให้น้ำเป็นเวลา 7 วัน หลังจากนั้นให้น้ำปกติเพื่อติดตามการฟื้นตัวของพืช นอกเหนือจากการศึกษาการเจริญของพืชเมื่อสิ้นสุดการทดลอง การทดลองนี้ยังเก็บตัวอย่างดินรอบรากข้าวและข้าวโพดเมื่อสิ้นสุดการทดลอง แล้วนำไปศึกษาการเปลี่ยนแปลงและความหลากหลายของประชากรแบคทีเรียกลุ่มเด่นบริเวณรากพืช (Rhizosphere microbiome) ด้วย Nextera XT index kit (Illumina, USA) จำแนกลำดับเบสโดย MiSeq sequencing machine (Illumina) ผลการทดลองทั้งหมดจะเปรียบเทียบระหว่างชุดที่เติมและไม่เติมหัวเชื้อแบคทีเรีย และระหว่างระบบที่มีการให้น้ำปกติตลอดช่วงการปลูกและระบบที่มีสภาวะแล้ง

ส่วนการทดสอบประสิทธิภาพของหัวเชื้อแบคทีเรียแบบผสมต่อการเจริญพืชจนถึงระยะเก็บเกี่ยว ได้ปลูกพืชในกระบะขนาดใหญ่ที่วางในโรงเรือน แล้วใช้หัวเชื้อแบคทีเรียผสมเป็นแกรมบวก 6 ชนิด เนื่องจากแบคทีเรียแกรมลบที่ใช้ทดสอบก่อนหน้านี้ อยู่ในจีนัสเดียวกับแบคทีเรียก่อโรค ซึ่งไม่สามารถใช้ได้ตามประกาศพระราชบัญญัติเชื้อโรคและพิษจากสัตว์ พ.ศ. 2558 สำหรับการปลูกพืชในโรงเรือนทดลองนั้นนอกจากการทดสอบประสิทธิภาพของหัวเชื้อแบคทีเรียผสมต่อการเจริญของพืชแล้ว ยังได้ทำการศึกษาการใช้น้ำของพืชอีกด้วย การใช้น้ำของพืช หมายถึงปริมาณน้ำทั้งหมดที่สูญเสียจากพื้นที่สู่บรรยากาศในรูปของไอน้ำ ปริมาณดังกล่าวนี้ประกอบด้วยสองส่วนหลัก คือ ปริมาณที่พืชดูดไปจากดิน เรียกว่า การคายน้ำ (transpiration) และปริมาณน้ำที่ระเหยจากผิวดินบริเวณรอบๆ ต้นพืช เรียกว่า การระเหย (evaporation) ปริมาณการใช้น้ำของพืชสามารถวัดได้โดยใช้ถัง lysimeter ซึ่งสามารถแยกออกได้ตามลักษณะการทำงานเป็น 2 ประเภทใหญ่ๆ คือ ประเภทวัดโดยไม่เกี่ยวข้องกับน้ำหนัก เช่น ถังวัดการใช้น้ำแบบระบายน้ำ และประเภทวัดโดยอาศัยน้ำหนัก เช่น ถังวัดการใช้น้ำแบบใช้เครื่องชั่ง ซึ่งงานวิจัยนี้เลือกที่จะใช้วิธีวัดแบบใช้เครื่องชั่ง (weight lysimeter) เนื่องจากเป็นวิธีที่ง่ายและเหมาะสมกับพื้นที่โรงเรือนทดลอง โดยวัดจากน้ำหนักของกระถางเมื่อมีน้ำเข้าและน้ำออกในแต่ละวันและนำไปคำนวณปริมาณการใช้น้ำของพืชตามสมการของ Camoglu (2013)

การทดลองในระดับโรงเรือนได้ปลูกพืชทั้งข้าว กข47 และข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ สายพันธุ์แปซิฟิก 339 ในกระบะขนาดใหญ่ โดยใช้เมล็ดพันธุ์เคลือบหัวเชื้อแบคทีเรียผสมระหว่าง *Bacillus thuringiensis* B2, *B. stratosphericus* L19, *Jeotgalicoccus huakuii* RA2, *Jeotgalicoccus* sp. RA11, *B. sonorensis* SA8 และ *B. altitudinis* T17 ซึ่งการขยายขนาดของพื้นที่ปลูกช่วยให้สามารถเก็บข้อมูลได้แม่นยำกว่าการทดลองในกระถางเล็ก ๆ เนื่องจากช่วยให้สามารถเก็บตัวอย่างปริมาณมาก เพื่อไปศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพและชีวภาพของดิน เช่น ปริมาณน้ำในดิน และการเปลี่ยนแปลงจำนวนแบคทีเรียในดินบริเวณรากพืชได้ นอกจากนี้ยังสามารถปลูกต้นพืชให้โตไปจนถึงระยะเก็บเกี่ยว ทำให้สามารถตรวจติดตามประสิทธิภาพของหัวเชื้อแบคทีเรียได้นานขึ้น ทั้งนี้ผู้วิจัยงดให้น้ำพืชในระยะออกดอก เนื่องจากเป็นระยะที่มีความสำคัญต่อผลผลิตของทั้งข้าวและข้าวโพด และยังเป็นระยะที่พืชมีการใช้น้ำมากที่สุด และเมื่อสิ้นสุดระยะการงดให้น้ำแล้ว จึงติดตามการฟื้นตัวของต้นพืชจนกระทั่งสิ้นสุดระยะการปลูกและเก็บเกี่ยวผลผลิต ผลการทดลองทั้งหมดจะเปรียบเทียบ

ระหว่างชุดที่เติมและไม่เติมหัวเชื้อแบคทีเรีย และระหว่างระบบที่มีการให้น้ำปกติตลอดช่วงการปลูกและระบบที่งดการให้น้ำพืชในระยะออกดอก

ระเบียบวิธีวิจัย

5.1 ประสิทธิภาพเบื้องต้นของหัวเชื้อแบคทีเรียแบบผสมต่อพืชในระยะต้นกล้าในระดับกระถาง

5.1.1 ประสิทธิภาพเบื้องต้นของหัวเชื้อแบคทีเรียแบบผสมต่อข้าวหอมมะลิ 105

ในการทดลองก่อนหน้านี้ ได้จำลองสภาวะแห้งแล้งในระดับห้องปฏิบัติการ โดยปลูกพืชในระบบ hydroponic ที่ใช้อาหารเหลวเติม PEG 6000 ที่ความเข้มข้นต่างๆ เพื่อลดค่า Water potential และพยายามควบคุมให้เมล็ดพันธุ์และระบบปลูกมีจุลินทรีย์ตามธรรมชาตินอ้ยที่สุด ทั้งนี้เพื่อให้สะดวกในการทดลอง และสามารถเห็นผลของหัวเชื้อแบคทีเรียต่อต้นข้าวในเวลารวดเร็ว อย่างไรก็ดีผู้วิจัยตระหนักว่าสภาพแวดล้อมของการปลูกพืชในระบบ hydroponic ต่างจากการปลูกพืชในดินมาก และประสิทธิภาพของแบคทีเรียทนแล้งต่อการปกป้องพืชในสภาวะแห้งแล้งของระบบดินอาจจะต่างจากระบบ Hydroponic ได้ เนื่องจากมีรายงานว่าแบคทีเรียบางชนิดสามารถผลิตโพลีแซคคาไรด์ที่ช่วยเพิ่มปริมาณน้ำรอบๆ ราก และทำให้ดินจับตัวดีขึ้น (Sandhya และคณะ, 2009) ดังนั้นในการทดลองนี้จึงทดสอบประสิทธิภาพของหัวเชื้อแบคทีเรียทนแล้งที่คัดเลือกต่อต้นข้าวที่ปลูกในดิน โดยเบื้องต้นได้ทำการทดลองในระดับกระถางขนาดเล็ก ในสภาวะที่ไม่ได้ควบคุมอุณหภูมิ โดยวางกระถางไว้ริมระเบียงเพื่อให้ได้รับแสงจากธรรมชาติ เนื่องจากขณะนั้นโรงเรือนเพาะปลูกควบคุมอุณหภูมิยังก่อสร้างไม่เสร็จ โดยมีรายละเอียดดังต่อไปนี้

การทดสอบประสิทธิภาพของหัวเชื้อแบคทีเรียแบบผสม (Mix) 6 ไอโซเลต คือ *Bacillus stratosphericus* L19, *Bacillus pumilus* T1, *Bacillus altitudinis* T17, *Acinetobacter* sp. L9, *Pseudomonas* sp. T8 และ *Pseudomonas* sp. X3 ต่อต้นข้าวในระยะต้นกล้า ทำการทดลองโดยกำจัดเชื้อจุลินทรีย์บริเวณพื้นผิวเมล็ดข้าวด้วยเอธานอลและคลอร็อกซ์ แล้วแช่เมล็ดข้าวในสารต้านเชื้อรา Ketoconasol ความเข้มข้น 20 มก. /มล. เขย่า 150 รอบ/นาที ข้ามคืน เพื่อป้องกันรา หลังจากนั้นล้างเมล็ดข้าวด้วยเครื่องล้างอุลตร้าโซนิค (Ultrasonic Cleaner) เป็นเวลา 10 นาที การทดลองได้แบ่งเมล็ดข้าวเป็น 2 ชุด คือ 1) ชุดควบคุม (ไม่เคลือบเมล็ดด้วยแบคทีเรีย, Control-drought) แช่เมล็ดข้าวด้วยน้ำปราศจากเชื้อข้ามคืน (150 รอบ/นาที) และ 2) ชุดทดลอง (เคลือบเมล็ดด้วยแบคทีเรียผสม, Mix-drought) โดยแช่เมล็ดข้าวในสารแขวนลอยเซลล์ที่มีเชื้อตั้งต้น 10^9 CFU/มล. (OD = 1) ที่ผสม 1.5% CMC ข้ามคืน (150 รอบ/นาที) หลังจากนั้นนำเมล็ดข้าวทั้ง 2 ชุด มาเพาะในกระถางพลาสติกขนาด 25.5 เซนติเมตร สูง 18 เซนติเมตร (ขนาด 0.0088 ลูกบาศก์เมตร) รดน้ำทุกวันเป็นเวลา 10 วัน คัดเลือกต้นที่มีความสูงใกล้เคียงกันไว้และถอนต้นที่ไม่ต้องการทิ้ง เลี้ยงจนต้นข้าวมีอายุ 25 วัน สังเกตเห็นต้นข้าวเริ่มแตกกอ จึงงดให้น้ำ สังเกตลักษณะสีน้ำตาลของลำต้นและใบ ลำต้นหักงอ ปลายใบยังมีสีเขียว เป็นเวลาทั้งสิ้น 11 วัน ต่อมาทำการเติมหัวเชื้อแบคทีเรียผสมเพิ่มเติม เมื่อพืชมีอายุ 13 วัน เพื่อให้ในดินมีปริมาณแบคทีเรียทนแล้งเพิ่มขึ้น โดยเก็บตัวอย่างรากพืชมานับจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดรอบรากพืชด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptic Soy Agar (TSA) ก่อน หลังจากนั้นเติมเชื้อความเข้มข้น 10^9 CFU ต่อมิลลิลิตร บริเวณดินรอบโคนต้นข้าว ทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง แล้วเก็บตัวอย่างรากพืชอายุ 14 วัน มานับจำนวนแบคทีเรียรอบรากพืช

จากนั้นทดสอบการฟื้นตัวของต้นข้าวภายหลังสภาวะแล้ง ให้น้ำต้นข้าวต่ออีก 7 วัน โดยให้น้ำแก่ดินในกระถางพลาสติกจนชุ่ม เนื่องจากกระถางพลาสติกสำหรับปลูกไม่สามารถขังน้ำได้ จึงยกกระถางพลาสติกวางในถาดสี่เหลี่ยม เติมน้ำในถาดจนระดับน้ำสูงประมาณ 4 เซนติเมตร เพื่อคงค่าความชื้นในดิน ให้ดินในกระถาง

สามารถดูดความชื้นขึ้นไปในกระถางได้ ทั้งนี้ทำการทดลองปลูกข้าวในกระถาง 3 ซ้ำ ต่อ 1 การทดลอง บันทึกผลการทดลองวันสุดท้ายได้แก่ ความยาวยอด ความยาวราก จำนวนใบ จำนวนราก ความกว้างของใบ ความยาวรอบลำต้น จำนวนแบคทีเรียทั้งหมดที่ราก และน้ำหนักแห้งของต้นข้าว ทั้งนี้เปรียบเทียบผลการทดลองกับต้นข้าวที่ปลูกในสภาวะปกติ ทั้งที่ไม่เติม (Control) และเติมแบคทีเรียผสม (Mix) ด้วย

5.1.2 ประสิทธิภาพเบื้องต้นของหัวเชื้อแบคทีเรียแบบผสมต่อข้าวโพดเลี้ยงสัตว์

การทดสอบประสิทธิภาพของหัวเชื้อแบคทีเรียแบบผสม (Mix) 6 ไอโซเลต คือ *Bacillus stratosphericus* L19, *Bacillus pumilus* T1, *Bacillus altitudinis* T17, *Acinetobacter* sp. L9, *Pseudomonas* sp. T8 และ *Pseudomonas* sp. X3 ต่อข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ ทำการทดลองเช่นเดียวกับการปลูกข้าวหอมมะลิ โดยเบื้องต้นได้ทำการทดลองในระดับกระถางขนาดเล็ก ในสภาวะที่ไม่ได้ควบคุมอุณหภูมิ โดยวางกระถางไว้ริมระเบียงเพื่อให้ได้รับแสงจากธรรมชาติ การเตรียมเมล็ดพันธุ์ทำโดยกำจัดเชื้อจุลินทรีย์บริเวณพื้นผิวเมล็ดข้าวโพดด้วยเอธานอลและคลอร็อกซ์ แล้วแช่เมล็ดข้าวโพดในสารต้านเชื้อรา Ketoconasol ความเข้มข้น 20 มก. /มล. เขย่า 150 รอบ/นาที ข้ามคืน เพื่อป้องกันรา หลังจากนั้นล้างเมล็ดด้วยเครื่องล้างอุลตร้าโซนิค (Ultrasonic Cleaner) เป็นเวลา 10 นาที การทดลองได้แบ่งเมล็ดข้าวโพดเป็น 2 ชุด คือ 1) ชุดควบคุม (ไม่เคลือบเมล็ดด้วยแบคทีเรีย) แช่เมล็ดข้าวโพดด้วยน้ำปราศจากเชื้อข้ามคืน (150 รอบ/นาที) และ 2) ชุดทดลอง (เคลือบเมล็ดด้วยแบคทีเรีย) โดยแช่เมล็ดในสารแขวนลอยเซลล์ที่มีเชื้อตั้งต้น 10^9 CFU/มล. (OD = 1) ที่ผสม 1.5% CMC ข้ามคืน (150 รอบ/นาที) หลังจากนั้นนำเมล็ดข้าวโพดทั้ง 2 ชุด มาเพาะในกระถางพลาสติกขนาด 25.5 เซนติเมตรสูง 18 เซนติเมตร รดน้ำทุกวันเป็นเวลา 10 วัน คัดเลือกต้นที่มีความสูงใกล้เคียงกันไว้และถอนต้นที่ไม่ต้องการทิ้ง ต่อมาทำการเติมหัวเชื้อแบคทีเรียผสมเพิ่มเติม เมื่อพืชมีอายุ 13 วัน เพื่อให้ในดินมีปริมาณแบคทีเรียทนแล้งเพิ่มขึ้น โดยเก็บตัวอย่างรากพืชมานับจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดรอบรากพืชด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptic Soy Agar (TSA) ก่อน หลังจากนั้นเติมเชื้อความเข้มข้น 10^9 CFU ต่อมิลลิลิตร บริเวณดินรอบโคนต้นข้าว ทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง แล้วเก็บตัวอย่างรากพืชอายุ 14 วัน มานับจำนวนแบคทีเรียรอบรากพืช

เลี้ยงจนต้นข้าวโพดมีอายุ 25 วัน จึงงดให้น้ำ สังเกตลักษณะสีน้ำตาลของลำต้นและใบ ลำต้นและใบหักงอ ปลายใบยังมีสีเขียว เป็นเวลาทั้งสิ้น 11 วัน จากนั้นทดสอบการฟื้นตัวของต้นข้าวโพดภายหลังสภาวะแล้งให้น้ำต้นข้าวโพดต่ออีก 7 วัน โดยให้น้ำระบบน้ำหยด ทั้งนี้ทำการทดลองปลูกข้าวโพดในกระถาง 3 ซ้ำ ต่อ 1 การทดลอง บันทึกผลการทดลองวันสุดท้ายได้แก่ ความยาวยอด ความยาวราก จำนวนใบ จำนวนราก ความกว้างของใบ ความยาวรอบลำต้น จำนวนจุลินทรีย์ที่ราก และน้ำหนักแห้งของต้นข้าว

5.1.3 การเปลี่ยนแปลงจำนวนแบคทีเรียและความหลากหลายของแบคทีเรียในดินบริเวณราก

5.1.3.1 เก็บตัวอย่างดินรอบรากพืชหลังการฟื้นตัวของต้นข้าวหอมมะลิ 105 และข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ โดยขุดดินบริเวณรากข้าวลึกประมาณ 10-15 เซนติเมตร ใส่ถุงซิปล็อก เก็บรักษาตัวอย่างที่อุณหภูมิติดลบ 80 องศาเซลเซียส ก่อนนำมาสกัดดีเอ็นเอ และเพิ่มจำนวนยีนบริเวณ 16S rRNA ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (Polymerase Chain Reaction; PCR)

5.1.3.2 นำผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้มาติด index ด้วย Nextera XT index kit (Illumina, USA) จำแนกลำดับเบสโดย MiSeq sequencing machine (Illumina) เพื่อวิเคราะห์ลำดับเบสของสิ่งมีชีวิตที่มี 16S

rRNA ในตัวอย่างดินทั้งหมด ณ ศูนย์วิทยาศาสตร์โอมิกส์และชีวสารสนเทศ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

5.2 การทดสอบประสิทธิภาพของหัวเชื้อแบคทีเรียแบบผสมต่อการเจริญและการฟื้นตัวของพืชจนถึงระยะเก็บเกี่ยว ในระดับเรือนทดลอง

การทดลองนี้ทำในโรงเรือน โดยขณะนั้นผู้รับเหมาก่อสร้างโรงเรือนเพาะปลูกเสร็จแล้ว แต่ยังไม่มาติดตั้งระบบควบคุมอุณหภูมิ ซึ่งผู้รับเหมาอ้างว่าไปรับงานที่จังหวัดอื่นและประสบอุบัติเหตุ เนื่องจากข้อจำกัดเรื่องเวลาของโครงการ ผู้วิจัยจึงเริ่มทำการทดลองไปก่อน จึงทำให้พบปัญหาจากการเปลี่ยนแปลงสภาพอากาศตลอดระยะเวลาทดลอง อย่างไรก็ดีการทดลองนี้ช่วยให้เห็นแนวโน้มการใช้ประโยชน์จากหัวเชื้อแบคทีเรียทนแล้งที่พัฒนาขึ้นในบทที่ 3 และ 4 ขั้นตอนการทดลองมีรายละเอียดดังต่อไปนี้

5.2.1 การเตรียมเมล็ดพืชก่อนปลูก

5.2.1.1 การเตรียมหัวเชื้อแบคทีเรียทนแล้ง

1) เพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย 6 เชื้อ (*Bacillus thuringiensis* B2, *B. stratosphericus* L19, *Jeotgalicoccus huakuii* RA2, *Jeotgalicoccus* sp. RA11, *B. sonorensis* SA8, *B. altitudinis* T17) โดยเขี่ยเชื้อลงบนอาหารแข็ง TSA บ่มที่อุณหภูมิ 35°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

2) ใช้เข็มเขี่ยเชื้อเขี่ยเชื้อแบคทีเรียแต่ละชนิดจากข้อ 1.1.1 ใส่ในขวดอาหารเหลว TSB เขย่า 150 รอบ/นาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำเชื้อแบคทีเรียแต่ละชนิดมาเจือจางในน้ำเกลือและปรับ OD_{625} ให้เท่ากับ 1

3) ผสมสารละลายแบคทีเรียทั้ง 6 เชื้อ ในอัตราส่วนที่เท่ากัน และปรับ OD_{625} ให้เท่ากับ 1 อีกครั้ง และเติม Carboxymethyl Cellulose (CMC) 1.5% ผสมจนเป็นเนื้อเดียวกัน

5.2.1.2 การคัดเลือกและวิธีการเคลือบเมล็ดข้าวกข.47 และข้าวโพดเลี้ยงสัตว์แปซิฟิค 339

1) คัดเลือกเมล็ดข้าวและข้าวโพดที่สมบูรณ์ ไม่มีรอยกัดแทะ ไม่มีเชื้อราปกคลุม นำมาชั่งน้ำหนักเพื่อแยกกลุ่มเมล็ดที่มีน้ำหนักใกล้เคียงกัน และคัดเลือกเมล็ดข้าวที่มีน้ำหนักระหว่าง 0.02 - 0.03 กรัม ส่วนเมล็ดข้าวโพดเลือกน้ำหนักเมล็ดระหว่าง 0.30 – 0.4 กรัม

2) ชั่งเมล็ดข้าวที่คัดเลือกไว้จำนวน 50 กรัม ใส่ขวดรูปชมพู่ ขนาด 250 มิลลิลิตร และชั่งเมล็ดข้าวโพดเลี้ยงสัตว์จำนวน 200 กรัม ใส่ขวดรูปชมพู่ ขนาด 500 มิลลิลิตร

3) แช่เมล็ดข้าว และข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ด้วยแอลกอฮอล์ 70% เป็นเวลา 1 นาที เทสารละลายทิ้ง จากนั้นแช่เมล็ดในสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรต์ 10% เป็นเวลา 5 นาที แล้วล้างด้วยน้ำสะอาดที่ผ่านการฆ่าเชื้อ 3 ครั้ง

4) แช่เมล็ดข้าว และข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ ด้วยน้ำสะอาดที่ผ่านการฆ่าเชื้อปริมาตร 100 มิลลิลิตร เติมสารละลายคีโตโคนาโซล ความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร เขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

5) ล้างเมล็ดข้าว และข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ ด้วยเครื่องอัลตร้าโซนิค 10 นาที แล้วแช่เมล็ดพืชกับสารละลายแบคทีเรียผสม ความเข้มข้น 10^9 CFU/มล. เขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

5.2.2 การเตรียมต้นกล้าข้าวกข.47 และข้าวโพดเลี้ยงสัตว์แปซิฟิค 339

1) หยอดเมล็ดข้าว และข้าวโพดเลี้ยงสัตว์จากข้อ 5.2.1.2 ลงในถาดหลุมที่บรรจุพีทมอสเป็นวัสดุปลูก จากนั้นรดน้ำให้ชุ่มและวางไว้ในที่ร่ม

2) เพาะเมล็ดข้าว และข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ให้งอกเป็นต้นกล้า จากนั้นคัดเลือกต้นกล้าที่มีความสูงใกล้เคียงกันย้ายลงถุงเพาะชำ และรดน้ำต้นกล้าให้ชุ่ม (ข้าวอายุ 7 วัน ปลูกถุงละ 3 ต้น, ข้าวโพดเลี้ยงสัตว์อายุ 5 วันปลูกถุงละ 1 ต้น)

5.2.3 การเตรียมกล่องพลาสติกและดินสำหรับปลูกพืช

1) การทดลองนี้ใช้กล่องพลาสติกขนาด 0.0088 ลูกบาศก์เมตร ที่บุด้วยแผ่นรองระบายน้ำและผ้าจีโอเท็กซ์ไทล์ เพื่อกันดินรั่วออกจากระบบ ก่อนการทดลองนำกล่องพลาสติกมาเจาะบริเวณด้านล่างเพื่อใส่ก๊อกน้ำสำหรับใช้ระบายน้ำ เพื่อให้สามารถลดปริมาณน้ำในดินได้ ชั่งน้ำหนักกล่องพลาสติก แผ่นรองระบายน้ำ และผ้าจีโอเท็กซ์ไทล์

2) ชั่งดินใส่ในกล่องพลาสติกให้มีความสูง 30 เซนติเมตร ชั่งน้ำหนักรวมทั้งกล่องพลาสติกบันทึกผล

3) นอกจากนี้ได้ส่งตัวอย่างดินไปวิเคราะห์คุณสมบัติที่คณะสิ่งแวดล้อมและทรัพยากรศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล ซึ่งพบว่าตัวอย่างดินนาข้าว (ตารางที่ 5.1) มีอินทรีย์วัตถุในดินค่อนข้างต่ำ ฟอสฟอรัสปานกลาง การใส่ปุ๋ยในระยะแรกจึงควรมีการเพิ่มปุ๋ยแอมโมเนียมฟอสเฟต สูตร 16-20-0 สำหรับข้าวขาว กข47 ซึ่งเป็นข้าวที่ไม่ไวต่อช่วงแสง ในอัตรา 25 กิโลกรัมต่อไร่ ใส่ในวันที่ย้ายต้นกล้าลงกระบะปลูก ในขณะที่ดินสำหรับปลูกข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ (ตารางที่ 5.2) มีปริมาณไนโตรเจนปานกลาง การใส่ปุ๋ยในระยะแรกจึงควรมีการเพิ่มปุ๋ยยูเรีย (46-0-0) ในอัตรา 25 กิโลกรัมต่อไร่ และใส่ในวันที่ย้ายต้นกล้าลงกระบะปลูกเช่นกัน

ตารางที่ 5.1 สมบัติของดินนาจาก ต.โพตลาดแก้ว อ.ท่าวุ้ง จ.ลพบุรี

รายการวิเคราะห์	**ค่าวิเคราะห์**		
เนื้อดิน	(Texture)	Clay Loam	ดินร่วนเหนียว
อนุภาคขนาดทราย (เปอร์เซ็นต์)	(Sand; %)	30.2	
อนุภาคขนาดทรายแป้ง (เปอร์เซ็นต์)	(Silt; %)	37.5	
อนุภาคขนาดดินเหนียว (เปอร์เซ็นต์)	(Clay; %)	32.3	
พีเอชดิน (pH ดิน:น้ำ, 1:1)	(pH Soil:H_2O; 1:1)	6.39	กรดเล็กน้อย
ค่าสภาพการนำไฟฟ้าของดิน (เดซิซีเมนต่อเมตร)	(EC_e; dS/m)	0.44	ไม่เค็ม
อินทรียวัตถุในดิน (เปอร์เซ็นต์)	(Organic Matter; %)	1.44	ค่อนข้างต่ำ
ฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์ (มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม)	(Avail.P; mg/kg)	11.98	ปานกลาง
โพแทสเซียมที่แลกเปลี่ยนได้ (มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม)	(Exch.K; mg/kg)	58.51	ต่ำ
ไนโตรเจนทั้งหมด (มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม)	(Total N; mg/kg)	0.137	สูง
ความจุแลกเปลี่ยนแคตไอออน (เซนติโมลต่อกิโลกรัม)	(CEC; cmol $_c$/kg)	17.2	ค่อนข้างสูง
ความหนาแน่นรวม (กรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตร)	(ρ; g/cm ^{3})	1.31	-
ความชื้นความจุสนาม (เปอร์เซ็นต์)	(Fc; %)	31	-
ความชื้นจุดเหี่ยวถาวร (เปอร์เซ็นต์)	(PWP; %)	15	-
ความชื้นที่จุดอิ่มตัว	(%)	56	-
ความชื้นที่ความดัน 0.1 บาร์	(%)	39	-
ความชื้นที่ความดัน 10.27 บาร์	(%)	15	-

ตารางที่ 5.2 สมบัติของดินสำหรับปลูกข้าวโพด จาก ต. ตำบลโคกตูม อ.เมือง จ.ลพบุรี

รายการวิเคราะห์	**ค่าวิเคราะห์**		
เนื้อดิน	(Texture)	Clay Loam	ดินร่วนเหนียว
อนุภาคขนาดทราย (เปอร์เซ็นต์)	(Sand; %)	37.1	
อนุภาคขนาดทรายแป้ง (เปอร์เซ็นต์)	(Silt; %)	34.6	
อนุภาคขนาดดินเหนียว (เปอร์เซ็นต์)	(Clay; %)	28.3	
พีเอชดิน (pH ดิน:น้ำ, 1:1)	(pH Soil:H_2O; 1:1)	7.24	เป็นกลาง
ค่าสภาพการนำไฟฟ้าของดิน (เดซิซีเมนต่อเมตร)	(EC_e; dS/m)	0.66	ไม่เค็ม
อินทรียวัตถุในดิน (เปอร์เซ็นต์)	(Organic Matter; %)	3.51	สูง
ฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์ (มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม)	(Avail.P; mg/kg)	10.80	ปานกลาง
โพแทสเซียมที่แลกเปลี่ยนได้ (มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม)	(Exch.K; mg/kg)	87.26	ปานกลาง
ไนโตรเจนทั้งหมด (มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม)	(Total N; mg/kg)	0.107	ปานกลาง
ความจุแลกเปลี่ยนแคตไอออน (เซนติโมลต่อกิโลกรัม)	(CEC; cmol $_c$/kg)	29.4	สูง
ความหนาแน่นรวม (กรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตร)	(ρ; g/cm ^{3})	1.26	-
ความชื้นความจุสนาม (เปอร์เซ็นต์)	(Fc; %)	29	-
ความชื้นจุดเหี่ยวถาวร (เปอร์เซ็นต์)	(PWP; %)	11	-
ความชื้นที่จุดอิ่มตัว	(%)	52	-
ความชื้นที่ความดัน 0.1 บาร์	(%)	40	-
ความชื้นที่ความดัน 10.27 บาร์	(%)	13	-

5.2.4 การย้ายต้นพืชลงกล่องพลาสติกสำหรับปลูกพืช

1) ขุดหลุมลึก 15 เซนติเมตร ในชุดทดลองข้าวขุด 3 หลุม/กล่อง และ ชุดทดลองข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ขุด 2 หลุม/กล่อง เพื่อให้ต้นพืชมีพื้นที่ในการเจริญ จากนั้นแกะถุงต้นกล้าข้าว และต้นกล้าข้าวโพดเลี้ยงสัตว์อายุ 27 วัน ออก เพื่อปลูกลงในกล่อง ฝังตัววัดความชื้นในดิน (Delmhorst soil moisture measuring system) ลึกประมาณ 15 เซนติเมตร บริเวณรากพืช สำหรับตรวจติดตามความชื้นในดิน

2) รดน้ำต้นข้าว และข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ให้ชุ่มจนดินอิ่มน้ำ หลังจาก 15 นาที เอียงกล่องฝั่งที่ใส่ก๊อกน้ำเพื่อปล่อยน้ำออกจากกล่องให้หมด และวัดความชื้นดิน ชั่งน้ำหนักกล่อง บันทึกผล สำหรับชุดทดลองข้าว ขังน้ำในกล่องสูงจากผิวหน้าดิน 1 เซนติเมตร

5.2.5 การหาค่าการระเหยของน้ำในแต่ละวัน

1) ชั่งน้ำหนักกล่องต้นข้าว และข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ขณะที่ดินอิ่มน้ำ วัดความชื้นดินในกล่อง และวัดอุณหภูมิและความชื้นในโรงเรือน บันทึกผล

2) วันต่อมาชั่งน้ำหนักกล่องต้นข้าว และข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ก่อนรดน้ำ วัดความชื้นดินในกล่อง และวัดอุณหภูมิและความชื้นในโรงเรือน บันทึกผล

3) ชั่งน้ำหนักกล่องต้นข้าว และข้าวโพดเลี้ยงสัตว์หลังรดน้ำ วัดความชื้นดินในกล่อง และวัดอุณหภูมิและความชื้นในโรงเรือน บันทึกผล

5.2.6 การทดสอบทนแล้งของต้นข้าวกข.47 และข้าวโพดเลี้ยงสัตว์แปซิฟิค 339

1) ใส่ปุ๋ยสูตร 46-0-0 ในกล่องต้นข้าว และข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ เมื่อต้นพืชมีอายุ 43 วัน และให้น้ำปกติ

2) เติมสารละลายแบคทีเรียผสม (B2, L19, RA2, RA11, SA8 และ T17) ความเข้มข้น 10^9 CFU/มล. ที่โคนต้น ต้นข้าว และข้าวโพดเลี้ยงสัตว์อายุ 60 วัน ต้นละ 10 มิลลิลิตร

3) ใส่ปุ๋ยสูตร 15-15-15 ในกล่องต้นข้าวอายุ 67 วัน และรดน้ำให้ชุ่ม ส่วนกล่องต้นข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ไม่ใส่ปุ๋ย เนื่องจากมีช่อเกสรตัวผู้และเริ่มมีการออกดอกแล้ว จึงเริ่มทดสอบทนแล้ง โดยเอียงน้ำในกล่องออกให้หมด และงดให้น้ำต้นข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ในกลุ่มสภาวะแล้ง

4) เริ่มทดสอบทนแล้งต้นข้าวอายุ 85 วัน ในกลุ่มสภาวะแล้ง โดยเอียงน้ำในกล่องออกให้หมด และงดให้น้ำ

5) หยุดทดสอบทนแล้งของต้นข้าวอายุ 100 วัน และข้าวโพดเลี้ยงสัตว์อายุ 94 วัน โดยการให้น้ำตามปกติจนต้นข้าว และข้าวโพดเลี้ยงสัตว์อายุ 110 วัน รวมระยะเวลาที่งดให้น้ำสำหรับข้าวและข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ คือ 15 วัน และ 27 วัน ตามลำดับ

6) วัดความสูงของต้นข้าว และข้าวโพดเลี้ยงสัตว์จากโคนต้นเหนือดินถึงยอด บันทึกผล จากนั้นเก็บดินบริเวณรากและรากใส่ถุงเพื่อใช้ในการนับจำนวนเชื้อแบคทีเรีย

7) เก็บผลผลิตของต้นข้าว และข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ ชั่งน้ำหนักผลผลิต จากนั้นอบผลผลิตด้วยอุณหภูมิ 80°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง และชั่งน้ำหนักผลผลิต บันทึกผล

5.2.7 การวิเคราะห์ความชื้นดิน

1) ศึกษาการเปลี่ยนแปลงของความชื้นในดินด้วยระบบวัดความชื้น Delmhorst soil moisture measuring system (Delmhorst Instrument Co.) โดยฝังหัววัดความชื้น ในดินลึกประมาณ 10-15 เซนติเมตร จากระดับผิวดิน ค่าที่อ่านได้นำมาเทียบกับค่าแรงดึงความชื้นในดินจากรูปที่ 4 เปรียบเทียบกับค่าความชื้นในดิน 3 กลุ่ม ได้แก่

- ความชื้นที่จุดอิ่มตัว (Saturated soil) ที่ความดันบรรยากาศน้อยกว่า 0.3 บาร์
- ความจุสนาม (Field capacity; FC) ที่ความดันบรรยากาศ 0.3 บาร์
- ความชื้นในดินที่จุดเหี่ยวเฉาถาวร (Permanent wilting point; PWP) ที่ความดันบรรยากาศ 15 บาร์

2) เมื่อสิ้นสุดการทดลอง เก็บตัวอย่างดินในกล่องต้นข้าวโพดเลี้ยงสัตว์สภาวะปกติและสภาวะแล้ง กล่องละ 2 จุด (ขุดดินลึก 10 เซนติเมตร) ชั่งดิน 10 กรัม ใส่ภาชนะสำหรับอบ บันทึกผล จากนั้นอบดินที่

อุณหภูมิ 100°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ชั่งน้ำหนักดินหลังอบ บันทึกผล นำค่าน้ำหนักดินก่อนอบ – หลังอบมาหาค่าความชื้นของดินตามสูตร

เปอร์เซ็นต์ความชื้นในดิน = (น้ำหนักดินก่อนอบ – น้ำหนักดินหลังอบ) / น้ำหนักดินหลังอบ x 100

สรุปกิจกรรมตลอดการทดลอง

วันที่	กิจกรรม
วันที่ 0 (8 ก.ค. 59)	- เพาะเมล็ดข้าวและข้าวโพดในถาดหลุมพีทมอส
วันที่ 5 (13 ก.ค. 59)	- ย้ายต้นกล้าข้าวโพดใส่ถุงเพาะชำ
วันที่ 7 (15 ก.ค. 59)	- ย้ายต้นกล้าข้าวใส่ถุงเพาะชำ
วันที่ 23 (31 ก.ค. 59)	- ย้ายต้นกล้าข้าวและข้าวโพดลงกล่องพลาสติก เริ่มชั่งน้ำหนักและวัดความชื้นดิน
วันที่ 43 (20 ส.ค. 59)	- ใส่ปุ๋ยสูตร 46-0-0 ให้ต้นข้าวและข้าวโพด
วันที่ 52 (29 ส.ค. 59)	- น้ำป่าไหลปิดเส้นทางถนนทำให้ไม่สามารถไปโรงเรือนได้
วันที่ 58 (4 ก.ย. 59)	- ต้นข้าวโพดออกดอกเกสรตัวผู้
วันที่ 60 (6 ก.ย. 59)	- เติมสารละลายเชื้อที่ความเข้มข้น 10^9 CFU/มล. ที่โคนต้นข้าวและข้าวโพด
วันที่ 62 (8 ก.ย. 59)	- ต้นข้าวโพดออกเกสรตัวเมีย
วันที่ 67 (13 ก.ย. 59)	- ใส่ปุ๋ยสูตร 15-15-15 ให้ต้นข้าว - ต้นข้าวโพดเริ่มปล่อยแล้งวันแรก
วันที่ 69-71 (15-17 ก.ย. 59)	- วัดความชื้นดินต้นข้าวโพดกล่องที่ปล่อยแล้งทุก 4 ชั่วโมง
วันที่ 72-74 (18-20 ก.ย. 59)	- วัดความชื้นดินต้นข้าวโพดกล่องที่ปล่อยแล้งทุก 1 ชั่วโมง
วันที่ 74 (20 ก.ย. 59)	- ต้นข้าวเริ่มแตกใบธง
วันที่ 84 (30 ก.ย. 59)	- ต้นข้าวเริ่มตั้งท้อง
วันที่ 85 (1 ต.ค. 59)	- ต้นข้าวปล่อยแล้งวันแรก
วันที่ 91 (7 ต.ค. 59)	- ฝนตกหนัก
วันที่ 92-93 (8-9 ต.ค. 59)	- วัดความชื้นดินต้นข้าวกล่องที่ปล่อยแล้งทุก 1 ชั่วโมง
วันที่ 93 (9 ต.ค. 59)	- เก็บตัวอย่างดินต้นข้าวโพดไปอบหาความชื้น - เลิกปล่อยแล้งต้นข้าวโพด (ข้าวโพดแล้ง 26 วัน)
วันที่ 100 (16 ต.ค. 59)	- เลิกปล่อยแล้งต้นข้าว (ข้าวแล้ง 15 วัน)
วันที่ 109 (25 ต.ค. 59)	- เก็บผลผลิตข้าวและข้าวโพด

ผลการทดลอง

5.1 ประสิทธิภาพเบื้องต้นของหัวเชื้อแบคทีเรียแบบผสมต่อพืชในระยะต้นกล้าในระดับกระถาง

5.1.1 ประสิทธิภาพเบื้องต้นของหัวเชื้อแบคทีเรียแบบผสมต่อข้าวหอมมะลิ 105

ในช่วงแรกของการทดลองได้ปลูกข้าวทั้งที่เตรียมจากเมล็ดพันธุ์ที่เคลือบหัวเชื้อแบคทีเรียผสม (Mix) และที่ไม่มีแบคทีเรีย (Control) ในสภาวะเดียวกัน พบว่าต้นกล้ามีลักษณะไม่ต่างกัน ดังตัวอย่างต้นกล้าอายุ 6 และ 10 วัน ในตารางที่ 5.3 แต่เมื่อเวลาผ่านไปที่สภาวะการให้น้ำปกติพบว่าต้นข้าวที่เติมแบคทีเรียมีลักษณะแข็งแรง และใบเขียวกว่าต้นข้าวที่ไม่เติมแบคทีเรีย ตลอดระยะเวลาปลูก (ตารางที่ 5.3) นอกจากนี้มีความยาวยอด ความยาวราก น้ำหนักแห้ง ความกว้างใบ และ น้ำหนักรากเมื่อสิ้นสุดการทดลอง (วันที่ 42) สูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญ (รูปที่ 5.1 และ 5.2) ผลการทดลองนี้ยืนยันว่าหัวเชื้อแบคทีเรียช่วยส่งเสริมการเจริญของข้าวในดินเมื่อมีการให้น้ำปกติ ในระดับกระถาง ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองในระบบไฮโดรโปนิกส์ หัวข้อ 4.2.2

เมื่อทดสอบสภาวะแล้งโดยงดการให้น้ำ พบว่าต้นกล้าข้าวทั้งที่เติมและไม่เติมแบคทีเรีย ค่อยๆ เหี่ยวลง ใบม้วน และใบมีสีซีดลง จนใบแห้งหมดในวันที่ 36 แต่ต้นข้าวที่เติมแบคทีเรียสามารถฟื้นตัวใหม่เมื่อมีการให้น้ำต่อเนื่อง ในขณะที่กระถางชุดควบคุมไม่สามารถฟื้นได้แม้แต่ต้นเดียว (ตารางที่ 5.4) โดยในวันที่ 42 ต้นข้าวที่เติมแบคทีเรียในสภาวะฟื้นตัว หลังจากทิ้งไว้ไม่ให้น้ำ 11 วัน แล้วให้น้ำต่ออีก 7 วัน มีความยาวยอด ความยาวรอบลำต้น น้ำหนักแห้ง จำนวนใบ และ น้ำหนักรากสูงกว่าต้นข้าวที่ไม่เติมแบคทีเรีย อย่างมีนัยสำคัญ (รูปที่ 5.1 และ 5.2) ผลการทดลองนี้ยืนยันว่าหัวเชื้อแบคทีเรียช่วยส่งเสริมการทนแล้งและการฟื้นตัวของข้าวในดินระดับกระถาง ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองในระบบไฮโดรโปนิกส์ หัวข้อ 4.2.2 ในการทดลองนี้แบคทีเรียที่นำมาใช้เป็นหัวเชื้อแบคทีเรียแบบผสม คัดแยกจากดินปลูกพืชต่างชนิดกัน โดย *Bacillus stratosphericus* L19 และ *Acinetobacter* sp. L9 มาจากดินรากอ้อย *Bacillus pumilus* T1, *Bacillus altitudinis* T17 และ *Pseudomonas* sp. T8 มาจากดินรากข้าว และ *Pseudomonas* sp. X3 มาจากดินรากข้าวโพด (ตารางที่ 3.3 และ 3.4) ดังนั้นผลการทดลองข้างต้นแสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียทนแล้งจากแหล่งที่มาต่างๆ สามารถนำมาใช้ร่วมกันได้ และมีแนวโน้มจะสามารถนำมาใช้กับพืชได้หลายชนิด ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากแบคทีเรียบริเวณรากพืชมีแหล่งที่มาจากดิน จึงความจำเพาะต่อชนิดของพืชน้อยกว่าแบคทีเรียเอนโดไฟต์ที่อาศัยในเนื้อเยื่อพืช

ตารางที่ 5.3 ลักษณะของต้นกล้าข้าวกข 47 ที่เตรียมจากเมล็ดพันธุ์ที่เคลือบหัวเชื้อแบคทีเรียผสม (Mix) และที่ไม่มีแบคทีเรีย (Control) ในการทดลองระดับกระถาง

อายุต้นข้าว	สภาวะปกติ
6 วัน	
10 วัน	

หมายเหตุ: ชุดควบคุมไม่เติมแบคทีเรีย (กระถางซ้ายมือ) ชุดทดลองเคลือบเมล็ดด้วยแบคทีเรียผสม (กระถางขวามือ)

ตารางที่ 5.4 ลักษณะของต้นข้าวกข 47 ที่เตรียมจากเมล็ดพันธุ์ที่เคลือบหัวเชื้อแบคทีเรียผสม (Mix) และที่ไม่มีแบคทีเรีย (Control) เมื่อปลูกในสภาวะปกติและสภาวะแล้ง ในการทดลองระดับกระถาง

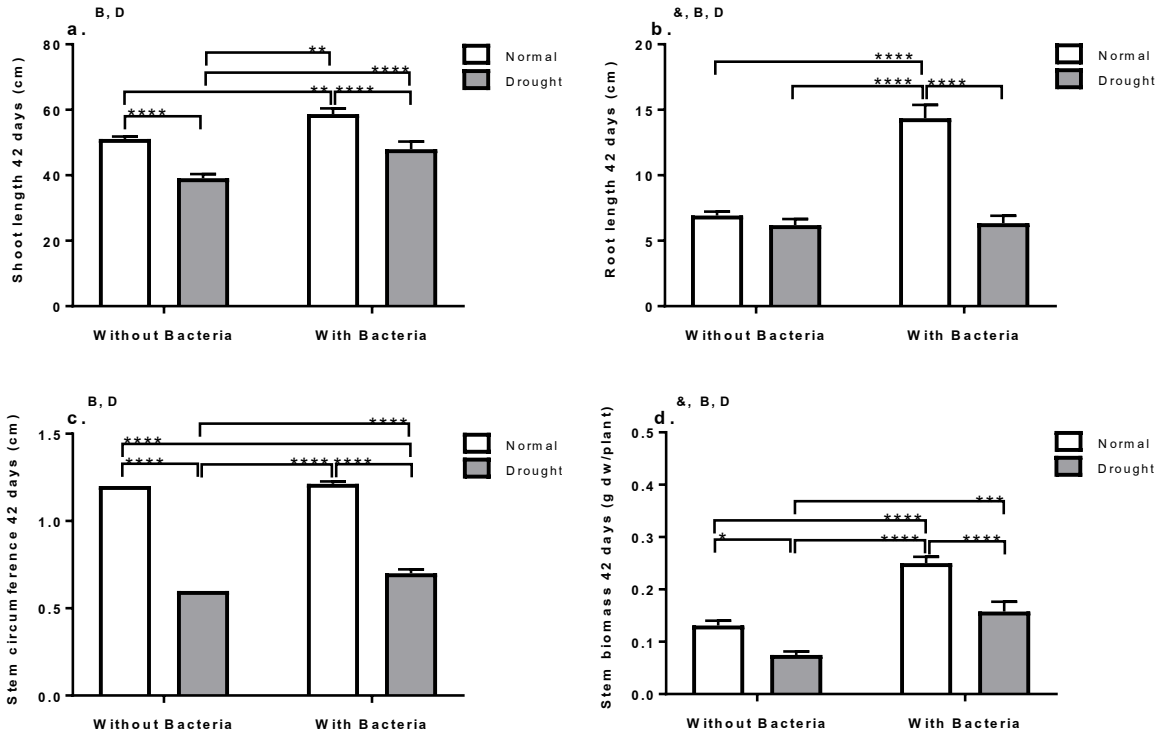
อายุต้นข้าว	สภาวะปกติ	สภาวะแล้ง
26 วัน งดให้น้ำวันที่ 2		

หมายเหตุ: ชุดควบคุมไม่เติมแบคทีเรีย (กระถางซ้ายมือ) ชุดทดลองเคลือบเมล็ดด้วยแบคทีเรียผสม (กระถางขวามือ)

ตารางที่ 5.4 (ต่อ)

อายุต้นข้าว	สภาวะปกติ	สภาวะแล้ง
29 วัน		
32 วัน		
36 วัน สิ้นสุดแล้ง		
42 วัน ระยะฟื้นตัว โดยให้น้ำต่อเนื่อง 7 วัน		

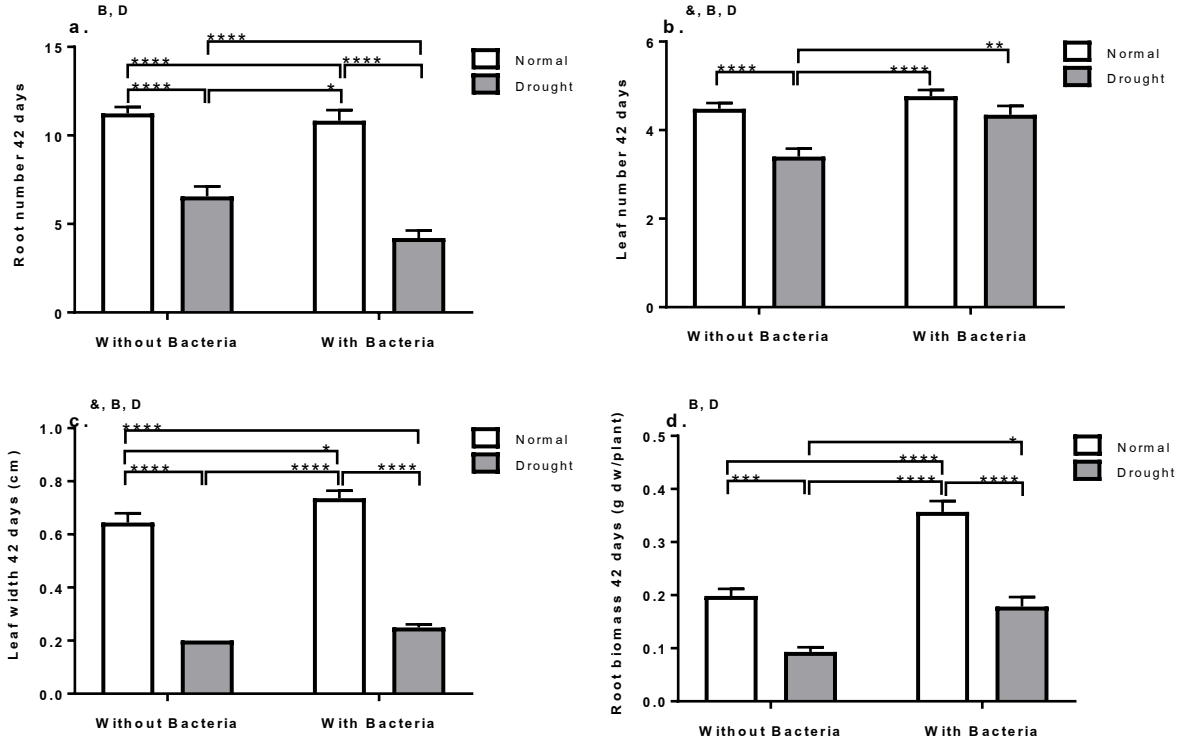
หมายเหตุ: ชุดควบคุมไม่เติมแบคทีเรีย (กระถางซ้ายมือ) ชุดทดลองเคลือบเมล็ดด้วยแบคทีเรียผสม (กระถางขวามือ)



รูปที่ 5.1 ความยาวยอด ความยาวราก ความยาวรอบลำต้น และ น้ำหนักแห้ง ของต้นข้าวหอมมะลิ 105 ที่ไม่เติมและเติมหัวเชื้อแบคทีเรียผสม ในสภาวะการปลูกแบบปกติ และสภาวะแล้ง โดยที่อายุข้าว 42 วัน หมายถึง ข้าวในสภาวะฟื้นตัว หลังจากทิ้งไว้ไม่ให้น้ำ 11 วัน แล้วให้น้ำต่ออีก 7 วัน

สัญลักษณ์ & หมายถึง ปฏิสัมพันธ์ระหว่างความชื้นดิน (สภาวะปกติและสภาวะแล้ง) และแบคทีเรียทนแล้ง (ไม่ใส่และใส่แบคทีเรียทนแล้ง) มีอิทธิพลต่อความแปรปรวนของค่าเฉลี่ย ($p \leq 0.05$) สัญลักษณ์ B หมายถึง แบคทีเรียทนแล้ง มีอิทธิพลต่อความแปรปรวนของค่าเฉลี่ย ($p \leq 0.05$) สัญลักษณ์ D หมายถึง ความชื้นดิน มีอิทธิพลต่อความแปรปรวนของค่าเฉลี่ย ($p \leq 0.05$)

สัญลักษณ์ *, **, ***, และ **** หมายถึง การเปรียบเทียบพหุคูณมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ $p \leq 0.05$, $p \leq 0.01$, $p \leq 0.001$, และ , $p \leq 0.0001$ ตามลำดับ



รูปที่ 5.2 จำนวนราก จำนวนใบ ความกว้างใบ และ น้ำหนักรากของต้นข้าวหอมมะลิ 105 ที่ไม่เติมและเติมหัวเชื้อแบคทีเรียผสม ในสภาวะการปลูกแบบปกติ และสภาวะแล้ง โดยที่อายุข้าว 42 วัน หมายถึง ข้าวในสภาวะฟื้นตัว หลังจากทิ้งไว้ไม่ให้น้ำ 11 วัน แล้วให้น้ำต่ออีก 7 วัน

สัญลักษณ์ & หมายถึง ปฏิสัมพันธ์ระหว่างความชื้นดิน (สภาวะปกติและสภาวะแล้ง) และแบคทีเรียทนแล้ง (ไม่ใส่และใส่แบคทีเรียทนแล้ง) มีอิทธิพลต่อความแปรปรวนของค่าเฉลี่ย ($p \leq 0.05$) สัญลักษณ์ B หมายถึง แบคทีเรียทนแล้ง มีอิทธิพลต่อความแปรปรวนของค่าเฉลี่ย ($p \leq 0.05$) สัญลักษณ์ D หมายถึง ความชื้นดิน มีอิทธิพลต่อความแปรปรวนของค่าเฉลี่ย ($p \leq 0.05$)

สัญลักษณ์ *, **, ***, และ **** หมายถึง การเปรียบเทียบพหุคูณมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ $p \leq 0.05$, $p \leq 0.01$, $p \leq 0.001$, และ , $p \leq 0.0001$ ตามลำดับ

5.1.2 ประสิทธิภาพเบื้องต้นของหัวเชื้อแบคทีเรียแบบผสมต่อข้าวโพดเลี้ยงสัตว์

การทดสอบของเมล็ดข้าวโพดเคลือบหัวเชื้อแบคทีเรียทนแล้งมีผลการทดลองใกล้เคียงกับผลการทดลองของต้นข้าวหอมมะลิ 105 แม้ว่าหัวเชื้อผสมที่ใช้ในการทดลองนี้ไม่เคยนำมาทดสอบกับต้นข้าวโพดมาก่อน แต่จากผลการทดลองข้อ 5.1.1 พบว่าหัวเชื้อนี้สามารถใช้กับต้นข้าวได้ดี จึงได้เลือกมาทดสอบกับข้าวโพดต่อ พบว่าในช่วงแรกของการทดลองได้ปลูกข้าวโพดทั้งที่เตรียมจากเมล็ดพันธุ์ที่เคลือบหัวเชื้อแบคทีเรียผสม (Mix) และที่ไม่มีแบคทีเรีย (Control) ในสภาวะเดียวกัน พบว่าต้นกล้ามีลักษณะไม่ต่างกัน ดังตัวอย่างต้นกล้าอายุ 6 และ 10 วัน ในตารางที่ 5.5 แต่เมื่อเวลาผ่านไปที่สภาวะการให้น้ำปกติพบว่าต้นข้าวโพดที่เติมแบคทีเรียมีความยาวยอดสูงกว่าต้นข้าวที่ไม่เติมแบคทีเรียอย่างมีนัยสำคัญ แต่ลักษณะอย่างอื่นคล้ายกัน (วันที่ 42) (รูปที่ 5.4) ผลการทดลองนี้ยืนยันว่าหัวเชื้อแบคทีเรียช่วยส่งเสริมการเจริญของข้าวโพดในดินเมื่อมีการให้น้ำปกติได้เล็กน้อย ในระดับกระถาง

เมื่อทดสอบสภาวะแล้งโดยงดการให้น้ำ พบว่าต้นข้าวโพดทั้งที่เติมและไม่เติมแบคทีเรีย ค่อยๆ เหี่ยวลง ใบมีสีซีดลง จนใบแห้งหมดในวันที่ 36 โดยต้นข้าวโพดทั้ง 2 แบบสามารถฟื้นตัวใหม่เมื่อมีการให้น้ำต่อเนื่อง (ตารางที่ 5.5) อย่างไรก็ตามในวันที่ 42 ต้นข้าวโพดที่เติมแบคทีเรียในสภาวะฟื้นตัว หลังจากทิ้งไว้ไม่ให้น้ำ 11 วัน แล้วให้น้ำต่ออีก 7 วัน มีความยาวยอดสูงกว่าต้นข้าวโพดที่ไม่เติมแบคทีเรีย อย่างมีนัยสำคัญ (รูปที่ 5.3 และ 5.4) และมีจำนวนใบและความกว้างของใบมากกว่าเล็กน้อย (ตารางที่ 5.7) ผลการทดลองแสดงว่าการเติมเชื้อผสมช่วยส่งเสริมการฟื้นตัวของข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ได้บ้าง ซึ่งแตกต่างจากการทดลองที่ใช้ข้าวซึ่งเห็นผลแตกต่างชัดเจน (หัวข้อ 5.1.1) อาจเนื่องมาจากข้าวโพดเลี้ยงสัตว์เป็นพืชที่ทนต่อความแล้งได้ดีอยู่แล้ว นอกจากนี้ระยะเวลาที่ทดสอบสภาวะแล้งอาจจะสั้นไป ต้นข้าวโพดจึงยังสามารถฟื้นตัวได้ ดังนั้นในการทดลองครั้งต่อไปจึงควรเพิ่มระดับความแล้งให้มากขึ้น

ตารางที่ 5.5 ลักษณะของต้นกล้าข้าวโพดที่เตรียมจากเมล็ดพันธุ์ที่เคลือบหัวเชื้อแบคทีเรียผสม (Mix) และที่ไม่มีแบคทีเรีย (Control) ในการทดลองระดับกระถาง

อายุต้นข้าวโพด	**สภาวะปกติ**
6 วัน	
10 วัน	

หมายเหตุ: ชุดควบคุมไม่เติมแบคทีเรีย (กระถางซ้ายมือ) ชุดทดลองเคลือบเมล็ดด้วยแบคทีเรียผสม (กระถางขวามือ)

ตารางที่ 5.6 ลักษณะของต้นข้าวโพดที่เตรียมจากเมล็ดพันธุ์ที่เคลือบหัวเชื้อแบคทีเรียผสม (Mix) และที่ไม่มีแบคทีเรีย (Control) เมื่อปลูกในสภาวะปกติและสภาวะแล้ง ในการทดลองระดับกระถาง

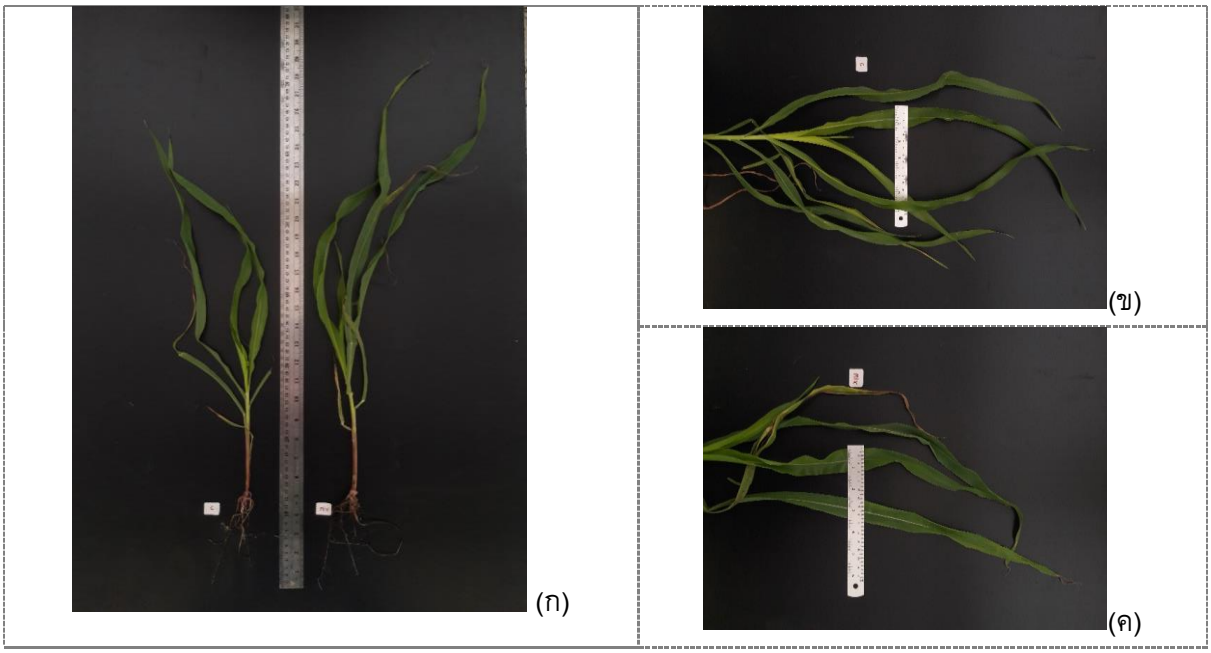
อายุต้นข้าวโพด	สภาวะปกติ	สภาวะแล้ง
26 วัน งดให้น้ำวันที่ 2		
29 วัน		
32 วัน		
36 วัน สิ้นสุดแล้ง เริ่มให้น้ำ		

หมายเหตุ: ชุดควบคุมไม่เติมแบคทีเรีย (กระถางซ้ายมือ) ชุดทดลองเคลือบเมล็ดด้วยแบคทีเรียผสม (กระถางขวามือ)

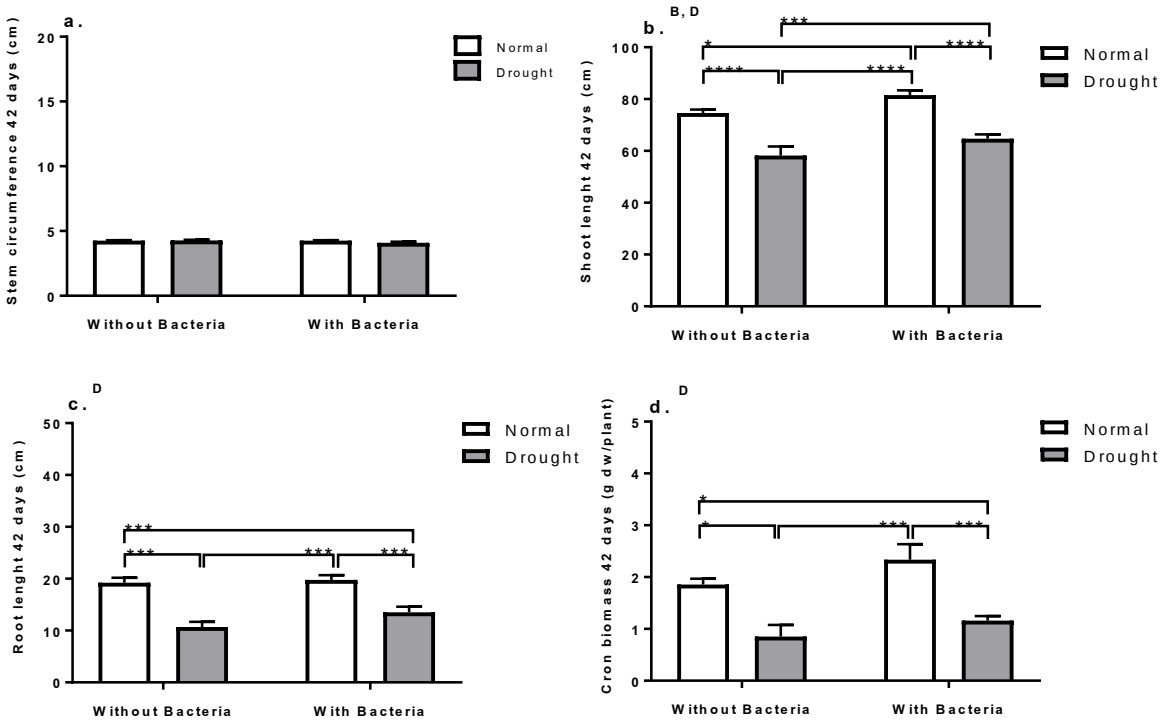
ตารางที่ 5.6 (ต่อ)

อายุต้นข้าวโพด	สภาวะปกติ	สภาวะแล้ง
42 วัน สิ้นสุดการทดลอง		

หมายเหตุ: ชุดควบคุมไม่เติมแบคทีเรีย (กระถางซ้ายมือ) ชุดทดลองเคลือบเมล็ดด้วยแบคทีเรียผสม (กระถางขวามือ)



รูปที่ 5.3 ความยาวของต้นข้าวโพดวันที่ 42 ซึ่งผ่านสภาวะแล้งและอยู่ในระยะฟื้นตัวเปรียบเทียบระหว่างชุดควบคุมไม่เติมแบคทีเรีย (ซ้ายมือ) ชุดที่เติมแบคทีเรีย (ขวามือ) (ก) ส่วนความกว้างของใบข้าวโพดของชุดควบคุมไม่เติมแบคทีเรีย (ข) และ ชุดที่เติมแบคทีเรีย (ค)



รูปที่ 5.4 ความยาวยอด ความยาวราก ความยาวรอบลำต้น และ น้ำหนักแห้ง ของต้นข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ที่ไม่เติมและเติมหัวเชื้อแบคทีเรียผสม ในสภาวะการปลูกแบบปกติ และสภาวะแล้ง โดยที่อายุข้าวโพด 42 วัน หมายถึง ข้าวโพดในสภาวะฟื้นตัว หลังจากทิ้งไว้ไม่ให้น้ำ 11 วัน แล้วให้น้ำต่ออีก 7 วัน

สัญลักษณ์ & หมายถึง ปฏิสัมพันธ์ระหว่างความชื้นดิน (สภาวะปกติและสภาวะแล้ง) และแบคทีเรียทนแล้ง (ไม่ใส่และใส่แบคทีเรียทนแล้ง) มีอิทธิพลต่อความแปรปรวนของค่าเฉลี่ย ($p \leq 0.05$) สัญลักษณ์ B หมายถึง แบคทีเรียทนแล้ง มีอิทธิพลต่อความแปรปรวนของค่าเฉลี่ย ($p \leq 0.05$) สัญลักษณ์ D หมายถึง ความชื้นดิน มีอิทธิพลต่อความแปรปรวนของค่าเฉลี่ย ($p \leq 0.05$)

สัญลักษณ์ *, **, ***, และ **** หมายถึง การเปรียบเทียบพหุคูณมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ $p \leq 0.05$, $p \leq 0.01$, $p \leq 0.001$, และ , $p \leq 0.0001$ ตามลำดับ

ตารางที่ 5.7 จำนวนราก จำนวนใบ ความกว้างของใบ และความยาวรอบลำต้น ของต้นข้าวโพดภายหลังสภาวะแล้ง (วันที่ 42)

ชุดทดลอง	จำนวนราก	จำนวนใบ	ความกว้างของใบ (ซม.)	ความยาวรอบลำต้น (ซม.)
ให้น้ำปกติแบบไม่เติมแบคทีเรีย	7.83±1.24	7.67±0.70	2.91±0.32	4.26±0.10
งดให้น้ำแบบไม่เติมแบคทีเรีย	7.42±1.08	6.58±0.49	3.30±0.43	4.26±0.10
ให้น้ำปกติแบบเติมแบคทีเรีย	5.60±0.88	5.80±0.32	2.58±0.38	4.28±0.06
งดให้น้ำแบบเติมแบคทีเรีย	5.87±1.21	6.33±0.71	2.65±0.41	4.09±0.21

5.1.3 การเปลี่ยนแปลงจำนวนแบคทีเรียและความหลากหลายของแบคทีเรียในดินบริเวณรากพืช

ผลการทดลองในดินระดับกระถางของหัวข้อ 5.1.1 และ 5.1.2 แสดงให้เห็นว่าหัวเชื้อแบคทีเรียผสมมีประสิทธิภาพในการส่งเสริมการเจริญของพืชทั้งข้าวหอมมะลิและข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ และยังช่วยให้พืชที่ผ่านสภาวะแล้งมีการฟื้นตัวดีขึ้น ผลการทดลองพบว่าจำนวนแบคทีเรียบริเวณรากข้าวที่มาจากเมล็ดพืชเคลือบหัวเชื้อผสม มีค่าสูงกว่าชุดควบคุมที่ไม่เคลือบหัวเชื้อเพียงเล็กน้อยเท่านั้น (ตารางที่ 5.8) ทั้งนี้เป็นเพราะในดินมีแบคทีเรียตามธรรมชาติอยู่แล้ว อย่างไรก็ดีการเติมหัวเชื้อเพิ่มเติมในวันที่ 13 ทำให้รากพืชอายุ 14 วัน มีจำนวนแบคทีเรียเพิ่มขึ้นอย่างชัดเจน แสดงดังตารางที่ 5.8

เมื่องดให้น้ำเป็นเวลา 12 วัน และกลับมาให้น้ำเพื่อทดสอบการฟื้นตัวต่ออีก 6 วัน เก็บตัวอย่างรากพืชอายุ 42 วัน มานับจำนวนแบคทีเรียรอบรากพืช ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าจำนวนแบคทีเรียบริเวณรากพืชมีจำนวนลดลงจากการทดลองวันที่ 14 โดยข้าวหอมมะลิ 105 ชุดทดลองที่ผ่านสภาวะแล้งมามีจำนวนแบคทีเรียอยู่ที่ประมาณ 10^6 CFU ต่อกรัมราก และข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ชุดทดลองที่ผ่านสภาวะแล้งมามีจำนวนแบคทีเรียอยู่ที่ประมาณ 10^7 CFU ต่อกรัมราก ในขณะที่แบคทีเรียรอบรากพืชที่ไม่ได้เจอสภาวะแล้งมีจำนวนแบคทีเรียอยู่ที่ประมาณ 10^8 CFU ต่อกรัมราก ทั้งนี้การเติมหัวเชื้อแบคทีเรียผสมช่วยให้พืชมีจำนวนแบคทีเรียรอบรากมากขึ้น อย่างไรก็ดียังไม่สามารถพิสูจน์ได้ว่าแบคทีเรียที่พบนี้ เป็นแบคทีเรียทนแล้งหรือไม่ เนื่องจากใช้อาหารที่มีความชื้นปกติ ในการทดลองต่อไปจึงจะทดสอบโดยใช้อาหาร TSA+PEG6000 เพิ่มเติม นอกจากนี้ควรมีการเติมหัวเชื้อแบคทีเรียเป็นระยะ เพื่อให้แบคทีเรียมีจำนวนมากพอที่จะแข่งขันกับแบคทีเรียท้องถิ่นของดิน แล้วสามารถเพิ่มจำนวนจนเป็นประชากรเด่นของอานาเขตรากพืชได้

ตารางที่ 5.8 จำนวนแบคทีเรียทั้งหมดที่ได้จากบริเวณรากพืชโดยวิธี Plate count บนอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA

ชนิดพืช	ชุดทดลอง	อายุ 13 วัน (CFU ต่อกรัมราก)	อายุ 14 วัน (CFU ต่อกรัมราก)	อายุ 42 วัน (CFU ต่อกรัมราก)
ข้าวหอมมะลิ 105	ให้น้ำปกติแบบไม่เติมแบคทีเรีย	$5.32x10^5 \pm 2.4x10^5$	ND	$1.61x10^7 \pm 1.3x10^7$
	งดให้น้ำแบบไม่เติมแบคทีเรีย			$1.68x10^6 \pm 0.4x10^6$
	ให้น้ำปกติแบบเติมแบคทีเรีย	$6.68x10^5 \pm 4.8x10^5$	$2.96x10^8 \pm 0.4x10^8$	$1.25x10^8 \pm 1.0x10^8$
	งดให้น้ำแบบเติมแบคทีเรีย			$4.04x10^6 \pm 1.2x10^6$
ข้าวโพดเลี้ยงสัตว์	ให้น้ำปกติแบบไม่เติมแบคทีเรีย	$1.68x10^7 \pm 0.2x10^7$	ND	$6.52x10^7 \pm 2.8x10^7$
	งดให้น้ำแบบไม่เติมแบคทีเรีย			$1.20x10^7 \pm 0.8x10^7$
	ให้น้ำปกติแบบเติมแบคทีเรีย	$3.73x10^7 \pm 0.6x10^6$	$2.24x10^9 \pm 0.2x10^9$	$4.52x10^8 \pm 3.2x10^8$
	งดให้น้ำแบบเติมแบคทีเรีย			$1.94x10^7 \pm 0.1x10^7$

การเปลี่ยนแปลงของกลุ่มประชากรแบคทีเรียในดินบริเวณรากต้นข้าวของวันที่ 42 จากวิธีจำแนกลำดับเบส 16S rRNA เมตาจีโนมจากดินด้วย MiSeq sequencing machine (Illumina) พบว่าประชากรกลุ่มเด่นในดินเปลี่ยนไปตามสภาวะการให้น้ำและการเติมหัวเชื้อแบคทีเรีย โดยเมื่อเปรียบเทียบกลุ่มแบคทีเรียในลำดับ Class ระหว่างตัวอย่างดินก่อนนำมาใช้ทดลอง พบว่ามีความแตกต่างกับตัวอย่างดินที่ให้น้ำปกติแบบไม่เติมแบคทีเรีย ตัวอย่างดินที่งดให้น้ำแบบไม่เติมแบคทีเรีย ตัวอย่างดินที่น้ำปกติแบบเติมแบคทีเรีย และตัวอย่างดินที่งดให้น้ำแบบเติมแบคทีเรีย (ตารางที่ 5.9) โดยในชุดทดลองกลุ่มแบคทีเรียผสมเคลือบเมล็ด มีสัดส่วนของแบคทีเรียใน Class Gammaproteobacteria และ Class Bacilli เพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับตัวอย่างดินที่ใช้ปลูกข้าวและตัวอย่างดินจากชุดควบคุม ซึ่งสอดคล้องกับประชากรในหัวเชื้อแบคทีเรียแบบผสมที่ประกอบด้วยแบคทีเรียของทั้งสอง Class นี้ (Class Gammaproteobacteria: ไอโซเลท L9, T8 และ X3; Class Bacilli: ไอโซเลท L19, T1 และ T17) จึงมีความเป็นไปได้ว่ากลุ่มแบคทีเรียที่เคลือบเมล็ดข้าวสามารถเจริญในดินรอบรากข้าวภายหลังการงอกของเมล็ดได้ และยังมีชีวิตอยู่ได้ทั้งในสภาวะมีน้ำปกติและสภาวะแล้ง

ตารางที่ 5.9 สัดส่วนของประชากรแบคทีเรียกลุ่มเด่นในดินรอบรากของต้นข้าวเมื่อสิ้นสุดการทดลอง และในดินก่อนนำมาปลูกข้าว

Class	สัดส่วนของการอ่านทั้งหมด (% Total Reads)				
	ดินก่อนนำมาใช้ทดลอง	ดินที่ให้น้ำปกติแบบไม่เติมแบคทีเรีย	ดินที่งดให้น้ำแบบไม่เติมแบคทีเรีย	ดินที่ให้น้ำปกติแบบเติมแบคทีเรีย	ดินที่งดให้น้ำแบบเติมแบคทีเรีย
Acidobacteria	5.64%	-	-	-	-
Actinobacteria	12.36%	11.82%	16.65%	10.70%	12.65%
Alphaproteobacteria	13.24%	15.86%	9.66%	11.79%	10.51%
Bacilli	-	-	6.19%	6.63%	6.69%
Betaproteobacteria	10.53%	16.03%	8.97%	13.10%	11.63%
Clostridia	8.93%	10.62%	8.36%	8.84%	8.92%
Deltaproteobacteria	6.49%	8.26%	8.22%	10.21%	9.04%
Gammaproteobacteria	13.00%	9.98%	9.32%	10.99%	13.45%
Sphingobacteria	-	4.97%	-	-	-
Unclassified at Class level	7.82%	5.33%	8.35%	7.82%	7.26%
รวม	78.01%	82.87%	75.72%	80.08%	80.15%
Others	21.99%	17.13%	24.28%	19.92%	19.85%

หมายเหตุ: Others หมายถึงกลุ่มแบคทีเรียใน Class อื่น ๆ นอกเหนือจากเปอร์เซ็นต์ของกลุ่มแบคทีเรีย 8 อันดับแรกในแต่ละชุดตัวอย่าง

สำหรับดินรอบรากต้นข้าวโพดจากตารางที่ 5.10 นั้นส่วนใหญ่พบกลุ่มแบคทีเรียจาก Class ต่าง ๆ คล้ายกับกลุ่มแบคทีเรียที่พบทั้งหมดจากตัวอย่างดินรอบรากต้นข้าว โดยพบว่าตัวอย่างดินรอบรากต้นข้าวโพดที่เติมหัวเชื้อแบคทีเรีย มีประชากรเด่นที่เป็นสมาชิกของ Class Gammaproteobacteria เพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับตัวอย่างที่ไม่เติมแบคทีเรีย นอกจากนี้พบกลุ่มแบคทีเรียใน Class Bacilli ในชุดทดลองที่งดให้น้ำมากกว่าในสภาวะปกติ จากการรายงานในอดีตที่ผ่านมาพบว่าแบคทีเรียรอบรากพืชที่ช่วยส่งเสริมการเจริญของพืชในสภาวะแล้งมักมีการรายงานการใช้แบคทีเรียใน Class Gammaproteobacteria และ Class Bacilli เช่น *Pseudomonas* spp., *Burkholderia phytofirmans*, *Enterobacter* sp., *Bacillus* spp., *Paenibacillus polymyxa* (Ngumbi and Kloepper, 2016) ผลการทดลองจากตารางที่ 5.9 และ 5.10 แสดงเห็นว่าแบคทีเรียกลุ่มเด่นในตัวอย่างดินรอบรากคือแบคทีเรียใน Class Gammaproteobacteria และ Actinobacteria ดังนั้นการใช้กลุ่มแบคทีเรียทนแล้งเคลือบเมล็ด และการเติมสารละลายกลุ่มแบคทีเรียนี้น่าจะช่วยส่งเสริมการทนแล้งของพืช โดยการสร้างสารบางอย่างที่ช่วยกระตุ้นการทนแล้ง หรือช่วยทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของกลุ่มประชากรแบคทีเรียทำให้แบคทีเรียที่มีบทบาทในการกระตุ้นการทนแล้งที่มีอยู่แล้วในดินให้มีจำนวนเพิ่มมากขึ้น และทำให้พืชได้รับสารเคมีสำหรับการกระตุ้นการทนแล้งมากขึ้น ซึ่งในประเด็นนี้จะได้มีการศึกษาเพิ่มเติมต่อไป

ตารางที่ 5.10 สัดส่วนของประชากรแบคทีเรียกลุ่มเด่นในดินรอบรากของต้นข้าวโพดเมื่อสิ้นสุดการทดลอง และในดินก่อนนำมาปลูกข้าวโพด

Class	สัดส่วนของการอ่านทั้งหมด (% Total Reads)				
	ดินก่อนนำมาใช้ทดลอง	ดินที่ให้น้ำปกติแบบไม่เติมแบคทีเรีย	ดินที่งดให้น้ำแบบไม่เติมแบคทีเรีย	ดินที่ให้น้ำปกติแบบเติมแบคทีเรีย	ดินที่งดให้น้ำแบบเติมแบคทีเรีย
Actinobacteria	22.12%	16.61%	23.25%	17.83%	20.25%
Alphaproteobacteria	12.21%	9.66%	16.60%	13.47%	14.55%
Bacilli	8.44%	3.11%	8.35%	5.08%	7.26%
Betaproteobacteria	-	8.41%	14.67%	6.52%	4.82%
Clostridia	9.08%	5.54%	4.06%	5.72%	7.31%
Deltaproteobacteria	3.71%	4.41%	-	4.16%	-
Gammaproteobacteria	11.15%	32.78%	13.03%	25.32%	17.26%
Sphingobacteria	-	-	5.29%	-	-
Thermoleophilia	5.40%	-	-	-	4.19%
Unclassified at Class level	8.02%	5.20%	3.78%	6.04%	6.70%
รวม	80.13%	85.72%	89.03%	84.14%	82.34%
Others	19.87%	14.28%	10.97%	15.86%	17.66%

หมายเหตุ: Others หมายถึงกลุ่มแบคทีเรียใน Class อื่น ๆ นอกเหนือจากเปอร์เซ็นต์ของกลุ่มแบคทีเรีย 8 อันดับแรกในแต่ละชุดตัวอย่าง

5.1.4 การเปลี่ยนแปลงของความชื้นในดินจากกระถางข้าวหอมมะลิ 105 และข้าวโพดเลี้ยงสัตว์เมื่องดให้น้ำ

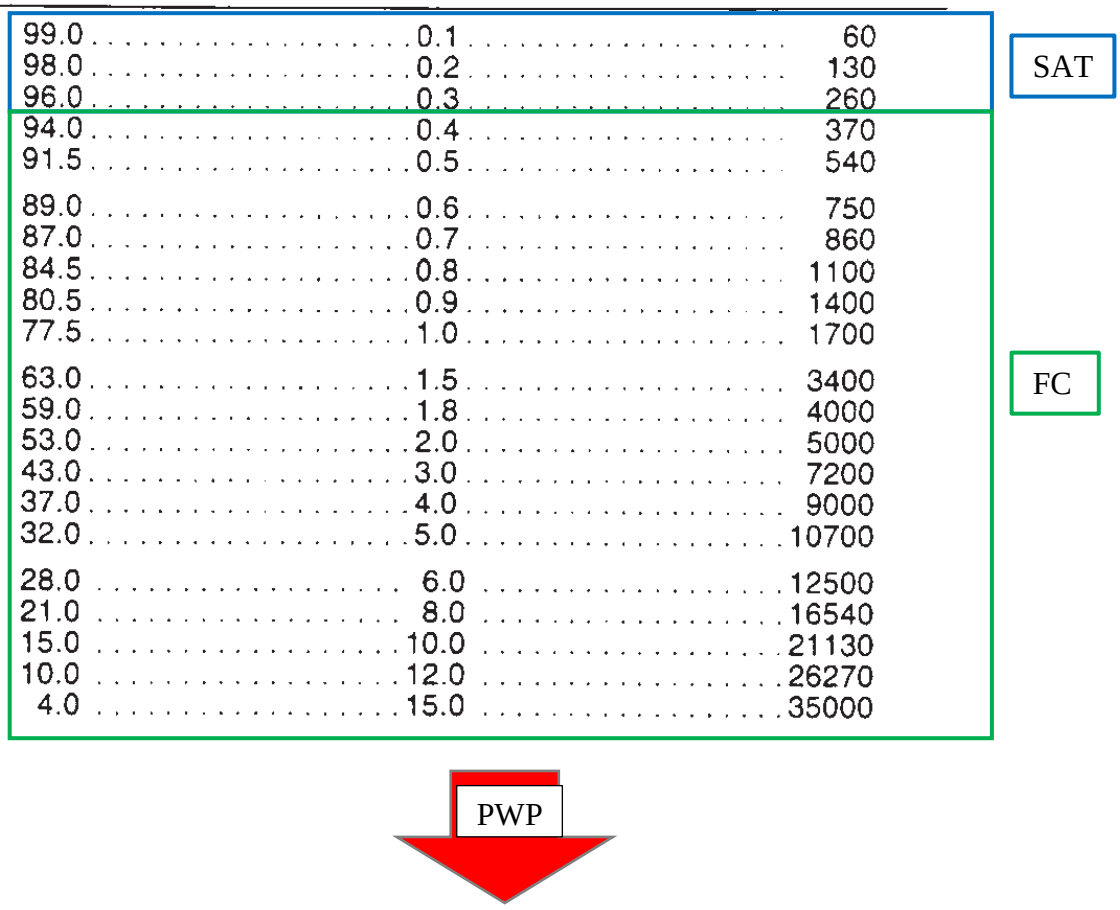
ระหว่างการทดสอบประสิทธิภาพของหัวเชื้อแบคทีเรียต่อการกระตุ้นการทนแล้งของข้าวหอมมะลิ 105 และข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ในระดับกระถาง ได้ศึกษาการเปลี่ยนแปลงของความชื้นในดินด้วยระบบวัดความชื้น Delmhorst soil moisture measuring system ด้วย ค่าที่อ่านได้นำมาเทียบกับค่าแรงดึงความชื้นในดินจากรูปที่ 5.5 เพื่อเปรียบเทียบกับค่าความชื้นในดิน 3 กลุ่ม ได้แก่

- ความชื้นที่จุดอิ่มตัว (Saturated soil) ที่ความดันบรรยากาศน้อยกว่า 0.3 บาร์
- ความจุสนาม (Field capacity; FC) ที่ความดันบรรยากาศ 0.3 บาร์
- ความชื้นในดินที่จุดเหี่ยวเฉาถาวร (Permanent wilting point; PWP) ที่ความดันบรรยากาศ 15 บาร์

KS-D1 **Fig. 1A**

Meter Reading vs. Soil Moisture Tension and Electrical Resistance

METER READING KS-D1	MOISTURE TENSION BARS	RESISTANCE OHMS
99.0	0.1	60
98.0	0.2	130
96.0	0.3	260
94.0	0.4	370
91.5	0.5	540
89.0	0.6	750
87.0	0.7	860
84.5	0.8	1100
80.5	0.9	1400
77.5	1.0	1700
63.0	1.5	3400
59.0	1.8	4000
53.0	2.0	5000
43.0	3.0	7200
37.0	4.0	9000
32.0	5.0	10700
28.0	6.0	12500
21.0	8.0	16540
15.0	10.0	21130
10.0	12.0	26270
4.0	15.0	35000



รูปที่ 5.5 ค่าแรงดึงความชื้นในดินเทียบกับค่าที่อ่านได้จากเครื่องมือวัดความชื้น (ที่มา: KS-D1 manual, Delmhorst)

น้ำที่พืชนำไปใช้ได้ (plant available water) คือ น้ำในดินส่วนที่รากพืชสามารถดูดไปได้ ถูกดินดึงดูดไว้ด้วยแรงยึดเหนี่ยวระหว่าง -0.3 ถึง -15 บาร์ จากการทดลองดังตารางที่ 5.11 พบว่าข้าวหอมมะลิ 105 เข้าสู่จุดเหี่ยวเฉาถาวรภายใต้สภาวะแล้งหลังวันที่ 3 ของการงดให้น้ำ เนื่องจากค่าแรงดึงความชื้นในดินในวันที่ 3 เข้าใกล้จุดเหี่ยวเฉาถาวรของพืช แต่จากแนวโน้มในวันที่ 3 ของการงดให้น้ำ จะเห็นว่าความชื้นในดินของข้าวโพดเลี้ยงสัตว์จะเข้าสู่จุดเหี่ยวเฉาถาวรช้ากว่าข้าว ซึ่งสอดคล้องกับลักษณะของดินในกระถางของชุดทดลองภายใต้สภาวะแล้งของข้าวหอมมะลิ 105 ที่แห้งมากกว่าข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ ในระยะเวลาเดียวกัน (รูปที่ 5.6) การเปลี่ยนแปลงของความชื้นในดินแสดงให้เห็นว่าระยะเวลาในการงดให้น้ำแก่ข้าวโพดเลี้ยงสัตว์อาจจะไม่นานพอ และสายพันธุ์ข้าวโพดเลี้ยงสัตว์เป็นสายพันธุ์ที่มีคุณสมบัติทนแล้ง (แปซิฟิก 339) ทำให้ต้นข้าวโพดของชุดควบคุมและชุดทดลองของข้าวโพดเลี้ยงสัตว์สามารถฟื้นตัวมาได้ทั้ง 2 ชุดการทดลอง ดังนั้นในการทดลองครั้งต่อไปจะต้องเพิ่มระยะเวลาการงดให้น้ำจนถึงจุดเหี่ยวเฉาถาวร (PWP) กับข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ให้นานกว่า 5 วัน

ตารางที่ 5.11 ค่าความชื้นในดินของข้าวหอมมะลิ 105 และข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ ในสภาวะแล้ง

ชนิดพืช	ชุดทดลอง	ค่าแรงดึงความชื้นในดิน (Soil moisture tension : Bars) หลังจากงดให้น้ำ						
		วันที่ 1	วันที่ 2	วันที่ 3	วันที่ 6	วันที่ 7	วันที่ 8	วันที่ 9
ข้าวหอมมะลิ 105	ให้น้ำปกติแบบไม่เติมแบคทีเรีย	0.2 SAT	0.2 SAT	0.2 SAT	0.2 SAT	0.2 SAT	0.2 SAT	0.2 SAT
	งดให้น้ำแบบไม่เติมแบคทีเรีย	0.2 SAT	1.8 FC	10.8 FC	>15 PWP	>15 PWP	>15 PWP	>15 PWP
	ให้น้ำปกติแบบเติมแบคทีเรีย	0.2 SAT	0.2 SAT	0.2 SAT	0.2 SAT	0.2 SAT	0.2 SAT	0.2 SAT
	งดให้น้ำแบบเติมแบคทีเรีย	0.2 SAT	2.9 FC	14.1 FC	>15 PWP	>15 PWP	>15 PWP	>15 PWP
ข้าวโพดเลี้ยงสัตว์	ให้น้ำปกติแบบไม่เติมแบคทีเรีย	0.2 SAT	0.2 SAT	0.2 SAT	0.2 SAT	0.2 SAT	0.2 SAT	0.2 SAT
	งดให้น้ำแบบไม่เติมแบคทีเรีย	0.2 SAT	0.4 FC	1.4 FC	>15 PWP	>15 PWP	>15 PWP	>15 PWP
	ให้น้ำปกติแบบเติมแบคทีเรีย	0.2 SAT	0.2 SAT	0.2 SAT	0.2 SAT	0.2 SAT	0.2 SAT	0.2 SAT
	งดให้น้ำแบบเติมแบคทีเรีย	0.2 SAT	0.4 FC	0.9 FC	>15 PWP	>15 PWP	>15 PWP	>15 PWP

หมายเหตุ: วันที่ 4 และ 5 ไม่สามารถบันทึกค่าความชื้นจากมิเตอร์ได้

รูปที่ 5.6 ลักษณะของดินในกระถางของชุดทดลองภายใต้สภาวะแล้งของ ข้าวหอมมะลิ 105 (ซ้าย) และข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ (ขวา)

5.2 ประสิทธิภาพของหัวเชื้อแบคทีเรียแบบผสมต่อการเจริญและการฟื้นตัวของพืชจนถึงระยะเก็บเกี่ยว ในระดับเรือนทดลอง

เนื่องจากการจำแนกว่าแบคทีเรียไอโซเลตใด ๆ จัดเป็นเชื้อก่อโรคหรือไม่ ตามพระราชบัญญัติเชื้อโรคและพิษจากสัตว์ พ.ศ. 2558 จะดูจากสปีชีส์ของแบคทีเรียที่พบในประกาศของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข เรื่องระดับความเสี่ยงของเชื้อโรคและพิษจากสัตว์ ฉบับลงวันที่ 8 ธันวาคม พ.ศ. 2557 แต่ในงานวิจัยข้างต้น ผู้วิจัยใช้ข้อมูลจากเอกสาร เรื่อง เชื้อโรคและระดับความเสี่ยง โดยกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข พ.ศ. 2552 เมื่อพิจารณาประกาศใหม่จึงพบว่าแบคทีเรียทุกสปีชีส์ของจีนัส *Pseudomonas* และ *Acinetobacter* จัดเป็นเชื้อโรค ทำให้การนำแบคทีเรียเหล่านี้ไปใช้ประโยชน์ ต้องลงทุนสร้างห้องปฏิบัติการที่มีระบบความปลอดภัยระดับ BSL2 และต้องมีผู้ปฏิบัติงานที่มีความรู้เฉพาะทาง ดังนั้นเพื่อความปลอดภัยของเกษตรกรและผู้ใช้งานในอนาคต จึงจำเป็นต้องงดใช้แบคทีเรียที่คัดเลือกมาก่อนหน้านี้ 3 ไอโซเลต คือ *Acinetobacter* sp. L9, *Pseudomonas* sp. T8 และ *Pseudomonas* sp. X3 ทั้งนี้ผู้วิจัยได้คัดเลือกแบคทีเรียแกรมบวกที่มีสมบัติต่างๆ ใกล้เคียงกันมาทดแทน โดยแบคทีเรียที่จะใช้สำหรับการทดสอบในขั้นต่อไปประกอบด้วย *Jeotgalicoccus huakuii* RA2, *Jeotgalicoccus* sp. RA11, *Bacillus tequilensis* SA8, *B. thuringiensis* B2, *B. stratosphericus* L19 และ *B. altitudinis* T17 ซึ่งไอโซเลท B2 และ L19 คัดแยกจากดินรากอ้อย ส่วนแบคทีเรียอื่นๆ คัดแยกมาจากดินรากข้าว (ตารางที่ 3.3 และ 3.4)

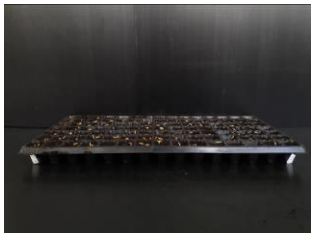
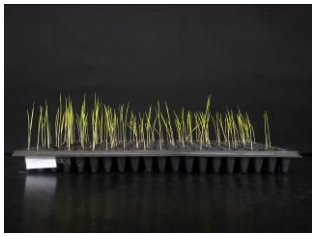
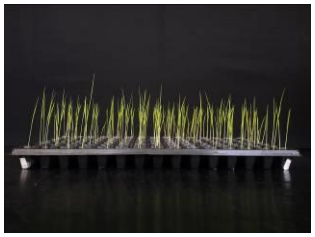
5.2.1 การทดสอบประสิทธิภาพของหัวเชื้อแบคทีเรียต่อการเจริญและการฟื้นตัวจนถึงระยะเก็บเกี่ยวของข้าว กข 47

จากผลการทดลองจะเห็นว่าต้นข้าวที่ปลูกในสภาวะที่มีการให้น้ำปกติ มีการเจริญเติบโตดี (ตารางที่ 5.12, 5.13 และ 5.14) และไม่พบความแตกต่างที่มีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบผลผลิตข้าวและความยาวยอดระหว่างข้าวที่เติมและไม่เติมหัวเชื้อแบคทีเรีย (รูปที่ 5.7) สาเหตุที่สำคัญน่าจะมาจากหัวเชื้อแบคทีเรียที่ใช้แตกต่างจากการทดลองในข้อ 5.1 จากผลการทดลองในบทที่ 3 พบว่าแบคทีเรียแกรมบวกมีประสิทธิภาพในการผลิตฮอร์โมน IAA ต่ำกว่าแบคทีเรียแกรมลบ (รูปที่ 3.8) โดย IAA เป็นฮอร์โมนพืชกลุ่มออกซิน มีบทบาทต่อการยืดยาวและการแบ่งเซลล์ รวมทั้งช่วยกระตุ้นการเจริญและพัฒนาการเกี่ยวกับกลไกการป้องกันตนเองของพืช ทำให้รากพืชมีพื้นที่ผิวรากเพิ่มขึ้น ความสามารถในการลำเลียงธาตุอาหารก็จะสูงขึ้นตามไปด้วย (Yang และคณะ, 2009) การใช้แบคทีเรียผสมจากแบคทีเรียแกรมบวกเพียงอย่างเดียวจึงมีประสิทธิภาพต่ำในการส่งเสริมการเจริญของต้นข้าวในสภาวะปกติ

เมื่อเปรียบเทียบการเจริญของข้าวในระหว่างการงดให้น้ำและการฟื้นตัวเมื่อให้น้ำปกติ พบว่าการงดให้น้ำในระยะต้นข้าวออกดอกทำให้ผลผลิตและความยาวยอดลดลงอย่างมีนัยสำคัญ (รูปที่ 5.7) ทั้งนี้การเติมแบคทีเรียช่วยให้ต้นข้าวมีความยาวยอดเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ (รูปที่ 5.7) แต่ลักษณะอื่นๆ มีความใกล้เคียงกัน (ตารางที่ 5.13 และ 5.14) ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับการทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียผสมนี้ในระบบไฮโดรโปนิกส์หัวข้อ 4.2.2 ที่พบว่าการเติมแบคทีเรียผสมจากแบคทีเรียแกรมบวก ช่วยให้ต้นข้าวมีความยาวรากสูงกว่าชุดควบคุมที่ไม่ได้เคลือบแบคทีเรียอย่างมีนัยสำคัญ แต่ไม่ได้ช่วยส่งเสริมลักษณะอื่นๆ เมื่อปลูกข้าวในสภาวะแล้ง นอกจากนี้จำนวนแบคทีเรียบริเวณรากยังลดลงเกือบ 1 Log เมื่อเปรียบเทียบกับสภาวะให้น้ำปกติ (ตารางที่ 5.15) เมล็ดข้าวจากชุดทดลองที่งดให้น้ำมีความแตกต่างจากสภาวะให้น้ำปกติ คือ เมล็ดข้าวไม่สมบูรณ์ แห้งฝ่อ และมีเชื้อรา (รูปที่ 5.8) เมื่อเปรียบเทียบเมล็ดข้าวของชุดทดลองที่เคลือบเมล็ดและไม่เคลือบ

เมล็ดพบว่า ผลผลิตจากชุดทดลองที่เคลือบเมล็ดมีความสมบูรณ์ของเมล็ดมากกว่าชุดที่ไม่เติมแบคทีเรีย และให้น้ำหนักผลผลิตมากกว่าเล็กน้อย (ตารางที่ 5.15) ค่าการคายระเหยน้ำของทุกชุดทดลองมีค่าไม่แตกต่างกันตลอดช่วงการทดลอง (รูปที่ 5.9) ซึ่งยืนยันว่าการเติมหัวเชื้อแบคทีเรียผสมของแบคทีเรียแกรมบวกนี้ มีประสิทธิภาพต่ำในการส่งเสริมการเจริญและการฟื้นตัวของต้นข้าว อย่างไรก็ตามช่วงระยะเวลาการออกดอกของต้นข้าวนั้นมีอุณหภูมิภายในโรงเรือนสูงมาก (รูปที่ 5.12) และมีการหมุนเวียนของอากาศในโรงเรือนน้อย เนื่องจากเป็นช่วงที่ยังไม่ได้ติดตั้งระบบระบายอากาศ ทำให้ความร้อนในโรงเรือนสูง จึงอาจเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้ผลการทดลองมีความคลาดเคลื่อน

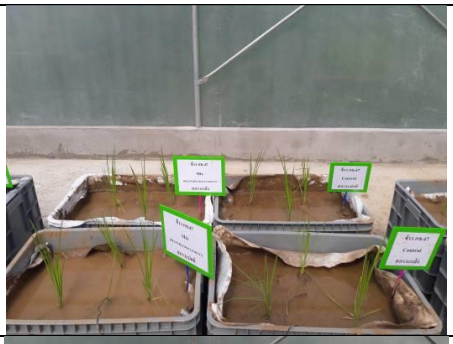
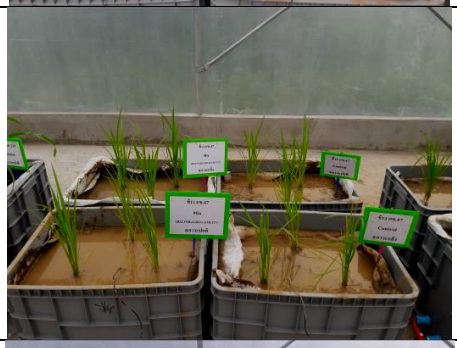
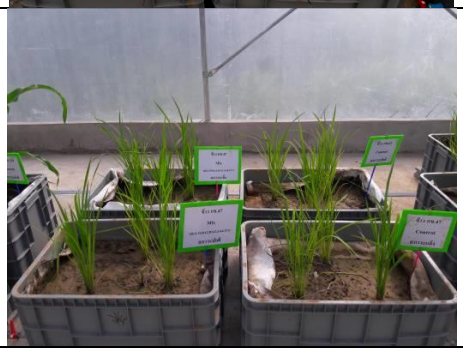
ตารางที่ 5.12 ลักษณะของต้นกล้าข้าวกข 47 ที่เตรียมจากเมล็ดพันธุ์ที่เคลือบหัวเชื้อแบคทีเรียผสม (Mix) และที่ไม่มีแบคทีเรีย (Control)

อายุพืช	**ต้นข้าว กข 47**	
	Control	**Mix (B2,L19,Ra2,Ra11,SA8,T17)**
วันที่ 0		
วันที่ 7		
วันที่ 9		
วันที่ 15		

ตารางที่ 5.12 (ต่อ)

อายุพืช	ต้นข้าว กข 47	
	Control	**Mix (B2,L19,Ra2,Ra11,SA8,T17)**
วันที่ 21		

ตารางที่ 5.13 ลักษณะของต้นข้าวกข 47 ที่เตรียมจากเมล็ดพันธุ์ที่เคลือบหัวเชื้อแบคทีเรียผสม (Mix) และที่ไม่มีแบคทีเรีย (Control) เมื่อปลูกในสภาวะให้น้ำปกติ

อายุพืช	ต้นข้าว กข 47
วันที่ 27	
วันที่ 37	
วันที่ 43 (ใส่ปุ๋ยสูตร 46-0-0)	

ตารางที่ 5.14 ลักษณะของต้นข้าวกข 47 ที่เตรียมจากเมล็ดพันธุ์ที่เคลือบหัวเชื้อแบคทีเรียผสม (Mix) และที่ไม่มีแบคทีเรีย (Control) เมื่อใกล้ระยะออกดอกจนถึงระยะเก็บเกี่ยวในสภาวะให้น้ำปกติ เปรียบเทียบกับสภาวะแล้ง

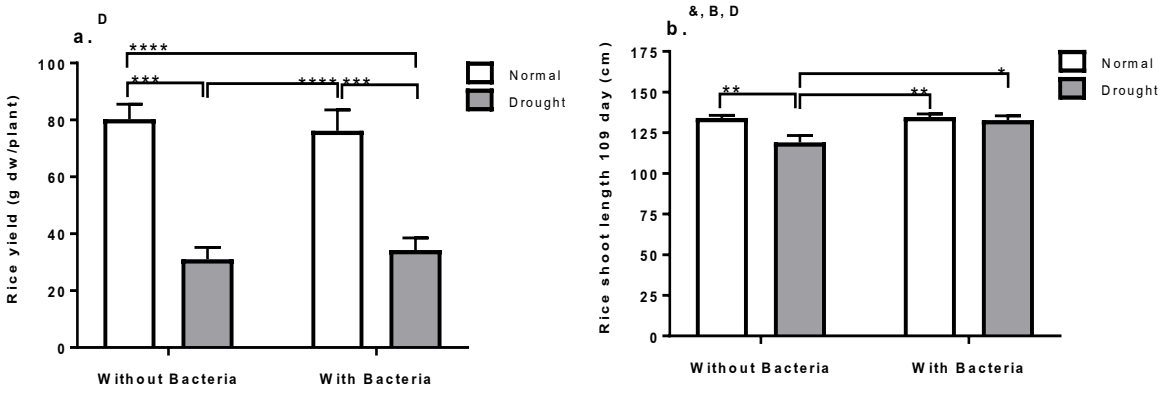
วันที่	ต้นข้าว กข.47			
	Control สภาวะปกติ	**Control** สภาวะแล้ง	**Mix** สภาวะปกติ	**Mix** สภาวะแล้ง
วันที่ 61 (เติมสารละลายเชื้อแบคทีเรีย)				
วันที่ 67 (ใส่ปุ๋ยสูตร 15-15-15)				
วันที่ 74				
วันที่ 85 (เริ่มสภาวะแล้ง)				

ตารางที่ 5.14 (ต่อ)

วันที่	ต้นข้าว กข.47			
	Control สภาวะปกติ	**Control** สภาวะแล้ง	**Mix** สภาวะปกติ	**Mix** สภาวะแล้ง
วันที่ 90 (สภาวะแล้ง วันที่ 5)				
วันที่ 93 (สภาวะแล้ง วันที่ 8)				
วันที่ 95 (สภาวะแล้ง วันที่ 10)				
วันที่ 98 (สภาวะแล้ง วันที่ 13)				
วันที่ 100 (สภาวะแล้ง วันที่ 15)				

ตารางที่ 5.14 (ต่อ)

วันที่	ต้นข้าว กข.47			
	Control สภาวะปกติ	**Control** สภาวะแล้ง	**Mix** สภาวะปกติ	**Mix** สภาวะแล้ง
วันที่ 103 (สภาวะปกติ วันที่ 3)				
วันที่ 107 (สภาวะปกติ วันที่ 7)				
วันที่ 109 (ปล่อยแล้ง วันที่ 9)				



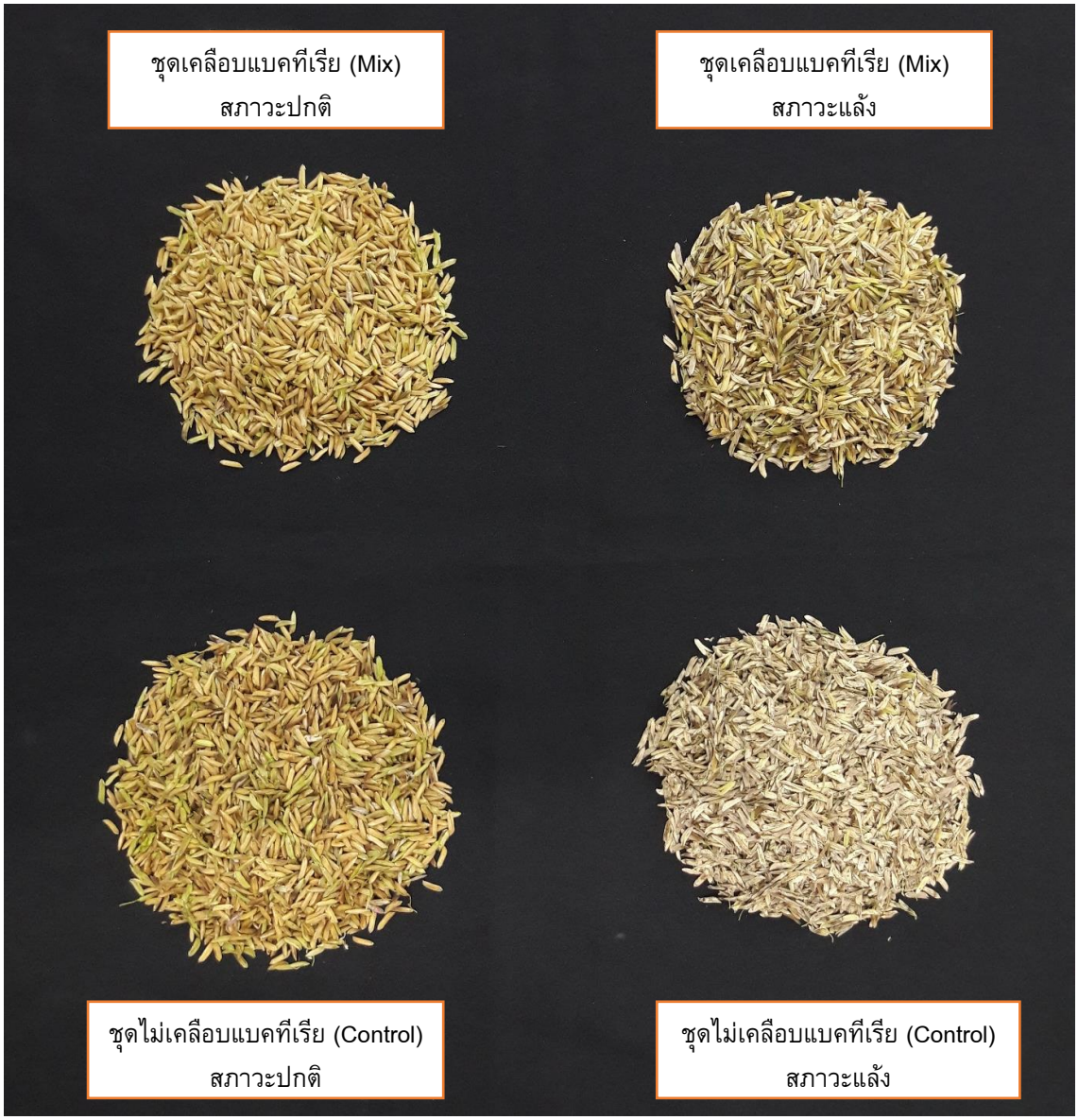
รูปที่ 5.7 ผลผลิตและความสูงของต้นข้าวพันธุ์ กข 47 อายุ 109 วันที่ปลูกในเรือนทดลอง

สัญลักษณ์ & หมายถึง ปฏิสัมพันธ์ระหว่างความชื้นดิน (สภาวะปกติและสภาวะแล้ง) และแบคทีเรียทนแล้ง (ไม่ใส่และใส่แบคทีเรียทนแล้ง) มีอิทธิพลต่อความแปรปรวนของค่าเฉลี่ย ($p \leq 0.05$) สัญลักษณ์ B หมายถึง แบคทีเรียทนแล้ง มีอิทธิพลต่อความแปรปรวนของค่าเฉลี่ย ($p \leq 0.05$) สัญลักษณ์ D หมายถึง ความชื้นดิน มีอิทธิพลต่อความแปรปรวนของค่าเฉลี่ย ($p \leq 0.05$)

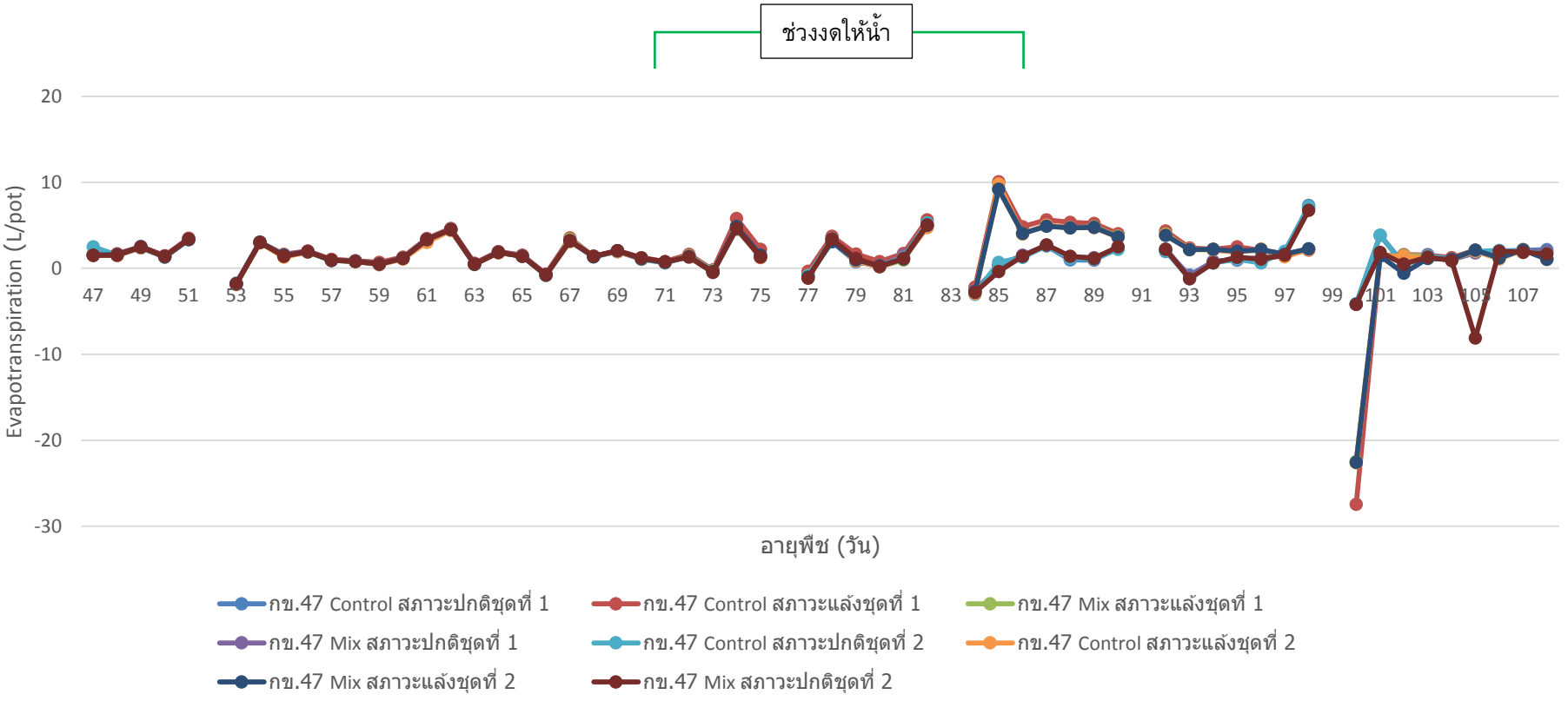
สัญลักษณ์ *, **, ***, และ **** หมายถึง การเปรียบเทียบพหุคูณมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ $p \leq 0.05$, $p \leq 0.01$, $p \leq 0.001$, และ , $p \leq 0.0001$ ตามลำดับ

ตารางที่ 5.15 จำนวนแบคทีเรียที่รากข้าวและน้ำหนักแห้งของผลผลิตเมื่อสิ้นสุดการทดลอง

ชุดทดลอง	จำนวนโคโลนีบริเวณรากพืช (CFU/กรัมราก)	น้ำหนักแห้งต่อกอ (กรัม)	น้ำหนักแห้งรวมต่อกล่อง (กรัม)
ให้น้ำปกติแบบไม่เติมแบคทีเรีย	$1.02 \times 10^6 \pm 7.29 \times 10^5$	77.52±12.80	232.57
งดให้น้ำแบบไม่เติมแบคทีเรีย	$6.75 \times 10^5 \pm 1.88 \times 10^5$	73.47±17.69	220.40
ให้น้ำปกติแบบเติมแบคทีเรีย	$1.37 \times 10^6 \pm 8.68 \times 10^5$	28.16±10.29	84.47
งดให้น้ำแบบเติมแบคทีเรีย	$2.08 \times 10^5 \pm 5.56 \times 10^4$	31.46±10.24	94.38



รูปที่ 5.8 ลักษณะเมล็ดข้าวเมื่อสิ้นสุดการทดลอง



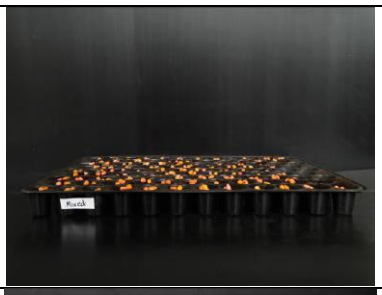
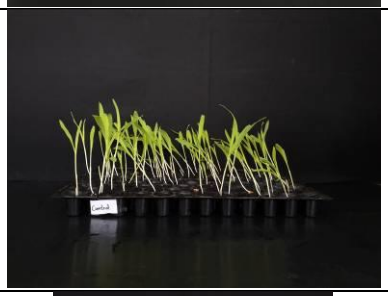
รูปที่ 5.9 ค่าการคายระเหยน้ำ (Evapotranspiration ; ET) ของต้นข้าวพันธุ์ กข 47 ที่ปลูกในเรือนทดลอง

5.2.2 การทดสอบประสิทธิภาพของหัวเชื้อแบคทีเรียต่อการเจริญและการฟื้นตัวจนถึงระยะเก็บเกี่ยวของข้าวโพดเลี้ยงสัตว์

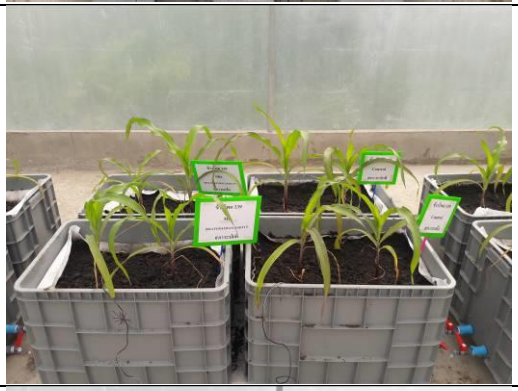
การทดสอบประสิทธิภาพของหัวเชื้อแบคทีเรียผสมจากแบคทีเรียแกรมบวก ต่อการเจริญของต้นข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ภายใต้สภาวะให้น้ำปกติ มีแนวโน้มคล้ายคลึงกับการทดลองต้นข้าวในหัวข้อ 5.2.1 คือ ข้าวโพดที่เติมและไม่เติมหัวเชื้อแบคทีเรียมีการเจริญใกล้เคียงกัน (ตารางที่ 5.16, 5.17 และ 5.18) นอกจากนี้ เมื่องดให้น้ำเป็นเวลา 27 วัน พบว่าข้าวโพดไม่สามารถฟื้นตัวได้ โดยเมื่อสิ้นสุดการทดลองพบว่าการงดให้น้ำเป็นเวลายาวนานทำให้ผลผลิตลดลงอย่างมีนัยสำคัญ (รูปที่ 5.10) และหัวเชื้อแบคทีเรียไม่สามารถส่งเสริมการเจริญและการฟื้นตัวของต้นข้าวโพดได้ ผลการนับจำนวนแบคทีเรียบริเวณรากข้าวโพดเมื่อสิ้นสุดการทดลอง มีค่าแตกต่างกันระหว่างชุดทดลองแต่ไม่เป็นไปตามที่คาดการณ์ (ตารางที่ 5.19) จึงไม่สามารถสรุปผลได้ ฝักข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ที่ได้จากการทดลองทั้งหมดมีเมล็ดไม่สมบูรณ์ ทั้งจากชุดทดลองในสภาวะให้น้ำปกติและสภาวะแล้ง (ตารางที่ 5.20)

การติดเมล็ดเกิดขึ้นน้อยมาก อาจเนื่องมาจากอุณหภูมิภายในโรงเรือนมีค่าสูง (รูปที่ 5.12) ถ้าข้าวโพดออกดอกในช่วงที่มีอุณหภูมิสูง และความชื้นในดินต่ำจะทำให้ช่อดอกไหม้ หรือเรณูจะตายหลังจากที่ร่วงจากอับเรณู และทำให้เส้นไหมเหี่ยวก่อนที่จะรับเรณู ทำให้ผสมเกสรไม่ติด นอกจากนั้น ยังทำให้การระเหยของน้ำมีมากขึ้นด้วย ทำให้ลำต้นข้าวโพดเหี่ยวแห้งและส่งผลให้เกสรร่วงก่อน (Naveed และคณะ, 2014; Suwa และคณะ, 2010) จากรูปที่ 5.12 จะเห็นว่าอุณหภูมิภายในเรือนทดลองในช่วงกลางวันมีอุณหภูมิสูงกว่า 30 องศาเซลเซียสเกือบทุกวัน ประกอบกับภายในเรือนทดลองมีอากาศถ่ายเทได้น้อย เนื่องจากมีการคลุมผ้าใบเพื่อรอติดตั้งอุปกรณ์ปรับอุณหภูมิในโรงเรือน จึงอาจเป็นสาเหตุให้การผลิตผลผลิตพืชทั้งสองชนิดเกิดขึ้นได้น้อย และอาจต้องเพิ่มขั้นตอนและระยะเวลาการเติมหัวเชื้อแบคทีเรียบริเวณรากพืชเพิ่มขึ้น เพื่อช่วยให้ต้นพืชผ่านสภาวะแล้งและอุณหภูมิสูงได้มากขึ้น

ตารางที่ 5.16 ลักษณะของต้นกล้าข้าวโพดที่เตรียมจากเมล็ดพันธุ์ที่เคลือบหัวเชื้อแบคทีเรียผสม (Mix) และที่ไม่มีแบคทีเรีย (Control)

อายุพืช	ข้าวโพดเลี้ยงสัตว์แปซิฟิค 339	
	Control	Mix (B2,L19,Ra2.Ra11,SA8,T17)
วันที่ 0		
วันที่ 5		
วันที่ 15		
วันที่ 21		

ตารางที่ 5.17 ลักษณะของต้นข้าวโพดที่เตรียมจากเมล็ดพันธุ์ที่เคลือบหัวเชื้อแบคทีเรียผสม (Mix) และที่ไม่มีแบคทีเรีย (Control) เมื่อปลูกในสภาวะให้น้ำปกติ

อายุพืช	ต้นข้าวโพดเลี้ยงสัตว์แปซิฟิค 339
วันที่ 28	
วันที่ 37	
วันที่ 43 (ใส่ปุ๋ยสูตร 46-0-0)	

*** Mix (สภาวะแล้ง) ซ้ายบน, Control (สภาวะปกติ) ขวาบน, Mix (สภาวะปกติ) ซ้ายล่าง, Control (สภาวะแล้ง) ขวาล่าง

ตารางที่ 5.18 ลักษณะของต้นข้าวโพดที่เตรียมจากเมล็ดพันธุ์ที่เคลือบหัวเชื้อแบคทีเรียผสม (Mix) และที่ไม่มีแบคทีเรีย (Control) เมื่อใกล้ระยะออกดอกจนถึงระยะเก็บเกี่ยวในสภาวะให้น้ำปกติ เปรียบเทียบกับสภาวะแล้ง

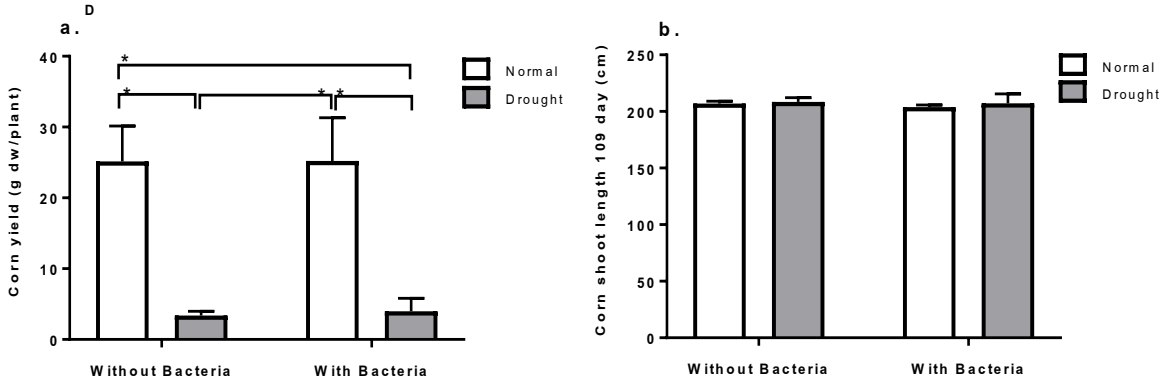
วันที่	ต้นข้าวโพดเลี้ยงสัตว์แปซิฟิค 339			
	Control สภาวะปกติ	**Control สภาวะแล้ง**	**Mix สภาวะปกติ**	**Mix สภาวะแล้ง**
วันที่ 61 (เติมสารละลายเชื้อแบคทีเรีย)				
วันที่ 67 (เริ่มสภาวะแล้ง)				
วันที่ 72 (สภาวะแล้ง วันที่ 5)				

ตารางที่ 5.18 (ต่อ)

วันที่	ต้นข้าวโพดเลี้ยงสัตว์แปซิฟิค 339			
	Control สภาวะปกติ	**Control** สภาวะแล้ง	**Mix** สภาวะปกติ	**Mix** สภาวะแล้ง
วันที่ 79 (สภาวะแล้ง วันที่ 12)				
วันที่ 84 (สภาวะแล้ง วันที่ 17)				
วันที่ 87 (สภาวะแล้ง วันที่ 20)				
วันที่ 90 (สภาวะแล้ง วันที่ 23)				

ตารางที่ 5.138 (ต่อ)

วันที่	ต้นข้าวโพดเลี้ยงสัตว์แปซิฟิค 339			
	Control สภาวะปกติ	**Control** สภาวะแล้ง	**Mix** สภาวะปกติ	**Mix** สภาวะแล้ง
วันที่ 95 (สภาวะปกติ วันที่ 2)				
วันที่ 100 (สภาวะปกติ วันที่ 6)				
วันที่ 113 (สภาวะปกติ วันที่ 19)				



รูปที่ 5.10 ผลผลิตและความสูงของต้นข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ อายุ 109 วันที่ปลูกในเรือนทดลอง

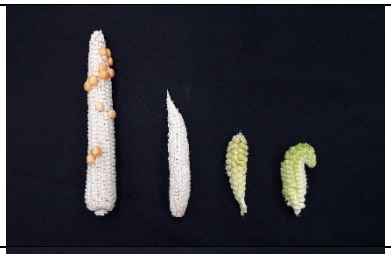
สัญลักษณ์ & หมายถึง ปฏิสัมพันธ์ระหว่างความชื้นดิน (สภาวะปกติและสภาวะแล้ง) และแบคทีเรียทนแล้ง (ไม่ใส่และใส่แบคทีเรียทนแล้ง) มีอิทธิพลต่อความแปรปรวนของค่าเฉลี่ย ($p \leq 0.05$) สัญลักษณ์ B หมายถึง แบคทีเรียทนแล้ง มีอิทธิพลต่อความแปรปรวนของค่าเฉลี่ย ($p \leq 0.05$) สัญลักษณ์ D หมายถึง ความชื้นดิน มีอิทธิพลต่อความแปรปรวนของค่าเฉลี่ย ($p \leq 0.05$)

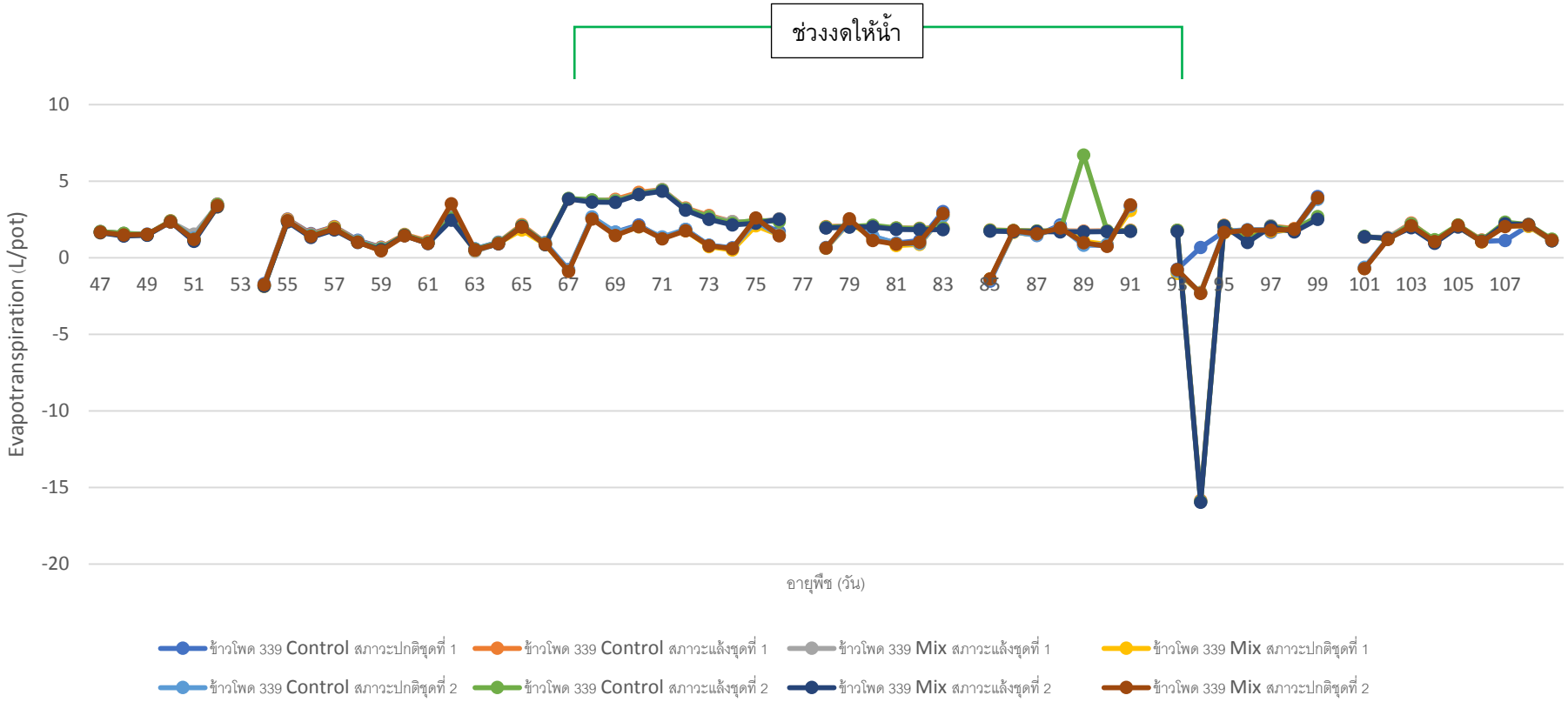
สัญลักษณ์ *, **, ***, และ **** หมายถึง การเปรียบเทียบพหุคูณมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ $p \leq 0.05$, $p \leq 0.01$, $p \leq 0.001$, และ , $p \leq 0.0001$ ตามลำดับ

ตารางที่ 5.19 จำนวนแบคทีเรียที่รากข้าวโพดและน้ำหนักแห้งของผลผลิตเมื่อสิ้นสุดการทดลอง

ชุดทดลอง	จำนวนโคโลนีบริเวณรากพืช (CFU/กรัมราก)	น้ำหนักฝักแห้ง (กรัม/ต้น)	นน.ฝักแห้งรวม (กรัม)
ให้น้ำปกติแบบไม่เติมแบคทีเรีย	$7.32x10^5 \pm 3.16x10^5$	23.00±10.14	91.99
งดให้น้ำแบบไม่เติมแบคทีเรีย	$1.80x10^6 \pm 1.99x10^5$	23.14±12.67	92.55
ให้น้ำปกติแบบเติมแบคทีเรีย	$1.23x10^7 \pm 4.56x10^6$	2.39±1.22	9.56
งดให้น้ำแบบเติมแบคทีเรีย	$7.28x10^6 \pm 2.09x10^6$	2.98±3.71	11.91

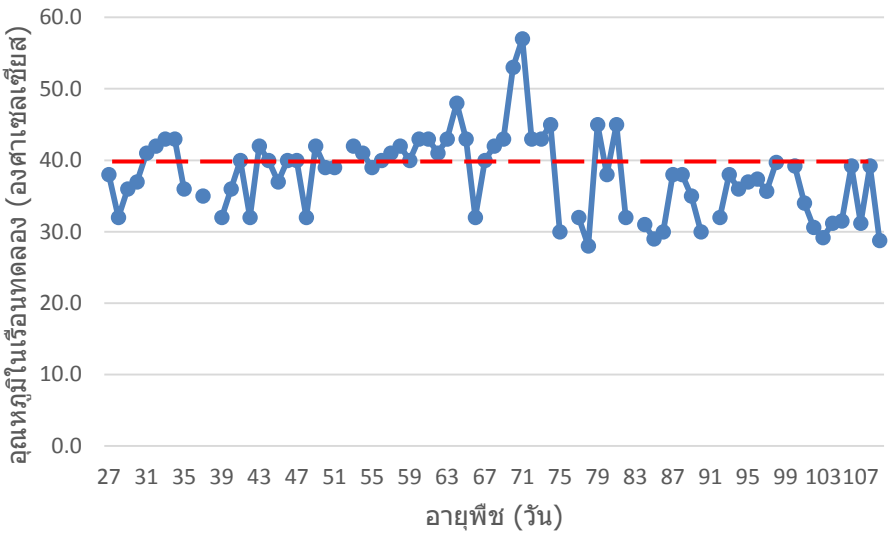
ตารางที่ 5.20 ลักษณะของฝักข้าวโพดเมื่อสิ้นสุดการทดลอง

ชุดทดลอง	**ต้นข้าวโพดเลี้ยงสัตว์แปซิฟิค 339**	
	กล่องที่ 1	กล่องที่ 2
ให้น้ำปกติแบบไม่เติมแบคทีเรีย		
งดให้น้ำแบบไม่เติมแบคทีเรีย		
ให้น้ำปกติแบบเติมแบคทีเรีย		
งดให้น้ำแบบเติมแบคทีเรีย		



รูปที่ 5.11 ค่าการคายระเหยน้ำ (Evapotranspiration ; ET) ของต้นข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ พันธุ์แปซิฟิก 339 ที่ปลูกในเรือนทดลอง

จากค่าการคายระเหยน้ำ (Evapotranspiration ; ET) ของทั้งต้นข้าวและข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ พบว่าค่าที่วัดได้บางช่วงเวลามีความแตกต่างจากกัน ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากอุณหภูมิและความชื้นในอากาศ อุณหภูมิในเรือนทดลองแสดงดังรูปที่ 6



รูปที่ 5.12 อุณหภูมิสูงสุดที่วัดได้ภายในเรือนทดลองในแต่ละวัน

บทที่ 6

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

6.1 สรุปผลการทดลอง

ในการพัฒนาหัวเชื้อแบคทีเรียผสมที่มีความสามารถทนแล้ง สำหรับใช้ส่งเสริมการเจริญเติบโตและการฟื้นตัวของข้าวเจ้าและข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ เริ่มจากการคัดกรองแบคทีเรียจากคลังของแบคทีเรียทนแล้งซึ่งคัดแยกจากดินบริเวณรากพืช แบคทีเรียทนแล้งแต่ละไอโซเลตที่เลือกมาศึกษามีลักษณะโคโลนีแตกต่างกัน เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง โดยประสิทธิภาพในการทนแล้งดูจากการเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB ที่เติม PEG 6000 ความเข้มข้น 30 - 40% (w/v) (แรงดันออสโมติก ที่ 25 องศาเซลเซียส คือ -1.027 และ -1.757 MPa ตามลำดับ) โดยดูจากสมบัติในการส่งเสริมการเจริญของพืช งานวิจัยนี้ได้คัดแยกแบคทีเรียรวมทั้งสิ้น 112 ไอโซเลต โดยเป็นแบคทีเรียจากดินรากข้าว อ้อย และข้าวโพด ในจังหวัดลพบุรี จำนวน 78 ไอโซเลต และจากดินนาข้าวจังหวัดร้อยเอ็ด จำนวน 34 ไอโซเลต การคัดแยกแบคทีเรียทนแล้งที่ทั้งใช้วิธีคัดแยกโดยตรง และวิธี Enrichment โดยนำดินเพิ่มปริมาณแบคทีเรียทนแล้งก่อน ในอาหารเหลว TSB ที่เติม 30% PEG6000 เป็นเวลา 3 สัปดาห์ ทำให้แบคทีเรียที่ทนแล้งได้นานจริงๆ ถึงจะอยู่รอดได้

หลังจากการศึกษาสมบัติเบื้องต้น ได้เลือกแบคทีเรีย 30 ไอโซเลท มาวิเคราะห์ชนิด และทดสอบสมบัติที่เกี่ยวข้องกับการส่งเสริมการเจริญของพืชเพิ่มเติม พบว่าแบคทีเรียทนแล้ง 30 ไอโซเลต จัดอยู่ในจีนัสดังต่อไปนี้ Acinetobacter (2 ไอโซเลต), Alcaligenes (1 ไอโซเลต), Bacillus (10 ไอโซเลต), Brevibacterium (2 ไอโซเลต), Citrobacter (1 ไอโซเลต), Corynebacterium (1 ไอโซเลต), Enterobacter (3 ไอโซเลต), Jeotgalicoccus (3 ไอโซเลต), Leucobacter (1 ไอโซเลต), และ Pseudomonas (6 ไอโซเลต) ทั้งนี้แบคทีเรียทั้งหมดที่นำมาศึกษาผลิตเอนไซม์คะตาเลซได้ และมีแบคทีเรียจำนวน 21 ไอโซเลต ที่ผลิตเอนไซม์ ACC deaminase ได้ แบคทีเรียทนแล้งที่คัดแยกได้มีค่า Phosphate Solubilization Index ต่ำ ส่วนการผลิต IAA พบว่าแบคทีเรียแกรมลบส่วนใหญ่ผลิต IAA ได้ดี (ประมาณ 100 µM) แต่ผลิต Exopolysaccharide ได้ต่ำ ในขณะที่แบคทีเรียแกรมบวกผลิต IAA ได้ต่ำ แต่ผลิต Exopolysaccharide ได้ ในเบื้องต้นจึงมีความเห็นว่าควรเตรียมหัวเชื้อแบคทีเรียผสมที่ประกอบด้วยแบคทีเรียแกรมลบและแบคทีเรียแกรมบวก นอกจากนี้แบคทีเรียส่วนใหญ่ไม่สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิว และแบคทีเรียหลายสายพันธุ์สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียชนิดอื่น เช่น *Brevibacterium* sp. RD1 เป็นปฏิปักษ์ต่อ K3, L20, T17, X3, X6, Y2, และ Y8 และ *Jeotgalicoccus huakuii* RA2 เป็นปฏิปักษ์ต่อ SD6, K3, L20, X3, X6, Y2, และ Y8 ข้อมูลนี้จึงจะใช้สำหรับการคัดเลือกแบคทีเรียที่ไม่เป็นปฏิปักษ์ต่อกัน แล้วนำมาผลิตเป็นหัวเชื้อผสมต่อไป

การพัฒนาหัวเชื้อแบคทีเรียผสมที่มีประสิทธิภาพในการปกป้องพืชเมื่ออยู่ในสภาวะแล้ง และสามารถอาศัยบริเวณรากพืช โดยทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียทนแล้งไอโซเลทต่างๆ ต่อการส่งเสริมการเจริญการทนแล้ง และการฟื้นตัวของต้นพืชในระยะต้นกล้า การจำลองสภาวะแล้งทำในระบบไฮโดรโปนิกส์ (Hydroponics) ที่ปลูกพืชโดยใช้อาหารที่ผสม PEG 6000 นอกจากนี้ได้ทดสอบการฟื้นตัวของต้นพืชหลังการขาดน้ำโดยย้ายต้นกล้าไปปลูกในอาหารใหม่ที่ไม่เติม PEG 6000 พบว่าในสภาวะที่มีน้ำปกติต้นข้าวมีการเจริญเติบโตดี และแบคทีเรียหลายไอโซเลท สามารถส่งเสริมการเจริญของต้นข้าว โดยต้นกล้าที่ปลูกจากเมล็ด

ที่เคลือบแบคทีเรียมีลักษณะแข็งแรงกว่าเมล็ดที่ไม่เคลือบเชื้อ ทั้งนี้แบคทีเรียแกรมลบ เช่น *Enterobacter* sp. K1, *Acinetobacter* sp. L9, *Pseudomonas* sp. T8, *Pseudomonas putida* X3 และ *Pseudomonas putida* Y9 ช่วยส่งเสริมการเจริญของต้นกล้าข้าวทั้งเมื่ออยู่ในสภาวะปกติและสภาวะแล้ง โดยดูจากค่าเฉลี่ยจำนวนใบและจำนวนรากของต้นข้าว ความยาวยอด น้ำหนักแห้งเฉลี่ยและเส้นรอบวงลำต้นของต้นข้าวที่เคลือบหัวเชื้อแบคทีเรียมีค่าที่สูงกว่าต้นกล้าข้าวที่ไม่เติมหัวเชื้อ ต้นกล้าข้าวที่มีแบคทีเรียดังกล่าว ยังสามารถฟื้นตัวภายหลังสภาวะแล้งได้ดี ทั้งนี้ประสิทธิภาพของแบคทีเรียเหล่านี้สอดคล้องกับความสามารถในการผลิตฮอร์โมน IAA และผลิตเอนไซม์ ACC deaminase ส่วนต้นกล้าจากเมล็ดข้าวที่เคลือบด้วยแบคทีเรียแกรมบวกในสภาวะแล้งพบว่ามีความยาวรากสูงกว่าชุดควบคุมที่ไม่ได้เคลือบแบคทีเรียอย่างมีนัยสำคัญ แต่มีน้ำหนักแห้งใกล้เคียงกัน โดยแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพสูงได้แก่ *Jeotgalicoccus huakuii* RA2, *B. altitudinis* T17 และ *B. stratosphericus* L19 การทดสอบประสิทธิภาพของหัวเชื้อแบคทีเรียกับต้นกล้าข้าวโพดให้ผลไปในทางเดียวกัน คือการเติมแบคทีเรียผสมส่งเสริมการเจริญของต้นข้าวโพดได้

ต่อมาได้นำหัวเชื้อแบคทีเรียผสมที่ประกอบด้วยแบคทีเรียแกรมบวก 3 ชนิด และแบคทีเรียแกรมลบ 3 ชนิด คือ *Bacillus stratosphericus* L19, *Bacillus pumilus* T1, *Bacillus altitudinis* T17, *Acinetobacter* sp. L9, *Pseudomonas* sp. T8 และ *Pseudomonas* sp. X3 ไปทดสอบประสิทธิภาพต่อพืชที่ปลูกในดินจริงระดับกระถาง โดยเคลือบหัวเชื้อผสมบนเมล็ดพันธุ์พืชก่อนปลูก และมีการเติมเชื้อในรูปสารแขวนลอยระหว่างปลูกอีก 1 ครั้ง เมื่อต้นกล้าอายุ 25 วัน นำไปทดสอบสภาวะแล้งโดยงดให้น้ำเป็นเวลา 7 วัน หลังจากนั้นให้น้ำปกติเพื่อติดตามการฟื้นตัวของพืช เมื่อมีการให้น้ำปกติหัวเชื้อแบคทีเรียช่วยส่งเสริมการเจริญของข้าวในดิน ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองในระบบไฮโดรโปนิกส์ เมื่องดการให้น้ำพบว่าต้นกล้าข้าวทั้งที่เติมและไม่เติมแบคทีเรีย ค่อย ๆ เหี่ยวลง ใบม้วน และใบมีสีซีดลง จนใบแห้งหมดในวันที่ 36 แต่ต้นข้าวที่เติมแบคทีเรียสามารถฟื้นตัวใหม่เมื่อมีการให้น้ำต่อเนื่อง ในขณะที่กระถางชุดควบคุมไม่สามารถฟื้นได้แม้แต่ต้นเดียว การศึกษาชนิดของประชากรเด่นในดินบริเวณรากพืชด้วยวิธีจำแนกลำดับเบส 16S rRNA ของเมตาจีโนมจากดินก่อนและหลังจากการปลูกข้าวแบบต่างๆ พบว่ามีสัดส่วนของแบคทีเรียใน Class Gammaproteobacteria และ Class Bacilli เพิ่มขึ้น และสอดคล้องกับประชากรในหัวเชื้อแบคทีเรียแบบผสม แสดงว่ากลุ่มแบคทีเรียที่เคลือบเมล็ดข้าวสามารถเจริญในดินรอบรากข้าวภายหลังการงอกของเมล็ดได้ และยังมีชีวิตอยู่ได้ทั้งในสภาวะมีน้ำปกติและสภาวะแล้ง สำหรับข้าวโพดเลี้ยงสัตว์พบว่าหัวเชื้อแบคทีเรียช่วยส่งเสริมการเจริญของข้าวโพดในดินเมื่อมีการให้น้ำปกติได้เล็กน้อย และการเติมเชื้อผสมช่วยส่งเสริมการฟื้นตัวของข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ได้บ้าง ซึ่งแตกต่างจากการทดลองที่ใช้ข้าวซึ่งเห็นผลแตกต่างชัดเจน อาจเนื่องมาจากข้าวโพดเลี้ยงสัตว์เป็นพืชที่ทนต่อความแล้งได้ดีอยู่แล้ว

อย่างไรก็ดีผู้วิจัยไม่สามารถนำหัวเชื้อแบคทีเรียผสมข้างต้นไปศึกษาต่อได้ เนื่องจากตามพระราชบัญญัติเชื้อโรคและพิษจากสัตว์ พ.ศ. 2558 ระบุว่าแบคทีเรียทุกสปีชีส์ของจีนัส Pseudomonas และ Acinetobacter จัดเป็นเชื้อโรค ในประกาศของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข เรื่องระดับความเสี่ยงของเชื้อโรคและพิษจากสัตว์ ฉบับลงวันที่ 8 ธันวาคม พ.ศ. 2557 ซึ่งทำให้การนำแบคทีเรียเหล่านี้ไปใช้ประโยชน์ ต้องลงทุนสร้างห้องปฏิบัติการที่มีระบบความปลอดภัยระดับ BSL2 และต้องมีผู้ปฏิบัติงานที่มีความรู้เฉพาะทาง ดังนั้นเพื่อความปลอดภัยของเกษตรกรและผู้ใช้งานในอนาคต จึงจำเป็นต้องงดใช้แบคทีเรียแกรมลบที่มีประสิทธิภาพทั้งหมด ทั้งนี้ผู้วิจัยได้คัดเลือกแบคทีเรียแกรมบวกที่มีสมบัติต่างๆ ใกล้เคียงกันมาทดแทน โดยแบคทีเรียที่ใช้สำหรับการทดสอบประสิทธิภาพต่อการเจริญและการฟื้นตัวของพืช

จนถึงระยะเก็บเกี่ยว โดยปลูกพืชในกระถางขนาดใหญ่ในระดับโรงเรือน ประกอบด้วย *Jeotgalicoccus huakuii* RA2, *Jeotgalicoccus* sp. RA11, *Bacillus tequilensis* SA8, *B. thuringiensis* B2, *B. stratosphericus* L19 และ *B. altitudinis* T17 ซึ่งไอโซเลท B2 และ L19 คัดแยกจากดินรากอ้อย ส่วนแบคทีเรียอื่นๆ คัดแยกมาจากดินรากข้าว ผลการทดลองพบว่าต้นข้าวและข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ที่ปลูกในสภาวะที่มีการให้น้ำปกติมีการเจริญเติบโตดี แต่มีการเจริญที่ลดลงมากเมื่องดให้น้ำในระยะออกดอก นอกจากนี้พืชทั้ง 2 ชนิดยังไม่สามารถฟื้นตัวได้ ซึ่งการทดลองนี้ไม่พบความแตกต่างที่มีนัยสำคัญ เมื่อเปรียบเทียบลักษณะและผลผลิตระหว่างข้าวและข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ที่เติมและไม่เติมหัวเชื้อแบคทีเรีย สาเหตุที่สำคัญน่าจะมาจากหัวเชื้อแบคทีเรียผสมที่ใช้ประกอบด้วยแบคทีเรียแกรมบวกเพียงอย่างเดียวมีประสิทธิภาพในการผลิตฮอร์โมน IAA ซึ่งเป็นฮอร์โมนพืชกลุ่มออกซิน มีบทบาทต่อการยืดยาวและการแบ่งเซลล์ รวมทั้งช่วยกระตุ้นการเจริญและพัฒนาการเกี่ยวกับกลไกการป้องกันตนเองของพืช ทำให้รากพืชมีพื้นที่ผิวรากเพิ่มขึ้น ความสามารถในการลำเลียงธาตุอาหารก็จะสูงขึ้นตามไปด้วย นอกจากนี้โรงเรือนที่ใช้ทดลองไม่สามารถควบคุมสภาพแวดล้อมได้ ทำให้อุณหภูมิในโรงเรือนสูงมากในบางช่วงของการปลูก ต้นพืชจึงได้รับความเครียดที่นอกเหนือไปจากสภาวะแล้ง แล้วทำให้ไม่เห็นประสิทธิภาพของการเติมแบคทีเรียในระดับโรงเรือน

ผลการศึกษาทั้งหมดแสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียทนแล้งที่คัดแยกจากดินบริเวณรากของข้าว ข้าวโพด และอ้อย มีสมบัติในการส่งเสริมการเจริญของพืชแตกต่างกัน จึงจำเป็นต้องคัดกรองเฉพาะแบคทีเรียทนแล้งที่มีคุณสมบัติการผลิตสารส่งเสริมการเจริญของพืชสูงมาใช้ประโยชน์ต่อไป ทั้งนี้ความสามารถในการผลิต IAA เป็นสมบัติที่สำคัญ ในการคัดเลือกแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพมาพัฒนาเป็นหัวเชื้อแบคทีเรียผสมเพื่อส่งเสริมการทนแล้งของพืช โครงการวิจัยนี้ยังแสดงให้เห็นว่าสามารถนำแบคทีเรียทนแล้งจากแหล่งที่มาต่างๆ มาผสมร่วมกันเป็นหัวเชื้อได้ และมีแนวโน้มว่าหัวเชื้อที่มีประสิทธิภาพสูงจะสามารถนำมาใช้กับพืชได้หลายชนิด ทั้งนี้เนื่องมาจากแบคทีเรียบริเวณรากพืชมีแหล่งที่มาจากดิน จึงความจำเพาะต่อชนิดของพืชน้อยกว่าแบคทีเรียเอนโดไฟต์ที่อาศัยในเนื้อเยื่อพืช อย่างไรก็ดีการเติมหัวเชื้อแบคทีเรียจะเหมาะสำหรับพืชที่ไวต่อสภาวะแล้ง เช่น ข้าว มากกว่าข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ที่ทนสภาวะแล้งได้ดีอยู่แล้ว นอกจากนี้ประสิทธิภาพของแบคทีเรียจะขึ้นกับปัจจัยทางสภาพแวดล้อมด้วย

6.2 ข้อเสนอแนะ

1) เนื่องจากแบคทีเรียทนแล้งที่มีสมบัติในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชสูง ส่วนใหญ่จัดอยู่ในจีนัส Pseudomonas และ Acinetobacter ซึ่งตามพระราชบัญญัติเชื้อโรคและพิษจากสัตว์ พ.ศ. 2558 และประกาศของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข เรื่องระดับความเสี่ยงของเชื้อโรคและพิษจากสัตว์ ฉบับลงวันที่ 8 ธันวาคม พ.ศ. 2557 กำหนดว่าเป็นเชื้อก่อโรค จึงควรคัดแยกแบคทีเรียจากแหล่งต่างๆ เพิ่มเติม เพื่อจะได้มีความหลากหลายของชนิดพันธุ์ที่มากพอสำหรับจะนำมาคัดกรองแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพสูงต่อไป

2) ในการคัดแยกแบคทีเรียทนแล้ง ควรใช้วิธี Enrichment โดยนำดินเพิ่มปริมาณแบคทีเรียทนแล้งก่อน ในอาหารเหลว TSB ที่เติม 30% PEG6000 เป็นเวลา 3 สัปดาห์ ทำให้แบคทีเรียที่ทนแล้งได้นานจริงๆ ถึงจะอยู่รอดได้ นอกจากนี้ยังพบว่าวิธีนี้จะให้แบคทีเรียที่เป็นแบคทีเรียแกรมบวกจำนวนมาก ซึ่งส่วนใหญ่ไม่จัดอยู่ในกลุ่มของเชื้อก่อโรค

3) การคัดกรองแบคทีเรียทนแล้งที่มีประสิทธิภาพ ควรพิจารณาจากสมบัติในการผลิตฮอร์โมน IAA และเอนไซม์ ACC deaminase สูงก่อน เนื่องจากเป็นสมบัติที่ส่งผลสำคัญเมื่อนำแบคทีเรียไปใช้ร่วมกับพืช หลังจากนั้นจึงพิจารณาสมบัติอื่นๆ ต่อไป เช่น การผลิต Exopolysaccharide

4) ประสิทธิภาพของแบคทีเรียทนแล้งไอโซเลทต่างๆ ต่อการส่งเสริมการเจริญ การทนแล้ง และการฟื้นตัวของต้นพืช สามารถทำการศึกษาเบื้องต้นในระบบไฮโดรโปนิกส์ (Hydroponics) ที่ปลูกพืชโดยใช้อาหารที่ผสม PEG 6000 เพื่อจำลองสภาวะแล้ง เนื่องจากเป็นวิธีที่สะดวกและรวดเร็ว

5) ควรยืนยันประสิทธิภาพของแบคทีเรียทนแล้งไอโซเลทต่างๆ ต่อการส่งเสริมการเจริญ การทนแล้ง และการฟื้นตัวของต้นพืช ในระดับโรงเรือนที่ควบคุมปัจจัยทางสภาพแวดล้อม และในระดับไร่นา ต่อไป

6) ควรนำหัวเชื้อแบคทีเรียทนแล้งที่มีประสิทธิภาพ ไปพัฒนาเป็นสูตรสำหรับเคลือบเมล็ดพันธุ์ และสูตรน้ำสำหรับเติมลงในวัสดุปลูกและดิน พร้อมทั้งทดสอบกับพืชที่ไวต่อสภาวะแล้งหลายๆ ชนิด เพื่อให้สามารถนำหัวเชื้อแบคทีเรียไปใช้ประโยชน์ ในพื้นที่เกษตรต่างๆ ได้

7) ควรศึกษากลไกที่เกี่ยวข้องกับการทำงานร่วมกันระหว่างแบคทีเรียและพืช ในสภาวะแล้งและสภาวะให้น้ำปกติ เช่น การเปลี่ยนแปลงฮอร์โมนและเมตาบอไลต์ต่างๆ ของพืช การเจริญเติบโตและการผลิตเมตาบอไลต์ต่างๆ ของหัวเชื้อแบคทีเรีย และการเปลี่ยนแปลงของประชากรจุลินทรีย์ในดินบริเวณรากพืช เพื่อให้มีข้อมูลสำหรับการพัฒนาหัวเชื้อแบคทีเรียและการใช้ประโยชน์แบคทีเรียต่อการทำเกษตรในสภาวะแห้งแล้

8) ทั้งนี้ผู้วิจัยได้เสนอแนวทางการทำโครงการวิจัยต่อไปใน ภาคผนวก จ. แผนงานวิจัย (ร่าง) เรื่อง การเพิ่มประสิทธิภาพของหัวเชื้อแบคทีเรียผสมเพื่อส่งเสริมการเจริญและการฟื้นตัวของพืชเศรษฐกิจในสภาวะแห้งแล้ง และการศึกษากลไกที่เกี่ยวข้อง

เอกสารอ้างอิง

กรมอุตุนิยมวิทยา. 2542. ข้อมูลกรมอุตุนิยมวิทยา (พ.ศ.2542-2551).

กรมอุตุนิยมวิทยา. 2559. ข้อมูลกรมอุตุนิยมวิทยา (พ.ศ. 2550-2559).

กลุ่มป้องกันภัยธรรมชาติและความเสี่ยงทางการเกษตร กองนโยบายและแผนการใช้ที่ดิน กรมพัฒนาที่ดิน กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. การคาดการณ์ความแห้งแล้งในพื้นที่ทำการเกษตร ปี 2558. เข้าถึงจาก http://irw101.ldd.go.th/lib/ เข้าถึงเมื่อ 12 เมษายน 2558.

ฐานข้อมูลพันธุ์ข้าวรับรองของไทย. 2560 เข้าถึงจาก http://www.brrd.in.th/rvdb/index.php?option=com_content&view=article&id=117:rd47&catid=34:non-photosensitive-lowland-rice&Itemid=55. เข้าถึงเมื่อ 28 กุมภาพันธ์ 2560.

ฐานข้อมูลเพื่อการรายงานสถานการณ์คุณภาพของสิ่งแวดล้อมของประเทศไทย เข้าถึงจาก http://www.onep.go.th/env_data/2016/01_71/ เข้าถึงเมื่อ 27 มิถุนายน 2560

ธวัชชัย ณ นคร. 2526. ความสัมพันธ์ระหว่างดิน น้ำ และพืช. วารสารวิชาการเกษตร 1: 186-194.

นวรัตน์ อุดมประเสริฐ 2558. สรีรวิทยาของพืชภายใต้สภาวะเครียด. พิมพ์ครั้งที่ 1 สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย น. 4-17.

สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. 2558. สถานการณ์สินค้าเกษตรที่สำคัญและแนวโน้มปี 2558. กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ กรุงเทพฯ. เข้าถึงจาก www.oae.go.th/download/document_tendency/journalofecon2558.pdf เข้าถึงเมื่อ 25 มิถุนายน 2560.

สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. 2558. สถิติการเกษตรของประเทศไทยปี 2558. กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ กรุงเทพฯ. เข้าถึงจาก http://www.oae.go.th/download/download_journal/2559/yearbook58.pdf เข้าถึง เมื่อ 27 มิถุนายน 2560.

สำนักป้องกันภัยธรรมชาติและความเสี่ยงทางการเกษตร กรมพัฒนาที่ดิน กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ เข้าถึงจาก http://irw101.ldd.go.th/lib/ เข้าถึงเมื่อ 13 ตุลาคม 2557.

สายัณห์ สดุดี. 2556. ความสัมพันธ์ระหว่างน้ำกับพืช. เอกสารประกอบคำสอนวิชาสรีรวิทยาการผลิตพืช ภาควิชาพืชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ เข้าถึงจาก http://www.natres.psu.ac.th/Department/PlantScience/physio/index.htm เข้าถึงเมื่อ 17 เมษายน 2557.

มนตรี เพ็ชรทองคำ. 2546. สรีรวิทยาของพืช. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยรามคำแหง พิมพ์ครั้งที่ 5: กรุงเทพฯ น. 135-148.

มูลนิธิข้าวไทย ในพระบรมราชูปถัมภ์. 2560. เข้าถึงจาก http://www.thairice.org/ht/aboutrice/about_rice3.htm เข้าถึงเมื่อ 5 กุมภาพันธ์ 2560.

อนิสรา สุไลมาน, จารุวัฒน์เถาธรรมพิทักษ์, สุพจน์กาเซ็ม และ สุดฤดีประเทืองวงศ์. 2557. การเจริญเติบโตของข้าวภายใต้สภาวะแล้งที่มีการใช้แบคทีเรียปฏิปักษ์ทนร้อน. Proceedings of 52nd Kasetsart University Annual Conference: Plants: 4-7 ก.พ. 2557. P216-223.

ไทยรัฐฉบับพิมพ์. 2559. เข้าถึงจาก https://www.thairath.co.th/content/617634 เข้าถึงเมื่อ 27 มิถุนายน 2559

Ahmad, F., Ahmad, I. and Khan, M.S. 2008. Screening of free-living rhizospheric bacteria for their multiple plant growth promoting activities. Microbiological Research. 163; 173-181.

Ali, S.Z., Sandhya, V. and Rao, L.V. 2014. Isolation and characterization of drought-tolerant ACC deaminase and exopolysaccharide-producing fluorescent *Pseudomonas* sp. Annals of Microbiology. 64; 493-502.

Armada, E., Roldán, A. and Azcon, R. 2013. Differential activity of autochthonous bacteria in controlling drought stress in native Lavandula and Salvia plants species under drought conditions in natural arid soil. Microbial Ecology. 67; 410–420.

Arshad, M., Saleem, M. and Hussain, S. 2007. Perspective of bacterial ACC deaminase in phytoremediation. Trends in Biotechnology. 25(8); 356-362

Bal, H.B., Nayak, L., Das, S. and Adhya, T.K. 2013. Isolation of ACC deaminase producing PGPR from rice rhizosphere and evaluating their plant growth promoting activity under salt stress. Plant Soil. 366; 93–105.

Bashan, Y., de-Bashan, L.E., Prabhu, S.R. and Hernandez, J.P. 2014. Advances in plant growth-promoting bacterial inoculant technology: formulations and practical perspectives (1998–2013). Plant Soil. 378; 1–33.

Benabdellah, K., Abbas, Y., Abourouh, M., Aroca, R. and Azcón R. 2011. Influence of two bacterial isolates from degraded and non-degraded soils and arbuscular mycorrhizae fungi isolated from semi-arid zone on the growth of *Trifolium repens* under drought conditions: Mechanisms related to bacterial effectiveness. European Journal of Soil Biology. 47; 303-309.

Bottini, R., Cassán, F. and Piccoli, P. 2004. Gibberellin production by bacteria and its involvement in plant growth promotion and yield increase. Applied Microbiology Biotechnology. 65(5); 497 – 503.

Carlos, M.H., Stefani, P.V., Janette, A.M., Melani, M.S. and Gabriela, P.O. 2016. Assessing the effects of heavy metals in ACC deaminase and IAA production on plant growth-promoting bacteria. Microbiological Research. 188-189; 53–61.

Chakraborty, U., Chakraborty, B.N., Chakraborty, A.P. and Day, P.L. 2012. Water stress amelioration and plant growth promotion in wheat plants by osmotic stress tolerant bacteria. World Journal of Microbiology and Biotechnology. 29; 789-803.

Chantamalee, C. and Luepromchai, E. 2012. Isolation and application of *Gordonia* sp. JC11 for removal of boat lubricants. Journal of General and Applied Microbiology. 58; 19-31.

Cha-um, S., Roytakul, S., Sathung, T., Maijandang, A. and Kirdmanee, C. 2007. Effect of exogenous glucose and abscisic acid on physiological and morphological performances of in vitro Indica Rice (*Oryza sativa* L.sp. indica). American Journal of Plant Physiology. 2(2); 155-166.

Coleman-Derr, D., and Tringe, S. G. 2014. Building the crops of tomorrow: advantages of symbiont-based approaches to improving abiotic stress tolerance. [Perspective]. Frontiers in Microbiology. 5: 283.

Dodd, I.C. and Pérez-Alfocea, F. 2012. Microbial amelioration of crop salinity stress. Journal of Experimental Botany. 63(9); 3415-3428.

Echigo, A., Hino, M., Fukushima, T., Mizuki, T., Kamekura, M. and Usami, R. 2005. Endospores of halophilic bacteria of the family *Bacillaceae* isolated from non-saline Japanese soil may be transported by Kosa event (Asian dust storm). Saline Systems 1(1); 8.

Etesami, H. and Alikhani, H.A. 2016. Co-inoculation with endophytic and rhizosphere bacteria allows reduced application rates of N-fertilizer for rice plant. Rhizosphere. 2; 5–12.

Farooq, M., Basra, SMA., Wahid, A., Ahmad, N. and Saleem, BA. 2009. Improving the drought tolerance in rice (*Oryza sativa* L.) by exogenous application of salicylic acid. Journal of Agronomy and Crop Science. 195; 237-246.

Forchetti, G., Masciarelli, O., Alemano, S., Alvarez D. and Abdala, G. 2007. Endophytic bacteria in sunflower (*Helianthus annuus* L.): isolation, characterization, and production of jasmonates and abscisic acid in culture medium. Applied Microbiology and Biotechnology. 76; 1145–1152.

Glick, B.R. 1995. The enhancement of plant growth by free living bacteria. Canandian Journal of Microbiology. 41; 109–114.

Glick, B.R., Patten, C.L., Holguin, G. and Penrose, D.M. 1999. Biochemical and genetic mechanisms used by plant growth-promoting bacteria. Imperial College Press, London

Glick, B.R., Cheng, Z., Czarny, J., Cheng, Z. and Duan, J. 2007. Promotion of plant growth by ACC deaminase-producing soil bacteri. European Journal of Plant Pathology. 119; 329-339.

Glick, B.R. 2014. Bacteria with ACC deaminase can promote plant growth and help to feed the world. Microbiological Research. 169(1); 30-39.

Govindasamy, V., Senthilkumar, M., Kumar, U. and Annapurna, K. 2008. PGPR biotechnology for Management of Abiotic and Biotic Stresses in Crop Plants, In Maheswari, D.K. and Dubey, R.C. (Eds.), Potential Microorganisms for Sustainable Agriculture, I.K. International Publishing House Pvt. Ltd., New Delhi.

Gül, A., Özaktan, H., Kıdoğlu, F., & Tüzel, Y. (2013). Rhizobacteria promoted yield of cucumber plants grown in perlite under Fusarium wilt stress. Scientia Horticulturae, 153, 22-25.

Guo, X.-Q., Li, R., Zheng, L.-Q., Lin, D.-Q., Sun, J.-Q., Li, S.-P., Li, W.-J. and Jiang, J.-D. 2010. *Jeotgalicoccus huakuii* sp. nov., a halotolerant bacterium isolated from seaside soil. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 60(6); 1307-1310.

Jaleel, C.A., Manivannan, P., Sankar, B., Kishorekumar, A., Gopi, R., Somasundaram, R. and Panneerselvam, R. 2007. *Pseudomonas fluorescens* enhances biomass yield and ajmalicine production in *Catharanthus roseus* under water deficit stress, Colloids and Surfaces B: Biointerfaces. 60; 7-11.

Kaushal, M. and Wani, S.P. 2016. Plant-growth-promoting rhizobacteria: drought stress alleviators to ameliorate crop production in drylands. Annals of Microbiology. 66; 35-42.

Kavamura, V.N., Santos, S.N., Silva, J.L., Parma, M.M., Ávila, L.A., Visconti, A., Zucchi, T. D., Taketani R.G., Andreote, F.D. and Melo, I.S. (2013) Screening of *Brazilian cacti* rhizobacteria for plant growth promotion under drought. Microbiological Research. 168; 183–191.

Khan, N., Bano, N. and Babar, MD A. 2016. The root growth of wheat plants, the water conservation and fertility status of sandy soils influenced by plant growth promoting rhizobacteria. Symbiosis. 72(3); 195-205.

Kim, D., Rakwal, R., Agrawal, G.K., Jung, Y., Shibato, J., Jwa N., Iwahashi, Y., Iwahashi, H., Kim D., Shim, I. and Usui, K., 2005. A hydroponic rice seedling culture model system for investigating proteome of salt stress in rice leaf. Electrophoresis. 26; 4521–4539.

Kloepper, J.W., Lifshitz, R. and Zablotowicz, R.M. 1989. Free-living bacterial inocula for enhancing crop productivity. Trends Biotechnology. 7; 39–43.

Kumar, R. R., Karajol, K. and Naik, G. R. 2011. Effect of polyethylene glycol induced water stress on physiological and biochemical responses in Pigeonpea (*Cajanus cajan* L. Millsp.). Recent Research in Science and Technology. 3; 148-152.

Kumari, S., Vaishnav, A., Jain, S., VarmaDevendra, A. and Choudhary, K. 2015. Induced drought tolerance through wild and mutant bacterial strain Pseudomonas simiae in mung bean (*Vigna radiata* L.). World Journal of Microbiology and Biotechnology. 32(1); 4.

Leung, J. and Giraudat, J. 1998. Absicic acid signal transduction. Annual. Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology. 49; 199-222.

Lloret, J., Bolanos, L., Lucas, M.M., Peart, J.M., Brewin, N.J., Bonilla, I. and Rivilla, R. 1995. Ionic stress and osmotic pressure induce different alterations in the lipopolysaccharide of a Rhizobium meliloti strain. Applied and Environmental Microbiology. 61; 3701–3704.

Ma, Y., Prasad, M.N.V., Rajkumar, M. and Freitas, H. 2011. Plant growth promoting rhizobacteria and endophytes accelerate phytoremediation of metalliferous soils. Biotechnology Advances. 29; 248-258.

Mahajan, S. and Tuteja, N. 2005. Cold, salinity and drought stresses: An overview. Archives of Biochemistry and Biophysics. 444(2); 139-158.

Marcelino, P.R.F., Milani, K.M.L. and Mali, S. 2016. Formulations of polymeric biodegradable low-cost foam by melt extrusion to deliver plant growth-promoting bacteria in agricultural systems. Applied Microbiology and Biotechnology. 100(16); 7323-7338.

Nautiyal, C.S., Srivastava, S., Chauhan, P.S., Seem, K., Mishra, A. and Sopory, S.K. 2013. Plant growth-promoting bacteria *Bacillus amyloliquefaciens* NBRISN13 modulates gene expression profile of leaf and rhizosphere community in rice during salt stress. Plant Physiology Biochemistry. 66; 1–9

Naveed, S., Aslam, M., Maqbool, M.A., Bano, S., Zaman, Q.U. and Ahmad, R.M. 2014. Physiology of high temperature stress tolerance at reproductive stages in maize. The Journal of Animal & Plant Sciences. 24; 1141-1145.

O'Callaghan, M., Wright, D., Swaminathan, J., Young, S. and Wessman, P. 2012. Microbial inoculation of seed - issues and opportunities. Agronomy New Zealand. 42; 149-154.

Okon, Y. and Labandera-Gonzalez, C.A. 1994. Agronomic applications of *Azospirillum*. In: Ryder, M.H., Stephens, P.M., Bowen, G.D. (Eds.), Improving plant productivity with rhizosphere bacteria, Common wealth Scientific and Industrial Research Organization, Adelaide, Australia, 274-278.

Ortiz, N., Armada, E., Duque, E., Roldán, R. and Azcón, R. 2015. Contribution of arbuscular mycorrhizal fungi and/or bacteria to enhancing plant drought tolerance under natural soil conditions: effectiveness of autochthonous or allochthonous strains. Journal of Plant Physiology. 174; 87-96.

Pacheco, G.J., Reis, R.S., Fernandes, A.C.L.B., da Rocha, S.L.G., Pereira, M.D., Perales, J. and Freire, D.M.G. 2012. Rhamnolipid production: effect of oxidative stress on virulence factors and proteome of Pseudomonas aeruginosa PA1. Applied Microbiology and Biotechnology. 95(6); 1519-1529.

Paul, D. and Sinha, S.N. 2013. Phosphate solubilizing activity of some bacterial strains isolated from jute mill effluent exposed water of River Ganga. Indian Journal of Fundamental and Applied Life Sciences. 3; 39-45.

Paul, D. and Sinha, S.N. 2017. Isolation and characterization of phosphate solubilizing bacterium *Pseudomonas aeruginosa* KUPSB12 with antibacterial potential from river Ganga, India. Annals of Agrarian Science. 15; 130-136.

Penrose, D.M. and Glick, B.R. 2003. Methods for isolating and characterizing ACC deaminase-containing plant growth promoting rhizobacteria. Physiologia Plantarum. 118; 10-15.

Qurashi, A.W. and Sabri, A.N. 2012. Bacterial exopolysaccharide and biofilm formation stimulate chickpea growth and soil aggregation under salt stress. Brazilian Journal of Microbiology. 43: 1183-1191.

Rajkumar, M., Ae, N. and Freitas, H. 2009. Endophytic bacteria and their potential to enhance heavy metal phytoextraction. Chemosphere. 77; 153-160.

Rodríguez, H. and Fraga, R. 1999. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. Biotechnology Advances. 17; 319-339.

Rolli, E., R. Marasco, G. Vigani, B. Ettoumi, F. Mapelli, M.L. Deangelis, C. Gandolfi, E. Casati, F. Previtali, R. Gerbino, F. Pierotti Cei, S. Borin, C. Sorlini, G. Zocchi, D. Daffonchio. 2015. Improved plant resistance to drought is promoted by the root-associated microbiome as a water stress- dependent trait. Environmental Microbiology. 17; 316-331.

Roohi, A., Ahmed, I., Khalid, N., Iqbal, M. and Jamil, M. 2014. Isolation and phylogenetic identification of halotolerant/halophilic bacteria from the salt mines of Karak, Pakistan. International Journal of Agriculture and Biology. 16; 564-570

Saharan, B.S. and Verma, S. 2014. Potential plant growth promoting activity of *Bacillus licheniformis* UHI(II)7. International Journal of Microbial Resource Technology. 2; 22-27.

Saleem, M., Arshad, M., Hussain, S. and Bhatti, A.S. 2007. Perspective of plant growth Promoting rhizobacteria (PGPR) containing ACC deaminase in stress agriculture. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology. 34; 635-648.

Sandhya, V. Ali, S.Z., Grover, M., Reddy, G. and Venkateswarlu, B. 2009. Alleviation of drought stress effects in sunflower seedlings by the exopolysaccharides producing *Pseudomonas putida* strain GAP-P45. Biology and Fertility of Soils. 46; 17–26.

Shahzad, R., Khan, A.L., Bilal, S., Waqas, M., Kang, S.M. and Lee, I.J. 2017. Inoculation of abscisic acid producing endophytic bacteria enhances salinity stress tolerance in *Oryza sativa*. Environmental and Experimental Botany. 136; 68-77.

Shilev, S., Sancho, E.D. and Benlloch-González, M. 2012. Rhizospheric bacteria alleviate salt-produced stress in sunflower. Journal of Environmental Management. 95; S37-S41.

Souza, R. d., Ambrosini, A. and Passaglia, L. M. P. 2015. Plant growth-promoting bacteria as inoculants in agricultural soils. Genetics and Molecular Biology. 38; 401-419.

Szymanska, S., Płociniczak, T., Piotrowska-Seget, Z., Złoch, M., Ruppel, S. and Hrynkiewicz, K. 2016. Metabolic potential and community structure of endophytic andrhizosphere bacteria associated with the roots of the halophyte *Aster tripolium* L. Microbiological Research. 182; 68–79

Timmusk, S., Nicander, B., Granhall, U. and Tillberg, E. 1999. Cytokinin production by *Paenibacillus polymyxa*. Soil Biology and Biochemistry. 31; 1847-1852.

Timmusk, S., Paalme, V., Pavlicek, T., Bergquist, J., Vangala, A. and Danilas, T., 2011. Bacterial distribution in the rhizosphere of wild barley under contrasting microclimates. PLoS One. 6(3); e17968.

Timmusk, S. and Behers, L. 2012. Rhizobacterial application for sustainable water management on the areas of limited water resources. Irrigation and drainage systems engineering. 1; 4, 1-2

Timmusk, S., El-Daim, I. A., Copolovici, L., Tanilas, T., Känaste, A., Behers, L., Nevo, E., Seisenbaeva, G., Stenström, E., and Niinemets Ü. 2014. Drought-tolerance of wheat improved by rhizosphere bacteria from harsh environments: enhanced biomass production and reduced emissions of stress volatiles. PLoS One. 9; e96086.

Tsavkelova, E.A., Klimova, S.Y., Cherdyntseva, T.A., and Netrusov, A.I. 2006. Microbial producers of plant growth stimulators and their practical use: a review. Applied Biochemistry and Microbiology. 42(2); 117-126.

Uma, C., Sivagurunathan, P., and Sangeetha, D. 2013. Performance of Bradyrhizobial isolates under drought conditions. International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences. 2: 228-232.

Vanavil, B., Perumalsamy, M. and Rao, A.S. 2013. Biosurfactant production from novel air isolate NITT6L: screening, characterization and optimization of media. Journal of Microbiology Biotechnology. 23(9); 1229-1243.

Vardharajula, S., Ali, Z.S., Grover, M., Reddy, G. and Bandi, V. 2011. Drought-tolerant plant growth promoting *Bacillus* spp.: effect on growth, osmolytes, and antioxidant status of maize under drought stress. Journal of Plant Interactions. 6; 1-14.

Vurukonda, S.S., Vardharajula, S., Shrivastava, M. and SkZ, A. 2016. Enhancement of drought stress tolerance in crops by plant growth promoting rhizobacteria. Microbiological Research. 184; 13–24.

Wenzel, W.W. 2009. Rhizosphere processes and management in plant-assisted bioremediation (phytoremediation) of soils. Plant and Soil. 321; 385-408.

Weyen, N., van der Lelie, D., Taghavi, S. and Vangronsveld, J. 2009. Phytoremediation: plant-endophyte partnerships take the challenge. Current Opinion in Biotechnology. 20; 248-254.

Zingaretti, S.M., Inacio, M.C., Pereira, L.v.d. M., Paz, T.A., and França, S.d.C. 2013. Water stress and agriculture. In S. Akinci (Ed.), Responses of Organisms to Water Stress: InTech.

Yang, J., Kloepper, J. W. and Ryu, C.-M. 2009. Rhizosphere bacteria help plants tolerate abiotic stress. Trends in Plant Science. 14; 1-4.

Yoon, J.-H., Lee, K.-C., Weiss, N., Kang, K.-H. and Park, Y.-H. 2003. *Jeotgalicoccus halotolerans* gen. nov., sp. nov. and *Jeotgalicoccus psychrophilus* sp. nov., isolated from the traditional Korean

fermented seafood jeotgal. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 53(2); 595-602.

ภาคผนวก

ก. ประสิทธิภาพเบื้องต้นของหัวเชื้อแบคทีเรียแบบผสมต่อต้นข้าว

ข. ตัวอย่างการทดลองในระดับห้องปฏิบัติการ และระดับโรงเรือน

ค. กิจกรรมที่เกี่ยวข้องกับการนำผลจากโครงการไปใช้ประโยชน์

ง. ตารางเปรียบเทียบวัตถุประสงค์ กิจกรรมที่วางแผนไว้ และกิจกรรมที่ดำเนินการมาและผลที่ได้รับตลอดโครงการ

จ. แผนงานวิจัย (ร่าง) เรื่องการเพิ่มประสิทธิภาพของหัวเชื้อแบคทีเรียผสมเพื่อส่งเสริมการเจริญและการฟื้นตัวของพืชเศรษฐกิจในสภาวะแห้งแล้ง และการศึกษากลไกที่เกี่ยวข้อง

ภาคผนวก ก.

ประสิทธิภาพเบื้องต้นของหัวเชื้อแบคทีเรียแบบผสมต่อต้นข้าว

ก.1 การทดสอบประสิทธิภาพของหัวเชื้อแบคทีเรียแกรมลบแบบผสม ต่อต้นข้าวหอมมะลิ 105

ในการทดลองนี้ได้ปลูกพืชในระบบ hydroponics โดยเตรียมหัวเชื้อแบคทีเรียแบบผสมที่ประกอบด้วย L9, T8, X6, Y7 และ Y9 โดยนำสารแขวนลอยเซลล์แต่ละชนิดที่มีเชื้อตั้งต้น 10^8 CFU/มล. มาผสมกัน ก่อนที่จะเติม 1.5% carboxy methyl cellulose (CMC) แล้วจึงใช้เคลือบเมล็ดพันธุ์ข้าว ทำการเพาะเมล็ดและเตรียมต้นกล้าเช่นเดียวกับในข้อ 2.2.1 ข. เมื่อต้นกล้าข้าวมีอายุครบ 14 วัน นำมาทดสอบการทนแล้ง 2 แบบ คือ 1) สภาวะแล้งแบบค่อยๆ เพิ่มขึ้น โดยใส่ต้นกล้าในอาหาร Yoshida + PEG6000 10% 3 วัน ต่อมาย้ายต้นกล้าไปใส่ในอาหารใหม่ที่เพิ่มความเข้มข้น PEG6000 เป็น 20% 3 วัน และย้ายมาลงในอาหารใหม่ที่เพิ่มความเข้มข้น PEG6000 เป็น 30% อีก 3 วัน และ 2) สภาวะแล้งแบบค่อยๆ รุนแรง โดยใส่ต้นกล้าในอาหาร Yoshida + PEG6000 30% 7 วัน ในการทดลองนี้ยังได้ทดสอบการฟื้นตัวของต้นกล้าข้าวที่ผ่านสภาวะแล้งทั้ง 2 แบบเพิ่มเติม โดยย้ายต้นกล้าข้าวที่ทดสอบแล้วไปใส่ในอาหารใหม่ที่ไม่เติม PEG6000 แล้วบ่มต่อจนครบ 25 วัน ทั้งนี้ปรับ pH ของอาหารประมาณ 5.5 ทุก 3 วัน นอกจากนี้เพื่อให้ต้นกล้าข้าวมีจำนวนแบคทีเรียเพิ่ม ได้นำต้นกล้าข้าวชุด Mix 3 ไปแช่ในสารแขวนลอยเซลล์ที่มีแบคทีเรียผสม ก่อนไปทดสอบการทนแล้ง ทั้งนี้ทำการทดลองชุดละ 3 ซ้ำ คือ แต่ละชุดทดลองมีต้นข้าว 3 ขวด รวม 9 ต้น นับจำนวนแบคทีเรียบนรากข้าวเมื่อสิ้นสุดการทดลองโดยวิธี spread plate บนอาหาร TSA

ชุดควบคุมของการทดลองนี้เป็นต้นข้าวที่ปลูกจากเมล็ดพันธุ์ไม่เคลือบเชื้อ แล้วนำไปทดสอบการทนแล้ง 2 แบบเช่นกัน ในระหว่างนี้ได้ปลูกข้าวที่ไม่เติมแบคทีเรียในสภาวะปกติ (อาหาร Yoshida ที่ไม่เติม PEG6000) ที่มีการเปลี่ยนอาหารใหม่ตามวันที่ใช้ทดสอบการทนแล้งด้วย ทั้งนี้เพื่อยืนยันว่าสภาวะแล้งที่จำลองขึ้นในห้องปฏิบัติการส่งผลต่อการเจริญของต้นข้าวจริง โดยรูปที่ 7 แสดงให้เห็นว่าต้นข้าวที่ไม่เติมแบคทีเรียแล้วปลูกในสภาวะปกติมีการเจริญดีในระบบ hydroponics ตลอดระยะเวลาทดลองทั้งหมด 40 วัน รหัสของชุดทดลองทั้งหมด มีดังนี้

Normal = ต้นข้าวที่ปลูกจากเมล็ดพันธุ์ไม่เคลือบเชื้อ ในสภาวะปกติ อาหาร Yoshida ที่ไม่เติม PEG

Control 1 = ต้นข้าวที่ปลูกจากเมล็ดพันธุ์ไม่เคลือบเชื้อ อาหาร Yoshida + PEG 10% >> 20% >> 30%

Control 2 = ต้นข้าวที่ปลูกจากเมล็ดพันธุ์ไม่เคลือบเชื้อ อาหาร Yoshida + PEG 30%

Mix1 = ต้นข้าวที่ปลูกจากเมล็ดพันธุ์เคลือบเชื้อ Mix culture + อาหาร Yoshida + PEG 10% >> 20% >> 30%

Mix2 = ต้นข้าวที่ปลูกจากเมล็ดพันธุ์เคลือบเชื้อ Mix culture + อาหาร Yoshida + PEG 30%

Mix3 = ต้นข้าวที่ปลูกจากเมล็ดพันธุ์เคลือบเชื้อ และแช่รากในหัวเชื้อผสมเพิ่ม วันที่ 14 >> อาหาร Yoshida + PEG 10% >> 20% >> 30%

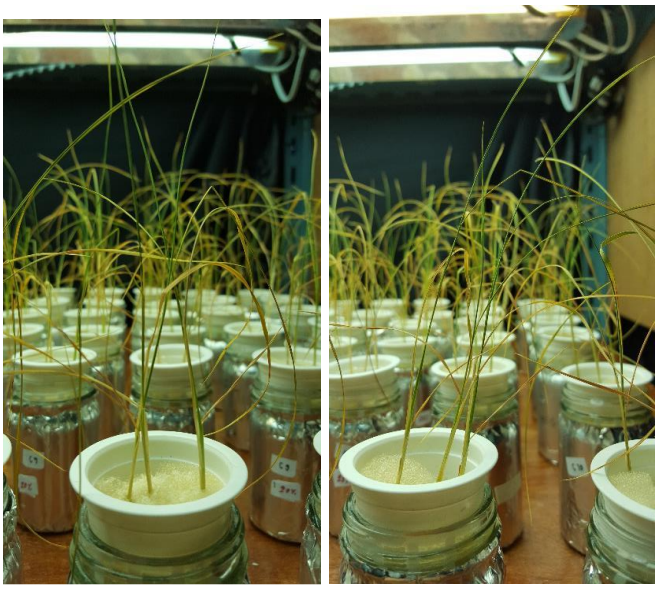
ผลการศึกษาจะเห็นว่าแบคทีเรียแต่ละไอโซเลทช่วยส่งเสริมการเจริญของต้นกล้าข้าวในลักษณะที่แตกต่างกัน ทั้งในช่วงการเจริญปกติและช่วงทำการเจริญในสภาวะแห้งแล้ง โดยบางไอโซเลทส่งผลให้ข้าวมี

ขนาดลำต้น จำนวนใบ และจำนวนราก สูงกว่าต้นกล้าที่ไม่เคลือบเมล็ดอย่างชัดเจน แต่ไม่มีไอโซเลทไหนที่ให้ผลดีในทุกด้าน ดังนั้นผู้วิจัยจึงเลือกไอโซเลท L9, T8, X6, Y7 และ Y9 มาทดสอบต่อ โดยผลของการวิเคราะห์ลำดับเบสของ 16s rDNA เบื้องต้นพบว่าแบคทีเรียเหล่านี้อยู่ในจีนัส *Acinetobacter*, *Alcaligenes*, *Enterobacter* และ *Pseudomonas* ซึ่งสอดคล้องกับการติดสี Gram แบคทีเรียในจีนัสเหล่านี้ยังมีรายงานว่าสามารถนำมาผลิตหัวเชื้อเพื่อส่งเสริมการเจริญของพืชได้ (Bashan และคณะ, 2014)

เนื่องจากการทดลองนี้ทดสอบทั้งสภาวะแห้งแล้งและการฟื้นตัวของต้นกล้าข้าว ซึ่งใช้เวลานานถึง 40 วัน ผู้วิจัยจึงทดลองปลูกข้าวที่ไม่เติมแบคทีเรียในสภาวะปกติควบคู่กันไปด้วย พบว่าต้นข้าวมีการเจริญดีในระบบ hydroponics ตลอดระยะเวลาทดลองทั้งหมด แสดงว่าสภาพแวดล้อมในห้องปฏิบัติการทั่วไปไม่มีผลต่อการเจริญของข้าวที่ระยะเวลาทดสอบ ในขณะที่ต้นกล้าข้าวที่ย้ายไปลงในอาหารที่เติม PEG 6000 พบว่าใบข้าวจะเหี่ยว แห้ง ม้วน และเปลี่ยนเป็นสีเหลือง ชัดเจน ซึ่งสื่อถึงความเครียดจากสภาวะแล้ง

ลักษณะการเจริญของต้นกล้าข้าวที่ไม่เติมแบคทีเรียในสภาวะปกติ

ชุดทดลอง	ต้นข้าววันที่ 15	ต้นข้าววันที่ 23	ต้นข้าววันที่ 40
Normal			



ลักษณะของใบข้าวเมื่อย้ายต้นกล้าจากอาหาร Yoshida + 10% PEG6000 ไปปลูกในอาหาร Yoshida + 20% PEG6000 ใบข้าวจะเหี่ยว แห้ง ม้วน และเปลี่ยนเป็นสีเหลือง

เมื่อนำต้นกล้าข้าวอายุ 14 วัน มาทดสอบในสภาวะแล้งแบบค่อยๆ เพิ่มขึ้น โดยเปลี่ยนอาหารทุกๆ 3 วัน รวม 3 ครั้ง เริ่มจากอาหารที่ผสม PEG 6000 10% (-0.148 MPa) แล้วย้ายต้นกล้าไปอาหารใหม่ที่มี PEG 6000 20% (-0.491 MPa) ตามด้วย PEG 6000 30% (-1.027 MPa) ผลการทดลองพบว่าต้นกล้าข้าวที่ปลูกจากเมล็ดพันธุ์ไม่เคลือบเชื้อ เมื่อนำมาทดสอบในสภาวะแล้งแบบค่อยๆ เพิ่มขึ้น (Control 1) จะมีใบเหี่ยวเมื่อสิ้นสุดการทดสอบ (วันที่ 23) แต่สามารถฟื้นตัวได้เมื่อย้ายมาปลูกในอาหารปกติ (วันที่ 40) อย่างไรก็ดีเมื่อทดสอบในสภาวะแล้งแบบรุนแรงในอาหารที่ผสม PEG 6000 30% (Control 2) พบว่าต้นกล้าข้าวมีอาการเหี่ยวเฉามากกว่าชัดเจน และไม่สามารถฟื้นตัวได้ นอกจากนี้สภาวะแล้งแบบรุนแรงยังทำให้ต้นกล้าข้าวที่ปลูกจากเมล็ดพันธุ์ไม่เคลือบเชื้อหยุดการเจริญ จึงมีค่าเส้นผ่านศูนย์กลางลำต้น จำนวนใบ และความยาวยอดและรากคงที่ ส่วนสภาวะแล้งแบบค่อยๆ เพิ่มขึ้น ต้นกล้าข้าวจะสามารถฟื้นตัวได้ แต่อย่างไรก็ดียังมีการเจริญน้อยกว่าต้นข้าวที่ปลูกในสภาวะปกติที่เวลาเดียวกัน

ในขณะเดียวกันต้นกล้าข้าวที่ปลูกจากเมล็ดพันธุ์ที่เคลือบเชื้อแบคทีเรียผสม แล้วนำมาทดสอบในสภาวะแล้งแบบค่อยๆ เพิ่มขึ้น พบว่าต้นกล้าที่มีการเพิ่มจำนวนแบคทีเรียด้วยวิธีแช่ราก (Mix 3) จะมีการเจริญมากกว่าต้นกล้าข้าวที่ปลูกจากเมล็ดพันธุ์ที่เคลือบเชื้ออย่างเดียว (Mix 1) โดยมีน้ำหนักแห้งต่อต้นและเส้นผ่านศูนย์กลางลำต้นที่วันที่ 40 สูงกว่า ส่วนลักษณะอื่นๆ คล้ายคลึงกัน แต่เมื่อนำต้นกล้าข้าวที่ปลูกจากเมล็ดพันธุ์ที่เคลือบเชื้อมาทดสอบในสภาวะแล้งแบบรุนแรง (Mix 2) พบว่าต้นกล้าข้าวมีอาการเหี่ยวเฉาชัดเจน และไม่สามารถฟื้นตัวได้ เช่นเดียวกับต้นกล้าข้าวที่ปลูกจากเมล็ดพันธุ์ไม่เคลือบเชื้อ ทั้งนี้ต้นกล้าที่มีการเพิ่มจำนวนแบคทีเรียด้วยวิธีแช่ราก (Mix 3) มีจำนวนแบคทีเรียบริเวณรากพืชสูงสุด รองลงมาคือ Mix 1 และ 2 ผลการศึกษายืนยันว่าการแช่รากเพิ่มปริมาณแบคทีเรียได้ และเมื่อพืชเหี่ยวเฉาจะทำให้จำนวนแบคทีเรียที่อาศัยบริเวณรากลดลง ซึ่งคาดว่าเนื่องจากอาหารที่ปล่อยออกมาทางรากหมดไป

การเจริญของต้นกล้าข้าวที่เติมเชื้อผสม (L9+T8+X6+Y7+Y9) ภายหลังการทดสอบการทนแล้งแบบต่าง ๆ

ชุดทดลอง	ต้นข้าววันที่ 15 (สภาวะแล้งวันที่ 1)	ต้นข้าววันที่ 23 (สภาวะแล้งวันที่ 9)	ต้นข้าววันที่ 40 (ระยะฟื้นตัว)
Control 1			
Control 2			

Mix1			
Mix2			
Mix3			

เมื่อเปรียบเทียบระหว่างต้นกล้าข้าวที่ปลูกจากเมล็ดพันธุ์เคลือบและไม่เคลือบเชื้อ ในสภาวะแล้งแบบค่อยๆ เพิ่มขึ้น จะเห็นว่าการเติมหัวเชื้อผสมช่วยให้ต้นข้าวฟื้นตัวหลังจากสภาวะแล้งได้ดีกว่า โดยมีค่าเส้นผ่านศูนย์กลางลำต้นจำนวนใบ และ น้ำหนักแห้งต่อต้น ของวันที่ 40 สูงกว่าชัดเจน อย่างไรก็ดีต้นกล้าข้าวที่ปลูกแบบมีหัวเชื้อแบคทีเรียผสมในสภาวะแล้งแบบค่อยๆ เพิ่มขึ้น ยังมีการเจริญน้อยกว่าต้นข้าวที่ปลูกในสภาวะปกติ จึงจำเป็นต้องพัฒนาหัวเชื้อแบคทีเรียให้มีประสิทธิภาพเพิ่มขึ้นต่อไป ทั้งนี้มีแนวคิดที่จะทดสอบแบคทีเรียชนิดอื่นๆ ในคลังเพิ่ม และปรับวิธีการใช้เชื้อผสมต่อไป

ลักษณะของต้นกล้าข้าวที่ปลูกจากเมล็ดพันธุ์ที่เติมเชื้อผสม (L9+T8+X6+Y7+Y9) ภายหลังการทดสอบการทนแล้งแบบต่าง ๆ

การทดสอบ	เส้นผ่านศูนย์กลางลำต้น (ซม.)		จำนวนใบ		น้ำหนักแห้งต่อต้น (กรัม) วันที่ 40*	จำนวนแบคทีเรียรากข้าว (CFU/กรัมราก)**
	วันที่ 15	วันที่ 40	วันที่ 15	วันที่ 40		
Normal	0.15	0.60	3.00	7.11	0.31±0.03	ND
Control 1	0.13	0.44	3.00	5.89	0.14±0.06	ND
Control 2	0.16	0.16	3.00	3.00	0.05±0.03	ND
Mix1	0.06	0.49	3.00	6.78	0.20±0.07	$7.40x10^2$
Mix2	0.13	0.13	3.00	3.00	0.03±0.00	$1.72x10^2$
Mix3	0.16	0.53	2.89	6.11	0.24±0.07	$8.92x10^2$

หมายเหตุ: *น้ำหนักแห้ง วัดจากตัวอย่างต้นข้าวหลังอบแห้งตัวที่ 80 องศาเซลเซียส 24 ชม.

**นับจำนวนแบคทีเรียจากรากพืชที่เติมหัวเชื้อเท่านั้น

ND = Not determined

Normal = ต้นข้าวที่ปลูกในสภาวะปกติ อาหาร Yoshida ที่ไม่เติม PEG

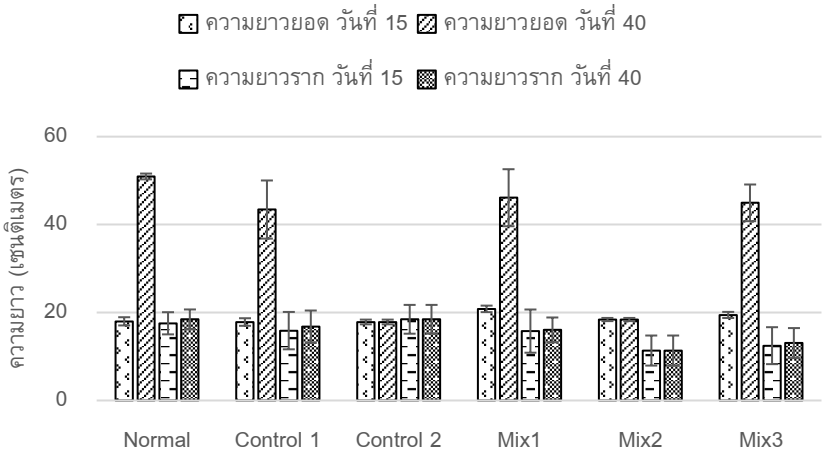
Control 1 = ต้นข้าวที่ปลูกจากเมล็ดพันธุ์ไม่เคลือบเชื้อ อาหาร Yoshida + PEG 10% >> 20% >> 30%

Control 2 = ต้นข้าวที่ปลูกจากเมล็ดพันธุ์ไม่เคลือบเชื้อ อาหาร Yoshida + PEG 30%

Mix1 = ต้นข้าวที่ปลูกจากเมล็ดพันธุ์เคลือบเชื้อ Mix culture + อาหาร Yoshida + PEG 10% >> 20% >> 30%

Mix2 = ต้นข้าวที่ปลูกจากเมล็ดพันธุ์เคลือบเชื้อ Mix culture + อาหาร Yoshida + PEG 30%

Mix3 = ต้นข้าวที่ปลูกจากเมล็ดพันธุ์เคลือบเชื้อ และแช่รากในหัวเชื้อผสมเพิ่ม วันที่ 14 >> อาหาร Yoshida + PEG 10% >> 20% >> 30%



ความยาวยอดและความยาวรากของต้นข้าวที่เติมเชื้อผสมภายหลังการทดสอบการทนแล้ง

ก2. ประสิทธิภาพของหัวเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก ทั้งแบบเดี่ยวและผสมต่อต้นข้าวหอมมะลิ 105

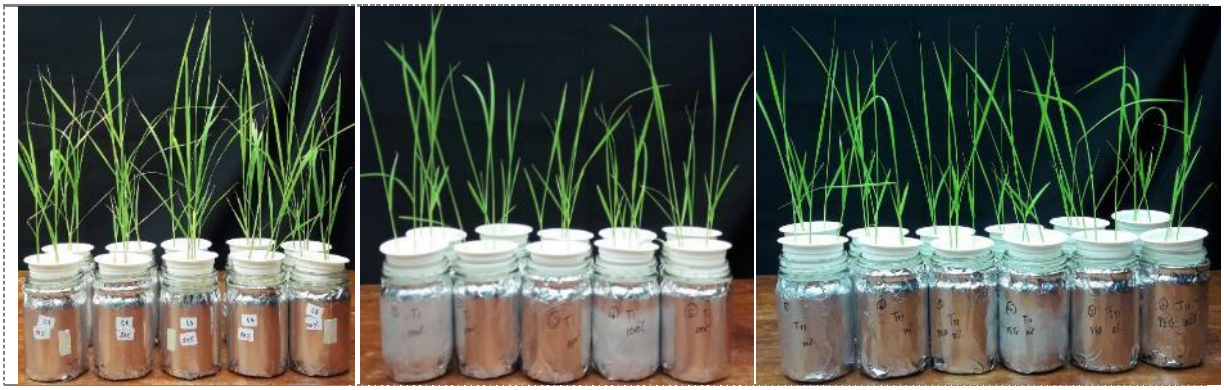
การทดลองทำเช่นเดียวกับการทดลองข้อก. 1 ทั้งนี้แบคทีเรียที่ใช้ในการทดลองนี้ได้แก่ แบคทีเรียแกรมบวกที่คัดแยกได้จากดินในจังหวัดลพบุรีเท่านั้น แบ่งการทดลองเป็น 2 ครั้ง ได้แก่

ครั้งที่ 1 แบคทีเรีย *Bacillus pumilus* T1 และ *B. cereus* T11

ครั้งที่ 2 แบคทีเรีย *Bacillus altitudinis* T17, *B. stratosphericus* L19 และ *B. altitudinis* L20 และเชื้อผสมของแบคทีเรียทั้ง 3 สายพันธุ์ (Mix) ทำการทดลองโดยใช้ต้นข้าว 3 ต้นต่อ 1 ซ้ำ และใช้จำนวนซ้ำทั้งหมด 5 ซ้ำ ต่อ 1 การทดลอง

ลักษณะของต้นกล้าข้าวขาวดอกมะลิ 105 กับเชื้อแบคทีเรีย T1 และ T11 อายุ 14 วัน ก่อนทดสอบสภาวะแล้ง

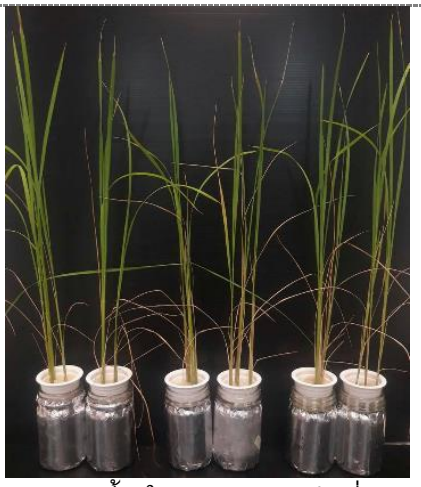
ชุดทดลอง	ความยาวยอด (ซม.)	ความยาวราก (ซม.)
ไม่เคลือบเชื้อ	17.4±1.2	12.0±4.1
แบคทีเรีย T1	17.8±1.7	11.1±3.3
แบคทีเรีย T11	18.7±1.5	10.7±3.4



การทดสอบการเจริญของต้นกล้าข้าวขาวดอกมะลิ 105 ไม่เคลือบเชื้อ (ซ้าย) กับเชื้อแบคทีเรีย T1 (กลาง) และ T11 (ขวา) สภาวะปกติ 14 วัน

30% PEG6000 วันสุดท้าย

ย้ายมาเลี้ยงในอาหารปกติ วันที่ 3



ย้ายมาเลี้ยงในอาหารปกติ วันที่ 10 Normal (ซ้าย) T1 (กลาง) และ T11 (ขวา)

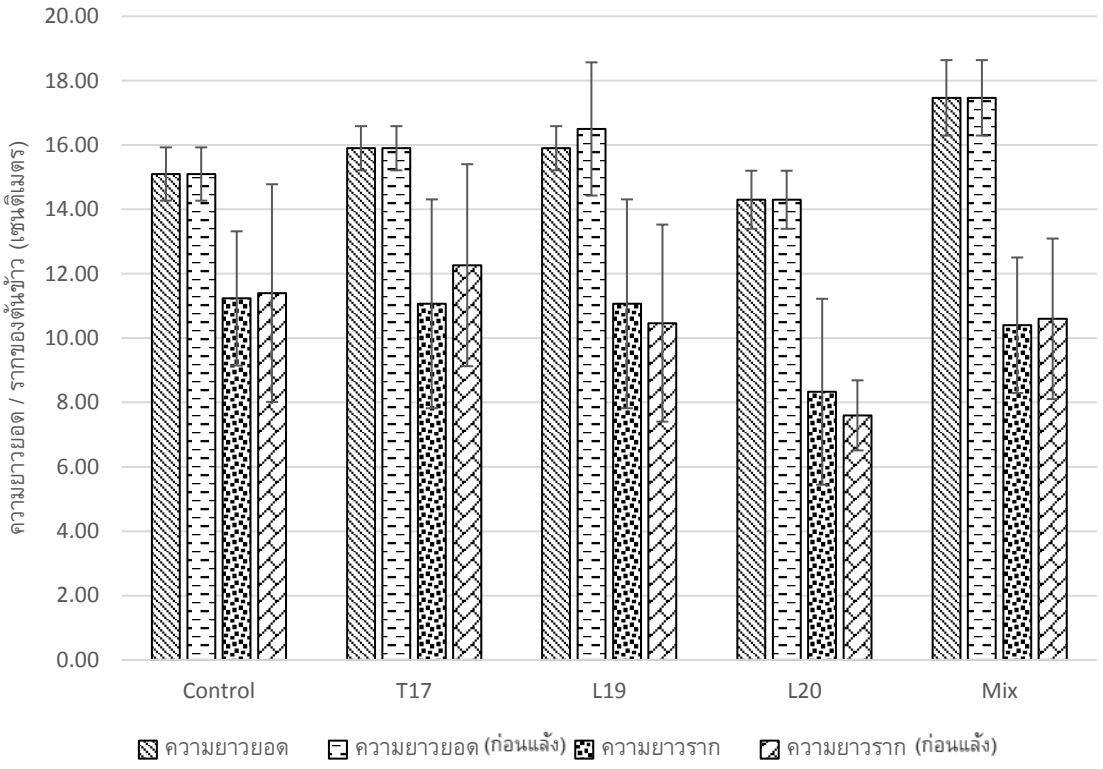
การทดสอบการเจริญของต้นกล้าข้าวขาวดอกมะลิ 105 กับเชื้อแบคทีเรีย T1 และ T11 หลังสภาวะแห้งแล้ง ในรูป ไม่เคลือบเชื้อ (ซ้าย) T1 (กลาง) และ T11 (ขวา)

ต่อมาผู้วิจัยได้คัดเลือกแบคทีเรียแกรมบวกที่สร้างสปอร์ และมีความสามารถในการสร้างเอนไซม์คะตะเลส ละลายฟอสเฟต และผลิต IAA เพิ่มเติม เมื่อนำมาจำแนกชนิดด้วยลำดับเบสของ 16s rRNA พบว่าคือ *Bacillus pumilus* T1, *B. altitudinis* T17, *B. stratosphericus* L19, *B. altitudinis* L20 และ *B. cereus* T11 ซึ่งต่อมาได้นำ *Bacillus altitudinis* T17, *B. stratosphericus* L19 และ *B. altitudinis* L20 มาทดสอบประสิทธิภาพการส่งเสริมการเจริญของพืช ทั้งแบบแบคทีเรียเดี่ยว และแบคทีเรียผสม 3 ชนิด ไม่นำ *B. cereus* T11 มาศึกษาต่อเพราะเป็นสปีชีส์ที่ก่อโรคในคนและสัตว์ ตามรายงานในเอกสารเรื่อง เชื้อโรคและระดับความเสี่ยง โดยกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข พ.ศ. 2552

ผลการทดลองเบื้องต้นพบว่าการเติมแบคทีเรียผสมระหว่าง *B. altitudinis* T17, *B. stratosphericus* L19 และ *B. altitudinis* L20 ช่วยให้ต้นกล้าข้าวในวันที่ 14 (สภาวะปกติ ก่อนจะนำไปทดสอบสภาวะแล้ง) มีความยาวยอดสูงกว่าต้นข้าวที่ไม่เติมแบคทีเรียและที่เติมแบคทีเรียเดี่ยว จากการทดลองของ Nautiyal และคณะ (2013) ได้ศึกษาผลของแบคทีเรีย *B. amyloliquefaciens* NBRISN13 ที่สามารถช่วยกระตุ้นการเจริญของต้นข้าวที่เลี้ยงในระบบ Hydroponics ภายใต้สภาวะที่มีเกลือ (200 mM NaCl) ได้ จากรายงานที่ผ่านมาพบว่า *B. amyloliquefaciens* และ *B. subtilis* สามารถผลิตสารส่งเสริมการเจริญของพืชทั้งยอดและรากได้ เช่น gibberellins, IAA, ACC deaminase, extracellular phytase, chitinase, antifungal peptides และสามารถเพิ่มผลผลิตแก่พืชหลายชนิด อย่างไรก็ดีพบว่าต้นข้าวที่เติมแบคทีเรียแกรมบวกทั้งหมดมีการเจริญน้อยกว่าต้นข้าวที่เติมแบคทีเรียแกรมลบในข้อที่ 4.3.1 ซึ่งสอดคล้องกับความสามารถในการผลิต IAA ของแบคทีเรียทั้ง 3 ไอโซเลท ที่มีค่า IAA ต่ำกว่าแบคทีเรียแกรมลบที่คัดเลือกมาก่อนหน้านี้ ปัญหาอีกประการที่พบคือ ต้นข้าวทั้งหมดมีการเจริญน้อยกว่าต้นข้าวในข้อ ก.1 แม้ว่าจะปลูกในสภาวะปกติ และต้นข้าวเหี่ยวเฉาอย่างรวดเร็วเมื่อนำมาทดสอบสภาวะแล้ง ซึ่งคาดว่าเป็นเพราะเมล็ดพันธุ์ที่ใช้ปลูกเป็นเมล็ดเก่า มีอายุการเก็บมากกว่า 1 ปี และมีมอดเจาะเมล็ดข้าวในถุงบางส่วน แม้ว่าผู้วิจัยได้เลือกเฉพาะเมล็ดที่ไม่มีมอดเจาะมาปลูก แต่ก็ยังพบว่าต้นกล้าข้าว

ทั้งหมดเจริญเติบโตไม่ดี ทำให้ไม่เห็นประสิทธิภาพของการเติมหัวเชื้อแบคทีเรียที่ชัดเจน ผู้วิจัยจึงจะทดลองซ้ำอีกรอบ

แม้ว่าแบคทีเรียที่ใช้ในการทดลองนี้ มีประสิทธิภาพที่ไม่ค่อยดี แต่อาจจะมีสมบัติอื่นที่จะช่วยส่งเสริมการเจริญของพืชได้ เช่น Jin และคณะ (2012) พบว่า *B. altitudinis* ZJ 186 ที่คัดแยกได้จากดินใต้ทะเลจีนตะวันออก มีคุณสมบัติในการยับยั้งเชื้อราก่อโรคข้าว *Magnaporthe oryzae* ได้ ส่วน *B. stratosphericus* เป็นแบคทีเรียที่คัดแยกครั้งแรกได้จากอากาศที่ระดับความสูงมากกว่า 21 กิโลเมตร เหนือพื้นดิน อย่างไรก็ตาม แบคทีเรียชนิดนี้มีรายงานว่าสามารถคัดแยกได้จากดินปลูกข้าวและธัญพืช ในประเทศอินเดีย (Yadav และคณะ, 2011) และมีคุณสมบัติในการสร้างไบโอฟิล์ม (Biofilm) (Zhang และคณะ, 2012) ดังนั้นมีความเป็นไปได้ว่า *Bacillus altitudinis* T17, *B. stratosphericus* L19 และ *B. altitudinis* L20 ที่คัดแยกได้นี้ จะสามารถยับยั้งเชื้อราก่อโรคข้าว หรือสร้างไบโอฟิล์มได้



การเจริญของต้นข้าววันที่ 14 เมื่อเติมหัวเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกแบบเดี่ยว และแบบผสม (Mix = T17+L19+L20) โดยชุด Control คือต้นข้าวที่ไม่เติมแบคทีเรีย

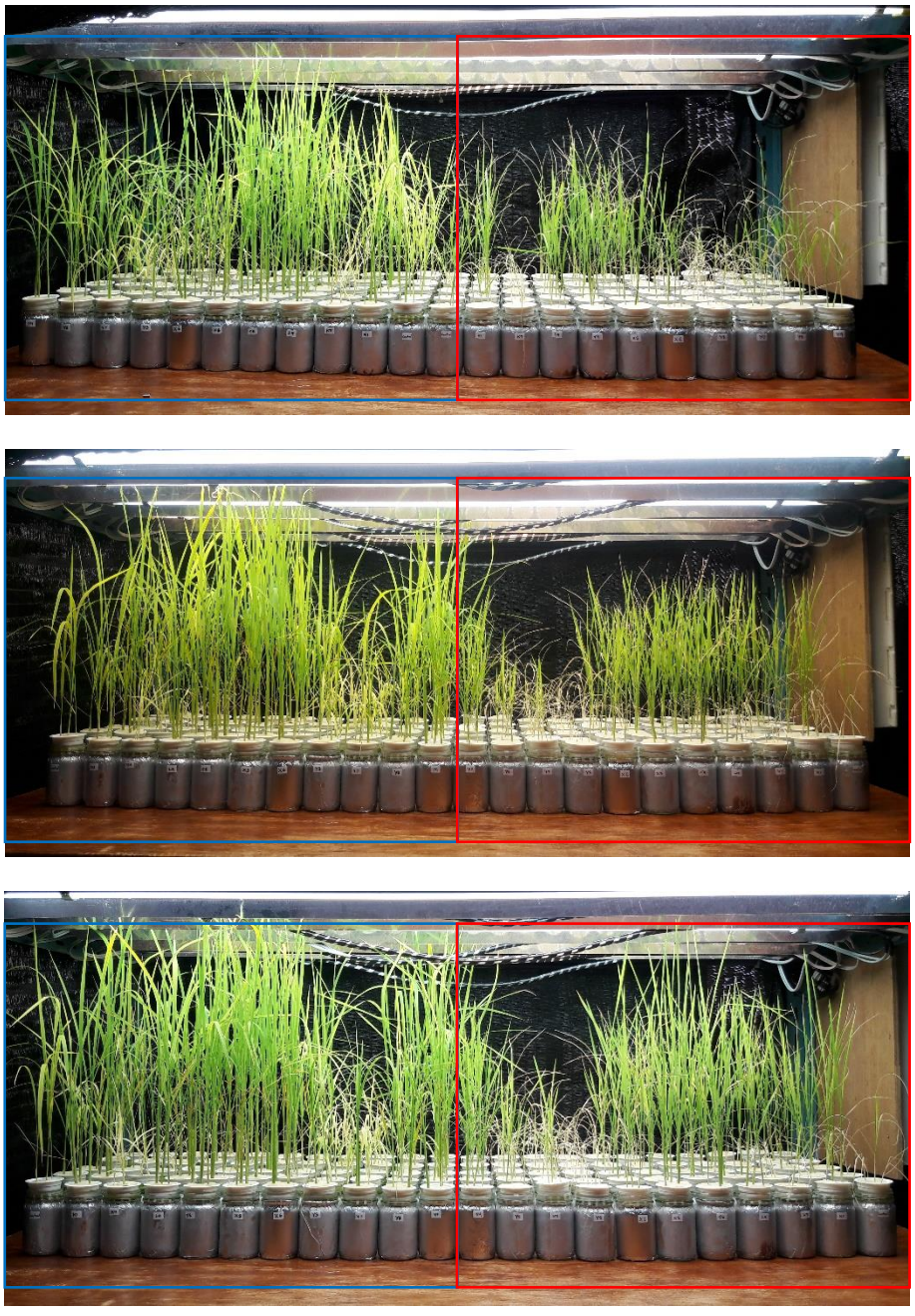
การเปลี่ยนแปลงของต้นข้าวเติมหัวเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกแบบเดี่ยว และแบบผสม

สภาวะการปลูกข้าว	สภาวะปกติ	สภาวะแล้ง
วันที่ 14 (ก่อนสภาวะแล้ง, อาหาร Yoshida)		
วันที่ 17 (สภาวะแล้ง, อาหาร 10% PEG 6000 วันที่ 3)		
วันที่ 20 (สภาวะแล้ง, อาหาร 20% PEG 6000 วันที่ 3)		
วันที่ 23 (สภาวะแล้ง, อาหาร 30% PEG 6000 วันที่ 3)		

หมายเหตุ: เรียงขวดทดลองทีละ 2 ซ้ำ จาก Control, *Bacillus altitudinis* T17, *B. stratosphericus* L19, *B. altitudinis* L20 และแบคทีเรียผสม โดยชุด Control คือต้นข้าวที่ไม่เติมแบคทีเรีย

ภาคผนวก ข.

ตัวอย่างการทดลองในระดับห้องปฏิบัติการ และระดับโรงเรือน



ตัวอย่างการปลูกพืชแบบไฮโดรโปนิกส์ในห้องปฏิบัติการ

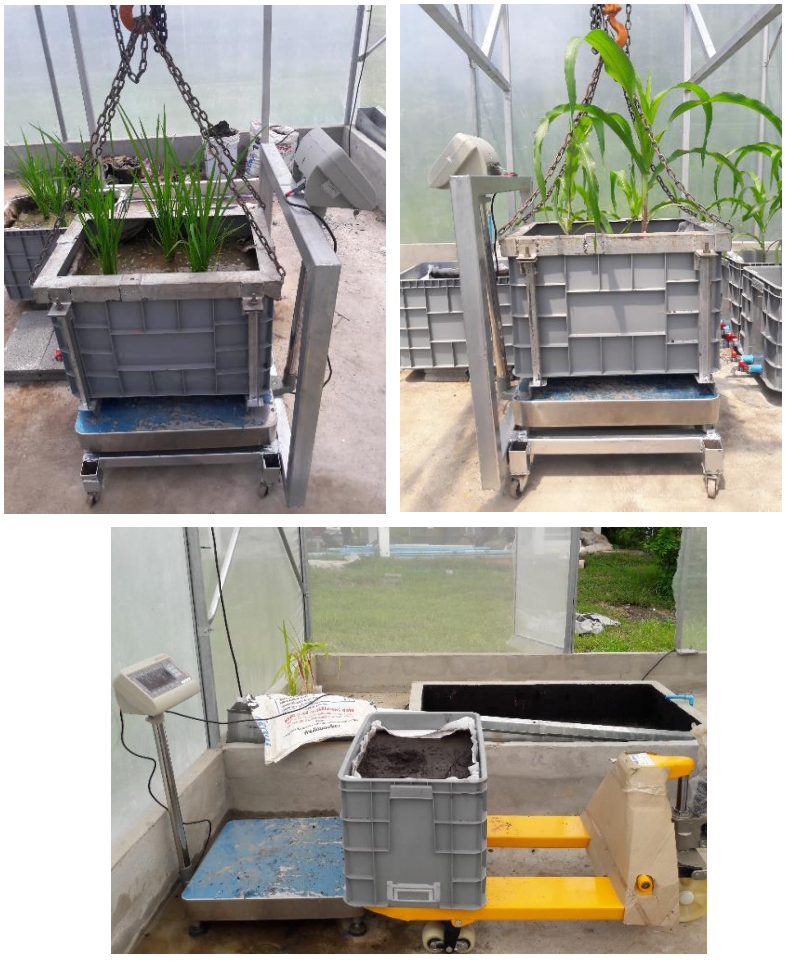
การเตรียมอุปกรณ์และต้นกล้าพืชสำหรับการทดลองในโรงเรือน

ลักษณะของโรงเรือนที่ก่อสร้างและติดตั้งอุปกรณ์ควบคุมอุณหภูมิและความชื้นเสร็จเรียบร้อยแล้ว

(มกราคม 2560)

ตัวอย่างการเตรียมดินและการปลูกข้าวในกล่อง

ตัวอย่างการเตรียมดินและการปลูกข้าวโพดในกล่อง



วิธีการชั่งกล่องดินสำหรับใช้เป็นข้อมูลเพื่อคำนวณค่าการคายระเหยน้ำ

ภาคผนวก ค.

กิจกรรมที่เกี่ยวข้องกับการนำผลจากโครงการไปใช้ประโยชน์

การเผยแพร่ผลงานวิจัย

Duangsrikaew K., Femuechang P., Jaidee R., Kachenchart B. and Luepromchai E. 2015. Isolation of drought tolerant rhizosphere bacteria for promoting growth of rice seedlings. Poster Presentation. The 27th Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology and International Conference. Bangkok. 17-20 November, 2015.

Duangsrikaew K., Femuechang P., Jaidee R., Kachenchart B. and Luepromchai E. 2016. Bacterial Inoculum for Enhancing Rice Recovery after Drought Condition in Pot Experiment. Poster Presentation. The 28th Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology and International Conference. Chiangmai. 28-30 November, 2016.

Duangsrikaew K., Femuechang P., Kachenchart B. and Luepromchai E. 2017. Efficiency of mixed bacterial inoculum on promoting growth and recovery of rice under drought condition. International Union of Microbiological Societies Congresses 2017, Singapore, 17 – 21 July 2017.

การจัดทำโครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์ สำหรับนิสิตหลักสูตรจุลชีววิทยา

นรมน แซ่จิว 2558 การคัดแยกและศึกษาสมบัติของแบคทีเรียทนแล้งจากรากข้าวหอมมะลิ105 และข้าวเหนียว กข6 ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

อุทัยวรรณ เศวตรัตน์ 2559 การพัฒนาวิธีเคลือบหัวเชื้อแบคทีเรียผสมบนเมล็ดข้าวเพื่อส่งเสริมการเจริญของข้าวในสภาวะแล้ง ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ง.

ตารางเปรียบเทียบวัตถุประสงค์ กิจกรรมที่วางแผนไว้ และกิจกรรมที่ดำเนินการมาและผลที่ได้รับตลอดโครงการ

วัตถุประสงค์	กิจกรรมที่วางแผนไว้	กิจกรรมที่ดำเนินการมาและผลที่ได้รับตลอดโครงการ
1. คัดกรองแบคทีเรียทนแล้งที่มีสมบัติในการส่งเสริมการเจริญของพืชและสามารถอาศัยบริเวณรากพืช	1.1 เพาะเลี้ยงแบคทีเรียทนแล้งสายพันธุ์ต่างๆ ที่คัดแยกจากดินบริเวณรากอ้อยและข้าว ที่ปลูกในจังหวัดลพบุรี	งานวิจัยนี้ได้คัดแยกแบคทีเรียรวมทั้งสิ้น 112 ไอโซเลต โดยเป็นแบคทีเรียจากดินรากข้าว อ้อย และข้าวโพด ในจังหวัดลพบุรี จำนวน 78 ไอโซเลต และจากดินนาข้าว จังหวัดร้อยเอ็ด จำนวน 34 ไอโซเลต
	1.2 คัดเลือกแบคทีเรียทนแล้งที่มีสมบัติเกี่ยวข้องกับการเจริญของพืช	ได้เลือกแบคทีเรีย 30 ไอโซเลท มาวิเคราะห์ชนิด และทดสอบสมบัติที่เกี่ยวข้องกับการส่งเสริมการเจริญของพืช พบว่าแบคทีเรียทั้งหมดผลิตเอนไซม์คะตาเลซได้ และมีแบคทีเรียจำนวน 21 ไอโซเลต ที่ผลิตเอนไซม์ ACC deaminase ได้ แบคทีเรียทนแล้งที่คัดแยกได้มีค่า Phosphate Solubilization Index ต่ำ ส่วนการผลิต IAA พบว่าแบคทีเรียแกรมลบส่วนใหญ่ผลิต IAA ได้ดี แต่ผลิต Exopolysaccharide ได้ต่ำ ในขณะที่แบคทีเรียแกรมบวกผลิต IAA ได้ต่ำ แต่ผลิต Exopolysaccharide ได้ นอกจากนี้แบคทีเรียส่วนใหญ่ไม่สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิว
2. พัฒนาหัวเชื้อแบคทีเรียผสมที่มีประสิทธิภาพในการปกป้องพืชเมื่ออยู่ในสภาวะแล้ง และสามารถอาศัยบริเวณรากพืช	2.1 ศึกษาลักษณะการเจริญและประสิทธิภาพของแบคทีเรียทนแล้งที่คัดเลือก เมื่อนำมาเพาะเลี้ยงร่วมกับพืชในสภาวะแห้งแล้ง	พบว่าในสภาวะที่มีน้ำปกติต้นข้าวมีการเจริญเติบโตดี และแบคทีเรียหลายไอโซเลทสามารถส่งเสริมการเจริญของต้นข้าว โดยต้นกล้าที่ปลูกจากเมล็ดที่เคลือบแบคทีเรียมีลักษณะแข็งแรงกว่าเมล็ดที่ไม่เคลือบเชื้อ ทั้งนี้แบคทีเรียแกรมลบ เช่น *Enterobacter* sp. K1, *Acinetobacter* sp. L9, *Pseudomonas* sp. T8, *Pseudomonas putida* X3 และ *Pseudomonas putida* Y9

วัตถุประสงค์	กิจกรรมที่วางแผนไว้	กิจกรรมที่ดำเนินการมาและผลที่ได้รับตลอดโครงการ
		ช่วยส่งเสริมการเจริญของต้นกล้าข้าวทั้งเมื่ออยู่ในสภาวะปกติและสภาวะแล้ง โดยดูจากค่าเฉลี่ยจำนวนใบและจำนวนรากของต้นข้าว ความยาวยอด น้ำหนักแห้งเฉลี่ยและเส้นรอบวงลำต้นของต้นข้าวที่เคลือบ ต้นกล้าข้าวที่มีแบคทีเรียดังกล่าว ยังสามารถฟื้นตัวภายหลังสภาวะแล้งได้ดี ส่วนต้นกล้าจากเมล็ดข้าวที่เคลือบด้วยแบคทีเรียแกรมบวกในสภาวะแล้ง พบว่ามีความยาวรากสูงกว่าชุดควบคุมที่ไม่ได้เคลือบแบคทีเรียอย่างมีนัยสำคัญ แต่มีน้ำหนักแห้งใกล้เคียงกัน โดยแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพสูงได้แก่ *Jeotgalicoccus huakuii* RA2, *B. altitudinis* T17 และ *B. stratosphericus* L19 การทดสอบประสิทธิภาพของหัวเชื้อแบคทีเรียกับต้นกล้าข้าวโพดให้ผลไปในทางเดียวกัน คือการเติมแบคทีเรียผสมส่งเสริมการเจริญของต้นข้าวโพดได้
	2.2 ศึกษาปริมาณหัวเชื้อแบคทีเรียผสมที่เหมาะสมต่อการการเจริญบริเวณรากพืชที่ปลูกในสภาวะแห้งแล้ง	งานวิจัยนี้ได้แปรผันปริมาณหัวเชื้อแบคทีเรียที่ 10^8 - 10^9 CFU/mL พบว่าจำนวนแบคทีเรียบริเวณรากพืชเพิ่มขึ้น เมื่อเติมหัวเชื้อที่มีแบคทีเรียความเข้มข้น 10^9 CFU/mL จึงเลือกใช้ความเข้มข้นนี้ในงานต่อมา และพบว่าควรผสม CMC เพื่อช่วยการเกาะของแบคทีเรียบนเมล็ดพืช ซึ่งปริมาณแบคทีเรียที่ใช้นี้มีค่าเท่ากับข้อมูลในบทความวิชาการส่วนใหญ่ ทั้งนี้ผู้วิจัยไม่ได้แปรผันจำนวนแบคทีเรียเพิ่มจากนี้ เพราะคำนึงถึงต้นทุนของการผลิตหัวเชื้อแบคทีเรีย การใช้แบคทีเรียปริมาณมากๆ จำเป็นต้องปั่นเก็บเซลล์หลายรอบ จึงไม่สามารถใช้จริงในพื้นที่การเกษตรได้

วัตถุประสงค์	กิจกรรมที่วางแผนไว้	กิจกรรมที่ดำเนินการมาและผลที่ได้รับตลอดโครงการ
3. ทดสอบประสิทธิภาพของหัวเชื้อแบคทีเรียในการส่งเสริมการเจริญและการฟื้นตัวของพืชเศรษฐกิจในสภาวะแห้งแล้ง	3.1 ทดสอบประสิทธิภาพของหัวเชื้อแบคทีเรียในการเพิ่มความทนต่อสภาวะแห้งแล้งของพืช	ทำกิจกรรมข้อ 3.1 และ 3.2 พร้อมกัน โดยพบว่าหัวเชื้อแบคทีเรียผสมที่ประกอบด้วยแบคทีเรียแกรมบวก 3 ชนิด และแบคทีเรียแกรมลบ 3 ชนิด คือ *Bacillus stratosphericus* L19, *Bacillus pumilus* T1, *Bacillus altitudinis* T17, *Acinetobacter* sp. L9, *Pseudomonas* sp. T8 และ *Pseudomonas* sp. X3 ไปทดสอบประสิทธิภาพต่อพืชที่ปลูกในดินจริงระดับกระถาง พบว่าเมื่อมีการให้น้ำปกติหัวเชื้อแบคทีเรียช่วยส่งเสริมการเจริญของข้าวในดิน ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองในระบบไฮโดรโปนิกส์ เมื่องดการให้น้ำพบว่าต้นกล้าข้าวทั้งที่เติมและไม่เติมแบคทีเรียค่อยๆ เหี่ยวลง ใบม้วน และใบมีสีซีดลง จนใบแห้งหมดในวันที่ 36
	3.2 ทดสอบประสิทธิภาพของหัวเชื้อแบคทีเรียในการช่วยให้พืชฟื้นตัวหลังสภาวะแล้ง	
	3.3 ทดสอบประสิทธิภาพของหัวเชื้อแบคทีเรียในการช่วยรักษาระดับการคายระเหยน้ำของพืชในสภาวะแล้ง	หัวเชื้อแบคทีเรียไม่ช่วยรักษาระดับการคายระเหยน้ำของพืชในสภาวะแล้ง ทั้งนี้อาจจะมาจากวิธีวัดค่าการคายระเหยน้ำด้วยการชั่งน้ำหนักไม่เหมาะสม ค่าที่ได้หยาบเกินไป จึงไม่สามารถนำมาเชื่อมโยงกับประสิทธิภาพของหัวเชื้อแบคทีเรีย ควรใช้พารามิเตอร์ที่มีความละเอียดมากกว่า เช่น ปริมาณคลอโรฟิลล์ เพื่อบอกถึงความสามารถในการดูดซับแสงและสังเคราะห์แสงของพืช ในสภาวะต่างๆ
	3.4 ประมวลผลการศึกษา	แบคทีเรียทนแล้ง มีสมบัติในการส่งเสริมการเจริญของพืชแตกต่างกัน จึงจำเป็นต้องคัดกรองเฉพาะแบคทีเรียทนแล้งที่มีคุณสมบัติการผลิตสารส่งเสริมการเจริญของพืชสูงมาใช้ประโยชน์ต่อไป โครงการวิจัยนี้ยังแสดงให้เห็นว่าสามารถนำแบคทีเรียทนแล้งจากแหล่งที่มาต่างๆ มาผสมร่วมกันเป็นหัวเชื้อได้ อย่างไรก็ดีการเติมหัวเชื้อแบคทีเรียจะเหมาะสำหรับพืชที่

วัตถุประสงค์	กิจกรรมที่วางแผนไว้	กิจกรรมที่ดำเนินการมาและผลที่ได้รับตลอดโครงการ
		ไวต่อสภาวะแล้ง เช่น ข้าว มากกว่าข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ที่ทนสภาวะแล้งได้ดีอยู่แล้ว นอกจากนี้ประสิทธิภาพของแบคทีเรียจะขึ้นกับปัจจัยทางสภาพแวดล้อมด้วย

ภาคผนวก จ.

แผนงานวิจัย (ร่าง) เรื่อง การเพิ่มประสิทธิภาพของหัวเชื้อแบคทีเรียผสมเพื่อส่งเสริมการเจริญและการฟื้นตัวของพืชเศรษฐกิจในสภาวะแห้งแล้ง และการศึกษากลไกที่เกี่ยวข้อง

โครงการวิจัยเรื่อง การพัฒนาหัวเชื้อแบคทีเรียผสมเพื่อส่งเสริมการเจริญและการฟื้นตัวของพืชเศรษฐกิจในสภาวะแห้งแล้ง ที่สนับสนุนโดย ฝ่ายเกษตร สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย ในปี 2558 ทำให้ทราบว่าแบคทีเรียทนแล้งที่คัดแยกจากดินรากพืชมีหลากหลายสายพันธุ์ โดยบางไอโซเลตมีคุณสมบัติที่เกี่ยวข้องกับการส่งเสริมการเจริญของพืชและการอาศัยอยู่บริเวณรากพืช เมื่อนำแบคทีเรียทนแล้ง 6 ไอโซเลตที่มีคุณสมบัติแตกต่างกันมาผสมกัน เพื่อใช้เป็นหัวเชื้อแบคทีเรียผสมสำหรับเคลือบเมล็ดพันธุ์ข้าวและข้าวโพด และสำหรับใส่เป็นหัวเชื้อรูปแบบน้ำในดินเพิ่มเติมระหว่างปลูก พบว่าพืชที่มีการเติมหัวเชื้อแบคทีเรียสามารถฟื้นตัวภายหลังสภาวะแล้งได้ดีกว่าพืชชุดควบคุม แสดงว่าแบคทีเรียทนแล้งที่ใช้สามารถช่วยกระตุ้นการเจริญและการทนแล้งของพืชได้ อย่างไรก็ตามจำเป็นต้องพัฒนาวิธีเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพของหัวเชื้อแบคทีเรียผสมเพื่อให้สามารถนำไปใช้งานจริงได้อย่างสะดวกมากขึ้น ทั้งนี้ผู้วิจัยมีแนวคิดจะปรับปรุงวิธีเคลือบหัวเชื้อแบคทีเรียบนเมล็ดพืช และการเตรียมแบคทีเรียสูตรน้ำเพื่อใช้เติมเพิ่มในดินระหว่างที่มีสภาวะแล้ง หลังจากนั้นจะขยายผลของการใช้หัวเชื้อแบคทีเรียทนแล้งกับ พืชเศรษฐกิจชนิดอื่น โดยผู้วิจัยสนใจจะทดลองนำหัวเชื้อแบคทีเรียที่พัฒนาขึ้นไปทดสอบกับอ้อย และจะคัดแยกแบคทีเรียเอนโดไฟต์ที่สามารถทนแล้งเพิ่มเติม เนื่องจากแบคทีเรียเอนโดไฟต์สามารถอาศัยในเนื้อเยื่อพืช จึงคาดว่าจะสามารถช่วยปกป้องพืชได้อย่างมีประสิทธิภาพมากขึ้น อย่างไรก็ดีเอนโดไฟต์มีความจำเพาะกับชนิดของพืชมากกว่าแบคทีเรียรากพืช และเจริญเติบโตในระดับห้องปฏิบัติการได้ยากกว่า ผู้วิจัยจึงจะพัฒนาหัวเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟต์เพื่อนำไปใช้กับไม้ผลซึ่งมีมูลค่าทางเศรษฐกิจสูง เช่น ทุเรียน นอกจากนี้ผู้วิจัยสนใจจะศึกษาบทบาทของหัวเชื้อแบคทีเรียต่อการเปลี่ยนแปลงของระดับฮอร์โมนพืชระหว่างการเจริญในสภาวะแล้ง โดยจะเลือกข้าวมาเป็นพืชต้นแบบก่อน 1 ชนิด แล้วติดตามการเปลี่ยนแปลงของระดับฮอร์โมนพืชหลายชนิดพร้อมกันด้วยวิธี Liquid-chromatography-high resolution-mass spectrometry (LC-HRMS) โดยเปรียบเทียบระหว่างต้นข้าวที่เติมและไม่เติมหัวเชื้อแบคทีเรียผสม ซึ่งข้อมูลที่ได้จะเป็นอีกแนวทางหนึ่งที่จะช่วยให้เข้าใจถึงความสำคัญของการเติมหัวเชื้อแบคทีเรีย และการใช้ประโยชน์ต่อไปได้

ดังนั้นในปี 2560-61 ผู้วิจัยจึงจะขอรับการสนับสนุนงบประมาณวิจัยในลักษณะแผนงานวิจัย ที่ประกอบด้วยโครงการวิจัยย่อย 3 โครงการ และมีผู้ร่วมวิจัยจากหลายหน่วยงาน เพื่อให้ได้ข้อมูลที่สมบูรณ์และสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้กับพืชเศรษฐกิจชนิดต่างๆ ที่ปลูกในหลายพื้นที่ โดยมีงบประมาณรวม 5.5 ล้านบาท ระยะเวลารวม 2 ปี โดยมีรายละเอียดเบื้องต้นดังนี้

โครงการวิจัยย่อย 1 การพัฒนาหัวเชื้อแบคทีเรียผสมสำหรับส่งเสริมการเจริญและการฟื้นตัวของข้าว ข้าวโพด และ อ้อย ในสภาวะแห้งแล้ง

คณะผู้วิจัย รศ. ดร. เอกวัล ลือพร้อมชัย (จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย) อ. ดร. บุญลือ คะเชนทร์ชาติ (มหาวิทยาลัยมหิดล) และ อ. กัลย์สุดา ดวงศรีแก้ว (มหาวิทยาลัยราชภัฏเทพสตรี)

ในอดีตมีการผลิตหัวเชื้อแบคทีเรียในงานทางด้านการเกษตรหลากหลายวิธี ทั้งที่เป็นวิธีที่ใช้วัสดุจากธรรมชาติ และการใช้สารเคมีเพื่อเข้ามาช่วยในการเคลือบแบคทีเรียบนผิวเมล็ดพืช การเคลือบเมล็ดด้วยแบคทีเรียที่ให้ประโยชน์นั้นมีข้อดีคือทำง่าย บางเบา ติดอย่างสม่ำเสมอ และมีประสิทธิภาพดี อย่างไรก็ตาม การเคลือบผิวเมล็ดด้วยแบคทีเรียนั้นมีข้อเสียบางประการ เช่น การคงอยู่ของแบคทีเรียบนผิวเมล็ดเมื่อเก็บรักษาเป็นเวลานาน เนื่องจากความชื้นจำกัด หรือในบางกรณีที่เมล็ดมีขนาดเล็ก ทำให้มีจำนวนแบคทีเรียเกาะอยู่บนพื้นผิวเมล็ดได้น้อย อย่างไรก็ดีแบคทีเรียที่ใช้ในโครงการวิจัยนี้เป็นแบคทีเรียที่สามารถทนต่อความแห้งแล้งได้ในระดับหนึ่ง ดังนั้นการเคลือบเมล็ดด้วยโพลิเมอร์ที่เหมาะสมจึงจะช่วยยืดอายุของแบคทีเรียที่เกาะบนผิวเมล็ดได้ จากงานวิจัยที่ผ่านมาพบว่าการเคลือบเมล็ดนั้นมีเทคนิคหลากหลายแบบ รวมทั้งมีการใช้โพลิเมอร์หลายชนิด เช่น อัลจีเนต แคลเซียมซิลิเกต CMC PEG 6000 และ Hydroxypropyl Methylcellulose (HPMC) งานวิจัยนี้จึงจะทดสอบการใช้โพลิเมอร์ชนิดต่าง ๆ ในการเคลือบเมล็ดข้าวและข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ เพื่อทดสอบการมีชีวิตของแบคทีเรียทนแล้งที่เกาะบนผิวเมล็ดพันธุ์ภายหลังการเก็บรักษาเมล็ด

ในการวิจัยครั้งนี้ยังจะทดสอบแบคทีเรียทนแล้งที่คัดแยกได้ต่อการเจริญของต้นอ้อยในระยะแตกกอ ซึ่งเป็นระยะที่ต้นอ้อยต้องการน้ำเพื่อใช้สำหรับการเจริญมาก ดังนั้นถ้าขาดน้ำจะมีผลกระทบต่อการเจริญในระยะถัดไปหรืออาจทำให้ต้นอ้อยตายได้ จึงจะได้ทดสอบการใช้หัวเชื้อแบคทีเรียสูตรน้ำ Minimal medium ที่เติมสารป้องกันเซลล์ เช่น Glycerol DMSO และ Skim milk และทดสอบอายุการเก็บรักษาอย่างน้อย 3 เดือน หัวเชื้อสูตรน้ำนี้ใช้สำหรับเติมลงในดินบริเวณรากพืชในช่วง 3 วันแรกของการทดสอบสภาวะแล้ง เพื่อช่วยเพิ่มการทนแล้งของพืชจากแบคทีเรียควบคู่ไปกับการเคลือบเมล็ดหรือแช่หน่อในระดับห้องปฏิบัติการและระดับโรงเรือน โดยการปลูกในกระถางบรรจุดิน เมื่อได้วิธีที่มีประสิทธิภาพจะขยายการทดลองทั้งหมดไปสู่ระดับแปลงปลูก (field scale) และทำการถ่ายทอดเทคโนโลยีให้เกษตรกร

การวิจัยที่จะทำควบคู่ไปกับการปลูกพืชเติมหัวเชื้อแบคทีเรีย คือการวิเคราะห์ไมโครไบโอมบริเวณรากพืชด้วยวิธี Metagenomics ทั้งนี้จะเน้นการศึกษาประชากรแบคทีเรียที่มียีนที่เกี่ยวข้องกับการทนแล้งของพืช เช่น ACC deaminase gene (*acdS*) โดยเปรียบเทียบกับสังคมของแบคทีเรียทั้งหมดในตัวอย่างดินรอบรากพืช และแบคทีเรียที่มียีน *acdS* จากตัวอย่างพืชที่ปลูกในสภาวะต่างๆ ซึ่งเอนไซม์ ACC deaminase เป็นเอนไซม์ที่ช่วยในการชะลอการเหี่ยวของพืชได้ จึงคาดว่าแบคทีเรียที่ส่งเสริมการเจริญของพืชในสภาวะแล้งจะมีบทบาทในการเพิ่มปริมาณเอนไซม์นี้ ดังนั้นไมโครไบโอมของพืชที่มีการเติมหัวเชื้อแบคทีเรียเมื่อผ่านสภาวะแล้งในระดับโรงเรือนจะมีลักษณะแตกต่างจากพืชที่ไม่ได้เติมหัวเชื้อ และควรจะสอดคล้องกับการฟื้นตัวของพืชและการเปลี่ยนแปลงของระดับฮอร์โมนพืชที่เกี่ยวข้อง (จากผลการทดลองของโครงการวิจัยย่อย 3) ทั้งนี้จะเปรียบเทียบกับไมโครไบโอมของพืชที่ปลูกในสภาวะแบบให้น้ำปกติทั้งที่เติมและไม่เติมหัวเชื้อด้วย ผลการทดลองทั้งหมดจะชี้ให้เห็นว่าการเติมแบคทีเรียทนแล้งมีบทบาทอย่างไรต่อการส่งเสริมการเจริญของพืชในสภาวะต่างๆ

โครงการวิจัยย่อย 2 การแยกและคัดเลือกแบคทีเรียเอนโดไฟต์สำหรับส่งเสริมการเจริญและการฟื้นตัวของทุเรียนในสภาวะแห้งแล้ง

คณะผู้วิจัย อ.ดร. จิรภัทร จันทมาลี (มหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี) อ. ดร. ณมนรัก คำฉัตร (มหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี) และ อ. วิญญู ภักดี (มหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี)

เนื่องจากทุเรียนเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญของจังหวัดจันทบุรี ในช่วงปีที่ผ่านมาเกษตรกรผู้ปลูกทุเรียนประสบปัญหาจากสภาวะแล้ง ทำให้ผลผลิตตกต่ำ เนื่องจากทุเรียนเป็นพืชยืนต้นที่มีขนาดใหญ่ มีระบบรากหยั่งลึกลงในดิน จึงไม่เหมาะสมที่จะใช้วิธีใส่หัวเชื้อแบคทีเรียทนแล้งที่คัดแยกจากรากพืชลงในดิน งานวิจัยนี้จึงสนใจคัดแยกแบคทีเรียเอนโดไฟต์จากเนื้อเยื่อต่างๆ ของต้นทุเรียน แล้วคัดกรองแบคทีเรียที่สามารถทนแล้ง สำหรับมาพัฒนาวิธีใช้งานต่อไป โดยมีขั้นตอนการทำงาน ดังนี้

1) คัดแยกแบคทีเรียเอนโดไฟต์ทนแล้งโดยวิธี Surface Sterilization Technique จากชิ้นส่วนต่างๆ ของทุเรียน ได้แก่ ราก, ลำต้น และใบ โดยใช้ทุเรียนอย่างน้อย 3 สายพันธุ์ (พันธุ์เศรษฐกิจ: หมอนทอง, ก้านยาว, ชะนี, พวงมณี จากเขตที่มีการเพาะปลูกทุเรียนเพื่อการส่งออกมากของจังหวัดจันทบุรี เช่น อำเภอท่าใหม่ อำเภอขลุง ทั้งนี้อาจมีการใช้พันธุ์พื้นเมืองร่วมด้วย เช่น ชายมะไฟ นกหยิบ กบ ฯลฯ จากสวนหรือร้านขายต้นพันธุ์ทุเรียน ที่มักนิยมใช้พันธุ์พื้นเมืองในการเป็นต้นพันธุ์ (จากการสอบถามเบื้องต้น เกษตรกรไม่นิยมปลูกทุเรียนพันธุ์พื้นเมืองแล้ว เนื่องจากมีราคาต่ำ แต่มีข้อดีคือทนโรค)
2) การทดสอบประสิทธิภาพการทนแล้งของแบคทีเรียเอนโดไฟต์ เช่น ทดสอบ ACC deaminase, IAA และอาจทดสอบประสิทธิภาพในด้านการเป็นประโยชน์ต่อพืช เพิ่มเติม ได้แก่ การทนร้อน, การย่อยสลายฟอสเฟต, และ การยับยั้งราไฟทอปทอรา ผลที่ได้จากการขั้นนี้ จะได้แบคทีเรียเอนโดไฟต์ทนแล้งที่มีคุณสมบัติในการเป็นแบคทีเรียส่งเสริมการเจริญของพืช (Plant growth promoting bacteria, PGPR) เช่น ทนแล้งและย่อยสลายฟอสเฟต, ทนแล้งและยับยั้งไฟทอบปอรา, ทนแล้งและทนร้อน หรืออาจได้แบคทีเรียที่มีคุณสมบัติในการเป็น PGPR มากกว่า 1 ลักษณะ
3) การติดเชื้อ (Infect) แบคทีเรียเอนโดไฟต์ทนแล้งในชิ้นสวนทุเรียนในสภาพปลอดเชื้อ ในสภาวะจำลองเครียดน้ำ ผลที่ได้จากการทดสอบขั้นนี้ จะเป็นการยืนยันว่าแบคทีเรียและพืช (ต้นอ่อนทุเรียน: seedling) สามารถอยู่ร่วมกันได้ภายใต้สภาพเครียดน้ำ
4) การตรวจสอบยืนยันผลทางด้านกายวิภาค (anatomy) ของพืชถึงการเข้าอาศัยอยู่ของแบคทีเรียเอนโดไฟต์ทนแล้งในส่วนต่าง ๆ ของพืช และการยืนยันแอคติวิตีในการทนแล้งของแบคทีเรียในสภาวะดังกล่าว
5) การผลิตหัวเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟต์ทนแล้ง เพื่อใช้สำหรับการเตรียมกล้าพันธุ์ทุเรียน เช่น การชุบเมล็ดทุเรียนด้วยหัวเชื้อแบคทีเรีย (สำหรับการเตรียมต้นพันธุ์ที่แข็งแรงก่อนตัดยอดเพื่อเสียบยอดพันธุ์เศรษฐกิจ) การชุบกิ่งพันธุ์ทุเรียนเศรษฐกิจ ก่อนนำไปเสียบยอด เพื่อผลิตต้นพันธุ์ และการผสมหัวเชื้อกับวัสดุปลูกกิ่งพันธุ์ทุเรียนเศรษฐกิจ ซึ่งเป็นประโยชน์สำหรับการขยายพันธุ์ทุเรียนของเกษตรกรต่อไป

โครงการวิจัยย่อย 3 การวิเคราะห์ผลกระทบของแบคทีเรียทนแล้งในพืชเศรษฐกิจด้วยการวิเคราะห์ฮอร์โมนพืชหลายตัวในคราวเดียว

คณะผู้วิจัย ดร. อุมาพร เอื้อวิเศษวัฒนา (ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพ, BIOTEC) และ ดร. นิศรา การุณอุทัยศิริ (ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพ, BIOTEC)

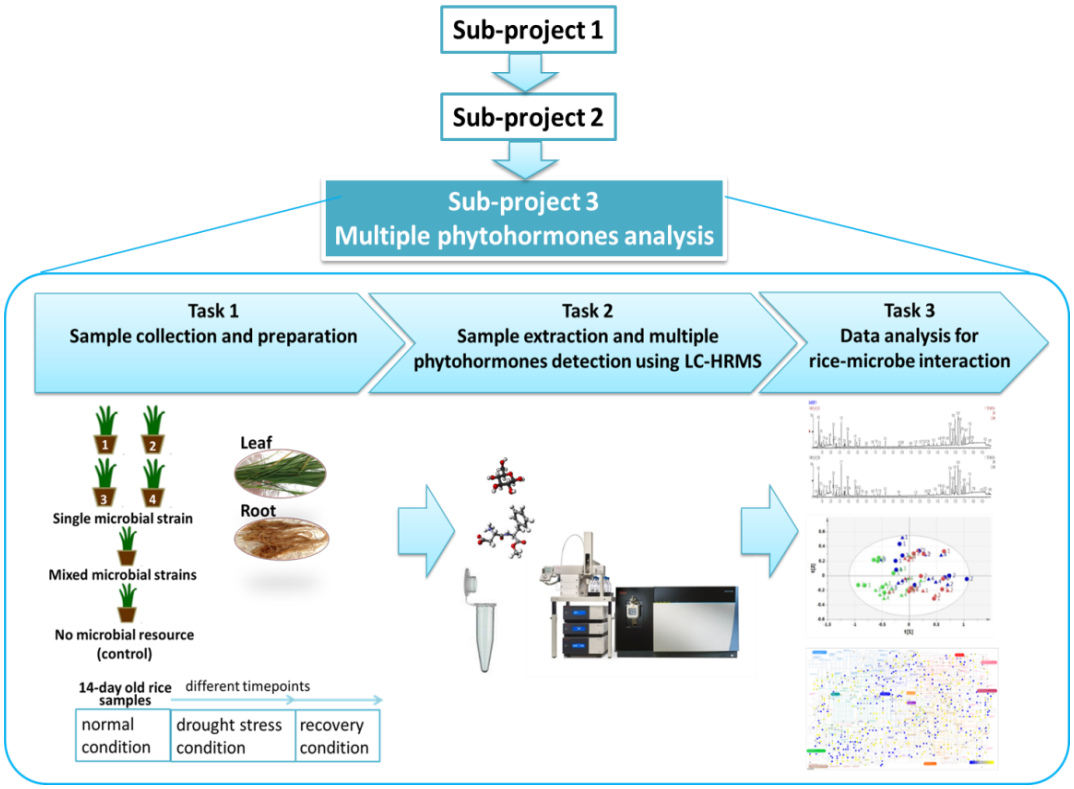
เป็นที่ทราบกันดีว่าแบคทีเรียมีประโยชน์ต่อพืชในด้านการสนับสนุนและปรับปรุงการเจริญเติบโตของพืชภายใต้สภาวะเครียดอันเนื่องมาจากสิ่งมีชีวิตและสิ่งไม่มีชีวิต เช่น เชื้อโรค แมลงศัตรูพืช ความเย็น และความร้อน ฮอร์โมนพืชเป็นหนึ่งในสารส่งสัญญาณที่มีบทบาทสำคัญในการเป็นตัวกลางในการปรับตัวต่อสภาวะเครียดและสิ่งเร้าต่างๆ โดยฮอร์โมนพืชไซโตไคนิน จิเบอเรลลิน อินโดลอะซิติก แอบไซซิก แจสโมนิก ซาลิไซลิก และเอทิลีน จัดเป็นสารส่งสัญญาณสำคัญที่เกี่ยวข้องต่อกระบวนการเหนี่ยวนำให้เกิดการต้านทานต่อสภาวะแล้ง จากงานวิจัยที่มีมาก่อนหน้านี้พบว่าแบคทีเรียทนแล้งมีเอนไซม์ ACC deaminase เพื่อลดปริมาณเอทิลีนในพืช โดยเฉพาะในข้าวระหว่างสภาวะแล้ง ผลงานวิจัยดังกล่าวนำไปสู่สมมติฐานที่ว่าแบคทีเรียเหล่านี้สามารถทำให้ข้าวปรับตัวให้ทนต่อสภาวะแล้งได้ อย่างไรก็ตาม การศึกษากลไกการเปลี่ยนแปลงของระดับฮอร์โมนพืชที่เกี่ยวข้องภายใต้สภาวะแล้งขณะที่มีแบคทีเรีย และไม่มีแบคทีเรียทนแล้งนั้นยังมีอยู่น้อย ดังนั้นการศึกษาเปลี่ยนแปลงของระดับฮอร์โมนพืชกลุ่มนี้ว่า แบคทีเรียนั้นมีศักยภาพในการช่วยให้ข้าวปรับตัวให้ทนต่อสภาวะแล้งได้อย่างไร ซึ่งจะช่วยสร้างความเข้าใจถึงกลไกการทนแล้งได้มากขึ้น และจะนำไปสู่การพัฒนาวิธีการตรวจวัดระดับของฮอร์โมนพืชที่เกี่ยวข้องหลายตัวในคราวเดียว เพื่อประโยชน์ต่อการนำไปใช้ในการคัดเลือกหัวเชื้อแบคทีเรียที่มีความสามารถในการทนแล้ง รวมไปถึงนำไปใช้ในการคัดเลือกสายพันธุ์ข้าวทนแล้ง ดังนั้นในเบื้องต้นงานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อตรวจวัดระดับการเปลี่ยนแปลงของฮอร์โมนพืชในข้าว ด้วยเทคนิค liquid chromatography-high resolution-mass spectrometry (LC-HRMS) ซึ่งเป็นวิธีที่มีความไวสูง ความแม่นยำสูง และความเร็วในการตรวจวัดสูง ผลจากการศึกษานี้จะทำให้ทราบถึงกลไกที่แบคทีเรียใช้เพื่อส่งเสริมให้พืชทนแล้งได้ โดยองค์ความรู้ดังกล่าว จะช่วยให้นักวิทยาศาสตร์เข้าใจถึงกลไกที่แบคทีเรียมีต่อข้าว และยังช่วยระบุการส่งเสริมซึ่งกันและกันระหว่างแบคทีเรียและข้าวต่อความทนแล้ง นอกจากนี้ฮอร์โมนพืชดังกล่าวยังสามารถใช้เป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพ เพื่อประโยชน์ในการพัฒนาชุดตรวจคัดเลือกสายพันธุ์ข้าวทนแล้งได้ในอนาคต ในระยะต่อมาผู้วิจัยจะใช้ความรู้เรื่องฮอร์โมนของข้าว ไปปรับใช้กับพืชเศรษฐกิจชนิดอื่นที่ศึกษาในโครงการวิจัยย่อย 1 และ 2 คือ ข้าวโพด อ้อย และทุเรียน เพื่อยืนยันประสิทธิภาพของหัวเชื้อแบคทีเรียทนแล้งต่อไป

แผนงานวิจัย

ผู้วิจัยจะทำการทดสอบการเปลี่ยนแปลงของระดับฮอร์โมนพืชที่สภาวะปกติ ที่สภาวะทนแล้งขณะที่มีแบคทีเรีย และไม่มีแบคทีเรียทนแล้ง ที่ระยะเวลาต่างๆ และที่สภาวะฟื้นตัว กับพืชเศรษฐกิจ 4 ชนิด ได้แก่ ข้าว ข้าวโพด อ้อย และทุเรียน โดยมีขั้นตอนอยู่ 3 ขั้นตอนหลักดังนี้

1. การเก็บตัวอย่างใบ และรากพืชที่สภาวะปกติ ที่สภาวะทนแล้งขณะที่มีแบคทีเรีย และไม่มีแบคทีเรียทนแล้ง ที่ระยะเวลาต่างๆ และที่สภาวะฟื้นตัว
2. การเตรียมตัวอย่างในรูปแบบที่เหมาะสมก่อนการสกัด และการสกัดสารในกลุ่มฮอร์โมนพืชจากตัวอย่าง

3. การวิเคราะห์เชิงคุณภาพ และปริมาณของฮอร์โมนพืชกลุ่มดังกล่าวในตัวอย่างพืช โดยเปรียบเทียบกับฮอร์โมนพืชมาตรฐาน รวมไปถึงการวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ระหว่างฮอร์โมนพืชกลุ่มดังกล่าว ต่อพืชในสภาวะต่าง ๆ



แผนงานวิจัยโครงการย่อยที่ 3