



รายงานผลการวิจัย

เรื่อง

การแยกและคัดเลือกรจุลินทรีย์ที่ช่วยส่งเสริมศักยภาพในการผลิตข้าวอินทรีย์
เพื่อประยุกต์ใช้ในระบบการปลูกข้าวแบบประณีต

Isolation and screening of microorganisms for increasing potential
of organic rice agriculture production for application in
system rice intensification (SRI)

โดย

สมคิด คีจวัง และ วราภรณ์ สงวนพงษ์

มหาวิทยาลัยแม่โจ้

2558



รายงานผลการวิจัย

เรื่อง การแยกและคัดเลือกรจุลินทรีย์ที่ช่วยส่งเสริมศักยภาพในการผลิตข้าวอินทรีย์
เพื่อประยุกต์ใช้ในระบบการปลูกข้าวแบบประณีต

Isolation and screening of microorganisms for increasing potential
of organic rice agriculture production for application in system rice
intensification(SRI)

ได้รับการจัดสรรงบประมาณวิจัย ประจำปี 2558

จำนวน 265,600 บาท

หัวหน้าโครงการ

นางสาวสมคิด

ดีจริง

ผู้ร่วมโครงการ

นางวรางคณา

สงวนพงษ์

งานวิจัยเสร็จสิ้นสมบูรณ์

9/08/2559

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยโครงการวิจัยเรื่อง การแยกและคัดเลือกลูกลิ้นทรีที่ช่วยส่งเสริมศักยภาพในการผลิตข้าวอินทรีย์เพื่อประยุกต์ใช้ในระบบการปลูกข้าวแบบประณีต ขอขอบคุณ ทุนอุดหนุนการวิจัยจากสำนักวิจัยและส่งเสริมวิชาการการเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้ ประจำปีงบประมาณ 2558 และสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.) และขอขอบคุณ คณะวิทยาศาสตร์ รวมทั้งห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา มหาวิทยาลัยแม่โจ้ ที่อนุเคราะห์สถานที่ เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการดำเนินการวิจัยจนเสร็จสิ้นสมบูรณ์ และขอขอบคุณนักศึกษาสาขาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ ที่มีส่วนช่วยทำให้งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี

คณะผู้วิจัย

สิงหาคม 2559

สารบัญ

	หน้า
สารบัญตาราง	ข
สารบัญภาพ	ค
บทคัดย่อ	1
Abstract	2
คำนำ	3
วัตถุประสงค์ของการวิจัย	5
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	6
การตรวจเอกสาร	7
วิธีการวิจัย	31
ผลการวิจัย	39
วิจารณ์ผลการวิจัย	70
สรุปผลการวิจัย	80
เอกสารอ้างอิง	82
ภาคผนวก	93

ข

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 1 ตัวอย่างจุลินทรีย์และสารที่ผลิตโดยจุลินทรีย์ที่อยู่บริเวณรอบรากพืช	12
ตารางที่ 2 ระดับความรุนแรงของความเป็นกรด-ด่างของดิน	26
ตารางที่ 3 ส่วนประกอบของปฏิกิริยาการเพิ่มปริมาณยีน 16S rRNA	38
ตารางที่ 4 โปรแกรมการทำงานของเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ	38
ตารางที่ 5 จำนวนไอโซเลทของแบคทีเรียที่แยกได้จากดินรอบรากข้าวจาก แปลงข้าวเกษตรอินทรีย์ระยะเวลาด่าง ๆ	39
ตารางที่ 6 จำนวนแบคทีเรียที่แยกได้จากชิ้นส่วนของข้าวจากแปลง เกษตรอินทรีย์ระยะเวลา 1, 5 และ มากกว่า 10 ปี บนอาหารเลี้ยงเชื้อ 4 ชนิด	40
ตารางที่ 7 ผลการละลายฟอสเฟตขึ้นต้นบนอาหารแข็ง PVK agar	42
ตารางที่ 8 ร้อยละของแบคทีเรียที่แยกจากแหล่งต่าง ๆ ที่เกิดวงใสบนอาหาร PVK agar	42
ตารางที่ 9 ผลปริมาณการละลายฟอสเฟตของแบคทีเรียในอาหารเหลว PVK	43
ตารางที่ 10 ลักษณะการเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อและลักษณะทางสัณฐาน วิทยาของแบคทีเรียที่ละลายฟอสเฟตได้ดี	45
ตารางที่ 11 ผลการทดสอบคุณลักษณะทางสรีรวิทยาและชีวเคมีของ แบคทีเรียที่ละลายฟอสเฟตได้ดี	53
ตารางที่ 12 ผลการจำแนกแบคทีเรียเมื่อนำลำดับเบสบน 16S rDNA ไปเทียบกับฐานข้อมูลใน GenBank ของแบคทีเรียที่ละลายฟอสเฟตได้ดี	56
ตารางที่ 13 ผลการคัดเลือกแบคทีเรียที่สามารถผลิตกรดอินโดลอะซิติกขึ้นต้น	58
ตารางที่ 14 ร้อยละของแบคทีเรียที่สามารถผลิต IAA ขึ้นต้น	58
ตารางที่ 15 ผลการวิเคราะห์ปริมาณกรดอินโดลอะซิติก ในอาหารเหลวของแบคทีเรียที่คัดเลือกได้	59
ตารางที่ 16 ลักษณะการเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อและลักษณะ ทางสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียที่ผลิตกรดอินโดลอะซิติกได้สูง	61
ตารางที่ 17 ผลการทดสอบคุณลักษณะทางสรีรวิทยาและชีวเคมี ของแบคทีเรียที่ผลิตกรดอินโดลอะซิติกได้สูง	67

ตารางที่ 18 ผลการจำแนกแบคทีเรียเมื่อนำลำดับเบสบน 16S rRNA	
ไปเทียบกับฐานข้อมูลใน GenBank ที่ผลิตกรดอินโดลอะซิติกได้สูง	68
ตารางที่ 19 แบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่ทั้งผลิตกรดอินโดลอะซิติกและละลายฟอสเฟตได้	69
ตารางภาคผนวก จ 1 ผลการคัดเลือกเชื้อที่สามารถละลายฟอสเฟตได้ขั้นต้น	
บนอาหารแข็ง PVK agar	127
ตารางภาคผนวก จ 2 ผลการวิเคราะห์ปริมาณฟอสเฟต	131

สารบัญภาพ

	หน้า
ภาพที่ 1 กลไกของการผลิตสารเร่งการเจริญเติบโตของพืชจากแบคทีเรียที่อยู่รอบรากพืช	11
ภาพที่ 2 แบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่ถูกแยกจากส่วนต่างๆ ของข้าว	16
ภาพที่ 3 ความสัมพันธ์ของจุลินทรีย์เอนโดไฟท์และการประยุกต์ใช้ประโยชน์	16
ภาพที่ 4 บทบาทของแบคทีเรียละลายฟอสเฟต	20
ภาพที่ 5 ชนิดของสารอินทรีย์และสารอนินทรีย์ที่ผลิตโดยจุลินทรีย์ที่ละลายฟอสเฟตในดิน	21
ภาพที่ 6 โครงสร้างทางเคมีของออกซินธรรมชาติและออกซินสังเคราะห์	23
ภาพที่ 7 วิธีการสังเคราะห์กรดอินโดลอะซิติก	24
ภาพภาคผนวก ข 1 กราฟมาตรฐานฟอสฟอรัส	99
ภาพภาคผนวก ข 2 กราฟมาตรฐานกรดอินโดลอะซิติก	99
ภาพภาคผนวก ค 1 การเจริญของเชื้อเอนโดไฟท์จากชิ้นส่วนของข้าว บนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่างๆ	100
ภาพภาคผนวก ค 2 ลักษณะการเกิดวงใสรอบโคโลนีของแบคทีเรียบนอาหาร PVK และการวิเคราะห์ปริมาณฟอสฟอรัส	100
ภาพภาคผนวก ค 3 การทดสอบการผลิตกรดอินโดลอะซิติกขั้นต้นและ การวิเคราะห์ปริมาณกรดอินโดลอะซิติก	101
ภาพภาคผนวก ง 1 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของแบคทีเรีย S68 ที่ตรงกับเบสของ <i>Burkholderia cenocepacia</i>	102
ภาพภาคผนวก ง 2 ผลการเทียบเบสของแบคทีเรีย S69 ที่ตรงกับเบสของ <i>Burkholderia cenocepacia</i>	103
ภาพภาคผนวก ง 3 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของแบคทีเรีย S83 ที่ตรงกับเบสของ <i>Burkholderia cenocepacia</i>	104
ภาพภาคผนวก ง 4 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของแบคทีเรีย S84 ที่ตรงกับเบสของ <i>Burkholderia cenocepacia</i>	105
ภาพภาคผนวก ง 5 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของแบคทีเรีย S91	

ที่ตรงกับเบสของ <i>Burkholderia cenocepacia</i>	106
ภาพภาคผนวก ง 6 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของแบคทีเรีย S92	
ที่ตรงกับเบสของ <i>Bacillus thuringiensis</i>	107
ภาพภาคผนวก ง 7 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อแบคทีเรียรหัส RRSTSA 2	
ที่ตรงกับเบส <i>Burkholderia vietnamensis</i>	108
ภาพภาคผนวก ง 8 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อแบคทีเรียรหัส RRSPVK6-1	
ที่ตรงกับเบส <i>Acinetobacter sp.</i>	109
ภาพภาคผนวก ง 9 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อแบคทีเรียรหัส RRSTSA3	
ที่ตรงกับเบส <i>Klebsiella pneumonia</i>	110
ภาพภาคผนวก ง 10 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อแบคทีเรียรหัส RRPVK-4	
ที่ตรงกับเบสของ <i>Paenibacillus favisporus</i>	111
ภาพภาคผนวก ง 11 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อแบคทีเรียรหัส RSPVK-2	
ที่ตรงกับเบสของ <i>Burkholderia cenocepacia</i>	112
ภาพภาคผนวกที่ ง 12 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อแบคทีเรียรหัส RRTSA-5	
ที่ตรงกับเบสของ <i>Bacillus pumilus</i>	113
ภาพภาคผนวก ง 13 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อแบคทีเรียรหัส RRTSA-6	
ที่ตรงกับเบสของ <i>Paenibacillus alvei</i>	114
ภาพภาคผนวก ง 14 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อแบคทีเรียรหัส W-RR	
ที่ตรงกับเบสของ <i>Bacillus pumilus</i>	115
ภาพภาคผนวก ง 15 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อแบคทีเรียรหัส W-RS	
ที่ตรงกับเบสของ <i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	116
ภาพภาคผนวก ง 16 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อแบคทีเรียรหัส S58	
ที่ตรงกับเบสของ <i>Bacillus sp.</i>	117
ภาพภาคผนวก ง 17 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อแบคทีเรียรหัส S65	
ที่ตรงกับเบสของ <i>Paenibacillus alvei</i>	118
ภาพภาคผนวก ง 18 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อแบคทีเรียรหัส S203	

ที่ตรงกับเบสของ <i>Paenibacillus alvei</i>	119
ภาพภาคผนวก ง 19 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อแบคทีเรียรหัส S230	
ที่ตรงกับเบสของ <i>Paenibacillus alvei</i>	120
ภาพภาคผนวก ง 20 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อแบคทีเรียรหัส S232	
ที่ตรงกับเบสของ <i>Paenibacillus alvei</i>	121
ภาพภาคผนวก ง 21 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อแบคทีเรียรหัส S238	
ที่ตรงกับเบสของ <i>Paenibacillus alvei</i>	122
ภาพภาคผนวก ง 22 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อแบคทีเรียรหัส ISP2RR1	
ที่ตรงกับเบสของ <i>Chryseobacterium kwangyangense</i>	123
ภาพภาคผนวก ง 23 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อแบคทีเรียรหัส RRSPCA	
ที่ตรงกับเบสของ <i>Pseudomonas sp.</i>	124
ภาพภาคผนวก ง 24 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อแบคทีเรียรหัส LRSPCA2	
ที่ตรงกับเบสของ <i>Chryseobacterium kwangyangense</i>	125
ภาพภาคผนวก ง 25 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของแบคทีเรีย RRTSA-6	
ที่ตรงกับเบสของ <i>Paenibacillus alvei</i>	126

การแยกและคัดเลือกรจุลินทรีย์ที่ช่วยส่งเสริมศักยภาพในการผลิตข้าวอินทรีย์
เพื่อประยุกต์ใช้ในระบบการปลูกข้าวแบบประณีต

Isolation and screening of microorganisms for increasing potential of
organic rice agriculture production for application in
system rice intensification(SRI)

สมคิด ดีจิง¹ และ วารangkana สงวนพงษ์²

Somkid Deejing¹ and Varangkana Sanguanpong²

¹คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ จ. เชียงใหม่ 50290

²กลุ่มวิเคราะห์ดิน สำนักพัฒนาที่ดินเขต 6 กรมพัฒนาที่ดิน จ. เชียงใหม่ 50180

บทคัดย่อ

จุลินทรีย์ที่อยู่บริเวณรอบรากข้าวและแบคทีเรียเอนโดไฟต์ที่มีบทบาทสำคัญที่ช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช งานวิจัยนี้ ได้แยกแบคทีเรียเอนโดไฟต์จากต้นข้าวจากแปลงเกษตรอินทรีย์ และแบคทีเรียจากน้ำล้างสุดท้ายของน้ำเชื้อบริเวณพื้นผิว รวมทั้งแบคทีเรียจาก stock culture ของห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา มหาวิทยาลัยแม่โจ้ รวมทั้งหมด 487 ไอโซเลต แล้วคัดเลือกแบคทีเรียที่ละลายฟอสเฟตและผลิตกรดอินโดลอะซิติก พบว่า มีแบคทีเรียละลายฟอสเฟตได้ดี ได้แก่ S83, S69, S68, S92, S84, S91, W-RS, RSPVK-2, RRSTSA3, W-RR, RRSPVK6-1, RRPVK-4, RRTSA-5 และ RRTSA6 โดยละลายฟอสเฟตได้ 776.57, 766.35, 756.92, 724.69, 690.88, 620.13, 294.39, 191.78, 97.88, 97.68, 92.79, 92.65, 91.80 และ 73.22 มิลลิกรัมฟอสเฟตต่อลิตร ตามลำดับ การจำแนกชนิดของแบคทีเรียละลายฟอสเฟตโดยการหาลำดับเบสของยีนส่วน 16S rRNA พบว่า เป็น Burkholderia cenocepacia, Bacillus thuringiensis, Burkholderia vietnamensis, Acinetobacter sp., Klebsiella pneumonia, Paenibacillus favisporus, Burkholderia cenocepacia, Bacillus pumilus และ Paenibacillus alvei และมีแบคทีเรียที่ผลิตกรดอินโดลอะซิติก ได้แก่ ISP2RR1, S58, S203, S65, S238, S232, RRSPCA, S230, RRTSA6, LRSPCA2 โดยผลิตได้ 53.29, 28.68, 25.02, 23.07, 21.85, 21.12, 20.93, 20.63, 20.55 และ 7.11 และ มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ การจำแนกชนิดของแบคทีเรียผลิตกรดอินโดลอะซิติกโดยการหาลำดับเบสของยีนส่วน 16S rRNA พบว่า แบคทีเรีย Bacillus sp., Paenibacillus alvei, Chryseobacterium kwangyangense และ Pseudomonas sp. ซึ่งแบคทีเรียละลายฟอสเฟตและผลิตกรดอินโดลอะซิติกที่คัดเลือกได้ในงานวิจัยนี้ น่าจะมีศักยภาพนำไปประยุกต์ใช้กับระบบเกษตรอินทรีย์ รวมทั้งส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชที่อยู่ในภาวะภูมิอากาศเปลี่ยนแปลงได้

คำสำคัญ: การแยก การคัดเลือก แบคทีเรียรอบรากพืช แบคทีเรียเอนโดไฟต์ แบคทีเรียละลายฟอสเฟต แบคทีเรียผลิตกรดอินโดลอะซิติก

Abstract

Rhizobacteria and endophytic bacteria play an important role in promoting the growth of plants. The aims of this research were to isolate endophytic bacteria from organic rice, bacteria from surface sterile water and bacteria from the stock culture of the microbiology laboratory in Maejo University include 487 isolates. The screening of phosphate solubilizing and indole-3-acetic acid (IAA) producing bacteria were examined. It was found that bacteria S83, S69, S68, S92, S84, S91, W-RS, RSPVK-2, RRSTSA3, W-RR, RRSPVK6-1, RRPVK-4, RRTSA-5 and RRTSA6 solubilized phosphate at 776.57, 766.35, 756.92, 724.69, 690.88, 620.13, 294.39, 191.78, 97.88, 97.68, 92.79, 92.65, 91.80 and 73.22 mgP/L, respectively. The 16S rRNA genes sequencing of phosphate solubilizing bacteria had similar to Burkholderia cenocepacia, Bacillus thuringiensis, Burkholderia vietnamensis, Acinetobacter sp., Klebsiella pneumoniae Paenibacillus favisporus, Burkholderia cenocepacia, Bacillus pumilus Paenibacillus alvei. The indole-3-acetic acid producing bacteria were ISP2RR1, S58, S203, S65, S238, S232, RRSPCA, S230, RRTSA6, LRSPCA2 produced IAA at 53.29, 28.68, 25.02, 23.07, 21.85, 21.12, 20.93, 20.63, 20.55 and 7.11 mg/L, respectively. The indole acetic acid producing bacteria had 16S rRNA gene sequence similar to Bacillus sp., Paenibacillus alvei and Chryseobacterium kwangyangense, Pseudomonas sp. The results obtained in this study demonstrated phosphate solubilizing bacteria and indole acetic acid producing bacteria had the potentiality for application to organic farming and plants growth promoting in climate change condition.

Key words: isolation, screening, rhizobacteria, endophytic bacteria, phosphate solubilizing bacteria, indole acetic acid producing bacteria

คำนำ

การผลิตข้าวอินทรีย์โดยระบบการปลูกแบบประณีต หรือการปลูกข้าวต้นเดี่ยว (System rice intensification, SRI) เป็นทางเลือกที่น่าสนใจเพื่อช่วยแก้ปัญหาในด้านผลผลิตต่ำ รวมทั้งยังช่วยแก้ปัญหาภาวะภัยแล้งที่เกิดจากภาวะการเปลี่ยนแปลงภูมิอากาศของโลก รวมทั้ง การทำเกษตรในพื้นที่สูงที่มีปริมาณน้ำน้อย เนื่องจากระบบการปลูกข้าวดังกล่าวเป็นระบบที่มีการใช้น้ำปริมาณน้อยมาก และสิ่งสำคัญอย่างยิ่งคือระบบการปลูกข้าวแบบประณีตช่วยลดปริมาณก๊าซมีเทนซึ่งก่อให้เกิดภาวะโลกร้อนเป็นอย่างมาก ซึ่งระบบการเกษตรแบบประณีตเน้นการจัดการสภาพแวดล้อมที่สนับสนุนการทำงานขององค์ประกอบต่าง ๆ ของดินข้าวให้เกิดการเกื้อหนุนซึ่งกันและกันจนแสดงออกถึงศักยภาพอย่างเต็มที่ ระบบการปลูกข้าวแบบประณีตมีข้อดีที่สำคัญคือ สามารถประหยัดน้ำ ได้ผลผลิตสูงกว่าการปลูกข้าวแบบมีน้ำขัง และที่สำคัญอย่างยิ่งคือ ช่วยลดการปลดปล่อยก๊าซมีเทนสู่สิ่งแวดล้อมได้เป็นอย่างดี นอกจากนี้ ยังได้ปริมาณผลผลิตสูงกว่าการปลูกข้าวแบบมีน้ำขังทั่วไป ระบบการปลูกข้าวแบบประณีต มีการจัดการพืช จัดการดิน และการจัดการน้ำร่วมกัน โดยมีการควบคุมน้ำในแปลงนาในช่วงที่ต้นข้าวกำลังเจริญเติบโตให้น้ำโดยการปล่อยให้น้ำเข้าออกแปลงนาให้มิน้ำเปียกสลับกับแห้ง เมื่อต้นข้าวเริ่มออกกรวงแล้วปล่อยให้น้ำขังไว้ในแปลงนาข้าวและปล่อยน้ำออกก่อนเก็บเกี่ยว หรือช่วงฝนตกปริมาณมากก็ต้องระบายน้ำออกจากแปลงนาข้าว ผลของการระบายน้ำเข้า-ออก จากแปลงนาข้าวของระบบการปลูกข้าวแบบประณีตอาจมีข้อเสียคือ ทำให้เกิดการสูญเสียธาตุอาหารสำคัญ อินทรีย์วัตถุผิวหน้าดิน รวมทั้ง จุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ในดิน ซึ่งเป็นส่วนที่มีความอุดมสมบูรณ์กว่าส่วนอื่น ๆ รวมทั้งจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ในดินจากการระบายน้ำได้ ซึ่งอาจส่งผลกระทบต่อผลผลิตโดยรวมได้ ซึ่ง Takamura and Kubota (1977) รายงานว่า การไหลบ่าของน้ำมีการสูญเสียในโตรเจนที่ใส่ให้ข้าวในญี่ปุ่นประมาณ 13-16 เปอร์เซ็นต์ ของจำนวนปุ๋ยที่ใส่ให้แก่ข้าว และจากรายงานของ Singh et al. (1978) พบว่า การสูญเสียในโตรเจนจากการไหลเข้าออกของน้ำในนาข้าว มากกว่า 10 % ของปุ๋ยในโตรเจนที่ใส่ ขึ้นอยู่กับ ปริมาณน้ำที่ระบายออกจากผิวดิน ส่งผลให้มีการสูญเสียปริมาณในโตรเจนเฉลี่ย 0.9 กิโลกรัมต่อไร่ จึงมีการเพิ่มปริมาณในโตรเจน 0.4 กิโลกรัมต่อไร่ ในการปลูกข้าวแบบประณีต มักพบปัญหาของการเกิดวัชพืชในแปลงนาข้าว เนื่องจากมีการให้น้ำแบบเปียกและแห้งสลับกัน นอกจากนี้ อาจทำให้สูญเสียแร่ธาตุสำคัญและจุลินทรีย์ไป

แบคทีเรียละลายฟอสเฟตและแบคทีเรียที่ผลิตกรดอินทรีย์ละลายฟอสเฟตจัดเป็นแบคทีเรียที่ส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช (plant growth promoting bacteria) (Souza et al. (2015) ดังนั้น

ผู้วิจัยจึงสนใจแยกและคัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีอยู่แล้วในธรรมชาติในแปลงนาข้าวอินทรีย์ โดยเฉพาะจุลินทรีย์ที่มีบทบาทช่วยเพิ่มเพิ่มธาตุหลักให้แก่ดิน เช่น แบคทีเรียช่วยละลายฟอสเฟต (ฟอสเฟตมีความสำคัญต่อพืชคือมีผลต่อการเจริญของรากและส่งเสริมการแตกกอของต้นข้าว) และจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการผลิตสารส่งเสริมการเจริญของต้นข้าว เช่น ฮอร์โมนพืชกลุ่มออกซิน (auxin) หรือกรดอินโดลอะซิติก (indole acetic acid, IAA) (กรดอินโดลอะซิติกปริมาณที่เหมาะสมมีผลส่งเสริมการเจริญของต้นข้าวโดยส่งเสริมการเกิดรากและการพัฒนาในระยะแรกของรากจะช่วยให้เกิดรากได้เร็วขึ้นและมากขึ้น แต่ถ้าความเข้มข้นสูงมีคุณสมบัติเป็นสารกำจัดวัชพืช (herbicides) ผู้ทดลองจึงสนใจคัดเลือกจุลินทรีย์พวกที่ละลายฟอสเฟตและผลิตกรดอินโดลอะซิติกได้ ซึ่งอาจนำไปประยุกต์ใช้ร่วมกับแผนดินที่เป็นแหล่งเพิ่มไนโตรเจนจากแหล่งธรรมชาติให้แก่พืชในนาข้าวอินทรีย์ และทำการคัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการผลิตกรดอินโดลอะซิติกได้ปริมาณสูง ซึ่งผู้วิจัยเห็นว่า น่าจะเป็นแนวทางที่จะช่วยเพิ่มศักยภาพในการผลิตข้าวอินทรีย์โดยใช้ระบบการปลูกข้าวแบบประณีต ซึ่งจะช่วยส่งเสริมแรงจูงใจ เพื่อให้เกษตรกรที่ผลิตนาข้าวอินทรีย์อยู่แล้ว หันมาให้ความสนใจการปลูกข้าวแบบประณีตมากขึ้น ซึ่งจะช่วยในการเพิ่มผลผลิตและใช้วิธีการทางชีวภาพในการกำจัดวัชพืชเพื่อลดการใช้สารเคมีทางการเกษตรที่ตกค้างในสิ่งแวดล้อม และที่สำคัญที่สุดคือช่วยลดปริมาณก๊าซมีเทนที่ส่งผลต่อการเกิดภาวะโลกร้อนได้อีกด้วย

นอกจากนี้ ผู้วิจัยคิดว่า จุลินทรีย์ที่คัดเลือกได้น่าจะนำไปประยุกต์ใช้เพื่อช่วยเพิ่มผลผลิตทางการเกษตรอินทรีย์ เช่น ในพื้นที่สูงที่มีปริมาณน้ำน้อย พื้นที่แห้งแล้งขาดแคลนน้ำ หรือภัยแล้งที่เกิดจากภาวะภูมิอากาศเปลี่ยนแปลง หรือ ภาวะโลกร้อนได้อีกด้วย

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อแยกแบคทีเรียเอนโดไฟต์จากต้นข้าวในแปลงเกษตรอินทรีย์
2. เพื่อศึกษาความสามารถในการละลายฟอสเฟตและผลิตกรดอินทรีย์ของแบคทีเรียเอนโดไฟต์ที่แยกได้จากข้าวและจาก stock culture ของห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา มหาวิทยาลัยแม่โจ้
3. เพื่อระบุชนิดของแบคทีเรียที่คัดเลือกได้

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ได้แบบที่เรียที่สามารถละลายฟอสเฟตเพื่อการประยุกต์ใช้ในการปลูกข้าวอินทรีย์
2. ได้แบบที่เรียที่สามารถผลิตกรดอิน โดลอะซิดิกเพื่อการประยุกต์ใช้ในการปลูกข้าวอินทรีย์
3. เป็นแนวทางที่จะนำจุลินทรีย์ที่คัดเลือกได้ไปประยุกต์ใช้ในการปรับปรุงบำรุงดินของแปลงนาข้าวอินทรีย์ของระบบการปลูกข้าวอินทรีย์แบบประณีต หรือการนำไปประยุกต์ใช้ประโยชน์จากจุลินทรีย์ในพื้นที่บริเวณที่มีน้ำน้อย เช่น เกษตรในพื้นที่สูง พื้นที่ประสบภัยแล้งจากภาวะอากาศเปลี่ยนแปลงที่มีปริมาณฝนตกน้อย

การตรวจเอกสาร

ข้าวอินทรีย์ (Organic rice)

ประเทศไทย มีนโยบายที่จะเป็นครัวของโลก ผลิตอาหารปลอดภัยจากสารพิษ เกษตรอินทรีย์ เป็นทางเลือกสำหรับผู้ผลิตและผู้บริโภค ข้าวอินทรีย์ เป็นข้าวที่ได้ระบบการผลิตข้าวที่ไม่ใช้สารเคมีทางการเกษตรทุกชนิด รวมทั้ง ปุ๋ยเคมี สารควบคุมการเจริญเติบโต สารควบคุมและกำจัดวัชพืช สารป้องกันกำจัดโรค แมลง และสัตว์ ศัตรูข้าว เกษตรอินทรีย์เน้นธรรมชาติเป็นสำคัญ มีการปรับปรุงความอุดมสมบูรณ์ของดินโดยการปลูกพืชหมุนเวียน ไม่ใช้วัตถุพิษจากแหล่งอื่น ควบคุมโรค แมลง และสัตว์ศัตรูข้าวโดยวิธีผสมผสานไม่ใช้สารเคมี การเลือกใช้พันธุ์ข้าวที่เหมาะสม มีความต้านทานโดยธรรมชาติ ช่วยรักษาสมดุลของศัตรูธรรมชาติ การจัดการพืช ดิน และน้ำ ให้ถูกต้องเหมาะสมกับความต้องการของต้นข้าว เพื่อทำให้ต้นข้าวเจริญเติบโตได้ดี มีความสมบูรณ์แข็งแรง ตามธรรมชาติ การจัดการสภาพแวดล้อม ไม่ให้เหมาะสมต่อการระบาดของศัตรูข้าว (สาคร และ เรืองฤทธิ์, 2555) การผลิตข้าวอินทรีย์นอกจากจะทำให้ได้ผลผลิตข้าวที่มีคุณภาพสูงและปลอดภัยจากสารพิษแล้ว ยังเป็นการอนุรักษ์ทรัพยากรธรรมชาติและรักษาสีเขียวของสิ่งแวดล้อมซึ่งเป็นการพัฒนาการเกษตรแบบยั่งยืนอีกด้วย

การปลูกข้าวในระบบประณีต (System of Rice Intensification; SRI)

ระบบการปลูกข้าวแบบประณีตคือ ใช้ต้นกล้าข้าวอ่อนอายุไม่เกิน 15 วัน (2 ใบ) มีการย้ายกล้าปลูกแบบรวดเร็วและพิถีพิถัน ปลูกแบบต้นเดี่ยว หรือ 1 ต้นต่อหลุม ปลูกแบบไม่มีการขังน้ำ โดยมีการให้น้ำแบบเปียกและแห้งสลับกันจนกระทั่งออกรวง จึงมีการขังน้ำเพียงเล็กน้อยเพื่อไม่ให้พืชขาดน้ำ จัดการไม่ให้มีวัชพืชขึ้นแข่งขันกับต้นข้าว ระบบการปลูกข้าวแบบประณีตเป็นการจัดการพืช ดิน และน้ำร่วมกัน เพื่อให้เกิดประโยชน์และประสิทธิภาพสูงสุด โดยเฉพาะการเพิ่มผลผลิตข้าว

จากรายงานของ Barison and Uphoff (2011) พบว่า ข้าวที่ปลูกในระบบประณีตมีผลทำให้ได้ผลผลิตสูงเมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการปลูกแบบมีน้ำขังแบบเดิม และพบว่า มีความแตกต่างในด้านการเจริญของราก ความต้านทานต่อโรคการเจริญเติบโตของรากเล็ก ซึ่งมีประสิทธิภาพต่อการให้ธาตุอาหารและ ื่อต่อการดูดซึม พืชได้รับสารอาหารที่เพิ่มขึ้น เมื่อเปรียบเทียบการปลูกข้าวแบบน้ำขัง และการปลูกข้าวแบบ SRI พืชมีความสามารถในการดึงดูดธาตุอาหารหลักมาใช้ในการเจริญได้มากกว่า คือ ข้าวที่ปลูกในระบบ SRI ดูดซึมธาตุอาหาร N, P และ K เท่ากับ 74.9, 291.1 และ 70.4 ตามลำดับ ในขณะที่การปลูกข้าวแบบมีน้ำขังข้าวมีความสามารถในการ

ดูดซึมธาตุอาหารหลักได้เพียง 69.2 , 347.2, และ 69.7 ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่า ระบบ SRI มีประสิทธิภาพดีกว่าการปลูกข้าวแบบมีน้ำขัง และ แสดงให้เห็นว่า สามารถเพิ่มศักยภาพของรากของข้าวได้โดยอาศัยการจัดการที่ดี

การปลูกข้าวทั่วไปจะให้น้ำแบบขังต่อเนื่องมีผลดีคือสามารถช่วยควบคุมกำจัด หรือลดการเจริญเติบโตของวัชพืชในแปลงนาและยังช่วยให้เกษตรกรสามารถใส่ปุ๋ยในช่วงระยะที่เหมาะสมแก่ข้าว แต่มีผลเสียจากการที่มีน้ำท่วมขัง หรือท่วมผิวดินตลอดฤดูกาลปลูกพืช จะมีผลกระทบต่อการเจริญเติบโตของต้นข้าวเนื่องจากรากข้าวถูกทำลายจากสารประกอบต่าง ๆ ที่เป็นพิษเพราะมีสาเหตุมาจากการขาดความสมดุลของก๊าซออกซิเจนในดิน จึงทำให้รากบางชนิดมีระดับสูง ทำให้เกิดการระบาดของศัตรูข้าวมากขึ้นที่สำคัญคือหอยเชอรี่ทำให้ต้นข้าวอ่อนแอจึงเป็นสาเหตุทำให้มอดทนทานโรค-แมลง เฉพาะอย่างยิ่งเมื่อสภาพอากาศมีความชื้นสูงและทำให้เกิดก๊าซเรือนกระจก เช่น ก๊าซมีเทน ซึ่งเป็นสาเหตุหนึ่งในการทำให้โลกร้อน เนื่องจากอุณหภูมิของโลกสูงขึ้น การปลูกข้าวในนาข้าวขังมีการปล่อยก๊าซมีเทนขึ้นสู่บรรยากาศในปีหนึ่ง ๆ 10-15 เปอร์เซ็นต์ ของปริมาณก๊าซมีเทนทั้งหมดที่เกิดขึ้นในโลก (Ishizuka et al. 2002)

บทบาทของจุลินทรีย์ต่อการเกษตรอินทรีย์

จุลินทรีย์ที่ช่วยให้ธาตุอาหารเป็นประโยชน์กับพืช

จุลินทรีย์ที่สร้างกรดอินทรีย์ หรือเอนไซม์แปรสภาพฟอสฟอรัสย่อยสารประกอบกลุ่มอินทรีย์ฟอสฟอรัสให้อยู่ในรูปที่พืชสามารถนำไปใช้ได้ นอกจากนี้ ยังสามารถย่อยสารประกอบอินทรีย์ฟอสฟอรัส เช่น หินฟอสเฟต หรือตะกอนของสารประกอบฟอสเฟต ซึ่งเกิดจากการใช้ปุ๋ยฟอสเฟตอย่างต่อเนื่องแต่ถูกต้องวิธี วัินดินการใส่จุลินทรีย์ละลายฟอสเฟตจะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการใช้ปุ๋ยฟอสเฟตในดินได้จุลินทรีย์แปรสภาพฟอสฟอรัส

จุลินทรีย์ส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช (*Plant Growth Promoting Rhizobacteria; PGPR*)

เป็นกลุ่มจุลินทรีย์ช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช เช่น ผลิต siderophore ซึ่งมีสมบัติเพิ่มการนำธาตุเหล็กเข้าสู่เซลล์พืช โดยการแย่งจับธาตุเหล็กบริเวณรอบรากพืชทำให้เชื้อโรคพืชไม่สามารถนำธาตุเหล็กไปใช้ได้ นอกจากนี้ เชื้อจุลินทรีย์ยังสามารถสร้างฮอร์โมนพืช (phytohormones) เช่น ออกซิน (auxin) ซึ่งกระตุ้นการยืดตัวของเซลล์การแบ่งเซลล์และการเปลี่ยนสภาพของเซลล์ สร้างเอนไซม์ไคตินเนส (chitinase) และ ลามินารินเนส (laminarinase) ย่อยเส้นใยเชื้อราโรคพืช สร้างสารปฏิชีวนะที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อราสาเหตุโรคพืชได้ จุลินทรีย์ที่อยู่ใน

กลุ่ม PGPR ได้แก่ *Azospirillum sp.*, *Streptomyces sp.*, *Bacillus sp.*, *Pseudomonas sp.* และ *Trichoderma sp.* เป็นต้น (สุวรรณ, 2555) ซึ่ง Gupta et al. (2015) กล่าวว่า การใช้จุลินทรีย์ส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช มีบทบาทสำคัญที่จะช่วยให้ความอุดมสมบูรณ์ของดินเพิ่มขึ้น ช่วยการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชและยังช่วยลดปัญหาเชื้อก่อโรคพืช ซึ่งควรจะใช้พัฒนาการเกษตรแบบยั่งยืน ซึ่งเป็นวิธีการที่เป็นมิตรกับสภาพแวดล้อมเพื่อเพิ่มการผลิตพืชและสุขภาพ

กลไกการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชโดยจุลินทรีย์

การส่งเสริมการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์แบ่งออกได้เป็น 2 ทางคือ ทางตรงกับทางอ้อม จุลินทรีย์ส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชได้โดยตรงโดยให้ธาตุอาหารแก่พืช เช่น การผลิตกรดอินโดลอะซิติก ไซโตไคนิน และจิบเบอเรลลิน เป็นต้น โดยกลไกการส่งเสริมการเจริญเติบโตทางตรงของจุลินทรีย์ เช่น การผลิตกรดอินโดลอะซิติก ที่ช่วยกระตุ้นการยืดตัวของราก การละลายฟอสเฟต การส่งเสริมความสามารถในการใช้ธาตุหลักของพืช การตรึงไนโตรเจน (Ahmad and Kibret, 2014) ส่วนกลไกการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชทางอ้อมโดยจุลินทรีย์ เช่น การผลิตสารปฏิชีวนะและเอนไซม์ที่สามารถทำลายผนังเซลล์ของเชื้อก่อโรคพืชได้ เช่น เอนไซม์ *chitinases*, *cellulases*, β -1,3 *glucanases*, *proteases* และ *lipases* การแย่งจับแหล่งอาหาร การเหนี่ยวนำระบบภูมิคุ้มกัน และการผลิตสารเมแทบอไลต์ที่ยับยั้งเชื้อรา เป็นวิธีหลักในการควบคุมทางชีวภาพของจุลินทรีย์ส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช การผลิตไซโตไคโพลีน การเหนี่ยวนำระบบภูมิคุ้มกันของพืช

จุลินทรีย์ที่มีบทบาทต่อการผลิตข้าว

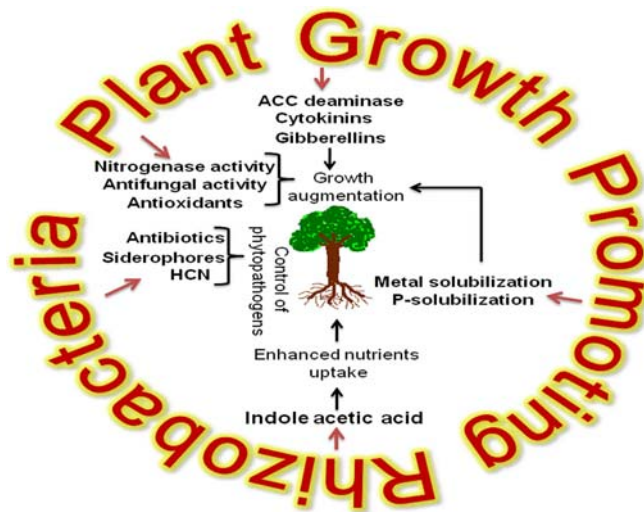
แบคทีเรียรอบรากพืช (*Rhizobacteria*)

บริเวณรอบ ๆ รากพืช (*Rhizosphere*) เป็นส่วนของดินในส่วนที่สัมผัสกับรากหรือบริเวณรอบ ๆ รากพืช ซึ่งมีกิจกรรมของจุลินทรีย์ อันจะมีผลต่อความสามารถในการดูดธาตุอาหารของรากพืช บริเวณรอบรากพืช เป็นที่อยู่อาศัยของจุลินทรีย์ และมีการพึ่งพาอาศัยระหว่างรากพืชกับจุลินทรีย์ ผลของรากพืชต่อจุลินทรีย์บริเวณรอบรากพืช ได้แก่ การดูดน้ำของพืช การปล่อยสารอินทรีย์ลงสู่ดิน จุลินทรีย์ในบริเวณใกล้รากจะมีมากกว่าบริเวณที่ไกลออกไปจำนวนและชนิดของจุลินทรีย์จะเปลี่ยนแปลงไปตามระยะการเจริญของพืช เพราะสารที่พืชปล่อยออกมาในแต่ละระยะจะแตกต่างกัน สารที่พืชหลั่งออกมาเป็นแหล่งพลังงานและสนับสนุนกิจกรรมของจุลินทรีย์ และผลของจุลินทรีย์รอบ ๆ รากพืชต่อพืช ได้แก่ ส่งเสริมการเจริญของพืช โดยเพิ่มการหมุนเวียนน้ำและแร่ธาตุ สร้างวิตามินและสารส่งเสริมการเจริญของ

พืช เช่น ออกซิน จิบเบอเรลลิน และต่อต้านเชื้อก่อโรคโดยการแข่งขันหรือโดยการสร้างยาปฏิชีวนะ ช่วยเปลี่ยนสารที่เป็นพิษต่อพืชให้เป็นสารที่ไม่เป็นพิษ เพิ่มความสามารถของพืชในการนำแร่ธาตุไปใช้ เช่น เพิ่มการละลายของฟอสเฟต การร่วมกันสร้างสารอัลลิโลพาที่ ซึ่งเป็นสารที่พืชปล่อยออกมาสู่สิ่งแวดล้อมและมีผลกระทบต่อพืชอื่น เพิ่มความทนทานต่อสิ่งแวดล้อมและการเจริญในสถานะที่ไม่เหมาะสม เช่น การเจริญในดินที่ปนเปื้อนน้ำมัน ซึ่ง Souza et al. (2015) กล่าวว่า จุลินทรีย์บริเวณรอบ ๆ รากพืช ช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโต และช่วยเพิ่มผลผลิต รวมทั้งเพิ่มความอุดมสมบูรณ์ของดิน แบคทีเรียที่ช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตเป็นแบคทีเรียที่สามารถเพิ่มประสิทธิภาพการเจริญเติบโตของพืชและการป้องกันพืชจากโรคและความเครียดจากสิ่งไม่มีชีวิต ซึ่งเชื่อมีบทบาทสำคัญ ได้แก่ การตรึงไนโตรเจน ละลายฟอสเฟต มีกิจกรรมเอนไซม์ ACC deaminase ผลิต siderophores และ ฮอโมนพืช

ตัวอย่างจุลินทรีย์ที่แยกได้จากบริเวณรากพืชต่าง ๆ ที่สามารถผลิตสารส่งเสริมการเจริญของพืช (plant growth promoter rhizobacteria, PGPR) ได้แก่ *Pseudomonas*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Burkholderia*, *Bacillus* และ *Serratia* (Glick (1995); Joseph et al., 2007) ซึ่ง Gopalakrishnan et al., (2013) พบว่า แบคทีเรียที่แยกได้จากบริเวณรอบรากข้าว ซึ่งมีผลช่วยควบคุมโรคเน่าในข้าวฟ่าง และแบคทีเรียที่แยกได้ยังผลิตสารส่งเสริมการเจริญในพืช และเป็นปุ๋ยบำรุงต้นพืช และ Gosh et al. (2011) รายงานว่า *Bacillus* sp., *Citrobacter* sp., *Shigella* sp. และ *Klebsiella* sp. ที่แยกได้จากดินบริเวณรอบรากหญ้าทะเล (seagrass) มีผลช่วยลดปลดปล่อยฟอสเฟตในดิน ที่ช่วยส่งเสริมการเจริญของพืชได้ นอกจากนี้ จุลินทรีย์รอบรากพืชยังช่วยผลิตฮอโมนพืช เช่น *Bacillus amyloliquefaciens* ที่แยกได้จากดินบริเวณรอบรากถั่วเหลือง ช่วยในการผลิตสารส่งเสริมการเจริญของพืชได้ดี (Nautiyal et al., 2013)

และ Gunes et al. (2015) ศึกษาการใช้แบคทีเรียรอบรากพืช ช่วยเพิ่มความอุดมสมบูรณ์ของดิน และ ซึ่งมีแบคทีเรียที่มีบทบาทส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช ได้แก่ *Bacillus megaterium* (M3) *Pantoea agglomerans* (RK-92), *Bacillus megaterium* (TV-17C) *Bacillus megaterium* (TV-3D), *Bacillus megaterium* (TV-87A) *Hafnia alvei* (TV-34A) *Bacillus megaterium* (TV-60D) *Pseudomonas fluorescens* (FDG-37) *Bacillus megaterium* (KBA-10) และ *Bacillus megaterium* (TV-91C) ซึ่งแบคทีเรีย *B. megaterium* M3, *B. megaterium* (TV-17C) และ *Pantoea agglomerans* (RK-92) มีศักยภาพที่จะนำมาใช้เป็นปุ๋ยอินทรีย์สำหรับการเจริญเติบโตของพืชในการเกษตรอย่างยั่งยืนและอินทรีย์ต่อไป กลไกของการผลิตสารเร่งการเจริญเติบโตของพืชจากแบคทีเรียที่อยู่รอบรากพืช แสดงในภาพที่ 1 และตารางที่ 1 แสดงตัวอย่างจุลินทรีย์และสารที่ผลิตโดยจุลินทรีย์ที่อยู่บริเวณรอบรากพืช



ภาพที่ 1 กลไกของการผลิตสารเร่งการเจริญเติบโตของพืชจากแบคทีเรียที่อยู่รอบรากพืช
ที่มา: Ahemad and Kibret (2014)

ตารางที่ 1 ตัวอย่างจุลินทรีย์และสารที่ผลิตโดยจุลินทรีย์ที่อยู่ในบริเวณรอบรากพืช

PGPR	Plant growth promoting traits
<i>Pseudomonas putida</i>	IAA, siderophores, HCN, ammonia, exo-polysaccharides, phosphate solubilization
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	IAA, siderophores, HCN, ammonia, exo-polysaccharides, phosphate solubilization
<i>Klebsiella</i> sp.	IAA, siderophores, HCN, ammonia, exo-polysaccharides, phosphate solubilization
<i>Enterobacter asburiae</i>	IAA, siderophores, HCN, ammonia, exo-polysaccharides, phosphate solubilization
<i>Rhizobium</i> sp. (pea)	IAA, siderophores, HCN, ammonia, exo-polysaccharides
<i>Mesorhizobium</i> sp.	IAA, siderophores, HCN, ammonia, exo-polysaccharides
<i>Acinetobacter</i> spp.	IAA, phosphate solubilization, siderophores
<i>Rhizobium</i> sp.(lentil)	IAA, siderophores, HCN, ammonia, exo-polysaccharides
<i>Pseudomonas</i> sp. A3R3	IAA, siderophores
<i>Psychrobacter</i> sp. SRS8	Heavy metal mobilization
<i>Bradyrhizobium</i> sp.	IAA, siderophores, HCN, ammonia, exo-polysaccharides
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 4EA	Siderophores
<i>Bradyrhizobium</i> sp. 750,	Heavy metal mobilization
<i>Pseudomonas</i> sp., <i>Ochrobactrum cytisi</i>	IAA, siderophores, HCN, ammonia
<i>Bacillus</i> species PSB10	IAA, siderophores
<i>Paenibacillus polymyxa</i>	IAA
<i>Rhizobium phaseoli</i>	Nitrogenase activity, phosphate solubilization, IAA, ACC deaminase
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	Phosphate solubilization, IAA, ACC deaminase
<i>Rahnella aquatilis</i>	Siderophores
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Pseudomonas fluorescens</i> , <i>Ralstonia metallidurans</i>	Siderophores
<i>Proteus vulgaris</i>	Phosphate solubilization, IAA, siderophore, HCN, biocontrol potentials
<i>Pseudomonas</i> sp.	IAA, nitrogenase activity
<i>Azospirillum amazonense</i>	IAA, siderophores, HCN, ammonia
<i>Mesorhizobium</i> sp.	ACC deaminase, IAA, siderophore
<i>Pseudomonas</i> sp.	IAA, siderophore, HCN
<i>Serratia marcescens</i>	ACC deaminase, phosphate solubilization
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	ACC deaminase, IAA, antifungal activity, N ₂ -fixation, phosphate solubilization
<i>Acinetobacter</i> sp., <i>Pseudomonas</i> sp.	ACC deaminase, IAA, siderophore, phosphate solubilization
<i>Enterobacter</i> sp.	ACC deaminase, IAA, siderophore, heavy metal solubilization, phosphate solubilization
<i>Burkholderia</i>	ACC deaminase, IAA, siderophore, heavy metal solubilization, phosphate solubilization
<i>Pseudomonas jessenii</i>	ACC deaminase, IAA, siderophore, heavy metal solubilization, phosphate solubilization
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ACC deaminase, IAA, siderophore, phosphate solubilization
<i>Pseudomonas</i> sp.	ACC deaminase, IAA, siderophore, heavy metal solubilization, phosphate solubilization
<i>Azotobacter</i> sp., <i>Mesorhizobium</i> sp., <i>Pseudomonas</i> sp., <i>Bacillus</i> sp.	IAA, siderophore, antifungal activity, ammonia production, HCN
<i>Bradyrhizobium</i> sp.	IAA, siderophores, HCN, ammonia
<i>Rhizobium</i> sp.	IAA, siderophores, HCN, ammonia
<i>Mesorhizobium ciceri</i> , <i>Azotobacter chroococcum</i>	IAA, siderophores
<i>Pseudomonas</i> , <i>Bacillus</i>	Phosphate solubilization, IAA and siderophores
<i>Klebsiella oxytoca</i>	IAA, phosphate solubilization, nitrogenase activity

ตารางที่ 1 (ต่อ)

PGPR	Plant growth promoting traits
<i>Bacillus</i> spp., <i>Pseudomonas</i> spp., <i>Azotobacter</i> spp., <i>Rhizobium</i> spp. <i>Pseudomonas fluorescens</i>	IAA, ammonia production Induced systemic resistance, antifungal activity
<i>Pseudomonas chlororaphis</i> <i>Bacillus subtilis</i> <i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i> <i>Brevibacillus</i> spp. <i>Bacillus subtilis</i> <i>Pseudomonas</i> sp., <i>Bacillus</i> sp. <i>Pseudomonas putida</i> <i>Bravibacterium</i> sp. <i>Xanthomonas</i> sp. RJ3, <i>Azomonas</i> sp. RJ4, <i>Pseudomonas</i> sp. RJ10, <i>Bacillus</i> sp. RJ31 <i>Bacillus</i> sp.	Antifungal activity Antifungal activity Zinc solubilization Zn resistance, IAA IAA, phosphate solubilization IAA, siderophore, phosphate solubilization Antifungal activity, siderophore, HCN, phosphate solubilization Siderophore IAA P-solubilization IAA
<i>Bradyrhizobium japonicum</i> <i>Pseudomonas putida</i> <i>Pseudomonas fluorescens</i> PRS ₉ , <i>Pseudomonas fluorescens</i> GRS ₁ <i>Variovorax paradoxus</i> , <i>Rhodococcus</i> sp., <i>Flavobacterium</i> <i>Sphingomonas</i> sp., <i>Mycobacterium</i> sp., <i>Bacillus</i> sp., <i>Rhodococcus</i> sp., <i>Cellulomonas</i> sp., <i>Pseudomonas</i> sp.	Siderophores, Pb and Cd resistance IAA, siderophores, phosphate solubilization IAA and siderophores IAA
<i>Pseudomonas fluorescens</i> <i>Bacillus</i> , <i>Azospirillum</i> sp. <i>Azospirillum brasilense</i> , <i>Azospirillum amazonense</i> <i>Pseudomonas fluorescens</i> <i>Rhizobium</i> , <i>Bradyrhizobium</i> <i>Bacillus</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Azotobacter</i> , <i>Azospirillum</i> , <i>Rhizobium</i> <i>Mesorhizobium</i> , <i>Bradyrhizobium</i> sp. <i>Azotobacter chroococcum</i> <i>Azotobacter chroococcum</i> <i>Rhizobium meliloti</i> <i>Kluyvera ascorbata</i> <i>Kluyvera ascorbata</i> <i>Bradyrhizobium</i> , <i>Rhizobium</i> <i>Bradyrhizobium</i> , <i>Rhizobium</i> <i>Rhizobium ciceri</i> <i>Bradyrhizobium japonicum</i> <i>Rhizobium leguminosarum</i> <i>Rhizobium</i> , <i>Bradyrhizobium</i>	IAA, siderophores, antifungal activity IAA, P-solubilization IAA, P solubilization, nitrogenase activity, antibiotic resistance IAA, phosphate solubilization HCN, siderophore, Siderophore, IAA, P-solubilization P-solubilization and IAA Siderophore Gibberellin, kinetin, IAA P-solubilization Siderophore Siderophore ACC deaminase, siderophores, metal resistance Siderophore IAA Siderophore Siderophore Cytokinin P-solubilization

ที่มา : *Ahemad and Kibret (2014)*

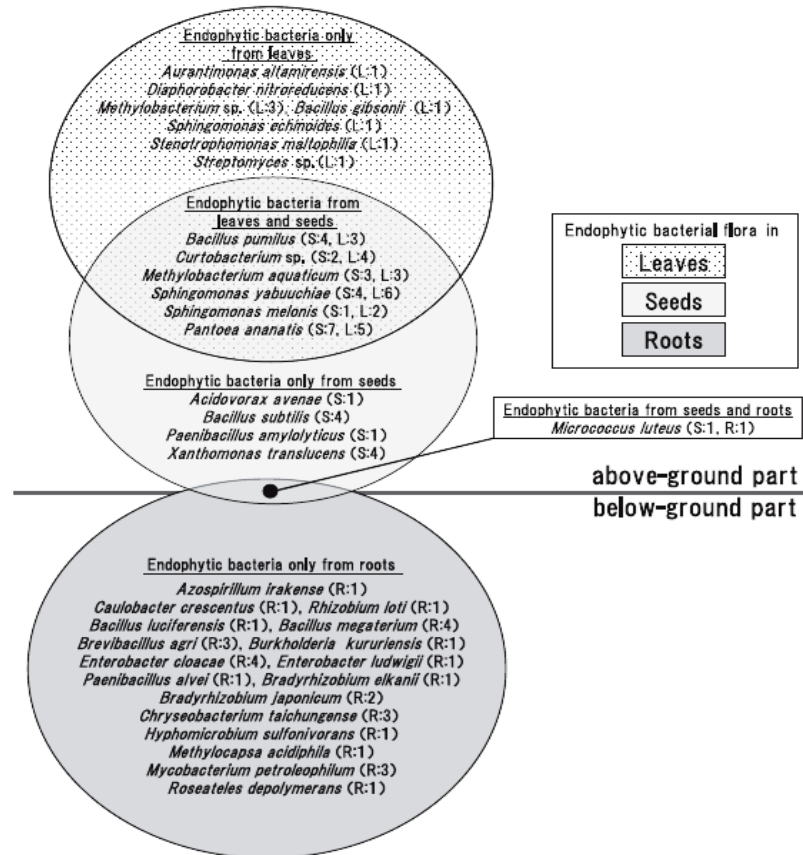
แบคทีเรียเอนโดไฟท์ (Endophytic bacteria)

แบคทีเรียเอนโดไฟท์ เป็นแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ในเนื้อเยื่อพืชหรือสกัดได้จากพืชและไม่ก่อให้เกิดอันตรายต่อพืช (Mano and Morisaki, 2008) อาศัยอยู่ในพืชโดยมีความสัมพันธ์กับพืชแบบอิงอาศัย (Schulz and Boyle, 2006) โดยได้รับสารอาหารบางอย่างจากพืชและผลิตสารส่งเสริมการเจริญเติบโตต่อพืชที่อาศัย เอนโดไฟท์บางชนิดสร้างสารบางอย่าง หรือปฏิกริยาเคมีต่าง ๆ ระหว่างเชื้อรากับพืชอาศัย ทำให้เนื้อเยื่อลดความดึงดูดต่อศัตรูพืชและบางสายพันธุ์กระตุ้นให้พืชเกิดความต้านทาน ส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช ในทางกลับกัน เอนโดไฟท์ได้รับประโยชน์จากพืชโดยอาศัยสารอาหารต่าง ๆ จากพืชและดำรงชีวิตอยู่ภายในต้นพืช

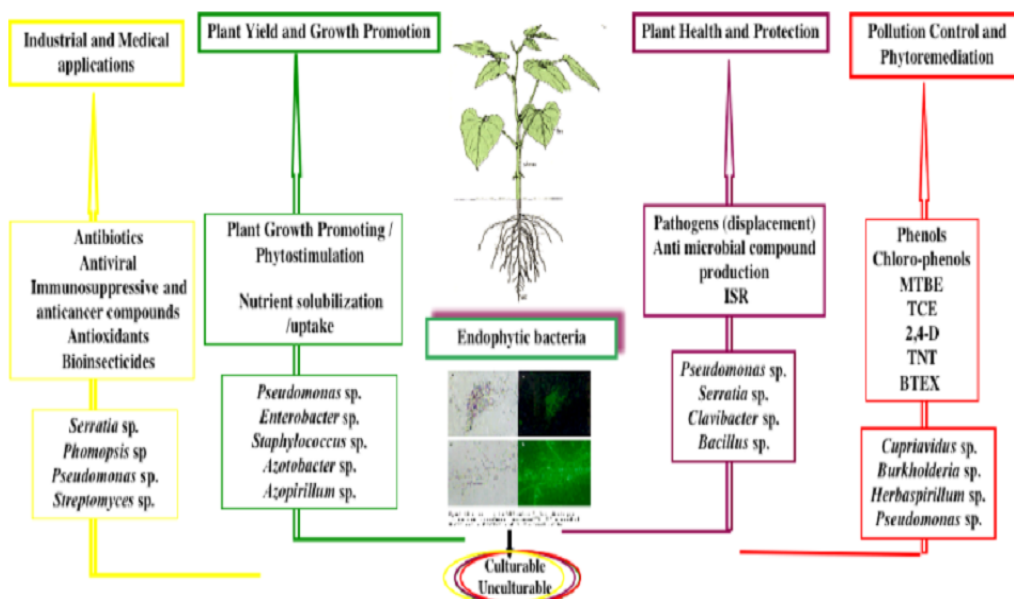
นอกจากนี้ ยังพบว่า เอนโดไฟต์บางสายพันธุ์สามารถกระตุ้นการเจริญเติบโตของพืชได้ และสามารถใช้เป็นตัวควบคุมทางชีวภาพ โดยเป็นปฏิปักษ์ต่อเชื้อจุลินทรีย์สาเหตุโรคพืช หรือ กระตุ้นให้เกิดความต้านทานของโรคได้ (Chamway, 1998) ซึ่ง Suman et al. (2016) กล่าวว่า จุลินทรีย์เอนโดไฟต์จะเข้าสู่พืชผ่านทาง บาดแผลของพืช หรือผ่านรากขนและบริเวณผิว นอกจากนี้ และเข้าสู่พืชโดยผ่านช่องเปิดธรรมชาติ หรือการใช้เอนไซม์ย่อยสลาย เช่น เอนไซม์ เซลลูเลสและเพคตินเอส ซึ่งพบว่า จุลินทรีย์เอนโดไฟต์ ได้แก่ *Acidobacteria*, *actinobacteria*, *Ascomycota*, *Bacteroidetes*, *Deinococcus-Thermus* และ *Firmicutes* จุลินทรีย์เอนโดไฟต์ที่พบเด่นที่สุด ได้แก่ *actinobacteria*, *Proteobacteria* และ *Firmicutes* ซึ่งอยู่ในสกุล *Achromobacter*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Enterobacter*, *Herbaspirillum*, *Pantoea*, *Pseudomonas* *Rhizobium* และ *Streptomyces* ซึ่งสามารถประยุกต์ใช้จุลินทรีย์เอนโดไฟต์เพื่อการเกษตรที่ยั่งยืน ซึ่งเป็นที่ทราบกันดีแล้วว่าจุลินทรีย์เอนโดไฟต์ช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตและเพิ่มผลผลิตของพืช ช่วยตรึงไนโตรเจนและช่วยในการละลายของฟอสฟอรัส โพแทสเซียมและสังกะสี ผลิตของฮอร์โมนพืช เช่น *cytokinins*, *auxins* และ *gibberellins* และสร้าง แอมโมเนียไนโตรเจนในดินและ *siderophores* และควบคุมเชื้อก่อโรค รวมทั้งลดระดับเอทิลีนเพื่อพืชอยู่ในสภาวะเครียด และ Saunders and Kohn (2008) พบว่า เชื้อราเอนโดไฟต์ *Nigrospora oryzae*, *Acremonium zeae* และ *Periconia macrospinoso* สามารถกระตุ้นให้ข้าวโพดสร้างสารทุติยภูมิที่มีผลทำให้ข้าวโพดมีความต้านทานโรคได้ ซึ่ง Hossain et al. (2016) รายงานว่า แบคทีเรียเอนโดไฟต์ *Bacillus oryzicola* YC7007 ช่วยให้พืชต้านทานต่อโรคพืชและผลิตสารปฏิชีวนะช่วยยับยั้งเชื้อรา *Fusarium fujikuroi* ก่อโรคยอดฝักดาบในข้าว เมื่อใช้เชื้อนี้ 2.0×10^7 cfu/ml ใสรอบ ๆ รากข้าว มีผลช่วยลดความรุนแรงของโรคนี้ 46-78 เปอร์เซ็นต์ และ Prakamhang et al. (2009) ศึกษาความหลากหลายและกลุ่มของแบคทีเรียเอนโดไฟต์ที่ตรึงไนโตรเจนในดินบริเวณรอบรากข้าว (*diazotroph*) โดยใช้กลุ่มแบคทีเรียและแบคทีเรียชนิดเดียว พบว่า การใช้แบคทีเรียชนิดเดียวมีผลในการยับยั้งและส่งเสริมการตรึงก๊าซไนโตรเจนได้ พบว่า เป็นเชื้อ *Enterobacter dissolvens*, *Brevundimonas aurantiaca*, *Pantoea agglomerans*, *Pseudomonas* sp. และ *Enterobacteriaceae* การใช้แหล่งคาร์บอน การผลิต IAA การผลิตเอนไซม์เพคตินเอส เซลลูเลสมีความหลากหลายสูงในเนื้อเยื่อของข้าว และได้ตรวจเชื้อตรึงไนโตรเจนในส่วนของรากต้นและใบ จะพบความหลากหลายของเชื้อตรึงไนโตรเจนของดินนาที่มีการใช้ปุ๋ยไนโตรเจนมากกว่าที่ไม่ใช้ปุ๋ยไนโตรเจน และพบว่าบริเวณรากพืชที่เจริญในดินที่มีการให้ปุ๋ยไนโตรเจนมีจำนวนเชื้อตรึงไนโตรเจนน้อยกว่า ซึ่งชี้ให้เห็นว่าชนิดเนื้อเยื่อของพืชมีผลต่อความหลากหลายของจุลินทรีย์ด้วย ในปีเดียวกัน Naik et al. (2009) ศึกษาความหลากหลายของประชากรเอนโดไฟต์ในนาข้าว

ในตอนที่๓ของอินเดีย โดยศึกษากิจกรรมการยับยั้งช่วงฤดูหนาวและฤดูร้อน พบว่า มีอยู่ 40.3 เปอร์เซ็นต์ในราก ส่วนในใบมี 25.83 เปอร์เซ็นต์ในช่วงฤดูหนาว ส่วนในช่วงฤดูร้อนในรากพบ 20.15 เปอร์เซ็นต์ ส่วนในใบพบ 8.66 เปอร์เซ็นต์ และพบว่า เป็น *Streptomyces* sp., *Chaetomium globosum*, *Penicillium chrysogenum*, *Fusarium oxysporum* และ *Cladosporium cladosporioides* ที่เป็นเอนโดไฟท์กลุ่มเด่น ความถี่ของกลุ่มที่พบในแต่ละบริเวณ ฤดูกาล สายพันธุ์ข้าว มีผลให้พบเอนโดไฟท์แตกต่างกัน การใช้เชื้อผสมระหว่าง *C. globosum*, *P. chrysogenum* และ *Streptomyces* sp. มีความเหมาะสมในการผลิตสารประกอบทางชีวภาพได้ดี และจุลินทรีย์เอนโดไฟท์ยังสามารถผลิตสารต่อต้านเชื้อราโรคพืชได้อีกด้วย และ *Petcharat and Duangpaeng* (2012) คัดเลือกแบคทีเรียเอนโดไฟท์จากเนื้อเยื่อของต้นข้าวเพื่อใช้ในการผลิตกรดอินโดลอะซิดิก โดยเก็บตัวอย่างจากนาที่ทำข้าวอินทรีย์ระยะเวลา 1 ปี, 3 ปี และ นาข้าวเกษตรเคมีในจังหวัดอุดรธานี โดยเฉพาะเลี้ยงลงในอาหาร *Trypti soy agar* และ *Potato dextrose agar* พบว่า ได้เชื้อจำนวนทั้งหมด 71 ไอโซเลต และพบว่ามีจำนวน 26 ไอโซเลตที่แยกได้จากนาข้าวอินทรีย์ที่ระยะเวลา 3 ปี เมื่อจำแนกเชื้อ พบว่าเป็น *Pseudomonas* sp., *Bacillus* sp., *Azotobacter* sp. และ *Enterobacter* มี 4 ไอโซเลตที่ผลิต IAA ได้มากกว่า 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และพบว่า O-1-R-4 ซึ่งจำแนกเป็น *Bacillus* sp. สามารถผลิต IAA ได้สูงที่สุด 14.58 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และในปีเดียวกัน *Duangpaeng et al.* (2012) ได้แยกแบคทีเรียเอนโดไฟท์จากต้นข้าวที่ปลูกในแปลงข้าวอินทรีย์และคัดเลือกเชื้อที่สามารถผลิตสารส่งเสริมการเจริญที่คล้ายกับ IAA โดยทำการเพาะเชื้อที่มีศักยภาพการผลิตสารส่งเสริมการเจริญได้สูงลงในเมล็ดงอกบนกระดาษ พบว่า มีเชื้อ 35 ไอโซเลต ที่เป็นแบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่สามารถผลิตสารที่มีลักษณะคล้าย IAA ได้สูง คือไอโซเลต O-3-S-3(2) และ O-1-S-2 ที่ช่วยเพิ่มความยาวของต้นและรากในเมล็ดที่กำลังงอกได้ ส่วนไอโซเลต O-3-S-3(2) และ O-1-S-2 มีผลช่วยเพิ่มจำนวนต้นและเพิ่มความยาวของลำต้นข้าวได้อีกด้วย ซึ่ง *Etesami et al.* (2013) ได้คัดเลือกจุลินทรีย์จากพืช *Trifolium alexandrinum* เพื่อใช้ในการผลิตสารส่งเสริมการเจริญของต้นข้าว พบว่า ได้เชื้อทั้งหมด 200 ไอโซเลต (80 ไอโซเลต เป็นแบคทีเรีย และ 120 ไอโซเลต แยกได้จากบริเวณรอบรากพืช จากนั้นทำการปลูกเชื้อผสม 10 ชนิดเปรียบเทียบกับการปลูกเชื้อชนิดเดียวลงในข้าว 2 สายพันธุ์ พบว่า แบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่เป็นเชื้อผสมมีผลส่งเสริมการเจริญของต้นข้าวได้ดี และพบว่า เชื้อมีการสร้าง IAA ที่มีผลต่อขนาดของราก การเจริญของพืชอย่างเห็นได้ชัด ซึ่งน่าจะนำไปประยุกต์เป็นสารส่งเสริมการเจริญของต้นข้าวได้ในอนาคต และในปีเดียวกัน *J et al.* (2013) รายงาน การแยกและศึกษาคุณลักษณะของแบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่ตรึงก๊าซไนโตรเจนบริเวณราก จากข้าวที่ปลูกในเกาหลี ได้แยกแบคทีเรียเอนโดไฟท์จากส่วนของใบ ต้นและราก ข้าวจำนวน 10 สาย-

พันธุ์ และจำแนกชนิดโดย 16s rRNA พบว่า เป็นพวกที่ตรึงไนโตรเจนได้จำนวน 12 ชนิดคือ เป็น *Penibacillus* sp. 2 ชนิด, *Microbacterium* sp. 3 ชนิด, *Bacillus* sp. 3 ชนิด และ *Klebsiella* sp. 4 ชนิด เมล็ดข้าวที่ได้รับความเสียหายจากการเจริญของต้นพืช พบว่า พืชมีความสูงเพิ่มขึ้น น้ำหนักแห้งเพิ่มขึ้น และยังยับยั้งการเจริญของเชื้อราก่อโรคพืชได้ด้วย นอกจากนี้ พบว่า ผลิออกซินและสารยับยั้งเชื้อโรคพืช *siderophore* รวมทั้งยังมีบทบาทในการปลดปล่อยธาตุอาหารในดินได้อีกด้วย โดยพบว่า มี 6 สายพันธุ์ ที่ผลิต *siderophore* ได้ ส่วนอีก 4 สายพันธุ์ สามารถช่วยปลดปล่อยฟอสเฟตในดินได้ดี ซึ่ง Feng et al. (2004) ศึกษาการเคลื่อนที่ของแบคทีเรียเอนโดไฟต์ *Azospirillum brasilense* Yu62 จากรากสู่ลำต้นและภายในใบข้าวและยาสูบ พบว่า เชื้อมีการรวมกลุ่มที่บริเวณผิว ช่องว่างระหว่างเซลล์และระบบลำเลียงของลำต้นและใบพืชและโครงสร้างภายในของราก ซึ่งพบว่า แบคทีเรีย *A. brasilense* Yu62 สามารถขึ้นไปยังส่วนของราก ลำต้น และใบด้วยตัวเอง โดยดูจากจำนวนเชื้อที่มากขึ้นในส่วนต่างๆ ของข้าวและยาสูบ ซึ่งช่วยให้เข้าใจถึงการย้ายที่ของแบคทีเรียเอนโดไฟต์ในต้นพืช และ Tharek et al. (2011) ได้แยกแบคทีเรียเอนโดไฟต์จากใบของปาล์มน้ำมันซึ่งจำแนกเชื้อโดย 16SrDNA พบว่า เป็น *Enterobacter* sp., *Acinetobacter* sp., *Azospirillum* sp., *Glucanacetobacter* sp. และ *Phytobacter* sp. โดยเชื้อข้างต้นมีความสามารถในการตรึงไนโตรเจน และผลิตกรดอินโดลอะซิติกซึ่งเป็นฮอร์โมนส่งเสริมการเจริญเติบโตของต้นพืชได้ แล้วนำไปทดสอบการเข้าอาศัยในพืชอื่น ๆ คือข้าวโดยศึกษาการเคลื่อนย้ายและการอาศัยอยู่ของเชื่อดังกล่าวในต้นข้าว และศึกษาการผลิตเอนไซม์ที่ย่อยสลายผนังเซลล์ของพืชเพื่อให้เชื้อเอนโดไฟต์เข้าสู่ต้นพืชและแพร่กระจายในเซลล์พืชอาศัยได้ ซึ่งน่าจะเป็นเชื้อที่มีศักยภาพนำไปประยุกต์ใช้ในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชและมีศักยภาพในการเข้าอาศัยและและเพิ่มจำนวนในพืชอาศัยต่อไปซึ่งแบคทีเรียเอนโดไฟต์สามารถแยกได้จากส่วนต่างๆ ของข้าว (ภาพที่ 2) และในภาพที่ 3 แสดงความสัมพันธ์ของจุลินทรีย์เอนโดไฟต์และการประยุกต์ใช้ประโยชน์



ภาพที่ 2 แบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่ถูกแยกจากส่วนต่างๆ ของข้าว
ที่มา: Mano and Morisaki (2008)



ภาพที่ 3 ความสัมพันธ์ของจุลินทรีย์เอนโดไฟท์และการประยุกต์ใช้ประโยชน์
ที่มา : Ahemad and Kibret (2014)

การเข้าสู่รากพืชและลำต้นพืชของแบคทีเรียเอนโดไฟท์

นงลักษณ์ (2550) รายงานว่า แบคทีเรียเอนโดไฟท์จะเข้าสู่พืชทางช่องเปิดธรรมชาติ บริเวณระหว่างรากและ *hypocotyl* โดยเฉพาะการเข้าทางรากปฐมภูมิ และรากทุติยภูมิ บริเวณรอบๆ รากและ หมวกราก นอกจากนี้บาดแผลก็เป็นอีกเส้นทางหนึ่งที่แบคทีเรียชนิดนี้จะเข้าสู่พืช โดยแบคทีเรียเอนโดไฟท์ อาจจะอยู่เฉพาะตำแหน่งของการเข้าสู่พืชหรือแพร่กระจายทุกส่วนของพืช ผ่านทาง *intercellular space* ของ *cortex parenchyma* โดยสามารถอาศัยอยู่ภายในเซลล์พืช ในส่วน *intercellular apoplast* หรือใน *vascular system* โดยส่วนโคนต้นและรากจะเป็นส่วนของพืชที่มีการตั้งรกรากของเชื้อสูงที่สุด ปกติจะมีเชื้อหนึ่งชนิดหรือหลายชนิดที่พบอยู่อย่างหนาแน่น ถึง 10^4 หรือสูงกว่านี้ต่อกรัมน้ำหนัก ซึ่ง Rashid et al. (2012) ได้แยกแบคทีเรียเอนโดไฟท์จากมะเขือเทศจากส่วนของ ราก ลำต้น และใบ และได้ทำการศึกษาการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชโดยแบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่แยกได้ พบว่า แบคทีเรียเอนโดไฟท์ใช้ *1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC)* ที่เป็นองค์ประกอบของพืชใช้เป็นแหล่งของไนโตรเจนได้ ซึ่งเป็นผลมาจากเอนไซม์ *ACC deaminase* และทำการทดสอบการแสดงออกของเอนไซม์ดังกล่าวในการผลิตกรดอินโดลอะซิติก พบว่า *Microbacterium spp.* 3 สายพันธุ์ให้ระดับการสังเคราะห์กรดอินโดลอะซิติกสูงสุด คือ *Microbacterium sp. 3407bBRRJ (AS3)*, *Microbacterium sp. 3407bBRRJ (AS2)* และ *Microbacterium takaoensis strain PIP4 (AS1)* ได้ปริมาณกรดอินโดลอะซิติกที่ผลิตในอาหารเหลวที่มีปริมาณกรดอะมิโนทริปโตเฟนเป็นสารตั้งต้น 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิเมตร คือ 143.34, 105.5 และ 96.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิเมตร ตามลำดับ โดยเกิดจากการชักนำของ กรดอะมิโนทริปโตเฟน (*exogenous l-tryptophan*) และ เกิดจากกิจกรรมของเอนไซม์ *ACC deaminase* ในระดับ ปานกลาง โดย พบว่า ทั้ง 3 สายพันธุ์นี้ช่วยส่งเสริมความยาวของราก *Canola* ได้มากกว่าเชื้อ *Burkholderia phytofirmans* ที่เป็นเชื้อควบคุมจุลินทรีย์ที่ละลายฟอสเฟต

ฟอสฟอรัสเป็นองค์ประกอบของสารที่สำคัญในพืชหลายชนิด เช่น เป็นองค์ประกอบสำคัญของนิวคลีโอโปรตีน ฟอสโฟลิพิด เป็นแหล่งพลังงานของพืช อะดีโนซีนไตรฟอสเฟต ช่วยเคลื่อนย้ายพลังงานในพืช และกรดนิวคลีอิก เป็นต้น ธาตุฟอสฟอรัสมีประโยชน์ในการเร่งการเจริญเติบโตของราก ทำให้รากขยายยึด ส่งเสริมการเจริญของรากฝอยและ รากแขนง ทำให้ลำต้นแข็งแรงไม่ล้มง่ายและต้านทานโรค ช่วยการออกดอกและสร้างเมล็ดต้นอ่อน ช่วยในการสังเคราะห์แสง สร้างแป้งและน้ำตาล ช่วยให้พืชดูดไนโตรเจน โพแทสเซียม และโมลิบดีนัม ได้ดีขึ้น ฟอสเฟตในรูปที่เป็นประโยชน์ต่อพืชอยู่ในสารละลายในดิน พวกนี้มักจะเปลี่ยนไปอยู่ใน

รูปที่พืชใช้ประโยชน์ไม่ได้ในทุกสภาพของความเป็นกรดต่าง เช่น ถ้าดินเป็นกรด ฟอสเฟตจะทำปฏิกิริยาทางเคมีกับเหล็กหรือ อะลูมิเนียมไปเป็นเหล็กหรือ อะลูมิเนียมฟอสเฟตที่พืชไม่สามารถดูดไปใช้ได้หรือถ้าดินเป็นด่างจะทำปฏิกิริยาทางเคมีกับแคลเซียมและแมกนีเซียม เปลี่ยนไปเป็นแคลเซียมหรือแมกนีเซียมฟอสเฟตที่ไม่ละลายน้ำพืชนำไปใช้ประโยชน์ไม่ได้เช่นกัน เพื่อให้ฟอสฟอรัสหรือฟอสเฟตเป็นประโยชน์ต่อพืช จึงควรรักษาให้ดินมีปริมาณอินทรีย์วัตถุในระดับสูงและระดับความเป็นกรดต่างของดินควรอยู่ในช่วงประมาณ 6.0-7.0 รูปที่ฟอสฟอรัสจะเป็นประโยชน์ต่อพืชได้ คือ $H_2PO_4^-$ และ HPO_4^{2-} หากพืชขาดหรือได้รับฟอสฟอรัสไม่เพียงพอกับความต้องการของพืช รากพืชจะไม่เจริญ มีรากฝอยน้อยและรากจะพอม บาง ล้วน และมีจำนวนน้อย ต้นแคระแกรน การเจริญเติบโตจะหยุดชะงัก ใบมีสีแดงแซม เนื่องจากพืชมีการสังเคราะห์รงควัตถุ แอนโทไซยานิน เพิ่มขึ้น จึงทำให้สีของใบกลายเป็นสีม่วงเข้ม โดยเฉพาะเกิดที่ใบแก่ การออกดอกช้า มีขนาดเล็ก การติดเมล็ดน้อย และจำนวนลดลง พืชหักล้มได้ง่าย

จุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องกับการทำให้ฟอสเฟตเป็นประโยชน์ต่อพืชมีความสำคัญ เพราะฟอสฟอรัสเป็นธาตุอาหารพืชที่สำคัญธาตุหนึ่ง มีฟอสเฟตอยู่ในดินเป็นจำนวนมาก แต่ฟอสเฟตจะถูกตรึงอยู่ในดิน โดยกระบวนการทางเคมี อยู่ในรูปที่พืชไม่สามารถนำไปใช้เป็นประโยชน์ได้ จุลินทรีย์บางชนิดในดินจะช่วยทำให้ฟอสเฟตที่ถูกยึดตรึงอยู่ในดิน ให้อยู่ในรูปที่เป็นประโยชน์ต่อพืชได้ มีจุลินทรีย์ดินหลายชนิด ที่เป็นทั้งพวกแบคทีเรีย และเชื้อรา สามารถทำให้หินฟอสเฟตและฟอสเฟตที่ถูกยึดตรึงอยู่ในดินให้ละลายออกมาอยู่ในรูปที่เป็นประโยชน์ต่อพืชได้เพิ่มมากขึ้น

กลไกการละลายฟอสเฟตโดยจุลินทรีย์ (Khan et al., 2014)

ฟอสฟอรัสที่อยู่ในรูปที่ไม่ละลาย เช่น ไตรแคลเซียมฟอสเฟต (Ca_3PO_4) อะลูมิเนียมฟอสเฟต (Al_3PO_4) ไอรอนฟอสเฟต (Fe_3PO_4) และอื่น ๆ จะถูกเปลี่ยนไปอยู่ในรูปของฟอสฟอรัสที่ละลายได้โดยจุลินทรีย์ละลายฟอสเฟต มีการศึกษาเกี่ยวกับกระบวนการละลายฟอสเฟตของจุลินทรีย์อย่างแพร่หลายพบว่า กระบวนการละลายฟอสเฟตของจุลินทรีย์ที่ได้รับการยอมรับส่วนใหญ่คือ การสร้างกรดอินทรีย์โมเลกุลต่ำของจุลินทรีย์เป็นกระบวนการหนึ่งซึ่งช่วยในการละลายฟอสเฟต ประสิทธิภาพในการละลายฟอสเฟตนั้นขึ้นอยู่กับชนิดและ ความเข้มข้นของกรดอินทรีย์ที่ปลดปล่อยออกมาในอาหารซึ่งคุณภาพของกรดอินทรีย์มีความสำคัญมากกว่าปริมาณของกรดอินทรีย์ที่ถูกปล่อยออกมา นอกจากนั้น การสร้างกรดอินทรีย์หลาย ๆ ชนิดในขณะเดียวกันของจุลินทรีย์ละลายฟอสเฟตสามารถช่วยให้ประสิทธิภาพการละลายฟอสเฟตดี

จุลินทรีย์ในดินหลายชนิดสามารถละลายฟอสเฟตได้ได้แก่ แบคทีเรีย รา และแอคติโนมัยซีท ฟอสเฟตที่ละลายได้มีส่วนใหญ่เกิดจากการสร้างกรดแล้วปลดปล่อยออกมา ดังนี้

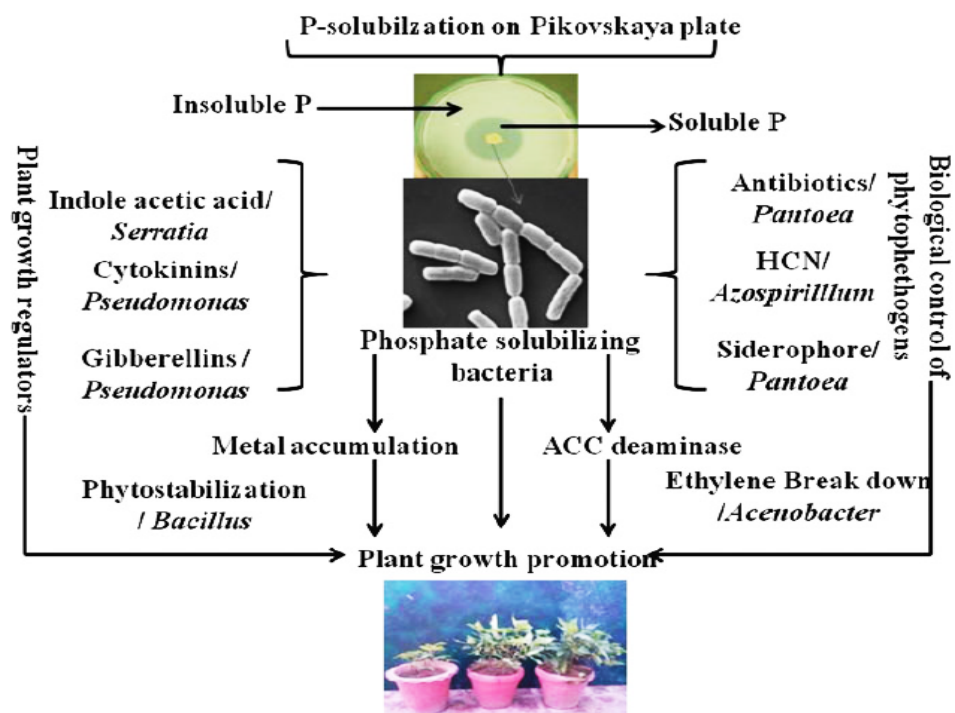
1. กรดอินทรีย์ (*organic acids*) กรดอินทรีย์ที่พบทั่วไปโดยจุลินทรีย์ปลดปล่อยออกมา ได้แก่ กรดฟอร์มิก กรดอะซิติก กรดโพรพิโอนิก กรดไกลโคลิก กรดฟูมาริก และกรดซัคซินิก เป็นต้น ส่วนมากแล้ว *heterotroph* จะปลดปล่อยกรดอินทรีย์ออกมาจำนวนหนึ่งเสมอในระหว่างการย่อยสลายสารอินทรีย์ แต่มีความแตกต่างกันทั้งชนิด และปริมาณของกรดอินทรีย์

2. กรดอนินทรีย์ (*inorganic acids*) จุลินทรีย์บางชนิดสร้างและปลดปล่อยกรดอนินทรีย์ออกมา ได้แก่ กรดไนตริก จากกิจกรรมของ *Nitrobacter* และ *Thiobacillus* ตามลำดับ

กรดต่าง ๆ ที่เกิดขึ้นเหล่านี้จะส่งผลให้ pH ลดลง และเกิดการละลายฟอสเฟตมากขึ้น กรดอินทรีย์บางชนิดอาจเกิดคีเลตกับแคลเซียมและเหล็ก ทำให้เกิดการละลายและการใช้ฟอสเฟตมากขึ้น อย่างไรก็ตาม ปริมาณการละลายฟอสเฟต จะแตกต่างกัน ตามความสามารถในการละลายของจุลินทรีย์แต่ละชนิด รวมทั้งลักษณะ และชนิดของหินฟอสเฟตด้วย

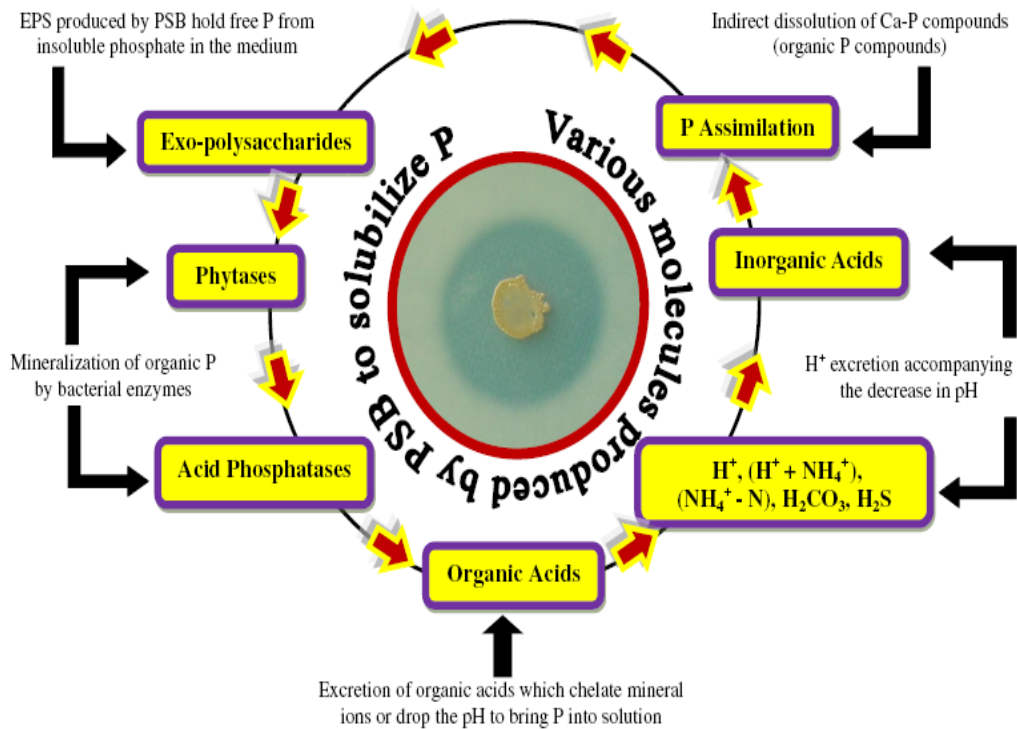
สารประกอบอินทรีย์ฟอสฟอรัสจะผ่านกระบวนการสะสมแร่ธาตุ (*mineralization*) และฟอสฟอรัสจะถูกนำไปใช้เป็นอาหารของพืช กระบวนการนี้จะเกิดขึ้นโดยจุลินทรีย์ที่อยู่บริเวณรากของพืช (*Rhizosphere microflora*) ที่สามารถเปลี่ยนสภาพของสารประกอบอินทรีย์ฟอสฟอรัสไปเป็นฟอสฟอรัสที่สามารถละลายได้ กระบวนการสะสมแร่ธาตุ (*mineralization*) เกิดขึ้นโดยผ่านการทำงานของเอนไซม์โดยเฉพาะเอนไซม์ฟอสฟาเตส (*Phosphatases*) และเอนไซม์ไฟเตส (*Phytases*) ที่ถูกปล่อยออกมาโดยจุลินทรีย์ (Khan et al., 2014) ซึ่งเอนไซม์ฟอสฟาเตส (*Phosphatases*) จะถูกปล่อยออกมาภายนอกเซลล์ของจุลินทรีย์และจะไม่จำเพาะต่อสารตั้งต้นซึ่งใช้สารประกอบอินทรีย์ฟอสฟอรัสเป็นสารตั้งต้นในการเปลี่ยนไปเป็น ฟอสฟอรัสอนินทรีย์ โดยทั่วไปแล้วเอนไซม์ฟอสฟาเตส (*Phosphatases*) มักจะพบในเชื้อราเป็นส่วนใหญ่ อีกกลไกหนึ่งของการละลายฟอสเฟตในกระบวนการสะสมแร่ธาตุของสารประกอบอินทรีย์ฟอสฟอรัสผ่านการย่อยสลายโดยเอนไซม์ไฟเตส (*Phytases*) ซึ่งเป็นการปลดปล่อยฟอสฟอรัสจากไฟเตท (*phytate*) โดยเฉพาะ ซึ่งไฟเตทเป็นส่วนประกอบหลักของสารประกอบอินทรีย์ฟอสฟอรัสในดิน ซึ่งความสามารถในการได้รับฟอสฟอรัสของพืชจากไฟเตท (*phytate*) นั้นมีอยู่อย่างจำกัด โดย Richardson et al. (2001) พบว่า ต้นอะราบิโดพซิส (*Arabidopsis*) มีการเจริญและได้รับฟอสฟอรัสจากไฟเตทเพิ่มขึ้นเมื่อได้รับการส่งถ่ายยีน (*phyA*) จากเชื้อรา *Aspergillus niger* นอกจากนี้ ยังมีเอนไซม์ชนิดอื่น ๆ เช่น *Phosphonates* และ *C-P lyases* เป็นเอนไซม์ที่สามารถแยกพันธะระหว่างคาร์บอนกับฟอสฟอรัสของ ออกาโน-ฟอสโฟเนตได้ เมื่ออินทรีย์ฟอสเฟตหรือสารประกอบอินทรีย์ฟอสเฟตถูกเปลี่ยนเป็นฟอสฟอรัสที่อยู่ในรูปที่ละลายได้ จะถูกนำไปใช้เป็นสารอาหารของพืชและจุลินทรีย์ได้ง่ายขึ้น หลังจากนั้นฟอสฟอรัสจะถูกนำไปเป็นส่วนประกอบของสารอินทรีย์ภายในเซลล์ เช่น ดีเอ็นเอ อาร์เอ็นเอ และสารให้พลังงานสูง ATP

ดังนั้นจากกิจกรรมของเอนไซม์สามารถประยุกต์ใช้การเพาะเลี้ยงแบคทีเรียหรือเชื้อราเพื่อผลิตเอนไซม์ฟอสฟาเตส และไฟเตสได้เพื่อใช้ในการเพิ่มผลผลิตได้อย่างยั่งยืน บทบาทของแบคทีเรียละลายฟอสเฟตแสดงในภาพที่ 4 และในภาพที่ 5 แสดงชนิดของสารอินทรีย์และสารอนินทรีย์ที่ผลิตโดยจุลินทรีย์ที่ละลายฟอสเฟตในดิน



ภาพที่ 4 บทบาทของแบคทีเรียละลายฟอสเฟต

ที่มา: Khan et al. (2014)



ภาพที่ 5 ชนิดของสารอินทรีย์และสารอนินทรีย์ที่ผลิตโดยจุลินทรีย์ที่ละลายฟอสเฟตในดิน
ที่มา : Ahemad and Kibret (2014)

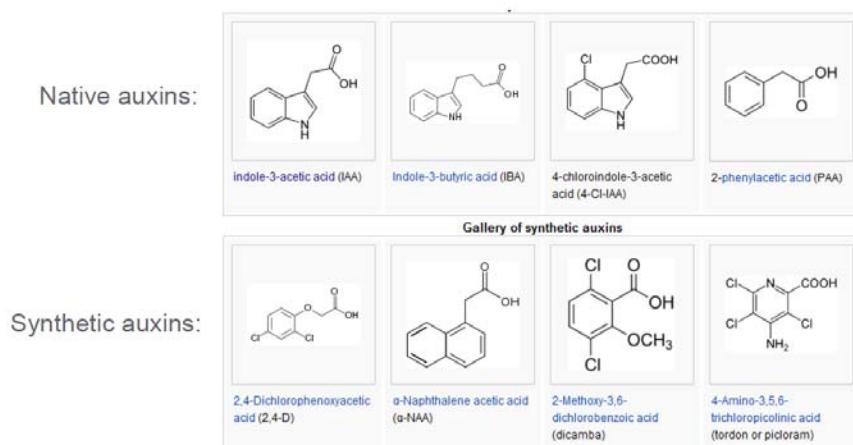
Wu et al. (2005) ศึกษาผลของการใช้ปุ๋ยชีวภาพที่ประกอบไปด้วยแบคทีเรียที่ตรึงไนโตรเจน แบคทีเรียที่ช่วยปลดปล่อยฟอสเฟตและโพแทสเซียมจากดิน รวมทั้ง *Arbuscular mycorrhizal fungi* (AMF) เพื่อช่วยในการเจริญของข้าวโพดที่ปลูกในเรือนทดลอง พบว่า เมื่อผสมจุลินทรีย์ทั้ง 4 กลุ่มคือ AMF คือ *Glomus misseeae* หรือ *Glomus intraradices* ในที่มีและไม่มีแบคทีเรียตรึงไนโตรเจน (N_2 fixer) (*Azotobacter chroococcum*) แบคทีเรียที่ช่วยปลดปล่อยฟอสเฟตจากดิน คือ *Bacillus megaterium* และแบคทีเรียที่ช่วยปลดปล่อยโพแทสเซียมจากดินคือ *Bacillus mucilaginous* พบว่า การใช้ AMF ร่วมกับแบคทีเรียทั้ง 3 ชนิด มีผลทำให้ต้นข้าวโพดเจริญเติบโตในด้านของน้ำหนัก ความสูงของการงอกมากที่สุด และเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ และเมื่อใส่ปุ๋ยชีวภาพดังกล่าวลงไปในดินเพียงปริมาณเล็กน้อย ก็พบว่า ต้นข้าวโพดมีการเจริญเติบโตได้ดีเมื่อเปรียบเทียบกับการใช้ปุ๋ยอินทรีย์และปุ๋ยเคมี ซึ่งการใช้ปุ๋ยชีวภาพนั้นไม่เพียงแต่ทำให้ผลผลิตและคุณค่าทางโภชนาการในพืชสูงขึ้นเท่านั้น แต่ยังมีผลในการปรับปรุงคุณภาพดินโดยการเพิ่มปริมาณธาตุต่าง ๆ เช่น ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส และโพแทสเซียม รวมทั้งเพิ่มปริมาณสารอินทรีย์และปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดในดินอีกด้วย ในทางกลับกัน ในการทดลองนี้ พบว่า พวก AMF มีผลในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่ช่วยปลดปล่อยฟอสเฟตจากดินคือ *Bacillus megaterium* ซึ่งมีผลทำให้ดินขาดธาตุฟอสเฟต แต่การเกิดสภาพเช่นนี้มีผลทำให้ส่งเสริมการเจริญของแบคทีเรียพวกที่ตรึงไนโตรเจน และพบ AMF จำนวนมาก ซึ่ง

Sharma et al. (2007) รายงานว่า แบคทีเรีย 2 สายพันธุ์ที่แยกได้จากดิน คือ *Pseudomonas fluorescens* และ *Bacillus megaterium* สามารถช่วยละลายฟอสเฟต มีความสามารถในการผลิตสารส่งเสริมการงอกและการเจริญของเมล็ดถั่วชิกพี (*chickpea*) ได้ ต่อมา Mahdi et al. (2010) รายงานว่า การใช้ปุ๋ยชีวภาพมีความจำเป็นต่อการทำเกษตรอินทรีย์ เนื่องจากเป็นการเพิ่มสารอาหารที่จำเป็นที่มีบทบาทในการรักษาคุณภาพของดินในแปลงเกษตรอินทรีย์ให้มีชีวิตในระยะยาวและยั่งยืน ซึ่งปัจจุบันมีการทำปุ๋ยชีวภาพออกมาในรูปแบบของเหลว หรือน้ำหมักชีวภาพ ซึ่งทำให้เกษตรกรสะดวกในการนำไปใช้ได้ง่าย และสามารถผลิตปุ๋ยน้ำชีวภาพในเชิงการค้าได้อีกด้วย

Laskar and Sharma (2013) รายงานว่า แบคทีเรียที่สามารถตรึงก๊าซไนโตรเจนซึ่งแยกได้จากบริเวณรอบรากข้าวในอินเดีย จำนวน 11 ไอโซเลต และจำแนกโดย 16S rDNA พบว่าเป็น *Shingomonas zotifigens*, *Pseudomonas putida*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Acinetobacter radioresistance*, *Alkaligenes faecalis*, *Enterobacter cloaceae* subsp. *dissolvens*, *Pantoea agglomerans*, *Klebsiella pneumoniae*, *Achromobacter xyloxydans*, *Herbispirillum rubrisubalbicans* และ *Herbispirillum* sp. ซึ่ง *Sphingomonas azotifigens* เป็นแบคทีเรียสายพันธุ์ใหม่ที่แยกได้ในอินเดีย และพบว่า ไอโซเลต KR-6 (*Stenotrophomonas maltophilia*) and KR-7 (*Herbispirillum rubrisubalbicans*) มีความสามารถในการตรึงก๊าซไนโตรเจนและมีศักยภาพในการผลิต IAA และผลิตเอนไซม์ ACC deaminase และยังมีบทบาทช่วยปลดปล่อยฟอสเฟตในดินอีกด้วย นอกจากนี้ Zhang et al. (2013) รายงานว่า การเพิ่มสารอาหารลงในดินและการปลูกพืชแบบประณีต ส่งผลต่อการปลูกพืชเศรษฐกิจในประเทศจีน ซึ่งได้ประเมินอิทธิพลของระบบนิเวศของการปลูกพืชแบบเดิมกับการปลูกพืชแบบประณีต พบว่า มีผลทำให้ดินมีสารคาร์บอนอินทรีย์ และปริมาณไนโตรเจนและดินมีการปลดปล่อยธาตุฟอสฟอรัสเพิ่มขึ้น และดินมีค่าการนำไฟฟ้าดีขึ้น แต่คุณสมบัติทางกายภาพของดิน เช่น ความหนาแน่นของเนื้อดิน ปริมาณดินเหนียว ความสามารถในการอุ้มน้ำ ไม่มีการเปลี่ยนแปลงมากนัก ซึ่งพบว่า การใส่ปุ๋ยมูลสัตว์และปุ๋ยอินทรีย์มีส่วนสำคัญต่อการเพิ่มขึ้นของธาตุอาหารในดิน มีรายงานของ เกตน์ณิกา (2556) พบว่า *Burkholderia* sp. ที่แยกได้จากดินนาข้าว สามารถละลายฟอสเฟตได้ 180-187 มิลลิกรัมฟอสเฟตต่อลิตร ส่วน Gupta et al. (2012) ได้แยกและจำแนกชนิดของแบคทีเรียที่สามารถละลายฟอสเฟต เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการเจริญเติบโต พบว่า จำแนกชนิดของแบคทีเรียด้วย 16S rRNA พบว่า เป็น *Pseudomonas synxantha*, *Burkholderia gladioli*, *Enterobacter hormaechei* และ *Serratia marcescens*

กรดอินโดลอะซีติก (Indole-3-acetic acid, IAA)

กรดอินโดลอะซีติก หรือที่เรียกว่า ออกซิน (*auxin*) เป็นสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช (*plant growth regulating chemicals : PGRC*) เกิดขึ้นตามธรรมชาติ (Lambrecht et al., 2000) เป็นฮอร์โมนพืชที่มีบทบาทในการกระตุ้นการเจริญเติบโตและพัฒนาการของพืช เพราะมีผลเกี่ยวกับการเจริญของลำต้นและราก การแตกตา การออกดอก การติดผล การเจริญของผล และเมล็ด นอกจากนี้ ยังมีบทบาทต่อขบวนการทาง สรีรวิทยา อีกมากมาย ออกซินเป็นสารที่มีบทบาทอย่างมากในด้านการเพิ่มขนาดของเซลล์ นอกจากนี้ ยังมีบทบาทต่อการเพิ่มความยาวของเซลล์อีกด้วย ในธรรมชาติพืชมีการสังเคราะห์สารในกลุ่มออกซินขึ้นมาหลายชนิดด้วยกัน แต่ชนิดที่มีบทบาทและมีความสำคัญมากที่สุด คือ IAA มีการสังเคราะห์สารต่าง ๆ ที่มีคุณสมบัติคล้ายออกซินเพื่อนำไปใช้ประโยชน์ทางการเกษตร สารสังเคราะห์เหล่านี้มีอยู่หลายชนิด แต่ที่นิยมใช้กันทั่วไปมีอยู่เพียงไม่กี่ชนิด ได้แก่ NAA (1-naphthylacetic acid) IBA (4-(indol-3-yl) butyric acid) 2,4-D (2,4-dichlorophenoxyacetic acid) และ 4-CPA (4-chlorophenoxyacetic acid) ซึ่งออกซินในความเข้มข้นที่พอเหมาะจะช่วยส่งเสริมการเจริญของต้นพืชได้ แต่ถ้ามีออกซินความเข้มข้นสูง มีผลในการยับยั้งการเจริญของพืชได้โดยออกซินมีคุณสมบัติเป็นสารกำจัดวัชพืช ออกซินทุกชนิดถ้าใช้ความเข้มข้นสูงจะสามารถฆ่าพืชได้ ดังนั้น จึงมีการนำสารออกซินมาใช้เป็นยากำจัดวัชพืชอย่างกว้างขวาง ภาพที่ 6 แสดงโครงสร้างทางเคมีของออกซินธรรมชาติและออกซินสังเคราะห์



Auxins have an aromatic ring and a carboxylic acid group

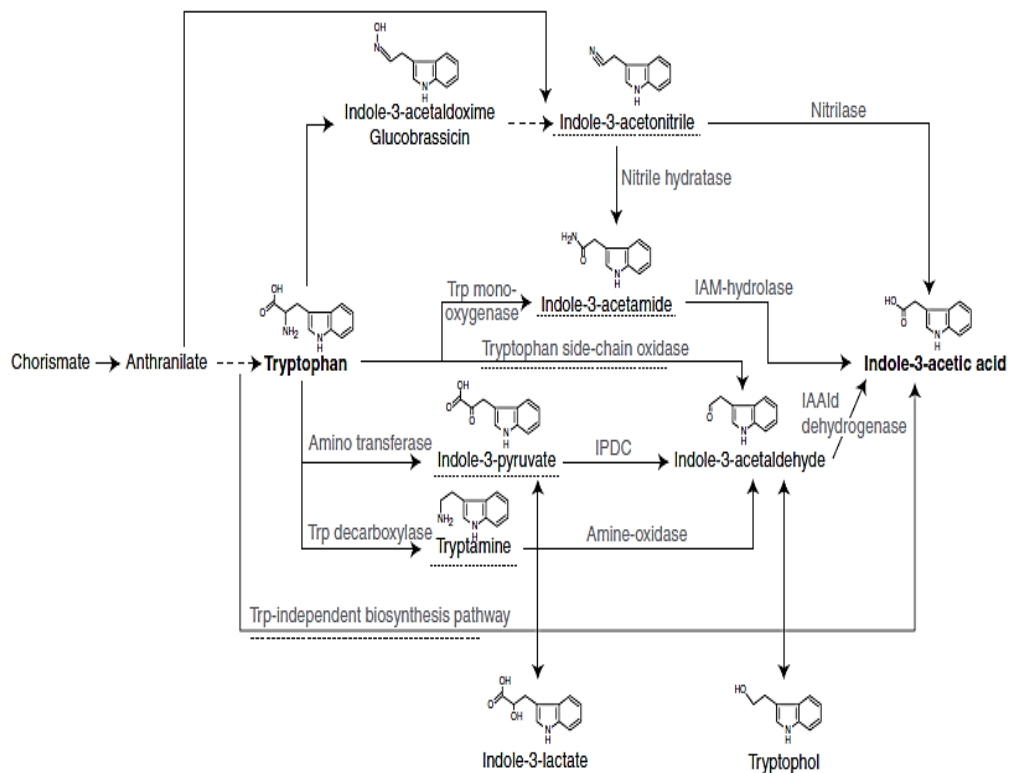
ภาพที่ 6 โครงสร้างทางเคมีของออกซินธรรมชาติและออกซินสังเคราะห์

ที่มา: http://2011.igem.org/Team:Imperial_College_London/Project_Auxin_Overview

15 สิงหาคม 2559

กลไกการสังเคราะห์กรดอินโดลอะซิติกโดยแบคทีเรีย (Spaepen and Vanderleyden, 2010)

การสังเคราะห์กรดอินโดลอะซิติกในแบคทีเรีย เกิดขึ้นจากการแสดงออกของยีน โดยใช้ กรดอะมิโน ทริปโตเฟน (tryptophan) เป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์กรดอินโดลอะซิติก ซึ่ง กระบวนการสังเคราะห์ทริปโตเฟน เริ่มจากกระบวนการเมตาบอลิซึมของ *chorismate* ซึ่ง เกิดปฏิกิริยาทั้งหมด 5 ขั้นตอนซึ่งควบคุมโดย *trp* ยีน โดย *chorismate* ได้จากการสังเคราะห์จาก *phosphoenolpyruvate* และ *erythrose 4-phosphate* ในวิถี *shikimate* ซึ่งเป็นวิถีหลักในการ สังเคราะห์กรดอะมิโน (aromatic amino acids) และ สารเมแทบอไลต์ทุติยภูมิ (secondary metabolites) ต่าง ๆ ดังแสดงในภาพที่ 7



ภาพที่ 7 วิธีการสังเคราะห์กรดอินโดลอะซิติก

ที่มา: Spaepen and Vanderleyden (2010)

การทดสอบกรดอินโดลอะซิติก (Indole test) (MacWilliams, 2009)

การทดสอบกรดอินโดลอะซิติกเป็นการทดสอบทางชีวเคมีของแบคทีเรียที่สามารถผลิต กรดอินโดลอะซิติกได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อ *Tryptone* จากการไฮโดรไลซิส (Hydrolysis) และการ ดึงหมู่เอมีน ($-NH_2$) ออกจากโมเลกุลของกรดอะมิโนทริปโตเฟน (Tryptophan) โดยการทำงานของเอนไซม์ ทริปโตฟานเนส (Tryptophanase) ได้ผลิตภัณฑ์สุดท้ายคือ วงแหวนอินโดล กรดไพ-

รูวิก และ แอมโมเนียม ในการทดสอบกรดอินโดลอะซิติก (Indole test) สารเคมีที่ใช้ในการทดสอบคือ Kovac's reagent โดยมีส่วนประกอบคือ Amyl หรือ isoamyl alcohol (butyl alcohol) 150.0 มิลลิลิตร *p*-dimethylaminobenzaldehyde (DMAB) และ กรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น เมื่อแบคทีเรียสามารถผลิตกรดอินโดลอินอะซิติกได้ จะเกิดปฏิกิริยาเคมีระหว่างวงแหวนอินโดล และ *p*-dimethylaminobenzaldehyde (DMAB) ที่เป็นส่วนประกอบของ Kovac's reagent ภายใต้สภาวะที่เป็นกรด ทำให้เกิดวงแหวนสีแดงที่เรียกว่า *rosindole*

การวิเคราะห์คุณสมบัติของดิน

การวัดความเป็นกรด-ด่าง ของดิน (pH)

ความเป็นกรด (acidity) หรือความเป็นด่าง (alkalinity) ของดิน การที่ดินมีสภาพเป็นกรด หรือเป็นด่าง เป็นเพราะ hydrogen ion (H^+) ในสารละลายดิน ถ้าในสารละลายดินมี H^+ มากกว่า OH^- ดินมีปฏิกิริยาเป็นกรด ถ้า H^+ น้อยกว่า OH^- ดินมีปฏิกิริยาเป็นด่าง และถ้า H^+ เท่ากับ OH^- ดินมีปฏิกิริยาเป็นกลาง การวิเคราะห์ความเป็นกรดเป็นด่างของดิน นิยมวัดเป็นค่า pH เรียกว่า มาตราพีเอช (pH scale) ที่บ่งบอกเป็นตัวเลขซึ่งสัมพันธ์กับความเข้มข้นของ H^+ มากกว่าการใช้ความเข้มข้นของ H^+ โดยตรงเป็นกรณีของความเป็นกรดและความเป็นด่าง

การวัด pH ของดิน ในห้องปฏิบัติการทดลองใช้วัดด้วยเครื่อง pH meter หลักการเหมือนกับการวัด pH โดยทั่วไป แต่การวัด pH ของดินใช้สารละลายได้หลายชนิด เป็นต้นว่า วัดในน้ำ ในสารละลายโพแทสเซียมคลอไรด์ สารละลายแคลเซียมคลอไรด์ หรือโซเดียมฟลูออไรด์ การใช้สารละลายต่างชนิดกัน จะเป็นตัวชี้บอกคุณสมบัติบางอย่างของดินนั้น ๆ เมื่อต้องการทราบเพียงว่าดินมี pH เป็นกรด หรือด่าง การวัดใช้วัดในน้ำ ในอัตราส่วนของดินต่อน้ำต่าง ๆ กัน ตั้งแต่อัตราส่วน 1:1, 1:2, 1:2.5, 1:5 ผู้วัดจะเลือกใช้อัตราส่วนใดก็ได้ แต่มีข้อสังเกตว่าปริมาณสัดส่วนของน้ำที่ต่างกันจะมีผลต่อค่า pH ที่วัดได้ ในห้องปฏิบัติการวิเคราะห์ดินโดยทั่วไปมักใช้สัดส่วนดินต่อน้ำเป็น 1:1 หรือ 1:2 ในกรณีที่ต้องการทราบว่าความเป็นกรดของดินเกิดจากปริมาณ Al^{3+} ในดิน หรือจาก H^+ มักใช้วัด pH ในสารละลายของ KCl ความเข้มข้น 1N ในอัตราส่วน 1:1

วิธีที่นิยมใช้ในการวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง ของดินมี 2 วิธีคือ วิธีที่นิยมใช้ในสนามคือวิธี Colorimetric method ซึ่งส่วนใหญ่ใช้สารประกอบอินทรีย์ที่ให้สีเฉพาะเจาะจงเมื่อสัมผัสกับดินที่มีค่าความเป็นกรด-ด่าง หนึ่ง ๆ และนำไปเทียบกับ chart สีมาตรฐานของ pH indicator แต่ละชนิด ซึ่งค่าที่เป็นค่าโดยประมาณเท่านั้น ส่วนวิธีที่นิยมใช้ในห้องปฏิบัติการคือ วิธี Electrometric หรือ potentiometric method ใช้เครื่องมือ pH meter จากหลักการความต่าง

ศักย์ไฟฟ้าระหว่างขั้วไฟฟ้า (glass electrode) สองอันที่จุ่มอยู่ในสารละลายดิน ซึ่งผันแปรโดยกลับกับความเข้มข้นของ H^+ อิสระที่อยู่ในสารละลายความสัมพันธ์นี้ถูกนำมาดัดแปลงให้อ่านออกมาเป็นค่าความเป็นกรด-ด่าง บนหน้าปัดของ pH meter ระดับความรุนแรงของความเป็นกรด-ด่างของดิน แสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ระดับความรุนแรงของความเป็นกรด-ด่างของดิน (ดิน : น้ำ = 1 : 1)

ระดับ (rating)	พิสัย (range)
เป็นกรดรุนแรงมากที่สุด (ultra acid)	< 3.5
เป็นกรดรุนแรงมาก (extremely acid)	3.5-4.5
เป็นกรดจัดมาก (very strongly acid)	4.6-5.0
เป็นกรดจัด (strongly acid)	5.1-5.5
เป็นกรดปานกลาง (moderately acid)	5.6-6.0
เป็นกรดเล็กน้อย (slightly alkaline)	6.1-6.5
เป็นกลาง (neutral)	6.6-7.3
เป็นด่างเล็กน้อย (slightly alkaline)	7.4-7.8
เป็นด่างปานกลาง (moderately alkaline)	7.9-8.4
เป็นด่างจัด (Strongly alkaline)	8.5-9.0
เป็นด่างจัดมาก (very strongly alkaline)	>9.0

ที่มา: สำนักวิทยาศาสตร์เพื่อการพัฒนาที่ดิน (2547)

การวิเคราะห์ความหนาแน่นรวมของดิน (soil bulk density)

ความหนาแน่นรวมของดิน หมายถึง สัดส่วนระหว่างมวลของดิน ขณะที่มวลแห้งสนิท ต่อหนึ่งหน่วยปริมาตรรวมของดิน (ปริมาตรของอนุภาคดินและช่องว่างในดิน) ค่านี้จะแตกต่างจาก “ความหนาแน่นของอนุภาค” (particle density) ซึ่งหมายถึง สัดส่วนระหว่างมวลของดิน ขณะที่แห้งสนิทต่อหนึ่งหน่วยปริมาตรของส่วนที่เป็นของดิน ค่าความหนาแน่นของอนุภาคจึงสูงกว่าค่าความหนาแน่นรวมเสมอ ค่าความหนาแน่นรวมมีหน่วยเป็นน้ำหนักต่อหน่วยปริมาตร ที่ใช้โดยทั่วไปคือ $g\ cm^{-3}$ วิธีการหาความหนาแน่นรวมของดินมีหลายวิธี แต่ที่นิยมใช้กันคือ clod method และ core method ปกติค่าความหนาแน่นจาก clod method จะสูงกว่า core method เนื่องจากปริมาตรของดินไม่ได้รวมถึงปริมาตรของช่องว่างระหว่างเม็ดดินกับวงแหวนวิธีที่นำมาใช้ในห้องปฏิบัติการด้านวิเคราะห์ดินของกรมพัฒนาที่ดินที่ใช้ core method

หลักการ ดินในที่ต่าง ๆ จะมีค่าความหนาแน่นรวมแตกต่างกันไป ขึ้นอยู่กับปริมาณอินทรีย์วัตถุในดิน เนื้อดินโครงสร้างของดิน และการเขตรกรรม เป็นต้น โดยทั่ว ๆ ไป ค่าความหนาแน่นรวมของดินบนที่มีเนื้อดินเป็นดินเหนียว ดินร่วนปนเหนียว และดินร่วนปนทรายเบ่งมีค่าอยู่ในช่วง $1.20-1.80 \text{ g cm}^{-3}$ ส่วนใหญ่ค่าความหนาแน่นรวมของดินจะเพิ่มขึ้นตามความลึก เนื่องจากมีอินทรีย์วัตถุน้อยกว่าดินบน ดินล่างต้องรับน้ำหนักของดินที่อยู่ข้างบน หรือเครื่องมือเขตรกรรม การเหยียบย่ำของคน หรือสัตว์

วิเคราะห์ปริมาณน้ำในภาคสนาม (field water content)

คือสภาพของดินที่สามารถอุ้มน้ำหรือดูดซับน้ำได้มากที่สุดซึ่งอยู่ในช่วงความลึกจากผิวดินลงไป 6 นิ้ว ช่องว่างขนาดเล็กในดินจะอึดตัวด้วยน้ำ ส่วนน้ำที่อยู่ในช่องว่างขนาดใหญ่จะเคลื่อนที่ออกหมดโดยแรงดึงดูดของโลก น้ำที่เป็นประโยชน์ต่อพืชจะมากหรือน้อยขึ้นอยู่กับเนื้อดินเป็นหลัก ดินเหนียว ซึ่งเป็น ดินเนื้อละเอียด พบว่าน้ำที่เป็นประโยชน์ต่อพืชมีช่วงกว้างกว่าดินร่วนและดินทราย การให้น้ำอย่างมีประสิทธิภาพสูงสุดในการเพาะปลูกต้องคำนึงเนื้อดินเป็นองค์ประกอบด้วย ถ้าเนื้อดินเป็นดินทรายการให้น้ำต้องบ่อยครั้งมากกว่าดินร่วนและดินเหนียว ในการหาน้ำที่เป็นประโยชน์ต่อพืชทำได้ดังนี้ น้ำที่เป็นประโยชน์ = ความจุความชื้นภาคสนาม - ความชื้นที่จุดเหี่ยวถาวร สามารถแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความชื้นของดินในระดับต่างๆกับเนื้อดิน

รายงานการวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Ouzari et al. (2008) รายงานการแยกแบคทีเรียที่แยกได้จากปมของต้นมะกอก พบว่าทุกไอโซเลทสามารถผลิตสารเร่งการเจริญของพืช IAA ซึ่งเมื่อจำแนกชนิดของแบคทีเรียโดย 16 rRNA พบว่า เป็น *Pseudomonas savastanoi*, *Pantoea oleae/agglomerans*, *Burkholderia cepacia*, *Pseudomonas putida*, *Stenotrophomonas maltophilia* และ *Hafnia alvei* ต่อมา Shahab et al. (2009) รายงานว่า พบแบคทีเรียที่สามารถละลายฟอสเฟต จำนวน 3 ไอโซเลท คือ CMG854, CMG857, CMG860 ที่แยกได้จากดิน โดยเฉพาะเลี้ยงเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่ต่างกัน 4 ชนิด พบว่า แบคทีเรียทั้ง 3 สายพันธุ์ สามารถผลิตออกซิน เมื่อวิเคราะห์โดยใช้วิธีการทางชีวภาพและวิเคราะห์โดย HPLC พบว่า เป็นออกซินชนิด IAA และเมื่อเพาะเลี้ยงแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกรดอะมิโนทริปโตเฟนอยู่ แบคทีเรียสามารถผลิตออกซินที่มีผลการเจริญของรากและลำต้นของถั่ว *Vigna radiate* และ พบว่า แบคทีเรีย CMG860 มีประสิทธิภาพในการผลิตสารส่งเสริมการเจริญมากที่สุด ซึ่ง Amal et al. (2011) ศึกษาจุลินทรีย์ที่มีศักยภาพในการ

ผลิตสารกำจัดวัชพืชที่แยกได้จากจุลินทรีย์รอบรากพืชของ *Polygonum monspeliensis*, *Phalaris paradox* และ *Convolvulus arvensis* ที่โตอยู่บนตัวอย่างปุ๋ยหมัก ซึ่งพบว่า แบคทีเรีย *Pseudomonas syringae* st.1, *Pseudomonas syringae* st.2 และ *Colletotrichum* sp. ผลิตสารกำจัดวัชพืชได้ และสามารถยับยั้งการงอกของเมล็ด และลดความยาวของต้นและราก ของวัชพืชได้ และเมื่อวิเคราะห์สารกำจัดวัชพืชจากจุลินทรีย์ดังกล่าวข้างต้น พบว่า *P. syringae* st.1 ผลิตสารพวก coronatine และ syringopeptin ส่วน *P. syringae* st.2 ผลิตกรดเพอรูลิก และอนุพันธ์ syringopeptin และพบว่า ketopiperazine และอนุพันธ์ colletotrichins เป็นสารที่ผลิตได้จาก *Colletotrichum* sp. และ Brasil et al. (2011) คัดเลือกแบคทีเรีย *Rhizobacteria* ที่แยกได้จากบริเวณรอบรากพืชต่าง ๆ ของพืชที่สามารถผลิต phytoxin เพื่อใช้ในการควบคุมวัชพืช โดยนำไปทดสอบการงอกของพืช *Lactuca sativa* L. และ *Triticum aestivum* L. และพบว่าแบคทีเรีย *Bacillus cereus*, *B. pumilus* และ *Stenotrophomonas maltophilia* สามารถผลิต phytoxin ที่น่าจะนำไปพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ในการกำจัดวัชพืชได้ นอกจากนี้ Bal et al. (2013) รายงานการผลิต IAA จากแบคทีเรียที่แยกได้จากบริเวณรอบรากพืช ได้แบคทีเรียจำนวน 355 ไอโซเลต พบว่ามีจำนวน 6 ไอโซเลต ที่สามารถผลิต 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) deaminase ได้ 603.94 to 1350.02 nmol α -ketobutyrate $mg^{-1} h^{-1}$ และ ผลิต IAA ได้ 10.54 to 37.65 $\mu M ml^{-1}$ เมื่อจำแนกชนิดของแบคทีเรียโดย 16 srRNA พบว่า เป็น *Bacillus*, *Microbacterium*, *Methylophaga*, *Agromyces* และ *Paenibacillus* เมื่อทดสอบการเร่งการเจริญของข้าว พบว่า มีผลต่อการเจริญแตกต่างกัน รวมทั้งการยึดตัวของรากที่มีความสัมพันธ์กับกิจกรรมของเอนไซม์ 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) deaminase ดีมาก และมี 2 สายพันธุ์ ที่ผลิต siderophores ซึ่งแสดงให้เห็นถึงความหลากหลายของจุลินทรีย์บริเวณรอบรากพืชที่มีผลในการส่งเสริมการเจริญของต้นข้าวและสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการจัดการพืชได้ต่อไป

สุจิตตรา และคณะ (2556) ที่ได้ทดสอบความสามารถในการผลิตสารส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชจากแบคทีเรียเอนโดไฟท์บริเวณรากข้าวเจ้าหอมสุพรรณบุรี พบว่า แบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่สามารถผลิตสารส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช คือ สามารถละลายฟอสเฟต และผลิตกรดอินโดลอะซิติกได้ ซึ่งเป็นไอโซเลต KJHSB-9 ที่สามารถผลิตสารส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชได้ในระดับสูง คือ สามารถละลายฟอสเฟตและผลิตกรดอินโดลอะซิติกได้ 465.9 ไมโครกรัมต่อมิลลิเมตร และ 12.0 ไมโครกรัมต่อมิลลิเมตร และ เนตรนภา และคณะ (2558) พบว่าการยึดขยายรากสามารถช่วยเพิ่มความสามารถในการดูดใช้ธาตุอาหารของข้าวได้ เมื่อใส่เชื้อ *Brevibacillus borstelensis*, *Bacillus megaterium* และ *Brevibacillus agri* ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่สร้างกรดอินโดลอะซิติกที่สามารถกระตุ้นให้พืชเจริญเติบโต

ชนิกานต์ (2552) แยกแบคทีเรียเอนโดไฟท์ตรึงไนโตรเจนจากรากและลำต้นของข้าวปลูกพันธุ์ข้าวขาวดอกมะลิ 105 และข้าวป่า *Oryza rufipogon* พบว่า ได้ทั้งหมด 52 ไอโซเลต

โดยแยกได้จากข้าวป่า 32 ไอโซเลต และข้าวปลูก 20 ไอโซเลต แบคทีเรียที่แยกได้เป็นแบคทีเรียในสกุล *Azospirillum*, *Herbaspirillum* และ *Pseudomonas* 32, 8 และ 12 ไอโซเลต แบคทีเรียเอนโดไฟต์ทั้ง 52 ไอโซเลตมีอัตราการตรึงไนโตรเจนระหว่าง 0.72-138.13 นาโนโมลาร์ ของเอธิลีนต่อมิลลิกรัมโปรตีนต่อชั่วโมง และมีการสร้างกรดอินโดลอะซิติก 25.22-67.91 ไมโครโมลต่อมิลลิกรัม คัดเลือกแบคทีเรียเอนโดไฟต์ตรึงไนโตรเจนที่มีอัตราการตรึงไนโตรเจนและสร้างกรดอินโดลอะซิติกสูงจำนวน 6 ไอโซเลต ทดสอบความสามารถในการส่งเสริมการเจริญของต้นข้าว ขาวดอกมะลิ 105 ในระยะแรกของการเจริญ พบว่าทุกไอโซเลตสามารถส่งเสริมการเจริญของข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ที่ช่วงอายุ 30 วัน โดยแบคทีเรียเอนโดไฟต์ตรึงไนโตรเจนไอโซเลต CMOR15 ทำให้น้ำหนักแห้งของลำต้นและปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดที่สะสมในส่วนเหนือดินมากที่สุด โดยมีค่าน้ำหนักแห้งของลำต้นเท่ากับ 1.69 กรัมต่อกระถางและปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดที่สะสมในส่วนเหนือดินเท่ากับ 29.19 มิลลิกรัมต่อกระถาง ตามลำดับ รองลงมา คือ ไอโซเลต CMOR06 โดยมีค่าน้ำหนักแห้งของ ลำต้นเท่ากับ 1.58 กรัมต่อกระถาง และปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดที่สะสมในส่วนเหนือดินเท่ากับ 27.93 มิลลิกรัมต่อกระถาง ตามลำดับ ปลูกถ่ายเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟต์ตรึงไนโตรเจนทั้งสองไอโซเลตนี้ให้กับข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ในกระถางสภาพเรือนทดลอง พบว่าแบคทีเรียเอนโดไฟต์ตรึงไนโตรเจนไอโซเลต CMOR15 ทำให้ความสูงของลำต้นและ จำนวนกอดต่อดันของข้าวมากที่สุด และมีค่า *log number* ของจำนวนแบคทีเรียเอนโดไฟต์ตรึงไนโตรเจนทั้งในส่วนรากและลำต้น อยู่ระหว่าง 4.81-4.85 และ 4.16-4.72 ตามลำดับ โดยพบจำนวนแบคทีเรียไอโซเลต CMOR15 มากกว่าไอโซเลต CMOR06 ในส่วนของรากมากกว่าลำต้น แบคทีเรียไอโซเลต CMOR15 และ CMOR06 ทำให้น้ำหนักแห้งของลำต้นและรากของข้าวที่ ปลูกถ่ายเชื้อแบคทีเรียทั้งสองไอโซเลตมากกว่าชุดควบคุม โดยมีค่าอยู่ระหว่าง 9.36-15.43 และ 4.63-11.56 กรัมต่อกระถาง ตามลำดับ

Prakamhang et al. (2009) ศึกษาการอยู่อาศัยของประชากรแบคทีเรียเอนโดไฟต์ในข้าวขาวดอกมะลิ 105 *Oryza sativa* L. ที่ปลูก พบว่า แบคทีเรียเอนโดไฟต์เป็นเชื้อ *Enterobacter* sp., *Brevundimonas* sp. และ *Pseudomonas* spp. เมื่อใช้วิธีการทางชีวโมเลกุลในการตรวจหาประชากรแบคทีเรียเอนโดไฟต์โดยตรวจดูการใช้แหล่งคาร์บอนและการผลิตกรดอินโดลอะซิติก การผลิตเอนไซม์เพคตินเอสและเซลลูเลส ของแบคทีเรียเอนโดไฟต์ในส่วน ราก ลำต้น และ ใบของข้าว โดยพบว่า หากมีการใส่ปุ๋ยไนโตรเจนในดินนาจะส่งผลให้มีแบคทีเรียเอนโดไฟต์พวกที่ตรึงไนโตรเจนได้หลากหลายน้อยลง นอกจากนี้ยังพบว่า เนื้อเยื่อที่พืชเข้าไปอาศัยอยู่เช่น ส่วนของราก ลำต้น ใบมีอิทธิพลต่อโครงสร้างชุมชนของแบคทีเรียเอนโดไฟต์ด้วย

Castillo et al. (2015) แยกแบคทีเรียเอนโดไฟต์ และแบคทีเรียบริเวณรากข้าวในสเปน ซึ่งพื้นที่นี้มีปัญหาในด้านความเค็มและมีเชื้อราก่อโรคในข้าวคือ *Magnaporthe* sp. โดยแยกได้

เชื้อจำนวน 624 ไอโซเลท โดยดูจากความแตกต่างของลักษณะและสีของโคโลนี ซึ่งได้ศึกษาคุณลักษณะของเชื้อที่ส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช เช่น การผลิตกรดอินโดลอะซิติก การผลิต 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) การผลิตเอนไซม์ไคตินเอส ความสามารถในการละลายฟอสเฟตและการผลิต siderophores ซึ่งได้คัดเลือกและจำแนกแบคทีเรียจำนวน 28 ไอโซเลท ซึ่งเป็นเชื้อที่มีคุณลักษณะของเชื้อที่ส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชเพื่อประยุกต์ใช้ในการเพาะปลูกข้าวภายใต้สภาวะเครียด

Ahmed et al. (2015) ใช้เอนโดไฟต์ที่แยกได้จากดินรอบรากพืชเพื่อควบคุมโรคไหม้ในข้าวที่เกิดจาก *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. เมื่อศึกษาลำดับเบสของ 16srRNA พบว่า เป็น *Bacillus amyloliquefaciens*, *B. methylotrophicus* และ *B. subtilis* ซึ่งยับยั้งเชื้อก่อโรคพืชได้ 50.29–57.8 เปอร์เซ็นต์ และช่วยเพิ่มน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งของข้าวได้ 50.03–73.11 และ 64.11–86.65 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งเชื้อสามารถผลิตกรดอินโดลอะซิติก ไซเดอร์โรฟอร์ ช่วยละลายฟอสเฟต และมีการรวมกลุ่มอยู่ที่รากของข้าว

Vejan et al. (2016) แยกแบคทีเรียเอนโดไฟต์จากรากและลำต้นข้าว และศึกษาลำดับเบส 16S rRNA พบว่า เป็น *Pedobacter*, *Sphingomonas* และ *Paenibacillus* ซึ่งช่วยเพิ่มน้ำหนักสดในข้าว 2.30–3.18 ซึ่งเชื้อข้างต้นสามารถตรึงไนโตรเจน ผลิต siderophore ผลิตกรดอินโดลอะซิติก และมีกิจกรรมของเอนไซม์ ACC-deaminase และสามารถประยุกต์ใช้แบคทีเรียเอนโดไฟต์เพื่อเป็นปุ๋ยชีวภาพในข้าวได้

วิธีการวิจัย

1. การวิเคราะห์คุณสมบัติของดิน

นำตัวอย่างดินจากแปลงข้าวหอมมะลิแดงที่ทำการเกษตรอินทรีย์ระยะเวลา 1 ปี, 5 ปี และมากกว่า 10 ปี โดยนำดินมาศึกษาคุณลักษณะทางกายภาพของดิน ได้แก่ สี ความหนาแน่นของดิน (soil bulk density) ตามวิธีของ Blake (1965) วิเคราะห์ปริมาณน้ำในภาคสนาม (field water content) ตามวิธีของ Gardner (1986) และวิเคราะห์คุณสมบัติทางเคมีของดิน ได้แก่ ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ของดิน การวิเคราะห์คุณสมบัติทางกายภาพของดิน ได้แก่ ค่าความหนาแน่นของดิน โดยส่งวิเคราะห์คุณสมบัติของดิน ที่หน่วยวิเคราะห์ดิน สำนักงานพัฒนาที่ดินเขต 6 กรมพัฒนาที่ดิน จังหวัดเชียงใหม่

2. การแยกเชื้อจากดินบริเวณรอบรากข้าว

ในการทดลองนี้มีเชื้อที่แยกได้จากดินบริเวณรอบรากข้าวจากแปลงข้าวเกษตรอินทรีย์ระยะเวลาที่ทำการเกษตรอินทรีย์ 1, 5 และ มากกว่า 10 ปี จาก อำเภอสันกำแพง อำเภอสันทราย และอำเภอแมริม จังหวัดเชียงใหม่ ซึ่งมีผู้แยกไว้แล้วของห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ จำนวน 165 ไอโซเลท ซึ่งวิธีการแยกเชื้อจากดินรอบรากพืชทำโดยนำตัวอย่างดินจากรอบรากข้าวมา เจือจางตามลำดับ แล้วเลือกกระดပ်ความเจือจางที่เหมาะสมเพาะเลี้ยงเชื้อโดยเทเพลท (pour plate) ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ จากนั้นบ่มเชื้อ แล้วเลือกเชื้อที่มีโคโลนีแตกต่างกันมา streak ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อให้ได้เชื้อที่บริสุทธิ์ แล้วเก็บรักษาเชื้อบริสุทธิ์ไว้บนอาหารวุ้นเอียง ในตู้เย็นอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และเก็บไว้ในกลีเซอรอล 40 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการศึกษาต่อไป

3. การแยกแบคทีเรียเอนโดไฟต์จากข้าว

3.1 การเก็บตัวอย่าง

เก็บตัวอย่างต้นข้าวหอมมะลิแดงในช่วงระยะที่ต้นข้าวแตกกอ ซึ่งความสูงของต้นข้าวประมาณ 105 เซนติเมตร และมีจำนวนต้นตอกอประมาณ 25 ต้น จากแปลงข้าวเกษตรอินทรีย์ โดยเก็บต้นข้าวจากแปลงที่ทำการเกษตรอินทรีย์ระยะเวลาดังกล่าวแตกต่างกันในเขตจังหวัดเชียงใหม่คือที่ระยะเวลาที่ทำการเกษตรอินทรีย์ 1, 5 และ มากกว่า 10 ปี จาก อำเภอสันกำแพง อำเภอสันทราย และอำเภอแมริม ตามลำดับ เพื่อแยกแบคทีเรียเอนโดไฟท์

3.2 การแยกแบคทีเรียเอนโดไฟท์

การฆ่าเชื้อบริเวณพื้นผิว (surface sterile) ของต้นข้าว

นำต้นข้าว ที่ได้จากแปลงข้าวเกษตรอินทรีย์ระยะเวลา 1, 5 ปี และมากกว่า 10 ปี มาล้างดินออกจากรากให้สะอาดแล้วล้างส่วนของลำต้นและใบให้สะอาด จากนั้นตัดชิ้นส่วนของต้นข้าว ได้แก่ ราก ลำต้น และใบ ให้มีขนาดความยาวประมาณ 1 เซนติเมตร แล้วใส่ชิ้นส่วนข้าวแต่ละส่วนลงในหลอดปั่นเหวี่ยงที่ปราศจากเชื้อขนาด 50 มิลลิลิตร แล้วใส่แอลกอฮอล์เข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 20 มิลลิลิตร แล้วเขย่าหลอดที่บรรจุชิ้นส่วนของข้าวโดยมือเขย่าเป็นเวลา 2 นาที แล้วเทแอลกอฮอล์เข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ทิ้งแล้วเติมสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ (คลอโรค) ปริมาตร 20 มิลลิลิตร เข้มข้น 4 เปอร์เซ็นต์ เขย่าและตั้งไว้เป็นเวลา 15 นาที เติมน้ำกลั่นให้เต็มหลอดแล้วล้างด้วย น้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อแล้วจำนวน 8 ครั้ง จากนั้นนำน้ำสุดท้ายที่ได้จากการล้างชิ้นส่วนต่าง ๆ ของข้าวปริมาตร 1 มิลลิลิตร ไปเพาะเลี้ยงลงในอาหารแข็ง Nutrient agar (NA) โดยวิธี pour plate แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 24 ชั่วโมง แล้วบันทึกผลการทดลอง

3.3 การแยกเชื้อเอนโดไฟท์จากส่วนต่าง ๆ ของต้นข้าว

นำชิ้นส่วนของต้นข้าวทั้ง 3 ส่วนคือส่วนราก ลำต้น และใบ ที่ผ่านการฆ่าเชื้อบริเวณพื้นผิวแล้วไปวางบนอาหารแข็ง 4 ชนิด ได้แก่ Pikovskaya medium (PVK), International streptomyces projected medium 2 (ISP2), Tryptic soy agar medium (TSA) และ Plate count agar medium (PCA) จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 72 ชั่วโมง แล้วบันทึกผล ซึ่งอาหารเลี้ยงเชื้อแต่ละชนิด ได้แก่ PVK medium (Kucey, 1963) เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่แยกแบคทีเรียที่ละลายฟอสเฟต ส่วน ISP2 เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้สำหรับการแยกแอกติโนมัยสีท นอกจากนี้ TSA medium ใช้แยกแบคทีเรียที่เจริญได้ยาก (fastidious bacteria) และ PCA medium ใช้สำหรับการตรวจนับจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด

3.4 การทำให้ได้เชื้อบริสุทธิ์

หลังจากมีเชื้อเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อแต่ละชนิด นำมาทำให้ได้เชื้อบริสุทธิ์โดยแต่ละเชื้อด้วยห้วงเขี่ยเชื้อปราศจากเชื้อมาลากลงบนอาหารแข็งโดยวิธี cross streak โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเดียวกันกับที่ใช้ในการแยกเชื้อ จากนั้นนำไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 24-48 ชั่วโมง แล้วเลือกโคโลนีเดี่ยว ๆ ที่มีลักษณะโคโลนีแตกต่างกันมาทำให้ได้เชื้อ

บริสุทธิ์โดยทำ cross streak อีกครั้งบนอาหารเลี้ยงเชื้อแต่ละชนิดแล้วเก็บเชื้อบริสุทธิ์ไว้บนอาหารวุ้นผิวแข็ง Nutrient agar (NA) แล้วนำไปเก็บไว้ในกลีเซอรอล 40 เปอร์เซ็นต์ ทำโดยนำเชื้อบริสุทธิ์ มาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว Nutrient broth (NB) บ่มเชื้อโดยเขย่าบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 130 รอบต่อวินาที ระยะเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อเชื้อเจริญนำไปเก็บในกลีเซอรอล 40 เปอร์เซ็นต์ แล้วนำไปเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการศึกษาต่อไป

4. การคัดเลือกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการละลายฟอสเฟตและผลิตกรดอินโดลอะซิติก

ในการทดลองนี้มีเชื้อที่นำมาใช้ในการคัดเลือกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการละลายฟอสเฟตและผลิตกรดอินโดลอะซิติก ได้แก่ 1) แบคทีเรียเอนโดไฟต์ที่แยกจากราก ลำต้น และใบของต้นข้าวแปลงเกษตรอินทรีย์ 1, 5 และมากกว่า 10 ปี จำนวน 178 ไอโซเลต 2) แบคทีเรียที่แยกได้จากน้ำสุดท้ายของการล้างจากการฆ่าเชื้อบริเวณพื้นผิว 2 ไอโซเลต 3) แบคทีเรียจาก stock culture ของห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา มหาวิทยาลัยแม่โจ้ (เป็นแบคทีเรียที่แยกได้จากดินรอบรากข้าวแปลงเกษตรอินทรีย์ 1, 5 และ มากกว่า 10 ปี ดินแปลงข้าวเกษตรทั่วไป และน้ำหมักชีวภาพ รวมทั้งหมด 307 ไอโซเลต) รวมแบคทีเรียที่นำมาใช้ในการคัดเลือกครั้งนี้จำนวนทั้งหมด 487 ไอโซเลต

4.1 การคัดเลือกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการละลายฟอสเฟตขั้นต้นบนอาหารแข็ง

นำแบคทีเรียบริสุทธิ์ทั้งหมด 487 ไอโซเลต มาทดสอบความสามารถในการละลายฟอสเฟตเบื้องต้น โดยเฉพาะเลี้ยงเชื้อแบบจุด (point inoculation) บนอาหารแข็ง Pikovskaya's medium (PVK agar) ที่มีไตรแคลเซียมฟอสเฟต (Ca_3PO_4) เป็นแหล่งฟอสฟอรัส จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 24-48 ชั่วโมง วัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใสที่เกิดขึ้นรอบโคโลนีแล้วบันทึกผล คัดเลือกเชื้อที่เกิดวงใสไว้ศึกษาในขั้นตอนต่อไป

4.2 การทดสอบการละลายฟอสเฟตได้ในอาหารเหลวและการวิเคราะห์ปริมาณฟอสเฟต

4.2.1 การเตรียมเชื้อเริ่มต้น

นำแบคทีเรียที่เกิดวงใสที่คัดเลือกได้จากข้อ 3.1 ไปเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว Nutrient broth และนำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง (ทำการทดลองเดือนพฤศจิกายน) บนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 130 รอบต่อวินาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อใช้เป็นเชื้อเริ่มต้น

4.2.2 การทดสอบความสามารถในการละลายฟอสเฟตในอาหารเหลว

นำเชื้อเริ่มต้นที่เตรียมได้จากข้อ 3.2.1 มาปรับค่าความขุ่นของเชื้อโดยเทียบกับค่าความขุ่นของ McFarland No.1.0 (มีเชื้ออยู่ประมาณ 3×10^8 CFU/mL) แล้วเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว PVK โดยใช้ความเข้มข้นของเชื้อเริ่มต้น 2 เปอร์เซ็นต์ของปริมาตรอาหาร แล้ว

นำไปบ่มบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 130 รอบต่อนาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยง เพื่อแยกส่วนใสที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที ระยะเวลา 20 นาที และนำส่วนใสที่ได้ไปวิเคราะห์ปริมาณฟอสเฟตตามวิธีของ Bray and Kurt (1945) คัดเลือกเชื้อที่สามารถละลายฟอสเฟตได้สูงไว้ศึกษาต่อไป

5. การคัดเลือกแบคทีเรียที่สามารถผลิตกรดอิน โดลอะซิดิก

5.1 การทดสอบความสามารถในการผลิตกรดอิน โดลอะซิดิกเบื้องต้น

นำแบคทีเรียบริสุทธิ์ทั้งหมด 487 ไอโซเลท มาทดสอบความสามารถในการผลิตกรดอิน โดลอะซิดิก โดยทำการเพาะเลี้ยงเชื้อลงในอาหารเหลว Tryptone broth แล้วนำไปบ่มบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 130 รอบต่อนาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นหยดสารละลาย Kovac's reagent 5 หยด สังเกตสีแดงที่เกิดขึ้นที่ผิวหน้าด้านบนของอาหารเลี้ยงเชื้อ แสดงว่าแบคทีเรียผลิตอิน โดลได้ หรือให้ผลเป็นบวก แต่ถ้าเป็นสีเดิมของสารละลาย หรือไม่มีสีแดงเกิดขึ้นที่ผิวหน้าอาหารแสดงว่าเป็นผลลบ ขั้นตอนนี้จะเลือกเชื้อที่ให้ผลเป็นบวกไปใช้ศึกษาขั้นตอนต่อไป

5.2 การวิเคราะห์ปริมาณกรดอิน โดลอะซิดิกที่เชื้อสามารถผลิตได้

5.2.1 การเตรียมเชื้อเริ่มต้น

นำแบคทีเรียที่แยกได้ในข้อ 4.1 มาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว Nutrient broth และนำไปบ่มบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 130 รอบต่อนาที ระยะเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อใช้เป็นเชื้อเริ่มต้นในขั้นตอนต่อไป

5.2.2 การเพาะเลี้ยงเชื้อ

นำเชื้อเริ่มต้นที่เตรียมได้ในข้อ 4.2.1 ในอาหารเหลว Nutrient broth มาปรับค่าความขุ่นของเชื้อโดยเทียบกับค่าความขุ่นของ McFarland No. 1.0 (มีจำนวนเซลล์ประมาณ 3×10^8 CFU/ml) แล้วเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว มาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว Nutrient broth ที่เติม Tryptophan ลงไปให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 0.2 เปอร์เซ็นต์ของปริมาตรอาหาร เพื่อเป็นสารตั้งต้นในการผลิตกรดอิน โดลอะซิดิก (Ahmad et al., 2008) โดยใช้ความเข้มข้นของเชื้อเริ่มต้นเป็น 2 เปอร์เซ็นต์ของปริมาตรอาหาร จากนั้นนำไปบ่มบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 130 รอบต่อนาที ระยะเวลา 48 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที ระยะเวลา 20 นาที เก็บส่วนใสไว้วิเคราะห์หาปริมาณกรดอิน โดลอะซิดิกต่อไป

5.2.3 การวิเคราะห์ปริมาณกรดอินโดลอะซิดิก

นำส่วนใสที่ได้จากข้อ 4.2.2 มาวิเคราะห์หาปริมาณกรดอินโดลอะซิดิก โดยนำส่วนใสปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมกับสารพัฒนาสี Salkowski reagent 2 มิลลิลิตร แล้วนำไปเก็บไว้ในที่มีดปล่อยไว้ระยะเวลา 30 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (spectrophotometer) ที่ความยาวคลื่น 530 นาโนเมตร แล้วนำไปเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานเพื่อหาปริมาณความเข้มข้นของกรดอินโดลอะซิดิก (Ahmad et al., 2008) และคัดเลือกเชื้อที่สามารถผลิตกรดอินโดลอะซิดิกในปริมาณสูงไว้ศึกษาในขั้นตอนต่อไป

6. การศึกษาคุณลักษณะของเชื้อเพื่อจำแนกแบคทีเรียที่คัดเลือกได้

6.1 การศึกษาลักษณะการเจริญบนอาหารแข็ง

นำแบคทีเรียที่มีความสามารถในการละลายฟอสเฟต และมีความสามารถในการผลิตกรดอินโดลอะซิดิกได้สูง มาศึกษาลักษณะการเจริญบนอาหารแข็งโดยทำ cross streak ลงบนอาหารแข็ง Nutrient agar แล้วบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 24 ชั่วโมง และบันทึกลักษณะโคโลนีของเชื้อ

6.2 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา

นำแบคทีเรียที่มีความสามารถในการละลายฟอสเฟต และสามารถผลิตกรดอินโดลอะซิดิกได้สูง มาศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา โดยการย้อมสีแบบแกรม แล้วตรวจดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบเลนส์ประกอบที่กำลังขยาย 1,000 เท่า และบันทึกการติดสีแกรม รูปร่างและการจัดเรียงตัวของเซลล์แบคทีเรีย

6.3 การศึกษาลักษณะทางสรีรวิทยาและชีวเคมี

นำแบคทีเรียที่มีความสามารถในการละลายฟอสเฟต และมีความสามารถในการผลิตกรดอินโดลอะซิดิกได้สูง มาศึกษาลักษณะทางสรีรวิทยาและชีวเคมี ดังนี้คือ

6.3.1 การทดสอบการผลิตเอนไซม์อะคาเลส

ทดสอบโดยใช้ห้วงเชื้อแต่ละเชื้อที่เลี้ยงไว้แล้วในอาหารเหลว Nutrient broth ที่ต้องการทดสอบแล้วแต่ละลงบนแผ่นสไลด์ที่สะอาด จากนั้นหยดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ ลงไปบนเชื้อหากเกิดฟองอากาศแสดงว่าเชื้อผลิตเอนไซม์อะคาเลส บันทึกผลเป็นบวก หากเชื้อไม่สามารถผลิตเอนไซม์อะคาเลสจะไม่เกิดฟองอากาศ บันทึกผลเป็นลบ

6.3.2 การทดสอบการผลิตเอนไซม์ออกซิเดส

ทดสอบโดยจุ่มกระดาษกรองลงในสารละลาย Tetramethyl-p-phenylenediamin HCl 0.5 เปอร์เซ็นต์จนชุ่ม จากนั้นใช้หัวงี๋เย็บเชื้อและเชื้อที่ต้องการทดสอบแต่ละลงบนกระดาษกรอง หากเกิด สีม่วงขึ้นตรงจุดที่เชื้อลงบนกระดาษกรองแสดงว่า เชื้อสามารถผลิตเอนไซม์ออกซิเดสได้ บันทึกผลเป็นบวก หากเชื้อไม่สามารถผลิตเอนไซม์ออกซิเดสได้จะไม่เกิดสีม่วง บันทึกผลเป็นลบ

6.4 การทดสอบการใช้แหล่งคาร์บอน

นำแบคทีเรียที่มีความสามารถในการละลายฟอสเฟต และมีความสามารถในการผลิตกรดอินโดลอะซิติก จะถูกนำมาทดสอบการใช้แหล่งคาร์บอน โดยเติมปริมาณเชื้อเริ่มต้น 2 เปอร์เซ็นต์ของปริมาตรอาหารลงในอาหารเหลว Carbohydrate broth ที่มีแหล่งคาร์บอนชนิดต่าง ๆ ได้แก่ ฟรุคโตส ซูโครส มอลโตส กลูโคส กาแลกโตส ไซลิทอล แลคโตส และ แมนนิทอล โดยที่ในอาหารเหลวนั้นได้ใส่หลอดดักก๊าซไว้แล้วเพื่อสังเกตการเปลี่ยนแปลงที่เกิดจากการใช้แหล่งคาร์บอนของเชื้อ จากนั้นนำไปบ่มโดยตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในตู้บ่มระยะเวลา 24 ชั่วโมง แล้วบันทึกผลการเปลี่ยนแปลงของสีอาหารและการเกิดก๊าซ ถ้าหากสีของอาหารเปลี่ยนจากสีม่วงเป็นสีเหลืองและมีก๊าซเข้าไปแทนที่ของเหลวในหลอดดักก๊าซ แสดงว่าให้ผลเป็นบวก หากไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงให้ผลเป็นลบ

6.5 การจำแนกแบคทีเรียโดยใช้วิธีการหาลำดับเบสบน 16S rRNA

6.5.1 การสกัดดีเอ็นเอ

ทำการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียที่ต้องการจำแนกลงในอาหารเหลว Nutrient broth ปริมาตร 5 มิลลิตร แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง (ทำการทดลองเดือนธันวาคม) บนเครื่องเขย่า ที่ความเร็ว 130 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำเชื้อปริมาตร 1,200 ไมโครลิตร ไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที ระยะเวลา 5 นาที จากนั้นเทส่วนที่เป็นของเหลวใส่ทิ้ง แล้วนำส่วนที่เป็นตะกอนมาทำการสกัดดีเอ็นเอด้วยชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จภาพ Genomic DNA Mini Kit (Geneaid, Taiwan) ซึ่งมีวิธีการดังนี้

1. คู่ออาหารเหลวที่มีเชื้อเจริญ (culture broth) ปริมาตร 1200 ไมโครลิตร ลงในหลอดปั่นเหวี่ยงขนาดเล็ก ขนาด 1.5 มิลลิตร
2. นำไปปั่นเหวี่ยง 5 นาที ด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง ที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที
3. เทของเหลวในหลอดทิ้ง
4. เติม 200 ไมโครลิตร ของไลโซไซม์ (lysozyme) 10 มิลลิกรัม/TEN buffer 1 มิลลิตร
5. ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที (กลับหลอดไปมาทุก 3 นาที)

6. เติม GB buffer 200 ไมโครลิตร (ทำให้เซลล์แตก)
 7. นำไปปั่นผสมด้วยเครื่องผสมสาร (vortex mixing)
 8. นำไปปั่นที่ 70 องศาเซลเซียส 10 นาที (จนกว่าตะกอนละลายใส กลับหลอดทุก 3 นาที) พร้อมทิ้งบ่ม elution 100 ไมโครลิตรต่อ 1 ตัวอย่าง
 9. เติม ethanol (ABS) 200 ไมโครลิตร
 10. นำไปปั่นผสมด้วยเครื่องผสมสาร (vortex mixing) 10 วินาที
 11. เติมทั้งหมดลงในหลอด GD column
 12. นำไปปั่นเหวี่ยง 5 นาที ด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง ที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที
 13. เทของเหลวในหลอดทิ้ง
 14. เติม W1 buffer 400 ไมโครลิตร
 15. นำไปปั่นเหวี่ยง 5 นาที ด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง ที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที (เทของเหลวทิ้ง)
 16. เติม wash buffer 600 ไมโครลิตร
 17. นำไปปั่นเหวี่ยง 5 นาที ด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที
 18. ย้ายหลอด GD column ลงหลอดปั่นเหวี่ยงใหม่
 19. เติม elution ที่บ่มทิ้งไว้ที่ 70 องศาเซลเซียส 100 ไมโครลิตรต่อ 1 ตัวอย่าง
 20. ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที
 21. นำไปปั่นเหวี่ยง 5 นาที ด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง ที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที
 22. ทิ้งหลอด GD column
 23. เก็บส่วนใสของดีเอ็นเอที่อยู่ในหลอดปั่นเหวี่ยงไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส
- จากนั้นทำการตรวจสอบผลการสกัดดีเอ็นเอโดยใช้วิธี Gel Electrophoresis และเก็บตัวอย่าง ดีเอ็นเอที่สกัดได้ไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในขั้นตอนต่อไป

6.5.2 การเพิ่มปริมาณ 16S rRNA โดยใช้วิธีการ Polymerase Chain Reaction (PCR)

นำตัวอย่างดีเอ็นเอที่สกัดได้มาทำการเพิ่มปริมาณยีน 16S rRNA โดย Universal Primer ที่ใช้คือ 27F ซึ่งมีลำดับนิวคลีโอไทด์คือ 5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3' สำหรับส่วนประกอบของปฏิกิริยาแสดงในตารางที่ 3

ตารางที่ 3 ส่วนประกอบของปฏิกิริยาการเพิ่มปริมาณยีน 16S rRNA

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา	ปริมาตรต่อปฏิกิริยา (ไมโครลิตร)
Quick Taq	24
Primer I (27F)	4
dH ₂ O	19
DNA	3
รวม	50

เมื่อผสมส่วนประกอบของปฏิกิริยาตามตารางที่ 2 เสร็จแล้วนำไปเพิ่มปริมาณของยีน 16S rRNA โดยใช้เครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ PCR Thermal Cycle โดยกำหนดโปรแกรมการทำงานตามตารางที่ 3 ซึ่งจะทำให้การเพิ่มปริมาณ 16S rRNA ทั้งหมด 25 รอบ

ตารางที่ 4 โปรแกรมการทำงานของเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ

ขั้นตอนการ PCR	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	เวลา (นาที)
Initial Denaturation	95	5
Denaturation	95	1
Annealing	55	1
Extension	72	1
Final Extension	72	1
Set Hold	20	5

หลังจากการเพิ่มปริมาณ 16S rRNA เสร็จแล้ว นำ PCR Product ที่ได้มาทำการตรวจสอบขนาดของดีเอ็นเอภายใต้สนามแม่เหล็กไฟฟ้าโดยใช้วิธีการ Gel-electrophoresis ซึ่งเทียบขนาดของ PCR Product ที่ได้กับขนาดของ DNA Marker ทางการค้า จากความเข้มของแถบดีเอ็นเอเมื่อนำไปตรวจด้วยเครื่องตรวจแถบดีเอ็นเอ ซึ่งขนาดของ 16S rRNA จะมีความยาวประมาณ 1500 คู่เบส จากนั้นส่ง PCR Product ที่ได้ไปวิเคราะห์ผลหาลำดับเบสของ 16S rRNA โดย 1st BASE (www.base-asia.com) ประเทศมาเลเซีย

6.5.3 การวิเคราะห์ผลลำดับเบส

หลังจากได้ผลการวิเคราะห์ผลหาลำดับเบสของ 16S rRNA แล้วนำผลการวิเคราะห์ที่ได้ มาจัดเรียงด้วยโปรแกรม Bio Edit Sequence Alignment Editor

ผลการวิจัย

ผลการวิเคราะห์คุณสมบัติของดิน

ตัวอย่างดินจากแปลงข้าวเกษตรอินทรีย์ที่ทำการเกษตรอินทรีย์ระยะเวลาทำการเกษตร 1 ปี, 5 ปี และ มากกว่า 10 ปี มีค่าความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 5.3, 5.3 และ 4.7 ตามลำดับ ส่วนค่าความหนาแน่นของดิน (bulk density) เท่ากับ 1.47, 0.92 และ 1.19 กรัมต่อลูกบาศก์ เซนติเมตร ตามลำดับ และได้นำตัวอย่างดินจากแปลงข้าวเกษตรอินทรีย์ที่ทำการเกษตรอินทรีย์ ระยะเวลาทำการเกษตร 1-2 ปี, 5-6 ปี และ 10 ปี ขึ้นไป มาวิเคราะห์ปริมาณน้ำในภาคสนาม (field water content) พบว่า มีค่า เท่ากับ 22.70, 44.37 และ 40.83 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก ตามลำดับ

ผลการแยกเชื้อจากดินรอบรากข้าว

จากการแยกเชื้อจากดินรอบรากข้าวจากดินแปลงเกษตรอินทรีย์ พบว่า ได้แบคทีเรียดัง แสดงในตารางที่ 5

ตารางที่ 5 จำนวนไอโซเลทของแบคทีเรียที่แยกได้จากดินรอบรากข้าวจากแปลงข้าวเกษตรอินทรีย์ระยะเวลาด่าง ๆ

ตัวอย่างดิน	จำนวนแบคทีเรีย				
	รูปร่างและการติดสีแกรมของแบคทีเรีย				
	แกรมบวก รูปร่างท่อน	แกรมบวก รูปร่างกลม	แกรมลบ รูปร่างท่อน	แกรมลบ รูปร่าง กลม	รวม
ดินแปลงเกษตรอินทรีย์ ระยะเวลา 1-2 ปี	13	1	15	13	42
ดินแปลงเกษตรอินทรีย์ ระยะเวลา 5-6 ปี	3	18	18	5	44
ดินเกษตรเกษตรอินทรีย์ ระยะเวลามากกว่า 10 ปี	19	19	26	15	79
รวม	35	38	59	33	165

ผลการแยกแบคทีเรียเอนโดไฟต์จากชิ้นส่วนของต้นข้าว

จากการแยกเชื้อเอนโดไฟต์จากส่วนราก ลำต้นและใบ ของต้นข้าว จากแปลงข้าวที่ทำเกษตรอินทรีย์ระยะเวลา 1, 5 และมากกว่า 10 ปี บนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่าง ๆ คือ PCA, PVK, TSA และ ISP2 พบว่า ได้แบคทีเรียเอนโดไฟต์จากส่วนต่าง ๆ ของต้นข้าวที่อยู่ในแปลงข้าวที่ทำเกษตรอินทรีย์มีระยะเวลา 1, 5 ปี และมากกว่า 10 ปี จำนวน 84, 53 และ 41 ไอโซเลท ตามลำดับ รวมแบคทีเรียเอนโดไฟต์ที่แยกได้ในการทดลองนี้ทั้งหมดจำนวน 178 ไอโซเลท และแยกได้แบคทีเรียจากน้ำสุดท้ายของการล้างส่วนของรากและลำต้นข้าว (จากแปลงเกษตรอินทรีย์มากกว่า 10 ปี) จำนวน 1 และ 1 ไอโซเลท ตามลำดับ (ตารางที่ 6)

ตารางที่ 6 จำนวนแบคทีเรียที่แยกได้จากชิ้นส่วนของข้าวจากแปลงเกษตรอินทรีย์ระยะเวลา 1, 5 และ มากกว่า 10 ปี บนอาหารเลี้ยงเชื้อ 4 ชนิด

ส่วนที่แยกจากข้าว	จำนวนไอโซเลทของแบคทีเรียที่แยกได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อต่าง ๆ				
ข้าวจากแปลงเกษตรอินทรีย์ 1 ปี					
	PCA	PVK	TSA	ISP2	รวม
รากข้าว	8	8	10	4	30
ลำต้นข้าว	4	9	12	6	31
ใบข้าว	5	8	7	3	23
น้ำสุดท้าย	0	0	0	0	0
รวม	17	25	29	13	84
ข้าวจากแปลงเกษตรอินทรีย์ 5 ปี					
	PCA	PVK	TSA	ISP2	รวม
รากข้าว	5	11	7	9	32
ลำต้นข้าว	1	4	1	3	9
ใบข้าว	5	6	0	1	12
น้ำสุดท้าย	0	0	0	0	0
รวม	11	21	8	13	53

ตารางที่ 6 (ต่อ)

ข้าวจากแปลงเกษตรอินทรีย์มากกว่า 10 ปี					
ส่วนที่แยกจากข้าว	จำนวนไอโซเลทของแบคทีเรียที่แยกได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อต่าง ๆ				
ข้าวจากแปลงเกษตรอินทรีย์ 1 ปี					
	PCA	PVK	TSA	ISP2	รวม
รากข้าว	7	4	6	3	20
ลำต้นข้าว	3	2	3	2	10
ใบข้าว	3	2	2	4	11
รวม	13	8	11	9	41
น้ำสุดท้าย	จากราก (1) และ จากลำต้น (1)	0	0	0	2

ผลการคัดเลือกเชื้อที่สามารถละลายฟอสเฟตขั้นต้น

จากการนำแบคทีเรียเอนโดไฟท์ แบคทีเรียที่แยกได้จากน้ำสุดท้ายของส่วนของรากและลำต้นข้าว แบคทีเรียจาก *stock culture* ของห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา มหาวิทยาลัยแม่โจ้ จำนวน 2,178 และ 307 ไอโซเลท ตามลำดับ รวมแบคทีเรียที่นำมาใช้ในการคัดเลือกในการทดลองนี้ทั้งหมดจำนวน 487 ไอโซเลท เมื่อนำเชื้อทั้งหมดมาทดสอบความสามารถในการละลายไตรแคลเซียมฟอสเฟตโดยเฉพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง *PVK agar* และดูขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใสรอบโคโลนีเชื้อ จากการทดลองในตารางที่ 7 พบว่า มีแบคทีเรียที่เกิดวงใสรอบโคโลนี จำนวน 60, 2 และ 53 ไอโซเลท ตามลำดับ รวมทั้งหมด 117 ไอโซเลท โดยมีแบคทีเรียที่ละลายฟอสเฟตได้จากแบคทีเรียเอนโดไฟท์ และ *stock culture* และ คิดเป็นร้อยละ 33.71 และ 17.26 ตามลำดับ (ตารางที่ 8) ในขั้นตอนนี้ คัดเลือกเชื้อที่เกิดวงใสรอบโคโลนีซึ่งสามารถละลายฟอสเฟตได้ไว้ศึกษาในขั้นตอนต่อไป

ตารางที่ 7 ผลการละลายฟอสเฟตขั้นต้นบนอาหารแข็ง *PVK agar*

การละลายฟอสเฟตบนอาหาร <i>PVK agar</i>	
ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง (mm)	จำนวนไอโซเลต
1-10	111
11-20	3
21-30	1

ตารางที่ 8 ร้อยละของแบคทีเรียที่แยกจากแหล่งต่าง ๆ ที่เกิดวงใสบนอาหาร *PVK agar*

จำนวนแบคทีเรีย (ไอโซเลต)	จำนวน (ไอโซเลต)		ร้อยละ (%) ของแบคทีเรียที่เกิดวงใส	
	แบคทีเรียจาก stock culture	แบคทีเรียเอนโด- ไฟท์จากต้นข้าว	แบคทีเรียจาก stock culture	แบคทีเรียเอนโด- ไฟท์จากต้นข้าว
เกิดวงใสบนอาหาร แข็ง <i>PVK</i>	53	60	17.26	33.71
ไม่เกิดวงใสบน อาหารแข็ง <i>PVK</i>	254	118	82.74	66.29
รวม	307	178	100	100

หมายเหตุ แบคทีเรียที่แยกได้จากน้ำสุดท้ายของการล้างบริเวณพื้นผิวเกิดวงใสทั้ง 2 ไอโซเลต

ผลการทดสอบการละลายฟอสเฟตในอาหารเหลวและการวิเคราะห์ปริมาณฟอสเฟต

เมื่อนำแบคทีเรียที่เกิดวงใสบนอาหารแข็ง *PVK* ที่คัดเลือกได้ขั้นต้น จำนวน 115 ไอโซเลต มาทดสอบความสามารถในการละลายฟอสเฟตโดยเฉพาะเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว *PVK broth* ผลการทดสอบแสดงในตารางที่ 8 พบว่า มีแบคทีเรียที่สามารถละลายฟอสเฟตได้ดีจาก *stock culture* ของห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา มหาวิทยาลัยแม่โจ้ จำนวน 6 ไอโซเลต ได้แก่ แบคทีเรีย S68, S69, S83, S84, S91 และ S92 ซึ่งเป็นเชื้อที่แยกได้จากดินรอบรากข้าว แปลงเกษตรอินทรีย์ ระยะเวลา 1 ปี โดยละลายฟอสเฟตได้ 756.92, 766.35, 776.57, 690.88, 620.13 และ 724.69 มิลลิกรัมฟอสเฟตต่อลิตร ตามลำดับ ส่วนแบคทีเรียเอนโดไฟท์ พบว่า มี 7 ไอโซเลต ซึ่งเป็นเชื้อที่แยกได้คือ แบคทีเรีย RRSTSA2, RRSPVK6-1, RRSTSA3, RRPVK-4, RRPVK-2, RRTSA-5 และ RRTSA6 สามารถละลายฟอสเฟตได้ 114.32, 92.79, 97.88, 92.65,

191.78, 91.80 และ 73.22 มิลลิกรัมฟอสเฟตต่อลิตร ตามลำดับ ซึ่งแบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่ละลายฟอสเฟตได้ดีเป็นเชื้อแยกได้จากส่วนของรากข้าวทั้ง 7 ไอโซเลท

ส่วนแบคทีเรีย *W-RS* และ *W-RR* ซึ่งแยกได้จากน้ำสุดท้ายของการล้างส่วนของรากและลำต้นของข้าวสามารถละลายฟอสเฟตได้ 97.68 และ 294.39 มิลลิกรัมฟอสเฟตต่อลิตรตามลำดับ ซึ่งจะนำแบคทีเรียที่สามารถละลายฟอสเฟตได้ดีที่คัดเลือกได้ไปจำแนกเพื่อระบุชนิดของแบคทีเรียต่อไป ผลของปริมาณการละลายฟอสเฟตของแบคทีเรียในอาหารเหลว PVK แสดงในตารางที่ 9

ตารางที่ 9 ผลปริมาณการละลายฟอสเฟตของแบคทีเรียในอาหารเหลว PVK

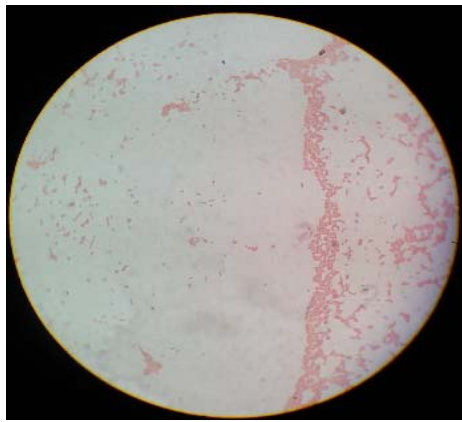
ปริมาณการละลายฟอสเฟต	
ปริมาณฟอสเฟต (mgPO ₄ ²⁻ /L)	จำนวนไอโซเลท
1-300	103
301-600	6
601-900	6

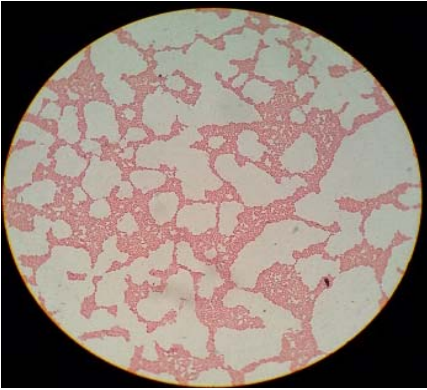
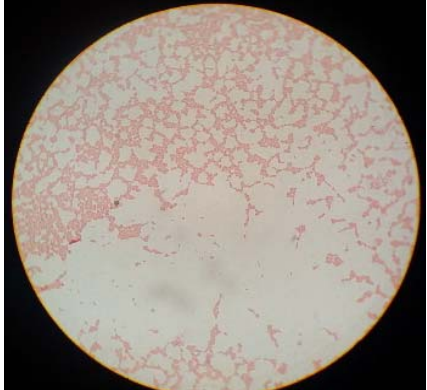
ผลการศึกษาคุณลักษณะของเชื้อเพื่อจำแนกแบคทีเรียที่คัดเลือกได้

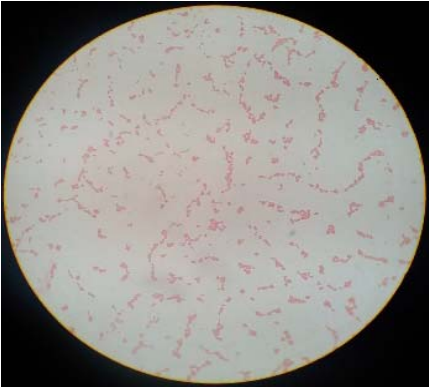
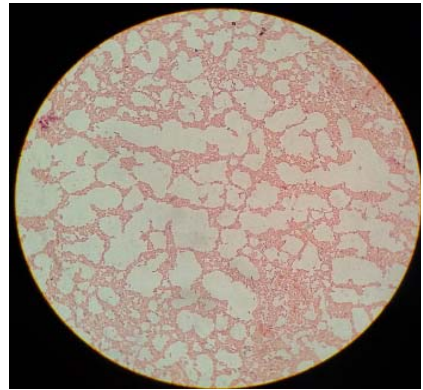
จากการนำแบคทีเรียละลายฟอสเฟตได้ดีทั้งจากที่คัดเลือกได้จากแบคทีเรียเอนโดไฟท์เชื้อที่แยกได้จากน้ำสุดท้ายของการล้างส่วนของข้าว และจาก *stock culture* ของห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา มหาวิทยาลัยแม่โจ้ จำนวน 7, 2 และ 6 ไอโซเลท ตามลำดับ ไปศึกษาคุณลักษณะเบื้องต้น ได้แก่ การศึกษาลักษณะการเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแบคทีเรีย พบว่า แบคทีเรียทั้ง 6 คือ S68, S69, S83, S84, S91 และ S92 มีรูปร่างโคโลนีกลมมน ขอบเรียบ ผิวหน้ามีลักษณะ มันวาว และเนื้อโคโลนีคล้ายเนยเหลว และมีสีของโคโลนีแตกต่างกันคือ โคโลนีสีครีม สีเหลืองอ่อน สีเหลืองเข้มจำนวน 2, 3 และ 1 ไอโซเลท ตามลำดับ เมื่อนำแบคทีเรียทั้ง 6 ไอโซเลท มาย้อมสีแบบแกรมแล้วนำมาศึกษาลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบเลนส์ประกอบ ที่กำลังขยาย 1000 เท่า พบว่า เป็นแบคทีเรียรูปร่างท่อนเซลล์อยู่เดี่ยวๆ และเป็นแบคทีเรียแกรมลบ จำนวน 5 ไอโซเลท คือ S68, S69, S83, S84 และ S91 ยกเว้นแบคทีเรีย S92 ที่มีเซลล์รูปร่างท่อนขนาดใหญ่และเซลล์เรียงต่อเป็นสาย เป็น

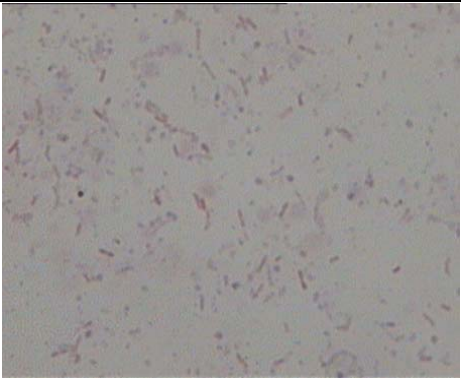
แบคทีเรียแกรมบวก ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 8 ในการทดลองนี้เมื่อนำแบคทีเรียจำนวน 6 ไอโซเลท มาทดสอบการใช้น้ำตาลชนิดต่าง ๆ 8 ชนิด ได้แก่ ฟรุคโตส ซูโครส มอลโตส กลูโคส กาแลคโตส ไซลิทอล แลคโตส และแมนนิทอล รวมทั้ง ทดสอบการผลิตเอนไซม์ คีตาเลสและเอนไซม์ออกซิเดส ผลการทดลองในตารางที่ 9 จะเห็นได้ว่า แบคทีเรียแต่ละชนิดมีความสามารถในการใช้น้ำตาลชนิดต่าง ๆ แตกต่างกัน ส่วนแบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่สามารถละลายฟอสเฟตได้ดีจำนวน 7 ไอโซเลท ได้แก่ RRSTSA2, RRSPVK6-1, RRSTSA3, RRPVK-4, RSPVK-2, RRTSA-5 และ RRTSA6 พบว่า แบคทีเรียที่มีโคโลนีสีครีม ได้แก่ RRSTSA2, RRSPVK6-1, RSPVK-2, RRTSA-5, RRTSA6 และ W-RR ส่วนแบคทีเรีย RRSTSA3 มีโคโลนีสีส้มอ่อน และแบคทีเรีย RRPVK-4 และ WRS มีโคโลนีใส จากการศึกษา ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแบคทีเรีย โดยการย้อมสีแบบแกรมและส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบเลนส์ประกอบ กำลังขยาย 1,000 เท่า พบแบคทีเรียรูปร่างท่อน เป็นแบคทีเรียแกรมลบ ได้แก่ RRSTSA2, RRSPVK6-1, RRSTSA3, RSPVK-2 ส่วนแบคทีเรีย RRPVK-4, RRTSA-5, RRTSA6, W-RR และ W-RS เป็นแบคทีเรียแกรมบวกรูปร่างท่อน (ตารางที่ 10) จากผลการทดลอง พบว่า แบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่ละลายฟอสเฟตได้ส่วนใหญ่เป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างท่อน และพบว่า แบคทีเรียแต่ละไอโซเลทมีลักษณะทางสรีรวิทยาและชีวเคมี ได้แก่ การใช้น้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอน มีการผลิตเอนไซม์คีตาเลสและออกซิเดส ได้แตกต่างกัน ดังแสดงในตารางที่ 11

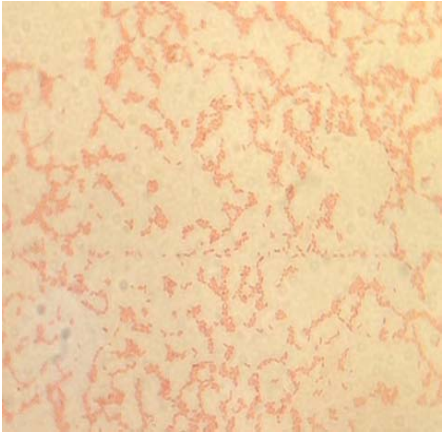
ตารางที่ 10 ลักษณะการเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อและลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียที่ละลายฟอสเฟตได้ดี

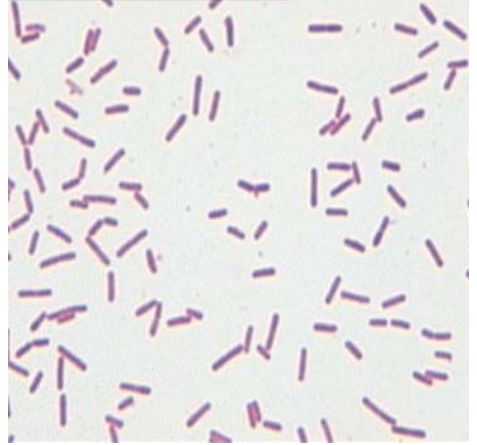
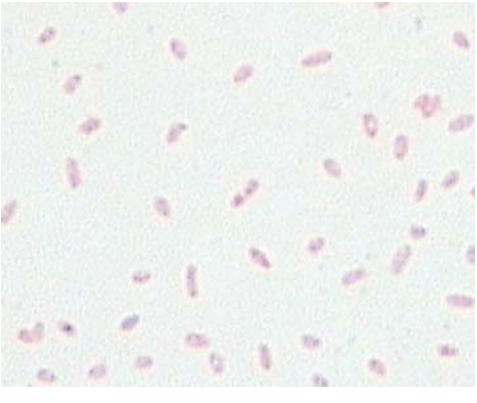
ลำดับ	ไอโซเลท	ลักษณะการเจริญบนอาหารแข็ง	ลักษณะสัณฐานวิทยา		
			รูปร่างและการจัดเรียงตัวของเซลล์	การติดสีแกรม	ลักษณะเซลล์ใต้กล้องจุลทรรศน์ 1,000 เท่า
แบคทีเรียจาก stock culture					
1	S 68	โคโลนีสีเหลือง อ่อน กลมทูน ขอบเรียบ ผิวหน้ำมันวาว เนื้อโคโลนิค้าย เหนียวเหลว		ท่อนเล็ก เซลล์อยู่เดี่ยว ๆ	แกรมลบ 

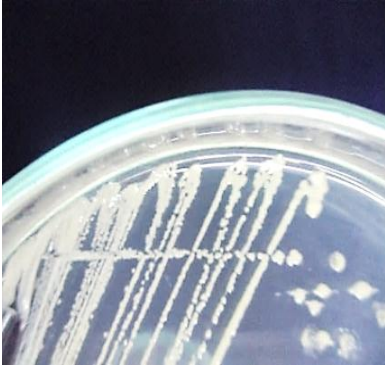
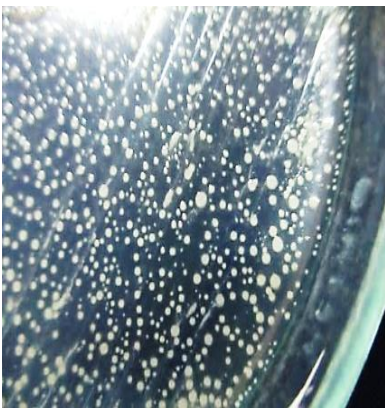
2	S 69	โคโลนีสีเหลือง กลมมน ขอบ เรียบ ผิวหน้ามี มันวาว เนื้อ โคโลนีคล้ายเนย เหลว		ท่อนเล็ก เซลล์ อยู่เดี่ยว ๆ	แกรมลบ	
3	S 83	โคโลนีสีครีม กลมมนขอบ เรียบ ผิวหน้า มันวาว เนื้อ โคโลนีคล้ายเนย เหลว		ท่อนเล็ก เซลล์ อยู่เดี่ยว ๆ	แกรมลบ	

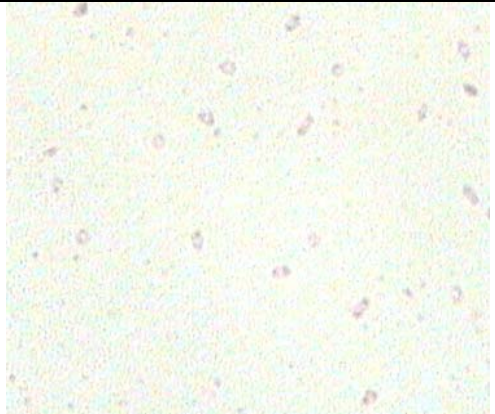
4	S 84	โคโลนีสีครีม รูปร่างกลม ขอบเรียบ ผิวหน้ามี ลักษณะมันวาว เนื้อโคโลนีคล้าย เนยเหลว		ท่อนเล็ก เซลล์ อยู่เดี่ยว ๆ	แกรมลบ	
5	S 91	โคโลนีสีเหลือง อ่อน รูปร่างกลม ขอบเรียบ ผิวหน้ามี ลักษณะมันวาว เนื้อโคโลนีคล้าย เนยเหลว		ท่อนเล็ก เซลล์อยู่เดี่ยว ๆ	แกรมลบ	

6	S 92	โคโลนีสีเหลือง อ่อน กลมมน ขอบเรียบ ผิวหน้ามันวาว เนื้อโคโลนีคล้าย เนยเหลว		ท่อนใหญ่ ต่อกันเป็น สายยาว	แกรมบวก	
แบคทีเรียเอนโดไฟต์จากข้าว						
7	RRSTS42	โคโลนีสีครีม กลมมน ขอบ เรียบ ผิวหน้า มันวาว เนื้อ โคโลนีคล้าย เนยเหลว		ท่อนเล็ก เซลล์อยู่เดี่ยว ๆ	แกรมลบ	

8	RRSPVK6-1	โคโลนีสีครีม กลมมน ขอบ เรียบออก หยักเล็กน้อย ผิวหน้ามัน วาว เนื้อ โคโลนีคล้าย เนยเหลว		ท่อนเล็ก เซลล์อยู่เดี่ยว ๆ	แกรมลบ	
9	RRSTA3	โคโลนีสีส้ม ออกเหลือง กลมมน ขอบ เรียบ ผิวหน้า มันวาว เนื้อ โคโลนีคล้าย เนยเหลว		ท่อนเล็ก เซลล์อยู่เดี่ยว ๆ	แกรมลบ	

10	RRPVK-4	โคโลนีสีใส กลม ขนาดเส้นผ่าน ศูนย์กลางน้อย กว่า 0.1 มม. ขอบเรียบ ผิวทึบน้ำมัน วาวเป็นเมือก		ท่อน เซลล์เป็น สาย	แกรมบวก	
11	RSPVK-2	โคโลนีสีครีม กลม ขอบเรียบ ผิวทึบน้ำมัน วาวเป็นเมือก		ท่อน เซลล์ อยู่เดี่ยวๆ	แกรมลบ	

12	RRTSA-5	สีขาวขุ่น กลม ขอบเรียบ ผิวหน้ามัน มันวาว		ท่อน เซลล์ อยู่เป็นคู่	แกรมบวก	
13	RRTSA-6	สีครีม กลม ง เส้นผ่าน ศูนย์กลาง น้อยกว่า 0.1 มิลลิเมตร ขอบ เรียบ ผิวหน้ามัน มันวาว		ท่อน เซลล์ อยู่เป็นคู่	แกรมบวก	

14	W-RR	โคโลนีสีขาว กลมมน ขอบเรียบ ผิวหน้ำมันเงา		ท่อนเซลล์อยู่เป็นคู่	แกรมบวก	
15	W-RS	โคโลนีสีใส กลมมน ขอบเรียบ ผิวหน้ำมันเงา		ท่อนเซลล์อยู่เดี่ยวๆ	แกรมบวก	

ตารางที่ 11 ผลการทดสอบคุณลักษณะทางสรีรวิทยาและชีวเคมีของแบคทีเรียที่ละลายฟอสเฟตได้ดี

แบคทีเรียจาก stock culture										
รหัสเชื้อ	อะตาลาส	ออกซิเดส	fructose	galactose	glucose	lactose	mannitol	maltose	sucrose	xylitol
<i>S 68</i>	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-
<i>S 69</i>	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-
<i>S 83</i>	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-
<i>S 84</i>	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-
<i>S 91</i>	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-
<i>S 92</i>	+	-	+	-	+	-	-	+	+	-
<i>RRSTS42</i>	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+
<i>RRSPVK6-1</i>	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-

ตารางที่ 11 (ต่อ)

แบคทีเรียเอนโดไฟต์จากข้าว										
รหัสเชื้อ	กะตาเลส	ออกซิเดส	fructose	galactose	glucose	lactose	mannitol	maltose	sucrose	xylitol
<i>RRSTA3</i>	+	-	+	(+)	(+)	+	(+)	-	(+)	(+)
<i>RRPVK-4</i>	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
<i>RSPVK-2</i>	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-
<i>RRTSA-5</i>	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
<i>RRTSA-6</i>	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-
<i>W-RR</i>	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
<i>W-RS</i>	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+

หมายเหตุ

(+) คือ อาหารเปลี่ยนจากสีม่วงเป็นสีเหลือง เกิดแก๊ส

+ คือ อาหารเปลี่ยนจากสีม่วงเป็นเหลือง ไม่เกิดแก๊ส

- คือ อาหารยังคงเป็นสีม่วงเหมือนเดิม

การทดสอบกะตาเลส

+ เกิดฟอง

- ไม่เกิดฟอง

การทดสอบออกซิเดส

+ เกิดสีม่วงเข้ม

- ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง

เมื่อนำแบคทีเรียทั้ง 6 ไอโซเลท ไปวิเคราะห์หาลำดับเบสบนยีนส่วน 16S rRNA ของประเทศมาเลเซีย ได้ผลการจำแนกแบคทีเรียเมื่อนำไปเทียบกับฐานข้อมูลใน GenBank พบว่า ที่แบคทีเรียจาก stock culture ห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา มหาวิทยาลัยแม่โจ้ที่สามารถละลายฟอสเฟตได้ดีคือแบคทีเรีย S68, S69, S83, S84, S91 มีลำดับเบสของยีน 16S rRNA เหมือนกับลำดับเบสของ *Burkholderia cenocepacia* J2315 ที่ระดับความเหมือน 100 เปอร์เซ็นต์ ส่วนแบคทีเรีย S92 มีลำดับเบสของยีน 16S rRNA เหมือนกับลำดับเบสของ *Bacillus thuringiensis* ที่ระดับความเหมือน 100 เปอร์เซ็นต์

ส่วนแบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่สามารถละลายฟอสเฟตได้ดีคือ RRSTSA2, RRSPVK6-1, RRSTSA3, RRPVK-4, RSPVK-2, RRTSA-5 RRTSA6 มีลักษณะเหมือนกับ *Burkholderia vietnamensis*, *Acinetobacter* sp., *Klebsiella pneumoniae*, *Paenibacillus favisporus*, *Burkholderia cenocepacia*, *Bacillus pumilus* และ *Paenibacillus alvei* 100, 100, 99, 100, 100, 100 และ 100 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ และแบคทีเรีย W-RR และ WRS เป็นแบคทีเรียที่แยกได้จากน้ำสุดท้ายที่ล้างพีชในขั้นของการฆ่าเชื้อบริเวณพื้นผิว พบว่า มีลำดับเบสของยีน 16S rRNA เหมือนกับลำดับเบสของ *Bacillus pumilus* และ *Bacillus amyloliquefaciens* ที่ระดับความเหมือน 100 และ 100 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ (ตารางที่ 12)

ตารางที่ 12 ผลการจำแนกแบคทีเรียเมื่อนำลำดับเบสบน 16S rDNA ไปเทียบกับฐานข้อมูลใน GenBank ของแบคทีเรียที่ละลายฟอสเฟตได้ดี

แบคทีเรียจาก stock culture				
ไอโซเลท	แบคทีเรีย	Accession number	Query Cover	Identities
S68	<i>Burkholderia cenocepacia</i> J2315	NC_011000.1	100%	730/731 (99%)
S69	<i>Burkholderia cenocepacia</i> J2315	NC_011000.1	100%	582/583 (99%)
S83	<i>Burkholderia cenocepacia</i> J2315	NC_011000.1	100%	749/750 (99%)
S84	<i>Burkholderia cenocepacia</i> J2315	NC_011000.1	100%	685/686 (99%)
S91	<i>Burkholderia cenocepacia</i> J2315	NC_011000.1	100%	775/776 (99%)
S92	<i>Bacillus thuringiensis</i> serovar <i>konkukian</i> str. 97-27	NC_005957.1	100%	843/844 (99%)
แบคทีเรียเอนโดไฟต์จากข้าว				
RRSTA2	<i>Burkholderia vietnamensis</i>	AB568311.1	100 %	821/821 (100%)
RRSPVK-1	<i>Acinetobacter</i> sp.	KU643206.1	100 %	801/801 (100 %)
RRSTA3	<i>Klebsiella pneumonia</i>	CP016159.1	99 %	779/780 (99 %)
RRPVK-4	<i>Paenibacillus favisporus</i>	LC127090.1	100%	680/680 (100%)
RSPVK-2	<i>Burkholderia cenocepacia</i> J2315	NC_011000.1	100%	754/756 (99%)
RRTSA-5	<i>Bacillus pumilus</i> strain NJ-M2	NZ_CP012329.1	100%	685/685 (100%)
RRTSA-6	<i>Paenibacillus alvei</i> DSM 29 PAV_2c	NZ_AMBZ01000002	100%	686/690 (99%)
W-RR	<i>Bacillus pumilus</i> strain NJ-M2	NZ_CP012329.1	100%	760/760 (100%)
W-RS	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> DSM7	NC_014551.1	100%	760/762 (99%)

ผลการคัดเลือกเชื้อที่ผลิตกรดอินโดลอะซิติก

จากการนำแบคทีเรีย *stock culture* ของห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา มหาวิทยาลัยแม่โจ้ จำนวน 307 ไอโซเลท มาทดสอบการผลิตกรดอินโดลอะซิติกขั้นต้นในอาหารเหลว *tryptone broth* ที่บรรจุในหลอดทดลอง จากผลการทดลองในตารางที่ 11 มีแบคทีเรียที่ให้ผลการทดสอบเป็นผลบวก คือ เกิดสีแดงที่บริเวณผิวหน้าอาหาร ซึ่งแสดงว่า แบคทีเรียสามารถผลิตกรดอินโดลอะซิติกได้ พบว่า มีแบคทีเรีย 6 ไอโซเลท คือ S58, S65, S203, S230, S232 และ S238 คิดเป็นร้อยละของแบคทีเรียที่สามารถผลิตกรดอินโดลอะซิติกได้เท่ากับ 1.95 และ แบคทีเรียร้อยละ 98.05 ไม่สามารถผลิตกรดอินโดลอะซิติกได้ ดังแสดงในตารางที่ 12 แบคทีเรียที่สามารถผลิตกรดอินโดลอะซิติกได้เป็นแบคทีเรียที่แยกได้จากดินรอบรากข้าวในแปลงเกษตรอินทรีย์ 1 ปี คือแบคทีเรีย S58 และ S65 และแยกได้จากดินรอบรากข้าวในแปลงเกษตรอินทรีย์ 5 ปี คือแบคทีเรีย S203 และ S230 ส่วนแบคทีเรีย S232 และ S238 แยกได้จากดินรอบรากพืชในแปลงเกษตรอินทรีย์ 10 ปี ผลการคัดเลือกแบคทีเรียที่สามารถผลิตกรดอินโดลอะซิติกขั้นต้น แสดงในตารางที่ 13

ส่วนแบคทีเรียเอนโดไฟท์ พบว่า มีแบคทีเรียที่สามารถผลิตกรดอินโดลอะซิติกได้จำนวน 4 ไอโซเลทคือ *ISP2RR1*, *RRTSA-6*, *RRSPCA* และ *LRSPCA2* คิดเป็นร้อยละของแบคทีเรียที่สามารถผลิตกรดอินโดลอะซิติกได้เท่ากับ 2.25 และ แบคทีเรียร้อยละ 97.75 ไม่สามารถผลิตกรดอินโดลอะซิติกได้ ซึ่งเป็นแบคทีเรียเอนโดไฟท์ *ISP2RR1* แยกได้จากรากของต้นข้าวจากแปลงเกษตรอินทรีย์ 1 ปี ส่วนแบคทีเรียเอนโดไฟท์ *RRSPCA* และ *LRSPCA2* แยกได้จากส่วนของรากและใบของข้าวจากแปลงเกษตรอินทรีย์ 5 ปี ตามลำดับ และแบคทีเรียเอนโดไฟท์ *RRTSA-6* แยกได้จากรากของต้นข้าวจากแปลงเกษตรอินทรีย์ 10 ปี ผู้ทดลองได้เลือกแบคทีเรียทั้ง 10 ไอโซเลทดังกล่าวข้างต้นไว้ไปทดสอบการผลิตกรดอินโดลอะซิติกในอาหารเหลวและศึกษาหาปริมาณกรดอินโดลอะซิติกต่อไป ตารางที่ 14 แสดงร้อยละของแบคทีเรียที่สามารถผลิต *IAA* ขั้นต้น

ตารางที่ 13 ผลการคัดเลือกแบคทีเรียที่สามารถผลิตกรดอินโดลอะซิติกขั้นต้น

แบคทีเรียจาก stock culture				แบคทีเรียเอนโดไฟต์จากต้นข้าว			
	รหัส แบคทีเรีย	แหล่งที่มา ของเชื้อ	การผลิตกรด อินโดลอะซิ ติก		รหัส แบคทีเรีย	แหล่งที่มา ของเชื้อ	การผลิตกรด อินโดลอะซิติก
1	S58	ดินแปลงเกษตร ทั่วไป	+	1	ISP2RR1	รากข้าว	+
2	S65	ดินแปลงเกษตร ทั่วไป	+	2	RRSPCA	รากข้าว	+
3	S203	ดินรอบรากข้าว เกษตรอินทรีย์ 5 ปี	+	3	LRSPCA2	ใบข้าว	+
4	S230	ดินรอบรากข้าว เกษตรอินทรีย์ 5 ปี	+	4	RRTSA-6	รากข้าว	+
5	S232	ดินรอบรากข้าว เกษตรอินทรีย์ 10 ปี	+				
6	S238	ดินรอบรากข้าว เกษตรอินทรีย์ 10 ปี	+				

ตารางที่ 14 ร้อยละของแบคทีเรียที่สามารถผลิต IAA ขั้นต้น

จำนวนแบคทีเรีย (ไอโซเลต)	จำนวน (ไอโซเลต)		ร้อยละ (%)	
	แบคทีเรียจาก stock culture	แบคทีเรียเอนโด- ไฟต์จากต้นข้าว	แบคทีเรียจาก stock culture	แบคทีเรียเอนโด- ไฟต์จากต้นข้าว
จำนวนไอโซเลตที่ ผลิตกรดอินโดลอะ- ซิติก	6	4	1.95	2.25
จำนวนไอโซเลตที่ ไม่ผลิตกรดอิน- โดลอะซิติก	301	174	98.05	97.75
รวม	307	178	100	100

ผลการทดสอบการผลิตกรดอินโดลอะซิติกในอาหารเหลว และการวิเคราะห์ปริมาณกรดอินโดลอะซิติก

จากการนำแบคทีเรีย S58, S65, S203, S230, S232 และ S238 ที่สามารถผลิตกรดอินโดลอะซิติกได้ ซึ่งคัดเลือกได้จากแบคทีเรียใน stock culture ของห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา มหาวิทยาลัยแม่โจ้ มาทดสอบการผลิตกรดอินโดลอะซิติกในอาหารเหลว Nutrient broth ที่บรรจุในหลอดทดลองและเติมกรดอะมิโน tryptophan ให้มีความเข้มข้นสุดท้าย เท่ากับ 0.2 เปอร์เซ็นต์ แล้วทำการวิเคราะห์ปริมาณกรดอินโดลอะซิติก จากผลการทดลองในตารางที่ 13 พบว่า แบคทีเรีย S58, S65, S203, S230, S232 และ S238 สามารถผลิตกรดอินโดลอะซิติก ได้เท่ากับ 28.68, 23.07, 25.02, 20.63, 21.12 และ 21.85 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ส่วนแบคทีเรียเอนโดไฟท์ ISP2RR1, RRSPCA, LRSPCA2 และ RRTSA-6 สามารถผลิตกรดอินโดลอะซิติกได้เท่ากับ 53.29, 20.93, 7.11 และ 20.55 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ตารางที่ 15 แสดงผลการวิเคราะห์ปริมาณกรดอินโดลอะซิติกในอาหารเหลวของแบคทีเรียที่คัดเลือกได้

ตารางที่ 15 ผลการวิเคราะห์ปริมาณกรดอินโดลอะซิติกในอาหารเหลวของแบคทีเรียที่คัดเลือกได้

แบคทีเรียจาก stock culture				แบคทีเรียเอนโดไฟท์จากต้นข้าว			
	รหัสแบคทีเรีย	แหล่งที่มาของเชื้อ	การผลิตกรดอินโดลอะซิติก		รหัสแบคทีเรีย	แหล่งที่มาของเชื้อ	การผลิตกรดอินโดลอะซิติก
1	S58	ดินแปลงเกษตรทั่วไป	+	1	ISP2RR1	รากข้าว	+
2	S65	ดินแปลงเกษตรทั่วไป	+	2	RRSPCA	รากข้าว	+
3	S203	ดินรอบรากข้าวเกษตรอินทรีย์ 5 ปี	+	3	LRSPCA2	ใบข้าว	+
4	S230	ดินรอบรากข้าวเกษตรอินทรีย์ 5 ปี	+	4	RRTSA-6	รากข้าว	+
5	S232	ดินรอบรากข้าวเกษตรอินทรีย์ 10 ปี	+				
6	S238	ดินรอบรากข้าวเกษตรอินทรีย์ 10 ปี	+				

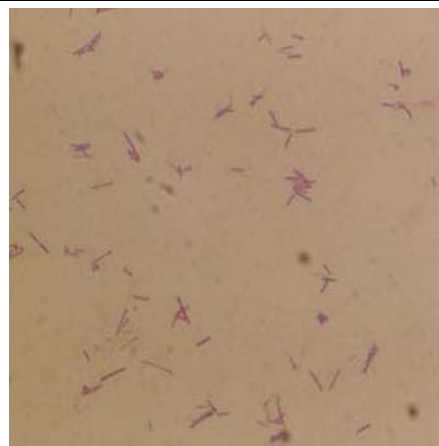
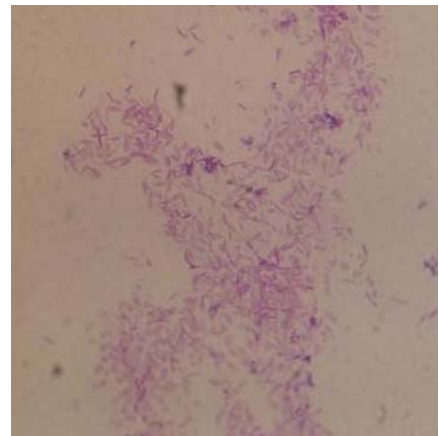
ผลการศึกษาลักษณะของเชื้อเพื่อจำแนกแบคทีเรียที่คัดเลือกได้

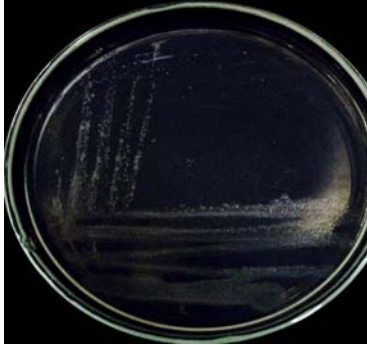
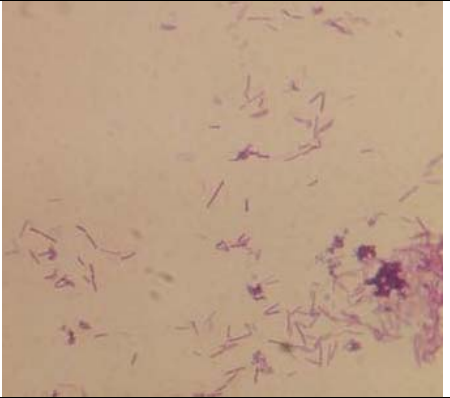
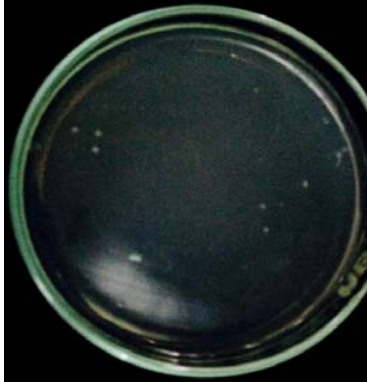
ในการทดลองนี้ ผู้ทดลองนำแบคทีเรียที่สามารถผลิตกรดอินโดลอะซิติกที่คัดเลือกได้จาก *stock culture* ของห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา มหาวิทยาลัยแม่โจ้ ทั้ง 6 ไอโซเลท ได้แก่ แบคทีเรีย S58, S65, S203, S230, S232 และ S238 มาศึกษาลักษณะเบื้องต้น ได้แก่ ลักษณะการเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่า แบคทีเรียมีรูปร่างโคโลนิกลมมน ขอบเรียบ ผิวหนามันวาว และเนื้อโคโลนิคล้ายเนยเหลวทั้ง 6 ไอโซเลท แบคทีเรียที่มีโคโลนิสีครีม S58, S65, S203, S230, S232 และ S238 และศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาโดยการย้อมสีแบบแกรมแล้วส่องดูใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิดเลนส์ประกอบที่กำลังขยาย 1,000 เท่า พบว่า เป็นแบคทีเรียรูปร่างท่อนเซลล์เดี่ยว ทั้ง 6 ไอโซเลท ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมบวก ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 16 เมื่อทดสอบการใช้น้ำตาลชนิดต่าง ๆ ทั้งหมด 8 ชนิด คือ ฟรุคโตส ซูโครส มอลโตส กลูโคส กาแลคโตส ไซลิทอล แลคโตส และ แมนนิทอล รวมทั้ง ทดสอบการผลิตเอนไซม์อะตาเลส และออกซิเดส ผลการทดลองในตารางที่ 17 จะเห็นได้ว่า แบคทีเรียแต่ละชนิดมีความสามารถในการใช้น้ำตาลชนิดต่าง ๆ และการผลิตเอนไซม์อะตาเลส และออกซิเดสแตกต่างกัน (ตารางที่ 17)

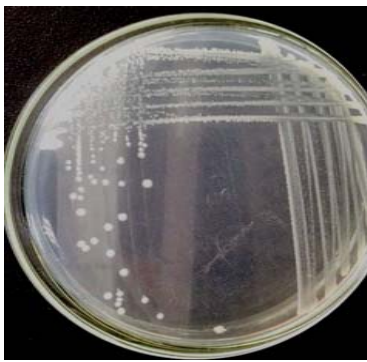
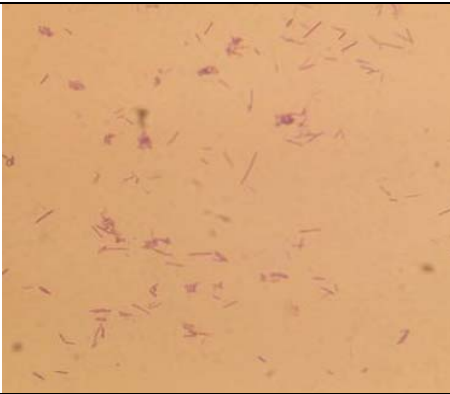
ส่วนแบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่สามารถผลิตกรดอินโดลอะซิติก ได้แก่ แบคทีเรีย *ISP2RR1*, *RRSPCA*, *LRSPCA2* และ *RTSA6* ซึ่งแบคทีเรีย *ISP2RR1* มีลักษณะโคโลนิสีเหลือง เนื้อโคโลนิเหมือนเนยเหลว โคโลนิกลม ขอบเรียบ ผิวหนานูน มันเงา ส่วนลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียโดยการย้อมสีแบบแกรม และส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบเลนส์ประกอบ กำลังขยาย 1,000 เท่า พบว่า เป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปร่างท่อนเซลล์เดี่ยว แบคทีเรีย *RRSPCA* โคโลนิสีขาวขุ่น รูปร่างโคโลนิกลมมน ขอบเรียบ ผิวหน้ามีลักษณะมันวาว เนื้อโคโลนิคล้ายเนยเหลว *LRSPCA2* จะมีโคโลนิสีเหลืองอ่อนออกสีส้ม รูปร่างนูนกลม ขอบเรียบ ผิวหน้ามีลักษณะมันวาว เนื้อโคโลนิ คล้ายเนยเหลว ทั้งแบคทีเรีย *RRSPCA* และ *LRSPCA2* เป็นแบคทีเรียรูปร่างท่อน แกรมลบ เซลล์เดี่ยว ส่วนแบคทีเรีย *RTSA-6* มีโคโลนิสีขาวครีม รูปร่างโคโลนิกลมขนาดเล็กผ่านศูนย์กลางโคโลนีน้อยกว่า 0.1 มิลลิเมตร ขอบเรียบ ผิวหนานูนมันวาว เป็นแบคทีเรียรูปร่างท่อนเซลล์เรียงเป็นคู่ แกรมบวก (ตารางที่ 16) และแบคทีเรียเอนโดไฟท์แต่ละชนิดสามารถใช้น้ำตาลชนิดต่าง ๆ แตกต่างกัน (ตารางที่ 17)

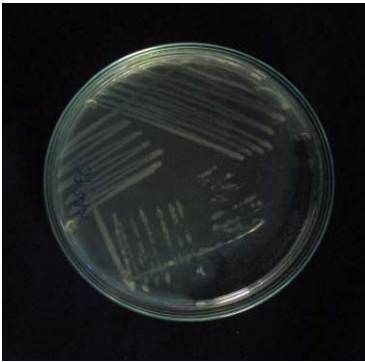
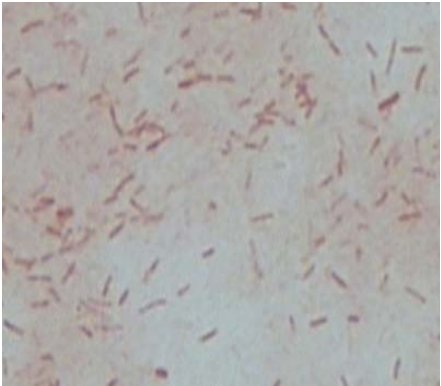
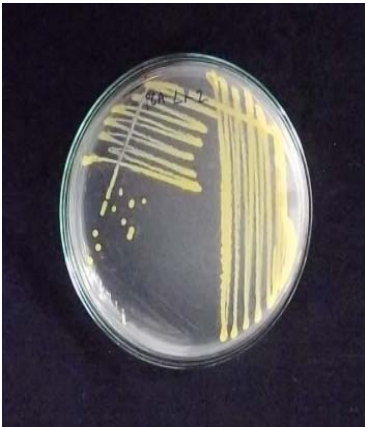
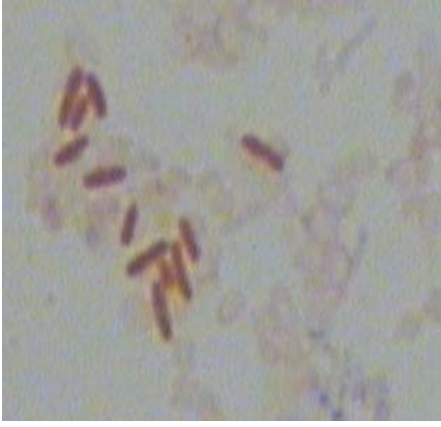
ตารางที่ 16 ลักษณะการเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อและลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียที่ผลิตกรดอินโดลอะซิติกได้สูง

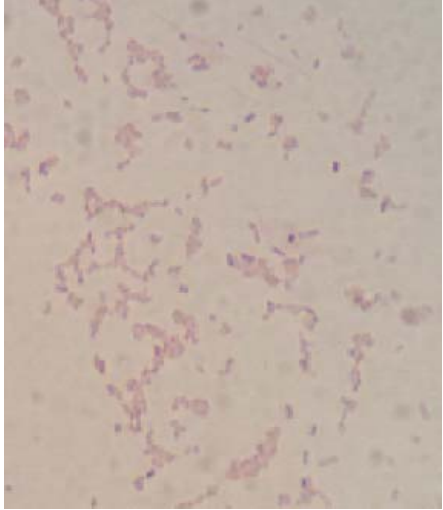
ลำดับ	ไอโซเลท	ลักษณะการเจริญบนอาหารแข็ง	ลักษณะสัณฐานวิทยา		
			รูปร่างและ การจัดเรียง ตัวของเซลล์	การติด สีแกรม	ลักษณะได้กล้อง1,000เท่า
แบคทีเรียจาก stock culture					
1	S58	โคโลนีสีครีม กลมขอบเรียบ ผิวหน้มนวาว เนื้อโคโลนีและ คล้ายเนยเหลว		รูปร่างท่อน เซลล์เดี่ยว	แกรมบวก 

2	S65	โคโลนีสีครีม กลม ขอบเรียบ ผิวหน้ามันวาว เนื้อโคโลนีและ คล้ายเนยเหลว		รูปร่างท่อน เซลล์เดี่ยว	แกรมบวก	
3	S203	โคโลนีสีครีม กลม ขอบเรียบ ผิวหน้ามันวาว เนื้อโคโลนีและ คล้ายเนยเหลว		รูปร่างท่อน เซลล์เดี่ยว	แกรมบวก	

4	S230	โคโลนีสีครีม กลม ขอบเรียบ ผิวหน้า มันวาว เนื้อโคโลนี และคล้ายเนยเหลว		รูปร่างท่อน เซลล์เดี่ยว	แกรมบวก	
5	S232	โคโลนีสีครีม กลม ขอบเรียบ ผิวหน้า มันวาว เนื้อโคโลนี และคล้ายเนยเหลว		รูปร่างท่อน เซลล์เดี่ยว	แกรมบวก	

6	S238	โคโลนีสีครีม กลม ขอบเรียบ ผิวหน้า มันวาว เนื้อโคโลนี และคล้ายเนยเหลว		รูปร่างท่อน เซลล์เดี่ยว	แกรมบวก	
แบคทีเรียเอนโดไฟต์จากข้าว						
7	ISP2RR1	โคโลนีสีเหลือง ออกส้ม เหมือน เนยเหลว รูปร่าง กลม ขอบเรียบ ผิวหน้ามัน มันวาว		รูปร่างท่อน จัดเรียงตัว เป็นเซลล์ เดี่ยว	แกรมลบ	

8	RRSPCA	โคโลนีสีขาวขุ่น รูปร่างกลม ขอบเรียบ ผิวหน้า มีลักษณะมันวาว เนื้อโคโลนีคล้าย เนยเหลว		รูปร่างท่อน ขนาดเล็ก เซลล์ จัดเรียงตัว แบบเซลล์ เดี่ยว	แกรมลบ	
9	LRSPCA2	โคโลนีสีเหลือง อ่อนออกสีส้ม รูปร่างกลม ขอบเรียบ ผิวหน้า มีลักษณะมันวาว เนื้อโคโลนีคล้าย เนยเหลว		รูปร่างท่อน ยาว เซลล์เรียง ตัวแบบ เซลล์เดี่ยว	แกรมลบ	

10	RR TSA-6	สีขาวครีม รูปร่างกลมเป็นเม็ดเล็กๆ แผ่กระจายออกนอกรอยขีด มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางน้อยกว่า 0.1 มิลลิเมตร ขอบเรียบ ผิวหน้านูนมันวาว		ท่อน เซลล์อยู่เป็นคู่	แกรมบวก	
----	----------	---	--	------------------------------	----------------	---

ตารางที่ 17 ผลการทดสอบคุณลักษณะทางสรีรวิทยาและชีวเคมีของแบคทีเรียที่ผลิตกรดอินโดลอะซิติกได้สูง

แบคทีเรียจาก stock culture										
คุณลักษณะทางสรีรวิทยาและชีวเคมี										
การใช้น้ำตาลชนิดต่าง ๆ										
รหัสเชื้อ	อะตาเลส	ออกซิเดส	ฟรุคโตส	ซูโครส	มอลโตส	กลูโคส	กาแลคโตส	ไซลิทอล	แลคโตส	แมนนิทอล
S58	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+
S65	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-
S203	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-
S230	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-
S232	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-
S238	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-
แบคทีเรียเอนโคไฟท์จากข้าว										
ISP2RR1	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-
RRSPCA	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-
LRSPCA2	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-
RRTSA-6	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-

หมายเหตุ (+) คืออาหารเปลี่ยนจากสีม่วงเป็นสีเหลืองเกิดแก๊ส + คืออาหารเปลี่ยนจากสีม่วงเป็นเหลืองไม่เกิดแก๊ส - คืออาหารยังคงเป็นสีม่วงอยู่เหมือนเดิม การทดสอบอะตาเลส+ เกิดฟอง - ไม่เกิดฟอง การทดสอบออกซิเดส + เกิดสีม่วงเข้มภายใน 10 วินาที - ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง

ผลการจำแนกแบคทีเรียโดยการหาลำดับเบสบน 16S rRNA

เมื่อนำแบคทีเรีย S58, S65, S203, S230, S232 และ S238 จาก stock culture ของห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา มหาวิทยาลัยแม่โจ้ ที่สามารถผลิตกรดอินโดลอะซิติกได้ไปหาลำดับเบสบนยีนส่วน 16S rRNA ได้ผลการจำแนกแบคทีเรียเมื่อนำไปเทียบกับฐานข้อมูลใน GenBank ดังตารางที่ 18 พบว่าแบคทีเรีย S58 มีลำดับเบสของยีน 16S rRNA เหมือนกับลำดับเบสของ *Bacillus* sp. ที่ระดับความเหมือน 100 เปอร์เซ็นต์ ส่วนแบคทีเรีย S65, S203, S230, 232 และ S238 มีลำดับเบสของยีน 16S rRNA เหมือนกับลำดับเบสของ *Paenibacillus alvei* ที่ระดับความเหมือน 98-100 % ส่วนแบคทีเรียเอนโดไฟต์ ISP2RR1, RRSPCA, LRSPCA2 และ RRTSA6 ที่สามารถผลิตกรดอินโดลอะซิติกได้มีลำดับเบสของยีน 16S rRNA เหมือนกับ *Chryseobacterium kwangyangense*, *Pseudomonas* sp., *Chryseobacterium kwangyangense*, *Paenibacillus alvei* ที่ระดับความเหมือน 100, 100, 100 และ 100 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ในตารางที่ 19 แบคทีเรียเอนโดไฟต์ที่ทั้งผลิตกรดอินโดลอะซิติกและละลายฟอสเฟตได้

ตารางที่ 18 ผลการจำแนกแบคทีเรียเมื่อนำลำดับเบสบน 16S rRNA ไปเทียบกับฐานข้อมูลใน GenBank ที่สามารถผลิตกรดอินโดลอะซิติกได้สูง

แบคทีเรียจาก stock culture				
ไอโซเลต	แบคทีเรีย	Accession number	Query Cover	Identities
S58	<i>Bacillus</i> sp.	NC005945.1	100%	796/796 (100%)
S65	<i>Paenibacillus alvei</i> DSM 29 PAV_2c	NZ_AMBZ01000002.1	98%	741/777 (95%)
S203	<i>Paenibacillus alvei</i> DSM 29 PAV_2c	NZ_AMBZ01000002.1	100%	731/739 (99%)
S230	<i>Paenibacillus alvei</i> DSM 29 PAV_2c	NZ_AMBZ01000002.1	99%	717/722 (99%)
S232	<i>Paenibacillus alvei</i> DSM 29 PAV_2c	NZ_AMBZ01000002.1	100%	740/776 (98%)
S238	<i>Paenibacillus alvei</i> DSM 29 PAV_2c	NZ_AMBZ01000002.1	98%	741/777 (95%)

ตารางที่ 18 (ต่อ)

แบคทีเรียเอนโดไฟต์				
ISP2RR1	<i>Chryseobacterium kwangyangense</i>	EU169201.1	100 %	800/800 100%
RRSPCA	<i>Pseudomonas sp.</i>	KU312801.1	100 %	801/801 100%
LRSPCA2	<i>Chryseobacterium kwangyangense</i>	EU169201.1	100 %	800/800 100%
RRTSA-6	<i>Paenibacillus alvei</i> DSM 29 PAV_2c	NZ_AMBZ01000002	100%	686/690 (99%)

ตารางที่ 19 แบคทีเรียเอนโดไฟต์ที่ทั้งผลิตกรดอินโดลอะซิติกและละลายฟอสเฟตได้

รหัสแบคทีเรีย	แหล่งที่แยกเชื้อได้	ชื่อแบคทีเรีย
RRTSA-6	เอนโดไฟต์จากรากข้าวหอมมะลิแดงจากแปลง ข้าวเกษตรอินทรีย์มากกว่า 10 ปี	<i>Paenibacillus alvei</i>

วิจารณ์ผลการวิจัย

การวิเคราะห์ค่าความเป็นกรดต่างของดินแปลงเกษตรอินทรีย์ระยะเวลาทำการเกษตร 1 ปี, 5 ปี และ มากกว่า 10 ปี มีค่าความเป็นกรด-ด่าง ระหว่าง 4.7-5.3 ซึ่งตามเกณฑ์การประเมินค่าความเป็นกรด-ด่างในดิน ที่มีค่าระหว่าง 4.5-5.4 จัดเป็นดินที่อยู่ในสภาพที่เป็นกรดจัด ความเป็นกรด-ด่างของดิน ไม่ได้มีผลโดยตรงต่อการเจริญเติบโตของพืชแต่จะมีผลทางอ้อมคือเป็นตัวควบคุมการละลายของธาตุอาหารพืชออกมาสู่สารละลายดินให้อยู่ในรูปที่พืชสามารถดูดซึมขึ้นไปใช้ได้รวมทั้งควบคุมการละลายสารอื่น ๆ ที่อาจเป็นพิษต่อพืชด้วย เช่น เหล็ก อะลูมิเนียม แมงกานีส จะละลายออกมาได้มากในดินกรด ทำให้เกิดเป็นอันตรายต่อพืช และยังจะส่งเสริมการตรึงฟอสฟอรัสให้อยู่ในรูปของเหล็ก และอะลูมิเนียมฟอสเฟต ซึ่งยากแก่พืชที่จะใช้ประโยชน์ ทั้งนี้ เนื่องจากเหล็กและอะลูมิเนียมฟอสเฟตที่อยู่ในสภาพที่ละลายน้ำ (soluble) ได้นั้นมีมาก โดยเฉพาะอย่างยิ่งเมื่อค่าความเป็นกรด-ด่าง ต่ำกว่า 5.0 เมื่อใส่ปุ๋ยฟอสเฟตลงไปในดินที่เป็นกรด ส่วนใหญ่ของปุ๋ยที่ใส่ลงไปจะทำปฏิกิริยากับเหล็กและอะลูมิเนียมเสียหมดทำให้เหลือส่วนที่พืชจะนำไปใช้ประโยชน์น้อยลง (สำนักวิทยาศาสตร์เพื่อการพัฒนาที่ดิน, 2547) นอกจากนี้ ค่าความเป็นกรด-ด่างของดินอาจส่งผลต่อการเจริญของจุลินทรีย์ เนื่องจากในสภาวะที่เป็นกรดอาจทำให้มียับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์บางชนิด ซึ่งอาจมีเฉพาะจุลินทรีย์พวกที่ชอบสภาวะที่เป็นกรด (acidophile) เจริญได้เท่านั้นจึงส่งผลให้พบจำนวนจุลินทรีย์น้อยเช่นเดียวกัน โดย Kemmitt et al. (2006) พบว่า ค่าความเป็นกรด-ด่างของดินเป็นปัจจัยสำคัญที่ควบคุมการหมุนเวียนและการผลิตของสารอินทรีย์และอนินทรีย์ในโตรเจนในดินทางการเกษตร และการเปลี่ยนแปลงในค่าความเป็นกรด-ด่างในดิน ส่งผลกระทบต่อกิจกรรมของจุลินทรีย์ดินและอัตราการเกิดของวัฏจักรคาร์บอนและไนโตรเจนในดินอีกด้วย

ส่วนค่าความหนาแน่นของดิน (bulk density) จากแปลงเกษตรอินทรีย์ระยะเวลาทำการเกษตร 1 ปี, 5 ปี และ มากกว่า 10 ปี มีค่าอยู่ระหว่าง 0.9-1.5 กรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตร ซึ่งหากความหนาแน่นของดินมากเกินไป เนื่องจาก มีปริมาณอินทรีย์วัตถุในดินอยู่น้อย อาจมีผลเสียคือทำให้รากพืชเจริญลงไปดินได้ยากซึ่งการแก้ปัญหาดินที่มีความหนาแน่นมากเกินไป อาจทำได้โดยโดยการใส่อินทรีย์วัตถุเพิ่มลงไปในดิน

และดินจากแปลงข้าวเกษตรอินทรีย์ที่ทำการเกษตรอินทรีย์ระยะเวลา 1-2 ปี, 5-6 ปี และมากกว่า 10 ปี มีปริมาณน้ำในภาคสนาม (field water content) อยู่ระหว่าง 23-44 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนัก

ผลการแยกและคัดเลือกแบคทีเรียที่ละลายฟอสเฟตได้

จากการแยกเชื้อเอนโดไฟต์จากส่วนราก ลำต้นและใบ ของข้าวจากแปลงที่ทำเกษตรอินทรีย์ระยะเวลา 1, 5 ปี และมากกว่า 10 ปี บนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่าง ๆ พบว่า ได้จำนวนแบคทีเรียเอนโดไฟต์แตกต่างกันจากส่วนของข้าวที่มาจากแต่ละแหล่ง ซึ่งในการทดลองนี้จะไม่นำจำนวนเชื้อเอนโดไฟต์ที่แยกได้จากแปลงข้าวที่มีระยะเวลาทำการเกษตรอินทรีย์ต่างกันมาเปรียบเทียบกัน เนื่องจากเป็นตัวอย่างต้นข้าวมาจากคนละพื้นที่ซึ่งในแต่ละพื้นที่เกษตรกรมีการดูแลพื้นที่แตกต่างกัน

ในการทดลองนี้ ได้ทดสอบความสามารถในการละลายฟอสเฟตขั้นต้นของแบคทีเรียบนอาหารแข็ง *PVK agar* โดยดูจากขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใสรอบโคโลนี ซึ่ง *Panhwar et al. (2012)* อธิบายว่ากลไกหลักในการละลายสารฟอสเฟตของจุลินทรีย์ส่วนใหญ่จะเกิดจากการสร้างกรดและปลดปล่อยออกมานอกเซลล์เพื่อละลายเกลือฟอสเฟตโดยตรง จึงทำให้ฟอสฟอรัสอยู่ในรูปที่เป็นกับฟิซ แต่ปริมาณการละลายฟอสเฟตจะแตกต่างกันตามความสามารถในการละลายของจุลินทรีย์แต่ละชนิด ส่วนใหญ่ของแบคทีเรียละลายฟอสเฟตสามารถผลิตกรดอินทรีย์ เช่น กรดซัคซินิก กรดออกซาลิก และ กรดโพรพิโอนิก ได้ในอาหารเหลว ภัทชนาวรรณ (2557) พบว่า การละลายฟอสเฟตเกิดขึ้นสัมพันธ์กับการเจริญของเชื้อและประสิทธิภาพของเชื้อในการสร้างกรดระหว่างการเจริญทำให้การละลายฟอสเฟตเพิ่มมากขึ้น ซึ่งในผลการทดลองนี้ พบว่า วงใสรอบโคโลนีของเชื้อที่ละลายฟอสเฟตได้ไม่สัมพันธ์กับปริมาณการละลายได้ของฟอสเฟตคือแบคทีเรียบางไอโซเลทให้ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางวงใสมากบนอาหารแข็ง *PVK* ในขั้นตอนของการคัดเลือกขั้นต้น แต่เมื่อวิเคราะห์ปริมาณฟอสเฟตในอาหารเหลว พบว่า มีปริมาณน้อย แต่อย่างไรก็ตาม ในการทดลองนี้ผู้ทดลองได้นำแบคทีเรียที่เกิดวงใสบนอาหารแข็ง *PVK* ทุกไอโซเลท มาทดสอบความสามารถการละลายฟอสเฟตในอาหารเหลว ซึ่งมีรายงานว่า ขนาดของวงใสรอบโคโลนีของเชื้อที่ละลายฟอสเฟตได้ไม่มีความสัมพันธ์กับปริมาณการละลายได้ของฟอสเฟต (*Arora et al., 1979; Ostwal et al. (1972)*) นอกจากนี้ *Nautiyal (1999)* รายงานว่า การวิเคราะห์ปริมาณการละลายได้ของฟอสเฟตในอาหารเหลวได้ค่าแม่นยำกว่าการทดสอบบนอาหารแข็งเนื่องจากกรดอินทรีย์แต่ละชนิดมีอัตรา

การแพร่บนอาหารแข็งด้วยอัตราที่แตกต่างกัน นอกจากนี้ *Johri et al. (1999)* ก็รายงานว่า การทดสอบประสิทธิภาพการละลายฟอสเฟตในอาหารเหลวให้ผลน่าเชื่อถือกว่าการทดสอบบนอาหารแข็ง และยังพบว่า เชื้อแบคทีเรียละลายฟอสเฟตเกิดวงใสบนอาหารแข็งที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในอาหารที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์ 5 เปอร์เซ็นต์ และสามารถละลายไทรแคลเซียมฟอสเฟตได้ในอาหารเหลวที่มีเกลือ ค่าความเป็นกรด-ด่างและอุณหภูมิต่าง ๆ กันอีกด้วย

ในผลการทดลองนี้ พบว่า แบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่สามารถละลายฟอสเฟตซึ่งแยกจากส่วนของรากข้าวได้มากกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับส่วนอื่น ๆ ทั้งนี้อาจเป็นผลมาจากรากเป็นบริเวณที่สัมผัสกับดินซึ่งจะพบจุลินทรีย์อาศัยอยู่อย่างหนาแน่นมากกว่าบริเวณอื่น ๆ เนื่องจากรากพืชมีการขับสารออกมาเพื่อเป็นประโยชน์ต่อจุลินทรีย์รอบรากพืช ได้แก่ น้ำตาล กรดอะมิโน สารที่พืชขับออกมาเป็นแหล่งพลังงานและสนับสนุนกิจกรรมของจุลินทรีย์ที่อยู่บริเวณรอบรากพืชได้ ซึ่งจุลินทรีย์ช่วยส่งเสริมการเจริญของพืช โดยเพิ่มการหมุนเวียนน้ำและแร่ธาตุ สร้างวิตามินและสารส่งเสริมการเจริญของพืช เช่น ออกซิน จิบเบอเรลลิน ช่วยเปลี่ยนสารที่เป็นพิษต่อพืชให้เป็นสารที่ไม่เป็นพิษ เพิ่มความสามารถของพืชในการนำแร่ธาตุไปใช้ เช่น เพิ่มการละลายของฟอสเฟต เพิ่มความทนทานต่อสิ่งแวดล้อมและการเจริญในสถานะที่ไม่เหมาะสม ซึ่งบริเวณรากพืชเป็นบริเวณที่มีจำนวนของแบคทีเรียเอนโดไฟท์มากที่สุดเมื่อเทียบกับส่วนอื่น ๆ *Rosenblueth and Romero (2006); Baker et al. (2012);* ปรรธนา (2555) ซึ่ง *Johri et al. (1999)* พบว่า แบคทีเรียละลายฟอสเฟตจำนวนมากที่สุดในส่วนของ บริเวณพื้นผิวของรากพืช (*rhizoplane*) ตามด้วยส่วนบริเวณรอบรากพืช (*rhizosphere*) และในส่วนของดิน ซึ่ง *Nath and Joshi (2016)* กล่าวถึงกระบวนการเข้าสู่พืชของจุลินทรีย์เอนโดไฟท์โดยผ่านทาง บาดแผลของพืช หรือผ่านรากขนและบริเวณผิว นอกจากนี้ และเข้าสู่พืชโดยผ่านช่องเปิดธรรมชาติ หรือการใช้เอนไซม์ย่อยสลาย เช่น เอนไซม์เซลลูเลสและเพคติเนส ซึ่ง *Souza et al. (2015)* กล่าวว่า จุลินทรีย์บริเวณรอบ ๆ รากพืช ช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโต และช่วยเพิ่มผลผลิต รวมทั้งเพิ่มความอุดมสมบูรณ์ของดิน แบคทีเรียที่ช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโต (*PGPB*) เป็นแบคทีเรียที่สามารถเพิ่มประสิทธิภาพการเจริญเติบโตของพืชและการป้องกันพืชจากโรคและความเครียดจากสิ่งไม่มีชีวิต ซึ่งเชื่อมีบทบาทสำคัญ ได้แก่ การตรึงไนโตรเจน ละลายฟอสเฟต มีกิจกรรมเอนไซม์ *ACC deaminase* และผลิต *siderophores* และ ฮอรัโมนพืช ซึ่งสุภาพร และคณะ (2553) รายงานว่า *Burkholderia sp.* สายพันธุ์ *Rs01* สามารถละลายฟอสเฟตในรูป $Ca_3(PO_4)_2$ ได้สูงสุดคือ 878.8 มิลลิกรัมฟอสเฟตต่อลิตร ส่วนการละลายฟอสเฟตของแบคทีเรียเอนโดไฟท์ รายงานโดย สุจิตรา และ คณะ (2556) พบว่า แบคทีเรียเอนโดไฟท์จากรากข้าวเจ้าหอม

สุพรรณบุรี ได้จำนวน 34 ไอโซเลท คัดเลือกไอโซเลทที่สมบูรณ์จำนวน 13 ไอโซ-เลท เพื่อทดสอบความสามารถในการผลิตสารส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช โดยสามารถละลายฟอสเฟตได้ 421.7- 465.9 ไมโครกรัมต่อมิลลิเมตร นอกจากนี้ ภัทรนาวรรณ์ (2557) พบว่า การละลายฟอสเฟตจากตะกอน Ca_3PO_4 ในอาหารเหลว PVK โดยแบคทีเรียไอโซเลท PSB03 สามารถละลายฟอสเฟตในอาหารเหลวได้สูงสุดที่ระยะเวลา 3 วัน และ 7 วัน เท่ากับ 102.11 และ 191.02 มิลลิกรัมฟอสเฟตต่อลิตร ตามลำดับ ซึ่งกลไกในการละลายฟอสเฟตที่อยู่ในรูป ของแคลเซียมฟอสเฟตเป็นผลมาจากการผลิตกรดอินทรีย์ และกิจกรรมของเอนไซม์ฟอสฟาเตส ของแบคทีเรีย (Panhwar et al., 2012, Shankar et al., 2013, Anand et al. (2016) นอกจากนี้ ยังมีเอนไซม์ไฟเตส (phytase) อีกด้วย (Glick, 2012) และยังมีปัจจัยอื่น ๆ ที่มีผลต่อการละลายฟอสเฟตได้อีก เช่น อุณหภูมิ ความเป็นกรด-ด่าง ชนิดและความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจน ซึ่งในการทดลองนี้ ทดสอบการละลายฟอสเฟตในปริมาณอาหารที่น้อยและบ่มเชื้อที่อุณหภูมิไม่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตกรดอินทรีย์และฟอสฟอริก ซึ่ง Baliah and Begum (2015) รายงานว่า แบคทีเรียละลายฟอสเฟตเจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 28 -35 องศาเซลเซียส และเจริญได้ดีในอาหารที่มี กลูโคสและฟรุคโตส เป็นแหล่งคาร์บอน ส่วน Gupta et al. (2012) พบว่า แบคทีเรียละลายฟอสเฟตสามารถปลดปล่อยฟอสฟอรัสได้โดยการลดลงของค่าความเป็นกรด-ด่าง นอกจากนี้ ในรายงานการวิจัยของ Yadav et al. (2013) พบแบคทีเรียละลายฟอสเฟตทนร้อน *Brevibacillus* sp. มีประสิทธิภาพการละลายเฟอริกฟอสเฟต อะลูมิเนียมฟอสเฟต จากหินฟอสเฟตในเหมืองแร่ เป็นแหล่งคาร์บอน เจริญเติบโตได้ดีที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7.5

เมื่อจำแนกชนิดของแบคทีเรียจาก stock culture ที่ละลายฟอสเฟตได้ดีจำนวน 6 ไอโซ-เลท ได้แก่ แบคทีเรีย S68, S69, S83, S84, S91 และ S92 โดยลักษณะการเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแบคทีเรีย การศึกษาลักษณะทางสรีรวิทยาและชีวเคมีและวิเคราะห์หาลำดับเบสบนยีนส่วน 16S rRNA ไปเทียบกับฐานข้อมูลใน GenBank พบว่า แบคทีเรีย S68, S69, S83, S84 และ S91 มีลำดับเบสของยีน 16S rRNA เหมือนกับลำดับเบสของ *Burkholderia cenocepacia* J2315 ที่ระดับความเหมือน 100 เปอร์เซ็นต์ ส่วนแบคทีเรีย S92 มีลำดับเบสของยีน 16S rRNA เหมือนกับลำดับเบสของ *Bacillus thuringiensis* ที่ระดับความเหมือน 100 เปอร์เซ็นต์

สำหรับแบคทีเรียเอนโดไฟต์จากข้าวที่สามารถละลายฟอสเฟตได้ดี ได้แก่ *RRSTA2*, *RRSPVK6-1*, *RRSTA3*, *RRPVK-4*, *RSPVK-2*, *RRTSA-5* และ *RRTSA6* และแบคทีเรียที่แยกได้จากน้ำล้างสุดท้ายของการนำเชื้อบริเวณพื้นผิวน้ำคือแบคทีเรีย *W-RR* และ *WRS* เมื่อจำแนกชนิดของแบคทีเรียโดยศึกษาลักษณะการเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแบคทีเรีย ลักษณะทางสรีรวิทยาและชีวเคมี และหาลำดับเบสบนยีนส่วน *16S rRNA* โดยเทียบกับฐานข้อมูลใน *GenBank* มีลักษณะเหมือนกับ *Burkholderia vietnamiensis*, *Acinetobacter sp.*, *Klebsiella pneumonia*, *Paenibacillus favisporus*, *Burkholderia cenocepacia*, *Bacillus pumilus*, *Paenibacillus alvei* ที่ระดับความเหมือน 100, 99, 100, 100, 100, 100 และ 100 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ส่วนแบคทีเรีย *W-RR* และ *WRS* มีลักษณะเหมือน *Bacillus pumilus* และ *Bacillus amyloliquefaciens* ซึ่ง *Kumar et al. (2016)* รายงานว่า แยกแบคทีเรียเอนโดไฟต์ที่แยกได้จากเหง้าของขมิ้นชัน แล้วศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและชีวเคมีและหาลำดับเบส *16S rRNA* พบว่า เป็น *Bacillus cereus* (*ECL1*) *Bacillus thuringiensis* (*ECL2*) *Bacillus sp.* (*ECL3*) *Bacillus pumilis* (*ECL4*) *Pseudomonas putida* (*ECL5*) และ *Clavibacter michiganensis* (*ECL6*) ซึ่งทุกสายพันธุ์ผลิต *IAA* และฟอสเฟตละลายและมี 2 สายพันธุ์ที่ผลิต siderophore (*ECL3* และ *ECL5*) ส่วน *Murugappan et al. (2013)* แยกได้ *Bacillus pumilus* จากชิ้นส่วนของพืชสมุนไพรชนิดนี้สามารถละลายฟอสเฟตและผลิตกรดอินทรีย์ชนิดต่างๆ ผลิตไซโตไคน์ ฮอร์โมนพืช ไบโอดีเอส และไคตินเนสที่ช่วยยับยั้งเชื้อก่อโรคในพืชได้อีกด้วย นอกจากนี้ *Istina et al. (2015)* แยกแบคทีเรียละลายฟอสเฟตจากดินพลู พบว่า *Burkholderia gladioli* และ *Penicillium aculeatum* สามารถละลายฟอสเฟตในรูป Ca_3PO_4 ได้ 306 และ 231.83 มิลลิกรัมฟอสเฟตต่อลิตร ตามลำดับ ต่อมา *Ghosh et al. (2016)* ได้ทำการศึกษาแบคทีเรียที่สามารถละลายฟอสเฟต 3 ไอโซเลท พบว่าสามารถละลายฟอสเฟตได้ถึง 580.56 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร 517.12 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ 485.18 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และจำแนกชนิดของแบคทีเรียด้วย *16S rRNA* พบว่า เป็นแบคทีเรีย *Burkholderia tropica*, *Burkholderia unamae* และ *Burkholderia cepacia* ตามลำดับ ซึ่ง *Sarsan (2016)* รายงานว่า *Bacillus PSB24* ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่สามารถละลายฟอสเฟต และส่งเสริมการเจริญเติบโตและเพิ่มผลผลิตในมะเขือเทศโดยมีผลทำให้มีการเจริญเติบโตของราก

ลำต้น และช่วยเพิ่มน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งในมะเขือเทศได้ มีการนำแบคทีเรียละลายฟอสเฟตไปประยุกต์ใช้เป็นปุ๋ยชีวภาพซึ่งส่งผลดีต่อสิ่งแวดล้อมอีกด้วย (Anand et al., 2016) ซึ่ง Liu et al. (2015) เมื่อได้คัดแยกเชื้อแบคทีเรียที่สามารถละลายฟอสเฟต และจำแนกชนิดของแบคทีเรียด้วย 16S rRNA พบว่า เป็นแบคทีเรีย *Bacillus megaterium*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Rhizobium sp.*, *Acinetobacter sp.* และ *Pseudomonas oryzihabitans*

จากผลการคัดเลือกเชื้อที่ผลิตกรดอินโดลอะซิติก พบว่า เป็นเชื้อที่แยกได้จากดินรอบรากข้าวจากแปลงเกษตรอินทรีย์ 1, 5 และ มากกว่า 10 ปี ส่วนแบคทีเรียเอนโดไฟท์แยกได้จากส่วนรากและส่วนใบข้าว ซึ่งในการทดลองนี้ใช้วิธีการคัดเลือกเชื้อที่ผลิตกรดอินโดลอะซิติกได้ขั้นต้นโดยวิธี indole test ซึ่ง พิมพรีดา และคณะ (2550) คัดเลือกจุลินทรีย์ที่ผลิตกรดอินโดลอะซิติกจากตัวอย่างดินบริเวณราก ด้วยวิธี indole test โดยการเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว tryptone broth แล้วนำมาทดสอบกับ Kovac 's reagent พบว่า เมื่อหยด Kovac 's reagent ลงไปแล้ว มีการเปลี่ยนแปลงของน้ำยาเป็นสีแดงที่ผิวชั้นบนอาหาร เนื่องจาก tryptophanase สามารถเปลี่ยนกรดอะมิโน tryptophan เป็น indole ammonia และ pyruvic เมื่อทำปฏิกิริยากับ Kovac 's reagent ซึ่งบ่งบอกเบื้องต้นได้ว่า แบคทีเรียมีความสามารถในการผลิตกรดอินโดลอะซิติก จาก tryptophan ได้ในการคัดเลือกการผลิตกรดอินโดลอะซิติกเบื้องต้นในอาหาร tryptone broth เป็นการบ่งบอกขั้นต้นได้ว่า แบคทีเรียมีความสามารถในการผลิตกรดอินโดลอะซิติกได้หรือไม่ ซึ่งการคัดเลือกเชื้อที่ผลิตกรดอินโดลอะซิติกขั้นต้นด้วยวิธีนี้เป็นวิธีที่ช่วยย่นระยะเวลา (Sahasrabudhe, 2011)

จากผลการทดสอบการผลิตกรดอินโดลอะซิติก ในอาหารเหลว Nutrient broth ที่เติมกรดอะมิโน tryptophan ให้มีความเข้มข้นสุดท้าย เท่ากับ 0.2 เปอร์เซ็นต์ พบว่า แบคทีเรียจาก stock culture ของห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา มหาวิทยาลัยแม่โจ้ ผลิตกรดอินโดลอะซิติกได้ระหว่าง 20.63-28.68 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่วนแบคทีเรียเอนโดไฟท์ผลิตกรดอินโดลอะซิติกได้ระหว่าง 7.11-53.29 มิลลิกรัมต่อลิตร

ในการทดลองนี้ จะเห็นว่า แบคทีเรียที่แยกได้จากแหล่งต่าง ๆ ผลิตกรดอินโดลอะซิติกไม่สูงมากนัก ทั้งนี้อาจเป็นผลมาจากการทดลองนี้ทดสอบการผลิตกรดอินโดลอะซิติกในอาหารเหลวที่บรรจุในหลอดทดลองที่มีปริมาณอาหารเลี้ยงเชื้อเพียง 5 มิลลิลิตร ซึ่งอาจส่งผลให้เชื้อผลิตกรดอินโดลอะซิติกได้น้อย ซึ่งยังมีปัจจัยอื่น ๆ ที่มีผลต่อการผลิตกรดอินโดลอะซิติกให้

สูงขึ้นได้ เช่น ปริมาณอาหารเลี้ยงเชื้อ อุณหภูมิ ค่าความเป็นกรด-ด่าง ออกซิเจน และชนิดความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจน รวมทั้งปัจจัยอื่น ๆ ซึ่งศรีกาญจนา และคณะ (2557) พบว่า แบคทีเรียสามารถผลิตกรดอินโดลอะซิดิก ได้สูงสุดในอาหารที่มีความเข้มข้นของ tryptophan 600 มิลลิกรัมต่อมิลลิตร โดยผลิตกรดอินโดลอะซิดิกได้ดีที่ค่าความเป็นกรด-ด่างที่ 7.0-9.0 อีกทั้งยัง พบว่า การให้อากาศในการเพาะเลี้ยงสามารถทำให้แบคทีเรียผลิตกรดอินโดลอะซิดิกได้เป็น 2 เท่า เมื่อเทียบกับการเพาะเลี้ยงในสภาพตั้งทิ้งไว้ มีรายงานการวิจัยของ Nita et al. (2011) พบว่า เมื่อได้ทำการทดลองการผลิตกรดอินโดลอะซิดิกของแบคทีเรีย *Acetobacter diazotrophicus* จะสามารถผลิตกรดอินโดลอะซิดิกได้สูงที่สุดเมื่อเติมปริมาณ Tryptophan 1.2 กรัมต่อลิตร และการผลิตกรดอินโดลอะซิดิก จะลดลงเมื่อเติมปริมาณ Tryptophan มากกว่า 1.2 กรัมต่อลิตร นอกจากนี้ Bharucha and Patei (2013) พบว่าเมื่อทำการทดลองการผลิตกรดอินโดลอะซิดิกของแบคทีเรีย *Pseudomonas putida* UB1 ที่เพาะเลี้ยงเชื้อในเครื่องเขย่าด้วยความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที จะสามารถผลิตกรดอินโดลอะซิดิกได้มากกว่าเพาะเลี้ยงแบบตั้งทิ้งไว้ถึง 2 เท่า ต่อมา Mohite (2013) ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตกรดอินโดลอะซิดิกของแบคทีเรียที่แยกได้จากดินรอบรากพืช โดยศึกษาค่าความเป็นกรด-ด่าง และอุณหภูมิ ควบคู่กับการควบคุมแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจน ตลอดจนความเข้มข้นของกรดอะมิโนทรีปโตเฟน พบว่า ที่ความเข้มข้นของทรีปโตเฟน 0.1 เปอร์เซ็นต์ ไอโซเลต br1 และ br2 ให้ปริมาณการผลิตกรดอินโดลอะซิดิกสูงสุด ที่ความเข้มข้นของทรีปโตเฟน 1.5 เปอร์เซ็นต์ ไอโซเลต mr2 และ br2 ให้ปริมาณการผลิตกรดอินโดลอะซิดิกสูงสุด และที่ความเข้มข้น 0.05 เปอร์เซ็นต์ ไอโซเลต wr2 ให้ปริมาณการผลิตกรดอินโดลอะซิดิกสูงสุด พบว่า แหล่งของไนโตรเจนส่งผลต่อความเข้มข้นของกรดอินโดลอะซิดิก อย่างมีนัยสำคัญ และพบว่าอาหารที่มีค่าความเป็นกรดสูงจะไม่ก่อให้เกิดการสังเคราะห์ กรดอินโดลอะซิดิก โดยเชื้อสามารถผลิตกรดอินโดลอะซิดิกได้ในปริมาณที่สูงที่ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 8 สำหรับไอโซเลต br1, br2 และ br3 ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7 สำหรับ ไอโซเลต mr2 และ ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 9.0 สำหรับ ไอโซเลต wr2 และสามารถผลิตกรดอินโดลอะซิดิกได้ดีที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

ในการทดลองนี้ ได้จำแนกชนิดของแบคทีเรียที่ผลิตกรดอินโดลอะซิดิกจาก stock culture ของห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา มหาวิทยาลัยแม่โจ้ โดยศึกษาลำดับเบสของยีน 16srRNA

พบว่า เป็น *Bacillus* sp., *Paenibacillus alvei* ส่วนแบคทีเรียเอนโดไฟต์แยกได้จากส่วนของราก และใบของข้าวจากแปลงเกษตรอินทรีย์เป็น *Paenibacillus alvei* DSM 29, *Pseudomonas* sp. และ *Chryseobacterium kwangyangense* ซึ่ง Xuam et al. (2016) ได้แยกและศึกษาคุณลักษณะของแบคทีเรียเอนโดไฟต์จากดินที่มีสภาพเป็นกรดในเวียดนาม พบว่า มีเชื้อ 160 สายพันธุ์ ที่สามารถตรึงไนโตรเจน ละลายฟอสเฟต และผลิตกรดอินโดลอะซิติก และมีจำนวน 60 สายพันธุ์ ที่มีคุณลักษณะที่ดีที่สุด เมื่อจำแนกเชื้อโดยใช้วิธีชีวโมเลกุล พบว่า เป็น *Bacillus* (20%) 12 ไอโซเลต, *Proteobacteria* (80%) มี *beta* และ *Gammaproteobacteria* จำนวน 5 ไอโซเลต (33%) และ 7 ไอโซเลต (47%) ตามลำดับ และเป็นเชื้อ *Burkholderia vietnamiensis* (*Burkholderia vietnamiensis* HG6-21b, KG2-21, BL1-21b และ LA5-22b) ซึ่งเชื้อข้างต้นมีศักยภาพสำหรับการประยุกต์ใช้เป็นจุลินทรีย์หรือปุ๋ยชีวภาพไปปรับใช้กับดินที่อยู่ในสภาวะดินที่เป็นกรด เพื่อให้ได้ผลผลิตของข้าวสูง และยังเป็นสายพันธุ์ที่ปลอดภัยสำหรับการเกษตรอย่างยั่งยืน ส่วน Midekssa et al. (2015) จำแนกชนิดของแบคทีเรียละลายฟอสเฟตที่แยกได้จากบริเวณรอบรากต้นถั่วในเอธิโอเปีย โดยหาลำดับเบส 16srRNA พบว่า เป็น *Acinetobacter*, *Agrobacterium*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Chryseomonas*, *Enterobacter*, *Pseudomonas*, *Ralstonia* และ *Sphingomonas* ซึ่งเชื้อ *Enterobacter kobei* (PSBL5), *Bacillus subtilis* (PSBL21) *Enterobacter* ชนิด (PSBL26) สายพันธุ์ *Bacillus* (PSBL31) และ *Pseudomonas fluorescence* (PSBL37) สามารถผลิตสารส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช เช่น กรดอินโดลอะซิติกและสามารถยับยั้งเชื้อราก่อโรคพืช *Fusarium oxysporum* โดย Susilowati et al. (2015) ได้ศึกษาความหลากหลายของชนิดและหน้าที่ของแบคทีเรียรอบรากพืชที่แยกได้จากดินในนาข้าวในอินโดนีเซีย จากการจำแนกโดยการหาลำดับเบส 16S rRNA พบว่า ส่วนใหญ่เป็น *Bacillus* sp. และมี 75 สายพันธุ์ ที่ผลิตกรดอินโดลอะซิติกได้ มีจำนวน 32 สายพันธุ์ ที่ตรึงไนโตรเจน และสามารถละลายฟอสเฟตได้ 37 สายพันธุ์ และมี 33 สายพันธุ์ ที่ผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้ โดย Acuna et al. (2011) รายงานว่า สภาวะดินที่มีค่าความเป็นกรด-ด่างต่ำและมีโลหะที่เป็นพิษจะมีผลทำให้เชื้อ *Paenibacillus* sp. T-03 ที่แยกได้จากบริเวณรอบรากพืชผลิตกรดอินโดลอะซิติกได้สูงขึ้น แต่เชื้อ *Bacillus* sp. MQH-19 ผลิตกรดอินโดลอะซิติกได้ลดลง แต่ทั้งสองเชื้อมีกิจกรรมของเอนไซม์ไฟเตสต่ำ ซึ่งในสภาวะ

ที่ค่าความเป็นกรด-ด่างต่ำ และมี Mn^{2+} 350 mM จะมีผลทำให้ผลิตกรดอินโดลอะซิติกลดลง 30-100 เปอร์เซ็นต์ และ 44-70 เปอร์เซ็นต์

เชื้อที่สามารถละลายฟอสเฟตและผลิตกรดอินโดลอะซิติกได้ในการทดลองนี้ อาจมีบางชนิดที่เป็นเชื้อก่อโรค เช่น *Paenibacillus* sp. จะเป็นเชื้อก่อโรคสัตว์ เช่น โรคในผึ้งตัวอ่อน แต่มีรายงานว่า *Paenibacillus* sp. สามารถผลิตสารต้านจุลินทรีย์ได้ที่หลากหลายชนิด เช่น *lantibiotics* (He et al. (2007), *lipopeptides* (Martin et al. (2003) และ *macrolide* (Wu et al. 2010) *Lipopeptides* นอกจากนี้ *lipopeptides* มีฤทธิ์ในการต้านไวรัส ช่วยเสริมคุ้มกัน หรือยับยั้งสารพิษหรือเอนไซม์อย่างจำเพาะ (Rodrigues et al. (2006) ยังมีรายงานของ Pragash et al. (2009) ศึกษาคุณลักษณะของสายพันธุ์ *Chryseobacterium aquaticum* PUPC1 ซึ่งแยกได้จากดินบริเวณรอบรากข้าว สามารถผลิตเอนไซม์โปรติเอสยับยั้งเชื้อราก่อโรคพืชได้ นอกจากนี้ เชื้อนี้ยังผลิตเอนไซม์ *aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) deaminase* และฟอสฟาเตส เมื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของการผลิตเอนไซม์ พบว่า ค่าความเป็นกรด-ด่าง 6.0 และอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส สามารถผลิตเอนไซม์โปรติเอสได้สูงสุดใน *Medium B* ที่ประกอบด้วย 1% *tryptone*, 0.5% *sucrose*, and 0.005% $MnCl_2$ และเอนไซม์นี้มีความเสถียรที่ค่าความเป็นกรด-ด่าง 5.0-10.0 และที่อุณหภูมิ 40-70 องศาเซลเซียส และเอนไซม์โปรติเอสของเชื้อนี้มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อราก่อโรคพืช จากรายงานวิจัยของ Kishi et al. (2012) พบว่า เชื้อที่แยกได้จากดินบริเวณรอบรากอ้อยในบราซิลสามารถละลายฟอสเฟตและผลิตกรดอินโดลอะซิติกได้ เมื่อจำแนกชนิดโดยการหาลำดับเบส 16srRNA พบว่า เป็น *Enterobacter* sp. *Enterobacter homaechei* subsp *verschuerennii*, *Burkholderia* sp. และ *Labrys portucalensis*

ในการทดลองนี้ พบว่า แบคทีเรีย RRTSA-6 ซึ่งเป็นแบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่แยกได้จากรากข้าวจากแปลงเกษตรอินทรีย์มากกว่า 10 ปี ที่มีคุณสมบัติทั้งการผลิตกรดอินโดลอะซิติกและละลายฟอสเฟตได้ซึ่งเป็นประโยชน์อย่างยิ่งที่ได้เชื้อที่มีคุณสมบัติทั้งสองลักษณะข้างต้นอยู่ในเชื้อเดียวกัน นอกจากนี้ ในการทดลองนี้ ยังแยกได้เชื้อที่มีประโยชน์ในทางการเกษตร เช่น *Bacillus thuringiensis* ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่ช่วยในการกำจัดแมลงศัตรูพืช ซึ่งนี่ถือว่าเป็นเชื้อที่มีความจำเพาะ ปลอดภัย และมีประสิทธิภาพในการควบคุมแมลงศัตรูพืชได้ดี (Jong Yul et al., 2007) นอกจากนี้ Shrestha et al. (2016) ยังรายงานว่า แบคทีเรียสกุล *Bacillus* sp. ที่แยกได้จากข้าวมีศักยภาพในการควบคุมโรคพืชได้ เช่น เชื้อก่อโรคในข้าวจากเชื้อ *Rhizoctonia solani*

และ *Burkholderia glumae* โดยจำแนกชนิดของแบคทีเรียโดยการหาลำดับเบส 16srRNA พบว่าเป็น *B. methylotrophicus* และ *B. subtilis* และเชื้อที่สร้างสารยับยั้งเชื้อก่อโรคในกาบใบแห้งในข้าวได้ดี คือ *B. amyloliquefaciens* และ *B. subtilis*

การประยุกต์ใช้ประโยชน์จากเชื้อที่คัดเลือกได้ในการทดลองนี้ อาจนำไปใช้ร่วมกับเชื้อส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช (*Plant growth promoting microorganisms, PGPR*) อื่น ๆ ซึ่งจุลินทรีย์กลุ่ม *PGPR* มีประโยชน์ต่อพืช 3 ด้าน ได้แก่ จะช่วยให้พืช ช่วยให้พืชทนทานต่อสภาวะเครียด ช่วยให้พืชทนทานต่อเชื้อก่อโรคพืช และเป็นปุ๋ยชีวภาพ ช่วยส่งเสริมการเจริญของพืช Souza et al. (2015) ซึ่ง Khan et al. (2006) กล่าวว่า หากใช้แบคทีเรียละลายฟอสเฟตร่วมกับจุลินทรีย์อื่น ๆ เช่น จุลินทรีย์ส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชและไมคอร์ไรซา โดยใช้ในรูปแบบเชื้อผสมจะทำให้มีประสิทธิภาพในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชมากยิ่งขึ้น ซึ่งเชื้อที่ได้ในการทดลองนี้อาจนำไปประยุกต์ใช้ประโยชน์ต่อการผลิตพืชในระบบเกษตรอินทรีย์ต่อไปในอนาคต

สรุปผลการวิจัย

การแยกแบคทีเรียเอนโคไฟท์จากส่วนของราก ลำต้น และใบของข้าว จากแปลงข้าวที่ท่าเกษตรอินทรีย์เป็นระยะเวลา 1, 5 และ มากกว่า 10 ปี ในจังหวัดเชียงใหม่ ได้แบคทีเรียเอนโคไฟท์ทั้งหมดจำนวน 178 ไอโซเลต และแยกได้แบคทีเรียจากน้ำสุดท้ายของการล้างส่วนของรากและลำต้นของข้าว 2 ไอโซเลต ตามลำดับ

การคัดเลือกแบคทีเรียที่ละลายฟอสเฟตขั้นต้น ของแบคทีเรียทั้งหมดจำนวน 487 ไอโซเลต บนอาหารแข็ง PVK พบว่า มีแบคทีเรีย 6 ไอโซเลต จาก stock culture ของห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา (S68, S69, S83, S84, S91, S92) และแบคทีเรียเอนโคไฟท์ 7 ไอโซเลต (RRSTSA2, RRSPVK6-1, RRSTSA3, RRPVK-4, RRPVK-2, RRTSA-5 และ RRTSA6) ที่สามารถละลายฟอสเฟตได้ 756.92, 766.35, 776.57, 690.88, 620.13, 724.69 114.32, 92.79, 97.88, 92.65, 191.78, 91.80 และ 73.22 มิลลิกรัมฟอสเฟตต่อลิตร ตามลำดับ และพบทั้งแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ การจำแนกชนิดของแบคทีเรียละลายฟอสเฟตโดยการหาลำดับเบสของยีนส่วน 16S rRNA พบว่า S68, S69, S83, S84 และ S91 เป็น *Burkholderia cenocepacia* ส่วนแบคทีเรีย S92 เป็น *Bacillus thuringiensis* ส่วนแบคทีเรียเอนโคไฟท์เป็น *Burkholderia vietnamiensis*, *Acinetobacter* sp., *Klebsiella pneumonia*, *Paenibacillus favisporus*, *Burkholderia cenocepacia*, *Bacillus pumilus* *Paenibacillus alvei* ตามลำดับและพบว่าแบคทีเรียจาก stock culture (S58, S65, S203, S230, S232 และ S238) และแบคทีเรียเอนโคไฟท์ (ISP2RR1, RRSPCA, LRSPCA2 และ RRTSA6) รวม 10 ไอโซเลต ที่ผลิตกรดอินโดลอะซิติกได้สูงเท่ากับ 28.68, 23.07, 25.02, 20.63, 21.12, 21.85, 53.29, 20.93, 7.11 และ 20.55 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ การจำแนกชนิดของแบคทีเรียผลิตกรดอินโดลอะซิติกโดยการหาลำดับเบสของยีนส่วน 16S rRNA พบว่า แบคทีเรีย S58 มีลำดับเบสของยีน 16S rRNA เหมือนกับ *Bacillus* sp. ส่วนแบคทีเรีย S65, S203, S230, 232 และ S238 มีลำดับเบสของยีน 16S rRNA เหมือนกับ *Paenibacillus alvei* และแบคทีเรียเอนโคไฟท์ ISP2RR1, RRSPCA, LRSPCA2 และ RRTSA6 มีลำดับเบสของยีน 16S rRNA เหมือนกับ *Chryseobacterium kwangyangense*, *Pseudomonas* sp., *Chryseobacterium kwangyangense*, *Paenibacillus alvei* ซึ่งคาดว่าจะนำแบคทีเรียละลาย

ฟอสเฟตและผลิตภัณฑ์อินทรีย์ได้อะซิดิกได้คัดเลือกได้ในงานวิจัยนี้ไปประยุกต์ใช้ในการปลูกข้าวในระบบการปลูกข้าวอินทรีย์แบบประณีต หรือการนำไปประยุกต์ใช้ประโยชน์จากจุลินทรีย์ในพื้นที่บริเวณที่มีน้ำน้อย เช่น เกษตรในพื้นที่สูง พื้นที่ประสบภัยแล้งจากภาวะอากาศเปลี่ยนแปลงที่มีปริมาณฝนตกน้อย ซึ่งเป็นภาวะภูมิอากาศเปลี่ยนแปลงที่กำลังเผชิญอยู่ในปัจจุบัน

เอกสารอ้างอิง

- เกตนันธนิภา วันชัย. 2556. การประยุกต์ใช้จุลินทรีย์ท้องถิ่นที่ตรึงอยู่บนวัสดุชนิดต่างๆ ในการปรับปรุง คุณภาพดินนาข้าวที่เกิดอุทกภัย. วิทยานิพนธ์ มหาวิทยาลัยราชภัฏพระนครศรีอยุธยา. ชนิกานต์ คุ่มนง. 2558. การส่งเสริมการเจริญของข้าวโดยแบคทีเรียเอนโดไฟต์ ตรึงไนโตรเจนที่แยกได้จากข้าวปลูกและข้าวป่า. *Rajabhat J. Sci. Humanit. Soc. Sci.* 16(1): 64-76, 2015.
- ชนิกานต์ คุ่มนง. 2552. การส่งเสริมการเจริญของข้าวโดยแบคทีเรียตรึงไนโตรเจน เอนโดไฟท์. กรุงเทพมหานคร : สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ. 25.
- นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ และปรีชา สุวรรณพินิจ และ 2544. จุลชีววิทยาทั่วไป. สำนักพิมพ์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. กรุงเทพฯ. 356 น.
- นงลักษณ์ แหวนวิเศษ. 2550. อิทธิพลของเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟต์ต่อการเจริญเติบโตและการเกิดโรคในอ้อย. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. [ระบบออนไลน์]. แหล่งที่มา http://agkb.lib.ku.ac.th/kw/search_detail/result/158807 (10 พฤษภาคม 2559).
- ปรารธนา หงส์ฤทธิพันธุ์. 2555. การแยกและการคัดเลือกแบคทีเรียเอนโดไฟต์ตรึงไนโตรเจนในข้าว. กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา. กระทรวงศึกษาธิการ. กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. กระทรวงวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี. กระทรวงทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม. กระทรวงเทคโนโลยีสารสนเทศและการสื่อสาร. สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ. สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย. [ระบบออนไลน์]. แหล่งที่มา <http://kucon.lib.ku.ac.th> (24 พฤษภาคม 2559).
- พิมพ์ธิดา เรืองไพศาล, นววรรณ เหลืองวุฒิโรจน์ และดารารัตน์ โสตาก้า. 2550. การพัฒนาผลิตภัณฑ์เชื้อจุลินทรีย์ที่สร้างฮอร์โมนเพื่อส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช. กรมพัฒนาที่ดิน. หน้า 33
- ภัทธนาวรรณ ฉันทรัตน์โยธิน. 2557. การคัดแยกเชื้อจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพสูงในการสลายฟอสเฟตจากรากของข้าวหอมมะลิแดง. มหาวิทยาลัยแม่โจ้.
- ศรีกาญจนา คล้ายเรือง ฐปน ชื่นบาล ปิยะนุช เนียมทรัพย์ และนลิน วงศ์ขัตติยะ. 2556. รายงานการวิจัย การศึกษาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากแบคทีเรียรีดิวส์คลอเรตเพื่อใช้ประโยชน์ทางการเกษตร. คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้, หน้า 15-25.

- สาคร คงเมือง และ เรืองฤทธิ์ สร้อยสังวาลย์. 2555. คนรักแม่โพสพ. [ระบบออนไลน์]. แหล่งที่มา <http://www.agrinature.or.th> (10 พฤษภาคม 2559).
- สุจิตรา ปะนันโต ภาควิชาพืชสวน, ศิริลักษณ์ จิตรอักษร, รังสฤษฎ์ กาวีตะ และ
กรรมกร สัจจาพันธ์. 2556. เอนโดไฟติกแบคทีเรียและผลในการส่งเสริมการ
เจริญเติบโตของข้าว. กรมวิชาการเกษตรร่วมกับมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
- สุภาพร จันทรวงเรือง, เบญจมาศ รสโสภา และ กรรมกร สัจจาพันธ์. 2553. ผลของแบคทีเรีย
ละลายฟอสเฟต *Burkholderia* sp. สายพันธุ์ Rs01 ต่อการเจริญเติบโตของข้าวโพด
หวานอินทรีย์ 2, วิทยาศาสตร์การเกษตร. 8: 1-14.
- สุวรรณิ แทนธานี. 2555. จุลินทรีย์ เทคโนโลยีชีวภาพเพื่อการปรับปรุงบำรุงดิน.
ว. วิทยาศาสตร์บริการ. 20: 19-29.
- สำนักวิทยาศาสตร์เพื่อการพัฒนาที่ดิน. 2547. คู่มือการวิเคราะห์ตัวอย่างดิน น้ำ ปุ๋ย พืช
วัสดุปรับปรุงดิน และการวิเคราะห์เพื่อตรวจรับรองมาตรฐานสินค้า เล่ม 1.
กรมพัฒนาที่ดิน. กรุงเทพฯ. 181 หน้า.
- Acuña, J. J., M.A. Jorquera, O.A. Martínez, D. Menezes-Blackburn, M.T. Fernández,
P. Marschner, R. Greiner and M.L. Mora. 2011. Indole acetic acid and phytase
activity produced by rhizosphere bacilli as affected by pH and metals. J. Soil Sci.
Plant Nutr. 11(3): 1-12.*
- Ahmad, F., I. Ahmad and M.S. Khan. 2008. Screening of free-living rhizospheric bacteria
for their multiple plant growth promoting activities. Microbiol. Res. 163:
173-181.*
- Ahemad, M. and M. Kibret. 2014. Mechanisms and applications of plant growth promoting
rhizobacteria: Current perspective. J. K. S. Univ. Sci. 26: 1-20.*
- Ahmed, S.A., E. Shakh, K.U. Kakar, X. Wang, A.A. Almoneafy, M.R. Ojaghian M.R.,
B. Li, S.I. Anjum and G. Xie. 2015. Controlling bacterial leaf blight of rice and
Enhancing the plant growth with endophytic a rhizobacterial *Bacillus* strains.
J. Toxic. Environ. Chem. 97(6): 55-63.*
- Amal, M., B. Omer and M.A. Balah. 2011. Using of rhizo-microbes as bioherbicides
for weeds global. J. Biotechnol. Biochem. 6 (3): 102-111.*

- Anand, K. B. Kumari, M.A. Mallick. 2016. Phosphate solubilizing microbes: An effective and alternative approach as fertilizers. *Int. J. Pharm. Pharm Sci.* 8(2): 37-40.
- Arora, D. and A.C. Gaur. 1979. Microbial solubilization of different inorganic phosphates. *Indian. J. Exp. Biol.* 11: 1258-1261.
- Bal, H.B. , S. Das, T.K. Dangar, Adhya T.K. 2013. ACC deaminase and IAA producing Growth promoting bacteria from the rhizosphere soil of tropical rice plants. *J. Basic Microbiol.* 53(12): 972-984.
- Baliah, T.N., and J.P. Begum. 2015. Isolation, identification and characterization of phosphate solubilizing bacteria (PSB) isolated from economically important crop plants. *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci.* 4: 915-24.
- Baker, S., P. Santhosh, D. Rakshith and S. Satish. 2012. Screening of bacterial endophytes inhabiting *Mimosa pudica* L. *Scientific. J. Microbiol.* 1: 136-140.
- Barison, J. and N. Uphoff. 2011. Rice yield and its relation to root growth and nutrient-use efficiency under SRI and conventional cultivation: an evaluation in Madagascar Paddy. *Water Environ.* 9:65–78.
- Bharucha, U. and K. Patei. 2013. Optimization of indole acetic acid production by *Pseudomonas putida* UB1 and its effects as plant growth-promoting rhizobacteria no mustard (*Brassicainigra*). *Agric. Res.* 2: 215-221.
- Bishnu, K., H. S. Shrestha, M. Karki1, D.E. Groth, N. Jungkhun, J.H. Ham. 2016. Biological control agents for major rice diseases. *Plos One.* 60(2): 91–99.
- Brasil, E.C. , V. Maria, C. Alves, I.V. Marriel, G.V.E Pitta. and J.C. Carvalho. 2011. Rhizosphere properties of maize genotypes with contrasting phosphorus efficiency. *R. Bras. Ci. Solo.* 35: 171-181.
- Bray, R.H. and L.T. Kurtz. 1945. Determination of total organic and available forms of phosphorus in soils. *Soil Sci.* 59: 39-45.
- Castillo, I., J. Ojeda, E. Megias, H.J. Manyani , L. Baena, F.P. Montano, R.A. Bellogin, R.M. Espuny, M.T. Cubo, F.J. Ollero and M. Megias. 2015. Isolation of endophytic, epiphytic and rhizosphere plant growth-promoting bacteria from

- cultivated rice paddy soils of the Guadalquivir river marshes. Global Adv. Res. J. Agric, Sci. 4(2): 127-136.*
- Chamway, C.P. 1998. Bacterial endophytes: ecological and practical implications. Sydowia 50: 149–170.*
- Duangpaeng, A., P. Phetcharat, S. Chanthapho, N. Boonkantong, N. Okuda. 2012. The study and development of endophytic bacteria for enhancing organic rice Growth. Procedia Engineering. 32: 172–176.*
- Etesami, H., H. Mirsyedhosseini and H. A. Alikhani. 2013. Rapid screening of berseem clover (Trifolium alexandrinum) endophytic bacteria for rice plant seedlings growth-promoting agents. ISRN Soil Science. 201: 1-9.*
- Feng, C., S.H. Hua¹, C.S. Feng, J.Y. Xiang. 2004. Migration of Azospirillum brasilense Yu62 from root to stem and leaves inside rice and tobacco plants. Acta Botanica Sinica. 46 (9): 1065-1070.*
- Glick, B.R., 1995. The enhancement of plant growth by free living bacteria. Canadian J. Microbiol. 41 (2): 109–114.*
- Glick, B.R., 2012. Plant growth-promoting bacteria: mechanisms and applications. Hindawi Publishing Corporation, Scientifica. pp. 1-15*
- Ghosh, R., S. Barman, R. Mukherjee and N. C. Mandal. 2016. Role of phosphate solubilizing Burkholderia spp. for successful colonization and growth promotion of Lycopodium cernuum L. (Lycopodiaceae) in lateritic belt of Birbhum district of West Bengal, India. Microbiol. Res. 183 : 80-91.*
- Gopalakrishnan, S., P. Humayun, B.K. Kiran, I.G. Kannan, M.S. Vidya, K. Deepthi and O. Rupela. 2011. Evaluation of bacteria isolated from rice rhizosphere for Biological control of charcoal rot of sorghum caused by Macrophomina phaseolina (Tassi) Goid. World J. Microbiol. Biotechnol. 27(6): 1313-1321.*
- Gunes, A., K. Karagoz, M. Turan, R. Kotan, E. Yildirim, R. Cakmakci and F. Sahin. 2015. Fertilizer efficiency of some plant growth promoting rhizobacteria for plant growth. Res. J. Soil Biol. 7(2): 28-45.*

- Gupta, M., S. Kiran, A. Gulati, B. Singh and R. Tewari. 2012. Isolation and identification of phosphate solubilizing bacteria able to enhance the growth and aloin-A biosynthesis of *Aloe barbadensis* Miller. *Microbiol. Res.* 167: 358-63.
- Gupta, G., S. S. Parihar, N. K. Ahirwar, S. K. Snehi and V. Singh. 2015. Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): current and future prospects for development of sustainable agriculture. *Microb. Biochem. Technol.* 7(2): 96-102.
- He, Z., D.Kisla, L. Zhang, C. Yuan, B.K. Green-church and A.E. Yousef. 2007. Isolation and identification of a *Paenibacillus polymyxa* strain that coproduces a novel antibiotic and polymyxin. *Appl. Environ. Microbiol.* 73: 168-178.
- Hossain, M.T., A. Khan, E.J. Chung, M.H. Rashid and Y.R. Chung. 2016. Control of rice bakanae by an endophytic *Bacillus oryzicola* YC7007. *Plant Pathol. J. Biological.* 32(3): 228-241.
- Ishizuka, S., H. Tsuruta and D. Murdiyarso. 2002. An intensive field study on C_2O , CH_4 and N_2O emission from soils at four land-use types in Sumatra, Indonesia. *Global Biogeochem.* 16: 1049.
- Istina, I.N., I.W. Happy, J. Benny and A. Merry. 2015. Phosphate-solubilizing microbe from saprists peat soil and their potency to enhance oil palm growth and P uptake. *Procedia Food Sci.* 3: 426-435.
- Ji, S.H., M.A. Gururani, S.C.Chun. 2013. Isolation and characterization of plant growth promoting endophytic diazotrophic bacteria from Korean rice cultivars. *Microbiol. Res.* 169(1): 83-98.
- Johri, J.K., S. Surange, C.S. Nautiyal. 1999. Occurrence of salt, pH, and temperature tolerant, phosphate-solubilizing bacteria in alkaline soils. *Curr. Microbiol.* 39(2): 89-93.
- Jong Yul, R., J. Young Choi, M. Shun Li, B. Rar Jin and Y. Ho Je. 2007. *Bacillus thuringiensis* as a specific, safe, and effective tool for insect pest control. *J. Microbiol. Biotechnol.* 17(4): 547-559.

- Kishi, R.N.I., L. T. Kishi, S. C. Picchi, J.C.Barbosa, M. T. O. Lemos, J. Marcondes and E. G. M. Lemos . 2012. Phosphate solubilizing and IAA production activities in plant growth promoting rhizobacteria from brazilianl soils under sugarcane cultivation. J. EngineerApplied Sci. 7(11): 1446-1454.**
- Khan, A.A., G.Jilani, M.S. Akhtar, S.M.S Naqvi and M. Rasheed. 2009. Phosphorus solubilizing bacteria: occurrence, mechanisms and their role in crop production J. Agric. Biol. Sciences. 50-58.**
- Khan, M.S., A. Zaidi and E. Ahmad. 2014. Chapter 2 Mechanism of phosphate solubilization and physiological functions of phosphate-solubilizing microorganisms. [Online]. Available <http://www.springer.com> (25 November 2015).**
- Kemmitt, S.J., D. Wright, K.W.T. Goulding and D.L. Jones. 2006. pH regulation of carbon and nitrogen dynamics in two agricultural soils. *Soil Biol. Biochem.* 38: (5). 898–911.
- Kumar, A., R. Singh, A. Yadav, D. D. Giri, P. K. Singh and K.D. Pandey. 2016. Isolation and characterization of bacterial endophytes of *Curcuma longa* L. *Biotechnol.* 6(1): 60-70.**
- Lambrecht, M., Y. Okon, A.V. Broek and J. Vanderleyden. 2000. Indole-3-acetic acid: a reciprocal signalling molecule in bacteria–plant interactions. *Trend Microbiol.* 8: 298-300.**
- Laskar, F. and G.D. Sharma. 2013. Isolation and characterization of diazotrophic bacteria from rhizosphere of different rice cultivars of South Assam, India. *Current world environment. Inter. Res. J. Environ. Sci.* 8(1): 157-163.**
- Liu, Z., L. Yuncong, Z. Shouan. and F. Xiaohui. 2015. Characterization of phosphate-solubilizing bacteria isolated from calcareous soils. *Appl. Soil Ecol.* 96: 217-224.**
- MacWilliams, P.M. 2009. Indole Test Protocol. [Online]. Available [http://www.microbe-library.org/ component/resource/laboratory-test/3202-indole-test-protocol](http://www.microbe-library.org/component/resource/laboratory-test/3202-indole-test-protocol)**

- Mahdi, S.S., G.I. Hassan, S.A. Samoon, H.A. Rather, A.D. Showkat and B. Zehra. 2010. *Biofertilizers in organic agriculture. J. Phytol.* 2(10): 42-54.
- Mano, H. and H. Morisaki. 2008. *Endophytic bacteria in the rice plant. Microb. and Environ.* 23: 109-17.
- Martin, N.I., H. Hu, M.M Moake, J.J. Churey, R. Whittal, R.W. Worobo and J.C. Vederas. 2003. *Isolation, structural characterization, and properties of mattacin (polymyxin M), a cyclic peptide antibiotic produced by Paenibacillus kobensis M. J. Biol. Chem.* 278:13124–13132.
- Midekssa, M.J., R.C. Löscher, R.A. Schmitz and F. Assefa. 2015. *Characterization of phosphate solubilizing rhizobacteria isolated from lentil growing areas of Ethiopia. African J. Microbiol. Res.* 9(25): 1637-1648.
- Mohite, B. 2013. *Isolation and characterization of indole acetic acid (IAA). J. Soil. Sci. Plant. Nutrit.* 13: 638-49.
- Murugappan, R.M. , S.B.Begum, R.R. Roobia. 2013. *Symbiotic influence of endophytic Bacillus pumilus on growth promotion and probiotic potential of the medicinal plant Ocimum sanctum biological control activities of rice associated Bacillus sp. J. Biol. Chem.* 60(2): 90–99.
- Naik, B.S., J. Shashikala and Y.L. Krishnamurthy. 2009. *Study on the diversity of Endophytic communities from rice (Oryza sativa L.) and their antagonistic activities in vitro. Microbiol. Res.* 164(3): 290-296.
- Nath A. and S.R. Joshi. 2016. *Endophytic fungi from tropical ethnoveterinary plants and their antibacterial efficacy against Pasteurella multocida Capsular Type A strain. Revista de Biologia Tropical.* 64(2): 10-19.
- Nautiyal, C.S. 1999. *An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. FEMS Microbiology Letters.* 170 (1): 265–270.
- Nautiyal, C.S., S. Srivastava, P.S. Chauhan, K. Seem, A. Mishra and S.K. Sopory. 2013. *Plant growth-promoting bacteria Bacillus amyloliquefaciens NBRISN13 modulates gene expression profile of leaf and rhizosphere community in rice during salt stress. Plant Physiol. Biochem.* 66: 1-9.

- Nita, B. P., M. Gajbhiye, S. S. Ahiwale, A. B. Gunjal and B. P. Kapadnis. 2011. *Optimization of indole acetic acid (IAA) production by Azotobacter diazotrophicus L1 isolate from sugarcane. Inter. J. Environ. Sci. 2 : 295-301.*
- Ostwal, K.P. and V.P. Bhide. 1972. *Solubilization of tricalcium phosphate by soil Pseudomonas. Indian J. Exp. Biol. 10: 153-154.*
- Ouzari, H., A. Khsairi, N. Raddadi, L. Jaoua, A. Hassen, M. Zarrouk, D. Daffonchio, and A.J. Boudabous. 2008. *Basic Microbiol. 48(5): 370-377.*
- Panwar, J.D.S. and K. Swarnalakshmi. 2005. *PGPR: a new group of biofertilizer for sustainable crop productivity. New India Publishing Agency. New Delhi. pp 159-180 [Online]. Available <http://books.google.co.th> (2 June 2016).*
- Phetcharat, P. and A. Duangpaeng. 2012. *Screening of endophytic bacteria from organic rice tissue for indole acetic acid production. Procedia Engineer. 32: 177–183.*
- Pragash, G., M., K. Badri Narayanan, P. Ravindra Naik and N. Sakthivel. 2009. *Characterization of Chryseobacterium aquaticum strain PUPC1 producing a novel antifungal protease from rice rhizosphere soil. J. Microbiol. Biotechnol. 19(1): 99-107.*
- Prakamhang, J., K.Minamisawa, K. Teamtaisong, N. Boonkerd, and N. Teaumroong. 2009. *The communities of endophytic diazotrophic bacteria in cultivated rice (Oryza sativa L.). Appl. Soil Ecol. 42(2): 141-149.*
- Rashid, S., C.T. Charles and R.B. Glick. 2012. *Isolation and characterization of new plant growth-promoting bacterial endophytes. Appl. Soil. Ecol. 61: 217- 24.*
- Richardson, A.E. , P.A. Hadobas, J.E. Hayes. 2001. *Extracellular secretion of Aspergillus phytase from Arabidopsis roots enables plants to obtain phosphorus from phytate. Plant J. 25(6): 641-649.*
- Rodrigues, L., I.M.Banat, J. Teixeira and R. Oliveira. 2006. *Biosurfactants: potential applications in medicine. J. Antimicrob. Chemother. 57: 609–618.*
- Rosenblueth, E. and M. Martínez-Romero. 2006. *Bacterial endophytes and their interactions with hosts. Molec. Plant. Micro. Inter. 19: 827-837.*
- Sahasrabudhe, M.M. 2011. *Screening of rhizobia for indole acetic acid production. Annals*

- Biol. Res.* 2: 460-468.
- Sarsan, S. 2016. *Effect of Phosphate Solubilising Bacteria Bacillus PSB24 on Growth of Tomato Plants. Int. J. Curr. Microbiol. App.Sci.* 5(7): 311-320.
- Saunders, M., L.M. Kohn. 2009. *Evidence for alteration of fungal endophyte community assembly by host defense compounds. New Phytologist.* 182: 229-238.
- Schulz, B., C. Boyle. 2006. *What are endophytes. In: Microbial root endophytes. B. Schulz, C. Boyle and T. Sieber, eds. Springer-Verlag. Berlin.* 1-13.
- Shahab, S., N. Ahmed and N. S. Khan. 2009. *Indole acetic acid production and enhanced plant growth promotion by indigenous PSBs. African J. Agric.Res.* 4(11): 1312-1316.
- Shankar, T., T. Sivakumar, G. Asha, S. Sankaralingam and V. M. Sundaram. 2013. *Effect of PSB on growth and development of chilli and maize plants. World Appl. Sci. J.* 26(5): 610-617.
- Sharma, K., G. Dak, A. Agrawal, M. Bhatnagar and R. Sharma. 2007. *Effect of phosphate solubilizing bacteria on the germination of Cicer arietinum seeds and seedling growth. J. Herbal Med.Toxicol.* 1(1): 61-63.
- Sharma, S.K. , A.Ramesh and B.N. Johri. 2013. *Isolation and characterization of plant growth promoting Bacillus amyloliquefaciens strain sks_bnj_1 and its influence on rhizosphere soil properties and nutrition of soybean (Glycine max L. Merrill). J. Virol. Microbiol.* 3: 1-19.
- Shrestha, B.K. , H. S. Karki, D.E. Groth, N. Jungkhun and J. H. Ham. 2016. *Biological Control agents for major rice diseases. Plos One.* 60(2): 91–99.
- Singh, V.P., T.H. Wichham and I.T. corpus. 1978. *Nitrogen movement to Laguna lake though drainage from rice field. Paper Presents at the 9th Annual Scientific Meeting of the Crop Science Society of the Philippines, 11-13 May 1978, Iloilo city, Philippines.* 16 p.
- Spaepen, S. and J. Vanderleyden. 2010. *Auxin and plant-microbe interactions. Cold Spring Harb Perspect Biol. [Online]. Available* <http://cshperspectives.cshlp.org> (15 May 2016).

- Suman, A., A. N. Yadav and P. Verma. 2016. Endophytic microbes in crops: diversity And beneficial impact for sustainable agriculture. *Res. Perspectives. 1*: 117-143.**
- Susilowati, D.N., I.M. Sudiana, N.R. Mubarik and A. Suwanto. 2015. Species and function diversity of rhizobacteria of rice plant in the coastal soils of Indonesia. *Indonesian J. Agric Sci. 16 (1)*: 39-50.**
- Souza, R., A. Ambrosini and L.M.P. 2015. Passaglia Plant growth-promoting bacteria as inoculants in agricultural soils. *Genet. Mol. Biol. 38(4)*: 80-90.**
- Takamura, Y.T. and T. Kubota. 1977. Behavior and balance of applied nitrogen and phosphorus under rice field conditions.. In society of the science of the soil and manure, Japan. *Proceedings of the international seminar (SEFMLA), Tokyo-Japan, Tokyo*.342-349.**
- Tharek, M., K. Dzulaikha, S. Salwani, H.G. Amir and N. Najimudin. 2011. Ascending endophytic migration of locally isolated diazotroph, *Enterobacter* sp. strain USML2 in rice. *Biotechnol. 10(6)*: 521-527.**
- Vejan, P., R. Abdullah, T. Khadiran, S. Ismail and B.A. Nasrullah. 2016. Role of plant growth promoting rhizobacteria in agricultural sustainability-A Review. *Molecules. 21(5)*: 44-53.**
- Wu, S.C., Z.H. Cao, Z.G. Li., K.C. Cheung and M.H. Wong. 2005. Effect of biofertilizer containing N-fixer, P and K solubilizers and AM fungi on maize growth : a greenhouse trial. *Geoderma. 125*: 155-166.**
- Wu, X.C., C. Dong Qian, H. Huan Fang, Y. Ping Wen, J. Ying Zhou, Z. Jun Zhan, R. Ding, Ou Li and H.Gao. 2010. Paenimacrolidin, a novel macrolide antibiotic from *Paenibacillus* sp. F6-B70 active against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Microb. Biotechnol. 4*:491-502.**
- Xuan, L.N., T. Van Dung, N. Ngoc Hung and C. Ngoc Diep. Isolation and characterization of rice endophytic bacteria in acid bacteria in acid sulphate soil of Mekong delta. Vietnam World J. Pharma. Sci. 5(8): 301-317.**

Yadav, H, R.K. Gothwal., V.K. Nigam., S. Sinha-Roy. and P. Ghosh. 2013. Optimization of culture conditions for phosphate solubilization by a thermo-tolerant phosphate-solubilizing bacterium Brevibacillus sp. BISR-HY65 isolated from phosphate mines. Biocatalysis Agric. Biotechnol. 2: 217-225.

Zhang, X., L. Chen, Q. Li, X. Qi and S. Yang. 2013. Increase in soil nutrients in intensively managed cash-crop agricultural ecosystems in the Guanting Reservoir catchment, Beijing, China. Geoderma. 193-194.

http://2011.igem.org/Team:Imperial_College_London/Project_Auxin_Overview

15 สิงหาคม 2559

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี

1. การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

Nutrient broth (NB)

<i>Beef extract</i>	3	กรัม
<i>Peptone</i>	5	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร
<i>pH 7.0</i>		

ละลายส่วนผสมในน้ำกลั่นแล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

ส่วน *Nutrient agar (NA)* เตรียมเช่นเดียวกับ *Nutrient broth* แต่ไม่ต้องเติมวุ้น

Plate count agar medium (PCA)

<i>Tryptone</i>	5.0	กรัม
<i>Yeast extract</i>	2.5	กรัม
<i>Glucose</i>	1.0	กรัม
<i>Agar</i>	15.0	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

ละลายส่วนผสมในน้ำกลั่นแล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที เมื่อนำออกจากเครื่องฆ่าเชื้อแล้วรอให้อุณหภูมิของอาหารลดลงประมาณ 50-55 องศาเซลเซียส แล้วเทลงบนจานเพาะเชื้อ

Pikovskaya medium (PVK)

<i>Glucose</i>	10	กรัม
$Ca_3(PO_4)_2$	5.0	กรัม
$(NH_4)_2SO_4$	0.5	กรัม

<i>KCl</i>	0.2	กรัม
<i>MgSO₄ · 7H₂O</i>	0.1	กรัม
<i>MnSO₄</i>	tract	
<i>FeSO₄</i>	tract	
<i>Yeast extracts</i>	0.5	กรัม
<i>Agar</i>	15	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร

ละลายส่วนผสมในน้ำกลั่นแล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที เมื่อนำออกจากเครื่องฆ่าเชื้อแล้วรอให้อุณหภูมิของอาหารลดลงประมาณ 50-55 องศาเซลเซียส แล้วเทลงบนจานเพาะเชื้อ

International Streptomyces projected medium 2 (ISP2)

<i>Malt extract</i>	10.0	กรัม
<i>Yeast extract</i>	4.0	กรัม
<i>Glucose</i>	4.0	กรัม
<i>Agar</i>	15.0	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

ละลายส่วนผสมในน้ำกลั่นแล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที เมื่อนำออกจากเครื่องฆ่าเชื้อแล้วรอให้อุณหภูมิของอาหารลดลงประมาณ 50-55 องศาเซลเซียส แล้วเทลงบนจานเพาะเชื้อ

Tryptic soy agar medium (TSA)

<i>Tryptone (Pancreatic Digest of Casein)</i>	15.0	กรัม
<i>Soytone (Papaic Digest of Soybean Meal)</i>	5.0	กรัม
<i>Sodium Chloride</i>	5.0	กรัม
<i>Agar</i>	15.0	กรัม

pH 7.3±0.2

ละลายส่วนผสมในน้ำกลั่นแล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที เมื่อนำออกจากเครื่องฆ่าเชื้อแล้วรอให้อุณหภูมิของอาหารลดลงประมาณ 50-55 องศาเซลเซียส แล้วเทลงบนจานเพาะเชื้อ

Tryptone broth

<i>Tryptone</i>	10.0	กรัม
<i>Agar</i>	15.0	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

ละลายส่วนผสมในน้ำกลั่นแล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

Carbohydrate broth

<i>Beef extract</i>	3	กรัม
<i>Peptone</i>	5	กรัม
<i>Bromcresol purple</i>	1.25	มิลลิลิตร
น้ำตาลชนิดต่าง ๆ	0.5	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร

แหล่งคาร์บอนได้แก่ *Fructose, Sucrose, Maltose, Glucose, Galactose, Xylitol, Lactose* และ

Mannitol

ละลายส่วนผสมในน้ำกลั่นแล้ว ใส่ลงในหลอดทดลองที่มีหลอดดักก๊าซหลอดละ 10 มิลลิลิตร ปิดฝาหลอดแล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

2. เตรียมสารสำหรับวิเคราะห์ปริมาณฟอสฟอรัส

เตรียมสารละลาย reagent A

1. ละลาย *Ammonium molybdate* ($(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) 50 กรัม ใน น้ำ กลั่น 200 มิลลิลิตรคนให้ละลาย

2. ละลาย *Antimony potassium tartrate* ($\text{KSbO}^+\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6^- \cdot 1/2\text{H}_2\text{O}$) 1.213 กรัม ในน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร (ถ้าไม่ละลายนำไปอุ่นที่อุณหภูมิไม่เกิน 60 องศาเซลเซียส)

3. นำสารละลายในข้อที่ 1 และข้อที่ 2 มาผสมกัน คนให้ละลายเข้ากัน

4. เติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 700 มิลลิลิตร ป้อนทิ้งไว้ให้เย็น เทลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 1 ลิตรและปรับปริมาตรให้เป็น 1 ลิตรด้วยน้ำกลั่น เก็บไว้ในขวดสีชา และเก็บไว้ในที่เย็น

เตรียมสารละลายพัฒนาสี (*Working solution*)

ละลาย *ascorbic acid* 1.76 กรัม ในน้ำกลั่น 1,600 มิลลิลิตร เติมสารละลาย *reagent A* 40 มิลลิลิตร เทลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 2 ลิตร และปรับปริมาตรให้เป็น 2 ลิตรด้วยน้ำกลั่น ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นประมาณ 2 ชั่วโมง จึงนำไปใช้ได้ สารละลายนี้เก็บได้ไม่เกิน 24 ชั่วโมง

การเตรียมสารเคมีที่ใช้ในการทดสอบกรดอินโดลอะซิติก

Kovac's reagent

<i>Para-dimethyl-amino-benzaldehyde</i>	5.0	กรัม
<i>Amyl alcohol</i>	75.0	มิลลิลิตร
<i>Hydrochloric acid</i> 35%	25.0	มิลลิลิตร

ละลาย *Para-dimethyl-amino-benzaldehyde* 5.0 กรัม ใน *Amyl alcohol* แล้วเติม *Hydrochloric acid* 35% ลงไป 25.0 มิลลิลิตร

การเตรียมสารเคมีวิเคราะห์ปริมาณกรดอินโดลอะซิติก

Salkowski coloring reagent

<i>Hyperchloric acid</i> (HClO_4) 35%	50	มิลลิลิตร
<i>Ferric chloride</i> (FeCl_3) 0.5M	1	มิลลิลิตร

การเตรียมสารเคมีที่ใช้ในการจำแนกแบคทีเรียโดยใช้วิธีการหาลำดับเบสบน 16S rDNA

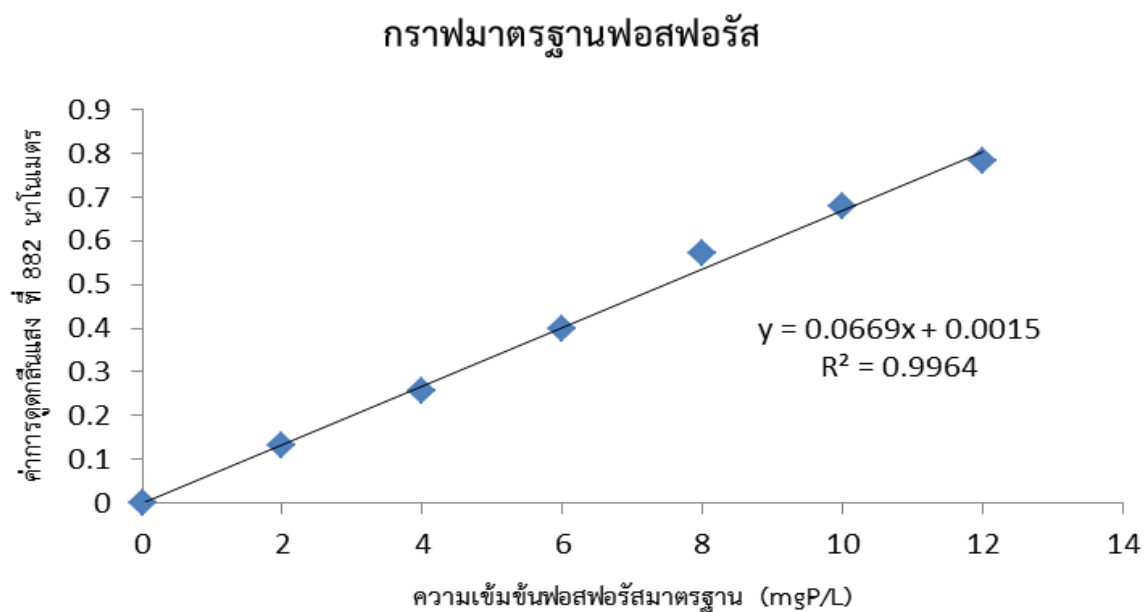
- EDTA 0.5 M ปริมาตร 500 ml pH 8.0

- Tris HCl 1 M

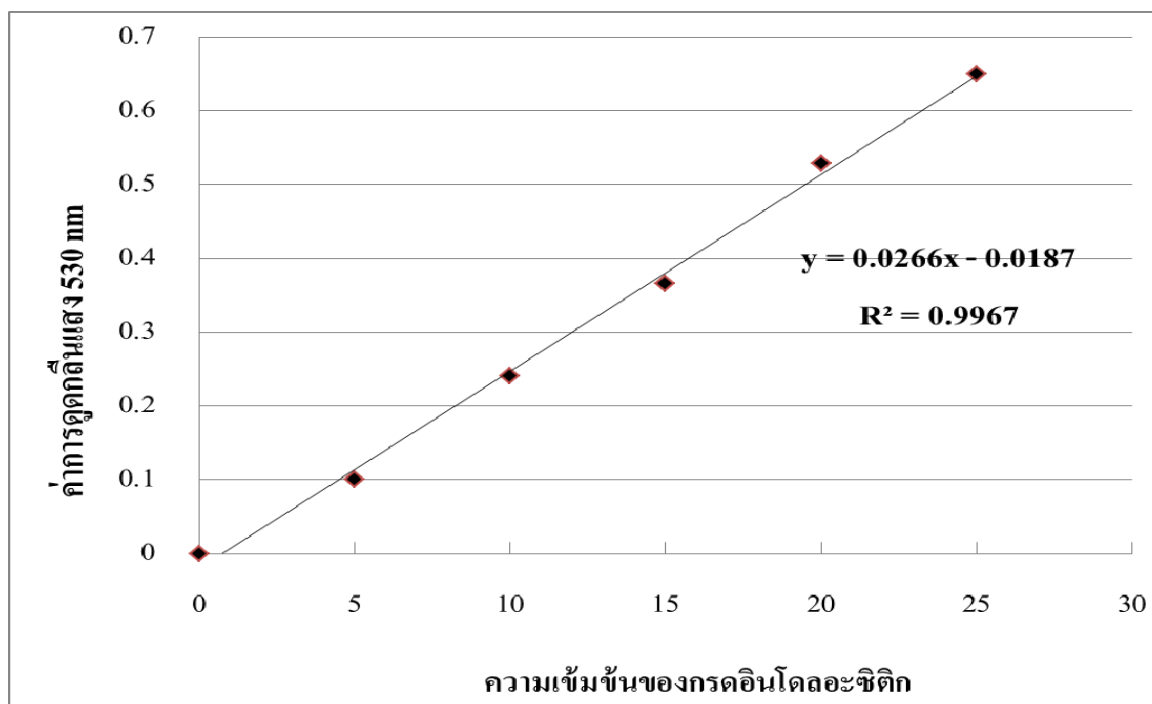
- TEN buffer 1X	500	มิลลิลิตร
1 M Tris HCl (pH 8.0)	5	มิลลิลิตร
0.5 M EDTA (pH 8.0)	1	มิลลิลิตร
NaCl	2.922	กรัม
- TAE buffer 50X	500	มิลลิลิตร
Tris base ($C_4H_{11}NO_3$) MW 121.14 g.mole⁻¹	121.14	กรัม
0.5 M EDTA pH 8.0	50	มิลลิลิตร
Glacial acetate	28.55	มิลลิลิตร

ภาคผนวก ข

กราฟมาตรฐาน



ภาพภาคผนวก ข 1 กราฟมาตรฐานฟอสฟอรัส



ภาพภาคผนวก ข 2 กราฟมาตรฐานกรดอินโดลอะซิติก

ภาคผนวก ค

ภาพการเจริญของเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อและการทดสอบคุณลักษณะของเชื้อ



ก



ข



ค

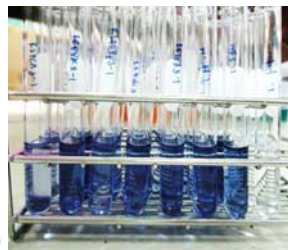


ง

ภาพภาคผนวก ค 1 การเจริญของเชื้อเอนโคไฟท์จากชิ้นส่วนของข้าวบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่าง ๆ ก) PCA ข) PVK ค) ISP2 และ ง) TSA



ก)

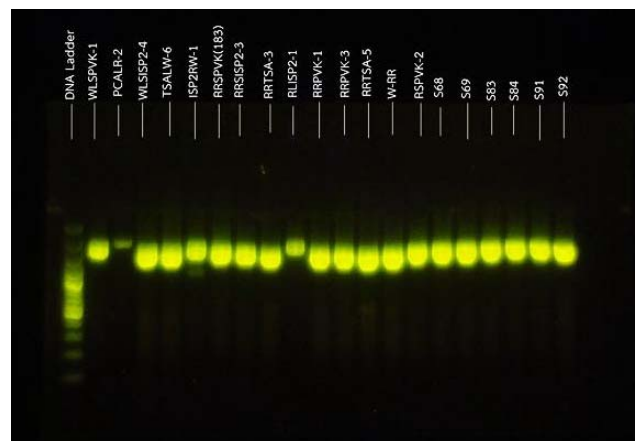


ข)

ภาพภาคผนวก ค2 ก) ลักษณะการเกิดวงใสรอบโคโลนีของแบคทีเรียบนอาหาร PVK ระยะเวลา 24 ชั่วโมง ข) การวิเคราะห์ปริมาณฟอสฟอรัส



ภาพภาคผนวก ค3 ก) การทดสอบการผลิตกรดอินโดลอะซิติกขั้นต้น ข) การวิเคราะห์ปริมาณกรดอินโดลอะซิติก



ภาพภาคผนวก ค4 ผลการ run gel electrophoresis ของ PCR product

ภาคผนวก ง

ลำดับนิวคลีโอไทด์ของแบคทีเรีย

Burkholderia cenocepacia J2315 chromosome 1, complete genome

Sequence ID: [ref|NC_011000.1|](#) Length: 3870082 Number of Matches: 4

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1345 bits(728)	0.0	730/731(99%)	0/731(0%)	Plus/Plus

Features: rRNA-16S ribosomal RNA

Query	1	GGGTGAGTAATACATCGGAACATGTCCTGTAGTGGGGGATAGCCCGGCGAAAGCCGGATT	60
Sbjct	246400	GGGTGAGTAATACATCGGAACATGTCCTGTAGTGGGGGATAGCCCGGCGAAAGCCGGATT	246459
Query	61	AATACCGCATACGATCTACGGATGAAAGCGGGGGACCTTCGGGCTTCGCGCTATAGGGTT	120
Sbjct	246460	AATACCGCATACGATCTACGGATGAAAGCGGGGGACCTTCGGGCTTCGCGCTATAGGGTT	246519
Query	121	GGCCGATGGCTGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCTACCAAGGCGACGATCAGTAGC	180
Sbjct	246520	GGCCGATGGCTGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCTACCAAGGCGACGATCAGTAGC	246579
Query	181	TGGTCTGAGAGGACGACCACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAG	240
Sbjct	246580	TGGTCTGAGAGGACGACCACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAG	246639
Query	241	GCAGCAGTGGGGAATTTTGGACATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCAATGCCGCGTGTGTG	300
Sbjct	246640	GCAGCAGTGGGGAATTTTGGACATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCAATGCCGCGTGTGTG	246699
Query	301	AAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGCACTTTTGTCCGGAAGAAATCCTTGGCTCTAATACA	360
Sbjct	246700	AAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGCACTTTTGTCCGGAAGAAATCCTTGGCTCTAATACA	246759
Query	361	GTCGGGGGATGACGGTACCGGAAGAATAAGCACCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGG	420
Sbjct	246760	GTCGGGGGATGACGGTACCGGAAGAATAAGCACCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGG	246819
Query	421	TAATACGTAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGTGCGCAGGCGGTT	480
Sbjct	246820	TAATACGTAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGTGCGCAGGCGGTT	246879
Query	481	TGCTAAGACCGATGTGAAATCCCGGGCTCAACCTGGGAATGCATTGGTGACTGGCAGG	540
Sbjct	246880	TGCTAAGACCGATGTGAAATCCCGGGCTCAACCTGGGAATGCATTGGTGACTGGCAGG	246939
Query	541	CTAGAGTATGGCAGAGGGGGTAGAATTCACGTGTAGCAGTGAATGCGTAGAGATGTG	600
Sbjct	246940	CTAGAGTATGGCAGAGGGGGTAGAATTCACGTGTAGCAGTGAATGCGTAGAGATGTG	246999
Query	601	GAGGAATACCGATGGCGAAGGCGACCCCTGGGCAATACTGACGCTCATGCAAGAAAGC	660
Sbjct	247000	GAGGAATACCGATGGCGAAGGCGACCCCTGGGCAATACTGACGCTCATGCAAGAAAGC	247059
Query	661	GTGGGGAGCAAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCCTAAACGATGTCAACTAGT	720
Sbjct	247060	GTGGGGAGCAAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCCTAAACGATGTCAACTAGT	247119
Query	721	TGTTGGGGATT	731
Sbjct	247120	TGTTGGGGATT	247130

ภาพภาคผนวก ง 1 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อแบคทีเรีย S68 ที่ตรงกับเบสของ *Burkholderia cenocepacia* J2315 99% ที่ Accession number NC_011000.1

Burkholderia cenocepacia J2315 chromosome 1, complete genome

Sequence ID: [reflNC_011000.1](#) Length: 3870082 Number of Matches: 4

Range 1: 246372 to 246954 [GenBank](#) [Graphics](#) [▼ Next Match](#) [▲ Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1072 bits(580)	0.0	582/583(99%)	0/583(0%)	Plus/Plus

Features: [rRNA-16S ribosomal RNA](#)

Query	1	TGCTTGACCTGGTGGCGAGTGGCGAACGGGTGAGTAATACATCGGAACATGTCCTGTAG	60
Sbjct	246372	TGCTTGACCTGGTGGCGAGTGGCGAACGGGTGAGTAATACATCGGAACATGTCCTGTAG	246431
Query	61	TGGGGGATAGCCCGGCGAAAGCCGGATTAAATCCGCATACGATCTACGGATGAAAGCGGG	120
Sbjct	246432	TGGGGGATAGCCCGGCGAAAGCCGGATTAAATCCGCATACGATCCACGGATGAAAGCGGG	246491
Query	121	GGACCTTCGGGCCCTCGCGCTATAGGGTTGGCCGATGGCTGATTAGCTAGTTGGTGGGGTA	180
Sbjct	246492	GGACCTTCGGGCCCTCGCGCTATAGGGTTGGCCGATGGCTGATTAGCTAGTTGGTGGGGTA	246551
Query	181	AAGGCCTACCAAGGCGACGATCAGTAGCTGGTCTGAGAGGACGACCGCCACTGGGGAC	240
Sbjct	246552	AAGGCCTACCAAGGCGACGATCAGTAGCTGGTCTGAGAGGACGACCGCCACTGGGGAC	246611
Query	241	TGAGACACGGCCCGAGACTCCTACGGGAGGCGAGTGGGGAATTTTGGACATGGGCGAA	300
Sbjct	246612	TGAGACACGGCCCGAGACTCCTACGGGAGGCGAGTGGGGAATTTTGGACATGGGCGAA	246671
Query	301	AGCCTGATCCAGCAATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGCACTTTTGT	360
Sbjct	246672	AGCCTGATCCAGCAATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGCACTTTTGT	246731
Query	361	CCGGAAGAAGATCCTTGGCTCTAATACAGTCGGGGGATGACGGTACCGGAAGATAAGCA	420
Sbjct	246732	CCGGAAGAAGATCCTTGGCTCTAATACAGTCGGGGGATGACGGTACCGGAAGATAAGCA	246791
Query	421	CCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCCGGTAATACGTAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATT	480
Sbjct	246792	CCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCCGGTAATACGTAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATT	246851
Query	481	ACTGGGCGTAAAGCGTGCAGGCGGTTTGCTAAGACCGATGTGAAATCCCCGGGCTCAA	540
Sbjct	246852	ACTGGGCGTAAAGCGTGCAGGCGGTTTGCTAAGACCGATGTGAAATCCCCGGGCTCAA	246911
Query	541	CCTGGGAAGTGCATTGGTGAAGTGGCAGGCTAGAGTATGGCAGA	583
Sbjct	246912	CCTGGGAAGTGCATTGGTGAAGTGGCAGGCTAGAGTATGGCAGA	246954

ภาพภาคผนวก ง 2 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อแบคทีเรีย *S69* ที่ตรงกับเบสของ *Burkholderia cenocepacia J2315* 99% ที่ Accession number NC_011000.1

Burkholderia cenocepacia J2315 chromosome 1, complete genome

Sequence ID: [ref|NC_011000.1|](#) Length: 3870082 Number of Matches: 4

Range 1: 246368 to 247117		GenBank	Graphics	▼ Next Match	▲ Previous Match
Score	Expect	Identities	Gaps	Strand	
1380 bits(747)	0.0	749/750(99%)	0/750(0%)	Plus/Plus	

Features: [rRNA-16S ribosomal RNA](#)

Query	1	CGGGTGCTTGCACTGGTGGCGAGTGGCGAACGGGTGAGTAATACATCGGAACATGTCCT	60
Sbjct	246368	CGGGTGCTTGCACTGGTGGCGAGTGGCGAACGGGTGAGTAATACATCGGAACATGTCCT	246427
Query	61	GTAGTGGGGATAGCCCGCGAAGCCGGATTAAATCCGCATACGATCTACGGATGAAAG	120
Sbjct	246428	GTAGTGGGGATAGCCCGCGAAGCCGGATTAAATCCGCATACGATCTACGGATGAAAG	246487
Query	121	CGGGGGACCTTCGGGCTCGCGCTATAGGGTTGGCCGATGGCTGATTAGCTAGTTGGTGG	180
Sbjct	246488	CGGGGGACCTTCGGGCTCGCGCTATAGGGTTGGCCGATGGCTGATTAGCTAGTTGGTGG	246547
Query	181	GGTAAAGGCTTACCAAGGCGACGATCAGTAGCTGGTCTGAGAGGACGACCGCCACACTG	240
Sbjct	246548	GGTAAAGGCTTACCAAGGCGACGATCAGTAGCTGGTCTGAGAGGACGACCGCCACACTG	246607
Query	241	GGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCGAGTGGGGAATTTGGACAATGGG	300
Sbjct	246608	GGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCGAGTGGGGAATTTGGACAATGGG	246667
Query	301	CGAAGCCTGATCCAGCAATGCCGCTGTGTGAAGAAGGCCCTTCGGGTGTAAAGCACTT	360
Sbjct	246668	CGAAGCCTGATCCAGCAATGCCGCTGTGTGAAGAAGGCCCTTCGGGTGTAAAGCACTT	246727
Query	361	TTGTCCGAAAGAAATCCTTGGCTCTAATACAGTCGGGGGATGACGGTACCGGAAGAATA	420
Sbjct	246728	TTGTCCGAAAGAAATCCTTGGCTCTAATACAGTCGGGGGATGACGGTACCGGAAGAATA	246787
Query	421	AGCACCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGGTGCAAGCGTTAATCGG	480
Sbjct	246788	AGCACCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGGTGCAAGCGTTAATCGG	246847
Query	481	AATTACTGGGCGTAAAGCGTGCGCAGGCGGTTTGCTAAGACCGATGTGAAATCCCCGGG	540
Sbjct	246848	AATTACTGGGCGTAAAGCGTGCGCAGGCGGTTTGCTAAGACCGATGTGAAATCCCCGGG	246907
Query	541	TCAACCTGGGAAGTGCATTGGTGACTGGCAGGCTAGAGTATGGCAGAGGGGGTAGAATT	600
Sbjct	246908	TCAACCTGGGAAGTGCATTGGTGACTGGCAGGCTAGAGTATGGCAGAGGGGGTAGAATT	246967
Query	601	CCACGTGTAGCAGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAATACCGATGGCGAAGGCAGCCCC	660
Sbjct	246968	CCACGTGTAGCAGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAATACCGATGGCGAAGGCAGCCCC	247027
Query	661	CTGGGCCAATACTGACGCTCATGCACGAAAGCGTGGGGAGCAACAGGATTAGATACCGT	720
Sbjct	247028	CTGGGCCAATACTGACGCTCATGCACGAAAGCGTGGGGAGCAACAGGATTAGATACCGT	247087
Query	721	GGTAGTCCACGCCCTAAACGATGTCAACTA	750
Sbjct	247088	GGTAGTCCACGCCCTAAACGATGTCAACTA	247117

ภาพภาคผนวก ง 3 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อแบคทีเรีย S83 ที่ตรงกับเบสของ *Burkholderia cenocepacia* J2315 99% ที่ Accession number NC_011000.1

Burkholderia cenocepacia J2315 chromosome 1, complete genome

Sequence ID: [ref|NC_011000.1|](#) Length: 3870082 Number of Matches: 4

Range 1: 246369 to 247054 [GenBank](#) [Graphics](#) [▼ Next Match](#) [▲ Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1262 bits(683)	0.0	685/686(99%)	0/686(0%)	Plus/Plus

Features: [rRNA-16S ribosomal RNA](#)

Query	1	GGGTGCTTGCACTGTTGGCGAGTGGCGAACGGGTGAGTAATACATCGGAACATGTCTTG	60
Sbjct	246369	GGGTGCTTGCACTGTTGGCGAGTGGCGAACGGGTGAGTAATACATCGGAACATGTCTTG	246428
Query	61	TAGTGGGGGATAGCCCGGCGAAAGCCGGATTAAACCGCATACGATCTACGGATGAAAGC	120
Sbjct	246429	TAGTGGGGGATAGCCCGGCGAAAGCCGGATTAAACCGCATACGATCTACGGATGAAAGC	246488
Query	121	GGGGGACCTTCGGGCTTCGCGCTATAGGGTTGGCCGATGGCTGATTAGCTAGTTGGTGGG	180
Sbjct	246489	GGGGGACCTTCGGGCTTCGCGCTATAGGGTTGGCCGATGGCTGATTAGCTAGTTGGTGGG	246548
Query	181	GTAAGGCGCTACCAAGCGACGATCAGTAGCTGGTCTGAGAGGACGACCCAGCCACACTGG	240
Sbjct	246549	GTAAGGCGCTACCAAGCGACGATCAGTAGCTGGTCTGAGAGGACGACCCAGCCACACTGG	246608
Query	241	GACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTTGGACAATGGGC	300
Sbjct	246609	GACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTTGGACAATGGGC	246668
Query	301	GAAAGCCTGATCCAGCAATGCCGCGTGTGTGAAGAGGCCTTCGGGTTGTAAAGCACTTT	360
Sbjct	246669	GAAAGCCTGATCCAGCAATGCCGCGTGTGTGAAGAGGCCTTCGGGTTGTAAAGCACTTT	246728
Query	361	TGTCCGGAAGAAATCCTTGCGCTCTAATACAGTCGCGGGATGACGGTACCGGAAGATAA	420
Sbjct	246729	TGTCCGGAAGAAATCCTTGCGCTCTAATACAGTCGCGGGATGACGGTACCGGAAGATAA	246788
Query	421	GCACCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGGTGCAAGCGTTAATCGGA	480
Sbjct	246789	GCACCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGGTGCAAGCGTTAATCGGA	246848
Query	481	ATTACTGGGCGTAAAGCGTGCGCAGGCGGTTTGCTAAGACCGATGTGAAATCCCCGGGCT	540
Sbjct	246849	ATTACTGGGCGTAAAGCGTGCGCAGGCGGTTTGCTAAGACCGATGTGAAATCCCCGGGCT	246908
Query	541	CAACCTGGGAACTGCATTGGTGACTGGCAGGCTAGAGTATGGCAGAGGGGGTAGAATTC	600
Sbjct	246909	CAACCTGGGAACTGCATTGGTGACTGGCAGGCTAGAGTATGGCAGAGGGGGTAGAATTC	246968
Query	601	CACGTGTAGCAGTGAATGCGTAGAGATGTGGAGGAATACCGATGGCGAAGGCAGCCCC	660
Sbjct	246969	CACGTGTAGCAGTGAATGCGTAGAGATGTGGAGGAATACCGATGGCGAAGGCAGCCCC	247028
Query	661	TGGGCCAATACTGACGCTCATGCAAG	686
Sbjct	247029	TGGGCCAATACTGACGCTCATGCAAG	247054

ภาพภาคผนวก ง 4 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อแบคทีเรีย S84 ที่ตรงกับเบสของ *Burkholderia cenocepacia* J2315 99% ที่ Accession number NC_011000.1

Burkholderia cenocepacia J2315 chromosome 1, complete genome

Sequence ID: [ref|NC_011000.1|](#) Length: 3870082 Number of Matches: 4

Range 1: 246373 to 247148 [GenBank](#) [Graphics](#) [▼ Next Match](#) [▲ Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1428 bits(773)	0.0	775/776(99%)	0/776(0%)	Plus/Plus

Features: [rRNA-16S ribosomal RNA](#)

Query	1	GCTTGCACCTGGTGGCGAGTGGCGAAGCGGTGAGTAATACATCGGAACATGTCCTGTAGT	60
Sbjct	246373	GCTTGCACCTGGTGGCGAGTGGCGAAGCGGTGAGTAATACATCGGAACATGTCCTGTAGT	246432
Query	61	GGGGGATAGCCCGCGAAGCCCGGATTAAATACCGCATACGATCTACGGATGAAAGCGGGG	120
Sbjct	246433	GGGGGATAGCCCGCGAAGCCCGGATTAAATACCGCATACGATCTACGGATGAAAGCGGGG	246492
Query	121	GACCTTCGGGCTCGCGCTATAGGGTTGGCCGATGGCTGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAA	180
Sbjct	246493	GACCTTCGGGCTCGCGCTATAGGGTTGGCCGATGGCTGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAA	246552
Query	181	AGGCCTACCAAGGCGACGATCAGTAGCTGGTCTGAGAGGACGACCGCCACACTGGGACT	240
Sbjct	246553	AGGCCTACCAAGGCGACGATCAGTAGCTGGTCTGAGAGGACGACCGCCACACTGGGACT	246612
Query	241	GAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCGAGTGGGGATTTTGGACATGGGCGAAA	300
Sbjct	246613	GAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCGAGTGGGGATTTTGGACATGGGCGAAA	246672
Query	301	GCCTGATCCAGCAATGCCGCGTGTGTGAAGAGGCCCTTCGGGTTGTAAAGCACTTTTGTG	360
Sbjct	246673	GCCTGATCCAGCAATGCCGCGTGTGTGAAGAGGCCCTTCGGGTTGTAAAGCACTTTTGTG	246732
Query	361	CGGAAGAAATCCTTGGCTCTAATACAGTCGGGGGATGACGGTACCGGAAGAAATAGCAC	420
Sbjct	246733	CGGAAGAAATCCTTGGCTCTAATACAGTCGGGGGATGACGGTACCGGAAGAAATAGCAC	246792
Query	421	CGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTA	480
Sbjct	246793	CGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTA	246852
Query	481	CTGGGCTAAAGCGTGCAGGCGGTTTGTCTAAGACCGATGTGAAATCCCCGGGCTCAAC	540
Sbjct	246853	CTGGGCTAAAGCGTGCAGGCGGTTTGTCTAAGACCGATGTGAAATCCCCGGGCTCAAC	246912
Query	541	CTGGGAATGCAATTGGTGACTGGCAGGCTAGAGTATGGCAGAGGGGGTAGAATCCACG	600
Sbjct	246913	CTGGGAATGCAATTGGTGACTGGCAGGCTAGAGTATGGCAGAGGGGGTAGAATCCACG	246972
Query	601	TGTAGCAGTGAATGCGTAGAGATGTGGAGGAATACCGATGGCGAAGGCGAGCCCCCTGGG	660
Sbjct	246973	TGTAGCAGTGAATGCGTAGAGATGTGGAGGAATACCGATGGCGAAGGCGAGCCCCCTGGG	247032
Query	661	CCAATACTGACGCTCATGCAGAAAGCGTGGGGAGCAACAGGATTAGATACCCCTGGTAG	720
Sbjct	247033	CCAATACTGACGCTCATGCAGAAAGCGTGGGGAGCAACAGGATTAGATACCCCTGGTAG	247092
Query	721	TCCACGCCCTAAACGATGTCAACTAGTTGTTGGGGATTCAATTCCTTAGTAACGTA	776
Sbjct	247093	TCCACGCCCTAAACGATGTCAACTAGTTGTTGGGGATTCAATTCCTTAGTAACGTA	247148

ภาพภาคผนวก ง 5 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อแบคทีเรีย *S91* ที่ตรงกับเบสของ *Burkholderia cenocepacia J2315* 99% ที่ Accession number NC_011000.1

Bacillus thuringiensis serovar konkukian str. 97-27 chromosome, complete genome

Sequence ID: [ref|NC_005957.1](#) Length: 5237682 Number of Matches: 14

Range 1: 9389 to 10232		GenBank	Graphics	▼ Next Match ▲ Previous Match	
Score	Expect	Identities	Gaps	Strand	
1554 bits(841)	0.0	843/844(99%)	0/844(0%)	Plus/Plus	
Query 1		AGCTTGCTCTTATGAAAGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACTGCCCATTA			60
Sbjct 9389		AGCTTGCTCTTATGAAAGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACTGCCCATTA			9448
Query 61		AGACTGGGATAAATCCGGGAAACCGGGCTAATACCGGATAACATTTTGAACGTCATGGT			120
Sbjct 9449		AGACTGGGATAAATCCGGGAAACCGGGCTAATACCGGATAACATTTTGAACGTCATGGT			9508
Query 121		TCGAAATTGAAAGGCGGCTTCGGCTGTCACTTATGGATGGACCCGCGTCGATTAGCTAG			180
Sbjct 9509		TCGAAATTGAAAGGCGGCTTCGGCTGTCACTTATGGATGGACCCGCGTCGATTAGCTAG			9568
Query 181		TTGGTGAGGTAAACGGCTCACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGC			240
Sbjct 9569		TTGGTGAGGTAAACGGCTCACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGC			9628
Query 241		CACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCGAGTAGGGGAATCTTCCG			300
Sbjct 9629		CACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCGAGTAGGGGAATCTTCCG			9688
Query 301		CAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGCTTTCGGGTCGTAA			360
Sbjct 9689		CAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGCTTTCGGGTCGTAA			9748
Query 361		AACCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAGTGCTAGTTGAATAAGCTGGCACCTTGACGGTACCT			420
Sbjct 9749		AACCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAGTGCTAGTTGAATAAGCTGGCACCTTGACGGTACCT			9808
Query 421		AACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGTGGCAAGCG			480
Sbjct 9809		AACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGTGGCAAGCG			9868
Query 481		TTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCAGGTGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAG			540
Sbjct 9869		TTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCAGGTGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAG			9928
Query 541		CCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCATTGGAACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAAGAGGAAA			600
Sbjct 9929		CCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCATTGGAACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAAGAGGAAA			9988
Query 601		GTGGAATTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATATGGAGGAACACCAAGTGGCGAAG			660
Sbjct 9989		GTGGAATTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATATGGAGGAACACCAAGTGGCGAAG			10048
Query 661		GCGACTTTCGGTCTGTAACCTGACACTGAGGCGCGAAAGCGTGGGAGCAAAACAGGATTA			720
Sbjct 10049		GCGACTTTCGGTCTGTAACCTGACACTGAGGCGCGAAAGCGTGGGAGCAAAACAGGATTA			10108
Query 721		GATACCCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTAGAGGGTTTCCGCCCT			780
Sbjct 10109		GATACCCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTAGAGGGTTTCCGCCCT			10168
Query 781		TTAGTGCTGAAGTTAACGCATTAAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTGAAA			840
Sbjct 10169		TTAGTGCTGAAGTTAACGCATTAAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTGAAA			10228
Query 841		CTCA 844			
Sbjct 10229		CTCA 10232			

ภาพภาคผนวก ง 6 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อแบคทีเรีย S92 ที่ตรงกับเบสของ *Bacillus thuringiensis* serovar – konkukian strain 97-27 99% ที่ Accession number NC_005957.1

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1478 bits(800)	0.0	800/800(100%)	0/800(0%)	Plus/Plus
Query 1	GGCAGCACGGGTGCTTGACCTGGTGGCGAGTGGCGAACGGGTGAGTAATACATCGGAAC	60		
Sbjct 31	GGCAGCACGGGTGCTTGACCTGGTGGCGAGTGGCGAACGGGTGAGTAATACATCGGAAC	90		
Query 61	ATGTCCTGTAGTGGGGGATAGCCCGGCGAAAGCCGGATTAATACCGCATACGATCTATGG	120		
Sbjct 91	ATGTCCTGTAGTGGGGGATAGCCCGGCGAAAGCCGGATTAATACCGCATACGATCTATGG	150		
Query 121	ATGAAAGCGGGGGACCTTCGGGCCTCGCGCTATAGGGTTGGCCGATGGCTGATTAGCTAG	180		
Sbjct 151	ATGAAAGCGGGGGACCTTCGGGCCTCGCGCTATAGGGTTGGCCGATGGCTGATTAGCTAG	210		
Query 181	TTGGTGGGGTAAAGGCCTACCAAGGCGACGATCAGTAGCTGGTCTGAGAGGACGACCAGC	240		
Sbjct 211	TTGGTGGGGTAAAGGCCTACCAAGGCGACGATCAGTAGCTGGTCTGAGAGGACGACCAGC	270		
Query 241	CACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTTGA	300		
Sbjct 271	CACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTTGA	330		
Query 301	CAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCAATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAA	360		
Sbjct 331	CAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCAATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAA	390		
Query 361	AGCACTTTTGTCCGAAAGAAATCCTTGGCTCTAATACAGTCGGGGGATGACGGTACCGG	420		
Sbjct 391	AGCACTTTTGTCCGAAAGAAATCCTTGGCTCTAATACAGTCGGGGGATGACGGTACCGG	450		
Query 421	AAGAATAAGCACCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGGTGCAAGCGT	480		
Sbjct 451	AAGAATAAGCACCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGGTGCAAGCGT	510		
Query 481	TAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGTGCGCAGGCGGTTTGCTAAGACCGATGTGAAATC	540		
Sbjct 511	TAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGTGCGCAGGCGGTTTGCTAAGACCGATGTGAAATC	570		
Query 541	CCCGGGCTCAACCTGGGAACTGCATTGGTGAAGTGGCAGGCTAGAGTATGGCAGAGGGGGG	600		
Sbjct 571	CCCGGGCTCAACCTGGGAACTGCATTGGTGAAGTGGCAGGCTAGAGTATGGCAGAGGGGGG	630		
Query 601	TAGAATTCACGTGTAGCAGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAATACCGATGGCGAAGG	660		
Sbjct 631	TAGAATTCACGTGTAGCAGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAATACCGATGGCGAAGG	690		
Query 661	CAGCCCCCTGGGCCAATACTGACGCTCATGCACGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAG	720		
Sbjct 691	CAGCCCCCTGGGCCAATACTGACGCTCATGCACGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAG	750		
Query 721	ATACCCTGGTAGTCCACGCCCTAAACGATGTCAACTAGTTGTTGGGGATTCAATTCCTTA	780		
Sbjct 751	ATACCCTGGTAGTCCACGCCCTAAACGATGTCAACTAGTTGTTGGGGATTCAATTCCTTA	810		
Query 781	GTAACGTAGCTAACGCGTGA	800		
Sbjct 811	GTAACGTAGCTAACGCGTGA	830		

ภาพภาคผนวก ง 7 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อแบคทีเรียรหัส *RRSTSA 2* (ความยาว 800 คู่เบส)
เมื่อเทียบกับฐานข้อมูล *NCBI* โดยแสดงความเหมือนต่อลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อ

Burkholderia vietnamensis 100 %

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1496 bits(810)	0.0	810/810(100%)	0/810(0%)	Plus/Plus
Query 1	GGAGAGAGGTAGCTTGCTACTGATCTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCTTAGGAATCT	60		
Sbjct 32	GGAGAGAGGTAGCTTGCTACTGATCTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCTTAGGAATCT	91		
Query 61	GCCTATTAGTGGGGGACAACATTTTCGAAAGGAATGCTAATACCGCATACGTCCTACGGGA	120		
Sbjct 92	GCCTATTAGTGGGGGACAACATTTTCGAAAGGAATGCTAATACCGCATACGTCCTACGGGA	151		
Query 121	GAAAGCAGGGGATCTTCGGACCTTGCCTAATAGATGAGCCTAAGTCGGATTAGCTAGTT	180		
Sbjct 152	GAAAGCAGGGGATCTTCGGACCTTGCCTAATAGATGAGCCTAAGTCGGATTAGCTAGTT	211		
Query 181	GGTGGGGTAAAGGCCTACCAAGGCGACGATCTGTAGCGGGTCTGAGAGGATGATCCGCCA	240		
Sbjct 212	GGTGGGGTAAAGGCCTACCAAGGCGACGATCTGTAGCGGGTCTGAGAGGATGATCCGCCA	271		
Query 241	CACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACA	300		
Sbjct 272	CACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACA	331		
Query 301	ATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCTTATGGTTGTAAAG	360		
Sbjct 332	ATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCTTATGGTTGTAAAG	391		
Query 361	CACCTTAAGCGAGGAGGAGGCTACTTTAGTTAATACCTAGAGATAGTGGACGTTACTCGC	420		
Sbjct 392	CACCTTAAGCGAGGAGGAGGCTACTTTAGTTAATACCTAGAGATAGTGGACGTTACTCGC	451		
Query 421	AGAATAAGCACCGGCTAACTCTGTGCCAGCAGCCGCGTAATACAGAGGGTGCAAGCGTT	480		
Sbjct 452	AGAATAAGCACCGGCTAACTCTGTGCCAGCAGCCGCGTAATACAGAGGGTGCAAGCGTT	511		
Query 481	AATCGGATTTACTGGGCGTAAAGCGCGCTAGGCGGCTAATTAAGTCAAATGTGAAATCC	540		
Sbjct 512	AATCGGATTTACTGGGCGTAAAGCGCGCTAGGCGGCTAATTAAGTCAAATGTGAAATCC	571		
Query 541	CCGAGCTTAACCTTGGGAATTGCATTGATAGTGGTTAGCTAGAGTGTGGGAGAGGATGGT	600		
Sbjct 572	CCGAGCTTAACCTTGGGAATTGCATTGATAGTGGTTAGCTAGAGTGTGGGAGAGGATGGT	631		
Query 601	AGAATTCCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGATGGCGAAGGC	660		
Sbjct 632	AGAATTCCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGATGGCGAAGGC	691		
Query 661	AGCCATCTGGCCTAACACTGACGCTGAGGTGCGAAAGCATGGGGAGCAAACAGGATTAGA	720		
Sbjct 692	AGCCATCTGGCCTAACACTGACGCTGAGGTGCGAAAGCATGGGGAGCAAACAGGATTAGA	751		
Query 721	TACCCTGGTAGTCCATGCCGTAAACGATGTCTACTAGCCGTTGGGGCCTTTGAGGCTTTA	780		
Sbjct 752	TACCCTGGTAGTCCATGCCGTAAACGATGTCTACTAGCCGTTGGGGCCTTTGAGGCTTTA	811		
Query 781	GTGGCGCAGCTAACGCGATAAGTAGACCGC	810		
Sbjct 812	GTGGCGCAGCTAACGCGATAAGTAGACCGC	841		

ภาพภาคผนวก ง 8 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อแบคทีเรียรหัส *RRSPVK6-1* (ความยาว 810 คู่เบส) เมื่อเทียบกับ ฐานข้อมูล *NCBI* โดยแสดงความเหมือนต่อลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อ *Acinetobacter sp.* 100 %

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1463 bits(792)	0.0	794/795(99%)	0/795(0%)	Plus/Minus
Features: tRNA uridine(34) 5-carboxymethylaminomethyl synthesis enz... rRNA-16S ribosomal RNA				
Query 1	GGTAGCACAGAGAGCTTGCTCTCGGGTGACGAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGTCTGGGA	60		
Sbjct 760245	GGTAGCACAGAGAGCTTGCTCTCGGGTGACGAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGTCTGGGA	760186		
Query 61	AACTGCCTGATGGAGGGGGATAACTACTGGAAACGGTAGCTAAAACCGCATAACGTCGCA	120		
Sbjct 760185	AACTGCCTGATGGAGGGGGATAACTACTGGAAACGGTAGCTAATACCGCATAACGTCGCA	760126		
Query 121	AGACCAAAGTGGGGGACCTTCGGGCCCTCATGCCATCAGATGTGCCAGATGGGATTAGCT	180		
Sbjct 760125	AGACCAAAGTGGGGGACCTTCGGGCCCTCATGCCATCAGATGTGCCAGATGGGATTAGCT	760066		
Query 181	AGTAGGTGGGGTAACGGCTCACCTAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGACCA	240		
Sbjct 760065	AGTAGGTGGGGTAACGGCTCACCTAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGACCA	760006		
Query 241	GCCCACTGGAAGTGAACACGCTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTG	300		
Sbjct 760005	GCCCACTGGAAGTGAACACGCTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTG	759946		
Query 301	CACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCCGTGTGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGT	360		
Sbjct 759945	CACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCCGTGTGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGT	759886		
Query 361	AAAGCACTTTTCAAGCGGGAGGAAGGCGTTAAGGTTAATAACCTTGCGATTGACGTTACC	420		
Sbjct 759885	AAAGCACTTTTCAAGCGGGAGGAAGGCGTTAAGGTTAATAACCTTGCGATTGACGTTACC	759826		
Query 421	CGCAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGGAGGGTGCAAGC	480		
Sbjct 759825	CGCAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGGAGGGTGCAAGC	759766		
Query 481	GTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGCGGCTGTCAAGTCGGATGTGAAA	540		
Sbjct 759765	GTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGCGGCTGTCAAGTCGGATGTGAAA	759706		
Query 541	TCCCCGGGCTCAACCTGGGAAGTGCATTGAAACTGGCAGGCTAGAGTCTTGAGAGGGG	600		
Sbjct 759705	TCCCCGGGCTCAACCTGGGAAGTGCATTGAAACTGGCAGGCTAGAGTCTTGAGAGGGG	759646		
Query 601	GGTAGAATTCCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAA	660		
Sbjct 759645	GGTAGAATTCCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAA	759586		
Query 661	GGCGGCCCCCTGGACAAAGACTGACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATT	720		
Sbjct 759585	GGCGGCCCCCTGGACAAAGACTGACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATT	759526		
Query 721	AGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGTCGATTGGAGGTTGTGCCCTTGAGGCG	780		
Sbjct 759525	AGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGTCGATTGGAGGTTGTGCCCTTGAGGCG	759466		
Query 781	TGGCTTCCGGAGCTA	795		
Sbjct 759465	TGGCTTCCGGAGCTA	759451		

ภาพภาคผนวก ง ๑ ลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อแบคทีเรียรหัส *RRSTS43* (ความยาว 795 คู่เบส) เมื่อเทียบกับฐานข้อมูล *NCBI* โดยแสดงความเหมือนต่อลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อ *Klebsiella pneumoniae* 99 %

Paenibacillus favisporus gene for 16S ribosomal RNA, partial sequence, strain: JCA-1313

Sequence ID: [dbj|LC127090.1](#) Length: 1434 Number of Matches: 1

Range 1: 45 to 724 [GenBank](#) [Graphics](#)

▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1256 bits(680)	0.0	680/680(100%)	0/680(0%)	Plus/Plus
Query 1	CTCTCCTGATGGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTAGGCAACCTGCCTGCAAGACC	60		
Sbjct 45	CTCTCCTGATGGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTAGGCAACCTGCCTGCAAGACC	104		
Query 61	GGGATAACCCACGGAAACGTGAGCTAATACCGGATATCTCATTTCTCTCCTGAGGGGAT	120		
Sbjct 105	GGGATAACCCACGGAAACGTGAGCTAATACCGGATATCTCATTTCTCTCCTGAGGGGAT	164		
Query 121	GATGAAAGACGGAGCAATCTGTCACTTGCGGATGGGCCTGCGGCGCATTAGCTAGTTGGT	180		
Sbjct 165	GATGAAAGACGGAGCAATCTGTCACTTGCGGATGGGCCTGCGGCGCATTAGCTAGTTGGT	224		
Query 181	GAGGTAACGGCTCACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGAACGGCCACAC	240		
Sbjct 225	GAGGTAACGGCTCACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGAACGGCCACAC	284		
Query 241	TGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATG	300		
Sbjct 285	TGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATG	344		
Query 301	GGCGAAAGCCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAGCTC	360		
Sbjct 345	GGCGAAAGCCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAGCTC	404		
Query 361	TGTTGCCAGGGAAGAACGTCCGGTAGAGTAACTGCTATCGGAGTGACGGTACCTGAGAAG	420		
Sbjct 405	TGTTGCCAGGGAAGAACGTCCGGTAGAGTAACTGCTATCGGAGTGACGGTACCTGAGAAG	464		
Query 421	AAAGCCCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGGGCAAGCGTTGTCC	480		
Sbjct 465	AAAGCCCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGGGCAAGCGTTGTCC	524		
Query 481	GGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGCGGTCATTTAAGTCTGGTGTTTAAGGCCAAG	540		
Sbjct 525	GGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGCGGTCATTTAAGTCTGGTGTTTAAGGCCAAG	584		
Query 541	GCTCAACCTTGGTTTCGCACTGGAACTGGGTGACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAAAT	600		
Sbjct 585	GCTCAACCTTGGTTTCGCACTGGAACTGGGTGACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAAAT	644		
Query 601	TCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATGTGGAGGAACACCAAGTGGCGAAGGCGACTC	660		
Sbjct 645	TCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATGTGGAGGAACACCAAGTGGCGAAGGCGACTC	704		
Query 661	TCTGGGCTGTAAGTACGCT	680		
Sbjct 705	TCTGGGCTGTAAGTACGCT	724		

ภาพภาคผนวก ง 10 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อแบคทีเรียรหัส RRPVK-4 ที่ตรงกับเบสของ

Paenibacillus favisporus 100% ที่ Accession number LC127090.1

Burkholderia cenocepacia J2315 chromosome 1, complete genome

Sequence ID: [ref|NC_011000.1|](#) Length: 3870082 Number of Matches: 4

Range 1: 246374 to 247129		GenBank	Graphics	▼ Next Match ▲ Previous Match	
Score	Expect	Identities	Gaps	Strand	
1386 bits(750)	0.0	754/756(99%)	0/756(0%)	Plus/Plus	
Features: rRNA-16S ribosomal RNA					
Query	1	CTTGCACTGCTGGCGAGTGGCGAACGGGTGAGTAATACATCGGAACATGTCCTGTAGTG			60
Sbjct	246274	CTTGCACTGCTGGCGAGTGGCGAACGGGTGAGTAATACATCGGAACATGTCCTGTAGTG			246433
Query	61	GGGGATAGCCCGCGAAGCCGGATTAAACCGCATACGATCTATGGATGAAAGCGGGGG			120
Sbjct	246434	GGGGATAGCCCGCGAAGCCGGATTAAACCGCATACGATCCACGGATGAAAGCGGGGG			246493
Query	121	ACCTTCGGGCTCGCGCTATAGGGTTGGCCGATGGCTGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAA			180
Sbjct	246494	ACCTTCGGGCTCGCGCTATAGGGTTGGCCGATGGCTGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAA			246553
Query	181	GGCCTACCAAGGCGACGATCAGTAGCTGGTCTGAGAGGACGACCGCCACACTGGGACTG			240
Sbjct	246554	GGCCTACCAAGGCGACGATCAGTAGCTGGTCTGAGAGGACGACCGCCACACTGGGACTG			246613
Query	241	AGACACGGCCCGAGACTCCTACGGGAGGCGAGTGGGGAAATTTTGGACAATGGGCGAAAG			300
Sbjct	246614	AGACACGGCCCGAGACTCCTACGGGAGGCGAGTGGGGAAATTTTGGACAATGGGCGAAAG			246673
Query	301	CCTGATCCAGCAATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCCTTCGGGTTGTAAAGCACTTTTGTCC			360
Sbjct	246674	CCTGATCCAGCAATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCCTTCGGGTTGTAAAGCACTTTTGTCC			246733
Query	361	GGAAAGAAATCCTTGGCTCTAATACAGTCGGGGGATGACGGTACCGGAAGATAAGCACC			420
Sbjct	246734	GGAAAGAAATCCTTGGCTCTAATACAGTCGGGGGATGACGGTACCGGAAGATAAGCACC			246793
Query	421	GGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAAATACGTAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTAC			480
Sbjct	246794	GGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAAATACGTAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTAC			246853
Query	481	TGGGCGTAAAGCGTGCGCAGGCGGTTTGTCTAAGACCGATGTGAATCCCCGGGCTCAACC			540
Sbjct	246854	TGGGCGTAAAGCGTGCGCAGGCGGTTTGTCTAAGACCGATGTGAATCCCCGGGCTCAACC			246913
Query	541	TGGGAATCTGCATTGGTGACTGGCAGGCTAGAGTATGGCAGAGGGGGGTAGAATTCCACGT			600
Sbjct	246914	TGGGAATCTGCATTGGTGACTGGCAGGCTAGAGTATGGCAGAGGGGGGTAGAATTCCACGT			246973
Query	601	GTAGCAGTGAATGCGTAGAGATGTGGAGGAATACCGATGGCGAAGGCAAGCCCTGGGC			660
Sbjct	246974	GTAGCAGTGAATGCGTAGAGATGTGGAGGAATACCGATGGCGAAGGCAAGCCCTGGGC			247033
Query	661	CAATACTGACGCTCATGCAGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGT			720
Sbjct	247034	CAATACTGACGCTCATGCAGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGT			247093
Query	721	CCACGCCCTAAACGATGTCAACTAGTTGTTGGGGAT	756		
Sbjct	247094	CCACGCCCTAAACGATGTCAACTAGTTGTTGGGGAT	247129		

ภาพภาคผนวก ง 11 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อแบคทีเรียรหัส RSPVK-2 ที่ตรงกับเบสของ

Burkholderia cenocepacia J2315 99% ที่ Accession number

NC_011000.1

Bacillus pumilus strain NJ-M2, complete genome

Sequence ID: [ref|NZ_CP012329.1](#) Length: 3793419 Number of Matches: 7

Range 1: 280890 to 281574 [GenBank](#) [Graphics](#)

▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1266 bits(685)	0.0	685/685(100%)	0/685(0%)	Plus/Minus
Features: rRNA-16S ribosomal RNA				
Query 1	CTTGCTCCCGGATGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACTGCCTGTAAGA	60		
Sbjct 281574	CTTGCTCCCGGATGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACTGCCTGTAAGA	281515		
Query 61	CTGGGATAACTCCGGGAAACCGGAGCTAATACCGGATAGTTCCTTGAACCGCATGGTTCA	120		
Sbjct 281514	CTGGGATAACTCCGGGAAACCGGAGCTAATACCGGATAGTTCCTTGAACCGCATGGTTCA	281455		
Query 121	AGGATGAAAGACGGTTTCGGCTGTCACTTACAGATGGACCCGCGCGCATTAGCTAGTTG	180		
Sbjct 281454	AGGATGAAAGACGGTTTCGGCTGTCACTTACAGATGGACCCGCGCGCATTAGCTAGTTG	281395		
Query 181	GTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCAC	240		
Sbjct 281394	GTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCAC	281335		
Query 241	ACTGGGACTGAGACACGGGCCAGACTCCTACGGGAGGCGAGTAGGGGAATCTTCCGCAA	300		
Sbjct 281334	ACTGGGACTGAGACACGGGCCAGACTCCTACGGGAGGCGAGTAGGGGAATCTTCCGCAA	281275		
Query 301	TGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCCGTGAAGGTTTTCGGATCGTAAAGC	360		
Sbjct 281274	TGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCCGTGAAGGTTTTCGGATCGTAAAGC	281215		
Query 361	TCTGTTGTTAGGGGAAGACAAGTGCAGAGTAAGTCTTGACACCTTGACGGTACCTAACC	420		
Sbjct 281214	TCTGTTGTTAGGGGAAGACAAGTGCAGAGTAAGTCTTGACACCTTGACGGTACCTAACC	281155		
Query 421	AGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGT	480		
Sbjct 281154	AGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGT	281095		
Query 481	CCGGAATTATTGGGCGTAAGGGCTCGCAGGCGGTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCC	540		
Sbjct 281094	CCGGAATTATTGGGCGTAAGGGCTCGCAGGCGGTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCC	281035		
Query 541	CGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAAGTGGGAACTTGAGTGCAAGAGGAGAGTGG	600		
Sbjct 281034	CGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAAGTGGGAACTTGAGTGCAAGAGGAGAGTGG	280975		
Query 601	AATTCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAATGGCGAAGGCCA	660		
Sbjct 280974	AATTCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAATGGCGAAGGCCA	280915		
Query 661	CTCTCTGGTCTGTAACTGACGCTGA	685		
Sbjct 280914	CTCTCTGGTCTGTAACTGACGCTGA	280890		

ภาพภาคผนวกที่ 12 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อแบคทีเรียรหัส *RRTSA-5* ที่ตรงกับเบสของ

Bacillus pumilus strain *NJ-M2* 100% ที่ Accession number *NZ_CP012329.1*

Paenibacillus alvei DSM 29 PAV_2c, whole genome shotgun sequence

Sequence ID: [ref|NZ_AMBZ01000002.1|](#) Length: 881196 Number of Matches: 6

Range 1: 82773 to 83462		GenBank	Graphics	▼ Next Match ▲ Previous Match	
Score	Expect	Identities	Gaps	Strand	
1253 bits(678)	0.0	686/690(99%)	0/690(0%)	Plus/Minus	
Query 1	GGAGTGCCTTGCACTCCTGATGGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTAGGTAACCTGC	60			
Sbjct 83462	GGAGTGCCTTGCACTCCTGATGGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTAGGTAACCTGC	83403			
Query 61	CCATAAGACTGGGATAACCCACGGAACGTGAGCTAATACCAGATAGGCATTTTCCTCGC	120			
Sbjct 83402	CCATAAGACTGGGATAACCCACGGAACGTGAGCTAATACCAGATAGGCATTTTCCTCGC	83343			
Query 121	ATGAGGGGAGATGAGAAAGGCGGAGCAATCTGCCACTTATGGATGGACCTGCGGCGCATT	180			
Sbjct 83342	ATGAGGGGAGATGAGAAAGGCGGAGCAATCTGTCACTTATGGATGGACCTGCGGCGCATT	83283			
Query 181	GCTAGTTGGTAAAGGTAACGGCTTACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGA	240			
Sbjct 83282	GCTAGTTGGTAAAGGTAACGGCTTACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGA	83223			
Query 241	TCGGCCCACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCGAGCAGTAGGGGATC	300			
Sbjct 83222	TCGGCCCACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCGAGCAGTAGGGGATC	83163			
Query 301	TTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGGAGCAACGCCGCGTGAAGTGAAGGTTTTCGGAT	360			
Sbjct 83162	TTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGGAGCAACGCCGCGTGAAGTGAAGGTTTTCGGAT	83103			
Query 361	CGTAAAGCTCTGTTGCCAGGGGAAGAACGCCCTAGGAGAGTAAGTCTCTAGGGTGACGGT	420			
Sbjct 83102	CGTAAAGCTCTGTTGCCAGGGGAAGAACGCCCTAGGAGAGTAAGTCTCTAGGGTGACGGT	83043			
Query 421	ACCTGAGAAGAAAGCCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGGGCG	480			
Sbjct 83042	ACCTGAGAAGAAAGCCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGGGCG	82983			
Query 481	AGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAGCGCGCGCAGGCGCAATGTAAGTTGGGTGTT	540			
Sbjct 82982	AGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAGCGCGCGCAGGCGCAATGTAAGTTGGGTGTT	82923			
Query 541	TAAACCTAGGGCTCAACCTTGGGTGCGATCCAAAAGTGCATAGCTTGAGTACAGAAGAGG	600			
Sbjct 82922	TAAACCTAGGGCTCAACCTTGGGTGCGATCCAAAAGTGCATAGCTTGAGTACAGAAGAGG	82863			
Query 601	AAAGTGGAAATTCACGTGTAGCGGTGAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAAGTGGCG	660			
Sbjct 82862	AAAGTGGAAATTCACGTGTAGCGGTGAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAAGTGGCG	82803			
Query 661	AAGGCGACTTTCTGGGCTGTAAGTACGCT	690			
Sbjct 82802	AAGGCGACTTTCTGGGCTGTAAGTACGCT	82773			

ภาพภาคผนวก ง 13 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อแบคทีเรียรหัส *RRTSA-6* ที่ตรงกับเบสของ

Paenibacillus alvei DSM 29 PAV_2c 99% ที่ Accession number

NZ_AMBZ01000002

Bacillus pumilus strain NJ-M2, complete genome

Sequence ID: [ref|NZ_CP012329.1](#) Length: 3793419 Number of Matches: 7

Range 1: 280817 to 281576 [GenBank](#) [Graphics](#) [▼ Next Match](#) [▲ Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1404 bits(760)	0.0	760/760(100%)	0/760(0%)	Plus/Minus
Features: rRNA-16S ribosomal RNA				
Query 1	AGCTTGTCTCCCGGATGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACCGTGGGTAACTGCCTGTAA	60		
Sbjct 281576	AGCTTGTCTCCCGGATGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACCGTGGGTAACTGCCTGTAA	281517		
Query 61	GACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGAGCTAATACCGGATAGTTCCCTTGAACCGCATGGTT	120		
Sbjct 281516	GACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGAGCTAATACCGGATAGTTCCCTTGAACCGCATGGTT	281457		
Query 121	CAAGGATGAAAGACGGTTTCGGCTGTCACTTACAGATGGACCCGCGGCATTAGCTAGT	180		
Sbjct 281456	CAAGGATGAAAGACGGTTTCGGCTGTCACTTACAGATGGACCCGCGGCATTAGCTAGT	281397		
Query 181	TGCTGAGGTAAACGGCTCACCAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCC	240		
Sbjct 281396	TGCTGAGGTAAACGGCTCACCAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCC	281327		
Query 241	ACACTGGGACTGAGACACGCCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCGCG	300		
Sbjct 281336	ACACTGGGACTGAGACACGCCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCGCG	281277		
Query 301	AATGGACGAAAGTCTGACGAGCAACGCCGCTGAGTGATGAAGGTTTTCGGATCGTAAA	360		
Sbjct 281276	AATGGACGAAAGTCTGACGAGCAACGCCGCTGAGTGATGAAGGTTTTCGGATCGTAAA	281217		
Query 361	GCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAAGTGCAAGAGTAAGTCTTGACCTTGACGGTACCTAA	420		
Sbjct 281216	GCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAAGTGCAAGAGTAAGTCTTGACCTTGACGGTACCTAA	281157		
Query 421	CCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTT	480		
Sbjct 281156	CCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTT	281097		
Query 481	GTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGCTCGCAGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAGCC	540		
Sbjct 281096	GTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGCTCGCAGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAGCC	281037		
Query 541	CCCGGCTCAACCGGGGAGGTCATTGGGAACTGGGAACTTGAGTGCAAGAGGAGAGT	600		
Sbjct 281036	CCCGGCTCAACCGGGGAGGTCATTGGGAACTGGGAACTTGAGTGCAAGAGGAGAGT	280977		
Query 601	GGAAATCCACGTGTAGCGGTGAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCACTGGCGAAGGC	660		
Sbjct 280976	GGAAATCCACGTGTAGCGGTGAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCACTGGCGAAGGC	280917		
Query 661	GACTCTCTGCTCTGTAAGTACGCTGAGGAGCGAAGCGTGGGAGCGAACAGGATTAGA	720		
Sbjct 280916	GACTCTCTGCTCTGTAAGTACGCTGAGGAGCGAAGCGTGGGAGCGAACAGGATTAGA	280857		
Query 721	TACCCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTG	760		
Sbjct 280856	TACCCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTG	280817		

ภาพภาคผนวก ง 14 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อแบคทีเรียรหัส W-RR ที่ตรงกับเบสของ

Bacillus pumilus strain NJ-M2 100% ที่ Accession number [NZ_CP012329.1](#)

Bacillus amyloliquefaciens DSM7 complete genome

Sequence ID: [ref|NC_014551.1|](#) Length: 3980199 Number of Matches: 10

Range 1: 31578 to 32339 [GenBank](#) [Graphics](#)

▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1397 bits(756)	0.0	760/762(99%)	0/762(0%)	Plus/Plus

Features: [rRNA-16S ribosomal RNA](#)

Query	1	GATGGGAGCTTGCTCCCTGATGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACTGC	60
Sbjct	31578		31637
Query	61	CTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATGTTGTCTGAACCGC	120
Sbjct	31638		31697
Query	121	ATGGTTTACAGACATAAAGGTGGCTTCGGCTACCACTTACAGATGGACCCGCGGCGCATT	180
Sbjct	31698		31757
Query	181	GCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGA	240
Sbjct	31758		31817
Query	241	TCGGCCCACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGGATC	300
Sbjct	31818		31877
Query	301	TTCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCTGAGTGATGAAGGTTTTTCGGAT	360
Sbjct	31878		31937
Query	361	CGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTGCCGTTCAATAGGGCGGCACCTTGACGG	420
Sbjct	31938		31997
Query	421	TACCTAACAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGC	480
Sbjct	31998		32057
Query	481	AAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAGGGCTCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGT	540
Sbjct	32058		32117
Query	541	GAAAGCCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAACTGGGGAACTTGAGTGCAAGA	600
Sbjct	32118		32177
Query	601	GGAGAGTGGAATCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAAGTGG	660
Sbjct	32178		32237
Query	661	CGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTAACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAG	720
Sbjct	32238		32297
Query	721	GATTAGATACCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGAGTGCT	762
Sbjct	32298		32339

ภาพภาคผนวก ง 15 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อแบคทีเรียห้ำ *W-RS* ที่ตรงกับเบสของ

Bacillus amyloliquefaciens **DSM7** 99% ที่ *Accession number*

NC_014551.1

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1471 bits(796)	0.0	796/796(100%)	0/796(0%)	Plus/Plus
Query 1	GCTTGCTCCCGGATGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCTGTAAG	60		
Sbjct 47	GCTTGCTCCCGGATGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCTGTAAG	106		
Query 61	ACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGAGCTAATACCGGATAGTTCCTTGAACCGCATGGTTC	120		
Sbjct 107	ACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGAGCTAATACCGGATAGTTCCTTGAACCGCATGGTTC	166		
Query 121	AAGGATGAAAGACGGTTTCGGCTGTCACTTACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTT	180		
Sbjct 167	AAGGATGAAAGACGGTTTCGGCTGTCACTTACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTT	226		
Query 181	GGTGGGGTAATGGCTCACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCA	240		
Sbjct 227	GGTGGGGTAATGGCTCACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCA	286		
Query 241	CACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCA	300		
Sbjct 287	CACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCA	346		
Query 301	ATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAG	360		
Sbjct 347	ATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAG	406		
Query 361	CTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTGCGAGAGTAAGTCTCGCACCTTGACGGTACCTAAC	420		
Sbjct 407	CTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTGCGAGAGTAAGTCTCGCACCTTGACGGTACCTAAC	466		
Query 421	CAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTG	480		
Sbjct 467	CAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTG	526		
Query 481	TCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGCTCGCAGGCGGTTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCC	540		
Sbjct 527	TCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGCTCGCAGGCGGTTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCC	586		
Query 541	CCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAAACTGGGAACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTG	600		
Sbjct 587	CCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAAACTGGGAACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTG	646		
Query 601	GAATTCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAAGTGGCGAAGGCG	660		
Sbjct 647	GAATTCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAAGTGGCGAAGGCG	706		
Query 661	ACTCTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGAT	720		
Sbjct 707	ACTCTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGAT	766		
Query 721	ACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGGGGGTTTTCCGCCCTTA	780		
Sbjct 767	ACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGGGGGTTTTCCGCCCTTA	826		
Query 781	GTGCTGCAGCTAACGC	796		
Sbjct 827	GTGCTGCAGCTAACGC	842		

ภาพภาคผนวก ง 16 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อแบคทีเรียรหัส S58 (ความยาว 796 คู่เบส) เมื่อเทียบกับ ฐานข้อมูล NCBI โดยแสดงความเหมือนต่อลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อ *Bacillus sp.* 100 %

Paenibacillus alvei DSM 29 PAV_2c, whole genome shotgun sequence

Sequence ID: [ref|NZ_AMBZ01000002.1](#) Length: 881198 Number of Matches: 8

Range 1: 82702 to 83440		GenBank	Graphics	▼ Next Match ▲ Previous Match	
Score	Expect	Identities		Gaps	Strand
1321 bits(715)	0.0	731/739(99%)		0/739(0%)	Plus/Minus
Query	1	TTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTAAGCTGCCCATAGACTGGGATAACCCAC	60		
Sbjct	83440	TTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTAAGCTGCCCATAGACTGGGATAACCCAC	83381		
Query	61	GGAAACGTGAGCTAATACAGATAGGCATTTCTCGCATGAGGGAGATGAGAAAGGCGG	120		
Sbjct	83380	GGAAACGTGAGCTAATACAGATAGGCATTTCTCGCATGAGGGAGATGAGAAAGGCGG	83321		
Query	121	AGCAATCTGCCACTTATGGATGGACCTGCGGCGCATAGCTAGTTGGTAAGGTAACGGCT	180		
Sbjct	83320	AGCAATCTGTCACTTATGGATGGACCTGCGGCGCATAGCTAGTTGGTAAGGTAACGGCT	83261		
Query	181	TACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCCACTGGGACTGAGAC	240		
Sbjct	83260	CACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCCACTGGGACTGAGAC	83201		
Query	241	AGGGCCGAGACTCCTACGGGAGGCGAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTG	300		
Sbjct	83200	ACGGCCGAGACTCCTACGGGAGGCGAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTG	83141		
Query	301	ACGGAGCAACGCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGCCAGGGA	360		
Sbjct	83140	ACGGAGCAACGCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGCCAGGGA	83081		
Query	361	AGAACGCTAGGAGAGTAAGTCTCTAGGGTGACGGTACCTGAGAGAAAGCCCCGGCT	420		
Sbjct	83080	AGAACGCTAGGAGAGTAAGTCTCTAGGGTGACGGTACCTGAGAGAAAGCCCCGGCT	83021		
Query	421	AACACGTGCGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGGGCGAGCGTTGTCCGGAATTATTGGG	480		
Sbjct	83020	AACACGTGCGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGGGCGAGCGTTGTCCGGAATTATTGGG	82961		
Query	481	CGTAAAGCGCGCGCAGGCGGCAATGTAAAGTTGGGTGTTTAAACCTAGGGCTCAACCTTGA	540		
Sbjct	82960	CGTAAAGCGCGCGCAGGCGGCAATGTAAAGTTGGGTGTTTAAACCTAGGGCTCAACCTTGA	82901		
Query	541	GTCGCATCCAAACTGCATAGCTTGAGTACAGAGAGGAAAGTGGAAATCCACGTGTAGC	600		
Sbjct	82900	GTCGCATCCAAACTGCATAGCTTGAGTACAGAGAGGAAAGTGGAAATCCACGTGTAGC	82841		
Query	601	GGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACCAAGTGGCGAAGGCGACTTTCTGGGCTGTAA	660		
Sbjct	82840	GGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACCAAGTGGCGAAGGCGACTTTCTGGGCTGTAA	82781		
Query	661	CTGACGCTGAGGCGCGAAGCGTGTGGAGCAACAGGATTAGATACCTTGGTAGTCCACG	720		
Sbjct	82780	CTGACGCTGAGGCGCGAAGCGTGTGGAGCAACAGGATTAGATACCTTGGTAGTCCACG	82721		
Query	721	CCGTAAACGATGAATGCTA	739		
Sbjct	82720	CCGTAAACGATGAATGCTA	82702		

ภาพภาคผนวก ง 17 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อแบคทีเรียรหัส S65 ที่ตรงกับเบสของ

Paenibacillus alvei DSM 29 PAV_2c 99% ที่ Accession number NZ_AMBZ01000002.1

Paenibacillus alvei DSM 29 PAV_2c, whole genome shotgun sequence

Sequence ID: [ref|NZ_AMBZ01000002.1|](#) Length: 881196 Number of Matches: 6

Range 1: 82702 to 83440		GenBank	Graphics	▼ Next Match ▲ Previous Match	
Score	Expect	Identities		Gaps	Strand
1321 bits(715)	0.0	731/739(99%)		0/739(0%)	Plus/Minus
Query 1	TTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTAGGTAACCTGCCCATAGACTGGGATAACCCAC				60
Sbjct 83440	TTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTAGGTAACCTGCCCATAGACTGGGATAACCCAC				83381
Query 61	GGAAACGTGAGCTAATACCAGATAGGCATTTCTCGCATGAGGGAGATGAGAAAGGCGG				120
Sbjct 83380	GGAAACGTGAGCTAATACCAGATAGGCATTTCTCGCATGAGGGAGATGAGAAAGGCGG				83321
Query 121	AGCAATCTGCCACTTATGGATGGACCTGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTAAGGTAAACGGCT				180
Sbjct 83320	AGCAATCTGTCACTTATGGATGGACCTGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTAAGGTAAACGGCT				83261
Query 181	TACCAGGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGAC				240
Sbjct 83260	CACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGAC				83201
Query 241	AGGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTG				300
Sbjct 83200	ACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTG				83141
Query 301	ACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGSTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGCCAGGGA				360
Sbjct 83140	ACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGSTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGCCAGGGA				83081
Query 361	AGAACGCCTAGGAGAGTAAGTCTCTAGGGTGACGGTACCTGAGAAGAAAGCCCCGGCT				420
Sbjct 83080	AGAACGCCTAGGAGAGTAAGTCTCTAGGGTGACGGTACCTGAGAAGAAAGCCCCGGCT				83021
Query 421	AACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGGGGCGAGCGTTGTCCGGAATTATTGGG				480
Sbjct 83020	AACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGGGGCGAGCGTTGTCCGGAATTATTGGG				82961
Query 481	CGTAAAGCGCGCGCAGGCGGCAATGTAAGTTGGGTGTTTAAACCTAGGGCTCAACCTTGA				540
Sbjct 82960	CGTAAAGCGCGCGCAGGCGGCAATGTAAGTTGGGTGTTTAAACCTAGGGCTCAACCTTGA				82901
Query 541	GTCGCATCCAAACTGCATAGCTTGAGTACAGAAGAGGAAGTGGAATTCACGCTGTAGC				600
Sbjct 82900	GTCGCATCCAAACTGCATAGCTTGAGTACAGAAGAGGAAGTGGAATTCACGCTGTAGC				82841
Query 601	GGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAAGTGGCGAAGGCGACTTTCGGGCTGTAA				660
Sbjct 82840	GGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAAGTGGCGAAGGCGACTTTCGGGCTGTAA				82781
Query 661	CTGACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGTGGAGCAAAACAGGATTAGATACCTGGTAGTCCACG				720
Sbjct 82780	CTGACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGTGGAGCAAAACAGGATTAGATACCTGGTAGTCCACG				82721
Query 721	CCGTAAACGATGAATGCTA	739			
Sbjct 82720	CCGTAAACGATGAATGCTA	82702			

ภาพภาคผนวก ง 18 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อแบคทีเรียห้ำ S203 ที่ตรงกับเบสของ
Paenibacillus alvei DSM 29 PAV_2c 99% ที่ Accession number NZ_AMBZ01000002.1

Paenibacillus alvei DSM 29 PAV_2c, whole genome shotgun sequence

Sequence ID: [ref|NZ_AMBZ01000002.1|](#) Length: 881196 Number of Matches: 6

Range 1: 82758 to 83479		GenBank	Graphics	▼ Next Match ▲ Previous Match	
Score	Expect	Identities		Gaps	Strand
1306 bits(707)	0.0	717/722(99%)		0/722(0%)	Plus/Minus
Query 2		AGTCGAGCGGACTTGAAGGAGTGCTTGCACTCCTGATGGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTA	61		
Sbjct 83479		AGTCGAGCGGACTTGAATGGAGTGCTTGCACTCCTGATGGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTA	83420		
Query 62		ACACGTAGGTAACTGCCCATAGACTGGGATAACCCACGGAACGTGAGCTAATACCAG	121		
Sbjct 83419		ACACGTAGGTAACTGCCCATAGACTGGGATAACCCACGGAACGTGAGCTAATACCAG	83360		
Query 122		ATAGGCATTTTCTCGCATGAGGGAGATGAGAAAGGCGGAGCAATCTGCCACTTATGGAT	181		
Sbjct 83359		ATAGGCATTTTCTCGCATGAGGGAGATGAGAAAGGCGGAGCAATCTGTCACTTATGGAT	83300		
Query 182		GGACCTGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTAAGGTAACGGCTTACCAAGGCGACGATGCGTAG	241		
Sbjct 83299		GGACCTGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTAAGGTAACGGCTTACCAAGGCGACGATGCGTAG	83240		
Query 242		CCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCCACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGA	301		
Sbjct 83239		CCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCCACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGA	83180		
Query 302		GGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCTGAGT	361		
Sbjct 83179		GGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCTGAGT	83120		
Query 362		GATGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGCCAGGGAAGAACGCTAGGAGAGTAACT	421		
Sbjct 83119		GATGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGCCAGGGAAGAACGCTAGGAGAGTAACT	83060		
Query 422		GCTCCTAGGGTGACGGTACCTGAGAAGAAAGCCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCG	481		
Sbjct 83059		GCTCCTAGGGTGACGGTACCTGAGAAGAAAGCCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCG	83000		
Query 482		GTAATACGTAGGGGGCGAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGCGGC	541		
Sbjct 82999		GTAATACGTAGGGGGCGAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGCGGC	82940		
Query 542		AATGTAAAGTTGGGTGTTTAAACCTAGGGCTCAACCTTGGGTGCGATCCAAAACGTGATAG	601		
Sbjct 82939		AATGTAAAGTTGGGTGTTTAAACCTAGGGCTCAACCTTGGGTGCGATCCAAAACGTGATAG	82880		
Query 602		CTTGAGTACAGAAGAGGAAAGTGGAAATCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTG	661		
Sbjct 82879		CTTGAGTACAGAAGAGGAAAGTGGAAATCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTG	82820		
Query 662		GAGGAACACCAAGTGGCGAAGGCGACTTTCTGGGCTGTAAGTACGCTGAGGCGCGAAGGC	721		
Sbjct 82819		GAGGAACACCAAGTGGCGAAGGCGACTTTCTGGGCTGTAAGTACGCTGAGGCGCGAAGGC	82760		
Query 722	GT	723			
Sbjct 82759	GT	82758			

ภาพภาคผนวก ง 19 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อแบคทีเรียรหัส S230 ที่ตรงกับเบสของ

Paenibacillus alvei DSM 29 PAV_2c 99% ที่ Accession number NZ_AMBZ01000002.1

Paenibacillus alvei DSM 29 PAV_2c, whole genome shotgun sequence

Sequence ID: [ref|NZ_AMBZ01000002.1|](#) Length: 881196 Number of Matches: 6

Range 1: 82758 to 83479		GenBank	Graphics	▼ Next Match ▲ Previous Match	
Score	Expect	Identities		Gaps	Strand
1306 bits(707)	0.0	717/722(99%)		0/722(0%)	Plus/Minus
Query 2		AGTCGAGCGGACTTGAAGGAGTGCTTGCACTCCTGATGGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTA	61		
Sbjct 83479		AGTCGAGCGGACTTGAAGGAGTGCTTGCACTCCTGATGGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTA	83420		
Query 62		ACACGTAGGTAACCTGCCATAAGACTGGGATAACCCACGGAAACGTGAGCTAATACCG	121		
Sbjct 83419		ACACGTAGGTAACCTGCCATAAGACTGGGATAACCCACGGAAACGTGAGCTAATACCG	83360		
Query 122		ATAGGCATTTTCTCGCATGAGGGAGATGAGAAAGGCGGAGCAATCTGCCACTTATGGAT	181		
Sbjct 83359		ATAGGCATTTTCTCGCATGAGGGAGATGAGAAAGGCGGAGCAATCTGTCACTTATGGAT	83300		
Query 182		GGACCTGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTAAGGTAACGGCTTACCAAGGCGACGATGCGTAG	241		
Sbjct 83299		GGACCTGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTAAGGTAACGGCTTACCAAGGCGACGATGCGTAG	83240		
Query 242		CCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCCACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGA	301		
Sbjct 83239		CCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCCACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGA	83180		
Query 302		GGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCTGAGT	361		
Sbjct 83179		GGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCTGAGT	83120		
Query 362		GATGAAGGTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGCCAGGGAAGAACGCCTAGGAGAGTAAT	421		
Sbjct 83119		GATGAAGGTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGCCAGGGAAGAACGCCTAGGAGAGTAAT	83060		
Query 422		GCTCCTAGGGTGACGCTACCTGAGAAGAAAGCCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCG	481		
Sbjct 83059		GCTCCTAGGGTGACGCTACCTGAGAAGAAAGCCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCG	83000		
Query 482		GTAAATACGTAGGGGCGAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCAGGCGGC	541		
Sbjct 82999		GTAAATACGTAGGGGCGAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCAGGCGGC	82940		
Query 542		AATGTAAAGTTGGGTGTTTAAACCTAGGGCTCAACCTTGGGTGCGATCCAAAACCTGCATAG	601		
Sbjct 82939		AATGTAAAGTTGGGTGTTTAAACCTAGGGCTCAACCTTGGGTGCGATCCAAAACCTGCATAG	82880		
Query 602		CTTGAGTACAGAAGAGGAAAGTGGAAATCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTG	661		
Sbjct 82879		CTTGAGTACAGAAGAGGAAAGTGGAAATCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTG	82820		
Query 662		GAGGAACACCACTGGCGAAGGCGACTTTCTGGGCTGTAACTGACGCTGAGGCGCGAAAGC	721		
Sbjct 82819		GAGGAACACCACTGGCGAAGGCGACTTTCTGGGCTGTAACTGACGCTGAGGCGCGAAAGC	82760		
Query 722		GT 723			
Sbjct 82759		GT 82758			

ภาพภาคผนวก ง 20 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อแบคทีเรียรหัส S232 ที่ตรงกับเบสของ

Paenibacillus alvei DSM 29 PAV_2c 95% ที่ Accession number NZ_AMBZ01000002.1

Paenibacillus alvei DSM 29 PAV_2c, whole genome shotgun sequence

Sequence ID: [ref|NZ_AMBZ01000002.1|](#) Length: 881196 Number of Matches: 6

Range 1: 82670 to 83445		GenBank	Graphics	▼ Next Match ▲ Previous Match	
Score	Expect	Identities	Gaps	Strand	
1225 bits(663)	0.0	741/777(95%)	12/777(1%)	Plus/Minus	
Query 1		GATGGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTAGGTAACTGCCATAAGACTGGGATAA			60
Sbjct 83445		GATGGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTAGGTAACTGCCATAAGACTGGGATAA			83386
Query 61		CCCAAGGAAACGTGAGCTAATACCAGATAGGCATTTTCCTCGCATGAGGGAGATGAGAAA			120
Sbjct 83385		CCCAAGGAAACGTGAGCTAATACCAGATAGGCATTTTCCTCGCATGAGGGAGATGAGAAA			83326
Query 121		GGCGGAGCAATCTGCCACTTATGGATGGACCTGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTAAGGTAA			180
Sbjct 83325		GGCGGAGCAATCTGTCACTTATGGATGGACCTGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTAAGGTAA			83266
Query 181		CGGCTTACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGACCGGCCACACTGGGACT			240
Sbjct 83265		CGGCTCACCAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACT			83206
Query 241		GAGACAGGGCCCAAACTCATACGGGAGGCAGCAGTAGGGATCTTCCGCAATGGACGAAA			300
Sbjct 83205		GAGACAGGGCCCAAACTCATACGGGAGGCAGCAGTAGGGATCTTCCGCAATGGACGAAA			83146
Query 301		GTCTGACGGAGCAACGCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGCC			360
Sbjct 83145		GTCTGACGGAGCAACGCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGCC			83086
Query 361		AGGGAAGAAGCGCTAGGAGAGTAAGTCTCCTAGGGTGACGGTACCTGAGAAGAAAGGCC			420
Sbjct 83085		AGGGAAGAAGCGCTAGGAGAGTAAGTCTCCTAGGGTGACGGTACCTGAGAAGAAAGGCC			83026
Query 421		CGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGATAATACGTAGGATGCGAGCGTTGTCCGGAATTA			480
Sbjct 83025		CGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGATAATACGTAGGAGGCGAGCGTTGTCCGGAATTA			82966
Query 481		TTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGCGGCTATGTAAGTGGGGTGTCTAAACCTAGGGCTCAAC			540
Sbjct 82965		TTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGCGGCAATGTAAGTGGGGTGTCTAAACCTAGGGCTCAAC			82906
Query 541		CTTGGGTGCGCATCCAAAGACTGCATAGCTTGAGTACAGAAGAGGAAAGTGGAAATCCACGT			600
Sbjct 82905		CTTGGGTGCGCATCCAAAGACTGCATAGCTTGAGTACAGAAGAGGAAAGTGGAAATCCACGT			82846
Query 601		GTAGCGGTGAA-TGCGTAGAGATGTGGAT-AACACCAAGTGGCGAAGGCGACTT-TGCGGC			657
Sbjct 82845		GTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAAACACCAAGTGGCGAAGGCGACTTTCTGGGC			82786
Query 658		TGTATCTGACGCTGAGTGCGC-AA-GCGT-GGGAGCAAACAGCATTAGATACC-TGGTAG			713
Sbjct 82785		TGTAAGTACGCTGAG-GCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCTTGGTAG			82727
Query 714		TCCACGCCTTCA-CGATG-ATGCTAGGCGTAAGGG-TTTCGATACCTT-GGTGCCGA			766
Sbjct 82726		TCCACGCCGTAAACGATGAATGCTAGGTGTTAGGGGTTTCGATACCTTGGTGCCGA			82670

ภาพภาคผนวก ง 21 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อแบคทีเรียรหัส S238 ที่ตรงกับเบสของ

Paenibacillus alvei DSM 29 PAV_2c 95% ที่ Accession number NZ_AMBZ01000002.1

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1478 bits(800)	0.0	800/800(100%)	0/800(0%)	Plus/Plus
Query 1	GTAGAGATCTTTTCGGGATCTTGAGAGCGGCGTACGGGTGCGGAACACGTGTGCAACCTGC	60		
Sbjct 16	GTAGAGATCTTTTCGGGATCTTGAGAGCGGCGTACGGGTGCGGAACACGTGTGCAACCTGC	75		
Query 61	CTTTATCTGGGGGATAGCCTTTTCGAAAGGGAGATTAATACCCCATATATATTGAGTGGC	120		
Sbjct 76	CTTTATCTGGGGGATAGCCTTTTCGAAAGGGAGATTAATACCCCATATATATTGAGTGGC	135		
Query 121	ATCACTTAATATTGAAAACCTCCGGTGGATAGAGATGGGCACGCGCAAGATTAGATAGTTG	180		
Sbjct 136	ATCACTTAATATTGAAAACCTCCGGTGGATAGAGATGGGCACGCGCAAGATTAGATAGTTG	195		
Query 181	GTGAGGTAACGGCTCACCAGTCTGCGATCTTTAGGGGGCTGAGAGGGTGATCCCCAC	240		
Sbjct 196	GTGAGGTAACGGCTCACCAGTCTGCGATCTTTAGGGGGCTGAGAGGGTGATCCCCAC	255		
Query 241	ACTGGTACTGAGACACGGACCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGAGGAATATTGGACAA	300		
Sbjct 256	ACTGGTACTGAGACACGGACCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGAGGAATATTGGACAA	315		
Query 301	TGGGTGCAAGCCTGATCCAGCCATCCCGCGTGAAGGACGACGGCCCTATGGGTTGTAAC	360		
Sbjct 316	TGGGTGCAAGCCTGATCCAGCCATCCCGCGTGAAGGACGACGGCCCTATGGGTTGTAAC	375		
Query 361	TTCTTTTGTATAGGGATAAACCTAGATACGTGTATCTAGCTGAAGGTACTATACGAATAA	420		
Sbjct 376	TTCTTTTGTATAGGGATAAACCTAGATACGTGTATCTAGCTGAAGGTACTATACGAATAA	435		
Query 421	GCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGGAGGGTGCAAGCGTTATCCGGA	480		
Sbjct 436	GCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGGAGGGTGCAAGCGTTATCCGGA	495		
Query 481	TTTATTGGGTTTAAAGGGTCCGTAGGCGGATTTGTAAGTCAGTGGTGAAATCTCACAGCT	540		
Sbjct 496	TTTATTGGGTTTAAAGGGTCCGTAGGCGGATTTGTAAGTCAGTGGTGAAATCTCACAGCT	555		
Query 541	TAACTGTGAAACTGCCATTGATACTGCAAGTCTTGAGTGTGTTGAAGTAGCTGGAATAA	600		
Sbjct 556	TAACTGTGAAACTGCCATTGATACTGCAAGTCTTGAGTGTGTTGAAGTAGCTGGAATAA	615		
Query 601	GTAGTGTAGCGGTGAAATGCATAGATATTACTTAGAACACCAATTGCGAAGGCAGGTTAC	660		
Sbjct 616	GTAGTGTAGCGGTGAAATGCATAGATATTACTTAGAACACCAATTGCGAAGGCAGGTTAC	675		
Query 661	TAAGCAACAACCTGACGCTGATGGACGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTG	720		
Sbjct 676	TAAGCAACAACCTGACGCTGATGGACGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTG	735		
Query 721	GTAGTCCACGCCGTAACGATGCTAACTCGTTTTTGGGCTTTCGGGTTTCAGAGACTAAGC	780		
Sbjct 736	GTAGTCCACGCCGTAACGATGCTAACTCGTTTTTGGGCTTTCGGGTTTCAGAGACTAAGC	795		
Query 781	GAAAGTGATAAGTTAGCCAC	800		
Sbjct 796	GAAAGTGATAAGTTAGCCAC	815		

ภาพภาคผนวก ง 22 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อแบคทีเรียรหัส *ISP2RR1* (ความยาว 800 คู่เบส)
เมื่อเทียบกับฐานข้อมูล *NCBI* โดยแสดงความเหมือนต่อลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อ

Chryseobacterium kwangyangense 100 %

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1478 bits(800)	0.0	800/800(100%)	0/800(0%)	Plus/Plus
Query 1	CGGATGAGTGGAGCTTGCTCCATGATTGACGGCGGACGGGTGAGTAATGCCTAGGAATC	60		
Sbjct 23	CGGATGAGTGGAGCTTGCTCCATGATTGACGGCGGACGGGTGAGTAATGCCTAGGAATC	82		
Query 61	TGCCTGGTAGTGGGGGATAACGTTTCGAAAGGAACGCTAATACCGCATACGTCCTACGGG	120		
Sbjct 83	TGCCTGGTAGTGGGGGATAACGTTTCGAAAGGAACGCTAATACCGCATACGTCCTACGGG	142		
Query 121	AGAAAGTGGGGGATCTTCGGACCTCACGCTATCAGATGAGCCTAGGTCGGATTAGCTAGT	180		
Sbjct 143	AGAAAGTGGGGGATCTTCGGACCTCACGCTATCAGATGAGCCTAGGTCGGATTAGCTAGT	202		
Query 181	TGGTGGGGTAATGGCCCAAGGCGACGATCCGTAAGTGGTCTGAGAGGATGATCAGTC	240		
Sbjct 203	TGGTGGGGTAATGGCCCAAGGCGACGATCCGTAAGTGGTCTGAGAGGATGATCAGTC	262		
Query 241	ACACTGGAAGTGAACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGAC	300		
Sbjct 263	ACACTGGAAGTGAACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGAC	322		
Query 301	AATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGTCTTCGGATTGTAAA	360		
Sbjct 323	AATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGTCTTCGGATTGTAAA	382		
Query 361	GCACTTTAAGTTGGGAGGAAGGGCAGTAAGTTAATACCTTGCTGTTTTGACGTTACCAAC	420		
Sbjct 383	GCACTTTAAGTTGGGAGGAAGGGCAGTAAGTTAATACCTTGCTGTTTTGACGTTACCAAC	442		
Query 421	AGAATAAGCACCGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGAAGGGTGCAAGCGTT	480		
Sbjct 443	AGAATAAGCACCGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGAAGGGTGCAAGCGTT	502		
Query 481	AATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCGCTAGGTGGTTCAGCAAGTTGGATGTGAAAGCC	540		
Sbjct 503	AATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCGCTAGGTGGTTCAGCAAGTTGGATGTGAAAGCC	562		
Query 541	CCGGGCTCAACCTGGGAATTGCATCCAAACTACTGAGCTAGAGTACGGTAGAGGGTGGT	600		
Sbjct 563	CCGGGCTCAACCTGGGAATTGCATCCAAACTACTGAGCTAGAGTACGGTAGAGGGTGGT	622		
Query 601	GGAATTTCTGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATAGGAAGGAACACCAAGTGGCGAAGGC	660		
Sbjct 623	GGAATTTCTGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATAGGAAGGAACACCAAGTGGCGAAGGC	682		
Query 661	GACCACCTGGACTGATACTGACACTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGA	720		
Sbjct 683	GACCACCTGGACTGATACTGACACTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGA	742		
Query 721	TACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGTCGACTAGCCGTTGGGATCCTTGAGATCTTA	780		
Sbjct 743	TACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGTCGACTAGCCGTTGGGATCCTTGAGATCTTA	802		
Query 781	GTGGCGCAGCTAACGCGATA	800		
Sbjct 803	GTGGCGCAGCTAACGCGATA	822		

ภาพภาคผนวก ง 23 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อแบคทีเรียรหัส *RRSPCA* (ความยาว 800 คู่เบส)
เมื่อเทียบกับฐานข้อมูล *NCBI* โดยแสดงความเหมือนต่อลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อ

Pseudomonas sp. 100 %

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1478 bits(800)	0.0	800/800(100%)	0/800(0%)	Plus/Plus
Query 1	GTAGAGATCTTTCGGGATCTTGAGAGCGGCGTACGGGTGCGGAACACGTGTGCAACCTGC	60		
Sbjct 16	GTAGAGATCTTTCGGGATCTTGAGAGCGGCGTACGGGTGCGGAACACGTGTGCAACCTGC	75		
Query 61	CTTTATCTGGGGGATAGCCTTTCGAAAGGGAGATTAATACCCCATATATATTGAGTGGC	120		
Sbjct 76	CTTTATCTGGGGGATAGCCTTTCGAAAGGGAGATTAATACCCCATATATATTGAGTGGC	135		
Query 121	ATCACTTAATATTGAAACTCCGGTGGATAGAGATGGGCACGCGCAAGATTAGATAGTTG	180		
Sbjct 136	ATCACTTAATATTGAAACTCCGGTGGATAGAGATGGGCACGCGCAAGATTAGATAGTTG	195		
Query 181	GTGAGGTAACGGCTCACCAAGTCTGCGATCTTTAGGGGGCCTGAGAGGGTGATCCCCAC	240		
Sbjct 196	GTGAGGTAACGGCTCACCAAGTCTGCGATCTTTAGGGGGCCTGAGAGGGTGATCCCCAC	255		
Query 241	ACTGGTACTGAGACACGGACCACTCTACGGGAGGCAGCAGTGAGGAATATTGGACAA	300		
Sbjct 256	ACTGGTACTGAGACACGGACCACTCTACGGGAGGCAGCAGTGAGGAATATTGGACAA	315		
Query 301	TGGGTGCAAGCCTGATCCAGCCATCCCGCGTGAAGGACGACGGCCCTATGGGTTGTAAAC	360		
Sbjct 316	TGGGTGCAAGCCTGATCCAGCCATCCCGCGTGAAGGACGACGGCCCTATGGGTTGTAAAC	375		
Query 361	TTCTTTTGTATAGGGATAAACCTAGATACGTGTATCTAGCTGAAGGTACTATACGAATAA	420		
Sbjct 376	TTCTTTTGTATAGGGATAAACCTAGATACGTGTATCTAGCTGAAGGTACTATACGAATAA	435		
Query 421	GCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGGAGGGTGCAAGCGTTATCCGGA	480		
Sbjct 436	GCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGGAGGGTGCAAGCGTTATCCGGA	495		
Query 481	TTTATTGGGTTTAAAGGGTCCGTAGGCGGATTTGTAAGTCAGTGGTGAAATCTCACAGCT	540		
Sbjct 496	TTTATTGGGTTTAAAGGGTCCGTAGGCGGATTTGTAAGTCAGTGGTGAAATCTCACAGCT	555		
Query 541	TAACTGTGAAACTGCCATTGATACTGCAAGTCTTGAGTGTGTTGAAGTAGCTGGAATAA	600		
Sbjct 556	TAACTGTGAAACTGCCATTGATACTGCAAGTCTTGAGTGTGTTGAAGTAGCTGGAATAA	615		
Query 601	GTAGTGTAGCGGTGAAATGCATAGATATTACTTAGAACACCAATTGCGAAGGCAGGTTAC	660		
Sbjct 616	GTAGTGTAGCGGTGAAATGCATAGATATTACTTAGAACACCAATTGCGAAGGCAGGTTAC	675		
Query 661	TAAGCAACAACGACGCTGATGGACGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTG	720		
Sbjct 676	TAAGCAACAACGACGCTGATGGACGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTG	735		
Query 721	GTAGTCCACGCCGTAAACGATGCTAACTCGTTTTTGGGCTTTCGGGTTTCAGAGACTAAGC	780		
Sbjct 736	GTAGTCCACGCCGTAAACGATGCTAACTCGTTTTTGGGCTTTCGGGTTTCAGAGACTAAGC	795		
Query 781	GAAAGTGATAAGTTAGCCAC	800		
Sbjct 796	GAAAGTGATAAGTTAGCCAC	815		

ภาพภาคผนวก ง 24 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อแบคทีเรียรหัส *LRSPCA2* (ความยาว 800 คู่เบส)
เมื่อเทียบกับฐานข้อมูล *NCBI* โดยแสดงความเหมือนต่อลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อ
Chryseobacterium kwangyangense 100 %

Paenibacillus alvei DSM 29 PAV_2c, whole genome shotgun sequence

Sequence ID: [ref|NZ_AMBZ01000002.1|](#) Length: 881196 Number of Matches: 6

Range 1: 82773 to 83462		GenBank	Graphics	▼ Next Match ▲ Previous Match	
Score	Expect	Identities	Gaps	Strand	
1253 bits(678)	0.0	686/690(99%)	0/690(0%)	Plus/Minus	
Query 1	GGAGTGCCTTGCACTCCTGATGGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTAGGTAACCTGC	60			
Sbjct 83462	GGAGTGCCTTGCACTCCTGATGGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTAGGTAACCTGC	83403			
Query 61	CCATAAGACTGGGATAACCCACGGAACGTGAGCTAATACCAGATAGGCATTTTCCTCGC	120			
Sbjct 83402	CCATAAGACTGGGATAACCCACGGAACGTGAGCTAATACCAGATAGGCATTTTCCTCGC	83343			
Query 121	ATGAGGGGAGATGAGAAAGGCGGAGCAATCTGCCACTTATGGATGGACCTGCGGCGCATT	180			
Sbjct 83342	ATGAGGGGAGATGAGAAAGGCGGAGCAATCTGTCACTTATGGATGGACCTGCGGCGCATT	83283			
Query 181	GCTAGTTGGTAAGGTAACGGCTTACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGA	240			
Sbjct 83282	GCTAGTTGGTAAGGTAACGGCTTACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGA	83223			
Query 241	TCGGCCCACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCGAGCAGTAGGGGATC	300			
Sbjct 83222	TCGGCCCACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCGAGCAGTAGGGGATC	83163			
Query 301	TTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAAGTGAAGGTTTTCGGAT	360			
Sbjct 83162	TTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAAGTGAAGGTTTTCGGAT	83103			
Query 361	CGTAAAGCTCTGTTGCCAGGGGAAGAACGCCCTAGGAGAGTAAGTCTCTAGGGTGACGGT	420			
Sbjct 83102	CGTAAAGCTCTGTTGCCAGGGGAAGAACGCCCTAGGAGAGTAAGTCTCTAGGGTGACGGT	83043			
Query 421	ACCTGAGAAGAAAGCCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGGGCG	480			
Sbjct 83042	ACCTGAGAAGAAAGCCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGGGCG	82983			
Query 481	AGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAGCGCGCGCAGGCGCAATGTAAGTTGGGTGTT	540			
Sbjct 82982	AGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAGCGCGCGCAGGCGCAATGTAAGTTGGGTGTT	82923			
Query 541	TAAACCTAGGGCTCAACCTTGGGTGCGATCCAAAAGTGCATAGCTTGAGTACAGAAGAGG	600			
Sbjct 82922	TAAACCTAGGGCTCAACCTTGGGTGCGATCCAAAAGTGCATAGCTTGAGTACAGAAGAGG	82863			
Query 601	AAAGTGGAAATTCACGTGTAGCGGTGAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAAGTGGCG	660			
Sbjct 82862	AAAGTGGAAATTCACGTGTAGCGGTGAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAAGTGGCG	82803			
Query 661	AAGGCGACTTTCTGGGCTGTAAGTACGCT	690			
Sbjct 82802	AAGGCGACTTTCTGGGCTGTAAGTACGCT	82773			

ภาพภาคผนวก ง 25 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของแบคทีเรีย RRTSA-6 ที่ตรงกับเบสของ

Paenibacillus alvei DSM 29 PAV_2c 99% ที่ Accession number

NZ_AMBZ01000002

ภาคผนวก จ

ผลการคัดเลือกแบคทีเรียละลายฟอสเฟตขั้นต้นและผลการวิเคราะห์ปริมาณฟอสเฟต

ตารางภาคผนวก จ 1 ผลการคัดเลือกเชื้อที่สามารถละลายฟอสเฟตได้ขั้นต้นบนอาหารแข็ง PVK agar

แบคทีเรียจาก stock culture			แบคทีเรียเอนโดไฟต์จากข้าว		
ลำดับ	รหัส แบคทีเรีย	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางวงใส (mm)	ลำดับ	รหัสแบคทีเรีย	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางวงใส (mm)
1	BF 1	6.5	1	ISP2RR5	6.5
2	BF 4	2.0	2	ISP2RS1	7.0
3	BF 5	1.5	3	ISP2RS4	8.5
4	BF 6	3.0	4	ISP2RS6	7.5
5	BF 9	4.5	5	ISP2RS8	2.0
6	BF 12	4.5	6	ISP2RL4	8.0
7	BF 15	3.5	7	ISP2RL5	2.0
8	BF 27	10.0	8	PCARR4	2.0
9	BF 28	2.0	9	PCARL4	13.0
10	BF 32	2.0	10	PCARL5	3.0
11	BF 41	2.0	11	PVKRS5	7.0
12	BF 55	4.5	12	PVKRS7	10.0
13	BF 59	5.0	13	PVKRS8	13.0
14	BF 61	5.0	14	PVKRS10	10.0
15	BF 63	3.0	15	PVKRL1	7.0
16	BF 64	3.0	16	PVKRL2	5.0
17	BF 67	4.0	17	PVKRL7	4.0
18	BF 68	2.5	18	RRSPCA	2.0
19	S 1	2.0	19	RRSPCA5	2.0

ตารางภาคผนวก จ 1 (ต่อ)

แบคทีเรียจาก stock culture			แบคทีเรียเอนโดไฟต์จากข้าว		
ลำดับ	รหัส แบคทีเรีย	ขนาดเส้นผ่าน ศูนย์กลาง (mm)	ลำดับ	รหัสแบคทีเรีย	ขนาดเส้นผ่าน ศูนย์กลาง (mm)
20	S 3	2.5	20	RRSPCA6	4.5
21	S 4	2.5	21	RRSPCA-192	1.5
22	S 9	2.0	22	RRSTSA2	5.0
23	S 10	2.0	23	RRSTSA3	2.5
24	S 23	2.0	24	RRSTSA3-1	2.0
25	S 25	2.0	25	RRSTSA13	2.0
26	S 26	2.0	26	RRSPVK	2.0
27	S 28	3.5	27	RRSPVK	2.0
28	S 41	2.5	28	RRSPVK	2.0
29	S 45	4.5	29	RRSPVK-183	8.0
30	S 59	3.0	30	RRSPVK6-191	7.0
31	S 60	4.5	31	RRSISP3	5.0
32	S 68	4.5	32	RRSISP4	3.0
33	S 69	4.5	33	RSTSA3	8.5
34	S 83	3.0	34	RSPVK4	3.0
35	S 84	5.5	35	RSISP7-1	3.0
36	S 91	3.0	36	LRSTSA2	4.0
37	S 92	5.0	37	RRPCA-1	4.0
38	S 129	3.0	38	RRPCA-3	3.0
39	S 137	4.0	39	RRPCA-4	3.5
40	S 139	6.5	40	RSPCA-2	22.0

ตารางภาคผนวก จ 1 (ต่อ)

แบคทีเรียจาก stock culture			แบคทีเรียเอนโดไฟต์จากข้าว		
ลำดับ	รหัสแบคทีเรีย	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางวงใส (mm)	ลำดับ	รหัสแบคทีเรีย	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางวงใส (mm)
41	S 141	3.5	41	RSPCA-3	2.0
42	S 142	9.0	42	RLPCA-2	5.0
43	S 143	2.5	43	RLPCA-3	5.0
44	S 144	2.5	44	RRPVK-1	4.5
45	S 149	2.5	45	RRPVK-2	7.0
46	S 174	3.5	46	RRPVK-4	6.5
47	S 200	6.0	47	RSPVK-2	10
48	S 201	5.0	48	RLPVK-1	6.0
49	S 210	2.0	49	RLPVK-2	5.0
50	S 213	4.0	50	RRTSA-2	10.0
51	S 216	2.0	51	RRTSA-3	6.0
52	S 220	5.5	52	RRTSA-5	4.0
53	S 221	5.0	53	RRTSA-6	3.0
			54	RSTSA-1	5.0
			55	RSTSA-3	6.0
			56	RSISP2-1	2.5
			57	RSISP2-2	11.0
			58	RLISP2-1	3.0
			59	RLISP2-2	3.5

	60	<i>RLISP2-3</i>	6.0
	61	<i>W-RR</i> (น้ำสุดท้าย จากการล้างส่วนราก)	2.0
	62	<i>W-RS</i> (น้ำสุดท้าย จากการล้างส่วนลำต้น)	5.0

หมายเหตุ เชื้อจาก stock culture รหัสเชื้อ BF แยกเชื้อได้จากน้ำหมักชีวภาพ, รหัสเชื้อ S1-S174 แยกเชื้อได้จากดินแปลงเกษตรทั่วไป และรหัสเชื้อ S175-S239 แยกเชื้อได้จากดินรอบรากข้าวจากแปลงเกษตรอินทรีย์เชื้อเอนโดไฟท์ ลำดับ 1-17 แยกจากแปลง 1 ปี, ลำดับ 18-36 แยกจากแปลง 5 ปี, ลำดับ 37-62 แยกจากแปลงมากกว่า 10 ปี

รหัสเชื้อ

อักขรตำแหน่งที่ 1 R = Rice อักขรตำแหน่งที่ 2 R = Root, S = Stem, L =Leaves

อักขรตำแหน่งที่ 3 คืออาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้แยก ได้แก่ TSA, PVK, ISP2, PCA

ตัวเลขสุดท้ายคือหมายเลขไอโซเลท

ตารางภาคผนวก จ 2 ผลการวิเคราะห์ปริมาณฟอสเฟต

แบคทีเรียจาก stock culture			แบคทีเรียเอนโดไฟต์จากข้าว		
ลำดับ	รหัส แบคทีเรีย	ปริมาณฟอสเฟต (mgPO ₄ ²⁻ /L)	ลำดับ	รหัสแบคทีเรีย	ปริมาณฟอสเฟต (mgPO ₄ ²⁻ /L)
1	BF 1	178.84	1	ISP2RR5	12.54
2	BF 4	217.04	2	ISP2RS1	13.85
3	BF 5	58.95	3	ISP2RS4	13.67
4	BF 6	191.18	4	ISP2RS6	13.30
5	BF 9	176.32	5	ISP2RS8	14.57
6	BF 12	207.06	6	ISP2RL4	12.98
7	BF 15	209.97	7	ISP2RL5	13.21
8	BF 27	189.21	8	PCARR4	15.36
9	BF 28	187.96	9	PCARL4	14.24
10	BF 32	189.53	10	PCARL5	13.62
11	BF 41	132.69	11	PVKRS5	18.56
12	BF 55	183.95	12	PVKRS7	17.52
13	BF 59	168.30	13	PVKRS8	17.00
14	BF 61	168.08	14	PVKRS10	17.94
15	BF 63	196.38	15	PVKRL1	16.58
16	BF 64	179.15	16	PVKRL2	15.02
17	BF 67	220.75	17	PVKRL7	17.81
18	BF 68	154.31	18	RRSPCA	14.25
19	S 1	168.87	19	RRSPCA5	15.98
20	S 3	138.90	20	RRSPCA6	17.22
21	S 4	162.88	21	RRSPCA-192	14.59
22	S 9	163.51	22	RRSTSA2	114.32

ตารางภาคผนวก จ 2

แบคทีเรียจาก stock culture			แบคทีเรียเอนโดไฟต์จากข้าว		
ลำดับ	รหัสแบคทีเรีย	ปริมาณฟอสเฟต (mgPO ₄ ²⁻ /L)	ลำดับ	รหัสแบคทีเรีย	ปริมาณฟอสเฟต (mgPO ₄ ²⁻ /L)
23	S 10	201.89	23	RRSTSA3	16.21
24	S 23	156.27	24	RRSTSA3-1	16.92
25	S 25	168.38	25	RRSTSA13	17.21
26	S 26	118.30	26	RRSPVK	18.54
27	S 28	147.31	27	RRSPVK	14.26
28	S 41	258.49	28	RRSPVK	13.25
29	S 45	173.81	29	RRSPVK-183	52.22
30	S 59	182.37	30	RRSPVK6-1	92.79
31	S 60	205.03	31	RRSISP3	49.70
32	S 68	756.92	32	RRSISP4	35.80
33	S 69	766.35	33	RRSTSA3	97.88
34	S 83	776.57	34	RSPVK4	20.52
35	S 84	690.88	35	RSISP7-1	16.35
36	S 91	620.13	36	LRSTSA2	15.26
37	S 92	724.69	37	RRPCA-1	26.65
38	S 129	204.25	38	RRPCA-3	51.41
39	S 137	513.99	39	RRPCA-4	60.84
40	S 139	488.05	40	RSPCA-2	47.87
41	S 141	462.89	41	RSPCA-3	47.72
42	S 142	359.91	42	RLPCA-2	56.04
43	S 143	228.62	43	RLPCA-3	54.244

ตารางภาคผนวก จ 2 (ต่อ)

แบคทีเรียจาก stock culture			แบคทีเรียเอนโดไฟต์จากข้าว		
ลำดับ	รหัสแบคทีเรีย	ปริมาณฟอสเฟต ($\text{mgPO}_4^{3-}/\text{L}$)	ลำดับ	รหัสแบคทีเรีย	ปริมาณฟอสเฟต ($\text{mgPO}_4^{3-}/\text{L}$)
44	S 144	411.01	44	RRPVK-1	70.93
45	S 149	335.53	45	RRPVK-2	47.57
46	S 174	232.55	46	RRPVK-4	92.65
47	S 200	188.43	47	RSPVK-2	191.78
48	S 201	187.96	48	RLPVK-1	42.04
49	S 210	121.21	49	RLPVK-2	58.33
50	S 213	154.78	50	RRTSA-2	45.83
51	S 216	137.01	51	RRTSA-3	71.23
52	S 220	208.18	52	RRTSA-5	91.80
53	S 221	190.94	53	RRTSA-6	73.22
			54	RSTSA-1	69.93
			55	RSTSA-3	58.63
			56	RSISP2-1	65.95
			57	RSISP2-2	32.78
			58	RLISP2-1	73.17
			59	RLISP2-2	31.55
			60	RLISP2-3	67.49
			61	W-RR(น้ำ ล้างสุดท้าย)	97.68
			62	W-RS(น้ำล้าง สุดท้าย)	294.39