

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัย อภิปรายผลและข้อเสนอแนะ

สรุปผลการวิจัย

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อแยกและคัดเลือกแบคทีเรีย PGPR ที่มีความสามารถในการผลิตสารไซโตโรโพรจากดินบริเวณรอบรากมันสำปะหลัง จำแนกชนิดของแบคทีเรีย PGPR ที่สร้างสารไซโตโรโพร และเตรียมแบคทีเรียที่แยกได้ในรูปเจลเซลล์ตรึง (ปีที่ 1) ทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรีย PGPR ที่มีความสามารถในการผลิตสารไซโตโรโพรที่คัดแยกได้ ในการเพิ่มประสิทธิภาพการสังเคราะห์แสงและผลผลิตของมันสำปะหลัง โดยทดสอบในแปลงสาธิต (ปีที่ 2) ซึ่งสรุปผลการวิจัยดังนี้

1. การศึกษาการคัดแยก PGPR ที่มีความสามารถในการผลิตสารไซโตโรโพร

การศึกษาคัดแยกแบคทีเรีย PGPR ที่มีความสามารถในการผลิตสารไซโตโรโพรโดยเก็บตัวอย่างดินบริเวณรอบรากมันสำปะหลัง ในเขตพื้นที่อำเภอตำบลขุนทด จังหวัดนครราชสีมา ขนาดพื้นที่ 400 เมตร x 400 เมตร จำนวนทั้งสิ้น 30 ตัวอย่าง นำมาคัดแยกแบคทีเรียที่มีศึกษาคุณสมบัติการส่งเสริมการเจริญของพืชและผลิตสารไซโตโรโพร ได้แก่ phosphate solubilization assay และ siderophore production ผลการศึกษา Phosphate solubilization assay พบว่ามีแบคทีเรียที่แยกได้จากดินรอบรากมันสำปะหลัง 7 ไอโซเลท ที่ให้ลักษณะ halo zone รอบโคโลนี แต่มีเพียงไอโซเลทที่สามารถสร้าง siderophore โดยให้โคโลนีที่มีสีเหลือง - ส้มรอบโคโลนี (orange halo size) บนอาหารเลี้ยงเชื้อ CAS agar จากการศึกษา Siderophore production

2. การทดสอบคุณสมบัติการส่งเสริมการเจริญของพืช

การทดสอบคุณสมบัติ phosphate solubilization assay และ siderophore production ผลการศึกษา Phosphate solubilization assay พบว่ามีแบคทีเรียที่แยกได้จากดินรอบรากมันสำปะหลัง 7 ไอโซเลท ที่ให้ลักษณะ halo zone รอบโคโลนี แต่มีเพียง 1 ไอโซเลทที่สามารถสร้าง siderophore โดยให้โคโลนีที่มีสีเหลือง - ส้มรอบโคโลนี (orange halo size) บนอาหารเลี้ยงเชื้อ CAS agar จากการศึกษา Siderophore production

เมื่อนำแบคทีเรียไอโซเลทที่คัดเลือกได้มาศึกษาปริมาณการผลิตสารไซโตโรโพร โดยปริมาณไซโตโรโพรจะคำนวณออกมาในรูปของเปอร์เซ็นต์ siderophore units (% SU) พบว่า เปอร์เซ็นต์ siderophore units (% SU) เท่ากับ 60.2 %SU

3. การจำแนกชนิดของแบคทีเรีย PGPR ที่สร้างสารไซโตโรโพร

ผลการจำแนกแบคทีเรียไอโซเลท S9 ที่สามารถผลิตสารไซโตโรโพร โดยศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา และลักษณะทางชีวเคมีโดยใช้ Bergey's Manual of Systemic พบว่ามีลักษณะแกรมลบ รูปแท่ง (rod) oxidase test ให้ผลบวก ferment glucose ให้ผล non-acidic และ nitrate reduction

ให้ผลบวก จำแนกแบคทีเรียที่วัดความสามารถในการสร้างสารไซโตโครฟลูออโรฟอรด้วยเทคนิคทางอณูชีววิทยา โดยทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอส่วน Conserved region ของ 16S rRNA ของแบคทีเรีย ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะ และแยกดีเอ็นเอด้วยกระแสไฟฟ้าโดยใช้เครื่อง Electrophoresis ผลการศึกษาพบว่าสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอส่วน Conserved regions ของ 16S rRNA ได้ PCR Product ขนาด 750 bp นำไปวิเคราะห์ลำดับเบส เพื่อจัดจำแนกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการสร้างไซโตโครฟลูออโรฟอรในระดับสปีชีส์ โดยเปรียบเทียบลำดับเบส 16S rRNA ยีนของแบคทีเรียแต่ละไอโซเลทกับลำดับเบสอื่น ๆ ในฐานข้อมูล GenBank พบว่า ลำดับเบสของแบคทีเรียที่สร้างไซโตโครฟลูออโรฟอร มีความเหมือนกับลำดับเบสของ *Pseudomonas fluorescens* strain IGFR1_PSB_9a(2)_16S ถึง 99 %

4. การเตรียมแบคทีเรียในรูปเจลเซลล์ตรึง

เตรียมแบคทีเรียในรูปเจลเซลล์ตรึง โดยใช้โซเดียมอัลจิเนตความเข้มข้น 1, 2 และ 3 เปอร์เซ็นต์ หยอดส่วนผสมแต่ละความเข้มข้นลงในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 0.03, 0.05 และ 0.07 โมล นำไปอบที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 ชั่วโมง แล้วนำมาทดสอบการพองตัวโดยแช่ในน้ำกลั่น sterile พบว่า เมื่อเปรียบเทียบการพองตัวของเจลเซลล์ตรึง ที่ห่อหุ้มโซเดียมอัลจิเนตที่มีความเข้มข้นต่าง ๆ ได้แก่ 1, 2 และ 3 เปอร์เซ็นต์ เตรียมในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 0.03, 0.05 และ 0.07 โมล ในระยะเวลา 6, 12 ชั่วโมง และ 1, 2, 4 และ 7 วัน ตามลำดับ พบว่า การพองตัวของแบคทีเรียในรูปเจลเซลล์ตรึง ที่ห่อหุ้มด้วยโซเดียมอัลจิเนตความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ มีการพองตัวสูงสุด เมื่อเปรียบเทียบกับน้ำหนักการพองตัวของเจลปิด ซึ่งมีการพองตัวเท่ากับ 1.85 กรัม ในระยะเวลา 2 วัน แต่เจลปิดยังคงสภาพของเจลปิดได้ไม่แตกออกจากกัน ส่วนแบคทีเรียในรูปเจลเซลล์ตรึง ที่ห่อหุ้มด้วยโซเดียมอัลจิเนตความเข้มข้น 2 และ 3 เปอร์เซ็นต์ มีการพองตัวต่ำกว่าในทุกช่วงเวลา

5. การศึกษาปริมาณการปลดปล่อยของแบคทีเรีย

การศึกษาปริมาณการปลดปล่อยของแบคทีเรียในรูปเจลเซลล์ตรึง โดยใช้โซเดียมอัลจิเนตความเข้มข้น 1, 2 และ 3 เปอร์เซ็นต์ ศึกษาปริมาณการปลดปล่อยแบคทีเรียที่เวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง โดยนำมาทำการเจือจางซีสเฟนชั้นของเซลล์แบบ ten-fold dilution นับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต โดยวิธีการ spread plate ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient Agar พบว่า ในเจลเซลล์ตรึงที่ห่อหุ้มด้วยโซเดียมอัลจิเนตความเข้มข้น 1% ในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.03, 0.05 และ 0.07 โมล ที่เวลา 24 ชั่วโมง มีปริมาณการปลดปล่อยของแบคทีเรีย เท่ากับ 6.606, 6.322 และ 6.279 Log CFU/ml ตามลำดับ ที่เวลา 48 ชั่วโมง มีปริมาณการปลดปล่อยของแบคทีเรีย เท่ากับ 6.778, 6.763 และ 6.607 Log CFU/ml ตามลำดับ ที่เวลา 72 ชั่วโมง มีปริมาณการปลดปล่อยของแบคทีเรียเท่ากับ 6.663, 6.613 และ 6.82 Log CFU/ml ตามลำดับ ส่วนในเจลเซลล์ตรึงที่ห่อหุ้มด้วยโซเดียมอัลจิเนตความเข้มข้น 2% ในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.03, 0.05 และ 0.07 โมล ที่ระยะเวลา 24 ชั่วโมง มีปริมาณการปลดปล่อยของแบคทีเรีย เท่ากับ 6.255, 6.954 และ 6.204 Log CFU/ml ตามลำดับ ที่เวลา 48 ชั่วโมง มีปริมาณการปลดปล่อยของแบคทีเรีย เท่ากับ 6.881, 6.591 และ 6.813 Log CFU/ml ตามลำดับ ที่เวลา 72 ชั่วโมง มีปริมาณการปลดปล่อยของแบคทีเรีย เท่ากับ 6.176, 6.415 และ 6.568 Log CFU/ml ตามลำดับ ในเจลเซลล์ตรึงที่ห่อหุ้มด้วยโซเดียมอัลจิเนตความเข้มข้น 3% ในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.03, 0.05 และ 0.07 โมล ที่เวลา 24 ชั่วโมง มีปริมาณการปลดปล่อยของ

แบคทีเรีย เท่ากับ 6.041, 6.580 และ 6.763 Log CFU/ml ตามลำดับ ที่เวลา 48 ชั่วโมง มีปริมาณการปลดปล่อยของแบคทีเรีย เท่ากับ 7.354, 6.653 และ 6.699 Log CFU/ml ตามลำดับ ที่เวลา 72 ชั่วโมง มีปริมาณการปลดปล่อยของแบคทีเรีย เท่ากับ 6.491, 6.959 และ 6.785 Log CFU/ml ตามลำดับ

6. การศึกษาการรอดชีวิตของแบคทีเรียในรูปเจลเซลล์ตรึงในสถานะต่าง ๆ

ในการเตรียมแบคทีเรียในรูปเจลเซลล์ตรึง ในขั้นตอนการทดสอบการรอดชีวิตของแบคทีเรียพบว่า สภาวะที่เหมาะสมที่สุดในการรอดชีวิตของแบคทีเรียในรูปเจลเซลล์ตรึง ที่พีเอช 6 อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ในช่วงระยะเวลา 4 วัน โดยในสภาวะที่ค่าพีเอช 6 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสระยะเวลา 2, 4 และ 6 วัน มีการรอดชีวิตของแบคทีเรียเท่ากับ 6.114, 6.447 และ 5.580 LogCFU/ml ตามลำดับ ในสภาวะพีเอช 6 ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 2, 4 และ 6 วัน มีจำนวนการรอดชีวิตของแบคทีเรียเท่ากับ 5.398, 6.778 และ 5.732 LogCFU/ml ตามลำดับ ในสภาวะที่ค่าพีเอช 8 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2, 4 และ 6 วัน มีการรอดชีวิตของแบคทีเรียเท่ากับ 5.477, 6.462 และ 5.756 LogCFU/ml และในสภาวะที่ค่าพีเอช 8 ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2, 4 และ 6 วันมีการรอดชีวิตของแบคทีเรียเท่ากับ 5.732, 5.806 และ 5.968 LogCFU/ml ตามลำดับ ดังจะเห็นได้ว่า ในสภาวะที่ค่าพีเอช 6 อุณหภูมิ 37 และ 45 องศาเซลเซียส และค่าพีเอช 8 อุณหภูมิ 37 และ 45 องศาเซลเซียส แบคทีเรียมีจำนวนการรอดชีวิตมากที่สุดในระยะเวลา 4 วัน และจำนวนการรอดชีวิตจะลดน้อยลงในเวลา 6 วัน

การอภิปรายผล

จากวิจัยครั้งนี้สามารถแยกแบคทีเรีย PGPR ที่มีความสามารถในการผลิตสารไซโตไคน์ได้ 7 ไอโซเลท การศึกษา Phosphate solubilization assay พบว่า มีแบคทีเรียที่แยกได้จากดินรอบรากมันสำปะหลัง 7 ไอโซเลท ที่ให้ลักษณะ halo zone รอบโคโลนี จากการศึกษา Siderophore production พบว่า มีเพียง 1 ไอโซเลทที่สามารถสร้าง siderophore โดยให้โคโลนีที่มีสีเหลือง – ส้ม รอบโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ CAS agar ในการวิจัยครั้งนี้ผู้วิจัยได้นำแบคทีเรีย PGPR จำนวน 1 ไอโซเลท ที่มีความสามารถในการสร้างสารไซโตไคน์ เมื่อทำ PCR Product ส่วนยีน 16s rRNA ของแบคทีเรีย PGPR ไอโซเลท ไปวิเคราะห์ลำดับเบสและนำไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลใน NCBI พบว่าลำดับเบสที่วิเคราะห์ได้มีความคล้ายคลึงกับลำดับเบสของแบคทีเรีย *Pseudomonas fluorescens* strain IGFR1_PSB_9a(2)_16S ถึง 99 % ที่ผ่านมามีการศึกษาของ ศตวรรษ ใจชื่อและคณะ (2559) ซึ่งศึกษาการสกัดสารพอลิแซคคาไรด์จาก *P. fluorescens* SP007s พบว่า สารพอลิแซคคาไรด์ที่สกัดได้ มีสมบัติในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของมันสำปะหลัง และควบคุมโรครากและหัวเน่า ผ่านการสะสม indole-3-acetic acid (IAA) ภายในลำต้น เพื่อให้รอดจากการเข้าทำลายของ *Pythium* sp. ซึ่งเป็นสาเหตุโรครากและหัวเน่าในมันสำปะหลัง ที่มีความสำคัญและส่งผลกระทบต่อผลผลิตมันสำปะหลังในวงกว้าง Cheng, X. และคณะ (2016) ศึกษาการระบุสารเมตาโบไลต์และยีนใน *P. fluorescens* strain SBW25 (Pf.SBW25) และ *P. fluorescens* strain SS101 (Pf.SS101) และบทบาทของแบคทีเรียในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชและการควบคุมทางชีวภาพ จากการศึกษาพบว่า ยีน GacS / GacA มีบทบาทสำคัญในการเป็นเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ในการควบคุมโรคพืช การส่งเสริมการเจริญเติบโตโดย *P. fluorescens* มีความ

เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์และการขนส่งออกซิน ในการศึกษาครั้งนี้ คณะผู้วิจัยจึงนำแบคทีเรียที่แยกได้ มาเตรียมให้อยู่ในรูปเจลเซลล์ตรึง เพื่อป้องกันเซลล์ของแบคทีเรียไม่ให้เสียคุณสมบัติในการทำงาน การศึกษาการรอดตัวของเจลเซลล์ตรึง ปริมาณการปลดปล่อยของแบคทีเรีย และการรอดชีวิตของ แบคทีเรียในรูปเจลเซลล์ตรึงในสภาวะต่าง ๆ เพื่อนำไปประยุกต์ใช้ในแปลงทดลองต่อไป จากการศึกษา การรอดตัวของแบคทีเรียในรูปเจลเซลล์ตรึง ที่ห่อหุ้มด้วยโซเดียมอัลจิเนตความเข้มข้น 2 และ 3 เปอร์เซ็นต์ มีการรอดตัวต่ำกว่าในทุกช่วงเวลา ขณะที่เจลเซลล์ตรึง ที่ห่อหุ้มด้วยโซเดียมอัลจิเนตความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ มีการรอดตัวสูงสุด เมื่อเปรียบเทียบกับน้ำหนักการรอดตัวของเจลปิด ซึ่งมีการรอดตัว เท่ากับ 1.85 กรัม ในระยะเวลา 2 วัน การศึกษาปริมาณการปลดปล่อยของแบคทีเรียพบว่า การห่อหุ้ม แบคทีเรียในรูปเจลเซลล์ตรึงที่ระดับความเข้มข้นของโซเดียมอัลจิเนต 3 เปอร์เซ็นต์ ในสารละลาย แคลเซียมคลอไรด์ 0.05 โมล จะให้ปริมาณการปลดปล่อยของแบคทีเรียสูงที่สุด (การรอดชีวิตสูง) ในช่วง เวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง โดยมีปริมาณการปลดปล่อยของแบคทีเรียเท่ากับ 6.580, 6.653 และ 6.959 Log CFU/ml ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าระดับความเข้มข้นของโซเดียมอัลจิเนต 3 เปอร์เซ็นต์ ใน สารละลายแคลเซียมคลอไรด์ 0.05 โมล มีความเหมาะสมในการห่อหุ้มเซลล์ ช่วยการรอดชีวิตของ แบคทีเรีย เพื่อนำไปประยุกต์ใช้ในแปลงมันสำปะหลัง นอกจากนี้การศึกษากการรอดชีวิตในสภาวะต่าง ๆ พบว่า ในสภาวะที่ค่าพีเอช 6 อุณหภูมิ 37 และ 45 องศาเซลเซียส และค่าพีเอช 8 อุณหภูมิ 37 และ 45 องศาเซลเซียส แบคทีเรียมีจำนวนการรอดชีวิตมากที่สุดในระยะเวลา 4 วัน และจำนวนการรอดชีวิตจะลด น้อยลงในเวลา 6 วัน ที่ผ่านมามีการศึกษาของ อภิชาติ อุไพจิตร และคณะ (2558) พบว่า การห่อหุ้มเซลล์ โดยใช้อัลจิเนตความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ สารละลายแคลเซียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.1 โมล แบคทีเรียมี การรอดชีวิตในสภาวะจำลองของกระเพาะอาหารสูงที่สุด โดยสันนิษฐานว่าระดับความเข้มข้นของอัลจิเนต ที่เพิ่มขึ้นและระดับสารละลายแคลเซียมคลอไรด์มีผลต่อการรอดชีวิตของแบคทีเรีย และจากการศึกษา สภาวะที่เหมาะสมในการพัฒนาแบคทีเรียในรูปเจลเซลล์ตรึง พบว่าแบคทีเรียสามารถรอดชีวิตในสภาวะที่ ค่าพีเอช เท่ากับ 6 ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียสสูงที่สุด และสามารถรอดชีวิตในสภาวะอื่น ๆ ได้ ซึ่ง อุณหภูมิในดินของประเทศไทยที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของจุลินทรีย์อยู่ในช่วงอุณหภูมิ 25 - 35 องศา เซลเซียส และมีค่าพีเอชของดิน ระหว่าง 4.5 - 9 (โอบาส วงศ์ทางประเสริฐ, 2558) ดังนั้นจึงมีความ เหมาะสมในการนำไปประยุกต์ใช้เพื่อการเพิ่มประสิทธิภาพการสังเคราะห์แสงและผลผลิตมันสำปะหลังใน พื้นที่เกษตรกรรมต่อไป

ข้อเสนอแนะ

จากการศึกษาการเพิ่มประสิทธิภาพการสังเคราะห์แสงและผลผลิตมันสำปะหลัง โดยแบคทีเรีย ส่งเสริมการเจริญของพืชที่สามารถผลิตสารไซโตเคอโรฟออร์

1. ควรนำแบคทีเรียส่งเสริมการเจริญของพืชที่สามารถผลิตสารไซโตเคอโรฟออร์สายพันธุ์ที่ได้จาก การศึกษานี้ไปทดสอบในสภาพแปลงปลูกของเกษตรกร และศึกษาการปรับใช้ให้เหมาะสม
2. ควรศึกษาการแบคทีเรียเจลเซลล์ตรึงให้อยู่ในรูปแบบชีวภัณฑ์แห้ง เพื่อให้เกษตรกรนำไปใช้ได้ สะดวก