



ใบรับรองวิทยานิพนธ์
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (ปฐพีวิทยา)

ปริญญา

ปฐพีวิทยา

ปฐพีวิทยา

สาขา

ภาควิชา

เรื่อง การศึกษาประสิทธิภาพของอาหารที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงเชื้อ *Azospirillum brasilense*
และ *A. lipoferum*

The Study on the Efficiency of Appropriated Medium for the Culturing of
Azospirillum brasilense and *A. lipoferum*

นามผู้วิจัย นางสาวอรุณี คงสอน

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(รองศาสตราจารย์ธงชัย มาลา, Ph.D.)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(อาจารย์ศุภชัย อำคา, Ph.D.)

หัวหน้าภาควิชา

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์อรรถศิษฐ์ วงศ์มณีโรจน์, วท.ม.)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

(รองศาสตราจารย์กัญญา ชีระกุล, D.Agr.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ เดือน พ.ศ.

สืบสืงวี มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

การศึกษาประสิทธิภาพของอาหารที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงเชื้อ

Azospirillum brasilense และ *A. lipoferum*

The Study on the Efficiency of Appropriated Medium for the Culturing of

Azospirillum brasilense and *A. lipoferum*

โดย

นางสาวอรุณี คงสอน

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (ปฐพีวิทยา)

พ.ศ. 2553

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

อรุณี คงสอน 2553: การศึกษาประสิทธิภาพของอาหารที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงเชื้อ *Azospirillum brasilense* และ *A. lipoferum* ปรินญาวิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (ปฐพีวิทยา) สาขาปฐพีวิทยา ภาควิชาปฐพีวิทยา อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: รองศาสตราจารย์รัชชัย มาลา, Ph.D. 75 หน้า

การศึกษาประสิทธิภาพของอาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ *A. brasilense* และ *A. lipoferum* เพื่อใช้ในการแยกเชื้อบริสุทธิ์นี้แยกออกเป็น 2 การทดลอง การทดลองที่ 1 การศึกษาประสิทธิภาพของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงเชื้อ *A. brasilense* และ *A. lipoferum* วางแผนการทดลองแบบ 4 x 4 Factorial Experiment in Completely Randomized Design จำนวน 4 ซ้ำ ปัจจัยที่ 1 แหล่งคาร์บอน มี 4 ชนิด คือ กลูโคส ซูโครส กรดมาลิก และกรดซัคซินิก ปัจจัยที่ 2 ปริมาณของแหล่งคาร์บอน มี 4 ระดับ คือ 1, 5, 10 และ 20 กรัม/ลิตร ศึกษาในอาหาร MPSS ทั้งสภาพอาหารแข็ง และอาหารเหลวที่ไม่มีไนโตรเจนอนินทรีย์ ผลการศึกษาพบว่า กรดมาลิกเป็นแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ *A. brasilense* และ *A. lipoferum* มากที่สุด โคโลนีของอะโซสไปริลัมทั้ง 2 ชนิดที่เจริญบนอาหารแข็ง มีลักษณะกลม ขอบเรียบ สีขาวขุ่นเป็นมันวาว ผิวหน้าขุ่น ขนาด 1.62 และ 2.06 มิลลิเมตร เซลล์ติดสีแกรมลบ มีขนาด 0.8-1.0 และ 1.0-1.4 ไมโครเมตร ตามลำดับ มีลักษณะเป็นแท่ง โค้งเล็กน้อย สร้างเส้นที่หัวเซลล์ 1 เส้น เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวมีเซลล์มีชีวิต 3.89 และ 194.88×10^7 CFU/มิลลิลิตร ที่ 24 ชั่วโมง มีระยะเวลาในการแบ่งเซลล์ 60.6 และ 48 นาที และส่งเสริมให้มีการตรึงไนโตรเจนเท่ากับ 5.63 และ 4.82 ไมโครกรัม/100 มิลลิลิตร/วัน ในอาหารที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน โคโลนีมีลักษณะกลม ขอบเรียบ สีขาวขุ่นเป็นมันวาว ขนาด 2.31 มิลลิเมตร เซลล์ติดสี แกรมลบ มีลักษณะเป็นแท่ง โค้งเล็กน้อย สร้างเส้นที่หัวเซลล์ 1 เส้น ในอาหารเหลวที่อายุ 24 ชั่วโมง มีเซลล์มีชีวิตเท่ากับ 3.89×10^5 CFU/มิลลิลิตร แต่ปริมาณเชื้อในอาหารที่มีกรดมาลิก และกลูโคสไม่มีความแตกต่างกัน การทดลองที่ 2 ศึกษาปริมาณของกรดมาลิก และกลูโคสที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงเชื้อ *A. brasilense* และ *A. lipoferum* วางแผนการทดลองแบบ CRD (Completely Randomized Design) จำนวน 4 ซ้ำ ปริมาณของ กรดมาลิก และ กลูโคส มี 9 ระดับ คือ 1.0, 2.5, 5.0, 7.5, 10.0, 12.5, 15.0, 17.5 และ 20.0 กรัม/ลิตร ในอาหารเหลว MPSS ผลการทดลองพบว่ากรดมาลิก 2.5 กรัม/ลิตร เป็นปริมาณที่เหมาะสม ส่งเสริมให้มีเซลล์มีชีวิต 91.20 และ 74.10×10^7 CFU/มิลลิลิตร และมีระยะเวลาในการแบ่งเซลล์ 48.6 และ 49.2 นาที ตามลำดับ สูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ *A. brasilense* และ *A. lipoferum* ประกอบด้วย กรดมาลิก 2.5 กรัม/ลิตร $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 1.0 กรัม/ลิตร $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ 0.002 กรัม/ลิตร และ $MnSO_4 \cdot H_2O$ 0.002 กรัม/ลิตร และสูตรอาหารคัดเลือกเฉพาะสำหรับเชื้อ *A. lipoferum* มีปริมาณกลูโคสที่เหมาะสม 12.5 กรัม/ลิตร โดยส่งเสริมให้มีเซลล์มีชีวิต 30.19×10^8 CFU/มิลลิลิตร มีระยะเวลาในการแบ่งเซลล์ 45.6 นาที และสูตรอาหารคัดเลือกเฉพาะสำหรับเชื้อ *A. lipoferum* ประกอบด้วย กลูโคส (D-glucose) 12.5 กรัม/ลิตร $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 1.0 กรัม/ลิตร $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ 0.002 กรัม/ลิตร และ $MnSO_4 \cdot H_2O$ 0.002 กรัม/ลิตร

Arunee Kongsorn 2010: The Study on the Efficiency of Appropriated Medium for the Culturing of *Azospirillum brasilense* and *A. lipoferum*. Master of Science (Soil Science), Major Field: Soil Science, Department of Soil Science. Thesis Advisor: Associate Professor Thongchai Mala, Ph.D. 75 pages.

The study on the efficiency of appropriated medium for the culturing of *A. brasilense* and *A. lipoferum* was separated into two experiments. The experiment 1, study the effect of various carbon sources on growth *A. brasilense* and *A. lipoferum* in both solid and liquid N-free MPSS medium, was designed in 4 x 4 factorial experiment in completely randomized design with 4 replications. The first factors consisted of 4 types of carbon source (glucose, sucrose, malic acid and succinic acid), while, the another was the quantity of each carbon source (1, 5, 10 and 20 g/l). The result showed that malic acid is the best carbon source for enhancing growth of *A. brasilense* and *A. lipoferum*. Colonies of both species on MPSS medium were circular, entire, white color and convex with the size of colony diameter were 1.62 and 2.06 mm., respectively. The cell characteristic was Gram negative with the size at 0.8-1.0 and 1.0-1.4 μm respectively. General cell morphology of both species were rod, little curve with a polar flagellum. The population of *A. brasilense* and *A. lipoferum* detected in liquid medium for 24 hours were 3.89 and 194.88 x10⁷ CFU/ml, respectively. The generation time of them were 60.6 and 48 min and the nitrogen fixing activity of *A. brasilense* and *A. lipoferum* were 5.63 and 4.82 $\mu\text{g}/100 \text{ ml/day}$, respectively. The characters of *A. lipoferum* in glucose-MPSS medium was studied. The results showed that the bacterial colony was circular, entire, white color and convex with the size at 2.31 mm. The cell was Gram negative, little curve and with a polar flagellum. The population of *A. lipoferum* in liquid medium at 24 hours were 3.89 x10⁵ CFU/ml, however, the population was not different from that in malic acid as carbon source. The second experiment was the study of various levels of malic acid and glucose suitable for growth of *A. brasilense* and *A. lipoferum*. This experiment was completely randomized design with 4 replications. The levels of glucose and malic acid (1.0, 2.5, 5.0, 7.5, 10.0, 12.5, 15.0, 17.5 and 20.0 g/l) were studied in liquid MPSS medium. The result found that quantity of malic acid at 2.5 g/l is appropriated for growth of azospirillum. The population of *A. brasilense* and *A. lipoferum* were 91.20 and 74.10 x10⁷ CFU/ml with the generation time at 48.6 and 49.2 min., respectively. The appropriated medium for *A. brasilense* and *A. lipoferum* may be composed of malic acid 2.5 g/l, MgSO₄.7H₂O 1.0 g/l, FeCl₃.6H₂O 0.002 g/l, and MnSO₄.H₂O 0.002 g/l., while, the appropriated glucose level for isolation of *A. lipoferum* may be at 12.5 g/l that showed high growth of bacteria at 30.19 x10⁸ CFU/ml. The generation time of bacteria in this medium was at 45.6 min. Then, the appropriated selective medium of *A. lipoferum* may be composed of D-glucose 12.5 g/l, MgSO₄.7H₂O 1.0 g/l, FeCl₃.6H₂O 0.002 g/l and MnSO₄.H₂O 0.002 g/l.

Student's signature

Thesis Advisor's signature

กิตติกรรมประกาศ

ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.ธงชัย มาลา อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก และ ดร.ศุภชัย อ่ำคา อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่ให้คำปรึกษา แนะนำ และช่วยเหลือในการเรียน การค้นคว้าวิจัย ตลอดจนการทำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นอย่างดี กราบขอบพระคุณ รศ.ดร.ขงยุทธ โอสดสภา ผู้ทรงคุณวุฒิภายนอก และ ผศ.ดร. ชัยสิทธิ์ ทองจู ประธานการสอบ ที่ได้กรุณาให้คำปรึกษา และคำแนะนำเพิ่มเติมทำให้วิทยานิพนธ์เล่มนี้สมบูรณ์มากยิ่งขึ้น

ขอขอบคุณ คุณจงดี หารเอี่ยม ที่ให้ความช่วยเหลือในการทำการทดลอง และขอกราบขอบพระคุณ คุณพิมพ์ภัท หีบเงิน ที่คอยให้คำแนะนำทุกเรื่อง คอยเตือนสติ และเป็นกำลังใจ รวมถึงเป็นที่พึ่งทางใจและทางกายด้วยดีตลอดมา

สุดท้ายนี้ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ ครอบครัวที่รักทุกคน ซึ่งเป็นกำลังใจที่สำคัญที่สุดของข้าพเจ้า ทำให้ข้าพเจ้ามีกำลังใจ และสามารถผ่านพ้นอุปสรรคนานาประการมาได้ โดยเฉพาะคุณแม่ และพี่น้อง ที่ให้ความเข้าใจ สนับสนุน และคอยดูแลข้าพเจ้าเป็นอย่างดีตลอดมา

อรุณี กงสอน
เมษายน 2553

สารบัญ

| | หน้า |
|-----------------------------|------|
| สารบัญ | (1) |
| สารบัญตาราง | (2) |
| สารบัญภาพ | (4) |
| คำนำ | 1 |
| วัตถุประสงค์ | 3 |
| การตรวจเอกสาร | 4 |
| อุปกรณ์และวิธีการ | 26 |
| อุปกรณ์ | 26 |
| วิธีการ | 27 |
| ผลและวิจารณ์ | 31 |
| สรุปและข้อเสนอแนะ | 60 |
| สรุป | 60 |
| ข้อเสนอแนะ | 60 |
| เอกสารและสิ่งอ้างอิง | 61 |
| ภาคผนวก | 68 |
| ประวัติการศึกษา และการทำงาน | 75 |

สารบัญตาราง

| ตารางที่ | | หน้า |
|----------|---|------|
| 1 | ขนาดโคโลนีของเชื้อ <i>A. brasiliense</i> บนอาหารตัดแปลงที่มีชนิดและปริมาณคาร์บอนที่แตกต่างกัน | 33 |
| 2 | ขนาดโคโลนีของเชื้อ <i>A. lipoferum</i> บนอาหารตัดแปลงที่มีชนิดและปริมาณคาร์บอนที่แตกต่างกัน | 36 |
| 3 | ค่า \log_{10} ของปริมาณเซลล์ของเชื้อ <i>A. brasiliense</i> ในอาหารเหลวตัดแปลงที่มีชนิดและปริมาณคาร์บอนที่แตกต่างกัน ที่อายุ 24 ชั่วโมง | 41 |
| 4 | ค่า \log_{10} ของปริมาณเซลล์ของเชื้อ <i>A. lipoferum</i> ในอาหารเหลวตัดแปลงที่มีชนิดและปริมาณคาร์บอนที่แตกต่างกัน ที่อายุ 24 ชั่วโมง | 44 |
| 5 | ระยะเวลาในการแบ่งเซลล์ (ชั่วโมง) ของเชื้อ <i>A. brasiliense</i> ในอาหารเหลวตัดแปลงที่มีชนิดและปริมาณคาร์บอนที่แตกต่างกัน ตั้งแต่ 0 – 24 ชั่วโมง | 46 |
| 6 | ระยะเวลาในการแบ่งเซลล์ (ชั่วโมง) ของเชื้อ <i>A. lipoferum</i> ในอาหารเหลวตัดแปลงที่มีชนิดและปริมาณคาร์บอนที่แตกต่างกัน ตั้งแต่ 0 – 24 ชั่วโมง | 47 |
| 7 | การตรึงไนโตรเจนของเชื้อ <i>A. brasiliense</i> ในอาหารเหลวตัดแปลงที่มีชนิดและปริมาณคาร์บอนที่แตกต่างกัน ($\mu\text{g}/100 \text{ ml}$) | 51 |
| 8 | การตรึงไนโตรเจนของเชื้อ <i>A. lipoferum</i> ในอาหารเหลวตัดแปลงที่มีชนิดและปริมาณคาร์บอนที่แตกต่างกัน ($\mu\text{g}/100 \text{ ml}$) | 52 |
| 9 | ค่า \log_{10} ของปริมาณเซลล์ของเชื้อ <i>A. brasiliense</i> ในอาหารเหลวตัดแปลงที่มีกรดมาลิกเป็นแหล่งคาร์บอนที่อายุ 24 และ 30 ชั่วโมง | 55 |
| 10 | ค่า \log_{10} ของปริมาณเซลล์ของเชื้อ <i>A. lipoferum</i> ในอาหารเหลวตัดแปลงที่มีกรดมาลิกเป็นแหล่งคาร์บอน ที่อายุ 24 และ 30 ชั่วโมง | 57 |
| 11 | ค่า \log_{10} ของปริมาณเซลล์ของเชื้อ <i>A. lipoferum</i> ในอาหารเหลวตัดแปลงที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน ที่อายุ 24 และ 30 ชั่วโมง | 58 |
| 12 | ราคาของอาหาร NFB, MPSS และอาหารที่เสนอขึ้นใหม่สำหรับเชื้อ <i>A. brasiliense</i> และ <i>A. lipoferum</i> | 59 |

สารบัญตาราง (ต่อ)

| ตารางผนวกที่ | | หน้า |
|--------------|--|------|
| 1 | อัตราการเจริญเติบโตของเชื้อ <i>A. brasiliense</i> (\log_{10} ของปริมาณเซลล์) ในอาหารเหลวตัดแปลงที่มีชนิดและปริมาณคาร์บอนที่แตกต่างกัน | 69 |
| 2 | อัตราการเจริญเติบโตของเชื้อ <i>A. brasiliense</i> (\log_{10} ของปริมาณเซลล์) ในอาหารเหลวตัดแปลงที่มีชนิดและปริมาณคาร์บอนที่แตกต่างกัน | 70 |
| 3 | อัตราการเจริญเติบโตของเชื้อ <i>A. lipoferum</i> (\log_{10} ของปริมาณเซลล์) ในอาหารเหลวตัดแปลงที่มีชนิดและปริมาณคาร์บอนที่แตกต่างกัน | 71 |
| 4 | อัตราการเจริญเติบโตของเชื้อ <i>A. lipoferum</i> (\log_{10} ของปริมาณเซลล์) ในอาหารเหลวที่มีกรดมาลิกปริมาณต่าง ๆ | 72 |
| 5 | อัตราการเจริญเติบโตของเชื้อ <i>A. lipoferum</i> (\log_{10} ของปริมาณเซลล์) ในอาหารเหลวที่มีกลูโคสปริมาณต่าง ๆ | 73 |
| 6 | ราคาสารเคมีในการเตรียมอาหารสูตร NFB, MPSS และอาหารที่เสนอขึ้นใหม่สำหรับเชื้อ <i>A. brasiliense</i> และ <i>A. lipoferum</i> | 74 |

สารบัญภาพ

| ภาพที่ | | หน้า |
|--------|---|------|
| 1 | การใช้แหล่งคาร์บอนของอะโซสไปริลัม | 12 |
| 2 | กราฟการเติบโตของจุลินทรีย์เซลล์เดี่ยว | 18 |
| 3 | ลักษณะโคโลนีของเชื้อ <i>A. brasilense</i> ในอาหารที่มีแหล่งคาร์บอนต่างกัน | 32 |
| 4 | ลักษณะโคโลนีของเชื้อ <i>A. brasilense</i> และ <i>A. lipoferum</i> ที่เจริญบนอาหารสูตร MPSS | 33 |
| 5 | ลักษณะการติดสีแกรมของ <i>A. brasilense</i> (A) และ <i>A. lipoferum</i> (B) ภายใต้กำลังขยาย 100 เท่า | 35 |
| 6 | ลักษณะโคโลนีของเชื้อ <i>A. lipoferum</i> ในอาหารที่มีแหล่งคาร์บอนต่างกัน | 37 |
| 7 | ลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ของเชื้อ <i>A. brasilense</i> (A) และ <i>A. lipoferum</i> (B) (F คือ polar flagellum) ภายใต้กำลังขยาย 100 เท่า | 38 |
| 8 | โครงสร้างแคปซูล (C) ของเชื้อ <i>A. brasilense</i> ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ที่กำลังขยาย 100 เท่า | 40 |
| 9 | อัตราการเจริญเติบโตของเชื้อ <i>A. brasilense</i> ในอาหารดัดแปลงสูตรต่าง ๆ ที่มีกรดมาลิก(ก) กรดซัคซินิก(ข) กลูโคส(ค) และซูโครส(ง) เป็นแหล่งคาร์บอน | 42 |
| 10 | อัตราการเจริญเติบโตของเชื้อ <i>A. lipoferum</i> ในอาหารดัดแปลงสูตรต่าง ๆ ที่มีกรดมาลิก(ก) กรดซัคซินิก(ข) กลูโคส(ค) และซูโครส(ง) เป็นแหล่งคาร์บอน | 45 |
| 11 | ความสัมพันธ์ระหว่างค่า OD ₂₃₀ กับ log ₁₀ (ปริมาณเซลล์) ของเชื้อ <i>A. brasilense</i> ในอาหารดัดแปลงสูตรต่าง ๆ ที่มีกรดมาลิก(ก) กรดซัคซินิก(ข) กลูโคส(ค) และซูโครส(ง) เป็นแหล่งคาร์บอน | 48 |
| 12 | ความสัมพันธ์ระหว่างค่า OD ₂₃₀ กับ log ₁₀ (ปริมาณเซลล์) ของเชื้อ <i>A. lipoferum</i> ในอาหารดัดแปลงสูตรต่าง ๆ ที่มีกรดมาลิก(ก) กรดซัคซินิก(ข) กลูโคส(ค) และซูโครส(ง) เป็นแหล่งคาร์บอน | 49 |
| 13 | ลักษณะการเจริญเติบโตของเชื้อ <i>A. brasilense</i> ในอาหารที่มีกรดมาลิก (ก) <i>A. lipoferum</i> ในอาหารที่มีกรดมาลิก(ข) และ <i>A. lipoferum</i> ในอาหารที่มีกลูโคส (ค) เป็นแหล่งคาร์บอนในอาหารเหลวปลอดไนโตรเจน | 56 |

การศึกษาประสิทธิภาพของอาหารที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงเชื้อ

Azospirillum brasilense และ *A. lipoferum*

The Study on the Efficiency of Appropriated Medium for the Culturing of

Azospirillum brasilense and *A. lipoferum*

คำนำ

อะโซสปิริลลัม (*azospirillum*) เป็นแบคทีเรียที่สามารถตรึงไนโตรเจนได้จากบรรยากาศ ส่งเสริมการเจริญเติบโต และการให้ผลผลิตของพืช เช่น เมล็ดพืชอาหารสัตว์ ถั่ว และมะเขือเทศ (Okon, 1994) นอกจากความสามารถในการตรึงไนโตรเจนแล้ว อะโซสปิริลลัมยังสามารถสร้างฮอร์โมนของพืชได้ Akbari *et al.* (2007) รายงานว่าฮอร์โมน indole acetic acid (IAA) ที่ผลิตโดยเชื้ออะโซสปิริลลัม ส่งเสริมการเจริญเติบโตของรากข้าวสาลีที่ปลูกด้วยเมล็ด โดยการใส่เชื้อดังกล่าวมีผลทำให้ความยาวราก น้ำหนักแห้งของราก และขนรากเพิ่มขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับ Maria *et al.* (2002) ที่ทดสอบกับข้าวสาลีโดยการใส่เชื้อ *A. brasilense* พบว่ามวลชีวภาพ ผลผลิต และความเข้มข้นของไนโตรเจน สูงกว่าการไม่ใส่เชื้อ ซึ่งแสดงให้เห็นว่า *A. brasilense* ส่งเสริมการเจริญเติบโตของข้าวสาลีโดยกระตุ้นการดูดใช้ในโตรเจนของราก พืช C₄ เช่น ข้าวโพด อ้อย เป็นพืชอาศัยของ *A. lipoferum* มากกว่า *A. brasilense* ที่พบอาศัยอยู่ร่วมกับพืช C₃ เช่น ข้าวสาลี ข้าวโอ๊ต ความสามารถในด้านต่าง ๆ ของเชื้อนั้นจำเป็นต้องมีการคัดเลือกเพื่อให้ได้สายพันธุ์ที่มีความเหมาะสมตรงตามวัตถุประสงค์ของงาน

A. brasilense และ *A. lipoferum* เป็นแบคทีเรีย 2 ชนิด ที่มีการนำมาใช้ประโยชน์กันอย่างกว้างขวางในรูปของปุ๋ยชีวภาพ นอกจากนี้จุลินทรีย์ทั้ง 2 ชนิดนี้มีความสามารถในการใช้แหล่งคาร์บอนที่แตกต่างกัน เพราะความแตกต่างของเมแทบอลิซึมที่เกิดขึ้นของจุลินทรีย์ (Martinez *et al.*, 1984) เมื่อพิจารณาความสามารถในการใช้แหล่งคาร์บอนที่ต่างกันของอะโซสปิริลลัมพบว่า *A. lipoferum* สามารถใช้ กลูโคส (glucose) กลีเซอรอล (glycerol) แมนนิทอล (mannitol) และซอร์บิทอล (sorbitol) เป็นแหล่งคาร์บอนได้ ส่วน *A. brasilense* ใช้กลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอน *A. amazonense* ใช้ กลูโคส และ ซูโครส (sucrose) เป็นแหล่งคาร์บอน *A. halopraeferens* ใช้กลีเซอรอล และ แมนนิทอลเป็นแหล่งคาร์บอน ส่วน *A. irakense* ใช้กลูโคส เพกติน (pectin) และ ซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอน (Okon, 1994) งานวิจัยของ Loh *et al.* (1984) พบว่า *A. brasilense* Sp7 เจริญเติบโตอย่างรวดเร็วในอาหาร AZO ที่ลดความเข้มข้นของไนโตรเจน และซั๊กซินेट ที่เป็น

แหล่งของคาร์บอนลง และไม่เจริญเติบโตในอาหารที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนเพียงอย่างเดียว ในทางตรงกันข้าม *A. lipoferum* Sp59b สามารถเจริญเติบโตได้ดีในอาหารที่มีซัคซิเนต หรือกลูโคส ผสมอยู่ ปัจจุบันนี้มีอาหารไม่กี่สูตรที่ใช้เลี้ยงเชื้ออะโซสไปริลลัม ได้แก่ สูตรของ Okon, Dobereiner, สูตร modified peptone succinate salts (MPSS) และ potato agar (BMS) ซึ่งสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อเหล่านี้ไม่สามารถแยกชนิดของเชื้ออะโซสไปริลลัมออกจากกันได้อย่างชัดเจนนัก จึงต้องอาศัยความแตกต่างของการใช้แหล่งคาร์บอนของจุลินทรีย์มาประยุกต์ใช้ เพื่อพัฒนาสูตรอาหารที่เหมาะสม การพัฒนาสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อมีความเจาะจง และเหมาะสมกับเชื้อ *A. brasilense* และ *A. lipoferum* ซึ่งเป็นปฏิกิริยาที่สำคัญ จึงเป็นหนทางที่น่าสนใจและต้องมีการพัฒนาเพื่อความสะดวกในการจัดจำแนกเชื้อเบื้องต้นต่อไป

วัตถุประสงค์

1. ศึกษาประสิทธิภาพของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงเชื้อ *A. lipoferum* และ *A. brasiliense*
2. ศึกษาลักษณะการเจริญเติบโตของเชื้อ *A. lipoferum* และ *A. brasiliense* ในอาหาร MPSS ดัดแปลง
3. สร้างสูตรอาหารที่เหมาะสมสำหรับเชื้อ *A. lipoferum* และ *A. brasiliense*



การตรวจเอกสาร

1. อะโซสไปริลลัม (azospirillum)

อะโซสไปริลลัมเป็นแบคทีเรียที่มีความสามารถในการตรึงไนโตรเจนจากอากาศได้ในสภาพที่มีออกซิเจนเล็กน้อย (microaerobic condition) เจริญได้ดีในบรรยากาศปกติเมื่อมีเกลือของไนโตรเจนอยู่ด้วย ต้องการออกซิเจนในการเจริญเติบโต หรืออาจใช้ในเตรตเป็นตัวรับอิเล็กตรอนได้ แต่อาจเฟอร์เมนต์ได้เล็กน้อย เมื่อออกซิเจนจำกัดอย่างรุนแรง ไนเตรตจะเปลี่ยนเป็นไนไตรต์หรือไนตรัสออกไซด์ หรือแก๊สไนโตรเจน อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตอยู่ระหว่าง 35 ถึง 37 องศาเซลเซียส อาศัยอยู่อย่างอิสระในดิน หรืออาศัยอยู่ที่รากของธัญพืช หญ้า และพืชหัว โดยไม่ชักนำให้เกิดปม (ธงชัย, 2546)

1.1 การจำแนกชนิดของเชื้ออะโซสไปริลลัม

อะโซสไปริลลัมเป็นแบคทีเรีย gram negative ซึ่งตามการจัดจำแนกของ Jame *et al.* (2001) ได้จำแนกเชื้ออะโซสไปริลลัมไว้ดังนี้

Phylum Proterobacteria phy. Nov.

Class Alphaproteobacteria

Order Rhodospirillales

Family Rhodospirillaceae

Genus Azospirillum

จากรายงานของ Okon (1994) ได้รายงานเกี่ยวกับลักษณะของเชื้ออะโซสไปริลลัมแต่ละชนิดไว้ดังนี้

1) *A. amazonense* เซลล์มีขนาด 0.9-1.0 ไมโครเมตร ไม่สร้างแส้รอบเซลล์ (lateral flagella) เจริญเติบโตได้ดีที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ไม่ต้องการไบโอติน (biotin) ในการเจริญเติบโต และไม่สามารถใช้ ซิเตรต (citrate) กลีเซอรอล แมนนิทอล และซอบิทอลเป็นแหล่งคาร์บอนได้

2) *A. brasilense* รูปร่างแบบ vibrioid สร้างแสร้งรอบเซลล์ เซลล์มีขนาด 1.0-1.2 ไมโครเมตร เจริญเติบโตได้ดีที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส *A. brasilense* ไม่สามารถใช้ซิงเทรต กลูโคส แมนนิทอล แมนโนส (mannose) ไรโบส (ribose) ซอบิทอล และซูโครสเป็นแหล่งของ คาร์บอนในการเจริญเติบโตบนอาหารปลอดไนโตรเจนกึ่งแข็ง และไม่ต้องการไบโอตินในการ เจริญเติบโต พบอาศัยอยู่มากกับพืช C₃ เช่น ข้าวสาลี ข้าวบาร์เลย์ ข้าว ข้าวโอต ข้าวไรย์ เป็นต้น (ธงชัย, 2546)

3) *A. halopraeferens* เซลล์มีขนาด 0.7-1.4 ไมโครเมตร ไม่สร้างแสร้งรอบเซลล์ เจริญเติบโตได้ดีที่อุณหภูมิ 41 องศาเซลเซียส ไม่สามารถใช้ กาแลกโตส (galactose) กลูโคส ซอบิทอล และซูโครส เป็นแหล่งคาร์บอนได้ ต้องการไบโอตินในการเจริญเติบโต

4) *A. irakense* เซลล์มีขนาด 0.6-0.9 ไมโครเมตร สร้างแสร้งรอบเซลล์ เจริญเติบโตได้ดี ที่อุณหภูมิ 33 องศาเซลเซียส ไม่สามารถใช้ฟรุกโตส (fructose) กลีเซอรอล แมนนิทอล และซอบิทอล เป็นแหล่งคาร์บอนได้ และไม่ต้องการไบโอตินในการเจริญเติบโต

5) *A. lipoferum* เป็นแบคทีเรีย gram negative รูปร่างแบบ vibrioid มีขนาดประมาณ 1.0 μm เมื่อมีอายุมากจะมีรูปร่างได้หลายแบบ (pleomorphism) เมื่อเลี้ยงในสภาวะที่มีออกซิเจน และมีสภาพเป็นด่าง เคลื่อนที่โดยใช้เส้นที่ขั้วเซลล์ (polar flagella) เส้นเดียว บนอาหารแข็งเคลื่อนที่ โดยใช้แอสบริเวนด้านข้าง เป็นพวก chemoorganotroph (ศุภยงค์, 2547) สามารถใช้กลูโคสเป็น แหล่งคาร์บอนในอาหารปลอดไนโตรเจนกึ่งแข็ง (semi solid N-free medium) ที่มีไบโอติน เนื่องจากต้องการไบโอตินในการเจริญเติบโต โดย *A. lipoferum* พบอาศัยอยู่มากกับพืช C₄ เช่น ข้าวโพด เป็นต้น (ธงชัย, 2546) Enrique (1982) พบว่าโคโลนีของ *Azospirillum* spp. แตกต่างจาก โคโลนีของ diazotrophs อื่น ๆ โดยจะมีสีแดงสดในอาหารที่มี congo red ผสมอยู่

Brenner *et al.* (2005) รายงานลักษณะทางสัณฐานวิทยาในอาหารเหลว modified peptone succinate salts (MPSS) ของ *A. lipoferum* และ *A. brasilense* ว่าจะเจริญเติบโตอย่างรวดเร็ว เซลล์มีลักษณะเป็นแท่งบิดเป็นเกลียวเล็กน้อย มีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 1.0 ไมโครเมตร Brenner และ Staley (2005) รายงานว่า *A. lipoferum* และ *A. brasilense* จะแสดง ลักษณะของแคปซูลเมื่ออยู่ในสภาพที่สูญเสียน้ำ และอุณหภูมิไม่เหมาะสมในสภาพขาดแคลน อาหาร

1.2 ประโยชน์ที่พืชได้รับจากเชื้ออะโซสไปริลัม

1.2.1 การเพิ่มผลผลิตพืช

อะโซสไปริลัมสามารถตรึงไนโตรเจนจากบรรยากาศให้อยู่ในรูปของแอมโมเนียที่พืชสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ ในสภาพที่มีออกซิเจนเล็กน้อย Maria *et al.* (2002) รายงานว่าการใส่เชื้อ *A. brasilense* ทำให้ข้าวสาลี มีมวลชีวภาพ ผลผลิต และความเข้มข้นของไนโตรเจนสูงกว่าการไม่ใส่เชื้อ และยังส่งเสริมการดูดใช้ในโตรเจนของราก

Martin *et al.* (2008) ศึกษาผลของการใส่เชื้อ *A. brasilense* กับการเพิ่มผลผลิตของพืชในพื้นที่การเกษตร เพื่อศึกษาจำนวนผลผลิตของข้าวสาลี (*Triticum aestivum* L.) โดยการคลุกเมล็ดด้วยเชื้อเหลวของ *A. brasilense* สายพันธุ์ INTA Az-39 ภายใต้สภาพแปลงที่แห้งแล้งของประเทศอาเจนตินา ทำการศึกษาในฤดูปลูกข้าวสาลีในปี 2002-2006 แบ่งการทดลองเป็นการใส่เชื้อและไม่ใส่เชื้อ ทำการทดลองในแปลง 297 พื้นที่ ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าการคลุกเมล็ดทำให้พืชมีความแข็งแรง มีขนาดต้นใหญ่กว่า และมีการสะสมน้ำหนักแห้งของต้นและรากมากกว่า (12.9 และ 22.0 % ตามลำดับ) นอกจากนี้การใส่เชื้อยังเพิ่มปริมาณผลผลิตเมล็ดถึง 6.1% และให้ผลผลิต 41.6 กก./ไร่ และมีผลที่ตอบสนองเป็นบวกถึง 70% ของพื้นที่จำนวนแปลงทดลองทั้งหมด ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับผลผลิตที่เก็บเกี่ยวได้ ปุ๋ย การปลูกพืชอื่น และการจัดการดิน แต่อย่างไรก็ตาม ก็มีตอบสนองต่อการใส่เชื้ออย่างมาก ในการศึกษาจึงแนะนำใส่เชื้อ *A. brasilense* เพื่อส่งเสริมให้ผลผลิตของข้าวสาลีสูงขึ้น

Albrecht *et al.* (1981) และ Patriquin *et al.* (1983) รายงานว่า เชื้ออะโซสไปริลัมสามารถเพิ่มผลผลิตให้แก่พืช ซึ่งไม่ใช่ผลจากการตรึงไนโตรเจนเท่านั้น เนื่องจากเชื้ออะโซสไปริลัมสามารถรีดิวซ์ไนเตรต เพิ่มการละลายของฟอสเฟต สังเคราะห์สารปฏิชีวนะ และสารตั้งต้นในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช รวมถึงฮอร์โมนพืช (phytohormones) และซิเดโรฟอรัส (siderophores) รวมไปถึงการพัฒนาของรากซึ่งจะทำให้พืชหาน้ำและดูดธาตุอาหารได้ดีขึ้น (Pandey, 1998; Jofré, 1998; Olubayi, 1998; Fallik, 1996; Steenhoudt, 2000)

Fulchieri and Frion (1994) ศึกษาผลของการใช้เชื้ออะโซสไปริลัมที่มีต่อผลผลิตข้าวโพด โดยใช้ *A. brasilense* (AZ 39), *A. lipoferum* (AZ 30) and *A. brasilense* ATCC 29745 strain Sp 7 พบว่าเชื้อ *A. brasilense* สามารถเพิ่มน้ำหนักแห้งของต้นข้าวโพดที่ปลูกในภาชนะปลูก เป็นระยะเวลา 50 วันได้ จาก 380 มก./กระถาง เป็น 523 มก./กระถาง และสามารถเพิ่ม

น้ำหนักเมล็ดข้าวโพดจาก 446.72 กก./ไร่ (ไม่ใส่เชื้อและปุ๋ย) เป็น 711.52 กก./ไร่ ซึ่งมีค่าเทียบเท่ากับผลผลิตที่ได้จากการใส่ปุ๋ยยูเรีย 9.6 กก./ไร่ ที่มีผลผลิตเท่ากับ 659.52 กก./ไร่

Osmar *et al.* (2004) ศึกษาผลของเชื้ออะโซสไปริลัมที่มีต่อข้าวโพดในสภาพแปลง โดยใช้ *Azospirillum* sp. RAM-7 และ *Azospirillum* RAM-5 พบว่า เชื้อดังกล่าวสามารถช่วยลดการใช้ปุ๋ยไนโตรเจนได้ 40 %

1.2.2 การสร้างสารส่งเสริมการเจริญเติบโต

Azospirillum sp. มีความสามารถในการผลิตฮอร์โมนพืช รวมทั้งโพลีเอมีน และกรดอะมิโนในเซลล์ (Thuler *et al.*, 2003) สำหรับ *A. brasilense* สามารถสร้างฮอร์โมน IAA ที่เพิ่มความยาวของราก พื้นที่ผิวของราก และน้ำหนักแห้งของราก (El-Khawas and Adachi, 1999; Molla *et al.*, 2001) และมีความสามารถในการตรึงไนโตรเจนทางชีวภาพ และเพิ่มกิจกรรมของ glutamate dehydrogenase และ glutamine synthetase (Ribaud *et al.*, 2001) อะโซสไปริลัมสามารถสร้างฮอร์โมนพวกออกซิน (Lambrecht *et al.*, 2000) และในบางครั้งสร้างไซโตไคนินและจิบเบอเรลลินด้วย (Bottini *et al.*, 1989) นอกจากนี้ Fallik *et al.* (1994) รายงานว่าการใส่เชื้ออะโซสไปริลัมในการปลูกพืชจะช่วยให้พืชมีความหนาแน่นและความยาวของขนรากมากขึ้น เป็นผลให้รากมีพื้นที่ผิวสัมผัสเพิ่มมากขึ้น

2. อาหารที่ใช้เลี้ยงเชื้ออะโซสไปริลัม

อาหารเลี้ยงเชื้อ (culture medium) หมายถึง อาหารที่มีส่วนประกอบที่เอื้ออำนวยให้จุลินทรีย์เจริญ และแบ่งเซลล์ โดยจุลินทรีย์ต่างชนิดกันมีความต้องการสารอาหาร ตลอดจนสภาพความเป็นกรดต่างของอาหารที่แตกต่างกัน ซึ่งอาหารเลี้ยงเชื้อทั่วไปควรมีลักษณะดังนี้ (ภาควิชาจุลชีววิทยา, 2544)

- 1) มีธาตุอาหารและความเข้มข้นที่เหมาะสมต่อการเจริญของจุลินทรีย์
- 2) มี pH ที่เหมาะสมกับการเจริญของจุลินทรีย์
- 3) ปราศจากสารพิษ ที่มีผลต่อการเจริญของจุลินทรีย์
- 4) ไม่มีสิ่งมีชีวิตใด ๆ อยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อนั้น

ลักษณะความต้องการอาหารของแบคทีเรียที่ต่างกันนั้นขึ้นกับประเภท โดยเฉพาะแหล่งของพลังงาน และคาร์บอน ตลอดจนสารอาหารอื่น ๆ ที่สะท้อนให้เห็นความหลากหลายเชิงเมแทบอลิซึม (metabolic diversity) ดังนั้นอาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเชื้ออะซิโอสไปริลลัมจำเป็นต้องมีสารอาหารที่เหมาะสมกับการเจริญเติบโตของเชื้อและถูกต้องตามวัตถุประสงค์ของการใช้งาน ซึ่งสามารถจำแนกเป็นประเภทของอาหารเลี้ยงเชื้อได้ดังนี้

1) อาหารเพาะเลี้ยงทั่วไป (basic media)

อาหารชนิดนี้เป็นอาหารที่ประกอบด้วยสารที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ทั่ว ๆ ไปที่ไม่ต้องการสารอาหารพิเศษเพิ่มเติม อาหารเลี้ยงเชื้อประเภทนี้นิยมใช้เพาะเลี้ยงเชื้อที่แยกบริสุทธิ์แล้ว หรือเก็บไว้เป็นเชื้อคงคลัง ตัวอย่างอาหารเพาะเลี้ยงทั่วไป ได้แก่ nutrient broth และ nutrient agar เป็นต้น

2) อาหารเพาะเลี้ยงเสริมสารพิเศษ (enriched media)

เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมสารพิเศษที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์บางชนิด เช่น เปปโตน วิตามิน เป็นต้น

3) อาหารเพาะเลี้ยงเพื่อการเลือกจำเพาะ (selective media)

เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่เพิ่มสารยับยั้งมากกว่าหนึ่งชนิด เพื่อยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ที่ไม่ต้องการ และส่งเสริมการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ที่ต้องการได้ดี จึงเปรียบเสมือนเป็นการเลือกจุลินทรีย์เฉพาะชนิดที่ต้องการให้เจริญเท่านั้น

อาหารที่มักนิยมใช้เลี้ยงเชื้ออะซิโอสไปริลลัมโดยทั่ว ๆ ไปคือ สูตร N-free bromothymol blue medium (Dobereiner *et al.* 1976) ที่ใช้ในการแยกเชื้อบริสุทธิ์ ซึ่งมีกรดมาลิก เป็นแหล่งคาร์บอน ไม่มีแหล่งไนโตรเจน และ Azospirillum medium (Okon *et al.* 1997) สำหรับการเพาะเลี้ยงทั่วไป ประกอบไปด้วย NH_4Cl และสารสกัดจากยีส (yeast extract) เป็นแหล่งของไนโตรเจน สารเร่งการเจริญเติบโต (growth factors) กรดมาลิก เป็นแหล่งคาร์บอน และมี K_2HPO_4 และ KH_2PO_4 เป็นแหล่งของฟอสเฟต

3. ปัจจัยที่มีผลต่อการเลี้ยงเชื้ออะโซสไปริลลัม

3.1 แหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงาน

แบคทีเรียมืดนั้นจะมีความต้องการอาหารแตกต่างกันมาก บางชนิดต้องการอาหารที่ซับซ้อน แต่ในบางชนิดก็เจริญในอาหารที่ง่าย ๆ ได้ ลักษณะการดำรงชีวิตของจุลินทรีย์นั้นสามารถแบ่งตามความต้องการของแหล่งพลังงาน และแหล่งคาร์บอน (Bergey, 1974 ; ควงพร, 2537) ได้ดังนี้

3.1.1. แบ่งตามแหล่งคาร์บอน (carbon source)

แหล่งคาร์บอน หมายถึง สารประกอบที่มีคาร์บอนเป็นองค์ประกอบอยู่ด้วยความต้องการคาร์บอนของจุลินทรีย์มีอยู่ในรูปต่าง ๆ กัน ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิดของจุลินทรีย์ กล่าวคือ จุลินทรีย์พวกสร้างอาหารได้เอง (autotrophs) สามารถใช้กระบวนการสังเคราะห์แสงนำเอาคาร์บอนไดออกไซด์ มาใช้ในการสร้างสารประกอบอินทรีย์ต่าง ๆ แก่เซลล์ได้ นอกจากนี้แล้วพวก autotrophs ยังสามารถใช้เกลือคาร์บอเนตได้อีกด้วย ส่วนพวกสร้างอาหารเองไม่ได้ (heterotrophs) นั้นได้คาร์บอนจากสารอินทรีย์ เช่น โปรตีน ไขมัน และคาร์โบไฮเดรต เป็นต้น เพื่อให้ได้พลังงานและการสังเคราะห์ของเซลล์ ทำให้สามารถแบ่งจุลินทรีย์เป็น 2 กลุ่ม คือ

1) จุลินทรีย์สร้างอาหารเองได้ (autotroph) คือ พวกที่สามารถใช้ CO_2 เป็นแหล่งคาร์บอนในการสร้างอาหาร

2) จุลินทรีย์สร้างอาหารเองไม่ได้ (heterotroph) คือ พวกที่ใช้คาร์บอนจากสารประกอบคาร์บอน ซึ่งเป็นสารประกอบคาร์บอนอินทรีย์ (organic carbon) เช่น คาร์โบไฮเดรต และลิพิด เป็นต้น

3.1.2 แบ่งตามแหล่งพลังงาน (energy sources)

เนื่องจากการเจริญเติบโตเป็นกระบวนการที่จำเป็นต้องใช้พลังงานเพื่อนำมาสังเคราะห์ ส่วนประกอบต่าง ๆ ของเซลล์ จุลินทรีย์อาจได้พลังงานมาจากแหล่งต่าง ๆ ซึ่งแหล่งพลังงานที่จุลินทรีย์ใช้สามารถแบ่งจุลินทรีย์เป็น 2 กลุ่ม คือ

1) พวกที่สร้างอาหารจากพลังงานแสง (phototroph) สามารถตรึงพลังงานแสงด้วยรงควัตถุ เช่น ใช้คลอโรฟิลล์ในแบคทีเรีย (bacteriochlorophyll) ในการเปลี่ยนพลังงานแสงมาสังเคราะห์พลังงาน เก็บรักษาในรูป ATP โดยผ่านขบวนการ photophosphorylation ซึ่งจัดเป็นแบคทีเรียที่สังเคราะห์แสงได้ (photosynthetic bacteria เช่น purple bacteria, green bacteria, cyanobacteria)

2) พวกที่สร้างอาหารจากพลังงานทางเคมี (chemotroph) คือ สร้างพลังงานจากกระบวนการออกซิเดชัน (oxidation) ของสารเคมี ซึ่งอาจจะใช้สารอินทรีย์และอนินทรีย์เป็นแหล่งพลังงาน โดยผ่านกระบวนการออกซิเดชัน-รีดักชัน (oxidation-reduction) เช่น แบคทีเรีย *Nitrobacter* sp. และ *Nitroisomonas* sp. เป็น nitrifying bacteria สามารถออกซิไดส์ NH_4^+ ไปเป็น NO_3^- ใน 2 ขั้นตอน เรียก กระบวนการ nitrification โดยทั้ง 2 ขั้นตอนจะปลดปล่อยพลังงานที่จุลินทรีย์สามารถนำไปเก็บในรูป ATP โดยกระบวนการ phosphorylation ได้ บางทีเรียกการสังเคราะห์ ATP แบบนี้ว่า oxidative phosphorylation

อะโซสไปริลัมมีการดำรงชีวิตแบบสร้างอาหารจากพลังงานทางเคมี (chemoheterotroph) ใช้คาร์บอนจากสารประกอบคาร์บอน ซึ่งเป็นสารประกอบอินทรีย์ และสร้างพลังงานจากกระบวนการออกซิเดชันของสารเคมี ซึ่งอาจจะใช้สารอินทรีย์และอนินทรีย์เป็นแหล่งพลังงาน อะโซสไปริลัมสามารถใช้ กรดมาลิก กรดซักซินิก อะราบิโนส (arabinose) ซิเตรด ฟรุกโตส กาแลกโตส กลูโคส กลีเซอรอล แมนนิทอล แมนโนส ไโรโบส ซอบิทอล ซูโครส เป็นต้น เป็นแหล่งคาร์บอน (Okon, 1994)

กลูโคส (glucose) มีสูตร โครงสร้าง คือ $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$ เป็นน้ำตาลโมโนแซ็กคาไรด์ (monosaccharide) ซึ่งเซลล์ของสิ่งมีชีวิตทุกชนิดใช้กลูโคสเป็นแหล่งพลังงาน กลูโคสสามารถเข้าสู่กระบวนการสลายน้ำตาลเพื่อให้ได้พลังงานผ่าน Entner-Doudoroff pathway ซึ่งเป็นส่วนหนึ่งของกระบวนการไกลโคไลซิส (glycolysis) เป็นกระบวนการหลักที่ใช้สลายกลูโคสให้ได้เป็น pyruvate ซึ่งจะถูกลดต่อโดย 2 กระบวนการ คือ ในสภาวะที่มีออกซิเจน pyruvate จะถูกเปลี่ยนไปเป็น acetyl CoA แล้วจึงเข้าสู่วัฏจักรเครปส์ ซึ่งจะถูกออกซิไดส์ต่อไปได้ CO_2 และ H_2O แต่ถ้าอยู่ในสภาวะที่ขาดออกซิเจนเซลล์จะเปลี่ยน pyruvate ให้เป็น lactate

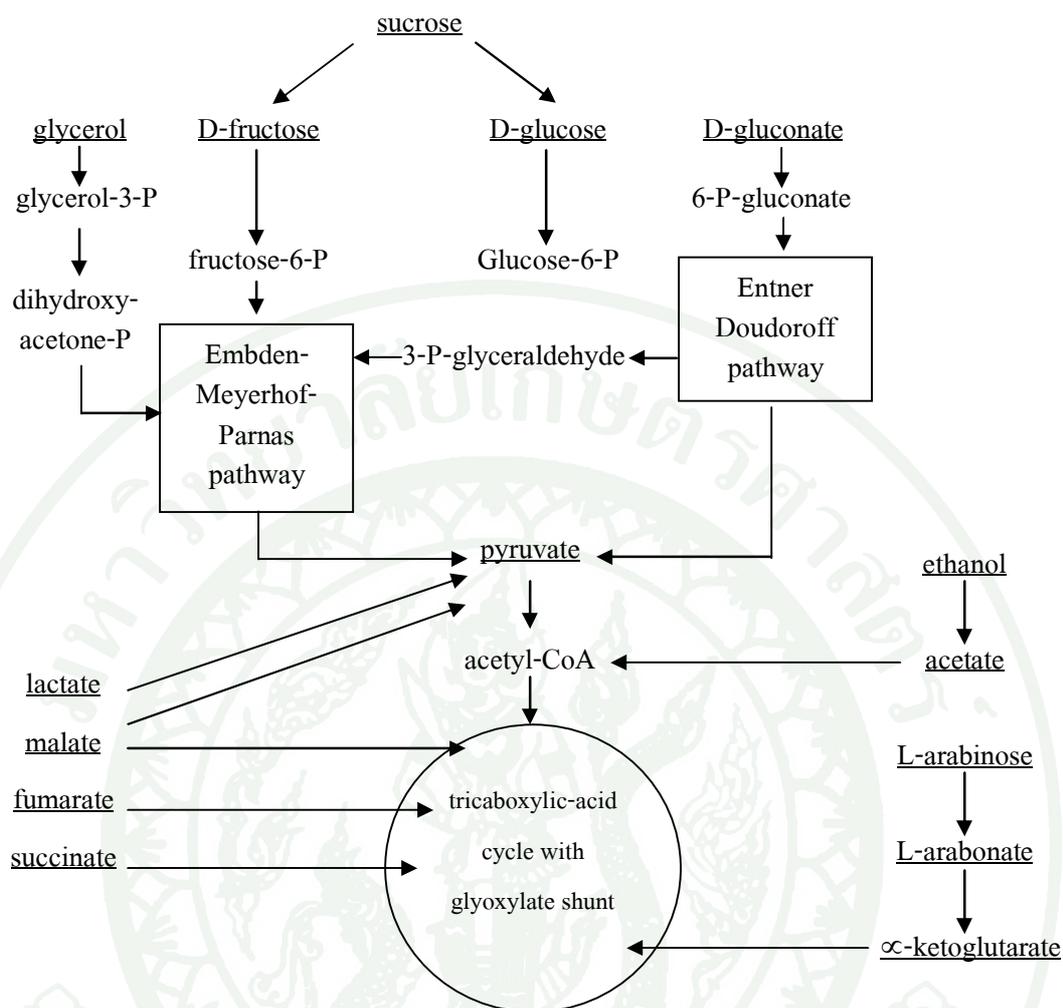
ซูโครส (sucrose) มีโครงสร้าง คือ $\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$ เป็นน้ำตาลไดแซ็กคาไรด์ (disaccharide) มีชื่อสามัญว่า น้ำตาลทราย ซึ่งซูโครส 1 โมเลกุล ประกอบด้วยโมโนแซ็กคาไรด์ 2 โมเลกุล ได้แก่ กลูโคส และฟรุกโตส โดยโมเลกุลของกลูโคส 1 โมเลกุล เชื่อมต่อกับโมเลกุลของ

ฟรุกโตส 1 โมเลกุล ด้วยโควาเลนต์ที่ชื่อว่า glycosidic bond สูตรเอมไพริกัลของซูโครส คือ $C_{12}H_{22}O_{11}$ และชื่อเคมีคือ $\beta - D - \text{fructofuranosyl} - (2 \rightarrow 1) - \alpha - D - \text{glucopyranoside}$ ซึ่ง *A. brasiliense* และ *A. lipoferum* ไม่มีเอนไซม์ที่ใช้ในการย่อยสลายน้ำตาลโมเลกุลคู่ ทำให้ไม่สามารถเจริญเติบโตได้ในอาหารที่มีซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอนเพียงอย่างเดียว

กรดมาลิก (malic acid) เป็นสารอินทรีย์ชนิดหนึ่ง มีสูตร $C_4H_6O_5$ กรดมาลิกเป็น dicarboxylic acid เป็นสารให้รสเปรี้ยวในอาหาร กรดมาลิกจะพบในผลไม้ยังไม่สุก เกลือ และส่วนผสมของกรดมาลิก เรียกว่า malates โดย malate anion เป็นสารมัธยันตร์ (intermediate product) ใน citric acid cycle กรดมาลิกมี 2 stereoisomers ด้านซ้ายเป็น L-enantiomer และด้านขวาเป็น D-enantiomer โดย L-Malic acid เกิดขึ้นเองตามธรรมชาติ ส่วน D-malic acid เป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการสังเคราะห์ ซึ่งเชื้ออะโซสไปริลัมสามารถใช้ในส่วนของ pyruvate ได้ทันทีโดยไม่ได้ผ่านในขั้นตอนของกระบวนการไกลโคไลซิส

กรดซักซินิก (succinic acid) ในระบบ International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC) เรียกว่า กรด butanedioic มีสูตรโครงสร้าง คือ $C_4H_6O_4$ เป็นสารประกอบอินทรีย์เช่นเดียวกับกรดมาลิก เมื่อเป็นแอนไอออน เรียก succinate และเรียก esters ของกรดซักซินิกว่า alkyl succinates กรดซักซินิกพบได้ในเศษซากพืชและซากสัตว์ กรดซักซินิกนั้นเชื้ออะโซสไปริลัมสามารถนำไปใช้แทน pyruvate ได้ทันทีเช่นเดียวกับการใช้กรดมาลิก โดยไม่ได้ผ่านในขั้นตอนของกระบวนการไกลโคไลซิส

อย่างไรก็ตาม เมื่อแบ่งตามชนิดของอะโซสไปริลัม พบว่า อะโซสไปริลัมแต่ละชนิดมีความสามารถในการใช้แหล่งคาร์บอนที่แตกต่างกัน *A. brasiliense* และ *A. lipoferum* สามารถใช้ประโยชน์จากแหล่งคาร์บอนที่หลากหลาย ตามความแตกต่างของ แมแทบอลิซึมที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายสารของเชื้ออะโซสไปริลัม (Martinez-Drets *et al.*, 1984) มีรายงานความคล้ายคลึงกันของเอนไซม์ของจุลินทรีย์ทั้งสองชนิด กระบวนการ oxidative ของ hexose monophosphate pathway ใน *A. brasiliense* และ *A. lipoferum* ของกระบวนการ Embden - Meyerhof-Parnas pathways (EMP) ของฟรุกโตสในการเจริญเติบโตของ *A. brasiliense* และระหว่าง Entner-Doudoroff (ED) และ EMP pathways ในการเจริญเติบโตของ *A. lipoferum* (Westby *et al.*, 1983) นอกจากนี้ *A. brasiliense* และ *A. lipoferum* มีความคล้ายคลึงกันบางส่วน คือมีการเจริญเติบโตได้เมื่อใช้ผลผลิตของ tricarboxylic acid cycle และกรดอินทรีย์ แต่ไม่เจริญเติบโตในน้ำตาลโมเลกุลคู่ เช่น ซูโครส แลกโตส และ แมนโนส (Das and Mishra, 1983)



ภาพที่ 1 การใช้แหล่งคาร์บอนของอะโซสไปริลลัม (Okon, 1994)

จากภาพที่ 1 สารประกอบที่ขีดเส้นใต้เป็นสารในกระบวนการแคทาบอลิซึม (กระบวนการที่ทำให้สารสลายตัวหรือแตกตัว) ที่ *A. brasilense*, *A. liopferum* หรือ *A. amazonense* ไปช่วยทำให้มันสลายตัว โดยอาศัยกิจกรรมเอนไซม์ของ Embden-Meyerhof-Parnas pathway, the Enter-Doudoroff pathway, tricarboxylic acid cycle, glyoxylate shunt และกิจกรรมต่างๆ ก็จะเกิดขึ้นตามลูกศร (Okon, 1994)

3.2 แหล่งของไนโตรเจน

สารประกอบที่มีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบเช่น โปรตีน กรดอะมิโน เกลือแอมโมเนียมต่าง ๆ เป็นต้น ซึ่งจุลินทรีย์แต่ละชนิดมีความต้องการและความสามารถในการใช้แตกต่างกัน ในบางกรณีต้องเติมสารพวกกรดอะมิโนบางตัวลงไปในการเลี้ยงเชื้อ เพราะจุลินทรีย์ไม่สามารถสังเคราะห์ได้เอง สารดังกล่าวอาจได้จากหางนม แป้งถั่วเหลือง และ yeast extract เป็นต้น (วิกานดา และคณะ, 2547) เนื่องจากไนโตรเจนเป็นส่วนประกอบสำคัญของสารประกอบที่เป็น โครงสร้าง และมีบทบาทต่อกิจกรรมของจุลินทรีย์ แหล่งของไนโตรเจนที่จุลินทรีย์จะนำไปใช้ได้มีหลายชนิด ได้แก่ ไนเตรตไอออน แอมโมเนียมไอออน และไนโตรเจนอินทรีย์ ต่าง ๆ เช่น yeast extract และ peptone เป็นต้น Alef and Nannipieri (1995) รายงานว่า *A. lipoferum*, *A. brasilense*, *A. amazonense*, *A. halopraeferens* และ *A. irakense* มีความสามารถในการรีดิวซ์ ไนเตรต เป็นไนไตรต์ แต่ความสามารถในการรีดิวซ์ไนไตรต์ไปเป็นแก๊สไนตรัสออกไซด์นั้นพบเฉพาะใน *A. lipoferum* *A. brasilense* และ *A. halopraeferens* เท่านั้น

อย่างไรก็ตาม อะโซสไปริลลัมก็เป็นจุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่อย่างอิสระ และมีความสามารถในการตรึงไนโตรเจนจากบรรยากาศในสภาพที่มีออกซิเจนเล็กน้อย ซึ่งหากมีแหล่งของคาร์บอนที่เหมาะสมก็สามารถเจริญเติบโตได้ดีในอาหารที่ไม่มีไนโตรเจนผสมอยู่เช่นกัน

3.3 แหล่งของ growth factor

เนื่องจากจุลินทรีย์หลายชนิดไม่สามารถสังเคราะห์กรดอะมิโนหรือวิตามินบางอย่างได้เช่น ไลซีน (lysine), เมทไทโอนีน (methionine), วิตามิน บี, pantothenic acid, folic acid และ biotin เป็นต้น ดังนั้นหากเราต้องการให้จุลินทรีย์เจริญได้ด้วยดีเพื่อผลิตผลิตภัณฑ์ที่ต้องการอย่างมีประสิทธิภาพแล้ว จำเป็นต้องศึกษาถึงความต้องการและปริมาณที่ใช้ของ จุลินทรีย์นั้น ๆ ด้วย (จूरียร์ตัน, 2550) สอดคล้องกับ Eddy (1941) รายงานว่าจุลินทรีย์ต้องการ growth factor ที่จำเป็นต่อการดำรงชีวิต จุลินทรีย์หลายชนิดสามารถสังเคราะห์วิตามินต่าง ๆ ได้ แต่บางชนิดก็ไม่สามารถสังเคราะห์วิตามินบางอย่างขึ้นใช้ได้ จึงจำเป็นต้องให้วิตามินเหล่านั้นในอาหาร

Tarrand *et al.* (1978) รายงานว่า *A. lipoferum* ต้องการไบโอตินในการเจริญเติบโต ตรงข้ามกับ *A. brasilense* ที่ไม่ต้องการไบโอตินในการเจริญเติบโต

3.4 ธาตุอาหารอื่น ๆ

จุลินทรีย์ต้องการเกลือแร่บางชนิดในปริมาณเล็กน้อย แต่ถ้าไม่มีจะเป็นผลเสียต่อเซลล์จุลินทรีย์มาก เพราะเกลือแร่บางชนิดเป็นตัวเร่งในปฏิกิริยาชีวเคมีหลายอย่างและเป็นส่วนประกอบของเอนไซม์และองค์ประกอบบางอย่างของเซลล์ แบ่งเกลือแร่ออกเป็น “major elements” ได้แก่เกลือแร่ที่จุลินทรีย์ต้องการในปริมาณมาก ได้แก่ P, Mg, Ca, K, S และ Na ส่วนพวกที่จุลินทรีย์ต้องการในปริมาณเพียงเล็กน้อยเท่านั้น ซึ่งมักไม่จำเป็นต้องเติมลงไปในสารอาหาร เนื่องจากมีปะปนมากับวัตถุดิบหลายชนิดที่นำมาใช้อยู่แล้ว เรียกว่า minor หรือ trace elements ได้แก่ Fe, Co, Cu, Mn, Zn, Mo และ B เกลือแร่ที่จำเป็นมากที่จะต้องมียูในสารอาหาร ได้แก่ P และ Mg เพราะเป็นตัวเร่งในปฏิกิริยาการสร้างและถ่ายพลังงานสำหรับจุลินทรีย์ (วิกานดา และคณะ, 2547)

เชื้ออะโซสไปริลัมต้องการธาตุอาหารอื่น ๆ ในการเจริญเติบโตอีกหลายอย่าง เช่น K^+ , PO_4^{3-} , Mg^{2+} , SO_4^{2-} , Cu^{2+} , Mn^{2+} , MoO_4^{2-} , Co^{2+} , Ni^{2+} และ Fe^{2+} ซึ่งธาตุเหล่านี้จะมีความจำเป็นต่อการเจริญเติบโตของเชื้ออะโซสไปริลัม เช่น ฟอสเฟตเป็นองค์ประกอบของสารที่ให้พลังงาน นอกจากนี้โมลิบดีนัม และเหล็ก ยังเป็นองค์ประกอบของเอนไซม์ในโตรจินเนสที่จำเป็นในการตรึงไนโตรเจน ซึ่งประกอบด้วยโปรตีนที่ต่างกัน 2 ส่วน คือ dinitrogenase (MoFe protein) ทำหน้าที่จับและรีดิวซ์แก๊สไนโตรเจน และ dinitrogenase reductase (Fe protein) ซึ่งเป็นตัวส่งผ่านอิเล็กตรอนให้กับเอนไซม์ dinitrogenase (Tate, 2000) และ Mg^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} และ Fe^{2+} ที่จำเป็นต่อกระบวนการรีดักชัน ซึ่งช่วยให้ ATP ทำงานได้ตามปกติ (สมศักดิ์, 2541)

3.5 ความเป็นกรดเป็นด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อ

pH มีอิทธิพลต่อการเจริญของจุลินทรีย์ ซึ่งจุลินทรีย์แต่ละชนิดจะมีช่วง pH ที่เหมาะสมสำหรับการเจริญเติบโต ซึ่งถ้าต่ำหรือสูงกว่านั้น จะไม่มีการเจริญเติบโต หรือเจริญเติบโตได้ไม่ดีเท่าในช่วง pH ที่เหมาะสม (จรรย์รัตน์, 2550) จากรายงานของ Alef and Nannipieri (1995) ได้รายงานช่วง pH ที่เหมาะสมของเชื้ออะโซสไปริลัมแต่ละชนิดไว้ดังนี้ โดย *A. brasilense*, *A. lipoferum*, *A. amazonense*, *A. irakense* และ *A. halopraeferans* มีช่วง pH ที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโต คือ 6.0-7.8, 5.7-6.8, 5.7-6.5, 6.4-6.7 และ 6.8-8.0 ตามลำดับ

3.6 อิทธิพลของอุณหภูมิต่อการเจริญของอะโซสไปริลลัม

อุณหภูมิมิผลต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์เช่นเดียวกันกับความเป็นกรดเป็นด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อ ช่วงอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์จะคงที่ และเป็นลักษณะเฉพาะของแต่ละสายพันธุ์ (จรัญรัตน์, 2550) จากรายงานของ Alef and Nannipieri (1995) ได้รายงานช่วงอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเชื้ออะโซสไปริลลัมแต่ละชนิดว่า *A. brasilense*, *A. lipoferum*, *A. amazonense*, *A. irakense* และ *A. halopraeferans* มีช่วงอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโต คือ 22-37, 32-37, 32-37, 30-33 และ 41 องศาเซลเซียส ตามลำดับ

3.7 แก๊สออกซิเจนหรือตัวรับอิเล็กตรอน

จุลินทรีย์แต่ละชนิดมีความต้องการออกซิเจนในการเจริญที่แตกต่างกัน แต่ออกซิเจนมีสมบัติละลายในสารละลายได้ในปริมาณน้อยแบคทีเรียใช้ออกซิเจน (aerobic bacteria) จะใช้ออกซิเจนปริมาณน้อยหมดในเวลารวดเร็ว ทำให้การเจริญเติบโตถูกจำกัดด้วยอัตราการแพร่ของออกซิเจน ระหว่างน้ำกับอากาศ วิธีที่จะเพิ่มอากาศให้จุลินทรีย์ในอาหารเลี้ยงเชื้อทำได้โดยเพิ่มพื้นที่ผิวที่อากาศจะลงไปสัมผัสกับอาหารเหลว ทำได้โดยการพ่นอากาศที่ผ่านการกรอง การกวนอาหารเพื่อช่วยการกระจายตัวของอาหาร และการให้อากาศโดยเครื่องเขย่า ซึ่งการให้อากาศด้วยเครื่องเขย่าความเร็วรอบที่ใช้ก็มีผลต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ในอาหารเลี้ยงเชื้อเช่นกัน

อะโซสไปริลลัม เป็นจุลินทรีย์ในกลุ่มที่ต้องการออกซิเจนเล็กน้อยในการดำรงชีวิต (microaerophilic) ซึ่งในสภาพที่มีไนโตรเจนอินทรีย์ เช่น ไนเตรต และ แอมโมเนียม เชื้อจะเจริญได้ดีในสภาพที่มีออกซิเจนสูง แต่สภาพที่ขาดเกลือไนโตรเจนอินทรีย์ เชื้อจะเจริญเติบโตได้ดีเมื่อมีออกซิเจนอยู่เพียงเล็กน้อยเท่านั้น (ธงชัย, 2546)

4. การศึกษาการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย

การเจริญเติบโตของแบคทีเรีย หมายถึง การเพิ่มจำนวนเซลล์ ซึ่งเป็นผลมาจากการเปลี่ยนแปลงทางเคมีและฟิสิกส์ภายในเซลล์ การเจริญเติบโตเป็นปัจจัยที่สำคัญอย่างยิ่งในการดำรงชีวิต เซลล์แต่ละเซลล์มีช่วงอายุที่จำเพาะเจาะจงสำหรับชนิด (species) หนึ่งๆ การเจริญเติบโตของประชากรนั้นสามารถที่จะตรวจสอบได้โดยการวัดการเปลี่ยนแปลงของจำนวนเซลล์ หรือมวลชีวภาพ(biomass) ของประชากรต่อหนึ่งหน่วยเวลา ซึ่งเรียกว่า “อัตราการ

เจริญเติบโต” (growth rate) เวลาที่ใช้ในการเพิ่มจำนวนประชากรจากเดิมเป็น 2 เท่า เรียกว่า เวลาชั่วรุ่น (generation time หรือ doubling time) จะแตกต่างกันไปในแต่ละชนิด ในสภาวะแวดล้อมหนึ่งๆ การเติบโตของจุลินทรีย์สามารถบอกได้โดยการวัดความขุ่น (turbidity) ของจุลินทรีย์ในอาหารเหลว การเพิ่มขนาดของโคโลนีบนอาหารแข็ง หรือการเพิ่มของจำนวนเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ทั้งนี้การวัดนั้นต้องเทียบกับหน่วยเวลา (กนกวรรณ และคณะ, 2547)

ในการศึกษาเพื่อหาระยะเวลาที่จะเป็นเวลาชั่วรุ่น (generation time) ของแบคทีเรียแต่ละชนิด ทำได้โดยเลี้ยงแบคทีเรียในสภาวะที่เหมาะสม จากนั้นนำแบคทีเรียไปนับหาจำนวนเริ่มต้น โดยใช้กล้องจุลทรรศน์ หลังจากทิ้งให้แบคทีเรียมีการเจริญและทวีจำนวนเป็นช่วงระยะเวลาหนึ่ง แล้วนับจำนวนใหม่อีกครั้งหนึ่ง ดังนั้นข้อมูลที่ได้ในการหาเวลาชั่วรุ่น (generation time) จึงประกอบด้วย

- 1) จำนวนแบคทีเรียเมื่อเริ่มต้น
- 2) จำนวนแบคทีเรียในครั้งสุดท้าย (เมื่อปล่อยให้เจริญในระยะเวลาหนึ่ง)
- 3) ระยะเวลาที่ปล่อยให้แบคทีเรียเจริญ

สมมติว่าการศึกษานี้มีแบคทีเรียในระยะเริ่มต้น 1 เซลล์ เมื่อเวลาผ่านไป 1 generation time จะได้จำนวนแบคทีเรียเพิ่มเป็น 2 เซลล์ เมื่อระยะเวลาเป็น 2 generation time จะได้แบคทีเรียเป็น 4 เซลล์ และเมื่อทิ้งระยะเวลาเป็น 3,4,5,... generation time ก็จะได้แบคทีเรียเป็น 8,16,32,... เซลล์ ตามลำดับ ถ้าให้แบคทีเรียเริ่มต้นเป็น a เซลล์ และปล่อยให้แบ่งตัว n จะได้จำนวนแบคทีเรียสุดท้ายเป็น $a \times 2^n$ แสดงให้เห็นว่าระยะเวลาที่ผ่านไปในแต่ละ generation time จำนวนแบคทีเรียจะเพิ่มเป็นสองเท่าเสมอ ดังสมการข้างล่างนี้

การหา generation time และการทวีจำนวนของแบคทีเรีย

สำหรับความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนเซลล์แบคทีเรียกับ generation time เขียนเป็นสมการได้ดังนี้

- ให้ n เป็นจำนวน generation time
 a เป็นจำนวนแบคทีเรียเริ่มต้น
 b เป็นจำนวนหลังจาก n generation time
 g เป็นเวลาในแต่ละ generation time

t เป็นระยะเวลาที่ให้แบคทีเรียแบ่งเซลล์จาก a ถึง b

ดังนั้นจำนวนแบคทีเรียหลังจาก n generation time เป็น

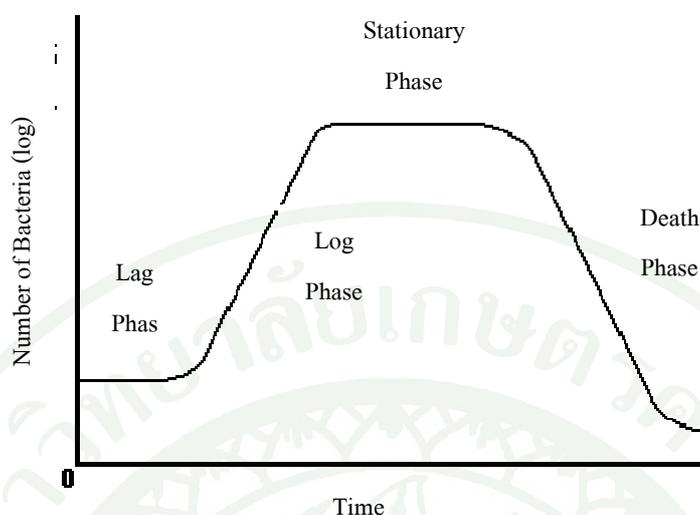
$$\begin{aligned} b &= a \times 2^n \\ \log b &= \log a + n \log 2 \\ n &= (\log b - \log a) / \log 2 \\ \text{แต่ } \log 2 &= 0.30103 \\ n &= (\log b - \log a) / 0.30103 \\ \text{แต่ } n &= t/g \\ \text{ดังนั้น } t/g &= (\log b - \log a) / 0.30103 \\ \text{และ } g &= t (0.30103) / (\log b - \log a) \end{aligned}$$

ถ้าค่า g ที่ได้น้อย แสดงว่าแบคทีเรียแบ่งเซลล์อย่างรวดเร็ว แต่ถ้าค่า g มาก แสดงว่าแบคทีเรียแบ่งตัวได้ช้า

จุลินทรีย์เซลล์เดี่ยวจะเจริญเติบโตเพิ่มจำนวนด้วยการแบ่งเซลล์จาก 1 เป็น 2 (binary fission) เซลล์รุ่นลูกแต่ละเซลล์มีลักษณะเหมือนเซลล์แม่ทุกประการ เมื่อการแบ่งเซลล์สิ้นสุดลง จำนวนเซลล์หรือมวลชีวภาพ (biomass) จะเพิ่มเป็น 2 เท่าของเมื่อก่อนแบ่งเซลล์ การเจริญเติบโตของจุลินทรีย์สามารถศึกษาได้จากกราฟการเติบโต (growth curve) โดยที่กราฟการเติบโตปกติ (typical growth curve) จะแสดงให้เห็นถึงระยะการเติบโต 4 ขั้นด้วยกัน (รูปที่ 2) คือ

- 1) ระยะ lag (A) เซลล์อยู่ในช่วงการปรับตัวก่อนแบ่งเซลล์เพิ่มจำนวน
- 2) ระยะ log (B) เซลล์มีการเจริญเติบโตอย่างเต็มที่ จำนวนเซลล์เพิ่มขึ้นแบบ (exponential)
- 3) ระยะ stationary (C) อัตราการเพิ่มมวลชีวภาพเป็น 0
- 4) ระยะ decline (D) จำนวนของเซลล์ที่มีชีวิตลดลง อัตราการเพิ่มจำนวนน้อยกว่าอัตราการตาย

การเจริญเติบโตของจุลินทรีย์นั้นขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายชนิด เหตุผลประการหนึ่งคือ ความแตกต่างในด้านความต้องการธาตุอาหารของจุลินทรีย์ต่างชนิดกัน



ภาพที่ 2 กราฟการเติบโตของจุลินทรีย์เซลล์เดี่ยว

4.1 วิธีการวัดการเจริญของแบคทีเรีย

วิธีการวัดการเจริญของแบคทีเรียมีหลายวิธีด้วยกัน คือ

4.1.1 Counting chamber method เป็นการนับจำนวนเซลล์โดยใช้กล้องจุลทรรศน์ ซึ่งใช้สไลด์ที่เรียกว่า Petroff Hausser ที่ทำเป็นร่อง ซึ่งทราบขนาดของความกว้างและความลึก เมื่อหยด suspension ของแบคทีเรียแล้วปิดด้วย cover slide นำไปตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบ compound microscope หรือแบบ phase microscope นับจำนวนแบคทีเรียที่พบแล้วคำนวณหาจำนวนแบคทีเรียต่อมิลลิลิตรใน suspension ได้ ข้อดีของวิธีนี้คือ สามารถทราบจำนวนแบคทีเรียได้อย่างรวดเร็ว และสามารถสังเกตลักษณะของแบคทีเรียที่นับได้ด้วย ข้อเสียคือ เป็นการนับเซลล์แบคทีเรียทั้งหมด ซึ่งไม่สามารถแยกได้ว่าแบคทีเรานั้นมีชีวิตหรือไม่ และไม่เหมาะที่จะนับจำนวนแบคทีเรียใน suspension ที่มีปริมาณมากหรือน้อยเกินไป (กนกวรรณ และคณะ, 2547)

4.1.2 Plate count technique เป็นวิธีการที่ใช้กันแพร่หลายสำหรับการนับเป็นเซลล์ โดยเฉพาะแบคทีเรีย เพราะแบคทีเรียส่วนใหญ่ไม่สามารถใช้วิธีนี้ได้ การผสมวุ้นกับอาหารที่ใช้เลี้ยงจุลินทรีย์ และเทลงในจานเพาะเลี้ยง นำตัวอย่างที่ต้องการตรวจนับเจือจางให้อยู่ในช่วงที่นับได้แล้ว ถ้วยบนผิววุ้นเรียกว่า surface spread method หรือให้ตัวอย่างผสมกับอาหารในจานเพาะเลี้ยง

เรียกว่า pour plate method วิธี plate count มีขีดจำกัดในการใช้ เช่น ต้องพิจารณาอาหารที่ใช้ สภาพแวดล้อมการบ่ม เช่น มีออกซิเจนหรือไม่ ใช้เวลามากอย่างน้อย 2 วัน เสียค่าใช้จ่ายสูง เมื่อเชื้อจะเจริญจากแต่ละเซลล์เดี่ยวจนเป็นโคโลนี ดังนั้นโคโลนีบนจานเพาะเลี้ยงบอกถึงเซลล์มีชีวิตที่ปลูกลงในจานเพาะ ตัวอย่าง ปกติจะถูกเจือจางเพื่อว่าจำนวนโคโลนีที่ขึ้นบนจานเพาะเลี้ยงจะอยู่ระหว่าง 30-300 ซึ่งภายในช่วงนี้สามารถนับได้อย่างถูกต้อง และโอกาสการเกิดการรบกวนของการเจริญของ 1 เซลล์ กับเซลล์อื่นๆ จะน้อย โคโลนีจะนับโดยการฉายแสงผ่าน ดูจากข้างล่าง (dark-field illumination) เพื่อที่จะเห็นได้ง่ายและการใช้เลนส์ขยายให้ใหญ่ก็นิยมใช้อุปกรณ์อิเล็กทรอนิกส์ที่พัฒนาสำหรับการนับโคโลนี (ภาควิชาจุลชีววิทยา, 2544)

ขีดจำกัดของ plate count technique คือ ใช้กับแบคทีเรียซึ่งจะนับการเจริญบนอาหารที่ใช้ และภายใต้สภาวะการบ่มที่จัดไว้ จึงเป็นข้อที่นำพิจารณา ถ้าเป็นเชื้อผสมของแบคทีเรียที่ต้องการเงื่อนไขต่างกัน อีกข้อคือขีดจำกัดที่แต่ละการเจริญภายใต้สภาวะที่จัดให้อาจจะไม่ได้ 1 โคโลนี การเจริญของ 1 โคโลนีจาก 1 เซลล์ สามารถจะเกิดขึ้นได้เมื่อ suspension เป็นเนื้อเดียวกัน และไม่เกาะกลุ่มแต่เซลล์ที่มีแนวโน้ม เกาะกลุ่ม เช่น cocci เป็น clusters (staphylococci) ลูกโซ่ (streptococci) หรือคู่ (diplococci) ผลการนับด้วยวิธีนี้จึงได้จำนวนเซลล์ต่ำกว่าพวกที่เป็นเซลล์เดี่ยวๆ ด้วยเหตุผลนี้การนับบ่อยๆ ครั้งจึงรายงาน เป็น colony forming unit (CFU) ต่อมิลลิลิตร มากกว่าที่จะบอกเป็นจำนวนเซลล์ต่อมิลลิลิตร

วิธีการนี้จะใช้กับลักษณะงานปกติ เช่น การตรวจประชากรแบคทีเรียในน้ำนม น้ำ อาหาร และวัสดุอื่น ๆ สะดวกและสามารถดัดแปลงวิธีการวัดประชากร ข้อดีของวิธีนี้คือ มีความไว (sensitive) คือ เซลล์จำนวนน้อยก็สามารถนับได้ ทางทฤษฎีถ้าตัวอย่างมีเซลล์ 1 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ก็จะเกิด 1 โคโลนี บนจานเพาะเลี้ยงเมื่อใช้ตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร

4.1.3 การวัดความขุ่น (turbidity) หากความขุ่นมากแสดงว่ามีจำนวนเซลล์มาก วัดโดยใช้ spectrophotometer โดยวัดค่า optical density (OD) วิธีนี้สะดวกรวดเร็วใช้มากในการศึกษาจุลศาสตร์ การเจริญสามารถแปรเป็นจำนวนเซลล์ได้ โดยใช้กราฟมาตรฐานระหว่างค่า OD และจำนวนเซลล์ การวัดความขุ่น อาศัยหลักการที่ว่ากรมองสิ่งต่างๆ ผ่านหมอกจะลดความชัดของภาพลง โดยขึ้นกับความหนาแน่น ของหมอกและระยะทางระหว่างผู้สังเกต และวัตถุที่ถูกมองนี้เป็นเพราะแต่ละหยดของน้ำในหมอก จะดูดกลืนและกระจายแสงที่ผ่านมันเข้าไปและเมื่อมีหยดน้ำมากในทางที่แสงผ่านการมองเห็นก็จะ ยิ่งน้อยลง

ทำนองเดียวกันกับเซลล์แบคทีเรียในสารแขวนลอยก็จะดูคลิ่นและกระจายแสงที่ผ่านมัน เช่นกัน ดังนั้นถ้าเชื้อมากกว่า 10^7-10^8 เซลล์ / มล. จะเกิดความขุ่นของเชื้อได้ การเกิดความขุ่น เป็นวิธีที่ง่ายรวดเร็วที่จะติดตามการเจริญ แต่วิธีนี้เชื้อจะต้องมีความหนาแน่นมากพอ นอกจากนี้ก็ อาจจะวัดไม่ได้ ถ้าเชื้อเจริญในอาหารที่มีสีเข้ม เชื้อเจริญในอาหารที่มีความขุ่นและเป็นการ วัดทั้งเซลล์เป็นและเซลล์ตายรวมกัน ชัดจำกัดการใช้วิธีนี้คือต้องใช้กับเชื้อบริสุทธิ์เท่านั้น จึงจะมีความถูกต้องสูง เนื่องจากการดูคลิ่นแสงที่ความยาวคลื่นต่างกันของแบคทีเรียหรือยีสต์ สำหรับ เชื้อราใช้วิธีไม่ได้ เพราะเป็นเส้นใยและไม่ทำให้อาหารขุ่น (ภาควิชาจุลชีววิทยา, 2544)

4.1.4 วัดหาน้ำหนักแห้งของเซลล์ วิธีนี้เป็นการวัดการเจริญของแบคทีเรียจากน้ำหนักของเซลล์ที่เพิ่มขึ้น โดยนำ suspension ของแบคทีเรียไปทำให้แห้งและต้องไม่ให้มีสารอื่นๆเจือปนมาด้วย suspension ที่จะนำมาหาน้ำหนักของเซลล์นั้นจะต้องมีเซลล์แบคทีเรียอยู่เป็นจำนวนมาก วิธีนี้นิยมใช้มากในงานวิจัยทางจุลชีววิทยา (กนกวรรณ และคณะ, 2547)

4.1.5 วัดปริมาณสารที่แบคทีเรียผลิตออกมา เมื่อนำ แบคทีเรียบางชนิดไปเลี้ยงในอาหารที่มีน้ำตาลแลคโตส จะ ferment น้ำตาลให้ผลิตผลออกมาเป็นกรดหรือบางชนิด ferment น้ำตาลแล้วให้แก๊ส ซึ่งแก๊สหรือกรดที่ได้นี้จะเป็นส่วน สัดส่วนโดยตรงกับปริมาณของแบคทีเรีย กล่าวคือถ้ามีปริมาณแก๊ส หรือกรดมากจะมีแบคทีเรียจำนวนมากด้วย (กนกวรรณ และคณะ, 2547)

4.1.6 การวัดการเจริญจากปริมาณธาตุไนโตรเจนของเซลล์ ธาตุไนโตรเจนเป็นส่วนที่สำคัญของเซลล์เพราะพบเป็นส่วนประกอบของโปรตีนและกรดนิวคลีอิก ดังนั้น เมื่อเซลล์มีปริมาณมากก็จะมีธาตุไนโตรเจนมากด้วย โดยทั่วไปแบคทีเรียมีธาตุไนโตรเจนประมาณ 14 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้ง การวัดการเจริญของแบคทีเรียด้วยวิธีนี้ จะต้องล้างเซลล์ในน้ำที่ไม่มีไนโตรเจนปะปน แล้ววัดหาปริมาณธาตุไนโตรเจนด้วยวิธีทางเคมี นิยมใช้ในงานวิจัยส่วนใหญ่ (กนกวรรณ และคณะ, 2547)

4.2 ลักษณะโคโลนิของแบคทีเรีย

โดยปกติสามารถสังเกตเห็นโคโลนิของแบคทีเรียเมื่อเพาะเชื้อแล้ว 24 ชั่วโมงและบ่มที่อุณหภูมิเหมาะสม (optimum temperature) และควรจะสังเกตผลทุกๆ 24 ชั่วโมง หลังจากเชื้อเจริญแล้วสำหรับการจำแนกลักษณะ (characterization) และการวินิจฉัยเชื้อ (identification) ของแบคทีเรานั้นสามารถนำวิธีการตามข้างล่างนี้เพื่อสังเกตลักษณะที่มองเห็นได้ วิธีการเหล่านี้ได้แก่

1) การติดสีแกรม (Gram reaction)

การย้อมแกรม แบ่งแบคทีเรียออกเป็น แกรมบวก (Gram-positive) กับแกรมลบ (Gram-negative) นอกจากนี้ปฏิกิริยาในการติดสีย้อมแบบของแกรมยังมีความเกี่ยวข้องกับคุณสมบัติต่าง ๆ ของแบคทีเรียอีกด้วย (ภาควิชาจุลชีววิทยา, 2544)

2) รูปร่าง ขนาดและการจัดเรียงตัวของเซลล์

รูปร่างของแบคทีเรียมีทั้งแบบเป็นแท่ง ทรงกลม หรือเกลียว การจัดเรียงตัว รวมถึงโครงสร้างพิเศษต่าง ๆ ซึ่งการย้อมสีแบคทีเรียจะทำให้เห็นลักษณะดังกล่าวได้ชัดเจนขึ้น

3) ความสามารถในการเคลื่อนไหว (motility)

การเคลื่อนที่ของแบคทีเรียเกิดได้ทั้งการใช้วิธีม้วนตัวหรือกลิ้งตัว และการใช้แฟลกเจลลา (กนกวรรณ และคณะ, 2547) อะโซสไปริลัมสามารถเคลื่อนไหวได้โดยแส้ที่อยู่ส่วนหัวเซลล์ (polar flagella) ซึ่งเป็น โครงสร้างพิเศษ โดย *A. brasilense* และ *A. lipoferum* มีโครงสร้างของแส้อยู่ 2 ชนิด คือ แส้ส่วนหัวของเซลล์ และแส้รอบเซลล์

4) การมีหรือไม่มีเอนโดสปอร์(endospore) แคปซูล (capsule) และแฟลกเจลลา (flagella)

การย้อมเพื่อดูลักษณะพิเศษต่าง ๆ ของโครงสร้างแบคทีเรีย เช่น การย้อมสีแคปซูล การย้อมสีเอนโดสปอร์ การย้อมสีแฟลกเจลลา เป็นต้น ในการย้อมสีแฟลกเจลลานั้นเนื่องจากแฟลกเจลลาของแบคทีเรียมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเล็กมาก ไม่สามารถมองเห็นได้ด้วยกล้องจุลทรรศน์ธรรมดา จึงต้องอาศัยการย้อมสีพิเศษ คือใช้ tannic acid และ aluminium potassium sulfate เป็นตัวช่วยตรึงสีย้อม (crystal violet หรือ acid fuchsin) ที่เคลือบแฟลกเจลลาให้หนาขึ้น ทำให้มองเห็นแฟลกเจลลาด้วยกล้องจุลทรรศน์ การย้อมสีแฟลกเจลลามีข้อควรระวังคือต้องใช้เชื้อจากอาหารเลี้ยงเชื้อที่แข็งที่เหลว และอายุไม่เกิน 24 ชั่วโมง การเตรียมเสมียร์เชื้อ ให้เขี่ยเชื้อเบา ๆ และลงในหยดน้ำกลั่นโดยไม่ต้องเกลี่ยเชื้อให้กระจาย และไม่ต้องตรึงเซลล์ด้วยความร้อน เพื่อให้แฟลกเจลลาหลุดออกจากเซลล์ และจำเป็นต้องใช้สไลด์ที่สะอาดปราศจากไขมัน เพื่อให้เชื้อติดกับสไลด์ได้ดี (ภาควิชาจุลชีววิทยา, 2548)

5) การติดสีแอซิดฟาส (acid fast)

เนื่องจากแบคทีเรียใน genus *Mycobacterium* มีส่วนประกอบเคมีพิเศษโดยมีสารจำพวกไขมันซึ่งยอมได้ด้วยสีที่มีฤทธิ์เป็นด่างและละลายอยู่ใน phenol เนื่องจากมันติดสียอมได้ดีมาก แม้จะล้างด้วยแอลกอฮอล์ที่มีฤทธิ์เป็นกรดก็ล้างไม่ออก เนื่องจาก *Mycobacterium* เป็นแบคทีเรียที่มีความสำคัญในทางการแพทย์ เช่น พวกที่ทำให้เกิดวัณโรคและโรคเรื้อน และแบคทีเรียสายพันธุ์อื่นๆ

5. การตรึงไนโตรเจน

การตรึงไนโตรเจนทางชีวภาพที่เกิดจากสิ่งมีชีวิตเกิดขึ้นประมาณ 175×10^6 เมตริกตัน/ปี คิดเป็นประมาณ 60 % ของการตรึงไนโตรเจนโดยสิ่งมีชีวิตนั้น พบเฉพาะในกลุ่มของจุลินทรีย์ จุลินทรีย์บางชนิดตรึงไนโตรเจนได้เฉพาะเมื่ออยู่ร่วมกับพืชชั้นสูง การตรึงไนโตรเจนจากอากาศโดยจุลินทรีย์แบ่งได้เป็น 2 ประเภท คือ การตรึงไนโตรเจนโดยจุลินทรีย์ที่เจริญอยู่อย่างอิสระในธรรมชาติ (free living หรือ non-symbiosis nitrogen fixation) และการตรึงไนโตรเจน โดยจุลินทรีย์ที่เจริญอยู่ร่วมกับสิ่งมีชีวิตชนิดอื่น (symbiotic nitrogen fixation) ซึ่งกระบวนการรีดักชันของแก๊สไนโตรเจน ไปเป็นแอมโมเนียโดยจุลินทรีย์ตรึงไนโตรเจนเกิดขึ้นโดยการกระตุ้นของเอนไซม์ไนโตรจีเนส แก๊สไนโตรเจนจะถูกรีดิวซ์ไปเป็นแอมโมเนียดังสมการ



การตรึงไนโตรเจนเป็นกระบวนการที่ต้องการพลังงานเป็นอย่างมาก ในสภาวะแวดล้อมที่เหมาะสม จุลินทรีย์ตรึงไนโตรเจนจะต้องใช้พลังงานเกือบทั้งหมดที่มี เนื่องจากในการรีดิวซ์แก๊สไนโตรเจน 1 โมล ไปเป็นแอมโมเนีย 2 โมล ต้องใช้ ATP ถึง 16 โมล ตัวให้พลังงานซึ่งเป็นตัวจำกัดปริมาณแก๊สไนโตรเจนที่จะถูกรีดิวซ์ โดยจุลินทรีย์ดินซึ่งได้พลังงานจากการย่อยสลายสารอินทรีย์ การเปลี่ยนแก๊สไนโตรเจนไปเป็นแอมโมเนียให้เกิดขึ้นสูงสุด จำเป็นต้องมีแหล่งพลังงานที่มากพอและคงที่ เช่นที่เกิดขึ้นในธรรมชาติบริเวณรอบรากพืช (rhizosphere) ซึ่งแบคทีเรียได้พลังงานจากสารที่ขับออกมาจากราก (exudate) หรือจากการอยู่ร่วมกับสิ่งมีชีวิตอื่น หรือโดยตรงจากพลังงานแสง ในพวกไซยาโนแบคทีเรีย หรือแบคทีเรียที่สังเคราะห์ด้วยแสง โดยทั่วไปในธรรมชาติสารอินทรีย์ที่จำเป็นต่อแบคทีเรียมักไม่เพียงพอที่จะทำให้เกิดการตรึงไนโตรเจนได้มาก

ยกเว้นพวกที่ตรึงไนโตรเจนแบบพึ่งพาอาศัยกับพืช เนื่องจากได้รับพลังงานจากพืชในรูปของคาร์โบไฮเดรต เช่น ไรโซเบียมกับพืชตระกูลถั่ว

5.1 เอนไซม์ในโตรจีเนส

ไนโตรจีเนสเป็นเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาการรีดักชันของ แก๊สไนโตรเจนไปเป็นแอมโมเนีย ประกอบด้วยโปรตีนที่ต่างกัน 2 ส่วนคือ dinitrogenase หรือ MoFe protein หรือ protein I และ dinitrogenase reductase หรือ Fe protein หรือ protein II สำหรับ dinitrogenase เป็นโปรตีนขนาดใหญ่ประมาณ 220-240 กิโลดาลตัน (Kdaltons) ซึ่งจะจับและรีดิวซ์แก๊สไนโตรเจน ขณะที่ dinitrogenase reductase จะเป็นตัวส่งผ่านอิเล็กตรอนให้กับเอนไซม์ dinitrogenase (Tate, 2000; กัญญา, 2544)

ปฏิกิริยารีดักชันของไนโตรเจน ถูกกระตุ้นโดยเอนไซม์ในโตรจีเนส จะต้องอาศัย

- 1) ตัวให้อิเล็กตรอน (electron doner) ได้แก่ α -hydrtoxy-butyrate, glyceraldehyde-3-phosphate, isocitrate, glucose-6-phohphate, H_2 , NADPH และ ascorbate เป็นต้น
- 2) ตัวรับอิเล็กตรอน (electron acceptor) ในปฏิกิริยานี้ตัวรับอิเล็กตรอนคือ N_2
- 3) แหล่งพลังงาน ซึ่งได้แก่ ATP (adenosine triphosphate)
- 4) divalent metal ion Mg^{2+} Mn^{2+} Co^{2+} Fe^{2+} และ Ni^{2+} เป็นต้น ซึ่งช่วยให้ ATP ทำปฏิกิริยาได้ตามปกติ

Giller and Wilson, 1991 กล่าวว่า นอกจากต้นทุนแหล่งพลังงาน (energy cost) ในการรีดิวซ์แก๊สไนโตรเจนและความไวของเอนไซม์ในโตรจีเนสต่อออกซิเจนแล้ว สารประกอบไนโตรเจนก็เป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อการตรึงไนโตรเจน ในแบคทีเรียอิสระที่ตรึงไนโตรเจนนั้น กิจกรรมเอนไซม์ในโตรจีเนสจะไม่เกิดขึ้นถ้ามีสารประกอบไนโตรเจนปริมาณที่เพียงพออยู่ในเซลล์ของแบคทีเรียแล้ว การขาดแคลนสารประกอบไนโตรเจน และลักษณะทางพันธุกรรมการควบคุมการสร้างเอนไซม์ในโตรจีเนสในสภาวะที่มีออกซิเจนปริมาณต่ำ จะเป็นตัวควบคุมและชักนำให้เกิดกิจกรรมเอนไซม์ในโตรจีเนส แบคทีเรียอิสระที่ตรึงไนโตรเจนได้บางชนิดเอนไซม์ในโตรจีเนสจะหยุดทำงานชั่วคราวในสภาวะที่มีแอมโมเนีย เนื่องจากพันธะโคเวเลนต์ในเอนไซม์เกิดการเปลี่ยนแปลง (covalent modification) สำหรับเอนไซม์ 2 ชนิด คือ เอนไซม์ DART

(dinitrogenase reductase ADP-ribosyl transferase) นั้น ในสภาพที่มีแอมโมเนียมจะเกิดการเติม ADP ให้กับเอนไซม์ dinitrogenase reductase ทำให้เอนไซม์ในโตรจีนินสหยุดทำงานชั่วคราว และเมื่อความเข้มข้นของแอมโมเนียมลดลงเอนไซม์ DRAG (dinitrogenase reductase activating glycohydrolase) จะทำให้เกิดปฏิกิริยาย้อนกลับของ ADP-ribosylation เอนไซม์ในโตรจีนินจึงทำงานได้ตามปกติ ปรากฏการณ์นี้พบใน *Rhodospirillum rubrum*, *Azorhizobium caulinodans* อย่างไรก็ตามการหยุดการทำงานชั่วคราวของเอนไซม์ในโตรจีนินไม่ได้พบทั่วไปในแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนทั้งหมด เช่นไม่พบใน *Azotobacter* spp. หรือใน *Klebsiella pneumoniae*

5.2 การวัดการตรึงไนโตรเจนทางชีวภาพโดยสิ่งมีชีวิต

วิธีการวัดการตรึงของไนโตรเจนมีหลายวิธีด้วยกัน เช่น วัดการเจริญของแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากไนโตรเจน เพื่อความสามารถในการตรึงไนโตรเจน (Tate, 2000) วิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจน (N-analysis) โดยวิธีของ Kjeldahl โดยวัดความแตกต่างของปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด ก่อนและหลังการเจริญในสภาพที่มีไนโตรเจน (Burns and Hardy, 1975) ติดตามธาตุไนโตรเจนด้วย ^{15}N และใช้วิธีการรีดิวซ์แก๊สอะเซทิลีน (C_2H_2) ไปเป็นเอทิลีน (C_2H_4) เป็นตัวบ่งชี้ความสามารถในการตรึงไนโตรเจน อย่างไรก็ตามไม่มีวิธีที่สมบูรณ์แบบ (Hardy *et al.*, 1973) เนื่องจากแต่ละวิธีต่างมีข้อบกพร่องแตกต่างกันออกไป วิธีวัดการตรึงไนโตรเจนมีดังนี้

1) วัดการตรึงไนโตรเจนโดยตรวจสอบการเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากแหล่งไนโตรเจน (nitrogen-free cultivation) ตรวจสอบการเจริญของแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากไนโตรเจน เป็นวิธีที่ง่ายที่สุด วัดการเจริญจากการเพิ่มขึ้นของมวลชีวภาพ (biomass) หรือค่าการดูดกลืนแสง (OD) ของอาหารเลี้ยงเชื้อเนื่องจากการเจริญของแบคทีเรีย

2) วิเคราะห์หาปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด (total nitrogen)

โดยวิธีของเจลดาล (Kjeldahl method) เป็นวิธีที่มีความไวน้อยกว่าวิธีอื่น ๆ มาก ไม่สามารถใช้วัดไนโตรเจนในปริมาณที่ต่ำได้

3) วิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจนโดยวิธีไนโตรเจน-15 ($^{15}\text{N}_2$ method)

เป็นวิธีวัดการตรึงไนโตรเจนทางตรง โดยใช้ไอโซโทปที่เสถียรของไนโตรเจน วิเคราะห์หาปริมาณไนโตรเจนที่ตรึงได้ สามารถติดตามแหล่งไนโตรเจนได้แน่นอนและถูกต้องที่สุด โดยใช้ ไอโซโทป ^{15}N เมื่อเลี้ยงแบคทีเรียภายใต้บรรยากาศที่มี ^{15}N แล้วตรวจหาปริมาณ ^{15}N ในเซลล์ของ แบคทีเรียด้วยเครื่อง mass spectrometer ซึ่งวิธีนี้มีความไวกว่าวิธี Kjeldahl ถึง 1,000 เท่า ให้ผลแม่นยำเที่ยงตรง แต่มีข้อเสีย คือต้องใช้เทคนิคค่อนข้างสูง และมีค่าใช้จ่ายมาก

4) วิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจนโดยวิธีอะเซทิลีนรีดักชัน (acetylene reduction assay)

เป็นวิธีวัดกิจกรรมเอนไซม์ไนโตรจิเนสทางอ้อม โดยใช้ความสามารถของเอนไซม์ไนโตรจิเนสในการรีดิวซ์ substrate อื่นนอกจากแก๊สไนโตรเจน (Turner and Gibson, 1980) ซึ่งอะเซทิลีน (C_2H_2) มีความเหมาะสมมากที่สุด เนื่องจากปกติไม่พบแก๊สอะเซทิลีนในบรรยากาศ และมีราคาไม่แพง สามารถวิเคราะห์ได้ด้วยเครื่อง gas chromatography (GC) โดยเอนไซม์ไนโตรจิเนสจะรีดิวซ์แก๊สอะเซทิลีน (C_2H_2) ไปเป็นแก๊สเอทิลีน (C_2H_4) ซึ่งสามารถตรวจสอบแก๊สทั้งสองชนิดได้ แม้ในปริมาณต่ำ ๆ ด้วยเครื่อง GC ข้อดีของวิธีนี้คือ มีความไวสูง ไวกว่าวิธีไนโตรเจน-15 ถึง 10^3 - 10^4 เท่า เป็นวิธีที่สะดวก รวดเร็วใช้เทคนิคง่าย ๆ ใช้เครื่องมือไม่ยาก และราคาไม่แพง

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. งานสำหรับการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์
2. ขวดรูปชมพู่ขนาด 125, 250 และ 500 มิลลิลิตร
3. หม้อนึ่งความดันไอ
4. กล้องจุลทรรศน์
5. เครื่องปั่นเหวี่ยง
6. เครื่อง spectrophotometer
7. เครื่องกลั่น
8. เครื่องเขย่า
9. block digestion
10. pH meter
11. เครื่องซั่งสารเคมีทศนิยม 3 ตำแหน่ง

วิธีการ

การศึกษานี้แบ่งออกเป็น 2 การทดลอง คือ

1. การศึกษาประสิทธิภาพของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงเชื้อ *A. brasiliense* และ *A. lipoferum*

1.1 แผนการทดลอง

ใช้แผนการทดลองแบบ 4 x 4 factorial experiment in completely randomized design จำนวน 4 ซ้ำ

ปัจจัยที่ 1 แหล่งคาร์บอน มี 4 ชนิด คือ กลูโคส ซูโครส กรดมาลิก และกรดซัคซินิก

ปัจจัยที่ 2 ปริมาณของแหล่งคาร์บอน มี 4 ระดับ คือ 1, 5, 10 และ 20 กรัม/ลิตร

1.2 เชื้ออะโซสไปริลัม

เชื้อ *A. brasiliense* สายพันธุ์ B23 และ *A. lipoferum* สายพันธุ์ B42 ที่ได้จากศูนย์รวบรวมเชื้อจุลินทรีย์ ห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา ภาควิชาปฐพีวิทยา คณะเกษตร กำแพงแสน

1.3 อาหารเลี้ยงเชื้อ

สูตรอาหารที่ใช้ในการทดสอบ คือ สูตร MPSS (modified peptone succinate salts medium : Martin *et al.*, 2006) ซึ่งมีส่วนประกอบดังนี้ peptone 5.0 กรัม/ลิตร, succinic acid (free acid) 1.0 กรัม/ลิตร $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1.0 กรัม/ลิตร $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.0 กรัม/ลิตร $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.002 กรัม/ลิตร $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.002 กรัม/ลิตร และปรับ pH ให้เท่ากับ 7 ด้วย 10% KOH ตัดแปลงสูตรอาหารโดยใช้ กลูโคส ซูโครส กรดมาลิก และกรดซัคซินิก ปริมาณ 1, 5, 10 และ 20 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอนของอาหารสูตร MPSS ที่ไม่มีแหล่งของไนโตรเจน

1.4 ศึกษาลักษณะการเจริญบนอาหารที่เพาะเลี้ยง และสมบัติทางด้านสัณฐานวิทยาบางประการ

เพาะเชื้อ *A. brasilense* และ *A. lipoferum* บนอาหารแข็ง MPSS ดัดแปลง ภายหลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 72 ชั่วโมง บันทึกลักษณะของโคโลนีที่พบ คือ ขนาด รูปร่าง สี ระดับและผิวหน้าของโคโลนี ขอบ และการยอมให้แสงผ่านได้ และศึกษาสมบัติทางด้านสัณฐานวิทยาเบื้องต้นของเชื้อ ด้วยการย้อมแกรม และการย้อมแฟลกเจลลา

1.4.1 การย้อมแกรม (Benson, 2005)

เกลี่ยเชื้อบนสไลด์ จากนั้นนำมาลนบนเปลวไฟ 2-3 ครั้ง เพื่อให้เชื้อติดแน่นบนสไลด์ แล้วหยด crystal violet ทิ้งไว้ประมาณ 20 วินาที ล้างด้วยน้ำเปล่า หยดไอโอดีนทิ้งไว้ 1/1-2 นาที แล้วล้างด้วยแอลกอฮอล์ 95% โดยให้ไหลผ่านช้า ๆ บนสไลด์จนกระทั่งไม่มีสีของ crystal violet ปนไปกับแอลกอฮอล์ (อย่างน้อย 20 วินาที) จากนั้นย้อมทับด้วยสี safranin O ทิ้งไว้ 1 นาที ล้างสีออกด้วยน้ำเปล่า ชับน้ำให้แห้งด้วยกระดาษ แล้วนำไปส่องใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 100 เท่า

1.4.2 ตรวจสอบชนิดของแฟลกเจลลา ตามวิธีการของ Washington *et al.* (2005)

ใช้ loop และน้ำกลั่นสะอาด 2 loop เกลี่ยบนสไลด์ให้ได้พื้นที่ประมาณ 1 ตารางเซนติเมตร ใช้เข็มเจียเชื้อตะโคโลนีของเชื้อตัวอย่างเบา ๆ แล้วนำมาแตะที่หยดน้ำบนสไลด์ 2-4 จุด ทิ้งไว้ให้แห้งโดยไม่ต้องตรึงด้วยความร้อน จากนั้นหยดสี flagella stain ให้ท่วมบริเวณที่มีเชื้อ จับเวลา 30-60 วินาที ล้างด้วยน้ำประปา แล้วทิ้งไว้ให้แห้งโดยไม่ต้องใช้กระดาษซับ แล้วนำไปส่องใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 100 เท่า

1.5 ศึกษาอัตราการเจริญเติบโตในอาหารเหลว

เตรียมกล้าเชื้อ *A. brasilense* และ *A. lipoferum* ในอาหารเหลวสูตร MPSS ให้อากาศโดยเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 100 รอบ/นาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำกล้าเชื้อที่ได้มาทำการปั่นเหวี่ยงเอาเฉพาะเซลล์ ล้างเซลล์ด้วย 0.85 % NaCl นำเซลล์ที่ได้มาทำเป็น suspension ใน phosphate buffer โดยปรับค่า optical density (OD) ให้เท่ากับ 0.2 ที่ความยาวคลื่น 230 นาโนเมตร

ดูดเซลล์ 10 ไมโครลิตร ใส่ในอาหารเหลวสูตรต่าง ๆ ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ที่บรรจุอยู่ในขวดชมพู ขนาด 150 มิลลิลิตร ให้อากาศโดยการใช้เครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 100 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 72 ชั่วโมง วัดค่า optical density (OD) ทุก 6 ชั่วโมง ด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 230 นาโนเมตร ซึ่งเป็นความยาวคลื่นที่เชื้อดุดกลืนได้สูงที่สุด ควบคู่ไปกับการตรวจดู ปริมาณของเซลล์ที่มีชีวิต (\log_{10} ของปริมาณเซลล์) โดยวิธีการ dilution plating method และศึกษา สมบัติทางด้านสัณฐานวิทยาของเชื้อ โดยการย้อมแกรมตามวิธีการของ Benson (2005) ตรวจดูชนิด ของแฟลกเจลลาตามวิธีการของ Washington *et al.* (2005)

1.6 การวัดการตรึงไนโตรเจนในอาหารเหลว

เตรียมกล้าเชื้อ *A. brasilense* และ *A. lipoferum* เช่นเดียวกับการศึกษาการเจริญเติบโต ในอาหารเหลว ดูดเซลล์ 10 ไมโครลิตร ใส่ในอาหารเหลวสูตรต่าง ๆ ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ที่บรรจุ อยู่ในขวดชมพูขนาด 150 มิลลิลิตร ให้อากาศโดยการใช้เครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 100 รอบ/นาที เป็นเวลา 72 ชั่วโมง นำไปวิเคราะห์หาไนโตรเจนที่ตรึงได้ในอาหารเหลว โดยวิธีของ Kjeldahl method (Jackson, 1965; ทศนีย์ และจงรักษ์, 2542) ประกอบด้วย 2 ส่วน คือ digestion เป็นการย่อย ตัวอย่างด้วยกรดซัลฟิวริกเข้มข้น ที่อุณหภูมิ 320 องศาเซลเซียส และ distillation เป็นขั้นตอนการ กลั่นสารละลายที่ได้จากการย่อย และดักจับไนโตรเจนด้วย H_3BO_3 indicator

การคำนวณ

$$\%N = \frac{\text{ml } H_2SO_4 \text{ used (sample-blank titration)} \times \text{normality } H_2SO_4 \times 1.4}{\text{volume of sample (ml)}}$$

1.7 วิเคราะห์ข้อมูล

วิเคราะห์ค่าความแปรปรวนและเปรียบเทียบความแตกต่างของข้อมูลด้วยวิธีการของ Duncan ' s new multiple range test (DMRT)

2. ศึกษาปริมาณของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงเชื้อ *A. brasilense* และ *A. lipoferum*

การทดลองนี้แบ่งออกเป็น 2 การทดลองย่อย คือ การทดลองที่ 1 ศึกษาปริมาณของกรดมาลิกที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของ *A. brasilense* และ *A. lipoferum* ส่วนการทดลองที่ 2 เป็นการศึกษาปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของ *A. lipoferum*

2.1 แผนการทดลอง

ทั้ง 2 การทดลองย่อยใช้แผนการทดลองแบบ CRD (Completely Randomized Design) จำนวน 4 ซ้ำ โดยตัดแปลงปริมาณของแหล่งคาร์บอนแต่ละชนิดที่ใช้ คือ 1, 2.5, 5, 7.5, 10, 12.5, 15, 17.5 และ 20 กรัม/ลิตร

2.2 ศึกษาอัตราการเจริญเติบโตในอาหารเหลว

เตรียมกล้าเชื้อ *A. brasilense* และ *A. lipoferum* ตามแต่ละการทดลองย่อยในอาหารเหลวสูตร MPSS เช่นเดียวกับการศึกษาประสิทธิภาพของแหล่งคาร์บอน ดูดเซลล์ 10 ไมโครลิตร ใส่ในอาหารเหลวที่ใช้คาร์บอนแตกต่างกัน ปริมาตร 50 มิลลิลิตรที่บรรจุอยู่ในขวดชมพูขนาด 150 มิลลิลิตร ให้อากาศโดยการใช้เครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 100 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 72 ชั่วโมง ตรวจสอบปริมาณของเซลล์ที่มีชีวิต (\log_{10} ของปริมาณเซลล์) โดยวิธีการ dilution plating method ทุก 6 ชั่วโมง เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

2.3 วิเคราะห์ข้อมูล

วิเคราะห์ค่าความแปรปรวนและเปรียบเทียบความแตกต่างของข้อมูลด้วยวิธีการของ Duncan ' s new multiple range test (DMRT)

ผลและวิจารณ์

1. ประสิทธิภาพของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงเชื้อ *A. brasilense* และ *A. lipoferum*

1.1 ลักษณะและสมบัติทางสัณฐานวิทยาบางประการของเชื้ออะโซสไปริลัม

1.1.1 *A. brasilense*

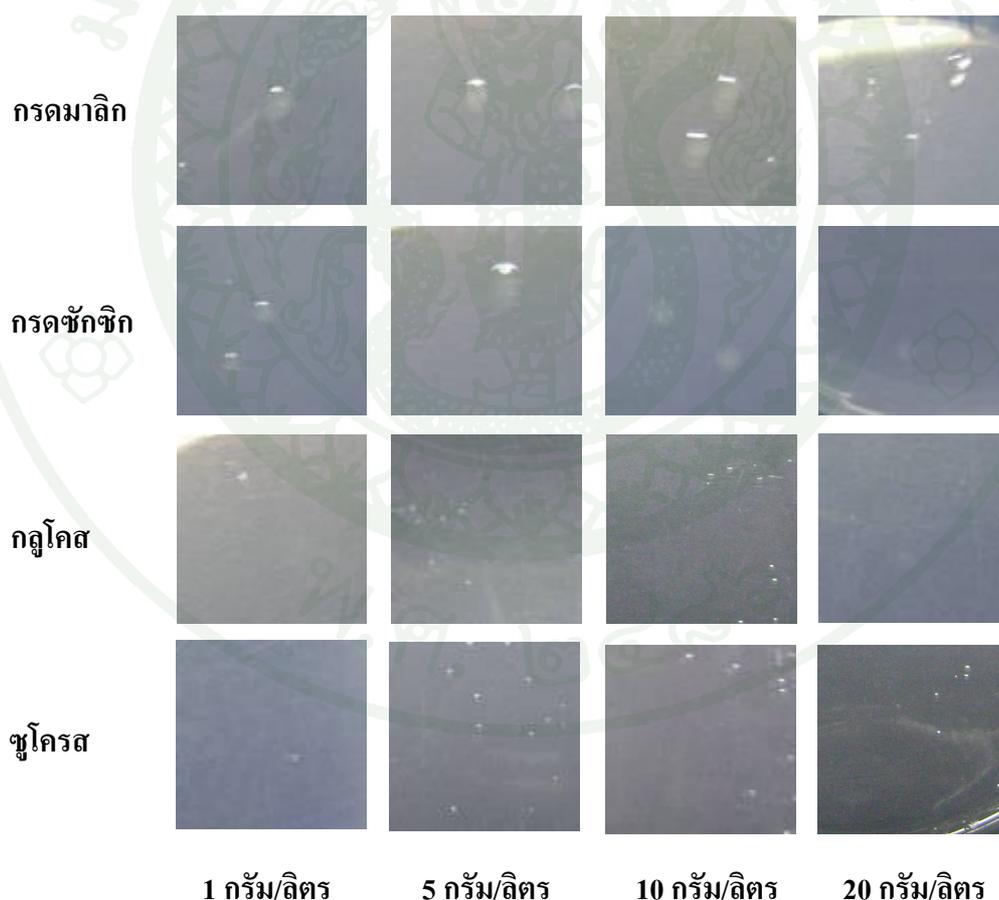
1) โคลโลนีของเชื้อ *A. brasilense*

โคลโลนีของ *A. brasilense* ในอาหารแข็งตัดแปลงที่มี กรดมาลิก และ กรดซัคซินิก เป็นแหล่งคาร์บอน มีขนาดใหญ่ เนื่องจากเจริญเติบโตได้อย่างรวดเร็ว โคลโลนีมีลักษณะ กลม ขอบเรียบ สีขาวขุ่นเป็นมันวาว ผิวหนานูน ขนาดของโคลโลนีเฉลี่ย 1.5-2.5 มิลลิเมตร ที่อายุ 72 ชั่วโมง แต่โคลโลนีของ *A. brasilense* ในอาหารแข็งตัดแปลงที่มีกลูโคส และซูโครส เป็นแหล่งคาร์บอน มีขนาดเล็กกว่า 0.5 มิลลิเมตร มีลักษณะ กลม ขอบเรียบ สีขาวขุ่นเป็นมันวาว แต่ผิวหนานูนต่ำเนื่องจากเจริญเติบโตได้ช้า (ภาพที่ 3) และพบว่ามีความแตกต่างจากโคลโลนีของเชื้อ *A. brasilense* ที่เจริญบนอาหาร MPSS ที่อายุ 72 ชั่วโมง ที่มีขนาดใหญ่กว่า ขนาดโคลโลนีเฉลี่ย 5.0 มิลลิเมตร และผิวหน้าของโคลโลนีนูนสูงกว่า (ชงชัย, 2546) และเมื่อวิเคราะห์ทางสถิติพบว่าขนาด โคลโลนีของ *A. brasilense* มีความแตกต่างกันทางสถิติ ซึ่งในอาหารที่มีกรดมาลิก และกรดซัคซินิก เป็นแหล่งคาร์บอนมีขนาด โคลโลนีใหญ่ที่สุด และมีขนาดโคลโลนีเฉลี่ยเท่ากับ 1.62 และ 1.81 มิลลิเมตร ตามลำดับ แต่ปริมาณของแหล่งคาร์บอนที่ใช้ไม่ส่งผลให้ขนาด โคลโลนีของเชื้อ *A. brasilense* แตกต่างกัน (ตารางที่ 1) แสดงว่าปริมาณของแหล่งคาร์บอนที่แตกต่างกันไม่ส่งผลต่อขนาดของโคลโลนี

2) ลักษณะเซลล์บางประการของเชื้อ *A. brasilense*

ลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ของเชื้อ *A. brasilense* ที่เจริญในอาหารตัดแปลงสูตรต่าง ๆ พบว่าเชื้อ *A. brasilense* บนอาหารที่มี กรดมาลิก และ กรดซัคซินิก เป็นแหล่งคาร์บอน เซลล์ติดสี่แกรมลบ มีลักษณะเป็นแท่ง โค้งเล็กน้อย ขนาด 0.8-1.0 ไมโครเมตร (ภาพที่ 5) นอกจากนี้ยังพบว่ามีโครงสร้างเส้นที่ขั้วเซลล์ (polar flagellum) เส้นเดียว

(ภาพที่ 7) เมื่อตรวจสอบที่ระยะ 72 ชั่วโมง สำหรับอาหารที่มี กลูโคส และซูโครส เป็นแหล่งคาร์บอน เซลล์ดัดสีแกรมลบ ขนาดของเซลล์ค่อนข้างเล็กกว่า มีขนาด 0.5-0.8 ไมโครเมตร มีการสร้างเส้นที่ขั้วเซลล์ (polar flagellum) เส้นเดียว เช่นเดียวกัน สอดคล้องกับรายงานของ Brenner *et al.* (2005) ที่รายงานเกี่ยวกับลักษณะเซลล์ของ *A. brasilense* ทุกสายพันธุ์ที่เจริญในอาหารเหลว MPSS ไว้ว่า เซลล์ดัดสีแกรมลบ แต่ทว่ายังมีบางสายพันธุ์มีการติดสีแปรปรวนเนื่องจากการสร้างแคปซูล และสอดคล้องกับรายงานของ Moens *et al.* (1995) ที่กล่าวว่า *A. brasilense* เป็นแบคทีเรียแกรมลบ ที่ส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช สามารถเคลื่อนที่ได้โดยเส้นเซลล์ 2 ชนิด แต่ในอาหารที่ผสม bacto agar 0.4% เคลื่อนที่ได้โดยเส้นรอบเซลล์ (lateral flagella) สอดคล้องกับรายงานของ Alef and Nannipieri (1995) เกี่ยวกับลักษณะเซลล์ของ *A. brasilense* ที่เจริญในอาหาร NFB เซลล์มีขนาดปานกลาง ($1 \times 3-5 \mu\text{m}$) เคลื่อนไหวได้ เซลล์มีลักษณะเป็นแท่งโค้ง



ภาพที่ 3 ลักษณะ โคลนินของเชื้อ *A. brasilense* ในอาหารที่มีแหล่งคาร์บอนต่างกัน

*A. brasilense**A. lipoferum*

ภาพที่ 4 ลักษณะโคโลนีของเชื้อ *A. brasilense* และ *A. lipoferum* ที่เจริญบนอาหารสูตร MPSS

ตารางที่ 1 ขนาดโคโลนีของเชื้อ *A. brasilense* บนอาหารตัดแปลงที่มีชนิดและปริมาณคาร์บอนที่แตกต่างกัน

| ชนิดของแหล่งคาร์บอน (C) | ขนาดโคโลนี <i>A. brasilense</i> (มม.) | | | | เฉลี่ย |
|----------------------------|---------------------------------------|------|-------|------|--------|
| | ปริมาณของแหล่งคาร์บอน (V, กรัม/ลิตร) | | | | |
| | 1 | 5 | 10 | 20 | |
| กรดมาลิก | 1.75 | 1.50 | 1.75 | 1.50 | 1.62a |
| กรดซัคซินิก | 1.75 | 2.25 | 1.75 | 1.50 | 1.81a |
| กลูโคส | 0.45 | 0.45 | 0.50 | 0.50 | 0.48b |
| ซูโครส | 0.45 | 0.45 | 0.45 | 0.50 | 0.46b |
| เฉลี่ย | 1.10 | 1.16 | 1.11 | 1.00 | |
| F-test ; C | | | * | | |
| ; V | | | ns | | |
| ; C x V | | | ns | | |
| % CV | | | 22.60 | | |

หมายเหตุ ns หมายถึง ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

* หมายถึง แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

1.1.2 *A. lipoferum*

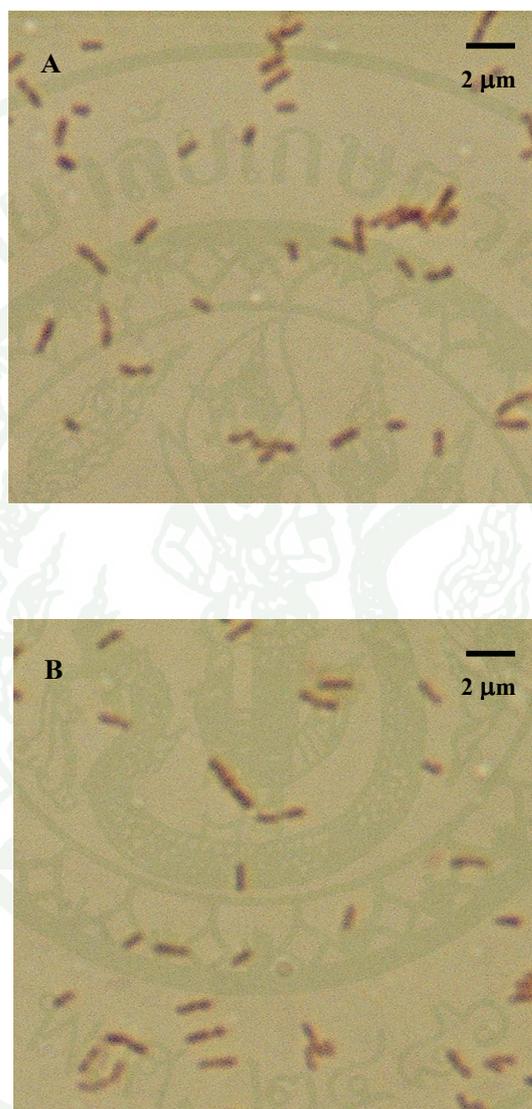
1) โคลิโคนของเชื้อ *A. lipoferum*

A. lipoferum เจริญเติบโตได้ดีบนอาหารดัดแปลงที่มี กรดมาลิก กรดซัคซินิก และกลูโคส เป็นแหล่งคาร์บอน ส่วนอาหารที่มี ซูโครส เป็นแหล่งคาร์บอนนั้น เจริญเติบโตได้ไม่ดี ซึ่งโคลิโคนของ *A. lipoferum* บนอาหารที่มี กรดมาลิก กรดซัคซินิก และกลูโคส เป็นแหล่งคาร์บอนมีลักษณะ กลม ขอบเรียบ สีขาวขุ่นเป็นมันวาว ผิวหน้าขนสูง โคลิโคนีมีขนาดใหญ่ ขนาด 2.0-3.0 มิลลิเมตร ซึ่งมีความแตกต่างจาก โคลิโคนที่เจริญบนอาหารที่มีซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอน มีขนาดเล็กกว่า 0.5 มิลลิเมตร แต่ลักษณะทั่วไปของโคลิโคนคล้ายคลึงกับที่เจริญบนอาหารที่มี กรดมาลิก กรดซัคซินิก และกลูโคส เป็นแหล่งคาร์บอน แต่ผิวหน้าของโคลิโคนจะนูนต่ำ (ภาพที่ 6) แตกต่างจากโคลิโคนของเชื้อที่เจริญบนอาหาร MPSS ที่มีขนาดของโคลิโคนเฉลี่ย 5.0 มิลลิเมตร ลักษณะกลม ขอบเรียบ สีขาวขุ่นเป็นมันวาว ผิวหน้าขนสูงเช่นเดียวกับเชื้อ *A. brasilense* แตกต่างจากที่ Brenner *et al.*, (2005) รายงานไว้ว่าโคลิโคนของ *A. lipoferum* ในอาหาร BMS ผิวหน้าของโคลิโคนไม่เป็นมันวาว และบางสายพันธุ์โคลิโคนมีลักษณะเป็นรูปดาว แต่เมื่อเจริญในอาหารที่มีกลูโคส 0.5 % โคลิโคนีมีขนาดใหญ่สีขาวเป็นมันวาว เมื่อวิเคราะห์ทางสถิติพบว่า ชนิดของแหล่งคาร์บอนส่งผลให้ขนาดโคลิโคนีมีความแตกต่างกัน โดยการใช้กรดมาลิก กรดซัคซินิก และกลูโคส เป็นแหล่งคาร์บอน ทำให้มีขนาดโคลิโคนีใหญ่กว่าการใช้ซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอน และพบปฏิสัมพันธ์ระหว่างชนิดของแหล่งคาร์บอนที่ใช้กับปริมาณที่ใช้ โดยการใช้กลูโคส 20 กรัม/ลิตร ส่งผลให้มีขนาดโคลิโคนีใหญ่ที่สุด แต่ไม่แตกต่างกับการใช้กลูโคส 1 และ 5 กรัม/ลิตร กรดมาลิก 5, 10 และ 20 กรัม/ลิตร และกรดซัคซินิก 1, 5, 10 และ 20 กรัม/ลิตร แสดงว่าแหล่งของคาร์บอนมีผลต่อขนาดโคลิโคนีของเชื้อ *A. lipoferum* (ตารางที่ 2)

2) ลักษณะทางสัณฐานวิทยาบางประการของเชื้อ *A. lipoferum*

ลักษณะทางสัณฐานวิทยาบางประการภายใต้กล้องจุลทรรศน์ของเชื้อ *A. lipoferum* ที่บนอาหารดัดแปลงที่มี กรดมาลิก กรดซัคซินิก และกลูโคส เป็นแหล่งคาร์บอน เซลล์ติดสี่แกรมลบ มีลักษณะเป็นแท่ง ขนาด 1.0-1.4 ไมโครเมตร มีการสร้าง polar flagellum เส้นเดียวเช่นเดียวกับ *A. brasilense* (ภาพที่ 7) สอดคล้องกับ Brenner *et al.*, (2005) ที่รายงานว่า *A. lipoferum* มีรูปร่างได้หลายแบบในอาหารมาเลต แต่ไม่แสดงลักษณะนี้ในอาหารกลูโคส และทุกสายพันธุ์ติดสี่แกรมลบเมื่อเลี้ยงในอาหารเหลว MPSS ที่อายุ 48-72 ชั่วโมง รวมทั้ง Alef and

Nannipieri (1995) ที่รายงานไว้ว่า *A. lipoferum* ที่เจริญบนอาหาร NFb มีลักษณะของเซลล์ไม่แตกต่างจาก *A. brasilense* แต่เมื่อเจริญในอาหารที่เป็นต่างเซลล์จะเปลี่ยนแปลงมีรูปร่างได้หลายแบบ



ภาพที่ 5 ลักษณะการติดสีแกรมของ *A. brasilense* (A) และ *A. lipoferum* (B) ภายใต้กำลังขยาย 100 เท่า

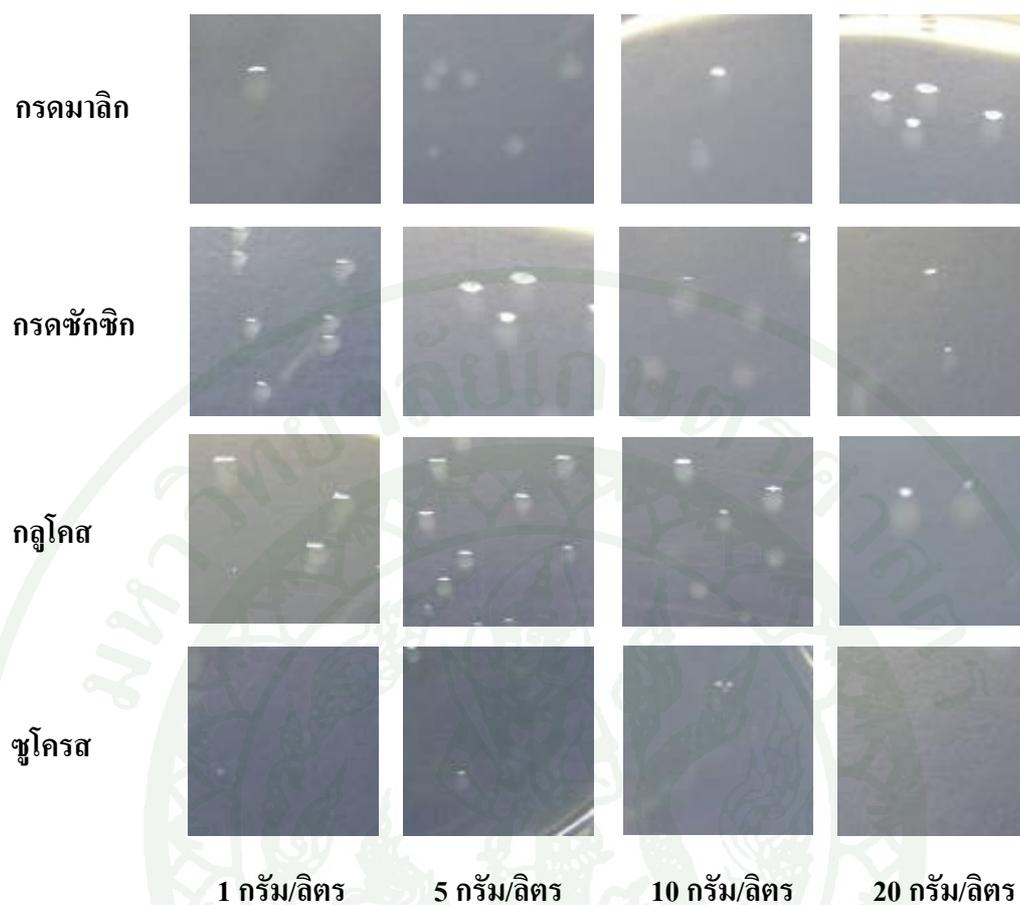
ตารางที่ 2 ขนาดโคโลนีของเชื้อ *A. lipoferum* บนอาหารดัดแปลงที่มีชนิดและปริมาณคาร์บอนที่แตกต่างกัน

| ชนิดของแหล่งคาร์บอน (C) | ขนาดโคโลนี <i>A. lipoferum</i> (มม.) | | | | เฉลี่ย |
|----------------------------|--------------------------------------|--------------------|--------------------|--------------------|-------------------|
| | ปริมาณของแหล่งคาร์บอน (V, กรัม/ลิตร) | | | | |
| | 1 | 5 | 10 | 20 | |
| กรดมาลิก | 1.25 ^c | 2.25 ^{ab} | 2.75 ^a | 2.00 ^{ab} | 2.06 ^a |
| กรดซัคซินิก | 2.75 ^a | 2.00 ^{ab} | 2.00 ^{ab} | 2.00 ^{ab} | 2.18 ^a |
| กลูโคส | 2.75 ^a | 2.00 ^{ab} | 1.50 ^c | 3.00 ^a | 2.31 ^a |
| ซูโครส | 0.45 ^d | 0.45 ^d | 0.45 ^d | 0.50 ^d | 0.46 ^b |
| เฉลี่ย | 1.80 | 1.68 | 1.68 | 1.88 | |
| F-test | | | | | |
| ; C | | | * | | |
| ; V | | | ns | | |
| ; C x V | | | * | | |
| % CV | | | 21.87 | | |

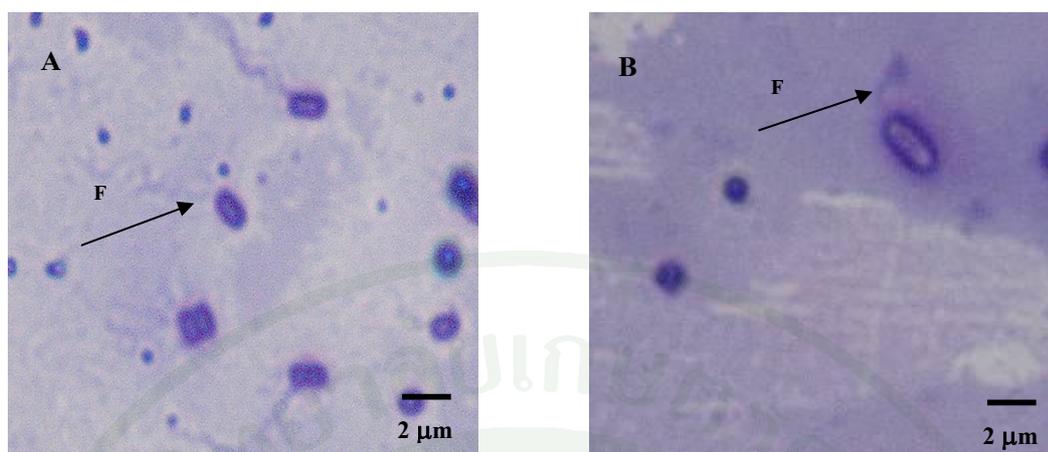
หมายเหตุ ns หมายถึง ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

* หมายถึง แตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

_ / หมายถึง การเปรียบเทียบความแตกต่างในกลุ่มข้อมูลที่มีปฏิสัมพันธ์กัน



ภาพที่ 6 ลักษณะโคโลนีของเชื้อ *A. lipoferum* ในอาหารที่มีแหล่งคาร์บอนต่างกัน



ภาพที่ 7 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์เมื่อย้อมด้วยสีข้อมแพลกเจลลา ของเชื้อ *A. brasilense* (A) และ *A. lipoferum* (B) (F คือ polar flagellum) ภายใต้กำลังขยาย 100 เท่า

1.2 การเจริญของเชื้ออะโซสไปริลลัมในอาหารเหลวตัดแปลงที่มีชนิดและปริมาณคาร์บอนที่แตกต่างกัน

1.2.1 การเจริญเติบโตของเชื้อ *A. brasilense*

A. brasilense มีการเจริญเติบโตได้ดีที่สุดในอาหารสูตรที่มีกรดมาลิกเป็นแหล่งคาร์บอน ในขณะที่ในอาหารสูตรที่มี กลูโคส และซูโครส เป็นแหล่งคาร์บอน เชื้อเจริญเติบโตได้น้อยมาก (ภาพที่ 9) Tarrand (1978) รายงานไว้ว่า *A. brasilense* และ *A. lipoferum* เจริญเติบโตได้ดีในกรดอินทรีย์ เช่น มาลิก ซักซินิก แลกติก ไพรูเวต หรือ cis-aconitic ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Westby *et al.* (1983) ว่า *A. brasilense* ไม่สามารถเจริญเติบโตได้เมื่อมี กลูโคส แมนโนส ซอโบส หรือ ซูโครส แต่เจริญเติบโตได้ใน ฟรุกโตส กาแลกโตส และ อราบีโนส แต่ *A. lipoferum* สามารถใช้กรดอินทรีย์ และคาร์โบไฮเดรตเป็นแหล่งคาร์บอนได้ในการเจริญเติบโต โดยสามารถเจริญเติบโตได้ใน กลูโคส แมนโนส ซอโบส และ o-ketoglutarate ซึ่งเป็นความแตกต่างระหว่าง *A. brasilense* และ *A. lipoferum* ภายใต้สภาวะการตรึงไนโตรเจน และ Guixiang *et al.* (2006) รายงานว่า *A. brasilense* ไม่สามารถใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนได้ แต่ยังคงมีความแปรปรวนในบางสายพันธุ์ที่สามารถใช้กลูโคสได้เล็กน้อย ซึ่งในการทดลองนี้พบว่าเชื้อยังสามารถเจริญเติบโตได้เล็กน้อย แสดงให้เห็นว่ากลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนที่ไม่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของ

A. brasilense สอดคล้องกับการศึกษาการย่อยสลายสารของ *A. brasilense* Entner-Doudoroff Pathway ที่เป็นเส้นทางหลักของ gluconate ในขั้นตอนของ Entner-Doudoroff Pathway มีเอนไซม์ 3 ชนิด คือ gluconokinase, phosphogluconate dehydratase และ phospho-2-keto-3-deoxygluconate aldolase โดย gluconate จำเป็นต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ *A. brasilense* เช่นเดียวกับที่พบใน *Pseudomonas* spp. และ *Rhizobium* spp., บางส่วนของเส้นทางนี้มีความสำคัญในการย่อยสลาย gluconate แต่พบว่า phosphogluconate dehydrogenase ได้ขาดหายไป ใน *A. brasilense* ทำให้เกิดการชะงักของ hexose monophosphate จากเหตุการณ์นี้ทำให้เกิด gluconate 2- dehydrogenase ระดับต่ำมากใน Entner - Doudoroff Pathway แต่อย่างไรก็ตามใน *A. brasilense* Sp7 ยังมีเส้นทางของ 2-ketogluconate เนื่องจาก *A. brasilense* สามารถเติบโตได้เมื่อมี 2- ketogluconate เป็นแหล่งคาร์บอนเพียงอย่างเดียว นอกจากนี้เอนไซม์ glucokinase และ glucose dehydrogenase อาจไม่มีใน *A. brasilense* หรือไม่สำคัญในการย่อยสลายสาร ทำให้ *A. brasilense* ไม่สามารถใช้น้ำตาล กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนเพียงอย่างเดียวได้ (Carl *et al.*, 1983) และอัตราการเจริญเติบโตของเชื้อ *A. brasilense* จะสูงสุดในช่วง 24-30 ชั่วโมง หลังจากปลูกเชื้อ ดังนั้นเมื่อพิจารณาค่า \log_{10} ของปริมาณเซลล์ ที่อายุ 24 ชั่วโมง พบว่ามีความแตกต่างกันทางสถิติ โดยการใช้ กรดมาลิก และกรดซัคซินิก เป็นแหล่งคาร์บอน ส่งผลให้มีปริมาณของเซลล์ที่มีชีวิตสูงกว่า กลูโคส และซูโครส (ภาพที่ 11) นอกจากนี้กรดมาลิกส่งผลให้มีปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตที่อายุ 24 ชั่วโมง สูงกว่าการใช้กรดซัคซินิก อย่างไรก็ตามปริมาณของกรดมาลิก 1, 10 และ 20 กรัม/ลิตร ไม่ส่งผลให้ปริมาณของเซลล์มีความแตกต่างกันทางสถิติ (ตารางที่ 3) ทำให้มีเซลล์มีชีวิต 20.89, 19.50 และ 13.80×10^7 CFU/มิลลิลิตร ตามลำดับ และในอาหารที่มีกรดมาลิกเป็นแหล่งคาร์บอน *A. brasilense* มีระยะเวลาในการแบ่งเซลล์ได้เร็วที่สุด รองลงมาคือ กรดซัคซินิก ซูโครส และกลูโคส ตามลำดับ (ตารางที่ 5)

นอกจากนี้ยังพบว่าเชื้อ *A. brasilense* ในอาหารเหลวปลอดไนโตรเจนที่มีกลูโคส และซูโครส เป็นแหล่งคาร์บอน ที่อายุ 12 ชั่วโมง แสดงโครงสร้างของแคปซูล (ภาพที่ 8) ส่วนอาหารที่มีกรดมาลิกเป็นแหล่งคาร์บอนมีการสร้างแคปซูลที่อายุ 48 ชั่วโมง ซึ่งการสร้างแคปซูลเนื่องมาจากสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ เช่น อุณหภูมิสูงกว่า 60 องศาเซลเซียส หรือการขาดแคลนแหล่งอาหาร เป็นต้น (Mulyukin *et al.*, 2009) ซึ่งสอดคล้องกับ Konnova *et al.* (2001) รายงานว่าองค์ประกอบแคปซูลของ *A. brasilense* สายพันธุ์ Sp245 เป็นสารประกอบคาร์โบไฮเดรต และคอยปกป้องแบคทีเรียจากปัจจัยภายนอกที่ไม่เหมาะสม ให้สามารถรอดชีวิตจากอุณหภูมิสูง 46-48 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิที่ต่ำ -20 และ -70 องศาเซลเซียส, pH 2 และ 10, การขาดแคลนแหล่งอาหาร และสภาพแห้ง ซึ่งแสดงให้เห็นอย่าง

ชัดเจนว่า *A. brasilense* ไม่สามารถใช้กลูโคส และซูโครส เป็นแหล่งของคาร์บอนในอาหารเหลว
ปลอดไนโตรเจนได้



ภาพที่ 8 โครงสร้างแคปซูล (C) ของเชื้อ *A. brasilense* ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ที่กำลังขยาย 100 เท่า

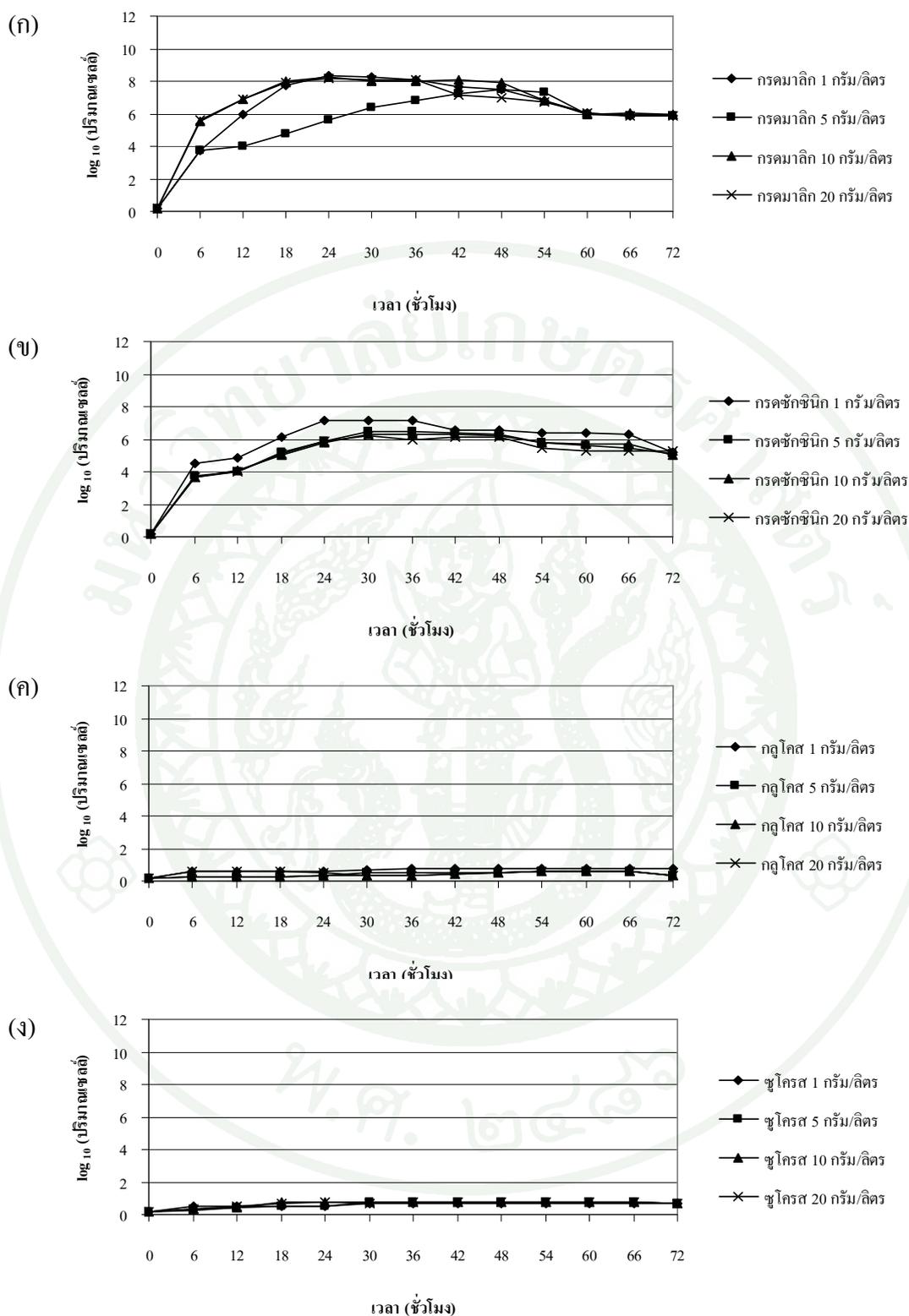
ตารางที่ 3 ค่า \log_{10} ของปริมาณเซลล์ของเชื้อ *A. brasilense* ในอาหารเหลวตัดแปลงที่มีชนิดและปริมาณคาร์บอนที่แตกต่างกัน ที่อายุ 24 ชั่วโมง

| ชนิดของแหล่งคาร์บอน (C) | <i>A. brasilense</i> | | | | เฉลี่ย |
|----------------------------|--------------------------------------|-------------------|-------------------|--------------------|-------------------|
| | ปริมาณของแหล่งคาร์บอน (V, กรัม/ลิตร) | | | | |
| | 1 | 5 | 10 | 20 | |
| กรดมาลิก | 8.32 ^a | 5.59 ^b | 8.29 ^a | 8.14 ^a | 7.59 ^a |
| กรดซัคซินิก | 7.14 ^a | 5.90 ^b | 5.80 ^b | 5.90 ^b | 6.19 ^b |
| กลูโคส | 0.60 ^{cd} | 0.30 ^e | 0.30 ^e | 0.55 ^{cd} | 0.44 ^d |
| ซูโครส | 0.61 ^{cd} | 0.50 ^d | 0.78 ^c | 0.74 ^c | 0.66 ^c |
| เฉลี่ย | 4.17 ^a | 3.07 ^c | 3.79 ^b | 3.83 ^{ab} | |
| F-test | | | | | |
| ; C | | | * | | |
| ; V | | | * | | |
| ; C x V | | | * | | |
| % CV | | 41.75 | | | |

หมายเหตุ ns หมายถึง ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

* หมายถึง แตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

_/ หมายถึง การเปรียบเทียบความแตกต่างในกลุ่มข้อมูลที่มีปฏิสัมพันธ์กัน



ภาพที่ 9 อัตราการเจริญเติบโตของเชื้อ *A. brasilense* ในอาหารคัดแปลงสูตรต่าง ๆ ที่มีกรดมาลิก (ก) กรดซัคซินิก (ข) กลูโคส (ค) และซูโครส (ง) เป็นแหล่งคาร์บอน

1.2.2 การเจริญเติบโตของเชื้อ *A. lipoferum*

การเจริญเติบโตของเชื้อ *A. lipoferum* สูงในอาหารที่มีกรดมาลิก กรดซัคซินิก และกลูโคส เป็นแหล่งคาร์บอน และเห็นได้อย่างชัดเจนว่าในอาหารสูตรที่มีซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอนอัตราการเจริญเติบโตของเชื้อค่อนข้างต่ำ (ภาพที่ 10) สาเหตุที่เป็นดังนี้อาจเนื่องมาจากมีกิจกรรมของเอนไซม์ 6-phosphofuctokinase ต่ำ ดังนั้นจึงไม่เกิดกระบวนการย่อยสลายสารใน Embden-Meyerhof-Parns Pathway จึงไม่สามารถใช้ซูโครสเป็นแหล่งของคาร์บอนได้ในอาหารปลอดไนโตรเจน (Okon, 1994) จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตมีปริมาณสูงสุดในช่วง 24-30 ชั่วโมง เมื่อพิจารณาค่า \log_{10} ของเซลล์มีชีวิตที่อายุ 24 ชั่วโมง พบว่าชนิดของแหล่งคาร์บอนมีความแตกต่างกันทางสถิติ กรดมาลิกมีปริมาณเซลล์มีชีวิตสูงสุด รองลงมาคือ กรดซัคซินิก กลูโคส และซูโครส ตามลำดับ และพบปฏิสัมพันธ์ระหว่างชนิดและปริมาณที่ใช้ ซึ่งกรดมาลิก 5 กรัม/ลิตร ส่งผลให้ปริมาณเซลล์มีชีวิตที่อายุ 24 ชั่วโมง สูงที่สุด แต่ไม่แตกต่างกับการใช้กรดมาลิก 20 กรัม/ลิตร (ตารางที่ 4) ทำให้มีปริมาณของเซลล์ที่มีชีวิต 75.86 และ 33.11 $\times 10^8$ CFU/มิลลิลิตร ตามลำดับ เมื่อดูระยะเวลาในการแบ่งเซลล์จะเห็นได้อย่างชัดเจนว่าในอาหารที่มีกรดมาลิกเป็นแหล่งคาร์บอนใช้ระยะเวลาในการแบ่งเซลล์น้อยที่สุด รองลงมาคือ กรดซัคซินิก กลูโคส และซูโครส ตามลำดับ สอดคล้องกับผลของอัตราการเจริญเติบโตที่พบ (ตารางที่ 6)

จากผลการทดลอง *A. brasiliense* และ *A. lipoferum* มีอัตราการเจริญเติบโตในอาหารดัดแปลงสูตรที่มีกรดมาลิกเป็นแหล่งคาร์บอน ดีกว่าในอาหารสูตรที่มีกรดซัคซินิกเป็นแหล่งคาร์บอน เนื่องจากในกระบวนการหายใจ กรดมาลิก และกรดซัคซินิก *A. brasiliense* และ *A. lipoferum* สามารถนำมาไปใช้ได้ทันทีในส่วนของวัฏจักรเครปส์ โดยกรดซัคซินิก จะถูกเปลี่ยนเป็น กรดมาลิกก่อนเข้าสู่วัฏจักรเครปส์ กรดซัคซินิกจะเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน ได้เป็นกรดฟูมาลิก และเมื่อกรดฟูมาลิกทำปฏิกิริยากับน้ำจึงได้เป็นกรดมาลิก ในขณะที่กรดมาลิกนั้นสามารถเข้าสู่วัฏจักรเครปส์ได้ทันที (วิกานดา และคณะ, 2547)

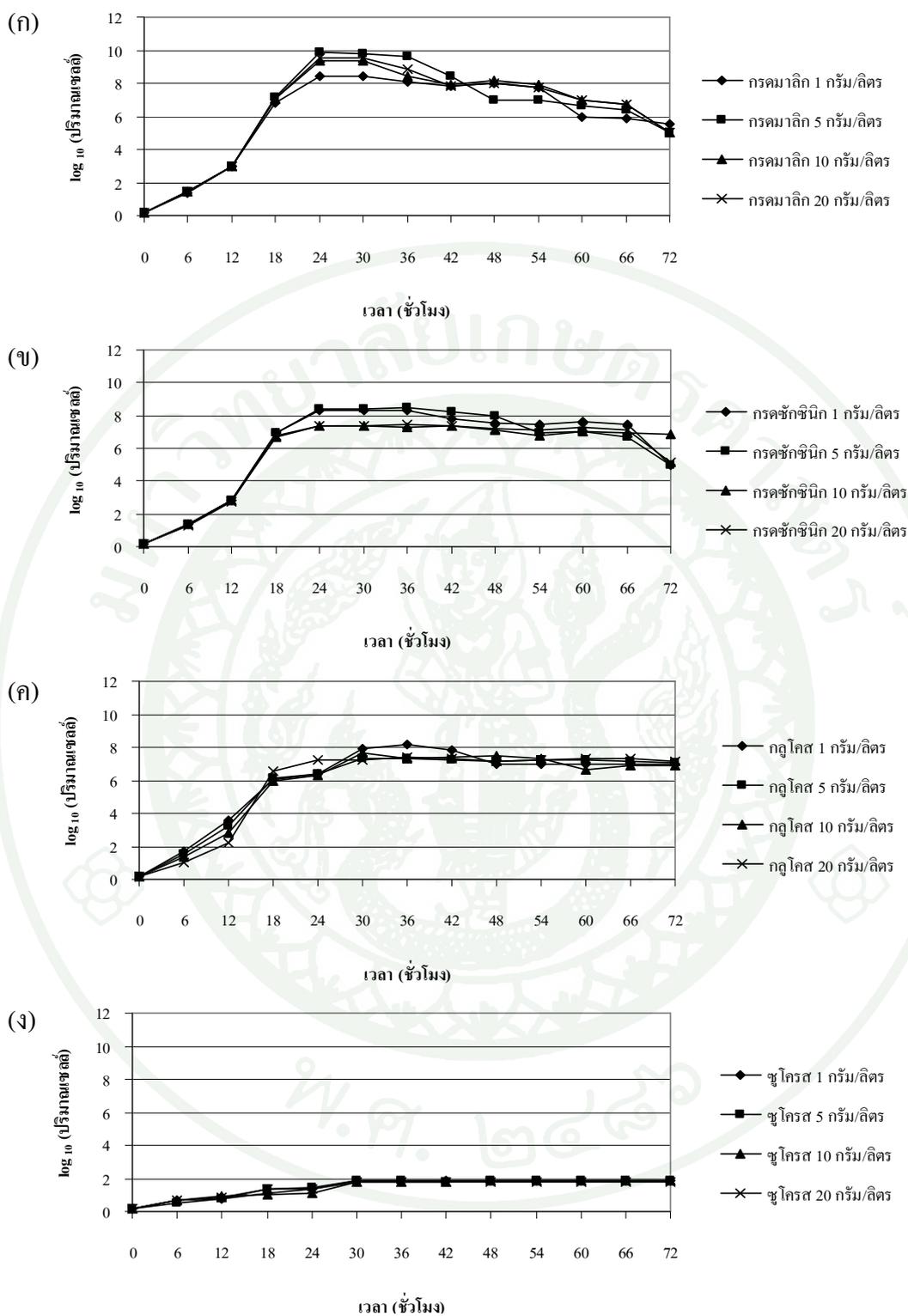
ตารางที่ 4 ค่า \log_{10} ของปริมาณเซลล์ของเชื้อ *A. lipoferum* ในอาหารเหลวตัดแปลงที่มีชนิดและปริมาณคาร์บอนที่แตกต่างกันที่อายุ 24 ชั่วโมง

| ชนิดของแหล่งคาร์บอน (C) | <i>A. lipoferum</i> | | | | เฉลี่ย |
|----------------------------|--------------------------------------|-------------------|-------------------|--------------------|-------------------|
| | ปริมาณของแหล่งคาร์บอน (V, กรัม/ลิตร) | | | | |
| | 1 | 5 | 10 | 20 | |
| กรดมาลิก | 8.41 ^c | 9.88 ^a | 9.36 ^b | 9.52 ^{ab} | 9.29 ^a |
| กรดซัคซินิก | 8.32 ^c | 8.43 ^c | 7.37 ^d | 7.41 ^d | 7.88 ^b |
| กลูโคส | 6.41 ^e | 6.41 ^e | 6.28 ^e | 7.27 ^d | 6.59 ^c |
| ซูโครส | 1.46 ^f | 1.43 ^f | 1.10 ^g | 1.39 ^f | 1.35 ^d |
| เฉลี่ย | 6.15 ^b | 6.54 ^a | 6.03 ^c | 6.40 ^{ab} | |
| F-test | | | | | |
| ; C | | | * | | |
| ; V | | | * | | |
| ; C x V | | | * | | |
| % CV | | 22.69 | | | |

หมายเหตุ ns หมายถึง ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

* หมายถึง แตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

_/ หมายถึง การเปรียบเทียบความแตกต่างในกลุ่มข้อมูลที่มีปฏิสัมพันธ์กัน



ภาพที่ 10 อัตราการเจริญเติบโตของเชื้อ *A. lipoferum* ในอาหารตัดแปลงสูตรต่าง ๆ ที่มีกรดมาลิก (ก) กรดซัคซินิก (ข) กลูโคส (ค) และซูโครส (ง) เป็นแหล่งคาร์บอน

ตารางที่ 5 ระยะเวลาในการแบ่งเซลล์ (ชั่วโมง) ของเชื้อ *A. brasilense* ในอาหารเหลวตัดแปลงที่มีชนิดและปริมาณคาร์บอนที่แตกต่างกันตั้งแต่ 0 – 24 ชั่วโมง

| ชนิดของแหล่งคาร์บอน (C) | <i>A. brasilense</i> | | | | เฉลี่ย |
|----------------------------|--------------------------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|
| | ปริมาณของแหล่งคาร์บอน (V, กรัม/ลิตร) | | | | |
| | 1 | 5 | 10 | 20 | |
| กรดมาลิก | 52.8 ^h | 79.8 ^h | 54.0 ^h | 54.6 ^h | 60.6 ^d |
| กรดซัคซินิก | 63.0 ^{gh} | 76.8 ^{gh} | 78.0 ^{gh} | 76.8 ^{gh} | 73.2 ^c |
| กลูโคส | 652.2 ^f | 2,776.2 ^a | 2,811.0 ^a | 1,254.6 ^c | 1,873.2 ^a |
| ซูโครส | 1,054.8 ^d | 1,448.4 ^b | 744.6 ^{ef} | 804.0 ^e | 1,012.8 ^b |
| เฉลี่ย | 455.4 ^d | 1,095.0 ^a | 921.6 ^b | 547.2 ^c | |
| F-test | | | | | |
| ; C | | | * | | |
| ; V | | | * | | |
| ; C x V | | | * | | |
| % CV | | 50.57 | | | |

หมายเหตุ ns หมายถึง ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

* หมายถึง แตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

_/ หมายถึง การเปรียบเทียบความแตกต่างในกลุ่มข้อมูลที่มีปฏิสัมพันธ์กัน

ตารางที่ 6 ระยะเวลาในการแบ่งเซลล์ (นาฬิกา) ของเชื้อ *A. lipoferum* ในอาหารเหลวที่ดัดแปลงที่มีชนิด และปริมาณคาร์บอนที่แตกต่างกันตั้งแต่ 0 – 24 ชั่วโมง

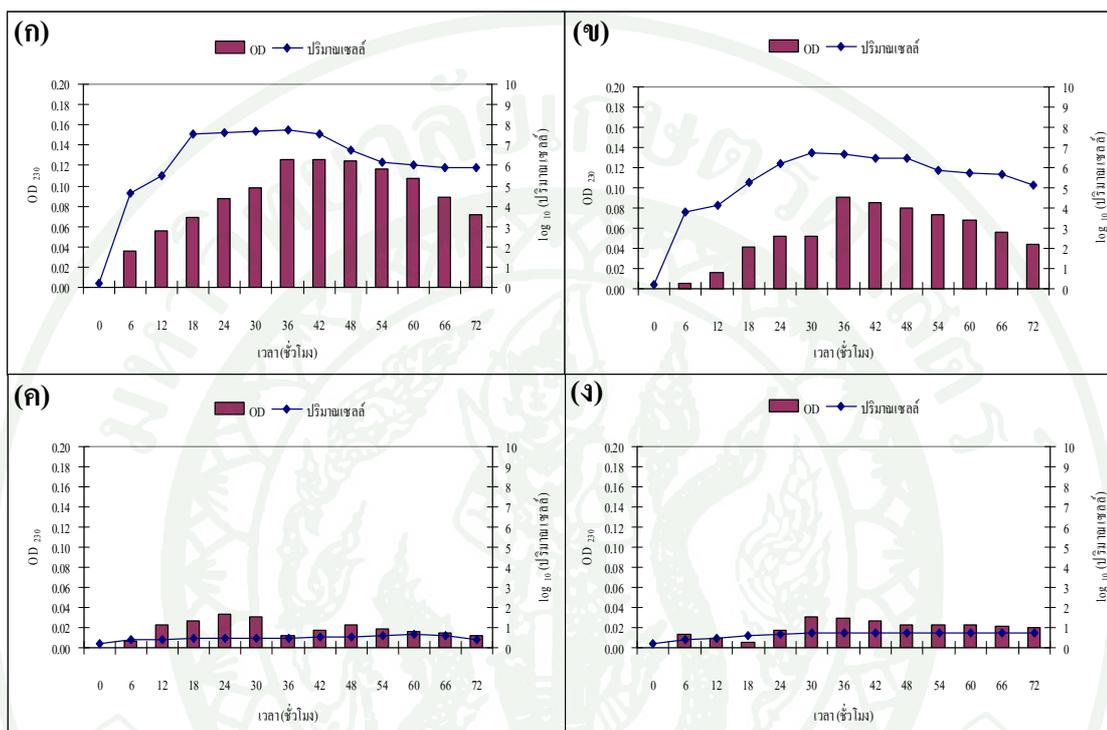
| ชนิดของแหล่งคาร์บอน (C) | <i>A. lipoferum</i> | | | | เฉลี่ย |
|----------------------------|--------------------------------------|---------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| | ปริมาณของแหล่งคาร์บอน (V, กรัม/ลิตร) | | | | |
| | 1 | 5 | 10 | 20 | |
| กรดมาลิก | 52.8 ^f | 45.0 ^g | 47.4 ^g | 46.8 ^g | 48.0 ^d |
| กรดซัคซินิก | 53.4 ^f | 52.8 ^f | 60.6 ^e | 60.0 ^e | 56.4 ^c |
| กลูโคส | 69.6 ^d | 69.6 ^d | 71.4 ^d | 61.2 ^e | 67.8 ^b |
| ซูโครส | 343.8 ^c | 352.2 ^{bc} | 481.8 ^a | 364.2 ^b | 385.8 ^a |
| เฉลี่ย | 130.2 ^b | 130.2 ^b | 165.0 ^a | 133.2 ^b | |
| F-test | | | | | |
| ; C | | | * | | |
| ; V | | | * | | |
| ; C x V | | | * | | |
| % CV | | | 32.35 | | |

หมายเหตุ ns หมายถึง ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

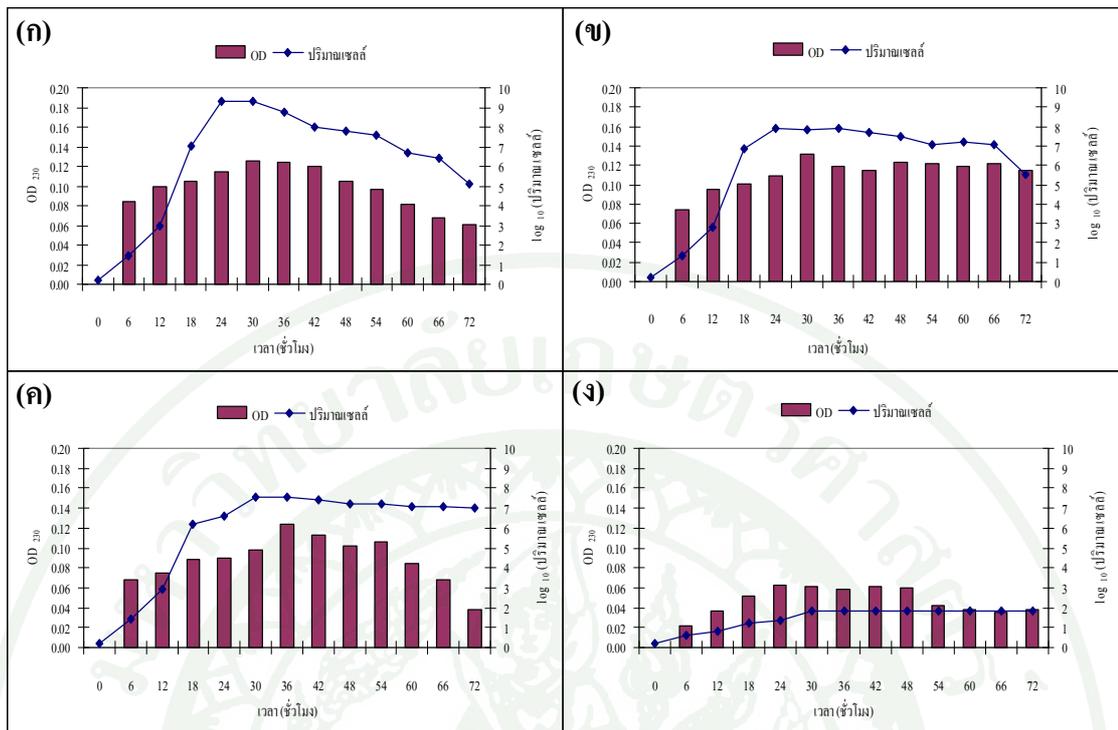
* หมายถึง แตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

_/ หมายถึง การเปรียบเทียบความแตกต่างในกลุ่มข้อมูลที่มีปฏิสัมพันธ์กัน

นอกจากนี้จากผลการทดลองยังเห็นได้อย่างชัดเจนว่า ค่าการดูดกลืนแสง (OD_{230}) มีความสัมพันธ์กับปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตของเชื้อ *A. brasiliense* และ *A. lipoferum* อย่างมาก ดังแสดงให้เห็นในภาพที่ 11 และ 12 คือเมื่อเซลล์มีปริมาณเพิ่มขึ้น ค่าการดูดกลืนแสงก็จะเพิ่มขึ้นตามไปด้วย แต่อย่างไรก็ตาม ยังพบว่ามีความแปรปรวนอยู่บ้างที่ค่าการดูดกลืนแสงให้ผลสูงกว่าความเป็นจริง



ภาพที่ 11 ความสัมพันธ์ระหว่างค่า OD_{230} กับ \log_{10} (ปริมาณเซลล์) ของเชื้อ *A. brasiliense* ในอาหารดัดแปลงสูตรต่าง ๆ ที่มีกรดมาลิก (ก) กรดซัคซินิก (ข) กลูโคส (ค) และ ชูโครส (ง) เป็นแหล่งคาร์บอน



ภาพที่ 12 ความสัมพันธ์ระหว่างค่า OD₂₃₀ กับ log₁₀ (ปริมาณเซลล์) ของเชื้อ *A. lipoferum* ในอาหารดัดแปลงสูตรต่าง ๆ ที่มีกรดมาลิก (ก) กรดซัคซินิก (ข) กลูโคส (ค) และ ซูโครส (ง) เป็นแหล่งคาร์บอน

1.3 ประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจน

1.3.1 ปริมาณการตรึงไนโตรเจนของเชื้อ *A. brasilense*

มีความแตกต่างทางสถิติของชนิดแหล่งคาร์บอนที่ใช้ในการตรึงไนโตรเจนของเชื้อ *A. brasilense* ในอาหารปลอดไนโตรเจนที่มีกรดมอลิก และกรดซัคซินิกเป็นแหล่งคาร์บอน *A. brasilense* ตรึงไนโตรเจนได้สูงกว่าการใช้กลูโคส และซูโครส เป็นแหล่งคาร์บอนในอาหารเหลวปลอดไนโตรเจน มีปริมาณไนโตรเจนที่ตรึงได้เท่ากับ 16.88, 14.47, 2.68 และ 3.22 ไมโครกรัม/100 มิลลิลิตร ตามลำดับ (ตารางที่ 7) สอดคล้องกับผลของการเจริญเติบโตที่พบว่า *A. brasilense* เจริญเติบโตได้ดีในอาหารที่มีกรดมอลิก และกรดซัคซินิกเป็นแหล่งคาร์บอน Okon (1976) รายงานว่า *A. brasilense* สายพันธุ์ Sp7 สามารถตรึงไนโตรเจนได้ในสภาพที่มีออกซิเจนเพียงเล็กน้อย (microaerophilic) เมื่อมี มาเลต ซักซินเนต แล็กเตต หรือไพรูเวต เป็นแหล่งคาร์บอน อย่างไรก็ตาม *A. brasilense* ไม่สามารถใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับการเจริญเติบโต หรือการตรึงไนโตรเจนได้ จึงส่งผลให้ปริมาณการตรึงไนโตรเจนในอาหารเหลวคัดแปลงสูตรที่มีกลูโคส และซูโครส เป็นแหล่งคาร์บอน มีปริมาณที่ต่ำมาก

1.3.2 ปริมาณการตรึงไนโตรเจนของเชื้อ *A. lipoferum*

ชนิดของแหล่งคาร์บอนที่แตกต่างกันส่งผลให้ปริมาณไนโตรเจนที่ *A. lipoferum* ตรึงได้แตกต่างกัน การใช้กรดมอลิก กรดซัคซินิก และกลูโคส เป็นแหล่งคาร์บอนมีการตรึงไนโตรเจนได้สูงกว่าการใช้ซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอนในอาหารเหลวปลอดไนโตรเจน มีปริมาณไนโตรเจนที่ตรึงได้เท่ากับ 14.47, 14.47, 14.47 และ 3.04 ไมโครกรัม/100 มิลลิลิตร (ตารางที่ 8) *A. lipoferum* มีการเจริญเติบโตแบบใช้ออกซิเจนในอาหารเหลว ส่งผลให้ตรึงไนโตรเจนได้มาก แต่ไม่เจริญเติบโตในสภาพอับอากาศ และไม่ตรึงไนโตรเจน นอกจากนี้การตรึงไนโตรเจนสามารถเกิดได้ในอาหารเหลวที่มีกลูตามेट (Brenner *et al.*, 2005)

ตารางที่ 7 ปริมาณการตรึงไนโตรเจนของเชื้อ *A. brasilense* ในอาหารเหลวตัดแปลงที่มีชนิดและปริมาณคาร์บอนที่แตกต่างกันเมื่อเลี้ยงเชื้อ 72 ชั่วโมง ($\mu\text{g}/100 \text{ ml}$)

| ชนิดของแหล่งคาร์บอน (C) | <i>A. brasilense</i> | | | | เฉลี่ย |
|----------------------------|--------------------------------------|-------|-------|-------|--------|
| | ปริมาณของแหล่งคาร์บอน (V, กรัม/ลิตร) | | | | |
| | 1 | 5 | 10 | 20 | |
| กรดมาลิก | 19.30 | 14.47 | 14.47 | 19.30 | 16.88a |
| กรดซัคซินิก | 14.47 | 14.47 | 14.47 | 14.47 | 14.47a |
| กลูโคส | 2.14 | 2.86 | 2.14 | 3.57 | 2.68b |
| ซูโครส | 2.86 | 3.57 | 2.86 | 3.57 | 3.22b |
| เฉลี่ย | 9.69 | 8.84 | 8.49 | 10.23 | |
| F-test | | | | | |
| ; C | | | | | * |
| ; V | | | | | ns |
| ; C x V | | | | | ns |
| % CV | | | | | 29.98 |

หมายเหตุ ns หมายถึง ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

* หมายถึง แตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

ตารางที่ 8 ปริมาณการตรึงไนโตรเจนของเชื้อ *A. lipoferum* ในอาหารเหลวตัดแปลงที่มีชนิดและปริมาณคาร์บอนที่แตกต่างกันเมื่อเลี้ยงเชื้อ 72 ชั่วโมง ($\mu\text{g}/100 \text{ ml}$)

| ชนิดของแหล่งคาร์บอน (C) | <i>A. lipoferum</i> | | | | เฉลี่ย |
|----------------------------|--------------------------------------|-------|-------|-------|--------|
| | ปริมาณของแหล่งคาร์บอน (V, กรัม/ลิตร) | | | | |
| | 1 | 5 | 10 | 20 | |
| กรดมาลิก | 14.47 | 14.47 | 14.47 | 14.47 | 14.47a |
| กรดซัคซินิก | 14.47 | 14.47 | 14.47 | 14.47 | 14.47a |
| กลูโคส | 14.47 | 14.47 | 14.47 | 14.47 | 14.47a |
| ซูโครส | 3.57 | 2.86 | 3.57 | 2.15 | 3.04b |
| เฉลี่ย | 11.75 | 11.57 | 11.75 | 11.39 | |
| F-test | | | | | |
| ; C | | | | | * |
| ; V | | | | | ns |
| ; C x V | | | | | ns |
| % CV | | | | | 22.99 |

หมายเหตุ ns หมายถึง ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

* หมายถึง แตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

2. ปริมาณของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงเชื้อ *A. brasilense* และ *A. lipoferum*

จากการศึกษาประสิทธิภาพของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงเชื้อ *A. brasilense* และ *A. lipoferum* ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่ากรดมาลิกเป็นแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการส่งเสริมให้เชื้อ *A. brasilense* และ *A. lipoferum* มีอัตราการเจริญเติบโตสูงที่สุดในระยะที่เซลล์มีการเจริญเติบโตอย่างเต็มที่จำนวนเซลล์เพิ่มขึ้นแบบ exponential เมื่อเปรียบเทียบกับอายุ 24 ชั่วโมง แต่ปริมาณที่ใช้ไม่มีผลต่ออัตราการเจริญเติบโตของเชื้อทั้ง 2 ชนิด ทำให้ต้องมีการศึกษาปริมาณของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการส่งเสริมการเจริญเติบโตของ *A. brasilense* และ *A. lipoferum* นอกจากนี้ยังพบว่า *A. brasilense* และ *A. lipoferum* มีความสามารถในการใช้กลูโคสเป็นแหล่งของคาร์บอนในอาหารปลอดไนโตรเจนได้ต่างกัน *A. brasilense* มีอัตราการเจริญเติบโตที่ต่ำ ตรงข้ามกับ *A. lipoferum* ที่มีอัตราการเจริญเติบโตที่สูงในอาหารคัดแปลงที่มีกลูโคสเป็นองค์ประกอบ ดังนั้นในสูตรอาหารที่มีกลูโคสเป็นแหล่งของคาร์บอนสามารถเป็นสูตรอาหารคัดเลือกจำเพาะสำหรับเชื้อ *A. lipoferum*

2.1 ปริมาณของกรดมาลิกที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงเชื้อ *A. brasilense* และ *A. lipoferum*

การเจริญเติบโตของเชื้อ *A. brasilense* ในสูตรอาหารเหลวคัดแปลงที่มีกรดมาลิกปริมาณต่าง ๆ เป็นแหล่งคาร์บอนในอาหารปลอดไนโตรเจน *A. brasilense* มีอัตราการเจริญเติบโตสูงที่สุดในช่วง 24 – 30 ชั่วโมง เมื่อวิเคราะห์ปริมาณเซลล์ที่อายุ 24 และ 30 ชั่วโมง พบว่ามีความแตกต่างทางสถิติที่อายุ 24 ชั่วโมง กรดมาลิก 17.5 กรัม/ลิตร ส่งผลให้มีปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตสูงที่สุด 151.36×10^8 CFU/มิลลิลิตร (ตารางที่ 9) แต่ไม่แตกต่างกับการใช้กรดมาลิก 1, 2.5, 7.5, 12.5 และ 15 กรัม/ลิตร ที่ส่งผลให้มีปริมาณเซลล์ที่มีชีวิต 26.30, 91.20, 60.26, 56.23 และ 43.65×10^7 CFU/มิลลิลิตร และ *A. lipoferum* ที่เจริญเติบโตในอาหารเหลวคัดแปลงที่มีกรดมาลิกเป็นแหล่งคาร์บอนในปลอดไนโตรเจนปริมาณต่าง ๆ มีอัตราการเจริญเติบโตสูงที่สุดในช่วง 24 – 30 ชั่วโมง ซึ่งมีความแตกต่างทางสถิติที่อายุ 24 ชั่วโมง (ตารางที่ 10) กรดมาลิก 10 กรัม/ลิตร มีปริมาณเซลล์ที่มีชีวิต 44.65×10^8 CFU/มิลลิลิตร แต่ไม่แตกต่างกับการใช้กรดมาลิก 2.5, 5, 7.5, 12.5, 15, 17.5 และ 20 กรัม/ลิตร ที่มีปริมาณเซลล์ที่มีชีวิต 7.41, 14.45, 23.99, 27.54, 26.92, 18.62 และ 24.55×10^8 CFU/มิลลิลิตร

ดังนั้นจากผลการทดลอง จึงเลือกใช้กรดมาลิกปริมาณ 2.5 กรัม/ลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน ในอาหารปลอดไนโตรเจน เนื่องจากไม่มีความแตกต่างกับปริมาณการใช้ที่สูงขึ้น และส่งผลให้ เซลล์มีชีวิตในช่วงของ stationary เป็นเช่นเดียวกับปริมาณการใช้ที่สูงขึ้น (ภาพที่ 13) ทำให้ได้สูตรอาหารที่เหมาะสมสำหรับการเลี้ยงเชื้อ *A. brasiliense* และ *A. lipoferum* คือ กรดมาลิก (malic acid) 2.5 กรัม/ลิตร, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.0 กรัม/ลิตร $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.002 กรัม/ลิตร $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.002 กรัม/ลิตร และปรับ pH ให้เท่ากับ 7 ด้วย 10% KOH

2.2 ปริมาณของกลูโคสที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงเชื้อ *A. lipoferum*

ในอาหารเหลวปลอดไนโตรเจน *A. lipoferum* มีการเจริญเติบโตสูงสุดในช่วง 24 – 30 ชั่วโมง ซึ่งมีความแตกต่างทางสถิติ (ตารางที่ 11) ที่เวลา 24 ชั่วโมง *A. lipoferum* เจริญเติบโตได้สูงสุดในอาหารเหลวที่มีกลูโคส 20 กรัม/ลิตร มีเซลล์มีชีวิต 45.71×10^8 CFU/มิลลิลิตร แต่ไม่แตกต่างกับการใช้กลูโคส 1, 12.5 และ 17.5 กรัม/ลิตร ซึ่งมีปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตเท่ากับ 10.72, 30.19 และ 14.13×10^8 CFU/มิลลิลิตร และที่อายุ 30 ชั่วโมง กลูโคส 12.5 กรัม/ลิตร ส่งผลให้มีปริมาณเซลล์สูงสุด 89.13×10^9 CFU/มิลลิลิตร จากผลการทดลองการใช้กลูโคสปริมาณ 12.5 กรัม/ลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน เป็นปริมาณที่เหมาะสมสำหรับสูตรอาหารคัดเลือกจำเพาะสำหรับเชื้อ *A. lipoferum* ทำให้ได้สูตรอาหารดังนี้ กลูโคส (D-glucose) 12.5 กรัม/ลิตร, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.0 กรัม/ลิตร $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.002 กรัม/ลิตร $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.002 กรัม/ลิตร และปรับ pH ให้เท่ากับ 7 ด้วย 10% KOH

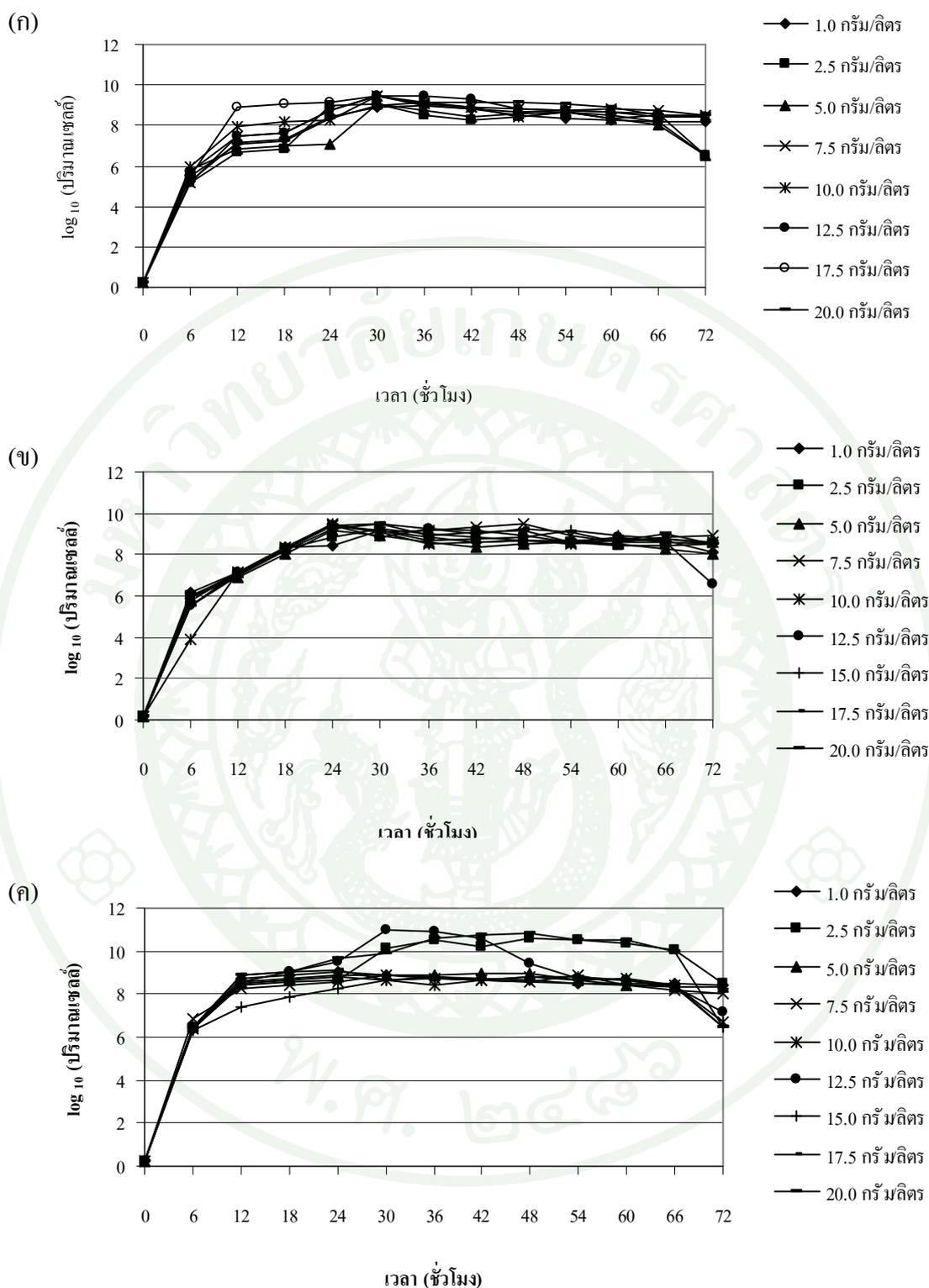
จากผลการศึกษาทำให้ได้สูตรอาหารใหม่ในการเลี้ยงเชื้อ *A. brasiliense* และ *A. lipoferum* ซึ่งสูตรอาหารที่เสนอใหม่นี้มีราคาถูกกว่าอาหารสูตร MPSS นอกจากนี้เมื่อเปรียบเทียบกับอาหารสูตร NFB ยังพบว่ามีราคาถูกกว่าเป็นอย่างมาก ดังแสดงในตารางที่ 12 จากผลการทดลองของ อรุณี (2549) พบว่า *A. lipoferum* สายพันธุ์ B42 ที่อายุ 24 ชั่วโมง มีเซลล์ที่มีชีวิต 98×10^2 CFU/มิลลิลิตร ซึ่งน้อยกว่าที่เจริญในสูตรอาหารที่ได้เสนอใหม่ ที่เป็นสูตรอาหารปลอดไนโตรเจนเช่นเดียวกันแต่กลับมีราคาถูกกว่า

ตารางที่ 9 ค่า \log_{10} ของปริมาณเซลล์ของเชื้อ *A. brasiliense* ในอาหารเหลวดัดแปลงที่มีกรดมาลิก เป็นแหล่งคาร์บอนที่อายุ 24 และ 30 ชั่วโมง

| ปริมาณของแหล่งคาร์บอน กรัม/ลิตร | เวลา (ชั่วโมง) | |
|------------------------------------|----------------|------|
| | 24 | 30 |
| 1.0 | 8.42ab | 8.90 |
| 2.5 | 8.96ab | 9.04 |
| 5.0 | 7.09c | 9.10 |
| 7.5 | 8.78ab | 9.48 |
| 10.0 | 8.27b | 9.48 |
| 12.5 | 8.75ab | 9.48 |
| 15.0 | 8.64ab | 9.48 |
| 17.5 | 9.18a | 9.48 |
| 20.0 | 8.37b | 9.01 |
| F-test | * | ns |
| %CV | 7.38 | 3.6 |

หมายเหตุ ns หมายถึง ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

* หมายถึง แตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%



ภาพที่ 13 ลักษณะการเจริญเติบโตของเชื้อ *A. brasilense* ในอาหารที่มีกรดมาลิก (ก) *A. lipoferum* ในอาหารที่มีกรดมาลิก (ข) และ *A. lipoferum* ในอาหารที่มีกลูโคส (ค) เป็นแหล่งคาร์บอน ในอาหารเหลวปลอดไนโตรเจน

ตารางที่ 10 ค่า \log_{10} ของปริมาณเซลล์ของเชื้อ *A. lipoferum* ในอาหารเหลวดัดแปลงที่มีกรดมาลิก เป็นแหล่งคาร์บอน ที่อายุ 24 และ 30 ชั่วโมง

| ปริมาณของแหล่งคาร์บอน กรัม/ลิตร | เวลา (ชั่วโมง) | |
|------------------------------------|----------------|------|
| | 24 | 30 |
| 1.0 | 8.45b | 9.14 |
| 2.5 | 8.87ab | 9.27 |
| 5.0 | 9.16ab | 8.89 |
| 7.5 | 9.38a | 9.09 |
| 10.0 | 9.47a | 9.06 |
| 12.5 | 9.44a | 8.81 |
| 15.0 | 9.43a | 9.17 |
| 17.5 | 9.27a | 9.46 |
| 20.0 | 9.39a | 9.48 |
| F-test | * | ns |
| %CV | 4.36 | 3.47 |

หมายเหตุ ns หมายถึง ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

* หมายถึง แตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

ตารางที่ 11 ค่า \log_{10} ของปริมาณเซลล์ของเชื้อ *A. lipoferum* ในอาหารเหลวตัดแปลงที่มีกลูโคส เป็นแหล่งคาร์บอน ที่อายุ 24 และ 30 ชั่วโมง

| ปริมาณของแหล่งคาร์บอน กรัม/ลิตร | เวลา (ชั่วโมง) | |
|------------------------------------|----------------|--------|
| | 24 | 30 |
| 1.0 | 9.03abcd | 8.87c |
| 2.5 | 8.68cd | 10.16b |
| 5.0 | 8.88bcd | 8.86c |
| 7.5 | 8.57cd | 8.87c |
| 10.0 | 8.79bcd | 8.64c |
| 12.5 | 9.48ab | 10.95a |
| 15.0 | 8.28d | 8.68c |
| 17.5 | 9.15abc | 8.66c |
| 20.0 | 9.66a | 9.89b |
| F-test | * | * |
| %CV | 5.38 | 9.08 |

หมายเหตุ * หมายถึง แตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

ตารางที่ 12 ราคาของอาหาร NFB, MPSS และอาหารที่เสนอขึ้นใหม่สำหรับเชื้อ *A. brasiliense* และ *A. lipoferum* (g/l)

| สารเคมี | อาหาร NFB | | อาหาร MPSS | | อาหารดัดแปลงสำหรับเชื้อ <i>A. brasiliense</i> และ <i>A. lipoferum</i> | | อาหารคัดเลือกเฉพาะสำหรับเชื้อ <i>A. lipoferum</i> | |
|---|--------------|-----------|--------------|-----------|---|-----------|---|-----------|
| | ปริมาณ(กรัม) | ราคา(บาท) | ปริมาณ(กรัม) | ราคา(บาท) | ปริมาณ(กรัม) | ราคา(บาท) | ปริมาณ(กรัม) | ราคา(บาท) |
| peptone | - | - | 5 | 29.50 | - | - | - | - |
| succinic acid | - | - | 1 | 2.90 | - | - | - | - |
| (NH ₄) ₂ SO ₄ | - | - | 1 | 0.45 | - | - | - | - |
| Malic acid | 5 | 9.20 | - | - | 2.5 | 4.6 | - | - |
| glucose | - | - | - | - | - | - | 12.5 | 8.75 |
| KOH | 4 | 2.56 | - | - | - | - | - | - |
| K ₂ HPO ₄ | 0.5 | 0.48 | - | - | - | - | - | - |
| FeCl ₃ .6H ₂ O | - | - | 0.002 | 0.003 | 0.002 | 0.003 | 0.002 | 0.003 |
| FeSO ₄ .7H ₂ O | 0.05 | 0.04 | - | - | - | - | - | - |
| MnSO ₄ .H ₂ O | 0.01 | 0.01 | 0.002 | 0.002 | 0.002 | 0.002 | 0.002 | 0.002 |
| MgSO ₄ .7H ₂ O | 0.1 | 0.12 | 0.002 | 1.24 | 0.002 | 1.24 | 0.002 | 1.24 |
| NaCl | 0.02 | 0.004 | - | - | - | - | - | - |
| CaCl ₂ | 0.01 | 0.003 | - | - | - | - | - | - |
| Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O | 0.002 | 0.007 | - | - | - | - | - | - |
| รวมราคา | | 12.42 | | 34.10 | | 5.85 | | 10.00 |

สรุปและข้อเสนอแนะ

สรุป

1. การศึกษาประสิทธิภาพของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงเชื้อ *A. brasiliense* และ *A. lipoferum* พบว่าการใช้กรดมาลิกเป็นแหล่งของคาร์บอนในอาหารดัดแปลงที่ปลอดไนโตรเจน เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ *A. brasiliense* และ *A. lipoferum* เนื่องจากส่งผลให้มีอัตราการเจริญเติบโตได้สูงที่สุด และมีระยะเวลาของการแบ่งเซลล์สั้นที่สุดอีกด้วย และปริมาณของกรดมาลิกที่เหมาะสม คือ 2.5 กรัม/ลิตร ทำให้ได้สูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ *A. lipoferum* และ *A. brasiliense* ดังนี้

กรดมาลิก (malic acid) 2.5 กรัม/ลิตร, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.0 กรัม/ลิตร $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.002 กรัม/ลิตร $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.002 กรัม/ลิตร และปรับ pH ให้เท่ากับ 7 ด้วย 10 % KOH

2. จากความสามารถในการใช้กลูโคสที่แตกต่างกันของ *A. brasiliense* และ *A. lipoferum* ทำให้สามารถสร้างสูตรอาหารคัดเลือกจำเพาะสำหรับเชื้อ *A. lipoferum* การใช้กลูโคสปริมาณ 12.5 กรัม/ลิตร เป็นแหล่งคาร์บอนในอาหารปลอดไนโตรเจน ส่งผลให้เชื้อ *A. lipoferum* มีอัตราการเจริญเติบโตได้สูงที่สุด ทำให้ได้สูตรอาหารคัดเลือกจำเพาะสำหรับเชื้อ *A. lipoferum* ดังนี้

กลูโคส (D-glucose) 12.5 กรัม/ลิตร, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.0 กรัม/ลิตร $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.002 กรัม/ลิตร $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.002 กรัม/ลิตร และปรับ pH ให้เท่ากับ 7 ด้วย 10 % KOH

ข้อเสนอแนะ

อย่างไรก็ตามการศึกษานี้ยังไม่ได้มีการศึกษาเพิ่มเติมในการแยกเชื้อบริสุทธิ์จากดินโดยตรง เป็นเพียงการทดสอบกิจกรรมของเชื้อที่บริสุทธิ์แล้วเท่านั้น จึงน่าจะมีการทดสอบการแยกเชื้อจากดินโดยตรง และเปรียบเทียบกับ การตรวจสอบในระดับ DNA ด้วยเทคนิค polymerase chain reaction (PCR)

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

กนกวรรณ ปวงคำ, จิณภัทร ใจคำ, กิตติพร เปล่งเสริมทรัพย์, หัตยา อรุโณทยานันท์ และ ศรีวิษณ์ อินทพันธุ์. 2547. **สื่อการสอนอิเล็กทรอนิกส์ประกอบวิชา 602122 จุลชีววิทยาทางอาหาร** **ทั่วไป**. คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

กัญญา ม่วงแก้ว. 2544. การปรับปรุงคุณภาพปุ๋ยหมักโดยเชื้อจุลินทรีย์ที่ย่อยสลายเซลลูโลสและ
ตรึงไนโตรเจน. **บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย**. กรุงเทพฯ.

จुरีย์รัตน์ ลีสmith. 2550. **ระบบพันธุกรรมของจุลินทรีย์**. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
กรุงเทพฯ. 244 หน้า

ดวงพร คันชโชติ. 2547. **อนุกรมวิธานของแบคทีเรียและปฏิบัติการ**. โอ.เอส.พรีนติ้ง เฮ้าส์.
กรุงเทพฯ. 198 หน้า.

ทัศนีย์ อัดตะนันท์ และจรงค์ จันทร์เจริญสุข. 2542. **แบบฝึกหัดและคู่มือปฏิบัติการ : การ
วิเคราะห์ดินและพืช**. ภาควิชาปฐพีวิทยา คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
กรุงเทพฯ.

ธงชัย มาลา. 2546. **ปุ๋ยอินทรีย์และปุ๋ยชีวภาพ: เทคนิคการผลิตและการใช้ประโยชน์**. พิมพ์ครั้งที่1.
มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ. 300 หน้า.

ภาควิชาจุลชีววิทยา. 2544. **จุลชีววิทยาปฏิบัติการ**. คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
เจ้าพระยาระบบการพิมพ์ จำกัด. กรุงเทพฯ. 330 หน้า.

ภาควิชาจุลชีววิทยา. 2549. **คู่มือปฏิบัติการจุลชีววิทยา** คณะสาธารณสุขศาสตร์
มหาวิทยาลัยมหิดล. 182 หน้า.

วิกานดา ปกป้องเมือง, ภัทรพร ชมพวงศ์, วัชรพงศ์ เดชะตา, ภัทร คมกมล และ วิวัฒน์
เขียวจันทร์แสง. 2547. **สื่อการสอนอิเล็กทรอนิกส์ประกอบวิชา 602120
จุลชีววิทยาในอุตสาหกรรมเกษตรเบื้องต้น**. คณะอุตสาหกรรมเกษตร

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. 94 หน้า.

สมศักดิ์ วังโน. 2541. การตรึงไนโตรเจนไรโซเบียม-พืชตระกูลถั่ว. พิมพ์ครั้งที่ 1. สำนักพิมพ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ.

ศุภยงค์ วรวิฑูคุณชัย. 2547. การพิสูจน์เอกลักษณ์ของแบคทีเรียกรัมนบวกและกรัมลบ. สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. กรุงเทพฯ. 203 หน้า.

Akbari, A. G., S. M. Arab, H. A. Alikhani, I. Allahdadi and M. H. Arzanesh. 2007. Isolation and selection of indigenous *Azospirillum* spp. and the IAA of superior strains effects on wheat roots. **World J. Agri. Sci.** 3 (4): 523-529.

Albrecht, S. L., Y. Okon, L. Lonquist, and R. H. Burris. 1981. Nitrogen fixation by corn-*Azospirillum* association in a temperate climate. **Crop Sci.** 21: 301-306.

Alef, K. and P. Nanninpiari. 1995. **Methods in Applied Soil Microbiology and Biochemistry.** Harcourt Brace & Cimpany. 576 p.

Anthony, E. E. J. 1931. **A note on capsule staining.** Science (New Series) 73(1890): 319–320.

Brenner, D. J. and J. T. Staley. 2005. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology.** Springer. Vol. 2. 1390 p.

Benson, H. J. 2005. **Microbiological Applications.** 9th ed. McGraw-Hill, New York.

Bottini, R., M. Fulchieri, D. Pearce and R. P. Pharis. 1989. Identification of gibberellins A1, A3 and iso-A3 in culture of *Azospirillum lipoferum*. **Plant Physiol.** 89: 1-3.

Burns, R. C. and R. W. F. Hardy. 1975. Nitrogen Fixation in Bacteria and Higher Plants. Berlin:Springer-Verlag.

- Carl, A. W., D. S. Cutshall and G. V. Vigil. 1983. Metabolism of Various Carbon Sources by *Azospirillum brasilense*. **J. Bacteriol.** 1369-1372.
- Davies, J. A., G. K. Anderson, T. J. Beveridge and H. C. Clark. 1983. Chemical mechanism of the Gram stain and synthesis of a new electron-opaque marker for electron microscopy which replaces the iodine mordant of the stain. **J. Bacteriol.** 156 (2): 837-845.
- Das, A., and A. K. Mishra. 1983. Utilization of fructose by *Azospirillum brasilense*. **Can. J. Microbiol.** 29:1213-1217.
- Dobereiner, J., I. E. Marriel and M. Nery. 1976. Ecological distribution of *Spirillum lipoferum* Beijerinck. **Can. J. Microbiol.** 22 : 1464-1473.
- Eddy, W. H. 1941. **What Are the Vitamins**. Reinhold Publishing Corporation. New York.
- El-Khawas, H. and K. Adachi. 1999. Identification and quantification of auxins in culture media of *Azospirillum* and *Klebsiella* and their effect on rice roots. **Biol. Fertil. Soils.** 28: 377-381.
- Enrique, A. R. C. 1982. **Improved Medium for Isolation of *Azospirillum* spp.** Applied and environmental microbiology. 990-991.
- Fallik, E., S. Sarig and Y. Okon. 1994. Morphology and physiology of plant roots associated with *Azospirillum*. In ***Azospirillum/Plant Associations***. ed. Y. Okon, pp. 77-86. CRC Press: Boca Raton, FL.
- Fallik, E. and Y. Okon. 1996. The response of maize (*Zea mays*) to *Azospirillum* inoculation in various types of soils in the field. **World Microb. Biol.** 12: 511-515.
- Fulchieri, M and L. Frion. 1994. *Azospirillum UAA* inoculation on maize (*Zea mays*):effect on yield in a field experiment in central Argentina.. **Soil Biol. Biochem.** 26(7): 921-923.

- Guixiang, P., H. Wang, G. Zhang, W. Hou, Y. Liu, E. T. Wang and Z. Tan. 2006. *Azospirillum mmelinis* sp.nov., a group of diazotrophs isolated from tropical molasses grass. **J. Sys. Evol. Microbiol.** 56:1263-1271.
- Hardy, R. W. F., R. C. Bruns and R. D. Holsten. 1973. Applications of the acetylene-ethylene assay for measurement of nitrogen fixation. **Soil Biol. Biochem.** 5: 47-81.
- Jackson, M. L. 1965. **Soil Chemical Analysis-Advanced Course.** Department of Soils, University of Wisconsin.
- Jame, T. S., D. R. Boone, V. Chairman, D. J. Brenner, R. W. Castenholz, G. M. Garrity, M. Goodfellow, N. R. Krieg, F. A. Rainey and K. Schleifer. 2001. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology.** Springer. Vol. 1. 721 p.
- Jofre, E., S. Fischer, V. Rivarola, H. Balengo and G. Mori. 1998. Saline stress affects the attachment of *Azospirillum brasilense* to maize and wheat roots. **Can. J. Microbiol.** 44: 416-422.
- Kim, J., and D. C., Rees. 1994. Nitrogenase and biological nitrogen fixation. **Biochem.** 33(2) : 389-397.
- Konnova, S. A., O. S. Brykova, O. A. Sachkova, I. V. Egorenkova, and V. V. Ignatov. 2001. Protective Role of the Polysaccharide-containing Capsular Components of *Azospirillum brasilense*. **J. Microbiol.** 70(4): 436-440.
- Lambrecht, M., Y. Okon, A. V. Broek and J. Vanderleyden. 2000. Indole-3-acetic acid: a reciprocal signalling molecule in bacteria-plant interactions. **Trends in Microbiol.** 8 : 298-300.
- Loh, W. H. T., C. I. Randles, W. R. Sharp, and R. H. Miller. 1984. Intermediary carbon metabolism of *Azospirillum brasilense*. **J. Bacteriol.** 264-268.

- Maria, I. S., N. Fatta and A. J. Barneix. 2002. The effect of inoculation with *Azospirillum brasilense* on growth and nitrogen utilization by wheat plants. **Plant and Soil**. 245: 215–222.
- Martinez, D., G., M. del Gallo, C. L. Burpee, and R. H. Burris. 1984. Catabolism of carbohydrates and organic acids by the azospirilla. **J. Bacteriol.** 159:80-85.
- Martin, D., S. Falkow, E. Rosenberg, K. H. Schleife and E. Stackebrandt. 2006. **The Prokaryotes: Proteobacteria: alpha and beta subclasses**. Springer. 919 p.
- Martin, D. Z. and M. V. F. Canigiab. 2008. Field performance of a liquid formulation of *Azospirillum brasilense* on dryland wheat productivity. **European Journal of Soil Biology**. journal homepage: <http://www.elsevier.com/locate/ejsobi>.
- Moens, S., K. Michiels, V. Keijers, L. F. Van and J. Vanderleyden. 1995. Cloning, Sequencing, and Phenotypic Analysis of *laf1*, Encoding Flagellin of the Lateral Flagella of *Azospirillum brasilense* Sp7. **J. Bacteriol.** 177 : 5419–5426.
- Molla, A. H., Z. H. Shamsuddin and H. M. Saud. 2001. Mechanism of root growth and promotion of nodulation in vegetable soybean by *Azospirillum brasilense*. **Commun. Soil Sci. Plant Anal.** 32: 2177–2187.
- Mulyukin, A. L., N. E. Suzina, A. Yu. Pogorelova, L. P. Antonyuk, V. I. Duda and G. I. El-Registan. 2009. Diverse Morphological Types of Dormant Cells and Conditions for Their Formation in *Azospirillum brasilense*. **Microbiol.** 78(1) : 33-41.
- Okon, Y. 1994. **Azospirillum/Plant Associations**. CRC Press. 175 p.
- _____, S. L. Albrecht, and R. H. Burris. 1976. Carbon and ammonia metabolism of *Spirillum lipoferum*. **J. Bacteriol.** 128:292-297.

- _____, S. L. Albrecht and R. H. Burris. 1977. Methods for growing *Spirillum lipoferum* and for counting it in pure culture and in association with plants. **Appl. Environ. Microbiol.** 33 : 85–88.
- Olubayi, I., R. Caudales, A. Atkinson and C. A. Neyra, 1998. Differences in chemical composition between nonflocculant and flocculated *Azospirillum brasilense* Cd. **Can. J. Microbiol.** 44: 386-390.
- Osmar, R., S. Dalla, R. P. Ronzelli, H. Ramona, L. Georgina, and P. Ashok. 2004. Effects of inoculation of *Azospirillum* sp. in maize seeds under field conditions. **Food. Agri. Environ.** 2(1): 238-242.
- Pandey, A., E. Sharma and L. M. S. Palni. 1998. Influence of bacterial inoculation on maize in upland farming systems of the Sikkim Himalaya. **Soil Biol. Biochem.** 30: 379–384.
- Patriquin, D. G., J. Dobereiner, and D. K. Jain. 1983. Sites and process of association between diazotrophs and grasses. **Can. J. Microbiol.** 29: 900-915.
- Ribaudó, C. M., D. P. Rondanini, J. A. Cura and A. A. Frascina. 2001. Response of Zea mays to the inoculation with *Azospirillum* on nitrogen metabolism under greenhouse conditions. **Biol. Plant.** 44: 631–634.
- Steenhoudt, O. and J. Vanderleyden. 2000. *Azospirillum*, a free-living nitrogen fixing bacterium closely associated with grasses: genetic, biochemical and ecological aspects. **FEMS Microbiol. Rev.** 24: 487-506.
- Tarrand, J. J., N. R. Krieg, and J. Nbereiner. 1978. A taxonomic study of the Spirillum lipoferum group, with descriptions of a new genus, Azospirillum gen. nov. and two species, *Azospirillum lipoferum* (Beijerinck) comb. nov. and *Azospirillum brasilense* sp. nov. **Can. J. Microbiol.** 24:967-980.

Tate, R. L. 2000. **Soil Microbiology**. 2nd ed. 346-372. New York : John Wiley & Sons.

Thuler, D. S., E. I. S. Floh, W. Handro and H. R. Barbosa. 2003. Plant growth regulators and amino acids released by *Azospirillum* sp. in chemically defined media. **Let. Appl. Microbiol.** 37: 174–178.

Turner, G. I., and A. H. Gibson. 1980. Measurement of nitrogen fixation by indirect means. In F. J. Bergersen (ed.), **Methods for Evaluating Biological Nitrogen Fixation**, pp, 111 – 131. New York : John Wiley & Sons.

Washington, C. W., E. W. Koneman, S. D. Allen, W. M. Janda, P. C. Schreckenberger, G. W. Procop and G. L. Woods. 2005. **Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology**. Lippincott Williams & Wilkins. 1,565 p.

Westby, C. A., D. S. Cutshall, and G. V. Vigil. 1983. Metabolism of various carbon sources by *Azospirillum brasilense*. **J. Bacteriol.** 156:1369-1372.



ภาคผนวก

ตารางผนวกที่ 1 อัตราการเจริญเติบโตของเชื้อ *A. brasilense* (\log_{10} ของปริมาณเซลล์) ในอาหารเหลวคัดแปลงที่มีชนิดและปริมาณคาร์บอนที่แตกต่างกัน

| แหล่งคาร์บอน | | เวลา (ชั่วโมง) | | | | | | | | | | | | |
|--------------|-----------------------|----------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| ชนิด | ปริมาณ (กรัม/ลิตร) | 0 | 6 | 12 | 18 | 24 | 30 | 36 | 42 | 48 | 54 | 60 | 66 | 72 |
| กรดซัคซินิก | 1 | 0.2 | 4.15 | 4.45 | 5.67 | 7.14 | 7.12 | 7.14 | 6.54 | 6.55 | 6.41 | 6.35 | 6.29 | 5.23 |
| | 5 | 0.2 | 3.71 | 4.01 | 5.18 | 5.9 | 6.61 | 6.6 | 6.55 | 6.48 | 5.78 | 5.64 | 5.44 | 5.14 |
| | 10 | 0.2 | 3.69 | 4.05 | 5.04 | 5.8 | 6.07 | 5.94 | 5.97 | 5.98 | 5.76 | 5.71 | 5.7 | 4.99 |
| | 20 | 0.2 | 3.65 | 3.99 | 5.08 | 5.9 | 7.23 | 7.07 | 6.89 | 6.84 | 5.42 | 5.28 | 5.3 | 5.24 |
| กรดมาลิก | 1 | 0.2 | 3.72 | 5.98 | 7.78 | 8.32 | 8.22 | 8.12 | 7.68 | 7.52 | 6.85 | 6.01 | 5.87 | 5.84 |
| | 5 | 0.2 | 3.73 | 5.62 | 6.53 | 5.59 | 6.35 | 6.78 | 7.83 | 7.89 | 7.26 | 5.99 | 5.89 | 5.87 |
| | 10 | 0.2 | 5.56 | 6.89 | 7.98 | 8.29 | 8.01 | 8.04 | 7.6 | 7.95 | 6.85 | 6 | 6.06 | 5.99 |
| | 20 | 0.2 | 5.6 | 3.55 | 7.88 | 8.14 | 8.12 | 8.08 | 7.12 | 3.67 | 3.55 | 6.02 | 5.88 | 5.86 |
| กลูโคส | 1 | 0.2 | 0.57 | 0.58 | 0.59 | 0.6 | 0.7 | 0.73 | 0.73 | 0.72 | 0.73 | 0.74 | 0.74 | 0.74 |
| | 5 | 0.2 | 0.26 | 0.25 | 0.29 | 0.3 | 0.51 | 0.55 | 0.52 | 0.48 | 0.57 | 0.6 | 0.57 | 0.3 |
| | 10 | 0.2 | 0.24 | 0.27 | 0.28 | 0.3 | 0.3 | 0.3 | 0.44 | 0.48 | 0.57 | 0.6 | 0.57 | 0.3 |
| | 20 | 0.2 | 0.57 | 0.59 | 0.59 | 0.55 | 0.3 | 0.3 | 0.44 | 0.48 | 0.57 | 0.6 | 0.57 | 0.3 |
| ซูโครส | 1 | 0.2 | 0.48 | 0.49 | 0.53 | 0.54 | 0.72 | 0.71 | 0.71 | 0.64 | 0.67 | 0.67 | 0.69 | 0.69 |
| | 5 | 0.2 | 0.27 | 0.39 | 0.47 | 0.5 | 0.73 | 0.73 | 0.74 | 0.75 | 0.75 | 0.75 | 0.73 | 0.69 |
| | 10 | 0.2 | 0.38 | 0.44 | 0.74 | 0.78 | 0.73 | 0.74 | 0.74 | 0.74 | 0.75 | 0.74 | 0.74 | 0.72 |
| | 20 | 0.2 | 0.35 | 0.49 | 0.68 | 0.74 | 0.72 | 0.75 | 0.76 | 0.78 | 0.78 | 0.78 | 0.76 | 0.72 |

ตารางผนวกที่ 2 อัตราการเจริญเติบโตของเชื้อ *A. lipoferum* (\log_{10} ของปริมาณเซลล์) ในอาหารเหลวตัดแปลงที่มีชนิดและปริมาณคาร์บอนที่แตกต่างกัน

| แหล่งคาร์บอน | | เวลา (ชั่วโมง) | | | | | | | | | | | | |
|--------------|--------------------|----------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| ชนิด | ปริมาณ (กรัม/ลิตร) | 0 | 6 | 12 | 18 | 24 | 30 | 36 | 42 | 48 | 54 | 60 | 66 | 72 |
| กรดซัคซินิก | 1 | 0.2 | 1.35 | 2.81 | 6.91 | 8.32 | 8.31 | 8.30 | 7.82 | 7.52 | 7.50 | 7.59 | 7.48 | 5.00 |
| | 5 | 0.2 | 1.39 | 2.80 | 6.93 | 8.43 | 8.42 | 8.46 | 8.19 | 7.99 | 6.91 | 7.00 | 6.70 | 5.00 |
| | 10 | 0.2 | 1.34 | 2.84 | 6.67 | 7.37 | 7.35 | 7.32 | 7.39 | 7.15 | 6.81 | 7.00 | 6.98 | 6.89 |
| | 20 | 0.2 | 1.31 | 2.77 | 6.81 | 7.41 | 7.33 | 7.48 | 7.38 | 7.22 | 7.11 | 7.30 | 7.12 | 5.14 |
| กรดมาลิก | 1 | 0.2 | 1.39 | 2.95 | 6.83 | 8.41 | 8.44 | 8.12 | 7.85 | 8.00 | 7.70 | 6.00 | 5.87 | 5.50 |
| | 5 | 0.2 | 1.41 | 2.95 | 7.18 | 9.88 | 9.81 | 9.62 | 8.41 | 7.00 | 6.96 | 6.65 | 6.37 | 5.00 |
| | 10 | 0.2 | 1.42 | 2.95 | 7.05 | 9.36 | 9.39 | 8.42 | 7.94 | 8.15 | 7.88 | 7.00 | 6.70 | 5.00 |
| | 20 | 0.2 | 1.44 | 2.95 | 7.09 | 9.52 | 9.49 | 8.84 | 7.80 | 8.00 | 7.74 | 7.00 | 6.70 | 5.00 |
| กลูโคส | 1 | 0.2 | 1.69 | 3.54 | 6.01 | 6.41 | 7.94 | 8.13 | 7.86 | 7.00 | 7.00 | 7.00 | 7.00 | 7.00 |
| | 5 | 0.2 | 1.54 | 3.23 | 6.13 | 6.41 | 7.30 | 7.35 | 7.21 | 7.15 | 7.20 | 7.24 | 7.19 | 7.09 |
| | 10 | 0.2 | 1.34 | 2.83 | 5.98 | 6.28 | 7.66 | 7.30 | 7.40 | 7.48 | 7.29 | 6.65 | 6.91 | 6.89 |
| | 20 | 0.2 | 1.04 | 2.24 | 6.52 | 7.27 | 7.22 | 7.43 | 7.32 | 7.15 | 7.27 | 7.35 | 7.30 | 7.15 |
| ซูโครส | 1 | 0.2 | 0.69 | 0.78 | 1.09 | 1.39 | 1.86 | 1.86 | 1.86 | 1.85 | 1.85 | 1.86 | 1.86 | 1.86 |
| | 5 | 0.2 | 0.55 | 0.75 | 1.39 | 1.43 | 1.83 | 1.84 | 1.82 | 1.85 | 1.85 | 1.85 | 1.86 | 1.88 |
| | 10 | 0.2 | 0.69 | 0.90 | 1.00 | 1.10 | 1.81 | 1.81 | 1.83 | 1.85 | 1.87 | 1.88 | 1.88 | 1.87 |
| | 20 | 0.2 | 0.64 | 0.88 | 1.32 | 1.39 | 1.83 | 1.83 | 1.83 | 1.83 | 1.80 | 1.80 | 1.80 | 1.77 |

ตารางผนวกที่ 3 อัตราการเจริญเติบโตของเชื้อ *A. brasilense* (\log_{10} ของปริมาณเซลล์) ในอาหารเหลวที่มีกรดมาลิกปริมาณต่าง ๆ

| กรดมาลิก (กรัม/ลิตร) | เวลา (ชั่วโมง) | | | | | | | | | | | | |
|-------------------------|----------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| | 0 | 6 | 12 | 18 | 24 | 30 | 36 | 42 | 48 | 54 | 60 | 66 | 72 |
| 1.0 | 0.2 | 5.27 | 7.12 | 7.29 | 8.42 | 8.90 | 8.97 | 8.80 | 8.51 | 8.38 | 8.28 | 8.22 | 8.19 |
| 2.5 | 0.2 | 5.18 | 6.67 | 6.84 | 8.96 | 9.04 | 8.53 | 8.24 | 8.42 | 8.63 | 8.49 | 8.19 | 6.48 |
| 5.0 | 0.2 | 5.81 | 6.81 | 6.98 | 7.09 | 9.10 | 8.72 | 8.42 | 8.62 | 8.64 | 8.36 | 8.06 | 6.48 |
| 7.5 | 0.2 | 5.17 | 7.43 | 7.61 | 8.78 | 9.48 | 9.08 | 8.92 | 8.86 | 8.73 | 8.86 | 8.76 | 8.48 |
| 10.0 | 0.2 | 5.92 | 7.97 | 8.15 | 8.27 | 9.48 | 9.16 | 8.93 | 8.45 | 8.65 | 8.34 | 8.53 | 8.45 |
| 12.5 | 0.2 | 5.75 | 7.45 | 7.62 | 8.75 | 9.48 | 9.48 | 9.26 | 8.80 | 8.75 | 8.66 | 8.58 | 6.48 |
| 15.0 | 0.2 | 5.48 | 7.34 | 7.52 | 8.64 | 9.48 | 9.48 | 9.48 | 9.47 | 9.37 | 9.18 | 8.83 | 8.67 |
| 17.5 | 0.2 | 5.48 | 8.88 | 9.05 | 9.18 | 9.48 | 8.94 | 8.83 | 8.66 | 8.73 | 8.68 | 8.43 | 8.42 |
| 20.0 | 0.2 | 5.48 | 7.07 | 7.25 | 8.37 | 9.01 | 9.15 | 9.13 | 9.11 | 9.08 | 8.89 | 8.50 | 8.51 |

ตารางผนวกที่ 4 อัตราการเจริญเติบโตของเชื้อ *A. lipoferume* (\log_{10} ของปริมาณเซลล์) ในอาหารเหลวที่มีกรดมาลิกปริมาณต่าง ๆ

| กรดมาลิก (กรัม/ลิตร) | เวลา (ชั่วโมง) | | | | | | | | | | | | |
|-------------------------|----------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| | 0 | 6 | 12 | 18 | 24 | 30 | 36 | 42 | 48 | 54 | 60 | 66 | 72 |
| 1.0 | 0.20 | 6.17 | 7.17 | 8.33 | 8.45 | 9.14 | 8.86 | 8.56 | 8.66 | 8.69 | 8.79 | 8.68 | 8.11 |
| 2.5 | 0.20 | 5.97 | 7.09 | 8.25 | 8.87 | 9.27 | 8.97 | 8.85 | 8.67 | 8.63 | 8.46 | 8.47 | 8.48 |
| 5.0 | 0.20 | 5.89 | 6.89 | 8.05 | 9.16 | 8.89 | 8.63 | 8.34 | 8.52 | 8.63 | 8.54 | 8.23 | 8.03 |
| 7.5 | 0.20 | 5.91 | 7.10 | 8.26 | 9.38 | 9.09 | 9.15 | 9.33 | 9.46 | 8.94 | 8.63 | 8.82 | 8.95 |
| 10.0 | 0.20 | 3.88 | 7.17 | 8.35 | 9.47 | 9.06 | 8.52 | 8.61 | 8.68 | 8.49 | 8.64 | 8.76 | 8.56 |
| 12.5 | 0.20 | 5.51 | 7.14 | 8.31 | 9.44 | 8.81 | 9.28 | 9.13 | 8.90 | 8.61 | 8.86 | 8.56 | 6.53 |
| 15.0 | 0.20 | 5.78 | 7.14 | 8.31 | 9.43 | 9.17 | 8.72 | 8.79 | 8.86 | 9.17 | 8.91 | 8.74 | 8.48 |
| 17.5 | 0.20 | 5.53 | 6.98 | 8.15 | 9.27 | 9.46 | 9.27 | 8.98 | 9.28 | 9.08 | 8.60 | 8.56 | 8.51 |
| 20.0 | 0.20 | 5.49 | 7.09 | 8.26 | 9.39 | 9.48 | 8.89 | 9.04 | 9.15 | 8.58 | 8.69 | 8.97 | 8.54 |

ตารางผนวกที่ 5 อัตราการเจริญเติบโตของเชื้อ *A. lipoferume* (\log_{10} ของปริมาณเซลล์) ในอาหารเหลวที่มีกลูโคสปริมาณต่าง ๆ

| กลูโคส (กรัม/ลิตร) | เวลา (ชั่วโมง) | | | | | | | | | | | | |
|-----------------------|----------------|------|------|------|------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|------|
| | 0 | 6 | 12 | 18 | 24 | 30 | 36 | 42 | 48 | 54 | 60 | 66 | 72 |
| 1.0 | 0.20 | 6.39 | 8.73 | 8.90 | 9.03 | 8.87 | 8.77 | 8.71 | 8.64 | 8.49 | 8.53 | 8.47 | 8.40 |
| 2.5 | 0.20 | 6.43 | 8.38 | 8.56 | 8.68 | 10.16 | 10.51 | 10.21 | 10.62 | 10.54 | 10.34 | 10.05 | 8.52 |
| 5.0 | 0.20 | 6.46 | 8.58 | 8.76 | 8.88 | 8.86 | 8.85 | 8.93 | 9.00 | 8.66 | 8.41 | 8.37 | 8.32 |
| 7.5 | 0.20 | 6.88 | 8.27 | 8.44 | 8.57 | 8.87 | 8.75 | 8.68 | 8.60 | 8.88 | 8.43 | 8.16 | 8.01 |
| 10.0 | 0.20 | 6.42 | 8.49 | 8.66 | 8.79 | 8.64 | 8.40 | 8.66 | 8.83 | 8.62 | 8.75 | 8.45 | 6.70 |
| 12.5 | 0.20 | 6.48 | 8.56 | 9.06 | 9.48 | 10.95 | 10.88 | 10.58 | 9.41 | 8.74 | 8.63 | 8.35 | 7.18 |
| 15.0 | 0.20 | 6.30 | 7.42 | 7.85 | 8.28 | 8.68 | 8.83 | 8.67 | 8.84 | 8.83 | 8.63 | 8.34 | 6.48 |
| 17.5 | 0.20 | 6.43 | 8.85 | 9.03 | 9.15 | 8.66 | 8.76 | 8.69 | 8.59 | 8.51 | 8.42 | 8.41 | 6.48 |
| 20.0 | 0.20 | 6.47 | 8.86 | 9.04 | 9.66 | 9.89 | 10.62 | 10.73 | 10.82 | 10.51 | 10.51 | 10.01 | 6.48 |

ตารางที่ 6 ราคาสารเคมีในการเตรียมอาหารสูตร NFB, MPSS และอาหารที่เสนอขึ้นใหม่สำหรับเชื้อ *A. brasiliense* และ *A. lipoferum*

| สารเคมี | ปริมาณ(กรัม) | ราคา(บาท) |
|---|--------------|-----------|
| peptone | 500 | 2,950 |
| succinic acid | 500 | 1,450 |
| (NH ₄) ₂ SO ₄ | 500 | 225 |
| Malic acid | 500 | 920 |
| glucose | 500 | 350 |
| KOH | 500 | 320 |
| K ₂ HPO ₄ | 500 | 480 |
| FeCl ₃ .6H ₂ O | 500 | 680 |
| FeSO ₄ .7H ₂ O | 500 | 350 |
| MnSO ₄ .H ₂ O | 500 | 520 |
| MgSO ₄ .7H ₂ O | 500 | 620 |
| NaCl | 1,000 | 205 |
| CaCl ₂ | 500 | 1,700 |
| Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O | 500 | 1,800 |

ประวัติการศึกษา และการทำงาน

| | |
|----------------------|--|
| ชื่อ-นามสกุล | นางสาวอรุณี คงสอน |
| วัน เดือน ปี ที่เกิด | 14 พฤษภาคม 2527 |
| สถานที่เกิด | โรงพยาบาลโพธาราม จังหวัดราชบุรี |
| ประวัติการศึกษา | วท.บ. (เกษตรศาสตร์) สาขาปฐพีวิทยา มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ปี 2549 |

